



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 696 31 795 T2 2005.02.10

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 871 459 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 696 31 795.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US96/15406

(96) Europäisches Aktenzeichen: 96 933 140.4

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 97/12622

(86) PCT-Anmeldetag: 26.09.1996

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 10.04.1997

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 21.10.1998

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 03.03.2004

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 10.02.2005

(51) Int Cl.<sup>7</sup>: C12N 15/86

C12N 7/01, A61K 35/76, A61K 48/00

(30) Unionspriorität:

540259 06.10.1995 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(73) Patentinhaber:

The Salk Institute for Biological Studies, La Jolla,  
Calif., US

(72) Erfinder:

VERMA, Inder, Solana Beach, US; TRONO, Didier,  
San Diego, US; NALDINI, Luigi, Del Mar, US;  
GALLAY, Philippe, Solana Beach, US

(74) Vertreter:

Vossius & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: VEKTOR UND VERFAHREN ZUR EINBRINGUNG VON NUKLEINSÄURE IN SICH NICHT TEILENDE  
ZELLEN

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 eingelebt, 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****Gebiet der Erfindung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft im Allgemeinen das Gebiet viraler Vektoren und im Besonderen ein neues, rekombinantes Retrovirus, das für den Transfer und die Expression von Nucleinsäuresequenzen in sich nicht teilenden Zellen nützlich ist.

**Hintergrund der Erfindung**

**[0002]** Die Entwicklung von genetischen Vektoren hat das schnell wachsende Gebiet des somatischen Gentransfers angekündigt. Vektoren, die auf einfache Retroviren wie z.B. auf das Moloney-Leukämie-Virus (MLV) basieren, werden häufig ausgewählt, weil sie effizient in das Genom der Zielzelle integrieren. Man geht davon aus, dass die Integration eine Grundvoraussetzung für eine lang anhaltende Expression des transduzierten Gens ist. Die zur Zeit erhältlichen, retroviralen Vektoren können jedoch nur in Zellen integrieren, die sich aktiv teilen, welches ihre Verwendung für den In-vivo-Gentransfer deutlich limitiert. Sich nicht teilende Zellen sind der vorherrschende, langlebende Zelltyp im Körper und zählen zu den wünschenswertesten Zielen des Gentransfers, wobei Leberzellen, Muskelzellen und Gehirnzellen eingeschlossen sind. Sogar Protokolle, welche die Transduktion von hämatopoetischen Stammzellen anstreben, benötigen anspruchsvolle Ex-vivo-Verfahren, um die Zellteilung dieser Zellen vor der Infektion auszulösen.

**[0003]** In den frühen Schritten der Infektion bringen Retroviren ihren Nukleoproteinkern in das Zytoplasma der Zielzelle ein. Hier findet die reverse Transkription des viralen Genoms statt, während der Kern zu einem Prä-Integrationskomplex reift. Der Komplex muss den Nukleus erreichen, um die Integration der viralen DNA in die Chromosomen der Wirtszelle zu erzielen. Einfache Retroviren (Oncoretroviren) benötigen bei diesem Schritt die Auflösung der nukleären Membran in der mitotischen Prophase, sehr wahrscheinlich weil die umfangreiche Größe des Prä-Integrationskomplexes die passive Diffusion durch die nukleären Poren verhindert.

**[0004]** Während retrovirale Vektoren für viele Arten von In-vitro-Gentransferstudien nützlich sind, limitieren Probleme, die einen niedrigen Titer einschließen, ihre Verwendung für einige In-vitro- und für die meisten In-vivo-Studien. Ein weiteres Problem ist, dass man davon ausging, dass die Integration von retroviralen Vektoren in das Wirtsgenom auf Zellen beschränkt ist, die DNA-Replikation vollziehen. Daher ist die Zellteilung für die provirale Integration dieser Vektoren notwendig, obwohl retrovirale Vektoren bekannt sind, die eine breitgefächerte Klasse von Zelltypen infizieren können. Dies beschränkt effektiv die effiziente Verwendung von retroviralen Vektoren auf sich replizierende Zellen. Retroviren wurden daher nicht dazu verwendet, Gene in sich nicht teilende Zellen oder in postmitotische Zellen einzubringen.

**[0005]** Ein möglicher Weg, um dieses Hindernis zu umgehen, wurde durch neuere Studien der Pathogenese von lentiviralen Erkrankungen angedeutet. Lentiviren sind komplexe Retroviren, die zusätzlich zu den üblichen retroviralen Genen gag, pol und env andere Gene mit regulatorischen und strukturellen Funktionen enthalten. Die höhere Komplexität ermöglicht dem Virus seinen Lebenszyklus zu modulieren, wie z.B. im Verlauf einer latenten Infektion. Ein typisches Lentivirus ist das humane Immunschwäche-Virus (HIV), der Erreger von AIDS. HIV kann in vivo Makrophagen infizieren, die endgültig differenzierte Zellen sind, die sich selten teilen. In vitro kann HIV primäre Kulturen von Monozyten abgeleitete Makrophagen (MDM) infizieren sowie HeLa-Cd4 oder T-Lymphozyten, die durch die Behandlung mit Aphidicolin oder durch  $\gamma$ -Bestrahlung im Zellzyklus arretiert sind. Die Infektion dieser Zellen ist abhängig von der aktiven nukleären Aufnahme des HIV-Prä-Integrationskomplexes durch die nukleären Poren der Zielzellen. Dies erfolgt durch die Interaktion von multiplen, teilweise überreichlichen molekularen Bestimmungssequenzen im Komplex mit der nukleären Importmaschinerie der Zielzelle. Identifizierte Bestimmungssequenzen schließen ein funktionelles, nukleäres Lokalisationssignal (NLS) im gag-MA-Protein, das karyophile, Virion assoziierte Protein vpr und einen C-terminalen Phosphotyrosinrest in einer Untergruppe des gag-MA-Proteins ein.

**Zusammenfassung der Erfindung**

**[0006]** Die vorliegende Erfindung stellt ein rekombinantes Retrovirus bereit, das sich nicht teilende Wirtszellen infiziert und Nucleinsäuresequenzen transferiert, die anschließend in der Wirtszelle exprimiert werden können. Daher erfüllt die vorliegende Erfindung ein für lange Zeit bestehendes Bedürfnis nach einem Verfahren für das Einbringen von Nucleinsäuresequenzen in sich nicht teilende Zellen.

**[0007]** In einer ersten Ausführungsform stellt die Erfindung ein rekombinantes Retrovirus bereit, das eine sich

nicht teilende Zelle infizieren kann und das ein virales GAG, ein virales POL, ein virales ENV und eine heterologe Nucleinsäuresequenz umfasst, die funktionell mit einer regulatorischen Nucleinsäuresequenz verbunden ist, sowie in cis wirkende Nucleinsäuresequenzen, die erforderlich für die reverse Transkription und die Integration sind. Das rekombinante Retrovirus der Erfindung ist vorzugsweise ein Lentivirus.

**[0008]** In einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren der Herstellung eines rekombinanten Retrovirus zur Verfügung, das eine sich nicht teilende Zelle infizieren kann, welches das Transfizieren einer geeigneten Wirtszelle mit dem folgenden umfasst: einem Vektor, der eine Nucleinsäure zur Verfügung stellt, die ein virales gag und ein virales pol codiert, einem Vektor, der eine Nucleinsäure zur Verfügung stellt, die ein virales env codiert, einem Vektor, der eine Nucleinsäuresequenz zur Verfügung stellt, die ein Verpackungssignal codiert, das flankiert ist von in cis wirkenden Nucleinsäuresequenzen für die reverse Transkription und Integration, und die eine Klonierungsstelle für das Einbringen einer heterologen Nucleinsäuresequenz zur Verfügung stellt, die funktionell mit einer regulatorischen Nucleinsäuresequenz verbunden ist, und die Gewinnung des rekombinanten Virus.

**[0009]** In noch einer weiteren Ausführungsform stellt die Erfindung ein Verfahren zur Einbringung und Expression einer heterologen Nucleinsäuresequenz in einer sich nicht teilenden Zelle zur Verfügung, welches das Infizieren der sich nicht teilenden Zelle mit dem rekombinanten Virus der Erfindung und die Expression der heterologen Nucleinsäuresequenz in der sich nicht teilenden Zelle umfasst.

#### Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0010]** **Fig. 1** ist eine schematische Darstellung des Verfahrens zur Herstellung eines auf HIV basierenden, rekombinanten Retrovirus.

**[0011]** **Fig. 2** ist eine Tabelle des Titers von infektiösen Viruspartikeln, wobei ein VSV.G env. LacZ-Reporter-Gen und ein Verpackungskonstrukt verwendet wurden, die ein HIV (pCMVDR8) oder MLV gag/pol besitzen, vor und nach Konzentration (= „Ausbeute“).

**[0012]** **Fig. 3** ist eine Tabelle der Titer des rekombinanten Virus nach Ko-Transfektion von 293T-Zellen (eine Fibroblasten Verpackungszelllinie) mit auf HIV basierenden und auf MLV basierenden Verpackungskonstrukten.

**[0013]** **Fig. 4** ist ein Graph der Effizienz der Transduktion von HIV und MLV basierenden CMV- $\beta$ -Galaktosidase-Vektoren in wachsende HeLa-Zellen, in Zellen, die in der G1 / S-Interphase durch Aphidicolin arretiert wurden, und in Zellen, die in G2 durch Röntgenstrahlung arretiert wurden.

**[0014]** **Fig. 5** ist ein Graph der Effizienz der Transduktion von HIV und MLV CMV-Luciferase-Vektoren in Rat-ten-208F-Fibroblasten in G0 nach 4, 7, 11 und 15 Tagen.

**[0015]** **Fig. 6** ist ein Graph der Effizienz der Transduktion von HIV und MLV CMV-Luciferase-Vektoren in menschliche, primäre Makrophagen.

**[0016]** **Fig. 7** ist ein Graph des Überdauerns des HIV und MLV basierenden Vektors in Zellen, die für drei Wochen arretiert, mit dem Vektor beimpft und zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion zur Zellteilung angeregt wurden.

#### Beschreibung der bevorzugten Ausführungsformen

**[0017]** Die vorliegende Erfindung stellt ein rekombinantes Retrovirus zur Verfügung, das sich nicht teilende Zellen infizieren kann. Das Virus ist nützlich für den in vivo und den ex vivo Transfer und die Expression von Genen und Nucleinsäuresequenzen (z.B. in sich nicht teilende Zellen).

**[0018]** Retroviren sind RNA-Viren, wobei das virale Genom RNA ist. Wenn eine Wirtszelle mit einem Retrovirus infiziert ist, wird die genomische RNA in eine DNA-Zwischenform revers transkribiert, die sehr effizient in die chromosomalne DNA der infizierten Zellen integriert wird. Diese integrierte DNA-Zwischenform wird als Pro-virus bezeichnet. Die Transkription des Proviruses und der Aufbau zu einem infektiösen Virus geschieht in Anwesenheit eines geeigneten Helfervirus oder in einer Zelllinie, die geeignete Sequenzen enthält, welche die Einkapselung ohne die übereinstimmende Herstellung eines kontaminierenden Helfervirus ermöglicht. Wie nachfolgend beschrieben wird, ist ein Helfervirus für die Herstellung des rekombinanten Retrovirus der vorlie-

genden Erfindung nicht notwendig, weil die Sequenzen zur Einkapselung durch Ko-Transfektion mit geeigneten Vektoren zur Verfügung gestellt werden.

**[0019]** Das retrovirale Genom und die provirale DNA haben drei Gene: das gag, das pol und das env, die von zwei langen, terminalen Sequenzwiederholungen (long terminal repeats LTR) flankiert werden. Das gag-Gen codiert die internen Strukturproteine (Matrix, Capsid und Nucleocapsid); das pol-Gen codiert die RNA gerichtete DNA-Polymerase (Reverse Transkriptase) und das env-Gen codiert die viralen Glykoproteine der Hülle. Die 5'- und 3'-LTRs dienen dazu, die Transkription und die Polyadenylierung der Virion-RNAs zu fördern. Die LTR enthält alle anderen in cis wirkenden Sequenzen, die für die virale Replikation erforderlich sind. Lentiviren haben zusätzliche Gene, die vif, vpr, tat, rev, vpu, nef und vpx (in HIV-1, in HIV-2 und / oder in SIV) einschließen.

**[0020]** Angrenzend an den 5'-LTR liegen Sequenzen, die für die reverse Transkription des Genoms (die tRNA-Primer-Bindungsstelle) und für das effiziente Einkapseln der viralen RNA zu Partikeln (die Psi-Stelle) notwendig sind. Wenn die Sequenzen, die zur Einkapselung (oder zur Verpackung der retroviroalen RNA zu infektiösen Virionen) notwendig sind, im viralen Genom fehlen, dann ist das Ergebnis ein cis-Defekt, der die Einkapselung der genomischen RNA verhindert. Die resultierende Mutante kann jedoch noch die Synthese aller Virion-Proteine lenken.

**[0021]** In einer ersten Ausführungsform, stellt die Erfindung ein rekombinantes Retrovirus zur Verfügung, das eine sich nicht teilende Zelle infizieren kann. Das rekombinante Retrovirus umfasst ein virales GAG, ein virales POL, ein virales ENV, eine heterologe Nucleinsäuresequenz, die funktionell mit einer regulatorischen Nucleinsäuresequenz verbunden ist, und in cis wirkende Nucleinsäuresequenzen, die für die Verpackung, die reverse Transkription und die Integration erforderlich sind, wie vorstehend beschrieben wurde. Es sollte selbstverständlich sein, dass das rekombinante Retrovirus der Erfindung so wohl sich teilende Zellen als auch sich nicht teilende Zellen infizieren kann.

**[0022]** Das rekombinante Retrovirus der Erfindung ist daher in einer Weise genetisch modifiziert, dass einige der strukturellen, infektiösen Gene des nativen Virus entfernt und statt dessen durch eine Nucleinsäuresequenz ersetzt wurde, die in die sich nicht teilende Zielzelle eingebracht werden soll. Nach der Infektion einer Zelle durch das Virus injiziert das Virus seine Nucleinsäuren in die Zelle und das genetische Material des Retrovirus kann in das Genom der Wirtszelle integrieren. Das transferierte genetische Material des Retrovirus wird anschließend innerhalb der Wirtszelle transkribiert und in Proteine translatiert.

**[0023]** Die Erfindung stellt ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Retrovirus zur Verfügung, das eine sich nicht teilende Zelle infizieren kann, welches die Transfektion einer geeigneten Wirtszelle mit dem folgenden umfasst: einem Vektor, der eine Nucleinsäure zur Verfügung stellt, die ein virales gag und eine virales pol codiert; einem Vektor, der eine Nucleinsäure zur Verfügung stellt, die ein virales env codiert; einem Vektor, der eine Nucleinsäuresequenz zur Verfügung stellt, die ein Verpackungssignal codiert, das durch cis wirkende Nucleinsäuresequenzen für die reverse Transkription und die Integation flankiert wird, und der eine Klonierungsstelle zur Einbringung eines heterologen Gens zur Verfügung stellt, das funktionell mit einer regulatorischen Nucleinsäuresequenz verbunden ist, und die Gewinnung des rekombinanten Virus. Eine Darstellung der individuellen Vektoren, welche in dem Verfahren der Erfindung verwendet wurden, wird in **Fig. 1** gezeigt.

**[0024]** Das Verfahren der Erfindung schließt die Kombination eines Minimums von drei Vektoren ein, um ein rekombinantes Virion oder ein rekombinantes Retrovirus herzustellen. Ein erster Vektor stellt eine Nucleinsäure zur Verfügung, die ein virales gag und ein virales pol codiert. (Siehe die Darstellung des Verpackungskontaktes, **Fig. 1**). Diese Sequenzen codieren ein gruppenspezifisches Antigen und eine gruppenspezifische Reverse Transkriptase (sowie Integrase und Protease-Enzyme, die zur Reifung und zur reversen Transkription notwendig sind), wie vorstehend beschrieben wurde. Besonders bevorzugt wird das virale gag und pol, von einem Lentivirus abgeleitet, und am meisten bevorzugt von HIV.

**[0025]** Ein zweiter Vektor stellt eine Nucleinsäure zur Verfügung, die eine virale Hülle (env) codiert. Das env-Gen kann von jedem beliebigen Virus abgeleitet sein, Retroviren eingeschlossen. Das env kann ein amphotropes Hüllprotein sein, das die Transduktion von menschlichen Zellen oder Zellen anderer Arten erlaubt, oder es kann ein ecotropes Hüllprotein sein, das nur Mäuse- und Rattenzellen transduzieren kann. Des weiteren kann es wünschenswert sein, das rekombinante Virus durch die Verbindung des Hüllproteins mit einem Antikörper oder einem speziellen Liganden zur Markierung eines Rezeptors eines bestimmten Zelltyps zu markieren. Durch die Insertion einer Sequenz von Interesse (welche die regulatorische Region einschließt) in einem viralen Vektor zum Beispiel zusammen mit einem Gen, das den Liganden für den Rezeptor auf einer spe-

zifischen Zielzelle codiert, wird der Vektor zielspezifisch. Retrovirale Vektoren können durch Insertion von zum Beispiel eines Glykolipids oder eines Proteins zielspezifisch hergestellt werden. Die Zielausrichtung wird häufig durch Verwendung eines Antikörpers erreicht, um den retroviroalen Vektor zielspezifisch zu machen. Dem Fachmann sind spezifische Verfahren bekannt, um das Einbringen eines retroviroalen Vektors in ein spezifisches Ziel zu erreichen, oder er kann dies einfach und ohne übermäßiges Experimentieren ermitteln.

**[0026]** Beispiele von retroviral abgeleiteten env-Genen schließen folgende Gene ein, sind aber nicht auf diese begrenzt: das Moloney murine Leukämie Virus (MoMuLV), das Harvey murine Sarkoma Virus (HaMuSV), das murine Mammary Tumor Virus (MuMTV), das Gibbon Ape Leukämie Virus (GaLV), das humane Immunschwäche-Virus (HN) und Rous Sarkoma Virus (RSV). Andere env-Gene wie z.B. das vesikuläre Stomatitis-Virus (VSV) (Protein G) können ebenfalls verwendet werden.

**[0027]** Der Vektor, der die virale env-Nucleinsäuresequenz zur Verfügung stellt, ist funktionell mit einer regulatorischen Sequenz assoziiert, z.B. einem Promoter oder einem Verstärker (Enhancer). (Siehe das pseudotypisierende ENV-Plasmid, **Fig. 1**). Vorzugsweise ist die regulatorische Sequenz ein viraler Promoter. Die regulatorische Sequenz kann jeder eukaryotischer Promoter oder Verstärker (Enhancer) sein, eingeschlossen zum Beispiel das Promoter-Verstärker (Enhancer)-Element des Moloney murines Leukämie Virus, der menschliche Cytomegalovirus-Verstärker (Enhancer) (wie in dem erläuternden Beispiel verwendet) oder der Vaccinia-P7,5-Promoter. In einigen Fällen, wie z.B. beim Promoter-Verstärker (Enhancer)-Element des Moloney murinen Leukämie Virus, sind diese Promoter-Verstärker (Enhancer)-Elemente innerhalb der LTR-Sequenzen lokalisiert oder sie grenzen daran an.

**[0028]** Ein dritter Vektor stellt die in cis wirkenden, viralen Sequenzen zur Verfügung, die für den viralen Lebenszyklus notwendig sind. Solche Sequenzen schließen die  $\psi$ -Verpackungssequenz, die Signale für die reverse Transkription, Integrationssignale, den viralen Promoter, den Verstärker (Enhancer) und die Polyadenylierungssequenzen ein. Der dritte Vektor enthält ebenfalls eine Klonierungsstelle für eine heterologe Nucleinsäuresequenz, die in eine sich nicht teilende Zelle transferiert werden soll. Eine schematische Darstellung eines geeigneten Vektors ist in **Fig. 1** gezeigt.

**[0029]** Da rekombinante Retroviren, die durch Standardverfahren des Fachgebiets hergestellt werden, fehlerhaft sind, benötigen sie Hilfe, um infektiöse Vektorpartikel herzustellen. Typischerweise wird diese Hilfe zum Beispiel durch die Verwendung einer Helfer-Zelllinie zur Verfügung gestellt, welche die fehlenden viralen Funktionen zur Verfügung stellt. Diesen Plasmiden fehlt eine Nukleotidsequenz, die dem Verpackungsmechanismus erlaubt, ein RNA-Transkript für die Verkapselung zu erkennen. Helfer-Zelllinien, die Deletionen des Verpackungssignals haben, schließen zum Beispiel  $\psi$ 2, PA317 und PA12 ein, sind aber nicht auf diese beschränkt. Geeignete Zelllinien stellen leere Virione her, da kein Genom verpackt wird. Wenn ein retroviroaler Vektor in solche Zellen eingebracht wird, in denen das Verpackungssignal intakt ist, aber die strukturellen Gene durch andere Gene von Interesse ausgetauscht sind, kann der Vektor verpackt und ein Vektor-Virion hergestellt werden.

**[0030]** Das Verfahren zur Herstellung des rekombinanten Retrovirus der Erfindung unterscheidet sich von dem vorstehend beschriebenen Standardverfahren mittels Helfer-Virus / Verpackungszelllinie. Die drei oder mehr individuellen Vektoren, die verwendet werden, um die Ko-Transfektion einer geeigneten Verpackungszelllinie durchzuführen, enthalten kollektiv alle benötigten Gene zur Herstellung eines rekombinanten Virus für die Infektion und den Transfer von Nucleinsäuren in eine sich nicht teilende Zelle. Daher ist ein Helfervirus nicht erforderlich.

**[0031]** Die heterologe Nucleinsäuresequenz ist funktionell mit einer regulatorischen Nucleinsäuresequenz verbunden. Der Ausdruck „heterologe“ Nucleinsäuresequenz, wie er hierin verwendet wird, bezeichnet eine Sequenz, die von einer fremden Art abgeleitet ist, oder, falls sie von der gleichen Art abstammt, deren ursprüngliche Form deutlich modifiziert wurde. Alternativ ist eine unveränderte Nucleinsäuresequenz, die normalerweise nicht in einer Zelle exprimiert wird, eine heterologe Nucleinsäuresequenz. Der Ausdruck „funktionell verbunden“ bezeichnet eine funktionelle Verbindung zwischen der regulatorischen Sequenz und der heterologen Nucleinsäuresequenz. Vorzugsweise ist die heterologe Sequenz mit einem Promoter verbunden, woraus ein chimäres Gen resultiert. Die heterologe Nucleinsäuresequenz ist vorzugsweise entweder unter der Kontrolle von viralen LTR-Promoter-Verstärker (Enhancer)-Signalen oder eines internen Promoters und die zurückbehaltenen Signale innerhalb der retroviroalen LTR können noch eine effiziente Integration des Vektors in das Wirtszellgenom vermitteln.

**[0032]** Die Promoter-Sequenz kann homolog oder heterolog zu der gewünschten Gensequenz sein. Ein brei-

tes Spektrum von Promotoren kann verwendet werden, einschließlich viraler oder Säugetier-Promotoren. Zell- oder gewebespezifische Promotoren können verwendet werden, um die Expression der Gensequenzen in spezifischen Zellpopulationen zu erzielen. Geeignete Säugetier- oder Virus-Promotoren für die vorliegende Erfindung sind im Fachgebiet erhältlich.

**[0033]** Vorzugsweise enthält während des Klonierungsstadiums das Nucleinsäurekonstrukt, welches als Transfer-Vektor bezeichnet wird, der das Verpackungssignal und die heterologe Klonierungsstelle besitzt, auch ein detektierbares Markergen. Markergene werden verwendet, um das Vorhandensein des Vektors zu untersuchen und somit die Infektion und Integration zu bestätigen. Das Vorhandensein dieses Markergens stellt sicher, dass nur solche Wirtszellen wachsen, welche die Insertion exprimieren. Typische Selektionsgene codieren Proteine, die eine Resistenz gegen Antibiotika und gegen andere toxische Substanzen wie z.B. Histidinol, Puromycin, Hygromycin, Neomycin, Methotrexat, etc. vermitteln. Die erläuternden Beispiele hierin verwenden den  $\beta$ -Galaktosidase (LacZ) oder einen Luciferase-Reporter oder Markersystem.

**[0034]** Das rekombinante Virus der Erfindung kann eine Nucleinsäuresequenz in eine sich nicht teilende Zelle transferieren. Der Ausdruck Nucleinsäuresequenz bezeichnet jedes Nucleinsäuremolekül, vorzugsweise DNA. Das Nucleinsäuremolekül kann von einer Vielzahl von Quellen abgeleitet sein, einschließlich DNA, cDNA, synthetische DNA, RNA oder Kombinationen davon. Solche Nucleinsäuresequenzen können genomische DNA umfassen, die natürlich vorkommende Introns einschließen oder nicht einschließen. Des Weiteren kann eine solche genomische DNA in Assoziation mit Promoterregionen, Introns oder Poly A-Sequenzen erhalten werden. Genomische DNA kann von geeigneten Zellen extrahiert und gereinigt werden durch Verfahren, die auf dem Fachgebiet gut bekannt sind. In einer anderen Ausführungsform kann Messenger-RNA (mRNA) von Zellen isoliert und dazu verwendet werden, um cDNA durch reverse Transkription oder durch andere Mittel herzustellen.

**[0035]** Der Ausdruck einer „sich nicht teilenden“ Zellen bezeichnet eine Zelle, die keine Mitose durchläuft. Sich nicht teilende Zellen können an jedem Punkt des Zellzyklus gehemmt sein (z.B. G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/S<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>/M), so lange sich die Zelle nicht aktiv teilt. Für die Ex-vivo-Infektion kann eine sich teilende Zelle durch ein Standardverfahren behandelt werden, die vom Fachmann verwendet wird, um die Zellteilung zu hemmen, einschließlich Bestrahlung, Behandlung mit Aphidicolin, Serum-Entzug und Kontaktinhibition. Es sollte jedoch selbstverständlich sein, dass eine Ex-vivo-Infektion häufig durchgeführt wird, ohne dass die Zellen gehemmt werden, da viele Zellen bereits arretiert sind (z.B. Stammzellen). Der rekombinante, retrovirale Vektor der Erfindung kann jede sich nicht teilende Zelle infizieren unabhängig vom Mechanismus, der verwendet wurde, um die Zellteilung zu hemmen, oder vom Punkt des Zellzyklus, an dem die Zelle gehemmt ist. Beispiele von bereits existierenden, sich nicht teilenden Zellen im Körper schließen neuronale Zellen, Muskel-, Leber-, Haut-, Lungen- und Knochenmarkszellen und deren Derivate ein.

**[0036]** Vorzugsweise ist das rekombinante Retrovirus, das durch das Verfahren der Erfindung hergestellt wird, von einem Lentivirus abgeleitet und noch stärker bevorzugt wird ein rekombinantes Lentivirus, das ein Derivat des humanen Immunschwäche-Virus (HIV) ist. Typischerweise, wenn das Retrovirus HIV ist, wird das env aus Gründen der öffentlichen Politik von einem anderen Virus als HIV abgeleitet sein.

**[0037]** Das Verfahren der Erfindung stellt wenigstens drei Vektoren zur Verfügung, die alle der Funktionen zur Verfügung stellen, die, wie vorstehend diskutiert wurde, für die Verpackung des rekombinanten Virions benötigt werden. Das Verfahren stellt auch die Möglichkeit zur Transfektion von Vektoren dar, welche virale Gene wie z.B. vpr, vif, nef, vpx, tat, rev und vpu einschließen. Einige oder alle diese Gene können zum Beispiel auf dem Verpackungskonstrukt-Vektor oder sie können in einer anderen Ausführungsform auf den individuellen Vektoren liegen. Es gibt keine Begrenzung der Anzahl der verwendeten Vektoren, so lange sie in die Verpackungszelllinie ko-transfiziert werden, um einen einzelnen, rekombinanten Retrovirus herzustellen. Zum Beispiel könnte man die env-Nucleinsäuresequenz auf das gleiche Konstrukt wie das gag und das pol legen.

**[0038]** Die Vektoren werden mittels Transfektion oder Infektion in die Verpackungszelllinie eingebracht. Die Verpackungszelllinie stellt die viralen Partikel her, die das Genom des Vektors enthalten. Verfahren zur Transfektion oder Infektion sind dem Fachmann gut bekannt. Nach der Ko-Transfektion der Verpackungszelllinie mit mindestens drei Vektoren wird das rekombinante Virus aus dem Kulturmedium gewonnen und der Titer wird durch Standardverfahren ermittelt, die vom Fachmann verwendet werden.

**[0039]** In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung ein rekombinantes Retrovirus zur Verfügung, das durch das Verfahren der Erfindung, wie vorstehend beschrieben wurde, hergestellt wurde.

**[0040]** Die Erfindung stellt außerdem ein rekombinantes Retrovirus zur Verfügung, das eine sich nicht teilende Zelle infizieren kann und das ein vitales GAG, ein vitales POL, ein vitales ENV, eine heterologe Nucleinsäuresequenz, die funktionell mit einer regulatorischen Nucleinsäuresequenz verbunden ist, und in cis wirkende Nucleinsäuresequenzen, die für die Verpackung, die reverse Transkription und die Integration notwendig sind, umfasst. Das rekombinante Retrovirus ist vorzugsweise ein Lentivirus und am stärksten bevorzugt HIV. Wie vorstehend für das Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Retrovirus beschrieben wurde, kann das rekombinante Retrovirus der Erfindung des weiteren mindestens ein Protein von VPR, VIF, NEF, VPX, TAT, REV und VPU einschließen. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, geht man davon aus, dass ein oder mehrere dieser Gen- / Proteinprodukte wichtig sind, um den viralen Titer des hergestellten, rekombinanten Retrovirus zu erhöhen (z.B. NEF), oder dass sie notwendig für die Infektion und die Verpackung der Virionen sein können (z.B. VIF), wobei dies abhängig von der gewählten Verpackungszelllinie ist.

**[0041]** Die Erfindung stellt ebenfalls ein Verfahren für den Transfer von Nucleinsäuren in eine sich nicht teilende Zelle zur Verfügung, um die Expression einer bestimmten Nucleinsäuresequenz zur Verfügung zu stellen. In einer anderen Ausführungsform stellt die Erfindung daher ein Verfahren für das Einbringen und die Expression einer heterologen Nucleinsäuresequenz in eine sich nicht teilende Zelle zur Verfügung, wobei dies die Infektion der sich nicht teilenden Zelle mit dem rekombinanten Virus der Erfindung und die Expression der heterologen Nucleinsäuresequenz in der sich nicht teilenden Zelle umfasst.

**[0042]** Es kann wünschenswert sein, die Expression eines Gen regulierenden Moleküls in einer Zelle durch das Einbringen eines Moleküls mittels des Verfahrens der Erfindung zu modulieren. Der Ausdruck „modulieren“ bedeutet die Unterdrückung der Expression eines Gens, wenn es überexprimiert ist, oder die Verstärkung der Expression, wenn es unterexprimiert ist. Wenn eine Störung des Zellwachstums mit der Expression eines Gens assoziiert ist, können Nucleinsäuresequenzen verwendet werden, welche die Expression des Gens auf dem Level der Translation beeinflussen. Dieser Ansatz verwendet zum Beispiel Antisense-Nucleinsäuren, Ribozyme oder Triplex-Wirkstoffe, um die Transkription oder die Translation einer spezifischen mRNA entweder durch die Maskierung der mRNA mit einer Antisense-Nucleinsäure oder einem Triplex-Wirkstoff oder durch ihre Spaltung mit einem Ribozym zu hemmen.

**[0043]** Antisense-Nucleinsäuren sind DNA- oder RNA-Moleküle, die komplementär zu mindestens einem Teil eines spezifischen RNA-Moleküls sind (Weintraub, Scientific American 262 (1990), 40). In der Zelle hybridisieren die Antisense-Nucleinsäuren mit der korrespondierenden mRNA, wobei sie ein doppelsträngiges Molekül bilden. Die Antisense-Nucleinsäuren stören die Translation der mRNA, weil die Zelle eine mRNA, die doppelsträngig ist, nicht translatiert. Antisense-Oligomere von etwa 15 Nukleotiden werden bevorzugt, da sie einfach zu synthetisieren sind und sie unwahrscheinlicher als größere Moleküle Probleme hervorrufen, wenn sie in die Zielzelle eingebracht werden. Die Verwendung von Antisense-Verfahren zur Inhibition der Translation von Genen in vitro ist auf dem Fachgebiet gut bekannt (Marcus-Sakura, Anal Biochem 172 (1988), 289).

**[0044]** Die Antisense-Nucleinsäuren können verwendet werden, um die Expression eines mutierten Proteins oder eines dominant aktiven Genprodukts zu hemmen, wie zum Beispiel das Amyloid-Vorläuferprotein, dass in der Alzheimer-Krankheit akkumuliert. Solche Verfahren sind ebenfalls nützlich für die Behandlung von Chorea Huntington, der hereditären Parkinson-Krankheit und anderen Erkrankungen. Antisense-Nucleinsäuren sind ebenfalls nützlich für die Inhibition der Expression von Proteinen, die mit Toxizität assoziiert sind.

**[0045]** Die Verwendung eines Oligonukleotids zur Hemmung der Transkription ist bekannt als die Triplex-Strategie, da das Oligomer sich um die Doppelhelix der DNA windet, wobei eine dreisträngige Helix gebildet wird. Diese Triplex-Verbindungen können daher entworfen werden, um eine einzigartige Stelle in einem ausgewählten Gen zu erkennen (Maker et al., Antisense Res and Dev 1 (3) (1991), 227; Helene C, Anticancer Drug Design 6 (6) (1991), 569).

**[0046]** Ribozyme sind RNA-Moleküle, welche die Fähigkeit besitzen, eine andere einzelsträngige RNA spezifisch in einer Weise zu spalten, die analog zu der von DNA-Restriktionsendonukleasen ist. Durch die Modifikation der Nukleotidsequenzen, welche diese RNAs codieren, ist es möglich, ein Molekül herzustellen, dass spezifisch Nucleinsäuresequenzen in einem RNA-Molekül erkennt und diese spaltet (Cech, J Amer Med Assn 260 (1988), 3030). Ein großer Vorteil dieses Ansatzes besteht darin, dass aufgrund ihrer Sequenzspezifität nur mRNAs mit bestimmten Sequenzen inaktiviert werden.

**[0047]** Es kann wünschenswert sein, eine Nucleinsäure zu transferieren, die einen Modulator einer biologischen Antwort codiert. In dieser Kategorie sind immunpotenzierende Wirkstoffe eingeschlossen, wobei diese Nucleinsäuren einschließen, die eine Anzahl von Zytokinen codieren, die als „Interleukine“ klassifiziert sind.

Diese schließen zum Beispiel Interleukin 1 bis 12 ein. In dieser Kategorie sind ebenfalls Interferone eingeschlossen, obwohl sie nicht notwendigerweise nach den gleichen Mechanismen wirken, und im Besonderen gamma-Interferon ( $\gamma$ -Interferon), Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) und der Granulozyten-Makrophagen-Kolonie stimulierende Faktor (GM-CSF). Es kann wünschenswert sein, diese Nucleinsäuren in Knochenmarkszellen oder Makrophagen einzubringen, um enzymatische Defizite oder Immundefekte zu behandeln. Nucleinsäuren, die Wachstumsfaktoren, toxische Peptide, Liganden, Rezeptoren oder andere physiologisch wichtige Proteine codieren, können ebenfalls in bestimmte sich nicht teilende Zellen eingebracht werden.

**[0048]** Das rekombinante Retrovirus der Erfindung kann verwendet werden, um eine HIV infizierte Zelle (z.B. eine T-Zelle oder einen Makrophagen) mit einem anti-HIV-Molekül zu behandeln. Zusätzlich kann zum Beispiel das Epithelialgewebe der Atmungsorgane mit einem rekombinanten Retrovirus der Erfindung infiziert werden, der ein Gen des Cystic-Fibrosis-Transmembrane-Conductance-Regulators (CFTR) für die Behandlung von Mukoviszidose enthält.

**[0049]** Das Verfahren der Erfindung kann auch nützlich für die Transplantation von neuronalen Zellen und Gliazellen oder für die „Implantation“, welche die Transplantation von Zellen beinhaltet, die mit dem rekombinaten Retrovirus der Erfindung ex vivo infiziert wurden, oder die Infektion des zentralen Nervensystems oder der ventrikulären Höhlen in vivo oder die subdurale Infektion der Oberfläche eines Wirtsgehirns. Solche Verfahren zur Implantation werden dem Fachmann bekannt sein und sind in „Neural Grafting in the Mammalian CNS“, Björklund und Stenevi, Ed. (1085) beschrieben und werden durch Bezugnahme hier aufgenommen. Die Verfahren schließen intraparenchymale Transplantation (wie z.B. in das Wirtsgehirn) ein, die durch Injektion oder Ablagerung auf dem Gewebe im Wirtsgehirn erreicht werden, um dem Parenchym des Gehirns zum Zeitpunkt der Transplantation beigefügt zu sein.

**[0050]** Die Verabreichung der Zellen oder des Virus in ausgewählte Regionen des Gehirns des Empfängers kann durchgeführt werden, indem ein Loch gebohrt und die Dura durchbrochen wird, um das Einbringen der Nadel einer Mikrospritze zu erlauben. Die Zellen oder die rekombinanten Retroviren können alternativ intrathekal in die Region des Rückenmarks injiziert werden. Eine Zellpräparation, die ex vivo infiziert wurde, oder das rekombinante Retrovirus der Erfindung erlaubt das Implantieren von neuronalen Zellen an jeder beliebigen, zuvor bestimmten Stelle des Gehirns oder des Rückenmarks und erlaubt das gleichzeitige, multiple Implantieren an mehreren verschiedenen Stellen, wobei die gleiche Zellsuspension oder virale Suspension verwendet wird, und es erlaubt Gemische von Zellen aus verschiedenen, anatomischen Regionen.

**[0051]** Zellen, die mit dem rekombinanten Retrovirus der Erfindung in vivo oder ex vivo infiziert wurden und die zur Behandlung von zum Beispiel einer neuronalen Erkrankung verwendet wurden, können optional ein exogenes Gen enthalten, zum Beispiel ein Gen, das einen Rezeptor codiert, oder ein Gen, das einen Liganden codiert. Solche Rezeptoren schließen Rezeptoren ein, die auf Dopamin, GABA, Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin, Glutamat, Acetylcholin oder andere Neuropeptide reagieren, wie vorstehend beschrieben wurde. Beispiele von Liganden, die einen therapeutischen Effekt bei einer neuronalen Erkrankung hervorrufen können, schließen Dopamin, Adrenalin, Noradrenalin, Acetylcholin, gamma-Aminobutyrsäure und Serotonin ein. Die Diffusion und die Aufnahme der benötigten Liganden nach der Sekretion einer infizierten Spenderzelle würde sich bei einer Erkrankung als günstig erweisen, bei der die neuronalen Zellen des Patienten fehlerhaft bei der Herstellung eines solchen Genprodukts sind. Eine Zelle, die genetisch modifiziert wurde, um einen neurotrophischen Faktor wie z.B. den Nerven-Wachstumsfaktor (NGF) zu sezernieren, kann dazu verwendet werden, um die Degeneration von cholinriger Neuronen zu verhindern, die sonst ohne Behandlung abgestorben wären. In einer anderen Ausführungsform können Zellen, die in einem Patienten mit einer Erkrankung der Basalganglien wie z.B. der Parkinson-Erkrankung implantiert werden, so modifiziert werden, dass sie ein exogenes Gen enthalten, das L-DOPA codiert, das Vorläuferprotein von Dopamin. Die Parkinson-Erkrankung ist durch einen Verlust von dopaminerger Neuronen in der Substantia nigra des Mittelhirns gekennzeichnet, welche die Basalganglien als ihr Hauptzielorgan haben.

**[0052]** Andere neuronale Erkrankungen, die auf ähnliche Weise durch Verfahren der Erfindung behandelt werden können, schließen die Alzheimer-Erkrankung, die Chorea Huntington, neuronale Schäden aufgrund eines Schlaganfalls und Schäden des Rückenmarks ein. Die Alzheimer-Erkrankung ist durch die Degeneration cholinriger Neuronen des basalen Vorhirns gekennzeichnet. Der Neurotransmitter für diese Neuronen ist Acetylcholin, das notwendig für ihr Überleben ist. Das Implantieren von cholinriger Zellen, die mit einem rekombinanten Retrovirus der Erfindung infiziert wurden, das ein exogenes Gen für einen Faktor enthält, der das Überleben dieser Neuronen fördert würde, kann durch das Verfahren der Erfindung erreicht werden, wie beschrieben wurde. Nach einem Schlaganfall erfolgt ein selektiver Verlust von Zellen im CA1 des Hippocampus sowie ein Verlust kortikaler Zellen, welches dem Verlust der kognitiven Funktion und des Gedächtnis zugrunde liegen

kann. Sobald Moleküle identifiziert werden, die für das Absterben der CA1-Zellen verantwortlich sind, können sie durch die Verfahren der Erfindung gehemmt werden. Zum Beispiel können Antisense-Sequenzen oder ein Gen, das einen Antagonisten codiert, in eine neuronale Zelle transferiert und in die Hippocampus-Region des Gehirns implantiert werden.

**[0053]** Das Verfahren zum Transfer der Nucleinsäure beabsichtigt auch das Implantieren von Neuroblasten in Kombination mit anderen therapeutischen Verfahren, die nützlich bei der Behandlung von Erkrankungen des ZNS sind. Zum Beispiel können die retroviral infizierten Zellen zusammen mit Wirkstoffen wie z.B. Wachstumsfaktoren, Gangliosiden, Antibiotika, Neurotransmittern, n-Eurohormonen, Toxinen, Neuriten fördernden Molekülen und Antimetaboliten und Vorläufer dieser Moleküle wie z.B. der Vorläufer von Dopamin, L-DOPA, verabreicht werden.

**[0054]** Des weiteren existiert eine Anzahl erblicher, neurologischer Erkrankungen, in denen fehlerhafte Gene ersetzt werden könnten, einschließlich: Erkrankungen, welche die Speicherung von Lysosomen betreffen, wie z.B. solche, die β-Hexoaminidase oder Glukocerebrosidase einbeziehen: fehlerhafte Aktivität der Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase (das „Lesh-Nyhan-Syndrom“); Amyloid-Polyneuropathien (-Präalbumin); Duchenne-Muskeldystrophie oder zum Beispiel das Retinoblastom.

**[0055]** Bei Erkrankungen, die aufgrund eines fehlerhaften Proteinprodukts auftreten, könnte der Gentransfer ein normales Gen in das betroffene Gewebe als Ersatztherapie einbringen und es könnten Tiermodelle für die Erkrankung hergestellt werden, wobei Antisense-Mutationen verwendet werden. Zum Beispiel kann es wünschenswert sein, eine den Faktor IX codierende Nucleinsäure als Insertion in einen Retrovirus zur Infektion von Muskelgewebe von Leberzellen einzufügen.

**[0056]** Die folgenden Beispiele sollen die Erfindung erläutern, nicht aber beschränken. Während diese Beispiele typisch für solche sind, die verwendet werden könnten, können andere Verfahren, die dem Fachmann bekannt sind, in einer anderen Ausführungsform verwendet werden.

## BEISPIELE

**[0057]** Die folgenden Beispiele erläutern das aus drei lentiviralen Plasmidvektoren bestehende System der Erfindung. Ein nicht infektiöses Plasmid stellt in trans die strukturellen und regulatorischen Proteine von HIV, nicht aber die Hülle (Verpackungskontrukt, pCMVΔR8) zur Verfügung. Der transduzierende Vektor enthält alle bekannten in cis wirkenden Sequenzen von HIV und die Klonierungsstellen zur Einbringung des Gens, das transduziert werden soll (Vektorplasmid, pH'R'). In den Experimenten, die nachfolgend beschrieben werden, wurden zwei Markergene (*E. coli* β-Galaktosidase -LacZ- und Firefly-Luciferase -Lucif-) in das Vektorplasmid kloniert, die von dem menschlichen Cytomegalovirus Immediate-Early-Verstärker (Enhancer)/Promoter – CMV oder C – angetrieben werden, wobei pH'R'CLacZ und pH'R'-Clucif hergestellt wurden (**Fig. 1**).

**[0058]** Ein drittes Plasmid codiert eine heterologe Hülle, um eine Pseudotypisierung der viralen Partikel zu erreichen. Die Pseudotypisierung erweitert den Wirtsbereich des Vektors und erhöht die Biosicherheit. Drei Arten von env codierenden Plasmiden wurden in den vorliegenden Beispielen verwendet. Das Plasmid pSV-A-MLV-env (Page et al., J Virol 64 (1990), 5270) codiert die amphotrope Hülle des 4070 Moloney Leukämie Virus (MLV/Ampho) unter der transkriptionellen Kontrolle des MLV LTRs. Das Plasmid pCMV-Eco env codiert die ecotrope Hülle des Moloney Leukämie Virus (MLV/Eco) unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promoters (Somia, Salk Institute, La Jolla, CA). Das Plasmid pMD.G codiert das Hüllprotein G des vakuären Stomatitis Virus (VSV.G) unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promoters (D Ory and R Mulligan, Whitehead Institute, Cambridge, MA).

**[0059]** Viruspartikel, die eine fehlerhafte Replikation haben, werden durch die transiente Ko-Transfektion der drei Plasmide in menschliche 293T-Nierenzellen hergestellt. Das konditionierte Medium wurde gewonnen, gefiltert und die Transduktion der Reportergene in den Zielzellen durch Standardverfahren analysiert. Menschliche HeLa-Zellen und Ratten-208F-Fibroblasten wurden unter verschiedenen Wachstumsbedingungen getestet und die Abhängigkeit der Transduktion von der Progression des Zellzyklus wurde ermittelt. Der Wachstumsarrest durch Dichte abhängige Inhibition des Wachstums (G0) wurde mit dem Zellzyklusarrest (in späteren Phasen des Zellzyklus) verglichen, der durch pharmakologische oder durch andere Mittel ausgelöst wurde. Die Transduktion von sich nicht teilenden, terminal differenzierten Zellen wie z.B. Makrophagen und Neuronen wurde ebenfalls getestet, sowohl in vitro als auch in vivo.

## Beispiel 1

## KONSTRUKTION VON pCMVΔR8

**[0060]** Das Verpackungsplasmid pCMCDR8 wurde schrittweise aufgebaut, wobei vom Plasmid pR8 ausgegangen wurde, ein infektiöser Klon der proviralen HIV-DNA. Das pR8 wurde durch den Austausch eines BarnHI-BssHII-Fragments im Plasmid pR7 hergestellt (Kim et al., J Virol 63 (1998), 3708; von Schwedler et al., J Virol 67 (1993), 4945), das die HIV-1 HXB2d provirale DNA (Shaw et al., Science 226 (1984), 1165) mit einem nef-Reading-Frame vollständiger Länge enthält, durch das homologe Fragment der NL4.3 HIV proviralen DNA. NL4.3 ist ein molekular konstruiertes Proivirus, dass funktionelle vpr- und vpu-Reading-Frames vollständiger Länge enthält (Adachi et al., J Virol., 59 (1985), 284). Das Rückgrat des Plasmids pR7/R8 enthält das Amp-Resistenzgen und den pUC-Replikationsursprung von Plasmid sp65 und den SV40-Replikationsursprung und das gpt-Gen von Plasmid pSVgpt. Eine Version von pR8 mit fehlerhaftem env, pΔER8, wurde durch den Austausch des 2,7 kbp-Sa1I-BamHI-Fragments mit dem homologen Fragment von pΔER7 hergestellt, das eine Insertion eines MluI-Linkers an der Stu1-Stelle 6831 enthält, der zu einer Verschiebung des Leserahmens des env-Reading-Frames führt (Trono et al., Cell 59 (1989), 113). Eine interne 39 bp-Deletion in der Ψ-Sequenz zwischen der 5'-Splice-Donorstelle und dem Startcodon des gag-Gens wurde in pΔER8 durch den Austausch eines 797 bp-BssHII-SpeI-Fragments mit einem homologen 758 bp-Fragment eingeführt, welches eine zuvor beschriebene Deletion im Verpackungssignal enthält (Aldovini & Young, J Virol 64 (1990), 1920). Das resultierende Plasmid wurde pΔΨΔER8 genannt. Das Plasmid pAΔΨΔER8 wurde durch Austausch des 3' HIV LTR mit der Polyadenylierungsstelle der genetischen DNA von Insulin aufgebaut (Trono et al., Cell 59 (1989), 113), welches den nef-Reading-Frame intakt hält. Es wurde durch PCR aufgebaut, wobei ein einzigartige NotI-Stelle an der Verbindungsstelle zwischen dem nef-Reading-Frame und dem PolyA-Signal eingeführt wird.

**[0061]** In einer ersten Serie von Amplifikationen wurde ein 961 bp Fragment mit den Oligonukleotiden gp41.4 (s) amplifiziert, wobei die BamHI-Stelle in gp41.1 von HIV1HXB2- und nef27 (a) von der pΔER8-Matrize überlappten, und ein 402 bp Fragment wurde mit den Oligonukleotiden LN-A (s) und LN-B (a) amplifiziert, die eine XbaI-Stelle enthielten, von einer DNA-Matrize, die eine Polyadenylierungsstelle des Insulingens enthält. Die Oligonukleotide nef27 (a) und LN-A (s) enthalten eine komplementäre Sequenz, die eine NotI-Restriktionsstelle trägt. Die zwei Amplifikationsprodukte wurden gereinigt, gemischt und als Matrize für eine zweite Amplifikation mit den Oligonukleotiden gp41.4 (s) und LN-B (a) verwendet (siehe Tabelle1 für die Oligo-Sequenzen). Das endgültige 1,3 kbp Produkt wurde gereinigt, mit BamHI und XbaI gespalten und in das 13,5 kbp BamHI-XbaI-Fragment von pΔΨΔER8 kloniert. Das Plasmid pCMVΔ8 wurde aufgebaut, indem die 5'LTR- und Leader-Sequenzen in pAΔΨΔER8 mit dem CMV-Promoter substituiert wurden. Ein 0,8 kbp Fragment, das den CMV-Promoter enthält, wurde von dem Plasmid pCMVpA (WW Chang, Universität Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX) durch eine doppelte Spaltung mit SmaI und HpaI entnommen. Ein MluI-Linker wurde an den HpaI-Enden angefügt und das Fragment wurde in das 14,5 kbp BssHII-HpaI-Fragment von pAΔΨΔER8 kloniert. Der Fachmann kann basierend auf den Lehren hierin ähnliche Startplasmide und Sequenzen identifizieren, ohne dass übermäßiges Experimentieren notwendig wäre.

Tabelle 1

Oligonukleotide	Nukleotidsequenzen
gp41.4 (s)	5' GTGAACGGATCCTTGGCACTATC 3' (SEQ ID NO:1)
nef 27 (a)	5' CGGGCGGCCGCTCAGCAGTTCT TGAAG-TACTC 3' (SEQ ID NO:2)
LN-A (s)	5' CCGGAGTACTTCAAGAACTGCTGA GCGGCCG-CCCCGGTGACCTTCAGA CCTTGGC 3' (SEQ ID NO:3)
LN-B (a)	5' GCGGTCTAGACTAAGAACCATATTAA TCAT-GAC 3' (SEQ ID NO:4)
gag31 (s)	5' AAGACCACCGCACAGCAAGCGGA CGCT-GACACAGGACACAGCAAT 3' (SEQ ID NO:5)

## Beispiel 2

## KONSTRUKTION VON pH'R'

**[0062]** Das Vektorplasmid pH'R' wurde durch die Klonierung eines Fragments des env-Gens aufgebaut, wel-

ches das RRE responsive element und eine Spleiss-Akzeptor-Stelle zwischen den zwei LTRs der HIV-1 HXB2 proviralen DNA umspannt. Die Leader- und die  $\Psi$ -Sequenzen wurden in dem Konstrukt erhalten zusammen mit dem 5' 0,3 kbp des gag-Gens, wie vorstehend gezeigt wurde, um ein erweitertes Verpackungssignal zu bilden. Ein 854 bp env-Fragment (BglIII 7620 – BamHI 8474) wurde von pR7 erhalten. Ein NotI-Linker wurde an das aufgefüllte BglIII-Ende angehangen. Das Fragment wurde in das 8,9 kbp NotI-BamHI-Fragment des Plasmids pMAKK<sup>113</sup>TTR7 kloniert, ein pR7-Derivat, das Mutationen in den gag-Codons 113, 114 und 118 enthält (die letzten führen eine einzigartige NotI-Klonierungsstelle ein; Sequenz wie im Oligonukleotid Gag 31 (s)). Das Plasmid pHr wurde erhalten. Das Plasmid pHr' wurde hergestellt, wobei eine Frameshift-Mutation AUG 42 bp stromabwärts des gag-Gens eingeführt wurde, welche den Reading-Frame des Genfragments abschließt, das in dem Konstrukt erhalten wurde. Die Mutation wurde durch Öffnen und Auffüllen einer C1al-Stelle eingeführt. Zwei einzigartige BamHI- und Xhol-Stellen sind im pHr' stromaufwärts des 3'LTR für die Klonierung von Insertionen verfügbar.

#### Beispiel 3

##### KONSTRUKTION VON pHr'-CLacZ und pHr'-Clucif

**[0063]** Ein Sa11-Xhol 3,6-kbp-Fragment, welches das E. coli  $\beta$ -Galaktosidase-Gen unter der transkriptionellen Kontrolle des CMV-Promoters enthält, wurde von dem Plasmid pSLX-CMVLacZ erhalten (Scharfmann et al., Proc Natl Acad Sci USA 88 (1991), 4626). Nach dem Auffüllen des Sa11-Endes wurde das Fragment in das 8,9 kbp Xhol-BamHI-Fragment von pHr' kloniert, dessen BamHI-Enden zuvor aufgefüllt wurden. Das pHr'-ClacZ wurde so erhalten. Das pHr'-Clucif wurde dadurch erhalten, dass ein 3,1 kbp BamHI-Xhol-Fragment in pHr'-CLacZ, welches den LacZ-Reading-Frame enthielt, durch ein 1,7 kbp BamHI-Xhol-Fragment von pGEM-luc (Promega) ausgetauscht wurde, das den Reading-Frame der Firefly-Luciferase enthielt.

#### Beispiel 4

##### HERSTELLUNG VON VEKTORPARTIKEL

**[0064]** In der Replikation effektive, virale Partikel wurden durch die transiente Ko-Transfektion der vorstehend beschriebenen Plasmide in menschliche 293T-Nierenzellen hergestellt. Alle Plasmide wurden in E. coli HB101-Bakterien transformiert und vermehrt, wobei Standardverfahren der Molekularbiologie verwendet wurden. Zur Transfektion von eukaryotischen Zellen wurde die Plasmid-DNA zweimal durch eine Gleichgewichtszentrifugation in einem CsCl-Ethidiumbromid-Gradienten gereinigt. Eine Gesamtmenge von 40  $\mu$ g DNA wurde in den nachstehend beschriebenen Teilmengen zur Transfektion einer Kultur in einem 10-cm Kulturgefäß verwendet: 10  $\mu$ g pCMV $\Delta$ R8, 20  $\mu$ g pHr' und 10  $\mu$ g env-Plasmid, entweder MLV/Ampho, MLV/Eco oder VSV.G. Wenn ein Plasmid weggelassen oder in einer anderen Teilmenge zugegeben wurde, dann wurde pGEM-LacZ zugegeben, um eine konstante Gesamtmenge der DNA zu erhalten, die den Zellen zugegeben wurde. Die 293T-Zellen wurden in einem 10% CO<sub>2</sub>-Inkubator in DMEM kultiviert, das mit 10% fötalem Kälberserum und Antibiotika vervollständigt wurde. Die Zellen wurden mit einer Dichte von  $1,3 \times 10^6$  / 10-cm Kulturplatte am Tag vor der Transfektion ausplattiert. Das Kulturmedium wurde 4 bis 6 Stunden vor der Transfektion ausgetauscht. Komplexe aus Calciumphosphat und DNA wurden nach dem Verfahren von Chen und Okayama hergestellt (Mol Cell Biol 7 (1987), 2745) und über Nacht mit den Zellen in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Morgen wurde das Medium ausgetauscht und die Kulturen wurden wieder bei 10% CO<sub>2</sub> gehalten. Das konditionierte Medium wurde 48 bis 60 Stunden nach der Transfektion gewonnen, durch Zentrifugation bei einer niedrigen Geschwindigkeit (300  $\times$  g, 10 min) von Zelltrümmern gereinigt und durch einen 0,45- $\mu$ m Filter mit niedriger Proteinbindung gefiltert. Das konditionierte Medium wurde entweder sofort zur Infektion verwendet oder bei -80°C aufgehoben. Der Gehalt der viralen Partikel wurde durch einen p24 gag-Antigen-ELISA (DuPont) kontrolliert.

**[0065]** MLV basierende Vektoren wurden ebenfalls durch transiente Ko-Transfektion von 293T-Zellen mit den nachfolgenden Plasmiden hergestellt. Das Plasmid pSLX-CMVLacZ (Scharfmann et al., Proc Natl Acad Sci USA 88 (1991), 4626) ist ein MLV abgeleiteter Vektor, der ein CMV gesteuertes E. coli  $\beta$ -Galaktosidase-Gen trägt. Die pCL-Plasmid-Serie trägt einen hybriden CMV-LTR-Promoter, der eine CMV gesteuerte Transkription in der Verpackungzelllinie und die Rekonstitution eines funktionellen LTRs in der Zielzelle erlaubt (R Naviaux, Salk Institute, La Jolla, CA). Das Plasmid pCLNC-Lucif ist ein MLV abgeleiteter Vektor, der ein CMV gesteuertes Firefly-Luciferase-Gen trägt. Es wurde durch die Klonierung eines 1,7 kbp HindIII-StuI-Fragments von pGEM-luc (Promega), das den Luciferase-Reading-Frame enthält, in das 8 kbp Clal-HindIII-Fragment von pCLNCX hergestellt, nachdem die Clal-Enden aufgefüllt wurden. Das Plasmid pCL-ECO ist ein ecotropes Verpackungsplasmid. Das Plasmid pCMV-GAGPOL (N Somia, Salk Institute, La Jolla, CA) ist ein Semi-Verpa-

ckungsplasmid, das ein CMV gesteuertes gag-pol-Gen von MLV trägt. Es wurde verwendet in Verbindung mit pMD.G, um VSV.G pseudotypisierende, MLV basierende Vektoren zu verpacken.

**[0066]** **Fig.** 2 zeigt einen Vergleich der Infektionsraten eines rekombinanten Lentivirus (HIV)-Konstrukts und eines MLV-Konstrukts, die mit 208F-Fibroblasten untersucht wurden. Die Ergebnisse zeigen, dass der HIV-Vektor der vorliegenden Erfindung mindestens so infektiös ist wie der MLV-Standardvektor. Die gereinigte Stocklösung zeigt die Raten nach der Konzentration des Überstandes durch Ultrazentrifugation. Die Ausbeute reflektiert die Wiedergewinnung des Virus nach der Konzentration.

**[0067]** **Fig.** 3 zeigt die Ergebnisse der Ko-Transfektion eines Verpackungskonstrukts, eines env codierenden Konstrukts und des Transfervektors (wie in **Fig.** 1). Verschiedene HIV und MLV basierende Verpackungskonstrukte wurden verglichen, wobei amphotrope und ecotrope env-Gene sowie das VSV.G-env verwendet wurden. Die Figur zeigt einen Vergleich der Infektion von Ratten-208F-Zellen mit den resultierenden, rekombinanten Retroviren. Die Raten der HIV-Konstrukte, die ein MLV (amphotrop) oder ein VSV.G-env hatten, waren dem MLV basierenden Standardvektor ähnlich (ungefähr  $10^5$ ). Der Infektionsraten des HIV basierenden Konstrukts, das ein MLV ecotropes env hatte, war etwa 10fach geringer als der des amphotropen env (ungefähr  $10^4$ ).

#### Beispiel 5

##### KONZENTRATION DER VIRALEN PARTIKEL

**[0068]** Vereinte, konditionierte Medien, die wie vorstehend beschrieben gesammelt wurden, wurden auf ein Polster aus einer 20% Sucrose-Lösung in PBS aufgeschichtet und in einem Beckman SW28-Rotor mit  $50.000 \times g$  für 90 min zentrifugiert. Das Pellet wurde durch Inkubation für 30 – 60 min und vorsichtiges Pipettieren in 1 – 4 ml PBS resuspendiert, anschließend erneut bei  $50.000 \times g$  für 90 min in einem Beckman SW28-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wurde in einem minimalen Volumen (20 – 50 µl) PBS resuspendiert und entweder direkt für die Infektion verwendet oder in Aliquots bei  $-80^\circ\text{C}$  tiefgefroren.

#### Beispiel 6

##### INFEKTION VON KULTIVIERTEN ZELLEN

**[0069]** Für die Infektion von kultivierten Zellen wurden Verdünnungsreihen des konditionierten Mediums von transienten 293T-Transfektanten oder von konzentrierten viralen Stocklösungen dem Kulturmedium zugegeben, das mit 8 µg / ml Polybrene ergänzt war. Die Zellen wurden zwischen 3 Stunden und über Nacht inkubiert, anschließend wurde das Medium ausgetauscht und die Zellen wurden weiter für 36 Stunden inkubiert, bevor die Expression der transduzierten Gene untersucht wurde. Die Expression des β-Glaktosidase-Gens (β-Gal) wurde durch die Fixierung der Kulturen für 5 min in kaltes 2% Formaldehyd / 0,2% Glutaraldehyd in PBS, das zweifaches Waschen in PBS und die Färbung für 4 Stunden bis über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  mit 1 mg / ml X-gal in PBS gemessen, das je 5 mM K-Ferri- und Ferrocyanid und 2 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt. Die Raten wurden berechnet, indem die Anzahl der individuellen Zentren der blauen Zellen pro Vertiefung gezählt und mit dem Volumen der zugegebenen Stocklösung des Vektors und des Verdünnungsfaktors multipliziert wurde. Die Expression der Luciferase wurde durch das zweifache Waschen der Kulturen mit TBS und der Extraktion der Zellen mit 200 µl / Vertiefung 0,5% NP40 in TBS untersucht, das 5 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt. Das Extrakt wurde durch Zentrifugation bei  $15.000 \times g$  für 10 min gereinigt. 50 µl des Extrakts wurden mit 150 µl 75 mM Tris-HCl, pH-Wert = 7,8, 15 mM Mg-Acetat und 4 mM ATP verdünnt und die Lumineszenz wurde in einem Luninometer untersucht, wobei 100 µl 1 mM Luciferin zugegeben wurde.

**[0070]** Menschliche HeLa-Zellen (ATCC) wurden in RPMI 1640 / 10% fötales Kälberserum in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Infektion von sich teilenden Zellen wurden die Zellen mit einer Dichte von  $1,6 \times 10^5$  / Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen am Tag vor der Transfektion ausgesät. G1/S arretierte Kulturen wurden hergestellt, indem  $2 \times 10^5$  Zellen / Vertiefung zwei Tage vor der Infektion ausgesät wurden und 15 µg / ml Aphidicolin 24 Stunden vor der Infektion zugegeben wurde. Das Aphidicolin wurde wie beschrieben täglich dem Medium während der Infektions- und der Post-Infektionszeit zugegeben. G2 arretierte Zellen wurden hergestellt, indem die Zellen einen Tag vor der Infektion für 20 min mit einer <sup>61</sup>Co-Quelle expoziert wurden, die auf 200 rad / min kalibriert war, und die Zellen mit  $4 \times 10^5$  / Vertiefung ausgesät wurden. Der Zellzyklusarrest in den angegebenen Phasen des Zyklus wurde durch Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie bestätigt.

**[0071]** **Fig.** 4 zeigt die relative Effizienz der Transduktion von CMV-β-Gal in HeLa-Zellen. Die Zellen waren im

Wachstum arretiert, wobei entweder pharmakologische Wirkstoffe (Aphidicolin) oder Röntgenstrahlung verwendet wurde. Die Infektionsrate des HIV basierenden Vektors war effizienter, wenn die Zellen durch Aphidicolin in der G1/S-Interphase arretiert waren, der HIV basierende Vektor war jedoch generell effizienter als der MLV basierende Vektor.

**[0072]** Ratten 208F-Fibroblasten (ein Geschenk von B Sefton, Salk Institute, L Jolla, CA) wurden in DMEM + 10% Kälberserum in einer Atmosphäre von 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Für die Infektion von wachsenden Kulturen wurden die Zellen mit einer Dichte von 10<sup>5</sup> Zellen / Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen am Tag vor der Infektion ausgesät. Im Wachstum arretierte Kulturen wurden durch das Aussäen von 2,5 × 10<sup>5</sup> Zellen / Vertiefung in einer Zellkulturplatte mit 6 Vertiefungen und das Umsetzen der Kulturen nach dem Erreichen der Konfluenz in Medium hergestellt, das 5% Kälberserum und 2 µM Dexamethazon enthielt, wie es in Miller et al. beschrieben wurde (Mol Cell Biol 10 (1990), 4239). Das Medium wurde jeden dritten oder vierten Tag gewechselt und die Kulturen wurden für zwei bis vier Wochen gehalten. Wenn es nicht anders vermerkt ist, wurden G0-Kulturen 3 Wochen nach dem Erreichen der Konfluenz verwendet. Der Wachstumsarrest wurde durch Propidiumiodid-Färbung und Durchflusszytometrie dokumentiert. Die Fraktion der Zellen in S-Phase betrug 40 bis 50% in wachsenden Zellen und 10 bis 2% nach dem Erreichen der Konfluenz in Abhängigkeit von der Zeit, die nach der Konfluenz vergangen war. Für Rettungsexperimente wurden infizierte G0-Kulturen nach der angegebenen Zeit nach der Infektion trypsiniert und die Zellen wurden mit verschiedenen Verdünnungen erneut ausplattiert. Die Expression des β-Gal wurde 48 Stunden nach dem erneuten Ausplattieren gemessen.

**[0073]** **Fig. 5** zeigt die relative Effizienz der Transduktion von CMV-Luciferase in Ratten 208F-Fibroblasten mit HIV und MLV basierenden Vektoren in Zellen, die für 4, 7, 11 oder 15 Tage im Wachstum arretiert waren. Die Ergebnisse zeigen, dass beide Vektoren effizient wachsenden Zellen infizieren. Die Effizienz der Transduktion des HIV basierenden Vektors gegenüber dem MLV basierenden Vektor war ungefähr 4 – 10fach höher in Abhängigkeit von der Länge der Zeit nach dem Wachstumsarrest.

**[0074]** Menschliche, periphere Monozyten wurden aus den Buffy coats gesunder Spender hergestellt, wie zuvor beschrieben wurde (von Schwedler et al., Proc Natl Acad Sci USA 91 (1994), 6992). Monozyten abgeleitete Makrophagen wurden in RPMI + 10% menschliches Serum (Sigma) für zwei bis vier Wochen vor der Infektion kultiviert. **Fig. 6** zeigt die Ergebnisse der Transduktion der CMV-Luciferase in menschliche, primäre Makrophagen, wobei die HIV basierenden und die MLV basierenden Vektoren entweder mit oder ohne Hülle verwendet wurden. Der MLV basierende Vektor war fast vollständig ineffektiv bei der Infektion der Zellen und war in der Infektiosität den nicht eingehüllten Viren ähnlich. Im Gegensatz dazu war der HIV basierende Vektor sehr effizient bei der Transduktion von primären Makrophagen.

**[0075]** Des weiteren wurde das Überdauern des HIV basierenden Vektors in im Wachstum arretierten Zellen ermittelt, die über einen Zeitraum von 2 – 8 Tagen kultiviert wurden. Das Überdauern des MLV basierenden Vektors war sehr gering in Zellen in der G0-Phase und nach dem erneuten Ausplattieren nach 2, 4 und 8 Tagen. Der HIV basierende Vektor behielt jedoch ungefähr 40 – 50% der Infektiosität in den selben Zellen. Ohne an eine bestimmte Theorie gebunden sein zu wollen, vermutet man, dass HIV, unähnlich dem MLV, extrachromosomal erhalten bleiben kann, ohne degradiert zu werden. Aus diesem Grund ist HIV ohne Integration stabil.

### Beispiel 7

#### Infektion in vivo

**[0076]** Für In-vivo-Experimente wurden HIV basierende und MLV basierende Vektoren verwendet, die ein CMV-LacZ-Markergen trugen. Beide Vektorenarten wurden mit VSV-G-Hüllproteinen pseudotypisiert. Die Vektoren wurden gereinigt und auf einen Titer von 3 × 10<sup>8</sup> I.U. / ml in einer Trägerlösung aus sterilem PBS konzentriert, das mit 2 µg / ml Polybrene ergänzt wurde. Alle Verfahren wurden gemäß der Institution genehmigter Protokolle für Tierversuche und in einer Umgebung mit einer biologischen Sicherheitsstufe 3 (S3) durchgeführt. Normale, erwachsene, weibliche Fisher-Ratten wurden mit einem Gemisch aus Ketamin (44 mg / kg), Acepromazin (0,75 mg / kg) und Xylozin (4 mg/kg) in 0,9% NaCl betäubt. 2 µg der viralen Suspension wurden langsam in das Corpus striatum auf beiden Seiten des Gehirns mit stereotaktischen Führung injiziert, wobei eine 5-µl Hamilton-Spritze mit einer 26-Gauge abgeschrägten Nadel verwendet wurde. 7 Tage nach der Injektion wurden die Ratten tief betäubt und mit 4% Formaldehyd / 0,1 % Glutaraldehyd durchspült. Die Gehirne wurden entfernt und frei schwimmende koronale Mikrotom-Gefrierschnitte (40 µm) wurden in parallelen Serien von je einem Schnitt aus jedem fünften Schnitt verarbeitet. Eine Serie wurde für die β-Gal-Immunzytochemie mit einem monoklonalen Antikörper verarbeitet und mit Avidin / Biotin-Peroxidase und Diaminobenzidin / NiCl<sub>2</sub> als Substrat gefärbt. Eine andere Serie wurde für eine dreifache Immunfluoreszenzfärbung mit β-Gal- (Kaninchen),

NeuN- (monoclonal) und GFAP- (Meerschweinchen) Antikörper verarbeitet, wobei FITC-, Texas Red- oder Cy5-markierte Sekundärantikörper verwendet wurden. NeuN ist ein nukleärer Marker, von dem berichtet wurde, dass er in terminal differenzierten Neuronen vorhanden ist (Mullen, Develop 116 (1992), 201). Glial-Fibrillar-Acidic-Protein (GFAP) ist ein Differenzierungsmarker für Astrozyten. Die Schnitte wurden anschließend mittels eines konfokalen Scanning-Lasermikroskops (BioRad MRTC600) untersucht. Immunfluoreszenzsignale wurden erhoben, farblich digital verstärkt und übereinanderlagert. Künstliche Farbbilder wurden elektronisch unter Verwendung von Adobe Photoshop (Adobe System Inc.) hergestellt.

**[0077]** Die Ergebnisse zeigten zahlreiche  $\beta$ -gal positiv Neuronen in Regionen, die mit dem HN basierenden Vektor injiziert wurden, nicht aber in Regionen, die mit dem MLV basierenden Vektor beimpft wurden.

## ZUSAMMENFASSUNG

**[0078]** Die Ergebnisse zeigten die Durchführbarkeit von Gentransfer unter Verwendung eines lentiviralen Vektors. Wenn wachsende Zellen verwendet werden, war die Transduktionseffizienz, die mit einem transienten, aus drei Plasmid bestehenden Verpackungssystem erreicht wurde, vergleichbar mit der, die mit ähnlich aufgebauten, konventionellen (MLV basierenden) Vektoren erreicht wurde. Der lentivirale Vektor konnte jedoch einen effizienten Gentransfer in der Abwesenheit von Zellteilung der Zielzelle erzielen, was im deutlichen Gegensatz zu MLV basierenden Vektoren stand. Die Effizienz der Transduktion in sich nicht teilende Zellen in vitro war abhängig von der Phase des Zellzyklusarrests. Die Infektion von G1/S und G2 arretierten Zellen war ebenso effizient wie die, die in wachsenden Zellen beobachtet wurde. Die Infektion von in G0 arretierten Zellen war in vitro weniger effizient und um so geringer, je länger die Kulturen in G0 gehalten wurden. In Langzeit-G0-Kulturen überdauerte der Vektor jedoch als ein stabiles Zwischenprodukt und konnte durch Stimulation der Zellteilung wieder dazu gebracht werden, den Infektionszyklus zu vervollständigen. Die Transduktion der Marker-gene in terminal differenzierten Zellen wie z.B. in menschlichen, primären Makrophagen in vitro und in cerebralen Neuronen von Ratten in vivo wurde beobachtet.

## Patentansprüche

1. Replikations-defektes, rekombinantes Retrovirus, umfassend
  - (a) ein lentivirales GAG-Protein;
  - (b) ein lentivirales POL-Protein;
  - (c) ein nicht-lentivirales ENV-Protein; und
  - (d) ein retrovirales Genom, umfassend: eine heterologe Nucleinsäuresequenz, funktionell verbunden mit einer regulatorischen Nucleinsäuresequenz; mindestens eine lentivirale, in cis wirkende Nucleinsäuresequenz, erforderlich für reverse Transkription und Integration; eine lentivirale Verpackungs-Nucleinsäuresequenz, wobei die lentivirale Verpackungs-Nucleinsäuresequenz eine lentivirale 5'-Spleiss-Donor-Sequenz umfasst, eine psi-Sequenz, wobei die Nucleinsäuresequenz frei ist von lentiviralen Sequenzen, sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts von der Spleiss-Donor-Stelle zu einer gag-Initiationsstelle.
2. Retrovirus nach Anspruch 1, wobei das retrovirale Genom von einem Lentivirus abgeleitet ist.
3. Retrovirus nach Anspruch 1 oder 2, wobei das Lentivirus das humane Immunschwäche-Virus (HIV) ist.
4. Retrovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das ENV-Protein amphotrop oder ecotrop ist.
5. Retrovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei das ENV-Protein Moloney-Leukämie-Virus (MLV)- oder vesikuläres Stomatitis-Virus (VSV)-ENV ist.
6. Retrovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die regulatorische Nucleinsäuresequenz ein Promoter oder ein Enhancer ist.
7. Retrovirus nach Anspruch 6, wobei der Promoter ein viraler Promoter ist.
8. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Retrovirus, das sich nicht teilende Zellen infiziert, wobei das Verfahren umfasst:
  - (a) Transfizieren einer geeigneten Verpackungs-Wirtszelle mit den folgenden Vektoren:
    - (i) einem retroviralen Vektor, der eine Nucleinsäure zur Verfügung stellt, die ein retrovirales gag und ein retrovirales pol codiert, wobei die gag- und pol-Nucleinsäuresequenzen mit einer heterologen regulatorischen Nucleinsäuresequenz funktionell verbunden sind, und wobei der Vektor fehlerhaft ist hinsichtlich einer Nuclein-

säuresequenz, die ein funktionelles ENV-Protein codiert, und wobei die Nucleinsäure des retrovirusalen Vektors frei ist von lentiviralen Sequenzen, sowohl stromaufwärts als auch stromabwärts von der Spleiss-Donor-Stelle zu einer gag-Initiationsstelle eines lentiviralen Genoms;

(ii) einem Vektor, der eine Nucleinsäure zur Verfügung stellt, die ein nichtlentivirales ENV-Protein codiert; und  
(iii) einem Vektor, der eine Nucleinsäure zur Verfügung stellt, die ein lentivirales Verpackungssignal enthält, das flankiert ist von lentiviralen, in cis wirkenden Nucleinsäuresequenzen fit reverse Transkription, Verpackung und Integration; eine heterologe Nucleinsäuresequenz, funktionell verbunden mit einer regulatorischen Nucleinsäuresequenz; und ein gag-Struktur-Gen, das weniger als die volle Länge umfasst; und

(b) Gewinnung des rekombinanten Virus.

9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der retrovirale Vektor von einem Lentivirus abgeleitet ist.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei das Lentivirus das menschliche Immunschwäche-Virus (HN) ist.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 10, wobei das Transfizieren des weiteren mindestens einen Vektor einschließt, der eine Nucleinsäuresequenz zur Verfügung stellt, die ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus vpr, vif, nef vpx, tat, rev und vpu.

12. Ex-vivo-Verfahren für das Einbringen einer heterologen Nucleinsäuresequenz in eine Zelle, die sich nicht teilt, umfassend das Infizieren der sich nicht teilenden Zelle mit dem rekombinanten Virus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 und das Einbringen der heterologen Nucleinsäuresequenz in die sich nicht teilende Zelle.

13. Ex-vivo-Verfahren nach Anspruch 12, wobei die heterologe Nucleinsäuresequenz eine Antisense-Nucleinsäure oder eine biologische modifizierende Nucleinsäure ist.

14. Retrovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder Verfahren nach einem der Ansprüche 8 bis 11 oder ex-vivo-Verfahren nach Anspruch 12 oder 13, wobei die sich nicht teilende Zelle ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus einer Nervenzelle, einer Muskelzelle, einer Leberzelle, einer Hautzelle, einer Herzzelle, einer Lungenzelle und einer Knochenmarkszelle.

15. Ex-vivo-Verfahren nach einem der Ansprüche 12 bis 14, wobei das virale GAG-Protein, das virale POL-Protein oder der retrovirale Vektor von einem Lentivirus abgeleitet sind.

16. Rekombinantes Retrovirus nach Anspruch 1, wobei die Lentivirus-abgeleiteten GAG- und POL-Proteine vom menschlichen Immunschwäche-Virus abgeleitet sind.

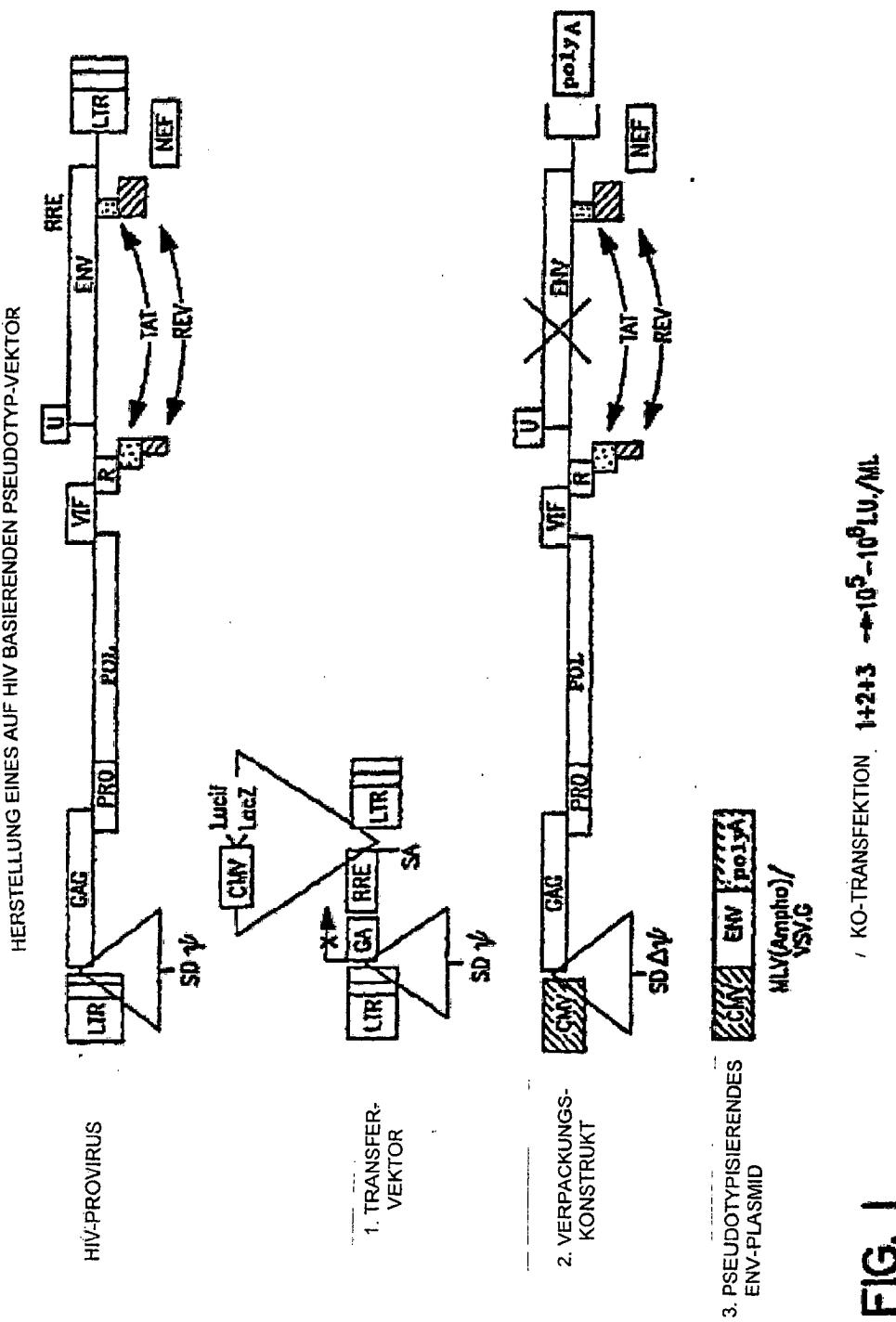
17. Rekombinantes Retrovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 16, des Weiteren umfassend mindestens ein virales Protein ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus VPR, VIF, NEF, VPX, TAT, REV und VPU.

18. Verwendung des rekombinanten Retrovirus nach einem der Ansprüche 1 bis 7 oder 16 und 17 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Behandlung einer HIV-infizierten Zelle, von cystischer Fibrose oder von neuronalen Störungen.

19. Verwendung nach Anspruch 18, wobei die neuronale Störung Parkinson-Krankheit, Alzheimer-Krankheit, Huntington-Krankheit, ein neuronaler Schaden als Folge eines Schlaganfalls, ein Schaden des Rückenmarks, lysosomale Speicherkrankheiten, Lesch-Nyhan Syndrom, amyloide Polyneuropathien, Duchenne-Muskeldystrophie oder Retinoblastom ist.

Es folgen 7 Blatt Zeichnungen

## Anhängende Zeichnungen

**FIG. I**

TRANSFEKTANT	INFEKTIONSTITER VON 208-FIBROBLASTEN			AUSBEUTE
	KONDITIONIERTES MEDIUM	LU/ml	GEREINIGTE STOCK-LSG.	
pCMVDR5 pHR'Cluc2\VS.G	$6 \cdot 10^5$		$3.5 \cdot 10^8$	30%
pCMVGAGPOL(MLV) pSL_X-Cluc2\VS.G	$10^5$		$3 \cdot 10^8$	25%

FIG. 2

KO-TRANSFEKTION IN 293-ZEILLEN		Env CODIERENDES PLASMID	MLV (Ampho)	INFEKTION VON RATTEN 208F-ZELLEN I.U./ml
VERPACKUNGSKONSTRUKT	CMV-LacZ TRÄGENDES PLASMID			
HIV BASIERTEN		PHR*	-	0 (<1/ml)
PCMVDR8	PHR*	PHR*	MLV (Ampho)	0
PCMVDR8	PHR*	PHR*	MLV (Ampho)	10 <sup>5</sup>
PCMVDR8	PHR*	PHR*	MLV (Eco)	10 <sup>4</sup>
PCMVDR8	PHR*	PHR*	VSV-G	5 10 <sup>5</sup>
PCMVDR8	pNL-SLX	pNL-SLX	MLV (Ampho)	0
PCMVDR8	pGEM	pGEM	MLV (Ampho)	0
MLV BASIERTEN	pCL-ECO	pNL-SLX		10 <sup>5</sup>
	pCL-ECO	PHR*		0
	PCMVAGGPOL	pNL-SLX	MLV (Ampho)*	10 <sup>5</sup>

FIG. 3

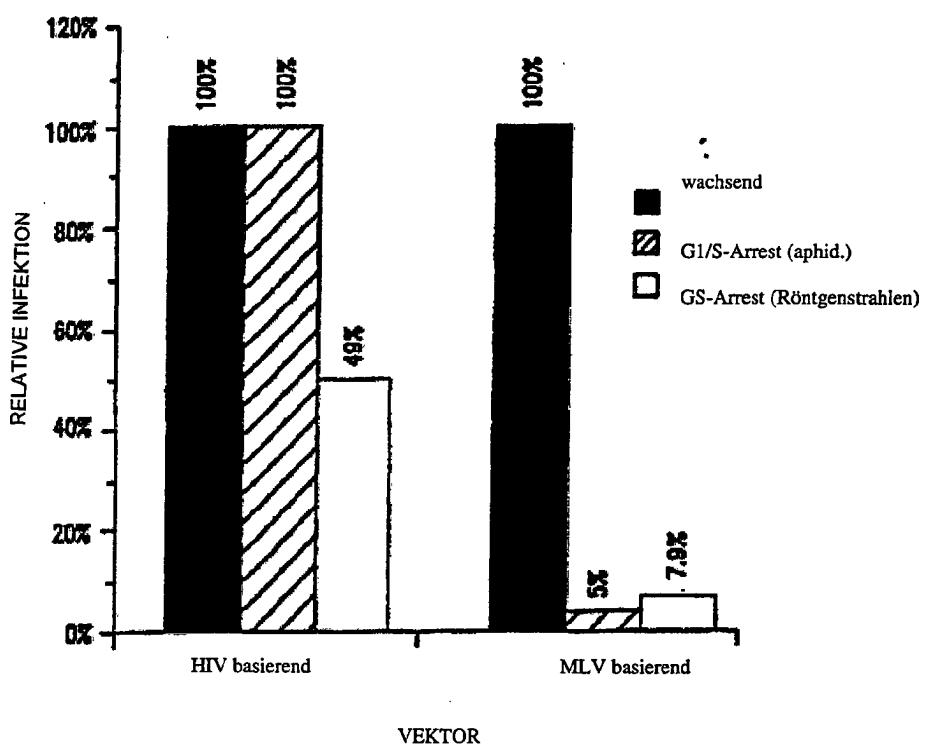


FIG. 4

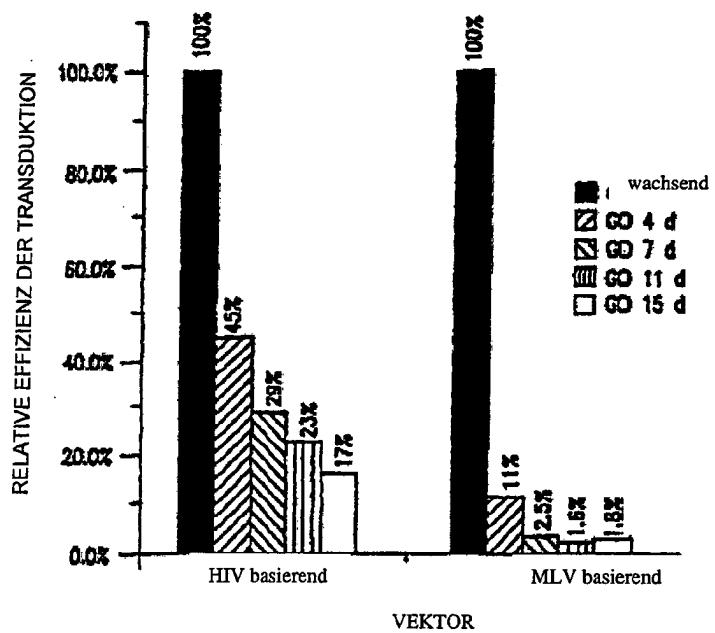


FIG. 5

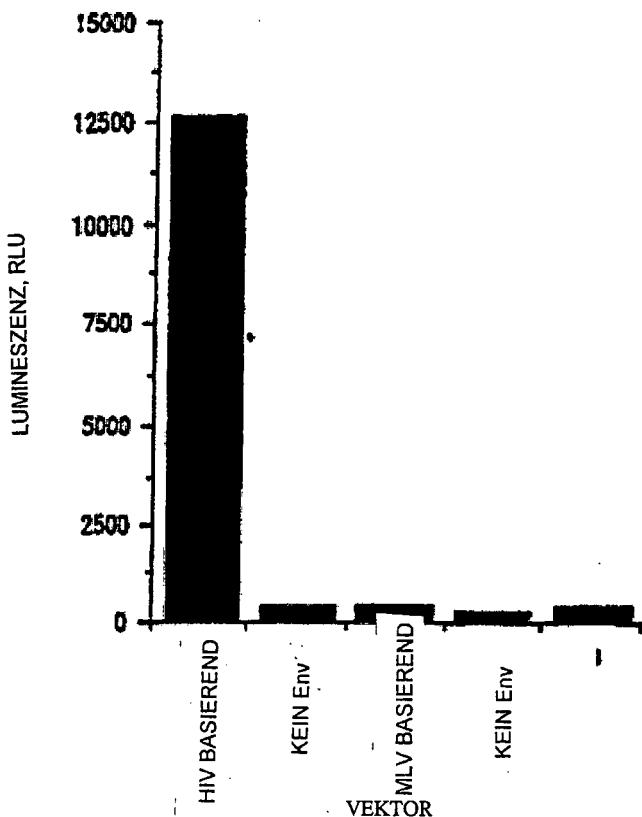


FIG. 6

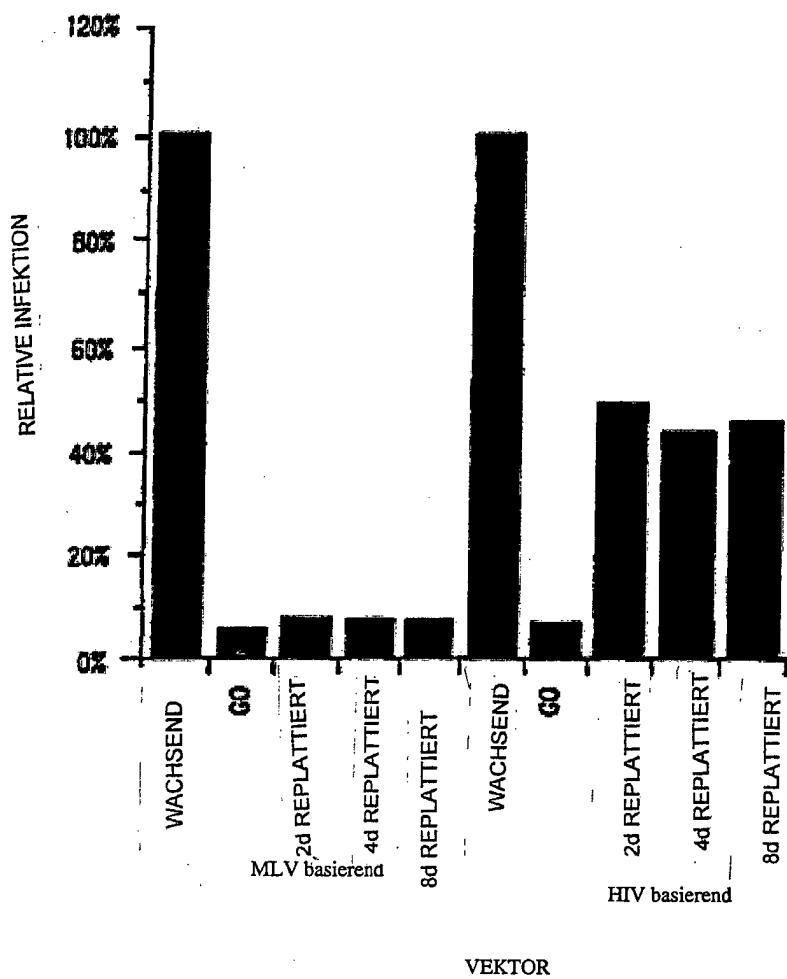


FIG. 7