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

(10) **DE 694 34 750 T2** 2007.04.26

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 689 593 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **694 34 750.7**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US94/02951**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **94 911 647.9**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1994/021792**
(86) PCT-Anmeldetag: **17.03.1994**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **29.09.1994**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **03.01.1996**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **31.05.2006**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **26.04.2007**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/86*** (2006.01)
C12N 15/23 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/26 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C07K 14/57 (2006.01)
C07K 14/735 (2006.01)
C07K 14/535 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
32846 **17.03.1993** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Oxford Biomedica (UK) Ltd., Oxford, GB

(74) Vertreter:
Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183 Wiesbaden

(72) Erfinder:
BARBER, R., Jack, San Diego, CA 92129, US;
JOLLY, J., Douglas, Leucadia, CA 92024, US;
RESPESS, G., James, San Diego, CA 92109, US

(54) Bezeichnung: **INHIBIERUNG DES WACHSTUMS VON AUSGEWÄHLTEN TUMOREN MIT REKOMBINANTEN VIREN-VEKTOREN**

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

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

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft allgemein das Gebiet der Krebsimmuntherapeutika und insbesondere Verfahren zur Hemmung des Wachstums eines ausgewählten Tumors unter Verwendung von Vektorkonstrukten.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Krebs bedingt ein Fünftel der gesamten Sterblichkeit in den Vereinigten Staaten und ist die zweithäufigste Todesursache. Krebs ist typischerweise durch die unkontrollierte Teilung einer Population von Zellen gekennzeichnet. Diese unkontrollierte Teilung führt typischerweise zur Bildung eines Tumors, der anschließend an anderen Stellen metastasieren kann.

[0003] Feste Primärtumore können im allgemeinen durch chirurgische Resektion behandelt werden. Die Mehrzahl der Patienten mit festen Tumoren weist jedoch über die Stelle des Primärtumors hinaus auch Mikrometastasen auf. Bei chirurgischer Behandlung alleine kommt es bei etwa 70% dieser Patienten zu einem Wiederauftreten des Krebses. Zusätzlich zu chirurgischen Eingriffen werden viele Krebsarten nun auch mit einer Kombination von Therapien behandelt, die zytotoxische chemotherapeutische Arzneimittel (z.B. Vincristin, Vinblastin, Cisplatin, Methotrexat, 5-FU usw.) und/oder Strahlentherapie umfassen. Eine Schwierigkeit bei diesem Ansatz besteht jedoch darin, daß radiotherapeutische und chemotherapeutische Mittel für normale Gewebe toxisch sind und oft lebensbedrohliche Nebenwirkungen hervorrufen. Des weiteren gibt es bei diesen Ansätzen oft extrem hohe Mißerfolgsraten/Remissionsraten (bis zu 90% je nach Art des Krebses).

[0004] Zusätzlich zu Chemo- und Strahlentherapien wurden viele Versuche unternommen, das eigene Immunsystem eines Individuums zu stärken oder zu verbessern, um die Krebszellen zu eliminieren. Verschiedene Immuntherapien haben bakterielle oder virale Komponenten als Hilfsmittel eingesetzt, um das Immunsystem zu stimulieren und die Tumorzellen zu zerstören. Beispiele solcher Komponenten umfassen BCG, Endotoxin, gemischte bakterielle Impfstoffe, Interferone (α, β und γ), Interferon-Induktoren (z.B. Brucella abortus und verschiedene Viren) und Thymusfaktoren (z.B. Thymosin-Fraktion 5 und Thymosin alpha-1) (siehe allgemein "Principles of Cancer Biotherapy", Oldham (Hrsg.), Raven Press, New York, 1987). Solche Mittel waren als Hilfsstoffe und nichtspezifische Stimulanzien in Tier-Tumormodellen im allgemeinen nützlich, sie haben sich jedoch im Menschen noch nicht als allgemein wirkungsvoll erwiesen.

[0005] Auch Lymphokine wurden bei der Behandlung von Krebs verwendet. Kurz gefaßt werden Lymphokine von einer Vielzahl von Zellen abgesondert und haben bei der Erzeugung einer Immunantwort allgemein eine Wirkung auf bestimmte Zellen. Beispiele von Lymphokinen umfassen die Interleukine (IL)-1, -2, -3 und -4 sowie koloniestimulierende Faktoren, wie G-CSF, GM-CSF und M-CSF. Kürzlich verwendete eine Gruppe IL-2, um periphere Blutzellen so zu stimulieren, daß diese sich vergrößern und große Mengen an Zellen produzieren, die für Tumorzellen zytotoxisch sind (Rosenberg et al., N. Engl. J. Med. 313: 1485-1492, 1985).

[0006] Andere haben die Verwendung von durch Antikörper vermittelten Antikrebstherapien vorgeschlagen. Kurz gefaßt können Antikörper entwickelt werden, die bestimmte Zelloberflächenantigene erkennen, die entweder einzigartig sind oder die im Vergleich zu normalen Zellen auf Krebszellen häufiger vorkommen. Diese Antikörper oder "magischen Geschosse" können entweder alleine oder in Konjugation mit einem Toxin verwendet werden, um spezifisch auf Tumorzellen zu zielen und diese abzutöten (Dillman, "Antibody Therapy", Principles of Cancer Biofherapy, Oldham (Hrsg.), Raven Press, Ltd., New York, 1987). Beispielsweise behandelten Ball et al. (Blood 62:1203-1210, 1983) mehrere Patienten mit akuter myelogener Leukämie mit einem oder mehreren von verschiedenen monoklonalen, für die Leukämie spezifischen Antikörpern, was während der Behandlung zu einer deutlichen Verringerung der zirkulierenden Leukämiezellen führte. In ähnlicher Weise verwendeten andere mit Toxin konjugierte Antikörper therapeutisch, um eine Vielzahl von Tumoren, einschließlich beispielsweise Melanome, Kolorektalkarzinome, Prostatakarzinome, Brustkarzinome und Lungenkarzinome, zu behandeln (siehe Dillman, supra). Eine Schwierigkeit besteht jedoch darin, daß die meisten monoklonalen Antikörper von Mäusen stammen, und somit kann eine Überempfindlichkeit gegen den Maus-Antikörper dessen Wirksamkeit insbesondere nach wiederholten Therapien einschränken. Übliche Nebenwirkungen umfassen Fieber, Hitze- und Kältewallungen, Hautausschläge, Arthritis und Nervenlähmungen.

[0007] Die Verwendung eines retroviralen Vektors, der die Expression von Gamma-Interferon steuert, bei der Herstellung eines Medikaments zur Behandlung eines Tumors in situ ist in der WO 93/21959 offenbart. Der

retrovirale Vektor wird in einem Behandlungssystem verwendet, welches die Verabreichung eines sensibilisierenden Hilfsmittels und eines chemotherapeutischen Mittels umfaßt.

[0008] Daher können Zusammensetzungen und Verfahren, welche die natürliche Wirtsabwehr gegen die Tumorbildung oder -progression ohne die zytotoxischen Nebenwirkungen früherer Verfahren steigern, die Remissionsraten erhöhen und das Überleben von Patienten mit Krebs verbessern. Die vorliegende Erfindung stellt solche Zusammensetzungen bereit und liefert des weiteren auch andere damit verbundene Vorteile.

Zusammenfassung der Erfindung

[0009] Gemäß einem Aspekt der vorliegenden Erfindung wird die Verwendung eines rekombinanten retroviralen Vektors, der die Expression von Gamma-Interferon steuert, zur Herstellung eines Medikaments für die direkte Verabreichung an einen festen Tumor bereitgestellt, wobei der Tumor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Melanom, einem Kolorektalkarzinom, einem Lungenkarzinom, einem Nierenzellkarzinom und einem Brustadenokarzinom.

[0010] In einer Ausführungsform ist der feste Tumor ein Melanom.

[0011] In einer weiteren Ausführungsform ist der feste Tumor ein Kolorektalkarzinom.

[0012] In einer weiteren Ausführungsform ist der feste Tumor ein Lungenkarzinom.

[0013] In einer weiteren Ausführungsform ist der feste Tumor ein Nierenzellkarzinom.

[0014] In einer weiteren Ausführungsform ist der feste Tumor ein Brustadenokarzinom.

[0015] Es werden zusätzliche Verfahren zur Inhibition des Wachstums eines ausgewählten Tumors in einem warmblütigen Tier beschrieben, welche die Stufen umfassen, bei denen man (a) mit dem ausgewählten Tumor assoziierte Tumorzellen aus einem warmblütigen Tier entnimmt, (b) die entnommenen Zellen mit einem rekombinanten retroviralen Vektor, wie er oben beschrieben wurde, infiziert, und (c) die infizierten Zellen in ein warmblütiges Tier einbringt, so daß das Wachstum des ausgewählten Tumors gehemmt wird. Vor der Stufe des Einbringens können Fibroblasten aus den entnommenen Zellen entfernt werden. Zusätzlich können vor dem Einbringen der infizierten Zellen in ein warmblütiges Tier die infizierten Zellen inaktiviert werden.

[0016] Ein Verfahren zur Inhibition des Wachstums eines ausgewählten Tumors in einem warmblütigen Tier kann die Stufen umfassen, bei denen man (a) mit dem ausgewählten Tumor assoziierte Tumorzellen aus einem warmblütigen Tier entnimmt, (b) die Zellen mit einem Vektorkonstrukt, welches die Expression eines Antitumormittels steuert, in Kontakt bringt, so daß die Zellen in der Lage sind, das Antitumormittel zu exprimieren, und (c) die Zellen aus Stufe (b) in ein allogenes warmblütiges Tier einbringt, so daß das Wachstum des ausgewählten Tumors gehemmt wird.

[0017] Diese und weitere Aspekte der vorliegenden Erfindung werden offensichtlich beim Studium der nachfolgenden ausführlichen Beschreibung und der beigefügten Zeichnungen.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0018] **Fig.** 1 zeigt schematisch die Klonierung von Maus-Gamma-Interferon in einen hinsichtlich Replikation defekten retroviralen Vektor.

[0019] Fig. 2 ist ein Western-Blot, welcher die Expression von MHC Klasse I-Protein in den Zellinien L33 und B16F10 zeigt.

[0020] **Fig.** 3 ist ein Western-Blot, welcher die Expression von MHC Klasse I in L33- und B16F10-Zellen zeigt, die in vitro mit rekombinantem Maus-Gamma-Interferon behandelt wurden.

[0021] Fig. 4A ist ein Diagramm, welches die Auslösung einer Anti-B16F10-CTL-Antwort in Black 6-Mäusen zeigt.

[0022] Fig. 4B ist ein Diagramm, welches die Auslösung einer Anti-B16F10-Maus-Gamma-Interferon #4-CTL-Antwort in Black 6-Mäusen zeigt.

[0023] Fig. 5 ist ein Diagramm, welches die Auslösung einer Anti-B16F10-Maus-Gamma-Interferon #4-CTL-Antwort in Mäusen, gefolgt von einer entweder i.p. oder i.m. verabreichten Injektion zeigt.

[0024] Fig. 6 ist ein Säulendiagramm, welches das Tumorwachstum in Black 6-Mäusen zeigt, denen entweder B16F10- oder B16F10 mγ-IFN #4-Zellen injiziert wurden.

[0025] Fig. 7 ist ein Säulendiagramm, welches das Tumorwachstum in Black 6-Mäusen, die mit B16F10-Zellen gereizt wurden, nach der Impfung mit entweder bestrahlten B16F10-Zellen oder bestrahlten B16F10-Maus-Gamma-Interferon #4-Zellen zeigt.

[0026] Fig. 8 ist ein Säulendiagramm, welches das Tumorwachstum nach im allgemeinen verschiedenen Impfsystemen mit entweder bestrahlten B16F10-Zellen oder bestrahlten B16F10-Maus-Gamma-Interferon #4-Zellen zeigt.

[0027] Fig. 9 ist ein Diagramm, welches das Tumorwachstum in Balb/C-Mäusen zeigt, denen entweder 6×10^6 L33-Zellen, mit rekombinantem Maus-Gamma-Interferon behandelte L33-Zellen oder L33-Maus-Gamma-Interferon #15-Zellen injiziert wurden.

[0028] Fig. 10 ist ein Diagramm, welches das Tumorwachstum in Balb/C-Mäusen zeigt, denen entweder 6×10^6 L33-Zellen, mit rekombinantem Maus-Gamma-Interferon behandelte L33-Zellen oder L33-Maus-Gamma-Interferon #15-Zellen injiziert wurden.

[0029] Fig. 11 ist ein Diagramm, welches das Tumorwachstum in Balb/C-Nacktmäusen zeigt, denen entweder L33-Zellen oder L33-Maus-Gamma-Interferon #15-Zellen injiziert wurden.

[0030] Fig. 12 ist ein Diagramm, welches das Tumorwachstum in Balb/C-Mäusen zeigt, denen entweder CT 26-Zellen oder gepoolte Maus-Gamma-Interferon exprimierende CT 26-Zellen injiziert wurden.

[0031] Fig. 13 ist ein Diagramm, welches die CTL-Auslösung durch gepoolte Maus-Gamma-Interferon exprimierende CT 26-Zellen (ein nicht klonaler Pool) in nicht-tumortragenden Tieren zeigt.

[0032] Fig. 14 ist ein Diagramm, welches die CTL-Auslösung durch bestrahlte Maus-Gamma-Interferon #10 exprimierende CT 26-Zellen zeigt.

[0033] Fig. 15 ist ein Diagramm, welches die CTL-Spezifität von CT 26-Maus-Gamma-Interferon #10 für CT 26-Zielzellen zeigt.

[0034] Fig. 16 ist ein Diagramm, welches die Auswirkung der Expression von Maus-Gamma-Interferon durch Maus-Gamma-Interferon #10 CT-26-Zellen auf die CT 26-CTL-Lyse zeigt.

[0035] Fig. 17 ist ein Diagramm, welches das Tumorwachstum in C57Bl/6-Mäusen zeigt, denen entweder LLT-Zellen oder Maus-Gamma-Interferon exprimierende LLT-Zellen injiziert wurden.

[0036] Fig. 18 ist ein Diagramm, welches die CTL-Auslösung durch bestrahlte Maus-Gamma-Interferon exprimierende LLT-Zellen zeigt.

[0037] Fig. 19 ist ein Diagramm, welches die CTL-Spezifität von LLT-Maus-Gamma-Interferon-Effektor-T-Zellen für LLT-Zielzellen zeigt.

[0038] Fig. 20 ist ein Diagramm, welches die Auswirkungen der Expression von Maus-Gamma-Interferon durch Maus-Gamma-Interferon-LLT-Zellen auf die LLT-CTL-Lyse zeigt.

[0039] Fig. 21 ist eine Serie von Diagrammen, die die FACS-Analyse der MHC-Niveaus in L33-Zellen, Maus-Gamma-Interferon #13-L33-Zellen, Maus-Gamma-Interferon #15-L33-Zellen und Maus-Gamma-Interferon exprimierenden L33-Zellen (ein nicht-klonaler Pool) zeigt.

[0040] Fig. 22 ist eine Serie von Western-Blots, die die Zunahme von HLA Klasse I in γ-IFN exprimierenden menschlichen Melanomen zeigt.

[0041] Fig. 23 ist ein Diagramm, welches den Prozentsatz der Transduktion im Vergleich zur Multiplizität der

Infektion ("MOI") für die Melanome DM252, DM6 und DM92 zeigt.

[0042] Fig. 24 ist eine Fotografie einer Melanomzellen enthaltenden 6-Well-Platte, die die Transduktion menschlicher Melanome mit konzentriertem ungereinigtem Vektor zeigt.

[0043] Fig. 25 ist eine stark vergrößerte Fotografie von mit Vektor transduzierten Melanomzellen.

[0044] Fig. 26 ist eine Fotografie von 4 Gewebekulturplatten, die zeigt, daß das menschliche Melanom innerhalb von 24 Stunden nach dem Einbringen in Gewebekultur leicht transfiziert wird.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0045] Wie es oben erwähnt wurde, werden Verfahren zur Inhibition des Wachstums eines ausgewählten Tumors unter Verwendung rekombinanter retroviraler Vektorkonstrukte, welche die Expression von Gamma-Interferon steuern, beschrieben. Kurz gesagt ist die Fähigkeit, fremde Pathogene, wie Tumorzellen, zu erkennen und abzuwehren, für das Funktionieren des Immunsystems wesentlich. Dieses System ist durch Immunerkennung in der Lage, "eigen" von "nicht eigen" (fremd) zu unterscheiden, und es ist notwendig, um sicherzustellen, daß Abwehrmechanismen gegen eindringende Einheiten und nicht gegen Wirtsgewebe gerichtet werden. Die Verfahren, die unten ausführlicher beschrieben werden, stellen ein wirkungsvolles Mittel zum Induzieren einer uneingeschränkten MHC-Antwort, starken Klasse I-restringierten oder Klasse II-restringierten schützenden und therapeutischen CTL-Antworten sowie humoralen Antworten bereit.

[0046] Insbesondere werden Verfahren zur Inhibition des Wachstums eines ausgewählten Tumors in einem warmblütigen Tier beschrieben, welche die Stufe umfassen, bei der man ein retrovirales Vektorkonstrukt, welches die Expression von Gamma-Interferon steuert, direkt an den Tumor verabreicht, so daß das Wachstum des Tumors gehemmt wird. In diesem Kontext bezieht sich der Ausdruck "Inhibition des Wachstums eines ausgewählten Tumors" entweder (1) auf die direkte Inhibition der Tumorzellteilung oder (2) auf die Immunzell-vermittelte Tumorzelllyse oder beides, was zu einer Unterdrückung der Nettoentwicklung von Tumorzellen führt. Die Inhibition des Tumorwachstums durch irgendeinen dieser beiden Mechanismen kann durch einen Durchschnittsfachmann auf dem Gebiet auf Basis einer Anzahl gut bekannter Verfahren leicht bestimmt werden. Beispielsweise kann die Tumorinhibition durch Messen der tatsächlichen Tumorgröße über einen Zeitraum bestimmt werden. Alternativ kann die Tumorinhibition durch Abschätzen der Größe eines Tumors (über einen Zeitraum) unter Verwendung von Verfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt sind, bestimmt werden. Spezieller kann eine Vielzahl radiologischer Abbildungsverfahren (z.B. Einzelphotonen- und Positronenemissions-Computertomographie, siehe allgemein "Nuclear Medicine in Clinical Oncology", Winkler, C. (Hrsg.) Springer-Verlag, New York, 1986) verwendet werden, um die Tumorgröße abzuschätzen. Solche Verfahren können auch eine Vielzahl von Abbildungsmitteln, einschließlich beispielsweise herkömmlichen Abbildungsmitteln (z.B. Gallium-67-citrat), sowie spezielle Reagenzien für die Abbildung von Metaboliten, die Rezeptorabbildung oder die immunologische Abbildung (z.B. für radioaktiv markierte, monoklonale Antikörper spezifische Tumormarker) verwenden. Zusätzlich können auch nicht-radioaktive Verfahren, wie Ultraschall (siehe "Ultrasonic Differential Diagnosis of Tumors", Kossoff und Fukuda (Hrsg.), Igaku-Shoin, New York, 1984) verwendet werden, um die Größe eines Tumors abzuschätzen.

[0047] Zusätzlich zu den in vivo-Verfahren zur Bestimmung der Tumorinhibition, wie oben diskutiert, kann eine Vielzahl von in vitro-Verfahren verwendet werden, um die Tumorinhibition in vivo vorherzusagen. Repräsentative Beispiele umfassen durch Lymphozyten vermittelte zytolytische Antitumoraktivität, die beispielsweise durch einen ^{51}Cr-Freisetzungstest bestimmt wird, tumorabhängige Lymphozytenproliferation (Ioannides et al., J. Immunol. 146(5):1700-1707, 1991), die Erzeugung von tumorspezifischen Antikörpern in vitro (Herlyn et al., J. Immunol. Meth. 73:157-167, 1984), zellulär (z.B. durch CTL, Helfer-T-Zellen) oder humoral (z.B. durch Antikörper) vermittelte Inhibition des Zellwachstums in vitro (Gazit et al., Cancer Immunol. Immunother. 35:135-144, 1992) und für all diese Tests die Bestimmung der Häufigkeit von Zellvorläufern (Vose, Int. J. Cancer 30:135-142 (1982).

[0048] Alternativ kann für andere Formen von Krebs die Inhibition des Tumorwachstums auf Basis einer Veränderung im Vorliegen eines Tumormarkers bestimmt werden. Beispiele umfassen prostataspezifisches Antigen ("PSA") für die Detektion von Prostatakrebs (siehe US-Patent Nr. Re. 33,405) und karzinoembryonales Antigen ("CEA") für die Detektion von Kolorektalkrebs und bestimmten Brustkrebsarten. Für noch weitere Arten von Krebs, wie Leukämie, kann die Inhibition des Tumorwachstums auf Basis der verringerten Anzahl leukämischer Zellen in einer repräsentativen Blutzellzählung bestimmt werden.

[0049] Eine Vielzahl von Tumoren kann für die Behandlung gemäß den hier beschriebenen Verfahren ausgewählt werden. Im allgemeinen werden feste Tumore bevorzugt, obwohl auch Leukämien und Lymphome behandelt werden können, wenn sie eine feste Masse entwickelt haben oder wenn es geeignete tumorassoziierte Marker gibt, so daß die Tumorzellen physisch von nicht-pathogenen normalen Zellen getrennt werden können. Die Zellen von akuter lymphozytischer Leukämie können beispielsweise mit dem leukämiespezifischen Marker "CALLA" unter anderen Lymphozyten aussortiert werden. Repräsentative Beispiele geeigneter Tumore umfassen Melanome, Kolorektalkarzinome, Lungenkarzinome (einschließlich Großzell-, Kleinzell-, Plattenepithel- und Adenokarzinome), Nierenzellkarzinome und Brustadenokarzinome.

[0050] Wie es oben erwähnt wurde, kann eine Vielzahl von Antitumormitteln verwendet werden. Der Begriff "Antitumormittel" ist so zu verstehen, daß er sich auf Verbindungen oder Moleküle bezieht, die das Wachstum eines ausgewählten Tumors hemmen, wie es oben diskutiert wurde. Repräsentative Beispiele von Antitumormitteln umfassen Immunaktivatoren und Tumorproliferationsinhibitoren. Kurz gefaßt wirken Immunaktivatoren so, daß sie die Immunerkennung von tumorspezifischen Antigenen verbessern, so daß das Immunsystem "geprimt" wird. Das Primen kann in der Lymphozytenproliferation, der Differenzierung oder der Weiterentwicklung zu Wechselwirkungen mit höherer Affinität bestehen. Das so geprimte Immunsystem hemmt Tumorzellen in effektiverer Weise oder tötet sie ab. Die Immunaktivierung kann weiter in Immunmodulatoren (Moleküle, die die Wechselwirkung zwischen Lymphozyt und Tumorzelle beeinflussen) und Lymphokine, die so wirken, daß sie Immuneffektorzellen proliferieren, aktivieren oder differenzieren, unterteilt werden. Repräsentative Beispiele von Immunmodulatoren umfassen CD3, ICAM-1, ICAM-2, LFA-1, LFA-3, β-2-Mikroglobulin, Chaperone, Alpha-Interferon und Gamma-Interferon, B7/BB1, B7-2 und Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC). Repräsentative Beispiele von Lymphokinen umfassen Gamma-Interferon, Tumornekrosefaktor, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, GM-CSF, CSF-1 und G-CSF.

[0051] Tumorproliferationsinhibitoren wirken so, daß sie das Zellwachstum direkt hemmen oder die Tumorzelle direkt abtöten. Repräsentative Beispiele von Tumorproliferationsinhibitoren umfassen Toxine, wie Ricin (Lamb et al., Eur. J. Biochem. 148:265-270, 1985), Abrin (Wood et al., Eur. J. Biochem. 198:723-732, 1991, Evensen et al., J. of Biol. Chem. 266:6848-6852, 1991, Collins et al., J. of Biol. Chem. 265:8665-8669, 1990, Chen et al., Fed. of Eur. Biochem. Soc. 309:115-118, 1992), Diphtherietoxin (Tweten et al., J. Biol. Chem. 260:10392-10394, 1985), Choleratoxin (Mekalanos et al., Nature 306:551-557, 1983, Sanchez & Holmgren, PNAS 86:481-485, 1989), Gelonin (Stirpe et al., J. Biol. Chem. 255:6947-6953, 1980), Kermesbeere (Irvin, Pharmac. Ther. 21:371-387, 1983), antivirales Protein (Barbieri et al., Biochem. J. 203:55-59, 1982, Irvin et al., Arch. Biochem. & Biophys. 200:418-425, 1980, Irvin, Arch. Biochem. & Biophys. 169:522-528, 1975), Tritin, Shigellatoxin (Calderwood et al., PNAS 84:4364-4368, 1987, Jackson et al., Microb. Path. 2:147-153, 1987) und Pseudomonas-Exotoxin A (Carroll und Collier, J. Biol. Chem. 262:8707-8711, 1987), Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase (HSVTK) (Field et al., J. gen. Virol. 49:115-124, 1980) und E. coli-Guaninphosphoribosyltransferase. Zusätzliche Beispiele von Tumorproliferationsinhibitoren umfassen Antisense-Sequenzen, die das Tumorzellwachstum hemmen, indem sie die zelluläre Synthese von kritischen Proteinen, die für das Zellwachstum benötigt werden, verhindern. Beispiele solcher Antisense-Sequenzen umfassen Antisense-Thymidinkinase, Antisense-Dihydrofolatreduktase (Maher und Dolnick, Arch. Biochem. & Biophys. 253:214-220, 1987, Bzik et al., PNAS 84:8360-8364, 1987), Antisense-HER2 (Coussens et al., Science 230:1132-1139, 1985), Antisense-ABL (Fainstein et al., Oncogene 4:1477-1481, 1989), Antisense-Myc (Stanton et al., Nature 310:423-425, 1984) und Antisense-ras sowie Antisense-Sequenzen, die irgendeines der Enzyme im Stoffwechselweg der Nukleotidbiosynthese blockieren. Schließlich umfassen Tumorproliferationsinhibitoren auch Tumorsuppressoren, wie p53, Retinoblastom (Rb) und MCC und APC für Kolorektalkarzinom.

[0052] Des weiteren kann Antisense-RNA als Antitumormittel verwendet werden, um eine starke Klasse I-restringierte Antwort zu induzieren. Kurz gefaßt wird angenommen, daß zusätzlich zur Bindung von RNA und dadurch Verhindern der Translation einer spezifischen mRNA große Mengen von spezifischen Antisense-Sequenzen die gesteigerte Expression von Interferonen (einschließlich Gamma-Interferon) induzieren, was auf die Bildung großer Mengen doppelstrangiger RNA zurückzuführen ist. Die gesteigerte Expression von Gamma-Interferon wiederum verstärkt die Expression von MHC Klasse I-Antigenen. Bevorzugte Antisense-Sequenzen zur Verwendung in dieser Hinsicht umfassen Actin-RNA, Myosin-RNA und Histon-RNA. Antisense-RNA, die mit Actin-RNA eine Fehlpaarung bildet, ist besonders bevorzugt.

[0053] Sequenzen, die die oben beschriebenen Antitumormittel codieren, können aus einer Vielzahl von Quellen erhalten werden. Beispielsweise können Plasmide, die Antitumormittel codierende Sequenzen enthalten, von einer Hinterlegungsstelle, wie der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland) oder von kommerziellen Quellen, wie British Bio-Technology Limited (Cowley, Oxford, England) erhalten werden. Repräsentative Quellensequenzen, die die oben erwähnten Antitumormittel codieren, umfassen BBG 12 (ent-

hält das GM-CSF-Gen, welches das reife Protein von 127 Aminosäuren codiert), BBG 6 (enthält Sequenzen, die Gamma-Interferon codieren), ATCC Nr. 39656 (enthält TNF codierende Sequenzen), ATCC Nr. 20663 (enthält Sequenzen, die Alpha-Interferon codieren), ATCC Nr. 31902, 31902 und 39517 (enthalten Sequenzen, die Beta-Interferon codieren), ATCC Nr. 67024 (enthält eine Sequenz, die Interleukin-1β codiert), ATCC Nr. 39405, 39452, 39516, 39626 und 39673 (enthalten Sequenzen, die Interleukin-2 codieren), ATCC Nr. 59399, 59398 und 67326 (enthalten Sequenzen, die Interleukin-3 codieren), ATCC Nr. 57592 (enthält Sequenzen, die Interleukin-4 codieren), ATCC Nr. 59394 und 59395 (enthalten Sequenzen, die Interleukin-5 codieren) und ATCC Nr. 67153 (enthält Sequenzen, die Interleukin-6 codieren).

[0054] Alternativ können bekannte cDNA-Sequenzen, die Antitumormittel codieren, aus Zellen erhalten werden, die die Sequenzen exprimieren oder enthalten. Kurz gefaßt wird in einer Ausführungsform mRNA aus einer Zelle, die das interessierende Gen exprimiert, mit reverser Transkriptase unter Verwendung von Oligo-dT oder zufälligen Primern revers transkribiert. Die einzelstrangige cDNA kann dann mittels PCR (siehe US-Patente Nr. 4,683,202, 4,683,195 und 4,800,159. Siehe auch PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich (Hrsg.), Stockton Press, 1989) unter Verwendung von Oligonukleotidprimern, die zu Sequenzen auf jeder Seite der gewünschten Sequenzen komplementär sind, vervielfältigt werden. Insbesondere wird eine doppelstrangige DNA durch Erhitzen in Gegenwart von hitzestabiler Taq-Polymerase, sequenzspezifischen DNA-Primern, ATP, CTP, GTP und TTP, denaturiert. Doppelstrangige DNA wird erzeugt, wenn die Synthese abgeschlossen ist. Dieser Zyklus kann viele Male wiederholt werden, was zu einer faktoriellen Vervielfältigung der gewünschten DNA führt.

[0055] Sequenzen, die die oben beschriebenen Antitumormittel codieren, können beispielsweise auch auf einem DNA-Synthetisierer von Applied Biosystems Inc. (z.B. ABI DNA-Synthetisierer, Modell 392 (Foster City, Kalifornien)) synthetisiert werden.

[0056] Zusätzlich zu den oben beschriebenen Antitumormitteln können die Antitumormittel auch ein Fusionsprotein von z.B. zwei oder mehr Zytokinen, Immunmodulatoren, Toxinen oder Differenzierungsfaktoren umfassen. Bevorzugte Antitumormittel in dieser Hinsicht umfassen Alpha-Interferon – Interleukin-2, Interleukin-12, GM-CSF-IL-4, GM-CSF-IL-2, GM-CSF-IL-3 (siehe US-Patente Nr. 5,082,927 und 5,108,910), GM-CSF-Gamma-Interferon und Gamma-Interferon-IL-4. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist das Antitumormittel ein Fusionsprotein von Gamma-Interferon-Interleukin-2. In anderen bevorzugten Ausführungsformen können mehrere Antitumormittel (z.B. zwei oder mehr Lymphokine) unter Verwendung von inneren Ribosombindungsstellen von einem einzigen Vektorkonstrukt exprimiert werden, wie es unten ausführlicher diskutiert wird. Die Konstruktion dieser (dieses) Antitumormittel(s) kann in Anbetracht der hier bereitgestellten Offenbarung leicht bewerkstelligt werden. Die Konstruktion eines besonders bevorzugten Antitumormittels, Gamma-Interferon-Interleukin-2, wird unten in Beispiel 1F ausführlicher beschrieben.

[0057] Das Antitumormittel kann weiterhin einen Membrananker umfassen und kann beispielsweise als ein Fusionsprotein von Antitumormittel-Membrananker konstruiert werden. Kurz gefaßt kann der Membrankeraspekt des Fusionsproteins aus einer Vielzahl von Sequenzen, einschließlich beispielsweise der Transmembrandomäne gut bekannter Moleküle, ausgewählt werden. Im allgemeinen sind Membrankersequenzen Bereiche eines Proteins, die das Protein an eine Membran binden. Für gewöhnlich gibt es zwei Arten von Ankersequenzen, die ein Protein an die äußere Oberfläche einer Zellmembran anhängen: (1) Transmembranbereiche, die die Lipiddoppelschicht der Zellmembran überspannen und mit dem hydrophoben mittleren Bereich wechselwirken (Proteine, die solche Bereiche enthalten, werden als integrale Membranproteine bezeichnet), und (2) Domänen, die mit einem integralen Membranprotein oder mit der polaren Oberfläche der Membran wechselwirken (solche Proteine werden als periphere oder extrinsische Proteine bezeichnet).

[0058] Membrananker zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung können Transmembrandomänen enthalten, die die Membran einmal oder mehrere Male überspannen. In Glycophorin und Guanylylcyclase beispielsweise überspannt der Membranbindungsbereich die Membran einmal, wohingegen die Transmembrandomäne von Rhodopsin die Membran siebenmal überspannt und die Transmembrandomäne des photosynthetischen Reaktionszentrums von Rhodopseudomonas viridis die Membran elfmal überspannt (siehe Ross et al., J. Biol. Chem. 257:4152, 1982, Garbers, Pharmac. Ther. 50:337-345, 1991, Engelman et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2023, 1980, Heijne und Manoil, Prot. Eng. 4:109-112, 1990). Ganz gleich, wie oft das Protein die Membran überquert, die die Membran überspannenden Bereiche haben typischerweise eine ähnliche Struktur. Spezieller besteht der aus 20 bis 25 Aminosäureresten bestehende Abschnitt der Domäne, der innerhalb der Membran liegt, im allgemeinen fast vollständig aus hydrophoben Resten (siehe Eisenberg et al., Ann. Rev. Biochem. 53:595-623, 1984). Beispielsweise sind 28 der 34 Reste in dem die Membran überspannenden Bereich von Glycophorin hydrophob (siehe Ross et al., Tomita et al., Biochemistry 17:4756-4770, 1978). Dar-

über hinaus haben die die Membran überspannenden Bereiche, obwohl Strukturen wie Beta-Faltblattstrukturen oder Faßstrukturen auftreten können, typischerweise eine alpha-helikale Struktur, bestimmt durch Röntgenbeugungs-, Kristallographie- und Verbindungsstudien (siehe Eisenberg et al., S. 20, Heijne und Manoil, S. 109). Die Lage dieser Transmembranhelices innerhalb einer gegebenen Sequenz kann oft auf Basis von Hydrophobizitätsplots vorausgesagt werden. Stryer et al., Biochemistry, 3. Aufl. 304, 1988. Besonders bevorzugte Membrananker zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung umfassen natürlich vorkommende zelluläre Proteine (die nicht-immunogen sind), von denen gezeigt wurde, daß sie als Membransignalanker wirken (wie z.B. Glycophorin).

[0059] In einem bevorzugten Aspekt der vorliegenden Erfindung wird eine DNA-Sequenz bereitgestellt, die ein Fusionsprotein aus Membrananker-Gamma-Interferon codiert. In einer Ausführungsform kann dieses Fusionsprotein konstruiert werden, indem man die Sequenz, die den Membrananker der Gamma-Kette des Fc-Rezeptors codiert, mit einer Sequenz, die Gamma-Interferon codiert, genetisch fusioniert. Die Konstruktion eines solchen Antitumormittels wird in Beispiel 1 unten ausführlicher beschrieben.

[0060] Sobald eine Sequenz, die wenigstens ein Antitumormittel codiert, erhalten wurde, ist es notwendig sicherzustellen, daß die Sequenz ein nicht-tumorigenes Protein codiert. Verschiedene Tests, die die Tumorigenizität einer bestimmten zellulären Komponente feststellen, sind bekannt und können einfach ausgeführt werden. Repräsentative Tests umfassen die Tumorbildung in Nacktmäusen oder Ratten, die Koloniebildung in weichem Agar und die Bereitstellung transgener Tiere, wie transgener Mäuse.

[0061] Die Tumorbildung in Nacktmäusen oder Ratten ist ein besonders wichtiges und empfindliches Verfahren zur Bestimmung der Tumorigenizität eines Antitumormittels. Nacktmäuse haben kein funktionelles zelluläres Immunsystem (d.h. sie besitzen keine CTLs) und stellen daher ein geeignetes in vivo-Modell zum Testen des tumorigenen Potentials von Zellen bereit. Normale, nicht-tumorigene Zellen zeigen keine unkontrollierten Wachstumseigenschaften, wenn sie Nacktmäusen injiziert werden. Transformierte Zellen proliferieren in Nacktmäusen jedoch rasch und bilden Tumore. Kurz gefaßt wird das Vektorkonstrukt syngenen Maus-Zellen zugeführt, gefolgt von einer Injektion in Nacktmäuse. Die Mäuse werden über einen Zeitraum von 2 bis 8 Wochen nach der Injektion visuell untersucht, um das Tumorwachstum zu bestimmen. Die Mäuse können auch getötet und autopsiert werden, um zu bestimmen, ob Tumore vorhanden sind. (Giovanella et al., J. Natl. Cancer Inst. 48:1531-1533, 1972, Furesz et al., "Tumorigenicity testing of cell lines considered for production of biological drugs", Abnormal Cells, New Products and Risk, Hopps und Petricciani (Hrsg.), Tissue Culture Association, 1985, und Levenbook et al., J. Biol. Std. 13:135-141, 1985).

[0062] Die Tumorigenizität kann auch durch Sichtbarmachen der Koloniebildung in weichem Agar beurteilt werden (MacPherson und Montagnier, Vir. 23:291-294, 1964). Kurz gefaßt ist eine Eigenschaft normaler, nicht-tumorigener Zellen die "Kontaktinhibition" (d.h. Zellen hören auf, sich zu vermehren, wenn sie benachbarte Zellen berühren). Wenn Zellen in einem halbfesten Agar-Trägermedium ausplattiert werden, werden normale Zellen schnell durch Kontakt inhibiert und hören auf, sich zu vermehren, wohingegen tumorigene Zellen sich in weichem Agar weiterhin vermehren und Kolonien bilden.

[0063] Transgene Tiere, wie transgene Mäuse, können auch verwendet werden, um die Tumorigenizität eines Antitumormittels zu beurteilen (z.B. Stewart et al., Cell 38:627-637, 1984, Quaife et al., Cell 48:1023-1034, 1987, und Koike et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5615-5619, 1989). Bei transgenen Tieren kann das interessierende Gen in allen Geweben des Tieres exprimiert werden. Diese nicht-regulierte Expression des Transgens kann als ein Modell für das tumorigene Potential des neu eingebrachten Gens dienen.

[0064] Zusätzlich zu Studien zur Tumorigenizität ist es allgemein bevorzugt, vor der Verabreichung die Toxizität der (des) Antitumormittel(s) zu bestimmen. Eine Vielzahl von Verfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet gut bekannt sind, kann verwendet werden, um diese Toxizität zu messen, einschließlich beispielsweise klinischer Chemietests, die die systemischen Mengen verschiedener Proteine und Enzyme sowie das Volumen und die Anzahl der Blutzellen messen.

[0065] Sobald ein Antitumormittel ausgewählt wurde, wird es in ein Vektorkonstrukt, welches seine Expression steuert, eingebracht. Im Kontext der vorliegenden Erfindung ist ein "Vektorkonstrukt" so zu verstehen, daß es sich auf einen Aufbau bezieht, der in der Lage ist, die Expression der interessierenden Sequenz(en) oder der interessierenden Gene (des interessierenden Gens) zu steuern. Das Vektorkonstrukt muß (ein) transkriptionale(s) Promotorelement(e) beinhalten, und es beinhaltet vorzugsweise ein Signal, welches die Polyadenylierung steuert. Des weiteren muß das Vektorkonstrukt eine Sequenz beinhalten, die, wenn sie transkribiert wurde, funktionsfähig mit der interessierenden Sequenz (den interessierenden Sequenzen) oder dem interes-

sierenden Gen (den interessierenden Genen) verbunden ist und als eine die Translation initiierende Sequenz wirkt. Optional kann das Vektorkonstrukt auch einen selektierbaren Marker, wie Neo, TK, Hygromycin, Phleomycin, Histidinol oder DHFR, sowie eine oder mehrere Restriktionsstellen und eine die Translation terminierende Sequenz beinhalten. Zusätzlich muß das Vektorkonstrukt, wenn es in ein Retrovirus eingebracht wird, ein Verpackungssignal, lange terminate Wiederholungen (LTRs) und Positivstrang- und Negativstrang-Primerbindungsstellen, die für das verwendete Retrovirus geeignet sind, beinhalten (sofern sie nicht schon vorliegen).

[0066] Wie es oben erwähnt wurde, werden rekombinante Retroviren beschrieben, die ein Vektorkonstrukt tragen, welches in der Lage ist, die Expression eines Antitumormittels zu steuern. Die Konstruktion solcher rekombinanter retroviraler Vektoren ist in einer Anmeldung mit dem Titel "Recombinant Retroviruses" (USSN 07/586,603, eingereicht am 21. September 1990, die durch Bezugnahme vollständig hierin aufgenommen ist) ausführlicher beschrieben. Diese rekombinanten retroviralen Vektoren können verwendet werden, um transduktionsfähige retrovirale Vektorpartikel zu erzeugen, indem sie in geeignete Verpackungszellinien eingebracht werden (siehe USSN 071800,921). Darüber hinaus beschreiben die Beispiele 1, 3 und 4 die Herstellung von rekombinanten retroviralen Vektoren sowie von Vektorkonstrukten, die die Expression mehrerer Antitumormittel steuern.

[0067] Vektorkonstrukte können auch mit anderen viralen Trägern entwickelt und verwendet werden, einschließlich beispielsweise Poliovirus (Evans et al., Nature 339:385-388, 1989, und Sabin, J. of Biol. Standardization 1:115-118, 1973), Rhinovirus, Pockenviren, wie Kanarienvogel-Pockenvirus oder Vacciniavirus (Fisher-Hoch et al., PNAS 86:317-321, 1989, Flexner et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 569:86-103, 1989, Flexner et al., Vaccine 8:17-21, 1990, US-Patente Nr. 4,603,112 und 4,769,330, WO 89/01973), SV40 (Mulligan et al., Nature 277:108-114, 1979), Influenzavirus (Luytjes et al., Cell 59:1107-1113, 1989, McMicheal et al., The New England Journal of Medicine 309:13-17, 1983, und Yap et al., Nature 273:238-239, 1978), Adenovirus (Berkner, Biotechniques 6:616-627, 1988, und Rosenfeld et al., Science 252:431-434, 1991), Parvovirus, wie adenoassoziiertes Virus (Samulski et al., Journal of Virology 63:3822-3828, 1989, und Mendelson et al., Virology 166:154-165, 1988), Herpes (Kit, Adv. Exp. Med. Biol. 215:219-236, 1989), SV40, HIV, Masern (EP 0 440 219) und Sindbisvirus (Xiong et al., Science 234:1188-1191, 1989), und Koronavirus. Zusätzlich können virale Träger homologe, nicht-pathogene (defekte), replikationsfähige Viren sein (z.B. Overbaugh et al., Science 239:906-910, 1988) und dennoch zelluläre Immunantworten, einschließlich CTL, auslösen.

[0068] Wie es oben erwähnt wurde, wird ein Vektorkonstrukt, welches die Expression wenigstens eines Antitumormittels steuert, direkt an den Tumor verabreicht. Verschiedene Verfahren können verwendet werden, um das Vektorkonstrukt direkt an den Tumor zu verabreichen. Beispielsweise kann eine kleine metastatische Läsion lokalisiert werden, und der Vektor kann mehrere Male an mehreren verschiedenen Stellen in den Körper des Tumors injiziert werden. Alternativ können Blutgefäße, die einen Tumor versorgen, identifiziert werden, und der Vektor kann in ein solches Blutgefäß injiziert werden, um den Vektor direkt dem Tumor zuzuführen. Ein Tumor mit nekrotischem Zentrum kann ausgesaugt werden, und der Vektor kann direkt in das nun leere Zentrum des Tumors injiziert werden. Das Vektorkonstrukt kann direkt an die Oberfläche des Tumors verabreicht werden, und zwar beispielsweise durch Verwendung einer das Vektorkonstrukt enthaltenden topischen pharmazeutischen Zusammensetzung oder vorzugsweise eines das Vektorkonstrukt tragenden rekombinanten retroviralen Vektors.

[0069] Es werden Verfahren zur Inhibition des Wachstums eines ausgewählten Tumors beschrieben, welche die Stufe umfassen, bei der man einem warmblütigen Tier ein rekombinantes retrovirales Vektorkonstrukt, welches die Expression wenigstens eines Antitumormittels steuert, zuführt, so daß das Wachstum des Tumors gehemmt wird.

[0070] Zusätzlich zu Vektorkonstrukten können auch Antitumormittel codierende Nukleinsäuren mittels einer Vielzahl von Verfahren an einen Patienten verabreicht werden. Repräsentative Beispiele umfassen die Transfektion mittels verschiedener physikalischer Verfahren, wie Lipofektion (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989), direkte DNA-Injektion (Acsadi et al., Nature 352:815-818, 1991), Mikroprojektil-Beschuß (Williams et al., PNAS 88:2726-2730, 1991), Liposome (Wang et al., PNAS 84:7851-7855, 1987), $CaPO_4$ (Dubensky et al., PNAS 81:7529-7533, 1984), DNA-Liganden (Wu et al., J. of Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989) oder Verabreichung von mit abgetötetem Adenovirus verbundener DNA (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992). Eine Vielzahl von Verfahren zur Verabreichung rekombinanter retroviraler Vektoren kann ebenfalls verwendet werden, wobei solche Verfahren in einer Anmeldung mit dem Titel "Recombinant Retroviruses" (USSN 07/586,603) ausführlicher beschrieben sind.

[0071] Zusätzlich kann eine zelluläre Antwort (einschließlich CTL) auch durch Verabreichung eines Bakteri-

ums erzeugt werden, welches ein Antitumormittel, wie diejenigen, die oben diskutiert wurden, auf seiner Zelloberfläche exprimiert. Repräsentative Beispiele umfassen BCG (Stover, Nature 351:456-458, 1991) und Salmonella (Newton et al., Science 244:70-72, 1989).

[0072] Es wird ein Verfahren zur Inhibition des Wachstums eines ausgewählten Tumors in einem warmblütigen Tier beschrieben, welches die Stufen umfaßt, bei denen man (a) mit dem ausgewählten Tumor assoziierte Zellen aus einem warmblütigen Tier entnimmt, (b) die entnommenen Zellen mit einem Vektorkonstrukt, welches die Expression wenigstens eines Antitumormittels steuert, infiziert, und (c) die infizierten Zellen einem warmblütigen Tier zuführt, so daß das Wachstum des ausgewählten Tumors durch Immunantworten, die gegen die genetisch modifizierte Tumorzelle erzeugt werden, gehemmt wird. Im Anschluß an die Entnahme von Tumorzellen aus einem warmblütigen Tier kann beispielsweise durch physische Spaltung oder proteolytischen Verdau eine Einzelzellsuspension erzeugt werden. Des weiteren kann durch Zugabe verschiedener Faktoren, wie melanozytenstimulierendem Faktor für Melanome oder epidermalem Wachstumsfaktor für Brustkarzinome, die Teilung der Zellen gesteigert werden, um die Aufnahme, die genomische Integration und die Expression des rekombinanten viralen Vektors zu verbessern.

[0073] Es versteht sich, daß die entnommenen Zellen nicht nur wieder in das gleiche Tier eingebracht werden können, sondern daß sie auch verwendet werden können, um das Wachstum ausgewählter Tumorzellen in einem anderen, allogenen Tier zu hemmen. In einem solchen Fall ist es allgemein bevorzugt, daß die Histokompatibilität der Tiere zusammenpaßt (wenngleich nicht immer; siehe z.B. Yamamoto et al., "Efficacy of Experimental FIV Vaccines", 1 st International Conference of FIV Researchers, University of California, Davis, September 1991). Es wird ein Verfahren zur Inhibition des Wachstums eines ausgewählten Tumors in einem warmblütigen Tier beschrieben, welches die Stufen umfaßt, bei denen man (a) mit dem ausgewählten Tumor assoziierte Tumorzellen aus einem warmblütigen Tier entnimmt, (b) die Zellen mit einem Vektorkonstrukt, welches die Expression eines Antitumormittels steuert, in Kontakt bringt, so daß die Zellen in der Lage sind, dieses Antitumormittel zu exprimieren, und (c) die Zellen aus Stufe (b) einem allogenen warmblütigen Tier zuführt, so daß das Wachstum des ausgewählten Tumors gehemmt wird.

[0074] Des weiteren versteht es sich, daß im Kontext der vorliegenden Erfindung eine Vielzahl von Zellen (Zielzellen), einschließlich beispielsweise Zellen von Menschen, Makaken, Hunden, Ratten und Mäusen, verwendet werden kann.

[0075] Zellen können aus einer Vielzahl von Stellen, einschließlich beispielsweise aus einem ausgewählten Tumor, entnommen werden. Zusätzlich kann in anderen Ausführungsformen der Erfindung ein Vektorkonstrukt in nicht-tumorigene Zellen, einschließlich beispielsweise Zellen der Haut (dermale Fibroblasten) oder des Blutes (z.B. Peripherblut-Leukozyten), eingebracht werden. Falls gewünscht, können auch bestimmte Fraktionen von Zellen, wie ein Teilsatz von T-Zellen, oder Stammzellen spezifisch aus dem Blut entnommen werden (siehe beispielsweise PCT WO 91/16116, eine Anmeldung mit dem Titel "Immunoselection Device and Method"). Die Vektorkonstrukte können dann unter Verwendung irgendeiner der oben beschriebenen Techniken mit den entnommenen Zellen in Kontakt gebracht werden, gefolgt von der Rückführung der Zellen in das warmblütige Tier, und zwar vorzugsweise in einen Tumor oder in der Nähe eines Tumors.

[0076] Die oben beschriebenen Verfahren können zusätzlich die Stufen der Abreicherung von Fibroblasten oder anderen nicht-kontaminierenden Tumorzellen im Anschluß an die Entnahme von Tumorzellen aus einem warmblütigen Tier und/oder die Stufe der Inaktivierung der Zellen beispielsweise mittels Bestrahlung umfassen.

[0077] Wie es oben erwähnt wurde, können verschiedene Antitumormittel entweder gleichzeitig oder nacheinander verabreicht werden, um das Wachstum eines ausgewählten Tumors gemäß den Verfahren der vorliegenden Erfindung zu hemmen. Beispielsweise kann γ-IFN zusammen mit anderen Antitumormitteln, wie IL-2 oder IL-12, entweder gleichzeitig oder nacheinander an ein warmblütiges Tier verabreicht werden, um ein pathogenes Mittel zu hemmen oder zu zerstören. Solche therapeutische Zusammensetzungen können unter Verwendung eines einzigen Vektorkonstrukts, welches die Expression wenigstens zweier Antitumormittel steuert, direkt verabreicht werden, oder sie können von unabhängigen Vektorkonstrukten exprimiert werden. Alternativ kann ein Antitumormittel (z.B. γ-IFN) unter Verwendung eines Vektorkonstrukts verabreicht werden, während andere Tumormittel (z.B. IL-2) direkt verabreicht werden (z.B. intravenös in Form einer pharmazeutischen Zusammensetzung).

[0078] Vektoren oder VCLs, die sowohl ein γ-IFN-Gen als auch ein weiteres, IL-2 codierendes Gen ausliefern und exprimieren, können an den Patienten verabreicht werden. In einem solchen Konstrukt kann ein Gen von

der Vektor-LTR exprimiert werden, und das andere kann einen zusätzlichen transkriptionalen Promotor, der zwischen den LTRs gefunden wurde, verwenden, oder es kann, möglicherweise unter Verwendung einer internen Ribosomenbindungsstelle, als eine polycistronische mRNA exprimiert werden. Nach der Genübertragung in vivo wird das Immunsystem des Patienten aufgrund der Expression von γ-IFN aktiviert. Eine Infiltration des absterbenden Tumors durch inflammatorische Zellen steigert wiederum die Immunpräsentation und verbessert die Immunantwort des Patienten gegen den Tumor weiter.

[0079] Pharmazeutische Zusammensetzungen, die ein rekombinantes Retrovirus, welches eines der oben beschriebenen Vektorkonstrukte trägt, in Kombination mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder einem Verdünnungsmittel umfassen, können in der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Die Zusammensetzung kann entweder als flüssige Lösung oder in fester Form (z.B. lyophilisiert), die vor der Verabreichung in einer Lösung suspendiert wird, hergestellt werden. Zusätzlich kann die Zusammensetzung mit für eine Verabreichung an die Oberfläche, eine Injektion, eine orale, nasale, vaginale, sublinguale, inhalative oder rektale Verabreichung geeigneten Trägern oder Verdünnungsmitteln hergestellt werden.

[0080] Pharmazeutisch verträgliche Träger oder Verdünnungsmittel sind für die Empfänger in den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen nicht toxisch. Repräsentative Beispiele von Trägern oder Verdünnungsmitteln für injizierbare Lösungen umfassen Wasser, isotonische Salzlösungen, die vorzugsweise auf einen physiologischen pH-Wert gepuffert sind (wie z.B. phosphatgepufferte Salzlösung oder Tris-gepufferte Salzlösung), Mannitol, Dextrose, Glycerol und Ethanol sowie Polypeptide oder Proteine, wie menschliches Serumalbumin. Eine besonders bevorzugte Zusammensetzung umfaßt einen Vektor oder ein rekombinantes Virus in 10 mg/ml Mannitol, 1 mg/ml HSA, 20 mM Tris, pH, 7,2, und 150 mM NaCl. In diesem Fall kann der rekombinante Vektor, da er etwa 1 µg an Material ausmacht, weniger als etwa 1 % an Material mit hohem Molekulargewicht und weniger als 1/100.000 des Gesamtmaterials (einschließlich Wasser) ausmachen. Diese Zusammensetzung ist bei –70°C für wenigstens sechs Monate stabil.

[0081] Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können zusätzlich auch Faktoren beinhalten, die die Zellteilung und damit die Aufnahme und die Einbringung eines rekombinanten retroviralen Vektors stimulieren. Repräsentative Beispiele umfassen melanozytenstimulierendes Hormon (MSH) für Melanome oder epidermalen Wachstumsfaktor für Brust- oder andere epitheliale Karzinome. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen der vorliegenden Erfindung können über eine Vielzahl von Wegen injiziert werden (z.B. intradermal ("i.d."), intracranial ("i.c."), intraperitoneal ("i.p."), intrathekal ("i.t."), intravenös ("i.v."), subkutan ("s.c."), intramuskulär ("i.m.") oder vorzugsweise direkt in den Tumor). Die normalerweise verwendeten Einzeldosen betragen 10^7 bis 10^9 c.f.u. (koloniebildende Einheiten mit Neomycinresistenz, titriert auf HT1080-Zellen). Diese werden anfänglich in ein- bis vierwöchigen Intervallen für drei oder vier Dosen verabreicht.

[0082] Nachfolgende Wiederholungsimpfungen können nach 6-12 Monaten und danach jährlich in Form einer oder zweier Dosen verabreicht werden.

[0083] Die folgenden Beispiele werden nur zu Veranschaulichungszwecken angegeben und sollen nicht beschränkend sein.

BEISPIELE

Beispiel 1

HERSTELLUNG VON RETROVIRALER PROVEKTOR-MAUS-DNA

A. Herstellung des retroviralen Rückgrats KT-3

[0084] Ein EcoR I–EcoR I-Fragment, welches eine lange terminale Wiederholung ("LTR") am 5'-Ende und gag-Sequenzen eines Moloney-Maus-Leukämievirus ("MoMLV") in einem N2-Vektor enthält (Armentano et al., J. Vir. 61:1647-1650, 1987, Eglitis et al., Science 230:1395-1398, 1985), enthalten in pUC31, wird in das Plasmid SK^+ (Stratagene, Kalif.) ligiert. (Das Plasmid pUC31 ist von pUC19 (Stratagene, Kalif.) abgeleitet, in welches zusätzliche Restriktionsstellen Xho I, Bgl II, BssH II und Nco I zwischen den EcoR I- und Sac I-Stellen des Polylinkers eingefügt sind.) Das resultierende Konstrukt wird als N2R5 bezeichnet. Das N2R5-Konstrukt wird durch ortsgerichtete Mutagenese in vitro mutiert, um das ATG-Startcodon in ATT zu ändern, um die gag-Expression zu verhindern. Dieses mutagenisierte Fragment ist 200 Basenpaare (bp) lang und wird von Pst I-Erkennungsstellen flankiert. Das mutierte Pst I-Pst I-Fragment wird aus dem SK^+-Plasmid gereinigt und in die

Pst I-Stelle von N2 MoMLV 5'LTR in pUC31 eingefügt, um das nicht-mutierte 200 bp lange Fragment zu ersetzen. Dieses Konstrukt wird als pUC31/N2R5g^{M} bezeichnet.

[0085] Das 1,0 Kilobasen (Kb) lange MoMLV 3'LTR EcoR I-EcoR I-Fragment aus N2 wird in das Plasmid SK^{+} kloniert, was ein als N2R3^{-} bezeichnetes Konstrukt ergibt. Ein 1,0 Kb langes Cla I-Hind III-Fragment wird aus diesem Konstrukt gereinigt.

[0086] Das dominante selektierbare Cla I-Cla I-Markergenfragment aus dem retroviralen Vektor pAFVXM (Kriegler et al., Cell 38:483, 1984, St. Louis et al., PNAS 85:3150-3154, 1988), welches einen frühen SV40-Promotor umfaßt, der die Expression des Neomycin-Phosphotransferasegens vorantreibt, wird in das Plasmid SK^{+} kloniert. Ein 1,3 Kb langes Cla I-BstB I-Neo-Genfragment wird aus diesem Plasmid gereinigt.

[0087] Der Expressionsvektor wird durch eine dreiteilige Ligation konstruiert, bei der das Xho I-Cla I-Fragment, welches ein interessierendes Gen enthält, wie es unten beschrieben wird, und das 1,0 Kb lange MoMLV 3'LTR Cla I-Hind III-Fragment in die Xho I-Hind III-Stelle des pUC31/N2R5g^{M}-Plasmids eingefügt werden. Das 1,3 Kb lange Cla I-BstB I-Neo-Genfragment wird dann in Sense-Orientierung in die Cla I-Stelle dieses Plasmids eingefügt.

B. Klonierung von mγ-IFN in KT-3

[0088] Eine mγ-IFN-cDNA wird im wesentlichen so, wie es unten ausgeführt wird, in die EcoR I-Stelle von pUC1813 kloniert. Kurz gefaßt wird pUC1813 (welches eine γ-IFN codierende Sequenz enthält) im wesentlichen so hergestellt, wie es von Kay et al., Nucleic Acids Research 15:2778, 1987, und Gray et al., PNAS 80:5842, 1983) (**Fig. 1A**) beschrieben wird. Die mγ-IFN-cDNA wird durch EcoR I-Verdau von pUC1813 gewonnen, und das isolierte Fragment wird in die EcoR I-Stelle von mit Phosphatase behandeltem pSP73 (Promega, Madison, Wisc.) kloniert (**Fig. 1B**). Dieses Konstrukt wird als SP mγ-IFN bezeichnet. Die Orientierung der cDNA wird durch geeigneten Restriktionsenzymverdau und DNA-Sequenzierung bestätigt. In der Sense-Orientierung ist das 5'-Ende der cDNA benachbart zu der Xho I-Stelle des pSP73-Polylinkers, und das 3'-Ende ist benachbart zu der Cla I-Stelle. Das Xho I-Cla I-Fragment, das die mγ-IFN-cDNA entweder in Sense- oder in Antisense-Orientierung enthält, wird aus dem SP mγ-IFN-Konstrukt gewonnen und in die Xho I-Cla I-Stelle des Retrovirusrückgrats KT-3 kloniert. Dieses Konstrukt wird als KT mγ-IFN bezeichnet (**Fig.** 1).

C. Klonierung von hγ-IFN in KT-3

1. Herstellung von hγ-IFN codierenden Sequenzen unter Verwendung von PCR

(a) PHA-Stimulation von Jurkat-Zellen

[0089] Jurkat-Zellen (ATCC-Nr. CRL 8163) werden in einer Konzentration von 1 × 10^{6} Zellen/ml in RPMI-Wachstumsmedium (Irvine Scientific, Santa Ana, Kalif.) mit 5% fötalem Rinderserum (FBS) zu einem Endvolumen von 158,0 ml resuspendiert. Phytohämagglutinin ("PHA") (Curtis Mathes Scientific, Houston, Texas) wird zu der Suspension bis zu einer Endkonzentration von 1 % zugegeben. Die Suspension wird über Nacht bei 37°C in 5% CO_2 inkubiert. Die Zellen werden am nächsten Tag geerntet und in aliquoten Teilen auf drei 50,0 ml-Zentrifugenröhrchen verteilt. Die drei Pellets werden in 50 ml 1x phosphatgepufferter Salzlösung (PBS, 145 mM, pH 7,0) vereinigt und bei 1000 U.p.M. für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, und die Zellen werden mit 50,0 ml PBS gewaschen. Die Zellen werden zur Isolierung von RNA gesammelt.

(b) Isolierung von RNA

[0090] Die mit PHA stimulierten Jurkat-Zellen werden in 22,0 ml Guanidiniumlösung (4 M Guanidiniumthiocyanat, 20 mM Natriumacetat, pH 5,2, 0,1 M Dithiothreitol, 0,5% Sarcosyl) resuspendiert. Diese Zellen/Guanidinium-Suspension wird dann sechsmal durch eine Nadel mit 20 Gauge geleitet, um die Zellmembranen zu zerstören. Eine CsCl-Lösung (5,7 M CsCl, 0,1 M EDTA) wird dann mit 11,0 ml der Lösung aus zerstörten Zellen/Guanidinium überlagert. Die Lösung wird für 24 Stunden bei 28.000 U.p.M. in einem SW28.1-Rotor (Beckman, Fullerton, Kalif.) bei 20°C zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wird der Überstand vorsichtig abgesaugt, und die Röhrchen werden trockengetupft. Das Pellet wird in einer Guanidinium-HCl-Lösung (7,4 M Guanidinium-HCl, 25 mM Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM Dithiothreitol) auf ein Endvolumen von 500,0 µl resuspendiert. Diese Lösung wird in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Zwölfeinhalb Mikroliter konzentrierter Eisessig (HAc) und 250 µl 100%-iger EtOH werden in das Mikrozentrifugenröhrchen zugegeben. Die Lösung wird gemischt und für mehrere Tage bei –20°C gelagert, um RNA zu präzipitieren.

[0091] Nach der Lagerung wird die Lösung für 20 Minuten bei 14.000 U.p.M., 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird dann in 75%-igem EtOH resuspendiert und für 10 Minuten in einer Mikrozentrifuge bei 14.000 U.p.M. und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird mittels Zentrifugation unter Vakuum getrocknet und in 300 µl entionisiertem (DI) H_2O resuspendiert. Die Konzentration und die Reinheit der RNA werden durch Messen der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt.

(c) Reverse Transkriptionsreaktion

[0092] Unmittelbar vor der Verwendung werden 5,0 µl (3,4 mg/ml) gereinigte Jurkat-RNA für 5 Minuten bei 90°C hitzebehandelt und dann auf Eis gegeben. Eine Lösung von 10,0 µl 10x PCR-Puffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)), 10,0 µl 10 mM dATP, 10,0 µl 10 mM dGTP, 10,0 µl 10 mM dCTP, 10,0 µl 10 mM dTTP, 2,5 µl RNasin (40.000 U/ml, Promega, Madison, Wis.) und 33,0 µl DI H_2O werden zu der hitzebehandelten Jurkat-Zell-RNA zugegeben. Diese Lösung wird mit 5,0 µl (108 nmol/ml) V-OLI #56 (Sequenz-ID Nr. 1) und 5,0 µl (200.000 U/ml) MoMLV reverser Transkriptase (Bethesda Research Laboratories, EC 3.1.27.5, Maryland) in einem Mikrozentrifugenröhrchen gemischt und bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgemisch für 1 Stunde bei 37°C inkubiert und dann für 5 Minuten bei 95°C inkubiert. Das Reaktionsgemisch der reversen Transkription wird dann in Vorbereitung auf die PCR auf Eis gegeben.

(d) PCR-Vervielfältigung

[0093] Das PCR-Reaktionsgemisch enthält 100,0 µl des Reaktionsgemischs der reversen Transkription, 356,0 µl DI H_2O, 40,0 µl 10x PCR-Puffer, 1,0 µl (137 nmol/ml) V-OLI #5 (Sequenz-ID Nr. 2), 0,5 µl (320 nmol/ml) V-OLI #6 (Sequenz-ID Nr. 3) und 2,5 µl, 5.000 U/ml Taq-Polymerase (EC 2.7.7.7, Perkin-Elmer Cetus, Kalif.). Einhundert Mikroliter dieses Gemischs werden in aliquoten Teilen auf 5 Röhrchen verteilt.

V-OLI #56 (Sequenz-ID Nr. 1)

5'-3': TAA TAA ATA GAT TTA GAT TTA

[0094] Dieser Primer ist komplementär zu einer Sequenz der mγ-IFN-cDNA 30 Basenpaare hinter dem Stopcodon.

V-OLI #5 (Sequenz-ID Nr. 2)

5'-3': GC CTC GAG ACG ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG

[0095] Dieser Primer ist komplementär zu dem 5'-codierenden Bereich des mγ-IFN-Gens, der bei dem ATG-Startcodon beginnt. Das 5'-Ende des Primers enthält eine Xho I-Restriktionsstelle.

V-OLI #6 (Sequenz-ID Nr. 3)

5'-3': GA ATC GAT CCA TTA CTG GGA TGC TCT TCG ACC TGG

[0096] Dieser Primer ist komplementär zu dem 3'-codierenden Bereich des mγ-IFN-Gens, der bei dem TAA-Stopcodon endet. Das 5'-Ende des Primers enthält eine Cla I-Restriktionsstelle.

[0097] Jedes Röhrchen wurde mit 100,0 µl Mineralöl überlagert und in eine PCR-Maschine (Ericomp Twin Block System, Ericomp, Kalif.) gegeben. Das PCR-Programm stellt die Temperatur des Reaktionsgefäßes erst für 1 Minute auf 95°C, dann für 2 Minuten auf 67°C und schließlich für 2 Minuten auf 72°C ein. Dieser Zyklus wird 40-mal wiederholt. Der letzte Zyklus stellt die Temperatur des Reaktionsgefäßes erst für 1 Minute auf 95°C, dann für 2 Minuten auf 67°C und schließlich für 7 Minuten auf 72°C ein. Die abgeschlossenen PCR-Vervielfältigungsreaktionen werden in Vorbreitung auf die Isolierung von PCR-DNA bei 4°C für 1 Monat gelagert.

(e) Isolierung von PCR-DNA

[0098] Die wäßrige Phase aus den PCR-Vervielfältigungsreaktionen wird in ein einziges Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Fünfzig Mikroliter 3 M Natriumacetat und 500,0 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) werden zu der Lösung zugegeben. Die Lösung wird gevortext und dann bei 14.000 U.p.M. bei Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wird in ein frisches Mikrozentrifugenröhrchen überführt,

und 1,0 ml 100%-iger EtOH wird zugegeben. Diese Lösung wird für 4,5 Stunden bei –20°C inkubiert und dann bei 14.000 U.p.M. für 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, und das Pellet wird mit 500,0 µl 70%-igem EtOH gespült. Das Pellet wird mittels Zentrifugation unter Vakuum getrocknet. Die isolierte hγ-IFN-PCR-DNA wird in 10,0 µl DI H_2O resuspendiert.

2. Konstruktion von retroviralen hγ-IFN-Vektoren

(a) Erzeugung und Isolierung von stumpfendigen hγ-IFN-PCR-DNA-Fragmenten

[0099] Die hγ-IFN-PCR-DNA wird unter Verwendung von T4-DNA-Polymerase stumpfendig gemacht. Insbesondere werden 10,0 µl mittels PCR vervielfältigter DNA, 2,0 µl, 10x T4-DNA-Polymerasepuffer (0,33 M Tris-Acetat, pH 7,9, 0,66 M Kaliumacetat, 0,10 M Magnesiumacetat, 5 mM Dithiothreitol, 1 mg/ml Rinderserumalbumin (BSA)), 1,0 µl, 2,5 mM dNTP (ein Gemisch, welches gleiche molare Konzentrationen von dATP, dGTP, dTTP und dCTP enthält), 7,0 µl DI H_2O, 1,0 µl, 5000 U/ml Klenow-Fragment (EC 2.7.7.7, New England Biolabs, Mass.) und 1,0 µl, 3000 U/ml T4-DNA-Polymerase (EC 2.7.7.7, New England Biolabs, Mass.) miteinander gemischt und bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Das Reaktionsgemisch wird dann bei Raumtemperatur für 40 Minuten inkubiert, gefolgt von einer Inkubation bei 68°C für 15 Minuten.

[0100] Das stumpfendige hγ-IFN wird mittels Agarosegelelektroforese isoliert. Insbesondere werden 2,0 µl Beladungsfarbstoff (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol und 50% Glycerol) zu dem Reaktionsgemisch zugegeben, und 4,0 µl werden in jede der 5 Spuren eines Ethidiumbromid enthaltenden 1 % Agarose/Tris-Borat-EDTA (TBE)-Gels geladen. Die Elektroforese des Gels wird für 1 Stunde bei 100 Volt durchgeführt. Die gewünschte, hγ-IFN enthaltende DNA-Bande, die ungefähr 500 Basenpaare lang ist, wird unter Ultraviolettlicht sichtbar gemacht.

[0101] Diese Bande wird von dem Gel entfernt und mittels elektroforetischer Übertragung auf NA 45-Papier (Schleicher und Schuell, Keene, New Hampshire) übertragen. Das Papier wird bei 68°C für 40 Minuten in 400,0 µl NET-Puffer mit hohem Salzgehalt (1 M NaCl, 0,1 mM EDTA und 20 mM Tris, pH 8,0) inkubiert, um die DNA zu eluieren. Das NA 45-Papier wird aus der Lösung entfernt, und 400,0 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) werden zugegeben. Die Lösung wird gevortext und bei 14.000 U.p.M. für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wird in ein frisches Röhrchen überführt, und 400,0 µl Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) werden zugegeben. Das Gemisch wird gevortext und für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wird ein zweites Mal in ein frisches Röhrchen überführt, und 700,0 µl 100%-iger Ethanol werden zugegeben. Das Röhrchen wird bei –20°C für 3 Tage inkubiert. Nach der Inkubation wird die DNA mittels Zentrifugation für 20 Minuten bei 14.000 U.p.M. aus dem Röhrchen präzipitiert. Der Überstand wird dekantiert, und das Pellet wird mit 500,0 µl 70%-igem EtOH gespült. Das Pellet, welches stumpfendige hγ-IFN-DNA enthält, wird mittels Zentrifugation unter Vakuum getrocknet und in 50,0 µl DI H_2O resuspendiert.

[0102] Die isolierte stumpfendige hγ-IFN-DNA wird unter Verwendung von Polynukleotidkinase phosphorylliert. Insbesondere werden 25,0 µl stumpfendige hγ-IFN-DNA, 3,0 µl 10x Kinasepuffer (0,5 M Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 M $MgCl_2$, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA), 3,0 µl 10 mM ATP und 1,0 µl T4-Polynukleotidkinase (10.000 U/ml, EC 2.7.1.78, New England Biolabs, Manland) gemischt und bei 37°C für 1 Stunde 45 Minuten inkubiert. Das Enzym wird dann durch Inkubieren bei 68°C für 30 Minuten hitzeinaktiviert.

(b) Ligation von hγ-IFN-pCR-DNA in den SK^+-Vektor

[0103] Ein SK^+-Plasmid wird mit Hinc II-Restriktionsendonuklease verdaut und mittels Agarosegelelektroforese gereinigt, wie es unten beschrieben wird. Insbesondere werden 5,9 µl (1,7 mg/ml) SK^+-Plasmid-DNA (Stratagene, San Diego, Kalif.), 4,0 µl 10x Universalpuffer (Stratagene, Kalif.), 30,1 µl DI H_2O und 4,0 µl Hinc II, 10.000 U/ml, in einem Röhrchen gemischt und für 7 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 4,0 µl Beladungsfarbstoff zu dem Reaktionsgemisch zugegeben, und 4,0 µl dieser Lösung werden zu jeder der 5 Spuren eines Ethidiumbromid enthaltenden 1 % Agarose/TBE-Gels zugegeben. Die Elektroforese des Gels wird für 2 Stunden bei 105 Volt durchgeführt. Das mit Hinc II geschnittene SK^+-Plasmid, welches 2958 Basenpaare lang ist, wird mit Ultraviolettlicht sichtbar gemacht. Das verdaute SK^+-Plasmid wird unter Verwendung des in Beispiel 1 C, Abschnitt 2(a) beschriebenen Verfahrens aus dem Gel isoliert.

[0104] Die Dephosphorylierung der Hinc II-Spaltungsstelle des Plasmids wird unter Verwendung von alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm durchgeführt. Insbesondere werden 50,0 µl verdautes SK^+-Plasmid, 5,0 µl 1 M Tris, pH 8,0, 2,0 µl 5 mM EDTA, pH 8,0, 43,0 µl H_2O und 2,0 µl, 1.000 U/ml, Phosphatase aus Kälberdarm ("CIP") (Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) in einem Röhrchen gemischt und bei 37°C für 15 Minu-

ten inkubiert. Im Anschluß an die Inkubation werden 2,0 µl CIP zugegeben, und die Lösung wird bei 55°C für 90 Minuten inkubiert. Nach dieser Inkubation werden 2,5 µl 20%-iges Natriumdodecylsulfat ("SDS"), 1,0 µl, 0,5 M EDTA, pH 8,0, und 0,5 µl, 20 mg/ml, Proteinase K (EC 3.4.21.14, Boehringer Mannheim, Indianapolis, Indiana) zugegeben, und die Lösung wird bei 55°C für 2 Stunden inkubiert. Diese Lösung wird auf Raumtemperatur gekühlt, und 110,0 µl Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) werden zugegeben. Das Gemisch wird gevortext und bei 14.000 U.p.M. für 5 Minuten zentrifugiert. Die obere wäßrige Phase wird in ein frisches Röhrchen überführt, und 200,0 µl 100%-iger EtON werden zugegeben. Dieses Gemisch wird bei 70°C für 15 Minuten inkubiert. Das Röhrchen wird zentrifugiert, und das Pellet wird mit 500,0 µl 70%-igem EtON gespült. Das Pellet wird dann mittels Zentrifugation unter Vakuum getrocknet. Das dephosphorylierte SK^+-Plasmid wird in 40 µl DI H_2O resuspendiert.

[0105] Die hγ-IFN-PCR-DNA wird unter Verwendung von T4-DNA-Ligase in das SK^+-Plasmid ligiert. Insbesondere werden 30,0 µl des Reaktionsgemischs mit stumpfendiger phosphorylierter hγ-IFN-PCR-DNA, 2,0 µl dephosphoryliertes SK^+-Plasmid und 1,0 µl T4-DNA-Ligase in einem Röhrchen vereinigt und über Nacht bei 16°C inkubiert. DNA wird unter Verwendung eines Miniprep-Verfahrens isoliert. Spezieller wird der Bakterienstamm DH5a (Gibco BRL, Gaithersburg, MD) mit 15,0 µl Ligationsreaktionsgemisch transformiert, auf Luria-Bertani-Agarplatten (LB-Platten), die Ampicillin und 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-b-D-galactosid (X-gal, Gold Biotechnology, St. Louis, Missouri) enthielten, ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. DNA wird unter Verwendung des von Sambrook et al. beschriebenen Verfahrens (Molecular Cloning, Cold Springs Harbor Press, 1989) aus weißen Bakterienkolonien isolier. Das Vorliegen des hγ-IFN-Gens wird durch Restriktionsendonukleasespaltung mit Xho I, Cla I, Ava II, Dra I und Ssp I bestimmt. Die erwarteten Fragmentgrößen der Restriktionsendonukleasespaltung für das hγ-IFN-Gen enthaltende Plasmide sind in Tabelle 1 angegeben. Das isolierte DNA-Plasmid wird als SK hγ-IFN bezeichnet und bei der Konstruktion des retroviralen Vektors verwendet.

Tabelle 1

Enzym	Fragmentgröße (bp)
Xho I und Cla I	500, 2958
Ava II	222, 1307, 1937
Dra I	700, 1149, 1500
Ssp I	750, 1296, 2600

(c) Ligation des hγ-IFN-Gens in retroviralen Vektor

[0106] Das Interferon-Gen wird mittels Verdau mit Xho I- und Cla I-Restriktionsendonuklease aus dem SK hγ-IFN-Vektor entfernt. Das resultierende, das hγ-IFN-Gen enthaltende Fragment ist etwa 500 bp lang und wird in einer 1% Agarose/TBE-Gel-Elektroforese isoliert, wie es in Beispiel 1C, 2(b) beschrieben ist. Das Xho I-Cla I-hγ-IFN-Fragment wird dann in das KT-3-Retrovirusrückgrat ligiert.

[0107] Dieses Konstrukt wird als KT hγ-IFN bezeichnet. Die Struktur und die vorhandene Expression von hγ-IFN wird durch Transformieren des Bakterienstamms DH5a mit dem KT hγ-IFN-Konstrukt bestimmt. Insbesondere wird das Bakterium mit 15,0 µl Ligationsreaktionsgemisch transformiert. Die transformierten Bakterienzellen werden auf Ampicillin enthaltende LB-Platten ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert, und Bakterienkolonien werden selektiert. Die DNA wird isoliert, wie es in (b) oben beschrieben ist, und mit Xho I, Cla I, Dra I, Nde I und Ssp I verdaut. Die erwarteten Fragmentgrößen der Restriktionsendonukleasespaltung für Plasmide, die das hγ-IFN-Gen enthalten, sind in Tabelle 2 angegeben.

Tabelle 2

Enzym	Fragmentgröße (bp)
Xho I und Cla I	500, 6500
Nde I	1900, 5100
Dra I	692, 2700, 3600
Ssp I	541, 1700, 4700

D. Klonierung von hIL-2 in KT-3

[0108] Das Verfahren zum Klonieren von hIL-2 in den retroviralen Vektor KT-3 ist im wesentlichen identisch zu dem Verfahren zum Klonieren von hγ-IFN in KT-3, mit der Ausnahme, daß unterschiedliche Primer erforderlich sind, um die hIL-2-DNA-Sequenz zu vervielfältigen. Die folgenden hIL-2-PCR-Primersequenzen werden verwendet:

V-OLI #55 (Sequenz-ID Nr. 4)

5'-3': ATA AAT AGA AGG CCT GAT ATG

[0109] Dieser Primer ist komplementär zu einer Sequenz der hIL-2-cDNA hinter dem Stopcodon.

V-OLI #1 (Sequenz-ID Nr. 5)

5'-3': GC CTC GAG ACA ATG TAC AGG ATG CAA CTC CTG TCT

[0110] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz des hIL-2-Gens, die zu dem 5'-codierenden Bereich, der am ATG-Startcodon beginnt, komplementär ist. Das 5'-Ende des Primers enthält eine Xho I-Restriktionsstelle.

V-OLI #2 (Sequenz-ID Nr. 6)

5'-3': GA ATC GAT TTA TCA AGT CAG TGT TGA GAT GAT GCT

[0111] Der Primer ist die Antisense-Sequenz des hIL-2-Gens, die zu dem 3'-codierenden Bereich, der am TAA-Stopcodon endet, komplementär ist. Das 5'-Ende des Primers enthält die Cla I-Restriktionsstelle.

E. Klonierung von membrangebundenem menschlichem γ-IFN in KT-3

1. Verfahren zum Konstruieren von membrangebundenem menschlichem γ-IFN

(a) Sequenzauswahl für membrangebundenes hγ-IFN

[0112] Das membrangebundene hγ-IFN-Zelloberflächenprotein ist ein chimäres Protein, welches die vollständige cDNA von hγ-IFN, den Transmembranbereich der γ-Kette von menschlichem Fc-Rezeptor und einen modifizierten zytoplasmatischen Bereich der γ-Kette des Fc-Rezeptors umfaßt. Die Modifikation des zytoplasmatischen Bereichs besteht in einer internen Deletion und soll jegliche mit einem Fc-Rezeptor assoziierte Signaltransduktion blockieren.

[0113] Die Modifikation und das Splicen von DNA werden durch das Überlappverlängerungs-PCR-Verfahren von Horton et al. (Gene 77:61-68, 1978) erzielt. Der Carboxylterminus von hγ-IFN wird am Aminoterminus des Transmembranbereichs an die γ-Kette des Fc-Rezeptors gebunden. Die unterstrichenen Aminosäuren identifizieren die Sequenz des Transmembranbereichs.

Menschliches γ-IFN . . .G R R A S Q COOH
(Sequenz-ID Nr. 7)

γ-Kette des menschlichen Fc-Rezeptors NH_2 . . . . L G E P Q L C Y I L D A COOH
(Sequenz-ID Nr. 8)

Hybrid NH_2 . . . G R R A S Q L C Y I L D A COOH
(Sequenz-ID Nr. 9)

[0114] Die Hinzufügung mehrerer hydrophiler Aminosäuren zwischen hγ-IFN und dem Transmembranbereich kann dazu verwendet werden, den aktiven Bereich von der Zelloberfläche weg auszudehnen (Kuster et al., J. Bio. Chem. 265:6448, 1990). Die Sequenzmodifikation des Transmembranbereichs der γ-Kette des menschlichen Fc-Rezeptors umfaßt die Deletion der Aminosäuren S^{57}-Y^{76}. Die unterstrichenen Aminosäuren identifizieren die deletierte Sequenz.

[0115] Intrazellulärer Bereich der γ-Kette des menschlichen Fc-Rezeptors

(Sequenz-ID Nr. 10 und 36)

...KAAITS^{57}YEK...QETY^{76}ETLK...COOH

Modifizierter intrazellulärer Bereich

(Sequenz-ID Nr. 11)

...KAAITETLK...COOH

(b) PCR-Vervielfältigung

[0116] Ein Gemisch für die Polymerasekettenreaktion (PCR) wird gemäß von Perkin-Elmer-Cetus, Kalif., spezifizierten Verfahren hergestellt. Spezieller enthält das Reaktionsgemisch 0,5 µg gereinigtes Plasmid, 5,0 µl 10x PCR-Reaktionspuffer, 5,0 µl von jeweils 2,5 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, 1,0 µl, 0,5 µg von jedem Primer, 0,5 µl, 2,5 Einheiten/100,0 µl Taq-Polymerase und 8,0 µl 10 mM $MgCl_2$. Das Reaktionsgemisch wird dann mit DI H_2O auf 50,0 µl gebracht.

[0117] Jedes Reaktionsgemisch wird mit 100,0 µl Mineralöl überlagert und in eine PCR-Maschine (Ericomp Twin Block System) gegeben. Das PCR-Programm stellt die Temperatur des Reaktionsgefäßes zuerst für 1 Minute auf 95°C, dann für 2 Minuten auf 67°C und schließlich für 2 Minuten auf 72°C ein. Dieser Zyklus wird 40-mal wiederholt. Der letzte Zyklus stellt die Temperatur des Reaktionsgefäßes zuerst für 1 Minute auf 95°C, dann für 2 Minuten auf 67°C und schließlich für 7 Minuten auf 72°C ein. Die abgeschlossenen PCR-Reaktionen werden etwa 1 Monat bei 4°C gelagert.

(c) Konstruktion von hybridem retroviralem Vektor aus γ-IFN/Fc-Rezeptor

[0118] Die folgenden hγ-IFN-PCR-Primersequenzen werden verwendet:

(Sequenz-ID Nr. 12)

5'-3': CAG GAC CCA TAT GTA AAA GAA GCA GAA AAC C

[0119] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz von hγ-IFN, die einem Bereich des Carboxylterminus des Proteins entspricht, und wird als hγ-IFN/P1 bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 13)

5'-3': GCA GAG CTG GGA TGC TCT TCG ACC TCG

[0120] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz von hγ-IFN, die einem Bereich des Carboxylterminus des Proteins entspricht, und wird als hγ-IFN/P2 bezeichnet.

[0121] Die folgenden Primersequenzen der γ-Kette des Fc-Rezeptors werden verwendet:

(Sequenz-ID Nr. 14)

5'-3': GCA TCC CAG CTC TGC TAT ATC CTG GAT GCC

[0122] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz der γ-Kette des Fc-Rezeptors und wird als γ-Ketten-Fc/P3 bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 15)

5'-3': GGC ATG CAG GCA TAT GTG ATG CCA ACC

[0123] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz der γ-Kette des Fc-Rezeptors und wird als γ-Ketten-Fc/P4 bezeichnet.

[0124] Die hγ-IFN-Matrizen-DNA aus Beispiel 1C 1(e), hγ-IFN/P1-Primer-DNA, hγ-IFN/P2-Primer-DNA, γ-Ketten-Fc-Rezeptor-Matrizen-DNA, γ-Ketten-Fc/P3-Primer-DNA und γ-Ketten-Fc/P4-Primer-DNA werden vereinigt, bei 95°C für 1 Minute denaturiert und in Gegenwart des PCR-Reaktionsgemischs ohne zusätzliche Primer verlängert. Das 3'-Ende der hγ-IFN-Matrizen-Primer-DNA annealt an das 5'-Ende der γ-Ketten-Fc-Matrizen-Primer-DNA, und die Verlängerung erzeugt das als hγ-IFN/Fc-Rec bezeichnete hybride Produkt. Die Primer hγ-IFN/P1 und γ-Ketten-Fc/P4 werden dann zugegeben und 40 Zyklen PCR werden durchgeführt, um das hγ-IFN/Fc-Rec-Produkt zu vervielfältigen.

[0125] Das hγ-IFN/Fc-Rec-Produkt enthält nur ein kurzes Fragment des hγ-IFN-Gens. Dieses Fragment erstreckt sich von der Nde I-Restriktionsendonukleasestelle in dem Gen bis zum Ende der Gensequenz. hγ-IFN/Fc-Rec wird mit Nde I verdaut und in KT hγ-IFN, welches den Kopfabschnitt von hγ-IFN enthält, kloniert. Dieser Vektor wird als KT hγ-IFN/Fc-Rec bezeichnet.

(d) Konstruktion des retroviralen Vektors des intrazellulären Bereichs aus hybridem hγ-IFN/modifiziertem Fc-Rezeptor

[0126] Die γ-Kette des Fc-Rezeptors wird modifiziert, um die biologische Aktivität des Proteins zu beseitigen. Die folgenden PCR-Primersequenzen aus dem intrazellulären Bereich des modifizierten Fc-Rezeptors werden verwendet:

(Sequenz-ID Nr. 16)

5'-3': CAG AGT CTC GGT TAT AGC TGC CTT TCG CAC

[0127] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz des intrazellulären Bereichs des modifizierten Fc-Rezeptors und wird als mFc/P5 bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 17)

5'-3': GCT ATA ACC GAG ACT CTG AAG CAT GAG

[0128] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz des intrazellulären Bereichs des modifizierten Fc-Rezeptors und wird als mFc/P6 bezeichnet.

[0129] Die hγ-IFN/Fc-Rec-Matrizen-DNA aus Beispiel 1C 3(a), hγ-IFN/P1-Primer-DNA, mFc/P5-Primer-DNA, mFc/P6-Primer-DNA und γ-Ketten-Fc/P4-Primer-DNA werden vereinigt, bei 95°C für 1 Minute denaturiert und in Gegenwart des PCR-Reaktionsgemischs ohne zusätzliche Primer verlängert. Das 3'-Ende des Matrizen-Pri-

mers (durch hγ-IFN/Fc-Rec-Matrizen-DNA gebundene hγ-IFN-Primer-DNA und mFc/P5-Primer-DNA) annealt an das 5'-Ende des Matrizen-Primers (durch hγ-IFN/Fc-Rec-Matrizen-DNA gebundene mFc/P6-Primer-DNA und γ-Ketten-Fc/P4-Primer-DNA), und die Verlängerung ergibt eine γ-Kette des modifizierten Fc-Rezeptors, bei der 20 Aminosäure-Codons ausgelassen werden. Die Primer mFc/P6 und γ-Ketten-Fc/P4 werden dann zugegeben, und 40 Zyklen PCR werden ausgeführt, um das modifizierte Produkt zu vervielfältigen. Das PCR-Produkt wird als mFcIR bezeichnet.

[0130] Der KT-hγ-IFN/Fc-Rec-Vektor wird mit Nde I verdaut. Das aus diesem Vektor entfernte Nde I-Nde I-Fragment wird durch das Nde I-Nde I-mFcIR-PCR-DNA-Fragment ersetzt. Dieser Vektor wird als KT hγ-IFN/mFc-Rec bezeichnet.

F. Klonierung von menschlichem Gamma-IFN/menschlichem IL-2 in KT-3

1. Verfahren zum Konstruieren von hγ-IFN/hIL-2-Hybrid

(a) Sequenzauswahl für hγ-IFN/hIL-2-Hybrid

[0131] Unten werden zwei Verfahren zur Konstruktion von hγ-IFN/hIL-2-Hybridproteinen beschrieben. Das erste Verfahren beschreibt die Konstruktion eines Hybridproteins mit γ-IFN am Carboxylterminus, und das zweite Verfahren beschreibt ein Hybridprotein mit menschlichem Interleukin-2 (hIL-2) am Carboxylterminus.

[0132] Die Modifikation und das Splicen von DNA werden durch das Überlappverlängerungs-PCR-Verfahren von Horton et al. (Gene 77:61-68, 1989) erzielt. Im ersten Verfahren zur Konstruktion wird die vollständige hγ-IFN codierende Sequenz, einschließlich der hγ-IFN-Signalsequenz, mit der vollständigen hIL-2 codierenden Sequenz mit Ausnahme der hIL-2-Signalsequenz verknüpft. Die DNA-Sequenzen werden von Genebank, Washington D.C., erhalten: hγ-IFN (HUMIFNINI). Die unterstrichene Sequenz zeigt die Signalpeptidsequenz, die ausgeschlossen wurde.

Menschliches γ-IFN NH_2. . . G R R A S Q COOH

(Sequenz-ID Nr. 18)

Menschliches IL-2 NH_2. . . . L V T N S A P T S S S . .COOH

(Sequenz-ID Nr. 19)

Hybride Amino-

säuresequenz

NH_2. . . G R R A S Q A P T S S S . .COOH

(Sequenz-ID Nr. 20)

[0133] In dem zweiten Verfahren wird die vollständige zweite hIL-2 codierende Sequenz, einschließlich der hIL-2-Signalsequenz, mit der vollständigen hγ-IFN codierenden Sequenz mit Ausnahme der hγ-IFN-Signalsequenz verknüpft. Die DNA-Sequenzen werden von Genebank erhalten: hIL-2 (HUMIL2S1, HUMIL2S2 und HUMIL2S3). Die unterstrichene Sequenz zeigt die Signalpeptidsequenz an.

Menschliches IL-2 NH_2. . . I I S T L T COOH

(Sequenz-ID Nr. 21)

Menschliches γ-IFN NH_2. . V L G S L G C Y C Q D . . . COOH

(Sequenz-ID Nr. 22)

Hybride Amino-

säuresequenz

NH_2. . . I I S T L T C Y C Q D . . . COOH

(Sequenz-ID Nr. 23)

(b) Konstruktion von hybridem retroviralem hγ-IFN/hIL-2-Vektor

[0134] Die folgenden hγ-IFN-Primersequenzen werden verwendet:

(Sequenz-ID Nr. 24)

5'-3': CAG GAC CCA TAT GTA AAA GAA GCA GAA G

[0135] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz von hγ-IFN, die einem Bereich des Carboxylterminus des hγ-IFN-Proteins entspricht, und wird als hγ-IFN/P7 bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 25)

5'-3': GG TGC ACT CTG GGA TGC TCT TCG ACC TCG

[0136] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz von hγ-IFN, die einem Bereich des Carboxylterminus des hγ-IFN-Proteins entspricht, und wird als hγ-IFN/P8 bezeichnet.

[0137] Die nachfolgenden hIL-2-Primersequenzen werden verwendet:

(Sequenz-ID Nr. 26)

5'-3': CC CAG GCA CCT ACT TCA AGT TCT ACA AAG

[0138] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz von hIL-2, die einem Bereich des Aminoterminus des hIL-2-Proteins entspricht, und wird als hIL-2/P9 bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 27)

5'-3': GGG TCT TAA GTG AAA GTT TTT GCT TTG AGC

[0139] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz von hIL-2, die einem Bereich des Aminoterminus des hIL-2-Proteins entspricht, und wird als hIL-2/P10 bezeichnet.

[0140] Die hγ-IFN-Matrizen-DNA aus Beispiel 1C 1(e), hγ-IFN/P7-Primer-DNA, hγ-IFN/P8-Primer-DNA, hIL-2-Matrizen-DNA aus hIL-2/P9-Primer-DNA und hIL-2/P10-Primer-DNA werden vereinigt, bei 95°C für 1 Minute denaturiert und in Gegenwart des PCR-Reaktionsgemischs ohne zusätzliche Primer verlängert. Das 3'-Ende der Matrizen-Primer-hγ-IFN-DNA annealt an das 5'-Ende der Matrizen-Primer-hIL-2-DNA, und die Verlängerung liefert ein 673 bp langes Fragment, das als hp-IFN/hIL-2 bezeichnet wird. Die Primer hγ-IFN/P7 und hIL-2/P10 werden dann zugegeben und 40 Zyklen PCR werden durchgeführt, um das hγ-IFN/hIL-2-Produkt zu vervielfältigen.

[0141] Der hybride hγ-IFN/hIL-2-Vektor wird durch eine dreiteilige Ligation konstruiert. Das 5'-Ende des retroviralen KT hγ-IFN-Vektors wird aus Nde I-Restriktionsendonukleaseverdau isoliert. Dieses hγ-IFN/hIL-2-Produkt wird unter Erhalt eines 656 Basenpaare langen Fragments mit Nde I und Afl II verdaut. Dieses Fragment wird an die Nde I-Stelle des isolierten 5'-Endes von KT hγ-IFN ligiert. Das 3'-Ende des retroviralen Vektors KT hIL-2 wird aus Afl II-Restriktionsendonukleaseverdau isoliert. Die Afl II-Restriktionsstelle von 3'-KT hIL-2 wird als KT hγ-IFN/hIL-2 bezeichnet.

(c) Konstruktion des hybriden retroviralen Vektors hIL-2/hγ-IFN

[0142] Die folgenden hIL-2-Primersequenzen werden verwendet:

(Sequenz-ID Nr. 28)

5'-3': CAT CTT CAG TGT CTA GAA GAA GAA CTC

[0143] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz von hIL-2-, die einem Bereich des Carboxylterminus des hIL-2-Proteins entspricht, und wird als hIL-2/P11 bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 29)

5'-3': G GCA GTA ACA AGT CAG TGT TGA GATVGAT GC

[0144] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz von hIL-2, die einem Bereich des Carboxylterminus des hIL-2-Proteins entspricht, und wird als hIL-2/P12 bezeichnet.

[0145] Die folgenden hγ-IFN-Primersequenzen werden verwendet:

(Sequenz-ID Nr. 30)

5'-3': GT GAC TGA TGT TAC TGC CAG GAC CCA TAT G

[0146] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz, die einem Bereich des Aminoterminus des hγ-IFN-Proteins entspricht, und wird als hγ-IFN/P13 bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 31)

5'-3': CGA ATA ATT AGT CAG CTT TTC GAA GTC

[0147] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz, die einem Bereich des Aminoterminus des hγ-IFN-Proteins entspricht, und wird als hγ-IFN/P14 bezeichnet.

[0148] Die hIL-2-Matrizen-DNA aus hIL-2/P11-Primer-DNA, hIL-2/P12-Primer-DNA, hγ-IFN/P13-Matrizen-DNA aus Beispiel 1C 1(e), hγ-IFN/P13-Primer-DNA und hγ-IFN/P14-Primer-DNA werden vereinigt, bei 95°C für 1 Minute denaturiert und in Gegenwart des PCR-Reaktionsgemischs ohne zusätzliche Primer verlängert. Das 3'-Ende der Matrizen-Primer-hIL-2-DNA annealt an das 5'-Ende der Matrizen-Primer-hγ-IFN-DNA, und die Verlängerung liefert ein 541 bp langes Fragment, das als hIL-2/hγ-IFN bezeichnet wird. Die Primer hIL-2/P11 und hγ-IFN/P14 werden dann zugegeben und 40 Zyklen PCR werden durchgeführt, um das hIL-2/hγ-IFN-Produkt zu vervielfältigen.

[0149] Der hybride hIL-2/hγ-IFN-Vektor wird durch eine dreiteilige Ligation konstruiert. Das 5'-Ende des retroviralen Vektors KT hIL-2 wird aus Xba I-Restriktionsendonukleaseverdau isoliert. Dieses hγ-IFN/hIL-2-Produkt wird unter Erhalt eines 507 Basenpaare langen Fragments mit Xba I und BstB I verdaut. Das 3'-Ende des retroviralen Vektors KT hγ-IFN wird aus BstB I-Restriktionsendonukleaseverdau isoliert. Die BstB I-Restriktionsstelle von 3' KT hγ-IFN wird an die BstB I-Restriktionsstelle des Konstrukts ligiert. Dieses retrovirale Konstrukt wird als KT hIL-2/hγ-IFN bezeichnet.

Beispiel 2

Die REPARATUR DES hγ-IFN-GENS

[0150] Die anschließende Sequenzierung von KT hγ-IFN, dem retroviralen Vektor, ergab das Vorliegen einer ein Basenpaar langen Deletion in dem hγ-IFN-Gen. Diese Deletion wird unter Verwendung eines mehrstufigen PCR-Verfahrens rückgängig gemacht.

A. Sequenzauswahl

[0151] Sequenzen werden aus dem IBI Pustell-Sequenzanalyseprogramm (Int. Biotech, Inc., New Haven,

Conn.) erhalten.

[0152] Die folgenden hγ-IFN-Primersequenzen werden verwendet:

(Sequenz-ID Nr. 32)

5'-3': G CCT CGA GCT CGA GCG ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG

[0153] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz, die komplementär zum Bereich des ATG-Startcodons ist, welches sich sieben Codons vor dem hγ-IFN-Gen erstreckt, und wird als hγ-IFN 1b bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 33)

5'-3': GTC ATC TCG TTT CTT TTT GTT GCT ATT

[0154] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz, die zu den Codons 106 bis 120 des hγ-IFN-Gens komplementär ist, und wird als hγ-IFN Rep B bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 34)

5'-3': AAT AGC AAC AAA AAG AAA CGA GAT GAC

[0155] Dieser Primer ist die Sense-Sequenz, die zu den Codons 106 bis 120 des hγ-IFN-Gens komplementär ist, und wird als hγ-IFN Rep A bezeichnet.

(Sequenz-ID Nr. 35)

5'-3': G CAT CGA TAT CGA TCA TTA CTG GGA TGC TCT TCG ACC TCG

[0156] Dieser Primer ist die Antisense-Sequenz, die zu dem Bereich des ATT-Stopcodons komplementär ist und sich über sieben Codons vor dem hγ-IFN-Gen erstreckt, und wird als hγ-IFN 3b bezeichnet.

B. Anfängliche PCR

[0157] Eine Lösung von 1 × 10^6 KT hγ-IFN-Plasmidmolekülen in 398,0 µl DI H_2O, 50 µl, 10x PCR-Puffer (500 mM KCl und 200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM $MgCl_2$, 1,0 mg/ml BSA), 5,0 µl, 2,5 mM dATP, 5,0 µl, 2,5 mM dGTP, 5,0 µl, 2,5 mM dCTP, 5,0 µl, 2,5 mM dTTP, 12,0 µl, 18,6 nmol/ml Oligonukleotid-hγ-IFN 1b, 15,0 µl, 24,6 nmol/ml, Oligonukleotid hγ-IFN RepB und 2,5 µl Taq-Polymerase werden in einem Mikrozentrifugenröhrchen gemischt, und 50 µl werden in aliquoten Teilen auf 10 Röhrchen verteilt. In ähnlicher Weise wird eine Lösung von 1 × 10^6 KT hγ-IFN-Plasmidmolekülen in 395,0 µl DI H_2O, 50,0 µl 10x PCR-Puffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml BSA), 5,0 µl, 2,5 mM dATP, 5,0 µl, 2,5 mM dGTP, 5,0 µl, 2,5 mM dCTP, 5,0 µl, 2,5 mM dTTP, 13 µl, 23,4 nmol/ml, Oligonukleotid hγ-IFN RepA, 17,0 µl, 18,0 nmol/ml, Oligonukleotid hγ-IFN 3b und 2,5 µl Taq-Polymerase in einem Mikrozentrifugenröhrchen gemischt, und 50,0 µl werden in aliquoten Teilen auf 10 Röhrchen verteilt. Die 20 Röhrchen werden in eine PCR-Maschine (Modell 9600, Perkin Elmer Cetus, Los Angeles, Kalif.) gegeben. Das PCR-Programm stellt die Temperatur des Reaktionsgefäßes im ersten Zyklus für 2 Minuten auf 94°C ein. Die nächsten 35 Zyklen werden für 0,5 Minuten auf 94°C, dann für 0,5 Minuten auf 55°C und schließlich für 1 Minute auf 72°C eingestellt. Der letzte Zyklus wird für 10 Minuten auf 72°C eingestellt. Dieses Zyklusprogramm wird als Programm 10 bezeichnet.

[0158] Nach der PCR-Vervielfältigung werden 225,0 µl aus jedem Reaktionsröhrchen mit 25,0 µl Beladungsfarbstoff (0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol und 50% Glycerol, Agarosegel-Beladungsfarbstoff) gemischt und auf die Wells eines Ethidiumbromid enthaltenden 2%-igen Agarosegels geladen. Das Gel wird bei etwa 90 Volt für 1 Stunde Elektroforese unterzogen. Ultraviolettlicht wird verwendet, um die Trennung der DNA-Banden sichtbar zu machen. Durch elektroforetische Übertragung auf NA 45-Papier, wie es zuvor in Beispiel 1C 2(a) beschrieben wurde, werden zwei Banden, ein Fragment mit einer Größe von 250 bp und ein Fragment mit einer Größe von 150 bp, isoliert. Nach der Präzipitation wird jedes der beiden DNA-Pellets in 20,0 µl DI H_2O resuspendiert und für weitere PCR-Vervielfältigung vorbereitet.

C. Annealen und zweiter PCR-Durchlauf

[0159] Eine Lösung von 20,0 µl der 150 bp langen PCR-DNA, 20,0 µl der 350 bp langen PCR-DNA, 161,5 µl DI H_2O, 25,0 µl 10x PCR-Puffer (500 mM KCl, 200 mM Tris-HCl, pH 8,4, 25 mM $MgCl_2$ und 1 mg/ml BSA), 2,5 µl, 2,5 mM dATP, 2,5 µl, 2,5 mM dGTP, 2,5 µl, 2,5 mM dCTP, 2,5 µl, 2,5 mM dTTP und 1,25 µl Taq-Polymerase werden in einem Mikrozentrifugenröhrchen gemischt, und 47,3 µl werden in aliquoten Teilen auf 5 Röhrchen verteilt. Jedes Röhrchen wird in eine PCR-Maschine (Modell 9600, Perkin-Elmer-Cetus, Kalif.) gegeben. Das PCR-Programm stellt die Temperatur des Reaktionsgefäßes für 5 Zyklen zu 0,5 Minuten auf 94°C ein. Der nächste Zyklus wird für 1 Minute auf 55°C eingestellt. Nach diesem Zyklus werden 1,2 µl hγ-IFN 1b und 1,5 µl hγ-IFN 3b zu dem Reaktionsgemisch zugegeben. Die Röhrchen werden dann unter Verwendung von Programm **10** mittels PCR vervielfältigt. Das Produkt wird als rhγ-IFN bezeichnet.

D. Erzeugung und Isolierung des stumpfendigen rhγ-IFN-PCR-DNA-Fragments

[0160] Die mittels PCR vervielfältigte rhγ-IFN-DNA wird unter Verwendung von T4-Polymerase stumpfendig gemacht. Insbesondere werden 120,0 µl rhγ-IFN-PCR-Lösung mit 1,25 µl, 2,5 mM dATP, 1,25 µl, 2,5 mM dGTP, 1,25 µl, 2,5 mM dCTP, 1,25 µl, 2,5 mM dTTP, 1 µl T4-DNA-Polymerase und 1,0 µl Klenow-Fragment gemischt. Dieses Gemisch wird bei Raumtemperatur für 10 Minuten inkubiert. Nach der Inkubation werden 13,0 µl Agarosegel-Beladungsfarbstoff zu dem Gemisch zugegeben, und diese Lösung wird auf ein 1 %-iges Agarosegel geladen. Das Gel wird bei etwa 90 Volt für 1 Stunde Elektroforese unterzogen. Ultraviolettlicht wird verwendet, um die DNA-Banden sichtbar zu machen. Eine 500 bp lange Bande wird mittels elektroforetischer Übertragung auf NA 45-Papier, wie es in Beispiel 1C 2(a) beschrieben wurde, isoliert. Nach der Präzipitation wird das DNA-Pellet in 12,0 µl DI H_2O resuspendiert.

[0161] Das isolierte 500 bp lange Fragment wird unter Verwendung von T4-Polynukleotidkinase stumpfendig gemacht. Insbesondere werden 1,0 mg dieses Fragments mit 1,5 µl 10x Kinasepuffer (0,5 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,1 mM $MgCl_2$, 50 mM Dithiothreitol, 1 mM Spermidin, 1 mM EDTA), 1,5 µl, 10 mM ATP und 1,0 µl T4-Polynukleotidkinase gemischt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

E. Ligation von rhγ-IFN-PCR-DNA in den SK^+-Vektor

[0162] Die rhγ-IFN-PCR-DNA wird in den SK^+-Vektor ligiert, wie es in Beispiel 1C 2(b) beschrieben ist. Eine Lösung von 2,0 µl rhγ-IFN-PCR-DNA-Kinase-Reaktionsgemisch, 2,0 µl mit CIP behandelter SK^+-Vektor und 1,0 µl T4-DNA-Ligase wird bei 16°C für 4 Stunden inkubiert. Das Bakterium DH5a wird wie in Beispiel 1C 2(c) beschrieben transformiert.

F. Ligation des rhγ-IFN-Gens in retroviralen Vektor

[0163] Die Ligation des rhγ-IFN-Gens in retroviralen Vektor wird wie in Beispiel 1C 2(c) beschrieben durchgeführt. Der neue Vektor wird als KT rhγ-IFN bezeichnet.

Beispiel 3

TRANSDUKTION VON VERPACKUNGSZELLINIEN (CA UND DA) UND MAUS-TUMORZELLINIEN (B16F10 UND L33) MIT DEM RETROVIRALEN VEKTOR mγ-IFN

A. Transfektion von Plasmid-DNA

[0164] 293 2-3-Zellen (eine von 293-Zellen abgeleitete Zellinie, ATCC Nr. CRL 1573, WO 92/05266) werden in einer Menge von 5×10^5 Zellen bei etwa 50% Konfluenz auf einer 6 cm-Gewebekulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium 4 Stunden vor der Transfektion durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Eine standardmäßige Calciumphosphat-DNA-Copräzipitation wird durch Mischen von 10,0 µg KT mγ-IFN-Plasmid und 10,0 µg MLP G-Plasmid mit einer 2 M CaCl-Lösung, Zugeben einer 1x gepufferten Hepes-Salzlösung, pH 6,9, und Inkubieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Calciumphosphat-DNA-Copräzipitat wird auf die 293 2-3-Zellen übertragen, die dann über Nacht bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert werden. Am nächsten Morgen werden die Zellen 3-mal in 1x PBS, pH 7,0, gewaschen. Frisches Medium wird zu den Zellen zugegeben, gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 37°C, 10% CO_2. Am nächsten Tag wird das Medium von den Zellen abgesammelt und durch einen 0,45 µm-Filter geleitet. Dieser Überstand wird verwendet, um Verpackungs- und Tumorzellinien zu transduzieren.

B. Transduktion von Verpackungszellinien

[0165] CA-Zellen (eine von CF-2-Zellen abgeleitete amphotrope Zellinie, ATCC Nr. 6574, WO 92/05266) werden in einer Menge von 1×10^5 Zellen/6 cm-Schale ausgesät. Ein halber Milliliter des frisch gesammelten Überstands der 293 2-3-Zellen wird zu den CA-Zellen zugegeben. Am nächsten Tag wird G418 zu diesen Zellen zugegeben, und über einen Zeitraum von einer Woche wird ein arzneimittelresistenter Pool erzeugt. Dieser Pool von Zellen wird durch Verdünnung kloniert, indem 0,8-1,0 Zellen zu jedem Well in 96-Well-Platten zugegeben werden. Vierundzwanzig Klone werden auf 24-Well-Platten und dann auf 6-Well-Platten verteilt, woraufhin die Zellüberstände für die Titrierung gesammelt werden. CA-Klone werden für die Vektorerzeugung ausgewählt. Ein CA-Klon mit einem Titer von ungefähr 5×10^6 cfu/ml wird ausgewählt und als mγ-IFN #23 bezeichnet.

[0166] DA-Zellen (in der WO 92/05266 als DA2 bezeichnet), eine von D 17-Zellen abgeleitete amphotrope Zellinie, ATCC Nr. CCL-183, werden in einer Menge von 5×10^5 Zellen/10 cm-Schale ausgesät. 0,5 ml des bei –70°C gelagerten Überstands der 293 2-3-Zellen werden zu den DA-Zellen zugegeben. Am nächsten Tag wird G418 zu diesen Zellen zugegeben, und über einen Zeitraum von einer Woche wird ein arzneimittelresistenter Pool erzeugt. Die DA-Klone werden für die Vektorerzeugung ausgewählt.

C. Transduktion von Maus-Tumorzellinien

1. L33

[0167] L33-Zellen (Dennert, USC Comprehensive Cancer Center, Los Angeles, Kalif., Patek et al., Int. J. of Cancer 24:624-628, 1979) werden in einer Menge von 1×10^5 Zellen/6 cm-Schale ausgesät. 1,0 ml des bei –70°C gelagerten Überstands der 293 2-3-Zellen wird zu den L33-Zellen zugegeben. Am nächsten Tag wird G418 zu diesen Zellen zugegeben, und über einen Zeitraum von einer Woche wird ein arzneimittelresistenter Pool erzeugt. Dieser Pool von Zellen wird durch Verdünnung kloniert, indem 1,0 Zellen zu jedem Well in 96-Well-Platten zugegeben werden, gefolgt von der Verteilung der Klone auf 24-Well-Platten und dann auf 6-Well-Platten, woraufhin Zelllysate für die Analyse der Expression des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) hergestellt werden. Ein Klon, L33/mγ-IFN #15, der deutlich erhöhte Niveaus an MHC-Expression zeigte, wird für anschließende Maus-Studien verwendet.

2. B16F10

[0168] B16F10-Zellen (Dennert, USC Comprehensive Cancer Center, Los Angeles, Kalif., Warner et al., Nature 300:113-121, 1982) werden in einer Menge von 2×10^5 Zellen/10 cm-Schale mit 10 µg/ml Polybren (1,5-Dimethyl-1,5-diazaundeca-methylenpolymethobromid, Sigma, St. Louis, Missouri) ausgesät. 0,1 ml Überstand des CA mγ-IFN-Pools wird zu den Zellen zugegeben und für 6 Stunden bei 37°C, 10% CO_2 inkubiert. G418 wird nach der Inkubation zugegeben, und ein arzneimittelresistenter Pool wird erzeugt. Dieser Pool wird durch Verdünnung kloniert, indem 1,0 Zellen zu jedem Well in 96-Well-Platten zugegeben werden. Vierundzwanzig Klone werden auf 24-Well-Platten und dann auf 6-Well-Platten verteilt, woraufhin Zelllysate für die Analyse der MHC-Expression hergestellt werden. Ein Klon, B16F10/mγ-IFN #4, mit deutlich erhöhten Niveaus von MHC-Expression wird in anschließenden Maus-Studien verwendet.

3. CT 26- und Lewis-Lungentumorzellen

[0169] Darmtumor 26-(CT 26-)(Brattain, Baylor College of Medicine, Houston, Texas) und Lewis-Lungentumor-(LLT-)(Waude, Southern Research Institute, Birmingham, Alabama, ATCC Nr. CRL 1642) Zellen werden in einer Menge von 1×10^5 Zellen/6 cm-Platte für jede Zellinie in DMEM mit 10% FBS und 4 µg/ml Polybren ausgesät und für 24 Stunden bei 37°C, 10% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wird 1,0 ml des retroviralen Vektors KT mγ-IFN (9×10^6 cfu/ml) zu jeder entsprechenden Zellinie zugegeben und für 24 Stunden bei 37°C, 10% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wird das Medium gewechselt und durch DMEM mit 10% FBS und 400 µg/ml G418 ersetzt. Diese Zellinien werden für ungefähr zwei Wochen unter G418-Selektion gehalten. Ausgewählte resistente CT 26- und LLT-Pools werden mittels Verdünnung kloniert, indem 1,0 Zellen zu jedem Well in 96-Well-Platten zugegeben werden. Zwei 96-Well-Platten werden für jeden mit G418 ausgewählten Pool ausgesät. CT 26 und LLT mγ-IFN exprimierende Klone werden auf 24-Well-Platten und dann auf 6-Well-Platten verteilt. Lysate von jedem Klon werden hergestellt und mittels Western-Blot-Analyse hinsichtlich gesteigerter MHC-Proteinexpression analysiert. Ein Klon, CT 26/mγ-IFN #10, mit einer gesteigerten MHC-Proteinexpression wird ausgewählt. Alle LLT-Studien werden unter Verwendung des nicht-klonalen Pools der mγ-IFN exprimierenden LLT-Zellen durchgeführt.

Beispiel 4

TRANSDUKTION VON VERPACKUNGSZELLINIEN UND MENSCHLICHEN MELANOMZELLINIEN MIT DEM RETROVIRALEN VEKTOR hγ-IFN

A. Transfektion von Plasmid-DNA

[0170] 5×10^5 293 2-3-Zellen (beschrieben in der Patentanmeldung WO 92/05266) werden bei etwa 50% Konfluenz auf einer 6 cm-Gewebekulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium 4 Stunden vor der Transfektion durch 3 ml frisches Medium ersetzt. Zum Zeitpunkt der Transfektion werden 5,0 µl KT hγ-IFN-Plasmid mit 2,0 µg MLP G-Plasmid in 0,1x Tris-EDTA, 150 mM, pH 7,4, gemischt. Eine standardmäßige Calciumphosphat-DNA-Copräzipitation wird durch Mischen der DNA mit einer 2 M CaCl-Lösung, Zugeben einer 1x gepufferten Hepes Salzlösung, 2 M, pH 6,9, und Inkubieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Calciumphosphat-DNA-Copräzipitat wird auf die 293 2-3-Zellen übertragen, die dann über Nacht bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert werden. Am nächsten Morgen werden die Zellen 3-mal in 1x PBS, pH 7,0, gespült. Frisches Medium wird zu den Zellen zugegeben, gefolgt von Inkubation über Nacht bei 37°C. Am nächsten Tag wird das Medium von den Zellen abgesammelt und durch einen 0,45 µm-Filter geleitet. Der filtrierte Überstand wird zur Verwendung bei der Transduktion von Verpackungszellen bei –70°C gelagert.

B. Transduktion von Verpackungszellen

[0171] CA 6BM-Zellen (CA-Zellen, die in der Patentanmeldung WO 92/05266 beschrieben sind, aus denen Mycoplasma durch 6 Zyklen von BM-Cyclin entfernt wurde) werden in einer Menge von 1 × 105 Zellen/6 cm-Schale mit 4 µg/ml Polybren ausgesät. Am nächsten Tag werden 0,2 ml des Überstands der in Beispiel 4A transient transfizierten 293 2-3-Zellen zu dem Medium der CA-Zellen zugegeben. Diese Zellen werden dann über Nacht bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium durch frisches Medium ersetzt, welches 800 µg/ml G418 enthält. Die Zellen werden auf Konfluenz gezüchtet und unter G418-Selektion vergrößert. Bei der anschließenden Konfluenz wird ein Großteil der Zellen eingefroren, während eine Kultur von G418 frei gehalten wird. Wenn die Zellen erneut Konfluenz erreicht haben, wird der Überstand zur Analyse des Vorliegens von hγ-IFN mittels Virusinhibitionstest gesammelt. Der Pool von Zellen wird durch Verdünnung kloniert, indem 1,0 Zellen zu jedem Well in 96-Well-Platten zugegeben werden. G418 ist in dem Kulturmedium enthalten. Vierundzwanzig Klone werden verteilt und hinsichtlich Titer, dem Vorliegen von Helfervirus, Expression und dem funktionalen Transfer der Expression analysiert.

C. Transfektion/Transduktion der zweiten Generation

1. Transduktion von CA 6BM

[0172] $5{,}0 \times 10^5$ DX-Zellen (eine von D 17-Zellen abgeleitete Zellinie, ATCC Nr. 183, WO 92/05266) werden bei etwa 50% Konfluenz auf einer 6 cm-Gewebekulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium 3,5 Stunden vor der Transfektion durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Eine standardmäßige Calciumphosphat-DNA-Copräzipitation wird durch Mischen von 10,0 µg KT hγ-IFN-Plasmid mit einer 120 ml 2 M CaCl-Lösung, Zugeben von 240 ml 2M 1x gepufferter Hepes-Salzlösung, pH 6,9, und Inkubieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Calciumphosphat-DNA-Copräzipitat wird auf die DX-Zellen übertragen, die dann über Nacht bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert werden. Am nächsten Morgen werden die Zellen 3-mal mit 145 mM 1x PBS, pH 7,0, gespült. Frisches Medium wird zu den Zellen zugegeben, gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 37°C, 10% CO_2. Am nächsten Tag wird das Medium von den Zellen abgesammelt, durch einen 0,45 µm-Filter geleitet und bei –70°C gelagert.

[0173] Drei Tage später werden CA 6BM-Zellen mit 4 µg/ml Polybren in einer Menge von 1×10^5 Zellen/6 cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag werden 5,0 und 1,0 ml des von den transfizierten DX-Zellen gesammelten Überstands zu den CA 6BM-Zellen zugegeben. Diese Gemische werden für 4 Stunden bei 37°C, 10% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation werden die Zellen in Gegenwart von 800 µg/ml G418 in einer Menge von 10 und 30 Zellen/Well in 96-Well-Platten mittels Verdünnung kloniert. Vierzig Klone werden auf 24-Well-Platten und dann auf 6-Well-Platten verteilt. Die Zellüberstände werden gesammelt und titriert. Klone mit Titern von wenigstens 1×10^6 cfu/ml werden in Rollflaschen gegeben und hinsichtlich der Erzeugung von Helfervirus überwacht. Diese Verpackungszellinie wird als CA/hγ-IFN bezeichnet.

2. Transduktion von DA

[0174] 5,0 × 10^5 DX-Zellen werden bei etwa 50% Konfluenz auf einer 6 cm-Gewebekulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wird das Medium 4 Stunden vor der Transfektion durch 4 ml frisches Medium ersetzt. Eine standardmäßige Calciumphosphat-DNA-Copräzipitation wird durch Mischen von 2,0 µl, 6,0 µg KT hγ-IFN-Plasmid mit einer 120 ml 2 M CaCl-Lösung, Zugeben von 240 ml 2M 1x gepufferter Hepes-Salzlösung, pH 6,9, und Inkubieren für 15 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Calciumphosphat-DNA-Copräzipitat wird auf die DX-Zellen übertragen, die dann über Nacht bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert werden. Am nächsten Morgen werden die Zellen 3-mal mit 3 ml 145 mM 1x PBS, pH 7,0, gespült. Frisches Medium wird zu den Zellen zugegeben, gefolgt von einer Inkubation über Nacht bei 37°C, 10% CO_2. Am nächsten Tag wird das Medium von den Zellen abgesammelt und durch einen 0,45 µm-Filter geleitet.

[0175] Am vorherigen Tag werden DA-Zellen (zuvor beschrieben in der Patentanmeldung WO 92/05266 als DA2) in einer Menge von 1 × 10^5 Zellen/6 cm-Schale ausgesät. 1,0 ml des frisch gesammelten DX-Überstands wird zu den DA-Zellen zugegeben. Am nächsten Tag wird G418 zu diesen Zellen zugegeben, und über einen Zeitraum von 2 Wochen wird ein arzneimittelresistenter Pool erzeugt. Der Pool von Zellen wird durch Verdünnung kloniert, indem 1,0 Zellen zu jedem Well in 96-Well-Platten zugegeben werden. Vierundzwanzig Klone werden auf 24-Well-Platten und dann auf 6-Well-Platten verteilt. Die Zellüberstände werden zur Titrierung gesammelt, und Klone mit Titern von wenigstens 5 × 10^5 cfu/ml werden ausgewählt. Ein DA-Klon, hIFNr #15, wird ausgewählt und als DA/hγ-IFN bezeichnet.

D Transduktion von menschlichem Melanom

[0176] Die Melanomzellinien DM6, DM92, DM252, DM265, DM262 und DM259 wurden aus Biopsien menschlicher Tumore hergestellt (Dr. Hilliard Seigler, Duke University und Viagene, Inc.), indem der Tumor in 1 mm große Stücke zerkleinert wurde oder indem der Tumor durch ein Cellector-Netz gemahlen wurde und die Stücke auf einer Gewebekulturflasche ausplattiert wurden. Die Zellen wurden wiederholt differentieller Trypsinierung unterzogen, wobei die Zellen trypsiniert werden und die Tumorzellen entfernt werden, ehe sich die Fibroblasten von der Flasche abheben. Die Zellen wurden getragen, bis ein konstantes Wachstum beobachtet wurde, und eine ausreichende Anzahl von Zellen wurde erzeugt und eingefroren. Nach der Herstellung wurde jede Zellinie in einer Menge von 10^6 Zellen/10 cm-Schale mit 4 µg/ml Polybren ausgesät. Am nächsten Tag wurden 5-10 ml gefilterter Überstand aus dem DA/hγ-IFN-Pool zu jeder der Zellkulturen zugegeben. Dies entspricht einer Multiplizität der Infektion (MOI) von 5-10. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 800 µg/ml G418 selektiert. Proben der Überstände aller transduzierten Zellinien wurden zweimal wöchentlich gesichert. Die Überstände wurden durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und bei –70°C gelagert, bis sie, wie in Beispiel 6 beschrieben, hinsichtlich Expression von γ-IFN getestet wurden. Die Kulturen wurden gehalten, bis die Selektion abgeschlossen war, und eine ausreichende Anzahl von Zellen wurde erzeugt und eingefroren.

Beispiel 5

EXPRESSION VON MHC KLASSE I

A. Bestimmung der Expression von MHC Klasse I in der Maus mittels Western-Blot-Analyse

[0177] RIPA-Lysate werden aus konfluenten Platten von Zellen hergestellt. Insbesondere wird das Medium erst von den Zellen abgesaugt. In Abhängigkeit von der Größe der die Zellen enthaltenden Kulturplatte wird ein Volumen von 100,0 bis 500,0 µl eiskalter RIPA-Lysepuffer (10 mM Tris, pH 7,4, 1 % Nonidet P40 (Calbiochem, Kalif.), 0,1 % SDS, 150 mM NaCl) zu den Zellen zugegeben. Die Zellen werden unter Verwendung einer Mikropipette von den Platten abgekratzt, und das Gemisch wird in ein Mikrozentrifugenröhrchen überführt. Das Röhrchen wird für 5 Minuten zentrifugiert, um Zelltrümmer zu präzipitieren, und der Lysatüberstand wird in ein weiteres Röhrchen überführt. Die Lysate werden auf einem 10%-igen SDS-PAGE-Gel Elektroforese unterzogen, und die Proteinbanden werden bei 10 bis 60 Volt für 2 bis 18 Stunden auf eine Immobilon-Membran in CAPS-Puffer (10 mM CAPS, pH 11,0, 10% Methanol) übertragen. Die Membran wird aus dem CAPS-Puffer in 5% Blotto (5% Magermilchpulver, 50 mM Tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, 0,02% Natriumazid und 0,05% Tween 20) überführt und mit einem Ratten-IgM-Antikörper, 72.14S (Richard Dutton, UCSD, San Diego, Kalif.), sondiert. Diese Antikörpersonde ist gegen einen konservierten intrazellulären Bereich des Maus-MHC Klasse I-Moleküls gerichtet. Die Antikörperbindung an die Membran wird unter Verwendung von ^{125}I-Protein A detektiert.

B. Analyse der MHC-Expression in Maus-Tumorzellinien mit und ohne retroviralen Vektor mγ-IFN

[0178] Die MHC-Expression wird durch Western-Blot- und FACS-Analyse bestätigt. Insbesondere exprimieren die L33-, CT 26- und LLT-Elternzellinien relativ normale Mengen an MHC Klasse I-Protein, und die B16F10-Elternzellinie weist verringerte Mengen an MHC Klasse I-Protein auf. Die mit mγ-IFN transduzierten Pools und Klone dieser Zellinien exprimieren größere Mengen an MHC Klasse I als ihre entsprechenden Elternzellinien, was durch Western-Blot- und FACS-Analyse demonstriert wird. Die Western-Blot-Analyse von Lysaten verschiedener CT 26 mγ-IFN-, LLT mγ-IFN-Subklone und der CT 26- und LLT-Elternzellinien zeigt eine gesteigerte Expression von MHC Klasse I. Eine Western-Blot-Analyse zweier L33 mγ-IFN-Subklone, zweier B16F10 mγ-IFN-Subklone, der L33-Elternzellinie und der B16F10-Elternzellinie veranschaulicht die gesteigerte Expression von MHC Klasse I der mγ-IFN-Klone im Vergleich zu den Elternzellen, siehe **Fig. 2**. Eine FACS-Analyse von L33 und zwei L33 mγ-IFN-Subklonen veranschaulicht, daß auf der Oberfläche der Subklone im Vergleich zu den Elternzellen eine beträchtlich größere Menge an MHC Klasse I exprimiert ist. Die FACS-Analyse wird mit geernteten Zellen durchgeführt. Insbesondere werden Zellen mit einem für MHC Klasse I spezifischen Antikörper, 34.4 Anti-D^d-Antikörper (Dutton, UCSD, San Diego, Kalif.), inkubiert. Dieser gebundene Antikörper wird durch Inkubieren der durch 34.4 Anti-D^d gebundenen Zellen mit fluoreszenzkonjugiertem Kaninchen-Anti-Maus-IgG-Antikörper detektiert (Capell, North Carolina). Die Fluoreszenzemission von dem zellgebundenen Antikörper-Fluoreszen-Konjugat wird detektiert und durch FACS mengenmäßig bestimmt, siehe **Fig. 21**.

C. MHC-Expression in Tumorzellen. die in vitro mit rekombinantem mγ-IFN behandelt wurden

[0179] $1{,}0 \times 10^6$ Zellen, die in vitro mit rekombinantem mγ-IFN behandelt wurden, werden am Tag vor der Behandlung ausplattiert, so daß bis zum nächsten Tag 50% Konfluenz erreicht wird. Rekombinantes mγ-IFN (Genzyme, Cambridge, MA) wird in Konzentrationen im Bereich von 0 bis 500 U/ml zugegeben, um die Platten der studierten Zellen zu verdoppeln. Die Platten werden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert, und die Zellen werden lysiert und mittels Western-Blot analysiert, um eine Zunahme der Expression von MHC Klasse I zu bestimmen. Die Daten sind in **Fig.** 3 angegeben.

[0180] Um die Auswirkungen von rekombinantem mγ-IFN auf die Menge der MHC-Expression in exogen behandelten Zellen nach der Entfernung des IFN zu untersuchen, werden am Tag vor der Behandlung mehrere Platten von L33-Zellen ausgesät, so daß am nächsten Tag 50% Konfluenz erreicht wird. Rekombinantes mγ-IFN wird in einer Endkonzentration von 200 U/ml zugegeben, und die Zellen werden für 48 Stunden inkubiert. Die Zellen werden dann mit PBS gewaschen, frisches Medium wird zugegeben, und die Zellen werden 0, 24, 48 und 72 Stunden nach dem Waschen mit PBS lysiert. Die Zellextrakte werden mittels Western-Blot hinsichtlich Expression von MHC Klasse I analysiert. Die Ergebnisse zeigen, daß es 48 Stunden nach der Entfernung von IFN zu einer signifikanten Abnahme der zellulären Expression von MHC Klasse I kommt, und daß diese Abnahme mit der Zeit fortschreitet (**Fig. 3A**).

Beispiel 6

BESTIMMUNG DER AKTIVITÄT VON γ-IFN

A. mγ-IFN-Test

[0181] Die Aktivität von γ-IFN wird von Lee Biomolecular, San Diego, Kalif., als die Messung der schützenden Wirkung gegen zytozide Infektion mit Enzephalomyokarditis-(EMC-) Virus quantifiziert. Eine Mauszellinie L929, ATCC CCL I, wird für Tests hinsichtlich mγ-IFN verwendet. Die gefilterten Überstände werden in unterschiedlichen Konzentrationen zu den Zellen zugegeben, und dann werden die Zellen mit dem EMC-Virus gereizt. Proben von Maus-γ-IFN werden mit dem geeigneten NIH und Vergleichsreagenzien parallel getestet, und die Ergebnisse werden auf NIH-Referenzeinheiten (U/ml) normalisiert (Brennan et al., Biotechniques 1:78, 1983).

[0182] Proben der Überstände aller transduzierten Zellinien werden gesichert, wenn die Zellen zweimal wöchentlich ernährt werden. Der Überstand wird durch einen 0,45 µm-Filter filtriert und bis zum Testen bei –70°C gelagert. Die Aktivität wird für die Zelltypen CT 26, BC10ME, LLT und B16F10 aufgezeichnet. Diese Daten sind in den Tabellen 3 und 4 angegeben.

Tabelle 3

PRODUKTION VON γ-IFN IN VERSCHIEDENEN BALB/C-ZELLINIEN

Zelltyp	U/ml
rCT26	3,5
CT26 IFN-Pool	3400
CT26 IFN-Klon #10	4500
BC10ME	22
BC10ME IFN-Pool	110
L33	< 0,3
L33 α-IFN	7,7

ND = nicht durchgeführt

Tabelle 4

PRODUKTION VON γ-IFN IN VERSCHIEDENEN C57BL/6-ZELLINIEN

Zelltyp	U/ml
LLT	< 0,69
LLT IFN-Pool	82
LLT IFN #21	40
LLT IFN #28	2,1
LLT IFN-Pool-Tumor	21
LLT IFN-Pool Ig met	11
B16F10	< 2,6
B16F10 IFN #4	90

Beispiel 7

TUMORIGENIZITÄT VON B16F10- UND B16F10/mγ-IFN #4-ZELLEN

[0183] B16F10- und B16F10/mγ-IFN#4-Elternzellen werden geerntet, gezählt und auf eine Konzentration von 8×10^5 Zellen/ml in Hank'scher gepufferter Salzlösung (HBSS, Irvine Scientific, Kalif.) resuspendiert. Zwei Black 6-Mäusen (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, Indiana) werden intravenös (i.v.) 0,5 ml der B16F10-Zellsuspension (3×10^5 Zellen) injiziert. Fünf C57 Bl/6-Mäusen weiden i.v. 0,5 ml der B16F10 IFN#4-Zellsuspension injiziert. Vierzehn Tage nach der Injektion werden die Lungen aus den Mäusen entnommen, eingefärbt und in Bouin'scher Lösung (Sigma, St. Louis, Missouri) konserviert. Die 4 Lungenflügel werden abgetrennt, bei 10-facher Vergrößerung untersucht, und die jeweils vorhandene Anzahl an schwarzen Tumoren wird bestimmt.

[0184] Die durchschnittliche Anzahl an Tumoren pro Lunge für jede Gruppe und die Standardabweichung sind in Fig. 6 gezeigt.

Beispiel 8

B16F10-CTL-TESTS

A. Experiment 1

[0185] B16F10/mγ-IFN #4-Zellen werden am Salk Institute mit 10.000 rad ^{60}Co bestrahlt. Zwei Black 6-Mäusen werden intraperitoneal (i.p.) 1×10^7 bestrahlte Zellen in 1,0 ml HBSS injiziert. Drei Wochen später werden den Mäusen i.v. 3×10^5 lebende B16F10-Zellen in 0,5 ml HBSS injiziert. Zwei Black 6-Kontrollmäusen wird dieselbe Dosis injiziert. Vierzehn Tage später werden die Lungen und Milzen aus den Mäusen entnommen. Die Lungen werden eingefärbt und in Bouin'scher Lösung konserviert. Die 4 Lungenflügel werden abgetrennt, bei 10-facher Vergrößerung untersucht, und die jeweils vorhandene Anzahl an schwarzen Tumoren wird bestimmt. Auf keiner der Lungen waren irgendwelche Tumore zu sehen. Splenozyten werden aus den Milzen entnommen, dreimal in HBSS gewaschen und in CTL-Medium, welches RPMI und 5% hitzeinaktiviertes FBS enthält, in einer Menge von 3×10^7 Zellen/10 ml in T-25-Flaschen resuspendiert. Sechzigtausend B16F10-Zellen, die am Salk Institute mit 10.000 rad ^{60}Co bestrahlt wurden, werden zu den Flaschen zugegeben. Die Zellen werden für 6 Tage bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wird ein standardmäßiger 5-stündiger CTL-Test durchgeführt, bei dem sowohl B16F10- als auch B16F10/hγ-IFN #4-Zellen als Ziele verwendet werden. Die Daten sind in **Fig.** 4 gezeigt.

[0186] Sechs bis acht Wochen alten weiblichen Balb/C-Mäusen (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, Indiana) werden zweimal i.p. 1×10^7 vektortransduzierte Zellen, die bei Raumtemperatur mit 10.000 rad bestrahlt wurden, injiziert. Die Tiere werden 7 Tage später getötet, und 3×10^6 Splenozyten/ml werden in vitro mit 6×10^4 bestrahlten syngenen transduzierten Zellen/ml in T-25-Flaschen kultiviert. Das Kulturmedium besteht aus RPMI 1640, 5% hitzeinaktiviertem FBS, 1 mM Pyruvat, 50 mg/ml Gentamycin und 10^{-5} M 2-Mercaptoethanol. Effektorzellen werden 4-7 Tage später geerntet und unter Verwendung verschiedener Effektor:Zielzelle-Verhältnissen in 96-Well-Mikrotiterplatten in einem standardmäßigen 4- bis 6-stündigen Test getestet. Der Test verwendet $Na_2{}^{51}CrO_4$-markierte, 100 µCi, 1 h bei 37°C (Amersham, Arlington Heights, Illinois) inkubierte Zielzellen in einer Menge von 1×10^4 Zellen/Well in einem Endvolumen van 200,0 µl. Nach der Inkubation werden 100,0 µl des Kulturmediums entnommen und in einem Beckman-Gammaspektrometer (Beckman, Dallas, Texas) analysiert. Die spontane Freisetzung (SR) wird als CPM aus Zielzellen plus Mittelwert bestimmt, und die maximale Freisetzung (MR) wird als CPM aus Zielzellen plus 1 M HCl bestimmt. Der Prozentsatz der Zielzelllyse wird wie folgt berechnet: [(Effektorzelle + Ziel-CPM) – (SR)/(MR) – (SR)] × 100. Die Werte der spontanen Freisetzung betragen typischerweise 10%-20% der MR.

B. Experiment 2

[0187] B16F10/mγ-IFN#4-Zellen werden geerntet, in HBSS resuspendiert und am Salk Institute mit 20.000 rad ^{60}Co bestrahlt. Die Zellen werden bei 2 verschiedenen Konzentrationen in aliquote Teile aufgeteilt: 1×10^7 Zellen/ml und 1×10^7 Zellen/0,1 ml. Drei Gruppen aus 4 Black 6-Mäusen erhalten eine Injektion. Die erste Gruppe mit drei Mäusen erhält keine Zellen, die zweite Gruppe erhält 1,0 ml i.p., $1,0 \times 10^7$ Zellen insgesamt, und die dritte Gruppe erhält 0,1 ml i.m., 1×10^7 Zellen insgesamt.

[0188] Sieben Tage nach der Injektion werden allen Mäusen i.v. 0,5 ml lebende B16F10-Zellen in einer Menge von 8×10^5 Zellen/ml HBSS injiziert. Vierzehn Tage nach der i.v. Injektion werden die Milzen aus den Mäusen entnommen. Die Splenozyten werden aus den Milzen isoliert, dreimal in HBSS gewaschen und in CTL-Medium in einer Menge von 3×10^7 Zellen/10 ml in T-25-Flaschen resuspendiert. Sechzigtausend B16F10-Zellen, die am Salk Institute mit 20.000 rad ^{60}Co bestrahlt wurden, werden zu den Flaschen zugegeben. Die Zellen werden für 5 Tage bei 37°C, 5% CO_2 inkubiert. Nach der Inkubation wird ein standardmäßiger 6,5-stündiger CTL-Test unter Verwendung von B16F10-Zellen als Ziele durchgeführt. Die Daten sind in **Fig. 5** gezeigt.

Beispiel 9

B16F10-IMPFSTUDIEN

A. Experiment 1

[0189] B16F10- und B16F10/mγ-IFN#4-Zellen werden geerntet und in HBSS resuspendiert. Die Zellen werden mit 10.000 rad ^{60}Co bestrahlt. Die Zellkonzentration wird für beide Zellsuspensionen auf 8×10^5 Zellen/ml eingestellt. Drei Gruppen von drei Black 6-Mäusen erhalten eine Injektion. Der ersten Gruppe werden i.v. 0,5

ml, 4,0 × 10^5 bestrahlte B16F10-Zellen injiziert. Der zweiten Gruppe werden i.v. 0,5 ml der bestrahlten B16F10/mγ-IFN#4-Zellen injiziert, und die letzte Gruppe erhält keine Zellen. Zehn Tage nach der Injektion werden allen 9 Mäusen i.v. 0,5 ml lebende B16F10-Zellen in einer Menge von 6,0 × 10^5 Zellen/ml HBSS injiziert. Vierzehn Tage nach der i.v. Injektion werden die Lungen aus den Mäusen entnommen und eingefärbt und in Bouin'scher Lösung konserviert. Die 4 Lungenflügel werden abgetrennt, bei 10-facher Vergrößerung untersucht, und die jeweils vorhandene Anzahl an schwarzen Tumoren wird bestimmt.

[0190] Die durchschnittliche Anzahl an Tumoren pro Lunge für jede Gruppe und die Standardabweichung sind in Fig. 7 gezeigt.

B. Experiment 2

[0191] B16F10/hγ-IFN#4-Zellen werden geerntet, in HBSS resuspendiert und mit 10.000 rad ^{60}Co bestrahlt. Die Zellen werden bei 5 verschiedenen Konzentrationen in aliquote Teile aufgeteilt: 4 × 10^5 Zellen/0,5 ml, 5 × 10^5 Zellen/ml, 1 × 10^7 Zellen/ml, 5 × 10^6 Zellen/0,1 ml und 1 × 10^7 Zellen/0,1 ml. Sechs Gruppen von 4 Black 6-Mäusen erhalten eine Injektion. Gruppe Eins werden keine Zellen injiziert. Gruppe Zwei werden i.v. 0,5 ml, 4 × 10^5 B16F10/mγ-IFN#4-Zellen injiziert. Der dritten Gruppe wird i.p. 1,0 ml, 5 × 10^6 B16F10/mγ-IFN#4-Zellen injiziert. Der vierten Gruppe wird i.p. 1,0 ml, 1 × 10^7 B16F10/mγ-IFN#4-Zellen injiziert. Der fünften Gruppe wird intramuskulär (i.m.) 0,1 ml, 5 × 10^6 B16F10/mγ-IFN#4-Zellen injiziert, und der letzten Gruppe wird i.m. 0,1 ml, 1,0 × 10^7 B16F10/mγ-IFN#4-Zellen injiziert. Sieben Tage nach der Injektion werden allen Mäusen i.v. 0,5 ml lebende B16F10-Zellen in einer Menge von 6,0 × 10^5 Zellen/ml HBSS injiziert. Vierzehn Tage nach der i.v. Injektion werden die Lungen aus den Mäusen entnommen, eingefärbt und in Bouin'scher Lösung konserviert. Die 4 Lungenflügel werden abgetrennt, bei 10-facher Vergrößerung untersucht, und die Anzahl an schwarzen Tumoren in jeder Lunge wird bestimmt.

[0192] Die durchschnittliche Anzahl an Tumoren pro Lunge für jede Gruppe und die Standardabweichung sind in Fig. 8 gezeigt.

Beispiel 10

VERGLEICH DER TUMORIGENIZITÄTSEIGENSCHAFTEN VON MIT mγ-IFN UND REKOMBINANTEM mγ-IFN-PROTEIN BEHANDELTEN ZELLEN

A. Experiment 1

[0193] Das nachfolgende Experiment wird durchgeführt, um zu bestimmen, ob mit mγ-IFN behandelte Tumorzellen im Vergleich zu Tumorzellen, die kontinuierlich mγ-IFN exprimieren, in vivo anders wachsen. Drei separaten Gruppen von zehn Balb/C-Mäusen werden subkutan entweder 3 × 10^6 L33-Zellen, 3 × 10^6 L33-Zellen, die drei Tage vor der Injektion in vitro mit 400 Einheiten rekombinantem mγ-IFN behandelt wurden, oder 3 × 10^6 Zellen eines Klons von mγ-IFN-vektormodifizierten L33-Tumorzellen, L33/mγ-IFN #15, injiziert. Vor der Injektion werden diese Zellen in 10 cm Falcon-Gewebekulturschalen unter Verwendung von DMEM mit 10% FBS gezüchtet. Die Zellen werden mit Versehe (Irvine Scientific, Kalif.) geerntet und in HBSS in einer Konzentration von 1,5 × 10^7 pro ml resuspendiert. Drei Millionen Zellen von jedem der oben genannten L33-Subtypen werden subkutan in der Nähe des Sternums jedes Tieres in einem Gesamtvolumen von 0,2 ml injiziert. Das Tumorwachstum wird wöchentlich aufgezeichnet. Das Volumen jedes Tumors wird durch Messen der Länge, der Breite und der Höhe des Tumors unter Verwendung eines Castroviejo Caliper von Roboz Instruments, Deutschland, bestimmt. Die mittlere Tumorgröße wird mit dem mittleren Tumorwachstum in den beiden anderen Gruppen verglichen.

[0194] Die Daten zeigen, daß die mit rekombinantem mγ-IFN behandelten L33-Zellen in ähnlicher Weise wachsen wie die L33-Elterntumorlinie. Im Gegensatz dazu wird der L33/mγ-IFN #15-Klon, der kontinuierlich mγ-IFN exprimiert, abgestoßen, siehe Fig. 9 und Fig. 21. Zusammenfassend können die mγ-IFN exprimierenden Tumorzellen eine stärkere und vollständigere Immunantwort induzieren als die Tumorzellen, die in vitro mit mγ-IFN behandelt wurden.

B. Experiment 2

[0195] Dieses Experiment ist identisch zu Experiment 1, mit der folgenden Ausnahme. Anstelle einer Injektion von 3 × 10^6 Zellen von entweder L33-Zellen, L33-Zellen, die in vitro mit rekombinantem mγ-IFN behandelt wurden, oder L33/mγ-IFN #15-Zellen werden 6 × 10^6 Zellen jedes Typs als Inoculum in den Tieren verwendet. Die

Daten zeigen, daß, wenn die doppelte Anzahl an Zellen injiziert wird, mγ-IFN exprimierende Tumorzellen eine stärkere und vollständigere Immunantwort induzieren als die Zellen, die in vitro mit mγ-IFN behandelt wurden, siehe **Fig. 10**.

C. Tumorigenizität von mγ-IFN exprimierenden L33-Zellen in Nacktmäusen

[0196] Die Tumorigenizität wird durch Überwachen des Wachstums von L33/mγ-IFN #15-Zellen in Mäusen mit geschwächter T-Zell-vermittelter Immunität bestimmt. Zwei Gruppen von 7 Balb/C-Nacktmäusen werden entweder 6×10^6 L33-Zellen oder 6×10^6 L33/mγ-IFN #15-Zellen injiziert. Das Tumorwachstum wird überwacht, und die durchschnittlichen gemessenen Werte beider Gruppen werden miteinander verglichen.

[0197] Die Daten zeigen, daß die L33/mγ-IFN #15-Zellen in Nacktmäusen nicht abgestoßen werden, siehe **Fig.** 1. Zusätzlich wachsen die mγ-IFN exprimierenden Zellen um ungefähr 40% langsamer als die L33-Elternzellen. Allem Anschein nach wird eine T-Zell-vermittelte Komponente im Immunsystem der Maus benötigt, um die L33-Tumorzellen abzustoßen. Diese Antwort wird in Mäusen mit einem normalen Immunsystem, nicht jedoch in Mäusen mit einer geschwächten T-Zellvermittelten Immunität induziert.

Beispiel 11

BESTIMMUNG EINER GESTEIGERTEN IMMUNITÄT IN BALB/C-MÄUSEN DURCH mγ-IFN EXPRIMIERENDE CT 26-TUMORZELLEN

A. Tumorigenizität von mγ-IFN exprimierenden CT 26-Tumorzellen

[0198] Die Tumorigenizität wird durch Beobachten des Tumorwachstums in normalen Balb/C-Mäusen, denen CT 26/mγ-IFN injiziert wurde, bestimmt. Zwei Gruppen von 10 Mäusen werden subkutan entweder CT 26-Elternzellen oder mγ-IFN exprimierende CT 26-Pool-Zellen injiziert. Dieser Pool ist eine nicht-klonale Population von mit G418 selektierten transduzierten Zellen. Diese Zellypen werden in 10 cm Falcon-Gewebekulturschalen unter Verwendung von DMEM und 10% FBS gezüchtet. Die Zellen werden unter Verwendung von Versene geerntet und in HBSS in einer Konzentration von $2{,}5 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Eine Gesamtmenge von 0,1 ml Zellsuspension wird subkutan in der Nähe des Sternums jeder Maus injiziert. Messungen des Tumorwachstums jedes Tieres werden wöchentlich aufgezeichnet. Die mittleren gemessenen Tumorwerte der drei Gruppen werden miteinander verglichen. **Fig. 12** zeigt das Tumorwachstum über einen Zeitraum von 30 Tagen.

[0199] Die Daten zeigen, daß die mγ-IFN exprimierenden CT 26-Zellen abgestoßen werden, wohingegen bei unmodifizierten CT 26-Zellen keine Abstoßung zu beobachten ist. Zusammenfassend wird durch Lymphokin exprimierende Zellen eine Immunantwort induziert, die durch Elterntumorzellen nicht induziert wird.

B. Zytolytische Aktivität von Splenozyten in Tieren. die CT 26- und CT 26/mγ-IFN exprimierende Tumore tragen

[0200] Mäuse, die ihre jeweiligen mγ-IFN exprimierenden CT 26-Tumore abgestoßen haben, werden verwendet, um zu bestimmen, ob die beobachtete Abstoßung auf eine gesteigerte Immunantwort zurückzuführen ist. Insbesondere werden Splenozyten von Tieren geerntet, die ihren jeweiligen mγ-IFN exprimierenden CT 26-Tumor abgestoßen haben. Diese Tumore werden durch eine einzige subkutane Injektion jedes Tumorzelltyps in einer Menge von $2{,}0 \times 10^5$ Zellen in der Nähe des Sternums jedes Tieres induziert. Der Vorgang der Splenozytengewinnung wird kurz beschrieben. Die Milz einer Maus wird durch Einschneiden des äußeren Pelzes und der inneren Bauchdecke in Längsrichtung unter Verwendung einer Schere entnommen. Die Milz wird dann aseptisch von dem angrenzenden Bindegewebe abgetrennt und in HBSS gegeben. Die Milz wird dann in eine 10 cm-Platte mit 2 ml frischer HBSS gegeben. Die Splenozyten werden aus der Milz entnommen, indem an einem Ende ein kleiner Riß erzeugt wird, gefolgt von leichtem Schlagen der Milz unter Verwendung der abgeflachten Oberfläche einer Nadel mit 23 Gauge. Die Splenozyten werden durch Zugeben von 7 ml HBSS zu der Platte gesammelt. Die Zellsuspension wird mit einer Pipette gesammelt und durch ein Nytex-Sieb (Tetco, Elmsford, New York) geleitet, um Klumpen aufzulösen. Sieben Milliliter zusätzliches Medium werden verwendet, um verbleibende Splenozyten von der Platte abzuspülen, und das Gemisch wird durch das Nytex-Sieb geleitet. Die resultierenden Splenozyten werden in einem 15 ml-Polypropylenröhrchen bei 1600 U.p.M. für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die pelletierten Splenozyten werden in 14 ml HBSS resuspendiert und bei 1600 U.p.M. für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die pelletierten Splenozyten werden in 10 ml HBSS resuspendiert und bei 1600 U.p.M. für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Vor der Zentrifugation wird eine Verdünnung eines aliquoten Teils der resuspendierten Splenozyten entnommen und in Trypan-

blau gezählt (Irvine Scientific, Santa Ana, Kalif.). Die Konzentration der nicht blauen Zellen wird bestimmt. Die Splenozyten werden dann in RPMI und 5% hitzeinaktiviertem FBS in einer Konzentration von 3×10^7 Splenozyten/ml resuspendiert. Die Splenozyten werden dann in vitro restimuliert. Insbesondere werden 3×10^7 Splenozyten mit 6×10^5 bestrahlten CT 26-Zellen oder einem anderen geeigneten Restimulator in einer T-25 cm-Flasche mit 10 ml RPMI und 5% FBS in einem Effektor:Restimulator-Zellen-Verhältnis von 50:1 gemischt und bei 37°C, 5% CO_2 für 5-7 Tage inkubiert. Nach der Inkubation werden diese Effektoren aus der Flasche entfernt, gezählt und in verschiedenen Verhältnissen mit ^{51}Chrom-(^{51}Cr-) markierten Zielzellen in einer 96-Well-Platte für 4 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden 100 µl Überstand aus jedem Well von jedem Effektor:Zielzelle-Verhältnis in ein Röhrchen gegeben, und die Freisetzung von ^{51}Cr wird unter Verwendung eines Gammazählers bestimmt. Der Prozentsatz an Lyse wird unter Verwendung der folgenden Formel bestimmt.

$$\% \text{ Lyse} = \frac{\text{(Experimentelle Freisetzung, CPM) - (Spontane Freisetzung, CPM)}}{\text{(Maximale Freisetzung, CPM) - (Spontane Freisetzung, CPM)}} \times 100$$

[0201] Die Daten zeigen, daß eine starke Immunantwort in Tieren, die ihre mγ-IFN exprimierenden CT 26-Zellen abgestoßen haben, induziert wird, siehe Fig. 13. Zusammenfassend können die mγ-IFN exprimierenden CT 26-Zellen eine Immunantwort induzieren, die der elterliche Tumor nicht induzieren kann.

Beispiel 12

INDUZIERUNG VON ZYTOLYTISCHER AKTIVITÄT VON SPLENOZYTEN IN BALB/C-MÄUSEN UNTER VERWENDUNG BESTRAHLTER CT 26- ODER CT 26/mγ-IFN EXPRIMIERENDER TUMORZELLEN

A. Erzeugung einer zytolytischen Aktivität von Splenozyten unter Verwendung zweier Infektionen von CT 26- oder CT 26/mγ-IFN exprimierenden Zellen

[0202] Eine Serie von Injektionen wird durchgeführt, um zu bestimmen, ob bestrahlte mγ-IFN CT 26-Zellen die Immunaktivierung gegen CT 26 mehr steigern können als bestrahlte unmodifizierte CT 26-Zellen. Zwei Mäusen werden zwei wöchentliche Dosen von $1{,}0 \times 10^7$ bestrahlten CT 26- oder CT 26/my-IFN #10-Zellen pro Dosis injiziert. Nach zwei Wochen werden die Milzen entnommen, in vitro mit ihren jeweiligen Inducern stimuliert und gegen mit Chrom markierte CT 26-Zielzellen in einem

B. Spezifität von Splenozyten. induziert durch die beiden Infektionen von CT 26- oder CT 26/mγ-IFN exprimierenden Tumorzellen

[0203] Die durch eine Behandlung mit zwei Dosen von 1×10^7 CT 26/mγ-IFN #10-Zellen erzeugten Splenozyteneffektoren werden in einem ^{51}Cr-Freisetzungstest gegen mehrere Nicht-CT 26-Zielzellen verwendet, um eine Spezifität für CT 26 zu demonstrieren. BC10ME, eine syngene Linie in Balb/C-Mäusen, und B16F10, eine Tumorzellinie, die aus einem anderen Stamm von Mäusen, C57Bl/6 (Harlan Sprague-Dawley, Indianapolis, Indiana) und nicht Balb/C, erhalten wurde, werden ausgewählt. Die Daten zeigen, daß, wenn mγ-IFN exprimierende CT 26-Zellen als Stimulatoren verwendet werden, die induzierte Antwort für CT 26 spezifisch ist und nicht gegen andere Zelltypen entweder desselben Mausstamms oder eines nicht verwandten Stamms, siehe Fig. 15. ^{51}Cr-Freisetzungstest verwendet. Die Daten zeigen, daß die Zytotoxizität der CT 26/mγ-IFN-Effektoren gegen CT 26 stärker ist als gegen CT 26-Effektoren, siehe 14.

C. Verbesserte Zytolyse von γ-IFN exprimierenden CT 26-Tumorzellen

[0204] mγ-IFN exprimierende, ^{51}Cr-markierte CT 26-Zielzellen zeigen eine verstärkte Lyse in Chromfreisetzungstests, wenn Effektorsplenozyten, die durch die Behandlung mit zwei Dosen von 1×10^7 bestrahlten CT 26-Zellen erzeugt wurden, verwendet werden. Die Daten in Fig. 16 zeigen, daß mγ-IFN exprimierende CT 26-Zellen als bessere Ziele dienen als unmodifizierte CT 26-Zellen. Es ist möglich, daß das durch diese modifizierten CT 26-Zielzellen exprimierte mγ-IFN eine größere Affinität für die CT 26-Effektoren induzieren kann, was in einer effizienteren Zytolyse durch diese Effektoren resultiert. Die gesteigerte Menge an MHC-Molekülen auf der Oberfläche dieser Zellen kann auch zu der verstärkten Lyse beitragen.

Beispiel 13

BESTIMMUNG EINER VERSTÄRKTEN IMMUNITÄT IN C57BL/6-MÄUSEN DURCH mγ-IFN EXPRIMIERENDE LLT-ZELLEN

A. Tumorigenizität von mγ-IFN exprimierenden LLT-Zellen

[0205] Die Tumorigenizität von mγ-IFN exprimierenden LLT-Zellen wird durch Injektion in normale C57Bl/6-Mäuse bestimmt. Zwei Gruppen von zehn Mäusen werden subkutan entweder elterliche LLT-Zellen oder mγ-IFN exprimierende LLT-Pool-Zellen injiziert. Diese Zellen werden wie in Beispiel 3 C 3 beschrieben gezüchtet. Die Zellen werden wie in Beispiel 13 A beschrieben geerntet und in HBSS in einer Konzentration von $2{,}5 \times 10^6$ Zellen/ml resuspendiert. Ein Zehntel Milliliter Zellsuspension wird subkutan in der Nähe des Sternums jeder Maus injiziert. Die Tumormessungen werden wöchentlich aufgezeichnet, und die durchschnittlichen Tumorgrößen der beiden Gruppen werden miteinander verglichen. **Fig. 17** stellt das Tumorwachstum über einen Zeitraum von 21 Tagen dar.

[0206] Die Daten zeigen, daß die mγ-IFN exprimierenden LLT-Zellen bedeutend langsamer wachsen als die unmodifizierten LLT-Zellen. Zusammenfassend besagen die Daten, daß durch mγ-IFN exprimierende Zellen eine teilweise Immunantwort induziert wird, die durch elterliche LLT-Zellen nicht induziert wird.

B. Erzeugung von zytolytischer Aktivität von Splenozyten unter Verwendung zweier Injektionen von mγ-IFN exprimierenden LLT-Zellen

[0207] Eine Serie von Injektionen in C57Bl/6-Mäusen wird durchgeführt, um zu bestimmen, ob bestrahlte, mγ-IFN-modifizierte LLT-Zellen eine stärkere Immunaktivierung gegen LLT-Zellen bewirken als bestrahlte LLT-Zellen. Den Mäusen werden zwei wöchentliche Dosen von 1×10^7 bestrahlten LLT-Zellen oder LLT/mγ-IFN-Pool-Zellen injiziert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion werden die Milzen entnommen, in vitro mit ihrem jeweiligen Inducer stimuliert und gegen ^{51}Cr-markierte LLT-Zielzellen in einem Chromfreisetzungstest verwendet. Die Daten zeigen, daß die Zytotoxizität der LLT/mγ-IFN-Effektoren gegen LLT stärker ist als gegen LLT-Effektoren oder unmodifizierte Stimulatoren, was die größere Wirksamkeit von mγ-IFN exprimierenden Stimulatorzellen zeigt, siehe **Fig. 18**.

C. Spezifität von Splenozyten induziert durch zwei Injektionen von γ-IFN exprimierenden LLT-Zellen

[0208] Die durch eine Behandlung mit zwei Dosen von 1×10^7 LLT mγ-IFN-Poolzellen erzeugten Splenozyteneffektoren werden in einem Chromfreisetzungstest gegen verschiedene Nicht-LLT-Zielzellen verwendet, um eine Spezifität für LLT zu demonstrieren. B16F10, eine syngene Tumorlinie in C57Bl/6-Mäusen, und CT 26, eine Tumorzellinie in Balb/C-, jedoch nicht in C57Bl/6-Mäusen, werden ausgewählt. Die Daten zeigen, daß unter Verwendung von mγ-IFN exprimierenden LLT-Zellen als Stimulatoren die induzierte Antwort spezifisch für LLT ist und nicht gegen andere Zelltypen entweder desselben Mausstamms oder eines nicht verwandten Stamms, siehe **Fig. 19**.

D. Verstärkte Zytolyse von mγ-IFN exprimierenden LLT-Tumorzellen

[0209] mγ-IFN exprimierende, ^{51}Cr-markierte LLT-Zielzellen zeigen eine verstärkte Lyse in Chromfreisetzungstests, wenn Effektorsplenozyten, die durch die Behandlung mit zwei Dosen von 1×10^7 bestrahlten LLT-Zellen erzeugt wurden, verwendet werden, siehe **Fig. 20**. Die Daten zeigen, daß mγ-IFN exprimierende LLT-Zellen als bessere Ziele dienen als unmodifizierte LLT-Zellen. Es ist möglich, daß die mγ-IFN, die durch diese modifizierten LLT-Zielzellen exprimiert werden, eine größere Affinität für die LLT-Effektoren induzieren, was zu einer effizienteren Zytolyse durch diese Effektoren führt.

Beispiel 14

HLA KLASSE I- UND hγ-IFN-EXPRESSION IN TRANSDUZIERTEN MENSCHLICHEN MELANOMEN

A. Bestimmung der Expression von menschlichem MHC (HLA) Klasse I mittels Western-Blot-Analyse

[0210] Die HLA-Expression wird im wesentlichen bestimmt, wie es in Beispiel 5A für Maus-MHC beschrieben ist, mit der Ausnahme, daß der für HLA Klasse I spezifische Antikörper W6/32 verwendet wird.

B. Analyse und HLA-Expression in menschlichen Melanomen mit und ohne den retroviralen Vektor hγ-IFN

[0211] DM92, DM252 oder DM265 werden mit hγ-IFN-Vektor oder hIL-2 als Kontrolle für die Vektortransduktion behandelt. Die Daten in **Fig. 22** zeigen, daß der hγ-IFN-Vektor die Menge an HLA im Vergleich zu den nicht-transduzierten Zellen steigert, wohingegen dies bei den mit IL-2 transduzierten Zellen nicht der Fall war. Die Transduktion von DM265 führt zu einer gesteigerten Menge an HLA, selbst wenn wenig oder kein hγ-IFN in das Medium abgesondert wird (Tabelle 4).

[0212] hγ-IFN wird durch die virale Inhibition von Enzephalomyokarditisvirus auf einer Schimpansenzellinie, A549, ATCC CCL 185, quantifiziert. Die Aktivität wird durch Vergleich mit authentischen NIH-Vergleichsreagenzien bestimmt und auf NIH-Referenzeinheiten (U/ml) normalisiert (Brennan et al., Biofechniques 1:78, 1983). Die Daten für mehrere menschliche Melanomzellinien sind in Tabelle 4 angegeben. Diese Daten zeigen, daß alle menschlichen Melanome, die mit dem retroviralen Vektor hγ-IFN transduziert wurden, leicht detektierbare Mengen an biologisch aktivem hγ-IFN exprimieren. Diese Expression ist über die Zeit oft stabil (Tabelle 5, DM252 und DM92), nimmt jedoch in Kultur im Laufe der Zeit manchmal ab (Tabelle 4, DM6 und DM265). Diese zeitabhängige Abnahme von hγ-IFN kann darauf hindeuten, daß die Expression des Gens leicht toxisch ist, was somit zu einem selektiven Vorteil für Zellen führt, die geringe Mengen an hγ-IFN exprimieren.

Tabelle 5

mγ-IFN-AKTIVITÄT IN MENSCHLICHEN MELANOMZELLINIEN

hγ-IFN-Produktion	Tag	U/ml
DM 262		<1,1
DM262/Dhγ-IFN	20	20
DM252		<6,6
DM252/Dhγ-IFN	2	710
	15	890
	20	1700
	27	400
	34	470
	73	370
	84	240
DM6		<5,0
DM6/Dhγ-IFN	6	54
	13	63
	20	37
	34	<7,7
	73	<1,1
DM92		<5,0
DM92/Dhγ-IFN	6	83
	13	54
	20	83
	30	45
	34	56
DM265		<4,4
DM265/Dhγ-IFN	13	45
	16	45
	20	<7,7
	37	<1,1
	58	4,6
	70	<1,1
DM259		<1,1
DM259/Dhγ-IFN	30	8,1

Beispiel 15

TRANSDUZIERBARKEIT VON MENSCHLICHEN MELANOMZELLINIEN DURCH RETROVIRALE VEKTOREN

A. Transduktion von menschlichen Melanomzellinien mit unkonzentrierten Vektorüberständen

[0213] Die menschlichen Melanomzellinien DM6, DM92 und DM252 wurden mit verschiedenen MOI mit einem retroviralen Vektor, der E. coli-β-Galactosidasegen (CBβgal) exprimiert, transduziert. CBβgal ist ein Vektor, der durch Ersetzen des HIV IIIB gag/prof-Gens von KT-3 durch das E. coli-β-Galactosidasegen erzeugt wird. Produzierende Zellinien wurden analog zu der in den Beispielen 1, 3 und 4 beschriebenen Weise hergestellt. Drei Tage nach der Transduktion mit CBβgal wurden die Zellen mit X-gal (Gold Biotechnology, St. Louis, MO) eingefärbt, die Anzahl an blauen Zellen wurde gezählt, und der Prozentsatz der Transduktion wurde berechnet (Norton et al., Molec. and Cell. Biol. 5:218-290, 1985). Die Ergebnisse zeigen, daß die drei menschlichen Melanomzellinien leicht transduzierbar waren und sich einer fast 100%-igen Transduktion annäherten.

B. Effizienz der Transduktion von menschlichen Melanomen unter Verwendung von konzentriertem Vektor

[0214] Amphotroper CBβgal-Vektor wurde aus CA-Erzeugerzellinien geerntet und durch Tangentialfluß-Konzentration 40-fach konzentriert. Sechs-Well-Platten mit DM252, DM6 und DM92 werden mit 4×10^4 Zellen/Well angelegt. Am nächsten Tag, Tag 0, wird jede Melanomzellinie mit einer MOI von 50, 25, 10, 5, 1 und 0 mit CBβgal-Vektor, der konzentriert, aber nicht gereinigt ist, transduziert. Am nächsten Tag (Tag 1) wird der Vektor aus den Zellen entfernt, und die Zellen werden mit Medium gespült. Am Tag 5 werden die Zellen mit X-gal eingefärbt. Diese Zellen werden nicht mit G418 ausgewählt. Die Effizienz der Transduktion menschlicher Melanome nimmt mit zunehmender MOI ab, wenn konzentrierter Vektor verwendet wird (**Fig. 24**), was auf das Vorliegen eines Inhibitors für die Transduktion hindeutet. Daher kann die Reinigung des Vektors für die direkte Injektion von Vektor in Tumore, die konzentrierten Vektor erfordern, kritisch sein. Die Reinigungsverfahren können Verfahren umfassen, die typischerweise von Fachleuten auf dem Gebiet der Proteinreinigung verwendet werden, wie beispielsweise Gelfiltration oder Ionenaustauschchromatographie. Die mikroskopische Untersuchung der Proben, MOI = 1,0, für das obige Experiment zeigte, daß selbst unter diesen Bedingungen 25-90% der Zellpopulation ohne die Hilfe von G418-Selektion transduziert werden können (**Fig. 25**).

C. Transduktionszeitexperiment nach Beginn der Kultur

[0215] Stücke aus der Biopsie eines menschlichen DM262-Tumros, die eingefroren worden waren, werden aufgetaut, mit Skalpellen zerkleinert, durch ein Sieb passiert und in zehn 6,0 cm-Gewebekulturplatten ausplattiert. An den Tagen 1, 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10 und 13 nach Beginn der Kultur wird eine Platte mit $1,0 \times 10^6$ cfu ungereinigtem CBβgal-Vektor transduziert. Am Tag 20 werden alle Platten mit X-gal eingefärbt. Diese Zellen werden nicht mit G418 selektiert. Die Daten zeigen, daß der Tumor schon einen Tag nach dem Beginn der Kultur rasch mit hoher Effizienz transduzierbar ist.

[0216] Die Transduktion unmittelbar nach dem Beginn der Kultur erlaubt, daß die Melanome rasch und mit minimalem Auswirkungen aufgrund von hγ-IFN-Toxizität oder antigenem Drift in der Kultur wieder in die Patienten eingebracht werden können. Die hohe Effizienz der Transduktion so bald nach dem Ausplattieren deutet darauf hin, daß die Transduktion in vivo durch die direkte Injektion von Vektor in Tumore effektiv sein kann.

Beispiel 16

DIREKTE VERABREICHUNG VON VEKTOR AN TUMOR TRAGENDE TIERE

A. Direkte Verabreichung von Vektor an Mäuse

[0217] Maustumorsysteme können verwendet werden, um zu zeigen, daß zellvermittelte Immunantworten durch die direkte Verabreichung eines Vektorkonstrukts, welches wenigstens ein Antitumormittel exprimiert, verstärkt werden können. Beispielsweise werden sechs bis acht Wochen alten weiblichen Balb/C- oder C57Bl/6-Mäusen subkutan 1×10^5 bis 2×10^5 Tumorzellen injiziert, die man für eine bis zwei Wochen in den Mäusen wachsen läßt. Die resultierenden Tumore können variable Größen haben (für gewöhnlich ein Volumen von 1-4 mm^3), solange das Transplantat nicht durch Infektion oder Geschwürbildung gefährdet wird. Ein Zehntel bis zwei Zehntel Milliliter eines Vektorkonstrukts, welches ein Antitumormittel, wie γ-IFN, exprimiert (minimaler Titer 10^6 cfu/ml), wird dann intratumoral injiziert (mit oder ohne Polybren oder Promatinsulfat, um die Ef-

fizienz der Transduktion zu steigern). Mehrere Injektionen des Vektors werden alle zwei bis drei Tage an den Tumor verabreicht.

[0218] In Abhängigkeit von den Parametern des betreffenden Experiments kann auch die Art der Vektorpräparate variabel sein. Der Vektor kann aus gefilterten oder ungefilterten Überständen von vektorerzeugenden Zellinien (VCL) stammen, oder er kann durch Filtration, Konzentration oder Dialyse und Formulierung weiterverarbeitet werden. Es können auch andere standardmäßige Reinigungstechniken, wie Gelfiltration und Ionenaustauschchromatographie, verwendet werden, um den Vektor zu reinigen. Beispielsweise kann Dialyse verwendet werden, um γ-Interferon, welches durch die VCL selbst erzeugt wurde (und welches, wenn es verabreicht wird, das Wachstum des Tumors bewirken kann) zu eliminieren. Die Dialyse kann auch verwendet werden, um mögliche Inhibitoren der Transduktion zu entfernen. Eine weitere Option besteht darin, intratumorale Injektionen der γ-Interferon-VCL selbst zu verabreichen, um den Vektor in größerem Umfang einzubringen. Kurz gesagt werden Zellen injiziert, nachdem sie aus Kulturfluid herauszentrifugiert und in einem pharmazeutisch verträglichen Medium (z.B. PBS plus 1 mg/ml HSA) resuspendiert wurden. Eine kleine Anzahl von nur 10^5 Zellen kann bei diesem Aspekt der Erfindung verwendet werden.

[0219] Die Wirksamkeit des Vektorkonstrukts kann durch Messen der Reduktion des Primärtumorwachstums, der Reduktion der Tumorbelastung (bestimmt durch ein verringertes Tumorvolumen) oder durch die Auslösung einer gesteigerten T-Zell-Aktivität gegen Tumorzielzellen (gemessen in einem in vitro-Testsystem unter Verwendung von Lymphozyten, die aus den Milzen dieser Tumor tragenden Zellen isoliert wurden) bestimmt werden. In einem metastatischen Maus-Tumormodell kann die Wirksamkeit auch bestimmt werden, indem man zuerst Tumorzellen injiziert, die metastatisch sind, und dann, wenn der Tumor ein Volumen von 1-4 mm^3 hat, mehrere Male Vektor in diesen Tumor injiziert. Das Primärtumor-Transplantat kann dann nach 2-3 Wochen chirurgisch entnommen werden, und die Reduktion der Metastasen in dem festgelegten Zielorgan (Lunge, Niere, Leber usw.) kann gezählt werden. Um die Veränderung der Metastasen in einem Zielorgan zu messen, kann das Organ entnommen, gewogen und mit einem nicht-tumortragenden Organ verglichen werden. Zusätzlich kann die Menge an Metastasen in dem Zielorgan durch Zählen der Anzahl sichtbarer metastatischer Knötchen unter Verwendung eines Sektionsmikroskops mit niedriger Energie bestimmt werden.

B. Direkte Verabreichung von Vektor an Menschen

[0220] Für die Menschen ist die bevorzugte Stelle für die direkte Verabreichung eines Vektorkonstrukts von der Lage des Tumors oder der Tumore abhängig. Das menschliche γ-Interferon-Gen oder andere Sequenzen, die Antitumormittel codieren, können durch Verabreichung von Vektoren (die Vektoren können wie zuvor beschrieben gereinigt werden) direkt in feste Tumore eingebracht werden. Sie können auch an Leukämien, Lymphome oder Aszites-Tumore verabreicht werden. Für Hautläsionen, wie Melanome, kann der Vektor direkt in die oder um die Läsion herum injiziert werden. Es sollten wenigstens 10^5 cfu, vorzugsweise mehr als 10^6 cfu an Vektorpartikeln in einer pharmazeutisch verträglichen Formulierung (z.B. 10 mg/ml Mannitol, 1mg/ml HSA, 25 mM Tris, pH 7,2, und 105 mM NaCl) verabreicht werden. Für innere Tumorläsionen kann der betroffene Tumor mittels Röntgen-, CT-Abtastungs-, Antikörperabbildungs- oder anderen Verfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet der Tumorlokalisierung bekannt sind, lokalisiert werden. Die Injektion von Vektor kann durch die Haut in innere Läsionen oder durch Adaptionen von Bronchoskopie (für die Lungen), Sigmoidoskopie (für Kolorektal- oder Ösophagustumore) oder intraarterielle oder Intra-Blutgefäß-Katheter (für viele Arten von vaskularisierten festen Tumoren) erfolgen. Die Injektion kann in die oder um die Tumorläsion herum erfolgen. Die Effizienz der Auslösung einer biologischen Antwort kann mittels CTL-Test oder durch verzögerte Überempfindlichkeits-(DTH-) Reaktionen auf den Tumor gemessen werden. Die Effizienz und die klinischen Antworten können durch Messen der Tumorbelastung unter Verwendung von Röntgen-, CT-Abtastungs- oder Antikörperabbildungs- oder anderen Verfahren, die Fachleuten auf dem Gebiet der Tumorlokalisierung bekannt sind, bestimmt werden.

Beispiel 17

DIREKTE INJEKTION VON β-GAL-VEKTOR IN MÄUSE, DENEN CT 26-TUMORZELLEN INJIZIERT WURDEN

[0221] Um zu bestimmen, ob Tumorzellen durch die direkte Injektion von Vektor in vivo transduziert werden können, wird ein Reportervektor, der das E. coli-β-Galactosidasegen (CB β-gal) exprimiert, verwendet. Kurz gefaßt werden fünf Gruppen von jeweils zwei Mäusen s.c. 2×10^5 CT 26-Tumorzellen injiziert. Einer weiteren Gruppe von zwei Mäusen werden s.c. die 2×10^5 β-gal exprimierenden CT 26-Zellen als Kontrolle für die β-gal-Färbung injiziert. Der Injektionsbereich wird auf jeder Maus mit wasserfestem Marker eingekreist. Zwei

Tage nach der Impfung mit Tumorzellen werden den Mäusen 0,2 ml von entweder PBS plus Polybren (4 µg/ml), CB β-gal (5×10^6 koloniebildende Einheiten (CFU)/ml) mit und ohne Polybren oder DAhγ-IFN #15 mit und ohne Polybren injiziert. Den Mäusen in jeder Gruppe wird ihr jeweiliger Impfstoff alle zwei Tage in den mit wasserfestem Marker markierten Bereich injiziert. Jede Gruppe erhält insgesamt vier Injektionen. Zwei Tage nach den letzten Injektionen werden Tumore aus jeder der Gruppen von Mäusen entnommen, zerkleinert und in zwei 10 cm^2-Platten, die DMEM plus 10% FBS und Antibiotika enthalten, ausgesät. Diese Tumorexplantate läßt man in vitro eine Woche wachsen. Nach einer Woche werden die Zellen geerntet, mit 2% Formaldehyd fixiert und mit X-gal über Nacht eingefärbt. Die Ergebnisse dieses Experiments sind unten angegeben:

Art des Tumors und Behandlung	Gesamtzahl an Zellen	Anzahl an blauen Zellen	% Blau
1. CT26 (PBS + Polybren)	$7,4 \times 10^6$	$2,4 \times 10^5$	3,2%
2. CT26 β-gal	$6,2 \times 10^6$	$2,0 \times 10^6$	31,6%
3. CT26 + β-gal-Vektor ohne Poly	$6,6 \times 10^6$	$8,8 \times 10^5$	13,3%
4. CT26 + β-gal-Vektor mit Poly	$6,4 \times 10^6$	$1,3 \times 10^6$	20,0%
5. CT26 + DAhγ-IFN #15 ohne Poly	$6,9 \times 10^6$	$2,0 \times 10^5$	2,9%
6. CT26 + DAhγ-IFN #15 mit Poly	$1,3 \times 10^6$	$3,0 \times 10^4$	2,7%

[0222] Aufgrund der Färbung über Nacht gab es eine beträchtliche Hintergrundfärbung bei den unmodifizierten CT26-Zellen oder CT26-Zellen, in die hγ-IFN-Vektor als Färbungskontrolle injiziert worden war (3%). Unter diesen Bedingungen wurde ein maximaler Nettowert von 17% der Zellen eingefärbt (20 minus die 3% aus dem Hintergrund). Unter der Annahme, daß die Positivkontrolle (100% transduziert) selbst nur zu 28,6% eingefärbt war, zeigt die 17%-ige Färbung an, daß (17/28,6) × 100 oder 60% der Zellen in vivo transduziert wurden. Es ist wichtig zu bemerken, daß die transduzierten Tumorzellen sich in der log-Phase befanden und daß die Multiplizität der Infektion (MOI) daher mit dem Tumorwachstum abnahm.

[0223] Aus dem Vorstehenden versteht sich, daß, obwohl hier spezifische Ausführungsformen der Erfindung zu Veranschaulichungszwecken beschrieben wurden, verschiedene Modifikationen vorgenommen werden können, ohne vom Geist und Schutzbereich der Erfindung abzuweichen. Dementsprechend wird die Erfindung nur durch die anhängenden Ansprüche beschränkt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER: Barber, Jack R.
Jolly, Douglas J.
Respess, James G.

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: ZUSAMMENSETZUNG UND VERFAHREN FÜR DIE KREBSIMMUNTHERAPIE

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 36

(iv) BRIEFADRESSE:
(A) ADRESSAT: Seed and Berry
(B) STRASSE: 6300 Columbia Center, 701 Fifth Avenue
(C) ORT: Seattle
(D) BUNDESLAND: Washington
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 98104-7092

(v) COMPUTERLESBARE FASSUNG:
(A) DATENTRÄGER: Floppy-Disk
(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25

(vi) DATEN DER JETZIGEN ANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER:
(B) ANMELDETAG:
(C) KLASSIFIKATION:

(vii) DATEN DER VORANMELDUNG:
(A) ANMELDENUMMER:
(B) ANMELDETAG:

(viii) ANGABEN ZUM VERTRETER:
(A) NAME: McMasters, David D.
(B) VERTRETERNUMMER: 33,963
(C) AKTENZEICHEN: 930049.408

(ix) TELEKOMMUNIKATION:
(A) TELEFON: (206) 622-4900
(B) TELEFAX: (206) 682-6031
(C) TELEX: 3723836

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

TAATAAATAG ATTTAGATTT A

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 35 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

GCCTCGAGAC GATGAAATAT ACAAGTTATA TCTTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 35 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GAATCGATCC ATTACTGGGA TGCTCTTCGA CCTGG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

ATAAATAGAA GGCCTGATAT G

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 35 Basenpaare

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

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

GCCTCGAGAC AATGTACAGG ATGCAACTCC TGTCT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 35 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

GAATCGATTT ATCAAGTCAG TGTTGAGATG ATGCT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Gly Arg Arg Ala Ser Gln
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Leu Gly Glu Pro Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Gly Arg Arg Ala Ser Gln Leu Cys Tyr Ile Leu Asp Ala
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Lys Ala Ala Ile Thr Ser Tyr Glu Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Lys Ala Ala Ile Thr Glu Thr Leu Lys
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:
(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
(A) LÄNGE: 31 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

CAGGACCCAT ATGTAAAAGA AGCAGAAAAC C

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

GCAGAGCTGG GATGCTCTTC GACCTCG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

GCATCCCAGC TCTGCTATAT CCTGGATGCC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

GGCATGCAGG CATATGTGAT GCCAACC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

CAGAGTCTCG GTTATAGCTG CCTTTCGCAC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

GCTATAACCG AGACTCTGAA GCATGAG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Gly Arg Arg Ala Ser Gln
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:
(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Leu Val Thr Asn Ser Ala Pro Thr Ser Ser Ser
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:
(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Gly Arg Arg Ala Ser Gln Ala Pro Thr Ser Ser Ser
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:
(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:

Ile Ile Ser Thr Leu Thr
1 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 22:
(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Val Leu Gly Ser Leu Gly Cys Tyr Cys Gln Asp
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:
(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Ile Ile Ser Thr Leu Thr Cys Tyr Cys Gln Asp
1 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:
(A) LÄNGE: 28 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

CAGGACCCAT ATGTAAAAGA AGCAGAAG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

GGTGCACTCT GGGATGCTCT TCGACCTCG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:
(A) LÄNGE: 29 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

CCCAGGCACC TACTTCAAGT TCTACAAAG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

GGGTCTTAAG TGAAAGTTTT TGCTTTGAGC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

CATCTTCAGT GTCTAGAAGA AGAACTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

GGCAGTAACA AGTCAGTGTT GAGATGATGC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:
(A) LÄNGE: 30 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

GTGACTGATG TTACTGCCAG GACCCATATG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

CGAATAATTA GTCAGCTTTT CGAAGTC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 32:
(A) LÄNGE: 40 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

GCCTCGAGCT CGAGCGATGA AATATACAAG TTATATCTTG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 33:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 33:

GTCATCTCGT TTCTTTTTGT TGCTATT

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 34:
(A) LÄNGE: 27 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 34:

ATTAGCAACA AAAAGAAACG AGATGAC

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 35:
(A) LÄNGE: 40 Basenpaare
(B) ART: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 35:

GCATCGATAT CGATCATTAC TGGGATGCTC TTCGACCTCG

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 36:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(C) STRANGFORM: einzeln
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) MOLEKÜLART: Peptid

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(v) FRAGMENTART: N-terminal

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 36:

Gln Glu Thr Tyr Glu Thr Leu Lys
1 5

Patentansprüche

1. Verwendung eines rekombinanten retroviralen Vektors, welcher die Expression von Gamma-Interferon steuert, zur Herstellung eines Medikaments für die direkte Verabreichung an einen festen Tumor, wobei der Tumor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus einem Melanom, einem Kolorektalkarzinom, einem Lungenkarzinom, einem Nierenzellkarzinom und einem Brustadenokarzinom.

2. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der feste Tumor ein Melanom ist.

3. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der feste Tumor ein Kolorektalkarzinom ist.

4. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der feste Tumor ein Lungenkarzinom ist.

5. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der feste Tumor ein Nierenzellkarzinom ist.

6. Verwendung nach Anspruch 1, wobei der feste Tumor ein Brustadenokarzinom ist.

Es folgen 22 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

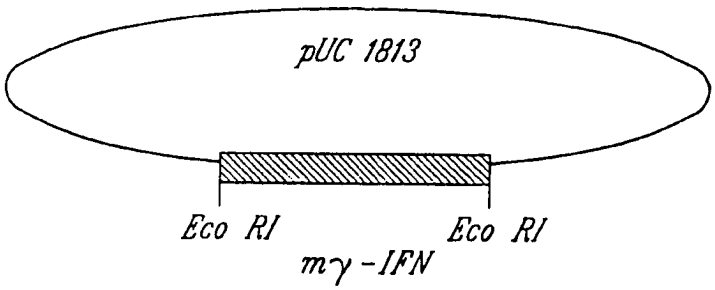


FIG. 1A

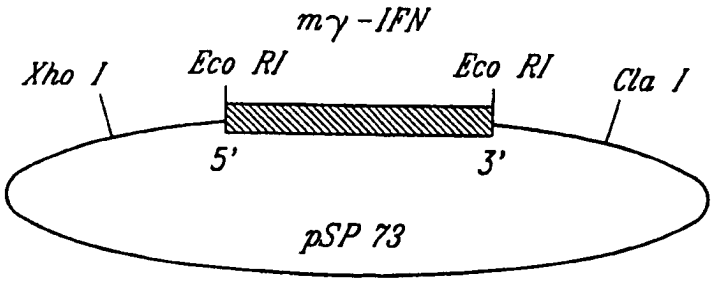


FIG. 1B

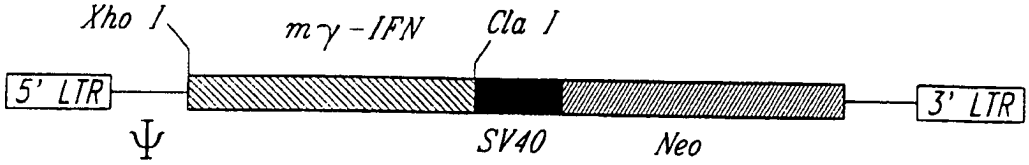


FIG. 1C

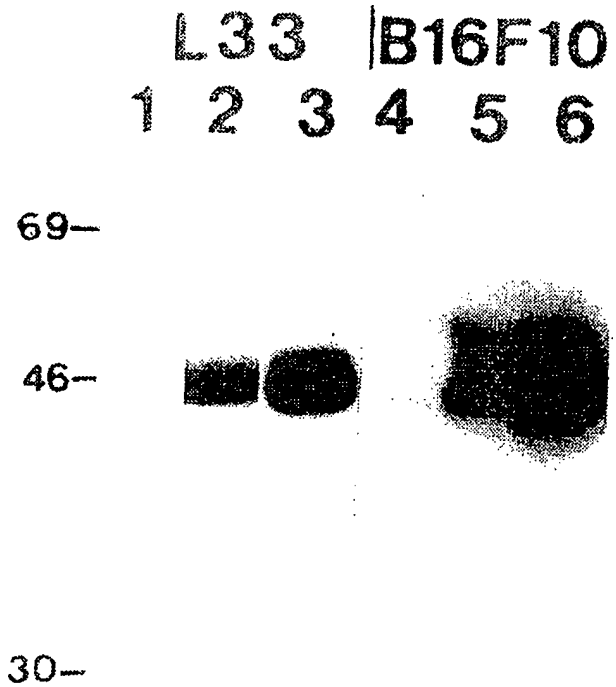


FIG. 2

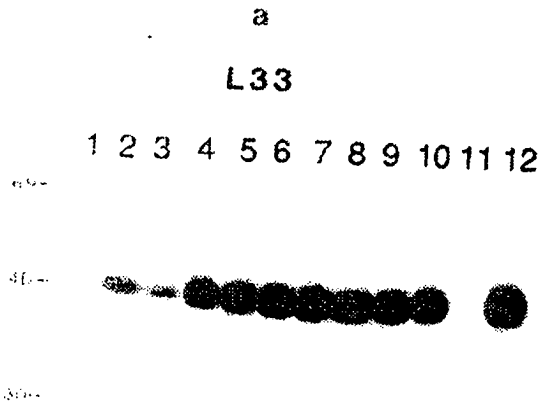


FIG. 3A

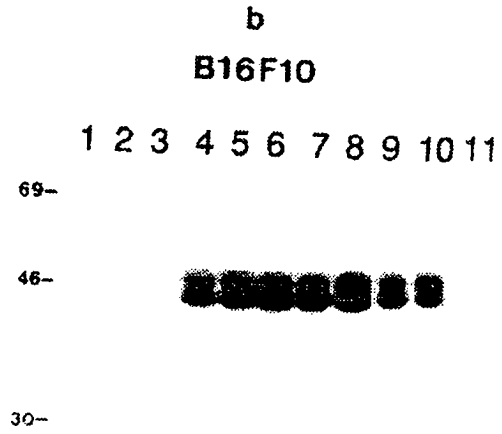


FIG. 3B

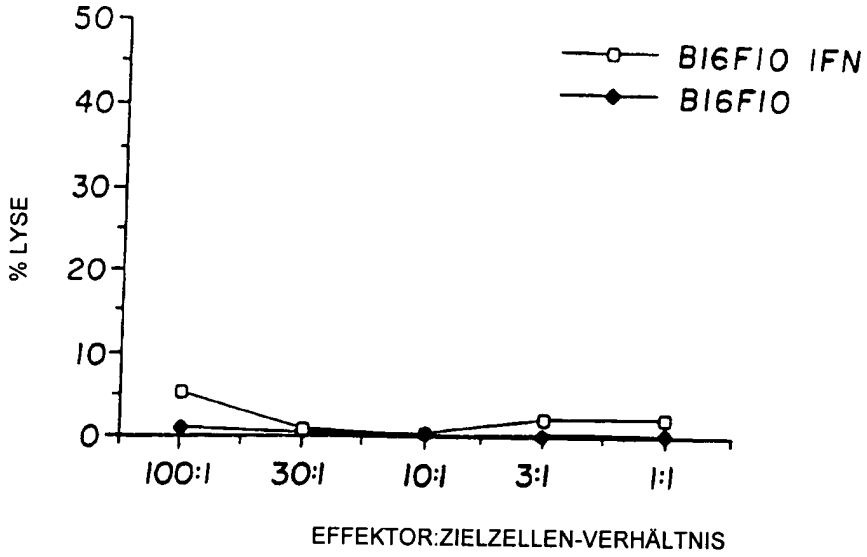

50
40
30
20
10
0
% LYSE
B16F10 IFN
B16F10
100:1
30:1
10:1
3:1
1:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 4A

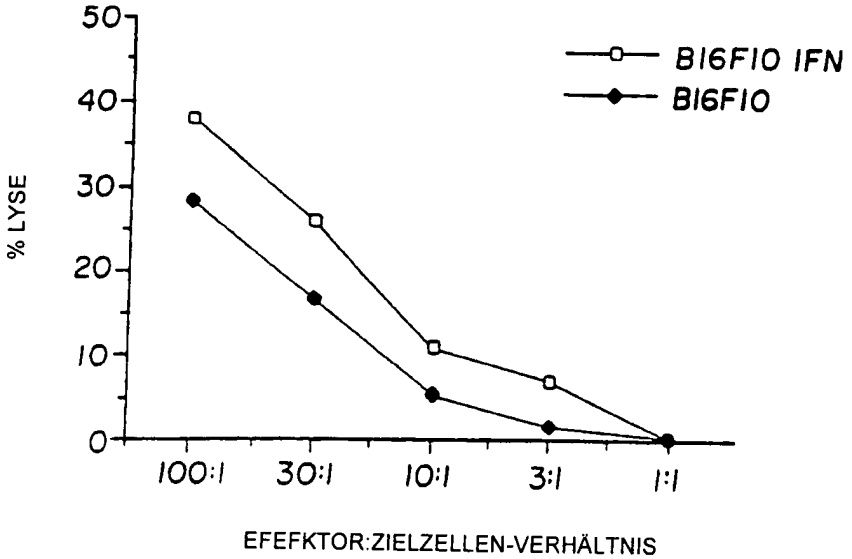

50
40
30
20
10
0
% LYSE
B16F10 IFN
B16F10
100:1
30:1
10:1
3:1
1:1
EFEFKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 4B

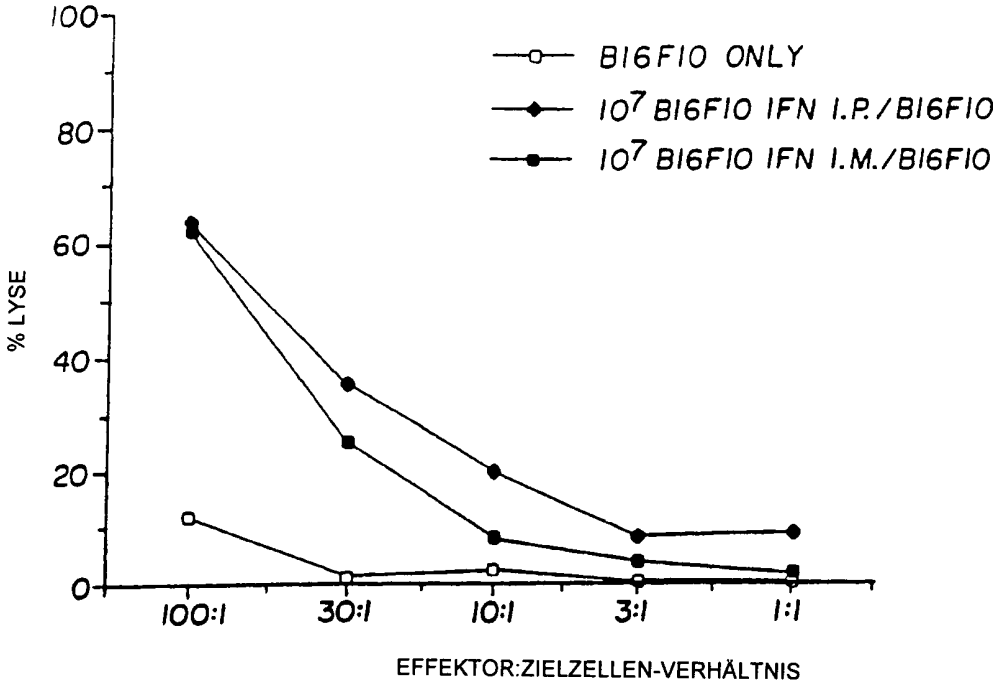

100
80
60
40
20
0
% LYSE
B16F10 ONLY
10^7 B16F10 IFN I.P./B16F10
10^7 B16F10 IFN I.M./B16F10
100:1
30:1
10:1
3:1
1:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 5

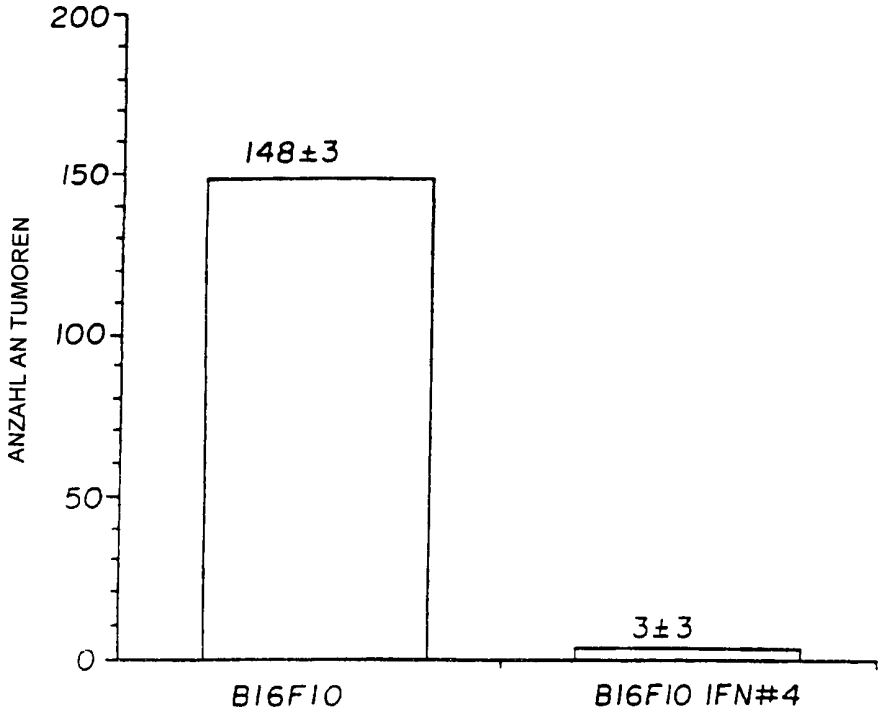

200
150
100
50
0
ANZAHL AN TUMOREN
148±3
3±3
B16F10
B16F10 IFN#4

FIG. 6

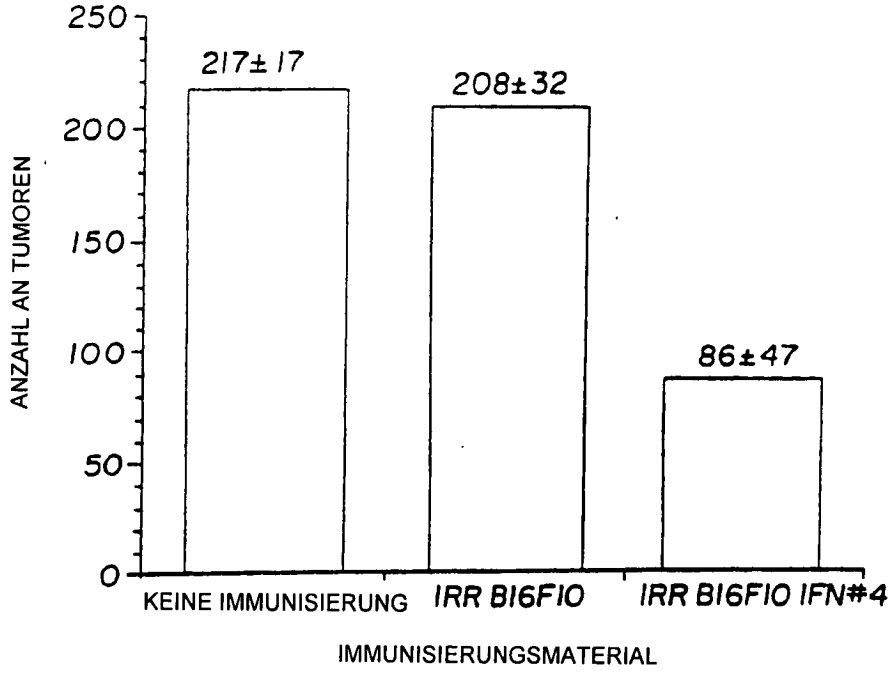

250
200
150
100
50
0
ANZAHL AN TUMOREN
217± 17
208±32
86±47
KEINE IMMUNISIERUNG
IRR B16F10
IRR B16F10 IFN#4
IMMUNISIERUNGSMATERIAL

FIG. 7

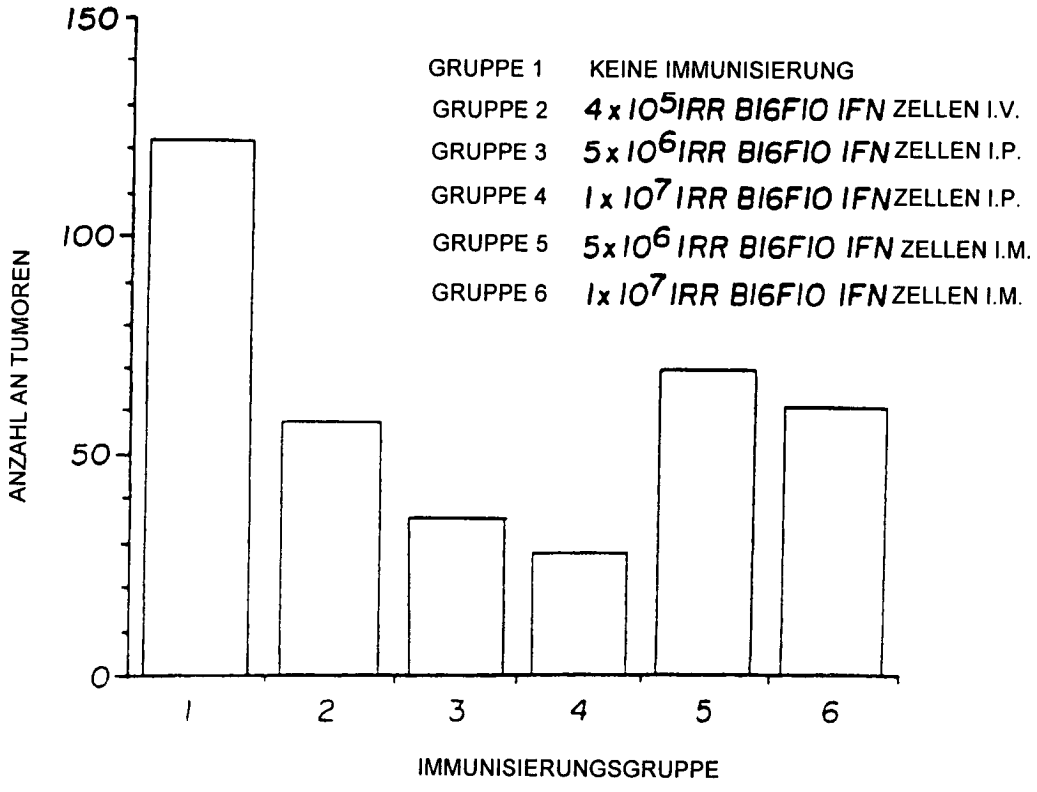

150
100
50
0
ANZAHL AN TUMOREN
GRUPPE 1 KEINE IMMUNISIERUNG
GRUPPE 2 4x10^5 IRR B16F10 IFN ZELLEN I.V.
GRUPPE 3 5x10^6 IRR B16F10 IFN ZELLEN I.P.
GRUPPE 4 1x10^7 IRR B16F10 IFN ZELLEN I.P.
GRUPPE 5 5x10^6 IRR B16F10 IFN ZELLEN I.M.
GRUPPE 6 1x10^7 IRR B16F10 IFN ZELLEN I.M.
1
2
3
4
5
6
IMMUNISIERUNGSGRUPPE

FIG. 8

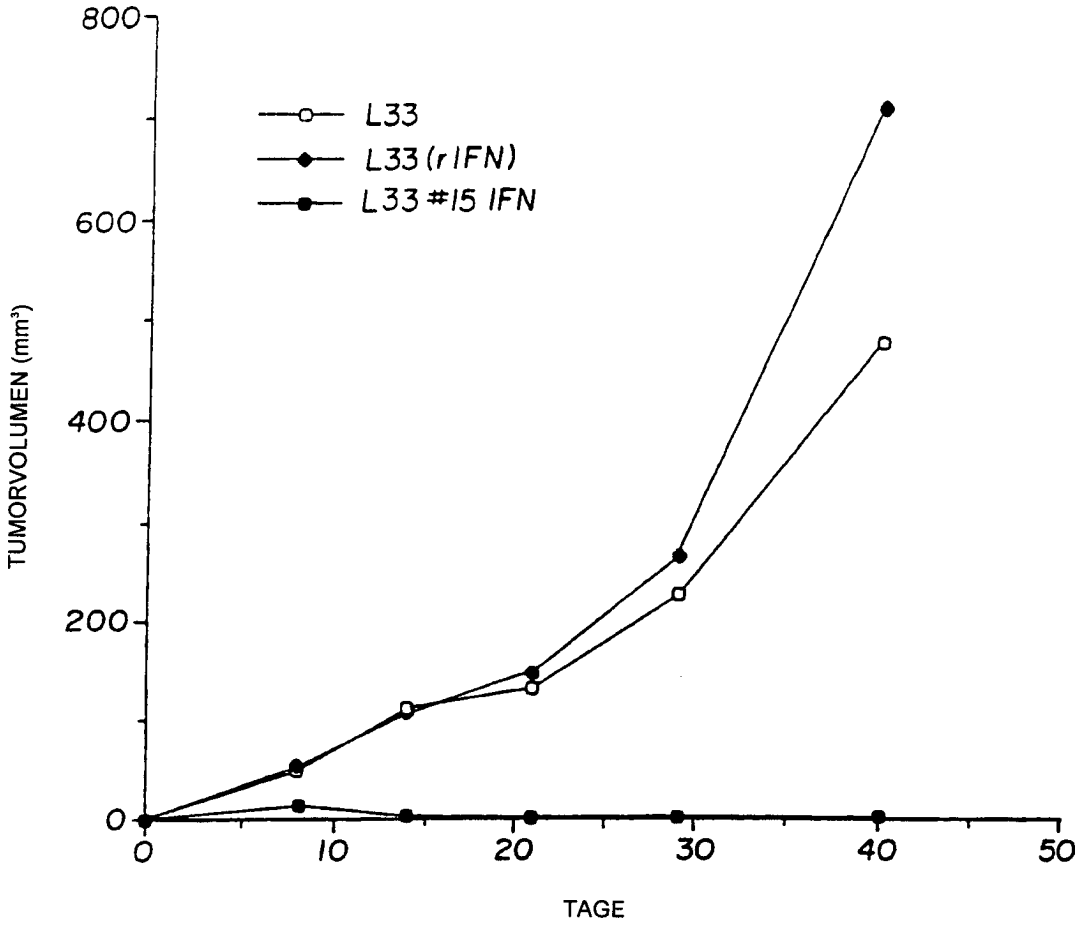

800
600
400
200
0
TUMORVOLUMEN (mm³)
L33
L33 (r IFN)
L33 #15 IFN
0
10
20
30
40
50
TAGE

FIG. 9

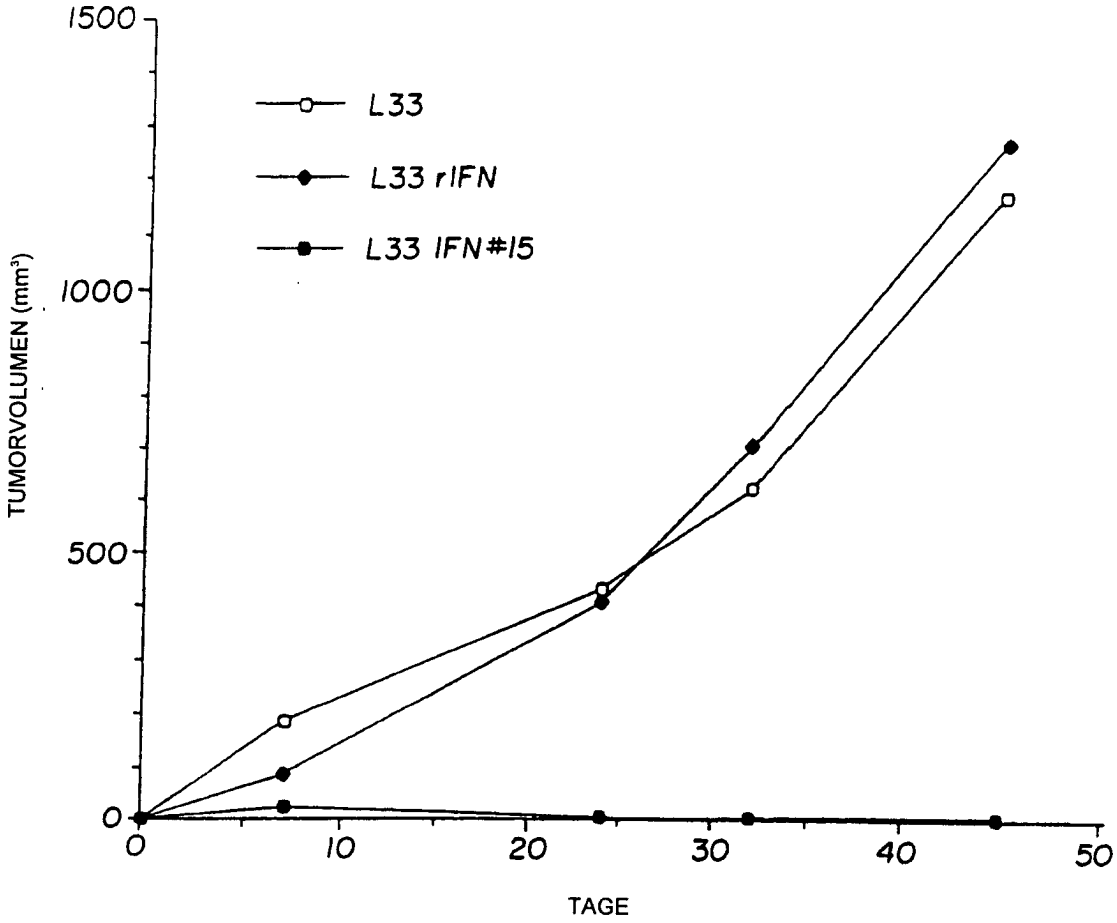

1500
1000
500
0
TUMORVOLUMEN (mm³)
L33
L33 rIFN
L33 IFN#15
0
10
20
30
40
50
TAGE

FIG. 10

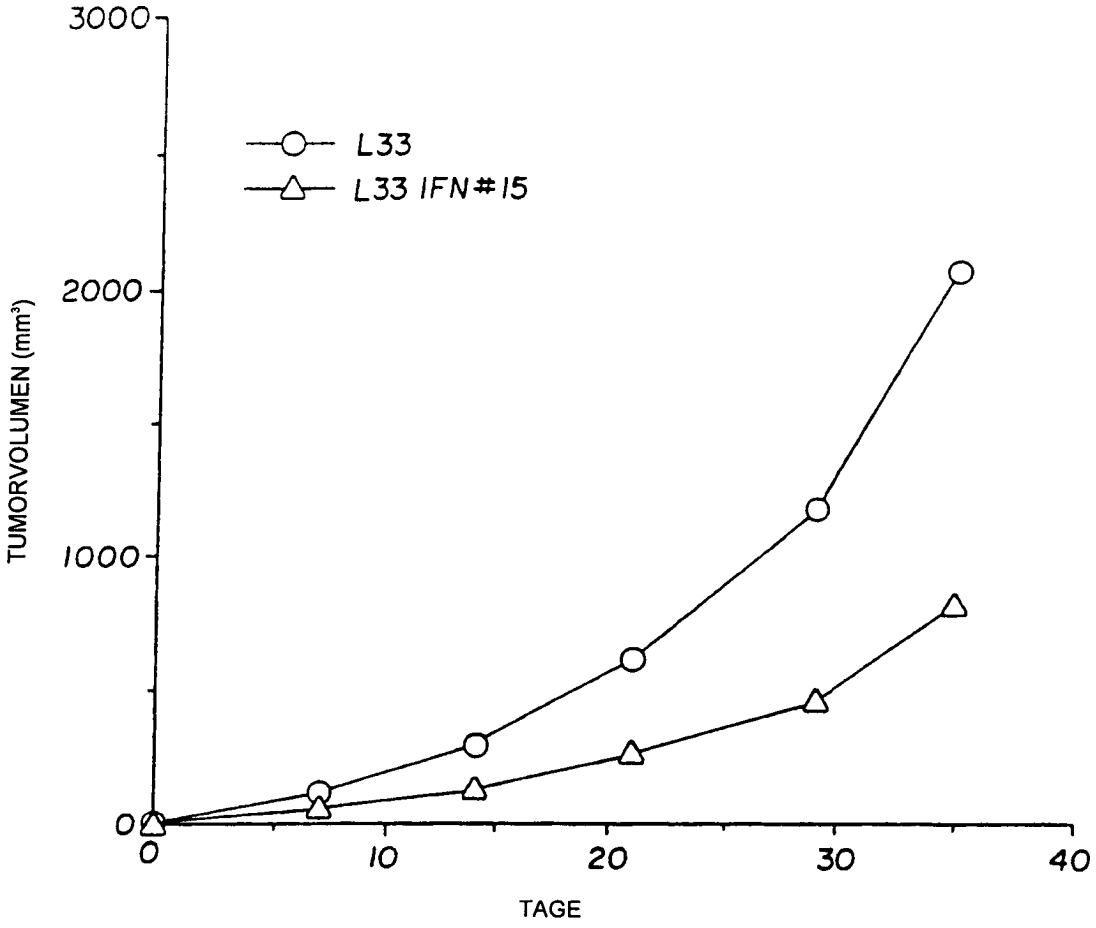

3000
2000
1000
0
TUMORVOLUMEN (mm³)
L33
L33 IFN#15
0
10
20
30
40
TAGE

FIG. 11

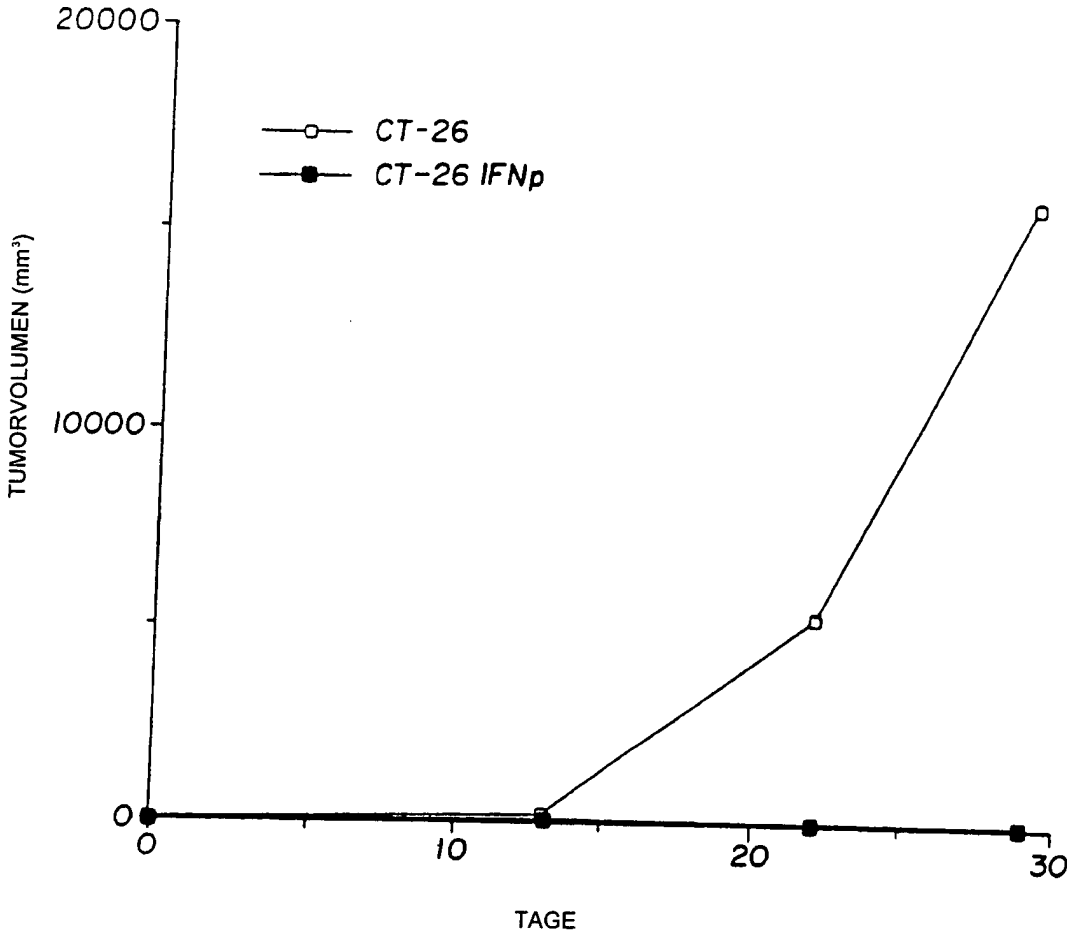


FIG. 12

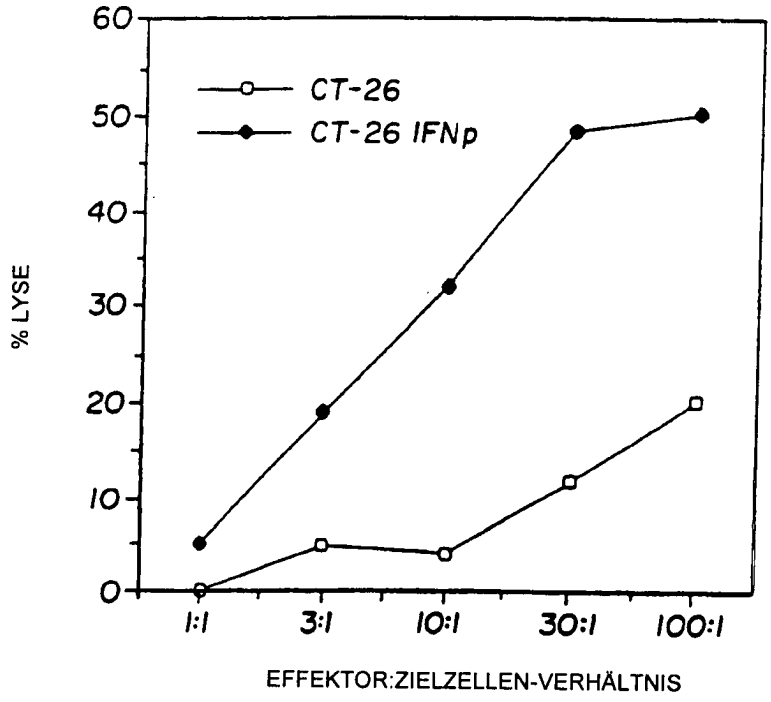

60
50
40
30
20
10
0
% LYSE
CT-26
CT-26 IFNp
1:1
3:1
10:1
30:1
100:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 13

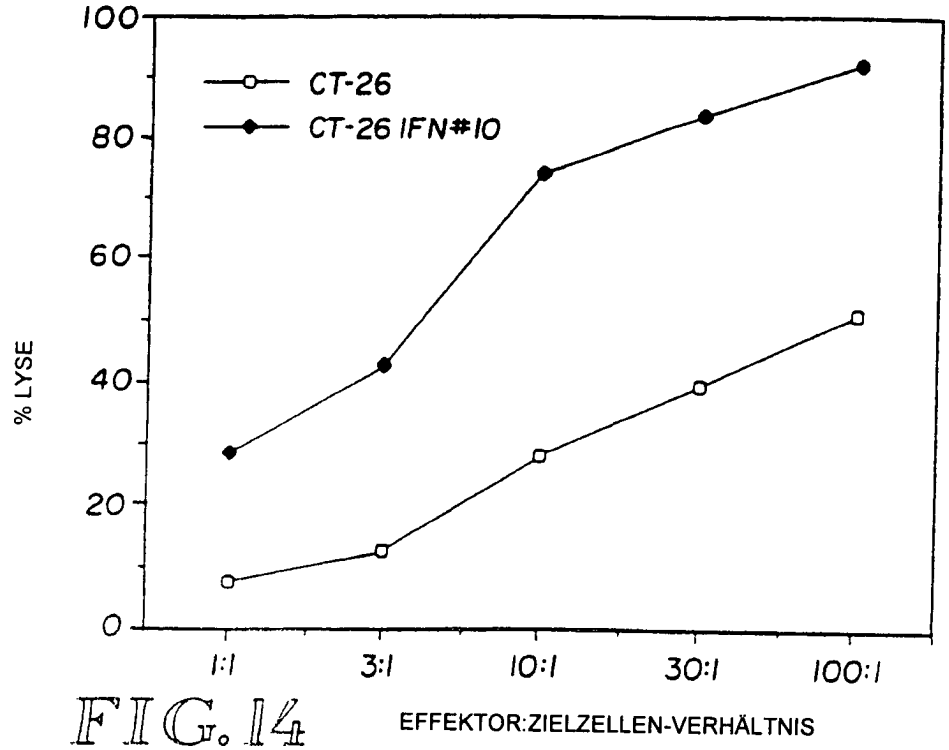

100
80
60
40
20
0
% LYSE
CT-26
CT-26 IFN#10
1:1
3:1
10:1
30:1
100:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 14

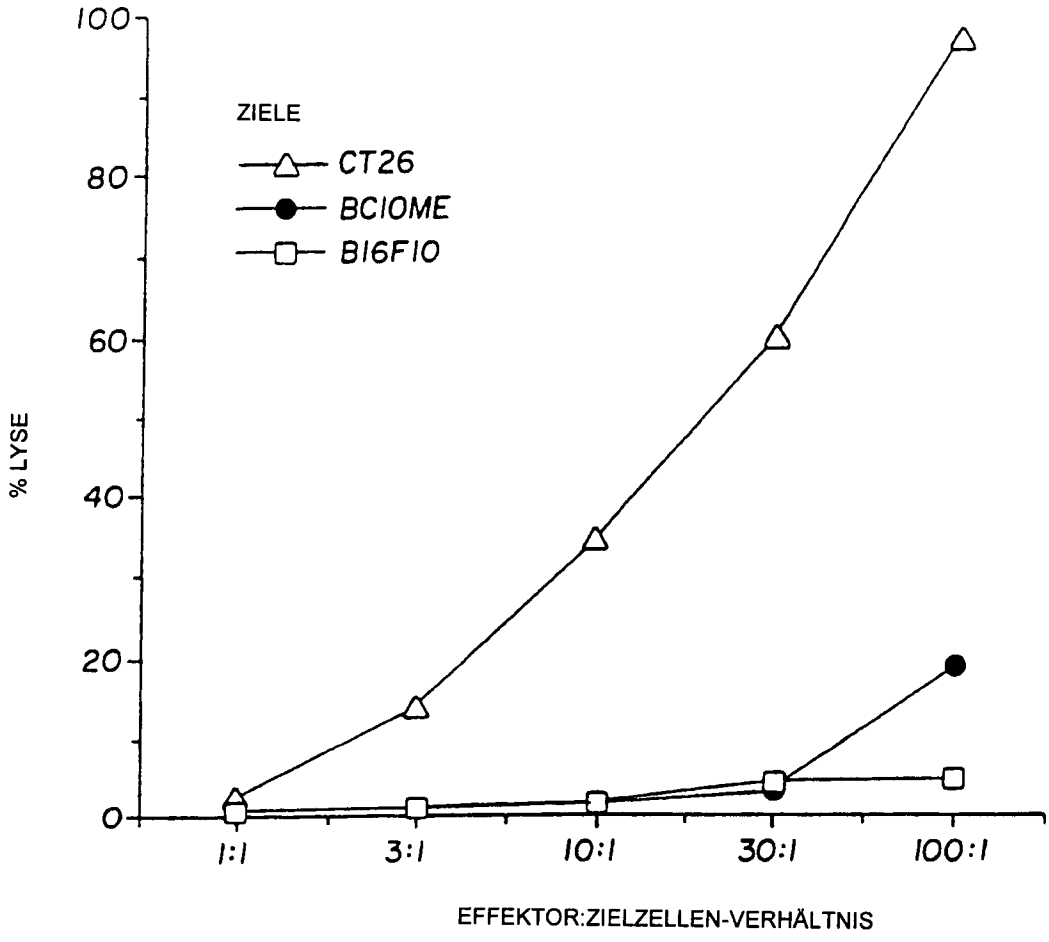

100
80
60
40
20
0
% LYSE
ZIELE
CT26
BC10ME
B16F10
1:1
3:1
10:1
30:1
100:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 15

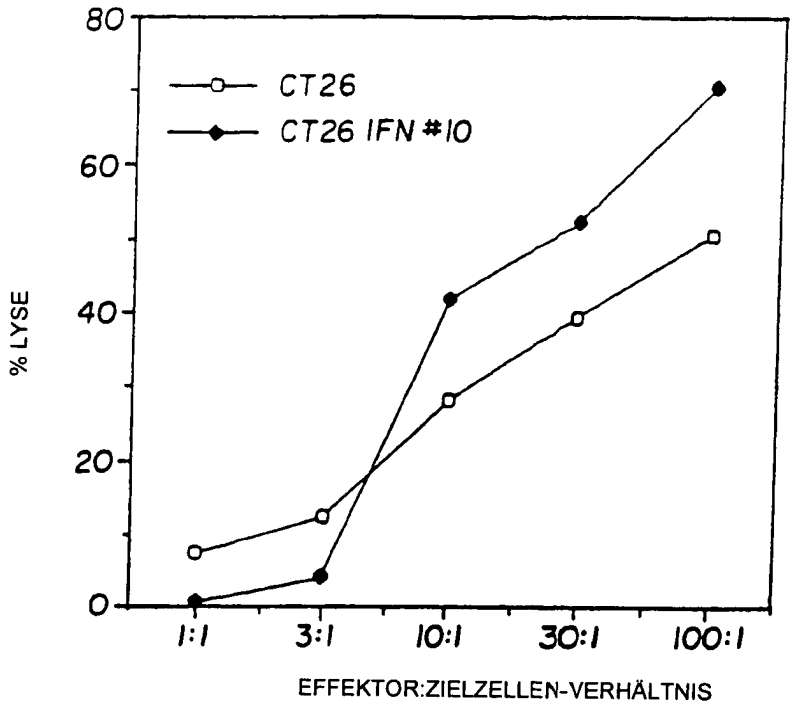

80
60
40
20
0
% LYSE
CT26
CT26 IFN #10
1:1
3:1
10:1
30:1
100:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 16

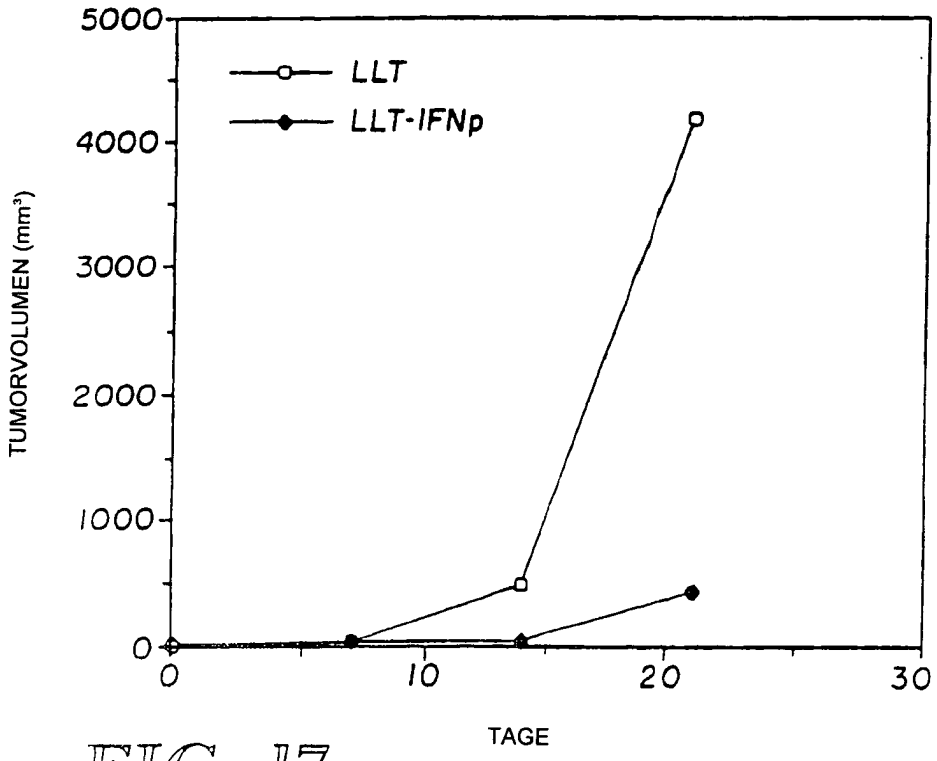

5000
4000
3000
2000
1000
0
TUMORVOLUMEN (mm³)
LLT
LLT-IFNp
0
10
20
30
TAGE

FIG. 17

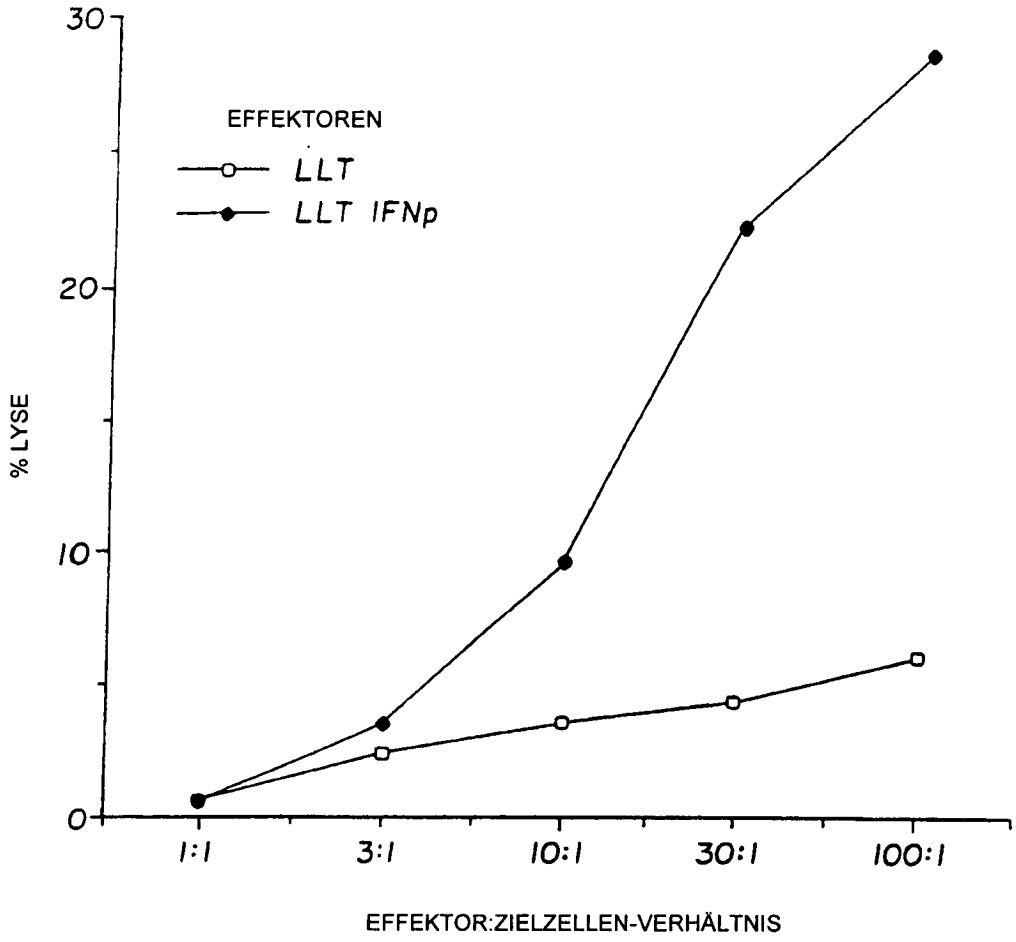

30
20
10
0
% LYSE
EFFEKTOREN
LLT
LLT IFNp
1:1
3:1
10:1
30:1
100:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 18

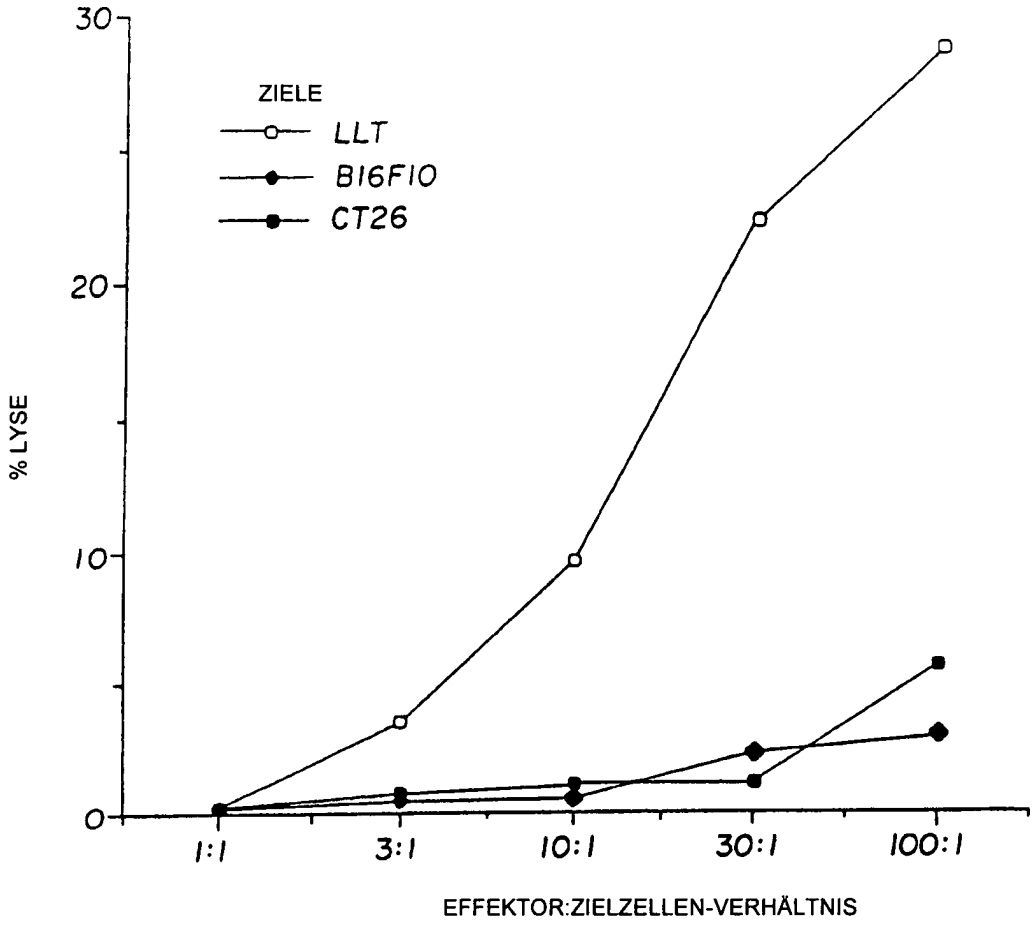

30
20
10
0
% LYSE
ZIELE
LLT
B16F10
CT26
1:1
3:1
10:1
30:1
100:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 19

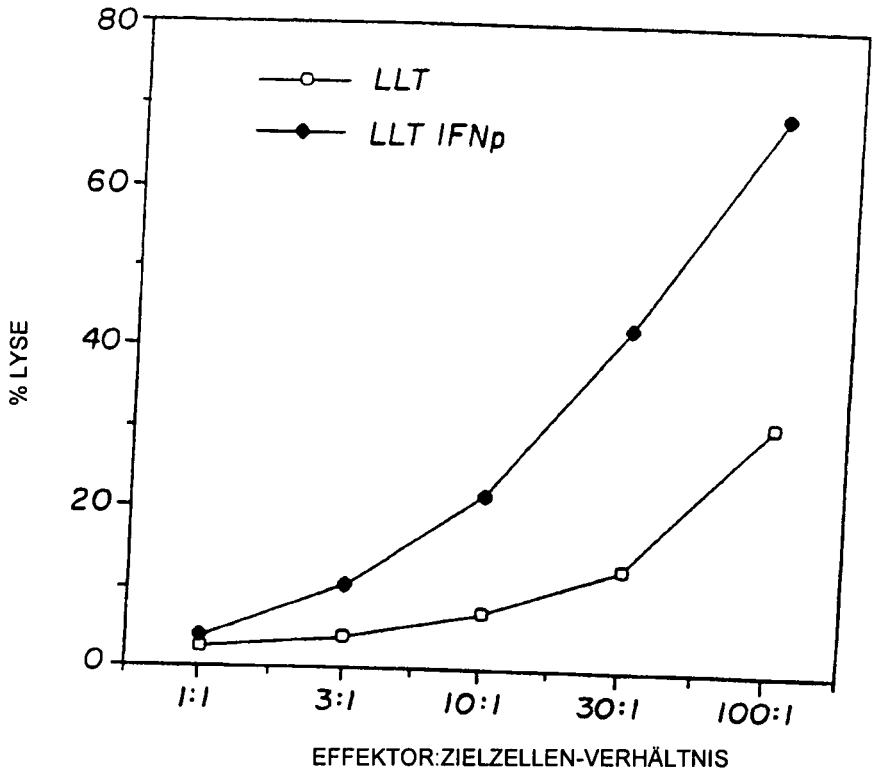

80
60
40
20
0
% LYSE
LLT
LLT IFNp
1:1
3:1
10:1
30:1
100:1
EFFEKTOR:ZIELZELLEN-VERHÄLTNIS

FIG. 20

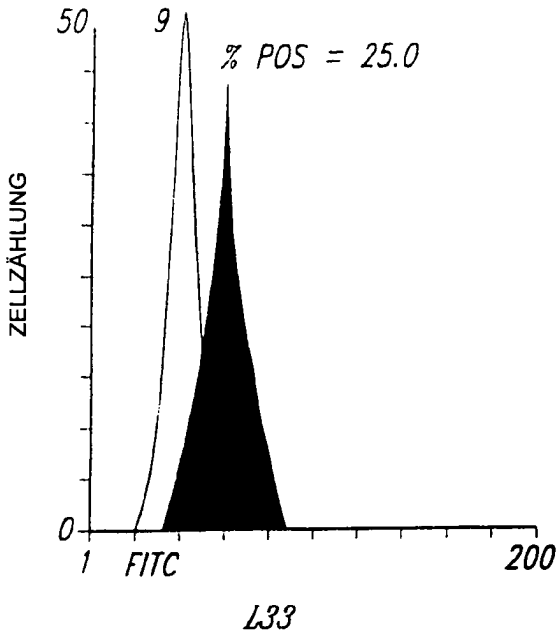


FIG. 21A

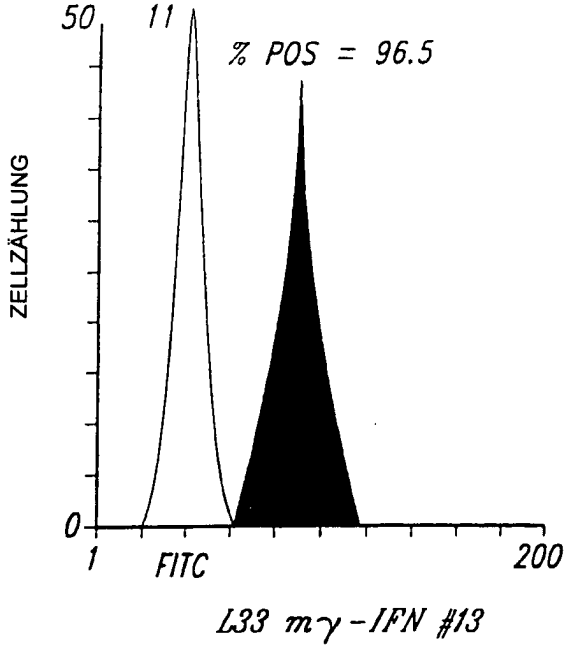


FIG. 21B

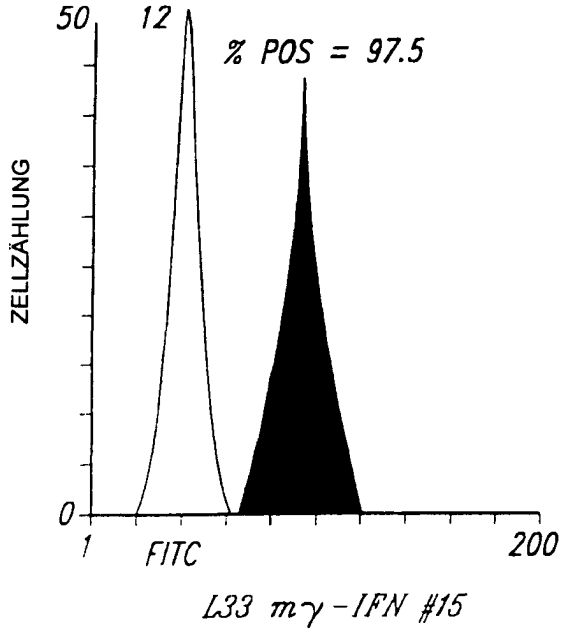


FIG. 21C

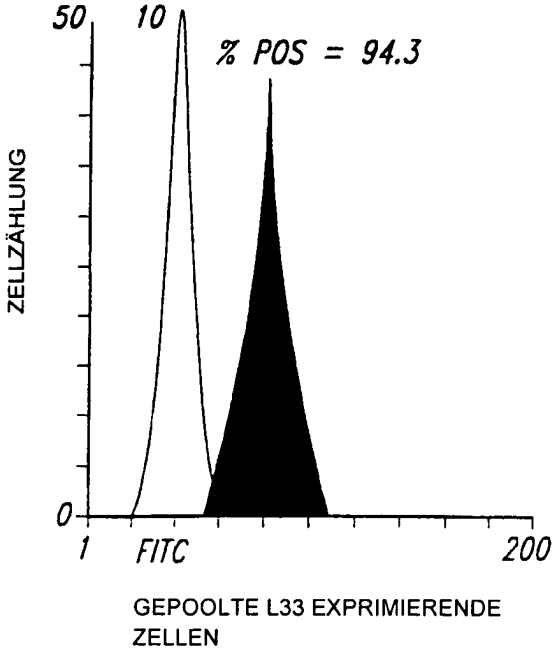


FIG. 21D

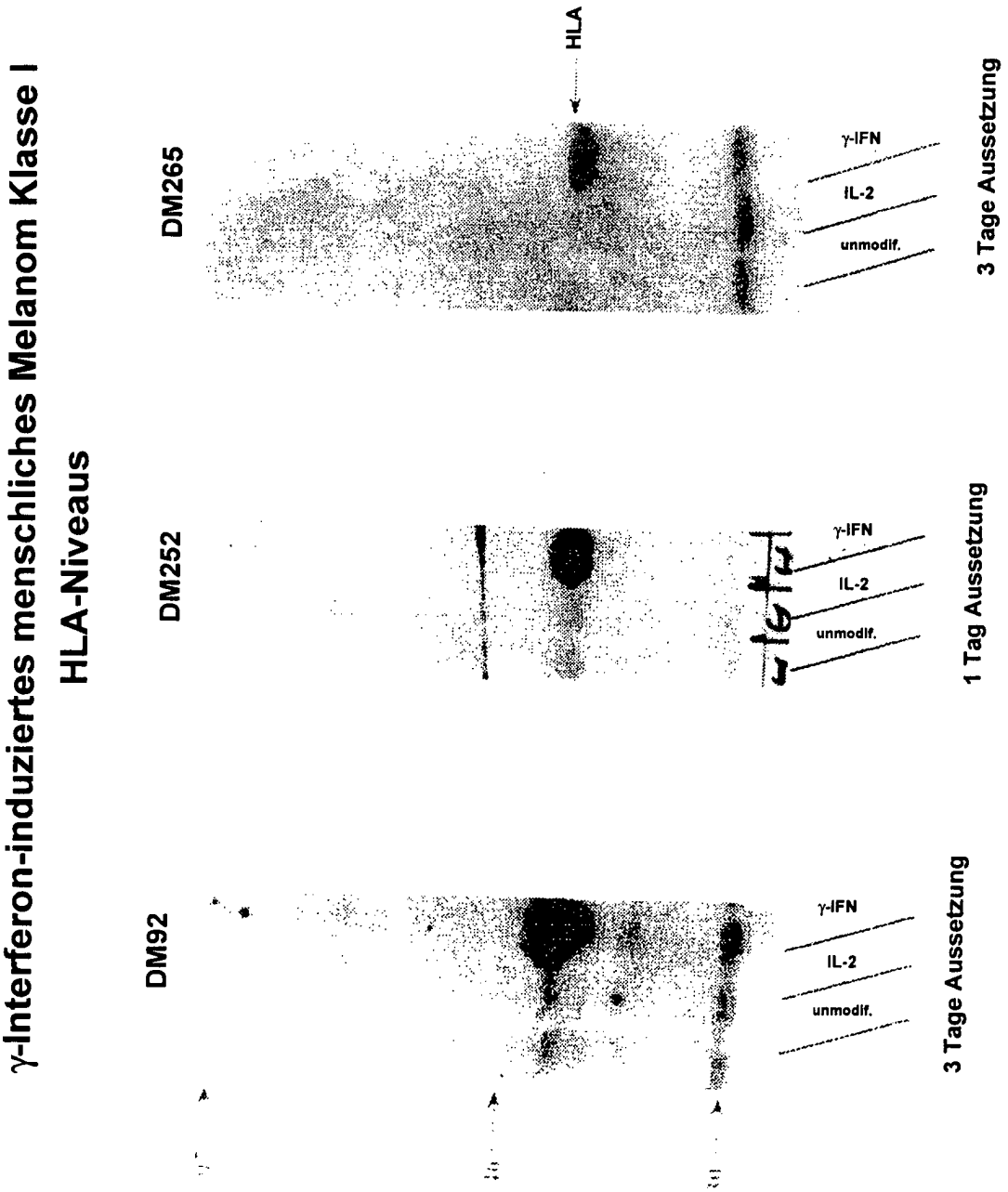

γ-Interferon-induziertes menschliches Melanom Klasse I HLA-Niveaus
DM265
HLA
γ-IFN
IL-2
unmodif.
3 Tage Aussetzung
DM252
γ-IFN
IL-2
unmodif.
1 Tag Aussetzung
DM92
γ-IFN
IL-2
unmodif.
3 Tage Aussetzung

FIG. 22

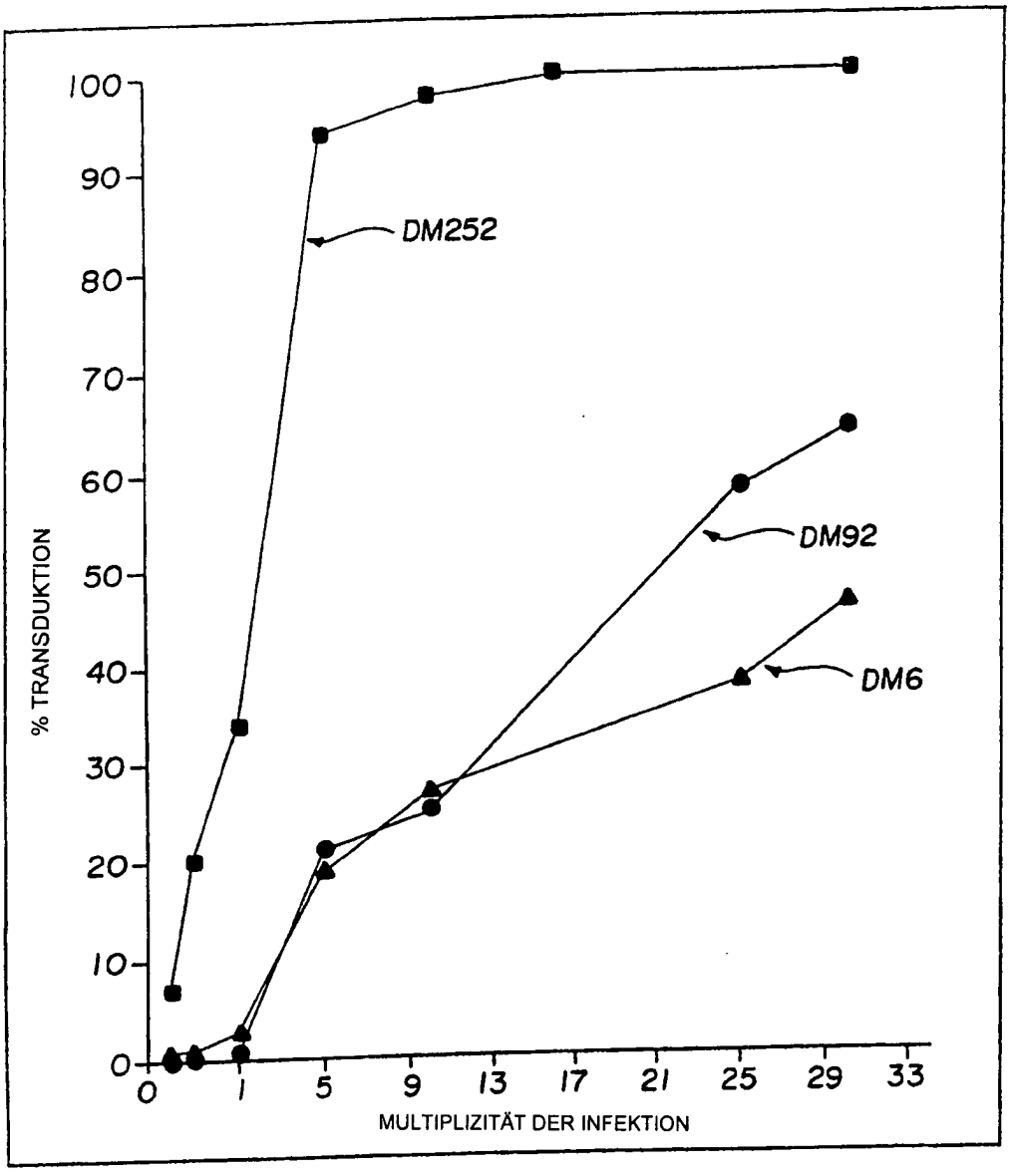
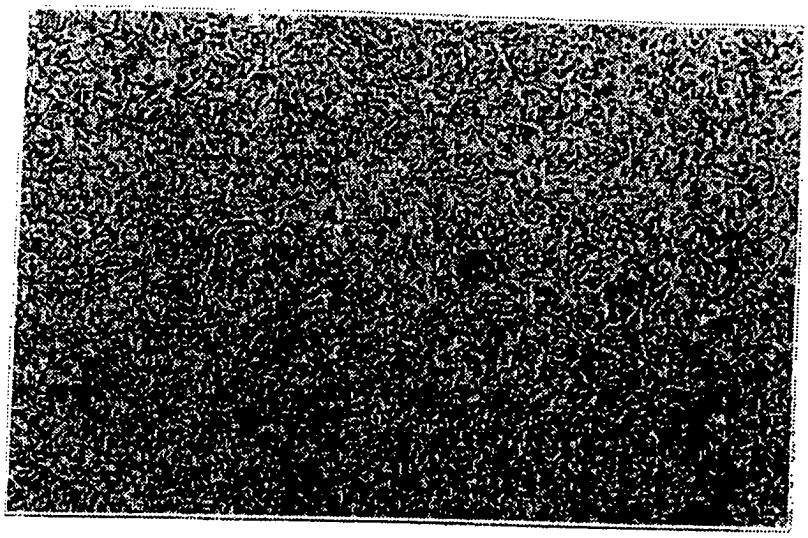

100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
% TRANSDUKTION
DM252
DM92
DM6
0
1
5
9
13
17
21
25
29
33
MULTIPLIZITÄT DER INFEKTION

FIG. 23

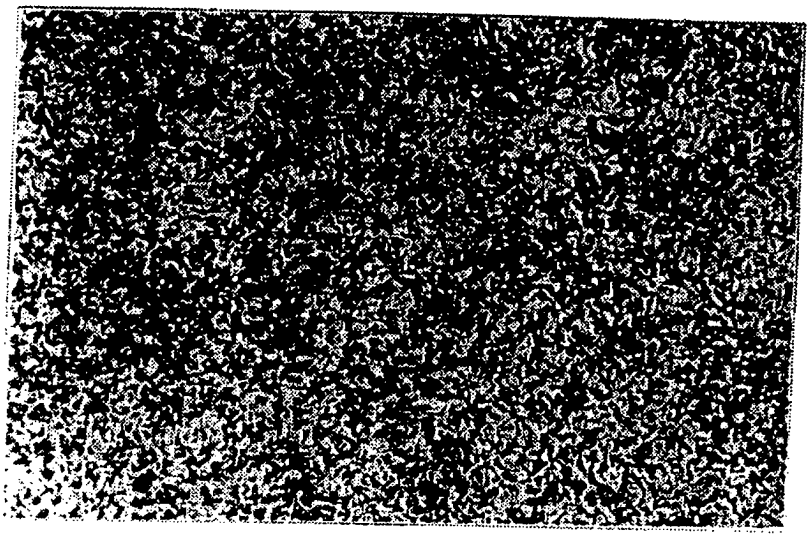
Multiplizität der Infektion von Melanomzellen mit konzentriertem, ungereinigtem Vektor

FIG. 24

Transduzierbarkeit von menschlichem Melanom - DM252



Nicht-transduziert



Transduziert mit MOI = 1

FIG. 25

Transduktion von menschlichem Melanom DM262
nach Beginn der Kultur

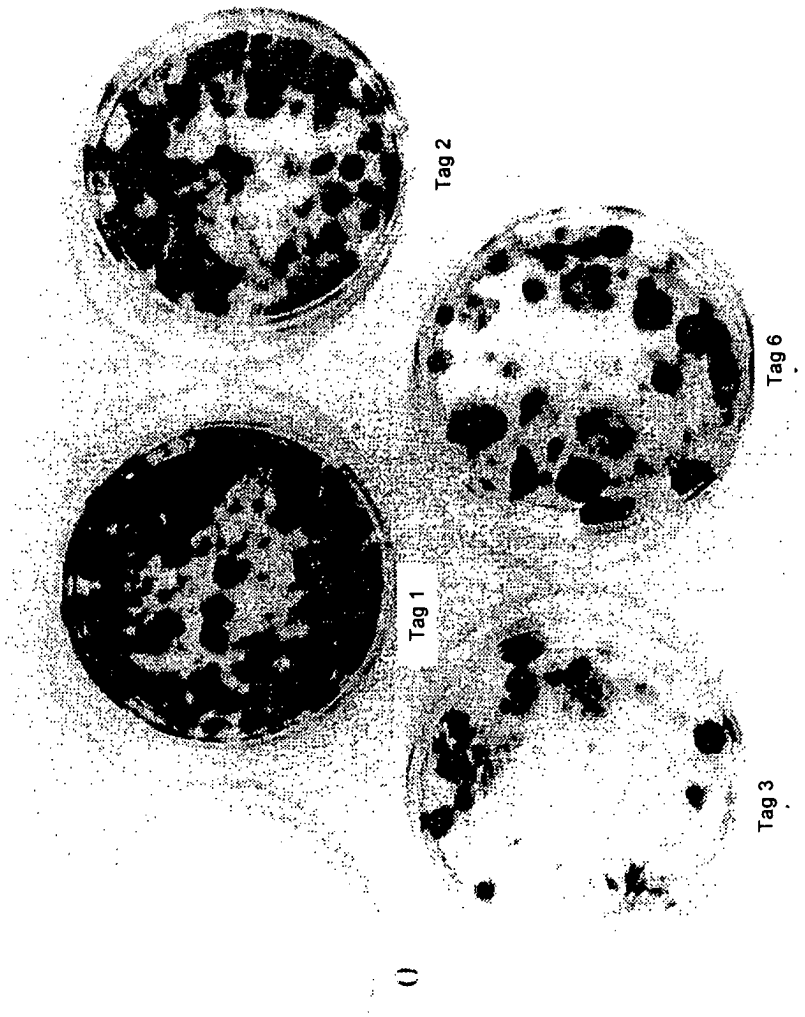


FIG. 26