(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 703 T2** 2009.02.19

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 755 454 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 703.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/04587**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 916 379.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/028493**
(86) PCT-Anmeldetag: **13.04.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **26.10.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.01.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **13.02.2008**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **19.02.2009**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/864*** (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01)
C12N 9/88 (2006.01)
A61K 38/43 (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)
C12N 15/60 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
227319 **13.04.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
The Rockefeller University, New York, N.Y., US;
Yale University, New Haven, Conn., US

(72) Erfinder:
KAPLITT, Michael G., New York, NY 10021, US;
DURING, Matthew J., Weston, CT 06883, US

(74) Vertreter:
Müller-Boré & Partner, Patentanwälte, European Patent Attorneys, 81671 München

(54) Bezeichnung: **AAV-vermittelte Zufuhr von DNA an Zellen des Nervensystems**

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

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

Beschreibung

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft die Zufuhr von DNA an und die Expression von zugeführten Gene in Zellen des Nervensystems.

BESCHREIBUNG DES STANDES DER TECHNIK

[0002] Die erste Humangentherapie-Studie begann im September 1990 und umfasste einen retroviral vermittelten Transfer des Adenosindeaminase-(ADA)-Gens in Lymphozyten von Patienten mit schwerer kombinierter Immundefizienz (SCID). Die günstigen Ergebnisse dieser Studie förderten ein weiteres Interesse für die Gentherapie, was zu weiteren 67 klinischen Protokollen der Gentherapie führte, die bis heute durch das NIH Recombinant DNA Advisory Commitee (RAC) zugelassen wurden. Obwohl die ursprüngliche Hoffnung der Gentherapie in der Entwicklung einer heilenden Behandlung für einfache Einzelgenerkrankungen lag, fand die große Mehrheit der Gentherapiestudien für komplexe genetische oder erworbene Erkrankungen, wie infektiöse Erkrankung und Krebs, statt. Eine große Anzahl der anfänglichen klinischen Gentransferstudien waren keine Gentherapie-, sondern eher Genmarkierungsstudien. Der erste Typ der Markierungsexperimente verwendete Tumor infiltrierende Lymphozyten, welche in vitro mit retroviralen Vektoren vor einer Infusion in Patienten mit Krebs transduziert wurden. Die zweite Klasse der Genmarkierungsstudien umfasste den Versuch, verbleibende Tumorzellen im Knochenmark nachzuweisen, welche nach einer ablativen Chemotherapie in Patienten infundiert wurden.

[0003] Von den derzeit zugelassenen Gentherapiestudien verwendeten alle Studien vor 1992 retrovirale Vektoren, und die Erkrankungen, auf die sie abzielten, schlossen SCID, familiäre Hypercholesterinämie und Krebs ein. Erst kürzlich wurden Gentherapiestudien für AIDS und Hämophilie B begonnen, wiederum unter Verwendung retroviraler Vektoren. Zusätzlich wurden kürzlich adenovirale Vektoren für zystische Fibrose zugelassen. Die große Mehrheit dieser Protokolle hat zur Zeit sehr wenige Patienten eingeschlossen, und die meisten der Studien sind bis jetzt unveröffentlicht. Die verfügbaren Daten erscheinen jedoch vielversprechend, zum Beispiel hat die Expression des LDL-Rezeptors in der Leber, welche einer ex vivo Transduktion von operativ entfernten Hepatozyten und ihrer Infusion in die Pfortader in Patienten mit familiärer Hypercholesterinämie folgte, zu einem 20% Abfall der Plasmacholesterinmengen geführt (Randall (1992) JAMA 269: 837–838). Es ist daher wahrscheinlich, dass es ein exponentielles Wachstum von Gentherapiestudien geben wird, und eine große Anzahl von medizinischen Fakultäten und Ausbildungskrankenhäusern Gentherapiezentren einrichten werden.

[0004] Die Fähigkeit, Gene dem Nervensystem zuzuführen und ihre Expression zu manipulieren kann die Behandlung von zahlreichen neurologischen Störungen möglich machen. Bedauerlicherweise bringt ein Gentransfer in das zentrale Nervensystem (ZNS) mehrere Probleme mit sich, einschließlich der relativen Unzugänglichkeit des Gehirns und der Blut-Hirn-Schranke, und dass Neuronen des postnatalen Gehirns postmitotisch sind. Der Standardansatz eines Gentransfers somatischer Zellen, d. h., der von retroviralen Vektoren, ist für das Gehirn nicht möglich, da ein retroviral vermittelter Gentransfer mindestens eine Zellteilung zur Integration und Expression benötigt. Eine Anzahl von neuen Vektoren und nicht-viralen Verfahren wurde daher für einen Gentransfer in das ZNS verwendet. Obwohl die ersten Studien des Gentransfers in das ZNS einen ex vivo Ansatz verwendeten, d. h. die Transplantation von retroviral transduzierten Zellen, verwendeten kürzlich mehrere Gruppen ebenfalls einen in vivo Ansatz. Forscher verwendeten HSV-1 und adenovirale Vektoren, sowie nicht-virale Verfahren, einschließlich kationischer Lipid-vermittelter Transfektion (Wolff (1993) Curr. Opin. Biol. 3: 743–748).

[0005] Der ex vivo Ansatz wird durch eine kürzlich durchgeführte Studie dargestellt, in welcher Oligodendrozyten retroviral infiziert und in ein syngenes Rattenmodell für eine Demyelinisierung transplantiert wurden (Groves et al. (1993) Nature 362: 453–457). Zusätzlich zur Verwendung von Hirnzellen als Träger für eine Expression fremder Gene im ZNS wurden auch nicht-neuronale Zellen, einschließlich von Fibroblasten und primären Muskelzellen verwendet (Horrelou et al. (1990) Neuron. 5: 393–402; Jiao et al. (1993) Nature 362: 450–453).

[0006] Der in vivo Ansatz basierte anfänglich größtenteils auf der Verwendung des neurotropen Herpes Simplex Virus (HSV-1), jedoch bringen HSV-Vektoren mehrere Probleme mit sich, einschließlich der Instabilität der Expression und der Reversion zum Wildtyp (siehe unten). Eine neuere Entwicklung war die Verwendung von

adenoviralen Vektoren. Studien mit adenoviralem Vektor zeigten eine Expression von Markergenen im Rattengehirn, welche für zwei Monate anhielt, obwohl die Expression drastisch abfiel (Davidson et al. (1993) Nature Genetics 3: 219–2223). Zusätzlich zu Ansätzen mit viralem Vektor verwendeten andere Forscher eine direkte Injektion eines kationischen Liposom:Plasmid-Komplexes, wodurch sie eine niedrigstufige und vorübergehende bzw. transiente Expression eines Markergens erhielten (Ono et al. (1990) Neurosci. Lett. 117: 259–263).

[0007] Es gab sehr wenig Studien, welche "therapeutische" Gene im ZNS verwendeten. Die Mehrheit von diesen verwendete den ex vivo Ansatz mit einer Transduktion von Fibroblasten und Muskelzellen mit dem humanen Tyrosinhydroxylase-Gen, um L-Dopa sezernierende Zellen für die Verwendung in Modellen der Parkinson Krankheit herzustellen (z. B. Horrelou et al. (1990) Neuron. 5: 393–402; Jiao et al. (1993) Nature 362: 450–453). Von den in vivo Ansätzen wurden HSV-Vektoren verwendet, um β-Glucuronidase (Wolfe et al. (1992) Nature Genetics 1: 379–384), Glukosetransporter (Ho et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 6791–6795) und Nervenwachstumsfaktor (Federoff et al. (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1636–1640) zu exprimieren. Ein adenoviraler Vektor wurde verwendet, um eine niedrigstufige vorübergehende Expression von humanem α1-Antitrypsin zu induzieren (Bajocchi et al. (1993) 3: 229–234).

[0008] Die einzigen klinischen Studien zum Gentransfer in das Gehirn folgten einem Bericht von Culver et al. (1992) Science 256: 18550–18522, in welchem sie Ratten im Wesentlichen heilten, welche intrazerebral mit Gliom-Zelllinien implantiert waren. Sie verwendeten ein Retrovirus, welches das HSV-1-Thymidinkinase-(tk)-Gen exprimiert, und behandelten nachfolgend mit Ganciclovir. 1993 wurde ein humanes Protokoll für Glioblastoma multiforme unter Verwendung des retroviralen tk-Vektor-Ganciclovir-Protokolls zugelassen (Oldfield et al. (1993) Human Gen. Ther. 4: 39–69).

Herpesviren

[0009] Das Genom des Herpes Simplex Virus Typ-1 (HSV-1) weist ungefähr 150 kb linearer, doppelsträngiger DNA auf, welche ungefähr 70 Gene enthält. Viele virale Gene können deletiert werden, ohne dass das Virus seine Fähigkeit verliert, sich zu vermehren. Die "immediately early"(IE)-Gene werden zuerst transkribiert. Sie kodieren trans-wirkende Faktoren, welche die Expression von anderen viralen Genen regulieren. Die "early"(E)-Genprodukte nehmen an der Replikation der viralen DNA teil. Die späten Gene kodieren die strukturellen Bestandteile des Virions, sowie Proteine, welche die Transkription der IE- und E-Gene einschalten oder die Wirtszell-Proteintranslation unterbrechen.

[0010] Nach dem viralen Eintritt in den Kern eines Neurons kann die virale DNA in einen Latenzzustand eintreten und als zirkuläre episomale Elemente im Kern vorkommen. Während es sich im Latenzzustand befindet, ist seine transkriptionelle Aktivität reduziert. Wenn das Virus nicht in die Latenz eintritt oder wenn es reaktiviert wird, stellt das Virus zahlreiche infektiöse Partikel her, welche schnell zum Tod des Neurons führen. HSV-1 wird wirksam zwischen synaptisch verbundenen Neuronen transportiert und kann sich daher schnell im Nervensystem ausbreiten.

[0011] Zwei Typen von HSV-Vektoren wurden für einen Gentransfer in das Nervensystem verwendet. Rekombinante HSV-Vektoren umfassen das Entfernen eines Immediate-Early-Gens innerhalb des HSV-Genoms (zum Beispiel ICP4) und das Ersetzen mit dem Gen von Interesse. Obwohl ein Entfernen dieses Gens eine Replikation und ein Ausbreiten des Virus innerhalb von Zellen verhindert, welche das fehlende HSV-Protein nicht ersetzen bzw. komplementieren, werden alle anderen Gene innerhalb des HSV-Genoms beibehalten. Eine Replikation und Ausbreitung solcher Viren in vivo ist dadurch beschränkt, aber eine Expression von viralen Genen innerhalb infizierter Zellen setzt sich fort. Mehrere der viralen Expressionsprodukte können direkt toxisch für die Empfängerzelle sein, und eine Expression von viralen Genen innerhalb von Zellen, welche MHC-Antigene exprimieren, kann schädliche Immunreaktionen hervorrufen. Zusätzlich beherbergen fast alle Erwachsenen latente Herpes simplex Viren innerhalb der Neurone, und die Anwesenheit von rekombinanten HSV-Vektoren könnte zu Rekombinationen führen, welche ein aktiv replizierendes Wildtypvirus herstellen können. Alternativ könnte die Expression von viralen Genen von dem rekombinanten Vektor innerhalb einer Zelle, welche ein latentes Virus beherbergt, eine Reaktivierung des Virus fördern. Abschließend wurde eine Langzeitexpression des rekombinanten HSV-Vektors nicht zuverlässig gezeigt. Es ist wahrscheinlich, dass, außer für Bedingungen, in welchen eine Latenz induziert wird, die Unfähigkeit von HSV-Genomen, in die Wirts-DNA zu integrieren, zu einer Empfänglichkeit für einen Abbau der Vektor-DNA führt.

[0012] In einem Ansatz, die Schwierigkeiten zu umgehen, welche dem rekombinanten HSV-Vektor innewohnen, wurden defekte HSV-Vektoren als Gentransfer-Träger innerhalb des Nervensystems eingesetzt. Der defekte HSV-Vektor stellt ein Plasmid-basiertes System dar, wobei ein Plasmidvektor (Amplikon genannt) erzeugt

wird, welcher das Gen von Interesse und zwei cis-wirkende HSV-Erkennungssignale enthält. Diese sind der Ursprung der DNA-Replikation und das Spaltungs-Verpackungssignal. Diese Sequenzen kodieren keine HSV-Genprodukte. In der Anwesenheit von HSV-Proteinen, welche durch ein Helfervirus bereitgestellt werden, wird das Amplikon repliziert und in eine HSV-Hülle verpackt. Dieser Vektor exprimiert daher keine viralen Genprodukte innerhalb der Empfängerzelle, und eine Rekombination mit den oder eine Reaktivierung der latenten Viren durch den Vektor ist aufgrund der geringen Menge der HSV-DNA-Sequenz, welche im defekten HSV-Vektorgenom anwesend ist, beschränkt. Die Haupteinschränkung dieses Systems ist jedoch die Unfähigkeit, verbleibendes Helfervirus aus dem defekten Vektorstamm zu entfernen. Das Helfervirus ist häufig ein mutiertes HSV, welches, wie die rekombinanten Vektoren, nur unter permissiven Bedingungen in einer Gewebekultur replizieren kann. Die fortgesetzte Anwesenheit von mutiertem Helfer-HSV innerhalb des defekten Vektor-Stamms bringt jedoch Probleme mit sich, welche ähnlich zu jenen sind, die oben bezüglich des rekombinanten HSV-Vektors ausgeführt wurden. Dies würde daher dazu dienen, die Brauchbarkeit des defekten HSV-Vektors für humane Anwendungen zu beschränken.

[0013] Für weitere Informationen über HSV-vermittelte Genzufuhr an Neurone, siehe Breakefield und DeLuca, "Herpes Simplex Virus for Gene Delivery to Neurons", (1991) New Biologist 3: 203–18; Ho und Mocarski (1988) "Beta-Galactosidase as a marker in the herpes simplex virus-infected mouse", Virology 167: 279–93; Palella, et al. (1988) "Herpes Simplex Virus-Mediated human hypoxanthine-guanine phosphoribosyl-transferase gene transfer into neuronal cells", Molec. & Cell. Biol. 8: 457–60; Pallela et al. (1988) "Expression of human HPRT mRNA in brains of mice infected with a recombinant herpes simplex virus-1 vector", Gene 80: 137–144; Andersen et al. (1992) "Gene transfer into mammalian central nervous system using the neuron-specific enolase promoter", Human Gene Therapy 3: 487–99; Kaplitt et al. (1993) "Molecular alterations in nerve cells: Direct manipulation and physiological mediation", Curr. Topics Neuroendocrinol. 11: 169–191; Spaele und Frenkel (1982) "The Herpes Simplex Virus Amplicon: A New Eukaryotic Defective-Virus-Cloning-Amplifying Vector", Cell 30: 295–304 (1982); Kaplitt et al. (1991) "Expression of a Functional Foreign Gene in Adult Mammalian Brain Following In Vivo Transfers via a Herpes-Simplex Virus. Type 1 Defective Viral Vector", Molec. & Cell. Neurosci. 2: 320–30; Federoff et al. (1992) "Expression of Nerve Growth Factor In Vivo from a Defective Herpex Simplex Virus 1 Vector Prevents Effects of Axotomy an Sympathetic Ganglia", Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 1636–40.

[0014] Obwohl HSV-Vektoren mit reduzierter Toxizität und Replikationsfähigkeit vorgeschlagen wurden, können sie dennoch zu einer gefährlicheren Form mutieren oder ein latentes Virus aktivieren, und da das HSV nicht integriert, würde ein Erreichen einer Langzeitexpression schwierig werden.

Adenoviren

[0015] Das Adenovirus-Genom besteht aus ungefähr 36 kb doppelsträngiger DNA. Adenoviren zielen auf epitheliale Atemwegszellen ab, sind aber in der Lage, Nervenzellen zu infizieren.

[0016] Rekombinante Adenovirus-Vektoren wurden als Gentransfer-Träger für sich nicht teilende Zellen verwendet. Diese Vektoren sind den rekombinanten HSV-Vektoren ähnlich, da das Adenovirus-E1a-Immediate-Early-Gen entfernt wird, aber die meisten viralen Gene zurückbehalten werden. Da das E1a-Gen klein ist (ungefähr 1,5 kb) und das Adenovirus-Genom 1/3 der Größe des HSV-Genoms aufweist, werden andere nicht essentielle Adenovirus-Gene entfernt, um ein fremdes Gen in das Adenovirus-Genom zu inserieren.

[0017] In der Natur sind Erkrankungen, welche sich aus Adenovirus-Infektionen ergeben, nicht so schwer wie jene, welche durch eine HSV-Infektion ausgelöst werden, und dies stellt den Hauptvorteil von rekombinanten Adenovirus-Vektoren gegenüber HSV-Vektoren dar. Das Zurückbehalten und die Expression von vielen Adenovirus-Genen bringt jedoch Probleme mit sich, die jenen ähnlich sind, welche für den HSV-Vektor beschrieben wurden, insbesondere das Problem der Zytotoxizität für die Empfängerzelle. Zusätzlich lösen rekombinante Adenovirus-Vektoren häufig Immunantworten aus, welche sowohl dazu dienen können, die Wirksamkeit des Vektor-vermittelten Gentransfers zu beschränken, als auch andere Mittel für den Abbau von transduzierten Zellen bereitstellen können. Schließlich ist, wie bei den HSV-Vektoren, die Stabilität der Langzeitexpression derzeit unklar, da es keinen Mechanismus für eine spezifische virale Integration in das Genom von sich nicht teilenden Wirtszellen mit hoher Frequenz gibt. Während es theoretisch möglich ist, würden defekte Adenovirus-Vektoren schwer herzustellen sein, da mindestens 20% des Ad-Genoms zum Verpacken benötigt werden (ungefähr 27 kb), und es schwierig ist, mit Vektoren dieser Größe zu arbeiten. Im Gegensatz dazu stellen die defekten HSV-Vektoren kleine Plasmide dar, welche replizieren, bis die richtige Aggregatgröße für eine einwandfreie Verpackung erreicht ist.

[0018] Für weitere Informationen über Vektoren, siehe Akli et al. (1993) "Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors", Nature Genetics 3: 224–228; La Salle, et al., "An adenovirus vector for gene tansfer into neurons and glia in the brain", Science 259: 988–90 (1993), Leitartikel, "Adventures with adenovirus", 3: 1–2 (1993); Neve, "Adenovirus vectors enter the brain", TIBS 16: 251–253 (1993).

[0019] Adeno-assoziiertes Virus stellt ein defektes Parvovirus dar, dessen Genom als ein einzelsträngiges DNA-Molekül in ein Kapsid eingeschlossen ist. Stränge mit Plus- und Minus-Polarität werden beide verpackt, aber in getrennten Viruspartikeln. Obwohl AAV unter besonderen Umständen in der Abwesenheit eines Helfervirus replizieren kann, erfordert eine effiziente Replikation eine Koinfektion mit einem Helfervirus der Herpesvirus- oder Adenovirusfamilie. In der Abwesenheit des Helfervirus verursacht das AAV eine latente Infektion, in welcher das virale Genom als ein integriertes Provirus in der Wirtszelle vorkommt. (Es wird keine AAV-Genexpression benötigt, um eine latente Infektion zu verursachen). Die Integration des Virus ist stellenspezifisch (Chromosom 19). Wenn eine latent infizierte Zelllinie später mit einem geeigneten Helfervirus superinfiziert wird, wird das AAV-Provirus ausgeschnitten, und das Virus tritt in die "produktive" Phase seines Lebenszyklus ein. Es wurde jedoch berichtet, dass bestimmte, von AAV-abgeleitete transduzierende Vektoren nicht durch eine Adenovirussuperinfektion gerettet werden.

[0020] Obwohl AAV ein humanes Virus ist, ist sein Wirtsbereich für lytisches Wachstum ungewöhnlich breit. Zelllinien von nahezu jeder Säugetierart, die getestet wurde (einschließlich einer Vielzahl von Menschen-, Affen-, Hunde-, Rinder- und Nagetier-Zelllinien), können produktiv mit AAV infiziert werden, vorausgesetzt, dass ein geeignetes Helfervirus verwendet wird (z. B. Hunde-Adenovirus in Hundezellen).

[0021] Abgesehen davon wurde keine Erkrankung mit AAV assoziiert, weder in menschlichen noch in anderen Tierpopulationen, anders als sowohl bei HSV, als auch bei Adenovirus.

[0022] AAV wurde als ein nicht-pathogenes koinfizierendes Mittel aus fäkalen bzw. Agens, Okularen und respiratorischen Proben während akuter Adenovirus-Infektionen isoliert, aber nicht während anderer Erkrankungen.

[0023] Ähnlich wurden latente AAV-Infektionen sowohl in humanen, als auch in nicht humanen Zellen identifiziert. Insgesamt scheint die Virusintegration keine sichtbare Wirkung auf das Zellwachstum oder die Morphologie zu haben. Siehe Samulski (1993) Curr. Op. Gen. Devel. 3: 74–80.

[0024] Das Genom von AAV-2 ist 4.675 Basen lang und wird von invertierten terminalen Wiederholungssequenzen von jeweils 145 Basen flankiert. Von diesen Wiederholungen wird angenommen, dass sie als Ursprungspunkte für die DNA-Replikation wirken.

[0025] Es gibt zwei bedeutende offene Leserahmen. Der linke Rahmen kodiert mindestens vier nicht strukturelle Proteine (die Rep-Gruppe). Es gibt zwei Promotoren P5 und P19, welche die Expression dieser Proteine kontrollieren. Als ein Ergebnis des differenziellen Spleißens steuert der P5-Promotor die Herstellung der Proteine Rep 78 und Rep 68 und der P19-Promotor, Rep 52 und Rep 40. Von den Rep-Proteinen wird angenommen, dass sie an der viralen DNA-Replikation, der trans-Aktivierung der Transkription von den viralen Promotoren und der Repression von heterologen Enhancern und Promotoren beteiligt sind.

[0026] Der rechte ORF, der durch den P40-Promotor kontrolliert wird, kodiert die Kapsidproteine Vp1 (91 kDa), Vp2 (72 kDa) und Vp3 (60 kDa). Vp3 umfasst 80% der Virionstruktur, während Vp1 und Vp2 unbedeutendere Bestandteile darstellen. Es gibt eine Polyadenylierungsstelle an der Karteneinheit 95. Für die vollständige Sequenz des AAV2-Genoms siehe Vastava et al. (1983) J. Virol. 45: 555-64.

[0027] McLaughlin et al. ((1988) J. Virol. 62: 1963–73) stellten zwei AAV-Vektoren her: dl 52–91, welcher die AAV-rep-Gene zurückbehält, und dl 3–94, in welchen die gesamten AAV-Kodiersequenzen bzw. kodierenden Sequenzen deletiert wurden. Er behält jedoch die zwei 145 Basen langen, terminalen Wiederholungen und zusätzlich 139 Basen, welche das AAV-Polyadenylierungssignal enthalten, zurück. Restriktionsstellen wurden auf beiden Seiten des Signals eingeführt.

[0028] Ein fremdes Gen, welches eine Neomycinresistenz kodiert, wurde in beide Vektoren inseriert. Die viralen Stämme wurden durch Ergänzung mit einem rekombinanten AAV-Genom hergestellt, welches die fehlenden AAV-Genprodukte in trans beisteuerte, aber selber zu groß war, um verpackt zu werden.

[0029] Leider waren die Virusstämme mit Wildtyp-AAV kontaminiert (10% im Fall von dl 3–94), vermutlich als

ein Ergebnis einer homologen Rekombination zwischen dem defekten und dem ergänzenden bzw. komplementierenden Virus.

[0030] Samulski et al. ((1989) J. Virol. 63: 3822–28) entwickelten ein Verfahren zum Herstellen von rekombinanten AAV-Stämmen ohne nachweisbarem Wildtyp-Helfer-AAV. Ihr AAV-Vektor behielt nur die terminalen 191 Basen des AAV-Chromosoms zurück. In dem Helfer-AAV wurden die terminalen 191 Basen des AAV-Chromosoms durch terminalen Adenovirus-Sequenzen ersetzt. Da eine Sequenzhomologie zwischen dem Vektor und dem Helfer-AAV so im Wesentlichen ausgeschlossen war, wurde kein nachweisbares Wildtyp-AAV durch homologe Rekombination erzeugt. Darüber hinaus wurde die Helfer-DNA selber nicht repliziert und in ein Kapsid eingeschlossen, da die AAV-Termini für diesen Vorgang benötigt werden. Daher konnte in dem AAV-System, anders als im HSV-System, das Helfervirus vollständig ausgeschlossen werden, was einen helferfreien AAV-Vektorstamm zurückließ.

[0031] Muro-Cacho et al. ((1992) J. Immunother. 11: 231–237) verwendeten AAV-basierte Vektoren für einen Gentransfer in sowohl T-, als auch B-Lymphozyten. Walsh et al. ((1992) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 89: 7257–61) verwendeten einen AAV-Vektor, um ein humanes gamma-Globulin-Gen in humane Erythroleukämie-Zellen einzuführen, das Gen wurde exprimiert. Flotte et al. ((1993) J. Biol. Chem. 268: 3781–90) führten das Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulatorgen epithelialen Atemwegszellen mit Hilfe eines AAV-Vektors zu. Siehe auch Flotte et al. (1992) Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 7: 349–56; Flotte et al. (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 90: 10613–17.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0032] Für das adeno-assoziierte Virus wurde nicht berichtet, dass es natürlicherweise irgendwelche Nervensystemzellen infiziert, und AAV-abgeleitete Vektoren wurden bisher nicht verwendet, um terminal differenzierte, sich nicht teilende Zellen zu transfizieren. Dennoch zeigt die vorliegende Erfindung, dass ein adeno-assoziiertes Virus-abgeleiteter Vektor, welcher frei von Helfervirus ist, verwendet werden kann, um exogene DNA Zellen des postnatalen zentralen und/oder peripheren Nervensystems zuzuführen, einschließlich von Neuronen und Glia, selbst wenn diese Zellen sich nicht teilen. Die Spezifität kann durch anatomisch spezifische Zufuhr oder durch gewebespezifische Expression erreicht werden.

[0033] Die exogene DNA umfasst ein Gen, welches ein Genprodukt kodiert, das für die Behandlung einer Nervensystemstörung geeignet ist. Dieses Gen ist in einigen Ausführungsformen operativ mit einem Promotor verbunden, welcher spezifisch für bestimmte Zelltypen oder Regionen innerhalb des Nervensystems ist. Da der AAV-Vektor integriert wird, kann eine stabile Langzeitexpression (z. B. für mehr als sieben Monate) erreicht werden. Daher stellt die Erfindung einen adeno-assoziiertes Virus-abgeleiteten Vektor (AAV-Vektor), welcher befähigt ist, eine nicht-pathogene latente adeno-assoziierte virale Infektion in einer Säugernervensystemzielzelle zu errichten, wobei der AAV-Vektor modifiziert wurde, um eine DNA zu umfassen, die sowohl zu dem adeno-assoziierten Virus, als auch zu der Säugernervensystemzielzelle exogen ist, und frei von Helfervirus ist, und nur die Replikations- und Packsignale von AAV zurückbehält, und welcher exprimierbare Gene umfasst, die Tyrosinhydroxylase und aromatische Aminosäure-Decarboxylase kodieren, bereit. Die Erfindung stellt weiterhin einen adeno-assoziierten Virus-abgeleiteten Vektor (AAV-Vektor), welcher befähigt ist, eine nicht-pathogene latente adeno-assoziierte virale Infektion in einer Säugernervensystemzielzelle zu errichten, wobei der AAV-Vektor modifiziert wurde, um eine DNA zu umfassen, die sowohl zu dem adeno-assoziierten Virus, als auch zu der Säugernervensystemzielzelle exogen ist, und frei von Helfervirus ist, und wobei die exogene DNA ein exprimierbares Gen umfasst, welches Thymidinkinase kodiert, bereit. Ebenfalls bereitgestellt wird ein adeno-assoziierter Virus-abgeleiteter Vektor (AAV-Vektor), welcher befähigt ist, eine nicht-pathogene latente adeno-assozierte virale Infektion in einer Säugernervensystemzielzelle zu errichten, wobei der AAV-Vektor modifiziert wurde, um eine DNA zu umfassen, die sowohl zu dem adeno-assoziierten Virus, als auch zu der Säugernervensystemzielzelle exogen ist, und frei von Helfervirus ist, und wobei die exogene DNA ein exprimierbares Gen umfasst, welches Tyrosinhydroxylase und/oder eine aromatische Aminosäure-Decarboxylase, von Glia abgeleiteten neurotrophen Faktor, von Gehirn abgeleiteten neurotrophen Faktor, Nervenwachstumsfaktor, Neurotrophin-3 und/oder Neurotrophin-4, Superoxiddismutase, Catalase und/oder Glutathionperoxidase, eine GABA-Rezeptorisoform oder das GABA-synthetisierende Enzym, Glutaminsäuredecarboxylase, oder Adenosin A-1-Rezeptor, Glutamatdecarboxylase, GABA-A-Rezeptorisoformen, calciumabhängige Kaliumkanäle und/oder ATP-sensitive Kaliumkanäle, kodiert.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0034] Fig. 1 stellt eine Karte des AAV-Vektors pAAVlac dar.

[0035] Fig. 2 stellt ein schematisches Diagramm dar, welches die Beziehung des Helferplasmids, des AAV-Vektors, des Adenovirushelfers, usw. darstellt.

[0036] Fig. 3 zeigt die Wirkung von intrastriatalem AAVth oder AAVlac auf Apomorphin-induziertes Rotationsverhalten im Nagetiermodell für Parkinson Krankheit.

[0037] **Fig.** 4 zeigt den immunhistochemischen Nachweis der hTH-Expression innerhalb des Nucleus caudatus von 6-OHDA-läsionierten Ratten nach einer Injektion mit AAVth. A, Abwesenheit einer Immunfärbung im Caudatus nach einer Injektion mit AAVlac. Es wurde nie eine Färbung in AAVlac-Tieren beobachtet, und eine Färbung trat niemals in nicht injiziertem Caudatus von AAVth-Tieren auf. B, C, TH-Expression in Zellen des Nucleus caudatus, 4 Monate nach einer Injektion mit AAVth. Diese Schnitte waren 30 µm dick, was eine morphologische Identifikation von positiven Zellen verhinderte. Ungefähr 30 Zellen sind an der Injektionsstelle sichtbar (B), und es sind ebenfalls Zellen 2 mm entfernt von der Injektionsstelle sichtbar (C), obwohl weniger Zellen bei 2 mm vorkommen. Diese Beobachtung wurde zweimal 4 Monate nach der Injektion wiederholt, während vergleichbare Ergebnisse bei drei Tieren zwei Monate nach und bei zwei Tieren ein Monat nach der Injektion erhalten wurden. D, TH-Expression im Caudatus 1 Woche nach der AAVth-Injektion. Dieser Schnitt war 7 µm dick, was die neuronale Erscheinung der Mehrheit der positiven Zellen erkennen lässt. 50 positive Zellen können in diesem Schnitt erkannt werden, was repräsentativ für ungefähr 50 aufeinanderfolgende positive Schnitte ist, welche von jedem Kurzzeit-Tier erhalten wurden. Weniger Zellen wurden bis zu 280 Schnitte (2 mm) entfernt von der Injektionsstelle beobachtet. Dieses Ergebnis wurde zweimal 1 Woche nach der Injektion wiederholt, und vergleichbare Ergebnisse wurden von 9 Tieren 48 Stunden und von 9 Tieren 24 Stunden nach der Injektion erhalten. E, F, doppelt markierte Immunzytochemie, welche die neuronale TH-Expression zeigt. E, TH-Expression in einer Caudatus-Zelle (Pfeil) wurde unter Verwendung eines FITC-markierten sekundären Antikörpers sichtbar gemacht. F, Eine neuronale Identifikation der TH-exprimierenden Zelle (Pfeil) wurde durch aufeinanderfolgendes Färben desselben Schnittes mit einem Anti-Neurofilament-Antikörper und Visualisierung mit einem Texas Rot-konjugierten sekundären Antikörper erhalten. Vergrößerung: A–D, 400× E, F, 630×.

[0038] Fig. 5 zeigt das Plasmid AAV-FlagTH-AADC. Dieses bicistronische Konstrukt enthält das bicistronische Konstrukt mit offenen Leserahmen für verkürzte Tyrosinhydroxylase, welche das N-terminale Flag-Epitop (Flag-TH) enthält, und die aromatische Aminosäure-Decarboxylase (AADC). TH wandelt Tyrosin in L-Dopa um, und anschließend wandelt AADC L-Dopa in Dopamin um. Zwischen den zwei offenen Leserahmen liegt eine Sequenz, welche den Ribosomen-Wiedereintritt und eine Initiation der Translation eines zweiten offenen Leserahmens, welcher strangabwärts von einem translationalen Stoppcodon liegt, erlaubt. Dies ist die interne Ribosomeneintrittsstelle (IRES für engl.: internal ribosome entry site). Diese werden als eine einzelne Messenger-RNA von dem humanen Cytomegalovirus-Immediate-Early-Genpromotor (CMV-Promotor) transkribiert. Am 3'-Ende des Inserts liegt ein Signal für eine Polyadenylierung der mRNA, welches aus dem SV40-Virus (SV40 polyA) abgeleitet wurde. Das gesamte Insert wird von terminalen Wiederholungen aus dem adeno-assoziierten Virus (AAV term.) flankiert, was eine Replikation, ein Ausschneiden und ein Verpacken des Inserts in der Anwesenheit von Proteinen erlaubt, die durch das Helferplasmid pAAV/Ad und das Helfer-Adenovirus bereitgestellt werden. Das Plasmid enthält ebenfalls Standard-Plasmidsequenzen, welche die Replikation und Amplifikation der DNA innerhalb eines Bakteriums (ori) und eine Selektion von bakteriellen Kolonien, welche das Plasmid tragen, durch eine Resistenz gegenüber Ampicillin (amp) erlauben. Eine von mehreren einzigartigen Eigenschaften des AAV-Vektors ist, dass, anders als bei anderen defekten viralen Vektoren, diese Plasmidsequenzen verloren gehen, wenn die DNA zwischen den AAV-Termini verpackt wird.

[0039] Fig. 6 zeigt die Dopamin-Freisetzung in das Kulturmedium nach einer Plasmidtransfektion in 293T-Zellen. Die erste Gruppe aus 4 Proben stellt 30 Minuten nach dem Hinzufügen von Tyrosin und Tetrahydrobiopterin dar, während die zweiten 4 Proben nach 60 Minuten entnommen wurden. Die Dopamin-Freisetzung war bei 30 Minuten signifikant und bei 60 Minuten sogar höher in Zellen, welche mit pAAV-FlagTH-AADC transfiziert waren, und welchen Tyrosin und Tetrahydrobiopterin (TH/DC+) gegeben wurde. Zellen, welche mit diesem Plasmid transfiziert wurden, denen aber kein Substrat und Kofaktor (TH/DC–) gegeben wurde, synthetisierten vernachlässigbare Mengen Dopamin zu beiden Zeitpunkten. Mit pAAVlac transfizierte Kontrollen, welche das bakterielle lacZ-Gen exprimierten, oder mit Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS) mock-transfizierte, stellten keine nachweisbare Menge Dopamin her.

DETAILLIERTE BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

Der Vektor

[0040] Der erfindungsgemäße Vektor ist ein Derivat des adeno-assoziierten Virus, in welches exogene DNA

eingeführt wurde, wie in den Ansprüchen 1, 8 und 9 definiert ist.

[0041] Während das Wildtyp adeno-assoziierte Virus bereits defekt ist, indem es die Anwesenheit eines Helfervirus für eine lytische Infektion benötigt, gibt es die Möglichkeit, dass das Individuum, welchem der Vektor zugeführt wird, eine Herpesvirus- oder Adenovirusinfektion trägt, welche den Vektor ergänzen kann. Um dieser Möglichkeit vorzubeugen, wird der Vektor modifiziert, um die Möglichkeit einer Rettung (engl.: rescue) zu reduzieren. Theoretisch können solche Modifikationen die Form von Punktmutationen in einem oder mehreren viralen Gen/en annehmen, wobei die Mutationen entweder eine Expression des Gens insgesamt verhindern oder zu der Expression eines modifizierten Genprodukts führen, welches nicht funktionell ist. Punktmutationen sind jedoch reversibel. Folglich wird in der vorliegenden Erfindung jedes unerwünschte Gen einfach deletiert, was den zusätzlichen Vorteil des Erzeugens von mehr Raum innerhalb der viralen Verpackung für fremde DNA aufweist.

[0042] Es ist bevorzugt, dass alle viralen Gene deletiert oder anderweitig inaktiviert werden, wie in dem bekannten AAV-Vektor dl3–94. Es sollte jedoch verstanden werden, dass ein Vektor, welcher ein oder mehrere AAV-Gen/e zurückbehält, wie der bekannte AAV-Vektor dl52–91, noch für eine Genzufuhr geeignet sein kann, obwohl er schlechter als die bevorzugten Vektoren ist.

[0043] Zur Vermehrung des Vektors in vitro werden empfängliche Zellen mit dem AAV-abgeleiteten Vektor und einem geeigneten AAV-abgeleiteten Helfervirus oder Plasmid kotransfiziert. Daher behält der Vektor vom AAV im Wesentlichen nur die Erkennungssignale zur Replikation und Verpackung zurück.

[0044] Es ist nicht notwendig, dass die AAV-abgeleiteten Sequenzen genau ihren Wildtyp-Prototypen entsprechen. Zum Beispiel können die erfindungsgemäßen AAV-Vektoren mutierte invertierte terminale Wiederholungen, usw. aufweisen, vorausgesetzt, dass der Vektor noch mit Hilfe des Helfervirus repliziert und verpackt werden kann und noch eine nicht pathogene latente Infektion in den Zielzellen aufbauen kann.

[0045] Der Vektor kann weiterhin eine oder mehrere Restriktionsstelle/n umfassen, in welche fremde DNA kloniert werden kann, ohne mit dem Verpacken und der Replikation zu interferieren. Vorzugsweise wird mindestens eine einzelne Restriktionsstelle bereitgestellt. Der Vektor kann ebenfalls ein oder mehrere Markergen/e umfassen, um die genetische Manipulation zu erleichtern. Geeignete Markergene schließen die Neomycin- und Hygromycin-Resistenzgene, das bakterielle lacZ- und das Leuchtkäfer-Luciferasegen, ein, sind aber nicht darauf beschränkt.

Das AAV-abgeleitere Helfervirus oder Plasmid

[0046] Das AAV-abgeleitete Helfervirus oder Plasmid kann irgendein Virus oder Plasmid darstellen, welches in der Lage ist, bei einer Expression der enthaltenen AAV-Gene, die Proteine, die für die Replikation und Verpackung des Vektors in vitro in einer geeigneten Wirtszelle nötig sind, für den Zweck des Herstellens eines Vektorstamms bereitzustellen.

[0047] Das Helfer-Adenovirus kann durch eine Hitzeinaktivierung bei 56°C für 30 Minuten entfernt werden oder von den verpackten AAV-Vektoren durch Zentrifugieren in einem Cäsiumchlorid-Gradienten getrennt werden.

Exogene DNA

[0048] Grundlegende Verfahren zum Konstruieren erfindungsgemäßer rekombinanter DNA- und RNA-Moleküle werden von Sambrook, J. et al., In: Molecular Cloning: A Laboratory Manual, zweite Auflage, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) offenbart.

[0049] Die erfindungsgemäße "exogene DNA" sollte exogen zu sowohl dem AAV, als auch zu der Zielzelle sein. Die DNA kann synthetische DNA, komplementäre DNA, genomische DNA oder eine Kombination davon sein. Die DNA kann irgendeine Sequenz oder Länge aufweisen, vorausgesetzt, dass sie in den Vektor eingeschlossen und Zielzellen zugeführt werden kann. Aufgrund der Verpackungsbeschränkungen des AAV wird die exogene DNA typischerweise eine Länge von ungefähr 10–5.000 Basen aufweisen. Vorzugsweise ist die DNA 100 bis 4.000 Basen lang.

[0050] Die vorliegende Erfindung kann für eine Gentherapie irgendeiner genetisch basierten oder erworbenen Nervensystemstörung verwendet werden. Ein Individuum kann eine Gentherapie benötigen, weil, als ein

Ergebnis von einer oder mehreren Mutation/en in der regulatorischen Region und/oder der kodierenden Sequenz von einem oder mehreren Genen ein besonderes Genprodukt ungeeignet exprimiert wird, z. B., eine fehlerhafte Aminosäuresequenz aufweist, oder in den falschen Geweben oder zu den falschen Zeiten exprimiert wird, unterexprimiert oder überexprimiert wird. Daher kann die DNA, die diesem Individuum zugeführt wird, als exogen angesehen werden, selbst wenn sie identisch zu einem Gen ist, welches für die Art dieses Individuums nativ ist, vorausgesetzt, dass es sich in der regulatorischen oder kodierenden Region von dem verwandten Gen des Individuums unterscheidet, welchem es zugeführt wird, und daher ein unterschiedliches Genprodukt kodiert oder in einem unterschiedlichen Grad und/oder in unterschiedlichen Zellen unter mindestens einigen Bedingungen exprimiert wird.

Parkinson Krankheit

[0051] Derzeitige Ansätze für Parkinson Krankheit (PD für engl.: Parkinson's Disease) basieren auf der Unterstützung der dopaminergen Neurotransmission im Caudatus putamen (CP). Die Hauptsäule der Behandlung stellt orales L-Dopa dar (und ein peripherer Decarboxylase-Inhibitor), welches durch endogenes AADC in dem denervierten CP zu Dopamin umgewandelt wird. Alternative pharmakologische Ansätze schließen direkte Dopaminagonisten, einschließlich Bromcriptin und Apomorphin, sowie Inhibitoren von Dopamin metabolisierendem Enzym (z. B. Monoaminoxidase) (MAOI), z. B. Deprenyl, ein. Obwohl diese Behandlungen eine erhebliche Verbesserung der Kurzzeit-Lebensqualität von PD-Patienten gebracht haben, läuft diese Erkrankung weiter, wobei alle Patienten schließlich refraktär gegenüber der oralen Behandlung über 5 bis 10 Jahre werden.

[0052] Alternative Forschungsstrategien haben fötale und adrenale Transplantation eingeschlossen, welche, obwohl sie in Tiermodellen der PD vielversprechend waren, eine unbedeutende Wirkung im Menschen aufwiesen. Darüber hinaus bringen diese Transplantationsansätze die neuronale Umgebung durcheinander, unnormale Sprossung und Synapsenbildung findet statt, und die transplantierten Zellen können eine Immunantwort induzieren, sowie auf dieselbe zugrundeliegende Neurodegeneration gerichtet sein, welche für die PD verantwortlich ist. Eine weitere Implantationsstrategie schließt ein Polymer oder ein Einkapselungshilfsmittel ein, in welches Zellen, die entweder Dopamin herstellen (z. B. PC 12) oder gentechnisch veränderte Zellen (Fibroblasten oder neuronale Zelllinien, welche typischerweise mit Retroviren transduziert wurden, um Tyrosinhydroxylaseenzym [THE] zu exprimieren) eingeschlossen sind. Diese Implantate bringen ebenfalls den neuronalen Schaltkreis durcheinander, erzeugen eine erhebliche Verletzung im Hinblick auf die Größe des Implantats und erzeugen darüber hinaus hohe lokale Dopaminkonzentrationen bis zu potenziell toxischen Konzentrationen.

[0053] Ein besserer Ansatz ist, einen viralen Vektor zu verwenden, um Neuronen in vivo zu transduzieren. Wir haben kürzlich festgestellt, dass ein HSV-1-Vektor, welcher THE exprimiert, stereotaktisch in das denervierte Striatum eines Rattenmodells für PD implantiert werden kann und erhalten eine biochemische und Verhaltensbesserung, welche sich auf mindestens ein Jahr erstreckt (During et al., eingereicht).

[0054] Die vorliegende Erfindung weist erhebliche Vorteile gegenüber dem defekten HSV-1-Vektoransatz auf. Insbesondere beträgt die Reversionshäufigkeit des defekten HSV-1-Virus ungefähr 10^{-5}, und bei den Mengen des Virus, welche für in vivo Studien benötigt werden, tritt eine ausreichende Wildtyp-Herpesinfektion auf, um zu einer Toxizität und zum Tod von Versuchstieren zu führen. Obwohl die Expression in den ersten zwei Wochen hoch ist, ist weiterhin die Menge der Vektorgen-Expression über 2 Wochen hinaus reduziert, etwa auf 5–20% der anfänglichen Expression.

[0055] Die vorliegende Erfindung stellt ebenfalls einen Hauptvorteil gegenüber Ansätzen bereit, welche die Expression von THE beschränken. In PD (und dem denervierten Striatum in Tiermodellen der PD) ist nicht nur das Enzym THE um 80–100% vermindert, sondern das zweite Enzym im biosynthetischen Dopamin-Weg, AADC, ist ebenfalls um ungefähr 85% vermindert. Da L-Dopa per se die dopaminerge Aktivität und die Verhaltensbesserung in PD nicht wiederherstellt, kann die Herstellung von Dopamin im denervierten Striatum, wo das THE wiederhergestellt wird, durch die Aktivität von AADC begrenzt werden. Die Fähigkeit für Zellen, den vollständigen dopaminergen Phänotyp zu erlangen (durch Exprimieren von sowohl THE, als auch AADC) ist wahrscheinlich wirksamer. Zur Unterstützung dieses Anspruchs hat eine Gruppe gezeigt, dass, wenn Tiere, die mit gentechnisch veränderten Zellen, welche nur THE exprimieren, transplantiert wurden, mit Tieren verglichen wurden, welche sowohl mit THE, als auch AADC exprimierenden Transplantaten implantiert wurden, die letztere Gruppe eine bessere Genesung aufwies.

[0056] Daher werden in einer Ausführungsform die erfindungsgemäßen Vektoren verwendet, um das Gen für Tyrosinhydroxylase (Genbank HUMTHX, Zugangsnr. M17589) Gehirnzellen zuzuführen. Vorzugsweise wird

das Gen für aromatische Aminosäure-Decarboxylase (Genbank HUMDDC, Zugangsnr. M76180) durch denselben oder einen anderen Vektor ähnlich zugeführt.

[0057] Die obige Beschreibung des Transduzierens striataler Zellen in vivo zu einem dopaminergen Phänotyp stellt den ersten Schritt in einem Gentherapieansatz für PD dar. PD wird jedoch symptomatisch, wenn 80% der Dopamin-Neurone verloren sind. Die Degeneration ist fortschreitend, und mit weiterer Denervation werden die Patienten zunehmend refraktär gegenüber allen derzeitigen Therapien und weisen ein "An-Aus"-Phänomen mit zunehmendem Einfrieren und vollständiger Immobilität auf. Das Transduzieren striataler Zellen mit einem viralen Vektor, um Dopamin synthetisierende Enzyme zu exprimieren, stellt einen rein palliativen Ansatz dar, und der zugrundeliegende Krankheitsvorgang wird unvermindert weiter laufen. Zu diesem Zweck wurden Vektoren konstruiert, welche "neuroprotektive oder neurotrophe" Faktoren exprimieren, um eine weitere Degeneration von dopaminergen Neuronen zu verhindern und eine Regeneration zu fördern. Dieser Ansatz schließt den spezifischsten neurotrophen Faktor für mesencephalische dopaminerge Neurone ein, welcher bisher identifiziert wurde, den Glia-abgeleiteten neurotrophen Faktor (GDNF). Andere neurotrophe Faktoren der NGF-Familie wurden kürzlich von HSV-1-Vektoren exprimiert, und es wurde gezeigt, dass sie neuroprotektive Wirkungen aufweisen (Federoff et al.). Diese neurotrophen Faktoren scheinen über Tyrosinkinase-Rezeptoren zu wirken, um eine Apoptose oder einen programmierten Zelltod (PCD, für engt.: "programmed cell death") zu verhindern. So wie das Protoonkogen bcl-2 einen neuronalen PCD in vitro verhindern kann, wurde ein AAV-Vektor konstruiert, welcher bcl-2 exprimiert, um einen PCD in vivo zu verhindern. Dieser Vektor könnte daher für irgendeine neuronale Degeneration im Gehirn in Betracht gezogen werden, einschließlich Ischämie, Epilepsie oder Gehirntrauma, wo eine sekundäre neuronale Verletzung über einen PCD auftritt.

[0058] Daher könnte eine Gentherapie für PD eine Verarbeitung durch AAV-Vektoren des Gens für GDNF (Genbank HUMGDNF02, Zugangsnr. L19063), Gehirn-abgeleiteten neurotrophen Faktor (GDNF), Nervenwachstumsfaktor (NGF) (EMBL HSNGF2, Zugangsnr. X53655) und/oder andere Mitglieder der Neurotrophin-Faktor-Familie, einschließlich Neurotrophin(NT)-3 (Genbank HUMBDNF, Zugangsnr. M37762) und NT-4 (Genbank HUMPPNT4P, Zugangsnr. M86528) umfassen.

[0059] Kürzliche Beweise implizieren nachdrücklich oxidativen Stress in der Substantia nigra als eine primäre Determinante des fortschreitenden neuronalen Verlustes. Insbesondere scheint Eisen in der Nigra von PD-Patienten konzentriert zu sein, und Studien haben gezeigt, dass eine Eisenbindung an Neuromelanin den Nigra-Zellen freie Radikale erzeugt. Es wurde daher eine antioxidative Strategie für PD vorgeschlagen. Die Schlüsselenzyme, welche die Erzeugung freier Radikale reduzieren und/oder freie Radikale beseitigen, sind Superoxiddismutase (SOD), Catalase und Glutathionperoxidase (GPO). Obwohl Mutationen oder Veränderungen in der Expression dieser Enzyme bislang in PD nicht bestimmt wurden, wird die gesteigerte Expression dieser Enzyme in den nigrostriatalen dopaminergen Neuronen ihre Fähigkeit steigern, dem oxidativen Stress standzuhalten. Daher wurde ein AAV-Vektor hergestellt, welcher SOD exprimiert. Dieser SOD-exprimierende Vektor ist ebenfalls von Interesse für die Behandlung von amyotropher lateraler Sklerose (ALS), in welcher die familiäre Form mit Mutationen im SOD-1-Gen assoziiert ist.

[0060] Es kann daher wünschenswert sein, die AAV-Vektoren zu verwenden, um die Gene für Superoxiddismutase (SOD1 oder SOD2) (GenBank HUMCUZNDI, Zugangsnr. M12367, für SOD-1, EMBL HSSOD2G, Zugangsnr. X65965 für SOD-2), Catalase (EMBL HSCATR, Zugangsnr. X04076) und/oder Glutahionperoxidase (MBL HSGSHPX, Zugangsnr. Y00433) zuzuführen bzw. zu verabreichen.

Epilepsie

[0061] Komplex partielle Anfälle und insbesondere Temporallappen-Epilepsie (TLE) stellt eine der am häufigsten refraktären Formen der Epilepsie dar. Obwohl antiepileptische Arzneimittel (AED für engl.: antiepileptic drugs) Anfälle in einigen Patienten kontrollieren werden, werden 40% trotz einer Poly-AED-Therapie unkontrolliert bleiben. Der derzeitige Ansatz für diese Patienten liegt darin, eine schrittweise Bewertung für die Erwägung einer resektiven Operation zu durchlaufen. Typischerweise wird ein Temporallappen als die Stelle des Anfallsursprungs (die epileptogene Region) definiert, und der mediale Temporallappen, welcher den vorderen Hippocampus einschließt, wird herausgeschnitten. TLE ist keine genetische Erkrankung und es gibt keine etablierte Ätiologie, die Erkrankung ergibt sich jedoch aus einem Ungleichgewicht der Erregung zur Inhibition mit Interventionen, welche die Erregung verstärken oder die Inhibition blockieren, was Anfälle hervorruft, und umgekehrt weist der Antagonismus der Erregung und die Verstärkung der Inhibition eine antiepileptische Wirkung auf. Ein Gentherapieansatz für TLE ist, die Inhibition zu verbessern. Für diesen Zweck wurde die Adenosin-A-1-Rezeptor-(GenBank S56143, Zugang S56143)-cDNA in den AAV-Vektor inseriert. Da für Adenosin gezeigt wurde, dass es das natürliche Antikrampfmittel des Gehirns darstellt (welches über A-1-Rezeptoren

wirkt), und die Mengen des Rezeptors in der epileptogenen Region vermindert sind, ist es wahrscheinlich, dass diese Strategie eine Inhibition verstärkt und Anfälle verhindert.

[0062] Alternative Strategien, um die Inhibition zu steigern, schließen die Insertion von Genen ein, deren Expression die GABAerge Aktivität verstärken würde. Diese Gene würden $GABA_A$-Rezeptor-Isoformen und das GABA-synthetisierende Enzym GAD einschließen.

[0063] Ein verwandter Ansatz, um die Inhibition zu steigern, liegt darin, die Expression von Ionenkanälen zu steigern, welche die neuronale Erregbarkeit verändern, insbesondere die aktivitätsabhängigen Kanäle, einschließlich der Calcium-aktivierten Kaliumkanäle und der ATP-sensitiven Kaliumkanäle.

[0064] Ein komplementärer Ansatz liegt darin, ein Antisense gegen anregende Rezeptoren zu exprimieren, insbesondere Glutamatrezeptoren, einschließlich NMDARs, mGluRs und ionotrope Glutamatrezeptoren, einschließlich von sowohl AMPA, als auch Kainat. Da wir gezeigt haben, dass eine Expression von GluR6 unter Verwendung eines HSV-1-Vektors Epilepsie induziert, ist es sinnvoll vorherzusagen, dass ein Vektor, welcher Antisense gegen diese Rezeptortypen exprimiert, Anfälle inhibieren kann.

[0065] Daher können für die Behandlung von Epilepsie Gene, welche Adenosin-A-1-Rezeptor (GenBank S56143, Zugang S56143), Glutamatdecarboxylase (GenBank S61898, Zugang S61898), GABA-A-Rezeptorisoformen (EMBL HSGABAAA1, Zugang X14766), Calcium-abhängige Kaliumkanäle (GenBank DROKCHAN, Zugang M96840) und/oder ATP-sensitive Kaliumkanäle (Ho, et al. 1993 Nature 362: 31–8) kodieren, durch AAV-Vektoren zugeführt bzw. verabreicht werden.

Hirntumore

[0066] Hirntumore sind schwer zu behandelnde und gewöhnlich tödliche Erkrankungen, welche größtenteils Kinder und Erwachsene im mittleren Alter befallen. Derzeit gibt es keine bekannten Ursachen für die meisten Hirntumore, und die Behandlungsmodalitäten waren größtenteils unwirksam. Es gab zwei derzeitige Strategien unter Verwendung einer Gentherapie als mögliche Ansätze für eine Hirntumor-Therapie. Im ersten Ansatz wurde ein mutiertes HSV verwendet, welches nur in sich teilenden Zellen replizieren kann. Dies sollte zum Abbau von sich teilenden Tumorzellen führen, während sich nicht teilende Zellen im gesunden Gehirn verschont blieben. Obwohl es einige experimentelle Belege gab, welche die Tatsache unterstützten, dass diese Viren die Geschwindigkeit des Hirntumorwachstums in Versuchstieren reduzierten, waren die Ergebnisse variabel und nicht so beeindruckend, wie erhofft wurde. Es gab keine Studien am Menschen für dieses Verfahren.

[0067] Der zweite Ansatz umfasst die Insertion des Thymidinkinase-(TK)-Gens aus dem Herpes simplex Virus Typ 1 in einen replikationsdefizienten retroviralen Vektor. Der retrovirale Vektor übertrug das TK-Gen nur in sich teilende Tumorzellen, konnte aber keine Gene entweder in sich nicht teilende Tumorzellen oder in gesunde Gehirngewebe übertragen.

[0068] Es wurde in Gewebekultur und in Tiertumoren gefunden, dass Zellen, welche mit TK über den retroviralen Vektor transduziert wurden, empfänglich für die Zytotoxizität durch das Arzneimittel Ganciclovir wurden. TK phosphoryliert Ganciclovir, und die phosphorylierte Form unterbricht die DNA-Replikation und tötet dadurch sich teilende Zellen. Es wurde ebenfalls gefunden, dass in der Nähe liegende, sich teilende Zellen, welche nicht mit TK transduziert wurden, ebenfalls getötet werden konnten. Dies wurde Zuschauereffekt (engl.: "bystander effect") genannt, da angenommen wird, dass einiges des phosphorylierten Arzneimittels die transduzierte Zelle verlassen kann und in nahe gelegene, nicht transduzierte Zellen über Gap Junctions eintreten kann. Sich nicht teilende Zellen sind selbst bei aktiviertem Arzneimittel nicht betroffen. Dieser Ansatz für eine Tumortherapie befindet sich derzeit in klinischen Studien beim NIH.

[0069] Da die Ergebnisse mit dieser Therapie in Tierstudien ebenfalls variabel waren, zeigten aktuellere Experimente, dass die Verwendung eines replikationskompetenten retroviralen Vektors die Antwort in Tieren verbessern kann. Dieser Ansatz würde jedoch für humane Erkrankungen aufgrund der sehr großen Gefahr, große Mengen von Wildtyp-Retroviren direkt in menschliche Patienten zu bringen, nicht anwendbar sein. Dies wurde zuvor niemals für menschliche Patienten, aufgrund der Möglichkeit der Zytotoxizität und der Induktion von de novo Tumoren, welche einer zufälligen Integration von Wildtyp-Retroviren in das Genom der Empfängerzelle folgen, erlaubt.

[0070] Diese Ausführungsform der vorliegenden Erfindung stellt eine erhebliche Verbesserung gegenüber diesen vorherigen Studien dar. Eine Insertion des TK-Gens (EMBL HEHSV1TK, Zugang X03764, EMBL

HEHS07, Zugang V00466) in den AAV-Vektor sollte eine Transduktion von Genen in sich teilende Tumorzellen mit Wirksamkeiten erlauben, welche mindestens gleich zu den retroviralen Vektoren sind, und möglicherweise mit größerer Wirksamkeit (was in Vergleichen von AAV- mit defekten HSV-Vektoren im Rattenhirn beobachtet wurde). Anders als Retroviren werden AAV-Vektoren jedoch ebenfalls das TK-Gen in sich langsam teilende oder nicht teilende Zellen innerhalb des Tumors, sowie in sich nicht teilende normale Zellen übertragen. Dies könnte zwei erhebliche Vorteile verglichen mit retroviralen Vektoren aufweisen.

[0071] Erstens sollte die Fähigkeit, Arzneimittel innerhalb von sich nicht teilenden Tumorzellen und normalen Zellen zu phosphorylieren, einen größeren Vorrat an aktiviertem Arzneimittel innerhalb des Tumors erzeugen. Angesichts der Beobachtung des Zuschauereffekts sollten sich nicht teilende Tumorzellen, welche das HSV-TK-Gen enthalten, das Arzneimittel phosphorylieren, und dies könnte anschließend in eine nahe gelegene, sich teilende Zelle eintreten, welche vielleicht nicht mit dem viralen Gen transduziert wurde. So könnte eine sich nicht teilende Zelle die Zerstörung einer nahe gelegenen, nicht transduzierten Zelle erlauben, selbst wenn die transduzierte, sich nicht teilende Zelle nicht nachteilig beeinflusst werden würde. Auf diese Weise würde eine größere Population von sich teilenden Zellen zerstört werden.

[0072] Der zweite Vorteil ist die Fähigkeit der AAV-Vektoren, in sich nicht teilende Zellen zu integrieren. Wenn ein Retrovirus in eine sich nicht teilende Zelle eintritt, findet keine reverse Transkription statt, und der Vektor ist verloren. Wenn der AAV-Vektor in eine sich nicht teilende Tumorzelle eintritt, sollte der Vektor jedoch in das Wirtsgenom integrieren. Wenn diese Tumorzelle anschließend wieder in die Zellteilung eintritt, sollte daher das TK-Gen in dieser Zelle und allen Abkömmlingen zurückbehalten werden. Dies sollte anschließend solche zuvor schlafenden Tumorzellen empfänglich für eine Zerstörung durch Ganciclovir oder ein Analogon machen. Da retrovirale Vektoren in sich nicht teilenden Zellen verloren gehen und andere virale DNA-Vektoren nicht verlässlich innerhalb des Wirtsgenoms integrieren, stellt die Fähigkeit, das TK-Gen zurückzubehalten, wenn eine schlafende Zelle die Teilung beginnt, eine Eigenschaft dar, welche einzigartig für den AAV-Vektor ist. Abschließend sollte wiederholt werden, dass die Integration des AAV-Vektors nicht zur Unterbrechung oder abweichenden Regulation von Wirtsgenen führen sollte, und dass eine Transduktion von normalen, sich nicht teilenden Zellen mit TK nicht irgendwelche nachteiligen Wirkungen aufweisen sollte, da es die nachfolgende Aktivierung des Arzneimittels durch TK ist, welche die DNA-Replikation blockiert, und nur dies zur Zerstörung von sich teilenden Zellen führt. Daher stellt diese Ausführungsform der Erfindung wesentliche Verbesserungen gegenüber bisherigen Tumorbehandlungsstrategien der Arzneimittel-Empfindlichkeit bereit.

Zielzellen

[0073] Die Zielzellen der erfindungsgemäßen Vektoren sind Zellen des zentralen oder peripheren Nervensystems eines Säugetiers. In einer Ausführungsform stellen die Zellen Zellen dar, welche in vitro kultiviert werden.

[0074] In einer anderen Ausführungsform stellen die Zellen einen Teil eines lebenden Säugers zu dem Zeitpunkt dar, an dem der Vektor der Zelle zugeführt wird. Das Säugetier kann sich in irgendeinem Stadium der Entwicklung zum Zeitpunkt der Zufuhr befinden, z. B. embryonal, fötal, infantil, juvenil oder adult.

[0075] Der Vektor kann Zellen des zentralen Nervensystems, Zellen des peripheren Nervensystems oder beiden zugeführt werden. Wenn der Vektor den Zellen des zentralen Nervensystems zugeführt wird, kann er Zellen des Rückenmarks, des Hirnstamms (Medulla, Pons und Mittelhirn), des Cerebellums, des Diencephalons (Thalamus, Hpyothalamus), des Telencephalons (Corpus striatum, Großhirnrinde oder innerhalb des Kortex die Occipital-, Temporal-, Parietal- oder Frontallappen) oder Kombinationen davon zugeführt werden. Ähnlich kann er innerhalb des peripheren Nervensystems Zellen der sensorischen und/oder der Effektorbahnen zugeführt werden.

[0076] Um den Vektor spezifisch einer bestimmten Region des zentralen Nervensystems zuzuführen, kann er durch stereotaktische Mikroinjektion verabreicht werden, wie in Beispiel 2 beispielhaft dargestellt wird. Zum Beispiel wird Patienten am Tag der Operation die stereotaktische Rahmenbasis an der Stelle fixiert werden (in den Schädel geschraubt). Das Gehirn mit der stereotaktischen Rahmenbasis (MRI-kompatibel mit Referenzmarkierungen) wird unter Verwendung einer Hochauflösungs-MRI dargestellt. Die MRI-Bilder werden anschließend auf einen Computer übertragen, auf welchem eine stereotaktische Software läuft. Eine Reihe von koronalen, sagittalen und axialen Bildern wird verwendet werden, um das Ziel (die Stelle der AAV-Vektorinjektion) und die Trajektorie zu bestimmen. Die Software übersetzt die Trajektorie direkt in 3-dimensionale Koordinaten, welche für den stereotaktischen Rahmen geeignet sind. Bohrlöcher werden über der Eintrittsstelle gebohrt, und der stereotaktische Apparat wird mit der Nadel, welche in der gegebenen Tiefe implantiert ist, ausgerichtet. Der AAV-Vektor wird anschließend an den Zielstellen injiziert. Da der AAV-Vektor eher in die Zielzellen integrie-

ren wird, als virale Partikel herzustellen, wird die nachfolgende Ausbreitung des Vektors geringfügig sein und hauptsächlich eine Funktion der passiven Diffusion von der Injektionsstelle vor der Integration darstellen. Der Grad der Diffusion kann durch Anpassen des Verhältnisses von Vektor zu Trägerflüssigkeit kontrolliert werden.

[0077] Wenn eine weiter verbreitete Verteilung des Vektors über das ZNS gewünscht ist, kann er in die Zerebrospinalflüssigkeit injiziert werden, z. B. durch Lumbalpunktion.

[0078] Um den Vektor zum peripheren Nervensystem zu leiten, kann er in das Rückenmark injiziert werden, oder wenn eine begrenztere PNS-Verteilung gefragt ist, in die peripheren Ganglien oder das Fleisch (subkutan oder intramuskulär) des Körperteils von Interesse.

[0079] In einigen Situationen wird der Vektor über einen intravaskulären Ansatz verabreicht werden. Zum Beispiel wird der Vektor intraarteriell (karotid) in Situationen verabreicht werden, in denen die Blut-Hirn-Schranke gestört ist. Solche Bedingungen schließen Hirninfarkte (Schlaganfälle), sowie einige Hirntumore ein. Darüber hinaus wird der Vektor für eine umfassendere Zufuhr während des "Öffnens" der Blut-Hirn-Schranke verabreicht werden, welche durch Infusion von hypertonischen Lösungen, einschließlich Mannitol, erreicht wird. Natürlich muss der Verwender bei einer intravenösen Zufuhr in der Lage sein, die Zufuhr des Vektors an Zellen, welche nicht jene des Nervensystems sind, zu tolerieren.

[0080] Der Vektor kann auch intrazerebroventrikulär und/oder intrathekal für spezifische Anwendungen zugeführt werden, einschließlich von Vektoren, welche Superoxiddismutase und neurotrophe Faktoren für amylotrophe laterale Sklerose und Alzheimer Erkrankung und Gene exprimieren, welche Enzyme von neurogenetischen Erkrankungen kodieren, z. B. Tay-Sachs- und Lesch-Nyan-Erkrankung.

[0081] Zusätzliche Wege der Verabreichung werden eine lokale Verabreichung des Vektors unter direkter Sichtbarmachung sein, z. B. superfizielle kortikale Verabreichung oder eine andere nicht-stereotaktische Verabreichung.

[0082] Um den Vektor auf einen besonderen Zelltyp auszurichten, z. B. ein Neuron, ist es nötig, den Vektor mit einem Zielmittel zu verbinden, welches spezifisch an einen Oberflächenrezeptor der Zelle bindet. Daher kann der Vektor an einen Liganden konjugiert werden (z. B. Enkephalin), für welchen bestimmte Nervensystemzellen Rezeptoren aufweisen. Die Konjugation kann kovalent, z. B. ein Vernetzungsmittel, wie Glutaraldehyd, oder nicht kovalent, z. B. die Bindung eines avidinierten Liganden an einen biotinylierten Vektor, sein. Eine andere Form der kovalenten Konjugation wird durch gentechnische Veränderung des Helfervirus bereitgestellt, welches verwendet wird, um den Vektorstamm herzustellen, sodass eines der kodierten Hüllproteine eine Chimäre eines nativen AAV-Hüllproteins und eines Peptids oder Proteinliganden ist, sodass der Ligand auf der Oberfläche exponiert wird.

[0083] Welche Form die Konjugation auch hat, es ist nötig, dass sie nicht wesentlich mit entweder der Integration des AAV-Vektors oder mit der Bindung des Liganden an den zellulären Rezeptor interferiert.

[0084] Die Zielzellen können humane Zellen oder Zellen von anderen Säugetieren sein, insbesondere von nicht humanen Primaten und Säugetieren der Ordnungen Rodentia (Mäuse, Ratten, Kaninchen, Hamster), Carnivora (Katzen, Hunde) und Artiodactyla (Kühe, Schweine, Schafe, Ziegen, Pferde).

Genexpression

[0085] Wenn die exogene DNA ein exprimierbares Gen umfasst, kann das Gen eines sein, welches natürlich vorkommt, ein nicht natürlich vorkommendes Gen, welches dennoch ein natürlich vorkommendes Polypeptid kodiert, oder ein Gen, welches eine erkennbare Mutante eines solchen Polypeptids kodiert. Sie kann ebenfalls eine mRNA kodieren, welche "antisense" zu einer gefundenen DNA oder einer mRNA sein wird, welche normalerweise in der Wirtszelle transkribiert wird, aber deren Antisense-RNA nicht selber in ein funktionelles Protein translatierbar ist.

[0086] Die genaue Natur der regulatorischen Regionen, welche für eine Genexpression benötigt werden, kann von Organismus zu Organismus variieren, aber schließt im Allgemeinen einen Promotor ein, welcher die Initiation der RNA-Transkription steuert. Solche Regionen können jene 5'-gelegenen, nicht kodierenden Sequenzen einschließen, welche an der Initiation der Transkription beteiligt sind, wie die TATA-Box. Der Promotor kann konstitutiv oder regulierbar sein. Konstitutive Promotoren sind jene, welche ein operativ verbundenes Gen dazu bringen, im Wesentlichen zu jeder Zeit exprimiert zu werden. Regulatorische Promotoren sind jene,

welche aktiviert oder deaktiviert werden können. Regulierbare Promotoren schließen induzierbare Promotoren ein, welche gewöhnlich "aus" sind, aber welche induziert werden können, um "ein" zu schalten und "reprimierbare" Promotoren, welche gewöhnlich "an" sind, aber abgeschaltet werden können. Viele verschiedene Regulatoren sind bekannt, einschließlich von Temperatur, Hormonen, Schwermetallen, dem Produkt des nativ nachfolgenden Gens und regulatorische Proteine. Diese Unterscheidungen sind nicht absolut, ein konstitutiver Promotor kann bis zu einem gewissen Grad regulierbar sein.

[0087] Die Regulierbarkeit eines Promotors kann mit einem bestimmten genetischen Element verbunden sein, welches häufig "Operator" genannt wird, an welches ein Induktor oder Repressor bindet. Der Operator kann modifiziert werden, um seine Regulierung zu verändern. Es können Hybridpromotoren konstruiert werden, in welchen der Operator von einem Promotor in einen anderen übertragen wird.

[0088] Der Promotor kann ein "universeller" Promotor sein, welcher in im Wesentlichen allen Zellen des Wirtsorganismus aktiv ist, z. B. die beta-Aktin- oder Optomegalovirus-Promotoren, oder es kann ein Promotor sein, dessen Expression mehr oder weniger spezifisch für die Zielzellen ist. Vorzugsweise sind die gewebsspezifischen Promotoren im Wesentlichen nicht außerhalb des Nervensystems aktiv, und die Aktivität des Promotors kann gegebenenfalls in einigen Abschnitten des Nervensystems höher sein als in anderen.

[0089] Daher kann der Promotor einer sein, welcher primär im zentralen Nervensystem oder primär im peripheren Nervensystem aktiv ist, oder er kann in beiden erheblich aktiv sein. Wenn er im ZNS aktiv ist, kann er spezifisch für das Rückenmark, den Hirnstamm (Medulla, Pons, Mittelhirn oder Kombinationen davon), das Cerebellum, das Diencephalon (Thalamus und/oder Hypothalamus), das Telencephalon (den Corpus striatum und/oder die Großhirnrinde und wenn das letztere, für die Occipital-, Temporal-, Parietal- und/oder Frontallappen) oder Kombinationen davon sein. Die Spezifität kann absolut oder relativ sein.

[0090] Ähnlich kann der Promotor spezifisch für bestimmte Zelltypen sein, wie Neurone oder Gliazellen im Fall des ZNS oder für bestimmte Rezeptoren c der Effektoren im Fall des PNS. Wenn er in Gliazellen aktiv ist, kann er spezifisch für Astrozyten, Oligodendrozyten, ependymale Zellen, Schwann'sche Zellen oder Mikroglia sein. Wenn er in Neuronen aktiv ist, kann er spezifisch für bestimmte Typen der Neurone sein, z. B. Motoneurone, sensorische Neurone oder Interneurone.

[0091] Um einen gewebsspezifischen Promotor zu finden, wird im Allgemeinen ein Protein identifiziert, welches nur (oder hauptsächlich) in diesem Gewebe exprimiert wird, und anschließend wird das Gen, welches dieses Protein kodiert, isoliert. (Das Gen kann ein normales zelluläres Gen oder ein virales Gen eines Virus sein, welches die Zelle infiziert). Es ist wahrscheinlich, dass der Promotor des Gens die gewünschte gewebsspezifische Aktivität behält, wenn er mit einem anderen Gen verbunden wird. Die Gewebespezifität eines Promotors kann mit einem bestimmten genetischen Element verbunden sein, welches modifiziert oder in einen zweiten Promotor transferiert werden kann.

[0092] Die Kontrolle der Expression in spezifischen Zelltypen wird durch das Verwenden von Kontrollelementen der Genexpression erreicht. Spezifisch können diese Ansätze verwendet werden:

(1) Expression in allen Zelltypen:

[0093] Sowohl starke virale (z. B. der Immediate-Early-CMV, verfügbar auf Plasmid pCDNA1 von Invitrogen, Inc., San Diego, CA), als auch relativ unspezifische zelluläre Promotoren (z. B. β-Aktin, Genbank HUMACTBET, K00790) können verwendet werden, um die Expression in allen Zelltypen zu steuern.

(2) Spezifische neuronale Expression:

[0094] Die Ansätze werden die Verwendung von neuronspezifischen Promotoren einschließen, z. B. neuronspezifische Enolase-(EMBL HSENO2, X51956), AADC-, Neurofilament-(Genbank HUMNFL, L04147), Synapsien-(Genbank HUMSYNIB, M55301) und Serotoninrezeptor- (Genbank S62283) Promotoren, sowie die Kombination von breiter aktiven Promotoren zusammen mit Silencer-Elementen, welche die Expression auf Neurone beschränken.

(3) Glia-spezifische Expression:

[0095] Die Ansätze werden die Verwendung des sauren Gliafaserprotein-(GFAP)-Promotors (Genbank HUMGFAP, J04569), des S100-Promotors (Genbank HUMS100AS, M65210) und des Giutaminsynthase (EM-

BL HSGLUS, X59834)-Promotors einschließen.

(4) Die Expression kann auf spezifische neuronale Subpopulationen unter Verwendung der folgenden genetischen Elemente beschränkt werden:

[0096] Peptiderge Promotoren: z. B. Enkephalin (Genbank HUMENKPH1, K00488), Prodynorphin, Somatostatin (Genbank RATSOMG, J00787, Genbank HUMSOMI, J00306), monoaminerge Promotoren: Tyrosinhydroxylase (Genbank M23597), Dopamin-β-Hydroxylase (Genbank RATDBHDR, M96011), PNMT (EMBL HSPNMTB, X52730), für cholinerge Neurone: Cholinacetyltransferase-Promotor (Genbank HUMCHAT1, M89915, EMBL HSCHAT, X56585).

[0097] Damit das Gen exprimierbar sein kann, muss die kodierende Sequenz operativ mit einer Promotorsequenz verbunden sein, welche in der Zielzelle funktionsfähig ist. Eine Promotorregion würde operativ mit einer kodierenden Sequenz verbunden sein, wenn der Promotor so ausgerichtet ist, dass die kodierende Sequenz transkribiert wird, wenn der Promotor aktiviert wird. Die kodierenden Sequenzen sind operativ verbunden, wenn die Verbindung keinen Fehler beim Lesen der strangabwärts gelegenen Sequenz verursacht. Um "operativ verbunden" zu sein, ist es nicht nötig, dass zwei Sequenzen unmittelbar benachbart zueinander liegen.

[0098] Wenn es gewünscht wird, kann die nicht kodierende Region, welche 3' zu der Gensequenz liegt, welche das gewünschte RNA-Produkt kodiert, erhalten werden. Diese Region kann für ihre regulatorischen Sequenzen der transkriptionellen Termination zurückbehalten werden, wie jene, welche die Termination und Polyadenylierung bereitstellen. Durch Zurückbehalten der 3'-Region, welche natürlicherweise an die kodierende Sequenz angrenzt, können daher die transkriptionellen Terminationssignale bereitgestellt werden. Wenn die transkriptionellen Terminationssignale, welche nativ mit der kodierenden Sequenz verbunden sind, nicht zufriedenstellend in der Expressionswirtszelle funktionsfähig sind, dann kann eine andere 3'-Region, welche in der Wirtszelle funktionsfähg ist, substituiert werden.

[0099] Ein "Expressionsvektor" ist ein Vektor, welcher (aufgrund der Anwesenheit von geeigneten transkriptionellen und/oder translationellen Kontrollsequenzen) zum Exprimieren eines DNA-Moleküls, welches in den Vektor kloniert wurde, und dadurch zum Herstellen einer RNA oder eines Proteinprodukts ist, welches durch ein exprimierbares Gen kodiert wird, welches durch die DNA bereitgestellt wird, in der Lage ist. Die Expression der klonierten Sequenzen findet statt, wenn der Expressionsvektor in eine geeignete Wirtszelle eingeführt wird. Wenn ein prokaryotischer Expressionsvektor eingesetzt wird, dann würde die geeignete Wirtszelle irgendeine prokaryotische Zelle darstellen, welche zum Exprimieren der klonierten Sequenzen in der Lage ist. Ähnlich würde, wenn ein eukaryotischer Expressionsvektor eingesetzt wird, z. B. zur genetischen Manipulation vor der Genzufuhr, die geeignete Wirtszelle anschließend irgendeine eukaryotische Zelle darstellen, welche zum Exprimieren der klonierten Sequenzen in der Lage ist.

[0100] Zusätzlich zu oder anstelle von einem exprimierbaren Gen kann die Nukleinsäure Sequenzen umfassen, welche homolog zum genetischen Material der Zielzelle sind, wodurch sie sich selbst in das Genom durch homologe Rekombination inserieren kann, wobei eine kodierende oder Kontrollsequenz eines Gens ersetzt wird oder ein Gen insgesamt deletiert wird, vorausgesetzt, dass diese Sequenzen nicht wesentlich mit der Integration des AAV interferieren.

[0101] In einer anderen Ausführungsform ist das Nukleinsäuremolekül "Antisense" zu einer genomischen oder anderen DNA-Sequenz des Zielorganismus (einschließlich Viren und anderen Pathogenen) oder zu einer Messenger-RNA, welche in Zellen des Organismus transkribiert wird, welche ausreichend damit hybridisiert, um die Transkription der genomischen Ziel-DNA oder der Translation der Ziel-Messenger-RNA zu inhibieren. Die Wirksamkeit einer solchen Hybridisierung ist eine Funktion der Länge und Struktur der hybridisierenden Sequenzen. Je länger die Sequenz und je näher die Komplementarität zur Vollkommenheit ist, desto stärker ist die Interaktion. Wenn die Anzahl der Basenpaar-Fehlpaarungen ansteigt, wird die Hybridisierungswirksamkeit abnehmen. Weiterhin wird der GC-Gehalt der Verpackungssequenz-DNA oder der Antisense-RNA ebenfalls die Hybridisierungswirksamkeit aufgrund der zusätzlichen Wasserstoffbindung, welche in einem GC-Basenpaar anwesend ist, verglichen zu einem AT-(oder AU-)Basenpaar beeinflussen. Daher ist eine Zielsequenz, welche reicher im GC-Gehalt ist, als Ziel vorzuziehen.

[0102] Es ist wünschenswert, Antisense-Sequenzen zu vermeiden, welche eine Sekundärstruktur aufgrund von intramolekularer Hybridisierung ausbilden würden, da dies die Antisense-Nukleinsäure weniger aktiv oder inaktiv für ihren beabsichtigten Zweck machen würde. Der Fachmann wird einfach erkennen, ob eine Sequenz eine Tendenz zur Bildung einer Sekundärstruktur aufweist. Sekundärstrukturen können durch Auswählen einer

unterschiedlichen Zielsequenz vermieden werden.

[0103] In noch einer anderen Ausführungsform kodiert das Gen ein Ribozym, d. h. eine RNA mit einer gewünschten enzymatischen Aktivität.

Zusammenfassung der Beispiele

[0104] Derzeitige Ansätze zum Transferieren von Genen in das Nervensystem setzen entweder rekombinante virale Vektoren ein, welche virale Gene zurückbehalten, oder defekte Vektoren, welche restliche und potenziell gefährliche Helferviren enthalten. Adeno-assoziierte virale (AAV) Vektoren sind nicht-pathogene, integrierende DNA-Vektoren, in welchen alle viralen Gene entfernt sind (96% des viralen Genoms) und das Helfervirus vollständig beseitigt ist. Ein AAV-Vektor, welcher β-Galactosidase exprimiert, wurde stereotaktisch in Rattenhirnregionen injiziert, einschließlich Striatum, Hippocampus und Substantia nigra. Vektor-DNA und die Expression des transduzierten Gens wurde von 1 Tag bis 3 Monate nach der Injektion nachgewiesen. Ein zweiter Vektor, welcher humane Tyrosinhydroxylase (TH) exprimiert, wurde erzeugt. Dieser Vektor (AAVth) wurde in das denervierte Striatum von unilateral 6-Hydroxydopamin-läsionierten Ratten injiziert, und eine TH-Immunreaktivität wurde in striatalen Zellen, einschließlich von sowohl Glia, als auch Neuronen, bis zu 4 Monaten erhalten. Es gab keinen Beleg für eine Pathologie oder Toxizität in irgendeinem mit AAV-Vektoren behandelten Tier. Anfängliche Daten weisen darauf hin, dass eine TH-Transduktion in das Striatum über einen AAV-Vektor eine erhebliche Verhaltensbesserung in läsionierten Ratten, verglichen mit AAVlac-Kontrollen ergibt.

MATERIALIEN UND METHODEN

[0105] Plasmide: Das Plasmid pSub201 (Samulski et al. (1989) J. Virol. 63: 3822–28) wurde mit XbaI gespalten, um nahezu das gesamte AAV-Genom zu entfernen, was nur die terminalen Wiederholungen zurückließ. Eine CMV-Promotor-lacZ-Gen-SV40-polyA-Signalkassette wurde aus Plasmid pHCL (Kaplitt et al. (1991) Mol. Cell. Neurosci. 2: 320–30) durch Spaltung mit SpeI und XbaI isoliert, und diese wurde in XbaI-gespaltenes pSub201 inseriert, umd pAAVlac zu erzeugen. Ein zweites Plasmid (pAAV-CMV-polyA) wurde durch Spaltung von pAAVlac mit HindIII und XbaI erzeugt, um das lacZ-Gen und das polyA-Signal zu entfernen, gefolgt durch die Insertion eines HindIII-XbaI-Fragments aus pREP4 (Invitrogen), welches einen Polylinker und ein SV40-polyA-Signal enthielt. Dieses Plasmid wurde anschließend mit HindIII und BamHI gespalten, gefolgt von der Insertion einer humanen Tyrosinhydroxylase(hTH)-cDNA (O'Malley et al. (1987) Biochemistry 26: 6910–14), um pAAVth zu erzeugen.

[0106] Erzeugen von defekten viralen Vektoren: Um AAV-Vektoren zu erzeugen, wurden Plasmide (pAAVlac oder pAAVth) über das Calciumphosphatverfahren (Graham et al. (1973) Virology 52: 496–67) in 293T-Zellen transfiziert, eine Variante der 293-Zellen (Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36: 59–74) (bezogen von D. Baltimore), welche konstitutiv sowohl das Adenovirus-E1a-Protein, als auch das SV40-T-Antigen exprimieren. Die Vektorplasmide wurden zusammen mit dem Helferplasmid pAd8 kotransfiziert, welches die nötigen Replikations- und Strukturproteine bereitstellt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit dem Adenovirusstamm dl309 infiziert (Jones und Shenk (1978) Cell 13: 181–88) (bezogen von Thomas Shenk, Princeton University). Nach der vollständigen zytopathischen Wirkung wurde das Virus durch mehrfache Einfrier/Auftau-Zyklen geerntet. Die viralen Stämme wurden anschließend für 30 Minuten auf 56°C erhitzt, um restliches Adenovirus zu inaktivieren (Samulski et al. 1989). Die Vektortiter wurden durch einen histochemischen Assay für X-gal (Kaplitt et al. (1991) Mol. Cell. Neurosci. 2: 320–30) oder durch immunzytochemische Identifikation der hTH-Expression in 293T-Zellen, welche mit seriellen Verdünnungen des Vektorstamms infiziert waren, unter Verwendung eines monoklonalen Anti-hTH-Antikörpers (Boehringer Mannheim) und des ABC-Elite-Detection-Systems (Vector Labs) erhalten.

[0107] Immunozytochemie und X-Gal-Histochemie: Für eine Analyse von Gehirnschnitten von Tieren, welche mit AAVlac injiziert wurden, wurden die Gewebe durch eine interkardiale Perfusion mit 2% Paraformaldehyd/5 mM EGTA/2 mM $MgCl_2$ in 0,1 M HEPES (pH-Wert 7,3) fixiert. Das Hinzufügen von EGTA beseitigt irgendwelche Hintergrundfärbung aufgrund von endogenen zellulären Enzymen. Gewebekulturzellen wurden mit 2% Formaldehyd/0,2% Glutaraldehyd in PBS (pH-Wert 7,2) fixiert. Die X-gal-Histochemie zum Nachweis der β-Galactosidase-Expression wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

[0108] In Situ PCR: Gehirnschnitte wurden für 1 Stunde in Detergenspuffer (0,01% Natriumdesoxycholat/0,02% NP-40 in PBS) gebracht. Nach dem PBS-Waschschritt wurden die Schnitte in Alkohol dehydriert, und 200 µl PCR-Reaktionspuffer wurden zu jedem Objektträger hinzugefügt (PCR-Reaktionspuffer: 1 × PCR-Puffer/1 µM von jedem Primer/1 M $MgCl_2$/10 µl Digoxigenin-dUTP (Boehringer)). Die für das lacZ-Gen spezifi-

schen Primer sind wie folgt:
N-terminal – 5' nach 3'CCGACTGATGCCTTCTGAACAA (SEQ ID NR: 1) (als lacZ 182 bezeichnet). Der strangabwärts gerichtete Primer, wiederum 5' nach 3'GACGACAGTATCGGCCTCAGGA (SEQ ID NR: 2) (lacZ 560).

[0109] Die Objektträger wurden eingedeckt, und die Deckgläser wurden auf einer Seite mit Nagellack verankert. Die Objektträger wurden auf Aluminiumfolie auf den Block eines Thermocyclers gebracht, und die Temperatur wurde auf 82°C angehoben. Die Deckgläser wurden angehoben, 2 µl Enzymgemisch (1 × PCR-Puffer/2U/ml Taq) wurden zu jedem Objektträger hinzugefügt, und die Deckgläser wurden aufgelegt. Die Objektträger wurden mit Mineralöl bedeckt, und das folgende Profil wurde angewendet: 35 Zyklen mit 2 Minuten 55°C, 2 Minuten 72°C, 2 Minuten 94°C. Die Objektträger wurden in Xylen gelegt, um das Mineralöl zu entfernen, und die Schnitte wurden rehydriert. Das PCR-Produkt wurde in situ mit einem alkalische Phosphatase markierten Anti-Digoxigenin-Antikörper gemäß den Anweisungen des Herstellers nachgewiesen.

[0110] Tiere und Gewebepräparation: Männliche Sprague-Dawley-Ratten wurden in allen Studien verwendet. Die Tiere wurden gemäß den NIH-Richtlinien zur Tierhaltung und Verwendung behandelt. Für operative Verfahren wurden die Tiere mit einem Gemisch aus Enfluran und NO_2 anästhesiert. Eine stereotaktische Mikroinjektion wurde für alle Hirnregioninjektionen verwendet, und die Koordinaten wurden gemäß dem Atlas von Paxinos und Watson, The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, (Academic Press, Sydney, Australien: 1982) bestimmt. Das Gewebe für die Immunzytochemie wurde entfernt und schnell in Einbettungsmedium eingefroren. 5 µm Schnitte wurden mit einem Kryostat hergestellt, und die Schnitte wurden in gepuffertem Formalin fixiert. Das Gewebe für die X-gal-Histochemie wurde wie oben beschrieben hergestellt.

[0111] Unilaterale Läsionierung der Substantia Nigra: Unilaterale Läsionen der Nigra wurden unter Verwendung des Verfahrens von Perese et al. (1989) Brain Res. 494: 285–93 erzeugt, wie kürzlich beschrieben, During et al. (1992) Exp. Neurol. 115: 193–99. In Kürze, männliche Sprague-Dawley-Ratten, 290–310 Gramm, wurden mit Xylazin/Ketamin anästhesiert und in einen stereotaktischen Kopf-Rahmen gebracht. Der Schädel wurde freigelegt, und Bohrlöcher wurden über der linken Substantia nigra gebohrt, Lambda +3,5, L 2,15. Frisch hergestelltes 6-Hydroxydopamin (4 mg in 2 ml 0,1% Ascorbinsäure in PBS) wurde in eine Hamilton-Spritze geladen, welche in zwei Stellen über 2 Minuten eingesenkt wurde. Die Koordinaten der medialen Stelle betrugen lateral 1,9 und ventral 7,1 mm, wobei die Nadelschräge rostral zeigte, während die laterale Stelle 2,3 mm lateral und 6,8 mm in der dorsalen ventralen Ebene liegt, wobei die Nadelschräge lateral orientiert ist (Graham et al. (1977) J. Gen. Virol. 36: 59–74). An jeder Stelle wurden 2 ml über 5 Minuten injiziert, und die Nadel wurde für weitere 5 Minuten an der Stelle gelassen, bevor sie über weitere 5 Minuten herausgezogen wurde.

[0112] Verhaltenstest: Ratten wurden 10–16 Tage nach den 6-OHDA-Injektionen getestet. Sie wurden in ein halbkugelförmiges Rotameter gebracht, und die Gesamtanzahl der vollständigen Körperdrehungen wurde von 15–20 Minuten nach der Verabreichung von Apomorphin (1 mg/kg) aufgenommen, wie von Heft et al. (1980), Brain Res., 195: 123–27 beschrieben. Ein Minimum von drei Tests, welche durch mindestens 2 Wochen getrennt waren, wurde verwendet, um eine basale Rotationsgeschwindigkeit zu erzeugen. Tiere, welche durchgängig ein stabiles (weniger als 25% Variation) asymmetrisches Rotationsverhalten von mehr als 10 Drehungen pro Minute aufwiesen, wurden zufällig für entweder eine AAVlac- oder eine AAVth-Injektion ausgewählt.

[0113] Stereotaktische Injektion von AAVlac oder AAVth in 6-OHDA-läsionierte Ratten: Ratten, welche die oben erwähnten Verhaltenskriterien einer nahezu vollständigen Läsion erfüllten, wurden mit Ketamin/Xylazin (70 mg/7 mg pro kg) anästhesiert und in einen stereotaktischen Kopf-Rahmen gebracht. Der Schädel wurde freigelegt, und Löcher wurden über dem denervierten Striatum (links) an den Paxinos & Watson Koordinaten AP 0,2, L 2,6 und AP 1,5, L 2,0 und L 3,0 gebohrt. Entweder wurde AAVlac oder AAVth langsam unter Verwendung einer Hamilton-Spritze in jede der drei Stellen mit einer DV-Tiefe von 5 mm injiziert. Jedes Injektionsvolumen betrug 2 ml. Die Ratten wurden auf Apomorphin induziertes Rotationsverhalten einen oder zwei Monate nach der Operation getestet.

[0114] TH, NF und GFAP-Immunzytochemie: Für eine immunhistochemische (IHC) Analyse von Gehirnschnitten, wurden Ratten mit Chloralhydrat tief anästhesiert, und es folgte ein interkardiale Perfusion mit IM PBS (pH-Wert = 7,3), gefolgt von 4% Paraformaldehyd (PF). Die Gehirne wurden entfernt und in 4% PF nachfixiert (3–4 Stunden), gefolgt von aufsteigenden Saccharoselösungen (10/15/30% in PBS) als Gefrierschutzmittel. Die Schnitte (7–30 mm) wurden in einem Kryostaten (Reichert-Jung) geschnitten und auf Polylysin beschichtete Objektträger gebracht. Wir verwendeten ein Doppelmarkierungsprotokoll für den gemeinsamen Nachweis von TH-positiven Zellen in spezifisch neuronalen oder glialen Subpopulationen. Die Schnitte wurden anfänglich in Blockierungspuffer inkubiert (5% Ziegenserum (GS)/5% normales Pferdeserum (NHS) in 1 M Phosphat gepufferter Salzlösung (PBS)). Die Schnitte wurden anschließend in primären Antikörpern, welche

in Blockierungspuffer verdünnt waren (Maus-Anti-TH [Boehringer Mannheim, 1:200], Maus-Anti-NF [Sigma, 1:400], Kaninchen-Anti-TH [Chemicon International, 1:3000], Kaninchen-Anti-GFAP [überlassen vom Department of Pathology, Memorial Hospital, 1:800]), bei Raumtemperatur (2–4 Stunden) inkubiert, in Blockierungspuffer gespült und in zweiten Antikörpern (Maus-Anti-Texas Rot [Vektor, 1:75] oder biotinylierter Kaninchen-Anti-IgG [Vektor, 1:400]) bei Raumtemperatur (1 Stunde) inkubiert. Die Schnitte wurden in PBS gewaschen und bei Raumtemperatur (1 Stunde) in Avidin-Neutralite FITC [Molecular Probes Inc., 1:400] inkubiert. Die Objektträger wurden mit PBS/Glycerin (0,05:1) eingedeckt und bei –20°C gelagert.

Beispiel 1

Erzeugung eines adeno-assoziierten Virus(AAV)-Vektor für einen Gentransfer in das Gehirn.

[0115] Das bakterielle lacZ-Gen wurde in das Plasmid psub201 (Samulski et al. (1989) J. Virol. 63: 3822–28) zwischen die Enden des AAV-Genoms inseriert. Diese Enden enthalten die Erkennungssignale für eine Spaltung und Verpackung in einem AAV-Vektor. Das lacZ-Gen kodiert das bakterielle Enzym β-Galactosidase, welches ein unlösliches blaues Präzipitat bei einer Reaktion mit dem geeigneten Substrat herstellt. Der humane Cytomegalovirus(CMV)-Immediate-Early-Promotor wurde verwendet, um die Genexpression zu steuern, und ein SV40-Polyadenylierungssignal wurde strangabwärts von dem lacZ-Gen platziert (**Fig. 1**). Die Zellen wurden mit pAAVlac und einem zweiten Plasmid, pAd8 (Samulski et al. 1989), welches AAV-Strukturproteine bereitstellt, aber welchem die AAV-Enden fehlen und welches daher nicht in das Virus verpackt werden kann, transfiziert. Kotransfizierte Zellen wurden anschließend mit Adenovirus Typ 5 (Jones und Shenk (1978) Cell 13: 181–188) infiziert, um die restliche Replikations- und Verpackungsmaschinerie bereitzustellen (**Fig. 2**). Der sich ergebende Stamm bestand aus verpackten AAV-lac-Vektoren (AAVlac) und Nachkommen-Helferadenovirus, das Helfervirus wurde anschließend durch Erhitzen bei 56°C für 30 Minuten beseitigt. Die vollständige Beseitigung des Adenovirus wurde durch die Unfähigkeit bestätigt, irgendwelche viralen Plaques in kultivierten Zellen 1 Woche nach einer Infektion mit diesem viralen Stamm nachzuweisen. AAV-Vektoren wurden anschließend durch Infektion von kultivierten 293-Zellen, histochemischem Färben der β-Galactosidase-Expression und Zählen von blauen Zellen getitert. Es gab keinen Unterschied in der Anzahl der Zellen, welche 1 und 5 Tage nach der Infektion beobachtet wurden, was eine Abwesenheit einer Vektorreplikation und -ausbreitung zeigt. Wenn das Verfahren unter Verwendung eines lacZ-Plasmids ohne die AAV-Erkennungssignale wiederholt wurde, wurden keine positiven Zellen nach einer Infektion mit dem sich ergebenden Stamm beobachtet. Dies weist darauf hin, dass das lacZ-Gen in ein AAV-Virus verpackt wurde, welches nicht zur autonomen Replikation in der Lage war, während restliches Adenovirus vollständig beseitigt war.

Beispiel 2

AAV-Vektoren können ein fremdes Gen in das adulte Rattengehirn transferieren und stabil exprimieren

[0116] AAVlac wurde stereotaktisch in verschiedene Regionen des adulten Rattengehirns mikroinjiziert, einschließlich des Nucleus caudatus, der Amygdala, des Striatums und des Hippocampus. Die Tiere wurden anfänglich zwischen 1 und 3 Tagen nach der Injektion getötet, und Schnitte wurden für eine X-gal-Histochemie verarbeitet. Positive Zellen wurden innerhalb jeder Region gezeigt. Die Wirksamkeit des Gentransfers in das Gehirn erschien mindestens gleich zu dem zuvor mit HSV- oder Adenovirusvektoren beobachteten zu sein.

[0117] Um die Langzeitstabilität des AAV-Gentransfers und die Expression innerhalb des Säugergehirns zu analysieren, wurden Tiere in den Nucleus caudatus mit AAVlac injiziert und 2–3 Monate nach der Operation getötet. Zuerst wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) für eine Verwendung in Gehirnschnitten angepasst, um eine Amplifikation und Sichtbarmachung der viralen Vektor-DNA in situ zu erlauben. Siehe Nuovo et al. (1991) Am. J. Pathol. 139: 1239–44; Nuovo et al. (1993) PCR Meth, 2: 305–12; Flotte et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 10613–17.

[0118] Es wurden zahlreiche Zellen innerhalb des Gehirns nachgewiesen, welche das bakterielle lacZ-Gen nach 2 Monaten behielten. Es gab keine Färbung auf der gegenüberliegenden Seite der Gehirnschnitte oder in Schnitten, welche ohne Taq-Polymerase verarbeitet wurden, und positive Zellen waren ebenfalls in Gehirnen abwesend, welche nur mit Adenovirus injiziert wurden. Zusätzliche Tiere wurden anschließend getötet, und die Schnitte wurden für eine X-gal-Histochemie verarbeitet (siehe Kaplitt et al. (1991) Mol. Cell. Neurosci. 2: 320–30), um Zellen zu identifizieren, welche funktionelle β-Galactosidase enthielten. Positive Zellen wurden innerhalb der injizierten Regionen des Nucleus caudatus bis zu 3 Monaten nach der Vektorinjektion identifiziert. Zu keinem Zeitpunkt wurden Verhaltens- oder physiologische Abweichungen innerhalb der Tierindividuen nachgewiesen, und die Gehirnschnitte zeigten keinen Beleg einer Pathologie, welche sich aus dem AAV-Gen-

transfer ergab.

Beispiel 3

Der AAV-Vektor ergibt eine Expression von Tyrosinhydroxylase im Nucleus caudatus von 6-OHDA-läsionierten Ratten

[0119] Die Parkinson Krankheit (PD) ist eine neurodegenerative Störung, welche durch den Verlust von nigrostriatalen Bahnen gekennzeichnet ist, und ist verantwortlich für Behandlungen, welche die dopaminerge Transmission im Caudatus putamen unterstützen. (Yahr und Bergmann, Parkinson's Disease (Raven Press, 1987), Yahr et al. (1969) Arch. Neurol. 21: 343–54). In Versuchstieren induzieren genetisch modifizierte Zellen, welche Tyrosinhydroxylase exprimieren und dadurch Dihydroxyphenylalanin (L-Dopa) synthetisieren, eine Verhaltensbesserung in Nagetiermodellen der PD. (Wolff et al. (1989) PNAS (USA) 86: 9011–14; Freed et al. (1990) Arch. Neurol. 47: 505–12; Jiao et al. (1993) Nature 262:4505). Ein alternativer Ansatz ist der des direkten in vivo Gentransfers in somatische Zellen, wodurch die intrinsischen Zellen des Neostriatums in L-Dopa herstellende Zellen durch Transduktion mit einem Vektor, welcher TH exprimiert, umgewandelt werden. Ein HSV-1-Vektor, welcher TH exprimiert, zeigte, dass dieser Ansatz eine brauchbare Alternative zur Gewebstransplantation darstellen kann. (During et al. (1992) Soc. Neurosci Abstr. 18: 331–8). HSV-1-Vektoren weisen jedoch derzeit mehrere Beschränkungen auf, wie oben beschrieben wurde. Um einen Vektor zu erzeugen, welcher einen therapeutischen Nutzen für humane PD-Patienten aufweisen kann, inserierten wir eine humane TH-cDNA (Form II) (O'Malley et al. Biochemistry 26: 6910–14) in unseren AAV-Vektor (AAVth). AAVth wurde verpackt, und das Helfervirus wurde wie für AAVlac oben beschrieben, beseitigt.

[0120] Unilaterale 6-Hydroxydopamin-Läsionen der Substantia nigra wurden verwendet, um ein etabliertes Nagetiermodell für PD zu erzeugen. In diesem Modell führt die Asymmetrie, welche durch unterschiedliche postsynaptische Rezeptorempfindlichkeiten zwischen dem denervierten und intaktem Striatum verursacht wird, zu einem Rotationsverhalten, welches einer systemischen Verabreichung von dopaminergen Mitteln, wie Apomorphin, folgt (Heft et al. (1980) Brain Res. 195: 123–7). Die Geschwindigkeit der asymmetrischen Rotation steht direkt in Bezug zur Schwere des striatalen Dopamindefizits, und dieses Modell weist eine prädiktive Fähigkeit beim Definieren von Behandlungen auf, welche eine therapeutische Wirksamkeit bei PD aufweisen (Freed et al. (1987) Ann. Neurol. 8: 510–19; Hargraves et al. (1987) Life Sci. 40: 959–66). Die läsionierten Ratten wurden alle zwei Wochen mit einem Minimum von drei Gelegenheiten auf Apomorphin induzierte Rotation getestet, und die Tiere, welche die Verhaltenskriterien von > 95% Läsionswirksamkeit (> 10 Rotationen/Minuten) erfüllten, wurden identifiziert (Hefti et al. 1980). Das AAVth- oder AAVlac-Virus oder der Träger alleine (Phosphat gepufferte Salzlösung, [PBS]), wurden durch stereotaktische Injektion dem denervierten Striatum zugeführt. Die Tiere wurden auf eine Apomorphin induzierte asymmetrische Rotation nach 2, 4 und 9 Wochen getestet. Das Rotationsverhalten der AAVlac-injizierten Tiere war ähnlich zu dem der PBS-injizierten Tiere. Im Gegensatz dazu zeigten die AAVth-injizierten Tiere eine erhebliche Verhaltensbesserung (**Fig. 3**), verglichen zu den AAVlac- oder PBS-injizierten Gruppen (Kontrollgruppen). Die durchschnittliche Verhaltensbesserung, welche durch AAVth verursacht wurde, betrug 31 ± 6% 4 Wochen und wurde bei 32 + 3% 9 Wochen ($P < 0,01$) nach der Injektion gehalten.

[0121] Um die viral kodierte TH-Genexpression nach einer Transduktion mit AAVth zu untersuchen, wurden Tiere zu Zeitpunkten analysiert, die von 24 Stunden bis 7 Monate nach der Injektion reichten. Die Expression des TH durch den AAV-Vektor wurde unter Verwendung von Immunzytochemie mit einem monoklonalen Maus-Anti-TH-Antikörper nachgewiesen. Obwohl dieser Antikörper nicht zwischen dem Ratten- und menschlichen Protein unterscheidet, wird TH nicht innerhalb entweder der intrinsischen Neurone oder der Glia des Rattenstriatums exprimiert (Chatterjee et al. (1992) Science 258: 1485–88). Weiterhin ist eine endogene TH-Immunreaktivität (TH-IR) innerhalb des Striatums auf die afferenten dopaminergen Fasern in unläsionierten Tieren beschränkt und fehlt im vollständig denervierten Striatum. In beiden, der Kontrolle und den AAVlac-injizierten Ratten trat keine striatale TH-Immunreaktivität (TH-IR) auf der denervierten Seite auf. Im Gegensatz dazu waren in den denervierten Striata, welche mit AAVth injiziert waren, zahlreiche TH-IR-Zellen um die Injektionsstelle herum angesammelt und reichten bis zu 2 mm weg von der Injektion. Die Mehrheit der Zellen innerhalb des Striatums schienen morphologisch Neurone zu sein, und eine Doppelmarkierung mit sowohl dem monoklonalen Anti-TH-Antikörper, als auch einem Anti-Neurofilament-Antikörper bestätigten, dass eine wesentliche Anzahl der intrinsischen striatalen Neurone immunreaktives TH de novo exprimierten. Zusätzliche Schnitte wurden anschließend mit sowohl dem monoklonalen TH-Antikörper, als auch mit einem polyklonalen Kaninchen-Antikörper gegen saures Gliafaserprotein (GFAP), einem Marker für Astrozyten und Oligodendrozyten, doppelt markiert. Andere Schnitte wurden mit TH-Antikörper und Antikörpern für Glutaminsäuredecarboxylase (GAD), einem Marker für GABAerge Neurone, der vorherrschenden neuronalen Population des Neo-

striatums, doppel markiert. Die Doppelmarkierung ergab, dass die Mehrheit der TH-IR-Zellen immunreaktiv für GAD war, während ein kleiner prozentualer Anteil der TH-IR-Zellen GFAP-positiv war. GABAere Neurone bilden ungefähr 95% der intrinsischen striatalen Neuronpopulation, wobei Cholinacetyltransferase (ChAT, cholinerge) positive Zellen den Rest ausmachen. Eine Doppelmarkierung mit TH und ChAT ergab ebenfalls eine Expression von Vektorkodieretem TH in striatalen cholinergen Neuronen.

[0122] Der Titer des AAVth-Stamms, welcher für diese in vivo Studien verwendet wurde, betrug 5×10^6 infektiöse Teilchen (i. p.)/ml. Daher würde eine einzelne Injektion von 2 ml zu 10.000 positiven Zellen führen, wenn die Wirksamkeit der Infektion 100% betragen würde, und jedes i. p. eine unterschiedliche Zelle infizieren würde. Da jedoch eine vorherige Infektion mit AAV eine nachfolgende Reinfektion, oder dass mehrere Partikel dieselbe Zelle infizieren, in der direkten Umgebung der Injektion nicht verhindert, könnten wir erwarten, dass Zellen eine mehrfache Infektion aufweisen. Darüber hinaus könnte AAVth ebenfalls Axone und Terminale infizieren und nach einem retrograden Transport in den Zellkörperregionen der striatalen Afferenten exprimiert werden (z. B. den überlebenden nigralen Dopamin-Neuronen, dem Kortex, dem Nucleus reticularis des Thalamus und im Raphe nucleus dorsalis). In den AAVth-injizierten Tieren überstieg die Gesamtzahl der striatalen Zellen, welche eine TH-IR enthielten, durchgängig 1000 für jede der 2 ml-Injektionen, was ein Minimum von 10% in vivo-Wirksamkeit nahe legt, was erheblich größer ist, als bisherige Beobachtungen unter Verwendung von defekten HSV-1-Vektoren (bei 2%). Darüber hinaus wurde die Menge der Expression ebenfalls zu Zeitpunkten im Bereich von 3 Tagen bis 7 Monaten untersucht. Die Expression blieb während dieses 7-monatigen Zeitraums erhalten, obwohl die Menge der Expression um ungefähr 50% absank.

[0123] Weiterhin gab es keine Zeichen von zytophatischen Wirkungen. Die einzigen Veränderungen, welche in den Kurzzeittieren (weniger als 1 Woche nach der Injektion untersucht) beobachtet wurden, war eine leichte Nadelverletzung an der Injektionsstelle, welche ähnlich in PBS-injizierten und AAVlac-injizierten Tieren war. In den Langzeittieren (mehr als zwei Monate) war der restliche Nadelverlauf nicht durchgängig sichtbar, und es gab keinen Beleg für irgendeine neuronale Verletzung oder eine reaktive Gliose. Es gab ebenfalls keine Verhaltens- oder groben pathologischen Zeichen eines Hirnschadens in irgendeinem Testindividuum.

Beispiel 4

Die Expression von zwei Genen durch einen einzelnen AAV-Vektor führt zur de novo Synthese des Neurotransmitters Dopamin

[0124] Die Dopaminsynthese wird von zwei Enzymen katalysiert, TH und aromatische Säuredecarboxylase (AADC). Die durch TH katalysierte Reaktion führt zur Synthese von L-Dopa, und dies ist der geschwindigkeitsbegrenzende Schritt bei der Synthese von Dopamin. Dopamin ergibt sich anschließend aus der Umwandlung von L-Dopa durch AADC. Obwohl das Striatum keine Zellen enthält, welche endogen TH herstellen, gibt es einen kleinen prozentualen Anteil von striatalen Zellen, welche AADC herstellen. Daher tritt eine Verhaltensbesserung in Tieren, welche mit AAVth (oder anderen Ansätzen unter Verwendung von TH alleine) behandelt wurden, vermutlich sekundär zur Umwandlung des sich ergebenden L-Dopa zu Dopamin durch endogene striatale AADC auf. Da eine begrenzte Anzahl von Zellen AADC herstellt, ist es jedoch möglich, dass die Synthese von Dopamin durch eine Expression von sowohl TH, als auch AADC in jeder transduzierten Zelle verstärkt werden könnte. Auf diese Weise würde jede Zielzelle nach einem Gentransfer eine autonom Dopamin herstellende Zelle werden. Derzeitige Belege legen in der Tat nahe, dass eine Expression von beiden Genen im denervierten Striatum einer Expression von TH alleine überlegen sein kann (Kang, et al., 1993). Weiterhin trat die erheblichste Verhaltensbesserung nach einer Zelltransplantation auf, wenn TH-exprimierende Muskelzellen verwendet wurden (Jiao et al. 1993), und anders als Fibroblasten aus früheren Studien exprimieren Muskelzellen eine endogene AADC-Aktivität. Dies legte nahe, dass die Erzeugung eines AAV-Vektors, welcher sowohl TH, als auch AADC enthält, nützlich sein würde.

[0125] Aufgrund der Beschränkung der Insertgrößen in AAV-Vektoren waren mehrere Modifikationen nötig, um einen Vektor zu erzeugen, welcher beide Gene enthielt. Zuerst wurde das TH-Gen verkürzt, wobei das 5'-Ende beseitigt wurde. Für ein Verkürzen des TH-Gens wurde sogar gezeigt, dass es die enzymatische Aktivität aufgrund der Entfernung einer aminoterminalen regulatorischen Domäne steigert. (Walker et al. (1994) Bioch. Biophys. Acta 1206: 113–119). Daher dient dies einem funktionellen Zweck, sowie dem Vergrößern des für andere genetische Elemente verfügbaren Raums. Zusätzlich wurde ein kleines synthetisches Oligonukleotid, welches ein neuartiges Epitop kodierte, an das 5'-Ende des verkürzten TH angeheftet. Diese neuartige Epitop, "Flag" genannt, wird durch einen kommerziell verfügbaren monoklonalen Antikörper erkannt, dies stellt einen unabhängigen und eindeutigen Marker für eine Expression von AAV-tranduzierter TH in vivo dar.

[0126] Nach dem Modifizieren der TH wurde das AADC-Gen in den Vektor inseriert. Ein Erzeugen von zwei unabhängigen Expressionseinheiten mit zwei Promotoren und zwei Polyadenylierungssignalen hätte zu einer so großen Insertgröße geführt, dass sie mit den Beschränkungen des AAV-Vektors inkompatibel gewesen wäre. Daher wurde ein IRES-Element zwischen die Flag-TH- und AADC-cDNAs inseriert. Die meisten eukaryotischen mRNAs sind monocistronisch, sie enthalten einen einzelnen offenen Leserahmen, und wenn die Translation eines Peptids gestoppt wird und das Ribosom vom Transkript abfällt, kann eine zusätzliche strangabwärts gelegene Translations-Startstelle nicht verwendet werden. Wenn das IRES-Element auf einer mRNA strangabwärts von einem Translations-Stoppcodon anwesend ist, steuert es einen ribosomalen Wiedereintritt (Ghattas et al. (1991) Mol. Cell. Biol. 11: 5848–5959), welcher die Initiation der Translation am Start eines zweiten offenen Leserahmens erlaubt (IRES = Interne Ribosomeneintrittsstelle). Auf diese Weise kann eine eukaryotische bicistronische mRNA erzeugt werden, welche eine Translation von zwei unterschiedlichen Peptiden durch eine einzelne mRNA erlaubt (**Fig. 2**). Daher könnte mit nur einem einzelnen Promotor (CMV) und einem einzelnen mRNA-Polyadenylierungssignal (SV40), welche die Expression eines einzelnen Transkripts steuern, die Translation von sowohl den Flag-TH, als auch den AADC-Proteinen innerhalb einer einzelnen Zelle auftreten, welche mit einem einzelnen AAV-Vektor transduziert wurde.

[0127] Nach der Erzeugung des Plasmids AAV-Flag-TH/AADC, wurde jeder der unabhängigen Expressionsparameter in Kultur getestet. Das Plasmid wurde in 293T-Zellen transfiziert, und dann wurden am folgenden Tag das Substrat Tyrosin und ein essenzieller Kofaktor (Tetrahydrobiopterin) zu dem Gewebekulturmedium von einigen dieser Kulturen hinzugefügt. Zum Vergleich wurden zusätzliche Zellen mit dem Plasmid AAVlac transfiziert oder wurden Mock-transfiziert. Proben des Mediums wurden 30 Minuten und 60 Minuten nach dem Hinzufügen der Kofaktoren (oder der Mock-Behandlung) entnommen, und diese wurden auf die Anwesenheit von Dopamin durch eine Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC) analysiert. Wie in **Fig. 6** dargestellt ist, wurden sehr große Mengen Dopamin in den 293T-Zellen hergestellt, welche mit AAV-Flag-TH/AADC transfiziert waren, in der Anwesenheit von beiden Kofaktoren. In ähnlich transfizierten Zellen, denen die Kofaktoren fehlten, wurden kaum nachweisbare Mengen von Dopamin hergestellt, während AAVlac-transfizierte oder Mock-transfizierte Zellen überhaupt keine Dopaminsynthese ergaben, selbst in der Anwesenheit von geeigneten Kofaktoren. Dies zeigte, dass die 293T-Zellen unfähig waren, die Dopaminsynthese endogen zu steuern, ein Einführen des bicistronischen Vektors AAV-Flag-TH/AADC wandelte diese Zellen jedoch in Hochleistungs, Kofaktor abhängige Hersteller von Dopamin um. Abschließend sollte erwähnt werden, dass diese Zellen anschließend fixiert und mit dem monoklonalen Anti-Flag-Antikörper gefärbt wurden, und dies einen hochspezifischen histochemischen Nachweis des Flag-Epitops ohne Hintergrund ergab.

[0128] Die Spezifität und Funktion des bicistronischen AAV-Vektors wurde weiterhin in kultivierten 293T-Zellen analysiert. Trotz der oben erwähnten Daten war es noch möglich, dass 293T-Zellen eine endogene AADC-Aktivität enthielten. Wenn dies richtig war, dann würde eine Expression von Flag-TH alleine ähnliche Daten ergeben, ohne eine Translation des zweiten (AADC) offenen Leserahmens erreicht zu haben. Um dies zu testen, wurde ein zusätzlicher Vektor erzeugt. AAVFlag-TH enthält ein monocistronisches Insert mit dem offenen Leserahmen für Flag-TH, aber es fehlt sowohl die IRES-Sequenz, als auch der offene Leserahmen für AADC. 293T-Zellen wurden anschließend mit AAV-Flag-TH/AADC, AAVFlag-TH, AAVlac oder ohne Plasmid transfiziert. Beide Kofaktoren wurden zu allen Kulturen am folgenden Tag hinzugefügt, und anschließend wurden Proben des Mediums auf sowohl L-Dopa, als auch Dopamin durch eine HPLC getestet (Tabelle 1). Zellen, welche ohne Plasmid oder mit AAVlac transifiziert waren, konnten keine nachweisbare Menge von entweder L-Dopa oder Dopamin synthetisieren. Das Fehlen von L-Dopa zeigte, dass 293T-Zellen keine endogene TH-Aktivität besitzen. Weiterhin ergaben Zellen, welche mit AAVFlag-TH transfiziert waren, sehr große Mengen von L-Dopa, aber nicht nachweisbare Mengen von Dopamin. Dies zeigt, dass 293T-Zellen auch keine AADC-Aktivität besitzen. Weiterhin weist dies darauf hin, dass das verkürzte TH hochaktiv ist, und das Hinzufügen der 5'-Flag-Sequenz die Enzymaktivität nicht nachteilig beeinflusst. Schließlich stellten Zellen, welche mit AAV-Flag-TH/AADC transifiziert waren, erhebliche Mengen L-Dopa her, aber sehr große Mengen von Dopamin. Wahrscheinlich ergab sich die geringere Menge des L-Dopa in diesen Zellen, verglichen mit jenen, welche mit AAVFlag-TH transfiziert waren, aufgrund der wirksamen Umwandlung von L-Dopa zu Dopamin. Daher können zwei Gene in einen einzelnen AAV-Vektor gebracht werden, und Techniken wie eine Insertion einer dazwischenliegenden IRES-Sequenz kann zur Translation von beiden Proteinprodukten führen. Diese Daten weisen ebenfalls darauf hin, dass AAV-Vektoren eine Expression von mehreren, funktionell aktiven Proteinen ergeben kann, welche bei der Produktion eines einzelnen, biologisch aktiven Neurotransmitters synergetisch wirken können. Für das Flag-Epitop wurde ebenfalls gezeigt, dass es einen spezifischen, unabhängigen Marker für die AAV-abgeleitete TH-Proteinherstellung darstellt, ohne die enzymatische TH-Aktivität nachteilig zu beeinflussen.

Tabelle 1. Freisetzung von L-Dopa und Dopamin in das Kulturmedium von 293T-Zellen nach einer Plasmidtransfektion

	L-Dopa (pg/ml)	Dopamin (pg/ml)
Blindprobe	< 40	< 40
lacZ	< 40	< 40
Flag-TH	8200	< 40
TH-AADC	800	4050

[0129] Die Kontrollen, welche mit pAAVlac transfiziert oder mit PBS Mock-transifiziert waren, stellten keine nachweisbare Menge von entweder L-Dopa oder Dopamin her, und daher enthielten alle mindestens diese Zellen keine TH-Aktivität. Nach einer Transfektion mit pAAV-FlagTH, welches nur Tyrosinhydroxylase exprimiert, wurden erhebliche Mengen von L-Dopa hergestellt, aber nichts davon wurde zu Dopamin umgewandelt. Dies zeigte, dass das verkürzte TH mit dem N-terminalen Flag-Epitop enzymatisch aktiv war, jedoch enthalten die 293T-Zellen keine endogene AADC-Aktivität, daher die Abwesenheit der Umwandlung zu Dopamin. Im Gegensatz dazu ergaben die Zellen, welche mit dem bicistronischen Vektor pAAV-FlagTH-AADC transfiziert waren, erhebliche Mengen L-Dopa, aber viel größere Mengen Dopamin. Dies zeigte, dass das Flag-TH vollständig aktiv beim Synthetisieren von L-Dopa war, aber dass funktionsfähiges AADC ebenfalls von derselben mRNA translatiert wurde und dies viel des L-Dopa zu Dopamin umwandelte. Daher wurden zwei Enzyme von einem einzigen Vektor exprimiert, wodurch eine Zelle ohne endogene TH- oder AADC-Aktivität in eine Dopamin-herstellende Zelle umgewandelt wurde.

Beispiel 5

AAV-Vektor vermittelte Gentherapie in einem Primatenmodell für Parkinson Krankheit

[0130] Das große Potenzial des bicistronischen Vektors als ein therapeutisches Mittel für Parkinson Krankheit hat zum schnellen Beginn von Primatenstudien geführt. Das Primatenmodell für Parkinson Krankheit wird als der beste Standard für eine Überprüfung möglicher Therapien vor dem Eintritt in klinische Studien am Menschen angesehen. Dieses Modell wurde ursprünglich aus der Beobachtung in den frühen 1980ern entwickelt, wo Gruppen von jüngeren Menschen eine neurodegenerative Störung entwickelten, welche auffallend ähnlich zur ideopathischen Parkinson Krankheit war. Die Quelle dieser Störung wurde auf die Verwendung einer Straßendroge zurückverfolgt, und es wurde gefunden, dass das spezifische verursachende Mittel 1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridin (MPTP) war (Langston (1985) Trends. Pharmacol. Sci. 6: 375–378). Als MPTP anschließend an Primaten gegeben wurde, entwickelten die Tiere eine Parkinsonstörung, welche zu einem Hauptmodell zum Testen von Anti-Parkinsonmitteln wurde. Peripher verabreichtes MPTP wird die Blut-Hirn-Schranke durchqueren, wobei es von Monoaminoxidase B (MAO-B) zu MPP+ umgewandelt wird. Diese Verbindung wird anschließend selektiv innerhalb der dopaminergen Neurone der Substantia nigra über einen energieabhängigen, präsynaptischen Aufnahmemechanismus konzentriert. Dies kann durch die Fähigkeit von Neuromelanin, welches in nigralen Neuronen gefunden wurde, MPP+ zu binden, verstärkt werden (D'Amato et al. (1986) Science 231: 987–989). MPP+ ist ein potentes Neurotoxin, welches letztendlich die Degeneration von nigralen dopaminergen Neuronen und den Verlust des nigrostriatalen Dopamin-Wegs verursacht, wie es in der Parkinson Krankheit beobachtet wird. (Redmond et al. (1993) Ann. N. Y. Acad. Sci. 695: 258–266; Tipton und Singer (1993) J. Neurochem. 61: 1191–1206).

[0131] Frühe Studien, die in MPTP-Primaten begonnen wurden, wurden entworfen, um die Sicherheit des AAV-Systems in Primaten zu testen und Information bezüglich der potenziellen therapeutischen Wirksamkeit von AAV-Flag-TH/AADC für die Parkinson Krankheit zu erhalten. Die anfängliche Studie setzte eine kleine Anzahl von Tieren mit nur mäßigen nigralen Läsionen ein und wurde entworfen, um zu bestimmen, ob AAV-Vektoren Gene in das adulte Primatengehirn transferieren können, und ob eine Dopamintransmission im Striatum unter Verwendung des bicistronischen Vektors verstärkt werden könnte. Gereinigter Vektor wurde stereotaktisch unilateral in das Striatum von MPTP-behandelten Primaten injiziert, und die Testindividuen wurden anschließend entweder 10 Tage oder 4,5 Monate nach der Injektion getötet. Gewebeschnitte wurden auf eine Flag-Immunreaktivität analysiert, und zahlreiche positive Zellen wurden in mehreren Schnitten aus dem injizierten Striatum in sowohl Kurz-, als auch Langzeitindividuen gezeigt, während Schnitte von der nicht injizierten Seite vollständig negativ waren. Die Mehrheit der positiven Zellen schienen morphologisch Neurone zu sein. Dies zeigte zum ersten Mal, dass AAV-Vektoren erfolgreich Gene in das Primatengehirn transferieren konnten (During et al. (1994) Abstr. Soc. Neurosci. 20:1465).

[0132] Eine biochemische Analyse der Gewebeproben von behandelten Primaten wies weiterhin darauf hin, dass der Vektor einen Anstieg des striatalen Dopamins verursachte (During et al. (1994)). Zum Beispiel betrug in einem Individuum, welches 10 Tage nach der Behandlung getötet wurde, die Menge des Dopamins aus einer striatalen Gewebeprobe nahe der Stelle der AAV-Injektion 18,93 ng/mg Protein. Eine äquivalente Gewebeprobe von dem nicht injizierten, kontralateralen Striatum ergab eine Dopaminmenge von 7,97 ng/mg Protein. Gewebeproben von distalen Stellen auf den injizierten und nicht injizierten Seiten führten jeweils zu Dopaminmengen von 2,48 ng/mg und 2,27 ng/mg. Da peripher verabreichtes MPTP bilateral zu annähernd gleichen Läsionen der Substantia nigra führen sollte, legt der nahezu 140% Anstieg der Dopaminmengen in dem injizierten Striatum verglichen mit der unbehandelten Seite nahe, dass der AAV-Vektor zu einer Expression von funktionell aktiven Enzymen führte.

[0133] Eine zweite Studie setzte schwerer läsionierte Primaten ein, um zu bestimmen, ob es ein therapeutisches Potenzial für AAV-Flag-TH/AADC gibt. Die Individuen wurden in zwei Gruppen aufgeteilt, wobei die behandelte Gruppe AAV-Flag-TH/AADC erhielt und die Kontrollen AAVlac erhielten. Alle Tiere erhielten bilaterale stereotaktische Injektionen, wobei dasselbe Virus in das Striatum auf beiden Seiten des Gehirns infundiert wurde. Die Individuen wurden anschließend für 2,5 Monate nach der Operation beobachtet. Die Beobachtungen legen nahe, dass der bicistronische Vektor zu einer anhaltenden Verbesserung des Parkinson-Verhaltens führte (During et al. (1994)). Pflegepersonal, das den Behandlungsstatus des Tieres nicht kannte (engl.: "blinded caretakers"), berichtete in den monatlichen Bewertungen über nahezu keine Veränderung im Verhalten der Tiere, welche nachfolgend bestimmt wurden, Kontrollen gewesen zu sein, während die Antwort bei behandelten Individuen von einer mäßigen Verbesserung bis zu einer erheblichen Besserung der Funktion variierte. Die meisten Tiere begannen die Studie unfähig, wobei sie die meiste Zeit mit dem Gesicht nach unten verbrachten und Hilfe benötigten, um zu fressen und sich selbst zu pflegen. Berichte weisen darauf hin, dass Verbesserungen in den behandelten Tieren in einigen Fällen zu einer verminderten Zeit führten, die mit dem Gesicht nach unten verbracht wurde, und zu einer Besserung der Fähigkeit, zu fressen und sich selbst zu pflegen. Diese verblindeten Beobachtungen legen nahe, dass AAV-Vektoren zu einer Verhaltensbesserung von Parkinson-Primaten führen können. Es sollte ebenfalls erwähnt werden, dass es in beiden Primatenstudien keine Verhaltens- oder histologischen Belege für eine Toxizität aufgrund des AAV-Vektors gab. Alle Daten weisen darauf hin, dass eine sichere Langzeitverbesserung von menschlichen neurologischen Erkrankungen über eine genetische Modifikation von adulten Gehirnzellen in vivo unter Verwendung von AAV-Vektoren möglich sein kann.

Beispiel 6

Eine Expression eines Wachstumsfaktors durch einen AAV-Vektor kann eine Besserung der Funktion nach neuronalen Läsionen ergeben

[0134] Ein zusätzlicher AAV-Vektor wurde als alternativer Ansatz zu der Behandlung der Parkinson Krankheit entwickelt. Bislang konzentrierte sich die Mehrheit der therapeutischen Strategien für PD auf das Anheben der striatalen Dopaminmengen. Obwohl eine Verhaltensbesserung in Tiermodellen wiederholt gezeigt wurde, stellt dies keine Heilung der Erkrankung dar, sondern eher eine symptomatische Linderung. Die neuronale Degeneration in der Substantia nigra ist das pathologische Ergebnis des Krankheitsverlaufs, und ein Fortschreiten der Neurodegeneration wird nicht durch Anheben des striatalen Dopamins verändert. Kürzlich haben jedoch mehrere Berichte bestimmt, dass Wachstumsfaktoren, wie der Glia-abgeleitete neurotrophe Faktor (GDNF) schützend und trophisch für Neurone der Substantia nigra sein können (Lin et al. (1993) Science 260: 1130–1132). Daher wurde ein AAV-Vektor erzeugt, welcher die cDNA für GDNF unter der Kontrolle des CMV-Promotors enthielt.

[0135] Ratten wurden mit 6-OHDA läsionert und erhielten nachfolgend Injektionen von AAVgdnf, AAVlac oder Salzlösung in die läsionierte Substantia nigra (During et al. (1994)). Nach mehreren Wochen wurde die Dopaminfreisetzung in das Striatum auf der läsionierten Seite unter Verwendung einer intrazerebralen Mikrodialyse bestimmt. Diese Technik erlaubt das Beproben der lokalen Neurotransmitterfreisetzung innerhalb einer spezifischen Gehirnregion von lebenden Tieren (During und Spencer (1993) Lancet 341: 1607–1610). Grundlinien-Dopaminmengen wurden dreimal beprobt, und es gab keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Die Tiere wurden anschließend mit Kalium behandelt, welches eine Freisetzung von Dopamin aus den präsynaptischen Terminalen induziert. Weder die AAVlac- noch die Salzlösung-behandelten Tiere zeigten irgendeine Variation in der Dopaminfreisetzung zur Grundlinie, was darauf hinweist, dass es wenige dopaminerge Terminelen innerhalb des Striatums gab. Die mit AAVgdnf behandelte Gruppe ergab jedoch einen erheblichen Anstieg in der Dopaminfreisetzung von 200% ($p < 0,05$). Da der AAV-Vektor nur das Gen für einen Wachstumsfaktor enthielt, legt die Wiederherstellung der Kalium induzierten Dopaminfreisetzung in das Striatum nahe, dass eine

GDNF-Expression entweder das erneute Wachstum von dopaminergen Neuronen in der Substantia nigra, nach einer 6-OHDA-Behandlung schützte oder förderte.

[0136] Diese Ergebnisse wurden weiterhin durch eine nachfolgende Verabreichung von Nomifensin an die Tierindividuen unterstützt, nachdem die Dopaminmengen in der AAVgdnf-Gruppe zur Grundlinie zurückkehrten. Nomifensin ist ein Arzneimittel, welches die synaptischen Dopaminmengen durch Inhibieren der Wiederaufnahme des Dopamins erhöht. Wiederum zeigten beide Kontrollgruppen keine Änderung in den Dopaminmengen in Antwort auf Nomifensin, während das striatale Dopamin um 150% ($p < 0,05$) in der mit AAVgdnf behandelten Gruppe anstieg. Zusammen zeigen diese Daten, dass ein AAV-vermittelter Transfer eines Wachstumsfaktor-Gens dopaminerge Eingänge in das Striatum entweder schützen oder wiederherstellen kann. Daher kann eine Gentherapie sowohl für die Linderung der PD durch eine striatale Expression von synthetischen Enzymen für Dopamin, als auch für eine Behandlung des zugrundeliegenden Krankheitsverlaufs durch Exprimieren von Wachstumsfaktoren, welche dopaminerge Neurone schützen oder regenerieren können, geeignet sein. Die vorliegende Erfindung ist der erste Nachweis, dass AAV-Vektoren sicher und wirksam ein fremdes Gen-Markergen (lacZ) in das adulte Rattengehirn transferieren und exprimieren können. Weiterhin wurde eine Stabilität der viralen DNA und der lacZ-Expression innerhalb des Gehirns für mindestens 7 Monate ohne Nachweis einer Pathologie oder Toxizität beobachtet. Eine Expression humaner Tyrosinhydroxylase (hTH) wurde sowohl in Neuronen, als auch der Glia von Rattengehirnen gezeigt, welche zuvor unilaterale 6-Hydroxydopamin(6-OHDA)-Läsionen in der Substantia nigra erhielten. Diese Läsionen führen zu einem asymmetrischen (kontralateral zur Seite der Läsion) Rotationsverhalten, wenn die Ratten mit Apomorphin behandelt werden, und dies wurde als Verhaltensmodell der Parkinson Krankheit (PD) verwendet. Einer Vektorinjektion in den Nucleus caudatus folgend, wurde eine Expression von hTH bis zu 7 Monate später gezeigt, und vorläufige Belege weisen darauf hin, dass eine anhaltende Expression von hTH durch einen AAV-Vektor das Rotationsverhalten nach einer 6-OHDA-Verabreichung reduzieren kann.

Patentansprüche

1. Adeno-assoziierter Virus-abgeleiteter Vektor (AAV-Vektor), welcher befähigt ist, eine nicht-pathogene latente adeno-assoziierte virale Infektion in einer Säugernervensystemzielzelle zu errichten, wobei der AAV-Vektor modifiziert wurde, um eine DNA zu umfassen, die sowohl zu dem adeno-assoziierten Virus als auch zu der Säugernervensystemzielzelle exogen ist, und
frei von Helfervirus ist, und
nur die Replikations- und Packsignale von AAV zurückbehält und welcher exprimierbare Gene umfaßt, die Tyrosinhydroxylase und aromatische Aminosäure-Decarboxylase kodieren.

2. AAV-Vektor nach Anspruch 1, wobei die exprimierbaren Gene in der Zielzelle entweder konstitutiv oder unter regulierten Bedingungen exprimierbar sind.

3. AAV-Vektor nach Anspruch 2, wobei die exprimierbaren Gene eine Kodiersequenz und einen mit der Kodiersequenz funktionell verbundenen regulierbaren Promotor umfassen, wodurch, wenn der Promotor aktiviert ist, ein Messenger-RNA-Transkript von der Kodiersequenz transkribiert wird.

4. AAV-Vektor nach Anspruch 3, wobei der regulierbare Promotor die Expression nervensystemspezifisch macht.

5. AAV-Vektor nach Anspruch 4, wobei die Expression neuronspezifisch oder gliaspezifisch ist.

6. AAV-Vektor nach Anspruch 4, wobei die Expression zentralnervensystemspezifisch ist.

7. AAV-Vektor nach Anspruch 6, wobei die Expression spezifisch für eine oder mehrere der ZNS-Komponenten Rückenmark, Hirnstamm, Cerebellum, Diencephalon oder Telencephalon ist.

8. Adeno-assoziierter Virus-abgeleiteter Vektor (AAV-Vektor), welcher befähigt ist, eine nicht-pathogene latente adeno-assoziierte virale Infektion in einer Säugernervensystemzielzelle zu errichten, wobei der AAV-Vektor modifiziert wurde, um eine DNA zu umfassen, die sowohl zu dem adeno-assoziierten Virus als auch zu der Säugernervensystemzielzelle exogen ist, und
frei von Helfervirus ist, und
wobei die exogene DNA ein exprimierbares Gen umfaßt, welches Thymidinkinase kodiert.

9. Adeno-assoziierter Virus-abgeleiteter Vektor (AAV-Vektor), welcher befähigt ist, eine nicht-pathogene la-

tente adeno-assoziierte virale Infektion in einer Säugernervensystemzielzelle zu errichten, wobei der AAV Vektor modifiziert wurde, um eine DNA zu umfassen, die sowohl zu dem adeno-assoziierten Virus als auch zu der Säugernervensystemzielzelle exogen ist, und
frei von Helfervirus ist, und
wobei die exogene DNA ein exprimierbares Gen umfaßt, welches Tyrosinhydroxylase und/oder eine aromatische Aminosäure-Decarboxylase, von Glial abgeleiteten neurotrophen Faktor, von Gehirn abgeleiteten neurotrophen Faktor, Nervenwachstumsfaktor, Neurotrophin-3 und/oder Neurotrophin-4, Superoxiddismutase, Catalase und/oder Glutathionperoxidase,
eine GABA-Rezeptorisoform oder das GABA-synthetisierende Enzym, Glutaminsäuredecarboxylase, oder Adenosin A-1-Rezeptor, Glutamatdecarboxylase, GABA-A-Rezeptorisoformen, calciumabhängige Kaliumkanäle und/oder ATP-sensitive Kaliumkanäle, kodiert.

10. AAV-Vektor nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei der AAV-Vektor kein AAV-Gen in funktioneller Form umfaßt.

11. AAV-Vektor nach Anspruch 1, wobei der AAV-Vektor nur die invertierten terminalen Wiederholungen (inverted terminal repeats) von AAV beibehält.

12. AAV-Vektor nach Anspruch 1, zur Verwendung im Vorbeugen, Behandeln oder Verbessern einer genetisch bestimmten, prädisponierten oder affizierten Störung des Nervensystems durch Zuführen exogener DNA an bzw. in Zellen des Nervensystems, wobei die exogene DNA gewählt wird, so daß das Zuführen die genetisch bestimmte, prädisponierte oder affizierte Störung des Nervensystems vorbeugt, behandelt oder verbessert.

13. Verwendung eines adeno-assoziierten Virus-abgeleiteten Vektors (AAV-Vektor), welcher geeignet ist, eine nicht-pathogene latente adeno-assoziierte virale Infektion in einer Säugernervensystemzielzelle zu errichten, wobei der Vektor modifiziert ist, um eine DNA zu umfassen, die sowohl zu dem adeno-assoziierten Virus als auch zu der Säugerzielzelle exogen ist, und welcher frei von Helfervirus und Wildtypvirus ist, wobei die DNA ein therapeutisches Protein in funktioneller Verbindung mit einer Promotorsequenz kodiert, in der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung von Parkinsons Krankheit, anderen mit dem Verlust dopaminerger Neuronen verbundenen Krankheiten, Ischämie, komplexen partiellen Anfällen, Epilepsie, Gehirntrauma, amylotropher lateraler Sklerose und Gehirntumoren.

14. Verwendung nach Anspruch 13, wobei, in dem AAV-Vektor, die exogene DNA ein exprimierbares Gen umfaßt, und das Gen in der Zielzelle entweder konstitutiv oder unter regulierbaren Bedingungen exprimierbar ist.

15. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das exprimierbare Gen eine Kodiersequenz und einen mit der Kodiersequenz funktionell verbundenen regulierbaren Promotor umfaßt, wobei, wenn der Promotor aktiviert ist, ein Messenger-RNA-Transkript von der Kodiersequenz transkribiert wird.

16. Verwendung nach Anspruch 15, wobei der regulierbare Promotor die Expression nervensystemspezifisch macht.

17. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Expression neuronenspezifisch oder gliaspezifisch ist.

18. Verwendung nach Anspruch 16, wobei die Expression zentralnervensystemspezifisch ist.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die Expression spezifisch für eine oder mehrere der ZNS-Komponenten Rückenmark, Gehirnstamm, Cerebellum, Diencephalon oder Telencephalon ist.

20. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das exprimierbare Gen Thymidinkinase kodiert und die zu behandelnde Bedingung ein Gehirntumor ist.

21. Verwendung nach Anspruch 14, wobei das exprimierbare Gen Tyrosinhydroxylase und/oder eine aromatische Aminosäure-Decarboxylase;
von Glial abgeleiteten neurotrophen Faktor, vom Gehirn abgeleiteten neurotrophen Faktor, Nervenwachstumsfaktor, Neurotrophin-3 und/oder Neurotrophin-4;
Superoxiddismutase, Catalase und/oder Glutathionperoxidase;
eine GABA Rezeptorisoform oder das GABA-synthetisierende Enzym, Glutaminsäuredecarboxylase, oder

Adenosin A-1 Rezeptor, Glutamatdecarboxylase, GABA-A-Rezeptorisoformen, calciumabhängige Kaliumkanäle und/oder ATP-sensitive Kaliumkanäle, kodiert.

22. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 bis 21, wobei der AAV-Vektor kein AAV-Gen in funktioneller Form umfaßt.

23. Verwendung nach Anspruch 13, wobei der AAV-Vektor nur die invertierten terminalen Wiederholungen (inverted terminal repeats) von AAV beibehält.

24. Verwendung eines adeno-assoziierten Virus-abgeleiteten DNA-Vektors (AAV-Vektor), welcher modifiziert wurde, um eine DNA zu umfassen, die sowohl zu dem adeno-assoziiertem Virus als auch einer Säurenervensystemzielzelle exogen ist, und welche frei von Helfervirus ist, und die nur die Replikations- und Packsignale von AAV beibehält, und welche exprimierbare Gene umfaßt, die Tyrosinhydroxylase und aromatische Aminosäure-Decarboxylase kodieren, in der Herstellung eines Medikaments für die Behandlung von Parkinsons Krankheit, anderen mit dem Verlust von dopaminergen Neuronen verwandten Krankheiten, Ischämie, komplexen partiellen Anfällen, Epilepsie, Gehirntrauma, amylotrophischer lateraler Sklerose und Gehirntumoren.

Es folgen 6 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

FIG. 1

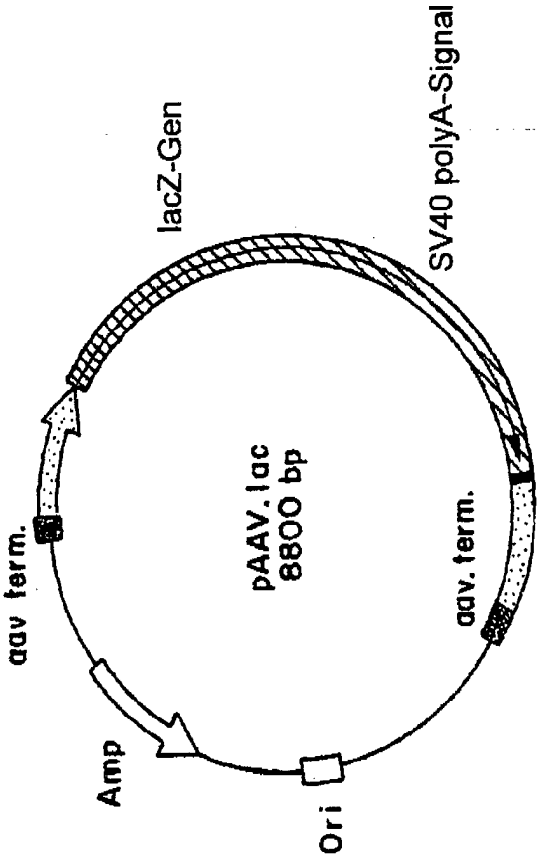


FIG.2

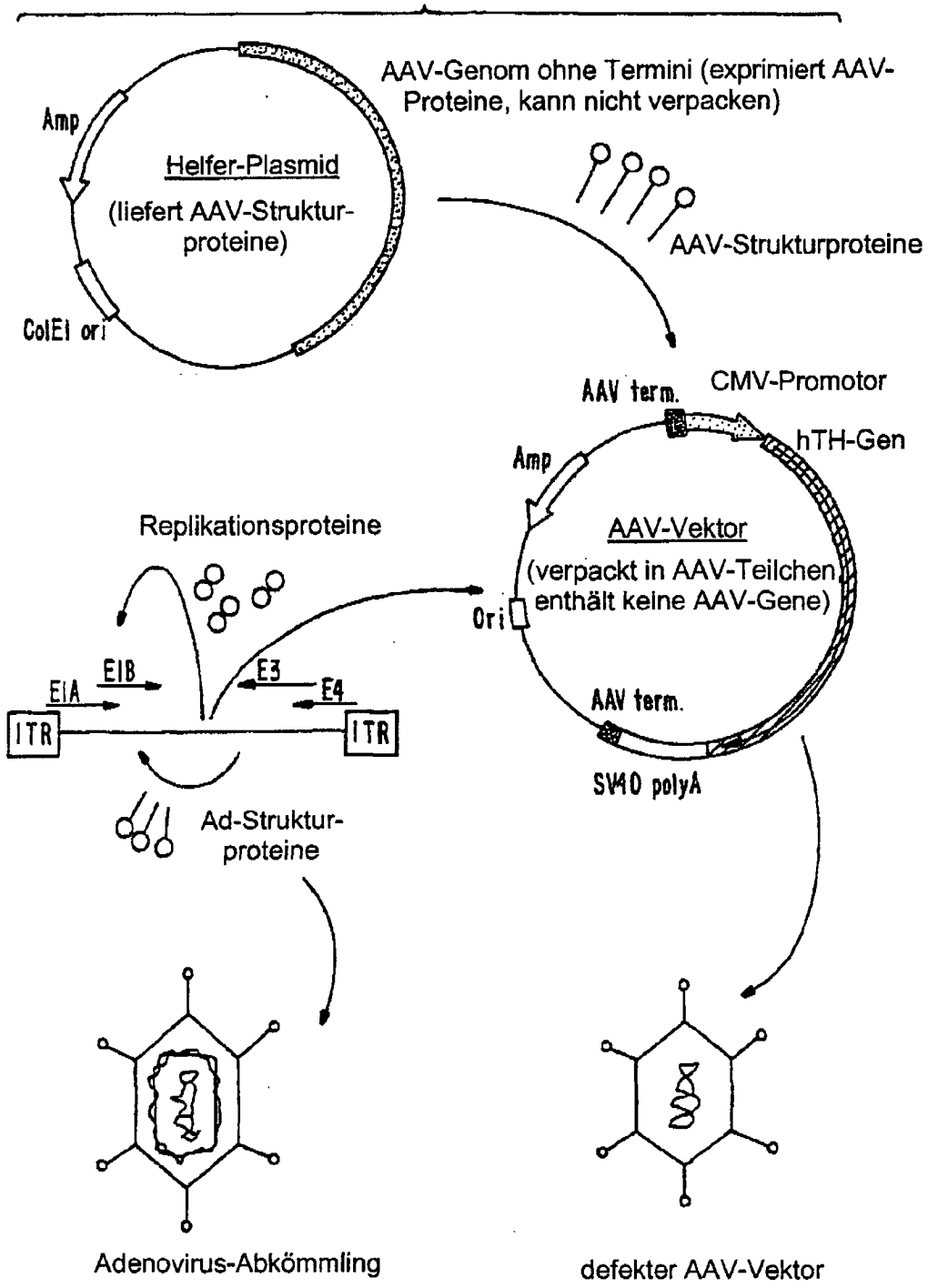

AAV-Genom ohne Termini (exprimiert AAV-Proteine, kann nicht verpacken)
Amp
Helfer-Plasmid
(liefert AAV-Struktur-proteine)
ColE1 ori
AAV-Strukturproteine
AAV term.
CMV-Promotor
hTH-Gen
Amp
AAV-Vektor
(verpackt in AAV-Teilchen enthält keine AAV-Gene)
Ori
AAV term.
SV40 polyA
Replikationsproteine
E1A
E1B
E3
E4
ITR
ITR
Ad-Struktur-proteine
Adenovirus-Abkömmling
defekter AAV-Vektor

FIG.3

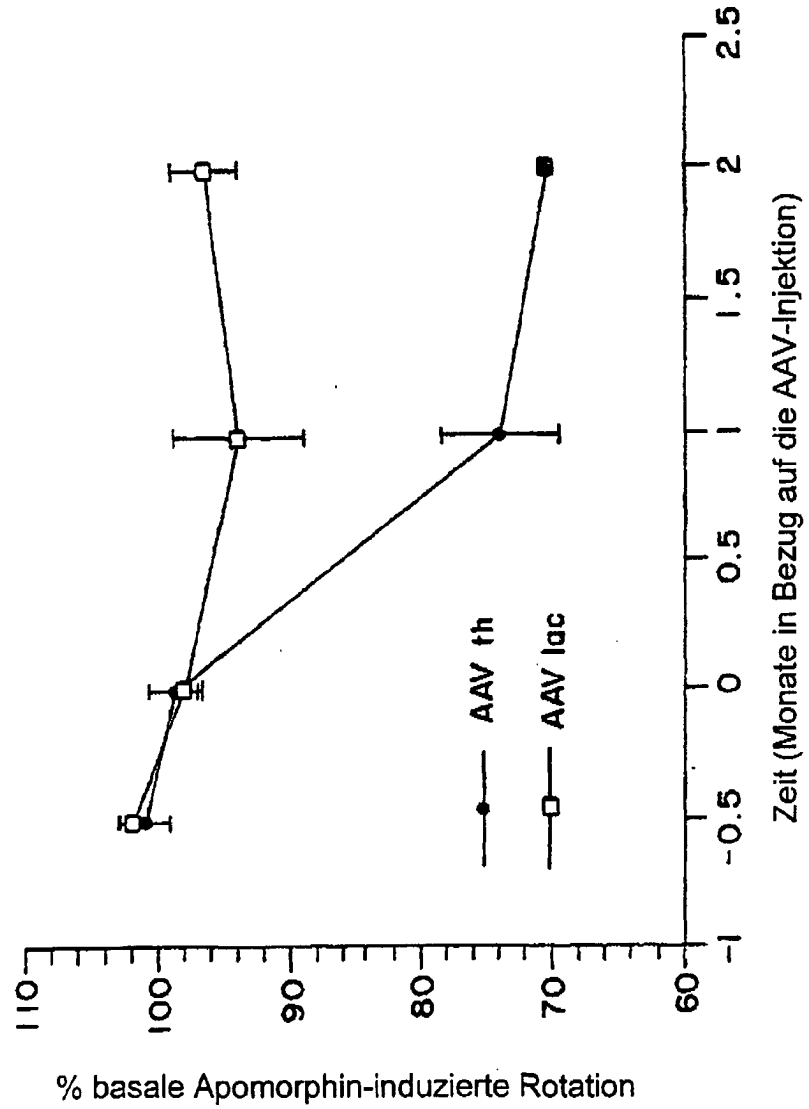

110
100
90
80
70
60
% basale Apomorphin-induzierte Rotation
-1
-0.5
0
0.5
1
1.5
2
2.5
Zeit (Monate in Bezug auf die AAV-Injektion)
AAV th
AAV lac

FIG. 4A

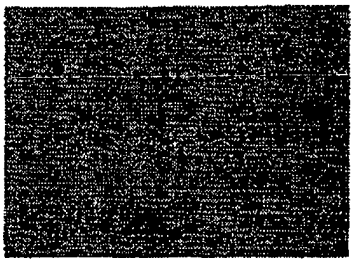


FIG. 4B

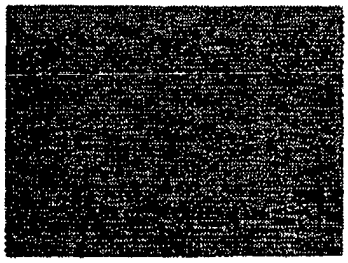


FIG. 4C

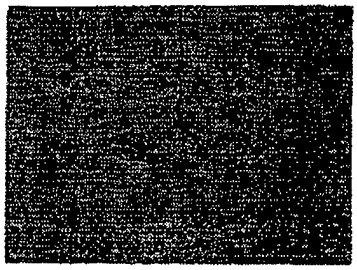


FIG. 4D

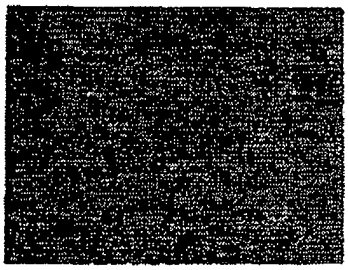


FIG. 4E

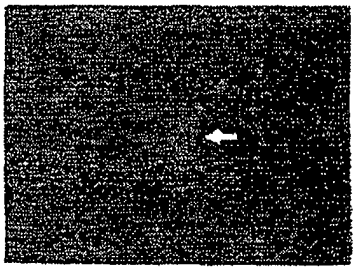


FIG. 4F

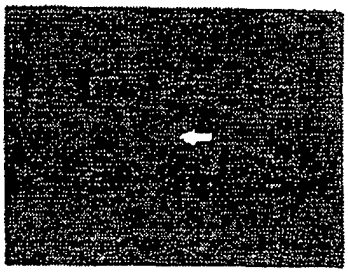


FIG.5

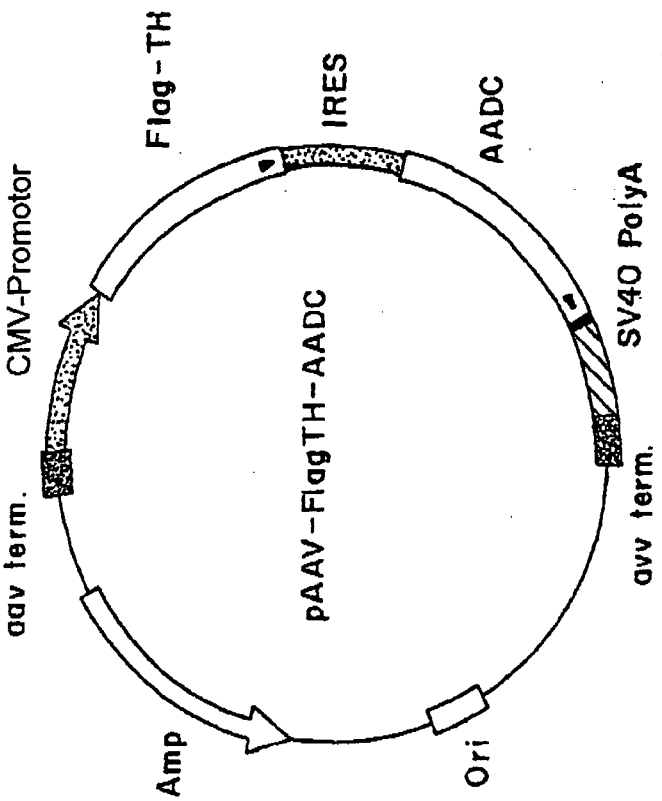
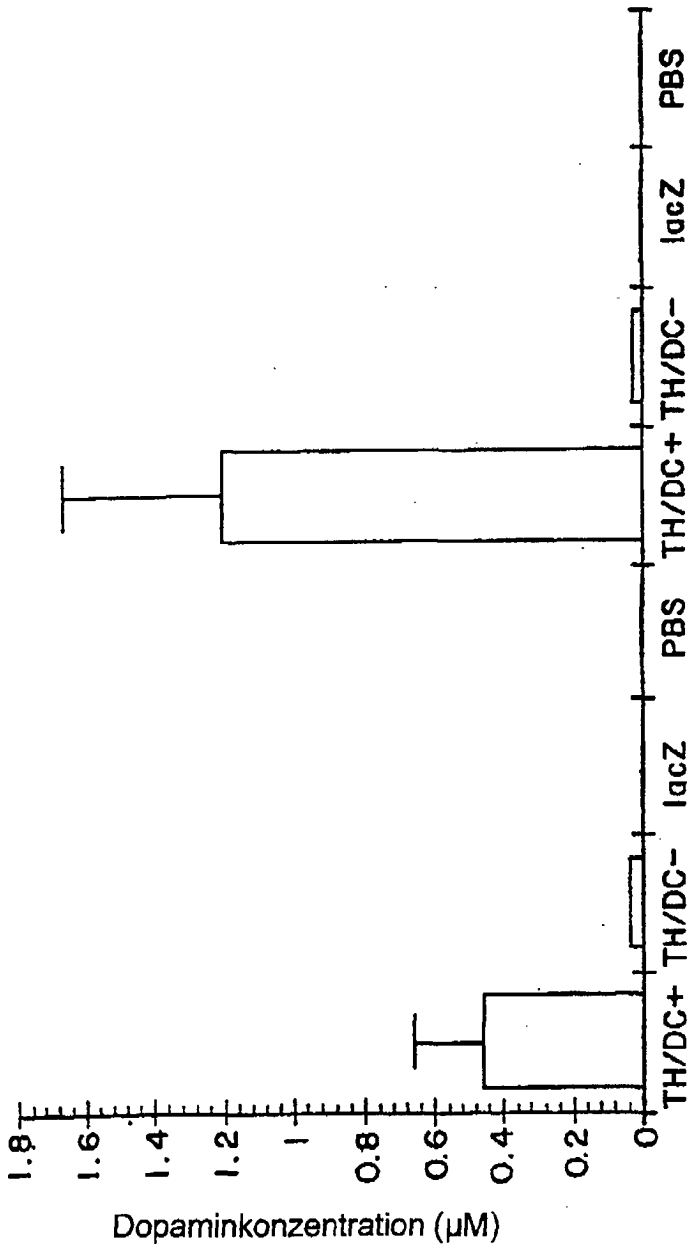

Flag-TH
IRES
AADC
SV40 PolyA
avv term.
Ori
Amp
aav term.
CMV-Promotor
pAAV-FlagTH-AADC

FIG.6


TH/DC+
TH/DC-
lacZ
PBS
TH/DC+
TH/DC-
lacZ
PBS
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
1.2
1.4
1.6
1.8
Dopaminkonzentration (µM)