



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 696 34 904 T2** 2006.05.18

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 864 645 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **696 34 904.3**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP96/03068**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **96 935 402.6**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 97/016538**

(86) PCT-Anmeldetag: **22.10.1996**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **09.05.1997**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **16.09.1998**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **29.06.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.05.2006**

(51) Int Cl.⁸: **C12N 7/01** (2006.01)

C12N 15/45 (2006.01)

C12N 15/86 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 9/99 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

30831595 31.10.1995 JP

(73) Patentinhaber:

Dnavec Research Inc., Tsukuba, Ibaraki, JP

(74) Vertreter:

BOEHMERT & BOEHMERT, 80336 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, CH, DE, DK, FI, FR, GB, IT, LI, NL, SE

(72) Erfinder:

NAGAI, Yoshiyuki, Shibuya-ku, Tokyo 150, JP;
KATO, Atsushi, Hamura-shi, Tokyo 205, JP;
MURAI, Fukashi, Tsukuba-shi, JP; ASAKAWA,
Makoto, Tsukuba-shi, Ibaraki 305, JP; SAKATA,
Tsuneaki, Toyonaka-shi, Osaka 565, JP;
HASEGAWA, Mamoru, Tsukuba-shi, Ibaraki 305,
JP; SHIODA, Tatsuo, Setagaya-ku, Tokyo 158, JP

(54) Bezeichnung: **NEGATIVSTRAND RNA VIRUS MIT SELBSTÄNDIGER REPLIKATIONSAKTIVITÄT**

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

Bereich der Erfindung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft einen viralen Vektor zur Gentherapie. Genauer betrifft diese Erfindung einen Negativstrang-RNA-Virusvektor.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Im Zusammenhang mit der Gentherapie an Mensch und Tier sind therapeutische Wirksamkeit und Sicherheit sehr wichtige Faktoren. Insbesondere eine Therapie, die unter Verwendung eines „viralen Vektors“ oder „Virusvektors“, erhalten durch die virale Genrekombination, durchgeführt wird, muss sehr vorsichtig durchgeführt werden, wenn solche unbestreitbaren Möglichkeiten existieren, wie dass ein Gen an unspezifischen Stellen von chromosomaler DNA eingefügt werden kann, dass das rekombinante Virus und pathogene Virus in die natürliche Umgebung entlassen werden kann und dass die Expressionsstärke des in die Zellen transfizierten Gens nicht kontrolliert werden kann oder Ähnliches, selbst wenn die therapeutische Wirksamkeit anerkannt wird.

[0003] Heutzutage wird eine große Anzahl von Gentherapien unter Verwendung rekombinanter Viren durchgeführt, und es werden viele klinische Gentherapiepläne vorgeschlagen. Die Kennzeichen dieser rekombinanten viralen Vektoren hängen zum größten Teil von denen der Viren ab, von denen die Vektoren abgeleitet werden.

[0004] Das wesentliche Prinzip eines viralen Vektors ist ein Verfahren zum Übertragen des gewünschten Gens auf Zielzellen unter Nutzung der viralen Infektiosität. Der Begriff „Infektiosität“ in dieser Beschreibung bedeutet die Fähigkeit eines Virus, seine Nukleinsäure etc. in Zellen durch seine erhaltene Adhäsivität an Zellen und Fähigkeit zur Fusion mit der Membran zu übertragen. Mit der Oberfläche von rekombinanten viralen Vektoren, die genetisch manipuliert sind, um ein gewünschtes Gen einzufügen, sind die Nukleokapside und Hüllproteine etc. verbunden, die aus dem Virus abgeleitet werden und dem rekombinanten Virus die Infektiosität verleihen. Diese Proteine erlauben den Transfer des eingeschlossenen rekombinanten Gens in Zellen. Derartige rekombinante virale Vektoren können nicht nur zum Zweck der Gentherapie verwendet werden, sondern auch zur Produktion von Zellen, die ein gewünschtes Gen exprimieren, ebenso wie transgene Tiere.

[0005] Virale Vektoren werden in drei Klassen unterteilt, welche den retroviralen Vektor, den DNA-Virusvektor und den RNA-Virusvektor umfassen.

[0006] Heutzutage sind die in der Gentherapie am häufigsten verwendeten Vektoren retrovirale Vektoren, die aus Retroviren stammen. Retroviren replizieren sich durch die folgenden Vorgänge. Zunächst erzeugen sie, nachdem eine virale Infektion begründet ist, komplementäre DNAs (complementary DNA, cDNA) unter Verwendung ihrer eigenen reversen Transkriptase als mindestens einem Teil der Katalysatoren und ihrer eigenen RNA-Matrizen. Nach mehreren Schritten werden die cDNAs in die chromosomalen DNAs des Wirts aufgenommen, wodurch Proviren entstehen. Proviren werden durch die DNA-abhängige RNA-Polymerase, die aus dem Wirt stammt, transkribiert, wodurch virale RNAs erzeugt werden, die durch die Genprodukte, die durch eigenen Gene kodiert werden, verpackt werden, wodurch virale Partikel entstehen.

[0007] Im Allgemeinen sind retrovirale Vektoren, die in der Gentherapie etc. verwendet werden, in der Lage, die Vorgänge bis zur Erzeugung eines Provirus durchzuführen. Allerdings gibt es defiziente Viren, denen die Gene, die zu ihrer Verpackung notwendig sind, entzogen sind, so dass sie keine Viruspartikel aus dem Provirus bilden. Retroviren werden beispielsweise durch das Mäuseleukämie-Virus, Katzenleukämie-Virus, Pavian-Onkovirus Typ C, menschliches Immunschwäche-Virus, adulte-T-Zell-Leukämie-Virus etc. verkörpert. Weiterhin wurde bisher berichtet, dass rekombinante retrovirale Vektoren jene einschließen, die sich vom Mäuseleukämie-Virus [siehe *Virology*, 65, 1202 (1991), *Biotechniques*, 9, 980 (1989), *Nucleic Acids Research*, 18, 3587 (1990), *Molecular and Cellular Biology*, 7, 887 (1987), *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 90, 3539 (1993), *Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America*, 86, 3519 (1989), etc.] ableiten, und jenen, die sich vom menschlichen Immunschwäche-Virus [siehe *Journal of Clinical Investigation*, 88, 1043 (1991)] ableiten.

[0008] Retrovirale Vektoren werden hergestellt mit dem Ziel, wirksam eine bestimmte DNA in chromosomale DNA zu integrieren. Da allerdings die Insertionsposition des gewünschten Gens nicht vorher zu sagen ist, gibt es unbestreitbare Möglichkeiten, wie etwa die Beschädigung normaler Gene, die Aktivierung von Onkogenen

und die exzessive oder suppressive Expression des gewünschten Gens aufgrund einer Inaktivierung durch die Insertion. Um diese Probleme zu lösen, ist ein System zur transienten Expression unter Verwendung von DNA-Virusvektoren, die als extrachromosomale Gene verwendet werden können, entwickelt worden.

[0009] DNA-Virusvektoren werden von DNA-Viren abgeleitet, die DNA als genetische Information in viralen Partikeln tragen. Die Replikation dieser DNA wird durch das Wiederholen des Vorgangs aus Erzeugen eines komplementären DNA-Strangs unter Verwendung einer DNA-abhängigen DNA-Replikase, die aus einem Wirt stammt, als mindestens einem der Katalysatoren mit der eigenen DNA als Matrize durchgeführt. Die eigentliche Gentherapie, die einen adenoviralen Vektor, einen DNA-Virusvektor, der als extrachromosomales Gen verwendet werden kann, verwendet, wird in dem Artikel [Nature Genetics, 3, 1–2, (1993)] veranschaulicht. Da allerdings im Fall von DNA-Virusvektoren das Auftreten ihrer unerwünschten Rekombination mit chromosomaler DNA im Nukleus ebenfalls hoch wahrscheinlich ist, sollten sie als Vektoren zur Gentherapie sehr vorsichtig angewendet werden.

[0010] Kürzlich sind RNA-Virusvektoren auf der Grundlage von RNA-Viren entwickelt worden als denkbar sicherere Vektoren als die oben beschriebenen DNA-Virusvektoren. RNA-Viren replizieren durch das Wiederholen der Vorgänge zum Erzeugen komplementärer Stränge unter Verwendung ihrer eigenen RNA-abhängigen RNA-Replikase als dem Katalysator mit ihrer eigenen RNA als Matrize.

[0011] Die genomische RNA von Positivstrang-RNA-Viren weist Doppelfunktionen als messenger-RNA (im Folgenden einfach als mRNA bezeichnet) auf, die Proteine erzeugt, was von den translationalen Funktionen der Wirtszellen abhängig ist, wichtig für die Replikation und Bildung von Viruspartikeln. Mit anderen Worten, die genomische RNA von Positivstrang-RNA-Viren selbst hat eine Fähigkeit zur Verbreitung. In der vorliegenden Beschreibung bedeutet der Ausdruck „Fähigkeit zur Verbreitung“ oder „disseminative Fähigkeit“ die Fähigkeit, infektiöse Partikel oder ihre äquivalenten Komplexe zu bilden und sie in anderen Zellen nach dem Transfer der Nukleinsäure in Wirtszellen durch Infektion oder künstliche Techniken und die intrazelluläre Replikation der Nukleinsäure zu verbreiten. Das Sindbis-Virus, das den Positivstrang-RNA-Viren zugeordnet wird, und das Sendai-Virus, das den Negativstrang-RNA-Viren zugeordnet wird, weisen sowohl Infektiosität als auch die Fähigkeit zur Verbreitung auf. Das Adenosatelliten-Virus, das den Parboviren zugeordnet wird, ist infektiös, verbreitet sich jedoch nicht (es ist eine gemischte Infektion mit einem Adenovirus für die Bildung von Viruspartikel erforderlich). Weiterhin verbreitet sich die Positivstrang-RNA, die aus dem Sindbis-Virus stammt, die in vitro künstlich transkribiert wird (sie bildet infektiöse Viruspartikel, wenn Zellen damit transfiziert werden), jedoch verbreiten sich weder positive noch negative RNA-Stränge des Sendai-Virus, die in vitro künstlich transkribiert werden (sie erzeugen keine infektiösen Viruspartikel, wenn Zellen damit transfiziert werden).

[0012] Im Hinblick auf den Vorteil, dass die genomische RNA gleichzeitig als mRNA fungiert, ging die Entwicklung von RNA-Virusvektoren, die aus Positivstrang-RNA-Viren stammen, voran [siehe Bio/Technology, 11, 916–920 (1993), Nucleic Acids Research, 23, 1495–1501 (1995), Human Gene Therapy, 6, 1161–1167 (1995), Methods in Cell Biology, 43, 43–53 (1994), Methods in Cell Biology, 43, 55–78 (1994)]. Beispielsweise weisen RNA-Virusvektoren, die sich von dem Semliki-Forest-Virus (SFV) und dem Sindbis-Virus ableiten, im Wesentlichen die RNA-Struktur auf, wobei die Strukturgenregionen, die mit der Virusstruktur in Beziehung stehen, deletiert sind, und eine Gruppe von Genen, welche die Proteine kodieren, die zur viralen Transkription und Replikation wichtig sind, bleibt in einem gewünschten Fremdgen, das stromabwärts vom Transkriptionspromotor verknüpft ist, erhalten. Ein direkter Transfer derartiger rekombinanter RNA oder cDNA, welche die RNA [Nucleic Acids Research, 23, 1495–1501 (1995)] in Zellen durch Microinjektion etc. transkribieren kann, erlaubt eine autonome Replikation von RNA-Vektoren, die das Fremdgen enthalten, und die Transkription des Fremdgens, das stromabwärts von dem Transkriptionspromotor eingefügt ist, was zur Expression des gewünschten Produkts von dem Fremdgen in Zellen führt. Weiterhin waren die Erfinder der vorliegenden Erfindung erfolgreich beim Bilden eines infektiösen, sich aber nicht verbreitenden Komplexes durch die Co-Präsenz einer cDNA-Einheit (Helfer) zum Exprimieren des viralen Strukturgens und zum Exprimieren des RNA-Vektors in den verpackenden Zellen. Allerdings tritt eine Rekombination zwischen RNA, die aus einem Helfer stammt, und Vektor-RNA häufig während des Verpackens auf, was zu dem Auftauchen infektiöser Partikel führt. Dann klärte sich auf, dass Spike-Proteine, die in den ikosahedralen Kapsiden, die für Positivstrang-RNA-Viren charakteristisch sind, vorhanden sind, diese Rekombination katalysieren. Deshalb wurde versucht, diese Probleme durch das Einführen einer Variation in den Spike-Proteinen zu lösen [Bio/Technology, 11, 916–920 (1993)].

[0013] Es wird angenommen, dass Positivstrang-RNA-Virusvektoren als RNA-Vektoren mit einer Fähigkeit zur autonomen Replikation nützlich sind, ihre Verwendung als Vektoren zur Gentherapie wirft jedoch folgende Probleme auf:

1. Da sie die ikosahedrale Struktur aufweisen, ist die Größe eines Fremdgens, dessen Einfügen möglich

gemacht wird, auf höchstens 3700 Nukleotide begrenzt.

2. Da die Nukleinsäuren aus dem verpackten Komplex in die Zellen freigesetzt und repliziert werden, sind mindestens fünf Durchgänge erforderlich, einschließlich zellulärer Adhäsion, Endozytose, Membranfusion, Dekapsidation und Translation von Replikationsenzymen.

3. Eine mögliche Bildung sich verbreitender Viruspartikel, selbst in geringster Menge, während des Verpackens kann nicht ausgeschlossen werden. Insbesondere mit abgeschwächten Viruspartikeln weist die innere RNA selbst eine Potenz zur Verbreitung auf und kann verspätet amplifiziert werden, was eine Überprüfung schwierig macht.

4. Da sich diese Vektoren von Viren ableiten, die auf Tiere durch Insekten, wie etwa Stechmücken, übertragen werden können, können, wenn die Tiere und Menschen, auf die derartige Vektorgene übertragen werden, gemischt mit Wildtyp-Viren infiziert sind, sich verbreitende Rekombinanten gebildet werden, die möglicherweise weiter ein Risiko schaffen, dass die Rekombinanten in die natürliche Umgebung durch Insekten ausgestreut werden.

[0014] Derartige Probleme, wie oben beschrieben, werden als im Wesentlichen überwunden betrachtet, wenn RNA-Virusvektoren, die von Negativstrang-RNA-Viren stammen, konstruiert werden. Dies bedeutet, da Negativstrang-RNA-Viren nicht das Kapsid mit der ikosaedralen Struktur aufweisen und auch, da bekannt ist, dass die Größe von Hüllpartikeln in Abhängigkeit von dem inneren RNA-Gehalt variiert, wird angenommen, dass sie viel weniger durch die Größe von einzufügenden Fremdgenen begrenzt werden, wenn sie als RNA-Virusvektoren verwendet werden. Da weiterhin eine Gruppe von Proteinen, die zur Transkription und Replikation erforderlich ist, in Partikel verpackt wird, sind nur zwei Durchgänge erforderlich, einschließlich zellulärer Adhäsion und Membranfusion, bis Nukleinsäuren aus dem verpackten Komplex freigesetzt und repliziert werden. Zusätzlich verbreitet sich virale RNA nicht alleine, und sich verbreitende Partikel können leicht identifiziert werden, da sie leicht mit einer Zellmembran fusionieren und in Zellen proliferieren. Deshalb kann das Vorhandensein sich verbreitender Partikel leicht nachgewiesen werden. Weiterhin werden Negativstrang-RNA-Viren nicht durch Insekten übertragen.

[0015] Trotz vieler Vorteile von Negativstrang-RNA-Viren, die als Quelle industriell nützlicher viraler Vektoren verwendet werden können, sind keine Negativstrang-RNA-Vektoren, die zur Gentherapie anwendbar sind, bis heute verfügbar geworden. Dies ist wahrscheinlich auf die enormen Schwierigkeiten beim Rekonstituieren viraler Partikel durch virale cDNA zurückzuführen. Da die Genmanipulation auf DNA-Ebene erforderlich ist, um Fremdgene in Vektoren einzufügen, sofern Viruspartikel nicht aus viraler cDNA mit einem eingefügten Fremdgen rekonstruiert werden, ist es schwierig, Negativstrang-RNA-Viren als Vektor zu verwenden. Der Ausdruck „Rekonstruktion viraler Partikel“ oder „Rekonstruktion von Viruspartikeln“ bezieht sich auf die Bildung eines ursprünglichen Virus oder eines rekombinanten Virus *in vitro* oder intrazellulär aus künstlich hergestellten Nukleinsäuren des viralen Genoms.

[0016] Wie oben beschrieben ist eindeutig gezeigt worden, dass, selbst wenn RNA von Negativstrang-RNA-Viren (viral RNA, vRNA) oder RNA ihres Komplementärstrangs (complementary RNA, cRNA) alleine in Zellen übertragen wird, kein Negativstrang-RNA-Virus erzeugt werden kann. In diesem Punkt besteht definitiv ein Unterschied zu dem Fall von Positivstrang-RNA-Viren. Obwohl in Tokkai H4-211377, „Verfahren zum Herstellen von cDNA, die dem Negativstrang-RNA-Virusgenom entsprechen und eines infektiösen Negativstrang-RNA-Virus“ beschrieben werden, erwiesen sich die gesamten Experimente des in „EMBO J., 9, 379–384 (1990)“ beschriebenen Dokuments später als nicht reproduzierbar, so dass die Autoren selbst den gesamten Inhalt des Artikels zurücknehmen mussten [siehe EMBO J., 10, 3558 (1991)]. Deshalb ist offensichtlich, dass die in Tokkai H4-211377 beschriebenen Techniken mit dem Stand der Technik der vorliegenden Erfindung nichts zu tun haben.

[0017] Im Hinblick auf das System zur Rekonstitution von Negativstrang-RNA-Viren gibt es Berichte zum Influenza-Virus [Annu. Rev. Microbiol., 47, 765–790 (1993); Curr. Opin. Genet. Dev., 2, 77–81 (1992)]. Das Influenza-Virus ist ein Negativstrang-RNA-Virus mit acht Segmenten. Nach dieser Literatur wurde ein Fremdgen zunächst in eine cDNA, die einem der Segmente entsprach, eingefügt, und die RNA, die von der cDNA transkribiert wurde, die allen acht Segmenten, einschließlich demjenigen, in das das Fremdgen eingefügt war, entsprach, wurde mit dem virusabgeleiteten NP-Protein zusammengesetzt, um ein RNP zu bilden. Dann wurde das System zur Virusrekonstitution etabliert, indem Zellen mit diesen RNPs und RNA-abhängiger RNA-Polymerase verfügbar gemacht wurden. Zusätzlich wurde, wie bei Negativ-Einzelstrang-RNA-Viren, über eine Virusrekonstitution von cDNA mit dem Rabies-Virus, das zu den Rhabdoviren gehört, berichtet [J. Virol., 68, 713–719 (1994)].

[0018] Allerdings ist es schwierig gewesen, diese Techniken zur Virusrekonstitution als solche zum Konstru-

ieren von Vektoren zur Gentherapie aufgrund folgender Probleme zu verwenden.

1. Rekonstituierte Viren werden nur durch die Expression eines Markergens, RT-PCR etc. identifiziert. Ein System zur Rekonstitution, das zur Produktion von Vektorviren mit einer befriedigenden Ausbeute nützlich ist, ist nicht etabliert worden.
2. Um Komplexe mit Infektiosität, jedoch ohne die Potenz zur Verbreitung, als Vektoren zur Gentherapie zu bilden, ist es anders als bei Positivstrang-RNA-Viren notwendig, Faktoren einzuschließen, die zur primären Transkription und Replikation in dem Komplex erforderlich sind. Eine Technik zum Amplifizieren dieser Komplexe im Großmaßstab ist nicht etabliert worden.
3. Zu dem Zweck, Faktoren, die zur viralen Rekonstitution notwendig sind, intrazellulär verfügbar zu machen, werden Zellen, in die cDNAs eingeführt werden, mit Helferviren, wie etwa Wildtyp-Viren und dem Vaccinia-Virus etc., gemischt infiziert. Es ist nicht einfach, diese zugegebenen Viren vom natürlichen Typ zu trennen.

[0019] Weiterhin ist es als ein Problem im Hinblick auf RNA-Virusvektoren im Allgemeinen denkbar möglich, im Voraus Inhibitoren der Replikation von RNA-Virusvektoren, die keine Auswirkungen auf die Replikation und Transkription des Wirts haben, verfügbar zu machen, wodurch für den Fall Vorsorge getroffen wird, dass RNA, die in großen Mengen repliziert und transkribiert wird, unerwünschte Wirkungen auf die behandelten Menschen und Tiere ausübt. Allerdings sind derartige Inhibitoren nicht entwickelt worden.

Offenbarung der Erfindung

[0020] Die durch die vorliegende Erfindung zu lösenden Aufgaben sind, Negativstrang-RNA-Virusvektoren zur praktischen Anwendung, Verfahren zum effizienten Herstellen der Vektoren und Inhibitoren der Replikation der Vektoren zu entwickeln.

[0021] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung versuchten zunächst, das Sendai-Virus aus Nukleinsäuren dieses Virus, das ein typisches Negativstrang-RNA-Virus ist, zu rekonstituieren und nahmen an, dass dies für einen Vektor unter dem Gesichtspunkt der Sicherheit und Zweckmäßigkeit industriell am nützlichsten ist. Um dies zunächst auf den Rekonstitutionstest anzuwenden, wurden verschiedene Untersuchungen unter Verwendung von cDNA, die aus Sendai-Virus DI-Partikeln (defective interfering, DI) stammte [siehe EMBO J., 10, 3079–3085 (1991)], oder von cDNA des Sendai-Virus-Minigenoms als experimentelles Material durchgeführt. Als Ergebnis wurden wirksame Bedingungen im Hinblick auf die Gewichtsverhältnisse zwischen den in die Wirtszellen zu übertragenden Materialien, einschließlich cDNA, cDNAs, welche die Transkription und Replikation betreffen, aufgefunden und das rekombinante Vaccinia-Virus, um eine Einheit zum Expressieren der T7-RNA-Polymerase verfügbar zu machen. Weiterhin erhielten die Erfinder der vorliegenden Erfindung Volllänge-cDNAs, die sowohl Positiv- als auch Negativsträngen entsprachen, konstruierten Plasmide zum Induzieren der intrazellulären Biosynthese von entweder Positiv- oder Negativstrang-RNA des Sendai-Virus, und sie übertrugen die Plasmide in Wirtszellen, wobei cDNAs, welche die Transkription und Replikation betreffen, exprimiert wurden. Als Ergebnis waren sie zunächst beim Rekonstruieren von Sendai-Virus-Partikeln von abgeleiteten cDNAs erfolgreich.

[0022] Zusätzlich fanden die Erfinder der vorliegenden Erfindung, dass das Sendai-Virus ohne Verwendung eines rekombinanten Vaccinia-Virus als T7-RNA-Polymerase-Expressionseinheit rekonstruiert werden konnte. Dies bedeutet, dass, wenn die in vitro transkribierte Volllänge-RNA des Sendai-Virus auf Zellen übertragen wurde, und cDNAs, die Enzyme zum Start der Transkription und Replikation kodieren, unter der Kontrolle des T7-Promotors transkribiert werden, Viruspartikel rekonstruiert wurden. Dies zeigt, dass, wenn Zellen, welche eine Gruppe von allen Enzymen, die zum Start der Transkription und Replikation erforderlich sind, konstituiert werden, das rekombinante Sendai-Virus, schließlich Komplexe, wie oben beschrieben, vollständig und ohne Verwendung von Helferviren, wie etwa dem Vaccinia-Virus, gebildet werden können. Da Zellen, die eine Gruppe von allen Enzymen, die zum Start der Transkription und Replikation erforderlich sind, exprimieren, bereits beschrieben wurden [J. Virology, 68, 8413–8417 (1994)], werden diejenigen, die sich auf dem Fachgebiet auskennen, derartige Zellen unter Bezugnahme auf den genannten Artikel herstellen. Zellen, die in der Referenz beschrieben werden, sind diejenigen, die aus der Zelllinie 293, welche drei der Sendai-Virusgene auf ihrem Chromosom trägt, nämlich NP, P/C und L, welche Proteine exprimieren, die durch die drei Gene NP, P/C und L kodiert werden, abgeleitet werden.

[0023] Aus einer Anzahl von Beispielen von viralen Vektoren, falls Viruspartikel wirksam aus Nukleinsäuren rekonstruiert werden können, ist offensichtlich, dass der Fachmann in der Lage ist, ein gewünschtes Virusgen leicht auszutauschen, ein Fremdgen einzufügen oder ein gewünschtes Gen zu aktivieren oder zu deletieren. Beispielsweise zeigt ein Artikel zur Verwendung von DI-Partikel [J. Virol., 68, 8413–8417 (1994)] eindeutig,

dass, wenn RNA in mindestens einem Teil der Strukturgene des Sendai-Virus defizient ist, jedoch normale Gene für Replikationsenzyme in die Zellen übertragen werden, die erfolgreiche autonome Replikation in der Lage ist, fortzufahren, falls Gruppen von Enzymen, die zum Start von Transkription und Replikation erforderlich sind, in den Zellen zur Verfügung stehen. Deshalb, sobald ein RNA-Molekül, das ein Fremdgen enthält, das von einer „bestimmten viralen cDNA, die in mindestens einem Teil der Strukturgene defizient, in Bezug auf Gene der Gruppe der Replikationsenzyme jedoch normal ist“, transkribiert wird, in die Virusstruktur, welche die Enzyme zum Start der Transkription und Replikation umfasst, eingeschlossen werden kann, können Komplexe, die infektiös und funktionell sind und sich autonom replizieren, die jedoch in Bezug auf die Potenz zur Verbreitung defizient sind, wie der Fremdgen-Vektor gebildet werden. Derartige Komplexe sind außerordentlich nützlich als ein Vektor zur Gentherapie. Dies bedeutet, dass es durch die vorliegende Erfindung mit einem Negativstrang-RNA-Virus möglich wird, Komplexe herzustellen, die infektiös sind, ebenso wie autonom-replikativ, die jedoch in Bezug auf die Potenz zur Verbreitung defizient sind, beispielsweise Komplexe, welche die Enzyme zum Start der Transkription und Replikation umfassen.

[0024] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung entwickelten weiterhin ein Verfahren zum Amplifizieren des selben Komplexes durch Transfizieren von Zellen mit dem Komplex, welche die Strukturproteine, die den Genen in der RNA des Komplexes, die deletiert oder inaktiviert worden sind, entsprechen, exprimieren. Weiterhin, wenn Vogeleier als das geeignetste Medium zum Proliferieren von Sendai-Virus in Betracht gezogen werden, um den Komplex zu amplifizieren, stellten die Erfinder fest, dass transgene Vögel, ihre Eier und Zellen, die mindestens eines oder mehrere Gene der M-, F- und HN-Gene des Sendai-Virus auf ihrem Chromosom tragen, zum Amplifizieren von Komplexen geeignet sind. Von Verfahren zum Herstellen transgener Vögel ist berichtet worden [Poultry Sci., 65, 1445–1458 (1986); Bio/Technology, 12, 60–63 (1994)], und diejenigen, die sich auf dem Fachgebiet auskennen, können auf geeignete Weise transgene Vögel, die mindestens eines oder mehrere Gene der M-, F- und HN-Gene auf ihren Chromosomen tragen, hervorbringen. Vorzugsweise werden Proteine, die durch Gene, die mit der Defizienz in Bezug auf die Fähigkeit zur Verbreitung von RNA, die in dem Komplex unter M-, F- und HN-Genen enthalten sind, in Beziehung stehen, in transgenen Vögeln exprimiert.

[0025] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung entwickelten auch ein Verfahren zum Herstellen des oben beschriebenen Komplexes. Im Folgenden werden Fälle, die mit dem Sendai-Virus in Beziehung stehen, beispielhaft dargestellt. Das Genom des Sendai-Virus Z ist eine Einzelstrang-RNA, die 15384 Nukleotide umfasst [Virology, 108, 318–324]. Seine gesamte Basensequenz ist an cDNA-Klonen bestimmt worden, die unter Verwendung von reverser Transkriptase hergestellt worden sind [Nucleic Acids Research, 11, 7313–7330 (1983); Nucleic Acids Research, 12, 7965–7972 (1984); Nucleic Acids Research, 14, 1545–1563 (1986)]. Da die genomische RNA ein Negativstrang ist, vollbringt eine Gruppe von Enzymen zur Transkription und Replikation in den Viruspartikeln sowohl die Transkription als auch die Replikation der genomischen RNA als Matrize. Mindestens 6 Proteine, einschließlich NP, P/C, M, F, HN und L, sind als Proteine bekannt, die durch die genomische RNA kodiert werden. Es hat sich aufgeklärt, dass von diesen Proteinen NP, P/C und L Faktoren sind, die essentiell und ausreichend sind zur Replikation [Journal of Virology, 68, 8413–8417 (1994)], und M, F und N sind Bestandteile, die zum Aufbau der viralen Struktur notwendig sind. Auf der Grundlage dieser Fakten ist es möglich, dass, wenn ein bestimmtes RNA-Virus, von dem sich die RNA ableitet, das Sendai-Virus ist, einen infektiösen Komplex zu rekonstruieren, indem sowohl 1) cDNA, die transkribierbar in DNA ist, und 2) ein Gen, das die RNA-Polymerase, die zum Transkribieren der cDNA in Zellen oder ein RNA-Molekül selbst, das von der cDNA in vitro in Zellen transkribiert wurde, zu übertragen, wobei alle Gene zur autonomen Replikation, NP, P/C und L, und eine Gruppe von Genen von M-, F- und HN-Genen für die Defizienz der Fähigkeit zur Verbreitung exprimiert werden.

[0026] In diesem Fall können alle Gene für die autonome Replikation, NP, P/C und L, und Gene von M-, F- und HN-Genen für die Defizienz der Fähigkeit zur Verbreitung von RNA transient exprimiert werden, indem Zellen mit den Plasmiden, die die entsprechenden Gene kodieren, zur Transfektion verwendet werden. Allerdings sind Gene, die mit der Defizienz der Fähigkeit zur Verbreitung von RNA zusammenhängen, mindestens vorzugsweise in Chromosomen aufgenommen, um stabil exprimiert zu werden.

[0027] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung entwickelten weiterhin ein Verfahren zum Herstellen des Komplexes, der auf diese Weise in großen Mengen rekonstruiert wurde, wobei der Komplex repliziert wird, indem Zellen damit transfiziert werden, die keine Gene aufweisen, die mit der autonomen Replikation in Beziehung stehen, jedoch Gene exprimieren, ausgewählt aus M-, F- und HN-Genen, die mit der Defizienz der Potenz zur Verteilung von RNA in Beziehung stehen. Da Zellen, die keine Gene aufweisen, die zu der autonomen Replikation in Beziehung stehen, jedoch eine Gruppe von Genen, ausgewählt aus M-, F- und HN-Genen, exprimieren, die mit der Defizienz der Fähigkeit zur Verbreitung von RNA in Beziehung stehen, sind in diesem Fall transgene Vogeleier, die diese Gruppe von Genen exprimieren, für die Herstellung eines Komplexes im Großmaß-

stab zu bevorzugen.

[0028] Weiterhin stellten die Erfinder der vorliegenden Erfindung Zellen zum Propagieren des Komplexes her, die die RNA und Proteine enthielten. Genauer sind die Zellen diejenigen mit Genen, die einer Gruppe von Genen, die mit der Defizienz der Fähigkeit der RNA, die in dem Komplex beibehalten wird, infektiöse Partikel zu bilden, in Beziehung stehen, entsprechen, und zur intrazellulären Herstellung von Proteinen, die durch die Gene kodiert werden, in der Lage sind. In dem Fall, in dem das bestimmte RNA-Virus, von dem sich die RNA ableitet, das Sendai-Virus ist, werden Zellen, die mindestens mehr als ein Gen aus den M-, F- und HN-Genen auf ihren Chromosomen aufweisen, oder Tiere, die solche Zellen aufweisen, verwendet. Zusätzlich sind M-, F- und HN-Gene nicht notwendigerweise vom Wildtyp. Jedes von solchen mit Funktionen, die zu denen des Wildtyps äquivalent sind, sind anwendbar. Dies bedeutet, dass jedes Gen verwendet werden kann, wobei das Gen eine Komplementarität zum Wildtyp des defizienten Virus aufweisen kann, wenn es funktionell in Zellen eingeführt wird. Bevorzugte Zellen, die verwendet werden sollen, sind Wirtszellen für das Sendai-Virus. Es ist bevorzugt, dass Proteine, die durch Gene kodiert werden, die denen entsprechen, die mit der Defizienz der Fähigkeit, infektiöse Partikel zu bilden, in Beziehung stehen, ausgewählt aus M-, F- und HN-Genen in der viralen Vektor-RNA, intrazellulär hergestellt werden.

[0029] Bisher ist nur die Steigerung der Expressionseffizienz mit herkömmlichen Virus-RNA-Vektoren hervorgehoben worden, und wenig Fortschritt ist gemacht worden, um Verbindungen zu entwickeln, welche die RNA-Replikation supprimieren, um unvorteilhafte Ergebnisse aufgrund einer exzessiven Expression zu verhindern. In dieser Hinsicht entwickelten die Erfinder der vorliegenden Erfindung einen Inhibitor für den Negativstrang-Virusvektor, der spezifisch die RNA-abhängige RNA-Replikation und die RNA-abhängige RNA-Transkription hemmt, ohne die Transkription und Translation von RNAs, die aus Zellen stammen, zu beeinflussen, was nur zu der Hemmung der RNA-abhängigen RNA-Replikation führt.

[0030] Dies bedeutet, dass die vorliegende Erfindung Folgendes umfasst.

1. Einen Komplex, der ein RNA-Molekül umfasst, das sich von einem bestimmten sich verbreitenden Negativstrang-RNA-Virus und viralen Strukturbestandteilen, die keine Nukleinsäuren enthalten, ableitet, das die Infektiosität und die Fähigkeit zur autonomen RNA-Replikation aufweist, jedoch in der Fähigkeit zur Verbreitung defizient ist.
2. Komplex nach Beschreibung 1, wobei das bestimmte RNA-Virus ein Negativstrang-RNA-Virus mit einem nicht-segmentierten Genom ist.
3. Komplex nach Beschreibung 2, wobei das bestimmte RNA-Virus das Sendai-Virus ist.
4. Ein RNA-Molekül, das Sendai-Virus-RNA oder Sendai-Virus-cRNA umfasst, wobei das RNA-Molekül insofern fehlerhaft ist, als mindestens mehr als ein Gen, das die M-, F- und HN-Proteine kodiert, deletiert oder inaktiviert ist.
5. Ein Komplex, der die RNA nach Beschreibung 4 und virale Strukturbestandteile, die keine Nukleinsäure enthalten, umfasst, abgeleitet vom Sendai-Virus, der die Infektiosität und die Fähigkeit zur autonomen RNA-Replikation aufweist, jedoch in der Fähigkeit zur Verbreitung defizient ist.
6. Ein DNA-Molekül, das eine DNA-Matrize umfasst, die in ein RNA-Molekül nach Beschreibung 4 in vitro oder intrazellulär transkribierbar ist.
7. Der Komplex nach einer der Beschreibungen 1 bis 3 oder 5, wobei das RNA-Molekül, das in dem Komplex enthalten ist, ein Fremdgen umfasst.
8. Der Komplex nach den Beschreibungen 3 oder 5, wobei das RNA-Molekül, das in dem Komplex enthalten ist, ein Fremdgen umfasst.
9. Das RNA-Molekül nach Beschreibung 4, das ein Fremdgen umfasst.
10. Das DNA-Molekül nach Beschreibung 6, das ein Fremdgen umfasst.
11. Ein Inhibitor der RNA-Replikation, der in dem Komplex nach einer der Beschreibungen 1 bis 3, 5, 7 oder 8 enthalten ist, der einen hemmenden Wirkstoff der RNA-abhängigen RNA-Replikation umfasst.
12. Ein Wirt, auf den sich der Komplex nach einer der Beschreibungen 1 bis 3, 5, 7 oder 8 ausbreiten kann.
13. Der Wirt nach Beschreibung 12, der eine Gruppe von Genen umfasst, die mit der Infektiosität des Komplexes nach einer der Beschreibungen 1 bis 3, 5, 7 oder 8 auf seinen Chromosomen in Beziehung steht, und der in der Lage ist, die selben Kopien des Komplexes zu replizieren, wenn er damit infiziert ist.
14. Der Wirt nach den Beschreibungen 12 oder 13, wobei der Wirt ein Tier oder Zellen, Gewebe oder Eier, die davon stammen, ist.
15. Der Wirt nach Beschreibung 14, wobei das Tier ein Säugetier ist.
16. Der Wirt nach Beschreibung 14, wobei das Tier ein Vogel ist.
17. Ein Wirt, der eine Gruppe von Genen umfasst, die mit der Infektiosität des Komplexes nach einer der Beschreibungen 3, 5 oder 8 auf seinen Chromosomen in Beziehung steht, und der zum Replizieren der selben Kopien des Komplexes in der Lage ist, wenn er damit infiziert ist.

18. Ein Wirt, der mindestens mehr als ein Gen der M-, F- und HN-Gene des Sendai-Virus oder Gene mit Funktionen, die zu diesen äquivalent sind, auf seinen Chromosomen umfasst.
19. Ein Wirt, der das M-Gen des Sendai-Virus oder sein funktionell äquivalentes Gen auf seinen Chromosomen umfasst.
20. Ein Wirt, der die M-, NP-, P/C- und L-Gene des Sendai-Virus auf seinen Chromosomen umfasst (wobei jedes Gen durch sein funktionell äquivalentes Gen substituiert sein kann).
21. Ein Wirt, der die M-, F- und HN-Gene des Sendai-Virus auf seinen Chromosomen umfasst (wobei jedes Gen durch sein funktionell äquivalentes Gen substituiert sein kann).
22. Ein Wirt, der die M-, F-, HN-, NP-, P/C- und L-Gene des Sendai-Virus auf seinen Chromosomen umfasst (wobei jedes Gen durch sein funktionell äquivalentes Gen substituiert sein kann).
23. Der Wirt nach einer der Beschreibungen 17 bis 22, wobei der Wirt ein Tier oder eine Zelle, ein Gewebe oder ein Ei, die bzw. das davon stammt, ist.
24. Der Wirt nach Beschreibung 22, wobei das Tier ein Säugetier ist.
25. Der Wirt nach Beschreibung 23, wobei das Tier ein Vogel ist.
26. Ein Kit, das aus den folgenden drei Bestandteilen besteht:
- a) das RNA-Molekül, das in dem Komplex nach einer der Beschreibungen 1 bis 3, 5, 7 oder 8 enthalten ist, oder cRNA der RNA oder eine Einheit, die in der Lage ist, die RNA oder die cDNA zu biosynthetisieren;
 - b) eine Gruppe von Enzymen, die für das Replizieren der RNA oder der cDNA notwendig ist, oder eine Einheit, die in der Lage ist, die Gruppe von Enzymen zu biosynthetisieren; und
 - c) eine Gruppe von Proteinen, die mit der Infektiosität des Komplexes in Beziehung steht, oder eine Einheit zur Biosynthese der Gruppe von Proteinen.
27. Ein Kit, das aus den folgenden drei Bestandteilen besteht:
- a) das RNA-Molekül, das in dem Komplex nach einer der Beschreibungen 1 bis 3, 5, 7 oder 8 enthalten ist, oder cRNA der RNA oder eine Einheit, die in der Lage ist, die RNA oder die cDNA zu biosynthetisieren;
 - b) eine Gruppe von Enzymen, die zum Replizieren der RNA oder der cDNA erforderlich ist, oder eine Einheit, die in der Lage ist, die Gruppe von Enzymen zu biosynthetisieren; und
 - c) der Wirt nach einer der Beschreibungen 12 bis 25.
28. Ein Kit, das aus den folgenden drei Bestandteilen besteht:
- a) der Komplex nach einer der Beschreibungen 1 bis 3, 5, 7 oder 8; und
 - b) der Wirt nach einer der Beschreibungen 12 bis 25.
29. Ein Kit, der aus den folgenden drei Bestandteilen besteht:
- a) das RNA-Molekül, das in dem Komplex nach einer der Beschreibungen 3, 5 oder 8 enthalten ist, oder cDNA der RNA oder eine Einheit, die in der Lage ist, die RNA oder die cRNA zu biosynthetisieren;
 - b) alle NP-, P/C- und L-Proteine des Sendai-Virus oder eine Einheit zur Biosynthese der Gruppe von Proteinen; und
 - c) eine Gruppe von Proteinen, die mit der Infektiosität des Komplexes in Beziehung steht, oder eine Einheit zur Biosynthese der Gruppe von Proteinen.
30. Ein Kit, das aus den folgenden drei Bestandteilen besteht:
- a) das RNA-Molekül, das in dem Komplex nach einer der Beschreibungen 3, 5 oder 8 enthalten ist, eine cRNA der RNA oder eine Einheit, die in der Lage ist, die RNA oder die cRNA zu biosynthetisieren;
 - b) alle NP-, P/C- und L-Proteine des Sendai-Virus oder eine Einheit, die in der Lage ist, die Gruppe von Proteinen zu biosynthetisieren; und
 - c) der Wirt nach einer der Beschreibungen 17 bis 25.
31. Ein Kit, das aus den folgenden zwei Bestandteilen besteht:
- a) der Komplex nach einer der Beschreibungen 3, 5 oder 8; und
 - b) der Wirt nach einer der Beschreibungen 17 bis 25.
32. Ein Verfahren zum Herstellen des Komplexes nach einer der Beschreibungen 1 bis 3, 5, 7 oder 8 durch Einführen von drei Bestandteilen der Beschreibungen 26 a), 26 b) und 26 c) in den Wirt.
33. Ein Verfahren zum Herstellen des Komplexes nach einer der Beschreibungen 1 bis 3, 5, 7 oder 8 durch Einführen beider Bestandteile der Beschreibungen 27 a) und 27 b) in den Wirt nach Beschreibung 27 c).
34. Ein Verfahren zum Amplifizieren und Herstellen des Komplexes nach Beschreibung 28 a) durch Transfizieren des Wirts nach Beschreibung 28 b) mit dem Komplex.
35. Ein Verfahren zum Herstellen des Komplexes nach einer der Beschreibungen 3, 5 oder 8 durch Einführen der drei Bestandteile nach den Beschreibungen 29 a), 29 b) und 29 c) in einen Wirt.
36. Ein Verfahren zum Herstellen des Komplexes nach einer der Beschreibungen 3, 5 oder 8 durch Einführen beider Bestandteile nach den Beschreibungen 30 a) und 30 b) in den Wirt nach Beschreibung 30 c).
37. Verfahren zum Amplifizieren und Herstellen des Komplexes nach Beschreibung 31 a) durch Transfizieren des Komplexes in den Wirt nach Beschreibung 31 b).
38. Das RNA-Molekül nach Beschreibung 9, wobei ein Gen, das dem M-Gen entspricht, deletiert oder inaktiviert ist.

39. Das RNA-Molekül nach Beschreibung 9, wobei alle Gene, die den M-, F- und HN-Genen entsprechen, deletiert oder inaktiviert sind.
40. Ein Kit, das aus den folgenden drei Bestandteilen besteht:
- a) das RNA-Molekül nach Beschreibung 38;
 - b) der Wirt nach Beschreibung 20; und
 - c) der Wirt nach Beschreibung 19.
41. Ein Verfahren zum Herstellen eines Komplexes durch Einführen des RNA-Moleküls nach Beschreibung 40 a) in den Wirt nach Beschreibung 40 b) und Amplifizieren und Herstellen des Komplexes durch Transfektion des Wirts nach Beschreibung 40 c).
42. Ein Komplex, der durch das Verfahren nach Beschreibung 41 hergestellt wird.
43. Ein Kit, das aus den folgenden drei Bestandteilen besteht:
- a) das RNA-Molekül nach Beschreibung 39;
 - b) der Wirt nach Beschreibung 22; und
 - c) der Wirt nach Beschreibung 21.
44. Ein Verfahren zum Herstellen eines Komplexes durch Einführen des RNA-Moleküls nach Beschreibung 43 a) in den Wirt nach Beschreibung 43 b) und Amplifizieren und Herstellen des Komplexes durch Transfektion des Wirts nach Beschreibung 43 c).
45. Ein Komplex, der durch das Verfahren nach Beschreibung 44 hergestellt wird.
46. Ein Inhibitor der RNA-Replikation, der in dem Komplex nach entweder Beschreibung 42 oder 45 enthalten ist, der einen inhibitorischen Wirkstoff der RNA-abhängigen RNA-Replikation umfasst.
47. Verfahren zum Herstellen der Fremdproteine, wobei das Verfahren den Vorgang des Einführens des Komplexes nach Beschreibung 7 in einen Wirt und den Vorgang des Gewinnens der exprimierten Fremdproteine umfasst.
48. Verfahren zum Herstellen der Fremdproteine nach Beschreibung 47, wobei der Wirt eine Zelle ist, die eine Gruppe von Genen exprimiert, ausgewählt aus denen, die mit der Fähigkeit zur Verbreitung in Beziehung stehen, die in Bezug auf das RNA-Molekül, das in dem Komplex nach Beschreibung 7 enthalten ist, defizient sind.
49. Ein Kulturmedium oder eine chorio-allantoide Flüssigkeit, die die exprimierten Fremdproteine enthält, wobei das Kulturmedium oder die chorio-allantoide Flüssigkeit durch Beimpfen eines Wirts mit dem Komplex nach Beschreibung 7 und das Gewinnen des Mediums oder der Flüssigkeit erhalten wird.

[0031] Jedes Negativstrang-RNA-Virus mit der Fähigkeit zur Verbreitung kann als Material im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden. Obwohl unvollständige Viren, wie etwa beschädigte DI-Partikel (defective interfering, DI) und synthetische Oligonukleotide, als Teilmaterial verwendet werden können, müssen sie im Allgemeinen die Basensequenz aufweisen, die zu der des Virus mit der Fähigkeit zur Verbreitung äquivalent ist. Negativstrang-RNA-Viren der vorliegenden Erfindung schließen beispielsweise das Sendai-Virus, Newcastle-Krankheit-Virus, Mumps-Virus, Masern-Virus, Respiratory Syncytial-Virus, Rinderpest-Virus von Rind und Hundestaube-Virus von Paramyxoviridae, Influenzavirus von Orthomyxoviridae, Vesikuläre-Stomatitis-Virus und Tollwut-Virus von Rhabdoviridae ein.

[0032] Als das Negativstrang-Virusmaterial können rekombinante Negativstrang-Viren, die sich von jedem der oben beschriebenen Viren ableiten und die Fähigkeit zur Verbreitung beibehalten haben, verwendet werden. Beispielsweise kann das rekombinante Negativstrang-Virus dasjenige mit dem Gen für die Inaktivierung der Immunogenität oder einer Teilregion eines Gens, das verändert ist, um die Wirksamkeit der RNA-Transkription oder RNA-Replikation zu steigern, sein.

[0033] RNAs, die in dem RNA/Protein-Komplex der vorliegenden Erfindung enthalten sind, können durch das Transkribieren modifizierter cDNAs, die sich von jedem der oben beschriebenen Viren oder rekombinanten Viren ableiten, in vitro oder intrazellulär erhalten werden. In den dadurch erhaltenen RNAs muß mindestens ein Gen, das mit der Fähigkeit zur Verbreitung in Beziehung steht, des ursprünglichen Virus deletiert oder inaktiviert sein, das Gen, das mit der autonomen Replikationen in Beziehung steht, sollte dies jedoch nicht sein. Zusätzlich können RNA-Moleküle mit künstlichen Sequenzen, die durch Transkribieren in vitro oder intrazellulär von DNA, die durch Einführen der Gene für die autonome Replikation in cDNA, die beide Terminusstrukturen des Virusgenoms, wie etwa ein DI-Molekül aufweist, erhalten worden sind, verwendet werden.

[0034] Wie oben beschrieben, bezieht sich der Ausdruck „die Gene, die mit einer autonomen Replikation in Beziehung stehen“ im Fall des Sendai-Virus auf jedes der NP-, P/C- und L-Gene, und der Ausdruck „das Gen, das mit der Fähigkeit zur Verbreitung in Beziehung steht“ bezieht sich auf jedes der M-, F- und HN-Gene. Deshalb ist das RNA-Molekül des Sendai-Virus vom Stamm Z, dem nur das M-Gen fehlt, beispielsweise als ein Bestandteil, der in dem „Komplex“ der vorliegenden Erfindung enthalten ist, geeignet. Auch das RNA-Molekül,

bei dem alle M-, F- und HN-Gene deletiert oder inaktiviert sind, ist ebenfalls als Bestandteil, der in dem „Komplex“ der vorliegenden Erfindung enthalten ist, zu bevorzugen. Auf der anderen Seite ist es für die Gene, die die NP-, P/C- und L-Proteine kodieren, notwendig, von RNA exprimiert zu werden. Allerdings sind die Sequenzen dieser Gene nicht notwendigerweise dieselben wie die des Virus und können durch Einführen von Variationen oder Ersetzen durch das entsprechende Gen, das aus anderen Viren stammt, modifiziert werden, sofern die Transkriptions- und Replikationsaktivität der resultierenden RNA ähnlich oder höher ist als die natürliche.

[0035] Der in der vorliegenden Erfindung verwendete Ausdruck „viraler Strukturbestandteil, der frei von Nukleinsäure ist“ schließt beispielsweise ein Virus ein, bei dem nur dessen RNA entfernt wurde. Als solcher wird der strukturelle Bestandteil als derjenige verwendet, der die Infektiosität und die Fähigkeit zur autonomen Replikation im frühen Stadium ergänzt, nicht jedoch die Fähigkeit zur Verbreitung. Im Fall des Sendai-Virus weist der Komplex, der aus seiner RNA zusammengesetzt ist, bei der nur das M-Gen deletiert ist, und des Sendai-Virus, bei dem nur seine RNA deletiert ist, die Infektiosität und die Fähigkeit zur autonomen Replikation, nicht jedoch die Fähigkeit zur Verbreitung auf. Der Komplex kann andere Bestandteile enthalten, sofern er nicht mit einer Fähigkeit zur Verbreitung verfügbar gemacht wird. Beispielsweise kann der Komplex ein Adhäsionsmolekül, einen Liganden, Rezeptoren etc. auf seiner Hülloberfläche enthalten, um das Adhären an bestimmte Zellen zu erleichtern.

[0036] Das RNA-Molekül, das in dem Komplex enthalten ist, kann ein Fremdgen an einer geeigneten Stelle eingefügt haben. Um ein gewünschtes Protein zu exprimieren, wird das Fremdgen, das das Protein kodiert, eingefügt. Im Fall von Sendai-Virus-RNA wird eine Basensequenz mit einer Anzahl von 6 Vervielfältigungen vorzugsweise zwischen die Sequenzen R1 (5'-AGGGTCAAAGT-3') und R2 (5'-GTAAGAAAA-3') [Journal of Virology, Vol. 67, No. 8 (1993), S. 4822–4830] eingefügt. Die Expressionsstärken des Fremdgens, das in die RNA eingefügt ist, kann mittels der Stelle der Insertion des Gens und der Basensequenz, die das Fremdgen flankiert, reguliert werden. Beispielsweise ist im Fall der Sendai-Virus-RNA bekannt, dass die Expressionsstärken des eingefügten Gens mit zunehmender Entfernung des Gens von dem NP-Gen zunehmen. Bevorzugte Wirtszellen für die Einführung des Komplexes, um gewünschte Proteine zu exprimieren, sind diejenigen, die Gene exprimieren, die in dem RNA-Molekül, das aus dem Komplex zusammengesetzt ist, deletiert sind. Deshalb werden transgene Vogeleier, die diese Gene exprimieren, zum Herstellen von Proteinen in großen Mengen am stärksten bevorzugt. Beispielsweise können Proteine, die auf diese Weise exprimiert werden, unter Verwendung von Standardtechniken aus dem Kulturmedium gewonnen werden, wenn die Wirtszellen kultivierte Zellen sind, und aus der chorio-allantoiden Flüssigkeit, wenn die Wirtszellen Hühnereier sind. In den Beispielen 5 und 6 wird ein Komplex mit der Fähigkeit zur Verbreitung anstelle eines zur Verbreitung nicht fähigen Komplexes der vorliegenden Erfindung verwendet. Allerdings wird denjenigen, die sich auf dem Fachgebiet auskennen, klar sein, dass ähnliche Ergebnisse mit dem Komplex der vorliegenden Erfindung wie mit dem Komplex mit der Fähigkeit zur Verbreitung in diesen Beispielen erhalten werden, wenn „Zellen, die Gene exprimieren, die ausgewählt sind aus Genen, die in Bezug auf die Fähigkeit zur Verbreitung in dem RNA-Molekül, das in dem Komplex enthalten ist, deletiert sind“ als Wirtszellen verwendet werden.

[0037] Weiterhin haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung bestätigt, dass für die wirksame Konstitution von Sendai-Virus-Partikeln die in die Zellen einzuführende cDNA vorzugsweise in der ringförmigen Form anstelle der linearen Form vorliegt, und dass zur Bildung von Viruspartikeln mit hoher Effizienz die Transkription der Positivstrang-RNA gegenüber der Negativstrang-RNA in den Zellen bevorzugt ist. Obwohl diese Bedingungen nicht notwendigerweise auf die Rekonstitution aller anderen Negativstrang-RNA-Viren anwendbar ist, ist es möglich, nach geeigneten Bedingungen für die Rekonstitution anderer Negativstrang-RNA-Viren auf der Grundlage der Offenbarung der vorliegenden Erfindung und herkömmlicher Technologie zu suchen, wodurch eine Möglichkeit zum Etablieren von Techniken, um wesentliches Material der gewünschten Negativstrang-Virusvektoren, d. h. die viralen Rekonstitutionssysteme, herzustellen.

[0038] Ebenso wie der „RNA-Replikationsinhibitor“ der vorliegenden Erfindung kann jeder Wirkstoff zur Hemmung der RNA-abhängigen RNA-Replikation angewendet werden, und es werden beispielsweise Ribavirin, TJ13025 etc. vorzugsweise verwendet. Derartige Replikationsinhibitoren sind beispielsweise wirksam, wenn eine Verschlechterung des Gesundheitszustandes mit der zellulären Amplifikation von rekombinanter RNA zu verzeichnen ist oder wenn die Kontrolle der intrazellulären Expression der Fremdgene, die sich von rekombinanter RNA ableiten, erforderlich ist.

[0039] Als eine Ausführung der vorliegenden Erfindung werden Verfahren zum Rekonstituieren des Komplexes der vorliegenden Erfindung aus cDNA, bei der das M-Gen des Sendai-Virus deletiert ist (Schritte A-B), und zum Amplifizieren des Komplexes (Schritte B-C) in [Fig. 1](#) gezeigt.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0040] [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung eines Verfahrens zum Erzeugen von Komplexen der vorliegenden Erfindung aus cDNA, die in Bezug auf das M-Gen des Sendai-Virus defizient ist (Schritte A → B), und weiter zum Amplifizieren der Komplexe (Schritte B → C).

[0041] [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung der Konstruktion einer pUC18/T7(+)-HVJRz.DNA.

[0042] [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung der Konstruktion einer pUC18/T7(-)-HVJRz.DNA.

[0043] [Fig. 4](#) ist eine grafische Darstellung, die die Beziehung zwischen der Zeit nach der Infektion von SeVgp120 in CV-1-Zellen und dem Wert für HAU und der Stärke der Expression von gp120 zeigt.

Beste Art und Weise, um die Erfindung auszuführen

[0044] Im Folgenden wird die Erfindung unter Bezugnahme auf Beispiele genau beschrieben, wobei die Erfindung nicht auf die Beispiele beschränkt ist.

Beispiel 1: Präparation der Sendai-Virus-Transkriptionseinheiten pUC18/T7(-)-HVJRz.DNA und pUC18/T7(+)-HVJRz.DNA

[0045] Das Plasmid pUC18/T7(-)-HVJRz.DNA wurde konstruiert, indem ein DNA-Molekül, das den T7-RNA-Polymerasepromotor umfasste, Sendai-Virus-cDNA, die dazu entworfen war, in die Negativstrang-RNA transkribiert zu werden, und das Ribozymgen in dieser Reihenfolge in einen pUC18-Vektor eingefügt wurde. Auch das Plasmid pUC18/T7(+)-HVJRz.DNA wurde konstruiert, indem ein DNA-Molekül, das den T7-RNA-Polymerasepromotor umfasste, Sendai-Virus-cDNA, die dafür entworfen wurde, um in die Positivstrang-RNA transkribiert zu werden, und das Ribozymgen in dieser Reihenfolge in einen pUC18-Vektor eingefügt wurde. Die Konstruktionen von pUC18/T7(-)-HVJRz.DNA und pUC18/T7(+)-HVJRz.DNA werden in den [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#) gezeigt.

Beispiel 2: Experiment zur Rekonstitution von Sendai-Virus aus cDNA

[0046] LLC-MK2-Zellen (2×10^6), die auf die übliche Weise trypsiniert wurden, wurden in eine Kunststoff-Petrischale mit 60 mm Durchmesser gesetzt und in MEM-Medium (MEM, supplementiert mit 10 % FBS) (2 ml) in einer 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37°C 24 Stunden inkubiert. Nach Entfernen des Mediums und Waschen der Zellen mit PBS (1 ml) wurde eine Suspension des rekombinanten Vaccinia-Virus vTF7-3, das die T7-Polymerase exprimiert, in PBS (0,1 ml) den Zellen zum Zeitpunkt der Vervielfachung der Infektion (multiplicity of infection, moi) von 2 zugesetzt. Die Schale wurde alle 15 Minuten vorsichtig bewegt, um die Viruslösung während der einstündigen Infektion sorgfältig zu verteilen. Nach Entfernen der Viruslösung und Waschen der Zellen mit PBS (1 ml) wurde ein Medium, das cDNA enthielt, hergestellt wie im Folgenden beschrieben, der Schale zugegeben.

[0047] Die in den Tabellen 1 und 2 gezeigten Nukleinsäuren (die Plasmide enthielten, die Faktoren exprimierten, die für die Replikation des Sendai-Virus erforderlich sind, pGEM-L, pGEM-P/C und pGEM-NP) wurden in ein 1,5 ml Probenröhrchen gegeben, und das Volumen wurde auf ein Gesamtvolumen von 0,1 ml mit HBS (Hepes-gepufferte Kochsalzlösung; 20 mM Hepes pH 7,4 mit 150 mM NaCl) eingestellt. In diesen Tabellen stellen (-) und (+)cDNAs die Plasmide pUC18T7(-)-HVJRz.DNA bzw. pUC18T7(+)-HVJRz.DNA dar, und /C und /L zeigen, dass cDNA in Zellen in der ringförmigen Form und der linearen Form nach Behandlung mit dem Restriktionsenzym MluI eingeführt worden ist.

[0048] Auf der anderen Seite wurden in ein Polystyrolröhrchen HBS (0,07 ml) und DOTAP (Boehringer Mannheim) (0,03 ml) gegeben. In dieses Röhrchen wurde die oben beschriebene Nukleinsäurelösung gegeben, und die Mischung wurde als solche 10 Minuten lang stehengelassen. Dann wurde dieser Mischung das oben beschriebene Zellkulturmedium (2 ml, MEM, supplementiert mit 10 % FBS) zugegeben, gefolgt von den Vaccinia-Virus-Inhibitoren, Rifampicin und Cytosin-Arabinosid C (C/Ara/C), um Endkonzentrationen von 0,1 mg/ml bzw. 0,04 mg/ml zu erreichen, was zu der Herstellung des oben beschriebenen cDNA-haltigen Mediums führte.

[0049] Die oben beschriebene Schale wurde in einer 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37°C 40 Stunden inkubiert. Die Zellen in der Schale wurden unter Verwendung eines Zellschabers („rubber policeman“) geerntet, in ein Eppendorf-Röhrchen überführt, durch Zentrifugieren bei 6000 Upm für 5 Minuten sedimentiert und in PBS (1

ml) resuspendiert. Mit Aliquots dieser Zellsuspension als solchen oder nach Verdünnung wurden 10 Tage alte, sich entwickelnde Hühnerei-Embryos angeimpft. Das heißt, die Zellsuspension wurde mit PBS auf die in Tabelle 1 angegebene Zellzahl verdünnt, und die mit 0,5 ml-Aliquots beimpften Eier wurden bei 35°C 72 Stunden inkubiert, dann bei 4°C über Nacht. Die chorio-allantoide Flüssigkeit wurde als Viruslösung von diesen Eiern unter Verwendung einer Spritze mit einer Nadel gewonnen.

[0050] Die Hämagglutinin-Einheit (hemagglutinin unit, HAU) und die Plaque-bildende Einheit (plaque-forming unit, PFU) der gewonnenen Viruslösung wurden wie folgt bestimmt.

[0051] HAU wurde wie folgt bestimmt. Hühnerblut wurde bei 400 × g 10 Minuten zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Die auf diese Weise erhaltenen Präzipitate wurden in 100 Volumen PBS suspendiert und 10 Minuten bei 400 × g zentrifugiert, um den Überstand zu werfen. Dieses Verfahren wurde zweimal wiederholt, um eine 0,1 % Blutzell-Lösung zu erhalten. Es wurden zweifache serielle Verdünnungen der Viruslösungen hergestellt, und jeweils 0,05 ml der zu untersuchenden Verdünnung wurden in jede Vertiefung einer 96-Well-Microtiterplatte verteilt. Die Blutzell-Lösung (jeweils 0,05 ml) wurde weiterhin jeder Vertiefung zugegeben, es wurde vorsichtig geschwenkt, um eine sorgfältige Mischung sicherzustellen, und die Platte wurde 40 Minuten bei 4°C stehengelassen. Die höchste Virusverdünnung, welche eine mit bloßem Auge zu beobachtende Hämagglutination verursachte, wurde als HAU verwendet.

[0052] Die PFU wurde wie folgt getestet. CV-1-Zellen wurden zu einer Einzelzellschicht (monolayer) in einer 6-Well-Kulturplatte wachsen gelassen. Nachdem das Kulturmedium verworfen worden war, wurde eine 10-fach seriell verdünnte Viruslösung (jeweils 0,1 ml) in jede Vertiefung der Kulturplatte verteilt, um die Zellen bei 37°C eine Stunde zu infizieren. Während der Infektion wurde eine Mischung aus 2x serumfreiem MEM und geschmolzenem 2% Agar (55°C) hergestellt, und es wurde Trypsin in einer Endkonzentration von 0,0075 mg/ml zu der Mischung gegeben. Nach einer Stunde Infektion und Entfernen der Viruslösung wurde das mit Agar gemischte Kulturmedium (jeweils 3 ml) jeder Vertiefung der Kulturplatte zugesetzt, und die Platte wurde in einer 5 % CO₂-Atmosphäre bei 37°C drei Tage inkubiert. Jeder Vertiefung wurde Phenolrot (0,1 %) (0,2 ml) zugesetzt, es wurde bei 37°C drei Stunden inkubiert, und das Phenolrot wurde dann entfernt. Ungefärbte Plaques wurden gezählt, um den Virustiter als PFU/ml zu bestimmen.

[0053] Tabelle 1 zeigt Matrizen-cDNAs des Sendai-Virus, mit denen LLC-2-Zellen transfiziert wurden, Mengen von cDNA-Faktoren, pGEM-L, pGEM-P/C und pGEM-NP, die für die RNA-Replikation erforderlich sind, die Inkubationszeit, die Zellzahlen, mit denen die Hühnereier beimpft wurden, HAU- und PFU-Werte.

Tabelle 1								
Matrize cDNA	Gesamt- menge (µg)	pGEM -L (µg)	pGEM -P/C (µg)	pGEM -NP (µg)	Inkubations- zeit (h)	Zell- zahl	HAU	PFU
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁵	512	2x10 ⁹
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁵	256	9x10 ⁸
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁶	256	9x10 ⁸
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁵	<2	<10
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁵	<2	<10
(+)cDNA/L	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁶	<2	<10
(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁴	<2	<10
(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁵	<2	<10
(-)cDNA/L	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁶	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁴	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁵	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	1,00x10 ⁶	4	8x10 ³

[0054] Proben, die sowohl HAU als auch PFU zeigten, wurden durch Ultrazentrifugation sedimentiert, resuspendiert, durch eine Sucrose-Dichtegradientenzentrifugation von 20% bis 60% gereinigt und durch 12,5 % SDS-PAGE fraktioniert. Jedes Protein, das in diesen Proben enthalten war, wies die gleiche Größe auf wie das

des Sendai-Virus.

[0055] Diese Ergebnisse zeigen, dass das Sendai-Virus durch Einführen von cDNAs in Zellen rekonstituiert werden kann, und dass Viruspartikel durch Einführen von cDNAs, die Positivstrang-RNAs transkribieren, im Vergleich zu denen, die Negativstrang-RNAs transkribieren, und weiter durch Einführen von cDNAs in der ringförmigen Form anstelle der linearen Form wirksamer rekonstituiert werden können.

Beispiel 3: Erfassung von RNA-Replikationsfaktoren, die zur Rekonstitution des Sendai-Virus erforderlich sind

[0056] Es wurden Experimente durchgeführt, um zu untersuchen, ob alle drei Plasmide, die die L-, P/C- und NP-Proteine exprimieren, für die Rekonstitution des Sendai-Virus erforderlich sind. Die experimentellen Verfahren waren ähnlich wie die in Beispiel 2 beschriebenen, außer dass jede Kombination von zwei, ausgewählt aus pGEM-L, pGEM-P/C- und pGEM-NP-Plasmiden, oder nur eines davon anstelle von allen dreien, die in Beispiel kombiniert wurden, gemeinsam mit einer Matrizen-cDNA in Zellen eingeführt wurden.

[0057] Tabelle 2 zeigt Matrizen-cDNAs des Sendai-Virus, die in LLC-MK2-Zellen eingeführt wurden, die Mengen an den cDNA-Faktoren, die zur RNA-Replikation erforderlich sind, einschließlich pGEM-L, pGEM-P/C und pGEM-NP, die Inkubationszeit, die Zellzahl, mit denen Hühnereier beimpft wurden, und Werte von HAU und PFU.

Tabelle 2								
Matrize cDNA	Gesamt- menge (μg)	pGEM -L (μg)	pGEM -P/C (μg)	pGEM -NP (μg)	Inkubations- zeit (h)	Zell- Zahl, beimpft	HAU	PFU
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1,00 \times 10^5$	256	6×10^8
(+)cDNA/C	10	4	2	4	40	$1,00 \times 10^6$	512	4×10^9
(+)cDNA/C	10	0	2	4	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	0	2	4	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	0	4	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	0	4	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	2	0	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	2	0	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	0	0	4	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA	10	0	0	4	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	0	2	0	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/c	10	0	2	0	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	0	0	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10
(+)cDNA/C	10	4	0	0	40	$1,00 \times 10^6$	<2	<10

[0058] Wie in Tabelle 2 gezeigt, wurde beim Einführen jeder Kombination von zwei der drei Faktoren in Zellen keine Virusrekonstitution beobachtet, was die Notwendigkeit von allen drei Proteinen L, P/C und NP für die Virusrekonstitution bestätigt.

Beispiel 4: Experiment zur Rekonstitution des Sendai-Virus in vitro von transkribierten RNAs

[0059] Da die Rekonstitution des Sendai-Virus aus funktionellen cDNA-Klonen in Beispiel 2 beschrieben wurde, wurde weiterhin untersucht, ob Transkriptionsprodukte der cDNAs in vitro, d.h. vRNA und cRNA, eine ähnliche Rekonstitution unterstützen können.

[0060] Nachdem die Sendai-Virus-Transkriptionseinheiten pUC18/T7(-)HVJRz.DNA und

pUC18/T7(+)/HVJRz.DNA mit dem Restriktionsenzym MluI linearisiert worden sind, wurde unter Verwendung dieser DNAs als Matrizen eine RNA-Synthese in vitro mit einer gereinigten T7-Polymerase-Präparation durchgeführt (EPICENTRE TECHNOLOGIES: Ampliscribe T7 Transcription Kit). Das Verfahren zum Synthetisieren von RNAs in vitro folgt im wesentlichen den mit dem Kit zur Verfügung gestellten Protokollen. Unter Verwendung der auf diese Weise erhaltenen RNA-Produkte anstelle der cDNAs in Beispiel 2 wurden ähnliche Experimente durchgeführt, und die Virusproduktion wurde durch einen HA-Test bestimmt. Die Ergebnisse werden in Tabelle 3 gezeigt.

Tabelle 3

Matrize cDNA	Gesamt- menge (μg)	pGEM -L (μg)	pGEM -P/C (μg)	pGEM -NP (μg)	Inkubations- zeit (h)	Zell- Zahl, beimpft	HAU	PFU
in vitro (-)RNA	10	4	2	4	40	$1,00 \times 10^6$	512	2×10^9
in vitro (-)RNA	10	4	2	4	40	$1,00 \times 10^6$	512	ND
in vitro (+)RNA	10	4	2	4	40	$1,00 \times 10^6$	2	5×10^3
in vitro (+)RNA	10	4	2	4	40	$1,00 \times 10^6$	<2	ND

[0061] Diese Ergebnisse zeigen, dass das Virus durch Einführen von entweder Negativ- oder Positivsinnstrang-RNAs in Zellen rekonstituiert werden kann.

Beispiel 5: Expression von Fremdgenen, die in Sendai-Virusvektoren in Wirtszellen eingefügt sind

1. Präparation des Sendai-Virusvektors „pSeVgp120“, eingefügt mit einem Fremdgen (HIV-1gp120)

[0062] Unter Verwendung eines Satzes von Primern, der Primer a (5'-TGCGGCCGCGTACGGTGGCAAT-GAGTGAAGGAGAAGT-3') (SEQ ID NO:1) und Primer d (5'-TTGCGGCCGCGATGAACCTTTCACCCTAAGTT-TTT VTTA CTACGGCGTACGTACATCTTTTTTCTCTCTGC-3') (SEQ ID NO:2) umfasste, wurde das HIV-1gp120-Gen an „pN1432“ durch Standard-PCR-Techniken amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden einer TA-Klonierung unterzogen, mit NotI verdaut und dann in die NotI-Schnittstelle von „pSeV18⁺“ eingefügt. Dann wurden E. coli-Zellen mit diesem rekombinanten Plasmid transformiert. Die DNAs wurden aus jeder Kolonie von E. coli durch das „Miniprep“-Verfahren extrahiert, mit DraIII verdaut und dann einer Elektrophorese unterzogen. Die positiven Klone (nachfolgend als „Klon 9“ bezeichnet) wurden danach ausgewählt, dass sich bestätigte, dass sie DNA-Fragmente mit der aus der Insertion erwarteten Größe enthielten. Nachdem bestätigt worden war, dass die DNA-Fragmente die authentische Nukleotid-Sequenz aufwiesen, wurden die DNAs durch eine Cäsiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation gereinigt. Im Folgenden wird pSeV18⁺ mit dem eingefügten gp120-Gen als „pSeVgp120“ bezeichnet.

2. Rekonstitution von Sendai-Virus, das pSeVgp120 (SeVgp120) enthält, und Analyse der Expression von gp120

[0063] Außer im Fall der weiteren Transfektion von LLCMK2-Zellen mit pSeVgp120, zusätzlich zu pGEM-NP, pGEM-P/C und pGEM-L, wurde chorio-allantoide Flüssigkeit aus Hühnereiembryos gewonnen und auf die virale HAU genau wie im Beispiel 2 beschrieben untersucht. Das gewonnene Virus wurde auch auf die Expression von gp120 durch ELISA wie folgt untersucht.

[0064] Es wurden Proben (jeweils 100 μl) in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte verteilt, die mit einem monoklonalen Antikörper gegen HIV-1 beschichtet worden war, und bei 37°C 60 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde ein HRP-verknüpfter anti-HIV-1-Antikörper (jeweils 100 μl) jeder Vertiefung zugegeben, und es wurde bei 37°C 60 Minuten inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS wurde jeder Vertiefung Tetramethylbenzidin zugegeben, und es wurden die Mengen an Reaktionsprodukt, die durch die Wirkung von HRP unter sauren Bedingungen umgesetzt worden waren, bestimmt, indem die optische Dichte bei 450 nm verfolgt wurde, um die Expressionsstärke von gp120 zu bestimmen. Die Ergebnisse werden in der linken Spalte in Tabelle 4 gezeigt.

[0065] Mit der auf diese Weise erhaltenen Viruslösung wurden CV-1-Zellen beimpft und auf ähnliche Weise, wie folgt, untersucht. CV-1-Zellen wurden auf eine Kulturplatte mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen/Platte verteilt, wachsen gelassen, und dann wurde das Kulturmedium verworfen. Nach dem Waschen mit PBS(-) wurde die Viruslösung den Zellen bei der Vervielfachung der Infektion von 10 zugesetzt, und der Ansatz wurde bei Raumtemperatur eine Stunde inkubiert. Nachdem die Viruslösung verworfen worden war, wurde mit PBS(-) gewaschen, frisches MEM-Medium (MEM-Medium, supplementiert mit den Antibiotika AraC und Rif sowie Trypsin) wurde den Zellen zugegeben, und der Ansatz wurde bei 37°C 48 Stunden inkubiert. Nach der Reaktion wurde das Medium gewonnen und auf HAU (durch ein ähnliches Verfahren wie in Beispiel 2 beschrieben) getestet und auf die Expression von gp120 (durch ELISA) untersucht. Die Ergebnisse werden in der mittleren Spalte von Tabelle 4 gezeigt. Zusätzlich wurden Hühnereiembryos wieder mit dem Zellkulturüberstand von CV-1-Zellen beimpft, und die auf diese Weise erhaltene Viruslösung wurde auf HAU getestet und auch auf die gp120-Expression (durch ELISA) untersucht. Die Ergebnisse werden in der rechten Spalte von Tabelle 4 gezeigt.

Tabelle 4

		(µg/ml)
Chorio-allantoide	CV-1-Medium (F1)	Chorio-allantoide
Flüssigkeit (F1)	gp120 (HAU)	Flüssigkeit (F2)
gp120 (HAU)		gp120 (HAU)
0,10 (4)	3,46 (128)	
0,15 (32)	1,81 (128)	1,56, 1,21 (512, 512)
0,05 (32)	2,20 (128)	

[0066] Wie in Tabelle 4 gezeigt, werden deutlich hohe Konzentrationen an gp120 in CV-1-Zellen in Kultur nachgewiesen (mittlere Spalte in der Tabelle), und auch in den chorio-allantoiden Flüssigkeiten von Hühnereiembryonen, die wieder mit dem Virus beimpft worden waren (rechte Spalte der Tabelle). In den rechten und mittleren Spalten der Tabelle werden die Mittelwerte der drei Klone gezeigt.

[0067] Weiterhin wurde die Expression von gp120 durch Westernblot analysiert. Nachdem das Kulturmedium von CV-1-Zellen, die mit SeVgp120 infiziert waren, bei 20.000 Upm eine Stunde zentrifugiert worden war, um das Virus zu sedimentieren, wurde der Überstand entweder mit TCA (10 Vol.-%) 15 Minuten auf Eis oder mit 70% Ethanol bei -20°C behandelt und 15 Minuten bei 15.000 Upm zentrifugiert. Die auf diese Weise präzipitierten Proteine wurden gemischt, um mit einem „SDS-PAGE-Probenpuffer“ (Daiichi Chemicals) bei 90°C 3 Minuten zu reagieren, und sie wurden dann einer Elektrophorese in 10% SDS-Polyacrylamidgel (SDS-PAGE) unterzogen. Die auf diese Weise fraktionierten Proteine wurden auf PVDF-Membranen (Daiichi Chemicals) übertragen, mit einem monoklonalen Antikörper 902 bei Raumtemperatur eine Stunde lang reagieren gelassen und dann mit T-TBS gewaschen. Die Membranen wurden mit anti-mIgG (Amersham) bei Raumtemperatur eine Stunde reagieren gelassen und mit T-TBS gewaschen. Die Membranen wurden dann mit HRP-verknüpftem Protein A (Amersham) bei Raumtemperatur für eine Stunde reagieren gelassen, mit T-TBS gewaschen, und es wurde 4-Chlor-1-naphthol (4CNPlus) (Daiichi Chemicals) zugegeben, um gp120 nachzuweisen. Als Ergebnis wurden Proteinbanden in Positionen sichtbar gemacht, die denen des erwarteten Molekulargewichts von gp120 entsprachen.

[0068] Zusätzlich wurden die Wirkungen eines Zeitraums nach Infektion (Postinfektionszeit) von CV-1-Zellen, die mit SeVgp120 transfiziert worden waren, auf den HAU-Wert und die Expressionsstärke von gp120 analysiert. CV-1-Zellen (5×10^6), die auf 10 cm-Platten verteilt worden waren, wurden mit SeVgp120 bei einer Vervielfachung der Infektion von 10 infiziert, und das Kulturmedium (jeweils 1 ml) wurde nach der Infektion zu den Zeitpunkten 30, 43, 53 und 70 h mit einem gleichen Volumen an frischem Medium gemischt und der Bestimmung des HAU, der Untersuchung der gp120-Expression (durch ELISA) und einem Westernblot unterzogen. Die Ergebnisse werden in [Fig. 4](#) gezeigt. Wie in [Fig. 3](#) eindeutig gezeigt, neigt die Produktion von gp120 dazu, mit dem Ansteigen des HA-Titers des Sendai-Virus anzusteigen.

Beispiel 6: Analyse der SeVgp120-Propagation und der Expressionsstärke von gp120 in verschiedenen Zelltypen

[0069] Unter Verwendung ähnlicher Verfahren wie denen in Beispiel 5, mit Ausnahme der Verwendung von verschiedenen Zelltypen, wurden HAU und die Expressionsstärken von gp120 (durch ELISA) getestet. Die Ergebnisse werden in Tabelle 5 gezeigt.

Tabelle 5

Zelltyp	Zeit (nach Infektion)	HAU	rgp120 ($\mu\text{g/ml}$)
CV-1	96	32	2,5
LLCMK2	48	16	0,5
CHO	55	4	0,46
NIH3T3	48	4	0,25
MT4	24	16	0,8
MOLT4/	24	16	1,2

[0070] In der linken Spalte der Tabelle werden die Zeiten nach Infektion von verschiedenen Zelltypen, die mit SeVgp120 transfiziert worden waren, gezeigt. Als Ergebnis wurden die SeVgp120-Propagation und die gp120-Expressionen in allen Zelltypen getestet.

Beispiel 7: Studien zur Expression des Luziferasegens, eingefügt in den Sendai-Virusvektor in Wirtszellen

[0071] Um das Luziferasegen zum Einfügen in Vektoren zu isolieren, wurde das Luziferasegen, begrenzt durch die konstruierten NotI-Schnittstellen an beiden Termini, durch Standard-PCR und Verwendung eines Satzes von Primern [5'-AAGCGGCCGCCAAAGTTCACGATGGAAGAC-3' (30mer) (SEQ ID NO: 3)] und [5'-TGCGGCCGCGATGAACTTTACCCCTAAGTTTTTCTTACTACGGATTATTACAATTT GGACTTTCCGCC-3-(69mer) (SEQ ID NO: 4)] mit „pHluciRT4“ als Matrize konstruiert. Das PCR-Produkt wurde in das NotI-Fenster von pSev18⁺ kloniert, um einen Sendai-Virusvektor zu erhalten, in den das Luziferasegen eingefügt wurde. Dann wurden mit diesem rekombinanten Vektor LLCMK2-Zellen transfiziert, und Hühnereimembryos wurden damit beimpft. Chorio-allantoide Membranen von sich entwickelnden Eiern wurden ausgeschnitten, zweimal mit kalter PBS(-) gewaschen, und es wurde nach der Zugabe eines Lysepuffers (Picagene-WAKO) (25 μl) und sorgfältigem Mischen bei 15.000 U_{pm} 2 Minuten zentrifugiert. Dem Überstand (jeweils 5 μl) wurde das Substrat (IATRON) (50 μl) zugegeben, und die Mischung wurde in jede Vertiefung einer 96-Well-Platte verteilt. Die Fluoreszenzintensität wurde mit einem Luminometer (Luminous CT-9000D, DIA-IATRON) gemessen, und die Enzymaktivität wurde in Counts pro Sekunde (cps) ausgedrückt. Als Ergebnis wurde eine extrem hohe Luziferaseaktivität mit CV-1-Zellen 24 Stunden nach Infektion nachgewiesen (Tabelle 6). In diesem Fall wurde das Sendai-Virus, das das Luziferasegen nicht trug, als Kontrolle verwendet (in der Tabelle durch „SeV“ dargestellt). Die von zwei Klonen erhaltenen Ergebnisse werden in der Tabelle gezeigt.

Tabelle 6

Fluoreszenzintensität (Counts/10 sec)

	Chorio-allantoide	CV-1 (24 h nach Infektion)
	Membran	
Luc/Sev	669187	
	2891560	8707815
SeV	69	48
	23	49

Gewerbliche Anwendbarkeit

[0072] Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung ist ein System etabliert worden, das die effiziente Gewinnung von Viruspartikeln von cDNAs von Negativstrangviren erlaubt, und es ist auch ein Verfahren entwickelt worden, das die Produktion und Amplifikation von „Komplexen, die von RNAs umfasst werden, die sich von einem bestimmten sich verbreitenden Negativstrang-RNA-Virus und strukturellen Virusbestandteilen, die keine Nukleinsäuren enthalten, ableiten, damit sie Infektiosität und die Fähigkeit, autonom RNA zu replizieren, jedoch keine Potenz zur Verbreitung" aufweisen. Da die Komplexe sich nur in infizierten Zellen replizieren können, sind diese Techniken besonders nützlich auf dem Gebiet der Gentherapie etc., auf dem die therapeutische Sicherheit höchst wünschenswert ist.

Patentansprüche

1. Komplex, umfassend ein RNA-Molekül, umfassend Sendai-Virus-RNA oder Sendai-Virus-cRNA, worin das RNA-Molekül darin defekt ist, dass mindestens mehr als ein Gen, das für M-, F- und HN-Proteine kodiert, deletiert oder inaktiviert ist, und virale strukturelle Komponenten, abgeleitet von dem Sendai-Virus, die keine Nukleinsäure enthalten, wobei der Komplex eine zelluläre Infektiosität aufweist und in der Lage ist, autonom RNA zu replizieren, jedoch in seiner Fähigkeit zur Verbreitung defizient ist.

2. Komplex nach Anspruch 1, wobei das in dem Komplex enthaltene RNA-Molekül ein Fremdgen umfasst.

3. Kit, umfassend die folgenden Komponenten,

a) das in dem Komplex nach Anspruch 1 oder 2 enthaltene RNA-Molekül oder die cRNA dieser RNA oder eine cDNA, die in der Lage ist, die RNA oder die cRNA zu biosynthetisieren,

b) Enzyme, die für eine Replikation der RNA oder der cRNA erforderlich sind, oder ein Gen, das in der Lage ist, die Enzyme zu biosynthetisieren, und

c) Proteine, die mit der Infektiosität des Komplexes zusammenhängen, oder ein Gen oder ein Wirt, der in der Lage ist, diese Proteine zu biosynthetisieren.

4. Kit nach Anspruch 3, worin die Komponente nach Anspruch 3 c) einem Wirt entspricht, auf den sich der Komplex nach Anspruch 1 oder 2 verbreiten kann.

5. Kit nach Anspruch 3, wobei die Komponenten nach Anspruch 3 a) und b) dem Komplex nach Anspruch 1 oder 2 entsprechen und die Komponente nach Anspruch 3 c) einem Wirt entspricht, auf den sich der Komplex nach Anspruch 1 oder 2 verbreiten kann.

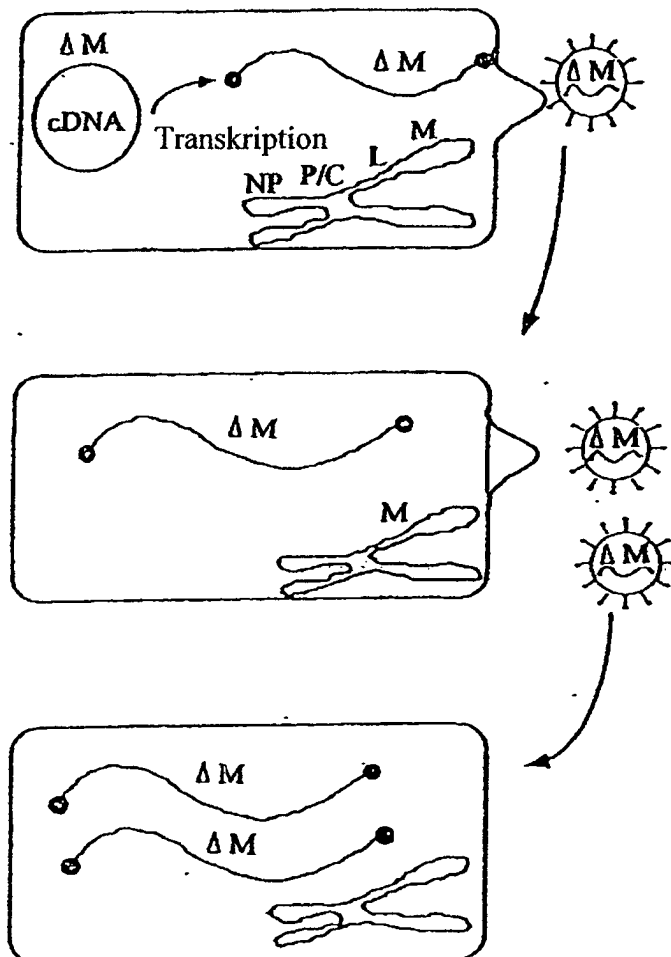
6. Kit nach Anspruch 3, wobei die Enzyme nach Anspruch 3 b) allen NP-, P/C- und L-Proteinen des Sendai-Virus entsprechen.

7. Kit nach Anspruch 3, wobei die Enzyme nach Anspruch 3 b) allen NP-, P/C- und L-Proteinen des Sendai-Virus entsprechen und die Komponente nach Anspruch 3 c) einem Wirt entspricht, auf den sich der Komplex nach Anspruch 1 oder 2 verbreiten kann.

8. Verfahren zur Herstellung des Komplexes nach Anspruch 1 oder 2 durch Einführen aller drei Komponenten nach Anspruch 3 a), 3 b) und 3 c) in einen Wirt.
9. Verfahren zur Herstellung des Komplexes nach Anspruch 1 oder 2 durch Einführen beider Komponenten nach Anspruch 3 a) und 3 b) in den Wirt nach Anspruch 4.
10. Verfahren zur Amplifizierung und Herstellung des Komplexes nach Anspruch 1 oder 2 durch Transfizieren des Komplexes in den Wirt nach Anspruch 5.
11. Verfahren zur Herstellung des Komplexes nach Anspruch 1 oder 2 durch Einführen beider Komponenten nach Anspruch 3 a) und 3 c) und aller NP-, P/C- und L-Proteine des Sendai-Virus oder eines Gens, das in der Lage ist, diese Proteine zu biosynthetisieren, in einen Wirt.
12. Verfahren zur Herstellung des Komplexes nach Anspruch 1 oder 2 durch Einführen des RNA-Moleküls nach Anspruch 3 a) und aller NP-, P/C- und L-Proteine des Sendai-Virus oder eines Gens, das in der Lage ist, diese Proteine zu biosynthetisieren in den Wirt nach Anspruch 7.
13. Kit, umfassend die folgenden Komponenten,
 - a) das RNA-Molekül nach Anspruch 1,
 - b) einen Wirt, umfassend die M-, NP-, P/C- und L-Gene des Sendai-Virus auf seinen Chromosomen, und
 - c) einen Wirt, umfassend das M-Gen des Sendai-Virus auf seinen Chromosomen.
14. Verfahren zur Herstellung eines Komplexes durch Einführen des RNA-Moleküls nach Anspruch 13 a) in den Wirt nach Anspruch 13 b) und Amplifizieren und Herstellen des Komplexes durch Transfizieren desselben in den Wirt nach Anspruch 13 c).
15. Kit, umfassend die folgenden Komponenten,
 - a) das RNA-Molekül nach Anspruch 1,
 - b) einen Wirt, umfassend die M-, F-, HN-, NP-, P/C- und L-Gene auf seinen Chromosomen, und
 - c) einen Wirt, umfassend die M-, F- und HN-Gene des Sendai-Virus auf seinen Chromosomen.
16. Verfahren zur Amplifizierung und Herstellung eines Komplexes durch Einführen des RNA-Moleküls nach Anspruch 15 a) in den Wirt nach Anspruch 15 b) und Amplifizieren und Herstellen des Komplexes durch Transfizieren desselben in den Wirt nach Anspruch 15 c).
17. Komplex, hergestellt durch das Verfahren nach Anspruch 14 oder 16.
18. Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen, wobei das Verfahren die Prozesse des Einführens des Komplexes nach Anspruch 2 in einen Wirt und Erhalten der exprimierten Proteine umfasst.
19. Verfahren zur Herstellung von Fremdproteinen nach Anspruch 18, wobei der Wirt eine Zelle ist, die eine Gruppe von Genen unter denjenigen exprimiert, die mit der Fähigkeit zur Verbreitung zusammenhängen, die in dem RNA-Molekül defizient sind, das in dem Komplex nach Anspruch 2 enthalten ist.
20. Kulturmedium oder chorio-allantoide Flüssigkeit, enthaltend den Komplex nach Anspruch 2 und die exprimierten Fremdproteine, erhältlich durch Beimpfen eines Wirts mit dem Komplex nach Anspruch 2 und Erhalten seines Kulturmediums oder der chorio-allantoiden Flüssigkeit.
21. Verwendung eines Komplexes nach einem der Ansprüche 1, 2 und 17 zur Herstellung eines Vektors zur Verwendung in der Gentherapie.

Es folgen 4 Blatt Zeichnungen

Fig.1



A. Unter Verwendung einer Zelllinie, die die NP-, P/C- und M-Proteine exprimiert, als Verpackungszelle, wird virale RNA von cDNA, der das M-Gen fehlt transkribiert, und es wird schließlich ein Typ von Viruspartikeln, denen das M-Gen fehlt (Viruspartikel vom ΔM -Typ), produziert.

B. Diese Viruspartikel vom ΔM -Typ können in den das M-Gen exprimierenden Zellen verpackt und als Partikel gewonnen werden.

C. Normale Zellen werden mit Viruspartikeln vom ΔM -Typ infiziert, wobei die virale RNA in den Zellen repliziert wird, jedoch keine Viruspartikel gebildet werden.

Fig.2

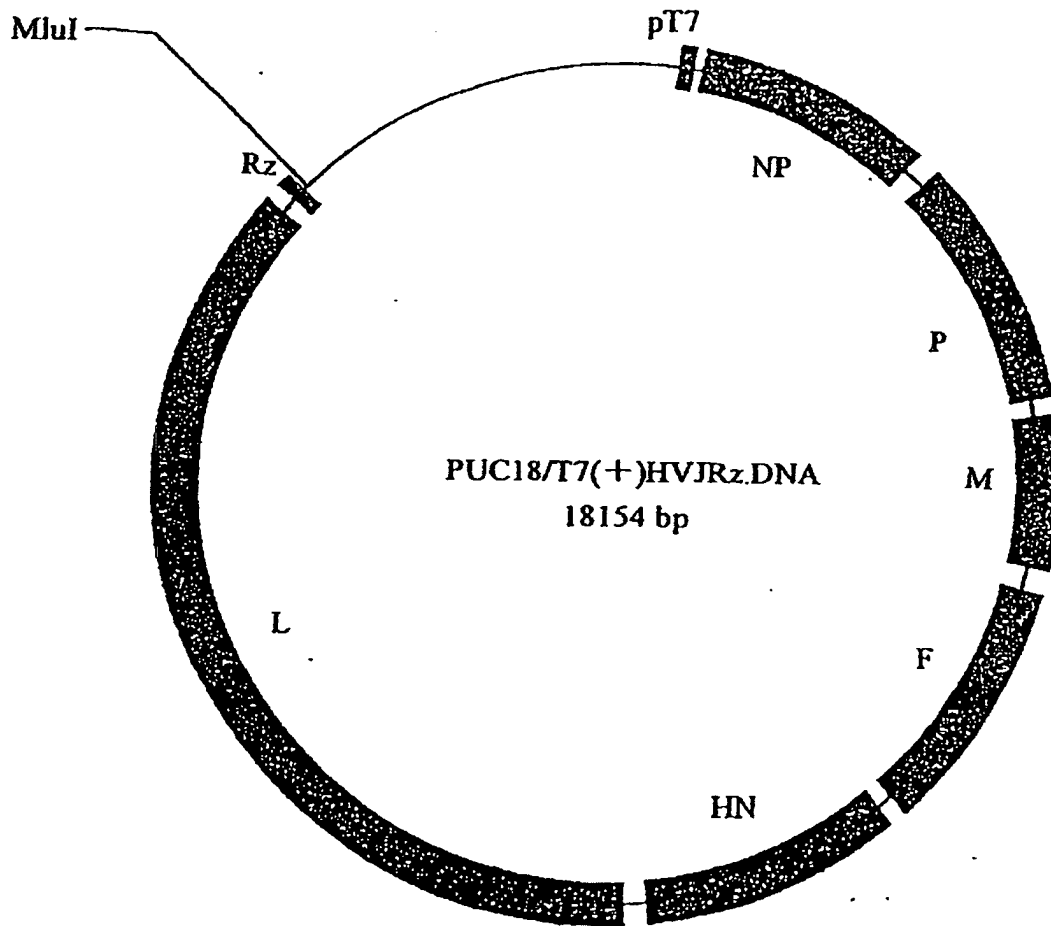


Fig.3

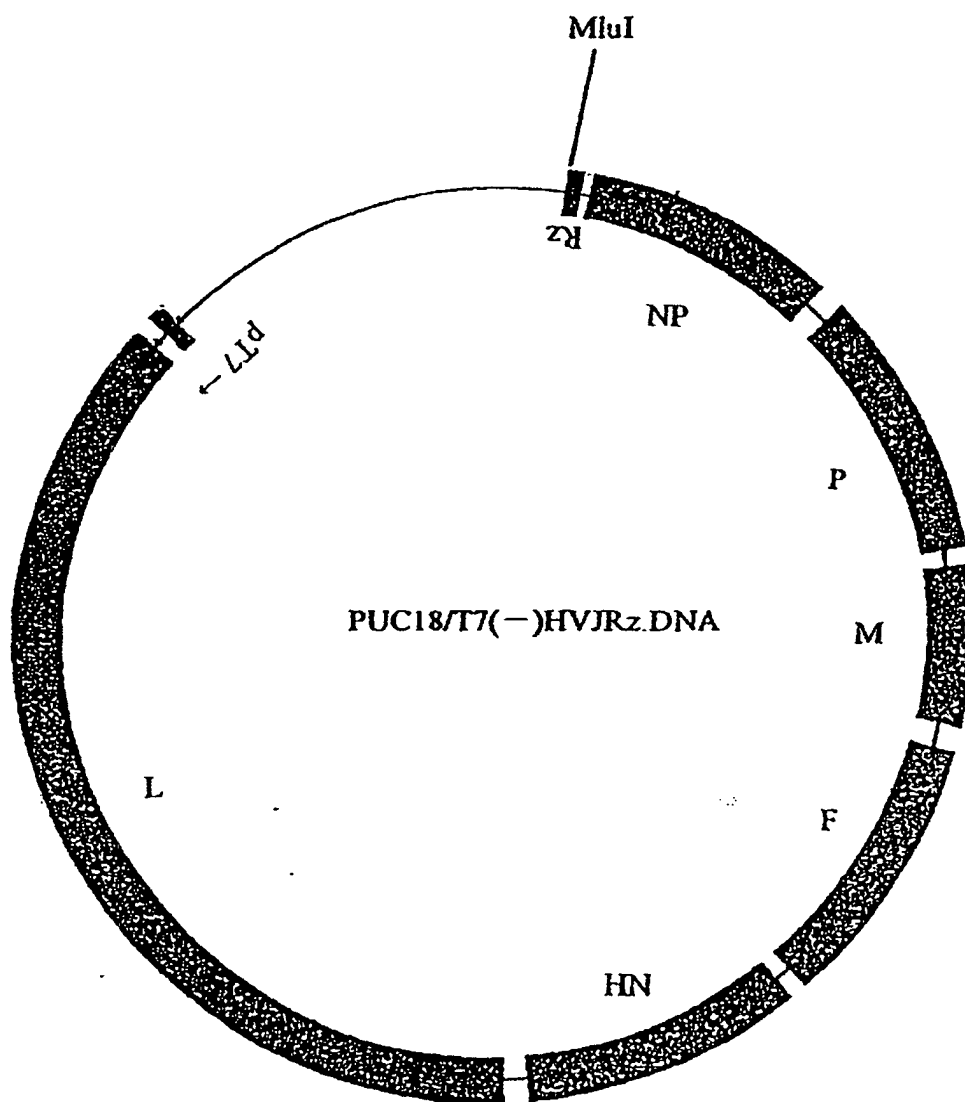


Fig.4

