



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 37 764 T2 2008.01.31**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 012 244 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 37 764.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/14527**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 933 339.8**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1999/002657**

(86) PCT-Anmeldetag: **10.07.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **21.01.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **28.06.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **09.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **31.01.2008**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 7/00 (2006.01)**

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 15/00 (2006.01)

A61K 39/21 (2006.01)

A61K 39/205 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

52366 P 11.07.1997 US

(73) Patentinhaber:

Yale University, New Haven, Conn., US

(74) Vertreter:

Jones Day Rechtsanwälte Patentanwälte, 80538 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

ROSE, John K., Guilford, CT 06437, US; SCHELL, Mathias, Hamden, CT 06518, US; JOHNSON, Erik E., New Haven, CT 06511, US

(54) Bezeichnung: **RHABDOVIRUS MIT GENTECHNISCH VERÄNDERTER HÜLLE**

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

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

Beschreibung

Technisches Gebiet der Erfindung

[0001] Die Erfindung betrifft in erster Linie replikationsfähige Rhabdoviren, denen ein funktionelles Glycoprotein-Gen fehlt und die in der Virushülle mindestens ein Membranpolypeptid exprimieren, wie einen Rezeptor für ein weiteres Virus. Die erfindungsgemäßen rekombinanten Rhabdoviren, wie der vesikuläre Stomatitis-Virus, der mindestens einen Zellrezeptor und einen Corezeptor eines anderen pathogenen Virus exprimiert, wie HIV, eignen sich zur Behandlung von Patienten, die mit dem pathogenen Virus infiziert sind.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Zur Herbeiführung einer Infektion müssen membranumhüllte Viren, wie der Human-Immunschwächevirus Typ 1 (HIV 1), zuerst Rezeptoren an der Zelloberfläche binden und anschließend ihre eigene Membran mit der der Zelle verschmelzen. Dieser Fusionsprozess setzt das genetische Virusmaterial in das Cytoplasma frei und beginnt die Infektion. Der Eintritt von HIV-1 in die Zellen erfordert bekanntlich die Virusbindung an das Zelloberflächenmolekül CD4 (Maddon et al., 1986; Sattentau und Weiss, 1988), und neue Untersuchungen haben Chemokinrezeptormoleküle, CXCR4, definiert (Feng et al., 1996; Berson, et al., 1996), CCR5 (Alkhatib et al., 1996; Choe et al., 1996; Deng, et al., 1996; Doranz, et al., 1996; Dragic, et al., 1996), und CCR3 (Choe, et al., 1996; Doranz, et al., 1996) als Corezeptoren, die für den Eintritt erforderlich sind. Der HIV-Eintritt erfolgt in den Stufen: auf die anfängliche Bindung des viralen Hüllproteins (Bezeichnung gp120/41) an CD4 kommt es zu Konformationsänderungen, die eine Bindung an den Corezeptor und die anschließende Koaleszenz der Virus- und Zellmembranen ermöglichen (Lapham et al., 1996; Trkola et al., 1996; Wu et al., 1996). HIV-infizierte Zellen exprimieren gp120/41 auf der Zelloberfläche während der Infektion und vor seinem Einbau in keimende HIV-1-Partikel.

[0003] Neue Studien haben ergeben, dass das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) Potential als sehr wirkungsvoller Expressionsvektor hat, der die fremden Proteine in die Virushülle aufnehmen kann (Schnell, et al., 1996a; Schnell et al., 1996b). VSV bewirkt eine extrem schnelle zytopathische Infektion in den meisten Tierzellen einschließlich menschlicher T-Zellen in Kultur, ist aber normalerweise in den Menschen nicht pathogen (für einen Überblick siehe Wagner und Rose, 1996). Innerhalb von zwei bis drei Stunden nach Infektion blockiert VSV die Wirtszell-Proteinsynthese und produziert innerhalb von acht Stunden sehr große Mengen Folgeviruspartikel, die von der Zelloberfläche vor der Zellyse abknospen. VSV hat ein nichtsegmentiertes Negativstrang-RNA-Genom, das im Zytoplasma infizierter Zellen durch die Viren-RNA-Polymerase kopiert wird, so dass fünf mRNAs erzeugt werden, welche fünf Strukturproteine kodieren. Nur eins dieser Proteine, ein Glycoprotein mit der Bezeichnung G ist in der Virusmembran zugegen und ist für den sehr breiten Wirtsbereich von VSV verantwortlich. Das G-Protein erkennt Zelloberflächen und katalysiert die Fusion der Virusmembran mit den zellularen Membranen (Florkiewicz und Rose, 1984). Fremde Membranproteine wie CD4 und andere Virenmembranproteine können in sehr hohen Mengen aus dem Genom von rekombinanten VSVs exprimiert werden, und diese Moleküle werden dann in hohen Mengen zusammen mit dem G-Protein in die Virenmembran eingebaut (Schnell, et al., 1996b).

[0004] Schubert et al. (J. Virol. 1992, S 1579-1589) betrifft vesikuläre Stomatitis-Viren, die CD4 oder CD4/G-Glycoprotein-Fusionen exprimieren, welche durch ein Plasmid codiert werden.

[0005] EP 0702085 lehrt mutierte nichtsegmentierte Negativstrang-RNA-Viren, wie mutiertes Rabies-Virus, worin ein Fremdgen ein Pseudogen ersetzt und das Virus ein Wild-Typ-G-Glycoproteingen umfasst oder das Virus ein mutiertes G-Glycoprotein umfasst, das durch ein exogenes G-Glycoprotein komplementiert wird.

Zusammenfassung der Erfindung

[0006] Eine Aufgabe der Erfindung ist die Verwendung dieser Strategie zur gentechnischen Herstellung rekombinanter Viren, die eingesetzt werden können, um Zellen anzuzielen, die mit einem anderen Virus als HIV infiziert sind.

[0007] Eine weitere und spezifischere Aufgabe ist die Bereitstellung eines Verfahrens zum Behandeln einer mit HIV infizierten Person.

[0008] Diese und andere Aufgaben werden durch die vorliegende Erfindung bewerkstelligt, die replikationsfähige rekombinante Rhabdoviren bereitstellt, wie die vesikulären Stomatitis-Viren (VSV), denen ein funktio-

nelles Glycoprotein-G-Gen fehlt und die in ihren Virenhüllen mindestens ein fremdes Membranpolypeptid exprimieren. In bevorzugten Ausführungsformen ist das fremde Polypeptid ein zellulärer Rezeptor für ein anderes Virus und wird so exprimiert, dass Zellen angezielt werden, die mit dem anderen Virus infiziert sind. In einer Ausführungsform stellt die Erfindung replikationsfähiges rekombinantes vesikuläres Stomatitis-Virus zur Verfügung, dem ein funktionelles G-Glycoprotein fehlt und das mindestens einen Zellrezeptor für ein pathogenes Säugetiervirus aufweist. Wenn das andere Virus HIV ist, ist das exprimierte Polypeptid ein HIV-Rezeptor, wie CD4, ein HIV-Corezeptor, wie CXCR4 und/oder Mischungen von diesen.

[0009] Die Erfindung stellt entsprechend Viren zur Verwendung bei der Herstellung von Medikamenten zum Behandeln von Patienten bereit, die mit einem pathogenen Virus infiziert sind. Wie nachher dargelegt wird, werden Behandlungsverfahren für mit HIV-1 und/oder HIV-2 infizierte Patienten offenbart.

Beschreibung der Abbildungen

[0010] Die [Fig. 1](#) veranschaulicht Diagramme rekombinanter VSV-Genome. Die Reihenfolge der Gene im Wildtyp-VSV und in den beschriebenen rekombinanten VSVs ist gezeigt. Jedes Extragen wurde so eingesetzt, damit es die entsprechenden Signale enthielt, die VSV-Polymerasetranskriptionsstart- und -endpunkt spezifizieren. Die Details der Plasmidkonstruktionen und die Ableitung der rekombinanten Viren sind in den Beispielen gegeben. Die Gene werden von links nach rechts aus dem Negativstrang-RNA-Genom, das in der 3'-5'-Orientierung gezeigt ist, transkribiert.

[0011] Die [Fig. 2](#) zeigt Photographien von Kulturen, die veranschaulichen, dass VSVs, denen das G-Gen fehlt, Plaques auf einer komplementierenden Zelllinie bilden. BHK-G Zellen wurden auf Platten mit 6 Vertiefungen ($1,5 \times 10^5$ Zellen in jeder Vertiefung) gezüchtet, und die G-Proteinexpression wurde durch Entfernung des Tetracyclins induziert. Die angezeigten Verdünnungen von 100 μ l VSV Δ G-CD4-Virus (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4}) wurden 16 Std. später hinzugefügt, gefolgt von Zugabe von 2 ml DME mit 2% Methylcellulose. Die Zellen wurden für 48 Std. inkubiert und dann mit Naphthalinschwarz gefärbt, um die kleinen Plaques sichtbar zu machen. Wildtyp-VSV-Plaques sind viel größer und sind nach 18 Std. sichtbar, jedoch war die Plaquebildung durch das defekte Virus auf dieser Zelllinie langsamer, und zwar vermutlich wegen des reduzierten Ausmaßes der Komplementierung des exprimierten VSV G-Proteins.

[0012] Die [Fig. 3](#) zeigt die immunoelektronenmikroskopische Sichtbarmachung von CD4 in den Hüllen von VSV Δ G-CD4 und von VSV Δ G-CC4. Gereinigte Wildtyp-VSV-, VSV Δ G-CD4- oder VSV Δ G-CC4-Partikel wurden mit Phosphorwolframsäure negativ gefärbt, nachdem man sie mit einem monoklonalen Antikörper gegen CD4 markiert hatte, gefolgt von Gold-konjugat-Ziege-Anti-Maus-IgG-Partikel. Wildtyp-VSV-Partikel enthielten sichtbare Spitzen der VSV G-Proteintrimer (Pfeile) und banden Antikörper nicht an CD4 (Wildtyp-VSV, linkes Feld), wohingegen VSV Δ G-CD4 oder VSV Δ G-CC4 anti-CD4-Antikörper banden und keine sichtbaren Spitzen auf der Oberfläche zeigten.

[0013] Die [Fig. 4](#) veranschaulicht die Analyse von HIV-1- und von VSV Δ G-CC4-Infektion durch Immunofluoreszenzmikroskopie. Doppelte Kulturen von Jurkat-Zellen wurden mit dem HIV-1-Stamm IIIB infiziert und fünf Tage später mit VSV Δ G-CC4 superinfiziert (Feld D, E, F) oder ohne Superinfektion vermehrt (Feld A, B, C). Jurkat-Zellen, die nicht mit HIV-1 infiziert waren, wurden auch mit VSV Δ G-CC4 infiziert (Feld G, H, I). Vierzehn Tage nach der VSV Δ G-CC4-Infektion, wurden die Zellen fixiert und mit einem monoklonalen Maus-Antikörper gegen VSV N Protein und einem sekundären, affinitätsgereinigten Rhodamin-konjugierten anti-Maus-Antikörper (nachgewiesen in Feld C, F, I) und mit einem menschlichen polyklonalen anti-HIV-Immunglobulin markiert, gefolgt von affinitätsgereinigten FITC-konjugierten anti-Mensch-Antikörpern (nachgewiesen in den Feldern B, E, H). Die Felder A, D und G zeigen Nomarski Bilder von den gleichen Feldern der Zellen, die in den beiden Bildern rechts gefärbt gezeigt sind.

[0014] Die [Fig. 5](#) liefert Liniendiagramme, die die quantitative Bestimmung der HIV-1- und VSV Δ G-CC4-Infektion in den Jurkat-Zellen veranschaulichen. Doppelkulturen der Jurkat-Zellen wurden mit HIV-1 IIIB an Tag 0 infiziert und entweder mit VSV Δ -CC4 fünf Tage später (\blacksquare) superinfiziert oder ohne Superinfektion vermehrt (\square). Der Prozentsatz von HIV⁺-Zellen wurde durch Immunofluoreszenzmikroskopie an den angegebenen Tagen bestimmt ([Fig. 5A](#)). Der Prozentsatz der HIV⁺-Zellen, die auch mit VSV Δ G-CC4 infiziert wurden, wurde durch Immunofluoreszenzmikroskopie festgestellt, so dass VSV N-Protein erfasst wurde ([Fig. 5B](#)). Hundert bis zweihundert Zellen wurden von mehrfachen statistischen Feldern gezählt, um die Prozentsätze an Zellen festzustellen, die positiv auf HIV- oder VSV-Antigene gefärbt wurden.

[0015] Die [Fig. 6](#) liefert Liniendiagramme, die die Wirkung der VSV Δ G-CC4-Infektion auf die Produktion von

infektiösem HIV-1 und auf Freisetzung von RT veranschaulichen. Medien aus Jurkat-Zellkulturen wurden auf infektiöse HIV-Titer und auf RT-Aktivität analysiert, wie in den Beispielen beschrieben. Die Titer ([Fig. 5A](#)) wurden in dreifacher Ausführung durchgeführt und werden als TCID₅₀/ml (□, nur HIV infiziert; ■, HIV + VSVΔG-CC4) angegeben. Die Titer, die durch diesen Test bestimmt wurden, stimmten mit den Titer überein, die durch einen indirekten Immunfluoreszenztest festgestellt wurden, der HIV-Antigene nachweist. Die RT-Aktivität ([Fig. 5B](#)) wird in Gesamtzählimpulsen pro Minute (cpm) angegeben, die an das DEAE-Papier banden, nach Abzug eines Hintergrundes von weniger als 50 cpm; (□, nur HIV-infiziert; ■, HIV + VSVΔG-CC4; Δ, nur VSVΔG-CC4-infiziert). Die geplotteten Zahlen sind der Durchschnitt der Doppelproben, die innerhalb von 5% übereinstimmten. Die Proben wurden aus Jurkat-Kulturen an den angezeigten Tagen nach Superinfektion mit VSVΔG-CC4 gesammelt.

Eingehende Beschreibung der Erfindung

[0016] Diese Erfindung beruht auf der Konstruktion eines neuen Virus des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), das replikationsfähig ist und Zellen schnell tötet, aber nur Zellen anstecken kann, die erstmalig mit HIV infiziert werden. Das Virus enthält eine Deletion im VSV Hüll-Glycoproteinen und exprimiert statt der Gene für HIV Rezeptor-CD4 und den HIV-Corezeptor, CXCR4. Das Virus tötet HIV-infizierte Zellen in der Kultur und steuert die HIV-Infektion.

[0017] In der Praxis dieser Erfindung werden replikationsfähige rekombinante Rhabdoviren erzeugt, denen ein funktionelles Glycoprotein G-Gen fehlt und die ein fremdes Membranpolypeptid in ihren Virenhüllen exprimieren. "Fremd" bedeutet, dass es im transformierten Rhabdovirus nicht natürlich vorkommt. Das fremde Membranpolypeptid bindet in vielen Ausführungsformen an eine Säugetier-Zelle, wie einen Zellrezeptor und/oder einen Corezeptor für ein anderes Virus, und einen Antikörper in anderen Ausführungsformen. Die Erfindung eignet sich besonders zum Anzielen von Zellen, die mit membranumhüllten Viren infiziert sind. Die Erfindung stellt eine allgemeine Strategie der Virusanziehung an infizierte Zellen bereit, und zwar wenn der oder die Rezeptoren, die durch Virenhüllproteine erkannt werden, bekannt sind, und das Virusprotein Membranfusionsaktivität hat. Man kennt entsprechend auch herkömmliche und Hybridantikörper gegen pathologische Zellen, und diese werden benutzt, um diese Zellen anzu zielen. In jedem Fall werden fremde Polypeptide im Rhabdovirus so stark exprimiert, dass die abzutötenden Zellen angezielt werden. Folglich bedeutet, wie hier verwendet, ein "rekombinantes Rhabdovirus, dem ein funktionelles glycoprotein G-Gen fehlt" ein Virus, das jede mögliche Änderung oder Unterbrechung des Glycoprotein G-Gens hat und/oder ein schlecht oder nicht funktionelles Glycoprotein exprimiert, oder Kombinationen davon.

[0018] In den folgenden Beispielen werden rekombinante VSVs erzeugt, denen ein funktionelles Hüllglycoprotein G oder entsprechendes Gen fehlt und stattdessen mindestens einen Rezeptor oder Corezeptor eines HIV-Virus exprimieren. In den bevorzugten Ausführungsformen wird das G-Gen deletiert, aber jede Mutation des Gens, das die Wirtsbereichspezifität von VSV verändert oder sonstwie die Funktion des G Proteins eliminiert, kann eingesetzt werden.

[0019] Ein Gen für ein fremdes Membranpolypeptid wie eins, das an Säugetier-Zellen bindet, die mit einem pathogenen Virus infiziert sind, wird dann in das Genom des rekombinanten Rhabdovirus eingesetzt und/oder zu diesem hinzugefügt. Wie oben zusammengefasst, ist das addierte Gen in vielen typischen Ausführungsformen ein Rezeptor, der durch ein Virusglycoprotein erkannt wird und der sich auf der Oberfläche der Säugetier-Zellen befindet. Rekombinante Rhabdoviren, die gentechnisch so verändert wurden, dass sie andere Zellen, beispielsweise Krebszellen, töten, liegen jedoch innerhalb der Erfindung. In diesen Ausführungsformen werden Gene für spezifische Antikörper und ein Membranfusionsprotein gewöhnlich in die Rhabdoviren eingebracht, denen das funktionelle Glycoproteinen fehlt.

[0020] Die Erfindung stellt somit die Verwendungen bei der Herstellung von medizinischen oder veterinärmedizinischen Medikamenten zum Behandeln eines Patienten (menschliches Wesen oder Tier) bereit, der mit einem pathogenen Säugervirus infiziert ist, indem dem Patienten eine wirksame Menge eines replikationsfähigen rekombinanten vesikulären Stomatitis-Virus verabreicht wird, dem ein funktionelles G-Glycoproteinen fehlt und das einen Rezeptor des pathogenen Virus in seiner Hülle aufweist, und zwar derart, dass die mit dem pathogenen Virus infizierten Zellen angezielt werden. Ein Beispiel, worin das pathogene, membranumhüllte Virus HIV ist, und die Hüllproteine, die dem VSV hinzugefügt werden, ein HIV-Rezeptor und ein spezifischer Corezeptor sind, wird im nachfolgenden Beispielabschnitt gegeben. In dieser Abbildung wird ein T Zelltropes HIV eingesetzt, aber die erfindungsgemäßen rekombinanten VSVs können gentechnisch so verändert werden, dass sie Corezeptoren anderer HIV-Stämme exprimieren. Andere Ausführungsformen exprimieren einen Rezeptor und keinen Corezeptor, und einige erfindungsgemäße rekombinante VSVs exprimieren mehr als einen

HIV-Corezeptor.

[0021] In der Praxis einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung, wird ein HIV-infizierter Patient behandelt, indem man ihm eine wirksame Menge eines replikationsfähigen rekombinanten vesikulären Stomatitis-Virus verabreicht, dem ein funktionelles Glycoprotein G-Gen fehlt und das mindestens einen HIV-Rezeptor wie CD4 und mindestens einen HIV-Corezeptor wie CXCR4, CCR5, CCR3 und/oder Mischungen davon, exprimiert. Ein beispielhaftes Konstrukt ist das später beschriebene und in [Fig. 1](#) veranschaulichte VSVΔG-CC4.

[0022] Die Verabreichung eines erfindungsgemäßen rekombinanten Rhabdovirus an eine Person oder ein anderes Säugetier kann über ein beliebiges lokales oder systemisches Verfahren erfolgen, das dem Fachmann bekannt ist, ist aber vorzugsweise systemisch. Die systemische Verabreichung umfasst intravenöse, intramuskulöse oder intradermale Verabreichung durch sterile Injektionen, parenterale Verabreichung und dergleichen, gewöhnlich in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger und/oder einem anderen Hilfsstoff oder einer Ergänzungsverbindung, das/die die Lebensfähigkeit des rekombinanten VSV-Virus oder anderen Rhabdovirus beibehält, oder seine Wirkung verstärkt. Kombinationen von Therapien können auch eingesetzt werden.

[0023] Die Menge an rekombinantem Rhabdovirus, die zum Hervorbringen der therapeutischen Behandlung nötig ist, ist an sich nicht fest und hängt notwendigerweise von der Schwere oder dem Ausmaß der Krankheit ab. Die Verabreichung wird erleichtert und in einigen Fällen werden zusätzliche therapeutische Wirkungen durch den Träger zur Verfügung gestellt. Wenn ein Träger eingesetzt wird, muss er insofern inert sein, als er den rekombinanten VSV oder anderen Rhabdovirus nicht inaktiviert und insofern als er dem Patienten, dem er verabreicht wird, keine schädliche Wirkung beibringt. In den meisten Situationen hängen die Dosen vom Ausmaß der Krankheit des Patienten, dem Alter, dem Gewicht und dem klinischen Zustand des zu behandelnden Patienten, von der Stärke des rekombinanten Virus, den eingesetzten Hilfsstoffen oder Ergänzungsverbindungen (falls vorhanden) und den Konzentrationen des rekombinanten Rhabdovirus und von anderen Inhaltsstoffen ab, die gewöhnlich zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger zusammengefügt werden. Am stärksten bevorzugt verringert die Verabreichung der erfindungsgemäßen rekombinanten Rhabdoviren die kranken Zellen bei dem Patienten so stark, dass sie kaum oder gar nicht nachweisbar sind.

[0024] Ein Vorteil der Erfindung ist, dass die bevorzugten rekombinanten VSVs, die den Rezeptor von einem Virus in der Hülle eines anderen enthalten, Zellen rasch töten, die mit dem anderen Virus infiziert sind, und folglich die Infektion steuern. Ein weiterer Vorteil der Erfindung ist, dass die rekombinanten VSVs oder anderen erfindungsgemäßen Rhabdoviren gentechnisch an spezifische Ziele angepasst werden, und nur infizierte oder pathogene Zellen töten.

[0025] Die folgenden Beispiele veranschaulichen und erklären die vorliegende Erfindung weiter und sollen diese keinesfalls einschränken.

Beispiele

[0026] In den hier beschriebenen Untersuchungen, werden VSV-Rekombinanten erzeugt, die eine vollständige Deletion des VSV G-Gens und eine Substitution anstelle der Gene für CD4 und CXCR4 aufweisen. Diese Viren bauen die Partikel zusammen, die CD4 und CXCR4 in ihren Hüllen enthalten und werden spezifisch angezielt, um HIV-1-infizierte Zellen zu infizieren.

Experimentelle Verfahren

Plasmidkonstruktion.

[0027] Über die Spaltung mit MluI und SphI wurde das gesamte VSV G-Gen aus pVSV-CD4 (Schnell et al., 1996b) deletiert. Das resultierende Plasmid hatte die Bezeichnung pVSVΔG-CD4. Ein Plasmid, welches das Protein CXCR4 mit einem HA Epitope-Tag kodiert, wurde vorher beschrieben (Berson et al., 1996). CXCR4 wurde durch PCR von diesem Plasmid mit der VENT-Polymerase (Stratagene) mit Hilfe der Primer 5'-ACTGCCGGGCTCGAGGTTACCATGGAGGGGATCAG-3' (Seq.-ID.-Nr. 1) und 5'-AGCTGCGGCCGCTAGCTTAGCTCCCGGGAAGAGATGCG-3' (Seq.-ID.-Nr. 2) amplifiziert. Der erste Primer enthält eine XhoI-Stelle und der zweite eine NheI-Stelle (fettgedruckte Buchstaben). Das PCR-Produkt wurde mit XhoI und NheI gespalten und in pVSV-XN1 (Schnell et al., 1996a) kloniert, das mit XhoI und NheI gespalten wurde. Das resultierende Plasmid hatte die Bezeichnung pVSV-CXCR4. Das G-Gen wurde aus pVSV-CXCR4 mit XhoI und MluI deletiert. Die codierende Sequenz für menschliches CD4 wurde aus pCD4 (Shaw et al., 1989) durch PCR mit Hilfe der Pri-

mer 5'-CCGGGTACCACGCGTACAATGAACCGGGGAGTCCCTTTAG-3' (Seq.-ID.-Nr. 3) und 5'-GGGCCCTCGAGCGTGATATCTGTTAGTTTTTTTCATACTCAAATGGGGCTACATGTCTTC-3 (Seq.-ID.-Nr. 4) amplifiziert. Der erste Primer enthält eine MluI-Stelle (fett gedruckte Buchstaben); der zweite Primer enthält eine XhoI-Stelle (fettgedruckte Buchstaben) und ein VSV-Transkriptions-Stopp-Start-Signal (unterstrichene Buchstaben). Das CD4-Gen wurde an der Stelle der G-Deletion eingesetzt, so dass ein Plasmid mit der Bezeichnung pVSVΔDG-CC4 erzeugt wurde.

Konstruktion einer BHK-Zelllinie, die das VSV G-Protein exprimiert.

[0028] Das eingesetzte Tetracyclin-regulierte System wurde vorher beschrieben (Shockett et al., 1995). Ein VSV G-Gen wurde aus einem Plasmid mit der Bezeichnung pBSG durch Spaltung mit XhoI hergestellt. Die Extensionen wurden mit Klenow-Enzym aufgefüllt, und das Fragment an pTet-Spice (Life Technologies) ligiert, das mit EcoRV gespalten worden war. Das resultierende Plasmid hatte die Bezeichnung pTET-G. BHK-Zellen auf den 10 cm-Platten (20% konfluent) wurden mit 1 µg pTET-G und 10 µg pTet-TAK (Life Technologies) transfiziert, wobei das CaPO₄-Verfahren verwendet wurde (Säugetier-Transfection Kit; Stratagene). Ein Tag nach der Transfektion wurde 0,5 µg/ml Tetracyclin zugegeben, um die G-Proteinexpression zu unterdrücken, was für BHK Zellen toxisch ist, und stabil transfizierte Zellen wurden selektiert, indem 0,75 mg/ml Geneticin (G418) zugegeben wurde. 10 Tage nach der Transfektion wurden die Zellkolonien isoliert und nach Induktion durch Entfernung des Tetracyclins, wurden sie auf die Expression von VSV G Protein durch Immunfluoreszenzmikroskopie durchmustert.

Gewinnung von VSV-Rekombinanten.

[0029] Babyhamster-Nierenzellen (BHK-21, ATCC) wurden in DMEM (Dulbeccos modifiziertes Eagle's Medium), angereichert mit 5% fötalem Rinderserum (FBS), gehalten. Zellen auf 10 cm-Schalen (~80% konfluent) wurden bei einer MOI von 10 mit vPF7-3 infiziert (Lawson et al., 1995). Nach 1 Stunde wurden die Plasmide, die die N-, P-, G- und L-Proteine und die geeignete rekombinante Antigenom-RNA kodieren, in die Zellen mit einem kationischen Liposomreagens transfiziert, das Dimethyldioctadecylammoniumbromid und Phosphatidylethanolamin enthielt (Lawson et al., 1995; Rose et al., 1991). Die Plasmidmengen waren 10 µg vom jeweiligen Vollängen-Plasmid (VSVΔG-CD4 oder VSVΔG-CC4), 3 µg pBS-N, 5 µg pBS-P, 4 µg BS-G und 2 µg pBS-L. Die Überstände der Gewinnungen wurden durch 0,22 µm-Filter filtriert, und 5 ml wurden verwendet, um BHK-G-Zellen auf den 10 cm-Platten zu infizieren, die zwölf Stunden lang durch Entfernung des Tetracyclins induziert worden waren. Die Überstände des ersten Durchganges wurden zweimal durch einen Spritzenfilter filtriert (0,1 µm Porengröße), um jedes mögliche Vaccinia-Virus zu entfernen, und die Viren wurden dann auf 4 × 10⁶ BHK-G Zellen passieren gelassen. Die Überstände (10 ml) wurden auf BHK-G Zellen titriert und bei -80°C eingefroren. Für die Produktion der Virusstammpräparate wurden 2 × 10⁶ BHK-Zellen auf den 10 cm-Platten für 2 Std. mit den 10 ml-Überständen von VSVΔG-CD4 oder VSVΔG-CC4, gewachsen auf BHK-G Zellen, infiziert, dreimal mit phosphatgepufferter Saline (PBS) gewaschen, gefolgt von der Zugabe von 10 ml RPMI-Medium mit 10% fötalem Rinderserum (FBS) oder 10 ml DMEM mit 5% FBS. 16 Std. nach der Infektion wurden die Überstände durch Zentrifugieren geklärt und für Experimente verwendet oder bei -80°C aufbewahrt.

Vorbereitung und Analyse der Viren.

[0030] Zur Isolation von Virions wurde ein Monolager aus BHK-Zellen (~80% konfluent) auf einer 10 cm-Platte mit VSVΔG-CD4 oder VSVΔG-CC4 (Multiplicity of Infektion, MOI=5) oder Wildtyp-VSV (MOI=0,01) infiziert. 16 Std. nach der Infektion wurden Zelltrümmer und Kerne durch Zentrifugation bei 1250 × g für 5 Minuten entfernt und Virus wurde dann zweimal durch Ultrazentrifugation bei 120.000 × g durch eine 20% Saccharoselösung gereinigt, die 10 mM Tris HCl, pH 7,5 und 1 mM EDTA enthielt. Viruspellets wurden resuspendiert und durch SDS-PAGE (10% Acrylamid) analysiert. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt oder auf Nitrozellulosemembranen überführt. Die Membranen wurden mit 5% Magermilchpulver in TEST (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 0,05% TweenTM-20) für 1 Std. bei Raumtemperatur blockiert und dann mit einem Antikörper gegen CD4 (Schaf-α-CD4, AIDS Research Reference and Reagent Program) oder einem Antikörper 12CA5 (Boehringer-Mannheim) gegen das HA-Epitop in CXCR4 inkubiert. Proteine wurden nach Inkubation mit Meerrettichperoxydase-konjugiertem Esel-anti-Schaf-IgG, oder Meerrettichperoxydase-konjugiertem Ziege-Anti-Maus-IgG (Jackson Research) für 1 Std. bei Raumtemperatur sichtbar gemacht, wobei das System mit erhöhter Chemolumineszenz (ECL; Amersham) verwendet wurde.

Elektronenmikroskopie und Markierung mit Gold-konjugierten Antikörpern.

[0031] Viruspartikel aus der Infektion von ungefähr 10^7 Zellen auf einer 15 cm-Schale wurden aus dem Kulturmedium gewonnen, indem zuerst die Zelltrümmer bei $1500 \times g$ für 10 Min. pelletiert wurden. Das Virus wurde dann durch Zentrifugation konzentriert und gereinigt, wie oben beschrieben. Virusproben wurden auf kohlebeschichtete Grids für 5 Minuten absorbiert und dann mit 1% BSA in PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Die Grids wurden dann auf einen 50 μ l-Tropfen von anti-CD4 MAK OKT4 (Reinherz et al., 1979), 1:50 in PBS verdünnt, das 1% BSA enthält, untergebracht. Nach 1 Stunde wurde überschüssiger Antikörper entfernt, indem die Grids nacheinander auf fünf 50 μ l-Tropfen 1% BSA in PBS jedes Mal für 2 Minuten überführt wurden. Die Grids wurden dann auf einen 50 μ l Tropfen Ziege-anti-Maus IgG (Fc) überführt, das mit 15 nm Goldpartikeln markiert war (AuroProbe, Amersham Inc.). Ungebundene Goldkonjugate wurden durch fünf aufeinander folgende 2 Min. Waschen mit PBS entfernt. Die Virusimmunogoldkomplexe wurden dann negativ gefärbt, durch Inkubation der Grids für 4 Minuten auf 50 μ l-Tropfen 2% Phosphowolframsäure (pH 7,2). Überschüssiger Farbstoff wurde entfernt und die Grids wurden an der Luft getrocknet. Bilder der Viren wurden mit einem Zeiss EM910 Elektronenmikroskop erhalten.

Infektion und Immunfluoreszenzmikroskopie der infizierten Jurkat-Zellen.

[0032] Ungefähr 3×10^6 Jurkat-Zellen (Klon E6-1, ATCC #TIB-125) wurden in T-25-Kolben überimpft und in RPMI-Medium, ergänzt mit 10% FBS, gezüchtet. Die Infektion mit HIV-1-Stamm IIIB hatte eine MOI von ungefähr 0,01. Fünf Tage nach der Infektion wurden die Zellen mit 5 ml Medium superinfiziert, das VSV Δ G-CC4 enthielt. Als Kontrollen wurde eine HIV-infizierte Kultur nicht superinfiziert, und eine dritte Kultur wurde nur mit VSV Δ G-CC4 infiziert. Zellen wurden zur Analyse zu jedem Zeitpunkt wie folgt gesammelt. Eine Hälfte des Volumens der Kultur wurde gesammelt und ein gleiches Volumen RPMI, ergänzt mit 10% FBS, wurde zurück zu den ursprünglichen Kulturen hinzugefügt. Die Zellen wurden bei 1000 U/min für fünf Minuten bei 5°C in einer IEC Centra-7R Kühlzentrifuge (Fisher Scientific) pelletiert. Die Medien wurden verworfen, die Zellen wurden einmal in 5 ml PBS gewaschen und erneut pelletiert. Das PBS wurde entfernt, und die Zellen wurden in 100 μ l PBS resuspendiert. Die Zellen wurden dann in 1 ml 3% Paraformaldehyd eine Stunde lang bei Zimmertemperatur oder über Nacht bei 4°C fixiert. Nach Permeabilisierung in 1% Triton X-100, wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen VSV N-Protein und mit dem menschlichen polyklonalen HIV-Immunglobulin (AIDS Research Reference and Reagent-Program) gefärbt, gefolgt von Rhodamin-konjugierten Anti-Maus- und FITC-konjugierten Anti-Mensch-Antikörpern (Jackson Research).

[0033] Die Zellen wurden mit Planapochromat 40X Objektiv auf einem Nikon Microphot-FX-Mikroskop, das für Epifluoreszenz ausgerüstet war, überprüft und fotografiert. Die Infektion der Zellen mit HIV-1 oder VSV Δ G-CC4 wurde überwacht, indem man mindestens drei statistische Zellfelder zählte, die gewöhnlich 100-200 Zellen enthielten. Die Synzytien wurden als Einzelzellen gezählt.

Ermittlung der HIV Titer.

[0034] Die HIV-Titer wurden mit Überständen aus infizierten Kulturen erhalten und dreifache serielle Verdünnungen in Platten mit 96 Vertiefungen hergestellt. Zehntausend MT-2-Zellen, bereitgestellt vom AIDS Research Reference and Reagent Program (ARRRP), wurden in jede Vertiefung gegeben, und das Virus und die Zellen wurden durch Pipettieren gemischt. Die Platten wurden für 3 bis 5 Tage bei 37°C inkubiert und auf die Anwesenheit von Synzytien untersucht. Die Titer wurden zu jedem Zeitpunkt dreifach durchgeführt, und zwei oder mehr Synzytien pro Vertiefung wurden als positiv für HIV Infektion gezählt. Die Titer wurden errechnet, wie zuvor beschrieben (Reed und Muench, 1938) und werden als 50% Gewebe-Kultur-infektiöse Dosen (TCID₅₀) pro ml berichtet.

Reverse-Transkriptase-Tests.

[0035] Jeder Test wurde in Platten mit 96 Vertiefungen in doppelter Ausführung durchgeführt (Willey et al., 1988). Fünfundzwanzig Mikroliter Reaktionsmix für die Reverse Transkription (0,05% NP-40, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 75 mM KCl, 2 mM DTT, 5 mM MgCl₂, 5 Einheiten Oligo (dT) 12-18, 5 mg/ml poly A) wurden hinzugefügt, gefolgt von der Zugabe von 10 μ l der zellfreien Kulturüberstände. Zusätzliche 25 μ l Reaktionsmix wurden hinzugefügt, die 10 μ Ci/ml α [³²P]-dTTP enthalten, und die Reaktion wurde für 90 Minuten bei 37°C gehalten. Fünf Mikroliter jeder Probe wurden dann punktförmig auf Whatman DE81-Papier aufgetragen, das an der Luft trocknen gelassen wurde. Das DE81-Papier wurde dann in $2 \times$ SSC (0,3 M NaCl, 20 mM Natriumcitrat)-Puffer viermal, jedes Mal bei Raumtemperatur für fünf Minuten gewaschen, gefolgt von zwei einminütigen Wäschen in 95% Ethanol bei Raumtemperatur. Nach dem Trocknen an der Luft wurde das Papier einem Molecular Dyna-

mics PhosphorImager-Screen über Nacht ausgesetzt. Die Proben wurden direkt auf dem Phosphorimager quantitativ bestimmt und durch Zählen in einem Szintillationspektrometer nach Ausschneiden aus dem Papier. Doppelte Proben stimmten innerhalb von 5% überein.

Neutralisation der Infektion durch VSVΔG-CC4.

[0036] Polyklonales Schaf-anti-CD4-Serum und anti-gp120-Serum (ARRRP) wurden bei 56°C eine Stunde lang wärmebehandelt, um das Komplement zu inaktivieren. Der neutralisierende monoklonale anti-VSV-Antikörper (I1) war die Mause-Aszites-Flüssigkeit. Die Neutralisationen erfolgten folgendermaßen: VSVΔG-CC4-Virus (1 ml, hergeleitet von $\sim 10^6$ infizierten BHK-Zellen) wurden mit 100 μ l anti-CD4 oder 100 μ l anti-VSV eine Stunde lang bei 37°C gemischt, und dann wurde die Mischung zu $\sim 10^6$ Jurkat-Zellen hinzugefügt, die mit einer MOI von 0,01 HIV-1 IIIB fünf Tage vorher infiziert worden waren. Alternativ wurden 100 μ l anti-gp120-Serum direkt zu 1 ml HIV-infizierten Jurkat-Zellen eine Stunde lang bei 37°C hinzugefügt. Dann wurde 1 ml VSVΔG-CC4 zu den Zellen hinzugefügt. Nach 3 Tagen wurden die Zellen bei 1000 U/min in einer klinischen Zentrifuge für 5 Minuten pelletiert und einmal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden fixiert und gefärbt, um HIV und VSV N Protein-Antigene zu ermitteln.

Ergebnisse

Gewinnung von VSV Rekombinanten, die CD4 und CXCR4 exprimieren.

[0037] Gentechnische Veränderung der nichtsegmentierten Negativstrang-RNA-Viren wie VSV wird durch die Tatsache erschwert, dass die minimale infektiöse Einheit des Virus nicht RNA ist, sondern vielmehr das Viren-RNA-Genom in einem Ribonukleoproteinkomplex, der aus Nucleocapsid (N) und Polymeraseproteinen (L und P) besteht. Infektiöses VSV kann aus Plasmid-DNA wie folgt gewonnen werden. Vier verschiedene Plasmide, die die Vollängen-Antigenom-VSV-RNA und das N-, P- und L-Gen unter Steuerung der Promotoren des Bakteriophagen T7 exprimieren, werden in Zellen transfiziert, die bereits mit einer Vaccinia Virus-Rekombinante infiziert sind, die T7-RNA-Polymerase exprimiert (vTF7-3). Nach dem intrazellulären Zusammenbau der Antigenom-RNA in Nucleocapside folgt die VSV-Replikation und -Transkription, um infektiöses, replikationsfähiges VSV zu erzeugen (Fuerst et al., 1986; Lawson et al., 1995; Whelan et al., 1995). Zusätzliche Gene können aus weiteren Transkriptionseinheiten exprimiert werden, die in das VSV-Genom eingebracht werden (Schnell et al., 1996a).

[0038] Die Konstruktion einer VSV-Rekombinante, die das CD4-Protein neben den fünf VSV-Proteinen N, P, M, G und L exprimieren, wurde zuvor beschrieben (Schnell et al., 1996b). Zur Erzeugung einer Rekombinante, die CD4 und CXCR4 anstelle des VSV-G exprimiert, wurde das stromaufwärts gelegene VSV-G-Gen aus dem VSVCD4-Konstrukt deletiert ([Fig. 1](#)). Die Gewinnung von Virus mit der Bezeichnung VSVΔG-CD4 erfolgte dann durch Einschließen eines komplementierenden Plasmids, das das VSV-G-Protein codiert, neben denen, die N, P und L codieren. Das Gen, das CXCR4 an der Position stromabwärts von CD4 codiert, wurde anschließend zugegeben, und das Virus mit der Bezeichnung VSVΔG-CC4 wurde gewonnen. Weil die gewonnenen Viren nur eine einzige Infektionsrunde auf BHK-Zellen durchführen können, wurden sie zu Beginn gewonnen und auf Zellen gezüchtet, die mit einem Vaccinia-Virus infiziert sind, das die T7-RNA-Polymerase codiert und das transient ein komplementierendes VSV-G-Protein aus einer transfizierten Plasmid-DNA exprimiert.

Eine Zelllinie, die das VSV-G-Protein exprimiert, ermöglicht das Wachstum der defekten Viren.

[0039] Zur Anzucht des VSVΔG-CD4- und VSVΔG-CC4-Virus in Abwesenheit von Vaccinia-Virus, wurde eine BHK-Zelllinie, die das VSV-G-Protein aus einem induzierbaren Promoter exprimiert (Shockelt et al., 1995), gezüchtet. Die [Fig. 2](#) zeigt, dass das VSVΔG-CC4-Virus Plaques auf dieser Zelllinie bildet, was mehrfache Infektionsrunden anzeigt. Die nach der Anzucht der defekten Viren auf dieser Linie erhaltenen Titer lagen im Bereich von $0,5-1 \times 10^6$ pfu/ml. Diese Titer sind gegenüber denen des Wildtyp-VSV mindestens 1000-fach verringert, weil die Mengen an G-Protein, die von der komplementierenden Zelllinie bereitgestellt werden, niedrig sind, verglichen mit denen, die bei der Wildtyp-Infektion exprimiert werden.

Einbau von CD4 und CXCR4 in rekombinante Viren.

[0040] Um festzustellen, ob die Moleküle CD4 und CXCR4 von den defekten Viren exprimiert und in Viruspartikel eingebaut wurden, wurden die BHK-Zellen (die VSV G nicht exprimieren) mit VSVΔG-CD4 oder VSVΔG-CC4 infiziert, das auf der BHK-G Linie (MOI = 5) gezüchtet worden war. Nach 16 Stunden, als alle Zellen getötet worden waren, wurden die Viruspartikel aus dem Medium gereinigt. Virenproteine wurden dann

durch SDS-PAGE getrennt und durch Färben mit Coomassie Blau erfasst. Das Wildtyp-Virus enthält die L-, G-, N- und M-Proteine (P ist ein kleines Protein, das mit N comigriert), während den Viren VSVΔG-CD4 und VSVΔG-CC4 G fehlt, die aber ein neues Protein von ungefähr 55000 Dalton enthalten, d.h. mit der Größe, die für CD4 erwartet wird. Das Vorhandensein von CD4 in den Partikeln wurde auch durch Western-Blotting mit Schaf-anti-CD4-Antikörper oder monoklonalem Antikörper 12CA5 gegen das HA-Epitoptag in CXCR4 überprüft. Das Protein CXCR4 wurde nicht in VSVΔG-CC4 durch Färbung nachgewiesen, möglicherweise, weil es sieben membranüberspannende Segmente enthält, die den Farbstoff nicht binden, aber wurde leicht durch Western-Blotting nachgewiesen.

[0041] Das Keimen von VSV bei Fehlen des VSV G-Proteins ist bekanntlich ungefähr 20-fach weniger effizient als das Keimen in seiner Anwesenheit (Knipe et al., 1977). Ähnliche Resultate sind für Rabies-Virus erreicht worden (Mebatsion et al., 1996). Obgleich die Mengen des Proteins, ermittelt durch Coomassie Blau-Färbung, für alle Viren ähnlich aussehen, stammte das Virus, das in die Testspuren geladen wurde, von 10^7 infizierten BHK-Zellen ab, wohingegen das Wildtyp-Virus in der Kontrollspur nur von 2×10^5 oder 50-fach weniger infizierten Zellen stammte, um eine ähnliche Färbung zu erzielen. Die Resultate bestätigen nicht nur die Bedeutung des VSV G-Proteins beim Antreiben einer hocheffizienten Viruskeimung, sondern veranschaulichen auch, dass signifikante Mengen Virusproduktion selbst bei Fehlen des VSV G-Proteins erfolgen.

[0042] Zur Untersuchung der Morphologie der rekombinanten Viruspartikel und zur Überprüfung, dass CD4 auf der Virenmembran exponiert wurde, wurden gereinigte Viruspartikel nach dem Markieren mit Antikörper an CD4 und einem goldkonjugierten Sekundärantikörper durch Elektronenmikroskopie untersucht. Photographien der negativ gefärbten Viruspartikel sind in [Fig. 3](#) gezeigt. Wildtyp VSV-Partikel enthielten sichtbare G Protein-spitzen (Pfeile) und banden Antikörper nicht an CD4, wohingegen die VSVΔG-CD4- oder VSVΔG-CC4-Viren keine sichtbaren Spitzen aufwiesen und anti-CD4-Antikörper banden. Der Antikörper an CXCR4, der beim Western-Blotting verwendet wird, erkennt das interne C-terminale HA-Tag an CXCR4 und ist folglich nicht zum Markieren von Viruspartikeln verwendbar.

Infektion der HIV-1 infizierten Zellen durch VSVΔG-CC4.

[0043] Weil HIV-1-infizierte Zellen das gp120/41-Hüllprotein auf ihrer Oberfläche haben, wäre es möglich, diese Zellen mit VSVΔG-CC4 zu infizieren. Die auf der Zelloberfläche vorhandenen gp120/41 Moleküle, sollten an CD4 und CXCR4 auf der Virusoberfläche binden und die Fusion der Viren- und Zellmembranen fördern. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde eine menschliche T Zelllinie (Jurkat) mit HIV-1 IIB infiziert. Fünf Tage nach der Infektion wurde es von den vorhergehenden Experimenten erwartet, dass etwa die Hälfte der Zellen mit HIV-1 infiziert wird, und es wurde VSVΔG-CC4-Virus zugegeben. Zwei Kontrollkulturen, eine nur mit HIV-1 infiziert, und die andere nur mit VSVΔG-CC4 infiziert, wurden parallel verfolgt.

[0044] Zuerst wurde die Infektion durch HIV-1 und VSVΔG-CC4 mit indirekter Immunfluoreszenzmikroskopie zur Erfassung beider HIV-1 Proteine und von VSV-Nucleokapsid (N)-Protein verfolgt. Ein Beispiel von Ergebnissen aus der Immunfluoreszenzanalyse 19 Tage nach der HIV-Infektion ist in der [Fig. 4](#) gezeigt, zusammen mit einem Nomarski-Bild vom gleichen Zellfeld. Eine Kompilierung der Immunfluoreszenzdaten, die während des Experimentes erhalten werden, ist in der [Fig. 5](#) graphisch dargestellt. Die in der [Fig. 4](#) gezeigten Felder veranschaulichen, dass in der nur mit HIV-1 infizierten Kontrollkultur fast alle Zellen positiv auf HIV-Antigene (A und B) gefärbt wurden, wohingegen keine der Zellen positiv auf VSV N-Protein (C) gefärbt wurden. In den mit HIV-1 und VSVΔG-CC4 infizierten Zellen war nur ein kleiner Bruchteil der Zellen für die HIV-1-Antigene positiv (D und E), und der Großteil jener Zellen war auch positiv für VSV N-Protein (F), was anzeigt, dass sie mit VSVΔG-CC4 superinfiziert wurden. Es wurde auch beobachtet, dass seltene Zellen, die für die VSV N-Proteinexpression stark positiv waren, nur wenig oder kein offensichtliches HIV-Protein hatten. Diese Zellen können aus dem Abschalten der zellulären und HIV-Proteinsynthese durch VSVΔG-CC4 oder aus anderen Infektionsmechanismen hervorgehen (siehe Diskussion unten). In den nur mit VSVΔG-CC4 infizierten Jurkat-Zellen zeigten keine der Zellen die Anwesenheit von HIV- oder VSV N-Antigenen (H, I und J).

[0045] Aus der quantitativen Bestimmung in [Fig. 5](#) ist es offensichtlich, dass bei der Infektion der Zellen nur mit HIV-1 der Prozentsatz der HIV-1⁺-Zellen bis fast 100% stieg und während des Experimentes hoch blieb. Wurden die Zellen zuerst mit HIV-1 und anschließend mit VSVΔG-CC4 infiziert, begann der Prozentsatz der HIV⁺-Zellen an Tag 14 zu sinken und flachte an Tag 21 auf Niveaus zwischen 5 und 10% HIV⁺ ab. Zusätzlich zeigt die [Fig. 5](#), dass der Prozentsatz von HIV-1⁺-Zellen, die auch mit VSVΔG-CC4 infiziert wurden, stieg und dann ein Plateau bei ungefähr 90-95% erreichte. Es scheint folglich, dass die mit HIV-1 infizierten Zellen rasch mit VSVΔG-CC4 superinfiziert werden und getötet werden, bevor hohe Mengen HIV-1 freigesetzt werden können. Ein Gleichgewicht wird dann zwischen den beiden Viren erreicht, in denen die HIV-Infektion durch

VSVΔG-CC4-Infektion gesteuert und auf niedrigen Niveaus beibehalten wird. Sehr ähnliche Resultate wurden in einem Experiment erreicht, das mit der H9 T-Zelllinie, einer anderen Zelllinie, in der HIV-1 IIIB gut wächst, durchgeführt wurde.

[0046] Die Möglichkeit, dass das Virus VSVΔG-CD4, dem das Corezeptor-Gen fehlt, HIV-1-infizierte Zellen infizieren könnte, wurde auch geprüft. In einem Experiment wurde es beobachtet, dass ein niedriges Infektionsmaß durch VSVΔG-CD4 (ungefähr 10% von dem mit VSVΔG-CC4 beobachteten) auftrat. Jedoch konnte die anfängliche Infektion mit Antikörper gegen VSV G vollständig neutralisiert werden, was zeigt, dass eine Spur des G Proteins, die genügte, um die Infektion zu beginnen, in den Virions zugegen gewesen sein musste. Dieses G-Protein wurde vermutlich von dem in der BHK-G Linie gewachsenen Eingangsvirus in die BHK Zelllinie überführt, und dann in die austretenden Virions eingebaut. Sobald die Infektion in HIV-infizierten Jurkat-Zellen hergestellt wurde, bestand sie interessanterweise für einige Wochen fort, was anzeigte, dass sich das Virus fortpflanzen konnte, ohne seinen eigenen Corezeptor zu kodieren. Vermutlich können keimende Virions zellkodierten Coreceptor aufnehmen und können sich dann vermehren. Jedoch war die Steuerung der HIV-1-Infektion nicht so stark wie mit VSVΔG-CC4, was zeigt, dass das Virus vorzugsweise hohe Niveaus des Coreceptors kodiert. Weil die Steuerung der HIV-Infektion ohne Coreceptor weniger wirkungsvoll war, erfolgten keine weiteren Studien mit diesem Virus.

VSVΔG-CC4-Infektion steuert die Freisetzung von infektiösem HIV-1.

[0047] Zum Messen der Effekte von VSVΔG-CC4 auf die Produktion von infektiösem HIV-1 und auf die Freisetzung der HIV-1-Partikel, wurden die in den [Fig. 4](#) und 5 gezeigten Experimente wiederholt, folgten aber stattdessen den HIV-1-Titer und der Freisetzung der reversen Transkriptase (RT) in das Medium ([Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#)). Zum Zeitpunkt der Zugabe von VSVΔG-CC4 drei Tage nach der HIV-1-Infektion, waren die HIV-Titer und die RT-Mengen im Medium niedrig. In den Kontrollzellen, die nur mit HIV-1 infiziert wurden oder in den Zellen, die mit VSVΔG-CC4 superinfiziert wurden, hatten die HIV-Titer und die RT-Aktivität 10 Tage nach Infektion Maxima. Es gab dann eine Abnahme in der RT-Aktivität bis zum Tag 14 in den Zellen, die mit VSVΔG-CC4 superinfiziert waren, und eine Abschwächung von ungefähr 10% der RT-Menge in den Kontrollzellen. Die Resultate mit Titer von infektiösem HIV-1 waren viel drastischer, mit einem kompletten Verschwinden von infektiösem HIV-1 (> 4 log unter der Kontrolle) an Tag 14, gefolgt von einer Fluktuation bei Mengen von nur 0-39 infektiösen Partikeln pro Milliliter bis zu Tag 34. Diese Titer sollten mit persistierenden Titer von $\sim 10^4$ /ml für die Kontrollkultur verglichen werden, die nicht mit VSVΔG-CC4 infiziert wurde.

[0048] Die RT-Resultate stimmten mit den vorherigen Beobachtungen der Immunofluoreszenz in [Fig. 5](#) überein, aber die viel größeren Abnahmen an infektiösem HIV-Titer wurden nicht erwartet. Diese niedrigeren Titer konnten erklärt werden, wenn die VSVΔG-CC4-Infektion auf HIV-infizierte Zellen selektierte, die wenig oder keine HIV-Hülle exprimierten, und folglich HIV-Partikel produzierten, denen die Hülle fehlt, die aber RT enthalten.

Anti-CD4 oder anti-gp120 blockieren die Infektion durch VSVΔG-CC4.

[0049] Neutralisationskontrollexperimente (Tabelle 1) zur Verifizierung, dass dieser Eintritt von VSVΔG-CC4 in HIV-infizierte Zellen von CD4 und gp120 abhängt, wurden auch durchgeführt. VSVΔG-CC4 wurde mit Antikörper gegen CD4, neutralisierendem Antikörper gegen VSV-G oder ohne Antikörper inkubiert, vor der Zugabe zu den Jurkat-Zellen, die für fünf Tage wie in Tabelle 5 mit HIV-1 infiziert worden waren. Die Tabelle 1 zeigt, dass anti-CD4 vollständig die VSVΔG-CC4-Infektion beseitigte, der Antikörper gegen G hingegen nicht.

Antikörper ^a	%HIV ⁺ Zellen ^b	%VSV N ⁺ Zellen ^b
keiner	60	39
anti-VSV G	59	37
anti-CD4	74	0
anti-HIV gp120	71	0

^a Auf BHK Zellen gewachsene Viren, die VSV G nicht exprimieren, wurden mit anti-VSV G oder anti-CD4 inkubiert, oder die Zellen wurden mit anti-HIV gp120 vor dem Mischen von Virus und Zellen inkubiert.

^b HIV-positive und VSV N⁺-Zellen wurden durch indirekte Immunofluoreszenzmikroskopie wie in den [Fig. 4](#) und 5 identifiziert. Ungefähr 100 Zellen aus statistischen Feldern wurden für jede Ermittlung gezählt. Der Prozent-

satz der Zellen, die für HIV-Antigene oder VSV N-Protein positiv sind, wird angezeigt.

[0050] Ähnlich verhinderte die Vorinkubation der HIV-infizierten Zellen mit einem polyklonalen anti-gp120-Antikörper vollständig die Infektion durch VSVΔG-CC4. Weil CD4 den MHC der Klasse II an Zelloberflächen binden kann (Doyle und Strominger, 1987), war es denkbar, dass ein gewisses niedriges Ausmaß der Infektion nach Bindung von VSVΔG-CC4 an MHC der Klasse II an Zellen auftreten könnte, obgleich dieses nicht ohne ein Membranfusionsprotein erwartet wurde. Zur Überprüfung dieser Möglichkeit wurden Daudi-Zellen, eine Lymphozytenzelllinie, die bekanntlich abundante Mengen MHC der Klasse II-Protein exprimiert (Till et al., 1988), verwendet. Diese Zellen wurden leicht durch Wildtyp-VSV infiziert, es wurde aber keine Infektion durch VSVΔG-CC4 beobachtet.

Diskussion

[0051] Ein rekombinantes VSV, dem sein eigenes Hüllprotein (G) fehlt und das stattdessen die HIV-1-Rezeptor- und Corezeptormoleküle CD4 und CXCR4 exprimiert, wurde konstruiert. Dieses neue Virus ist für den Eintritt in normale Zellen defekt, kann aber auf Zellen vermehrt werden, die ein komplementierendes VSV-Hüllprotein exprimieren. Das komplementierende Virus kann dann auf Zellen wachsen, die kein G-Protein exprimieren, wobei es Partikel hervorbringt, die CD4 und CXCR4 in der Virenmembran enthalten. Diese Viren sind replikationsfähig, können aber nur in Zellen eintreten und sich fortpflanzen, die zuerst mit HIV-1 infiziert wurden und HIV-1-Hüllprotein exprimieren. Die Infektion dieser Zellen durch VSVΔG-CC4 wird durch Antikörper gegen CD4 neutralisiert, der dem Virus hinzugefügt wird, oder durch Antikörper gegen HIV gp120, der den Zellen hinzugefügt wird.

[0052] Die Resultate zeigen, dass in einer Mischpopulation von Zellen, von denen etwa die Hälfte HIV-1-infiziert war und die andere Hälfte nicht infiziert war, eine Superinfektion mit VSVΔG-CC4 schließlich die Produktion von infektiösem HIV-1 auf Niveaus begrenzte, die kaum nachweisbar oder nicht nachweisbar waren, und zwar mindestens 300-fach bis 104-fach niedriger als die HIV-Titer, die von den Kontrollzellen produziert wurden, die nicht mit VSVΔG-CC4 superinfiziert wurden. Diese Reduktion ist vermutlich das Resultat der Abtötung der HIV-1-infizierten Zellen durch das VSVΔG-CC4-Virus. Die Reduktion der HIV-1-Titer war größer als aufgrund der Analyse der Anzahl der HIV-1-infizierten Zellen oder aus RT-Tests vorhergesagt wurde. Die Zahl der HIV-positiven Zellen wurde ungefähr zehnfach durch VSVΔG-CC4-Infektion verringert, und die Freisetzung von RT wurde auf ein ähnliches Maß verringert. Berücksichtigt man den Mechanismus der VSVΔG-CC4-Wirkung, ist diese Diskrepanz angemessen, weil VSVΔG-CC4 jene Zellen anzielt und abtötet, die HIV-Hüllprotein exprimieren und folglich auf Zellen selektiert, die wenig oder keine HIV-Hülle produzieren. Solche Zellen erweisen sich noch als positiv für die HIV-1-Antigenproduktion und würden normale Mengen HIV-ähnliche Partikel produzieren, die RT enthalten, jedoch wäre der Großteil dieser Partikel nicht-infektiös.

[0053] Der Bestand eines niedrigen Niveaus der HIV-1- und VSVΔG-CC4-Coinfektion für mehr als einen Monat in der Kultur zeigt an, dass beide Viren sich weiterhin replizieren und dass sie ein Gleichgewicht erreicht haben. Auf der Basis der Daten erscheint es unwahrscheinlich, dass VSVΔG-CC4 überhaupt die HIV-1-Infektion in der Kultur vollständig eliminiert. Dieser Bestand des niedrigen Niveaus kann auftreten, weil VSVΔG-CC4 nach Expression von gp120/41 auf der Zelloberfläche nur HIV-1-infizierte Zellen infizieren kann, und solche Zellen setzen wahrscheinlich etwas HIV-1 frei, bevor sie getötet werden.

[0054] Das VSVΔG-CC4-Virus infiziert Zellen, die bereits mit HIV-1 infiziert worden sind, aber es kann auch direkt mit HIV-1-Virions fusionieren. Solche fusionierte Viren enthalten die Nukleokapside von HIV und VSV und können die Infektion einleiten, wenn sich noch genügend gp120/41 auf der Membran befindet. Eine solche Infektion würde ziemlich sicher die Replikation von VSVΔG-CC4 begünstigen, weil VSV die zelluläre Proteinsynthese in 2-3 Stunden abstellen würde, sogar bevor HIV genügend Zeit für reverse Transkription und Integration hatte. Die Infektion durch diese fusionierten Viren könnte das Vorhandensein von Zellen erklären (Fig. 4), die VSV Proteine bilden, aber keine HIV-Proteine synthetisiert zu haben scheinen. Man möchte zwar nicht durch eine bestimmte Theorie gebunden sein, es ist jedoch möglich, dass VSV die HIV-Proteinsynthese in diesen Zellen hemmte. Die Infektion der nicht infizierten Zellen durch VSVΔG-CC4 kann auch auftreten, wenn die VSVΔG-CC4-Pseudotypen, die HIV-Hüllprotein tragen, in HIV-infizierten Zellen erzeugt wurden. Der Einbau der Wildtyp-HIV-Hülle in VSV-Partikel ist extrem wirkungslos (Johnson et al., 1997), und folglich würde dieser letzte Mechanismus wahrscheinlich selten sein. Um direkt auf solche Pseudotypen zu prüfen, wurde eine kurzfristige Infektion der Jurkat-Zellen mit Überständen von den Zellen durchgeführt, die mit HIV-1 und VSVΔG-CC4 coinfiziert waren. Die VSV-Proteinexpression wurde nicht in diesen Zellen nachgewiesen, konnte jedoch leicht nachgewiesen werden, indem man den gleichen Überstand verwendete, um HIV-infizierte Jurkat-Zellen zu infizieren. Es wurde gefolgert, dass die VSVΔG-CC4 (HIV)-Pseudotypen extrem selten sind, so-

fern sie überhaupt existieren.

[0055] Einige Aspekte dieses Systems, die bemerkenswert sind. Erstens weil VSVΔG-CC4 spezifisch diese Zellen anzielt, die bereits mit HIV-1 infiziert sind, erwartet man, dass das Ausmaß der VSVΔG-CC4-Infektion parallel zur HIV Infektion verläuft und mit Klärung von HIV verschwindet. Zweitens kodiert VSVΔG-CC4 nur menschliche Proteine als seine Hüllproteine und induziert folglich nicht die Produktion der neutralisierenden Antikörper. Die internen VSV-Proteine induzieren erwartungsgemäß cytotoxische T-Zell-Reaktionen, aber solche Reaktionen können bei der Klärung der HIV-Infektion helfen, indem sie schnell die Zellen töten, die mit HIV-1 und VSVΔG-CC4 infiziert sind. Drittens werden Mutationen zur Medikamentenresistenz schnell in HIV-1 selektiert, aber die Resistenz gegen Infektion durch VSVΔG-CC4 erfordert den Verlust der Fähigkeit der HIVs, an CD4 oder Corezeptor zu binden, und wird folglich nicht selektiert.

[0056] Die Resultate veranschaulichen auch einen wichtigen Aspekt von VSV-Keimung und Zusammenbau. Auf der Basis der Virusproteinausbeuten und -titer, wird es geschätzt, dass jede BHK-Zelle, die mit Wildtyp-VSV infiziert ist, ungefähr 100.000 Partikel produziert, und bis zu 10% dieser Partikel infektiös sind. Die Deletion des VSV G-Gens verringerte die Partikel ausbeuten von VSVΔG-CC4 oder VSVΔG-CD4 ungefähr 30-50fach, was eine wichtige Rolle für G bei der Förderung der Keimung anzeigt. Trotz dieser verringerten Keimung, werden jedoch mindestens 2000 Partikel VSVΔG-CC4 oder VSVΔG-CD4 aus jeder BHK-Zelle bei Fehlen des G-Proteins produziert. Der Einbau von CD4 und CXCR4 in diese Partikel erfolgt voraussichtlich durch einen passiven Prozess des Proteinabfangens, während Virus aus der Zelloberfläche keimt, weil man auch erwartet, dass kein Protein die spezifischen Signale enthält, die den Einbau fördern. Weil VSV die Wirts-Proteinsynthese blockiert und extrem große Mengen seiner mRNA und Proteine exprimiert, sind CD4 und CXCR4 wahrscheinlich die Hauptproteine, die auf einer Zelloberfläche vorhanden sind, und folglich die Hauptproteine in der VSVΔG-CC4-Hülle.

Literaturverzeichnis

- Alkhatib, G., Combadiere, C., Broder, C. C., Feng, Y., Kennedy, P. E., Murphy, P. M., and Berger, E. A. (1996). CCCKR5: a RANTES, MIP-1alpha, MIP-1beta receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272, 1955-8.
- Berson, J. F., Long, D., Doranz, B. J., Rucker, J., Jirik, F. R., and Doms, R. W. (1996). A seven-transmembrane domain receptor involved in fusion and entry of T-cell-tropic human immunodeficiency virus type 1 strains. *J Virol* 70, 6288-95.
- Choe, H., Farzan, M., Sun, Y., Sullivan, N., Rollins, B., Ponath, P. D., Wu, L., Mackay, C. R., LaRosa, G., Newman, W., Gerard, N., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996). The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell* 85, 1135-48.
- Deng, H., Liu, R., Ellmeier, W., Choe, S., Unutmaz, D., Burkhart, M., Di Marzio, P., Marmon, S., Sutton, R. E., Hill, C. M., Davis, C. B., Peiper, S. C., Schall, T. J., Littman, D. R., and Landau, N. R. (1996). Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381, 661-6.
- Doranz, B. J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R. J., Samson, M., Peiper, S. C., Parmentier, M., Collman, R. G., and Doms, R. W. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 85, 1149-58.
- Doyle, C., and Strominger, J. L. (1987). Interaction between CD4 and class II MHC molecules mediates cell adhesion. *Nature* 330, 256-9.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., Nagashima, K. A., Cayanan, C., Maddon, P. J., Koup, R. A., Moore, J. P., and Paxton, W. A. (1996). HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381, 667-73.
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272, 872-7.
- Florkiewicz, R. Z., and Rose, J. K. (1984). A cell line expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fuses at low pH. *Science* 225, 721-3.
- Fuerst, T. R., Niles, E. G., Studier, F. W., and Moss, B. (1986). Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 8122-6.
- Johnson, J. E., Schnell, M. J., Buonocore, L., and Rose, J. K. (1997). Specific targeting to CD4+ Cells of recombinant vesicular stomatitis viruses encoding human immunodeficiency virus envelope proteins. *J. Virol.* 71, 5060-5068.
- Knipe, D. M., Baltimore, D., and Lodish, H. F. (1977). Maturation of viral proteins in cells infected with temperature-sensitive mutants of vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 21, 1149-58.
- Lapham, C. K., Ouyang, J., Chandrasekhar, B., Nguyen, N. Y., Dimitrov, D. S., and Golding, H. (1996). Evidence

- for cell-surface association between fusin and the CD4-gp120 complex in human cell lines. *Science* 274, 602-5.
- Lawson, N. D., Stillman, E. A., Whitt, M. A., and Rose, J. K. (1995). Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 4477-81.
- Maddon, P. J., Dalgleish, A.G., McDougal, J. S., Clapham, P. R., Weiss, R. A., and Axel, R. (1986). The T4 gene encodes the AIDS virus receptor and is expressed in the immune system and the brain. *Cell* 47, 333-48.
- Mebatsion, T., Konig, M., and Conzelmann, K. K. (1996). Budding of rabies virus particles in the absence of the spike glycoprotein. *Cell* 84, 941-951.
- Moore, J. P. (1997). Coreceptors: implications for HIV pathogenesis and therapy. *Science* 276, 51-52.
- Reed, L. J., and Muench, H. (1938). A Simple Method of Estimating Fifty Percent Endpoints. *American Journal of Hygiene* 27, 493-497.
- Reinherz, E. L., Kung, P. C., Goldstein, G., and Schlossman, S. F. (1979). Separation of functional subsets of human T cells by a monoclonal antibody. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4061-5.
- Riedel, H., Kondor-Koch, C., and Garoff, H. (1984). Cell surface expression of fusogenic vesicular stomatitis virus G protein from cloned cDNA. *Embo J* 3, 1477-83.
- Rose, J. K., Buonocore, L., and Whitt, M. A. (1991). A new cationic liposome reagent mediating nearly quantitative transfection of animal cells. *Biotechniques* 10, 520-5.
- Sattentau, Q. J., and Weiss, R. A. (1988). The CD4 antigen: physiological ligand and HIV receptor. *Cell* 52, 631-3.
- Schnell, M. J., Buonocore, L., Kretzschmar, E., Johnson, E., and Rose, J. K. (1996b). Foreign glycoproteins expressed from recombinant vesicular stomatitis viruses are incorporated efficiently into virus particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11359-11365.
- Schnell, M. J., Buonocore, L., Whitt, M. A., and Rose, J. K. (1996a). The minimal conserved transcription stop-start signal promotes stable expression of a foreign gene in vesicular stomatitis virus. *J. Virol.* 70, 2318-2323.
- Schuitmaker, H., and Miedema, F. (1996). Viral and cellular determinants of HIV-1 replication in macrophages. *Aids* 10, S25-32.
- Shaw, A. S., Amrein, K. E., Hammond, C., Stern, D. F., Sefton, B. M., and Rose, J. K. (1989). The Ick tyrosine protein kinase interacts with the cytoplasmic tail of the CD4 glycoprotein through its unique amino-terminal domain. *Cell* 59, 627-36.
- Shockett, P., Difilippantonio, M., Hellman, N., and Schatz, D. G. (1995). A modified tetracycline-regulated system provides autoregulatory, inducible gene expression in cultured cells and transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6522-6.
- Till, M. A., Ghetie, V., Gregory, T., Patzer, E. J., Porter, J. P., Uhr, J. W., Capon, D. J., and Vitetta, E. S. (1988). HIV-infected cells are killed by rCD4-ricin A chain. *Science* 242, 1166-8.
- Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J. M., Olson, W. C., Allaway, G. P., Cheng-Mayer, C., Robinson, J., Maddon, P. J., and Moore, J. P. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR5 [see comments]. *Nature* 384, 184-7.
- Wagner, R. R., and Rose, J. K. (1996). Rhabdoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*, B. N. Fields and D. M. Knipe, eds., (New York: Lippincott-Raven).
- Weiss, R. A. (1993). How does HIV cause AIDS? *Science* 260, 1273-9.
- Whelan, S. P. J., Ball, L. A., Barr, J. N., and Wertz, G. T. W. (1995). Efficient recovery of infectious vesicular stomatitis virus entirely from cDNA clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8388-8392.
- Willey, R. L., Smith, D. H., Lasky, L. A., Theodore, T. S., Earl, P. L., Moss, B., Capon, D. J., and Martin, M. A. (1988). In vitro mutagenesis identifies a region within the envelope gene of the human immunodeficiency virus that is critical for infectivity. *J. Virol.* 62, 139-147.
- Wu, L., Gerard, N. P., Wyatt, R., Choe, H., Parolin, C., Ruffing, N., Borsetti, A., Cardoso, A. A., Desjardin, E., Newman, W., Gerard, C., and Sodroski, J. (1996). CD4-induced interaction of primary HIV-1 gp120 glycoproteins with the chemokine receptor CCR-5. *Nature* 384, 179-83.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) ANMELDER: : John K. Rose
Matthias Schnell
Erik Johnson
- (ii) TITEL DER ERFINDUNG: Rhabdoviren mit gentechnisch
neu erzeugten Hüllen
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 4
- (iv) KORRESPONDENZADRESSE:
 - (A) ADRESSE: Yale School of Medicine
 - (B) STRASSE: 310 Cedar Street Street
 - (C) ORT: New Haven
 - (D) STAAT: Connecticut
 - (E) LAND: United States of America
 - (F) PLZ: 06510
- (v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
 - (A) MEDIUMART: 3.5" 1.44 Mb diskette
 - (B) COMPUTER: IBM PC
 - (C) BETRIEBSSYSTEM: MS DOS
 - (D) SOFTWARE: Word Processing
- (vi) DATEN DER VORLIEGENDEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER: PCT/US/98/
 - (B) ANMELDETAG: 10-JUL-1998
 - (D) KLASSIFIZIERUNG:
- (vii) DATEN DER VORHERIGEN ANMELDUNG:
 - (A) ANMELDENUMMER: 60/052,366
 - (B) ANMELDETAG: 11-JUL-1997
- (viii) ANGABEN ZUM ANWALT:
 - (A) NAME: Mary M. Krinsky
 - (B) REGISTRIERUNGS-NR.: 32423
 - (C) REFERENZ-/DOCKETNUMMER: OCR-882
- (ix) ANGABEN ZUR TELEKOMMUNIKATION:
 - (A) TELEFONNUMMER: 203-773-9544
 - (B) TELEFAXNUMMER: 203-772-0587

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NR.: 1:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 36
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS:

- (A) BESCHREIBUNG: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: in Konstrukten verwendeter Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 1:

ACTGCCCGGG CTCGAGGTTA CCATGGAGGG GATCAG 36

(3) ANGABEN ZU SEQ ID NR.: 2:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 38
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS:

- (A) BESCHREIBUNG: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: in Konstrukten verwendeter Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 2:

AGCTGCGGCC GCTAGCTTAG CTCCCGGAA GAGATGCG 38

(4) ANGABEN ZU SEQ ID NR.: 3:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 41
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS:

- (A) BESCHREIBUNG: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: in Konstrukten verwendeter Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 3:

CCGGGTACCA CGCGTACAAT GAACCGGGGA GTC CCTTTTA G 41

(5) ANGABEN ZU SEQ ID NR.: 4:

(i) SEQUENZEIGENSCHAFTEN:

- (A) LÄNGE: 61
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS:

- (A) BESCHREIBUNG: DNA

(ix) MERKMAL:

- (A) NAME/SCHLÜSSEL: in Konstrukten verwendeter Primer

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NR.: 4:

GGGCCCTCG AGCGTGATAT CTGTTAGTTT TTTTCATACT 40

CAAATGGGGC TACATGTCTT C 61

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Yale University

<120> RHABDOVIREN MIT GENTECHNISCH NEU ERZEUGTEN HÜLLEN

<130> MGH/JM/P10323EP

<140> 98933339.8

<141> 1998-07-10

<150> PCT/US98/14527

<151> 1997-07-10

<160> 4

<170> FastSEQ für Windows Version 3.0

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 1 36
 actgcccggg ctcgaggta ccattygagg gatcag

<210> 2

<211> 38

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 2 38
 agctgcggcc gctagcttag ctcccgggaa gagatgag

<210> 3

<211> 41

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

<400> 3 41
 cccgggtacca cgcgtacaat gaaccgggga gtcaccttta g

<210> 4

<211> 61

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Primer

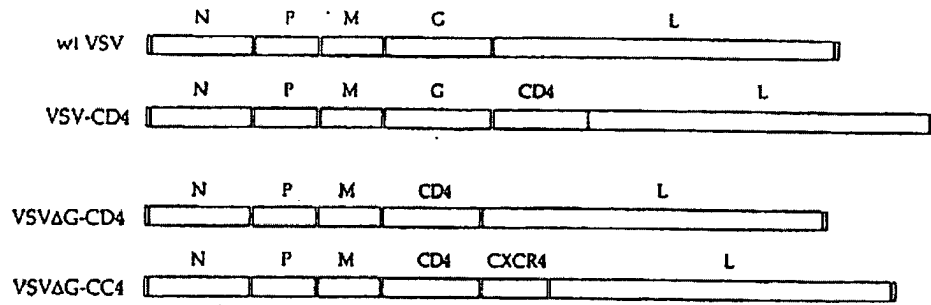
<400> 4
 gggcccctcg agcgtgatat ctgttagttt ttttcataact caaatggggc tacatgttt 60
 c 61

Patentansprüche

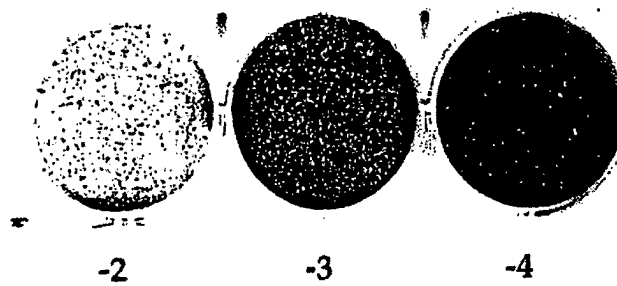
1. Replikationsfähiges rekombinantes Vesikuläres Stomatitis-Virus ("VSV"), dem ein funktionelles Rhabdovirus-Glycoprotein G-Gen fehlt und dessen Genom für mindestens ein fremdes Membranpolypeptid kodiert, so dass das fremde Membranprotein in der Virushülle des rekombinanten VSV exprimiert wird.
2. Ein rekombinantes VSV nach Anspruch 1, wobei das mindestens eine fremde Membranpolypeptid ein Zellrezeptor eines anderen Virus ist, welcher in dem VSV auf eine Art und Weise exprimiert wird, die ausreicht, um Zellen zielgerichtet anzusteuern, die mit dem anderen Virus infiziert sind.
3. Ein rekombinantes VSV nach Anspruch 1, wobei das mindestens eine fremde Membranpolypeptid mindestens ein Zellrezeptor eines pathogenen Säugervirus ist.
4. Ein rekombinantes VSV nach Anspruch 3, wobei das pathogene Säugervirus HIV-1 oder HIV-2 ist.
5. Ein rekombinantes Säugervirus nach Anspruch 4, wobei das pathogene Säugervirus HIV-1 ist.
6. Ein rekombinantes VSV nach Anspruch 4, das in seiner Virushülle ("viral envelope") mindestens einen HIV-Rezeptor, mindestens einen HIV-Corezeptor, oder Gemische aus diesen, exprimiert.
7. Ein rekombinantes VSV nach Anspruch 3, dessen Genom für CD4 und CXCR4 codiert.
8. Ein rekombinantes VSV nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das G-Glykoprotein-Gen durch mindestens ein Gen, das für das mindestens eine fremde Membranpolypeptid kodiert, ersetzt bzw. substituiert ist.
9. Ein rekombinantes VSV nach einem der Ansprüche 3-8, zur Verwendung bei der Behandlung eines Patienten, der mit einem pathogenen Säugervirus infiziert ist, wobei das rekombinante VSV in seiner Virushülle mindestens einen Rezeptor des pathogenen Säugervirus exprimiert, so dass die Zellen des Patienten, die das Virus beherbergen, zielgerichtet angesteuert werden können.
10. Ein rekombinantes VSV nach Anspruch 9, wobei der Patient mit HIV-1 oder HIV-2 infiziert ist.
11. Verwendung eines VSV nach einem der Ansprüche 3-8 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung eines Patienten, der mit einem pathogenen Säugervirus infiziert ist, wobei das rekombinante VSV in seiner Virushülle den mindestens einen Rezeptor des pathogenen Säugervirus exprimiert, so dass die Zellen des Patienten, die das Virus beherbergen, zielgerichtet angesteuert werden.
12. Verwendung nach Anspruch 11, wobei der Patient mit HIV-1 oder HIV-2 infiziert ist.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen



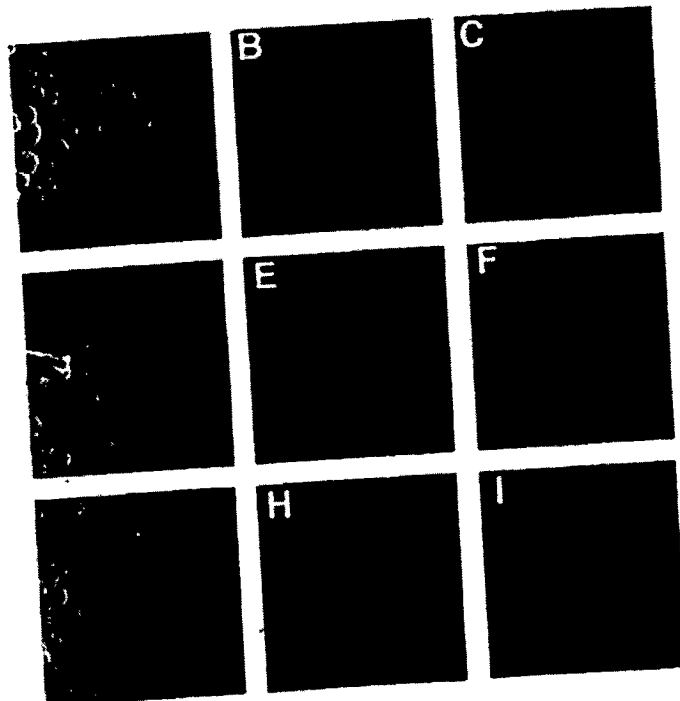
Figur 1



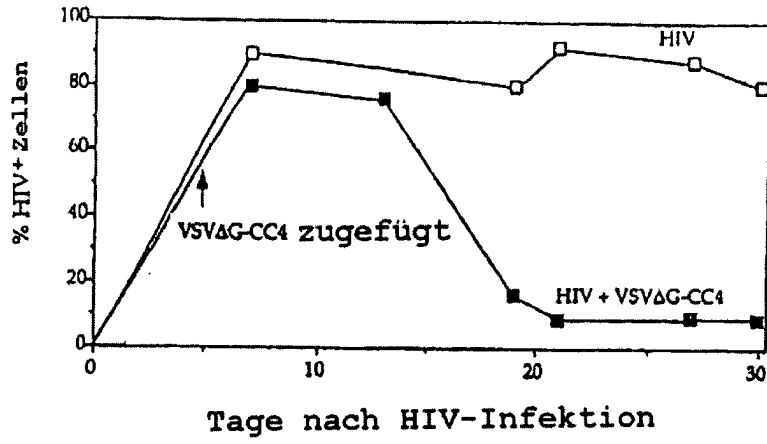
Figur 2



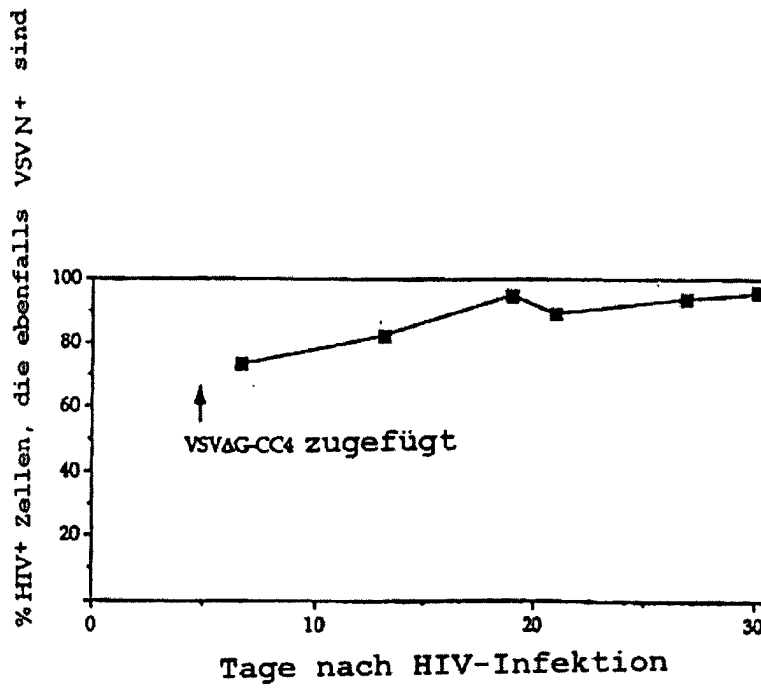
Figur 3



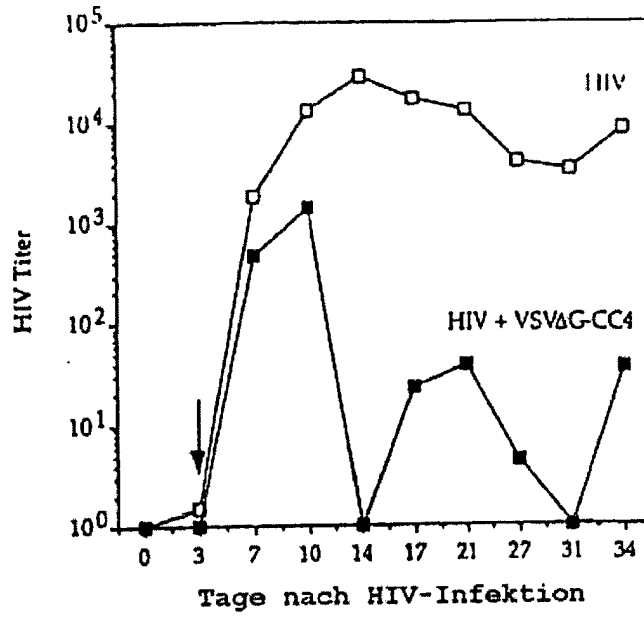
Figur 4



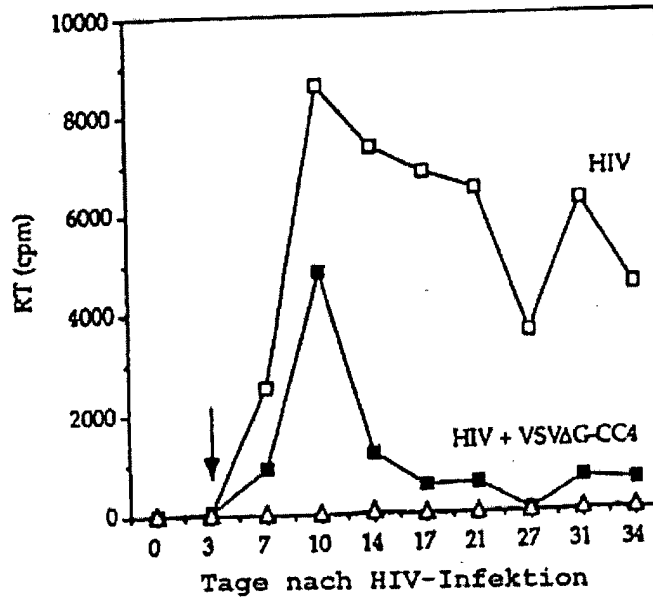
Figur 5A



Figur 5B



Figur 6A



Figur 6B