



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 30 663 T2** 2006.05.11

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 017 797 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 30 663.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/19162**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 948 216.1**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 99/015641**

(86) PCT-Anmeldetag: **15.09.1998**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **01.04.1999**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **12.07.2000**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **22.06.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **11.05.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 15/86** (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

936633 **24.09.1997** **US**

(73) Patentinhaber:

**The Regents of the University of California,
Oakland, Calif., US**

(74) Vertreter:

**WUESTHOFF & WUESTHOFF Patent- und
Rechtsanwälte, 81541 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**POESCHIA, M., Eric, San Diego, US; LOONEY, J.,
David, Encinitas, US; WONG-STAAAL, Flossie, San
Diego, US**

(54) Bezeichnung: **Nicht-Primaten-Lentivirus-Vektoren und Verpackungssysteme**

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

ERKLÄRUNG ZUR STAATLICHEN UNTERSTÜTZUNG

[0001] Diese Erfindung erfolgte mit der durch die Veteran's Administration gewährten staatlichen Unterstützung, und mit den durch die Nationale Gesundheitsbehörde gewährten Zuschüsse Nrn. Ca 67394 und A136612. Die Regierung hat bestimmte Rechte an dieser Erfindung.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Die Gentherapie stellt Verfahren zur Bekämpfung von chronischen Infektionskrankheiten (z.B. HIV-Infektionen) als auch nicht-infektiösen Krankheiten, einschließlich Krebs und einigen anderen Formen von Erbkrankheiten, wie Enzymmangelerscheinungen, bereit. Es wurden verschiedene Ansätze zum Einführen von Nukleinsäuren in Zellen in vivo, ex vivo und in vitro verwendet. Diese beinhalten den Liposom-basierten Gentransport (Debs und Zhu (1993) WO 93/24640 und U.S. Pat. Nr. 5,641,662); Mannino und Gould-Fogerite (1988) BioTechniques 6 (7): 682–691; Rose U.S. Pat. Nr. 5,279,833; Brigham (1991) WO 91/06309; und Felgner et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 7413–7414) und den durch einen Adenovirusvektor-vermittelten Gentransport, z.B. zur Behandlung von Krebs (siehe z.B. Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054–3057; Tong et al. (1996) Gynecol. Oncol. 61: 175–179; Clayman et al. (1995) Cancer Res. 55: 1–6; O'Malley et al. (1995) Cancer Res. 55: 1080–1085; Hwang et al. (1995) Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. 13: 7–16; Haddada et al. (1995) Curr. Top. Microbiol. Immunol. 199 (Pkt. 3): 297–306; Addison et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 8522–8526; Colak et al. (1995) Brain Res. 691: 76–82; Crystal (1995) Science 270: 404–410; Elshami et al. (1996) Human Gene Ther. 7: 141–148; Vincent et al. (1996) J. Neurosurg. 85: 648–654). Replikationsdefiziente retrovirale Vektoren, die eine therapeutische Polynukleotidsequenz als Teil des retroviralen Genoms enthalten, wurden ebenfalls verwendet, insbesondere in Bezug auf einfache MuLV-Vektoren (siehe z.B. Miller et al. (1990) Mol. Cell. Biol. 10: 4239 (1990); Kolberg (1992) J. NIH Res. 4: 43, und Cornetta et al. Hum. Gene Ther. 2: 215 (1991)).

[0003] Eines der vielversprechendsten Ziele für die Gentherapie stellt die HIV-Infektion dar. Die pandemische Verbreitung von HIV führte zu intensiven weltweiten Bemühungen, die molekularen Mechanismen und den Lebenszyklus dieser Viren zu enträtseln. Es ist heute klar, dass der Lebenszyklus von HIV viele potentielle Ziele zur Inhibierung durch die Gentherapie bereitstellt, umfassend die zelluläre Expression von transdominanten mutierten gag- und env-Nukleinsäuren zur Störung des Viruseintritts, TAR(die Bindungsstelle für tat, die üblicherweise für die Transaktivierung erforderlich ist)-Köder, um die Transkription und die Transaktivierung zu inhibieren, und RRE(die Bindungsstelle für Rev; d.h. das Rev Response-Element)-Köder und transdominante Rev-Mutanten, um das Prozessieren von RNA zu inhibieren (siehe für einen Überblick über die HIV-Infektion und den HIV-Lebenszyklus Rosenburg und Fauci (1993) in Fundamental Immunology, 3. Auflage, Paul (Herausgeber) Raven Press, Ltd., New York, und die darin enthaltenen Referenzen). Gentherapie-Vektoren, die für Ribozyme, Antisense-Moleküle, Köder-Gene, transdominante Gene und Suizidgene codieren, einschließlich Retroviren, sind in Yu et al., Gene Therapy (1994) 1: 13–26 beschrieben. Antisense- und Ribozym-Therapeutika sind von zunehmender Bedeutung bei der Behandlung und Prävention von HIV-Infektionen.

[0004] Trotz der verschiedenen genterapeutischen Ansätze, die sich zur Zeit für die Behandlung von Krebs, HIV und dergleichen anbahnen, weisen die zur Zeit in der Gentherapie verwendeten Transportsysteme eine Vielzahl von Einschränkungen auf. In Bezug auf die HIV-Behandlung transduzieren Die häufig verwendeten, murinen retroviralen Vektoren transduzieren (Transfer von nukleinen Säuren in) menschliche periphere Blutleukozyten schlecht und vermögen sich nicht-teilende Zellen, wie Monozyten/Makrophagen, die als HIV-Reservoir bekannt sind, nicht zu transduzieren. Neue, sicherere Vektoren für den Transport von viralen Inhibitoren, insbesondere zu den sich nichtteilenden hämatopoietischen Stammzellen, für die Behandlung von HIV-Infektionen, sind wünschenswert.

[0005] Nicht-Primaten-Lentiviren stellen ein denkbare System für die Entwicklung von neuen Vektorsystemen dar; es ist jedoch verhältnismäßig wenig über diese Viren bekannt. Obwohl deren Biologie deutlich weniger genau untersucht wurde als diejenige der Primaten-Lentiviren (z.B. HIV-1, HIV-2 und SIV), sind die Nicht-Primaten-Lentiviren für die vergleichende Lentivirusbiologie und als mögliche Quelle für sicherere lentivirale Vektoren von Interesse. HIV-basierte retrovirale Vektoren haben sich kürzlich als vielversprechend für den therapeutischen Gentransfer herausgestellt, da diese die Lentiretrovirus-spezifische Eigenschaft aufweisen, sich nicht teilende Zellen permanent zu infizieren (siehe Naldini et al. (1996) Science 272, 263–267). Im Gegensatz dazu müssen die von einfacheren Retroviren (z.B. den Oncovirinae) abgeleiteten retroviralen Vektoren während der Mitose die Kernhülle abbauen, um die reverse Transkription und die Integration abzuschlie-

ßen. Folglich transduzieren diese Vektoren sich nicht teilende Zellen schlecht, wodurch deren Verwendbarkeit sich auf den Gentransfer in ruhende oder postmitotische zelluläre Ziele beschränkt. Allerdings weisen HIV-Vektoren komplexe Sicherheitsprobleme auf (siehe Emerman (1996) *Nature Biotechnology* 14, 943).

[0006] Die Nicht-Primaten-Lentiviren umfassen Huftier-Lentiviren, einschließlich dem Visna/Maedi-Virus, dem caprinen Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV), den equinen infektiösen Anämievirus (EIAV) und dem bovinen Immunschwächevirus (BIV). Diese Lentiviren infizieren nur Tiere mit Hufen (Huftiere) und infizieren im Allgemeinen nur bestimmte Huftierarten.

[0007] Die Nicht-Primaten-Lentiviren umfassen auch das feline Immunschwächevirus (FIV) (siehe Clements & Zink (1996) *Clinical Microbiology Reviews* 9, 100–117), das nur Katzen infiziert. Es wurden zahlreiche FIV-Stämme identifiziert.

[0008] Nicht-Primaten(z.B. Katzen- und Huftier-)Lentiviren können eine sicherere Alternative zu den Primaten-Lentivirus-Vektoren bereitstellen, deren Verwendung wird jedoch durch einen entsprechenden Mangel an Wissen über deren molekulare Eigenschaften, insbesondere aber deren Fähigkeit, sich an Nicht-Wirt-Tierzellen anzupassen (Emerman, a.a.O.) erschwert. Alle Lentiviren weisen einen stark eingeschränkten Tropismus auf (siehe Clements & Zink (1996), supra, und Haase (1994) *Annals of the New York Academy of Sciences* 724, 75–86).

[0009] FIV wurde im Jahre 1986 als Ursache der erworbenen Immunschwäche und neurologischen Erkrankung in, und nur in, Hauskatzen (*Felis catus*) entdeckt (Pedersen et al. (1987) *Science* 235, 790–793 (1987); Elder & Phillips (1993) *Infectious Agents and Disease* 2, 361–374; Pedersen (1993) "The feline immunodeficiency virus" in *The Retroviridae* (Levy, J. A., Herausgeber) 181–228 (Plenum Press, New York, Bendinelli et al. (1995) *Clinical Microbiology Reviews* 8, 87–112; und Sparger (1993) *Veterinary Clinics of North America, Small Animal Practice* 23, 179–191). In Großkatzen ist FIV geographisch weit verbreitet und scheint ein Kommensale zu sein: es ist bekannt, dass weltweit 18 von 37 Arten von frei herumwandernden, nicht domestizierten Felidae infiziert sind, sich jedoch bei keiner dieser Arten eine Krankheit entwickelt (Elder & Phillips (1993), supra; Olmsted et al. (1992) *Journal of Virology* 66, 6008–6018; Barr et al. (1995) *Journal of Virology* 69, 7371–7374; Courchamp & Pontier (1994) "Feline immunodeficiency virus: an edipemiological review" *Comptes Rendus de L Academie des Sciences, Serie III, Science de la Vie* 317, 1123–1134). Das Virus ist weit verbreitet und hat 2–20% der Hauskatzenpopulationen in Nordamerika, Europa und Japan infiziert; höhere Raten werden bei Katzen beobachtet, die unter veterinärmedizinische Beobachtung gestellt wurden (Pedersen (1993), supra und Courchamp, F. & Pontier (1994), supra). Die weltweite Verbreitung von FIV in verschiedenen Felidae und die Beobachtung, dass *Felis catus*-Seren aus den 1960-igern ähnlich hohe positive Raten aufweisen, legen nahe, dass FIV nicht erst kürzlich in Hauskatzen eingeführt wurde (Bendinelli et al. (1995), supra, Olmsted et al. (1992), supra; Courchamp, F. & Pontier (1994) supra; Shelton et al. (1990) *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* 3, 623–630; Bennett & Smyth (1992) *British Veterinary Journal* 148, 399–421; Brown et al. (1993) *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* 24, 357–364; Carpenter & O'Brien (1995) *Current Opinion in Genetics and Development* 5, 739–745).

[0010] Es gibt keine Anzeichen für eine FIV-Infektion bei Nicht-Katzen. Eine Kreuzinfektion durch irgendein Huftier- oder Katzen-Lentivirus wurde in Nicht-Huftieren bzw. Nicht-Katzen nie beobachtet. HIV und FIV unterscheiden sich namentlich in deren Übertragungswege, da FIV hauptsächlich durch Beißen übertragen wird (Pederson (1993), supra). Obwohl Menschen durch Bisse von Hauskatzen häufig HIV ausgesetzt sind, führt diese wohl effiziente Art der Inokulation nicht zu einer humanen Serokonversion oder irgendeinem anderen nachweisbaren Anzeichen einer humanen Infektion oder Erkrankung (Pedersen (1993), a.a.O.; Bendinelli et al. (1995) supra; Sparger (1993), supra; Courchamp, F. & Pontier (1994), supra; Brown et al. (1993).

[0011] FIV ist auch genetisch und antigenisch entfernt verwandt mit Primaten-Lentiviren. Nukleotidsequenzvergleiche zeigen eine engere Beziehung zu den Huftier-Lentiviren als zu HIV und SIV (Olmsted et al. (1989) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2448–2452 (Olmsted et al. (1989) A); Olmsted et al. (1989) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 8088–8092 (Olmsted et al. (1989) B)). Es wurde eine serologische Kreuzreaktivität von FIV-Kernproteinen zu verschiedenen Huftier-Lentiviren beobachtet, nicht jedoch zu HIV-1, HIV-2 oder SIV (Elder, J. H. & Phillips (1993), supra; Bennett, M. & Smyth (1992), supra; Olmsted et al. (1989) A, supra; Talbott et al. (1989) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 5743–5747; Miyazawa et al. (1994) *Archives of Virology* 134, 221–234). Das Virus codiert eine dUTPase; diese fünfte pol-codierte enzymatische Aktivität ist ein Merkmal, das nur in Nicht-Primaten-Lentiviren gefunden wird (Wagaman et al. (1993) *Virology* 196, 451–457). Phylogenetische und epidemiologische Daten sprechen für einen weit zurück-

liegenden Anpassungsvorgang zwischen FIV und den Vorläufern von Wildkatzen als auch für eine frühe evolutionäre Divergenz der Vorläufer von anderen Lentiviren (Olmsted, R. A. et al. (1992), supra; Brown et al. (1993), supra; Carpenter & O'Brien (1995) Talbott et al. (1989), supra.).

[0012] In menschlichen Zellen sind zudem auf zellulärer Ebene Beschränkungen sowohl hinsichtlich der produktiven als auch der infektiösen Phase des Lebenszyklus der Nicht-Primaten-Lentiviren nachgewiesen (Tomonaga et al. (1994) *Journal of Veterinary Medical Science* 56, 199–201; Miyazawa et al. (1992) *Journal of General Virology* 73, 1543–1546; Thormar & Sigurdardottir (1962) *Acta Pathol. Microbiol. Scandinav.* 55, 180–186; Gilden et al. (1981) *Archives of Virology* 67, 181–185; Carey & Dalziel (1993) *British Veterinary Journal* 149, 437–454). Die Gründe für diese Hindernisse, welche die Entwicklung von Nicht-Primaten-Lentivirus-basierten Vektoren für humane Anwendungen verhindern könnten, sind nicht gut verstanden.

[0013] Die CD4-Moleküle von Primaten sind die einzigen bekannten Primärrezeptoren für Lentiviren (z.B. für HIV). Weder Primär- noch Sekundärrezeptoren wurden bislang für irgendein Nicht-Primaten-Lentivirus bestimmt. Obwohl ein Antikörper, der an das feline Homologe von CD9 bindet, in Gewebekultur eine FIV-Infektion verhindert (Willett (1994) *Immunology* 81, 228–233), haben nachfolgende Untersuchungen gezeigt, dass weder CD9 noch das feline Homologe von CD9 FIV-Rezeptoren sind (Willett et al. (1997) *Journal of General Virology* 78, 611–618). Beschriebene Hindernisse bei der FIV-Expression in humanen Zellen umfassen die schlechte Wirkungsweise der viralen Kernfunktionen, wie der Rev/RRE regulatorischen Achse (Tomonaga, K. et al. (1994) supra; Simon et al. (1995) *Journal of Virology* 69, 4166–4172) und die schlechte Promotoraktivität der langen terminalen Sequenzwiederholung (engl. long terminal repeat, LTR) (Miyazawa et al. (1992), supra; Sparger et al. (1992) *Virology* 187, 165–177). Aufgrund dieser Hindernisse wurde die Expression der Rev-abhängigen Strukturproteine von Nicht-Primaten-Lentiviren in Nicht-Wirt-Tierzellen nur sehr eingeschränkt untersucht.

[0014] Zusätzlich zu der Fragestellung des eingeschränkten Tropismus würde die Herstellung von Nicht-Primaten-Lentivirus-Vektoren in Huftier- oder Katzen-Zellen für die klinische Verwendung Risiken hinsichtlich der Übertragung von endogenen Retroviren oder anderen potentiellen Pathogenen erzeugen. Dieses Risiko wurde für Zellen unterschiedlichen tierischen Ursprungs belegt (Stoye & Coffin (1995) *Nature Medicine* 1, 1100; van der Kuyl et al. (1997) *Journal of Virology* 71, 3666–3676). Feline Zellen enthalten auch mehrere Kopien eines replikationskompetenten endogenen Retrovirus vom Typ C (RD 14), das sich in menschlichen Zellen repliziert, sich phänotypisch mit anderen Retroviren vermischt und auf der Ebene der Nukleotidsequenz mit einem Primaten-Retrovirus (endogener Pavian-Virus) verwandt ist (McAllister et al. (1972) *Nature New Biol.* 235, 3–6). Überdies widersteht RD114 im Gegensatz zu den meisten anderen Säugetier-Retroviren vom Typ C der Inaktivierung durch humanes Serumkomplement (Takeuchi et al. (1994) *Journal of Virology* 68, 8001–8007). Katzenzellen können auch andere unbekannte und potentiell pathogene infektiöse Agenzien enthalten.

[0015] Folglich besteht auf dem Fachgebiet ein Bedürfnis für sicherere lentivirale Vektoren, z.B. für den Transport von Genen, Krebstherapeutika, viralen Inhibitoren und dergleichen in sich nicht teilende Zellen, einschließlich hämopoietische Stammzellen und Nervenzellen, und für humane Vektorverpackungszellen, die Nicht-Primaten-Lentivirus-Vektoren verpacken können. Die vorliegende Erfindung stellt diese und andere Merkmale bereit.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0016] Diese Erfindung beschreibt retrovirale Verpackungssysteme, Vektoren, verpackbare Nukleinsäuren und andere Merkmale, die auf der Entdeckung und Entwicklung von in menschlichen Zellen aktiven Nicht-Primaten-Lentivirus-Vektoren basieren. Die Vektoren, die durch den Nicht-Primaten-Lentivirus FIV verpackbar sind, transduzieren sich nicht teilende menschliche Zellen. Die Verpackungssysteme erzeugen Vektorverpackungskomponenten in menschlichen Zellen in trans, wodurch die Möglichkeit des Einführens von neuen Pathogenen in die menschliche Bevölkerung vermieden wird. Diese Vektoren und Verpackungskomponenten sind nützlich bei der Konstruktion von allgemeinen Gentransfervektoren und für die humane Gentherapie.

[0017] Eine Klasse der durch die Erfindung bereitgestellten retroviralen Vektoren weist eine Vektornukleinsäure auf, die durch das Nicht-Primaten-Lentivirus FIV verpackt ist. Der Vektor weist somit eine verpackbare Nukleinsäure auf, die durch die von ausgewählten Retroviren (d.h. FIV) codierten viralen Verpackungsproteine erkannt und verpackt wird. Die Vektornukleinsäure kann auch eine heterologe Zielnukleinsäure, wie ein therapeutisches Gen, umfassen. Die Vektornukleinsäure ist nicht virulent, da die Nukleinsäure einen Defekt hinsichtlich einer oder mehrerer für die virale Replikation erforderlichen Gene aufweist oder ein oder mehrere für die virale Replikation erforderlichen Gene fehlen. Wenn jedoch die fehlende oder defekte Komponente (z.B.

ein retrovirales Protein) in trans (z.B. in einer Verpackungszelle) bereitgestellt wird, wird die Vektornukleinsäure in ein Viruspartikel verpackt. Die Vektoren umfassen gegebenenfalls Vektorverpackungs- oder Replikationselemente, wie virale Proteine, Viruspartikel, reverse Transkriptaseaktivität oder dergleichen.

[0018] Eine bevorzugte Klasse von Zielen für die erfindungsgemäßen Vektoren sind humane Zellen, insbesondere sich nicht teilende Zellen, wie enddifferenzierte hämatopoietische Zellen und Nervenzellen (wobei die Zellen in vitro oder in vivo vorliegen). Folglich sind Eigenschaften, die sich auf die Transduktion und Infektion von humanen Zellen beziehen, bevorzugte Eigenschaften. Beispielsweise ist die Inkorporation des Glykoproteins des vesikulären Stomatitisvirus (VSV) in die Oberfläche des Vektors in einigen Ausführungsformen bevorzugt, da dies den Eintritt des Vektors in eine Vielzahl von menschlichen Zellen erleichtert. Ebenfalls wünschenswert ist die Inkorporation eines Promotors (z.B. des CMV-Promotors oder des t-RNA-Promotors), der die Expression einer oder mehrerer durch den Vektor codierten Nukleinsäuren in einer menschlichen Zelle kontrolliert, zur Herstellung von Nukleinsäuren und gegebenenfalls von Proteinen, die durch den Vektor codiert sind, in einer menschlichen Zielzelle.

[0019] Verpackungsplasmide, die virale Komponenten codieren, welche die Vektornukleinsäure in trans verpacken, können ebenfalls bereitgestellt werden. Die Verpackungsplasmide umfassen einen Promotor, der in einer menschlichen Zelle (d.h. eine für das Verpacken von Vektoren verwendete menschliche Zelle) aktiv ist. Dieser Promotor ist operativ an eine Nukleinsäure gebunden, die wenigstens ein Protein codiert, das zum Verpacken der Vektornukleinsäure, z.B. einer FIV-Verpackungsnukleinsäure, erforderlich ist. Dem Verpackungsplasmid fehlt eine FIV-Verpackungsstelle.

[0020] In einer bevorzugten Ausführungsform weist das Verpackungsplasmid einen FIV-LTR mit einer U3-Promotordeletion auf, wobei üblicherweise ein heterologer Promotor in die Deletionsstelle eingeführt ist. Diese Anordnung führt dazu, dass die endogene FIV LTR-Promotorfunktion ausgeschaltet wird und ermöglicht die Regulation durch den heterologen Promotor.

[0021] Es ist zu verstehen, dass die retroviralen Verpackungszellen, welche die verpackbaren Nicht-Primate-Lentivirus-Nukleinsäuren verpacken, mit den oben beschriebenen Verpackungsplasmiden versehen sind. Insbesondere umfassen die Zellen, die vorzugsweise menschlichen Ursprungs sind, Verpackungsplasmide, die für virale Verpackungskomponenten (z.B. Gag- und Env-Proteine) codieren. Diese Verpackungskomponenten werden zum Verpacken der verpackbaren Vektornukleinsäuren in trans verwendet. Aus Sicherheitsgründen ist es oft bevorzugt, dass die Zelle getrennte Verpackungsplasmide umfasst, wobei jedes der Plasmide unterschiedliche Verpackungsproteine codiert. Beispielsweise kann eine Verpackungszelle zwei getrennte Verpackungsplasmide umfassen, die verschiedene retrovirale Verpackungsproteine (z.B. FIV Gag- und Env-Proteine) codiert. Die Zelle kann ferner ein Plasmid umfassen, das ein Pseudotypisierungselement, wie das VSV-Hüllglykoprotein, codiert, um den Anwendungsbereich irgendeines verpackten Plasmids zu erweitern. Das Pseudotypisierungselement kann auf demselben Plasmid wie andere Nicht-Primate-Retrovirus-Elemente oder auf einem getrennten Plasmid codiert sein. In jedem Fall stehen die gewünschten Verpackungselemente unter der Kontrolle von geeigneten Regulatorelementen, welche die Expression der Komponenten in einer menschlichen Zelle kontrollieren. Es ist zu verstehen, dass verpackbare Nukleinsäuren (z.B. diejenigen, welche eine FIV-Verpackungsstelle und eine heterologe Nukleinsäure umfassen) gegebenenfalls in die erfindungsgemäßen Zellen transduziert (stabil oder transient) werden.

KURZBESCHREIBUNG DER ZEICHNUNGEN

[0022] **Fig. 1** ist eine schematische Darstellung, welche die erfindungsgemäßen Nukleinsäurekonstrukte, umfassend FIV34TF-10, CT5, CTRZLb und CTAGCb, darstellt.

[0023] **Fig. 2A** und B zeigen die experimentellen Ergebnisse in graphischer Form.

DEFINITIONEN

[0024] Zum Zwecke der vorliegenden Erfindung sind die folgende Begriffe nachstehend definiert.

[0025] Ein "Vektor" ist eine Zusammensetzung, die eine Zelle transduzieren, transformieren oder infizieren kann, wodurch die Zelle veranlasst wird, vektorcodierte Nukleinsäuren und gegebenenfalls Proteine, die nicht den nativen Proteinen der Zelle entsprechen, oder auf eine der Zelle nicht native Art und Weise zu exprimieren. Ein Vektor umfasst eine in einer Zelle zu exprimierende Nukleinsäure (üblicherweise RNA oder DNA) (eine "Vektornukleinsäure"). Ein Vektor umfasst gegebenenfalls Materialien, um den Eintritt der Nukleinsäure in die

Zelle zu erleichtern, wie ein retrovirales Partikel, ein Liposom, eine Proteinhülle oder dergleichen.

[0026] Eine "verpackbare Nicht-Primaten-Lentivirus-Nukleinsäure" ist eine Nukleinsäure mit einer funktionellen Virusverpackungsstelle eines Huftier-Lentivirus oder eines FIV-Lentivirus. Nukleinsäuren mit dieser Verpackungsstelle, die durch virale Komponenten, die durch ein entsprechendes Wildtypvirus in trans bereitgestellt werden, in ein Viruspartikel inkorporiert werden, werden durch den Wildtypvirus (oder geeignete Verpackungskomponenten, die sich von einem Wildtypvirus ableiten) verpackt.

[0027] Ein Verpackungsdefekt, der das Selbstverpacken blockiert "einer Nicht-Primaten-Lentivirus-Vektornukleinsäure" bezieht sich auf die Unfähigkeit der Nukleinsäure, wenigstens ein virales Protein zu erzeugen, das für das Verpacken der Vektornukleinsäure in ein Viruspartikel innerhalb einer Zelle erforderlich ist. Wenn beispielsweise Gag- oder Env-Proteine nicht durch den lentiviralen Vektor codiert werden, müssen die Proteine in trans zugeführt werden, bevor die Vektornukleinsäure in der Zelle verpackt werden kann. Der Wegfall kann auf eine Deletion oder Mutation eines für das virale Verpacken erforderlichen Gens eines Virusklons in der codierenden oder nicht-codierenden (z.B. Promotor-)Region des betreffenden Gens zurückzuführen sein. Die Vektornukleinsäure ist in trans reaktivierbar, wenn diese eine virale Verpackungsstelle codiert, die durch einen Nicht-Primaten-Virus-Vektor, wie FIV, erkannt wird.

[0028] Ein "Verpackungsplasmid" ist ein Plasmid, das Komponenten codiert, welche für die Herstellung von Viruspartikeln durch eine mit dem Verpackungsplasmid transduzierte Zelle erforderlich sind. Das Verpackungsplasmid codiert gegebenenfalls alle Komponenten, die zur Herstellung von Viruspartikeln erforderlich sind, oder umfasst gegebenenfalls einen Teil der für das Verpacken erforderlichen Komponenten. In einer bevorzugten Ausführungsform wird beispielsweise eine Verpackungszelle mit mehr als einem Verpackungsplasmid transformiert, wobei jedes der Verpackungsplasmide sich ergänzende Aufgaben bei der Herstellung eines FIV-Partikels übernimmt. Den Verpackungsplasmiden fehlt es an einer funktionellen Verpackungsstelle, d.h. eine Verpackungsstelle, die durch die Plasmid-codierten Nicht-Primaten-Lentivirus-Komponenten erkannt wird, wodurch das Plasmid nicht in der Lage ist, sich selbst zu verpacken.

[0029] Zwei (oder mehrere) Nicht-Primaten-Lentivirus-basierte Verpackungsplasmide sind "komplementär", wenn diese zusammen alle Funktionen codieren, die für das virale Verpacken erforderlich sind und wenn jedes der Plasmide für sich nicht alle für das Verpacken erforderlichen Funktionen codiert. Folglich sind zwei Vektoren beispielsweise "komplementär", wenn eine einzelne Zelle mit zwei Plasmiden transduziert wird und diese zusammen die Information zur Herstellung von FIV-Verpackungspartikeln codieren. Die Verwendung von komplementären Plasmiden ist bevorzugt, da dies die Sicherheit irgendeiner Verpackungszelle, die durch die Transformation mit einem Verpackungsplasmid hergestellt wurde, erhöht, indem die Möglichkeit, dass ein Rekombinationsereignis ein infektiöses Virus erzeugt, verringert wird.

[0030] Die Verpackungsplasmide codieren die Komponenten eines Viruspartikels. Die Partikel vermögen Ziel-RNA, die eine entsprechende Verpackungsstelle aufweist, zu verpacken. "Hocheffiziente Verpackungsplasmide" verpacken Verpackungsstellen aufweisende Ziel-RNAs so, dass die Verpackungszellen transient oder stabil mit dem Verpackungsplasmid und mit einer verpackbaren Zielnukleinsäure-Vektor-RNA mit einem Titer von wenigstens etwa 10^5 oder 10^6 bis etwa 10^7 oder selbst 10^8 Transduktionseinheiten pro ml oder mehr transduziert werden. Der genau erzeugte Titer variiert in Abhängigkeit von der Art der verpackbaren Nukleinsäure und der ausgewählten Verpackungszelle. Höhere Infektionsraten, werden üblicherweise erhalten, wenn Verpackungsvektoren mit vollständigen Verpackungsstellen verwendet werden.

[0031] Ein "Inhibitor" oder "viraler Inhibitor" ist typischerweise eine Nukleinsäure, die ein aktives antivirales Agens codiert oder selbst ein antivirales Agens ist. Folglich ist in einer Gruppe von Ausführungsformen der Inhibitor ein "direkter Inhibitor", d.h. der Inhibitor wirkt direkt auf eine virale Komponente ein, um die Infektion, Replikation, Integration oder Wachstum des Virus in der Zelle zu inhibieren. Beispielsweise umfasst der Inhibitor in einer besonders bevorzugten Ausführungsform ein trans-aktives Ribozym, das ein HIV-Transkript schneidet. In dieser Ausführung ist der Inhibitor üblicherweise ein RNA-Molekül mit einer katalytischen Nuklease-Aktivität. In einer anderen Gruppe von Ausführungsformen ist der Inhibitor ein "indirekter Inhibitor", d. h. der Inhibitor codiert den direkten Inhibitor. Ein Inhibitor "codiert" einen direkten Inhibitor, wie ein aktives Ribozym, ein Protein, einen molekularen RNA-Köder oder eine Antisense-RNA, wenn er entweder die Sense- oder Antisense-Codierung oder eine komplementäre Nukleinsäure, die dem direkten Inhibitor entspricht, enthält. Per Konvention werden direkte Inhibitor-RNAs, wie Ribozyme, üblicherweise als ihre entsprechenden DNA-Sequenzen aufgelistet. Dies dient der vereinfachten Darstellung der entsprechenden aktiven RNA, die der gegebenen Sequenz entspricht, wobei die T-Reste durch U-Reste ausgetauscht sind.

[0032] "Virale Inhibierung" bezeichnet die Fähigkeit einer Komponente, die Infektion, das Wachstum, die Integration oder Replikation eines Virus in einer Zelle zu inhibieren.

[0033] Die Inhibierung wird typischerweise gemessen, indem die Veränderungen der Virusladung einer Zelle (d.h. die Anzahl von Viren und/oder viralen Proteinen oder Nukleinsäuren, die in der Zelle, der Zellkultur oder dem Organismus vorhanden sind) verfolgt werden oder indem die Resistenz einer Zelle, einer Zellkultur oder eines Organismus auf eine Infektion verfolgt wird.

[0034] Ein "Promotor" ist eine Anordnung von Nukleinsäure-Kontrollsequenzen, welche die Transkription einer Nukleinsäure kontrolliert. Wie hierin verwendet, umfasst ein Promotor notwendige Nukleinsäuresequenzen in der Nähe der Startstelle der Transkription, wie ein TATA-Element im Falle des Polymerase II-Promotors. Ein Promotor umfasst gegebenenfalls auch distale Enhancer- oder Repressorelemente, die nicht weniger als mehrere tausend Basenpaare entfernt von der Startstelle der Transkription angeordnet sein können.

[0035] Ein "konstitutiver" Promotor ist ein Promotor, der unter den meisten Umwelt- und Entwicklungsbedingungen aktiv ist. Ein "induzierbarer" Promotor ist ein Promotor, der durch Umwelt- und Entwicklungsbedingungen reguliert wird.

[0036] Die Begriffe "isoliert" oder "biologisch rein" bezeichnen ein Material, dass im Wesentlichen oder hauptsächlich frei von Komponenten ist, welche dieses im natürlichen Zustand gewöhnlich begleiten.

[0037] Der Begriff "heterolog" bedeutet bei der Verwendung hinsichtlich Teile einer Nukleinsäure, dass die Nukleinsäure zwei oder mehrere Subsequenzen umfasst, die in der Natur in derselben Beziehung zueinander gefunden werden. Beispielsweise ist die Nukleinsäure üblicherweise rekombinant hergestellt und weist zwei oder mehrere Sequenzen von nicht verwandten Genen auf, die so angeordnet sind, dass eine neue funktionelle Nukleinsäure hergestellt wird. Beispielsweise weist die Nukleinsäure in einer Ausführungsform einen Promotor eines Gens auf, der so angeordnet ist, dass die Expression der codierenden Sequenz eines anderen Gens, wie eines antiviralen Ribozyms, kontrolliert wird. Folglich ist der Promotor in Bezug auf die Ribozym-codierende Sequenz heterolog.

[0038] Der Begriff "identisch" im Zusammenhang mit zwei Nukleinsäuren oder Polypeptidsequenzen bezeichnet die Reste in den zwei Sequenzen, die bei einem Alignment mit maximaler Übereinstimmung gleich sind. Wenn in Bezug auf Proteine oder Peptide eine prozentuale Sequenzidentität verwendet wird, ist zu beachten, dass Positionen von Resten, die nicht identisch sind, sich oft durch konservative Aminosäuresubstitutionen, bei denen Aminosäurereste durch andere Aminosäurereste mit ähnlichen chemischen Eigenschaften (z.B. Ladung oder Hydrophobizität) ausgetauscht sind, unterscheiden, und daher die funktionellen Eigenschaften des Moleküls nicht verändern. Wenn die Sequenzen sich hinsichtlich konservativer Substitution unterscheiden, kann die prozentuale Sequenzidentität nach oben angepasst werden, um den konservativen Charakter der Substitution zu berücksichtigen. Dem Fachmann sind Mittel zur Durchführung dieser Korrektur gut bekannt. Üblicherweise bedeutet dies, dass eine konservative Substitution als teilweise Nicht-Übereinstimmung und nicht als völlige Nicht-Übereinstimmung bewertet wird, wodurch die prozentuale Sequenzidentität erhöht wird. Wenn einer identischen Aminosäure beispielsweise eine Punktzahl von 1 und einer nicht-konservativen Substitution eine Punktzahl von 0 zugeordnet wird, wird einer konservativen Substitution folglich eine Punktzahl zwischen 0 und 1 zugeordnet. Die Bewertung der konservativen Substitutionen wird beispielsweise nach dem Algorithmus von Meyers und Miller, *Computer Applic. Biol. Sci.*, 4: 11–17 (1988) berechnet, der in dem Programm PC/GENE (Intelligenetics, Mountain View, California, USA) implementiert ist. Ein "Vergleichsfenster", wie hierin verwendet, bezeichnet einen Abschnitt von wenigstens 50 benachbarten Positionen, gewöhnlich etwa 50 bis etwa 200, üblicherweise etwa 100 bis 150, innerhalb dem eine Sequenz mit einer Referenzsequenz mit der gleichen Anzahl von benachbarten Positionen verglichen wird, nachdem die zwei Sequenzen einem optimalen Alignment unterzogen wurden. Verfahren für das Alignment von Sequenzen für Vergleichszwecke sind im Stand der Technik gut bekannt. Ein optimales Alignment von Sequenzen für Vergleichszwecke erfolgt beispielsweise mittels des lokalen Homologie-Algorithmus von Smith und Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2: 482; durch den Homologie-Alignment-Algorithmus von Needleman und Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48: 443; durch das Ähnlichkeitssuchverfahren von Pearson und Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 2444; durch die Computerimplementierung dieser Algorithmen (umfassend CLUSTAL in dem PC/Gene-Programm von Intelligenetics, Mountain View, California, GAP, BESTFIT, FASTA und TFasta in dem Wisconsin Genetics Software Paket, Genetics Computer Group (GCG), 575 Science Dr., Madison, Wisconsin, USA, jedoch nicht darauf beschränkt); das CLUSTAL-Programm ist gut beschrieben durch Higgins und Sharp (1988) *Gene*, 73: 237–244 und Higgins und Sharp (1989) *CABIOS* 5: 151–153; Corpet, et al. (1988) *Nucleic Acids Research* 16, 10881–90; Huang, et al. (1992) *Computer Applications in the Biosciences* 8, 155–65, und Pear-

son, et al. (1994) *Methods in Molecular Biology* 24, 307–31. Das Alignment wird oft auch durch eine Inaugenscheinnahme und mittels manuellem Alignment durchgeführt. "Konservativ modifizierte Variationen" einer bestimmten Nukleinsäuresequenz beziehen sich auf diejenigen Nukleinsäuren, die für identische oder im Wesentlichen identische Aminosäuresequenzen codieren oder, wenn die Nukleinsäure keine Aminosäuresequenz codiert, auf im Wesentlichen identische Sequenzen. Aufgrund der Degeneration des genetischen Codes codieren eine große Anzahl von funktionell identischen Nukleinsäuren ein bestimmtes Polypeptid. Beispielsweise codieren die Codons CGU, CGC, CGA, CGG, AGA und AGG alle für die Aminosäure Arginin. Somit kann an jeder Position, an der durch das Codon ein Arginin vorgesehen ist, das Codon in irgendein entsprechendes, beschriebenes Codon verändert werden, ohne dabei das codierte Polypeptid zu verändern. Solche Nukleinsäurevariationen sind "stille Variationen", die eine Art der "konservativ modifizierten Variationen" darstellen. Jede hierin beschriebene Nukleinsäure, die ein Polypeptid codiert, beschreibt auch jede mögliche stille Variation. Einem Fachmann ist bekannt, dass jedes Codon in einer Nukleinsäure (außer AUG, das gewöhnlich das einzige Codon für Methionin ist) durch Standardverfahren verändert werden kann, um ein funktionell identisches Molekül zu erhalten. Folglich ist jede "stille Variation" einer für ein Polypeptid codierenden Nukleinsäure implizit in jeder beschriebenen Sequenz enthalten. Des Weiteren ist einem Fachmann bekannt, dass einzelne Substitutionen, Deletionen oder Additionen, wodurch eine einzelne Aminosäure oder ein geringer Prozentanteil von Aminosäuren (üblicherweise weniger als 5%, insbesondere weniger als 1%) in einer codierten Sequenz geändert, hinzugefügt oder deletiert wird, "konservativ modifizierte Variationen" sind, bei denen die Änderungen zur Substitution einer Aminosäure durch eine chemisch ähnliche Aminosäure führt. Tabellen mit konservativen Substitutionen, die funktionell ähnliche Aminosäuren enthalten, sind im Stand der Technik gut bekannt. Die folgenden sechs Gruppen enthalten Aminosäuren, die untereinander konservative Substitutionen darstellen: 1) Alanin (A), Serin (S), Threonin (T); 2) Asparaginsäure (D), Glutaminsäure (E); 3) Asparagin (N), Glutamin (Q); 4) Arginin (R), Lysin (K); 5) Isoleucin (I), Leucin (L), Methionin (M), Valin (V); und 6) Phenylalanin (F), Tyrosin (Y), Tryptophan (W) (siehe auch Creighton (1984) *Proteins* W. H. Freeman and Company). Schließlich stellt das Anfügen von Sequenzen, welche die Aktivität eines Nukleinsäuremoleküls nicht ändert, wie eine nicht funktionelle Sequenz, eine konservative Modifikation der Grundnukleinsäure dar.

[0039] "Stringente Hybridisierungswaschbedingungen" im Rahmen von Nukleinsäurehybridisierungsexperimente, wie Southern- und Northern-Hybridisierungen sind sequenzabhängig und unterschiedlich unter verschiedenen Umweltparametern. Eine ausführliche Anleitung betreffend die Hybridisierung von Nukleinsäuren findet sich in Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Hybridization with Nucleic Acid Probes* Teil 1, Kapitel 2 "overview of principles of hybridization and the strategy of nucleic acid probe assays", Elsevier, New York. Im Allgemeinen werden hochstringente Hybridisierungs- und Waschbedingungen ausgewählt, die bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH etwa 5°C niedriger sind als der thermische Schmelzpunkt (T_m) für die spezifische Sequenz. Der T_m ist die Temperatur (bei einer definierten Ionenstärke und einem definierten pH), bei der 50% der Zielsequenz mit einer perfekt zusammenpassenden Sonde hybridisiert. Hochstringente Bedingungen werden so ausgewählt, dass diese gleich dem T_m für eine bestimmte Sonde sind.

[0040] Ein Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen zur Hybridisierung von komplementären Nukleinsäuren mit mehr als 100 komplementären Resten auf einem Filter in einem Southern- oder Northernblot stellt 50% Formalin mit 1 mg Heparin bei 42°C dar, wobei die Hybridisierung über Nacht durchgeführt wird. Ein Beispiel für stringente Waschbedingungen stellt das Waschen mit $2 \times$ SSC für 15 min bei 65°C dar (siehe für eine Beschreibung des SSC-Puffers Sambrook, supra). Oft geht diesem hochstringenten Waschen ein niedrigstringentes Waschen voraus, um das Hintergrundsignal zu entfernen. Ein Beispiel für das niedrigstringente Waschen stellt $2 \times$ SSC für 15 min bei 40°C dar. Im Allgemeinen zeigt ein Signal-Rausch-Verhältnis von $2 \times$ (oder höher) als dasjenige, das für eine nicht verwandte Sonde in dem bestimmten Hybridisierungsansatz beobachtet wird, den Nachweis einer spezifischen Hybridisierung an.

[0041] Nukleinsäuren, die unter stringenten Bedingungen nicht miteinander hybridisieren, sind immer noch im Wesentlichen identisch, wenn die Polypeptide, welche diese codieren, im Wesentlichen identisch sind. Dies tritt beispielsweise dann auf, wenn eine Kopie einer Nukleinsäure unter Verwendung der maximalen durch den genetischen Code zugelassene Codon-Degeneriertheit erzeugt wird.

[0042] Ein "FIV-1 Gag-Protein" ist ein durch das FIV-1 gag-Gen codiertes Protein. Die Gag-Proteine werden üblicherweise als großes Vorläuferprotein translatiert, das geschnitten wird, um die strukturellen Kernproteine zu bilden, welche die genomische Wildtyp-FIV-RNA verpacken. Eine verkürztes Gag-Protein ist ein Protein, das mittels eines gag-Gens hergestellt ist, das bezüglich der Wildtypsequenz eine Deletion aufweist. So werden auch ein FIV Reverse Transkriptaseprotein und ein FIV-Hüllprotein durch die pol- bzw. env-Gene codiert.

[0043] Der Begriff "Nukleinsäure" bezeichnet ein Desoxyribonukleotid- oder ein Ribonukleotid-Polymer in der einsträngigen oder doppelsträngigen Form und umfasst, sofern nicht anderweitig beschränkt, bekannte Analoga von natürlich vorkommenden Nukleotiden, die auf eine ähnliche Art und Weise wie die natürliche vorkommenden Nukleotide mit Nukleinsäuren hybridisieren. Eine bestimmte Nukleinsäuresequenz umfasst gegebenenfalls die komplementäre Sequenz davon, solange nichts anderes angegeben ist.

[0044] Der Begriff "operativ gebunden an" bezieht sich auf eine funktionelle Verbindung zwischen einer Expressionskontrollnukleinsäuresequenz (wie einen Promotor oder eine Anordnung von Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren) und einer zweiten Nukleinsäuresequenz, wobei die Expressionskontrollsequenz die Transkription der Nukleinsäure, die der zweiten Sequenz entspricht, kontrolliert.

[0045] Der Begriff "rekombinant" bedeutet bei der Verwendung in Bezug auf eine Zelle, dass die Zelle eine Nukleinsäure repliziert oder exprimiert oder ein durch eine Nukleinsäure codiertes Peptid oder Protein exprimiert, die in Bezug auf die Zelle exogen sind. Rekombinante Zellen können Gene exprimieren, die in der nativ vorliegenden (nicht rekombinanten) Zellform nicht vorkommen. Rekombinante Zellen können auch Gene exprimieren, die in der nativen Form der Zelle vorkommen, wobei die Gene künstlich erneut in die Zelle eingeführt werden.

[0046] Eine "rekombinante Expressionskassette" oder einfach eine "Expressionskassette" ist ein rekombinant oder synthetisch erzeugtes Nukleinsäurekonstrukt mit Nukleinsäureelementen, welche die Transkription einer bestimmten Nukleinsäure in einer Zelle ermöglichen. Die rekombinante Expressionskassette kann ein Teil eines Plasmids, eines Virus oder eines Nukleinsäurefragments sein. Üblicherweise umfasst die rekombinante Expressionskassette eine zu transkribierende Nukleinsäure und einen Promotor. In einigen Ausführungsformen kann die Expressionskassette beispielsweise auch einen Replikationsstartpunkt und/oder Chromosomen-Integriationselemente (z.B. einen retroviralen LTR) umfassen.

[0047] Der Begriff "Subsequenz" im Rahmen einer bestimmten Nukleinsäuresequenz bezeichnet einen Bereich einer Nukleinsäure, die gleich oder kleiner ist als die bekannte Nukleinsäure.

[0048] Ein Virus oder ein Vektor "transduziert" eine Zelle, wenn dadurch Nukleinsäure in die Zelle eingebracht wird. Ein Virus oder ein Vektor ist "infektiös", wenn dieses/dieser eine Zelle transduziert, repliziert und sich (ohne Unterstützung durch irgendein komplementäres Virus oder irgendeinen ergänzenden Vektor) Nachkommenvektoren oder -viren derselben Art wie das ursprünglich transduzierende Virus oder der ursprünglich transduzierende Vektor auf andere Zellen in einem Organismus oder einer Zellkultur ausbreiten, wobei die Nachkommenvektoren oder -viren die gleiche Reproduktionsfähigkeit aufweisen und sich überall in dem Organismus oder der Zellkultur verbreiten. Demzufolge ist beispielsweise eine ein FIV-Partikel codierende Nukleinsäure nicht infektiös, wenn die Nukleinsäure durch das FIV-Partikel nicht verpackt werden kann (z.B. wenn die Nukleinsäure keine FIV-Verpackungsstelle aufweist), selbst wenn die Nukleinsäure verwendet werden kann, um eine Zelle zu transfizieren und zu transformieren. Ebenso ist eine FIV-verpackbare Nukleinsäure, die durch ein FIV-Partikel verpackt ist, nicht infektiös, wenn diese das FIV-Partikel, in dem sie verpackt ist, nicht codiert, selbst wenn diese verwendet werden kann, um eine Zelle zu transformieren und zu transfizieren. Vektoren, die nicht einen kompletten Satz von viralen Verpackungskomponenten (z.B. Gag- und Env-Proteine) codieren, sind "verpackungsdefizient". Diese Vektoren sind "in trans reaktivierbar", wenn die Vektoren durch virale Proteine verpackt werden, die in trans in einer Verpackungszelle bereitgestellt werden. Wenn eine FIV-verpackbare Nukleinsäure verwendet wird, um eine mit FIV infizierte Zelle in einer Zellkultur oder einen mit FIV infizierten Organismus zu transformieren, wird die FIV-verpackbare Nukleinsäure repliziert und zusammen mit dem infizierenden FIV-Virus im gesamten Organismus verbreitet. Die FIV-verpackbare Nukleinsäure ist jedoch selbst nicht "infektiös", da die Verpackungsfunktionen durch das infektiöse FIV-Virus über eine trans-Komplementation bereit gestellt werden.

[0049] Ein "Zellüberstand" ist das Kulturmedium, in dem eine Zelle gezüchtet wird. Das Kulturmedium umfasst Zellmaterial, z.B. umfassend FIV-Viruspartikel, die aus der Zellmembran knospen und in das Kulturmedium gelangen.

AUSFÜHRLICHE DISKUSSION DER ERFINDUNG

[0050] Die Transfektion des Nicht-Primaten-Lentivirus-Klons CF1 in menschliche HeLa, 293- und 293 T-Nierenzellen mittels des Calciumphosphat-Copräzipitationsverfahrens führte zu dem überraschenden Ergebnis, dass ausgedehnte aufgeblähte Syncytien (vielkernige Riesenzellen, die durch die Verschmelzung von hüllend exprimierenden Zellen mit anderen Zellen erzeugt werden), und fünfzig bis mehrere hundert Zellkerne enthiel-

ten, und hohe Konzentrationen (über eine Million cpm) Reverse Transkriptase im Überstand auftraten. Unerwarteterweise wurden nach der transienten Transfektion von CF1 (beispielsweise durch die Transfektion von 10 µg CF1 in einen 75 cm²-Kolben) humane 293- und 293 T-Zellen und HeLa-Monolayer-Kulturen auf reproduzierbare Art und Weise zu 90% bis 95% durch Syncytien zerstört, es wurden jedoch keine infektiöse oder replikationskompetente Viren erzeugt: die Überführung von großen Volumen von CF1-transfiziertem 293 T-Zell-Überstand zu frischen 293- oder 293 T-Zellen oder zu feline Crandall-Nierenzellen führte zu keinen Syncytien oder Erzeugung von RT. CF1Δenv, der identisch zu CF1 ist, außer in Bezug auf eine Deletion der FIV-Hülle, führt zu keinen Syncytien, erzeugt jedoch hohe Konzentrationen an Reverser Transkriptase und viraler Funktionen, die für das Verpacken von Vektoren benötigt werden. Diese noch nie da gewesenen Ergebnisse führten zu der neuen Erkenntnis, dass alle Funktionen von Nicht-Primaten-Vektoren, wie FIV, die für die Proteinerzeugung benötigt werden, umfassend die Rev/RRE regulatorische Achse, die Erzeugung von FIV gag/pol und hüllenvermittelte Syncytien, in menschlichen Zellen ablaufen können, wenn der FIV-Promotor durch einen in menschlichen Zellen aktiven Promotor ausgetauscht wird.

[0051] Die vorliegende Erfindung stellt demzufolge die erstmalige Verwendung von in menschlichen Verpackungszellen verpackten Nicht-Primaten-Lentivirus-Vektoren zur Transduktion von menschlichen Zielzellen dar. Vor der vorliegenden Erfindung konnte man nicht wissen, ob diese Verpackungssysteme in menschlichen Zellen entwickelt werden können oder ob die verpackten Nicht-Primaten-Lentivirus-Vektoren verwendet werden können, um menschliche Zellen zu transduzieren oder ob die Regulator-, Prozessierungs- und Verpackungskomponenten solcher Vektoren in menschlichen Zellen aktiv sind. Es gab keine Informationen über erwünschte Anordnungen oder besondere Konstrukte, die für die erfindungsgemäßen Vektoren und Verpackungszellen besonders geeignet sind, z.B. die hierin beschriebene Anordnung und Konstruktion der FIV-basierten Vektoren und Verpackungssysteme. Die Vorteile der Vektoren umfassen die fehlende Humanpathogenität der Viren, auf denen die Vektoren und Verpackungssysteme basieren, und die Fähigkeit der Vektoren, sich nicht teilende menschliche Zellen zu transduzieren. Solche sich nicht teilende Zellen umfassen Zellen des menschlichen Nervensystems, Auges, hämatopoietischen Systems, Integuments, endokrinen Systems, Leber-Gallen-Systeme, Magen-Darm-Trakts, Urogenitaltrakts, Knochens, Muskels, kardiovaskulären Systems und respiratorischen Systems, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Alle diese Zellen werden unter Verwendung der erfindungsgemäßen Vektoren in vitro oder in vivo transduziert. Diese Vektoren verhindern auch, das Patienten nicht humanen Zellen sowie von bekannten Pathogenen abgeleiteten lentiviralen Genen oder lentiviralen Proteinen ausgesetzt werden.

[0052] Die Mechanismen des FIV-Lebenszyklus in menschlichen Zellen werden hierin beschrieben. Es wird hier das erste Mal berichtet, dass durch ein Verpackungsplasmid codierte feline Immunschwächevirus(FIV)-Proteine in hohen Konzentrationen in menschlichen Zellen auf eine replikationsdefiziente Art und Weise exprimiert werden können und FIV-verpackbare Vektoren in trans zugeführt werden können, indem die lange terminate Sequenzwiederholung des FIV-Genoms mit einem heterologen Promotor, wie dem Immediate-Early-Promotor von humanem Cytomegalovirus (CMV-Promotor), ersetzt wird. Insbesondere ermöglichte die Substitution der Promotorelemente des FIV-LTR durch einen heterologen pol II-Promotor die FIV-Protein-erzeugung in menschlichen Zellen in trans mit hohen Konzentrationen. Zusätzlich führte der selektive Austausch des FIV 5-Strich-U3-Elements durch genaues Fusionieren eines heterologen Promotors an die R-Sequenzwiederholung in menschlichen Zellen zu einer hohen Produktion von Wildtyp-FIV, das nur in feline Zellen replikationskompetent war. Ein replikationsdefizientes, env-deletiertes, vollständig durch heterologe Promotoren angetriebenes FIV-Vektorsystem aus drei Plasmiden wurde konstruiert und festgestellt, dass dieses sich teilende und sich nicht teilende menschliche Zellen mittels vesikulären Stomatitisvirus-Glykoprotein G(VSV-G)-pseudotypisierten FIV-Partikeln effizient transduziert. Feline Zellen wurden nicht bevorzugt transduziert; die relativen Transduktionseffizienzen in sich teilenden Zellen verschiedener humaner und feline Zelllinien waren dieselben wie für einen murinen Molony-Leukämievirus(M-MuLV)-basierten Vektor. Im deutlichen Gegensatz zu dem üblichen M-MuLV-Vektor transduzierten FIV-Vektoren effizient sich nicht teilende menschliche Zellen, einschließlich enddifferenzierte humane Makrophagen und Nervenzellen (hNT-Nervenzellen). Es bilden sich ausgedehnte Syncytien, wenn die FIV-Expression in menschlichen Zellen möglich ist; diese Aktivität erfordert die Expression von CXCR4/Fusin35, den Corezeptor für Syncytium-induzierende HIV-Isolate. Die Expression von humanem CXCR4 in feline CRFK-Zellen verändert den viralen Phänotyp in Richtung eines stark Syncytium-induzierenden Phänotyps und vermittelt den Eintritt des FIV-umhüllten Vektors. Die Untersuchungen zeigen, dass FIV das humane Homologe von CXCR4 verwenden kann für die Syncytienbildung in menschlichen, Nagetier- und feline Zellen und, in Übereinstimmung mit der Rolle eines Corezeptors, für den viralen Eintritt in feline Zellen.

[0053] Das feline Immunschwächevirus, das für feline Zellen, nicht jedoch für menschliche Zellen replikationskompetent ist, wird mit hohen Konzentrationen in humanen und feline Zellen hergestellt, indem ein hete-

rologer Promotor, wie der Immediate-Early-Promotor von humanem Cytomegalovirus (CMV-Promotor), mit dem FIV-Genom unmittelbar stromaufwärts der FIV R-Sequenzwiederholung wie beschrieben genau fusioniert wird. In einer Ausführungsform fügt sich die Fusion genau an die TATA-Box (die TATA-Box des CMV-Promotors wird verwendet; die FIV-Sequenzen beginnen an der SacI-Stelle unmittelbar stromabwärts der TATA-Box). Einzelheiten dieser Fusion, welche die räumliche Anordnung der TATA-Box zur mRNA-Transkriptionsstartstelle beibehält, sind in den Beispielen dargestellt.

[0054] Die FIV-abgeleiteten retroviralen Vektoren werden wahlweise von derselben heterologen Fusion des Promotors und der R-Sequenzwiederholung in hohen Konzentrationen exprimiert, bei der das 5-Strich-U3-Element des FIV-Vektors auf präzise Art und Weise durch einen heterologen Promotor ausgetauscht wurde. Diese FIV-Vektoren können mit hohem Titer auf eine replikationsdefiziente Art und Weise über heterologe Hüllen nicht-felinen Säugetierzellen zugeführt werden, einschließlich sowohl sich teilende als auch Wachstum-arretierte menschlichen Zellen, was das Pseudotypisieren durch das Hüllglykoprotein G des vesikulären Stomatitisvirus (VSV-G) umfasst, jedoch nicht darauf beschränkt ist; dies ist der erste Beweis des Transports von Genen in menschliche Zellen unter Verwendung eines Nicht-Primaten-Lentivirus.

[0055] Die gleichzeitige Herstellung von FIV-Proteinen und FIV-Vektoren führte zu replikationsdefizienten lentiviralen Vektoren mit hohem Titer, welche Gene menschlichen Zellen als auch felinen Zellen zuführen können. Es wurden FIV-Vektortiter erreicht, welche 10^7 pro ml auf menschlichen Zellen überschritten und höhere Titer wurden durch Verbesserungen und Aufkonzentrierung unter Verwendung von verfügbaren Verfahren erreicht. Die Erfindung findet folglich direkte Anwendung auf die humane Gentherapie. Andere Promotoren, die in menschlichen Zellen aktiv sind, können in einigen Ausführungsformen ebenfalls verwendet werden.

[0056] Die Erfindung bringt mehrere Sicherheitsvorteile mit sich. Ein wichtiger Sicherheitsvorteil dieser Erfindung stellt die Herstellung des replikationsdefizienten Vektors alleine in menschlichen Zellen dar. Der native FIV-Promotor (LTR) ist in menschlichen Zellen inaktiv oder minimal aktiv. Der hier verwendete hCMVIE-Promotor erlaubt eine stärkere Expression als der FIV-LTR in felinen als auch menschlichen Zellen. Während der natürliche FIV-LTR in felinen Herstellungszellen verwendet wird, um die Expression anzutreiben (analog zu der Verwendung des murinen Molony-Leukämie(MoMLV)-Virus-Promotors in MoMLV-basierten Systemen) stellt eine solche Verwendung unterschiedliche Sicherheitsprobleme dar, die vorzugsweise vermieden werden. Feline Zellen können ein replikationskompetentes endogenes Retrovirus vom Typ C (RD114) enthalten, das sich in humanen Zellen repliziert. Feline Zellen, die wissenschaftlich weniger genau untersucht wurden als humane Zellen, können auch andere unbekannte infektiöse Agenzien, die potentiell pathogen sind, enthalten. RD114 wurde ursprünglich aus humanen Rhabdomyosarkom-Zellen isoliert, die in fötalen Kätzchen passagiert wurden; replikationskompetentes RD114 wurde auch durch gleichzeitiges Kultivieren mit menschlichen und anderen, nicht-felinen Zellen aus kultivierten felinen Zelllinien isoliert. Zusätzlich ist das RD114 auf der Ebene der Nukleotidsequenz auffallend mit einem Primaten-Retrovirus (endogener Pavianvirus oder BaEV) verwandt; diese Tatsache, zusätzlich zu der gezeigten Replikationskompetenz in menschlichen Zelllinien, weist auf das eindeutige Potenzial für die artübergreifende Übertragung auf Menschen hin. Die Übertragungsgefahr von endogenen Retroviren wie RD114 oder anderen Viren auf Menschen durch die Xenotransplantation oder dem Kontakt mit biologischen Materialien, die von tierischen Zellen oder tierischen Geweben abstammen, hat vor kurzem große Bedenken hervorgerufen. Es wurde beispielsweise jetzt gezeigt, dass Schweinezellen einen endogenen Retrovirus beherbergen, der sich in menschlichen Zellen auf ähnliche Weise wie RD114 replizieren kann; diese Entdeckung führte nun bei Fachleuten auf dem Gebiet zu ernsthaften Zweifeln an der Xenotransplantation von tierischen Organen in Menschen oder der Verwendung von auf Tiere zurückzuführenden biologischen Stoffen für therapeutische Zwecke, die nicht sterilisierbar sind. Deshalb wäre das Aussetzen von Menschen gegenüber von felinen Zelllinien abgeleiteten Vektoren, die viel weniger gut charakterisiert sind als menschliche oder Nagetierzelllinien, problematisch. Der chimäre Aufbau der hierin beschriebenen Vektoren erlaubt die Produktion alleine in gut definierten humanen Herstellungszelllinien, wie 293T-Zellen. Der Sicherheitsvorteil besteht darin, dass der Kontakt mit felinen Zellen oder Geweben in allen Herstellungsphasen vermieden wird. Demzufolge ist es für Anwendungen, welche das Einführen von Zellen oder Vektoren in Patienten umfassen, bevorzugt, Vektoren zu verwenden, die in humanen Verpackungszellen verpackt wurden.

[0057] In allen Ausführungsformen stellt das System auch einen signifikanten Sicherheitsvorteil gegenüber HIV-basierten lentiviralen Vektoren dar, da wie oben erwähnt FIV weder auf Menschen übertragbar noch für den Menschen pathogen ist. Diese Erfindung beruht daher auf der gut belegten Tatsache, dass es keine Anzeichen für die Pathogenität von FIV in Menschen gibt. Die praktische Anwendbarkeit dieser Erfindung wird auch durch die Tatsache begünstigt, dass das Fehlen eines Tropismus oder Pathogenität in Menschen für FIV besser nachgewiesen ist als für irgendeinen anderen Nicht-Primaten-Lentivirus (diese umfassen Visna/Maedi, CAEV, EIAV und BIV), da viele tausend Menschen im Jahr denselben Übertragungswegen, durch die FIV so-

wohl unter wildlebenden als auch domestizierten Katzen überwiegend übertragen wird, d.h. Katzenbissen, ausgesetzt sind.

[0058] Alle Lentiviren werden ausschließlich durch den Austausch von Körperflüssigkeiten übertragen. HIV wird überwiegend sexuell übertragen; es gibt kaum Beweise, dass FIV in der Natur sexuell übertragen wird; vielmehr stellen Katzenbisse – welchen auch Menschen häufig ausgesetzt sind – den Hauptmechanismus dar. Bisswunden sind unter Katzen häufig, da diese Tiere ein Territorial-Verhalten zeigen und insbesondere die Männchen häufig Kämpfe über ihr Territorium und ihre Dominanzstellung austragen; die FIV-Infektion ist demzufolge unter männlichen Katzen häufiger als bei weiblichen Katzen.

[0059] Es gibt zusammengefasst keine Anzeichen für eine FIV-Infektion bei Nicht-Katzen: dieser eingeschränkte Tropismus ist für alle bekannten Lentiviren kennzeichnend. Die natürliche Hauptverbreitungsart von FIV unter Katzen stellt das Beißen dar und diese wohl effiziente Inokulationsweise führt trotz dem häufigen Kontakt von Menschen mit FIV aufgrund von Katzenbissen nicht zu einer menschlichen Serokonversion oder irgendeinem anderen nachweisbaren Anzeichen einer humanen Infektion. Unter den Nicht-Primaten-Lentiviren sind daher die epidemiologischen Anzeichen gegen die Humanpathogenität von FIV sehr überzeugend.

[0060] Da mit FIV routinemäßig unter der biologischen Sicherheitsstufe 2 (BL-2) gearbeitet wird, kann mit den Vektoren routinemäßig in BL-2-Anlagen gearbeitet werden, sind die Risiken, die sich für das Personal ergibt, das mit deren Entwicklung und Herstellung befasst ist, verglichen mit HIV-Vektoren verringert, und ist die Herstellung einfacher.

[0061] Zusätzlich zu den Sicherheitsvorteilen, die der Verwendung eines Nicht-Primaten-Lentivirus für den zellulären Gentransfer und für die Gentherapie innewohnen, weist ein bevorzugtes hierin beschriebenes System eines molekularen FIV-Klons (34TF10) einen Defekt in einem wichtigen FIV-Gen (ORF2) auf und ist demzufolge ein attenuiertes Virus. 34TF10 repliziert in adhärennten Katzenszelllinien, nicht jedoch in Lymphozyten; die Replikationsfähigkeit in felines Lymphozyten wurde zu ORF2 kartiert. Zusätzlich weist das ORF2-minus Virus einen Tropismus für Nervenzellen auf. Der ORF2 kann repariert werden, falls dies für den Transport in bestimmte Zelltypen notwendig ist. Zusätzlich werden in anderen Ausführungsformen andere Stämme oder molekulare Klone von FIV auf ähnliche Art und Weise verwendet, da die vorliegende Erfindung deren Anpassungsfähigkeit im Hinblick auf die Transduktion von menschlichen Zellen deutlich macht.

[0062] Obwohl eine chimäre Konstruktion, bei welcher der heterologe Promotor mit FIV-Sequenzen fusioniert ist, in einem hierin beschriebenen Beispiel verwendet wurde, werden nur FIV-Sequenzen transkribiert (d.h. nur FIV-Promotorsequenzen erscheinen in der durch das System erzeugten mRNA; die heterologen Promotorsequenzen werden nicht transkribiert), da sich die Fusion an der Transkriptionsstartstelle befindet. Die Möglichkeit eines replikationskompetenten chimären Virus, der durch Rekombination auf RNA-Ebene entsteht, ist dadurch verringert.

[0063] Außerdem ist es nun klar, dass andere Nicht-Primaten-Lentiviren, insbesondere Huftier-Lentiviren, auf ähnliche Art und Weise verwendet werden können, da für dieses Lentivirus, das phylogenetisch weit entfernt verwandt mit HIV ist, in der vorliegenden Erfindung nun gezeigt wurde, dass dieses für die Transduktion von menschlichen Zellen anpassbar ist. Indem die Expression des Verpackungsplasmids, des Vektors und des Hüllexpressionsplasmids vom selben humanen Promotor erfolgt, wird die gleichzeitige (d.h. zeitlich koordinierte) Proteinexpression erleichtert.

Herstellung von Verpackungsplasmiden und verpackbaren Nukleinsäuren

[0064] Die vorliegende Erfindung stellt eine Vielzahl von oben beschriebenen Verpackungsplasmiden und verpackbaren Nukleinsäuren bereit. Die Verpackungsplasmide umfassen von Nicht-Primaten-Lentivirus abgeleitete Nukleinsäuren, insbesondere diejenigen, die sich von FIV ableiten. Verpackbare Nukleinsäurevektoren codieren RNAs, die eine FIV-Verpackungsstelle und gegebenenfalls andere Nicht-Primaten-Lentivirus-Nukleinsäuren oder heterologe Nukleinsäuren umfassen.

[0065] Die erfindungsgemäßen verpackbaren Vektoren und Verpackungsplasmide stammen von lentiviralen Klone. Dem Fachmann sind viele solche Klone bekannt und öffentlich zugänglich. Gängige Hinterlegungsstellen für Sequenzinformationen umfassen Gen-Bank, EMBL, DDBJ und das NCBI. Gut charakterisierte HIV-Klone umfassen: HIV-1_{NL43}, HIV-1_{SF2}, HIV-1_{BRU}, HIV-1_{MN}.

[0066] Ferner können Virusklone unter Verwendung von bekannten Verfahren aus Wildtypviren isoliert wer-

den. Typischerweise wird ein Lamda-Phagen-Klon, der ein lentivirales Vollängen-Provirus enthält, von der genomischen DNA einer Zelllinie erhalten, die mit einem aus mononukleären Zellen des peripheren Bluts eines seropositiven Tieres erhaltenen viralen Stammes infiziert wurde. Das Virus ist in vitro replikationskompetent und erzeugt nach der direkten Transfektion in Zielzellen des Organismus (z.B. CD4⁺-Zellen) infektiöse Nachkommenvirionen. Im Allgemeinen kann ein gesamtes virulentes Genom verwendet werden, um ein Verpackungsplasmid herzustellen. Ein „Vollängen-FIV-Genom“ in Bezug auf einen FIV-Verpackungsvektor besteht aus einer durch ein FIV-Virus oder einen viralen Klon (z.B. einen DNA-Phagen) codierten Nukleinsäure (RNA oder DNA), welche die 5'- oder 3'-LTR-Bereiche oder die Gene zwischen den LTR-Bereichen, die in einem entsprechenden typischen Virus vorhanden sind, umfasst. Für FIV umfassen diese Gene: gag-pol, env und orf-2, wobei es insbesondere in env mehrere nicht charakterisierte Leseraster gibt.

[0067] Ein Verpackungsplasmid wird hergestellt, indem die Verpackungsstelle eines Vollängen-Genoms deletiert wird, wodurch der Klon virale Proteine herstellen kann, jedoch nicht in der Lage ist, virale RNAs selbst zu verpacken. Die RNA-Sekundärstruktur der FIV-Verpackungsstelle umfasst wahrscheinlich den Bereich zwischen MSD und gag-pol; zusätzlich können andere Bereiche für das richtige Verpacken wichtig sein. Die genaue Art der Verpackungsstelle kann festgestellt werden, indem eine Deletionsanalyse durchgeführt wird.

[0068] In Verpackungsplasmiden ist vorzugsweise die gesamte psi-Stelle (Verpackungsstelle) deletiert, es ist jedoch irgendeine Mutation oder Deletion, welche die Stelle ausreichend deletiert oder mutiert, so dass das Verpacken verhindert ist, ausreichend. Dies führt üblicherweise zu einer beträchtlichen Deletion im Bereich zwischen der Hauptspleisstelle („MSD“) und dem Beginn des gag-Gens und kann auch andere Bereiche umfassen. Die Deletion von Promotorelementen, welche die virale Expression der codierten viralen Proteine kontrolliert, ist ebenfalls wünschenswert, wie auch die Inkorporation von heterologen Promotoren, insbesondere humanen Promotoren (d.h. in menschlichen Zellen aktive Promotoren, die üblicherweise, jedoch nicht zwangsläufig, menschlichen Ursprungs sind, oder von einem humanen Pathogen, wie einem in einem Menschen aktiven Virus, abgeleitet sind).

[0069] Die resultierenden erfindungsgemäßen Verpackungsplasmide werden verwendet, um Viruspartikel herzustellen, in dem der Deletionsklon in eine Verpackungszelle (üblicherweise eine humane Zelle, wie eine 293-Zelle oder eine andere gut charakterisierte Zelle, die keine unerwünschten Komponenten umfasst) transduziert und das Plasmid exprimiert wird. Da die Plasmide keine lentivirale Verpackungsstelle aufweisen, werden diese nicht in Viruspartikel verpackt.

[0070] Um die Sicherheit der transduzierten Verpackungszellen zu erhöhen ist es bevorzugt, das Verpackungsplasmid (oder homologe Klone) in mehrere Verpackungsplasmide mit komplementären Funktionen zu trennen (z.B. durch Subklonieren). Dies verringert die Wahrscheinlichkeit, dass ein Rekombinationsereignis zu einem infektiösen Partikel führt.

[0071] Die verpackbaren Nukleinsäuren codieren eine RNA, die in ein FIV-Partikel verpackt werden kann. Solche Nukleinsäuren können konstruiert werden, indem eine FIV-Verpackungsstelle mit einer beliebigen Nukleinsäure rekombinant kombiniert wird. Die Verpackungsstelle (psi-Stelle) befindet sich benachbart zu dem 5'-LTR, vor allem zwischen der MSD-Stelle und dem gag-Initiationscodon (AUG) in der Leadersequenz des gag-Gens. Somit umfasst die minimale Verpackungsstelle einen Großteil der Nukleinsäure zwischen dem MSD und dem gag-Initiationscodon des maßgeblichen Lentivirus. Vorzugsweise umfasst eine vollständige Verpackungsstelle für eine maximale Verpackungseffizienz Sequenzen von dem 5'-LTR und der 5'-Region des gag-Gens. Diese Verpackungssequenzen umfassen üblicherweise einen Teil des gag-Gens, der sich z.B. über etwa 100 Basen in die codierende Region von gag oder weiter und etwa 100 Basen in den FIV 5'-LTR oder weiter erstreckt. Außerdem umfasst die Verpackungsstelle gegebenenfalls Sequenzen des env-Gens, insbesondere das RRE.

[0072] Mit dieser Strategie zur Herstellung von erfindungsgemäßen Verpackungsplasmiden und verpackbare Zielvektornukleinsäuren kann der Fachmann eine Vielzahl von Klonen konstruieren, die funktionell gleichwertige Nukleinsäuren enthalten. Klonierungsverfahren, um diese Ziele zu erreichen und Sequenzierungsverfahren, um die Sequenz der Nukleinsäuren zu überprüfen, sind im Stand der Technik gut bekannt. Beispiele für geeignete Klonierungs- und Sequenzierungsverfahren und ausreichende Anweisungen, um einen Fachmann durch viele Klonierungsanwendungen zu führen, finden sich in Berger und Kimmel, Guide to Molecular Cloning Techniques, Methods in Enzymology Band 152 Academic Press, Inc, San Diego, CA (Berger); Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning – A Laboratory Manual (2. Ausgabe) Band 1–3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, NY, (Sambrook); und Current Protocols in Molecular Biology, F. M. Ausubel et al., Herausgeber, Current Protocols, ein gemeinsames Unternehmen von Greene Publishing Associates, Inc. und

John Wiley & Sons, Inc., (1994 Ergänzungsband) (Ausubel). Produktinformationen von Herstellern von biologischen Reagenzien und Versuchsgeräten stellen ebenfalls Informationen bereit, die in bekannten biologischen Verfahren nützlich sind. Solche Hersteller umfassen das Chemieunternehmen SIGMA (Saint Louis, MO), R&D systems (Minneapolis, MN), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, NJ), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, CA), Chem Genes Corp., das Chemieunternehmen Aldrich (Milwaukee, WI), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, MD), Fluka Chemika-Biochemika-Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz), Invitrogen (San Diego, CA), und Applied Biosystems (Foster City, CA) und viele andere einem Fachmann bekannte kommerzielle Quellen.

[0073] Die erfindungsgemäßen Nukleinsäurezusammensetzungen, unabhängig davon, ob es sich um RNA, cDNA, genomische DNA, oder eine Mischung der zahlreichen Kombinationen handelt, werden aus biologischen Quellen isoliert oder in vitro synthetisiert. Die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren liegen in transformierten oder transfizierten ganzen Zellen, in transformierten oder transfizierten Zelllysaten oder in einer teilweise gereinigten oder in einer im Wesentlichen reinen Form vor.

[0074] Es sind in vitro-Amplifikationsverfahren bekannt, die zum Amplifizieren von als molekulare Sonden verwendeten Sequenzen, oder zum Erzeugen von Nukleinsäurefragmenten für das nachfolgende Subklonieren geeignet sind. Beispiele für Verfahren, die ausreichend sind, um einen Fachmann durch solche in vitro-Amplifikationsverfahren, einschließlich der Polymerase-Kettenreaktion (PCR), der Ligase-Kettenreaktion (LCR), der Q β -Replikase-Amplifikation und andere, durch die RNA-Polymerase vermittelte Verfahren (z.B. NASBA) zu führen, finden sich in Berger, Sambrook und Ausubel als auch in Mullis et al., (1987) U.S. Patent Nr. 4,683,202; PCR Protocols A Guide to Methods and Applications (Innis et al., Herausgeber) Academic Press Inc. San Diego, CA (1990) (Innis); Arnheim & Levinson (1. Oktober 1990) C&EN 36–47, The Journal of NIH Research (1991) 3, 81–94; (Kwoh et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173; Guatelli et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 1874; Lomell et al. (1989) J. Clin. Chem. 35, 1826; Landegren et al., (1988) Science 241, 1077–1080; Van Brunt (1990) Biotechnology 8, 291–294; Wu und Wallace, (1989) Gene 4, 560; Barringer et al. (1990) Gene 89, 117, und Sooknanan und Malek (1995) Biotechnology 13: 563–564. Verbesserte Verfahren zum Klonieren von in vitro amplifizierten Nukleinsäuren sind in Wallace et al., U.S. Patent Nr. 5,426,039 beschrieben.

[0075] Als Sonden verwendete Oligonucleotide, z.B. in in vitro Amplifikationsverfahren, für die Verwendung als Gensonden oder als Inhibitorbestandteile (z.B. Ribozyme), werden üblicherweise gemäß dem von Beaucage und Caruthers (1981), Tetrahedron Letts., 22 (20): 1859–1862 beschriebenen Festphasen-Phosphoramiditriester-Verfahren chemisch synthetisiert, beispielsweise unter Verwendung eines wie in Needham-VanDevanter et al. (1984) Nucleic Acids Res., 12: 6159–6168 beschriebenen automatisierten Synthesegeräts. Oligonucleotide können auch auf Bestellung hergestellt werden und bei einer Vielzahl von einem Fachmann bekannten kommerziellen Quellen bestellt werden. Die Reinigung von Oligonucleotiden, falls notwendig, erfolgt üblicherweise entweder durch native Acrylamidgelelektrophorese oder durch Anionenaustausch-HPLC, wie in Pearson und Regnier (1983) J. Chrom. 255: 137–149 beschrieben. Die Sequenz des synthetischen Oligonucleotids kann unter Verwendung des chemischen Abbauprozesses nach Maxam und Gilbert (1980) in Grossman und Moldave (Herausgeber) Academic Press, New York, Methods in Enzymology 65: 499–560 nachgeprüft werden.

Erzeugung von konservativen Substitutionen

[0076] Ein Fachmann weiss, dass viele konservative Variationen der offenbaren Nukleinsäurekonstrukte ein funktionell identisches Konstrukt liefern. Beispielsweise sind „stille Substitutionen“ (d.h. Substitutionen einer Nukleinsäuresequenz, die zu keiner Veränderung in einem codierten Polypeptid führen) auf Grund der Degeneriertheit des genetischen Codes ein in jeder eine Aminosäure codierenden Nukleinsäuresequenz implizit enthaltenes Merkmal. Ebenso werden „konservative Aminosäuresubstitutionen“, bei denen eine oder einige Aminosäuren in einer Aminosäuresequenz eines Verpackungskonstrukts oder verpackbaren Konstrukts durch unterschiedliche Aminosäuren mit hochgradig ähnlichen Eigenschaften ausgetauscht sind (siehe den obigen Definitionsabschnitt), ebenfalls ohne weiteres als hochgradig ähnlich zu einem offenbaren Konstrukt erkannt. Solche konservativ substituierte Variationen jeder explizit offenbaren Sequenz stellt eine Besonderheit der vorliegenden Erfindung dar.

[0077] Ein Fachmann kennt viele Wege zur Erzeugung von Veränderungen in einem bestimmten Nukleinsäurekonstrukt. Solche gut bekannten Verfahren umfassen die ortsspezifische Mutagenese, die PCR-Amplifikation unter Verwendung von degenerierten Oligonucleotiden, das Aussetzen von Nukleinsäure enthaltenden Zellen gegenüber mutagenen Agenzien oder Strahlung, die chemische Synthese eines gewünschten Oligonucle-

otids (z.B. zusammen mit Ligieren und/oder Klonieren, um große Nukleinsäuren herzustellen) und andere gut bekannte Verfahren (siehe Gilman und Smith (1979) *Gene* 8: 81–97, Roberts et al. (1987) *Nature* 328: 731–734 und Sambrook, Innis, Ausubel, Berger, Needham, VanDevanter und Mullis (alle oben erwähnt).

[0078] Ein Fachmann kann eine gewünschte erfindungsgemäße Nukleinsäure ausgehend von den bereitgestellten Sequenzen und dem allgemeinen Fachwissen bezüglich Retroviren auswählen. Die spezifischen Wirkungen vieler Mutationen in retroviralen Genomen sind bekannt. Überdies ermöglicht das allgemeine Wissen bezüglich der Natur von Proteinen und Nukleinsäuren einem Fachmann, geeignete Sequenzen auszuwählen, die eine Aktivität aufweisen, die ähnlich oder identisch zu den Nukleinsäuren und Polypeptiden, die in den Sequenzprotokollen hierin offenbart sind, ist. Der Definitionsabschnitt hierin beschreibt beispielhafte konservative Aminosäuresubstitutionen.

[0079] Schließlich werden die meisten Nukleinsäureveränderungen durch Routine-Screeningverfahren in geeigneten Assays auf die gewünschte Eigenschaft untersucht. Beispielsweise können Veränderungen der immunologischen Eigenschaft des codierten Polypeptids durch einen geeigneten immunologischen Assay nachgewiesen werden. Veränderungen anderer Eigenschaften, wie die Hybridisierung einer Nukleinsäure an eine komplementäre Nukleinsäure, die Redox- oder thermische Stabilität von codierten Proteinen, die Hydrophobizität, die Proteolyseempfindlichkeit oder die Aggregationsneigung, werden alle gemäß Standardverfahren untersucht.

Herstellung von stabilen Verpackungszelllinien

[0080] Stabile Verpackungszelllinien werden hergestellt, indem eine Säugerzelle stabil oder transient mit einem Verpackungsplasmid transduziert wird, besonders bevorzugt, indem eine menschlichen Zelle transduziert wird. Die Transduktion von Säugerzellen (einschließlich menschlichen Zellen) ist im Stand der Technik bekannt. Die Wirtszellen sind kompetent oder wurden auf verschiedene bekannte Arten kompetent gemacht für die Transformation. Es gibt mehrere gut bekannte Verfahren zum Einführen von DNA in Tierzellen. Diese umfassen: Calciumphosphatpräzipitation, Fusion der Empfängerzelle mit bakteriellen Protoplasten, welche die DNA enthalten, Behandlung der Empfängerzellen mit Liposomen, welche die DNA enthalten, DEAE-Dextran, Rezeptor-vermittelte Endocytose, Elektroporation und Mikroinjektion der DNA direkt in die Zellen.

[0081] Die Zellkultur, die in Verbindung mit der vorliegenden Erfindung verwendet wird, umfassend Zelllinien und kultivierte Zellen von Gewebe- oder Blutproben, ist im Stand der Technik gut bekannt. Freshney (*Culture of Animal Cells, a Manual of Basic Technique*, 3. Ausgabe, Wiley-Liss, New York (1994)) und die darin zitierten Literaturstellen stellen eine allgemeine Anleitung bezüglich Zellkulturen dar. Die transformierten Zellen werden durch im Stand der Technik gut bekannte Mittel kultiviert (siehe auch Kuchler et al. (1977) *Biochemical Methods in Cell Culture and Virology*, Kuchler, R. J., Dowden, Hutchinson und Ross, Inc.). Säugetier-Zellsysteme liegen oft in Form von Monolayerschichten vor, obwohl Säugerzellsuspensionen auch verwendet werden. Anschauungsbeispiele für Säugerzelllinien umfassen VERO- und HeLa-Zellen, embryonale 293-Nierenzellen, Zelllinien aus Eierstockzellen des chinesischen Hamsters (engl. chinese hamster ovary (CHO)-cell lines), W138-, BHK-, Cos-7- oder MDCK-Zelllinien (siehe beispielsweise Freshney, supra). Am meisten bevorzugt sind menschliche Zellen.

[0082] Überstände der Zellkulturen der erfindungsgemäßen Verpackungszellen werden unter Verwendung von Standardverfahren, wie die in Freshney, supra, beschrieben, erhalten (siehe auch Corbeau et al. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14070–14075 und die darin angegebenen Literaturstellen). Die Komponenten der Zellüberstände können unter Verwendung von Standardverfahren weiter gereinigt werden. Beispielsweise können in dem Überstand enthaltene FIV-Partikel von dem Überstand durch Verfahren, die üblicherweise zur Virusreinigung verwendet werden, wie Zentrifugation, Chromatographie, Affinitätsreinigungsverfahren und dergleichen, gereinigt werden.

[0083] Das Transformieren von Säugerzellen mit Nukleinsäuren kann beispielsweise das Inkubieren von kompetenten Zellen mit einem Plasmid, das Nukleinsäuren enthält, welche für ein FIV-Partikel codiert, umfassen. Das Plasmid, das verwendet wird, um die Wirtszelle zu transformieren, enthält vorzugsweise Nukleinsäuresequenzen, um die Transkription in Gang zu bringen, und Sequenzen, um die Translation der codierten Sequenzen zu kontrollieren. Diese Sequenzen werden im Allgemeinen als Expressionskontrollsequenzen (bzw. Expressionsregulierungssequenzen) bezeichnet. Beispielhafte Säugerexpressionskontrollsequenzen werden von dem SV 40-Promotor (*Science* (1983) 222: 524–527), dem CMV I. E. Promotor (*Proc. Natl. Acad. Sci.* (1984) 81: 659–663), dem CMV Promotor, oder dem Metallothionein-Promotor (*Nature* (1982) 296: 39–42) erhalten. Ein Klonierungsvektor, der die Expressionskontrollsequenzen enthält, wird unter Verwendung von Re-

striktionsenzymen geschnitten und die Größe wie erforderlich oder erwünscht angepasst und mit DNA, die für die HIV-Sequenzen von Interesse codieren unter Verwendung von im Stand der Technik gut bekannten Mitteln ligiert. Eine grosse Vielfalt von in menschlichen Zellen aktiven spezifischen pol II- und pol III-Promotoren sind im Stand der Technik bekannt und ein Fachmann kann solche Promotoren aufgrund des gewünschten Expressionsgrades, des gewünschten Expressionsmusters, der transformierten Zelle oder dergleichen auswählen und verwenden.

[0084] In die erfindungsgemäßen Vektoren werden üblicherweise Polyadenylierungs- oder Transkriptionsterminatorsequenzen von bekannten Säugergenen inkorporiert. Ein Beispiel einer Terminatorsequenz ist die Polyadenylierungssequenz des bovinen Wachstumshormogens. Sequenzen für das genaue Spleissen des Transkripts können auch enthalten sein. Ein Beispiel einer Spleissequenz ist das VP1-Intron von SV40 (Sprague et al. (1983) *J. Virol.* 45: 773–781). Außerdem werden Gensequenzen, um die Replikation in einer speziellen Wirtszelle zu kontrollieren, wie diejenigen, die in bovinen Papillomavirus-artigen Vektoren gefunden werden (siehe Saveria-Campo (1985), „Bovine Papilloma virus DNA a Eukaryotic Cloning Vector“ in *DNA Cloning Band II a Practical Approach* Glover (Herausgeber) IRL Press, Arlington, Virginia Seiten 213–238), in den Vektor inkorporiert.

[0085] In den Selektionsverfahren können Coplasmide verwendet werden. In diesem Verfahren wird ein Plasmid, das einen selektierbaren Marker, wie ein Antibiotika-Resistenzgen enthält, verwendet, um eine Zelle zusammen mit einem Plasmid, das HIV-Verpackungsnukleinsäuren codiert, zu transfizieren. Die Zellen werden auf ihre Antibiotikaresistenz selektiert und die Anwesenheit des Plasmides von Interesse wird durch Southern-Analyse, Northern-Analyse oder PCR bestätigt. Coplasmide, die auf der Oberfläche eines HIV-Partikels zu exprimierende Proteine codieren (z.B. Proteine, welche den Wirtsbereich des Capsids erweitern, wie die FSV-Hülle, einen Zellrezeptorliganden oder ein Antikörper gegen einen Zellrezeptor) werden wahlweise in die Verpackungszelle transduziert. Zusätzlich zu VSV werden die Hüllproteine von anderen Lipid-umhüllten Viren wahlweise in ein erfindungsgemäßes Partikel inkorporiert, wodurch der Transduktionsbereich des Partikels erweitert wird.

[0086] Nukleinsäuren enthaltende, virale Vektoren, die ausgewählte Sequenzen codieren, werden ebenfalls verwendet, um Zellen zu transformieren, die innerhalb des Wirtsbereichs des Vektors liegen (siehe z.B. *Methods in Enzymology*, Band 185, Academic Press, Inc., San Diego, CA (D. V. Goeddel, Herausgeber) (1990) oder M. Krieger, *Gene Transfer and Expression – A Laboratory Manual*, Stockton Press, New York, NY (1990) und die darin zitierten Literaturstellen).

[0087] Nachdem stabil transformierte Zelllinien hergestellt wurden, welche FIV-Partikel exprimieren, werden die transformierten Zelllinien mit Vektoren, welche die in die FIV-Vektoren zu inkorporierenden Nukleinsäuren codieren, transfiziert. Üblicherweise sind diese Vektoren Plasmide oder sind in viralen Vektoren codiert. Die verpackten Nukleinsäuren umfassen eine FIV-Verpackungsstelle-Subsequenz zusammen mit einer Sequenz von Interesse, wie ein virales Inhibitor- oder anderes Genthapeutikum (dies ist so zu verstehen, dass jeder Zustand, der durch sich nicht teilende Zellen oder deren Nachkommen vermittelt ist, umfassend HIV-Infektionen, HTLV-Infektionen, Lymphome, Leukämien, Nerventumoren und dergleichen, behandelbar sind).

[0088] Menschliche Zellen sind bevorzugte Verpackungszelllinien und können durch die oben beschriebenen Verfahren kompetent für die Transformation gemacht werden. Beispielsweise wurden, wie in den Beispielen beschrieben, FIV-Zellen durch das Calciumphosphat-Verfahren transfiziert, um eine stabile FIV-Verpackungszelllinie zu erzeugen. Eine subkonfluente Kultur, z.B. in einer 6-Well-Platte (Costar, Cambridge, MA) wird mit einem linearisierten und Calciumphosphat-präzipitierten Plasmid (10 µg), z.B. in mit 10% FCS, Antibiotika und Glutamin ergänztem Dulbecco's modifiziertem Eagle's-Medium (DMEM-10% FCS), gegebenenfalls mit einem Coplasmid als Marken transfiziert. Nach 18 h werden die Wells mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter Salzlösung (PBS) pH 7,8 gewaschen, für 2 min bei 20°C in 15%-iger Glycerinlösung in HEPES-gepufferter Salzlösung (50 mM HEPES, pH 7,1, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na₂HPO₄) inkubiert, zweimal mit PBS gewaschen und in DMEM-10%FCS kultiviert. Die Zellen wurden auf eine für ein Transduktionsmarkergen geeignete Art und Weise selektiert.

Nachweis von Verpackungsplasmiden, verpackbaren Nukleinsäuren und FIV-Partikeln in Verpackungszelllinien, Zielzellen und Zelllysaten

[0089] Eine große Vielzahl von Ausführungen und Markierungen sind verfügbar und geeignet zum Nachweis von Verpackungsplasmiden, verpackbaren Nukleinsäuren und Lentiviruspartikeln in Verpackungszellen, Zielzellen, Patienten und Zelllysaten. Antikörper gegen lentivirale Komponenten und die Polypeptide und Nuklein-

säuren der Erfindung (Vektoren, Verpackungsplasmide, codierte Nukleinsäuren und Polypeptide, etc.) werden nachgewiesen und mittels irgendeines der zahlreichen Mittel, die dem Fachmann bekannt sind, quantifiziert. Diese Mittel umfassen analytische biochemische Verfahren, wie Spektrophotometrie, Radiographie, Elektrophorese, Kapillarelektrophorese, hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatographie (TLC), Hyperdiffusionschromatographie und dergleichen und verschiedene immunologische Verfahren, wie Flüssig- oder Gelpräzipitationsreaktionen, Immundiffusion (einfach oder doppelt), Immunelektrophorese, Radioimmunoassays (RIAs), Enzyme-linked Immunosorbentassays (ELISAs), Immunfluoreszenzassays und dergleichen. Es sind mehrere ELISA-Assays für den Nachweis von Lentiviruskomponenten (z.B. FIV) verfügbar, die es einem Fachmann ermöglichen, Nicht-Primaten-Lentiviruspartikel oder einen Nicht-Primaten-Lentivirus in einer biologischen Probe nachzuweisen.

[0090] Der Nachweis von Nukleinsäuren erfolgt mittels gut bekannter Verfahren, wie Southern-Analyse, Northern-Analyse, Gelelektrophorese, PCR, Radiomarkieren und Scintillationszählen und Affinitätschromatographie. Viele Untersuchungsformate sind geeignet, umfassend diejenigen, die zusammengefasst sind in Tijssen (1993) *Laboratory Techniques in biochemistry and molecular biology-hybridization with nucleic acid probes* Teile I und II, Elsevier, New York, und Choo (Herausgeber) (1994) *Methods in Molecular Biology* Band 33 – *In Situ Hybridization Protocols* Humana Press Inc., New Jersey (siehe auch andere Bücher aus der Reihe *Methods in Molecular Biology*); siehe insbesondere Kapitel 21 von Choo (a.a.O.) „Detection of Virus Nucleic Acids by Radioactive and Nonisotopic *In Situ* Hybridization“. Eine Vielzahl von automatisierten Festphasennachweisverfahren sind ebenfalls geeignet. Beispielsweise werden sehr groß angelegte immobilisierte Polymer-Arrays (VLSIPS™) für den Nachweis von Nukleinsäuren verwendet (siehe Tijssen (supra), Fodor et al. (1991) *Science*, 251: 767–777 und Sheldon et al. (1993) *Clinical Chemistry* 39 (4): 718–719). Schließlich wird auch PCR routinemäßig verwendet, um Nukleinsäuren in biologischen Proben nachzuweisen (siehe Innis, supra, für eine allgemeine Beschreibung von PCR-Verfahren).

[0091] In einer bevorzugten Ausführungsform werden Antikörper verwendet, um durch den verpackten Vektor exprimierte Proteine und Verpackungsnukleinsäure nachzuweisen oder die Konzentrationen von zirkulierendem HIV, HTLV (oder von einem anderen relevanten Pathogen) in menschlichem Blut zu überwachen, z.B. um die *in vivo*-Wirkung eines durch die FIV-verpackten Nukleinsäuren codierten Genterapeutikums zu überwachen. In einer anderen Ausführungsform werden Antikörper zur Inkorporation in Viruspartikel in den Verpackungszellen coexprimiert. Verfahren zur Herstellung von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern sind dem Fachmann bekannt und viele Antikörper sind erhältlich (siehe beispielsweise, Coligan (1991) *Current Protocols in Immunology* Wiley/Greene, NY; und Harlow und Lane (1989) *Antibodies A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (Herausgeber) *Basic and Clinical Immunology* (4. Auflage) Lange Medical Publications, Los Altos, CA, und die darin zitierten Literaturstellen; Goding (1986) *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (2. Auflage) Academic Press, New York, NY; und Kohler und Milstein (1975) *Nature* 256: 495–497). Andere geeignete Verfahren zur Herstellung von Antikörpern umfassen das Selektieren von rekombinanten Antikörper-Bibliotheken in Phagen oder ähnlichen Vektoren (siehe Huse et al. (1989) *Science* 246: 1275–1281; und Ward, et al. (1989) *Nature* 341: 544–546). Spezifische monoklonale und polyklonale Antikörper und Antiseren binden üblicherweise mit einem K_D von wenigstens etwa 0,1 μM , vorzugsweise mit einem K_D von wenigstens etwa 0,01 μM oder besser und typischerweise und am meisten bevorzugt mit einem K_D von 0,001 μM oder besser.

Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren als molekulare Sonden

[0092] Zusätzlich zu der Herstellung von Verpackungszelllinien, können die erfindungsgemäßen nicht infektiösen Verpackungsplasmide verwendet werden, um Wildtypvirus unter Verwendung von Southern- oder Northern-Blot-Assays in biologischen Proben nachzuweisen. Kurz dargestellt wird dabei eine durch das Verpackungsplasmid codierte Nukleinsäure markiert, üblicherweise unter Verwendung einer radioaktiven oder bioluminiszierenden Markierung, und dazu verwendet, einen Northern- oder Southern-Blot einer Probe, von der erwartet wird, dass sie ein Virus (FIV) enthält, zu sondieren. Die Verwendung des Verpackungsplasmids als Sonde ist sicherer als die Verwendung eines infektiösen Virus als Sonde. Es ist zudem wahrscheinlicher, mit dem Verpackungsplasmid ein Wildtypvirus nachzuweisen als mit einer kleineren Sonde, da die Verpackungsplasmidsonde, im Gegensatz zu einer kleinen Sonde, gegebenenfalls praktisch das gesamte Genom mit einem Wildtypvirus (außer die Verpackungsstelle) gemein hat, wodurch die Wahrscheinlichkeit gering ist, dass das Wildtypvirus sich dem Nachweis durch eine Mutation der Sondenbindungsstelle entziehen kann.

[0093] Des Weiteren kann das Verpackungsplasmid als Positivkontrolle in im Wesentlichen allen bekannten Nachweisverfahren zum Nachweis des entsprechenden Retrovirus (FIV) verwendet werden. In dieser Ausführungsform wird eine Verpackungsplasmidnukleinsäure oder ein codiertes Polypeptid als Positivkontrolle

verwendet, um festzustellen, ob der FIV-Nachweisassay richtig funktioniert. Beispielsweise werden Oligonukleotide als Primer in PCR-Reaktionen verwendet, um FIV-Nukleinsäuren in biologischen Proben, wie Katzenblut im veterinärmedizinischen Bereich, nachzuweisen. Das Verpackungsplasmid, welches die Nukleinsäuresubsequenzen umfasst, welche den zu amplifizierenden Regionen entsprechen, wird als Amplifikationstemplate in einer zu einer Testprobe, wie menschliches Blut, getrennten Reaktion verwendet, um festzustellen, ob die PCR-Reagenzien und die Hybridisierungsbedingungen passend sind. Auf ähnliche Art und Weise können die durch das Verpackungsplasmid codierten Polypeptide verwendet werden, um ELISA-Reagenzien in Assays zum Nachweis von FIV-Expressionsprodukten in biologischen Proben zu überprüfen.

[0094] Verpackbare Nukleinsäuren können auch auf die gleiche Art und Weise als molekulare Sonden verwendet werden, z.B. zum Nachweis von HIV oder als HIV-Nachweisreagenzien, wenn diese HIV-Komponenten, wie HIV-Verpackungsstellen, HIV-LTRs, transdominante Tat- oder Rev-Proteine oder dergleichen codieren.

Zelltransformation und Gentherapie

[0095] Die vorliegende Erfindung stellt verpackbare Nukleinsäuren für die Transformation von Zellen in vitro und in vivo bereit. Diese verpackbaren Nukleinsäuren werden in Nicht-Primaten-Lentiviruspartikeln, wie FIV-Partikeln, in den hierin beschriebenen lentiviralen Verpackungszelllinien verpackt. Vorzugsweise umfasst das Partikel auch VSV-Glykoproteine, wenn das Ziel im Wirtsbereich des VSV-Virus (z.B. eine hämatopoietische Stammzelle) liegt. Die Nukleinsäuren werden über die Wechselwirkung des FIV-Partikels, das die Nukleinsäure umgibt, und einem FIV- oder VSV-Zellrezeptor in die Zellen transfiziert.

[0096] In einer besonders bevorzugten Gruppe von Ausführungsformen werden die erfindungsgemäßen verpackbaren Nukleinsäuren bei Zelltransformationsverfahren zur Gentherapie verwendet. Die Gentherapie stellt Verfahren zur Bekämpfung von chronischen Infektionskrankheiten, wie HIV, als auch nicht infektiösen Krankheiten, wie Krebs und Erbkrankheiten, wie Enzymmangelkrankungen, bereit. Yu et al. (1994) Gene Therapy 1: 13-26 und die Literaturstellen darin stellen eine allgemeine Anleitung bezüglich Gentherapie-Strategien gegen HIV-Infektionen bereit (siehe auch Sodoski et al. PCT/US91/04335). Eine allgemeine Einschränkung von gebräuchlichen Gentherapie-Vektoren, wie murine Retroviren, besteht darin, dass diese nur sich aktiv teilende Zellen infizieren und im Allgemeinen nicht spezifisch sind. Die vorliegende Erfindung stellt mehrere Merkmale bereit, welche es einem Fachmann ermöglichen, leistungsfähige retrovirale Gentherapie-Vektoren zu erzeugen, welche sich spezifisch auf Stammzellen in vivo richten und welche viele Zelltypen in vitro transformieren. CD4⁺-Zellen, Nervenzellen und andere sich nicht teilende Zellen (oft CXCR4 positiv) werden durch in FIV-Partikel verpackte Nukleinsäuren transduziert. Zusätzlich sind die Vektoren gegebenenfalls für die Transformation von Stammzellen pseudotypisiert.

Pseudotypisieren des verpackbaren Vektors

[0097] Hämatopoietische Stammzellen sind im Allgemeinen besonders bevorzugte Ziele für die Zelltransformation und insbesondere für die Gentherapie (besonders für die Anti-HIV-Gentherapie). Verpackbare Vektoren werden im Hinblick auf die Transformation von CD34⁺-Zellen kompetent gemacht, indem der Vektor pseudotypisiert wird. Dies erfolgt durch Transduzieren der zum Verpacken des Vektors verwendeten Verpackungszelllinie mit einer Nukleinsäure, die ein Env-Protein codiert, das die retrovirale env-Funktion ersetzt oder ergänzt. Die Hüllfunktion kann in trans durch irgendeine Anzahl von heterologen viralen Hüllproteinen bereitgestellt werden. Diese umfassen VSV-G, die amphotropische Hülle des murinen Moloney-Leukämievirus (MoMuLV), und die Hülle des Pavian-Leukämievirus. Das Hüllglykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus, das auf der Oberfläche des Vektors exprimiert wurde, ist eine bevorzugte Pseudotypisierungskomponente. VSV infiziert sowohl sich teilende als auch sich nicht teilende CD34⁺-Zellen und pseudotypisierte Vektoren, welche VSV-Hüllproteine exprimieren, vermögen diese Zellen zu transduzieren.

[0098] Ebenso können virale oder zelluläre Proteine allgemein coexprimiert werden, um den Wirtsbereich eines FIV-basierten Vektors zu erweitern. Üblicherweise wird eine ein ausgewähltes Protein codierende Nukleinsäure in einer erfindungsgemäßen FIV-Verpackungszelle coexprimiert. Das durch die Nukleinsäure codierte Protein wird in das Partikel inkorporiert, das eine FIV-verpackbare Nukleinsäure verpackt und aus der Verpackungszellmembran knospet. Wenn das Protein durch einen Zellrezeptor auf einer Zielzelle erkannt wird, wird das Partikel mittels Rezeptor-vermittelter Endozytose in die Zelle transduziert. Bevorzugte Proteine umfassen virale Hüllproteine- oder Umhüllungsproteine (bzw. Mantelproteine), Zellrezeptorliganden, Antikörper oder Antikörperfragmente, die an Zellrezeptoren auf Zielzellen binden, und dergleichen.

Bevorzugte Promotoren

[0099] Eine Gruppe von Ausführungsformen verwendet eine HIV LTR-Sequenz als Promotor für den FIV-verpackbaren Vektor. Diese LTR-Sequenzen werden nach der Infektion einer LTR-Promotor enthaltenen Zelle durch das infizierende HIV-Virus trans-aktiviert. Die HIV LTR-Promotoren reagieren zusätzlich zur Bindung von tat und rev auf zelluläre Cytokine (wie IL-2 und SP-1), welche die Transkription des HIV-Genoms nach der Infektion ermöglichen. Folglich wird in einer Ausführungsform eine ausgewählte therapeutische Nukleinsäure unter die Kontrolle eines LTR-Promotors gestellt, wodurch die Zellen, die gewöhnlich für eine HIV-Infektion sehr anfällig sind, resistent gegenüber einer Infektion werden. Des Weiteren ist in einer Ausführungsform eine HIV-Verpackungsstelle (zusätzlich zu der FIV- oder einer anderen Nicht-Primaten-Lentivirus-Verpackungsstelle) in dem verpackbaren FIV-Vektor enthalten. Dies ermöglicht es, dass das durch den FIV-basierten Vektor codierte Anti-HIV-Therapeutikum verpackt und durch infizierende HIV-Viren ausbreitet wird, was zu einer zweiten Schutzwirkung führt, die sich zusammen mit der HIV-Infektion verbreitet, wodurch die Infektion verlangsamt wird. Die HIV-Verpackungsstelle ist gut beschrieben (siehe Poznansky et al. (1991) *Journal of Virology* 65 (1): 532–536; Aldovini und Young (1990) *Journal of Virology* 64 (5): 1920–1926, und Clever et al. (1995) *Journal of Virology* 69 (4): 2101–2109. Für eine Beschreibung der Vektoren, die durch HIV verpackt werden, um eine zweite Schutzwirkung bereitzustellen siehe Wong-Stall et al. U.S. Patent-Nr. 5,650,309.

[0100] Konstitutive Promotoren zur Regulation der Expression von therapeutischen Nukleinsäuren, wie pol III-Promotoren, sind ebenfalls bevorzugt. Die PCT-Anmeldung PCT/US94/05700 (WO 94/26877) und Chatterjee et al. *Science* (1992), 258: 1485–1488, nachstehend als Chatterjee et al. 1 bezeichnet), beschreiben die Antisense-Inhibition einer HIV-1 Infektion in Zielzellen unter Verwendung von viralen Vektoren mit einer konstitutiven pol III-Expressionskassette, die anti-TAR RNA exprimiert. Chatterjee et al. (PCT Anmeldung PCT/US91/03440 (1991), nachfolgend als Chatterjee et al. 2 bezeichnet), beschreibt virale Vektoren, umfassend AAV-basierte Vektoren, die Antisense-TAR-Sequenzen exprimieren. Chatterjee und Wong (*Methods, A companion to Methods in Enzymology* (1993), 5: 51–59) beschreiben des Weiteren virale Vektoren zur Bereitstellung von Antisens-RNA. Die PCT-Veröffentlichung WO 94/26877 (PCT/US94/05700) beschreibt eine Vielzahl von anti-HIV therapeutischen Genen und Gentherapiestrategien im Allgemeinen, umfassend die Verwendung von Suizidgenen, transdominanten Genen, Ribozymen, Antisense-Genen und Köder-Genen in Gentherapie-Vektoren. Yu et al. (1994) *Gene Therapy* 1: 13–26 und die darin zitierten Literaturstellen stellen eine allgemeine Anleitung betreffend Gentherapiestrategien bereit, die gegen HIV-Infektionen nützlich sind.

Ex Vivo Transformation von Zellen

[0101] Ex vivo-Verfahren zum Inhibieren der viralen Replikation in einer Zelle in einem Organismus (oder das Einführen eines therapeutischen Gens in die Zelle auf eine andere Art und Weise) umfasst das Transduzieren der Zelle ex vivo mit einer erfindungsgemäßen therapeutischen Nukleinsäure und das Einführen der Zelle in den Organismus. Die Zielzellen umfassen CD4⁺-Zellen, wie aus einem Patienten isolierte oder kultivierte CD4⁺T-Zellen oder Makrophagen, Stammzellen oder dergleichen. Für eine Diskussion, wie Zellen aus Patienten isoliert und kultiviert werden, wird beispielsweise auf Freshney et al., supra, und die darin zitierten Literaturstellen verwiesen. Alternativ können die Zellen diejenigen sein, die in einer Zellbank (z.B. einer Blutbank) aufbewahrt werden. In einer Gruppe von bevorzugten Ausführungsformen codiert die verpackbare Nukleinsäure ein antivirales therapeutisches Agens (z.B. ein Suizidgen, ein transdominantes Gen, ein Anti-HIV-Ribozym, ein Antisense-Gen oder ein Köder-Gen) unter der Kontrolle eines aktivierten oder konstitutiven Promotors, welches das Wachstum oder die Replikation des HIV-Virus hemmt. Der Zelltransformationsvektor inhibiert die virale Replikation in all denjenigen Zellen, die bereits mit dem HIV-Virus infiziert sind und überträgt zusätzlich eine Schutzwirkung auf Zellen, die nicht mit HIV infiziert sind. Außerdem wird der Vektor in bevorzugten Ausführungsformen unter Verwendung der HIV-Replikationsmaschinerie repliziert und in HIV-Kapside verpackt, wodurch sich das therapeutische Anti-HIV-Gen zusammen mit der Replikation eines HIV-Virus ausbreitet. Somit kann die Infektion eines mit HIV infizierten Organismus behandelt werden, indem eine Population seiner Zelle mit einem erfindungsgemäßen Vektor transduziert wird und die transduzierten Zellen wie hierin beschrieben in den Organismus zurückgeführt werden. Folglich stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Schützen von Zellen in vitro, ex vivo oder in vivo bereit, selbst wenn die Zellen bereits mit dem Virus infiziert sind, gegen das ein Schutz begehrt wird.

[0102] In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden Stammzellen, (die üblicherweise nicht CD4⁺ sind) in ex vivo-Verfahren zur Zelltransformation und Gentherapie verwendet. Der Vorteil der Verwendung von Stammzellen ist, dass diese in vitro in andere Zelltypen differenziert werden können oder in ein Säugetier (wie der Spender der Zellen) eingeführt werden können, wo sich diese in das Knochenmark implantieren werden. Verfahren zur Differenzierung von CD34⁺-Zellen in vitro in klinisch wichtige Typen von Immunzellen unter Ver-

wendung von Cytokinen, wie GM-CSF, IFN- γ und TNF- α sind bekannt (siehe, Inhaba et al. (1992) J. Exp. Med. 176, 1693–1702, und Szabolcs et al. (1995) 154: 5851–5861). Verfahren zum Pseudotypisieren von FIV-Vektoren, so dass diese Stammzellen transformieren können sind oben beschrieben. Ein Isolationsverfahren mittels einer Affinitätssäule kann verwendet werden, um Zellen zu isolieren, die an CD34 oder an CD34 gebundene Antikörper binden (siehe, Ho et al. (1995) Stem Cells 13 (Beiheft 3): 100–105, siehe auch Brenner (1993) Journal of Hematotherapy 2: 7–17). In einer anderen Ausführungsform werden hämatopoietische Stammzellen aus fötalem Nabelschnurblut isoliert. Yu et al. (1995) PNAS 92: 699–703 beschreibt ein bevorzugtes Verfahren zum Transduzieren von CD34⁺-Zellen aus humanem fötalem Nabelschnurblut unter Verwendung von retroviralen Vektoren. Neben der Verwendung von Stammzellen, werden in bevorzugten Ausführungsformen von ex vivo-Verfahren auch T-Zellen transduziert. Etliche Verfahren sind für das Isolieren von T-Zellen bekannt. In einem Verfahren wird die Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Hypaque verwendet, um PBMC von roten Blutzellen und Neutrophilen nach bekannten Methoden zu trennen. Die Zellen werden mit modifizierten AIM-V (das aus AIM-V (GIBCO) mit 2 mM Glutamin, 10 μ g/ml Gentamicinsulfat, 50 μ g/ml Streptomycin besteht), das mit 1%-igem fötalem Rinderserum (FBS) ergänzt ist. Die Anreicherung von T-Zellen erfolgt gemäß Standardverfahren durch negative oder positive Selektion mit geeigneten monoklonalen Antikörpern, die an Säulen oder Magnetkügelchen gekoppelt sind. Ein Aliquot der Zellen wird hinsichtlich des gewünschten Zelloberflächenphänotyps (z.B., CD4, CD8, CD3, CD14, etc.) analysiert.

[0103] Im Allgemeinen erleichtert die Expression von Oberflächenmarkern die Identifikation und Reinigung von T-Zellen. Verfahren zur Identifikation und Isolierung von T-Zellen umfassen FACS, Säulenchromatographie, Selektion (panning) mittels Magnetkügelchen, Western-Blots, Radiographie, Elektrophorese, Kapillarelektrophorese, hochauflösende Flüssigchromatographie (HPLC), Dünnschichtchromatographie (TLC), Hyperdiffusionschromatographie und dergleichen und verschiedene immunologische Verfahren, wie Flüssig- oder Gelpräzipitationsreaktionen, Immundiffusion (einfach oder doppelt), Immunelektrophorese, Radioimmunoassays (RIAs), Enzyme-linked Immunosorbentassays (ELISAs), Immunfluoreszenzassays und dergleichen. Für eine Übersicht von immunologischen und Immunoassay-Verfahren im Allgemeinen siehe Stites und Terr (Herausgeber) 1991 Basic and Clinical Immunology (7. Auflage) und Paul, supra). Für eine Erörterung, wie Antikörper gegen ausgewählte Antigene hergestellt werden, wird beispielsweise auf Coligan (1991) Current Protocols in Immunology Wiley/Greene, NY; und Harlow und Lane (1989) Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Press, NY; Stites et al. (Herausgeber) Basic and Clinical Immunology (4. Auflage) verwiesen.

[0104] Zusätzlich zu den oben beschriebenen ex vivo-Verwendungen sind die erfindungsgemäßen Verpackungszelllinien und die erfindungsgemäßen HIV-verpackbaren Nukleinsäuren allgemein nützlich bei Klonierungsverfahren. Verpackbare Nukleinsäuren werden in ein FIV-Partikel verpackt und verwendet, um eine FIV-infizierbare Zelle (z.B. eine feline hämatopoietische Zelle) in vitro oder in vivo zu transformieren. Dies verschafft ein Verfahren und Vektoren zum Transformieren von Zellen mit einer ausgewählten Nukleinsäure, z.B. in Assays zur Entdeckung von Arzneimitteln, oder als Werkzeug bei der Untersuchung der Genregulation oder als allgemeiner Klonierungsvektor.

In Vivo Transformation

[0105] Nicht-Primaten-Lentiviruspartikel, die therapeutische Nukleinsäuren enthalten, können dem Organismus direkt verabreicht werden zur Transduktion von Zellen in vivo. Die Verabreichung erfolgt über irgendeinen der Wege, die üblicherweise verwendet werden, um ein Molekül in direkten Kontakt mit Blut oder Gewebezellen zu bringen. Verpackbare Nukleinsäuren, die in FIV oder anderen Nicht-Primaten-Lentiviruspartikeln verpackt sind, werden verwendet, um virusbedingte Erkrankungen, wie AIDS, in Tieren und menschlichen Patienten zu verhindern. Die verpackten Nukleinsäuren werden auf irgendeine geeignete Art und Weise verabreicht, vorzugsweise mit pharmazeutisch verträglichen Trägern. Geeignete Verfahren zur Verabreichung solcher verpackten Nukleinsäuren an einem Patienten im Rahmen der vorliegenden Erfindung sind verfügbar und, obwohl mehr als ein Weg verwendet werden kann, um eine bestimmte Zusammensetzung zu verabreichen, kann ein bestimmter Weg oft eine unmittelbarere und wirksamere Reaktion als ein anderer Weg darstellen.

[0106] Pharmazeutisch verträgliche Träger werden teilweise durch die bestimmte zu verabreichende Zusammensetzung als auch durch das bestimmte zur Verabreichung der Zusammensetzung verwendete Verfahren bestimmt. Folglich gibt es eine große Vielfalt von geeigneten Formulierungen der erfindungsgemäßen pharmazeutischen Zusammensetzungen.

[0107] Die verpackten Nukleinsäuren, alleine oder zusammen mit anderen geeigneten Komponenten, können auch zu Aerosol-Formulierungen zur Inhalationsverabreichung verarbeitet werden (d.h. diese können „zerstäubt“ werden). Die Aerosol-Formulierungen können in unter Druck stehende verträgliche Treibgase, wie Di-

chlordifluormethan, Propan, Stickstoff und dergleichen, gegeben werden.

[0108] Formulierungen, die für die parenterale Verabreichung, wie beispielsweise intraartikulär (in die Gelenke), intravenös, intramuskulär, intradermal, intraperitoneal und subkutan, geeignet sind, umfassen wässrige und nicht wässrige, isotonische, sterile Injektionslösungen, welche Antioxidationsmittel, Puffer, bakteriostatische Mittel und gelöste Stoffe, welche die Formulierung isotonisch mit dem Blut des vorgesehenen Empfängers machen, enthalten können, und wässrige und nicht wässrige sterile Suspensionen, welche Suspensionsmittel, Lösungsvermittler, Verdickungsmittel, Stabilisierungsmittel und Konservierungsmittel enthalten können. Die parenterale Verabreichung und die intravenöse Verabreichung sind die bevorzugten Verabreichungsverfahren. Die Formulierungen der verpackten Nukleinsäure können in abgedichteten Behältern mit Einheitsdosen oder Multidosen, wie Ampullen und Vials, dargestellt werden.

[0109] Zellen, die wie oben beschrieben mit der verpackten Nukleinsäure im Rahmen einer ex vivo-Therapie transduziert wurden, können ebenfalls wie oben beschreiben intravenös oder parenteral verabreicht werden.

[0110] Die im Rahmen der vorliegenden Erfindung an einen Patienten verabreichte Dosis sollte ausreichend sein, um im Patienten über eine Zeit eine günstige therapeutische Antwort zu bewirken oder die Infektion durch ein Pathogen zu inhibieren. Die Dosis bestimmt sich nach der Wirksamkeit des jeweiligen verwendeten Vektors und dem Zustand des Patienten als auch nach dem Körpergewicht oder der Oberfläche des zu behandelnden Patienten. Die Dosismenge bestimmt sich auch nach dem Auftreten, der Art und des Ausmasses irgendwelcher ungünstiger Nebenwirkungen, von der die Verabreichung eines bestimmten Vektors begleitet ist, oder dem transduzierten Zelltyp in einem bestimmten Patienten.

[0111] Bei der Bestimmung der wirksamen Menge des zu verabreichenden Vektors zur Behandlung oder Prophylaxe von virusvermittelten Krankheiten, wie AIDS, beurteilt der Arzt die zirkulierenden Plasmaspiegel, die Vektortoxizität, den Krankheitsverlauf und die Erzeugung von Antikörpern gegen den Vektor. Im Allgemeinen beträgt das Dosis-Äquivalent einer nackten Nukleinsäure eines Vektors etwa 1 µg bis 100 µg für einen typischen 70 kg schweren Patienten und die Dosen von Vektoren, die ein Retroviruspartikel umfassen, werden so berechnet, dass eine äquivalente Menge der Inhibitornukleinsäure erhalten wird. Die erfindungsgemäßen Vektoren können die Behandlung von virusvermittelten Zuständen durch irgendeine bekannte herkömmlich Therapie, umfassend zytotoxische Agenzien, Nukleotidanaloga und Mittel zur Modifikation der biologische Antwort, ergänzen.

[0112] Zur Verabreichung können Inhibitoren und erfindungsgemäße transduzierte Zellen in einer Konzentration verabreicht werden, die durch den LD-50 des Inhibitors, Vektors oder transduzierten Zelltyps und den Nebeneffekten des Inhibitors, Vektors oder Zelltyps bei verschiedenen Konzentrationen, bezogen auf das Gewicht und auf den Gesamtgesundheitszustand des Patienten, bestimmt wird. Die Verabreichung kann über Einzel- oder Teildosen erfolgen.

[0113] Zur Einführung von transduzierten Zellen werden vor der Infusion Blutproben genommen und für eine Analyse aufbewahrt. Zwischen 1×10^8 und 1×10^{12} transduzierte Zellen werden über 60 bis 200 min intravenös infundiert. Die Lebenszeichen und die Sauerstoffsättigung durch Pulsoximetrie werden genau überwacht. Blutproben werden 5 min und 1 h nach der Infusion genommen und für eine nachfolgende Analyse aufbewahrt. Die Leukophorese, Transduktion und Reinfusion werden alle 2 bis 3 Monate bei einer Gesamtanzahl von 4 bis 6 Behandlungen in einer Einjahresperiode wiederholt. Nach der ersten Behandlung können die Infusionen nach dem Ermessen des Arztes auf einer ambulanten Basis durchgeführt werden. Wenn die Reinfusion ambulant erfolgt, wird der Beteiligte für wenigstens 4 und vorzugsweise 8 h nach der Therapie überwacht.

[0114] Die transduzierten Zellen werden für die Reinfusion gemäß bekannten Verfahren hergestellt (siehe Abrahamsen et al. (1991) J. Clin. Apheresis 6: 48–53; Carter et al. (1988) J. Clin. Apheresis 4: 113–117; Aebersold et al. (1988), J. Immunol. Methods 112: 1–7; Muul et al. (1987) J. Immunol. Methods 101: 171–181 und Carter et al. (1987) Transfusion 27: 362–365). Nach einer Zeitspanne von etwa 2 bis 4 Wochen in Kultur sollten die Zellen eine Anzahl zwischen 1×10^8 und 1×10^{12} erreicht haben. In diesem Zusammenhang variieren die Wachstumscharakteristika der Zellen von Patient zu Patient und von Zelltyp zu Zelltyp. Etwa 72 h vor der Reinfusion der transduzierten Zellen wird ein Aliquot für die Analyse des Phänotyps und des prozentualen Anteils an Zellen, die das therapeutische Agens exprimieren, entnommen.

[0115] Wenn ein Patient, der einer Infusion eines Vektors oder einer transduzierten Zelle unterzogen wird, Fieber, Schüttelfrost oder Muskelschmerzen entwickelt, erhält er/sie die passende Dosis von Aspirin, Ibuprofen oder Acetaminophen. Patienten, die auf die Infusion Reaktionen wie Fieber, Muskelschmerzen und Schüttel-

frost zeigen, werden 30 min vor der anstehenden Fusion entweder mit Aspirin, Acetaminophen oder Diphenhydramin medizinisch vorbehandelt. Meperidin wird für schwereren Schüttelfrost und schwere Muskelschmerzen, die nicht schnell auf Antipyretika und Antihistamine reagieren, verwendet. Die Zellinfusion wird in Abhängigkeit der Schwere der Reaktion verlangsamt oder abgebrochen.

Virale Inhibitoren

[0116] Spezialisierte virale Inhibitoren werden üblicherweise durch die erfindungsgemäßen verpackten Nukleinsäuren codiert, bei denen die beabsichtigte Verwendung die virale (z.B. HIV) Inhibierung ist. Folglich finden Verfahren, die zur Konstruktion und Erhaltung von Nukleinsäuren einsetzbar sind, Anwendung auf die erfindungsgemäßen Inhibitoren. Antivirale Agenzien, die gegebenenfalls in die erfindungsgemäßen viralen Inhibitoren inkorporiert sind, umfassen Antisense-Gene, Ribozyme, Köder-Gene und transdominante Nukleinsäuren.

[0117] Eine Antisense-Nukleinsäure ist eine Nukleinsäure, welche nach der Expression mit einem bestimmten RNA-Molekül, einem Transkriptionspromotor oder dem Sinnstrang eines Gens hybridisiert. Durch die Hybridisierung stört die Antisense-Nukleinsäure die Transkription einer komplementären Nukleinsäure, die Translation einer mRNA oder die Funktion einer katalytischen RNA. Im Rahmen dieser Erfindung nützliche Antisense-Moleküle umfassen diejenigen, die mit viralen Gentranskripten hybridisieren. Zwei Zielsequenzen für Antisense-Moleküle sind das erste und das zweite Exon der HIV-Gene *tat* und *rev*. Chatkerjee und Wong, *supra*, und Marcus-Sekura (*Analytical Biochemistry* (1988) 172, 289–285) beschreiben die Verwendung von Antisense-Genen, welche die Genexpression blockieren oder verändern.

[0118] Ein Ribozym ist ein katalytisches RNA-Molekül, welches andere RNA-Moleküle mit bestimmten Nukleinsäuresequenzen schneidet. Allgemeine Verfahren zur Konstruktion von Ribozymen, umfassend Hairpin-Ribozym, Hammerhead-Ribozym, RNase P Ribozym (d.h. Ribozym, die sich von dem natürlich vorkommenden RNase P Ribozym aus Prokaryonten oder Eukaryonten ableiten), sind im Stand der Technik bekannt. Castanotto et al. (1994) *Advances in Pharmacology* 25: 289–317 bietet einen allgemeinen Überblick über Ribozym, umfassend Ribozym der Gruppe I, Hammerhead-Ribozym, Hairpin-Ribozym, RNase P-, und Axhead-Ribozym. Ribozym, die in der vorliegenden Erfindung nützlich sind, fassen diejenigen, die virale Transkripte, insbesondere HIV-Gentranskripte schneiden. Ojwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, 89: 10802–06 (1992); Wong-Staal et al. (PCT/US94/05700); Ojwang et al. (1993) *Proc. Natl. Avac. Sci. USA* 90: 6340–6344; Yamada et al. (1994) *Human Gene Therapy* 1: 39–45; Leavitt et al. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 699–703; Leavitt et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5: 1151–1120; Yamada et al. (1994) *Virology* 205: 121–126, und Dropulic et al. (1992) *Journal of Virology* 6b (3): 1432–1441 beschreiben Beispiele von HIV-1 spezifischen Hairpin- und Hammerhead-Ribozymen.

[0119] Kurz gesagt umfassen die zwei Typen von Ribozymen, die in der vorliegenden Erfindung besonders gut verwendbar sind, das Hairpin-Ribozym und das Hammerhead-Ribozym. Das Hammerhead-Ribozym (siehe Rossie et al. (1991) *Pharmac. Ther.* 50: 245–254; Forster und Symons (1987) *Cell* 48: 211–220; Haseloff und Gerlach (1988) *Nature* 328: 596–600; Walbot und Bruening (1988) *Nature* 334: 196; Haseloff und Gerlach (1988) *Nature* 334: 585; und Dropulic et al und Castanotto et al., und die darin zitierten Veröffentlichungsstellen, *supra*) und das Hairpin-Ribozym (siehe beispielsweise Hampel et al. (1990) *Nucl. Acids Res.* 18: 299–304; Hempel et al., (1990) Europäische Patentveröffentlichung Nr. 0 360 257; U.S. Patent Nr. 5,254,678, erteilt am 19. Oktober 1993; Wong-Staal et al., PCT/US94/05700; Ojwang et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6340–6344; Yamada et al. (1994) *Human Gene Therapy* 1: 39–45; Leavitt et al. (1995) *Proc Natl. Sci. USA* 92: 699–703; Leavitt et al. (1994) *Human Gene Therapy* 5: 1151–1120; und Yamada et al. (1994) *Virology* 205: 121–126) sind katalytische Moleküle mit Antisense- und Endoribonukleotidase-Aktivität. Es wurde gezeigt, dass die intrazelluläre Expression von Hammerhead-Ribozymen und Hairpin-Ribozymen, die gegen HIV-RNA gerichtet sind, zu einer erheblichen Resistenz gegenüber einer HIV-Infektion führt. Diese Ribozym sind konstruiert, dass sie auf einen Teil des HIV-Genoms oder eine durch das Genom codierte Nukleinsäure abzielen. Bevorzugte Zielstellen in HIV-1 umfassen die U5-Region und das Polymerasegen. GUC- und GUA-schneidende transaktive Anti-HIV-Ribozym sind bekannt.

[0120] Eine Köder-Nukleinsäure ist eine Nukleinsäure mit einer Sequenz, die durch ein regulatorisches nukleinsäurebindendes Protein (d.h. einen Transkriptionsfaktor, einen Zelltransportfaktor, usw.) erkannt wird. Bei der Expression bindet der Transkriptionsfaktor eher an die Köder-Nukleinsäure als an sein natürliches Ziel im Genom. Nützliche Köder-Nukleinsäuresequenzen umfassen jede Sequenz, an die ein viraler Transkriptionsfaktor bindet. Beispielsweise sind die TAR-Sequenz, an die das *tat*-Protein bindet, und die RRE-Sequenz von HIV (insbesondere die SL II-Sequenz), an welche die *rev*-Proteine binden, geeignete Sequenzen für die Ver-

wendung als Köder-Nukleinsäuren.

[0121] Eine transdominante Nukleinsäure ist eine Nukleinsäure, die ein Protein exprimiert, dessen Phänotyp, falls durch Trans-Komplementierung bereitgestellt, sich über die Wirkung der nativen Form des Proteins hinwegsetzt. Beispielsweise können tat und rev so mutiert werden, dass diese die Fähigkeit an TAR beziehungsweise an RRE zu binden behalten, die zugehörige korrekte Regulatorfunktion dieser Proteine jedoch fehlt. Insbesondere kann rev transdominant gemacht werden, indem die Leucin-reiche Domäne in der Nähe des C-Terminus, die für die korrekte normale Regulation der Transkription unerlässlich ist, entfernt wird. Tat-transdominante Proteine können durch Mutationen in der RNA-Bindungs-/Kernlokalisations-Domäne erzeugt werden. Die gegenseitige Komplementierung von defekten molekularen HIV-Klonen ist beispielsweise in Lori et al. (1992) Journal of Virology 66 (9) 5553–5560 beschrieben.

BEISPIELE

[0122] Die folgenden Beispiele dienen nur der Erläuterung und sind nicht beschränkend. Ein Fachmann erkennt ohne weiteres eine Vielzahl von nicht kritischen Parametern, deren Änderung oder Abwandlung zu im Wesentlichen gleichen Ergebnissen führen.

Beispiel 1: Konstruktion von FIV-Verpackungsplasmiden und -vektoren

[0123] Die lange terminate Sequenzwiederholung (LTR) aus FIV ist in menschlichen Zellen inaktiv oder minimal aktiv. Bisher wurde kein Verfahren zur hohen Expression zur vollständigen Komplementierung von Proteinen eines Nicht-Primates-Lentivirus in trans in menschlichen Zellen und auf eine replikationsdefiziente Art und Weise beschrieben. Um hohe Konzentrationen des FIV-Proteins in trans auf eine replikationsdefiziente Art und Weise in menschlichen Zellen zu exprimieren und um die Sicherheit durch den Austausch eines kritischen Teils von FIV, der für die Replikation benötigt wird, zu erhöhen, wurde deshalb der FIV-Klon 34TF10 mit Espl geschnitten, mit Klenow-Polymerase in Gegenwart von 200 μ M dNTPs behandelt, anschließend mit SacI geschnitten und mit T4 DNA-Polymerase in Gegenwart von 200 μ M dNTPs behandelt, und das erhaltene Fragment, das die viralen Codierungsregionen (nicht jedoch nicht die LTRs) enthält, gelgereinigt. Dieses Fragment wurde dann über stumpfe Enden in das Not I & XbaI-geschnittene, Klenow-behandelte, mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm behandelte Grundgerüst des CMV-Expressionsplasmids pRc/CMV ligiert. Das erhaltene Plasmid (CF1) wurde durch mehrere diagnostische Restriktionsverdauungen überprüft. CF1 enthält den CMV-Promotor, gefolgt von dem FIV-Genom von dem distalen Teil der post-LTR 5'-Leader Sequenz (93 nt stromaufwärts der Hauptsplissstelle) bis 38 nt stromabwärts des letzten ORF (Rev) von FIV.

[0124] Der FIV-Klon 34TF10 wurde für diese Arbeit ausgewählt, da dieser FIV-Klon bereits eine Mutation aufweist, die das ORF2-Gen inaktiviert (siehe Talbott, R. L. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5743–5747). ORF2 ist ein mutmaßlicher Transaktivator, für den gezeigt wurde, dass dieser für die Replikation in feline peripheren Blutlymphozyten erforderlich ist. Folglich ist 34TF10 ein attenuiertes Virus; diese Attenuierung ist für die vorliegende Erfindung von Vorteil, da dadurch das Risiko des pathogenen Wildtyp-FIV weiter verringert wird, während die Vektorfunktionen nicht beeinflusst werden. Andere Klone mit ähnlichen Eigenschaften sind jedoch verfügbar oder können leicht hergeleitet werden, indem auf ähnliche Art und Weise unter Verwendung von rekombinanten Verfahren das Wildtypvirus inaktiviert wird.

[0125] Die Transfektion von CF1 in humane HeLa-, 293- und 293 T-Nierenzellen durch das Calciumphosphat-Coprecipitationsverfahren führte zu dem überraschenden Resultat, dass ausgedehnte aufgeblähte Syncytien (vielkernige Riesenzellen, die durch die Verschmelzung von hüllenexprimierenden Zellen mit anderen Zellen erzeugt werden) auftraten, die fünfzig bis mehrere hundert Zellkerne und hohe Konzentrationen (über eine Million cpm) von Reverser Transkriptase im Überstand enthielten. Wir haben gefunden, dass humane 293- und 293 T-Zellen und HeLa-Monolayer-Kulturen nach der transienten Transfektion von CF1 (beispielsweise durch Transfektion von 10 μ g CF1 in einem 75 cm²-Kolben) auf reproduzierbare Art und Weise zu 90–95% durch Syncytien zerstört wurden, allerdings wurden wie geplant und erwartet keine infektiöse oder replikationskompetente Viren produziert: die Überführung von großen Volumen des Überstands von CF1-transfizierten 293 T-Zellen zu frischen 293- oder 293 T-Zellen oder zu feline Crandall-Nierenzellen führte zu keinen Syncytien oder Erzeugung von RT. CF1 Δ env, das mit Ausnahme einer FIV-Hülldeletion (siehe die untenstehenden detaillierten Darstellungen) identisch zu CF1 ist, führt zu keinen Syncytien, erzeugt jedoch hohe Konzentrationen von Reverser Transkriptase und von viralen Funktionen, die für das Verpacken von Vektoren erforderlich sind. Dieses beispiellose Ergebnis führte zu der neuen Erkenntnis, dass alle für die Proteinerzeugung benötigten Funktionen von FIV, umfassend die Rev/RRE-regulatorische Achse, die FIV gag/pol-Erzeugung und hüllenvermittelte Syncytien, in menschlichen Zellen vorhanden sein können, wenn der FIV-Promotor

spezifisch durch einen in menschlichen Zellen aktiven Promotor ersetzt wird.

[0126] Die in menschlichen Zellen durch CF1 und CT5 (unten) erzeugten Syncytien wurden durch den Einschluss einer 1:1000-Verdünnung von Plasma aus FIV-infizierten Katzen (IC₅₀ zwischen einer 1:10000-Verdünnung und einer 1:30000-Verdünnung) vollständig verhindert, durch irgendeine Verdünnung (selbst 1:10) des Plasmas aus nicht infizierten Hauskatzen jedoch überhaupt nicht verhindert. Diese spezifische Inhibierung durch Anti-FIV-Antikörper erbrachte einen weiteren Nachweis, dass die Syncytien FIV-hüllenspezifisch sind.

[0127] Die Radioimmunpräzipitation von 35S-Methionin und 35S-Cystein-markierten menschlichen (293 T, HeLa) und felines (CRFK) Zellen, die mit CF1 und dem Parenteral-Virus (34TF10) transfiziert waren, zeigte, dass virale FIV-Proteine mit FIV⁺-Serum von CRFK-Zellen, die mit einem der beiden Plasmide transfiziert wurden, spezifisch immunpräzipitiert werden konnten. In den menschlichen Zellen erzeugte 34TF10 wenig oder kein Protein, was auf eine minimale Aktivität des FIV-Promotors hinweist, während CF1 große Mengen an FIV-Protein erzeugte. Für diese Proteine wurde gezeigt, dass diese auf Grund deren Abwesenheit in Immunpräzipitaten derselben mit einem Kontrollplasmid transfizierten Zellen FIV-spezifisch sind.

[0128] Um die Verwendung einer heterologen (z.B. VSV-G) Hülle zu ermöglichen, erfolgte eine spezifische Deletion der FIV-Hülle (das Produkt des env-Gens) in CF1 durch eine dreiteilige Ligation: CF1 wurde mit PflmI (viermal vorhanden in CF1) restringiert. Da die zwei PflmI-Stellen von Interesse in dem env-Gen inkompatibel sind das einfache Stumpfmachen dieser PflmI-Stellen eine das Leseraster nicht verändernde env-Deletion erzeugen würde, wurde der PflmI-Verdau mit T4-Polymerase behandelt, um den 3'PflmI-Überhang zu entfernen und in einen Leseraster-verschiebenden SacII-Linker ligiert, mit SacII verdaut und gelgereinigt. Aliquote des PflmI/SacII-verbundenen Verdau wurden dann mit SacII und einzeln entweder mit PvuI oder Bsu361 restringiert. Anschließend erfolgte eine dreifache Ligation, (PvuI-BsU361 plus BsU361-PflmI(SacII-Linker) plus (SacII-Linker)PflmI-PvuI). Das resultierende Plasmid (CF1Δenv) wurde durch mehrere diagnostische Restriktionsverdau überprüft. CF1Δenv enthielt eine 875 nt-Deletion in env. Es produzierte nach der Transfektion in menschlichen Zellen hohe Konzentrationen an Reverser Transkriptase, jedoch keine Syncytien, wodurch zusätzlich zu den oben beschriebenen Experimente zur Plasmahinibierung ein weiterer Nachweis erbracht wurde, dass die in Zusammenhang mit CF1 beobachteten Syncytien spezifisch FIV-Hüllen-vermittelt sind.

[0129] Die Hüllfunktion von CF1Δenv kann in trans durch irgendeine Anzahl von heterologen viralen Hüllproteinen bereitgestellt werden. Diese umfassen VSV-G, die amphotropische Hülle des murinen Moloney-Leukämievirus (MoMuLV) und die Pavian-Leukämievirus(GALV)-Hülle, von denen der Fachmann weiss, dass diese die Hüllfunktion von Retroviren wirksam ersetzen können, sind jedoch nicht darauf beschränkt.

[0130] In anderen Ausführungsformen werden zusätzliche Deletionen der FIV-Sequenzen des CF1Δenv gemacht. Beispielsweise kann die Region zwischen der 5'-Hauptsplicesstelle und dem gag ATG Kodon, obwohl diese in FIV nur 20 Nukleotide lang ist (verglichen mit mehr als 40 in HIV-1 und mehr als 70 in HIV-2), deletiert oder in der Sequenz verändert werden. Zusätzliche env-Sequenzen werden entfernt und untersucht, und die Wirkungen des Deletierens von vif oder anderen Regionen wird untersucht.

[0131] In einer bevorzugten Ausführungsform wurde aus verschiedenen Gründen (U3 oder die einzige 3'-Region enthält die Promoter/Enhancer-Elemente eines Retrovirus) entschieden, die Promotorfunktion von FIV-U3 in diesem System (das heißt sowohl in den Verpackungs- als auch Vektorkonstrukten) vollständig zu ersetzen. Erstens ist der FIV-LTR in menschlichen Zellen inaktiv oder kaum aktiv und man wollte ferner versuchen, einen Vektor in menschlichen Zellen herzustellen, da dies die Wahrscheinlichkeit einer anschließenden Transduktion in menschliche Zellen erhöhen kann und weil gute Transfektionssysteme mittels felines Zellen nicht gut charakterisiert sind. Zweitens sind die gut bekannten, hohen Expressionsraten, die durch einen Promotor, wie den Immediate-Early-Promotor von hCMV, in definierten Systemen (z.B. das humane embryonale 293T-Nierenzellsystem) erhalten werden, wünschenswert. Drittens trägt das Austauschen von U3 sowohl in dem Vektor- als auch in dem Verpackungskonstrukt ferner dazu bei, das Risiko von replikationskompetenten FIV zu beseitigen. In einer anderen Abwandlung wurden auch 80 Basen der 3'-Strich-U3-Region des Vektors deletiert, welche insbesondere die TATA-Box umfassen. Aufgrund dieser Deletion und weil das Verpackungsplasmid sowohl die env-Gendeletion und das ORF2-inaktivierende Stop-Codon aufweist, kann daher kein replikationskompetentes FIV gebildet werden. Viertens kann die aufeinander abgestimmte Expression und die effiziente Partikelbildung verbessert werden, da alle drei Komponenten (Verpackungsplasmid, Vektor, Hüllensexpressionsplasmid) vom selben Promotor kontrolliert werden. Fünftens ist die Herstellung von humanen Zellen, wie oben beschrieben, sicherer als die Herstellung von felines Zellen zur klinischen Anwendung, da feline Zellen das Risiko mit sich bringen, bekannte oder unbekannte infektiöse Agenzien in Menschen einzuführen.

[0132] Die Konstruktion des Konstrukts umfasst die genaue Fusion des CMV-Promotors und des FIV-Genoms (von der 5'R-Sequenzwiederholung an) an die TATA-Box. Zunächst wurde eine PCR (synthetische PCRs wurden mit Exonuklease + Vent-Polymerase durchgeführt) mit einem am Ende mit SacI-versehenen PCR-Sense-Primer, der homolog zu den unmittelbar stromabwärts von der FIV TATA-Box angeordneten Nukleotiden (5'-atataGAGCTCgtgaaacttcgaggagtctc-3') ist, zusammen mit einem PCR-Antisense-Primer (5'-ccaatctgc-cctgtccattcccc-3'), der zu dem Gegenstrang des FIV gag-Gens homolog ist, durchgeführt. Das erzeugte PCR-Produkt war 450 bp lang. Dieses PCR-Produkt wurde vor dem SacI-Verdau mit XhoI verdaut (weil in dem FIV-LTR eine Sac-Stelle der XhoI-Stelle unmittelbar folgt und sonst ein SacI-SacI-Fragment erzeugt würde). Nach dem XhoI-Verdau und dem nachfolgenden SacI-Verdau war das erhaltene 310 bp-Fragment:

GAGCT/Cgtgaaacttcgaggagtctctttgttgaggacttttgagttcccttgaggctcccacagatacaa
 taaatattgagattgaaccctgtcgagtatctgtgtaactttttacctgtgaggtctcgaatccgggccgagaactt
 cgcagttggcggccgaacagggacttgattgagagtgattgaggaagtgaagctagagcaatagaaagctgttaagcag
 aactctgctgacctaataaggaagcagtagcagacgctgctaacagtgagtatctctagtgaagcggaC/TCGAGctc.

[0133] Dieses Fragment wurde von dem 140 bp-Rest gelgereinigt und in das SacI-XhoI-Grundgerüst des pRc/CMV-Plasmid kloniert. Zusammengefasst ordnet dieser Schritt die FIV-LTR-Sequenzen stromabwärts von der TATA-Box in genauem Leseraster zu der TATA-Box des CMV-Promotors wie auch der ersetzten TATA-Box von FIV an: es wird eine SacI-Stelle 3 Nukleotide stromabwärts der TATA-Box angeordnet, genauso wie auch in dem hCMV-Promotor 3 Nukleotide stromabwärts der TATA-Box eine SacI-Stelle angeordnet ist und die FIV R-Sequenzwiederholung wird genau 9 nt stromabwärts von der TATA-Box angeordnet, genau wie in dem FIV-Genom. Die Fusion behält daher (und verbindet) den Nukleotidabstand sowohl des CMV-Promotors als auch der FIV Transkriptionssequenzen bei und ist in der nachfolgenden Sequenz genau beschrieben:

..acgtataagttgtccattgtaagagta**TATA**accagtgcttgtgaaacttcgaggagtctctttgttgagga FIV
AGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCTCTGGCTAACTA
 GAGAACC..... pRc/CMV
AGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCgtgaaacttcgaggagtct ctttgttgagga
 CRF1

[0134] CRF1 vervollständigte die 5-Strich-Fusion des CMV-Promotors an die FIV R-Sequenzwiederholung, der 3-Strich LTR und der Rest des FIV-Genoms blieben jedoch stromabwärts angeordnet. Deshalb wurden am Ende die mit SalI-versehenen PCR-Primer F3'S (tatataGTCgactagggactgtttacgaac) und F3'A/Not (atatatagtc-gacGCGGCCGCTgcaagttctcg) verwendet, um den 3'FIV LTR zu amplifizieren: das SalI-verdaute PCR-Produkt wurde in die mit alkalischer Phosphatase behandelte XhoI-Stelle von CRF1 ligiert und die Ligation inaktiviert und gegen den Wildtyp mit XhoI selektiert. Das resultierende Plasmid, als CRF(L) bezeichnet, weist beide LTRs auf und weist eine am 3'-Terminus des 3'-LTR angeordnete einzelne NotI-Stelle auf.

[0135] Anschließend wurde der codierende Hauptbereich des FIV-Genoms eingefügt, indem das 8845 nt BbeI-EspI-Fragment von p34TF10 in das mit Phosphatase behandelte BbeI-EspI-Grundgerüst von CRF(L) ligiert wurde. Das resultierende Plasmid wurde als CT5 bezeichnet (für CMV-Promotor → Fusion an der TATA-Box → komplettes FIV-Genom von der R-Sequenzwiederholung bis zum normalen proviralen Terminus an dem 3'LTR U5-Element). CT5 codiert infektiöses Vollängen-FIV, das in der ersten Runde von dem CMV-Promotor unterstützt wird (die nachfolgenden Runden sind durch FIV-LTR unterstützt, da die reverse Transkription einen Wildtyp U3 am 5'-Terminus des Provirus erzeugt). Die Transfektion von entweder CT5 oder den Wildtyp 34TF10 in humane 293T-Zellen führte in einem Standard-Assay für die FIV-Replikation in beiden Fällen zu gleichen Konzentrationen von RT in den Überständen und zu ausgedehnten Syncytien: die Syncytien-Bildung von auf 0,5%-Serum gehaltenen felines Crandall-Nierenzelle (CRFK-Zellen), gefolgt von der Überführung des gefilterten Überstandes der transfizierten 293 T-Zellen (siehe auch Tozzini et al. (1992) Journal of Virological Methods 37, 241–252). Das CT5-erzeugte Virus entspricht jedoch, wie das 34TF10-erzeugte Virus, hinsichtlich des Tropismus dem Wildtyp: es repliziert nicht in menschlichen Zellen. Dies ist zu erwarten, da der 3-Strich-U3 von CT5 dem Wildtyp entspricht (Retroviren tragen ihre Promotoren an dem 3'-Ende der Virion-mRNA: die reverse Transkription führt dazu, dass eine Kopie der 3-Strich-U3 an dem 5'Ende des integrierten Provirus angeordnet wird, wo diese die Fähigkeit besitzt, nachfolgende Transkriptionsrunden in empfänglichen Zellen zu unterstützen). Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass FIV, das in felines Zellen replikationskompetent ist, hergestellt wurde, indem CT5 in adhärenente Zelllinien, umfassend 293 T-Zellen, transfiziert wurde, wodurch nachgewiesen wurde, dass die produktive Phase des Lebenszyklus, nicht jedoch die Replikation, in

menschlichen Zellen auf effiziente Weise ablief.

Von CT5 abgeleitete FIV-Vektoren

[0136] Unabhängig davon, ob CT5 in menschliche oder feline Zellen transfiziert wurde, erzeugt CT5 FIV, das in feline, nicht jedoch in menschlichen Zellen replikationskompetent ist: die viralen Transkripte werden von einem humanen, nicht-feline Promotor in Herstellungszellen exprimiert, der feline 3-Strich-U3 bleibt jedoch intakt und der Ursprung des 5-Strich-U3-Promotor ist in allen nachfolgenden Replikationsrunden ist der 3-Strich-U3 des Transkripts der Herstellungszelle. Dieses verbleibende 3-Strich-U3-Element kann auch deletiert werden.

[0137] Um retrovirale Vektoren durch Veränderungen von CT5 zu erzeugen, wurden zwei Strategien verwendet. Eine Ausführungsform berücksichtigt die Tatsache, dass das RRE von FIV 3-Strich- zu der codierenden Sequenz in FIV angeordnet ist (am Ende des TM-Proteins und nicht an der SU/TM-Verbindungsstelle wie in anderen Lentiviren). Deshalb wird die Position des RRE beibehalten, wenn eine Reporter-Genkassette, welche ihr eigenes Polyadenylierungs p(A)-Signal enthält, in Antisense-Orientierung in Bezug auf die FIV-Sequenzen angeordnet wird, wodurch die Verwendung von cis-wirkenden Signalen und das Verpacken verbessert wird. In einer zweiten Ausführungsform wurde das RRE von seiner üblichen 3-Strich-Stelle entfernt und mittels Standard-Klonierungsverfahren unmittelbar nach einem Teil des FIV gag/pol-Gens angeordnet, wodurch sowohl der Rev-Schutz des gag-Sequenz enthaltenden Vektortranskripts als auch die Insertion einer Reporter-Genkassette in Sense-Orientierung stromabwärts ermöglicht wird. Die gag-Gensequenzen sind in diesen Vektoren enthalten, da für diese gezeigt wurde, dass sie das Verpacken in anderen Retroviren verbessern. In diesen Vektoren ist das gag-Gen jedoch rasterverschoben durch das Schliessen einer Tth III 1-Stelle über stumpfe Enden, die sich bei Nukleotid 298 von gag befindet (kloniert durch Tth III1-Verdau, Klenow-Polymerasevermitteltes Auffüllen, Ligation, Ligaseinaktivierung und schließlich TthIII1-Selektion gegen den Wildtyp), um eine Rekombination von funktionellem gag und die Erzeugung von transdominant-suppressivem Gag-Protein zu verhindern. Zusätzliche Bereiche von gag nach der Rasterverschiebung oder sogar der Laserrasterverschiebung vorausgehend, können aus den Vektoren entfernt werden, ohne den Titer zu beeinflussen.

[0138] Man beachte, dass die Transkription dieser Vektoren von dem CMV-Promotor und nicht von dem FIV-Promotor erfolgt. Andere Promotoren werden gegebenenfalls verwendet. Zusätzlich sind mehrere Modifikationen möglich, indem, wie unten detailliert beschrieben, zusätzliche Bereiche des FIV-Genoms, z.B. Bereiche von gag deletiert werden.

[0139] Solche Vektoren sind nachfolgenden beschrieben und dargestellt:

1. Vektor CTAGCgfsB. Die unterstrichenen in Fettschrift dargestellten Buchstaben in den Kapselbeschreibungen, wie die hier in Klammern dargestellten, weisen auf die Herkunft des Vektornamens hin (CMV-Promotor, der mit einer TATA-Box verbunden ist, welcher die Expression einer internen Reporter-Genkassette CMV-GFP-p(A) in entgegengesetzter Orientierung kontrolliert und der eine gag-Gen-Leserastermutation (engl. frame shift mutation) und eine nachfolgende Insertion der SV 40 T-Antigen-Bindungsstelle aufweist, um die Amplifikation des Plasmids nach der Transfektion in SV40 T-Antigen-exprimierende Zellen bewirkt wird). CTAGCgfsB wurde mittels einer dreiteiligen Ligation des pvul-EcoRI-Fragments von CT5, das EcoR1-Spe1-Fragment eines Plasmids, das ein Gen eines grünen fluoreszierenden Proteins (engl. green fluorescent protein; GFP) enthält, pZcmvGFPpA, und des Spe1-Pvul-Fragments von CT5 konstruiert. Diese Ligation ordnet die CMV-Promotor-GFP-p(A)-Signalkassette in entgegengesetzter Orientierung zwischen EcoRI und Spe1 in dem FIV-Genom an. Anschließend wurde die Tth III 1-Stelle im Bereich von gag/pol, der in dem Vektor verbleibt, geschnitten, mit Klenow-Polymerase in Gegenwart von 200 µM dNTPs aufgefüllt und mit T4-DNA-Ligase verbunden. Die Ligation über stumpfe Enden führt einen zusätzlichen G-Rest ein, der zu einer Leserasterverschiebung in dem gag-Fragment einige Basen entfernt von der Tth III 1-Stelle führt. Es sind keine pol-Sequenzen vorhanden. Deshalb muss der gag/pol-Vorläufer in trans von CF1Δenv oder nachfolgenden Abwandlungen von CF1Δenv bereitgestellt werden. Überdies verringert dieser Schritt die Wahrscheinlichkeit einer Wildtyp-Rekombination und die Wahrscheinlichkeit, dass ein transdominant-interferierendes Gag-Proteinfragment erzeugt wird. Schließlich wurde die SV40-Promotor-neoR-Kassette von pRc/CMV außerhalb von Vektorsequenzen in das Plasmid eingefügt, um von der SV40-T-Antigen-kontrollierten Plasmid-Amplifikation zu profitieren und die Selektion auf neoR, falls erforderlich, zu ermöglichen. In einer Abwandlung kann das ATG-Startcodon des gag-Gens zu einem Stop-Codon mutagenisiert werden. Zudem ist die Region zwischen der BsRG1-Stelle und den stromaufwärts gelegenen PstI-Stellen gegebenenfalls deletiert, um mehr von gag zu entfernen.

2. Vektor CTRZLb. (CMV-Promotor, der mit einer TATA-Box verbunden ist, welcher die Expression kontrolliert und mit der R-Sequenzwiederholung einer internen Sense-orientierten LacZ-Reporter-Genkassette be-

ginnt und ein 3'LTR nach lacZ aufweist; er weist auch eine Leserrastermutation des gag-Gens an der Tth III 1-Stelle und eine nachfolgende Insertion der SV40 T-Antigen-Bindungsstelle auf, um nach der Transfektion die Amplifikation des Plasmids zu bewirken). Um diesen Vektor zu konstruieren, wurde CTAGCgfs zwischen EcoR1 und BsrG1 mittels Schneiden mit diesen Enzymen deletiert, Klenow-behandelt mit 200 µM dNTPs, über stumpfe Enden mit T4-Ligase ligiert und gegen den Wildtyp mit EcoR1 selektiert. Die BsrG1-Stelle wurde wieder erhalten. Das BsrGI-EcoNI-Fragment von pz-lacZ wurde mit Klenow-Polymerase behandelt und über stumpfe Enden in die einzige EcoNI-Stelle ligiert. Die Struktur war folglich: CMV-Promotor – Tata-Box-Fusion mit FIV R-Sequenzwiederholung – U5 – Δgag-FIV Rev-Response-Element-cmv-Promotor-LacZ-Gen-LTR. Schließlich wurde die SV40 Promotor-neoR-Region aus pRc/CMV in das Plasmid stromabwärts des Vektors eingefügt, um eine T-Antigenbindungsstelle bereitzustellen, um von der SV40-T-Antigen-kontrollierten Plasmid-Amplifikation zu profitieren und die Selektion auf neoR, falls erforderlich, zu ermöglichen. Das ATG-Startcodon des gag-Gens kann zu einem Stopcodon mutagenisiert werden und die zusätzlichen Bereiche von gag sind gegebenenfalls deletiert.

[0140] Die durch das Calciumphosphat-Cotransfektionsverfahren erzeugten Vektorüberstände wurden auf menschliche (HeLa, 293) und feline (CRFK, Fc3Tg) Zellen gegeben. Verglichen mit herkömmlichen retroviralen Vektoren, die auf dem murinen Moloney-Leukämievirus (Mo-MuLV)-basieren, waren die FIV-Vektoren bezüglich des Transduzierens von humanen und feline Zellen gleich effizient. Titer von 10^7 wurden sowohl mit feline als auch humanen Zellen nach einer einzigen Konzentrationsrunde durch Ultrazentrifugation erreicht. Höhere Titer sind mit einer Verbesserung der Transfektion und weiteren Ultrazentrifugation erreichbar. Zusätzlich werden sowohl humane (HeLa) als auch feline (CRFK) Zellen effizient transduziert, wenn deren Wachstum durch die Verwendung von 15 µg/ml Aphidicolin im Kulturmedium, das 24 h vor der Transduktion zugegeben und während dem LacZ-Färben täglich ausgetauscht wurde, arretiert wurde. Die LacZ-Titer mit dem FIV-Vektor in Aphidicolin-arretierten Zellen betragen 80 bis 90% derjenigen von sich teilenden Zellen, während die Transduktion von Mo-MuLV-Vektoren durch die Aphidicolin-Behandlung wegfiel. Diese Ergebnisse zeigen, dass der FIV-Vektor humane Zellen transduzieren kann und eindeutig Lentivirus-spezifische biologische Eigenschaften aufweist, die den herkömmlichen (z.B. murinen) retroviralen Vektoren fehlen: die Fähigkeit, sich nicht teilende Zellen zu transduzieren. Es ist wichtig, dass wir keine Präferenz der FIV-Vektoren für feline Zellen nachgewiesen haben: die relative Transduktion von verschiedenen humanen und feline Zellen war zellspezifisch und nicht vektorspezifisch. Dies bedeutet mit anderen Worten, dass die Zellen, die mit dem FIV-Vektor effizient transfektiert wurden, auch durch herkömmliche murine Moloney-Leukämie-Virus-Vektoren transduziert wurden und umgekehrt.

[0141] Diese Erfindung ist auf die humane Gentherapie anwendbar. Wie oben genau beschrieben, weisen diese retroviralen Vektoren Sicherheitsvorteile gegenüber HIV-basierten lentiviralen Vektoren auf, da die HIV-Vektoren sich von letalen Humanpathogenen ableiten. Da mit den FIV-Vektoren in Anlagen der Sicherheitsstufe BL-2 gearbeitet werden kann, sind die Risiken, denen sich Personen aussetzen, die an deren Herstellung beteiligt sind, verglichen mit HIV-Vektoren geringer und die Herstellung ist einfacher und praktischer. Diese Vektoren weisen Vorteile gegenüber anderen Gentransportverfahren auf, wenn ein stabiler Gentransfer in sich nicht teilende oder sich unregelmäßige teilende Zellen gewünscht ist. Solche Zellen umfassen Zellen des menschlichen Nervensystems, Auges, hämatopoietischen Systems, Integuments, endokrinen Systems, Leber/Gallen-Systeme, Magen-Darm-Trakts, Urogenitaltrakts, Knochens, Muskels, kardiovaskulären Systems und respiratorischen Systems, sind jedoch nicht darauf beschränkt. Diese Vektoren vermeiden auch den Kontakt von Patienten mit nicht menschlichen Zellen und lentiviralen Genen oder lentiviralen Proteinen, die sich von bekannten Pathogenen ableiten.

Beispiel 2: Transduktion von sich nicht teilenden humanen Zellen mit FIV-basierten lentiviralen Vektoren und Nachweis eines CXCR4-Erfordernisses für die FIV-Infektion und -Zytopathogenität

[0142] HIV-basierte lentivirale Vektoren transduzieren sich nicht teilende Zellen effizient, sind jedoch wegen deren Abstammung von letalen humanen Pathogenen problematisch. Die Verwendung der Nicht-Primate-Lentiviren war jedoch erschwert durch einen relativen Wissensmangel bezüglich deren molekularen Eigenschaften, insbesondere deren Anpassungsfähigkeit gegenüber menschlichen Zellen. Dieses Beispiel beschreibt sowohl die produktiven als auch die postrezeptorischen Infektionsmechanismen des FIV-Lebenszyklus in menschlichen Zellen und zeigt, dass die für die Transduktion von lentiviralen Vektoren erforderlichen Funktionen auf hocheffiziente Weise auftreten können. Der FIV-Promotor, der in den nicht-feline Zellen schlecht funktioniert, wurde substituiert. Ein vollständig durch heterologe Promotoren angetriebenes und ein env-pseudotypisiertes FIV-Vektorsystem zeigte eine Expression in humanen Zellen mit hoher Rate sowie ein Prozessieren von FIV-Proteinen in trans und erzeugte retrovirale FIV-Vektoren, welche sich teilende, Wachstum-arretierte und postmitotische menschliche Zellen (Makrophagen und hNT-Nervenzellen) mit hohen Titern transduzierten.

Das System beseitigt die Sicherheitsrisiken von feline Herstellungszellen. Es wurde eine schwere Zytotoxizität des durch heterologe Promotoren angetriebenen FIV-Hüllproteins in menschlichen Zellen beobachtet und die erfindungsgemäßen Vektoren wurden verwendet, um dieses Phänomen zu untersuchen. Die Expression des FIV-Genoms mit dem humanen Cytomegalovirus-Promotor verursachte Env-spezifische Syncytien in einer Vielzahl von menschlichen Zellen, nicht jedoch in Nagerzellen. Überdies erforderte diese Fusionsaktivität die gleichzeitige Expression von CXCR4, den Corezeptor für Syncytium-induzierende Stämme von HIV. Trotz der Abhängigkeit von CXCR4 war die Induktion von FIV Env-Syncytien in Nicht-Wirtszellen von dem Virus-Eintritt trennbar: die Expression von CXCR4 in nicht-feline Zellen erlaubte die FIV Env-spezifische Zellfusion, jedoch weder die FIV Env-vermittelte Vektortransduktion noch eine virale Replikation. In Übereinstimmung mit einer Corezeptorrolle veränderte die Expression von humanem CXCR4 in feline Zellen den Virus-Phänotyp von nichtzytotoxischen zu hochzytotoxischen und erhöhte sowohl die virale Ansteckungsfähigkeit als auch die Transduktion von FIV-umhüllten Vektoren. Die Verwendung von CXCR4 durch evolutionär entfernte verwandte Lentiviren impliziert eine elementare Rolle dieses Chemokin-Rezeptors bei der lentiviralen Replikation und Zytotoxizität. Die Ergebnisse haben Auswirkungen auf die vergleichende Lentivirusbiologie als auch auf die humane Gentherapie.

[0143] Es wurde ein molekularer Klon mit einem ORF2-Defekt (FIV 34TF10)¹⁹ des Petaluma-Stamms verwendet (**Fig. 1**). Im oberen Teil der **Fig. 1** sind FIV 34TF10 und das Plasmid CF1 gezeigt. Weitere in dieser Untersuchung verwendete Abwandlungen von CF1 sind unter der Zeichnung von FIV 34TF10 dargestellt und beschrieben. Um CF1 zu erzeugen, wurde das SacI-EspI-Fragment von 34TF10 über stumpfe Enden zwischen NotI und XbaI in den Polylinker des Expressionsplasmids pRc/CMV mit dem hCMVIE-Promotor (Invertogen) ligiert. Es erfolgte eine Fusion des hCMVIE-Promotors mit dem FIV-Genom zwischen der TATA-Box (CMVIEp-abgeleitet) und dem Beginn der R-Sequenzwiederholung (FIV-abgeleitet), welche für das Plasmid CT5 gezeigt ist (Verbindungsstelle an der SacI-Stelle). Die PCR-erzeugte Fusion führt dazu, dass die FIV R-Sequenzwiederholungen stromabwärts von der TATA-Box von CMV in genauem Raster zu der ersetzten TATA-Box aus FIV angeordnet ist; sie kontrolliert auch die Expression der Vektoren (unten), die alle keine vif-, ORF2-, pol- und env- Sequenzen aufweisen. Die Markergen-kassette liegt in Sense-Orientierung für lacZ und Antisense-Orientierung, mit einem zusätzlichen poly(A)-Signal, für GFP vor. Eine Leserasterverschiebung wurde bei nt 298 des verbleibenden gag-Fragments in die Vektoren eingeführt. Um einen pseudotypisierten Vektor zu erzeugen, wurde das VSV-G-Expressionsplasmid pHCMV-G 42 (nicht gezeigt) in 293T-Zellen mit CF1 Δ env und den gezeigten Vektoren cotransfiziert. Weitere Einzelheiten zum Klonieren finden sich in Beispiel 1.

[0144] 34TF10 infiziert produktiv feline Crandell-Nierenzelle (CRFK-Zellen), nicht jedoch feline periphere Blutlymphozyten oder feline primäre Makrophagen (Carpenter & O'Brien (1995) *Current Opinion in Genetics and Development* 5, 739–745; Waters et al. (1996) *Virology* 215, 10–16; Sparger et al. (1994) *Virology* 205, 546–553; Bandecchi et al. (1995) *New Microbiologica* 18, 241–252; Tozzini et al. (1992) *Journal of Virological Methods* 37, 241–252 (1992); Olmsted et al. (1989) *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86, 2448–2452). Dieser eingeschränkte Tropismus kartiert in die ORF2-Mutation, nicht env: die Reparatur von ORF2, ein mutmaßlicher LTR-Transaktivator, führt zu einer produktiven 34TF10-Infektion aller dieser feline Zelltypen mit 36. Die 34TF10-Hülle kann deshalb in entfernter Analogie zu HIV als einen „dualen Tropismus“ aufweisend angesehen werden; eine laborangepasste/T-tropische versus-primäre/Makrophagen-tropische-Klassifikation wurde für FIV-Stämme oder Klone nicht festgelegt. Obwohl die CD4-Verarmung, die zu AIDS führt, charakteristisch ist, infiziert FIV auch CD8⁺-T-Zellen und B-Zellen als auch CD4⁺-T-Zellen in infizierten Katzen (Pedersen (1993), *supra*). Weder 34TF10 noch irgendein anderer Hauskatzenstamm oder -klon sind in CRFK-Zellen zytolytisch; kleine vielkernige Riesenzellen (4–12 Zellkerne) können in einer maximal infizierten Kultur nachgewiesen werden, ein häufiger Zelltod erfolgt jedoch nicht (Barr et al. (1995), *supra*; Tozzini et al. (1992) *Journal of Virological Methods* 37, 241–252; Barr (1997) *Virology* 228, 84–91). 34TF10 führt zu keiner signifikanten Virämie oder Erkrankung in experimentell infizierten Hauskatzen; der in vivo-Phänotyp des ORF2-reparierten Klons ist noch nicht bekannt (Sparger et al. (1994) *Virology* 205, 546–553).

[0145] Wie in **Fig. 1** graphisch dargestellt wurde der Immediate-Early-Genpromotor (hCMVIEp) von humanem Cytomegalovirus so angeordnet, dass dieser entweder (a) den gesamten FIV-LTR ersetzt mit einer Verbindungsstelle 97 nt stromaufwärts der FIV 5'-Hauptpleisstelle, (im Plasmid CF1) oder (b) selektiv die FIV U3-Promotorelemente durch eine Fusion an der Position –14 zwischen der TATA-Box und der Transkriptionsstartstelle, d.h. der R-Sequenzwiederholung, selektiv ersetzt (im Plasmid CT5 und in FIV-Vektoren). Bei dieser Anordnung ist die TATA-Box von CMV in Bezug auf die Transkriptionsstartstelle (Position –27) in genauem Leseraster zu der ersetzten TATA-Box von FIV angeordnet. CF1 fehlen beide LTRs, außer des 89 nt langen Bereichs des 3-Strich-U3, welcher mit dem rev ORF überlappt (FIV weist kein Homolog zu dem nef von HIV auf), folglich sind die cis-wirkenden Sequenzen, die für die Replikation und die Integration erforderlich sind (U3-Pro-

motorsequenzen, tRNA-Primer-Bindungsstellen, R-Sequenzwiederholungen, U5-Elemente) deletiert. Bezüglich der Einzelheiten betreffend das Klonieren der in diesem Beispiel beschriebenen Konstrukte wird auch auf das Beispiel 1 verwiesen. CF1 Δ env weist eine zusätzliche 875 nt-Deletion in env auf, welche sich über die SU-TM-Verbindungsstelle erstreckt und ebenfalls zu einer Änderung des Leserasters führt: dieses Plasmid, das zum Verpacken von pseudotypisierten Vektoren verwendet wurde, weist demzufolge einen Defekt bezüglich ORF-2, env und den erwähnten cis-wirkenden retroviralen Elementen auf. Im Gegensatz dazu codiert CT5 replikationskompetentes 34TF10, das vollständig dem Wildtyp entspricht. Das System benötigt daher keinen felines Promotor. Die Funktion von ORF2 ist nicht abschliessend bestimmt, die für dessen Genprodukt 36 beschriebene FIV LTR-transaktivierende Aktivität wäre jedoch folglich auch entbehrlich.

[0146] Die Transfektion von menschlichen Zellen mit CF1 oder CT5, nicht jedoch 34TF10, führte innerhalb von 12–18 h zu einer explosionsartigen Bildung von Syncytien. HeLa-Zellen- und humane Zellen embryonale 293-Nierenzellen-Monolayer wurden innerhalb von 48–60 h nach der Transfektion mit CF1 oder CT5 auf reproduzierbare Art und Weise zu 90–95% durch Syncytien-vermittelte Lyse zerstört (**Fig. 1**). Alle drei Plasmide erzeugten in CRFK-Zellen immer viel weniger (400-fach), kleinere (4–12 Zellkerne) Syncytien und keine erkennbare Zytolyse.

[0147] Die Transfektionen erfolgten durch die Calciumphosphat-Präzipitation, außer für U87MG und U87MG. CXCR4-Zellen, die elektroporiert wurden. In allen Fällen wurden die in dieser Untersuchung transfizierten Zellen mittels des quantitativen Syncytien-Fokus-Assays verglichen, wobei Zellen verwendet wurden, die gleichzeitig mit demselben Calciumphosphat-Präzipitat transfiziert wurden. Die Zellen wurden mit Kristallviolett gefärbt oder, für fokale Infektiositäts-Assays, durch die Immunperoxidase-Färbung mit FIV-Petaluma-Seren und einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten sekundären Ziegenantikörper gegen felines IgG41 eingefärbt. Alle Vergleiche wurden durch die Cotransfektion eines unter der Kontrolle eines hCMVIE-Promotors stehenden GFP- oder LacZ-Reporterplasmids, als 10% der eingesetzten DNA, kontrolliert; nur Experimente, deren Transfektionseffizienzen sich unter den verglichenen Zelllinien um < 5% unterschieden, sind wiedergegeben. Wenn die Lyse nach 24 h für CF1 erheblich war, wurde die Vergleichstransfektionseffizienz mittels GFP-Fluoreszenz in nebeneinander liegenden Wells in Gegenwart einer 1:300-Verdünnung von FIV-infiziertem Hauskatzenplasma untersucht, um die Bildung von Syncytien zu hemmen. Alle Zellen waren ATCC-Linien, die in 10% Rinderserum mit Antibiotika vermehrt wurden; die CRFK-Zellen wurden wie beschrieben in L50-Medium gezüchtet. Die ATCC-Nr. für CRFK ist ATCC CCL94.

[0148] Übereinstimmend mit früheren Studien (Barr et al. (1995) *Journal of Virology* 69, 7371–7374) führte die Transfektion von CRFK-Zellen (ATCC CCL 94) mit 34TF10 und CT5 nach 7 bis 14 Tagen zu einer persistierenden Infektion mit hohen Konzentrationen von RT ($> 5 \times 10^5$ cpm/ml), jedoch zu minimalen zytopathischen Wirkungen (6–12 \pm 4 Syncytien, jeweils 4–8 Zellkerne, je 9,6 cm²-Well einer Platte mit 6 Wells). CF1 erzeugte jedoch, wie erwartet, kein infektiöses Virus: die Zugabe von filtriertem Überstand von CF1-transfizierten menschlichen oder felines Zellen zu 10^7 CRFK-Zellen oder zu 10^7 menschlichen Zellen (HeLa, 293, H9, Molt4, supT1, U937) erzeugte keine Syncytien oder RT; die adhärennten Zelllinien waren auch in einem bereits beschriebenen fokalen Infektiositäts-Assay (FIA) negativ (Remington et al. (1991) *Journal of Virology* 65, 308–312), der auf < 5 infektiöse Einheiten pro ml in 34TF10- oder CT5-infizierten CRFK-Zellen reagiert.

[0149] Unabhängig davon, ob in menschlichen oder CRFK-Zellen hergestellt, replizierten weder p34TF10- noch CT5-erzeugtes FIV in irgendeiner menschlichen Zellen. Dennoch wurden die Syncytien, die durch die CF1- und CT5-Transfektion in menschliche und feline Zellen erzeugt wurden, spezifisch durch das FIV-Hüllprotein hervorgerufen, da die Transfektion von CF1 Δ env niemals Syncytien in irgendeiner Zelle erzeugte, jedoch zu vergleichbar hohen Konzentrationen von RT führte.

[0150] Mg²⁺-abhängige Reverse Transkriptase wurde wie zuvor beschrieben (Willey et al. (1988) *Journal of Virology* 62, 139–147) 52 h nach der Transfektion der erwähnten Plasmide in CRFK-Zellen, HeLa-, 293- und 293T-Zellen gemessen. Eine umfassende Syncytien-vermittelte Lyse wurde in Zellen beobachtet, die mit CTS, CF1, CF1 Δ pol und pHCMV-G transfiziert wurden. Die letzten zwei Plasmide wurden als Kontrollen für die Zytolyse mit einbezogen, um die virale Spezifität zu verifizieren. Überstände von H9-Zellen, die zwei Wochen früher mit HIV-1 und HIV-2 bei einem m.o.i. von 1,0 infiziert wurden, wurden zum Vergleich ebenfalls untersucht. In **Fig. 2** stellt jeder Punkt den Mittelwert von Dreifachmessungen \pm Standardfehler dar. Es wurde eine Radioimmunopräzipitation von transfizierten Zellen mit FIV(Petaluma-Stamm)-infiziertem Hauskatzenplasma durchgeführt. 293-Zellen, HeLa- und CRFK-Zellen wurden mit den erwähnten Plasmiden mittels Calciumphosphat-Präzipitation in 25 cm²-Kolben transfiziert. Nach 27 h (293-Zellen) oder 48 h (HeLa- und CRFK-Zellen) nach der Transfektion wurden die Zellen für 5 h mit ³⁵S-Cystein und ³⁵S-Methionin in Cystein- und Methionin-freiem Medium mit 7,5% dialysiertem fötalem Rinderserum nach einer Präinkubation in diesem Medium ohne Isotop für

eine Stunde radioaktiv markiert. Die Lysate wurden mit normalem Katzenserum und Protein A-Sepharose vorgeklärt, über Nacht mit 10 µl FIV-infiziertem Katzenplasma inkubiert, mit Protein A-Sepharose präzipitiert und einer Elektrophorese mit vorgefärbten Markern in 10 oder 12,5% SDS-Polyacrylamidgelen unterzogen. Die Lysate leiten sich wegen des Zellverlusts aufgrund der erheblichen Syncytien-vermittelten Lyse von ungefähr 15–25% der Menge der Zellen in den anderen Spuren ab. Die Abbildung B zeigt die Inhibierung von CF1-induzierten Syncytien in 293 T- und HeLa-Zellen durch FIV-infiziertes Hauskatzenplasma. Nach 48 h wurden Foci mit ≥ 8 Zellkerne als Syncytien bewertet, wobei die mit Methanol fixierten Zellen mit Kristallviolett angefärbt wurden. Verdünnungen von entweder FIV⁺ (Quadrate, Kreise) oder FIV⁻ (Rauten, Dreiecke) Plasmen wurden zum Zeitpunkt der Transfektion zu den Zellen in Platten mit 12 Wells gegeben und erneut beim Wechsel des Mediums 14 h später.

[0151] Die Syncytien in CF1-transfizierten menschlichen Zellen wurden durch das mit dem FIV Petamula-Stamm infizierte Hauskatzenplasma stark supprimiert, mit einer 50%-Inhibierung auf 293 T- und HeLa-Zellen bei einer 1:32000-fachen beziehungsweise 1:12700-fachen Verdünnung, während das Präimmunhauskatzenplasma bei keiner Verdünnung, selbst bei 1:10, keine Wirkung auf die Bildung von Syncytien hatte ([Fig. 2B](#)). Überdies wurde die Induktion von Syncytien durch eine kleinere, 539 nt lange (nt 7322–7861), das Leseraster nicht verändernde Deletion verunmöglicht, die auf den SU-Bereich von env eingeengt wurde (welcher die TM-Domäne und die stromaufwärts gelegene proteolytische Schnittstelle unberührt lässt; siehe CF1ΔSU in [Fig. 1](#)), was darauf hinweist, dass sowohl die SU- als auch die TM-Domäne der Hülle für die Induktion von Syncytien benötigt werden. Die Transfektionseffizienzen, die durch GFP-Reporter-Cotransfektion in nebeneinander liegenden Wells in Gegenwart von Antiserum, das für die Versuche 1:300-fach verdünnt wurde, bestimmt wurden, betragen $\leq 10\%$, wodurch gezeigt wurde, dass die Syncytium-vermittelte Lyse durch die Verschmelzung von nicht transfizierten Zellen mit transfizierten Zellen vermittelt wurde.

[0152] Die Expression in menschlichen Zellen wurde dann durch Reverse Transkriptase(RT)-Assays und durch Immunopräzipitation von radioaktiv markierten Zellen mit Plasma von FIV-infizierten Hauskatzen weiter untersucht. Konstrukte, die unter der Kontrolle des hCMVIE-Promotors stehen, exprimierten hohe Konzentrationen von Mg²⁺-abhängiger RT in menschlichen Zellen (HeLa, 293, 293T) und waren zudem besser als der native LTR von p34TF10 sowohl in felinen (CRFK)-Zellen als auch in menschlichen Zellen ([Fig. 2A](#)). Im Gegensatz dazu war die LTR-kontrollierte RT-Expression durch 34TF10 in menschlichen Zellen minimal; die Proteinexpression durch die chimären hCMVIEp-Konstrukte war auch etwa sechsmal so hoch wie die 34TF10-Expression in den felinen Zellen. Eine pol-Deletionsmutante (CF1Δpol) erzeugte keine RT ([Fig. 2A](#)), erzeugte jedoch ebenso ausgedehnte Syncytien wie CF1.

[0153] Die Immunpräzipitation von transfizierten, radioaktiv markierten humanen und felinen Zellen zeigte ein Wildtyp-34TF10-Expressionsmuster durch CF1 oder CT5 in menschlichen Zellen, wobei die Mengen den RT-Assays entsprachen. Eine p34TF10-Expression war dennoch eindeutig durch RIPA in HeLa-Zellen nachweisbar, jedoch mit einer beträchtlich geringeren Konzentration als die CMVIEp-chimären Konstrukte und war in 293- oder 293 T-Zellen (selbst nach anhaltender Schichteinwirkung) nicht nachweisbar. Im Einklang mit diesem Ergebnis wurden kleine Syncytien (4–6 Zellkerne, 11–14 Syncytien ± 4 , n = 4, je Well einer Platte mit 6 Wells 48 h nach einer Transfektion mit p34TF10) in HeLa-Zellen nachweisbar. Die Leseraster-beibehaltende SU-Deletion von CF1ΔSU führte zu dem vorhergesagten verkürzten Hüllenvorläufer; dieser läuft in einem schlecht aufgelösten Schmier mit dem verkürzten SU/gp100-Spaltprodukt. Das verwendete Plasma präzipitierte das TM-Protein beliebiger Zellen nicht. Die anderen zwei env-Mutanten verunmöglichten die Herstellung von immunpräzipitierbarem Env und es wurden in allen Zellen keine Syncytien durch die Hüllmutanten gebildet. Im Einklang mit den RT-Daten war die CF1-Expression auch besser als die LTR-kontrollierte Expression in CRFK-Zellen.

[0154] Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass eine hohe Expression des gesamten Genom-Repertoires eines Nicht-Primates-Lentivirus in menschlichen Zellen erfolgt und dass es durch die Promotorsubstitution möglich ist, dass die produktive Phase der FIV-Replikation (umfassend die Rev/RRE-regulatorische Achse, das Spleissen, die Herstellung sowohl von Gag/Pol- und Env-Vorläufern sowie das korrekte proteolytische Prozessieren derselben) in menschlichen Zellen mit maximaler Effizienz und mit höheren Raten als mit dem nativen Promotor oder dem CMVIE-Promotor in CRFK-Zellen erfolgt. Sowohl der selektive U3-Austausch (in CT5 und zur Verwendung in unten beschriebenen Vektoren) als auch die Substitution des gesamten LTR (für die Proteinzeugung in trans) waren effektiv.

[0155] Um die Phasen des FIV-Lebenszyklus nach dem Eintritt in menschlichen Zelle zu untersuchen, wurde CT5 als Ausgangspunkt für die Konstruktion von retroviralen Vektoren verwendet, die durch einen internen Promotor angetriebene Markergenkassetten enthalten, welche pol, env und die akzessorischen Proteine als

auch einen Teil von gag ersetzt. Eine Leseraster-Mutation wurde in allen Vektoren bei nt 298 des verbliebenen gag ORF durch Schliessen einer TthIII 1-Stelle über stumpfe Enden eingeführt, wodurch ein Stop-Codon bei nt 319 erzeugt wurde (Fig. 1). Der Vektor CTRZLb wurde mit CF1Δenv und dem VSV-G-Expressionsplasmid pHCMV-G mittels Calciumphosphat-Copräzipitation in 293T-Zellen cotransfiziert. 48 bis 96 h nach der Transfektion wurden die Überstände des FIV-Vektors und eines VSV-G-pseudotypisierten Mu-MLV lacZ-Kontrollvektors geklärt, filtriert (0,45 µM), auf HeLa-Zellen gegeben und dann erneut durch limitierte Verdünnung auf eine Platte von felines und menschlichen Zelllinien gegeben; die Experimente erfolgten mit Zellen, die sich entweder im Wachstum befanden oder mit 20 µg/ml Aphidicolin in G1/S arretiert waren. Hohe Titer (10^6), die denjenigen eines herkömmlichen murinen retroviralen Moloney-Leukämievirus-Vektors entsprechen, waren mit einer einzigen Konzentrationsrunde durch Ultrazentrifugation erreichbar (Burns et al. (1991) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90, 8033–8037). Wie die HIV-Vektoren wurde der FIV-Vektor nur minimal durch die Arretierung des Zellzykluses beeinflusst, während die Transduktion des Mu-MLV-Vektors eliminiert wurde, wodurch diese Lentivirus-spezifische Eigenschaft des FIV-Vektors und die Übertragbarkeit dieser Eigenschaften auf menschliche Zellen nachgewiesen wurde. Ebenso wichtig ist die Tatsache, dass der FIV-Vektor, verglichen mit dem VSV-G-pseudotypisierten murinen Moloney-Leukämievirus-LacZ-Vektor in wachsenden Zellen, keine signifikante Präferenz für feline Zellen aufwies (vergleiche die Titerverhältnisse, siehe hierzu die graphische Darstellung in dem Tabelleneinsatz). Wenn nach der Transduktion mit CTRZLb eine Proliferation ermöglicht wurde, wurden große (100–400 Zellen) homoge LacZ-positive Kolonien erzeugt, die auf die stabile, klonale Erhaltung des Transgens hinweisen. Obwohl die Zellen wie erwartet hinsichtlich der Transduzierbarkeit beträchtlich variierten, waren diese Unterschiede für die Moloney- und FIV-Vektoren gleich: das heißt, dass diese zellspezifisch und nicht vektorspezifisch waren und widerspiegelt die Suszeptivität für eine VSV-G-vermittelte Transduktion. Damit wurde gezeigt, dass das Haupthindernis in der Infektionsphase des FIV-Lebenszyklus in nicht-felinen Zellen auf der Ebene des Eintritts des Virions und nicht etwa weiter nachfolgend vorliegt.

[0156] Um die Fähigkeit der FIV-Vektoren, sich nicht teilende menschliche Zellen zu transduzieren, weiter zu untersuchen, haben wir postmitotische menschliche Zellen transduziert, wobei die zwei am weitesten entwickelten und am besten beschriebenen humanen Gewebekulturmodelle verwendet wurden: primäre humane Makrophagen und hNT-Nervenzellen. hNT-Nervenzellen sind irreversibel differenzierte, polarisierte humane Nervenzellen, die über ein 6 Wochen dauerndes Verfahren, das Retinolsäure und mehrere Mitoseinhibitoren verwendet, von NT2-Teratokarzinom-Zellen hergeleitet werden. Die zum dritten Mal ausplattierten hNT-Zellen, die hier verwendet werden, sind irreversibel postmitotisch, verbleiben in diesem Zustand nach der Transplantation in das Gehirn von Nacktmäusen für ein Jahr, ähneln morphologisch primären Nervenzellen, exprimieren eine Fülle von Nervenzellen-spezifischen Markern und wachsen zu Klumpen von Nervenzellen, welche funktionelle Axone und Dendriten bilden. Die Transduktion von hNT-Nervenzellen bei einem moi von 1,0 zeigte, dass die LacZ-Färbung sowohl in Zellkörpern als auch in Zellfortsätzen sichtbar war. Primäre humane Makrophagen zeigten eine hohe LacZ-Hintergrundfärbung und wurden deshalb mit dem GFP-Vektor CTAGCb am Tag 9 nach der Isolierung aus peripherem Blut von normalen Spendern transduziert. Diese Zellen wurden durch den FIV-Vektor, nicht jedoch durch einen GFP-transduzierenden Mu-MLV-Vektor, mit hohem Titer transduziert.

[0157] Die Einflussfaktoren der FIV-Verpackung wurden bislang nicht untersucht. Die lentiviralen Verpackungssignale sind komplexer als diejenige von murinen Oncovirinae (Lever, (1996) Gene Therapy 3, 470–471). Die LTRs wurden in CF1Δenv deletiert, um das Verpacken zu verhindern und die Sequenzen zu entfernen, die für die reverse Transkription und die Integration erforderlich sind; die 20 Nukleotide zwischen der Hauptpleissstelle und dem gag-Gen, die mutmaßlich zum lentiviralen Verpacken beitragen, ist außergewöhnlich kurz in FIV (20 nt, verglichen mit 44 nt in HIV-1, 75 nt in HIV-2 und 375 nt in Mu-MLV). Das Scrambling und Deletieren dieses Bereichs kann den Titer verbessern.

[0158] Um zu untersuchen, ob FIV-Sequenzen, die Strukturgene codieren, durch die Transduktion mit CF1-verpackten Vektor in Zielzellen transferiert werden, wurden 10^6 CRFK-Zellen mit einem mit DNase-behandelten CTRZLb-Vektor mit einem $m.o.i. = 10$ transduziert, wodurch eine 99%-ige Transduktion erhalten wurden. 1 µg genomischer DNA dieser Zellen war mit PCR hinsichtlich gag-Sequenzen negativ, während die gleichzeitige Amplifikation derselben Menge dieser DNA, die mit genomischer DNA von lediglich 10 Zellen aus einer chronisch 34TF10-infizierten CRFK-Kultur versetzt wurde, positiv war.

[0159] Wenn die Expression der FIV-Hülle in menschlichen Zellen möglich war, führte dies zu einer schweren Zytotoxizität. Wegen der kürzlichen Entdeckung von CXCR4 als Corezeptor von Syncytium-induzierenden Stämmen von HIV, warf diese Beobachtung unmittelbar Fragen nach den spezifischen Mechanismus auf. Der FIV-Primärrezeptor bleibt unbekannt. Da die meisten menschlichen Zelllinien, einschließlich HeLa- und

293-Zellen, nennenswerte Konzentration von CXCR4 exprimieren, haben wir als Nächstes diejenigen seltenen menschlichen Zelllinien verwendet, von denen bekannt ist, dass sie kein CXCR4 (U87MG und SK-N-MC-Zellen) oder extrem geringe Konzentrationen von CXCR4 (HOS-Zellen) exprimieren (Benson et al. (1996) *Journal of Virology* 70, 6288–6295; Endres et al. (1996) *Cell* 87, 745–756; Harouse & Ganzales-Scarano (1996) *Journal of Virology* 70, 7290–7294). Die Transfektion von CF1 oder CT5 in U87MG- und K-N-MC-Zellen (durch Elektroporation oder Calciumphosphat-Coprazipitation) führte nie zur Syncytien-Bildung ($n = 9$ für jede Zelllinie, Transfektionseffizienzen $\geq 10\%$ bei einer GFP-Reporter-Cotransfektion). Außerdem erfolgte mit SK-N-MC oder U87MG-Zellen keine Fusion, während CF1-transfizierte Ratten-208F-Zellen ohne Weiteres mit einer Vielzahl von menschlichen Zelllinien und mit CRFK-Zellen fusionierten. Zusätzlich führte die Transfektion von anderen Nagerzellen (NIH 3T3, CHO) zu keinen Syncytien ($n = 8$, Effizienzen $\geq 10\%$ bei GFP-Cotransfektion).

[0160] Wir haben deshalb einen MMLV-basierten retroviralen Vektor, pZ.CXCR4, konstruiert, der humanes CXCR4 und neoR von einer bicistronischen mRNA exprimiert und haben diesen verwendet, um G418-selektierte U87MG-, HOS-, SK-N-MC-, NIH3T3- und CRFK-Zelllinien zu erzeugen, die humanes CXCR4 exprimieren. G418-selektierte Kontrolllinien wurden mit dem parentalen retroviralen Vektor pJZ30854 erzeugt. Die Expression von CXCR4 wurde für alle pZ.CXCR4-transduzierten Linien dokumentiert. Die Transfektion von CF1 oder CT5 in U87MG.CXCR4, SK-N-MC.CXCR4, 3T3.CXCR4 ($n = 8$ für CF1, $n = 6$ für CT5), nicht jedoch die gleichzeitige Transfektion in die jeweiligen Kontrolllinien, erzeugte übermäßig viele Syncytien. Überdies erzeugten die CF1-transfizierten HOS.CXCR4-Zellen sehr viele vielkernige Riesenzellen, die mehrere Hundert Zellkerne enthielten, während in CF1-transfizierten HOS-Zellen durchwegs 4–8 Zell-Syncytien beobachtet wurden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, haben wir auch feline/humane Zellmischuntersuchungen mit 3201-FIV-Zellen durchgeführt (chronisch mit FIV-infizierte Katzen-Lymphozyten, ATCC CRL 10909). U87MG-, SK-N-MC-, HOS-, 3T3-Zellen, deren jeweilige pZ.CXCR4-Vektor-selektierten Zelllinien, und HeLa-Zellen wurden alle in Platten mit sechs Wells ausplattiert (3×10^5 Zellen). Am nächsten Tag wurden 10^5 3201-FIV-Zellen pro Well zugegeben. Nach 18 h wurden große aufgeblähte Syncytien (umfassend 30–80% des Monolayers) der HeLa-Zellen und allen CXCR4-exprimierenden Zelllinien beobachtet; überhaupt keine Syncytien wurden zu irgendeinem Zeitpunkt in U87MG-, SK-N-MC-, HOS- oder 3T3-Zellen beobachtet.

[0161] Die Transduktion durch FIV-Env wurde dann mittels Cotransfektion von CF1 und CTRZLb in 293T-Zellen untersucht. Wie in Tabelle 1 gezeigt, war dieser Vektor unabhängig von der CXCR4-Expression nicht in der Lage, irgendeine menschliche Zelllinie zu transduzieren; eine Transduktion konnte in CRFK-Zellen nachgewiesen werden, jedoch mit einem sehr geringen Titer (< 10 Transduktionseinheiten/ml). Im Gegensatz dazu waren CRFK.CXCR4-Zellen mit einem wenigstens zwei logarithmische Einheiten höheren Titer ($3,6 \times 10^2$) als CRFK transduzierbar. Überdies inhibierte der Ligand für CXCR4 die Vektortransduktion über die FIV-Hülle.

[0162] Da die Vektordaten darauf hinweisen, das CXCR4 sowohl den Virus-Eintritt in feline Zellen steigert als auch die Fusion allgemein in breiterem Masse vermittelt, haben wir als Nächstes die Infektiosität von replikationskompetentem FIV auf CRFK-Zellen und CRFK.CXCR4-Zellen verglichen. Jede Zelllinie wurde in Platten mit 48 Wells mit 10^4 Zellen pro Well gegeben und am nächsten Tag mit vierfachen Reihenverdünnungen eines 34TF10-Virus-Stamms, der in CRFK-Zellen erzeugt wurde, infiziert. Um die aufgrund eines Artefakts verursachte Verringerung an Titer der merklichen Zytopathogenität von 34TF10 in CRFK.CXCR4-Zellen zu verringern, wurden die Platten fixiert und 40 h nach der Infektion mittels eines fokalen Infektiositäts-Assays untersucht (dabei wurde eine 1:500-Verdünnung der FIV-positiven Seren und ein Meerrettichperoxidase-konjugierter sekundärer AntiKatzen-IgG-Antikörper verwendet), der auf 1 in 10^6 infizierten Zellen reagiert (siehe auch, Remington et al. (1991) *Journal of Virology* 65; 308–312 und Chesebro & Wehrly (1988) *Journal of Virology* 62, 3779–3788). 34TF10 war achtmal infektiöser auf CRFK.CXCR4 als auf CRFK ($p = 0,0002$). Wir halten dies für eine Mindestschätzung für das Infektionsverhältnis, da zahlreiche abgerundete umherschwimmende oder schlecht adhätierende Zellen, welche durch IFA angefärbt wurden, bereits nach 40 h in den infizierten CRFK.CXCR4-Wells vorhanden waren (nicht jedoch in den nicht infizierten Kontroll-Wells oder den infizierten CRFK-Wells) und diese nicht mitgezählt wurden. Um diese Ergebnisse zu bestätigen, wurde eine limitierte Verdünnungstitration von 34TF10 auf die zwei Zelllinien durchgeführt, indem diese wie oben beschrieben infiziert wurden; die Zellen wurden in Zeitabständen von 4–5 Tagen aufgeteilt und die positiven Wells wurden durch einen RT-Assay identifiziert.

[0163] Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse, das die Fusionsaktivität und der Virus-Eintritt von entfernt verwandten Primaten- und Nicht-Primaten-Lentiviren durch dasselbe Zelloberflächenmolekül vermittelt werden: Diese breite Verwendung von CXCR4 im Falle eines Nicht-Primaten-Lentivirus, der CD4 nicht als Primärrezeptor verwendet, impliziert eine grundlegende Rolle von CXCR4 bei der lentiviralen Syncytien-Bildung und bei der Pathogenität von AIDS. Unsere Experimente schließen nicht aus, dass eine FIV-Hüllen-vermittelte Infektion von menschlichen Zellen mit geringer Rate erfolgt, möglicherweise über CXCR4 alleine, wie dies für

einige Isolate von HIV-1 und HIV-2 gut beschrieben wurde (Endres et al. (1996) Cell 87, 745–756; Harouse & Gonzalez-Scarano (1996) Journal of Virology 70, 7290–7294; McKnight et al. (1994) Virology 201, 8–18; Reeves et al. (1997) Virology 231, 130–134; Potempa et al. (1997) Journal of Virology 71, 4419–4424; Harouse et al. (1995) Journal of Virology 69, 7383–7390; Talbot et al. (1995) Journal of Virology 69, 3399–3406; Tateno et al. (1989) Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86, 4287–4290 (1989); Clapham et al. (1992) Journal of Virology 66, 3531–3537), weisen jedoch darauf hin, dass ein solcher Vorgang, wie in den meisten dieser Beispiele, ineffizient ist. Kaninchen können ebenso mit HIV-1 infiziert werden, der Vorgang ist jedoch völlig ineffizient (Garnder & Luciw (1989) FASEB Journal 3, 2593–2606). Unsere Daten stehen im Einklang mit der Existenz eines primären FIV-Rezeptors. Zusätzlich zu den Vektordaten unterstützen beispielsweise HeLa-Zellen die produktive FIV-Replikation nicht, waren jedoch mit den VSV-G-pseudotypisierten Vektoren leicht transduzierbar, exprimierten reichlich CXCR4, wiesen eine erhebliche Env-spezifische Zytotoxizität auf, zeigten geringe, jedoch signifikante Raten einer FIV LTR-gesteuerten Expression, ermöglichten das normale Prozessieren von viralen Proteinen und erzeugten ausgehend von dem Plasmid CT5 replikationskompetentes FIV.

[0164] Die Ergebnisse haben deshalb wichtige Auswirkungen auf die Lentivirusbiologie als auch für die humane Gentherapie. Indem gezeigt wurde, dass einen Nicht-Primaten-Lentivirus CXCR-4 auch sowohl für die Zellfusion als auch für den Viruseintritt verwendet, zeigen unsere Daten, dass dieser Chemokinrezeptor eine sehr grundlegende Rolle bei der Replikation von Lentiviren, bei der Bildung von Syncytien und vielleicht in der Pathogenese spielt. Es ist ebenfalls wahrscheinlich, dass die in vivo-Replikation von FIV zusätzliche und subtilere Voraussetzungen aufweist. Die FIV-Vektoren stellen daher eine schon an sich sicherere Alternative zu HIV-Vektoren dar. Die epidemiologischen Anhaltspunkte für diese Hypothese sind für FIV stärker als für irgendeinen anderen Nicht-Primaten-Lentivirus, da FIV, nach der über viele Jahre durch den gleichen in Katzen wirksamen grundsätzlichen Infektionsweg (Katzenbisse) erfolgten natürlichen Inokulation vieler Menschen, nicht in der Lage ist, infizierend zu wirken oder eine Erkrankung in Menschen zu verursachen. Des Weiteren sind zusätzlich zu U3, ORF2 und env, Deletionen von FIV-Sequenzen sowohl der Vektoren als auch der Verpackungsplasmide möglich. Die FIV-Vektoren sind logistisch einfacher herzustellen, da infektiöses FIV routinemäßig in Gewebekulturen der biologischen Sicherheitsstufe 2 vermehrt wird (die hierin beschriebenen Vektoren sind für die BL-2-Verwendung durch das UC San Diego Institutional Biosafety Committee zugelassen).

Patentansprüche

1. Nukleinsäurevektor, umfassend eine FIV-Verpackungs-Stelle und ein FIV-5'-LTR, wobei die U3-Region des 5'-LTR ersetzt ist durch eine Expressionsregulierungssequenz, welche in menschlichen Zellen funktioniert; und wobei der Nukleinsäurevektor nicht in der Lage ist, mindestens ein virales Protein, notwendig für das Verpacken des Vektors in einen Viruspartikel im Kontext einer Zelle, zu erzeugen.
2. Nukleinsäurevektor von Anspruch 1, umfassend eine heterologe Nukleinsäure, funktionstüchtig verknüpft an eine Expressionsregulierungssequenz, welche in menschlichen Zellen funktioniert.
3. Nukleinsäurevektor von Anspruch 2, wobei die heterologe Nukleinsäure ein Protein codiert.
4. Nukleinsäurevektor von Anspruch 2, wobei die heterologe Nukleinsäure einen viralen Inhibitor codiert.
5. Nukleinsäurevektor von Anspruch 4, wobei der virale Inhibitor gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus Antisinn-Nukleinsäure, Ribozym, Köder-Nukleinsäure und transdominanter Nukleinsäure.
6. Nukleinsäurevektor von Anspruch 2, wobei die heterologe Nukleinsäure eine HIV-Komponente codiert.
7. Nukleinsäurevektor von mindestens einem der Ansprüche 2 bis 6, wobei die Expressionsregulierungssequenz gewählt ist aus der Gruppe, bestehend aus der CMV-Promotorsequenz, HIV-Promotorsequenz, HIV-LTR-Promotorsequenz, SV-40-Promotorsequenz, pol-II-Promotorsequenz und po-III-Promotorsequenz.
8. Nukleinsäurevektor von Anspruch 7, wobei die Expressionsregulierungssequenz eine CMV-Promotorsequenz ist.
9. Nukleinsäurevektor von Anspruch 1, welcher die R-Region und U5-Region des 5'-LTR umfasst.
10. Nukleinsäurevektor von Anspruch 1, welcher ein FIV-3'-LTR umfasst und wobei die U3-Region des 3'-LTR oder ein Teil davon deletiert ist.

11. Viruspartikel, welches den Nukleinsäurevektor von Anspruch 1 umfasst.
12. Viruspartikel von Anspruch 11, umfassend ein virales env-Polypeptid, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus FIV-Hüll-Polypeptid, HIV-Hüll-Polypeptid, VSV-Hüll-Polypeptid, MoMLV-Hüll-Polypeptid und GALV-Hüll-Polypeptid.
13. Viruspartikel von Anspruch 11, umfassend ein VSV-Hüll-Polypeptid.
14. Zelle, welche den Nukleinsäurevektor von mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 umfasst.
15. Zelle von Anspruch 14, welche menschlich ist.
16. Zelle von Anspruch 14 oder 15, umfassend ein Nukleinsäureplasmid, worin:
das Nukleinsäureplasmid eine Nukleotidsequenz umfasst, welche ein oder mehrere Polypeptide codiert, notwendig zum Verpacken des Nukleinsäurevektors;
die Nukleotidsequenz funktionstüchtig an eine Expressionsregulierungssequenz verknüpft ist, welche in menschlichen Zellen funktioniert; und
dem Nukleinsäureplasmid eine funktionale lentivirale Verpackungsstelle fehlt.
17. Zelle von Anspruch 16, wobei die Nukleotidsequenz ein Polypeptid codiert, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus einem viralen Hüll-Polypeptid, viralen Mantel-Polypeptid, Zellrezeptorligand, Antikörper oder Antikörperfragment.
18. Zelle von Anspruch 16, wobei die Nukleotidsequenz ein oder mehrere virale Polypeptide codiert, gewählt aus env, gag und pol.
19. Zelle von Anspruch 17, wobei das virale env-Polypeptid gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus FIV-Hüll-Polypeptid, HIV-Hüll-Polypeptid, VSV-Hüll-Polypeptid, MoMLV-Hüll-Polypeptid und GALV-Hüll-Polypeptid.
20. Zelle von Anspruch 19, wobei die Nukleotidsequenz ein VSV-Hüll-Polypeptid codiert.
21. Zelle von mindestens einem der Ansprüche 16 bis 20, wobei die Expressionsregulierungssequenz gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus der CMV-Promotorsequenz, HIV-Promotorsequenz, HIV-LTR-Promotorsequenz, SV-40-Promotorsequenz, pol-II-Promotorsequenz und pol-III-Regulierungsexpressionssequenz.
22. Zelle von Anspruch 21, wobei die Expressionsregulierungssequenz eine CMV-Promotorsequenz ist.
23. Verfahren zum Transfizieren einer Zelle mit einem Nukleinsäurevektor gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 oder Transduzieren einer Zelle mit einem den Nukleinsäurevektor umfassenden Viruspartikel, welches das Inkontaktbringen der Zelle mit dem Nukleinsäurevektor oder Viruspartikel in vitro umfasst, wobei:
der Nukleinsäurevektor eine heterologe Ziel-Nukleinsäure umfasst, die funktionstüchtig an eine Expressionsregulierungssequenz verknüpft ist.
24. Verfahren von Anspruch 23, wobei die Zelle eine menschliche Zelle ist.
25. Verfahren von Anspruch 23, wobei die Zelle eine sich nicht teilende menschliche Zelle ist.
26. Verfahren von Anspruch 24, wobei die sich nicht teilende menschliche Zelle gewählt wird aus der Gruppe, bestehend aus einer enddifferenzierten neuronalen Zelle und enddifferenzierten hämatopoietischen Zelle.
27. Verfahren von Anspruch 24, wobei die sich nicht teilende menschliche Zelle aus einem Gewebe stammt, gewählt aus der Gruppe, bestehend aus Nervensystem, Auge, hämatopoietischem System, Integument, endokrinem System, Leber/-Gallen-System, Magendarmtrakt, Urogenitaltrakt, Knochen, Muskel, kardiovaskulärem System und respiratorischem System.
28. Nukleinsäurevektor gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10 oder Viruspartikel, enthaltend den Nukleinsäurevektor, zur Verwendung in einem Verfahren zum Transfizieren einer menschlichen Zelle mit

der Nukleinsäure oder Transduzieren einer menschlichen Zelle mit dem Viruspartikel, umfassend das Inkontaktbringen der Zelle mit der Nukleinsäure oder dem Viruspartikel in vivo.

29. Nukleinsäure oder Viruspartikel gemäß Anspruch 28, wobei die Zelle wie in mindestens einem der Ansprüche 24 bis 27 definiert beschaffen ist.

30. Nukleinsäurevektor gemäß mindestens einem der Ansprüche 1 bis 10, ein Viruspartikel, enthaltend den Nukleinsäurevektor, oder eine Zelle, wie definiert in mindestens einem der Ansprüche 16 bis 22, zur Verwendung in einem Therapieverfahren.

31. Zelle gemäß Anspruch 30, wobei die Zelle zur Verwendung in einem Verfahren, umfassend die Infusion in einen Patienten, vorgesehen ist.

32. Verfahren von mindestens einem der Ansprüche 23 bis 27, welches das Inkontaktbringen der Zelle mit einem Nukleinsäurevektor-Plasmid, wie definiert in mindestens einem der Ansprüche 16 bis 20, umfasst.

33. Verfahren von Anspruch 23, wobei das Viruspartikel wie in Anspruch 12 oder 13 definiert beschaffen ist.

Es folgen 3 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

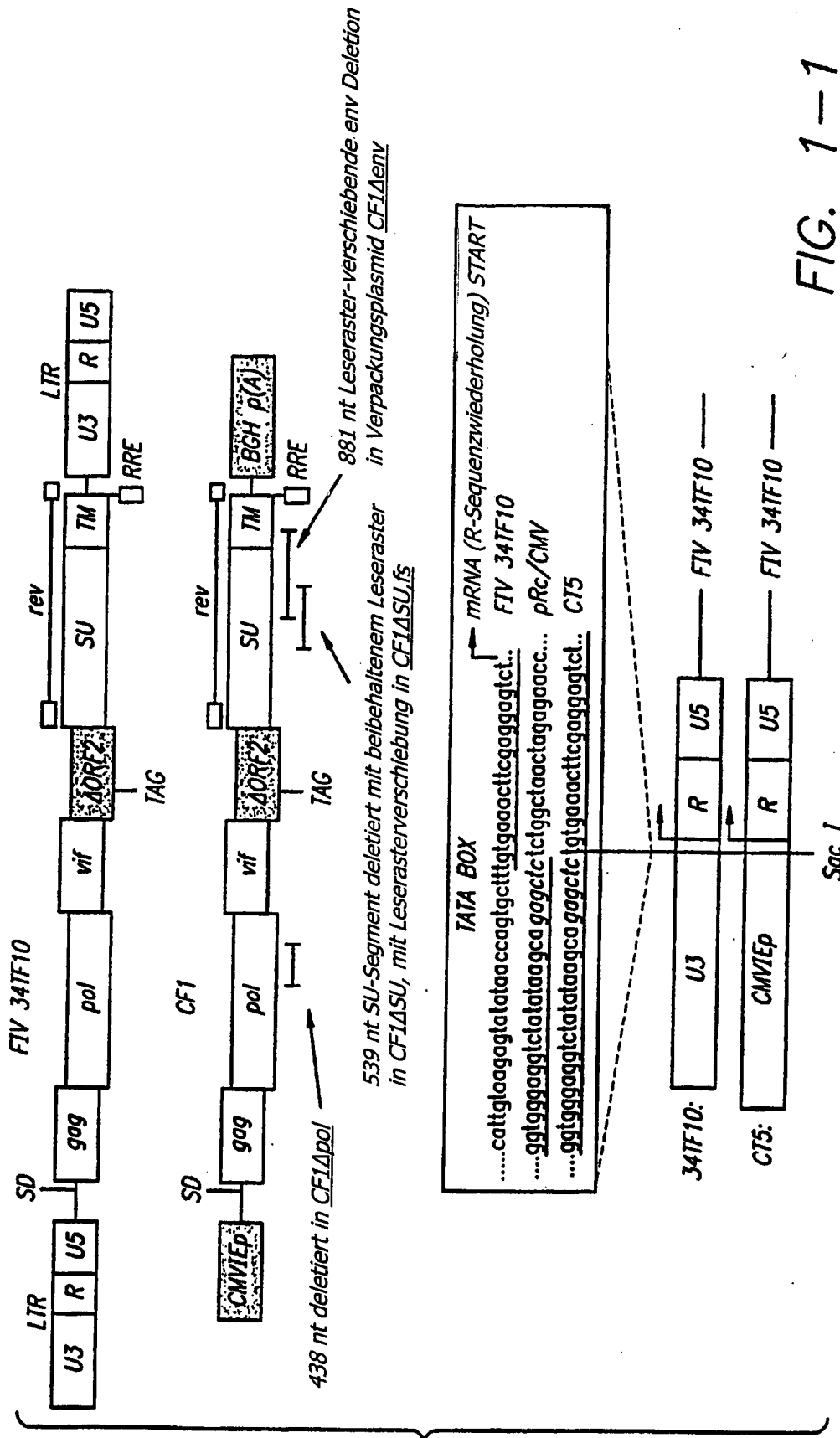


FIG. 1-1

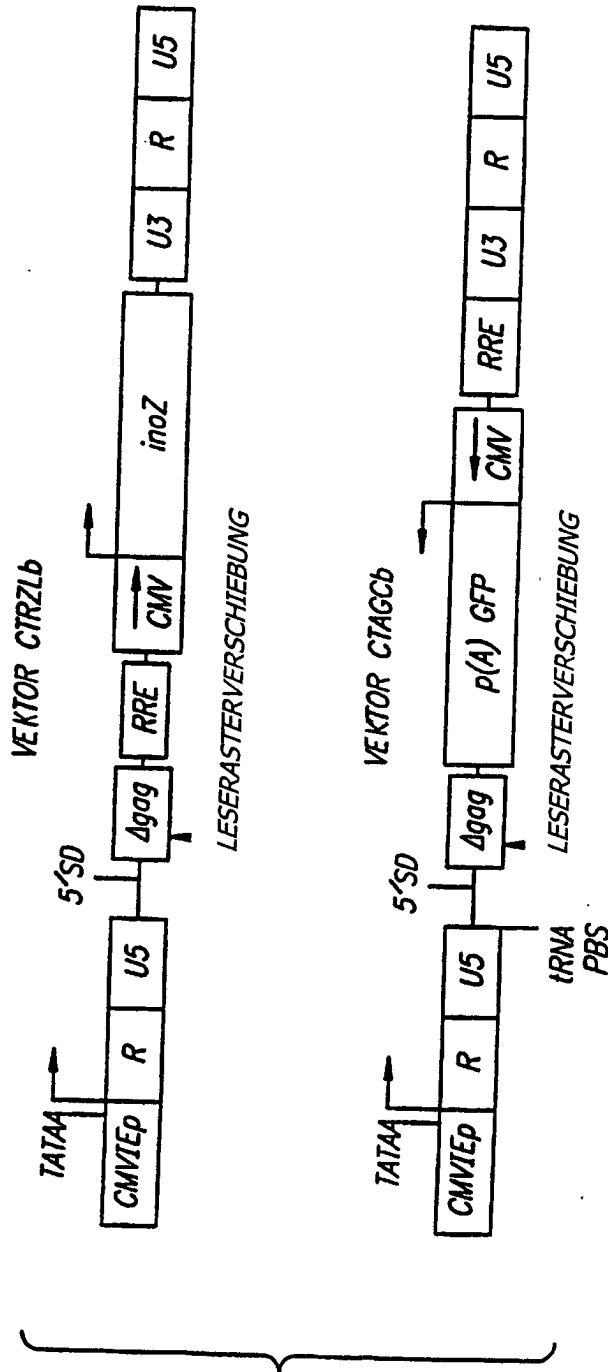


FIG. 1-2

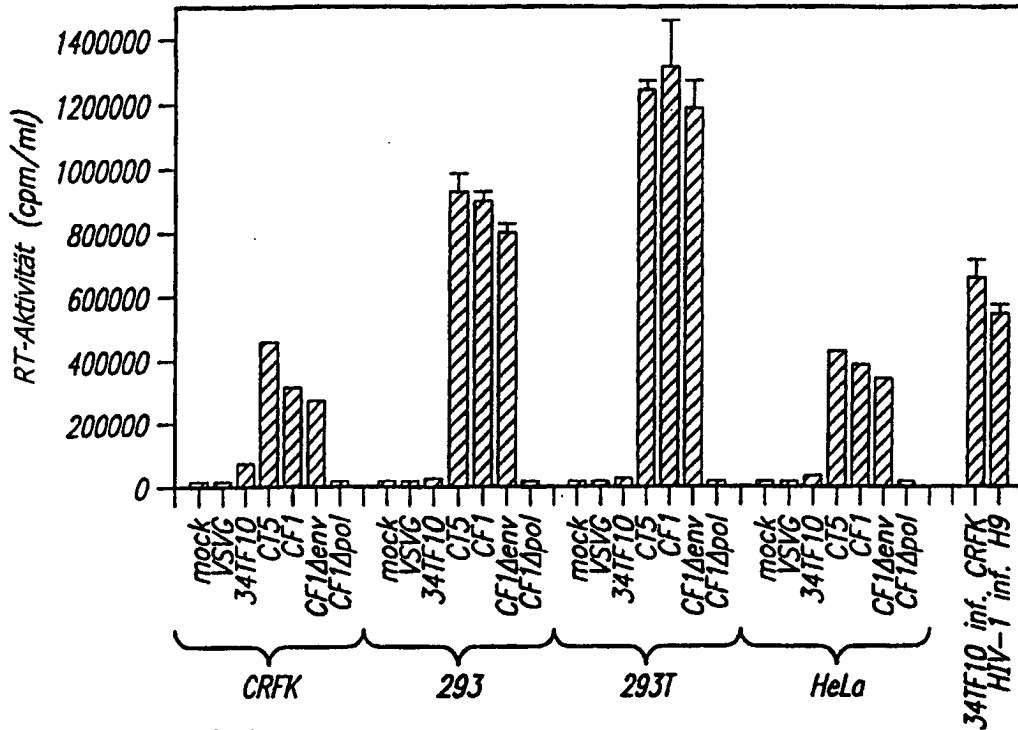


FIG. 2A

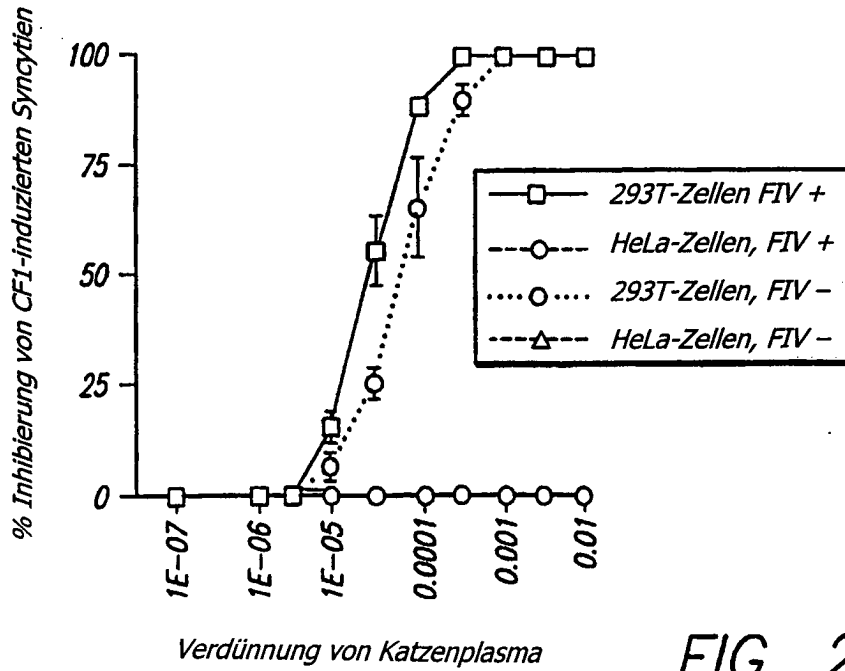


FIG. 2B