



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 31 741 T2** 2006.07.06

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 991 763 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 31 741.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR98/00668**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 917 294.5**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/044121**

(86) PCT-Anmeldetag: **02.04.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **08.10.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.04.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **28.09.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **06.07.2006**

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

C12N 15/86 (2006.01)

C07K 14/075 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9703987 **02.04.1997** **FR**

9704747 **17.04.1997** **FR**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

**Transgene S.A., Straßburg/Strasbourg, FR; Centre
National de la Recherche Scientifique, Paris, FR**

(72) Erfinder:

**LEGRAND, Valerie, F-67200 Strasbourg, FR;
MEHTALI, Majid, F-67400 Illkirch Graffenstaden,
FR; BOULANGER, Pierre, F-34000 Montpellier, FR**

(74) Vertreter:

Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München

(54) Bezeichnung: **MODIFIZIERTE ADENOVIRALE FIBER UND SIE ENTHALTENDE ADENOVIREN**

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

[0001] Die Erfindung hat eine adenovirale Faser zum Gegenstand, welche in den an der Erkennung und der Bindung des natürlichen zellulären Rezeptors der Adenoviren beteiligten Regionen mutiert ist. Sie betrifft gleichfalls die rekombinanten Adenoviren, die an ihrer Oberfläche eine solche Faser tragen, und einen Liganden, der diesen eine modifizierte oder zielgerichtete Wirtsspezifität gegenüber einem bestimmten Zelltyp verleiht, die Zellen, die diese Adenoviren enthalten, wie auch ein Verfahren zur Produktion von infektiösen Viruspartikeln ausgehend von diesen Letzteren, die für eine therapeutische Verwendung bestimmt sind. Die Erfindung weist einen ganz besonderen Nutzen in Hinblick auf eine Gentherapie, insbesondere beim Menschen, auf.

[0002] Dank ihrer besonderen Eigenschaften werden die Adenoviren in einer steigenden Anzahl von Anwendungen im Rahmen einer Gentherapie eingesetzt. Nachgewiesen in zahlreichen Tierspezies, sind sie wenig pathogen, nicht-integrativ und replizieren sich ebenso gut in in Teilung befindlichen wie in ruhenden Zellen. Außerdem weisen sie ein breites Wirtsspektrum auf und sind in der Lage, eine sehr große Anzahl von Zelltypen, wie die Epithelzellen, Endothelzellen, Myozyten, Hepatozyten, Nervenzellen und Synoviozyten, zu infizieren (Bramson et al., 1995, Curr. Op. Biotech. 6, 590–595). Indessen könnte dieses Fehlen von Infektionsspezifität eine Barriere für die Verwendung der rekombinanten Adenoviren bilden einerseits aufgrund der Sicherheit, denn es kann dabei eine Ausbreitung des rekombinanten Gens in dem Wirtsorganismus geben, und andererseits aufgrund der Wirksamkeit, denn das Virus infiziert nicht spezifisch den Zelltyp, den man zu behandeln wünscht.

[0003] Allgemein wird das adenovirale Genom aus einem Molekül linearer, doppelsträngiger und ungefähr 36 kb großer DNA gebildet, welche die die viralen Proteine kodierenden Gene und an ihren Enden zwei invertierte Sequenzwiederholungen (welche als ITR für „Inverted Terminal Repeat“ (invertierte terminale Sequenzwiederholung) bezeichnet werden), welche an der Replikation beteiligt sind, und die Verkapselungsregion enthält. Die frühen Gene sind in 4 in dem adenoviralen Genom verstreuten Regionen (E1 bis E4; E für „early“ (früh) im Englischen) verteilt, welche 6 Transkriptionseinheiten, welche mit ihren eigenen Promotoren ausgestattet sind, umfassen. Die späten Gene (L1 bis L5; L für „late“ (spät) im Englischen) überspannen teilweise die frühen Transkriptionseinheiten und werden zumeist ausgehend von dem hauptsächlichlichen späten Promotor MLP (für „Major Late Promoter“ im Englischen) transkribiert.

[0004] Zur Unterrichtung sind alle im Rahmen der Gentherapieprotokolle verwendeten Adenoviren replikationsdefizient durch Deletion von wenigstens der Region E1 und werden vermehrt in einer Komplementationszelllinie, die in trans die deletierten viralen Funktionen bereitstellt. Man setzt üblicherweise die Linie 293 ein, welche ausgehend von embryonalen humanen Nierenzellen etabliert worden ist, die wirksam die E1-Funktion komplementiert (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59–72). Unlängst wurden in der Literatur Vektoren der zweiten Generation vorgeschlagen. Sie bewahren die für die Replikation des Virus in der infizierten Zelle erforderlichen Regionen in cis (ITRs und Verkapselungssequenzen) und umfassen bedeutende interne Deletionen, welche darauf abzielen, die Hauptmenge der viralen Gene, deren Expression in vivo zu der Etablierung von Entzündungs- oder Immunreaktionen beim Wirt führen könnte, zu unterdrücken. Die adenoviralen Vektoren und deren Herstellungstechnik sind Gegenstand zahlreicher Veröffentlichungen, die den Fachleuten auf diesem Gebiet zugänglich sind, gewesen.

[0005] Der Infektionszyklus der Adenoviren läuft in 2 Schritten ab. Die frühe Phase geht der Initiation der Replikation voraus und erlaubt, die frühen Proteine zu produzieren, die die Replikation und die Transkription der viralen DNA regulieren. Der Replikation des Genoms folgt die späte Phase, während welcher die Strukturproteine, die die Viruspartikel bilden, synthetisiert werden. Der Zusammenbau der neuen Virionen findet im Kern statt. Zunächst lagern sich die viralen Proteine so zusammen, dass sie leere Capside von Ikosaederstruktur bilden, in welchen das Genom verkapselt wird. Die freigesetzten Adenoviren sind in der Lage, andere permissive Zellen zu infizieren. In dieser Hinsicht spielen die Faser und die Penton-Base, die auf der Oberfläche der Capside vorhanden sind, eine kritische Rolle bei der Zellanheftung der Virionen und deren Internalisierung.

[0006] Das Adenovirus bindet an einen auf der Oberfläche der permissiven Zellen vorhandenen zellulären Rezeptor durch das Zwischenglied der trimeren Faser (Philipson et al., 1968, J. Virol. 2, 1064–1075; Defer et al., 1990, J. Virol., 64, 3661–3673). Das Partikel wird dann durch Endozytose durch die Bindung der Penton-Base an die zellulären Integrine $\alpha_v\beta_3$ und $\alpha_v\beta_5$ internalisiert (Mathias et al., 1994, J. Virol. 68, 6811–6814). Das Vermögen der löslichen Faser oder von Anti-Faser-Antikörpern, die Infektion zu inhibieren, zeigt deren Rolle bei der zellulären Anheftung des Virus.

[0007] Die Faser wird aus 3 Domänen gebildet (Chroboczek et al., 1995, Current Top. Microbiol. Immunol. 199, 165–200):

- (1) Am N-Terminus wechselwirkt der von einem Serotyp zum anderen hoch konservierte Schwanz mit der Penton-Base und stellt die Verankerung des Moleküls im Capsid sicher.
- (2) Der Stiel ist eine stäbchenartige Struktur, welche aus einer bestimmten Anzahl von β -Faltblatt-Wiederholungen, wobei diese Anzahl je nach Serotyp variiert, gebildet wird.
- (3) Schließlich ist am distalen Ende des Stiels der Kopf eine globuläre kugelförmige Struktur, die die Trimerisierungssignale enthält (Hong und Engler, 1996, J. Virol. 70, 7071–7078; Novelli und Boulanger, 1991, J. Biol. Chem. 266, 9299–9303; Novelli und Boulanger, 1991, Virology 185, 365–376). Überdies zeigt der größte Teil der experimentellen Daten, dass die Domäne des Kopfes für die Bindung an die permissiven Zellen verantwortlich ist (Henry et al., 1994, J. Virol. 68, 5239–5246; Louis et al., 1994, J. Virol. 68, 4104–4106).

[0008] „Mit zielgerichteter Spezifität versehene“ Adenoviren, deren native Faser derart modifiziert ist, dass sie einen unterschiedlichen zellulären Rezeptor erkennt, sind bereits in der Literatur vorgeschlagen worden. So beschreibt WO 94/10323 Mutanten der Faser von Ad5, in welchen eine Sequenz, welche ein Antikörperfragment (vom Typ scFv) kodiert, an dem Ende von einer der 22 Wiederholungseinheiten des Stiels inseriert worden ist mit dem Ziel, die Infektionsspezifität gegenüber den Zellen, welche das Zielantigen präsentieren, zu modifizieren. US 5,543,328 beschreibt eine chimäre Ad5-Faser, in welcher die Domäne des Kopfes durch den Tumornekrosefaktor (TNF) derart ersetzt ist, dass diese mit dem zellulären TNF-Rezeptor wechselwirkt. Bei einem anderen Konstrukt ist die native Faser von Ad5 an ihrem C-terminalen Ende mit dem Peptid ApoE fusioniert, welches eine Bindung an den LDL-Rezeptor (für „low density lipoprotein“ (Lipoprotein niedriger Dichte) im Englischen), welcher auf der Oberfläche der Leberzellen vorhanden ist, erlaubt. WO 95/26412 beschreibt eine durch Einbau eines Liganden an dem C-terminalen Ende modifizierte Faser, die deren Trimerisierungsfähigkeiten bewahrt. WO 96/26281 beschreibt eine chimäre Faser, welche durch Ersetzen eines Teils der nativen Faser und insbesondere des Kopfes, durch den äquivalenten Teil einer adenoviralen Faser eines anderen Serotyps und gegebenenfalls durch Insertion eines für Vitronectin spezifischen RGD-Peptids am C-terminalen Ende erhalten wird.

[0009] Gall et al., J. Virol. Band 70, 1996, S. 2116–2123, beschreiben die Herstellung eines chimären Adenovirus, bei welcher man die vollständige Substitution der Fasern des Adenovirus vom Typ 5 durch Fasern von Adenoviren vom Typ 7 vornimmt. Diese vollständige Substitution (Kopf, Stiel und Schwanz der Faser) ist dazu bestimmt, die Erkennungsspezifität des adenoviralen Partikels zu modifizieren. McClelland et al., J. Cell. Biochem., 1995, S. 411, beschreiben das Ersetzen des Kopfes der Ad5-Faser (begrenzt durch die Nukleotide 405–592) durch eine Sequenz, welche in der Lage ist, eine Bindungsstelle zu erkennen, welche von jener der Ad5-Faser verschieden ist. Nach dieser Substitution der Gesamtheit des Kopfes der Faser stellen die Autoren fest, dass es möglich ist, die Erkennungsspezifität der adenoviralen Faser zu modifizieren.

[0010] Wie zuvor angegeben, wird die Infektionsspezifität eines Adenovirus durch die Anheftung der adenoviralen Faser an einen zellulären Rezeptor, der sich auf der Oberfläche der permissiven Zellen befindet, bestimmt. Die französische Patentanmeldung 97 01005 hat die Rolle der Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klasse I und der Module III von Fibronectin als primärer Rezeptor bzw. als Cofaktor der Adenoviren nachgewiesen. Es können aber auch andere Proteine beteiligt sein. In dieser Hinsicht haben neuere Arbeiten die Nutzung des zellulären Rezeptors des Coxsackievirus durch die Adenoviren der Typen 2 und 5, um in deren Zielzellen einzudringen, vorgeschlagen (Bergelson et al., 1997, Science 275, 1320–1323). Das Problem, das sich die Erfindung vornimmt, zu lösen, besteht darin, die Wechselwirkungsregion der adenoviralen Faser mit dem/den zellulären Rezeptor(en) zu modifizieren, um die natürliche Wirtsspezifität der Adenoviren, die die mutierte Faser tragen, zu verändern. Um das Verständnis zu erleichtern, wird nachfolgend der Begriff „zellulärer Rezeptor“ der Adenoviren verwendet, um das oder die zellulären Polypeptide zu bezeichnen, die direkt oder nicht an der Bindung der Adenoviren an deren natürliche Zielzellen oder an dem Eindringen in diese Letzteren beteiligt sind. Selbstverständlich kann der Rezeptor je nach Serotyp unterschiedlich sein. Das Hinzufügen eines Liganden erlaubt, einen neuen Tropismus gegenüber einem oder mehreren spezifischen Zelltypen, welche auf ihrer Oberfläche ein Zielmolekül, welches durch den fraglichen Liganden erkannt wird, tragen, zu verleihen.

[0011] Die Erfindung stellt eine Verbesserung des Standes der Technik dar, da sie die Regionen der Faser offenbart, die zu mutieren sind, um die Bindung an den natürlichen zellulären Rezeptor der Adenoviren zu hemmen oder zu verhindern. Es wurden jetzt ein oder mehrere Reste der Region 443 bis 462 des Kopfes der Ad5-Faser substituiert und eine Inhibition der Infektiosität der entsprechenden Adenoviren gegenüber normalerweise permissiven Zellen gezeigt. Die Einführung des GRP-Liganden (für „gastrin releasing peptide“ im Eng-

lischen; Gastrin-freisetzendes Peptid) in diese Fasern müsste es erlauben, die Infektion in Richtung der Zellen, welche den Rezeptor für GRP exprimieren, zu dirigieren. Das Ziel der Erfindung besteht darin, die einzusetzenden therapeutischen Mengen von Adenoviren zu verringern und die Infektion zielgerichtet in Richtung der zu behandelnden Zellen zu dirigieren. Diese Spezifität ist unabdingbar, wenn man ein Adenovirus einsetzt, welches ein zytotoxisches Gen exprimiert, um die Ausbreitung der zytotoxischen Wirkung in gesunden Zellen zu vermeiden. Die durch die Erfindung bereitgestellten Vorteile bestehen darin, die Ausbreitungsrisiken und die mit der adenoviralen Technologie verbundenen Nebenwirkungen zu verringern.

[0012] Aus diesem Grunde hat die Erfindung eine Faser eines Adenovirus, welche durch Mutation von einem oder mehreren Resten der Faser modifiziert ist, zum Gegenstand, welche dadurch gekennzeichnet ist, dass die Reste in Richtung des natürlichen zellulären Rezeptors der Adenoviren gerichtet sind.

[0013] Der Begriff „Faser“ wird im Einführungsabschnitt breit definiert. Die Faser der Erfindung kann sich von einem Adenovirus humaner Herkunft, von Hund-, Vogel-, Rinder-, Maus-, Schaf-, Schwein- oder Affen-Herkunft ableiten oder ferner hybrid sein und Fragmente unterschiedlicher Herkunft umfassen. Betreffend die humanen Adenoviren wird bevorzugt, jene des Serotyps C und insbesondere die Adenoviren vom Typ 2 oder 5 (Ad2 oder Ad5) einzusetzen. Es wird angegeben, dass die Faser von Ad2 580 Aminosäuren (AS) umfasst, deren Sequenz in Herissé et al. (1981, Nucleic Acid Res. 9, 4023–4042) offenbart wird. Jene von Ad5 weist 582 AS auf und deren in der Sequenzbeschreibung 1 (SEQ ID NR: 1) aufgeführte Sequenz wurde von Chroboczek und Jacrot (1987, Virology 161, 549–554) offenbart. Wenn die Faser der Erfindung von einem tierischen Adenovirus stammt, greift man bevorzugt auf die Rinder-Adenoviren und insbesondere jene des Stamms BAV-3 zurück. Diese Letzteren haben den Gegenstand von zahlreichen Untersuchungen gebildet und die Sequenz der Faser wird in der Internationalen Anmeldung WO 95/16048 offenbart. Selbstverständlich kann die Faser der Erfindung andere Modifizierungen bezogen auf die native Sequenz außer jenen, die den Gegenstand der Erfindung bilden, aufweisen.

[0014] Gemäß den durch die Erfindung verfolgten Zielen ist die erfindungsgemäße Faser derart modifiziert, dass deren Bindungsfähigkeit an den natürlichen zellulären Rezeptor verringert oder vernichtet ist. Eine solche Eigenschaft kann durch die Untersuchung der Infektiosität oder der Bindung der entsprechenden Viren an Zellen unter Anwendung der Techniken dieses Fachgebiets, wie jenen, die nachfolgend detailliert erläutert werden, verifiziert werden. Gemäß einer vorteilhaften Ausführungsweise werden die Eigenschaften der Trimerisierung und der Bindung an die Penton-Base nicht beeinflusst.

[0015] Im Sinne der Erfindung bezeichnet der Ausdruck „Mutation“ eine Deletion, eine Substitution oder ferner ein Hinzufügen von einem oder mehreren Resten oder eine Kombination dieser Möglichkeiten. Man bevorzugt insbesondere den Fall, wo die für die Wechselwirkung mit dem natürlichen zellulären Rezeptor zuständigen Regionen in ihrer Gesamtheit oder teilweise deletiert und insbesondere durch einen für ein anderes Zell-Oberflächenprotein als den natürlichen Rezeptor der Adenoviren spezifischen Liganden ersetzt sind.

[0016] Die dreidimensionale kristallographische Struktur des adenoviralen Kopfs wurde von Xia et al. (1994, Structure 2, 1259–1270) bestimmt. Jedes Monomer umfasst 8 antiparallele β -Faltblätter, welche als A bis D und G bis J bezeichnet werden und 6 hauptsächliche Schleifen mit 8 bis 55 Resten. Beispielsweise verbindet die CD-Schleife das β -Faltblatt C mit dem β -Faltblatt D. Es wird angegeben, dass die kleineren Faltblätter E und F so aufgefasst werden, dass sie einen Teil der DG-Schleife, die sich zwischen den Faltblättern D und G befindet, bilden. Zur Unterrichtung gibt die Tabelle 1 die Lage von diesen Strukturen in der Aminosäuresequenz der Faser von Ad5, wie sie in der Sequenzbeschreibung Nr. 1 (SEQ ID NR: 1) gezeigt ist, an, wobei das +1 den Met-Startrest angibt. Allgemein bilden die Faltblätter eine wohlgeordnete und kompakte Struktur, wohingegen die Schleifen flexibler sind. Diese Begriffe sind auf dem Gebiet der Biochemie der Proteine klassisch und werden in den Grundlagenwerken definiert (siehe beispielsweise Stryer, Biochemistry, 2. Auflage, Kap. 2, S. 11 bis 39, Hrsg. Freeman und Company, San Francisco).

Tabelle 1

β -Faltblatt		Schleife	
Nomenklatur	Reste	Nomenklatur	Reste
A	400 bis 403	AB	404 bis 418
B	419 bis 428	-	-
C	431 bis 440	CD	441 bis 453
D	454 bis 461	DG	462 bis 514
G	515 bis 521	GH	522 bis 528
H	529 bis 536	HI	537 bis 549
I	550 bis 557	IJ	558 bis 572
J	573 bis 578		

[0017] Die vier β -Faltblätter A, B, C und J bilden die Faltblätter V, welche in Richtung des Viruspartikels gerichtet sind. Die vier anderen (D, G, H und I) bilden die Faltblätter R, von welchen angenommen wird, dass sie dem zellulären Rezeptor gegenüber liegen. Die Faltblätter V scheinen eine bedeutende Rolle bei der Trimerisierung der Struktur zu spielen, wohingegen die Faltblätter R an der Wechselwirkung mit dem Rezeptor beteiligt sein sollen. Die Reste der Faser von Ad2, Ad3, Ad5, Ad7, Ad40, Ad41 und des Hunde-Adenovirus CAV, welche diese unterschiedlichen Strukturen bilden, sind in der vorangegangenen Referenz eindeutig angegeben.

[0018] Die Modifikationen der adenoviralen Faser gemäß der Erfindung berühren insbesondere den Teil, welcher die CD-Schleife, das Faltblatt D und den proximalen Teil der DG-Schleife (Positionen 441 bis 478 der Faser von Ad2 und von Ad5) umfasst, und insbesondere die Region, welche sich von den Resten 443 bis 462, was Ad5 angeht, oder 451 bis 466 in dem Falle von Ad2 erstreckt. Die andere Zielregion für die Modifikationen ist das Faltblatt H (AS 529 bis 536 der Ad5-Faser und der Faser von Ad2). Eine andere Alternative besteht in der Modifizierung der kleineren Faltblätter E (AS 479–482 Ad5) und F (AS 485–486 Ad5).

[0019] Wie zuvor angegeben, kann man durch Substitution von einer oder mehreren Aminosäuren in den erläuterten Regionen vorgehen. Man kann in dieser Hinsicht die folgenden Beispiele aufführen, die sich von der Faser von Ad5 ableiten, in welcher:

- der Glycinrest an Position 443 durch eine Asparaginsäure ersetzt ist,
- der Leucinrest an Position 445 durch ein Phenylalanin ersetzt ist,
- der Glycinrest an Position 450 durch ein Asparagin ersetzt ist,
- der Threoninrest an Position 451 durch ein Lysin ersetzt ist,
- der Valinrest an Position 452 durch ein Asparagin ersetzt ist,
- der Alaninrest an Position 455 durch ein Phenylalanin ersetzt ist,
- der Leucinrest an Position 457 durch ein Alanin oder ein Lysin ersetzt ist und/oder
- der Isoleucinrest an Position 459 durch ein Alanin ersetzt ist.

[0020] Es ist gleichfalls möglich, mehrere Substitutionen in die Zielregion der Faser insbesondere auf der Ebene der Aminosäuren, welche eine Krümmung, vorzugsweise vom Typ α (siehe Tabelle 2 von Xia et al., 1994, a.a.O.), bilden, einzuführen. Zur Veranschaulichung kann man die beiden folgenden Beispiele aufführen, in welchen die Faser von Ad5 modifiziert ist durch Substitution:

- des Glycinrests an Position 443 durch eine Asparaginsäure,
- des Serinrests an Position 444 durch ein Lysin und
- des Alaninrests an Position 446 durch ein Threonin; oder ferner
- des Serinrests an Position 449 durch eine Asparaginsäure,
- des Glycinrests an Position 450 durch ein Lysin,
- des Threoninrests an Position 451 durch ein Leucin und
- des Valinrests an Position 452 durch ein Threonin.

[0021] Selbstverständlich sind die für eine Ersetzung in Frage kommenden Aminosäuren lediglich beispielhaft erwähnt und es kann eine jegliche Aminosäure für die Zwecke der Erfindung geeignet sein. Indessen wird be-

vorzugt, die dreidimensionale Struktur nicht drastisch zu modifizieren. Bevorzugt werden die Aminosäuren, die eine Krümmung bilden, durch Reste ersetzt, welche eine ähnliche Struktur bilden, wie jene, die in der Referenz Xia et al., die bereits erwähnt worden ist, aufgeführt sind.

[0022] Die Faser der Erfindung kann gleichfalls durch Deletion modifiziert werden. Die entfernte Region kann die Gesamtheit oder einen Teil der erläuterten Domäne betreffen und insbesondere der CD-Schleife, des Faltblatts D, der Schleife DG und/oder der Faltblätter E und F. Bezüglich einer Faser von Ad5 gemäß der Erfindung kann man insbesondere aufführen die Deletion:

- der Region, welche sich von dem Serin an Position 454 bis zu dem Phenylalanin an Position 461 erstreckt,
- der Region, welche sich von dem Valin an Position 441 bis zu dem Glutamin an Position 453 erstreckt,
- der Region, welche sich von dem Valin an Position 441 bis zu dem Phenylalanin an Position 461 erstreckt oder
- der Region, welche sich von dem Asparagin an Position 479 bis zu dem Threonin an Position 486 erstreckt.

[0023] Es ist gleichfalls möglich, andere Substitutions- oder Deletionsmutanten in den anderen Faltblättern oder Schleifen zu erzeugen, wie beispielsweise den Faltblättern G, H und I und den Schleifen HI und DG.

[0024] Es ist gleichfalls möglich, dass, wenn wenigstens eine der Modifikationen eine Deletion von wenigstens 3 aufeinanderfolgenden Resten einer Schleife und/oder eines Faltblatts ist, die deletierten Reste ersetzt werden können durch Reste einer äquivalenten Schleife und/oder eines äquivalenten Faltblatts, abgeleitet von einer Faser eines zweiten Adenovirus, welches in der Lage ist, mit einem zellulären Rezeptor, welcher sich von jenem, der durch das erste Adenovirus erkannt wird, unterscheidet, zu wechselwirken. Das zweite Adenovirus kann von irgendeiner humanen oder tierischen Herkunft sein. Dies erlaubt, die Struktur der erfindungsgemäßen Faser beizubehalten, wobei dieser zugleich eine Wirtsspezifität, die jener des zweiten Adenovirus entspricht, verliehen wird. Wie in Xia et al. (1994, a.a.O.) angegeben, unterscheidet sich der zelluläre Rezeptor, welcher die Infektion durch die Adenoviren der Typen 2 und 4 vermittelt, von jenem, der mit den Adenoviren der Typen 3 und 7 wechselwirkt. So kann eine Faser von Ad5 oder von Ad2, bei welcher wenigstens 3 aufeinanderfolgende Reste unter jenen, die oben spezifiziert worden sind, deletiert worden sind, durch Reste, welche aus einer äquivalenten Region der Faser von Ad3 oder von Ad7 stammen, substituiert werden, um deren Vermögen, an den Rezeptor von Ad5 zu binden, zu verringern und jener eine neue Spezifität in Richtung des zellulären Rezeptors von Ad3 oder Ad7 zu verleihen. Als nicht einschränkendes Beispiel kann man das Ersetzen der Reste LAPISGTVQSAHLIRFD (Positionen 445 bis 462) der Faser von Ad5 durch die Reste VNTLFKNKN-VSINVELYFD der Faser von Ad3 oder das Ersetzen der Reste PVTLTITL (Position 529 bis 536) der Faser von Ad5 durch die Reste PLEVTVML der Faser von Ad3 aufführen.

[0025] Die Erfindung betrifft gleichfalls eine Faser eines Adenovirus, welche ein substantiell verringertes Bindungsvermögen an den natürlichen zellulären Rezeptor aufweist und gleichwohl in der Lage ist, zu trimerisieren und die Penton-Base zu binden. Wie zuvor angegeben, wird der natürliche zelluläre Rezeptor vorteilhafterweise ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus den Haupthistokompatibilitätsantigenen der Klasse I, Fibronectin und dem zellulären Rezeptor des Coxsackievirus (CAR) oder einer jeglichen anderen Determinante der Zelloberfläche, welche bei der Infektiosität der Adenoviren üblicherweise interveniert oder daran teilnimmt.

[0026] Gemäß einer gleichfalls vorteilhaften Ausführungsweise umfasst die erfindungsgemäße Faser außerdem einen Liganden. Im Sinne der Erfindung definiert der Begriff „Ligand“ eine jegliche Entität, welche in der Lage ist, vorzugsweise mit einer hohen Affinität, ein Zelloberflächenmolekül, welches sich von dem natürlichen zellulären Rezeptor unterscheidet, zu erkennen und zu binden. Dieses Molekül kann exprimiert oder auf der Oberfläche der Zelle, die man zielgerichtet anzusteuern wünscht, exprimiert werden (Zelloberflächenmarker, Rezeptor, antigenes Peptid, welches durch die Histokompatibilitätsantigene präsentiert wird ...). Gemäß den durch die Erfindung verfolgten Zielen kann ein Ligand ein Antikörper, ein Peptid, ein Hormon, ein Polypeptid oder ferner ein Zucker sein. Der Begriff Antikörper umfasst insbesondere die monoklonalen Antikörper, die Antikörper-Fragmente (Fab) und die einzelkettigen Antikörper (scFv). Diese Bezeichnungen und Abkürzungen sind auf dem Gebiet der Immunologie konventionell.

[0027] Im Rahmen der Erfindung kann es interessant sein, insbesondere eine Tumorzelle, eine infizierte Zelle, einen bestimmten Zelltyp oder eine Kategorie von Zellen, welche einen spezifischen Oberflächenmarker tragen, zielgerichtet anzusteuern. Wenn beispielsweise die zielgerichtet anzusteuern Wirtszelle eine durch das HIV-Virus (Human-Immunodeficiency-Virus) infizierte Zelle ist, kann der Ligand ein Antikörperfragment gegen Fusin, den CD4-Rezeptor oder gegen ein exponiertes virales Protein (Hüllglykoprotein) oder ferner den Teil des TAT-Proteins des HIV-Virus, welcher sich von den Resten 37 bis 72 erstreckt, sein (Fawell et al., 1994,

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 664–668). Handelt es sich um eine Tumorzelle, wird die Wahl auf einen Liganden fallen, welcher ein für den Tumor spezifisches Antigen (beispielsweise das Protein MUC-1 im Falle des Brustkrebses, bestimmte Epitopen der Proteine E6 oder E7 des Papillomavirus HPV) oder ein Antigen, welches überexprimiert wird (der IL2-Rezeptor, der bei bestimmten lymphoiden Tumoren überexprimiert wird, das Peptid GRP für „Gastrin Releasing Peptide“, welches in Lungenkarzinomzellen (Michael et al., 1995, Gene Therapy 2, 660–668) und in Tumoren des Pankreas, der Prostata und des Magens überexprimiert wird), erkennt. Wenn gewünscht wird, die T-Lymphozyten zielgerichtet anzusteuern, kann man einen Liganden des T-Zellrezeptors einsetzen. Außerdem ist Transferrin ein guter Kandidat für das zielgerichtete Ansteuern der Leber. Allgemein sind die Liganden, die im Kontext der Erfindung verwendet werden können, in der Literatur umfänglich beschrieben und können durch Standardtechniken kloniert werden. Es ist gleichfalls möglich, diese auf chemischem Wege zu synthetisieren und diese an die Faser gemäß der Erfindung zu koppeln. In dieser Hinsicht müsste das Ankoppeln von Galactosylresten eine Spezifität für die Leber verleihen aufgrund der Wechselwirkung mit den Rezeptoren für die Asialoglycoproteine. Die bevorzugte Ausführungsweise besteht aber darin, den Liganden am C-terminalen Ende der Faser gemäß der Erfindung oder unter Ersetzung von deletierten Resten, wenn wenigstens eine der Modifikationen eine Deletion von wenigstens 3 aufeinanderfolgenden Resten ist, zu inserieren.

[0028] Die Erfindung bezieht sich gleichfalls auf ein DNA-Fragment, welches eine erfindungsgemäße Faser kodiert, wie auch auf einen Expressionsvektor eines solchen Fragments. Zu diesem Zweck kann ein jeglicher Vektortyp eingesetzt werden, sei er von Plasmid- oder viraler Herkunft, integrativ oder nicht. Solche Vektoren sind kommerziell erhältlich oder in der Literatur beschrieben. Ebenso ist der Fachmann in der Lage, die für die Expression des DNA-Fragments gemäß der Erfindung erforderlichen Regulationselemente anzupassen. Außerdem kann er mit einer oder mehreren Substanzen, welche in der Lage sind, die Transfektionseffizienz und/oder die Stabilität des Vektors zu verbessern, kombiniert werden. Diese Substanzen sind in der Literatur, die für den Fachmann auf diesem Gebiet zugänglich ist, umfassend dokumentiert (siehe beispielsweise Felgner et al., 1989, Proc. West. Pharmacol. Soc. 32, 115–121; Hodgson und Solaiman, 1996, Nature Biotechnology 14, 339–342; Remy et al., 1994, Bioconjugate chemistry 5, 647–654). Zur Unterrichtung und nicht zur Einschränkung kann es sich um Polymere, um insbesondere kationische Lipide, um Liposome, um nukleäre Proteine und um neutrale Lipide handeln. Eine Kombination, die in Betracht gezogen werden kann, ist ein Vektor, welcher mit kationischen Lipiden (DC-Chol, DOGS.. u.s.w.) und neutralen Lipiden (DOPE) assoziiert ist.

[0029] Die Erfindung betrifft gleichfalls ein Adenovirus, welchem eine funktionsfähige native Faser fehlt und welches auf seiner Oberfläche eine erfindungsgemäße Faser umfasst. Diese kann durch das adenovirale Genom exprimiert werden oder in trans durch eine Komplementationszelllinie, wie sie nachfolgend definiert wird, bereitgestellt werden. Es kann außerdem einen Liganden, wie oben definiert, umfassen. Bevorzugt ist die Bindungsspezifität eines solchen Adenovirus an seinen natürlichen zellulären Rezeptor aufgrund der modifizierten Faser, die es trägt, signifikant verringert oder noch besser vernichtet. Der Verlust der natürlichen Spezifität kann durch Zellanheftungsuntersuchungen, die in Gegenwart von markierten Viren (beispielsweise mit ³H-Thymidin gemäß der Technik von Roelvink et al., 1996, J. Virol. 70, 7614–7621) ausgeführt werden, oder durch Untersuchungen der Infektiosität von permissiven Zellen oder solchen, welche das durch den Liganden zielgerichtet angesteuerte Oberflächenmolekül exprimieren, ausgewertet werden (siehe die folgenden Beispiele).

[0030] Der Ligand kann chemisch mit dem erfindungsgemäßen Adenovirus gekoppelt werden. Es wird jedoch die Variante bevorzugt, gemäß welcher die Sequenzen, welche den Liganden kodieren, in das adenovirale Genom, insbesondere in Sequenzen, welche die modifizierte Faser gemäß der Erfindung kodieren, vorzugsweise in Phase, um das Leseraster zu bewahren, inseriert sind. Die Insertion kann an einem beliebigen Ort erfolgen. Gleichwohl befindet sich die bevorzugte Insertionsstelle strangaufwärts von dem Stop-Codon am C-terminalen Ende oder an der Stelle von deletierten Resten. Es kann gleichfalls in Betracht gezogen werden, die Sequenzen des Liganden in andere adenovirale Sequenzen, insbesondere jene, welche ein anderes Capsid-Protein, wie das Hexon oder das Penton, kodieren, zu inserieren.

[0031] Ein erfindungsgemäßes Adenovirus ist vorteilhafterweise rekombinant und replikationsdefekt, d.h. zu einer autonomen Replikation in einer Wirtszelle nicht in der Lage. Die Defizienz wird durch Mutation oder Deletion von einem oder mehreren essentiellen viralen Genen und insbesondere der Gesamtheit oder eines Teils der E1-Region erzielt. Deletionen innerhalb der Region E3 können ins Auge gefasst werden, um das Klonierungsvermögen zu erhöhen. Indessen kann es vorteilhaft sein, die das Protein gp19k kodierenden Sequenzen zu bewahren (Gooding und Wood, 1990, Critical Reviews of Immunology 10, 53–71), um die Immunantworten des Wirts zu modulieren. Selbstverständlich kann das Genom eines erfindungsgemäßen Adenovirus gleichfalls ergänzende Deletionen oder Mutationen, welche andere Regionen, insbesondere die Regionen E2, E4 und/oder L1–L5 betreffen, umfassen (siehe beispielsweise die Internationale Anmeldung WO 94/28152 und

Ensinger et al., 1972, J. Virol. 10, 328–339, welche die wärmeempfindliche Mutation des Gens DBP von E2 beschreibt).

[0032] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsweise ist ein erfindungsgemäßes Adenovirus rekombinant und umfasst ein oder mehrere Gen(e) von Interesse, welches oder welche unter die Kontrolle der für dessen (deren) Expression in einer Wirtszelle erforderlichen Elemente gestellt ist bzw. sind. Das fragliche Gen kann von irgendeiner Herkunft sein, genomisch, cDNA (komplementäre DNA) oder hybrid (Minigen, welchem ein oder mehrere Introns fehlen). Es kann erhalten werden durch die herkömmlichen Techniken der Molekularbiologie oder durch chemische Synthese. Es kann eine Antisinn-RNA, ein Ribozym oder eine mRNR, die in der Folge in ein Polypeptid von Interesse translatiert werden wird, kodieren. Jenes kann zytoplasmatisch, membranständig sein oder aus der Wirtszelle sekretiert werden. Außerdem kann es sich um die Gesamtheit oder einen Teil eines Polypeptids, wie es in der Natur gefunden wird, ein chimäres Polypeptid, welches aus der Fusion von Sequenzen unterschiedlicher Herkunft hervorgegangen ist, oder um ein bezogen auf die native Sequenz mutiertes Polypeptid, welches verbesserte und/oder modifizierte biologische Eigenschaften aufweist, handeln.

[0033] Im Rahmen der Erfindung kann es vorteilhaft sein, die Gene zu verwenden, die die folgenden Polypeptide kodieren:

- Zytokine oder Lymphokine (Interferone α , β und γ , Interleukine und insbesondere IL-2, IL-6, IL-10 oder IL-12, Tumornekrosefaktoren (TNF), Kolonie-stimulierende Faktoren (GM-CSF, C-CSF, M-CSF ...);
- zelluläre oder nukleäre Rezeptoren, insbesondere jene, die durch pathogene Organismen (Viren, Bakterien oder Parasiten) und bevorzugt durch das HIV-Virus oder deren Liganden (fas-Ligand) erkannt werden;
- Proteine, welche an einer genetisch bedingten Erkrankung beteiligt sind (Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Dystrophin oder Minidystrophin, Insulin, das Protein CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator), Wachstumshormone (hGH);
- Enzyme (Urease, Renin, Thrombin ...);
- Inhibitoren von Enzymen (α 1-Antitrypsin, Antithrombin III, Inhibitoren von viralen Proteasen);
- Polypeptide mit Antitumor-Wirkung, welche in der Lage sind, die Initiation oder das Fortschreiten von Tumoren oder Krebserkrankungen wenigstens teilweise zu hemmen (Antikörper, Inhibitoren, welche auf der Ebene der Zellteilung oder von Translations- bzw. Transduktionssignalen wirken, Expressionsprodukte von Tumorsuppressorgenen, beispielsweise p53 oder Rb, Proteine, welche das Immunsystem stimulieren ...);
- Proteine des Haupthistokompatibilitätskomplexes der Klassen I oder II oder regulatorische Proteine, welche auf die Expression der entsprechenden Gene einwirken;
- Polypeptide, welche in der Lage sind, eine virale, bakterielle oder durch Parasiten bewirkte Infektion oder ihre Entwicklung zu hemmen (antigene Polypeptide mit immunogenen Eigenschaften, antigene Epitope, Antikörper, transdominante Varianten, welche in der Lage sind, die Wirkung eines nativen Proteins durch Konkurrenz zu hemmen ...);
- Toxine (Thymidinkinase des Herpes simplex-Virus 1 (TK-HSV-1), Ricin, Cholera-Toxin, Diphtherie-Toxin ...) oder Immuntoxine,
- Marker (β -Galactosidase, Luciferase ...),
- ein Polypeptid, welches eine Wirkung auf die Apoptose ausübt (Induktor von Apoptose: Bax ..., Inhibitor von Apoptose: Bcl2, Bclx), zytostatische Mittel (p21, p16, Rb ...), die Apolipoproteine (apoE ...), SOD, Katalase, Stickoxid-Synthase (NOS); und
- Wachstumsfaktoren (FGF für „Fibroblast Growth Factor“, VEGF für „Vascular Endothelial cell growth Factor“ ...).

[0034] Es ist darauf hinzuweisen, dass diese Liste nicht einschränkend ist und dass andere Gene gleichfalls eingesetzt werden können.

[0035] Außerdem kann ein erfindungsgemäßes Adenovirus außerdem ein der Selektion dienendes Gen, welches erlaubt, die infizierten Zellen zu selektionieren oder zu identifizieren, umfassen. Man kann die Gene neo (welches die Neomycinphosphotransferase kodiert), welches eine Resistenz gegen das Antibiotikum G418 verleiht, dhfr (Dihydrofolatreduktase), CAT (Chloramphenicolacetyltransferase), pac (Puromycinacetyltransferase) oder ferner gpt (Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) aufführen. Allgemein sind die der Selektion dienenden Gene dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt.

[0036] Unter Elemente, welche für die Expression eines Gens von Interesse in einer Wirtszelle erforderlich sind, versteht man die Gesamtheit der Elemente, welche dessen Transkription in RNA und die Translation einer mRNA in ein Protein erlauben. Unter jenen kommt dem Promotor eine besondere Bedeutung zu. Im Rahmen der Erfindung kann er sich von einem beliebigen Gen eukaryotischer oder sogar viraler Herkunft ableiten und kann konstitutiv oder regulierbar sein. Außerdem kann er derart modifiziert sein, dass seine Promotorak-

tivität verbessert ist, eine die Transkription inhibierende Region supprimiert ist, ein konstitutiver Promotor regulierbar gemacht worden ist oder umgekehrt, eine Restriktionsstelle eingeführt worden ist ... Alternativ kann es sich um den natürlichen Promotor des zu exprimierenden Gens handeln. Man kann als Beispiele die viralen Promotoren des CMV (Zytomegalievirus), RSV (Rous-Sarkom-Virus), des TK-Gens des HSV-1-Virus, den frühen Promotor des SV40-Virus (Simian Virus 40), den adenoviralen MLP-Promotor oder ferner die eukaryotischen Promotoren der Gene PGK (Phosphoglyceratkinase) aus der Maus oder dem Menschen, MT (Metallothionein), α 1-Antitrypsin und Albumin (Leber-spezifisch), von Immunoglobulinen (Lymphozyten-spezifisch) aufführen. Man kann gleichfalls einen tumorspezifischen Promotor einsetzen (α -Fetoprotein AFP, Ido et al., 1995, Cancer Res. 55, 3105–3109; MUC-1; PSA für Prostata-spezifisches Antigen, Lee et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, 4561–4568; und flt1, spezifisch für Endothelzellen, Morishita et al., 1995, J. Biol. Chem. 270, 27948–27953).

[0037] Selbstverständlich kann ein Gen von Interesse bei einer Verwendung im Rahmen der Erfindung außerdem zusätzliche Elemente, welche für die Expression (Intronsequenz, Signalsequenz, Kernlokalisierungssequenz, Transkriptionsterminationssequenz, Translationsstartstelle vom Typ IRES oder andere ...) oder ferner dessen Aufrechterhaltung in der Wirtszelle erforderlich sind, umfassen. Solche Elemente sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt.

[0038] Die Erfindung betrifft gleichfalls ein Verfahren zur Produktion eines Adenovirus gemäß der Erfindung, gemäß welchem:

- man eine geeignete Zelllinie mit dem Genom des Adenovirus transfiziert,
- man die transfizierte Zelllinie unter Bedingungen, die geeignet sind, um die Produktion des Adenovirus zu ermöglichen, kultiviert und
- man das Adenovirus aus der Kultur der transfizierten Zelllinie gewinnt und man gegebenenfalls das Adenovirus im Wesentlichen reinigt.

[0039] Die Wahl der Zelllinie hängt von den defekten oder fehlenden Funktionen des erfindungsgemäßen Adenovirus ab und man wird eine Komplementationslinie verwenden, welche in der Lage ist, in trans die defekte(n) Funktion oder Funktionen bereitzustellen. Die Linie 293 ist geeignet, um die Funktion E1 zu komplementieren (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol. 36, 59–72). Bei einer doppelten E1- und E2- oder E4-Defizienz kann man eine Linie von jenen, die in der französischen Patentanmeldung 96 04413 beschrieben worden sind, einsetzen. Man kann gleichfalls ein Hilfsvirus, um das defekte Adenovirus gemäß der Erfindung in einer beliebigen Wirtszelle zu komplementieren, oder ferner ein gemischtes System, welches Komplementationszellen und Hilfsviren, in welchem die Elemente voneinander abhängig sind, einsetzen. Die Mittel zur Vermehrung eines defekten Adenovirus sind dem Fachmann auf diesem Gebiet bekannt, der sich beispielsweise auf Graham und Prevec (1991, Methods in Molecular Biology, Band 7, S. 190–128; Hrsg. E. J. Murey, The Human Press Inc.) beziehen kann. Das adenovirale Genom wird vorzugsweise in vitro in Escherichia coli (E. coli) durch Li-gation oder ferner homologe Rekombination rekonstituiert (siehe beispielsweise die französische Anmeldung 94 14470). Die Reinigungsverfahren werden im Stand der Technik beschrieben. Man kann die Zentrifugationstechnik auf einem Dichtegradienten aufführen.

[0040] Die Erfindung betrifft gleichfalls eine Zelllinie, welche entweder in in das Genom integrierter Form oder in Form eines Episoms ein eine erfindungsgemäße Faser kodierendes DNA-Fragment, welches unter die Kontrolle der Elemente, die dessen Expression erlauben, gestellt ist, umfasst. Die Linie kann außerdem in der Lage sein, ein Adenovirus zu komplementieren, welches hinsichtlich einer oder mehrerer Funktionen, ausgewählt aus jenen, die durch die Regionen E1, E2, E4 und L1–L5 kodiert werden, defizient ist. Sie leitet sich bevorzugt von der Linie 293 ab. Eine solche Linie kann nützlich sein für die Herstellung eines Adenovirus, in dessen Genom die Gesamtheit oder ein Teil der Sequenzen, welche die Faser kodieren, fehlt (derart, dass eine nicht funktionsfähige Faser produziert wird). Die Erfindung hat gleichfalls das entsprechende Verfahren zum Gegenstand, gemäß welchem:

- man eine Zelllinie gemäß der Erfindung mit dem Genom des Adenovirus transfiziert,
- man die transfizierte Zelllinie unter Bedingungen, die geeignet sind, um die Produktion des Adenovirus zu ermöglichen, kultiviert und
- man das Adenovirus in der Kultur der transfizierten Zelllinie gewinnt und man gegebenenfalls das Adenovirus im Wesentlichen reinigt.

[0041] Die Erfindung umfasst gleichfalls eine Wirtszelle, welche durch ein erfindungsgemäßes Adenovirus oder eines, welches durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhalten werden kann, infiziert ist. Es handelt sich vorteilhafterweise um eine Säugetierzelle und insbesondere um eine humane Zelle. Sie kann eine primäre Zelle oder eine Tumorzellen und von beliebiger Herkunft sein, beispielsweise hämopoetisch (totipotente

Stammzelle, Leukozyt, Lymphozyt, Monozyt oder Makrophage), muskulär (Satellitenzelle, Myozyt, Myoblast, glatte Muskelzelle), kardial, nasal, pulmonal, tracheal, hepatisch, epithelial oder ein Fibroblast.

[0042] Die Erfindung hat gleichfalls eine pharmazeutische Zusammensetzung zum Gegenstand, welche als therapeutisches oder prophylaktisches Mittel eine Wirtszelle oder ein Adenovirus gemäß der Erfindung oder ein Adenovirus, welches durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhalten werden kann, in Kombination mit einem aus pharmazeutischer Sicht annehmbaren Träger umfasst. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist insbesondere für die präventive oder kurative Behandlung von Erkrankungen, wie genetisch bedingten Erkrankungen (Hämophilie, Mukoviszidose, Diabetes oder Duchenne-Muskeldystrophie, Becker-Muskeldystrophie ...), Krebserkrankungen wie jenen, die durch Onkogene oder Viren induziert werden, viralen Erkrankungen, wie Hepatitis B oder C und AIDS (erworbenes Immundefektsyndrom, welches aus der Infektion durch HIV resultiert), rezidivierenden viralen Erkrankungen, wie den durch das Herpes-Virus hervorgerufenen Virusinfektionen, und Herz-Kreislauf-Erkrankungen, darunter die Restenosen, bestimmt.

[0043] Eine pharmazeutische Zusammensetzung gemäß der Erfindung kann auf herkömmliche Weise hergestellt werden. Insbesondere kombiniert man eine therapeutisch wirksame Menge des therapeutischen oder prophylaktischen Mittels mit einem Träger, wie einem Verdünnungsmittel. Eine erfindungsgemäße Zusammensetzung kann auf lokalem Wege, systemischem Wege oder durch ein Aerosol, insbesondere auf intragastrischem, subkutanem, intrakardialem, intramuskulärem, intravenösem, intraperitonealem, intratumoralem, intrapulmonalem, intranasalem oder intratrachealem Wege verabreicht werden. Die Verabreichung kann in einer einzelnen Dosis oder in einmalig oder mehrmals nach einem bestimmten Zeitintervall wiederholten Dosen stattfinden. Der geeignete Verabreichungsweg und die geeignete Dosierung variieren abhängig von verschiedenen Parametern, beispielsweise von dem zu behandelnden Individuum oder der zu behandelnden Erkrankung oder ferner dem oder den Gen(en), das bzw. die zu transferieren ist bzw. sind. Die erfindungsgemäßen Viruspartikel können insbesondere in Form von Dosen zwischen 10^4 und 10^{14} pfu (Plaque-bildende Einheiten), vorteilhafterweise 10^5 und 10^{13} pfu und vorzugsweise 10^6 und 10^{12} pfu eingeschlossen formuliert werden. Die Formulierung kann gleichfalls ein Verdünnungsmittel, ein Adjuvans oder einen Hilfsstoff, ein Vehikel, welche aus pharmazeutischer Sicht annehmbar sind, ebenso wie ein Stabilisierungs-, Konservierungs- und/oder Solubilisierungsmittel umfassen. Eine Formulierung in Kochsalzlösung, nicht-wässriger oder isotonischer Lösung sind für eine Verabreichung über eine Injektion besonders geeignet. Sie kann in flüssiger oder trockener (beispielsweise Lyophilisat ...) oder einer jeglichen anderen galenischen Form, welche auf dem Gebiet der Pharmazie üblicherweise eingesetzt wird, vorgelegt werden.

[0044] Schließlich bezieht sich die Erfindung auf die therapeutische oder prophylaktische Verwendung eines Adenovirus oder einer Wirtszelle gemäß der Erfindung oder eines Adenovirus, welches durch ein erfindungsgemäßes Verfahren erhalten werden kann, für die Herstellung eines Arzneimittels, welches für die Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers durch Genterapie bestimmt ist. Gemäß einer ersten Möglichkeit kann das Arzneimittel direkt in vivo verabreicht werden (beispielsweise durch intravenöse Injektion in einen zugänglichen Tumor, in die Lungen durch ein Aerosol ...). Man kann gleichfalls den ex vivo-Ansatz heranziehen, der darin besteht, dem Patienten Zellen zu entnehmen (Stammzellen des Knochenmarks, Lymphozyten des peripheren Bluts, Muskelzellen ...), diese in vitro gemäß den Techniken dieses Fachgebiets zu transfizieren oder zu infizieren und diese dem Patienten erneut zu verabreichen.

[0045] Die Erfindung erstreckt sich gleichfalls auf ein Behandlungsverfahren, gemäß welchem man eine therapeutisch wirksame Menge eines Adenovirus oder einer Wirtszelle gemäß der Erfindung einem Patienten, der einer solchen Behandlung bedarf, verabreicht.

BEISPIELE

[0046] Die folgenden Beispiele veranschaulichen lediglich eine Ausführungsweise der Erfindung.

[0047] Die nachfolgend beschriebenen Konstruktionen erfolgen gemäß den allgemeinen Techniken der Gentechnologie und der molekularen Klonierung, die detailliert in Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) erläutert werden, oder gemäß den Empfehlungen des Herstellers, wenn man einen kommerziellen Kit verwendet. Die Klonierungsschritte, welche bakterielle Plasmide einsetzen, erfolgen vorzugsweise in dem Stamm E. coli 5K (Hubacek und Glover, 1970, J. Mol. Biol. 50, 111–127) oder BJ 5183 (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557–580). Man setzt diesen letztgenannten Stamm bevorzugt für die Schritte einer homologen Rekombination ein. Der Stamm NM522 (Stratagene) empfiehlt sich für die Vermehrung der M13-Phagenvektoren. Die Amplifizierungstechniken durch PCR sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt (siehe beispielsweise PCR Protocols – A guide to methods and appli-

cations, 1990, herausgegeben von Innis, Gelfand, Sninsky und White, Academic Press Inc.). Handelt es sich um die Reparatur von Restriktionsstellen, besteht die eingesetzte Technik in einem Auffüllen der überhängenden 5'-Enden mit Hilfe des großen Fragments der DNA-Polymerase I von *E. coli* (Klenow). Die Ad5-Nukleotidsequenzen sind jene, die in der Datenbank Genbank unter der Referenz M73260 verwendet werden.

[0048] Was die Zellbiologie angeht, werden die Zellen gemäß den Standardtechniken, die den Fachleuten auf diesem Gebiet wohlbekannt sind, transfiziert. Man kann die Calciumphosphat-Technik (Maniatis et al., a.a.O.) aufführen, es kann aber ein jegliches anderes Protokoll gleichfalls eingesetzt werden, wie die DEAE-Dextran-Technik, die Elektroporation, die auf osmotischen Schocks basierenden Techniken, die Mikroinjektion oder die auf dem Einsatz von kationischen Lipiden basierenden Methoden. Was die Kulturbedingungen angeht, sind diese klassisch. In den folgenden Beispielen wird auf die humane Linie 293 (ATCC CRL 1573) und auf die Mäuse-Linien Swiss 3T3 (ATCC CCL92), NR6 (Wells et al., 1990, Science 247: 962–964), NR6-hEGFR (Schneider et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 333–336), Daudi HLA– (ATCC CCL213) und Daudi HLA+ (Quillet et al., 1988, J. Immunol. 141, 17–20) zurückgegriffen. Es wird angegeben, dass die Daudi-Linie ausgehend von einem Burkitt-Lymphom etabliert worden ist und von Natur aus bezüglich der Expression von β -2-Mikroglobulin defizient ist und aus diesem Grunde auf ihrer Oberfläche keine HLA-Moleküle der Klasse I aufweist (Daudi HLA–). Die Zelllinie E8.1, welche von den Daudi abgeleitet ist, wurde durch Transfektion mit einem Gen, welches R-2-Mikroglobulin kodiert, erzeugt, um die Expression von HLA-Molekülen der Klasse I auf deren Oberfläche wiederherzustellen (Daudi-HLA+; Quillet et al., 1988, J. Immunol. 141, 17–20). Es versteht sich, dass andere Zelllinien gleichfalls eingesetzt werden können.

BEISPIEL 1: Konstruktion eines Adenovirus, welches einen Wirtstropismus gegenüber Zellen, welche den Rezeptor des GRP (für „Gastrin Releasing Peptide“ im Englischen) exprimieren, aufweist

A. Insertion der den GRP-Liganden kodierenden Sequenzen (Faser-GRP)

[0049] Das Plasmid pTG6593. leitet sich von p poly II (Lathe et al., 1987, Gene 57, 193–201) durch Einführung des vollständigen Gens, welches die Ad5-Faser kodiert, in Form eines EcoRI-SmaI-Fragments (Nukleotide (nt) 30049 bis 33093) ab. Das HindIII-SmaI-Fragment (nt 31994–33093) wird isoliert und in M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene 26, 91–99), welches durch die gleichen Enzyme verdaut worden ist, kloniert, wodurch M13TG6526 erhalten wird. Dieses Letztere wird einer zielgerichteten Mutagenese mit Hilfe des Oligonukleotids oTG7000 (SEQ ID NR: 2) unterworfen (Kit Sculptor, in vitro mutagenesis, Amersham), um einen einen Spacer-Arm von 12 Aminosäuren mit der Sequenz PSASASAPGS kodierenden Adaptor einzuführen. Der so erhaltene mutierte Vektor, M13TG6527, wird einer zweiten Mutagenese unterworfen, welche erlaubt, die die 10 Reste des GRP-Peptids (GNHWAVGHLM; Michael et al., 1995, Gene Ther. 2, 660–668) kodierende Sequenz einzuführen. Man setzt zu diesem Zweck das Oligonukleotid oTG7001 (SEQ ID NR: 3) ein. Das HindIII-SmaI-Fragment wird aus dem mutierten Phagen M13TG6528 isoliert und durch die Technik der homologen Rekombination (Chartier et al., 1996, J. Virol. 70, 4805–4810) eingeführt in das Plasmid pTG6590, welches das sich von den nt 27081 bis 35935 erstreckende und durch MunI (nt 32825) linearisierte Fragment des adenoviralen Ad5-Genoms trägt. Das SmaI-ScaI-Fragment (welches die nt 27082 bis 35935 des Ad5-Genoms, welche durch Einführung des Spacer-Arms und des GRP-Peptids modifiziert worden sind, enthält) wird aus dem vorangegangenen, als pTG8599 bezeichneten Vektor isoliert, wird dann gegen das äquivalente Fragment von pTG6591, welches vorab durch die gleichen Enzyme verdaut worden ist, ausgetauscht. Zur Unterrichtung umfasst pTG6591 die adenoviralen Wildtyp-Sequenzen der Positionen 21562 bis 35935. Man erhält pTG4600, woraus man das BstEII-Fragment (nt 24843 bis 35233) isoliert. Nach homologer Rekombination mit dem Plasmid pTG3602, welches das Ad5-Genom umfasst (detaillierter in der internationalen Anmeldung WO96/17070 beschrieben) erzeugt man den Vektor pTG4601.

[0050] Eine Kasette, welche die Expression des LacZ-Gens erlaubt, wird an der Stelle der adenoviralen E1-Region durch homologe Rekombination zwischen dem durch ClaI linearisierten Plasmid pTG4601 und einem BsrGI-PstI-Fragment, welches das β -Galactosidase kodierende LacZ-Gen unter der Kontrolle des MLP-Promotors von Ad2 und des Polyadenylierungssignals des SV40-Virus umfasst, eingeführt. Dieses Fragment wird aus dem Vektor pTG8526, welcher das 5'-Ende der genomischen viralen DNA (nt 1 bis 6241), in welcher die E1-Region (nt 459 bis 3328) durch die LacZ-Expressionskasette ersetzt ist, enthält, isoliert. Deren Konstruktion liegt im Vermögen des Fachmanns auf diesem Gebiet. Der endgültige Vektor wird als pTG4628 bezeichnet.

[0051] Die entsprechenden Viren AdTG4601 und AdTG4628 werden durch Transfektion der Linie 293 mit den adenoviralen Fragmenten, die aus den Plasmidsequenzen durch PacI-Verdau freigesetzt werden, erhalten. Zur Unterrichtung enthält AdTG4601 das vollständige Ad5-Genom, in welchem das Gen der Faser an seinem

3'-Ende einen Spacer-Arm, gefolgt von dem GRP-Peptid, umfasst. Das rekombinante Virus AdTG4628 enthält außerdem die Expressionskassette des LacZ-Reportergens unter der Kontrolle des adenoviralen MLP-Promotors.

B. Untersuchung des Tropismus des die Faser-GRP enthaltenden Virus

[0052] Die Anwesenheit des GRP-Peptids auf der Ebene der adenoviralen Faser erlaubt es, zielgerichtet die Zellen, welche auf ihrer Oberfläche den GRP-Rezeptor exprimieren, anzusteuern. Die Expression der mRNAs, welche diesen Letzteren kodieren, wird in 293-Zellen und in Swiss-3T3-Mäusezellen (Zachary et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82, 7616–7620) durch Northern-Blot untersucht. Man setzt als Sonde eine Mischung von 2 zu der den GRP-Rezeptor kodierenden Sequenz komplementären DNA-Fragmenten, die durch die herkömmlichen Techniken mit dem ^{32}P -Isotop markiert worden sind, ein. Zur Unterrichtung werden die Fragmente durch Umkehr-PCR ausgehend von den gesamten zellulären RNAs mit Hilfe der Oligonukleotide oTG10776 (SEQ ID NR: 4) und oTG10781 (SEQ ID NR: 5) (Battey et al., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 395–399; Corjay et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, 18771–18779) produziert. Die Intensität der detektierten mRNAs ist viel bedeutender in dem Falle der Swiss-3T3-Zellen als in den 293-Zellen, was die Überexpression des GRP-Rezeptors durch die Mäuse-Linie anzeigt.

[0053] An den 2 Zelltypen werden Konkurrenzexperimente ausgeführt. Der Kompetitor besteht in dem Kopf der in E. coli produzierten Ad5-Faser, dessen Bindungseigenschaften an den zellulären adenoviralen Rezeptor gezeigt wurden (Henry et al., 1994, J. Virol. 68, 5239–5246). Die in einer Monolayer vorliegenden Zellen werden vorab 30 min in Gegenwart von PBS oder von steigenden Konzentrationen von rekombinantem Ad5-Kopf (0,1 bis 100 µg/ml) in DMEM-Medium (Gibco BRL), welches mit 2% fötalem Kälberserum (FCS) komplementiert wird, inkubiert. Dann wird das Virus AdTG4628, dessen Faser das GRP-Peptid enthält, in einer Infektionsmultiplizität von 0,001 infektiöse Einheit/Zelle 24 h bei 37°C zugesetzt. Man setzt als Kontrolle und unter den gleichen Versuchsbedingungen das rekombinante Virus AdLacZ (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest. 90, 626–630), welches ein Gen der nativen Faser trägt, ein. Die Zellen werden dann fixiert und die Expression des LacZ-Gens ausgewertet (Sanes et al., 1986, EMBO J. 5, 3133–3142). Die Anzahl von blauen Zellen ist repräsentativ für die Effizienz der Virusinfektion. Eine Inhibition durch Konkurrenz kommt zum Ausdruck durch eine Verringerung der Anzahl von gefärbten Zellen bezogen auf eine Vergleichsprobe ohne Kompetitor (PBS).

[0054] Die Zugabe von rekombinantem Ad5-Kopf in einer Konzentration von 100 µg/ml inhibiert die Infektion der 293-Zellen durch die Viren AdLacZ und AdTG4628 stark (Inhibitionsgrad 95 und 98%). Dies legt nahe, dass das Vorhandensein des Kompetitors die Wechselwirkung der adenoviralen Faser mit ihrem natürlichen zellulären Rezeptor verhindert. Im Gegensatz dazu zeigen die beiden Viren ein unterschiedliches Verhalten gegenüber den Swiss-3T3-Zellen. Die Infektion durch das Virus AdTG4628 in Gegenwart von 100 µg/ml Kompetitor wird lediglich teilweise gehemmt, wohingegen unter den gleichen Versuchsbedingungen jene durch das Virus AdLacZ, welches die native Faser aufweist, vollständig gehemmt wird. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Infektion der Swiss-3T3-Zellen durch AdTG4628 teilweise durch einen unabhängigen Rezeptor, wahrscheinlich den Rezeptor für das GRP, welches diese Zellen überexprimieren, vermittelt wird. Als Schlussfolgerung begünstigt das Anfügen des Liganden GRP an das C-terminale Ende der Faser die Infektion der Zellen, welche den Rezeptor für das GRP exprimieren, auf eine von der Wechselwirkung zwischen der Faser und dem natürlichen zellulären Rezeptor unabhängige Weise.

BEISPIEL 2: Konstruktion eines Adenovirus, welches einen Wirtstropismus gegenüber Zellen, welche den Rezeptor für EGF („Epidermal Growth Factor“ im Englischen) exprimieren, aufweist

[0055] Dieses Beispiel beschreibt eine Faser, welche die EGF-Sequenzen an ihrem C-terminalen Ende trägt. Dafür setzt man die Oligonukleotide oTG11065 (SEQ ID NR: 6) und oTG11066 (SEQ ID NR: 7) ein, um ein HindIII-XbaI-Fragment ausgehend von dem Plasmid M13TG6527 zu amplifizieren. Die Oligonukleotide oTG11067 (SEQ ID NR: 8) und oTG11068 (SEQ ID NR: 9) erlauben es, ein XhoI-SmaI-Fragment (welches von dem Stop-Codon bis zu nt 33093 geht) ausgehend von M13TG6527 zu erzeugen. Die komplementäre DNA des EGF, welche von der ATCC erhalten wurde (Nr. 59957), wird in Form eines XhoI-XbaI-Fragments mit Hilfe der Oligonukleotide oTG11069 (SEQ ID NR: 10) und oTG11070 (SEQ ID NR: 11) amplifiziert. Die drei durch die adäquaten Enzyme verdauten Fragmente werden dann religiert, wodurch ein HindIII-SmaI-Fragment erhalten wird, welches den EGF fusioniert an das C-terminale Ende der Faser enthält. Man wendet die gleiche Vorgehensweise der homologen Rekombination wie jene, die in Beispiel 1 beschrieben wurde, an, um dieses Fragment in seinem genomischen Kontext zu ersetzen.

[0056] Indessen kann man die Klonierungsschritte vereinfachen, indem man eine einmalig vorkommende BstBI-Stelle in die Zielregion durch die klassischen Mutagenesetechniken einführt. Man erhält pTG4609 und pTG4213 mit LacZ. Die homologe Rekombination zwischen durch BstBI linearisiertem pTG4609 und dem vorangegangenen HindIII-SmaI-Fragment erzeugt das Plasmid pTG4225, welches die E1-Wildtyp-Region trägt. Ihr Äquivalent, welches die LacZ-Expressionskassette pTG4226 trägt, wird durch homologe Rekombination mit pTG4213, welches durch BstBI verdaut wurde, erhalten. Die Viren AdTG4225 und AdTG4226 können auf klassische Weise durch Transfektion einer geeigneten Zelllinie, welche beispielsweise den Rezeptor für den EGF überexprimiert, erzeugt werden.

[0057] Um die Infektionsspezifität dieser Viren zu testen, kann man die Mäuse-Fibroblastenzellen NR6 und die NR6-hEGFR-Zellen, welche den Rezeptor für den humanen EGF exprimieren, einsetzen. Kompetitionen mit dem rekombinanten Kopf von Ad5 oder mit EGF erlauben, die Intervention der natürlichen zellulären Rezeptoren und EGF für die Vermittlung der Infektion durch die Viren auszuwerten.

BEISPIEL 3: Modifikationen des Kopfes der Faser, um die Bindung an den natürlichen zellulären Rezeptor zu beseitigen

[0058] Die Mutation der Region der adenoviralen Faser, welche an der Wechselwirkung mit dem natürlichen zellulären Rezeptor beteiligt ist, wurde unternommen, um das Vermögen der Faser, an ihren natürlichen Rezeptor zu binden, zu beseitigen, und das Hinfügen eines Liganden wird erlauben, den Tropismus der entsprechenden Adenoviren zu modifizieren.

[0059] Die Sequenzen der Ad5-Faser, welche die Region, welche sich von den Resten 443 bis 462 und 529 bis 536 erstreckt, kodieren, wurden diversen Mutationen unterworfen. Die Deletion des Faltblatts D setzt das Mutagenese-Oligonukleotid oTG7414 (SEQ ID NR: 12) und die Deletion der Schleife CD das Oligonukleotid oTGA (SEQ ID NR: 13) ein. Das Oligonukleotid oTGB (SEQ ID NR: 14) erlaubt seinerseits die Deletion der CD-Schleife und des Faltblatts D. Das Oligonukleotid OTG 7416 (SEQ ID NR: 38) erlaubt die Deletion des Faltblatts H. Alle diese Oligonukleotide enthalten eine BamHI-Stelle, welche erlaubt, die Mutanten leicht zu detektieren und gleichfalls die einen Liganden, beispielsweise das Peptid EGF, kodierenden Sequenzen zu inserieren.

[0060] Eine andere Reihe von Modifikationen besteht darin, diese deletierten Regionen durch die äquivalenten Sequenzen, welche von der Faser von Ad3 stammen, zu ersetzen (D + CD5 gegen D + CD3 bezeichnet, dass die Region CD und D der Ad5-Faser gegen ihr Äquivalent aus Ad3 ersetzt wird). Tatsächlich zeigen zahlreiche Daten, dass Ad5 und Ad3 nicht an den gleichen Rezeptor binden derart, dass eine solche Substitution die durch den Ad5-Rezeptor vermittelte Infektion vernichten und zielgerichtet die Zellen, welche den Ad3-Rezeptor tragen, ansteuern lassen müsste. Das Ersetzen der CD-Schleife von Ad5 durch jene von Ad3 setzt oTG11135 (SEQ ID NR: 15) ein, das Ersetzen des Faltblatts D der Ad5-Faser durch jenes der Ad3-Faser erfolgt durch das Oligonukleotid oTG10350 (SEQ ID NR: 16) und das Ersetzen des Faltblatts D und der Schleife CD von Ad5 durch jene aus Ad3 erfolgt an der vorangegangenen Mutante mit Hilfe von oTG11136 (SEQ ID NR: 17). Das Ersetzen des Faltblatts H erfolgt mit Hilfe des Oligonukleotids OTG 10352 (SEQ ID NR: 39).

[0061] Diese Zielregion des adenoviralen Kopfes wurde gleichfalls durch eine Reihe von Punktmutationen modifiziert:

- Ersetzen der $\alpha\alpha$ -Krümmung GSLA gegen die $\alpha\alpha$ -Krümmung DKLT: oTGC (SEQ ID NR: 18),
- Ersetzen der $\alpha\alpha$ -Krümmung SGTV gegen die $\alpha\alpha$ -Krümmung DKLT: oTGC (SEQ ID NR: 19),
- G443 gegen D (G443D): oTGE (SEQ ID NR: 20),
- L445 gegen F (L445F): oTGF (SEQ ID NR: 21),
- G450 gegen N (G450N): oTGG (SEQ ID NR: 22),
- T451 gegen K (T451K): oTGH (SEQ ID NR: 23),
- V452 gegen N (V425N): oTGI (SEQ ID NR: 24),
- A455 gegen F (A455F): oTGJ (SEQ ID NR: 25),
- L457 gegen K (L457K): oTGK (SEQ ID NR: 26),
- I459 gegen A (I459A): oTGL (SEQ ID NR: 27).

[0062] Die oTGE bis I führen Mutationen in die CD-Schleife der adenoviralen Faser bei Aminosäuren, die zwischen Ad5 und Ad3 nicht konserviert sind, ein, wohingegen die OTGJ bis K Aminosäuren des Faltblatts D betreffen, die an einer die Struktur stabilisierenden Wasserstoffbrückenbindung nicht beteiligt sind.

[0063] Die Mutagenesen können an dem Vektor M13TG6526 oder M13TG6528 ausgeführt werden. Der erste

trägt das HindIII-SmaI-Wildtyp-Fragment und der zweite eben dieses Fragment, welches durch die Insertion der GRP-Sequenzen modifiziert worden ist. Die Plasmide, welche das adenovirale Genom tragen, können rekonstituiert werden, wie weiter oben für die Plasmide pTG4609 (E1-Wildtyp) und pTG4213 (LacZ anstelle der E1-Region) beschrieben. Die Viren werden durch Transfektion von 293-Zellen oder ebenso von Zellen, welche den Rezeptor, welcher den betreffenden Liganden bindet, überexprimieren, erzeugt. Solche Zellen können durch Transfektion mit der entsprechenden komplementären DNA erzeugt werden. Man setzt vorzugsweise Zellen ein, die den natürlichen zellulären Rezeptor der Adenoviren von Natur aus nicht exprimieren, beispielsweise die Linie Daudi (ATCC CCL213).

[0064] Die Lebensfähigkeit der verschiedenen Mutanten wird ausgewertet durch Transfektion von 293-Zellen und 293-Fb⁺-Zellen (293-Zellen, welche durch einen Expressionsvektor der Ad5-Wildtyp-Faser transfiziert worden sind). Indessen ist die Transfektionseffizienz von einem Experiment zum anderen variabel, ebenso was ein Adenovirus betrifft, welches eine Wildtyp-Faser, in welche das GRP-Peptid an ihrem C-terminalen Ende inkorporiert worden ist (AdFbGRP), betrifft. Um die Ergebnisse zu standardisieren, werden die nach Transfektion von 293-Fb⁺-Zellen erhaltenen Plaques zuallererst auf eben dieser Linie amplifiziert und die erzeugten Viren werden titriert: in diesem Stadium können sie entweder die Wildtyp-Faser oder die mutierte Faser oder die beiden Arten tragen. Die 293-Zellen werden dann mit diesen Viren in einer geringen Infektionsmultiplizität, welche lediglich erlaubt, ungefähr 10% der Zellen zu infizieren (MOI von ungefähr 0,2 infektiöse Einheit/Zelle), infiziert und man bestimmt den Umfang der Virusinfektion 7 Tage nach der Infektion, indem man die Anhäufung der viralen DNA und den Virustiter misst. Da die Propagierung der Infektion von der mutierten Faser abhängig ist, sind die interessanten Mutanten jene, die zu keiner produktiven Infektion führen, was zeigt, dass die Mutation die Bindung an den natürlichen Rezeptor verändert. Das Propagierungsvermögen der Adenoviren, welche die mutierte Faser tragen, wird mit jenem eines Wildtyp-Adenovirus und eines AdFbGRP verglichen.

[0065] Die Ergebnisse zeigen, dass die Insertion des GRP-Peptids am Ende der Wildtyp-Faser die Vermehrung des entsprechenden Virus verglichen mit einem Wildtyp-Ad leicht verringert, aber der Vermehrungsfaktor liegt nichtsdestotrotz in der Größenordnung von 1000. Die Mutationen V425N, D + CD5 gegen D + CD3 und L445F verringern die Affinität des Kopfes der mutierten Faser für den natürlichen zellulären Rezeptor der Adenoviren signifikant (Faktor 3 bis 11). Die Mutationen Δ D (Deletion des Faltblatts D der Ad5-Faser), Δ CD + D (Deletion der CD-Schleife und des Faltblatts D), CD5 gegen CD3 (Ersetzen der CD-Schleife eines Ad5 durch ihr Äquivalent aus einem Ad3), G443D, A455F, L457K und I459A vernichten die Propagierung der entsprechenden Viren in den 293-Zellen (Vermehrungsfaktor unter 1).

[0066] Dann verifiziert man das Vermögen der mutierten Viren, in die Zielzellen durch das Zwischenglied des Rezeptors für das GRP einzudringen. Die interessanten Mutanten sind jene, die einen signifikanten Vermehrungsfaktor (über 1) aufweisen. Zu diesem Zweck kann man eine als 293-GRPR bezeichnete Linie einsetzen, welche den MHC-I und den Rezeptor für das GRP in erhöhten Niveaus exprimiert. Sie wird erzeugt durch Transfektion von 293-Zellen mit einem eukaryotischen Expressionsplasmid, welches die cDNA des GRP-Rezeptors trägt (Corjay et al., 1991, J. Biol. Chem. 266, 18771–18779). Die Expressionskassette wird aus dem frühen CMV-Promotor (Boshart et al., 1985, Cell 41, 521), den Spleißsequenzen des β -Globin-Gens, der den GRP-Rezeptor kodierenden cDNA und den polyA-Sequenzen des β -Globin-Gens gebildet. Die Selektion der Transformanten erfolgt in Gegenwart von Hygromycin (350 μ g/ml) und es werden 50 Klone selektioniert, amplifiziert und hinsichtlich der Expression der den Rezeptor kodierenden mRNA durch die Northern-Technik getestet. Die am stärksten produzierenden Klone werden vereinigt und als 293-GRPR bezeichnet. Die Expression des Proteins kann gleichfalls durch FACS mit Hilfe eines mit Biotin und mit Avidin-FITC konjugierten GRP-Peptids, gefolgt von einer Detektion mit Hilfe von Fluorescein, kontrolliert werden.

BEISPIEL 4: Insertion des Liganden in ein anderes Capsid-Protein als die Faser in Kombination mit einer der vorangegangenen Modifikationen der Faser

[0067] Dieses Beispiel beschreibt die Insertion des Liganden EGF in das Capsid-Protein Hexon. Selbstverständlich ist es bevorzugt, dass das entsprechende Adenovirus seine Fähigkeit zur Anheftung an den natürlichen zellulären Rezeptor verloren hat. Sein Genom kann beispielsweise ein Gen der modifizierten Faser umfassen (siehe Beispiel 3) oder ihm kann wenigstens ein Teil der Sequenzen der Faser fehlen.

[0068] Man konstruiert ein Transfer-Plasmid für die homologe Rekombination, welches die Region des Genoms von Ad5, welche das Hexon kodiert (nt 18842–21700), überspannt. Das HindIII-XhoI-Fragment von Ad5 (nt 18836–24816) wird in durch eben diese Enzyme verdauten pBSK+ (Stratagene) kloniert, wodurch das Plasmid pTG4224 erhalten wird. Die das Peptid EGF kodierenden Sequenzen werden in die hypervariable Schleife L1 des Hexons durch Erzeugung von chimären Fragmenten durch PCR eingeführt: Hexon (nt

19043–19647)-XbaI-EGF-BsrGI-Hexon (nt 19699–20312). Das Fragment nt 19043 bis 19647 wird durch PCR-Amplifizierung ausgehend von dem Plasmid pTG3602 mit den Oligonukleotiden oTG11102 (SEQ ID NR: 28) und oTG11103 (SEQ ID NR: 29) erhalten. Das Fragment nt 19699 bis 20312 wird ausgehend von eben dieser DNA mit den Oligonukleotiden oTG11104 (SEQ ID NR: 30) und oTG11105 (SEQ ID NR: 31) amplifiziert. Der EGF wird ausgehend von der cDNA mit Hilfe der Oligonukleotide oTG11106 (SEQ ID NR: 32) und oTG11107 (SEQ ID NR: 33), welche erlauben, die den EGF kodierende Sequenz in Phase mit dem Hexon zu bringen, kloniert. Die PCR-Produkte werden mit den adäquaten Enzymen verdaut, dann religiert. Das chimäre Fragment kann dann durch homologe Rekombination in das durch NdeI linearisierte (nt 19549) Plasmid pTG4224 inseriert werden, wodurch pTG4229 erhalten wird. Die das modifizierte Hexon kodierenden Sequenzen können durch HindIII-XhoI-Verdau erhalten und in ihrem genomischen Kontext durch homologe Rekombination ersetzt werden. Man kann den durch SgfI linearisierten Vektor pTG3602, pTG4607, pTG4629 oder einen Vektor, welcher das adenovirale Genom, bei welchem Sequenzen der Faser deletiert sind (wie das nachfolgend beschriebene pTG4607), enthält oder welcher eine modifizierte Faser entsprechend dem Beispiel 3 exprimiert, einsetzen.

[0069] Das adenovirale Genom, welches nicht in der Lage ist, eine funktionsfähige native Faser zu erzeugen, wird durch eine Deletion erhalten, welche das Startcodon mit einbezieht, sich aber nicht auf die anderen adenoviralen ORFs erstreckt. Man geht auf die folgende Weise vor: das adenovirale Fragment 5' von der Deletion (nt 30564 bis 31041) wird durch PCR mit Hilfe der Primer oTG7171 und oTG7275 (SEQ ID NR: 34 und 35) amplifiziert. Die Amplifizierung des 3'-Fragments (nt 31129 bis 33099) setzt die Primer oTG7276 und oTG7049 (SEQ ID NR: 36 und 37) ein. Die PCR-Fragmente werden durch XhoI verdaut und ligiert, bevor sie durch homologe Rekombination in den durch NdeI linearisierten Vektor pTG6591 eingeführt werden, wodurch pTG4602 erhalten wird. Dann wird das aus diesem Letzteren isolierte BstEII-Fragment einer homologen Rekombination mit dem durch SpeI verdauten Vektor pTG3602 unterworfen. Man erhält pTG4607. Der Vektor pTG4629 ist äquivalent zu pTG4607, enthält aber außerdem die LacZ-Expressionskassette anstelle von E1.

[0070] Die entsprechenden Viren können nach Transfektion von 293-Zellen, 293-Fb⁺-Zellen oder von Zellen, welche den Rezeptor für den EGF überexprimieren, erhalten werden. Die Untersuchung der Infektionsspezifität wird man, wie zuvor beschrieben, unter Verwendung von EGF als Kompetitor ausführen können.

BEISPIEL 5: Konstruktion einer Mutante der Faser, bei welcher die Faltblätter E und F deletiert sind

[0071] Es wurde gleichfalls eine Mutante mit einer Deletion der Faltblätter EF der Domäne des Kopfes der Faser von Ad5 erzeugt. Das Plasmid pTG6593 wird durch HindIII und SmaI verdaut und das die Sequenzen der Faser enthaltende Fragment wird isoliert und in den durch HindIII und SmaI gespaltenen Vektor M13TG130 kloniert. Die Deletionsmutation setzt das in der SEQ ID NR: 40 angegebene Oligonukleotid ein. Das mutierte HindIII-SmaI-Fragment wird in *E. coli* mit durch BstBI linearisiertem pTG4609 (Chartier et al., 1996, *J. Virol.* 70, 4805–4810) rekombiniert.

[0072] Dieser Letztere enthält das vollständige Ad5-Genom, welches eine BstBI-Stelle an Position 32940 strangabwärts von dem Stop-Codon der Faser umfasst.

[0073] Das Trimerisierungsvermögen der modifizierten Faser wurde auf einem NDS-PAGE-Gel (Novelli und Boulanger, *J. of Biological Chemistry*, 1991, 266, 9299–9303) ausgehend von dem auf rekombinanten Wege in Sf9-Insektenzellen mit Hilfe eines rekombinanten Baculovirus, welches die entsprechenden Sequenzen unter die Kontrolle des Polyhedrin-Promotors gestellt enthält, produzierten Protein getestet. Parallel dazu wird die Lebensfähigkeit (oder das Vermögen, zu propagieren) der Virionen, welche die mutierte Faser tragen, durch Transfektion von 293- und 293Fb⁺-Zellen bestimmt. Schließlich kann die Bindung der Faser an die zellulären MHC-I- und CAR-Rezeptoren in Kompetitionsinfektionsexperimenten mit Hilfe eines rekombinanten Ad5-Luc-Adenovirus bei Daudi-HLA⁺- und CHO-CAR-Zellen (Bergelson et al., 1997, *Science* 275, 1320–1323) untersucht werden. Zur Unterrichtung ist das Ad5Luc-Virus ein replikationskompetentes Adenovirus, welches das unter die Kontrolle des frühen Promotors des SV40-Virus (Simian Virus 40) gestellte Luciferasegen inseriert in die E3-Region des adenoviralen Genoms enthält (Mittal et al., 1993, *Virus Research* 28, 67–90).

[0074] Die Faser ΔEF häuft sich in Form von Trimeren an, kann in 293- und 293Fb⁺-Zellen propagieren und ist kein Kompetitor hinsichtlich der Infektion der Daudi-HLA⁺-Zellen durch Ad5Luc. Sie ist in der Lage, die Infektion der CHO-CAR-Zellen teilweise zu hemmen, aber weniger wirkungsvoll als die Wildtyp-Faser. Dies legt nahe, dass die Faltblätter E und F für die Anheftung des Ad5 an den MHC-I-Rezeptor wichtig sind, wohingegen sie eine geringfügigere Rolle, vielleicht eine Stabilisierungsrolle, bei der Bindung an den CAR spielen. Die Insertion eines neuen Liganden müsste erlauben, die Infektiosität in Richtung der Zellen, die den durch den Li-

ganden erkannten Rezeptor tragen, umzudirigieren.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Transgene S.A.
- (B) STRASSE: 11 rue de Molsheim
- (C) STADT: Strasbourg
- (E) LAND: Frankreich
- (F) POSTLEITZAHL: 67000
- (G) TELEFON: (33) 03 88 27 91 00
- (H) TELEFAX: (33) 03 88 27 91 11

- (A) NAME: Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
- (B) STRASSE: 3 rue Michael Ange
- (C) STADT: Paris
- (E) LAND: Frankreich
- (F) POSTLEITZAHL: 75794 Cedex 16
- (G) TELEFON: (33) 01 44 96 40 00
- (H) TELEFAX: (33) 01 44 96 50 00

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Modifizierte adenovirale Faser und mit zielgerichteter Spezifität versehene Adenoviren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 40

(iv) COMPUTERLESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Diskette
- (B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 581 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Protein

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Ad5-Faser

(viii) POSITION IM GENOM:

- (B) POSITION AUF DER KARTE: 31063 bis 33120 des Ad5-Genoms

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 1:

```

Met Lys Arg Ala Arg Pro Ser Glu Asp Thr Phe Asn Pro Val Tyr Pro
1      5      10      15

Tyr Asp Thr Glu Thr Gly Pro Pro Thr Val Pro Phe Leu Thr Pro Pro
20      25      30

Phe Val Ser Pro Asn Gly Phe Gln Glu Ser Pro Pro Gly Val Leu Ser
35      40      45

Leu Arg Leu Ser Glu Pro Leu Val Thr Ser Asn Gly Met Leu Ala Leu
50      55      60

Lys Met Gly Asn Gly Leu Ser Leu Asp Glu Ala Gly Asn Leu Thr Ser
65      70      75      80

Gln Asn Val Thr Thr Val Ser Pro Pro Leu Lys Lys Thr Lys Ser Asn
85      90      95

Ile Asn Leu Glu Ile Ser Ala Pro Leu Thr Val Thr Ser Glu Ala Leu
100     105     110

Thr Val Ala Ala Ala Ala Pro Leu Met Val Ala Gly Asn Thr Leu Thr
115     120     125

Met Gln Ser Gln Ala Pro Leu Thr Val His Asp Ser Lys Leu Ser Ile
130     135     140

Ala Thr Gln Gly Pro Leu Thr Val Ser Glu Gly Lys Leu Ala Leu Gln
145     150     155     160

Thr Ser Gly Pro Leu Thr Thr Thr Asp Ser Ser Thr Leu Thr Ile Thr
165     170     175

Ala Ser Pro Pro Leu Thr Thr Ala Thr Gly Ser Leu Gly Ile Asp Leu
180     185     190

Lys Glu Pro Ile Tyr Thr Gln Asn Gly Lys Leu Gly Leu Lys Tyr Gly
195     200     205

Ala Pro Leu His Val Thr Asp Asp Leu Asn Thr Leu Thr Val Ala Thr
210     215     220

Gly Pro Gly Val Thr Ile Asn Asn Thr Ser Leu Gln Thr Lys Val Thr
225     230     235     240

Gly Ala Leu Gly Phe Asp Ser Gln Gly Asn Met Gln Leu Asn Val Ala
245     250     255

Gly Gly Leu Arg Ile Asp Ser Gln Asn Arg Arg Leu Ile Leu Asp Val
260     265     270

Ser Tyr Pro Phe Asp Ala Gln Asn Gln Leu Asn Leu Arg Leu Gly Gln
275     280     285

Gly Pro Leu Phe Ile Asn Ser Ala His Asn Leu Asp Ile Asn Tyr Asn
290     295     300

```

Lys Gly Leu Tyr Leu Phe Thr Ala Ser Asn Asn Ser Lys Lys Leu Glu
 305 310 315 320
 Val Asn Leu Ser Thr Ala Lys Gly Leu Met Phe Asp Ala Thr Ala Ile
 325 330 335
 Ala Ile Asn Ala Gly Asp Gly Leu Glu Phe Gly Ser Pro Asn Ala Pro
 340 345 350
 Asn Thr Asn Pro Leu Lys Thr Lys Ile Gly His Gly Leu Glu Phe Asp
 355 360 365
 Ser Asn Lys Ala Met Val Pro Lys Leu Gly Thr Gly Leu Ser Phe Asp
 370 375 380
 Ser Thr Gly Ala Ile Thr Val Gly Asn Lys Asn Asn Asp Lys Leu Thr
 385 390 395 400
 Leu Trp Thr Thr Pro Ala Pro Ser Pro Asn Cys Arg Leu Asn Ala Glu
 405 410 415
 Lys Asp Ala Lys Leu Thr Leu Val Leu Thr Lys Cys Gly Ser Gln Ile
 420 425 430
 Leu Ala Thr Val Ser Val Leu Ala Val Lys Gly Ser Leu Ala Pro Ile
 435 440 445
 Ser Gly Thr Val Gln Ser Ala His Leu Ile Ile Arg Phe Asp Glu Asn
 450 455 460
 Gly Val Leu Leu Asn Asn Ser Phe Leu Asp Pro Glu Tyr Trp Asn Phe
 465 470 475 480
 Arg Asn Gly Asp Leu Thr Glu Gly Thr Ala Tyr Thr Asn Ala Val Gly
 485 490 495
 Phe Met Pro Asn Leu Ser Ala Tyr Pro Lys Ser His Gly Lys Thr Ala
 500 505 510
 Lys Ser Asn Ile Val Ser Gln Val Tyr Leu Asn Gly Asp Lys Thr Lys
 515 520 525
 Pro Val Thr Leu Thr Ile Thr Leu Asn Gly Thr Gln Glu Thr Gly Asp
 530 535 540
 Thr Thr Pro Ser Ala Tyr Ser Met Ser Phe Ser Trp Asp Trp Ser Gly
 545 550 555 560
 His Asn Tyr Ile Asn Glu Ile Phe Ala Thr Ser Ser Tyr Thr Phe Ser
 565 570 575
 Tyr Ile Ala Gln Glu
 580

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 60 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG7000
(kodierte PSASASASAPGS)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 2:

AACGATTCTT TAGCTGCCGG GAGCAGAGCC GGAGGCGGAG GCGCTGGGTT CTTGGGCAAT 50

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 57 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid otg7001
(kodierte GRP)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 3:

AACGATTCTT TACATCAGGT GGCCACAGC CCAGTGGTTT CCGCTGCCGG GAGCAGA 57

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG10776

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 4:

CCTTCCACGG GAAGATTGTA 20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG10781

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 5:

GGGGTGTCTG TCTTCACACT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 26 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11065

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 6:

GGGAAGCTTG AGGTAACT AAGCAC

26

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11066

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 7:

GGGTCTAGAG CTGCCGGGAG CAGAGGCG

28

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzelsträngig
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:
(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11067

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 8:

GGGCTCGAGT TATGTTTCAA CGTGTATTAT

29

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 24 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11068

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 9:

GTGCCCCGGG AGTTTATTAA TATC

24

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 10:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 31 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11069
(EGF-Klonierung)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 10:

GCGTCTAGAA ATAGTGACTC TGAATGTCCC C

31

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 11:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 46 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11070
(EGF-Klonierung)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 11:

GCGCTCGAGC ACAAACGATT CTTTAGCGCA GTTCCCACCA CTTCAG

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 12:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG7414
(Deletion des Faltblatts D)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 12:

TAGCACTCCA TTTTCGTCGG ATCCTTGAAC TGTTCAGAT AT

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGA
(Deletion der Schleife CD)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 13:

CTTATAATAA GATGAGCACT GGATCCAGCC AAAACTGAAA CTG

43

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGB
 (Deletion Schleife CD und F. D)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 14:

GTAGCACTCC ATTTTCGTCTG GATCCAACAG CCAAACTGA AACTG

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 88 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Humanes Adenovirus Ad5 und Ad3
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11135
 (Schleife CD5 gegen CD3)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 15:

CGTCAAATCT TATAATAAGA TGAGCACTCA CGTTTTTGTT TTAAACAGG GTGTTGTAGT

60

CGCTAACAGC CAAAACTGAA ACTGTAGC

88

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 16:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 64 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Adenovirus (Mastadenovirus)
 (B) STAMM: Adenovirus 3
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG10350
 (Faltblatt D5 gegen D3)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 16:

GTAGCACTCC ATTTTCGTCA AAGTAGAGCT CCACGTTGAT ACTTTGAACT GTTCCAGATA

60

TTGG

64

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 17:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 88 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus Ad5 und Ad3
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11136
 (CD+D5 gegen CD+D3)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 17:

CGTCAAAGTA GAGCTCCACG TTGATACTCA CGTTTTTGTGTT TTTAAACAGG GTGTTGTAGT 60

CGCTAACAGC CAAAACGAA ACTGTAGC 88

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 56 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGC
 (Ersetzg. Krümmung GSLA gegen DKLT)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 18:

TTGAACTGTT CCAGATATTG GGGTCAGTTT GTCTTTAACA GCCAAACTG AACTG 56

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 48 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGD
 (Ersetzg. Krümmung SGTV gegen DKLT)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 19:

AATAAGATGA GCACTTTGGG TCAGTTTGTC TATTGGAGCC AAAC TGCC

48

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGE
(Ersetzg. G443 gegen D)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 20:

CCAGATATTG GAGCCAACT GTCTTTAACA GCCAAACTG AAAC

44

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGF
(Ersetzg. L445 gegen F)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 21:

TGTTCAGAT ATTGGAGCGA AACTGCCTTT AACAGCCAAA AC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 22:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGG
 (Ersetzg. G450 gegen N)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 22:

ATGAGCACTT TGAAGTGTGT TAGATATTGG AGCCAAACTG CC

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 23:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 44 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGH
 (Ersetzg. T451 gegen K)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 23:

TAAGATGAGC ACTTTGAACC TTTCCAGATA TTGGAGCCAA ACTG

44

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 24:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGI
 (Ersetzg. V452 gegen N)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 24:

CTTATAATAA GATGAGCACT TTGGTTTGT CCAGATATTG GAGCC

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 25:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 48 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus

(B) STAMM: Adenovirus 5

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGJ
(Ersetzg. A455 gegen F)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 25:

GTCAAATCTT ATAATAAGAT GGAAACTTTG AACTGTTCCA GATATTGG

48

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 47 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus

(B) STAMM: Adenovirus 5

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGK
(Ersetzg. L457 gegen K)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 26:

CCATTTTCGT CAAATCTTAT AATTTTATGA GCACTTTGAA CTGTTCC

47

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 46 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: einzelsträngig

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus

(B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)

(C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTGL
(Ersetzg. I459 gegen A)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 27:

GCACTCCATT TTCGTCAAAT CTAGCAATAA GATGAGCACT TTGAAC

46

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 28:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11102
 (Hexon-Klonierung)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 28:

CGGTTTCATCC CTGTGGACCG TGA

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 29:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11103
 (Hexon-Klonierung)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 29:

GGCCTCTAGA GTTGAGAAAA ATTGCATTTT CACTTGAC

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 30:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:

(A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11104
 (Hexon-Klonierung)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 30:

GGTATTGTAC AGTGAAGATG TAG

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 31:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11105
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 31:

CGTTGGAAGG ACTGTACTTT AGC

23

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 32:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 38 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11106
 (Klonierung cDNA EGF)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 32:

CGCGTCTAGA GGCGAATAGT GACTCTGAAT GTCCCCTG

38

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 33:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 45 Basenpaare
 (B) ART: Nukleinsäure
 (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
 (A) ORGANISMUS: Homo sapiens
 (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG11107
 (Klonierung cDNA EGF)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 33:

CCTGTGACATATACACTTT AGGGCGCAGT TCCCACCACT TCAGG

45

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 34:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 - (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG7171
(Deletion der Faser)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 34:

ATGGTTAACT TGCACCAGTG C

21

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 35:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 - (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG7275
(Deletion der Faser)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 35:

GGGCTCGAGC TGCAACAACA TGAAGAT

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 36:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
 - (B) ART: Nukleinsäure
 - (C) STRANGFORM: einzelsträngig
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTI-SENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
 - (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
 - (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG7276

(Deletion der Faser)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 36:

CCGCTCGAGA CTCCTCCCTT TGTATCC

27

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 37:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 20 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 5 (Ad5)
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG7049
(Deletion der Faser)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 37:

CTGCCCCGGA GTTATTAAT

20

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 38:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG7416
(Deletion des Faltblatts H)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 38:

TGTTTCCTGT GTACCGTTGG ATCCTTTAGT TTTGTCTCCG TT

42

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 39:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 64 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 3
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid oTG10352
(Faltblatt H5 gegen H3)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 39:

TGTTTCCTGT GTACCGTTTA GCATCACGGT CACCTCGAGA GGTTTAGTTT TGTCTCCGTT 60
TAAG 64

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR: 40:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 42 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: einzelsträngig
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTI-SENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: Mastadenovirus
- (B) STAMM: Adenovirus 5
- (C) INDIVIDUELLES ISOLAT: Synthese-Oligonukleotid
(Deletion Faltblätter E und F)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR: 40:

TGTATAGGCT GTGCCTTCGG ATCCCCAATA TTCTGGGTCC AG 42

Patentansprüche

1. Faser eines Adenovirus, welche durch Substitutionsmutation von einem oder mehreren Resten der Faser modifiziert ist, **dadurch gekennzeichnet**, dass diese Reste in Richtung des natürlichen zellulären Rezeptors des Adenovirus gerichtet und in dem Abschnitt der Faser, der die CD-Schleife, das D-Faltblatt und die DG-Schleife umfasst, enthalten sind, wobei die Mutation zur Wirkung hat, die Bindungsfähigkeit der modifizierten Faser an den natürlichen zellulären Rezeptor zu verringern oder zu beseitigen.

2. Faser eines Adenovirus nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie durch Substitutionsmutation von einem oder mehreren Resten in dem Abschnitt der Faser, welcher die CD-Schleife, das D-Faltblatt und den proximalen Teil der DG-Schleife umfasst, modifiziert ist.

3. Faser eines Adenovirus nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Adenovirus das Adenovirus vom Typ 5 (Ad5) ist und dass die Faser die Gesamtheit oder einen Teil der Sequenz, wie sie in der Sequenzbezeichnung Nr. 1 (SEQ ID NO: 1) gezeigt ist, umfasst und dass sie durch Substitutionsmutation von einem oder mehreren Resten aus der Region zwischen den Resten 441 bis 478 der SEQ ID NO: 1 und vorzugsweise 443 bis 462 modifiziert ist.

4. Faser eines Adenovirus nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass sie durch Substitutionsmutation von einem oder mehreren Resten, die in den Faltblättern E und F der Faser enthalten sind, modifiziert ist.

5. Faser eines Adenovirus nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Adenovirus das Adenovirus 5 (Ad5) ist und dass die Faser die Gesamtheit oder einen Teil der Sequenz, wie sie in der Sequenzbeschreibung Nr. 1 (SEQ ID NO: 1) gezeigt ist, umfasst und dass sie durch Substitutionsmutation von einem oder mehreren Resten aus der Region zwischen den Resten 479 bis 486 der SEQ ID NO: 1 modifiziert ist.

6. Faser eines Ad5-Adenovirus nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass sie modifiziert ist durch

Substitution:

- des Glycinrests an Position 443 durch einen Asparaginsäurerest,
- des Leucinrests an Position 445 durch einen Phenylalaninrest,
- des Valinrests an Position 452 durch einen Asparaginrest,
- des Alaninrests an Position 455 durch einen Phenylalaninrest,
- des Leucinrests an Position 457 durch einen Alanin- oder Lysinrest oder
- des Isoleucinrests an Position 459 durch einen Alaninrest.

7. Faser eines Adenovirus nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass das Adenovirus das Adenovirus vom Typ 2 (Ad2) ist und dass die Faser durch Substitutionsmutation von einem oder mehreren Resten aus der Region zwischen den Resten 441 bis 478 und vorzugsweise 451 bis 466 der Faser modifiziert ist.

8. Faser eines Adenovirus nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das Adenovirus das Adenovirus vom Typ 2 (Ad2) ist und dass die Faser durch Substitutionsmutation von einem oder mehreren Resten aus der Region zwischen den Resten 479 bis 486 der Faser modifiziert ist.

9. Faser eines Adenovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine substantiell verringerte Bindungsfähigkeit an den natürlichen zellulären Rezeptor verglichen mit einer nicht-modifizierten Faser aufweist und dass sie zur Trimerisierung in der Lage ist.

10. Faser eines Adenovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass sie außerdem einen Liganden umfasst, der in der Lage ist, ein von dem natürlichen zellulären Rezeptor des Adenovirus verschiedenes zelluläres Oberflächenmolekül zu erkennen.

11. Faser eines Adenovirus nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand aus der Gruppe, welche aus einem Antikörper, einem Peptid, einem Hormon, einem Polypeptid oder ferner einem Zucker gebildet wird, ausgewählt wird.

12. Faser eines Adenovirus nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand an dem C-terminalen Ende der Faser inseriert ist.

13. DNA-Fragment oder Expressionsvektor, welches bzw. welcher eine Faser eines Adenovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 12 kodiert.

14. Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, dass sie entweder in in das Genom integrierter Form oder in Form eines Episoms ein DNA-Fragment nach Anspruch 13 umfasst, welches unter die Kontrolle der Elemente, die dessen Expression in der Zelllinie erlauben, gestellt ist.

15. Zelllinie nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass sie außerdem in der Lage ist, ein Adenovirus zu komplementieren, welches hinsichtlich einer oder mehrerer Funktionen, ausgewählt aus den durch die Regionen E1, E2, E4 und L1–L5 kodierten Funktionen, defizient ist.

16. Zelllinie nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie von der Linie 293 abgeleitet ist.

17. Adenovirus, dadurch gekennzeichnet, dass es keine funktionsfähige native Faser aufweist und dass es eine Faser nach einem der Ansprüche 1 bis 12 umfasst, wobei die Faser nach einem der Ansprüche 1 bis 12 durch das Genom des Adenovirus kodiert wird oder in trans durch eine Zelllinie nach einem der Ansprüche 14 bis 16 bereitgestellt wird.

18. Adenovirus, dadurch gekennzeichnet, dass es keine funktionsfähige Faser aufweist und dass es eine Faser nach einem der Ansprüche 1 bis 12 und einen Liganden, welcher in der Lage ist, ein von dem natürlichen zellulären Rezeptor des Adenovirus verschiedenes zelluläres Oberflächenmolekül zu erkennen, umfasst.

19. Adenovirus nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand aus der Gruppe, welche aus einem Antikörper, einem Peptid, einem Hormon, einem Polypeptid oder ferner einem Zucker gebildet wird, ausgewählt wird.

20. Adenovirus nach einem der Ansprüche 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand an dem C-terminalen Ende der Faser inseriert ist.

21. Adenovirus nach einem der Ansprüche 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Ligand in ein anderes Capsidprotein als die Faser, insbesondere das Hexon oder das Penton inseriert ist.

22. Adenovirus nach einem der Ansprüche 17 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass es sich um ein replikationsdefektes rekombinantes Adenovirus handelt.

23. Adenovirus nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass aus diesem die Gesamtheit oder ein Teil der E1-Region und gegebenenfalls die Gesamtheit oder ein Teil der E3-Region deletiert ist.

24. Adenovirus nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass aus diesem außerdem die Gesamtheit oder ein Teil der Region E2, E4 und/oder L1–L5 deletiert ist.

25. Adenovirus nach einem der Ansprüche 22 bis 24, dadurch gekennzeichnet, dass es ein Gen von Interesse umfasst, welches ausgewählt wird aus den Genen, die ein Zytokin, einen zellulären oder nukleären Rezeptor, einen Liganden, einen Gerinnungsfaktor, das CFTR-Protein, Insulin, Dystrophin, ein Wachstumshormon, ein Enzym, einen Enzyminhibitor, ein Polypeptid mit Antitumorwirkung, ein Polypeptid, das in der Lage ist, eine bakterielle, durch Parasiten verursachte oder virale und insbesondere durch HIV verursachte Infektion zu hemmen, einen Antikörper, ein Toxin, ein Immuntoxin und einen Marker kodieren.

26. Verfahren zur Produktion eines Adenovirus nach einem der Ansprüche 17 bis 25, dadurch gekennzeichnet, dass:

- man eine geeignete Zelllinie mit dem Genom des Adenovirus transfiziert,
- man die transfizierte Zelllinie unter Bedingungen, die geeignet sind, um die Produktion des Adenovirus zu ermöglichen, kultiviert und
- man das Adenovirus aus der Kultur der transfizierten Zelllinie gewinnt und man gegebenenfalls das Adenovirus im Wesentlichen reinigt.

27. Verfahren zur Produktion eines Adenovirus, in dessen Genom die Gesamtheit oder ein Teil der eine Faser kodierenden Sequenzen fehlt, dadurch gekennzeichnet, dass:

- man eine Zelllinie nach einem der Ansprüche 14 bis 16 mit dem Genom des Adenovirus transfiziert,
- man die transfizierte Zelllinie unter Bedingungen, die geeignet sind, um die Produktion des Adenovirus zu ermöglichen, kultiviert und
- man das Adenovirus in der Kultur der transfizierten Zelllinie gewinnt und man gegebenenfalls das Adenovirus im Wesentlichen reinigt.

28. Wirtszelle, welche ein Adenovirus nach einem der Ansprüche 17 bis 25, oder welches durch ein Verfahren nach Anspruch 26 oder 27 erhalten wird, umfasst.

29. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche ein Adenovirus nach einem der Ansprüche 17 bis 25, oder welches durch ein Verfahren nach Anspruch 26 oder 27 erhalten wird, oder eine Wirtszelle nach Anspruch 28 in Kombination mit einem aus pharmazeutischer Sicht annehmbaren Träger umfasst.

30. Therapeutische oder prophylaktische Verwendung eines Adenovirus nach einem der Ansprüche 17 bis 25, oder welches durch ein Verfahren nach Anspruch 26 oder 27 erhalten wird, oder einer Wirtszelle nach Anspruch 28 für die Herstellung eines Arzneimittels, welches für die Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers durch Gentherapie bestimmt ist.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen