



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 694 33 461 T2** 2004.11.18

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 716 148 B1**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/86**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 33 461.8**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 115 460.8**

(96) Europäischer Anmeldetag: **15.09.1994**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.06.1996**

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: **02.01.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.11.2004**

(30) Unionspriorität:

122791	15.09.1993	US
198450	18.02.1994	US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Chiron Corp. (n.d.Ges.d. Staates Delaware),
Emeryville, Calif., US**

(72) Erfinder:

**Dubensky, Thomas W. Jr., Del Mar, CA 92014, US;
Ibanez, Carlos E., San Diego, CA 92129, US;
Chang, Stephen M.W., San Diego, CA 92129, US;
Jolly, Douglas J., Leucadia, CA 92024, US; Driver,
David A., San Diego, CA 92117, US; Polo, John M.,
San Diego, CA 92109, US**

(74) Vertreter:

**Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European
Patent Attorneys, 81671 München**

(54) Bezeichnung: **Rekombinanter Alphavirus Vektor**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein die Verwendung von rekombinanten Viren als Vektoren, und noch spezifischer, rekombinante Alphaviren, wie das Sindbis-Virus, welche zur Expression einer heterologen Sequenz in Zielzellen bzw. Targetzellen befähigt sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Alphaviren umfassen eine Reihe von serologisch-verwandten aus Arthropoden entstandenen Viren der Togavirus-Familie. Kurz gesagt, Alphaviren sind weltweit verbreitet und persistieren in der Natur durch einen Moskito-zu-Vertebraten-Zyklus. Vögel, Nagetiere, Pferde, Primaten und Menschen sind unter den definierten Alphavirus-Vertebraten-Reservoir/-Wirten.

[0003] Sechszwanzig bekannte Viren und Virus-Subtypen sind innerhalb der Alphavirus-Gattung unter Verwendung der Hemagglutinations-(HI)-Untersuchung klassifiziert worden. Kurz gesagt, der HI-Test trennt die 26 Alphaviren in drei Hauptkomplexe: den Venezuelian-Encephalitis-(VE)-Komplex, den Semliki-Forest-(SF)-Komplex und den Western-Encephalitis-(WE)-Komplex. Zusätzlich erhalten vier weitere Viren, der Eastern-Encephalitis (EE), der Barmah Forest, der Middelburg und der Ndumu, basierend auf dem HI-serologischen Test, eine individuelle Klassifizierung.

[0004] Die Mitglieder der Alphavirus-Gattung werden ebenso, basierend auf ihren relativen klinischen Merkmalen, in den Menschen klassifiziert: Alphaviren, welche primär mit Encephalitis assoziiert sind, und Alphaviren, welche primär mit Fieber, Hautausschlag und Polyarthrit assoziiert sind. In der vorherigen Gruppe sind die VE- und WE-Komplexe und EE eingeschlossen. Im allgemeinen kann die Infektion mit dieser Gruppe andauernde Folgen, einschließlich Verhaltensänderungen und Lernunfähigkeit oder Tod, haben. Zu der letzteren Gruppe gehört der SF-Komplex, umfassend die individuellen Alphaviren, Chikungunya, O'nyong-nyong, Sindbis, Ross River und Mayaro. Obwohl über schwere Epidemien berichtet worden ist, gilt bezüglich dieser Gruppe die Infektion allgemein als selbstlimitierend, ohne dauerhafte Folgen.

[0005] Das Sindbis-Virus ist das Prototypmitglied der Alphavirus-Gattung der Togavirus-Familie. Obwohl gewöhnlich nicht offensichtlich, schließen die klinischen Symptome der Sindbisvirus-Infektion Fieber, Arthritis und Hautausschlag ein. Das Sindbis-Virus ist über Europa, Afrika, Asien und Australien verbreitet, wobei die besten epidemiologischen Daten aus Südafrika kommen, wo 20% der Bevölkerung seropositiv sind. (Zur Übersicht, siehe Peters und Dalrymple, Fields Virology (2. Auflage), Fields et al. (Herausgeber), B. N. Raven Press, New York, NY, Kapitel 26, Seiten 713–762). Das infektiöse Sindbis-Virus ist aus menschlichem Serum nur während eines Ausbruchs in Uganda und aus einem Einzelfall in Zentralafrika isoliert worden.

[0006] Die Morphologie und Morphogenese der Alphavirus-Gattung ist allgemein völlig einheitlich. Insbesondere die umhüllten 60–65 nm Partikel infizieren die meisten Vertebraten-Zellen, wo die produktive Infektion zytopathisch ist. Auf der anderen Seite haben Infektionen von Invertebraten-Zellen, welche zum Beispiel aus Moskitos stammen, keine offenkundige Zytopathologie zur Folge. Typischerweise werden Alphaviren in schnell wachsenden BHK-21- oder Sero-Zellen vermehrt, wobei eine maximale Ausbeute innerhalb 24 Stunden nach der Infektion erreicht wird. Freilandstämme werden gewöhnlich aus primären Vogelembryonen, beispielsweise Hühnerfibroblasten-Kulturen, isoliert.

[0007] Die genomische RNA (49S-RNA) der Alphaviren ist nicht segmentiert, von positiver Polarität, mit einer Länge von ungefähr 11–12 kb und enthält eine 5'-Capstruktur und einen 3'-polyadenylierten Schwanz. Infektiöse umhüllte Viren werden durch Assembly bzw. Zusammenlagern bzw. Zusammenfügen der viralen Nukleokapsid-Proteine an die virale genomische RNA im Zytoplasma und Knospung durch die Zellmembran, in welcher viral-kodierte Glykoproteine eingebettet sind, erzeugt. Der Eintritt des Virus in die Zelle findet durch Endozytose durch Clathrin-bedeckte Vertiefungen, Fusion der viralen Membran mit dem Endosom, Freisetzung des Nukleokapsids und Enthüllen bzw. Freisetzung des viralen Genoms statt. Während der viralen Replikation dient die genomische 49S-RNA als Matritze für die Synthese des komplementären Negativ-Stranges. Der Negativstrang dient wiederum als Matritze für die genomische RNA und für eine intern initiierte 26S-subgenomische RNA. Die Nicht-Strukturproteine werden von der genomischen RNA translatiert. Alphavirale Strukturproteine werden von der subgenomischen 26S-RNA translatiert. Alle viralen Gene werden als ein Polyprotein exprimiert und in einzelne Proteine durch protolytische Spaltung nach Translation prozessiert.

[0008] Die Verwendung von rekombinanten Alphavirus-Vektoren zur Behandlung von Individuen erfordert, daß sie zum Transport und für die Lagerung über lange Zeiträume bei einer gewünschten Temperatur befähigt sind, so daß die Infektiosität und die Lebensfähigkeit des rekombinanten Virus erhalten bleibt. Gegenwärtige Verfahren zur Lagerung rekombinanter Viren umfassen allgemein die Lagerung als Flüssigkeiten und bei niedrigen Temperaturen. Solche Verfahren bringen Probleme in Dritte Welt-Ländern mit sich, welche typischerweise keine angemessenen Kühlkapazitäten aufweisen. Beispielsweise sterben jedes Jahr in Afrika Millionen von Kindern an infektiösen Krankheiten, wie Masern. Vakzinen, welche zur Vorbeugung gegen diese Krankheiten notwendig sind, können nicht an die Mehrheit dieser Länder verteilt werden, weil Kühlung nicht ohne weiteres zugänglich ist.

[0009] Zusätzlich zur Lagerung als Flüssigkeiten und bei niedrigen Temperaturen enthalten die gegenwärtigen viralen Formulierungen oft Mediumkomponenten, welche nicht für die Injektion in den Patienten wünschenswert sind. Daher gibt es die Notwendigkeit in der Technik für ein Verfahren zur Konservierung des gereinigten rekombinanten viralen Vektors (und insbesondere Alphavirus-Vektoren) in einer lyophilisierten Form bei erhöhten Temperaturen und für diese für die Injektion in die Patienten geeignete Form.

[0010] Die vorliegende Erfindung offenbart rekombinante Alphavirus-Vektoren, welche zur Verwendung in einer Vielzahl von Anwendungen geeignet sind, einschließlich beispielsweise Gentherapie, und stellt weitere andere damit in Beziehung stehende Vorteile bereit.

[0011] Dokumente, die sich auf die vorliegende Erfindung beziehen, sind WO 92/10578, Xiong et al., (1989), Science, 342, 1188–119, EP-A-0198386, EP-A-0647716, US 5127879, DE 43 15 109A, EP-1-0573767 und Leiser et al., (1992), PNAS, 89, 9136–9140.

[0012] WO 92/10578 und Xiong et al., [supra] betreffen sich mit Alphavirus-cDNA-Vektoren, die eine Transkription eines korrespondierenden RNA-Vektorkonstrukt in vitro ermöglichen. EP-A-0198386 betrifft mit DNA-Vektoren, welche die Transkription von mRNA von γ -Interferon lenken, aber nicht befähigt sind, virale RNA-Vektorkonstrukte zu erzeugen, die sich in einer eukaryotischen Zelle selbst replizieren können. EP-A-0647716 betrifft mit einem rekombinanten Vektor, der eine Kassette für die Transkription durch eine RNA-Polymerase III umfaßt, wobei das RNA-Transkript sich nicht in einer eukaryotischen Zelle selbst repliziert. US 5127879 betrifft mit infektiösen Sindbis-Virus-RNA-Molekülzusammensetzungen, die für die Expression heterologer kodierender Sequenzen in Wirtszellen verwendet werden, wobei die viralen RNA-Konstrukte in vitro synthetisiert werden.

[0013] DE 43 15 109A, EP-A-0573767 und Leiser et al. [supra] betreffen alle mit Konstrukten von Pflanzenviren und lehren nicht die Verwendung von DNA-Vektoren, die Alphavirus-RNA-Vektorkonstrukte kodieren.

[0014] In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-cDNA-Vektorkonstrukte bereitgestellt, welche einen 5'-Promotor umfassen, der befähigt ist, die Synthese von viraler RNA von cDNA zu initiieren, gefolgt von einer 5'-Sequenz, die befähigt ist, die Transkription eines Alphavirus zu initiieren, eine Nukleotidsequenz, welche die nicht-strukturellen Proteine des Alphavirus kodiert, einen viralen Verbindungsabschnitt, welcher so modifiziert wurde, daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments reduziert ist, eine Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz und eine 3'-Sequenz, welche die Termination der Transkription kontrolliert.

[0015] In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-cDNA-Vektorkonstrukte bereitgestellt, welche einen Promotor umfassen, der befähigt ist, die Synthese von viraler RNA von cDNA zu initiieren, gefolgt von einer 5'-Sequenz, welche befähigt ist, die Transkription eines Alphavirus zu initiieren, eine Nukleotidsequenz, die Nicht-Strukturproteine von Alphavirus kodiert, einen ersten vitalen Verbindungsabschnitt, welcher so inaktiviert wurde, daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments verhindert wird, gefolgt von einem zweiten viralen Verbindungsabschnitt bzw. -bereich, welcher so modifiziert wurde, daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments reduziert wird, eine Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz und eine 3'-Sequenz, welche die Termination der Transkription kontrolliert.

[0016] In einer Ausführungsform enthält das obenstehend beschriebene Vektorkonstrukt eine heterologe Sequenz. Typischerweise enthält solch ein Vektorkonstrukt eine heterologe Nukleotidsequenz, welche größer als 100 Basen ist, wobei allgemein die heterologe Nukleotidsequenz größer als 3 kb ist, und vorzugsweise die heterologe Nukleotidsequenz größer als 5 kb ist, und noch mehr bevorzugt die heterologe Nukleotidsequenz größer als 8 kb ist. In verschiedenen Ausführungsformen ist die heterologe Sequenz eine Sequenz, welche ein Protein, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11,

IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, α -, β - und γ -IFN, G-CSF und GM-CSF, kodiert.

[0017] In weiteren Ausführungsformen enthalten die vorstehend beschriebenen Vektorkonstrukte eine ausgewählte heterologe Sequenz, welche von einem Virus sein kann, das aus der Gruppe, bestehend aus Influenzavirus, HPV, HBV, HCV, EBV, HIV, HSV, FeLV, FIV, Hanta-Virus, HTLV I, HTLV II und CMV ausgewählt wird. In einer bevorzugten Ausführungsform kodiert die von HPV erhaltenene heterologe Sequenz ein Protein, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus E5, E6, E7 und L1.

[0018] In weiteren Ausführungsformen enthalten die vorstehend beschriebenen Vektorkonstrukte eine ausgewählte heterologe Sequenz, die ein HIV-Protein, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus HIV gp120 und gag, kodiert.

[0019] Die vorstehend beschriebenen ausgewählten heterologen Sequenzen können antisense-Sequenzen sein. In bevorzugten Ausführungsformen ist die antisense-Sequenz aus der Gruppe, bestehend aus Sequenzen, welche Influenzavirus, HPV, HBV, HCV, EBV, HIV, HSV, FeLV, FIV, Hanta-Virus, HTLV I, HTLV II und CMV kodieren, ausgewählt.

[0020] In einer anderen Ausführungsform enthalten die obenstehend beschriebenen Vektorkonstrukte keine Alphavirus-Strukturproteine. In anderen Ausführungsformen ist die ausgewählte heterologe Sequenz stromabwärts zu der viralen Verbindungsregion lokalisiert. In den obenstehend beschriebenen Vektorkonstrukten mit einer zweiten viralen Verbindung kann die ausgewählte heterologe Sequenz in bestimmten Ausführungsformen stromabwärts zu der zweiten viralen Verbindungsregion lokalisiert sein. Wo die heterologe Sequenz stromabwärts von der viralen Verbindungsregion lokalisiert ist, kann das Vektorkonstrukt weiter einen Polylinker umfassen, welcher anschließend an die virale Verbindungsregion lokalisiert ist. In den bevorzugten Ausführungsformen enthalten solche Polylinker keine Wildtyp-Alphavirus-Restriktionsendonuklease-Erkennungssequenz.

[0021] In einer weiter bevorzugten Ausführungsform kann in den obenstehend beschriebenen Vektorkonstrukten die ausgewählte heterologe Sequenz innerhalb der Nukleotidsequenz lokalisiert sein, welche Alphavirus-Nicht-Strukturproteine kodiert.

[0022] In besonderen Ausführungsformen schließen die obenstehend beschriebenen Vektorkonstrukte eine virale Bindungsregion ein, welche aus einer Nukleotidsequenz, wie in **Fig. 1** gezeigt, von Nukleotidnummer 7.579 bis Nukleotidnummer 7.597 (SEQ. ID Nr. 1) besteht. In anderen Ausführungsformen, wo das Vektorkonstrukt eine zweite virale Bindung einschließt, schließen die Vektorkonstrukte ein E3-Adenovirus-Gen ein, welches stromabwärts von der zweiten viralen Verbindungsregion lokalisiert ist und können auch weiter eine retrovirale Verpackungssequenz umfassen, welche zwischen der ersten viralen Verbindungsregion und der zweiten viralen Verbindungsregion lokalisiert ist.

[0023] In weiteren Aspekten stellt die vorliegende Erfindung einen isolierten rekombinanten Alphavirus-Vektor bereit, welcher nicht einen funktionellen viralen Verbindungsabschnitt enthält und welcher in bevorzugten Ausführungsformen eine reduzierte virale Transkription des subgenomischen Fragments erzeugt.

[0024] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Expressionskassette bereit, welche einen Promotor und eines oder mehrere Strukturproteine des Alphavirus umfaßt, wobei der Promotor befähigt ist, die Expression der Strukturproteine des Alphavirus zu lenken.

[0025] In verschiedenen Ausführungsformen ist die Expressionskassette befähigt, das Alphavirus-Capsid-Protein, wie ein Sindbis-Strukturprotein, ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus 6K, E3, E2 und E1, zu exprimieren.

[0026] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung eine Expressionskassette bereit, die einen Promotor, eines oder mehrere Alphavirus-Strukturproteine und eine heterologe Ligandensequenz umfaßt, wobei der Promotor befähigt ist, die Expression von Alphavirus-Strukturproteinen und der heterologen Sequenz zu lenken. In verschiedenen Ausführungsformen ist die heterologe Ligandensequenz ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus VSVG, HIV gp120, Antikörper, Insulin und CD4.

[0027] In bestimmten Ausführungsformen enthalten die vorstehend beschriebenen Expressionskassetten einen Promotor, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus MuLV, MMTV, Alphavirus-Verbindungsabschnitt, CMV und VA1RNA.

[0028] In noch einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung einen Alphaviruspartikel bereit, welcher durch Einführen in eine Targetzelle bzw. Zielzelle eine infizierte Zelle liefert, welche für mindestens 72 Stunden nach Infektion lebensfähig ist. Ebenso werden Targetzellen bereit gestellt, welche nach Infektion mit einem Alphaviruspartikel der vorliegenden Erfindung für mindestens 72 Stunden nach Infektion lebensfähig sind.

[0029] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein rekombinantes Alphavirus-Teilchen bereit, welches nach Einbringung in eine Zielzelle eine infizierte Zelle erzeugt, die für mindestens 72 Stunden nach der Infektion lebensfähig ist, wobei das Teilchen auch ein Vektorkonstrukt trägt, welches die Expression von mindestens einem Antigen oder einer modifizierten Form davon in mit dem Alphavirus-Teilchen infizierten Zielzellen lenkt, wobei das Antigen oder die modifizierte Form davon befähigt ist, eine Immunantwort in einem Tier zu stimulieren. In verschiedenen Ausführungsformen ruft das exprimierte Antigen oder die modifizierte Form davon eine zellvermittelte Immunantwort, vorzugsweise eine auf HLA-Klasse I beschränkte-Immunantwort hervor.

[0030] In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein rekombinantes Alphavirus-Teilchen bereit, welches ein Vektorkonstrukt trägt, das befähigt ist, die Expression eines Palliativums in mit dem Alphavirus-Teilchen infizierten Zellen, zu lenken, wobei das Palliativum befähigt ist, die Funktion eines für die Pathogenität notwendigen pathogenen Mittels zu inhibieren. In verschiedenen Ausführungsformen ist das pathogene Mittel ein Virus, Pilze, Protozoen oder Bakterien und die inhibierte Funktion ist ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus Adsorption, Replikation, Genexpression, Zusammenlagerung und Austritt des pathogenen Mittels aus infizierten Zellen. In anderen Ausführungsformen ist das pathogene Mittel eine karzinomatische Zelle, ein krebserregender Wachstumsfaktor, eine Autoimmunerkrankung, kardiovaskuläre Erkrankungen, wie Restenose, Osteoporose und männliche Glatzenbildung und die inhibierte Funktion ist ausgewählt aus einer Gruppe, bestehend aus der Lebensfähigkeit der Zelle und der Zellreplikation. In weiteren Ausführungsformen lenkt das Vektorkonstrukt die Expression eines toxischen Palliativums in infizierten Zielzellen als Antwort auf die Anwesenheit einer mit dem pathogenen Mittel assoziierten Substanz in solchen Zellen; vorzugsweise ist das Palliativum befähigt, die Expression eines pathogenen Gens selektiv zu inhibieren oder die Aktivität eines durch das pathogene Mittel erzeugten Proteins zu inhibieren. In weiteren Ausführungsformen umfaßt das Palliativum ein inhibierendes Peptid, das spezifisch für eine virale Protease ist, eine antisense-RNA, die komplementär zu den für die Pathogenität notwendigen RNA-Sequenzen ist, eine sense-RNA, die komplementär zu für die Pathogenität notwendigen RNA-Sequenzen ist, oder ein defektes Strukturprotein eines pathogenen Mittels, wobei ein solches Protein befähigt ist, das Zusammenfügen des pathogenen Mittels zu inhibieren.

[0031] In weiteren Ausführungsformen führt der oben beschriebene Alphaviruspartikel zur Expression eines Palliativums, noch spezifischer zur Expression eines Genprodukts, welches befähigt ist, einen sonst inaktiven Precursor bzw. Vorläufer in einen aktiven Hemmstoff eines pathogenen Agens zu aktivieren, beispielsweise das Herpes-Thymidinkinase-Genprodukt, ein Tumor-Suppressorgen oder ein Protein, welches eine Verbindung mit geringer oder keiner Zytotoxizität in ein toxisches Produkt in Anwesenheit eines pathogenen Agens aktiviert, wodurch eine lokale Therapie gegen das pathogene Agens bewirkt wird.

[0032] In einer anderen Ausführungsform lenkt das Alphavirus-Teilchen die Expression eines Proteins, das nach Prozessierung oder Modifikation durch ein von einem pathogenen Mittel stammenden Protein toxisch ist, eines anzeigenden Produkts auf der Oberfläche von mit dem Alphavirus infizierten Zielzellen, enthaltend ein pathogenes Mittel, oder eines RNA-Moleküls, das als für ein pathogenes RNA-Molekül spezifisches antisense oder Ribozym fungiert.

[0033] In bestimmten Ausführungsformen ist in der oben beschriebenen Alphaviruspartikel das Protein die Herpes-Thymidinkinase oder CD4.

[0034] In weiteren Aspekten stellt die vorliegende Erfindung ein Alphavirus-Teilchen bereit, welches die Expression eines Gens lenkt, das befähigt ist, ein oder mehrere Elemente des Immunsystems in mit dem Alphavirus infizierten Zielzellen zu unterdrücken, und ein Alphavirus-Teilchen, welches die Expression eines blockierenden Elements in mit dem Sindbis-Virus infizierten Zellen lenkt, wobei das blockierende Element befähigt ist, entweder an einen Rezeptor oder an ein Mittel zu binden, so daß die Interaktion zwischen Rezeptor und Mittel blockiert ist.

[0035] In weiteren Aspekten stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Stimulieren einer Immunantwort gegen ein Antigen bereit, welches das Infizieren empfindlicher Zielzellen mit einem Alphavirus-Teilchen, welches die Expression von mindestens einem Antigen oder einer modifizierten Form davon in mit dem Alphavirus infizierten Zielzellen lenkt, umfaßt, wobei das modifizierte Antigen befähigt ist, eine Immunantwort in ei-

nem Tier zu stimulieren. In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Zielzellen in vivo infiziert.

[0036] In weiteren Aspekten der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Stimulieren einer Immunantwort gegen ein pathogenes Antigen bereitgestellt, welches ein Infizieren der empfänglichen Zielzellen mit einem Alphavirus-Teilchen, welches die Expression einer modifizierten Form eines pathogenen Antigens in mit dem Alphavirus infizierten Zielzellen lenkt, wobei das modifizierte Antigen befähigt ist, eine Immunantwort in einem Tier zu stimulieren, wobei es jedoch eine reduzierte Pathogenität bezüglich des pathogenen Antigens aufweist.

[0037] In weiteren Aspekten der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zum Stimulieren einer Immunantwort gegen ein Antigen bereitgestellt, welches das Infizieren empfänglicher Zielzellen mit einem Alphavirus-Teilchen, welches die Expression eines oder mehrerer Epitope aufweisenden Peptids lenkt, umfaßt, wobei eines oder mehrere der Epitope auf verschiedene Proteine zurückgeführt werden.

[0038] In einem weiteren Aspekt der Erfindung wird ein Verfahren zum Stimulieren einer Immunantwort in einem warmblütigen Tier bereitgestellt, welches das Infizieren empfänglicher Zielzellen, die mit einem warmblütigen Tier assoziiert sind, mit Nukleinsäuresequenzen, die entweder einzelne Klasse I- oder Klasse II-MHC-Proteine oder Kombinationen davon kodieren, und das Infizieren der Zellen mit einem Alphavirus-Teilchen, welches die Expression von mindestens einem Antigen oder einer modifizierten Form davon in mit dem Alphavirus-Teilchen infizierten Zielzellen lenkt, umfaßt, wobei das Antigen oder die modifizierte Form davon befähigt ist, eine Immunantwort in dem Tier zu stimulieren.

[0039] In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Hemmung eines pathogenen Agens bereit gestellt, welches das Infizieren empfänglicher Targetzellen mit einem Alphaviruspartikel umfaßt, welcher zur Expression eines Palliativums in den Alphaviruspartikel-infizierten Zellen führt, wobei das Palliativum zur Hemmung einer Funktion eines pathogenen Agens befähigt ist, welches für die Pathogenität notwendig ist.

[0040] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden eukaryotische geschichtete Vektorinitiationssysteme bereitgestellt. Kurz gefaßt umfaßt das eukaryotische geschichtete Vektorinitiationssystem in einer Ausführungsform der Erfindung einen 5'-Promotor, ein Konstrukt, das befähigt ist, eine heterologe Nukleotidsequenz zu exprimieren, die befähigt ist, in Zellen entweder autonom oder als Antwort auf eine oder mehrere Faktoren zu replizieren, und eine Transkriptions-Terminations-Sequenz. In einem anderen Aspekt wird ein eukaryotisches geschichtetes DNA-Vektorinitiationssystem bereitgestellt, das einen 5'-Promotor, ein Konstrukt, welches befähigt ist, eine heterologe RNA-Sequenz zu exprimieren, die befähigt ist, in einer Zelle entweder autonom oder als Antwort auf einen oder mehrere Faktoren zu replizieren, und eine Transkriptions-Terminations-Sequenz umfaßt. In einer bevorzugten Ausführungsform ist das Konstrukt, welches befähigt ist, eine oder mehrere heterologe Nukleotidsequenzen zu exprimieren, ein Sindbis-cDNA-Vektorkonstrukt. In anderen Ausführungsformen ist das Konstrukt ein viraler Vektor, der ausgewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus Poliovirus, Rhinovirus, Pockenvirus, Retrovirus, Influenzavirus, Adenovirus, Adeno-assoziiertes Virus, Herpes-Virus, SV40-Virus, HIV, Masern, Astrovirus, Semliki-Forest-Virus und Coronavirus. In einer weiteren Ausführungsform umfaßt das eukaryotische geschichtete Vektorinitiationssystem weiter eine Polyadenylierungssequenz.

[0041] In noch einem anderen Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein oben beschriebenes Alphavirus-RNA-Vektormolekül bereit, welches befähigt ist, die Expression eines Palliativums in einer Targetzelle herbeizuführen. Das Palliativum in dieser Alphavirus-RNA-Expressionsvektor-Konfiguration hat, wenn es exprimiert wird, den gleichen Effekt wie die oben für ein Alphaviruspartikel beschriebenen Aspekte. Der Alphavirus-RNA-Expressionsvektor schließt der Reihe nach eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Alphavirus befähigt ist, eine Alphavirus-Nicht-Strukturproteine kodierende Nukleotidsequenz, eine virale Verbindungsregion, eine heterologe Sequenz, eine Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz und einen Abschnitt von 25 aufeinanderfolgenden polyadenylierten Resten ein, und wird direkt in die Zielzellen durch physikalische Mittel als ein RNA-Molekül, als ein Komplex mit verschiedenen Liposomenformulierungen oder als ein RNA-Ligand-Komplex, einschließlich dem Alphavirus-RNA-Vektormolekül, einer Polykationverbindung wie Polylysin, einem Rezeptor-spezifischen Liganden und gegebenenfalls einem Psoralen-inaktivierten Virus, wie Sendai oder Adenovirus, eingeführt.

[0042] Die vorliegende Erfindung stellt ebenso Verpackungszelllinien und Erzeuger- bzw. Herstellerzelllinien, welche zur Erzeugung bzw. Herstellung rekombinanter Alphaviruspartikel geeignet sind, bereit. Solche Verpackungs- oder Herstellerzelllinien können entweder aus Säugern oder Nicht-Säugern stammen (z. B. Insekten-

zellen wie Moskitozellen).

[0043] Eine breite Vielzahl von Alphaviren kann innerhalb des Zusammenhangs der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Charakteristische Beispiele schließen Aura, Venezelan Equine Encephalitis, Fort Morgan, Ross River, Semliki Forest Virus und Mayaro ein.

[0044] Diese und andere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden in Bezug auf die folgende detaillierte Beschreibung und den beigefügten Zeichnungen offensichtlich werden. Zusätzlich werden verschiedene Zitate unten dargestellt, welche detaillierter bestimmte Verfahren und Zusammensetzungen beschreiben (z. B. Plasmide, etc.).

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0045] Fig. 1 ist eine schematische Darstellung der Sindbis-Virus-Genomorganisation.

[0046] Fig. 2 ist eine Darstellung, welche ein Verfahren zur Amplifikation eines Sindbis-RNA-Genoms durch RT-PCR beschreibt.

[0047] Fig. 3A–H stellen die Sequenz eines typischen eukaryotischen "Layered Vektor Initiation System", abgeleitet aus Sindbis (siehe auch SEQ. ID Nr. 89), dar.

[0048] Fig. 4 ist eine schematische Darstellung eines Sindbis-Basisvektors und eines Sindbis-Luziferasevektors.

[0049] Fig. 5 ist eine Darstellung der Sindbis-Helfervektor-Konstruktion.

[0050] Fig. 6 ist eine graphische Darstellung, welche die Expression und Isolierung eines Sindbis-Luziferasevektors erläutert.

[0051] Fig. 7 ist eine Darstellung einer Methode zur Modifikation einer Sindbis-Verbindungsregion.

[0052] Fig. 8 ist eine schematische Darstellung der Sindbis-Verpackungs-Expressionskassetten.

[0053] Fig. 9 ist ein Balkendiagramm, welches die Sindbis-Luziferase-Vektorverpackung in LTR/SindIBs-pE-Zellen darstellt.

[0054] Fig. 10 ist eine schematische Darstellung, wie Astroviren oder andere heterologe Viren verwendet werden können, um Sindbis-Strukturproteine zu exprimieren.

[0055] Fig. 11 ist eine schematische Darstellung des Mechanismus zur Aktivierung einer funktionsunfähigen viralen Verbindungsregion bzw. viralen Verbindungsregion mit verminderter Funktion durch „RNA loop-out“ bzw. RNA-Entwindung.

Detaillierte Beschreibung der Erfindung

[0056] Vor der weiteren Beschreibung der Erfindung kann es für deren Verständnis hilfreich sein, Definitionen von bestimmten Begriffen zuerst darzustellen, welche hierin später verwendet werden.

[0057] „Alphavirus-Vektorkonstrukt bezieht sich auf ein Assembly, welches befähigt ist, zur Expression einer Sequenzen) oder eines Gens(en) von Interesse zu führen. Das Vektorkonstrukt sollte einen 5'-Promotor einschließen, welcher zur Initiation der viralen RNA-Synthese in vitro aus cDNA befähigt ist, eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Alphavirus befähigt ist, wie auch eine Sequenz(en), welche, wenn sie exprimiert werden, biologisch aktive Alphavirus-Nicht-Strukturproteine kodieren (d. h., NSP1, NSP2, NSP3 und NSP4). Zusätzlich sollte das Vektorkonstrukt eine virale Verbindungsregion einschließen, welche in bestimmten Ausführungsformen modifiziert werden kann, um die virale Transkription des subgenomischen Fragments und einer Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz zu verhindern, zu inhibieren oder zu reduzieren. Das Vektorkonstrukt kann ebenso (ein) Nukleinsäuremolekül(e), welches) eine Größe aufweisen (aufweist), welche ausreicht, um die Produktion von lebensfähigem Virus zu erlauben, sowie eine oder mehrere Restriktionssequenzen einschließen. Wenn das Alphavirus-Vektorkonstrukt ein cDNA-Vektorkonstrukt ist, sollte es zusätzlich einen 5'-Promotor, welcher zur Initiation der viralen RNA-Synthese von cDNA befähigt ist und eine

3'-Sequenz, welche die Termination der Transkription und Spleißerkennung kontrolliert, einschließen.

[0058] „Expressionskassette“ bezieht sich auf ein rekombinant hergestelltes Molekül, welches zur Expression von Alphavirus-Strukturproteinen) befähigt ist. Die Expressionskassette muß einen Promotor und eine Sequenz, welche (ein) Alphavirus-Strukturproteine) kodiert, einschließen. Gegebenenfalls kann die Expressionskassette Transkriptionsterminations-, Spleißerkennungs-, und Polyadenylierungszusatz-Sequenzen einschließen. Bevorzugte Promotoren schließen die CMV- und Adenovirus-VA1-RNA-Promotoren ein. Zusätzlich kann die Expressionskassette selektierbare Marker, wie Neo, SV2-Neo, Hygromycin, Phleomycin, Histidinol und DHFR, enthalten.

[0059] „Alphaviruspartikel“ bezieht sich auf ein Capsid, welches einen Alphavirus-Vektor enthält. Eine Vielzahl von Vektoren kann innerhalb des Alphaviruspartikel, einschließlich der Alphavirus-Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung, enthalten sein. Vorzugsweise ist das Alphaviruscapsid in einer Lipid-Doppelschicht, wie eine Zellmembran, in welcher viral-kodierte Proteine eingebettet sind, enthalten.

A. QUELLEN FÜR ALPHAVIREN

[0060] Wie oben angemerkt, stellt die vorliegende Erfindung Alphavirus-Vektorkonstrukte, sowie Verfahren zur Verwendung solcher Vektorkonstrukte bereit. Kurz gesagt, Sequenzen, welche das Wildtyp-Alphavirus kodieren, welches zur Verwendung in der Herstellung der oben beschriebenen Vektorkonstrukte geeignet ist, und Partikel können leicht bezüglich der hier bereitgestellten Offenbarung aus natürlich vorkommenden Quellen oder Hinterlegungsstellen (z. B. die American Type Culture Collection, Rockville, Maryland) erhalten werden.

[0061] Typische Beispiele von geeigneten Alphaviren schließen Aura (ATCC VR-368), Bebaru-Virus (ATCC VR-600, ATCC VR-1240), Cabassou (ATCC VR-922), Chikungunya-Virus (ATCC VR-64, ATCC VR-1241), Eastern Equine Enzephalomyelitis-Virus (ATCC VR-65, ATCC VR-1242), Fort Morgan (ATCC VR-924), Getah-Virus (ATCC VR 369, ATCC VR-1243), Kyzylagach (ATCC VR-927), Mayaro (ATCC VR-66), Mayaro-Virus (ATCC VR-1277), Middleburg (ATCC VR-370), Mucambo-Virus (ATCC VR-580, ATCC VR-1244), Ndumu (ATCC VR-371), Pixuna-Virus (ATCC VR-372, ATCC VR-1245), Ross River-Virus (ATCC VR-373, ATCC VR-1246), Semliki Forest-Virus (ATCC VR-67, ATCC VR-1247), Sindbis-Virus (ATCC VR-68, ATCC VR-1248), Tonate (ATCC VR-925), Trinité (ATCC VR-469), Una (ATCC VR-374), Venezuelan Equine Enzephalomyelitis (ATCC VR-69), Venezuelan Equine Enzephalomyelitis-Virus (ATCC VR-923, ATCC VR-1250, ATCC VR-1249, ATCC VR-532), Western Equine Encephalomyelitis (ATCC VR-70, ATCC VR-1251, ATCC VR-622, ATCC VR-1252), Whataroa (ATCC VR-926) und Y-62-33 (ATCC VR-375) ein.

B. SEQUENZEN, WELCHE DEN WILDTYP-SINDBISVIRUS KODIEREN

[0062] In einem besonders bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung können die Sequenzen, welche das Wildtyp-Alphavirus kodieren, aus dem Sindbisvirus erhalten werden. Insbesondere in einer Ausführungsform der Erfindung (und wie detaillierter unten in Beispiel 1 beschrieben) kann ein Sindbis-cDNA-Klon durch Verknüpfen des 5'-Endes eines Sindbisvirus-cDNA-Klons mit einem Bakteriophagen-RNA-Polymerasepromotor, und des 3'-Endes des cDNA-Klons mit einem Poly-Adenosin/(Poly-A)-Abschnitt von mindestens 25 Oligonukleotiden erhalten werden. Insbesondere kann die Synthese des ersten cDNA-Stranges von der viralen RNA-Matrize mit einem 3'-Oligonukleotid-Primer mit einer darauffolgenden Sequenz, umfassend eine Enzym-Erkennungssequenz, eine Sequenz von 25 Desoxythymidinnukleotiden und einen Abschnitt von annähernd 18 Nukleotiden, welcher zum 3'-viralen Ende komplementär ist, und mit einem 5'-Primer, welcher Puffer-nukleotide, eine Enzymerkennungssequenz, einen Bakteriophagen-Promotor und eine Sequenz, welche zum viralen 5'-Ende komplementär ist, enthält, durchgeführt werden. Die Enzym-Erkennungssequenzen, welche auf jedem dieser Primer vorliegen, sollten voneinander unterschiedlich sein und nicht im Sindbisvirus auftreten. Ferner sollte das erste mit dem 3'-Ende des Bakteriophagen-RNA-Polymerasepromotors verknüpfte Nukleotid das erste authentische Nukleotid des RNA-Virus sein. In vitro-transkribierte RNA von dem viralen cDNA-Klon, welcher die oben beschriebene Konstruktion aufweist und durch Verdau mit dem einzigen dT: dA-3'-distalem Restriktionsenzym linearisiert wird, initiiert nach Einführung in die geeignete eukaryotische Zelle den gleichen Infektionszyklus, welcher für die Infektion mit dem Wildtyp-Virus, aus welchem die cDNA kloniert wurde, charakteristisch ist. Dieser virale cDNA-Klon, welcher RNA ergibt, welche zur Initiation einer Infektion nach in vitro-Transkription befähigt ist, wird unten als „infektiöser cDNA-Klon“ bezeichnet.

C. HERSTELLUNG VON REKOMBINANTEN ALPHAVIRUS VEKTORKONSTRUKTEN MIT INAKTIVIERTEN VIRALEN VERBINDUNGSREGIONEN

[0063] Ein, wie oben beschrieben (oder unter Verwendung von Sequenzen, welche ein aus anderen Quellen erhaltenes Alphavirus kodieren) hergestellter, infektiöser cDNA-Klon kann schnell verwendet werden, um Alphavirus-Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung herzustellen. Kurz gesagt, in einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden rekombinante Alphavirus-Vektorkonstrukte bereit gestellt, umfassend eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Alphavirus befähigt ist, eine Nukleotidsequenz, welche Alphavirus-Nicht-Strukturproteine kodiert, eine virale Verbindungsregion, welche inaktiviert worden ist, so daß die virale Transkription des subgenomischen Fragmentes verhindert wird und eine Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz. Wie es später unten detaillierter diskutiert werden wird, transkribieren Alphavirus-Vektorkonstrukte, welche eine inaktivierte virale Verbindungsregion aufweisen, nicht das subgenomische Fragment, was diese für eine große Vielzahl von Anwendungen geeignet macht.

1. Sequenzen, welche die Transkription initiieren

[0064] Wie oben angemerkt, enthalten in den bevorzugten Ausführungsformen die Alphavirus-Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Alphavirus befähigt ist. Typische Beispiele solcher Sequenzen schließen die Nukleotide 1–60 des Wildtyp-Sindbisvirus (siehe **Fig. 3**), Nukleotide 10–75 für tRNA-Asparagin (Schlesinger et al., US-Patent Nr. 5,091,309) und 5'-Sequenzen von anderen Togaviren, welche die Transkription initiieren, ein.

2. Alphavirus-Nicht-Strukturproteine

[0065] Alphavirus-Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung sollten Sequenzen enthalten, welche Alphavirus-Nicht-Strukturproteine (NSP) kodieren. Als ein Beispiel für den Sindbis-Virus gibt es vier Sindbis-Nicht-Strukturproteine, NSP1, NSP2, NSP3 und NSP4, welche Proteine kodieren, welche es dem Virus ermöglichen, selbst zu replizieren. Nicht-Strukturproteine 1 bis 3 (NSP1–NSP3) werden in einer Ausführungsform der Erfindung durch die Nukleotide 60 bis 5.750 des Wildtyp-Sindbisvirus (siehe **Fig. 3**) kodiert. Diese Proteine werden als ein Polyprotein hergestellt und später in die Nicht-Strukturproteine NSP1, NSP2 und NSP3 gespalten. NSP4 wird in einer Ausführungsform durch die Nukleotide 5.928 bis 7.579 (siehe **Fig. 3**) kodiert.

[0066] Für den Fachmann ist es offensichtlich, daß eine große Vielzahl der Sequenzen, welche Alphavirus-Nicht-Strukturproteine kodieren, zusätzlich zu den oben diskutierten in der vorliegenden Erfindung verwendet werden können und daher, als in den Bereich der Bezeichnung „Alphavirus-Nicht-Strukturproteine“ fallend, betrachtet werden können. Beispielsweise kann in einer Ausführungsform der Erfindung wegen der Degeneration des genetischen Codes mehr als ein Codon eine angegebene Aminosäure kodieren. Daher können eine große Vielzahl von Nukleinsäuresequenzen, welche Alphavirus-Nicht-Strukturproteine kodieren, erzeugt werden. In anderen Ausführungsformen der Erfindung kann eine Vielzahl von anderen Nicht-Strukturprotein-Derivaten, einschließlich zum Beispiel, verschiedene Substitutionen, Insertionen oder Deletionen, hergestellt werden, deren Reinergebnis nicht die biologische Aktivität der Alphavirus-Nicht-Strukturproteine verändert. Innerhalb des Zusammenhangs der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-Nicht-Strukturproteine in toto als biologisch aktiv betrachtet, falls sie die Selbstreplikation des Vektorkonstrukts fördern. Selbstreplikation, welche sich auf die Replikation der viralen Nukleinsäuren und nicht auf die Produktion von infektiösem Virus bezieht, kann leicht durch eine RNase-Schutz-Untersuchung bestimmt werden, die im Laufe der Zeit ausgeführt wird. Verfahren zur Herstellung solcher Derivate können von einem Fachmann leicht mit der hierin bereit gestellten Offenbarung durchgeführt werden (siehe auch Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Auflage), Cold Spring Harbor Laboratory Press).

3. Virale Verbindungsregionen

[0067] In diesem Aspekt der Erfindung schließen die Alphavirus-Vektorkonstrukte ebenso eine virale Verbindungsregion ein, welche inaktiviert worden ist, so daß die virale Transkription des subgenomischen Fragmentes verhindert wird. Kurz gesagt, die Alphavirus-virale-Verbindungsregion kontrolliert normalerweise die Transkriptioninitiation des subgenomischen Fragmentes. Im Falle des Sindbis-Virus beginnt die normale virale Verbindungsregion typischerweise bei ungefähr Nukleotidnummer 7.579 und dehnt sich bis mindestens Nukleotidnummer 7.612 (und möglicherweise darüberhinaus) aus. Als ein Minimum werden die Nukleotide 7.579 bis 7.602 (5'-ATC TCT ACG GTG GTC CTA AAT AGT – SEQ. ID Nr. 1) für die Transkription des subgenomischen Fragmentes für notwendig gehalten. Diese Region (Nukleotide 7.579 bis 7.602) wird hier später als "minimal junction region core" bzw. "minimaler Verbindungsregionkern" bezeichnet.

[0068] In den bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung (und wie unten ausführlicher beschrieben) wird die virale Verbindungsregion inaktiviert, um die virale Transkription des subgenomischen Fragments zu verhindern. Wie innerhalb des Zusammenhangs der vorliegenden Erfindung verwendet, meint „inaktiviert“, daß das Fragment, welches dem Initiationspunkt des subgenomischen Fragments entspricht, wie durch einen RNAse-Schutz-Untersuchung gemessen, nicht nachweisbar ist (Typische Tests werden von Melton et al., Nuc. Acids Res. 12: 7.035–7.056, 1984; Calzon et al., Methods in Enz. 152: 611–632, 1987; und Kekule et al., Nature 343: 457–461, 1990 beschrieben).

[0069] In einer Ausführungsform der Erfindung wird die virale Verbindungsregion durch Verkürzen der viralen Verbindungsregion an Nukleotid 7.597 inaktiviert (d. h., die virale Verbindungsregion wird dann aus der Sequenz, wie in **Fig. 3** gezeigt, von Nukleotid 7.579 bis Nukleotid 7.597 bestehen). Diese Verkürzung verhindert die Transkription des subgenomischen Fragments und erlaubt zusätzlich die Synthese der vollständigen NSP1-Region (welche durch die Nukleotide 5.928 bis 7.579 kodiert wird).

[0070] Wie es für einen Fachmann mit der hierin bereit gestellten Offenbarung offensichtlich sein wird, können ebenso eine große Vielzahl von anderen Deletionen, Substitutionen oder Insertionen gemacht werden, um die virale Verbindungsregion zu inaktivieren. Beispielsweise kann die virale Verbindungsregion in anderen Ausführungsformen der Erfindung weiter in der Region verkürzt werden, welche NSP4 kodiert, wobei die virale Transkription vom subgenomischen Fragment verhindert wird, während die biologische Aktivität von NSP4 aufrechterhalten wird. Alternativ können in anderen Ausführungsformen wegen der Redundanz des genetischen Kodes Nukleotidsubstitutionen in der Sequenz gemacht werden, welche NSP4 kodiert, deren Reineffekt auch nicht die biologische Aktivität von NSP4 verändert, jedoch die Transkription des subgenomischen Fragments verhindert.

4. Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz und Poly-A-Schwanz

[0071] Wie oben anmerkt, sollten Alphavirus-Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung auch eine Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz (ebenso als „Alphavirus-Replikase-Erkennungssequenz“ bezeichnet) einschließen. Kurz gesagt, die Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz stellt eine Erkennungssequenz bereit, an welcher der Virus mit der Replikation des Negativstranges beginnt. Eine große Vielzahl von Sequenzen kann als eine Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz verwendet werden. Beispielsweise schließen in einer Ausführungsform die Sindbis-Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung eine Sindbis-Polymerase-Erkennungssequenz ein, welche durch die Nukleotide 11.647 bis 11.703 (siehe **Fig. 3**) kodiert wird. In anderen Ausführungsformen ist die Sindbis-Polymerase-Erkennung bis auf die kleinste Region verkürzt, welche immer noch als Erkennungssequenz funktionieren kann (z. B. Nukleotide 11.684 bis 11.703 von **Fig. 3**).

[0072] In den bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung kann das Vektorkonstrukt zusätzlich einen Poly-A-Schwanz enthalten. Kurz gesagt, der Poly-A-Schwanz kann von jeder Größe sein, welche ausreicht, um die Stabilität im Zytoplasma zu fördern, wodurch die Effizienz der Initiation des viralen Lebenszyklus gesteigert wird. Innerhalb verschiedener Ausführungsformen der Erfindung umfaßt der Poly-A-Schwanz mindestens 10 Adenosinnukleotide und am meisten bevorzugt mindestens 25 Adenosinnukleotide.

D. ANDERE ALPHAVIRUS-VEKTORKONSTRUKTE

[0073] Zusätzlich zu den Vektorkonstrukten, welche allgemein oben beschrieben wurden, kann eine große Vielzahl von anderen Alphavirus-Vektorkonstrukten, unter Verwendung der hierin bereit gestellten Offenbarung, hergestellt werden.

1. Modifizierte virale Verbindungsregionen

[0074] In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-Vektorkonstrukte bereit gestellt, wobei die virale Verbindungsregion modifiziert worden ist, so daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments reduziert ist. Kurz gesagt, die Infektion von Zellen mit Wildtyp-Alphavirus hat normalerweise den Zelltod als ein Ergebnis der reichlichen viralen Transkription des subgenomischen Fragments, welches von der viralen Verbindungsregion initiiert wird, zur Folge. Dieser große Überschuß von RNA-Molekülen kann die Transkriptionsmaschinerie der infizierten Zelle überschütten, was letztendlich den Tod der Zelle zur Folge hat. In Anwendungen, wo es erwünscht ist, daß die Infektion der Zielzelle eher einen therapeutischen Effekt (z. B. Strangspaltung der Zielnukleinsäure oder verlängerte Expression eines heterologen Proteins) als Zelltod ergeben sollte, können verschiedene Modifikationen des Alphaviruskonstrukts (zusätzlich zur Inaktivierung des Vektorkon-

strukts, wie oben beschrieben) gemacht werden, um den Spiegel der viralen Transkription des subgenomischen Fragments zu reduzieren und hierdurch das Leben der Vektor-infizierten Targetzelle zu verlängern. Innerhalb des Zusammenhangs der vorliegenden Erfindung wird die virale Transkription des subgenomischen Fragments als „reduziert“ betrachtet, wenn sie weniger subgenomisches Fragment als ein Standard-Wildtyp-Alphavirus (z. B. Sindbis-Virus ATCC Nr. VR-1248), wie durch einen "RNase-Schutztest" bestimmt, liefert.

[0075] Virale Verbindungsregionen können durch eine Vielzahl von Verfahren modifiziert werden, um den Spiegel der viralen Transkription des subgenomischen Fragments zu reduzieren. Beispielsweise können in einer Ausführungsform der Erfindung wegen der Redundanz des genetischen Kodes Nukleotidsubstitutionen in der viralen Verbindungsregion 7579 bis 7597 gemacht werden, deren Reineffekt nicht die Aminosäuresequenz NSP4 (oder in anderen Ausführungsformen die biologische Aktivität von NSP4) verändert und dennoch den Spiegel der viralen Transkription des subgenomischen Fragments reduziert. Wenn das modifizierte Vektorkonstrukt Nukleotide nach 7597 (z. B. bis 7602 oder 7612) einschließt, können ebenso auch weitere Nukleotidsubstitutionen durchgeführt werden, obwohl, da NSP1 bei 7597 endet, solche Substitutionen nicht auf der genetischen Redundanz basieren müssen. Typische Beispiele der modifizierten viralen Verbindungsregionen werden unten detaillierter in Beispiel 3 beschrieben.

2. Tandem-virale-Verbindungsregionen

[0076] In anderen Aspekten der Erfindung werden Alphavirus-Vektorkonstrukte bereit gestellt, welche eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Alphavirus befähigt ist, eine Nukleotidsequenz, welche Alphavirus-nicht-strukturelle-Proteine kodiert, eine erste virale Verbindungsregion, welche inaktiviert worden ist, so daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments verhindert ist, eine zweite virale Verbindungsregion, welche modifiziert worden ist, so daß die virale Transkription des genomischen Fragmentes reduziert ist, und eine Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz umfassen. Solche Vektorkonstrukte werden als „Tandem“-Vektorkonstrukte bezeichnet, weil sie sowohl eine erste inaktivierte (oder „funktionsunfähige“) virale Verbindungsregion als auch eine zweite modifizierte (oder „synthetische“) virale Verbindungsregion umfassen. In bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung folgt der inaktivierten Verbindungsregion direkt die zweite modifizierte virale Verbindungsregion.

[0077] In Anwendungen, wo ein niedriger Spiegel der subgenomischen Transkription benötigt wird, kann ein minimaler Verbindungsregion-Kern stromabwärts im Tandem zu der inaktivierten Verbindungsregion inseriert sein. Um stufenweise den Spiegel der subgenomischen Transkription für den gewünschten Effekt zu steigern, können die Sequenzen, welche zu der gesamten Verbindungsregion korrespondieren, an die Tandem-Verbindungsregion in Inkrementen angefügt werden.

3. Das Adenovirus-E3-Gen

[0078] In einem anderen Aspekt der Erfindung wird ein Adenovirus-E3-Gen in ein Tandem-Vektorkonstrukt, welches der zweiten viralen Verbindungsregion folgt, inseriert, um die HLA-Expression in Alphavirus-infizierten Zellen herunter zu regulieren. Kurz gesagt sind in verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung wiederholte Impfungen eines Gentherapeutikums in dasselbe Individuum erwünscht. Wiederholte Impfungen mit Alphaviren, wie das Sindbis-Virus, können jedoch zur Entwicklung von spezifischen Antikörpern oder zellvermittelter Immunantwort gegen virale Sindbis-Nicht-Strukturproteine (NSP) führen. Somit kann es notwendig sein, die Wirts-Immunantwort, welche gegen Vektor-spezifische Proteine gerichtet ist, zu mildern, um wiederholte Dosen an das gleiche Individuum zu verabreichen.

[0079] Daher werden innerhalb einer Ausführungsform der Erfindung Produkte des Adenovirustyp 2-"early region"-Gens 3 verwendet, um die Expression der gesamten Histokompatibilitäts-Antigene, welche auf der Oberfläche der infizierten Zellen exprimiert werden, herunter zu regulieren. Kurz gesagt, das E3 19.000 Dalton (E3/19K) Protein bindet an und bildet einen molekularen Komplex mit Klasse I-H-2/HLA-Antigenen im endoplasmatischen Reticulum, wobei terminale Glykolisierungswege, welche für die volle Reifung und den anschließenden Transport der Klasse I-H-2/HLA-Antigene an die Zelloberfläche notwendig sind, verhindert werden. In Zielzellen, welche mit einem Alphavirus-Vektor infiziert wurden, welcher das Ad 2 E3-Protein kodiert, findet keine Koexpression der viralen Nicht-Struktur-Proteine in Zusammenhang mit den Klasse I-Antigenen statt. Somit ist es möglich, wiederholte Dosierungen eines Alphavirus-Vektor, welcher das Ad 2 E3-Protein als eine Komponente seines therapeutischen Palliativum exprimiert, an das gleiche Individuum zu verabreichen. Ein typisches Beispiel für die Verwendung des Adenovirus E3 Gens wird unten in Beispiel 4A detaillierter dargestellt.

4. Das CMV-H301-Gen

[0080] Andere Methoden können auch verwendet werden, um eine Wirts-Immunantwort gegen virale NSPs zu mildern. Beispielsweise wird in einem anderen Aspekt der Erfindung das humane Cytomegalivirus ("HCMV")-H301-Gen in ein Alphavirus-Vektorkonstrukt, vorzugsweise direkt der zweiten viralen Verbindungsregion in einen Tandem-Vektor folgend, kloniert, um die Wirts-CTL-Antwort, welche gegen virale spezifische Proteine gerichtet ist, welche in Vektor-infizierten Zellen exprimiert werden, zu inhibieren.

[0081] Kurz gesagt, das β 2-Microglobulin (β 2m)-Protein bindet an die α 1-, α 2- und α 3-Domänen der α -Kette der Klasse 1-Haupthistokompatibilitätsmoleküle von höheren Eukaryoten. Das Verhindern der Interaktion zwischen β 2m und MHC Klasse I-Produkten macht die infizierten Zellen für zytotoxische T-Zellen nicht erkennbar. Daher, wie unten in Beispiel 4B ausführlicher beschrieben, kann die Expression des HCMV-H301-Genprodukts als eine Komponente eines therapeutischen Palliativum verwendet werden, um die Wirts-Immunantwort gegen virale NSP zu mildern.

5. Retrovirale Verpackungssequenz

[0082] Innerhalb eines anderen Aspektes der Erfindung wird eine retrovirale Verpackungssequenz in einen Tandem-Vektor insertiert und zwischen der ersten (inaktivierten) viralen Verbindungsregion und der zweiten, modifizierten viralen Verbindungsregion positioniert. Kurz gesagt signalisieren retrovirale Verpackungssequenzen die Verpackung eines RNA-Genoms in einen retroviralen Partikel. Wie unten ausführlicher beschrieben, kann die retrovirale Verpackungssequenz verwendet werden, um einen Alphavirus-Vektor in einen retroviralen Partikel unter Verwendung einer retroviralen Verpackungszelllinie zu verpacken. Dies wird ausgeführt, um die Effizienz des Alphavirus-Vektortransfers in eine Alphavirus-Verpackungszelllinie zu steigern.

6. Expression verschiedener heterologer Gene

[0083] Die genomische Länge und subgenomische Länge der mRNAs, welche in Wildtyp-Alphavirus-infizierten Zellen transkribiert werden, sind polycistronisch, kodierend für die vier viralen Nicht-Struktur-Proteine (NSPs) und vier Struktur-Proteine (SPs). Die genomischen und subgenomischen mRNAs werden als Polyproteine translatiert, und die Prozessierung in die individuellen Nicht-Struktur und Struktur-Proteine wird durch posttranslationale proteolytische Spaltung, katalysiert durch Virus-kodierte NSP- und SP-spezifische Proteasen, erreicht.

[0084] In bestimmten Anwendungen des hierin beschriebenen Alphavirusvektors ist die Expression von mehr als einem heterologen Gen erwünscht. Um beispielsweise metabolische Krankheiten, wie das Gaucher's Syndrom, zu behandeln, können mehrfache Verabreichungen von Alphavirus-Vektoren oder -Partikeln benötigt werden, weil die Lebensdauer des therapeutischen Palliativum begrenzt sein kann. Deshalb kann es bei bestimmten Ausführungsformen der Erfindung erwünscht sein, in einer Zielzelle das Ad2 E3-Gen (siehe Beispiel 4) neben einem therapeutischen Palliativum, wie das Glukocerbroidase-Gen (siehe Beispiel 11), kozyexpressieren. Im Wildtyp-Virus wird jedoch die polycistronische Botschaft des Strukturproteins („SP“) in ein einzelnes Polyprotein translatiert, welches anschließend in individuelle Proteine durch Spaltung mit SP-kodierten Proteasen prozessiert wird. Somit benötigt die Expression von verschiedenen heterologen Genen aus einer polycistronischen Botschaft einen vom Wildtyp-Virus unterschiedlichen Mechanismus, da das SP-Proteasegen oder die Peptide, welche bei der Spaltung erkannt werden, nicht in der Ersetzungsregion des Alphavirus-Vektors vorliegen.

[0085] Deshalb können in einer Ausführungsform der Erfindung Alphavirus-Vektoren durch Anordnen von geeigneten Signalen zwischen den Cistronen entweder des Ribosomen-Hindurchlesens oder des internen Ribosomen-Eintritts konstruiert werden. Ein solches typisches Verfahren zur Expression verschiedener heterologer Gene ist unten in Beispiel 5 dargestellt.

[0086] In noch einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird das Anordnen von Signalen, welche entweder das Ribosomen-Hindurchlesen oder den internen Ribosomeneintritt direkt stromabwärts zu der funktionsunfähigen Vektorverbindungsregion bzw. Vektorverbindungsregion mit verminderter Funktion pKSSINBV-dIJR fördern, beschrieben (siehe Beispiel 3). In dieser Vektorkonfiguration kann die Synthese von subgenomischer Botschaft nicht stattfinden; die heterologen Proteine werden jedoch von genomisch langer mRNA entweder durch ribosomales Durchlesen (Scannen) oder internen Ribosomeneintritt exprimiert. Relativ zum Wildtyp würde der niedrige Spiegel der viralen Transkription mit diesem Alphavirus-Vektor das Leben der infizierten Targetzelle verlängern.

[0087] In einer noch anderen Ausführungsform der Erfindung wird das Anordnen von Signalen, welche entweder das Ribosomen-Hindurchlesen oder den internen Ribosomen-Eintritt fördern, direkt stromabwärts zu den pKSSDINBVdIJRsjr- oder pKSSINBV-Vektoren beschrieben. Kurz gesagt, weil die Synthese der subgenomischen mRNA in Zellen stattfindet, welche mit pKSSINBVdIJRsjr und pKSSINBV-Vektoren infiziert sind, erlaubt das Anordnen von entweder einer Ribosomen-Hindurchlesen-Sequenz oder einer internen Ribosomen-Eintritts-Sequenz zwischen die zwei heterologen Genen die Translation von beiden Proteinen, welche durch die subgenomische mRNA-polycistronische Botschaft kodiert werden. Weiter können zusätzliche heterologe Gene in der subgenomischen mRNA-Region angeordnet werden, vorausgesetzt, daß ein geeignetes Translations-Initiationssignal am 5'-Ende des translationalen AUG-Startcodons liegt. Die Zahl der heterologen Gen(e), welche, wie hier beschrieben, in die subgenomische mRNA-Region inseriert werden können, wird nur durch die Verpackungsbeschränkung des Vektors begrenzt.

[0088] Verschiedene Sequenzen, welche entweder das Ribosomen-Hindurchlesen, Capunabhängige Translation oder internen Ribosomeneintritt erlauben, können in Sindbis-Vektoren pKSSINBVdIJR, pKSSINBV oder pKSSINBVdIJRsjr in die, wie oben diskutierten, Konfigurationen angeordnet werden. Die Quelle für diese translationalen Kontrollsequenzen sind die Picornaviren, Polio und EMCV, die 5'-nicht-kodierende Region des humanen Immunglobulin-schwere-Ketten-bindenden Proteins und eine synthetische Sequenz von mindestens 15 Basenpaaren, welche zum Teil mit der Kozak-Konsensussequenz für effiziente Translationsinitiation korrespondiert. Obwohl hier nicht im Detail beschrieben, können diese Signale, welche die Translationsinitiation beeinflussen, ebenso stromabwärts zu der Verbindungsregion und zwischen heterologen Genen in allen modifizierten Verbindungsregion-Vektoren, wie in Beispiel 3 beschrieben, angeordnet werden.

7. Alphavirus-cDNA-Vektorkonstrukte

[0089] Wie oben angemerkt, stellt die vorliegende Erfindung auch Alphavirus-cDNA-Vektorkonstrukte bereit. Beispielsweise werden in einem Aspekt der Erfindung Alphavirus-cDNA-Vektorkonstrukte bereit gestellt, welche einen 5'-Promotor, welcher zur Initiation der Synthese von viraler RNA von cDNA befähigt ist, gefolgt durch eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Alphavirus befähigt ist, eine Nukleotidsequenz, welche Alphavirus-Nicht-Struktur-Proteine kodiert, eine virale Verbindungsregion, welche entweder aktiv ist oder welche inaktiviert worden ist, so daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments verhindert ist, eine Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz und eine 3'-Sequenz, welche die Transkriptionsterminierung kontrolliert, umfassen. In verschiedenen Ausführungsformen kann die virale Verbindungsregion modifiziert werden, so daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments eher nur reduziert als inaktiviert ist. In anderen Ausführungsformen kann eine zweite virale Verbindungsregion, welche der ersten inaktivierten viralen Verbindungsregion folgt, inseriert werden, wobei die zweite virale Verbindungsregion modifiziert ist, so daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments reduziert ist.

[0090] Verschiedene Aspekte der Alphavirus-cDNA-Konstrukte sind oben diskutiert worden, einschließlich der 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Alphavirus befähigt ist, die Nukleotidsequenz, welche Alphavirus-Nicht-Strukturproteine kodiert, die virale Verbindungsregion, welche inaktiviert worden ist, so daß die virale Transkription des subgenomischen Fragments verhindert ist, und die Alphavirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz. Zusätzlich sind oben auch modifizierte Verbindungsregionen und Tandem-Verbindungsregionen diskutiert worden. Alphavirus-cDNA-Vektorkonstrukte unterscheiden sich jedoch durch das Hinzufügen eines 5'-Promotors, welcher zur Initiation der viralen RNA-Synthese von cDNA befähigt ist. Typische Beispiele von geeigneten Promotoren schließen den lac-Promotor, Metallthion-Promotor, CMV-Promotor und Hitzeschock-Promotor ein.

[0091] Wie oben anmerkt, schließt das Alphavirus-cDNA-Vektorkonstrukt ebenso eine 3'-Sequenz ein, welche die Transkriptionstermination kontrolliert. Ein typisches Beispiel einer solchen Sequenz ist unten in Beispiel 2 detaillierter dargestellt.

8. Gewebespezifische Expression

[0092] Innerhalb eines anderen Aspekts der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-Vektorkonstrukte bereit gestellt, welche zur Expression einer gewünschten heterologen Sequenz nur in einem ausgewählten Gewebe befähigt sind. Ein solches typisches Beispiel wird in **Fig. 11** gezeigt. Kurz gesagt, wie in **Fig. 11A** gezeigt, wird ein rekombinanter Alphavirus-Vektor derart konstruiert, daß nach Einführung des Vektors (**Fig. 11A**) in die Targetzelle interne invertierte Wiederholungssequenzen, welche die transkriptionalen Kontrollregionen (z. B. modifizierte Verbindungsregion) begrenzen, sich entwinden (siehe **Fig. 11B**), wodurch die virale Transkription der subgenomischen Sequenzen („G. O. I.“) von der synthetischen Verbindungsregion verhindert wird.

[0093] Andererseits kann die Aktivierung des Vektors erreicht werden, wenn die invertierten Wiederholungen entworfen sind, auch an eine spezifische RNA-Sequenz zu hybridisieren, welche charakteristisch für ein ausgewähltes Gewebe oder Zelltyp ist. So eine zelluläre RNA unterbricht die funktionsunfähige Stammschleifenstruktur bzw. Stammschleifenstruktur mit verminderter Funktion, wodurch die Bildung einer mehr stabileren sekundären Stammschleifenstruktur (**Fig. 11C und 11D**) erlaubt wird. Diese sekundäre Stammschleifenstruktur erlaubt die Transkription der subgenomischen Botschaft durch Anordnen der Verbindungsregion hinter ihre korrekte Positionskonfiguration.

[0094] Alphavirus-Vektoren mit voller Länge können auch unter Verwendung der sekundären Stammschleifenstruktur, unter Vorteilsnahme der Fähigkeit der viralen Polymerase Matrizen zu wechseln, während der Synthese des Negativstranges, unter Verwendung von einem Stranghoppingmechanismus, welcher als Kopienwahl bzw. "copy choice" (King, RNA genetics II, CRC Press, Inc., Boca Raton Fla., Domingo et al. (Editors), Seiten 150–185, 1988) bezeichnet wird, transkribiert werden. Wenn eine einzelne erfolgreiche Runde der Transkription stattgefunden hat, enthält das resultierende RNA-Transkript keine invertierten Wiederholungen, weil sie als ein Ergebnis des Polymerase-"copy choice"-Ereignisses deletiert sind. Dieses neu synthetisierte RNA-Molekül fungiert jetzt als primäres RNA-Vektortranskript, welches wie jeder andere, vorher beschriebene, funktionsunfähige genomische Alphavirus-Vektor bzw. genomischer Alphavirus-Vektor mit verminderter Funktion transkribiert und exprimiert wird. In dieser RNA-Vektorkonfiguration kann gewebe- oder zellspezifische Aktivierung des funktionsunfähigen Sindbis-Vektors bzw. Sindbis-Vektors mit verminderter Funktion erreicht werden, wenn spezifische RNA-Sequenzen, welche nur in der Targetzelle oder den Gewebetypen vorliegen, für den Entwurf der invertierten Wiederholungen verwendet werden. Auf diese Weise können Alphaviren, wie Sindbis, unter Verwendung ähnlicher invertierter, wie oben beschriebene, Sequenzen konstruiert werden, gewebespezifische Expressionsvektoren zu sein.

[0095] Die Verwendung dieses Vektorsystems, um gewebespezifische Expression zu erreichen, ermöglicht es, einen therapeutischen Alphavirus-Vektor oder -Partikel systemisch in einem Patienten zu verteilen. Wenn der Vektor eine Zelle infizieren sollte, welche nicht die geeigneten RNA-Spezies exprimiert, ist der Vektor nur zur Expression von Nicht-Strukturproteinen und nicht der Gene von Interesse befähigt. Eventuell wird der Vektor ungefährlich degradiert werden.

[0096] Die Verwendung der oben beschriebenen Vektoren ermöglicht tatsächlich die gewebespezifische Expression für eine Vielzahl von möglichen therapeutischen Anwendungen, einschließlich zum Beispiel Zielorientierung der Vektoren zur Behandlung von verschiedenen Typen von Krebs. Dieses Grundprinzip beruht auf der spezifischen Expression von tumorspezifischen Markern, wie das karcinoembryogene Tumor-spezifische Antigen (CEA) und der Alpha-Fetoprotein-Tumormarker. Kurz gesagt, die Verwendung solcher Tumor-spezifischer RNA, um spezifische Tumoren zu treffen, erlaubt die, unten diskutierte, Tumor-spezifische Expression von toxischen Molekülen, Lymphokinen oder Arzneimittelvorstufen. Solche Verfahren können für eine breite Vielzahl von Tumoren, einschließlich zum Beispiel Darm-, Lungen-, Brust-, Eierstock-, Blasen- und Prostatakrebs, verwendet werden, weil all diese Tumoren CEA exprimieren. Eine typische Beschreibung dieser Vektoren, welche zur Verwendung in diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung geeignet sind, wird unten in Beispiel 15 ausführlicher dargestellt.

[0097] Kurz gesagt, war CEA einer der ersten Tumor-spezifischen Marker, der zusammen mit dem Alpha-Fetoproteinmarker beschrieben wurde. CEA ist ein normales Glykoprotein im Embryogewebe der Eingeweide, Pankreas und Leber während der ersten zwei Trimester der fötalen Entwicklung (Pathologic Basis of Disease, 3. Auflage 1984, Robbins et al., Autor). Bis vor kurzem wurde angenommen, daß CEA spezifisch für Adenokarzinome des Darms ist. Mit der darauffolgenden Entwicklung von sensitiveren Radioimmuno-Untersuchungen wurde jedoch deutlich, daß CEA im Plasma von vielen endodermal abgeleiteten Krebsen, insbesondere pankreatische, gastritische und bronchogene, vorliegt.

[0098] In den verwandten Aspekten der vorliegenden Erfindung können Alphaviruszellspezifische Expressionsvektoren konstruiert werden, um virale Antigene, Ribozyme, Antisense-Sequenzen oder immunstimulierende Faktoren wie gamma-Interferon (γ -IFN) oder IL-2 zur zielorientierten Behandlung von Virus-infizierten Zelltypen zu exprimieren. Insbesondere, um Alphavirus-Vektoren auf fremde Organismen oder pathogen-infizierte Zellen zu richten, können invertierte Wiederholungen des Alphavirus-Vektors ausgewählt werden, um an jede Pathogenspezifische RNA, zum Beispiel Zielzellen, welche mit Pathogenen wie HIV, CMV, HBV, HPV und HSV infiziert sind, zu hybridisieren.

[0099] In einem noch anderen Aspekt der Erfindung können spezifische Organgewebe für die Behandlung von gewebespezifischen metabolischen Krankheiten unter Verwendung von Gensatztherapien getroffen

werden. Beispielsweise ist die Leber ein wichtiges Zielgewebe, weil sie für viele metabolische Körperfunktionen verantwortlich ist und mit vielen metabolischen genetischen Krankheiten assoziiert ist. Solche Krankheiten umfassen viele Glykogen-Speicherkrankheiten, Phenylketonurie, Gaucher's Krankheit und familiäre Hypercholesterinämie. Gegenwärtig gibt es viele leberspezifische Enzyme und Marker, welche sequenziert worden sind, welche verwendet werden können, um angemessene invertierte Wiederholungen der alphaviralen Vektoren zu konstruieren. Solche leberspezifischen cDNAs schließen Sequenzen ein, welche kodieren: S-Adenosylmethioninsynthetase (Horikawa et al., Biochem. Int. 25: 81, 1991), Lecithin: Cholesterinacyltransferase (Rogne et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 148: 161, 1987); ebenso wie andere leberspezifische cDNAs (Chin et al., Ann. N. Y. Acad. Sci. 478: 120, 1986). Solche leberspezifischen Alphavirus-Vektoren können verwendet werden, um Low Density- bzw. Niedrigdichte-Lipoproteinrezeptoren (Yamamoto et al., Cell 39: 27, 1984) auf Leberzellen zur Behandlung von familiärer Hypercholesterolemie (Wilson et al., Mol. Biol. Med. 7: 223, 1990) zu übertragen.

E. HETEROLOGE SEQUENZEN

[0100] Wie oben anmerkt, können eine große Vielzahl von Nukleotidsequenzen durch die Alphavirus-Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung getragen werden. Vorzugsweise sollten die Nukleotidsequenzen eine Größe aufweisen, welche ausreicht, um die Produktion von lebensfähigem Virus zu erlauben. Innerhalb des Zusammenhanges der vorliegenden Erfindung wird die Herstellung jedes meßbaren Titors von infektiösem Virus auf empfänglichen Monolayern als „Herstellung von lebensfähigem Virus“ betrachtet. Dies kann als ein Minimum ein Alphavirus-Vektorkonstrukt sein, welches keine zusätzliche heterologe Sequenz enthält. In anderen Ausführungsformen kann das Vektorkonstrukt jedoch zusätzlich heterologe oder fremde Sequenzen enthalten. In den bevorzugten Ausführungsformen umfaßt die heterologe Sequenz eine heterologe Sequenz von mindestens etwa 100 Basen, 2 kb, 3,5 kb, 5 kb, 7 kb oder sogar eine heterologe Sequenz von mindestens über 8 kb.

[0101] Wie es für einen Fachmann mit der hierin bereit gestellten Offenbarung offensichtlich sein wird, ist die Effizienz der Verpackung und daher der Virustiter bis zu einem gewissen Ausmaß von der Größe der Sequenz, die verpackt wird, abhängig. Daher können, um die Effizienz der Verpackung und die Herstellung von lebensfähigem Virus zu vergrößern, zusätzliche nicht-kodierende Sequenzen zu dem Vektorkonstrukt hinzugefügt werden. Darüber hinaus kann es in bestimmten Ausführungsformen der Erfindung erwünscht sein, den Virustiter zu steigern oder zu verringern. Diese Steigerung oder Verringerung kann durch Vergrößern oder Verringern der Größe der heterologen Sequenz, und daher der Effizienz der Verpackung, erreicht werden.

[0102] Eine große Vielzahl von heterologen Sequenzen kann in das Vektorkonstrukt, einschließlich zum Beispiel Sequenzen, welche Palliativa, wie Lymphokine, Toxine, Arzneimittelvorstufen, Antigene, welche eine Immunantwort stimulieren, Ribozyme und Proteine, welche eine Immunantwort fördern oder hemmen, kodieren, ebenso wie Antisense-Sequenzen (oder Sense-Sequenzen für „Antisense“-Anwendungen), eingefügt werden. Wie oben angemerkt, können in den verschiedenen Ausführungsformen der Erfindung die hierin bereit gestellten Alphavirus-Vektorkonstrukte zwei oder mehrere heterologe Sequenzen enthalten (und in bestimmten Ausführungsformen exprimieren).

1. Lymphokine

[0103] In einer Ausführungsform der Erfindung kodiert die heterologe Sequenz ein Lymphokin. Kurz gesagt, wirken Lymphokine, um Immuneffektorzellen zu vermehren, zu aktivieren oder zu differenzieren. Typische Beispiele von Lymphokinen schließen gamma-Interferon, Tumornekrose Faktor, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, GM-CSF, CSF-1 und G-CSF ein.

[0104] In verwandten Ausführungsformen der Erfindung kodiert die heterologe Sequenz einen immunmodulierenden Cofaktor. Kurz gesagt, wie innerhalb des Zusammenhanges der vorliegenden Erfindung verwendet, bezieht sich „immunmodulierender Cofaktor“ auf Faktoren, welche, wenn sie durch eine oder mehrere der Zellen hergestellt werden, welche an einer Immunantwort teilnehmen, oder wenn sie exogen zu den Zellen hinzugefügt werden, eine Immunantwort verursachen, welche unterschiedlich in Qualität oder Stärke von der, welche in Abwesenheit des Cofaktors stattfinden würde, ist. Die Qualität oder Stärke der Antwort kann durch eine Vielzahl von Tests gemessen werden, welche jemandem mit Stand der Technik bekannt sind, einschließlich zum Beispiel in vitro-Tests, welche die zelluläre Proliferation messen (z. B. ³H-Thymidin-Aufnahme) und in vitro-zytotoxische Tests (welche z. B. ⁵¹Cr-Freisetzung messen) (siehe Warner et al., AIDS Res. And Human Retroviruses 7: 645-655, 1991).

[0105] Typische Beispiele der immunmodulierenden Cofaktoren schließen ein: alpha-Interferon (Finter et al.,

Drugs 42(5): 749–765, 1991; U.S. Patent Nr. 4,892,743; U.S. Patent Nr. 4,966,843; WO 85/02862; Nagata et al., Nature 284: 316–320, 1980; Familetti et al., Methods in Enz. 78: 387–394, 1981; Twu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2046–2050, 1989; Faktor et al., Onkogene 5: 867–872, 1990), beta-Interferon (Seif et al., J. Virol. 65: 664–671, 1991), gamma-Interferone (Radford et al., American Society of Hepatology: 2008–2015, 1991; Watanabe et al., PNAS 86: 9456–9460, 1989; Gansbacher et al., Cancer Research 50: 7820–7825, 1990; Maio et al., Can. Immunol. Immunother. 30: 34–42, 1989; U.S. Patent Nummern 4,762,791 und 4,727,138), G-CSF (U.S. Patent Nummern 4,999,291 und 4,810,643), GM-CSF (WO 85/04188), TNFs (Jayaraman et al., J. Immunology 144: 942–951, 1990), Interleukin-2 (IL-2) (Karupiah et al., J. Immunology 144: 290–298, 1990; Weber et al., J. Exp. Med. 166: 1716–1733, 1987; Gansbacher et al., J. Exp. Med. 172: 1217–1224, 1990; U.S. Patent Nr. 4,738,927), IL-4 (Tepper et al., Cell 57: 503–512, 1989; Golumbek et al., Science 254: 713–716, 1991; U.S. Patent Nr. 5,017,691), IL-6 (Brakenhof et al., J. Immunol. 139: 4116–4121, 1987; WO 90/06370), IL-12, IL-15, ICAM-1 (Altman et al., Nature 338: 512–514, 1989), ICAM-2, LFA-1, LFA-3, MHC Klasse 1 Moleküle, MHC Klasse 2 Moleküle, β_2 -Microglobulin, Chaperone, CD3, B7/BB1, MHC-verknüpfte Transporterproteine oder deren Analoge.

[0106] Die Wahl, welchen immunmodulierenden Cofaktor innerhalb des Alphavirus-Vektorkonstruktes zu enthalten, kann auf bekannten therapeutischen Effekten dieses Cofaktors basieren oder experimentell bestimmt werden. Beispielsweise ist in chronischen Hepatitis-B-Infektionen alpha-Interferon gefunden worden, welches sehr effektiv in der Kompensation eines immunologischen Defizits eines Patienten sein soll und hierdurch die Genesung von der Krankheit fördern soll. Alternativ kann ein geeigneter immunmodulierender Cofaktor experimentell bestimmt werden. Kurz gesagt, werden zuerst Blutproben aus Patienten mit einer Hepatitiskrankheit entnommen. Periphere Blutlymphocyten (PBLs) werden in vitro mit autologen oder zu HLA-passenden Zellen (z. B. EBV-transformierte Zellen) restimuliert und mit einem Alphavirus-Vektorkonstrukt transduziert, welches zur Expression eines immunogenen Teils eines Hepatitis-Antigens und des immunmodulierenden Cofaktors führt. Stimulierte PBLs werden als Effektoren in einem CTL-Assay mit HLA-passenden, transduzierten Zellen als Ziele verwendet. Eine Steigerung der CTL-Antwort, welche in demselben Assay, ausgeführt unter Verwendung eines HLA-passenden Stimulators und Zielzellen, welche mit einem Vektor transduziert sind, welcher das Antigen allein kodiert, gesehen wird, weist auf einen nützlichen immunmodulierenden Cofaktor hin. In einer Ausführungsform der Erfindung ist der immunmodulierende Cofaktor gamma-Interferon besonders bevorzugt.

[0107] Ein anderes Beispiel für einen immunmodulierenden Cofaktor ist der B7/BB1 costimulierende Faktor. Kurz gesagt, benötigt die Aktivierung der vollen funktionellen Aktivität der T-Zellen zwei Signale. Ein Signal wird durch die Interaktion des Antigen-spezifischen T-Zell-Rezeptors mit Peptiden, welche an Haupthistokompatibilitätskomplex-(MHC)-Moleküle gebunden sind, bereit gestellt, und das zweite Signal wird, bezogen auf die Costimulation, auf die T-Zellen durch Antigen-präsentierende Zellen übertragen. Kurz gesagt, das zweite Signal wird für die Interleukin-2 (IL-2)-Herstellung durch T-Zellen benötigt und scheint in die Wechselwirkung von B7/BB1-Molekülen auf Antigen-präsentierende Zellen mit CD28- und CTLA-4-Rezeptoren auf T-Lymphocyten involviert zu sein (Linsley et al., J. Exp. Med., 173: 721–730, 1991a und J. Exp. Med., 174: 561–570, 1991). In einer Ausführungsform der Erfindung kann B7/BB1 in die Tumorzellen eingeführt werden, um eine Costimulation von CD8⁺-T-Zellen zu verursachen, so daß die CD8⁺-T-Zellen genug IL-2 herstellen, um zu expandieren und voll aktiviert zu werden. Diese CD8⁺-T-Zellen können Tumorzellen töten, welche kein B7 exprimieren, da die Costimulation nicht länger für die weitere CTL-Funktion benötigt wird. Vektoren, welche sowohl den costimulierenden B7/BB1-Faktor als auch zum Beispiel ein immunogenes HBV-Kernprotein exprimieren, können unter Verwendung von Verfahren, welche hierin beschrieben sind, hergestellt werden. Zellen, welche mit diesen Vektoren transduziert sind, werden noch effektivere Antigen-präsentierende Zellen sein. Die HBV-kernspezifische CTL-Antwort wird durch die voll aktivierten CD8⁺-T-Zellen über den costimulierenden Liganden B7/BB1 verstärkt werden.

2. Toxine

[0108] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung kodiert die heterologe Sequenz ein Toxin. Kurz gesagt, wirken Toxine, um direkt das Zellwachstum zu hemmen. Typische Beispiele von Toxinen schließen ein: Ricin (Lamb et al., Eur. J. Biochem. 148: 265–270, 1985); Abrin (Wood et al., Eur. J. Biochem. 198: 723–732, 1991; Evenson et al., J. of Biol. Chem. 266: 6848–6852, 1991; Collins et al., J. of Biol. Chem. 265: 8665–8669, 1990; Chen et al., Fed. of Eur. Biochem. Soc. 309: 115–118, 1992); Diphteritoxin (Tweten et al., J. Biol. Chem. 260: 10392–10394, 1985), Cholera-toxin (Mekalanos et al., Nature 306: 551–557, 1983; Sanchez und Holmgren, PNAS 86: 481–485, 1989), Gelonin (Stirpe et al., J. Biol. Chem. 255: 6947–6953, 1980), Pokeweed (Irwin, Pharmac. Ther. 21: 371–387, 1983), antivirales Protein (Barbieri et al., Biochem. J. 203: 55–59, 1982; Irvin et al., Arch. Biochem. & Biophys. 200: 418–425, 1980; Irvin, Arch. Biochem. & Biophys. 169: 522–528, 1975), Tritin, Shigella Toxin (Calderwood et al. PNAS 84: 4364–4368, 1987; Jackson et al., Microb. Path. 2: 147–153,

1987), Pseudomonas Exotoxin A (Carroll und Collier, J. Biol. Chem. 262: 8707–8711, 1987), Herpes-Simplex-Virus-Thymidinkinase (HSVTK) (Field et al., J. Gen. Virol. 49: 115–124, 1980) und E. coli. Guaninphosphoribosyl-Transferase.

3. Arzneimittelvorstufen bzw. Prodrugs

[0109] In anderen Ausführungsformen der Erfindung kodiert die heterologe Sequenz eine „Prodrug“. Kurz gesagt, wie innerhalb des Zusammenhangs der vorliegenden Erfindung verwendet, bezieht sich „Arzneimittelvorstufe“ auf ein Genprodukt, welches eine Verbindung mit geringer oder keiner Zytotoxizität in ein toxisches Produkt aktiviert. Typische Beispiele solcher Genprodukte schließen HSVTK und VZVTK ein, welche selektiv bestimmte Purin-Arabinoside und substituierte Pyrimidinverbindungen monophosphorylieren, wobei diese in zytotoxische oder zytostatische Metaboliten überführt werden. Noch spezifischer phosphoryliert die Exposition der Arzneimittel Ganciclovir, Acyclovir oder jeder ihrer Analoge (z. B. FIAU, FIAC, DHPG) gegenüber HSVTK das Arzneimittel in seine korrespondierende aktive Nukleotidtriphosphat-Form.

[0110] Typische Beispiele von anderen Arzneimittelvorstufen, welche innerhalb des Zusammenhangs der vorliegenden Erfindung verwendet werden können, schließen ein: E. coli-Guaninphosphoribosyl-Transferase, welche Thioxanthin in das toxische Thioxanthin-Monophosphat umwandelt (Besnard et al., Mol. Cell. Biol. 7: 4139–4141, 1987); alkalische Phosphatase, welche inaktive phosphorylierte Verbindungen, wie Mitomycin-Phosphat und Doxorubicin-Phosphat, in toxische dephosphorylierte Verbindungen umwandelt, fungale (z. B. Fusarium oxysporum) oder bakterielle Cytosin-Desaminase, welche 5-Fluorcytosin in die toxische Verbindung 5-Fluoruracil umwandelt (Mullen, PNAS 89: 33, 1992); Carboxypeptidase G2, welche Glutaminsäure von para-N-bis-(2-Chloroethyl)-Aminobenzoylglutaminsäure abspaltet, wodurch ein toxischer Benzoessäuresenf (engl. "benzoic acid mustard" erzeugt wird; und Penicillin-V-Amidase, welche Phenoxyacetamid-Derivate von Doxorubicin und Melphalan in toxische Verbindungen umwandelt (siehe allgemein, Vruthula et al., J. of Med. Chem. 36(7): 919–923, 1993; Kern et al., Canc. Immun. Immunther. 31(4): 202–206, 1990).

4. Antisense-Sequenzen

[0111] In einer anderen Ausführungsform der Erfindung ist die heterologe Sequenz eine antisense-Sequenz. Kurz gefaßt sind die antisense-Sequenzen so gestaltet, daß sie an RNA-Transkripte binden und dabei die zelluläre Synthese eines bestimmten Proteins verhindern oder die Verwendung dieser RNA-Sequenz durch die Zelle verhindern. Repräsentative Beispiele solcher Sequenzen enthalten die antisense-Thymidinkinase, die antisense-Dihydrofolatreduktase (Maher und Dolnick, Arch. Biochem. & Biophys. 253: 214–220, 1987, Bzik et al., PNAS 84: 8360–8364, 1987), antisense HER2 (Coussens et al., Science 230: 1132–1139, 1985), antisense ABL (Fainstein et al., Oncogene 4: 477–1481, 1989), antisense myc (Stanton et al., Nature 310: 423–425, 1984) und antisense ras, wie auch antisense-Sequenzen, welche jedes der Enzyme im Nukleotid-Biosyntheseweg blockieren. Zusätzlich können in anderen Ausführungsformen der Erfindung antisense-Sequenzen für γ -Interferon und β -2-Mikroglobulin zum Verringern einer Immunantwort verwendet werden.

[0112] Zusätzlich kann in einer weiteren Ausführungsform der Erfindung antisense-RNA als Antitumormittel zum Induzieren einer möglichen auf Klasse I beschränkten Antwort verwendet werden. Kurz gefaßt wird angenommen, daß hohe Grade an spezifischen antisense-Sequenzen zusätzlich zum Binden von RNA und dadurch Verhindern der Translation einer spezifischen mRNA eine erhöhte Expression von Interferonen (einschließlich γ -Interferon) aufgrund der Bildung großer Mengen doppelsträngiger RNA induzieren. Die erhöhte Expression von γ -Interferon hingegen fördert die Expression von MHC Klasse I-Antigenen. Bevorzugte antisense-Sequenzen zur Verwendung in diesem Sinne enthalten Actin-RNA, Myosin-RNA und Histon-RNA. Antisense-RNA, welche einen Mismatch mit Actin-RNA bildet, wird besonders bevorzugt.

5. Ribozyme

[0113] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-Vektoren bereitgestellt, welche bei der Infektion einer Wirtszelle Ribozyme bilden. Kurz gefaßt werden Ribozyme zum Spalten spezifischer RNAs verwendet und sie werden so entworfen, daß sie nur eine spezifische RNA betreffen. Im allgemeinen ist die Substratbindungssequenz eines Ribozyms zwischen 10 und 20 Nukleotiden lang. Die Länge dieser Sequenz ist für das Ermöglichen einer Hybridisierung mit der Ziel-RNA und einer Dissoziation des Ribozyms von der gespaltenen RNA ausreichend. Repräsentative Beispiele für das Erzeugen von Ribozymen schließen die im US Patent Nr. 5,116,742, 5,225,337 und 5,246,921 beschriebenen ein. Besonders bevorzugte Ribozyme zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung schließen die nachstehend detailliert in den Beispielen offenbarten (beispielsweise Beispiel 18) ein.

6. Proteine und andere zelluläre Bestandteile

[0114] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung kann eine große Vielzahl von Proteinen oder anderen zellulären Bestandteilen von dem Alphavirus-Vektorkonstrukt getragen werden. Repräsentative Beispiele für solche Proteine schließen native oder veränderte zelluläre Bestandteile, wie auch fremde Proteine oder zelluläre Bestandteile, die beispielsweise in Viren, Bakterien, Parasiten oder einem Pilz gefunden werden, ein.

(a) Veränderte zelluläre Komponenten

[0115] In einer Ausführungsform werden Alphavirus-Vektorkonstrukte bereitgestellt, welche die Expression einer immunogenen nicht-karzinogenen veränderten zellulären Komponente lenken. Der Begriff „immunogen“ wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf veränderte zelluläre Komponenten, welche unter geeigneten Bedingungen befähigt sind, eine Immunantwort zu verursachen. Diese Antwort muß zellvermittelt sein und darf auch eine humorale Antwort enthalten. Der Begriff „nicht-karzinogen“ bezieht sich auf veränderte zelluläre Komponenten, welche keine zelluläre Transformation oder eine induzierte Tumorbildung in Nacktmäusen verursachen werden. Der Begriff „veränderte zelluläre Komponente“ bezieht sich auf Proteine und andere zelluläre Bestandteile, welche entweder damit verbunden werden, daß sie die Zellen karzinogen machen, oder mit karzinogenen Zellen im Allgemeinen verbunden werden, jedoch nicht notwendig oder wesentlich sind, um eine Zelle karzinogen zu machen.

[0116] Vor dem Verändern können die zellulären Komponenten wesentlich für das normale Zellwachstum und die Regulation sein und sie können beispielsweise Proteine, welche die intrazelluläre Proteindegradation, die transkriptionelle Regulation, die Zellzykluskontrolle und die Zell-Zell-Interaktionen regulieren, einschließen. Nach der Veränderung führen die zellulären Komponenten nicht länger ihre regulierenden Funktionen durch und folglich kann die Zelle unkontrolliertes Wachstum erfahren. Repräsentative Beispiele für veränderte zelluläre Komponenten schließen ras*, p53*, Rb*, verändertes, von dem Wilms-Tumoren kodiertes Protein, Ubiquitin*, Mucin*, von den DCC-, APC- und MCC-Genen kodiertes Protein, das Brustkrebsgen BRCA1*, wie auch Rezeptoren oder Rezeptor-ähnliche Strukturen, wie neu, Thyroid-Hormonrezeptor, der Rezeptor für den platelet derived growth factor (PDGF), Insulinrezeptor, den Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor (epidermal growth factor, EGF) und den Rezeptor für den Kolonie-stimulierenden Faktor (colony stimulating factor, CSF) ein.

[0117] In einer Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-Vektorkonstrukte bereitgestellt, welche die Expression des nicht-karzinogenen, veränderten ras (ras*)-Gens lenken. Kurz gefaßt ist das ras*-Gen ein attraktives Ziel, da es ursächlich mit dem neoplastischen Phänotyp verknüpft ist und tatsächlich für die Induktion und Erhaltung der Karzinogenität in einer großen Vielzahl verschiedener Krebsarten, wie dem Pankreaskarzinom, dem Kolonkarzinom und dem Lungen-Adenokarzinom, notwendig sein kann. Zusätzlich werden ras*-Gene in prä-neoplastischen Tumoren gefunden und somit kann eine Immuninterventionstherapie vor der Detektion eines malignen Tumors angewendet werden.

[0118] Normale ras-Gene sind nicht-karzinogen und in allen Säugern überall zu finden. Sie sind in der Evolution hoch konserviert und scheinen eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des Zellzyklus und der normalen Wachstumseigenschaften zu spielen. Das normale ras-Protein ist ein G-Protein, welches GTP bindet und eine GTPase-Aktivität aufweist, und es ist in der Übermittlung von Signalen von dem externen Milieu in das Innere der Zelle involviert, wobei es der Zelle ermöglicht, auf ihre Umwelt zu antworten. Ras*-Gene andererseits verändern die normale Wachstumsregulierung von neoplastischen Zellen durch das Entkoppeln des Verhaltens der Zelle von der Umgebung, somit führen sie zu einer unkontrollierten Proliferation von neoplastischen Zellen. Es wird angenommen, daß Mutationen des ras-Gens ein frühes Ereignis in der Karzinogenese sind (Kumar et al., Science 248: 1101–1104, 1990), welche, wenn sie frühzeitig behandelt werden, Karzinogenität verhindern können.

[0119] Ras*-Gene kommen in einer großen Vielzahl von Krebsarten, einschließlich beispielsweise Pankreas-, Kolon- und Lungenadenokarzinome, vor.

[0120] Das Spektrum der in ras*-Genen vorkommenden Mutationen, die in einer Vielzahl von Krebsarten gefunden wurden, ist ziemlich begrenzt. Diese Mutationen verändern die GTPase-Aktivität des ras-Proteins durch das Umwandeln des normalen AN/AUS-Schalters zu einer konstitutiven AN-Position. Karzinogene Mutationen in ras* kommen primär (in vivo) in nur 3 Kodons vor: 12, 13 und 61. Kodon 12-Mutationen sind die vorherrschenden, sowohl in menschlichen als auch in tierischen Tumoren.

[0121] Die nachstehende Tabelle 1 faßt die bekannten in vivo-Mutationen (Kodons 12, 13 und 61), welche humanes ras aktivieren, wie auch potentielle Mutationen, welche in vitro transformierende Aktivität aufweisen, zusammen. Potentielle Mutationen mit einer in vitro transformierenden Aktivität wurden durch die systematische Substitution von Aminosäuren für das normale Kodon (beispielsweise wurden andere Aminosäuren für das normale Glycin auf Position 12 ersetzt) erzeugt. In vitro-Mutationen, von denen zur Zeit nicht bekannt ist, daß sie in Menschen oder Tieren vorkommen, können als Basis für ein Antikrebs-Immunotherapeutikum dienen, wenn sie eventuell in vivo gefunden werden oder entstehen.

TABELLE 1
Humane ras-Proteine aktivierende Aminosäuresubstitutionen

Amino- säure	Gly	Gly	Ala	Gln	Glu	Asn	Lys	Asp
mutiertes Kodon	12	13	59	61	63	116	117	119
<i>In vivo</i>	Val	Asp		Arg				
	Arg	Val		His				
	Asp	Arg		Leu				
	Cys							
	Ala							
	Ser							
	Phe							
<i>In vitro</i>	Ala	Ser	Thr	Val	Lys	His	Glu	His
	Asn			Ala		Ile	Arg	Glu
	Gln			Cys				Ala
	Glu			Asn				Asn
	His			Ile				
	Ile			Met				
	Leu			Thr				
	Lys			Tyr				
	Met			Trp				
	Phe			Phe				
	Ser			Gly				
	Thr							
	Trp							
	Tyr							

[0122] Die vorstehend beschriebenen Veränderungen entstehen in der Herstellung von Proteinen, die neue kodierende Sequenzen) enthalten. Die neuen Proteine, die von diesen Sequenzen) kodiert werden, können als Marker von karzinogenen Zellen verwendet werden, und eine gegen diese neuen kodierenden Abschnitte gerichtete Immunantwort kann zum Zerstören der die veränderten Sequenzen (ras*) enthaltenden, karzinogenen Zellen verwendet werden.

[0123] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-Vektorkonstrukte bereitgestellt, welche die Expression eines veränderten p53 (p53*)-Gens lenken. Kurz gefaßt ist das p53 ein nukleäres Phosphoprotein, welches ursprünglich in Extrakten von transformierten Zellen entdeckt wurde und somit initial als ein Onkogen klassifiziert wurde (Linzer und Levine, Cell 17: 43–52, 1979, Lane und Crawford, Nature 278: 261–263, 1979). Später wurde entdeckt, daß die ursprünglichen p53-cDNA-Klone mutierte Formen von p53 waren (Hinds et al., J. Virol. 63: 739–746, 1989). Zur Zeit scheint es, daß das p53 ein Tumor-Suppressorgen ist, welches den Zellzyklus negativ reguliert und daß eine Mutation dieses Gens zu einer Tumorbildung führen kann. Bei den untersuchten Kolon-Karzinomen zeigten 75%–80% einen Verlust der beiden p53-Allele. Einen durch Deletion und einen anderen durch Punktmutation. Ähnliche Mutationen wurden in Lungenkrebs und in Gehirn- und Brusttumoren gefunden.

[0124] Die Mehrzahl der p53-Mutationen (beispielsweise p53^{*1}, p53^{*2} etc.) häufen sich zwischen den Aminosäureresten 130 bis 290 (siehe Levine et al., Nature 351: 453–456, 1991, siehe auch die folgenden Referenzen, welche spezifische Mutationen detaillierter beschreiben: Baker et al., Science 244: 217–221, 1989, Nigro et al., Nature 342: 705–708, 1989 (p53-Mutationen häufen sich an vier Stellen („hot spots“), welche mit den vier hoch konservierten Abschnitten dieser Gene übereinstimmen und diese Mutationen werden in humanen Tumoren des Gehirns, der Brust, der Lunge und des Kolons beobachtet), Vogelstein, Nature 348: 681–682, 1990, Takahashi et al., Science 246: 491–494, 1989, Iggo et al., Lancet 335: 675–679, 1990, James et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 2858–2862, 1989, Mackay et al., Lancet 11: 1384–1385, 1988, Kelman et al., Blood 74: 2318–2324, 1989, Malkin et al., Science 250: 1233–1238, 1990, Baker et al., Cancer Res. 50: 7717–7722, 1991, Chiba et al., Oncogene, 5: 1603–1610, 1990 (die Pathogenese eines frühen Stadiums des nicht-kleinzelligen Lungenkrebs wird mit somatischen Mutationen im p53-Gen zwischen den Kodons 132 bis 283 assoziiert), Prosser et al., Oncogene 5: 1573–1579, 1990 (Mutationen im p53-Gen, welche die Aminosäuren 126 bis 224 kodieren, wurden in einem primären Brustkrebs identifiziert), Cheng und Hass, Mol. Cell. Biol. 10: 5502–5509, 1990, Bartek et al., Oncogene 5: 893–899, 1990, Rodrigues et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 7555–7559, 1990, Menon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5435–5439, 1990, Mulligan et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87: 5863–5867, 1990, und Romano et al., Oncogene 4: 1483–1488, 1990 (Identifizierung einer p53-Mutation im Kodon 156 in einer von einem humanen Osteosarkom abgeleiteten Zelllinie HOS-SL)).

[0125] Bestimmte Veränderungen des p53-Gens können durch bestimmte spezifische Toxine verursacht sein. Beispielsweise beschreibt Bressac et al. (Nature 350: 429–431, 1991) spezifische G zu T-Mutationen im Kodon 249 in Patienten, die von einem hepatozellulären Karzinom betroffen sind. Ein vorgeschlagenes verursachendes Mittel für diese Mutation ist Aflatoxin B₁, ein Leberkarzinogen, von dem bekannt ist, daß es eine Lebensmittelkontaminantion in Afrika ist.

[0126] Vier besonders betroffene Abschnitte des Gens kommen bei den Resten 132–145, 171–179, 239–248 und 272–286 vor. Drei Stellen („hot spots“), welche in diesen Abschnitten, die von besonderem Interesse sind, gefunden wurden, kommen an den Resten 175, 248 und 273 (Levine et al., Nature 351: 453–456, 1991) vor. Diese Veränderungen, wie auch andere vorstehend beschriebene, resultieren in der Herstellung von Protein(en), welche neue kodierende Sequenzen enthalten. Die neuen, von diesen Sequenzen kodierten Proteine können als Marker für karzinogene Zellen verwendet werden und eine gegen diese neuen kodierenden Abschnitte gerichtete Immunantwort kann zum Zerstören von karzinogenen, die veränderte Sequenz (p53*) enthaltenen Zellen verwendet werden.

[0127] Sobald eine Sequenz, welche die veränderte zelluläre Komponente kodiert, erhalten wurde, ist es notwendig, sicherzustellen, daß die Sequenz ein nicht-karzinogenes Protein kodiert. Verschiedene Assays, welche die Karzinogenität von einer bestimmten zellulären Komponente abschätzen, sind bekannt und können mühelos durchgeführt werden. Repräsentative Assays schließen einen Ratten-Fibroblastenassay, die Tumorbildung in Nacktmäusen oder Ratten, die Koloniebildung in Weichagar und die Herstellung in transgenen Tieren, wie transgene Mäuse, ein.

[0128] Tumorbildung in Nacktmäusen oder Ratten ist ein besonders wichtiges und sensitives Verfahren zur Bestimmung der Karzinogenität einer bestimmten zellulären Komponente. Nacktmäusen fehlt ein funktionsfähiges zelluläres Immunsystem (d. h. sie besitzen keine CTLs) und sie stellen daher ein brauchbares in vivo-Modell bereit, in dem das karzinogene Potential von Zellen getestet wird. Normale nicht-karzinogene Zellen zeigen keine unkontrollierten Wachstumseigenschaften, wenn sie in Nacktmäuse injiziert werden. Transformierte Zellen jedoch werden in Nacktmäusen rasch proliferieren und Tumore erzeugen. Kurz gefaßt wird in einer Ausführungsform das Alphavirus-Vektorkonstrukt an syngene Mäusezellen verabreicht, gefolgt von der Injektion in Nacktmäuse. Die Mäuse werden für einen Zeitraum von 2 bis 8 Wochen nach der Injektion zum Bestimmen eines Tumorwachstums visuell untersucht. Die Mäuse können auch abgetötet werden und eine Autopsie kann

an ihnen zum Bestimmen, ob Tumore vorliegen, durchgeführt werden (Giovanello et al., J. Natl. Cancer Inst. 48: 1531–1533, 1972, Furesz et al., Abnormal Cells, New Products and Risk, Hopps und Petricciani (Hrsg.), Tissue Culture Association, 1985, und Levenbook et al., J. Biol. Std. 13: 135–141, 1985).

[0129] Karzinogenität kann auch durch das Visualisieren der Koloniebildung in Weichagar abgeschätzt werden (Macpherson und Montagnier, Vir. 23: 291–294, 1964). Kurz gefaßt ist eine Eigenschaft von normalen nicht-karzinogenen Zellen, die „Kontaktinhibierung“ (d. h. die Zellen werden aufhören zu proliferieren, wenn sie benachbarte Zellen berühren). Wenn Zellen in ein halbfestes Agar-Stützmedium ausgesät werden, werden normale Zellen rasch kontaktinhibiert und hören auf zu proliferieren, wohingegen karzinogene Zellen fortfahren zu proliferieren und Kolonien im Weichagar bilden.

[0130] Transgene Tiere, wie transgene Mäuse, können auch zum Beurteilen der Karzinogenität einer veränderten zellulären Komponente verwendet werden (Stewart et al., Cell 38: 627–637, 1984, Quaife et al., Cell 48: 1023–1034, 1987, und Koike et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5616–5619, 1989). In transgenen Tieren kann das Gen von Interesse in allen Geweben des Tieres exprimiert werden. Diese unregulierte Expression des Transgens kann als Modell für das karzinogene Potential des neu eingeführten Gens dienen.

[0131] Wenn die veränderte zelluläre Komponente damit assoziiert wird, daß sie die Zelle karzinogen macht, dann ist es notwendig, die veränderte zelluläre Komponente nicht-karzinogen zu machen. Beispielsweise wird in einer Ausführungsform die Sequenz oder das die veränderte zelluläre Komponente kodierende Gen von Interesse gekürzt, um das Genprodukt nicht-karzinogen zu machen. Das die veränderte zelluläre Komponente kodierende Gen kann auf verschiedene Größen gekürzt werden, obwohl es bevorzugt wird, soviel wie möglich von der veränderten zellulären Komponente zu erhalten. Zusätzlich ist es notwendig, daß jede Verkürzung mindestens einige der immunogenen Sequenzen der veränderten zellulären Komponente intakt lassen. In einer anderen Ausführungsform können mehrere Translations-Terminations-Kodons stromabwärts von dem immunogenen Abschnitt eingefügt werden. Das Einfügen der Terminationskodons wird die Proteinexpression vorzeitig beenden, und somit wird es die Expression des transformierenden Teils des Proteins verhindern.

[0132] In einer Ausführungsform wird das ras*-Gen verkürzt, um das ras*-Protein nicht-karzinogen zu machen. Kurz gefaßt ermöglichen die Carboxy-terminalen Aminosäuren des ras* in funktioneller Hinsicht, daß das Protein an die Zellmembran bindet. Das Verkürzen dieser Sequenzen macht die veränderte zelluläre Komponente nicht-karzinogen. Vorzugsweise wird das ras*-Gen in der Purinring-Bindungsstelle, beispielsweise um die Sequenz, welche die Aminosäure Nummer 110 kodiert, verkürzt. Die ras*-Gensequenz kann so verkürzt werden, daß so wenig wie etwa 20 Aminosäuren (einschließlich der veränderten Aminosäure(n)) von dem Al-phavirus-Vektorkonstrukt kodiert werden, obwohl vorzugsweise so viele Aminosäuren wie möglich exprimiert werden sollten (während die Nicht-Karzinogenität aufrecht erhalten wird).

[0133] In einer anderen Ausführungsform wird das p53*-Protein durch Verkürzung modifiziert, um die zelluläre Komponente nicht-karzinogen zu machen. Wie vorstehend bemerkt, sind nicht alle Mutationen des p53-Proteins karzinogen und somit müßten nicht alle Mutationen verkürzt werden. Dennoch wird in einer bevorzugten Ausführungsform p53* zu einer Sequenz verkürzt, welche die Aminosäuren 100 bis 300 kodieren, und somit enthält sie alle vier Hauptstellen („hot spots“).

[0134] Andere veränderte zelluläre Komponenten, welche krebserregend sind, können auch verkürzt werden, um sie nicht-karzinogen zu machen. Beispielsweise können sowohl neu als auch bcr/abl verkürzt werden, um sie nicht-karzinogen zu machen. Nicht-Karzinogenität kann durch das Testen der verkürzten veränderten zellulären Komponente mit Hilfe eines Assays, wie vorstehend beschrieben, bestätigt werden.

[0135] Es sollte jedoch angemerkt werden, daß, wenn die veränderte zelluläre Komponente im Allgemeinen nur mit nicht-karzinogenen Zellen assoziiert wird und sie nicht notwendig oder wesentlich ist, um die Zelle karzinogen zu machen, dann ist es nicht notwendig, die zelluläre Komponente nicht-karzinogen zu machen. Repräsentative Beispiele von solchen veränderten zellulären Komponenten, welche nicht-karzinogen sind, schließen Rb*, Ubiquitin* und Mucin* ein.

[0136] Wie vorstehend erwähnt, muß die veränderte zelluläre Komponente zum Hervorrufen einer geeigneten Immunantwort auch immunogen sein. Immunogenität einer bestimmten Sequenz ist oft schwierig vorherzusagen, obwohl T-Zell-Epitope häufig eine immunogene amphipathische alpha-Helixkomponente besitzen. Im allgemeinen jedoch wird es bevorzugt, die Immunogenität in einem Assay zu bestimmen. Repräsentative Assays enthalten einen ELISA, welcher die Anwesenheit von Antikörpern gegen einen neu eingeführten Vektor detektieren, sowie Assays, welche auf T-Helferzellen testen, wie γ -Interferon-Assays, IL-2-Herstellungs-Assays.

says und Proliferations-Assays.

[0137] Wie vorstehend erwähnt, können in einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung mehrere verschiedene veränderte zelluläre Komponenten zum Bilden eines allgemeinen Antikrebstherapeutikum koexprimiert werden. Im allgemeinen wird es für den Durchschnittsfachmann offensichtlich sein, daß eine Vielzahl von Kombinationen gemacht werden kann. In bevorzugten Ausführungsformen kann dieses Therapeutikum auf eine bestimmte Krebsart abzielen. Beispielsweise besitzen fast alle Kolonkrebserkrankungen Mutationen in ras-, p53-, DCC-, APC- oder MCC-Genen. Ein Alphavirus-Vektorkonstrukt, welches eine Anzahl dieser veränderten zellulären Komponenten koexprimiert, kann einem Patienten mit Kolonkrebs zum Behandeln von allen möglichen Mutationen verabreicht werden. Diese Methodik kann auch zum Behandeln von anderen Krebserkrankungen verwendet werden. Somit kann ein Alphavirus-Vektorkonstrukt, welches Mucin*, ras*, neu, BRCA1* und p53* koexprimiert, zum Behandeln von Brustkrebs verwendet werden.

(b) Antigene von fremden Organismen oder andere Pathogene

[0138] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-Vektorkonstrukte bereitgestellt, welche die Expression von immunogenen Teilen von Antigenen von fremden Organismen oder anderen Pathogenen lenken. Repräsentative Beispiele von fremden Antigenen schließen bakterielle Antigene (beispielsweise E. coli, streptokokkale, staphylokokkale, mycobakterielle etc., pilzartige Antigene, parasitäre Antigene und virale Antigene (beispielsweise Influenzavirus, Humanes Immundefizienz-Virus („HIV“), Hepatitis A, B und C Virus („HAV“, „HBV“ beziehungsweise „HCV“), humanes Papillomavirus („HPV“), Epstein-Barr-Virus („EBV“), Herpes-simplex-Virus („HSV“), Hantavirus, TTLV I, HTLV II und Cytomegalovirus („CMV“) ein. „Immunogener Teil“ wie er im Kontext der vorliegenden Erfindung verwendet wird, bezieht sich auf einen Teil des entsprechenden Antigens, der befähigt ist, unter geeigneten Bedingungen eine Immunantwort (d. h. zellvermittelt oder humoral) zu verursachen. „Teile“ können von unterschiedlicher Größe sein, sind aber vorzugsweise mindestens 9 Aminosäuren lang und können das gesamte Antigen einschließen. Zellvermittelte Immunantworten können durch eine Präsentation durch den Haupthistokompatibilitätskomplex („MHC“) Klasse I oder durch eine Präsentation durch MHC Klasse II vermittelt werden oder durch beide.

[0139] In einem Aspekt der Erfindung werden Alphavirus-Vektorkonstrukte bereitgestellt, welche die Expression von immunogenen Teilen des Hepatitis B-Antigens lenken. Kurz gefaßt umfaßt das Hepatitis B-Genom eine zirkuläre DNA von etwa 3,2 Kilobasen Länge und wurde gut beschrieben (Tiollais et al., Science 213: 406–411, 1981, Tiollais et al., Nature 317: 489–495, 1985, und Ganem und Varmus, Ann. Rev. Biochem. 56: 651–693, 1987, siehe auch EP 0 278 940, EP 0 241 021, WO 88/10301 und US Patent Nrn. 4,696,898 und 5,024,938). Das Hepatitis B Virus präsentiert mehrere verschiedene Antigene, einschließlich unter anderem drei HB „S“-Antigene (HBsAg), ein HBc-Antigen (HBcAg), ein HBe-Antigen (HBeAg) und ein HBx-Antigen (HBxAg) (siehe Blum et al., TIG 5(5): 154–158, 1989). Kurz gefaßt resultiert das HBeAg aus der proteolytischen Spaltung des P22-Prä-Kern-Zwischenprodukts und wird von der Zelle sekretiert. HBeAg wird in Serum als ein 17 kD-Protein gefunden. Das HBcAg ist ein Protein aus 183 Aminosäuren und das HBxAg ist ein Protein aus 145 bis 154 Aminosäuren, abhängig vom Subtyp.

[0140] Die HBsAg (bezeichnet als „groß“, „mittel“ und „klein“) werden von drei Abschnitten des Hepatitis B-Genoms kodiert: S, Prä-S2 und Prä-S1. Das große Protein, welches eine Länge, die zwischen 389 bis 400 Aminosäuren variiert, aufweist, wird von den Prä-S1, Prä-S2 und S-Abschnitten kodiert und wird in glykosylierten und nicht-glykosylierten Formen vorgefunden. Das mittlere Protein ist 281 Aminosäuren lang und wird von den Prä-S2 und S-Abschnitten kodiert. Das kleine Protein ist 226 Aminosäuren lang und wird von dem S-Abschnitt kodiert. Es existiert in zwei Formen, glykosyliert (GP 27^S) und nicht-glykosyliert (P24^S). Wenn jeder dieser Abschnitte getrennt exprimiert wird, wird der Prä-S1-Abschnitt ein Protein von ungefähr 119 Aminosäuren kodieren, der Prä-S2-Abschnitt wird ein Protein von ungefähr 55 Aminosäuren kodieren und der S-Abschnitt wird ein Protein von ungefähr 226 Aminosäuren kodieren.

[0141] Wie für einen Fachmann offensichtlich sein wird, können verschiedene immunogene Teile der vorstehend beschriebenen S-Antigene zum Induzieren einer Immunantwort kombiniert werden, wenn sie durch eines der hier beschriebenen Alphavirus-Vektorkonstrukte verabreicht werden. Zusätzlich können aufgrund der großen immunologischen Variabilität, die in verschiedenen geographischen Regionen für den offenen Leserahmen von S von HBV gefunden werden, bestimmte Kombinationen von Antigenen für die Verabreichung in bestimmten geographischen Regionen bevorzugt werden. Kurz gefaßt werden Epitope, die in allen humanen Hepatitis B Virus-S-Proben gefunden werden, als Determinante „a“ festgelegt. Sich gegenseitig ausschließende Subtyp-Determinanten sind jedoch auch durch zweidimensionale Doppel-Immunodiffusion identifiziert worden (Ouchterlony, Progr. Allergy 5: 1, 1958). Diese Determinanten sind mit „d“ oder „y“ und „w“ oder „r“ bezeichnet

worden (LeBouvier, J. Infect. 123: 671, 1971, Bancroft et al., J. Immunol. 109: 842, 1972 und Courouze et al., Bibl. Haematol. 42: 1–158, 1976). Die immunologische Variabilität beruht auf einzelnen Nukleotidsubstitutionen in zwei Bereichen des offenen Leserahmens von Hepatitis B Virus-S, die in den folgenden Aminosäure-Änderungen resultieren: (1) Austausch von Lysin-122 zu Arginin im offenen Leserahmen von Hepatitis B Virus-S verursacht eine Subtyp-Verschiebung von d nach y und (2) Austausch von Arginin-160 zu Lysin verursacht eine Verschiebung von Subtyp r zu w. In Afrikanern ist der Subtyp ayw vorherrschend, während in den Vereinigten Staaten und dem nördlichen Europa der Subtyp adw₂ im Überfluss vorhanden ist (Molecular Biology of the Hepatitis B Virus, McLachlan (Hrsg.), CRC Press, 1991). Wie für einen Fachmann offensichtlich sein wird, wird es im Allgemeinen bevorzugt, einen Vektor für die Verabreichung zu konstruieren, welcher für den besonderen, in der geographischen Region der Verabreichung überwiegenden Hepatitis B Virus-Subtyp geeignet ist. Subtypen einer bestimmten Region können durch eine zweidimensionale Doppel-Immunodiffusion bestimmt werden oder vorzugsweise durch die Sequenzierung des offenen Leserahmens von S des aus Individuen in dieser Region isolierten HBV.

[0142] Durch HBV werden auch pol („HBV pol“), ORF5- und ORF6-Antigene präsentiert. Kurz gefaßt kodiert der offene Leserahmen der Polymerase von HBV eine reverse Transkriptase-Aktivität, die in Virionen und Kern-ähnlichen Teilchen in infizierten Lebern gefunden wurde. Das Polymeraseprotein besteht aus mindestens zwei Domänen: der Amino-terminalen Domäne, welche die reverse Transkription initiiierende Protein kodiert, und der Carboxy-terminalen Domäne, welche die reverse Transkriptase und die RNase H-Aktivität kodiert. Immunogene Teile von HBV pol können durch das Verwenden von hier beschriebenen Verfahren (beispielsweise nachstehend und in den Beispielen 12Aii und 13) bestimmt werden, wobei nachstehend beschriebene Alphavirus-Vektorkonstrukte verwendet werden und an ein warmblütiges Tier zum Erzeugen einer Immunantwort verabreicht werden. Ähnlich können andere HBV-Antigene, wie ORF 5 und ORF 6 (Miller et al., Hepatology 9: 322–327, 1989) durch das Verwenden von Alphavirus-Vektorkonstrukten, wie sie hier beschrieben werden, exprimiert werden. Repräsentative Beispiele von Alphavirus-Vektorkonstrukten unter Verwendung von ORF 5 und ORF 6 werden nachstehend in den Beispielen weitergeführt.

[0143] Wie vorstehend angemerkt, wird mindestens ein immunogener Teil eines Hepatitis B Antigens in ein Alphavirus-Vektorkonstrukt eingebracht. Der (die) immunogene Teil(e), welche in das Alphavirus-Vektorkonstrukt eingebracht werden, können von unterschiedlicher Länge sein, obwohl es im Allgemeinen bevorzugt wird, daß die Teile mindestens 9 Aminosäuren lang sind und das gesamte Antigen einschließen können. Die Immunogenität einer bestimmten Sequenz ist häufig schwierig vorauszusagen, obwohl T-Zellepitope unter Verwendung eines Computer-Algorithmus, wie TSITES (MedImmune, Maryland), zum Absuchen kodierender Abschnitte nach potentiellen T-Helferstellen und CTL-Stellen vorhergesagt werden können. Ausgehend von dieser Analyse werden Peptide synthetisiert und als Ziele in einem in vitro-zytotoxischen Assay verwendet. Andere Assays können jedoch auch verwendet werden einschließlich beispielsweise ELISA, welcher die Anwesenheit von Antikörpern gegen den neu eingeführten Vektor nachweist, wie auch Assays, welche auf T-Helferzellen testen, wie gamma-Interferon-Assays, IL-2-Herstellungs-Assays und Proliferations-Assays.

[0144] Immunogene Teile können auch durch andere Verfahren ausgewählt werden. Beispielsweise hat sich gezeigt, daß die HLA A2.1-transgene Maus als Modell für die humane T-Zellerkennung von viralen Antigenen verwendbar ist. Kurz gefaßt erkennt das von der Maus stammende T-Zell-Rezeptorrepertoire in den viralen Influenza- und Hepatitis B-Systemen die gleichen antigenen Determinanten, die von humanen T-Zellen erkannt werden. In beiden Systemen ist die CTL-Antwort, die in der HLA A2.1-transgenen Maus hervorgerufen wurde, praktisch gegen das gleiche Epitop wie das, welches durch humane CTLs des HLA A2.1-Haplotyps erkannt wird, gerichtet (Vitiello et al., J. Exp. Med. 173: 1007–1015, 1991, Vitiello et al., Abstract of Molecular Biology of Hepatitis B Virus Symposia, 1992).

[0145] Besonders bevorzugte immunogene Teile zum Einbringen in Alphavirus-Vektorkonstrukte schließen HBeAg, HBcAg und HBsAg, wie nachstehend in Beispiel 10 detaillierter beschrieben, ein.

[0146] Zusätzliche immunogene Teile des Hepatitis B Virus können durch das Verkürzen der kodierenden Sequenz an verschiedenen Stellen einschließlich beispielsweise der folgenden Stellen: Bst UI, Ssp I, Ppu M1 und Msp I (Valenzuela et al., Nature 280: 815–19, 1979, Valenzuela et al., Animal Virus Genetics: ICN/UCLA Symp. Mol. Cell Biol., 1980, B. N. Fields und R. Jaenisch (Hrsg.), S. 57–70, New York: Academic) erhalten werden. Weitere Verfahren zum Bestimmen passender immunogener Teile, wie auch Verfahren werden auch nachstehend im Zusammenhang mit Hepatitis C beschrieben.

[0147] Wie vorstehend angemerkt, kann mehr als ein immunogener Teil in das Alphavirus-Vektorkonstrukt eingebracht werden. Beispielsweise kann ein Alphavirus-Vektorkonstrukt (entweder getrennt oder als ein Kon-

strukt) die gesamten oder immunogene Teile von HBcAg, HBeAg, HBsAg, HBxAg, wie auch immunogene Teile von HCV-Antigenen exprimieren.

7. Quellen für heterologe Sequenzen

[0148] Sequenzen, welche die oben beschriebenen Proteine kodieren, können schnell von einer Vielzahl von Quellen, einschließlich zum Beispiel Hinterlegungsstellen, wie die American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland), oder aus kommerziellen Quellen, wie die British Bio-Technology Limited (Cowley, Oxford, England), erhalten werden. Typische Beispiele schließen ein: BBG 12 (enthaltend das GM-CSF-Gen, welches das reife Protein von 127 Aminosäuren kodiert); BBG 6 (welches gamma-Interferon-kodierende Sequenzen enthält), ATCC Nr. 39656 (welches TNF-kodierende Sequenzen enthält), ATCC Nr. 20663 (welches alpha-Interferon-kodierende Sequenzen enthält), ATCC Nummern 31902, 31902 und 39517 (welche beta-Interferon-kodierende Sequenzen enthalten), ATCC Nr. 67024 (welches eine Sequenz enthält, welche Interleukin-1b kodiert); ATCC Nummern 39405, 39452, 39516, 39626 und 39673 (welche Interleukin-2-kodierende Sequenzen enthalten); ATCC Nummern 59399, 59398 und 67326 (welche Interleukin-3-kodierende Sequenzen enthalten); ATCC Nr. 57592 (welches Interleukin-4-kodierende Sequenzen enthält), ATCC Nummern 59394 und 59395 (welche Interleukin-5-kodierende Sequenzen enthalten) und ATCC Nr. 67153 (welche Interleukin-6-kodierende Sequenzen enthält).

[0149] Sequenzen, welche wie oben beschrieben veränderte zelluläre Komponenten kodieren, können schnell aus einer Vielzahl von Quellen erhalten werden. Beispielsweise können Plasmide, welche Sequenzen enthalten, die ein verändertes zelluläres Produkt kodieren, aus einer Hinterlegungsstelle, wie die American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland), oder aus kommerziellen Quellen, so wie Advanced Biotechnologies (Columbia, Maryland), erhalten werden. Typische Beispiele von Plasmiden, welche irgendeine der oben beschriebenen Sequenzen enthalten, schließen ATCC Nr. 41000 (welches eine G nach T Mutation in dem 12. Codon von ras enthält) und ATCC Nr. 41049 (welches eine G nach A Mutation in dem 12. Codon enthält) ein.

[0150] Alternativ können Plasmide, welche normale zelluläre Komponenten kodieren, ebenso aus Hinterlegungsstellen, wie die ATCC, erhalten werden (siehe zum Beispiel ATCC Nr. 41001, welches eine Sequenz enthält, welche das normale ras-Protein kodiert; ATCC Nr. 57103, welches abl kodiert; und ATCC Nummern 59120 oder 59121, welche den bcr-Locus kodieren) und mutiert werden, um veränderte zelluläre Komponenten auszubilden. Verfahren zur Mutagenese bestimmter Sequenzen können schnell durch Verwenden von im Stand der Technik bekannten Verfahren durchgeführt werden (siehe Sambrook et al., supra., 15.3 et seq.). Insbesondere Punktmutationen von normalen zellulären Komponenten wie ras können leicht durch ortsspezifische Mutagenese eines bestimmten Codons, zum Beispiel Codons 12, 13 oder 61, durchgeführt werden.

[0151] Sequenzen, welche die oben beschriebenen viralen Antigene kodieren, können ebenso aus einer Vielzahl von Quellen erhalten werden. Beispielsweise können molekular geklonte Genome, welche das Hepatitis-B-Virus kodieren, aus Quellen, wie American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland), erhalten werden. Beispielsweise enthält ATCC Nr. 45020 die gesamte genomische DNA von Hepatitis B (extrahiert aus gereinigten Dane-Partikeln) (siehe **Fig. 3** von Blum et al., TIG 5(5): 154–158, 1989) in der Bam HI-Stelle des pBR322 (Moriarty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2606–2610, 1981).

[0152] Alternativ können cDNA-Sequenzen, welche die oben beschriebenen heterologen Sequenzen kodieren, aus Zellen erhalten werden, welche die Sequenzen exprimieren oder enthalten. Kurz gesagt, in einer Ausführungsform wird die mRNA von einer Zelle, welche das Gen von Interesse exprimiert, mit reverser Transkriptase unter Verwendung von Oligonukleotid-dT- oder Random-Primern revers transkribiert. Die Einzelstrang-cDNA kann dann durch PCR (siehe U.S. Patent Nummern 4,683,202; 4,683,195 und 4,800,159) amplifiziert werden. Siehe ebenso PCR Technologie: Principles and Applications for DNA Amplifikation, Erlich (Ed.), Stockton Press, 1989) unter Verwendung von Oligonukleotid-Primern, welche komplementär zu irgendeiner Stelle der gewünschten Sequenzen sind. Insbesondere wird eine doppelsträngige DNA durch Erhitzen in Gegenwart von hitzestabiler Taq-Polymerase, Sequenz-spezifischen DNA-Primern, dATP, dCTP, dGTP und dTTP denaturiert. Doppelsträngige DNA ist hergestellt, wenn die Synthese vollständig ist. Dieser Zyklus kann mehrere Male wiederholt werden, wobei sich eine faktorielle Amplifikation der gewünschten DNA ergibt.

[0153] Sequenzen, welche die oben beschriebenen Proteine kodieren, können auch, zum Beispiel in einem Applied Biosystems Inc. DNA Synthesizer (z. B. APB DNA-Synthesizer Modell 392 (Foster City, CA)), synthetisiert werden.

F. EUKARYOTISCHE GESCHICHTETE VEKTOR-INITIATIONSSYSTEME

[0154] Wie vorstehend erwähnt, stellt die vorliegende Erfindung eukaryotische geschichtete Vektor-Initiationssysteme bereit, welche einen 5'-Promotor, ein Konstrukt (beispielsweise ein Alphavirus-Vektorkonstrukt), welches befähigt ist, eine heterologe Nukleotidsequenzen zu exprimieren, die befähigt ist, in einer Zelle entweder autonom oder als Antwort auf einen oder mehrere Faktoren zu replizieren, und eine Transkriptions-Terminations-Sequenz umfassen. Kurz gefaßt stellen die eukaryotischen geschichteten Vektor-Initiationssysteme einen zweistufigen oder „geschichteten“ Mechanismus, welcher die Expression heterologer Nukleotidsequenzen kontrolliert, bereit. Die erste Schicht initiiert die Transkription der zweiten Schicht und umfaßt einen 5'-Promotor, eine Transkriptions-Terminations-Stelle, sowie eine oder mehrere Spleißstellen und eine Polyadenylierungsstelle, wenn gewünscht. Repräsentative Beispiele von für die Verwendung in dieser Hinsicht geeigneten Promotoren enthalten jegliche virale oder zelluläre Promotoren, wie CMV, retrovirale LTRs, SV40, β -Actin, Immunglobulin-Promotoren, und induzierbare Promotoren, wie den Metallthionin-Promotor und den Glucocorticoid-Promotor. Die zweite Schicht umfaßt ein Konstrukt, welches befähigt ist, eine oder mehrere heterologe Nukleotidsequenzen zu exprimieren und in einer Zelle entweder autonom oder als Antwort auf einen oder mehrere Faktoren zu replizieren. In einer Ausführungsform der Erfindung kann das Konstrukt ein Sindbis-cDNA-Vektorkonstrukt, wie vorstehend beschrieben, sein.

[0155] Eine große Vielzahl von anderen cDNA- und DNA-Vektorkonstrukten kann auch in den eukaryotischen geschichteten Vektor-Initiationssystemen verwendet werden, einschließlich beispielsweise viralen Vektorkonstrukten, entwickelt von Poliovirus (Evans et al., *Nature* 339: 385–388, 1989, und Sabin, *J. Biol. Standardization* 1: 115–118, 1973), Rhinovirus, Pockenviren, wie das Kanarienvirus (canary pox virus) oder Vaccinia Virus (Fisher-Hoch et al., *PNAS* 86: 317–321, 1989, Flexner et al., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 569: 86–103, 1989), Flexner et al., *Vaccine* 8: 17–21, 1990, US Patent Nrn. 4,603,112, 4,769,330 und 5,017,487, WO 89/01973), SV40 (Mulligan et al., *Nature* 277: 108–114, 1979), Retrovirus (US Patent Nr. 4,777,127, GB 2,200,651, EP 0,345,242 und WO 91/02805), Influenzavirus (Luytjes et al., *Cell* 59: 1107–1113, 1989, McMichael et al., *N. Engl. J. Med.* 309: 13–17, 1983, und Yap et al., *Nature* 273: 238–239, 1978), Adenovirus (Berkner, *Biotechniques* 6: 616–627, 1988, Rosenfeld et al., *Science* 252: 431–434, 1991), Parvovirus, wie das Adenoassoziierte Virus (Samulski et al., *J. Vir.* 63: 3822–3828, 1989, Mendelson et al., *Viol.* 166: 154–165, 1988, PA 7/222,684), Herpes (Kit, *Adv. Exp. Med. Biol.* 215: 219–236, 1989), SV40, HIV (Poznansky, *J. Virol.* 65: 532–536, 1991), Masern (EP 0,440,219), Astrovirus (Munroe et al., *J. Vir.* 67: 3611–3614, 1993), Semliki Forest Virus und Coronavirus, sowie andere virale Systeme (beispielsweise EP 0,440,219, WO 92/06693, US Patent Nr. 5,166,057) einschließen.

[0156] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Verfahren zum Befördern einer heterologen Nukleotidsequenz in ein warmblütiges Tier bereitgestellt, welche den Schritt des Verabreichens eines eukaryotischen geschichteten Vektor-Initiationssystems an ein warmblütiges Tier umfassen. Eukaryotische geschichtete Vektor-Initiationssysteme können entweder direkt an warmblütige Tiere (beispielsweise intravenös, intramuskulär, intraperitoneal, subkutan, oral, rektal, intraokular, intranasal) oder durch verschiedene physikalische Verfahren, wie Lipofectin (Felgner et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7413–7417, 1989), direkte DNA-Injektion (Acsadi et al., *Nature* 352: 815–818, 1991), Beschießen mit Mikroprojektilen (Williams et al., *PNAS* 88: 2726–2730, 1991), Liposomen verschiedener Arten (siehe beispielsweise Wang et al., *PNAS* 84: 7851–7855, 1987), CaPO_4 (Dubensky et al., *PNAS* 81: 7529–7533, 1984), einem DNA-Liganden (Wu et al., *J. of Biol. Chem.* 264: 16985–16987, 1989), Verabreichung der Nukleinsäuren alleine (WO 90/11092) oder Verabreichung von DNA, die mit einem abgetöteten Adenovirus verbunden ist (Curiel et al., *Hum. Gene Ther.* 3: 147–154, 1992), Polykation-Verbindungen, wie auch Polylysin, Rezeptor-spezifische Liganden, sowie Psoralen-inaktivierte Viren, wie Sendai oder Adenovirus, verabreicht werden.

[0157] Eukaryotische geschichtete Vektor-Initiationssysteme können auch an ein warmblütiges Tier verabreicht werden mit den Zielen, eine spezifische Immunantwort zu stimulieren, die Interaktion eines Mittels mit einem Wirtszellrezeptor zu verhindern, ein toxisches Palliativum, einschließlich beispielsweise konditional toxische Palliativa, zu exprimieren, ein Immunsystem immunologisch zu regulieren, Marker zu exprimieren und für eine Ersatz-Gentherapie. Diese und andere Verwendungen werden nachstehend ausführlicher diskutiert.

G. SINDBIS-VERPACKUNGSZELLINIEN

[0158] In weiteren Ausführungsformen der Erfindung werden Alphavirus-Verpackungszelllinien bereit gestellt. Insbesondere in einem Aspekt der vorliegenden Erfindung werden Alphavirus-Verpackungszelllinien bereit gestellt, wobei die viralen Strukturproteine in trans aus einem stabil integrierten Expressionsvektor bereit gestellt werden. Anschließende Transfektion oder Infektion von Alphavirus-Vektor-RNA-Transkripten erzeugt eine Al-

phavirus-Vektor-herstellende Zelllinie. Durch die Natur der ausgedehnten Länge des Alphavirus-cDNA-Moleküls ist der in vitro-Transkriptionsprozeß ineffizient. Zusätzlich können nur 1%–10% der Zellen, welche auf einer Petrischale enthalten sind, erfolgreich transfiziert werden. Folglich können, um die Ausführung und den Titer der Vektor-Herstellungszelllinie zu optimieren, zwei aufeinanderfolgende Zyklen des Gentransfer ausgeführt werden. Um dies durchzuführen, kann der Vektor zuerst in eine primäre Alphavirus-Verpackungszelllinie transfiziert werden. Diese transfizierte Zelllinie produziert dann niedrige Titer der infektiösen viralen Partikel in den Kulturüberständen. Diese infektiösen Überstände werden dann verwendet, um eine frische Monoschicht aus Alphavirus-Verpackungszellen zu transduzieren. Die Infektion des Alphavirus-Vektor in die Verpackungszelllinie wird vor der Transfektion wegen ihrer höheren RNA-Transfereffizienz in die Zellen und der optimierten biologischen Plazierung des Vektors in der Zelle bevorzugt. Dieser zweistufige Weg führt zu einer höheren Expression und höheren Titern des verpackten infektiösen rekombinanten Sindbis-Vektors.

[0159] In einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung werden stabil integrierte Alphavirus-DNA-Expressionsvektoren verwendet, um das Alphavirus-Vektor-RNA-Molekül herzustellen, welches die Fähigkeit zur Selbstreplikation beibehält. Dieser Ansatz kann sich als nützlich erweisen, um hohe Spiegel der Expression über lange Zeiträume der Kultivierung beizubehalten, weil der integrierte DNA-Vektor konstitutiv unveränderte RNA-Vektoren exprimiert. Bei dieser Konfiguration werden die kürzlich von einem Plasmid, welches die SP6-RNA-Polymerase-Erkennungsssequenz enthält, transkribierten Vektoren durch eine angemessene Promotorsequenz, welche durch die verwendete Elternzelllinie definiert wird, ersetzt. Diese Plasmidsequenz kann auch einen auswählbaren Marker enthalten, welcher unterschiedlich zu diesen ist, welche verwendet werden, um die Verpackungszelllinie zu erzeugen. In dieser Konfiguration werden die DNA-basierten Alphavirus-Vektoren durch Transfektion, wie kürzlich beschrieben, in die Verpackungszelllinie eingeführt, gefolgt durch Verdünnungsklonierung, um Zelllinien mit der höchsten Titer-Produktion zu finden.

1. Suizid-Vektor

[0160] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft die Expression von Alphavirus-Suizid-Vektoren zum Begrenzen der Ausbreitung von Wildtyp-Alphavirus in den Verpackungs-/Herstellungs-Zelllinien. Kurz gesagt würde in einer Ausführungsform der Alphavirus-Suizid-Vektor eine für die Wildtyp-Alphavirus-Sequenz spezifische antisense- oder Ribozym-Sequenz die von einem RNA-Rekombinationsereignis zwischen den 3'-Sequenzen der Verbindungsabschnitt des Vektors und den 5'-Alphavirus-Struktursequenzen des Expressionsvektors der Verpackungs-Zelllinie erzeugt wird, umfassen. Das antisense- oder Ribozym-Molekül würde nur in Anwesenheit der spezifischen Rekombinationssequenz thermostabil sein und würde keinen Effekt in der Alphavirus-Verpackungs-/Herstellungs-Zelllinie aufweisen. In einer anderen Ausführungsform kann ein toxisches Molekül (wie die nachstehend offenbaren) auch in Zusammenhang mit einem nur in Anwesenheit eines Wildtyp-Alphavirus exprimierenden Vektor exprimiert werden.

2. Alphavirus-Vektoren zum Verhindern der Ausbreitung metastasierender Tumoren

[0161] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf die Verwendung von Alphavirus-Vektoren zum Verhindern oder Reduzieren der Invasivität von malignen Neoplasmen. Kurz gesagt bezieht sich das Ausmaß der Malignität typischerweise auf die Vaskularisation des Tumors. Eine Ursache der Tumor-Vaskularisation ist die Herstellung von löslichen Tumor-Angiogenese-Faktoren (TAF) (Pawletz et al., Crit. Rev. Oncol. Hematol. 9: 197, 1989), die von einigen Tumoren exprimiert werden. In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung kann die Tumor-Vaskularisation durch die Verwendung von Alphavirus-Vektoren zur Expression von für TAF spezifischen antisense- oder Ribozym-RNA-Molekülen verlangsamt werden. In einer anderen Ausführungsform können Anti-Angiogenese-Faktoren (Moses et al., Science 248: 1408, 1990, Shapiro et al., PNAS 84: 2238, 1987) entweder alleine oder in Kombination mit den vorstehend beschriebenen Ribozymen oder antisense-Sequenzen zum Verlangsamen oder Inhibieren der Tumor-Vaskularisation exprimiert werden. In einer anderen Ausführungsform können Alphavirus-Vektoren auch zum Exprimieren eines Antikörpers, der spezifisch für die TAF-Rezeptoren auf den umgebenden Geweben ist, verwendet werden.

H. VERFAHREN ZUR VERWENDUNG VON ALPHAVIRUS-VEKTOREN

1. Immunstimulation

[0162] In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung können die Zusammensetzungen und Verfahren, die zum Verabreichen eines Alphavirus-Vektorkonstrukts bereit gestellt werden, verwendet werden, welches befähigt ist, infektiöse, krebsartige, autoimmune oder Immunkrankheiten zu verhindern, zu hemmen, zu stabilisieren oder aufzuheben. Typische Beispiele solcher Krankheiten schließen virale Infektionen, wie HIV,

HBV, HTLV I, HTLV II, CMV, EBV und HPV, Melanome, Diabetes, Abstoßungsreaktion, Alzheimer und Herzkrankheiten ein.

[0163] Noch spezifischer werden in einem Aspekt der vorliegenden Erfindung die Zusammensetzungen und Verfahren, die zur Stimulation einer Immunantwort (entweder humoral oder zellvermittelt) gegen ein pathogenes Agens bereitgestellt, so daß das pathogene Agens entweder getötet oder gehemmt wird. Typische Beispiele von pathogenen Agentien schließen Bakterien, Pilze, Parasiten, Viren und Krebszellen ein.

[0164] In einem Aspekt der vorliegenden Erfindung ist das pathogene Agens ein Virus und es werden Verfahren zur Stimulation einer spezifischen Immunantwort und Hemmung der viralen Ausbreitung durch Verwendung von rekombinanten Alphaviruspartikeln bereit gestellt, welche entworfen wurden, um ein Vektorkonstrukt zu liefern, welches zu der Expression eines Antigens oder einer modifizierten Form davon in empfindlichen Zielzellen führt, welches entweder befähigt ist, (1) eine Immunantwort gegen das virale Antigen zu initiieren oder (2) die virale Ausbreitung durch Besetzen der zellulären Rezeptoren, welche für virale Wechselwirkung benötigt werden, zu verhindern. Die Expression des Vektor-Nukleinsäure-kodierten Proteins kann transient oder über die Zeit stabil sein. Wo eine Immunantwort gegenüber einem pathogenen Antigen zu stimulieren ist, wird das rekombinante Alphavirus vorzugsweise so entworfen, daß es eine modifizierte Form des Antigens exprimiert, welche eine Immunantwort stimuliert und welche eine verminderte Pathogenizität relativ zu dem nativen Antigen aufweist. Diese Immunantwort wird erreicht, wenn die Zellen Antigene in korrekter Art und Weise präsentieren, d. h. im Zusammenhang mit den MHC-Klasse-I- und/oder -II-Molekülen zusammen mit den zusätzlichen bzw. Hilfsmolekülen, wie CD3, ICAM-1, ICAM-2; LFA-1 oder Analoge davon (z. B. Altmann et al., Nature 338: 512, 1989). Von mit Alphavirus-Vektoren infizierten Zellen wird erwartet, dies effizient zu tun, weil sie eng die echte virale Infektion nachahmen, und weil sie: (a) befähigt sind, nicht replizierende Zellen zu infizieren, (b) nicht in das Wirtszellgenom integrieren, (c) nicht mit irgendwelchen lebensbedrohenden Erkrankungen assoziiert sind und (d) hohe Spiegel von heterologem Protein exprimieren. Wegen dieser Unterschiede können Alphavirus-Vektoren leicht als sichere virale Vektoren angenommen werden, welche in gesunden Individuen zur Verwendung als Vakzine verwendet werden können.

[0165] Dieser Aspekt der Erfindung weist einen weiteren Vorteil über anderen Systemen auf, von denen erwartet wird, daß sie in ähnlicher Weise derart funktionieren, daß die vorhandenen Zellen voll lebensfähig und gesund sind und niedrige Spiegel von viralen Antigenen, relativ zu heterologen Genen, welche exprimiert werden, aufweisen. Dies bietet einen deutlichen Vorteil, weil die exprimierten antigenen Epitope durch selektive Klonierung der Subfragmente des Gens für das Antigen in dem rekombinanten Alphavirus verändert werden können, was zu Antworten gegen die immunogenen Epitope führt, welche anderenfalls durch immundominante Epitope überschattet werden können. Ein solcher Ansatz kann auf die Expression eines Peptids mit verschiedenen Epitopen, einem oder mehreren von verschiedenen Proteinen abgeleiteten Epitopen ausgedehnt werden. Darüber hinaus erlaubt dieser Aspekt die effiziente Stimulierung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL), welche gegen antigene Epitope und Peptidfragmente von Antigenen, welche durch Subfragmente von Genen kodiert werden, gerichtet sind, durch intrazelluläre Synthese und Assoziation dieser Peptidfragmente mit MHC-Klasse-I-Molekülen. Dieser Ansatz kann verwendet werden, um hauptimmundominante Epitope für die CTL-Induktion zu kartieren.

[0166] Eine Immunantwort kann auch durch Transfer auf eine geeignete Immunzelle (so wie ein T-Lymphozyt) des Gens für einen spezifischen T-Zell-Rezeptor, welcher das Antigen von Interesse (im Zusammenhang mit einem geeigneten MHC-Molekül, falls notwendig) erkennt, für ein Immunglobulin, welches ein Antigen von Interesse erkennt oder für ein Hybrid aus den zweien, welches eine CTL-Antwort in Abwesenheit des MHC-Zusammenhangs liefert, erreicht werden. Daher können rekombinante Alphavirus-infizierte Zellen als ein Immunstimulans, Immunmodulator oder Vakzine verwendet werden.

[0167] In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden Verfahren zur Herstellung von Hemmungspalliativa bereit gestellt, wobei die Alphavirus-Vektoren defekte interferierende virale Strukturproteine liefern und exprimieren, welche den viralen Zusammenbau hemmen. Solche Vektoren können defekte gag-, pol-, vnv- oder andere virale Partikelproteine oder Peptide kodieren, und diese würden in dominanter Weise den Zusammenbau von viralen Partikeln hemmen. Dies findet statt, da die Wechselwirkung von normalen Untereinheiten des viralen Partikels durch die Wechselwirkung mit defekten Untereinheiten gestört ist.

[0168] In einem weiteren Aspekt der Erfindung werden Verfahren für die Expression von hemmenden Peptiden oder Proteinen, welche für virale Protease spezifisch sind, bereit gestellt. Kurz gesagt, spaltet die virale Protease die viralen gag und gag/pol-Proteine in eine Reihe von kleineren Peptiden. Das Fehlen dieser Spaltung führt in allen Fällen zu einer kompletten Hemmung der Herstellung von infektiösen retroviralen Partikeln.

Als ein Beispiel ist von der HIV-Protease bekannt, eine Aspartylprotease zu sein, und diese sind dafür bekannt, durch Peptide, hergestellt aus Aminosäuren von Proteinen oder Analogen, gehemmt zu werden. Vektoren, um HIV zu hemmen, werden eine oder mehrere fusionierte Kopien von solchen Peptidinhibitoren exprimieren.

[0169] Eine andere Ausführungsform schließt das Liefern von Tumor-Suppressorgenen ein, welche, wenn sie deletiert, mutiert sind oder nicht in einem Zelltyp exprimiert werden, zur Tumorgenese in diesem Zelltyp führen. Wiedereinführung des deletierten Gens mit Hilfe eines viralen Vektors führt zur Regression des Tumorphenotyps in diesen Zellen. Beispiele solcher Krebse sind das Retinoplastom und der Wilms-Tumor. Da Bösartigkeit als eine Hemmung der zellulären terminalen Differenzierung, verglichen mit normalem Zellwachstum, betrachtet werden kann, führt die Übertragung des Alphavirus-Vektors und die Expression der Genprodukte, welche auch zur Differenzierung eines Tumors führten sollten, im allgemeinen zur Regression.

[0170] In noch einer anderen Ausführungsform stellt der Alphavirus-Vektor einen therapeutischen Effekt durch Kodierung eines Ribozyms (ein RNA-Enzym) bereit (Haseloff und Gerlach, Nature 334: 585, 1989), welches RNA-Moleküle, welche mit einer pathogenen Funktion korrespondieren, spaltet und daher inaktiviert. Da Ribozyme durch Erkennung einer spezifischen Sequenz in der Ziel-RNA funktionieren und diese Sequenz normalerweise 12 bis 17 Basenpaare aufweist, erlaubt dies die spezifische Erkennung von bestimmten RNA-Spezies wie einer RNA oder eines retroviralen Genomes. Zusätzliche Spezifität kann in einigen Fällen durch Herstellen dieses, bedingt toxischen Palliativum (siehe unten), erreicht werden.

[0171] Ein Weg zur Steigerung der Effektivität von hemmenden Palliativas ist, virale hemmende Gene in Verbindung mit der Expression von Genen zu exprimieren, welche die Wahrscheinlichkeit der Infektion der resistenten Zelle durch ein infrage kommendes Virus steigern. Das Ergebnis ist ein nicht-produktives „Sackgasen“-Ereignis, welches um produktive Infektionsereignisse konkurrieren würde. Im spezifischen Fall von HIV, können Vektoren geliefert werden, welche die HIV-Replikation (durch Expression von Anti-sense tat, etc., wie oben beschrieben) hemmen und auch Proteine wie CD4 überexprimieren, welche für die Infektion benötigt werden. Auf diese Weise wirkt eine relativ kleine Zahl von Vektor-infizierten HIV-resistenten Zellen als ein „Ausguß“ oder „Magnet“ für zahlreiche, nicht produktive Fusionsereignisse mit freiem Virus oder viral infizierten Zellen.

2. Blockierende Agentien

[0172] Viele Infektionskrankheiten, Krebs, Autoimmunerkrankungen und andere Krankheiten schließen die Wechselwirkung von viralen Partikeln mit Zellen, Zellen mit Zellen oder Zellen mit Faktoren ein. In viralen Infektionen treten die Viren gewöhnlicherweise in die Zellen über Rezeptoren auf der Oberfläche der empfänglichen Zellen ein. Bei Krebserkrankungen können die Zellen nicht angemessen oder nicht auf alle Signale von anderen Zellen oder Faktoren antworten. Bei Autoimmunerkrankungen gibt es eine unangemessene Erkennung der „Selbst“-Marker. In der vorliegenden Erfindung können solche Wechselwirkungen durch Herstellung eines Analogs oder irgendeines Partners in einer Interaktion in vivo blockiert werden.

[0173] Diese Blockierungshandlung kann intrazellulär, auf der Zellmembran oder extrazellulär stattfinden. Die Blockierungswirkung auf einen viralen, oder insbesondere einen Alphavirus-Vektor, welcher ein Gen zur Blockierung eines Agens trägt, kann entweder vom Inneren einer empfänglichen Zelle oder durch Sekretion einer Version eines blockierenden Proteins vermittelt werden, um lokal die pathogene Wirkung zu blockieren.

[0174] Im Fall von HIV sind die zwei Agentien der Wechselwirkung gp120/gp41-Hüllproteine und das CD4-Rezeptormolekül. Deshalb würde ein geeigneter Blocker ein Vektorkonstrukt, welches entweder ein HIV-env-Analog exprimiert, das den HIV-Eintritt ohne Verursachen von pathogenen Effekten blockiert, oder ein CD4-Rezeptor-Analoges sein. Das CD4-Analoge würde ausgeschieden werden und fungieren, um Nachbarzellen zu schützen, während das gp 120/gp 41 ausgeschieden wird oder nur intrazellulär hergestellt wird, um so nur die Vektor-enthaltenden Zellen zu schützen. Es kann vorteilhaft sein, humane Immunglobulinschwere Ketten oder andere Komponenten zu CD4 hinzuzufügen, um die Stabilität oder die Komplementlyse zu vergrößern. Übertragen eines Alphavirus-Vektors, welcher solch ein Hybrid-lösliches CD4 kodiert, auf einen Wirt, ergibt eine kontinuierliche Versorgung mit einem stabilen Hybridmolekül. Die Effizienz der Behandlung kann durch Messung von gewöhnlichen Indikatoren des Fortschreitens der Krankheit, einschließlich Antikörperspiegel, virale Antigenproduktion, infektiöse HIV-Spiegel oder Spiegel von nicht-spezifischen Infektionen untersucht werden.

3. Expression von Palliativa

[0175] Techniken, ähnlich zu den oben beschriebenen, können verwendet werden, um rekombinante Alphaviren mit Vektorkonstrukten herzustellen, welche die Expression eines Agens (oder „Palliativums“) herbeiführen, welches zur Hemmung einer Funktion eines pathogenen Agens oder Gen befähigt ist. In der vorliegenden Erfindung meint „befähigt zur Hemmung einer Funktion“, daß das Palliativum entweder direkt die Funktion hemmt oder es indirekt tut, zum Beispiel durch Überführen eines Agens, welches in den Zellen vorliegt, welches normalerweise nicht eine Funktion des pathogenen Agens hemmen würde, in eines, welches es tut. Beispiele solcher Funktionen für virale Krankheiten schließen Adsorption, Replikation, Genexpression, Zusammenbau und Austritt des Virus aus infizierten Zellen ein. Beispiele für solche Funktionen für Krebszellen oder krebsfördernde Wachstumsfaktoren schließen Überlebensfähigkeit, Zellreplikation, veränderte Empfänglichkeit zu externen Signalen (zum Beispiel Kontaktinhibition) und Fehlen der Herstellung oder Herstellung von mutierten Formen von Anti-Onkogenproteinen ein.

(a) Inhibierende Palliativa

[0176] In einem weiteren Aspekt der Erfindung kann das Alphavirus-Vektorkonstrukt verwendet werden, um die Expression eines Gens herbeizuführen, welches mit der Funktion eines pathogenen Agens, zum Beispiel in viralen oder malignen Erkrankungen, wechselwirken kann. Eine solche Expression kann entweder im wesentlichen kontinuierlich oder eine Antwort auf das Vorliegen in der Zelle eines anderen Agens sein, welches entweder mit der pathogenen Bedingung oder mit einem spezifischen Zelltyp (ein „identifizierendes Agens“) assoziiert ist. Zusätzlich kann die Vektorübertragung durch zielorientierten Vektoreintritt kontrolliert werden, welcher, wie oben beschrieben, spezifisch für den gewünschten Zelltyp (zum Beispiel eine Virus-infizierte oder maligne Zelle) ist.

[0177] Ein Verfahren zur Verabreichung ist die Leukaphorese, bei welcher ungefähr 20% der PBLs eines Individuums zu irgendeiner Zeit entfernt werden und in vitro manipuliert werden. Daher können etwa 2×10^9 Zellen behandelt werden und ersetzt werden. Wiederholte Behandlungen können ebenso ausgeführt werden. Alternativ kann das Knochenmark behandelt und erlaubt werden, den wie oben beschriebenen Effekt, zu vervielfachen. Zusätzlich können Verpackungszelllinien, welche einen Vektor herstellen, direkt in ein Subjekt injiziert werden, wobei eine kontinuierliche Produktion des rekombinanten Virions erlaubt wird.

[0178] In einer Ausführungsform können Alphavirus-Vektoren, welche RNA komplementär zu den pathogenen Schlüssel-Gentranskripten exprimieren (zum Beispiel ein virales Genprodukt oder ein aktiviertes zelluläres Onkogen), verwendet werden, um in einem Protein die Translation von diesem Transkript, wie die Hemmung der Translation des HIV-tat-Proteins, zu hemmen. Da die Expression dieses Proteins für die virale Replikation erforderlich ist, wären Zellen, welche den Vektor enthalten, gegenüber HIV-Replikation resistent sind.

[0179] In einer zweiten Ausführungsform, wo das pathogene Agens ein einzelsträngiger Virus mit einem Verpackungssignal ist, wird RNA komplementär zu dem viralen Verpackungssignal (z. B. ein HIV-Verpackungssignal, wenn das Palliativum gegen HIV gerichtet ist) exprimiert, so daß die Assoziation dieser Moleküle mit dem viralen Verpackungssignal im Falle von Retroviren die Stammschleifenbildung oder die tRNA-Primerbindung, welche für eine geeignete Einkapselung oder Replikation des Alphavirus-RNA-Genom benötigt wird, hemmt.

[0180] In einer dritten Ausführungsform kann ein Alphavirus-Vektor eingeführt werden, welcher ein Palliativum exprimiert, welches zur selektiven Hemmung der Expression eines pathogenen Gens oder eines Palliativum befähigt ist, welches zur Hemmung der Aktivität eines Proteins befähigt ist, welches durch das pathogene Agens hergestellt wird. Im Fall von HIV ist ein Beispiel ein mutiertes tat-Protein, welchem die Fähigkeit fehlt, die Expression von der HIV-LTR zu trans-aktivieren und (in einer transdominanten Weise) mit der normalen Funktion des tat-Proteins zu interferieren. Eine solche Mutante ist für das HTLV-II-tat-Protein („XII Leu^{5m}“-Mutant, siehe Wachsman et al., Science 235: 674, 1987) identifiziert worden. Ein mutierter Trans-Repressor tat sollte die Replikation mehr hemmen als für einen mutierten Repressor in HSV-1 gezeigt worden ist (Friedmann et al., Nature 335: 452, 1988).

[0181] Ein solches transkriptionelles Repressorprotein kann in der Gewebekultur unter Verwendung beliebiger Virus-spezifischer transkriptioneller Promotoren, deren Expression durch ein Virus-spezifisches transaktivierendes Protein (wie oben beschrieben) stimuliert wird, ausgewählt werden. Im speziellen Fall von HIV wird die Zelllinie, welche das HIV-tat-Protein und das HSVTK-Gen exprimiert, welche durch den HIV-Promotor angetrieben werden, in Anwesenheit von ACV sterben. Wenn jedoch eine Reihe von mutierten tat-Genen in das System eingeführt wird, wird eine Mutante mit angemessenen Eigenschaften (d. h. der die Transkription durch

den HIV-Promotor in Anwesenheit des Wildtyp-tats unterdrückt) wachsen und ausgewählt werden. Das mutierte Gen kann dann aus diesen Zellen reisoliert werden. Eine Zelllinie, welche mehrere Kopien des bedingt letalen Vektor/tat-Systems enthält, kann verwendet werden, um sicherzustellen, daß die überlebenden Zellklone nicht durch endogene Mutationen in diesen Genen verursacht werden. Eine Serie von zufällig mutierten tat-Genen wird dann in diese Zellen unter Verwendung eines „rettungsfähigen“ Alphavirus-Vektors (d. h. einer, der das mutierte tat-Protein exprimiert und einen bakteriellen Ursprung der Replikation und Drogenresistenzmarker für das Wachstum und die Selektion in Bakterien enthält) eingeführt. Dies erlaubt, eine große Reihe von zufälligen Mutationen zu bewerten und erlaubt ein leichtes anschließendes molekulares Klonieren der gewünschten mutierten Zelllinie. Dieses Verfahren kann verwendet werden, um Mutationen in einer Vielzahl von viralen transkriptionellen Aktivator/viralen Promotor-Systemen für potentielle antivirale Therapien zu identifizieren und zu verwenden.

4. Bedingt toxische Palliativa

[0182] Ein anderer Ansatz zur Hemmung eines pathogenen Agens ist, ein Palliativum zu exprimieren, welches toxisch für die Zelle ist, die den pathogenen Zustand exprimiert. In diesem Fall sollte die Expression des Palliativum vom Vektor durch die Gegenwart einer Wesenheit begrenzt werden, welche mit dem pathogenen Agens, wie eine spezifische virale RNA-Sequenz, verknüpft ist, welche den pathogenen Status identifiziert, um eine Zerstörung der nicht-pathogenen Zellen zu verhindern.

[0183] In einer Ausführungsform dieser Verfahrens trägt ein rekombinanter Alphavirus-Vektor ein Vektorkonstrukt, welches (wie oben diskutiert) ein toxisches Gen enthält, welches von einem zellspezifisch-reagierenden Vektor exprimiert wird. Auf diese Weise werden schnell replizierende Zellen, welche RNA-Sequenzen enthalten, welche zur Aktivierung des zellspezifischen reagierenden Vektors befähigt sind, bevorzugt durch das toxische Agens zerstört, welches durch das Alphavirus-Vektorkonstrukt hergestellt wird.

[0184] In ähnlicher Weise zu der vorherigen Ausführungsform kann das Alphavirus-Vektorkonstrukt ein Gen für Phosphorylierung, Phosphoribosylierung, Ribosylierung oder einen anderen Metabolismus des Purin- oder Pyrimidin-basierten Arzneimittels tragen. Dieses Gen darf kein Äquivalent in Säugerzellen aufweisen und könnte aus einem Organismus, wie ein Virus, Bakterie, Pilz oder Protozoe stammen. Ein Beispiel für dies würde das E. coli-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase-Genprodukt sein, welches in Anwesenheit von Thioxanthin tödlich ist (siehe Besnard et al., Mol. Cell. Biol. 7: 4139–4141, 1987). Bedingt tödliche Genprodukte dieses Typs (oben auch als „Arzneimittelvorstufen“ bezeichnet) finden Anwendung in vielen gegenwärtig bekannten Purin- oder Pyrimidin-basierten Antikrebs-Arzneimitteln, welche häufig die intrazelluläre Ribosylierung oder Phosphorylierung benötigen, um wirksame toxische Mittel zu werden. Das bedingt tödliche Genprodukt könnte auch ein nicht-toxischer Arzneistoff, welcher kein Purin- oder Pyrimidin-Analog ist, in eine zytotoxische Form metabolisieren (siehe Searle et al., Brit. J. Cancer 53: 377–384, 1986).

[0185] Säugerviren neigen im allgemeinen dazu, „immediate early“-Gene aufzuweisen, welche für die anschließende transkriptionelle Aktivierung von anderen viralen Promotorelementen notwendig sind. RNA-Sequenzen von dieser Natur sind ausgezeichnete Kandidaten zur Aktivierung von Alphavirus-Vektor-intrazellulären Signalen (oder „identifizierenden Agentien“) der viralen Infektion. Deshalb könnten bedingt tödliche Gene, welche von Alphavirus-zellspezifischen Vektoren exprimiert werden, welche auf diese viralen „immediate early“ Genprodukte reagieren, spezifisch Zellen töten, welche mit einem beliebigen speziellen Virus infiziert sind. Zusätzlich, da die humanen α - und β -Interferon Promotorelemente transkriptionell als Antwort auf die Infektion mit einer breiten Vielzahl von nicht-verwandten Viren aktiviert sind, könnte die Einführung von Vektoren, welche ein bedingt letales Genprodukt, wie HSVTK beispielsweise, als Antwort auf die Interferonherstellung exprimieren, die Zerstörung der Zellen ergeben, welche mit einer Vielzahl von verschiedenen Viren infiziert sind.

[0186] Die vorliegende Erfindung stellt einen rekombinanten Alphavirus-Vektor bereit, welcher ein Vektorkonstrukt trägt, das zur Expression eines Genprodukts führt, welches zur Aktivierung eines auf andere Weise inaktiven Vorläufers in einen aktiven Hemmstoff des pathogenen Agens befähigt ist. Beispielsweise kann das HSVTK-Genprodukt verwendet werden, um noch effektiver mögliche antivirale Nukleosidanaloge, wie AZT oder ddC, zu metabolisieren. Das HSVTK-Gen kann unter der Kontrolle eines zellspezifisch reagierenden Vektors exprimiert werden und in diese Zelltypen eingeführt werden. AZT (und andere nukleosidische antivirale Substanzen) müssen durch den zellulären Mechanismus in die Nukleotidtriphosphatform metabolisiert werden, um spezifisch die retrovirale reverse Transkriptase und deshalb die HIV-Replikation zu hemmen (Furman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8333–8337, 1986). Die konstitutive Expression von HSVTK (ein Nukleosid und Nukleosidkinase mit sehr breiter Substratspezifität) ergibt einen effektiveren Metabolismus dieser Arzneimittel in ihre biologisch aktive Nukleotidtriphosphatform. Die AZT- oder ddC-Therapie wird hierdurch effektiver,

was niedrigere Dosierungen, geringere allgemeine Toxizität und höhere Wirksamkeit gegen die produktive Infektion erlaubt. Zusätzlich werden Nukleosidanaloge, deren Nukleotidtriphosphatform eine Selektivität für retrovirale Transkriptase zeigt, aber als ein Ergebnis der Substratspezifität der zellulären Nukleosid- und Nukleotidkinase nicht phosphoryliert werden, wirksamer gemacht.

[0187] Verabreichung dieser Alphavirus-Vektoren an humane T-Zellen und Makrophagen/Monozytenzelllinien kann ihre Resistenz gegen HIV in Anwesenheit von AZT und ddC, verglichen mit derselben Zelle ohne retrovirale Vektorbehandlung, vergrößern. Behandlung mit AZT würde bei niedrigeren als normalen Spiegeln toxische Nebenwirkungen vermeiden, aber noch immer wirksam die Ausbreitung von HIV verhindern. Der Behandlungsverlauf würde wie für den Hemmstoff bzw. Blocker beschrieben sein.

[0188] In einer Ausführungsform trägt der rekombinante Alphavirus-Vektor ein Gen, welches ein Produkt spezifiziert, welches selbst nicht toxisch ist, aber wenn es prozessiert oder durch ein Protein, wie eine Protease, welche für ein virales oder anderes Pathogen spezifisch ist, modifiziert wird, in eine toxische Form überführt wird. Beispielsweise könnte der rekombinante Alphavirus ein Gen tragen, welches ein Pro-Protein für die Ricin-A-Kette kodiert, welches durch Prozessierung durch die HIV-Protease toxisch wird. Noch spezifischer könnte eine synthetische inaktive Pro-Proteinform des Toxins Ricin oder der Diphtherie-A-Kette in die aktive Form durch Anordnung der HIV viral-kodierten Protease gespalten werden, sodaß sie ein angemessenes „Pro“-Element erkennt und abspaltet.

[0189] In einer Ausführungsform kann das Alphavirus-Konstrukt ein „Reporter“-Produkt auf der Oberfläche von Targetzellen als Antwort auf die Anwesenheit eines identifizierenden Agens in den Zellen (wie die Expression eines viralen Gens) exprimieren. Dieses Oberflächenprotein kann durch ein zytotoxisches Agens, wie Antikörper gegen das Reporter-Protein, oder durch zytotoxische T-Zellen erkannt werden. In ähnlicher Weise kann ein solches System als ein Detektionssystem verwendet werden (siehe unten), um einfach diese Zellen mit einem bestimmten Gen zu identifizieren, welches ein identifizierendes Protein exprimiert.

[0190] Ähnlich kann in einer anderen Ausführungsform ein Oberflächenprotein exprimiert werden, welches selbst therapeutisch vorteilhaft ist. In dem besonderen Fall von HIV kann die Expression des humanen CD4-Protein, speziell in HIV-infizierten Zellen, auf zwei Weisen vorteilhaft sein:

1. Das Binden von CD4 an HIV-env könnte intrazellulär die Bildung von lebensfähigen viralen Partikeln hemmen, etwa wie es für lösliches CD4 gezeigt worden ist, auf den freien Virus zu wirken, aber ohne das Problem der systemischen "Clearance" bzw. "Klärung" und möglicher Immunogenität, weil das Protein membrangebunden bleiben wird und strukturell identisch zu endogenem CD4 ist (zu welchem der Patient immunologisch tolerant sein sollte).
2. Da der CD4/HIV-env-Komplex als ein Grund für Zelltod angenommen wird, führt die zusätzliche Expression von CD4 (in Anwesenheit eines Überschusses von HIV-env, vorliegend in HIV-infizierten Zellen) zu einem schnelleren Zelltod und hemmt daher die virale Verbreitung. Dies kann besonders für Monozyten und Makrophagen verwendbar sein, welche als Reservoir für die Virusproduktion als ein Ergebnis ihrer relativen Anfälligkeit auf HIV-induzierte Zytotoxizität wirken (welche wiederum offensichtlich wegen des relativen Fehlens von CD4 auf ihren Zelloberflächen ist).

[0191] In einer anderen Ausführungsform kodiert der Alphavirus-Vektor ein Riboenzym, welches RNA-Moleküle, welche für die Überlebensfähigkeit der Vektor-infizierten Zelle essentiell sind, spalten und inaktivieren wird. Durch Abhängigmachen der Ribozymproduktion von einer spezifischen RNA-Sequenz, welche mit einem pathogenen Status, wie HIV-tat, korrespondiert, ist die Zytotoxizität für den pathogenen Status spezifisch.

5. Expression von Markern

[0192] Die oben beschriebene Technik zur Expression eines Palliativum in einer Zelle als Antwort auf eine spezifische RNA-Sequenz kann auch modifiziert werden, um den Nachweis eines bestimmten Gens in einer Zelle zu ermöglichen, welche ein zu identifizierendes Protein exprimiert (z. B. ein Gen, welches durch einen bestimmten Virusgetargen getragen wird) und folglich den Nachweis von Zellen, die dieses Virus tragen, ermöglicht. Zusätzlich ermöglicht diese Technik den Nachweis von Viren (wie HIV) in einer klinischen Probe von Zellen, welche ein identifizierendes Protein, welches mit dem Virus assoziiert ist, tragen.

[0193] Diese Modifikation kann durch Bereitstellen eines Genoms, welches ein Produkt kodiert, dessen Gegenwart schnell identifiziert werden kann (das „Markerprodukt“), in einem Alphavirus-Vektor durchgeführt werden, welcher auf die Anwesenheit des zu identifizierenden Proteins in den infizierten Zellen reagiert bzw. antwortet. Beispielsweise stellt HIV, wenn es geeignete Zellen infiziert, tat und rev her. Die Indikator-Zellen können

daher mit einem Genom (wie durch Infektion mit einem geeigneten rekombinanten Alphavirus) bereit gestellt werden, welches ein Markergen, wie das alkalische Phosphatasegen, β -Galactosidasegen oder Luziferasegen, kodiert, welches durch das rekombinante Alphavirus nach Aktivierung durch das tat- und/oder rev-RNA-Transkript exprimiert wird. Im Falle der β -Galactosidase oder alkalischen Phosphatase ergibt das Aussetzen der Zellen gegenüber Substratanalogen eine Farb- oder Fluoreszenzänderung, falls die Probe HIV-positiv ist. Im Falle der Luziferase ergibt das Aussetzen der Probe gegenüber Luciferin eine Lumineszenz, wenn die Probe HIV-positiv ist. Für intrazelluläre Enzyme wie β -Galactosidase kann der Virustiter direkt durch Zählen der gefärbten oder fluoreszierenden Zellen oder durch Herstellen von Zelloxtrakten und Ausführen einer geeigneten Untersuchung gemessen werden. Für die membrangebundene Form der alkalischen Phosphatase kann der Virustiter ebenso durch Durchführen einer Enzymuntersuchung auf der Zelloberfläche unter Verwendung eines Fluoreszenzsubstrats gemessen werden. Für sezernierte Enzyme, wie eine konstruierte Form, der alkalischen Phosphatase werden kleine Proben der Kulturüberstände auf ihre Aktivität untersucht, was eine kontinuierliche Überwachung einer einzelnen Kultur über die Zeit erlaubt. Daher können verschiedene Formen dieses Markersystems für verschiedene Zwecke verwendet werden. Diese schließen ein Zählen des aktiven Virus oder empfindliches und einfaches Messen der viralen Ausbreitung in einer Kultur und die Hemmung dieser Ausbreitung durch verschiedene Arzneimittel ein.

[0194] Weitere Spezifität kann in das vorherige System durch Prüfen auf Anwesenheit des Virus, entweder mit oder ohne neutralisierende Antikörpern gegen dieses Virus, eingeführt werden. Beispielsweise können in einem Teil der klinischen getesteten Probe neutralisierende Antikörper gegen HIV vorliegen, während in einem anderen Teil keine neutralisierenden Antikörper vorliegen würden. Falls die Tests in dem System negativ waren, wo Antikörper vorlagen, und positiv, wo keine Antikörper vorlagen, würde dies helfen, die Anwesenheit von HIV zu bestätigen.

[0195] In einem analogen System für eine in-vitro-Untersuchung kann die Anwesenheit eines bestimmten Gens, wie ein virales Gen, in einer Zellprobe bestimmt werden. In diesem Fall werden die Zellen in der Probe mit einem geeigneten Alphavirus-Vektor infiziert, welcher ein Reporter gen trägt, welches nur in Gegenwart eines geeigneten viralen RNA-Transkriptes exprimiert wird. Das Reporter gen wird, nach Eintreten in die Probenzellen, sein Reporterprodukt (wie β -Galactosidase oder Luziferase) nur exprimieren, wenn die Wirtszelle das geeignete virale Protein exprimiert.

[0196] Diese Untersuchungen sind schneller und sensitiver, weil das Reporter gen eine größere Menge des Reporterprodukts als das vorliegende zu identifizierende Agens exprimieren kann, was einen Amplifikationseffekt ergibt.

6. Immunherrunterregulation

[0197] Wie oben kurz beschrieben, stellt die vorliegende Erfindung auch ein rekombinantes Alphavirus bereit das ein Vektorkonstrukt trägt welches zur Suppression eines oder mehrerer Elemente des Immunsystems in Targetzellen befähigt ist, welche mit dem Alphavirus infiziert sind.

[0198] Kurz gesagt, spezifische Herrunterregulation einer ungeeigneten oder unerwünschten Immunantwort, wie bei chronischer Hepatitis oder in Transplantaten von heterologen Geweben wie Knochenmark, kann unter Verwendung von immunsuppressiven viralen Genprodukten konstruiert werden, welche die Oberflächenexpression des Transplantations(MHC)-Antigens unterdrücken. Gruppe-C Adenoviren Ad2 und Ad5 besitzen ein 19 kd Glykoprotein (gp 19), welches in der E3-Region des Virus kodiert ist. Dieses gp-19-Molekül bindet an Klasse I-MHC-Moleküle im endoplasmatischen Reticulum der Zellen und verhindert terminale Glykolisierung und Translokation der Klasse I-MHC an die Zelloberfläche. Beispielsweise können vor der Knochenmarkstransplantation Spender-Knochenmarkszellen mit gp 19-kodierenden Vektorkonstrukten infiziert werden, welche nach Expression des gp 19 die Oberflächenexpression des MHC-Klasse I-Transplantationsantigens hemmen. Diese Spenderzellen können mit einem geringen Risiko der Abstoßungsreaktion transplantiert werden und können eine minimale immunsuppressive Lebensweise für den transplantierten Patienten erfordern. Dies kann einem akzeptablen Spender-Empfänger-chimären Status mit dem Auftreten von weniger Komplikationen ermöglichen. Ähnliche Behandlungsweisen können verwendet werden, um eine Reihe von sogenannten Autoimmunkrankheiten zu behandeln, einschließlich Lupus Erythematoses, Multiple Sklerose, rheumatische Arthritis oder chronisches Hepatitis-B-Infektion.

[0199] Eine alternative Methode schließt die Verwendung einer Antisense-Botschaft, eines Ribozyms oder anderer spezifischer Genexpressionshemmer, welche für T-Zellklone spezifisch sind, welche in der Natur autoreaktiv sind, ein. Diese blockieren die Expression von T-Zellrezeptoren auf bestimmten unerwünschten Klo-

nen, welche für eine Autoimmunantwort verantwortlich sind. Die Antisense-, Ribozym- oder andere Gene können unter Verwendung des viralen Vektor-Übertragungssystems eingeführt werden.

7. Ersetzende oder vergrößernde Gentherapie

[0200] Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung bezieht sich auf das Transformieren von Tierzellen können mit rekombinanten Alphavirus-Vektoren, welche als Gentransfervehikel dienen, um genetische Sequenzen zu liefern, welche befähigt sind, ein therapeutisches Protein zu exprimieren. In einer Ausführungsform wird das virale Vektorkonstrukt entworfen, ein therapeutisches Protein zu exprimieren, welches zur Verhinderung, Hemmung, Stabilisierung oder Umkehrung eines ererbten oder nicht-ererbten genetischen Defekts im Metabolismus, Immunregulation, Hormonregulation, enzymatischer oder Membran-assoziiierter strukturellen Funktion befähigt ist. Diese Ausführungsform beschreibt auch einen viralen Vektor, welcher zur Transduktion individueller Zellen befähigt ist, wobei das therapeutische Protein befähigt ist, systemisch oder lokal von einer spezifischen Zelle oder Gewebe exprimiert zu werden, wodurch das therapeutische Protein (a) zum Ersetzen eines abwesenden oder beschädigten zellulären Proteins oder Enzym oder (b) zur ergänzenden Herstellung eines beschädigten oder wenig exprimierten zellulären Proteins oder Enzym befähigt ist. Solche Krankheiten können zystische Fibrose, Parkinsonerkrankung, Hypercholesterolämie, Adenosindesaminasedefizienz, β -Globulinkrankheiten, Hämophilie A & B, Gaucher's Erkrankung, Diabetes und Leukämie einschließen.

[0201] Als ein Beispiel kann ein rekombinanter Alphavirus-viraler-Vektor verwendet werden, um die Gaucher's Erkrankung zu behandeln. Kurz gesagt, ist die Gaucher's Erkrankung eine genetische Störung, welche durch einen Mangel des Enzyms Glukozerebrosidase gekennzeichnet ist. Dieser Therapietyp ist ein Beispiel einer Einzelgen-Ersatztherapie durch Bereitstellen eines funktionellen zellulären Enzyms. Dieser Enzymmangel führt zur Akkumulation von Glukozerebrosid in den Lysosomen aller Zellen im Körper. Der Krankheitsphenotyp manifestiert sich jedoch nur in den Makrophagen, außer in der sehr seltenen Neuronen-pathogenen Form der Krankheit. Diese Krankheit führt gewöhnlich zu einer Vergrößerung der Leber und Milz und zu Schädigungen in den Knochen (zur Übersicht, siehe Science 256: 794, 1992 und The Metabolic Basis of Inherited Disease, 6. Aufl., Scriver et al., Bd. 2, S. 1677).

8. Verabreichung der Alphavirus-Partikel

[0202] In anderen Aspekten der vorliegenden Erfindung werden Verfahren zum Verabreichen rekombinanter Alphavirusvektoren oder Partikel bereit gestellt. Kurz gesagt, die letzte Art der viralen Vektorverabreichung vertraut gewöhnlicherweise auf die spezifische therapeutische Anwendung, die beste Art, die Vektorwirkung zu steigern, und den wirksamsten Verabreichungsweg. Allgemein schließt diese Ausführungsform rekombinante Alphavirus-Vektoren ein, welche entworfen werden können, durch zum Beispiel (1) direkte Injektion in den Blutstrom, (2) direkte Injektion in ein spezifisches Gewebe oder Tumor, (3) orale Verabreichung, (4) nasale Inhalation, (5) direkte Anwendung auf Schleimhautgewebe oder (6) ex vivo-Verabreichung der transduzierten autologen Zellen in das Lebewesen verabreicht zu werden. Deshalb kann der therapeutische Alphavirus-Vektor in solch einer Weise verabreicht werden, so daß der Vektor (a) eine normale gesunde Zelle transduzieren und die Zelle in einen Hersteller eines therapeutischen Proteins oder Agens transformieren kann, welches systemisch oder lokal sezerniert wird, (b) eine anomalen oder geschädigten Zelle transformieren kann, wobei die Zelle in einen normalen funktionierenden Phenotyp transformiert wird, (c) eine anomalen Zelle transformieren kann, so daß sie zerstört wird und/oder (d) Zellen transduzieren kann, um die Immunantwort zu beeinflussen.

I. MODULATION DER AKTIVITÄT VON TRANSKRIPTIONSFAKTOREN

[0203] In einer anderen Ausführungsform können Alphavirus-Vektoren verwendet werden, um die Wachstumskontrollaktivität von Transkriptionsfaktoren in der infizierten Zelle zu regulieren. Kurz gesagt, beeinflussen Transduktionsfaktoren direkt das Muster der Genexpression durch sequenzspezifische Transaktivierung oder Repression (Karin, New Biologist 21: 126–131, 1990). Daher ist es nicht überraschend, daß die mutierten Transkriptionsfaktoren eine Familie von Onkogenen darstellen. Alphavirus-Gentherapie kann verwendet werden, um beispielsweise die Kontrolle von Tumorzellen wieder umzukehren, deren unreguliertes Wachstum durch onkogene Transkriptionsfaktoren und Proteine aktiviert ist, welche die Bindung kooperativ in der Bildung von homo- oder heterodimeren, trans-aktivierenden oder – reprimierenden Transkriptionsfaktorkomplexen fördern oder hemmen.

[0204] Ein Verfahren zum Umkehren der Zellproliferation würde sein, das trans-aktivierende Potential des c-myc/Max heterodimeren Transkriptionsfaktorkomplexes zu hemmen. Kurz gesagt, das nukleäre Onkogen c-myc wird von proliferierenden Zellen exprimiert und kann durch verschiedene unterschiedliche Mechanis-

men, einschließlich retrovirale Insertion, Amplifikation und chromosomale Translokation, aktiviert werden. Das Max-Protein wird in ruhenden Zellen und, unabhängig von c-myc, entweder allein oder in Verbindung mit einem nicht-identifizierten Faktor exprimiert, welcher fungiert, um die Expression derselben Gene, welche durch das myc/Max-Heteromer aktiviert werden, zu unterdrücken (Cole, Cell 65: 715–716, 1991).

[0205] Die Hemmung der c-myc oder c-myc/Max-Proliferation von Tumorzellen kann durch die Überexpression von Max in Targetzellen, kontrolliert durch Alphavirus-Vektoren, durchgeführt werden. Das Max-Protein weist nur 160 Aminosäuren (korrespondierend zu 480 Nukleotiden RNA-Länge) auf und wird leicht in einen Alphavirus-Vektor entweder unabhängig oder in Verbindung mit anderen Genen und/oder Antisense-/Ribozymkomponenten aufgenommen, welche auf Faktoren gerichtet sind, welche die Wachstumskontrolle der Zellen aufheben.

[0206] Modulierung von Homo/Hetero-Komplexverbindung ist ein anderer Ansatz, die Transkriptionsfaktor-aktivierte Genexpression zu kontrollieren. Beispielsweise wird der Transport vom Zytoplasma in den Kern des transaktivierenden Transkriptionsfaktors NF- κ B durch einen Heterodimerkomplex mit dem Inhibitorprotein I κ B verhindert. Nach Induktion durch eine Vielzahl von Agentien, einschließlich bestimmter Zytokine, wird I κ B phosphoryliert und NF- κ B freigesetzt und in den Kern transportiert, wo es seine sequenzspezifische transaktivierende Funktion ausüben kann (Baeuerle und Baltimore, Science 242: 540–546, 1988). Die Dissoziation des NF- κ B/I κ B-Komplexes kann durch Maskieren der Phosphorylierungsstelle von I κ B durch einen Antikörper verhindert werden. Dieser Ansatz würde effizient die Trans-aktivierungsaktivität des NF-I κ B-Transkriptionsfaktors durch Verhindern seines Transports in den Kern hemmen. Die Expression des I κ B-Phosphorylierungs-Sequenzspezifischen Antikörpers oder Proteins in Targetzellen kann mit einem Alphavirus-Gentransfervektor durchgeführt werden. Ein ähnlicher zu dem hier beschriebenen Ansatz könnte verwendet werden, um die Bildung des trans-aktivierenden Transkriptions-Heterodimer-Faktors AP-1 (Turner und Tijan, Science 243: 1689, 1989) durch Hemmung der Bindung zwischen den jun- und fos-Proteinen zu verhindern.

J. PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN

[0207] Wie oben angemerkt, stellt die vorliegende Erfindung auch pharmazeutische Zusammensetzungen bereit, welche ein Sindbis-Vektorkonstrukt in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger, Verdünnungsmittel oder Empfänger, umfassen.

[0208] Die folgenden Beispiele werden zur Beschreibung und nicht zur Einschränkung bereit gestellt.

BEISPIEL 1

KLONIERUNG EINER SINDBIS-cDNA MIT GENOMISCHER LÄNGE

[0209] Die Natur der Viren mit einem RNA-Genom mit positiver Polarität ist derart, daß, wenn sie in eine eukaryotische Zelle eingeführt werden, welche als permissiver Wirt dient, die gereinigte genomische Nukleinsäure als funktionelles messenger-RNA-(mRNA)-Molekül dient. Deshalb kann diese genomische RNA, gereinigt aus dem Virus, den gleichen Infektionszyklus initiieren, welcher für die Infektion durch das Wildtypvirus, aus welchem die RNA gereinigt wurde, charakteristisch ist.

[0210] Der Sindbis-Virusstamm Ar-339 (ATCC #VR-1248, Taylor et al., Am. J. Trop. Med. Hyg. 4: 844, 1955), isoliert aus dem Mosquito *Culex univittatus*, wird in Babyhamsternieren- bzw. "baby hamster kidney"-(BHK)-Zellen vermehrt, welche mit geringer Multiplizität (0,1 PFU/Zelle) infiziert werden. Alternativ kann der Sindbis-Virusstamm hr (Lee Biomolecular, San Diego, CA) verwendet werden und durch die gleichen Verfahren vermehrt werden. Sindbis-Virionen werden aus dem geklärten Lysat 48 Stunden nach Infektion mit 10% (w/v) Polyethylenglykol (PEG-8000) bei 0°C, wie kürzlich beschrieben, präzipitiert. Die in dem PEG-Pellet enthaltenen Sindbis-Virionen werden mit 2% SDS lysiert, und die polyadenylierte mRNA wird durch Chromatographie unter Verwendung im Handel erhältlicher Oligo-dT-Säulen (Invitrogen) isoliert. Zwei Runden der Erststrang-cDNA-Synthese werden mit der polyA-selektierten mRNA unter Verwendung eines Oligonukleotidprimers mit der unten gezeigten Sequenz durchgeführt:

5'-TATATTCTAGA(dT)₂₅-GAAATG-3' (SEQ.ID NR. 2)

[0211] Der Primer enthält an seinem 5'-Ende eine fünf Nukleotid-"Puffersequenz" für einen effizienten Restriktionsendonukleaseverdau, gefolgt durch eine Xba I Erkennungssequenz, 25 aufeinanderfolgenden dT-Nukleotiden und sechs Nukleotiden, welche präzise komplementär zu dem äußersten Sindbis 3'-Ende sind. Daher erfolgt diese Selektion für die erste Runde der cDNA-Synthese auf zwei Niveaus:

[0212] (1) polyadenylierte Moleküle, eine Voraussetzung für funktionelle mRNA und (2) selektives Starten bzw. "Primen" der Sindbis-mRNA-Moleküle in einem Pool, welcher verschiedene mRNA-Spezies enthält. Ferner wird die reverse Transkription in Anwesenheit von 10 mM MeHgOH ausgeführt, um die Häufigkeit von künstlichen Stops während der reversen Transkription zu verringern.

[0213] Die primäre genomische Sindbis-cDNA wird durch PCR in sechs unterschiedlichen Segmenten unter Verwendung von sechs Paaren von überlappenden Primern amplifiziert. Zusätzlich zu viralen komplementären Sequenzen, enthält der Sindbis-5'-Ende-Forward-Primer bzw. Sindbis-5'-Ende-Vorwärts-Primer die 19 Nukleotidsequenz, welche dem bakteriellen SP6-RNA-Polymerasepromotor entspricht und die Apa I-Restriktions-Endonuklease-Erkennungssequenz, welche mit seinem 5'-Ende verknüpft ist. Eine fünf Nukleotid-"Puffersequenz" für den effizienten Verdau geht der Apa I-Erkennungssequenz voran. Die bakterielle SP6-RNA-Polymerase ist ausgeglichen, so daß die Transkription in vitro den Einschluß von nur einem einzelnen nicht-viralen G-Ribonukleotid, verknüpft an das A-Ribonukleotid, ergibt, welches dem authentischen Sindbis-5'-Ende entspricht. Einschluß der Apa I-Erkennungssequenz erleichtert die Insertion des PCR-Amplikons bzw. PCR-Amplifikationsproduktes in die Plasmid-Vektor-(pKS II⁺, Strategene)-Polylinkersequenz. Die Sequenz des SP6-5'-Sindbis-Forward-Primers und aller anderen Primerpaare, welche notwendig sind, um das ganze Sindbis-Genom zu amplifizieren, werden unten gezeigt. Die Referenzsequenz (GenBank Hinterlegungs-Nr. SINCG) stammt aus Strauss et al., Virology 133: 92-110.

Primer	Lokalisierung	Seq. ID Nr.	Sequenz	Erkennungs- sequenz (5'→3')
SP6-1A	Apal/SP6/+ SIN Nukleotide1- 18	3	TATATGGGCCCGATTAGGT GAC ACTATAGATTGACGGCGTA GTAC AC	Apa I
1B	3182-3160	4	CTGGCAACCGGTAAGTACG ATAC	Age I
2A	3144-3164	5	ATACTAGCCACGGCCGGTA	Age I
2B	5905-5885	6	TC TCCTCTTTCGACGTGTCGA GC	Eco RI
3A	5844-5864	7	ACCTTGGAGCGCAATGTCC	Eco RI
7349R	7349-7328	8	TG CCTTTTCAGGGGATCCGCC AC	Bam HI
7328F	7328-7349	9	GTGGCGGATCCCCTGAAAA	Bam HI
3B	9385-9366	10	GG TGGGCCGTGTGGTCGTCAT G	Bcl I
4A	9336-9356	11	TGGGTCTTCAACTCACCGG AC	Bcl I
10394R	10394-10372	12	CAATTCGACGTACGCCTCA CTC	Bsi WI
10373F	10373-10394	13	GAGTGAGGCGTACGTGAA	Bsi WI
4B	Xbal/dT ₂₅ / 11703-11698		TTG TATATTCTAGA(dT) ₂₅ - GAAATG	Xba I

[0214] Die PCR-Amplifikation der Sindbis-cDNA mit den oben gezeigten sechs Primersets wird in getrennten Reaktionen unter Verwendung der Thermalase-thermostabilen-DNA-Polymerase (Amresko Inc., Solon, Ohio) und dem Puffer, enthaltend 1,5 mM MgCl₂, welcher durch den Lieferanten bereit gestellt wird, ausgeführt. Zusätzlich enthalten die Reaktionen 5% DMSO und die Heißstart-Wachskügelchen (Perkin-Elmer) unter Verwendung des folgenden, unten gezeigten PCR-Amplifikationsprotokolls:

Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,5	
72	10	10

[0215] Auf die Amplifikation folgend, werden die sechs Reaktionsprodukte erst in den pCR-II-Vektor (Invitrogen) inseriert, dann unter Verwendung der oben gezeigten, geeigneten Enzyme schrittweise in den pKS II⁺-(Stratagene)-Vektor zwischen die Apa I- und Xba I-Stellen inseriert. Dieser Klon wird als pVGSP6GEN bezeichnet.

[0216] Der Sindbis-genomische cDNA-Klon pVGSP6GEN wird durch Verdau mit Xba I linearisiert, welches pVGSP6GEN einmal, direkt angrenzend und stromabwärts zu der 25 Nukleotid-langen poly-dA:dT-Strecke, spaltet. Der linearisierte pVGSP6GEN-Klon wird mit GeneClean (BIO 101, La Jolla, CA) gereinigt und auf eine Konzentration von 0,5 mg/ml eingestellt. Die Transkription des linearisierten pVGSP6GEN-Klons wird in vitro bei 40°C für 90 Minuten gemäß den folgenden Reaktionsbedingungen ausgeführt: 2 ml DNA/4,25 ml H₂O/10 ml 2,5 mM NTPs (UTP, ATP, GTP, CTP)/1,25 ml 20 mM m⁷ G(5')ppp(5')G cap Analog/1,25 ml 100 mM DTT/5 ml 5X Transkriptionspuffer (Promega)/0,5 ml Rnasin (Promega)/0,25 ml 10 mg/ml Rinderserumalbumin/0,5 ml SP6-RNA-Polymerase (Promega). Die in vitro-Transkriptionsreaktionsprodukte können mit DNase I (Promega) verdaut werden und durch nachfolgende Phenol/CHCl₃- und Etherextraktion, gefolgt durch Ethanolpräzipitation, gereinigt werden, oder alternativ direkt für die Transfektion verwendet werden. Die in vitro-Transkriptionsreaktionsprodukte oder gereinigte RNA werden mit einer im Handel erhältlichen kationischen Lipidverbindung (Lipofectin, GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) komplexiert und an Babyhamster-Kidney-21 (BHK-21)-Zellen, welche in einer 60 mm Petrischale bei 75% Konfluenz gehalten werden, verwendet. Die transfizierten Zellen werden bei 30°C inkubiert. 94 Stunden nach der Infektion werden ausgedehnte zytopathologische Effekte (CPE) beobachtet. Kein offensichtlicher CPE wurde auf den Platten beobachtet, welche keine, von dem Sindbis-cDNA-Klon transkribierte, RNA erhalten haben. Ferner ergibt 1 ml Überstand, genommen von den transfizierten Zellen, hinzugegeben zu frischen Monolayern von BHK-21 Zellen und inkubiert bei 30°C oder 37°C einen offensichtlichen CPE innerhalb von 18 Stunden. Dies zeigt, daß der Sindbis-cDNA-Klon pVGSP6GEN tatsächlich infektiös ist.

[0217] Sequenzanalyse von pVGSP6GEN, gezeigt in Tab. 1, offenbart verschiedene Sequenzunterschiede zwischen dem, hierin beschriebenen, Sindbis-genomischen Klon und dem viralen, in der Genbank enthaltenen Klon. Viele Sequenzunterschiede resultieren aus der Substitution der nicht-konservativen Aminosäureänderungen in den Sindbis-Proteinen. Um anzusprechen, welche Sequenzänderungen für den hierin beschriebenen Klon einzigartig sind, oder ein Ergebnis eines Klonierungsartifakts sind, wird die Virion-RNA durch RT-PCR, wie oben beschrieben, amplifiziert, und der Sequenzbezug zu den infrage kommenden Nukleotiden durch direktes Sequenzieren des RT-PCR Amplikonprodukts unter Verwendung eines im Handel erhältlichen Kits (Promega, Madison WI) bestimmt und mit der entsprechenden pVGSP6GEN-Sequenz verglichen. Die Ergebnisse dieser Studie werden in Tab. 2 angegeben. Kurz gesagt, werden drei nicht-konservative Aminosäureänderungen, Gly → Glu, Asp → Gly und Tyr → Cys, welche ein Ergebnis eines Klonierungsartifaktes sind, respektive an den viralen Nukleotiden 2245, 6193 und 6730, beobachtet. Diese Nukleotidänderungen, welche nicht-konservative Aminosäureänderungen ergeben, betreffen alle virale Nicht-Strukturprotein-(NSP)-Gene, Nukleotid 2245 bei NSP 2 und Nukleotide 6193 und 6730 bei NSP4.

[0218] Die Reparatur der NSP 2- und NSP 4-Gene wird durch RT-PCR, wie oben beschrieben, unter Verwendung von Virion-RNA aus fünfmal Plaque-gereinigter Stammlösung ausgeführt. Das oben beschriebene SP6-1A/1B-Primerpaar wird verwendet, um die Nukleotid-2245-Änderung zu reparieren. Das RT-PCR-Amplikonprodukt wird mit Eco 47III und Bgl II verdaut, und das 882 bp-Fragment wird durch 1% Agarose/TBE-Gel-Elektrophorese gereinigt und in der entsprechenden Region des pVGSP6GEN-Klons ausgetauscht, welcher durch Verdau mit Eco 47III und Bgl II und Behandlung mit CIAP hergestellt wurde. Das oben beschriebene 3A/7349R-Primerpaar wird verwendet, um die Nukleotid 6193- und Nukleotid 6730-Änderungen zu reparieren. Das RT-PCR-Amplikonprodukt wird mit Eco RI und Hpa I verdaut, und das 1.050 Basenpaar-Fragment durch 1% Agarose /TBE-Gel-Elektrophorese gereinigt und mit der entsprechenden Region des

pVGSP6GEN-Klons ausgetauscht. Dieser Klon ist als pVGSP6GENrep bekannt. Transfektion von BHK-Zellen mit in vitro-transkribierter RNA aus pVGSP6GENrep DNA, linearisiert durch Verdau mit Xba I, ergibt, wie oben beschrieben, einen ausgedehnten CPE 18 Stunden nach Transfektion.

Tabelle 1

Sindbis-genomische Klonunterschiede zwischen Viagen- und GenBank-Sequenzen

<u>SIN Nukleotid</u>	<u>Änderung</u>	<u>Codon-Änderung</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Aminosäure-</u>
<u>#</u>			<u>im Codon</u>	<u>Änderung</u>

Nichtkodierende Region:

45	T->C	N.A.	N.A.	N.A.
----	------	------	------	------

Nicht-Struktur-Proteine:

353	C->T	UAU->UAC	3'	Tyr->Tyr
1095	A->C	AUA->CUA	1'	Ile->Leu
1412	T->C	UUU->UUC	3'	Phe->Phe
2032	A->G	GAG->GGG	2'	Glu->Gly
2245	G->A	GGG->GAG	2'	Gly->Glu
2258	A->C	UCA->UCC	3'	Ser->Ser
2873	A->G	CAA->CAG	3'	Gln->Gln
2992	C->T	CCC->CUC	2'	Pro->Leu
3544	T->C	GUC->GCC	2	Val->Ala
3579	A->G	AAA->GAA	1'	Lys->Glu
3822	A->G	ACC->GCC	1'	Thr->Ala
3851	T->C	CUU->CUC	3'	Leu->Leu
5351	A->T	CAA->CAU	3'	Gln->His
5466	G->A	GGU->AGU	1'	Gly->Ser
5495	T->C	AUU->AUC	3'	Ile->Ile
5543	A->T	ACA->ACU	3'	Thr->Thr
5614	T->C	GUA->GCA	2'	Val->Ala
6193	A->G	GAC->GGC	2'	Asp->Gly
6564	G->A	GCA->ACA	1'	Ala->Thr
6730	A->G	UAC->UGC	2'	Tyr->Cys

<u>SIN Nukleotid</u>	<u>Änderung</u>	<u>Codon-Änderung</u>	<u>Lokalisation</u>	<u>Aminosäure-</u>
<u>#</u>			<u>im Codon</u>	<u>Änderung</u>

Struktur-Proteine:

8637	A->G	AUU->GUU	1'	Ile->Val
8698	T->A	GUA->GAA	2'	Val->Glu
9108	AAG del	AAG->del	1'-3'	Glu->del
9144	A->G	AGA->GGA	1'	Arg->Gly
9420	A->G	AGU->GGU	1'	Ser->Gly
9983	T->G	GCU->GCG	3'	Ala->Ala
10469	T->A	AUU->AUA	3'	Ile->Ile
10664	T->C	UUU->UUC	3'	Phe->Phe
10773	T->G	UCA->GCA	1'	Ser->Ala

Tabelle 2
Analyse der Sindbis-genomischen Klon-Artefakte

<u>SIN Nukleotid #</u>	<u>Aminosäure- Änderung</u>	<u>Viagene Einzigartigkeit</u>	<u>Klonierungs- Artefakt</u>
------------------------	---------------------------------	------------------------------------	----------------------------------

Nicht-Struktur-Proteine:

2032	Glu->Gly	+	*
2245	Gly->Glu		+
2258	Ser->Ser	+	*
2873	Gln->Gln	+	
2992	Pro->Leu	+	
3544	Val->Ala		+
3579	Lys->Glu	+	
3822	Thr->Ala		+
3851	Leu->Leu		+
5351	Gln->His	+	!
5466	Gly->Ser	+	+
5495	Ile->Ile		+
5543	Thr->Thr		+
6193	Asp->Gly		+
6730	Tyr->Cys		+

Struktur-Proteine:

8637	Ile->Val	+
8698	Val->Glu	+
9108	Glu->del	+
9144	Arg->Gly	+

*Mischung: Beide Genbank- und Viagen-Sindbis-Stränge liegen an diesem Nukleotid vor.

BEISPIEL 2

ERZEUGUNG VON PLASMID DNA-VEKTOREN, WELCHE DIE SINDBIS-INFEKTION INITIIEREN

[0219] Wegen der Größe des Gesamtlängen-genomischen Sindbis-cDNA-Klons ist die in vitro-Transkription des Gesamtlängenmoleküls eher ineffizient. Dies ergibt eine verringerte Transfektionseffizienz in Bezug auf die infizierten Viruszentren, wie durch Plaquebildung gemessen, relativ zu der Menge der in vitro transkribierten transfizierten RNA. Das Prüfen der cDNA-Klon-Kandidaten und anderer Sindbis-cDNA-Expressionsvektoren auf ihre Fähigkeit, einen Infektionszyklus zu initiieren oder zur Expression einer heterologen Sequenz zu führen, würde bedeutend erleichtert werden, wenn der cDNA-Klon in empfänglichen Zellen als ein DNA-Molekül transfiziert würde, was dann zu der Synthese viraler RNA in vivo führen würde. Transfektionseffizienten von 100% sind in Zellen, transfiziert mit DNA, komplexiert mit verschiedenen im Handel erhältlichen synthetischen Lipidpräparationen, oder transfiziert durch Elektroporation, berichtet worden. Es ist auch gezeigt worden, daß

cDNA aus Picornaviren befähigt ist, einen Infektionszyklus zu initiieren, wenn sie in empfänglichen Zellen transfiziert wird (van der Werf et al., PNAS 83: 2330–2334, 1986). Es ist jedoch nicht in der Literatur beschrieben worden, ob genomische Sindbis-cDNA, wenn sie nahe einem Säugerpromotor plaziert wird und in Zellen transfiziert wird, RNA ergibt, welche befähigt ist, den infektiösen Zyklus, welcher für Wildtypvirus charakteristisch ist, zu initiieren.

[0220] Es ist wohl bekannt, daß DNA-Moleküle mit geeigneten Signalen in vivo replizieren können, wenn sie direkt in Lebewesen eingeführt werden (Dubensky et al., PNAS 81: 7429–7533, 1984). Die Verabreichung von Sindbis-cDNA-Vektoren, direkt als DNA-Moleküle, ist in einigen Anwendungen möglich, in welchen die Sindbis-gerichtete Expression der Palliativa einen Trans-Effekt aufweist. Diese Anwendungen schließen Immunmodulation und Expression von Zytokinen oder anderen therapeutischen Proteinen ein. Im Bereich des Sindbis bietet die direkte Verabreichung der Sindbis-cDNA-Expressionsvektoren eine Anwendung, die einfacher ist als die Erzeugung eines Sindbis-Partikels.

[0221] Sindbis-cDNA-Vektorkonstrukte enthalten eine heterologe, therapeutische palliative Sequenz, welche in einer eukaryotischen RNA-Polymerase-II-Expressionskassette insertiert ist. Diese Konstruktion ist als ein "Eukaryotic-Layered-Vector-Initiation-System" (ELVIS) bekannt und umfaßt die folgenden angeordneten Elemente: einen 5'-eukaryotischen Promotor, befähigt zur Initiation der Synthese von viraler RNA an dem authentischen Sindbis-5'-Ende, eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Sindbis-Virus befähigt ist, eine Nukleotidsequenz, kodierend Sindbis-Nichtstrukturproteine, eine virale Verbindungsregion, eine heterologe Sequenz, eine Sindbis-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz, eine Transkriptions-Terminationssequenz und ein 3'-Polyadenylierungssignal. Der hierin beschriebene eukaryotische Sindbis-cDNA-Expressionsvektor kann auch das geeignete Splicing-Signal einschließen, welches beispielsweise zwischen Sindbis und heterologen Genregionen lokalisiert ist.

[0222] Die Fähigkeit des Sindbis-cDNA-Klons pVGSP6GENrep, einen Infektionszyklus zu initiieren, welcher für das Wildtyp-Virus charakteristisch ist, wird zuerst durch das Ersetzen der genomischen viralen cDNA in einer Säuger-RNA-Polymerase-II-Expressionskassette bestimmt. Diese Konstruktion wird, wie in der folgenden Ausführung beschrieben, durchgeführt. Der Klon pVGSP6GENrep wird mit Bgl II und Xba I verdaut, die Reaktionsprodukte werden auf einem 0,8% Agarose/TBE-Gel elektrophoresiert, und das resultierende 9.438 bp-Fragment wird ausgeschnitten, mit GeneClean (BIO 101, Vista, CA) gereinigt und in das 4,475 bp-Vektorfragment, welches aus der Behandlung von pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) mit Bgl II, Xba I und CIAP resultiert, ligiert. Diese Konstruktion ist als pcDNASINbgl/xba bekannt.

[0223] Der "long terminal repeat" (LTR) des Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV) wird an dem viralen 5'-Ende angeordnet, so daß das erste transkribierte Nukleotid ein einzelner G-Rest ist, welcher in vivo eine cap-Struktur aufweist, gefolgt von dem Sindbis-5'-Ende. Es ist bekannt, daß in vitro-transkribierte RNAs, welche drei nicht-virale Nukleotide an ihrem 5'-Ende enthalten, infektiös sind (Rice et al., J. Virol. 61: 3809–3819, 1987). Die Nebeneinanderanordnung des Mo-MLV-LTR und des Sindbis-5'-Endes wird durch überlappende PCR, wie in der folgenden Ausführung beschrieben, durchgeführt. Die Amplifikation des Mo-MLV-LTR in der ersten primären PCR-Reaktion wird in einer Reaktion, welche den BAG-Vektor (Price et al., PNAS 84: 156–160, 1987) und das folgende Primer-Paar enthält, durchgeführt:

Forward-Primer bzw. Vorwärts-Primer: BAGBg12F1 (Puffersequenz/Bgl II Erkennungssequenz/Mo-MLV LTR Nukleotide 1–22)

5'-TATATAGATCTAATGAAAGACCCACCTGTAGG

Reverse-Primer bzw. Rückwärts-Primer: BAGwt441R2 (SIN Nukleotide 5-1/Mo-MLV LTR Nukleotide 441–406)

5'-TCAATCCCCGAGTGAGGGGTTGTGGGCTCTTTTATTGAGC

[0224] Die PCR-Amplifikation des Mo-MLV-LTR mit dem oben gezeigten Primerpaar wird unter Verwendung der Thermalase-thermostabilen-DNA-Polymerase (Amresco Inc., Solon, Ohio) und dem 1,5 mM MgCl₂ enthaltenden Puffer, welcher von dem Lieferanten bereit gestellt wird, ausgeführt. Zusätzlich enthält die Reaktion 5% DMSO und die Heißstart-Wachskügelchen (Perkin-Elmer), wobei das folgende, unten gezeigte PCR-Amplifikationsprotokoll verwendet wird:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	0,5	
72	10	1

[0225] Die Amplifikation des Sindbis-5'-Endes in der zweiten primären PCR-Reaktion wird in einer Reaktion, welche den pVGSP6GENrep-Klon und das folgende Primerpaar enthält, durchgeführt:

Forward-Primer: (Mo-MLV LTR Nukleotide 421–441/SIN nts 1–16)

5'-CCACAACCCCTCACTCGGGGATTGACGGCGTAGTAC

Reverse-Primer: (SIN Nukleotide 3182–3160)

5'-CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC

[0226] Die PCR-Amplifikation der Mo-MLV LTR mit dem Primerpaar und den Amplifikationsreaktionsbedingungen ist oben gezeigt, und das folgende PCR-Amplifikationsprotokoll, welches unten gezeigt wird, wird verwendet:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,0	
72	10	1

[0227] Die 457 bp- und 3202 bp-Produkte der primären PCR-Reaktionen werden mit GeneClean aufgereinigt und zusammen in einer PCR-Reaktion mit dem folgenden Primerpaar verwendet:

Forward-Primer: BAGBgl2F1 (Puffersequenz/Bgl II Erkennungssequenz/Mo-MLV LTR Nukleotide 1–22)

5'-TATATAGATCTAATGAAAGACCCACCTGTAGG

Reverse-Primer: (SIN Nukleotide 2300–2278)

5'-GGTAACAAGATCTCGTGCCGTG

[0228] Die PCR-Amplifikation des Primer-PCR-Amplikonproduktes mit dem Primerpaar und den Amplifikations-Reaktionsbedingungen ist oben gezeigt, und das folgende, unten gezeigte, PCR-Amplifikationsproduktprotokoll wird verwendet:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,0	
72	10	1

[0229] Die 25 3'-terminalen Basen des ersten primären PCR-Amplikonprodukts überlappen mit den 25 5'-terminalen Basen des zweiten primären PCR-Amplikonprodukts; das resultierende, 2.752 bp überlappende, sekundäre PCR-Amplikonprodukt wird durch 0,8% Agarose/TBE-Elektrophorese gereinigt, mit Bgl II verdaut, und das 2.734 bp-Produkt wird in, mit Bgl II und CIAP behandelten, pcDBASINbgl/xba ligiert. Das resultierende Konstrukt weist 16.656 bps auf und ist als pVGELVIS bekannt. Die Sequenz von pVGELVIS ist in **Fig. 3** angegeben. Die Sindbis-Nukleotide sind in den Basen 1–11.700 der Sequenz enthalten.

[0230] Die pVGELVIS-Plasmid-DNA wird mit Lipofectamin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), gemäß den durch den Lieferanten vorgeschlagenen Bedingungen (ca. 5 µg DNA/8 mg Lipidreagens), komplexiert und zu 35 mm-Schalen hinzugegeben, welche BHK-21-Zellen von ungefähr 75% Konfluenz enthalten. Zytopathische Effekte (CPE), welche für die Wildtyp-Sindbisvirus-Infektion charakteristisch sind, werden innerhalb 48 h nach Infektion beobachtet. Zugabe von 1 ml Transfektionsüberstand zu frischen BHK-21-Monolayern ergibt einen CPE innerhalb von 16 h. Diese Daten zeigen eine korrekte Nebeneinanderanordnung von den Signalen der Expressionskassette der viralen cDNA und der RNA Polymerase II in dem pVGELVIS-Konstrukt, wodurch die de novo-Initiation eines RNA-Virus von einer DNA-Expressionseinheit resultiert. Diese Neuerung vergrößert nicht nur die Nützlichkeit des Sindbis-Systems im allgemeinen, sondern stellt auch ein anderes Verfahren für einen physikalischen Gentransfer-Vektor bereit.

[0231] Die Effizienz der Vektorreplikation, welche der ersten Transkription der genomischen RNA von pVGELVIS folgt, wird auch durch Modifikationen vergrößert, welche ein noch authentischeres 3'-Ende ergeben. Zu diesem Zweck werden zwei verschiedene Modifikationen an dem ELVIS-Vektorkonstrukt durchgeführt. Die Erste verwendet die anti-genomische Ribozymsequenz des Hepatitis Delta Virus (HDV), welche angrenzend an den Sindbis-polyadenylierten Abschnitt angeordnet ist. Die Zweite schließt eine Deletion des Sindbis-polyadenylierten Abschnitts und stromabwärts liegender Vektorsequenzen ein, was eine Fusion des Sindbis-Nukleotids 11.700 an die bovine-Wachstumshormon-Gentranskriptions-Terminations-/Polyadenylierungssequenz ergibt.

[0232] Das HDV-Ribozym-enthaltende Konstrukt wird unter Verwendung von PCR-Techniken und überlappenden Oligonukleotidprimern, welche die gesamte 84 Nukleotid-antigenomische Ribozymsequenz (Perotta und Been, Nature 350: 434–6, 1991) enthalten, erzeugt. Zusätzlich zu der HDV-Sequenz enthalten die zwei Primer flankierende Restriktionsenzymstellen zum Zwecke der Insertion in den ELVIS-Vektor. Zwei PCR-Runden werden ausgeführt: zuerst unter Verwendung der Oligonukleotidprimer HDV49-XC und HDV17-68 (unten gezeigt),

HDV17-68

5'-TCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGG-
ACGCACGTCCACT-3' (SEQ.ID Nr. 34)

HDV49-XC

5'-ACTTATCGATGGTTCTAGACTCCCTTAGCCATCCGAGTGGA-
CGTGCGTCCTCCTTC-3' (SEQ.ID Nr. 33)

gefolgt durch Verdünnung der ersten PCR-Reaktion und ihrer anschließenden Verwendung als Template bzw. Matrize in einer zweiten PCR-Runde mit den Primern HDV49-XC (von der ersten Reaktion) und HDVX-36 (unten gezeigt).

5'-ACGTCTAGATCTGGGTCGGCATGGCATCTCCACCTCCTCGCGGTCCGA-3'

[0233] Nach der Synthese wird das HDV-Ribozymfragment mit Xba I verdaut, welches die flankierenden Sequenzen (kursiv) spaltet und in die ELVIS-Vektor-DNA ligiert, welche teilweise mit Xba I verdaut worden ist, um eine ihrer zwei Schnittstellen zu spalten. Das Absuchen nach der Insertion in die geeignete Stelle und die korrekte Orientierung wird durch Restriktionsschnittstellen und Sequenzanalyse durchgeführt. Dieses Konstrukt ist als pVGELVISHDV bekannt.

[0234] In dem zweiten Verfahren wird die Fusion des Sindbis-Nukleotids 11.700 an die bovine-Wachstumshormon-Gentranskriptions-Terminations-/Polyadenylierungssequenz durch Deletion des Sindbis-Polyadenylierungsabschnitts und stromabwärts liegender Vektorsequenzen in pVGELVIS durch überlappende PCR durchgeführt. Die Amplifikation des Sindbis-3'-Endes in der ersten primären PCR-Reaktion wird in einer Reaktion, welche pVGELVIS und das folgende Primerpaar enthält, durchgeführt:

Forward-Primer: SIN10349F (SIN Nukleotide 10394–10372)

5'-GACAGTGAGAACAGCCAGATGAG

Reverse-Primer: SINBGH11700R (BGH Nukleotide 13-1/SIN Nukleotide 11700–11675)

5'-CAGCGAGCTCTAGGAAATGTTAAAAACAAAATTTTGTG

[0235] Die PCR-Amplifikation des pVGELVIS mit dem oben gezeigten Primerpaar wird unter Verwendung der Thermalase-thermostabilen DNA-Polymerase (Amresco Inc., Solon, Ohio) und den durch den Lieferanten bereit gestellten, 1,5 mM MgCl₂ enthaltenden Puffer durchgeführt. Zusätzlich enthält die Reaktion 5% DMSO und Heißstart-Wachskügelchen (Perkin-Elmer), wobei das folgende unten gezeigte PCR-Amplifikationsprotokoll verwendet wird:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	1,5	
72	10	1

[0236] Die Amplifikation der BGH-Gentranskriptions-Terminations-/Polyadenylierungssequenz in der zweiten primären PCR-Reaktion wird in einer Reaktion, welche den pVGELVIS-Klon und das folgende Primerpaar enthält, durchgeführt:

Forward Primer: pCSIN1018F (SIN Nukleotide 11.687–11.700/PCDNA3 Nukleotide 1018–1039)

5'-CCACAACCCCTCACTCGGGGATTGACGGCGTAGTAC

Reverse Primer: pCDNA1633R (pCDNA3 Nukleotide 1633–1608)

5'-GTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCAC

[0237] Die PCR-Amplifikation des 5'-Endes des BGH-Gens ist oben mit dem Primerpaar und den Amplifikationsbedingungen gezeigt und verwendet das folgende unten gezeigte PCR-Amplifikationsprotokoll:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	1,0	
72	10	1

[0238] Die 1.364 bp- und 629 bp-Produkte der primären PCR-Reaktionen werden mit GeneClean gereinigt und zusammen in einer PCR-Reaktion mit dem folgenden Primerpaar verwendet:

Forward-Primer SIND310374F (5 Nukleotid Puffer/Hind III Erkennungssequenz/SIN Nukleotide 10374–10394)

5'-TATATAAGCTTGAGGCGTACGTCTGAATTGTCAG

Reverse-Primer: pCDNA1575R (pCDNA3 Nukleotide 1575–1552)

5'-GAAAAACCGTCTATCAGGGCGATG

[0239] Die PCR-Amplifikation des Primer PCR-Amplikonproduktes ist oben mit dem Primerpaar und Amplifikations-Reaktionsbedingungen gezeigt, und das unten gezeigte, folgende PCR-Amplifikationsprotokoll wird verwendet:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	2,0	
72	10	1

[0240] Die 27 3'-terminalen Basen des ersten primären PCR-Amplikonproduktes überlappen mit den 27 5'-terminalen Basen des zweiten primären PCR-Amplikonproduktes; das resultierende 1.976 bp überlappende sekundäre PCR-Amplikonprodukt wird durch 0,8% Agarose/TBE-Elektrophorese gereinigt, mit Hind III und Dra III verdaut, und das 1.941 bp-Produkt in, mit Hind III und Dra III verdaute pcDNA3 ligiert und mit CIAP behandelt. Dieses Konstrukt ist als pCDNAELVIS3' bekannt. Das pCDNAELVIS3'-Konstrukt wird mit Bsi WI und Pvu I verdaut, und das resultierende 5197 bp-Fragment wird durch 0,8% Agarose/TBE-Elektrophorese gereinigt und mit dem durch Verdau von pVGELVIS mit Bsi WI und Pvu I isolierten 11.398 bp-Fragment ligiert und mit CIAP behandelt, gefolgt durch 0,8% Agarose/TBE-Elektrophorese und GeneClean. Das resultierende Konstrukt weist 16.595 bps auf und ist als pVGELVISdI3' bekannt.

[0241] Um die Fähigkeit von pVGELVISHDV- und pVGELVISdI3'-Plasmiden zu testen, eine für das Wildtyp-Sindbisvirus charakteristische Infektion zu initiieren, werden die DNA-Klone mit Lipofektamin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD), gemäß den durch den Lieferanten vorgeschlagenen Bedingungen (ca. 5 µg DNA/8 mg Lipidreagens), komplexiert und zu 35 mm Schalen, welche BHK-21-Zellen mit ungefähr 75% Konfluenz enthalten, hinzugegeben. Wenn ein CPE durch dieses Verfahren beobachtet wird, kann 1 ml des Transfektionsüberstandes verwendet werden, um frische BHK-21-Monolayer zu infizieren, oder alternativ kann der Spiegel des Sindbisvirus in den Überständen direkt durch einen Plaque-Test quantifiziert werden.

[0242] In anderen Anwendungen ist es wünschenswert, den CMV-Promotor, welcher in dem pcDNA3-Plasmid enthalten ist, gleich neben der Sindbis-genomischen cDNA anzuordnen, so daß die in vivo-Transkriptionsinitiation in vivo dem authentischen 5'-Ende des viralen Nukleotids entspricht. Die CMV-Promotorstartstelle auf dem Plasmid pcDNA3 ist durch Kartierung des Transkriptionsinitiationspunktes in vitro bestimmt worden. Dies

wird zuerst durch Verdau des pcDNA3-Plasmides mit der Dra III-Restriktionsendonuklease (New England Biolabs Inc., Beverly, MA), gemäß den Anweisungen des Herstellers, durchgeführt. Dra III spaltet das Plasmid einmal bei Nukleotid 1546, wobei ein lineares 5446 bp-DNA-Molekül resultiert. Die DNA wird unter Verwendung des GeneClean II-Kit (BIO 101 San Diego, CA), exakt wie in den Anweisungen angegeben, gereinigt. Ein linearisiertes pcDNA3 wird mit dem HeLa-Nuclear-Extract-in-vitro-Transkriptionssystem (Promega Corp., Madison, WI) in einer Reaktion, welche 3 µg linearisierten pcDNA3, 400 µM jedes Ribonukleotides, 3 mM MgCl₂ und 8 Einheiten bzw. Units von HeLa-Zellkernextrakt enthält, transkribiert. Die 25 µL Reaktion wird für eine Stunde bei 35°C inkubiert. Eine Einheit RQ1-DNAse (Promega Corp., Madison, WI) und 40 Einheiten RNasin (Promega Corp., Madison, WI) werden zu der Reaktion hinzugegeben und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert, um die DNA-Matrize zu entfernen. Die Reaktion wird durch Zugabe von 175 µL Stop Mix (geliefert mit dem HeLa-Extrakt) beendet. Die Reaktion wird mit einem gleichen Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25 : 24 : 1), gefolgt von einer Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohol (24 : 1), extrahiert. Die Reaktion wird mit 500 µL absolutem Ethanol präzipitiert. Die RNA wird durch Zentrifugation bei 12.000 × g für 15 Minuten pelletiert. Das Pellet wird mit 80% Ethanol gespült und in 20 µL Wasser resuspendiert.

[0243] Ein zu dem SP6-Promotor komplementärer Primer (ATTTAGGTGACACTATAG, BRL Corp., Bethesda, MD) wird an dem 5'-Ende mit ³²P durch Mischen von 10 pmol Primer mit einem zweifachen Überschuß von gamma ³²P-ATP (ICN Corp., Irvine, CA), zehn Einheiten der T4-Polynukleotid-Kinase (Promega Corp., Madison, WI) und 1X Kinase-Puffer (zusammen mit der T4-Kinase geliefert), markiert. Die Reaktion wird für 30 Minuten bei 37°C und dann für 5 Minuten bei 95°C inkubiert.

[0244] Die in vitro-transkribierte RNA wird an den markierten Primer durch Mischen von 10 µL RNA mit 1,5 pmol Primer gebunden bzw. annealed. Die Mischung wird auf 90°C erhitzt und langsam abkühlen lassen. Die Mischung wird auf 50 mM Tris-HCl pH 8,3, 10 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM DTT, 40 µM jedes dNTP und 15 Einheiten der AMV-Reversen Transkriptase (USB Corp., Cleveland, OH) eingestellt. Die Reaktionsmischung wird bei 42°C für 30 Minuten inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe eines Drittelvolumens 95% Formamid, 20 mM EDTA, 0,05% Bromphenolblau und 0,05% Xylencyanol FF beendet.

[0245] Das pcDNA3-Plasmid wird unter Verwendung des gleichen, oben beschriebenen ³²P-markierten Primer durch Verwendung des fmol-DNA-Sequenzierungssystems (Promega Corp., Madison, WI), exakt wie in den Anweisungen beschrieben, sequenziert. Die Sequenzreaktionen werden auf ein 6% denaturierendes Gel, angrenzend an 2 µL einer Primer-verlängerten in vitro RNA-Reaktion, geladen. Das Gel wird für eine Stunde bei 1600 V elektrophoresiert, getrocknet und mit einem Film über Nacht exponiert. Die Gesamtlängen-cDNA-Bande kann mit den pcDNA3-Sequenzspuren verglichen werden, um die Transkriptionsinitiationsstelle zu bestimmen. Unter Verwendung dieses Verfahrens kann die Transkriptionsinitiationsstelle des CMV-Promotors auf exakt 39 Basen stromabwärts zu dem CMV-Promotor beim G-Rest mit der Nukleotidzahl 858 (gemäß dem Numerierungssystem des Invitrogen pcDNA3-Vektor) bestimmt werden.

[0246] Der CMV-Promotor des pcDNA3-Plasmids wird dann neben die Sindbis-cDNA durch überlappende PCR unter Verwendung der, wie oben beschriebenen, Verfahren für die Konstruktion von pVGELVIS angeordnet. Der genaue Transkriptionsinitiationspunkt eines jeden RNA-Polymerase-II-Promotors kann durch die oben beschriebenen Verfahren bestimmt werden, was eine annähernde Nebeneinanderanordnung des Promotors in der ELVIS-Konfiguration erlaubt. Die Verwendung eines induzierbaren Promotors in der ELVIS-Konfiguration erlaubt, die Initiation der Infektion in transfizierten Zelllinien zu kontrollieren.

BEISPIEL 3

HERSTELLUNG VON RNA- UND PLASMID-DNA-SINDBIS-VEKTOREN

A. KONSTRUKTION DES SINDBIS-BASIS-VEKTORS

[0247] Der erste Schritt in der Konstruktion des Basis-Sindbis-Vektor ist die Erzeugung von zwei Plasmid-Subklonen, welche getrennte Elemente für die viralen 5'- und 3'-Enden enthalten, welche anschließend verwendet werden, um die Basis-Gentransfer-Vektoren zusammenzubauen. Der erste Plasmid-Subklon enthält 40 terminale Nukleotide am viralen 3'-Ende und eine 25 Basenstrecke von dA:dT-Nukleotiden. Das 3'-Ende des Vektors wird chemisch synthetisiert, um die Sequenz des unten gezeigten Primerpaars aufzuweisen.

Forward-Primer: SIN11664F: (Puffersequenz/Not I-Schnittstelle/SIN Nukleotide 11664–11698)

5'-TATATGCGGCCGCTTTCTTTTATTAATCAACAAAATTTTGTGTTTTAA

Reverse Primer: SINXba11700R (Puffersequenz/Sac I Schnittstelle dT25/SIN Nukleotide 11700–11692)

5'-TATATGAGCTCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGAATGTTAAAA

[0248] Die oberen Nukleotide werden in gleichen molaren Konzentrationen in Anwesenheit von 10 mM Mg Cl₂ gemischt, für 5 Minuten auf 100°C erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Das teilweise doppelsträngige Molekül wird dann unter Verwendung der Klenow-DNA-Polymerase und 50 µM dNTPs aufgefüllt. Das 89 bp-Molekül wird dann mit Not I und Sac I verdaut, auf einem 2% NuSieve-/1% Agarosegel gereinigt, in das pKS II⁺ Plasmid ligiert, mit Not I und Sac I verdaut und mit CIAP bei einem 10 : 1 molaren Überschuß von Insert : Vektor-Verhältnis behandelt. Dieses Konstrukt ist als pKSII3'SIN bekannt.

[0249] Der zweite Plasmid-Subklon enthält 5' 7.643 bps einschließlich eines 5' terminalen RNA-Polymerase-promotors von Sindbis. Das 3'-Ende dieses Klons wird durch PCR-Amplifikation mit einem Reverse-Primer mit der unten gezeigten Sequenz abgeleitet.

Reverse-Primer: SINXho7643R (Puffersequenz/Xho I Schnittstelle/SIN Nukleotide 7643–7621)

5'TATATCTCGAGGGTGGTGTGTTAGTATTAGTCAG

[0250] Der Reverse-Primer wird von den viralen Nukleotiden 7643–7621 dargestellt und liegt 41 bps stromabwärts von dem Verbindungskernelement des 3'-Endes. Zusätzlich liegt das virale Nukleotid 7643 4 Nukleotide stromaufwärts zu dem strukturellen Protein-Translationsinitiationspunkt. Die ersten 5 5'-Nukleotide in diesem Primer, denen 6 Nukleotide, umfassend eine Xho-I-Erkennungssequenz, folgen, sind enthalten, um als „Puffersequenz“ für den effizienten Verdau des PCR-Amplifizierungsproduktes zu dienen.

[0251] Der Forward-Primer in dieser Reaktion ist Primer 2A (beschrieben in Beispiel 1), mit der folgenden Sequenz:

ATACTAGCCACGGCCGGTATC (SEQ. ID NR. 5)

[0252] Das 4510 bp-Amplikonprodukt, welches aus dem PCR-Experiment, unter Verwendung der oben gezeigten Primer mit dem pVGSP6GENrep-Plasmid resultiert, wird mit den Enzymen Sfi I und Xho I verdaut. Das resultierende 2526 bp-Fragment wird auf einem Gel gereinigt. Der Sindbis-cDNA-Klon pVGSP6GENrep wird mit Apa I und Sfi I verdaut. Das 5144 bp-Fragment wird auf einem Gel gereinigt und zusammen mit dem 2526 bp-Sfi I/Xho I-verdauten Fragment und den Apa I- und Xho I-verdauten CIAP-behandelten pKS II⁺-Plasmiden ligiert. Ein Klon wird mit den Sindbis-Nukleotiden 1–7643, einschließlich des RNA-Polymerasepromotors am 5'-Ende, welcher in dem pKSII+Plasmid enthalten ist, isoliert. Dieses Konstrukt ist als pKSII5'SIN bekannt.

[0253] Der Zusammenbau des vollständigen Basisvektors wird durch Verdau von pKS5'SIN mit Xho I und Sac I, Behandlung mit CIAP und Gelreinigung des 10.533 bp-großen-Fragmentes durchgeführt. Das pKS5'SIN-10.533-bp-Fragment wird zusammen mit dem 168 bp-kleinen-Fragment, welches durch den Verdau des pKSII3'SIN mit Xho I und Sac I resultiert, ligiert. Dieses Konstrukt ist als pKSSINBV bekannt und ist schematisch in **Fig. 4** gezeigt.

[0254] Das Glühwürmchen-Luziferase-Reportergen wird in den Sindbis-Basisvektor inseriert, um die Expression eines heterologen Genes in Zellen, welche mit RNA transfiziert wurden, welche aus in vitro Transkription des Sindbis-Vektorklones resultiert, zu zeigen. Dieses Experiment zeigt die gesamte Funktionsfähigkeit des Sindbis-Vektors.

B. KONSTRUKTION DES SINDBIS-LUZIFERASE-VEKTORS

[0255] Die Konstruktion des Sindbis-Luziferase-Vektors wird durch Zusammenbau der Komponenten aus 3 unabhängigen Plasmiden durchgeführt: pKSII5'SIN, pKSII3'SIN und pGL2-Basisvektor. Das pGL2-Basisvektorplasmid (Promega, Madison, WI) enthält das gesamte Glühwürmchen-Luziferase-Gen. Das Luziferase-Gen wird als erstes in das pKSII3'SIN-Plasmid inseriert. Dieses wird durch Gelreinigung des 2689 bp-Luziferase-enthaltenden Fragmentes ausgeführt, welches durch Verdau des pGL2-Basisvektors mit Bam HI und Hind III und Ligation mit dem in einem Gel gereinigten 3008 bp großen Fragment resultiert, welches durch Verdau mit Bam HI und Hind III und Behandlung mit CIAP von pKSII3'SIN resultiert. Dieses Konstrukt ist als pKSII3'SIN-luc bekannt.

[0256] Der Endzusammenbau des Sindbis-Luziferase-Vektors wird durch Verdau von pKS5'SIN mit Xho I und Sac I, Behandlung mit CIAP und Gelreinigung des 10.533 bp großen Fragmentes durchgeführt. Das pKS5'SIN 10.533 bp-Fragment wird, mit dem 2854 bp kleinen Fragment zusammen ligiert, welches durch Verdau von pKSI3'SIN-luc mit Xho I und Sac I resultiert. Dieses Konstrukt enthält die gesamte Sindbis-Nicht-Strukturgen-kodierende-Region und 3'-virale Elemente, welche für die Genomreplikation wichtig sind. Das Glühwürmchen-Luziferase-Gen wird zwischen diese zwei viralen 5'- und 3'-Elemente plaziert. Dieser Vektor ist als pKS-SINBV-luc bekannt und wird in **Fig. 4** schematisch gezeigt. Die SIN-BV-Konstrukte zwischen Ffi I und Sac I werden in pGVELVIS zwischen Ffi I- und Xba I-Schnittstellen ausgewechselt. Die Expression der heterologen Gene wird nach Transfektion in BHK-Zellen beobachtet.

C. EXPRESSION DER LUZIFERASE IN TRANSFIZIERTEN UND INFIZIERTEN BHK-ZELLEN

[0257] Um die Funktionsfähigkeit des Sindbis-Basisvektors, die Expression der Luziferase in mit in vitro-transkribierter RNA transfizierten Zellen, wie in Beispiel 1 beschrieben, von pKSSINBV-luc zu überprüfen, wird durch Verdau mit Sac I linearisiert. Zusätzlich wird ein komplementärer Verpackungsvektor, von dem die meiste Nicht-Strukturgen-Region deletiert ist, durch Verdau von pVGSP6GENrep mit Bsp EI konstruiert und unter Verdünnungsbedingungen ligiert. Dieses Konstrukt ist als pVGSP6GENdlBsp bekannt und weist deletierte Nicht-Strukturgen-Sequenzen zwischen den Basen 422–7.054 auf. Dieser Klon weist 8.008 bps auf und ist schematisch in **Fig. 5** gezeigt. Die in vitro-Transkription von pVGSP6GENdlBsp ist wie in Beispiel 1 beschrieben; linearisiert wird mit Xba I. Die Expression der Luziferase in transfizierten Zellen wird 24 h nach Transfektion überprüft. Transfektionen und Kotransfektionen werden durch direkte Komplexierung von in vitro-Transkriptionsprodukten mit Lipofectamin (Gibco-BRL, Gaithersburg, MD) durchgeführt. Zusätzlich wird 1 ml des Überstandes verwendet, um einen konfluenten Monolayer von BHK-Zellen zu infizieren, und die Expression der Luziferase wird 24 h nach Infektion überprüft. Die Ergebnisse dieses Experiments sind in **Fig. 6** gezeigt. Die Ergebnisse zeigen deutlich eine reichliche Reporter-gen-Expression nach der Transfektion der BHK-Zellen und dem Transfer (z. B. Verpackung) der Expressionsaktivität, wenn die Zellen mit in vitro transkribierten pVGSP6GENdlBsp kotransfiziert werden.

D. KONSTRUKTION EINER VERÄNDERTEN VERBINDUNGSREGION IN SINDBIS-VEKTOREN

[0258] 1. Um die Verbindungsregion zu inaktivieren, werden die Nukleotide in dem Überlappungsbereich des carboxyterminalen NSP4 und der Verbindungsregion geändert, und die Vektor-Nukleotide, welche Sindbis entsprechen, werden vor dem subgenomischen Initiationspunkt bei Sindbis-Nukleotid 7598 terminiert bzw. beendet. Dieses Konstrukt ist schematisch in **Fig. 7** gezeigt.

[0259] Kurz gesagt, ein Fragment wird durch PCR von dem pKSSINBV Klon unter nicht-stringenten Reaktionszyklus-Bedingungen, unter Verwendung eines Reverse-Primers, mit der folgenden Sequenz amplifiziert:

TATATGGGCCCTTAAGACCATCGGAGCGATGCTTTATTTCCCC

[0260] Die unterstrichenen Basen in dem Reverse-Primer beziehen sich auf Nukleotidänderungen in der Verbindungsregion, ohne die kodierte Aminosäure (siehe unten) zu beeinflussen. Alle diese Nukleotidänderungen sind Transversionen.

3'-Ende von NSP 4 (virale Nukleotide 7580–7597)

TCT CTA CGG TGG TCC TAA

ser leu arg trp ser stop

G C A T

(resultierende Nukleotid-Änderungen von dem Reverse-Primer)

[0261] Der Reverse-Primer ist zu den Sindbis-Nukleotiden 7.597–7.566 (ausgenommen bei den Nukleotiden, wo, wie gezeigt, Verbindungsregionänderungen durchgeführt wurden) komplementär und schließt an seinem 5' Ende die 6 Nukleotid Apa I-Erkennungssequenz, welche auf eine 5'-terminale TATAT-Schwanz-„Puffersequenz“ für effizienten Enzymverdau folgt, ein.

[0262] Der Forward-Primer in dieser Reaktion ist Primer 2A (beschrieben in Beispiel 1) mit der folgenden Sequenz:

ATACTAGCCACGGCCGGTATC (SEQ.ID NR. 5)

[0263] Das 4.464 bp-Amplikon, welches aus einer PCR-Reaktion mit pKSSINBV, unter Verwendung des oben beschriebenen Primerpaares resultiert, wird mit Sfi I und Apa I verdaut, und das in einem Gel gereinigte 2.480 bp-Fragment wird zusammen mit dem in einem Gel gereinigten 5.142 bp-Fragment, welches aus dem Verdau von pKSSINBV mit Apa I und Sfi I resultiert und mit dem Gel-gereinigten 2.961 bp Fragment, welches aus dem Verdau von pKSI+ mit Apa I und aus der Behandlung mit CIAP resultiert, ligiert. Dieses Konstrukt, welches die Sindbis-Nukleotide 1–7.597 umfaßt, einschließlich der oben beschriebenen Änderungen in der Verbindungsregion und einschließlich des bakteriellen T7-Promotors, welcher an Sindbis-Nukleotid 1 gebunden ist, wird als pKS5'SINdIJR bezeichnet.

[0264] Das Endkonstrukt des inaktivierten Verbindungsregion-Vektors wird durch Ligierung des 7.622 bp-großen Sindbis Fragmentes, welches aus dem Verdau von pKS5'SINdIJR mit Apa I resultiert, mit dem 3.038 bp Fragment, welches aus dem Verdau mit Apa I und Behandlung mit CIAP von pKSI3'SIN resultiert, durchgeführt. Die positive Orientierung des 5'-Sindbis-Elementes, relativ zu dem 3'-Sindbis-Element, wird durch Restriktionsendonuklease-Analyse bestätigt. Dieses Konstrukt wird als pKSSINBVdIJR bezeichnet.

[0265] Die Initiation und Synthese der subgenomischen mRNA kann nicht vom pKSSINBVdIJR-Vektor stattfinden. Um diese Annahme zu bestätigen, werden vergleichende RNase-Schutz-Tests der pKDDINBV und pKSSINBVdIJR-Vektoren durchgeführt. Eine ³²P-endmarkierte RNA-Probe, welche zum Teil zur Verbindungsregion komplementär ist, wird, einschließlich des subgenomischen RNA-Initiationspunktes beim viralen Nukleotid 7.598, verwendet, um mit der viralen RNA, welche aus der Transfektion von BHK-21-Zellen mit dem pKSSINBV und pKSSINBVdIJR-Vektoren resultiert, zu hybridisieren. Der RNase-Schutz-Test zeigt, daß die Zellen, welche mit pKSSINBV transfiziert werden, zwei Fragmente mit genomischer und subgenomischer Spezifität aufweisen, während Zellen, welche mit pKSSINBVdIJR transfiziert werden, nur ein einzelnes Fragment mit genomischer Spezifität aufweisen. Diese Ergebnisse beweisen, daß die Verbindungsregion in dem pKSSINBVdIJR-Vektor tatsächlich inaktiviert ist.

[0266] 2. Um zu überprüfen, ob die Translation der genomischen RNA von der Region der subgenomischen RNA-Botschaft entspricht, wird das Luziferase-Reportergen, wie oben beschrieben, in den inaktivierten Verbindungsregion-Vektor pKSSINBVdIJR inseriert. Dieses Konstrukt wird durch Verdau des pKSSINBVdIJR-Plasmides mit Xho I und Sac I und Behandlung mit CIAP und Gelreinigung des resultierenden 10.197 bp-Fragmentes durchgeführt. Das pKSSINBVdIJR-Fragment wird zusammen mit dem 2.854 bp-kleinen Fragment, welches aus dem Verdau von pKSI3'SIN-luc mit Xho I und Sac I resultiert, ligiert. Diese Konstruktion enthält die gesamte Sindbis-Nichtstrukturgen-kodierende Region, welche in einer inaktivierten Verbindungsregion bei Sindbis-Nukleotid 7597 und 3'-viralen Elementen, welche für die Genomreplikation erforderlich sind, abschließt; das Glühwürmchen-Luziferase-Gen wird zwischen diese zwei viralen 5'- und 3'-Elemente plaziert. Dieser Vektor ist als pKSSINBVdIJR-luc bekannt.

[0267] Die Expression des Reportergens des pKSSINBVdIJR-luc-Vektors wird in transfizierten BHK-21-Zellen überprüft. Die Translation des funktionalen Luziferaseproteins wird in einem Luziferin-Lumineszenztest unter Verwendung eines Luminometers zum Nachweis bestimmt. Die Sensitivität dieses Tests liegt bei 1×10^{-20} Mol der Luziferase. Vorausgesetzt, daß das Molekulargewicht der Luziferase 62.000 Dalton aufweist, wandelt die Nachweisgrenze 6.020 Moleküle um. Deshalb wird in einem typischen Experiment, wenn nur 0,6% der 1×10^6 Zellen, welche in einer 60 mm Petrischale enthalten sind, mit dem pKSSINBVdIJR-luc-Vektor transfiziert werden, und wenn diese transfizierten Zellen nur ein einzelnes funktionierendes Luziferasemolekül exprimieren, die enzymatische Aktivität durch den verwendeten Test nachgewiesen. Es ist wichtig, in diesem Experiment zu zeigen, daß die Verbindungsregion des pKSSINBVdIJR-luc-Vektors inaktiviert ist. Dies wird durch einen RNase-Schutz-Test durchgeführt, welcher die synthetisierten viralen RNAs in mit den pKSSINBVdIJR-luc- und den pKSSINBV-luc-Vektoren transfizierten Zellen unter Verwendung der oben beschriebenen Probe vergleicht.

[0268] 3. Das minimale –19 → + 5 Verbindungsregionkern/-Oligonukleotidpaar, welches Sindbis-Nukleotide 7579–7602, wie kürzlich definiert (Levis et al., J. Virol. 64: 1726–1733, 1990) umfaßt, wird in vitro synthetisiert und durch Apa I und Xho I-Erkennungssequenzen, wie gezeigt, flankiert:

Oligonukleotid 1

CATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTC

Oligonukleotid 2

TCGAGACTATTTAGGACCACCGTAGAGATGGGCC

[0269] Die obigen Oligonukleotide werden zusammen in Gegenwart von 10 mM Mg²⁺ gemischt, auf 100°C für 5 Minuten erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die annealten Oligonukleotide werden in einem 25 : 1 molaren Verhältnis von Insert zu dem pKSSINBVdIJR-Vektor ligiert, hergestellt entsprechend: vollständiger Verdau mit Xho I, gefolgt durch Verdau mit Apa I unter unvollständigen Bedingungen, wobei eine Apa I induzierte Spaltung pro Molekül (von zwei möglichen Spaltungen) resultiert, Gelreinigung des 10.655 bp-Fragmentes und Behandlung mit CIAP. Dieser Vektor, welcher die gesamte NSP-kodierende Region enthält, welche in einem inaktivierten Verbindungsregionkern, gebunden an einen synthetischen Verbindungsregionkern und gefolgt durch 3' virale Elemente, welche für die Replikation benötigt werden, abschließt und in dem pK-SII+-Plasmid enthalten ist, ist als pKSSINdIJRsirc bekannt.

[0270] Um den Spiegel der subgenomischen RNA-Synthese zu regulieren, werden weitere Modifikationen des tandemartig-insertierten Verbindungsregionkernes in dem Plasmid pKSSINdIJRsirc durchgeführt. Diese Modifikationen des Verbindungsregionkernes werden durch zwei Ansätze durchgeführt; Nukleotidänderungen in dem Verbindungsregionkern oder Ausdehnung auf die 5'- und 3'-Verbindungsregionkernenden der flankierenden Sindbisnukleotide, gemäß der authentischen viralen Sequenz. Der minimale Verbindungsregionkern, welcher an den viralen Nukleotiden 7579–7602 liegt, ist unten gezeigt:

ATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGT (SEQ.ID NR. 1)

[0271] Durch Vergleich der genomischen Sequenz zwischen acht Alphaviren ist kürzlich gezeigt worden, daß es eine Sequenzabweichung in dem Verbindungsregionkern gibt. Nachstehend ist für bestimmte Verbindungsregionbereiche das Sindbisnukleotid, gefolgt von entsprechenden Nukleotiden, welche in anderen Alphaviren gefunden werden, gezeigt:

Nukleotidzahl	Sindbis	permissive Änderung
7579	A	C
7580	U	C
7581	C	U
7583	C	G
7589	U	C
7590	G	U
7591	G	A
7592	U	A
7600	A	U oder G
7602	U	G oder A

[0272] Verbindungsregionänderungen an den Sindbis-Nukleotiden 7579, 7580, 7581, 7583, 7589, 7590, 7591, 7592 ergeben mögliche Aminosäure-kodierende Änderungen in allen 5 Codons des Carboxyterminus von NSP 4, welcher mit der Verbindungsregion überlappt. Diese in der Verbindungsregion beobachteten Änderungen zwischen Alphaviren auf der Ebene des NSP 4-kodierenden Potentials und auf der Ebene der Verbindungsregion-cis-Aktivität können sowohl permissive Änderungen in NSP 4 als auch der Verbindungsregion, welche die Funktionalität nicht beeinflussen, oder auf der anderen Seite einfach unterschiedliche Viren darstellen. Auf jeden Fall betreffen die hierin präsentierten Änderungen den tandemartig-insertierten Verbindungsregionkern, von welchem keine NSP-Proteinsynthese stattfindet. Wie vorstehend diskutiert, findet die Translation der gesamten NSP-Region von dem pKSSINBVdIJR-Konstrukt statt. Die Verbindungsregionänderungen an den Sindbis-Nukleotiden 7600 und 7602 liegen stromabwärts zu dem NSP 4-Terminationscodon und stromaufwärts zu dem strukturellen Proteininitiationscodon.

[0273] Orte der Nukleotidunterschiede in dem Verbindungsregionkern, welche zwischen den unterschiedlichen Alphavirusstämmen beobachtet werden, werden hier als permissive Änderungen bezeichnet. Orte der Nukleotide in dem Verbindungsregionkern, welche den konservierten Sequenzen zwischen den unterschiedlichen Alphavirusstämmen entsprechen, werden hier als nicht-permissive Änderungen bezeichnet.

[0274] Um den Spiegel der subgenomischen mRNA-Initiation von dem synthetischen Verbindungsregionkern zu verringern, werden getrennt Änderungen in Nukleotiden, welche den permissiven Änderungen entsprechen und in Nukleotiden, welche den nicht-permissiven Änderungen entsprechen, gemacht. Die Verbindungsregionnukleotide, welche den permissiven Änderungen entsprechen, sind in der obigen Tabelle angegeben. Vierzehn Verbindungsregionnukleotide, an welchen keine Änderungen unter den acht sequenzierten Alphaviren (Semliki Forest Virus, Middleburg Virus, Ross River Virus, O'Nyong Nyong Virus, Eastern Equine Encephalitis Virus, Western Equine Encephalitis Virus und Venezuelan Equine Encephalitis Virus) beobachtet werden, sind unten angegeben:

Nukleotidzahl

7582
7584
7585
7586
7587
7588
7593
7594
7595
7596
7597
7598
7599
7601

[0275] Änderungen in der Verbindungsregion, welche unter Alphaviren beobachtet werden, können eine spezifische Wechselwirkung zwischen einer gegebenen alphaviralen RNA-Polymerase und ihrer verwandten Verbindungsregion widerspiegeln. Daher können Änderungen unter den „permissiven“ Nukleotiden, wie angemerkt, in einer Verringerung der subgenomischen mRNA-Synthese-Spiegel als Änderungen unter den „nicht-permissiven“ Nukleotiden der Verbindungsregion, resultieren. Auf der anderen Seite können diese tatsächlich Stellen von permissiven Änderungen in dem Verbindungsregionkern sein.

[0276] Die einzige wirkliche nicht-permissive Änderung in dem Verbindungsregionkern ist möglicherweise Sindbis-Nukleotid 7598, welches dem subgenomischen mRNA-Initiationspunkt entspricht. Änderungen dieses Nukleotides in dem tandemartiginsertierten Verbindungsregionkerns des Plasmides pKSSINdIJRsjrc sind hier nicht beschrieben.

[0277] Die Substitution der permissiven Nukleotide insgesamt in dem synthetischen minimalen –19 -> + 5 Verbindungsregionkern wird mit folgendem Nukleotidpaar durchgeführt, welches in vitro synthetisiert und von Apa I- und Xho I-Erkennungssequenzen, wie gezeigt, flankiert wird:

Oligonukleotid 1

CCCTTGTACGGCTAACCTAAAGGAC

Oligonukleotid 2

TCGAGTCCTTTAGGTTAGCCGTACAAGGGGGCC

[0278] Die obigen Oligonukleotide werden miteinander in Gegenwart von 10 mM Mg gemischt, auf 100°C für 5 Minuten erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die annealten Oligonukleotide werden in einem 25 : 1 molaren Verhältnis von Insert zu pKSSINBVdIJR-Vektor ligiert, hergestellt entsprechend: vollständiger Verdau mit Xho I, gefolgt durch Verdau mit Apa I unter unvollständigen Bedingungen, welche eine Apa I-induzierte Spaltung pro Molekül (bei zwei möglichen Spaltungen) ergeben, Gelreinigung des 10.655 bp-Fragmen-

tes und Behandlung mit CIAP. Dieser Vektor ist als pKSSINdIJRsjrPc bekannt.

[0279] Jedes der 13 (Nukleotid 7598 nicht geändert) nicht-permissiven Nukleotide in dem Verbindungsregionkern wird, unter Verwendung folgender Regeln, welche die drastischste transversale Substitution ergeben, individuell geändert:

A → C
T → G
G → T
C → A

[0280] Beispielsweise wird Nukleotid 7582 von T → G unter Verwendung des folgenden Oligonukleotidpaares geändert, welches in vitro synthetisiert und durch Apa I- und Xho I-Erkennungssequenzen, wie gezeigt, flankiert wird:

Oligonukleotid 1

CATCGCTACGGTGGTCCTAAATAGTC

Oligonukleotid 2

TCGAGACTATTTAGGACCACCGTAGCGATGGGCC

[0281] (Nukleotide, welche Transversion an nicht-permissiven Verbindungsregionstellen bewirken, werden in fester Schrift gezeigt)

[0282] Die obigen Nukleotide werden zusammen in Gegenwart von 10 mM Mg²⁺ gemischt, auf 100°C für 5 Minuten erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die annealten Oligonukleotide werden in einem 25 : 1 molaren Verhältnis von Insert zu dem pKSSINBVdIJR-Vektor ligiert, hergestellt entsprechend: kompletter Verdau mit Xho I, gefolgt durch Verdau mit Apa I unter unvollständigen Bedingungen, welche eine Apa I-induzierte Spaltung pro Molekül (bei zwei möglichen Spaltungen) ergeben, Gelreinigung des 10.655 bp Fragmentes und Behandlung mit CIAP. Der Vektor ist als pKSSINdIJRsjrNP7582 bekannt.

[0283] Unter Verwendung der oben gezeigten Transversionsänderungsregeln werden Änderungen in jeder der 12 verbleibenden nicht-permissiven Stellen in dem Verbindungsregionkern mit 12 getrennten Oligonukleotidpaaren, flankiert mit Apa I- und Xho I-Erkennungssequenzen, wie oben beschrieben, durchgeführt. Diese Vektoren sind bekannt als:

pKSSINdIJRsjrNP7584
pKSSINdIJRsjrNP7585
pKSSINdIJRsjrNP7586
pKSSINdIJRsjrNP7587
pKSSINdIJRsjrNP7588
pKSSINdIJRsjrNP7593
pKSSINdIJRsjrNP7594
pKSSINdIJRsjrNP7595
pKSSINdIJRsjrNP7596
pKSSINdIJRsjrNP7597
pKSSINdIJRsjrNP7599
pKSSINdIJRsjrNP7601

[0284] Um die relativen Spiegel der subgenomischen mRNA-Synthese zu überprüfen, wird das Luziferasereportergen in die modifizierten Tandemverbindungsregion-Vektoren inseriert. Dieses Konstrukt wird durch Verdau mit Xho I und Sac I und Behandlung mit CIAP der tandemartig inserierten synthetischen Verbindungsregionkern-Vektoren und Gelreinigung des resultierenden ungefähr 10.200 bp-Fragmentes erreicht. Das so behandelte Vektorfragment wird zusammen mit dem 2854 bp- kleinen Fragment, welches aus dem Verdau von pKSI13'SIN-luc mit Xho I und Sac I resultiert, ligiert. Diese Konstruktionen enthalten die gesamte Sindbis-Nicht-Strukturgen-kodierende Region, welche in einer inaktivierten Verbindungsregion bei Sindbis-Nukleotid 7597, dem tandemartig inserierten synthetischen Verbindungsregionkern (modifiziert oder nicht-modifiziert), dem Glühwürmchen-Luziferase-Gen und den 3'-viralen Elementen, welche für die Genomreplikation notwendig sind, abschließt. Die Bezeichnungen dieser Vektoren sind wie folgt:

Sindbis-Luziferasevektor	tandemartig insertierte Verbindungsregion- Modifikation
pKSSINdIJRsirc-luc	Nicht modifiziert
pKSSINdIJRsirPc-luc	Permissive Änderungen
pKSSINdIJRsirNP7582-luc	Nicht-permissive Änderungen
pKSSINdIJRsirNP7584-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7585-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7586-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7587-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7588-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7593-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7594-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7595-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7596-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7597-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7599-luc	„
pKSSINdIJRsirNP7601-luc	„

[0285] Unter der Annahme, daß die Translationseffizienzen in allen oben unmittelbar gezeigten Luziferase-Vektoren gleich sind, werden die relativen Spiegel der subgenomischen Synthese durch Vergleich der Luziferaseproduktion 16 Stunden nach Infektion der BHK-21-Zellen verglichen. Die relativen Spiegel der subgenomischen Transkription werden durch Vergleichen der Luziferaseproduktion durch die Vektoren pKSSIN-BV-luc und pKSSINdIJRsirc-luc mit allen oben gezeigten Luziferase-Vektoren der modifizierten Verbindungsregion bestimmt.

[0286] Es wird erwartet, daß die Vektoren, welche den tandemartig insertierten synthetischen Verbindungsregionkern (pKSSINdIJRsirc und Derivate davon) enthalten, einen niedrigeren Spiegel der subgenomischen mRNA-Expression relativ zu dem pKSSINBV-Konstrukt aufweisen werden. In bestimmten Ausführungsformen kann es erforderlich sein, den Spiegel der subgenomischen mRNA-Expression, welcher von dem pKSSINdIJRsirc-Vektor beobachtet wird, zu vergrößern. Dies wird durch Ausdehnung an den 5' und 3' synthetischen Verbindungsregionkernenden mit 11 zusätzlichen flankierenden Sindbis-Nukleotiden gemäß der authentischen viralen Sequenz erreicht.

[0287] Das unten gezeigte synthetische Oligonukleotidpaar wird in vitro synthetisiert und enthält 46 Sindbis-Nukleotide, einschließlich aller 24 Nukleotide (gezeigt in Fettschrift) des minimalen Verbindungsregionkerns. Die Sindbis-Nukleotide werden durch die Apa I- und Xho I-Erkennungssequenzen, wie gezeigt, flankiert:

Oligonukleotid 1

CGGAAATAAAGCATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTCAGCATAGTACC

TCGAGGTACTATGCTGACTATTTAGGACCACCGTAGAGATGCTTTA
TTTC-CGGGCC

[0288] Die oberen Oligonukleotide werden zusammen in Anwesenheit von 10 mM Mg gemischt, auf 100°C für 5 Minuten erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Die annealten Oligonukleotide werden in einem 25 : 1 molaren Verhältnis von Insert zu dem pKSSINBVdIJR-Vektor ligiert, hergestellt entsprechend: vollständiger Verdau mit Xho I, gefolgt durch Verdau mit Apa I unter unvollständigen Bedingungen, welche eine Apa I-induzierte Spaltung pro Molekül (bei zwei möglichen Spaltungen) ergeben, Genreinigung des 10.655 bp-Fragmentes und Behandlung mit CIAP. Dieser Vektor, welcher die gesamte NSP-kodierende Region enthält, welche an einem inaktivierten Verbindungsregionkern, verknüpft mit einer ausgedehnten synthetischen Verbindungsregion und gefolgt durch 3' virale Elemente, welche für die Replikation benötigt werden und in dem pKSII+Plasmid enthalten sind, abschließt, ist als pKSSINdIJRsexjr bekannt.

[0289] Um die relativen Spiegel der subgenomischen mRNA-Synthese zu überprüfen, wird das Luziferase-Reportergen in den ausgedehnten Tandem-Verbindungsregion-pKSSINdIJRsexjr-Vektor inseriert. Dieses Konstrukt wird durch Verdau mit Xho I und Sac I und Behandlung mit CIAP des pKSSINdIJRsexjr-Plasmids und Gelreinigung des resultierenden ungefähr 10.200 bp Fragmentes erreicht. Das so behandelte Vektorfragment wird zusammen mit dem 2854 bp-kleinen Fragment, welches durch den Verdau von pKSII3'SIN-luc mit Xho I und Sac I resultiert, ligiert. Diese Konstruktion enthält die gesamte Sindbis-Nichtstruktur-Gen kodierte Region, welche in einer inaktivierten Verbindungsregion des Sindbis-Nukleotids 7597, der tandemartig inserierten ausgedehnten synthetischen Verbindungsregion, dem Glühwürmchen-Luziferase-Gen und den 3'-viralen Elementen, welche für die Genomreplikation notwendig sind, abschließt. Der Name dieses Vektors ist pKS-SINdIJRsexjr-luc.

[0290] Die relativen Spiegel der subgenomischen Transkription werden durch Vergleich der Luziferaseproduktion durch den pKSSINdIJRsexjr-luc-Vektor mit den pKSSINBV-luc und pKSSINdIJRsirc-luc-Vektoren bestimmt.

BEISPIEL 4

A. INSERTION DES ADENOVIRUS-FRÜHER ABSCHNITT-E3-GENS IN SINDBIS-VEKTOREN

[0291] Das Adenovirus Typ 2 (Ad 2) E3/19K-Gen ATCC Nr. VR-846 wird unmittelbar stromabwärts vom Kern des Verbindungsabschnitts in das pKSSINdIJRsirc-Plasmid kloniert, um die CTL-gelenkte Antwort des Wirts gegen Virus-spezifische Proteine zu inhibieren, die in Vektor-infizierten Zellen für Anwendungen, bei denen eine wiederholte Verabreichung des Therapeutikums gewünscht wird, exprimiert werden.

[0292] Kurz gefaßt wird Ad 2 in einer permissiven Zelllinie, beispielsweise HeLa- oder Vero-Zellen, vermehrt und nach dem Offensichtlich werden von zytopathologischen Auswirkungen werden die Virionen aus dem Zellsat aufgereinigt und die Ad 2-DNA wird aus dem Virus aufgereinigt.

[0293] Das Ad 2-DNA-E3/19K-Gen, einschließlich der Signalsequenz am Amino-Ende, gefolgt von der intraluminalen Domäne und dem Carboxy-terminalen zytoplasmatischen Schwanz, der dem E3-19K-Protein ermöglicht, sich in das endoplasmatische Retikulum einzulagern, befindet sich zwischen den viralen Nukleotiden 28812 und 29288. Die Isolation des Ad 2-E3-19K-Gens von der viralen genomischen DNA wird durch eine PCR-Amplifikation mit dem nachstehend gezeigten Primerpaar durchgeführt:

Ad 2-E3-Vorwärtsprimer (Ad 2-Nukleotide 28812–28835)

5'-TAT ATC TCC AGA TGA GGT ACA TGA TTT TAG GCT TG-3'

(SEQ. ID NR.14)

Ad 2-E3-Rückwärtsprimer (Ad 2-Nukleotide 29241–29213)

5'-TAT ATA TCG ATT CAA GGC ATT TTC TTT TCA TCA ATA AAA C-3'

(SEQ. ID NR. 15)

[0294] Zusätzlich zu den zu Ad 2-komplementären Sequenzen enthalten beide Primer eine 5'-Nukleotid-„Puffersequenz“ an ihren 5'-Enden für einen wirksamen Enzymverdau der PCR-Amplikonprodukte. Im Vorwärtsprimer wird diese Sequenz von einer Xho I-Erkennungsstelle gefolgt und im Rückwärtsprimer wird diese Sequenz von einer Cla I-Erkennungsstelle gefolgt. Somit wird das E3/19K-Gen in der 5' nach 3'-Richtung durch Xho I- und Cla I-Erkennungsstellen flankiert. Die Amplifikation des E3/19K-Gens von Ad 2-DNA wird nach dem folgenden PCR-Zyklusprotokoll durchgeführt:

Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Anzahl Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,17	5
72	3,5	
94	0,5	30
70	3,5	
72	10	10

[0295] Nach der Amplifikation wird das 451 bp-Amplikon in einem 1,5% Agarosegel aufgereinigt und anschließend wird es mit Xho I- und Cla I-Enzymen verdaut und in ein mit CIAP behandeltes pKSSINdIJRsjrc-Plasmid, welches zuvor mit Xho I und Cla I verdaut wurde, ligiert. Dieser Klon wird als pKSSINdIJRsjrcAdE3 bezeichnet. Unter Verwendung der gleichen Klonierungsstrategie wird das Ad 2-E3/19K-Gen in alle in Beispiel 2 beschriebenen Vektoren mit einem modifizierten synthetischen Verbindungsabschnitt eingefügt.

B. INSERTION DES HUMANEN CYTOMEGALOVIRUS H301-GENS IN SINDBIS-VEKTOREN

[0296] Das Humane Cytomegalovirus (HCMV) H301-Gen wird in das pKSSINdIJRsjrc-Plasmid unmittelbar stromabwärts des Verbindungsabschnitts-Kerns kloniert, um die CTL-gelenkte Antwort des Wirts gegen virus-spezifische Proteine zu inhibieren, die in Vektor-infizierten Zellen für Anwendungen, bei denen eine wiederholte Verabreichung des Therapeutikums gewünscht wird, exprimiert werden.

[0297] Kurz gefaßt wird HCMV Strang AD169 (ATCC Nr. VR-538) in einer permissiven Zelllinie, beispielsweise primäre humane Vorhaut-Fibroblasten (human foreskin fibroblasts, HFF) (GIBCO/BRL, Gaithersburg, MD) vermehrt und nach dem Auftreten von zytopathologischen Auswirkungen werden die Virionen aus dem Zellysat aufgereinigt und nachfolgend wird die HCMV DNA von den Virionen aufgereinigt.

[0298] Das HCMV H301-Gen ist zwischen den viralen Nukleotiden 23637 und 24742 angeordnet. Die Isolation des HCMV H301-Gens aus der viralen genomischen DNA wird mit einer PCR-Amplifikation mit dem nachstehend gezeigten Primerpaar durchgeführt:

HCMV H301-Vorwärtsprimer (Puffersequenz/Xho I-Stelle/HCMV Nukleotide 23637–23660)

5'-TAT ATC TCC AGA TGA TGA CAA TGT GGT GTC TGA CG-3'

(SEQ. ID NR. 16)

HCMV H301-Rückwärtsprimer (Puffersequenz/Cla I-Stelle/HCMV Nukleotide 24744–24722)

5'-TAT ATA TCG ATT CAT GAC GAC CGG ACC TTG CG-3'

(SEQ. ID NR. 17)

[0299] Zusätzlich zu den zum HCMV H301-Gen komplementären Sequenzen enthalten beide Primer eine fünf Nukleotid-„Puffersequenz“ an ihren 5'-Enden für einen wirksamen Enzymverdau der PCR-Amplikonprodukte. Diese Sequenz wird im Vorwärtsprimer von einer Xho I-Erkennungsstelle gefolgt und im Rückwärtsprimer wird diese Sequenz von einer Cla I-Erkennungsstelle gefolgt. Somit wird das HCMV H301-Gen in der 5' nach 3'-Richtung durch Xho I- und Cla I-Erkennungsstellen flankiert. Die Amplifikation des HCMV H301-Gens von HCMV DNA wird mit dem folgenden PCR-Zyklusprotokoll durchgeführt:

Temperatur (°C)	Zeit (Min.)	Anzahl Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,17	5
72	3,5	
94	0,5	30
70	3,5	
72	10	10

[0300] Nach der Amplifikation wird das 1129 bp-Amplikonprodukt in einem 1,0% Agarosegel aufgereinigt und nachfolgend mit den Xho I- und Cla I-Enzymen verdaut und in ein mit CIAP behandeltes pKSSINdIJRsirc-Plasmid, das zuvor mit Xho I und Cla I verdaut wurde, ligiert. Dieser Klon wird mit pKSSINdIJRsircH301 bezeichnet. Unter Verwendung der gleichen Klonierungsstrategie wird das HCMV H301-Gen in alle in Beispiel 3 beschriebenen Vektoren mit einem modifizierten synthetischen Verbindungsabschnitt eingefügt.

BEISPIEL 5

EXPRESSION VON VERSCHIEDENEN HETEROLOGEN GENEN VON SINDBIS-VEKTOREN

[0301] Das Plasmid pBS-ECAT (Jang et al., J. Virol 63: 1651, 1989) schließt die 5'-nicht translatierte Region des Enzephalomyocarditis-Virus (EMCV) von den Nukleotiden 260–848 des viralen Genoms ein, welches die interne Ribosomen-Eintrittsstelle (IRES) enthält. Die EMCV-Nukleotide 260–827 werden von pBS-ECAT durch PCR unter Verwendung des folgenden Primerpaares amplifiziert:

EMCV IRES Forward-Primer A (zur Insertion nächstliegend zu der funktionsunfähigen Verbindungsregion in Vektor pKSSINBVdIJR an der Apa I-Schnittstelle)

5'-TAT ATG GGC CCC CCC CCC CCC CCC AAC G-3' (SEQ.ID NR. 18)

EMCV IRES Forward-Primer B (zur Insertion zwischen heterologen Genen, endend mit Cla I-Schnittstellen und beginnend mit Nco I-Schnittstellen)

5'-TAT ATA TCG ATC CCC CCC CCC CCC CCA ACG-3' (SEQ.ID NR. 19)

EMCV IRES Reverse-Primer (zur Verwendung mit entweder Primer A oder B):

5'-TAT ATC CAT GGC TTA CAA TCG TGG TTT TCA AAG G-3'
(SEQ.ID NR. 20).

[0302] Das Amplikon, welches aus der Amplifikation mit dem Forward-Primer A und dem Reverse-Primer resultiert, wird durch Apa I- und Nco I-Erkennungssequenzen in einer 5 bp-„Puffersequenz“ flankiert.

[0303] Das Amplikon, welches aus der Amplifikation mit dem Forward-Primer B und dem Reverse-Primer resultiert, wird durch Cla I- und Nco I-Erkennungssequenzen in einer 5 bp-„Puffersequenz“ flankiert.

[0304] Die Amplifikation der EMCV IRES-Sequenz des pBS-ECAT-Plasmids wird mit dem folgenden PCR-Zyklusprotokoll durchgeführt:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Zahl der Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,17	5
72	3,5	
94	0,5	30
70	3,5	
72	10	10

[0305] Für die Insertion in den pKSSINBVdIJR-Vektor wird das 589 bp-Amplikon mit Apa I und Nco I verdaut, auf einem 1% Agarosegel gereinigt und in den CIAP-behandelten Vektor, welcher mit Apa I und Nco I verdaut wurde, ligiert. Das ATG, entsprechend dem Startcodon des heterologen Gens, welches unmittelbar stromabwärts zu dem EMCV IRES Insert insertiert werden soll, wird zum Erhalt einer Nco I-Schnittstelle (CCATGG) modifiziert.

[0306] Für die Insertion in die pKSSINBV- oder pKSSINBVdIJRsirc-Vektoren zwischen heterologe Gene wird das 589 bp-Amplikon mit Cla I und Nco I verdaut, auf einem 1% Agarosegel gereinigt und in den bicistronischen heterologen Gen-Vektor, welcher mit Cla I und Nco I verdaut wird und mit CIAP behandelt wird, ligiert. In einer bicistronischen heterologen Gen-Konfiguration wird das 3'-Ende des stromabwärts liegenden heterologen Gens modifiziert, um in einer Cla I-Erkennungsstelle zu enden. Das ATG, entsprechend dem Startcodon des zweiten stromabwärts liegenden heterologen Gens, welches unmittelbar stromabwärts von dem EMCV IRES-Insert insertiert werden soll, wird zum Erhalt einer Nco I-Schnittstelle (CCATGG) modifiziert. Deshalb ist die Reihenfolge der Komponenten von 5' nach 3': pKSSINBV- oder pKSSINBVdIJRsirc-Gen #1-Cla/Nco EMCV IRES-Gen #2-3'SIN. Die Insertion in allen modifizierten Verbindungsregion-Vektoren, beschrieben in Beispiel 2, folgt der hier angegebenen Strategie für die pKSSINBV oder pKSSINBVdIJRsirc-Vektoren.

[0307] Der pKSSINBVdIJR-Vektor, welcher eine bicistronische heterologe Konfiguration enthält, wird mit jedem der oben beschriebenen EMCV IRES-Amplikons konstruiert. Das erste EMCV IRES-Amplikon wird durch Apa I- und Nco I-Schnittstellen flankiert und wird unmittelbar stromabwärts zur funktionsunfähigen Verbindungsregion an der Apa I-Schnittstelle, wie oben beschrieben, insertiert. Dieser EMCV IRES-Sequenz folgt das erste heterologe Gen, welches in einer Cla I-Erkennungssequenz endet. Dem ersten heterologen Gen folgt die zweite EMCV IRES-Sequenz unter Verwendung des Amplikons, welches durch Cla I und Nco I-Erkennungssequenzen flankiert wird. Das zweite heterologe Gen folgt der zweiten EMCV IRES-Sequenz. Deshalb ist die Reihenfolge der Komponenten von 5' nach 3': SINBVdIJR-Apa/Nco EMCV IRES Gen #1-Cla/Nco EMCV IRES #2-3' SIN.

[0308] Das Plasmid pP2-5' (Pelletier et al. Mol. Cell Biol. 8: 1103, 1988) schließt die Nicht-translatierte Region des Poliovirus P2/Lansing-Stammes von den Nukleotiden 1–1.872 des viralen Genoms ein, welches Polio IRES enthält. Die Poliovirusnukleotide 320–631 werden von pP2-5' durch PCR unter Verwendung des folgenden Primerpaares, amplifiziert:

Polio IRES Forward-Primer A (zur Insertion nächstliegend zu der funktionsunfähigen Verbindungsregion in Vektor pKSSINBVdIJR an der Apa I-Schnittstelle)

5'- TAT ATG GGC CCT CGA TGA GTC TGG ACG TTC CTC -3'
(SEQ.ID NR. 21).

Polio IRES-Forward-Primer B (zur Insertion zwischen heterologen Genen, welche mit Cla I-Schnittstellen abschließen und mit Nco I-Schnittstellen beginnen)

5'-TAT ATA TCG ATT CGA TGA GTC TGG ACG TTC CTC -3'

(SEQ.ID NR. 22)

Polio IRES Reverse-Primer (zur Verwendung mit einem der Primer A oder B)

5'- TAT ATC CAT GGC TCC AAT TTG CTT TAT GAT AAC AAT C -3'

(SEQ.ID NR. 23)

[0309] Das Amplikon, welches aus der PCR mit dem oben gezeigten Polio IRES-Forward-Primer A-/Reverse-Primer-Paar resultiert, wird von Apa I und Nco I-Erkennungssequenzen in einer 5 bp-„Puffersequenz“ flankiert.

[0310] Das Amplikon, welches aus der PCR mit dem oben gezeigten Polio IRES Forward-Primer B/reverse-Primerpaar resultiert, wird von Cla I- und Nco I-Erkennungssequenzen in einer 5' bp-„Puffersequenz“ flankiert.

[0311] Die Amplifikation der Polio IRES-Sequenz aus dem pP2-5'-Plasmid wird mit dem in Beispiel 5 gezeigten PCR-Protokoll durchgeführt:

[0312] Für die Insertion in den pKSSINBVdIJR-Vektor wird das 333 bp-Amplikon mit Apa I und Nco I verdaut, auf einem 1,5% Agarosegel gereinigt und in den mit Apa I und Nco I verdauten und mit CIAP behandelten Vektor ligiert. Das ATG, entsprechend dem Startcodon des heterologen Gens, welches unmittelbar stromabwärts zum Polio IRES-Insert insertiert werden soll, wird zum Erhalt einer Nco I-Schnittstelle (CCATGG) modifiziert.

[0313] Zur Insertion in die pKSSINBV oder pKSSINBVdIJRsirc-Vektoren zwischen heterologen Genen wird das 333 bp Amplikon mit Cla I und Nco I verdaut, auf einem 1,5% Agarosegel gereinigt und in den bicistronischen heterologen Gen-Vektor, welcher mit Cla I und Nco I verdaut ist und mit CIAP behandelt ist, ligiert. In einer bicistronischen heterologen Genkonfiguration wird das 3'-Ende des stromaufwärts liegenden heterologen Genes modifiziert, um in einer Cla I-Erkennungsstelle zu enden. Das ATG, entsprechend dem Startcodon des zweiten stromabwärts liegenden heterologen Genes, welches unmittelbar stromabwärts zu dem Polio IRES-Insert insertiert werden soll, wird zum Erhalt einer Nco I-Schnittstelle (CCATGG) modifiziert. Deshalb ist die Reihenfolge der Komponenten von 5' nach 3': pKSSINBV oder pKSSINBVdIJRsirc-Gen #1-Cla/Nco Polio IRES-Gen #2-3'SIN. Die Insertion in alle modifizierten Verbindungsregion-Vektoren, beschrieben in Beispiel 3, folgt der hier für pKSSINBV- oder pKSSINBVdIJRsirc-Vektoren angegebenen Strategie.

[0314] Der pKSSINBVdIJR-Vektor, welcher eine bicistronische heterologe Konfiguration enthält, wird mit jedem der Polio-IRES-Amplikons, wie oben beschrieben, konstruiert. Das erste Polio-IRES-Amplikon wird von zwei Apa I- und Nco I-Schnittstellen flankiert und wird direkt stromabwärts zu der funktionsunfähigen Verbindungsregion an der Apa I-Schnittstelle, wie oben beschrieben, insertiert. Dieser Polio-IRES-Sequenz folgt das erste heterologe Gen, welches an einer Cla I-Schnittstelle endet. Dem ersten heterologen Gen folgt eine zweite Polio-IRES-Sequenz unter Verwendung der das Amplikon flankierenden Cla I und Nco I-Schnittstellen. Das zweite heterologe Gen folgt der zweiten Polio-IRES-Sequenz. Daher ist vom 5'- bis zum 3'-Ende die Reihenfolge der Komponenten: SINBVdIJR-Apa/Nco Polio-IRES-Gen #1-Cla/Nco EMCV-IRES #2-3' SIN.

[0315] Die 220 bp BiP-cDNA, welche der 5'-Leader-Region der mRNA des humanen schwere Kette-Immunglobulin-bindenden Proteins entspricht, wird von dem Klon pGEM5ZBiP5' unter Verwendung von PCR amplifiziert. Die Sequenz, welche der BiP-cDNA entspricht, wurde ursprünglich in dem Bacteriophagen lamda hu28-1-Klon des humanen GRP78-Genes (Ting and Lee, DNA 7: 275-286, 1988) bestimmt. Der in der PCR zu verwendende Forward-Primer variiert, abhängig von dem Sindbis-Vektor, in welchem die BiP-cDNA insertiert wird. Der Reverse-Primer für die PCR-Reaktion ist für alle Sindbis-Vektoren der Gleiche. Die Amplifikation der BiP-cDNA-Sequenz von pGEM5ZBiP5' aus dem Plasmid für die Insertion in die Sindbis-Vektor pKSSINBVdIJR direkt stromabwärts zu der funktionsunfähigen Verbindungsregion wird durch Amplifikation mit dem folgenden Forward-Primer erreicht:

5'- TAT ATG GGC CCG GTC GAC GCC GGC CAA GAC -3'

(SEQ.ID NR.24)

[0316] Zusätzlich zu den BiP-cDNA komplementären Sequenzen, welche bei Nukleotid 12 beginnen, enthält der Primer eine fünf Nukleotide-lange „Puffersequenz“ an seinem 5'-Ende für einen effizienten Enzymverdau des PCR-Amplikonprodukts. Dieser Sequenz folgt die Apa I-Schnittstelle.

[0317] Die Amplifikation der BiP-cDNA-Sequenz vom pGEM5ZBiP5'-Plasmid für die Insertion in die Sindbis-Vektoren pKSSINBV oder pKSSINBVdIJRsjrc wird durch Amplifikation mit dem folgenden unten gezeigten Forward-Primer erreicht. Für diese Vektoren wird die BiP-cDNA zwischen zwei heterologe Gene insertiert, welche in der Region, welche den Sindbis-Strukturgenen entspricht, lokalisiert sind.

5'- TAT ATA TCG ATG GTC GAC GCC GGC CAA GAC-3'

(SEQ.ID NR. 25)

[0318] Zusätzlich zu den BiP-cDNA komplementären Sequenzen, welche am Nukleotid 12 beginnen, enthält der Primer eine fünf Nukleotide-lange „Puffersequenz“ an seinem 5'-Ende für einen effizienten Enzymverdau des PCR-Amplikonprodukts. Dieser Sequenz folgt die Cla I-Erkennungssequenz.

[0319] Der Reverse-Primer für die Amplifikation der BiP-cDNA-Sequenz vom pGEM5ZBiP5'-Plasmid für die Insertion in die Sindbis-Vektoren pKSSINBVdIJR, pKSSINBV oder pKSSINBVdIJRsjrc, ist:

5'- TAT ATC CAT GGT GCC AGC CAG TTG GGC AGC AG-3'

(SEQ.ID NR. 26)

[0320] Zusätzlich zu den BiP-cDNA komplementären Sequenzen, welche am Nukleotid 12 beginnen, enthält der Reverse-Primer eine fünf Nukleotide-lange „Puffersequenz“ an seinem 5'-Ende für einen effizienten Enzymverdau der PCR-Amplikonprodukte. Dieser Sequenz folgt die Nco I-Erkennungssequenz.

[0321] Die Amplifikation der BiP-cDNA von dem pGEM5ZBiP5' wird mit dem PCR-Protokoll, welches oben beschrieben ist, durchgeführt: Für die Insertion in den pKSSINBVdIJR-Vektor wird das 242 bp-Amplikon mit Apa I und Nco I verdaut, auf einem 2%igen Agarosegel gereinigt und in den mit Apa I und Nco I verdauten und mit CIAP behandelten Vektor ligiert. Das ATG, welches dem Startcodon des heterologen Genes entspricht, welches direkt stromabwärts zu dem BiP-cDNA-Insert insertiert werden soll, wird zum Erhalt einer Nco I-Schnittstelle (CCATGG) modifiziert.

[0322] Für die Insertion in die pKSSINBV- oder pKSSINBVdIJRsjrc-Vektoren zwischen heterologe Gene wird das 242 bp-Amplikon mit Cla I und Nco I verdaut, auf einem 2%igen Agarosegel gereinigt und in den bicistronischen heterologen, mit Cla I und Nco I verdauten und mit CIAP behandelten Gen-Vektor ligiert. In einer bicistronischen heterologen Genkonfiguration wird das 3'-Ende des stromaufwärts liegenden heterologen Genes modifiziert, so daß es in einer Cla I-Erkennungssequenz endet. Das ATG, welches dem Startcodon des zweiten stromabwärts liegenden heterologen Genes entspricht, welches direkt stromabwärts zu dem BiP-cDNA-Insert insertiert werden soll, wird zum Erhalt einer Nco I-Schnittstelle (CCATGG) modifiziert. Deshalb ist von 5' nach 3' die Reihenfolge der Komponenten: pKSSINBV oder pKSSINBVdIJRsjrc-Gen #1-Cla/Nco BiP-Gen #2-3' SIN. Die in Beispiel 2 beschriebene Insertion in alle modifizierten Verbindungsregion-Vektoren folgt der hier für die pKSSINBV oder pKSSINBVdIJRsjrc-Vektoren angegebenen Strategie.

[0323] Der pKSSINBVdIJR-Vektor, welcher eine bicistronische heterologe Konfiguration enthält, wird mit jedem der oben beschriebenen BiP-cDNA-Amplikons konstruiert. Das erste BiP-cDNA-Amplikon wird von Apa I- und Nco I-Sequenzen flankiert und wird direkt stromabwärts zu der funktionsunfähigen Verbindungsregion an der Apa I Schnittstelle, wie oben beschrieben, insertiert. Dieser BiP-Sequenz folgt das erste heterologe Gen, welches an einer Cla I-Erkennungssequenz endet. Dem ersten heterologen Gen folgt die zweite BiP-cDNA-Sequenz, unter Verwendung des durch Cla I- und Nco I-Erkennungssequenzen flankierten Amplikons. Das zweite heterologe Gen folgt der zweiten BiP-Sequenz. Deshalb ist von 5' nach 3' die Reihenfolge der Komponenten: SINBVdIJR-Apa/Nco BiP-Gen #1-Cla/Nco BiP-Gen #2-3' SIN.

[0324] Die Sequenzen, welche das ribosomale Durchlesen fördern, werden direkt stromabwärts zu der funktionsunfähigen Verbindungsregion in den pKSSINBVdIJR-Vektor plziert, welcher ribosomales Scannen in genomischer mRNA vom Nicht-Strukturgenende zu den heterologen Genen erlaubt. Die heterologen Proteine

werden von der mRNA mit genomischer Länge durch ribosomales Scannen exprimiert. Dies soll das Leben der infizierten Targetzellen verlängern, da keine subgenomische Transkription in mit diesem Vektor infizierten Zellen stattfindet. Ferner werden diese gleichen ribosomalen Scanningsequenzen zwischen heterologe Gene, welche in polycistronischen subgenomischen mRNAs enthalten sind, angeordnet. Die ribosomale Scanningsequenz, welche in dem pKSDINBVdIJR-Vektor und zwischen heterologen Genen in der polycistronischen mRNA-Region zu verwenden ist, lautet:

5'- TTA ATT AAC GGC CGC CAC CAT GG -3'

(SEQ.ID NR. 27)

[0325] Die fett gedruckten Codons beziehen sich auf das Ochre-Stopcodon bzw. das AUG-Startcodon. Die unterstrichenen Basen, welche das Stopcodon umgeben, beziehen sich auf die Pac I-Erkennungssequenz, und die unterstrichenen Basen, welche das Startcodon umgeben, beziehen sich auf die Noc I-Erkennungssequenz. Der intercistronische Abstand von 15 bp zwischen den Start- und Stopcodons erlaubt, wie kürzlich gezeigt, ein effizientes ribosomales Durchlesen (Levine et al., Gene 108: 167–174, 1991). Die Sequenzen, welche das ATG-Startcodon von den Basen –9 bis +1 umgeben, entsprechen der Kozak-Konsensus-Sequenz für effiziente Translationsinitiation (Kozak, Cell 44: 283–292, 1986). Wo möglich, wird das 3'-terminale Nukleotid, welches der carboxyterminalen Aminosäure entspricht, durch ortsspezifische Mutagenese in ein T geändert. Das 5'-terminale Nukleotid, welches der aminoterminalen Aminosäure in dem stromabwärts liegenden Cistron entspricht, wird auch durch ortsspezifische Mutagenese in ein G geändert.

[0326] Die Insertion der intercistronischen Sequenz zwischen heterologen Genen oder stromabwärts zu der funktionsunfähigen Verbindungsregion im Vektor pKSDINBVdIJR, welcher, wie oben beschrieben, modifiziert ist, wird durch Insertion des unten gezeigten doppelsträngigen Oligonukleotidpaares in kompatible Pac I/Nco I Enden erreicht:

Durchlesen der Sense-Oligonukleotide

5'-TAA CGG CCG CCA C-3' (SEQ.ID NR. 28)

Durchlesen der Antisense-Oligonukleotide

5'-CCA TGG TGG CGG CCG TTA AT-3' (SEQ.ID NR. 29)

[0327] Die obigen Nukleotide werden in gleichen molaren Mengen in Gegenwart von 10 mM MgCl₂ gemischt, auf 95°C für 5 Minuten erhitzt, langsam Raumtemperatur abkühlen gelassen, was die gewünschte, intercistronische, durch Pac I- und Nco I-Schnittstellen flankierte Sequenz ergibt. Die intercistronische Sequenz wird dann in den geeigneten Vektor, welcher Pac I- und Nco I-kompatible Sequenzen enthält, ligiert.

BEISPIEL 6

EXPRESSION VON VERSCHIEDENEN HETEROLOGEN GENEN DURCH ZUSAMMENPACKEN

[0328] Wie oben in einer Ausführung der Erfindung angemerkt, können Sindbis Nicht-Strukturproteingene und Strukturproteingene als getrennte positive-Sense RNA-Moleküle zusammengepackt werden, welche ihre Replikationsfähigkeit beibehalten, wenn jede der RNAs cis-wirkende Sequenzen enthält, welche für Replikation und Verpackung benötigt werden. Daher sollten in dieser Ausführung alle zusammengepackten Auravirus-RNA-Fragmente auch eine 5'-Sequenz enthalten, welche zur Initiation der Transkription von Aura RNA, einer Auravirus-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz und mindestens einer Kopie der RNA-Verpackungssequenz befähigt ist. Mindestens eines der zusammen verpackten RNA Moleküle muß die Sequenz enthalten, welche die Auravirus-Nicht-Strukturproteine kodiert. In den bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung enthalten ein oder mehrere RNA Fragmente, welche zusammengepackt werden sollen, auch eine virale Verbindungsregion, gefolgt von einem heterologen Gen.

A. KONSTRUKTION DER ZUSAMMENGEPACKTEN EXPRESSIONSKASSETTEN ZUR EXPRESSION VON VERSCHIEDENEM

1. Heterologe Gene

[0329] Um die Durchführbarkeit der Zusammenpackung, um die Expression von verschiedenen heterologen

Genen zu erlauben, zu zeigen, wurden zwei Vektorkonstrukte erzeugt. Das erste Konstrukt besteht aus einer 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription der Sindbisvirus-RNA befähigt ist, Sindbis RNA Sequenzen, welche für die Verpackung benötigt werden, Sequenzen, welche die Synthese von Nicht-Strukturproteinen 1–4 kodieren, einer Sindbis Verbindungsregion, dem Luziferasegen und Sindbis 3'-Sequenzen, welche für die Synthese der Minusstrang-RNA benötigt werden. Das zweite Konstrukt besteht aus einer 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Sindbisvirus befähigt ist, einer Sindbis-Verbindungsregion, Sindbis-Sequenzen, welche für die Verpackung benötigt werden, Sequenzen, welche das LacZ-Gen kodieren und Sindbis 3'-Sequenzen, welche für die Synthese von Minusstrang RNA benötigt werden. RNA-Transkripte von diesen Konstrukten, welche in eine Verpackungszelllinie transfiziert werden, werden zusammengepackt, um einen Vektorpartikel herzustellen, welcher zum Transfer der Expression sowohl von Luziferase als auch β -Galactosidase in die gleiche eukaryotische Zelle befähigt ist.

[0330] Das β -Galactosidase-Reportergen wird in den Sindbis Basisvektor (pKSSINBV), gefolgt durch Deletion eines Teils des Sindbis-Nicht-Strukturproteins aus dem Vektor, inseriert. Die RNA dieses Konstrukts wird mit RNA aus dem Sindbis Luziferasevektor (pKSSINBV-luc) kotransfiziert und durch eine der unten beschriebenen Methoden zusammengepackt. Die Infektion von frischen BHK-21-Zellen mit Vektorpartikeln, welche die zusammengepackte RNA-Expressionskassetten enthalten, sollten die Expression von sowohl Luziferase als auch β -Galactosidase in der gleichen Zelle ergeben.

B. KONSTRUKTION DER β -GALACTOSIDASE EXPRESSIONSKASSETTE

[0331] Das lacZ-Gen wird durch Verdau der pSV- β -Galactosidasevektor-DNA (Promega Corp., Madison, WI) mit den Enzymen HindIII und Sall erhalten. Das 3749 bp-Fragment, welches das LacZ-Gen enthält, wird in einem 1% Agarosegel gereinigt. Anschließend wird dieses Fragment in das pSP72-Plasmid (Promega Corp.) ligiert, welches auch mit HindIII und Sall verdaut worden ist und unter Verwendung von GeneClean (Bio101 Corp., San Diego, CA) gereinigt worden ist. Dieses Konstrukt ist als pSP72-lacZ bekannt. Das Plasmid pSP72 wird mit den Enzymen XhoI und XbaI verdaut, und das 3767 bp lacZ-enthaltende Fragment wird in einem 1% Agarosegel gereinigt. Dieses Fragment wird dann in den pKSSINBV ligiert, welcher auch mit XhoI und XbaI verdaut worden ist und unter Verwendung von GeneClean gereinigt worden ist. Dieses Sindbis Konstrukt, welches lacZ enthält, ist als pKSSINBV-lacZ bekannt. Das Plasmid pKSSINBV-lacZ wird anschließend mit dem Enzym AgeI verdaut, welches bei den Nukleotiden 3172 und 6922 der Sindbis Nicht-Strukturproteine-Gensequenzen spaltet. Das verbleibende Vektorfragment wird durch GeneClean gereinigt und seine Enden religiert. Das Plasmid weist jetzt eine 3750 bp-Deletion in den Sindbis Nicht-Strukturprotein-Genen auf, welche sie funktionell inaktiviert. Dieses Konstrukt ist als pKSSINBV Δ INSP-lacZ bekannt.

[0332] SP6-Transkripte von pKSSINBV Δ INSP-lacZ und pKSSINBV-luc werden, wie oben beschrieben, hergestellt. Diese RNA-Transkripte werden in Verpackungszellen kotransfiziert, welche die Sindbis Strukturproteine durch einen, der kürzlich beschriebenen, Mechanismen exprimieren. Jedes RNA-Transkript enthält eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription eines Sindbisvirus befähigt ist, RNA-Sequenzen, welche für die Verpackung benötigt werden, eine Sindbis Verbindungsregion, ein Reportergen und Sindbis-3'-Sequenzen, welche für die Synthese einer Minusstrang-RNA benötigt werden. Die pKSSINBV-luc Transkripte enthalten auch die Sindbis Nicht-Strukturproteine. In kotransfizierten Zellen werden beide RNA-Transkripte repliziert, und einige der viralen Partikel werden beide RNA-Transkripte, welche in den gleichen Partikeln verpackt sind, enthalten. Die Infektion von frischen Zellen mit zusammengepackten RNA-Partikeln ergibt eine Zelle, welche sowohl Luziferase als auch β -Lactosidase exprimiert.

C. ZUSAMMENVERPACKUNG VON VERSCHIEDENEN EXPRESSIONSKASSETTEN, UM DIE VERPACKUNGSKAPAZITÄT ZU VERGRÖßERN

[0333] Große Gene, wie der Faktor VIII, können von Vorteil bei der Zusammenverpackung sein. Die Insertion der cDNA, welche den Faktor VIII kodiert, in den Sindbis Basisvektor (pKSSINBV) ergibt ein RNA-Transkript von etwa 16 kb Länge. Wegen der vergrößerten Länge kann diese RNA nicht effizient repliziert oder verpackt werden. Unter Verwendung des oben beschriebenen Ansatzes konnten die Sindbis Nicht-Strukturprotein- und Faktor VIII-Gene auf zwei getrennte RNA-Moleküle von ungefähr 8 kb und 9 kb in der Länge aufgeteilt werden und in die gleichen Partikel zusammenverpackt werden.

D. KONSTRUKTION EINER EXPRESSIONSKASSETTE DES FAKTORS VIII

[0334] Das pKSSINBV-Konstrukt wird mit dem Enzym SacI verdaut, welches direkt nach dem Sindbis-3'-Ende und der Poly-A-Sequenz spaltet. Die überhängenden 3'-Enden werden durch Zugabe des Enzyms

T4-DNA-Polymerase und dNTPs geglättet und für 10 Minuten bei 16°C inkubiert. Das verdauten Fragment wird unter Verwendung von GeneClean gereinigt und in einen 12 Nukleotide langen selbstkomplementären Linker (5'-GTCACCGGTGAC-3') (SEQ. ID NR: 30), welcher die SgrAI Erkennungssequenz enthält, ligiert. Dieser Schritt ist notwendig, da das Faktor VIII-Gen mehrere SacI Schnittstellen enthält, und die SgrAI-Erkennungssequenz für die SacI-Sequenz substituiert ist, um eine Sequenz für die Linearisierung des Plasmids vor der SP6-Transkription zu erzeugen. Dieses Konstrukt ist als pKSSINBV-SgrAI bekannt. Das pKSSINBV-SgrAI Konstrukt wird mit den Enzymen XbaI und NotI verdaut und unter Verwendung von GeneClean gereinigt. Die cDNA-Sequenz des Faktors VIII wird durch Verdau mit den Enzymen XbaI und NotI erhalten. Das 8 kb Fragment, welches den Faktor VIII kodiert, wird in einem 1% Agarosegel gereinigt und anschließend in den XbaI/NotI verdauten pKSSINBV-SgrAI ligiert. Dieses Konstrukt ist als pKSSINBV-Faktor VIII bekannt.

[0335] Das pKSSINBV-Faktor VIII Konstrukt wird mit Age I verdaut, welches an den Sindbis-Nicht-Strukturproteinen bei den Nukleotiden 3172 und 6922 spaltet, unter Verwendung von GeneClean gereinigt und mit sich selbst relegiert. Dieses Konstrukt weist jetzt eine 3750 bp-Deletion in den Sindbis-Nicht-Strukturproteinen auf, welches sie funktionell inaktiviert. Dieses Konstrukt ist als pKSSINBVdINSP-Faktor VIII bekannt.

[0336] Die SP6-Transkripte des pKSSINBVdINSP-Faktors VIII und des pKSSINBV werden, wie oben beschrieben, hergestellt. Diese RNA-Transkripte werden in die Verpackungszellen kotransfiziert, welche die Sindbis Strukturproteine, durch einen oben beschriebenen Mechanismus, exprimieren. Beide RNA-Transkripte enthalten eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription von Sindbis-RNA-Sequenzen befähigt ist, welche für die RNA-Verpackung benötigt werden, eine Sindbis-Verbindungsregion und die Sindbis 3'-Sequenzen, welche für die Synthese der Minusstrang-RNA benötigt werden. Zusätzlich enthält das pKSSINBV-Transkript die Sindbis-Nicht-Strukturprotein-Gene, und das pKSSINBV-Faktor VIII-Konstrukt enthält die Faktor VIII Gene, aber nicht die Sindbis Nicht-Strukturproteingene. In kotransfizierten Zellen werden beide RNA-Transkripte repliziert, und einige virale Partikel enthalten beide in den gleichen Vektorpartikel zusammenverpackte RNA-Transkripte. Die Infektion der frischen BHK-21-Zellen mit der zusammenverpackten RNA ergibt nur die Faktor VIII-Expression, wenn beide RNA-Moleküle in der gleichen Zelle vorliegen.

E. KONSTRUKTION EINES AURAVIRUS-ZUSAMMENVERPACKUNGSVEKTORS

[0337] Um ein Auravirus-Expressionssystem analog zu dem für Sindbis beschriebenen zu entwickeln, werden Standardtechniken, welche im Stand der Technik bekannt sind, genauso wie spezifische Ansätze, welche in diesem Patent beschrieben sind, für die Konstruktionen verwendet. Das von ATCC erhaltene Virus wird in den gezüchteten Zellen vermehrt, seine Virion-RNA extrahiert und unter Verwendung von konventionellen Techniken, die cDNA, welche sich über das gesamte Genom erstreckt, synthetisiert und kloniert. Diese cDNA wird dann verwendet, um Gentransfer-Vektorsysteme, im Prinzip ähnlich zu diesen, beschrieben für das Sindbis-Patent, zu konstruieren, einschließlich, aber nicht begrenzt auf, ein Replikon, welches zum Tragen von dem heterologen Genen) befähigt ist, Verpackungszelllinien, welche die strukturellen Proteingene exprimieren und einzigartig für dieses System, ein getrennter Verpackungs-kompetenter subgenomischer Vektor, welcher befähigt ist, das (die) zusätzliche(n) heterologe(n) Gene) zu tragen. Da die Auravirus-subgenomische RNA ein Verpackungssignal enthält, mußten Vorexperimente durchgeführt werden, um diese Sequenz zu identifizieren, um deren Inaktivierung während des Ersetzens durch ein heterologes Genen) zu verhindern. Nach der Identifizierung dieser Verpackungssequenz werden individuelle Elemente dieses Aura-basierten Systems erzeugt.

[0338] Ein Basis-Replikonvektor wird konstruiert, um die folgenden minimalen Anforderungen zu enthalten: Aura-5'-Sequenzen, welche für die Replikation notwendig sind, Nicht-Strukturprotein-kodierende Regionen, eine modifizierte oder nicht modifizierte Verbindungsregion für subgenomische mRNA-Synthese, eine multiple Klonierungssequenz für die Insertion von einem heterologen Gen(en), eine oder mehrere Kopien des Verpackungssignals und 3'-Aura-Sequenzen, welche für die Replikation wichtig sind, einschließlich einer polyadenylierten Sequenz. Ein stromaufwärts liegender Bakteriophagen-RNA-Polymerase-Promotor wird für die in vitro Transkription der Replikon-RNA verwendet. Alternativ wird ein eukaryotischer RNA-Polymerase-Promotor für die direkte Transkription von der cDNA verwendet.

[0339] Ein Verpackungs-kompetenter subgenomischer Vektor soll derart konstruiert werden, daß er die folgenden Minimalanforderungen erfüllt: Eine modifizierte oder nicht-modifizierte Verbindungsregion, eine multiple Klonierungssequenz zur Insertion von einem heterologen Gen(en), eine oder mehrere Kopien des Verpackungssignals und 3'-Aura-Sequenzen, welche für die Replikation/Minus-Strangsynthese notwendig sind, einschließlich einer Polyadenylierungssequenz. Der subgenomische Vektor kann in einigen Fällen mit Aura-5'-Replikations-Sequenzen konstruiert werden, welche stromabwärts zu der Verbindungsregion positioniert sind, so daß der Vektor als ein Amplikon fungiert. Die Transkription der subgenomischen Vektor-RNA wird in

vitro unter Verwendung eines Bakteriophagen-RNA-Polymerase-Promotors oder der cDNA in vivo unter Verwendung eines eukaryotischen RNA-Polymerase-Promotors durchgeführt werden. Ferner kann das anfängliche Transkript in Sense-Konfiguration oder in Antisense-Konfiguration vorliegen.

[0340] Verpackungszelllinien werden, wie kürzlich für Sindbis-Vektoren beschrieben, derart konstruiert, daß die mRNA für eine oder mehrere der Strukturproteine von der Verbindungsregion transkribiert wird und durch das Aura-Replikon induzierbar ist. In anderen Fällen wird ein oder mehrere Strukturproteine unter der Kontrolle eines induzierbaren oder konstitutiven eukaryotischen Promotors exprimiert werden. In jedem Fall werden spezifische inaktivierende Mutationen an einigen Verpackungssequenzen durchgeführt, welche in den Strukturproteingenen vorliegen, um die Enkapsidierung dieser Sequenzen mit dem Replikon zu verhindern. Diese Mutationen sind stille Änderungen, gewöhnlich an der dritten Position des Codons, welche nicht die kodierten Aminosäuren beeinflusst.

[0341] Die Fähigkeit, verschiedene heterologe Gene zu verpacken, wird für viele therapeutische Anwendungen benützt, welche die Expression von verschiedenen Zytokinen, verschiedenen CTL-Epitopen, Kombinationen von Zytokinen und CTL-Epitopen, um die Immunpräsentation zu vergrößern, verschiedene Untereinheiten eines therapeutischen Proteins, Kombinationen von therapeutischen Proteinen und Antisense-RNAs, usw. einschließen, aber nicht darauf begrenzen. Zusätzlich zu seinem Nutzen für die Expression von verschiedenen heterologen Genen ermöglicht die Verpackung von subgenomischen mRNAs in Virionen diesem Vektorsystem auch den Transfer von extrem langen heterologen Sequenzen, welche in anderen Alphavirussystemen unmöglich sein könnten. Darüber hinaus kann dieser mehrphasige Ansatz auch für die Entwicklung von Herstellerzelllinien nützlich sein, wobei Replikaseproteine und Strukturproteine stabil exprimiert werden, und ein beliebiges heterologes Gen, welches in einem subgenomischen Vektor enthalten ist, könnte dann schnell als stabiler integrierender Bestandteil eingeführt werden.

BEISPIEL 7

KONSTRUKTION VON SINDBISVIRUS-VERPACKUNGSZELLINIEN

[0342] Eine weitere Ausführungsform des Sindbis-Gentransfersystems betrifft die Entwicklung von Sindbis-Verpackungszelllinien.

[0343] Die Nachbildung der Sindbis-Verpackungszelllinie nach dem natürlichen Replikationszyklus des Sindbisvirus sollte eine Zelllinie ergeben, welche hohe Spiegel der Genexpression ergibt, basierend auf der Zahl der zur Translation befähigten RNA-Moleküle, welche von dem replizierenden RNA-Molekül erzeugt werden. Auf der anderen Seite sind positiv-strängige RNA-Viren darauf gerichtet, defekt-interferierende RNAs herzustellen, welche darauf gerichtet sein können, den RNA-Vektor zu verändern, um so die Gesamteffektivität der Vektorpartikel zu verringern, und welche auch die hohen Spiegel der Expression während ausgedehnten Zuchtungsperioden verringern können. Deshalb ist ein Ansatz eingerichtet worden, in welchem ein stabil integrierter DNA-Expressionsvektor hergestellt wird, um das Sindbis-Vektor-RNA-Molekül zu erzeugen, welches die Fähigkeit beibehält, selbst zu replizieren. Dieser Ansatz erlaubt kontinuierliche Vektor-Expression über lange Zuchtungszeiträume, da das integrierte DNA-Vektor-Expressionssystem durch einen Arzneimittel-Selektionsmarker aufrechterhalten wird, und das DNA-System konstitutiv unveränderte RNA-Vektoren exprimiert, welche nicht durch defekte RNA-Kopien ausverdünnt werden können. In dieser Hersteller-Zellkonfiguration wird der DNA-basierte Sindbis-Vektor anfänglich in die Verpackungszelllinie durch Transfektion eingeführt, da Größenbegrenzungen die Verpackung des Expressionsvektors in einen viralen Vektorpartikel für die Transduktion verhindern könnten. Auch für diese Konfiguration wird die T7-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz des Plasmids, welche kürzlich verwendet worden ist, um die Vektor-RNA zu transkribieren, durch eine andere geeignete Promotorsequenz, welche durch die verwendete Elternzelllinie definiert ist, ersetzt. Diese Plasmidsequenz würde auch einen Selektionsmarker unterschiedlich von diesen, welche verwendet werden, um die Verpackungszelllinie zu erzeugen, enthalten.

[0344] Die Expression der Sindbisproteine und/oder Replikon-RNA auf bestimmten Spiegeln kann zytotoxische Effekte in Verpackungszelllinien ergeben. Daher ist es in einigen Fällen für diese Elemente wünschenswert, nur exprimiert zu werden, nachdem die Zellen sich auf eine gewisse kritische Dichte vermehrt haben. Zu diesem Zweck sind zusätzliche Modifikationen durchgeführt worden, wobei die Strukturproteine, welche für die Verpackung notwendig sind, nur nach der Induktion durch den RNA-Vektor selbst oder anderen Stimulanzien synthetisiert werden. Einige Modifikationen erlauben auch die individuelle Expression dieser Proteine unter der Kontrolle von getrennt induzierbaren Elementen unter Verwendung von Expressionsvektoren, welche die Gene, welche diese Proteine kodieren, entkoppeln. Zusätzlich kann die Expression des induzierten Vektormole-

küls selbst durch noch ein anderes induzierbares System kontrolliert werden. Diese Konfiguration ergibt eine Kaskade von Ereignissen, welche der Induktion folgen, welche schließlich zu der Herstellung von verpackten Vektorpartikeln führt.

A. AUSWAHL EINER ELTERNZELLINIE FÜR DIE ENTWICKLUNG DER SINDBIS-VERPACKUNGSZELLINIE

1. Persistent oder chronisch infizierbare Zellen

[0345] Ein wichtiges Kriterium für die Auswahl möglicher Elternzelllinien, um Sindbis-Verpackungszelllinien zu erzeugen, ist die Wahl von Zelllinien, welche nicht während der Sindbis-Vektorreplikation und -produktion lysiert werden. Dieses Kriterium ist für die Entwicklung einer Sindbis-Vektor-Herstellerzelllinie essentiell, welche über lange Zeiträume vermehrt werden kann und als eine stabile Vektorquelle verwendet werden kann. Es ist bekannt, daß die Sindbis-Infektion der meisten Säugerzellen die Lyse der Zelle ergibt; die Verwendung von verschiedenen Insektenzelllinien sollte dieses Problem jedoch umgehen. Als ein Beispiel ergibt die Infektion von *Aedes albopictus*-Zellen mit Sindbisvirus ein persistentes oder chronisches nicht-zytopathisches Viruswachstum, in welchem die infizierten Zellen lebensfähig bleiben und kontinuierlich Virus ausscheiden. Andere Insektenzelllinien wie *Aedes aegypti*-, *Spodoptera frugiperda*- und *Drosophila melanogaster*-Zelllinien sollten auch die gleiche persistente Infektion ausüben. Deshalb verwendet die erste Sindbis-Verpackungszelllinien-Konfiguration eine Insekten-Elternzelllinie, wie die *Aedes albopictus*- oder *Drosophila*-Zelllinie, welche einen stabil transfizierten Expressionsvektor, welcher die Sindbis-Strukturproteine unter der Kontrolle von induzierbaren oder nicht-induzierbaren Promotoren, welche in diesen Zelltypen aktiv sind, enthält und einen selektierbaren Marker koexprimiert.

[0346] Kürzlich ist ein Sindbisvirus-induziertes Protein zellulären Ursprungs, welches mit der Herunterregulation der Sindbisvirus-Produktion in infizierten *Aedes albopictus*-Zellen assoziiert worden ist, identifiziert und gereinigt worden (Virologie 194: 44). Das Protein ist ein kleines hydrophobes Peptid von etwa 3200 Da., welches den antiviralen Status induzieren und sowohl die 49S als auch die 26S virale RNA-Synthese inhibieren kann. Mit dem antiviralen Peptid behandelte Zellen zeigen gewöhnlich ruhenden Stillstand der Zellteilung für 96 Stunden in nicht-infizierten Zellen, und dann werden normale Wachstumsraten wiederhergestellt. Zellen, welche diesem Peptid vor der Infektion ausgesetzt worden sind, sind nicht befähigt, Sindbisvirus zu replizieren und scheinen diesen Phenotyp durch konstitutives Herstellen des antiviralen Proteins über 10 Monate kontinuierlicher Passagierung aufrechtzuerhalten.

[0347] Es ist erkannt worden, daß diese zelluläre Antwort auf die Sindbisinfektion in *Aedes albopictus*-Zellen die optimale Effizienz eines rekombinanten Sindbis-Vektor-Herstellersystems verringern könnte. Um die Effizienz der Sindbis-Vektor-Produktion zu verbessern, sind zwei Verfahren ausgedacht worden, um das Virus-induzierte zelluläre antivirale Protein zu inaktivieren, um so jegliche Reduktion der Vektorpartikel-Titer zu verhindern. Dieses erste Verfahren bringt eine Reinigung dieses oben beschriebenen zellulären Proteins und die Bestimmung eines Teils der primären Aminosäuresequenz von ihrem carboxyterminalen Ende unter Verwendung etablierter, im Stand der Technik bekannter Methoden mit sich. Die resultierende Aminosäuresequenz wird dann verwendet, um mögliche entsprechende genomische Sequenzen abzuleiten, welche es einem ermöglichen, ein degeneriertes PCR-Primerpaar zu entwerfen, welches verwendet werden kann, um die spezifische zelluläre Sequenz zu amplifizieren. Diese amplifizierte Sequenz wird dann unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Standardmethoden kloniert, um einen getrennten Bereich der Gene zu erhalten, welche dieses hemmende Protein kodieren. Die Bestimmung der Nukleotidsequenz dieses Klons ermöglicht es dann, einen Vektor zu entwerfen, welcher spezifisch in dieses Sindbis-hemmenden Gen durch homologe Rekombination integriert, und dessen Kapazität ausschaltet bzw. „ausknockt“, ein funktionelles Protein zu exprimieren. Klone, welche diese „Knockout-Sequenz“ enthalten, können durch Insertion eines auswählbaren Markers in die einzelne klonierte Region des hemmenden Proteins, vor der Transfektion der Zellen mit dem Vektor, selektiert werden.

[0348] Ein zweites Verfahren, um dieses Sindbis-Virus-hemmende Protein funktionsunfähig zu machen, schließt die Mutagenese von *Aedes albopictus*-Zellen mit beispielsweise BUDR (5-Bromdesoxyuridin) ein. Diese mutagenisierte Verpackungszelllinien-Population wird dann mit einem Sindbis-Vektor infiziert, welcher fähig ist, den Neomycin-Resistenzmarker zu exprimieren. Bei hohen Konzentrationen des G418-Arzneimittels sind nur diese Zellen, welche große Mengen des Sindbis-Vektors herstellen und deshalb unfähig sind, das Sindbis-hemmende Gen zu exprimieren, fähig zu überleben. Nach der Selektion werden resistente Kolonien gepooled, verdünnungskloniert bzw. unter verdünnten Bedingungen kloniert und auf hohe Titer der Sindbis-Produktion überprüft.

2. Modifizierung der Zellen um die Empfindlichkeit der Sindbis-Expression zu verringern: Unterdrückung der Apoptose

[0349] Obwohl die meisten Säuger-Zelllinien typischerweise während der Sindbis-Virusinfektion lysiert werden, haben neuere Ergebnisse den Wechsel von lytischer zur persistenten Sindbis-Infektion in einer Ratten-Prostata-Adenokarzinom (AT-3)-Zelllinie gezeigt. Dieser Wechsel wurde durch konstitutive Expression des bcl-2-Onkogenproduktes in der Zelllinie vor der Sindbis-Infektion durchgeführt. Die Sindbis-Infektion von AT-3-Zellen, welche das bcl-2-Onkogen exprimieren, ergibt die Herstellung des Virus ohne offensichtliche Zytopathologie (Nature 361: 739). Diese Zelllinien-Modifikation könnte sich für die Umwandlung von Zelllinien, wie die Hundezelllinien D-17 und Cf2, die humanen Zelllinien HT1080 und 293, die Wachtelzelllinie QT-6, die Babyhamster-Nierenzelllinie BHK-21, die Maus-Neuroblastomzelllinie N18 und die Rattenprostata-Adenokarzinom AT-3, für den persistent infizierbaren Status zur Verwendung als potentielle Sindbis-Verpackungs- und Herstellerzelllinien, ähnlich zu denen der Retrovektor-Herstellerlinien, als nützlich erweisen.

[0350] Ein bcl-2-Onkogen-retroviraler Expressionsvektor ist kürzlich beschrieben worden (Nature 361: 739). Ein neuer bcl-2-Expressionsvektor wird unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten, rekombinanten DNA-Standardtechniken konstruiert, um das 910 bp-EcoRI-cDNA-Fragment, welches von dem Plasmid p84 (Nature 336: 259) stammt, in jeden im Handel erhältlichen Expressionsvektor, welcher einen konstitutiven Promotor enthält und einen selektierbaren Marker kodiert, zu insertieren. Sorgfältige Überlegungen müssen gemacht werden, um jeden Typ von Homologie zwischen Sindbis-Nukleinsäuresequenzen und anderen transduzierten Vektoren zu vermeiden. Diese Vorkehrung sollte getroffen werden, um Rekombinationsereignisse zu verhindern, welche zum unerwünschten Verpacken von selektierbaren Markern oder dem bcl-2-Onkogen in rekombinanten Sindbis-Partikeln führen können. Dies ist als ein wichtiger Punkt durchzuführen, da das hierin beschriebene Sindbis-Vektorsystem zu Verwendung als ein biologisches Therapeutikum entworfen ist. Sobald der bcl-2-Expressionsvektor konstruiert ist, wird die Eltern-Säugerzelllinie (e. h. BHK-21-Zellen) unter Verwendung von Standardtechniken transfiziert und nach dem geeigneten Marker selektiert. Die resistenten Kolonien werden dann vereinigt, gefolgt durch Verdünnungsklonierung. Individuelle Klone werden dann vermehrt und auf bcl-2-Expression geprüft. Sobald die Expression nachgewiesen ist, wird die persistente Sindbis-Infektion überprüft, gefolgt durch ihre Verwendung als Elternzelllinie für die Sindbis-Verpackungszelllinien-Entwicklung.

[0351] Die Sindbis-Infektion von BHK-Zellen ergibt morphologische Änderungen und DNA-Fragmentationsmuster, welche Apoptose diagnostizieren, und die Umwandlung von lytischer zu persistierender Infektion durch das bcl-2-Onkogen kann durch eine Suppression dieses programmierten Zelltodes (Nature 361: 739) vermittelt werden. Zusätzlich hat die Infektion von Säugerzellen mit anderen Viren, einschließlich Adenovirus, Polyomavirus, SV40 und HIV Zytotoxizität wegen der Apoptose ergeben. Deshalb wären andere Genprodukte, zusätzlich zu dem bcl-2-Onkogen, welche Apoptose unterdrücken, für die Expression in einer Sindbis-Verpackungs- oder Herstellerzelllinie wünschenswert. Anfänglich werden drei virale Gene, welche gezeigt haben, die Apoptose zu unterdrücken, in Sindbis-Verpackungszelllinien exprimiert: Das Adenovirus E1B-Gen, welches das 19-kD-Protein kodiert (Rao et al., PNAS 89: 7742–7746, 1992), das Herpes Simplex-Virustyp-1-g_{34.5}-Gen (Chou and Roizman, PNAS 89: 3266–3270, 1992) und das AcMNPV-Baculovirus p35-Gen (Clem et al., Science 254: 1388–1390, 1991). Die individuellen Gene werden in Plasmid-Expressionsvektoren, welche von eukaryotischen konstitutiv transkriptionellen Promotoren kontrolliert werden und einen selektierbaren Marker enthalten, unter Verwendung von im Stand der Technik bekannten Standardtechniken insertiert. Diese Expressionsvektoren werden anschließend, wie kürzlich beschrieben, in Zelllinien transfiziert und die geeignete Selektion verwendet. Die Selektion nach stabiler Integration dieser Gene und konstitutiver Expression ihrer Produkte sollte eine weiter ausgedehnte Vektor-Produktion in Zelllinien, welche bekannt sind, empfindlich auf Sindbis-induzierte apoptotische Ereignisse zu sein, erlauben. Zusätzlich ist es möglich, daß jedes Genprodukt Apoptose durch seinen eigenen einzigartigen Mechanismus hemmen kann. Deshalb werden die Gene auch in die Verpackungszelllinien in verschiedenen Kombinationen eingeführt werden, um einen stärkeren suppressiven Effekt zu erhalten. Schließlich können andere Genprodukte mit ähnlichen Effekten auf die Apoptose leicht in Verpackungszelllinien aufgenommen werden, sowie sie entdeckt sind.

[0352] Bei der Herleitung von Sindbis-Vektor-Herstellerzelllinien werden viele Ansätze vorgeschlagen, um die Expression der viralen Gene zu kontrollieren, so daß die Herstellerzelllinien, welche stabil sowohl mit Vektor als auch mit Vektor-Verpackungskassetten transformiert sind, abgeleitet werden können. Diese Ansätze schließen induzierbare und/oder bezüglich der zellulären Differenzierung sensitive Promotoren, Antisense-Strukturgene, heterologe Kontrollsysteme und Moskito- und andere Zellen, in welchen virale persistente Infektionen etabliert werden, ein. Wie auch immer die Endkonfiguration der Sindbis-Vektor-Herstellerzelllinie ist, es scheint klar zu sein, daß die Etablierung der persistenten Infektion oder zumindest der Verzögerung des Zelltods als ein Ergebnis der viralen Genexpression durch Hemmung der Apoptose verbessert werden würde.

Die DNA-Tumroviren, einschließlich Adenovirus, HPV, SV40 und das Maus-Polyomavirus (Py) transformieren zum Teil die Zellen durch Bindung an und Inaktivierung des Retinoblastom-(Rb)-Genprodukts p105 und seines eng verwandten Genprodukts p107 und anderer Genprodukte, welche in die Kontrolle des Zellzyklus involviert sind, einschließlich Cyclin A, p33^{cdk2} und p34^{cdc2}. Alle diese Viren, ausgenommen Py, kodieren Genprodukte, welche an p53 binden und inaktivieren. Einzig Py kodiert das mittlere T-Antigen (mT), welches an die Membran-Tyrosinkinase src und auch die Phosphatidylinositol-3-Kinase bindet und inaktiviert, welche für das volle Transformationspotential dieses Virus benötigt wird (Talmage et al., Cell 59: 55–65, 1989). Die Bindung an und Inaktivierung von Rb- und p53-rezessiven Onkogenprodukten verhindert, daß Zellen, welche durch diese DNA-Tumroviren transformiert sind, in den apoptotischen Weg eintreten. Es ist bekannt, daß p53 fähig ist, die Zellteilung anzuhalten, zum Teil durch Hemmung der Expression von Proteinen, welche mit der zellulären Proliferation assoziiert sind, einschließlich c-fos, hsc70 und bcl-2 (Miyashita et al., Cancer Research 54: 3131–3135, 1994).

[0353] Um die Dauer der Sindbis-Virusproduktion zu verlängern oder um möglicherweise die persistente Sindbis-Infektion zu fördern, werden die Verpackungszellen mit viraler genomischer DNA von Py oder SV40 transformiert. Es ist bekannt, daß die Maus- und Primaten-DNA-Tumroviren Py bzw. SV40 leicht eine stabile Transformation in Zellen von Arten unterschiedlich von dem natürlichen Wirt etablieren. In solchen nicht-permissiven Zellen, beispielsweise solche, abgeleitet aus Hamstern, sind diese Viren nicht fähig, zu replizieren, wobei sich eine virale "Early Region"- bzw. frühe Region-expressionabhängige (z. B. T-Antigen) Integration ergibt (s. Kapitel 19, Benjamin und Vogt, Fields Virology Bd. 1). SV40- und Py-T-Antigene werden konstitutiv in diesen transformierten Hamsterzellen exprimiert.

[0354] SV40- und Py-transformierte Zelllinien werden etabliert, und die Kinetiken und Spiegel der Sindbis-Produktion und -zytopathologie nach der viralen Infektion bestimmt. Wenn die apoptotischen Ereignisse, welche für die Sindbis-Proliferation in Hamsterzellen charakteristisch sind, verringert werden, wird jede Prototyp-Sindbis-Verpackungszelllinie anschließend mit Py oder SV40 transformiert, um die Ausbeute an verpacktem Vektor aus diesen Zellen zu vergrößern.

3. Modifikation der Zellen um die Empfänglichkeit der Sindbis-Expression zu verringern: Herstellung von Aktivierungs-abhängigen Vektorpartikeln

[0355] Das Sindbis E2-Glykoprotein wird als ein "Precursor"- bzw. Vorläufer-PE2 synthetisiert. Dieser PE2-Vorläufer und das zweite virale Glykoprotein, E1, assoziieren im endoplasmatischen Retikulum und werden prozessiert und werden als ein Heterodimer für die Virion-Aufnahme zu der infizierten Zellmembran transportiert. Bei einigen Punkten während dieser Prozessierung wird PE2 in E3 und reifes E2 gespalten. E3 ist der 64-aminoterminal Rest von PE2 und wird während der Reifung in den extrazellulären Raum verloren. Das größere Spaltungsprodukt, E2, ist mit E1 assoziiert und mit dem verankert, was die virale Hülle wird. Eine Wirtszell-Protease ist für die Prozessierung des PE2-Vorläufers verantwortlich, welche an der Sequenz spaltet, welche direkt auf ein hochkonserviertes kanonisches vier Aminosäure-(aa)-Rest-Motiv, basische-X-basische-basische Aminosäuren folgt. Eine mutierte, aus dem CHO-K1 Stamm abgeleitete Zelllinie, bezeichnet als RPE.40 (Watson et al., (1991) J. Virol 65: 2332–2339), ist durch seine Unfähigkeit, den PE2-Vorläufer in die E3- und reife E2-Form zu prozessieren, unzulänglich in der Produktion des Sindbis-Virusstammes AR339. Die Hüllen der in der RPE.40-Zelllinie hergestellten Sindbis-Virionen enthalten deshalb das PE2/E1-Heterodimer. RPE.40-Zellen sind mindestens 100mal resistenter gegenüber der Sindbis-Virusinfektion als die Eltern-CHO-K1-Zellen, was auf eine Ineffizienz in der Fähigkeit der PE2-enthaltenden Virionen, Zellen zu infizieren, hindeutet. Diese defekten Virionen, erzeugt von der RPE.40-Zelllinie, können in eine vollinfektiöse Form durch Behandlung mit Trypsin überführt werden.

[0356] In Verpackungs- oder Herstellerzelllinien wird jedes durch Rekombination hergestellte Wildtyp-Virus Zellen reinfizieren und wird schnell amplifiziert werden; somit sind die verpackten Vektorpräparationen signifikant kontaminiert. Aus der RPE.40-Linie entwickelte Herstellerzellen würden eine deutliche Verbesserung gegenüber den anderen, für die Sindbis-Virusinfektion permissiven Linien wegen der ineffizienten Amplifikation jedes, während der Vektorherstellung und Verpackung erzeugten, Wildtyp-Virus sein. Deshalb sind die Vektorpräparationen nicht signifikant mit Wildtyp-Virus kontaminiert. Darüber hinaus kann dieses System auf andere Zelllinien durch Entwicklung von „Knock out“-Mutanten in der analogen zellulären Protease ausgedehnt werden.

B. STRUKTURELLE PROTEIN-EXPRESSION-KONSTRUKTE

1. Induzierbare und konstitutive Strukturprotein-Vektorkonstrukte

[0357] Die Entwicklung von Sindbis-Verpackungszelllinien ist von der Fähigkeit abhängig, hohe intrazelluläre Spiegel von wichtigen Strukturproteinen zu synthetisieren: Kapsid, E2 und E1. Unglücklicherweise können die hohen Expressionsspiegel dieser Proteine, insbesondere der Hüllglykoproteine E2 und E1, zu gleichzeitiger Zytopathologie und möglichem Zelltod führen. Deshalb sind die strukturellen Protein-Expressionskassetten mit induzierbaren regulatorischen Elementen entworfen worden, welche den Spiegel der Genexpression zusätzlich zu anderen, welche konstitutive Spiegel der Expression aufrechterhalten, kontrollieren.

[0358] In der ersten Konfiguration ist die Expression der Sindbis-Strukturproteine unter der Kontrolle von RSV LTR, in Verbindung mit den induzierbaren lac-Operon-Sequenzen. Dies wird durch Insertion der Sindbis-cDNA, welche den viralen Strukturproteingenen entspricht, in die pOP13 und pOPRSV1-Vektoren (Stratagene) erreicht. Diese getrennt verwendeten Vektoren werden mit dem p3'SS-Vektor (Stratagene) kotransfiziert, welcher das lac-Repressor-„i“-Protein exprimiert. In Abwesenheit des Induktors, beispielsweise Isopropyl-B-D-Thiogalaktopyranosid (IPTG), ist vom Basal- oder vom konstitutiven Spiegel der Expression eines Luciferase-Reportergens bei 10–20 Kopien pro Zelle berichtet worden. Die Zugabe von IPTG ergibt eine Konformationsänderung des Repressorproteins, welche eine verminderte Affinität des lac-i-Proteins für lac-Operator-Sequenzen ergibt, was einen hohen Expressionsspiegel des heterologen Genes erlaubt. 95-fache Induktionsspiegel in Gegenwart von IPTG sind für heterologe Gene, welche in dem pOP13-Vektor enthalten sind, berichtet worden.

[0359] Insbesondere wird die Sindbis-Strukturproteingen-(SP)-cDNA in die pOP13- und pOPRSV1-Vektoren, wie folgt, inseriert. Die SP-kodierende Region wird im ganzen mit einem Primerpaar amplifiziert, dessen entsprechende 5'-Enden zu den authentischen AUG Translationsstart- und UGA-Translationsstop-Sequenzen, einschließlich der umgebenden Nukleotide, welche der Kozak-Konsensussequenz für effiziente translationale Initiation an Sindbis-Nukleotid 7638 entsprechen, passen. Der Forward-Primer ist zu den Sindbis-Nukleotiden 7631–7661 komplementär, und der Reverse-Primer ist zu den Sindbis-Nukleotiden 11384–11364 komplementär. Die PCR-Amplifikation der Sindbis-cDNA, welche den Strukturproteingenen entspricht, wird mit einem Standard-Zweitemperatur-Zyklusprotokoll unter Verwendung des folgenden Oligonukleotidpaares durchgeführt:

Forward-Primer (7638F)

5'-TATATGCGGCCGCACCACCACCATGAATAGAGGATTCTTTAACATGC-3'

(SEQ.ID.NR. 38)

Reverse-Primer (11384R)

5'-TATATGCGGCCGCTCATCTTCGTGTGCTAGTCAG-3'

(SEQ.ID.NR. 39)

[0360] Zusätzlich zu ihren jeweiligen Komplementaritäten zu den angegebenen Sindbis-Nukleotiden wird eine 5 Nukleotid-„Puffersequenz“, gefolgt von einer Not I-Erkennungssequenz, an die 5'-Enden jedes Primers geknüpft. Nach der PCR-Amplifikation wird das 3.763 bp-Fragment in einem 1% Agarosegel gereinigt, dann anschließend mit Not I-Enzym verdaut. Das resultierende 3.749-bp Fragment wird dann getrennt in die pOP13- und pOPRSV1-Vektoren ligiert, welche mit Not I verdaut werden und dann mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelt werden. Diese Expressionskassetten-Vektoren, welche die gesamte kodierende Kapazität der Sindbis-Strukturproteine enthalten, sind als pOP13-SINSP und pOPRSV1-SINSP bekannt.

[0361] Variationen der lac-Operon-Sindbis-Strukturprotein-Genexpressionkassetten können auch unter Verwendung anderer viraler, zellulärer oder Insekten-basierter Promotoren konstruiert werden. Unter Verwendung allgemeiner, in der Technik bekannter molekularbiologischer Techniken, das lac-Operon und der RSV LTR-Promotor, oder nur der RSV LTR-Promotor, können Sequenzen aus den Stratagene pOP13 und pOPRSV1-Vektoren herausgeschnitten werden und durch andere Promotorsequenzen, wie der Cytomegalievirus-major-immediate-Promotor (pOPCMV-SINSP), der Adenovirus-major-late-Promotor (pOPAMLP-SINSP) oder Insekten-

promotorsequenzen, welche den Drosophila Metallothionein-induzierbaren Promotor (pMET-SINSP), Drosophila-Actin-5C distalen Promotor (pOPA5C-SINSP), Hitzeschockpromotoren HSP65 oder HSP70 (pHSP-SINSP) oder den Baculovirus Polyhedrinpromotor (pPHED-SINSP) einschließen, ersetzt werden.

2. Modifikation der Kassetten, um die Proteinexpressionsspiegel zu vergrößern

[0362] Die Sindbis-Strukturproteinexpression kann erhöht werden, wenn der Spiegel der mRNA-Transkripte erhöht ist. Die Erhöhung der Spiegel der mRNA-Transkripte kann durch Modifizieren der Expressionskassette durchgeführt werden, so daß Sindbis-Nicht-Strukturproteine diese Transkripte erkennen, und wiederum die Botschaft auf höheren Spiegeln replizieren. Diese Modifikation wird durch Zugabe des Minimalen-Verbindungsregionkernes vom Wildtyp (Nukleotide 7579 bis 7602) zu dem äußersten 5'-Ende der Sindbis-Strukturprotein-kodierenden Region zwischen die erste authentische ATG-Startsequenz für die Translation und die Promotorsequenzen der Expressionskassette durchgeführt. Dies kann durch Folgen der gleichen, oben beschriebenen PCR-Amplifikationstechnik für die Platzierung der Sindbis-Strukturprotein-cDNA in die pOPRSV13 und pOPRSV1-Expressionsvektoren durchgeführt werden. Die einzige Modifikation in diesem Verfahren ist das Ersetzen des 7638 Forward-Primer gegen einen ähnlichen Primer, welcher die Verbindungsregionkern-Nukleotide 7579–7602 zwischen der Not I-Restrictionsenzymsequenz und des ersten ATG der kodierenden Region wie folgt enthält:

Forward-Primer (JUN 7638F)

5'-TATATGCGGCCGCATCTCTACGGTGGTCCTAAATAGTACCACCACC-
ATGAATAGAGGATTC-3'

(SEQ.ID.NR. 40)

[0363] Nach der PCR-Amplifikation wird das resultierende 3.787 bp Fragment in einem 1% Agarosegel gereinigt, dann anschließend mit dem Not I Enzym verdaut. Das resultierende 3.773 bp Fragment wird dann getrennt in die pOP13 und pOPRSV1-Vektoren ligiert, welche mit Not I verdaut werden und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarmen behandelt werden. Die resultierenden Expressionskassetten-Vektoren sind als pOP13-JUNSINSP und pOPRSV1-JUNSINSP bekannt. Es muß jedoch erwähnt werden, daß die Einführung der Verbindungsregionsequenzen in die Strukturproteinexpressionskassetten Sequenzen einführt, welche möglicherweise zu unerwünschten Rekombinationsereignissen führen, was zu der Erzeugung von Wildtyp-Sindbisvirus führt.

3. Induzierbare Expression von Strukturproteinen über Sindbis-Vektor

[0364] Wegen der möglichen zytotoxischen Effekte durch die Strukturproteinexpression kann die Etablierung von induzierbaren Verpackungszelllinien, welche noch moderate Basalspiegel dieser Proteine exprimieren, nicht das beste Verfahren sein. Deshalb werden Verpackungs-Zelllinien-Expressionskassetten konstruiert, welche regulatorische Elemente für die Induktion der Strukturproteinsynthese durch hohe Spiegel durch Nicht-Strukturproteine, welche in trans durch den Sindbis-Vektor bereit gestellt werden, aber keine Basallevel-synthese, bis sie geeignet stimuliert werden, enthalten.

[0365] In dieser Konfiguration wird eine Strukturproteinkassette konstruiert, wobei die Transkription der Strukturproteingene von einer angrenzenden Sindbis-Verbindungsregion-Sequenz stattfindet. Die primären Merkmale dieser Kassette sind: ein RNA-Polymerase II-Promotor, welcher unmittelbar benachbart zu dem Sindbis-Nukleotid 1 positioniert ist, so daß die Transkriptioninitiation mit dem authentischen Sindbis-Nukleotid 1 beginnt, die 5'-terminalen-Sindbis-Sequenzen, welche für die Transkriptaseerkennung benötigt werden, die Sindbis-Verbindungsregion-Sequenz zur Expression der Strukturproteingen mRNA, die Sindbis-Strukturproteingensequenzen, die 3'-terminalen-Sindbis-Sequenzen, welche für die Replikation benötigt werden und eine Transkriptionsterminations/Polyadenylierungssequenz. Wegen eines stromaufwärts liegenden offenen Leserahmens, welcher an den Translation-Terminationscodons vor der AUG-Startsequenz der Strukturproteine endet, kann die Expression der Sindbis-Strukturproteine nur nach der Synthese der Minusstrang-RNA durch Vektorgelieferte Nicht-Strukturproteine und die anschließende Transkription einer Strukturproteingen-mRNA von der Verbindungsregion stattfinden. Deshalb hängt die Induzierbarkeit dieses Systems gänzlich von der Anwesenheit von Nicht-Strukturproteinen ab, welche mit dem Sindbis-Vektor selbst geliefert werden, welcher entweder als in vitro transkribierte RNA oder als cDNA, welche stromabwärts zu dem geeigneten Promotorelement positioniert ist, eingeführt ist. Zusätzlich erlauben die 5'- und 3'-terminalen-Sindbissequenzen diesem

RNA-Transkript der Strukturproteingenkassette, durch die gleichen durch den Vektor gelieferten Nicht-Strukturproteine amplifiziert zu werden (s. **Fig. 8**).

[0366] Spezifisch wird die Konstruktion einer Positiv-Sequenz, Vektor-induzierbaren Verpackungskassette wie folgt durchgeführt. Der kürzlich beschriebene pVGELVIS-Vektor wird mit dem Enzym BspEI verdaut, um die Nukleotide 422 bis 7054, einschließlich der meisten Nicht-Strukturproteinkodierenden Sequenzen, zu entfernen, und das verbleibende 9925 bp Fragment wird in einem 0,8% Agarosegel gereinigt und anschließend mit sich selbst religiert, um ein Konstrukt bekannt als pLTR/SindIBspE zu erzeugen. Diese Deletion läßt das 5'-Ende des authentischen Translationsstartcodons an den Nukleotiden 60–62 intakt und erzeugt in-frame bzw. im Rahmen stromabwärts UAA- und UGA-Stopcodons bei den Nukleotiden 7130–7132 bzw. 7190–7192 (ursprüngliche Numerierung), um auf diese Weise die Translation von stromabwärts Strukturproteingen-offenen Leserahmen zu verhindern. Das pLTR/SindIBspE-Verpackungskassettenkonstrukt wird anschließend in BHK-Zellen (ATCC #CCL 10) transfiziert, und positive Transfektanten werden unter Verwendung des G418-Arzneistoffs bei 400 µg/ml, wie zuvor beschrieben, selektiert. Die in **Fig. 4** gezeigten Daten zeigen, daß die Transfektion von Sin-luc Vektor-RNA in diese LTR/SindIBspE-Verpackungszellen die Herstellung von infektiösen Sindbis-Partikeln ergibt, welche die Sin-luc-RNA enthalten, sowie für die erhaltenen Überstände gezeigt wird, daß sie Sin-luc-Vektor-RNA auf frische Monolayer von BHK-Zellen transferieren.

[0367] Ein ähnliches Verpackungskonstrukt wird auch unter Verwendung des pVG-ELVISd-Klons (zuvor beschrieben) Ausgangsmaterial zur Erzeugung der BspEI-Deletion hergestellt. In diesem Klon folgt der Sindbis-3'-terminalen-Sequenz eine katalytische Ribozym-Sequenz, um noch genaueres Prozessieren des primären Transkripts, benachbart zu den 3'-terminalen-Sequenzen von Sindbis, zu erlauben. Zusätzlich können Variationen dieser Verpackungskassetten-Konstruktionen, unter Verwendung von in der Technik bekannten Standardtechniken, gemacht werden, welche einschließen: die Substitution von anderen RNA-Polymerasepromotoren für den gegenwärtigen MuLV LTR, Zugabe von einem oder mehreren Nukleotiden zwischen dem RNA-Polymerasepromotor und dem ersten Sindbis-Nukleotid oder die Substitution von Nicht-Sindbis-kodierenden Leserahmen stromaufwärts zu den Strukturproteinsequenzen, welche das 5'-Ende der Sindbis-Sequenzen, welches für die Transkriptaseerkennung benötigt wird, beibehalten oder nicht beibehalten können.

[0368] In einer anderen Vektor-induzierbaren Verpackungskonfiguration enthalten die Expressionskassetten eine cDNA-Kopie der Sindbis-Strukturprotein-Gensequenzen, welche durch ihre natürliche Verbindungs- und 3'-untranslatierte Regionen flankiert sind und in einen Expressionsvektor in einer Orientierung inseriert sind, so daß eine primäre Transkription von dem Promotor Antisense-Strukturprotein-Gen-RNA-Moleküle herstellt. Zusätzlich enthalten diese Konstrukte auch, benachbart zu der Verbindungsregion, Sindbis-5'-terminale-Sequenzen, welche notwendig für die Erkennung durch die virale Transkriptase sind, und eine katalytische Ribozymsequenz, welche direkt benachbart zu der Sindbis-Nukleotid 1 der 5'-terminalen-Sequenz positioniert ist. Als solches spaltet dieses Ribozym das primäre RNA-Transkript präzise nach dem ersten Sindbis-Nukleotid. In dieser Antisense-Orientierung können die Strukturproteingene nicht translatiert werden und sind völlig von der Anwesenheit von Sindbisvirus-Nicht-Strukturproteinen zur Transkription in die Positiv-Strang-mRNA vor ihrer Expression abhängig. Diese Nicht-Strukturproteine werden durch den Sindbis-Vektor selbst bereit gestellt. Zusätzlich, da diese Konfiguration die genauen Sindbis-Genom-5'- und 3'-terminalen-Sequenzen enthält, erfahren die Strukturproteingentranskripte eine Amplifikation, unter Verwendung der gleichen Nicht-Strukturproteine, welche durch den Sindbis-Vektor bereit gestellt werden.

[0369] Spezifisch wird die Sindbis-Strukturproteingen-cDNA aus dem genomischen Klon pVGSP6GEN entfernt und in den pcDNA3-Expressionsvektor (Invitrogen Corp., San Diego, CA) wie folgt inseriert. Zuerst wird das Plasmid pVGSP6GEN mit den Enzymen ApaI und BamHI verdaut, um alle Sindbis-Sequenzen bis Nukleotid 7335, einschließlich der Gene, welche die Nicht-Strukturproteine 1, 2, 3 und das meiste von 4 kodieren, zu entfernen. Das verbleibende 7285 bp Vektorfragment, welches die Sindbis-Strukturproteingene enthält, wird in einem 0,8% Agarosegel gereinigt und anschließend mit einer Polylinkersequenz, genannt SinMCS, welche durch Annealing von zwei synthetischen Oligonukleotiden erhalten wird, ligiert. Die Oligonukleotide, SinMCSI und SinMCSII, erhalten die Erkennungssequenzen für ClaI, BglII und SpeI und weisen nach dem Annealing ApaI- und BamHI-Enden auf. Diese Sequenzen sind wie folgt:

SinMCSI

5'-CTCATCGATCAGATCTGACTAGTTG-3'

(SEQ.ID.NR. 31)

5'-GATCCAAGTCTAGTCAGATCTGATCGATGAGGGCC-3'

(SEQ.ID.NR. 32)

[0370] Das resultierende Konstrukt, bekannt als pMCS-26s, wird dann modifiziert, um die 5'-terminalen 299 Nukleotide von Sindbis zu enthalten, fusioniert an die 84 Nukleotide lange Ribozymesequenz von dem antigenomischen Strang des Hepatitis Delta Virus (HDV)(Nature 350: 434), unter Verwendung von überlappender PCR-Amplifikation. Zwei Primerpaare werden anfänglich in getrennten Reaktionen verwendet, gefolgt durch ihre überlappende Synthese in einer zweiten PCR-Runde. In Reaktion #1 ist der Forward-Primer (HDV49-XC) komplementär zu HDV-Genom-Nukleotiden 823–859 und der Reverse-Primer (HDV17-68) ist komplementär zu den HDV-Genom-Nukleotiden 839–887, mit Sequenzen wie folgt:

Forward-Primer (HDV49-XC)

5'-ACTTATCGATGGTTCTAGACTCCCTTAGCCATCCGAGTGGACGTG-
CGTCCTCCTTC-3'

(SEQ.ID.NR. 33)

Reverse-Primer (HDV17-68)

5'-TCCACCTCCTCGCGGTCCGACCTGGGCATCCGAAGGAGGACGCAC-
GTCCACT-3'

(SEQ.ID.NR. 34)

[0371] Zusätzlich zu ihren entsprechenden Komplementaritäten enthält der Primer HDV49-XC flankierende XbaI und ClaI-Erkennungssequenzen am 5'-Ende. Die PCR-Amplifikation von HDV-Sequenzen wird durch ein Standard-Zweitemperatur-Zyklusprotokoll mit diesen Primern und Vent-Polymerase durchgeführt. In Reaktion #2 ist der Forward-Primer (SIN-HDV), welcher genau die HDV- und Sindbis-Sequenzen verbindet, komplementär zu den Nukleotiden 1–21 von Sindbis und genomischen Nukleotiden 871–903 von HDV und überlappt die Sequenz des Primer HDV17-68 (von oben) um 20 Nukleotide, und der Reverse-Primer (SIN276-SPE) ist komplementär zu den Sindbis-Nukleotiden 299–276, mit Sequenzen wie folgt:

Forward-Primer (SIN-HDV)

5'-TCGGACCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGCCGACCCATTGACGGC-
GTAGTACACACT-3'

(SEQ.ID.NR. 35)

Reverse-Primer (SIN276-SPE)

5'-CTGGACTAGTTAATACTGGTGCTCGGAAAACATTCT-3'

(SEQ.ID.NR. 36)

[0372] Zusätzlich zu ihren entsprechenden Komplementaritäten, enthält der Primer SIN276-SPE ein flankierendes UAA-Translations-Terminationscodon und eine Spel-Erkennungssequenz an seinem 5'-Ende. Die PCR-Amplifikation des Fragments, welches Sindbis-5'-terminale-Sequenzen fusioniert mit HDV-Ribozymsequenzen enthält, wird durch ein Standard-Zweitemperatur-Zyklusprotokoll unter Verwendung von Vent Polymerase, diesen Primern und pVGSP6GEN-Plasmid als Template bzw. Matrize durchgeführt. Nach der ersten

Runde der PCR-Amplifikation wird ein Zwanzigstel der Gesamtmengen jeweils von Reaktion #1 und Reaktion #2 kombiniert und als Template in einer zweiten Runde der PCR-Amplifikation mit zusätzlicher Zugabe der Primer HDV49-XC und SIN276-SPE und einem Standard-Zweitemperatur-Zyklusprotokoll verwendet. Nach der zweiten Runde der PCR wird das 414 bp Amplikon mit dem Mermaid Kit (Bio 101, La Jolla, CA) gereinigt und mit den Enzymen ClaI und SpeI gereinigt. Das verdaut Amplikon wird auf einem 1% Agarosegel gereinigt und anschließend in das Plasmid pMCS-26s ligiert, welches auch mit ClaI und SpeI verdaut und auf einem 1% Agarosegel gereinigt wird. Das resultierende Konstrukt, welches die Expressions-Kassettenelemente HDV antigenomisches Ribozym/Sindbis 5'-terminale 299 Nukleotide/Sindbis-Verbindungsregion/Sindbis-Strukturproteingene/Sindbis 3'-terminale untranslatierte Region enthält, ist als pδ5'26s bekannt.

[0373] Die Insertion der Strukturproteingenkassette von pδ5'26s in den pcDNA3-Vektor wird wie folgt durchgeführt. Plasmid pδ5'26s wird mit dem Enzym XbaI und den 3'-verkürzten Enden glatt bzw. "blunt" durch die Zugabe von Klenow-Enzym und dNTPs gemacht. Die gesamte 4798 bp Strukturproteingenkassette wird in einem 1% Agarosegel gereinigt. Plasmid pcDNA3 wird mit den Enzymen HindIII und ApaI verdaut, und die Enden werden glatt durch Zugabe von T4-DNA-Polymeraseenzym und dNTPs gemacht, und der 5342 bp Vektor wird in einem 1% Agarosegel gereinigt. Die zwei gereinigten DNA-Fragmente mit glatten Enden werden anschließend ligiert, und der resultierende Strukturprotein-Genexpressionskassetten-Vektor ist als pCMV-δ5'26s bekannt (s. Fig. 8). Die Transfektion von dieser DNA in Zellen und Selektion auf G418-Resistenz wird wie zuvor beschrieben ausgeführt.

[0374] Modifikationen des CMV-Promotor/Antisense-Sindbis-Strukturprotein-Vektors können auch unter Verwendung anderer viraler, zellulärer oder Insekten-basierender Promotoren konstruiert werden. Unter Verwendung allgemeiner im Stand der Technik bekannter molekularbiologischer Techniken kann der CMV-Promotor aus dem Invitrogen pcDNA3-Vektor ausgeschnitten werden und durch Promotoren wie solche, zuvor aufgelisteten, ersetzt werden. Eine andere Variation dieser Antisense-Verpackungskassette kann einschließen, ist aber nicht begrenzt darauf: Zugabe von einem oder mehreren Nukleotiden zwischen dem ersten Sindbis-Nukleotid und dem katalytischen Ribozym, die Verwendung von anderen katalytischen Ribozym-Sequenzen für die Transkript-Prozessierung, die Substitution eines genauen Transkriptions-Terminations-Signals für die katalytische Ribozym-Sequenz oder die Antisenseexpression von Strukturprotein-Genkassetten unter Verwendung einer beliebigen stromabwärts liegenden Sequenz, welche durch eine RNA-Polymerase erkannt wird, welche die Transkription einer Strukturprotein-Gen-mRNA ergibt.

[0375] Ferner sollte angemerkt werden, daß jedes der beschriebenen Vektor-induzierbaren Konstrukte Sequenzen, homolog zu dem Sindbis-Vektor selbst, enthält. Daher besteht das Potential zur Erzeugung von Wildtyp-Virus durch Rekombination zwischen zwei RNA-Molekülen. Zusätzliche Modifikationen werden durchgeführt, um diese Möglichkeit, wie unten beschrieben, zu eliminieren.

4. Trennung von Strukturprotein-Genen, um die Kombination zu verhindern

[0376] Nach dem Aufzeigen der Nützlichkeit der hier beschriebenen Ansätze werden zusätzliche Verpackungszelllinien, basierend auf diesen Prinzipien, erzeugt. Diese zusätzlichen Linien trennen die Integration und Expression der Strukturprotein-Gene, was ihre Transkription als nicht-überlappende, unabhängige RNA-Moleküle erlaubt. Die Expression von Capsid-Protein, unabhängig von den Glykoproteinen E2 und E1 oder jedes dieser drei Proteine unabhängig voneinander, eliminiert die Möglichkeit der Rekombination mit Vektor-RNA und anschließende Erzeugung von kontaminierendem Wildtyp-Virus.

[0377] Insbesondere wird das Capsidprotein unabhängig von einem induzierbaren Expressionsvektor exprimiert, so daß die Sequenzen, welche eine Rekombination mit der Vektor-RNA ergeben könnten, eliminiert werden. Als ein Beispiel wird das Capsidprotein-Gen von dem Plasmid pVGSP6GEN mit einem Primerpaar, welches zu den Nukleotiden 7632–7655 (Forward-Primer) und 8415–8439 (Reverse-Primer) komplementär ist, mit folgenden Sequenzen amplifiziert:

Forward-Primer

5'-GTCAAGCTTGCTAGCTACAACACCACCACCATGAATAGAG-3'

(SEQ.ID.NR. 37)

Reverse-Primer

5'-CAGTCTCGAGTTACTACCACTCTTCTGTCCCTTCCGGGGT-3'

(SEQ.ID.NR. 41)

[0378] Zusätzlich zu ihren entsprechenden Komplementaritäten enthält der Forward-Primer NheI- und HindIII-Erkennungssequenzen an seinem 5'-Ende, und der Reverse-Primer enthält sowohl UAG- als auch UAA-Translationsstopcodons und eine XhoI-Erkennungssequenz an seinem 5'-Ende. Die Amplifikation wird unter Verwendung eines Standard-Zweitemperatur-Zyklusprotokolls durchgeführt, und das resultierende Amplikon wird mit den Enzymen NheI und XhoI verdaut und auf einem 1% Agarosegel gereinigt. Das Expressionsplasmid pMAM (Clontech), welches eine Dexamethason-induzierbare MMTV LTR Promotorsequenz enthält, wird mit den Enzymen NheI und XhoI verdaut und die Plasmid-DNA in einem 1% Agarosegel gereinigt. Das Capsidprotein-Genfragment wird in den pMAM-Vektor ligiert, und das resultierende Konstrukt ist als pMAM-SinC bekannt. Plasmid pMAM-SinC wird in die geeignete Zelllinie, wie zuvor beschrieben, transfiziert und die Selektion auf stabile Transfektanten wird unter Verwendung von HAT (Nypoxanthin, Aminopterin, Thymidin)-Medium, wie vom Hersteller beschrieben, durchgeführt.

[0379] Die Glykoproteingene, E1 und E2, werden zusammen unter Verwendung eines der zuvor beschriebenen induzierbaren Systeme exprimiert. Beispielsweise werden die E1- und E2-Gene von dem Plasmid pVGSP6GEN unter Verwendung eines Primerpaars, welches zu den Sindbis-Nukleotiden 8440–8459 (Forward-Primer) und den Sindbis-Nukleotiden 11.384–11.364 (Reverse-Primer) komplementär ist, amplifiziert. Die PCR-Amplifikation wird unter Verwendung eines Standard-Zweitemperatur-Zyklusprotokolls und dem folgenden Oligonukleotidpaar durchgeführt:

Reverse-Primer (11384R)

5'-TATATGCGGCCGCTCATCTTCGTGTGCTAGTCAG-3'

(SEQ.ID.NR. 39)

Forward-Primer (8440F)

5'-TATATGCGGCCGCACCACCATGTCCGCAGCACCCTGGTCACG-3'

(SEQ.ID.NR. 42)

[0380] Zusätzlich zu ihren entsprechenden Komplementaritäten enthält der Forward-Primer ein „inframe“-AUG-Translation-Initiationscodon, und beide Primer enthalten eine NotI-Erkennungssequenz an ihren 5'-Enden. Nach der PCR-Amplifikation wird das Amplikon mit dem NotI-Enzym verdaut und in einem 1% Agarosegel gereinigt. Das resultierende Fragment wird dann getrennt in die pOP13- und pOPRSV1-Vektoren (Stratagene) ligiert, mit NotI verdaut und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm bzw. "calf-intestinal-alkaline-phosphatase" (engl.), wie zuvor beschrieben, behandelt. Diese Glykoprotein-Expressionsvektoren werden verwendet, um Zellen zu transfizieren, welche zuvor mit dem Capsidprotein-Expressionskonstrukt transfiziert worden sind.

5. Zusammenbau bzw. "Assembly" der Komponenten, um die Sindbis-Verpackungszelllinie zu erzeugen

[0381] Als Beispiel wird die Aedes albopictus-Zelllinie verwendet, um den Zusammenbau bzw. das Assembly der Komponenten zu zeigen. Es können jedoch andere möglichen Elternzelllinien verwendet werden, um Sindbis-Verpackungszelllinien zu erzeugen, und sind zuvor diskutiert worden. Aedes albopictus-Moskitozellen (ATCC Nr. CRL 1660) werden bei 28°C in 5% CO₂ in Minimal-Medium (Eagle) mit nicht-essentiellen Aminosäuren, 2 mM L-Glutamin, Earle's balanced-Salzlösung, 0,11 Natriumbicarbonat und 10% fötales Kälberserum (optimales Medium) gezüchtet. Etwa 5 × 10⁵ Moskitozellen werden in einer 35 mm Petrischale gezüchtet und mit 5 µg p3'SS unter Verwendung von 5 ml des Transfectam (Promega)-kationischen Lipidreagens unter serumfreien Mediumbedingungen, wie durch den Hersteller beschrieben, transfiziert. Jedoch kann jede Methode der Transfektion durchgeführt werden, d. h. durch Elektroporation, Calciumphosphat-Präzipitation oder unter

Verwendung einer von den leicht erhältlichen kationischen Liposomenformulierungen und Verfahren, welche im Stand der Technik allgemein bekannt sind. 24 h nach Transfektion werden die Zellen, wie oben beschrieben, mit 4 ml optimalen Medium bedeckt, mit 200 µg/ml des Antibiotikums Hygromycin ergänzt und über einen Zeitraum von 10 bis 14 Tagen selektiert. Expandierte Klone werden dann isoliert und auf die Fähigkeit zur Expression des Lac-Repressors durch Northern Blot-Hybridisierung überprüft. Ein einzelner Klon, welcher zufriedenstellende Spiegel an Lac-Repressor-mRNA exprimiert, wird dann mit einem Lac-Operon-Vektorkonstrukt retransfiziert, welches die Sindbis-Strukturproteine (d. h. pOP13-SINSP oder pOPRSV1-SINSP) exprimiert, gefolgt durch Arzneistoff-Selektion mit 200 bis 800 µg/ml Geneticin und fortgesetzter Hygromycin-Selektion. Kolonien, welche Resistenz gegen beide Antibiotika zeigen, werden dann vereinigt, verdünnungskloniert und vermehrt. Individuelle Klone werden dann mit 5 mM IPTG für 12 Stunden induziert und auf hohe Spiegel von Sindbis-Strukturprotein-Expression überprüft. Die Expression kann durch Western Blot-Analyse unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (erhältlich in der Literatur) oder durch Quantifizierung der Sindbis-spezifischen RNA in RNase-Schutztests unter Verwendung von ³²P-endmarkierten RNA-Proben, welche zu der RNA der Sindbis-Strukturprotein-Genregion komplementär sind, überprüft werden. Diese Testverfahren zeigen Klone mit den höchsten Spiegeln von Strukturprotein-Expression als Antwort auf die Induktion mit IPTG. Verschiedene der hochexprimierenden Moskitozellklone (bezeichnet als Albopictus-SINpak-Zellen) werden dann auf ihre funktionelle Aktivität geprüft. Die funktionelle Aktivität wird durch Aufzeigen der Fähigkeit der Zelllinien, den Luziferase-exprimierenden Vektor zu verpacken und die darauffolgende Fähigkeit des Mediumüberstandes BHK-21-Zellen zu reinfizieren und Luziferase-Aktivität zu übertragen, überprüft.

[0382] Spezifisch werden Albopictus-SINpak-Zellen, welche in 35 mm Petrischalen mit dem oben beschriebenen Selektionsmedium, welches Hygromycin und Geneticin enthält, mit RNA transfiziert, welche durch in vitro-Transkription (Promega) der zuvor beschriebenen pSKSINBV-luc cDNA transfiziert wird. Eine Stunde nach Transfektion wird das Medium mit 5 mM IPTG ergänzt. Der Überstand wird 24 h nach Transfektion geerntet und verwendet, um BHK-21-Zellen direkt und eine frische Monolayer von Albopictus-SINpak-Zellen, welche wie oben mit 5 mM IPTG für mindestens 12 h induziert werden, zu infizieren. Die Überstände der Infektion werden 24 h nach Infektion geerntet und dann verwendet, um eine zweite Monolayer von BHK-21-Zellen, welche in 35 mm Petrischalen wachsen, zu infizieren. 16 h nach Infektion werden die BHK-21-Zellen lysiert und auf ihre Luziferase-Aktivität, wie beschrieben (Promega), überprüft. Der Vergleich der Luziferaseaktivitäten, welche von BHK-21-Zellen erhalten werden, welche nach der ersten Runde der Vektorproduktion infiziert werden, mit BHK-21-Zellen, welche nach der zweiten Runde der Vektorproduktion infiziert werden, sollte mindestens eine zehnfache Differenz der Expressionsspiegel zeigen. Wenn die Unterschiede in den Spiegeln zehnfach niedriger sind, kann die Reduktion der dem Transfer folgenden Transduktionseffizienz eine Folge des besetzten zellulären Rezeptors auf der identischen Sindbis-Verpackungszelllinie, aus welcher der transiente Vektor hergestellt wurde, sein. Dies kann die Notwendigkeit für die Erzeugung von pseudotypisierten Sindbis-Vektoren zeigen, um die Transduktions-Effizienz in Hüllebezogenen Verpackungszelllinien zu verbessern.

C. INDUZIERBARER VEKTOR UND STRUKTURPROTEIN-EXPRESSION FÜR SINDBIS-HERSTELLERZELLINIEN

1. Verwendung von viralen Promotoren

[0383] Die Herausforderung für die Entwicklung einer Sindbis-Vektor-Herstellerzelllinie liegt in der Frage, ob ein Virus, dessen Infektion von Säugerzellen fast ausschließlich einen produktiven lytischen Zelltod ergibt, irgendwie umgewandelt werden kann, um eine persistente Infektion in den gleichen Zellen zu etablieren. Eine Möglichkeit ist die Sindbis-Vektor-Herstellerlinien aus Moskitozellen zu erzeugen, wo virale Persistenz nach der Infektion resultiert. Der Titer von infektiösem Virus, hergestellt in persistent-infizierten Moskitozellen, beträgt jedoch nur 1×10^4 PFU/ml, mindestens fünf Größenordnungen kleiner als der nach der lytischen Sindbisinfektion von BHK-Zellen Beobachtete. Deshalb kann es kommerziell nicht möglich sein, Moskito-abgeleitete Sindbis-Vektor-Herstellerzelllinien zu entwickeln.

[0384] Viele Strategien sind für induzierbare Sindbis-Vektor-Herstellerzelllinien beschrieben worden, welche sowohl Vektor- als auch virale Struktur-Genkassetten enthalten, so daß die produktive zytolytische Infektion nur nach dem korrekten Stimulus stattfindet. Da diese Versuche auf einem „feed forward“ Spiegel operieren, resultiert jeder Fehler bzw. Schwäche des Systems in der Initiation des Sindbis-Lebenszyklus und Zelltod.

[0385] Das Entwicklungsmerkmal ist der Differenzierungsstatus, welcher vom Genexpressionsmuster abhängig ist. Genexpressionsmuster unterscheiden sich weit zwischen undifferenzierten und ausdifferenzierten Stadien. Daher ist es möglich, daß eine Zelle, deren Differenzierungsstadium kontrolliert werden kann, ein idealer Wirt ist, um eine Sindbis-Vektor-Herstellerzelllinie abzuleiten. In einer solchen Konfiguration werden der Vektor

und die Strukturkomponenten aus Differenzierungs-Stadium-induzierbare Promotoren, gemäß der beschriebenen ELVIS-Strategie, gekoppelt und verwendet, um undifferenzierte Wirtszellen stabil zu transformieren. Die terminale Differenzierung bzw. Ausdifferenzierung der Wirts-Herstellerzelle nach Induktion durch die geeigneten Stimuli ergibt übereinstimmend die Induktion des Sindbis-Replikationszyklus und die Herstellung des verpackten Vektors. Andere hierin beschriebene Strategien, einschließlich Antisense-Strukturen und heterologen viralen Expressionssystemen, würden mit unten beschriebenen zellulären Differenzierungsstadium-abhängigen Promotoren gekoppelt werden. Für diesen Ansatz werden drei Beispiele unter Verwendung von entweder einem viralen oder zellulären Promotor beschrieben, welche nur in ausdifferenzierten Zellen aktiv sind.

[0386] Es ist gezeigt worden, daß das Maus-Polyomavirus (Py), SV40 und Moloney-Murine-Leukemia-virus (M-MuLV) alle befähigt sind, differenzierte embryonale Karzinom (EC)-Zellen der Maus zu infizieren und zu erreichen, aber die Expression ihrer Gene (und heterologen Gene) und Etablierung der produktiven Infektion ist blockiert (Swartzendruber und Lehmann, J. Cell. Physiol. 85: 179–188, 1975; Peries et al., J. Natl. Cancer Inst. 59: 463–465, 1977). Diese viralen Wachstumseigenschaften sind in zwei Zelllinien, PCC4 und F9 nachgewiesen worden, welche von malignen Stammzellen von Maus-Teratorkarzinomen stammen. Die Blockierung der viralen Vermehrung findet auf dem Niveau der Transkription und Replikation statt und passt zu den Enhancern, welche in den viralen nichtkodierenden Kontrollregionen enthalten sind (Linney et al., Nature 308: 470–472, 1984; Fujimura et al., Cell 23: 809–814, 1981; Katinka und Yaniv, Cell 20: 393–399, 1980).

[0387] Wenn M-MuLV undifferenzierte EC-Zellen infiziert, integriert die virale DNA in das Genom. Wie oben erwähnt, wird jedoch die Expression der viralen Gene oder der heterologen Gene blockiert. Diese Blockierung der viralen Expression wird nach der Ausdifferenzierung der EC-Zellen durch Zugabe von Retinsäure zum Wachstumsmedium aufgehoben.

[0388] Um die RNA-Expressionseigenschaften des pVGELVIS-Konstrukts in EC-Zellen zu überprüfen, wird Plasmid-DNA mit Lipofectamin gemäß der durch den Hersteller vorgeschlagenen Bedingungen (ca. 5 µg DNA/8 mg Lipidreagens) komplexiert und zu 35 mm Vertiefungen, welche undifferenzierte PCC4- oder F9-Zellen enthalten (Fujimura et al. 1981. Cell 23: 809–814), bei etwa 95% Konfluenz gegeben. Die Entwicklung der zytopathischen Effekte (CPE) und der Spiegel der produktiven Sindbis-Infektion, welche durch einen Plaque-test des Medienüberstandes quantifiziert wird, wird in regelmäßigen Intervallen über 5 Tage in undifferenzierten und differenzierten transfizierten PCC4- oder F9-Zellen bestimmt. Die Differenzierung von F9- und PCC4-Zellen wird durch Zugabe von Retinsäure (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) bei einer Endkonzentration von 1 µmol durchgeführt.

[0389] Es ist vorgeschlagen worden, daß die Hierarchie der relativen Expression heterologer Gene, welche in undifferenzierten EC-Zellen, welche mit M-MuLV-Vektoren infiziert sind, beobachtet wird, zum Teil insertionsabhängig sein kann (Linney et al. 1987. J. Virol. 61: 3248–3253). Deshalb werden möglicherweise undifferenzierte EC-Zellen, welche mit pVGELVIS transfiziert sind, unterschiedliche Ergebnisse in Bezug auf die Transkription der Sindbis-genomischen cDNA und als Folge in Bezug auf die Initiation des viralen Lebenszyklus liefern. Bei diesem Ereignis, welches auf die G418-Selektion von pVGELVIS-transfizierten undifferenzierten EC-Zellen folgt, werden die verbleibenden Zellen kloniert und expandiert. Die Zellklone werden dann auf die Produktion von Sindbisvirus nach der Differenzierung durch Zugabe von Retinsäure (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) bei einer Endkonzentration von 1 µmol überprüft.

[0390] Um die Vektor-Verpackungszelllinien, deren Herstellung aus Strukturproteinen in Anwesenheit von Sindbis-NSP Zelldifferenzierungsstadium-abhängig ist, zu isolieren, werden undifferenzierte F9- oder PCC4-Zellen, wie oben beschrieben, mit pLTR/SINdIBspE transfiziert und mit G418 selektiert. Differenzierungsstadiumsensitive Klone werden dann durch Infektion bei hoher Multiplizität mit verpacktem SIN-luc-Vektor selektioniert. Klone, welche gegenüber Zelllyse resistent sind oder keine verpackten SIN-luc-Vektorpartikel herstellen, sind Anwarter als Vektor-Verpackungsklone. Diese Anwarter-Klone werden dann auf SIN-luc-Vektor-Partikelproduktion, welche auf die Ausdifferenzierung durch Retinsäure, wie beschrieben, folgt, überprüft.

[0391] Das Maus-Wildtyp-Polyomavirus (Py) ist unfähig, in Teratorkarzinomzelllinien PCC4 oder F9 zu replizieren. Diese Blockierung der Replikation in undifferenzierten Zellen findet auf dem Niveau der Transkription der early region (d. h. T-Antigen)-Gene statt und wird durch Induktion der Ausdifferenzierung mit Vitamin A freigesetzt. Py-Mutanten, welche befähigt sind, produktive Infektion in undifferenzierten PCC4- oder F9-Zellen zu etablieren, passen zu der viralen Enhancerregion. Die Entstehung von viralen embryonalen gewebespezifischen transkriptionalen Enhancerelementen resultiert aus diesen Mutanten. Um diese Eigenschaft der Hemmung der Py-Replikation in undifferenzierten Teratorkarzinomzelllinien auszunützen, wird die virale regulatorische nichtkodierende Region, einschließlich des Enhancers, an die genomische cDNA des Sindbisvirus, ge-

mäß der ELVIS-Strategie, gekoppelt. Die genaue transkriptionale Startstelle der Py-early-Region ist bestimmt worden (siehe Tooze, DNA-Tumroviren). Die PCC4- und F9-Zelllinien werden stabil mit den Py-Sindbisvektoren transformiert. In diesem Modell findet die produktive Sindbisinfektion nach Zugabe von Retinsäure zu dem Kulturmedium und nach Induktion der Ausdifferenzierung statt.

[0392] Die Py-nichtkodierende Region der Basen 5021–152, welche die Sequenzen, welche den viralen Enhancern, 21 bp-Wiederholungen, Replikationsursprung, CAAT- und TATA-Boxen und der early-mRNA-Transkription-5'-Capsequenz entsprechen, einschließt, ist an dem 5'-viralen Ende positioniert, so daß in vivo nur ein einzelner gecappter C-Rest zu dem Sindbis-5'-Ende hinzugefügt wird. Das Nebeneinanderlegen der Py-nichtkodierenden Region und des Sindbis-5'-Endes wird durch überlappende PCR, wie im Folgenden detailliert beschrieben, durchgeführt. Die Amplifikation der Py-nichtkodierenden Region in der ersten primären PCR-Reaktion wird in einer Reaktion, welche den pBR322/Py, das Stamm-A2-Plasmid (ATCC-Nummer 45017-p53.A6.6(pPy-1)) und das folgende Primerpaar enthält, durchgeführt:

Forward-Primer: Pybgl5021F (Puffersequenz/Bgl II-Erkennungssequenz/Py nts 5021–5043)

5'-TATATAGATCTCTTGATCAGCTTCAGAAGATGGC (SEQ.ID NR. 43)

Reverse-Primer: SINPy152R (SIN nts 5-1/Py nts 152–134)

5'-TCAATGGCGGGAAGAGGCGGTTGG (SEQ.ID.NR. 44)

[0393] Die PCR-Amplifikation der Py-nichtkodierenden Region mit dem oben gezeigten Primerpaar wird unter Verwendung der Thermalase-thermostabilen-DNA-Polymerase (Ameresco Inc., Solon, Ohio) und dem vom Lieferanten bereitgestellten Puffer, welcher 1,5 mmol MgCl₂ enthält, ausgeführt. Zusätzlich enthält die Reaktion 5% DMSO und Heißstart-Wachspen (Perkin-Elmer), unter Verwendung des unten gezeigten folgenden PCR-Amplifikationsprotokolls:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	0,5	
72	10	1

[0394] Die Amplifikation des Sindbis-5'-Endes in der zweiten primären PCR-Reaktion wird in einer Reaktion durchgeführt, welche den pVGSP6GEN-Klon und das folgende Primerpaar enthält:

Forward-Primer: (Py nts 138–152/SIN nts 1–16)

5'-CCGCCTCTTCCCGCCATTGACGGCGTAGTAC (SEQ.ID.NR. 45)

Reverse-Primer: (SIN nts 3182–3160)

5'-CTGGCAACCGGTAAGTACGATAC (SEQ.ID.NR. 46)

[0395] Die PCR-Amplifikation der Sindbis-5'-terminale-Region mit dem oben gezeigten Primerpaar weist die oben beschriebenen Reaktionsbedingungen unter Verwendung des unten gezeigten folgenden PCR-Amplifikationsprotokolls auf:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,0	
72	10	1

[0396] Die 442 bp- und 3202 bp-Produkte von den primären PCR-Reaktionen wurden mit GeneClean (BIO 101) gereinigt und zusammen in einer PCR-Reaktion mit dem folgenden Primerpaar verwendet:

Forward-Primer: Pybgl5021F (Puffersequenz/Bgl II-Erkennungssequenz/Py nts 5021–5043)

5'-TATATAGATCTCTTGATCAGCTTCAGAAGATGGC (SEQ.ID NR. 47)

Reverse-Primer: (SIN nts 2300–2278)

5'-GGTAACAAGATCTCGTGCCGTG (SEQ. ID NR. 48)

[0397] Die PCR-Amplifikation des Primer-PCR-Amplikonprodukts mit dem oben gezeigten Primerpaar ist mit den obigen Reaktionsbedingungen unter Verwendung des unten gezeigten PCR-Amplifikationsprotokolls beschrieben:

Temperatur (°C)	Zeit (Minuten)	Nr. Zyklen
94	2	1
94	0,5	
55	0,5	35
72	3,0	
72	10	1

[0398] Die 20 3'-terminalen Basen des ersten primären PCR-Amplikonproduktes überlappen mit den 20 5'-terminalen Basen des zweiten primären PCR-Amplikonprodukts. Das resultierende 2,742 bp überlappende sekundäre PCR-Amplikonprodukt wird durch 0,8% Agarose/TBE-Elektrophorese gereinigt, mit Bgl II verdaut, und das 2.734 bp Produkt wird in den mit Bgl II und CIAP behandelten pcDNASINbgl/xba (siehe Beispiel 3) ligiert. Das resultierende Konstrukt weist 16.641 bps auf und ist als ELVIS-PySIN bekannt. Um einen Strukturprotein-Expressionsvektor ähnlich zu pLTR/SindIBsp für die Ableitung von Vektor-Verpackungszelllinien zu konstruieren, wird die ELVIS-PySIN-Konstruktion mit Bsp EI vollständig verdaut und unter verdünnten Bedingungen religiert, um eine Deletion der Nichtstrukturproteine zwischen den Basen 422–7054 durchzuführen. Dieses Konstrukt ist als ELVIS-PySINdIBspE bekannt.

[0399] ELVIS-PySIN-Plasmid-DNA wird mit Lipofectamin (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD) gemäß der vom Hersteller vorgeschlagenen Bedingungen (ca. 5 µg DNA/8 mg Lipidreagents) komplexiert und zu 35 mm-Vertiefungen hinzugefügt, welche undifferenzierte PCC4- oder F9-Zellen von annähernd 75% Konfluenz enthalten. Die Entwicklung der zytopathischen Effekte (CPE) und der Spiegel der produktiven Sindbis-Infektion, welche durch Plaque-tests des Mediumüberstandes quantifiziert werden, werden in regelmäßigen Intervallen von 5 Tagen in undifferenzierten und differenzierten PCC4- oder F9-Zellen bestimmt. Die Differenzierung von F9- und PCC4-Zellen wird durch Zugabe von Retinsäure (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) bei einer Endkonzentration von 1 µmol erreicht.

[0400] Wenn die undifferenzierten EC-Zellen eine heterologe Antwort auf die Transfektion mit ELVIS-PySIN aufweisen, werden die verbleibenden Zellen, welche nicht durch die Sindbisvirusvermehrung, nach der G418-Selektion von pVGELVIS-transfizierten undifferenzierten EC-Zellen, lysiert werden, kloniert und expandiert. Die Zellklone werden dann auf die Produktion von Sindbisvirus nach Differenzierung durch Zugabe von Retinsäure (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo) bei einer Endkonzentration von 1 µM überprüft.

[0401] Die Isolierung von Vektor-Verpackungszelllinien, welche stabil mit dem ELVIS-PySINdIBspE transfiziert sind, mit einem Zelldifferenzierungsstadium-abhängigen Expressionsmuster der Strukturproteine in Gegenwart von Sindbis-NSP wird wie oben für das pLTR/SindIBspE-Plasmid beschrieben durchgeführt.

2. Verwendung von zellulären Promotoren

[0402] Das dritte Beispiel dieser Strategie verwendet die β -Globin-Locus-Kontrollregion. Das β -Globin-Multigen-Kluster enthält fünf entwicklungsabhängig regulierte Gene. In den frühen Stadien der menschlichen Entwicklung ist der embryonische Dottersack das hemopoetische Gewebe und exprimiert das ϵ -Globin-Gen. Dies wird gefolgt von einem Umschalten auf das γ -Globulin-Gen in der fötalen Leber und die δ - und β -Globulin-Gene im erwachsenen Knochenmark (Collins und Weissman, 1984, Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 31–315).

[0403] Mindestens zwei Maus-Erythrozyten-Leukämie-Linien, MEL und Friend, dienen als Modelle für die von der Ausdifferenzierung abhängige Expression von β -Globin. Die Expression von β -Globin wird in diesen Linien nur nach Induktion der Ausdifferenzierung durch Zugabe von 2% DMSO zum Wachstumsmedium beobachtet.

[0404] Der gesamte β -Globin-Locus wird durch die Locus-Kontrollregion (LCR) reguliert. In der LCR liegt die dominante Kontrollregion (DCR) in der DNase I-hypersensitiven Region, welche sich 5' zu der kodierenden Region befindet. Die DCR enthält fünf DNase I-hypersensitive (HS1-HS5)-Sequenzen. Die DCR steuert auf hohem Niveau unabhängig von der Integration der Sequenz die Kopienzahl-abhängige Expression von einem verknüpften humanen β -Globin in transgenen Mäusen und transfiziert stabil Maus-Erythrozyten-Leukämie-(MEL)-Zellen (Grosveld et al., 1993, CSHSQB 58: 7–12). In einer neuen Studie (Ellis et al. 1993 EMBO 12: 127–134) werden Concatamere eines synthetischen Kerns, welcher mit Sequenzen in HS2 überstimmt, gezeigt, die als eine Locuskontrollregion funktionieren.

[0405] Um die vom Differenzierungsstadium abhängige Expression von Sindbis-Vektoren zu erreichen, wird die virale genomische cDNA neben einem Promotor angeordnet, welcher einen tandem-synthetischen Kern enthält, welcher der LCR HS2-Sequenz entspricht. Alternativ kann das gewünschte Sindbis-Vektorkonstrukt stromabwärts zu der LCR in dem endogenen β -Globin durch homologe Rekombination inseriert werden. In einer solchen Strategie würde die β -Globintranskriptions-Insertionssequenz nach der terminalen Differenzierung zuerst bestimmt, damit der Sindbis-Vektor exakt an die Startstelle plaziert werden kann.

[0406] Die hierin vorgeschlagene Strategie, in welcher die Initiation eines lytischen viralen Lebenszyklus durch das Differenzierungsstadium der Wirtszelle kontrolliert wird, sollte Anwendung in anderen Systemen finden, wo die Kontrolle von virusinduzierter Zytopathologie erwünscht ist.

3. Insertion der Vektorkonstrukte in Differenzierungsstadiumkontrollierte induzierbare Promotoren

[0407] Die Erzeugung von Klonen, deren Expression von heterologen Genen aus Sindbis-Vektoren, welche in der ELVIS-Konfiguration, wie in Beispiel 3 beschrieben, positioniert sind, Differenzierungsstadium-abhängig ist, wird wie oben für die pVGELVIS-, pLTR-SindIBspE-Plasmide erreicht. Die Erzeugung der Klone, deren Vektorproduktion vom Differenzierungsstadium abhängig ist, wird durch Transfektion der isolierten Differenzierungs-abhängigen Vektor-Verpackungsklone, wie oben für die ELVIS heterologen Genexpressions-Vektoren beschrieben, durchgeführt. Klone mit dem gewünschten Phänotyp oder Vektorproduktion nach Retinsäure-induzierter Differenzierung werden, wie oben beschrieben, isoliert.

D. Strukturproteinexpression von einer heterologen Astrovirus-Verbindungsregion

[0408] Zu den kritischen Merkmalen eines Vektor-Verpackungssystems gehört eine Zelllinie, welche die Strukturkomponenten exprimiert, welche wichtig sind, um einen infektiösen Partikel, ohne die Erzeugung von Wildtyp-Virus durch Rekombination zwischen Vektor und Strukturgen-Komponenten, zu erzeugen. Diese zwei gewünschten Fähigkeiten der Verpackungszelllinie werden in Systemen auf Retrovirus-Basis durch die konstitutive Expression von gag/pol- und env-Genen von individuellen, heterologen RNA-Polymerase II-Expressionskassetten durchgeführt.

[0409] Ein anderer wichtiger Aspekt von Vektor-Verpackungszelllinien ist, ein System abzuleiten, welches so nah wie möglich die normale Replikationsstrategie des Wildtyp-Virus nachahmt. Dieser Sachverhalt ist in bezug auf den beobachteten Titer Spiegel des verpackten rekombinanten Vektors wichtig. Die Synthese von viralen Strukturproteinen während der Sindbisinfektion wird nach der Transkription von hohen Spiegeln der subgenomischen mRNA von dem Verbindungsregion-Promotor, gefolgt durch die effiziente Translation in die Strukturproteine, erreicht. Der Verbindungsregion-Promotor liegt funktionell nur in Antisense-Orientierung vor, und die Synthese der anti-genomischen RNA findet nach der Translation der Nicht-Strukturproteine statt, um so die Expression der Strukturproteine zu verzögern. Daraus folgt, daß unter Berücksichtigung von Sindbis es wünschenswert wäre, eine Verpackungszelllinie zu konstruieren, in welcher die Synthese der Strukturproteine von dem Verbindungsregion-Promotor initiiert wird, welcher wiederum durch Nichtstrukturproteine aktiviert wird, welche von dem rekombinanten Vektormolekül exprimiert werden.

[0410] Es ist bekannt, daß eine relativ hohe Rekombinationshäufigkeit zwischen RNA genomischen Molekülen während der Infektion mit Sindbisvirus über einen "Copy-choice"-Mechanismus auftritt (PNAS 1991 88: 3253–3257). Eine Rekombination zwischen Vektor und Verbindungsregion-/Strukturgenkassetten würde die Erzeugung von Wildtyp-Sindbisvirus, vielleicht bei einem Niveau von einem Wildtyp-Virus pro Million verpackter Vektorpartikel, erzeugen (Liljestrom Bio/Technology 1991 9: 1356–1361). Ein Weg, die Erzeugung von Wildtyp-Virus abzuschwächen, ist die Strukturgene auf getrennten Expressionskassetten aufzutrennen, ein Ansatz, welcher sehr erfolgreich mit Retrovirus-Verpackungszelllinien verwendet worden ist und zuvor in Beispiel 7 diskutiert worden ist.

[0411] Ein zusätzlicher Ansatz, um den Spiegel von Wildtyp-Virusproduktion in Sindbis-Vektor-Verpackungszelllinien zu verringern, würde sein, die Strukturproteine unter der Kontrolle von genetischen Elementen des Astrovirus zu exprimieren. Ein Schema für diese Konfiguration ist in **Fig. 10** dargestellt. Ähnlich zu dem Sindbisvirus schließt die Expression der Astrovirus-Strukturproteine eine Verbindungsregion-Strategie ein, in welcher hohe Spiegel des Strukturproteins von der subgenomischen Botschaft synthetisiert werden. Die Astrovirus-Expressionskassette könnte aus einem der zwei folgenden angeordneten Elemente bestehen: (1) Induzierbarer Promotor/Astrovirus-5'-Ende/Astrovirus-Verbindungsregion/Sindbis-Strukturgene/Astrovirus-3'-Ende oder (2) Antisense-Astrovirus-3'-Ende/Antisense-Sindbis-Strukturgenen/Antisense-Astrovirus-Verbindungsregion/Antisense-Astrovirus-5'-Ende/Hepatitis-Deltavirus-Ribozym oder andere Konfigurationen, wie in Beispiel 7 beschrieben. In beiden Konfigurationen wird die Expressionseinheit durch Astrovirus-Nichtstrukturproteine über den gesamten Mechanismus, welcher während der viralen Replikation stattfindet, amplifiziert. Da viele Runden der subgenomischen mRNA-Synthese, welche von der Verbindungsregion initiiert wird, von jeder Expressionseinheit stattfinden, wird die Amplifikation der Expressionseinheit mit den Astrovirus-Nichtstrukturproteinen in der Produktion von hohen Spiegeln von Sindbis-Strukturproteinen resultieren. Die zweite Konfiguration der oben beschriebenen Sindbis-Strukturproteinkassette kann besser als die erste funktionieren, da das primäre Transkript des toxischen Sindbis-Strukturgens antisense vorliegt. Obwohl die Expression der Strukturgene in der ersten Konfiguration nicht vor der Synthese des Negativstrangs, gefolgt von der Synthese der positiven, subgenomischen RNA von der Verbindungsregion, stattfinden sollte, stellt die Antisense-Natur des primären Transkripts in der zweiten Konfiguration ein zusätzliches Kontrollniveau dar, um zytotoxische Proteinexpression zu verhindern.

[0412] Es ist möglich, daß kein Wildtyp-Virus in einer Verpackungszelllinie erzeugt wird, in welcher die Sindbisvirus-Strukturproteine individuell von den Astrovirus-Verbindungsregion-Expressionskassetten synthetisiert werden. Eine Rekombination zwischen der Nicht-Strukturprotein-Region des Vektors und einer Astrovirus-Strukturprotein-Expressionskassette würde ein Molekül ergeben, in welchem cis-Elemente des Astrovirus mit Sindbis-Virusgenen gekoppelt werden, eine nicht lebensfähige Kombination. Eine korrekte Kopplung von Sindbis cis- und trans-Elementen würde zwei exakte Rekombinations-Ereignisse zwischen Vektor und der Expressionskassette des Astrovirus, zwischen der Astrovirus-Verbindungsregion und Strukturgen-ATG und zwischen dem Strukturgen-Terminationscodon und dem Astrovirus-3'-Ende erfordern. Um Wildtyp-Virus zu erzeugen, würde dieses zweifache Rekombinationsereignis dreimal im gleichen Molekül (sechs Gesamt ereignisse) stattfinden müssen, um die drei getrennten Sindbis-Strukturgene aufzunehmen.

[0413] Um jede mögliche Toxizität der Astrovirus-Proteine zu verringern, wird die Synthese der Astrovirus-Expressionskassetten durch induzierbare Promotoren kontrolliert. Eine Möglichkeit ist, das lac-Operon gemäß des „lac-switch“-Systems, welches zuvor in Beispiel 7 beschrieben worden ist (Stratagene), zu verwenden. Der konstitutive Expressionsspiegel der lac-Operon-kontrollierten Gene in Abwesenheit von dem nicht verlangten Induktor IPTG beträgt etwa 10 Kopien RNA pro Zelle. Der induzierbare Promotor, welcher der Astrovirus-/Sindbisvirus-Strukturgen-Expressionskassette entspricht, kann der lac-Operon oder andere geeignete Promotoren

sein, welche sehr niedrige Spiegel der konstitutiven Expression aufweisen. Die Konstruktion der Verpackungszelllinien dieser Konfigurationen, in welchen die Kontrolle der Sindbisproteine durch einen heterologen Virus gesteuert wird, sollte die Erzeugung von Hochtitern Wildtyp-Virus-freien, verpackten Vektorpartikeln ergeben.

BEISPIEL 8

ALTERNATIVE VIRALE VEKTOR-VERPACKUNGSTECHNIKEN

[0414] Verschiedene alternative Systeme können verwendet werden, um rekombinante Sindbis-Viren, welche das Vektorkonstrukt tragen, herzustellen. Jedes dieser Systeme zieht einen Vorteil aus der Tatsache, daß das Baculovirus und die Säugerviren, Vaccinia bzw. Impfpocken und Adeno-Virus, welche kürzlich angepaßt worden sind, große Mengen von jedem gegebenen Protein, für welches das Gen kloniert worden ist, herstellen. (Smith et al., Mol. Cell. Biol. 3: 12, 1983; Piccini et al., Meth. Enzymology 153: 545, 1987 und Mansour et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 1359, 1985).

[0415] Diese viralen Vektoren können verwendet werden, um Proteine in Gewebekulturzellen durch Insertion von geeigneten Genen in den viralen Vektor herzustellen und können angepaßt werden, Sindbis-Vektorpartikel herzustellen.

[0416] Adeno-Virus-Vektoren stammen von im Kern replizierenden Viren ab und können funktionsunfähig sein. Gene können in Vektoren insertiert werden und verwendet werden, um Proteine in Säugerzellen entweder durch in vitro Konstruktion (Ballay et al. EMBO J. 4: 3861, 1985) oder durch Rekombination in Zellen (Thummel et al., J. Mol. Appl. Genetics 1: 435, 1982) herzustellen.

[0417] Ein bevorzugtes Verfahren ist, Plasmide unter Verwendung des Adeno-Virus- "Major late promoter"-(MLP)-Antriebes zu konstruieren: (1) Sindbis-Nicht-Strukturproteine und (2) ein modifiziertes Sindbis-Vektorkonstrukt. Ein modifizierter Sindbis-Vektor in dieser Konfiguration würde noch immer eine modifizierte Verbindungsregion enthalten, welche befähigt ist, dem transkribierten Vektor zu ermöglichen, selbst replizierend zu sein, wie es in einer natürlichen Umgebung wäre.

[0418] Diese Plasmide können dann verwendet werden, um Adeno-Virus-Genome in vitro herzustellen (Ballay et al., EMBO J. 4: 3861, 1985). Diese adenoviralen Genome, welche Replikations-defekt sind, werden in 293-Zellen transfiziert (eine humane Zelllinie, welche Adeno-Virus-E1A-Protein herstellt), um reine Bestände bzw. Vorräte von Sindbis-Strukturproteinen und Sindbis-Vektor, welche getrennt in den funktionsunfähigen Adenovirus-Vektoren vorkommen, zu erhalten. Da die Titer solcher Vektoren typischerweise bei 10^7 – 10^{11} /ml liegen, können diese Bestände verwendet werden, um Gewebekulturzellen simultan bei hoher Multiplizität der Infektion zu infizieren. Diese Zellen stellen dann Sindbis-Proteine und Sindbis-Vektorgenome mit hohen Spiegeln her. Da diese Adenovirus-Vektoren defekt sind, wird keine größere Menge von direkter Zelllyse stattfinden, und die Sindbis-Vektoren können aus den Zellüberständen geerntet werden.

[0419] Andere virale Vektoren, wie solche von nicht verwandten Sindbis-Vektoren (z. B. RSV, MMTV oder HIV) stammenden, können auch in der gleichen Weise verwendet werden, um Vektoren aus primären Zellen zu erzeugen. In einer Ausführungsform werden diese adenoviralen Vektoren in Verbindung mit primären Zellen verwendet, was Sindbis-Vektorpräparationen hervorruft.

[0420] Ein alternatives Expressionssystem ist auch beschrieben worden, in welchem chimäre HIV-/Poliovirus-Genome die Erzeugung von chimären Minireplikons ergeben (J. Virol. 65: 2875, 1991), welche zur Expression von Fusionsproteinen befähigt sind. Für diese chimären Poliovirus-Minireplikons wurde später gezeigt, daß sie unter Verwendung eines rekombinanten Vaccinavirus (VV-P1), welcher das ersetzte Poliovirus-Capsidvorläufer P1 Protein exprimiert, welches in dem chimären Minireplikon funktionsunfähig bzw. defekt ist, encapsidiert sind und infektiöse Partikel herstellen (J. Virol. 67: 3712, 1993). In der Untersuchung werden HIV1-gag-pol-Sequenzen durch die VP2- und VP3-Capsidgene des P1-Capsids des Poliovirus ersetzt. In ähnlicher Weise kann das Sindbis-Vektorgenom durch P1-Capsidsequenzen ersetzt werden und in diesem System als ein Mittel verwendet werden, um Polio-pseudotypisierte Sindbis-Vektoren nach Transfektion von in vitro transkribierten Sindbis-RNA-Transkripten der Zelllinie bereit zu stellen. Umgekehrt können Sindbis-Strukturproteine auch durch die VP2- und VP3-Sequenzen substituiert werden, wobei anschließend ein alternatives Verpackungszelliniensystem für Vektoren auf Sindbis-Basis bereit gestellt wird.

ZELLINIE ODER GEWEBESPEZIFISCHE SINDBIS-VEKTOR-„HYBRIDHÜLLEN“

[0421] Die Gewebe- und Zelltypspezifität von Sindbis-Virus wird primär durch die Virus-kodierten Hüllproteine E1 und E2 bestimmt. Diese viralen Strukturproteine sind Transmembran-Glykoproteine, eingebettet in eine von Wirtszellen stammenden Lipidhülle, welche erhalten wird, wenn die viralen Partikel von der Oberfläche der infizierten Zelle knospen. Die Hülle umgibt ein ikosaedrisches Kerncapsid, umfassend eine genomische RNA, welche mit vielfachen, hochgeordneten Kopien eines einzelnen Capsidproteins komplexiert ist. Die E1- und die E2-Hüllglykoproteine sind als Heterodimere komplexiert, welche sich in trimären Strukturen zusammenzulagern scheinen, wobei die charakteristischen „Spikes“ auf der Virusoberfläche gebildet werden. Zusätzlich wechselwirken die zytoplasmatischen Schwänze dieser Proteine mit den Kerncapsiden, wodurch die Zusammenlagerung von neuen viralen Partikeln initiiert wird (Virology 193: 424, 1993). Die individuellen, Sindbis-Glykoproteinen zugeschriebene Eigenschaften schließen Rezeptorbindung an Glykoprotein E2 (Virology 181: 694, 1991) und Glykoprotein E1-vermittelte Fusion der viralen Hülle und der endosomalen Membran ein, was in einer Lieferung des Kerncapsidpartikels in das Zytoplasma resultiert (New Aspects of Positive-Stranded RNA Virus, Seiten 166–172, 1990).

[0422] Die vorliegende Erfindung macht deutlich, daß durch Zerstörung bzw. Unterbrechen der Glykoprotein-Aktivität (insbesondere, aber nicht auf E2 begrenzt) und Koexpression eines intakten heterologen Glykoproteins oder durch Erzeugen von Genprodukten der Hybridhüllen (d. h. spezifisch ein Sindbis-Hüllglykoprotein mit seinen natürlichen zytoplasmatischen und membran-durchspannenden Regionen und exogenen Bindungsdomänen, welche in der Natur nicht im gleichen Proteinmolekül gefunden werden) oder durch Ersetzen der E2 und/oder E1-Glykoproteine durch andere Alpha-Viren oder ihrer Derivate, welche sich von Sindbis in ihrem Gewebetropismus unterscheiden, die Wirtsbereich-Spezifität ohne Zerstörung der zytoplasmatischen Funktionen, welche für die Virionzusammenlagerung benötigt werden, verändert werden kann. Deshalb können rekombinante Sindbis-Vektorpartikel hergestellt werden, welche spezifisch an vorselektierte Targetzellen, abhängig von dem Tropismus des eingeführten Proteinmoleküls oder Domäne, binden.

[0423] In der ersten Konfiguration wird die Substitution von analogen Hüllproteinen E1 und/oder E2 durch andere Alpha-Viren oder ihre Varianten verwendet, um den Gewebetropismus zu verändern. Zum Beispiel ist das Venezuelan-Equine Encephalitis-Virus (VEE) ein Alpha-Virus, welches einen Tropismus auf Zellen mit lymphoidem Ursprung, ungleich zu seinem Sindbis-Virus-Gegenpart, ausübt. Deshalb werden mit Sindbis-Vektor verpackte Zelllinien, welche die VEE-Strukturproteine exprimieren, die gleichen lymphotropen Eigenschaften wie das Eltern-VEE-Virus, von welchem die Strukturprotein-Genkassette der Verpackungszellen erhalten wurde, zeigen.

[0424] Spezifisch wird der Trinidad-Donkey-Stamm des VEE-Virus (ATCC #VR-69) in BHK-Zellen vermehrt, und die virale RNA unter Verwendung von Verfahren, ähnlich zu denen für die Klonierung von Sindbis beschriebenen, extrahiert. Die gesamte Strukturprotein-kodierende Region wird mit einem Primerpaar, dessen 5'-Enden zu der authentischen AUG-Translationsstartsequenz passen, einschließlich der umgebenden Kozak-Konsensussequenz und UGA-Translations-Stopsequenz, amplifiziert. Der Forward-Primer ist zu VEE Nukleotiden 7553–7579 komplementär, und der Reverse-Primer ist zu den VEE Nukleotiden 11206–11196 komplementär (Sequenz aus Virology 170: 19). Die PCR-Amplifikation von VEE-cDNA, welche den Strukturprotein-Genen entspricht, wird unter Verwendung eines zweistufigen Reverse-Transkriptase-PCR-Protokolls, wie für Sindbis beschrieben, mit VEE-genomischer-RNA als Matrice und dem folgenden Oligonukleotidpaar durchgeführt:

Forward-Primer (VEE 7553F)

5'-TATATGCGGCCGACCGCCAAGATGTTCCCGTTCCAGCCA-3'

(SEQ. ID NR. 49)

Reverse-Primer (VEE 11206R)

5'-TATATGCGGCCGCTCAATTATGTTTCTGGTTGGT-3'

SEQ. ID NR. 50)

[0425] Zusätzlich zu ihren entsprechenden Komplementaritäten zu den angezeigten VEE-Nukleotiden enthält jeder Primer eine NotI-Erkennungssequenz an seinen 5'-Enden. Nach der PCR-Amplifikation wird das 3800 bp-Fragment in einem 1% Agarosegel gereinigt, dann anschließend mit dem Enzym NotI verdaut. Das resultierende Fragment wird dann getrennt in die zuvor beschriebenen pOP13 und pOPRSV1-Vektoren ligiert, welche mit NotI verdaut werden und mit alkalischer-Phosphatase aus Kälberdarm behandelt werden. Diese resultierenden Vektoren, welche die gesamte VEE-Strukturprotein-kodierende Sequenz enthalten, sind als pOP13-VEESP und pOPRSV1-VEESP bekannt. Die Verwendung dieser Klone in der Entwicklung von Verpackungszelllinien folgt der für Sindbis-Verpackungszelllinien beschriebenen. Zusätzliche Variationen der lac-Operon-VEE-Strukturprotein-Genexpression-Vektoren werden auch unter Verwendung der in diesem Patent für Sindbis ausgeführten Systeme und im Stand der Technik bekannten Standardtechniken konstruiert. Darüber hinaus sind Varianten von VEE und anderen Alphaviren und ihrer Varianten, welche sich im Gewebetropismus unterscheiden, nützlich, wenn man diesem Ansatz folgt.

[0426] In der zweiten Konfiguration wird ein heterologes Glykoprotein oder zellulärer Ligand in einer Lipiddoppelschicht einer Verpackungszelllinie exprimiert, welche befähigt ist, umhüllte Sindbis-Vektorpartikel herzustellen. Diese Konfiguration ist ähnlich zu einer, welche in Beispiel 6 für die Herstellung von VSV-G-pseudotypisierten Sindbis-Vektoren beschrieben ist; außer daß in dieser Konfiguration die E2-Rezeptor-bindende Funktion durch Insertionsdeletion oder basenspezifische Sequenzmutagenese inaktiviert ist. Die Rezeptor-bindende Funktion von E2 wird inaktiviert, um den Vektorpartikel-Tropismus zu begrenzen, welcher durch das heterologe Glykoprotein oder zelluläre Liganden bereitgestellt wird. Zusätzlich zu dem Beispiel der VSV-G-Pseudotypisierung werden andere virale Glykoproteine, welche auf spezifische, zelluläre Rezeptoren gerichtet sind (wie das retrovirale HIV gp 120 Protein für CD4 Zelltargeting), verwendet, wenn sie von Standard-Vektoren, welche stabil in Sindbis-Verpackungszelllinien transfiziert sind, exprimiert werden.

[0427] In der dritten Konfiguration werden auch chimäre Glykoproteine hergestellt, welche ein "Targeting" bzw. Ausrichten der viralen Sindbis-Vektoren auf bestimmte Zelllinien in vitro oder Gewebetypen in vivo erlauben. Um ein solches chimäres Glykoprotein zu konstruieren, werden spezifische Oligoprimer, welche die Liganden-bindende Domäne des gewünschten Rezeptors plus homologe Sindbis-Sequenzen (welche eine einzigartige, spezifische Restriktionsendonuklease-Sequenz enthalten) verwendet, um eine Insert-Sequenz zu amplifizieren, welche durch den Sindbis-Strukturprotein-Expressionsvektor substituiert werden kann. Alternativ werden begrenzte Bal-31-Verdaus an einer passenden Restriktionsenzymsequenz durchgeführt, um hinter einer permissiven Insertions-Sequenz zu verdauen, gefolgt durch "glatte"-Enden-Ligierung eines Fragments, welches eine kleine Rezeptor-bindende Domäne kodiert, oder eines gesamten viralen Glykoproteins oder eines Zelloberflächenliganden. Als ein Beispiel können Peptide, welche der hauptsächlich neutralisierenden Domäne des HIV-gp120-Hüllproteins entsprechen (Virology 185: 820, 1991) verwendet werden, um den normalen E2-Tropismus zu unterbrechen und CD4-Zelltargeting bereit zu stellen.

[0428] Während das Beispiel von HIV-gp120 ein Hybridprotein erläutert, sind die Möglichkeiten nicht auf virale Glycoproteine beschränkt. Zum Beispiel wird der Rezeptor-bindende Teil des humanen Interleukin-2 mit dem(n) Hüllprotein(en) von Sindbis kombiniert, um Vektoren auf Zellen mit IL-2-Rezeptoren auszurichten. Darüber hinaus wird die vorhergehende Technik verwendet, um einen rekombinanten Sindbis-Vektorpartikel mit Hüllproteinen zu erzeugen, welcher Fc-Teile von Antikörpern erkennt. Monoklonale Antikörper, welche nur vorselektionierte Targetzellen erkennen, werden dann an solche Fc-Rezeptor-tragenden Sindbis-Vektor-Partikel gebunden, so daß die Vektorpartikel an diese vorselektionierten Targetzellen (z. B. Tumorzellen) binden und sie infizieren. Alternativ kann eine Hybridhülle mit der Bindungs-Domäne von Avidin verwendet werden, um Zellen zu treffen, welche mit biotinylierten Antikörpern oder anderen Liganden beschichtet worden sind. Der Patient wird zuerst mit Antikörpern überflutet und dann Zeit gegeben, die ungebundenen und nicht spezifisch-gebundenen Antikörper vor dem Verabreichen des Vektors zu entfernen. Die hohe Affinität (10–15) der Avidin-Bindungsstelle für Biotin erlaubt ein genaues und effizientes Ausrichten bzw. Targeting auf das Originalgewebe, welches durch das monoklonale „Bild“ identifiziert wird.

BESTIMMUNG VON VEKTOR-EINHEITEN IN EINER PRÄPARATION DURCH INFEKTION VON EINER β -GALACTOSIDASE-EXPRIMIERENDEN ZELLINIE UNTER DER KONTROLLE DER SINDBIS-VERBINDUNGSREGION

BESTIMMUNG EINER VEKTOREINHEIT IN EINER PRÄPARATION DURCH INFEKTION EINER β -GALACTOSIDASE-EXPRIMIERENDEN REPORTERZELLINIE

[0429] Um eine geeignete therapeutische Dosis des Vektors an Individuen zu verabreichen, ist es wünschenswert, eine Methode zu erlangen, durch welche die Vektor-Infektionseinheiten, welche in einer Präparation enthalten sind, leicht bestimmt werden können. Dies wird durch die Erzeugung einer Zelllinie, welche β -Galaktosidase oder andere Reportergene nur exprimiert, wenn funktionelle Sindbis-Nichtstrukturproteine in der Zelle vorhanden sind, durchgeführt. Die Zelllinie kann mit steigenden Verdünnungen einer Sindbis-Vektorpräparation infiziert werden, so daß einzelne Zellen nicht mit mehr als mit einem Vektorpartikel infiziert sind, wodurch erlaubt wird, den Titer oder die Vektor-Einheiten zu bestimmen. Daher ist diese Zelllinie ein Test von funktionellen Partikeln, welche in einer Vektor-Präparation vorliegen.

A. Erzeugung einer Zelllinie, welche funktionelles β -Galaktosidase-Protein unter der Kontrolle der Sindbis-Nichtstrukturproteine exprimiert

[0430] In einer Konfiguration wird eine eukaryotische Expressionskassette konstruiert, welche eine 5'-terminale-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription von Sindbis-RNA befähigt ist, eine Sindbis-Verbindungsregion, ein Reportergen und eine 3'-terminale-Sindbis-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz für die Minusstrangsynthese enthält. Diese Kassette wird in Antisense-Orientierung, benachbart zu einem eukaryotischen transkriptionalen Promotor, eingesetzt. Zusätzlich können diese Konstrukte auch eine katalytische Ribosym-Sequenz, unmittelbar benachbart zu dem Sindbis-Nukleotid 1 der 5'-terminalen-Sequenz, enthalten, welche die Spaltung des primären RNA-Transkripts präzise nach diesem Sindbis-Nukleotid ergeben wird. In dieser Antisense-Orientierung kann das Reportergen nicht translatiert werden und ist vor der Reporter-Genexpression völlig von der Anwesenheit von Sindbis-Nicht-Strukturproteinen für die Transkription in positivsträngige mRNA abhängig. Diese Nicht-Strukturproteine werden durch die titerbestimmte Sindbis-Vektorpräparation bereit gestellt. Zusätzlich wird diese Konfiguration, wenn sie entworfen wäre, die genauen Sindbisgenom-5'- und 3'-Endsequenzen zu enthalten, den Reporter-Gentranskripten ermöglichen einer Amplifikation durch Verwendung der gleichen Nicht-Strukturproteine, welche durch den Sindbis-Vektor bereit gestellt werden, zu unterliegen.

[0431] Ein Beispiel dieser Antisense-Titer-Konstruktion ist wie folgt. Plasmid pSKSINBV-lacZ wird mit dem Enzym SacI verdaut, welches direkt nach dem Sindbis-3'-Ende und der Poly-A-Sequenz spaltet. Das überstehende 3'-Ende wird durch Zugabe des Enzyms T4 DNA-Polymerase und dNTPs, gefolgt durch eine Inkubation für 10 Minuten bei 16°C, mit glatten Enden versehen. Das linearisierte Plasmid wird anschließend mit dem Enzym Bam HI verdaut, welches bei dem Nukleotid 7335 stromaufwärts zu der Sindbis-Verbindungsregion spaltet. Das resultierende Fragment wird in einem 1% Agarosegel gereinigt und mit pMCS-26s (in Beispiel 7 beschrieben), welches mit dem Enzym Xba I verdaut, mit glatten Enden, wie oben beschrieben, versehen, mit Bam HI verdaut, auf einem 1% Agarosegel gereinigt und mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm dephosphoryliert worden ist, ligiert.

[0432] Das resultierende Konstrukt, bekannt als pMCS-LacZ, wird dann modifiziert, um das 5'-Ende von 299 Nukleotiden von Sindbis, fusioniert an eine 84 Nukleotid-Ribosymsequenz des antigenomischen Strangs des Hepatitisdeltavirus (HDV), unter Verwendung von überlappender PCR-Amplifikation, zu enthalten (detailliert beschrieben, in Beispiel 7). Zwei Primerpaare werden anfänglich in getrennten PCR-Reaktionen verwendet, gefolgt durch ihre überlappende Synthese in einer zweiten PCR-Runde. Reaktion #1 enthält die Primer HDV17-68 (SEQ. ID NR.) und HDV49-XC (SEQ. ID NR.), und Reaktion #2 enthält die Primer SIN-HDV (SEQ. ID NR.) und SIN276-SPE (SEQ. ID NR.) und das Plasmid pVGSP6GEN als Matrize. Die PCR-Amplifikation wird durch ein Standard-Zweitemperatur-Zyklusprotokoll erreicht. Nach der ersten Runde der PCR-Amplifikation wird ein Zwölftel der Gesamtmenge von jeder Reaktion #1 und Reaktion #2 kombiniert und als Matrize in einer zweiten Runde der PCR-Amplifikation mit den Primern HDV49-XC und SIN276-SPE und einem Standard-Zweitemperatur-Zyklusprotokoll verwendet. Auf die zweite Runde der PCR folgend, wird das 414 bp-Amplikon mit dem Mermaid Kit (Bio101, La Jolla, CA) gereinigt und mit den Enzymen ClaI und SpeI verdaut. Das verdaute Amplikon wird auf einem 1% Agarosegel gereinigt und anschließend in das Plasmid pMCS-LacZ ligiert, welches auch mit ClaI und SpeI verdaut und in einem 1% Agarosegel gereinigt worden ist.

Das resultierende Konstrukt, welches die Expressionskassettenelemente HDV-antigenomisches Ribozyme/Sindbis-5'-terminale-299-Nukleotide/Verbindungsregion/LacZ-Gen/3'-terminale-untranslatierte Region enthält, ist als pd5'LacZ bekannt.

[0433] Die LacZ-Expressionskassette des Plasmids pd5'LacZ wird anschließend in pcDNA3 inseriert (Invitrogen Corp., San Diego, CA). Das Plasmid pd5'LacZ wird mit dem Enzym Not I verdaut, mit glatten Enden, wie oben beschrieben, versehen und dann mit dem Enzym Xba I verdaut. Das Fragment wird in einem 1% Agarosegel gereinigt und mit pcDNA3, welche mit dem Enzym Hind III verdaut, mit glatten Enden versehen, dann mit Xba I verdaut worden ist, ligiert. Das resultierende Konstrukt, welches einen CMV-Promotor enthält, welcher eine RNA der Antisense-Reporterkassette der Konfiguration Sindbis 3'-terminale-Sequenz/LacZ-Gen/Verbindungsregion/Sindbis 5'-terminale-Sequenz/HDV-Ribosym transkribiert, ist als pSINjraß-gal bekannt.

[0434] Die BHKSINjraß-gal-Zellen werden durch Transfektion von 5×10^5 BHK-21-Zellen, welche in einer 60 mm Petrischale wachsen, mit 5 µg des pSINjraß-gal-Vektors, welcher mit dem Polykation-Reagens Transfectam (Promega, Madison WI) komplexiert ist, erlangt. 24 h nach der Transfektion wird das Medium mit 400 µg/ml G418 (GibcoBRL, Gaithersburg, MD) ergänzt. Nachdem alle nicht transfizierten Zellen tot sind und die G418-resistenten Kolonien begonnen haben, sich zu teilen, werden die Zellen von der Platte durch Trypsinierung entfernt, vereinigt und dann durch begrenzte Verdünnung kloniert. Mehrere Klone werden auf die Herstellung von funktioneller β-Galactosidase durch Infektion mit einem bekannten Titer von Wildtyp-Vorrat des Sindbisvirus überprüft. Die Herstellung von funktionaler β-Galactosidase in Anwarter-BHKSINjraß-gal-Klonen wird 6 h nach Infektion durch Erstfixieren der PBS-gespülten Zellen mit einer Lösung, welche 2% Formaldehyd (37% Stammlösung)/0,2% Glutaraldehyd enthält, dann Färben der Zellen mit einer Lösung, welche 0,5 mmol Kalium-hexacyanoferrat(III)/0,5 mmol Kaliumhexacyanoferrat(II)/2 mmol MgCl₂/1 mg/ml X-gal enthält, bestimmt. Blaue Zellen sind innerhalb von 3 Stunden klar sichtbar. Vorausgesetzt, daß der Sindbis-Virusvorrat keine hohen Spiegel von defekten interferierenden (DI)-Partikeln enthält, sollte der Virustiter, wie durch Plaque-test an BHK-21-Zellen bestimmt, ähnlich zu dem Titer sein, welcher bei X-gal-Färbung von BHKSINjraß-gal-Zellen beobachtet wird.

[0435] Der Titer von verschiedenen Sindbis-Vektorpräparationen, in Vektoreinheiten, hergestellt durch solche Verpackungszelllinien, wie in Beispiel 7 beschrieben, wird durch Infektion von konfluenten Monolayern von BHKSINjraß-gal-Zellen mit verschiedenen Verdünnungen des Vektors bestimmt. Der Titer der Vektorpräparation wird 6 h nach der Infektion durch Sichtbarmachen der Zellen, welche β-Galactosidaseprotein herstellen, wie oben beschrieben, bestimmt. Da die beschriebenen Sindbis-Vektoren nicht die virale Region enthalten, welche den Strukturgenen entspricht, ist es nicht möglich, den Titer einer Vektorpräparation durch Plaque-Test in BHK-21-Zellen zu bestimmen.

[0436] Alternativ wird eine Zelllinie für die Titerbestimmung unter Verwendung einer unterschiedlichen Reporter-Kassettenkonfiguration hergestellt, welche aus einem eukaryotischen Promotor/durch die virale Transkriptase erkannte 5'-terminale-Sindbissequenz/Sindbis-Verbindungsregion/Reportergen/Sindbis-RNA-Polymerase-Erkennungssequenz für Minusstrang-Synthese besteht, und in Sense-Orientierung exprimiert. Diese Reporter-Expressionskassette benötigt die Synthese, durch vom Vektor gelieferte Sindbis-Nicht-Strukturproteine, in ein Antisense-RNA-Molekül vor der Transkription der subgenomischen Reporter-gen-kodierenden Botschaft.

[0437] Insbesondere wird das Verpackungskonstrukt in Sense-Orientierung wie folgt erzeugt. Plasmid pV-GELVIS wird mit dem Enzym Apal verdaut, welches an dem Nukleotid 11737 genau stromabwärts zu dem Sindbis-3'-Ende spaltet. Die Apal-verdaute DNA wird durch die Zugabe von T4-DNA-Polymerase und dNTPs und Inkubation bei 16°C für 10 Minuten mit glatten Enden versehen. Nach der Hitzeinaktivierung der Polymerase wird das DNA-Fragment mit dem Enzym Sfi I verdaut, und das 10041 bp Fragment in einem 1% Agarosegel gereinigt. Das Plasmid pSKSINBV-lacZ wird mit dem Enzym Sac I verdaut und, wie oben beschrieben, mit glatten Enden versehen. Das Fragment wird dann mit Sfi I verdaut, und das 7 kbp-Fragment wird in einem 1% Agarosegel gereinigt. Das 7 kb-pSKSINBV-lacZ-Fragment wird dann in das gereinigte pV-GELVIS-Fragment ligiert, um das Plasmid pELVIS-bgal zu erzeugen. Dieses Plasmid enthält die vollständigen Sindbis-Nicht-Strukturproteine, Sindbis-Verbindungsregion, LacZ-Gene und Sindbis-3'-terminale-Replikase-Erkennungssequenz unter der Kontrolle des MuLV-LTR-Promotors. Das Plasmid pELVIS-bgal wird mit BspE I verdaut, mit GeneClean gereinigt (Bio 101 Corp., San Diego, CA) und mit sich selbst religiert. BspE I entfernt die Sindbis-Nicht-Strukturprotein-Gensequenzen zwischen Nukleotiden 422–7054. Das religierte Konstrukt enthält eine 5'-Sequenz, welche zur Initiation der Transkription der Sindbis-RNA befähigt ist, die Sindbis-Verbindungsregion, Sequenzen, welche das lacZ-Gen kodieren, und Sindbis-3'-terminale-Sequenzen, welche für die Synthese von Minusstrang-RNA benötigt werden, alle stromabwärts und unter der Transkriptionskontrolle von einem MuLV-LTR-Promotor. Dieses Konstrukt ist als pELVISdINSP-bgal bekannt.

[0438] Das Plasmid pELVISdINSP-bgal wird in BHK-Zellen transfiziert und, wie zuvor beschrieben, überprüft. Die BHK-pELVISdINSP-bgal-Zellen stellen ein RNA-Transkript mit einer 5'-terminalen-Sequenz her, welche durch die Sindbis-Transkriptase erkannt wird, eine Sindbis-Verbindungsregion, Sequenzen, welche das lacZ-Gen kodieren, und Sindbis-3'-terminale-Sequenzen, welche für die Synthese von Minusstrang-RNA benötigt werden. Die β -Galactosidase-Expression von dem primären Transkript wird wegen des stromaufwärts liegenden offenen Leserahmens und den durch die BspEI-Deletion erzeugten Stop-Codons verhindert. Die Zugabe von Sindbis-Nicht-Strukturproteinen, bereit gestellt durch den titerbestimmten Sindbis-Vektor, ergibt die Transkription von aktiven lacZ-Transkripten von der Sindbis-Verbindungsregion nach der anfänglichen Synthese eines Antisense-Intermediates. Darüber hinaus ermöglicht diese Konfiguration, wenn sie entworfen wäre, die genauen Sindbis-Genom-5'- und 3'-terminalen-Sequenzen zu enthalten, den Reporter-Gen-Transkripten eine Amplifikation unter Verwendung der gleichen Nicht-Strukturproteine, welche durch den Sindbis-Vektor bereit gestellt werden, zu erfahren.

[0439] In einer anderen Konfiguration wird eine Zelllinie zur Titerbestimmung unter der Verwendung einer Expressionskassette hergestellt, welche ein Antisense-Reporter-Gen, gefolgt von dem 3'-Ende der Sindbis-Replikase-Erkennungssequenzen, positioniert in Sense-Orientierung, enthält. Dieses Konstrukt unter der Kontrolle eines eukaryotischen Promotors stellt ein RNA-Transkript her, das durch Sindbis-Nicht-Strukturproteine erkannt und transkribiert wird, welche durch den Vektor, dessen Titer zu bestimmen ist, bereit gestellt werden. Die Sindbis-Nicht-Strukturproteine erkennen Sequenzen in dem primären Reportertranskript und synthetisieren wiederum ein Sense-Reportertranskript. Dieses Konstrukt zieht keinen Vorteil aus der Amplifikation des Reporter-Gen-Transkripts, aber sollte noch immer genügend Transkripte bereit stellen, um die Vektor-Titerbestimmung zu ermöglichen.

[0440] Die Konstruktion dieses Typs der Titerbestimmungskassette ist wie folgt. PSV-B-Galactosidase-Vektor (Promega Corp., Madison, WI) wird mit dem Enzym Hind III verdaut und, wie oben beschrieben, mit glatten Enden versehen. Das Plasmid wird weiter mit den Enzymen BamHI und Xmn I verdaut, um das LacZ-Gen zu entfernen und die Größe des verbleibenden Fragments zu reduzieren. Das 3737 Nukleotid-Fragment, welches das LacZ-Gen enthält, wird in einem 1% Agarosegel gereinigt und in pcDNA3 (Invitrogen, San Diego, CA) ligiert, welches mit den Enzymen BamHI und EcoRV verdaut worden ist. Das neue Plasmidkonstrukt ist als pcDNAaLacZ bekannt. Dieses Plasmid wird mit dem Enzym Apa I verdaut, wie oben mit glatten Enden versehen, und weiter mit dem Enzym Xho I verdaut. Das Plasmid pKSINBV (zuvor beschrieben) wird mit Sac I verdaut, wie oben mit glatten Enden versehen, und dann mit Xho I verdaut. Das resultierende 146 Nukleotid-Fragment, welches die Sindbis 3'-Replikase-Erkennungssequenz enthält, wird auf einem 1,2% Agarosegel gereinigt und in den verdauten pcDNAaLacZ-Vektor ligiert. Das religierte Konstrukt enthält ein Antisense-lacZ-Gen und eine 3'-Sindbis-Replikase-Protein-Erkennungssequenz stromabwärts von einem CMV-Promotor. Das resultierende Konstrukt ist als pcDNAaLacZ-3'-SIN bekannt. Das Konstrukt wird in BHK-Zellen transfiziert und, wie zuvor beschrieben, verwendet.

BEISPIEL 11

ERZEUGUNG VON VEKTORKONSTRUKTEN, WELCHE HBV-ANTIGENE ZUR INDUKTION EINER IMMUNANTWORT EXPRIMIEREN

A. ISOLATION DER HBV E/KERN-SEQUENZ

[0441] Ein 1,8 kb-BamH I-Fragment, welches den gesamten Präkern/Kern-kodierenden Abschnitt von Hepatitis B enthält, wird von dem Plasmid pAM6 (ATCC Nr. 45020) erhalten und in die BamH I-Stelle von KS II⁺ (Stratagene, La Jolla, CA) ligiert. Dieses Plasmid wird mit KS II⁺-HBpc/c bezeichnet. Xho I-Linker werden zu der Stu I-Stelle Präkern/Kern in KS II⁺-HBpc/c (bei Nukleotidsequenz 1704) gegeben, gefolgt von dem Spalten mit Hinc II (bei Nukleotidsequenz 2592). Das resultierende 877 Basenpaar Xho I-Hinc II Präkern/Kern-Fragment wird in die Xho I/Hinc II-Stelle von SK II⁺ kloniert. Dieses Plasmid wird mit SK⁺HBe bezeichnet.

B. HERSTELLUNG VON SEQUENZEN UNTER VERWENDUNG DER PCR

1. Ortsspezifische Mutagenese der HBV e/Kern-Sequenz unter Verwendung der PCR

[0442] Das Präkern/Kern-Gen in Plasmid KS II⁺-HBpc/c wird sequenziert, um zu bestimmen, ob der Präkern/Kern-kodierende Abschnitt korrekt ist. Es wurde gefunden, daß diese Sequenz eine einzelne Basenpaar-deletion, welche eine Leserasterverschiebung bei Kodon 79 verursacht, die in zwei aufeinanderfolgenden im Leserahmen liegenden TAG-Stoppkodons bei den Kodons 84 und 85 resultiert. Diese Deletion wird durch eine

PCR-Überhangverlängerung (Ho et al., Gene 77: 51, 1989) des Präkern/Kern-kodierenden Abschnitts in Plasmid SK⁺ HBe korrigiert. Es wurden vier Oligonukleotidprimer für die drei zum Korrigieren der Deletion durchgeführten PCRs verwendet.

[0443] Die erste Reaktion verwendete zwei Primer. Die sense-Primersequenz entspricht der Nukleotidsequenz 1805 bis 1827 der adw-Linie und enthält zwei Xho I-Restriktionsstellen am 5'-Ende. Die Nummerierung der Nukleotidsequenz wurde von der Genbank (Intelligenics, Inc., Mountain View, CA) erhalten.

5'-CTC GAG CTC GAG GCA CCA GCA CCA TGC AAC TTT TT-3'
(SEQ. ID NR. 51)

[0444] Die zweite Primersequenz entspricht der antisense-Nukleotidsequenz 2158 bis 2130 der adw-Linie des Hepatitis B Virus und schließt die Kodons 79, 84 und 85 ein.

5'-CTA CTA GAT CCC TAG ATG CTG GAT CTT CC-3'
(SEQ. ID NR. 52)

[0445] Die zweite Reaktion verwendet auch zwei Primer. Der sense-Primer entspricht der Nukleotidsequenz 2130 bis 2158 der adw-Stamm und enthält die Kodons 79, 84 und 85.

5'-GGA AGA TCC AGC ATC TAG GGA TCT AGT AG-3'
(SEQ. ID NR. 53)

[0446] Der zweite Primer entspricht der antisense-Nukleotidsequenz vom SK⁺-Plasmid-Polylinkers und enthält eine Cla I-Stelle 135 bp stromabwärts des Stoppkodons des HBV Präkern/Kern-kodierenden Abschnitts.

5'-GGG CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC GC-3'
(SEQ. ID NR. 54)

[0447] Die dritte Reaktion verwendet auch zwei Primer. Der sense-Primer entspricht der Nukleotidsequenz 5 bis 27 der adw-Linie und enthält zwei Xho I-Restriktionsstellen am 5'-Ende.

5'-CTC GAG CTC GAG GCA CCA GCA CCA TGC AAC TTT TT
(SEQ. ID NR. 55)

[0448] Die zweite Primersequenz entspricht der antisense-Nukleotidsequenz vom SK⁺-Plasmid-Polylinkers und enthält eine Cla I-Stelle 135 bp stromabwärts des Stoppkodons des HBV Präkern/Kern-kodierenden Abschnitts.

5'-GGG CGA TAT CAA GCT TAT CGA TAC CG-3'
(SEQ. ID NR. 56)

[0449] Die erste PCR korrigiert die Deletion im antisense-Strang und die zweite Reaktion korrigiert die Deletion im sense-Strang. Die PCRs eins und zwei korrigieren die Mutation von CC zu CCA, welche in Kodon 79 vorkommt, und eine Basenpaar-Substitution von TCA zu TCT in Kodon 81. Primer 1 enthält zwei aufeinander folgende Xho I-Stellen 10 bp stromaufwärts des ATG-Kodons des HBV e-kodierenden Abschnitts und Primer 4 enthält eine Cla I-Stelle 135 bp stromabwärts des Stoppkodons des HBV Präkern/Kern-kodierenden Abschnitts. Die Produkte der ersten und zweiten PCRs werden in einer dritten PCR verlängert, um einen kompletten HBV Präkern/Kern-kodierenden Abschnitt mit der korrekten Sequenz zu erzeugen.

[0450] Die PCRs werden unter Verwendung der folgenden Zyklusbedingungen durchgeführt: Die Probe wird initial für 2 Minuten auf 94°C erwärmt. Dieser Schritt, genannt der Schmelzschritt, trennt die doppelsträngige DNA für die Synthese in einzelne Stränge. Die Probe wird dann für 30 Sekunden auf 56°C erwärmt. Dieser Schritt, genannt der Bindungsschritt, ermöglicht es den Primern, an die im ersten Schritt hergestellte einzel-

strängige DNA zu binden. Die Probe wird dann für 30 Sekunden auf 72°C erwärmt. Dieser Schritt, genannt der Verlängerungsschritt, synthetisiert den komplementären Strang der im ersten Schritt hergestellten einzelsträngigen DNA. Ein zweiter Schmelzschritt wird für 30 Sekunden bei 94°C durchgeführt, gefolgt von einem Bindungsschritt für 30 Sekunden bei 56°C, welcher von einem Verlängerungsschritt für 30 Sekunden bei 72°C gefolgt wird. Diese Vorgehensweise wird dann für 35 Zyklen wiederholt und resultiert in der Amplifikation des gewünschten DNA-Produkts.

[0451] Das Produkt der PCR wird durch eine 1,5% Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und auf NA 45-Papier (Schleicher und Schuell, Keene, New Hampshire) transferiert. Das gewünschte 787 bp-DNA-Fragment wird von dem NA 45-Papier durch eine Inkubation für 30 Minuten bei 65°C in 400 µl Hochsalzpuffer (1,5 M NaCl, 20 mM Tris, pH-Wert 8,0 und 0,1 mM EDTA) eluiert. Im Anschluß an die Elution werden 500 µl Phenol : Chloroform : Isoamylalkohol (25 : 24 : 1) zu der Lösung hinzugegeben. Das Gemisch wird gevortext und dann für 5 Minuten bei 14000 UpM in einer Brinkmann-Eppendorf-Zentrifuge (5415L) zentrifugiert. Die das gewünschte DNA-Fragment enthaltende wässrige Phase wird in ein frisches 1,5 ml-Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und es wird 1,0 ml 100% EtOH hinzugefügt. Diese Lösung wird für 5 Minuten auf Trockeneis inkubiert und dann für 20 Minuten bei 10000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet mit 500 µl 70% EtOH gespült. Das Pellet wird durch eine Zentrifugation bei 10000 UpM unter Vakuum in einem Savant-Speed-Vac-Konzentrator getrocknet und dann in 10 µl deionisiertem H₂O resuspendiert. Ein Mikroliter des PCR-Produkts wird durch eine 1,5% Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Das 787 Xho I-Cla I-Präkern/Kern-PCR-amplifizierte Fragment wird in die Xho I-Cla I-Stelle des SK⁺-Plasmids kloniert. Dieses Plasmid wird mit SK⁺HBe-c bezeichnet. E. coli (DH5 alpha, Bethesda Research Labs, Gaithersburg, MD) wird mit dem SK⁺HBe-c-Plasmid transformiert und vermehrt, um Plasmid-DNA zu erzeugen. Das Plasmid wird dann im wesentlichen wie bei Birnboim et al. beschrieben (Nuc. Acid Res. 7: 1513, 1979, siehe auch Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Press, 1989) isoliert und aufgereinigt. Das SK⁺HBe-c-Plasmid wird analysiert, um die Sequenz des Präkern/Kern-Gens zu bestätigen (**Fig. 4**).

2. Isolation der HBV Kern-Sequenz

[0452] Die einzelne Basenpaardeletion im Plasmid SK⁺ HBe wird, wie in Beispiel 9B beschrieben, durch PCR-Übergangverlängerung korrigiert. Vier Oligonukleotidprimer werden für die zur Korrektur der Mutation durchgeführten PCRs verwendet.

[0453] Die erste Reaktion verwendet zwei Primer. Der sense-Primer entspricht der Nukleotidsequenz für den T-7-Promotor des SK⁺HBe-Plasmids.

5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'

(SEQ. ID NR. 57)

[0454] Der zweite Primer entspricht der antisense-Sequenz 2158 bis 2130 der adw-Linie und schließt die Kodons 79, 84 und 85 ein.

5'-CTA CTA GAT CCC TAG ATG CTG GAT CTT CC-3'

(SEQ. ID NR. 58)

[0455] Die zweite Reaktion verwendet zwei Primer. Der antisense-Primer entspricht der Nukleotidsequenz des T-3-Promotors, der auf dem SK⁺HBe-Plasmid vorhanden ist.

5'-3': ATT AAC CCT CAC TAA AG

(SEQ. ID NR. 59)

[0456] Der zweite Primer entspricht der sense-Nukleotidsequenz 2130 bis 2158 der adw-Linie und schließt die Kodons 79, 84 und 85 ein.

5'-GGA AGA TCC AGC ATC TAG GGA TCT AGT AG-3'

(SEQ. ID NR. 60)

[0457] Die dritte Reaktion verwendet zwei Primer. Der antisense-Primer entspricht der Nukleotidsequenz des

T-3-Promotors, der auf dem SK⁺HBe-Plasmid vorhanden ist.

5'-ATT AAC CCT CAC TAA AG-3'

(SEQ. ID NR. 61)

[0458] Der zweite Primer entspricht der sense-Sequenz des T-7-Promotors, der auf dem SK⁺HBe-Plasmid vorhanden ist.

5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG G-3'

(SEQ. ID NR. 62)

[0459] Das PCR-Produkt der dritten Reaktion ergibt die korrekte Sequenz für den HBV Präkern/Kern-kodierenden Abschnitt.

[0460] Um den HBV Kern-kodierenden Abschnitt zu isolieren, wird ein Primer so entworfen, daß er die Xho I-Restriktionsstelle stromabwärts des ATG-Startkodons des Kern-kodierenden Abschnitts einfügt und die 29 Aminosäure-Leitsequenz des HBV Präkern-kodierenden Abschnitts eliminiert. In einer vierten Reaktion wird der HBV Kern-kodierende Abschnitt unter Verwendung des PCR-Produkts der dritten Reaktion und der folgenden zwei Primer hergestellt.

[0461] Der sense-Primer entspricht der Nukleotidsequenz 1885 bis 1905 der adw-Linie und enthält zwei Xho I-Stellen am 5'-Ende.

5'-CCT CGA GCT CGA GCT TGG GTG GCT TTG GGG CAT G-3'

(SEQ. ID NR. 63)

[0462] Der zweite Primer entspricht der antisense-Nukleotidsequenz für den T-3-Promotor, der auf dem SK⁺HBe-Plasmid vorhanden ist. Das ungefähr 600 bp-PCR-Produkt von der vierten Reaktion enthält den HBV Kern-kodierenden Abschnitt und neue Xho I-Restriktionsstellen am 5'-Ende und Cla I-Restriktionsstellen am 3'-Ende, das in der Multiklonierungsstelle des SK⁺HBe-Plasmids vorhanden war.

5'-ATT ACC CCT CAC TAA AG-3'

(SEQ. ID NR. 64)

[0463] Nach der vierten PCR wird die Lösung in ein frisches 1,5 ml Mikrozentrifugenröhrchen transferiert. Fünfzig Mikroliter von 3 M Natriumacetat werden zu dieser Lösung, gefolgt von 500 µl Chloroform : Isoamylalkohol (24 : 1) hinzugegeben. Das Gemisch wurde gevortext und dann für 5 Minuten bei 14000 UpM zentrifugiert. Die wässrige Phase wird in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen transferiert und 1,0 ml 100% EtOH wird hinzugegeben. Die Lösung wird für 4,5 Stunden bei -20°C inkubiert und dann für 20 Minuten bei 10000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet wird mit 500 µl 70% EtOH gespült. Das Pellet wird durch eine Zentrifugation bei 10000 UpM unter Vakuum getrocknet und dann in 10 µl deionisiertem H₂O resuspendiert. Ein Mikroliter des PCR-Produkts wird mit einer 1,5% Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

3. Isolation des HBV X-Antigens

[0464] Ein 642 bp-NCO I-Taq I-Fragment, das den offenen Leserahmen des Hepatitis B Virus X enthält, wird von dem pAM6-Plasmid (adw) (ATCC 45020) erhalten, durch ein Klenow-Fragment geglättet und in die Hinc II-Stelle von SK⁺ (Stratagene, La Jolla, Kalifornien) ligiert.

[0465] E. coli (DH5 alpha, Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, MD) werden mit der Ligationsreaktion transformiert und vermehrt. DNA aus Minipräparationen wird dann im wesentlichen wie von Birnboim et al. beschrieben (Nuc. Acid Res. 7: 15134, 1979, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook et al. (Hrsg.), Cold Spring Harbor Press, 1989) isoliert und aufgereinigt.

[0466] Da dieses Fragment in jeder Orientierung insertiert werden kann, werden die Klone ausgesucht, die bezüglich der Xho I- und Cla I-Stellen in der SK⁺-Multiklonierungsstelle eine sense-Orientierung aufweisen.

Genauer werden die DNAs aus Minipräparationen mit dem diagnostischen Restriktionsenzym Bam HI verdaut. Inserts in der korrekten Orientierung ergeben zwei Fragmente von 3,5 Kb und 0,6 Kb Größe. Inserts in der nicht-korrekten Orientierung ergeben zwei Fragmente von 3,6 Kb und 0,74 Kb. Ein Klon in der richtigen Orientierung wird ausgewählt und SK-X Ag genannt.

4. Konstruktion von HBVe-c, HBV Kern und HBV X exprimierenden Sindbis-Vektoren

[0467] Die Konstruktion eines die HBVe-c-Sequenz exprimierenden Sindbis-Vektors wird durch das Verdauen des SK⁺HBe-c-Plasmids mit Xho I und Cla I-Restriktionsenzymstellen zum Freisetzen des HBVe-c-Sequenzen kodierende cDNA-Fragments durchgeführt. Das Fragment wird dann durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert, mit Gene CleanTM (BIO101, San Diego, CA) aufgereinigt und in das gewünschte Sindbis-Vektor-Rückgrat, das durch den Verdau mit Xho I und Cla I hergestellt wurde, inseriert und mit CIAP behandelt. Die in Beispiel 2 beschriebenen Sindbis-Vektoren eignen sich für die Insertion der HBV-Antigensequenz. Solche Sindbis-Vektoren schließen pKSSINBV, pKSSINd1JRsjrc, kpKSSINd1JRsjrPC, pKSSINd1JRsjrNP (7582–7601) und pKSSINd1JRsexjr ein.

[0468] Die Konstruktion eines die HBV Kern-Sequenz exprimierenden Sindbis-Vektors wird durch das Behandeln mit Gene CleanTM des vorstehend beschriebenen PCR-Produkts durchgeführt. Das amplifizierte Produkt mit den Xho I- und Cla I-Restriktionsenzymstellen wird dann verdaut, durch eine Agarose-Gelelektrophorese isoliert, durch Gene CleanTM aufgereinigt und in die gleichen vorstehend beschriebenen Sindbis-Vektoren die mit Xho I- und Cla I-Enzymen vorbehandelt wurden, ligiert.

[0469] Die Konstruktion eines die HBV X-Antigensequenz exprimierenden Sindbis-Vektors wird durch das Verdauen des Plasmids SK-X Ag mit Xho I- und Cla I-Restriktionsenzymstellen zum Freisetzen des die HBV X-Sequenzen kodierende cDNA-Fragments durchgeführt. Das Fragment wird durch Agarose-Gelelektrophorese isoliert, unter Verwendung von Gene CleanTM aufgereinigt und in die gewünschten vorstehend beschriebenen mit Xho I- und Cla I-Enzymen vorbehandelten Sindbis-Vektor-Rückgrate eingefügt.

[0470] Die vorstehenden HBV exprimierenden Sindbis-Vektoren können auch so modifiziert werden, daß sie einen auswählbaren Arzneistoff-Resistenzmarker, abhängig von den Bedingungen des Experiments oder der Behandlung der Vektor-infizierten Zellen koexprimieren. Jeder der vorstehend beschriebenen Sindbis-HBV-Expressionsvektoren kann auch so entworfen sein, daß er eine G418-Resistenz koexprimiert. Dies wird durch das Einbauen einer internen Ribozym-Eintrittsstelle (Beispiel 5), gefolgt von dem bakterielle Neomycinphosphotransferase-Gen, das 3' von den HBV kodierenden Sequenzen und 5' von dem terminalen 3'-Ende des Vektors unter Verwendung der multiplen Klonierungsstelle des Vektors angeordnet wird durchgeführt. Diese G418-Resistenz-Vektorkonstrukte können zum Selektieren von Vektor-infizierten Zellen für die Erzeugung von HBV-spezifischen CTL-Zielen in den folgenden Abschnitten verwendet werden.

D. EXPRESSION DER MIT SINDBIS-VEKTOREN INFIZIERTEN ZELLEN

1. ELISA

[0471] Zellysate von Zellen, die mit einem der HBV exprimierenden Vektoren infiziert sind, werden durch das Waschen von $1,0 \times 10^7$ gezüchteten Zellen mit PBS, Resuspendieren der Zellen in PBS auf ein Gesamtvolumen von 600 µl und Beschallen für zwei 5-Sekunden-Zeiträume bei einer Einstellung von 30 in einem Branson-Sonikator, Modell 350 (Fisher, Pittsburgh, PA) oder durch dreimaliges Einfrieren und Auftauen gemacht. Die Lysate werden durch eine Zentrifugation von 5 Minuten bei 10000 UpM geklärt.

[0472] Kern-Antigen und Präkern-Antigen in Zellysaten und sekretiertes e-Antigen im Kulturüberstand werden unter Verwendung des Abbott-HBe-rDNA-EIA-Kitsw (Abbott Laboratories Diagnostic Division, Chicago, IL) getestet. Ein anderer sensitiver EIA-Assay für das Präkern-Antigen in Zellysaten und sekretiertes e-Antigen im Kulturüberstand wird unter Verwendung des Incstar ETI-EB Kit (Incstar Corporation, Stillwater, MN) durchgeführt. Eine Standardkurve wird mit Verdünnungen des rekombinanten Hepatitis B Kern- und e-Antigens, erhalten von Biogen (Genf, Schweiz), erzeugt.

[0473] Unter Verwendung dieser Vorgehensweisen werden ungefähr 10 ng/ml e-Antigen in transduzierten Zelllinien exprimiert.

2. Immunopräzipitation/Western Blot

[0474] Die Charakterisierung der Präkern/Kern- und e-Antigene, die von Vektor infizierten Zellen exprimiert werden, wird durch eine Immunopräzipitation, gefolgt von einer Western-Blot-Analyse, durchgeführt. Insbesondere werden 0,5–1,0 ml des Zelllysats in PBS oder des Kulturüberstands mit einem polyklonalen Anti-Hepatitis B Kern-Kaninchen-Antigen (DAKO Corporation, Carpinteria, Kalifornien), gebunden an G-Sepharose (Pharmacia LKB, Uppsala, Schweden) gemischt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Proben werden zweimal in 20 mM Tris-HCl, pH-Wert 8,0, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA gewaschen und in Probenladepuffer mit 0,5% β -2-Mercaptoethanol gekocht. Die Proteine werden als erstes durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und dann auf Immobilon (Millipore Corp., Bedford, ME) transferiert und mit dem DAKO-polyklonalen Anti-Hepatitis B Kern-Kaninchen-Antigen, gefolgt von ^{125}I -Protein A analysiert.

E. TESTEN DER IMMUNANTWORT

1. Zytotoxizitätsassays

(a) Inzucht-Mäuse

[0475] Sechs bis acht Wochen alten weiblichen Balb/C-, C57B1/6- und C3H-Mäusen (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, IN) werden zweimal intraperitoneal (i.p.) in Abständen von 1 Woche mit 1×10^7 bestrahlten (10000 rad bei Raumtemperatur) Sindbis-Vektor-infizierten L-M(TK⁻)-Zellen (ATCC CLL 1,3) injiziert. Die Tiere wurden 7 Tage später abgetötet und die Splenozyten ($3 \times 10^6/\text{ml}$) in vitro mit ihren entsprechenden bestrahlten, mit Sindbis-Vektor-infizierten Zellen ($6 \times 10^4/\text{ml}$) in T-25-Flaschen (Corning, Corning, NY) gezüchtet. Das Züchtungsmedium besteht aus RPMI 1640, 5% Hitze-inaktiviertem fötalen Rinderserum, 1 mM Natriumpyruvat, 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin und 10^{-5} M β -2-Mercaptoethanol (Sigma, St. Louis, MO). Die Effektorzellen werden 4–7 Tage später geerntet und unter Verwendung verschiedener Effektor : Zielzellen-Verhältnisse in Mikrotiterplatten mit 96 Vertiefungen (Corning, Corning, NY) in einem Standardchromium-Freisetzungssassay getestet. Die Ziele sind die Vektor-infizierten und nicht-Vektor-infizierten L-M(TK⁻)-Zellen, wohingegen die nicht-transduzierten Zelllinien als Negativkontrollen verwendet werden. Insbesondere werden $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ -markierte (Amersham, Arlington Heights, IL) (100 μCi , 1 Stunde bei 37°C) Zielzellen (1×10^4 Zellen/Vertiefung) mit Effektorzellen bei verschiedenen Effektor-zu-Zielzellen-Verhältnissen in einem Gesamtvolumen von 200 μl gemischt. Nach der Inkubation werden 100 μl des Kultivierungsmediums entfernt und in einem Beckman-gamma-Spektrometer (Beckman, Dallas, TX) analysiert. Spontane Freisetzung (spontaneous release, SR) wird als CPM von Zielen plus Medium bestimmt und maximale Freisetzung (maximum release, MR) wird als CPM von Zielen plus 1 M HCl bestimmt. Der Prozentsatz der Zielzellenlyse wird wie folgt berechnet: $[(\text{Effektorzellen-} + \text{Ziel-CPM}) - (\text{SR})]/(\text{MR}) - (\text{SR}) \times 100$. Die spontanen Freisetzungswerte der Ziele sind typischerweise 10%–20% der MR.

[0476] Für bestimmte CTL-Assays können die Effektoren in vitro mehrere Male stimuliert werden, beispielsweise an Tag 8–12 nach der primären in vitro-Stimulation. Genauer werden 10^7 Effektorzellen mit 6×10^5 bestrahlten (10000 rad) Stimulatorzellen und 2×10^7 bestrahlten (3000 rad) „Füll“-Zellen (hergestellt wie nachstehend beschrieben) in 10 ml „komplettem“ RPMI-Medium gemischt (RPMI enthaltend: 5% Hitze-inaktiviertes fötales Rinderserum, 2 mM L-Glutamin, 1 mM Natriumpyruvat, 1X nicht-essentielle Aminosäuren und 5×10^{-5} M β -2-Mercaptoethanol). Stimulatorzellen für die in vitro-Stimulation von Effektorzellen werden durch das Infizieren von L-M (TK⁻)-Zellen mit einem eine G418-Resistenz koexprimierenden Sindbis-HBV-Vektor erzeugt. Mit dem Vektor infizierte Zellen werden für zwei Wochen unter Verwendung von 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ G418 zur Markerselektion selektiert. Die G418-resistenten Zellen werden dann bei 10000 rad bestrahlt und dann für Restimulation der Effektorzellen in vitro, wie beschrieben, verwendet. „Füll“-Zellen werden von in RPMI resuspendierten, naiven syngenischen Mäuse-Milzzellen, die mit 3000 rad bei Raumtemperatur bestrahlt wurden, hergestellt. Die Splenozyten werden mit RPMI gewaschen, für 5 Minuten bei Raumtemperatur bei 3000 UpM zentrifugiert und das Pellet wird in RPMI resuspendiert. Die resuspendierten Zellen werden mit 1,0 ml Tris-Ammoniumchlorid (100 ml von 0,17 M Tris-Base, pH-Wert 7,65 zusätzlich 900 ml 0,155 M NH_4Cl , die endgültige Lösung wird auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt) bei 37°C für 3–5 Minuten behandelt. Die sekundäre in vitro-Restimulation wird dann für 5–7 Tage vor dem Testen in einem CTL-Assay gezüchtet. Jede der nachfolgenden Restimulationen wird, wie vorstehend beschrieben, mit der Zugabe von 2–10 U von rekombinantem IL-2 (200 U/ml, Katalog #799068, Boehringer Mannheim, Deutschland) gezüchtet.

[0477] Unter Verwendung dieser Vorgehensweisen kann gezeigt werden, daß CTLs zu HBV e-Antigen induziert werden kann.

(b) HLA A2.1 transgene Mäuse

[0478] Sechs bis acht Wochen alte weibliche HLA A2.1 transgene Mäuse (V. Engelhard, Charlottesville, VA) werden in Abständen von einer Woche zweimal intraperitoneal (i.p.) mit $1,0 \times 10^7$ bestrahlten (10000 rad bei Raumtemperatur) Vektor-transduzierten EL4 A2/K^b-Zellen (ATCC Nr. TIB-39) injiziert. Die Tiere werden 7 Tage später getötet und die Splenozyten (3×10^6 /ml) werden in vitro mit bestrahlten (10000 rad) transduzierten Jurkat A2/K^b-Zellen oder mit Peptid beschichteten Jurkat-A2/K^b-Zellen (6×10^4 /ml) in Flaschen (T-25, Corning, Corning, NY) gezüchtet. Der Rest des Chrom-Freisetzungssassays wird wie in Beispiel 9E 1.a beschrieben durchgeführt, wobei die Ziele transduzierte oder nicht-transduzierte EL4 A2/K^b- und Jurkat A2/K^b-Zellen sind. Nicht-transduzierte Zelllinien werden als Negativkontrollen verwendet. Die Ziele können auch mit Peptid-beschichtete EL4 A2/K^b-Zellen sein.

(c) Transduktion von humanen Zellen mit Vektorkonstrukt

[0479] Lymphoblastoid-Zelllinien (lymphoblastoid cell lines, LCL) werden für jeden Patienten durch das Infizieren (Transformieren) ihrer B-Zellen mit frischem Epstein-Barr-Virus (EBV) eingerichtet, das aus dem Überstand einer 3 Wochen alten Kultur von B95-8, EBV-transformierten Weißbüscheläffchen-Leukozyten (ATCC CRL 1612) genommen wurde. Drei Wochen nach der EBV-Transformation werden die LCL mit einem Sindbis-Vektor, der das HBV Kern- oder e-Antigen und eine G418-Resistenz exprimiert, infiziert. Die Vektorinfektion von LCL wird durch die Ko-Kultivierung von $1,0 \times 10^6$ LCL-Zellen mit $1,0 \times 10^6$ bestrahlten (10000 rad) Sindbis-Vektorproduzentenzellen in einem 6 cm-Schälchen, das 4,0 ml Medium enthält, durchgeführt oder durch Hinzufügen von infektiösem Vektorüberstand. Das Züchtungsmedium besteht aus RPMI 1640, 20% Hitze-inaktiviertem fötalem Rinderserum (Hyclone, Logan, UT), 5,0 mM Natriumpyruvat und 5,0 mM nicht-essentielle Aminosäuren. Nach einer Ko-Kultivierung über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ werden die LCL-Suspensionszellen von den bestrahlten (10000 rad) Sindbis-Vektorproduzentenzellen entfernt. Infizierte LCL-Zellen werden durch das Hinzugeben von 800 µg/ml G418 selektiert. Die Jurkat A2/K^b-Zellen (L. Sherman, Scripps Institute, San Diego, CA) werden im wesentlichen infiziert wie für die Infektion der LCL-Zellen beschrieben.

(d) Humane CTL Assays

[0480] Humane PBMC werden durch eine Ficoll (Sigma, St. Louis, MO) Gradientenzentrifugation getrennt. Insbesondere werden die Zellen für 5 Minuten bei 3000 UpM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die PBMCs werden in vitro mit ihren autologen transduzierten LCL, Beispiel 9E 1.c, in einem Effektor : Ziel-Verhältnis von 10 : 1 für 10 Tage restimuliert. Das Züchtungsmedium besteht aus RPMI 1640 mit vorgeprüften Mengen von 5% Hitze-inaktiviertem fötalem Rinderserum, 1 mM Natriumpyruvat und 50 µg/ml Gentamycin. Die resultierenden stimulierten CTL-Effektoren werden auf CTL-Aktivität unter Verwendung von infizierten autologen LCL- oder HLA-angepaßten Zellen als Ziele in einem Standard-Chrom-Freisetzungssassay, Beispiel 9E 1.a, getestet. Da die meisten Patienten eine Immunität für EBV aufweisen, werden die als Negativkontrollen verwendeten nicht-transduzierten EBV-transformierten B-Zellen (LCL) auch als Ziele für die EBV-spezifischen CTL zusammen mit den transduzierten LCL erkannt. Zum Reduzieren des hohen Hintergrunds, der auf das Töten der markierten Zielzellen durch EBV-spezifische CTL zurückzuführen ist, ist es notwendig, nicht-markierte nicht-transduzierte LCL zu den markierten Zielzellen in einem Verhältnis von 50 : 1 hinzuzufügen.

2. Nachweisen der humoralen Immunantwort

[0481] Humorale Immunantworten in Mäusen, die spezifisch für HBV Kern- und e-Antigene sind, werden mit dem ELISA nachgewiesen. Das ELISA-Protokoll verwendet zum Beschichten von Platten mit 96 Vertiefungen 100 µg/Vertiefung des rekombinanten HBV Kern- und rekombinanten HBV e-Antigens (Biogen, Genf, Schweiz). Die Seren von Mäusen, die mit Zellen oder direkt mit einem HBV Kern- oder HBV e-Antigen exprimierenden Vektor immunisiert wurden, werden in die Antigen-beschichteten Vertiefungen seriell verdünnt und für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird ein Gemisch aus Kaninchen-anti-Maus-IgG1, -IgG2a, -IgG2b und -IgG3 mit äquivalenten Titern zu den Vertiefungen hinzugegeben. Mit Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, „HRP“) konjugiertes Ziege-anti-Kaninchen-Antiserum wird zu jeder Vertiefung hinzugefügt und die Proben werden für 1 bis 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Inkubation wird die Reaktivität durch das Hinzufügen eines geeigneten Substrats sichtbar gemacht. In den Vertiefungen, die IgG-Antikörper spezifisch für HBV Kern- oder HBV e-Antigen enthalten, wird sich eine Farbe entwickeln.

3. T-Zell-Proliferation

[0482] Die Antigen-induzierte T-Helferaktivität, die aus zwei oder drei Injektionen von HBV Kern- oder e-Antigen exprimierenden direkten Vektorpräparationen resultieren, wird in vitro gemessen. Insbesondere werden Splenozyten von immunisierten Mäusen in vitro mit einem vorbestimmten Verhältnis mit Zellen, die HBV Kern- oder e-Antigen exprimieren, oder mit Zellen, die HBV Kern- oder e-Antigen nicht exprimieren als Negativkontrolle restimuliert. Nach fünf Tagen bei 37°C und 5% CO₂ in RPMI 1640 Züchtungsmedium, das 5% FBS, 1,0 mM Natriumpyruvat und 10⁻⁵ β-2-Mercaptoethanol enthält, wird der Überstand auf IL-2-Aktivität getestet. IL-2 wird spezifisch von durch HBV Kern- oder e-Antigen stimulierte T-Helferzellen sekretiert und seine Aktivität wurde mit Hilfe des CTL-Klons, CTLL-2 (ATCC TIB 214) gemessen. Kurz gefaßt ist der CTLL-2-Klon von IL-2 für sein Wachstum abhängig und er wird nicht in Abwesenheit von IL-2 proliferieren. CTLL-2-Zellen werden zu seriellen Verdünnungen von Überstandstestproben in einer Platten mit 96 Vertiefungen hinzugefügt und für 3 Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nachfolgend wird 0,5 µCi ³H-Thymidin zu den CTLL-2-Zellen hinzugegeben. 0,5 µCi ³H-Thymidin wird nur eingebaut, wenn die CTLL-2-Zellen proliferieren. Nach einer Übernacht-Inkubation werden die Zellen unter Verwendung eines PHD-Zellernters (Cambridge Technology Inc., Watertown, MA) geerntet und in einem Beckman-beta-Zähler gezählt. Die Menge des IL-2 in einer Probe wird durch eine Standardkurve, die durch einen rekombinanten, von Boehringer Mannheim (Indianapolis, IN) erhaltenen IL-2-Standard erzeugt wird, bestimmt.

F. VERABREICHUNGSPROTOKOLL

1. Mäuse

(a) Direkte Vektor-Verabreichung

[0483] Das Maussystem kann auch verwendet werden, um die Induktion der humoralen oder zellvermittelten Immunantworten mit der direkten Verabreichung eines HBV Kern- oder e-Antigen kodierenden Vektors zu bewerten. Kurz gefaßt werden sechs bis acht Wochen alte weibliche Balb/C-, C57B16- oder C3H-Mäuse intramuskulär (i.m.) mit 0,1 ml eines wiederhergestellten (mit sterilem deionisiertem, destilliertem Wasser) lyophilisierten HBV Kern oder HBV e exprimierenden Sindbis-Vektor injiziert. Zwei Injektionen werden im Abstand von einer Woche gegeben. Sieben Tage nach der zweiten Injektion werden die Tiere getötet. Chromfreisetzung-CTL-Assays werden dann im wesentlichen wie in Beispiel 9E 1.a beschrieben durchgeführt.

2. Schimpansen-Verabreichungs-Protokoll

[0484] Die in dem vorstehend beschriebenen Maussystem erzeugten Daten werden zum Bestimmen des Verabreichungsprotokolls des Vektors in Schimpansen, die mit dem Hepatitis B Virus chronisch infiziert sind, verwendet. Auf der Induktion von HBV-spezifischen CTLs in Mäusen basierend, werden die Versuchsobjekte in Schimpansenversuchen drei Dosen des Kern- oder e-Antigen-kodierenden Vektors in Intervallen von 28 Tagen erhalten, die in zwei aufeinanderfolgenden ansteigenden Dosierungsgruppen gegeben werden. Kontrollversuchstiere werden ein Placebo, umfassend HBV-IT (V)-Formulierungsmedien, erhalten. Die Dosierung, die in vier 0,5-ml-Injektionen i.m. an jedem Injektionstag gegeben wird, wird entweder 10⁶ oder 10⁷ HBV IT (V)-cfu sein. Blutproben werden an den Tagen 4, 12, 24, 36, 52, 70 und 84 und in den Monaten 6, 12, 18, 24, 30 und 36 entnommen, um die Serumalanin-Aminotransferase(ALT)-Pegel, die Anwesenheit des Hepatitis B-Antigens, die Anwesenheit von Antikörpern gegen das Hepatitis B-e-Antigen zu messen und um die Sicherheit und die Verträglichkeit der Behandlung zu beurteilen. Das Hepatitis B-e-Antigen und die Antikörper gegen das HB-e-Antigen werden durch das Abbott HB e rDNA EIA Kit (Abbott Laboratories Diagnostic Division, Chicago, IL) nachgewiesen. Die Effizienz der Induktion von CTLs gegen Hepatitis B Kern- oder e-Antigen kann wie in Beispiel 9E 1.c bestimmt werden.

[0485] Basierend auf den Sicherheits- und Effizienzresultaten der Schimpansenstudien wird das Dosierungs- und Impfschema für die Verabreichung des Vektors an Versuchspersonen in Versuchen mit Menschen bestimmt. Die Versuchspersonen werden auf ihre Serum-ALT-Pegel, die Anwesenheit von HBV e-Antigen und die Anwesenheit von Antikörpern gegen das HBV e-Antigen, wie im wesentlichen vorstehend beschrieben, überwacht. Die Induktion von humanen CTLs gegen Hepatitis B Kern- oder e-Antigen wird wie in Beispiel 9E 1.c bestimmt.

VIRALE PROTEINE EXPRIMIERENDE SINDBIS-VEKTOREN ZUR INDUKTION DER IMMUNANTWORT ODER ZUM BLOCKIEREN VON VIRUS-WIRTSZELLINTERAKTIONEN

[0486] Das folgende Beispiel beschreibt Vorgehensweisen zum Konstruieren von Sindbis-Vektoren, die befähigt sind, eine Immunantwort durch das Exprimieren eines viralen HIV-Antigens zu erzeugen. Es werden auch Verfahren zum Testen der Expression und der Induktion einer Immunantwort gegeben.

ZUM AUSLÖSEN EINER IMMUNANTWORT VERWENDETE SINDBIS-VEKTOREN

A. HIV-IIIB-ENV-EXPRESSIONSVEKTOREN

[0487] Ein 2,7 kb Kpn I-Xho I-DNA-Fragment wurde von dem proviralen HIV-Klon BH10-R3 (für die Sequenz siehe Ratner et al., Nature 313: 277, 1985) isoliert und ein 400 bp Sal I-Kpn I-DNA-Fragment von IllexE7deltaenv (eine Bal31-Deletion zu Nukleotid 5496) wurde in die Sal-I-Stelle in das Plasmid SK⁺ ligiert. Von diesem Klon wurde ein 3,1 kb env-DNA-Fragment (Xho I-Cla I) aufgereinigt und in die zuvor beschriebenen, mit Xho I und Cla I vorverdauten Sindbis-Vektoren ligiert.

B. GESTALTEN EINER PRODUZENTEN-ZELLINIE, WELCHE HIV-SPEZIFISCHE ANTIGENE EXPRIMIERT

[0488] Um eine Vektor-produzierende Zelllinie, die das von dem vorstehend beschriebenen Vektor erhaltene HIV-IIIB-env exprimiert, zu konstruieren, werden in vitro transkribierte RNA-Transkripte in eine Sindbis-Verpackungs-Zelllinie (Beispiel 7) transfiziert. Insbesondere werden die Sindbis-RNA-Vektormoleküle anfänglich unter Verwendung eines SP6 in vitro transkribierten RNA-Polymerasesystems, das für das Transkribieren von einem die HIV-spezifischen Sequenzen kodierenden cDNA-Sindbis-Vektorklon verwendet wurde, erzeugt. Die erzeugten in vitro RNA-Vektorprodukte werden dann in eine Sindbis-Verpackungs- oder Hopping-Zelllinie, welche zur Herstellung von transient infektiösen Vektorteilchen innerhalb von 24 Stunden führt, transfiziert. Diese Vektorteilchen werden dann aus dem Überstand der Zelllinienkulturen gesammelt und dann zum Vermeiden einer zellulären Kontamination durch einen 0,45 Mikron-Filter filtriert. Die filtrierten Überstände werden dann zum Infizieren einer frischen Monolayer von Sindbis-Verpackungszellen verwendet. Innerhalb von 24 Stunden nach der Infektion werden Sindbis-Vektorteilchen, die positive Stränge rekombinanter Sindbis-RNA enthalten, die Nicht-Strukturproteine des Sindbis-Virus und HIV-spezifische Sequenzen kodieren, erzeugt.

[0489] Eine alternative Gestaltung eines Sindbis-HIV-IIIB-env-Vektors ist ein Promotor-gesteuertes cDNA-Sindbis-Konstrukt, das einen auswählbaren Marker enthält. In dieser Konfiguration wird das vorstehend beschriebene Xho I bis Cla I-Fragment, das die spezifische HIV-IIIB-env-Sequenz enthält, in einen ähnlichen cDNA-Sindbis-Vektor angeordnet, der durch einen konstitutiven Promotor an Stelle einer Bakteriophagen-Polymerase-Erkennungssequenz angetrieben bzw. gesteuert wird. Unter Verwendung dieser Gestaltung werden die Expressions-Vektorplasmide in eine Verpackungs-Zelllinie transfiziert und für 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion auf das Arzneistoff-Resistenzgen selektiert. Resistente Kolonien werden dann 14 Tage später (abhängig von dem verwendeten Selektionsmarker) gesammelt und verdünnt kloniert. Mehrere Verdünnungs-Klone werden dann vermehrt und auf den höchsten Vektortiter getestet. Die Klone mit dem höchsten Titer werden dann vermehrt und gefroren aufbewahrt. Die aufbewahrten Klone werden auf HIV-spezifische Proteinherstellung und die Induktion einer Immunantwort getestet.

C. TESTEN AUF HIV-SPEZIFISCHE PROTEINHERSTELLUNG UND EINE IMMUNANTWORT

[0490] Zellysate der Sindbis-HIV-Produzenten-Zelllinie werden durch Western-Blot-Analyse auf HIV-spezifische Proteinherstellung getestet. Zum Testen der Fähigkeit des Vektors, die Expression in vitro zu transferieren, werden BHK-21-Zellen mit filtriertem, den viralen Vektor enthaltenden Überstand infiziert und durch Western-Blot-Analyse 24 Stunden nach Infektion getestet. Wenn die Proteinexpression verifiziert wurde, können in vivo Maus- und Primatenstudien zum Demonstrieren der Fähigkeit von syngeneten Zellen, ein fremdes Antigen nach einer Vektorbehandlung zu exprimieren, durchgeführt werden, um: (a) eine CTL-Antwort in Mäusen durch Injektion von entweder infizierten syngeneten Zellen oder von Präparaten von infektiösem Vektor hervorzurufen, (b) CTL-Antworten in einem humanen in vitro Kultursystem hervorzurufen, (c) Zellen von Menschen, Schimpansen und Makaken einschließlich primärer Zellen zu infizieren, so daß diese zum Hervorrufen von CTL-Antworten verwendet werden können und als Ziele in CTL-Assays dienen können, (d) Epitope einer Immunantwort zu kartieren und (e) CTL-Antworten auf andere nicht-HIV-Antigene, wie Maus-CMV (MCMV), hervorzurufen und zu messen.

1. Immunantwort auf virale Sindbis-Vektor-kodierte Antigene

[0491] Um die Immunantwort, die von einer mit einem Sindbis-HIV-IIIB-env-Vektor transduzierten Zelllinie hervorgerufen wurde zu testen, wird eine Tumor-Zelllinie der Maus (B/C10ME) (H-2^d) (Patek et al., Cell. Immunol. 72: 113, 1982) mit einem rekombinanten, den HIV-IIIB-Vektor tragenden Sindbis-Virus infiziert. Die HIV env-exprimierende Zelllinie (B/C10ME-IIIB) wurde dann zum Stimulieren von HIV env-spezifischen CTL in syngen (d. h. MHC-identischen) Balb/C (H-2^d) Mäusen verwendet. Die Mäuse wurden durch eine intraperitoneale Injektion mit B/C10ME-IIIB-Zellen (1×10^7 Zellen) immunisiert und am Tag 7–14 re-immunisiert. (Re-Immunsierung kann nicht notwendig sein.) Von diesen immunisierten Mäusen werden Suspensionen von ansprechenden Milzzellen hergestellt und die Zellen werden für 4 Tage in vitro in der Anwesenheit von entweder B/C10ME-IIIB (BCenv) oder B/C10ME(BC) Mitomycin-C-behandelten Zellen bei einem Stimulator : Ansprecher-Zellverhältnis von 1 : 50 gezüchtet. Von diesen Kulturen werden die Effektorzellen geerntet, gezählt und mit radiomarkierten (⁵¹Cr)-Zielzellen (beispielsweise B/C10MEenv-29 oder B/C10ME) bei verschiedenen Effektor : Ziel (E : T)-Zellverhältnissen in einem Standard-4–5-Stunden-⁵¹Cr-Freisetzungssassay gemischt. Im Anschluß an die Inkubation werden die Mikrotiterplatten zentrifugiert, 100 µl des Kulturüberstands werden entfernt und die Menge der von den lysierten Zellen freigesetzten Radiomarkierung in einem Beckman-gamma-Spektrometer quantifiziert. Die Zielzellyse wurde berechnet wie folgt: % Ziellyse = $\frac{\text{Exp CPM} - \text{SR CPM}}{\text{MR CPM} - \text{SR CPM}} \times 100$, wobei die experimentelle Zähler pro Minute (Exp CPM) die Effektoren plus die Ziele repräsentiert, die CPM der spontanen Freisetzung (SR) repräsentiert die Ziele alleine und die CPM der maximalen Freisetzung (MR) repräsentieren die Ziele in der Anwesenheit von 1 M HCl.

2. Stimulation einer Immunantwort in Mäusen durch die direkte Injektion eines rekombinanten Sindbis-Vektors

[0492] Es werden Experimente zum Bewerten der Fähigkeit von rekombinanten viralen Sindbis-Vektoren, die Expression von HIV-Hüllproteinen nach einer direkten Injektion in Mäusen zu induzieren, durchgeführt. Ungefähr 10^4 bis 10^5 (plaqueformende Einheit, pfu) des rekombinanten, das HIV-IIIB-env-Vektorkonstrukt tragenden Sindbis-Virus werden zweimal (2×) in Abständen von 3 Wochen entweder intraperitoneal (i.p.) oder intramuskulär (i.m.) injiziert. Die Menge des Sindbis-Virus wird bestimmt als kleiner als die Menge, von der angenommen wird, daß sie eine Immunantwort stimuliert. Milzzellen werden ungefähr 7 bis 14 Tage nach der zweiten Injektion des Vektors für CTL präpariert.

D. BLOCKIERUNGSMITTEL, DIE VON VIRALEN PROTEINANALOGA, DIE VON REKOMBINANTEN SIND-BIS-VEKTOREN EXPRIMIERT WERDEN STAMMEN

[0493] Viele infektiöse Krankheiten, Krebserkrankungen, Autoimmunerkrankungen und andere Krankheiten sind mit der Interaktion von viralen Teilchen mit Zellen, Zellen mit Zellen oder Zellen mit Faktoren verbunden. In viralen Infektionen gelangen die Viren gewöhnlicherweise durch Rezeptoren auf der Oberfläche der empfänglichen Zellen in die Zellen. Bei Krebserkrankungen können die Zellen nicht geeignet oder gar nicht auf Signale von anderen Zellen oder Faktoren antworten. Bei Autoimmunerkrankung gibt es kein geeignetes Erkennen eines „Selbst“-Markers. Diese Interaktionen können durch das Herstellen eines Analogons zu einem der Partner in einer Interaktion in vivo blockiert werden.

[0494] Diese Blockierungswirkung kann intrazellulär, auf der Zellmembran oder extrazellulär stattfinden. Die Blockierungswirkung eines viralen oder insbesondere eines ein Gen für ein blockierendes Mittel tragenden Sindbis-Vektors kann entweder vom Inneren einer empfänglichen Zelle oder durch das Sekretieren einer Version des blockierenden Proteins zur lokalen Blockade der pathogenen Interaktion vermittelt werden.

[0495] Im Fall von HIV sind die beiden Mittel der Interaktion das gp120/gp41-Hüllprotein und das CD4-Rezeptormolekül. Somit wäre ein geeigneter Blockierer ein Vektorkonstrukt, das entweder, ohne pathogene Effekte zu verursachen ein den Zugang von HIV blockierendes HIV env-Analogon exprimiert oder ein CD4-Rezeptoranalogen. Das CD4-Analogon würde sekretiert werden und würde während das gp120/gp41 sekretiert wird, zum Schutz der benachbarten Zellen fungieren oder nur intrazellulär hergestellt wird, so daß es nur die Vektor-enthaltende Zelle schützt. Es kann von Vorteil sein, die schweren Ketten eines humanen Immunglobulins oder andere Komponenten zur Verstärkung der Stabilität oder der komplementären Lyse zu CD4 hinzuzugeben. Das Befördern eines retroviralen Vektors, der ein solches hybridlösliches CD4 kodiert, zu einem Wirt, resultiert in einer kontinuierlichen Versorgung mit einem stabilen Hybridmolekül.

[0496] Zur Expression von HIV env-Analoga führende Vektorteilchen können auch, wie vorstehend beschrieben, konstruiert werden. Es wird für einen Durchschnittsfachmann offensichtlich sein, welche Teile befähigt sind, die Virusadsorption ohne offensichtliche pathogene Nebeneffekte zu blockieren (Willey et al., J. Virol. 62:

139, 1988, Fisher et al., Science 233: 665, 1986).

BEISPIEL 13

ERSATZ-GENTHERAPIE UNTER VERWENDUNG VON REKOMBINANTEN SINDBIS-VEKTOREN ZUR SYSTEMISCHEN PROTEINHERSTELLUNG. EINE BEHANDLUNG DER GAUCHER-ERKRANKUNG

A. GESTALTUNG EINES GLUKOZEREBSIDASE-SINDBIS-VEKTORS

[0497] Ein Glukozerebrosidase(GC)-cDNA-Klon, der eine Xho I-Restriktionsenzymstelle 5' von der cDNA-kodierenden Sequenz und eine Cla I-Restriktionsenzymstelle 3' von der cDNA-kodierenden Sequenz enthält, wird als erstes erzeugt. Der Klon kann durch Verdauen von pMFG-GC (Ohashi et al., PNAS 89: 11332, 1992) mit Nco I, Glätten mit einer Vent DNA Polymerase (New England Biolabs, Beverly, MA) geglättet und dann Ligation an Xho I-Linker erzeugt werden. Das Plasmid wird dann mit Bam HI verdaut, mit einer Vent DNA Polymerase geglättet, dann an Cla I-Linker ligiert. Das Fragment wird dann mit Xho I und Cla I verdaut und in die Xho I-Cla I-Stelle des gewünschten Sindbis-Vektors ligiert.

B. KONSTRUKTION EINER SINDBIS-GC-VEKTOR-PRODUZIERENDEN ZELLINIE

[0498] Der Vektor verwendet einen heterologen Promotor (Beispiel 7) in einem Plasmidkonstrukt, dem eine stabile Integration in der Verpackungs-Zelllinie ermöglicht ist. Replikations-kompetente Vektortranskripte werden dann in der transfizierten Verpackungs-Zelllinie transkribiert.

[0499] Wenn der virale Sindbis-GC-Vektor einen heterologen Promotor in einer Expressionsplasmid-Konfiguration mit einem selektierbaren Marker (Neomycin-Resistenzgen) verwendet wird, dann muß der cDNA-Vektor in die Verpackungs-Zelllinie transfiziert werden, gefolgt von einer Arzneistoff-Resistenzselektion. Resistente Kolonien werden dann gesammelt und Verdünnungs-kloniert. Einzelne Klone werden dann vermehrt und eingefroren. Die Klone werden einzeln auf einen hohen Titer, auf Expression von GC durch Western-Blot-Analyse und auf die funktionelle Aktivität des Proteins abgesucht.

[0500] Für solche Vektoren, die keinen selektierbaren Marker aufweisen, muß die Selektion von stabil oder persistent transfizierten Klonen durch Verdünnungsklonierung der DA-transduzierten Zellen ein oder zwei Tage nach dem Transfizieren der Zellen mit dem Sindbis-Vektor durchgeführt werden. Die Verdünnungskclone werden dann auf die Anwesenheit von GC unter Verwendung der reversen Transkription von Boten-RNA abgesucht, gefolgt von der Amplifikation der cDNA-Botschaft durch die Polymerasekettenreaktionstechnik. Diese Vorgehensweise ist als die RT-PCR-Technik bekannt und einem Handel verfügbarer Kit zur Durchführung dieses Assays ist von Invitrogen Corp. (San Diego, CA) erhältlich. RT-PCR wird an Klonen, welche für mindestens 10 Tage vermehrt wurden, durchgeführt. Ungefähr 50 bis 100 Klone werden zum Auffinden einer vernünftigen Anzahl von stabilen, persistent infizierten Klonen abgesucht. Um die RT-PCR durchzuführen, werden spezifische Primer für die gewünschte Botschaft, nach der durch Amplifikation des RNA-Produkts gesucht werden soll, benötigt. Die zur Amplifikation eines 521 Basenpaar-Produkts für das Suchen nach GC entworfenen Primer sind:

Primer für Absuchen auf GC

GC-PCR-Primer #1: 5'-TTT CTG GCT CCA GCC AAA GCC ACC CTA GGG GAG-3'

(SEQ. ID NR. 69)

GC-PCR-Primer #2: 5'-AAT GGA GTA GCC AGG TGA GAT TGT CTC CAG GAA-3'

(SEQ. ID NR. 70)

[0501] Jene Klone, welche höchste Expression und Titer aufweisen, werden dann auf Transfer der Expression auf BHK-2-Zellen getestet, gefolgt von einer Western-Blot-Analyse und einem funktionellen Assay auf GC-Aktivität. Ein spezifischer monoklonaler Antikörper (8E4) gegen humanes GC wird für die Western-Blot-Analyse zum Bestimmen der Anwesenheit des Proteins verwendet (Ohashi et al., PNAS 89: 11332, 1992, Barneveld et al., Eur. J. Biochem. 134: 310, 1983). Die enzymatische Aktivität des GC wird wie bei Correll et al. (Blood 80: 331, 1992) beschrieben getestet. Tierversuche werden durchgeführt, sobald der geeignete

Klon identifiziert wurde.

BEISPIEL 14

VERABREICHUNG VON REKOMBINANTEN SINDBISPARTIKELN

[0502] Ein therapeutischer Sindbis-Vektor, welcher für die Behandlung der Gaucher-Krankheit (Beispiel 13) verwendet wird, kann durch transduzierte, autologe CD34⁺-Zellen in einem ex vivo-Protokoll oder durch direkte Injektion des Vektors in das Patientenknorpelmark verabreicht werden. Um die längste therapeutische Expression des GC von dem rekombinanten multivalenten Vektor zu erreichen, ist die beste Art der Verabreichung langlebige Zellvorläufer des klinisch behafteten Zelltyps, z. B. Monozyten oder Macrophagen, zu transduzieren. Durch das Transduzieren der frühesten Vorläufer des behafteten Zelltyps sind die Zellvorläufer befähigt, sich selbst zu erneuern und das periphere Blut mit reifen GC-positiven Zellen wieder zu bevölkern. Die frühesten pluripotenten, hämatopoetischen Stammzellen, welche bis heute untersucht worden sind, sind die CD34⁺-Zellen, welche 1%–4% einer gesunden Knochenmarkspopulation oder 0,1% der peripheren Blutpopulation ausmachen. Die Fähigkeit CD34⁺-Zellen zu transduzieren, ist für das Aufrechterhalten der Langzeit-Expression, nicht nur für die Monozyten/Macrophagen-Familie, sondern für jede hämatopoetische Zelle, wichtig, welche für ein therapeutisches Protein ausgerichtet sind. Zwei Ansätze zur Transduktion von CD34⁺-Zellen schließen ein ex vivo- und ein in vivo-Protokoll ein. Das in vivo-Protokoll zielt auf die Transduktion einer willkürlichen bzw. unterschiedslosen Population von Knochenmarkszellen durch direkte Injektion des Vektors in das Knochenmark der Patienten ab. Das ex vivo-Protokoll zielt auf die Isolierung von CD34⁺-positiven Stammzellen aus dem Patientenknorpelmark oder aus dem Nabelschnurblut eines Säuglingspatienten, Transduktion der Zellen mit dem Vektor, dann anschließendes Injizieren der autologen Zellen zurück in den Patienten ab. Beide Ansätze sind möglich, aber das ex vivo-Protokoll ermöglicht, den Vektor effizienter durch die Transduktion einer spezifischen gezüchteten CD34⁺-Zellenpopulation zu verwenden. Details des ex vivo-Verfahrens werden in dem folgenden Abschnitt bereit gestellt.

EX VIVO VERABREICHUNG EINES MULTIVALENTEN GC-SINDBIS-VEKTORS

[0503] CD34⁺-Zellen werden von dem Patientenknorpelmark durch eine Spritzenabsaugung, ausgeführt von einem Arzt, welcher mit der Technik vertraut ist, gesammelt. Alternativ können die CD34⁺-Zellen auch aus dem Blut von Säuglingsnabelschnur erhalten werden, wenn bei dem Patienten vor der Geburt eine Diagnose gestellt wird. Allgemein, wenn das Knochenmark die Quelle der CD34⁺-Zellen ist, werden 20 Knochenmarksabsaugungen durch Punktion des Oberschenkels oder des hinteren Beckenkamms, unter Lokal- oder allgemeiner Anästhesie erhalten. Die Knochenmarksabsaugungen werden dann vereinigt, in HEPES-gepufferter Hanks ausgeglichener Salzlösung, welche Heparin mit 100 Einheiten pro ml und Desoxyribonuclease I mit 100 µg/ml enthält, suspendiert und dann einer Ficoll-Gradiententrennung unterworfen. Die über den Dichtegradienten präparierten Knochenmarkszellen werden dann gesammelt und gemäß dem Cellpro's CEPRATE™ LC (Cellpro, Bothell, WA) (CD34) Trennungssystem gewaschen. Die gewaschenen, über den Dichtegradienten separierten Zellen werden dann anschließend sequenziell mit anti-CD34-monoklonalem Antikörper gefärbt, gewaschen, und dann mit biotinyliertem sekundärem Antikörper, der mit dem CEPRATE™-System geliefert wird, gefärbt. Die Zellmischung wird auf die CEPRATE™-Avidinsäule geladen. Die Biotin-markierten Zellen werden dann auf der Säule adsorbiert, während die unmarkierten Zellen durchfließen. Die Säule wird dann gemäß den Anweisungen des CEPRATE™-Systems gespült, und die CD34⁺-Zellen durch Bewegung der Säule durch manuelles Pressen des Gelbetts eluiert. Sobald die CD34⁺-Zellen gereinigt sind, werden die gereinigten Stammzellen gezählt und in einer Konzentration von 1×10^5 Zellen/ml in Iscove's modifiziertem Dulbecco's Medium (JMDM, Irvine Scientific, Santa Ana, CA), welches 20% vereinigt, nicht-hitzeinaktiviertes humanes AB-Serum (hAB-Serum) enthält, ausplattiert.

[0504] Nach der Reinigung können verschiedene Verfahren zur Transduktion der gereinigten Stammzellen ausgeführt werden. Ein Ansatz beinhaltet die direkte Transduktion der gereinigten Stammzellpopulation mit Vektor-enthaltenden Kulturüberständen, welche von Vektor-herstellenden Zellen stammen. Ein zweiter Ansatz beinhaltet die Kokultivierung einer bestrahlten Monolayer von Vektor-produzierenden Zellen mit der gereinigten Population von nicht-adhärenenten CD34⁺-Zellen. Ein dritter und bevorzugter Ansatz beinhaltet einen ähnlichen Kokultivierungsansatz, die gereinigten CD34⁺-Zellen werden jedoch mit verschiedenen Zytokinen vorstimuliert und 48 Stunden vor der Kokultivierung mit den bestrahlten Vektor-herstellenden Zellen kultiviert. Neuere Veröffentlichungen haben gezeigt, daß die Vorstimulation der Stammzellen vor dem Transduzieren der Zellen mit retroviralen Vektoren das Gentransferniveau in diesen Zelltypen steigert (Nolta et al., Exp. Hematol. 20: 1065, 1992). Das gesteigerte Niveau der Transduktion wird der gesteigerten Proliferation der Stammzellen zugeschrieben, welche für eine effiziente retrovirale Transduktion notwendig ist. Da die Sindbis-Vektoren befähigt

sind, nicht-replizierende Zellen zu infizieren, kann die Vorstimulation dieser Zellen nicht erforderlich sein, die Vorstimulation dieser Kulturen, welche Proliferation verursachen, wird jedoch vergrößerte Zellpopulationen zur Reinfusion in den Patienten bereit stellen.

[0505] Die Vorstimulation von CD34⁺-Zellen wird durch Inkubation der Zellen mit einer Kombination von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, welche IL-1, IL-3, IL-6 und den Mastzellenwachstumsfaktor (MGF) einschließen, durchgeführt. Die Vorstimulation wird durch Züchten von $1-2 \times 10^5$ CD34⁺-Zellen/ml Medium in T25-Gewebekulturflaschen, welche Knochenmarkstimulations-Medium für 48 Stunden enthalten, durchgeführt. Das Knochenmarkstikulations-Medium besteht aus IMDM, welches 30% nicht-hitzeaktiviertes hAB-Serum, 2 mmol L-Glutamin, 0,1 mmol β 2-Mercaptoethanol, 1 μ mol Hydrokortison und 1% deionisiertes Rinderserumalbumin enthält. Alle in den Knochenmarkskulturen verwendete Reagenzien sollten auf ihre Fähigkeit überprüft werden, maximale Anzahlen der Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen, Megakaryozyten, Kolonie-bildenden Einheiten aus dem normalen Knochenmark zu unterstützen. Gereinigte rekombinante humane Zytokine und Wachstumsfaktoren (Immunex Corp., Seattle, WA) für die Vorstimulation sollten in den folgenden Konzentrationen verwendet werden: von E. coli-stammendes IL-1 α (100 U/ml), von Hefe-stammendes IL-3 (5 ng/ml), IL-6 (50 U/ml) und MGF (50 ng/ml) (Anderson et al., Cell Growth Differ. 2: 373, 1991).

[0506] Nach der Vorstimulation der CD34⁺-Zellen werden sie dann durch Kokultivierung mit der bestrahlten Sindbis-Herstellerzelllinie (welche den GC-therapeutischen Vektor exprimiert) in fortlaufender Anwesenheit von Stimulationsmedium infiziert. Die DA-Vektor-herstellende Zelllinie wird erst trypsiniert, bestrahlt (10.000 Rad) und $1-2 \times 10^5$ Zellen/ml in Knochenmarkstimulationsmedium ausplattiert. Am folgenden Tag werden $1-2 \times 10^5$ vorstimulierte CD34⁺-Zellen/ml zu der Monolayer der Sindbis-Vektor-Herstellerzelllinie zugegeben. Die Kokultivierung der Zellen wird über 48 Stunden ausgeführt. Nach der Kokultivierung werden die CD34⁺-Zellen von der adhärennten Monolayer der Sindbis-Vektor-herstellenden Zellen durch kräftiges Waschen mit Medium gesammelt und für 2 Stunden ausplattiert, um das Anhaften von allen entfernten Vektor-herstellenden Zellen zu erlauben. Die Zellen werden dann gesammelt und für weitere 72 Stunden vermehrt. Die Zellen werden gesammelt und in flüssigem Stickstoff unter Verwendung eines Gefrierschutzmittels in Aliquots von 1×10^5 Zellen pro Gefäß eingefroren. Wenn die transformierten CD34⁺-Zellen auf die Abwesenheit von fremden Agenzien überprüft worden sind, können die transformierten CD34⁺-Zellen aufgetaut werden, in einer Konzentration von 1×10^5 -Zellen/ml ausplattiert werden und für weitere 48 Stunden in Knochenmarkstimulationsmedium kultiviert werden. Die transformierten Zellen werden dann gesammelt, zweimal gewaschen und in normaler Kochsalzlösung resuspendiert. Die Zahl der transduzierten Zellen, welche verwendet werden, um durch Infusion zurück in den Patienten verabreicht zu werden, wird bei einem Minimum von $1-10 \times 10^7$ -Zellen pro Patient pro Injektionsstelle geplant, wobei vier Injektionsstellen benötigt werden. Die Infusion kann direkt zurück in das Patientenknöchelmark oder direkt in den peripheren Blutstrom durchgeführt werden. Patienten, welche autologe transduzierte Knochenmarkszellen erhalten, können entweder teilweise oder am ganzen Körper bestrahlt werden, um die existierenden Knochenmarkspopulationen zu entfernen. Die Behandlung kann zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infusion überprüft werden, um die GC-Aktivität und die Dauer der Expression in den differenzierten Zelltypen zu bestimmen. Wenn zu irgendeinem Zeitpunkt während dem Verlauf der nachfolgenden Verfahren die Expression absinkt oder nicht existiert, können transduzierte autologe Zellen in den Patienten reinjiziert werden.

BEISPIEL 15

GEWEBESPEZIFISCHE EXPRESSION DURCH AKTIVIERUNG VON FUNKTIONSunFÄHIGEN SINDBIS-VEKTOREN UNTER VERWENDUNG VON GEWEBESPEZIFISCHER ZELLULÄRER RNA

KONSTRUKTION VON SINDBIS-TUMORSPEZIFISCHEN EXPRESSIONS-VEKTOREN FÜR DIE BEHANDLUNG DES KOLOREKTALEN KARZINOMS

A. KONSTRUKTION EINES REKOMBINANTEN SINDBIS-VEKTORS (SIN-CEA) ABHÄNGIG VON DER EXPRESSION DES CEA-TUMORMARKERS

[0507] Um einen funktionsunfähigen Sindbis-Vektorpartikel in einer Sindbis-Verpackungszelllinie herzustellen, muß der Sindbis-Vektor durch einen DNA-Polymerase-Promotor angetrieben werden. Die Möglichkeit, in vitro-Transkription der Vektor-RNA zu verwenden, gefolgt von Transfixieren der RNA in die Sindbis-Verpackungszelllinie, wird nicht empfohlen, da die tertiäre Struktur, welche durch das funktionsunfähige RNA-Transkript erzeugt wird, vollständige genomische Transkripte verhindern, die Vektorreplikation und den Titer in der Verpackungszelllinie begrenzen kann. Aus diesem Grund wird ein Start-Sindbis-Vektor, welcher den CMV-MIEP-Promotor (pCMV-SIN) oder den Drosophila-Metallothionin-Promotor (pMET-CMV) enthält, abhän-

gig von der Verpackungszelllinie (d. h. Insekten oder Säuger) verwendet.

[0508] Wie zuvor beschrieben, wird das funktionsunfähige Verbindungs-Loop-out-Modell mit der Verbindungsregion des Vektors, flankiert durch invertierte Wiederholungssequenzen, welche homolog zu der ausgewählten RNA sind, konstruiert. In diesem Beispiel werden Sequenzen der CEA-Tumorantigen-cDNA (Beauchemin et al., Molec. and Cell. Biol. 7: 3221, 1987) in invertierten Wiederholungen verwendet. Um einen CEA-RNA-empfindlichen Sindbis-Vektor zu konstruieren, gehen der Verbindungsregion zwei CEA-Antisense-Sequenzdomänen (A¹ und B¹), welche durch eine Sechs-Basenpaar-Gelenkdomäne getrennt sind, voraus. Eine einzelne Zwanzig-Basenpaar-CEA-Sensesequenz (A2), welche komplementär zu A1 ist, wird an das 3'-Ende der Verbindungsregion gesetzt. Beim Auswählen der korrekten A1- und B1-Antisense-Sequenzen gibt es nur zwei Anforderungen, daß sie spezifisch für die Target-RNA-Sequenz sind, und daß die Antisense-Sequenzen mit den zwei RNA-Sequenzdomänen, welche durch drei Nukleotide getrennt sind, hybridisieren. Diese Drei-Nukleotidlücke dient als eine Gelenkdomäne für die Polymerase, um zu springen und die Lesestränge, welche die Nichtstrukturprotein-domäne des Vektors überbrücken, auf die Verbindungsregion des Vektors überzuleiten (**Fig. 5**). Um eine solche Konfiguration zu konstruieren, werden zwei Oligonukleotide synthetisiert, welche komplementär zueinander sind, um ein Fragmentinsert zu erzeugen, welches geeignete Restriktionsenzym-Sequenzen an den äußeren 5'- und 3'-Enden enthält. Das Oligonukleotid-Fragmentinsert wird dann in den Sindbis-Vektor zwischen der funktionsunfähigen Verbindungsregion und der Mehrfachklonierungssequenz des Sindbis-Vektors ligiert. Der Sense-Oligonukleotidstrang von 5' zu 3' sollte eine Apa I-Restriktionsstelle, gefolgt von einer A1-Antisense-Domäne, einer sechs bp Gelenkdomäne, einer B1-Antisense-Domäne, einer synthetischen Verbindungsregiondomäne und der A1-Sense-Domäne, gefolgt von einer Xho I-Restriktionsenzymsequenz, enthalten. Die folgende Oligonukleotidsequenz wird verwendet, um einen CEA-RNA-empfindlichen Sindbis-Vektor zu entwerfen. Die Nukleotidzahlsequenz ist aus Beauchemin et al., Molec. and Cell Biol. 7: 3221, 1987 erhalten.

5'-3'-CEA-Sense-Strang

CEA 618 CEA 589

Apa I *-----*

CGC GC G GGC CCT GT G ACA T TG AAT AGA GT G AGG G TC CTG

TTG GG (SEQ. ID NO. 71)

CEA 651 CEA 622

----- * synthetisch

A AAG G TT TCA CAT TT G TAG C TT GCT GTG TC A TTG C GA TCT

CTA CG (SEQ. ID NO. 72)

CEA 599 CEA 618

Verbindungskern * *-----* Xho I

G TGG T CC TAA ATA GT T CACT CT ATT CAA TG T CAC A CT CGA

GCC GG (SEQ. ID NO. 73)

[0509] Der 5'-3'-CEA-Antisense-Strang ist zu dem oberen Nukleotid komplementär. Nachdem beide Oligonukleotide synthetisiert sind, werden die Oligonukleotide zusammen in Anwesenheit von 10 mM Mg gemischt, auf 100°C für 5 Minuten erhitzt und langsam auf Raumtemperatur abgekühlt. Das Oligonukleotidpaar wird dann mit Apa I- und Xho I-Restriktionsenzymen verdaut, in einem 25 : 1 molaren Verhältnis von Insert zu Plasmid gemischt und ligiert, wobei pCMV-SIN oder pMET-SIN mit den gleichen Enzymen vorverdaut sind. Diese Konstrukte werden als pCMV/SIN-CEA bzw. pMET/SIN-CEA bezeichnet.

Konstruktion eines SIN-CEA-Vektors und Herstellerlinie, welche gamma-Interferon exprimiert (SIN-CEA/gIFN)

[0510] Die humane g-IFN-cDNA stammt von RNA, welche aus PHA-stimulierten Jurkat-T-Zellen durch Guanidin-Thiocyanat-Extraktion, gefolgt von Ultrazentrifugation über einen CsCl-Gradienten, isoliert wird. Die RNA

(Sigma, St. Louis, MO) wird dann in vitro reverse-transkribiert, und ein genspezifisches Oligonukleotidpaar wird verwendet, um die g-IFN-cDNA durch Polymerasekettenreaktion, unter Verwendung von Taq-Polymerase, zu amplifizieren. Die PCR-DNA wird mit T4-DNA-Polymerase und Klenow repariert und in die Hinc II-Schnittstelle des SK⁺-Plasmids (Stratagene, San Diego, CA), welches mit CIAP behandelt ist, kloniert. In der Sense-Orientierung ist das 5'-Ende der cDNA zu der Xho I-Sequenz des SK⁺-Polylinkers benachbart, und das 3'-Ende ist zu der Cla I-Sequenz benachbart. Das 512-Basenpaarfragment, welches das humane gamma-Interferonmolekül kodiert, wird in die Xho I/Cla I-Sequenz von entweder dem pCMV/SIN-CEA- oder dem pMET/SIN-CEA-Vektor plaziert. Diese neuen Plasmide werden als pCMV/SIN-CEA/γIFN bzw. pMET/SIN-CEA/γIFN bezeichnet.

B. KONSTRUKTION EINES SIN-CEA-VEKTORS UND HERSTELLERZELLINIE WELCHE THYMIDINKINASE EXPRIMIERT (SIN-CEA/TK)

[0511] Ein PCR-amplifiziertes Produkt, welches den cDNA-Klon der Herpes Simplex Thymidinkinase („HSV-VTK“), flankiert von 5'-XHO I- und 3'-Cla I-Restriktionsenzymchnittstellen, enthält, wird unter Verwendung des pHS1TK3KB (Mcknight et al., Nuc. Acids Res. 8: 5949, 1980)-Klon als Target-DNA erhalten. Die Sequenzen für die Primer, welche für die PCR-Amplifikation benutzt werden, werden aus veröffentlichten Sequenzen erhalten (Wagner et al., PNAS 78: 1442, 1981). Das 1.260 Basenpaar-amplifizierte Produkt wird dann mit Xho I und Cla I in die Xho I/Cla I-Schnittstelle von entweder dem pCMV/SIN-CEA oder dem pMET/SIN-CEA-Vektor ligiert. Diese neuen Plasmide werden als pCMV/SIN-CEA/HSVTK bzw. pMET/SIN-CEA/HSVTK bezeichnet.

C. ERZEUGUNG VON CEA-RNA-ABHÄNGIGEN SINDBIS-VEKTOR-HERSTELLERZELLINIEN

[0512] Im Unterschied zu den früheren Beispielen zur Erzeugung von Herstellerzelllinien (Beispiel 7) kann es sein, daß nur eine einzige Runde des Gentransfers in die Verpackungszelllinie durch Vektortransfektion möglich ist. Da diese Vektoren funktionsinaktiviert sind und in der Synthese von vollständigen genomischen Vektoren behindert sind, endet die Reinfektion einer frischen Schicht von Sindbis-Verpackungszelllinien in einer abortierten Infektion, da diese Vektoren jetzt von der Anwesenheit von CEA-RNA abhängig sind, um aktiv zu werden. Hohe Titer können durch Verdünnungsklonierung der transfizierten Herstellerzelllinien unter Verwendung der zuvor in Beispiel 11 beschriebenen RT-PCR-Technik erreicht werden.

BEISPIEL 16

ERSATZ-GENTHERAPIE UNTER VERWENDUNG VON REKOMBINANTEN SINDBIS-VEKTOREN ZUR SYSTEMISCHEN PROTEINHERSTELLUNG. EINE BEHANDLUNG FÜR DIE FAKTOR VIII-MANGEL HÄMOPHILIE A-ERKRANKUNG

[0513] Die Hämophilie A-Erkrankung ist durch die Abwesenheit des Faktors VIII, einem Blutplasma-Gerinnungsfaktor, gekennzeichnet. Ungefähr 1 in 20000 Männern weisen Hämophilie A auf, in welcher der Krankheitszustand als eine auf das Unvermögen der betroffenen Individuen, die Blutgerinnungskaskade vollständig auszuführen, zurückzuführende Blutungsstörung vorliegt.

[0514] Die Behandlung der Individuen mit Hämophilie A ist ein Austausch mit dem Faktor VIII-Protein. Die einzige Quelle für humanen Faktor VIII ist humanes Plasma. Um das humane Plasma für die Faktor VIII-Aufreinigung aufzubereiten, werden humane Spenderproben in Gruppen von über 1000 Spendern gesammelt. Aufgrund der Instabilität des Faktor VIII-Proteins sind die resultierenden pharmazeutischen Produkte sehr unrein und mit einer geschätzten Reinheit durch Gewicht von ungefähr 0,04%. Zusätzlich gibt es eine ernsthafte Bedrohung durch solche infektiösen Erkrankungen, wie unter anderem das Hepatitis B Virus und das Humane Immundefizienz-Virus, welche den Blutvorrat kontaminieren und somit möglicherweise mit dem Faktor VIII-Protein mit aufgereinigt werden.

[0515] Aus den vorstehend präsentierten Gründen würde eine rekombinante Herstellungsquelle von Faktor VIII einen zukunftssträchtigen Fortschritt in Richtung der Behandlung von Hämophilie A markieren.

[0516] Die optimale Behandlung für Hämophilie A wäre eine Gen-Ersatztherapie, dies ist der Ersatz eines normalen Faktor VIII-Gens in betroffene Individuen, welche ein Nachfolgen der normalen Gerinnungskaskade ermöglichen würde.

[0517] Die vorstehend präsentierte Diskussion ist den für eine mögliche Behandlung der Hämophilie A-Erkrankungen zuständigen Fachleuten wohl bekannt. Retroviren sind ein möglicher Genthapievektor, welche

für die Expression von Faktor VIII entwickelt wurden. Aus bisher wenig verstandenen Gründen ist jedoch der Grad der Expression des rekombinanten Faktors VIII mit diesem und anderen Verfahren vergleichsweise gering.

[0518] Eine Möglichkeit für die geringe Expression des rekombinanten Faktors VIII in mit dem Retrovirus oder andere Vektoren transduzierte Zellen ist eine vergleichsweise geringe Effizienz des Prozessierens und des Transports der voll ausgebildeten Faktor VIII-RNA vom Kern zum Zytoplasma. Fachleuten ist es bekannt, daß die Deletion der B-Domäne des Faktors VIII den Grad der Produktion und Sekretion dieses Gerinnungsfaktors erhöht.

[0519] Um die mit dem geringen Grad der Faktor VIII-Proteinherstellung aufgrund von geringem RNA-Expressionsgrad und ineffizientem Prozessieren verbundene Probleme zu vermeiden, wird die Insertion von Faktor VIII-cDNA in Sindbis-Vektoren beschrieben. Da der Sindbis-Lebenszyklus vollständig im Zytoplasma der infizierten Zellen stattfindet, werden die Probleme, die mit vom Kern exprimierten Faktor VIII verbunden sind, umgangen. Weiter voraussetzend die Effizienz, mit der Sindbis sich selbst repliziert, könnte der Grad der Faktor VIII-Herstellung in mit Sindbis/Faktor VIII-infizierten Zellen theoretisch so hoch sein wie 1×10^8 Faktor VIII-Proteinmoleküle/Zelle.

[0520] Ein mögliches Problem, das mit dem Einfügen von Faktor VIII in Sindbis-Vektoren verbunden ist, ist die resultierende physikalische Größe des Vektor/heterologes Gen-Konstrukts und die mögliche Beschränkung des Verpackens des Faktor VIII-Vektorkonstrukts in ein funktionelles infektiöses Sindbis-Teilchen. Die genomische Größe von Wildtyp-Sindbis ist 11703 Nukleotide plus einem Poly-A-Schwanz. Die Größe des Sindbis-Grundvektorkonstrukts (pKSSINBV, siehe Beispiel 2) ist 7830 Nukleotide einschließlich eines 25-mer Poly-A-Schwanzes. Somit ist die zulässige Größe eines in pKSSINBV einzufügenden, heterologen genetischen Materials, welches in einem genomischen Komplement mit derselben physikalischen Größe wie das Wildtyp-Virus resultiert, 3898 Nukleotide.

[0521] Ein Schlüsselbeweis läßt jedoch vermuten, daß das Fassungsvermögen des heterologen genetischen Materials, welches in pKSSINBV eingesetzt werden kann und in ein funktionelles infektiöses Sindbis-Teilchen verpackt werden kann, erheblich größer als 3898 bp ist. In einer in der Literatur veröffentlichten Arbeit (Geigenmüller-Gnirke et al., PNAS 88: 3253–3257, 1991) wird das Verpacken von zwei Molekülen, wobei jedes ein cis-benötigtes Verpackungssignal enthält, in einzelne funktionelle Sindbis-Teilchen beschrieben. Die physikalische Gesamtgröße der beiden verpackten Genome in dieser Studie ist 14600 bp. Dieses Ergebnis deutet stark an, daß das Fassungsvermögen von Sindbis-Vektoren für heterologes genetisches Material viel größer ist als zuvor angenommen wurde. Die Möglichkeit der Insertion von großen zellulären Genen in Sindbis-Vektoren erweitert wesentlich den Nutzen dieses Systems.

[0522] Der Faktor VIII-cDNA-Klon ist ungefähr 8000 bp. Die Insertion der Faktor VIII-cDNA in pKSSINBV ergibt eine Vektor/heterologe genomische Größe von ungefähr 15830 bp. Wenn die Verpackung dieses Teilchens ineffizient ist, kann die Größe des Inserts weiter durch das Eliminieren der „B-Domäne“ des Faktor VI-II-Inserts verringert werden. Es wurde gezeigt, daß der Faktor VIII B-Domäne-Abschnitt von der cDNA entfernt werden kann, ohne die Funktionalität des nachfolgend exprimierten Proteins zu beeinträchtigen.

[0523] Die Quelle für Faktor VIII-cDNA ist Klon pSP64-VIII, ein ATCC-Klon unter der Zugangsnummer 39812, der eine das humane Protein in voller Länge kodierende cDNA aufweist. pSP64-VIII wird mit Sal I verdaut, die Enden werden mit T4-DNA-Polymerase und 50 µM von jedem dNTP geglättet und das ca. 7700 bp-Fragment wird der Elektrophorese in einem 1% Agarose/TBE-Gel unterworfen und mit Gene Clean™ aufgereinigt. Die geglätteten Enden enthaltende Faktor VIII-cDNA wird dann in das durch den Verdau mit Hinc II hergestellte pKSI3'SIN (Beispiel 2) ligiert, mit CIAP behandelt und mit Gene Clean™ aufgereinigt. Dieses Plasmid ist als pF83'SIN bekannt.

[0524] Zur Insertion von Faktor VIII in die verschiedenen in Beispiel 2 beschriebenen Sindbis-Vektoren wird das Plasmid pF83'SIN mit Xho I und Sac II verdaut und das resultierende 7850 bp-Fragment wird mit einem 1% Agarose/TBE-Gel isoliert und durch Gene Clean™ aufgereinigt. Dieses Faktor VIII-3'SIN-Fragment wird in jedem der nachstehend aufgelisteten Vektoren eingefügt. Vor der Insertion dieses Fragments werden die Plasmide durch Verdau mit Xho I und Sac II hergestellt, mit CIAP behandelt, mit einer 1% Agarose/TBE-Gelelektrophorese isoliert und mit Gene Clean™ aufgereinigt.

Vektor	Funktioneller Verbindungsabschnitt (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINd1JRsjrc	+
pKSSINd1JRsjrPC	+
pKSSINd1JRsjrNP (7582-7601)	+
pKSSINd1JRsexjr	+

[0525] Nach der Insertion der Faktor VIII-cDNA werden die Vektoren mit pKSSINBVF8, pKSSINd1JRsjrcF8, pKSSINd1JRsjrPCF8, pKSSINd1JRsjrNP (7582-7601)F8 beziehungsweise pKSSINd1JRsexjrF8 bezeichnet.

[0526] Das Verpacken der Faktor VIII-cDNA-enthaltenden Vektoren wird entweder durch das Infizieren von mit Vektor/Faktor VIII in vitro-transkribierter RNA transfizierten Zellen mit Wildtyp-Virus oder in einer anderen Ausführungsform durch das Transfizieren mit in vitro-transkribierter Vektor/Faktor VIII-RNA der in Beispiel 7 beschriebenen Verpackungs-Zelllinien durchgeführt. Die Effizienz des Verpackens wird durch das Messen des Faktor VIII-Expressionsgrads in infizierten Zellen und das Vergleichen mit den Expressionsgraden, die in den gleichen mit dem in Beispiel 3 beschriebenen pKSSIN-luc-Vektor durchgeführten Experimenten bestimmt.

BEISPIEL 17

A. ERZEUGEN EINES GLUKOZEREBSIDASE-SINDBIS-VEKTORS

[0527] Ein Glukozerebrosidase (GC)-cDNA-Klon, welcher eine Xho I-Restriktionsenzymstichstelle 5' zu der cDNA-kodierenden Sequenz und eine Cla I-Restriktionsenzymstichstelle 3' zu der cDNA-kodierenden Sequenz enthält, wird zuerst erzeugt. Der Klon kann durch Verdau von pMFG-GC (PNAS 89: 11332; 1992) mit Nco I, Erzeugung glatter Enden mit Vent-DNA-Polymerase, dann Ligierung mit Xho I-Linkern erzeugt werden. Das Plasmid wird dann mit Bam HI verdaut, glatte Enden mit Vent-DNA-Polymerase erzeugt, dann an Cla I-Linker ligiert. Für die Insertion des Faktors VIII in die verschiedenen, in Beispiel 2 beschriebenen Sindbis-Vektoren, wird das Fragment dann mit Xho I und Cla I verdaut und auf einem 1% Agarose/TBE-Gel isoliert und durch Gene Clean gereinigt. Das GC-Fragment wird in jeden der nachstehenden Vektoren, hergestellt durch Verdau mit Xho I und Cla I, Behandlung mit CIAP, Isolierung durch 1% Agarose/TBE-Gel-Elektrophorese und Reinigung mit Gene Clean, inseriert:

Vektor	Funktionelle Verbindungsregion
pKSSINBV	+
pKSSINd1FRsjrc	+
pKSSINd1FRsjrPC	+
pKSSINd1FRsjrNP(7582 - 7601)	+
pKSSINd1FRsexjr	+

[0528] Nach der Insertion der Faktor VIIIcDNA sind diese Vektoren, wie unten gezeigt, bekannt:
pKSSINBV-GC
pKSSINd1FRsjrc-GC
pKSSINd1FRsjrPC-GC
pKSSINd1FRsjrNP (7582-7601)-GC
pKSSINd1FRsexjr-GC

[0529] Der Glukozerebrosidase(GC)-Sindbis-Vektor wird verwendet, um die GC-cDNA in Tierversuchen zu exprimieren, und wird eventuell verwendet, um Menschen durch direkte Injektion zu behandeln. Wenn mehr-

fache Injektionen benötigt werden, um die GC-Expression in dem behandelten Individuum aufrechtzuerhalten, wäre es ideal, wenn der Sindbis-Vektor entworfen wäre, minimal antigen zu sein oder in solcher Weise entworfen wäre, keine Immunantwort gegenüber dem Vektor zu induzieren. Beispiele für Sindbis-Vektoren, welche in einer solchen Weise entworfen sind und befähigt sind, verschiedene Proteine zu exprimieren, sind in den Beispiel 3 (Adenovirus Early region E3); Beispiel 4 (HCMVH301); Beispiel 5 (Expression von verschiedenen Genen) und Beispiel 17 (Ribozymexpression von Interferon A) beschrieben. Unter Verwendung der obigen Beispiele kann ein Sindbis-Vektor entworfen werden, die GC-cDNA in einer solchen Konfiguration zu exprimieren, wobei dem Interferon A-Haarnadel-Ribozym das AD E3 oder CMV H301-Gen folgt, gefolgt von einer internen Ribozym-Eintrittssequenz, gefolgt von der GC-cDNA oder anderen therapeutischen Palliativa bzw. Lindierungsmittel, unter Verwendung der gleichen Xho I- bis Cla I-Klonierungssequenzen in der Mehrfachklonierungssequenz des Vektors.

B. KONSTRUKTION EINER SINDBIS-GLUKOZEREBSIDASE-VEKTOR HERSTELLENDEN ZELLINIE

[0530] Ein Ansatz wird vorgestellt, um die Herstellerzelllinie zu erzeugen. Der Vektor verwendet einen heterologen Promotor in einem Plasmidkonstrukt, welches die stabile Integration in die Verpackungszelllinie erlauben würde (s. Beispiel 7 zur Übersicht). Replikationskompetente Sindbis-Vektor-Transkripte werden dann auf dem DNA-Niveau exprimiert und würden in die Sindbis-Verpackungszelllinie transfiziert werden.

[0531] Wenn der Sindbis-GC virale Vektor einen heterologen Promotor in einer Expressionsplasmid-Konfiguration mit einem selektierbaren Marker (Neomycin-Resistenzgen) verwendet, dann muß der cDNA-Vektor in die Verpackungszelllinie transfiziert werden, gefolgt von Arzneimittelresistenz-Selektion. Resistente Kolonien werden dann vereinigt und verdünnungskloniert. Einzelne Klone werden dann vermehrt und eingefroren. Die einzelnen Klone werden dann auf hohe Titer, wie in Beispiel 9 beschrieben, für die Expression von Glukozerebrosidase durch Westernblot-Test überprüft und dann auf funktionelle Aktivität des Proteins getestet (Correll et al.; Blood 80: 331, 1992).

[0532] Für solche Vektoren, welche nicht einen selektierbaren Marker aufweisen, muß die Selektion der stabilen oder persistent transfizierten Klone durch Verdünnungsklonierung der Verpackungszelllinien ein bis zwei Tage nach der Transfektion der Zellen mit dem Sindbis-Vektor durchgeführt werden. Die verdünnten Klone werden dann auf die Anwesenheit von Glukozerebrosidase, unter Verwendung der reversen Transkription der messenger-RNA, gefolgt durch Amplifikation der cDNA-Message durch die Polymerase-Ketten-Reaktions-Technik überprüft. Dieses Verfahren ist als RT-PCR-Technik bekannt und ein im Handel erhältlicher Kit ist verfügbar, um diesen Test durchzuführen (Invitrogen Corp., San Diego, CA). RT-PCR wird mit Klonen durchgeführt, welche für mindestens 10 Tage vermehrt worden sind. Ungefähr 50 bis 100 Klone werden überprüft, um eine vernünftige Zahl von stabilen, persistent-infizierten Klonen zu finden. Um die RT-PCR durchzuführen, werden spezifische Primer für die gewünschte Botschaft benötigt, welche durch die Amplifikation des RNA-Produkts zu screenen ist. Primer, die entworfen wurden, um ein 521-Basenpaarprodukt für den Glukozerebrosidase-Test zu amplifizieren, sind:

GC PCR (F) Primer#1: 5'

TTT CTG GCT CCA GCC AAA GCC ACC CTA GGG GAG 3'

(SEQ.ID NR. 74)

GC PCR (R) Primer#2: 5'

AAT GGA GTA GCC AGG TGA GAT TGT CTC CAG GAA 3'

(SEQ.ID NR. 75)

[0533] Solche Klone, welche die höchste Expression und Titer zeigen, werden dann auf die Übertragung der Expression durch Infektion von BHK-2-Zellen, gefolgt durch Western Blot-Analyse und einem funktionellen Test der Glukozerebrosidase (GC)-Aktivität in den BHK-2-Zellen überprüft. Ein spezifischer monoklonaler Antikörper (8E4) gegen humanes GC wird für Western Blots verwendet (PNAS 89: 11332, 1992) und ist in Barneveld, R. A. et al. beschrieben (Eur. J. Biochem. 134: 310, 1983). Wenn der geeignete Klon identifiziert worden ist, werden Überstände aus den Wachstumskulturen verwendet zum Erhalt von Vektoren, filtriert durch einen 0,45 µC Filter, verwendet, um mit Tierversuchen durch direkte Injektion in die Tiere zu beginnen. Nachdem

die Tierversuche durchgeführt worden sind, können maßstabvergrößerte direkte Injektionsprotokolle, welche aus den Tierversuchen stammen, für die Behandlung von Menschen mit der Gaucher-Erkrankung verwendet werden. Alternative Verabreichungsprotokolle für diesen Vektor werden in dem folgenden Beispiel angegeben.

BEISPIEL 18

INHIBIERUNG DER PATHOGENITÄT DES HUMANEN PAPILLOMA-VIRUS DURCH SEQUENZSPEZIFISCHE VON SINDBIS-VIRUS-VEKTOREN EXPRIMIERTE ANTISENSE- ODER RIBOZYM-MOLEKÜLE

[0534] Bis zum heutigen Tag sind mehr als sechzig Typen von humanen Papilloma-Viren (HPV), welche einen betonten Tropismus für Zellen von epitheliale Ursprung aufweisen, isoliert und charakterisiert worden. Innerhalb der HPV-Gruppe gibt es eine beträchtliche Anzahl von Typen, welche den humanen Anogenitaltrakt infizieren. Diese Gruppe der HPVs kann ferner in Typen, welche mit einer gutartigen oder malignen Proliferation des Anogenitaltrakts verbunden sind, unterteilt werden.

[0535] In den Vereinigten Staaten gibt es pro Jahr zwischen 13000 und 20000 Gebärmutterhalskrebs-Tote. In Entwicklungsländern ist Gebärmutterhalskrebs die häufigste Tumorerkrankung und in entwickelten Ländern liegt der Gebärmutterhalskrebs hinter Brust-, Lungen-, Uterus- und Eierstock-Krebsarten. Eine Statistik, welche die Ansicht, daß anogenitale Proliferation ein wachsendes Gesundheitsproblem ist, besonders unterstützt, ist, daß medizinische Konsultationen für Genitalwarzen von 169000 im Jahr 1966 auf über 2 Millionen im Jahr 1988 angestiegen sind.

[0536] Es existieren mehrere Beweisführungen, welche HPV mit der Pathogenese einer zervikalen proliferativen Erkrankung verbinden. Eine bestimmte Untergruppe von Typen, die sogenannten „Niedrig-Risiko HPVs“, sind mit gutartigen proliferativen Zuständen des Gebärmutterhalses verbunden (beispielsweise HPV 6, 11, 43, 44), während eine andere Untergruppe von Typen, die „Hoch-Risiko HPVs“, mit Läsionen, welche zu einem malignen Zustand fortschreiten können, verbunden werden (beispielsweise HPV 16, 18, 31, 33, 35 und so weiter). Ungefähr 95% der Gebärmutterhalstumore enthalten HPV, wobei die DNA von HPV-Typ 16 oder 18 in etwa 70% von ihnen gefunden wird.

[0537] Die Häufigkeit von HPV in der jungen sexuell aktiven weiblichen Population scheint ziemlich hoch zu sein. Tatsächlich waren in einer kürzlich durchgeführten Studie von 454 College-Frauen 213 oder 46% HPV-positiv. Innerhalb der HPV-positiven Gruppe waren 3% HPV 6/11 positiv und 14% waren HPV 16/18 positiv. Von diesen 454 Frauen wiesen 33 (7,3%) eine durch Zytologie festgestellte, anormale zervikale Proliferation auf.

[0538] Hinsichtlich des Entwurfs von therapeutischen, auf HPV abzielenden antisense- und Ribozym-Mittel gibt es wichtige Parameter, die in Betracht gezogen werden müssen, bezüglich der HPV-Typen, auf die abgezielt wird (d. h. mit Condyloma acuminatum verknüpfte Typen oder mit maligner zervikaler Proliferation verknüpfte Typen) und den HPV-exprimierten Genen, auf die abgezielt wird, einschließlich aber nicht nur der HPV-Gene E2, E6 oder E7.

[0539] Im allgemeinen wird die Expression von HPV-Genen zeitlich in zwei Phasen definiert, die frühen (early, E)-Gene, die vor der viralen DNA-Replikation exprimiert werden, und die späten (late, L)-Gene, die nach der viralen DNA-Replikation exprimiert werden. Es gibt 7 frühe enzymatische HPV-Gene und 2 späte strukturelle HPV-Gene.

[0540] Auf der vorstehend vorgestellten Diskussion basierend können gegen die HPV-6/11-Gruppen gerichtete antisense/Ribozym-Therapeutika konstruiert werden, welche auf das virale E2-Gen abzielen. Es scheint möglich, daß das E2-Gen-Ziel bedenklich hinsichtlich der HPV 16/18-Gruppe sein kann durch einen Mechanismus des Vorantreibens der Integration des Virus durch eine Inhibierung der E2-Proteinexpression. Somit scheint es, daß auf die E6/E7-Gene in den HPV-Typen 16/18 direkt abgezielt werden soll.

[0541] Nachstehend ist die Konstruktion von antisense- und Ribozym-Therapeutika in Sindbis-Virusvektoren (beschrieben in Beispiel 2) spezifisch für HPV-Typ 16 E6- und E7-RNA beschrieben. Die Insertion von HPV-antisense und Ribozymeinheiten ist zwischen den Cla I- und Xba I-Stellen des Sindbis-Vektors.

A. KONSTRUKTION EINES HPV 16 E6/E7-ANTISENSE-THERAPEUTIKUMS

[0542] Der virale genomische HPV 16-Klon, pHPV-16 (ATCC Nummer 45113) wird als Matrize in einer PCR

für die Amplifikation der spezifischen Sequenzen der viralen E6/E7-Gene verwendet. Die HPV 16-antisense-Einheit wird zuerst in den Plasmidvektor pKSII⁺ eingefügt, das Entfernen des antisense-Therapeutikums von dem Plasmidvektor und die Insertion in verschiedene Sindbis-Vektoren-Rückgrate wird durch die einzigen Cla I- und Xba I-Restriktionsendonukleasestellen terminal von der antisense-Einheit durchgeführt. Die Amplifikation eines Teils des HPV-16 E6/E7-Gens wird durch das nachstehend gezeigte Primerpaar durchgeführt:

Vorwärtsprimer (Puffersequenz/Xba I-Stelle/HPV 16 Nukleotide 201–222)

TATATTCTAGAGCAAGCAACAGTTACTGCGACG (SEQ. ID NR. 76)

Rückwärtsprimer (Puffersequenz/Cla I-Stelle/HPV 16 Nukleotide 759–738)

TATATATCGATCCGAAGCGTAGAGTCACACTTG (SEQ. ID NR. 77)

[0543] Zusätzlich zu den HPV 16 E6/E7-komplementären Sequenzen enthalten beide Primer eine fünf Nukleotid-„Puffersequenz“ an ihren 5'-Enden für einen effizienten Enzymverdau der PCR-Amplikonprodukte. Das Erzeugen des HPV 16-Amplikons mit den vorstehend gezeigten Primern wird mit dem in Beispiel 4 beschriebenen PCR-Protokoll durchgeführt. Früher hat sich gezeigt, daß die E6/E7-mRNA in infizierten zervikalen Epithelien in drei Formen vorhanden ist, ungespleißt und in zwei Spleißformen (E6* und E6**), bei denen in einer die Nukleotide 226–525 von E6 in der gereiften Botschaft nicht vorhanden sind (Smotkin et al., J. Virol. 63: 1441–1447, 1989). Der komplementäre Abschnitt zwischen der hier beschriebenen antisense-Einheit und dem HPV 16-Genom sind die viralen Nukleotide 201–759. Somit wird die antisense-Einheit befähigt sein, an die ungespleißte E6/E7-Botschaft und die gespleißten E6*- und E6**-Botschaften zu binden und ihre Translation zu inhibieren.

[0544] Das HPV 16 E6/E7 580 bp-Amplikonprodukt wird zuerst mit Gene Clean (Bio 101, San Diego, CA) aufgereinigt, dann mit den Restriktionsenzymen Cla I und Xba I verdaut und der Elektrophorese in einem 1% Agarose/TBE-Gel unterworfen. Die 568 bp-Bande wird dann aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA mit Gene Clean aufgereinigt und in das pKSII⁺-Plasmid, das durch einen Verdau mit Cla I und Xba I, einer Behandlung mit CIAP und einer Behandlung mit Gene Clean hergestellt wurde, ligiert. Dieses Plasmid ist als pKSaHPV16E6/E7 bekannt.

B. KONSTRUKTION VON HPV 16 E6/E7 HAARNADEL-RIBOZYM-THERAPEUTIKA

[0545] Um die Expression von HPV 16 E6- und E7-Proteinen effizient zu inhibieren, wird ein Haarnadel-Ribozym (HRBZ) mit Zielspezifitäten zu E6-mRNA konstruiert. Die HPV 16-Ribozymeinheit wird zuerst in den Plasmidvektor pKSII⁺ eingebaut, das Entfernen des Ribozym-Therapeutikums von dem Plasmidvektor und die Insertion in verschiedene Sindbis-Vektor-Rückgrate wird durch einzige Cla I- und Xba I-Restriktionsendonukleasestellen terminal von der Ribozymeinheit durchgeführt.

[0546] Das HRBZ ist zu der nachstehend gezeigten HPV 16 E6-RNA (Nukleotide 414–431) homolog:

TTAACTGTCAAAGCCAC (SEQ. ID NR. 78)

[0547] Das HRBZ ist derart entworfen, daß es nach dem T-Rest in dem vorstehend unterstrichen gezeigten TCTC-Haarnadel-Ribozymschleife 5-Substratmotiv spaltet. Nach dem Splaten wird das HRBZ wieder verwendet und es ist befähigt, an eine weitere ungespleißte E6/E7-mRNA oder an das gespleißte E6*-mRNA-Molekül zu hybridisieren und zu spalten.

[0548] Doppelsträngiges HRBZ, wie es zuvor definiert wurde (Hampel et al., Nucleic Acids Research 18: 299–304, 1990), welches eine 4-Base-„Tetraschleife“-3 und eine erweiterte Helix 4, welche für die vorstehend gezeigte HPV 16 E6-RNA spezifisch ist, enthält, wird chemisch synthetisiert und enthält sowohl die 5'- als auch die 3'-Enden beziehungsweise die Cla I- und Xba I-Stellen. Die Sequenzen der chemisch synthetisierten HPV 16 E6-HRBZ-Stränge werden nachstehend gezeigt:

HPV 16 E6-HRBZ, oberer Strang (5' → 3')

5'-GATGTGGCTTTTAGATGTTAAACCAGAGAAACACACGGACTTCGGTCCGTGGT
 ATATTAGCTGGTAT-3'

(SEQ. ID NR. 79)

HPV 16 E6-HBRZ, unterer Strang (5' → 3')

5'-TAGATACCAGCTAATATACCACGGACCGAAGTCCGTGTGTTTCTCTGGTTTAA
 ATCTAAAAGCCACAT-3'

(SEQ. ID NR. 80)

[0549] Um das doppelsträngige HPV 16 E6-spezifische HRBZ mit Cla I- und Xba I-kohäsiven Enden zu bilden, werden gleiche Mengen der Oligonukleotide zusammen mit 10 mM Mg²⁺ gemischt, für 5 Minuten bei 95°C erwärmt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um den Strängen ein Binden zu ermöglichen.

[0550] Das doppelsträngige HPV 16 E6-HRBZ mit Cla I- und Xba I-kohäsiven Enden wird zuerst in den pK-SII⁺-Plasmidvektor, der durch den Verdau mit Cla I und Xba I, die Behandlung mit CIAP und die Behandlung mit Gene Clean hergestellt wurde, ligiert. Dieses Plasmid ist als pKSHPV16E6HRBZ bekannt.

[0551] Die HPV 16-antisense- und Haarnadel-Ribozymeinheiten werden aus ihren Plasmidvektoren, pKSaHPV16E6/E7 beziehungsweise pKSHPV16E6HRBZ, durch das Verdauen mit Cla I und Xba I, die Aufreinigung durch Agarose-Elektrophorese und Gene Clean und die Insertion in das gewünschte Vektor-Rückgrat, das durch den Verdau mit Cla I und Xba I und die Behandlung mit CIAP hergestellt wurde, freigesetzt. Mehrere mögliche Sindbis-Vektoren, von denen einige nachstehend gezeigt werden, und deren detaillierte Konstruktion in Beispiel 2 beschrieben wird, sind für die Insertion der therapeutischen HPV 16 antisense- und Ribozymeinheiten geeignet:

Vektor	Funktioneller Verbindungsabschnitt (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINBVdIJR	-
pKSSINdIJRsirc	+
pKSSINdIJRsirPC	+
pKSSINdIJRsirNP (7582-7601)	+
pKSSINdIJRsirsexj	+

[0552] Da das antisense- und Ribozym-Therapeutikum auf der Ebene der RNA arbeitet, ist es nicht notwendig, daß die Vektoren, welche diese Einheiten enthalten, einen funktionellen Verbindungsabschnitt enthalten. Das bedeutet, daß die Translation des den strukturellen Sindbis-Proteinen entsprechenden Abschnitts nur von subgenomischer RNA stattfindet. Da jedoch die Translation des antisense- und Haarnadel-Ribozym-Therapeutikums nicht der Fall ist, werden diese Einheiten ihren Effekt von der Ebene der positiv gerichteten genomischen Sindbis-Vektor-RNA ausführen.

[0553] Auf der anderen Seite kann es gewünscht werden, daß wiederholte Dosen an ein Individuum verabreicht werden, somit würde das antisense- und Haarnadel-Palliativum stromabwärts der Adenovirus E3- oder Humanen Cytomegalovirus H301-Gene, welche die Expression von MHC Klasse I-Molekülen in infizierten Zellen herunterregulieren, eingefügt werden. Die Insertion der antisense- und Haarnadel-Palliativa wird in den nachstehend gezeigten Vektoren der Beispiele 3 und 4 zwischen den Cla I- und Xba I-Stellen durchgeführt:

Vektor	Funktioneller Verbindungsabschnitt (+/-)
pKSSINdIJRsircAdE3	+
pKSSINdIJRsircH301	+

[0554] Subgenomische mRNA, welche als translationale Matrize für die Ad E3- und CMV H301-Gene dient, wird in diese Vektoren synthetisiert. Somit werden in diesen Konstruktionen funktionelle HPV 16-antisense- und Haarnadel-Ribozym-Palliativa auf den Ebenen sowohl der subgenomischen als auch der genomischen Positivstrang-Sindbis-Vektor-RNA vorliegen.

[0555] Weiterhin können die HPV 16-antisense- und Haarnadel-Ribozym-Palliativa stromabwärts von einem in die beschriebenen Sindbis-Vektoren eingefügten heterologen Gen eingefügt werden. Beispielsweise kann man die HPV 16-antisense- und Haarnadel-Ribozym-Palliativa stromabwärts eines heterologen Gens, das ein immunogenes Epitop des HPV 16 von beispielsweise den E6/E7- oder L1-Proteinen kodiert, einfügen. Es wäre unerwünscht, in diese Vektoren die immunoregulatorischen Ad E3- oder CMV H301-Gene einzuschließen.

[0556] Die Expression der E6/E7-Gene während der Infektion mit sowohl den Hoch- als auch Niedrig-Risiko HPV-Gruppen wird für die Proliferation des zervikalen Epithels benötigt. Das HPV E7-Protein von allen getesteten HPV-Typen bildet einen Komplex mit dem Retinoblastoma-Protein und das E6-Protein der HPV-Typen 16 und 18 assoziiert mit und degradiert das zelluläre p53-Protein. Die zellulären p53- und Retinoblastoma-Genprodukte sind in die Wachstumskontrolle der Zelle involviert und ein Verändern der Expression oder der Funktion dieser Proteine kann die Wachstumskontrolle der betroffenen Zellen ausschalten. Somit sollte ein therapeutisches antisense- oder Ribozym-Mittel gegen beide HPV-Gruppen entweder direkt oder letztendlich die Expression von einem oder von beiden dieser Gene verringern. Die Expression der E6/E7-Gene wird durch das virale E2-Protein transaktiviert. Jedoch kann das E2-Protein auch durch das Verwenden einer alternativen Spleiß-Strategie als ein Transrepressor handeln. Die Integration der onkogenen HPV-Typen tritt in dem viralen E2-Abschnitt auf und hebt die Expression des E2-Proteins auf. Die Integration durch die onkogenen HPV-Typen scheint ein zentrales Ereignis in der freien Induktion und/oder Erhaltung des Gebärmutterhals-Karzinoms zu sein. Dieses Ereignis resultiert in der konstitutiven Expression der E6/E7-Gene. Im integrierten Zustand wird die Expression der E6/E7-Gene durch in infizierten Keratinozyten vorliegende Faktoren transaktiviert. Die Inaktivierung des viralen E2/Kontrollmechanismus als Antwort auf die zelluläre Keratinozyten-Faktor-Aktivierung der E6/E7-Expression kann ein kritisches Ereignis in der viralen Integration sein.

[0557] Nachstehend ist die Konstruktion von antisense- und Ribozym-Therapeutika in für HPV Typ 16 E6- und E7-RNA spezifische Sindbis-Virus-Vektoren (beschrieben in Beispiel 2) beschrieben. Die Insertion der HPV-antisense-Ribozymeinheiten ist zwischen den Cla I- und Xba I-Stellen des Sindbis-Vektors.

C. KONSTRUKTION EINES HPV 16 E6/E7-ANTISENSE-THERAPEUTIKUMS

[0558] Der virale genomische HPV 16-Klon, pHPV-16 (ATCC Nummer 45113) wird als Matrize in einer PCR für die Amplifikation von spezifischen Sequenzen der viralen E6/E7-Gene verwendet. Die HPV 16-antisense-Einheit wird zuerst in den Plasmidvektor pKSII⁺ eingebaut, das Entfernen des antisense-Therapeutikums von dem Plasmidvektor und die Insertion in verschiedene Sindbis-Vektor-Rückgrate wird durch die einzigen Cla I- und Xba I-Restriktionsendonukleasestellen terminal von der antisense-Einheit durchgeführt. Die Amplifikation eines Teils der HPV 16 E6/E7-Gene wird mit dem nachstehenden Primerpaar durchgeführt:

HPV 16-Vorwärtsprimer (Puffersequenz/Xba I-Stelle/HPV 16-Nukleotide 201–222)

5'-TAT ATT CTA GAG CAA GCA ACA GTT ACT GCG ACG-3'

(SEQ. ID NR. 81)

HPV 16-Rückwärtsprimer (Puffersequenz/Cla I-Stelle/HPV 16-Nukleotide 759–738)

5'-TAT ATA TCG ATC CGA AGC GTA GAG TCA CAC TTG-3'

(SEQ. ID NR. 82)

[0559] Zusätzlich zu den HPV 16 E6/E7-komplementären Sequenzen enthalten beide Primer eine fünf Nukleotid-„Puffersequenz“ an ihren 5'-Enden für einen effizienten Enzymverdau der PCR-Amplikonprodukte. Das Erzeugen des HPV 16-Amplikons mit den vorstehenden Primern wird unter Verwendung des in Beispiel 4 beschriebenen PCR-Protokolls durchgeführt. Es ist bekannt, daß die E6/E7-mRNA in infizierten zervikalen Epithelien in drei Formen vorliegt, ungespleißt und als zwei Spleiß-Alternativen (E6* und E6**), in welchen die Nukleotide 226–525 von E6 nicht in der reifen Botschaft vorliegen (Smotkin et al., J. Virol. 63: 1441, 1989). Der komplementäre Abschnitt zwischen dem antisense und dem HPV 16-Genom sind die virale Nukleotide 201–759. Somit wird die antisense-Einheit befähigt sein, an die ungespleißte E6/E7-Botschaft und die gespleißte E6*- und E6**-Botschaften zu binden und ihre Translation zu verhindern.

[0560] Das HPV 16 E6/E7 580 bp-Amplikonprodukt wird zuerst mit Gene Clean (Bio 101, San Diego, CA) aufgereinigt, mit den Restriktionsenzymen Cla I und Xba I verdaut und mit einer 1% Agarose/TBE-Gelelektrophorese

rese isoliert. Die 568 bp-Bande wird dann aus dem Gel ausgeschnitten, mit Gene Clean™ aufgereinigt und in das pKSII⁺-Plasmid, das durch den Verdau mit Cla I und Xba I hergestellt wurde, mit CIAP behandelt und mit Gene Clean™ aufgereinigt wurde, ligiert. Dieses Plasmid wird als pKSaHPV16E6/E7 bezeichnet.

D. KONSTRUKTION VON HPV 16 E6/E7-HAARNADEL-RIBOZYM-THERAPEUTIKA

[0561] Um die Expression der HPV 16 E6- und E7-Proteine wirksam zu inhibieren, wird ein Haarnadel-Ribozym (HRBZ) mit vier Ziel-Spezifitäten zu E6-mRNA konstruiert. Die HPV 16-Ribozymeinheit wird zuerst in den Plasmidvektor pKSII⁺ eingefügt, das Entfernen des Ribozym-Therapeutikums aus dem Plasmidvektor und die Insertion in die verschiedenen Sindbis-Vektorrückgrade wird mittels der einzigen Cla I- und Xba I-Restriktionsendonukleasenstellen terminal der Ribozymeinheit durchgeführt.

[0562] Das HRBZ ist homolog zu der nachstehend gezeigten HPV 16 E6-RNA-Nukleotidsequenz 414–431:

5'-TTA ACT GTC AAA AGC CAC-3'

(SEQ. ID NR. 83)

[0563] Das HRBZ wurde so entworfen, daß es nach dem ersten T-Rest in dem vorstehend unterstrichen gezeigten TGTC-Haarnadel-Ribozymschleife 5-Substratmotiv spaltet. Nach dem Spalten wird das HRBZ wieder verwendet und ist befähigt, an eine weitere ungespleißte E6/E7-mRNA oder das gespleißte E6*-mRNA-Molekül zu hybridisieren und zu spalten.

[0564] Doppelsträngiges HRBZ (Hampel et al., Nucleic Acids Research 18: 299, 1990), das eine 4-Base-„Tetraschleife“-3 und eine erweiterte Helix 4 mit einer Spezifität für die vorstehend gezeigte HPV 16 E6-RNA enthält, wird chemisch synthetisiert und enthält Cla I- und Xba I-Stellen an den 5'- beziehungsweise 3'-Enden. Die Sequenz der chemisch synthetisierten HPV 16 E6-HRBZ-Stränge werden nachstehend gezeigt:

HPV 16 E6-HRBZ, sense-Strang

5'-CGA TGT GGC TTT TAG ATG TTA AAC CAG AGA AAC ACA CGG ACT TCG
GTC CGT GGT ATA TTA GCT GGT AT-3'

(SEQ. ID NR. 84)

HPV 16 E6-HBRZ, antisense-Strang

5'-CTA GAT ACC AGC TAA TAT ACC ACG GAC CGA AGT CCG TGT GTT TCT
CTG GTT TAA CAT CTA AAA GCC ACA T-3'

(SEQ. ID NR. 85)

[0565] Um das doppelsträngige HPV 16 E6-spezifische HRBZ mit Cla I- und Xba I-kohäsiven Enden zu bilden, werden gleiche Mengen der Oligonukleotide in 10 mM MgCl₂ gemischt, für 5 Minuten bei 95°C erwärmt und dann langsam auf Raumtemperatur abgekühlt, um den Strängen ein Binden zu ermöglichen.

[0566] Das doppelsträngige HPV 16 E6-HRBZ mit Cla I- und Xba I-kohäsiven Enden wird in den pKSII⁺-Plasmidvektor ligiert. Der pKSII⁺-Vektor wird zuerst mit Cla I und Xba I verdaut, mit CIAP behandelt und mit Gene Clean™ vor der Ligation aufgereinigt. Dieses Plasmid wird als pKSHPV16E6HRBZ bezeichnet.

[0567] Die HPV 16-antisense- und Haarnadel-Ribozymeinheiten werden aus ihren Plasmidvektoren, pKSaHPV16E6/E7 beziehungsweise pKSHPV16E6HRBZ, durch den Verdau mit Cla I und Xba I, die Isolation durch Gelelektrophorese freigesetzt und unter Verwendung von Gene Clean™ aufgereinigt. Sie werden dann in das gewünschte Vektor-Rückgrat ligiert. Das Vektor-Rückgrat wird durch den Verdau mit Cla I und Xba I hergestellt und mit CIAP behandelt. Mehrere mögliche Sindbis-Vektoren sind für die Insertion der therapeutischen HPV 16-antisense- und Ribozymeinheiten geeignet. Einige dieser Vektoren aus Beispiel 2 werden nachstehend gezeigt:

Vektor	Funktioneller Verbindungsabschnitt (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINBVdIJR	-
pKSNdIJRsirc	+
pKSNdIJRsirPC	+
pKSSINdIJRsirNP (7582-7601)	+
pKSSINdIJRssexjr	+

[0568] Da das antisense- und Ribozym-Therapeutikum auf RNA-Ebene wirkt, ist es nicht notwendig, daß die Vektoren, welche diese Einheiten enthalten, auch einen funktionellen Verbindungsabschnitt enthalten. Insbesondere findet die Translation des den strukturellen Sindbis-Proteinen entsprechenden Abschnitts nur von subgenomischer RNA statt. Da jedoch eine Translation des antisense- und Haarnadel-Ribozym-Therapeutikums nicht der Fall ist, werden diese Einheiten ihren Effekt von der Ebene der Positivstrang-Sindbis-Vektor-RNA ausführen.

[0569] Auf der anderen Seite kann es gewünscht werden, einem Individuum wiederholte Dosen zu verabreichen, somit würde das antisense- und Haarnadel-Palliativum stromabwärts der Adenovirus E3- oder Humanen Cytomegalovirus H301-Gene eingefügt werden. (E3 und H301 regulieren die Expression von MHC Klasse I-Molekülen in infizierten Zellen herunter.) Die Insertion der antisense- und Haarnadel-Palliativa wird in den Vektoren von Beispiel 3 und 4 zwischen den Cla I- und Xba I-Restriktionsstellen durchgeführt:

Vektor	Funktioneller Verbindungsabschnitt (+/-)
pKSSINdIJRsircAdE3	+
pKSSINdIJRsircH301	+

[0570] In diese Vektoren wird subgenomische RNA synthetisiert, welche als eine Translations-Matrize für die Ad E3- und CMV H301-Gene dient. Somit werden in diesen Konstruktionen funktionelle HPV 16 antisense- und Haarnadel-Ribozym-Palliativa auf den Ebenen sowohl der subgenomischen als auch der genomischen Positivstrang-Sindbis-Vektor-RNA vorliegen.

[0571] Weiterhin können die HPV 16 antisense- und Haarnadel-Ribozym-Palliativa stromabwärts von einem heterologen Gen, das in den beschriebenen Sindbis-Vektoren eingeschlossen ist, eingefügt werden. Beispielsweise können die HPV 16-antisense- und Haarnadel-Ribozym-Palliativa stromabwärts eines heterologen Gens, das ein immunogenes Epitop der HPV 16 E6/E7- oder L1-Proteine kodiert, eingefügt werden. Es wäre unerwünscht, in diese Vektoren die immunregulatorischen Ad E3- oder CMV H301-Gene einzuschließen.

BEISPIEL 19

INHIBIERUNG DER EXPRESSION VON HUMANEM INTERFERON A IN INFIZIERTEN ZELLEN DURCH SEQUENZSPEZIFISCHE VON SINDBIS-VIRUS-VEKTOREN EXPRIMIERTE RIBOZYM-MOLEKÜLE

[0572] Interferone (IFN) umfassen eine Familie von kleinen Proteinen, welche eine große Spanne von biologischen Aktivitäten in der Säugerzelle einschließlich der Expression von MHC-Antigenen, der Expression verschiedener, das Zellwachstum kontrollierender Gene und der Resistenz gegen virale Infektionen bewirken (Pestka et al., Ann. Rev. Biochem, 56: 727-777, 1987). Von den drei Klassen von IFN, α , β , und γ , ist IFN- α , oder Leukozyten-Interferon, für die Aktivität, welche die virale Replikation in der infizierten Zelle begrenzt, verantwortlich.

[0573] Die antiviralen Effekte von IFN- α sind mit der Induktion von zwei zellulären Enzymen, welche den viralen Lebenszyklus in der infizierten Zelle inhibieren, verbunden. Ein Enzym ist eine von doppelsträngiger RNA abhängige 68 kDa-Proteinkinase, welche die Phosphorylierung der α -Untereinheit des Proteins-Synthese-Initiationsfaktors eIF-2 katalysiert. Das zweite durch IFN- α induzierte Enzym ist eine 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase (2',5'-OAS), welche in der Anwesenheit von doppelsträngiger RNA die latente Endonuklease, RNase L, welche für die Degradation von viralen und zellulären RNAs verantwortlich ist, aktiviert (Johnston und Torrence, Interferons 3: 189-298, Friedman (Hrsg.), Elsevier Science Publishers, B. V., Amsterdam, 1984).

[0574] Da ihre Replikationsstrategie eine doppelsträngige RNA-Zwischenform einschließt, sind RNA-Viren insbesondere starke Induktoren für Interferon. Bezüglich des Sindbis-Virus sind doppelsträngige RNA-Moleküle während der Replikation sowohl der positiv- wie auch negativ-strängigen Genom-langen Moleküle und während der Transkription der subgenomischen mRNA anwesend. Es wurde gezeigt, daß eine Infektion der Zellen

mit Sindbis-Virus in der Induktion von Interferon resultiert (Salto, J. Interferon Res. 9: 23–24, 1989).

[0575] In Anwendungen, in denen eine ausgedehnte Expression des therapeutischen Palliativums gewünscht wird, wird die Expression von IFN in der infizierten Zelle durch den Einschluss eines Haarnadel-Ribozyms mit einer Spezifität für IFN- α -mRNA in den Sindbis-Vektor inhibiert. Die Inhibierung der IFN- α -Expression schwächt somit die Induktion der Kaskade von zellulären Proteinen einschließlich der eIF-2-Proteinkinase und der 2',5'-OAS ab, welche bis zu dem Grad inhibieren, bei dem das Virus in der infizierten Zelle replizieren kann. In allen Anwendungen außer der Antigenpräsentation wird eine verlängerte Expression des therapeutischen Palliativums ohne die Induktion einer gegen die mit dem Vektor infizierte Zelle gerichteten Immunantwort gewünscht und schließt beispielsweise eine systemische Proteinherstellung, antisense und Ribozym und zusätzliche Moleküle ein.

A. KONSTRUKTION EINES HAARNADEL-RIBOZYMS MIT EINER GEZIELTEN SPEZIFITÄT FÜR INTERFERON A-mRNA

[0576] Um die Expression des Interferon A-Proteins in mit Sindbis-Vektoren infizierten Zellen wirksam zu inhibieren, wird ein Haarnadel-Ribozym (HRBZ) mit einer Zielspezifität für Interferon A-mRNA konstruiert. Die IFN- α -Ribozymeinheit wird zuerst in den Plasmidvektor pKSII⁺ (Stratagene, La Jolla, CA) eingefügt, das Entfernen des Ribozym-Therapeutikums von dem Plasmidvektor und die Insertion in verschiedene Sindbis-Vektor-Rückgrate wird mittels den einzigen Cla I- und Xba I-Restriktionsendonukleasestellen terminal von der Ribozymeinheit durchgeführt.

[0577] Das HRBZ ist zu den Nukleotiden 1026–1041 des nachstehend gezeigten Interferon-alpha-Gens IFN-alpha-4b und zu allen sequenzierten IFN- α -Genen einschließlich 5, 6, 7, 8 und 14, aber nicht Gen 16, homolog (Henco et al., J. Mol. Biol. 185: 227–260, 1985):

TCT CTG TCC TCC ATG A (SEQ. ID NR. 86)

[0578] Das HRBZ wurde so entworfen, daß es nach dem T-Rest in dem vorstehend unterstrichenen TGTC-Haarnadel-Ribozymschleife 5-Substratmotivs spaltet. Nach dem Spalten wird das HRBZ wieder verwendet und ist befähigt, an ein weiteres IFN- α -mRNA-Molekül zu hybridisieren und zu spalten.

[0579] Doppelsträngiges HRBZ, wie früher definiert (Hampel et al., Nucleic Acids Research 18: 299–304, 1990), das eine 4-Base-Tetraschleife-3 und eine erweiterte Helix 4 mit einer Spezifität für die vorstehend gezeigte IFN- α -mRNA enthält, wird chemisch synthetisiert und enthält an den 5'- beziehungsweise 3'-Enden Cla I- und Xba I-Stellen. Die Sequenz der chemisch synthetisierten IFN- α -HRBZ-Stränge wird nachstehend gezeigt:

IFN- α -HRBZ, sense-Strang (5' nach 3')

TCG AGT CAT GGA GAG AGG AGA ACC AGA GAA ACA CAC GGA CTT
CGG TCC GTG GTA TAT TAC CTG GAT
(SEQ. ID NR. 87)

IFN- α -HBRZ, antisense-Strang (5' nach 3')

CGA TCC AGG TAA TAT ACC ACG GAC CGA AGT CCG TGT GTT TCT
CTG GTT CTC CTC TCT CCA TGA C
(SEQ. ID NR. 88)

[0580] Um das doppelsträngige IFN- α -spezifische HRBZ mit Cla I- oder Xba I-kohäsiven Enden zu bilden, werden gleiche Mengen der Oligonukleotide zusammen in 10 mM Mg²⁺ gemischt, 5 Minuten bei 95°C erwärmt und dann langsam auf Raumtemperatur gekühlt, um den Strängen ein Binden zu ermöglichen.

[0581] Das doppelsträngige IFN- α -HRBZ mit Cla I- und Xba I-kohäsiven Enden wird zuerst in den pKSII⁺-Plasmidvektor, der durch den Verdau mit Cla I und Xba I, das Behandeln mit CIAP und das Behandeln mit Gene Clean hergestellt wurde, ligiert. Dieses Plasmid ist als pKSIFNaHRBZ bekannt.

[0582] Die IFN-a-Haarnadel-Ribozymeinheit wird aus dem pKSIFNaHRBZ-Plasmid durch Verdau mit Cla I und Xba I, Aufreinigung durch eine 2% Nu-Sieve/1% Agarose-Gel-Elektrophorese und Gene Clean und durch eine Insertion in das gewünschte Vektor-Rückgrat, das durch einen Verdau mit Cla I und Xba I und durch eine Behandlung mit CIAP hergestellt wurde, freigesetzt. Mehrere mögliche Sindbis-Vektoren, von denen einige nachstehend gezeigt werden, und deren detaillierte Konstruktion in den Beispielen 2, 3 und 4 beschrieben wird, sind für die Insertion der IFN-a-Haarnadel-Ribozymeinheit geeignet:

Vektor	Funktioneller Verbindungsabschnitt (+/-)
pKSSINBV	+
pKSSINBVdIJR	-
pKSSINdIJRsirc	+
pKSSINdIJRsirPC	+
pKSSINdIJRsirNP (7582-7601)	+
pKSSINdIJRsirxj	+
pKSSINdIJRsircAdE3	+
pKSSINdIJRsircH301	+

[0583] Da die Ribozymaktivität auf der Ebene der RNA wirkt, ist es nicht notwendig, daß dieser Abschnitt als eine teilweise subgenomische mRNA exprimiert wird. Jedoch ist der Grad von synthetisiertem Ribozym wesentlich größer und vielleicht wirksamer im Spalten des IFN-a-RNA-Ziels, wenn es stromabwärts von der funktionellen Verbindungsabschnitt angeordnet wird.

[0584] Weiterhin wird für manche Anwendungen, beispielsweise systemische Expression von Protein, die Verabreichung mehrerer Dosen an ein Individuum benötigt. In diesen Anwendungen wird eine verlängerte Expression des therapeutischen Palliativums ohne eine Induktion einer gegen die Vektor-infizierte Zelle gerichteten Immunantwort erwünscht. In dieser Konfiguration kann die IFN-a-HRBZ-Einheit stromaufwärts von den Adenovirus E3- oder Humanen Cytomegalovirus H301-Genen, welche die Expression von MHC Klasse I-Molekülen in infizierten Zellen herunterregulieren, eingefügt werden. Dem Gen, welches die MHC Klasse I-Expression moduliert, folgt konsekutiv ein aus der in Beispiel 5 beschriebenen Gruppe ausgewähltes IRES-Element und das therapeutische Palliativum. Ein geordnetes Einfügen der Komponenten des Haarnadel-Ribozyms, des Ad E3 oder CMV H301, der IRES und des heterologen Gens des Interesses zusammen mit der multiplen Klonierungssequenz, welche in dem Vektor zwischen dem Vektor-Verbindungsabschnitt und dem 3'-Ende liegt, wird durch die Modifizierung mit den geeigneten Restriktionsenzym-Erkennungsstellen der 5'- und 3'-Enden der Komponente durchgeführt. In diesen Konstruktionen werden funktionelle IFN-a-Haarnadel-Ribozym-Palliativa auf der Ebene sowohl der subgenomischen als auch der positiv-strängigen genomischen Sindbis-Vektor-RNA vorliegen.

BEISPIEL 20

LACTOSEFORMULIERUNG EINES REKOMBINANTEN ALPHAVIRUS-VEKTORS

[0585] Rohrer rekombinanter Alphavirus-Vektor wird aus dem Celligan Bioreaktor (New Brunswick, NJ) erhalten, welcher Verpackungszellen enthält, welche mit dem rekombinanten Alphavirus transfiziert oder transduziert sind, und an die Kügelchen der Bioreaktormatrix gebunden sind. Diese Zellen setzen den rekombinanten Alphavirus-Vektor in das Wachstumsmedium, das über die Zellen in einem kontinuierlichen Flußprozeß fließt, frei. Das Medium, welches den Bioreaktor verläßt, wird gesammelt und zuerst durch einen 0,8 micron Filter, dann durch einen 0,65 micron Filter durchgeleitet, um den rohen, rekombinanten Alphavirus-Vektor zu reinigen. Das Filtrat wird unter Verwendung eines Kreuzfluß-Konzentrierungssystems (Filtron, Boston, MA) konzentriert. Etwa 50 Einheiten DNase (Intergen, New York, NY) pro ml Konzentrat werden hinzugefügt, um die exogene DNA zu verdauen. Der Verdau wird unter Verwendung des gleichen Kreuzflußsystems auf 150 mM NaCl, 25 mM Tromethamin, pH-Wert 7,4 diafiltriert. Das Diafiltrat wird auf eine Sephadex S-500-Gelsäule (Pharmacia, Piscataway, NJ) geladen, welche mit 50 mM NaCl, 25 mM Tromethamin, pH-Wert 7,4 equilibriert ist. Der gereinigte rekombinante Alphavirus-Vektor wird von der Sephadex S-500-Gelsäule mit 50 mM NaCl, 25 mM Tromethamin, pH-Wert 7,4 eluiert.

[0586] Der Formulierungspuffer, welcher Lactose enthält, wird als eine 2X-konzentrierte Stammlösung hergestellt. Der Formulierungspuffer enthält 25 mM Tromethamin, 70 mM NaCl, 2 mg/ml Arginin, 10 mg/ml humanes Serumalbumin (HSA) und 10 mg/ml Lactose in einem Endvolumen von 100 ml bei einem pH von 7,4.

[0587] Der gereinigte rekombinante Alphavirus-Vektor wird durch Zugabe eines Teils 2X-Laktoseformulie-

rungspuffers zu einem Teil S-500 gereinigten rekombinanten Alphavirus-Vektor formuliert. Der formulierte rekombinante Alphavirus-Vektor kann bei -70°C bis -80°C gelagert oder getrocknet werden.

[0588] Der formulierte Alphavirus-Vektor wird in einer Edwards Gefrierkammer (3 Shelf RC3S Unit), verbunden mit einem Supermodulyo 12K Gefriertrockner (Edwards High Vacuum, Tonawanda, NY) gefriergetrocknet. Wenn der Gefriertrocknungszyklus vollständig ist, werden die Gefäße unter einem Vakuum, gefolgt von einem schwachen Stickstoffgasfluß, verschlossen. Nach dem Entfernen werden die Gefäße mit Aluminiumsiegeln umfalzt. Das lyophilisierte rekombinante Retrovirus wird mit 1,0 ml Wasser rekonstituiert.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) Allgemeine Information:

(i) Anmelder:

Name: Viagene, Inc.
Straße: 11055 Roselle Street
Stadt: San Diego, Kalifornien
Land: US
Postleitzahl: 92121
Telefon: (619) 452-1288

(ii) Titel der Erfindung: Rekombinante Alphavirus-Vektoren

(iii) Zahl der Sequenzen: 89

(iv) Korrespondenzadresse:

(A) Adressat: Seed und Berry
(B) Straße: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue
(C) Stadt: Seattle
(D) Staat: Washington
(E) Land: US
(F) Postleitzahl: 98104-7092

(v) Computerlesbare Form:

(A) Mediumtyp: Floppy Disk
(B) Computer: IBM PC-kompatibel
(C) Betriebssystem: PC-DOS/MS-DOS
(D) Software: PatentIn Release # 1.0, Version #1.25

(vi) Gegenwärtige Anmeldungsdaten:

(A) Anmeldernummer:
(B) Anmeldetag:

(C) Klassifizierung:

(viii) Anwalt/Vertreterinformation:

(A) Name: McMasters, David D.

(B) Registrierungsnummer: 33.963

(C) Registrierungs-/Verzeichnisnummer: 930049.423PC

(ix) Telekommunikationsinformation:

(A) Telefon: (206) 622-4900

(B) Telefax: (206) 682-6031

(C) Telex: 3723836 Seedanberry

(2) Information für SEQ ID Nr. 1:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 24 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 1:

ATCTCTACGG TGGTCCTAAA TAGT

24

(2) Information für SEQ ID Nr. 2:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 42 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.2:
TATATTCTAG ATTTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTTTTGAAA TG 42
- (2) Information für SEQ ID Nr. 3:
- (i) Sequenzeigenschaften
(A) Länge: 48 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strangform: einzeln
(D) Topologie: linear
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr.3:
TATATGGGCC CGATTTAGGT GACACTATAG ATTGACGGCG TAGTACAC 48
- (2) Information für SEQ ID Nr.4:
- (i) Sequenzeigenschaften
(A) Länge: 23 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure
(C) Strangform: einzeln
(D) Topologie: linear
- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 4 :
CTGGCAACCG GTAAGTACGA TAC 23
- (2) Information für SEQ ID Nr. 5:
- (i) Sequenzeigenschaften
(A) Länge: 21 Basenpaare
(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 5:

ATACTAGCCA CGGCCGGTAT C

21

(2) Information für SEQ ID Nr. 6:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 21 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 6:

TCCTCTTTCG ACGTGTCGAG C

21

(2) Information für SEQ ID Nr. 7:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 21 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 7:

ACCTTGGAGC GCAATGTCCT G

21

(2) Information für SEQ ID Nr. 8:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 21 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 8:

CCTTTTCAGG GGATCCGCCA C

21

(2) Information für SEQ ID Nr. 9:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 21 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 9:

GTGGCGGATC CCCTGAAAAG G

21

(2) Information für SEQ ID Nr. 10:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 19 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 10:

TGGGCCGTGT GGTCGCATG

19

(2) Information für SEQ ID Nr. 11:

- (i) Sequenzeigenschaften
 - (A) Länge: 21 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strangform: einzeln
 - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 11:

TGGGTCTTCA ACTCACCGGA C

21

(2) Information für SEQ ID Nr. 12:

- (i) Sequenzeigenschaften
 - (A) Länge: 22 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strangform: einzeln
 - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 12:

CAATTCGACG TACGCCTCAC TC

22

(2) Information für SEQ ID Nr. 13:

- (i) Sequenzeigenschaften
 - (A) Länge: 22 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strangform: einzeln
 - (D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 13:

GAGTGAGGCG TACGTCGAAT TG

22

(2) Information für SEQ ID Nr. 14:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 35 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 14:

TATATCTCCA GATGAGGTAC ATGATTTTAG GCTTG

35

(2) Information für SEQ ID Nr. 15:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 40 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 15:

TATATATCGA TTCAAGGCAT TTTCTTTTCA TCAATAAAAC

40

(2) Information für SEQ ID Nr. 16:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 35 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 16:

TATATCTCCA GATGATGACA ATGTGGTGTC TGACG

35

(2) Information für SEQ ID Nr. 17:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 32 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 17:

TATATATCGA TTCATGACGA CCGGACCTTG CG

32

(2) Information für SEQ ID Nr. 18:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 28 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 18:

TATATGGGCC CCCCCCCCCC CCCCACG

28

(2) Information für SEQ ID Nr. 19:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 30 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 19:

TATATATCGA TCCCCCCCCC CCCCCAACG

30

(2) Information für SEQ ID Nr. 20:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 20:

TATATCCATG GCTTACAATC GTGGTTTCA AAGG

34

(2) Information für SEQ ID Nr. 21:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 21:

TATATGGGCC CTCGATGAGT CTGGACGTTC CTC

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 22:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 22:

TATATATCGA TTCGATGAGT CTGGACGTTC CTC

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 23:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 37 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 23:

TATATCCATG GATCCAATTT GCTTTATGAT AACCAATC

37

(2) Information für SEQ ID Nr. 24:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 30 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 24:

TATATGGGCC CGGTCGACGC CGGCCAAGAC

30

(2) Information für SEQ ID Nr. 25:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 30 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 25:

TATATATCGA TGGTCGACGC CGGCCAAGAC

30

(2) Information für SEQ ID Nr. 26:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 32 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 26:

TATATCCATG GTGCCAGCCA GTTGGGCAGC AG 32

(2) Information für SEQ ID Nr. 27:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 23 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 27:

TTAATTAACG GCCGCCACCA TGG 23

(2) Information für SEQ ID Nr. 28:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 13 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 28:

TAACGGCCGC CAC 13

(2) Information für SEQ ID Nr. 29:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 20 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 29:

CCATGGTGGC GGCCGTTAAT

20

(2) Information für SEQ ID Nr. 30:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 12 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 30:

GTCACCGGTG AC

12

(2) Information für SEQ ID Nr. 31:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 25 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 31:

CTCATCGATC AGATCTGACT AGTTG

25

(2) Information für SEQ ID Nr. 32:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 32:

GATCCAACATA GTCAGATCTG ATCGATGAGG GCC

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 33:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 56 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 33:

ACTTATCGAT GGTCTAGAC TCCCTTAGCC ATCCGAGTGG ACGTGCGTCC TCCTTC

56

(2) Information für SEQ ID Nr. 34:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: **52** Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 34:

TCCACCTCCT CGCGGTCCGA CCTGGGCATC CGAAGGAGGA CGCACGTCCA CT

52

(2) Information für SEQ ID Nr. 35:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 57 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 35:

TCGGACCGCG AGGAGGTGGA GATGCCATGC CGACCCATTG ACGGCGTAGT ACACACT 57

(2) Information für SEQ ID Nr. 36:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 36 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 36:

CTGGACTAGT TAATACTGGT GCTCGGAAAA CATTCT 36

(2) Information für SEQ ID Nr. 37:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 40 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 37:

GTCAAGCTTG CTAGCTACAA CACCACCACC ATGAATAGAG 40

(2) Information für SEQ ID Nr. 38:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 47 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 38:

TATATGCGGC CGCACCACTA CCATGAATAG AGGATTCTTT AACATGC

47

(2) Information für SEQ ID Nr. 39:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 39:

TATATGCGGC CGCTCATCTT CGTGTGCTAG TCAG

34

(2) Information für SEQ ID Nr. 40:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 61 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 40:

TATATGCGGC CGCATCTCTA CGGTGGTCCT AAATAGTACC ACCACCATGA ATAGAGGATT

60

C

61

(2) Information für SEQ ID Nr. 41:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 40 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 41:

CAGTCTCGAG TTACTACCAC TCTTCTGTCC CTTCGGGGT

40

(2) Information für SEQ ID Nr. 42:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 43 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 42:

TATATGCGGC CGCACCACCA TGTCCGCAGC ACCACTGGTC ACG

43

(2) Information für SEQ ID Nr. 43:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 43:

TATATAGATC TCTTGATCAG CTTCAGAAGA TGGC

34

(2) Information für SEQ ID Nr. 44:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 24 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 44:

TCAATGGCGG GAAGAGGCGG TTGG

24

(2) Information für SEQ ID Nr. 45:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 31 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 45:

CCGCCTCTTC CCGCCATTGA CGGCGTAGTA C

31

(2) Information für SEQ ID Nr. 46:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 23 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 46:

CTGGCAACCG GTAAGTACGA TAC

23

(2) Information für SEQ ID Nr. 47:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 47:

TATATAGATC TCTTGATCAG CTTCAGAAGA TGGC

34

(2) Information für SEQ ID Nr. 48:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 22 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 48:

GGTAACAAGA TCTCGTGCCG TG

22

(2) Information für SEQ ID Nr. 49:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 40 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 49:

TATATGCGGC CGCACCGCCA AGATGTTCCC GTTCCAGCCA

40

(2) Information für SEQ ID Nr. 50:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 50:

TATATGCGGC CGCTCAATTA TGTTTCTGGT TGGT

34

(2) Information für SEQ ID Nr. 51:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 35 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 51:

CTCGAGCTCG AGGCACCAGC ACCATGCAAC TTTT

35

(2) Information für SEQ ID Nr. 52:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 29 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 52:

CTACTAGATC CCTAGATGCT GGATCTTCC

29

(2) Information für SEQ ID Nr. 53:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 29 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 53:

GGAAGATCCA GCATCTAGGG ATCTAGTAG

29

(2) Information für SEQ ID Nr. 54:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 26 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 54:

GGGCGATATC AAGCTTATCG ATACCG

26

(2) Information für SEQ ID Nr. 55:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 35 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 55:

CTCGAGCTCG AGGCACCAGC ACCATGCAAC TTTT

35

(2) Information für SEQ ID Nr. 56:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 26 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 56:

GGGCGATATC AAGCTTATCG ATACCG

26

(2) Information für SEQ ID Nr. 57:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 19 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 57:

AATACGACTC ACTATAGGG

19

(2) Information für SEQ ID Nr. 58:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 29 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 58:

CTACTAGATC CCTAGATGCT GGATCTTCC

29

(2) Information für SEQ ID Nr. 59:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 17 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 59:

ATTAACCCTC ACTAAAG

17

(2) Information für SEQ ID Nr. 60:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 29 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 60:

GGAAGATCCA GCATCTAGGG ATCTAGTAG

29

(2) Information für SEQ ID Nr. 61:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 17 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 61:

ATTAACCCTC ACTAAAG

17

(2) Information für SEQ ID Nr. 62:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 19 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 62:

AATACGACTC ACTATAGGG

19

(2) Information für SEQ ID Nr. 63:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 34 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 63:

CCTCGAGCTC GAGCTTGGGT GGCTTTGGGG CATG

34

(2) Information für SEQ ID Nr. 64:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 17 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 64:

ATTACCCCTC ACTAAAG

17

(2) Information für SEQ ID Nr. 65:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 52 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 65:

TCCACCTCCT CGCGGTCCGA CCTGGGCATC CGAAGGAGGA CGCACGTCCA CT 52

(2) Information für SEQ ID Nr. 66 :

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 56 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 66:

ACTTATCGAT GGTCTAGAC TCCCTTAGCC ATCCGAGTGG ACGTGCGTCC TCCTTC 56

(2) Information für SEQ ID Nr. 67:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 57 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 67:

TCGGACCGCG AGGAGGTGGA GATGCCATGC CGACCCATTG ACGGCGTAGT ACACACT 57

(2) Information für SEQ ID Nr. 68:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 36 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 68:

CTGGACTAGT TAATACTGGT GCTCGGAAAA CATTCT

36

(2) Information für SEQ ID Nr. 69:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 69:

TTTCTGGCTC CAGCCAAAGC CACCCTAGGG GAG

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 70:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 70:

AATGGAGTAG CCAGGTGAGA TTGTCTCCAG GAA

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 71:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 44 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 71:

CGCGCGGGCC CTGTGACATT GAATAGAGTG AGGGTCCTGT TGGG

44

(2) Information für SEQ ID Nr. 72:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 45 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 72:

AAAGGTTTCA CATTTGTAGC TTGCTGTGTC ATTGCGATCT CTACG

45

(2) Information für SEQ ID Nr. 73:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 45 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 73:

GTGGTCCTAA ATAGTTCACT CTATTCAATG TCACACTCGA GCCGG

45

(2) Information für SEQ ID Nr. 74:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 74:

TTTCTGGCTC CAGCCAAAGC CACCCTAGGG GAG

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 75:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 75:

AATGGAGTAG CCAGGTGAGA TTGTCTCCAG GAA

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 76:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 76:

TATATTCTAG AGCAAGCAAC AGTTACTGCG ACG

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 77:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 77:

TATATATCGA TCCGAAGCGT AGAGTCACAC TTG

33

(2) Information für SEQ ID Nr. 78:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 18 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 78:

TTAACTGTCA AAAGCCAC

18

(2) Information für SEQ ID Nr. 79:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 68 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 79:

CGATGTGGCT TTTAGATGTT AAACCAGAGA AACACACGGA CTCGGTCCG TGGTATATTA 60

GCTGGTAT 68

(2) Information für SEQ ID Nr. 80:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 70 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 80:

CTAGATACCA GCTAATATAC CACGGACCGA AGTCCGTGTG TTTCTCTGGT TTAACATCTA 60

AAAGCCACAT 70

(2) Information für SEQ ID Nr. 81:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 81:

TATATTCTAG AGCAAGCAAC AGTTACTGCG ACG 33

(2) Information für SEQ ID Nr. 82:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 33 Basenpaare

- (B) Typ: Nukleinsäure
- (C) Strangform: einzeln
- (D) Topologie: linear

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 82:
TATATATCGA TCCGAAGCGT AGAGTCACAC TTG

33

- (2) Information für SEQ ID Nr. 83:

- (i) Sequenzeigenschaften
 - (A) Länge: 18 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strangform: einzeln
 - (D) Topologie: linear

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 83:
TTAACTGTCA AAAGCCAC

18

- (2) Information für SEQ ID Nr. 84:

- (i) Sequenzeigenschaften
 - (A) Länge: 68 Basenpaare
 - (B) Typ: Nukleinsäure
 - (C) Strangform: einzeln
 - (D) Topologie: linear

- (xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 84:

CGATGTGGCT TTTAGATGTT AAACCAGAGA AACACACGGA CTTCGGTCCG TGGTATATTA 60

GCTGGTAT 68

(2) Information für SEQ ID Nr. 85:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 70 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 85:

CTAGATACCA GCTAATATAC CACGGACCGA AGTCCGTGTG TTTCTCTGGT TTAACATCTA 60

AAAGCCACAT 70

(2) Information für SEQ ID Nr. 86:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 16 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 86:

TCTCTGTCCT CCATGA 16

(2) Information für SEQ ID Nr. 87:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 66 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 87:

TCGAGTCATG GAGAGAGGAG AACCAGAGAA ACACACGGAC TTCGGTCCGT GGTATATTAC 60

CTGGAT 66

(2) Information für SEQ ID Nr. 88:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 64 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 88:

CGATCCAGGT AATATACCAC GGACCGAAGT CCGTGTGTTT CTCTGGTTCT CCTCTCTCCA 60

TGAC 64

(2) Information für SEQ ID Nr. 89:

(i) Sequenzeigenschaften

(A) Länge: 16656 Basenpaare

(B) Typ: Nukleinsäure

(C) Strangform: einzeln

(D) Topologie: linear

(xi) Sequenzbeschreibung: SEQ ID Nr. 89:

2

ATTGACGGCG TAGTACACAC TATTGAATCA AACAGCCGAC CAATCGCACT ACCATCACAA	60
TGGAGAAGCC AGTAGTAAAC GTAGACGTAG ACCCCCAGAG TCCGTTTGTC GTGCAACTGC	120
AAAAAAGCTT CCCGCAATTT GAGGTAGTAG CACAGCAGGT CACTCCAAAT GACCATGCTA	180
ATGCCAGAGC ATTTTCGCAT CTGGCCAGTA AACTAATCGA GCTGGAGGTT CCTACCACAG	240
CGACGATCTT GGACATAGGC AGCGCACCGG CTCGTAGAAT GTTTTCCGAG CACCAGTATC	300
ATTGTGTCTG CCCCATGCGT AGTCCAGAAG ACCCGGACCG CATGATGAAA TATGCCAGTA	360
AACTGGCGGA AAAAGCGTGC AAGATTACAA ACAAGAACTT GCATGAGAAG ATTAAGGATC	420
TCCGGACCGT ACTTGATACG CCGGATGCTG AAACACCATC GCTCTGCTTT CACAACGATG	480
TTACCTGCAA CATGCGTGCC GAATATTCCG TCATGCAGGA CGTGTATATC AACGCTCCCG	540
GAACCTATCTA TCATCAGGCT ATGAAAGGCG TCGGACCCT GTACTGGATT GGCTTCGACA	600
CCACCCAGTT CATGTTCTCG GCTATGGCAG GTTCGTACCC TCGGTACAAC ACCAACTGGG	660
CCGACGAGAA AGTCCTTGAA GCGCGTAACA TCGGACTTTG CAGCACAAAG CTGAGTGAAG	720
GTAGGACAGG AAAATTGTCG ATAATGAGGA AGAAGGAGTT GAAGCCCGGG TCGCGGGTTT	780

ATTTCTCCGT AGGATCGACA CTTTATCCAG AACACAGAGC CAGCTTGCAg AGCTGGCATC	840
TTCCATCGGT GTTCCAATTG AATGGAAAGC AGTCGTACAC TTGCCGCTGT GATACAGTGG	900
TGAGTTGCGA AGGCTACGTA GTGAAGAAAA TCACCATCAG TCCCGGGATC ACGGGAGAAA	960
CCGTGGGATA CGCGGTTACA CACAATAGCG AGGGCTTCTT GCTATGCAAA GTTACTGACA	1020
CAGTAAAAGG AGAACGGGTA TCGTTCCCTG TGTGCACGTA CATCCCGGCC ACCATATGCG	1080
ATCAGATGAC TGGTCTAATG GCCACGGATA TATCACCTGA CGATGCACAA AAACCTTCTGG	1140
TTGGGCTCAA CCAGCGAATT GTCATTAACG GTAGGACTAA CAGGAACACC AACACCATGC	1200
AAAATTACCT TCTGCCGATC ATAGCACAAG GGTTCAGCAA ATGGGCTAAG GAGCGCAAGG	1260
ATGATCTTGA TAACGAGAAA ATGCTGGGTA CTAGAGAACG CAAGCTTACG TATGGCTGCT	1320
TGTGGGCGTT TCGCACTAAG AAAGTACATT CGTTTTATCG CCCACCTGGA ACGCAGACCT	1380
GCGTAAAAGT CCCAGCCTCT TTTAGCGCTT TCCCATGTC GTCCGTATGG ACGACCTCTT	1440
TGCCCATGTC GCTGAGGCAG AAATTGAAAC TGGCATTGCA ACCAAAGAAG GAGGAAAAAC	1500
TGCTGCAGGT CTCGGAGGAA TTAGTCATGG AGGCCAAGGC TGCTTTTGAG GATGCTCAGG	1560
AGGAAGCCAG AGCGGAGAAG CTCCGAGAAG CACTTCCACC ATTAGTGGCA GACAAAGGCA	1620
TCGAGGCAGC CGCAGAAGTT GTCTGCGAAG TGGAGGGGCT CCAGGCGGAC ATCGGAGCAG	1680
CATTAGTTGA AACCCCGCGC GGTCACGTAA GGATAATACC TCAAGCAAAT GACCGTATGA	1740
TCGGACAGTA TATCGTTGTC TCGCCAAACT CTGTGCTGAA GAATGCCAAA CTCGCACCAG	1800
CGCACCCGCT AGCAGATCAG GTTAAGATCA TAACACACTC CGGAAGATCA GGAAGGTACG	1860
CGGTCTGAACC ATACGACGCT AAAGTACTGA TGCCAGCAGG AGGTGCCGTA CCATGGCCAG	1920

AATTCCTAGC ACTGAGTGAG AGCGCCACGT TAGTGACAA CGAAAGAGAG TTTGTGAACC	1980
GCAAACATA CCACATTGCC ATGCATGGCC CCGCCAAGAA TACAGAAGAG GGGCAGTACA	2040
AGGTTACAAA GGCAGAGCTT GCAGAAACAG AGTACGTGTT TGACGTGGAC AAGAAGCGTT	2100
GCGTTAAGAA GGAAGAAGCC TCAGGTCTGG TCCTCTCGGG AGAACTGACC AACCTCCCT	2160
ATCATGAGCT AGCTCTGGAG GGAAGAAGCC TCAGGTCTGG TCCTCTCGGG AGAACTGACC AACCTCCCT	2220
CAATAGGAGT GATAGGCACA CCGGGGTCGG GCAAGTCCGC TATTATCAAG TCAACTGTCA	2280
CGGCACGAGA TCTTGTTACC AGCGGAAAGA AAGAAAATTG TCGCGAAATT GAGGCCGACG	2340
TGCTAAGACT GAGGGGTATG CAGATTACGT CGAAGACAGT AGATTCGGTT ATGCTCAACG	2400
GATGCCACAA AGCCGTAGAA GTGCTGTACG TTGACGAAGC GTTCGCGTGC CACGCAGGAG	2460
CACTACTTGC CTTGATTGCT ATCGTCAGGC CCCGCAAGAA GGTAAGTACTA TGCGGAGACC	2520
CCATGCAATG CGGATTCTTC AACATGATGC AACTAAAGGT ACATTTCAAT CACCCTGAAA	2580
AAGACATATG CACCAAGACA TTCTACAAGT ATATCTCCCG GCGTTGCACA CAGCCAGTTA	2640
CAGCTATTGT ATCGACACTG CATTACGATG GAAAGATGAA AACCACGAAC CCGTGCAAGA	2700
AGAACATTGA AATCGATATT ACAGGGGCCA CAAAGCCGAA GCCAGGGGAT ATCATCCTGA	2760
CATGTTTCCG CGGGTGGGTT AAGCAATTGC AAATCGACTA TCCCGGACAT GAAGTAATGA	2820
CAGCCGCGGC CTCACAAGGG CTAACCAGAA AAGGAGTGTA TGCCGTCCGG CAGAAAGTCA	2880
ATGAAAACCC ACTGTACGCG ATCACATCAG AGCATGTGAA CGTGTTGCTC ACCCGCACTG	2940
AGGACAGGCT AGTGTGGAAG ACCTTGCAGG GCGACCCATG GATTAAGCAG CTCACTAACA	3000

TACCTAAAGG AACTTTTCAG GCTACTATAG AGGACTGGGA AGCTGAACAC AAGGGAATAA	3060
TTGCTGCAAT AAACAGCCCC ACTCCCCGTG CCAATCCGTT CAGCTGCAAG ACCAACGTTT	3120
GCTGGGCGAA AGCATTGGAA CCGATACTAG CCACGGCCGG TATCGTACTT ACCGGTTGCC	3180
AGTGGAGCGA ACTGTTCCCA CAGTTTGCGG ATGACAAACC ACATTCGGCC ATTTACGCCT	3240
TAGACGTAAT TTGCATTAAG TTTTTCGGCA TGGACTTGAC AAGCGGACTG TTTTCTAAAC	3300
AGAGCATCCC ACTAACGTAC CATCCCGCCG ATTCAGCGAG GCCGGTAGCT CATTGGGACA	3360
ACAGCCCAGG AACCCGCAAG TATGGGTACG ATCACGCCAT TGCCGCCGAA CTCTCCCGTA	3420
GATTTCCGGT GTTCCAGCTA GCTGGGAAGG GCACACAAC TGAATTTGCAG ACGGGGAGAA	3480
CCAGAGTTAT CTCTGCACAG CATAACCTGG TCCCGGTGAA CCGCAATCTT CCTCACGCCT	3540
TAGCCCCCGA GTACAAGGAG AAGCAACCCG GCCCGGTCGA AAAATTCTTG AACCAGTTCA	3600
AACACCACTC AGTACTTGTG GTATCAGAGG AAAAAATTGA AGCTCCCCGT AAGAGAATCG	3660
AATGGATCGC CCCGATTGGC ATAGCCGGTG CAGATAAGAA CTACAACCTG GCTTTCGGGT	3720
TTCCGCCGCA GGCACGGTAC GACCTGGTGT TCATCAACAT TGGAACATAA TACAGAAACC	3780
ACCACTTTCA GCAGTGCGAA GACCATGCGG CGACCTTAAA AGCCCTTTTCG CGTTCGGCCC	3840
TGAATTGCCT CAACCCAGGA GGCACCCTCG TGGTGAAGTC CTATGGCTAC GCCGACCGCA	3900
ACAGTGAGGA CGTAGTCACC GCTCTTGCCA GAAAGTTTGT CAGGGTGTCT GCAGCGAGAC	3960
CAGATTGTGT CTCAAGCAAT ACAGAAATGT ACCTGATTTT CCGACAATA GACAACAGCC	4020
GTACACGGCA ATTCACCCCG CACCATCTGA ATTGCGTGAT TTCGTCCGTG TATGAGGGTA	4080
CAAGAGATGG AGTTGGAGCC GCGCCGTCAT ACCGCACCAA AAGGGAGAAT ATTGCTGACT	4140

GTCAAGAGGA AGCAGTTGTC AACGCAGCCA ATCCGCTGGG TAGACCAGGC GAAGGAGTCT	4200
GCCGTGCCAT CTATAAACGT TGGCCGACCA GTTTTACCGA TTCAGCCACG GAGACAGGCA	4260
CCGCAAGAAT GACTGTGTGC CTAGGAAAGA AAGTGATCCA CGCGGTCGGC CCTGATTTCC	4320
GGAAGCACCC AGAAGCAGAA GCCTTGAAAT TGCTACAAAA CGCCTACCAT GCAGTGGCAG	4380
ACTTAGTAAA TGAACATAAC ATCAAGTCTG TCGCCATTCC ACTGCTATCT ACAGGCATTT	4440
ACGCAGCCGG AAAAGACCGC CTTGAAGTAT CACTTAACTG CTTGACAACC GCGCTAGACA	4500
GAAGTACGC GGACGTAACC ATCTATTGCC TGGATAAGAA GTGGAAGGAA AGAATCGACG	4560
CGGCACTCCA ACTTAAGGAG TCTGTAACAG AGCTGAAGGA TGAAGATATG GAGATCGACG	4620
ATGAGTTAGT ATGGATCCAT CCAGACAGTT GCTTGAAGGG AAGAAAGGGA TTCAGTACTA	4680
CAAAAGGAAA ATTGTATTCG TACTTCGAAG GCACCAAATT CCATCAAGCA GCAAAAGACA	4740
TGGCGGAGAT AAAGGTCCTG TTCCCTAATG ACCAGGAAAG TAATGAACAA CTGTGTGCCT	4800
ACATATTGGG TGAGACCATG GAAGCAATCC GCGAAAAGTG CCCGGTCGAC CATAACCCGT	4860
CGTCTAGCCC GCCCAAACG TTGCCGTGCC TTTGCATGTA TGCCATGACG CCAGAAAGGG	4920
TCCACAGACT TAGAAGCAAT AACGTCAAAG AAGTTACAGT ATGCTCCTCC ACCCCCCTTC	4980
CTAAGCACAA AATTAAGAAT GTTCAGAAGG TTCAGTGCAC GAAAGTAGTC CTGTTTAATC	5040
CGCACACTCC CGCATTGTT CCCGCCGTGTA AGTACATAGA AGTGCCAGAA CAGCCTACCG	5100
CTCCTCCTGC ACAGGCCGAG GAGGCCCCCG AAGTTGTAGC GACACCGTCA CCATCTACAG	5160
CTGATAACAC CTCGCTTGAT GTCACAGACA TCTCACTGGA TATGGATGAC AGTAGCGAAG	5220

GCTCACTTTT TTCGAGCTTT AGCGGATCGG ACAACTCTAT TACTAGTATG GACAGTTGGT	5280
CGTCAGGACC TAGTTCACTA GAGATAGTAG ACCGAAGGCA GGTGGTGGTG GCTGACGTTT	5340
ATGCCGTCCA TGAGCCTGCC CCTATTCCAC CGCCAAGGCT AAAGAAGATG GCCCGCCTGG	5400
CAGCGGCAAG AAAAGAGCCC ACTCCACCGG CAAGCAATAG CTCTGAGTCC CTCCACCTCT	5460
CTTTTGGTGG GGTATCCATG TCCCTCGGAT CAATTTTCGA CGGAGAGACG GCCCGCCAGG	5520
CAGCGGTACA ACCCCTGGCA ACAGGCCCCA CGGATGTGCC TATGTCTTTC GGATCGTTTT	5580
CCGACGGAGA GATTGATGAG CTGAGCCGCA GAGCAACTGA GTCCGAACCC GTCCTGTTTG	5640
GATCATTTGA ACCGGGCGAA GTGAACTCAA TTATATCGTC CCGATCAGCC GTATCTTTTC	5700
CACTACGCAA GCAGAGACGT AGACGCAGGA GCAGGAGGAC TGAATACTGA CTAACCGGGG	5760
TAGGTGGGTA CATATTTTCG ACGGACACAG GCCCTGGGCA CTTGCAAAAG AAGTCCGTTC	5820
TGCAGAACCA GCTTACAGAA CCGACCTTGG AGCGCAATGT CCTGGAAAGA ATTCATGCCC	5880
CGGTGCTCGA CACGTCGAAA GAGGAACAAC TCAAACCTCAG GTACCAGATG ATGCCACCG	5940
AAGCCAACAA AAGTAGGTAC CAGTCTCGTA AAGTAGAAAA TCAGAAAGCC ATAACCACTG	6000
AGCGACTACT GTCAGGACTA CGACTGTATA ACTCTGCCAC AGATCAGCCA GAATGCTATA	6060
AGATCACCTA TCCGAAACCA TTGTACTCCA GTAGCGTACC GGCGAACCTAC TCCGATCCAC	6120
AGTTCGCTGT AGCTGTCTGT AACAACTATC TGCATGAGAA CTATCCGACA GTAGCATCTT	6180
ATCAGATTAC TGACGAGTAC GATGCTTACT TGGATATGGT AGACGGGACA GTCGCCTGCC	6240
TGGATACTGC AACCTTCTGC CCCGCTAAGC TTAGAAGTTA CCCGAAAAAA CATGAGTATA	6300
GAGCCCCGAA TATCCGCAGT GCGGTTCCAT CAGCGATGCA GAACACGCTA CAAAATGTGC	6360

TCATTGCCGC AACTAAAAGA AATTGCAACG TCACGCAGAT GCGTGAAGT CCAACACTGG	6420
ACTCAGCGAC ATTCAATGTC GAATGCTTTC GAAAATATGC ATGTAATGAC GAGTATTGGG	6480
AGGAGTTCGC TCGGAAGCCA ATTAGGATTA CCACTGAGTT TGTCACCGCA TATGTAGCTA	6540
GACTGAAAGG CCCTAAGGCC GCCACACTAT TTGCAAAGAC GTATAATTTG GTCCCATTGC	6600
AAGAAGTGCC TATGGATAGA TTCGTCATGG ACATGAAAAG AGACGTGAAA GTTACACCAG	6660
GCACGAAACA CACAGAAGAA AGACCGAAAG TACAAGTGAT ACAAGCCGCA GAACCCCTGG	6720
CGACTGCTTA CTTATGCGGG ATTCACCGGG AATTAGTGCG TAGGCTTACG GCCGTCTTGC	6780
TTCCAAACAT TCACACGCTT TTTGACATGT CGGCGGAGGA TTTTGATGCA ATCATAGCAG	6840
AACACTTCAA GCAAGGCGAC CCGGTACTGG AGACGGATAT CGCATCATTC GACAAAAGCC	6900
AAGACGACGC TATGGCGTTA ACCGGTCTGA TGATCTTGGA GGACCTGGGT GTGGATCAAC	6960
CACTACTCGA CTTGATCGAG TCGCCTTTG GAGAAATATC ATCCACCCAT CTACCTACGG	7020
GTACTCGTTT TAAATTCGGG GCGATGATGA AATCCGGAAT GTTCCTCACA CTTTTGTCA	7080
ACACAGTTTT GAATGTCGTT ATCGCCAGCA GAGTACTAGA AGAGCGGCTT AAAACGTCCA	7140
GATGTGCAGC GTTCATTGGC GACGACAACA TCATACATGG AGTAGTATCT GACAAAGAAA	7200
TGGCTGAGAG GTGCGCCACC TGGCTCAACA TGGAGGTAA GATCATCGAC GCAGTCATCG	7260
GTGAGAGACC ACCTTACTTC TGCGGCGGAT TTATCTTGCA AGATTCGGTT ACTTCCACAG	7320
CGTGCCGCGT GGCGGATCCC CTGAAAAGGC TGTTTAAGTT GGGTAAACCG CTCCCAGCCG	7380
ACGACGAGCA AGACGAAGAC AGAAGACGCG CTCTGCTAGA TGAAACAAAG GCGTGGTTTA	7440

GAGTAGGTAT AACAGGCACT TTAGCAGTGG CCGTGACGAC CCGGTATGAG GTAGACAATA	7500
TTACACCTGT CCTACTGGCA TTGAGAACTT TTGCCAGAG CAAAAGAGCA TTCCAAGCCA	7560
TCAGAGGGGA AATAAAGCAT CTCTACGGTG GTCCTAAATA GTCAGCATAG TACATTTTCAT	7620
CTGACTAATA CTACAACACC ACCACCATGA ATAGAGGATT CTTTAACATG CTCGGCCGCC	7680
GCCCCTTCCC GGCCCCCACT GCCATGTGGA GGCCGCGGAG AAGGAGGCAG GCGGCCCCGA	7740
TGCCTGCCCC CAACGGGCTG GCTTCTCAA TCCAGCAACT GACCACAGCC GTCAGTGCCC	7800
TAGTCATTGG ACAGGCAACT AGACCTCAAC CCCCACGTCC ACGCCCGCCA CCGCGCCAGA	7860
AGAAGCAGGC GCCCAAGCAA CCACCGAAGC CGAAGAAACC AAAAACGCAG GAGAAGAAGA	7920
AGAAGCAACC TGCAAAACCC AAACCCGGAA AGAGACAGCG CATGGCACTT AAGTTGGAGG	7980
CCGACAGATT GTTCGACGTC AAGAACGAGG ACGGAGATGT CATCGGGCAC GCACTGGCCA	8040
TGGAAGGAAA GGTAATGAAA CCTCTGCACG TGAAAGGAAC CATCGACCAC CCTGTGCTAT	8100
CAAAGCTCAA ATTTACCAAG TCGTCAGCAT ACGACATGGA GTTCGCACAG TTGCCAGTCA	8160
ACATGAGAAG TGAGGCATTC ACCTACACCA GTGAACACCC CGAAGGATTC TATAACTGGC	8220
ACCACGGAGC GGTGCAGTAT AGTGGAGGTA GATTTACCAT CCCTCGCGGA GTAGGAGGCA	8280
GAGGAGACAG CGGTCGTCCG ATCATGGATA ACTCCGGTCG GGTTGTCGCG ATAGTCCTCG	8340
GTGGCGCTGA TGAAGGAACA CGAACTGCCC TTTCGGTCGT CACCTGGAAT AGTAAAGGGA	8400
AGACAATTAA GACGACCCCG GAAGGGACAG AAGAGTGGTC CGCAGCACCA CTGGTCACGG	8460
CAATGTGTTT GCTCGGAAAT GTGAGCTTCC CATGCGACCG CCCGCCACA TGCTATACCC	8520
GCGAACCTTC CAGAGCCCTC GACATCCTTG AAGAGAACGT GAACCATGAG GCCTACGATA	8580

CCCTGCTCAA TGCCATATTG CGGTGCGGAT CGTCTGGCAG AAGCAAAAGA AGCGTCGTTG	8640
ACGACTTTAC CCTGACCAGC CCCTACTTGG GCACATGCTC GTACTGCCAC CATACTGAAC	8700
CGTGCTTCAG CCCTGTTAAG ATCGAGCAGG TCTGGGACGA AGCGGACGAT AACACCATAC	8760
GCATACAGAC TTCCGCCCAG TTTGGATACG ACCAAAGCGG AGCAGCAAGC GCAAACAAGT	8820
ACCGCTACAT GTCGCTTAAG CAGGATCACA CCGTTAAAGA AGGCACCATG GATGACATCA	8880
AGATTAGCAC CTCAGGACCG TGTagAAGGC TTAGCTACAA AGGATACTTT CTCCTCGCAA	8940
AATGCCCTCC AGGGGACAGC GTAACGGTTA GCATAGTGAG TAGCAACTCA GCAACGTCAT	9000
GTACACTGGC CCGCAAGATA AAACCAAAT TCGTGGGACG GGAAAAATAT GATCTACCTC	9060
CCGTTACAGG TAAAAGAATT CTTGCACAG TGTACGACCG TCTGAAAACA ACTGCAGGCT	9120
ACATCACTAT GCACAGGCCG GGACCGCACG CTTATACATC CTACCTGGAA GAATCATCAG	9180
GGAAAGTTTA CGCAAAGCCG CCATCTGGGA AGAACATTAC GTATGAGTGC AAGTGCGGCG	9240
ACTACAAGAC CGGAACCGTT TCGACCCGCA CCGAAATCAC TGGTTGCACC GCCATCAAGC	9300
AGTGCGTCGC CTATAAGAGC GACCAAACGA AGTGGGTCTT CAACTACCG GACTTGATCA	9360
GACATGACGA CCACACGGCC CAAGGGAAAT TGCATTTGCC TTTCAAGTTG ATCCCGGGTG	9420
CCTGCATGGT CCCTGTTGCC CACGCGCCGA ATGTAATACA TGGCTTTAAA CACATCAGCC	9480
TCCAATTAGA TACAGACCAC TTGACATTGC TCACCACCAG GAGACTAGGG GCAAACCCGG	9540
AACCAACCAC TGAATGGATC GTCGGAAAGA CGGTCAGAAA CTTACCGTC GACCGAGATG	9600
GCCTGGAATA CATATGGGGA AATCATGAGC CAGTGAGGGT CTATGCCCAA GAGTCAGCAC	9660

CAGGAGACCC TCACGGATGG CCACACGAAA TAGTACAGCA TTACTACCAT CGCCATCCTG	9720
TGTACACCAT CTTAGCCGTC GCATCAGCTA CCGTGGCGAT GATGATTGGC GTAAGTGTG	9780
CAGTGTATG TGCCTGTAAA GCGCGCCGTG AGTGCCTGAC GCCATACGCC CTGGCCCCAA	9840
ACGCCGTAAT CCCAACTTCG CTGGCACTCT TGTGCTGCGT TAGGTCGGCC AATGCTGAAA	9900
CGTTCACCGA GACCATGAGT TACTTGTGGT CGAACAGTCA GCCGTTCTTC TGGGTCCAGT	9960
TGTGCATACC TTTGGCCGCG TTCATCGTTC TAATGCGCTA CTGCTCCTGC TGCCTGCCTT	10020
TTTTAGTGGT TGCCGGCGCC TACCTGGCGA AGGTAGACGC CTACGAACAT GCGACCACTG	10080
TTCCAAATGT GCCACAGATA CCGTATAAGG CACTTGTTGA AAGGGCAGGG TATGCCCCGC	10140
TCAATTTGGA GATCACTGTC ATGTCCTCGG AGGTTTTGCC TTCCACCAAC CAAGAGTACA	10200
TTACCTGCAA ATTCACCACT GTGGTCCCCT CCCCAAAAT CAAATGCTGC GGCTCCTTGG	10260
AATGTCAGCC GGCCGCTCAT GCAGACTATA CCTGCAAGGT CTTCGGAGGG GTCTACCCCT	10320
TTATGTGGGG AGGAGCGCAA TGTTTTTGCG ACAGTGAGAA CAGCCAGATG AGTGAGGCGT	10380
ACGTGCAATT GTCAGCAGAT TGC GCGTCTG ACCACGCGCA GGCGATTAAG GTGCACACTG	10440
CCGCGATGAA AGTAGGACTG CGTATAGTGT ACGGGAACAC TACCAGTTTC CTAGATGTGT	10500
ACGTGAACGG AGTCACACCA GGAACGTCTA AAGACTTGAA AGTCATAGCT GGACCAATTT	10560
CAGCATCGTT TACGECATTC GATCATAAGG TCGTTATCCA TCGCGGCCTG GTGTACAACT	10620
ATGACTTCCC GGAATATGGA GCGATGAAAC CAGGAGCGTT CGGAGACATT CAAGCTACCT	10680
CCTTGACTAG CAAGGATCTC ATCGCCAGCA CAGACATTAG GCTACTCAAG CCTTCCGCCA	10740
AGAACGTGCA TGTCCCGTAC ACGCAGGCCG CATCAGGATT TGAGATGTGG AAAAACAAC	10800

CAGGCCGCCC	ACTGCAGGAA	ACCGCACCTT	TCGGGTGTAA	GATTGCAGTA	AATCCGCTCC	10860
GAGCGGTGGA	CTGTTCATAC	GGGAACATTC	CCATTTCTAT	TGACATCCCG	AACGCTGCCT	10920
TTATCAGGAC	ATCAGATGCA	CCACTGGTCT	CAACAGTCAA	ATGTGAAGTC	AGTGAGTGCA	10980
CTTATTCAGC	AGACTTCGGC	GGGATGGCCA	CCCTGCAGTA	TGTATCCGAC	CGCGAAGGTC	11040
AATGCCCCGT	ACATTCGCAT	TCGAGCACAG	CAACTCTCCA	AGAGTCGACA	GTACATGTCC	11100
TGGAGAAAGG	AGCGGTGACA	GTACACTTTA	GCACCGCGAG	TCCACAGGCG	AACTTTATCG	11160
TATCGCTGTG	TGGGAAGAAG	ACAACATGCA	ATGCAGAATG	TAAACCACCA	GCTGACCATA	11220
TCGTGAGCAC	CCCGCACAAA	AATGACCAAG	AATTTCAAGC	CGCCATCTCA	AAAACATCAT	11280
GGAGTTGGCT	GTTTGCCCTT	TTCGGCGGCG	CCTCGTCGCT	ATTAATTATA	GGACTTATGA	11340
TTTTTGCTTG	CAGCATGATG	CTGACTAGCA	CACGAAGATG	ACCGCTACGC	CCCAATGATC	11400
CGACCAGCAA	AACTCGATGT	ACTTCCGAGG	AACTGATGTG	CATAATGCAT	CAGGCTGGTA	11460
CATTAGATCC	CCGCTTACCG	CGGGCAATAT	AGCAACACTA	AAAACGAT	GTACTTCCGA	11520
GGAAGCGCAG	TGCATAATGC	TGCGCAGTGT	TGCCACATAA	CCACTATATT	AACCATTTAT	11580
CTAGCGGACG	CCAAAACTC	AATGTATTTT	TGAGGAAGCG	TGGTGCATAA	TGCCACGCAG	11640
CGTCTGCATA	ACTTTTATTA	TTTCTTTTAT	TAATCAACAA	AATTTTGTTT	TTAACATTTT	11700
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAATCTAG	AGGGCCCTAT	TCTATAGTGT	CACCTAAATG	11760
CTAGAGCTCG	CTGATCAGCC	TCGACTGTGC	CTTCTAGTTG	CCAGCCATCT	GTTGTTTGCC	11820
CCTCCCCCGT	GCCTTCCTTG	ACCCTGGAAG	GTGCCACTCC	CACTGTCCTT	TCCTAATAAA	11880

ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCATTC TATTCTGGGG GGTGGGGTGG	11940
GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG	12000
GCTCTATGGC TTCTGAGGCG GAAAGAACCA GCTGGGGCTC TAGGGGGTAT CCCACGCGC	12060
CCTGTAGCGG CGCATTAAAGC GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC	12120
TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTTCG CTTTCTTCCC TTCCTTTCTC GCCACGTTTCG	12180
CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GCATCCCTTT AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT	12240
TACGGCACCT CGACCCCAAA AACTTGATT AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC	12300
CCTGATAGAC GGTTTTTCGC CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGAATCT	12360
TGTTCCAAAC TGGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA	12420
TTTTGGGGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA TTAAACGCGA	12480
ATTAATTCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG TCCCAGGCT CCCAGGCAG	12540
GCAGAAGTAT GCAAAGCATG CATCTCAATT AGTCAGCAAC CAGGTGTGGA AAGTCCCCAG	12600
GCTCCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA ACCATAGTCC	12660
CGCCCCTAAC TCCGCCCATC CCGCCCCTAA CTCCGCCAG TTCCGCCCAT TCTCCGCCCC	12720
ATGGCTGACT AATTTTTTTT ATTTATGCAG AGGCCGAGGC CGCCTCTGCC TCTGAGCTAT	12780
TCCAGAAGTA GTGAGGAGGC TTTTTTGGAG GCCTAGGCTT TTGCAAAAAG CTCCGGGAG	12840
CTTGTATATC CATTTTCGGA TCTGATCAAG AGACAGGATG AGGATCGTTT CGCATGATTG	12900
AACAAGATGG ATTGCACGCA GGTTCTCCGG CCGCTTGGGT GGAGAGGCTA TTCGGCTATG	12960
ACTGGGCACA ACAGACAATC GGCTGCTCTG ATGCCGCCGT GTTCCGGCTG TCAGCGCAGG	13020

GGCGCCCGGT TCTTTTTGTC AAGACCGACC TGTCCGGTGC CCTGAATGAA CTGCAGGACG 13080
AGGCAGCGCG GCTATCGTGG CTGGCCACGA CGGGCGTTCC TTGCGCAGCT GTGCTCGACG 13140
TTGTCACTGA AGCGGGAAGG GACTGGCTGC TATTGGGCGA AGTGCCGGGG CAGGATCTCC 13200
TGTCATCTCA CCTTGCTCCT GCCGAGAAAG TATCCATCAT GGCTGATGCA ATGCGGCGGC 13260
TGCATACGCT TGATCCGGCT ACCTGCCCAT TCGACCACCA AGCGAAACAT CGCATCGAGC 13320
GAGCACGTAC TCGGATGGAA GCCGGTCTTG TCGATCAGGA TGATCTGGAC GAAGAGCATC 13380
AGGGGCTCGC GCCAGCCGAA CTGTTCGCCA GGCTCAAGGC GCGCATGCCC GACGGCGAGG 13440
ATCTCGTCGT GACCCATGGC GATGCCTGCT TGCCGAATAT CATGGTGGAA AATGGCCGCT 13500
TTTCTGGATT CATCGACTGT GGCCGGCTGG GTGTGGCGGA CCGCTATCAG GACATAGCGT 13560
TGGCTACCCG TGATATTGCT GAAGAGCTTG GCGGCGAATG GGCTGACCGC TTCCTCGTGC 13620
TTTACGGTAT CGCCGCTCCC GATTGCGAGC GCATCGCCTT CTATCGCCTT CTTGACGAGT 13680
TCTTCTGAGC GGGACTCTGG GGTTGAAAT GACCGACCAA GCGACGCCCA ACCTGCCATC 13740
ACGAGATTTT GATTCCACCG CCGCCTTCTA TGAAAGGTTG GGCTTCGGAA TCGTTTTCCG 13800
GGACGCCGGC TGGATGATCC TCCAGCGCGG GGATCTCATG CTGGAGTTCT TCGCCCACCC 13860
CAACTTGTTT ATTGCAGCTT ATAATGGTTA CAAATAAAGC AATAGCATCA CAAATTTTAC 13920
AAATAAAGCA TTTTTTTCAC TGCATTCTAG TTGTGGTTTG TCCAAACTCA TCAATGTATC 13980
TTATCATGTC TGTATACCGT CGACCTCTAG CTAGAGCTTG GCGTAATCAT GGTCATAGCT 14040
GTTTCCTGTG TGAAATTGTT ATCCGCTCAC AATTCCACAC AACATACGAG CCGGAAGCAT 14100

AAAGTGTAAG GCCTGGGGTG CCTAATGAGT GAGCTAACTC ACATTAATTG CGTTGCGCTC	14160
ACTGCCCCGCT TTCCAGTCGG GAAACCTGTC GTGCCAGCTG CATTAAATGAA TCGGCCAACG	14220
CGCGGGGAGA GGC GGTTTGC GTATTGGGCG CTCTTCCGCT TCCTCGCTCA CTGACTCGCT	14280
GCGCTCGGTC GTTCGGCTGC GGC GAGCGGT ATCAGCTCAC TCAAAGGCGG TAATACGGTT	14340
ATCCACAGAA TCAGGGGATA ACGCAGGAAA GAACATGTGA GCAAAAGGCC AGCAAAAGGC	14400
CAGGAACCGT AAAAAGGCCG CGTTGCTGGC GTTTTTCCAT AGGCTCCGCC CCCCTGACGA	14460
GCATCACAAA AATCGACGCT CAAGTCAGAG GTGGCGAAAC CCGACAGGAC TATAAAGATA	14520
CCAGGCGTTT CCCCCTGGAA GCTCCCTCGT GCGCTCTCCT GTTCCGACCC TGCCGCTTAC	14580
CGGATACCTG TCCGCCTTTC TCCCTTCGGG AAGCGTGGCG CTTTCTCAAT GCTCACGCTG	14640
TAGGTATCTC AGTTCGGTGT AGGTCGTTTG CTCCAAGCTG GGCTGTGTGC ACGAACCCCC	14700
CGTTCAGCCC GACCGCTGCG CTTATCCGG TAACTATCGT CTTGAGTCCA ACCCGTAAG	14760
ACACGACTTA TCGCCACTGG CAGCAGCCAC TGGTAACAGG ATTAGCAGAG CGAGGTATGT	14820
AGGCGGTGCT ACAGAGTTCT TGAAGTGGTG GCCTAACTAC GGCTACACTA GAAGGACAGT	14880
ATTTGGTATC TGCGCTCTGC TGAAGCCAGT TACCTTCGGA AAAAGAGTTG GTAGCTCTTG	14940
ATCCGGCAAA CAAACCACCG CTGGTAGCGG TGGTTTTTTT GTTTGCAAGC AGCAGATTAC	15000
GCGCAGAAAA AAAGGATCTC AAGAAGATCC TTTGATCTTT TCTACGGGGT CTGACGCTCA	15060
GTGGAACGAA AACTCACGTT AAGGGATTTT GGTCATGAGA TTATCAAAAA GGATCTTCAC	15120
CTAGATCCTT TTAAATTAAA AATGAAGTTT TAAATCAATC TAAAGTATAT ATGAGTAAAC	15180
TTGGTCTGAC AGTTACCAAT GCTTAATCAG TGAGGCACCT ATCTCAGCGA TCTGTCTATT	15240

TCGTTTCATCC ATAGTTGCCT GACTCCCCGT CGTGTAGATA ACTACGATAC GGGAGGGCTT 15300

ACCATCTGGC CCCAGTGCTG CAATGATACC GCGAGACCCA CGCTCACC GG CTCCAGATTT 15360

ATCAGCAATA AACCAGCCAG CCGGAAGGGC CGAGCGCAGA AGTGGTCCTG CAACTTTATC 15420

CGCCTCCATC CAGTCTATTA ATTGTTGCCG GGAAGCTAGA GTAAGTAGTT CGCCAGTTAA 15480

TAGTTTGCGC AACGTTGTTG CCATTGCTAC AGGCATCGTG GTGTCACGCT CGTCGTTTGG 15540

TATGGCTTCA TTCAGCTCCG GTTCCCAACG ATCAAGGCCA GTTACATGAT CCCCCATGTT 15600

GTGCAAAAAA GCGGTTAGCT CCTTCGGTCC TCCGATCGTT GTCAGAAAGTA AGTTGGCCGC 15660

AGTGTTATCA CTCATGGTTA TGGCAGCACT GCATAATTCT CTTACTGTCA TGCCATCCGT 15720

AAGATGCTTT TCTGTGACTG GTGAGTACTC AACCAAGTCA TTCTGAGAAT AGTGTATGCG 15780

GCGACCGAGT TGCTCTTGCC CGGCGTCAAT ACGGGATAAT ACCGCGCCAC ATAGCAGAAC 15840

TTTAAAAGTG CTCATCATTG GAAAACGTTT TCGGGGCGA AAACCTCTCA GGATCTTACC 15900

GCTGTTGAGA TCCAGTTCGA TGTAACCCAC TCGTGCACCC AACTGATCTT CAGCATCTTT 15960

TACTTTCACC AGCGTTTCTG GGTGAGCAAA AACAGGAAGG CAAAATGCCG CAAAAAGGG 16020

AATAAGGGCG ACACGGAAAT GTTGAATACT CATACTCTTC CTTTTTCAAT ATTATTGAAG 16080

CATTTATCAG GGTTATTGTC TCATGAGCGG ATACATATTT GAATGTATTT AGAAAAATAA 16140

ACAAATAGGG GTTCCGCGCA CATTTCCCCG AAAAGTGCCA CCTGACGTCG ACGGATCGGG 16200

AGATCTAATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT TGGCAAGCTA GCTTAAGTAA CGCCATTTTG 16260

CAAGGCATGG AAAAATACAT AACTGAGAAT AGAGAAGTTC AGATCAAGGT CAGGAACAGA 16320

TGGAACAGCT GAATATGGGC CAAACAGGAT ATCTGTGGTA AGCAGTTCCT GCCCCGGCTC	16380
AGGGCCAAGA ACAGATGGAA CAGCTGAATA TGGGCCAAAC AGGATATCTG TGGTAAGCAG	16440
TTCCTGCCCC GGCTCAGGGC CAAGAACAGA TGGTCCCCAG ATGCGGTCCA GCCCTCAGCA	16500
GTTTCTAGAG AACCATCAGA TGTTTCCAGG GTGCCCAAG GACCTGAAAT GACCCTGTGC	16560
CTTATTTGAA CTAACCAATC AGTTCGCTTC TCGCTTCTGT TCGCGCGCTT CTGCTCCCCG	16620
AGCTCAATAA AAGAGCCAC AACCCCTCAC TCGGGG	16656

Patentansprüche

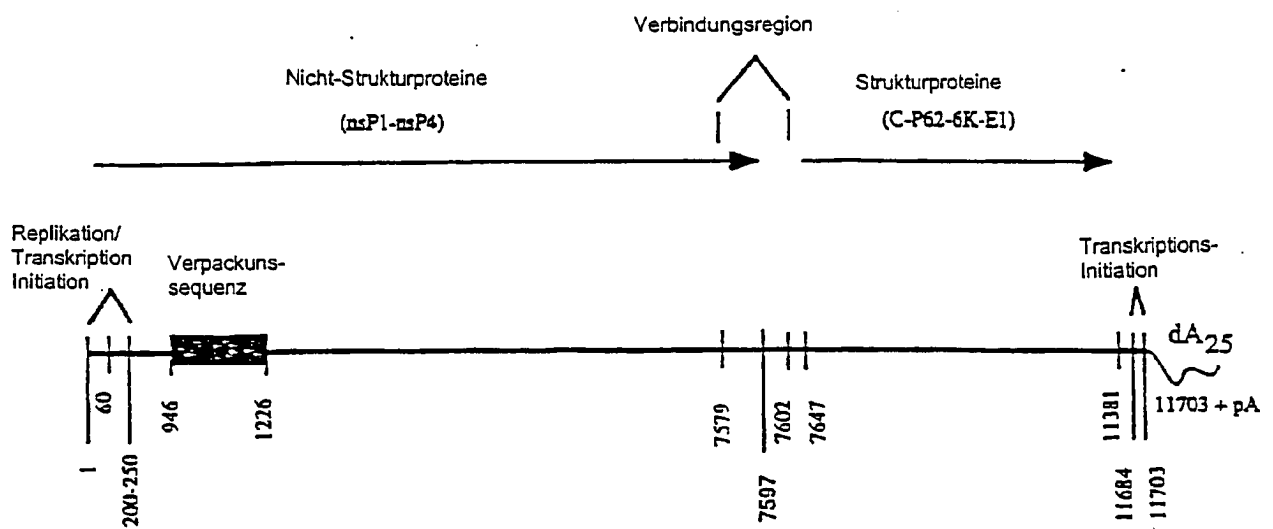
1. DNA-Vektor, umfassend
 - (i) einen 5'-eukaryotischen Promotor,
 - (ii) eine DNA-Sequenz, welche nach Transkription in einer eukaryotischen Zelle durch den Promotor ein Alphavirus-RNA-Vektorkonstrukt bereitstellt, und
 - (iii) eine Transkriptionsterminationsstelle zur Termination der Transkription, wobei das Alphavirus-RNA-Vektorkonstrukt befähigt ist, (a) Nichtstrukturproteine zu kodieren, die es dem Alphavirus-RNA-Vektorkonstrukt ermöglichen, selbst zu replizieren, und (b) eine oder mehrere heterologe Nukleotidsequenzen zu exprimieren.
2. DNA-Vektor nach Anspruch 1, wobei der Promotor ein induzierbarer Promotor ist.
3. DNA-Vektor nach Anspruch 1 oder 2, wobei der Promotor ein viraler Promotor ist.
4. DNA-Vektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei das Alphavirus aus dem Ross-River-Virus, Venezuelian-Equine-Enzephalitis-Virus und Semliki-Forest-Virus ausgewählt ist.
5. DNA-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das Alphavirus ein Sindbis-Virus ist.
6. DNA-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Transkriptionsterminationsstelle eine Transkriptionsterminationssequenz ist.
7. DNA-Vektor nach Anspruch 6, wobei die Terminationssequenz eine Terminations/Polyadenylierungssequenz ist.
8. DNA-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 7, welcher zur gerichteten Expression eines Antigens oder einer modifizierten Form davon, befähigt, eine Immunantwort gegen ein pathogenes Mittel zu stimulieren, in einer eukaryotischen Zelle befähigt ist.
9. DNA-Vektor nach Anspruch 8, wobei das pathogene Mittel ein Virus oder eine Krebszelle ist.
10. DNA-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 7, welcher zur gerichteten Expression eines Palliativum, befähigt, eine Funktion eines pathogenen, für die Pathogenizität notwendigen Mittels zu hemmen, in einer eukaryotischen Zelle befähigt ist.
11. DNA-Vektorsystem nach Anspruch 10, wobei das Palliativum eine Antisense-RNA oder ein Ribozym ist.
12. DNA-Vektor nach Anspruch 10, wobei das Palliativum ein Lymphokin ist.
13. DNA-Vektor nach Anspruch 12, wobei das Lymphokin IL-2, IL-12 oder γ -IFN ist.

14. DNA-Vektor nach Anspruch 10, wobei das Palliativum ein Genprodukt ist, welches eine Verbindung mit geringer oder keiner Cytotoxizität in ein toxisches Produkt überführt.
15. DNA-Vektor nach Anspruch 14, wobei das Genprodukt Herpes-simplex-Virus-Thymidinkinase (HSVTK) oder Cytosindesaminase ist.
16. Ex vivo-Zellen, die einen DNA-Vektor nach einem der vorherigen Ansprüche enthalten.
17. DNA-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 15 für die Verwendung in einem Verfahren zur therapeutischen Behandlung.
18. Pharmazeutische Zusammensetzung, die einen DNA-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 15 in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel enthält.
19. Zusammensetzung nach Anspruch 18 für die Stimulation einer Immunantwort gegen ein pathogenes Mittel, wobei die Zusammensetzung einen DNA-Vektor nach Anspruch 9 enthält.
20. Verwendung eines DNA-Vektors nach Anspruch 8 für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Verwendung in der Stimulation einer Immunantwort gegen ein pathogenes Mittel.
21. Verwendung eines DNA-Vektors nach einem der Ansprüche 9 bis 15 für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Verwendung in der Krebsbehandlung.
22. Verwendung eines DNA-Vektors nach einem der Ansprüche 9 bis 15 für die Herstellung einer Zusammensetzung zur Verwendung in der Behandlung einer Infektion durch ein pathogenes Mittel.
23. Verwendung eines DNA-Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 15 für die Herstellung eines viralen RNA-Vektorkonstrukts durch Transkription, wobei die Verwendung kein Behandlungsverfahren ist, das in einem menschlichen oder einem Tierkörper praktiziert wird.
24. Verfahren zum Herstellen eines DNA-Vektors nach einem der Ansprüche 1 bis 15, welches den Schritt des Insertierens einer cDNA, die zu dem viralen RNA-Vektorkonstrukt korrespondiert, in eine Expressionskassette umfaßt, wobei die Expressionskassette den eukaryotischen Promotor und die Transkriptionsterminationsstelle bereitstellt.

Es folgen 18 Blatt Zeichnungen

Sindbis-Virus

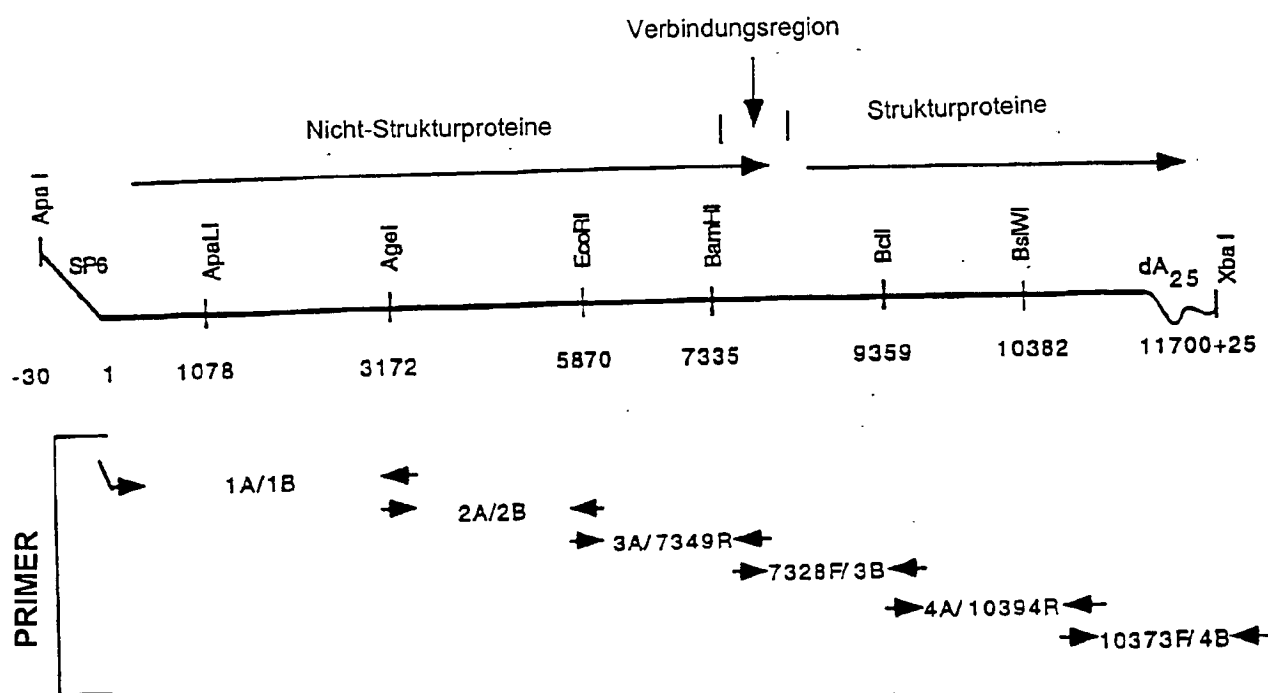
Genomorganisation



FIGUR 1

FIGUR 2

AMPLIFIKATION DES SINDBIS-GENOMS



FIGUR 3 A

ATTGACGGCG	TAGTACACAC	TATTGAATCA	AACAGCCGAC	CAATCGCACT	ACCATCACAA	60
TGGAGAAGCC	AGTAGTAAAC	GTAGACGTAG	ACCCCAGAG	TCCGTTTGTC	GTGCAACTGC	120
AAAAAAGCTT	CCCGCAATTT	GAGGTAGTAG	CACAGCAGGT	CACTCCAAAT	GACCATGCTA	180
ATGCCAGAGC	ATTTTCGCAT	CTGGCCAGTA	AACTAATCGA	GCTGGAGGTT	CCTACCACAG	240
CGACGATCTT	GGACATAGGC	AGCGCACCGG	CTCGTAGAAT	GTTTTCCGAG	CACCAGTATC	300
ATTGTGTCTG	CCCCATGCGT	AGTCCAGAAG	ACCCGGACCG	CATGATGAAA	TATGCCAGTA	360
AACTGGCGGA	AAAAGCGTGC	AAGATTACAA	ACAAGAACTT	GCATGAGAAG	ATTAAGGATC	420
TCCGGACCGT	ACTTGATACG	CCGGATGCTG	AAACACCATC	GCTCTGCTTT	CACAACGATG	480
TTACCTGCAA	CATGCGTGCC	GAATATTCCG	TCATGCAGGA	CGTGTATATC	AACGCTCCCG	540
GAACTATCTA	TCATCAGGCT	ATGAAAGGCG	TGCGGACCTT	GTAAGGATT	GGCTTCGACA	600
CCACCCAGTT	CATGTTCTCG	GCTATGGCAG	GTTCTGATCC	TGCGTACAAC	ACCAACTGGG	660
CCGACGAGAA	AGTCCTTGAA	GCGCGTAACA	TCGGACTTTG	CAGCACAAAG	CTGAGTGAAG	720
GTAGGACAGG	AAAATTGTCTG	ATAATGAGGA	AGAAGGAGTT	GAAGCCCGGG	TCGCGGGTTT	780
ATTCTCCGT	AGGATCGACA	CTTTATCCAG	AACACAGAGC	CAGCTTGCGAG	AGCTGGCATC	840
TTCCATCGGT	GTTCCACTTG	AATGGAAAGC	AGTCGTACAC	TTGCCGCTGT	GATACAGTGG	900
TGAGTTGCGA	AGGCTACGTA	GTGAAGAAAA	TCACCATCAG	TCCCGGGATC	ACGGGAGAAA	960
CCGTGGGATA	CGCGGTTACA	CACAATAGCG	AGGGCTTCTT	GCTATGCAAA	GTTACTGACA	1020
CAGTAAAAGG	AGAACGGGTA	TCGTTCCCTG	TGTGCACGTA	CATCCCGGCC	ACCATATGCG	1080
ATCAGATGAC	TGGTCTAATG	GCCACGGATA	TATCACCTGA	CGATGCACAA	AACTTCTGCG	1140
TTGGGCTCAA	CCAGCGAATT	GTCATTAACG	GTAGGACTAA	CAGGAACACC	AACACCATGC	1200
AAAATTACCT	TCTGCCGATC	ATAGCACAAAG	GGTTCAGCAA	ATGGGCTAAG	GAGCGCAAGG	1260
ATGATCTTGA	TAACGAGAAA	ATGCTGGGTA	CTAGAGAACG	CAAGCTTACG	TATGGCTGCT	1320
TGTGGGCGTT	TCGCACTAAG	AAAGTACATT	CGTTTTATCG	CCCACCTGGA	ACGCAGACCT	1380
GCGTAAAAGT	CCCAGCCTCT	TTAGCGCTT	TCCCCATGTC	GTCCGTATGG	ACGACCTCTT	1440
TGCCCATGTC	GCTGAGGCAG	AAATTGAAAC	TGGCATTGCA	ACCAAAGAAG	GAGGAAAAAC	1500
TGCTGCAGGT	CTCGGAGGAA	TTAGTCATGG	AGGCCAAGGC	TGCTTTTGAG	GATGCTCAGG	1560
AGGAAGCCAG	AGCGGAGAAG	CTCCGAGAAG	CACTTCCACC	ATTAGTGGCA	GACAAAGGCA	1620
TCGAGGCAGC	CGCAGAAGTT	GTCTGCGAAG	TGGAGGGGCT	CCAGGCGGAC	ATCGGAGCAG	1680
CATTAGTTGA	AACCCCGCGC	GGTCACGTAA	GGATAATACC	TCAAGCAAAT	GACCGTATGA	1740
TCGGACAGTA	TATCGTTGTC	TCGCCAAACT	CTGTGCTGAA	GAATGCCAAA	CTCGCACCAG	1800
CGCACCCGCT	AGCAGATCAG	GTTAAGATCA	TAACACACTC	CGGAAGATCA	GGAAGGTACG	1860
CGGTCGAACC	ATACGACGCT	AAAGTACTGA	TGCCAGCAGG	AGGTGCCGTA	CCATGGCCAG	1920
AATTCCTAGC	ACTGAGTGAG	AGCGCCACGT	TAGTGTACAA	CGAAAGAGAG	TTTGTGAACC	1980
GCAAACATA	CCACATTGCC	ATGCATGGCC	CCGCCAAGAA	TACAGAAGAG	GGGCAGTACA	2040
AGGTTACAAA	GGCAGAGCTT	GCAGAAACAG	AGTACGTGTT	TGACGTGGAC	AAGAAGCGTT	2100
GCGTTAAGAA	GGAAGAAGCC	TCAGGTCTGG	TCCTCTCGGG	AGAACTGACC	AACCTCCCT	2160
ATCATGAGCT	AGCTCTGGAG	GGACTGAAGA	CCCGACCTGC	GGTCCCGTAC	AAGGTCGAAA	2220
CAATAGGAGT	GATAGGCACA	CCGGGGTCCG	GCAAGTCCGC	TATTATCAAG	TCAACTGTCA	2280

FIGUR 3 B

CGGCACGAGA	TCTTGTTACC	AGCGGAAAGA	AAGAAAATTG	TCGCGAAATT	GAGGCCGACG	2340
TGCTAAGACT	GAGGGGTATG	CAGATTACGT	CGAAGACAGT	AGATTCGGTT	ATGCTCAACG	2400
GATGCCACAA	AGCCGTAGAA	GTGCTGTACG	TTGACGAAGC	GTTCGCGTGC	CACGCAGGAG	2460
CACTACTTGC	CTTGATTGCT	ATCGTCAGGC	CCCGCAAGAA	GGTAGTACTA	TGCGGAGACC	2520
CCATGCAATG	CGGATTCTTC	AACATGATGC	AACTAAAAGT	ACATTTCAAT	CACCTGAAA	2580
AAGACATATG	CACCAAGACA	TTCTACAAGT	ATATCTCCCG	GCGTTGCACA	CAGCCAGTTA	2640
CAGCTATTGT	ATCGACACTG	CATTACGATG	GAAAGATGAA	AACCACGAAC	CCGTGCAAGA	2700
AGAACATTGA	AATCGATATT	ACAGGGGCCA	CAAAGCCGAA	GCCAGGGGAT	ATCATCCTGA	2760
CATGTTTCCG	CGGGTGGGTT	AAGCAATTGC	AAATCGACTA	TCCCGGACAT	GAAGTAATGA	2820
CAGCCGCGGC	CTCACAAGGG	CTAACCAGAA	AAGGAGTGTA	TGCCGTCCGG	CAGAAAGTCA	2880
ATGAAAACCC	ACTGTACGCG	ATCACATCAG	AGCATGTGAA	CGTGTGCTC	ACCGCACTG	2940
AGGACAGGCT	AGTGTGGAAG	ACCTTGCAGG	GCGACCCATG	GATTAAGCAG	CTCACTAACA	3000
TACCTAAAGG	AAACTTTCAG	GCTACTATAG	AGGACTGGGA	AGCTGAACAC	AAGGGAATAA	3060
TTGCTGCAAT	AAACAGCCCC	ACTCCCCGTG	CCAATCCGTT	CAGCTGCAAG	ACCAACGTTT	3120
GCTGGGCGAA	AGCATTGGAA	CCGATACTAG	CCACGGCCGG	TATCGTACTT	ACCGTTGCC	3180
AGTGGAGCGA	ACTGTTCCCA	CAGTTTGCGG	ATGACAAACC	ACATTCGGCC	ATTTACGCCT	3240
TAGACGTAAT	TTGCATTAAG	TTTTTCGGCA	TGGACTTGAC	AAGCGGACTG	TTTTCTAAAC	3300
AGAGCATCCC	ACTAACGTAC	CATCCCGCCG	ATTGAGCGAG	GCCGGTAGCT	CATTGGGACA	3360
ACAGCCCAGG	AACCCGCAAG	TATGGGTACG	ATCACGCCAT	TGCCGCCGAA	CTCTCCCGTA	3420
GATTTCCGGT	GTTCCAGCTA	GCTGGGAAGG	GCACACAAC	TGATTTGCAG	ACGGGGAGAA	3480
CCAGAGTTAT	CTCTGCACAG	CATAACCTGG	TCCCGGTGAA	CCGCAATCTT	CCTCAGCCT	3540
TAGCCCCCGA	GTACAAGGAG	AAGCAACCCG	GCCCCGTGCA	AAAATTCTTG	AACCAGTTCA	3600
AACACCACTC	AGTACTTGTG	GTATCAGAGG	AAAAAATTGA	AGCTCCCCGT	AAGAGAATCG	3660
AATGGATCGC	CCCGATTGGC	ATAGCCGGTG	CAGATAAGAA	CTACAACCTG	GCTTTCGGGT	3720
TTCCGCCGCA	GGCACGGTAC	GACCTGGTGT	TCATCAACAT	TGGAACATAA	TACAGAAACC	3780
ACCACTTTCA	GCAGTGCGAA	GACCATGCGG	CGACCTTAAA	AGCCCTTTTCG	CGTTCGGCCC	3840
TGAATTGCCT	CAACCCAGGA	GGCACCCCTG	TGGTGAAGTC	CTATGGCTAC	GCCSACCGCA	3900
ACAGTGAGGA	CGTAGTCACC	GCTCTTGCCA	GAAAGTTTGT	CAGGGTGTCT	GCAGCGAGAC	3960
CAGATTGTGT	CTCAAGCAAT	ACAGAAATGT	ACCTGATTTT	CCGACAAC	GACAACAGCC	4020
GTACACGGCA	ATTCACCCCG	CACCATCTGA	ATTGCGTGAT	TTCGTCCGTG	TATGAGGGTA	4080
CAAGAGATGG	AGTTGGAGCC	GCGCCGTCAT	ACCGCACCAA	AAGGGAGAAT	ATTGCTGACT	4140
GTCAAGAGGA	AGCAGTTGTC	AACGCAGCCA	ATCCGCTGGG	TAGACCAGGC	GAAGGAGTCT	4200
GCCGTGCCAT	CTATAAACGT	TGGCCGACCA	GTTTTACCGA	TTCAGCCACG	GAGACAGGCA	4260
CCGCAAGAAT	GACTGTGTGC	CTAGGAAAGA	AAGTGATCCA	CGCGGTCGGC	CCTGATTTCC	4320
GGAAGCACCC	AGAAGCAGAA	GCCTTGAAAT	TGCTACAAAA	CGCCTACCAT	GCAAGTGGCAG	4380
ACTTAGTAAA	TGAACATAAC	ATCAAGTCTG	TCGCCATTCC	ACTGCTATCT	ACAGGCATTT	4440
ACGCAGCCGG	AAAAGACCGC	CTTGAAGTAT	CACCTAACTG	CTTGACAACC	GCGCTAGACA	4500
GAAGTGACGC	GGACGTAACC	ATCTATTGCC	TGGATAAGAA	GTGGAAGGAA	AGAATCGACG	4560

FIGUR 3 C

CGGCACTCCA	ACTTAAGGAG	TCTGTAACAG	AGCTGAAGGA	TGAAGATATG	GAGATCGACG	4620
ATGAGTTAGT	ATGGATCCAT	CCAGACAGTT	GCTTGAAGGG	AAGAAAGGGA	TTCAGTACTA	4680
CAAAAGGAAA	ATTGTATTCG	TACTTCGAAG	GCACCAAATT	CCATCAAGCA	GCAAAAGACA	4740
TGGCGGAGAT	AAAGGTCCTG	TTCCCTAATG	ACCAGGAAAG	TAATGAACAA	CTGTGTGCCT	4800
ACATATTGGG	TGAGACCATG	GAAGCAATCC	GCGAAAAGTG	CCCGGTCGAC	CATAACCCGT	4860
CGTCTAGCCC	GCCCAAAACG	TTGCCGTGCC	TTTGCATGTA	TGCCATGACG	CCAGAAAGGG	4920
TCCACAGACT	TAGAAGCAAT	AACGTCAAAG	AAGTTACAGT	ATGCTCCTCC	ACCCCCCTTC	4980
CTAAGCACAA	AATTAAGAAT	GTTCAGAAAG	TTCAGTGCAC	GAAAGTAGTC	CTGTTTAATC	5040
CGCACACTCC	CGCATTCTGT	CCCGCCCGTA	AGTACATAGA	AGTGCCAGAA	CAGCCTACCG	5100
CTCCTCCTGC	ACAGGCCGAG	GAGGCCCCCG	AAGTTGTAGC	GACACCGTCA	CCATCTACAG	5160
CTGATAACAC	CTCGCTTGAT	GTCACAGACA	TCTCACTGGA	TATGGATGAC	AGTAGCGAAG	5220
GCTCACTTTT	TTGAGCTTTT	AGCGGATCGG	ACAACTCTAT	TACTAGTATG	GACAGTTGGT	5280
CGTCAGGACC	TAGTTCCTA	GAGATAGTAG	ACCGAAGGCA	GGTGGTGGTG	GCTGACGTTT	5340
ATGCCGTCCA	TGAGCCTGCC	CCTATTCCAC	CGCCAAGGCT	AAAGAAGATG	GCCCGCCTGG	5400
CAGCGGCAAG	AAAAGAGCCC	ACTCCACCGG	CAAGCAATAG	CTCTGAGTCC	CTCCACCTCT	5460
CTTTTGGTGG	GGTATCCATG	TCCCTCGGAT	CAATTTTCGA	CGGAGAGACG	GCCCGCCAGG	5520
CAGCGGTACA	ACCCCTGGCA	ACAGGCCCCA	CGGATGTGCC	TATGTCTTTC	GGATCGTTTT	5580
CCGACGGAGA	GATTGATGAG	CTGAGCCGCA	GAGCAACTGA	GTCCGAACCC	GTCCTGTTTG	5640
GATCATTTGA	ACCGGGCGAA	GTGAACTCAA	TTATATCGTC	CCGATCAGCC	GTATCTTTTC	5700
CACTACGCAA	GCAGAGACGT	AGACGCAGGA	GCAGGAGGAC	TGAATACTGA	CTAACCGGGG	5760
TAGGTGGGTA	CATATTTTCG	ACGGACACAG	GCCCTGGGCA	CTTGCAAAAG	AAGTCCGTTC	5820
TGCAGAACCA	GCTTACAGAA	CCGACCTTGG	AGCGCAATGT	CCTGGAAAGA	ATTCATGCCC	5880
CGGTGCTCGA	CACGTCGAAA	GAGGAACAAC	TCAAACCTCAG	GTACCAGATG	ATGCCACCG	5940
AAGCCAACAA	AAGTAGGTAC	CAGTCTCGTA	AAGTAGAAAA	TCAGAAAGCC	ATAACCACTG	6000
AGCGACTACT	GTCAGGACTA	CGACTGTATA	ACTCTGCCAC	AGATCAGCCA	GAATGCTATA	6060
AGATCACCTA	TCCGAAACCA	TTGTACTCCA	GTAGCGTACC	GGCGAACTAC	TCCGATCCAC	6120
AGTTGCTGT	AGCTGTCTGT	AACAACATATC	TGCATGAGAA	CTATCCGACA	GTAGCATCTT	6180
ATCAGATTAC	TGACGAGTAC	GATGCTTACT	TGGATATGGT	AGACGGGACA	GTCGCCTGCC	6240
TGGATACTGC	AACCTTCTGC	CCCGCTAAGC	TTAGAAGTTA	CCCGAAAAAA	CATGAGTATA	6300
GAGCCCCGAA	TATCCGCAGT	GCGGTTCCAT	CAGCGATGCA	GAACACGCTA	CAAAATGTGC	6360
TCATTGCCGC	AACTAAAAGA	AATTGCAACG	TCACGCAGAT	GCGTGAAGT	CCAACACTGG	6420
ACTCAGCGAC	ATTCAATGTC	GAATGCTTTC	GAAAATATGC	ATGTAATGAC	GAGTATTGGG	6480
AGGAGTTCGC	TCGGAAGCCA	ATTAGGATTA	CCACTGAGTT	TGTCACCGCA	TATGTAGCTA	6540
GACTIONAAGG	CCCTAAGGCC	GCCACACTAT	TTGCAAAGAC	GTATAATTTG	GTCCCATTGC	6600
AAGAAGTGCC	TATGGATAGA	TTGTCATGG	ACATGAAAAG	AGACGTGAAA	GTTACACCAG	6660
GCACGAAACA	CACAGAAGAA	AGACCGAAAG	TACAAGTGAT	ACAAGCCGCA	GAACCCCTGG	6720
CGACTGCTTA	CTTATGCGGG	ATTCACCGGG	AATTAGTGCG	TAGGCTTACG	GCCGTCTTGC	6780
TTCCAAACAT	TCACACGCTT	TTTGACATGT	CGGCGGAGGA	TTTTGATGCA	ATCATAGCAG	6840

FIGUR 3 D

AACACTTCAA	GCAAGGCGAC	CCGGTACTGG	AGACGGATAT	CGCATCATTC	GACAAAAGCC	6900
AAGACGACGC	TATGGCGTTA	ACCGGTCTGA	TGATCTTGGA	GGACCTGGGT	GTGGATCAAC	6960
CACTACTCGA	CTTGATCGAG	TGCGCCTTTG	GAGAAATATC	ATCCACCCAT	CTACCTACGG	7020
GTA CTGTTT	TAAATTCGGG	GCGATGATGA	AATCCGGAAT	GTTCTCACA	CTTTTTGTCA	7080
ACACAGTTTT	GAATGTCGTT	ATCGCCAGCA	GAGTACTAGA	AGAGCGGCTT	AAAACGTCCA	7140
GATGTGCAGC	GTTTATTGGC	GACGACAACA	TCATACATGG	AGTAGTATCT	GACAAAGAAA	7200
TGGCTGAGAG	GTGCGCCACC	TGGCTCAACA	TGGAGGTTAA	GATCATCGAC	GCAGTCATCG	7260
GTGAGAGACC	ACCTTACTTC	TGCGGCGGAT	TTATCTTGCA	AGATTTCGGTT	ACTTCCACAG	7320
CGTGCCGCGT	GGCGGATCCC	CTGAAAAGGC	TGTTTAAAGTT	GGGTAAACCG	CTCCCAGCCG	7380
ACGACGAGCA	AGACGAAGAC	AGAAGACGCG	CTCTGCTAGA	TGAAACAAAG	GCGTGGTTTA	7440
GAGTAGGTAT	AACAGGCACT	TTAGCAGTGG	CCGTGACGAC	CCGGTATGAG	GTAGACAATA	7500
TTACACCTGT	CCTACTGGCA	TTGAGAACTT	TTGCCCAGAG	CAAAAGAGCA	TTCCAAGCCA	7560
TCAGAGGGGA	AATAAAGCAT	CTCTACGGTG	GTCCTAAATA	GTCAGCATAG	TACATTTTCAT	7620
CTGACTAATA	CTACAACACC	ACCACCATGA	ATAGAGGATT	CTTTAACATG	CTCGGCCGCC	7680
GCCCCTTCCC	GGCCCCCACT	GCCATGTGGA	GGCCGCGGAG	AAGGAGGCAG	GCGGCCCCGA	7740
TGCCTGCCCG	CAACGGGCTG	GCTTCTCAAA	TCCAGCAACT	GACCACAGCC	GTCAGTGCCC	7800
TAGTCATTGG	ACAGGCAACT	AGACCTCAAC	CCCCACGTCC	ACGCCCCGCA	CCGCGCCAGA	7860
AGAAGCAGGC	GCCCAAGCAA	CCACCGAAGC	CGAAGAAACC	AAAAACGCAG	GAGAAGAAGA	7920
AGAAGCAACC	TGCAAAACCC	AAACCCGGAA	AGAGACAGCG	CATGGCACTT	AAGTTGGAGG	7980
CCGACAGATT	GTTTCGACGTC	AAGAACGAGG	ACGGAGATGT	CATCGGGCAC	GCACTGGCCA	8040
TGGAAGGAAA	GGTAATGAAA	CCTCTGCACG	TGAAAGGAAC	CATCGACCAC	CCTGTGCTAT	8100
CAAAGCTCAA	ATTTACCAAG	TCGTCAGCAT	ACGACATGGA	GTTTCGCACAG	TTGCCAGTCA	8160
ACATGAGAAG	TGAGGCATTC	ACCTACACCA	GTGAACACCC	CGAAGGATTC	TATAACTGGC	8220
ACCACGGAGC	GGTGCAGTAT	AGTGGAGGTA	GATTTACCAT	CCCTCGCGGA	GTAGGAGGCA	8280
GAGGAGACAG	CGGTCGTCCG	ATCATGGATA	ACTCCGGTCG	GGTTGTGCGG	ATAGTCCTCG	8340
GTGGCGCTGA	TGAAGGAACA	CGAACTGCCC	TTTCGGTCTG	CACCTGGAAT	AGTAAAGGGA	8400
AGACAATTAA	GACGACCCCG	GAAGGGACAG	AAGAGTGGTC	CGCAGCACCA	CTGGTCACGG	8460
CAATGTGTTT	GCTCGGAAAT	GTGAGCTTCC	CATGCGACCG	CCCGCCCACA	TGCTATACCC	8520
GCGAACCTTC	CAGAGCCCTC	GACATCCTTG	AAGAGAACGT	GAACCATGAG	GCCTACGATA	8580
CCCTGCTCAA	TGCCATATTG	CGGTGCGGAT	CGTCTGGCAG	AAGCAAAAGA	AGCGTCGTTG	8640
ACGACTTTAC	CCTGACCAGC	CCCTACTTGG	GCACATGCTC	GTA CTGCCAC	CATACTGAAC	8700
CGTGCTTCAG	CCCTGTTAAG	ATCGAGCAGG	TCTGGGACGA	AGCGGACGAT	AACACCATAC	8760
GCATACAGAC	TTCCGCCCCAG	TTTGGATACG	ACCAAAGCGG	AGCAGCAAGC	GCAAACAAGT	8820
ACCGCTACAT	GTCGCTTAAG	CAGGATCACA	CCGTTAAAGA	AGGCACCATG	GATGACATCA	8880
AGATTAGCAC	CTCAGGACCG	TGTAGAAGGC	TTAGCTACAA	AGGATACTTT	CTCCTCGCAA	8940
AATGCCCTCC	AGGGGACAGC	GTAACGGTTA	GCATAGTGAG	TAGCAACTCA	GCAACGTCAT	9000
GTACACTGGC	CCGCAAGATA	AAACCAAAAT	TCGTGGGACG	GGAAAAATAT	GATCTACCTC	9060
CCGTTCACGG	TAAAAGAATT	CCTTGACACG	TGTACGACCG	TCTGAAAACA	ACTGCAGGCT	9120

FIGUR 3 E

ACATCACTAT	GCACAGGCCG	GGACCGCACG	CTTATACATC	CTACCTGGAA	GAATCATCAG	9180
GGAAAGTTTA	CGCAAAGCCG	CCATCTGGGA	AGAACATTAC	GTATGAGTGC	AAGTGCGGCG	9240
ACTACAAGAC	CGGAACCGTT	TCGACCCGCA	CCGAAATCAC	TGGTTGCACC	GCCATCAAGC	9300
AGTGCGTCGC	CTATAAGAGC	GACCAAACGA	AGTGGGTCTT	CAACTCACCG	GACTTGATCA	9360
GACATGACGA	CCACACGGCC	CAAGGGAAAT	TGCATTTGCC	TTTCAAGTTG	ATCCCGGGTG	9420
CCTGCATGGT	CCCTGTTGCC	CACGCGCCGA	ATGTAATACA	TGGCTTTAAA	CACATCAGCC	9480
TCCAATTAGA	TACAGACCAC	TTGACATTGC	TCACCACCAG	GAGACTAGGG	GCAAACCCGG	9540
AACCAACCAC	TGAATGGATC	GTCGGAAAAG	CGGTCAGAAA	CTTCACCGTC	GACCGAGATG	9600
GCCTGGAATA	CATATGGGGA	AATCATGAGC	CAGTGAGGGT	CTATGCCCAA	GAGTCAGCAC	9660
CAGGAGACCC	TCACGGATGG	CCACACGAAA	TAGTACAGCA	TTACTACCAT	CGCCATCCTG	9720
TGTACACCAT	CTTAGCCGTC	GCATCAGCTA	CCGTGGCGAT	GATGATTGGC	GTAAGTGTG	9780
CAGTGTATG	TGCCTGTAAA	GCGCGCCGTG	AGTGCCTGAC	GCCATACGCC	CTGGCCCCAA	9840
ACGCCGTAAT	CCCAACTTCG	CTGGCACTCT	TGTGCTGCGT	TAGGTCGGCC	AATGCTGAAA	9900
CGTTCACCGA	GACCATGAGT	TACTTGTGGT	CGAACAGTCA	GCCGTTCTTC	TGGGTCCAGT	9960
TGTGCATACC	TTTGGCCGCG	TTCATCGTTC	TAATGCGCTA	CTGCTCCTGC	TGCCTGCCTT	10020
TTTTAGTGGT	TGCCGGCGCC	TACCTGGCGA	AGGTAGACGC	CTACGAACAT	GCGACCACTG	10080
TTCCAAATGT	GCCACAGATA	CCGTATAAGG	CACTTGTTGA	AAGGGCAGGG	TATGCCCCGC	10140
TCAATTTGGA	GATCACTGTC	ATGTCCTCGG	AGGTTTTGCC	TTCCACCAAC	CAAGAGTACA	10200
TTACCTGCAA	ATTCAACCACT	GTGGTCCCTT	CCCCAAAAAT	CAAATGCTGC	GGCTCCTTGG	10260
AATGTCAGCC	GGCCGCTCAT	GCAGACTATA	CCTGCAAGGT	CTTCGGAGGG	GTCTACCCCT	10320
TTATGTGGGG	AGGAGCGCAA	TGTTTTTGCG	ACAGTGAGAA	CAGCCAGATG	AGTGAGGCGT	10380
ACGTGCAATT	GTCAGCAGAT	TGCGCGTCTG	ACCACGCGCA	GGCGATTAA	GTGCACACTG	10440
CCGCGATGAA	AGTAGGACTG	CGTATAGTGT	ACGGGAACAC	TACCAGTTTC	CTAGATGTGT	10500
ACGTGAACGG	AGTCACACCA	GGAACGTCTA	AAGACTTGAA	AGTCATAGCT	GGACCAATTT	10560
CAGCATCGTT	TACGCCATTC	GATCATAAGG	TCGTTATCCA	TCGCGGCCTG	GTGTACAACT	10620
ATGACTTCCC	GGAATATGGA	GCGATGAAAC	CAGGAGCGTT	CGGAGACATT	CAAGCTACCT	10680
CCTTGACTAG	CAAGGATCTC	ATCGCCAGCA	CAGACATTAG	GCTACTCAAG	CCTTCGCCCA	10740
AGAACGTGCA	TGTCCCGTAC	ACGCAGGCCG	CATCAGGATT	TGAGATGTGG	AAAAACAAC	10800
CAGGCCGCC	ACTGCAGGAA	ACCGCACCTT	TCGGGTGTAA	GATTGCAGTA	AATCCGCTCC	10860
GAGCGGTGGA	CTGTTCATAC	GGGAACATTC	CCATTTCTAT	TGACATCCCG	AACGCTGCCT	10920
TTATCAGGAC	ATCAGATGCA	CCACTGGTCT	CAACAGTCAA	ATGTGAAGTC	AGTGAGTGCA	10980
CTTATTCAGC	AGACTTCGGC	GGGATGGCCA	CCCTGCAGTA	TGTATCCGAC	CGCGAAGGTC	11040
AATGCCCCGT	ACATTCGCAT	TCGAGCACAG	CAACTCTCCA	AGAGTCGACA	GTACATGTCC	11100
TGGAGAAAGG	AGCGGTGACA	GTACACTTTA	GCACCGCGAG	TCCACAGGCG	AACTTTATCG	11160
TATCGCTGTG	TGGGAAGAAG	ACAACATGCA	ATGCAGAATG	TAAACCACCA	GCTGACCATA	11220
TCGTGAGCAC	CCCGCACAAA	AATGACCAAG	AATTTCAAGC	CGCCATCTCA	AAAACATCAT	11280
GGAGTTGGCT	GTTTGCCCTT	TTGGCGGGCG	CCTCGTCGCT	ATTAATTATA	GGACTTATGA	11340
TTTTTGCTTG	CAGCATGATG	CTGACTAGCA	CACGAAGATG	ACCGCTACGC	CCCAATGATC	11400

FIGUR 3 F

CGACCAGCAA	AACTCGATGT	ACTTCCGAGG	AACTGATGTG	CATAATGCAT	CAGGCTGGTA	11460
CATTAGATCC	CCGCTTACCG	CGGGCAATAT	AGCAACACTA	AAAACCTCGAT	GTACTTCCGA	11520
GGAAGCGCAG	TGCATAATGC	TGCGCAGTGT	TGCCACATAA	CCACTATATT	AACCATTAT	11580
CTAGCGGACG	CCAAAACTC	AATGTATTTT	TGAGGAAGCG	TGGTGCATAA	TGCCACGCAG	11640
CGTCTGCATA	ACTTTTATTA	TTTCTTTTAT	TAATCAACAA	AATTTTGT	TTAACATTTT	11700
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAAAATCTAG	AGGGCCCTAT	TCTATAGTGT	CACCTAAATG	11760
CTAGAGCTCG	CTGATCAGCC	TCGACTGTGC	CTTCTAGTTG	CCAGCCATCT	GTTGTTTGCC	11820
CCTCCCCCGT	GCCTTCCTTG	ACCCTGGAAG	GTGCCACTCC	CACTGTCCTT	TCCTAATAAA	11880
ATGAGGAAAT	TGCATCGCAT	TGTCTGAGTA	GGTGTCAATC	TATTCTGGGG	GGTGGGGTGG	11940
GGCAGGACAG	CAAGGGGGAG	GATTGGGAAG	ACAATAGCAG	GCATGCTGGG	GATGCGGTGG	12000
GCTCTATGGC	TTCTGAGGCG	GAAAGAACCA	GCTGGGGCTC	TAGGGGGTAT	CCCCACGCGC	12060
CCTGTAGCGG	CGCATTAAAGC	GCGGCGGGTG	TGGTGGTTAC	GCGCAGCGTG	ACCGCTACAC	12120
TTGCCAGCGC	CCTAGCGCCC	GCTCCTTTTCG	CTTTCTTCCC	TTCTTTTCTC	GCCACGTTTCG	12180
CCGGCTTTTC	CCGTCAAGCT	CTAAATCGGG	GCATCCCTTT	AGGGTTCCGA	TTTAGTGCTT	12240
TACGGCACCT	CGACCCCAAA	AAACTTGATT	AGGGTGATGG	TTCACGTAGT	GGGCCATCGC	12300
CCTGATAGAC	GGTTTTTCGC	CCTTTGACGT	TGGAGTCCAC	GTTCTTTAAT	AGTGGACTCT	12360
TGTTCCAAAC	TGGAACAACA	CTCAACCCTA	TCTCGGTCTA	TTCTTTTGAT	TTATAAGGGA	12420
TTTTGGGGAT	TTCGGCCTAT	TGGTTAAAAA	ATGAGCTGAT	TTAACAAAAA	TTTAACGCGA	12480
ATTAATTCTG	TGGAATGTGT	GTCAGTTAGG	GTGTGGAAAG	TCCCCAGGCT	CCCCAGGCAG	12540
GCAGAAGTAT	GCAAAGCATG	CATCTCAATT	AGTCAGCAAC	CAGGTGTGGA	AAGTCCCCAG	12600
GCTCCCCAGC	AGGCAGAAGT	ATGCAAAGCA	TGCATCTCAA	TTAGTCAGCA	ACCATAGTCC	12660
CGCCCCCTAAC	TCCGCCCATC	CGCCCCCTAA	CTCCGCCCAG	TTCCGCCCAT	TCTCCGCCCC	12720
ATGGCTGACT	AATTTTTTTT	ATTTATGCAG	AGGCCGAGGC	CGCCTCTGCC	TCTGAGCTAT	12780
TCCAGAAGTA	GTGAGGAGGC	TTTTTTGGAG	GCCTAGGCTT	TTGCAAAAAG	CTCCCGGGAG	12840
CTTGTATATC	CATTTTCGGA	TCTGATCAAG	AGACAGGATG	AGGATCGTTT	CGCATGATTG	12900
AACAAGATGG	ATTGCACGCA	GGTTCTCCGG	CCGCTTGGGT	GGAGAGGCTA	TTCGGCTATG	12960
ACTGGGCACA	ACAGACAATC	GGCTGCTCTG	ATGCCGCCGT	GTTCCGGCTG	TCAGCGCAGG	13020
GGCGCCCGGT	TCTTTTTGTC	AAGACCGACC	TGTCCGGTGC	CCTGAATGAA	CTGCAGGACG	13080
AGGCAGCGCG	GCTATCGTGG	CTGGCCACGA	CGGGCGTTCC	TTGCGCAGCT	GTGCTCGACG	13140
TTGTCACTGA	AGCGGGAAGG	GA CTGGCTGC	TATTGGGCGA	AGTGCCGGGG	CAGGATCTCC	13200
TGTCATCTCA	CCTTGCTCCT	GCCGAGAAAG	TATCCATCAT	GGCTGATGCA	ATGCGGCGGC	13260
TGCATACGCT	TGATCCGGCT	ACCTGCCCAT	TCGACCACCA	AGCGAAACAT	CGCATCGAGC	13320
GAGCACGTAC	TCGGATGGAA	GCCGGTCTTG	TCGATCAGGA	TGATCTGGAC	GAAGAGCATC	13380
AGGGGCTCGC	GCCAGCCGAA	CTGTTGCGCA	GGCTCAAGGC	GCGCATGCCC	GACGGCGAGG	13440
ATCTCGTCGT	GACCCATGGC	GATGCCTGCT	TGCCGAATAT	CATGGTGGA	AATGGCCGCT	13500
TTTCTGGATT	CATCGACTGT	GGCCGGCTGG	GTGTGGCGGA	CCGCTATCAG	GACATAGCGT	13560
TGGCTACCCG	TGATATTGCT	GAAGAGCTTG	GCGGCGAATG	GGCTGACCGC	TTCTCGTG	13620
TTTACGGTAT	CGCCGCTCCC	GATTGCGCAGC	GCATCGCCTT	CTATCGCCTT	CTTGACGAGT	13680

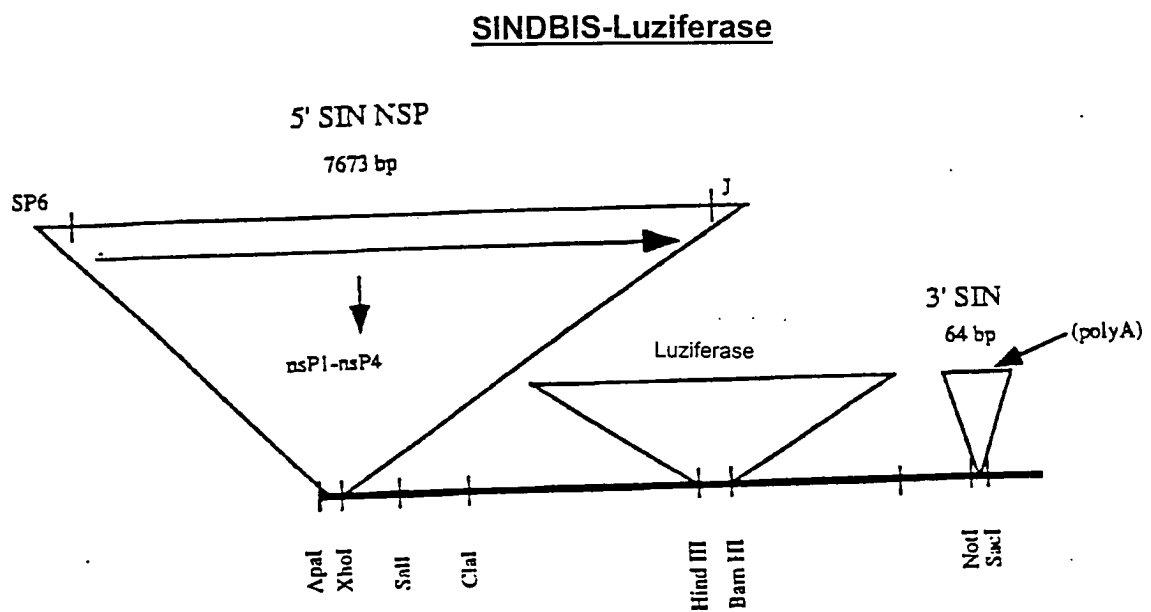
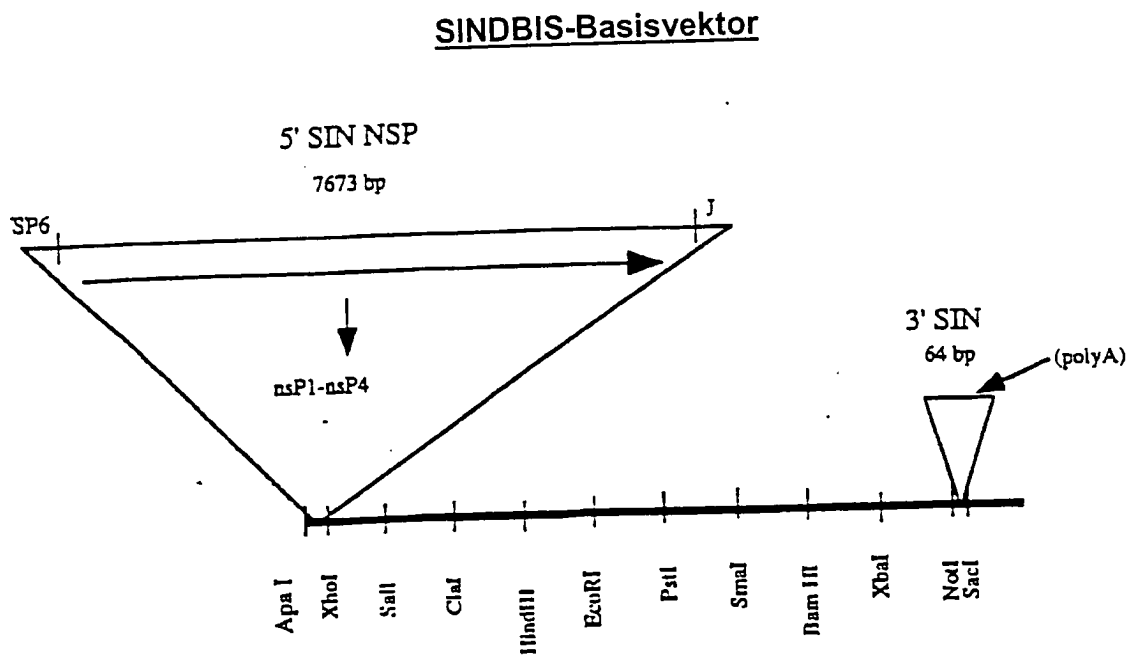
FIGUR 3 G

TCTTCTGAGC	GGGACTCTGG	GGTTCGAAAT	GACCGACCAA	GCGACGCCCA	ACCTGCCATC	13740
ACGAGATTTT	GATTCCACCG	CCGCCTTCTA	TGAAAGGTTG	GGCTTCGGAA	TCGTTTTCCG	13800
GGACGCCGGC	TGGATGATCC	TCCAGCGCGG	GGATCTCATG	CTGGAGTTCT	TCGCCCACCC	13860
CAACTTGTTT	ATTGCAGCTT	ATAATGGTTA	CAAATAAAGC	AATAGCATCA	CAAATTTAC	13920
AAATAAAGCA	TTTTTTTAC	TGCATTCTAG	TTGTGGTTTG	TCCAAACTCA	TCAATGTATC	13980
TTATCATGTC	TGTATACCGT	CGACCTCTAG	CTAGAGCTTG	GCGTAATCAT	GGTCATAGCT	14040
GTTCCTGTG	TGAAATTGTT	ATCCGCTCAC	AATCCACAC	AACATACGAG	CCGGAAGCAT	14100
AAAGTGTAAG	GCCTGGGGTG	CCTAATGAGT	GAGCTAACTC	ACATTAATTG	CGTTGCGCTC	14160
ACTGCCCGCT	TTCCAGTCGG	GAAACCTGTC	GTGCCAGCTG	CATTAATGAA	TCGGCCAACG	14220
CGCGGGGAGA	GGCGGTTTGC	GTATTGGGCG	CTCTTCCGCT	TCCTCGCTCA	CTGACTCGCT	14280
GCGCTCGGTC	GTTCCGCTGC	GGCGAGCGGT	ATCAGCTCAC	TCAAAGGCGG	TAATACGGTT	14340
ATCCACAGAA	TCAGGGGATA	ACGCAGGAAA	GAACATGTGA	GCAAAAAGGCC	AGCAAAAAGGC	14400
CAGGAACCGT	AAAAAGGCCG	CGTTGCTGGC	GTTTTTCCAT	AGGCTCCGCC	CCCCTGACGA	14460
GCATCACAAA	AATCGACGCT	CAAGTCAGAG	GTGGCGAAAC	CCGACAGGAC	TATAAAGATA	14520
CCAGGCGTTT	CCCCCTGGAA	GCTCCCTCGT	GCGCTCTCCT	GTTCCGACCC	TGCCGCTTAC	14580
CGGATACCTG	TCCGCTTTTC	TCCCTTCGGG	AAGCGTGGCG	CTTTCTCAAT	GCTCACGCTG	14640
TAGGTATCTC	AGTTCGGTGT	AGGTCGTTCT	CTCCAAGCTG	GGCTGTGTGC	ACGAACCCCC	14700
CGTTCAGCCC	GACCGCTGCG	CCTTATCCGG	TAATATCGT	CTTGAGTCCA	ACCCGGTAAG	14760
ACACGACTTA	TCGCCACTGG	CAGCAGCCAC	TGGTAACAGG	ATTAGCAGAG	CGAGGTATGT	14820
AGGCGGTGCT	ACAGAGTTCT	TGAAGTGGTG	GCCTAACTAC	GGCTACACTA	GAAGGACAGT	14880
ATTTGGTATC	TGCGCTCTGC	TGAAGCCAGT	TACCTTCGGA	AAAAGAGTTG	GTAGCTCTTG	14940
ATCCGGCAAA	CAAACCACCG	CTGGTAGCGG	TGGTTTTTTT	GTTTGCAAGC	AGCAGATTAC	15000
GCGCAGAAAA	AAAGGATCTC	AAGAAGATCC	TTTGATCTTT	TCTACGGGGT	CTGACGCTCA	15060
GTGGAACGAA	AACTCACGTT	AAGGGATTTT	GGTCATGAGA	TTATCAAAAA	GGATCTTCAC	15120
CTAGATCCTT	TTAAATTAAG	AATGAAGTTT	TAAATCAATC	TAAAGTATAT	ATGAGTAAAC	15180
TTGGTCTGAC	AGTTACCAAT	GCTTAATCAG	TGAGGCACCT	ATCTCAGCGA	TCTGTCTATT	15240
TCGTTTATCC	ATAGTTGCCT	GACTCCCCGT	CGTGTAGATA	ACTACGATAC	GGGAGGGCTT	15300
ACCATCTGGC	CCCAGTGCTG	CAATGATACC	GCGAGACCCA	CGCTCACCAG	CTCCAGATTT	15360
ATCAGCAATA	AACCAGCCAG	CCGGAAGGGC	CGAGCGCAGA	AGTGGTCCTG	CAACTTTATC	15420
CGCCTCCATC	CAGTCTATTA	ATTGTTGCCG	GGAAGCTAGA	GTAAGTAGTT	CGCCAGTTAA	15480
TAGTTTGCGC	AACGTTGTTG	CCATTGCTAC	AGGCATCGTG	GTGTCACGCT	CGTCGTTTGG	15540
TATGGCTTCA	TTCAGCTCCG	GTTCCCAACG	ATCAAGGCGA	GTTACATGAT	CCCCATGTT	15600
GTGCAAAAAA	GCGGTTAGCT	CCTTCGGTCC	TCCGATCGTT	GTCAGAAGTA	AGTTGGCCGC	15660
AGTGTTATCA	CTCATGGTTA	TGGCAGCACT	GCATAATTCT	CTTACTGTCA	TGCCATCCGT	15720
AAGATGCTTT	TCTGTGACTG	GTGAGTACTC	AACCAAGTCA	TTCTGAGAAT	AGTGTATGCG	15780
GCGACCGAGT	TGCTCTTGCC	CGGCGTCAAT	ACGGGATAAT	ACCGCGCCAC	ATAGCAGAAC	15840
TTTAAAAGTG	CTCATCATTG	GAAAACGTTT	TTCGGGGCGA	AAACTCTCAA	GGATCTTACC	15900
GCTGTTGAGA	TCCAGTTCGA	TGTAACCCAC	TCGTGCACCC	AACTGATCTT	CAGCATCTTT	15960

FIGUR 3 H

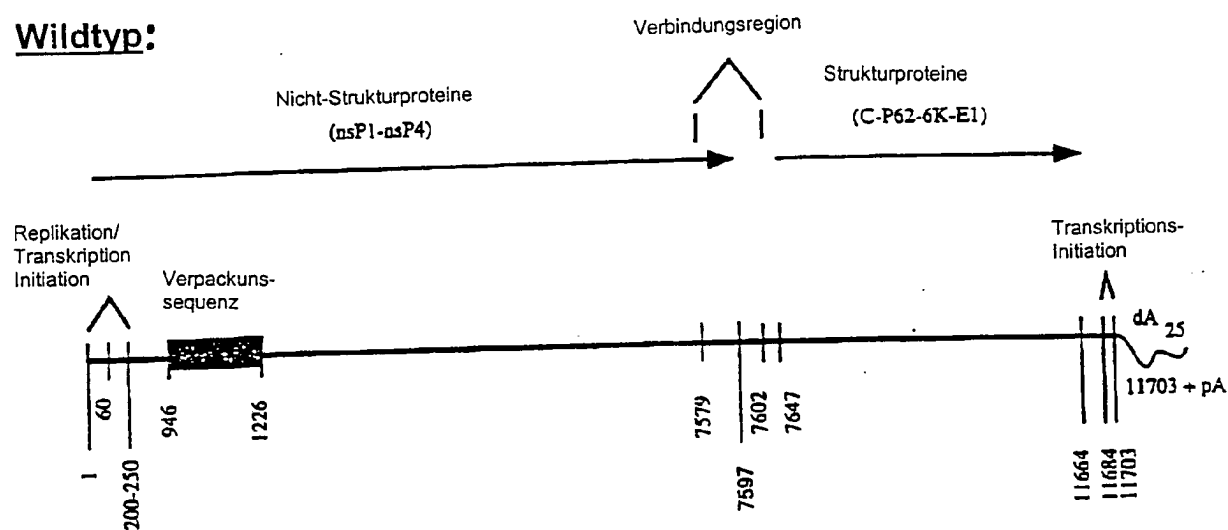
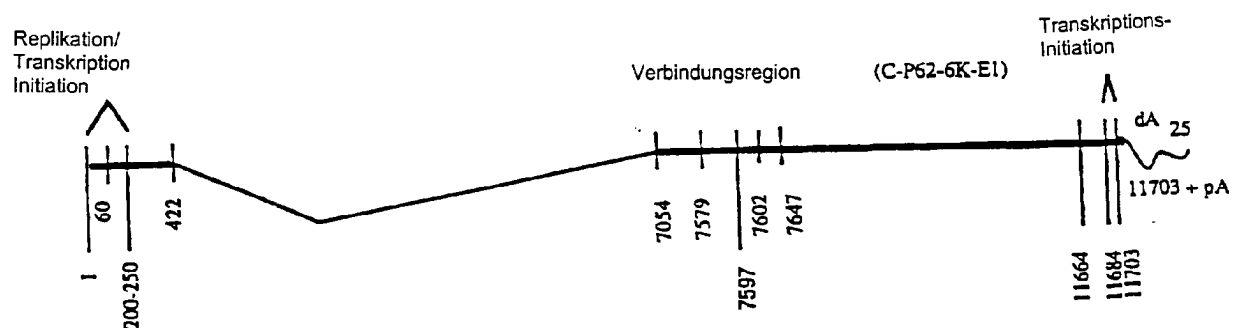
TACTTTCACC	AGCGTTTCTG	GGTGAGCAAA	AACAGGAAGG	CAAAATGCCG	CAAAAAAGGG	16020
AATAAGGGCG	ACACGGAAAT	GTTGAATACT	CATACTCTTC	CTTTTTCAT	ATTATTGAAG	16080
CATTTATCAG	GGTTATTGTC	TCATGAGCGG	ATACATATTT	GAATGTATTT	AGAAAAATAA	16140
ACAAATAGGG	GTTCCGCGCA	CATTTCCCCG	AAAAGTGCCA	CCTGACGTCG	ACGGATCGGG	16200
AGATCTAATG	AAAGACCCCA	CCTGTAGGTT	TGGCAAGCTA	GCTTAAGTAA	CGCCATTTTG	16260
CAAGGCATGG	AAAAATACAT	AACTGAGAAT	AGAGAAGTTC	AGATCAAGGT	CAGGAACAGA	16320
TGGAACAGCT	GAATATGGGC	CAACAGGAT	ATCTGTGGTA	AGCAGTTCCT	GCCCCGGCTC	16380
AGGGCCAAGA	ACAGATGGAA	CAGCTGAATA	TGGGCCAAAC	AGGATATCTG	TGGTAAGCAG	16440
TTCCTGCCCC	GGCTCAGGGC	CAAGAACAGA	TGGTCCCCAG	ATGCGGTCCA	GCCCTCAGCA	16500
GTTTCTAGAG	AACCATCAGA	TGTTTCCAGG	GTGCCCCAAG	GACCTGAAAT	GACCTGTGC	16560
CTTATTTGAA	CTAACCAATC	AGTTCGCTTC	TCGCTTCTGT	TCGCGCGCTT	CTGCTCCCCG	16620
AGCTCAATAA	AAGAGCCAC	AACCCCTCAC	TCGGGG			16656

FIGUR 4
SINDBIS-EXPRESSIONSVEKTOREN

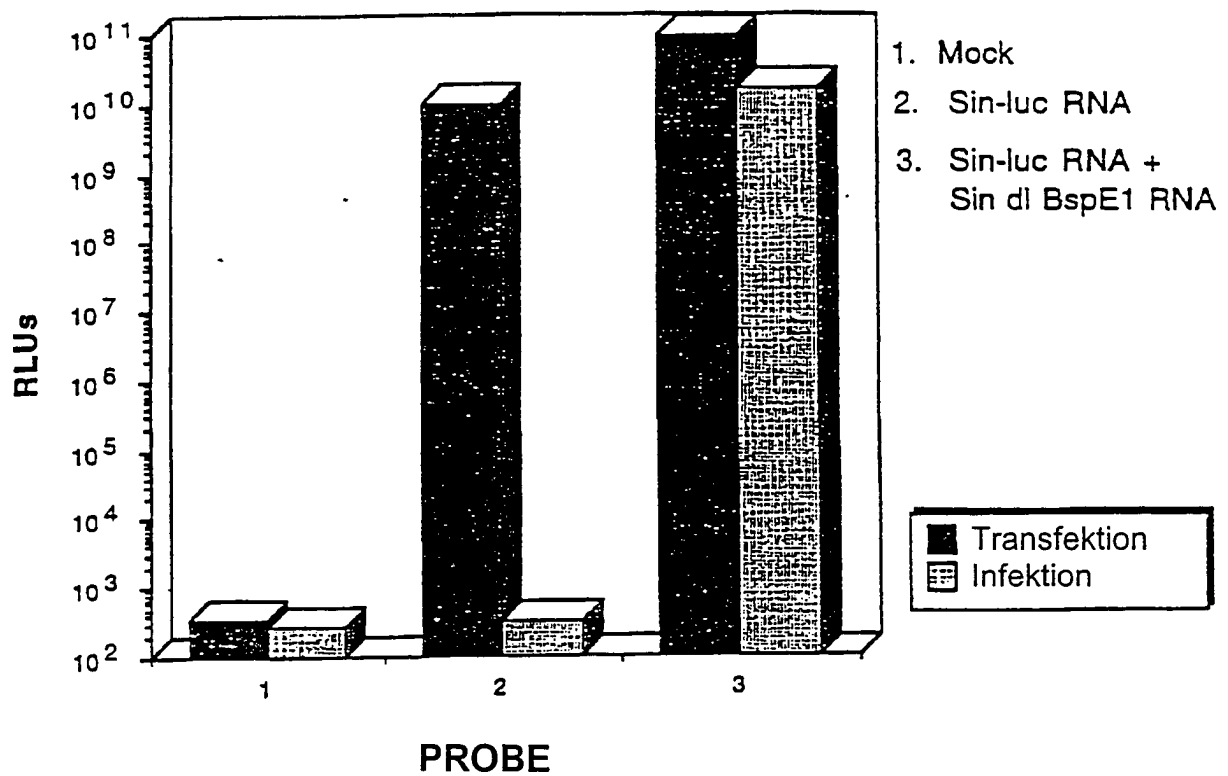


FIGUR 5

SIDBIS-HELPER-VEKTORKONSTRUKTION

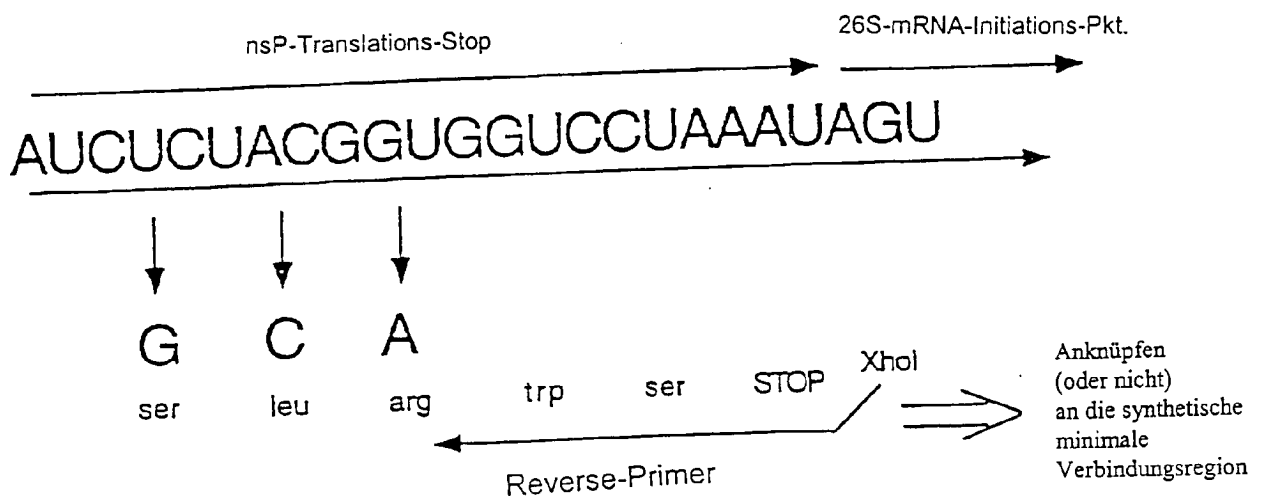
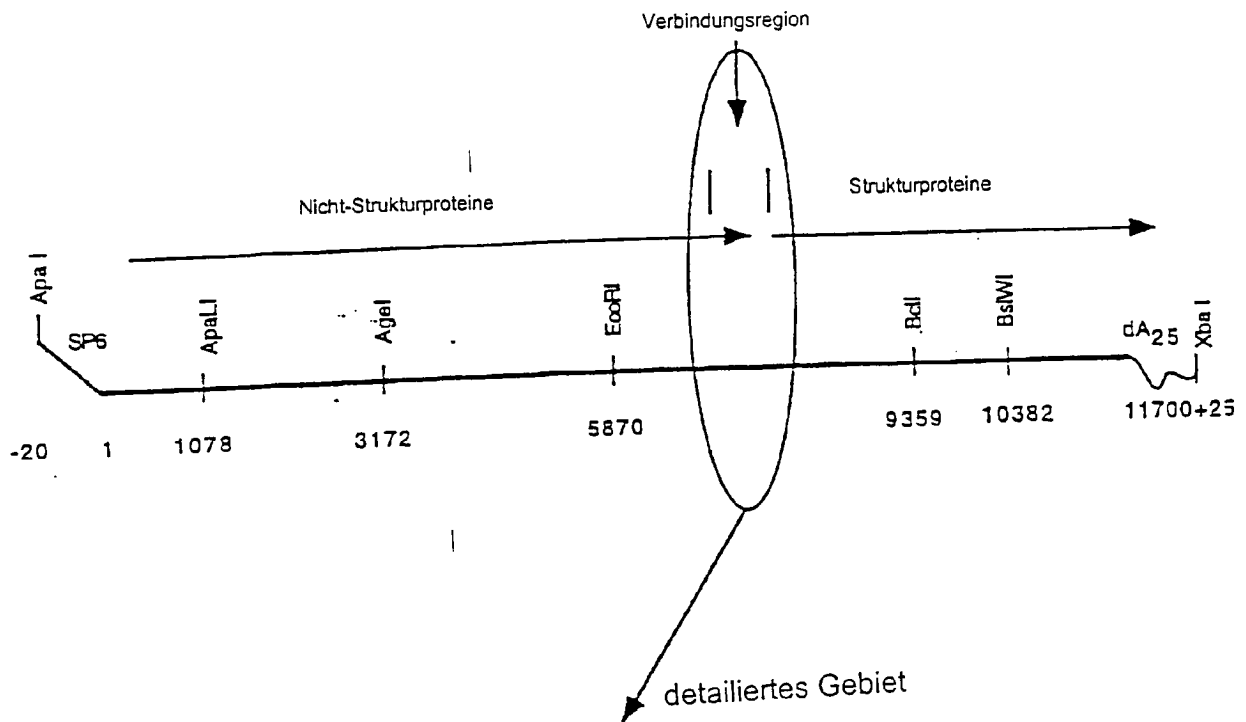
Wildtyp:dl Bsp EI:

**Figur 6: Expression und Isolierung
des Sindbis-Luziferase-Vektors**



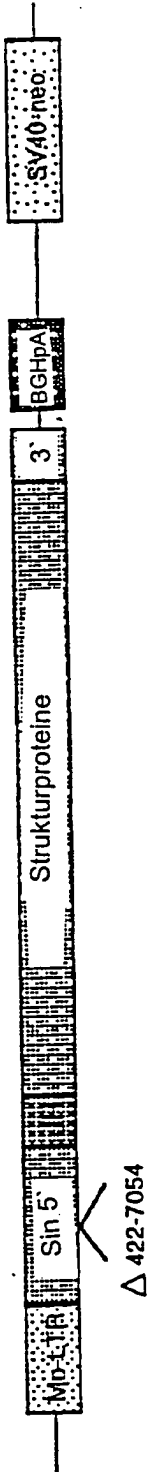
FIGUR 7

MODIFIKATION DER SINBIS-VERBINDUNGSREGION

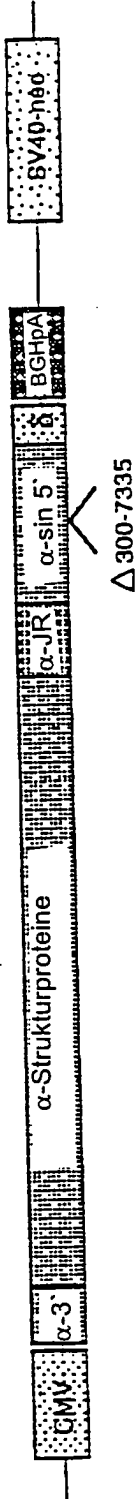


Figur 8 Verpackung-Expressionskassetten-Schema

pLTR/SIndlBspE (sense)

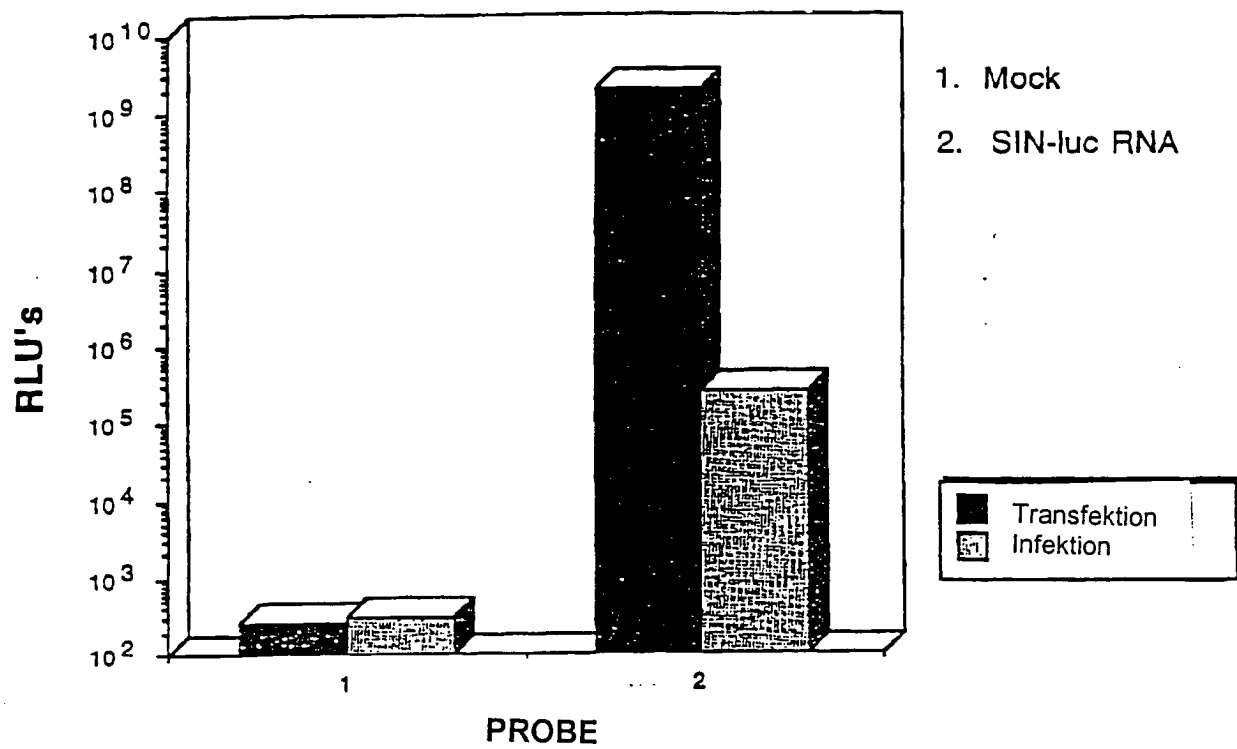


pCMV/δ5'26S (anti-sense)

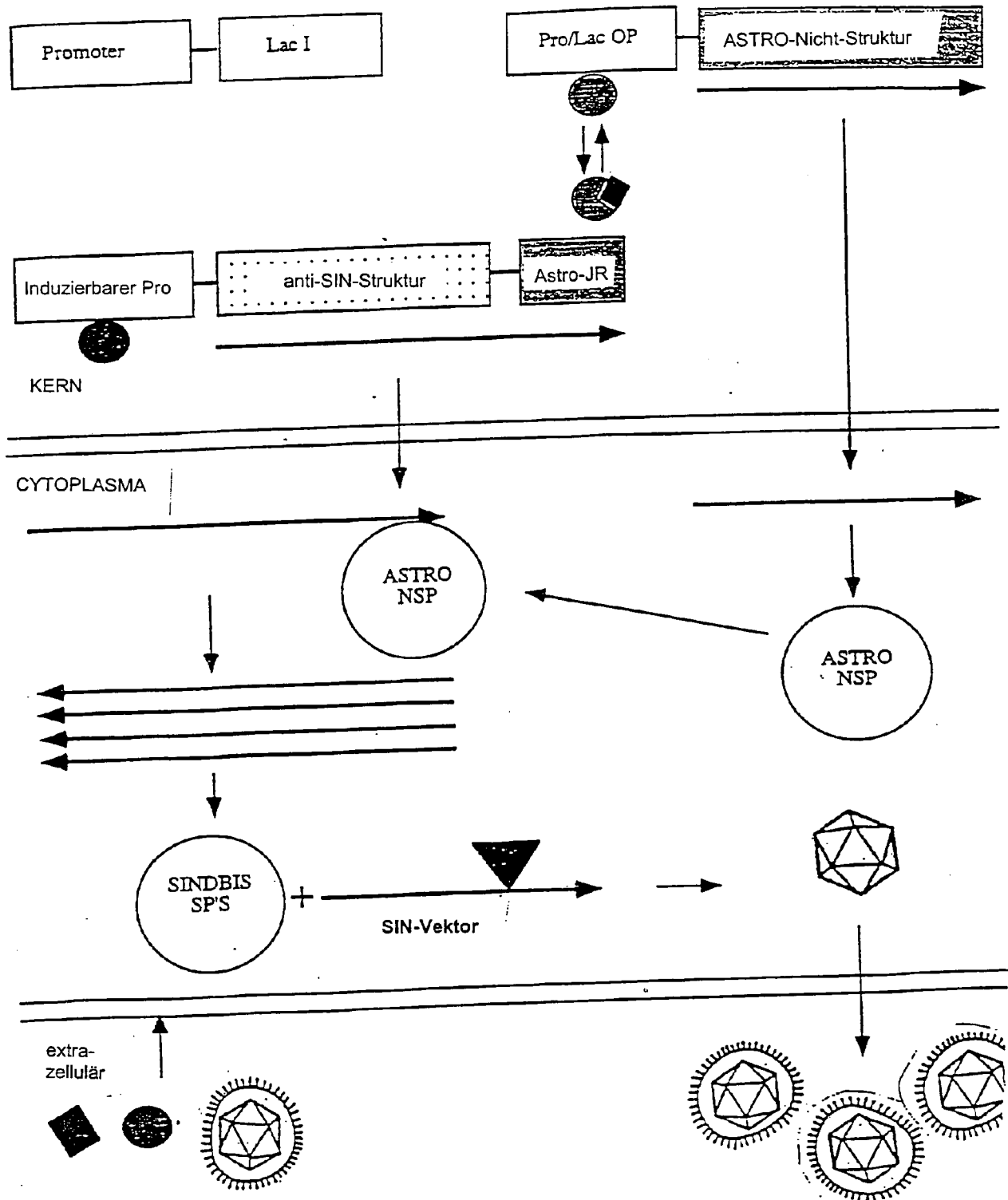


- | | |
|----------|--------------------------------|
| Mo-LTR | - Moloney-MuLV-LTR |
| CMV | - Cytomegalievirus-IE-Promoter |
| BGHpA | - transk.-term./polyA-Signal |
| SV40-neo | - Neomycin-Resistenz |
| δ | - HDV-antigenomisches Ribozym |
| JR | - Verbindungsregion |

Figur 9: Sindbis-Luziferase-Vektor-Verpackung in LTR/SindBspE-Zellen



FIGUR 10



FIGUR 11

Funktionsunfähiger Verbindungsregion-Loop-Out

