



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 24 027 T2** 2004.10.28

(12)

Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 1 021 553 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 24 027.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB98/00074**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 900 570.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 98/030707**

(86) PCT-Anmeldetag: **12.01.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **16.07.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **26.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **19.05.2004**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **28.10.2004**

(51) Int Cl.⁷: **C12N 15/86**

**C12N 15/85, C12N 7/01, C12Q 1/68,
A61K 39/00, A61K 48/00**

(30) Unionspriorität:

9700411 10.01.1997 GB

(73) Patentinhaber:

BioVex Ltd., Oxford, GB

(74) Vertreter:

**Rechts- und Patentanwälte Lorenz Seidler Gossel,
80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**COFFIN, Robert,S., London W1P 6DP, GB;
LATCHMAN, David,S., Cleveland Street, London
W1P 6DP, GB**

(54) Bezeichnung: **EUKARYOTISCHE GENEXPRESSIONSKASSETTE UND DEREN VERWENDUNGEN**

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

Fachgebiet der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Genexpressionskassette. Die Expressionskassette kann zum Steuern einer Langzeit-Expression von heterologen Genen in eukaryontischen Zellen eingesetzt werden. Die Erfindung betrifft auch Verfahren zum Untersuchen der Genfunktion. Außerdem betrifft sie Vektoren, einschließlich viraler Stämme, die die Expressionskassette beinhalten.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Das Herpes-simplex-Virus (HSV) wurde aufgrund seines neurotrophischen Lebensstils und seiner Fähigkeit, in Neuronen für die Lebensdauer der Zelle latent zu bleiben, häufig als ein geeigneter Gen-Transportvektor für das Nervensystem vorgeschlagen. Diese einzigartige Fähigkeit hat nahegelegt, dass mit einer geeigneten Entwicklung eine lediglich einmalige Anwendung solch eines Vektorsystems einen lebenslangen therapeutischen Nutzen für bestimmte Zustände, z. B. die Parkinson-Krankheit, erbringen könnte, bei denen sich die Expression von Tyrosinhydroxylase oder GDNF im Gehirn als nützlich erwiesen hat.

[0003] Zwar wurde von unwirksam gemachten Herpes-Viren gezeigt, dass sie in vivo wirksam Gene zum Nervensystem und zu anderen Geweben transportieren, doch erfolgt eine Transkription der aus dem Herpes-Genom exprimierten heterologen Gene unweigerlich nur über kurze Zeit (< 1 Woche). Die Transkription wird abgebrochen, sobald das Herpes-Genom den während der Virus-Latenz vorliegenden transkriptionell inaktiven Zustand annimmt. Während zwar eine Herpes-Vektor-DNA in der behandelten Zelle möglicherweise für die Lebensdauer jener Zelle verbleibt, würde sich ein therapeutischer Nutzen nur für kurze Zeit ergeben, da das heterologe Gen, das zwar vorhanden ist, gewöhnlich nicht transkribiert wird.

[0004] Daraus folgt, dass, wenn Promotorsysteme entwickelt werden könnten, die während der Latenz aktiv blieben, das volle Potential der Herpes-Virus-Vektoren entfaltet werden würde, da der therapeutische Nutzen während der viralen Latenz anhielte. Eine weitere erwünschte Eigenschaft solcher Promotoren wäre, dass sie lediglich in den zu behandelnden Zelltypen, d. h. Neuronen oder Subsets von Neuronen oder anderen spezifischen Zelltypen, eine Aktivität erbrächten, was die unzweckmäßige Expression eines potentiell therapeutischen Gens, die in einigen Fällen schädigend sein könnte, verhindern würde. Die "Gentherapie" wäre daher auf die zu behandelnden Zielzellen beschränkt.

[0005] Herpes-simplex-Viren, die Fieberbläschen (HSV1) oder Genitalherpes (HSV2) verursachen, infizieren die axonalen Endigungen sensibler Neuronen durch Abschürfungen auf der Haut- oder Schleimhautoberfläche, woraufhin sie zum Kern im Zellkörper wandern, wo sich entweder eine latente Infektion festsetzt oder eine lytische Replikation stattfindet. Die Faktoren, die die Entscheidung für eine latente oder eine lytische Infektion beeinflussen, sind nicht gut verstanden. Im Falle eines unwirksam gemachten Virus-Vektors ist jedoch lediglich der latente Weg möglich.

[0006] Während der Latenz ist das Herpes-Genom weitgehend transkriptionell inaktiv. Allerdings wird eine kleine Region innerhalb der langen Repeats des Genoms transkribiert, was die Latenz-assoziierten Transkripte (LATs) erzeugt, die hierin für HSV1 beschrieben sind, wenn auch HSV2 ähnlich ist. Die LATs unterteilen sich in zwei Klassen, die colinear sind, nämlich ein großes Transkript von etwa 8 Kilobasen (Kb) von sehr geringem Vorkommen, das von einem TATA-enthaltenden Promotor transkribiert wird (siehe Coffin und Latchman, 1996; hierin als LAT P1 bezeichnet), und kleinere Transkripte von hohem Vorkommen und etwa 2 Kb und 1,5 Kb Länge, die für „nested stable introns“, die vom größeren Transkript abgespleißt sind, gehalten werden. Das 1,5-Kb-Transkript ist nur in Neuronen nachweisbar, wobei das Vorkommen beider während der Latenz zunimmt. Eine zweite Region mit sehr schwacher Promotor-Aktivität (siehe Goins et al., 1994; hierin bezeichnet als LAT P2) wurde zwischen LAT P1 und dem Start des 2-kb-LAT identifiziert, was einige annehmen lässt, dass sie unter bestimmten Umständen als ein separates Transkript exprimiert werden könnte.

[0007] Die Verwendung von LAT-Promotor-Regionen zum Steuern der Langzeit-Expression von in das virale Genom insertierten heterologen Genen zeigte wenig Erfolg. Die Verwendung des LAT-P1-Promotors ergibt kurzfristig hohe Expressionsmengen, doch wird die Transkription nach nur wenigen Tagen schnell abgebrochen. Die Insertion heterologer Gene an verschiedenen Positionen nach dem endogenen LAT-P2-Promotor ergibt eine Langzeit-Aktivität, doch ist diese Aktivität sehr schwach (siehe Coffin und Latchman, 1996). In ähnlicher Weise wurde von einem Konstrukt, das außerhalb der LAT-Region (in der Glykoprotein-C-Region) insertiert wurde und das aus einem LAT-P2-Promotor, verknüpft mit einer lacZ-codierenden Region, eine Langzeit-Aktivität in vitro in den Spinalganglien berichtet, doch ist diese Aktivität ebenfalls sehr schwach (z. B. Goins et al., 1994).

Zusammenfassung der Erfindung

[0008] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Expressionskassette, die eine LAT-P2-Region des Herpes simplex-Virus, einen Promotor und ein heterolo-

ges Gen in funktionsfähiger Verknüpfung in dieser Reihenfolge umfasst. Die vorliegende Erfindung basiert auf der überraschenden Feststellung, dass die LAT-P2-Region einem angrenzenden Promotoren eine Langzeit-Aktivität übertragen kann. Bedeutsamerweise führt die Verwendung der LAT-P2-Region und eines angrenzenden Promotoren zum Steuern der Expression eines heterologen Gens nicht nur zu einer Langzeit-Expression des heterologen Gens, sondern auch zu hohen Expressionsmengen. Ein einzelnes LAT-P2-Element kann auch zum Steuern einer Langzeit-Expression von Promotor-Paaren eingesetzt werden.

[0009] Hierbei ist ein zentral lokalisiertes LAT-P2-Element durch zwei Promotoren flankiert, die von ihm in gegenläufige Richtungen zeigen, so dass zwei heterologe Gene funktionsfähig an diese Promotoren geknüpft werden können, was zur Langzeit-Expression beider Gene führt.

[0010] Unsere Hypothese ist die, dass die Region des HSV-Genoms, die zuvor als der LAT-P2- (Coffin und Latchman, 1996) oder LAP-2-Promotor (Goins et al., 1994) bezeichnet wurde, nicht selbst eine Promotor-Aktivität während der Latenz schafft. Stattdessen schafft sie eine veränderte DNA-Struktur in den umgebenden Regionen, was eine fortgesetzte Transkription von den nahegelegenen Promotoren in einem ansonsten transkriptionell inaktiven latenten Genom erlaubt.

[0011] Nukleinsäure-Konstrukte, einschließlich viraler Stämme, insbesondere HSV-Stämme, welche die Expressionskassette umfassen, können zum Beispiel zum Transport von therapeutischen Genen bei Methoden zur Behandlung von Erkrankungen oder von Schädigungen zum Beispiel des Nervensystems, einschließlich der Parkinson-Krankheit, Rückenmarksverletzungen oder Hirnschlägen, oder Erkrankungen des Auges, Herzens oder der Skelettmuskeln, oder Malignitäten, oder zum Transport von Genen, die für spezifische Antigene codieren, für Impfzwecke verwendet werden.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft auch Methoden zum Untersuchen der Funktion von Genen in eukaryontischen Zellen, insbesondere Säugerzellen, zum Beispiel zum Identifizieren von Genen, die zelluläre Dysfunktionen komplementieren, oder zum Untersuchen der Wirkung des Exprimierens mutanter Gene in Wildtyp- oder mutanten Zellen. Die Methoden der vorliegenden Erfindung können insbesondere für die funktionelle Untersuchung von an Krankheiten beteiligten Genen angewendet werden.

[0013] Demgemäß wird mit der vorliegenden Erfindung eine Expressionskassette bereitgestellt, die eine HSV-Latenz-assoziierte Transkript-P2-Region, einen Promotor und ein heterologes Gen in funktions-

fähiger Kopplung in dieser Reihenfolge umfasst. Vorzugsweise ist der Promotor ein nicht-Latenz-assoziiertes Transkript-Promotor. Bevorzugter ist der Promotor ein viraler Promotor oder Säuger-Promotor. Bevorzugt ist der Promotor ein viraler Promotor oder Säuger-Promotor, der die Expression des heterologen Gens in einer Säugerzelle, vorzugsweise einer Zelle des zentralen oder peripheren Nervensystems, oder einer Zelle des Auges, Herzens oder Skelettmuskels, bevorzugter einer Zelle des zentralen oder peripheren Nervensystems, zulässt. Der Promotor kann auch induzierbar und/oder Gewebe-spezifisch sein.

[0014] Die Expressionskassette, oder der Vektor, vorzugsweise ein viraler Stamm, bevorzugter ein HSV-Stamm, welcher die Expressionskassette der Erfindung umfasst, kann daher zum Transportieren eines heterologen Gens zu einer Säugerzelle verwendet werden, wo es exprimiert wird. Solche Expressionskassetten und Vektoren sind bei einer Vielzahl von Anwendungen nützlich, zum Beispiel in der Gentherapie, als Impfstoffe, bei in vitro- oder in vivo-Analysemethoden oder zur Untersuchung der Genfunktion.

[0015] Der Begriff heterologes Gen soll jegliches Gen umfassen, das nicht im HSV-Genom zu finden ist. Das heterologe Gen kann eine beliebige allele Variante eines Wildtyp-Gens sein oder kann ein mutantes Gen sein. Das heterologe Gen codiert vorzugsweise für ein Polypeptid von therapeutischem Nutzen, einschließlich Polypeptide, die zytotoxisch sind oder zum Umwandeln einer Vorläufer-Prodrug zu einer zytotoxischen Verbindung fähig sind.

[0016] Die Gentherapie und andere therapeutische Anwendungen können durchaus die Verabreichung multipler Gene erfordern. Die Expression multipler Gene kann für die Behandlung einer Vielzahl von Zuständen von Vorteil sein, z. B. unter Anwendung multipler neurotrophischer Faktoren. HSV eignet sich in einzigartiger Weise, da es nicht die begrenzten Verpackungsmöglichkeiten anderer viraler Vektorsysteme aufweist. Daher können multiple heterologe Gene innerhalb seines Genoms untergebracht werden. Es gibt zum Beispiel mindestens zwei Wege, mittels derer dies erreicht werden könnte. Zum Beispiel könnte mehr als eine Expressionskassette der Erfindung in einen bestimmten HSV-Stamm eingeführt werden. Jede Expressionskassette kann ein heterologes Gen umfassen. Ein alternativer Ansatz wäre die Verwendung von Promotor-Paaren (dieselben oder verschiedene Promotoren), die in gegenläufigen Orientierungen vom zentral lokalisierten LAT-P2-Element vorliegen, wobei diese Promotoren jeweils die Expression eines heterologen Gens (desselben oder verschiedener heterologer Gene) steuern.

[0017] So wird mit der vorliegenden Erfindung auch

eine Expressionskassette bereitgestellt, die außerdem einen zweiten Promotoren und ein zweites heterologes Gen in funktionsfähiger Verknüpfung in der Reihenfolge an die HSV-LAT-P2-Region und in gegenläufiger Orientierung zum ersten Promotoren und ersten heterologen Gen umfasst. Der zweite Promotor kann derselbe oder ein unterschiedlicher zum ersten Promotor sein. Das zweite heterologe Gen kann gleich oder verschieden vom ersten heterologen Gen sein. Bei einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist der erste Promotor ein Nicht-LAT-Promotor und der zweite Promotor ein LAT-P1-Promotor.

[0018] Zusammenfassend wird mit dieser Anordnung ein Paar von Promotor/heterologen Gen-Konstrukten in gegenläufigen Orientierungen, die eine einzelne LAT-P2-Region flankieren, bereitgestellt, was die Langzeit-Expression von Genpaaren erlaubt, die gleich oder verschieden sein können und die gesteuert wird durch gleiche oder verschiedene Promotoren.

[0019] Auch ein kombinatorischer Ansatz könnte angewendet werden, bei dem ein oder mehrere des ersten Typs der Expressionskassette in das Genom des HSV-Stamms, zusammen mit ein oder mehreren des zweiten Typs der Expressionskassette, eingeführt wird. Folglich und wo geeignet sollten Bezugnahmen auf "die Expressionskassette" so verstanden werden, dass sie multiple Expressionskassetten beider Arten umfassen.

[0020] Die Expressionskassette der vorliegenden Erfindung kann auch bei Methoden zum Untersuchen der Funktion von Genen in eukaryontischen Zellen, vorzugsweise Säugerzellen, zum Beispiel beim Identifizieren von Genen, die zelluläre Dysfunktionen komplementieren, oder Untersuchen der Wirkung des Exprimierens mutanter Gene in Wildtyp- oder mutanten Säugerzellen, verwendet werden. Die Methoden der vorliegenden Erfindung können insbesondere für die funktionelle Untersuchung von an Krankheiten beteiligten Genen angewendet werden.

[0021] Mit der Erfindung wird auch eine Methode zum Erzeugen eines viralen Stamms, vorzugsweise eines HSV-Stamms, umfassend eine Expressionskassette der Erfindung, bereitgestellt, welche Methode das Einführen einer Expressionskassette der Erfindung in das Genom des Virusstamms vorzugsweise durch homologe Rekombination umfasst.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

A. Expressionskassette – LAT-P2-Region, Promotor(en), heterologe(s) Gen(e)

[0022] Die Expressionskassette der Erfindung besteht im Wesentlichen aus einer LAT-P2-Region, einem Promotor und einem heterologen Gen in funkti-

onsfähiger Verknüpfung in dieser Reihenfolge. Der Begriff "funktionsfähig verknüpft" bezieht sich auf eine Juxtaposition, wobei die Komponenten in einer Beziehung stehen, die ihnen eine Funktion in ihrer vorgesehenen Weise erlaubt. So wird zum Beispiel ein Promotor in funktionsfähiger Knüpfung an eine heterologe Gensequenz in solcher Weise ligiert, dass die Expression des heterologen Gens unter Bedingungen erreicht wird, die mit der Aktivierung der Expression durch den Promotor kompatibel sind.

[0023] Die Expressionskassette kann ferner einen zweiten Promotor und ein zweites heterologes Gen in funktionsfähiger Verknüpfung in dieser Reihenfolge an die HSV-LAT-P2-Region und in der gegenläufigen Orientierung zum ersten Promotor und ersten heterologen Gen umfassen, wobei der zweite Promotor und das zweite heterologe Gen gleich oder verschieden vom ersten Promotor und ersten heterologen Gen sind. So flankiert ein Paar von Promotor/heterologes Gen-Konstrukten in gegenläufigen Orientierungen eine einzelne LAT-P2-Region, was die Langzeit-Expression der Paare von heterologen Genen, die gleich oder verschieden sein können und die durch dieselben oder verschiedene Promotoren gesteuert wird, ermöglicht. Weiterhin kann das Produkt des ersten heterologen Gens die Expression des zweiten heterologen Gens (oder umgekehrt) unter geeigneten physiologischen Bedingungen regulieren.

[0024] Der Begriff "Langzeit-Expression" soll die Expression eines heterologen Gens in einer mit einem Herpes-simplex-Virus der Erfindung selbst nach Erreichen einer Latenz der durch Herpes-simplex-Virus infizierten Zelle bedeuten. Vorzugsweise erfolgt dies für mindestens zwei Wochen, bevorzugter mindestens ein oder zwei Monate nach der Infektion, sogar noch bevorzugter für die Lebensdauer der Zelle.

[0025] Die Expressionskassette kann unter Anwendung routinemäßiger Kloniertechniken konstruiert werden, wie sie Fachleuten des Gebiets bekannt sind (siehe zum Beispiel Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning – a laboratory manual; Cold Spring Harbor Press).

1. LAT-P2-Region

[0026] Die LAT-P2-Region ist hierin als HSV1-Nukleotide 118.866–120.219 definiert (GenBank HE1CG: von PstI-BstXI-Stellen), die Fragmente oder Derivate dieser Region, einschließlich homologer Regionen von HSV2, definiert, die zur Bereitstellung einer Langzeit-Expression der heterologen Gene in der Expressionskassette dieser Erfindung fähig sind.

2. Promotor

[0027] Promotor meint einen transkriptionellen Promotor, der nicht aus der LAT-P2-Region von HSV

stammt. Der Begriff Promotor ist im Fachgebiet wohl bekannt und umfasst Nukleinsäure-Regionen, wobei er hinsichtlich Größe und Komplexität von minimalen Promotoren bis zu Promotoren reicht, die stromaufwärts gelegene Elemente und Enhancer umfassen. Der Promotor ist funktionsfähig geknüpft an und stromabwärts der LAT-P2-Region gelegen. Auch ist eine funktionsfähige Knüpfung in der umgekehrten Orientierung eines zusätzlichen Promotors stromaufwärts der LAT-P2-Region möglich, so dass die LAT-P2-Region beiden Promotoren eine langfristige Aktivität verleiht.

[0028] Der Promotor wird gewählt aus Promotoren, die in Säuger-, vorzugsweise humanen Zellen, funktionell sind. Der Promotor kann von Promotorsequenzen viraler oder eukaryontischer Gene abgeleitet sein. Zum Beispiel kann er ein Promotor sein, der aus dem Genom einer Zelle stammt, in der die Expression des heterologen Gens stattfinden soll, vorzugsweise einer Zelle des zentralen oder peripheren Säuger-Nervensystems. Bezüglich eukaryontischer Promotoren kann es sich um Promotoren handeln, die in einer überall vorkommenden Weise (wie etwa Promotoren von α -Actin, β -Actin, Tubulin) oder alternativ einer Gewebe-spezifischen Weise agieren (wie etwa Promotoren der Gene für Pyruvatkinase). Promotoren, die lediglich in bestimmten neuronalen Zelltypen aktiv sind, sind besonders bevorzugt (z. B. die Tyrosinhydroxylase-(TH)-, L7- oder Neuronen-spezifischen Enolase-(NSE)-Promotoren). Sie können auch Promotoren sein, die auf spezifische Reize reagieren, zum Beispiel Promotoren, die an Steroidhormon-Rezeptoren binden. Virale Promotoren können ebenfalls verwendet werden, zum Beispiel der murine Moloney-Leukämie-Virus-Long-Terminal-Repeat-(MMLV LTR)-Promotor, der HSV1- oder HSV2-LAT-P1-Promotor, der Rous-Sarkom-Virus-(RSV)-LTR-Promotor oder der humane Cytomegalovirus-(CMV)-IE-Promotor.

[0029] Es mag auch von Vorteil sein, wenn die Promotoren induzierbar sind, so dass die Expressionshöhen des heterologen Gens während der Lebensdauer der Zelle reguliert werden können. Induzierbar bedeutet, dass die mittels des Promotors erzielten Expressionsmengen reguliert werden können. Bei einer bevorzugten Ausführungsform zum Beispiel, bei der zwei Promotoren in gegenläufigen Orientierungen eine einzelne LAT-P2-Region flankieren, würde ein Promotor einen Promotor umfassen, der auf das Tet-Repressor/VP16-Transkriptionsaktivator-Fusionsprotein reaktionsfähig ist, wie zuvor beschrieben (Gossen und Bujard, 1992; Gossen et al., 1995) und das heterologe Gen steuert, dessen Expression reguliert werden soll. Der zweite Promotor würde einen starken Promotoren (z. B. den CMV-IE-Promotor) umfassen, der die Expression des Tet-Prepressor/VP16-Fusionsproteins steuert. Daher hinge bei diesem Beispiel die Expression des ersten heterolo-

gen Gens vom Vorhandensein oder der Abwesenheit von Tetracyclin ab.

[0030] Darüber hinaus kann jeder dieser Promotoren durch die Hinzufügung weiterer regulatorischer Sequenzen, zum Beispiel von Enhancer-Sequenzen, modifiziert werden. Chimäre Promotoren können ebenfalls verwendet werden, die Sequenzelemente von zwei oder mehreren der oben beschriebenen unterschiedlichen Promotoren umfassen.

3. Heterologe Gene

[0031] Der Begriff "Nukleinsäure" beinhaltet Ribonukleinsäure, Desoxyribonukleinsäure und deren Analoga. Der Begriff heterologes Gen umfasst jegliches andere Gen als die im HVS-Genom vorhandenen Gene. Das heterologe Gen kann jegliche allele Variante eines Wildtyp-Gens sein oder kann ein mutantes Gen sein. Der Begriff "Gen" soll Nukleinsäure-Sequenzen abdecken, die zumindest transkribierbar sind. Folglich sind für mRNA, tRNA und rRNA codierende Sequenzen in dieser Definition enthalten. Die Sequenzen können in Sense- oder Antisense-Orientierung bezüglich des Promotors vorliegen. Antisense-Konstrukte können zum Hemmen der Expression eines Gens in einer Zelle gemäß wohlbekannter Techniken verwendet werden. Für mRNA codierende Sequenzen umfassen wahlweise einige oder alle der 5'- und/oder 3'-transkribierten, doch untranslatierten flankierenden Sequenzen, die natürlich, oder anderweitig, mit der translatierten codierenden Sequenz assoziiert sind. Er kann wahlweise außerdem die assoziierten transkriptionellen Kontrollsequenzen umfassen, die normalerweise mit den transkribierten Sequenzen assoziiert sind, zum Beispiel transkriptionelle Stopp-Signale, Polyadenylierungsstellen und stromabwärts gelegene Enhancer-Elemente.

[0032] Das heterologe Gen kann zum Beispiel für Proteine codieren, die an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind, zum Beispiel Wachstumsfaktoren, einschließlich neurotrophischer Wachstumsfaktoren (wie etwa vom Hirn stammender neurotrophischer Faktor, von Gliazellen stammender neurotrophischer Faktor, NGF, NT3, NT4 und NT5), Zytokine (wie etwa α -, β - oder γ -Interferon, Interleukine einschließlich IL-1, IL-2, Tumornekrosefaktor oder insulinartige Wachstumsfaktoren I oder II), Proteinkinasen (wie etwa MAP-Kinase), Proteinphosphatasen und zelluläre Rezeptoren für die obengenannten. Das heterologe Gen kann auch für Enzyme codieren, die an den zellulären Stoffwechselwegen beteiligt sind, zum Beispiel Enzyme, die an der Aminosäure-Biosynthese oder -Abbau (wie etwa Tyrosinhydroxylase), Purin- oder Pyrimidin-Biosynthese oder -Abbau, und der Biosynthese oder dem Abbau von Neurotransmittern, wie etwa Dopamin, oder Protein, das an der Regulation dieser Wege, zum Beispiel Proteinkinasen und

Phosphatasen, beteiligt sind. Das heterologe Gen kann auch für Transkriptionsfaktoren oder Proteine codieren, die an ihrer Regulation beteiligt sind, zum Beispiel Elemente der Brn3-Familie oder „Pocket“-Proteine der Rb-Familie, wie etwa Rb oder p107, Membranproteine (wie etwa Rhodopsin), Strukturproteine (wie etwa Dystrophin) oder Hitzeschock-Proteine, wie etwa hsp70.

[0033] Vorzugsweise codiert das heterologe Gen für ein Polypeptid von therapeutischem Nutzen, oder dessen Funktion an einem krankhaften Prozess beteiligt sein kann. Zum Beispiel können von den oben beschriebenen Proteinen Tyrosinhydroxylase und Gliazell-abgeleiteter neurotrophischer Faktor in der Behandlung der Parkinson-Krankheit verwendet werden, kann Rhodopsin in der Behandlung von Augenleiden verwendet werden, kann Dystrophin zur Behandlung von muskulärer Dystrophie verwendet werden, und können Hitzeschockproteine zur Behandlung von Störungen des Herzens und Gehirns in Verbindung mit ischämischer Belastung verwendet werden. Polypeptide von therapeutischem Nutzen können auch zytotoxische Polypeptide wie Ricin umfassen; oder Enzyme, die zur Umwandlung einer Vorläufer-Prodruk zu einer zytotoxischen Verbindung zur Verwendung zum Beispiel bei Methoden einer „virus-directed enzyme prodrug therapy“ oder „gene-directed enzyme prodrug therapy“ fähig sind. Im letzteren Fall mag es erwünscht sein, sicherzustellen, dass das Enzym eine geeignete Signal-Sequenz zum Richten auf die Zelloberfläche aufweist, vorzugsweise eine Signal-Sequenz, die dem Enzym das Freiliegen auf der äußeren Zelloberfläche bei gleichzeitigem Verankertbleiben an der Zellmembran ermöglicht. Zu geeigneten Enzymen zählen bakterielle Nitroreduktase wie *E. coli*-Nitroreduktase, wie beschrieben in WO93/08288, oder Carboxypeptidase, insbesondere Carboxypeptidase CPG2, wie beschrieben in WO88/07378. Weitere Enzyme sind zu finden unter Bezugnahme auf EP-A-415731. Zu geeigneten Prodrugs zählen Mustard-Stickstoff-Produgs und andere Verbindungen, wie beschrieben in WO88/07378, WO89/10140, WO90/02729 und WO93/08288, die hierin durch Bezugnahme mitaufgenommen sind.

[0034] Heterologe Gene können auch für antigene Polypeptide zur Verwendung als Impfstoffe codieren. Vorzugsweise sind diese antigenen Polypeptide von pathogenen Organismen, zum Beispiel Bakterien oder Viren, oder von Tumoren abgeleitet.

[0035] Heterologe Gene können auch Marker-Gene umfassen (die zum Beispiel für β -Galaktosidase oder grün fluoreszierendes Protein codieren) oder Gene, deren Produkte die Expression anderer Gene regulieren (zum Beispiel transkriptionelle regulatorische Faktoren einschließlich des oben beschriebenen Tet-Repressor/VP16-Transkriptionsaktivator-Fusi-

onsproteins).

B. Vektoren

[0036] Die Expressionskassette kann in Form eines Nackte Nukleinsäure-Konstrukts verwendet werden. Alternativ kann sie in eine Vielfalt von Nukleinsäure-Vektoren eingeführt werden. Zu solchen Vektoren zählen Plasmide und virale Vektoren, bevorzugt HSV-Vektoren. Die Vektoren können außerdem die Expressionskassette flankierende Sequenzen enthalten, was Sequenzen umfasst, die zu eukaryontischen Genomsequenzen, vorzugsweise Säuger-Genomsequenzen oder viralen Genomsequenzen, homolog sind. Dies ermöglicht die Einführung der Expressionskassette in das Genom eukaryontischer Zellen oder Viren mittels homologer Rekombination. Speziell ein Plasmid-Vektor, der die durch virale Sequenzen, vorzugsweise HSV1- oder HSV2-Sequenzen, flankierte Expressionskassette umfasst, kann zur Präparierung eines viralen Vektors, vorzugsweise eines HSV-Vektors, verwendet werden, der geeignet ist, die Expressionskassette zu einer Säugerzelle zu transportieren. Dies ist nachstehend in weiteren Einzelheiten für das Herpes-simplex-Virus beschrieben. Die anzuwendenden Techniken jedenfalls sind den Fachleuten des Gebiets wohlbekannt und eignen sich auch für andere Viren, wie etwa Adenoviren. Zu weiteren Beispielen geeigneter viraler Vektoren zählen solche, die zur Integrierung ihrer Genome in das Wirtszell-Genom fähig sind, zum Beispiel Retroviren, einschließlich Lentiviren und Adeno-assoziierte Viren.

C. Herpes-simplex-Virus-Vektoren

1. Virale Stämme

[0037] Die HSV-Stämme der Erfindung, die die Expressionskassette umfassen, können zum Beispiel von HSV1- oder HSV2-Stämmen oder deren Derivaten stammen, vorzugsweise HSV1. Zu den Derivaten zählen Intertyp-Rekombinante, die die DNA von HSV1- und HSV2-Stämmen enthalten. Die Derivate weisen bevorzugt mindestens 70 Sequenzhomologie entweder zum HSV1- oder zum HSV2-Genom auf, bevorzugter mindestens 90%, sogar noch bevorzugter 95%.

[0038] Die Verwendung der HSV-Stämme bei therapeutischen Verfahren erfordert das Abschwächen der Stämme, so dass sie keinen lytischen Zyklus entfalten können. Insbesondere dann, wenn HSV-Vektoren in der Gentherapie am Menschen eingesetzt werden sollen, sollte die Expressionskassette vorzugsweise in ein essentielles Gen inseriert werden. Dies liegt daran, dass dann, wenn ein Vektor-Virus auf ein Wildtyp-Virus trifft, die Übertragung eines heterologen Gens auf das Wildtyp-Virus durch Rekombination stattfinden könnte. Solange jedoch das heterologe

Gen in ein essentielles Gen insertiert ist, würde die rekombinatorische Übertragung auch das essentielle Gen im Empfänger-Virus deletieren und das "Entkommen" des heterologen Gens in die Replikations-kompetente Wildtyp-Viruspopulation verhindern.

[0039] Zum Erhalt des HSV-Stamms der vorliegenden Erfindung können abgeschwächte Stämme verwendet werden, wie hierin lediglich in Form von Beispielen angegeben, einschließlich Stämme, die Mutationen entweder in ICP34.5 oder ICP27 aufweisen, zum Beispiel Stamm 1716 (MacLean et al., 1991), Stämme R3616 und R4009 (Chou und Roizman, 1992) und R90 (Chou et al., 1994), die alle Mutationen in ICP34.5 aufweisen, und d27-I (Rice und Knipe, 1990), der eine Deletion in ICP27 aufweist. Alternative Stämme, die für ICP4, ICP0, ICP22, ICP6, ICP47, vhs oder gH deletiert sind, mit einer inaktivierenden Mutation in VMW65, oder mit einer Kombination der obigen, können ebenfalls zur Erzeugung der HSV-Stämme der Erfindung verwendet werden.

[0040] Die zur Beschreibung der verschiedenen HSV-Gene verwendete Terminologie ist die, die bei Coffin und Latchman, 1996 zu finden ist.

2. Komplementierende Zelllinien

[0041] Bei ICP27 defekte HSV-Viren werden in einer ICP27 exprimierenden Zelllinie, zum Beispiel V27-Zellen (Rice und Knipe, 1990), 2-2-Zellen (Smith et al., 1992) oder B130/2-Zellen (siehe die Beispiele), bevorzugt B130/2-Zellen, vermehrt.

[0042] ICP27-exprimierende Zelllinien können durch Cotransfizieren von Säugerzellen, zum Beispiel den Vero- oder BHK-Zellen, mit einem Vektor, vorzugsweise einem Plasmid-Vektor, erzeugt werden, der ein funktionelles HSV ICP27-Gen umfasst, das in den Zellen exprimierbar ist, und einem Vektor, vorzugsweise einem Plasmid-Vektor, der für einen selektierbaren Marker, zum Beispiel die Neomycin-Resistenz, codiert. Die Klone, die den selektierbaren Marker besitzen, werden dann unter Anwendung von den Fachleuten des Gebiets bekannten Methoden (siehe zum Beispiel bei Rice und Knipe, 1990) weiter gescreent, um zu bestimmen, welche Klone ebenfalls funktionelles ICP27 exprimieren, zum Beispiel ausgehend von ihrer Fähigkeit, das Wachstum von ICP27-mutanten HSV-Stämmen zu unterstützen.

[0043] Zelllinien, die keine Reversion eines ICP27-mutanten HSV-Stamms zu einem Stamm mit funktionellem ICP27 zulassen, werden wie oben beschrieben erzeugt, wobei sichergestellt wird, dass der Vektor, der ein funktionelles ICP27-Gen umfasst, keine Sequenzen enthält, die mit Sequenzen überlappen (d. h. homolog sind), die im ICP27-mutanten Virus verbleiben.

[0044] Dort, wo HSV-Stämme der Erfindung inaktivierende Modifikationen in anderen essentiellen Genen, zum Beispiel ICP4, umfassen, werden komplementierende Zelllinien außerdem ein funktionelles HSV-Gen umfassen, welches das modifizierte essentielle Gen in derselben Weise wie für ICP27 beschrieben komplementiert.

3. Mutationsmethoden

[0045] HSV-Gene können mittels mehrerer, im Fachgebiet wohlbekannter Techniken funktionell inaktiv gemacht werden. Zum Beispiel können sie durch Deletionen, Substitutionen oder Insertionen, vorzugsweise durch Deletion, funktionell inaktiv gemacht werden. Durch Deletionen können Teile des Gens oder das gesamte Gen entfernt werden. Zu den insertierten Sequenzen kann die oben beschriebene Expressionskassette zählen.

[0046] Mutationen werden in den HSV-Stämmen durch den Fachleuten des Gebiets wohlbekannte homologe Rekombinationsmethoden vorgenommen. Zum Beispiel wird HSV-genomische DNA zusammen mit einem Vektor, vorzugsweise einem Plasmid-Vektor, transfiziert, der die durch homologe HSV-Sequenzen flankierte mutierte Sequenz umfasst. Die mutierte Sequenz kann Deletionen, Insertionen oder Substitutionen umfassen, die alle mittels routinemäßiger Techniken konstruiert werden können. Zu Insertionen können selektierbare Marker-Gene, zum Beispiel lacZ, zum Screening von rekombinanten Viren anhand zum Beispiel der β -Galaktosidase-Aktivität zählen.

[0047] Mutationen können auch in anderen HSV-Genen vorgenommen werden, zum Beispiel Genen wie ICP0, ICP4, ICP6, ICP22, ICP47, VMW65, gH oder vhs. Im Falle des VMW65-Gens ist das gesamte Gen nicht deletiert, da es für ein essentielles Strukturprotein codiert, doch wird eine kleine inaktivierende Insertion vorgenommen, welche die Fähigkeit des VMW65 zur transkriptionellen Aktivierung der IE-Gene vernichtet (Ace et al., 1989).

4. Die Expressionskassette enthaltende HSV-Stämme

[0048] Die Expressionskassette kann in das HSV-Genom an einer beliebigen Lokalisation insertiert werden, vorausgesetzt, dass das Virus nach wie vor vermehrbar ist, was die Verwendung einer Zelllinie erforderlich machen kann, die ein anderes essentielles HSV-Gen trägt (wie in 2. beschrieben), wenn das heterologe Gen in ein essentielles Gen insertiert wird. Wird zum Beispiel das heterologe Gen in das ICP27-Gen des HSV-Stamms insertiert, so wäre eine ICP27 exprimierende Zelllinie erforderlich. Die Expressionskassette wird vorzugsweise in die Region der ICP27-Mutation insertiert, außer in dem unwahr-

scheinlichen Fall, dass die Mutation durch Rekombination mit einem Wildtyp-Virus repariert wird, welche Reparatur die insertierte Expressionskassette entfernen würde.

[0049] Die Expressionskassette kann in das HSV-Genom durch homologe Rekombination der HSV-Stämme mit zum Beispiel Plasmid-Vektoren insertiert werden, die die durch HSV-Sequenzen flankierte Expressionskassette tragen, wie oben für die Insertion von Mutationen beschrieben. Die Expressionskassette kann in einen geeigneten Plamid-Vektor, der HSV-Sequenzen umfasst, unter Anwendung von im Fachgebiet wohlbekannten Kloniertechniken eingeführt werden.

[0050] Die Insertion von mehr als einer Expressionskassette in das virale Genom ist möglich, wodurch ein viraler Vektor mehr als eine Expressionskassette der Erfindung umfassen würde.

[0051] Auch ist die Ausnutzung einer endogenen LAT-P2-Region durch Klonieren von Konstrukten möglich, die einen funktionsfähig an ein heterologes Gen stromabwärts der endogenen LAT-P2-Region geknüpften Promotor umfassen. Ein anderes Konstrukt kann stromaufwärts der LAT-P2-Region, doch in gegenläufiger Orientierung, kloniert werden. Das resultierende Virus wird auf diese Weise eine Expressionskassette der Erfindung umfassen, wird aber mittels geringfügiger Abweichungen von den oben beschriebenen Methoden erhalten.

D. Verabreichung

[0052] Die Expressionskassette der Erfindung kann daher zur Darreichung therapeutischer Gene an einen Menschen oder ein Tier, der oder das einer Behandlung bedarf, verwendet werden. Insbesondere macht die neurotrophische Natur des Herpes-simplex-Virus die Verwendung abgeschwächter HSV-Stämme, die die Expressionskassette der Erfindung umfassen, ideal geeignet zur Behandlung zum Beispiel von Parkinson-Krankheit, Störungen des Nervensystems, Rückenmarksverletzungen, Hirnschlägen oder Malignitäten, zum Beispiel Gliomen. Alternativ kann die Expressionskassette der Erfindung zum Transport von Genen, die für potentiell immunogene Polypeptide codieren, für Impfzwecke verwendet werden.

[0053] Die Expressionskassette der Erfindung kann direkt als ein nacktes Nukleinsäure-Konstrukt verabreicht werden, welches vorzugsweise außerdem flankierende Sequenzen umfasst, die homolog zum Wirtszell-Genom sind. Die Aufnahme der nackten Nukleinsäure-Konstrukte durch Säugerzellen wird durch mehrere bekannte Techniken gefördert, einschließlich der biolistischen Transformation und der Lipofektion.

[0054] Alternativ kann die Expressionskassette als Teil eines Nukleinsäure-Vektors, einschließlich eines Plamid-Vektors oder viralen Vektors, vorzugsweise HSV, verabreicht werden.

[0055] Vorzugsweise wird das Transportvehikel (d. h. nacktes Nukleinsäure-Konstrukt oder viraler Vektor, der zum Beispiel die Expressionskassette umfasst) mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger oder Verdünnungsmittel zur Zubereitung einer pharmazeutischen Zusammensetzung kombiniert. Zu geeigneten Trägern und Verdünnungsmitteln zählen isotonische Kochsalzlösungen, zum Beispiel Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung. Die Zusammensetzung kann zur parenteralen, intramuskulären, intravenösen, intrakranialen, subkutanen, intraokularen oder transdermalen Verabreichung formuliert werden.

[0056] Die pharmazeutische Zusammensetzung wird in solcher Weise verabreicht, dass die Expressionskassette, die das therapeutische Gen für die Gentherapie enthält, in Zellen an einer geeigneten Stelle eingebaut werden kann. Ist das Ziel der Gentherapie zum Beispiel das zentrale oder periphere Nervensystem und die Expressionskassette durch einen Herpes-simplex-Virus-Vektor zu transportieren, so könnte die Zusammensetzung in einen Bereich verabreicht werden, in dem synaptische Endigungen lokalisiert sind, so dass das Virus in die Endigungen aufgenommen und in einer retrograden Weise das Axon hinauf in die axonalen Zellkörper über einen retrograden Axontransport transportiert werden kann. Die pharmazeutische Zusammensetzung wird typischerweise an das Gehirn durch stereotaktische Beimpfung verabreicht. Wird die pharmazeutische Zusammensetzung an das Auge verabreicht, so ist eine subretinale Injektion typischerweise die Technik der Wahl.

[0057] Wird die Expressionskassette an die Zellen durch einen viralen Vektor transportiert, so liegt die Menge an verabreichtem Virus im Bereich von 10^3 bis 10^{10} PFU, vorzugsweise 10^5 bis 10^8 PFU, bevorzugter 10^6 bis 10^7 PFU. Bei Injektion werden typischerweise 1 bis 10 μ l Virus in einem pharmazeutisch annehmbaren geeigneten Träger oder Verdünnungsmittel verabreicht.

[0058] Wird die Expressionskassette als eine nackte Nukleinsäure verabreicht, so liegt die verabreichte Menge an Nukleinsäure typischerweise im Bereich von 1 μ g bis 10 mg, vorzugsweise 100 μ g bis 1 mg.

[0059] Dort, wo das heterologe Gen unter der Kontrolle eines induzierbaren Promotors steht, mag eine Induktion der Genexpression lediglich für die Dauer der Behandlung erforderlich sein. Sobald der Zustand behandelt ist, wird der Induktor entfernt und die Expression des heterologen Gens gestoppt. Dies

weist eindeutig klinische Vorteile auf. Dieses System kann z. B. die Verabreichung des Antibiotikums Tetracyclin miteinbeziehen, wie oben beschrieben, um die Genexpression über seine Wirkung auf das Tet-Repressor/VP16-Fusionsprotein zu aktivieren.

[0060] Die Verwendung Gewebe-spezifischer Promotoren wird bei der Behandlung von Erkrankungen unter Verwendung der Expressionskassette der Erfindung hilfreich sein. Zum Beispiel begründen sich mehrere neurologische Störungen auf einer übermäßigen Expression bestimmter Genprodukte in lediglich einem kleinen Subset von Zellen. Es wird von Vorteil sein, therapeutische Gene lediglich in den relevanten betroffenen Zelltypen exprimieren zu können, insbesondere dann, wenn diese Gene bei Expression in anderen Zelltypen toxisch sind.

[0061] Die beschriebenen Verabreichungswege und Dosierungen sollen lediglich als eine Richtlinie dienen, da ein geübter Arzt ohne weiteres in der Lage sein wird, den optimalen Verabreichungsweg und die Dosierung für den jeweiligen Patienten und Zustand zu bestimmen.

E. Untersuchungsmethoden

[0062] Die Expressionskassetten der Erfindung können auch bei Methoden der wissenschaftlichen Forschung verwendet werden. Daher betrifft ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung Methoden zur In-vitro-Untersuchung der Genfunktion in eukaryontischen Zellen, vorzugsweise Säugerzellen. Eine Methode zur Untersuchung der Funktion eines heterologen Gens umfasst allgemein die Bestimmung der Wirkung der Expression eines heterologen Gens in einer eukaryontischen Zelle, wobei das Gen in die Zelle unter Verwendung einer Expressionskassette der Erfindung, die das heterologe Gen umfasst, eingeführt wurde.

[0063] Mit der Erfindung wird auch eine Methode zur Untersuchung der Funktion eines heterologen Gens bereitgestellt, welche außerdem den Schritt des Einführens der Expressionskassette in die Zelle in vitro umfasst.

[0064] Zum Beispiel kann die Zelle einen Temperatur-empfindlichen Defekt bei der Zellteilung aufweisen. Wird eine Expressionskassette, die ein heterologes Gen gemäß der Erfindung umfasst, in die defekte Zelle eingeführt und die Zelle bei der restriktiven Temperatur gezüchtet, so wird ein Fachmann ohne weiteres bestimmen können, ob das heterologe Gen den Defekt bei der Zellteilung komplementieren kann. Ähnlich können auch andere bekannte Techniken angewendet werden, um zu bestimmen, ob die Expression des heterologen Gens einen beobachtbaren mutanten Phänotyp in der Zelle korrigieren kann.

[0065] Diese Verfahrensweise kann auch bei Tieren, zum Beispiel Mäusen, angewendet werden, die sogenannte "Gen-Knockouts" tragen. Ein Wildtyp-heterologes Gen kann in das Tier unter Verwendung einer Expressionskassette der Erfindung eingeführt und die Wirkung auf das Tier unter Anwendung verschiedener, im Fachgebiet bekannter verhaltensanalytischer, histochemischer oder biochemischer Assays bestimmt werden. Alternativ kann ein mutantes heterologes Gen entweder in ein Wildtyp- oder "Gen-Knockout"-Tier eingeführt werden, um zu bestimmen, ob eine mit einer Erkrankung in Verbindung stehende Pathologie induziert wird. Ein Beispiel dafür ist die Verwendung von Genen, die für Prionen codieren, um die Creutzfeld-Jacob- und andere durch Prionen bedingte Erkrankungen im zentralen Nervensystem von Nagern zu induzieren. Zu weiteren Krankheitsmodellen können die für die Alzheimer-Krankheit, eine motorische Neuronenerkrankung oder die Parkinson-Krankheit umfassen.

[0066] Da die Einführung mindestens zweier verschiedener heterologer Gene in eine Zelle unter Verwendung einer oder mehrerer Expressionskassetten möglich ist, ist auch die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen zwei oder mehreren Genprodukten möglich.

[0067] Daher können die Methoden der vorliegenden Erfindung insbesondere für die funktionelle Untersuchung von an Krankheiten beteiligten Genen angewendet werden. Ein Vorteil der Anwendung der Methode der Erfindung zur Untersuchung der Genfunktion ist der, dass die Kontrollierbarkeit der temporären Expression eines bestimmten Gens die Möglichkeit bedeutet, festzustellen, zu welchem Stadium der Zellentwicklung oder Reparatur das Gen, sofern überhaupt, exprimiert werden muss.

[0068] Die Erfindung wird unter Bezugnahme auf die folgenden Beispiele beschrieben werden, die lediglich der Veranschaulichung und nicht einer Beschränkung dienen sollen.

BEISPIELE

[0069] In den Beispielen 1 bis 8 wird die Verwendung der LAT-P2-Region zur Erzielung einer Langzeit-Expression für die folgenden Konstrukte beschrieben:

1. Einen MMLV-LTR-Promotor, der die Langzeit-Expression von lacZ aus der LAT-Region in einem ICP34.5-deletierten Virus mit beseitigter VMW65-transaktivierender Aktivität (Virus-Stamm 1764/pR14) steuert. Hierbei wird eine MMLV-LTR/lacZ-Kassette direkt nach LAT-P2 in die LAT-Region inseriert.
2. Einen CMV-Promotor, der die lacZ-Expression aus der LAT-Region in einem ICP27-deletierten Virus (Virus-Stamm 17+/D27/pR19lacZ) steuert.

Hierbei wird eine CMV-IE-Promotor-lacZ-Kassette direkt nach LAT P2 in die LAT-Region inseriert.

3. Einen LAT P2/CMV-Promotor, der lacZ vom ICP27-Locus, d. h. wiederum mit ICP27 deletiert (Virus-Stamm 17+/D27/pR20), steuert. Hierbei wird die LAT-P2-Region, die einem Nicht-LAT-Promotor eine langfristige Aktivität verleiht, isoliert von anderen LAT-Sequenzen verwendet.

4. Eine LAT-P2-Region, die stromabwärts durch eine MMLV-LTR-Promotor/GFP-Kassette und stromaufwärts durch eine LAT-P1-Promotor/lacZ-Kassette in der gegenläufigen Orientierung (die pR20.9-Kassette) flankiert ist und in das UL43-Gen eines Virus inseriert wird, das für ICP34.5 deletiert ist und eine inaktivierende Mutation in VMW65 (Virus-Stamm 1764/pR20.9) aufweist.

Material und Methoden

Viren und Zelllinien

[0070] Alle Viren wurden mittels standardmäßiger Methoden (siehe z. B. Coffin und Latchman, 1996; Coffin et al., 1996) der homologen Rekombination präpariert, gefolgt von X-gal-Anfärbung für die lacZ-Aktivität, Plaque-Reinigung und Southern-Blotting zum Prüfen der korrekten Genomstruktur der rekombinanten Viren.

(a) Elternviren und ICP27-komplementierende Zelllinien

17+/D27w

[0071] Eine ICP27-Deletionsmutante, die kein Markergen enthielt, wurde zunächst durch homologe Rekombination zur Entfernung des lacZ-Gens aus einem zuvor erzeugten ICP27-deletierten Virus erzeugt, wobei lacZ in den ICP27-Locus inseriert und eine Auswahl der weißen Plaques nach Anfärben mit X-gal, jeweils mittels standardmäßiger Methoden, vorgenommen worden war. Dieses Virus wurde mit 17+/D27w bezeichnet und ist vom Wildtyp, mit Ausnahme der Deletion der Nukleotide 113.273–117.854, wodurch die codierende Sequenz für ICP27 (UL54) und die Gene UL55 und UL56 entfernt werden, die nicht-essentiell sind und daher auf einer ICP27-exprimierenden Zelllinie gezüchtet werden müssen. Die Nukleotid-Nummern beziehen sich auf die HSV1-Stamm-17+-Sequenz (Genbank Nr. HE1CG).

[0072] ICP27-deletierte Viren wurden generiert und Vorräte durch Züchten auf der ICP27-komplementierenden BHK-Zelllinie B130/2 hergestellt, die zuvor durch Cotransfektion der Plasmid-pSG130BS-(Sekulovich et al., 1988)-DNA mit Neomycin-Resistenz generiert worden war, die für das Plasmid pMamNeo (Invitrogen) codiert, in BHK-Zellen und der Auswahl

von Neomycin-resistenten Klonen erzeugt worden war. Ein in hohem Maße permissiver Klon für das Wachstum einer HSV1-ICP27-Deletionsmutante (B130/2) wurde für die Viruszüchtung ausgewählt. pSG130BS trägt ein BamHI-/SacI-Fragment von HSV1 (Nukleotide 113.322–115.743), das für die komplette ICP27-codierende Sequenz und einen Teil von UL55 codiert.

1764

[0073] Der HSV-Stamm 1764 wurde zuvor beschrieben (Coffin et al., 1996). Er ist für das ICP34.5 codierende Gen (MacLean et al., 1991) deletiert und weist eine inaktivierende Mutation im für VMW65 codierenden Gen (Ace et al., 1989) auf, das Virion-transaktivierende Protein. ICP34.5 ist für die Viruszüchtung in vitro nicht-essentiell, und VMW65 kann durch Aufnahme von Hexamethylenbisacetamid in das Medium komplementiert werden (McFarlane et al., 1992) und kann so auf BHK-Zellen gezüchtet werden.

Beispiel 1 – Konstruktion von 1764/pR14

[0074] Der Virus-Stamm 1764/pR14 wurde durch Cotransfektion von gereinigter genomischer 1764-DNA mit Plasmid pR14 in BHK-Zellen und Auswahl der blauen Plaques nach X-gal-Anfärbung erzeugt. pR14 wurde durch Insertion der MMLV-LTR/lacZ-Sequenzen in pNot 3.5 erzeugt. pNot 3.5 enthält ein 3,5-Kb-NotI-Fragment aus der LAT-Region von HSV1 (Nukleotide 118.439–122.025), kloniert in die NotI-Stelle von pGem5 (Promega). Die MMLV-LTR/lacZ-Insertion wurde in zwei Schritten vorgenommen:

1. Das lacZ-Gen (HindIII-BamHI) von pCH110 (Pharmacia) wurde in die HindIII-Stelle von pJ4 (enthaltend MMLV-LTR-Promotor/Polylinker/SV40-polyA-Sequenzen (Morgenstern und Land, 1990)) inseriert, was pJ4lacZb ergab.
2. MMLV-LTR/lacZpolyA von pJ4lacZ wurde in pNot 3.5 an der BbsI-Stelle (nach LAT P2) durch Ausschneiden von pJ4lacZ mit NheI und PstI inseriert, was pR14 ergab. Orientierung: LAT P1/LAT P2/LTR/lacZ.

Beispiel 2 – Konstruktion von 17+/D27/pr19lacZ

[0075] Virus-Stamm 17+/D27/pr19lacZ wurde durch Cotransfektion von gereinigter genomischer 17+/D27w-DNA mit Plasmid pr19lacZ in B130/2-Zellen und Auswahl der blauen Plaques nach X-gal-Anfärbung erzeugt. pr19lacZ wurde durch Insertion einer CMV-IE-Promotor/lacZ/polyA-Kassette in die BstXI-Stelle von pNot 3.5, d. h. nach LAT P2, erzeugt. Zunächst wurde das lacZ-Gen (HindIII-BamHI) von pCH110 (Pharmacia) in pcDNA3 (Invitrogen, enthaltend CMV-IE-Promotor/Polylinker/polyA-Sequenzen) zwischen die BamHI- und HindIII-Stellen kloniert. Die

CMV-IE-Promotor/lacZ/polyA-Kassette wurde dann mit NruI und BbsI ausgeschnitten und pNot 3.5 an der BstXI-Stelle inseriert. Orientierung: LAT P1/LAT P2/CMV/lacZ/polyA.

Beispiel 3 – Konstruktion von 17+/D27/pR20

[0076] Virus-Stamm 17+/D27/pR20 wurde durch Cotransfektion von gereinigter genomischer 17+/D27w-DNA mit Plasmid pR20 in B130/2-Zellen und Auswahl der blauen Plaques nach X-gal-Anfärbung erzeugt. pR20 wurde durch Insertion einer LAT P2/CMV-IE-Promotor/lacZ/polyA-Kassette (PstI-SrfI von pR19lacZ. Die SrfI-Stelle befindet sich direkt hinter der BstXI-Stelle in pNot 3.5) in pDMN konstruiert. pDMN wurde durch Deletieren eines NotI/XmnI-Fragments vom EcoRI-B-Fragment des HSV1-Genoms, kloniert in pACYC184 (NBL), erzeugt, was ein Fragment ergab, welches das Gen für ICP27 und flankierende Sequenzen (HSV1-Stamm 17+ Nukleotide 11.095–118.439) enthält. Ein Paar von MluI-Fragmenten, die die gesamte ICP27-codierende Sequenz zusammen mit den nicht-essentiellen Genen UL55 und 56 (Nukleotide 113.273–116.869) codiert, wurde dann durch Verdau mit MluI und Religation entfernt. Die LAT P2/CMV-IE-Promotor/lacZ/polyA-Kassette wurde dann an der MluI-Stelle inseriert.

Beispiel 4 – Konstruktion von 1764/pR20.9

[0077] Virus-Stamm 1764-pR20.9 wurde durch Cotransfektion der gereinigten genomischen 1764-DNA mit Plasmid pR20.9/43 erzeugt, was zur Insertion der pR20.9-Kassette in das UL43-Gen des Virus-Stamms 1764 führte. Dieser Konstrukt umfasst zwei heterologe Gene. Das erste Gen, grün fluoreszierendes Protein (GFP), steht unter der Kontrolle des MMLV-LTR-Promotors, wohingegen das zweite Gen, lacZ, unter der Kontrolle des LAT-P1-Promotors steht. Diese flankieren die LAT-P2-Region in gegenläufigen Orientierungen, so dass die jeweiligen Gene (lacZ und GFP) in gegenläufigen Orientierungen von der zentralen LAT-P2-Region transkribiert werden.

[0078] Plasmid pR20.9/43 wurde konstruiert durch:

- (i) Insertion von GFP in Plasmid pcDNA3 (Invitrogen) durch Ausschneiden des GFP-Gens aus Plasmid pEGFP-N1 (Clontech) mit AgeI und NotI und Insertieren zwischen die EcoRI- und NotI-Stellen von pcDNA3, was Plasmid pcDNA3GFP ergibt. Der Start des GFP-Gens ist dem CMV-Promotor nächstgelegen orientiert.
- (ii) Insertion des MMLV-Promotors von pJ4 (NheI-HindIII) in die BamHI-Stelle von pcDNA3GFP, was pcMMLVGFP in solcher Orientierung ergibt, dass die NheI-Stelle von pJ4 dem CMV-Promotor nächstgelegen ist.
- (iii) Insertion der MMLV/GFP/pA-Kassette von pcMMLVGFP in pNot 3.5 durch Ausschneiden mit HindIII und BbsI und Insertion zwischen die Bst-

XI-Stellen von pNot 3.5, d. h. nach der LAT-P2-Sequenz, in solcher Orientierung, dass der MMLV-Promotor der LAT-P2-Region nächstgelegen ist, was Plasmid p3.5MG ergibt.

(iv) Insertion des LAT-P1-Promotors (nt 118.179–118.877) von Ddel-Styl zwischen die EcoRV- und SpeI-Stellen von pGem5 (Promega) – Orientierung: Styl ligiert an EcoRV, Ddel ligiert an SpeI, was pGem5PI ergibt.

(v) Insertion von lacZ (HindIII-BamHI) von pCH110 (Pharmacia) in die NcoI-Stelle des pGEM5PI – Orientierung: HindIII nächstgelegen zur LAT-P1-Sequenz, was pP1/lacZ ergibt.

(vi) Insertion eines Oligonukleotids, das für eine SrfI-Stelle (5'-GCCCCGGGCCATG) codiert, in die SphI-Stelle von pP1/lacZ, was pP1/lacZSrf ergibt.

(vii) Insertion einer LAT P2/MMLV/GFP/pA-Kassette (PstI-Fragment) von p3.5MG in die /vsiI-Stelle von pP1/lacZSrf in solcher Orientierung, dass die LAT-P2-Region von p3.5MG nächstgelegen zur LAT-P1-Region von pP1/lacZSrf liegt, was Plasmid pR20.9 ergibt.

(viii) Insertion der pR20.9-Kassette in die UL43-flankierenden Regionen durch Ausschneiden mit SrfI und Insertion in die einzige NsiI-Stelle von p35, was pR20.9/43 ergibt. p35 enthält HSV1 Nt. 91.610–96.751 (BamHI-EcoRI), kloniert in pGem1 (Promega).

Beispiel 5 – Beimpfung von Mäusen/Ratten mit 1764/pR14/TH

Peripheres Nervensystem

[0079] 1764/pR14 wurde durch Beimpfung der Pfortenballen von Mäusen (1×10^7 PFU), gefolgt von der anschließenden Opferung und der Dissektion der Lendenspinalganglien, getestet. Nach Fixierung und X-gal-Anfärbung mittels standardmäßiger Methoden (Coffin et al., 1996) war eine Blaufärbung nach 2 Tagen, 2 Wochen, 1 Monat und 2 Monaten (längster getesteter Zeitraum) in den Lendenganglien L4 und L5 erkennbar, was eine Lngzeit-Promotor-Aktivität anzeigte.

Zentrales Nervensystem

[0080] Nach stereotaktischer Beimpfung (5×10^5 PFU in 2 μ l) in das Rattenstriatum (200–220 g Lewis-Ratten) ergab 1764/pR14 eine Blaufärbung nach der Fixierung und X-gal-Anfärbung nach 2 Tagen, 2 Wochen, 1 Monat und 2 Monaten (längster getesteter Zeitraum). Dies zeigte ebenfalls eine Langzeit-Promotor-Aktivität an.

Beispiel 6 – Beimpfung von Ratten mit 17+/D27/pR19

Zentrales Nervensystem

[0081] Nach stereotaktischer Beimpfung (5×10^6

PFU in 2 µl) in das Rattenstriatum (200–220 g Lewis-Ratten) ergab 17+/D27/pR19 eine Blaufärbung nach der Fixierung und X-gal-Anfärbung nach 2 Tagen, 2 Wochen, 1 Monat und 2 Monaten (längster getesteter Zeitraum). Dies zeigte, dass der CMV-IE-Promotor bei Platzierung nach LAT P2, wie der MMLV LTR, ebenfalls eine langfristige Aktivität erbringen konnte.

Beispiel 7 – Beimpfung von Ratten mit 17+/D27/pR20

Zentrales Nervensystem

[0082] Nach stereotaktischer Beimpfung (5×10^6 PFU in 2 µl) in das Rattenstriatum (200–220 g Lewis-Ratten) ergab 17+/D27/pR20 ebenfalls eine starke Blaufärbung nach der Fixierung und X-gal-Anfärbung nach 2 Tagen, 2 Wochen und 1 Monat (längster getesteter Zeitraum). Bedeutsamerweise zeigt dies an, dass LAT P2 eine Langzeit-Aktivität eines proximalen Promotors ergeben kann, wenn an anderer Stelle in das Herpes-Genom, d. h. nicht in die LAT-Region, inseriert.

Beispiel 8 – Beimpfung von Mäusen mit 1764/pR20.9

Peripheres Nervensystem

[0083] 1764/pR20.9 wurde durch Beimpfung der Pfotenballen von Mäusen (1×10^7 PFU), gefolgt von der anschließenden Opferung und der Dissektion der Lendenspinalganglien, getestet. Nach der Fixierung war eine starke grüne Fluoreszenz unter Fluoreszenz-Mikroskopie (Fluoreszeinoptik) erkennbar, und nach der X-gal-Anfärbung war eine Blaufärbung in denselben Zellen nach 2 Tagen, 2 Wochen, 1 Monat und 2 Monaten (längster getesteter Zeitraum) in den Lendenganglien L4 und L5, und in einem geringeren Umfang in anderen DRGs, erkennbar. Dies ergab, dass beide Promotoren langfristig aktiv waren und zeigte, dass Genpaare unter Verwendung einer Kasette der Erfindung wirksam exprimiert werden konnten.

LITERATURNACHWEISE

1. Coffin RS and Latchman DS. Herpes simplex virus-based vectors. In: Latchman DS (ed). Genetic manipulation of the nervous system. Academic Press: London, 1996, pp 99–114.
2. MacLean AR et al. Herpes simplex virus type I deletion variants 1714 and 1716 pinpoint neurovirulence related sequences in Glasgow strain 17+ between immediate early gene I and the 'a' sequence. J Gen Virol 1991; 12: 632–639.
3. Morgenstern JP and Land H. A series of mammalian expression vectors and characterisation of their expression of a reporter gene in stably and transiently transfected cells. NAR 1990.; 18: 1068.
4. Sekulovich RE et al., 1988, J. Virol. 64:

3916–3926.

5. Ace C et al. Construction and characterisation of a herpes simplex virus type I mutant unable to transinduce immediate early gene expression. J Virol 1989; 63: 2260–2269.
6. McFarlane M, Dakis JI, Preston CM. Hexamethylene bisacetamide stimulates herpes-simplex virus immediate early gene-expression in the absence of trans-induction by VMW65. J Gen Virol 1992; 73: 285–292.
7. Rice, SA and Knipe DM., 1990, J. Virol 64: 1704–1715.
8. Chou, J., Poon, APW, Johnson, J. and Roizman B. Differential response of human cells to deletions and stop codons in the $\gamma_134.5$ gene of herpes simplex virus. J. Virol. 1994; 68: 8304–8311.
9. Smith, IL et al., 1992, Virology 186: 74–86.
10. Coffin RS et al., 1996, Gene Therapy 3: 886–891.
11. Chou, J. and Roizman, B. The $\gamma_134.5$ gene of herpes simplex virus 1 precludes neuroblastoma cells from triggering total shutoff of protein synthesis characteristic of programmed cell death in neuronal cells. PNAS 1992; 89: 3266–3270.
12. Gossen M and Bujard H, 1992, PNAS 89: 5547–5551.
13. Gossen M et al., 1995, Science 268: 1766–1769.
14. Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning – A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Press.
15. Goins, W. F. et al., 1994, J. Virol. 68: 2239–2252.

Patentansprüche

1. Expressionskassette, welche umfasst:
 - eine Latenz-assoziierte Transkript-(LAT)-P2-Region von Herpes simplex-Virus (HSV), die aus HSV-Typ 1-Nukleotiden 188.866–120.219 oder aus einem Fragment oder Derivat davon besteht, welche zum Erzeugen einer Langzeit-Expression eines heterologen Gens in der Kasette fähig ist,
 - einen ersten Promotoren und
 - ein erstes heterologes Gen,
 welche funktionsfähig in dieser Reihenfolge verknüpft sind.
2. Expressionskassette nach Anspruch 1, welche außerdem einen zweiten Promotoren und ein zweites heterologes Gen umfasst, die funktionsfähig in dieser Reihenfolge an die HSV-LAT-P2-Region und in der entgegengesetzten Orientierung an den ersten Promotoren und das erste heterologe Gen geknüpft sind, wobei der zweite Promotor gleich oder verschieden vom ersten Promotoren ist und das zweite heterologe Gen gleich oder verschieden vom ersten heterologen Gen ist.
3. Expressionskassette nach Anspruch 2, wobei das Produkt aus dem ersten heterologen Gen die Ex-

pression des zweiten heterologen Gens unter geeigneten physiologischen Bedingungen reguliert.

4. Expressionskassette nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der erste und/oder zweite Promotor ein Nicht-LAT-Promotor ist.

5. Expressionskassette nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei der erste und/oder zweite Promotor ein viraler Promotor oder ein Säuger-Promotor ist, der die Expression des ersten und/oder zweiten heterologen Gens in einer Säugerzelle zulässt.

6. Expressionskassette nach Anspruch 5, wobei der Säuger-Promotor ein gewebespezifischer Promotor ist.

7. Expressionskassette nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das erste und/oder zweite heterologe Gen für ein Polypeptid von therapeutischem Nutzen kodiert.

8. Expressionskassette nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei das heterologe Gen gewählt ist aus Genen, welche für Polypeptide kodieren, die zytotoxisch sind, Polypeptide, die zum Umwandeln einer Vorläufer-Prodrug zu einer zytotoxischen Verbindung fähig sind, Proteine, die bei der Regulation der Zellteilung beteiligt sind, Enzyme, die am zellulären Stoffwechselweg beteiligt sind, Transkriptionsfaktoren und Hitzeschock-Proteine.

9. Expressionskassette nach einem der vorangehenden Ansprüche, wobei die LAT-P2-Region eine homologe Region vom HSV Typ 2 ist.

10. Expressionskassette nach einem der vorangehenden Ansprüche zur Anwendung beim Transportieren des heterologen Gens oder Gene zu einer eukaryontischen Zelle.

11. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 5, 6 oder 10, wobei die Säuger- oder eukaryontische Zelle eine Zelle des zentralen oder peripheren Nervensystems, Auges, Herzens oder Skelettmuskels eines Säugers ist.

12. Nukleinsäure-Vektor, welcher eine Expressionskassette umfasst, wie in einem der vorangehenden Ansprüche definiert.

13. Vektor nach Anspruch 12, welcher außerdem Säuger- oder HSV-genomische Sequenzen umfasst, welche die Expressionskassette flankieren.

14. HSV-Stamm, welcher eine Expressionskassette umfasst, wie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert.

15. HSV-Stamm nach Anspruch 14, welcher ein HSV1- oder HSV2-Stamm ist.

16. HSV-Stamm nach Anspruch 14 oder 15, wobei die LAT-P2-Region die endogene HSV-LAT-P2-Region ist.

17. In-vitro-Verfahren zum Untersuchen der Funktion eines oder mehrerer heterologer Gene in einer eukaryontischen Zelle, wobei das Verfahren das Bestimmen der Auswirkung der Expression eines heterologen Gens oder Gene in einer eukaryontischen Zelle umfasst, wobei das Gen oder die Gene in der Zelle in einer Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 11, einem Vektor nach Anspruch 12 oder 13 oder einem HSV-Stamm nach einem der Ansprüche 14 bis 16 vorliegt bzw. vorliegen.

18. Verfahren nach Anspruch 17, welches außerdem den Schritt des Einführens der Expressionskassette, Vektors oder HSV-Stamms in die eukaryontische Zelle in vitro umfasst.

19. Verfahren nach Anspruch 17 oder 18, wobei das heterologe Gen oder Gene Wildtyp- oder Mutanten-Gene sind, die an der Erregung einer Krankheit beteiligt sind.

20. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei die eukaryontische Zelle dysfunktional ist, das heterologe Gen oder Gene vom Wildtyp sind und die Auswirkung der Expression des heterologen Gens mittels eines Assays der Zellfunktion bestimmt wird.

21. Verfahren nach einem der Ansprüche 17 bis 19, wobei die eukaryontische Zelle ein oder mehrere endogene Gene aufweist, die durch Mutation inaktiviert sind.

22. Verfahren zum Erzeugen eines HSV-Stamms nach Anspruch 14, welches Verfahren das Einführen einer Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 9 in das Genom eines Herpes simplex-Virus umfasst.

23. Verfahren nach Anspruch 22, welches Verfahren das Einführen der Expressionskassette in das Genom eines Herpes simplex-Virus durch homologe Rekombination zwischen dem Genom und einem Vektor nach Anspruch 12 oder 13 umfasst.

24. Expressionskassette nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei das erste und/oder zweite heterologe Gen für ein Polypeptid kodiert, das mindestens ein Epitop umfasst.

25. Expressionskassette nach Anspruch 24, wobei das Polypeptid von einem pathogenen Organismus stammt.

26. Vektor, welcher eine Expressionskassette nach Anspruch 24 oder 25 umfasst.

27. HSV-Stamm, welcher eine Expressionskassette nach Anspruch 24 oder 25 umfasst.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen