



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 34 633 T2** 2006.08.10

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 781 344 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 34 633.4**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR95/01171**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 930 578.0**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1996/008574**

(86) PCT-Anmeldetag: **13.09.1995**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **21.03.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **02.07.1997**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **23.11.2005**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **10.08.2006**

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

**A61K 48/00** (2006.01)

**A61K 9/00** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**9410911**      **13.09.1994**      **FR**

(73) Patentinhaber:

**Transgene S.A., Straßburg/Strasbourg, FR**

(74) Vertreter:

**Samson & Partner, Patentanwälte, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**LEROY, Pierre, F-67000 Strasbourg, FR; MEHTALI,  
Majid, 67115 Plobsheim, FR**

(54) Bezeichnung: **IMPLANTAT UND VEKTOR ZUR BEHANDLUNG VON ERWORBENEN KRANKHEITEN**

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**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft eine neue Art von Implantat und dessen Verwendung zur Behandlung und Vorbeugung von Krebs oder AIDS. Sie hat insbesondere ein Implantat zum Gegenstand, das genetisch modifizierte Zellen enthält, die fähig sind, spezifische Antikörper zu exprimieren und zu sekretieren, welche Krebszellen oder infizierte Zellen erkennen, um ihre Teilung oder Propagierung sowie die Produktion von Viruspartikeln in infizierten Zellen zumindest teilweise zu hemmen. Die vorliegende Erfindung betrifft auch einen adenoviralen Vektor, der fähig ist, die Expression eines in mehrfacher Hinsicht interessanten Proteins sowie eines Antikörpers oder eines seiner Derivate zu steuern.

**[0002]** Die Möglichkeit der Behandlung menschlicher Krankheiten durch Gentherapie ist in einigen Jahren vom Stadium der theoretischen Überlegungen zu dem der klinischen Anwendungen übergegangen. So wurde das erste auf den Menschen angewandte Protokoll in den Vereinigten Staaten im September 1990 an einem Patienten initiiert, der aufgrund einer Mutation des für Adenosindesaminase (ADA) kodierenden Gens an einer genetisch bedingten Immunschwäche erkrankt war. Der relative Erfolg dieses ersten Versuchs hat die Entwicklung neuer Gentherapieprotokolle für verschiedene Erbkrankheiten oder erworbene Krankheiten angeregt. Diejenigen, die derzeit erprobt werden, bestehen zum Großteil darin, das therapeutische Gen ex vivo in Zellen des Patienten, zum Beispiel die Stammzellen der hämatopoetischen Linie, zu transferieren und diese korrigierten Zellen dann dem Kranken wieder zu infundieren. Es handelt sich somit um eine aufwendige Technologie, die nicht reversibel ist und das Risiko birgt, transformierte Zellen zu reimplantieren.

**[0003]** Die jüngst initiierte Neorgantechnologie ermöglicht es, die wesentlichen Nachteile der klassischen Gentherapieprotokolle zu beheben. Sie beruht auf der Reimplantation einer künstlichen Struktur in den Patienten, die man als "Implantat" bezeichnen kann und die lebende Zellen enthält, wahre "Mikrofabriken", die es ermöglichen, das interessierende therapeutische Molekül in vivo und kontinuierlich freizusetzen.

**[0004]** Genauer genommen besteht diese künstliche Struktur aus lebenden Zellen, die zuvor mit einem das therapeutische Gen enthaltenden viralen Vektor transduziert wurden und in einem Kollagengel enthalten sind, das ein Gerüst synthetischer Fasern aus einem biokompatiblen Material (PTFE, Polytetrafluorethylen oder Gore-Tex™) umhüllt. Dieses Gel enthält ebenfalls einen angiogenetischen Wachstumsfaktor (bFGF, basic Fibroblast Growth Factor). Nach seiner Reimplantation in das Lebewesen wird das Neorgan im Allgemeinen dank der angiogenetischen und trophischen Eigenschaften des bFGF innerhalb einiger Tage vaskularisiert. Es entwickelt sich dann zu einer autonomen Struktur, die mit Bindegewebe versehen ist, teilweise innerviert ist und mit dem Blutkreislauf verbunden ist, in den die therapeutischen Moleküle ausgeschüttet werden.

**[0005]** Die Möglichkeit, Neorgane für die Gentherapie zu verwenden, wurde bereits in mehreren wissenschaftlichen Artikeln sowie in der internationalen Anmeldung WO 92/15676 erwähnt. Die in den Dokumenten aus dem Stand der Technik offenbarte Technologie richtet sich jedoch nur auf die Behandlung monogener Erbkrankheiten, die aus der angeborenen fehlerhaften Expression eines einzigen Gens hervorgehen, und wurde folglich nur für die Sekretion therapeutischer Monomermoleküle, wie Faktor IX,  $\alpha_1$ -Antitrypsin, ADA, Erythropoietin (EPO) und  $\beta$ -Glucuronidase, eingesetzt. Diese Technologie wurde bisher nicht an die Sekretion von komplexeren therapeutischen Molekülen, wie Antikörpern, angepasst.

**[0006]** Es wurde nun festgestellt, dass ein Implantat aus Fibroblasten, die mit einem retroviralen Vektor genetisch so modifiziert wurden, dass sie die schweren und leichten Ketten eines Anti-HIV-Antikörpers exprimieren, nach Reimplantation in eine Maus in der Lage ist, kontinuierlich eine bedeutende Menge funktionellen Antikörper in den Blutkreislauf zu sekretieren, der infizierte Zellen erkennt, die an ihrer Oberfläche das Antigen tragen, gegen das er gerichtet ist. Die vorliegende Erfindung beruht auf der Tatsache, dass ein Fibroblast in der Lage ist, annähernd stöchiometrische Mengen an schweren und leichten Ketten eines Antikörpers zu produzieren, die sich dann zu einem Tetramer zusammenlagern können, um ein funktionelles Molekül zu bilden. Sie bietet die Möglichkeit, erworbene Krankheiten durch Immuntherapie zu behandeln, insbesondere AIDS und Krebs, zwei Krankheiten, bei denen die Komplexität, Schwere sowie das Fehlen wirklich zufriedenstellender Behandlungen die Entwicklung neuer Technologien, wie derjenigen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist, rechtfertigen.

**[0007]** Die vorliegende Erfindung stellt auch adenovirale Vektoren bereit, die fähig sind, die Expression von in mehrfacher Hinsicht interessanten Molekülen sowie von Antikörpern und ihren Derivaten zu steuern. Sie können verwendet werden, um ein gegen das HIV-Virus gerichtetes Immunotoxin herzustellen und die selektive Zerstörung infizierter Zellen zu induzieren.

**[0008]** Die vorliegende Erfindung hat deshalb ein Implantat von genetisch modifizierten Zellen zum Gegenstand, die eine exogene Nukleotidsequenz umfassen, welche für das Ganze oder einen Teil eines Antikörpers kodiert, der gegen ein Tumorantigen oder ein spezifisches Epitop eines Virus gerichtet ist, wobei die exogene Nukleotidsequenz unter die Kontrolle von Elementen gestellt ist, die für ihre Expression und die Sekretion des Antikörpers erforderlich sind, wobei die Zellen an einer extrazellulären Matrix befestigt sind und der von dem Implantat sekretierte Antikörper in der Lage ist, spezifisch das Antigen oder das Epitop, gegen das er gerichtet ist, zu binden.

**[0009]** Im Sinn der vorliegenden Erfindung bezeichnet ein Implantat jedwede Menge genetisch modifizierter lebender Zellen, wie sie nachfolgend definiert werden, die dazu bestimmt sind, in den menschlichen oder tierischen Körper implantiert zu werden. Besonders bevorzugt wird der Fall, in dem die Zellen an einer extrazellulären Matrix befestigt sind, wobei das Ganze eine biokompatible und vaskularisierbare Struktur bildet. Die Matrix besteht vorzugsweise aus Kollagen. Aber es können auch andere Materialien im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, sofern sie biokompatibel sind. Sie umfasst insbesondere (1) einen biokompatiblen Träger, wie synthetische PTFE (Polytetrafluorethylen oder Gore-Tex)-Fasern, die mit einem Kollagenfilm beschichtet sind, um die Zelladhäsion zu erlauben, (2) ein Kollagengel, in welches die Zellen im Implantat eingeschlossen sind und (3) eine angiogenetische Substanz, welche die Vaskularisierung im Wirt fördert. Der Begriff Implantat ist ein Oberbegriff, der unter anderem die Neorgane und Organoide einschließt.

**[0010]** Es kann sich darüber hinaus auch um verkapselte Implantate handeln, das heißt Implantate, die in eine Membran mit kontrollierter Porosität eingeschlossen sind, welche insbesondere den Durchtritt der Zellen verhindert (Zellen des Implantats und Zellen des Immunsystems des Wirts), aber die Diffusion des therapeutischen Moleküls, der Nährstoffe und der Abfallstoffe erlaubt.

**[0011]** Der Ausdruck "genetisch modifizierte Zelle" bezieht sich auf eine Zelle, die exogenes genetisches Material enthält. Dieses kann ins Genom der Zelle inseriert sein oder als Episom entweder im Zytoplasma oder im Zellkern vorliegen. Die Technologie zum Einbringen von exogenem genetischem Material in eine Zelle ist konventionell und dem Fachmann zugänglich. Es wurden in dieser Hinsicht zahlreiche Vektoren entwickelt, die in den dem Fachmann zugänglichen Basiswerken der Molekularbiologie ausführlich beschrieben sind.

**[0012]** Die genetisch modifizierten Zellen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden, enthalten insbesondere eine exogene Nukleotidsequenz. Diese kann eine natürliche (bereits im Genom der Wirtszelle vorhandene) oder eine heterologe Sequenz sein, ist aber durch Techniken der Gentechnik (also exogen) in die Wirtszellen eingebracht worden. Besonders bevorzugt wird eine Sequenz, die für ein Produkt kodiert, das normalerweise in diesen nicht exprimiert wird oder, wenn es exprimiert wird, in physiologisch geringen Konzentrationen. Entsprechend den von der vorliegenden Erfindung verfolgten Zielen kodiert die exogene Nukleotidsequenz für das Ganze oder einen Teil eines Antikörpers. Ein Antikörper ist ein normalerweise von den B-Lymphozyten produziertes Protein (Immunglobulin), das ein bestimmtes Fremdantigen erkennt und die Immunantwort auslöst. Ein nativer Antikörper ist ein Tetramer, das aus vier Proteinketten besteht: zwei leichten Ketten (L) und zwei schweren Ketten (H für heavy im Englischen), die untereinander durch Disulfidbrücken verbunden sind. Die leichte Kette besteht aus einer variablen Region ( $V_L$ ) in N-terminaler Position und einer konstanten Region ( $C_L$ ) in C-terminaler Position, während die schwere Kette vom N- zum C-Terminus eine variable Region ( $V_H$ ), gefolgt von drei konstanten Regionen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ), umfasst. Die entsprechenden Regionen der leichten und schweren Ketten lagern sich zu unterschiedlichen Domänen zusammen. Die variable Domäne, die durch die Assoziation der variablen Regionen der leichten und schweren Ketten eines Immunglobulins gebildet wird, ist für die Erkennung des entsprechenden Antigens verantwortlich. Die konstanten Domänen üben Effektorfunktionen aus, die in den Ablauf der Immunantwort eingreifen.

**[0013]** Im Sinn der vorliegenden Erfindung können die beiden schweren und leichten Ketten identisch sein (nativer Antikörper). In diesem Kontext wird eine exogene Nukleotidsequenz verwendet, die für eine schwere Kette und eine leichte Kette kodiert, die sich nach ihrer Synthese zu einem Tetramer zusammenlagern. Es kann aber auch eine Sequenz eingesetzt werden, die nur für einen Teil eines Antikörpers kodiert, so dass bevorzugt ein Fab-(ab für antigen binding im Englischen) oder  $F(ab')_2$ -, Fc-(c für crystallizable) oder scFv-Fragment (sc für single-chain und v für variable) produziert wird. Derartige Fragmente werden in Büchern der Immunologie, wie Immunology (dritte Auflage, 1993, Roitt, Brostoff und Male, Hg. Gambli, Mosby) ausführlich beschrieben und sind in [Fig. 1](#) schematisch dargestellt. Was speziell das scFv-Fragment betrifft, kann dieses aus einer Sequenz erhalten werden, die für eine  $V_L$ -Region gefolgt von einer  $V_H$ -Region kodiert, gegebenenfalls mit einem Spacer (1 bis 10 neutrale und wenig Raum beanspruchende Aminosäurereste) zwischen der  $V_L$ - und  $V_H$ -Sequenz.

**[0014]** Es kann auch ein chimärer (oder Hybrid-)Antikörper erzeugt werden, der aus der Fusion von Sequenzen unterschiedlicher Herkunft (Antikörperspezies oder -typen) hervorgeht. Insbesondere können konstante Regionen aus Antikörpern verschiedener Isotope eingefügt oder ausgetauscht werden, um dem chimären Antikörper neue Eigenschaften zu verleihen, zum Beispiel eine Verbesserung der zytotoxischen Reaktion. Es kann sich auch um einen humanisierten Antikörper handeln, der mindestens einen Teil der variablen Regionen eines Maus-Antikörpers und der konstanten Regionen eines humanen Antikörpers vereinigt. Es können auch eine oder mehrere variable und/oder konstante Regionen oder Teile von variablen und/oder konstanten Regionen beliebiger Herkunft, zum Beispiel aus leichten und/oder schweren Ketten, zu einem "single-chain"-Molekül fusioniert werden.

**[0015]** Ein weiterer Ansatz besteht schließlich darin, einen bispezifischen Antikörper zu produzieren, der zwei variable Domänen umfasst, zum Beispiel eine Domäne, die ein von einer Tumorzelle oder einer infizierten Zelle getragenes Antigen erkennt, und die andere eine die Immunantwort aktivierende Struktur. Dies erlaubt eine Erhöhung der Aktivität der Killerzellen bei Kontakt mit dem Tumor oder der infizierten Zelle.

**[0016]** Selbstverständlich kann ein in der vorliegenden Erfindung verwendeter Antikörper eine Sequenz aufweisen, die von der nativen Sequenz eines Antikörpers leicht abweicht. In der Praxis ist der gemeinsame Nenner für die Bezeichnung eines Antikörpers dessen Funktion, das heißt seine Fähigkeit, sich spezifisch an das Antigen zu binden, gegen das er gerichtet ist. Zahlreiche in den Allgemeinwerken der Immunologie dargestellte Techniken erlauben es, eine Antikörperfunktion nachzuweisen, zum Beispiel die ELISA-, Western-Blot- oder Fluoreszenztechniken. Die Erfindung erstreckt sich auf einen Antikörper, dessen Sequenz mit der oder den nativen Sequenzen (im Fall eines chimären Antikörpers) einen Homologiegrad von über 70%, vorteilhafterweise von über 80%, bevorzugt von über 90% und noch bevorzugter von über 95% aufweist. Ein solches Analogon kann durch Mutation, Deletion, Substitution und/oder Addition eines oder mehrerer Nukleotide der entsprechenden Sequenzen) erhalten werden.

**[0017]** Entsprechend den von der vorliegenden Erfindung verfolgten Zielen wird es bevorzugt, einen Antikörper einzusetzen, der gegen ein Tumorantigen oder ein spezifisches Epitop eines infektiösen und pathogenen Mikroorganismus, insbesondere eines Virus und speziell des HIV-Virus, gerichtet ist, vorteilhafterweise ein Antigen, das auf der Oberfläche der Zielzelle stark vertreten ist. Diese Art von Antikörper ist in der Literatur ausführlich beschrieben. Man kann zum Beispiel nennen:

- den humanen monoklonalen Antikörper 2F5 (Buchacher et al., 1992, *Vaccines*, 92, 191–195), der ein kontinuierliches (ELDKWAS) und sehr konserviertes Epitop des transmembranen Glykoproteins gp41 des Hüllmoleküls von HIV-1 erkennt,
- den murinen monoklonalen Antikörper 17-1-A (Sun et al., 1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 214–218), der das Glykoprotein GA733 erkennt, das auf der Oberfläche von humanen kolorektalen Karzinomzellen vorhanden ist,
- einen gegen das Protein MUC1 gerichteten Antikörper und
- einen Antikörper, der gegen das E6- oder E7-Protein des HPV-Virus (Human Papilloma Virus), insbesondere vom Typ 16 oder 18, gerichtet ist.

**[0018]** Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können die Nukleotidsequenzen, die für einen im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendeten Antikörper kodieren, durch jede beliebige im Bereich der Gentechnik eingesetzte konventionelle Technik, wie PCR (Polymerase Chain Reaction), Klonierung und chemische Synthese, erhalten werden. Rein zur Orientierung sei angemerkt, dass die Sequenzen, die für die schweren und leichten Ketten eines Antikörpers kodieren, durch PCR kloniert werden können, indem degenerierte Oligonukleotide verwendet werden, welche die konservierten Sequenzen erkennen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der meisten Immunglobulingene befinden (Persson et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 2432–2436; Burton et al., 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 10134–10137). Die Antikörperfunktion des Expressionsproduktes gegenüber einem spezifischen Antigen wird dann wie oben angegeben überprüft.

**[0019]** Ein weiterer, im übrigen bevorzugter Ansatz besteht darin, einen Antikörper zu verwenden, der durch Fusion mit einer toxischen Substanz oder einem immunpotenzierenden Protein modifiziert ist. Diese spezielle Ausführungsform erlaubt es, die Zielzelle (Krebszelle oder infizierte Zelle), die an ihrer Oberfläche das spezifische Antigen trägt, gegen das der Antikörperteil gerichtet ist, durch eine lokale Chemotherapie (toxische Substanz) in vivo zu zerstören oder die Immunreaktion ihr gegenüber zu verbessern (immunpotenzierende Substanz). Im Kontext der toxischen Substanz kann es vorteilhaft sein, Antikörper zu wählen, die von der Zielzelle endozytiert werden können. Natürlich können die entsprechenden Sequenzen durch jedes klassische Verfahren des Standes der Technik erhalten werden.

**[0020]** Der Ausdruck "toxische Substanz" bezieht sich auf ein Molekül, das eine abbauende Aktivität aufweist, die das Zellwachstum drastisch hemmt oder den Zelltod induziert. Es kann sich um ein von sich aus toxisches oder um ein indirekt toxisches Molekül handeln, zum Beispiel ein Protein, das die Synthese einer toxischen Substanz katalysiert. Diese Moleküle können aus Pflanzen, Tieren oder Mikroorganismen stammen. Natürlich kann die toxische Funktion durch eine native toxische Substanz (wie sie in der Natur vorliegt) oder durch ein Analogon von dieser ausgeübt werden, das auf klassische Weise durch Mutation, Deletion, Substitution und/oder Addition eines oder mehrerer Nukleotide der nativen Sequenz erhalten werden kann. Unter den bevorzugten toxischen Substanzen sind eine Ribonuklease, Ricin, das Diphtherie-Toxin, das Cholera-Toxin, die Thymidin-Kinase des Herpes-simplex-Virus Typ I (TK-HSV-I), die Cytosin-Deaminase von *Escherichia coli* oder einer Hefe der Gattung *Saccharomyces* und das Exotoxin von *Pseudomonas* zu nennen.

**[0021]** Zur Veranschaulichung eines immunpotenzierenden Proteins (mit der Funktion, die Immunreaktion des Wirtsorganismus gegenüber der Zielzelle zu verbessern) kann das Protein CD4, ein Rezeptor mit hoher Affinität für das HIV-1-Virus, oder ein Fc-Rezeptor für IgG (FcγR) genannt werden. Seine Bindung an einen Antikörper, der gegen ein Antigen des HIV-Virus oder ein Tumorantigen gerichtet ist, erlaubt es folglich, ein Hybridmolekül zu erzeugen, das über einen Liganden, der eine Killerzelle erkennt, und einen Liganden, der die Zielzelle erkennt, verfügt, um deren Beseitigung wirksamer zu fördern. In diesem Rahmen kann ein Hybridmolekül eingesetzt werden, das aus der Fusion zwischen einem Anti-HIV-Antikörper und FcγR oder zwischen der extrazellulären Domäne des CD4-Moleküls und einem Anti-CD3-Antikörper hervorgeht. Diese Beispiele sind jedoch nicht beschränkend, und derartige immunpotenzierende Proteine sind dem Fachmann bekannt.

**[0022]** Vorteilhafterweise wird die toxische Funktion von einer Ribonuklease ausgeübt, die prokaryotischen oder eukaryotischen Ursprungs sein kann. Von denen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendbar sind, sind zu nennen: Colicin E6, Cloacin von *Escherichia coli*, Nuklease von *Staphylococcus*, Barnase von *Bacillus intermedius* und Nuklease von *Bacillus amyloliquefaciens*, auch Barnase genannt, deren Sequenz in Hartley (1988, *J. Mol. Biol.*, 202, 913–915) offenbart ist. Besonders bevorzugt wird jedoch humanes Angiogenin eingesetzt (Saxena et al., 1991, *J. Biol. Chem.*, 266, 21208–21214; Saxena et al., 1992, *J. Biol. Chem.*, 267, 21982–21986).

**[0023]** Gemäß einer anderen Variante kann die toxische Funktion durch die TK-HSV-1 ausgeübt werden. Diese weist im Vergleich zu dem Säuger-TK-Enzym eine höhere Affinität zu bestimmten Nukleosidanaloga wie Acyclovir und Ganciclovir auf und wandelt sie in für die Zelle toxische Nukleotidvorstufen um. Folglich erlaubt ihr Einbau in die DNA von sich replizierenden Zellen es, speziell in Teilung befindliche Zellen wie Krebszellen durch einen toxischen Effekt und/oder durch einen "Bystander"-Effekt zu töten.

**[0024]** Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung kann ein abgeschwächtes Analogon eingesetzt werden, das noch eine toxische Funktion aufweist, die aber im Vergleich zu der nativen toxischen Substanz geringer ist. Jede beliebige Mutante mit einer abgeschwächten abbauenden Aktivität kann im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden. In diesem Kontext kann eine abgeschwächte Mutante einer Ribonuklease eingesetzt werden, die im Vergleich zur nativen Ribonuklease, von der sie abgeleitet ist, eine um einen Faktor 10 bis 10<sup>6</sup> oder besser 10 bis 10<sup>5</sup> und, besonders bevorzugt, 10<sup>2</sup> bis 10<sup>4</sup> abgeschwächte Aktivität aufweist. Diese Variante basiert auf der hohen Toxizität der Ribonukleasen hinsichtlich zellulärer RNAs, was die Schritte des Molekülaufbaus erschwert. Als Beispiel können die geschwächten Mutanten K27A (Mossakowska et al., 1989, *Biochemistry*, 28, 3843–3850) und K27A, L89F (Natsoulis et Boeke, 1991, *Nature*, 352, 1632–1635) der Barnase genannt werden. Die Nukleaseaktivität kann gemäß der von Shapiro et al. (1987, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8783–8787) beschriebenen Methode ermittelt werden. Es ist natürlich ebenso möglich, sie mittels anderer Techniken, wie der in Beispiel 2 angegebenen, zu messen.

**[0025]** Eine besonders bevorzugte Konstruktion besteht darin, die für die toxische oder immunpotenzierende Substanz kodierende Nukleotidsequenz 5' oder 3' von der Nukleotidsequenz einzufügen, welche für das Ganze oder einen Teil eines Antikörpers kodiert. Insbesondere wird der Fall bevorzugt, in dem sie stromabwärts der Sequenz eingefügt ist, die für die schwere Kette eines Antikörpers kodiert, wobei in Letzterer das Translations-Stoppocodon deletiert ist und die Fusion im richtigen Leserahmen erfolgt. Die operative Fusion zweier Sequenzen stellt eine im Vermögen des Fachmanns liegende klassische Technik der Molekularbiologie dar. Darüber hinaus kann im Bereich der Fusion eine Verbindungssequenz eingefügt werden, die in der Zielzelle gespalten werden kann, um das Toxin freizusetzen. In diesem Kontext bezieht sich der Begriff "exogene Nukleotidsequenz" auf eine Sequenz, welche für das Ganze oder einen Teil eines Antikörpers kodiert, der gegebenenfalls mit der besagten Substanz fusioniert ist.

**[0026]** Natürlich ist die exogene Nukleotidsequenz unter die Kontrolle von Elementen gestellt, die für ihre Ex-

pression erforderlich sind. Unter "erforderlichen Elementen" versteht man die Gesamtheit aller Elemente, die für ihre Transkription in Boten-RNA (mRNA) und die Translation dieser Letzteren in Protein erforderlich sind. Von den für die Transkription erforderlichen Elementen kommt dem Promotor eine besondere Bedeutung zu. Allgemein wird auf einen Promotor zurückgegriffen, der in einer eukaryotischen und insbesondere menschlichen Zelle funktionell ist. Es kann sich um einen konstitutiven Promotor oder einen regulierbaren Promotor handeln, und er kann aus einem beliebigen Gen eukaryotischen oder viralen Ursprungs isoliert sein. Darüber hinaus kann ein in der vorliegenden Erfindung verwendeter Promotor so modifiziert werden, dass er Regulationssequenzen, wie Aktivierungssequenzen vom Typ "Enhancer", enthält. Alternativ kann ein von den Immunoglobulinen abgeleiteter Promotor verwendet werden, wenn versucht wird, eine lymphozytäre Wirtszelle anzusteuern. Dennoch wird bevorzugt auf einen konstitutiven Promotor zurückgegriffen, der eine Expression in zahlreichen Zelltypen erlaubt, und insbesondere einen Promotor eines Haushaltsgens, wie den Promotor des Gens TK-HSV-1, den Adenovirus-E1A-Promotor, MLP (für Major Late Promoter im Englischen), den murinen oder humanen PGK-(Phosphoglycerat-Kinase-)Promotor, den Promotor des  $\beta$ -Aktin-Gens der Ratte (ACT), den HPRT-(Hypoxanthinphosphoribosyl-Transferase-)Promotor, den HMG-(Hydroxymethyl-Glutaryl-Coenzym A-)Promotor, den RSV-(Rous Sarcoma Virus)Promotor, den frühen Promotor des SV40-Virus (Simian-Virus) oder auch den DHFR-(Dihydrofolat-Reduktase-)Promotor. Zur Orientierung kann, wenn die Nukleotidsequenz in einen retroviralen Vektor eingebaut ist, das 5'-LTR als Promotor verwendet werden. Dennoch wird besonders bevorzugt auf einen internen nicht retroviralen Promotor der Art der zuvor genannten zurückgegriffen.

**[0027]** Die exogene Nukleotidsequenz kann darüber hinaus andere Elemente enthalten, die zu ihrer Expression sowohl auf der Ebene der Transkription als auch der Translation beitragen, insbesondere eine von entsprechenden Splicing-Signalen flankierte Intronsequenz, eine Kernlokalisierungssequenz, eine Translationsinitiationssequenz, Transkriptionsterminationselemente (Polyadenylierungssignal), und/oder eine Sequenz, die für ein Sekretionssignal kodiert. Letztere kann homolog, das heisst von dem Gen abstammen, das für den besagten Antikörper kodiert, oder heterolog sein, das heisst von einem beliebigen Gen abgeleitet sein, das für eine Vorstufe eines sekretierten Expressionsprodukts kodiert. Die Auswahl an solchen Elementen ist groß und liegt im Vermögen des Fachmanns.

**[0028]** Im Sinn der vorliegenden Erfindung wird die mit den zu ihrer Expression erforderlichen Elementen versehene exogene Nukleotidsequenz in eine Wirtszelle eingebracht, so dass eine genetisch modifizierte Zelle entsteht. Es können alle Protokolle verwendet werden, die es erlauben, eine Nukleinsäure in eine Zelle einzubringen, wie zum Beispiel die Calciumphosphatfällung, die DEAE-Dextran-Technik, die direkte Injektion der Nukleinsäure in die Wirtszelle, Beschuss der Zelle mit Nukleinsäure-beladenen Goldmikropartikeln oder auch die Verwendung von Liposomen oder kationischen Lipiden. Dennoch wird die exogene Nukleotidsequenz im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugt in einen Expressionsvektor inseriert. Er kann insbesondere von der Art eines Plasmids sein oder von einem tierischen Virus und insbesondere von einem Retrovirus, einem Adenovirus, einem Adenovirus-assoziierten Virus oder einem Herpesvirus abgeleitet sein. Dennoch wird bevorzugt ein Integrationsvektor verwendet. Die Auswahl an einem solchen Vektor ist groß, und die Techniken zur Klonierung in den gewählten Vektor liegen im Vermögen des Fachmanns. Ebenso ist ihm das Verfahren bekannt, das einzusetzen ist, um infektiöse Viruspartikel zu erzeugen.

**[0029]** Ein erster Vektor, der sich besonders für die vorliegende Erfindung eignet, ist ein adenoviraler Vektor (siehe weiter unten).

**[0030]** Gemäß einer weiteren ebenfalls vorteilhaften Alternative wird ein retroviraler Vektor eingesetzt. Die zahlreichen in der Literatur beschriebenen Vektoren können im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden und insbesondere die, die vom murinen Moloney-Leukämievirus (MoMuLV) oder vom murinen Friend-Leukämievirus (FrMuLV) abgeleitet sind. Allgemein sind in einem retroviralen Vektor, wie er in der vorliegenden Erfindung verwendet wird, alle oder ein Teil der viralen Gene gag, pol und/oder env deletiert, und der Vektor umfasst ein 5'-LTR, eine Enkapsidierungsregion und ein 3'-LTR. Die exogene Nukleotidsequenz wird bevorzugt stromabwärts der Enkapsidierungsregion inseriert. Die Vermehrung eines solchen Vektors erfordert die Verwendung von Komplementierungszelllinien, die im Stand der Technik beschrieben sind, wie den Zelllinien CRE, GP+E-86, PG13, Psi Env-am-12, pA317 und psi-CRIP.

**[0031]** Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform und um einen Antikörper herzustellen, der nicht nur aus einer Kette aufgebaut ist (der zum Beispiel zwei schwere und leichte Proteinketten umfasst), wird bevorzugt auf einen bicistronischen Vektor zurückgegriffen, der die Synthese der beiden Translationsprodukte ausgehend von einer einzigen mRNA erlaubt. Die Initiation der Translation des zweiten Translationsprodukts wird bevorzugt von einem IRES-Element (für Internal Ribosome Entry Site im Englischen, das heisst eine interne Ribosomen-Eintrittsstelle) zugesichert. Bisher wurde eine Reihe von IRES-Elementen identifiziert, und es kön-

nen die des Polyomyelitis-Virus (Pelletier et al., 1988, Mol. Cell. Biol., 8, 1103–112), des EMCV (Encephalomyocarditis-Virus) (Jang et al., J. Virol., 1988, 62, 2636–2643) oder die in der internationalen Anmeldung WO 93/03143 beschriebenen genannt werden. Es können aber auch andere IRES-Elemente verwendet werden. Diese Art von Konstruktion kann an jeden im Rahmen der Erfindung verwendeten Vektor angepasst werden.

**[0032]** Einer der im Rahmen der vorliegenden Erfindung bevorzugten Vektoren ist ein retroviraler Vektor, der von 5'- in 3'-Richtung umfasst:

- (a) ein 5'-LTR, das von einem Retrovirus abgeleitet ist,
- (b) eine Enkapsidierungsregion,
- (c) eine exogene Nukleotidsequenz, welche umfasst:
  - einen internen Promotor,
  - eine erste Sequenz, welche für die schwere Kette eines Antikörpers kodiert,
  - eine Initiationsstelle für den Eintritt der Ribosomen,
  - eine zweite Sequenz, welche für die leichte Kette eines Antikörpers kodiert, und
- (d) ein 3'-LTR, das von einem Retrovirus abgeleitet ist.

**[0033]** Ein weiterer bevorzugter retroviraler Vektor umfasst eine exogene Nukleotidsequenz, die mit dem murinen PGK-Promotor versehen ist, dem eine erste Sequenz, welche für die extrazellulären Domänen I und II des CD4-Moleküls kodiert, und eine zweite Sequenz, die in Phase mit der ersten fusioniert ist und für das  $\gamma$ 3-Segment der schweren Kette des Antikörpers 2F5 (sCD4-2F5) kodiert, sowie optional eine dritte, für das humane Angiotensin kodierende Sequenz folgt, die operativ mit der zweiten verbunden ist.

**[0034]** Selbstverständlich kann die Reihenfolge der ersten, zweiten und dritten Sequenz vertauscht werden. Darüber hinaus kann die exogene Nukleotidsequenz, wie zuvor angegeben, eine Sequenz umfassen, die für eine toxische oder immunpotenzierende Substanz kodiert. Diese wird bevorzugt stromabwärts der ersten, für die schwere Kette eines Antikörpers kodierenden Sequenz inseriert. Die vorliegende Erfindung ist jedoch nicht auf diese bestimmte Ausführungsform beschränkt.

**[0035]** Darüber hinaus kann ein im Rahmen der Erfindung verwendeter Vektor auch andere Elemente enthalten, beispielsweise ein Gen, das für einen Selektionsmarker kodiert, der es erlaubt, die transfizierten Wirtszellen zu selektionieren oder zu identifizieren. Es können das neo-Gen, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum G418 verleiht, das dhfr-Gen, das CAT-(Chloramphenicol-Acetyltransferase)Gen, das Puromycin-Acetyltransferase-(pac oder PURO)Gen oder auch das gpt-(Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)Gen genannt werden.

**[0036]** Eine genetisch modifizierte Zelle wird bevorzugt so gewählt, dass sie von dem Immunsystem des Wirtsorganismus, in welchen ein erfindungsgemäßes Implantat eingepflanzt werden soll, toleriert wird. In diesem Kontext wird insbesondere eine nicht-tumoröse und transfizierbare Zelle bevorzugt. Es kann sich insbesondere um autologe Zellen handeln, die diesem Wirtsorganismus entnommen oder von ihm abgeleitet wurden, aber auch um Zellen, die infolge einer geeigneten chemischen oder genetischen Behandlung toleriert werden können (es kann zum Beispiel in Betracht gezogen werden, die Expression der Oberflächenantigene zu reprimieren, die normalerweise vom Immunsystem des Wirtsorganismus erkannt werden). Es kann auch eine syngene Zelle oder eine allogene Zelle vom gleichen Haplotyp wie der Wirtsorganismus hinsichtlich der Klasse 11-Antigene des Haupthistokompatibilitätskomplexes verwendet werden.

**[0037]** Bevorzugterweise resultiert eine genetisch modifizierte Zelle aus dem Einbringen der exogenen Nukleotidsequenz in autologe Fibroblasten und insbesondere Fibroblasten, die der Haut eines Wirtsorganismus entnommen wurden. Es können aber auch andere Zelltypen verwendet werden, wie Endothelzellen, Myoblasten, Lymphozyten und Hepatozyten. Obgleich dies keine bevorzugte Ausführungsform ist, kann auch auf Tumorzellen (die gegebenenfalls durch Radiotherapie abgeschwächt wurden) zurückgegriffen werden, die einem Wirtsorganismus entnommen wurden, der Tumoren aufweist, um ihr Erbgut zu verändern und sie dazu zu befähigen, die Tumorphysion zu hemmen oder zu verlangsamen.

**[0038]** Vorteilhafterweise umfasst ein erfindungsgemäßes Implantat  $10^6$  bis  $10^{12}$ , bevorzugt  $10^7$  bis  $10^{11}$  und noch bevorzugter  $10^6$  bis  $10^{10}$  genetisch modifizierte Zellen.

**[0039]** Die vorliegende Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Herstellung eines Implantats gemäß der Erfindung, in dem man genetisch modifizierte Zellen mit einer extrazellulären Matrix in Kontakt bringt. Es können verschiedene Techniken angewandt werden, um ein erfindungsgemäßes Implantat herzustellen. Bevorzugt wird folgenderweise vorgegangen: die genetisch modifizierten Zellen werden mit einer Lösung flüssigen Kol-

lagers, bevorzugt vom Typ 1, einem biokompatiblen Träger aus beispielsweise synthetischen kollagenbeschichteten Gore-Tex-Fasern und mindestens einem angiogenetischen Wachstumsfaktor, zum Beispiel bFGF oder VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), in Kontakt gebracht. Das Ganze wird auf 37°C gebracht, so dass die Kollagenlösung ein dicht vernetztes Gel bildet, das die Zellen einschließt, und dann 4 bis 5 Tage in vitro kultiviert, um es den genetisch modifizierten Zellen zu ermöglichen, das Implantat zu kolonisieren. Es ist wünschenswert, den letzten Kulturschritt in einem Medium vorzunehmen, das mindestens einen angiogenetischen Faktor oder eine Kombination von zweien oder mehreren enthält. Allgemein sind die Techniken, die es ermöglichen, ein Implantat herzustellen, und die Kulturbedingungen dem Fachmann bekannt.

**[0040]** Ein erfindungsgemäßes Implantat ist dazu bestimmt, in einen tierischen oder bevorzugt menschlichen Wirtsorganismus eingepflanzt zu werden, um dort eine therapeutische (heilende und/oder vorbeugende) Wirkung zu erzielen. Wird es einem Versuchstier eingepflanzt, so ermöglicht das Implantat es insbesondere, die beim Menschen anwendbaren Therapieprotokolle zu evaluieren. Der Ort der Reimplantation ist bevorzugt die Peritonealhöhle oder subkutan, intrathekal oder auch intraabdominal.

**[0041]** Die Erfindung erstreckt sich auch auf die therapeutische Verwendung eines erfindungsgemäßen Implantats für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die insbesondere zur Behandlung und/oder Vorbeugung einer erworbenen Krankheit wie Krebs oder einer infektiösen, durch einen pathogenen Mikroorganismus (Virus, Parasit oder Bakterie) hervorgerufenen Krankheit bestimmt ist. Sie richtet sich insbesondere an die Behandlung von:

- Gebärmutterkrebs, induziert durch ein Papillomavirus, gegen das ein Implantat eingesetzt wird, das autologe Fibroblasten umfasst, in welche eine Sequenz eingebracht wurde, die für einen Antikörper kodiert, der gegen E6 oder E7 von HPV (insbesondere vom Typ 16 oder 18) gerichtet ist,
- Brustkrebs unter Verwendung eines Anti-MUC1-Antikörpers,
- AIDS unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen ein in zahlreichen Isolaten konserviertes Epitop des Hüllglykoproteins gerichtet ist,
- Hepatitis unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen ein Epitop des Hepatitis B- oder C-Virus gerichtet ist.

**[0042]** Selbstverständlich können diese Antikörper durch Fusion insbesondere mit Angiogenin, Barnase oder TK-HSV-1 modifiziert werden.

**[0043]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung erworbener Krankheiten, gemäß welchem in vitro ein erfindungsgemäßes Implantat hergestellt wird und einem Patienten eingepflanzt wird, der eine derartige Behandlung benötigt. Wie zuvor angemerkt, können die Orte der Reimplantation unterschiedlich sein. Ist die gewünschte therapeutische Wirkung erreicht, genügt es, das Implantat chirurgisch aus dem Patienten zu entfernen.

**[0044]** Natürlich müssen die Modalitäten des therapeutischen Protokolls vom Kliniker unter Berücksichtigung des Patienten und der zu behandelnden Krankheit festgelegt werden. Dieses Protokoll kann zahlreiche Veränderungen erfahren, wie der Anzahl der erfindungsgemäßen Implantate, die eingepflanzt werden sollen, des Orts der Implantation und des Typs des sekretierten Antikörpers sowie des Expressionsniveaus. Als Anhaltspunkt wird im Serum des Patienten ein Expressionsniveau des funktionellen Antikörpers von mindestens 50 ng/ml, vorteilhafterweise von mindestens 100 ng/ml, bevorzugt von mindestens 200 ng/ml und besonders bevorzugt von mindestens 500 ng/ml bevorzugt. Ein funktioneller Antikörper ist ein Antikörper, der fähig ist, das Antigen, gegen das er gerichtet ist, zu erkennen. Die Funktionalität kann beispielsweise mittels ELISA oder FACS nachgewiesen werden. Setzt man andererseits einen Antikörper ein, der mit TK-HSV-1 fusioniert ist, ist es wünschenswert, in das therapeutische Protokoll die Verabreichung von Acyclovir oder Ganciclovir aufzunehmen, damit seine toxische Wirkung ausgeübt werden kann.

**[0045]** Darüber hinaus betrifft die vorliegende Erfindung einen rekombinanten adenoviralen Vektor, der eine exogene Nukleotidsequenz umfasst, die für das Ganze oder einen Teil eines Antikörpers kodiert, der gegen ein Tumorantigen oder ein spezifisches Epitop eines infektiösen und pathogenen Mikroorganismus gerichtet ist und durch Fusion mit einer toxischen oder immunpotenzierenden Substanz modifiziert ist, wobei die Nukleotidsequenz unter die Kontrolle von Elementen gestellt ist, die für ihre Expression erforderlich sind, und der Antikörper in der Lage ist, spezifisch das Antigen oder das Epitop, gegen das er gerichtet ist, zu binden.

**[0046]** Sie betrifft auch einen rekombinanten adenoviralen Vektor, der eine exogene Nukleotidsequenz umfasst, die für das Ganze oder einen Teil eines oder mehrerer Proteine kodiert, das bzw. die in der Lage ist/sind, in einer Wirtszelle ein Multimer, bevorzugt ein Dimer oder ein Tetramer, zu bilden. Im Sinn der vorliegenden

Erfindung kann ein erfindungsgemäßer rekombinanter adenoviraler Vektor alleine verwendet werden, um eine durch einen pathogenen Organismus induzierte Infektion oder die Etablierung/ Ausbreitung eines Tumors in einem Wirtsorganismus oder einer Wirtszelle zu bekämpfen, und die exogene Nukleotidsequenz kodiert für das Ganze oder einen Teil wenigstens eines Antikörpers, der gegen ein Tumorantigen oder ein spezifisches Epitop eines infektiösen und pathogenen Mikroorganismus gerichtet ist, wobei der Antikörper in der Lage ist, spezifisch das Antigen oder das Epitop, gegen das er gerichtet ist, zu binden.

**[0047]** Ein erfindungsgemäßer rekombinanter adenoviraler Vektor ist bevorzugt von einem humanen Adenovirus vom Serotyp C, insbesondere vom Typ 2, 5 oder 7 abgeleitet. Es kann jedoch auch auf andere Adenoviren, insbesondere tierischen (caninen, bovinen, murinen, avianen, ovinen, porcinen oder simianen) Ursprungs oder auf ein Hybrid zwischen verschiedenen Arten zurückgegriffen werden. Insbesondere können die caninen Adenoviren CAV-1 oder CAV-2, das aviane Adenovirus DAV oder auch das bovine Adenovirus Bad vom Typ 3 genannt werden (Zakharchuk et al., 1993, Arch. Virol., 128, 171–176; Spibey und Cavanagh, 1989, J. Gen. Virol., 70, 165–172; Jouvenne et al., 1987, Gene, 60, 21–28; Mittal et al., 1995, J. Gen. Virol., 76, 93–102). Die allgemeine Adenoviren betreffende Technologie ist in Graham und Prevec (1991, Methods in Mol. Biol., Bd. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Hg.: Murray, The Human Press Inc., S. 109–118) offenbart.

**[0048]** Eine vorteilhafte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung besteht darin, einen Vektor zu verwenden, der für eine oder mehrere für die Replikation essentielle virale Funktionen) defekt ist, und zwar aufgrund der Deletion oder der Nichtfunktionalität eines oder mehrerer für die Funktion kodierender Virusgene. Ein solcher Vektor, der nicht zur autonomen Replikation fähig ist, wird in einer komplementierenden Zelle vermehrt, die in der Lage ist, die frühen und/oder späten Proteine in trans bereitzustellen, die er selbst nicht herstellen kann und die zur Bildung eines infektiösen Viruspartikels erforderlich sind. Der letztgenannte Ausdruck bezeichnet ein Viruspartikel, das die Fähigkeit hat, eine Wirtszelle zu infizieren und das Virusgenom darin eindringen zu lassen. Beispielsweise wird, um einen adenoviralen Vektor mit einer defekten E1-Funktion zu vermehren, auf eine komplementierende Zelle der Art der Linie 293 zurückgegriffen, die in der Lage ist, die gesamten von der E1-Region kodierten Proteine in trans bereitzustellen (Graham et al., 1977, J. Gen. Virol., 36, 59–72). Natürlich kann ein erfindungsgemäßer Vektor zusätzliche Deletionen umfassen, insbesondere in der für die Erhöhung der Klonierungskapazitäten nicht essentiellen E3-Region, aber auch in den essentiellen E2-, E4-, L1-L5-Regionen (siehe die internationale Anmeldung WO 94/28152). Die defekten Funktionen können mit Hilfe einer Helferzelllinie oder eines Helfervirus komplementiert werden.

**[0049]** Bei einem gemäß der Erfindung bevorzugten adenoviralen Vektor ist der Hauptteil der E1- und E3-Regionen deletiert, und der Vektor trägt anstelle der E1-Region eine Expressionskassette, umfassend:

- (a) einen Promotor, das Intron des humanen  $\beta$ -Globin-Gens (BGL), die Sequenzen, die für die leichte Kette des 2F5, das IRES-Element des EMCV-Virus und die schwere Kette des 2F5 sowie die Polyadenylierungsstelle des humanen  $\beta$ -Globin-Gens kodieren, oder
- (b) einen Promotor, das Intron des humanen  $\beta$ -Globin-Gens, die Sequenzen, die für das sCD4-2F5-Molekül kodieren, das gegebenenfalls am C-Terminus und im gleichen Leserahmen mit dem humanem Angiogenin fusioniert ist.

**[0050]** Von den Promotoren, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Betracht gezogen werden können, können genannt werden: der frühe Adenovirus-E1A-Promotor, der späte MLP-Promotor (Major Late Promoter), der murine oder humane PGK-(Phosphoglycerat-Kinase-)Promotor, der frühe Promotor des SV40-Virus, der Promotor des RSV-Virus (Rous Sarcoma Virus), ein Promotor, der spezifisch in Tumorzellen aktiv ist, und schließlich ein Promotor, der spezifisch in infizierten Zellen aktiv ist.

**[0051]** Die Erfindung betrifft auch ein infektiöses Adenoviruspartikel sowie eine eukaryotische Wirtszelle, die einen rekombinanten adenoviralen Vektor gemäß der Erfindung umfasst. Diese Wirtszelle ist vorteilhafterweise eine Säugerzelle und bevorzugt eine menschliche Zelle und kann den Vektor in ins Genom integrierter Form oder in nicht ins Genom integrierter Form (Episom) enthalten. Es kann sich um eine primäre Zelle oder Tumorzelle hämatopoetischen (totipotente Stammzelle, Leukozyt, Lymphozyt, Monozyt oder Makrophage ...), muskulären, hepatischen, epithelialen oder fibroblastischen Ursprungs handeln.

**[0052]** Ein erfindungsgemäßes infektiöses Viruspartikel kann gemäß einem beliebigen konventionellen Verfahren aus dem Stand der Technik (Graham und Prevec, 1991, siehe oben) hergestellt werden, zum Beispiel durch Kotransfektion eines Vektors und eines Adenovirusfragments in eine geeignete Zelle oder auch mittels eines Helfervirus, das die nicht funktionellen Virusfunktionen in trans bereitstellt. Es kann auch in Betracht gezogen werden, den viralen Vektor in vitro durch Ligation oder auch homologe Rekombination in *Escherichia coli* (*E. coli*) herzustellen (siehe zum Beispiel die französische Anmeldung 94 14470).

**[0053]** Die Erfindung betrifft auch eine pharmazeutische Zusammensetzung, die als therapeutisches oder prophylaktisches Mittel einen adenoviralen Vektor, ein infektiöses Viruspartikel oder eine eukaryotische Wirtszelle gemäß der Erfindung in Verbindung mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger umfasst. Die erfindungsgemäße Zusammensetzung ist insbesondere für die vorbeugende oder heilende Behandlung erworbener Krankheiten gedacht, wie von Krebs, Viruserkrankungen wie AIDS, Hepatitis B oder C, oder vom Herpesvirus ausgelösten wiederkehrenden Virusinfektionen.

**[0054]** Eine erfindungsgemäße pharmazeutische Zusammensetzung kann auf konventionelle Art hergestellt werden. Insbesondere wird eine therapeutisch wirksame Menge eines therapeutischen oder prophylaktischen Mittels mit einem Träger wie einem Verdünnungsmittel verbunden. Eine erfindungsgemäße Zusammensetzung kann lokal, systemisch oder durch Aerosol verabreicht werden. Insbesondere wird die intramuskuläre, intratumorale, intrapulmonale Verabreichung und ganz besonders die intravenöse Injektion bevorzugt. Die Verabreichung kann durch Einmalgabe oder durch nach einem bestimmten Zeitintervall einmalig oder mehrmals wiederholte Gabe erfolgen. Der geeignete Verabreichungsweg und die geeignete Dosierung variieren in Abhängigkeit verschiedener Parameter, zum Beispiel der zu behandelnden Person oder Krankheit oder des oder der interessierenden Gens bzw. Gene, die transferiert werden sollen. Insbesondere können die erfindungsgemäßen Viruspartikel in Form von Dosen zwischen  $10^4$  und  $10^{14}$  pfu (plaque forming units), vorteilhafterweise  $10^5$  und  $10^{13}$  pfu und bevorzugt  $10^6$  und  $10^{11}$  pfu formuliert sein. Die Formulierung kann auch einen Zusatzstoff oder einen pharmazeutisch annehmbaren Träger beinhalten.

**[0055]** Schließlich betrifft die vorliegende Erfindung den therapeutischen oder prophylaktischen Gebrauch eines adenoviralen Vektors, eines infektiösen Viruspartikels oder einer eukaryotischen Wirtszelle gemäß der Erfindung für die Herstellung eines Medikaments, das zur Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers, bevorzugt durch Gentherapie, bestimmt ist. Gemäß einer ersten Möglichkeit kann das Medikament direkt in vivo verabreicht werden (zum Beispiel durch intravenöse Injektion in einen zugänglichen Tumor, durch Aerosol in die Lungen ...). Es kann auch die ex-vivo-Vorgehensweise angewandt werden, die darin besteht, dem Patienten Zellen zu entnehmen (Stammzellen des Rückenmarks, Lymphozyten des peripheren Bluts, Muskelzellen ...), sie in vitro gemäß Verfahren des Standes der Technik zu infizieren und dem Patienten wieder zu verabreichen.

**[0056]** Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung erworbener Krankheiten, gemäß welchem einem Patienten, der eine entsprechende Behandlung benötigt, eine therapeutisch wirksame Menge eines rekombinanten adenoviralen Vektors, eines infektiösen Adenoviruspartikels oder einer Wirtszelle gemäß der Erfindung verabreicht wird.

**[0057]** Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele und durch Bezugnahme auf die folgenden Figuren veranschaulicht, ohne jedoch darauf beschränkt zu sein:

**[0058]** [Fig. 1](#) ist eine schematische Darstellung der Struktur eines Antikörpers und der F(ab)- und Fc-Fragmente.

**[0059]** [Fig. 2](#) ist eine schematische Darstellung des Vektors pTG4370, der die Expression des Antikörpers 2F5 ermöglicht.

**[0060]** [Fig. 3](#) ist eine schematische Darstellung des Vektors pTG6356, der die Expression des an native Barnase gekoppelten Antikörpers 17-1-A ermöglicht.

**[0061]** [Fig. 4](#) ist eine schematische Darstellung des Vektors pTG6357, der die Expression des an die abgeschwächte Barnase K27A gekoppelten Antikörpers 17-1-A ermöglicht.

**[0062]** [Fig. 5](#) ist eine schematische Darstellung des Vektors pTG6355, der die Expression des Antikörpers 17-1-A ermöglicht.

**[0063]** [Fig. 6](#) ist eine schematische Darstellung der Struktur des Membranproteins CD4.

**[0064]** [Fig. 7](#) ist eine Darstellung des Konstruktionschemas der für das Hybridmolekül sCD4-2F5 kodierenden Sequenzen.

**[0065]** [Fig. 8](#) ist eine schematische Darstellung des retroviralen Vektors pTG8338, der die Expression des Hybridmoleküls sCD4-2F5 ermöglicht.

**[0066]** [Fig. 9](#) ist eine schematische Darstellung des Vektors pTG8373, der die für das Fusionsmolekül sCD4-2F5-Angiogenin kodierenden Sequenzen enthält.

**[0067]** [Fig. 10](#) ist eine schematische Darstellung des adenoviralen Vektors pTG8357, der die Expression des Hybridmoleküls sCD4-2F5 ermöglicht.

**[0068]** [Fig. 11](#) ist eine schematische Darstellung des adenoviralen Vektors pTG8376, der die Expression des Fusionsmoleküls sCD4-2F5-Angiogenin ermöglicht.

## BEISPIELE

**[0069]** Die Realisierung der nachstehend beschriebenen Konstrukte erfolgt gemäß den allgemeinen Techniken der Gentechnik und molekularen Klonierung, wie in Maniatis et al. (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY) ausführlich beschrieben, oder gemäß den Empfehlungen des Herstellers, wenn ein kommerzieller Kit verwendet wird. Was die Reparatur der Restriktionsstellen betrifft, so kann das Auffüllen der überhängenden 5'-Enden mit Hilfe des Klenow-Fragments der DNA-Polymerase von *Escherichia coli* (*E. coli*) und der Abbau der überhängenden 3'-Enden in Gegenwart der DNA-Polymerase des Phagen T4 oder durch Behandlung mit der Nuclease S1, gefolgt von einer Reparatur durch Klenow, durchgeführt werden. Die PCR-Techniken sind dem Fachmann bekannt und in „PCR Protocols, a guide to methods and applications“ (Hg.: Innis, Gelfand, Sninsky und Whyte, Academic Press, Inc.) ausführlich beschrieben.

**[0070]** Die Klonierungsschritte, die bakterielle Plasmide verwenden, werden bevorzugt durch Einbringen in den *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene) durchgeführt, und die Schritte, die vom Phagen M13 abgeleitete Vektoren anbelangen, in *E. coli* NM522. Die Mutagenesen werden mit synthetischen Oligodesoxynukleotiden mit Hilfe eines Kits kommerzieller Herkunft (zum Beispiel Amersham, RPN1523) und gemäß den Empfehlungen des Herstellers durchgeführt.

Beispiel 1: Herstellung eines Implantats, das Antikörper 2F5 sekretiert und zur Immuntherapie von AIDS bestimmt ist

A. Konstruktion eines bicistronischen retroviralen Vektors zur Expression und Sekretion von Anti-HIV-Antikörper 2F5.

**[0071]** Der den Konstrukten zugrunde liegende Vektor ist der Vektor pLXSP, der von pLXSN abgeleitet ist (Miller und Rosman, 1989, BioTechniques, 7, 980–988). Letzterer ist ein retroviraler Vektor, der das 5'-LTR des MoMuSV (Moloney Murine Sarcoma Virus), eine retrovirale Enkapsidierungsregion, multiple Restriktionsstellen, das Neomycin-Resistenzgen *neo* unter der Kontrolle des SV40-Promotors und das 3'-LTR des MoMuLV umfasst. Der Vektor pLXSP wird zum einen nach Ersetzen des *NheI*-*KpnI*-Fragments des 3'-LTR von pLXSN durch ein analoges Fragment, das von dem aus dem Vektor pMPSV.H-2K.IL-2R isolierten MPSV (Myeloproliferatives Sarcoma Virus)-3'-LTR abgeleitet ist (Takeda et al., 1988, Growth Factors, 1, 59–66), und zum anderen nach Einführung des Puromycin-Resistenzgens als Ersatz des *neo*-Gens erhalten. Das Puromycin-Gen wird aus dem in Morgenstern und Land (1990, Nucleic Acids Res., 18, 3587–3596) beschriebenen pBabe-Puro erhalten.

**[0072]** Der Vektor pLXSP wird mit *EcoRI* und *HpaI* verdaut, und man inseriert in denselben (nach Reparatur der *PstI*-Schnittstelle) ein *EcoRI*-*PstI*-Fragment, das aus pKJ-1 isoliert wird (Adra et al., 1987, Gene, 60, 65–74). Dieses Fragment trägt den Promotor des Maus-PGK-Gens. Nach Ligation wird der Vektor pTG2663 erhalten. Dieser wird einem Verdau durch die Enzyme *ClaI* und *BamHI* unterzogen, um die Expressionskassette des Puromycin-Gens zu entfernen. Nach Klenow-Behandlung und Ligation wird der Vektor pTG2673 erhalten, in welchem die *BamHI*-Schnittstelle rekonstituiert ist.

**[0073]** Der Vektor pTG2676 wird durch Klonierung des *HindIII*-*EcoRI*-Fragments, das die für die leichte Kette (LC) des monoklonalen Antikörpers 2F5 kodierende cDNA umfasst, in das Plasmid Bluescript SK+ (Stratagene) erhalten. Er kann durch PCR aus einer cDNA-Bank, die aus mRNA des Hybridoms 2F5 stammt (Buchacher et al., 1994, AIDS Research and Human Retroviruses, 10, 359–369; Katinger, 1992, Septième Colloque des Cent Gardes, 299–303), unter Verwendung geeigneter Primer, die zu den das Translationsinitiationscodon und das Stoppcodon umgebenden Sequenzen komplementär sind, wie den Primern OTG5168 und OTG5169 (SEQ ID NO: 1 und 2), kloniert werden. Aus dem pTG2676 wird ein die 2F5-LC-cDNA tragendes *XhoI*-*BamHI*-Fragment isoliert, das in den zuvor durch die gleichen Enzyme verdauten Vektor pTG2673 inseriert wird, so dass pTG4336 gebildet wird.

**[0074]** Letzterer wird mit dem Enzym NcoI linearisiert und einer Ligation zum einen mit dem aus pTG2677 stammenden NcoI-EcoRI-Fragment, das die für die schwere Kette (HC) des Antikörpers 2F5 kodierende cDNA trägt, und zum anderen mit dem aus pTG4369 gereinigten EcoRI-NcoI-Fragment, welches das IRES-Element von EMCV trägt, unterzogen. Der Vektor pTG2677 ist ein pBluescript SK+, in welchen zwischen der HindIII- und EcoRI-Schnittstelle die 2F5-HC-cDNA mit den entsprechenden Enden inseriert wurde. Letztere wurde durch PCR aus der vorangehenden Bank mit Hilfe der Primer OTG5170 und OTG5171 (SEQ ID NO: 3 und 4) erhalten. Was den Vektor pTG4369 betrifft, stammt er ebenso aus der Klonierung des dem EMCV-IRES entsprechenden XbaI-ClaI-Fragments in den pBluescript SK+ (Jang et al., 1988, siehe oben). Die dreifache Ligation bildet den Vektor pTG4370 (Fig. 2). Optional kann die Expressionskassette des Puromycin-Gens wieder in den Plasmidteil von pTG4370 eingeführt werden, um die Selektionsschritte zu erleichtern. Man erhält pTG6368.

Infektiöse virale Partikel werden auf folgende Weise hergestellt:

**[0075]** Die ecotrope Komplementierungszelllinie GP+E-86 (Markowitz et al., 1988, J. Virol., 62, 1120–1124) und die von ATCC erhältlichen NIH3T3-Zielzellen (Maus-Fibroblastenzellen) werden bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)-Medium kultiviert, welches 10% fötales Kälberserum (FKS) (GibcoBRL), 1 mM Glutamin, 1% nicht-essentielle Aminosäuren und 40 µg/l Gentamycin (komplettes DMEM-Medium) enthält. Am Vortag der Transfektion werden  $5 \times 10^5$  GP+E-86-Zellen pro 10 cm-Schale ausgesät. Am nächsten Tag werden 20 µg linearisiertes pTG4370-Plasmid und 1 µg Selektionsvektor (zum Beispiel der Vektor pLXSP, der das Puromycin-Resistenzgen trägt) nach der herkömmlichen Calciumphosphat-Methode transfiziert. Am Tag darauf (T + 1) werden die Zellen fachgerecht gewaschen und für 48 Stunden in frisches Medium gegeben, bevor sie dann ab T + 3 in Selektivmedium kultiviert werden (5 µg/ml Puromycin).

**[0076]** Nach ungefähr 2-wöchiger Selektion sind in den Schalen Zellklone sichtbar, die gegenüber dem Antibiotikum resistent sind. Sie werden fachgerecht isoliert, und die Zellen werden in 96-Loch-Kulturplatten in Selektivmedium resuspendiert. Die besten Antikörper-produzierenden Klone werden mittels Durchführung der nachfolgend beschriebenen ELISA-Methode selektioniert, und die Überstände werden auf NIH3T3-Zielzellen titriert. Hierfür werden diese am Vortag der Infektion mit  $10^5$  Zellen pro Loch ausgesät. Die Infektionen mit Viren werden nach dem üblichen in der Literatur beschriebenen Protokoll vorgenommen. Die ELISA-Methode ermöglicht ein Titrieren der Menge an funktionellen Antikörpern 2F5, die das Zielepitop (ELDKWAS) erkennen. Dieses wird chemisch synthetisiert.

**[0077]** Kurz gefasst wird eine Peptidlösung (2 mg/ml) in einem Puffer (15 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 35 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) 2000-fach verdünnt, und 100 µl werden in jedes Loch einer Mikrotitrationsplatte eingebracht und bei 4°C 16 Std. inkubiert. Nach ausgiebigem Waschen in PBS-Puffer, 0,05% Tween-20, werden die Löcher bei 37°C 1 Std. mit 50 µl einer 1%-igen BSA-Lösung in PBS-Puffer gesättigt. Nach einem Waschschrift werden 100 µl der zu testenden Probe oder einer Eichlösung zugegeben. Die Platte wird 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert und ausgiebig mit dem PBS-Tween-20-Puffer gewaschen. Dann werden 100 µl eines Peroxidase-konjugierten Ziege-Anti-human-IgG-Antikörpers (Konzentration 0,8 mg/ml; Jackson Immuno Research Laboratories Inc, PA) zugegeben, der 1000-fach in PBS-Puffer, 1% BSA, verdünnt ist. Nach 2 Stunden bei Raumtemperatur und ausgiebigem Waschen wird die Peroxidase-Enzymaktivität durch Zugabe von 100 µl der folgenden Lösung (0,066 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,035 M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>, pH 5, 0,04% Orthophenylendiamin und 0,014% Wasserstoffperoxid) bestimmt. Die Reaktion wird mit 150 µl 1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt. Die Extinktion wird bei 490 nm gemessen.

**[0078]** Die Eichlösung wird entweder aus kommerzieller Quelle (Virus Testing Systems, Houston) oder aus einem mittels Centricon konzentrierten Hybridomüberstand erhalten. Die Antikörperlösung (1 µg/ml) wird in Zwischenschritten in fötalem Kälberserum verdünnt. Die Extinktion wird für jede der Verdünnungen gemessen, und die Eichkurve wird erstellt (ng Antikörper als Funktion der Extinktion). Auf diese Weise werden die am meisten produzierenden Klone bestimmt.

## B. Herstellung des Implantats

### 1/Entnahme und Ansetzen einer Kultur von primären Fibroblasten

**[0079]** Die Hautbiopsien werden bei zwei bis drei Tage alten weiblichen BALB/c-Mäusen vorgenommen. Andere Mäuselinien können jedoch ebenfalls geeignet sein. Nach einer groben mechanischen Dissoziation wird die Probenentnahme in 30 ml komplettes DMEM-Medium in Gegenwart von 5000 Dispase-Einheiten (Collaborative Medical Products) und 1% Kollagenase (Sigma) gebracht. Nach 2 Stunden bei 37°C wird die Mischung verdünnt, und die Zellen werden durch Zentrifugation geerntet, sorgfältig gewaschen und dann in RPMI

1640-Medium (Gibco BRL) resuspendiert. Nach etwa einwöchiger Kultur werden die primären Fibroblasten mit den Kulturüberständen der produzierenden Klone infiziert, welche wie im vorhergehenden Schritt (A) nach dem klassischen Protokoll selektioniert wurden. Es können auch NIH3T3-Fibroblastenzellen als Modell reimplantiert werden. Sie werden wie vorstehend angegeben kultiviert und auf konventionelle Weise infiziert. Das Vorliegen des Antikörpers 2F5 in den Überständen von NIH3T3-Zellen, die mit einem der produzierenden Klone infiziert wurden, wurde durch ELISA-Test verfolgt, und die Messung ergab 500 ng/ml/24 Std., was einer Produktivität von über  $1 \mu\text{g}/10^6$  Zellen/24 Std. entspricht.

## 2/Herstellung eines Neorgans

**[0080]** Die zuvor autoklavierten PTFE-Fasern (Gore Inc., AZ) werden zuerst für 2 Stunden und unter Vakuum in Kontakt mit einer Rattenschwanz-Kollagenlösung (0,5 mg/ml Lösung in 0,1 N Essigsäure) gebracht. Sie werden dann in einem Loch ausplattiert (12-Loch-Platte), UV-sterilisiert, über Nacht in PBS-Puffer rehydratisiert und dann 2 Stunden bei Raumtemperatur mit angiogenetischen Faktoren (10 ml PBS, das 2  $\mu\text{g}$  bFGF und 1  $\mu\text{g}$  VEGF für ungefähr 100 mg Fasern enthält) behandelt.

**[0081]** Zugleich werden die infizierten (primären oder NIH3T3-)Fibroblasten kurz trypsinisiert.  $1,5 \times 10^7$  Zellen werden in 0,2 ml Medium resuspendiert, und pro Loch werden 2 ml der folgenden Mischung zugegeben: 200  $\mu\text{l}$  RPMI 10  $\times$ , 24  $\mu\text{l}$  7,5%-iges Natriumbicarbonat, 5  $\mu\text{l}$  1 M HEPES, 20  $\mu\text{l}$  Gentamycin, 20  $\mu\text{l}$  Glutamin, 2  $\mu\text{l}$  bFGF (10 ng/ $\mu\text{l}$ ), 2  $\mu\text{l}$  EGF (Epidermal Growth Factor) (10 ng/ $\mu\text{l}$ ), 1,5 ml Kollagen (2 mg/ml), 12  $\mu\text{l}$  NaOH (10 N) und 15  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O. Nach einer 30- bis 60-minütigen Inkubation bei 37°C ist eine Polymerisation der Mischung zu beobachten. Diese wird ungefähr 4 Tage bei 37°C, die letzte Nacht über in Gegenwart von angiogenetischen Faktoren (bFGF und VEGF) kultiviert.

## 3/Reimplantation des Implantats

**[0082]** Ein oder zwei Implantate werden in die Peritonealhöhle entweder weiblicher BALB/c Mäuse oder Swiss Nude Mäuse eingesetzt. Einen Monat nach ihrer Implantation wird überprüft, ob sie sich im Fettgewebe der Bauchhöhle verankert haben und vaskularisiert sind. Ausserdem werden im Monat nach der Implantation regelmässig Blutproben entnommen, und die quantitative Bestimmung des Antikörpers 2F5 durch ELISA (nach der zuvor beschriebenen Technik) ergibt Werte in der Größenordnung von 20 ng/ml Serum in den syngenen BALB/c-Mäusen und von über 100 ng/ml Serum in den Nacktmäusen. Das Antikörpervniveau bleibt über einen Zeitraum von über 6 bis 7 Wochen nach der Implantation erhalten.

**[0083]** Die Wirksamkeit der Antikörper 2F5 zur Hemmung der HIV-Virusinfektion wird an SCID (Severe Combined Immuno Deficiency)-Mäusen bestimmt. Es handelt sich um immundefiziente Mäuse, die weder T-Zellen noch reife B-Zellen aufweisen und die darüber hinaus durch Einführung menschlicher Zellen oder Gewebe humanisiert werden können. Durch diese Behandlung können sie mit HIV infiziert werden (Namikawa et al., 1988, Science 242, 1684–1686).

**[0084]** Ein bis zwei Antikörper 2F5 sekretierende Neorgane werden in die Bauchhöhle von SCID-Mäusen implantiert, die durch intraperitoneale Injektion humaner Imphozytärer CEM A3-Zellen ( $40 \times 10^6$  Zellen) humanisiert wurden. 3 bis 5 Wochen nach der Implantation werden die Mäuse durch das HIV-Virus (1000 TCID<sub>50</sub> HIV-1-Isolat Bru intravenös) geschwächt. Die Zellen werden dem Tier 3 Tage nach der Infektion wieder entnommen und in Kultur gebracht. Der Zellüberstand wird in regelmässigen Zeitabständen abgenommen, und die Reverse-Transkriptase-Aktivität wird bestimmt. Es ist festzustellen, dass die humanen Zellen gegen die Infektion durch HIV geschützt sind und dass der Schutz über die gesamte Versuchsdauer (50 Tage) anhält. Die Reverse-Transkriptase-Aktivität liegt in den Mäusen, welchen die Antikörper 2F5 sekretierenden Implantate eingepflanzt wurden, unter der Nachweisgrenze (Verhalten vergleichbar mit dem nicht infizierten Kontrolltier). Diese Angaben zeigen eine Hemmung der HIV-Replikation in den Tieren, die 2F5 in ihrem Blutkreislauf produzieren.

## Beispiel 2: Herstellung eines Implantats zur Krebs-Immuntherapie

A. Konstruktion des bicistronischen retroviralen Vektors zur Expression und Sekretion von Antikörper 17-1-A.

**[0085]** Das Plasmid pBluescript SK+ wird zuerst mit NotI verdaut und dann einer Behandlung mit dem großen Klenow-Fragment der DNA-Polymerase unterzogen, bevor es religiert wird. Es wird der Vektor pTG6336 gebildet, in dem die NotI-Schnittstelle zerstört wurde. Zugleich wird die für die leichte Kette des Antikörpers 17-1-A kodierende cDNA durch PCR aus einer cDNA-Bank isoliert, welche aus mRNA konstruiert wurde, die

aus Zellen des Hybridoms 17-1-A isoliert wurde (Sun et al., 1987, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 214–218; Herlyn et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1438–1442). Zur Orientierung sei angemerkt, dass dieser Antikörper gegen ein Epitop des transmembranen Glykoproteins GA733-2 gerichtet ist (Szala et al., 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87, 3542–3546), das auf der Oberfläche von humanen kolorektalen Karzinomzellen vorhanden ist. Die PCR verwendet die Primer OTG6114 und OTG6115 (SEQ ID NO: 5 und 6), die so ausgelegt sind, dass sie Restriktionsstellen einführen, welche die nachfolgenden Klonierungsschritte erleichtern, jeweils die EcoRI- und NcoI-Schnittstelle am 5'-Ende und die BglII- und XbaI-Schnittstelle am 3'-Ende. Nach Kontrolle auf einem Agarosegel wird das auf diese Weise hergestellte PCR-Fragment mit EcoRI und XbaI verdaut und zwischen die entsprechenden Schnittstellen in pTG6336 kloniert. Es wird pTG6339 gebildet.

**[0086]** Letzterer wird mit EcoRI und NcoI verdaut und mit dem EcoRI-NcoI-Fragment von pTG4369 ligiert, welches das IRES-Element trägt, so dass pTG6343 entsteht. In diesen wird die für die schwere Kette des Antikörpers 17-1-A kodierende cDNA eingeführt, der das Stoppcodon fehlt, an dessen Stelle ein kleiner Spacer inseriert ist, der für die Aminosäurereste Gly-Gly-Gly-Gly-Ser kodiert. Die 17-1-A-HC-cDNA wird durch PCR aus der vorangehenden cDNA-Bank und unter Verwendung der Oligonukleotide OTG6192 und OTG6194 (SEQ ID NO: 7 und 8) erhalten. Die Insertion des mit Sall-EcoRI verdauten PCR-Fragments erlaubt die Herstellung von pTG6346.

**[0087]** Letzterer wird mit NotI linearisiert und mit einem NotI-Fragment ligiert, das die für Barnase kodierende Sequenz trägt, so dass pTG6347 gebildet wird. Das für Barnase kodierende Gen wird durch PCR aus einem Präparat genomischer DNA von *Bacillus amyloliquefaciens* und den Primern OTG5147 und OTG5148 (SEQ ID NO: 9 und 10) gewonnen. Die Oligonukleotide wurden so ausgelegt, dass sie am 5'-Ende des Codons, das der ersten Aminosäure der reifen Barnase entspricht, und am 3'-Ende des Stoppcodons eine NotI-Restriktionsstelle einführen. Es wird verifiziert, dass die Sequenz des auf diese Weise gebildeten PCR-Fragments der in Hartley (1988, J. Mol. Biol., 202, 913–915) veröffentlichten Sequenz entspricht.

**[0088]** Zugleich wird das NotI-Fragment in einen Vektor vom Typ M13, zum Beispiel den Vektor M13TG130 (Kieny et al., 1983, Gene, 26, 91–99) inseriert, in den zuvor durch gezielte Mutagenese eine NotI-Schnittstelle in die Klonierungsstellen eingeführt wurde. Die Modifikation von Restriktionsstellen durch gezielte Mutagenese ist ein dem Fachmann bekanntes Verfahren. Der auf diese Art erhaltene Vektor wird einer gezielten Mutagenese mit Hilfe des Oligonukleotids OTG5299 (SEQ ID NO: 11) unterzogen, um der Lysinrest (Lys oder K) an Position 27 der nativen Barnase durch einen Alaninrest (Ala oder A) zu ersetzen. Das modifizierte NotI-Fragment wird isoliert und wie zuvor in den Vektor pTG6346 inseriert, so dass pTG6348 gebildet wird.

**[0089]** Das aus dem Vektor pTG6347 oder pTG6348 isolierte Sall-BglII-Fragment wird in den zuvor mit XhoI und BamHI verdauten Vektor pTG2673 transferiert. Es werden die Vektoren pTG6356 beziehungsweise pTG6357 erhalten ([Fig. 3](#) und [Fig. 4](#)).

**[0090]** Darüber hinaus wird ein bicistronischer Vektor konstruiert, der die Sequenzen enthält, die für die 17-1-A-HC, das EMCV-IRES, gefolgt von der 17-1-A LC, kodieren. Das mit einem Stoppcodon versehene HC-Fragment wird durch PCR mit den Oligonukleotiden OTG6192 (SEQ ID NO: 7) und OTG6193 (SEQ ID NO: 12) aus dem Vektor pTG6346 erhalten. Dieses PCR-Fragment, das an seinem 5'-beziehungsweise 3'-Ende mit einer Sall- beziehungsweise EcoRI-Schnittstelle versehen ist, wird in den mit den gleichen Enzymen verdauten Vektor pTG6343 inseriert, so dass pTG6345 entsteht. Das Sall-BglII-Fragment des Letzteren wird zwischen die XhoI- und BamHI-Schnittstellen von pTG2673 kloniert. Man erhält den Vektor pTG6355 ([Fig. 5](#)).

**[0091]** Durch Transfektion von GP+E-86-Zellen mit den Vektoren pTG6355, pTG6356 und pTG6357 (Kotransfektion mit pLXSP) gemäß der in Beispiel 1 beschriebenen Technik werden Viruspartikel hergestellt, mit dem Unterschied, dass die transfizierten Klone wie nachstehend angegeben auf die Produktion von 17-1-A-Antikörper getestet werden. 100 µl eines zuvor 100-fach in Puffer (80 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 200 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 9,6) verdünnten Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin-Antikörpers (Southern Biotechnology) werden in den Löchern einer Mikrotitrationsplatte (Nunc) verteilt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Die nicht-adsorbierten Antikörper werden durch ausgiebiges Waschen mit einem 1 × PBS-Puffer mit 10 mM EDTA, 0,05% Tween 20 eliminiert. Die Löcher werden durch Zugabe von 200 µl einer 1 × PBS-Lösung, 1% BSA (Bovine Serum Albumine) 1 Std. bei 37°C gesättigt. Nach diesem Schritt wird die Platte erneut gewaschen und die Standardreihe (in 1 × PBS, 1% BSA verdünnt) oder die zu testenden Kulturüberstände werden in die Löcher eingebracht und unter Schütteln 2 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach mehreren Waschschrritten werden die Platten mit 100 µl eines Biotin (Southern Biotechnology)-gekoppelten Ziege-Anti-Ig2a-Antikörpers (17-1-A-Isotyp), der 5000-fach in einem 1 × PBS-Puffer, 1% BSA verdünnt ist, inkubiert. Nach einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Schütteln wird der Überschuss in 8 Waschschrritten entfernt, und es werden 100 µl einer 1000-fach

verdünnten Peroxidase-Streptavidin-Lösung (Amersham) verteilt. Nach 45 minütiger Inkubation, gefolgt von ausgiebigen Waschschritten, wird die Enzymaktivität durch Zugabe von 100 µl Substratlösung (für eine Platte: 12,5 ml Puffer mit 25 mM Citrat, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5; 1 5 mg-Pastille OPD (ortho-Phenylendiamin, Sigma); 5 µl 35% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) bestimmt. Die Reaktion wird durch Zugabe von 25 µl 3 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> pro Loch gestoppt. Die Extinktion wird dann bei 490 nm gelesen.

**[0092]** Die in den Kulturüberständen vorliegende Menge an Antikörpern wird als Funktion einer wie folgt bereiteten Standardreihe bestimmt: die Zellen des Hybridoms 17-1-A werden "nude"-Mäusen injiziert. Nach Bildung von Aszites wird die Aszitesflüssigkeit entnommen, aus welcher der 17-1-A-Antikörper durch Aufbringen auf eine Protein A-Sepharose-Säule gereinigt wird. Es handelt sich um eine konventionelle Technik im Vermögen des Fachmanns. Es wird eine Lösung gereinigten Antikörpers 17-1-A mit einer Konzentration von 1 µg/ml hergestellt und in Zwischenschritten in PBS-Puffer verdünnt. Es wird für jede der Verdünnungen die Extinktion gemessen, und die Eichkurve wird erstellt (ng Antikörper als Funktion der Extinktion). Je nach transfiziertem Vektor sekretieren die am meisten produzierenden Klone 200 bis 900 ng Antikörper 17-1-A/10<sup>6</sup> Zellen/24 Std.

#### B. Herstellung des Implantats

**[0093]** Die NIH3T3-Zellen werden mit den am meisten produzierenden Klonen (aus der Transfektion der GP+E-86-Zellen mit den Vektoren pTG6355, pTG6356 und pTG6357) infiziert, und die Kulturüberstände werden mittels ELISA auf die Sekretion von Antikörper 17-1-A getestet. Es wird eine Antikörperkonzentration nachgewiesen, die je nach den Konstruktionen von 100 bis 1000 ng/10<sup>6</sup> Zellen/24 Std. variiert.

**[0094]** Darüber hinaus wird überprüft, dass der produzierte Antikörper das von den SW948-Zellen exprimierte Antigen GA733 erkennt. Hierfür wird die Technik der Durchflusszytometrie angewandt. Die SW948-Zellen (ATCC CCL237) werden in komplettem DMEM-Medium kultiviert. Sie werden durch die Wirkung von Trypsin abgelöst, gezählt, und 5 × 10<sup>6</sup> Zellen werden in die Löcher einer 96-Loch-Platte verteilt. Diese Platte wird 1 min bei 1000 Upm ohne Bremse zentrifugiert, um die Zellen zu pelletieren. Der Überstand wird entfernt, die Platte dann gevortext, und die Zellen werden in 100 µl FACS-Puffer (kationisches 1 × PBS, 1% BSA, 0,1% humane γ-Globuline, 5 mM EDTA) resuspendiert. Die Platte wird erneut zentrifugiert, und der Überstand wird entfernt. Die Zellen werden dann in dem zu testenden Kulturüberstand oder in einer Verdünnung des Kontrollantikörpers in FACS-Puffer resuspendiert und 1 Std. bei 4°C inkubiert. Dann werden unter den zuvor beschriebenen Bedingungen 4 Waschschriffe durchgeführt und die Zellen in 100 µl eines in FACS-Puffer 100-fach verdünnten Ziege-Anti-Maus-Immunglobulin-F(ab')<sub>2</sub>-Fragments, gekoppelt an Fluoreszein (DTAF) (Jackson Immuno Research Laboratories), resuspendiert. Eine erneute einstündige Inkubation bei 4°C erlaubt die Bindung des Antikörpers. Der Überschuss wird durch 4 Waschschriffe entfernt, und die Zellen werden schließlich in 300 µl kationischem 1 × PBS resuspendiert, bevor sie mit einem FACScan-Durchflusszytometer (Becton Dickinson) analysiert werden. Es ist zu beobachten, dass alle getesteten NIH3T3-Überstände (aus der Infektion mit den 3 Viruspartikeltypen) einen Antikörper sekretieren, der zur Bindung an das Zielprotein GA733 fähig ist.

**[0095]** Im Fall der Konstruktionen, bei denen der Antikörper mit Barnase oder deren abgeschwächter Form (pTG6356 und pTG6357) fusioniert ist, ist es von Interesse, verifizieren zu können, dass der fusionierte Antikörper eine Nukleaseaktivität aufweist. Hierfür wird der Abbau einer tRNA verfolgt. 100 µl der zu testenden Überstände oder einer RNaseA-Lösung bekannter Konzentration (als Bezugswert der Reaktion) werden zu 200 µl 0,5 M Tris-HCl, pH 7,5, 5 mM EDTA, 0,5 mg/ml BSA und 1 mg/ml tRNA gegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Röhrchen werden auf Eis gelagert, und 700 µl 6%-ige Perchlorsäure werden zugegeben, um die tRNA 10 min lang auf Eis zu fällen. Eine 10-minütige Zentrifugation mit maximaler Geschwindigkeit bei 4°C erlaubt es, die tRNA zu pelletieren, wobei die durch die Wirkung des Enzyms freigesetzten freien Nukleotide in Suspension bleiben. Die Extinktion dieser Nukleotide wird dann bei 260 nm abgelesen.

**[0096]** Das Implantat kann nach der in Beispiel 1 genannten Methode durch Inkorporation von primären Maus-Fibroblasten oder NIH3T3-Zellen, die mit den Vektoren pTG6355, pTG6356 oder pTG6357 transduziert wurden, hergestellt werden.

Beispiel 3: Herstellung eines Implantats, das ein Immunadhäsion sekretiert und zur Immuntherapie von AIDS bestimmt ist

**[0097]** Es handelt sich hier darum, ein Immunadhäsion herzustellen, das aus der Fusion eines "adhäsiven" Moleküls, welches das Glykoprotein des HIV-Virus bindet, und eines Immunglobulins hervorgeht, das die Struktur stabilisiert und eine unspezifische Immunität verleiht. Der adhäsive Teil ist von dem Membranprotein CD4 (Struktur in [Fig. 6](#) dargestellt) abgeleitet, von dem man den N-terminalen Teil beibehält (Signalsequenz und

Domänen I und II der extrazellulären Region). Mehrere Studien haben gezeigt, dass sie alleine fähig sind, gp 120 zu binden, die Wechselwirkung des HIV mit den CD4<sup>+</sup>-Zielzellen und sein Eindringen in diese zu blockieren (Trauneker et al., 1988, Nature 331, 84–86; Deen et al., 1988, Nature 331, 82–84; Hussey et al., 1988, Nature 331, 78–81; Fisher et al., 1988, Nature 331, 76–78). Der Immunglobulin-Teil wird durch die konstante  $\gamma 3$ -Region (Scharnierregion -CH2-CH3) des Antikörpers 2F5 gebildet. Das Hybridmolekül wird im Folgenden mit sCD4-2F5 bezeichnet.

**[0098]** Die Konstruktion erfolgt auf folgende Weise (siehe [Fig. 7](#)):

Die für die sCD4-Region (Signalsequenz – Domänen I und II) kodierenden Sequenzen werden auf klassische Art mittels PCR isoliert. Als Matrize wird die in der Literatur beschriebene CD4-cDNA (aus mRNA von CD4<sup>+</sup>-Zellen erhalten) oder ein Plasmid aus dem Stand der Technik, in das die cDNA kloniert ist (Jay Maddon et al., 1985, Cell 42, 93–104), verwendet, welches mit den Primern OTG7094 und OTG7095 (SEQ ID NO: 13 und 14) hybridisiert wird. Der erste erlaubt das Einführen von einer XhoI-Schnittstelle und von Kozak-Konsensussequenzen stromaufwärts vom Start-ATG von CD4, und der zweite trägt Nukleotide, die zum einen dem C-terminalen Ende der Domäne II von CD4 und zum anderen dem N-terminalen Ende der Scharnierregion von 2F5-HC entsprechen. Die Reaktion läuft in 25 Zyklen ab (1 min bei 94°C, 2 min bei 50°C und 3 min bei 72°C).

**[0099]** Die für das konstante  $\gamma 3$ -Segment von 2F5-HC kodierenden Sequenzen werden ebenfalls mittels PCR amplifiziert. Es werden das Plasmid pTG2677 und die Primer OTG7097 und OTG7096 (SEQ ID NO: 15 und 16) verwendet. Der erste ist komplementär zu OTG7095 und der zweite deckt die in der CH3-Region liegende XmaI-Schnittstelle ab.

**[0100]** Die auf diese Weise erzeugten PCR-Produkte überdecken sich über 30 bp. Sie werden rehybridisiert und einer zweiten Amplifikationsreaktion unterzogen, die in zwei Schritten abläuft, einer ersten linearen Amplifikation zur Verlängerung des rehybridisierten Produkts (10 Zyklen: 1 min bei 94°C, 2 min bei 37°C und 3 min bei 72°C), der eine exponentielle Amplifikation in Gegenwart der Primer OTG7094 und OTG7096 (SEQ ID NO: 13 und 16) folgt (20 Zyklen: 1 min bei 94°C, 2 min bei 50°C und 3 min bei 72°C).

**[0101]** Das Endprodukt wird zwischen die XhoI- und XmaI-Schnittstellen von pTG2677 inseriert, so dass pTG8332 entsteht, um das komplette sCD4-2F5-Molekül zu rekonstituieren. Dieses wird durch XhoI-BamHI-Verdau herausgeschnitten und stromabwärts von dem murinen PGK-Promotor in den Vektor pTG6368 kloniert. Man erhält pTG8338 ([Fig. 8](#)).

**[0102]** Die NIH3T3-Zellen werden mit 10  $\mu$ g pTG8338 transfiziert, der mit BglII linearisiert wurde. Zwei Tage später werden die Zellen in zunehmenden Puromycin-Konzentrationen (5 bis 75  $\mu$ g/ml) kultiviert. Die Expression des sCD4-2F5-Proteins wird mittels Immunfluoreszenz unter Verwendung eines Antikörpers, der entweder den CD4-Teil (Leu3A; Becton Dickinson) oder den 2F5-Teil (monoklonaler Maus-Anti-Human-IgG3-Scharnierregion-Antikörper; Interchim) erkennt, und eines Konjugats, bestehend aus einem an Fluoreszein gekoppelten Esel-Anti-Maus-Ig-Antikörper (Jackson Laboratories), überprüft. Es ist festzustellen, dass ungefähr 30% des Zellpools ein nachweisbares Niveau an Immunadhäsion exprimieren. Aus diesem Grund werden produzierende Klone durch klonale Verdünnung isoliert.

**[0103]** Die Produktion der Viruspartikel erfolgt in GP+E-86-Zellen, die nach dem klassischen Protokoll transfiziert und in Gegenwart von Puromycin selektioniert wurden. Die NIH3T3-Zielzellen werden dann mit dem Zellüberstand infiziert, und die Immunfluoreszenzanalysen bestätigen die Expression des Transgens in 100% der Zellen.

**[0104]** Die quantitative Bestimmung erfolgt mittels ELISA. Zuerst werden 500 ng Hüllglykoprotein gp 160 des HIV-1-Virus abgeschieden, um den CD4-Teil des CD4-2F5-Moleküls zu binden. Es wird, wie in der internationalen Anmeldung WO 92/19742 angegeben, rekombinant hergestellt. Dann wird der quantitativ zu bestimmende Überstand und schließlich ein gegen den 2F5-Teil gerichteter Antikörper (Peroxidasekonjugierter Ziege-Anti-Human-Ig-Antikörper; Interchim) zugegeben. Die Eichlösung besteht aus rekombinantem Immunadhäsion, das aus den Kulturüberständen auf einer Protein G-Sepharose Fast Flow-Säule (Pharmacia) gereinigt wurde. In den Überständen der infizierten NIH3T3-Zellen wird eine Produktivität von über 10  $\mu$ g/ml/24 Std./10<sup>6</sup> Zellen gemessen. Dieser Test zeigt ebenfalls, dass das Protein in der Lage ist, gp 160 zu binden und folglich dazu fähig wäre, das HIV-Virus zu binden, um seine therapeutische Funktion auszuüben.

**[0105]** Die infizierten NIH3T3-Zellen werden durch Kultur in F175-Kulturflaschen amplifiziert. 4 Organoide, die jeweils ungefähr 10<sup>7</sup> Zellen enthalten, werden unter Anwendung der in Beispiel 1 ausgeführten Technologie hergestellt und in die Peritonealhöhle von 4 weiblichen BALB/c Nacktmäusen eingepflanzt. Die Sekretion von

Immunadhäsins ins Serum wird bis 5 Wochen nach der Implantation verfolgt (quantitative Bestimmung mittels ELISA). Die Ergebnisse zeigen eine Konzentration in der Größenordnung von 100 bis 200 µg/ml und eine kontinuierliche Sekretion während der Versuchsdauer.

Beispiel 4: Herstellung eines Implantats, das ein Protein sekretiert, welches aus der Fusion von Immunadhäsins sCD4-2F5 und humanem Angiogenin stammt

**[0106]** Angiogenin ist ein Plasmaprotein von 14,1 kDa, das der Familie der ribonukleolytischen Enzyme angehört. Seine lytische Wirkung ist jedoch eingeschränkter als die der Bezugs-Ribonuklease A (Rnase A) und zeigt eine deutliche Präferenz für bestimmte RNAs (insbesondere für die ribosomalen RNAs 18S und 28S und die Transfer-RNAs). Das Gen und die cDNA wurden bereits vor etwa zehn Jahren kloniert (Kurachi et al., 1985, *Biochemistry* 74, 5494–5499).

**[0107]** Die Fusion der Sequenzen, die für Angiogenin stromabwärts von sCD4-2F5 kodieren, sollte die Synthese eines Proteins ermöglichen, das in der Lage ist, HIV-infizierte Zellen als Ziel zu haben und zu zerstören. Diese wurden durch PCR aus dem Plasmid pHAG1 (Kurachi et al., 1985, siehe oben) mit Hilfe der Primer OTG10089 und OTG10090 (SEQ ID NO: 17 und 18) erhalten, die an ihren 5'-Enden EcoRI- und BamHI-Restriktionsstellen umfassen, welche 5' vom ersten Codon des reifen Proteins beziehungsweise 3' vom Stoppcodon liegen.

**[0108]** Wegen der sterischen Überfrachtung wird zwischen die beiden Einheiten ein Spacer eingeführt. Die PCR-Reaktion erfolgt mit Hilfe der Matrix pTG2677 und der Oligonukleotide OTG10087 und OTG10088 (SEQ ID NO: 19 und 20), um den Teil des 2F5-Gens zu amplifizieren, der sich von der XmaI-Schnittstelle (in CH3) zum Stoppcodon erstreckt. Der Primer OTG10088 ist ausgelegt, um das Stoppcodon zu eliminieren und in 3'-Richtung eine BamHI-Schnittstelle sowie den für die Aminosäurereste Gly-Gly-Gly-Gly-Ser kodierenden Spacer einzuführen.

**[0109]** Die beiden gewonnenen PCR-Fragmente, die von einer BamHI-Schnittstelle flankiert sind, werden miteinander ligiert. Man isoliert das XmaI-EcoRI-Fragment, das zuerst in pBluescript inseriert wird, um die Sequenz zu überprüfen, und dann in den Vektor pTG8332 inseriert wird, um die komplette Fusionssequenz "sCD4-2F5-Angiogenin" zu rekonstituieren. Es wird pTG8373 erhalten ([Fig. 9](#)). Der komplette Block kann durch XhoI-BglII-Verdau herausgeschnitten und in den mit XhoI und BamHI linearisierten retroviralen Vektor pTG6368 kloniert werden. Die Viruspartikel können wie vorstehend gebildet werden, und die Organoide können aus infizierten NIH3T3-Zielzellen oder aus primären Fibroblasten erzeugt werden.

Beispiel 5: Herstellung eines adenoviralen Vektors, der Immunadhäsins sCD4-2F5 exprimiert

**[0110]** Die adenoviralen Genomfragmente, die in den nachfolgend beschriebenen Konstruktionen verwendet werden, sind genau nach ihrer Position in der Nukleotidsequenz des Adenovirus Typ 5 (Ad5)-Genoms angegeben, wie sie in der Genebank-Datenbank unter der Referenz M73260 offenbart ist.

**[0111]** Das Intron und das Polyadenylierungssignal (pA) des humanen  $\beta$ -Globin-Gens werden aus dem Vektor pBCMG/Neo gewonnen (Karasuyama, 1988, *Eur. J. Immuno.* 18, 97–104; Karasuyama, 1989, *J. Exp. Med.* 169, 13–25) und in das Plasmid pREP4 (InVitrogen™) stromabwärts vom 3'-LTR des RSV-Virus eingefügt. Die Kasette "RSV-Promotor-Intron-pA  $\beta$ -Globin" wird aus dem vorangehenden Vektor in Form eines Sall-BamHI-Fragments isoliert und in den Vektor pTG9350 inseriert. Letzterer stammt aus der Klonierung der Ad5-Genomsequenzen, die sich von den Nukleotiden 1 bis 458 und 3328 bis 5788 erstrecken, in p polyII (Lathe et al., 1987, *Gene* 57, 193–201).

**[0112]** In den im vorangehenden Schritt erhaltenen Vektor pTG8346 wird (zwischen dem Intron und dem pA) ein Polylinker eingefügt, der mit multiplen Klonierungsstellen (Eco RI, XhoI, NotI, XbaI, SpeI, BamHI, EcoRV, HindIII, ClaI, KpnI und BglII) versehen ist, so dass pTG8347 entsteht.

**[0113]** Die Sequenzen, die für das Hybridprotein sCD4-2F5 kodieren, werden aus dem Vektor pTG8338 (Beispiel 3) durch XhoI-BamHI-Verdau isoliert und in den mit XhoI und BglII gespaltenen Vektor pTG8347 eingeführt, so dass pTG8349 entsteht, der ihre Expression unter der Kontrolle des RSV-Promotors ermöglicht.

**[0114]** Um das komplette Genom des rekombinanten Vektors zu rekonstituieren, wird die Technik der homologen in-vitro-Rekombination (in der französischen Anmeldung 94 14470 beschrieben) verwendet. Hierfür wird der Vektor pTG4656 eingesetzt, der das Ad5-Genom umfasst, in dem die E1- und E3-Regionen deletiert sind

(Ad5 1 bis 458 – Ad2-MLP-Promotor-LacZ-Gen-pA SV40-Ad5 3329 bis 28529 und 30470 bis 35935). Jeder andere E1<sup>-</sup> E3<sup>-</sup>-adenovirale Vektor ist ebenfalls geeignet, wie die in der internationalen Anmeldung WO 94/28152 beschriebenen. BJ5183-Zellen (Hanahan, 1983, J. Mol. Biol. 166, 557–580) werden mit pTG4656, der mit dem Enzym ClaI (10 bis 20 ng) linearisiert wurde, und dem aus pTG8349 gereinigten PacI-BstXI-Fragment (10-facher molarer Überschuss) kotransformiert. Die Rekombination im Bereich der homologen adenoviralen Sequenzen bewirkt den Austausch der LacZ-Kassette aus pTG4656 durch die aus sCD4-2F5 (RSV-Promotor –  $\beta$ -Globin-Intron-sCD4-2F5-Gen- $\beta$ -Globin-pA), die in dem aus pTG8349 stammenden Fragment enthalten ist. Es wird der Vektor pTG8357 erzeugt ([Fig. 10](#)).

**[0115]** Die rekombinanten Viren werden durch Transfektion von pTG8357 in 293-Zellen (ATCC CRL1573) gewonnen. Es werden 5 Plaques selektioniert, die durch Kultur in F25-Kulturflaschen in Gegenwart frischer 293-Zellen amplifiziert werden. Nach 5 Tagen werden die infizierten Zellen geerntet und einer HIRTH-Analyse (Gluzman und Van Doren, 1983, J. Virol. 45, 91–103) unterzogen, um das Vorliegen des Transgens zu überprüfen. Kurz gefasst besteht die HIRTH-Analyse in der Extraktion des adenoviralen Genoms, der Präzipitation der viralen DNA, dem Verdau mit einem geeigneten Restriktionsenzym, dem Membrantransfer und dem Hybridisieren mit einer radioaktiven Sonde, die an die sCD4-2F5-Sequenzen hybridisieren kann. Für die 5 analysierten Adenoviren wird ein positives Signal beobachtet.

**[0116]** Durch aufeinander folgende Amplifikation in 293-Zellen, Aufreinigung in zwei Cäsiumchloridgradienten und Dialyse wird ein bedeutender Adenovirus-Vorrat gebildet. Dieser Vorrat kann im Rahmen von klinischen Anti-AIDS-Tests verwendet werden.

Beispiel 6: Herstellung eines adenoviralen Vektors, der zytotoxisches Immunadhäsins sCD4-2F5-Angiogenin exprimiert

**[0117]** Die für das Fusionsprotein sCD4-2F5-Angiogenin kodierenden Sequenzen werden durch XhoI-BglII-Verdau aus dem Vektor pTG8373 (Beispiel 4) geschnitten und an der Stelle der entsprechenden Schnittstellen in den Vektor pTG8347 (Beispiel 5) kloniert. Man erhält den Vektor pTG8376 ([Fig. 11](#)), welcher der homologen Rekombination mit einem adenoviralen Vektor, zum Beispiel pTG4656, unterzogen werden kann, um defiziente rekombinante Adenoviren zu produzieren, die zytotoxisches Immunadhäsins exprimieren, das gegen HIV-infizierte Zellen gerichtet ist.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

- (i) Anmelder:
  - (A) NAME: Transgene S. A.
  - (B) STRASSE: 11 rue de Molsheim
  - (C) ORT: Strassburg
  - (E) LAND: Frankreich
  - (F) POSTLEITZAHL: 67082
  - (G) TELEFON: (33) 88 27 91 00
  - (H) TELEFAX: (33) 88 22 58 07
- (ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Implantat und Vektor zur Behandlung erworbener Krankheiten
- (iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 20
- (iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:
  - (A) DATENTRÄGER: Kassette
  - (B) COMPUTER: IBM-kompatibler PC
  - (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS / MS-DOS
  - (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (EPA)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 1:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG5168

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 1:

**GGAAGCTTCC ATGGACATGA GGGTC**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 2:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 25 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG5169

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 2:

**AAGAATTCCT AACACTCTCC CCTGT**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) KONFIGURATION: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:

(B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG5170

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 3:

**AAAAGCTTCC ATGGAGTTGG GTCTG**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 25 Basenpaare

(B) ART: Nukleinsäure

(C) STRANGFORM: Einzelstrang

(D) KONFIGURATION: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

(B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG5171

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 4:

**GGGAATTCTC ATTTAGCCGG AGACA**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

(A) LÄNGE: 27 Basenpaare

- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) KONFIGURATION: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:

- (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG6114

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 5:

**GGGAATTCCA CCATGGGCAT CAAGATG**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) KONFIGURATION: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG6115

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 6:

**GGTCTAGATC TAACACTCAT TCCTGTTGAA**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) KONFIGURATION: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:

- (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG6192

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 7:

**CTGTCGACCA CCATGGATGG AGCAGAG**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 8:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 43 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG6194

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 8:

**ACGAATTCGC GGCCGCGCTC CCTCCGCCAC CTTTACCCGG AGT**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 9:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 26 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG5147

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 9:

**CTGTGGCGGC CGCCGCACAG GTTATC**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 10:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 28 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: JA

- (vi) HERKUNFT:
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG5148

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 10:

**CAGGCGGCCG CTTTTTCGT TATCTGAT**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 11:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 21 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: DNA (genomisch)
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG5299

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 11:

**TACATTACAG CCTCAGAAGC A**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 12:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 23 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG6193

- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 12:

**ACGAATTCTC ATTTACCCGG AGT**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 13:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 35 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear

- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: cDNA des humanen CD4
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG7094

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 13:

**CCGCTCGAGC CACCATGAAC CGGGGAGTCC CTTTT**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 14:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: cDNA des humanen CD4
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid OTG7095

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 14:

**ACAAGATTTG GGCTCCTGGA AAGCTAGCAC**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 15:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: cDNA der schweren Kette des Antikörpers 2F5
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid (OTG7097)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 15:

**GTGCTAGCTT TCCAGGAGCC CAAATCTTGT**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 16:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 36 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: JA
- (vi) HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: cDNA der schweren Kette des Antikörpers 2F5
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid (OTG7096)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 16:

**TGGGCCCGGG ATGGGGCAG GGTGTACACC TGTGGT**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 17:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN
- (iii) ANTISENSE: NEIN
- (vi) HERKUNFT:
  - (A) ORGANISMUS: cDNA von humanem Angiogenin
  - (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid (OTG10089)
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 17:

**GGGGGATCCC AGGATAACTC CAGGTAC**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 18:

- (i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:
  - (A) LÄNGE: 27 Basenpaare
  - (B) ART: Nukleinsäure
  - (C) STRANGFORM: Einzelstrang
  - (D) KONFIGURATION: linear
- (ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA
- (iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: cDNA von humanem Angiogenin
- (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid (OTG10090)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 18:

**GGGGAATTCT TACGGACGAC GGAAAAT**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

- (A) LÄNGE: 30 Basenpaare
- (B) ART: Nukleinsäure
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) KONFIGURATION: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: NEIN

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: cDNA der schweren Kette des Antikörpers 2F5
- (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid (OTG10087)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 19:

**TGCCCCCATC CCGGGAGGAG ATGACCAAGA**

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO. 20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKA:

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

(ii) ART DES MOLEKÜLS: cDNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iii) ANTISENSE: JA

(vi) HERKUNFT:

- (A) ORGANISMUS: cDNA der schweren Kette des Antikörpers 2F5
- (B) STAMM: synthetisches Oligonukleotid (OTG10088)

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO. 20:

**GGGGGATCCC CCGCCACCTT TAGCCGGAGA CAGGGA**

### Patentansprüche

1. Implantat von genetisch modifizierten Zellen, die eine exogene Nukleotidsequenz umfassen, welche für das Ganze oder einen Teil eines Antikörpers kodiert, der gegen ein tumorales Antigen oder ein spezifisches Epitop eines Virus gerichtet ist, wobei die exogene Nukleotidsequenz unter die Kontrolle von Elementen ge-

stellt ist, die für ihre Expression und die Sekretion des Antikörpers erforderlich sind, wobei die Zellen an einer extrazellulären Matrix befestigt sind und der von dem Implantat sekretierte Antikörper in der Lage ist, spezifisch das Antigen oder das Epitop, gegen das er gerichtet ist, zu binden.

2. Implantat nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe, die besteht aus:

- einem nativen Antikörper,
- einem chimären Antikörper,
- einem Antikörper-Fragment und insbesondere einem Fab-, F(ab')<sub>2</sub>- oder auch scFv-Fragment und
- einem bispezifischen Antikörper.

3. Implantat nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper durch Fusion mit einer toxischen oder immunpotenzierenden Substanz modifiziert ist.

4. Implantat nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, dass die toxische Substanz ausgewählt ist aus einer Ribonuklease und insbesondere der Ribonuklease von *Bacillus amyloliquefaciens*, Ricin, Diphtherie-Toxin, Cholera-Toxin, Thymidin-Kinase des Herpes-simplex-Virus, Cytosin-Desaminase von *Escherichia coli* oder einer Hefe der Gattung *Saccharomyces*, dem Exotoxin von *Pseudomonas* und dem menschlichen Angiogenin oder einem Analogon dieser Substanzen.

5. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass die exogene Nukleotidsequenz, die unter die Kontrolle der Elemente gestellt ist, die für ihre Expression und die Sekretion des Antikörpers erforderlich sind, von einem Vektor getragen wird, der von einem Plasmid, einem Retrovirus, einem Herpes-Virus, einem Adenovirus oder einem Adenovirusassoziierten Virus abgeleitet ist, wobei der Vektor durch Transfektion in die genetisch modifizierten Zellen eingeführt wird.

6. Implantat nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor dicistronisch ist.

7. Implantat nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Vektor retroviral ist und von 5' in Richtung 3' umfasst:

- (a) ein 5'-LTR, das von einem Retrovirus abgeleitet ist,
- (b) eine Enkapsidierungsregion,
- (c) eine exogene Nukleotidsequenz, welche umfasst:
  - einen internen Promotor,
  - eine erste Sequenz, welche für die schwere Kette eines Antikörpers kodiert,
  - eine Initiationsstelle des Eingangs der Ribosomen,
  - eine zweite Sequenz, welche für die leichte Kette eines Antikörpers kodiert, und
- (d) ein 3'-LTR, das von einem Retrovirus abgeleitet ist.

8. Implantat nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, dass die exogene Nukleotidsequenz darüber hinaus eine dritte Sequenz umfasst, die für eine toxische oder immunpotenzierende Substanz kodiert und stromabwärts und operativ mit der zweiten Sequenz fusioniert ist.

9. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 8, das autologe genetisch modifizierte Zellen umfasst.

10. Implantat nach Anspruch 9, das genetisch modifizierte Fibroblasten umfasst.

11. Implantat nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass es 10<sup>6</sup> bis 10<sup>12</sup>, bevorzugt 10<sup>7</sup> bis 10<sup>11</sup> genetisch modifizierte Zellen umfasst.

12. Verfahren zur Herstellung eines Implantats nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass man genetisch modifizierte Zellen und eine extrazelluläre Matrix in Kontakt bringt.

13. Verwendung eines Implantats nach einem der Ansprüche 1 bis 11 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die zur Behandlung oder Verhütung einer erworbenen Krankheit bestimmt ist.

14. Verwendung eines Implantats nach Anspruch 13 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die zur Behandlung oder Verhütung einer infektiösen Krankheit und insbesondere von AIDS oder von Krebs bestimmt ist.

15. Rekombinanter adenoviraler Vektor, umfassend eine exogene Nukleotidsequenz, die für das Ganze oder einen Teil eines Antikörpers kodiert, der gegen ein tumorales Antigen oder ein spezifisches Epitop eines infektiösen und pathogenen Mikroorganismus gerichtet ist und durch Fusion mit einer toxischen oder immunpotenzierenden Substanz modifiziert ist, wobei die Nukleotidsequenz unter die Kontrolle von Elementen gestellt ist, die für ihre Expression erforderlich sind, und der Antikörper in der Lage ist, spezifisch das Antigen oder das Epitop, gegen das er gerichtet ist, zu binden.

16. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus einem nativen Antikörper, einem chimären Antikörper, einem Antikörper-Fragment und insbesondere einem  $F(ab')_2$ -, Fc- oder auch scFv-Fragment und einem bispezifischen Antikörper besteht.

17. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass die toxische Substanz aus einer Ribonuklease und insbesondere der Ribonuklease von *Bacillus amyloliquefaciens*, Ricin, Diphtherie-Toxin, Cholera-Toxin, Thymidin-Kinase des Herpes-simplex-Virus, Cytosin-Desaminase von *Escherichia coli* oder einer Hefe der Gattung *Saccharomyces*, dem Exotoxin von *Pseudomonas* und dem menschlichen Angiogenin oder einem Analogon dieser Substanzen ausgewählt ist.

18. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper durch Fusion mit einer immunpotenzierenden Substanz modifiziert ist.

19. Rekombinanter adenoviraler Vektor, umfassend eine exogene Nukleotidsequenz, die für das Ganze oder einen Teil eines oder mehrerer interessierender Proteine kodiert, das bzw. die in der Lage ist/sind, ein Multimer, wie ein Dimer oder ein Tetramer, in einer Wirtszelle zu bilden; wobei die exogene Nukleotidsequenz unter die Kontrolle von Elementen gestellt ist, die für ihre Expression erforderlich sind, wobei der Vektor von einem Adenovirus humanen, caninen, avianen, bovinen, murinen, ovinen, porcinen oder simianen Ursprungs oder auch von einem Hybrid abgeleitet ist, das Fragmente von adenoviralem Genom verschiedener Ursprünge umfasst, und wobei der Vektor dadurch gekennzeichnet ist, dass die exogene Nukleotidsequenz für das Ganze oder einen Teil mindestens eines Antikörpers kodiert, der gegen ein tumorales Antigen oder ein spezifisches Epitop eines infektiösen und pathogenen Mikroorganismus gerichtet ist, wobei der Antikörper in der Lage ist, spezifisch das Antigen oder das Epitop, gegen das er gerichtet ist, zu binden.

20. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass der Antikörper durch Fusion mit einer toxischen oder immunpotenzierenden Substanz modifiziert ist.

21. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach einem der Ansprüche 15 bis 18, der von einem Adenovirus humanen, caninen, avianen, bovinen, murinen, ovinen, porcinen oder simianen Ursprungs oder auch von einem Hybrid abgeleitet ist, das Fragmente von adenoviralem Genom verschiedener Ursprünge umfasst.

22. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach einem der Ansprüche 15 bis 21, dadurch gekennzeichnet, dass er replikationsdefizient ist.

23. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, dass ihm mindestens das Ganze oder ein Teil der Region E1 und gegebenenfalls das Ganze oder ein Teil der Region E3 fehlt.

24. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach Anspruch 22 oder 23, umfassend eine exogene Nukleotidsequenz, die für die schwere Kette des Antikörpers 2F5, ein IRES-Element und die leichte Kette des Antikörpers 2F5 kodiert; wobei die exogene Nukleotidsequenz unter die Kontrolle von Elementen gestellt ist, die für ihre Expression erforderlich sind.

25. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach Anspruch 22 oder 23, umfassend eine exogene Nukleotidsequenz, welche für die Signalsequenz und die extrazellulären Domänen I und II des CD4-Proteins kodiert, die operativ mit der konstanten  $\gamma$ 3-Region (CH2-Scharnierregion und CH3) der schweren Kette des Antikörpers 2F5 fusioniert sind.

26. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach Anspruch 22 oder 23, umfassend eine exogene Nukleotidsequenz, welche für die Signalsequenz und die extrazellulären Domänen I und II des CD4-Proteins kodiert, die operativ mit der konstanten  $\gamma$ 3-Region (CH2-Scharnierregion und CH3) der schweren Kette des Antikörpers 2F5 fusioniert sind, und die operativ mit reifem menschlichem Angiogenin fusioniert ist.

27. Rekombinanter adenoviraler Vektor nach einem der Ansprüche 15 bis 26, dadurch gekennzeichnet, dass die für die Expression erforderlichen Elemente einen Promotor umfassen, der aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus dem frühen adenoviralen E1A-Promotor, dem späten MLP-Promotor (Major Late Promoter), dem murinen oder humanen PGK-(Phosphoglycerat-Kinase-)Promotor, dem frühen Promotor des SV40-Virus, dem Promotor des RSV (Rous-Sarcoma-Virus), einem Promotor, der spezifisch in Tumorzellen aktiv ist, und schließlich einem Promotor, der spezifisch in infizierten Zellen aktiv ist, besteht.

28. Infektiöses virales Partikel, umfassend einen rekombinanten adenoviralen Vektor nach einem der Ansprüche 15 bis 27.

29. Eukaryotische Wirtszelle, umfassend einen rekombinanten adenoviralen Vektor nach einem der Ansprüche 15 bis 27 oder ein infektiöses virales Partikel nach Anspruch 28.

30. Pharmazeutische Zusammensetzung, umfassend einen rekombinanten adenoviralen Vektor nach einem der Ansprüche 15 bis 27, ein infektiöses virales Partikel nach Anspruch 28 oder eine eukaryotische Wirtszelle nach Anspruch 29 in Verbindung mit einem unter pharmazeutischem Gesichtspunkt annehmbaren Träger.

31. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 30, umfassend  $10^4$  bis  $10^{14}$  pfu.

32. Pharmazeutische Zusammensetzung nach Anspruch 30 oder 31, dadurch gekennzeichnet, dass sie in injizierbarer Form vorliegt.

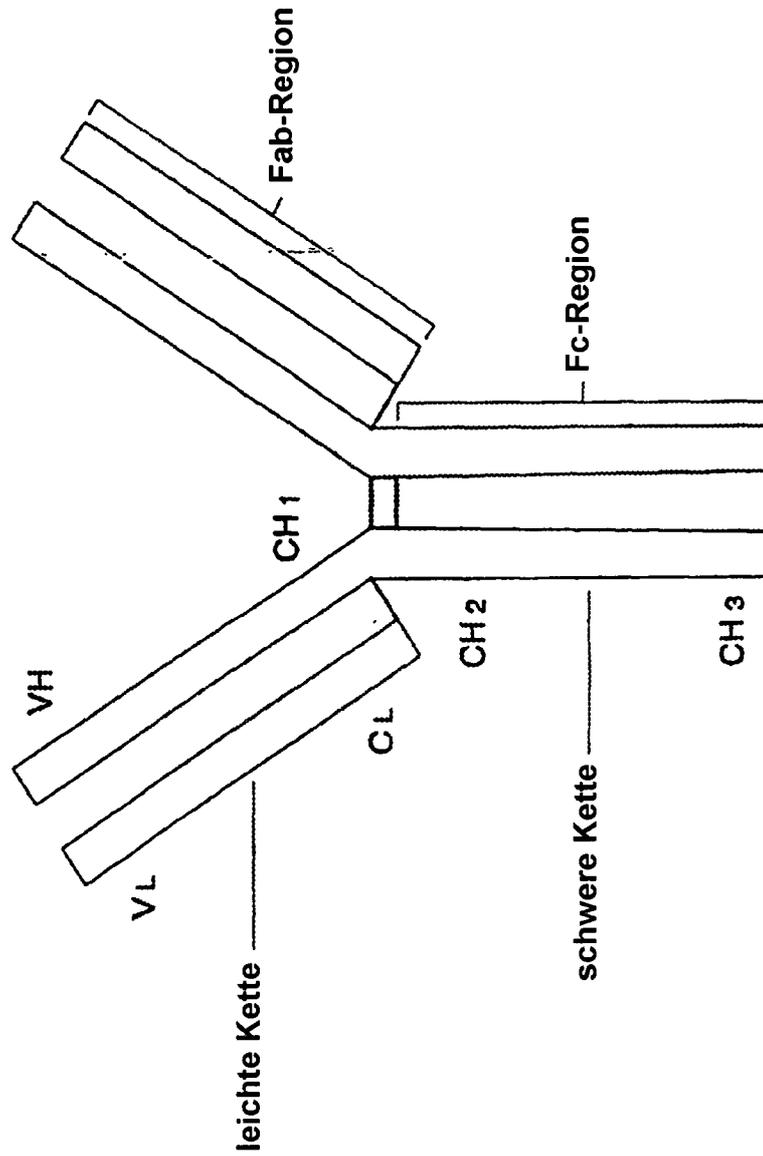
33. Verwendung eines rekombinanten adenoviralen Vektors nach einem der Ansprüche 15 bis 27, eines infektiösen viralen Partikels nach Anspruch 28 oder einer eukaryotischen Wirtszelle nach Anspruch 29 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die zur Behandlung und/oder Vorbeugung des menschlichen oder tierischen Körpers durch Gentherapie bestimmt ist.

34. Verwendung nach Anspruch 33 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die zur Behandlung und/oder Verhütung von erworbenen Krankheiten und insbesondere von Krebsen und von AIDS bestimmt ist.

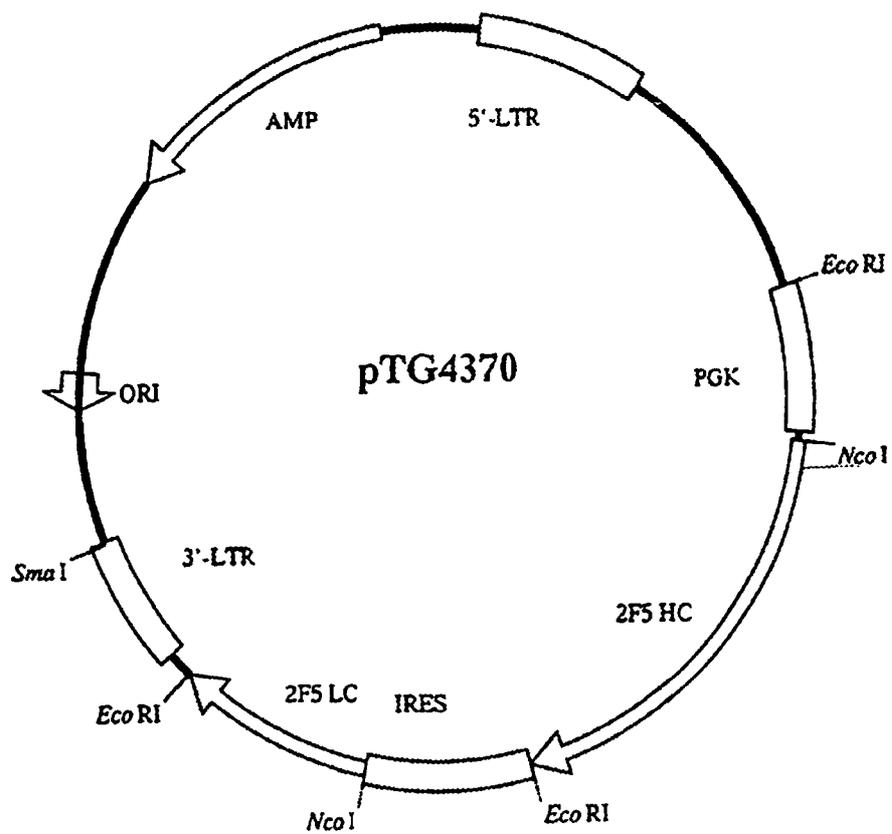
35. Verwendung nach Anspruch 34 für die Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung, die auf intravenösem oder intratumoralem Weg verabreichbar ist.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

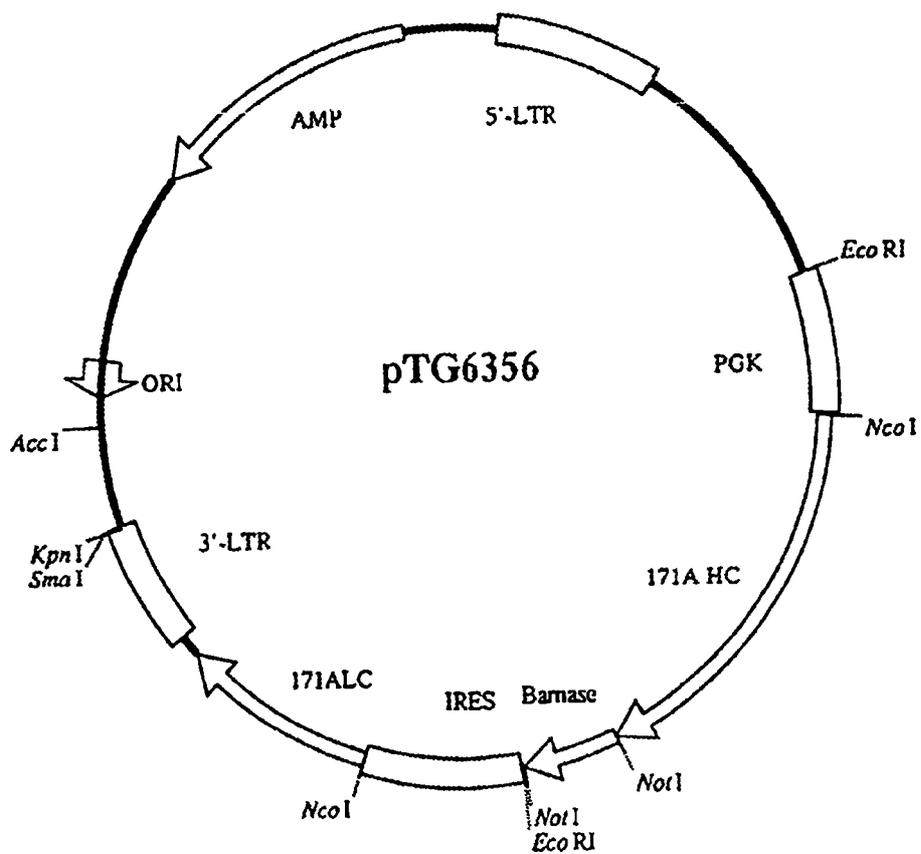
Anhängende Zeichnungen



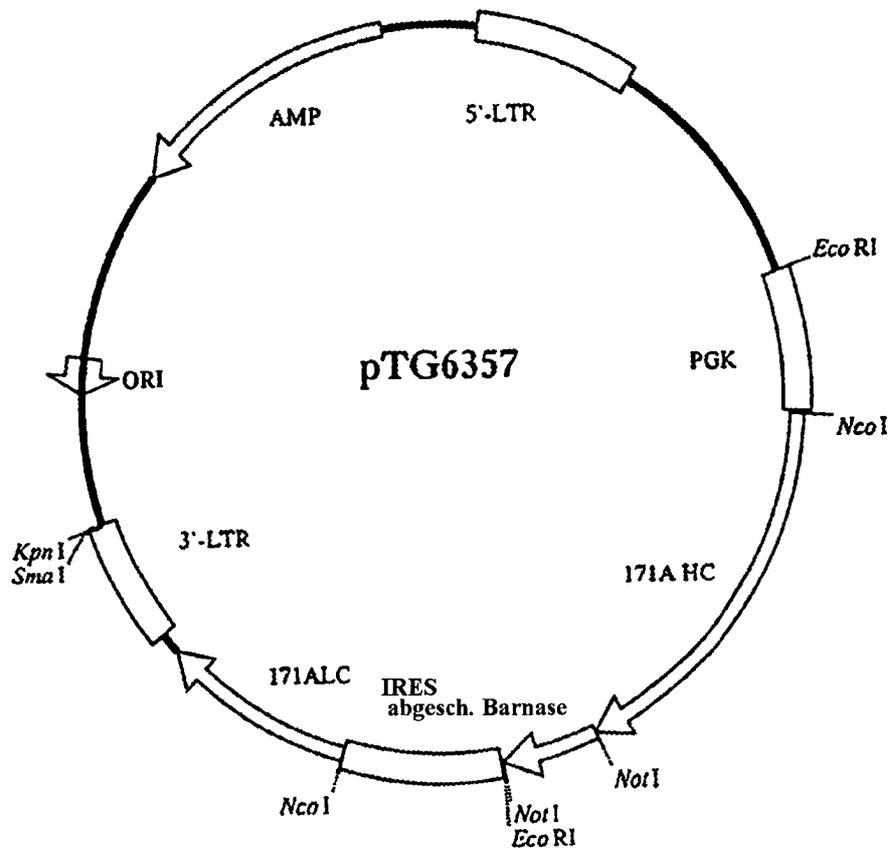
FIGUR 1



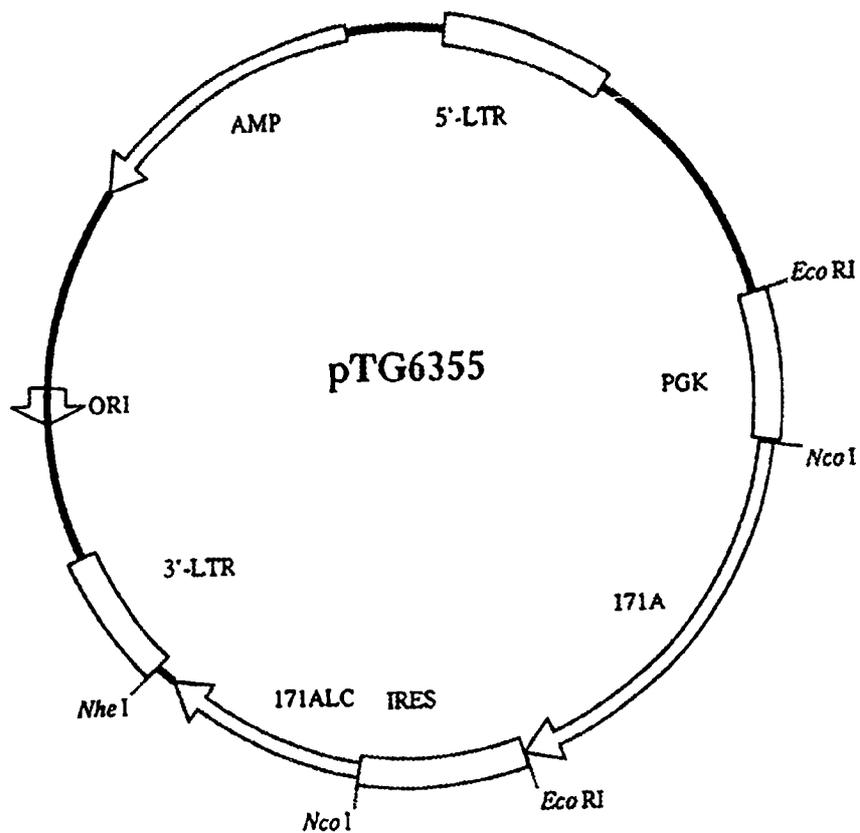
FIGUR 2



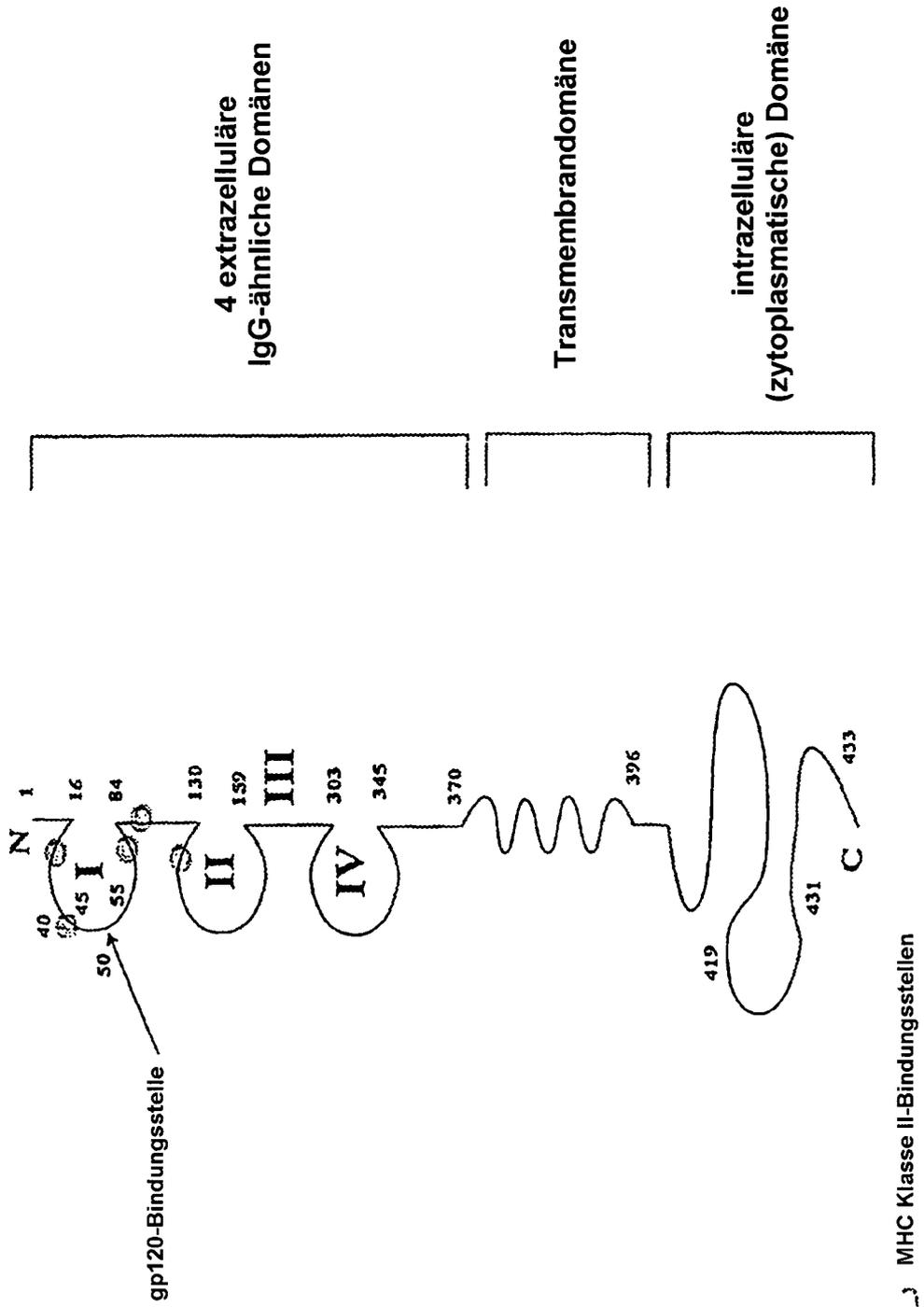
FIGUR 3



FIGUR 4

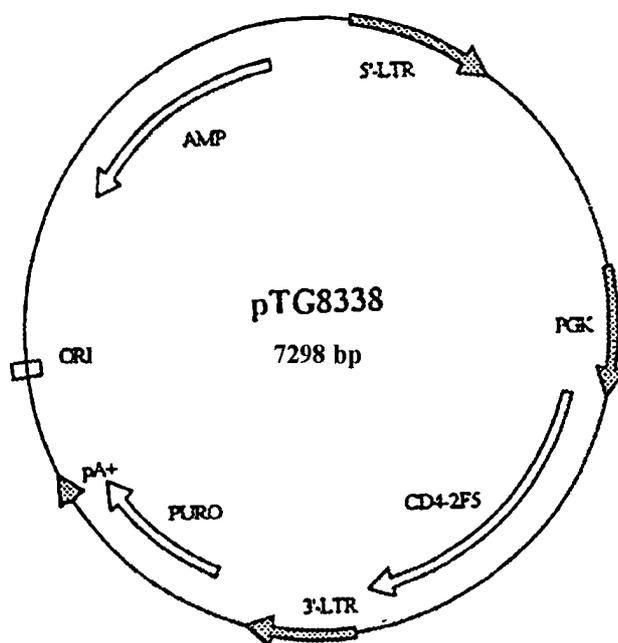


FIGUR 5

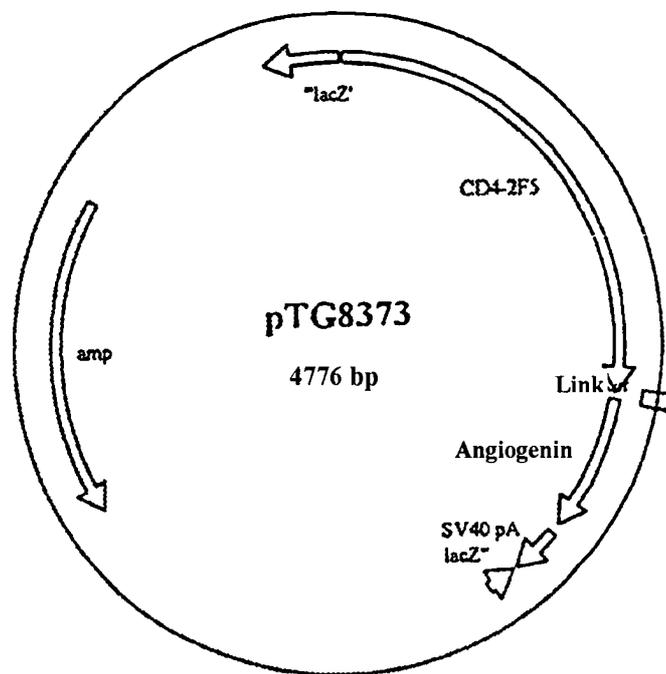


FIGUR 6

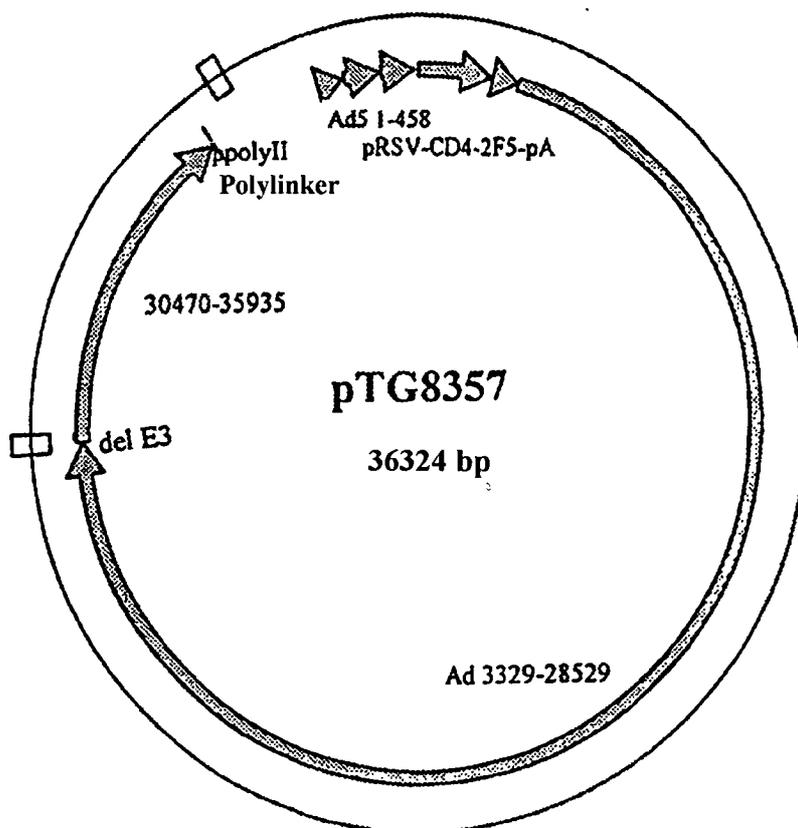




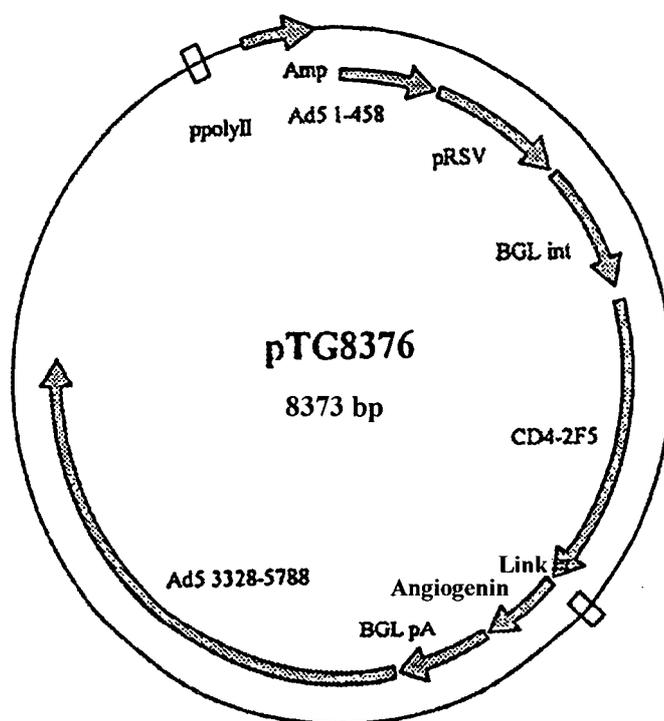
FIGUR 8



FIGUR 9



FIGUR 10



FIGUR 11