



(10) **DE 600 14 489 T3** 2010.08.12

(12) **Übersetzung der geänderten europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 054 064 B2**  
(21) Deutsches Aktenzeichen: **600 14 489.5**  
(96) Europäisches Aktenzeichen: **00 201 738.2**  
(96) Europäischer Anmeldetag: **16.05.2000**  
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **22.11.2000**  
(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **06.10.2004**  
(97) Veröffentlichungstag  
des geänderten Patents beim EPA: **16.12.2009**  
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **12.08.2010**

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: **C12N 15/86** (2006.01)  
**C12N 15/34** (2006.01)  
**C12N 5/10** (2006.01)  
**A61K 48/00** (2006.01)

**Patentschrift wurde im Einspruchsverfahren geändert**

(30) Unionspriorität:  
**99201545**      **17.05.1999**      **EP**

(73) Patentinhaber:  
**Crucell Holland B.V., Leiden, NL**

(74) Vertreter:  
**Patentanwälte von Kreisler, Selting, Werner, 50667  
Köln**

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

(72) Erfinder:  
**Bout, Abraham, 2751 XL Moerkapelle, NL; Vogels,  
Ronald, 3461 HW Linschoten, NL; Havenga,  
Menzo Jans Emco, 2401 KG Alphen aan den Rijn,  
NL**

(54) Bezeichnung: **Von Adenovirus abgeleitete Gentransfervehikel, die zumindest ein Element des Adenovirus Typ  
35 enthalten**

### Beschreibung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft das Gebiet der Gentherapie, insbesondere die Gentherapie, die Elemente einschließt, die von Viren, insbesondere von Elementen von Adenoviren, stammen. Adenoviren sind als geeignete Vehikel zur Übertragung von Genen auf den Wirt vorgeschlagen worden.

**[0002]** Eine Reihe von Eigenschaften von Adenoviren macht sie zur Entwicklung von Genübertragungsvektoren für die humane Gentherapie besonders brauchbar: Das Adenovirus-Genom ist gut charakterisiert. Es besteht aus einem linearen, doppelsträngigen DNA-Molekül aus etwa 36 000 Basenpaaren. Die Adenovirus-DNA enthält identische terminale invertierte Sequenzwiederholungen (ITR) von etwa 90–140 Basenpaaren, wobei die exakte Länge vom Serotyp abhängt. Die viralen Ursprünge der Replikation befinden sich innerhalb der ITR exakt an den Genomenden.

**[0003]** Die Biologie der Adenoviren ist ausführlich charakterisiert; bei immunkompetenten Individuen ist das Adenovirus mit keiner schweren humanen Pathologie assoziiert.

**[0004]** Die Wirksamkeit des Virus zur Einführung seiner DNA in die Wirtszelle ist extrem hoch; das Virus kann eine weite Vielzahl von Zellen infizieren und weist einen breiten Wirtsbereich auf.

**[0005]** Das Virus kann mit hohen Virustitern in großen Mengen hergestellt werden.

**[0006]** Das Virus kann durch die Deletion der frühen Region 1 (E1) des viralen Genoms replikationsdefekt gemacht werden (Brody et al., 1994). Die meisten derzeit in der Gentherapie verwendeten Adenovirus-Vektoren weisen eine Deletion im E1-Bereich auf, wo die gewünschten genetischen Informationen eingeführt werden können.

**[0007]** Auf der Grundlage dieser Eigenschaften nutzen bevorzugte Methoden für die in-vivo-Genübertragung in humane Zielzellen Adenovirus-Vektoren als Vehikel zur Genübertragung. Mit der therapeutischen Verwendung von adenoviralen Vektoren beim Menschen sind aber immer noch Nachteile verbunden. Ein größerer Nachteil besteht im Vorhandensein einer bereits vorhandenen Immunität innerhalb der Bevölkerung gegen Adenoviren. Bei Menschen ist die Exposition von Wildtyp-Adenoviren sehr verbreitet, wie eingehend dokumentiert worden ist [Übersicht in Wadell, 1984]. Diese Exposition hat zu Immunantworten gegenüber den meisten Typen von Adenoviren geführt, nicht nur gegen Adenoviren, denen Personen ausgesetzt wurden, sondern auch gegenüber Adenoviren, die ähnliche (neutralisierende) Epitope aufweisen. Dieses Phänomen der bereits vorhandenen Antikörper in Menschen kann in Kombination mit einer starken sekundären humoralen und zellulären Immunantwort gegen das Virus die Genübertragung mittels rekombinanter Adenovirus-Vektoren ernsthaft beeinflussen.

**[0008]** Bis heute sind sechs verschiedene Untergruppen von humanen Adenoviren vorgeschlagen worden, die insgesamt 51 einzelne Adenovirus-Serotypen umfassen (siehe Tabelle 1). Ein Serotyp ist auf der Grundlage seiner immunologischen Verschiedenartigkeit definiert, die durch eine quantitative Neutralisation mit tierischen Antiseren (Pferd, Kaninchen) bestimmt wird. Wenn die Neutralisation einen bestimmten Grad an Kreuzreaktionen zwischen zwei Viren zeigt, wird eine Verschiedenartigkeit der Serotypen angenommen, wenn A) die Hämagglutinine nicht verwandt sind, wie durch eine fehlende Kreuzreaktion bei der Hämagglutinationsinhibition gezeigt wird, oder B) wesentliche biophysikalische/biochemische Unterschiede der DNA existieren (Francki et al., 1991). Die zuletzt identifizierten neun Serotypen (42–51) wurden erstmals aus HIV-infizierten Patienten isoliert (Hierholzer et al., 1988, Schnurr et al., 1993). Aus Gründen, die nicht gut verstanden sind, kamen in den meisten solcher Patienten mit geschwächtem Immunsystem Adenoviren vor, die aus immunkompetenten Personen selten oder nie isoliert wurden (Hierholzer et al., 1988, 1992, Khoo et al., 1995, De Jong et al., 1998).

**[0009]** Die überwiegende Mehrzahl von Personen hatten zuvor Kontakt mit Adenoviren, insbesondere mit den wohluntersuchten Adenovirus-Serotypen 5 und Typ 2 (Ad5 und Ad2) oder immunologisch verwandten Serotypen. Wichtigerweise sind diese beiden Serotypen auch diejenigen, die zur Verwendung in der humanen Gentherapie am intensivsten untersucht worden sind.

**[0010]** Das erfindungsgemäße Genübertragungsvehikel kann auch Elemente aus anderen (Adeno)Viren umfassen, solange man ein Element, das zur Immunität gegen ein solches Genübertragungsvehikel führen könnte, durch ein Element des Adenovirus 35 oder ein funktionelles Homolog davon ersetzt, das einen geringeren Anteil eines solchen Nachteils aufweist und vorzugsweise einen solchen Nachteil vermeidet, wobei das funktionelle Homolog aus der aus dem Adenovirus 11, 26, 34, 48 und 49 bestehenden Gruppe ausgewählt ist. In

der vorliegenden Erfindung handelt es sich bei einem Genübertragungsvehikel um jedes Vehikel, das dazu fähig ist, eine interessierende Nucleinsäure in eine Wirtszelle zu übertragen. Gemäß der Erfindung muss es ein Element des Adenovirus 35 oder ein funktionelles Äquivalent eines solchen Elements umfassen, das eine vorteilhafte Wirkung bezüglich der Immunantwort gegenüber einem solchen Vehikel aufweisen muss und wobei das funktionelle Äquivalent aus der aus einem Adenovirus-Serotyp 11, 26, 34, 48 und 49 bestehenden Gruppe ausgewählt ist. Im Wesentlichen kann es sich bei allen anderen Elementen, aus denen das Vehikel besteht, um beliebige Elemente handeln, die im Fachgebiet bekannt oder entwickelt sind, solange sie zusammen dazu fähig sind, die interessierende Nucleinsäure zu übertragen. Im Prinzip kann der Fachmann alle Adenovirusprodukte oder -produktionssysteme verwenden und/oder sich diese beschaffen, die auf dem Gebiet der Adenoviren angewandt werden können oder angewandt worden sind. Typischerweise können die Produkte der Erfindung in denjenigen Verpackungszellen hergestellt werden, die z. B. für den Adenovirus 5 brauchbar ist, wobei typischerweise die Vektoren auf der Grundlage des Adenovirus 35 auf dieselbe Weise wie diejenigen anderer Adenoviren, z. B. des Adenovirus 2 und/oder 5, erzeugt und/oder verwendet werden können. Eine gute Übersicht über die Möglichkeiten von minimalen Vektoren, Verpackungssystemen, der intrazellulären Amplifikation, Systemen auf der Grundlage von Vektoren und Plasmiden kann in den anhängigen Anmeldungen (PCT/NL99/00235 und PCT/NL96/00244) des Anmelders gefunden werden. Nichtvirale Übertragungssysteme ebenso wie virale Übertragungssysteme können mit erfindungsgemäßen Elementen erzeugt werden. Beide Arten von System sind in vielen verschiedenen Ansätzen im Fachgebiet wohlbekannt und müssen hier daher nicht näher ausgeführt werden. Eine Übersicht über die vielen verschiedenen Systeme und ihre Eigenschaften sind in Robbins und Ghivizzani (1998) und in Prince (1998) zu finden.

**[0011]** Genübertragungsvehikel enthalten typischerweise eine interessierende Nucleinsäure. Eine interessierende Nucleinsäure kann ein Gen oder ein funktioneller Teil eines Gens (wobei ein Gen jede Nucleinsäure ist, die exprimiert werden kann) oder eine Vorstufe eines Gens oder ein transkribiertes Gen auf jedem Nucleinsäuregrad (DNA und/oder RNA: doppel- oder einsträngig) sein. Interessierende Gene sind im Fachgebiet wohlbekannt und umfassen typischerweise diejenigen, die therapeutische Proteine wie TPA, EPO, Cytokine, Antikörper oder Derivate davon etc. kodieren. Eine Übersicht über therapeutische Proteine, die in der Gentherapie anzuwenden sind, ist nachfolgend aufgeführt. Immunstimulierende Faktoren wie tumorspezifische Antigene, Cytokine etc., Antiangiogene Faktoren; nicht einschränkende Beispiele: Endostatin, Angiostatin, ATF-BPTI, CDT-6, dominant-negative VEGF-Mutanten etc., Angiogene Faktoren, nicht einschränkende Beispiele: VEGF, Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, Stickoxidsynthasen, ein natriuretisches Peptid vom C-Typ etc., entzündungshemmende Proteine wie lösliches CD40, FasL, IL-12, IL-10, IL-4, IL-13 und abgesonderte einkettige Antikörper für CD4, CD5, CD7, CD52, IL-2, IL-1, IL-6, TNF etc. oder abgesonderte einkettige Antikörper des T-Zellen-Rezeptors auf den autoreaktiven T-Zellen. Auch dominant-negative Mutanten von PML können zur Hemmung der Immunantwort verwendet werden.

**[0012]** Weiterhin können Antagonisten der entzündungsfördernden Cytokine verwendet werden, zum Beispiel IL-1RA (Rezeptorantagonist) und lösliche Rezeptoren wie sIL-1RI, sIL-1RII, sTNFR1 und sTNFR2. Das Wachstum und/oder die Immunantwort hemmende Gene wie ceNOS, Bcl3, cactus und I $\kappa$ B $\alpha$ ,  $\beta$  oder  $\gamma$  und die Apoptose induzierende Proteine wie das VP3-Protein des Chicken Anemia Virus können ebenfalls verwendet werden. Weiterhin können Suizidgene wie HSV-TK, Cytosin-Deaminase, Nitroreduktase und Linamerase verwendet werden.

**[0013]** Eine interessierende Nucleinsäure kann auch eine Nucleinsäure sein, die mit einer in der Wirtszelle vorhandenen Nucleinsäuresequenz hybridisieren kann, wodurch die Expression oder Transkription oder Translation der Nucleinsäure gehemmt wird. Sie kann auch durch Cosuppression blockieren. Kurz gefasst ist eine interessierende Nucleinsäure jede Nucleinsäure, mit der man eine Zelle versehen möchte, um eine Antwort durch diese Zelle zu induzieren, wobei es sich bei der Antwort um die Erzeugung eines Proteins, die Hemmung einer solchen Erzeugung, eine Apoptose, Nekrose, Proliferation, Differenzierung etc. handeln kann.

**[0014]** Die vorliegende Erfindung ist die erste, in der der Adenovirus 35 zur therapeutischen Verwendung offenbart ist, daher macht die Erfindung auch einen Adenovirus-Serotypen 35 oder einen davon stammenden chimären Virus oder ein Genübertragungsvehikel auf der Grundlage des Virus oder eines Chimären davon zur Verwendung als Pharmazeutikum verfügbar. Der Serotyp der vorliegenden Erfindung, der Adenovirustyp 35, ist an sich im Fachgebiet bekannt. Es handelt sich um einen ungewöhnlichen Adenovirus der Gruppe B, der aus Patienten mit dem erworbenen Immunschwäche-Syndrom und anderen Immundefekt-Krankheiten isoliert wurde (Flomenberg et al., 1987, De Jong et al., 1983). Es ist gezeigt worden, dass Ad35 sich von der vollständiger charakterisierten Untergruppe C (einschließlich Ad2 und Ad5) hinsichtlich der pathogenen Eigenschaften unterscheidet (Basler et al., 1996). Es ist vorgeschlagen worden, dass dieser Unterschied mit Unterschieden in der E3-Region des Genoms von Ad35 in Zusammenhang steht (Basler et al., 1996). Die DNA von Ad35 ist

partiell kloniert und kartiert worden (Kang et al., 1989 a und b; Valderrama-Leon et al., 1985).

**[0015]** Adenovirus-Serotypen vom Typ B, wie 34 und 35, haben eine andere E3-Region als andere Serotypen. Typischerweise ist dieser Bereich bei der Unterdrückung der Immunantwort gegenüber adenoviralen Produkten involviert. Somit macht die Erfindung ein erfindungsgemäßes Genübertragungsvehikel verfügbar, wodurch die Elemente, die bei der Vermeidung oder Verminderung der Immunantwort involviert sind, E3-Expressionsprodukte des Adenovirus-35 oder die diese codierende Gene umfassen.

**[0016]** Ein weiterer Teil von Adenoviren, die in Immunantworten involviert sind, ist das Kapsid, insbesondere die Penton- und/oder Hexonproteine. Somit macht die Erfindung auch ein erfindungsgemäßes Genübertragungsvehikel verfügbar, wobei die Elemente Adenovirus-35-Kapsidproteine oder einen funktionellen Teil davon einschließlich einer Faser, Penton- und Hexonproteinen oder Gene, die alle drei davon codieren, umfassen. Es ist nicht erforderlich, dass ein komplettes, für die Immunantwort relevantes Protein vom Adenovirus 35 stammt. Es ist sehr wohl möglich, einen Teil einer Adenovirus-Faser, eines Adenovirus-Pentons oder -Hexons in eine andere Faser, ein anderes Penton oder Hexon einzuführen. Somit werden chimäre Proteine erhalten.

**[0017]** Es ist auch möglich, ein Penton eines bestimmten Adenovirus, ein Hexon aus einem weiteren und eine Faser oder eine E3-Region aus noch einem anderen Adenovirus zu haben. Gemäß der Erfindung sollte wenigstens eines der Proteine oder der diese codierenden Gene ein Element aus Adenovirus 35 oder einem funktionellen Homolog davon umfassen, wobei das Element eine Wirkung auf die Immunantwort des Wirtes hat und wobei das funktionelle Homolog aus der aus den Adenovirus-Serotypen 11, 26, 34, 48 und 49 bestehenden Gruppe ausgewählt ist. Somit macht die Erfindung eine erfindungsgemäße Genübertragung verfügbar, bei der es sich um eine Chimäre des Adenovirus 35 mit wenigstens einem anderen Adenovirus handelt. Auf diese Weise kann man auch den resultierenden Virus hinsichtlich anderer Aspekte als der Immunantwort allein modifizieren. Man kann seine Infektionseffizienz mit dafür verantwortlichen Elementen verstärken, man kann seine Replikation auf einer Verpackungszelle verstärken, oder man kann seinen Tropismus ändern.

**[0018]** Somit macht die Erfindung z. B. ein erfindungsgemäßes Genübertragungsvehikel verfügbar, das einen anderen Tropismus als der Adenovirus 35 aufweist. Natürlich sollte der Tropismus vorzugsweise so geändert werden, dass das Genübertragungsvehikel vorzugsweise auf eine Untergruppe der Wirtszellen übertragen wird, d. h. den Zielzellen. Änderungen des Tropismus und andere Änderungen, die in der vorliegenden Erfindung von adenoviralen oder anderen Genübertragungsvehikeln ebenfalls angewandt werden können, sind in den anhängigen Anmeldungen des Anmelders (Nr. 98 204 482.8, 99 200 624.7 und 98 202 297.2) offenbart. Natürlich macht die vorliegende Erfindung alle Bausteine verfügbar, die erforderlich und/oder brauchbar sind, um zu den Genübertragungsvehikeln und/oder Chimären etc. der vorliegenden Erfindung zu gelangen. Dies umfasst Verpackungszellen wie PER.C6 (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) oder Zellen auf der Grundlage davon, die jedoch für Ad35 angepasst sind, es umfasst alle Aminosäuren, die funktionelle Teile des Adenovirus 35 kodieren, wie Helferkonstrukte und Verpackungskonstrukte, sowie Vektoren, die interessierende Gene und z. B. eine ITR etc. umfassen. Typischerweise offenbart die Anmeldung (PCT/NL96/00244) des Anmelders Elemente, die für den Erhalt der gefundenen Genübertragungsvehikel notwendig und brauchbar sind. Somit macht die Erfindung auch eine Nucleinsäure verfügbar, die wenigstens einen funktionellen Teil eines erfindungsgemäßen Genübertragungsvehikels oder einen erfindungsgemäßen Virus oder eine erfindungsgemäße Chimäre davon kodiert. Gemäß der Erfindung müssen solche Elemente, die Funktionen kodieren, die in das resultierende Genübertragungsvehikel gelangen, eine Nucleinsäure umfassen oder von dieser kodiert werden, die wenigstens eines der Elemente des Adenovirus-Serotypen 35 oder ein funktionelles Äquivalent davon, das zur Vermeidung oder Verminderung der Neutralisationsaktivität gegenüber adenoviralen Elementen durch den Host, auf den das Gen zu übertragen ist, kodiert, wobei das funktionelle Äquivalent des Elements von einem Serotypen stammt, der aus der aus den Adenovirus-Serotypen 11, 26, 34, 48 und 49 bestehenden Gruppe ausgewählt ist. Typischerweise wäre das interessierende Gen auf derselben Nucleinsäure vorhanden, was bedeutet, dass eine solche Nucleinsäure ein solches Gen oder eine Stelle zur Einführung eines interessierenden Gens darin aufweist.

**[0019]** Typischerweise umfasst eine solche Nucleinsäure wenigstens eine ITR, und wenn sie eine zu verpackende Nucleinsäure ist, auch ein Verpackungssignal. Wie jedoch oben erwähnt wurde, können alle erforderlichen und brauchbaren Elemente und/oder Bausteine für die vorliegende Erfindung in der Anmeldung (PCT/NL96/00244) des Anmelders gefunden werden. Ein Satz weiterer Verbesserungen auf dem Fachgebiet der Herstellung von adenoviralen Genübertragungsvehikeln ist das Plasmidsystem des Anmelders, das in der hier zuvor erwähnten PCT/NL99/00235 offenbart ist. Dieses System funktioniert in einer Ausführungsform als homologe Rekombination eines Adapterplasmids und eines längeren Plasmids, die zusammen alle Elemente der in das Genübertragungsvehikel einzuarbeitenden Nucleinsäure umfassen. Diese Verfahren können auch

auf die in der vorliegenden Erfindung gefundenen Genübertragungsvehikel und deren Bausteine angewandt werden. Somit macht die Erfindung auch eine erfindungsgemäße Nucleinsäure verfügbar, die weiterhin eine Region von Nucleotiden umfasst, die zur homologen Rekombination entworfen oder brauchbar sind, vorzugsweise wenigstens eines Teils oder als ein Satz von zwei Nucleinsäuren, die eine erfindungsgemäße Nucleinsäure umfassen, wobei der Satz von Nucleinsäuren zu einem einzigen homologen Rekombinationsereignis miteinander fähig ist, was zu einer Nucleinsäure führt, die ein funktionelles Genübertragungsvehikel kodiert. Beide leeren Verpackungszellen (bei denen der zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen Genübertragungsvehikels zu verpackende Vektor noch einzuführen oder herzustellen ist) sowie Zellen, die einen zu verpackenden erfindungsgemäßen Vektor umfassen, werden bereitgestellt. Somit umfasst die Erfindung auch eine Zelle, die eine erfindungsgemäße Nucleinsäure oder einen erfindungsgemäßen Satz von Nucleinsäuren umfasst, vorzugsweise eine Zelle, die die zur adenoviralen Replikation erforderlichen Elemente, die bei der zu verpackenden Nucleinsäure oder bei einem erfindungsgemäßen Satz von Nucleinsäuren fehlen, komplementiert. Bei der vorliegenden Erfindung ist gefunden worden, dass E1-deletierte Vektoren des Adenovirus 35 nicht zur Replikation in Zellen fähig sind, die Adenovirus-5-Proteine in trans verfügbar machen. Die Erfindung macht daher weiterhin eine Zelle verfügbar, die zur Bereitstellung von Adenovirus-35-E1-Proteinen in trans fähig ist. Bei einer solchen Zelle handelt es sich typischerweise um eine humane Zelle, die von der Retina oder der Niere stammt. Es ist gezeigt worden, dass embryonale Zellen wie Aminocyten für die Erzeugung einer E1 komplementierenden Zelllinie besonders geeignet sind. Solche Zellen sind daher in der vorliegenden Erfindung bevorzugt. Eine serotypenspezifische Komplementierung durch E1-Proteine kann auf ein oder mehrere durch die E1-Region kodierte Proteine zurückzuführen sein. Daher ist es wesentlich, dass wenigstens das serotypenspezifische Protein in der komplementierenden Zelllinie in trans bereitgestellt wird. Die nicht-serotypenspezifischen E1-Proteine, die für eine effektive Komplementierung eines E1-deletierten Adenovirus wesentlich sind, können von anderen Adenovirus-Serotypen stammen. Vorzugsweise ist wenigstens ein E1-Protein aus der E1B-Region des Adenovirus 35 in trans ausgebildet, um E1-deletierte Vektoren auf der Grundlage des Adenovirus 35 zu komplementieren. In einer Ausführungsform wird eine die eine oder mehrere serotypenspezifische E1-Proteine codierende Nucleinsäure in die PER.C6-Zelle oder eine von einer PER.C6-Zelle stammende Zelle (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) oder eine ähnliche, Elemente von Ad 35 komplementierende Verpackungszelle eingeführt.

**[0020]** Wie bereits angedeutet, umfasst die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Genübertragungsvehikels, umfassend das Expressieren einer erfindungsgemäßen Nucleinsäure in einer erfindungsgemäßen Zelle und das Ernten des resultierenden Genübertragungsvehikels. Das Obige bezieht sich auf das Füllen von leeren Verpackungszellen mit den betreffenden Nucleinsäuren. Das Format der gefüllten Zelle ist natürlich auch Teil der vorliegenden Erfindung, die ein Verfahren zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen Genübertragungsvehikels verfügbar macht, umfassend das Kultivieren einer gefüllten erfindungsgemäßen Verpackungszelle (produzierende Zelle) in einem geeigneten Kulturmedium und das Ernten des resultierenden Genübertragungsvehikels.

**[0021]** Die resultierenden, durch ein beliebiges der erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen Genübertragungsvehikel, insbesondere auch ein erfindungsgemäßes Genübertragungsvehikel, das von einer Chimäre eines Adenovirus und eines integrierenden Virus stammt, sind natürlich auch Teil der vorliegenden Erfindung. Es ist wohlbekannt, dass adenovirale Genübertragungsvehikel sich normalerweise nicht in das Genom des Wirts integrieren. Für eine langfristige Expression von Genen in einer Wirtszelle ist es daher bevorzugt, Chimären herzustellen, die diese Fähigkeit aufweisen. Solche Chimären sind in unserer anhängigen Anmeldung PCT/NL98/00731 offenbart worden. Ein sehr gutes Beispiel ist eine solche Chimäre eines Adenovirus und eines integrierenden Virus, wobei das integrierende Virus ein adenoassoziiertes Virus ist. Wie oben diskutiert wurde, sind andere brauchbare Chimären, die auch mit dem Obigen kombiniert werden können, Chimären (sei es durch das Vertauschen kompletter Proteine oder von Teilen davon oder beides) mit einem geänderten Tropismus. Ein sehr gutes Beispiel dafür ist eine Chimäre von Ad 35 und Ad 16, gegebenenfalls mit Elementen aus beispielsweise Ad 2 oder Ad 5, wobei der tropismusbestimmende Teil von Ad 16 verwendet wird, um das Genübertragungsvehikel zu Synoviocyten und/oder glatten Muskelzellen zu leiten (siehe unsere anhängigen Anmeldungen Nr. 98 204 482.8 und 99 200 624.7). Dendritische Zellen (DC) und hämopoetische Stammzellen (HSC) werden nicht leicht durch von Ad2 oder Ad5 stammenden Genübertragungsvehikel transduziert. Die vorliegende Erfindung macht Genübertragungsvehikel verfügbar, die eine erhöhte Transduktionskapazität von DC- und HSC-Zellen aufweisen. Solche Genübertragungsvehikel umfassen wenigstens den den Gewebetropismus bestimmenden Teil eines Ad35-Adenovirus. Die Erfindung macht daher weiterhin die Verwendung eines den Gewebetropismus bestimmenden Teils eines Adenovirus-35-Kapsids zur Transduktion von dendritischen Zellen und/oder hämopoetischen Stammzellen verfügbar. Andere Adenoviren vom B-Typ sind ebenfalls geeignet. Ein den Gewebetropismus bestimmender Teil umfasst wenigstens die Verdickung und/oder den Schaft eines Faserproteins. Natürlich ist es einem Fachmann sehr wohl möglich, die für den Gewebetropismus

im Faserprotein verantwortlichen Aminosäuresequenzen zu bestimmen. Solche Kenntnisse können zum Entfernen von chimären Proteinen, die solche Aminosäuresequenzen enthalten, verwendet werden. Daher sind solche chimären Proteine auch Teil der Erfindung. DC-Zellen sind sehr effiziente antigenpräsentierende Zellen. Durch die Einführung des Genübertragungsvehikels in solche Zellen kann das Immunsystem des Wirtes in Richtung auf spezielle Antigene getriggert werden. Solche Antigene können durch eine zur DC übertragene Nucleinsäure oder durch die Proteine des Genübertragungsvehikels selbst kodiert werden. Die vorliegende Erfindung macht daher auch ein Genübertragungsvehikel mit der Fähigkeit zur Umgehung des Immunsystems des Wirtes als Vakzin verfügbar. Der Vektor ist dazu fähig, das Immunsystem lange genug zu umgehen, um wirksam seine Zielzellen zu finden, und ist gleichzeitig dazu fähig, spezielle Antigene auf antigenpräsentierende Zellen zu übertragen, wodurch die Induktion und/oder Stimulation einer effizienten Immunantwort gegenüber dem (den) speziellen Antigen(en) ermöglicht wird. Um die Immunantwort weiter zu modulieren, kann das Genübertragungsvehikel Proteine und/oder solche Proteine codierende Nucleinsäuren umfassen, die zur Modulation einer Immunantwort fähig sind. Nicht einschränkende Beispiele für solche Proteine werden unter den Interleukinen, den Adhäsionsmolekülen, den costimulierenden Proteinen, den Interferonen etc. gefunden. Die Erfindung macht daher weiterhin ein Vakzin verfügbar, das ein Genübertragungsvehikel der Erfindung umfasst. Die Erfindung macht weiterhin einen Adenovirus-Vektor mit der Fähigkeit zur effizienten Transduktion von DC und/oder HSC verfügbar, wobei das Vehikel wenigstens einen den Gewebetropismus bestimmenden Teil des Adenovirus-Serotypen 35 umfasst. Die Erfindung macht weiterhin die Verwendung solcher Übertragungsvehikel zur Transduktion von HSC und/oder DC-Zellen verfügbar. Ähnliche Gewebetropismen werden bei anderen Adenoviren vom Serotyp B, insbesondere beim Serotyp 11, gefunden, und sind auch Teil der Erfindung. Natürlich ist es auch möglich, andere Genübertragungsvehikel mit dem einen Gewebetropismus bestimmenden Teil zu versehen, wodurch solche Übertragungsvehikel mit einer erhöhten DC- und/oder HSC-Transduktionsfähigkeit erhalten werden. Solche Genübertragungsvehikel sind daher auch Teil der Erfindung.

**[0022]** Die erfindungsgemäßen Genübertragungsvehikel können zur Übertragung von interessierenden Genen und Nucleinsäuren auf Wirtszellen verwendet werden. Dabei handelt es sich typischerweise um eine pharmazeutische Verwendung. Eine solche Verwendung ist in die vorliegende Erfindung eingeschlossen. Für eine solche Verwendung geeignete Zusammensetzungen sind ebenfalls Teil der vorliegenden Erfindung. Die Menge des Genübertragungsvehikels, die pro Dosis oder pro Infektion vorhanden sein muss (MOI), hängt von dem zu behandelnden Zustand, dem Verabreichungsweg (typischerweise parenteral), dem Patienten und der Infektionseffizienz etc. ab. Untersuchungen zur Dosisbestimmung sind im Fachgebiet wohlbekannt, und diejenigen, die bereits mit anderen (adenoviralen) Genübertragungsvehikeln durchgeführt worden sind, können typischerweise als Anleitung zum Auffinden von geeigneten Dosen der erfindungsgemäßen Genübertragungsvehikel verwendet werden. Typischerweise kann man dort auch geeignete Trägermittel, geeignete Verabreichungsmittel, geeignete Mittel zur Verhinderung einer Infektion mit dem Vehikel dort, wo dies nicht erwünscht ist, etc. finden. Somit macht die vorliegende Erfindung auch eine pharmazeutische Formulierung verfügbar, die ein erfindungsgemäßes Genübertragungsvehikel und ein geeignetes Trägermittel umfasst, sowie eine pharmazeutische Formulierung, die einen erfindungsgemäßen Adenovirus oder eine Chimäre davon und ein geeignetes Trägermittel umfasst.

#### Ausführliche Beschreibung

**[0023]** Wie oben beschrieben wurde, sind die am intensivsten untersuchten Serotypen von Adenoviren nicht idealerweise zur Übertragung von zusätzlichem genetischen Material in Wirtszellen geeignet. Dies ist teilweise auf die in der Bevölkerung bereits vorhandene Immunität gegen diese Serotypen zurückzuführen. Dieses Vorhandensein von bereits vorhandenen Antikörpern in Menschen beeinflusst zusammen mit einer starken sekundären humoralen und zellulären Immunantwort gegen den Virus die adenovirale Gentherapie.

**[0024]** Die vorliegende Erfindung macht die Verwendung wenigstens von Elementen eines Adenovirus-Serotypen verfügbar, die als Gentherapie-Vektoren sehr geeignet sind. Die vorliegende Erfindung offenbart auch ein automatisiertes, mit hohem Durchsatz erfolgreiches Screening aller bekannten Adenovirus-Serotypen gegen Seren aus vielen Personen verfügbar. Überraschenderweise wurde in keinem der Seren, die gegen einen bestimmten Serotypen, den Adenovirus 35 (Ad35) ausgewertet wurden, eine neutralisierende Fähigkeit gefunden. Dies macht den Serotypen der vorliegenden Erfindung als Vektorsystem für die Gentherapie beim Menschen extrem geeignet. Ein solches Vektorsystem ist dazu fähig, genetisches Material auf eine humane Zelle effizient und ohne das inhärente Problem einer bereits bestehenden Immunität zu übertragen. Typischerweise wird ein Virus unter Verwendung eines adenoviralen Vektors (typischerweise eines Plasmids, eines Cosmids oder eines Baculovirus-Vektors) erzeugt. Solche Vektoren sind natürlich auch Teil der vorliegenden Erfindung. Die Erfindung macht auch von Adenovirus stammende Vektoren verfügbar, die durch die Deletion oder Inaktivierung der E1-Region replikationsdefekt gemacht wurden. Natürlich kann auch ein interessierendes Gen zum

Beispiel an der Stelle von E1 des ursprünglichen Adenovirus, von dem der Vektor stammt, eingeführt werden. In allen Aspekten der Erfindung können die Adenoviren Deletionen im E1-Bereich und Insertionen von heterologen Genen enthalten, die mit einem Promoter verbunden sind oder auch nicht. Weiterhin können die Adenoviren Deletionen in den Regionen E2, E3 oder E4 und Insertionen oder heterologe Gene enthalten, die an einen Promoter gebunden sind. In diesen Fällen sind E2 und/oder E4 komplementierende Zelllinien zur Erzeugung von rekombinanten Adenoviren erforderlich.

**[0025]** Man kann sich aussuchen, den Ad35-Serotypen selbst zur Herstellung rekombinanter, in der Gentherapie zu verwendenden Adenoviren zu verwenden. Alternativ kann man sich aussuchen, Elemente zu verwenden, die vom Serotypen der vorliegenden Erfindung in solchen rekombinanten Adenoviren stammen. Man kann zum Beispiel einen chimären Adenovirus entwickeln, der wünschenswerte Eigenschaften verschiedener Serotypen vereinigt. Einige Serotypen haben einen etwas eingeschränkten Wirtsbereich, aber den Vorteil, weniger immunogen zu sein, und bei anderen ist es umgekehrt. Einige weisen das Problem auf, eine beschränkte Virulenz aufzuweisen, haben aber einen weiten Wirtsbereich und/oder eine verminderte Immunogenität. Solche chimären Adenoviren sind im Fachgebiet bekannt, und es ist vorgesehen, dass sie in den Rahmen der vorliegenden Erfindung fallen. Somit macht die Erfindung in einer Ausführungsform einen chimären Adenovirus verfügbar, der wenigstens einen Teil des Adenovirus-Genoms des vorliegenden Serotyps, der diesen mit dem Fehlen einer bereits bestehenden Immunität ausstattet, und wenigstens einen Teil des Adenovirus-Genoms aus einem anderen Adenovirus-Serotypen umfasst, was in einem chimären Adenovirus resultiert. Auf diese Weise ist der erzeugte chimäre Adenovirus so beschaffen, dass er das Fehlen einer bereits bestehenden Immunität des Serotypen der vorliegenden Erfindung mit anderen Merkmalen eines anderen Serotypen kombiniert. Bei solchen Merkmalen kann es sich um die Temperaturbeständigkeit, eine Assembly, eine Verankerung, eine umorientierte Infektion, eine Produktionsausbeute, eine umorientierte oder verbesserte Infektion, die Beständigkeit der DNA in der Zielzelle etc. handeln. Gewöhnlich wird eine Verpackungszelle benötigt, um eine ausreichende Menge von Adenoviren zu erzeugen. Zur Herstellung von rekombinanten Adenoviren zu Zwecken der Gentherapie sind mehrere Zelllinien verfügbar. Diese umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, die bekannten Zelllinien PER.C6 (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940), 911, 293 und E1 A549.

**[0026]** Ein wichtiges Merkmal der vorliegenden Erfindung ist das Mittel zur Erzeugung des Adenovirus. Typischerweise wünscht man nicht, dass eine Adenoviruscharge für klinische Anwendungen einen replikationsfähigen Adenovirus enthält. Im Allgemeinen ist es daher erwünscht, eine Anzahl Gene (aber wenigstens einen) aus dem adenoviralen Genom im adenoviralen Vektor wegzulassen und diese Gene dem Genom der Zelle, in der der Vektor zur Erzeugung von chimären Adenoviren gebracht wird, zuzuführen. Eine solche Zelle wird gewöhnlich als Verpackungszelle bezeichnet. Die Erfindung macht daher auch eine Verpackungszelle zur Erzeugung eines erfindungsgemäßen Adenovirus (eines Genübertragungsvehikels) verfügbar, der in trans alle diejenigen zur Erzeugung eines Adenovirus erforderlichen Elemente umfasst, die im erfindungsgemäßen adenoviralen Vektor nicht vorhanden sind. Typischerweise müssen der Vektor und die Verpackungszelle aneinander angepasst werden, damit sie alle erforderlichen Elemente aufweisen, sie haben aber keine überlappenden Elemente, die durch Rekombination zu einem replikationsfähigen Virus führen. Somit macht die vorliegende Erfindung auch einen Satz von Teilen verfügbar, umfassend eine erfindungsgemäße Verpackungszelle und einen erfindungsgemäßen rekombinanten Vektor, wodurch es im Wesentlichen keine Sequenzüberlappung gibt, die zu einer Rekombination führt, die zur Erzeugung eines replikationsfähigen Adenovirus zwischen der Zelle und dem Vektor führt.

**[0027]** Somit macht die vorliegende Erfindung Verfahren zur Herstellung eines bei einer Anwendung eine bereits vorhandene humorale Immunität umgehenden Adenovirus verfügbar, umfassend die Bereitstellung eines Vektors mit Elementen, die von einem Adenovirus-Serotypen stammen, gegen den praktisch keine natürliche Immunität besteht, und das Transfizieren des Vektors in einer erfindungsgemäßen Verpackungszelle und das Produzierenlassen von viralen Partikeln.

**[0028]** In einem Aspekt beschreibt diese Erfindung die Verwendung des Adenovirus-Serotypen der vorliegenden Erfindung zur Überwindung einer natürlich auftretenden oder induzierten neutralisierenden Wirtsaktivität gegenüber in vivo für therapeutische Anwendungen verabreichten Adenoviren. Der Bedarf an einem neuen Serotypen wird durch Beobachtungen unterstrichen, wonach 1) eine wiederholte systemische Verabreichung des rekombinanten Adenovirus-Serotypen 5 aufgrund der Bildung von hohen Titern neutralisierender Antikörper gegen den rekombinanten Adenovirus-Serotyp 5 erfolglos ist (Schulik et al., 1997) und 2) eine bereits vorhandene oder humorale Immunität in der Bevölkerung weitverbreitet ist.

**[0029]** In einem anderen Aspekt macht die vorliegende Erfindung die Verwendung von Genübertragungsvehikeln der Erfindung oder die Verwendung des Adenovirus-Serotypen 35 für Impfpurposes verfügbar. Eine sol-

che Verwendung verhindert wenigstens teilweise unerwünschte Immunreaktionen des Wirtes. Nicht einschränkende Beispiele für unerwünschte Immunantworten sind das Hervorrufen einer Immunantwort gegen das Genübertragungsvehikel oder den Adenovirus-Serotypen 35 und/oder die Verstärkung einer Immunantwort gegen das Genübertragungsvehikel oder den Adenovirus-Serotypen 35. In einem anderen Aspekt der Erfindung wird eine andere Nutzung von zu verschiedenen Untergruppen gehörenden Ad-Vektoren gemacht. Dieser Aspekt der Erfindung umgeht daher die Unfähigkeit zur Wiederholung der Verabreichung eines Adenovirus für Zwecke der Gentherapie.

#### Beispiel 1

Mit hohem Durchsatz erfolgreicher Assay zum Nachweis einer neutralisierenden Wirkung in humanem Serum

**[0030]** Um ein Screening einer großen Menge an humanem Serum auf das Vorhandensein neutralisierender Antikörper gegen alle Adenovirus-Serotypen zu ermöglichen, wurde ein automatisierter Assay für 96 Näpfe entwickelt.

#### Humane Seren

**[0031]** Eine Gruppe von 100 Personen wurde ausgewählt. Freiwillige (50% männlich, 50% weiblich) waren gesunde Individuen mit einem Alter zwischen 20 und 60 und ohne Einschränkungen hinsichtlich der Rasse. Alle Freiwilligen unterschrieben ein Einverständnisformular. Personen, die berufsmäßig mit der Adenovirus-Forschung zu tun haben, wurden ausgeschlossen.

**[0032]** Etwa 60 ml Blut wurde in trockene Röhrchen abgezogen. Innerhalb von 2 h nach der Probennahme wurde das Blut für 10 min bei 2500 U./min zentrifugiert. Etwa 30 ml Serum wurden in Polypropylenröhrchen übertragen und gefroren bei  $-20^{\circ}\text{C}$  bis zur Weiterverwendung aufbewahrt.

**[0033]** Serum wurde aufgetaut und für 10 min bei  $56^{\circ}\text{C}$  durch Wärme inaktiviert und dann aliquot aufgeteilt, um wiederholte Gefrier-/Tau-Zyklen zu vermeiden. Ein Teil wurde zur Herstellung von fünf Stufen von zweifachen Verdünnungen in einem Medium (DMEM, Gibco BRL) in einer Menge, die zum Füllen von etwa 70 Platten mit je 96 Näpfen ausreichend war, verwendet. Aliquote Teile von unverdünnten und verdünnten Seren wurden in Platten mit tiefen Näpfen (Format mit 96 Näpfen) pipettiert und unter Verwendung eines programmierten PlateMate als aliquote 100- $\mu\text{l}$ -Teile Platten mit 96 Näpfen zudosiert. Auf diese Weise wurden die Platten nach dem unten aufgeführten Schema mit acht verschiedenen Seren in duplo (100  $\mu\text{l}$ /Napf) beladen:

S1/2	S1/4	S1/8	S1/16	S1/32	S5/2	S5/4	S5/8	S5/16	S5/32	-	-
S1/2	S1/4	S1/8	S1/16	S1/32	S5/2	S5/4	S5/8	S5/16	S5/32	-	-
S2/2	S2/4	S2/8	S2/16	S2/32	S6/2	S6/4	S6/8	S6/16	S6/32	-	-
S2/2	S2/4	S2/8	S2/16	S2/32	S6/2	S6/4	S6/8	S6/16	S6/32	-	-
S3/2	S3/4	S3/8	S3/16	S3/32	S7/2	S7/4	S7/8	S7/16	S7/32	-	-
S3/2	S3/4	S3/8	S3/16	S3/32	S7/2	S7/4	S7/8	S7/16	S7/32	-	-
S4/2	S4/4	S3/8	S3/16	S3/32	S8/2	S8/4	S8/8	S8/16	S8/32	-	-
S4/2	S4/4	S3/8	S3/16	S3/32	S8/2	S8/4	S8/8	S8/16	S8/32	-	-

**[0034]** Während S1/2 bis S8/2 in den Spalten 1 und 6 ein Mal verdünnte Seren darstellen, stellen Sx/4, Sx/8, Sx/16 und Sx/32 die zweifachen seriellen Verdünnungen dar. Die letzten Platten enthielten auch vier Näpfe, die mit 100  $\mu\text{l}$  fötalem Kalbsserum als Negativkontrolle befüllt waren. Die Platten wurden bis zur Weiterverwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gehalten.

#### Herstellung von humanem Adenovirus-Ausgangsmaterial

**[0035]** Prototypen aller bekannten humanen Adenoviren wurden in T25-Kolben, die mit PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) (Fallaux et al., 1998) beimpft waren, inokuliert und nach einem vollständigen CPE geerntet. Nach einem Gefrieren/Auftauen wurden 1–2 ml der rohen Lysate zum Inokulieren eines T80-Kolbens mit PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) beimpft, und das Virus wurde bei einem vollständigen CPE geerntet. Der Zeitrahmen zwischen der Inokulierung und dem Auftreten eines CPE sowie die Virusmenge, die zum Reinfizieren einer neuen Kultur erforderlich war, variierte zwischen den Serotypen. Adenovirus-Ausgangsmaterialien wurden durch Gefrieren/Auftauen hergestellt und zum Inokulie-

ren von 3–4 T175-cm<sup>2</sup>-Dreischichtkolben mit PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) verwendet. Beim Auftreten eines CPE wurden Zellen durch ein Rütteln des Kolbens geerntet, granuliert, und Virus wurde isoliert und mittels eines zweistufigen CsCl-Gradienten wie folgt gereinigt. Zellgranulat wurde in einem 50 ml eines Puffers aus 10 mM NaPO<sub>4</sub> (pH-Wert 7,2) gelöst und bei –20°C gefroren. Nach einem bei 37°C erfolgenden Auftauen wurden 5,6 ml Natriumdeoxycholat (5% Gew./Vol.) zugegeben. Die Lösung wurde vorsichtig gemischt und 5–15 min lang bei 37°C inkubiert, um die Zellen vollständig zu lysieren. Nach einem Homogenisieren der Lösung wurden 1875 µl 1 M MgCl<sub>2</sub> zugegeben. Nach der Zugabe von 375 µl DNase (10 mg/ml) wurde die Lösung 30 min lang bei 37°C inkubiert. Zellrückstände wurden durch ein 30minütiges, bei RT ohne Bremse erfolgreiches Zentrifugieren bei 1880 × g entfernt. Der Überstand wurde anschließend durch Extraktion mit Freon (3 x) von Proteinen gereinigt. Der gereinigte Überstand wurde auf einen mit 1 M Tris/HCl gepufferten Cäsiumchlorid-Blockgradienten (Bereich: 1,2/1,4 g/ml) aufgegeben und für 2,5 h bei 10°C mit 21 000 U./min zentrifugiert. Das Virusband wird isoliert, wonach eine zweite Reinigung mittels eines mit 1 M Tris/HCl gepufferten kontinuierlichen Gradienten von 1,33 g/ml Cäsiumchlorid durchgeführt wurde. Das Virus wurde dann für 17 h bei 10°C mit 55 000 U./min zentrifugiert. Das Virusband wird isoliert, und Saccharose (50% Gew./Vol.) wird bis zu einer Endkonzentration von 1 zugegeben. Überschüssiges Cäsiumchlorid wird durch Dialyse (drei Mal für 1 h bei Raumtemperatur) in Dialyse-Objektträgern (Slide-a-lizer, Ausschlussgrenze 10 000 kDa, Pierce, USA) gegen 1,5 l PBS, unterstützt durch CaCl<sub>2</sub> (0,9 mM), MgCl<sub>2</sub> (0,5 mM) und eine steigende Saccharosekonzentration (1, 2, 5%) entfernt. Nach der Dialyse wird das Virus aus dem Slide-a-lizer entfernt, wonach es in Portionen von 25 und 100 µl aliquot aufgeteilt wird, wonach das Virus bei –85°C aufbewahrt wird.

**[0036]** Zur Bestimmung der Anzahl Viruspartikel pro Milliliter werden 50 µl der Viruscharge gemäß der Beschreibung von Shabram et al. (1997) in einen Hochdruck-Flüssigchromatographen (HPLC) aufgegeben. Viren wurden unter Verwendung eines von 0 bis 600 mM reichenden NaCl-Gradienten eluiert. Wie in Tabelle I gezeigt sich die NaCl-Konzentration, bei der die Viren eluiert wurden, signifikant zwischen den Serotypen.

**[0037]** Die meisten humanen Adenoviren vermehrten sich in PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) mit einigen Ausnahmen gut. Die Adenovirustypen 8 und 40 wurden in 911-E4-Zellen (He et al., 1998) gezüchtet. Gereinigte Ausgangsmaterialien enthielten zwischen  $5 \times 10^{10}$  und  $5 \times 10^{12}$  Viruspartikel/ml (VP/ml, siehe Tabelle I).

**[0038]** Titration von gereinigten humanen Adenovirus-Ausgangsmaterialien Adenoviren wurden in PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) titriert, um die Virusmenge zu bestimmen, die erforderlich ist, um einen vollen CPE innerhalb von 5 Tagen, der Zeitdauer des Neutralisationsassays, zu erhalten. Dazu wurden 100 µl Medium in jeden Napf von Platten mit 96 Nöpfen dosiert. 25 µl Adenovirus-Ausgangsmaterialien, die um  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$  oder  $10^7$  Mal vorverdünnt waren, wurden in die 2. Längsreihe einer Platte mit 96 Nöpfen gegeben und durch ein 10maliges Herauf- und Herunterpipettieren vermischt. Dann wurden 25 µl von der 2. Längsreihe in die 3. Längsreihe übertragen und erneut vermischt. Dies wurde bis zur 11. Längsreihe wiederholt, wonach 25 µl der 11. Längsreihe verworfen wurden. Auf diese Weise wurden ausgehend von einem vorverdünnten Ausgangsmaterial serielle Verdünnungen in 5er-Schritten erhalten. Dann wurden  $3 \times 10^4$  PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) in einem 100-µl-Volumen zugegeben, und die Platten wurden für fünf oder sechs Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der CPE wurde mikroskopisch überwacht. Zur Berechnung der eine 50-%ige Hemmung der Zellkultur bewirkenden Dosis (CCID<sub>50</sub>) wurde das Verfahren von Reed und Muensch angewandt. Parallel wurden identische Platten eingerichtet, die mittels des MTT-Assays (Promega) analysiert wurden. Bei diesem Assay werden lebende Zellen durch eine kolorimetrische Färbung quantifiziert. Dazu wurden 20 µl MTT (7,6 mg/ml in PBS) in die Nöpfe gegeben und für 2 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, inkubiert. Der Überstand wurde entfernt, und 100 µl einer 20:1-Lösung von Isopropanol/Triton-X100 wurde in die Nöpfe gegeben. Die Platten wurden für 3–5 min auf einen Schüttler für 96 Nöpfe gegeben, um ausgefallenes angefärbtes Material löslich zu machen. Die Extinktion wurde bei 540 nm und bei 690 nm (Hintergrund) gemessen. Mit diesem Assay können Assaywells mit einem fortschreitenden CPE oder einem vollen CPE unterschieden werden.

#### Neutralisationsassay

**[0039]** Platten mit 96 Nöpfen mit verdünnten Proben von humanem Serum wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> aufgetaut. Adenovirus-Ausgangsmaterial, das auf 200 CCID<sub>50</sub> auf 50 µl verdünnt war, wurde hergestellt, und 50-µl-Aliquote wurden zu den Längsreihen 1–11 der Platten mit Serum gegeben. Die Platten wurden für 1 h bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, inkubiert. Dann wurden 50 µl PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) mit  $6 \times 10^9$ /ml allen Nöpfen zudosiert und für 1 d bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, inkubiert. Der Überstand wurde mit frischen Pipettenspitzen für jede Querreihe entfernt, und 200 µl frisches Medium wurde allen Nöpfen zugegeben, um toxische Wirkungen des Serums zu vermeiden. Platten wurden für weitere 4 Tage bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, inkubiert.

Darüber hinaus wurden parallele Kontrollplatten mit verdünnten positiven Kontrollseren, die in Kaninchen erzeugt wurden und für jeden zu testenden Serotypen spezifisch waren, in Duplikat in den Längsreihen A und B und mit dem negativen Kontrollserum (FCS) in den Längsreihen C und D eingerichtet. Auch in jeder der Längsreihen E–H wurde eine Titration wie oben beschrieben in Schritten von fünffachen Verdünnungen durchgeführt, wobei mit 200 CCID<sub>50</sub> eines jeden zu testenden Virus begonnen wurde. Am 5. Tag der Kontrolle wurde eine der Kontrollplatten mikroskopisch und mit dem MTT-Assay analysiert. Der experimentelle Titer wurde aus der mikroskopisch untersuchten Kontroll-Titrationsplatte bestimmt. Wenn gefunden wurde, dass der CPE vollständig war, d. h. bei der ersten Verdünnung in dem mittels MTT analysierten Kontroll-Titrationsexperiment, bei der ein klarer Zelltod auftrat, wurden alle Assayplatten weiterverarbeitet. War dies nicht der Fall, wurde der Assay für einen bis mehrere Tage fortgesetzt, bis ein vollständiger CPE offensichtlich war, wonach alle Platten weiterverarbeitet wurden. In den meisten Fällen wurde der Assay am 5. Tag beendet. Für Ad1, 5, 33, 39, 42 und 43 dauerte der Assay sechs Tage, und bei Ad2 dauerte er acht Tage.

**[0040]** Eine Serumprobe wird als nicht neutralisierend betrachtet, wenn bei der höchsten Serumkonzentration im Vergleich zu den Kontrollen ohne Serum ein maximaler Schutz von 40% zu sehen ist.

**[0041]** Die Ergebnisse der Analyse von 44 Prototyp-Adenoviren gegen Serum von 100 gesunden Freiwilligen sind in [Fig. 1](#) dargestellt. Wie erwartet, war der Prozentwert der Serumproben, die neutralisierende Antikörper gegen Ad2 und Ad5 enthielten, sehr hoch. Dies galt auch für die meisten der Adenoviren mit kleineren Nummern. Überraschenderweise enthielt keine der Serumproben neutralisierende Antikörper gegen den Adenovirus-Serotypen 35. Auch die Zahl der Personen mit neutralisierenden Antikörper-Titern gegenüber den Serotypen 26, 34 und 48 war sehr niedrig.

**[0042]** Daher weisen rekombinante, E1-deletierte Adenoviren auf der Grundlage von Ad35 oder einem der anderen, oben erwähnten Serotypen im Vergleich zu rekombinanten Vektoren auf der Grundlage von Ad5 mit Bezug auf die Clearance der Viren durch neutralisierende Antikörper einen wichtigen Vorteil auf. Darüber hinaus werden Vektoren auf der Grundlage von Ad5, bei denen (Teile der) Kapsidproteine, die in die immunogene Antwort des Wirts einbezogen sind, durch die entsprechenden (Teile der) Kapsidproteine von Ad35 oder einen der anderen Serotypen ersetzt sind, weniger oder sogar gar nicht von der großen Mehrheit der humanen Seren neutralisiert.

**[0043]** Wie aus Tabelle I hervorgeht, war das VP/CCID<sub>50</sub>-Verhältnis, das aus den Viruspartikeln pro ml und dem für jedes Virus in den Experimenten erhaltene CCID<sub>50</sub> hochgradig variabel und reichte von 0,4 bis 5 log. Dies wird wahrscheinlich durch verschiedene Infektionseffizienzen von PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) und Unterschiede der Replikationseffizienz der Viren verursacht. Weiterhin können Unterschiede bei Chargenqualitäten eine Rolle spielen. Ein hohes VP/CCID<sub>50</sub>-Verhältnis bedeutet, dass zum Erhalt eines CPE in 5 Tagen mehr Virus in die Nöpfe gegeben wurde. Folglich kann das Ergebnis der Neutralisationsuntersuchung einen systematischen Fehler aufweisen, weil mehr (inaktive) Viruspartikel die Antikörper abschirmen könnten. Um zu überprüfen, ob dieses Phänomen aufgetreten war, wurde das VP/CCID<sub>50</sub>-Verhältnis gegen den Prozentwert der im Assay als positiv ermittelten Serumproben aufgetragen. Das Diagramm zeigt klar, dass es keine negative Korrelation zwischen der Menge der Viren im Assay und der Neutralisation im Serum gibt.

#### Beispiel 2

Erzeugung von Ad5-Plasmidvektoren zur Herstellung von rekombinanten Viren und leichte Manipulation von adenoviralen Genen

pBr/Ad-Bam-rITR (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082122)

**[0044]** Zur Erleichterung der Blunt-End-Klonierung der ITR-Sequenzen wurde DNA vom humanen Wildtyp-Adenovirustyp 5 (Ad5) in Gegenwart von überschüssigen dNTP mit Klenow-Enzym behandelt. Nach der Inaktivierung des Klenow-Enzyms und einer Reinigung mittels einer Phenol/Chloroform-Extraktion, gefolgt von einem Ausfällen mittels Ethanol, wurde die DNA mit BamHI aufgeschlossen. Dieses DNA-Präparat wurde ohne weitere Reinigung in einer Ligationsreaktion mit einer von pBr322 stammenden Vektor-DNA verwendet, die wie folgt hergestellt wurde: pBr322-DNA wurde mit EcoRV und BamHI aufgeschlossen, durch eine Behandlung mit dem Enzym ISAP (Life Technologies) dephosphoryliert und auf LMP-Agarosegel (SeaPlaque GTG) gereinigt. Nach einer Transformation in kompetentes *E. coli* DH5 $\alpha$  (Life Techn.) und einer Analyse der ampicillinresistenten Kolonien wurde ein Klon ausgewählt, der ein Aufschlussmuster zeigte, das für eine sich von der BamHI-Stelle in Ad5 zur rechten ITR erstreckende Insertion zu erwarten war.

**[0045]** Eine Sequenzanalyse der Klonierungsgrenze an der rechten ITR offenbarte, dass der größte Teil des am meisten in Richtung 3'-Ende gelegenen G-Rests des ITR fehlte, wobei gefunden wurde, dass der Rest der ITR richtig war. Der fehlende G-Rest wird während der Vermehrung durch die andere ITR komplementiert.

pBr/Ad.Sal-rITR (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082119)

**[0046]** pBr/Ad.Bam-rITR wurde mit BamHI und Sall aufgeschlossen. Das Vektorfragment, das das Adenovirus-Insert einschloss, wurde in LMP-Agarose (SeaPlaque GTG) isoliert und an ein Sall-BamHI-Fragment von 4,8 kb ligiert, das aus wt Ad5-DNA erhalten worden war, und mit dem GeneClean II Kit (Bio 101, Inc.) gereinigt. Ein Klon wurde ausgewählt, und die Integrität der Ad5-Sequenz wurde durch eine Restriktionsenzym-Analyse bestimmt. Der Klon pBr/Ad.Sal-rITR enthält Sequenzen vom Adenotyp 5 aus der Sall-Stelle bei bp 16746 bis zu und einschließlich des rITR (wobei der am meisten in Richtung 3'-Ende gelegene G-Rest fehlt).

pBr/Ad.Cla-Bam (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082117)

**[0047]** wt-Adenotyp-5-DNA wurde mit ClaI und BamHI aufgeschlossen, und das 20,6-kb-Fragment wurde mittels Elektroelution vom Gel isoliert. pBr322 wurde mit denselben Enzymen aufgeschlossen und mittels GeneClean von der Agarose gereinigt. Beide Fragmente wurden ligiert und in kompetentes DH5 $\alpha$  transformiert. Der resultierende Klon pBr/Ad.Cla-Bam wurde durch einen Aufschluss mit Restriktionsenzymen analysiert, und es zeigte sich, dass er ein Insert mit Adenovirus-Sequenzen von bp 919 bis 21566 enthielt.

pBr/Ad-AflII-Bam (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082114)

**[0048]** Der Klon pBr/Ad.Cla-Bam wurde mit EcoRI (in pBr322) linearisiert und mit AflII teilweise aufgeschlossen. Nach einer für 20 min mittels Wärme bei 65°C erfolgenden Inaktivierung von AflII wurden die Fragmentenden mit Klenow-Enzym gefüllt. Die DNA wurde dann an einen glatten, doppelsträngigen, eine PacI-Stelle enthaltenden Oligo-Linker (5'-AATTGTCTTAATTAACCGCTTAA-3') ligiert. Dieser Linker wurde hergestellt, indem die folgenden beiden Oligonucleotide, 5'-AATTGTCTTAATTAACCGC-3' und 5'-AATTGCGGTTAATTAA-GAC-3', einem Annealing unterzogen wurden, gefolgt von einer enzymatischen Reaktion zur Bildung von Blunt-Enden mittels des Klenow-Enzyms. Nach dem Ausfällen der ligierten DNA zur Änderung des Puffers wurden die Ligationen mit einem Überschuss des Enzyms PacI aufgeschlossen, um Koncatemere des Oligonucleotids zu entfernen. Das Ad5-Sequenzen von bp 3534 bis 21566 und die Vektorsequenzen enthaltende Teilfragment mit 22016 bp wurde in LMP-Agarose isoliert (SeaPlaque GTG), erneut ligiert und in kompetentes DH5 $\alpha$  transformiert. Ein Klon, bei dem gefunden wurde, dass er die PacI-Stelle enthielt und das große Adenovirus-Fragment behalten hatte, wurde ausgewählt und am 5'-Ende sequenziert, um die richtige Insertion des PacI-Linkers an der (verloren gegangenen) AflII-Stelle zu verifizieren.

pBr/Ad.Bam-rITRpac#2 (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082120) und pBr/Ad.Bam-rITRpac#8  
(ECACC-Hinterlegungsnummer P97082121)

**[0049]** Um die Insertion einer PacI-Stelle neben der ITR von Ad5 im Klon pBr/Ad.Bam-rITR zu ermöglichen, wurden etwa 190 Nucleotide zwischen der ClaI-Stelle im pBr322-Rückgrat und dem Start der ITR-Sequenzen entfernt. Dies wurde wie folgt durchgeführt: pBr/Ad.Bam-rITR wurde mit ClaI aufgeschlossen und mit der Nuclease Bal31 für variierende Zeiträume (2 min, 5 min, 10 min und 15 min) behandelt. Das Ausmaß der Nucleotid-Entfernung wurde mit separaten Reaktionen von pBr322-DNA (die ebenfalls an der ClaI-Stelle aufgeschlossen wird) unter Verwendung identischer Puffer und Bedingungen verfolgt. Das Enzym Bal31 wurde durch eine für 10 min bei 75°C erfolgende Inkubation inaktiviert, die DNA wurde ausgefällt und eine einem TE-Puffer mit einem kleineren Puffer resuspendiert. Um glatte Enden zu gewährleisten, wurden die DNA in Gegenwart von überschüssigen dNTP weiterhin mit T4-DNA-Polymerase behandelt. Nach einem Aufschluss der (Kontroll-)DNA pBr322 mit Sall wurde bei den für 10 min oder 15 min behandelten Proben ein zufrieden stellender Abbau (150 bp) beobachtet. Die für 10 min oder 15 min behandelten pBr/Ad.Bam-rITR Proben wurden dann an die oben beschriebenen PacI-Linker mit glatten Enden ligiert (siehe pBr/Ad.AflII-Bam). Die Ligationen wurden durch Ausfällen gereinigt, mit überschüssigem PacI aufgeschlossen und auf einem LMP-Agarosegel von den Linkern getrennt. Nach einer erneuten Ligation wurden die DNA in kompetente DH5 $\alpha$  transformiert und Kolonien analysiert. Es wurden 10 Kolonien ausgewählt, die eine Deletion in etwa der gewünschten Länge aufwiesen, und diese wurden mittels einer T-Track-Sequenzierung (T7 sequencing kit, Pharmacia Biotech) weiter analysiert. Es wurden zwei Klone gefunden, bei denen der PacI-Linker unmittelbar stromabwärts vom rITR inseriert war. Nach einem Aufschluss mit PacI wies Klon Nr. 2 28 bp und Klon Nr. 8 27 bp auf, die an die ITR gebunden waren.

## pWE/Ad.AfIII-rITR (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082116)

**[0050]** Der Cosmidvektor pWE15 (Clontech) wurde zum Klonen von größeren Ad5-Einschüben verwendet. Zuerst wurde ein Linker, der eine einzigartige PacI-Stelle enthielt, in die EcoRI-Stellen von pWE15 inseriert, wodurch pWE.pac erzeugt wurde. Mit Hinblick darauf wurde das doppelsträngige PacI-, für pBr/Ad.AfIII-BamHI verwendete Oligonucleotid verwendet, jetzt jedoch mit seinen hervorstehenden EcoRI-Enden. Die folgenden Fragmente wurden dann durch Elektroelution aus Agarosegel isoliert: mit PacI aufgeschlossenes pWE.pac, mit PacI und BamHI aufgeschlossenes pBr/AfIII-Bam und mit BamHI und PacI aufgeschlossenes pBr/Ad.Bam-rITR#2. Diese Fragmente wurden zusammenligiert und unter Verwendung von Verpackungsextrakten des  $\lambda$ -Phagen (Stratagene) gemäß dem Protokoll des Herstellers zusammenligiert. Nach der Infektion in Wirtsbakterien wurden Kolonien auf Platten gezogen und auf das Vorhandensein des kompletten Einschubs untersucht. pWE/Ad.AfIII-rITR enthält alle Sequenzen vom Adenovirustyp 5 von bp 3534 (AfIII-Stelle) bis zu einschließlich der rechten ITR (wobei der am meisten in Richtung 3'-Ende gelegene G-Rest fehlt).

## pBr/Ad.IITR-Sal(9.4) (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082115)

**[0051]** Adeno-5-wt-DNA wurde in Gegenwart von überschüssigen dNTP mit Klenow-Enzym behandelt und anschließend mit Sall aufgeschlossen. Zwei der resultierenden Fragmente, die als linkes ITR-Sal(9.4) bzw. Sal(16.7)-rechtes ITC bezeichnet wurden, wurden in LMP-Agarose (Seaplaque GTG) isoliert. pBr322-DNA wurde mit EcoRV und Sall aufgeschlossen und mit Phosphatase (Life Technologies) behandelt. Das Vektorfragment wurde unter Verwendung des GeneClean-Verfahrens (BIO 101, Inc.) isoliert und an die Ad5-Sal-II-Fragmenten ligiert. Nur die Ligation mit dem 9,4-kb-Fragment ergab Kolonien mit einem Einschub. Nach einer Analyse und Sequenzierung der Klonierungsgrenze wurde ein Klon ausgewählt, der die volle ITR-Sequenz enthielt und sich bis zur Sall-Stelle bei bp 9462 erstreckte.

## pBr/Ad.IITR-Sal(16,7) (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082118)

**[0052]** pBr/Ad.IITR-Sal(9.4) wird mit Sall aufgeschlossen und dephosphoryliert (TSAP, Life Technologies). Um diesen Klon bis zur dritten Sall-Stelle in Ad5 auszudehnen, wurde pBr/Ad.Cla-Bam mit BamHI linearisiert und mit Sall teilweise aufgeschlossen. Ein Sall-Fragment von 7,3 kb, das Adenovirus-Sequenzen von 9462-16746 enthielt, wurde in LMP-Agarosegel isoliert und an das mit Sall aufgeschlossene pBr/Ad.IITR-Sal(9.4)-Vektorfragment ligiert.

## pWE/Ad.AfIII-EcoRI

**[0053]** pWE.pac wurde mit ClaI aufgeschlossen, und die hervorstehenden 5'-Enden wurden mittels Klenow-Enzym gefüllt. Die DNA wurde dann mit PacI aufgeschlossen und aus Agarosegel isoliert. pWE/AfIII-rITR wurde mit EcoRI aufgeschlossen und nach der Behandlung mit Klenow-Enzym mit PacI aufgeschlossen. Das große Fragment von 24 kb, das die adenoviralen Sequenzen enthielt, wurde aus Agarosegel isoliert und unter Verwendung des Ligation Express™ von Clontech an den mit ClaI aufgeschlossenen und mit einem glatten Ende versehenen pWE.pac-Vektor ligiert. Nach der Transformation von ultrakompetenten XL10-Gold-Zellen von Stratagene wurden Klone identifiziert, die den erwarteten Einschub enthielten. pWE/AfIII-EcoRI enthält Ad5-Sequenzen ab bp 3534–27 336.

## Erzeugung von pWE/Ad.AfIII-rITRsp

**[0054]** Das ITR am 3'-Ende im Vektor pWE/Ad.AfIII-rITR schließt das terminale G-Nucleotid nicht ein. Weiterhin befindet sich die PacI-Stelle um fast 30 bp von der rechten ITR entfernt. Diese beiden Merkmale können die Effizienz der Viruserzeugung aufgrund einer ineffizienten Initiierung der Replikation am 3'-Ende von ITR vermindern. Es sei darauf hingewiesen, dass während der Viruserzeugung die linke ITR im Adapterplasmid intakt ist und eine Replikation der Virus-DNA nach einer homologen Rekombination ermöglicht.

**[0055]** Zur Verbesserung der Effizienz der Replikationsinitiierung am 3'-Ende der ITR wurde pWE/Ad.AfIII-rITR wie folgt modifiziert: Das Konstrukt pBr/Ad.Bam-rITRpac#2 wurde zuerst mit PacI aufgeschlossen und dann mit AvrII teilweise aufgeschlossen, und das den Vektor von 17,8 kb enthaltende Fragment wurde isoliert und unter Verwendung des SAP-Enzyms (Boehringer Mannheim) dephosphoryliert. Diesem Fragment fehlen die Adenosequenzen von Nucleotid 35 464 bis zum 3'-Ende von ITR. Unter Verwendung von DNA aus pWE/Ad.AfIII-rITR als Matrize und den Primern ITR-EPH: 5'-CGG AAT TCT TAA TTA AGT TAA CAT CAT CAA TAA TAT ACC-3' und Ad101: 5'-TGA TTC ACA TCG GTC AGT GC-3' wurde ein PCR-Fragment von 630 bp erzeugt, das den Ad5-Sequenzen am 31 Ende entspricht. Dieses PCR-Fragment wurde anschließend im Vek-

tor pCR2.1 (Invitrogen) geklont, und das PCR-Fragment enthaltende Klone wurden isoliert und sequenziert, um die richtige Amplifizierung der DNA zu überprüfen. Der PCR-Klon wurde dann mit PacI und AvrII aufgeschlossen, und der Adeno-Einschub von 0,5 kb wurde an das PacI/partiell mit AvrII aufgeschlossene pBr/Ad.Bam-rITRpac#2-Fragment ligiert, wodurch pBr/Ad.Bam-rITRsp erzeugt wurde. Als Nächstes wurde dieses Konstrukt zur Erzeugung eines (oben beschriebenen) Cosmidklons verwendet, der einen Einschub aufwies, der den Adenosequenzen 3534 bis 35 938 entsprach. Dieser Klon wurde als pWE/AfIII-rITRsp bezeichnet.

#### Erzeugung von pWE/Ad.AfIII-rITRΔE2A:

**[0056]** Die Deletion der E2A codierenden Sequenzen von pWE/Ad.AfIII-rITR (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082116) ist wie folgt bewerkstelligt worden. Die adenoviralen Sequenzen, die den E2A codierenden Bereich an der linken und der rechten Stelle flankieren, wurden in einer PCR-Reaktion mit dem Expand PCR System (Boehringer) gemäß dem Protokoll des Herstellers aus dem Plasmid pBr/Ad.Sal1.rITR (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082119) amplifiziert. Die folgenden Primer wurden verwendet:  
Rechte Flankierungssequenzen (entsprechend den Ad5-Nucleotiden 24 033 bis 25 180):

**ΔE2A.SnaBI:** 5'-GGC GTA CGT AGC CCT GTC GAA AG-3'  
**ΔE2A.DBP-start:** 5'-CCA ATG CAT TCG AAG TAC TTC CTT  
CTC CTA TAG GC-3'

**[0057]** Das amplifizierte DNA-Fragment wurde mit SnaBI und NsiI (die NsiI-Stelle wird im Primer ΔE2A.DBP-Start, unterstrichen, erzeugt) aufgeschlossen. Linke Flankierungssequenzen (entsprechend den Ad5-Nucleotiden 21 557 bis 22 442):

**ΔE2A.DBP-stop:** 5'-CCA ATG CAT ACG GCG CAG ACG G-3'  
**ΔE2A.BamHI:** 5'-GAG GTG GAT CCC ATG GAC GAG-3'

**[0058]** Die amplifizierte DNA wurde mit BamHI und NsiI (die NsiI-Stelle wird im Primer ΔE2A.DBP-Stop, unterstrichen, erzeugt) aufgeschlossen. Anschließend wurden die aufgeschlossenen DNA-Fragmente in mit SnaBI/BamHI aufgeschlossenes pBr/Ad.Sal-rITR ligiert. Eine Sequenzierung bestätigte den exakten Ersatz der DBP codierenden Region durch eine einzigartige NsiI-Stelle im Plasmid pBr/Ad.Sal-rITRΔE2A. Die einzigartige NsiI-Stelle kann zur Einführung einer Expressionskassette für ein durch den rekombinanten Vektor zu transduzierendes Gen verwendet werden.

**[0059]** Die Deletion der E2A codierenden Sequenzen wurde so durchgeführt, dass die Spleißakzeptorenden des 100 K codierenden L4-Gens an Position 24 048 im oberen Strang intakt blieben. Darüber hinaus wurden die Polyadenylierungssignale der ursprünglichen E2A-RNA und der L3-RNA an der linken Stelle der E2A codierenden Sequenzen intakt gelassen. Dadurch wird eine richtige Expression der L3-Gene und des das 100 K L4-Protein codierenden Gens während des Lebenszyklus des Adenovirus gewährleistet.

**[0060]** Als nächstes wurde das Plasmid pWE/Ad.AfIII-rITRΔE2A erzeugt. Das Plasmid pBr/Ad.Sal-rITRΔE2A wurde mit BamHI und SpeI aufgeschlossen. Das Fragment mit 3,9 kb, bei dem der E2A codierende Bereich durch die einzigartige NsiI-Stelle ersetzt war, wurde isoliert. Das pWE/Ad.AfIII-rITR wurde mit BamHI und SpeI aufgeschlossen. Das DNA-Fragment mit 35 kb, aus dem das BamHI/SpeI-Fragment, das die E2A codierende Sequenz enthielt, entfernt war, wurde isoliert. Die Fragmente wurden ligiert und mittels Verpackungsextrakt des λ-Phagen gemäß dem Protokoll des Herstellers (Stratagene) verpackt, wodurch das Plasmid pWE/Ad.AfIII-rITRΔE2A erhalten wurde.

**[0061]** Dieser Cosmidklon kann zur Erzeugung von adenoviralen Vektoren verwendet werden, die durch eine Cotransfektion von mit PacI aufgeschlossener DNA zusammen mit aufgeschlossenen Adapterplasmiden in Verpackungszellen, die das funktionelle E2A-Genprodukt exprimieren, für E2A deletiert sind. Konstruktion von Adapterplasmiden

**[0062]** Das Fehlen einer Sequenzüberlappung zwischen dem rekombinanten Adenovirus und den E1-Sequenzen in der Verpackungszelllinie ist für eine sichere, RCA-freie Erzeugung und Fortpflanzung der neuen rekombinanten Viren wichtig. Das Adapterplasmid pMLPI-TK (beschrieben in PCT/NL96/00244) ist ein Beispiel für ein Adapterplasmid, das zur Verwendung gemäß der Erfindung in Kombination mit den verbesserten Verpackungszelllinien der Erfindung konstruiert ist. Dieses Plasmid wurde als Ausgangsmaterial zur Herstellung eines neuen Vektors verwendet, bei dem spezielle Promoter- und Gensequenzen umfassende Nucleinsäure-

moleküle leicht ausgetauscht werden können.

**[0063]** Zuerst wurde ein PCR-Fragment aus pZipΔMo + PyF101(N<sup>-</sup>)-Matrix-DNA (beschrieben in PCT/NL96/00195) mit den folgenden Primern erzeugt:

**LTR-1: 5'-CTG TAC GTA CCA GTG CAC TGG CCT  
AGG CAT GGA AAA ATA CAT AAC TG-3'** und **LTR-2: 5'-GCG GAT CCT  
TCG AAC CAT GGT AAG CTT GGT ACC GCT AGC GTT AAC CGG GCG ACT  
CAG TCA ATC G-3'**

Pwo-DNA-Polymerase (Boehringer Mannheim) wurde gemäß dem Protokoll des Herstellers mit den folgenden Temperaturzyklen verwendet: ein Mal 5 min bei 95°C, 3 min bei 55°C und 1 min bei 72°C, und 30 Zyklen von 1 min bei 95°C, 1 min bei 60°C, 1 min bei 72°C, gefolgt von ein Mal 10 min bei 72°C. Das PCR-Produkt wurde dann mit BamHI aufgeschlossen und in den mit PvuII und BamHI aufgeschlossenen Vektor pMLP10 (Levrero et al., 1991) ligiert, wodurch der Vektor pLTR10 erzeugt wurde. Dieser Vektor enthält adenovirale Sequenzen von bp 1 bis zu bp 454, gefolgt von einem Promoter, der aus einem Teil von Mo-MuLV LTR besteht, deren Wildtyp-Enhancer-Sequenz durch den Enhancer aus einer Polyoma-Virus-Mutante (PyF101) ersetzt wurde. Das Promoterfragment wurde mit 1420 bezeichnet. Als nächstes wurde der codierende Bereich des Maus-HSA-Gens inseriert. pLTR10 wurde mit BstBI aufgeschlossen, gefolgt von einer Klenow-Behandlung und einem Aufschluss mit NcoI. Das HSA-Gen wurde durch PCR-Amplifizierung an pUC18-HSA (Kay et al., 1990) unter Verwendung der folgenden Primer erhalten:

**HSA1, 5'-GCG CCA CCA TGG GCA GAG CGA TGG TGG C-3'** und  
**HSA2, 5'-GTT AGA TCT AAG CTT GTC GAC ATC  
GAT CTA CTA ACA GTA GAG ATG TAG AA-3'**

Das amplifizierte Fragment mit 269 bp wurde unter Verwendung der NcoI- und der BglII-Stelle in einem Shuttle-Vektor subkloniert. Eine Sequenzierung bestätigte die Einarbeitung der richtigen codierenden Sequenz des HSA-Gens, wobei jedoch eine zusätzliche TAG-Insertion dem TAG-Stoppcodon direkt folgte. Die codierende Region des HSA-Gens einschließlich der TAG-Duplikation wurde dann als NcoI(klebrig)-Sall(glatt)-Fragment herausgeschnitten und in das NcoI(klebrig)/BstBI(glatt)-Fragment mit 3,5 kb aus pLTR10 kloniert, was zu pLTR-HSA10 führte. Schließlich wurde pLTR-HSA10 mit EcoRI und BamHI aufgeschlossen, wonach das die linke ITR, das Verpackungssignal, den Promoter 1420 und das HSA-Gen enthaltende Fragment in den Vektor pMLP1.TK eingeführt wurde, der mit denselben Enzymen aufgeschlossen wurde, und dadurch wurden die Promoter- und die Gensequenz ersetzt. Dies führte zum neuen Adapterplasmid pAd/L420-HSA, das zweckmäßige Erkennungsstellen für verschiedene Restriktionsenzyme um die Promoter- und die Gensequenz enthält. Zum Austausch von Promotersequenzen können SnaBI und AvrII mit HpaI, NheI, KpnI, HindIII kombiniert werden, wobei die letzteren Stellen mit den Stellen ClaI oder BamHI am 3'-Ende vom HSA kodierenden Bereich kombiniert werden können, um Gene in diesem Konstrukt zu ersetzen.

**[0064]** Ein anderes Adapterplasmid, das so konstruiert wurde, dass es einen leichten Austausch von Nucleinsäuremolekülen ermöglichte, wurde hergestellt, indem der Promoter, das Gen und die Poly-A-Sequenzen in pAd/L420-HSA durch den CMV-Promoter, eine Mehrfachklonierungsstelle, ein Intron und ein Poly-A-Signal ersetzt wurden. Zu diesem Zweck wurde pAd/L420-HSA mit AvrII und BglII aufgeschlossen, gefolgt von einer Behandlung mit Klenow, wodurch glatte Enden erhalten wurden. Das 5,1-kb-Fragment mit dem Vektor pBr322 und adenoviralen Sequenzen wurde isoliert und an ein glattes Fragment mit 1570 bp aus pCDNA1/amp (Invitrogen) ligiert, das durch einen Aufschluss mit HhaI und AvrII, gefolgt durch eine Behandlung mit T4-DNA-Polymerase, erhalten wurde. Dieses Adapterplasmid wurde als pAd5/CLIP bezeichnet. Um die Entfernung von Vektorsequenzen von der linken ITR in pAd5/CLIP zu ermöglichen, wurde dieses Plasmid teilweise mit EcoRI aufgeschlossen, und das lineare Fragment wurde isoliert. Ein Oligonucleotid der Sequenz 5'-TTAAGTCGAC-3' wurde einem Annealing mit sich selbst unterzogen, was zu einem Linker mit einer Sall-Stelle und einem EcoRI-Überhang führte. Der Linker wurde an den teilweise aufgeschlossenen pAd5/Clip-Vektor ligiert, und es wurden Klone ausgewählt, bei denen der Linker in die EcoRI-Stelle 23 bp stromaufwärts von der linken adenoviralen ITR in pAd5/Clip inseriert war, was zu pAd5/Clipsal führte. Auf vergleichbare Weise ist die EcoRI-Stelle in pAd5/Clip durch die Insertion eines Linkers der Sequenz 5'-AATTGTCTTAATTAACCGCAATT-3' zu einer PacI-Stelle geändert worden. Der Vektor pAd5/Clip wurde mit EcoRI teilweise aufgeschlossen, dephosphoryliert und an den PacI-Linker mit dem EcoRI-Überhang ligiert. Zur Entfernung von Konkatermenen wurde die Ligationsmischung mit PacI aufgeschlossen, aus Agarosegel isoliert und wieder ligiert. Der resultierende Vektor wurde als pAd5/Clippac bezeichnet. Diese Änderungen ermöglichen einer höhere Flexibilität bei der Freisetzung

der linken ITR von den Vektorsequenzen des Plasmids. Der Vektor pAd5/L420-HSA wurde auch modifiziert, wodurch eine Sall- oder PacI-Stelle stromaufwärts von der linken ITR erzeugt wurde. Dazu wurde pAd5/L420-HSA mit EcoRI aufgeschlossen und an den oben beschriebenen PacI-Linker ligiert. Die Ligationsmischung wurde mit PacI aufgeschlossen und nach der Isolierung der linearen DNA aus Agarosegel wieder ligiert, um konkaternere Linker zu entfernen. Dies führte zum Adapterplasmid pAd5/L420-HSApac. Dieses Konstrukt wurde wie folgt zur Erzeugung von pAd5/L420-HSAsal verwendet: pAd5/L420-HSApac wurde mit Scal und BsrGI aufgeschlossen, und das Vektorfragment wurde an das 0,3-kb-Fragment, das nach dem Aufschluss von pAd5/Clipsal mit denselben Enzymen isoliert wurde, ligiert.

#### Erzeugung der Adapterplasmide pAdMire und pAdApt

**[0065]** Zur Erzeugung eines Adapterplasmids, das nur eine Polylinkersequenz und keine Promoter- und keine polyA-Sequenz enthält, wurde pAd5/L420-HSApac mit AvrII und BglIII aufgeschlossen. Das Vektorfragment wurde an ein Linker-Oligonucleotid ligiert, das mit denselben Restriktionsenzymen aufgeschlossen worden war. Der Linker wurde hergestellt, indem Oligonucleotide der folgenden Sequenz einem Annealing unterzogen wurden:

PLL-1: 5'- GCC ATC CCT AGG AAG CTT GGT ACC GGT GAA TTC GCT  
AGC GTT AAC GGA TCC TCT AGA CGA GAT CTG G-3' un

PLL-2: 5'- CCA GAT CTC GTC TAG AGG ATC CGT TAA CGC TAG CGA  
ATT CAC CGG TAC CAA GCT TCC TAG GGA TGG C-3'.

**[0066]** Die einem Annealing unterzogenen Linker wurden mit AvrII und BglIII aufgeschlossen und durch Säulenreinigung (Qiaquick nucleotide removal kit) gemäß der Empfehlungen des Herstellers von den kleinen Enden getrennt. Der Linker wurde dann an das mit AvrII/BglIII aufgeschlossene pAd5/L420-HSApac-Fragment ligiert. Es wurde ein Klon mit der Bezeichnung AdMire ausgewählt, der den Linker eingearbeitet enthielt, und sequenziert, um die Integrität des Einschubs zu überprüfen. Das Adapterplasmid AdMire ermöglicht eine leichte Insertion von vollständigen Expressionskassetten.

**[0067]** Ein Adapterplasmid, das den humanen CMV-Promotor enthält, der hohe Expressionsstärken in humanen Zellen vermittelt, wurde wie folgt konstruiert: pAd5/L420-HSApac wurde mit AvrII aufgeschlossen, und die hervorstehenden 5'-Enden wurden unter Verwendung von Klenow-Enzym aufgefüllt. Ein zweiter Aufschluss mit HindIII führte zur Entfernung der L420-Promotersequenzen. Das Vektorfragment wurde isoliert und an ein PCR-Fragment ligiert, das die CMV-Promotorsequenz enthielt. Dieses PCR-Fragment wurde nach einer Amplifizierung von CMV-Sequenzen aus pCMVlacI (Stratagene) mit den folgenden Primern erhalten:

CMVplus: 5'-GATCGGTACCACTGCAGTGGTCAATATTGGCCATTAGCC-3' und

CMVminA: 5'-GATCAAGCTTCCAATGCACCGTTCCCGGC-3'.

**[0068]** Das PCR-Fragment wurde zuerst mit PstI (in CMVplus unterstrichen) aufgeschlossen, wonach die hervorstehenden 3'-Enden durch eine Behandlung mit T4-DNA-Polymerase entfernt wurden. Dann wurde die DNA mit HindIII (in CMVminA unterstrichen) aufgeschlossen und in das oben beschriebene, mit AvrII und HindIII aufgeschlossene pAd5/L420-HSApac-Vektorfragment ligiert. Das resultierende Plasmid wurde als pAd5/CMV-HSApac bezeichnet. Dieses Plasmid wurde dann mit HindIII und BamHI aufgeschlossen, und das Vektorfragment wurde isoliert und an die Polylinkersequenz ligiert, die nach dem Aufschluss von AdMire mit HindIII und BglIII erhalten worden war. Das resultierende Plasmid wurde als pAdApt bezeichnet. Das Adapterplasmid pAdApt enthält die Nucleotide -735 bis +95 des humanen CMV-Promoters (Boshart et al., 1985). Eine zweite Version dieses Adapterplasmids, die eine Sall-Stelle statt der PacI-Stelle stromaufwärts vom linken ITR enthielt, wurde hergestellt, indem das Scal-BsrGI-Fragment mit 0,7 kb von pAd5/Clipsal in pAdApt inseriert wurde, das mit Scal aufgeschlossen und mit BsrGI teilweise aufgeschlossen war. Dieser Klon wurde als pAdApt.sal bezeichnet.

#### Erzeugung von rekombinanten Adenoviren auf der Grundlage von Ad5

**[0069]** RCA-freie rekombinante Adenoviren können sehr effizient unter Verwendung der oben beschriebenen Adapterplasmide und das Konstrukte pWE/Ad.AflII-rITR oder pWE/Ad.AflII-rITrsp hergestellt werden. Gewöhnlich wird das Adapterplasmid, das das gewünschte Transgen in der gewünschten Expressionskassette enthält, mit geeigneten Enzymen aufgeschlossen, um den Einschub aus den Vektorsequenzen am 3'- und/oder am

5'-Ende freizusetzen. Die adenoviralen Komplementationsplasmide pWE/Ad.AfIII-rITR oder pWE/Ad.AfIII-rITRsp werden mit PaclI aufgeschlossen, um die Adenosequenzen von den Vektorplasmiden freizusetzen. Als nicht einschränkendes Beispiel sei die Erzeugung von AdApt-LacZ beschrieben. Das Adapterplasmid pAdApt-LacZ wurde wie folgt erzeugt. Das E. coli-Gen LacZ wurde mit den Primern 5'-GGGGTGGCCAGGG-TACCTCTAGGCTTTTGC AA-3' und 5'-GGGGGGATCCATAAACAAGTTCAGAATCC-3' aus dem Plasmid pMLP.nlsLacZ (EP 95-202 213) mittels PCR amplifiziert. Die PCR-Reaktion wurde mit Ex Taq (Takara) gemäß dem Protokoll des Lieferanten mit dem folgenden Amplifikationsprogramm durchgeführt: 5 min bei 94°C, 1 Zyklus; 45 s bei 94°C und 30 s bei 60°C und 2 min bei 72°C, 5 Zyklen; 45 s bei 94°C und 30 s bei 65°C und 2 min bei 72°C, 25 Zyklen; 10 min bei 72°C, 45 s bei 94°C und 30 s bei 60°C und 2 min bei 72°C, 5 Zyklen, 1 Zyklus. Das PCR-Produkt wurde anschließend mit KpnI und BamHI aufgeschlossen, und das aufgeschlossene DNA-Fragment wurde in pcDNA3 (Invitrogen), das mit KpnI/BamHI aufgeschlossen war, ligiert, wodurch pcDNA3.nlsLacZ erhalten wurde. Das Konstrukt pcDNA3.nlsLacZ wurde dann mit KpnI und BamHI aufgeschlossen, und das LacZ-Fragment mit 3 kb wurde aus Gel isoliert, wobei der GeneClean sein kit (Bio 101, Inc.) verwendet wurde. pAdApt wurde auch mit KpnI und BamHI aufgeschlossen, und das lineare Vektorfragment wurde wie oben aus Gel isoliert. Beide isolierten Fragmente wurden ligiert, und ein den LacZ-Einschub enthaltender Klon wurde ausgewählt. Das Konstrukt pAdApt-LacZ wurde mit Sall aufgeschlossen, mit dem GeneClean sein kit gereinigt und anschließend mit PaclI aufgeschlossen. pWE/Ad.AfIII-rITRsp wurde mit PaclI aufgeschlossen. Beide Aufschlussmischungen wurden für 30 min bei 65°C behandelt, um die Enzyme zu inaktivieren. Die Proben wurden auf Gel aufgetragen, um die Konzentration zu bestimmen. T25-Kolben mit DMEM mit 10% FCS und 10 mM MgCl wurden mit  $2,5 \times 10^6$  PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) beimpft. Am nächsten Tag wurden 4 µg eines jeden Plasmids unter Verwendung von Lipofectamine-Transfektionsreagenz (Life Technologies Inc.) gemäß der Anleitungen des Herstellers in PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) transfiziert. Am nächsten Tag wurde das Medium durch frisches Kulturmedium ersetzt, und Zellen wurden weiterhin bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub>, kultiviert. Wiederum 24 h später wurden die Zellen mit Trypsin behandelt, T80-Kolben wurde damit beimpft, und sie wurden bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub>, kultiviert. Ein vollständiger CPE wurde 6 Tage nach einem Beimpfen in T80-Kolben erhalten. Zellen wurden in dem Medium geerntet und einem Gefrier/Auftau-Zyklus unterzogen. Das auf diese Weise erhaltene rohe Lysat wurde zur Reinigung der Virusmischung mittels Plaques verwendet. Zehn Plaques wurden ausgewählt, in einer Platte mit 24 Näpfen ausgestrichen und nach einer Infektion von A549-Zellen auf die Expression von LacZ getestet. Viren aus allen zehn Plaques exprimierten LacZ.

### Beispiel 3

#### Erzeugung von chimären, rekombinanten Adenoviren

##### Erzeugung von Hexon kodierenden, chimären Adenoviren auf der Grundlage von Ad5

**[0070]** Neutralisierende Antikörper in humanem Serum sind hauptsächlich gegen das Hexon-Protein und in geringerem Ausmaß auf das Penton-Protein gerichtet. Hexon-Proteine von verschiedenen Serotypen weisen hochgradig variable Regionen auf, die in Schleifen vorhanden sind, von denen vorhergesagt wird, dass sie an der Außenseite des Virus freiliegen (Athappilly et al., 1994; 3. Mol. Biol. 242, 430–455). Die meisten typenspezifischen Epitope sind diesen hochvariablen Regionen zugeordnet worden (Toogood et al., 1989; J. Gen Virol. 70, 3203–3214). Somit ist ein Ersatz (eines Teils) der Hexonsequenzen durch entsprechende Sequenzen von einem verschiedenen Serotyp eine effektive Strategie zur Umgehung (bereits bestehender) neutralisierender Antikörper für Ad5. Hexon kodierende Sequenzen des Adenovirus-Serotyps 5 befinden sich zwischen den Nucleotiden 18 841 und 21 697. Zur Erleichterung eines leichten Austauschs von Hexon-Codierungssequenzen von alternativen Adenovirus-Serotypen in das Rückgrat des Adenovirus-Serotyps 5 wurde zuerst ein Shuttle-Vektor erzeugt. Dieser Subklon, kodiertes pBr/Ad.Eco-Pmel, wurde erzeugt, indem zuerst das Plasmid pBr322 mit EcoRI und EcoRV aufgeschlossen und das Pmel-EcoRI-Fragment mit 14 kb aus pWE/Ad.AfIII-Eco inseriert wurde. In diesem Shuttle-Vektor wurde eine Deletion eines SanDI-Fragments mit 1430 bp durch einen Aufschluss mit SanDI und eine erneute Ligation durchgeführt, wodurch pBr/Ad.Eco-PmelΔSanDI erhalten wurde. Das entfernte Fragment enthält einzigartige SpeI- und MspI-Stellen. Aus pBr/Ad.Eco-PmelΔSanDI wurde das die Adenovirus-Serotyp-5-DNA kodierende Hexon deletiert. Dazu wurden die flankierenden Sequenzen mittels PCR amplifiziert und miteinander verbunden, wodurch einzigartige Restriktionsstellen erzeugt wurden, die die das Hexon kodierende Region ersetzen. Für diese PCR-Reaktionen waren vier verschiedene Oligonucleotide erforderlich: Δhex1–Δhex4.

**Δhex1:** 5' - CCT GGT GCT GCC AAC AGC-3'

**Δhex2:** 5' - CCG GAT CCA CTA GTG GAA AGC GGG CGC GCG-3'

**Δhex3:** 5' - CCG GAT CCA ATT GAG AAG CAA GCA ACA TCA ACA AC-3'

**Δhex4:** 5' - GAG AAG GGC ATG GAG GCT G-3'

**[0071]** Das amplifizierte DNA-Produkt von ±1100 bp, das mit den Oligonucleotiden Δhex1 und Δhex2 erhalten wurde, wurde mit BamHI und FseI aufgeschlossen. Das amplifizierte DNA-Produkt von ±1600 bp, das mit den Oligonucleotiden Δhex3 und Δhex4 erhalten wurde, wurde mit BamHI und SbfI aufgeschlossen. Diese aufgeschlossenen PCR-Fragmente wurden anschließend vom Agarosegel gereinigt und in einer dreiteiligen Ligationsreaktion unter Verwendung von T4-Ligaseenzym mit pBr/Ad.Eco-PmeI ΔSanDI, das mit FseI und SbfI aufgeschlossen war, verbunden. Beim resultierenden Konstrukt handelte es sich um kodiertes pBr/Ad.Eco-PmeΔHexon. Dieses Konstrukt wurde teilweise sequenziert, um die richtige Nucleotidsequenz und das Vorhandensein der einzigartigen Restriktionsstellen MunI und SpeI zu bestätigen. pBr/Ad.Eco-PmeΔHexon dient als Shuttle-Vektor zur Einführung von heterologen Hexon-Sequenzen, die aus Virus-DNA aus verschiedenen Serotypen amplifiziert sind, bei denen Primer verwendet werden, die die einzigartigen Restriktionsstellen MunI und SpeI am 5'- bzw. am 3'-Ende der Hexonsequenzen einführen. Zur Erzeugung von Vektoren auf der Grundlage von Ad5, die Hexon-Sequenzen des Serotyps enthalten, gegenüber dem gesunde Personen keine oder nur sehr geringe NAB-Titer aufweisen, wurden die Hexon-Sequenzen von Ad35, Ad34, Ad26 und Ad48 unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

**Hex-up2:** 5' -GACTAGTCAAGATGGCYACCCCHTCGATGATG-3'

und

**Hex-do2:** 5' -GCTGGCCAATTGTTATGTKGTKGCGTTRCCGGC-3'.

**[0072]** Diese Primer wurden unter Verwendung der Sequenzen von veröffentlichten Hexon-Kodierungsregionen (z. B. können die Hexonsequenzen von Ad2, Ad3, Ad4, Ad5, Ad7, Ad16, Ad40 und Ad41 bei Genbank erhalten werden). Degenerierte Nucleotide wurden bei Positionen eingearbeitet, die eine Variation zwischen Serotypen aufweisen.

**[0073]** PCR-Produkte wurden mit SpeI und MunI aufgeschlossen und in das mit denselben Enzymen aufgeschlossene pBr/Ad.Eco-PmeΔHexon-Dieses Konstrukt kloniert.

**[0074]** Die hexonmodifizierten Sequenzen wurden anschließend durch Austausch des Ascl-Fragments in den Konstrukt pWE/Ad.AfIII-rITR eingeführt, wodurch pWE/Ad.AfIII-rITRHexXX erzeugt wurde, wobei XX für den zur Amplifizierung von Hexon-Sequenzen verwendeten Serotypen steht.

**[0075]** Die pWE/Ad.AfIII-rITRhexXX-Konstrukte werden dann zur Herstellung von Viren auf dieselbe Weise, die oben für rekombinante Ad5-Viren beschrieben ist, verwendet.

Erzeugung von Penton kodierenden, chimären, rekombinanten Adenoviren auf der Grundlage von Ad5

**[0076]** Das Gen für das Adenovirus-Typ-5-Penton befindet sich zwischen den Sequenzen 14 156 und 15 869. Bei der Pentonbase handelt es sich um das Adenovirus-Kapsid-Protein, das die Internalisierung des Virus in die Zielzelle vermittelt. Es ist gezeigt worden, dass wenigstens einige Serotypen (Typ C und B) dies durch die Wechselwirkung einer RGD-Sequenz im Penton mit Integrinen auf der Zelloberfläche bewirken. Adenoviren vom Typ F haben jedoch keine RGD-Sequenz, und bei den meisten Viren der Gruppen A und D ist die Pentonsequenz nicht bekannt. Daher kann ein Penton in die Spezifität der Zielzelle involviert sein. Weiterhin ist das Penton-Protein als Kapsid-Protein in die Immunogenität des Adenovirus involviert (Gahery-Segard et al., 1998). Daher verhindert ein Ersatz von Ad5-Penton-Sequenzen durch Penton-Sequenzen von Serotypen, gegen die keine oder niedrige NAB-Titer existieren, zusätzlich zum Ersatz der Hexon-Sequenzen eine Clearance des adenoviralen Vektors wirksamer als ein Ersatz des Hexons allein. Ein Ersatz von Penton-Sequenzen kann auch die Infektionsspezifität beeinflussen.

**[0077]** Zum zur Einführung von heterologen Penton-Sequenzen in Ad5 fähig zu sein, genutzt wird das oben beschriebene System auf der Grundlage von Plasmid. Zuerst wurde ein Shuttle-Vektor für Penton-Sequenzen durch eine Insertion des NheI-EcoRV-Fragments mit 7,2 kb aus dem Dieses Konstrukt pWE/Ad.AfIII-EcoRI in pBr322, das mit denselben Enzymen aufgeschlossen war, hergestellt. Der resultierende Vektor wurde als pBr/XN bezeichnet. Aus diesem Plasmid wurden die Ad5-Pentonsequenzen deletiert und durch einzigartige Restriktionsstellen ersetzt, die dann zur Einführung neuer Penton-Sequenzen von anderen Serotypen verwendet werden. Hierzu wurden die linken flankierenden Sequenzen des Pentons in pBr/XN unter Verwendung der

folgenden Gene mittels PCR amplifiziert:

**DP5-F: 5'- CTG TTG CTG CTG CTA ATA GC-3'**

und

**DP5-R: 5'- CGC GGA TCC TGT ACA ACT AAG GGG AAT ACA AG-3'**

**[0078]** DP5-R weist eine BamHI-Stelle (unterstrichen) zur Ligation an die rechte flankierende Sequenz auf und führt auch eine einzigartige BsrGI-Stelle (fett markiert) am 5'-Ende der früheren Ad5-Penton-Region ein. Die rechte flankierende Sequenz wurde unter Verwendung von: DP3-F: 5'-CGC GGA TCC CTT AAG GCA AGC ATG TCC ATC CTT-3' und DP3-3R: 5'-AAA ACA CGT TTT ACG CGT CGA CCT TTC-3' amplifiziert. DP3-F weist eine BamHI-Stelle (unterstrichen) zur Ligation an die linke flankierende Sequenz auf und führt auch eine einzigartige AflII-Stelle (fett markiert) am 3'-Ende der früheren Ad5-Penton-Region ein.

**[0079]** Die beiden resultierenden PCR-Fragmente wurden mit BamHI aufgeschlossen und zusammenligiert. Dann wurde diese Ligationsmischung mit AvrII und BglII aufgeschlossen. pBr/XN wurde auch mit AvrII und BglII aufgeschlossen, und das Vektorfragment wurde an die aufgeschlossenen, ligierten PCR-Fragmente ligiert. Der resultierende Klon wurde als pBr/Ad.Δpenton bezeichnet. Penton-Kodierungssequenzen aus Ad35, Ad34, Ad26 und Ad48 wurden so mittels PCR amplifiziert, dass das 5'- bzw. das 3'-Ende die BsrGI- bzw. die AflII-Stelle enthielt. Hierzu wurden die folgenden Primer verwendet:

Für Ad34 und Ad35:

**P3-for: 5'-GCT CGA TGT ACA ATG AGG AGA CGA GCC GTG CTA-3'**

**P3-rev: 5'-GCT CGA CTT AAG TTA GAA AGT GCG GCT TGA AAG-3'**

Für Ad26 und Ad48:

**P17F: 5'-GCT CGA TGT ACA ATG AGG CGT GCG GTG GTG TCT TC-3'**

**P17R: 5'-GCT CGA CTT AAG TTA GAA GGT GCG ACT GGA AAG C-3'**

Amplifizierte PCR-Produkte wurden mit BfrI und BsrGI aufgeschlossen und in pBr/Ad.Δpenton kloniert, das mit denselben Enzymen aufgeschlossen war. Die Einführung dieser heterologen Penton-Sequenzen in pBr/Ad.Δpenton führte zur Bildung von Konstrukten mit der Bezeichnung pBr/Ad.pentonXX, wobei XX die Nummer des Serotypen darstellt, der demjenigen Serotypen entspricht, der zur Amplifizierung der insertierten Penton-Sequenzen verwendet wurde. Anschließend wurden die neuen Penton-Sequenzen in den pWE/Ad.AfIII-rITR-Vektor mit einem modifizierten Hexon eingeführt. Zum Beispiel wurden Penton-Sequenzen aus Ad35 durch Austausch des gemeinsamen FseI-Fragments in den Konstrukt pWE/Ad.AfIII-rITRHex35 eingeführt. Andere Kombinationen von Penton- und Hexon-Sequenzen wurden ebenfalls durchgeführt. Viren mit modifizierten Hexon- und Penton-Sequenzen wurden gemäß der obigen Beschreibung hergestellt, wobei eine Cotransfektion mit einem Adapterplasmid in PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) angewendet wurde. Darüber hinaus wurden Penton-Sequenzen in das pWE/Ad.AfIII-rITR-Konstrukt eingeführt. Die letzten Konstrukte enthalten nur ein modifiziertes Penton, und aus diesen Konstrukten erzeugte Viren werden zur Untersuchung des Beitrags von Penton-Sequenzen auf die Neutralisation von Adenoviren und auch zur Analyse von möglichen Änderungen der Infektionseffizienz und -spezifität verwendet. Erzeugung von chimären, das Faserprotein kodierenden Viren auf der Grundlage von Ad5

**[0080]** Eine Adenovirus-Infektion wird durch zwei Kapsidproteine, das Faserprotein und das Penton-Protein, vermittelt. Die Bindung des Virus an die Zellen wird durch die Wechselwirkung des hervorstehenden Faserproteins mit einem Rezeptor auf der Zelloberfläche erreicht. Dann erfolgt nach einer Wechselwirkung des Penton-Proteins mit Integrinen auf der Zelloberfläche eine Internalisierung. Es ist gezeigt worden, dass wenigstens zwei Adenoviren aus den Untergruppen C und B einen verschiedenen Rezeptor für die Zellbindung nutzen und daher verschiedene Infektionseffizienzen auf verschiedenen Zelltypen aufweisen. Somit ist es möglich, das Infektionsspektrum von Adenoviren durch eine Änderung der Faser im Kapsid zu ändern. Die faserkodierende Sequenz des Adenovirus-Serotyps 5 befindet sich zwischen den Nucleotiden 31 042 und 32 787. Zur Entfernung der faserkodierenden Adenovirus-Serotyp-5-DNA gingen wir vom Konstrukt pBr/Ad.Bam-rITR aus. Zuerst wurde eine NdeI-Stelle aus diesem Konstrukt entfernt. Zu diesem Zweck wurde die Plasmid-DNA pBr322 mit NdeI aufgeschlossen, wonach hervorstehende Enden mittels Klenow-Enzym aufgefüllt wurden. Dieses Plasmid pBr322 wurde dann erneut ligiert, mit NdeI aufgeschlossen und in E. coli DH5α transformiert. Das erhaltene Plasmid pBr/ΔNdeI wurde mit Scal und Sall aufgeschlossen, und das resultierende Vektorfragment mit 3198 bp wurde an das von pBr/Ad.BamrITR stammende Scal-Sall-Fragment mit 15 349 bp ligiert, was zum Plasmid pBr/Ad.Bam-rITRΔNdeI führte, das somit eine einzigartige NdeI-Stelle enthielt. Als nächstes wurde eine PCR mit den Oligonucleotiden:

NY-up:

5'-CGA CAT ATG TAG ATG CAT TAG TTT GTG TTA TGT TTC AAC GTG-3'

und

NY-down:

5'-GGA GAC CAC TGC CAT GTT-3'

**[0081]** Während der Amplifizierung wurden eine NdeI-(fett markiert) und eine NsiI-(unterstrichen) Restriktionsstelle eingeführt, um das Klonieren der amplifizierten Faser-DNA zu erleichtern. Die Amplifizierung bestand aus 25 Zyklen von jeweils 45 s bei 94°C, 1 min bei 60°C und 45 s bei 72°C. Die PCR-Reaktion enthielt 25 pmol der Oligonucleotide NY-up oder NY-down, 2 mM dNTP, PCR-Puffer mit 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 1 Einheit wärmebeständige Elongase-Polymerase (Gibco, Niederlande). Ein Zehntel des PCR-Produkts wurde auf einem Agarose-Gel laufen gelassen, wodurch gezeigt wurde, dass das erwartete DNA-Fragment von ±2200 bp amplifiziert wurde. Dieses PCR-Fragment wurde anschließend mittels des GeneClean kit system (Bio101 Inc.) gereinigt. Dann wurden das Konstrukt pBr/Ad.Bam-rITRΔNdeI sowie das PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen NdeI und SbfI aufgeschlossen. Das PCR-Fragment wurde anschließend unter Verwendung des Ligase-Enzyms T4 in das mit NdeI und SbfI aufgeschlossene pBr/Ad.Bam-rITRΔNdeI kloniert, wodurch pBr/Ad.BamRΔFib erzeugt wurde. Dieses Plasmid ermöglicht die Insertion einer beliebigen mittels PCR amplifizierten Fasersequenz durch die einzigartigen NdeI- und NsiI-Stellen, die anstelle der entfernten Fasersequenz inseriert sind. Viren können gemäß der Beschreibung im Patent Nr. PCT/NL96/00244 durch eine doppelte homologe Rekombination in Verpackungszellen unter Verwendung eines Adapterplasmids, eines mit PacI und EcoRI aufgeschlossenen Konstrukts pBr/Ad.AfIII-EcoRI und eines Konstrukts pBr/Ad.BamRΔFib, in die heterologe Fasersequenzen inseriert wurden, erzeugt werden. Zur Erhöhung der Effizienz der Viruserzeugung wurde das Konstrukt pBr/Ad.BamRΔFib dahingehend modifiziert, dass sie eine die rechte ITR flankierende PacI-Stelle erzeugte. Dazu wurde pBr/Ad.BamRΔFib mit AvrII aufgeschlossen, und das Adenofragment mit 5 kb wurde isoliert und in den oben beschriebenen Vektor pBr/Ad.Bam-rITR.pac#8 eingeführt, wobei das entsprechende AvrII-Fragment ersetzt wurde. Das resultierende Konstrukt wurde als pBr/Ad.BamRΔFib.pac bezeichnet. Nachdem eine heterologe Fasersequenz in pBr/Ad.BamRΔFib.pac eingeführt wurde, wird der fasermodifizierte rechte Adenovirus-Klon in einen großen Cosmid-Klon eingeführt, wie oben für pWE/Ad.AfIII-rITR beschrieben ist. Solch ein großer Cosmid-Klon ermöglicht die Erzeugung eines Adenovirus durch nur eine homologe Rekombination. Viren auf der Grundlage von Ad5 mit modifizierten Fasern sind hergestellt und beschrieben worden (Nr. 98204482.8 und 99200624.7). Darüber hinaus sind Hexon- und Penton-Sequenzen von Serotypen dieser Erfindung mit den gewünschten Fasersequenzen kombiniert worden, wodurch Viren erzeugt wurden, die die Zielzellen der Wahl sehr effizient infizieren. Zum Beispiel werden Zellen von glatten Muskeln, endotheliale Zellen oder Synoviocyten, alle humanen Ursprungs, mit den Viren auf der Grundlage von Ad5 mit einer Faser aus Viren der Untergruppe 5, insbesondere dem Adenovirus-Typ 16, sehr gut infiziert.

**[0082]** Die oben beschriebenen Beispiele, bei denen spezielle Sequenzen vom Ad5-Rückgrat in den Plasmiden deletiert und durch entsprechende Sequenzen aus anderen Serotypen ersetzt werden, zeigen klar die Flexibilität des Systems. Es ist offensichtlich, dass durch die oben beschriebenen Verfahren jede Kapsidgen-Kombination aus verschiedenen Serotypen hergestellt werden kann. Somit werden chimäre, rekombinante Adenoviren auf der Grundlage von Ad5 mit gewünschten Hexon- und Penton-Sequenzen konstruiert, die das Virus weniger empfindlich für eine Neutralisation machen, und mit gewünschten Fasersequenzen, die eine effiziente Infektion in spezielle Zielgewebe ermöglichen.

#### Beispiel 4

Konstruktion eines Systems auf der Grundlage eines Plasmids zur Erzeugung von rekombinanten Ad35-Viren

**[0083]** Partielle Restriktionskarten von Ad35 sind bereits veröffentlicht worden (Valderrama-Leon et al., 1985; Kang et al., 1989, Li et al. 1991). Ein Beispiel für ein funktionelles System auf Plasmidbasis zur Erzeugung von rekombinanten Adenoviren auf der Grundlage von Ad35 besteht aus den folgenden Elementen:

1. Einem Adapterplasmid, umfassend eine linke ITR und von Ad35 stammende Verpackungssequenzen und wenigstens eine Restriktionsstelle zur Insertion einer heterologen Expressionskassette, und ohne E1-Sequenzen. Weiterhin enthält das Adapterplasmid Ad35-Sequenzen am 3'-Ende der E1b kodierenden Region einschließlich des pIX-Promoters und Kodierungssequenzen, die ausreichend sind, um eine homologe Rekombination des Adapterplasmids mit einem zweiten Nucleotid zu vermitteln.
2. Ein zweites Nucleotid, umfassend Sequenzen, die zum Adapterplasmid und den Ad35-Sequenzen, die

zur Replikation und Verpackung des rekombinanten Virus erforderlich sind, homolog sind, d. h. frühe, intermediäre und späte Gene, die in der Verpackungszelle nicht vorhanden sind.

3. Eine Verpackungszelle, die wenigstens funktionelle E1-Proteine verfügbar macht, die dazu fähig sind, die E1-Funktion von Ad35 zu komplementieren.

**[0084]** Ad35-DNA wurde aus einer gereinigten Viruscharge wie folgt isoliert. Zu 100 µl Virus-Ausgangsmaterial (Ad35:  $3,26 \times 10^{12}$  VP/ml) wurden 10 µl 10x DNase-Puffer (130 mM Tris-HCl, pH-Wert 7,5, 1,2 M  $\text{CaCl}_2$ , 50 mM  $\text{MgCl}_2$ ) gegeben. Nach der Zugabe von 10 µl einer DNase I mit 10 mg/ml (Roche Diagnostics) wurde die Mischung für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 2,5 µl 0,5 M EDTA, 3,2 µl 20%iger SDS und 1,5 µl ProteinaseK (Roche Diagnostics; 20 mg/ml) wurden Proben bei 50°C für 1 h inkubiert. Als nächstes wurde die virale DNA unter Verwendung des GeneClean sein kit (Bio101 Inc.) nach den Anleitungen des Herstellers isoliert. DNA wurde mit 25 µl sterilem MilliQ-Wasser aus der Spin-Säule eluiert. In den folgenden Größenangaben für DNA-Fragmente wird die Fragmentnummerierung nach Kang et al. (1989) verwendet. Ad35-DNA wurde mit EcoRI aufgeschlossen, und die drei Fragmente (etwa 22,3 (A), 7,3 (B) und 6 kb (C)) wurden unter Verwendung des GeneClean kit (Bio101, Inc.) aus Gel isoliert. pBr322 wurde mit EcoRI oder mit EcoRI und EcoRV aufgeschlossen, und aufgeschlossene Fragmente wurden aus Gel isoliert und mit Tsap-Enzym (Gibco BRL) dephosphoryliert. Als nächstes wurde das Ad35-C-Fragment mit 6 kb an das pBr322 × EcoRI-Fragment ligiert, und das ITR enthaltende Ad35-Fragment (EcoRI-B) wurde an das Fragment pBr322 × EcoRI/EcoRV ligiert. Ligationen wurden bei 16°C über Nacht inkubiert und in DH5α-kompetente Bakterien transformiert (Life Techn.). Minipreps von erhaltenen Kolonien wurden durch Restriktionsanalyse auf die richtige Insertion der Ad35-Fragmente analysiert. Es wurde festgestellt, dass sowohl das Ad35-Fragment mit 6 kb als auch das mit 7,3 kb richtig in pBr322 inseriert waren. Das Fragment mit 6 kb wurde in beiden Orientierungen pBr/Ad35-Eco6.0<sup>+</sup> und pBr/Ad35-Eco6.0<sup>-</sup> isoliert, wobei das + für 5' in Richtung 3' und die Ausrichtung in Bezug auf pBr322 steht. Der Klon mit dem Ad35-B-Insert von 7,3 kb mit der Bezeichnung pBr/Ad35-Eco7.3 wurde teilweise sequenziert, um die richtige Ligation des ITR am 3'-Ende zu überprüfen. Es wurde gefunden, dass die ITR im unteren Strang die Sequenz 5'-CATCATCAAT ...-3' hatte. Dann wurde pBr/Ad35-Eco7.3 durch die Insertion des Ad35-Fragments von 6 kb am 5'-Ende verlängert. Dazu wurde pBr/Ad35-Eco7.3 mit EcoRI aufgeschlossen und dephosphoryliert. Das Fragment wurde aus Gel isoliert und an das Ad35-EcoRI-Fragment mit 6 kb ligiert. Nach der Transformation wurden die Klone auf die richtige Ausrichtung des Inserts getestet, und ein Klon mit der Bezeichnung pBr/Ad35-Eco13.3 wurde ausgewählt. Dieser Klon wird dann mit dem nach dem Aufschluss von wt Ad35 mit Sall erhaltenen Sall-D-Fragment von etwa 5,4 kb verlängert. Dazu wird die Sall-Stelle im pBr322-Rückgrat durch einen partiellen Aufschluss von pBr/Ad35-Eco13.3 mit Sall entfernt, die klebrigen Enden werden mittels einer Klenow-Behandlung aufgefüllt und eine erneute Ligation wird durchgeführt. Es wird ein Klon ausgewählt, der eine einzige Sall-Stelle im adenoviralen Insert enthält. Dieser Klon mit der Bezeichnung pBrΔsal/Ad35-Eco13.3 wird dann mit AatII linearisiert, das im Rückgrat von pBr322 vorhanden ist, und an einen Sall-Linker mit komplementären AatII-Enden ligiert. Die DNA wird dann mit überschüssigem Sall aufgeschlossen, und das lineare Fragment wird isoliert und an das 5,4-kb-Sall-D-Fragment von Ad35 ligiert. Es wird ein Klon ausgewählt, der das Sall-Fragment enthält, das in der richtigen Orientierung in pBr/Ad35-Eco13.3 inseriert ist. Der resultierende Klon pBr/Ad35.Sal2-rITR enthält das 3'-Ende von Ad35 mit etwa 17 kb einschließlich der rechten ITR. Um die Freisetzung der rechten ITR von den Vektorsequenzen zum Zeitpunkt der Viruserzeugung zu ermöglichen, wird eine die rechte ITR flankierende NotI-Stelle mittels PCR eingeführt.

**[0085]** Das Ad35-ExoRI-A-Fragment mit 22,3 kb wurde ebenfalls in pBr322 × EcoRI/EcoRV geklont. Es wurde ein Klon mit der Bezeichnung pBr/Ad35-EcoA3' ausgewählt, der offensichtlich eine Deletion von etwa 7 kb am 5'-Ende aufwies. Es enthielt die Sall-Stelle bei 9,4 kb in Ad35-wt-DNA und etwa 1,5 kb Sequenzen stromaufwärts. Unter Verwendung dieser Sall-Stelle und der einzigartigen NdeI-Stelle im Rückgrat von pBr322 wird dieser Klon am 5'-Ende durch die Insertion eines Ad35-Fragments von etwa 5 kb am 5'-Ende des ersten Sall in Ad35 so verlängert, dass durch die Insertion eines Linkers am 5'-Ende des Ad35 eine NotI-Restriktionsstelle erzeugt wird. Dieser Klon mit der Bezeichnung pBr/Ad35.pIX-EcoA enthält nicht die Sequenzen am linken Ende (ITR, Verpackungssequenzen und E1), und am 3'-Ende weist er eine Überlappung von etwa 3,5 kb mit dem Klon pBr/Ad35.Sal2-rITR auf.

**[0086]** Zur Erzeugung eines Adapterplasmids wurde Ad35 mit Sall aufgeschlossen, und das B-Fragment von etwa 9,4 kb am linken Ende wurde isoliert. pBr322 wurde mit EcoRV und Sall aufgeschlossen, vom Gel isoliert und mit Tsap-Enzym dephosphoryliert. Beide Fragmente sind ligiert, und Klone mit der richtigen Insertion und der richtigen Sequenz der linken ITR werden ausgewählt. Zur Ermöglichung einer Freisetzung der linken ITR von den Vektorsequenzen zum Zeitpunkt der Viruserzeugung wird eine die linke ITR flankierende NotI-Stelle mittels PCR eingeführt. Von diesem Klon werden die E1-Sequenzen deletiert und mittels PCR durch eine Polylinker-Sequenz ersetzt. Die Polylinker-Sequenz wird zur Einführung einer Expressionskassette für ein Gen

der Wahl verwendet. Rekombinante Ad35-Klone werden durch Transfektion von PER.C6-Zellen mit dem Adapterplasmid pBr/Ad35.pIX-EcoA und pBr/Ad35.Sal2-rITR erzeugt, wie in [Fig. 3](#) veranschaulicht ist. Eine homologe Rekombination führt zu rekombinanten Viren.

#### Beispiel 5

Die Prävalenz der Neutralisierungsaktivität (NA) auf Ad35 ist in humanen Seren von verschiedenen geographischen Orten gering

**[0087]** In Beispiel 1 haben wir die Analyse der Neutralisierungsaktivität (NA) in humanen Seren aus einem Ort in Belgien beschrieben. Bemerkenswerterweise wurde bei einer Testgruppe von 44 untersuchten Adenovirus-Serotypen ein Serotyp, Ad35, bei keinem der untersuchten 100 Seren neutralisiert. Darüber hinaus wurde gefunden, dass wenige Serotypen, Ad26, Ad34 und Ad48, bei 8% oder weniger der getesteten Seren neutralisiert wurden. Diese Analyse wurde weiterhin auf andere Serotypen von Adenoviren ausgedehnt, die zuvor nicht untersucht wurden, und wurde unter Verwendung einer Auswahl von Serotypen aus dem ersten Screening auch auf Seren von verschiedenen geographischen Orten ausgedehnt.

**[0088]** Dazu wurden Adenoviren vermehrt, gereinigt und in dem in Beispiel 1 beschriebenen CPE-Inkubationstest auf Neutralisation getestet. Unter Verwendung der Seren aus derselben Charge wie in Beispiel 1 wurden die Adenovirus-Serotypen 7B, 11, 14, 18 bzw. 44/1876 auf Neutralisation getestet. Es wurde gefunden, dass diese Viren in 59, 13, 30, 98 bzw. 54% der Seren neutralisiert wurden. Somit wird aus dieser Serie Ad11 mit einer relativ niedrigen Häufigkeit neutralisiert.

**[0089]** Weil bekannt ist, dass die Häufigkeit der Isolierung von Adenovirus-Serotypen aus menschlichem Gewebe sowie die Prävalenz der NA gegenüber Adenovirus-Serotypen an verschiedenen geographischen Orten verschieden sein kann, haben wir weiterhin eine Auswahl der Adenovirus-Serotypen gegen Seren von verschiedenen Orten untersucht. Humane Seren wurden von zwei zusätzlichen Orten in Europa (Bristol, GB, und Leiden, Niederlande) und von zwei Orten in den Vereinigten Staaten (Stanford, CA, und Great Neck, NY) erhalten. Adenoviren, bei denen festgestellt wurde, dass sie in 20% oder weniger der Seren des ersten Screenings neutralisiert wurden, sowie Ad2, Ad5, Ad27, Ad30, Ad38, Ad43 wurden auf die Neutralisierung in Seren aus GB getestet. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in [Fig. 4](#) aufgeführt. Die Adenovirus-Serotypen 2 und 5 wurden wiederum in einem hohen Prozentsatz humaner Seren neutralisiert. Weiterhin werden einige der Serotypen, die bei einem niedrigen Prozentsatz von Seren im ersten Screening neutralisiert wurden, bei einem höheren Prozentsatz von Seren aus GB neutralisiert, z. B. Ad26 (7% im Vergleich zu 30%), Ad28 (13% im Vergleich zu 50%), Ad34 (5% im Vergleich zu 27%) und Ad48 (8% im Vergleich zu 32%). Eine Neutralisierungsaktivität gegenüber Ad11 bzw. Ad49, die beim ersten Screening bei einem relativ niedrigen Prozentsatz von Seren festgestellt wurde, wurde bei diesem zweiten Screening bei sogar noch einem niedrigeren Prozentsatz ermittelt (13% im Vergleich zu 5% bzw. 20% im Vergleich zu 11%). Jetzt wurde festgestellt, dass der Serotyp Ad35, der bei keinem der Seren des ersten Screenings neutralisiert wurde, bei einem niedrigen Prozentsatz (8%) von Seren aus GB neutralisiert wurde. Die Prävalenz der NA in humanen Seren aus GB ist gegenüber den Serotypen Ad11 und Ad35 am niedrigsten.

**[0090]** Zur weiteren Analyse wurden Seren aus zwei Orten in den US (Stanford, CA und Great Neck, NY) und aus den Niederlanden (Leiden) erhalten. In [Fig. 5](#) ist eine Übersicht von Daten aufgeführt, die mit diesen Seren und den bisherigen Daten erhalten wurden. Mit Ausnahme von Ad5, Ad11 und Ad35 wurden nicht alle Viren in allen Seren getestet. Die allgemeine Folgerung aus diesem umfassenden Screening von humanen Seren besteht darin, dass in westlichen Ländern die Prävalenz der Neutralisationsaktivität gegenüber Ad35 von allen Serotypen am niedrigsten ist: Durchschnittlich 7% der humanen Seren enthalten eine Neutralisationsaktivität (5 verschiedene Orte). Ein anderer Adenovirus der B-Gruppe, Ad11, wird ebenfalls von einem niedrigen Prozentsatz von humanen Seren (durchschnittlich 11% in Seren aus 5 verschiedenen Orten) neutralisiert. Der Adenovirus-Typ 5 wird in 56% der humanen Seren, die an 5 verschiedenen Orten erhalten wurden, neutralisiert. Obwohl der Serotyp 49 der D-Gruppe nicht in allen Seren getestet wurde, wird er ebenfalls mit einer relativ geringen Häufigkeit in Proben aus Europa und von einem Ort in den US neutralisiert (Mittelwert 14%).

**[0091]** Bei den oben beschriebenen Neutralisierungsexperimenten wird ein Serum als nicht neutralisierend bewertet, wenn in dem Napf mit der höchsten Serumkonzentration der maximale Schutz des CPE im Vergleich zu den Kontrollen ohne Serum 40% beträgt. Der Schutz wird wie folgt berechnet:

% Schutz = OD des entsprechenden Napfes-OD der Viruskontrolle × 100%

**[0092]** Gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 wird das Serum in fünf verschiedenen, von 4x bis 64x reichenden Verdünnungen ausplattiert. Daher ist eine Unterscheidung zwischen niedrigen NA-Titern (d. h. einer Neutralisation nur bei den höchsten Serumkonzentrationen) und hohen NA-Titern (d. h. auch einer Neutralisation in Nöpfen mit der niedrigsten Serumkonzentration) möglich. Es stellte sich heraus, dass von den in unserem Screening eingesetzten humanen Seren, von denen festgestellt wurde, dass sie eine Neutralisierungsaktivität gegenüber Ad5 aufweisen, 70% hohe Titer aufwiesen, während nur 15% derjenigen Seren, die eine NA gegenüber Ad35 aufwiesen, hohe Titer aufwiesen. Von den Seren, die hinsichtlich der NA auf Ad11 positiv waren, hatten nur 8% hohe Titer. Für Ad49 betrug dieser Wert 5%. Daher ist nicht nur die Häufigkeit einer NA gegenüber Ad35, Ad11 und Ad49 im Vergleich zu Ad5 viel niedriger, sondern die überwiegende Mehrzahl der Seren, die eine NA gegenüber diesen Viren aufweist, enthält niedrige Titer. Daher haben adenovirale Vektoren auf der Grundlage von Ad11, Ad35 oder Ad49 einen klaren Vorteil gegenüber Vektoren auf der Grundlage von Ad5, wenn sie als Vehikel für die Gentherapie oder Impfvektoren in vivo oder in einer beliebigen Anwendung eingesetzt werden, bei der die Infektionseffizienz durch eine Neutralisierungsaktivität behindert wird.

**[0093]** In den folgenden Beispielen wird die Konstruktion eines Vektorsystem zur Erzeugung von sicheren, von RCA freien Vektoren auf der Grundlage von Ad35 beschrieben.

#### Beispiel 6

##### Sequenz des humanen Adenovirus-Typs 35

**[0094]** Ad35-Viren wurden auf PER.C6-Zellen vermehrt, und DNA wurde gemäß der Beschreibung in Beispiel 4 isoliert. Die Gesamtsequenz wurde von Qiagen Sequence Services (Qiagen GmbH, Deutschland) erzeugt. Die gesamte virale DNA wurde durch eine Ultraschallbehandlung geschert, und die Enden der DNA wurde mittels T4-DNA-Polymerase glatt gemacht. Gescherte glatte Fragmente wurden auf Agarosegelen nach der Größe getrennt, und es wurden Gelscheiben erhalten, die DNA-Fragmenten mit 1,8 bis 2,2 kb entsprachen. DNA wurde mittels des QIA Gelextraktionsprotokolls von den Gelscheiben gereinigt und in eine Shotgun-Bank von pUC19-Plasmid klonierenden Vektoren subkloniert. Ein Array von Klonen in Platten mit 96 Nöpfen, die die Ziel-DNA 8 (+/-2) Mal abdeckten, wurde zur Erzeugung der gesamten Sequenz verwendet. Die Sequenzierung erfolgte in Thermocyclern 9700 von Perkin-Elmer unter Verwendung der BigDyeTerminator-Chemie und AmpliTaq-FS-DNA-Polymerase, gefolgt von einer Reinigung mittels Sequenzierungsreaktionen unter Verwendung der DyeEx-96-Technologie von QIAGEN. Sequenzierungs-Reaktionsprodukte wurden dann einer automatisierten Trennung und Detektion der Fragmente auf Sequenzern mit 96 Spuren unterzogen. Die Contig-Sequenz der und Lücken in der anfänglichen Sequenz wurden durch ein Lesen von Walking Primern der Ziel-DNA oder durch ein direktes Sequenzieren von PCR-Produkten gefüllt. Es stellte sich heraus, dass die Enden des Virus höchstwahrscheinlich aufgrund von Klonierungsschwierigkeiten, die aus den pTP-Aminosäuren, die nach dem mittels Proteinase K erfolgenden Aufschluss der viralen DNA an den ITR-Sequenzen gebunden blieben, resultierten, in der Shotgun-Bank fehlten. Durch zusätzliche Sequenzläufe an viraler DNA wurden die meisten Sequenzen in diesen Bereichen gelöst, wobei es jedoch schwierig war, eine klare Sequenz der terminalsten Nucleotide zu erhalten. Bei der am 5'-Ende erhaltenen Sequenz handelte es sich um 5'-CCAATAATA-TACCT ...-3', während es sich bei der am 3'-Ende erhaltenen Sequenz um 5'-... AGGTATATTATTGAT-GATGGG-3' handelte. Die meisten humanen Adenoviren weisen eine terminale Sequenz 5'-CATCATCAATAA-TATAACC-3' auf. Darüber hinaus stellte sich auch heraus, dass ein Klon, der das 3'-Ende der DNA von Ad35 darstellte, die nach dem Klonieren des terminalen Ad35-EcoRI-Fragments mit 7 kb in pBr322 erhalten wurde (siehe Beispiel 4) ebenfalls die typische CATCATCAATAAT ...-Sequenz aufwies. Daher kann Ad35 die typische Endsequenz aufweisen, und die Schwierigkeiten, die beim direkten Sequenzieren an der viralen DNA auftreten, sind auf Artefakte zurückzuführen, die mit Run-off-Sequenzläufen und dem Vorhandensein von restlichen Aminosäuren von pTP zurückzuführen sind.

**[0095]** Die Gesamtsequenz von Ad35 mit korrigierten terminalen Sequenzen ist in [Fig. 6](#) aufgeführt. Auf der Grundlage der Sequenzhomologie mit Ad5 (Genbank-Nr. M72360) und Ad7 (partielle Sequenz Genbank Nr. X03000) und der Position der offenen Leseraster ist die Organisation des Virus mit der allgemeinen Organisation der meisten humanen Adenoviren, insbesondere derjenigen von Viren der Untergruppe B, identisch. Die Gesamtlänge des Genoms beträgt 34 794 Basenpaare.

## Beispiel 7

Konstruktion eines Vektorsystems auf der Grundlage eines Plasmids zur Erzeugung rekombinanter Viren auf der Grundlage von Ad35.

**[0096]** Ein funktionelles Vektorsystem auf der Grundlage eines Plasmids zur Erzeugung rekombinanter adenoviraler Vektoren umfasst die folgenden Komponenten:

1. Ein Adapterplasmid, umfassend eine linke ITR und Verpackungssequenzen, die von Ad35 und wenigstens einer Restriktionsstelle stammen, zur Insertion einer heterologen Expressionskassette und fehlenden E1-Sequenzen. Weiterhin enthält das Adapterplasmid Ad35-Sequenzen in Richtung des 3'-Endes der E1B-Kodierungsbereichs einschließlich des pIX-Promoters und Kodierungssequenzen, die ausreichend sind, um eine homologe Rekombination des Adapterplasmids mit einem zweiten Nucleinsäuremolekül zu vermitteln.
2. Ein zweites Nucleinsäuremolekül, umfassend Sequenzen, die zum Adapterplasmid homolog sind, und Ad35-Sequenzen, die zur Vermehrung und zum Verpacken des rekombinanten Virus erforderlich sind, d. h. frühe, intermediäre und späte Gene, die in der Verpackungszelle nicht vorhanden sind.
3. Eine Verpackungszelle, die wenigstens funktionelle E1-Proteine verfügbar macht, die dazu fähig sind, die E1-Funktion von Ad35 zu komplementieren.

**[0097]** Andere Verfahren zur Erzeugung von rekombinanten Adenoviren in komplementierenden Verpackungszellen sind im Fachgebiet bekannt und können auf Ad35-Viren angewandt werden, ohne von der Erfindung abzuweichen. Als Beispiel wird die Konstruktion eines Systems auf der Grundlage eines Plasmids nachfolgend ausführlich beschrieben.

## 1) Konstruktion eines Ad35-Adapterplasmids.

**[0098]** Dazu wurde das Adapterplasmid pAdApt (**Fig. 7**, beschrieben in Beispiel 2) zuerst so modifiziert, dass Adapterplasmide erhalten wurden, die verlängerte Polylinker enthalten und zweckmäßige einzigartige Restriktionsstellen aufweisen, die die linke ITR und die Adenovirus-Sequenz am 3'-Ende flankieren, um die Freisetzung des Adenovirus-Inserts von Plasmidvektorsequenzen zu ermöglichen. Die Konstruktion dieser Plasmide wird nachfolgend ausführlich beschrieben: Das Adapterplasmid pAdApt (Beispiel 2) wurde mit Sall aufgeschlossen und zur Verminderung einer erneuten Ligation mit alkalischer Shrimp-Phosphatase behandelt. Ein Linker, der aus den folgenden beiden phosphorylierten und einem Annealing unterzogenen Oligonucleotiden

ExSalPacF 5' - TCG ATG

GCA AAC AGC TAT TAT GGG TAT TAT GGG TTC GAA TTA ATT AA- 3'; un

d

ExSalPacR 5' - TCG ATT AAT TAA TTC GAA CCC ATA ATA CCC

ATA ATA GCT GTT TGC CA- 3'

bestand, wurde direkt in das aufgeschlossene Konstrukt ligiert, wodurch die Sall-Restriktionsstelle durch Pi-PspI, Swal und PacI ersetzt wurde. Dieses Konstrukt wurde als pADAPT + ExSalPac-Linker bezeichnet. Weiterhin wurde ein Teil der linken ITR von pAdApt unter Verwendung der folgenden Primer mittels PCR amplifiziert:

PCLIPMSF: 5' - CCC CAA TTG GTC GAC CAT CAT CAA TAA TAT ACC

TTA TTT TGG -3'

und pCLIPBSRGI: 5' - GCG AAA ATT GTC ACT TCC TGT G - 3'.

Das amplifizierte Fragment wurde mit MunI und BsrGI aufgeschlossen und in mit EcoRI teilweise aufgeschlossenes pAd5/Clip (siehe Beispiel 2) kloniert und nach der Reinigung mit BsrGI aufgeschlossen, wodurch die linke ITR und das Verpackungssignal wieder insertiert wurden. Nach einer Analyse mittels Restriktionsenzymen wurde das Konstrukt mit Scal und SgrAI aufgeschlossen, und ein Fragment mit 800 bp wurde aus dem Gel isoliert und in einen mit Scal/SgrAI aufgeschlossenen pADAPT + ExSalPac-Linker ligiert. Das resultierende Konstrukt mit der Bezeichnung pIPspSalAdapt wurde mit Sall aufgeschlossen, dephosphoryliert und in den oben erwähnten phosphorylierten, doppelsträngigen Linker ExSalPacF/ExSalPacR ligiert. Ein Klon, bei dem sich die PacI-Stelle der ITR am nächsten befand, wurde durch Restriktionsanalyse identifiziert, und die Se-

quenzen wurden durch Sequenzanalyse bestätigt. Dieses neue pAdApt-Konstrukt mit der Bezeichnung pIPspAdapt (**Fig. 8**) erntet somit zwei ExSalPac-Linker, die Erkennungssequenzen für PacI, PI-PspI und BstBI enthalten, die den adenoviralen Teil des adenoviralen Adapterkonstrukts umgeben und die zur Linearisierung der Plasmid-DNA vor der Cotransfizierung mit adenoviralen Helferfragmenten verwendet werden können.

**[0099]** Um transgene Klonierungspermutationen weiter zu verstärken, wurde eine Reihe von Polylinkervarianten auf der Grundlage von pIPspAdapt konstruiert. Zu diesem Zweck wurde pIPspAdapt zuerst mit EcoRI aufgeschlossen und dephosphoryliert. Ein Linker, der aus den beiden folgenden phosphorylierten und einem Annealing unterzogenen Oligonucleotiden:

**Ecolinker+:** 5' -AAT TCG GCG CGC CGT CGA CGA TAT CGA TAG CGG  
CCG C -3'

und

**Ecolinker-:** 5' -AAT TGC GGC CGC TAT CGA TAT  
CGT CGA CGG CGC GCC G -3'

bestand, wurde in dieses Konstrukt ligiert, wodurch Restriktionsstellen für Ascl, Sall, EcoRV, ClaI und NotI erzeugt wurden. Beide Orientierungen dieses Linkers wurden erhalten, und Sequenzen wurden durch Restriktionsanalyse und Sequenzanalyse bestätigt. Das Plasmid, das den Polylinker in der Reihenfolge 5'-HindIII, KpnI, AgeI, EcoRI, Ascl, Sall, EcoRV, ClaI, NotI, NheI, HpaI, BamHI und XbaI enthielt, wurde als pIPspAdapt1 bezeichnet (**Fig. 9**), wogegen das Plasmid, das den Polylinker in der Reihenfolge HindIII, KpnI, AgeI, NotI, ClaI, EcoRV, Sall, Ascl, EcoRI, NheI, HpaI, BamHI und XbaI enthielt, als pIPspAdapt2 bezeichnet wurde.

**[0100]** Zur Erleichterung des Klonierens von Konstrukten mit einem anderen Sinn oder Antisense-Konstrukten wurde ein Linker konstruiert, der aus den beiden folgenden Oligonucleotiden bestand:

**pIPspAdapt:** HindXba+ 5'-AGC TCT AGA GGA TCC GTT AAC GCT AGC  
GAA TTC ACC GGT ACC AAG CTT A-3'; HindXba- 5'-CTA GTA AGC  
TTG GTA CCG GTG AAT TCG CTA GCG TTA ACG GAT CCT CTA G-3'.

um den Polylinker von pIPspAdapt zu reversieren. Dieser Linker wurde in mit HindIII/XbaI aufgeschlossenes pIPspAdapt ligiert, und das richtige Konstrukt wurde isoliert. Die Bestätigung erfolgte durch Restriktionsenzym-Analyse und Sequenzierung. Dieses neue Konstrukt, pIPspAdaptA, wurde mit EcoRI aufgeschlossen, und der oben erwähnte Ecolinker wurde in dieses Konstrukt ligiert. Beide Orientierungen dieses Linkers wurden erhalten, was zu pIPspAdapt3 führte (**Fig. 10**), das den Polylinker in der Reihenfolge XbaI, BamHI, HpaI, NheI, EcoRI, Ascl, Sall, EcoRV, ClaI, NotI, AgeI, KpnI und HindIII enthält. Alle Sequenzen wurden durch Restriktionsenzymanalyse und Sequenzierung bestätigt.

**[0101]** Adapterplasmide auf der Grundlage von Ad35 wurden wie folgt konstruiert: Die linke ITR und die den Verpackungssequenzen 1 bis 464 von Ad35 wt entsprechende Verpackungssequenz (**Fig. 6**) wurden mittels PCR unter Verwendung der folgenden Primer an wtAd35-DNA amplifiziert:

Primer 35F1:

5' -CGG AAT TCT TAA TTA ATC GAC ATC ATC AAT AAT ATA CCT TAT  
AG-3'

Primer 35R2:

5' -GGT GGT CCT AGG CTG ACA CCT ACG TAA AAA CAG-3'

**[0102]** Durch die Amplifizierung wird eine PacI-Stelle am 5'-Ende und eine AvrII-Stelle am 3'-Ende der Sequenz eingeführt.

**[0103]** Zur Amplifizierung wurde das Platinium-Pfx-DNA-Polymeraseenzym (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers, aber mit 0,6 µM Primern und mit DMSO, das bis zu einer Endkonzentration von 3% zugegeben wurde, verwendet. Das Amplifizierungsprogramm war wie folgt: 2 min bei 94°C (30 s bei 94°C, 30 s bei 56°C, 1 min bei 68°C) für 30 Zyklen, gefolgt von 10 min bei 68°C. Das PCR-Produkt wurde mittels eines PCR-Reinigungssatzes (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers gereinigt und mit PacI und AvrII aufgeschlossen. Das aufgeschlossene Fragment wurde dann mittels des GeneClean kit (Bio 101, Inc.) vom Gel gereinigt. Das

Adapterplasmid auf der Grundlage von Ad5, pIPspAdApt-3 (**Fig. 10**) wurde mit AvrII aufgeschlossen und dann teilweise mit PacI aufgeschlossen, und das Fragment von 5762 bp wurde in einer Gelscheibe aus LMP-Agarose isoliert und mit dem oben erwähnten PCR-Fragment ligiert, das mit denselben Enzymen aufgeschlossen und in elektrokompente DH10B-Zellen (LTI) transformiert worden war. Der resultierende Klon hat die Bezeichnung pIPspAdApt3-Ad35IIIR.

**[0104]** Parallel wurde ein zweites Stück Ad35-DNA unter Verwendung der folgenden Primer amplifiziert:

**35F3:** 5'- TGG TGG AGA TCT GGT GAG TAT TGG GAA AAC-3'

**35R4:** 5'- CGG AAT TCT TAA TTA AGG GAA ATG CAA ATC TGT GAG G-  
3'

**[0105]** Die Sequenz dieses Fragments entspricht den Nucl. 3401 bis 4669 von wtAd35 (**Fig. 6**) und enthält 1,3 kb Sequenzen, die in Richtung des 3'-Endes direkt von der E1B 55k kodierenden Sequenz starten. Die Amplifizierung und Reinigung erfolgte gemäß der obigen Beschreibung für das die linke ITR und die Verpackungssequenz enthaltende Fragment. Das PCR-Fragment wurde dann mit PacI aufgeschlossen und in den Vektor pNEB193 (New England Biolabs) subkloniert, der mit SmaI und PacI aufgeschlossen worden war. Die Integrität der Sequenz des resultierenden Klons wurde durch Sequenzanalyse überprüft. pNEB/Ad35pF3R4 wurde dann mit BglII und PacI aufgeschlossen, und der Ad35-Insert wurde mittels des QIAExII-Kits (Qiagen) vom Gel isoliert. pIPspAdApt3-Ad35IIIR wurde mit BglII und dann teilweise mit PacI aufgeschlossen. Das Fragment von 3624 bp (das Vektorsequenzen, die Ad35-ITR- und Verpackungssequenzen sowie den CMV-Promoter, eine Mehrfach-Klonierungsregion und ein polyA-Signal enthielt), wurde ebenfalls mittels des QIAExII-Kits (Qiagen) isoliert. Beide Fragmente wurden ligiert und in kompetente DH10B-Zellen (LTI) transformiert. Der resultierende Klon, pAdApt35IP3 (**Fig. 11**) weist die Expressionskassette von pIPspAdApt3 auf, enthält aber die linke ITR und Verpackungssequenzen von Ad35 und ein zweites, Nucl. 3401 bis 4669 von Ad35 entsprechendes Fragment. Eine zweite Version des Ad35-Adapterplasmids mit der Mehrfach-Klonierungsstelle in der gegenüberliegenden Orientierung wurde wie folgt angefertigt:

pIPspAdapt1 (**Fig. 9**) wurde mit NdeI und BglII aufgeschlossen, und das Band von 0,7 kbp, das einen Teil des CMV-Promotors, das MCS und SV40-polyA enthielt, wurde isoliert und in die entsprechenden Stellen von pAdApt35IP3 inseriert, wodurch pAdApt35IP1 erzeugt wurde (**Fig. 12**).

**[0106]** Dann wurden die Adapterplasmide pAdApt35.LacZ und pAdApt35.Luc erzeugt, indem die Transgene von pcDNA.LacZ (mit KpnI und BamHI aufgeschlossen) und pAdApt.Luc (mit HindIII und BamHI aufgeschlossen) in die entsprechenden Stellen in pAdApt35IP1 inseriert wurden. Die Erzeugung von pcDNA.LacZ und pAdAptLuc ist in WO99/55132 beschrieben.

## 2) Konstruktion des Cosmids pWE.Ad35.pXI-rITR

**[0107]** In **Fig. 13** sind die verschiedenen Schritte veranschaulicht, die zur Konstruktion des Plasmidklons unternommen wurden, der die Ad35-Sequenzen von bp 3401 bis 34 794 (Ende der rechten ITR), die ausführlich unten beschrieben sind, enthält.

**[0108]** Ein erstes PCR-Fragment (pIX-NdeI) wurde unter Verwendung des folgenden Primersatzes erzeugt:

**35F5:** 5'-CGG AAT TCG CGG CCG CGG TGA GTA TTG GGA AAA C -3'

**35R6:** 5'-CGC CAG ATC GTC TAC AGA ACA G-3'

**[0109]** Die DNA-Polymerase Pwo (Roche) wurde gemäß der Anleitungen des Herstellers verwendet, wobei jedoch eine Endkonzentration von 0,6 µM der beiden Primer und 50 ng wt Ad35 DNA als Matrize verwendet wurden. Die Amplifizierung wurde wie folgt durchgeführt: 2 min bei 94°C, 30 Zyklen von 30 s bei 94°C, 30 s bei 65°C und 1 min 45 s bei 72°C, gefolgt von 8 min bei 68°C. Zur Ermöglichung einer Klonierung in den TA-Klonierungsvektor PCR2.1 wurde eine letzte Inkubierung mit 1 Einheit superTaq-Polymerase (HT Biotechnology LTD) für 10 min bei 72°C durchgeführt.

**[0110]** Das amplifizierte Fragment mit 3370 bp enthält Ad35-Sequenzen von bp 3401 bis 6772 mit einer NotI-Stelle, die am 5'-Ende hinzugefügt wurde. Fragmente wurden unter Verwendung des PCR-Reinigungssatzes (LTI) gereinigt.

**[0111]** Ein zweites PCR-Fragment (NdeI-rITR) wurde unter Verwendung der folgenden Primer erzeugt:

**35F7: 5'-GAA TGC TGG CTT CAG TTG TAA TC -3'**

**35R8: 5'- CGG AAT TCG CGG CCG CAT TTA AAT CAT CAT CAA TAA  
TAT ACC-3'**

**[0112]** Die Amplifizierung erfolgte mit pfx-DNA-Polymerase (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers, aber mit 0,6 µM der beiden Primer und 3% DMSO, wobei 10 ng wtAd35-DNA als Matrix verwendet wurden. Das Programm war wie folgt: 3 min bei 94°C und 5 Zyklen von 30 s bei 94°C, 45 s bei 40°C, 2 min 45 s bei 68°C, gefolgt von 25 Zyklen von 30 s bei 94°C, 30 s bei 60°C, 2 min 45 s bei 68°C. Zur Ermöglichung einer Klonierung in den TA-Klonierungsvektor PCR2.1 wurde eine letzte Inkubierung mit 1 Einheit superTaq-Polymerase für 10 min bei 72°C durchgeführt. Das amplifizierte Fragment mit 1,6 kb, das von Nucl. 33 178 bis zum Ende der rechten ITR von Ad35 reichte, wurde mittels des PCR-Reinigungssatzes (LTI) gereinigt.

**[0113]** Beide gereinigten PCR-Fragmente wurden in den PCR2.1-Vektor des TA-Klonierungssatzes (Invitrogen) ligiert und in STBL-2-kompetente Zellen (LTI) transformiert. Klone, die den erwarteten Insert enthielten, wurden sequenziert, wodurch die richtige Amplifizierung bestätigt wurde. Als nächstes wurden beide Fragmente durch einen Aufschluss mit NotI und NdeI aus dem Vektor herausgeschnitten und mittels des GeneClean-Satzes (BIO 101, Inc.) vom Gel gereinigt. Der Cosmidvektor pWE15 (Clontech) wurde mit NotI aufgeschlossen, dephosphoryliert und auch vom Gel gereinigt. Diese drei Fragmente wurden ligiert und in STBL2-kompetente Zellen (LTI) transformiert. Einer der richtigen Klone, der beide PCR-Fragmente enthielt, wurden dann mit NdeI aufgeschlossen, und das lineare Fragment wurde mittels des GeneClean-Satzes vom Gel gereinigt. Ad35-wtDNA wurde mit NdeI aufgeschlossen, und das Fragment von 26,6 kb wurde mittels Agarose-Enzym (Roche) nach den Anleitungen des Herstellers vom LMP-Gel gereinigt. Diese Fragmente wurden zusammenligiert und unter Verwendung von Verpackungsextrakten des λ-Phagen (Stratagene) gemäß dem Protokoll des Herstellers verpackt. Nach der Infektion in STBL-2-Zellen wurden Kolonien auf Platten gezogen und auf das Vorhandensein des kompletten Inserts analysiert. Ein Klon, bei dem das große Fragment nach Aufschlüssen mit drei Enzymen (NcoI, PvuII und Scal) in der richtigen Orientierung und mit den richtigen Restriktionsmustern inseriert war, wurde ausgewählt. Dieser Klon hat die Bezeichnung pWE.Ad35.pIX-rITR. Er enthält die Ad35-Sequenzen von bp 3401 bis zum Ende und ist von NotI-Stellen flankiert (**Fig. 14**).

### 3) Erzeugung von rekombinanten Viren auf der Grundlage von Ad35 in PER.C6

**[0114]** Ad35-Wildtyp-Virus kann in PER.C6-Verpackungszellen mit sehr hohen Titern gezüchtet werden. Es ist jedoch unbekannt, ob die Ad5-E1-Region, die in PER.C6 vorhanden ist, dazu fähig ist, E1-deletierte, rekombinante Ad35-Viren zu komplementieren. Um dies zu testen, wurden PER.C6-Zellen mit dem oben beschriebenen Adapterplasmid pAdApt35.LacZ und dem großen Rückgrat-Fragment pWE.Ad35.pIX-rITR cotransfiziert. Zuerst wurde pAdApt35.LacZ mit PacI aufgeschlossen, und pWE.Ad35.pIX-rITR wurde mit NotI aufgeschlossen. Ohne weitere Reinigung wurden 4 µg eines jeden Konstrukts mit DMEM (LTI) vermischt und in PER.C6-Zellen transfiziert, und ein T25-Kolben wurde am Vortag mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen beimpft, wobei Lipofectamin (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers verwendet wurde. Als positive Kontrolle wurden 6 µg pWE.Ad35.pIX-rITR-DNA, die mit PacI aufgeschlossen war, mit einem NheI-Fragment von 6,7 kb cotransfiziert, das aus Ad35-wt-DNA isoliert worden war, die das linke Ende des die E1-Region enthaltenden viralen Genoms enthielt. Am nächsten Tag wurde das Medium (DMEM mit 10% FBS und 10 mM MgCl<sub>2</sub>) aufgefrischt, und Zellen wurden weiter inkubiert. Am 2. Tag nach der Transfektion wurden Zellen mit Trypsin behandelt und in T80-Kolben übertragen. Der Kolben mit der positiven Kontrolle wies an fünf Tagen nach der Transfektion CPE auf, was zeigt, dass das Konstrukt pWE.Ad35.pIX-rITR wenigstens in Gegenwart von Ad35-E1-Proteinen funktionell ist. Die Transfektion mit dem Adapterplasmid Ad35LacZ und pWE.Ad35.pIX-rITR ergab kein CPE. Diese Zellen wurden am 10. Tag im Medium geerntet und ein Mal gefroren/aufgetaut, um das Virus aus den Zellen freizusetzen. 4 ml des geernteten Materials wurden zu einem T80-Kolben mit PER.C6-Zellen (bei einer Konfluenz von 80%) gegeben und für weitere fünf Tage inkubiert. Diese Ernte/Reinfektion wurde zwei Mal wiederholt, aber es gab keinen Hinweis auf einen virusassoziierten CPE. Aus diesem Experiment scheint sich zu ergeben, dass die Ad5-E1-Proteine nicht oder nicht gut genug dazu fähig sind, Ad35-rekombinante Viren zu komplementieren, es kann aber sein, dass die Sequenzüberlappung des Adapterplasmids und des Rückgrat-Plasmids pWE.Ad35.pIX-rITR nicht groß genug ist, um effektiv zu rekombinieren und zu einem rekombinanten Virusgenom zu führen. Die positive Kontrolltransfektion erfolgte mit einem Fragment vom linken Ende mit 6,7 kb, und daher betrug die Sequenzüberlappung etwa 3,5 kb. Das Adapterplasmid und das Fragment pWE.Ad35.pIX-rITR weisen eine Sequenzüberlappung von 1,3 kb auf. Um zu prüfen, ob die Sequenzüberlappung von 1,3 kb zu klein für eine effiziente homologe Rekombination ist, wurde eine Cotransfektion mit pWE.Ad35.pIX-rITR, das mit PacI aufgeschlossen war, und einem PCR-Fragment von Ad35 wtDNA, die mit dem oben erwähnten 35F1 und 35R4 erzeugt worden war, wobei dieselben

Verfahren verwendet wurden, die oben erwähnt sind. Das PCR-Fragment enthält somit Sequenzen des linken Endes bis zu bp 4669 und hat daher dieselben Überlappungssequenzen mit pWE.Ad35.pIX-rITR wie das Adapterplasmid pAdApt35.LacZ, verfügt aber über Ad35-E1-Sequenzen. Nach der PCR-Säulenreinigung wurde die DNA mit Sall aufgeschlossen, um mögliche intakte Matrixsequenzen zu entfernen. Eine Transfektion mit dem aufgeschlossenen PCR-Produkt allein diente als negative Kontrolle. Vier Tage nach der Transfektion transfizierte in den Zellen vorliegendes CPE mit dem PCR-Produkt und dem Fragment Ad35 pIX-rITR und nicht in der negativen Kontrolle. Dies zeigt, dass überlappende Sequenzen von 1,3 kb ausreichend sind, um in Gegenwart der Ad35.E1-Proteine Viren zu erzeugen.

**[0115]** Wir schließen aus diesen Experimenten, dass das Vorhandensein wenigstens eines der Ad35.E1-Proteine zur Erzeugung von rekombinanten Vektoren auf der Grundlage von Ad35 aus Plasmid-DNA in Ad5 komplementierenden Zelllinien notwendig ist.

#### Beispiel 8

##### 1) Konstruktion von Ad35.E1-Expressionsplasmiden

**[0116]** Weil Ad5-E1-Proteine in PER.C6 nicht zur effizienten Komplementierung von rekombinanten Ad35-Viren fähig sind, müssen Ad35.E1-Proteine in Ad5 komplementierenden Zellen (z. B. PER.C6) exprimiert werden, oder eine neuen, Ad35.E1-Proteine exprimierende Verpackungszelllinie muss hergestellt werden, wobei entweder von diploiden, primären humanen Zellen oder etablierten, Adenovirus-E1-Proteine nicht exprimierenden Zelllinien ausgegangen werden muss. Um sich der ersten Möglichkeit zu widmen, wurde die Ad35-E1-Region gemäß der Beschreibung unten in Expressionsplasmiden geklont. Zunächst wurde die Ad35-E1-Region von bp 468 bis bp 3400 aus wtAd35-DNA amplifiziert, wobei der folgende Primersatz verwendet wurde:

**35F11:** 5'-GGG GTA CCG AAT TCT CGC TAG GGT ATT TAT ACC-3'

**35F10:** 5'-GCT CTA GAC CTG CAG GTT AGT CAG TTT CTT CTC CAC

**TG-3'**

**[0117]** Diese PCR führt eine KpnI- und eine EcoRI-Stelle am 5'-Ende und eine SbfI- und eine XbaI-Stelle am 3'-Ende ein.

**[0118]** Eine Amplifizierung an 5 ng Matrix-DNA wurde mit Pwo-DNA-Polymerase (Roche) unter Befolgung der Anleitungen des Herstellers durchgeführt, wobei aber beide Primer mit einer Endkonzentration von 0,6 µM verwendet wurden. Das Programm war wie folgt: 2 min bei 94°C, 5 Zyklen von 30 s bei 94°C, 30 s bei 56°C und 2 min bei 72°C, gefolgt von 25 Zyklen zu 30 s bei 94°C, 30 s bei 60°C und 2 min bei 72°C, gefolgt von 10 min bei 72°C. Das PCR-Produkt wurde mittels eines PCR-Reinigungssatzes (LTI) gereinigt und mit KpnI und XbaI aufgeschlossen. Das aufgeschlossene PCR-Fragment wurde dann an den Expressionsvektor pRSVhvbNeo (siehe unten) ligiert, der ebenfalls mit KpnI und XbaI aufgeschlossen war. Ligationen wurden gemäß der Anleitungen des Herstellers in kompetente STBL-2-Zellen (LTI) transformiert, und Kolonien wurden auf die richtige Insertion von Ad35E1-Sequenzen in den Polylinker zwischen dem RSV-Promoter und HBV-polyA analysiert. Der resultierende Klon wurde als pRSV.Ad35-E1 bezeichnet (**Fig. 15**). Die Ad35-Sequenzen in pRSV.Ad35-E1 wurden durch Sequenzanalyse überprüft.

**[0119]** pRSVhvbNeo wurde wie folgt erzeugt: pRc-RSV (Invitrogen) wurde mit PvuII aufgeschlossen, mit dem TSAP-Enzym (LTI) dephosphoryliert, und das Vektorfragment mit 3 kb wurde in Agarose mit einem niedrigen Schmelzpunkt (LMP) isoliert. Das in WO96/35798 beschriebene Plasmid pPGKneoA (**Fig. 16**) wurde mit SspI vollständig aufgeschlossen, um das Plasmid zu linearisieren und einen partiellen Aufschluss mit PvuII zu erleichtern. Nach dem partiellen Aufschluss mit PvuII wurden die resultierenden Fragmente auf einem LMP-Agarosegel getrennt, und das PvuII-Fragment mit 2245 bp, das den PGK-Promoter, das Resistenz gegen Neomycin verleihende Gen und HBVpolyA enthielt, wurde isoliert. Beide isolierten Fragmente wurden ligiert, wodurch der Expressionsvektor pRSV-pNeo erhalten wurde, bei dem jetzt die ursprüngliche Expressionskassette SV40promneo-SV40polyA durch eine Kassette PGKprom-neo-HBVpolyA ersetzt war (**Fig. 17**). Dieses Plasmid wurde zum Ersatz von BGHpA mit HBVpA weiter wie folgt modifiziert: pRSVpNeo wurde mit Scal linearisiert und weiter mit XbaI aufgeschlossen. Das Fragment mit 1145 bp, das einen Teil des Amp-Gens und die RSV-Promotersequenzen und die Polylinker-Sequenz enthielt, wurde mittels des GeneClean-Satzes (Bio Inc. 101) vom Gel isoliert. Als nächstes wurde pRSVpNeo mit Scal linearisiert und weiter mit EcoRI partiell aufgeschlossen, und das Fragment mit 3704 bp, das die PGKneo-Kassette und die Vektorsequenzen enthielt, wurde wie oben aus dem Gel isoliert. Ein drittes Fragment, das die durch XbaI bzw. EcoRI am 5'- bzw. am 3'-Ende flankierte HBV-polyA-Sequenz enthielt, wurde dann durch PCR-Amplifizierung in pRSVpNeo erzeugt, wobei

der folgende Primersatz verwendet wurde:

**HBV-F: 5' - GGC TCT AGA GAT CCT TCG CGG GAC GTC -3'** und

**HBV-R: 5' - GGC GAA TTC ACT GCC TTC CAC CAA GC -3'**

**[0120]** Die Amplifizierung erfolgte mit dem Elongase-Enzym (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers unter den folgenden Bedingungen: 30 s bei 94°C, dann 5 Zyklen zu 45 s bei 94°C, 1 min bei 42°C und 1 min bei 68°C, gefolgt von 30 Zyklen von 45 s bei 94°C, 1 min bei 65°C und 1 min bei 68°C, gefolgt von 10 min bei 68°C. Das PCR-Fragment mit 625 bp wurde dann mittels des Qiaquick-PCR-Reinigungssatzes gereinigt, mit EcoRI und XbaI aufgeschlossen und mittels des GeneClean-Satzes aus Gel gereinigt. Die drei isolierten Fragmente wurden ligiert und in DH5a-kompetente Zellen (LTI) transformiert, wodurch das Konstrukt pRSVhbvNeo (**Fig. 18**) erhalten wurde. Bei diesem Konstrukt sind die transkriptionsregulierenden Regionen der RSV-Expressionskassette und des Neomycin-Selektionsmarkers modifiziert, um eine Überlappung mit adenoviralen Vektoren, die oft die Transkription von CMV und SV40 regulierende Sequenzen enthalten, zu vermindern.

2) Erzeugung von Ad35-rekombinanten Viren in PER.C6-Zellen, die mit einem Ad35-E1-Expressionskonstrukt cotransfiziert sind.

**[0121]** Ein T25-Kolben wurde mit einer Dichte von  $5 \times 10^6$  Zellen mit PER.C6-Zellen beimpft, und am nächsten Tag wurden die Zellen mit einer DNA-Mischung transfiziert, die Folgendes enthielt:

- 1 µg pAdApt35.LacZ, mit PacI aufgeschlossen;
- 5 µg pRSV.Ad35E1, nicht aufgeschlossen;
- 2 µg pWE.Ad35.pIX-rITR, mit NotI aufgeschlossen.

**[0122]** Die Transfizierung erfolgte mit Lipofectamine gemäß der Anleitungen des Herstellers. 5 h nach der Zugabe der Transfektionsmischung zu den Zellen wurde das Medium entfernt und durch frisches Medium ersetzt. Nach zwei Tagen wurden Zellen in T80-Kolben überführt und weiter kultiviert. Eine Woche nach der Transfizierung wurde 1 ml des Mediums zu A549-Zellen gegeben, und an den folgenden Tagen wurden Zellen auf die Expression von LacZ gefärbt. Blaue Zellen waren nach einem zweistündigen Färben klar sichtbar, was darauf hindeutet, dass rekombinante, LacZ exprimierende Viren erzeugt wurden. Die Zellen wurden weiter kultiviert, wobei ein klares Auftreten von CPE aber nicht beobachtet wurde. Nach 12 Tagen erschienen aber Zellklumpen in der Einzelzellschicht, und 18 Tage nach der Transfektion wurden Zellen abgetrennt. Dann wurden die Zellen und das Medium geerntet, ein Mal gefroren/aufgetaut, und 1 ml des rohen Lysats wurde zur Infizierung von PER.C6-Zellen in einer Platte mit 6 Nöpfen verwendet. Zwei Tage nach der Infektion wurden Zellen auf eine LacZ-Aktivität gefärbt. Nach 2 h waren 15% der Zellen blau gefärbt. Um auf das Vorhandensein von und/oder replikationskompetenten Viren zu testen, wurden A549-Zellen mit diesen Viren infiziert und weiter kultiviert. Es wurden keine Anzeichen von CPE gefunden, was auf das Fehlen von replikationskompetenten Viren hindeutet. Diese Experimente zeigen, dass rekombinante AdApt35.LacZ-Viren in PER.C6-Zellen erzeugt wurden, die mit einem Ad35-E1-Expressionskonstrukt cotransfiziert waren.

3) Rekombinante Ad35-Viren entgehen der Neutralisation in humanem Serum, das eine neutralisierende Wirkung gegenüber Ad5-Viren enthält

**[0123]** Die AdApr35.LacZ-Viren wurden dann zur Untersuchung der Infektion in Gegenwart von Serum untersucht, das eine neutralisierende Wirkung gegenüber Ad5-Viren enthält. Gereinigte LacZ-Viren auf der Grundlage von Ad5 dienen als positive Kontrolle für NA. Dazu wurde eine Platte mit 24 Nöpfen mit PER.C6-Zellen mit einer Dichte von  $2 \times 10^5$  Zellen/Napf beimpft. Am nächsten Tag wurde eine humane Serumprobe mit einer hohen neutralisierenden Aktivität gegenüber Ad5 in fünf Stufen von fünffachen Verdünnungen im Kulturmedium verdünnt. 0,5 ml verdünntes Serum wurden dann mit  $4 \times 10^6$  Viruspartikeln des Virus AdApr.LacZ in 0,5 ml Medium vermischt, und nach 30 min einer Inkubierung bei 37°C wurden 0,5 ml der Mischung in doppelter Ausführung zu PER.C6-Zellen gegeben. Für die AdApr35.LacZ-Viren wurden 0,5 ml der verdünnten Serumproben mit 0,5 ml rohem, das AdApt35.LacZ-Virus enthaltenden Lysat vermischt, und nach der Inkubation wurden 0,5 ml dieser Mischung in Duplikat zu PER.C6-Zellen gegeben. Als positive Kontrolle für die Infektion wurden Virusproben verwendet, die in Medium ohne Serum inkubiert worden waren. Nach 2 h bei einer Infektion bei 37°C wurde Medium zugegeben, wodurch ein Endvolumen von 1 ml erreicht wurde, und die Zellen wurden weiter inkubiert. Zwei Tage nach der Infektion wurden Zellen auf die LacZ-Aktivität gefärbt. Die Ergebnisse sind in Tabelle II aufgeführt. Aus diesen Ergebnissen geht klar hervor, dass, während AdApt5-LacZ-Viren effizient neutralisiert werden, AdApt35.LacZ-Viren unabhängig vom Vorhandensein von humanem Serum infektiös bleiben. Dies beweist, dass rekombinante Viren auf der Grundlage von Ad35 der Neutralisation in humanen Seri-

en, die NA gegen Viren auf der Grundlage von Ad5 enthalten, entgehen.

#### Beispiel 9:

##### Chimärer Ad5/Faser-35-Vektor mit einer Zelltypspezifität für hämopoetische CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>-Stammzellen

**[0124]** In Beispiel 3 haben wir die Erzeugung einer Bank aus Adenoviren auf der Grundlage von Ad5, die Faserproteine anderer Serotypen beherbergen, beschrieben. Als nicht einschränkendes Beispiel für die Verwendung dieser Bank beschreiben wir hier die Identifikation von fasermodifizierten Adenoviren, die eine verbesserte Infektion von hämopoetischen Stammzellen aufweisen. Zellen, die aus humanem Knochenmark, Nabelschnur-Blut oder mobilisiertem periphärem Blut stammen, die den durchflusszytometrischen Phänotyp tragen, der für das Antigen CD34 positiv und für die frühen Differenzierungsmarker CD33, CD38 und CD71 (lin<sup>-</sup>) negativ ist, werden gewöhnlich als hämopoetische Stammzellen (HSC) bezeichnet. Eine genetische Modifizierung dieser Zellen ist von größerem Interesse, weil alle hämopoetischen Stammbäume von diesen Zellen stammen, und daher ist die HSC eine Zielzelle für die Behandlung vieler erworbener oder kongenitaler humaner hämopoetischer Störungen. Beispiele für Krankheiten, die für eine genetische Modifikation von HSC geeignet sind, umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein, die Hurlersche Krankheit, die Huntersche Krankheit, die Sanfilippus-Krankheit, die Morquios-Krankheit, die Gaucher-Krankheit, die Farbersche Krankheit, die Niemann-Pick-Krankheit, die Krabbe-Krankheit, die metachromatische Leukodystrophie, die I-Zellen-Krankheit, das schwere Immundefizienzsyndrom, die Jak-3-Defizienz, die Fucosidose-Defizienz, die Thalassämie und die Porphyria erythropoietica. Zusätzlich zu diesen hämopoetischen Störungen basieren auch Strategien zur Verhinderung oder Behandlung des erworbenen Immunschwäche-Syndroms (AIDS) und von hämopoetischen Krebsarten auf der genetischen Modifikation von HSC oder von HSC stammenden Zellen wie CD4-positiven T-Lymphozyten im Fall von AIDS. Die oben aufgeführten Beispiele zielen somit auf die Einführung von DNA in die HSC zur Komplementierung eines Gens und eines Proteinmangels auf genetischer Ebene ab. Im Fall von Strategien für AIDS oder Krebs kann es sich bei der in die HSC einzuführende DNA um antivirale Gene oder Suizidgene handeln.

**[0125]** Neben den oben aufgeführten Beispielen gibt es mehrere andere Bereiche, in denen eine effiziente Transduktion von HSC unter Verwendung von adenoviralen Vektoren eine wichtige Rolle spielt, zum Beispiel auf dem Gebiet der Gewebetechnologie. In diesem Bereich ist es wichtig, die Differenzierung von HSC in spezielle Stammbäume zu leiten. Einige nicht einschränkende Beispiele sind die ex vivo erfolgende Knochenbildung, die Knorpelbildung, die Hautbildung sowie die Erzeugung von Vorstufen von T-Zellen oder von Vorstufen von endothelialen Zellen. Die Erzeugung von Knochen, Knorpel oder Haut in Bioreaktoren kann zur Transplantation nach Knochenbrüchen oder Rückenmarkläsionen oder schweren Brandverletzungen eingesetzt werden. Natürlich können transduzierte Zellen auch direkt in einen Patienten reinfundiert werden. Die Bildung einer großen Zahl von endothelialen Zellvorstufen aus HSC ist von Interesse, weil diese endothelialen Vorstufenzellen nach der Reinfusion zu Stellen einer kardiovaskulären Verletzung wie einer Ischämie zurückkehren können. In gleicher Weise ist die Bildung einer großen Zahl von T-Zellen aus HSC von Interesse, weil diese T-Zellen-Vorstufen ex vivo präpariert werden können, um nach einer Reinfusion der präparierten T-Zellen bestimmte Zielzellen im menschlichen Körper auszurotten. Bevorzugte Ziele im menschlichen Körper können Tumore oder virusinfizierte Zellen sein.

**[0126]** Aus den oben beschriebenen Beispielen kann geschlossen werden, dass eine wirksame Genübertragung auf HSC ein Hauptinteresse für das Gebiet der Gentherapie ist. Daher ist eine Änderung des Wirtszellbereichs für den Adenovirus-Serotyp 5, um in vitro sowie in vivo auf HSC abzielen zu können, ein Hauptinteresse der Erfindung. Zur Identifizierung eines chimären Adenovirus mit bevorzugten Infektionsmerkmalen für humane HSC erzeugten wir eine Bank von Viren auf der Grundlage von Ad5, die das Fasermolekül von alternativen Serotypen (Serotypen 8, 9, 13, 16, 17, 32, 35, 45, 40-L, 51) tragen. Die Erzeugung dieser fasermodifizierten Bank ist in Beispiel 3 beschrieben. Ad5 wurde als Bezug verwendet. Eine kleine Gruppe dieser Bank wurde an humanem TF-1 (Erythroleukämie, ATCC CRL-2003) getestet, während alle erzeugten chimären Viren an humanen primären Stromazellen und humanen HSC getestet wurden. Humane TF-1-Zellen wurden routinemäßig in DMEM aufbewahrt, das um 10% FCS und 50 ng/ml IL-3 (Sandoz, Basel, Schweiz) ergänzt war. Humanes, primäres, fibroplastenartiges Stromas, das aus einem Knochenmarkspirat isoliert wurde, wird routinemäßig in DMEM/10% FCS aufbewahrt. Jeder Napf von Platten mit 24 Nöpfen wurde mit Stroms mit einer Konzentration von  $1 \times 10^5$  Zellen beimpft. 24 h nach dem Beimpfen wurden die Zellen 2 h lang 1000 Ad5-, Ad5.Fib16-, Ad5.Fib17-, Ad5.Fib35-, Ad5.Fib40-L- oder Ad5.Fib51-Viruspartikeln pro Zelle ausgesetzt, die alle das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Marker trugen. Nach 2 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen, und wiederum wurde Medium damit beimpft, ohne dass Virus zugegeben wurde. Jeder Napf von Platten mit 24 Nöpfen wurde mit TF-1-Zellen mit einer Konzentration von  $2 \times 10^5$  Zellen beimpft, und die Zellen wurden

ebenfalls 2 h lang 1000 Viruspartikeln der verschiedenen chimären Adenoviren ausgesetzt. Das Virus wurde durch ein Waschen der Zellen nach der 2-stündigen Einwirkung entfernt. Beide Zelltypen wurden 48 h nach der Viruseinwirkung geerntet und mittels eines Durchflusszytometers auf eine Expression von GFP analysiert. Die in **Fig. 19** veranschaulichten Ergebnisse für TF-1-Zellen zeigen, dass chimäre Adenoviren, die eine Faser der Serotypen 16, 35 oder 51 tragen (die alle aus der Adenovirus-Untergruppe B stammen) im Vergleich zu Ad5 (Untergruppe 5), Ad5.Fib17 (Untergruppe D) oder Ad5.Fib40-L (Untergruppe F) bevorzugte Infektionsmerkmale aufweisen. Es wurde primäres humanes Stroms getestet, weil diese Zellen üblicherweise als "Feeder"-Zellen verwendet werden, um eine Proliferation und ein Halten von HCS unter ex vivo-Kulturbedingungen zu ermöglichen. Im Gegensatz zur Transduktion von TF-1-Zellen war keines der chimären, Faserprotein kodierenden Adenoviren dazu fähig, humanes primäres Stroms effizient zu transduzieren (**Fig. 20**). Trotz der Beobachtung, dass keines der bekannten Rezeptormoleküle in diesen Zellen exprimiert wird (siehe Tabelle III), wurde eine annehmbare Infektion von humanem, fibroblastartigem, primärem Stroms nur mit Ad5 beobachtet. Das Fehlen einer Infektion von humanem Stroms bei der Verwendung der chimären Viren ist vorteilhaft, weil bei der Einrichtung einer Co-Kultur das chimäre Adenovirus nicht hauptsächlich von den Stroms-"Feeder"-Zellen absorbiert wird.

**[0127]** Um die Transduktionskapazität der chimären, Faserprotein exprimierenden Viren zu testen, wurde ein Pool von Nabelschnurblut (3 Personen) zur Isolierung von Stammzellen verwendet. CD34<sup>+</sup>-Zellen wurden unter Verwendung eines MACS-Labortrennsystems (Miltenyi Biotec) unter Anwendung des vom Hersteller mitgelieferten Protokolls aus einem mononuklearen Zellpräparat isoliert. 150 µl DMEM (ohne Serum; Gibco, Gaithersburg, MD) wurden mit  $2 \times 10^5$  CD34<sup>+</sup>-Zellen beimpft, und 10 µl chimäres Adenovirus wurden zugegeben (wodurch ein Endverhältnis Viruspartikel/Zellen von 1000 erhalten wurde). Bei den getesteten chimären Adenoviren handelte es sich um Ad5, Ad5.Fib16, Ad5.Fib35, Ad5.Fib17, Ad5.Fib51, die alle das grün fluoreszierende Protein (GFP) als Marker enthielten. Zellen wurden für 2 h in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Zellen ein Mal mit 500 µl DMEM gewaschen und in 500 µl Stem-Pro-34-SF-Medium (Life Technologies, Grand Island, NY) resuspendiert.

**[0128]** Zellen wurden dann für 5 Tage in Platten mit 24 Näpfen (Greiner, Frickenhausen, Deutschland) auf bestrahltem (20 Gy), zuvor hergestelltem humanem Knochenmarkstroma (Literaturstelle 1) in einer angefeuchteten Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> bei 37°C kultiviert. Nach 5 Tagen wurde die gesamte Zellpopulation durch eine Trypsinbehandlung mit 100 µl 0,25% Trypsin-EDTA (Gibco) isoliert. Die Anzahl der Zellen vor und nach der 5-tägigen Kultur wurde mittels eines Hämatozytometers gemessen. Die Anzahl der CD34<sup>+</sup>- und der CD34<sup>++</sup>CD33, 38, 71<sup>-</sup>-Zellen in jeder Probe wurde aus der Gesamtzahl der isolierten Zellen berechnet, und die Häufigkeit der CD34<sup>++</sup>CD33, 38, 71<sup>-</sup>-Zellen in der gesamten Population wurde mittels FACS-Analyse bestimmt. Die Transduktionswirksamkeit wurde mittels FACS-Analyse bestimmt, wobei die Häufigkeit der GFP exprimierenden Zellen sowie die Intensität des GFP pro individuelle Zelle in getrennten Unterpopulationen überwacht wurde. Die in **Fig. 21** veranschaulichten Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass der Adenovirus-Serotyp 5 oder der chimäre Adenovirus Ad5.Fib17 CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>-Zellen nicht infiziert, was durch das Fehlen einer GFP-Expression belegt wird. Im Gegensatz dazu werden, wenn die chimären Viren das Fasermolekül der Serotypen 16, 51 oder 35 tragen, hohe Prozentwerte von GFP-positiven Zellen in dieser Zellpopulation verzeichnet. Eine Spezifität für CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> wird demonstriert, weil eine geringe GFP-Expression in denjenigen CD34<sup>+</sup>-Zellen beobachtet wird, die auch CD33, CD38 und CD71 exprimieren. Eine Unterfraktionierung der CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>-Zellen (**Fig. 22**) zeigte, dass der Prozentwert der für GFP positiven Zellen bei Verwendung von Ad5.Fib16, Ad5.Fib35 oder Ad5.Fib51 abnimmt, wenn die Zellen mehr und mehr positiv für die frühen Differenzierungsmarker CD33 (Knochenmark), CD71 (Erythrozyten) und CD38 (üblicher früher Differenzierungsmarker) werden. Diese Ergebnisse zeigen somit die Spezifität der chimären Adenoviren Ad5.Fib16, Ad5.Fib35 und Ad5.Fib51 für HSC. **Fig. 23** zeigt eine Ausrichtung der Ad5-Faser auf die von Ad16, 35 und 51 stammenden chimären Fasergruppenproteine der B-Gruppe. Durch die Bestimmung der Anzahl der nach dem Transduktionsverfahren isolierten Zellen kann die Toxizität des Adenovirus bestimmt werden. Die Isolierung der Menge an CD34<sup>++</sup>-Zellen sowie der Menge an CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup> (**Fig. 24**) zeigt, dass eine 2-stündige Einwirkung auf 1000 Adenovirus-Teilchen keine Auswirkung auf die Anzahl der isolierten Zellen hatte.

#### Beispiel 10

Ein chimärer Ad5/Faser35-Vektor mit einer Zelltypspezifität für dendritische Zelle

**[0129]** Dendritische Zellen sind antigen-präsentierende Zellen (APC), die dahingehend spezialisiert sind, dass sie eine primäre Immunantwort initiieren und dazu fähig sind, einen Gedächtnistyp einer Immunantwort zu verstärken. In Abhängigkeit von ihrer Entwicklungsstufe haben DC verschiedene Funktionen: Unreife DC sind sehr effizient bei der Aufnahme und der Prozessierung von Antigenen zur Präsentation durch Moleküle

des Haupthistokompatibilitäts-Komplexes (MHC) der Klasse I und der Klasse II, während reife DC, die beim Abfangen und bei der Prozessierung von Antigenen weniger effektiv sind, bei der Stimulierung von naiven und Gedächtnis-CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aufgrund der hohen Expression von MHC-Molekülen und costimulierenden Molekülen auf ihrer Zelloberfläche viel besser funktionieren. Die unreifen DC reifen in vivo nach der Aufnahme von Antigenen, bewegen sich zu den T-Zellen-Bereichen in den lymphoiden Organen und primen die Aktivierung von T-Zellen.

**[0130]** Weil es sich bei den DC um diejenigen Zellen handelt, die zur Auslösung einer Immunantwort verantwortlich sind, besteht seit langem ein Interesse im Beladen von DC mit immunstimulierenden Proteinen, Peptiden oder den diese Proteine kodierenden Genen, um das Immunsystem zu triggern. Die Anwendungen für diese Strategie finden sich auf dem Gebiet der Krebsbehandlung sowie auf dem Gebiet der Impfung. Bisher haben sich Antikrebsstrategien hauptsächlich auf die ex vivo erfolgende Beladung von DC mit Antigenen (Protein oder Peptid) konzentriert. Diese Studien haben ergeben, dass dieses Verfahren zur Induktion einer cytotoxischen T-Zellen-Aktivität führte. Die zum Beladen der Zellen verwendeten Antigene werden gewöhnlich als tumorspezifisch identifiziert. Einige nicht einschränkende Beispiele für solche Antigene sind GP100, Mage oder Mart-1 für Melanome.

**[0131]** Neben der Behandlung von Krebs können andere potenzielle Krankheiten des Menschen gegenwärtig durch Impfung verhindert werden. Bei der Impfstrategie wird dem Immunsystem über die Wirkung von Antigen-präsentierenden Zellen, d. h. den unreifen DC, ein "verkrüppeltes" Pathogen präsentiert. Wohlbekannte Beispiele für eine Krankheitsprävention über Impfstrategien umfassen Hepatitis A, B und C, Influenza, Tollwut, Gelbfieber, Masern. Zusätzlich zu diesen wohlbekannteren Impfprogrammen werden Forschungsprogramme zur Behandlung von Malaria, Ebola, Onchozerkose, HIV und vielen anderen Krankheiten entwickelt. Viele der oben erwähnten Pathogene werden als gefährlich für die Bildung eines "verkrüppelten" Pathogenvakzins betrachtet. Letzteres erfordert daher die Isolierung und Charakterisierung von Proteinen eines jeden Pathogens, das dazu fähig ist, eine "vollständig aufgeblühte" Immunantwort auszulösen, was daher bei der Exposition mit einem Wildtyp-Pathogen zu einem vollständigen Schutz führt. Damit diese Strategie der Beladung von DC mit immunstimulatorischen Proteinen oder Peptiden therapeutisch machbar wird, müssen wenigstens zwei getrennte Kriterien erfüllt sein: 1) die Isolierung großer Zahlen von DC, die isoliert, manipuliert und in einen Patienten reinfundiert werden können, wodurch das Verfahren körpereigen wird. Heute ist es möglich, solch große Mengen an unreifen DC aus kultivierten peripheren Blutmonozyten von jedem gegebenen Donor zu erhalten. 2) kann ein Vektor übertragen werden, der DC effizient so transduzieren kann, dass die für in immunstimulatorisches Protein kodierende DNA verabreicht werden kann. Letzteres ist extrem wichtig, weil klar geworden ist, dass die Zeit, die erforderlich ist, damit die DC zu den lymphoiden Organen gelangen, so beschaffen ist, dass die meisten Proteine oder Peptide bereits aus den DC freigesetzt sind, was zu einer unvollständigen Immun-Initialreaktion führt. Weil DC terminal differenziert sind und somit nicht teilende Zellen sind, wird angenommen, dass rekombinante adenovirale Vektoren die Antigene für DC kodierende DNA übertragen. Idealerweise sollte dieses Adenovirus eine hohe Affinität für dendritische Zellen aufweisen, von neutralisierenden Antikörpern des Wirtes jedoch nicht erkannt werden, sodass eine in vivo erfolgende Transduktion von DC bewerkstelligt werden kann. Letzteres würde die Notwendigkeit für ex vivo erfolgende Manipulationen von DC entfallen lassen, würde aber zu einem medizinischen Verfahren führen, das mit den gegenwärtig etablierten Impfprogrammen, d. h. einer hauptsächlich intramuskulär oder subkutan erfolgenden Injektion, identisch ist. Somit kann eine DC, die von adenoviralen, ein immunogenes Protein kodierenden Vektoren übertragen wird, ideal dazu geeignet sein, als natürliche Adjuvantien für die Immuntherapie und die Impfung zu dienen. Aus den oben beschriebenen Beispielen kann geschlossen werden, dass eine effiziente Genübertragung auf DC für das Gebiet der Gentherapie ein Hauptinteresse ist. Daher ist eine Änderung des Wirtszellbereichs für den Adenovirus-Serotyp 5 ein Hauptinteresse der Erfindung, um dazu fähig zu sein, auf DC in vitro sowie in vivo abzielen zu können. Um einen chimären Adenovirus mit bevorzugten Infektionsmerkmalen für humane DC zu identifizieren, erzeugten wir eine Bank von Viren auf der Grundlage von Ad5, die ein Fasermolekül von alternativen Serotypen trugen (Serotypen 8, 9, 13, 16, 17, 32, 35, 45, 40-L, 51). Ad5 wurde als Referenz verwendet. Wir werteten die Empfindlichkeit von unreifen und reifen, von humanen Monozyten stammenden DC gegenüber rekombinanten, chimären, verschiedene Fasern exprimierenden Adenoviren aus.

**[0132]** Humane PBMC von gesunden Donoren wurden mittels Ficoll-Hypaque-Dichtezentrifugation isoliert. Monozyten wurden aus PBMC durch eine Anreicherung für CD14<sup>+</sup>-Zellen mittels einer Anfärbung mit anti-humanem, mit FITC markierten, monoklonalen CD14-Antikörper (Becton Dickinson), anti-FITC-Mikrokügelchen und MACS-Trennsäulen (Miltenyi Biotec) isoliert.

**[0133]** Dieses Verfahren führt gewöhnlich zu einer Zellpopulation, bei der es sich um < 90% um CD14<sup>+</sup> handelt, wie mittels FACS analysiert wird. Zellen wurden unter Verwendung des Mediums RPMI-1640 (Gibco), das

10% fötales Kalbsserum (Gibco), 200 ng/ml rhu GM-CSF (R&D/ITK Diagnostics, 100 ng/ml rhu IL-4 (R&D/ITK Diagnostics) in Kultur gebracht und 7 Tage lang kultiviert, wobei die Kulturen alle zwei Tage mit frischem, Zytokine enthaltenden Medium versorgt wurden. Die nach 7 Tagen aus diesem Verfahren resultierende unreife DC exprimiert einen Phänotypen CD83<sup>-</sup>, CD14<sup>low</sup> oder CD14<sup>-</sup>, HLA-DR<sup>+</sup>, wie durch FACS-Analyse gezeigt wurde. Unreife DC werden durch ein Kultivieren der Zellen in einem 100 ng/ml TNF-a enthaltenden Medium 3 Tage lang reifen gelassen, wonach sie CD83 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten.

**[0134]** In einem Pilotexperiment wurden Näpfe von Platten mit 24 Näpfen mit  $5 \times 10^5$  unreifen DC beimpft und 24 h lang mit 100 bzw. 1000 Viruspartikeln pro Zelle eines jeden rekombinanten, Faser-Protein exprimierenden Virus ausgesetzt. Bei dem getesteten Virus handelte es sich um den Adenovirus-Serotyp 5 (Ad5), und den chimären, Faser-Protein exprimierenden Viren auf der Grundlage von Ad5:Ad5.Fib12, Ad5.Fib16, Ad5.Fib28, Ad5.Fib32, Ad5.Fib40-L (lange Faser von Serotyp 40), Ad5.Fib49 und Ad5.Fib51 (wobei Fibxx für den Serotyp steht, von dem das Fasermolekül stammt). Diese Viren stammen von den Untergruppen C, A, B, D, D, F, D bzw. B. Die Zellen wurden nach 24 h lysiert (1% Triton X-100/PBS), und die Luciferase-Aktivität wurde unter Verwendung eines vom Hersteller (Promega, Madison, WI, USA) mitgelieferten Protokolls bestimmt. Die in [Fig. 25](#) veranschaulichten Ergebnisse dieses Experiments zeigen, dass Ad5 unreife DC schlecht infiziert, wie durch den niedrigen Grad einer Transgen-Expression belegt wird. Im Gegensatz dazu weisen Ad5.Fib16 und Ad5.Fib51 (beide ein chimäres, Faser exprimierendes Virus der Gruppe B) und auch Ad5.Fib40-L (Untergruppe F) eine effiziente Infektion von unreifen DC auf der Grundlage einer Expression des Luciferase-Transgens auf.

**[0135]** In einem zweiten Experiment wurden  $5 \times 10^5$  unreife und reife DC mit 10 000 Viruspartikeln pro Zelle von Ad5, Ad5.Fib16, Ad5.Fib40-L und Ad5.Fib51 infiziert, die alle das LacZ-Gen als Marker trugen. Die Expression von LacZ wurde durch Durchflusszytometrieanalyse überwacht, wobei ein CM-FDG-Kit-System und die vom Hersteller (Molecular Probes, Leiden, Niederlande) mitgelieferten Anleitungen verwendet wurden. Die in [Fig. 26](#) veranschaulichten Ergebnisse dieses Experiments korrelieren mit dem vorherigen Experiment dahingehend, dass Ad5.Fib16 und Ad5.Fib51 bei der Übertragung von reifen und unreifen humanen DC gegenüber Ad5 überlegen sind. Auch dieses Experiment zeigt, dass Ad5.Fib40-L nicht so gut wie Ad5.Fib16 und Ad5.Fib51, aber besser als Ad5 ist. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse testeten wir andere chimäre Adenoviren, die Fasern von Viren der Gruppe B enthielten, z. B. Ad5.Fib11 und Ad5.Fib35, auf ihre Kapazität zur Infektion von DC. Wir konzentrierten uns auf unreife DC, weil es sich bei diesen um die Zellen handelt, die ein exprimiertes Transgenprodukt in präsentierbare Peptide der MHC-Klasse I und II prozessieren. Platten mit 24 Näpfen (Costar) wurden mit einer Zelldichte von  $5 \times 10^5$  Zellen/Napf mit unreifen DC beimpft und mit 1000 bzw. 5000 Viruspartikeln pro Zelle infiziert, wonach die Zellen für 48 h unter Bedingungen für unreife DC kultiviert wurden, bevor eine Lyse der Zellen und Messungen der Luciferase-Aktivität erfolgten. Das in [Fig. 27](#) veranschaulichte Ergebnis dieses Experiments zeigt, dass chimäre Adenoviren auf der Grundlage von Ad5, die Fasern von Viren der Gruppe B enthalten, unreife DC effizient infizieren. In einem vierten Experiment haben wir wiederum unreife DC identisch mit der Beschreibung in den obigen Experimenten infiziert, wobei aber dieses Mal Ad5, Ad5.Fib16 und Ad5.Fib35 verwendet wurden, die grün fluoreszierendes Protein (GFP) als Markergen trugen. Die Auswirkungen auf die Expression von GFP, die 48 h nach der Viruseinwirkung mit einem Durchflusszytometer gemessen wurden, sind in [Fig. 28](#) veranschaulicht und entsprechen den bisher erhaltenen Daten. Somit sind die Ergebnisse bisher dahingehend konsistent, als Vektoren auf der Grundlage von Ad5, die eine Faser von einem alternativen, von der Untergruppe B, hauptsächlich eine Faser von 35, 51, 16 und 11 stammenden Adenovirus tragen, zur Transduktion von humanen DC gegenüber Ad5 überlegen sind. Die hier offenbarten Adenoviren sind auch zur Impfung von Tieren sehr geeignet. Um dies zu veranschaulichen, haben wir von der Maus und vom Schimpansen stammende DC getestet, um zu identifizieren, ob diese Viren in diesen Tiermodellen verwendet werden können. Letzteres ist besonders interessant, weil der Rezeptor für den von der Untergruppe B stammenden humanen Adenovirus bisher unbekannt ist und daher nicht bekannt ist, ob dieses Protein unter Spezies konserviert ist. Für beide Spezies wurde jeder Napf von Platten mit 24 Näpfen mit einer Dichte von  $10^5$  Zellen mit unreifen DC beimpft. Anschließend wurden die Zellen 48 h lang im Fall von Schimpansen-DC 1000 Ad5- und Ad.Fib35-Viruspartikeln pro Zelle ausgesetzt (siehe [Fig. 29](#)). Das Mausexperiment wurde mit Viren durchgeführt, die Luciferase als Marker trugen, und demonstrierte eine um das 10- bis 50-fache Erhöhung der Luciferase-Aktivität im Vergleich zu Ad5. Die Schimpansen-DC wurden mit den GFP-Viren infiziert und mittels eines Durchflusszytometers analysiert. Diese ebenfalls in [Fig. 29](#) veranschaulichten Ergebnisse zeigen, dass Ad5 (3%) Schimpansen-DC im Vergleich zu Ad5.Fib35 (66,5%) sehr schlecht transduziert.

## Beispiel 11

Konstruktion eines Vektorsystems auf der Grundlage von Plasmid zur Erzeugung von rekombinanten Viren auf der Grundlage von Ad11

**[0136]** Die Ergebnisse der in Beispiel 5 beschriebenen Neutralisationsexperimente zeigen, dass Ad11 wie Ad35 in der überwiegenden Mehrzahl der humanen Serumproben nicht neutralisiert wurde. Daher sind rekombinante Adenoviren auf der Grundlage von Ad11 gegenüber den üblicherweise verwendeten Vektoren auf der Grundlage von Ad2 und Ad5 als Vektoren für die Gentherapiebehandlung und Impfung bevorzugt. Sowohl Ad35 als auch Ad11 sind Viren der Gruppe B und als Viren klassifiziert, die zum DNA-Homologiecluster 2 gehören (Wadell, 1984). Daher sind die Genome von Ad35 und Ad11 sehr ähnlich. Zur Erzeugung eines Systems auf der Grundlage von Plasmid zur Erzeugung von rekombinanten Viren auf der Grundlage von Ad11 wird das in Beispiel 7 erzeugte Adapterplasmid pAdApt35IP1 wie folgt modifiziert. Das Konstrukt pAdApt35IP1 wird mit AvrII und dann teilweise mit PacI aufgeschlossen. Die Aufschlussmischung wird auf Gel getrennt, und das Fragment mit 4,4 kb, das die Expressionskassette und das Vektor-Rückgrat enthält, wird mittels des GeneClean-Satzes (BIO 101, Inc.) isoliert. Dann wird unter Verwendung der Primer 35F1 und 35R2 (siehe Beispiel 7) eine PCR-Amplifikation an wtAd11-DNA durchgeführt, wobei Pwo-DNA-Polymerase gemäß der Anleitungen der Hersteller verwendet wird. Das erhaltene PCR-Fragment von 0,5 kb wird unter Verwendung des PCR-Reinigungssatzes (LTI) gereinigt und an das oben hergestellte pAdApt35IP1-Fragment ligiert. Dadurch wird das Konstrukt pAdApt11-35IP1 erhalten, bei dem das 5'-Adenovirus-Fragment durch die entsprechende Sequenz von Ad11 ersetzt ist. Als nächstes wird pAdApt11-35IP1 mit BglII und teilweise mit PacI aufgeschlossen. Die erhaltenen Fragmente werden auf Gel getrennt, und das Fragment von 3,6 kb, das die Vektorsequenzen, das 5'-Adenovirus-Fragment und die Expressionskassette enthält, wird wie oben vom Gel gereinigt. Als nächstes wird ein PCR-Fragment unter Verwendung der Primer 35F3 und 35R4 (siehe Beispiel 7) an wtAd11-DNA erzeugt. Die Amplifizierung erfolgt wie oben, und das erhaltene Fragment von 1,3 kb wird mit BglII und PacI gereinigt und aufgeschlossen. Die isolierten Fragmente werden dann ligiert, wodurch das Konstrukt pAdApt11IP1 erhalten wird. Dieses Adapterplasmid enthält jetzt Ad11-Sequenzen statt Ad35-Sequenzen. Die richtige Amplifizierung der mittels PCR amplifizierten Ad11-Sequenzen wird durch Vergleich der Sequenz in diesem Klon mit der entsprechenden Sequenz von Ad11-DNA verifiziert. Letztere wird durch ein direktes Sequenzieren an Ad11-DNA unter Verwendung der aufgeführten PCR-Primer erhalten. Der große, das Ad11-Rückgrat enthaltende Kosmidklon wird wie folgt erzeugt. Zuerst wird ein PCR-Fragment unter Verwendung der Primer 35F5 und 35R6 mit Pwo-DNA-Polymerase gemäß der in Beispiel 7 für Ad35-DNA aufgeführten Beschreibung an Ad11-DNA amplifiziert. Das PCR-Fragment wird dann unter Verwendung des PCR-Reinigungssatzes (LTI) gereinigt und mit NotI und NdeI aufgeschlossen. Das resultierende Fragment von 3,1 kb wird mittels des GeneClean-Satzes (Bio 101, Inc.) vom Gel gereinigt. Dann wird unter Verwendung der Primer 35F7 und 35R8 (siehe Beispiel 7) mit Pwo-DNA-Polymerase gemäß der Anleitungen des Herstellers ein zweites PCR-Fragment an Ad11-DNA erzeugt und unter Verwendung des PCR-Reinigungssatzes (LTI) gereinigt. Dieses amplifizierte Fragment wird ebenfalls mit NdeI und NotI aufgeschlossen, und das resultierende Fragment von 1,6 kb wird wie oben vom Gel gereinigt. Die beiden aufgeschlossenen PCR-Fragmente werden dann mit dem Kosmidvektor pWE15, der zuvor mit NotI und unter Verwendung des Tsap-Enzyms (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers dephosphoryliert worden war, miteinander ligiert. Es wird ein Klon ausgewählt, in dem eine Kopie der beiden Fragmente insertiert ist. Die richtigen Klone werden durch einen analytischen Aufschluss mit NotI ausgewählt, der ein Fragment von 4,7 kb ergibt. Die Bestätigung wird durch eine PCR-Reaktion erhalten, bei der die Primer 35F5 und 35R8 verwendet werden, wodurch ein Fragment derselben Größe erhalten wird. Der richtige Klon wird dann mit NdeI linearisiert und vom Gel isoliert. Als nächstes wird wtAd11-DNA mit NdeI aufgeschlossen, und das große Fragment von 27 kb wird vom Agarosegel mit niedrigem Schmelzpunkt unter Verwendung von Agarase-Enzym (Roche) gemäß der Anleitungen des Herstellers isoliert. Beide Fragmente werden dann ligiert und unter Verwendung von Verpackungsextrakten des  $\lambda$ -Phagen (Stratagene) gemäß dem Protokoll des Herstellers verpackt. Nach einer Infektion in STBL-2-Zellen (LTI) werden Kolonien auf Platten gezogen und auf das Vorhandensein des kompletten Inserts analysiert. Die Funktionalität der ausgewählten Klone wird dann durch eine Cotransfektion in PER.C6 getestet. Dazu wird die DNA mit NotI aufgeschlossen, und 6  $\mu$ g werden mit 2  $\mu$ g eines PCR-Fragments, das auf Ad11-DNA mit den Primern 35F1 und 35R4 (siehe Beispiel 7) erzeugt wurde, cotransfiziert. Richtige Klone ergaben innerhalb einer Woche nach der Transfektion CPE. Der richtige Klon wird als pWE.Ad11.pIX-rITR bezeichnet.

**[0137]** Unter Anwendung des oben beschriebenen Verfahrens wird ein System auf der Grundlage von Plasmid erzeugt, das aus einem zur Insertion von Fremdgenen bestehenden Adapterplasmid und einem großen, das virale Rückgrat enthaltenden Helferfragment besteht. Rekombinante Viren auf der Grundlage von Ad11 werden unter Anwendung der hier für rekombinante Viren auf der Grundlage von Ad35 beschriebenen Verfahren hergestellt.

## Neutralisation von Adenoviren in von Patienten stammenden Proben

**[0138]** In den in den Beispielen 1 und 5 beschriebenen Neutralisationsexperimenten stammten alle Proben von gesunden Freiwilligen. Weil eine der Anwendungen für nicht neutralisierende Vektoren in das Gebiet der Gentherapie fällt, ist es interessant, zu untersuchen, ob Ad35 ebenfalls mit einer geringen Häufigkeit und mit niedrigen Titern in Gruppen von Patienten, die Kandidaten für die Behandlung durch die Gentherapie sind, neutralisiert wird.

## – Patienten mit einer kardiovaskulären Erkrankung

**[0139]** 26 gepaarte Serum- und Perikardflüssigkeits-(PF-)Proben wurden von Patienten mit Herzversagen erhalten. Diese wurden unter Verwendung des in Beispiel 1 beschriebenen Neutralisationsassays gegen Ad5 und Ad35 getestet. Die Ergebnisse bestätigten die bisherigen Daten mit Proben von gesunden Freiwilligen. 70% der Serumproben enthielten NA gegen Ad5 und 4% gegen Ad35. In den Perikardflüssigkeitsproben waren die Titer niedriger, was in einem Gesamtwert von 40% mit NA gegen Ad5 und keinem für Ad35 resultierte. Es gab eine gute Korrelation zwischen NA in PF und Serum, d. h., es gab keine positiven PF-Proben ohne NA in der gepaarten Serumprobe. Diese Ergebnisse zeigen, dass bei der Behandlung von kardiovaskulären Krankheiten die nicht neutralisierten Vektoren auf der Grundlage von Ad35 gegenüber Ad5-Vektoren bevorzugt sind. Da dies für alle Formen von nicht neutralisierten Vektoren in dieser Anmeldung gilt, kann der Vektor auf dem Genom des nicht neutralisierten Serotypen basieren, oder er kann auf Ad5 (oder einem anderen Serotypen) basieren, wobei er wenigstens die Haupt-Kapsidproteine (Hexon, Penton und gegebenenfalls eine Faser) des nicht neutralisierten Serotypen exprimiert.

## – Patienten mit rheumaartiger Arthritis

**[0140]** Die Arthritis zugrunde liegende molekulare Determinante ist noch nicht bekannt, es ist aber bekannt, dass sowohl die T-Zellen-Fehlfunktion als auch eine unausgeglichene Produktion von Wachstumsfaktoren in Gelenken eine Entzündung und Hyperplasie von synovialen Gewebe. Die Synoviozyten beginnen sich zu vermehren und dringen in den Knorpel und den Knochen ein, was zur Zerstörung dieser Gewebe führt. Gegenwärtige Behandlungen beginnen (wenn eine frühe Stufe vorliegt) mit der Verabreichung von entzündungshemmenden Medikamenten (Anti-TNF, IL-1-RA, IL-10) und/oder herkömmlichen Medikamenten (z. B. MTX, Sulfasalazin). In späten Stufen wird eine RA-Synovektomie durchgeführt, die auf einem chirurgischen, Bestrahlungs- oder chemischen Eingriff beruht. Eine Alternative oder zusätzliche Option ist eine Behandlung mittels Gentherapie, wobei ein adenoviraler Vektor direkt in die Gelenke von Patienten übertragen wird und ein entzündungshemmendes Medikament oder ein Suizidgen exprimiert. Vorherige Untersuchungen, die an Rhesusaffen durchgeführt wurden, die an einer kollageninduzierten Arthritis litten, haben gezeigt, dass Vektoren auf der Grundlage von Ad5, die ein Markergen tragen, Synoviozyte transduzieren können. Ob im Fall von Menschen eine adenovirale Übertragung durch das Vorhandensein von NA behindert wird, ist nicht bekannt. Zur Untersuchung des Vorhandenseins von NA in Synovialflüssigkeit von RA-Patienten wurden SF-Proben von einer Gruppe von 53 zufällig ausgewählten Patienten erhalten, die an Rheumatoidarthritis leiden. Diese wurden unter Anwendung des in Beispiel 1 beschriebenen Neutralisationsassays gegen mehrere wt-Adenoviren getestet. Die Ergebnisse dieses Screening sind in Tabelle III aufgeführt. Es wurde gefunden, dass der Adenovirustyp 5 in 72% der SF-Proben neutralisiert wurde. Die meisten dieser Proben enthalten hohe NA-Titer, und auch die höchste getestete Verdünnung der SF-Probe (64 x) neutralisierte Ad5-Viren. Dies bedeutet, dass eine adenovirale Übertragung von Vektoren in die Synoviozyten in den Gelenken von RA-Patienten sehr ineffizient ist. Weil die Titer in den SF so hoch sind, ist es darüber hinaus zweifelhaft, ob durch eine Spülung der Gelenke vor der Vektorinjektion genug der NA entfernt werden. Es zeigte sich, dass von den anderen getesteten Serotypen Ad35 nur von 4% der Proben neutralisiert wurde. Daher bestätigen diese Daten die an Serumproben von gesunden Patienten erhaltenen Ergebnisse und zeigen, dass zur Behandlung von Rheumatoidarthritis Vektoren auf der Grundlage von Ad35 oder chimäre Vektoren, die wenigstens einige der Kapsidproteine von Ad35 exprimieren, bevorzugte Vektoren sind.

## Modifikationen im Rückgrat von Viren auf der Grundlage von Ad35

## 1) Erzeugung von pBr/Ad35.Pac-rITR und pBr/Ad35.PRn

**[0141]** Beispiel 4 beschreibt die Erzeugung des Ad35-Subklons pBr/Ad35.Eco13.3. Dieser Klon enthält Ad35-Sequenzen von bp 21 943 bis zum Ende der rechten ITR, die in die EcoRI- und die EcoRV-Stelle von pBr322 geklont sind. Zur Erweiterung dieser Sequenzen bis zu der am bp 18 137 in Ad35 befindlichen PacI-Stelle wurde pBr/Ad35.Eco13.3 (siehe Beispiel 4) mit AatII und SnaBI aufgeschlossen, und das große vektorhaltige Fragment wurde mittels des QIAEX-II-Gelextraktionssatzes (Qiagen) vom Gel isoliert. Ad35-wt-DNA wurde mit PacI und SnaBI aufgeschlossen, und das Fragment mit 4,6 kb wurde wie oben isoliert. Dieses Fragment wurde dann an einen doppelsträngigen (ds) Linker ligiert, der einen PacI- und einen AatII-Überhang enthielt. Dieser Linker wurde nach einem Annealing der folgenden Oligonucleotide erhalten:

A-P1: 5'-CTG GTG GTT AAT-3'

A-P2: 5'-TAA CCA CCA GAC GT-3'.

**[0142]** Die den ds-Linker und das PacI-SnaBI-Ad35-Fragment enthaltende Ligationsmischung wurde auf einem LMP-Gel von unligiertem Linker getrennt. Das Band von 4,6 kb wurde aus dem Gel ausgeschnitten, bei 65°C geschmolzen, und dann an das gereinigte, mit AatII und SnaBI aufgeschlossene pBr/Ad35.Eco13.3-Vektorfragment ligiert. Ligationen wurden in elektrokompetente DH10B-Zellen (Life Technologies Inc.) transformiert. Der resultierende Klon, pBr/Ad35.Pac-rITR, enthielt Ad35-Sequenzen von der PacI-Stelle bei bp 18 137 bis zur rechten ITR.

**[0143]** Als Nächstes wurde eine einzigartige Restriktionsstelle am 3'-Ende der rechten ITR eingeführt, um dazu fähig zu sein, die ITR von Vektorsequenzen zu befreien. Dazu wurde ein PCR-Fragment verwendet, das Ad35-Sequenzen von der NdeI-Stelle am bp 33 165 bis zur rechten ITR mit den an die rITR gebundenen Restriktionsstellen SwaI, NotI und EcoRI abdeckt. Das PCR-Fragment wurde unter Verwendung der Primer 35F7 und 35R8 (in Beispiel 7 beschrieben) erzeugt. Nach der Reinigung wurde das PCR-Fragment in den AT-Klonierungsvektor (Invitrogen) kloniert und sequenziert, um die richtige Amplifizierung zu verifizieren. Der richtig amplifizierte Klon wurde dann mit EcoRI aufgeschlossen, mittels Klenow-Enzym mit einem glatten Ende versehen und dann mit NdeI aufgeschlossen, und das PCR-Fragment wurde isoliert. Parallel dazu wurde das NdeI im pBr-Vektor in pBr/Ad35.Pac-rITR wie folgt entfernt: Ein pBr322-Vektor, aus dem die NdeI-Stelle durch Aufschluss mit NdeI, eine Klenow-Behandlung und eine erneute Ligation entfernt wurde, wurde mit AatII und NheI aufgeschlossen. Das Vektorfragment wurde in LMP-Gel isoliert und an das Ad35-AatII-NheI-Fragment von pBr/Ad35.Pac-rITR mit 16,7 kb ligiert. Dadurch wurde pBr/Ad35.Pac-rITR. $\Delta$ NdeI erzeugt. Als Nächstes wurde pBr/Ad35.Pac-rITR. $\Delta$ NdeI mit NheI aufgeschlossen, die Enden wurden unter Verwendung des Klenow-Enzyms aufgefüllt, und die DNA wurde dann mit NdeI aufgeschlossen. Das große, den Vektor und Ad35-Sequenzen enthaltende Fragment wurde isoliert. Eine Ligation dieses Vektorfragments und des PCR-Fragments führte zu pBr/Ad35.PRn. In diesem Klon können spezielle, für eine Faser, E2A, E3, E4 oder das Hexon kodierende Sequenzen manipuliert werden. Darüber hinaus können Promotersequenzen, die zum Beispiel die E4-Proteine oder E2 exprimieren, mutiert oder deletiert und durch heterologe Promoter ausgetauscht werden.

## 2) Erzeugung von Viren auf der Grundlage von Ad35 mit Faserproteinen von verschiedenen Serotypen

**[0144]** Adenoviren infizieren humane Zellen mit verschiedenen Wirksamkeiten. Eine Infektion wird durch einen zweistufigen Prozess bewerkstelligt, der Folgendes umfasst: 1. Die Faserproteine, die die Bindung des Virus an spezielle Rezeptoren an den Zellen vermitteln, und 2. die Pentonproteine, die die Internalisierung durch eine Wechselwirkung zum Beispiel der RGD-Sequenz mit auf der Zelloberfläche vorhandenen Integrinen vermitteln. Für Viren der Untergruppe B, zu denen Ad35 gehört, ist der zelluläre Rezeptor für das Faserprotein nicht bekannt. Es gibt auffallende Unterschiede bei der Infektionseffizienz von humanen Zellen von Viren der Untergruppe B im Vergleich zu Viren der Untergruppe C wie Ad5 (siehe WO 00/03029 und EP 99 200 624.7). Sogar innerhalb einer Untergruppe können Infektionseffizienzen bestimmter humaner Zellen zwischen verschiedenen Serotypen variieren. Zum Beispiel infiziert die Faser von Ad16, wenn sie auf rekombinante Viren auf der Grundlage von Ad5 vorhanden ist, hauptsächlich endotheliale Zellen, Zellen von glatten Muskeln und Synoviozyten von humanem und Rhesusaffen-Ursprung besser als chimäre Ad5-Viren, die die Faser von Ad35 oder Ad51 tragen. Somit kann es zum Erhalt hoher Infektionseffizienzen von Viren auf der Grundlage von Ad35 notwendig sein, das Faserprotein durch ein Faserprotein eines verschiedenen Serotypen zu ersetzen.

Die Technologie für solche Faserchimäre ist für Viren auf der Grundlage von Ad5 in Beispiel 3 beschrieben und wird unten für Ad35-Viren veranschaulicht.

**[0145]** Zunächst werden die meisten Fasersequenzen vom Ad35-Rückgrat im Konstrukt pBr/Ad35.PRn wie folgt deletiert:

Die linken Flankierungssequenzen und ein Teil des von bp 30 225 stromaufwärts einer einzigartigen MluI-Stelle bis zu bp 30 872 (wobei die Nummern der in [Fig. 6](#) offenbarten wt-Ad35-Sequenz entsprechen) reichenden Faserproteins in Ad35 im Schwanz der Faser werden unter Verwendung der Primer:

**DF35-1 : 5'-CAC TCA CCA CCT CCA ATT CC-3'**

und

**DF35-2: 5'-CGG GAT CCC GTA CGG GTA GAC AGG GTT GAA GG-3'**

amplifiziert.

**[0146]** Durch diese PCR-Amplifikation wird eine einzigartige BsiWI-Stelle am Schwanz des Fasergens eingeführt.

**[0147]** Die rechten, vom Ende des Faserproteins bei bp 31 798 bis bp 33 199 (wobei die Nummern der in [Fig. 6](#) offenbarten wt-Ad35-Sequenz entsprechen) reichenden flankierenden Sequenzen in Richtung 3' von der einzigartigen NdeI-Stelle werden unter Verwendung der Primer

**DF35-3: 5'-CGG GAT CCG CTA GCT GAA ATA AAG TTT AAG TGT TTT**

**TAT TTA AAA TCA C-3'**

und **DF35-4: 5'-CCA GTT GCA TTG CTT GGT TGG-3'**

amplifiziert.

**[0148]** Durch diese PCR wird eine einzigartige NheI-Stelle anstelle der Fasersequenzen insertiert. Die PCR-Amplifikation erfolgt mit Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß der Anleitungen des Herstellers. Nach der Amplifizierung werden die PCR-Produkte unter Verwendung eines PCR-Reinigungssatzes gereinigt, und die Fragmente werden mit BamHI aufgeschlossen und zusammenligiert. Die ligierten Fragmente mit 2 kb werden vom Gel gereinigt und in den PCR-Script-Amp-Vektor (Stratagene) geklont. Die richtige Amplifizierung wird durch Sequenzieren überprüft. Das PCR-Fragment wird dann als MluI/NdeI-Fragment herausgeschnitten und in pBr/Ad35.PRn geklont, das mit denselben Enzymen aufgeschlossen war. Dadurch wird pBr/Ad35.PRΔfib erzeugt, einen Shuttle-Vektor, der zur Einführung von Fasersequenzen von alternativen Serotypen geeignet ist. Diese Strategie ist zur Fasermodifikationsstrategie für Viren auf der Grundlage von Ad5 gemäß der Offenbarung in WO 00/03029 analog. Zur Amplifizierung von Fasersequenzen verschiedener Adenovirus-Untergruppen wurden die in Tabelle I dieser Anmeldung aufgeführten Primer verwendet. Zur Amplifizierung von Fasern, die in pBr/Ad35.PRΔfib geklont werden, können dieselben (degenerierten) Primersequenzen verwendet werden, wobei die NdeI-Stelle in den Vorwärts-Primern (Schwanz-Oligonucleotide A bis E) jedoch zu einer BsiWI-Stelle geändert werden sollte und die NsiI-Stelle im reversen Oligonucleotid (Knopf-Oligonucleotid 1 bis 8) zu einer NheI-Stelle geändert werden sollte. Somit werden Faser-16-Sequenzen mittels der folgenden degenerierten Primer amplifiziert:

**5' - CCK GTS TAC CCG TAC GAA GAT GAA AGC-3'**

und

**5' -CCG GCT AGC TCA GTC ATC TTC TCT GAT ATA-3'**

**[0149]** Amplifizierte Sequenzen werden dann mit BsiWI und NheI aufgeschlossen und in pBr/Ad35.PRΔfib geklont, das mit denselben Enzymen aufgeschlossen wurde, wodurch pBr/Ad35.PRfib16 erzeugt wird. Letzteres Konstrukt wird dann mit PacI und SwaI aufgeschlossen, und der Insert wird vom Gel isoliert. Das PacI/SwaI-Ad35-Fragment mit modifizierter Faser wird dann in die entsprechenden Stellen von pWE/Ad35.pIX-rITR geklont, wodurch pWE/Ad35.pIX-rITR-fib16 erhalten wird. Dieses Kosmid-Rückgrat kann dann mit einem Adapter auf der Grundlage von Ad35 verwendet werden, um rekombinante Ad35-Viren zu erzeugen, die die Faser von Ad16 exprimieren. Andere Fasersequenzen können mit oben erwähnten (degenerierten) Primern amplifiziert werden. Wenn sich herausstellt, dass eine der Fasersequenzen eine innere BsiWI- oder NheI-Stelle aufweist, muss das PCR-Fragment partiell mit diesem Enzym aufgeschlossen werden.

## 3) Erzeugung von Viren auf der Grundlage von Ad35 mit einer induzierbaren, von E1 unabhängigen E4-Expression

**[0150]** Der Promoter des Adenovirus E4 wird durch die Expression von E1-Proteinen aktiviert. Es ist nicht bekannt, ob die Ad5-E1-Proteine dazu fähig sind, die Aktivierung des Ad35-E4-Promoters zu vermitteln. Um daher eine Erzeugung von Ad35-rekombinanten Viren in PER.C6-Zellen zu ermöglichen, kann es vorteilhaft sein, die Expression von E4 von E1 unabhängig zu machen. Dies kann bewerkstelligt werden, indem der Ad35-E4-Promoter durch heterologe Promotersequenzen ähnlich wie der 7xTetO-Promoter ersetzt wird, ohne auf diesen beschränkt zu sein. Es ist gezeigt worden, dass rekombinante, E1-deletierte Vektoren auf der Grundlage von Ad5 trotz des Fehlens einer Expression von E1 eine Restexpression von viralen Genen aus dem Vektor-Rückgrat in Zielzellen aufweisen. Eine virale Genexpression erhöht die Toxizität und kann Immunantwort des Wirtes gegenüber der infizierten Zelle auslösen. Bei den meisten Anwendungen für adenovirale Vektoren auf dem Gebiet der Gentherapie und Impfung ist es wünschenswert, die Expression viraler Gene vom Rückgrat zu vermindern oder zu eliminieren. Eine Möglichkeit, dies zu erreichen, besteht darin, alle Sequenzen oder so viele Sequenzen wie möglich aus dem viralen Rückgrat zu deletieren. Durch das Deletieren von E2A-, E2B- oder E4-Genen und/oder der späten Genfunktionen muss man diese Funktionen während der Produktion komplementieren. Diese Komplementierung kann entweder mittels eines Helfer-Virus oder durch eine stabile Addition dieser Funktionen mit oder ohne eine induzierbare Transkriptionsregulierung zur produzierenden Zelle erfolgen. Verfahren zur Bewerkstelligung davon sind für Ad5 beschrieben worden und im Fachgebiet bekannt. Ein spezielles Verfahren besteht im Ersatz des E4-Promotors durch Promotorsequenzen, die in den Zielzellen nicht aktiv sind. E4-Proteine spielen zum Beispiel bei der Replikation von Adenoviren durch eine Aktivierung des E2-Promotors und bei der Expression von späten Genen durch die Regulierung des Spleißens und beim nuklearen Export von Transkripten für späte Gene eine Rolle. Darüber hinaus sind wenigstens einige der E4-Proteine für Zellen toxisch. Daher werden Vektoren auf der Grundlage von Ad35 durch eine Verminderung oder Eliminierung der Expression von E4 in Zielzellen weiter verbessert. Ein Weg, um dies zu bewerkstelligen, besteht im Ersatz des E4-Promotors durch einen heterologen Promotor, der in den Zielzellen inaktiv ist. Ein Beispiel für ein heterologes Promotor/Aktivator-System, das in Zielzellen inaktiv ist, ist das durch Tetracyclin induzierbare TetO-System (Gossen und Bujard, 1992). Andere prokaryontische oder synthetische Promotor/Aktivator-Systeme können verwendet werden. In diesem Beispiel wird der E4-Promotor im Rückgrat des viralen Vektors durch ein DNA-Fragment ersetzt, das 7 Repetiereinheiten des auf Tetracyclin reaktiven Elements aus dem tet-Operon (7xTetO) enthält. Ein starker Transaktivator für diesen Promotor ist ein Fusionsprotein, das die DNA-Bindungsdomäne des tet-Repressors und die Aktivierungsdomäne von VP16 (Tet-Transaktivatorprotein, Tta) enthält. Eine starke Expression von E4, unabhängig von der Expression von E1, kann in Tta exprimierenden PER.C6-Zellen bewerkstelligt werden. Tta exprimierende PER.C6-Zellen sind erzeugt und beschrieben worden (siehe Beispiel 15). Von Ad5 stammende, E1-deletierte Viren mit E4 unter Kontrolle von 7xTetO können erzeugt und in diesen Zellen fortgepflanzt werden. Es wurde festgestellt, dass die Expression von E4 im Vergleich zu E1-deletierten Viren mit dem normalen E4-Promotor nach der Infizierung in Zellen humanen oder tierischen Ursprungs (die den Tta-Transaktivator nicht exprimieren) außerordentlich vermindert war. Nach der Konstruktion von pWE/Ad35.pIX-rITR.TetO-E4 wird ein Kosmid-Helfervektor zur Erzeugung von Viren mit einem Ersatz des E4-Promotors beschrieben.

**[0151]** Zunächst wurde mittels PCR-Amplifizierung an pBr/Ad35.PRn-DNA mit den folgenden Primern erzeugt:

**355ITR: 5'- GAT CCG GAG CTC ACA ACG TCA TTT TCC CAC G-3'**

und **353ITR: 5'-CGG AAT TCG CGG CCG CAT TTA AAT C-3'**

**[0152]** Dieses Fragment enthält Sequenzen zwischen bp 34 656 (Nummerierung gemäß wtAd35) und der NotI-Stelle in Richtung des 3'-Endes der rechten ITR in pBr/Ad35.PRn und führt eine SstI-Stelle in Richtung des 5'-Endes an der rechten ITR-Sequenz ein.

**[0153]** Ein zweites PCR-Fragment wurde an pBr/Ad35.PRn-DNA erzeugt, wobei die folgenden Primer verwendet wurden:

**35DE4: 5'-CCC AAG CTT GCT TGT GTA TAT ATA TTG TGG-3'** und

**35F7:**

35F7: siehe Beispiel 7.

**[0154]** Durch diese PCR werden Ad35-Sequenzen zwischen bp 33 098 und 34 500 (Nummerierung gemäß wtAd35) amplifiziert und eine HindIII-Stelle stromaufwärts der E4-Tata-Box eingeführt. Mit diesen beiden PCR-Reaktionen werden die rechts und die links flankierenden Sequenzen des E4-Promotors amplifiziert. Zur Amplifizierung wurde Pwo-DNA-Polymerase gemäß der Anleitungen des Herstellers verwendet. Ein drittes, den 7xTetO-Promotor enthaltendes Fragment wurde aus dem Konstrukt pAAO-E-TATA-7xTetO durch einen Aufschluss mit SstI und HindIII isoliert. Die Erzeugung von pAAO-E-TATA-7xTetO ist unten beschrieben. Das erste PCR-Fragment (355/353) wurde dann mit SstI und NotI aufgeschlossen und an das 7xTetO-Fragment ligiert. Die Ligationsmischung wurde dann mit HindIII und NotI aufgeschlossen, und das Fragment mit 0,5 kb wird aus Gel isoliert. Das zweite PCR-Fragment (35DE4/35F7) wurde mit NdeI und HindIII aufgeschlossen und vom Gel gereinigt. Diese beiden Fragmente wurden dann in pBr/Ad35.PRn ligiert, das das mit NdeI und NotI aufgeschlossen war, wodurch pBr/Ad35.PR.TetOE4 erhalten wurde. Die Modifikation des E4-Promotors wird dann auf den Ad35-Helfer-Kosmidklon übertragen, indem das PacI/SwaI-Fragment von Letzterem mit dem von pBr/Ad35.PR.TetOE4 ausgetauscht wird, wodurch pWE/Ad35.pIX-rITR.TetOE4 erhalten wird.

**[0155]** pAAO-E-TATA.7xTetO wurde wie folgt erzeugt. Zwei Oligonucleotide wurden synthetisiert:

**TATAp<sub>plus</sub>: 5'-AGC TTT CTT ATA AAT TTT CAG TGT TAG ACT AGT AAA  
TTG CTT AAG-3'**

und

**TATAm<sub>in</sub>: 5'-AGC TCT TAA GCA ATT TAC TAG TCT AAC ACT GAA AAT  
TTA TAA GAA-3'**

(Die unterstrichenen Sequenzen bilden eine modifizierte TATA-Box).

**[0156]** Die Oligonucleotide wurden einem Annealing unterzogen, wodurch ein doppelsträngiges DNA-Fragment mit Überhängen am 5'-Ende erzeugt wurde, die mit einer DNA verträglich sind, die mit HindIII aufgeschlossen wurde. Das Produkt der Annealing-Reaktion wurde in einen mit HindIII aufgeschlossenen pGL3-Enhancer-Vektor (Promega) ligiert, wodurch pAAO-E-TATA erhalten wurde. Der Klon, der die HindIII-Stelle am 5'-Ende des wieder hergestellten Inserts aufwies, wurde zur weiteren Klonierung ausgewählt.

**[0157]** Als Nächstes wurde die heptamerisierte tet-Operatorsequenz aus dem Plasmid pUHC-13-3 (Gossen und Bujard, 1992) in einer PCR-Reaktion, bei der das Expand-PCR-System (Roche) gemäß des Protokolls des Herstellers verwendet wurde, amplifiziert. Die folgenden Primer wurden verwendet:

**tet3: 5'- CCG GAG CTC CAT GGC CTA ACT CGA GTT TAC CAC TCC C-  
3'**

**tet5: 5'-CCC AAG CTT AGC TCG ACT TTC ACT TTT CTC-3'**

**[0158]** Das amplifizierte Fragment wurde mit SstI und HindIII aufgeschlossen (diese Stellen sind in tet3 bzw. in tet5 vorhanden) und in pAAO-E-TATA, das mit SstI/HindIII aufgeschlossen war, geklont, wodurch pAAO-E-TATA-7xtetO erhalten wurde.

**[0159]** Um die Funktionalität des erzeugten Kosmidklons pWE/Ad35.pIX-rITR.TetOE4 zu testen, wurde die DNA mit NotI aufgeschlossen. Das linke Ende von wtAd35-DNA wurde unter Verwendung der Primer 35F1 und 35R4 (siehe Beispiel 7) amplifiziert. Nach der Amplifizierung wurde die PCR-Mischung gereinigt und mit Sall aufgeschlossen, um intakte virale DNA zu entfernen. Dann wurden 4 g sowohl des pWE/Ad35.pIX-rITR.TetOE4 als auch des PCR-Fragments in PER.C6-tTA-Zellen, mit denen am Tag zuvor T25-Kolben beimpft worden waren, cotransfiziert. Transfizierte Zellen wurden nach zwei Tagen in T80-Kolben überführt, und zwei weitere Tage später wurde CPE erhalten, wodurch gezeigt wird, dass das Kosmid-Rückgrat funktionell ist.

#### Beispiel 14

Erzeugung von Zelllinien, die zur Komplementierung von E1-deletierten Ad35-Viren fähig sind

Erzeugung von pIG135 und pIG270

**[0160]** Das Konstrukt pIG.E1A.E1B enthält Sequenzen der E1-Region von Ad5, die den Nucleotiden 459 bis 3510 der wt-Ad5-Sequenz (Genbank-Zugangsnummer M72360) entsprechen, die mit dem humanen Phos-

pho-glycerat-kinase-Promotor (PGK) und den polyA-Sequenzen des Hepatitis-B-Virus operativ verbunden sind. Die Erzeugung dieses Konstrukts ist in WO97/00326 beschrieben. Die E1-Sequenzen von Ad5 wurden wie folgt durch entsprechende Sequenzen von Ad35 ersetzt. pRSV.Ad35-E1 (in Beispiel 8 beschrieben) wurde mit EcoRI und Sse8387I aufgeschlossen, und das den E1-Sequenzen von Ad35 entsprechende Fragment mit 3 kb wurde aus Gel isoliert. Das Konstrukt pIG.E1A.E1B wurde mit Sse8387I vollständig und mit EcoRI teilweise aufgeschlossen. Das Fragment von 4,2 kb, das Vektorsequenzen ohne den E1-Bereich von Ad5 entsprach, aber noch den PGK-Promotor aufwies, wurde auf LMP-Agarosegel von den anderen Fragmenten abgetrennt, und das richtige Band wurde aus dem Gel herausgeschnitten. Beide erhaltenen Fragmente wurden ligiert, was zu pIG.Ad35-E1 führte. Dieser Vektor wurde weiter dahingehend modifiziert, dass die im pUC119-Vektorrückgrat vorhandenen LacZ-Sequenzen entfernt wurden. Dazu wurde der Vektor mit BsaAI und BstXI aufgeschlossen, und das große Fragment wurde vom Gel isoliert. Ein doppelsträngiges Oligonucleotid wurde hergestellt, indem die beiden folgenden Oligonucleotide einem Annealing unterzogen wurden:

**BB1: 5'-GTG CCT AGG CCA CGG GG-3'** und

**BB2: 5'-GTG GCC TAG GCA C-3'**.

**[0161]** Die Ligation des Oligonucleotids und des Vektorfragments führte zum Konstrukt pIG135. Die richtige Insertion des Oligonucleotids stellt die Stellen BsaAI und BstXI wieder her und führt eine einzigartige AvrII-Stelle ein. Als Nächstes führten wir eine einzigartige Stelle am 3'-Ende der Ad35-E1-Expressionskassette in pIG135 ein. Dazu wurde das Konstrukt mit SapI aufgeschlossen, und die am 3'-Ende hervorstehenden Enden wurden durch eine Behandlung mit T4-DNA-Polymerase glatt gemacht. Das so behandelte lineare Plasmid wurde weiter mit BsrGI aufgeschlossen, und das große, den Vektor enthaltende Fragment wurde vom Gel isoliert. Zur Wiederherstellung des 3'-Endes der HBVpolyA-Sequenz und zur Einführung einer einzigartigen Stelle wurde ein PCR-Fragment mit den folgenden Primern erzeugt:

**270F: 5'-CAC CTC TGC CTA ATC ATC TC -3'** und

**270R: 5'-GCT CTA GAA ATT CCA CTG CCT TCC ACC -3'**.

**[0162]** Die PCR wurde mit pIG.Ad35.E1-DNA unter Verwendung von Pwo-Polymerase (Roche) gemäß der Anleitungen des Herstellers durchgeführt. Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit BsrGI aufgeschlossen und mittels des Tsap-Enzyms (LTI) dephosphoryliert, wobei Letzteres die Dimerisierung des Inserts an der BsrGI-Stelle verhindert. Das PCR-Fragment und das Vektorfragment wurden ligiert, wodurch das Konstrukt pIG270 erhalten wurde.

**[0163]** E1-Sequenzen von Ad35 sind dazu fähig, primäre Rattenzellen zu transformieren. Neugeborene WAG/RIJ-Ratten wurden in der 1. Trächtigkeitswoche getötet, und die Nieren wurden isoliert. Nach sorgfältiger Entfernung der Kapsel wurden die Nieren durch mehrere Inkubationsrunden in Trypsin/EDTA (LTI) bei 37°C und eine Isolierung von schwimmenden Zellen in kaltem, 1% FBS enthaltenden PBS zu einer einzelligen Suspension zerkleinert. Wenn der Hauptteil der Niere mit Trypsin behandelt war, wurden alle Zellen in DMEM resuspendiert, das um 10% FBS ergänzt war, und durch sterile Gaze filtriert. Von einer Niere erhaltene Baby-Rattennierenzellen wurden in 5 Schalen (Greiner, 6 cm) ausplattiert. Wenn eine Konfluenz von 70–80% erreicht war, wurden die Zellen mit 1 oder 5 µg DNA/Schale transfiziert, wobei der CaPO<sub>4</sub>-Ausfällungssatz (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers verwendet wurde. Die folgenden Konstrukte wurden in getrennten Transfektionen verwendet: pIG.E1A.E1B (die Ad5-E1-Region exprimierend), pRSV.Ad35-E1, pIG.Ad35-E1 und pIG270 (wobei Letzteres die Ad35-E1 exprimiert). Zellen wurden bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> inkubiert, bis Herde von transformierten Zellen erschienen. In Tabelle IV ist die Anzahl von Herden aufgeführt, die aus mehreren Transfektionsexperimenten unter Verwendung von zirkularer oder linearer DNA resultierten. Wie erwartet transformierte die E1-Region von Ad5 BRK-Zellen effizient. Herde erschienen auch in der mit E1 von Ad35 transfizierten Zellschicht, wenngleich mit geringerer Effizienz. Die durch Ad35 transformierten Herde erschienen zu einem späteren Zeitpunkt: etwa 2 Wochen nach der Transfektion, verglichen mit 7–10 Tagen für Ad5-E1. Diese Experimente zeigen klar, dass die E1-Gene des B-Gruppenvirus Ad35 dazu fähig sind, primäre Nagerzellen zu transformieren. Dadurch werden die Funktionalität der Ad35-E1-Expressionskonstrukte bewiesen und früher Befunde der Transformationskapazität der B-Gruppen-Viren Ad3 und Ad7 bestätigt (Dijkema, 1979). Um zu testen, ob es die Zellen im Herd tatsächlich transformiert waren, wurden einige Herde abgeimpft und expandiert. Es stellte sich heraus, dass von den 7 abgeimpften Herden wenigstens 5 als etablierte Zelllinien wuchsen. Erzeugung neuer, von primären humanen Amniozyten stammenden Verpackungszellen

**[0164]** Nach einer Amniozentese isolierte Amnionflüssigkeit wurde zentrifugiert, und Zellen wurden in Amniomax-Medium (LTI) resuspendiert und in Gewebekulturkolben bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Wenn Zellen

gut wuchsen (etwa eine Zellteilung/24 h), wurde das Medium durch eine 1:1-Mischung des vollständigen AmnioMix-Mediums und DMEM-Medium mit niedrigem Glucosegehalt (LTI), das um Glutamax I (Endkonzentration 4 mM, LTI) und Glucose (Endkonzentration 4,5 g/l, LTI) und 10% FBS (LTI) ergänzt war, ersetzt. Zur Transfizierung wurden  $\sim 5 \times 10^5$  Zellen in Gewebekulturschalen von 10 cm ausplattiert. Am nächsten Tag wurden Zellen mit 20 µg zirkularem pIG270/Schale transfiziert, wobei der CaPO<sub>4</sub>-Transfektionssatz (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers verwendet wurde, und Zellen wurden über Nacht mit dem DNA-Präzipitat inkubiert. Am nächsten Tag wurden Zellen zur Entfernung des Präzipitats 4 Mal mit PBS gewaschen und für über drei Wochen weiter inkubiert, bis Herde aus transformierten Zellen erschienen. Ein Mal pro Woche wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt. Andere Transfektionsmittel wie, ohne darauf beschränkt zu sein, LipofectAmine (LTI) oder PEI (Polyethylenimin, hohe Molmasse, wasserfrei, Aldrich) wurden verwendet. Von diesen drei Mitteln erreichte PEI bei primären humanen Amniozyten die beste Transfektionseffizienz:  $\sim 1\%$  blaue Zellen in 48 h nach der Transfektion von pAdApt35.LacZ.

**[0165]** Herde werden wie folgt isoliert. Das Medium wird entfernt und durch PBS ersetzt, wonach Herde isoliert werden, indem die Zellen mittels einer 50–200-µl-Gilson-Pipette mit einer Einweg-Filterspitze vorsichtig abgekratzt werden. In 10 µl PBS enthaltene Zellen wurden in eine Platte mit 96 Näpfen überführt, die 15 µl Trypsin/EDTA (LTI) enthielt, und eine Einzellsuspension wurde durch Herauf- und Herunterpipettieren und eine kurze Inkubation bei Raumtemperatur erhalten. Nach der Zugabe von 200 µl der oben beschriebenen 1:1-Mischung aus komplettem AmnioMax-Medium und DMEM mit Ergänzungen und 10% FBS wurden Zellen weiter inkubiert. Klone, die weiterwuchsen, wurden ausgestrichen, und ihre Fähigkeit zum Komplementieren des Wachstums von E1-deletierten adenoviralen Vektoren verschiedener Untergruppen, insbesondere denjenigen, die von Viren der B-Gruppe, insbesondere von Ad35 oder Ad11 stammen, wurde analysiert.

#### Bildung neuer Verpackungszelllinien aus humanen embryonischen Retinoblasten

**[0166]** Humane Retinazellen werden aus den Augen von fehlgeborenen Foeten isoliert und in DMEM-Medium (LTI) kultiviert, das um 10% FBS (LTI) ergänzt war. Am Tag vor der Transfektion wurden  $\sim 5 \times 10^5$  Zellen in 6-cm-Schalen ausplattiert und über Nacht bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Transfektion erfolgt unter Verwendung des CaPO<sub>4</sub>-Präzipitationssatzes (LTI) gemäß der Anleitungen des Herstellers. Jede Schale wird 8–10 µg pIG270-DNA entweder als zirkuläres Plasmid oder als gereinigtes Fragment transfiziert. Zum Erhalt des gereinigten Fragments wurde pIG270 mit AvrII und XbaI aufgeschlossen, und das der Ad35-E1-Expressionskassette entsprechende Fragment mit 4 kb wurde durch Agarase-Behandlung (Roche) vom Gel isoliert. Am folgenden Tag wird das Präzipitat vorsichtig durch vier Waschvorgänge mit sterilem PBS gewaschen. Dann wird frisches Medium zugegeben, und transfizierte Zellen werden weiter kultiviert, bis Herde von transformierten Zellen erscheinen. Wenn die Herde groß genug sind (> 100 Zellen), werden sie abgeimpft und in die oben beschriebenen Platten mit 96 Näpfen überführt. Klone von transformierten humanen embryonischen Retinoblasten, die weiter wachsen, werden ausgestrichen und auf ihre Fähigkeit zur Komplementierung des Wachstums von E1-deletierten adenoviralen Vektoren verschiedener Untergruppen, insbesondere denjenigen, die von Viren der Gruppe B, insbesondere von Ad35 oder Ad11, stammen, getestet.

#### Neue, von PER.C6 stammende Verpackungszelllinien

**[0167]** Gemäß der Beschreibung in Beispiel 8 ist es möglich, E1-deletierte Ad35-Viren mit einer Cotransfektion eines Ad35-E1-Expressionskonstrukts, z. B. pRSV.Ad35.E1, in PER.C6-Zellen zu erzeugen und zu ziehen. Eine im großen Maßstab erfolgende Erzeugung von rekombinanten Adenoviren unter Verwendung dieses Verfahrens ist aufwendig, weil für jeden Amplifizierungsschritt eine Transfektion des Ad35-E1-Konstrukts erforderlich ist. Dadurch wird bei diesem Verfahren die Gefahr einer nichthomologen Rekombination zwischen dem Plasmid und dem Virusgenom mit hohen Wahrscheinlichkeiten für die Bildung von rekombinanten, E1-Sequenzen umfassenden Viren erhöht, was zu replikationskompetenten Viren führt. Um dies zu vermeiden, muss die Expression von Ad35-E1-Proteinen in PER.C6 durch integrierte Kopien des Expressionsplasmids im Genom vermittelt werden. Weil PER.C6-Zellen bereits transformiert sind und Ad5-E1-Proteine exprimieren, kann eine Ergänzung um eine zusätzliche Expression von Ad35-E1 für die Zellen toxisch sein, wobei es jedoch nicht unmöglich ist, transformierte Zellen mit E1-Proteinen stabil zu transfizieren, weil Ad5-E1 exprimierende Ad549-Zellen erzeugt worden sind.

**[0168]** In einem Versuch, vom Virus 7 der Untergruppe B rekombinante Adenoviren zu erzeugen, waren Abrahamsen et al. (1997) nicht in der Lage, in 293-Zellen E1-deletierte Viren ohne eine Kontaminierung von wt Ad7 zu erzeugen. Es zeigte sich, dass Viren, die nach einer Plattenreinigung in 293-ORF6-Zellen abgeimpft wurden (Brough et al., 1996), durch eine nicht homologe Rekombination eingearbeitete Ad7-E1B-Sequenzen enthielten. Somit erwies sich, dass eine effiziente Fortpflanzung von Ad7-rekombinanten Viren nur in Gegen-

wart einer Ad7-E1B-Expression und einer Ad5-E4-ORF6-Expression möglich war. Es ist bekannt, dass die E1B-Proteine sowohl mit zellulären als auch mit viralen Proteinen Wechselwirken (Bridge et al., 1993; White, 1995). Möglicherweise ist der zwischen dem E1B-55 K-Protein und E4-ORF6 gebildete Komplex, der zur Verstärkung des mRNA-Exports von viralen Proteinen und zur Hemmung des Exports der meisten zellulären mRNA erforderlich ist, kritisch und in gewisser Weise serotypenspezifisch. Das obige Experiment lässt vermuten, dass die E1A-Proteine von Ad5 dazu fähig sind, eine Ad7-E1A-Deletion zu komplementieren und dass eine Expression von Ad7-E1B in Adenovirus-Verpackungszellen an sich nicht ausreichend ist, um eine stabile, komplementierende Zelllinie zu erzeugen. Um zu testen, ob eines der Ad35-E1B-Proteine oder beide der einschränkende Faktor bei einer effizienten Fortpflanzung des Ad35-Vektors in PER.C6-Zellen ist bzw. sind, haben wir ein Ad35-Adapterplasmid erzeugt, das den E1B-Promotor und E1B-Sequenzen enthält, dem aber der Promotor und die kodierende Region für E1A fehlt. Dazu wurde das linke Ende von wtAd35-DNA mittels der Primer 35F1 und 35R4 (beide in Beispiel 7 beschrieben) mit Pwo-DNA-Polymerase (Roche) gemäß der Anleitungen des Herstellers amplifiziert. Das PCR-Produkt mit 4,6 kb wurde mittels des PCR-Reinigungssatzes (LTI) gereinigt und mit den Enzymen SnaBI und Apal aufgeschlossen. Das resultierende Fragment von 4,2 kb wurde dann mittels des QIAexII-Satzes (Qiagen) vom Gel gereinigt. Als Nächstes wurde pAdApt35IP1 (Beispiel 7) mit SnaBI und Apal aufgeschlossen, und das den Vektor mit 2,6 kb enthaltende Fragment wurde mittels des Gene-Clean-Satzes (BIO 101, Inc.) vom Gel gereinigt. Beide isolierten Fragmente wurden ligiert, wodurch pBr/Ad35.leftITR-pIX erhalten wurde. Die richtige Amplifizierung während der PCR wurde wie folgt durch einen Funktionalitätstest verifiziert: Die DNA wurde mit BstBI aufgeschlossen, um den Ad35-Insert von Vektorsequenzen zu befreien, und 4 µg dieser DNA wurden mit 4 µg pWE/Ad35.pIX-riTR (Beispiel 7), das mit NotI aufgeschlossen war, in PER.C6-Zellen cotransfiziert. Die transfizierten Zellen wurden am 2. Tag in T80-Kolben überführt, und wiederum zwei Tage später hatten sich CPE gebildet, wodurch gezeigt wird, dass die neue pBr/Ad35.leftITR-pIX-Konstruktion funktionelle E1-Sequenzen enthält. Das pBr/Ad35.leftITR-pIX-Konstrukt wurde dann wie folgt weiter modifiziert. Die DNA wurde mit SnaBI und HindIII aufgeschlossen, und der HindIII-Überhang am 5'-Ende wurde mittels des Klenow-Enzyms aufgefüllt. Die erneute Ligation der aufgeschlossenen DNA und die Transformation in kompetente Zellen (LTI) ergab den Konstrukt pBr/Ad351eftITR-pIXΔE1A. Dieses letztere Konstrukt enthält das linke Ende von Ad35 mit 4,6 kb mit Ausnahme der E1A-Sequenzen zwischen bp 450 und 1341 (Nummerierung gemäß wtAd35, [Fig. 6](#)), und somit fehlt ihr der E1A-Promotor und die meisten E1A-kodierenden Sequenzen. pBr/Ad35.leftITR-pIXΔE1A wurde dann mit BstBI aufgeschlossen, und 2 µg dieses Konstrukts wurden mit 6 µg pWE/Ad35.pIX-riTR (Beispiel 7), das mit NotI aufgeschlossen war, in PER.C6-Zellen cotransfiziert. Eine Woche nach der Transfektion hatten sich in den transfizierten Zellen vollständige CPE gebildet.

**[0169]** Dieses Experiment zeigt, dass die Ad35-E1A-Proteine durch eine Expression von Ad5-e1A in PER.C6 funktionell komplementiert werden und dass wenigstens eines der Ad35-E1B-Proteine durch eine Expression von Ad5-E1 in PER.C6 nicht komplementiert werden kann. Es zeigt weiterhin, dass es möglich ist, eine komplementierende Zelllinie für E1-deletierte Ad35-Viren herzustellen, indem Ad35-E1B-Proteine in PER.C6 exprimiert werden. Eine stabile Expression von Ad35-E1B-Sequenzen aus integrierten Kopien im Genom von PER.C6-Zellen kann vom E1B-Promotor angetrieben und von einem heterologen Polyadenylierungssignal wie, ohne darauf beschränkt zu sein, HBVpA, terminiert werden. Das heterologe pA-Signal ist erforderlich, um eine Überlappung zwischen dem E1B-Insert und dem rekombinanten Vektor zu verhindern, weil die natürliche E1B-Terminierung sich in der pIX-Transkriptionseinheit befindet, die im adenoviralen Vektor vorhanden sein muss. Alternativ kann die E1B-Sequenz von einem heterologen Promotor wie, ohne darauf beschränkt zu sein, den humanen PGK-Promotor oder von einem induzierbaren Promotor wie, ohne darauf beschränkt zu sein, den 7xtetO-Promotor (Gossen und Bujard, 1992) getrieben werden. Auch in diesen Fällen wird die Transkription durch eine heterologe pA-Sequenz, z. B. HBV-pA, vermittelt werden. Die Ad35-E1b-Sequenzen umfassen zumindest einen der kodierenden Bereiche der Proteine E1B 21 K und E1B 55 K, die sich zwischen den Nucleotiden 1611 und 3400 der wt-Ad35-Sequenz befinden. Der Insert kann auch (einen Teil der) Ad35-E1B-Sequenzen zwischen den Nucleotiden 1550 und 1611 der wt-Ad35-Sequenz einschließen.

#### Beispiel 15

**[0170]** Erzeugung von produzierenden Zelllinien zur Erzeugung von rekombinanten adenoviralen Vektoren, in denen die frühe Region 1 und die frühe Region 2A deletiert sind

#### Erzeugung von PER.C6-tTA-Zellen

**[0171]** Hier wird die Erzeugung von Zelllinien zur Erzeugung von rekombinanten adenoviralen Vektoren, die in der frühen Region 1 (E1) und in der frühen Region 2A (E2A) deletiert sind, beschrieben. Die produzierenden Zelllinien komplementieren adenovirale Vektoren in trans durch eine konstitutive Expression sowohl des E1-

als auch des E2-Gens. Die zuvor etablierte, Ad5-E1-transformierte humane Embryo-Retinoblastenzelllinie PER.C6 (WO 97/00326) wurde weiterhin mit E2A-Expressionskassetten ausgestattet.

**[0172]** Das adenovirale E2A-Gen kodiert ein DNA-Bindungsprotein mit 72 kDa, das eine hohe Affinität für einsträngige DNA aufweist. Aufgrund seiner Funktion ist eine konstitutive Expression von DBP für Zellen toxisch. Die Mutante ts125E2A kodiert ein DBP, das eine Pro→Ser-Substitution der Aminosäure 413 aufweist. Aufgrund dieser Mutation ist das von ts125E2A kodierte DBP bei der permissiven Temperatur von 32°C vollständig aktiv, bindet bei nicht permissiven Temperatur von 39°C aber nicht an ssDNA. Dies ermöglicht die Erzeugung von Zelllinien, die konstitutiv E2A exprimieren, das nicht funktionell ist und bei einer nicht permissiven Temperatur von 39°C nicht toxisch ist. Temperaturempfindliches E2A wird bei einer Temperaturabnahme allmählich funktionell und wird bei einer Temperatur von 32°C, der permissiven Temperatur, vollständig funktionell.

A. Erzeugung von Plasmiden, die den Wildtyp E2A- oder das temperaturempfindliche Gen ts125E2A exprimieren

**[0173]** pcDNA3wtE2A: Die komplette frühe Wildtyp-Region 2A (E2A) kodierende Region wurde aus dem Plasmid pBR/Ad.Bam-rITR (ECACC-Hinterlegungsnummer P97082122) mit den Primern DBPpcr1 und DBPpcr2 unter Verwendung des Expand™ Long Template PCR-Systems nach dem Standardprotokoll des Lieferanten (Boehringer Mannheim) amplifiziert. Die PCR wurde in einem Biometra Trio Thermoblock durchgeführt, wobei das folgende Amplifikationsprogramm angewandt wurde: 94°C für 2 min, 1 Zyklus; 94°C für 10 s + 51°C für 30 s + 68°C für 2 min, 1 Zyklus; 94°C für 10 s + 58°C für 30 s + 68°C für 2 min, 10 Zyklen; 94°C für 10 s + 58°C für 30 s + 68°C für 2 min mit einer Verlängerung von 10 s pro Zyklus, 20 Zyklen; 68°C für 5 min, 1 Zyklus. Der Primer DBPpcr1: CGG GAT CCG CCA CCA TGG CCA GTC GGG AAG AGG AG (5' bis 3') enthält eine einzigartige BamHI-Restriktionsstelle (unterstrichen) in Richtung des 5'-Endes der Kozak-Sequenz (kursiv) und das Start-Codon der E2A kodierenden Sequenz. Der Primer DBPpcr2: CGG AAT TCT TAA AAA TCA AAG GGG TTC TGC CGC (5' bis 3') enthält eine einzigartige EcoRI-Restriktionsstelle (unterstrichen) in Richtung des 3'-Endes des Stopp-Codons der E2A kodierenden Sequenz. Die fetten Buchstaben beziehen sich auf Sequenzen, die von der E2A kodierenden Region stammen. Das PCR-Fragment wurde mit BamHI/EcoRI aufgeschlossen und in pcDNA3 (Invitrogen), die mit BamHI/EcoRI aufgeschlossen worden war, kloniert, wodurch pcDNA3wtE2A erhalten wurde.

**[0174]** pcDNA3tsE2A: Die komplette ts125E2A kodierende Region wurde aus DNA amplifiziert, die aus der temperaturempfindlichen Adenovirus-Mutante H5ts125 isoliert wurde. Das PCR-Amplifizierungsverfahren war mit demjenigen zur Amplifizierung von wtE2A identisch. Das PCR-Fragment wurde mit BamHI/EcoRI aufgeschlossen und in pcDNA3 (Invitrogen), die mit BamHI/EcoRI aufgeschlossen war, geklont, wodurch pcDNA3tsE2A erhalten wurde. Die Unversehrtheit der kodierenden Sequenz von wtE2A und tsE2A wurde durch Sequenzieren bestätigt.

B. Wachstumsmerkmale von produzierenden Zellen zur Erzeugung von rekombinanten adenoviralen Vektoren, die bei 32, 37 und 39°C kultiviert werden

**[0175]** PER.C6-Zellen wurden in nach Dulbecco modifiziertem Eagleschen Medium (DMEM, Gibco BRL), das um 10% fötales Rinderserum (FBS, Gibco BRL) und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> entweder bei 32°C, 37°C oder 39°C kultiviert. Am Tag 0 wurde jeder 25-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben (Nunc) mit insgesamt 1 × 10<sup>6</sup> PER.C6-Zellen beimpft, und die Zellen wurden entweder bei 32°C, 37°C oder 39°C kultiviert. Zellen wurden an den Tagen 1–8 gezählt. [Fig. 30](#) zeigt, dass die Wachstumsrate und die Enddichte der Zellen der PER.C6-Kultur bei 39°C mit derjenigen bei 37°C vergleichbar ist. Die Wachstumsrate und die Enddichte der Zellen der PER.C6-Kultur bei 32°C waren im Vergleich zu derjenigen bei 37°C oder 39°C leicht vermindert. Bei keiner der Inkubationstemperaturen wurde ein signifikanter Zelltod beobachtet. Somit funktioniert PER.C6 sowohl bei 32°C als auch bei 39°C, der permissiven bzw. der nicht permissiven Temperatur für ts125E2A, sehr gut.

C. Transfektion von PER.C6 mit E2A-Expressionsvektoren, Koloniebildung und Erzeugung von Zelllinien

**[0176]** Ein Tag vor der Transfektion jede 6-cm-Gewebe-Kulturschale (Greiner) mit 2 × 10<sup>6</sup> PER.C6-Zellen in DMEM beimpft, das um 10% FBS und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, und bei 37°C in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 3, 5 oder 8 µg entweder pcDNA3-, pcDNA3wtE2A- oder pcDNA3tsE2A-Plasmid pro Schale transfiziert, wobei der Reagenziensatz LipofectAMINI PLUS™ gemäß dem Standardprotokoll des Lieferanten (Gibco BRL) verwendet wurde, mit der Ausnahme, dass die Zellen bei 39°C in einer Atmosphäre von 10% CO<sub>2</sub> transfiziert wurden. Nach der Transfektion wurden die Zellen bei 39°C, der

nicht permissiven Temperatur für ts125E2A, gehalten. Drei Tage später wurden die Zellen in DMEM überführt, das um 10% FBS, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,25 mg/ml G418 (Gibco BRL) ergänzt war, und die ersten gegenüber G418 resistenten Kolonien erschienen 10 Tage nach der Transfektion. Wie in Tabelle 1 aufgeführt ist, gab es einen drastischen Unterschied zwischen der Gesamtzahl der Kolonien, die nach der Transfektion von pcDNA3 (~200 Kolonien) oder pcDNA3tsE2A (~100 Kolonien) und pcDNA3wtE2A (nur 4 Kolonien) erhalten wurden. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Toxizität von konstitutiv exprimiertem E2A durch die Verwendung einer temperaturempfindlichen Mutante von E2A (ts125E2A) und das Kultivieren der Zellen bei der nicht permissiven Temperatur von 39°C überwunden werden kann.

**[0177]** Aus jeder Transfektion wurde eine Reihe von Kolonien abgeimpft, indem die Zellen mit einer Pipette von der Schale gekratzt wurden. Die abgelösten Zellen wurden anschließend in Gewebekulturschalen mit 24 Näpfen (Greiner) überführt und bei 39°C in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> in DMEM weiter kultiviert, das um 10% FBS, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,25 mg/ml G418 ergänzt worden war. Wie in Tabelle 1 aufgeführt ist, ergab sich, dass 100% der mit pcDNA3 transfizierten Kolonien (4/4) und 82% der mit pcDNA3tsE2A transfizierten Kolonien (37/45) stabile Zelllinien waren (die übrigen 8 mit pcDNA3tsE2A transfizierten Kolonien wuchsen langsam und wurden verworfen). Im Gegensatz dazu konnte nur eine mit pcDNA3wtE2A transfizierte Kolonie nachgewiesen werden. Die anderen 3 starben direkt nach dem Abimpfen.

**[0178]** Als Nächstes wurden die E2A-Expressionsstärken in den verschiedenen Zelllinien durch Western Blotting bestimmt. Gewebekulturschalen mit 6 Näpfen wurden mit den Zelllinien beimpft, und subkonfluente Kulturen wurden zwei Mal mit PBS (NPBI) gewaschen und lysiert und in RIPA (1% NP-40, 0,5 Natriumdeoxycholat und 0,1% SDS in PBS, unterstützt durch 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 0,1 mg/ml Trypsin-Inhibitor) abgekratzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Lysate durch Zentrifugation gereinigt. Proteinkonzentrationen wurden mithilfe des Bio-Rad-Proteinassays gemäß den Standardverfahren des Lieferanten (BioRad) bestimmt. Gleiche Mengen des Ganzzellenextrakts wurden durch SDS-PAGE an 10%igen Gelen fraktioniert. Proteine wurden auf Immobilon-P-Membranen (Millipore) übertragen und mit dem monoklonalen α-DBP-Antikörper B6 inkubiert. Beim sekundären Antikörper handelte es sich um einen Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Ziegen-Antimäus-Antikörper (BioRad). Das Western-Blotting-Verfahren und die Inkubationen wurden gemäß dem von Millipore bereitgestellten Protokoll durchgeführt. Die Komplexe wurden mittels des ECL-Detektionssystems gemäß dem Protokoll des Herstellers (Amersham) visualisiert. [Fig. 31](#) zeigt, dass alle von der Transfektion mit pcDNA3tsE2A stammenden Zelllinien das E2A-Protein mit 72 kDa (linke Platte, Spuren 4–14, mittlere Platte, Spuren 1–13, rechte Platte, Spuren 1–12) exprimierten. Im Gegensatz dazu exprimierte die einzige Zelllinie, die von der pcDNAwtE2A-Transfektion stammte, das E2A-Protein nicht (linke Platte, Spur 2). Im Extrakt von einer Zelllinie, die von der pcDNA3-Transfektion stammte (linke Platte, Spur 1), die als negative Kontrolle diente, wurde kein E2A-Protein nachgewiesen. Extrakt von PER.C6-Zellen, der mit pcDNA3ts125 transient transfiziert war (linke Platte, Spur 3), diente als positive Kontrolle für das Western-Blot-Verfahren. Diese Daten bestätigten, dass eine konstitutive Expression von wtE2A für Zellen toxisch ist und dass diese Toxizität durch die Verwendung der ts125-Mutante von E2A umgangen werden konnte.

D. Komplementierung einer E2A-Deletion in adenoviralen Vektoren in PER.C6-Zellen, die ts125E2A über die volle Länge konstitutiv exprimieren.

**[0179]** Beim Adenovirus Ad5.d1802 handelt es sich um einen von Ad5 stammenden Vektor, der hinsichtlich des Hauptteils der E2A kodierenden Region deletiert ist und kein funktionelles DBP erzeugt. Zum Testen der E2A-trans-komplementierenden Aktivität von ts125E2A konstitutiv exprimierenden PER.C6-Zellen wurde Ad5.d1802 verwendet. Parenterale PER.C6-Zellen oder der PER.C6tsE2A-Klon 3–9 wurden in DMEM, das um 10% FBS und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, bei 39°C und in 10% CO<sub>2</sub> in 25-cm<sup>2</sup>-Kolben kultiviert und entweder scheininfiziert oder mit Ad5.d1802 mit einer MOI von 5 infiziert. Anschließend wurden die infizierten Zellen bei 32°C kultiviert, und Zellen wurden auf das Auftreten eines zytopathischen Effekts (CPE) gescreent, der durch Änderungen der Zellmorphologie und des Lösens von Zellen vom Kolben bestimmt wird. Ein vollständiger CPE trat in dem mit Ad5.d1802 infizierten PER.C6tsE2A-Klon 3–9 innerhalb von 2 Tagen auf. Bei den mit Ad5.d1802 infizierten PER.C6-Zellen oder den scheininfizierten Zellen trat kein CPE auf. Diese Daten belegten, dass ts125E2A konstitutiv exprimierende PER.C6-Zellen bei der permissiven Temperatur von 32°C für die E2A-Deletion im Ad5.d1802-Vektor in trans komplementierten.

E. Serumfreie Suspensionskultur von PER.C6tsE2A-Zelllinien.

**[0180]** Eine im großen Maßstab erfolgende Herstellung von rekombinanten adenoviralen Vektoren für die humane Gentherapie erfordert ein einfaches Verfahren zur Kultivierung der produzierenden Zelllinie, dessen Maßstab verändert werden kann, vorzugsweise eine Suspensionskultur in einem Medium ohne humane oder

tierische Bestandteile. Dahingehend wurde die Zelllinie PER.C6tsE2A c5-9 (als c5-9 bezeichnet) bei 39°C und 10% CO<sub>2</sub> in einem 175-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben (Nunc) in DMEM kultiviert, das um 10% FBS und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war. Bei einer Subkonfluenz (Konfluenz von 70–80%) wurden die Zellen mit PBS (NPBI) gewaschen, und das Medium wurde durch 25 ml eines serumfreien Suspensionsmediums Ex-cell™ 525 (JRH) ersetzt, das um 1 × L-Glutamin (Gibco BRL) ergänzt war und hiernach als SFM bezeichnet wird. Zwei Tage später wurden Zellen durch Anschneiden mit den Fingern vom Kolben gelöst, und die Zellen wurden für 5 min bei 1000 U./min zentrifugiert. Die Zelltablette wurde in 5 ml SFM resuspendiert, und 0,5 ml der Zellsuspension wurde zusammen mit 12 ml frischem SFM in einen 80-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben (Nunc) übertragen. Nach 2 Tagen wurden Zellen geerntet (alle Zellen befinden sich in Suspension) und in einem Burker-Zellzähler gezählt. Als Nächstes wurde ein 125-ml-Gewebekultur-Erlenmeyerkolben (Corning) mit einer Impfdichte von 3 × 10<sup>5</sup> Zellen pro ml in einem Gesamtvolumen von 20 ml SFM mit Zellen beimpft. Zellen wurden weiterhin bei 125 U./min in einem Rundschüttler (GFL) bei 39°C in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zellen wurden am Tag 1–6 in einem Burker-Zellzähler gezählt. In [Fig. 4](#) ist die mittlere Wachstumskurve von 8 Kulturen dargestellt. PER.C6tsE2A c5-9 funktionierte in der serumfreien Suspensionskultur gut. Die maximale Zelldichte von etwa 2 × 10<sup>6</sup> Zellen pro ml wird innerhalb einer 5-tägigen Kultur erreicht.

#### F. Wachstumsmerkmale von PER.C6 und PER.C6/E2A bei 37°C und 39°C.

**[0181]** PER.C6-Zellen oder PER.C6ts125E2A-(c8-4)Zellen wurden in nach Dulbecco modifiziertem Eagleschen Medium (DMEM, Gibco BRL), das um 10% fötales Rinderserum (FBS, Gibco BRL) und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> entweder bei 37°C (PER.C6) oder 39°C (PER.C6ts125E2A c8-4) kultiviert. Am Tag 0 wurde jeder 25-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben (Nunc) mit insgesamt 1 × 10<sup>6</sup> Zellen beimpft, und die Zellen wurden bei den jeweiligen Temperaturen kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen gezählt. Das Wachstum von PER.C6-Zellen bei 37°C war mit dem Wachstum von PER.C6ts125E2A c8-4 bei 39°C vergleichbar ([Fig. 33](#)). Dies zeigt, dass eine konstitutive Expression von mit ts125E2A kodiertem DBP keine nachteilige Auswirkung auf das Wachstum von Zellen bei der nicht permissiven Temperatur von 39°C hatte.

#### G. Stabilität von PER.C6ts125E2A

**[0182]** In mehreren Durchgängen wurde der Klon 8-4 der Zelllinie PER.C6ts125E2A bei 39°C und 10% CO<sub>2</sub> in einem 25-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben (Nunc) in DMEM, das um 10% FBS und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, in Abwesenheit eines Selektionsdrucks (G418) kultiviert. Bei der Subkonfluenz (Konfluenz 70–80%) wurden die Zellen mit PBS (NPBI) gewaschen und in RIPA (1% NP-40, 0,5% Natriumdeoxycholat und 0,1% SDS in PBS, um 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid und 0,1 mg/ml Trypsin-Inhibitor ergänzt) abgekratzt. Nach einer 15-minütigen Inkubation auf Eis wurden die Lysate durch Zentrifugation gereinigt. Proteinkonzentrationen wurden durch den BioRad-Proteinassay nach den Standardverfahren des Lieferanten (BioRad) bestimmt. Gleiche Mengen des Ganzzellenextrakts wurden mittels SDS-PAGE in 10-%igen Gelen fraktioniert. Proteine wurden auf Immobilon-P-Membrane (Millipore) übertragen und mit dem monoklonalen α-DBP-Antikörper B6 inkubiert. Beim sekundären Antikörper handelte es sich um Meerrettich-Peroxidase-Konjugiert-Ziegen-Antimaus-Antikörper (BioRad). Das Western-Blotting-Verfahren und die Inkubationen wurden gemäß dem von Millipore bereitgestellten Protokoll durchgeführt. Die Komplexe wurden mit dem ECL-Detektionssystem nach dem Protokoll des Herstellers (Amersham) visualisiert. Die Expression von mit ts125E2A kodiertem DBP war für wenigstens 16 Durchgänge stabil, was etwa 40 Zellverdopplungen äquivalent ist ([Fig. 34](#)). Während dieser Kulturdauer wurde keine Abnahme von DBP-Konzentrationen beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Expression von ts125E2A sogar in Abwesenheit des G418-Selektionsdrucks stabil war.

#### Beispiel 16

##### Erzeugung von tTA exprimierenden Verpackungszelllinien

###### A. Erzeugung eines Plasmids, von dem das tTA-Gen exprimiert wird.

**[0183]** pcDNA3.1-tTA: Das tTA-Gen, eine Fusion der Gene tetR und VP16, wurde durch einen Aufschluss unter Verwendung der Restriktionsenzyme BamHI und EcoRI aus dem Plasmid pUHD 15-1 (Gossen und Bujard, 1992) entfernt. Zunächst wurde pUHD15-1 mit EcoRI aufgeschlossen. Das linearisierte Plasmid wurde mit Klenow-Enzym in Gegenwart von dNTPs behandelt, um die klebrigen EcoRI-Enden aufzufüllen. Dann wurde das Plasmid mit BamHI aufgeschlossen. Das resultierende Fragment mit einer Länge von 1025 bp wurde von Agarose gereinigt. Anschließend wurde das Fragment in einer Ligationsreaktion mit pcDNA-3.1-HYGRO (–) (Invitrogen), das mit BamHI/EcoRV aufgeschlossen war, eingesetzt, wodurch pcDNA3.1-tTA erhalten wurde. Nach

der Transformation in kompetentes *E. Coli* DH5 $\alpha$  (Life Techn.) und einer Analyse von gegenüber Ampicillin resistenten Kolonien wurde ein Klon ausgewählt, der ein Aufschlussmuster aufwies, das für pcDNA3.1-tTA erwartet wurde.

#### B. Transfektion von PER.C6 und PER.C6/E2A mit dem Expressionsvektor tTA; Koloniebildung und Bildung von Zelllinien

**[0184]** Einen Tag vor der Transfektion wurden 60-mm-Gewebekulturschalen (Greiner) in nach Dulbecco modifiziertem Eagleschen Medium (DMEM, Gibco BRL), das um 10% FBS (JRH) und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, mit  $2 \times 10^6$  PER.C6- oder PER.C6/E2A-Zellen beimpft und bei 37°C und in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 4–8  $\mu$ g pcDNA3.1-tTA-Plasmid-DNA transfiziert, wobei der Reagensatz LipofectAMINE PLUS™ gemäß dem Standardprotokoll des Lieferanten (Gibco BRL) verwendet wurde. Die Zellen wurden mit der LipofectAMINE PLUS™-Mischung für 4 h bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Dann wurden 2 ml DMEM, das um 20% FBS und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, zugegeben, und Zellen wurden weiter bei 37°C und 10% CO<sub>2</sub> inkubiert. Am nächsten Tag wurden Zellen mit PBS gewaschen und in frischem DMEM, das um 10% FBS, 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, entweder bei 37°C (PER.C6) oder 39°C (PER.C6/E2A) in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> für drei Tage inkubiert. Dann wurden die Medien durch Selektionsmedien ersetzt, PER.C6-Zellen wurden mit DMEM, das um 10% FBS, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 50  $\mu$ g/ml Hygromycin B (GIBCO) ergänzt war, inkubiert, während PER.C6/E2A-Zellen in DMEM gehalten wurden, das um 10% FBS, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 100  $\mu$ g/ml Hygromycin B ergänzt war. Zellkolonien, die der Selektion widerstanden, erschienen innerhalb von drei Wochen, während nichtresistente Zellen in diesem Zeitraum abstarben.

**[0185]** Von jeder Transfektion wurde eine Anzahl unabhängiger, gegenüber Hygromycin resistenter Zellen abgeimpft, indem die Zellen mit einer Pipette von der Schale abgekratzt und in 2,5-cm<sup>2</sup>-Schalen (Greiner) überführt wurden, um dort weiter in DMEM, das 10% FBS, 10 mM MgCl<sub>2</sub> enthielt und um 50  $\mu$ g/ml (PER.C6-Zellen) bzw. 100  $\mu$ g/ml (PER.C6/E2A-Zellen) Hygromycin ergänzt war, in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> und bei 37°C bzw. 39°C gezogen zu werden.

**[0186]** Als Nächstes wurde bestimmt, ob diese gegenüber Hygromycin resistenten Zellkolonien funktionelles tTA-Protein exprimierten. Dazu wurden Kulturen von PER.C6/tTA oder PER/E2A/tTA-Zellen mit dem Plasmid pUHC 13-3, das das Luciferase-Transportergen unter der Kontrolle des Promoters 7xtetO (Gossens und Bujard, 1992) enthält, transfiziert waren. Um zu demonstrieren, dass die Expression von Luciferase von tTA vermittelt wurde, wurde eine Hälfte der Kulturen in einem Medium ohne Doxycyclin gehalten. Die andere Hälfte wurde in einem Medium mit 8  $\mu$ g/ml Doxycyclin (Sigma) gehalten. Letzteres Medikament ist ein Tetracyclin-Analog und bindet sich an tTA und hemmt dessen Aktivität. Alle PER.C6/tTA- und PER/E2A/tTA-Zelllinien ergaben hohe Luciferase-Konzentrationen, was darauf hin deutet, dass alle Zelllinien das tTA-Protein exprimierten (**Fig. 35**). Im Gegensatz dazu wurde die Expression von Luciferase außerordentlich unterdrückt, wenn die Zellen mit Doxycyclin behandelt wurden. Die Daten zeigten kollektiv, dass die isolierten und etablierten, gegen Hygromycin resistenten PER.C6- und PER/E2A-Zellklone alle funktionelles tTA exprimierten.

Legende zu den Figuren:

**[0187] Fig. 1:**

Balkendiagramm, in dem der Prozentwert der Serumproben dargestellt ist, die für eine Neutralisation eines jeden getesteten humanen wt-Adenovirus sind (zur Beschreibung des Neutralisationsassays siehe Beispiel 1).

**[0188] Fig. 2:**

Graphische Darstellung, in der das Fehlen einer Korrelation zwischen dem Verhältnis VP/CCID<sub>50</sub> und dem Prozentwert der Neutralisation dargestellt ist.

**[0189] Fig. 3:**

Schematische Darstellung einer partiellen Restriktionskarte von Ad35 (aus Kang et al., 1989) und der erzeugten Klone zur Herstellung rekombinanter Viren auf der Grundlage von Ad35.

**[0190] Fig. 4:** Balkendiagramm, in dem der Prozentwert von Serenproben dargestellt ist, die eine neutralisierende Wirkung gegenüber einer Auswahl von Adenovirus-Serotypen zeigen. Seren stammten von gesunden Freiwilligen aus Belgien und GB.

**[0191] Fig. 5:** Balkendiagramm, in dem der Prozentwert von Serenproben dargestellt ist, die eine neutralisierende Wirkung gegenüber den Adenovirus-Serotypen 5, 11, 26, 34, 35, 48 und 49 zeigen. Seren stammten von

fünf verschiedenen Orten in Europa und den Vereinigten Staaten.

[0192] **Fig. 6:** Sequenz des humanen Adenovirus-Typ 35. Wie im Text erläutert ist, ist die Nucleotidsequenz der terminalen Enden des Virus nicht definitiv aufgelöst.

[0193] **Fig. 7:** Karte von pAdApt.

[0194] **Fig. 8:** Karte von pIPspAdapt.

[0195] **Fig. 9:** Karte von pIPspAdapt1.

[0196] **Fig. 10:** Karte von pIPspAdapt3.

[0197] **Fig. 11:** Karte von pAdApt35IP3.

[0198] **Fig. 12:** Karte von pAdApt35IP1.

[0199] **Fig. 13:** Schematische Darstellung der zur Konstruktion von pWE.Ad35.pIX-riTR unternommenen Schritte.

[0200] **Fig. 14:** Karte von pWE.Ad35.pIX-riTR.

[0201] **Fig. 15:** Karte von pRSV.Ad35-E1.

[0202] **Fig. 16:** Karte von PGKneopA.

[0203] **Fig. 17:** Karte von pRSVpNeo.

[0204] **Fig. 18:** Karte von pRSVhvbNeo.

[0205] **Fig. 19:** Durchflusszytometrische Analyse der Expression des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) in humanen TF-1-Zellen. Nicht transduzierte TF-1-Zellen wurden zur Erzeugung einer Hintergrundkonzentration von 1% verwendet. Dargestellt ist die Expression von GFP in Zellen, die mit Ad5, Ad5.Fib16, Ad5.Fib17, Ad5.Fib40-L, Ad5.Fib35 und Ad5.Fib51 transduziert sind.

[0206] **Fig. 20:** Transduktion von primären, fibroblastenartigen Stromata. Zellen wurden 48 h nach einer zweistündigen Einwirkung der verschiedenen chimären Faserproteine analysiert. Dargestellt ist der Prozentwert von Zellen, die als positiv für das Transgen, grün fluoreszierendes Protein (GFP), mittels eines Durchfluss-Zytometers ermittelt wurden. Nicht transduzierte Stromazellen wurden zur Erzeugung eines Hintergrundes von 1% verwendet. Ergebnisse verschiedener Experimente ( $n = 3$ ) sind als  $\pm$ -Standardabweichung dargestellt.

[0207] **Fig. 21:** Transduktion von primären, humanen, fibroblastartigen Stromata, CD34<sup>+</sup>-Zellen und CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>-Zellen. Zellen wurden 5 Tage nach einer zweistündigen Einwirkung der verschiedenen chimären, Faserprotein exprimierenden Viren analysiert. Dargestellt ist der Prozentwert von Zellen, die als positiv für das Transgen, grün fluoreszierendes Protein (GFP), mittels eines Durchfluss-Zytometers ermittelt wurden. Nicht transduzierte Stromazellen wurden zur Erzeugung eines Hintergrundes von 1% verwendet. Ebenfalls dargestellt ist die Anzahl der GFP-positiven Ereignisse dividiert durch die Gesamtzahl der analysierten Ereignisse (in Klammern).

[0208] **Fig. 22:** A) Durchflusszytometrische Analyse von GFP-positiven Zellen nach der Transduktion von CD34<sup>+</sup>-Zellen mit Ad5.Fib51. Alle Zellen R2–R7 sind für CD34 positiv, unterscheiden sich aber hinsichtlich ihrer Expression der frühen Differenzierungsmarker CD33, CD38 und CD71 (Lin). Zellen in R2 sind für CD33, CD38, CD71 negativ, während Zellen in R7 für diese Marker positiv sind. Um die Spezifität von Ad5.Fib51 zu demonstrieren, wurde der Prozentwert von GFP-positiven Zellen in R2–R7 bestimmt, bei denen gezeigt wurde, dass sie von 91 (R2) bis 15% (R7) abnehmen. B) Ein zu A identisches Experiment (wobei die X-Achse R2–R7 ist), aber für die anderen chimären, Faserprotein exprimierenden Ad-Viren zeigte, dass Ad5.Fib35 und Ad5.Fib16 sich ähnlich wie Ad5.Fib51 verhalten.

[0209] **Fig. 23:** Ausrichtung der chimären Faserproteine von Ad5fib16, Ad5fib35 und Ad5fib51 mit der Ad5-Fasersequenz.

**[0210] Fig. 24:** Toxizität einer Adenovirus-Einwirkung auf primitive humane Knochenmarkzellen und Stammzellen. Zellkulturen wurden unmittelbar vor und 5 Tage nach der Transduktion des Adenovirus gezählt. Dargestellt ist der Prozentwert der primitiven humanen Knochenmarkzellen (CD34<sup>+</sup>) und HSC (CD34<sup>+</sup>Lin<sup>-</sup>), die im Vergleich zu Tag 0 isoliert wurden.

**[0211] Fig. 25:** Transduktion von unreifen DC bei einer Virusdosis von 100 oder 1000 Viruspartikeln pro Zelle. Beim getesteten Virus handelt es sich um Ad5 und Vektoren auf der Grundlage von Ad5, die die Faser des Serotypen 12 (Ad5.Fib12), 16 (Ad5.Fib16), 28 (Ad5.Fib28), 32 (Ad5.Fib32), die lange Faser von 40 (Ad5.Fib40-L, 49 (Ad5.Fib49), 51 (Ad5.Fib51) tragen. Die Expression des Luciferase-Transgens ist als relative Lichteinheiten pro µg Protein ausgedrückt.

**[0212] Fig. 26:** Durchflusszytometrische Analyse der LacZ-Expression auf unreife und reife DC, die mit 10 000 Viruspartikeln pro Zelle Ad5 oder die chimären Faservektoren Ad5.Fib16, Ad5.Fib40-L oder Ad5.Fib51 transduziert sind. Prozentwerte der als positiv eingestufteten Zellen sind in der oberen linken Ecke eines jeden Histogramms dargestellt.

**[0213] Fig. 27:** Die Expression des Luciferase-Transgens in humanen unreifen DC, gemessen 48 h nach einer Transduktion mit 1000 oder 5000 Viruspartikeln pro Zelle. Beim getesteten Virus handelte es sich um chimäre, Faserprotein exprimierende Viren, die die Faser von Elementen der Untergruppe B (Serotypen 11, 16, 35 und 51) trugen.

**[0214] Fig. 28:** Expression von grün fluoreszierendem Protein (GFP) in unreifen humanen DC 48 h nach der Transduktion mit 1000 Viruspartikeln pro Zelle Ad5, Ad5.Fib16 und Ad5.Fib35. Zur Einstellung einer Hintergrundkonzentration von etwa 1% (-) wurden nicht transduzierte Zellen verwendet.

**[0215] Fig. 29:** Transduktion von Maus- und Schimpansen-DC. Die Expression von Luciferase-Transgen wurde in Maus-DC 48 h nach der Expression der Transduktion als relative Lichteinheiten pro µg Protein gemessen. Schimpansen-DC wurden 48 h nach der Transduktion mit einem Durchfluss-Zytometer gemessen. Die Expression von GFP zeigt die schlechte Transduktion von Ad (35) im Gegensatz zu Ad5.Fib35 (66%).

**[0216] Fig. 30:** Temperaturabhängiges Wachstum von PER.C6. PER.C6-Zellen wurden in nach Dulbecco modifiziertem Eagleschen Medium, das um 10% fötales Rinderserum (FBS, Gibco BRL) und 10 mM MgCl<sub>2</sub> ergänzt war, in einer Atmosphäre mit 10% CO<sub>2</sub> entweder bei 32°C, 37°C oder 39°C kultiviert. Am Tag 0 wurde jeder 25-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben (Nunc) mit insgesamt 1 × 10<sup>6</sup> PER.C6-Zellen beimpft, und die Zellen wurden entweder bei 32°C, 37°C oder 39°C kultiviert. Zellen wurden an den Tagen 1–8 gezählt. **Fig. 30** zeigt, dass die Wachstumsrate und die Enddichte der Zellen der PER.C6-Kultur bei 39°C mit derjenigen bei 37°C vergleichbar ist. Die Wachstumsrate und die Enddichte der Zellen der PER.C6-Kultur bei 32°C waren im Vergleich zu derjenigen bei 37°C oder 39°C leicht vermindert.

**[0217]** 25-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben wurden jeweils mit einer Dichte von 1 × 10<sup>6</sup> PER.C6-Zellen beimpft, und die Zellen wurden entweder bei 32°C, 37°C oder 39°C kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen in einer Burker-Zellzählvorrichtung gezählt. PER.C6-Zellen wuchsen bei 32°C, 37°C und 39°C gut.

**[0218] Fig. 31:** DBP-Konzentrationen in PER.C6-Zellen, die mit pcDNA3, pcDNA3wtE2A oder pcDNA3ts125E2A transfiziert sind.

**[0219]** Gleiche Menge eines Ganzzellenextrakts wurden mittels SDS-PAGE an 10-%igen Gelen fraktioniert. Proteine wurden auf Immobilon-P-Membrane übertragen, und DBP-Protein wurde unter Verwendung des αDBP-monoklonalen B6 in einem ECL-Detektionssystem visualisiert. Alle von der pcDNA3ts125E2A-Transfektion stammenden Zelllinien exprimieren das E2A-kodierte DBP-Protein mit 72 kDa (linke Platte, Spuren 4–14, mittlere Platte, Spuren 1–13, rechte Platte, Spuren 1–12). Im Gegensatz dazu exprimierte die einzige Zelllinie, die von der pcDNAwtE2A-Transfektion stammte, das DBP-Protein nicht (linke Platte, Spur 2). Im Extrakt von einer Zelllinie, die von der pcDNA3-Transfektion stammte (linke Platte, Spur 1), die als negative Kontrolle diente, wurde kein E2A-Protein nachgewiesen. Extrakt von PER.C6-Zellen, der mit pcDNA3ts125 transient transfiziert war (linke Platte, Spur 3), diente als positive Kontrolle für das Western-Blot-Verfahren. Diese Daten bestätigten, dass eine konstitutive Expressionsform von wtE2A für Zellen toxisch ist und dass diese Toxizität durch die Verwendung der ts125-Mutante von E2A umgangen werden kann.

**[0220] Fig. 32:** Suspensionswachstum von PER.C6ts125E2A C5-9.

[0221] Die tsE2A exprimierende Zelllinie PER.C6tsE2A.c5-9 wurde in einer Suspension in serumfreiem Ex-cell™ kultiviert. An den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen in einer Burker-Zellzählvorrichtung gezählt. Aufgeführt sind die Ergebnisse von 8 unabhängigen Kulturen. PER.C6tsE2A wächst in einer Suspension aus serumfreiem Ex-cell™-Medium gut.

[0222] [Fig. 33](#): Wachstumskurve von PER.C6 und PER.C6tsE2A.

[0223] PER.C6-Zellen oder PER.C6ts125E2A-(c8-4)Zellen wurden bei 37°C bzw. 39°C kultiviert. Am Tag 0 wurde jeder 25-cm<sup>2</sup>-Gewebekulturkolben mit insgesamt  $1 \times 10^6$  Zellen beimpft, und die Zellen wurden bei den jeweiligen Temperaturen kultiviert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Zellen gezählt. Das Wachstum von PER.C6-Zellen bei 37°C war mit dem Wachstum von PER.C6ts125E2A c8-4 bei 39°C vergleichbar ([Fig. 33](#)). Dies zeigt, dass eine konstitutive Überexpression von ts125E2A keine nachteilige Auswirkung auf das Wachstum von Zellen bei der nicht permissiven Temperatur von 39°C hatte.

[0224] [Fig. 34](#): Stabilität von PER.C6ts125E2A.

[0225] Für mehrere Durchgänge wurde der PER.C6ts125E2A-Zelllinienklon 8-4 bei 39°C in Medium ohne G418 kultiviert. Gleiche Mengen des Ganzzellenextrakts wurden mittels SDS-PAGE in 10-%igen Gelen fraktioniert. Proteine wurden auf Immobilon-P-Membrane (Millipore) übertragen, und DBP-Protein wurde unter Verwendung des  $\alpha$ DBP-monoklonalen B6 in einem ECL-Detektionssystem visualisiert. Die Expression von mit ts125E2A kodiertem DBP war für wenigstens 16 Durchgänge stabil, was etwa 40 Zellverdopplungen äquivalent ist. Während dieser Kulturdauer wurde keine Abnahme von DBP-Konzentrationen beobachtet, was darauf hindeutet, dass die Expression von ts125E2A sogar in Abwesenheit des G418-Selektionsdrucks stabil war.

[0226] [Fig. 35](#): Aktivität von tTA in gegenüber Hygromycin resistentem PER.C6/tTA-(A) und PER/E2A/tTA-(B)Zellen.

[0227] 16 unabhängige, gegenüber Hygromycin resistente PER.C6/tTA-Zellkolonien und 23 unabhängige, gegenüber Hygromycin resistente PER/E2A/tTA-Zellkolonien wurden in 10-cm<sup>2</sup>-Näpfen bis zur Subkonfluenz gezogen und mit 2  $\mu$ g pUHC 13-3 (einem Plasmid, das das Luciferase-Reportergen unter der Kontrolle des Promotors 7xTetO enthält) transfiziert. Eine Hälfte der Kulturen wurde in dem Doxycyclin enthaltenden Medium gehalten, um die tTA-Aktivität zu hemmen. Zellen wurden 48 h nach der Transfektion geerntet, und die Luciferase-Aktivität wurde gemessen. Die Luciferase-Aktivität ist in relativen Lichteinheiten (RLU) pro  $\mu$ g Protein angegeben.

Tabelle I:

Serotyp	Elution [NaCl] mM	VP/ml	CCID50	log10 VP/CCID50-Verhältnis
1	597	$8,66 \times 10^{10}$	$5,00 \times 10^7$	3,2
2	574	$1,04 \times 10^{12}$	$3,66 \times 10^{11}$	0,4
3	131	$1,19 \times 10^{11}$	$1,28 \times 10^7$	4,0
4	260	$4,84 \times 10^{11}$	$2,50 \times 10^8$	3,3
5	533	$5,40 \times 10^{11}$	$1,12 \times 10^{10}$	1,7
6	477	$1,05 \times 10^{12}$	$2,14 \times 10^{10}$	1,7
7	328	$1,68 \times 10^{12}$	$2,73 \times 10^9$	2,4
9	379	$4,99 \times 10^{11}$	$3,75 \times 10^7$	4,1
10	387	$8,32 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^9$	3,9
12	305	$3,64 \times 10^{11}$	$1,46 \times 10^7$	4,4
13	231	$4,37 \times 10^{12}$	$7,31 \times 10^8$	3,8
15	443	$5,33 \times 10^{12}$	$1,25 \times 10^9$	3,6
16	312	$1,75 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^8$	3,5
17	478	$1,39 \times 10^{12}$	$1,45 \times 10^9$	3,0

19	430	$8,44 \times 10^{11}$	$8,55 \times 10^7$	4,0
20	156	$1,41 \times 10^{11}$	$1,68 \times 10^7$	3,9
21	437	$3,21 \times 10^{11}$	$1,12 \times 10^8$	3,5
22	365	$1,43 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^7$	3,4
23	132	$2,33 \times 10^{11}$	$1,57 \times 10^7$	4,2
24	405	$5,12 \times 10^{12}$	$4,27 \times 10^8$	4,1
25	405	$7,24 \times 10^{11}$	$5,59 \times 10^7$	4,1
26	356	$1,13 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^8$	4,0
27	342	$2,00 \times 10^{12}$	$1,28 \times 10^8$	4,2
28	347	$2,77 \times 10^{12}$	$5,00 \times 10^7$	4,7
29	386	$2,78 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^7$	4,1
30	409	$1,33 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^8$	3,4
31	303	$8,48 \times 10^{10}$	$2,19 \times 10^7$	3,6
33	302	$1,02 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^7$	5,0
34	425	$1,08 \times 10^{12}$	$1,63 \times 10^{11}$	0,8
35	446	$3,26 \times 10^{12}$	$1,25 \times 10^{11}$	1,4
36	325	$9,26 \times 10^{12}$	$3,62 \times 10^9$	3,4
37	257	$5,86 \times 10^{12}$	$2,8 \times 10^9$	3,3
38	337	$3,61 \times 10^{12}$	$5,59 \times 10^7$	4,8
39	241	$3,34 \times 10^{11}$	$1,17 \times 10^7$	4,5
42	370	$1,95 \times 10^{12}$	$1,12 \times 10^8$	4,2
43	284	$2,42 \times 10^{12}$	$1,81 \times 10^8$	4,1
44	295	$8,45 \times 10^{11}$	$2,00 \times 10^7$	4,6
45	283	$5,20 \times 10^{11}$	$2,99 \times 10^7$	4,2
46	282	$9,73 \times 10^{12}$	$2,50 \times 10^8$	4,6
47	271	$5,69 \times 10^{11}$	$3,42 \times 10^7$	4,2
48	264	$1,68 \times 10^{12}$	$9,56 \times 10^8$	3,3
49	332	$2,20 \times 10^{12}$	$8,55 \times 10^7$	4,4
50	459	$7,38 \times 10^{12}$	$2,80 \times 10^9$	3,4
51	450	$8,41 \times 10^{11}$	$1,88 \times 10^8$	3,7

Legende zu Tabelle I:

**[0228]** Alle in den Neutralisationsexperimenten verwendeten humanen Adenoviren wurden in PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) erzeugt (Fallaux et al., 1998) und gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 an CsCl gereinigt. Aufgeführt ist die NaCl-Konzentration, bei der die verschiedenen Serotypen aus der HPLC-Säule eluiert wurden. Viruspartikel/ml (VP/ml) wurden aus einem Ad5-Standard berechnet. Der Titer im Experiment (CCID50) wurde in PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) gemäß der Beschreibung in Beispiel 1 durch Titrations bestimmt, die parallel mit dem Neutralisationsexperiment durchgeführt wurden. Der CCID50 ist für die 44 in dieser Untersuchung verwendeten Viren aufgeführt und stellt die Verdünnung des Virus dar, die erforderlich war, um nach 5 Tagen in 50% der Näpfe einen CPE zu erhalten. Das Verhältnis VP/CCID50 ist als  $\log_{10}$  aufgeführt und stellt ein Maß für die Infektiosität der verschiedenen Chargen in PER.C6-Zellen (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) dar.

Tabelle II. AdApt35.LacZ-Viren entgehen einer Neutralisation durch humanes Serum

Virus	Verdünnung des humanen Serums					
	Kein Serum	10x	50x	250x	1250x	6250x
AdApt5.LacZ moi:5 VP/Zelle	100%	0%	0%	1%	40%	80%
AdApt35.LacZ 250 µl rohes Lysat	100%	100%	100%	100%	100%	100%

Tabelle III: Prozentwert der Proben mit Synovialflüssigkeit, die eine neutralisierende Wirkung (NA) gegenüber wt-Adenoviren verschiedener Serotypen enthalten

	der SF-Proben mit NA (alle positiven)	% der SF-Proben mit NA (positiv bei einer Verdünnung > 64x)
Ad5	72	59
Ad26	66	34
Ad34	45	19
Ad35	4	0
Ad48	42	4

Tabelle IV: Anzahl der Herde, die mit den verschiedenen E1-Expressionskonstrukten in BRK-Transformationsexperimenten erhalten wurden

Mittelwert der Anzahl Herde/Schale:

	Konstrukt	1 µg	5 µg
Experiment 1	pIG.E1A.E1 B	nd	60
	pIG.E1A.E1 B	nd	35
	pRSVAd35E1	0	3
	pIG.Ad35.E 1	3	7
Experiment 2	pIG.E1A.E1 B	37	nd
	pIGAd35.E 1	nd	2
Experiment 3	pIG.E1A.E1 B	nd	140
	pIG.Ad35.E 1	nd	20
	pIG270	nd	30

## LITERATURSTELLEN

- Abrahamsen, K., Kong, H-L., Mastrangeli, A., Brough, D., Lizonova, A., Crystal, R. and Falck-Pedersen, E. (1997) Construction of an adenovirus type 7a E1A<sup>-</sup> vector. *J. Virol.* 71, no. 11, p8946–8951.
- Athappilly, F. K., Murali, R., Rux, J. J., Cai, Z. and Burnett, R. M. (1994). The refined crystal structure of hexon, the major coat protein of adenovirus type 2, at 2.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 242, 430–455.
- Basler, C. F., Droguett, G., Horwitz, M. S. (1996). Sequence of the immunoregulatory early region 3 and flanking sequences of adenovirus type 35. *Gene* 170: 249–54
- Bridge, E., Medghalchi, S., Ubol, S., Leesong, M. and Ketner, G. (1993) Adenovirus early region 4 and viral DNA synthesis. *Virology* 193, 794–801.
- Brody, S. L. and Crystal, R. G. (1994) Adenovirus mediated in vivo gene transfer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 716:90–101.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Hasler, K., Fleckenstein B. and Schaffner W. (1985). A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell* 41, 521–530,

- Dijkema, R., Dekker, B. M. M., van der Feltz, M. J. M. and van der Eb, A. J. (1979). Transformation of primary rat kidney cells by DNA fragments of weakly oncogenic adenoviruses. *J. Virol.* 32, No 3, 943–950.
- Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., Valerio, D. and Hoeben, R. C. (1998). New helper cells and matched early region I-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication competent adenoviruses. *Hum. Gene Ther.* 9, 1909–1917.
- Gossen, M., and H. Bujard (1992) Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracyclin-responsive promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89; 5547–5551.
- Flomenberg, P. R., Chef, M., Munk, G., Horwitz, M. S. (1987). Molecular epidemiology of adenovirus type 35 infections in immunocompromised hosts. *J. Infect Dis.* 155(6): 1127–34.
- Francki, R. I. B., Fauquet, C. M., Knudson, D. L. and Brown, F. (1991). Classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international Committee on taxonomy of viruses. *Arch. Virol. Suppl.* 2: 140–144.
- Gahery-Segard, H., Farace, F., Godfrin, D., Gaston, J., Lengagne, R., Tursz, P., Boulanger, P. and Guillet, J.-G. (1998). Immune response to recombinant capsid proteins of adenovirus in humans: Antifiber and anti-penton base antibodies have a synergistic effect on neutralising activity. *J. Virol.* 72, 2388–2397.
- He, T.-C., Zhou, S., Da Costa, L. T., Vu, J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1998). A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 2509–2514.
- Hierholzer, J. C., Wigand, R., Anderson, L. J., Adrian, T., and Gold, J. W. M. (1988) Adenoviruses from patients with AIDS: a plethora of serotypes and a description of five new serotypes of subgenus D (types 43–47). *J. Infect. Dis.* 158, 804–813.
- De Jong, P. J., Valderrama, G., Spigland, I. and Horwitz, M. S. (1983). Adenovirus isolates from urine of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Lancet* 1(8337): 1293–1296.
- Kay, R., Takei, F., and Humphries, R. K. (1990). Expression cloning of a cDNA encoding M1/69. *J. Immunol.* 145, 1952–1959.
- Kang, W. G., Berencsi, G., Takacs, M., Asche, r. Z., Fejer, G., Nasz, I. (1989a). Molecular cloning and physical mapping of the DNA of human adenovirus type 35. *Acta Microbiol Hung* 36(1): 67–75.
- Kang, W. G., Berencsi, G., Banrevi, A., Ascher, Z., Fejer, G., Takacs, M., Kiss, A., Nasz, I. (1989b). Relationship of E1 and E3 regions of human adenovirus 35 to those of human adenovirus subgroups A, C and D. *Acta Microbiol Hung* 36(4): 445-57.
- Levero, M., Barban, V., Manteca, S., Ballay, A., Balsamo, C., Avantaggiati, M. L., Natoli, G., Skellekens, H., Tiollais, P., and Perricaudet, M. (1991). Defective and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes in vitro and in vivo. *Gene* 101, 195–202.
- Li, Q. G., Hambraeus, J. and Wadell, G. (1991). Genetic relationship between thirteen genomes of types of adenovirus 11, 34, and 35 with different tropisms. *Interviol.* 32, 338-350.
- Prince, H. M. (1998). Gene transfer: a review of methods and applications. *Pathology* 30(4), 335–347.
- Robbins, P. D. and Ghivizzani, S. C. (1998). Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol Ther.* 80, 35–47.
- Schnurr, D and Dondero, M. E. (1993). Two new candidate adenovirus serotypes. *Interviol.* 36, 79–83.
- Schulick, A. H., Vassalli, G., Dunn, P. F., Dong, G., Rade, J. J., Zamarron, C. and Dichek, D. A. (1997). Established immunity precludes adenovirus-mediated gene transfer in rat carotid arteries. Potential for immunosuppression and vector engineering to overcome barriers of immunity. *J. Clin. Invest.* 99(2), 209–19.
- Shabram, P. W., Giroux, D. D., Goudreau, A. M., Gregory, R. J., Horn, M. T., Huyghe, B. G., Liu, X., Nunnally, M. H., Sugarman, B. J. and Sutjipto, S. (1997) Analytical anion-exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles. *Hum. Gene Ther.* 8(4): 453–465.
- Toogood et al., 1989; *J. Gen Virol.* 70, 3203–3214 Toogood, C. I., Murali, R., Burnett, R. M., Hay, R. T. (1989). The adenovirus type 40 hexon: sequence, predicted structure and relationship to other adenovirus hexons. *J. Gen. Virol.* 70, 3203–14.
- Valderrama-Leon, G., Flomenberg, P., Horwitz, M. S. (1985). Restriction endonuclease mapping of adenovirus 35, a type isolated from immunocompromised hosts. *J virol.* 56(2): 647–50.
- Wadell, G. (1984). Molecular epidemiology of adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 110, 191–220.
- White, E. (1995) Regulation of p53-dependent apoptosis by E1a and E1b. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199, 34–58

### Patentansprüche

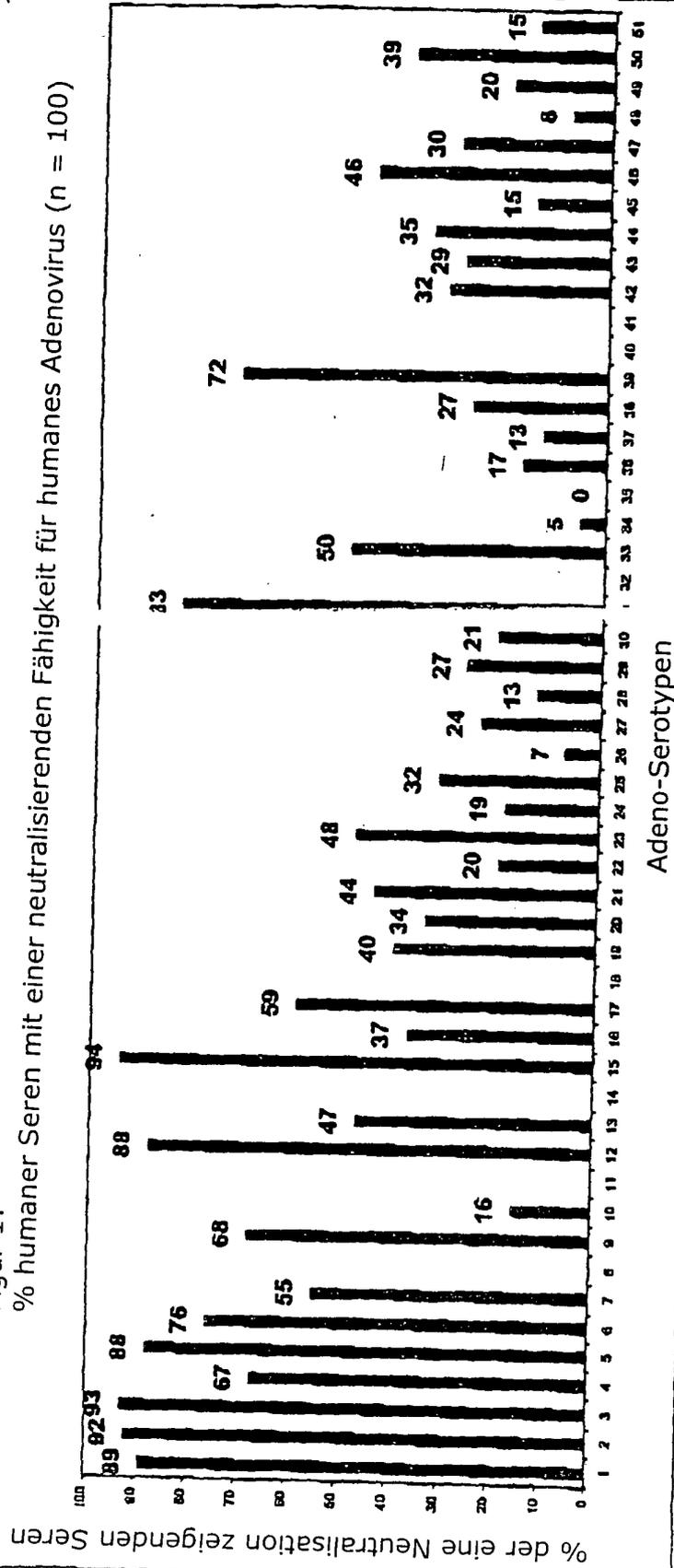
1. Genübertragungsvehikel, das ein interessierendes Gen, eine Adenovirus-Serotyp-35-Faser und ein Adenovirus-Serotyp-35-Penton oder -Hexon umfasst.
2. Adenovirus, das ein interessierendes Gen umfasst, zur Verwendung bei der Therapie, Prophylaxe und/oder Diagnose, wobei das Adenovirus aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Adenovirus Serotyp 11, 26, 34, 35, 48 und 49 besteht.

3. Genübertragungsvehikel gemäß Anspruch 1, das ein Adenovirus-Serotyp-35-Penton und -Hexon umfasst.
4. Genübertragungsvehikel gemäß Anspruch 1 oder 3, wobei das Genübertragungsvehikel eine Chimäre von Adenovirus Serotyp 35 mit wenigstens einem anderen Adenovirus-Serotyp ist.
5. Nucleinsäure, die ein interessierendes Gen umfasst und eine Adenovirus-Serotyp-35-Faser und ein Adenovirus-Serotyp-35-Penton und/oder -Hexon codiert.
6. Nucleinsäure, die ein interessierendes Gen umfasst und ein Adenovirus Serotyp 11, 26, 34, 35, 48 oder 49 codiert.
7. Nucleinsäure, die ein interessierendes Gen umfasst und eine Chimäre von Adenovirus Serotyp 35 mit wenigstens einem anderen Adenovirus-Serotyp umfasst.
8. Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 5 bis 7, die weiterhin wenigstens ein ITR umfasst.
9. Wenigstens ein Satz von zwei Nucleinsäuren, der eine Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8 umfasst, wobei der Satz von Nucleinsäuren zu einem einzigen Ereignis der homologen Rekombination zwischen den Nucleinsäuren befähigt ist, das zu einer Nucleinsäure führt, die ein funktionelles Genübertragungsvehikel codiert.
10. Zelle, die eine Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8 oder einen Satz von Nucleinsäuren gemäß Anspruch 9 umfasst.
11. Zelle gemäß Anspruch 10, die als Ergänzung die notwendigen Elemente für die adenovirale Replikation enthält, die in der Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8 fehlen oder die in einem Satz von Nucleinsäuren gemäß Anspruch 9 fehlen.
12. Zelle gemäß Anspruch 10 oder 11, die von einer PER.C6-Zelle (ECACC-Hinterlegungsnummer 96022940) stammt.
13. Verfahren zur Herstellung eines Genübertragungsvehikels gemäß Anspruch 1, 3 oder 4, umfassend das Exprimieren einer Nucleinsäure gemäß einem der Ansprüche 5 bis 8 in einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 und das Ernten des resultierenden Genübertragungsvehikels.
14. Verfahren zur Herstellung eines Genübertragungsvehikels gemäß Anspruch 1, 3 oder 4, umfassend das Kultivieren einer Zelle gemäß einem der Ansprüche 10 bis 12 in einem geeigneten Medium und das Ernten des resultierenden Genübertragungsvehikels.
15. Genübertragungsvehikel gemäß einem der Ansprüche 1, 3 oder 4 zur Verwendung als Pharmakon.
16. Pharmazeutische Zubereitung, die ein Genübertragungsvehikel gemäß einem der Ansprüche 1, 3 oder 4 und einen geeigneten Trägerstoff umfasst.
17. Pharmazeutische Zubereitung, die ein Adenovirus gemäß Anspruch 2 und einen geeigneten Trägerstoff umfasst.

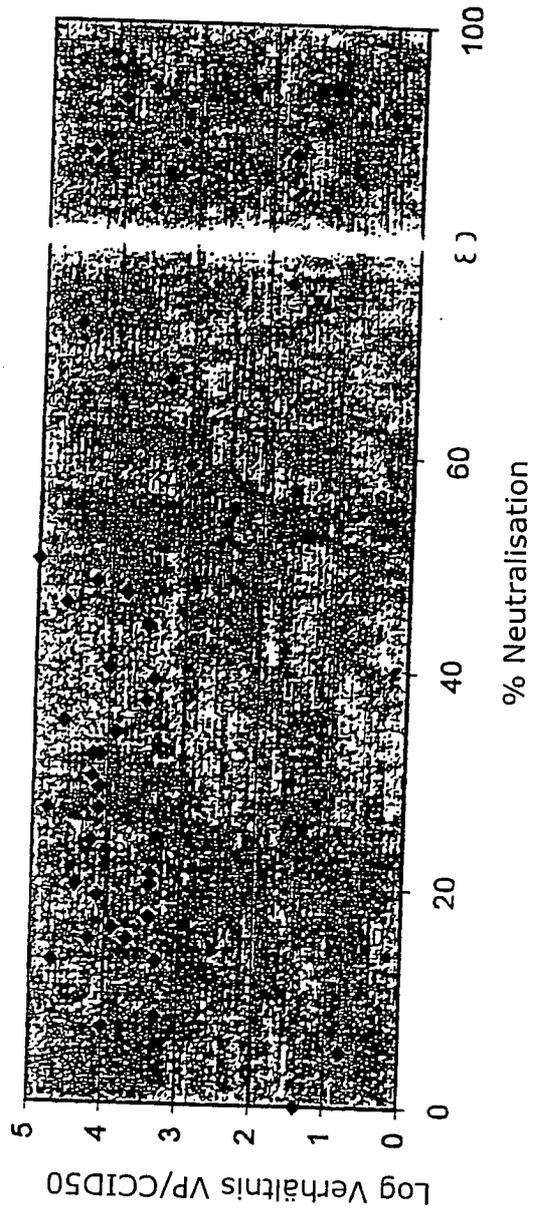
Es folgen 44 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

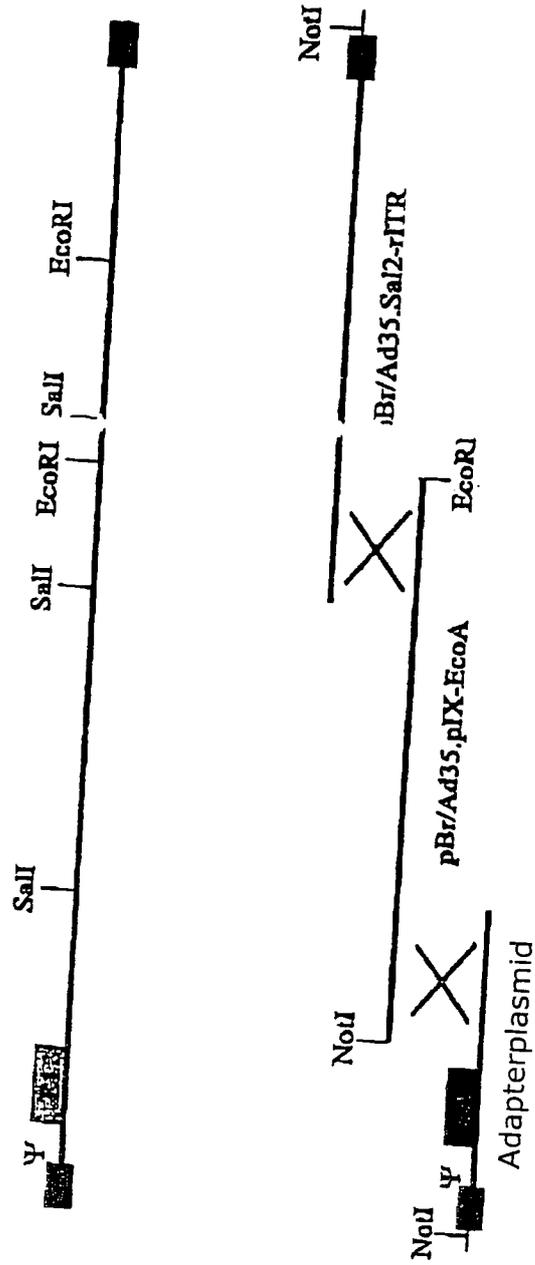
Figur 1:  
% humaner Seren mit einer neutralisierenden Fähigkeit für humanes Adenovirus (n = 100)



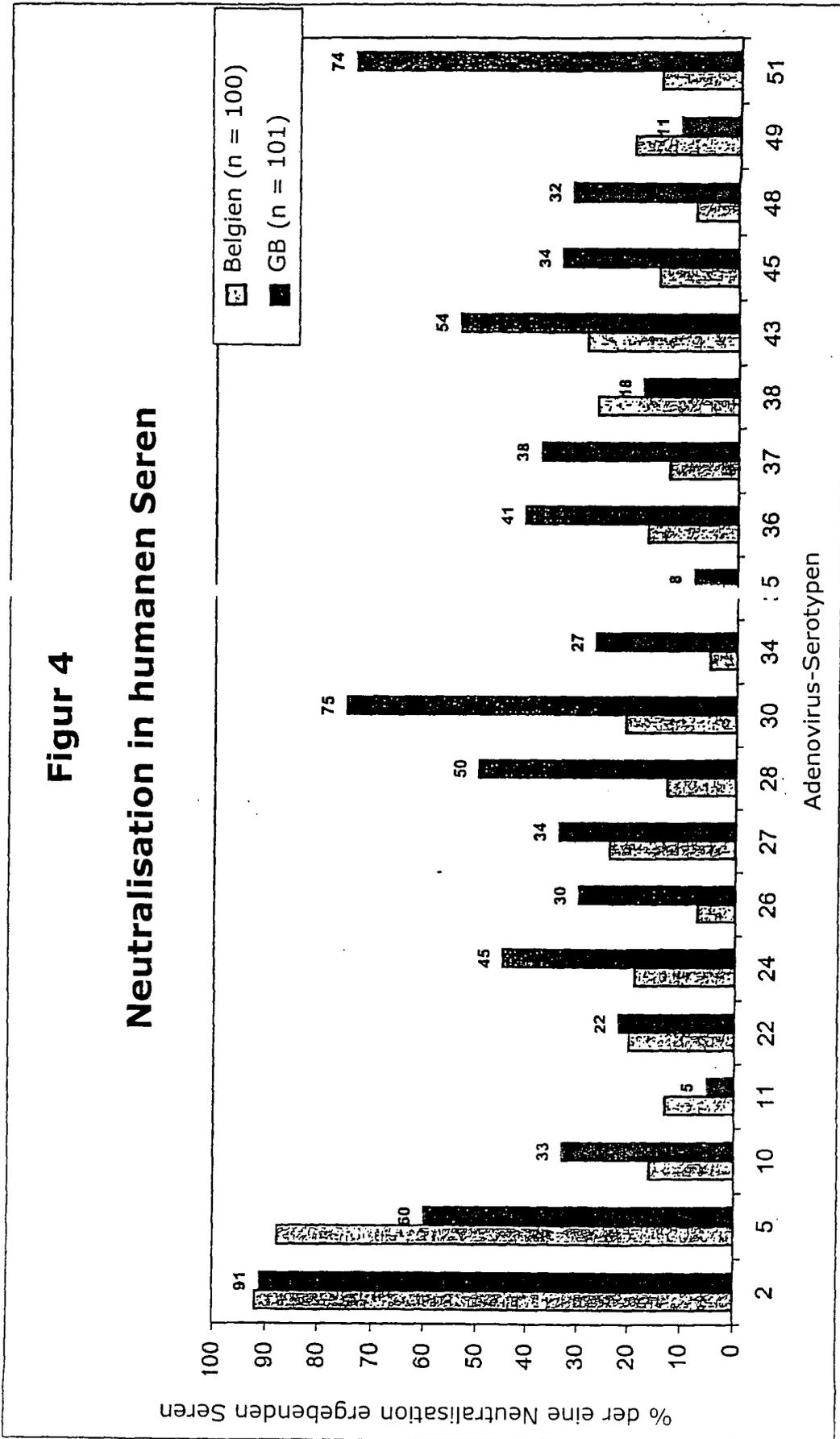
Figur 2



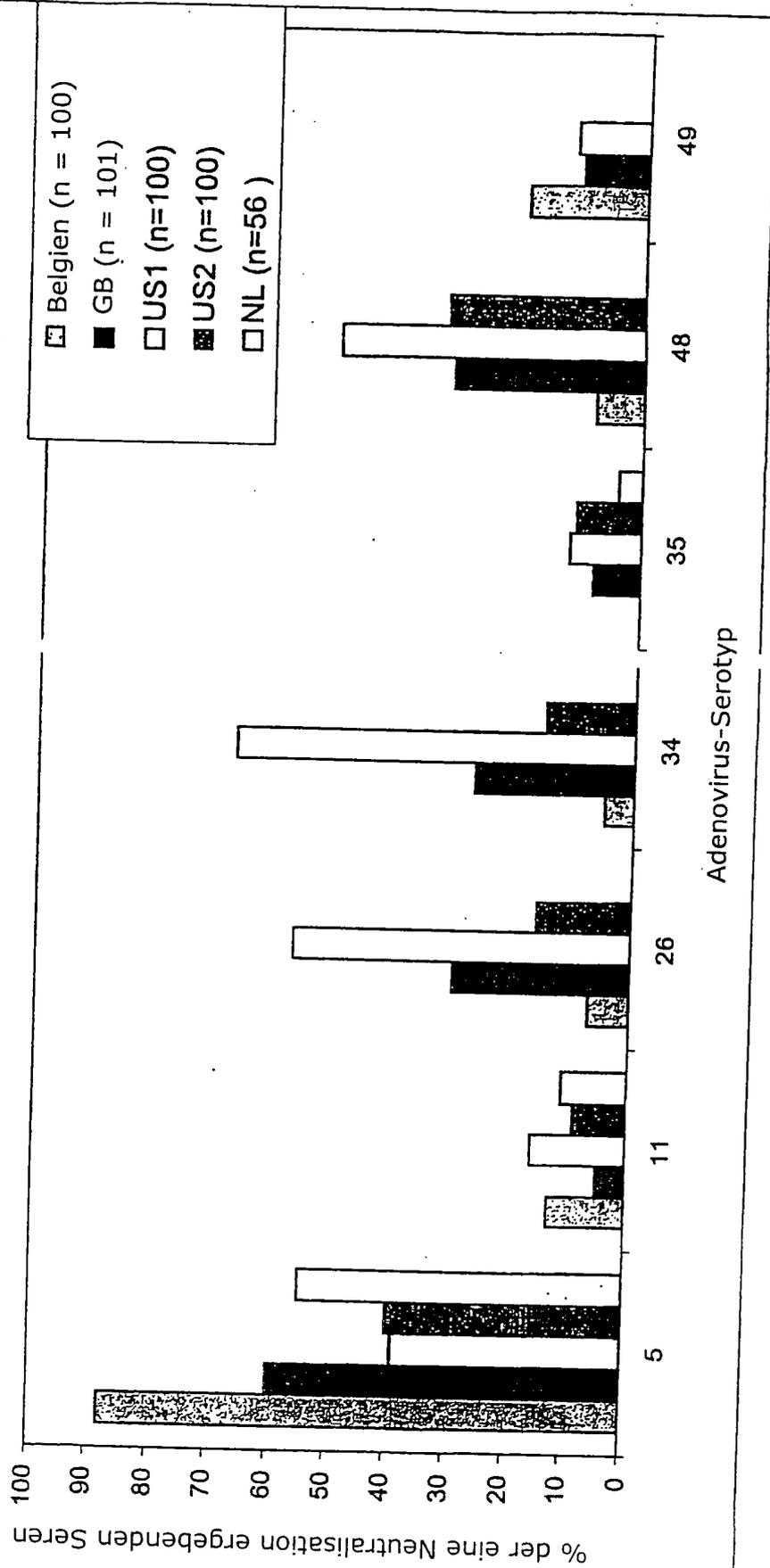
Figur 3: System auf der Grundlage von Ad35-Plasmid zur Viruserzeugung



**Figur 4**  
**Neutralisation in humanen Seren**



**Figur 5**  
**Neutralisation in humanen Seren von verschiedenen geographischen Orten**



Figur 6: Gesamtsequenz von Ad35

```

1 CATCATCAAT AATATACCTT ATAGATGGAA TGGTGCCAAT ATGTAATGA GGTGATTTTA AAAAGTGTGG
71 GCCGTGTGGT GATTGGCTGT GGGGTTAACG GTTAAAAGGG GCGGCGCGGC CGTGGGAAAA TGACGTTTTA
141 TGGGGGTGGA GTTTTTTTCG AAGTTGTGCG GGGAAATGTT ACGCATAAAA AGGCTTCTTT TCTCACGGAA
211 CTACTTAGTT TTCCCACGGT ATTTAACAGG AAATGAGGTA GTTTTGACCG GATGCAAGTG AAAATTGCTG
281 ATTTTCGCGC GAAAAC TGAACTGAA TGAGGAAGTG TTTTCTGAA TAATGTGGTA TTTATGGCAG GGTGGAGTAT
351 TTGTTACAGG CCAGGTAGAC TTTGACCCAT TACGTGGAGG TTTGATTAC CTGTGTTTTT ACCTGAATTT
421 CCGCGTACCG TGTCAAAAGT TTTCTGTTTT ACGTAGGTGT CAGCTGATCG CTAGGGTATT TATACCTCAG
491 GGTTTGTGTC AAGAGGCCAC TCTTGAGTGC CAGCGAGAAG AGTTTTCTCC TCTGCGCCGG CAGTTTAATA
561 AAAAAAAT GAGAGATTG CGATTTCTGC CTCAGGAAAT AATCTCTGCT GAGACTGGAA ATGAAATATT
631 GGAGCTTGTG GTGCACGCCG TGATGGGAGA CGATCCGGAG CCACCTGTGC AGCTTTTTGA GCCTCCTACG
701 CTTACAGGAA TGTATGATT AGAGGTAGAG GGATCGGAGG ATTCTAATGA GGAAGCTGTG AATGGCTTTT
771 TTACCGATT TATGCTTTTA GCTGCTAATG AAGGATTAGA ATTAGATCCG CCTTTGGACA CTTTCAATAC
841 TCCAGGGTGA ATTGTGGAAA GCGGTACAGG TGTAAGAAAA TTACCTGATT TGAGTCCCGT GGACTGTGAT
911 ATGAGAACCG ATGAAGACGG GTTTCCTCCG AGTGTAGGAG AGGACCATGA AAAGGAGCAG TCCATGCAGA
981 CTGCAGCGGG TGAGGGAGTG AAGGCTGCCA ATGTTGGTTT TCAGTTGGAT TGCCCGGAGC TTCTGGACA
1051 TGGCTGTAAG TCTTGTAAT TTCACAGGAA AAATACTGGA GTAAAGGAAC TGTATGTTT CTTTGTAT
1121 ATGAGAACCG ACTGCCACTT TATTTACAGT AAGTGTGTTT AAGTAAAAAT TTAAGGAAT ATGCTGTTTT
1191 TCACATGTAT ATTGAGTGTG AGTTTGTGCT TTCTTATTAT AGGTCTGTG TCTGATGCTG ATGAATCACC
1261 ATCTCCTGAT TCTACTACCT CACCTCCTGA TATTTCAAGCA CCTGTTCTCG TGGACGTGCG CAAGCCATT
1331 CCTGTGAAGC TTAAGCCTGG GAAACGTCCA GCAGTGGAGA AACTTGAGGA CTGTGTACAG GGTGGGACCG
1401 GACCTTTGGA CTTGAGTACA CGGAAACGTC CAAGACAATA AGTGTCCCAT ATCCGTGTTT ACTTAAGGTG
1471 ACGTCAATAT TGTGTGAGG AAAAAAATAT GTAACTGTT LACTGGTIII TAITGTTTT
1541 TGGGCGGGGA CTCAGGTATA TAAGTAGAAG CAGACCTGTG TGGTTAGCTC ATAGGAGCTG GCTTTCATCC
1611 ATGGAGGTTT GGCCCATTTT GGAAGACCTT AGGAAGACTA GGCAACTGTT AGAGAGCTGT TCGGACGGAG
1681 TCTCCGGTTT TTGGAGATTC TGGTTCGCTA GTGAATTAGC TAGGGTAGTT TTTAGGATAA AACAGGACTA
1751 TAAACAAGAA TTTGAAAAGT TGTTGGTAGA TTGCCCAGGA CTTTTTGAAG CTCTTAATTT GGGCCATCAG
1821 GTTCACTTTA AAGAAAAAGT TTTATCAGTT TTAGCTTTT CAACCCAGG TAGAACTGCT GCTGCTGTGG
1891 CTTTTCTTAC TTTTATATTA GATAAATGGA TCCCGCAGAC TCATTTGAGC AGGGGATACG TTTTGGATTT
1961 CATAGCCACA GCATTGTGGA GAACATGGAA GGTTGCAAG ATGAGGACAA TCTTAGGTTA CTGGCCAGTG
2031 GAGCCTTTGG GTGTAGCGGG AATCCTGAGG CATCCACCGG TCATGCCAGC GGTTCCTGGAG GAGGAACAGC
2101 AAGAGGACAA CCCGAGAGCC GGCCCTGGAC CTCCAGTGGG GGAGGCGGAG TAGCTGACTT GTCTCCTGAA
2171 CTGCAACGGG TGCTTACTGG ATCTACGTCC ACTGGACGGG ATAGGGGCGT TAAGAGGGAG AGGGCATCCA
2241 GTGGTACTGA TGCTAGATCT GAGTTGGCTT TAAGTTAAT GAGTCGCAGA CGTCCTGAAA CTTTTGGTG
2311 GCAATGAGBT CAGAAAGAGG GAAGGGATGA AGTTTCTGTA TTGCAGGAGA AATATTCCTT GGAACAGGTG
2381 AAAACATGTT GGTTGGAGCC AGAGGATGAT TGGGCGGTGG CCATTAATAA TTATGCCAAG ATAGCTTTGA
2451 GGCCTGATAA ACAGTATAAG ATCAGTAGAC GGATTAATAT CCGGAATGCT TGTACATAT CTGGAATGG
2521 GGCTGAGGTG GTAATAGATA CTCAAGACAA GACAGTTATT AGATGCTGCA TGATGGATAT GTGGCTGGA
2591 GTAGTCGGTA TGGAAGCAGT CACTTTTGTG AATGTTAAGT TTAGGGGAGA TGGTTATAAT GGAATAGTGT
2661 TTATGGCCAA TACCAAATTT ATATTGCATG GGGGTGTAG TTTCTATGCG TGTGGATTG CCACAGCTGG CAGAACCAG
2731 CTGGGGACAG GTTAGTGTAC GGGGTGTAG TTTCTATGCG TGTGGATTG ACCTGGGCAT TCTGAATGAA GCGGAAGCAA
2801 AGTCAATTGT CTCTGAAGAA ATGCATATTC CAAAGATGTA ACCTGGGCAT TCTGAATGAA GCGGAAGCAA
2871 GGGTCCGTTA CTGCGCTTCT ACAGATACTG GATGTTTTAT TTTAATTAAG GGAATGCCA CCGTAAAGCA
2941 TAACATGATT TGTGGTGTCT CCGATGAGAG GCCTTATCAA ATGCTCACTT GTGCTGGTGG GCATTGTAAT
3011 ATGCTGGCTA CTGTGCATAT TGTTTCCCAT CAACGCAAAA AATGGCCTGT TTTTGATCAC AATGTGTTGA
3081 CCAAGTGCAC CATGCATGCA GGTGGGCGTA GAGGAATGTT TATGCCCTAC CAGTGTAACTA TGAATCATGT
3151 GAAAGTGTGG TTGGAACCAG ATGCCTTTTC CAGAATGAGC CTAACAGGAA TCTTTGACAT GAACAGGCAA
3221 ATCTGGAAGA TCCTGAGGTA TGATGATACG AGATCGAGGG TGC CGCATG CGAATGCGGA GGCAAGCATG
3291 CCAGGTTCCA GCCGGTGTGT GTAGATGTGA CCGAAGATCT CAGACCGGAT CATTGGTTA TTGCCCGCAC
3361 TGGAGCAGAG TTCGGATCCA GTGGAGAAGA AACTGACTAA GGTGAGTATT GGGAAAACCT TGGGGTGGGA
3431 TTTTCAGATG GACAGATTGA GTAAAAATTT GTTTTTTCTG TCTTGCAGCT GACATGAGTG GAAATGAAAT
3501 TTTTAAGGGG GGAGTCTTCA GCCCTTATCT GACAGGGCGT CTCCCATCCT GGGCAGGAGT TCGTCAGACT
3571 GTTATGGGAT CTAAGTGTGA TGGAAAGACCC GTTCAACCCG CCAATTCTTC AACGCTGACC TATGCTACTT
3641 TAAGTTCTTC ACCTTTGGAC GCAGCTGCAG CCGCTGCCG CCGCTCTGTC GCCGCTAACA CTGTGCTTGG
3711 AATGGGTTAC TATGGAAGCA TCGTGGCTAA TTCCAATTCC TCTAATAACC CTTCTACTCT GACTCAGGAC
3781 AAGTTACTTG TCCTTTTGGC CCAGCTGGAG GCTTTGACCC AACGCTGCGG TGAACCTTCT CAGCAGGTGG
3851 CCGAGTTGCG AGTACAAACT GAGTCTGCTG TCGGCACGGC AAAGTCTAAA TAAAAAAT TCCAGAATCA
3921 ATGAAATAAT AAACGAGCTT GTTGTGTGAT TAAAATCAAG TGTTTTTATT TCATTTTTCT CGCACGGTAT
3991 GCCCTGGACC ACCGATCTCG ATCATTGAGA ACTCGGTGGA TTTTTTCCAG AATCCTATAG AGGTGGGATT
4061 GAATGTTTAG ATACATGGGC ATTAGGCCGT CTTTGGGGTG GAGATAGCTC CATTGAAGGG ATTCATGCTC
4131 CGGGGTAGTG TTGTAATCA CCCAGTCATA ACAAGGTCGC AGTGCATGGT GTTGCACAA ATCTTTTGA
4201 AGTAGGCTGA TTGCCACAGA TAAGCCCTTG GTGTAGGTGT TTACAAACCG GTTGAAGCTG GAGGGTGC
4271 TTCGAGGTGA AATTATGTGC ATTTTGGATT GGATTTTTAA GTTGGCAATA TTGCCGCCAA GATCCCGTCT

```

Figur 6, Fortsetzung

4341 TGGGTTTCATG TTATGAAGGA CTACCAAGAC GGTGTATCCG GTACATTTAG GAAATTTATC GTGCAGCTTG  
4411 GATGGAAAAAG CGTGGAAAAA TTTGGAGACA CCCTGTGTGC CTCCGAGATT TTCCATGCAC TCATCCATGA  
4481 TAATAGCAAT GGGGCCGTGG GCAGCGGCGC GGGCAAACAC GTTCCGTGGG TCTGACACAT CATAGTTATG  
4551 TTCCTGAGTT AAATCATCAT AAGCCATTTT AATGAATTTG GGGCGGAGCG TACCAGATTG GGGTATGAAT  
4621 GTTCTTCGGG GCCCCGGAGC ATAGTTCCCC TCACAGATTT GCATTTCCCA AGCTTTTCACT TCTGAGGGTG  
4691 GAATCATGTC CACCTGGGGG GCTATGAAGA ACACCGTTTT GGGGGCGGGG GTGATTAGTT GGGATGATAG  
4761 CAAGTTTCTG AGCAATTGAG ATTTGCCACA TCCGGTGGGG CCATAAATAA TTCCGATTAC AGGTTGCAGG  
4831 TGGTAGTTTA GGGAAACGGCA ACTGCCGTCT TCTCGAAGCA AGGGGGCCAC CTCGTTTATC ATTTCCCTTA  
4901 CATGCATATT TTCCCGCACC AAATCCATTA GGAGGCGCTC TCCTCCTAGT GATAGAAGTT CTTGTAGTGA  
4971 GAAAAAGTTT TTCAGCGGTT TTAGACCGTC AGCCATGGGC ATTTTGGAAA GAGTTTGTCTG CAAAAGTTCT  
5041 AGTCTGTTCC ACAGTTCAGT GATGTGTTCT ATGGCATCTC GATCCAGCAG ACCTCCTCGT TTCGCGGGTT  
5111 TGGACGGCTC CTGGAGTAGG GTATGAGAGC ATGGGCGTCC AGCGCTGCCA GGGTTCGGTC CTTCCAGGGT  
5181 CTCAGTGTTC GAGTCAGGGT TGTTCGGTC ACAGTGAAGG GGTGTGCGCC TGCTTGGGCG CTTGCCAGGG  
5251 TGCCTTCAG ACTCATTCTG CTGGTGGAGA ACTTCTGTCT CTTGGCGCCC TGTATGTCGG CCAAGTAGCA  
5321 GTTACCATG AGTTCGTAGT TGAGCGCCTC GGCTGCGTGG CTTTGGCGCG GGAGCTTACC TTTGGAAGTT  
5391 TTCTTGATA CCGGGCAGTA TAGGCATTTT AGCGCATACA GCTTGGGCGC AAGGAAAATG GATTCTGGGG  
5461 AGTATGCATC CGCGCCGCGAG GAGGCGCAAA TTTGATGCGT TTCCACCAGC CAGGTTAAAT CCGGTTTATT  
5531 GGGGTCAAAA ACAAGTTTTT CGCCATATTT TTTGATGCGT TTCTTACCTT TTGTTCCAT AAGTTCGTGT  
5601 CCTCGTTGAG TGACAAACAG GCTGTCCGTA TCTCCGTAGA CTGATTTTAC AGGCTTCTTC TCCAGTGGAG  
5671 TGCTCCGGTC TTCTTCGTAC AGGAACTCTG ACCACTCTGA TACAAAGGCG CGCGTCCAGG CCAGCACAAA  
5741 GGAGGCTATG TGGGAGGGGT AGCGATCGTT GTCAACCAGG GGGTCCACCT TTTCCAAAGT ATGCAAACAC  
5811 ATGTCACCCT CTCAACATC CAGGAATGTG ATTTGGCTTG AGGTGTATT CACGTGACCT GGGGTCCCGT  
5881 CTGGGGGGGT ATAAAAGGGG GCGGTTCTTT GCTCTTCTC ACTGTCTTCC GGATCGCTGT CCAGGAACCGT  
5951 CAGCTGTGGG GGTAGGTAAT CCGCTTCGAA GGGGGGCAAT ACCCTGCAAC TCAGGTTGTC AGTTCTTAG  
6021 AACGAGGAGG ATTTGATATT GACAGTGCCG GTTGAAGATG CTTTCATGAG GTTTTCGTCC ATTTGGTCAG  
6091 AAAACACAAT TTTTTATTG TCAAGTTTGG TGGCAAATGA TCCATACAGG GCGTTGGATA AAAGTTTGGC  
6161 AATGGATCGC ATGGTTTGGT TCTTTTCTTT GTCCGCGCGC TCTTGGCGGG CGATGTTGAG TTTGGACATC  
6231 TCGCGTGCCA GGCACCTCCA TTCGGGGAAG ATAGTTGTTA ATTCATCTGG CACGATTCTC ACTTGCCACC  
6301 CTCGATTATG CAAGGTAATT AAATCCACAC TGGTGGCCAC CTGCGCTCGA AGGGGTTTCA TGGTCCAACA  
6371 GAGCCTACCT CCTTTCCTAG AACAGAAAGG GGAAGTGGG TCTAGCATAA GTTCATCGGG AGGGTCTGCA  
6441 TCCATGGTAA AGATTCCCAG AGGTAATCC TATCAAAAT AGCTGATGGG AGTGGGGTCA TCTAAGGCCA  
6511 TTTGCCATTC TCGAGCTGCC AGTGCGCGCT CATATGGGTT AAGGGGACTG CCCCAGGCGA TGGGATGGGT  
6581 GAGAGCAGAG GCATACATGC CACAGATGTC ATAGACGTAG ATGGGATCCT CAAAGATGCC TATGTAGGTT  
6651 GGATAGCATC GCCCCCCTCT GATACTTGCT CGCACATAGT CATATAGTTC ATGTGATGGC GCTAGCAGCC  
6721 CCGGACCCAA GTTGGTGCGA TTGGGTTTTT CAGTCTGTA GACGATCTGG CGAAAGATGG CGTGAGAATT  
6791 GGAAGAGATG GTGGGTCTTT GAAAAATGTT GAAATGGGCA TGAGGTAGAC CTACAGAGTC TCTGACAAAG  
6861 TGGGCATAAG ATTCTTGAAG CTTGGTTACC AGTTCGGCGG TGACAAGTAC GTCTAGGGCG CAGTAGTCAA  
6931 GTGTTTCTTG AATGATGTCA TAACCTGGTT GGTTTTTCTT TTCCACAGT TCGCGGTTGA GAAGGTATTC  
7001 TTCGCGATCC TTCCAGTACT CTTCTAGCGG AAACCCGCTT TTGTCTGCAC GGTAAGATCC TAGCATGTAG  
7071 AACTGATTA A CTGCCTTGTG AGGGCAGCAG CCGTCTCTA CGGGTAGAGA GTATGCTTGA GCAGCTTTTC  
7141 GTAGCGAAGC GTGAGTAAGG GCAAAGGTGT CTCTGACTC GACTTTGAGA AATTGGTATT TGAAGTCCAT  
7211 GTCGTACACAG GCTCCCTGTT CCCAGAGTTG GAAGTCTACC CGTTTCTTGT AGGCGGGGTT GGGCAAAGCG  
7281 AAAGTAACAT CATTGAAGAG AATCTTACCG GCTCTGGGCA TAAAAATGCG AGTGATGCGG AAAGGCTGTG  
7351 GACTTCCGC TCGATTGTTG ATCACCTGGG CAGCTAGGAC GATTTCTGTC AAACCGTTGA TGTGTGTCC  
7421 TACGATGTAT AATTCTATGA AACGCGCGGT GCCCTGACG TGAGGTAGCT TACTGAGCTC ATCAAAGGTT  
7491 AGGTCTGTGG GGTCAGATAA GCGTAGTGT TCGAGAGCCC ATTCGTGCAG GTGAGGATTT GCATGTAGGA  
7561 ATGATGACCA AAGATCTACC GCCAGTGCTG TTTGTAAGT GTCCCGATAC TGACGAAAAT GCCGGCCAA  
7631 TGCCATTTTT TCTGGAGTGA CACAGTAGAA GGTTCGTTGG TCTTGTGCC ATCGATCCCA CTTGAGTTTA  
7701 ATGGCTAGAT CGTGGGCCAT GTTGACGAGA CGCTCTTCTC CTGAGAGTTT CATGACCAGC ATGAAAGGAA  
7771 CTAGTTGTTT GCCAAAGGAT CCCATCCAGG TGTAAGTTTC CACATCGTAG GTCAGGAAGA GTCTTTCTGT  
7841 GCGAGGATGA GAGCCGATCG GGAAGAACTG GATTTCTGTC CACCAGTTGG AGGATTGGCT GTTGTGTGA  
7911 TGGAAAGTGA AGTTTCTGCG GCGCGCCGAG CATTGCTGTT TGTGCTTGTG CAGACGGCCG CAGTAGTGC  
7981 AGCGTTGCAC GGGTTGTATC TCGTAATGA GCTGTACCTG GCTTCCCTTG ACGAGAAATT TCAGTGGGAA  
8051 GCCGAGGCCCT GCGGATTGTA TCTCGTCTC TTCTATATTC GCTGTATCGG CCTGTTTATC TTCTGTTTCG  
8121 ATGGTGGTCA TGCTGACGAG CCCCCGCGGG AGGCAAGTCC AGACCTCGG CCGGGAGGGG CCGAGCTGAA  
8191 GGACGAGAGC GCGCAGGCTG GAGCTGTCCA GAGTCTGAG ACGCTGCGGA CACAGTTAG TAGGTAGGGA  
8261 CAGAAGATTA ACTTGCATGA TCTTTTCCAG GCGTGCAGG AGGTTCCAGT GGTACTTGAT TTCCACAGG  
8331 TCGTTTGTAG AGACGTCAAT GGCTTGCAGG GTTCCGTGTC CTTTGGGCGC CACTACCCTA CTTTGTTTT  
8401 TTCTTTTGT CCGTGGTGGC TCTTTGCTT CTGATGCTC CAGAAGCGGT GACGGGGACG CGCCCGGGC  
8471 GGACGCGGT GTTCCGGACC CCGGGGCATG CTTGGTAGTG GCACGTCCGG GCCGCGCAC GGCAGGTTCT  
8541 GGTATTGCGC TCTGAGAAGA CTTGCGTGGC CCACCACGCG TCGATTGAC TCTTGTATCT GACGTCTCTG  
8611 GGTGAAAGCT ACCGGCCCCG TGAGCTTGAA CCTGAAAGAG AGTTCAACAG AATCAATTTT GGTATCGTTA  
8681 ACGGCAGCTT GTCTCAGTAT TTCTTGTACG TCACCAGAGT TGTCTGGTA GCGATCTCC GGCATGA  
8751 GCTCGATTTT TTCCTCTGA AGATCTCCGC GACCCGCTCT TTCGACGGT GCCGCGAGG CATTGGAGAT

Figur 6, Fortsetzung

8821 ACGGCCCATG AGTTGGGAGA ATGCATTCAT GCCCGCCTCG TTCCAGACGC GGCTGTAAAC CACGGCCCCC  
 8891 TCGGAGTCTC TTGCGCGCAT CACCACCTGA GCGAGGTTAA GCTCCACGTG TCTGGTGAAG ACCGCATAGT  
 8961 TGCATAGGCG CTGAAAAAGG TAGTTGAGTG TGGTGGCAAT GTGTTCCGGC ACGAAGAAAT ACATGATCCA  
 9031 TCGTCTCAGC GGCATTTCCG TAACATCGCC CAGAGCTTCC AAGCGCTCCA TGGCCTCGTA GAAGTCCACG  
 9101 GCAAAATTA AAAACTGGGA GTTTCGCGCG GACACGGTCA ATTCCTCCTC GAGAAGACGG ATGAGTTCGG  
 9171 CTATGGTGGC CCGTACTTCG CGTTCGAAGG CTCCCGGGAT CTCTTCTTCC TCTTCTATCT CTTCTTCCAC  
 9241 TAACATCTCT TCTTCGTCTT CAGGCGGGGG CGGAGGGGGC ACBCGGCGAC GTCGACGGCG CACGGGCAAA  
 9311 CGGTGATGA ATCGTTCAAT GACCTCTCCG CGGCGGCGGC GCATGGTTTC AGTGACGGCG CGGCCGTTCT  
 9381 CGCGGGTTCG CAGAGTAAAA ACACCGCCGC GCATCTCCTT AAAGTGGTGA CTGGGAGGTT CTCCGTTTGG  
 9451 GAGGGAGAGG GCGCTGATTA TACATTTAT TAATTGGCCC GTAGGGACTG CGCGCAGAGA TCTGATCGTG  
 9521 TCAAGATCCA CGGGATCTGA AAACCTTTCG ACGAAAGCGT CTAACCAGTC ACAGTCACAA GGATAGGCTGA  
 9591 GTACGGCTTC TTGTGGGCGG GGGTGGTTAT GTGTTCCGGT TGGGTCTTCT GTTCTTCTT CATCTCGGGA  
 9661 AGGTGAGACG ATGCTGCTGG TGATGAAATT AAAGTAGGCA GTTCTAAGAC GCGGGATGGT GCGGAGGAGC  
 9731 ACCAGGCTTT TGGTCCGGC TTGCTGGATA CCGAGGCGAT TGGCCATTCC CCAAGCATT TCCGTGACATC  
 9801 TAGCAAGATC TTTGTAGTAG TCTTGCATGA CCGTCTTAC GGGCACTTCT TCCTCACCCG TTCTGCCATG  
 9871 CATACGTGTG AGTCCAAATC CGCGCATTGG TTGTACCAGT GCGAAGTCAG CCAAGTCAG CTACGACTG TTCGGCGAGG  
 9941 ATGGCTTGCT GTACTTGGGT AAGGTGGCT TGAAGTCAT CAAAATCCAC AAAGCGGTGG TAAGCCCTTG  
 10011 TATTAATGGT GTAAGCACAG TTGGCCATGA CTGACCAGTT AACTGTCTGG TGACCAGGGC GCACGAGCTC  
 10081 GGTGTATTTA AGGCGCGAAT AGGCGCGGGT GTCAAAGATG TAATCGTTGC AGGTGCGCAC CAGATACTGG  
 10151 TACCCTATAA GAAAAATGCG CGGTGGTTGG CCGTAGAGAG GCCATCGTTC TGATGCTGGA GCGCCAGGGG  
 10221 CGAGGTCTTC CAACATAAGG CCGTGATAGC CGTAGATGTA CCTGGACATC CAGGTGATTC CTGCGCGGCT  
 10291 AGTAGAAGCC CGAGGAAACT CCGGTACGCG GTTCCAAATG TTGCGTAGCG GCATGAAGTA GTTCATTGTA  
 10361 GGCACGGTTT GACCAGTGAG GCGCGCGCAG TCATTGATGC TCTATAGACA CGGAGAAAAT GAAAGCGTTC  
 10431 AGCGACTCGA CTCCGTAGCC TGGAGGAAAG TGAAGGATTT GGGTCCGGT GTACCCCGGT TCGAGACTTG  
 10501 TACTCGAGCC GGCCGGAGCC GCGGCTAACG TGGTATTGGC ACTCCCCTCT CGACCCAGCC TACAAAATTC  
 10571 CAGGATACGG AATCGAGTCG TTTTGCTGGT TTCCGAATGG CAGGGAAGTG AGTCCTATTT TTTTITTTTT  
 10641 TTTGCCGCTC AGATGCATCC CGTGCTGCGA CAGATGCGCC CCCAACAAAC GCCCCCCTCG CAGCAGCAGC  
 10711 AGCAGCAACC ACAAAGGCT GTCCTGCAA CTACTGCAAC TGCCGCGGTG AGCGGTGCGG GACAGCCCGC  
 10781 CTATGATCTG GACTTGGAAG AGGGCGAAGG ACTGGCACGT CTAGGTGCGC CTTGCGCCGA GCGGCATCCG  
 10851 CGAGTTCAAC TGA AAAAAGA TTCTCGCGAG GCGTATGTGC CCCAACAGAA CCTATTTAGA GACAGAAGCG  
 10921 GCGAGGAGCC GGAGGAGATG CGAGCTTCCC GCTTTAACGC GGGTCGTGAG CTGCGTCACG GTTTGGACCG  
 10991 AAGACGAGTG TTGCGAGACG AGGATTTGCA AGTTGATGAA GTGACAGGGA TCAGTCTTGC CAGGGCACAC  
 11061 GTGGCTGCAG CCAACCTTGT ATCGGTTATG GAGCAGACAG TAAAGGAAGA GCGTAACCTC CAAAAGTCTT  
 11131 TTAATAATCA TGTGCGAACC CTGATTGCCG CGGAAGAAGT TACCCTTGGT TTGATGCATT TGTGGGATTT  
 11201 GATGGAAGCT ATCATTGAGA ACCCTACTAG CAAACCTCTG ACCGCCCAGC TGTCTTGGT GGTGCAACAC  
 11271 AGCAGAGACA ATGAGGCTTT CAGAGAGGCG CTGCTGAACA TCACCGAACC CGAGGGGAGA TGGTTGTATG  
 11341 ATCTTATCAA CATTCTACAG AGTATCATAG TGCAGGAGCG GAGCCTGGGC CTGCGCGAGA AGGTAGTCTC  
 11411 CATCAATTAC TCGGTTTTGA GCTTGGGAAA ATATTACGCT CGCAAAATCT ACAAGACTCC ATACGTTCCC  
 11481 ATAGACAAGG AGGTGAAGAT AGATGGGTTT TACATGCGCA TGACGCTCAA GGTCTTGACC CTGAGCGATG  
 11551 ATCTTGGGGT GTATCGCAAT GACAGAATGC ATCGCGCGGT TAGCGCCAGC AGGAGGCGCG AGTTAAGCGA  
 11621 CAGGGAACGT ATGCACGTT TGCAAAGAGC TCTGACTGGA GCTGGAACCG AGGGTGAGAA TFACTTCGAC  
 11691 ATGGGAGCTG ACTTGCAGTG GCAGCCTAGT CCGCAGGGCTC TGAGCGCCGC GACGCGAGGA TGTGAGCTTC  
 11761 CTTACATAGA AGAGGCGGAT GAAGGCGAGG AGGAAGAGGG CGAGTACTTG GAAGACTGAT GGCACAACCC  
 11831 GTGTTTTTTC CTAGATGGAA CAGCAAGCAC CGGATCCCCT AATGCGGGCG GCGCTGCAGA GCCAGCCGTC  
 11901 CGGCATTAAC TCCTCGGACG ATTGGACCCA GGCCATGCAA CGTATCATGG CGTTGACGAC TCGCAACCCC  
 11971 GAAGCCTTTA GACAGCAACC CCAGGCCAAC CGTCTATCGG CCATCATGGA AGCTGTAGTG CCTTCCCGAT  
 12041 CTAATCCAC TCATGAGAAG GTCCTGGCCA TCGTGAACGC GTTGGTGGAG AACAAAGCTA TTCGTCCAGA  
 12111 TGAGGCCGGA CTGGTATACA ACCTCTCTTT AGAACGCGTG GCTCGCTACA ACAGTAGCAA TGTGCAAACC  
 12181 AATTTGGACC GTATGATAAC AGATGTACGC GAAGCCGTGT CTCAGCGCGA AAGGTTCCAG CGTGATGCCA  
 12251 ACCTGGGTTT GCTGGTGGCG TTAATGCTT TCTTGAGTAC TCAGCCTGCT AATGTGCCCG GTGGTCAACA  
 12321 GGATTATACT AACTTTTTAA GTGCTTTGAG ACTGATGGTA TCAGAAGTAC CTCAGAGCGA AGTGTATCAG  
 12391 TCCGGTCTCG ATTACTTCTT TCAGACTAGC AGACAGGGCT TGCAGACGGT AAATCTGAGC CAAGCTTTTA  
 12461 AAAACCTTAA AGGTTTGTGG GGAGTGCATG CCCCCTGAGG AGAAAAGACA ACCGTGTCTA GCTTGTAAAC  
 12531 TCCGAACCTC CGCTGTTAT TACTGTTGGT AGCTCCTTTC ACCGACAGCG GTAGCATCGA CCGTAATTC  
 12601 TATTTGGGTT ACCTACTAAA CCTGTATCGC GAAGCCATAG GCAAGGCTCA GGTGGACGAG CAGACCTATC  
 12671 AAGAAATTAC CCAAGTCAGT CCGGCTTTGG GACAGGAAGA CACTGGCAGT TTGGAAGCCA CTCTGAACTT  
 12741 CTTGCTTACC AATCGGTCTC AAAAGATCCC TCCTCAATAT GCTCTTACTG CGGAGGAGGA GAGGATCCTT  
 12811 AGATATGTGC AGCAGAGCGT GGGATTGTTT CTGATGCAAG AGGGGGCAAC TCCGACTGCA GCACTGGACA  
 12881 TGACAGCGCG AAATATGGAG CCCAGCATGT ATGCCAGTAA CCGACCTTTC ATTAACAAAC TGCTGGACTA  
 12951 CTTGCACAGA GCTGCCGCTA TGAACCTTGA TTATTTCACC AATGCCATCT TAAACCCGCA CTGGCTGCC  
 13021 CCACCTGGTT TCTACACGGG CGAATATGAC ATGCCGACC CTAATGACGG ATTTCTGTGG GACGACCTGG  
 13091 ACAGCGATGT TTTTTCACCT CTTTCTGATC ATCGCACGTG GAAAAAGGAA GCGCGTGATA GAATGCATTC  
 13161 TTCTGCATCG CTGTCCGGG TCATGGGTGC TACCGCGCT GAGCCCGAGT CTGCAAGTCC TTTTCTAGT  
 13231 CTACCTTTT CTCTACACAG TGTACGTAGC AGCGAAGTGG GTAGAATAAG TCGCCCGAGT TTAATGGGCG

Figur 6, Fortsetzung

13301 AAGAGGAGTA CCTAACGAT TCCTTGCTCA GACCGGCAAG AGAAAAAAT TTCCCAAACA ATGGAATAGA  
 13371 AAGTTTGGTG GATAAAATGA GTAGATGGAA GACTTATGCT CAGGATCACA GAGACGAGCC TGGGATCATG  
 13441 GGGACTACAA GTAGAGCGAG CCGTAGACGC CAGCGCCATG ACAGACAGAG GGGTCTTGTG TGGGACGATG  
 13511 AGGATTGGGC CGATGATAGC AGCGTGTGG ACTTGGGTGG GAGAGGAAGG GGCAACCCGT TTGCTCATT  
 13581 GCGCCCTCGC TTGGGTGGTA TGTGTGAAA AAAAAATAAA AAGAAAACT CACCAAGGCC ATGGCGACGA  
 13651 GCGTACGTTT GTTCTTCTTT ATTATCTGTG TCTAGTATAA TGAGGCGAGT CGTGCTAGGC GGAGCGGTGG  
 13721 TGTATCCGGA GGGTCTCTCT CTTTCGTACG AGAGCGTGTG GCAGCAGCAG CAGGCGACGG CGGTGATGCA  
 13791 ATCCCACTG GAGGCTCCCT TTGTGCCTCC GCGATACCTG GCACCTACGG ABGGCAGAAA CAGCATTCTG  
 13861 TACTCGGAAC TGGCACCTCA GTACGATACC ACCAGTTGT ATCTGGTGGG CAACAAGTCG GCGGACATTG  
 13931 CTTCTCTGAA CTATCAGAAT GACCACAGCA ACTTCTTGAC CACGGTGGTG CAGAACAATG ACTTTACCCC  
 14001 TACGGAAGCC AGCACCCAGA CCATTAACCT TGATGAACGA TCGCGGTGGG GCGGTGAGCT AAAGACCATC  
 14071 ATGCATACTA ACATGCCAAA CGTGAACGAG TATATGTTA GTAACAAGTT CAAAGCGCGT GTGATGGTGT  
 14141 CCAGAAAACC TCCCGACGGT GCTGCAGTTG GGGTACTTTA TGATCACAAG CAGGATATTT TGGAAATATGA  
 14211 GTGGTTCGAG TTTACTTTGC CAGAAGGCAA CTTTTAGTT ACTATGACTA TTGATTTGAT GAACAATGCC  
 14281 ATCATAGATA ATTACTTGAA AGTGGGTAGA CAGAATGGAG TGCTTGAAAG TGACATTGGT GTTAAGTTCG  
 14351 ACACCAGGAA CTTCAAGCTG GGATGGGATC CCGAAACCAA GTTGATCATG CCTGGAGTGT ATACGTATGA  
 14421 AGCCTTCCAT CCTGACATTG TCTTACTGCC TGGCTGCGGA GTGGATTTTA CCGAGAGTCG TTTGAGCAAC  
 14491 CTTCTTGGTA TCAGAAAAAA ACAGCCATTT CAAGAGGGTT TTAAGATTTT GTATGAAGT TTAGAAGGTG  
 14561 GTAATATTCC GGCCCTCTTG GATGTAGATG CCTATGAGAA CAGTAAGAAA GAACAAAAAG CCAAAATAGA  
 14631 AGCTGCTACA GCTGCTGCAG AAGCTAAGGC AAACATAGTT GCCAGCGACT CTACAAGGTG TGCTAACGCT  
 14701 GGAGAGGTC AAGGAGACAA TTTTGCGCCA ACACCTGTTT CGACTGCAGA ATCATTATTG GCCGATGTGT  
 14771 CTGAAGGAAC GGACGTGAAA CTCACTATTC AACCTGTAGA AAAAGATAGT AAGAATAGAA GCTATAATGT  
 14841 GTTGAAGAC AAAATCAACA CAGCCTATCG CAGTTGGTAT CTTTCGTACA ATTATGGCGA TCCCGAAAAA  
 14911 GAGTGGGTT CTTGGGACTT GTTACCCACT TCGATGTCA CTTGGGAGC AGAGCAGGTT TACTGGTGGT  
 14981 TTCCAGACAT GATGAAGGAT CCTGTCACTT TCCGCTCCAC TAGACAAGTC AGTAACTACC CTGTGGTGGG  
 15051 TGCAGAGCTT ATGCCCGTCT TCTCAAAGAG CTTCTACAAC GAACAAGCTG TGTACTCCA GCAGCTCCGC  
 15121 CAGTCCACCT CGCTTACGCA CGTCTTCAAC CGCTTCCCTG AGAACCCAGT TTTAATCCGT CCGCCGGCCG  
 15191 CCACCATTAC CACCGTCAGT GAAAACGTTT CTGCTCTCAC AGATCACGGG ACCCTGCCGT TCGCAGCAG  
 15261 TATCCGGGGA GTCCAACGTG TGACCGTTAC TGACGCCAGA CGCCGCACCT GTCCCTACGT GTACAAGGCA  
 15331 CTGGGCATAG TCGCACCCGG CGTCCCTTTC AGCCGCACCT TCTAAAAAAA AAAAAATGTC ATTCTTATCT  
 15401 CGCCCAAGTAA TAACACCAGT TGGGGTCTGC GCGCTCCAAG CAAGATGTAC GGAGGGCCAC GCAAACGTTT  
 15471 TACCCAACAT CCCGTGCGTG TTCGCGGACA TTTTCGCGCT CCATGGGGTG CCTCAAGGG CCGCACTCGC  
 15541 GTTCGAACCA CCGTCGATGA TGTAATCGAT CAGGTGGTTG CCGACGCCCG TAATTATACT CCTACTGCGC  
 15611 CTACATCTAC TGTGGATGCA GTTATTGACA GTGTAGTGGC TGACGCTGCG AACTATGCTC GACGTAAGAG  
 15681 CCGGCGAAGG CGCATTGCCA GACGCCACCG AGCTACCCT GCCATGCGAG CCGCAAGAGC TCTGCTACGA  
 15751 AGAGCTAGAC GCGTGGGGCG AAGAGCCATG CTTAGGGCGG CAGCGGCGAC TATTGCGGAC ATGGCCCAAT CCGGAAGGG  
 15821 GCAGGTCCCG CAGCAAGCA GCCGTGTGCG CAGCGGCGAC TATTGCGGAC ATGGCCCAAT CCGGAAGGG  
 15891 CAATGTATAC TGGTGCCTG ACGTGTCCAC CCGTCAACGT GTACCCGTGC GCACCCGTCC CCCTCGCACT  
 15961 TAGAAGATAC TGAGCAGTCT CCGATGTTGT GTCCCAAGCG CGAGGATGTC CAAGCGCAAA TACAAGGAAG  
 16031 AAATGCTGCA GGTATCGCA CCTGAAGTCT ACGGCCAACC GTTGAAGGAT GAAAAAAAAC CCGCAAAAAT  
 16101 CAAGCGGGTT AAAAAAGGACA AAAAAAGAAGA GGAAGATGGC GATGATGGG TGGCGGAGTT TGTGCGCGAG  
 16171 TTTGCCCCAC GCGGACCGGT GCAATGGCGT GGGCGCAAAG TTCGACATGT GTTGAGACCT GGAACCTTCG  
 16241 TGGTCTTTAC ACCCGGCGAG CGTTCGAAGCG CTACTTTTAA GCGTTCTTAT GATGAGGTGT ACGGGGATGA  
 16311 TGATATTCTT GAGCAGGCGG CTGACCGGAT AGGCGAGTTT GCTTATGGCA AGCGTAGTAG AATAACTTCC  
 16381 AAGGATGAGA CAGTGTCAAT ACCCTTGGAT CATGGAAATC CCACCCCTAG TCTTAAACCG GTCACCTTTC  
 16451 AGCAAGTGTT ACCCGTAACT CCGCGAACAG GTGTTAAAACG CGAAGGTGAA GATTTGTATC CCACATGCA  
 16521 ACTGATGGTA CCCAAACGCC AGAAGTTGGA GGACGTTTTG GAGAAAGTAA AAGTGGATCC AGATATTCAA  
 16591 CCTGAGGTTA AAGTGAGACC CATTAAAGCA GTAGCGCCTG GTCTGGGGGT ACAAACCTGTA GACATTAAGA  
 16661 TTCCCACTGA AAGTATGGAA GTGCAAACTG AACCCGCAAA GCCTACTGCC ACCTCCACTG AAGTGCAAAC  
 16731 GGATCCATGG ATGCCCATGC CTATTACAAC TGACGCCGCG GGTCCCACTC GAAGATCCCG ACGAAAGTAC  
 16801 GTTCCAGCAA GTCTGTTGAT GCCCAATTAT GTTGTACACC CATCTATTAT TCCTACTCCT GCTACCGAG  
 16871 GCACCTCGTA CTATCGCAGC CGAAACAGTA CCTCCCGCGG TCGCCGCAAG ACACCTGCAA ATCGCAGTCG  
 16941 TCGCCGTAGA CGCACAAGCA AACCGACTCC CGGCGCCCTG GTGCGGCAAG TGTACCGCAA TGGTAGTGG  
 17011 GAACCTTTGA CACTGCCGCG TCGCGTTAC CATCCGAGTA TCATCACTTA ATCAATGTTG CCGCTGCCTC  
 17081 CTTGCAGATA TGGCCCTCAC TTGTCCGCTT CCGCTTCCA TCACTGGTTA CCGAGGAAGA AACTCGCGCC  
 17151 GTAGAAGAGG GATGTTGGGA CGCGGAATGC GACGCTACAG GCGACGGCGT GCTATCCGCA AGCAATTTCG  
 17221 GGGTGGTTTT TTACCAGCCT TAATTCCAAT TATCGCTGCT GCAATTGGCG CGATACCAGG CATAGCTTCC  
 17291 GTGGCGGTTT AGGCCTCGCA ACGACATTGA CATTGGAATA AAAACGTATA AATAAAAAAA AATACAATGG  
 17361 ACTCTGACAC TCCTGGTCTT GTGACTATGT TTTCTTAGAG ATGGAAGACA TCAATTTTTT ATCCTTGGCT  
 17431 CCGCGACACG GCACGAAGCC GTACATGGC ACCTGGAGCG ACATCGGCAC GAGCCAACCT AACGGGGGCG  
 17501 CCTTCAATTG GAGCAGTATC TGGAGCGGGC TTAATAAATTT TGGCTCAACC ATAAAAAATC ACGGGAACAA  
 17571 AGCTTGGAAC AGCAGTACAG GACAGGCGCT TAGAAATAAA CTTAAAGACC AGAACTTCCA ACAAAGGTA  
 17641 GTCGATGGGA TAGCTTCCGG CATCAATGGA GTGGTAGATT TGGCTAACCA GGTGTGCGAG AAAAAGATAA  
 17711 ACAGTCGTTT GGACCCGCGG CCAGCAACCC CAGGTGAAAT GCAAGTGGAG GAAGAAATTC CTTCCGCGA

Figur 6, Fortsetzung

17781 AAAACGAGGC GACAAGCGTC CGCGTCCC GA TTTGGAAGAG ACGCTGGTGA CGCGCGTAGA TGAACCCCT  
17851 TCTTATGAGG AAGCAACGAA GCTTGGAAATG CCCACCCTA GACCGATAGC CCCAATGGCC ACCGGGGTGA  
17921 TGA AACCTTC TCAGTTGCAT CGACCCGTCA CCTTGGATT GCCCCCTCCC CCTGCTGCTA CTGCTGTACC  
17991 CGCTTCTAAG CCTGTGCTG CCCC GAAACC AGTCGCCGTA GCCAGBTAC GTCCCGGGGG CGCTCCTCGT  
18061 CCAAATGCGC ACTGGCAAAA TACTCTGAAC AGCATCGTGG GTCTAGGCGT GCAAAGTGTAA AACCGCCGTC  
18131 GCTGCTTTTA ATTAATATG GAGTAGCGCT TAACTTGCCT ATCTGTGTAT ATGTGTCTATT ACACGCCGTC  
18201 ACAGCAGCAG AGGAAAAAAG GAAGAGGTCG TGCCTGACG CTGAGTTACT TTC AAGATGG CCACCCATC  
18271 GATGCTGCC CAATGGGCAT ACATGCACAT CGCCGGACAG GATGCTTCGG AGTACCTGAG TCCGGGTCTG  
18341 GTGCAGTTCG CCCGCGCCAC AGACACCTAC TCAATCTGG GAAATAAGTT TAGAATCCC ACCGTAGCGC  
18411 CGACCCACGA TGTGACCACC GACCGTAGCC AGCGGCTCAT GTTGCCTTC GTGCCCGTTG ACCGGGAGGA  
18481 CAATACATAC TCTTACAAAG TCGGTACAC CCTGGCCGTG GCGGACAACA GAGTGCTGGA TATGGCCAGC  
18551 ACGTTCTTTG ACATTAGGGG CGTGTGGAC AGAGGTCCCA GTTCAAACC CTATTCTGGT ACGGCTTACA  
18621 ACTCTCTGGC TCCTAAAGGC GCTCCAAATG CATCTCAATG GATTGCAAAA GCGGTACCAA CTGCAGCAGC  
18691 CCAAGGCAAT GGTGAAGAAG AACATGAAAC AGAGGAGAAA ACTGCTACTT ACAC TTTTGC CAATGCTCCT  
18761 GTAAAAGCCG AGGCTCAAAT TACAAAAGAG GGC TTAACAA TAGGTTTGA GATTTCACT GAAAACGAAT  
18831 CTA AACCCAT CTATGCAGT AAAC TTTATC AGCCAGAACC TCAAGTGGGA GATGAAACTT GGACTGACCT  
18901 AGACGGAAAA ACCGAAGAGT ATGGAGGCGA GGCCTAAAG CCTACTACTA ACATGAAACC CTGTTACGGG  
18971 TCCTATGCGA AGCCTACTAA TTTAAAAGGT GGT CAGGCAA AACCGAAAA CTCGGAACCG TCGAGTAAAA  
19041 AAATTGAATA TGATATTGAC ATGGAATTT TTGATAACTC ATCGCAAAGA ACAAACTTCA GTCCTAAAA  
19111 TGTCATGTAT GCAGAAAATG TAGGTTTGA AACGCCAGAC ACTCATGTAG TGTACAAACC TGAACAGAA  
19181 GACACAAGTT CCGAAGCTAA TTTGGGACAA CAGTCTATGC CCAACAGACC CAACTACATT GGCTTCAGAG  
19251 ATAAC TTTA TGGACTCATG TACTATAACA GTACTGGTAA CATGGGGGTG CTGGCTGGTC AAGCGTCTCA  
19321 GTTAAATGCA GTGGTTGACT TGCAGGACAG AAACACAGAA CTTTCTTACC AACTCTTGCT TGACTCTCTG  
19391 GGCACAGAA CACATCTT TACATGTTG AACAGGCTG TGGACAGTA TGA TCTTAT GATCTCTTA  
19461 TTGAAAATCA TGGTGTGGAA GATGAACTTC CCAACTATTG TTTTCCACTG GACGGCATAG GTGTTCCAAC  
19531 AACCGATTAC AAATCAATAG TTCCAAATGG AGAAGATAAT AATAATTGGA AAGAACCCTGA AGTAAATGGA  
19601 ACAAGTGAGA TCGGACAGGG TAATTTGTTT GCCATGAAA TTAACCTTCA AGCCAATCTA TGCGAAGTT  
19671 TCCTTTATTC CAATGTGGCT CTGTATCTCC CAGACTCGTA CAAATACACC CCGTCCAATG TCACCTTTCC  
19741 AGAAAACAAA AACACCTACG ACTACATGAA CCGGCGGGTG GTGCCGCTAT CTCTAGTAGA CACCTATGTG  
19811 AACATTGGTG CCAAGTGGTC TCTGGATGCC ATGGACAATG TCAACCCATT CAACCCAC CGTAACCTG  
19881 GCTTGGCTTA CCGATCTATG CTTCTGGGTA ACGGACGTTA TGTGCTTTC CACATAAAG TGCTCAAAA  
19951 ATTCTTCGCT GTTAAAAACC TGCTGCTTCT CCGAGCTCC TACACTTATG AGTGGAACTT TAGGAAGGAT  
20021 GTGAACATGG TTCTACAGAG TTTCCCTCGT AACGACCTGC GGGTAGATGG CGCCAGCATC AGTTTACCGA  
20091 GCATCAACCT CTATGCTACT TTTTCCCCA TGGCTCAAA CACCCGTTCC ACCCTGGAAG CATCTGCG  
20161 GAATGACACC AATGATCAGT CATTCAACGA CTACCTATCT GCAGCTAACA TGCTTACCC CATTCTGCC  
20231 AATGCAACCA ATATCCCAT TTCCATTTCT TCTCGCAACT GGGCGGCTTT CAGAGGCTGG TCATTTACCA  
20301 GACTGAAAAAC CAAAGAAACT CCTCTTTGG GGTCTGGATT TGACCCCTAC TTTGTCTATT CTGGTTCTAT  
20371 TCCCTACCTG GATGGTACCT TCTACCTGAA CCACACTTTT AAGAAGGTTT CCATCATGTT TGACTCTTCA  
20441 GTGAGCTGGC CTGGAATGA CAGGTTACTA TCTCCTAACG AATTTGAAAT AAAGCGCACT GTGGATGGCG  
20511 AAGGCTACAA CGTAGCCCAA TGCAACATGA CCAAAGACTG GTTCTTGGTA CAGATGCTCG CCAACTACAA  
20581 CATCGGCTAT CAGGGCTTCT ACATTCCAGA AGGATAACAA GATCGCATGT ATTCATTTT CAGAAACTTC  
20651 CAGCCCATGA GCAGGCAGGT GGTGATGAG GTCAATFACA AAGACTTCAA GGCCGCTCGC ATACCC TACC  
20721 AACACAACAA CTCTGGCTTT GTGGGTTACA TGGCTCCGAC CATGCGCCAA GGTCAACCTT ATCCCGTAA  
20791 CTATCCCTAT CCACTCATTG GAACAACTGC CGTAAATAGT GTTACGCAGA AAAAGTTCTT GTGTGACAGA  
20861 ACCATGTGGC GCATACCGTT CTCGAGCAAC TTCATGTCTA TGGGGGCCCT TACAGACTTG GGACAGAATA  
20931 TGCTCTATGC CAACTCAGT CATGCTCTGG ACATGACCTT TGAGGTGGAT CCCATGGATG AGCCACCCCT  
21001 GCTTTATCTT CTCTTGAAG TTTTCGACGT GGT CAGAGTG CATCAGCCAC ACCGCGGCAT CATCGAGGCA  
21071 GTCTACCTGC GTACACCGTT CTCGGCCGGT AACGCTACCA CGTAAGAAGC TTCTTGCTTC TTGCAAAATG  
21141 CAGCTGCAAC CATGGCCTGC GGATCCAAA ACGGCTCCAG CGAGCAAGAG CTCAGAGCCA TTGTCCAAGA  
21211 CCTGGGTTGC GGACCCTATT TTTTGGGAA CTACGATAAG CGCTTCCCGG GGTTCATGGC CCCCATAAG  
21281 CTCGCCTGTG CCATTGTAAC TACGGCCGGA CGTGAGACGG GGGGAGAGCA CTGGTTGGCT TTCGGTTGGA  
21351 ACCCACGTTT TAACACCTGC TACCTTTTTG ATCCTTTTTG ATTCTCGGAT GATCGTCTCA AACAGATTTA  
21421 CCAGTTTGA TATGAGGGTC TCCTGCGCCG CAGCGCTCTT GCTACCAAGG ACCGCTGTAT TACGTTGAA  
21491 AAATCTACCC AGACCGTGCA GGGCCCCCGT TCTGCCGCT GCGGACTTTT CTGCTGCATG TTCCTTACG  
21561 CTTTGTGCA CTGGCCTGAC CGTCCCATGG ACGGAAACCC CACCATGAAA TTGCTAACTG GAGTGCCAAA  
21631 CAACATCGCT CATTCTCCTA AAGTCCAGCC CACCTGTGT GACAATCAA AAGCACTCTA CCATTTTCTT  
21701 AATACCCATT CGCCTTATTT TCGCTCTCAT CGTACACACA TCGAAAGGGC CACTGCGTTC GACCGTAAAG  
21771 ATGTTCAATA ATGACTCATG TAAACAACGT GTTCAATAAA CATCACTTTA TTTTTTACA TGTATCAAGG  
21841 CTCTGGATTA CTTATTTATT TACAAGTCA ATGGGTTCTG ACGAGAATCA GAATGACCCG CAGGCAGTGA  
21911 TACGTTGCGG AACTGATACT TGGGTTGCCA CTTGAAATCG GGAATCACCA ACTTGGGAAC CGGTATATCG  
21981 GGCAGGATGT CACTCCACAG CTTTCTGGTC AGTGCAAAAG CTC CAAGCAG GTCAAGGACC GAAATCTTGA  
22051 AATCACAATT AGGACCAGTG CTTGAGCGC CACTGAGCGC GAGAGTTGCG GTACACCGGA TCGCAGCACT GAAACCCAT  
22121 CAGCGACGGA TGTCTACGC TTGCCAGCAC GGTGGGATCT GCAATCATGC CCACATCCAG ATCTTACGCA  
22191 TTGGCAATGC TGAACGGGGT CATCTTGCAG GTCTGCCTAC CCATGGCGGG CACCCAATTA GGCTTGTGGT

Figur 6, Fortsetzung

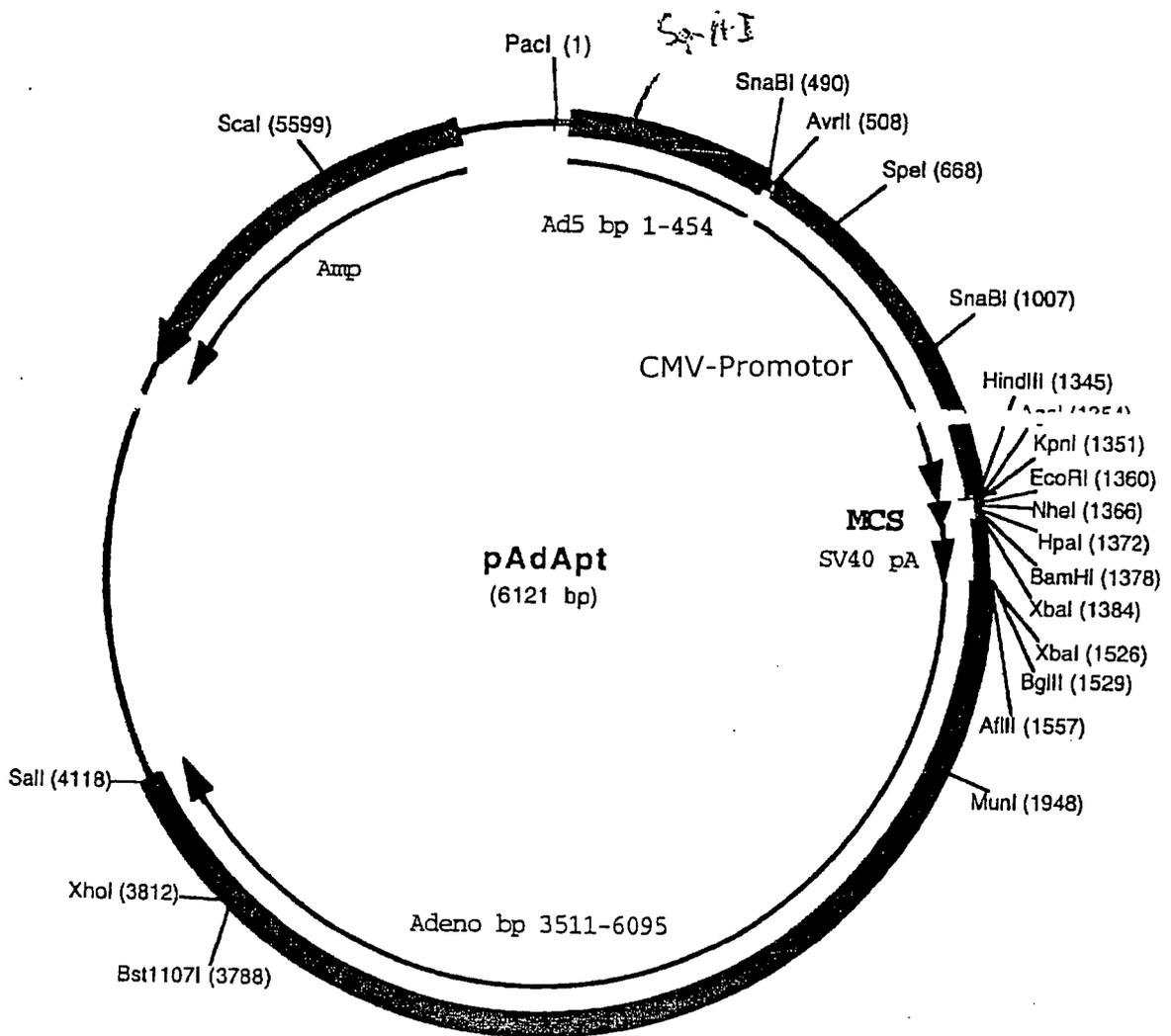
22261 TGCAATCGCA GTGCAGGGGG ATCAGTATCA TCTTGGCCTG ATCCTGTCTG ATTCTGGAT ACACGGCTCT  
 22331 CATGAAAGCA TCATATTGCT TGAAAGCCTG CTGGGCTTTA CTACCCTCGG TATAAAACAT CCCGCAGGAC  
 22401 CTGCTCGAAA ACTGGTTAGC TGCACAGCCG GCATCATTCA CACAGCAGCG GCGGTCATTG TTGGCTATTT  
 22471 GCACCACACT TCTGCCCCAG CCGTTTTGGG TGATTTTGGT TCGCTCGGGA TTCTCCTTTA AGGCTCGTTG  
 22541 TCCGTTCTCG CTGGCCACAT CCATCTCGAT AATCTGCTCC TTCTGAATCA TAATATTGCC ATGCAGGCAC  
 22611 TTCAGCTTGC CCTCATAATC ATTGCAGCCA TGAGGCCACA ACGCACAGCC TGTACATTCC CAATTATGGT  
 22681 GGGCGATCTG AGAAAAAGAA TGTATCATTG CCTGCAGAAA TCTTCCCATC ATCGTGCTCA GTGTCTTGTG  
 22751 ACTAGTAAA GTTAACTGGA TGCCTCGGTG CTCTTCGTTT ACGTACTGGT GACAGATGCG CTTGTATTGT  
 22821 TCGTGTGCT CAGGCATTAG TTTAAAAACAG GTTCTAAGTT CGTTATCCAG CCTGTACTTC TCCATCAGCA  
 22891 GACACATCAC TTCCATGCCT TTCTCCCAAG GAGACACCAG GGGCAAGCTA ATCGGATTCT TAACAGTGCA  
 22961 GGCAGCAGCT CCTTAGCCA GAGGGTCATC TTTAGCGATC TTTAGCGATC TTTCTCAATGC TTCTTTTGGC ATCCTTCTCA  
 23031 ACGATGCGCA CCGGCGGGTA GCTGAAACCC ACTGCTACAA GTTGCGCCTC TTCCTTTTCT TCTTCGTTGT  
 23101 CTTGACTGAT GTCTTGATG GGGATATGTT TGGTCTTCTT TGGCTTCTTT TTGGGGGGTA TCGGAGGAGG  
 23171 AGGACTGTGCT CTCGGTTCCG GAGACAGGGA GGATTTGTGAC GTTTGCCTCA CCATTACCAA CTGACTGTCC  
 23241 GTAGAAGAAC CTGACCCAC ACGCGACAG GTGTTTTTCT TCGGGGGCAG AGGTGGAGGC GATTGCGAAG  
 23311 GGC TCGGGT CCGACCTGGAA GCGGGATGAC TGGCAGAAC CTTCCGCGT TCGGGGGTGT GCTCCCTGTG  
 23381 GCGGTGCTT AACTGATTTT CTTCCGCGCT GGCCATTGTG TTCTCCTAGG CAGAGAAAACA ACAGACATGG  
 23451 AAACTCAGCC ATTGCTGTCA ACATCGCCAC GAGTGCCATC ACATCTCGTC CTCAGCGACG AGGAAAAGGA  
 23521 GCAGAGCTTA AGCATTCCAC CGCCCAGTCC TGCCACCACC TCTACCCTAG AAGATAAGGA GGTGACGCA  
 23591 TCTCATGACA TGCAGAATAA AAAAGCGAAA GAGTCTGAGA GAGTCTGAGA GAAAACTGCC GGCTATGTGA  
 23661 CACCGGTGGA ACACGAGGAA GAGTTGAAAC GCTTTCTAGA GAGAGAGGAT GAAAAGTCCG CAAAACAGCG  
 23731 AGCAGATAAC TATCACCAGG ATGCTGGAAG TAGGGATCAG AACACCGACT ACCTCATAGG GCTTGACGGG  
 23801 GAAGACGCGC TCCTTAAACA TCTAGCAAGA CAGTCTGCTCA TAGTCAAGGA TGCATTATTG GACAGAAGCTG  
 23911 AAGTCCCAI CAGTCTGGA GAGTCTGCTA GAGTCTGCTA GAGTCTGCTA GAGTCTGCTA GAGTCTGCTA GAGTCTGCTA  
 23941 CAAACGTCAG CCAAACGGCA CCTGCGAGCC AAATCCTCGC TTAACCTTTT ATCCAGCTTT TGCTGTGCCA  
 24011 GAAGTACTGG CTACCTATCA CATCTTTTTT AAAATCAAAA AAATTCAGT CTCCTGCCAG GCTAATCGCA  
 24081 CCGCGCCGGA TGCCCTACTC AATCTGGGAC CTGGTTCACG CTTACCTGAT ATAGCTTCTT TGAAGAGGT  
 24151 TCCAAGATC TTCGAGGGTC TGGGCAATAA TGAGACTCGG GCCGAAAATG CTCTGCAAAA GGGAGAAAAT  
 24221 GGCATGGATG AGCATCACAG CGTTCTGGTG GAATTTGAAG GCGATAATGC CAGACTCGCA GTACTCAAGC  
 24291 GAAGCGTCGA GGTCAACAC TTCGCATATC CCGCTGTCAA CCTGCCCTT AAAGTCATGA CCGCGGTAT  
 24361 GGACCAGTTA CTCATTAAGC GCGCAAGTCC CTTTTCAGAA GACATGCATG ACCCAGATGC CTGTGATGAG  
 24431 GGTAAACCGA TGGTCAAGTGA TGAGCAGCTA ACCCGATGGC TGGGCACCGA CTCTCCCCGG GATTGGAAG  
 24501 AGCGTCGCAA GCTTATGATG GCGTGGTGC TGGTTACCGT AGAAGTAGAG TGTCCTCGAC GTTCTTTTAC  
 24571 CGATTAGAA ACCTTGCACA AACTCGAAGA GAATCTGCAC TACACTTTTA GACACGGCTT TGTGCGGACG  
 24641 GCATGCAAGA TATCTAACGT GGAACCTACC AACCTGGTTT CCTACATGGG TATTCTGCAT GABAATCGCC  
 24711 TAGGACAAA CGTGCTGCAC AGCACCTTTA AGGGGGAAGC CCGCGTGAT TACATCCGCG ATTGTGTCTA  
 24781 TCTCTACCCT ACAAGCTCTT ACAGAAATCT CTTAAGTTT TGTTGACAGG GTTTCAGGAT GTCCTGACTT  
 24851 AAAGAGCTTG GGCAGACCTC ATCTTCCCAG AGCGTCTCAG AGCGTCTCAG CTGGAACGCT CGAAACGGAT TGCCTGACTT  
 24991 TATGAGCCAG AGCATGCTTA ACAATTTTCG CTCTTTCATC CTGGAACGCT CCGGTATCCT GCCCGCCACC  
 25061 TGCTGCGCAC TGCCCTCCGA CTTTGTGCCT CTCACCTACC GCAGTGGCCC CCGCGCGCTA TGGAGTCACT  
 25131 GCTACCTGTT CCGTCTGGCC AACTATCTCT CTTACACTCC GGATGTGATC GAGGATGTGA GCGGAGACGG  
 25201 CTTGCTGGAG TGCCACTGCC GCTGCAATCT GTGCACGCCC CACCGGTCCC TAGCTTGCAA CCCCCAGTTG  
 25271 ATGAGCGAAA CCAAGATAAT AGGCACCTTT GAATTTGCAAG GCCCCAGCAG CCAAGGCGAT GGGTCTTCTC  
 25341 CTGGGCAAG TTTAAAACCTG ACCCCGGGAC TGTGGACCTC CGCCTACTTG CGCAAGTTTG CTCGGAAAGA  
 25411 TTACCACCC TATGAAATCA AGTTCTATGA GGACCAATCA CAGCCTCCAA AGGCCGAAT TTCGGCTTGC  
 25481 GTCATACCC AGGGGGCAAT TCTGGCCCAA TTGCAAGCCA TCCAAAATC CCGCCAAGAA TTTCTACTGA  
 25551 AAAAGGGTAA GGGGGTCTAC CTTGACCCCC AGACCGGCGA GGAACCTAAC ACAAGGTTCC CTCAGGATGT  
 25621 CCAACGACG AGAAAACAAG AAGTTGAAGG TGCAGCCGCC GCCCCAGAA GATATGGAGG AAGATTGGGA  
 25691 CAGTCAGGCA GAGGAGGCGG AGGAGGACAG TCTGGAGGAC AGTCTGGAGG AAGACAGTTT GAGGAGGAA  
 25761 AACGAGGAGG CAGAGGAGGT GGAAGAAGTA ACCGCGGACA AACAGTTATC CTCGGCTGCG GAGACAAGCA  
 25831 ACAGCGCTAC CATCTCCGCT CCGAGTCGAG GACCCGGCG GCGTCCCAGC AGTAGATGGG ACGAGACCGG  
 25901 ACGCTTCCCG AACCCAACCA GCGCTTCCAA GACCGGTAAG AAGGATCGGC AGGGATACAA GTCTTGGCTG  
 25971 GGGCATAAGA ATGCCATCAT CTCCTGCTTG CATGAGTGGC GGGGCAACAT ATCCTTACCG CCGGCTACTG  
 26041 TGCTATTCCA CCAATGGGGTG AACTTTCCGC GCAATGTTTT GCATTACTAC CGTCACTCC ACAGCCCTTA  
 26111 CTATAGCCAG CAAATCCCGA CAGTCTCGAC AGATAAAGAC AGCGGCGGCG ACCTCCAACA GAAAACCAGC  
 26181 AGCGGCAGTT AGAAAATACA CAACAAGTGC AGCAACAGGA GGATTAAGA TTACAGCCAA CGAGCCAGCG  
 26251 CAAACCCGAG AGTTAAGAAA TCGGATCTTT CCAACCTTGT ATGCCATCTT CCAGCAGAGT CCGGGTCAAG  
 26321 AGCAGGAAC TGAATAAAAA AACCGATCTC TCGTTCGCT CACCAGAAGT TGTGTGTATC ACAAGAGCGA  
 26391 AGATCAACT CAGCGCACTC TCGAGGACGC CGAGGCTCTC TTCAACAAGT ACTGCGCGCT GACTCTTAAA  
 26461 GAGTAGGACG CGACCGCGCT TATTCAAAA AGGCGGGGAT TACATCATCC TCGACATGAG TAAAGAAAT  
 26531 CCCACGCCCT ACATGTGGAG TTATCAACCC CAAATGGGAT TGGCAGCAGG CGCTCCCAG GACTACTCCA  
 26601 CCGCATGAA TTGGCTCAGC GCCGGGCCCT CTATGATTT TCGAGTTAAT GATATACGCG CCTACCGAAA  
 26671 CCAAATACT TTGGAACAGT CAGCTCTTAC CACCACGCC CGCCAACAC TTAATCCCAG AAATTGGCCC

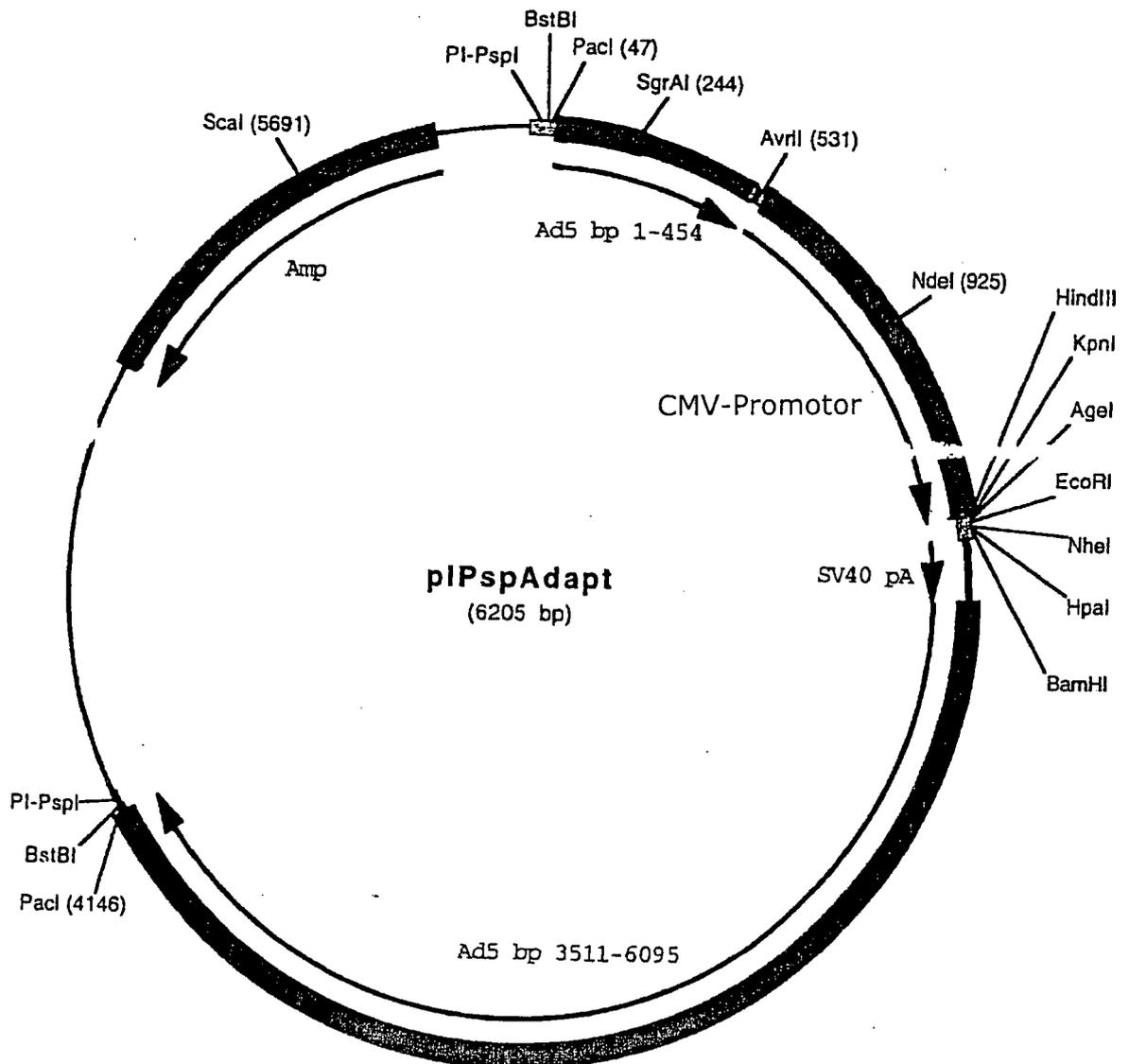
Figur 6, Fortsetzung

26741 GCCGCCCTAG TGTACCAGGA AAGTCCCGCT CCCACCACTG TATTACTTCC TCGAGACGCC CAGGCCGAAG  
 26811 TCCAAATGAC TAATGCAGGT GCGCAGTTAG CTGGCGGCTC CACCCTATGT CGTCACAGGC CTCGGCATAA  
 26881 TATAAACGC CTGATGATCA GAGGCCGAGG TATCCAGCTC AACGACGAGT CCGTGAGCTC TCCGCTTGGT  
 26951 CTACGACCAG ACGGAATCTT TCAGATTGCC GGCTGCGGGA GATCTTCCTT CACCCCTCGT CAGGCTGTTC  
 27021 TGACTTTGGA AAGTTCGTCT TCGCAACCCC GCTCGGGCGG AATCGGGACC GTTCAATTTG TAGAGGAGTT  
 27091 TACTCCCTCT GTCTACTTCA ACCCCTTCTC CGGATCTCCT GGGCACTACC CGGACGAGTT CATAACCGAAC  
 27161 TTCGACGCGA TTAGCGAGTC AGTGGACGGC TACGATTGAT GTCTGGTGAC GCGGCTGAGC TATCTCGGCT  
 27231 GCGACATCTA GACCACTGCC GCCGCTTTCG CTGCTTTGCC CGGGAACCTA TTGAGTTCAT CTACTTCCGA  
 27301 CTCCCCAAGG ATCACCTCA AGGTCGGGCC CACGGAGTGC GGATTACTAT CGAAGGCAAA ATAGACTCTC  
 27371 GCCTGCAACG AATTTTCTCC CAGCGGCCCG TGCTGATCGA GCGAGACCAG GGAACACCA CGGTTTCCAT  
 27441 CTAAGTCAAT TGTAATCACC CCGGATTGCA TGAAAGCCTT TGCTGTCTTA TGTGTACTGA GTTTAATAAA  
 27511 AACTGAATTA AGACTCTCCT ACGGACTGCC GCTTCTTCAA CCCGGATTTT ACAACCAGAA GAACAAAAC  
 27581 TTTCTGTGCG TCCAGGACTC TGTTAACTTC ACCTTTCCTA CTCACAAACT AGAAGCTCAA CGACTACACC  
 27651 GCTTTTCCAG AAGCATTTC CTAATAATA TACTTTTCAA AACCGGAGGT GAGCTCCAG GTCTCCCTAC  
 27721 AGAAAACCTT TGGGTGGAAG CCGGCTTGTG AGTACTAGGA ATTCTTGGCG GTGGGCTTGT GATTATTCTT  
 27791 TGCTACCTAT ACACACCTTG CTTCACTTTC CTAGTGGTGT TGTGGTATTG GTTTAAAAAA TGGGGCCCAT  
 27861 ACTAGTCTTG CTTGTTTTAC TTTCCGTTTT GGAACCGGGT TCTGCCAATT ACGATCCATG TCTAGACTTT  
 27931 GACCCAGAAA ACTGCACACT TACTTTTGCA CCCGACACAA GCCGCATCTG TGGAGTCTT ATTAAGTGCG  
 28001 GATGGGAATG CAGGTCCGTT GAAATTACAC ACAATAACAA AACCTGGAAC AATACCTTAT CCACCACATG  
 28071 GGAGCCAGGA GTTCCCGAGT GGTACACTGT CTCTGTCCGA GGTCTGACG GTTCCATCCG CATTAGTAAC  
 28141 AACACTTTCA TTTTTTCTGA AATGTGCGAT CTGGCCATGT TCATGAGCAA ACAGTATTCT CTATGGCCTC  
 28211 CTAGCAAGGA CAACATCGTA ACGTTCTCCA TTGCTTATTG CTTGTGCGCT TGCCTTCTTA CTGCTTFACT  
 28281 GTGCGTATGC ATACACCTGC TTGTAACCA TCGCATCAA AACGCCAATA ACAAAGAAAA AATGCCTTAA  
 28351 GCGCAACAG TCGTCTCTAT CCCACTAGGA CATAATTACA CTCTCATAGG ACCCCCAATC ACTTCAGAGG  
 28421 GGACAAACAG TCGTCTCTAT CCCACTAGGA CATAATTACA CTCTCATAGG ACCCCCAATC ACTTCAGAGG  
 28491 TCATCTGGAC CAAACTGGGA AGCGTTGATT ACTTTGATAT AATCTGTAAC AAAACAAAAC CAATAATAGT  
 28561 AACTTGCAAC ATACAAAATC TTACATTGAT TAATGTTAGC AAAGTTTACA GCGGTTACTA TTATGGTTAT  
 28631 GACAGATACA GTAGTCAATA TAGAAATTAC TTGGTTCTGT TTACCCAGTT GAAAACCACG AAAATGCCAA  
 28701 ATATGGCAAA GATTGATCC GATGACAAT CTCTAGAAAAC TTTTACATCT CCCACCACAC CCGACGAAAA  
 28771 AAACATCCCA GATTCAATGA TTGCAATTGT TGCAGCGGTG GCAGTGGTGA TGGCACTAAT AATAATATGC  
 28841 ATGCTTTTTT ATGCTTGTG CTACAAAAAG TTTTCATCCTA AAAAACAGA TCTCTACTA AGGCTTAACA  
 28911 TTTAATTTCT TTTTATACAG CCATGGTTTC CACTACCACA TTCTTATGC TTAGTAGTCT CGCAACTCTG  
 28981 ACTTCTGCTC GCTCACACCT CACTGTAAC ATAGGCCTAA ACTGCACACT AAAAGGACCT CAAGGTGGTC  
 29051 ATGCTTTTTG GTGGAGAATA TATGACAATG GATGGTTTAC AAAACCATGT GACCAACCTG GTAGATTTTT  
 29121 CTGCAACGGC AGAGACCTAA CCATTATCAA CGTGACAGCA AATGACAAAG GCTTCTATTA TGGAACCGAC  
 29191 TATAAAGATA GTTTAGATTA TAACATTATT GTACTGCCAT CTACCCTCC AGCACCCCGC ACAACTACTT  
 29261 TCTCTAGCAG CAGTGTGCT AACAATAACA TTTCCAATCC AACCTTTGCC GCGCTTTTAA AACGCCTGT  
 29331 GAATAATTCT ACAACTTAC ATACAACAAT TTCCACTTCA ACAATCAGCA TCATCGTCTG ATGACAATT  
 29401 GGAATATCTA TTCTTGTTTT TACCATAACC TACTACGCCT GCTGCTATAG AAAAGACAAA AGTAAAGGTG  
 29471 ATCCATTACT TAGATTTGAT ATTTAATTTG TTCTTTTTTT TTATTTACAG TATGGTGAAC ACCAATCATG  
 29541 GTACCTAGAA ATTTCTTCT CACCATACT ATCTGTGCTT TTAATGTTG CGCTACTTTC ACAGCAGTAG  
 29611 CCACAGCAAC CCCAGACTGT ATAGGAGCAT TTGCTTCTTA TGCACTTTTT GCTTTTTGTA CTTGCATCTG  
 29681 CGTATGTAGC ATAGTCTGCC TGGTTATTAA TTTTTTCCAA CTCTAGACT GGATCCTTGT CGGAATTTCC  
 29751 TACCTGCGCC ACCATCCCGA ATACCGCAAC CAAAATATCG CCGCACTTCT TAGACTCATC TAAAACCATG  
 29821 CAGGCTATAC TACCAATATT TTTGCTTCTA TTGCTTCCCT ACGETGTCTC AACCCAGCT GCCTATAGTA  
 29891 CTCCACCAGA ACACCTTAGA AAATGCAAT TCCAACAACC GTGGTCATT CTGTCTTGT ATCGAGAAAA  
 29961 ATCAGAAATC CCCCCAATT TAATAATGAT ATTAATATAA TCTGTTGCAC CATAATTTCA  
 30031 TTTTGTATAT ACCCCCTATT TGATTTTGGC TGGAAATGCT CCAATGCACA TGATCATCCA CAAGACCCAG  
 30101 AGGAACACAT TCCCCACAA AACATGCAAC ATCCAATAGC GCTAATAGAT TACGAAAGTG AACCAACACC  
 30171 CCCACTACTC CCTGCTATTA GTTACTTCAA CCTAACCGGG GGAGATGACT GAAACACTCA CCACCTCCAA  
 30241 TTCCGCGGAG GATCTGCTCG ATATGGACGG CCGCGTCTCA GAACAACGAC TTGCCAACT ACGCATCCCG  
 30311 CAGCAGCAGG AACCGGTGGC CAAAGAGCTC AGAGATGTCA TCCAAATTCA CCAATGCAAA AAAGGCATAT  
 30381 TCTGTTTGGT AAAACAAGCC AAGATATCCT ACGAGATCAC CGCTACTGAC CATCGCCTCT CTTACGAACT  
 30451 TGGCCCCCAA CGACAAAAT TTACCTGCAT GGTGGGAATC AACCCCATAG TTATCACCCA ACAAAGTGGGA  
 30521 GATACTAAGG GTTGCATTCA CTGCTCCTGC GATTCCATCG AGTGCACCTA CACCCCTGTG AAGACCTAT  
 30591 GCGGCCAAG AGACCTGCTA CCAATGAATT AAAAAAAAT GATTAATAAA AAATCACTTA CTTGAAATCA  
 30661 GCAATAAGGT CTCTGTTGAA ATTTTCTCCC AAGAGACCT CACTTCCCTC TTCCAACTC TGGTATTCTA  
 30731 AACCCCGTTC AGCGGCATAC TTTCTCCATA CTTTAAAGGG GATGTCAAAT TTAGCTCCT CTCTGTACC  
 30801 CACAATCTT ATGTCTTCT TCCCAGATGA CCAAGAGAGT CCGGCTCAGT GACTCCTTCA ACCCTGTCTA  
 30871 CCCCTATGAA CATGAAAGCA CCTCCCAACA CCCCTTATA AACCCAGGGT TTATTTCCCC AAATGGCTTC  
 30941 ACACAAAGCC CAGACGGAGT TCTTACTTAA AATAGTTTAA CCCCCTAAC AACCCAGGGT TTATTTCCCC AAATGGCTTC  
 31011 AGCTAAAAGT GGGAGGGGGA CTTACAGTGG ATGACACTGA ATGACACTGA TGGTACCTTA CAAGAAAAA TACGTCTAC  
 31081 AGCACCCATT ACTAAAAATA ATCACTCTGT AGAATATCC ATTGGAAATG GATTAGAAAC TCAAAAACAT  
 31151 AAACATATGT CCAAATTTGG AAATGGGTTA AAATTTAACA ACGGTGACAT TTGTATAAAG GATAGTATTA

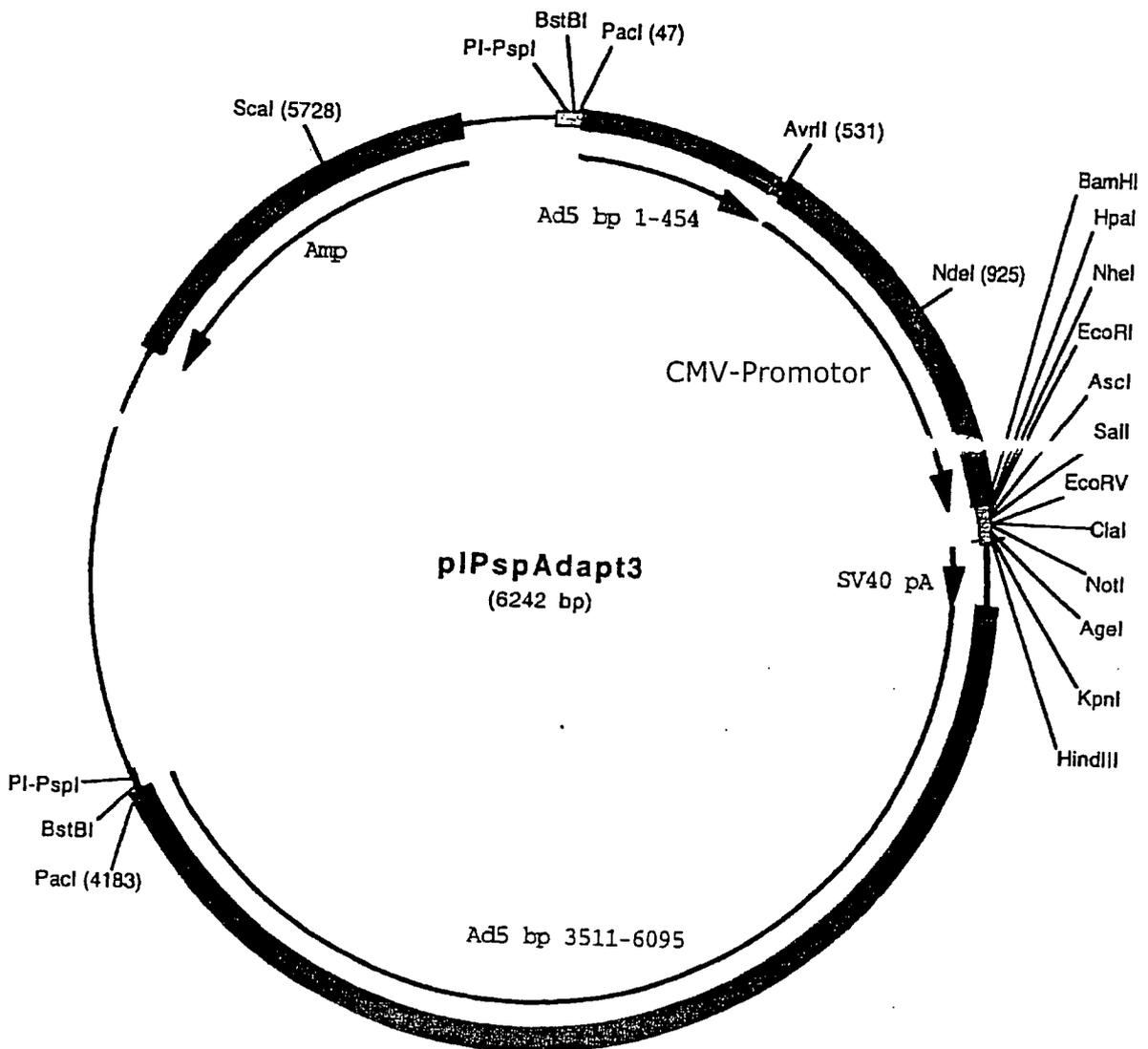
Figur 6, Fortsetzung

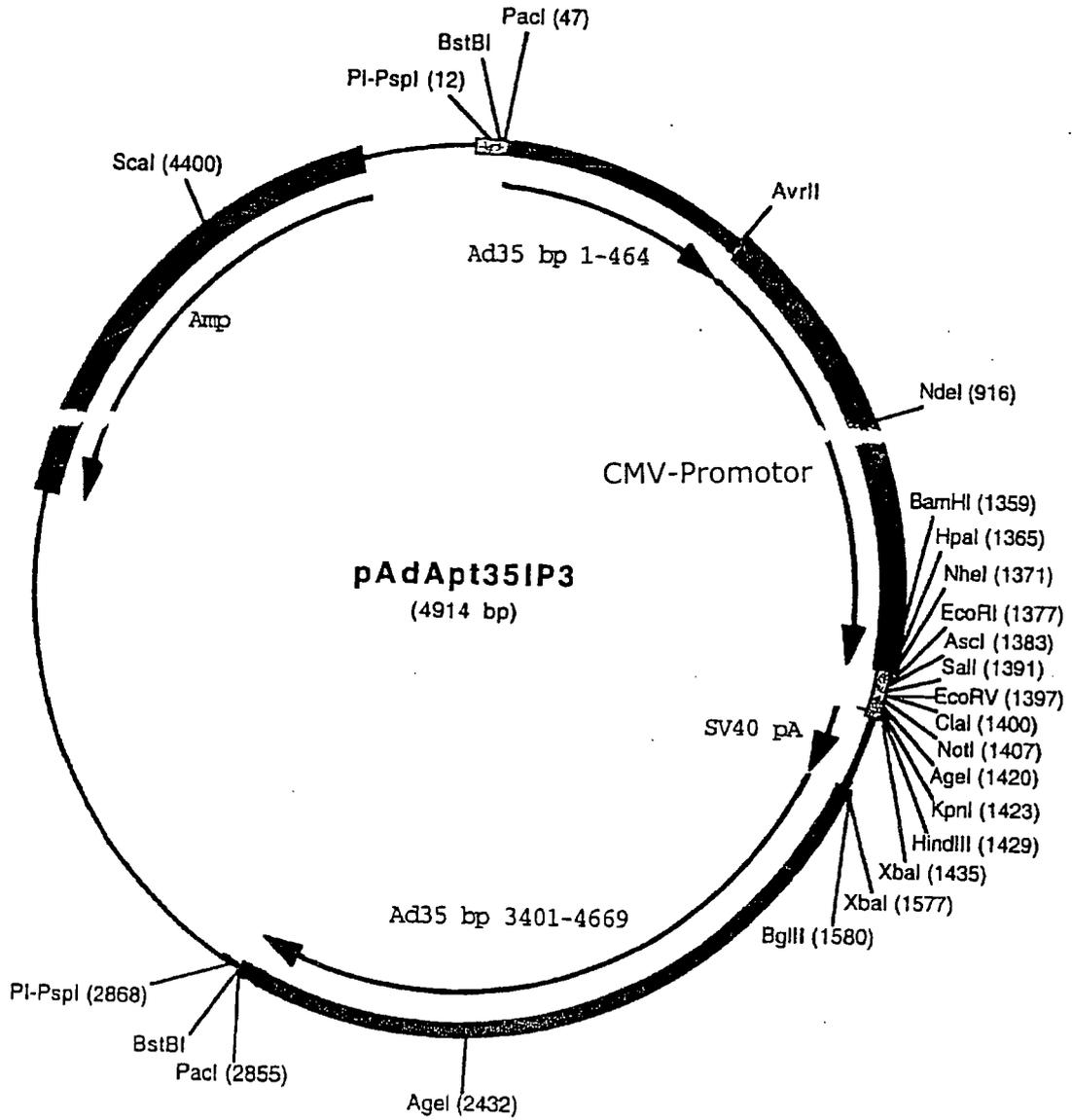
31221 ACACCTTATG GACTGGAATA AACCCCTCCAC CTAACCTGCA AATTGTGGAA AACACTAATA CAAATGATGG  
 31291 CAAACTTACT TTAGTATTAG TAAAAAATGG AGGGCTTGTT AATGGCTACG TGTCTCTAGT TGGTGTATCA  
 31361 GACACTGTGA ACCAAATGTT CACACAAAAG ACAGCAAACA TCCAATTAAG ATTATATTTT GACTCTTCTG  
 31431 GAAATCTATT AACTGAGGAA TCAGACTTAA AAATTCACAT TAAAAATAAA TCTTCTACAG CGACCAGTGA  
 31501 AACTGTAGCC AGCAGCAAAG CCTTTATGCC AAGTACTACA GCTTATCCCT TCAACACCAC TACTAGGGAT  
 31571 AGTGAAAAC TACATGACTA GTTATGATAG AAGTCTATT CCCTTGAACA  
 31641 TTTCTATAAT GCTAAACAGC CGTATGATTT CTTCACATGT TGCCTATGCC ATACAATTTG AATGGAATCT  
 31711 AAATGCAAGT GAATCTCCAG AAAGCAACAT AGCTACGCTG ACCACATCCC CCTTTTTTCT TTCTTACATT  
 31781 ACAGAAGACG ACAACTAAAA TAAAGTTTAA GTGTTTTTAT TAAAAATCAC AAAATTCGAG TAGTTATTTT  
 31851 GCCTCCACCT TCCCATTGGA CAGAATACAC CAATCTCTCC CCACGCACAG CTTTAAACAT TTGGATACCA  
 31921 TTAGAGATAG ACATTTGTTT AGATTCCACA TTCCAAACAG TTTCCAGAGCG AGCCAATCTG GGGTCAAGTGA  
 31991 TAGATAAAAA TCCATCGCGA TAGTCTTTTA AAGCGCTTTC ACAGTCCAAC TGCTGCGGAT GCGACTCCGG  
 32061 AGTTTGGATC ACGGTCACTT GGAAGAAGAA CGATGGGAAT CATAATCCGA AAACGGTATC GGACGATTGT  
 32131 GTCTCATCAA ACCCACAAGC AGCCGCTGTC TCGCTCGCTC CGTGCAGCTG CTGTTTTATGG GATCAGGGTC  
 32201 CACAGTTTCC TGAAGCATGA TTTTAAATAGC CCTTAAACATC AACTTTCTGG TCGGATGCGC GCAGGAACGC  
 32271 ATTCTGATTT CACTCAAAATC TTTGCAGTAG GTACAACACA TTATTACAAT ATTGTTTAAAT AAACCATAAT  
 32341 TAAAAGCGCT CCAGCCAAAA CTCATATCTG ATATAATCGC CCCTGCATGA CCATCATAACC AAAGTTTAAAT  
 32411 ATAAATTTAA TGACGTTCCC TCAAAAACAC ACTACCCACA TACATGATCT CTTTTGGCAT GTGCATATTA  
 32481 ACAATCTGTC TGTACCATGG ACAACGTTGG TTAATCATGC AACCCAATAT AACCTTCCGG AACCCACTG  
 32551 CCAACACCCG TCCCCAGCC ATGCATTGAA GTGAACCCG CTGATTACAA TGACAATGAA GAACCCAATT  
 32621 CTCTCGACCG TGAATCACTT GAGAATGAAA AATATCTATA GTGGCACAAAC ATAGACATAA ATGCATGCAT  
 32691 CTTCTCATAA TTTTAACTC CTCAGGATTT AGAAACATAT CCCAGGGAAT AGGAAGCTCT TGCAGAACAG  
 32761 TAAAGCTGGC AGAACAAGGA AGACCACGAA CACAACCTTAC ACTATGCATA GTCATAGTAT CACAATCTGG  
 32901 GTGTAAGGGT GATGTCTGGC GCATGATGTC GAGCGTGCGC GCAACCTTGT CATAATGGAG TTGCTTCTG  
 32971 ACATTCTCGT ATTTTGTATA GCAAAACGCG GCCCTGGCAC AACACACTCT TCTTCGCTT CTATCCTGCC  
 33041 GCTTAGCGTG TTCCGTGTGA TAGTTCAAGT ACAGCCACAC TCTTAAAGTTG GTCAAAAAGAA TGCTGGCTTC  
 33111 AGTTGTAATC AAAACTCCAT CGCATCTAAT TGTCTGAGG AAATCATCCA CGGTAGCATA CCAAACTCC  
 33181 AACCAAGCAA TGCAACTGGA TTGCGTTTCA AGCAGGAGAG GAGAGGGAAG AGACGGAAGA ACCATGTTAA  
 33251 TTTTATTCC AAACGATCTC GCAGTACTTC AAATGTAGA TC CGCGCAGAT GGCATCTCTC GCCCCACTG  
 33321 TGTGGTGAA AAAGCACAGC TAAATCAAAA GAAATCCGAT TTTCAAGGTG CTCAACGGTG GCTTCCAACA  
 33391 AAGCCTCCAC GCGCACATCC AAGAACA AAA GAATACCAA AGAAGGAGCA TTTTCTAECT CCTCAATCAT  
 33461 CATATTACAT TCCTGCACCA TTCCCAGATA ATTTTCAGCT TTCCAGCCTT GAATTATTCT TGTCACTTCT  
 33531 TGTGGTAAAT CCAATCCACA CATTACAAAC AGGTCCCAGG GGGCGCCCTC CACCACCATT CTTAAACACA  
 33601 CCCTCATAAT GACAAAATAT CTTGCTCCTG TGTACCTGT AGCGAATTGA GAATGGCAAC ATCAATTGAC  
 33671 ATGCCCTTGG CTCTAAGTTC TTCTTTAAGT TCTAGTTGTA AAAACTCTCT CATATTATCA CCAAATCTG  
 33741 TAGCCAGAAG CCCCCCGGA ACAAGAGCAG GGGACGCTAC AGTGCAGTAC AAGCGCAGAC CTCCCAATT  
 33811 GGCTCCAGCA AAAACAAGAT TGGATAAAGC ATATTGGGAA CCACCAGTAA TATCATCGAA GTTGCTGGAA  
 33881 ATATAATCAG GCAGAGTTTC TTGTAGAAAT TGAATAAAG AAAAATTTGC CAAAAAACA TTCAAACCT  
 33951 CTGGGATGCA AATGCAATAG GTTACCGCGC TGCCTCCAA CATTGTTAGT TTTGAATTAG TCTGCAAAAA  
 34021 TAAAAA AAA ACAAGCGTCA TATCATAGTA GCCTGACGAA CAGGTGGATA AATCAGTCT TCCATCATAA  
 34091 GACAAGCCAC AGGGTCTCCA GCTCGACCCCT CGTAAAACCT GTCATCGTGA TTAACAACA GCACCGAAAG  
 34161 TFCCTCGCG TGACCAGCAT GAATAAGTCT TGATGAAGCA TACAATCCAG ACATGTTAGC ATCAGTTAAG  
 34231 GAGAAAAAAC AGCCAACATA GCCTTTGGGT ATAATTATGC TTAATCGTAA GTATAGCAA GCCACCCCTC  
 34301 CGGGATACAA AGTAAAAGGC ACAGGAGAAT AAAAAATATA ATTATTTCTC TGCTGCTGTT TAGGCAACGT  
 34371 CGCCCCGGT CCCTCTAAAT ACACATACAA AGCCTCATCA GCCATGGCTT ACCAGAGAAA GTACAGCGGG  
 34441 CACACAAAC ACAAGCTCTA AAGTCACTCT CCAACCTSTC CACAATATAT ATACACAAGC CCTAAACTGA  
 34511 CGTAATGGGA CTAAGTGTA AAAAATCCCG CCAACCCAA CACACACCCC GAAACTGCGT CACCAGGAA  
 34581 AAGTACAGTT TCACTTCCGC AATCCCAACA AGCGTCACTT CCTCTTCTC ACGGTACGTC ACATCCCAT  
 34651 AACTTACAAC GTCATTTTCC CACGGCCGCG CCGCCCTTT TAACCGTTAA CCCCACAGCC AATCACCACA  
 34721 CGGCCACAC TTTTAAAAT CACCTCATT ACATATTGGC ACCATTCCAT CTATAAGGTA TATTATTGAT  
 34791 GATG

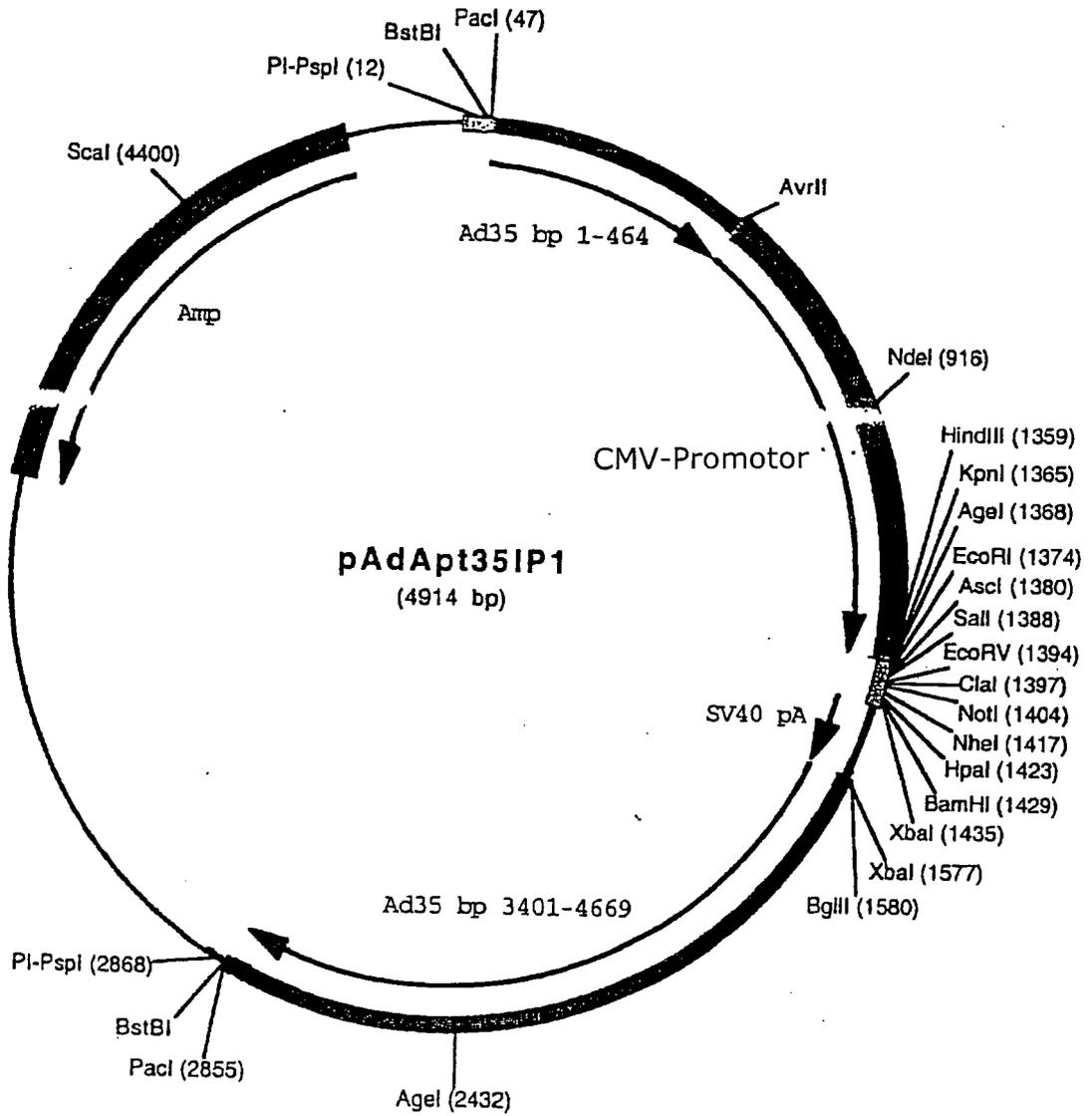












Konstruktion des Kosmidvektors pWE.Ad35.pIX-rITR

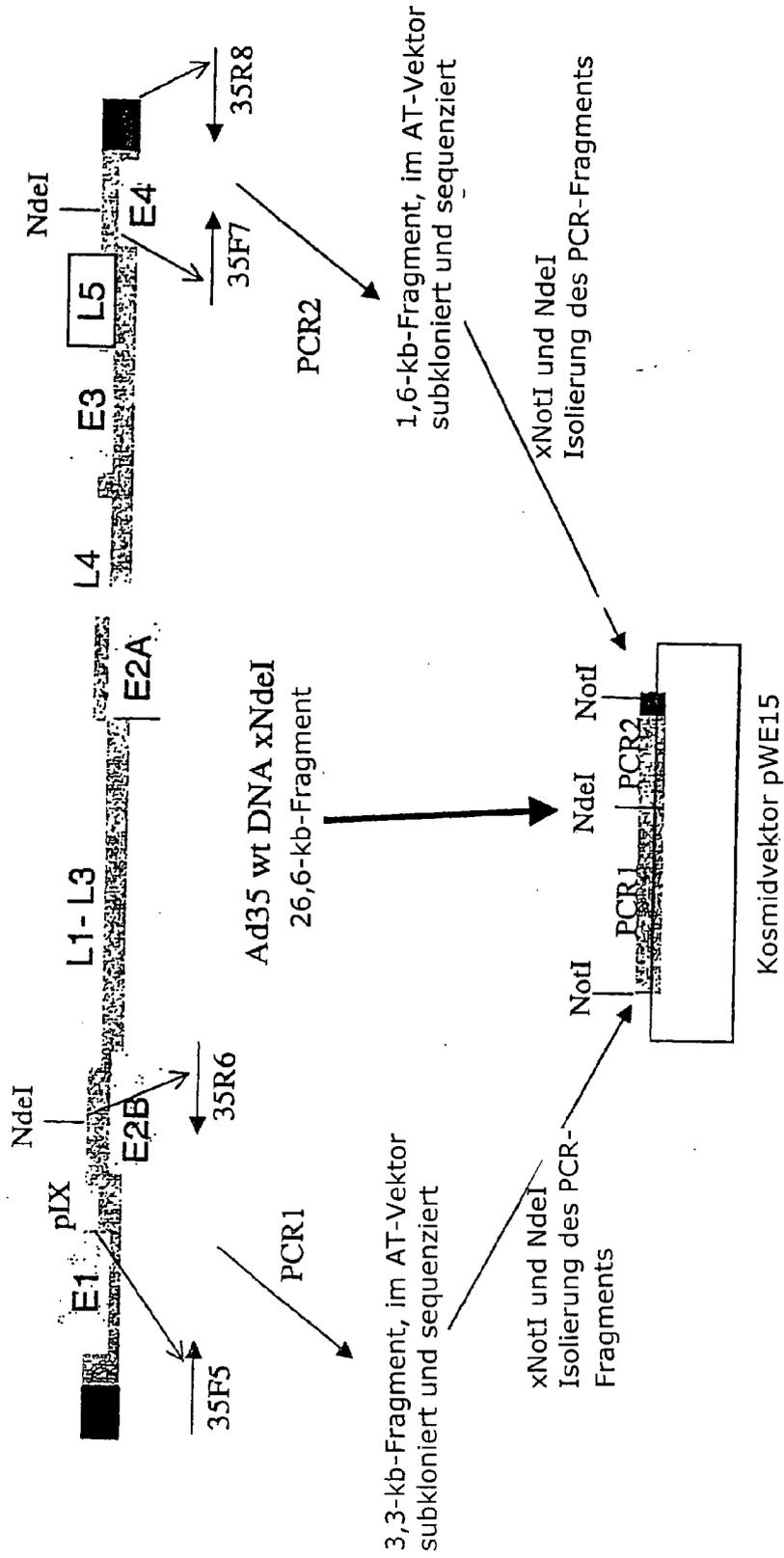
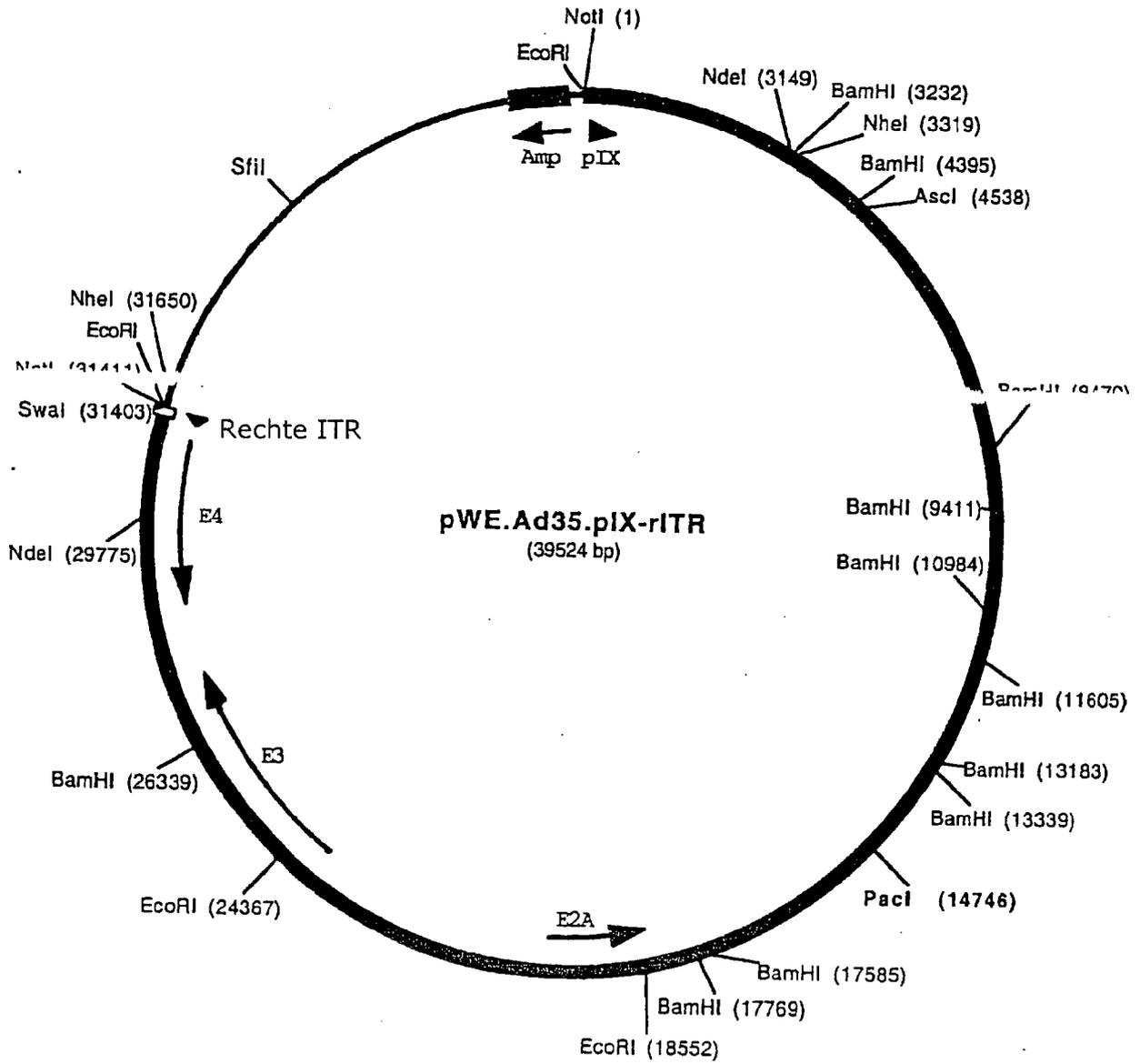
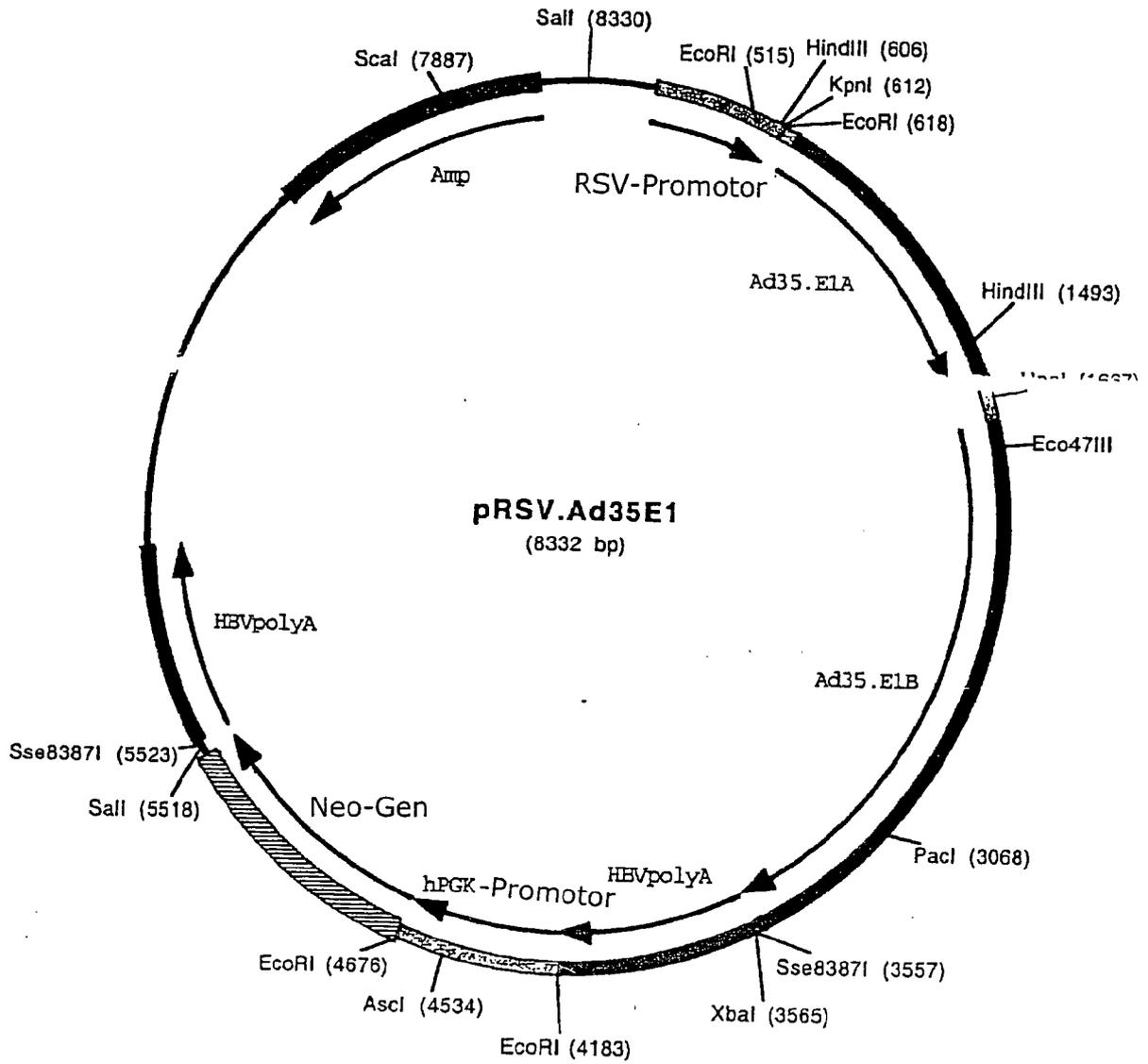
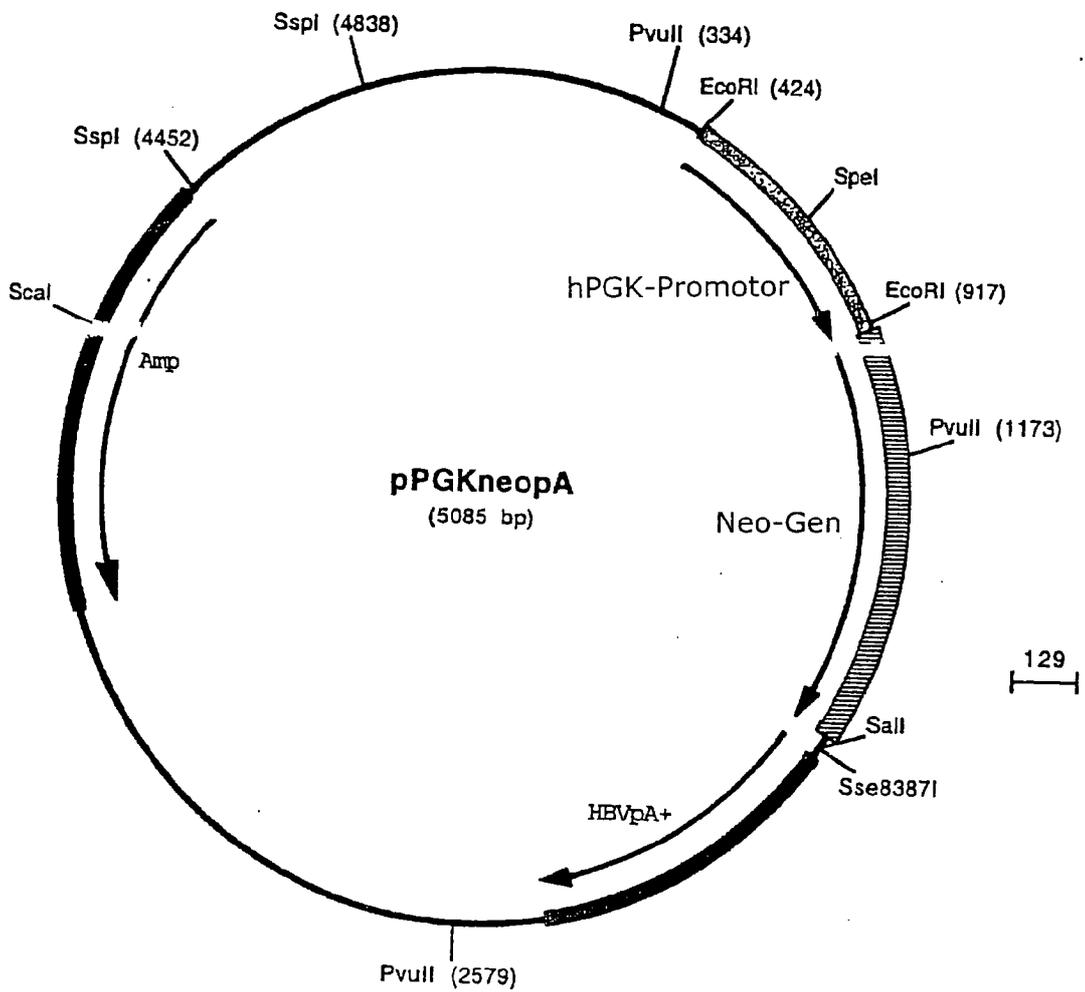
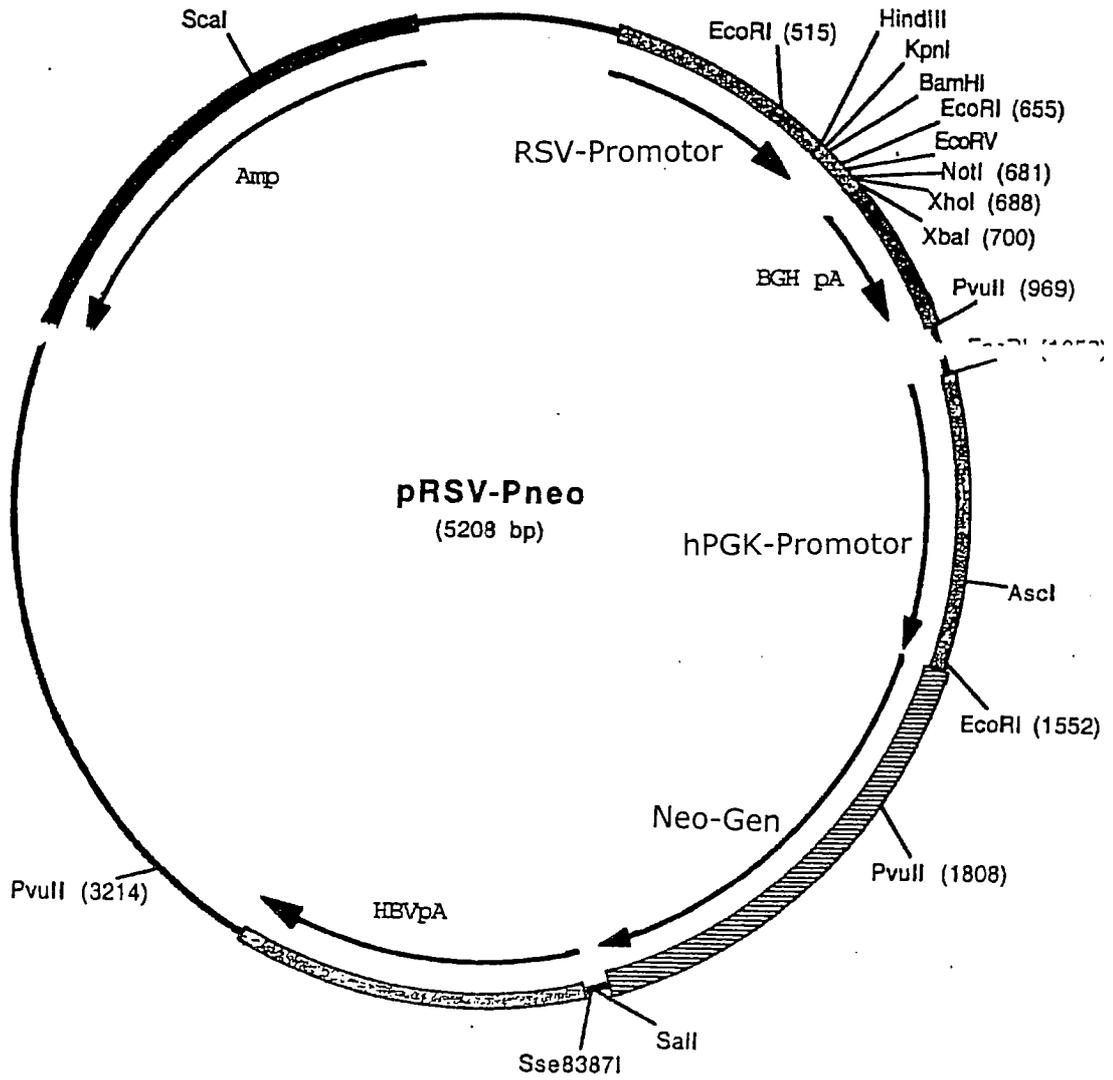


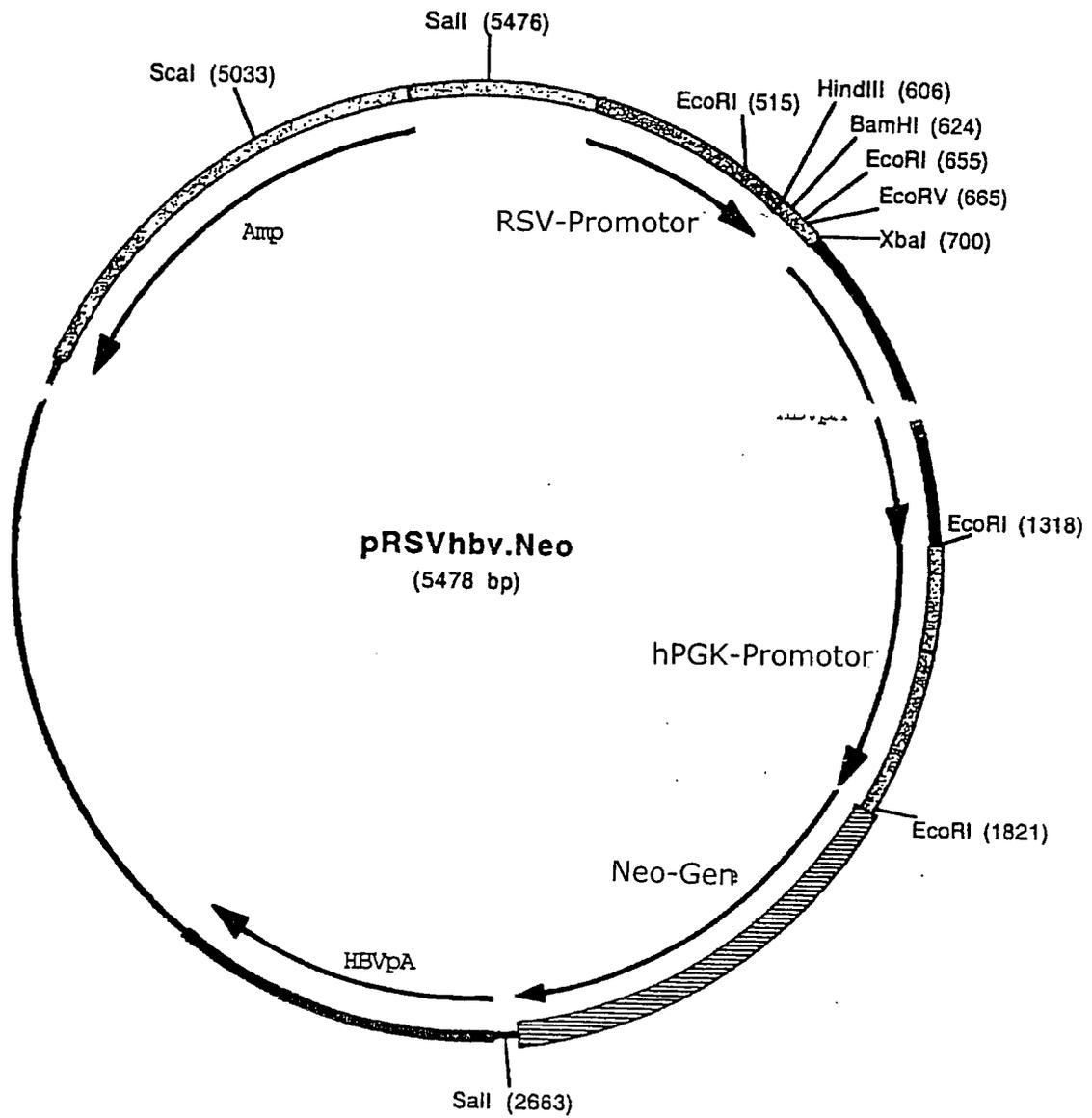
figure 13

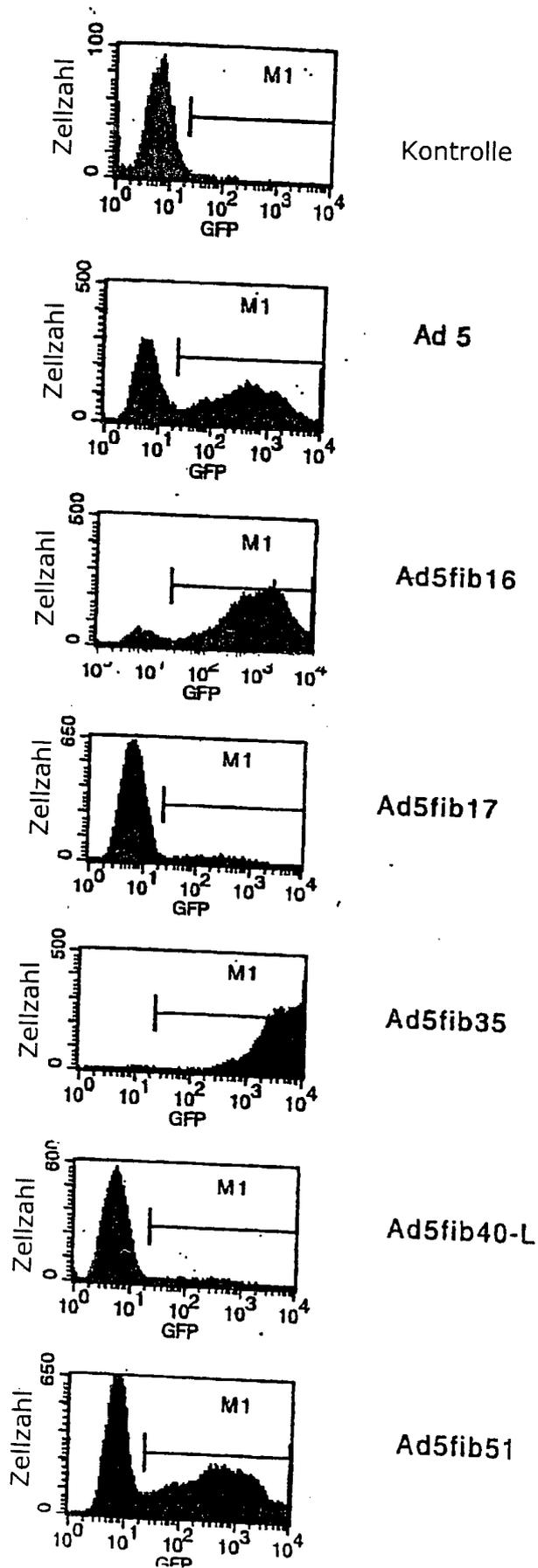




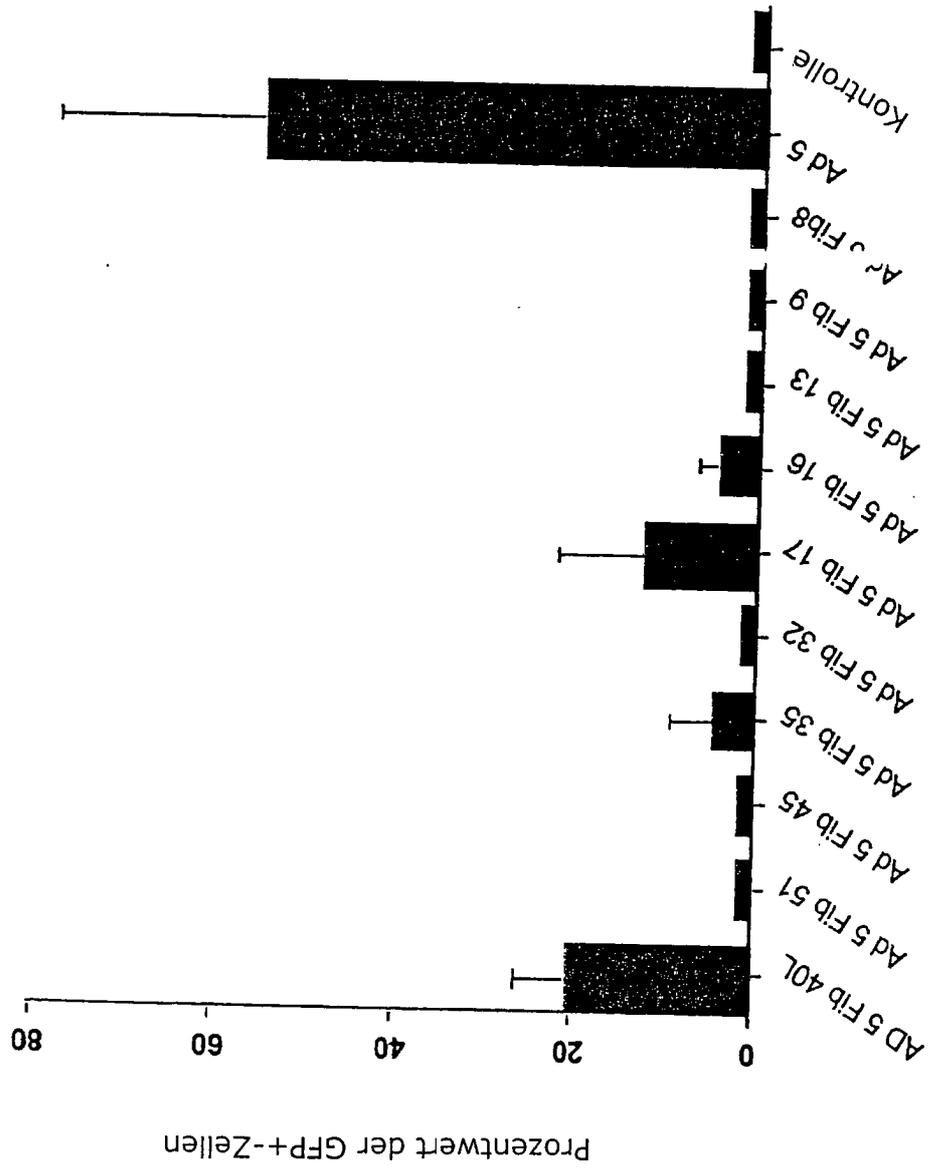




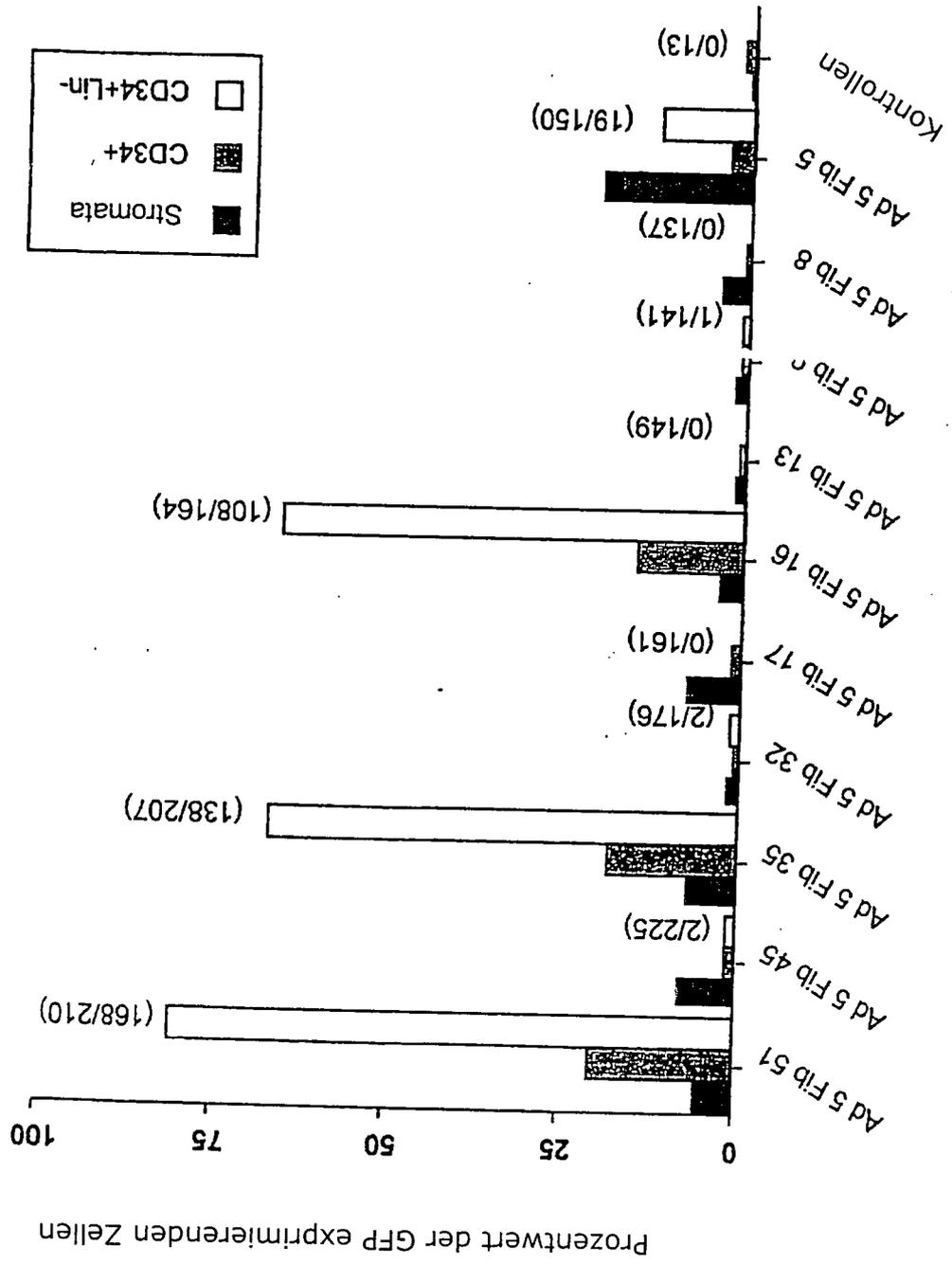




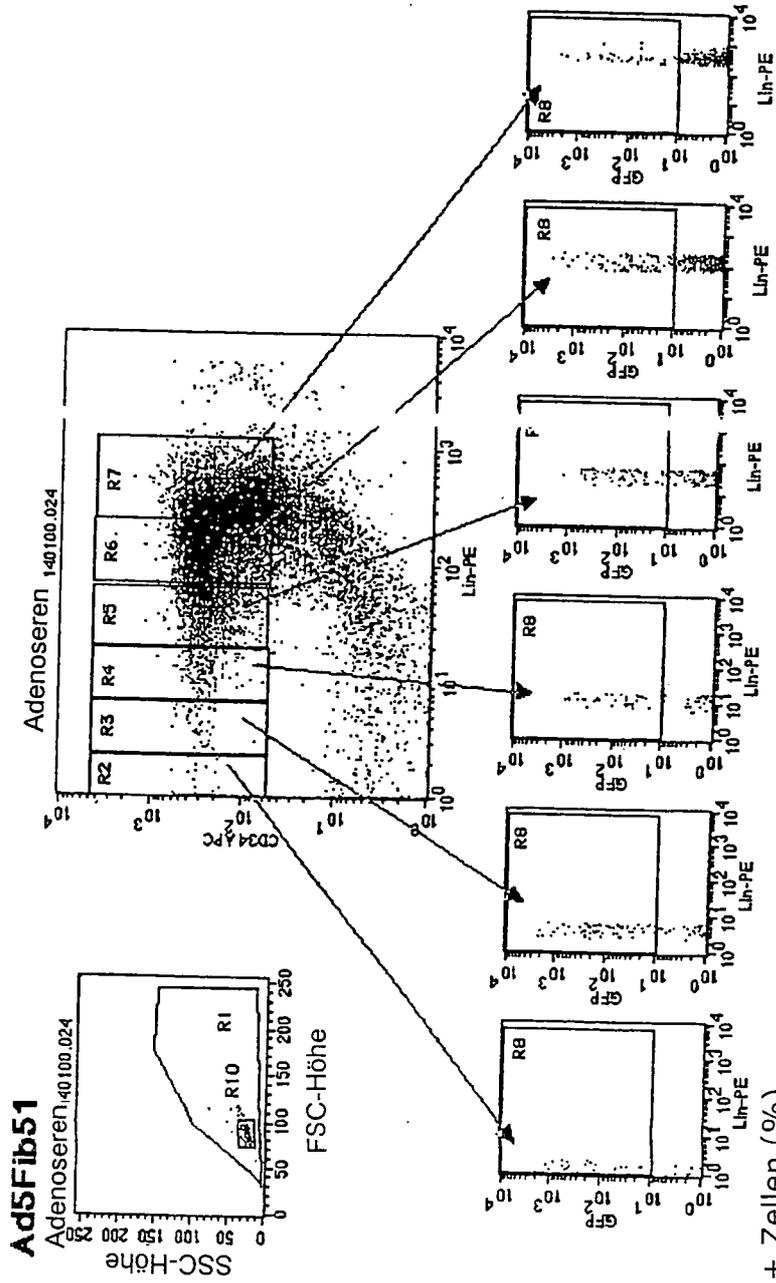
Figur 20



Figur 21



Figur 22a



GFP + Zellen (%)

91      73      52      43      28      15

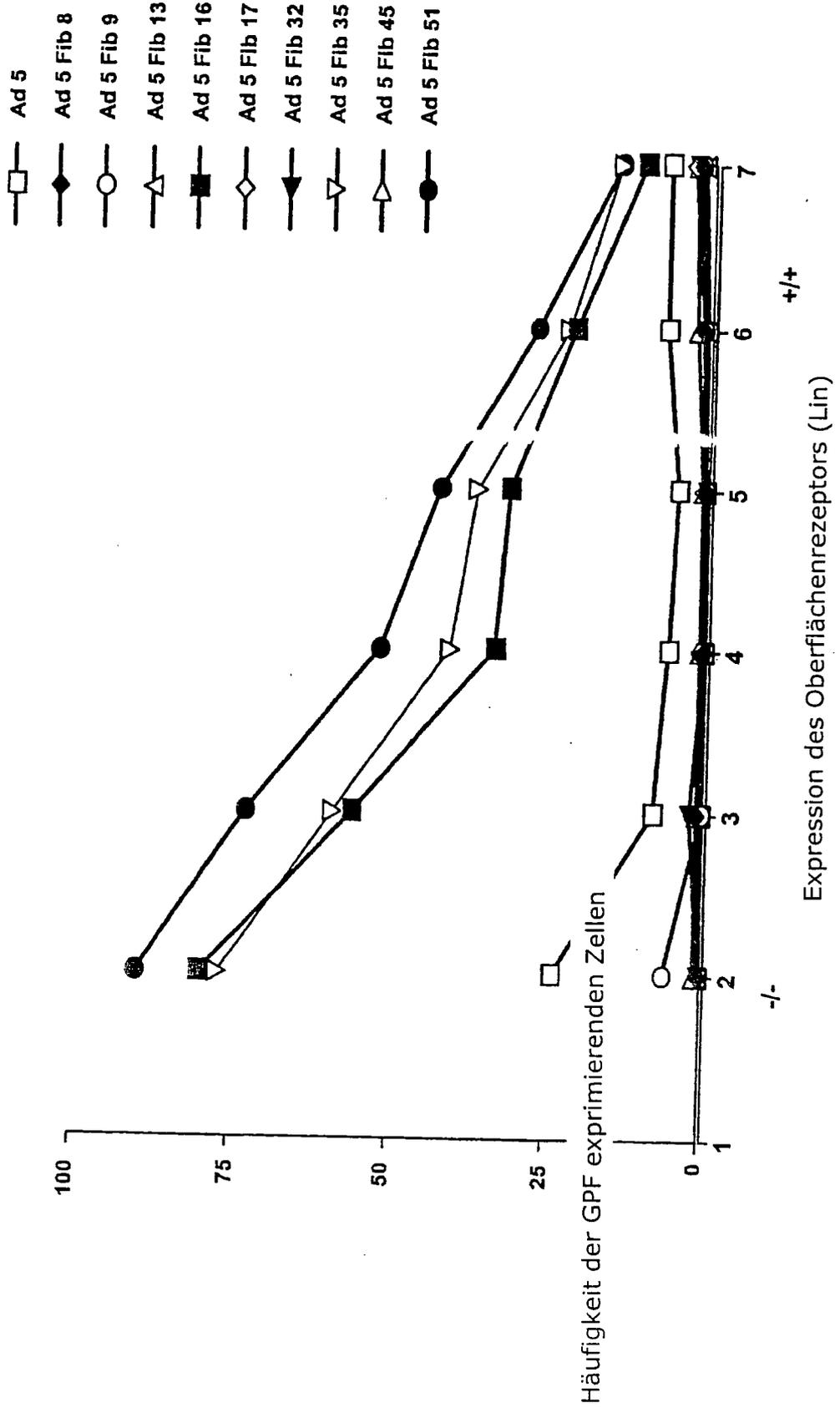
% der Zellen in R1

0.36      0.36      1.36      8.5      31      34

Peak ch

128      107      67      74      80

Figur 22b



FIGUR 23

```

1  MLLQMKRRARPS EDTFNPVYPYDTE TGPFTV PFLT PPFVSP Fib 5 protein
1  MLLQMKRRARPS EDTFNPVYPYED E SSSQR - PFINP GFI S S Fib 16 protein
1  MLLQMKRRARPS EDTFNPVYPYED ESTSQH - PFINP GFI S S Fib 35 protein
1  MLLQMKRRARPS EDTFNPVYPYED ESTSQH - PFINP GFI S S Fib 51 protein

41  NGFQES PFGVLS LRLSEPLVTSNGMLA LKMGNGLSLDEAG Fib 5 protein
40  NGFAQSPFGVLT LKCVNPLT TASGFLQLKVGSSSLTVDTID Fib 16 protein
40  NGFTQSPFGVLT LKCLTPLT TGGSLQLKVGGLTVDDTD Fib 35 protein
40  NGFTQSPFGVLT LKCLTPLT TGGSLQLKVGGLTVDDTD Fib 51 protein

81  NLTSEQNVTTVS PPLKTKSNINLE ISAPLTVTSEALTVA Fib 5 protein
80  GSLEENIT-AAA PLTKTNHSIIGLLIGSGLQT Fib 16 protein
80  GTLOENIR-ATA PITRNNHVSVELSIGNGLST Fib 35 protein
80  GTLOENIR-VTA PITRNNHVSVELSIGNGLST Fib 51 protein

121  AAPLMVAGNTLTMQSQAPLTVHDSKLSIATOGPLTVSEGK Fib 5 protein
110  -----KDKKLCLSLEDGLVTKDKK Fib 16 protein
110  -----QNNKLC----- Fib 35 protein
110  -----QNNKLC----- Fib 51 protein

161  LALQTSGLPLTTTDSSTLTITASPPLTTATGSLGIDLKEPI Fib 5 protein
129  LQI----- Fib 16 protein
116  ----- Fib 35 protein
116  ----- Fib 51 protein

201  YTQNGKLGKLYGAPLKVTDLNTLTVATGPGVTINNTSLO Fib 5 protein
132  ----- Fib 16 protein
116  ----- Fib 35 protein
116  ----- Fib 51 protein

241  TKVFGALGFDSQGNMQLNVAGGLRIDSONRRLLLDVSYFP Fib 5 protein
172  ----- Fib 16 protein
116  ----- Fib 35 protein
116  ----- Fib 51 protein

281  DAQNQLNLR LGQG PLFINSAHNLDINYNKGLYLPTASNS Fib 5 protein
132  -----SLGDKG----- Fib 16 protein
116  ----- Fib 35 protein
116  ----- Fib 51 protein

321  KKLEVNLS TAKGLMPDATAIAINAGDGLFEGSPNAPNTNP Fib 5 protein
137  ----- Fib 16 protein
116  ----- Fib 35 protein
116  ----- Fib 51 protein

361  LKTKIGRGLEFDSNKAMVPKLGTGLSPDSTGAITVGNKNN Fib 5 protein
137  LITK-----NDVLCAKLGHGLVFPDS-SNX-ITIE NN Fib 16 protein
116  -----AKLGNGLKFPNN-GDIICIKDSIN Fib 35 protein
116  -----AKLGNGLKFPNN-GDIICIKDSIN Fib 51 protein

401  DKLT LWTT PAPS PNCRL--NABERDAKLT LVLT KCGS QIL Fib 5 protein
166  --TLWTGAKP SANC VIKEGEDS PDCXLT LVLV RINGGL IIN Fib 16 protein
137  --TLWTG I NFP PNC QIVENTNTNDGKLT LVLV RINGGL V Fib 35 protein
137  --TLWTG I K P PNC QIVENTNTNDGKLT LVLV RINGGL V Fib 51 protein

438  ATVSVLAVKGS LAPITSGTVQSAHLIIRFPDENG VLLNNSP Fib 5 protein
203  GYITLMGASEYTN TLPKNNQVTIDVNLAFONTGQKIT YLS Fib 16 protein
174  GYVSLVGVSDTVNQMP TQXTANIQLRLYPDSSGNLLTEES Fib 35 protein
174  GYVSLVGVSDTVNQMP TQKSATIQRLYPDSSGNLLTDES Fib 51 protein

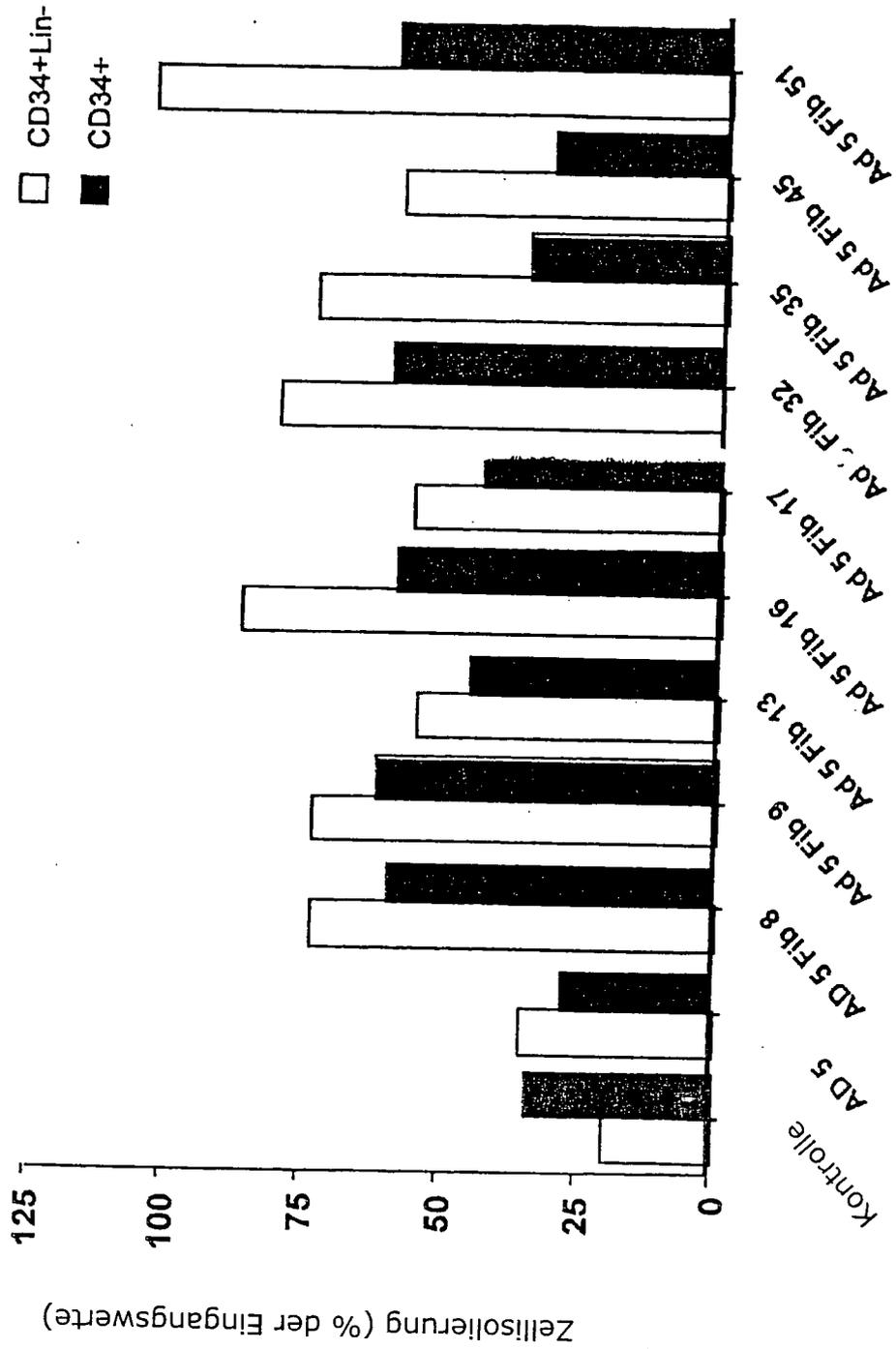
477  LDPEYWNFRNGDLTEGTAYTNAVGFMPNLSAYPKSHGRKA Fib 5 protein
243  SLKSNUNFKDNQNMATGTTTSAKGFMPSTTAYPFI--TV Fib 16 protein
214  DLRIPLKNKSSTA-TSETVASSKAFMPSTTAYPFN--TT Fib 35 protein
214  NLRIPLKNKSSTA-TSEANTSSKAFMPSTTAYPFN--TT Fib 51 protein

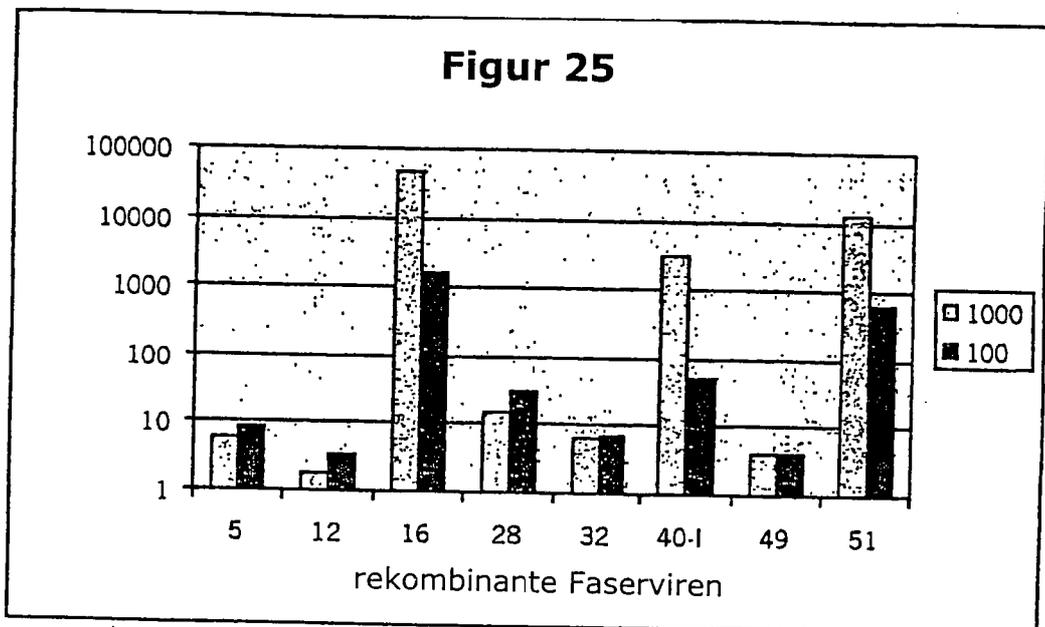
517  KSNIVSQVYLNGLD--RTK-----PVTLLITLNGTQETG Fib 5 protein
280  ATETLNEQYIYGC EYKRST-NGTLFELKVTVTLNRRMLAS Fib 16 protein
250  TRDS--ENYIHGICYYMTSYDRSLVPLNISIMLNSRMIS Fib 35 protein
250  TRDS--ENYIHGICYYMTSYDRSLVPLNISIMLNSRTISS Fib 51 protein

548  DTPPSAYSMS P S W D W S G H N Y I N E --IPATSSYTF SYIAQ Fib 5 protein
319  GM--AYAIMNFSWLSNAEEAPETTEVTLITSPFFPSYIRE Fib 16 protein
288  NV--AYAIQFEWNLNAESPE SNIMTLITSPFFPSYITE Fib 35 protein
288  NV--AYAIQFEWNLNAKRSPESNIATLITSPFFPSYITE Fib 51 protein

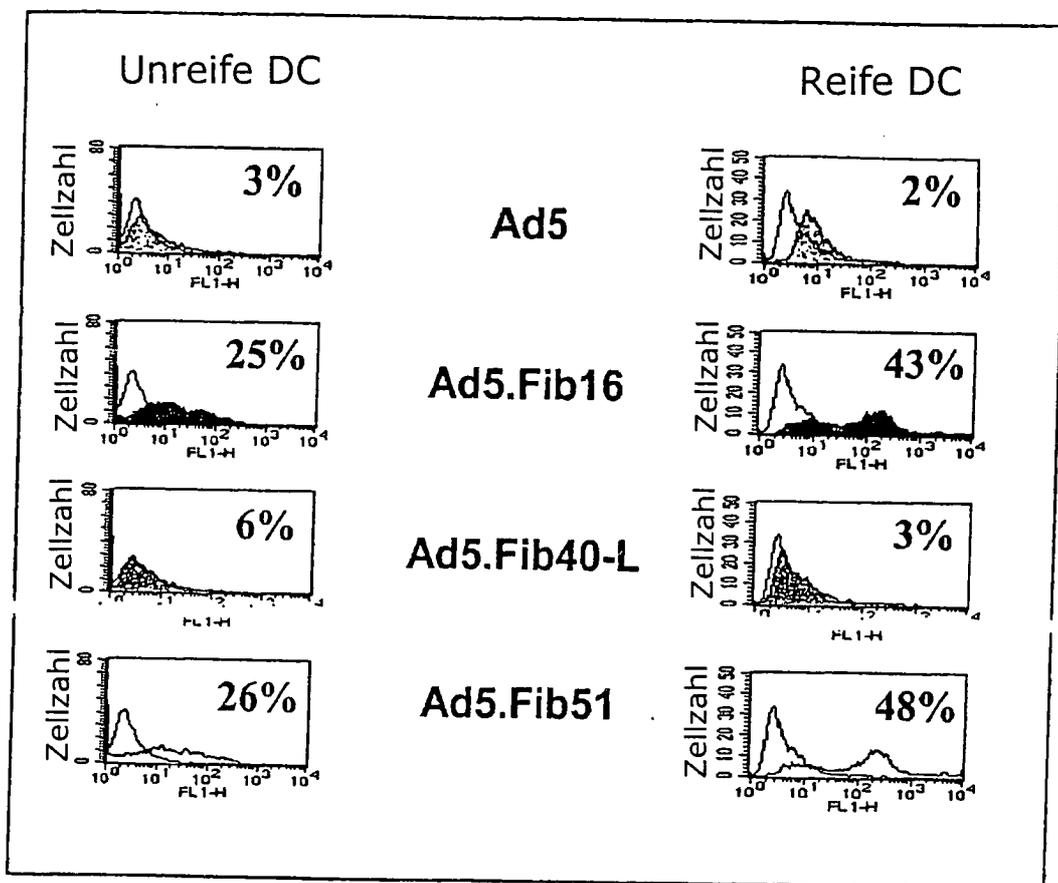
585  E. Fib 5 protein
356  D. Fib 16 protein
325  D. Fib 35 protein
325  D. Fib 51 protein
    
```

Figur 24

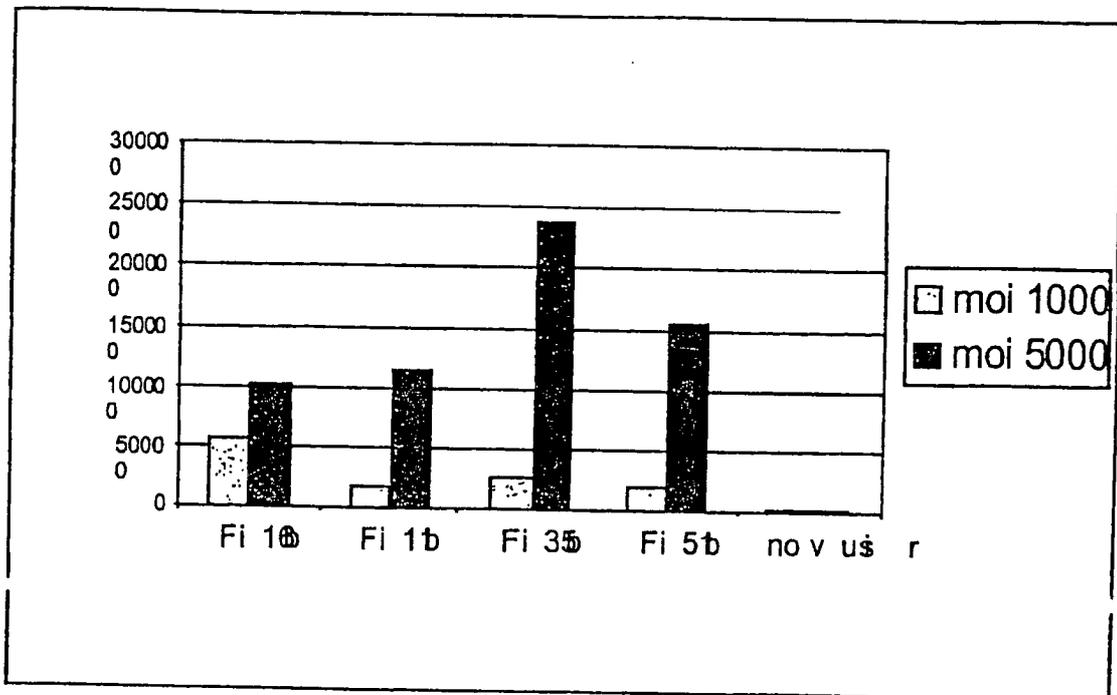




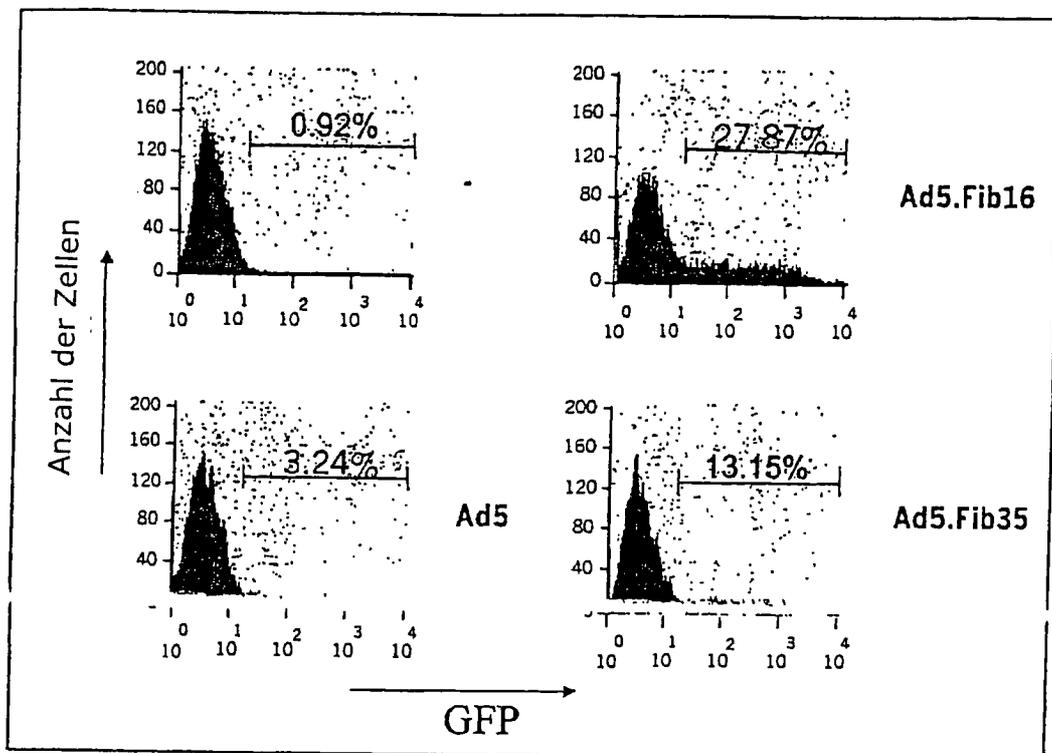
Figur 26



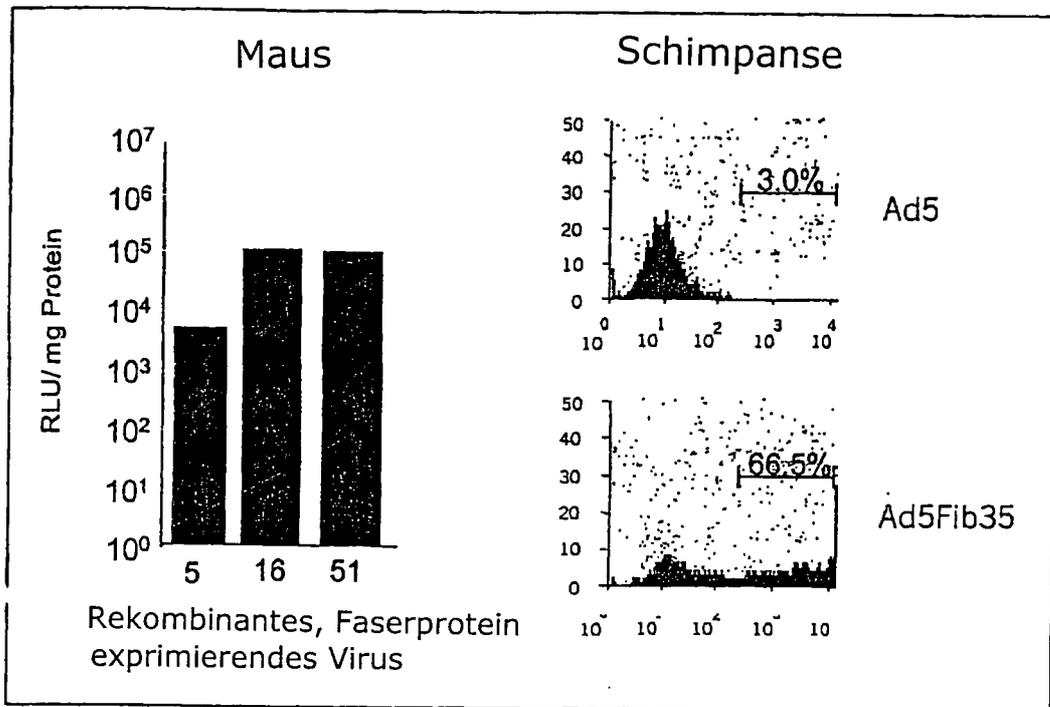
Figur 27



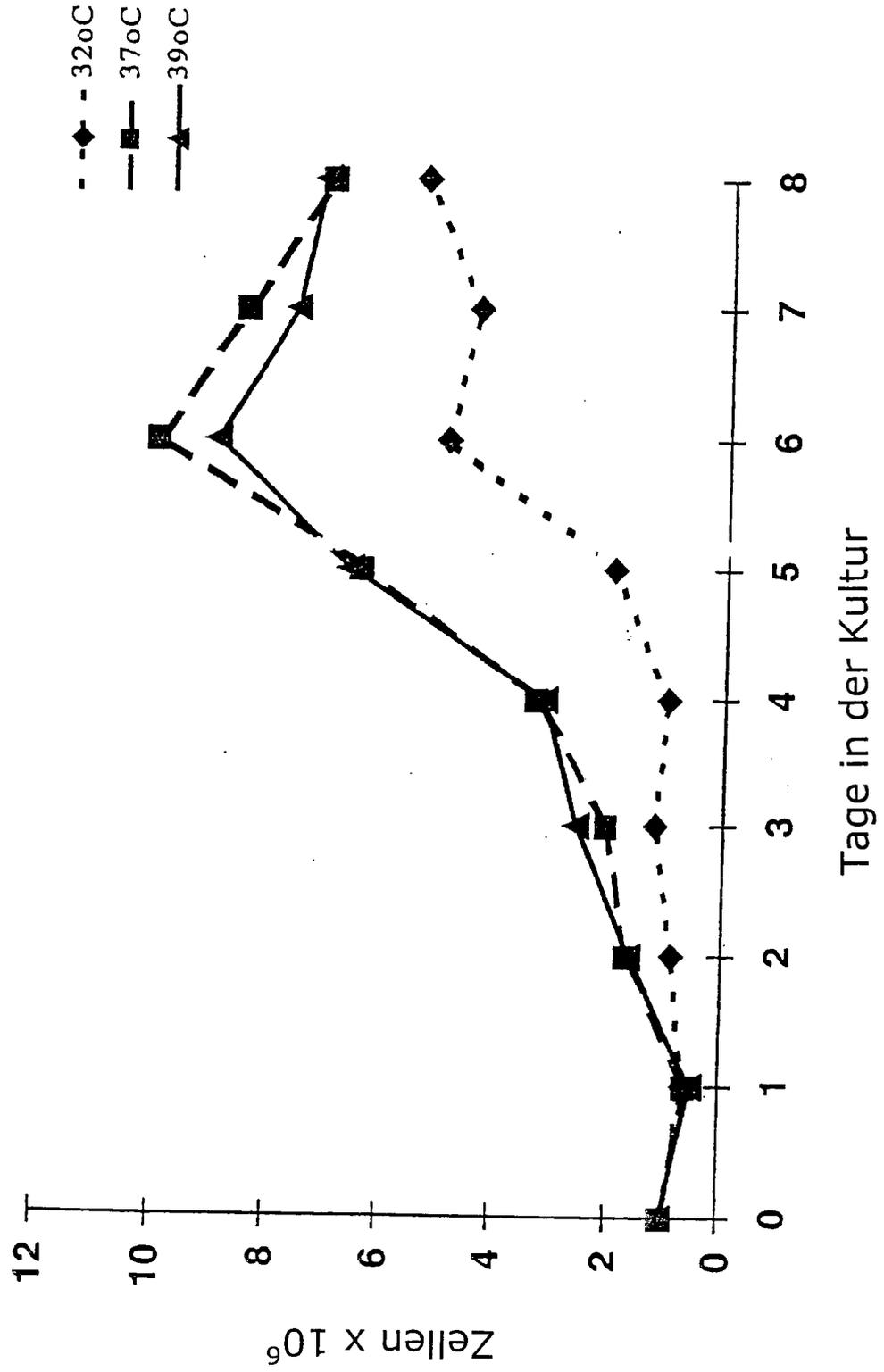
Figur 28



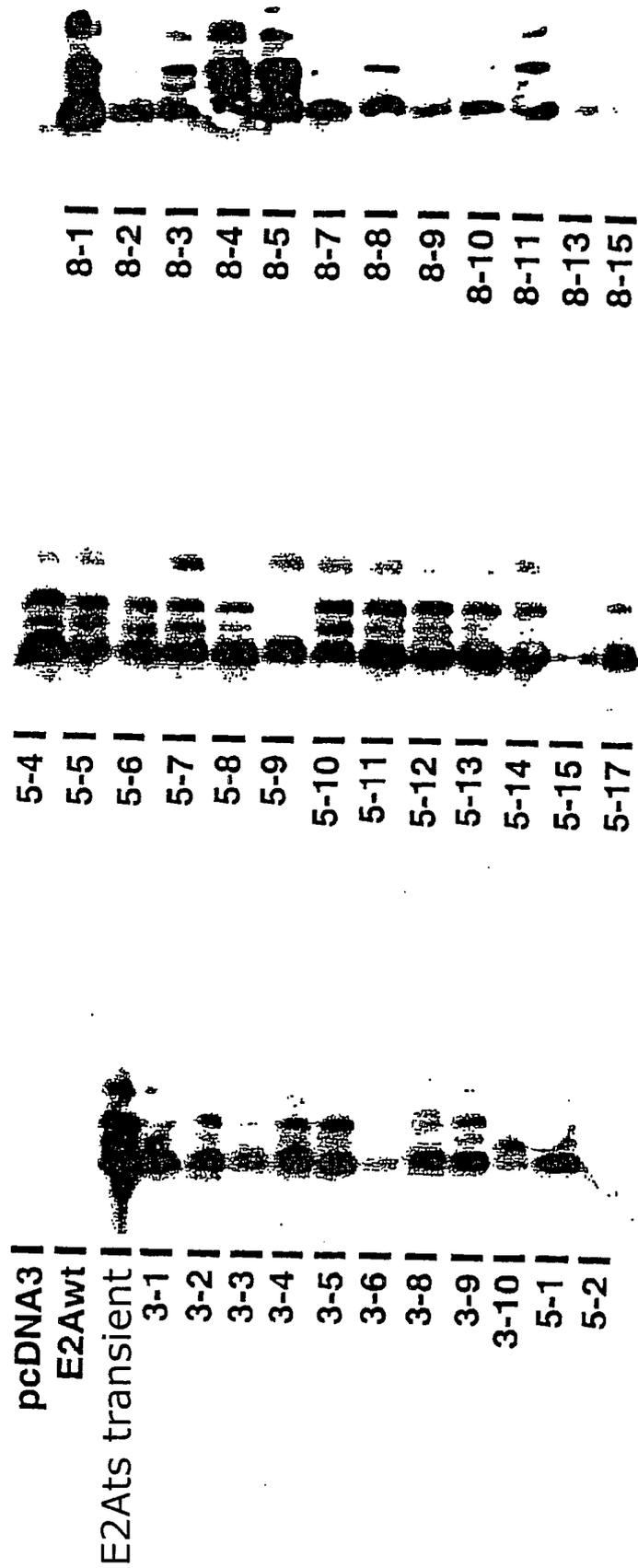
Figur 29



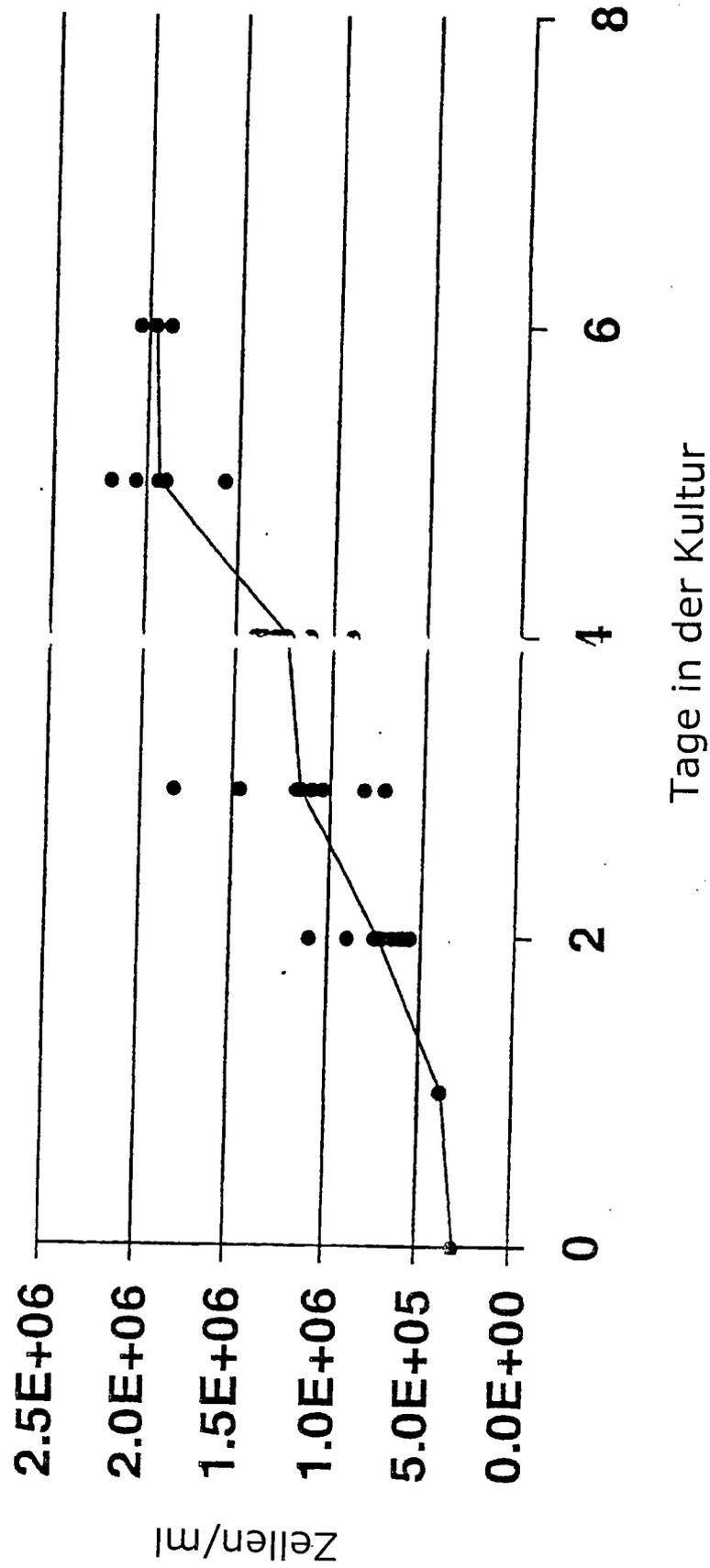
Figur 30 Temperaturabhängiges Wachstum von PER.C6



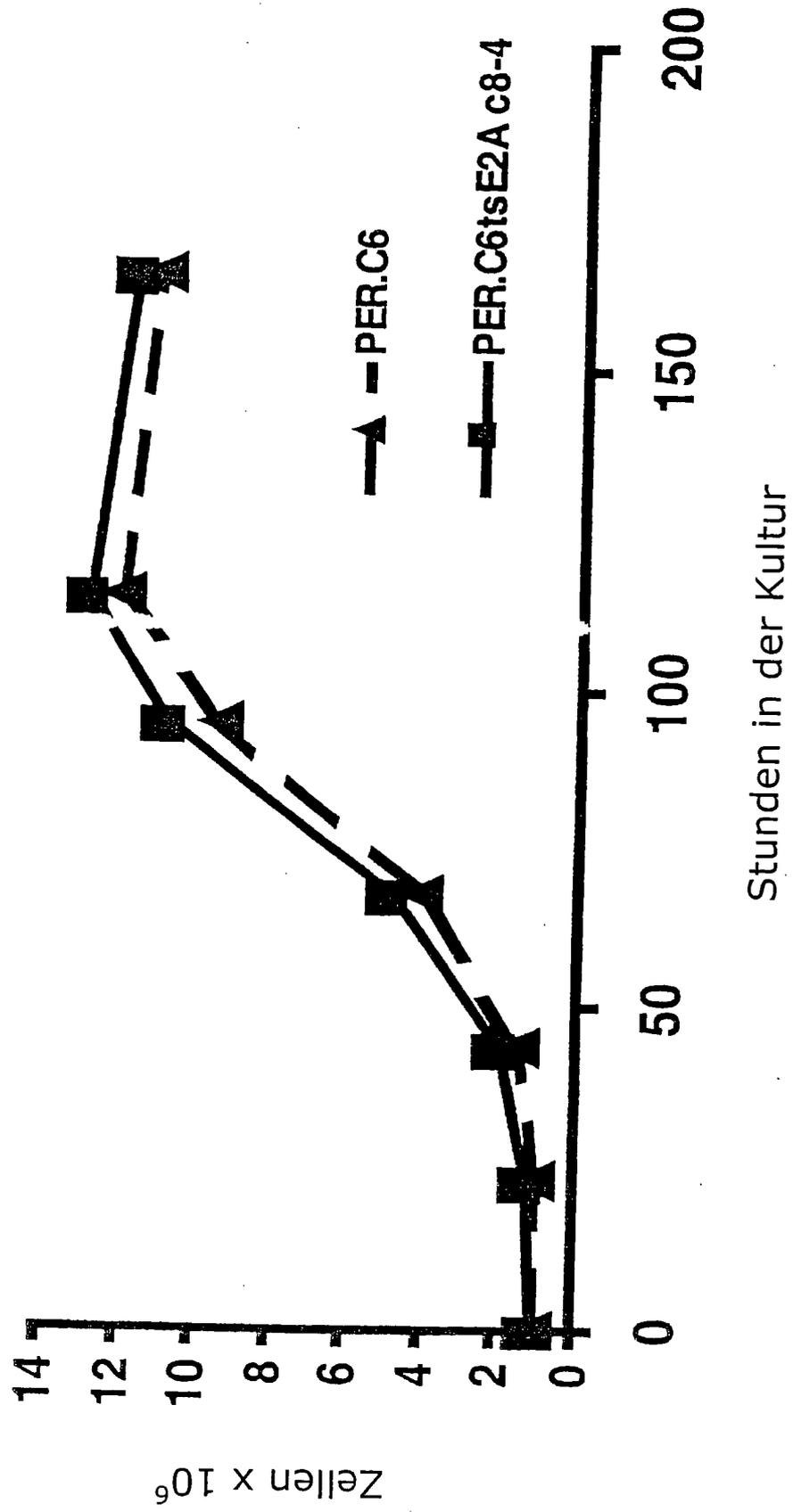
Figur 31 DBP-Konzentrationen in PER.C6-Zellen, die mit pcDNA3, pcDNA3wtE2A oder pcDNA3ts125E2A transfiziert sind



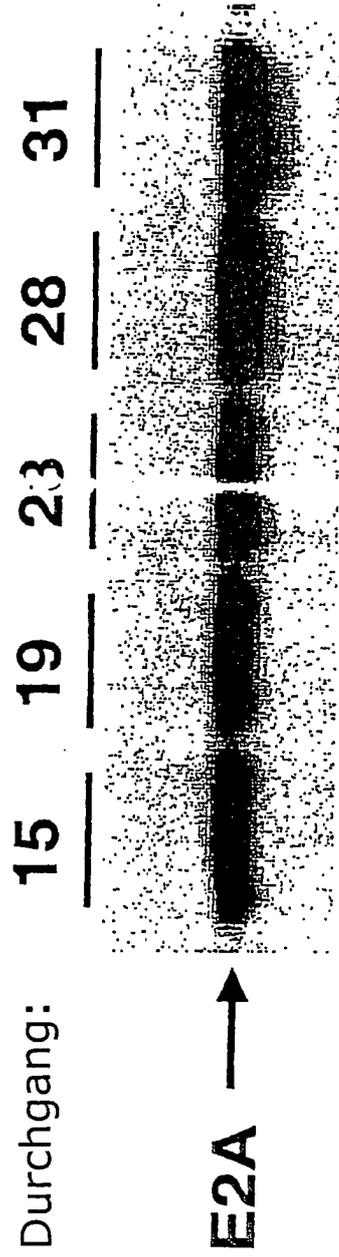
Figur 32 Wachstum von PER.C6ts125E2A C5-9 in Suspension



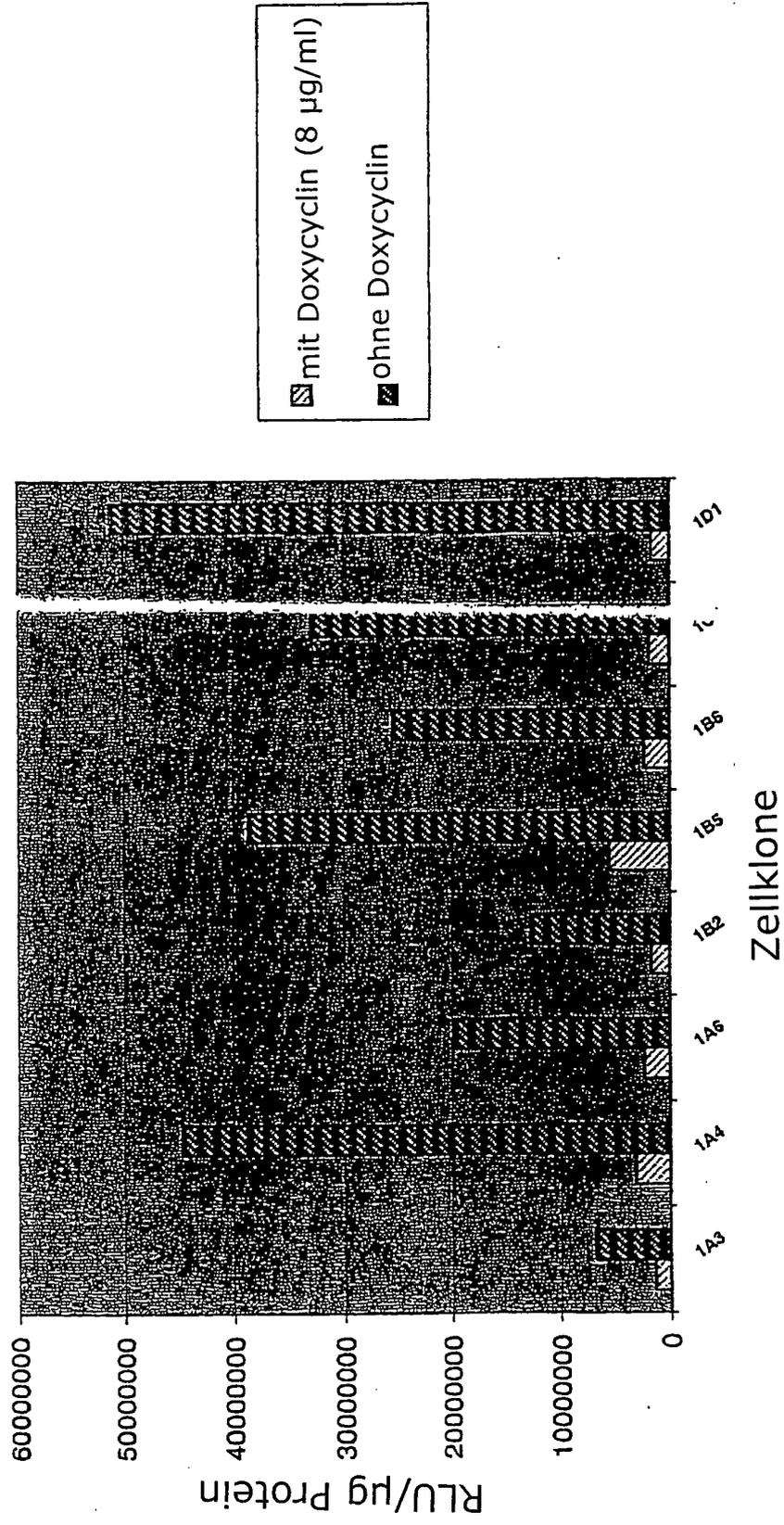
Figur 33 Wachstumskurve von PER.C6 und PER.C6tsE2A



Figur 34 Stabilität von PER.C6ts125E2A



Figur 35A tTA-Aktivität in PER.C6-tTA-Klonen



Figur 35B Aktivität von tTA in PER/E2A/tTA-Klonen

