



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 698 34 489 T2** 2006.09.07

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 988 389 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **698 34 489.8**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US98/10367**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **98 923 595.7**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1998/053087**

(86) PCT-Anmeldetag: **20.05.1998**

(87) Veröffentlichungstag  
der PCT-Anmeldung: **26.11.1998**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **29.03.2000**

(97) Veröffentlichungstag  
der Patenterteilung beim EPA: **10.05.2006**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **07.09.2006**

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

**A61K 48/00** (2006.01)

**C12N 5/10** (2006.01)

(30) Unionspriorität:

**861773**      **22.05.1997**      **US**

(73) Patentinhaber:

**Cornell Research Foundation, Inc., Ithaca, N.Y., US**

(74) Vertreter:

**Grünecker, Kinkeldey, Stockmair &  
Schwanhäusser, 80538 München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

**FALCK-PEDERSEN, Erik, Dobbs Ferry, NY 10522,  
US**

(54) Bezeichnung: **METHODE FÜR DIE PRODUKTION VON ADENOVIRALEN VEKTOREN, DIE NICHT VOM SEROTYP C ABGELEITET SIND**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

**Beschreibung**

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf das Herstellen eines replikationsdefizienten Adenovirus, das ein Passagieren für die Expression innerhalb einer Zelle umfasst.

**[0002]** Während des Winters und dem Frühjahr von 1952–1953 erzielten Rowe und seine Kollegen an dem National Institutes of Health (NIH) Adenoide, die chirurgisch aus jungen Kindern in dem Gebiet von Washington, D.C. (Rowe et al., Proc. Soc. Exp. Biol., Med., 84, 570–573 (1953)) gewonnen wurden und brachten diese Adenoide in Gewebekultur. Nach einigen Wochen zeigten viele der Kulturen eine beginnende progressive Degeneration, welche durch die Zerstörung der Epithelzellen gekennzeichnet war. Dieser cytopathische Effekt konnte nacheinander durch filtrierte Kulturflüssigkeiten auf etabliert Gewebekulturen von menschlichen Zelllinien übertragen werden. Das cytopathische Mittel wurde „Adenoid degenerierendes“ (Ad) Mittel genannt. Die Bezeichnung „Adenovirus“ wurde schließlich für diese Mittel verwendet. Die Entdeckung von vielen Prototypstämmen des Adenovirus, von denen einige respiratorische Erkrankungen hervorrufen, folgte diesen anfänglichen Entdeckungen (Rowe et al., supra; Dingle et al., Am. Rev. Respir. Dis., 97, 1–65 (1968); Horwitz, „Adenoviridae and Their Replication“, in Fundamental Virology (Fields et al., Hrsg., Raven Press Ltd., New York, NY, 2. Ausgabe., 1991), Seiten 771–813).

**[0003]** Alle Adenoviren sind morphologisch und strukturell ähnlich. Diese Viren sind nicht umhüllt, stellen reguläre Icosaeder dar, sind 65–80 nm im Durchmesser und bestehen aus einem äußeren Kapsid und einem inneren Kern. Das Kapsid besteht aus 20 dreieckigen Oberflächen oder Facetten und 12 Scheitelpunkten (Horne et al., J. Mol. Biol., 1, 84–86 (1959)). Die Facetten bestehen aus Hexons und die Scheitelpunkte bestehen aus Pentons. Eine Fiber erstreckt sich von jedem der Scheitelpunkte. Zusätzlich zu den Hexons, Pentons und den Fibern gibt es acht kleinere strukturelle Polypeptide, wobei die exakte Position von den meisten Polypeptiden nicht klar ist.

**[0004]** Der Virus Kern enthält ein lineares, doppelsträngiges DNA-Molekül mit terminalen invertierten Sequenzwiederholungen (ITRs), die in unterschiedlichen Isolaten in ihrer Länge von 103 Basenpaaren bis 163 Basenpaaren variieren (Garon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 2391–2394 (1972); Wolfson et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 69, 3054–3057 (1972); Arrand et al., J. Mol. Biol., 128, 577–594 (1973); Steenberg et al., Nucleic Acids Res., 4, 4371–4389 (1977); Tooze, DNA Tumor Viruses (2. Ausgabe, Cold Spring Harbor, New York; Cold Spring Harbor Laboratory, 1981), Seiten 943–1054). Die ITRs beherbergen die Startpunkte der DNA-Replikation (Garon et al., supra; Wolfson et al., supra; Arrand et al., supra; Steenberg et al., supra).

**[0005]** Die virale DNA ist mit vier Polypeptiden assoziiert, die V, VII, m und terminales Polypeptid (TP) genannt werden. Das 55 kd TP ist kovalent mit den 5' Enden der DNA über ein dCMP verbunden (Rekosh et al., Cell, 11, 283–295 (1977); Robinson et al., Virology, 56, 54–69 (1973)). Die anderen drei Polypeptide sind nicht-kovalent an die DNA gebunden und in solch einer Weise gefaltet, dass sie in das kleine Volumen des Kapsids passen. Die DNA scheint zu einer Struktur verpackt zu sein, die ähnlich zu zellulären Nukleosomen ist, wie dies aus Nukleaseverdauungsmustern erkenntlich ist (Corden et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 73, 401–404 (1976); Tate et al., Nucleic Acids Res., 6, 2769–2785 (1979); Mirza et al., Biochim. Biophys. Acta, 696, 76–86 (1982)).

**[0006]** Jenseits der verschiedenen physikalischen Ähnlichkeitseigenschaften der Adenoviren werden diese Viren in Unterabteilungen gemäß verschiedenen Kriterien aufgeteilt, einschließlich immunologischen Reaktivitäten, Onkogenität und dem GC-Gehalt des Genoms eines bestimmten Stammes. Siehe Horwitz, supra bei 777. Unter den menschlichen Adenovirus-Isolaten wurden zum Beispiel über 40 Serotypen und vier Hämagglutinationsgruppen identifiziert. Die folgende Tabelle fasst die Klassifizierung der menschlichen Adenoviren zusammen, wie dies bereitgestellt wurde von Horwitz, supra bei 777:

| Unter-<br>gruppe | Hämagglutinations-<br>gruppen                                    | Serotypen  | Onkogenes Potential   |                                   | Prozentsatz<br>von G+C in<br>der DNA |
|------------------|--|--|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
|                  |  |  | Tumore in<br>Tieren   | Transformation<br>in Gewebekultur |                                      |
| A                | IV (wenig oder keine<br>Agglutination)                           | 12,18,31   | hoch                  | +                                 | 48-49                                |
| B                | I (vollständige Agglu-<br>tination der Affen-<br>Erythrozyten)   | 3,7,11,<br>14,16,<br>21,34,35  | mittel                | +                                 | 50-52                                |
| C                | III (teilweise Agglu-<br>tination der Ratten-<br>Erythrozyten)   | 1,2,5,6  | niedrig<br>oder keine | +                                 | 57-59                                |
| D                | II (vollständige Agglu-<br>tination der Ratten-<br>Erythrozyten) | 8,9,19,<br>37,10,<br>13,15,<br>17,19,<br><br>20,22,<br>30,32,<br>33,36,<br>37,38,<br>39,42 | niedrig<br>oder keine | +                                 | 57-61                                |
| E                | III  | 4  | niedrig<br>oder keine | +                                 | 57-59                                |
| F                | III  | 40,41  | unbekannt             |                                   |                                      |

**[0007]** Zumindest hinsichtlich den adenoviralen Serotypen, welche bisher am meisten studiert wurden, nämlich Ad2 und Ad5, die voll sequenziert sind, ist die Gesamtorganisation des adenoviralen Genoms zwischen den Serotypen so erhalten, dass spezifische Funktionen in ähnlicher Weise positioniert sind. Teile der anderen Serotypen wurden sequenziert, wobei deren Ergebnisse mit der Hypothese einer konservierten genetischen Organisation innerhalb der Adenoviren konsistent ist. Wie in obiger Tabelle dargestellt, zeigen die Adenoviren dennoch eine substantielle Diversität auf dem genetischen Niveau. Die viralen Isolate von den verschiedenen Gruppen der Adenoviren zeigen zum Beispiel unterschiedliche GC-Gehalte in ihren entsprechenden Genomen. Ferner zeigen DNA-DNA Hybridisierungsstudien, dass es weniger als 20 % Homologie zwischen der DNA von verschiedenen Gruppen gibt, obgleich verfeinerte Analysen ergeben, dass konservierte Sequenzen beim Vergleich von subgenomischen Segmenten nachgewiesen werden können. Bei Studien von bis zu 30 Karteneinheiten der DNA-Länge wurde zum Beispiel gezeigt, dass wenigstens 20–50 % der DNA-Sequenz zwischen den Gruppen variiert (Horwitz, supra at 777). In einer anderen Studie wurde gezeigt, dass die Sequenzen des Replikationsstartpunktes von Subtypen, die mit jedem der sechs Gruppen der Adenoviren assoziiert sind, verwandt, aber verschieden sind.

**[0008]** Wichtig, wenn auch nicht verstanden, ist die Tatsache, dass die Adenoviren von verschiedenen Gruppen nicht miteinander rekombinieren, wenn eine Coinfektion des gleichen Wirts auftritt. Dagegen rekombinieren Adenoviren innerhalb einer Gruppe sehr effizient (Sambrook et al., J. Mol. Biol., 97, 369–390 (1975)). Das Unvermögen der Adenoviren zur Rekombination zwischen Serogruppen zeigt deutlich die genetische Varianz der adenoviralen Gruppen.

**[0009]** Die grundlegende Physiologie der adenoviralen Infektion wurde vorwiegend mit Ad2 und Ad5 untersucht. Gemäß diesen Studien beginnt das Adenovirus eine Zelle durch Anheftung der Fiber an einen spezifischen Rezeptor an der Zellmembran zu infizieren (Londberg-Holm et al., J. Virol., 4, 323–338 (1969); Morgan et al., J. Virol., 4, 777–796 (1969); Pastan et al., „Adenovirus entry into cells: some new observations on an old problem“, in Concepts in Viral Pathogenesis, Notkins et al., Hrsg., Springer-Verlag, New York, NY, Seiten 141–146 (1987)). Die Pentonbasis bindet dann an einen zellulären Integrinrezeptor. Das an den Rezeptor gebundene Virus migriert dann von der Plasmamembran an die mit Clathrin beschichteten Tüpfel, welche endocytische Vesikel oder Reptosomen bilden, wobei der pH auf 5,5 fällt. Es wird angenommen, dass der pH-Abfall

die Oberflächenkonfiguration des Virus verändert, was zu einem Bruch des Reptosoms führt und das Virus in das Cytoplasma der Zelle freisetzt.

**[0010]** Wenn das Virus die Kernporen erreicht, tritt die virale DNA in den Kern ein, wobei das meiste Protein im Cytoplasma verbleibt (Philipson et al., *J. Virol.*, 2, 1064–1075 (1968)). Die virale DNA ist jedoch nicht vollständig proteinfrei, so dass wenigstens ein Teil der viralen DNA mit wenigstens vier viralen Polypeptiden, nämlich V, VII, TP und m, assoziiert ist und einen viralen DNA-Zellhistonkomplex bildet (Tate et al., *Nucleic Acids Res.*, 6, 2769–2785 (1979)).

**[0011]** Der Kreislauf von der Zellinfektion bis zur Produktion der viralen Partikel dauert 1–2 Tage und führt zur Herstellung von bis zu 10.000 infektiösen Partikeln pro Zelle (Green et al., *Virology*, 13, 169–176 (1961)). Der Infektionsprozess des Adenovirus wird in eine frühe (E) und eine späte (L) Phase aufgeteilt, die durch die virale DNA-Replikation getrennt sind, wobei aber einige Ereignisse, die während der frühen Phase stattfinden, auch während der späten Phase stattfinden und vice versa. Weitere Unterteilungen der adenoviralen, genetischen Regionen wurden gemacht, um die zeitliche Expression der viralen Gene vollständig zu beschreiben.

**[0012]** Während der frühen Phase wird virale Messenger RNA („mRNA“), welche einen kleineren Anteil der in der Zelle vorhandenen Gesamt-RNA darstellt, von beiden Strängen der adenoviralen DNA, die in dem Zellkern gegenwärtig ist, synthetisiert. Zumindest fünf Regionen, die als E1, E2, E3, E4 und MLP-L1 bezeichnet sind, werden transkribiert (Lewis et al., *Cell*, 7, 141–151 (1976); Sharp et al., *Virology*, 75, 442–456 (1976); Sharp, „Adenovirus transcription“, in *The Adenoviruses*, Ginsberg, Hrsg., Plenum Press, New York, NY, Seiten 173–204 (1984)). Jede Region hat wenigstens einen distinkten Promotor und unterliegt einem Processing, um multiple mRNA Spezies zu erzeugen.

**[0013]** Die Produkte der frühen (E) Regionen (1) haben regulatorische Funktionen für die Expression der anderen viralen Komponenten, (2) sind beteiligt bei der allgemeinen Ausschaltung der zellulären DNA Replikation und der Proteinsynthese und (3) sind erforderlich für die virale DNA Replikation. Die komplizierte Serie von Ereignissen, welche die frühe mRNA Transkription regulieren, beginnt mit der Expression von bestimmten sehr frühen Regionen, einschließlich E1A, L1 und dem 13,5 kd Gen (zusammengefasst in Sharp (1984), supra; Horwitz, supra). Die Expression der frühen verzögerten Regionen E1B, E2A, E2B, E3 und E4 ist abhängig von den E1A Genprodukten. Drei Promotoren – der E2 Promotor bei 72 Karteneinheiten („mu“), der Protein IX Promotor und der IVa Promotor – werden gefördert durch den Beginn der DNA Replikation, wobei sie aber nicht davon abhängig sind (Wilson et al., *Virology*, 94, 175–184 (1979)). Ihre Expression kennzeichnet eine mittlere Phase der viralen Genexpression. Das Ergebnis der Kaskade der frühen Genexpression ist der Start der viralen DNA Replikation.

**[0014]** Die adenovirale DNA Replikation verschiebt einen Eltern-Einzelstrang durch die kontinuierliche Synthese in der 5' zu 3' Richtung von den Replikationsstartpunkten an jedem Ende des Genoms (zusammengefasst in Kelly et al., „Initiation of viral DNA replication“, in *Advances in Virus Research*, Maramorosch et al., Hrsg., Academic Press, Inc., San Diego, CA, 34, 1–42 (1988); Horwitz et al., in *Virology*, Raven Press, New York, 2, 1679–1721 (1990); van der Vliet, „Adenovirus DNA replication in vitro“, in *The Eukaryotic Nucleus*, Strauss et al., Hrsg., Telford Press, Caldwell, NJ, 1, 1–29 (1990)). Drei virale Proteine, die für E2 codieren, sind für die adenovirale DNA Synthese essentiell: (1) das einzelsträngige DNA bindende Protein (DBP), (2) die adenovirale DNA Polymerase (Ad pol) und (3) das preterminale Protein (pTP). Zusätzlich zu diesen drei essentiellen Proteinen haben in vitro Experimente viele Wirtszellfaktoren identifiziert, die für die DNA Synthese notwendig sind.

**[0015]** Die DNA Synthese wird durch die kovalente Anheftung eines dCMP Moleküls an einen Serinrest von pTP initiiert. Der pTP-dCMP Komplex fungiert dann als Primer für die Ad pol für die Verlängerung. Der verdrängte Eltern-Einzelstrang kann durch Basenpaarung der terminalen invertierten Sequenzwiederholungen eine Pfannenstielstruktur bilden. Diese terminate Duplexstruktur ist identisch an den Enden des parentalen Genoms und kann als ein Startpunkt für die Initiation der komplementären Strangsynthese dienen. Die Initiation der viralen DNA Replikation scheint essentiell für den Eintritt in die späte Phase zu sein. Die späte Phase der viralen Infektion ist gekennzeichnet durch die Produktion von großen Mengen von viralen Strukturpolypeptiden und von nicht-strukturellen Proteinen, die bei dem Kapsid-Zusammenbau beteiligt sind. Der späte Hauptpromotor (MLP) wird voll aktiv und produziert die Transkripte, die bei 16,5 mu beginnen und nahe am Ende des Genoms terminieren. Das posttranskriptionelle Processing von diesem langen Transkript führt zu fünf Familien von später mRNA, die bezeichnet werden als L1 bis L5 (Shaw et al., *Cell*, 22, 905–916 (1980)). Der Mechanismus, der den Übergang von der frühen zu der späten Phase kontrolliert und der zu solch einer dramatischen Veränderung der transkriptionellen Verwendung führt, ist unklar. Die Anforderung für die DNA Replikation mag

eine cis-Eigenschaft der DNA-Matrize sein, da die späte Transkription nicht bei einem superinfizierenden Virus zu einem Zeitpunkt auftritt, wenn die späte Transkription eines primären Infektionsvirus aktiv ist (Thomas et al., *Cell*, 22, 523–533 (1980)).

**[0016]** Der Zusammenbau des Virions ist von dem ersten Schritt des Zusammenbaus von strukturellen Haupteinheiten aus individuellen Polypeptidketten ein kompliziertes Verfahren (zusammengefasst in Philipson, „Adenovirus Assembly“, in *The Adenoviruses*, Ginsberg, Hrsg., Plenum Press, New York, NY (1984), Seiten 309–337; Horwitz, supra). Hexon, Pentonbasis und Fiber ordnen sich zu trimären Homopolymerformen nach der Synthese im Cytoplasma. Das 100 kd Protein scheint als ein Gerüstprotein für die Hexontrimerisierung zu fungieren. Das erzielte Hexontrimer wird als Hexonkapsomer bezeichnet. Die Hexonkapsomere können sich selbst anordnen, um die Hülle eines leeren Kapsides zu bilden. Die Pentonbasis und die Fibertrimere können miteinander kombinieren, um das Penton zu bilden, wenn die Komponenten innerhalb des Kerns sind. Die Facette des Ikosaeders wird von drei Hexonkapsomeren gebildet, was durch Dissoziierung des Kapsides zu erkennen ist, wobei aber der intermediäre Schritt der Bildung einer Gruppe von neun Hexons noch nicht beobachtet wurde. Verschiedene Intermediate des Zusammenbaus wurden aus Experimenten mit temperatursensitiven Mutanten identifiziert. Der Fortschritt des Kapsidzusammenbaus scheint von Gerüstproteinen abhängig zu sein, 50 kd und 30 kd. Die nackte DNA tritt höchstwahrscheinlich durch eine Öffnung an einem der Vertices in das fast vollständige Kapsid ein. Der letzte Schritt des Prozesses beinhaltet das proteolytische Trimming der Vorläufer-Polypeptide pVI, pVII, pVIII und pTP, was die Kapsidstruktur stabilisiert, die DNA unempfindlich gegenüber einer Nukleasebehandlung macht und ein reifes Virion ergibt.

**[0017]** Replikationsdefiziente Adenoviren sind für eine Reihe von Anwendungen bekannt. Replikationsdefiziente Adenoviren sind zum Beispiel nützlich für den Transfer von Genen und anderen genetischen Elementen, wie Ribozyme, Antisens-RNAs und DNA Segmente, welche diese exprimieren, in Zellen *in vivo* und *in vitro*. Die *in vivo* Anwendungen umfassen die genetische Veränderung von Zellen für diagnostische oder therapeutische Zwecke und das Studium von biologischen Phänomenen, wie Elemente, welche die Proteinhalfwertzeit, Transkriptionsraten und Proteinfunktion steuern. Die *in vitro* Anwendungen umfassen auch das Studium von den oben erwähnten, biologischen Phänomenen und können deshalb vorteilhaft sein, um experimentelle Bedingungen präziser zu steuern.

**[0018]** Bestimmte rekombinante adenovirale Vektoren werden bei der Gentherapie verwendet, nämlich Ad2 und Ad5, die beide Mitglieder der Gruppe C sind. Die Verwendung eines rekombinanten adenoviralen Vektors für den Transfer von einem oder mehreren rekombinanten Genen ermöglicht die zielgerichtete Lieferung dieses Gens oder der Gene zu einem Organ, Gewebe oder Zellen, die behandelt werden müssen, wodurch das Zuführproblem, welches bei den meisten Formen der somatischen Gentherapie auftritt, überwunden wird. Ferner benötigen rekombinante adenovirale Vektoren keine Wirtszellproliferation für die Expression der adenoviralen Proteine (Horwitz et al., supra; Berkner, *Bio Techniques*, 6, 616 (1988)). Falls das erkrankte Organ, das einer Behandlung bedarf, die Lunge ist, hat die Verwendung von Adenovirus als Vektor der genetischen Information den zusätzlichen Vorteil, dass das Adenovirus normal tropisch für das Lungenepithel ist (Straus, in *Adenoviruses*, Plenum Press, New York, Seiten 451–496 (1984)).

**[0019]** Weitere Vorteile der Adenoviren als Vektoren für die humane Gentherapie umfassen: (i) Rekombination ist selten; (ii) das adenovirale Genom (welches linear, doppelsträngige DNA ist) kann gegenwärtig so manipuliert werden, dass es fremde Gene im Größenbereich von wenigstens 7,5 kb in der Länge aufnehmen kann; (iii) ein adenoviraler Vektor inseriert seine DNA nicht in das Chromosom einer Zelle, so dass sein Effekt impermanent ist, und es unwahrscheinlich ist, dass eine Interferenz mit der normalen Zellfunktion der Zelle auftritt; (iv) das Adenovirus kann nicht-teilende oder terminal ausdifferenzierte Zellen infizieren, wie Zellen im Gehirn und in der Lunge; und (v) lebendes Adenovirus, das als eine wesentliche Eigenschaft, die Fähigkeit zur Replikation hat, wurde sicher als humaner Impfstoff verwendet (Horwitz et al., supra; Berkner et al., *J. Virol.*, 61, 1213–1220 (1987); Straus supra; Chanock et al., *JAMA*, 195, 151 (1966); Haj-Ahmad et al., *J. Virol.*, 57, 267 (1986); Ballay et al., *EMBO*, 4, 3861 (1985)).

**[0020]** Fremde Gene wurden in verschiedene Hauptregionen der Gruppe C des adenoviralen Genoms zur Verwendung als Expressionsvektoren eingesetzt, am häufigsten in die E1, E3 und E4 Regionen, wodurch ein einzeln defizientes Adenovirus und davon abstammende Vektoren bereitgestellt werden. Die Insertion in die E1 Region eines Adenovirus führt zu einer defekten Nachkommenschaft, die entweder ein Wachstum in komplexeren Zellen oder die Gegenwart eines Helfervirus erforderlich macht, wobei beide Anforderungen die Funktion der beeinträchtigten oder fehlenden E1 Region *in trans* bereitstellen (Berkner et al., supra; Davidson et al., *J. Virol.*, 61, 1226–1239 (1987); Mansour et al., *Mol. Cell. Biol.*, 6, 2684–2694 (1986)). Beispiele für Zelllinien, welche die Mängel von wesentlichen, adenoviralen Genfunktionen komplementieren, umfassen die hu-

manen embryogenen Nierenzellen, bekannt als HEK-293 (Graham et al., Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 39, 637–650 (1975)), W162 (Weinberg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5383–5386 (1983)), gMDBP (Klessig et al., Mol. Cell. Biol., 4, 1354–1362 (1984); Brough et al., Virology, 190, 624–634 (1992)) und 293/ORF6 Zellen (WO 95/34671, Kovessi et al.).

**[0021]** Die E1 Region des Genoms wurde bisher am häufigsten für die Expression einer fremden Nukleinsäure verwendet. In die E1 Region eingefügten Gene wurden unter die Kontrolle von verschiedenen Promotoren gestellt, und die meisten produzierten große Mengen des fremden Genproduktes in Abhängigkeit von der Expressionskassette.

**[0022]** Die E3 Region ist nicht essentiell für das Viruswachstum in der Gewebekultur und der Ersatz dieser Region durch eine fremde Nukleinsäure-Expressionskassette führt zu einem Virus, der in einer nicht-komplementierenden Zelllinie produktiv wachsen kann. Die Insertion und die Expression des Hepatitis-B-Oberflächenantigens in der E3 Region des Ad5 Virus-Serotyps mit nachfolgender Inokulation und Bildung von Antikörpern im Hamster wurde berichtet (Morin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84, 4626–4630 (1987)). Berichte von analogen E3 Mängeln, die in den Ad4 und in den Ad7 Serotypen geschaffen wurden, wurden auch berichtet (bezüglich Ad4, Chengalvala et al., Vaccine, 9, 485–490 (1991); bezüglich Ad7, Lindley et al., Gene, 138, 165–170 (1994) und Chengalvala et al., J. Gen. Virol., 75, 125–131 (1994)).

**[0023]** Auf dem Gebiet der adenoviralen Gentherapie haben die bisherigen klinischen Studien nur die beiden oben genannten Serotypen der Gruppe C verwendet, nämlich Ad2 und Ad5. Als Beispiele für diese Studien sei verwiesen auf Davidson et al., Nature, 3, 219 (1993), und Mastrangeli et al., J. Clin. Invest., 91, 225–234 (1993). Der Focus der gegenwärtigen Studien hinsichtlich der Serotypen der Gruppe C kann unter dem Gesichtspunkt verstanden werden, dass die überwältigende Mehrheit der Grundlagenforschung zur Charakterisierung der Adenoviren auf Ad2 und Ad5 gerichtet war. Siehe Fields, supra; siehe auch The Adenoviruses (Ginsberg, Hrsg., Plenum Press, New York, NY, 1984). Diese Studien haben gezeigt, dass die Adenoviren der Gruppe C außergewöhnlich effektiv als Übertragungsvehikel für eine Reihe von Zielgeweben sind, einschließlich des respiratorischen Epithels. Siehe z. B. Bajocchi et al., Nature Genetics, 3, 229–234 (1993).

**[0024]** Es gibt jedoch Beschränkungen hinsichtlich der Verwendung der adenoviralen Gentherapievektoren der Gruppe C. Ein Wirt kann eine Immunantwort auf einen besonderen adenoviralen Vektor, der bei der Gentherapie verwendet wird, entwickeln als Ergebnis einer natürlichen Exposition des Wirtes auf den gleichen Typ des Adenovirus vor Beginn der Gentherapie, oder als Ergebnis der Exposition des Wirtes auf den adenoviralen Vektor im Verlaufe der Gentherapie selbst. Eine zelluläre Immunreaktion kann die Lebensspanne der Zellen, die mit dem adenoviralen Vektor infiziert sind, verringern und so die Expression der fremden Nukleinsäure reduzieren und die Gesamteffektivität der Gentherapie verschlechtern. Es wurde tatsächlich empirisch gezeigt, dass eine Hauptbeschränkung der gegenwärtig benutzten, adenoviralen Gentherapiesysteme der Gruppe C die kurze Zeitdauer der dabei erzielten Genexpression ist. Siehe z. B. Crystal et al., Nature Genetics, 8, 42–51 (1994). Ferner kann eine humorale Immunantwort, die zu der Produktion von Antikörpern führt, signifikant die Wirksamkeit der Gentherapie, die einen besonderen adenoviralen Vektor verwendet, reduzieren. Diese Neutralisierung des Adenovirus beeinträchtigt eindeutig die Gentherapie und die in vivo Verwendung der adenoviralen Vektoren für biologische Forschungsanwendungen.

**[0025]** Für viele dieser Anwendungen ist es nützlich, einen replikationsdefizienten Adenovirus eines besonderen Serotyps zu verwenden. Die Gründe dafür sind vielfältig und umfassen die Tatsache, dass ein Serotyp des Adenovirus per Definition nicht auf einen Adenovirus eines anderen Serotyps reagiert. Wenn somit ein Säugetier, einschließlich des Menschen, einem Serotyp des Adenovirus ausgesetzt ist, wird er eine Immunantwort spezifisch gegenüber diesem Stamm des Adenovirus entwickeln, aber nicht gegenüber anderen Stämmen. Somit können verschiedene Stämme verwendet werden, um humorale und zelluläre Immunreaktionen, die spezifisch für andere Adenoviren sind, zu vermeiden. Ferner sind verschiedene Serotypen der Adenoviren tropisch für unterschiedliche Zelltypen. Ein replikationsdefizientes Adenovirus, das nützlich bei dem Transport von Passagiergenen in einen Zelltyp ist, kann weniger optimal als ein zweites Adenovirus für den Transport von diesem Passagiergenen in einen zweiten Zelltyp sein. Es gibt somit ein Bedürfnis für replikationsdefiziente Adenoviren von mehreren Stämmen. Falls jedoch jeder adenovirale Stamm seine eigene komplementierende Zelle erfordert, selbst wenn diese komplementierende Zelle durch Koinfektion mit einem Helfervirus geschaffen wird, wäre es ein teures, langweiliges und zeitaufwendiges Verfahren, um eine neue komplementierende Zelllinie für jeden adenoviralen Serotyp zu erzeugen.

**[0026]** Die Komplementierung eines replikationsdefizienten Adenovirus einer Serogruppe mit einem Helfervirus von einer verschiedenen Serogruppe ist beschrieben in Brasco et al. (1981, J. Virol. 39(1):300–305) und

Breiding et al. (1988, Virol. 164(2):390–402).

**[0027]** Demgemäß wurde ein Verfahren zur Herstellung von adenoviralen Vektoren, die nicht der Gruppe C angehören, ausgedacht und ist Gegenstand des US-Patentes 5,837,511. Das '511 Patent offenbart, dass in überraschender Weise komplementäre Zelllinien, wie HEK-293, die hergestellt wurden oder hergestellt werden können für die Komplementation von Replikationsmängeln in Gruppe C Vektoren, verwendet werden können, um die Herstellung von adenoviralen Vektoren der Nicht-Gruppe C zu komplementieren. Die Verwendung von solchen Gruppe C komplementierenden Zelllinien für die Komplementierung des Wachstums von Nicht-Gruppe C Vektoren führt jedoch zu einer schwachen Komplementation. Unglücklicherweise macht diese schwache Komplementation es schwierig, reine Stämme (das heißt, nicht durch Wildtypvirus kontaminiert) von E1-defizienten, adenoviralen Vektoren eines Nicht-Gruppe C Serotyps zu gewinnen und zwar insbesondere, wenn die Verwendung einer homologen Rekombination eines isolierten Arms des Virus benutzt wird, um E1-defiziente Nicht-Gruppe C Vektoren herzustellen.

**[0028]** Ferner ist die Herstellung von adenoviralen Vektoren der Gruppe C in komplementierenden Zelllinien, die für Nicht-Gruppe C Adenoviren entwickelt wurden, nützlich, da unter anderem die Rekombination zwischen dem Genom der komplementierenden Zelllinie und des Gruppe C Adenovirus außerordentlich ungünstig ist.

**[0029]** Demgemäß besteht Bedarf für ein verbessertes Verfahren zum Herstellen von E1-defizienten, adenoviralen Vektoren und zwar insbesondere dort, wo die Defizienz in E1 zu einem Replikationsmangel führt. Die vorliegende Erfindung versucht solche Vektoren und Verfahren zur Herstellung von diesen Vektoren bereit zu stellen. Diese und andere Aufgaben und Vorteile gemäß der vorliegenden Erfindung sowie zusätzliche erfindungsgemäße Merkmale werden aus der Beschreibung der hier vorliegenden Erfindung deutlich werden.

**[0030]** Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Herstellen eines replikationsdefizienten Adenovirus bereit, das ein Passagiergen umfasst, wobei das replikationsdefiziente Adenovirus einen ersten Serotyp hat, der zu einer ersten Serogruppe gehört, und ein Genom hat, welches defizient in einer essentiellen Genfunktion der E1 Region des adenoviralen Genoms ist, wobei das Verfahren umfasst:

- (a) Transfer einer ersten DNA, welches das adenovirale Genom und das Passagiergen umfasst, in eine Zelle, wobei die Zelle eine zweite DNA umfasst, die stabil in das Genom der Zelle eingebaut ist, wobei die zweite DNA eine oder mehrere essentielle Genfunktionen der E1 Region eines adenoviralen Genoms umfasst, das von einem Adenovirus abstammt, welches einen zweiten Serotyp hat, der zu einer zweiten Serogruppe gehört, und
- (b) Transfer einer dritten DNA, welche eine oder mehrere Genfunktionen der E4 Region eines adenoviralen Genoms umfasst, das von einem Adenovirus abstammt, welches einen dritten Serotyp hat, der zu der zweiten Serogruppe gehört, in eine Zelle, wobei die Genfunktionen der E4 Region aus der Gruppe ausgewählt werden, welche aus der E4/ORF6 Genfunktion, der E4/ORF3 Genfunktion, der E4/ORF4 Genfunktion und der E4/ORF6/7 Genfunktion besteht, wobei die erste Serogruppe verschieden von der zweiten Serogruppe ist, und
- (c) Erhaltung der Zelle, um das replikationsdefiziente Adenovirus zu produzieren.

**[0031]** Nach einer Ausführungsform der Erfindung wird die erste Serogruppe aus der Gruppe ausgewählt, die aus A, B, D, E und F besteht.

**[0032]** Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung sind der zweite Serotyp und der dritte Serotyp gleich.

**[0033]** Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung umfassen die Genfunktionen der E4 Region des adenoviralen Genoms die E4/ORF6 Genfunktion.

**[0034]** Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung umfassen die essentiellen Genfunktionen der E1 Region des adenoviralen Genoms eine essentielle Genfunktion der E1B Region des adenoviralen Genoms.

**[0035]** Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird eine Genfunktion der E1 und E4 Regionen eines adenoviralen Genoms von der DNA exprimiert, die in das Genom der Zelle eingebaut ist.

**[0036]** Bei einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden alle Genfunktionen der E1 und E4 Regionen eines adenoviralen Genoms von DNA exprimiert, die in das Genom der Zellen eingebaut ist.

**[0037]** Gemäß einer weiteren Ausführungsform der Erfindung ist die Zelle eine 293/ORF6 Zelle.

**[0038]** Nach einer anderen Ausführungsform der Erfindung wird wenigstens eine Genfunktion der E1 und E4 Regionen eines adenoviralen Genoms von der DNA exprimiert, die von einem Helfervirus bereitgestellt wird.

**[0039]** Gemäß einer anderen Ausführungsform der Erfindung werden alle Genfunktionen der E4 Region eines adenoviralen Genoms von der DNA exprimiert, die von einem Helfervirus bereitgestellt wird.

**[0040]** Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die DNA, welche das adenovirale Genom umfasst, mittels Infektion in die Zelle transferiert.

**[0041]** In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die Zelle mit einer Mischung von Adenoviren infiziert und das replikationsdefiziente Adenovirus wird Plaque-gereinigt.

**[0042]** In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die DNA, die das adenovirale Genom umfasst, mittels Transfektion in die Zelle transferiert.

**[0043]** Bei einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wird die DNA, die das adenovirale Genom umfasst, auf wenigstens zwei getrennten DNA-Segmenten bereitgestellt.

**[0044]** Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zum Herstellen eines replikationsdefizienten Adenovirus bereit, das defizient in der E1 Region des adenoviralen Genoms ist, welches ein Passagiergen umfasst, wobei das Verfahren die Notwendigkeit für eine getrennte, komplementierende Zelle für jeden adenoviralen Stamm vermeidet.

**[0045]** E1 defiziente Adenoviren der Gruppe C wachsen effektiv in Zellen, die in trans das defiziente essentielle Genprodukt bereitstellen, wenn das essentielle Genprodukt von einem Adenovirus des gleichen oder eines ähnlichen Serotyps abstammt (z. B. E1 defiziente Ad2 und Ad5 wachsen gut in 293 Zellen). Ferner sind Zellen, die effizient für essentielle Genfunktionsdefekte komplementieren, nicht notwendigerweise wirksam für die Komplementierung des Wachstums von replikationsdefizienten Adenoviren von anderen Serotypen. Zum Beispiel wächst ein E1 defizientes Ad5 (von der Serogruppe C) deutlich besser in 293 Zellen als ein homologes, E1 defizientes Ad7 (von der Serogruppe B). Ohne an eine besondere Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass die 293 Zellen in der Lage sind, das Wachstum von Adenoviren der Gruppe C im Vergleich zu anderen Adenoviren besser zu komplementieren, da die E1 Genprodukte in den 293 Zellen von einem Adenovirus der Gruppe C abstammen.

**[0046]** Bei dem vorliegenden erfindungsgemäßen Verfahren wird ein replikationsdefizientes Adenovirus, das eine Genomdefizienz in einer essentiellen Genfunktion der E1 Region des adenoviralen Genoms hat (oder von DNA Segmenten, die das Genom eines replikationsdefizienten Adenovirus umfassen) in eine komplementierende Zelle übertragen. Wenn das Genom von mehr als einem DNA Segment oder in einer diskontinuierlichen Weise getragen wird, erfolgt eine homologe Rekombination oder DNA Ligation innerhalb der Zelle, wodurch ein replikationsdefizientes, adenovirales Genom erzeugt wird. Alternativ kann ein replikationsdefizientes Adenovirus in die Zelle eingebracht werden oder seine DNA kann in die Zelle durch jede geeignete Transfektionstechnik, die im Stand der Technik bekannt ist (z. B. Elektroporation) inseriert werden. Die komplementierende Zelle stellt in trans bereit: Eine oder mehrere essentielle Genfunktionen der E1 Region eines adenoviralen Genoms und eine oder mehrere Genfunktionen der E4 Region eines adenoviralen Genoms. In überraschender Weise erlaubt diese Bereitstellung in trans von beiden E1 und E4 Funktionen in der Zelle im Gegensatz zu der Bereitstellung von nur den E1 Funktionen, die gesteigerte Produktion eines replikationsdefizienten Adenovirus, wenn der Serotyp des Adenovirus, von dem das in trans bereitgestellte, essentielle E1 Produkt abstammt, und der Serotyp des replikationsdefizienten Adenovirus zu unterschiedlichen Serogruppen gehören. Die Zelle, die das replikationsdefiziente Adenovirus-Genom umfasst, wird dann in Kultur über einen ausreichenden Zeitraum gehalten, um den replikationsdefizienten Adenovirus zu erzeugen. Das replikationsdefiziente Adenovirus kann mit jedem geeigneten Verfahren geerntet werden, um einen Stamm des replikationsdefizienten Adenovirus bereitzustellen.

**[0047]** Ohne an eine besondere Theorie gebunden zu sein, nimmt der Anmelder jedoch an, dass das E4 Genprodukt und das essentielle E1 Genprodukt funktionell miteinander agieren, um das Adenovirus vollständiger zu komplementieren. Die Fähigkeit zur funktionellen Interaktion scheint innerhalb eines Serotyps absolut konserviert zu sein, während die Konservierung zwischen unterschiedlichen Serotypen einer Serogruppe weniger ausgeprägt und zwischen Viren von unterschiedlichen Serogruppen scheint keine Konservierung vorzuliegen. Es ist somit klar zu verstehen, dass in einigen Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung es bevorzugt ist, dass die essentiellen Genprodukte der E1 und E4 Regionen des adenoviralen Genoms von der gleichen



Serogruppe abstammen, wobei es mehr bevorzugt ist, dass sie von dem gleichen Serotyp abstammen.

**[0048]** Die E4 Region enthält nur eine essentielle Genfunktion, wobei diese Genfunktion zumindest teilweise redundant mit der E4 Region des adenoviralen Genoms ist. Dies bedeutet, obwohl die E4/ORF6 Genfunktion oft als die essentielle Genfunktion der E4 Region des adenoviralen Genoms bezeichnet wird, diese Ansicht in einigen Aspekten zu einfach sein kann. Die E4/ORF3 Genfunktion kann zum Beispiel teilweise das E4/ORF6 Genprodukt ersetzen. Zusätzlich wurde E4/ORF6/7 gelegentlich als die essentielle E4 Genfunktion definiert. Jedoch haben die Komplementation und andere Studien gezeigt, dass die einzelne Genfunktion der E4 Region, welche notwendig ist und optimal die Deletion der gesamten E4 Region komplementiert, ORF6 ist. Somit ist die essentielle Genfunktion der E4 Region des adenoviralen Genoms, das in trans bereitgestellt wird, vorzugsweise die E4/ORF6 Genfunktion für viele Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung.

**[0049]** Ohne an eine besondere Theorie gebunden zu sein, wird angenommen, dass das ORF6 Genprodukt vorzugsweise mit dem Genprodukt der E1B Region des adenoviralen Genoms interagiert. Demgemäß ist die essentielle Genfunktion der E1 Region des adenoviralen Genoms, das in trans bereitgestellt wird, vorzugsweise die E1B Genfunktion für viele Ausführungsformen gemäß der vorliegenden Erfindung.

**[0050]** Von dem E1B Genprodukt ist auch bekannt, dass es mit dem nicht-essentiellen Genprodukt von E4/ORF4 interagiert. Die vorliegende Erfindung umfasst somit auch, dass das E4 Genprodukt, welches durch die komplementierende Zelle in trans bereitgestellt wird, das E4/ORF4 Genprodukt ist.

**[0051]** Es ist oft nützlich, eine Zelllinie zu etablieren, welche die Genfunktionen der E1 und E4 Regionen von der DNA bereitstellt, die stabil in der Zelle eingebaut ist, vorzugsweise in das Genom der Zelle. Solche Zelllinien vermeiden die Notwendigkeit eine komplementierende Zelllinie zu schaffen, wenn der Fachmann die Herstellung eines replikationsdefizienten Adenovirus wünscht. Alternativ kann entweder die Genfunktion der E1 oder der E4 Region stabil in die Zelle eingebaut werden, was dann die transiente Bereitstellung der anderen Genfunktion erfordern würde. Dies wird am einfachsten in der gut bekannten HEK-293 Zelllinie dargelegt, die bereits die essentiellen Genfunktionen der E1 Region enthält. Ein Helfervirus, das E4/ORF6 in einer 293 Zelle exprimiert, wird zum Beispiel in geeigneter Weise zu einer komplementären Zelle führen. Alternativ kann eine 293/ORF6 Zelllinie als die komplementierende Zelllinie, die im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung nützlich ist, verwendet werden. Die Technologie hinsichtlich des Herstellens einer 293/ORF6 Zelle und anderen Zellen, die stabil die DNA einbauen und exprimieren, welche beide, E1 und E4 essentielle Genfunktionen bereitstellt, ist im Stand Technik gut bekannt und zum Beispiel beschrieben in der internationalen Patentanmeldung WO 95/34671 (Kovesdi et al.).

**[0052]** WO 95/34671 offenbart, das komplementäre Zelllinien für replikationsdefiziente Adenoviren, denen die E1 und E4 Regionen des adenoviralen Genoms fehlen, durch Einbau von DNA-Segmenten, welche für die essentiellen Genprodukte codieren, in das Genom der Zelllinie hergestellt werden können. Diese DNA-Segmente werden operabel mit Promotoren verbunden, welche die Expression von ausreichenden Mengen des oder der Genprodukte steuern, um die Replikation des replikationsdefizienten (E1<sup>-</sup>, E4<sup>-</sup>) Adenovirus zu ermöglichen. WO 95/34671 lehrt auch, dass die essentiellen Genfunktionen der E4 Region schädlich für die Wirtszelle sind. Es ist somit sinnvoll, einen regulierbaren Promotor zu verwenden, so dass die Genfunktion der E4 Region nur dann bereitgestellt wird, wenn das replikationsdefiziente Adenovirus die toxischen Genprodukte für seine Replikation braucht. In ähnlicher Weise beeinflussen die essentiellen Genfunktionen der E1 Region die Eigenschaften der Wirtszelle. Es ist somit auch nützlich, die E1 Genfunktionen unter die Kontrolle eines regulierbaren Promotors zu stellen.

**[0053]** Während es bestimmte, klare Vorteile für den stabilen Einbau der E1 und E4 Genfunktionen in die komplementierende Zelle gibt, gibt es auch andererseits deutliche Gründe dafür, diese Funktionen in einer transienten Weise bereitzustellen. So kann zum Beispiel wenigstens eine essentielle Genfunktion der E1 Region und eine Genfunktion der E4 Region eines adenoviralen Genoms in trans durch einen Helfervirus bereitgestellt werden, das diese Genfunktionen produziert, wenn es eine Zelle infiziert. In ähnlicher Weise kann eine komplementierende Zelle durch Transfektion einer Wirtszelle mit Plasmiden oder anderen DNA-Elementen geschaffen werden. Vorzugsweise wird bei dieser oder jeder anderen Ausführungsform ein hoch effizientes Verfahren der Transfektion oder Infektion verwendet oder die transfizierten Zellen werden alternativ unter Selektionsdruck, zum Beispiel durch Verwendung von Antibiotika, durch ein Plasmid gestellt, das ein Antibiotikaresistenzgen trägt. Signifikante Vorteile der transienten Bereitstellung der DNA(s), welche für die komplementierenden Genfunktionen codiert, umfassen, sind aber nicht beschränkt auf, dass eine Zelllinie nicht aufrecht erhalten zu werden braucht, und dass die relativ schnelle Entwicklung einer komplementierenden Zelle.

**[0054]** Gemäß der obigen Beschreibung kann die DNA, welche das replikationsdefiziente, adenovirale Genom umfasst, mittels Infektion in die komplementierende Zelle eingebracht werden. Dieses Verfahren des Einbringens in die komplementierende Zelle von DNA, welche das adenovirale Genom umfasst, ist insbesondere nützlich, wenn ein besonderer adenoviraler Stamm das gewünschte, replikationsdefiziente Adenovirus und einen anderen Typ des Adenovirus umfasst. In diesem Fall kann das gewünschte replikationsdefiziente Adenovirus eines ersten Serotyps einfacher Plaquegereinigt werden, da bei Bereitstellung der essentiellen Genprodukte der Region E1 und E4 eines zweiten (oder zweiten und dritten) Serotyps durch die komplementierenden Zellen das Verhältnis von Partikel zu plaqueformender Einheit deutlich auf das 3- bis 5-fache abfällt. Dieser Abfall in dem Verhältnis von Partikel zu plaqueformender Einheit (für das replikationsdefiziente Adenovirus) bedeutet, dass ein kontaminierendes Virus (d. h., nicht das gewünschte, replikationsdefiziente Adenovirus) signifikant weniger wahrscheinlich in einem gegebenen Plaque vorliegt. Ferner zeigt der Abfall in dem Verhältnis von Partikel zu plaqueformender Einheit an, dass das Niveau der Komplementation der Defizienz des replikationsdefizienten Adenovirus zugenommen hat. Somit würde jeder potentielle Wachstumsvorteil eines kontaminierenden Adenovirus herabgesetzt sein. Die vorliegende Erfindung stellt somit ein verbessertes Verfahren der Plaquereinigung eines replikationsdefizienten Adenovirus bereit, das in einer komplementierenden Zelllinie hergestellt wird, welche eine komplementierende essentielle Genfunktion eines Adenovirus exprimiert, das zu einer verschiedenen Serogruppe gehört.

**[0055]** Ein anderes Verfahren für die Übertragung der DNA, welche das replikationsdefiziente, adenovirale Genom umfasst, in die komplementierende Zelle, ist die Transfektion. Diese Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens umschließt die Transfektion, wobei das adenovirale Genom auf wenigstens zwei getrennten DNA-Segmenten bereitgestellt wird. Bei dieser Ausführungsform kann das replikationsdefiziente, adenovirale Genom in einem Schritt geschaffen, vermehrt und verpackt werden.

**[0056]** Multiple Zelllinien, welche die Mängel in essentiellen Genfunktionen von Ad2 oder Ad5, welche Adenoviren der Gruppe C sind, komplementieren, wurden zuvor schon entwickelt. Diese Zelllinien umfassen insbesondere solche, die für Mängel der essentiellen E1 Genfunktionen komplementieren, wie HEK-239 Zellen und 293/ORF6 Zellen. In Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung erlauben diese Zelllinien, und zwar insbesondere solche, die für die essentielle E1A Genfunktion komplementieren, die Schaffung eines replikationsdefizienten Adenovirus in einer Zelllinie, die bereits für die Vermehrung von Adenoviren der Gruppe C etabliert worden ist, wobei dieses Adenovirus zu Antikörpern reaktiv ist, die spezifisch für ein Adenovirus der Gruppe A, B, D, E oder F sind, aber nicht notwendigerweise mit den Antikörpern reagiert, und wobei dieses Adenovirus in der Lage sind, eine Infektion eines Adenovirus der Gruppe C zu neutralisieren. Mit Neutralisation ist die Fähigkeit eines Antikörpers, der in stöchiometrischen Mengen an ein Virus bindet (d. h., 1 Antikörper an 1 Viruspartikel), gemeint, die Infektion einer geeigneten Wirtszelle mit diesem Virus zu verhindern. Das replikationsdefiziente Adenovirus ist gekennzeichnet durch den Einbau eines adenoviralen DNA-Segmentes, das aus einem Adenovirus oder substantiell homolog zu einem DNA-Segment, das in einem Adenovirus enthalten ist, isoliert wurde. Selbstverständlich kann das Adenovirus optional ein Passagieren tragen.

**[0057]** Während das adenovirale DNA-Segment, welches ein Teil des vorliegenden, erfindungsgemäßen, adenoviralen Vektors darstellt, vorzugsweise aus einem Adenovirus isoliert wird, kann das adenovirale DNA-Segment im wesentlichen auch homolog zu einem DNA-Segment sein, das in solch einem Adenovirus enthalten ist. Der Ausdruck „im wesentlichen homolog“, so wie er hier verwendet wird, bezieht sich auf die Fähigkeit von zwei Nukleinsäuren zur Hybridisierung unter wenigstens moderat stringenten Hybridisierungsbedingungen. Stringenz der Hybridisierung ist ein Fachausdruck, der sich auf Bedingungen bezieht, die für eine Hybridisierungsreaktion verwendet werden, wo komplementäre Einzelstränge von einer Nukleinsäure miteinander sich verbinden, um eine doppelsträngige Nukleinsäure mit einem gewissen Maß an Fehlpaarung zu bilden, wobei das Maß davon eine Funktion der verwendeten Stringenz ist. Die Stringenz hängt insbesondere von der Größe und der Zusammensetzung der Stränge der Nukleinsäure, die miteinander reagieren sollen, von dem Maß der erlaubten Fehlpaarung, von der gewünschten Kreuzreaktivität und von ähnlichen Bedingungen ab. Das Maß der Stringenz kann beeinflusst werden durch die verwendeten ionischen Bedingungen und der Temperatur und anderen Bedingungen, wie es im Stand der Technik gut bekannt ist (Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual (2. Ausgabe 1989)).

**[0058]** Wie in Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet, definiert die spezifische Stringenz der Hybridisierung zum Teil das erfindungsgemäße DNA-Segment. Demgemäß sind die Hybridisierungsbedingungen in geeigneter Weise so ausgewählt, dass sie wenigstens moderat stringent oder stringent sind. Im ersten Fall werden die geeigneten Bedingungen hinsichtlich Salz, Temperatur, Reaktionsmischung und Größe der Nukleinsäure-Reaktanten gemäß konventioneller Kenntnis eingestellt, um eine etwa 45 % bis etwa 80 % Fehlpaarung der Sequenz der Nukleotide der Nukleinsäure bereitzustellen.

**[0059]** Moderat stringente Hybridisierungsbedingungen werden vorzugsweise so festgelegt, um eine ca. 55 % bis ca. 75 % Fehlpaarung bereitzustellen, wobei solche Bedingungen mehr bevorzugt sind, wo eine ca. 60 % bis ca. 70 % Fehlpaarung bereitgestellt wird. Im zweiten Fall werden die geeigneten Bedingungen für die Hybridisierung gemäß bekannten Kenntnissen eingestellt, um eine ca. 10 % bis ca. 40 % Fehlpaarung bereitzustellen. Vorzugsweise sind die stringenten Hybridisierungsbedingungen so, um eine ca. 20 % bis 40 % Fehlpaarung bereitzustellen, wobei mehr bevorzugt solche Bedingungen sind, die eine ca. 30 % bis ca. 40 % Fehlpaarung bereitstellen. Mit Fehlpaarung ist das Ausmaß gemeint, mit dem nicht-komplementäre Basenpaare gegenüberliegend in einer ansonsten Duplex-DNA gefunden werden. Dadurch werden Blasenstrukturen gebildet und die Schmelztemperatur der Duplex im Vergleich zu einer 100 % korrekt gepaarten Duplex der gleichen Länge und der gleichen Basenzusammensetzung ist herabgesetzt.

**[0060]** Der vorliegende, erfindungsgemäße, adenovirale Vektor umfasst ferner vorzugsweise ein Passagiergen, das in typischer Weise innerhalb einer Wirtszelle für ein Produkt codieren und dieses exprimieren wird, welches eine Untersuchungs- (wie Markergene), therapeutische und/oder prophylaktische Verwendung hat. Solch ein Passagiergen codiert für RNA, Anti-sense RNA, ein synthetisches Oligonukleotid und/oder ein Polypeptid. Passagiergene mit einer therapeutischen Verwendbarkeit umfassen Gene, die für eine fehlende oder beschädigte Genfunktion codieren, wie das Transmembranregulatorgen der zystischen Fibrose (CFTR), welches mit der zystischen Fibrose (CF) assoziiert ist. Fremde Nukleinsäuren mit einer prophylaktischen Verwendbarkeit umfassen Gene, die für ein Genprodukt codieren, das die Fähigkeit zur direkten oder indirekten Verhinderung einer Krankheit besitzt, wie mittels Bereitstellung einer Quelle für ein Polypeptid oder ein anderes Antigen, um eine Immunreaktion dagegen hervorzurufen.

**[0061]** Die vorliegende Erfindung wird im Folgenden durch Beispiele weiter verdeutlicht, die jedoch nicht in irgendeiner Weise limitierend für den Umfang der vorliegenden Erfindung anzusehen sind.

#### Beispiel 1

**[0062]** Dieses Beispiel zeigt die Deletion der E1A Region von der adenoviralen DNA des Ad7a Virus der Gruppe B, wodurch große virale Fragmente erzeugt werden.

**[0063]** Das Ad7a Virus wurde verwendet für die Inokulation von HEK-293 Zellen in einem modifizierten Eagle's Medium mit 5 % Pferdeserum bei einer Infektionsmultiplizität von 100. Die DNA wurde aus geernteten Ad7a Viren isoliert, wobei die Verfahren verwendet wurden, die beschrieben sind in Falck-Pedersen in Cell Biology: A Laboratory Manual (Spector et al., Hrsg., Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1994). Die Ad7a DNA wurde dann einem Restriktionsendonukleaseverdau mit Aat II gemäß Dijkema et al., Gene, 12, 287 (1980) unterworfen, wodurch ein 1,483 kb kleines Fragment (Fragment 1) an der linken Seite, ein großes Fragment von etwa 30 kb, das in der Mitte des Genoms lokalisiert ist (Fragment 2), und ein zweites großes Fragment von 5 kb an der rechten Seite (Fragment 3) erzeugt wurden. Das kleine Fragment umfasst den Replikationsstartpunkt und Verpackungssequenzen sowie die frühe Region E1A, welche für die DNA-Replikation notwendig ist. Die großen Fragmente enthalten die anderen frühen Gene sowie die späten Gene, die für die Produktion von neuen Virionen notwendig sind.

**[0064]** Die großen Fragmente 2 und 3 werden co-gereinigt und isoliert von dem kleinen Fragment durch Trennung mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation. Ein 10 % bis 20 % kontinuierlicher Saccharosegradient mit einem 40 % Saccharosekissen wurde mit der Aat II geschnittenen Ad7a DNA überschichtet. Nach Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert. Die Fraktionen, welche die gereinigten großen Fragmente enthielten, wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert und mittels Ethidiumbromid-Anfärbung visualisiert.

**[0065]** Die Fraktionen, welche die großen Fragmente, die frei von den kleinen Fragmenten waren, enthielten, wurden zusammengefasst und mittels Präzipitation und nachfolgender Rekonstitution in einem kleineren Volumen konzentriert. Die zusammengefassten DNA-Segmente wurden in den nachfolgenden Schritten bei der Herstellung des Ad7a replikationseffizienten Virus aufgrund der Gegenwart der großen Fragmente (2 und 3) und der Abwesenheit des kleinen Fragmentes (1) verwendet, da bekannt war, dass sie die Region E1A enthielten.

#### Beispiel 2

**[0066]** Dieses Beispiel beschreibt die Erzeugung des Plasmides pAd7aCMV-CATgD. Das Plasmid pAd7aCMV-CATgD wurde durch directionales Cloning in drei aufeinander folgenden Schritten hergestellt.

**[0067]** Zunächst wurden unter Verwendung der Polymerasekettenreaktion (PCR) bis zu 475 Basenpaare an dem linken Ende des Ad7a Genoms (lokalisiert zwischen 0 und 1,3 Karteneinheiten ( $\mu$ ) auf dem Ad7a Genom) amplifiziert und isoliert. Die für die Amplifikation verwendeten Primer enthielten eine Sac I Stelle (linkes Ende des Primers) und eine Not I Stelle (rechtes Ende des Primers). Die amplifizierte DNA enthielt den essentiellen Startpunkt (ori) und Verpackungssequenzen (pkg). Die frühen Regionen E1A und ein Teil von E1B, lokalisiert zwischen 1,3 und 7,7  $\mu$ , wurden nicht amplifiziert. Ein Klonierungsvektor, pBS (Stratagene Cloning Systems, La Jolla, CA), wurde dann mit SacI-NotI geöffnet und das PCR Fragment SacI-ori/pkg-NotI wurde darin eingefügt.

**[0068]** Unter Verwendung von Standardverfahren wurde zweitens der pBS Vektor mit NotI-Sall geöffnet und der Cytomegalovirus-Promotor (CMV) wurde an ori und die pkg Elemente ligiert, gefolgt von der bakteriellen Chloramphenicol-Acetyltransferasesequenz (CAT) und der Maus B-maj Globin poly-(A) Stelle.

**[0069]** Drittens wurde eine Region von 2,8 bis 4,0 kb für Überlappungsrekombination mit dem Ad7a Genom durch einen ersten und einen zweiten PCR Primer erzeugt. Der erste Primer enthielt eine Nhe I Stelle, angrenzend an eine Sal I Stelle, angrenzend an die Sequenz von Ad7a von und umfassend die Position 2880 bis und umfassend die Position 2816. Der zweite Primer enthielt eine Apa I Stelle, angrenzend an eine Kpn I Stelle, angrenzend an die Sequenz von Ad7a von und umfassend die Position 4000 bis und umfassend die Position 3986.

**[0070]** Dieses Überlappungsrekombinations-Fragment ist angeordnet an 7,7 bis 11,1  $\mu$  auf dem Ad7a Genom. Der pBS Vektor wurde dann mit Sal I-Kpn I geöffnet und das PCR Fragment Sall-Ad7 Überlappung DNA 2,8–4,0 kb-Kpn I wurde darin inseriert, d. h., an das oben erwähnte DNA-Konstrukt nach der poly-(A) Stelle ligiert. Auf diese Weise wurde das pAd7aCMV-CATgD Plasmid erzeugt.

### Beispiel 3

**[0071]** Dieses Beispiel beschreibt die Bildung eines rekombinanten Ad7-CAT Adenovirus und zeigt die Fähigkeit des rekombinanten Ad7a Adenovirus, sich in HEK-293 Zellen zu replizieren und zu komplementieren durch diese Zellen.

**[0072]** Verschiedene Mikrogrammanteile der großen viralen Fragmente, die gemäß Beispiel 1 hergestellt wurden, und des Plasmides pAd7aCMV-CATgD, hergestellt gemäß Beispiel 2, wurden auf Monoschichten von HEK-293 Zellen ( $10^6$  Zellen pro 60 mm Schale) durch Calciumphosphatfällung transfiziert. Nach einer Woche wurden die Zellen geerntet und ein Viruslysate wurde durch wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen erzeugt. Ein 10 % Anteil des erzielten Lysates (0,5 ml) wurde verwendet, um eine frische Monoschicht von HEK-293 Zellen zu infizieren. Nach 24 Stunden wurden diese Zellen geerntet und die Lysate hergestellt. Die Lysate wurden auf Reporterogenaktivität getestet, d. h., auf Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität, unter Verwendung des Verfahrens, das offenbart ist in Gorman et al., Mol. Cell Biol., 2, 1044–1051 (1982) und Gorman et al., PNAS, 79, 6777–6781 (1982). Die erzielten, viralen Konstrukte wurden auf ihre Fähigkeit zur Induktion einer CAT Aktivität getestet. Unter Bedingungen, wo keine CAT Aktivität in dem Gorman et al. Test beobachtet wurde (zum Beispiel Transfektionen unter keiner Beteiligung von exogener CAT cDNA), zeigten einige Konstrukte eine bis zu 50 %-ige Acetylierung des Chloramphenicols, was die erfolgreiche Herstellung der vitalen Konstrukte zeigt.

### Beispiel 4

**[0073]** Dieses Beispiel bestätigt auch die Erzeugung des rekombinanten Ad7-CAT Adenovirus und die Fähigkeit des rekombinanten Ad7 Adenovirus in HEK-293 Zellen zu replizieren und dort zu komplementieren. Insbesondere beschreibt dieses Beispiel den Test eines sekundären Viruslysates auf CAT Genexpression.

**[0074]** Ein 1,0 ml Aliquot des gemäß Beispiel 3 erzeugten, primären Lysates wurde für die Infektion einer 60 mm Schale von HEK-293 Zellen verwendet. Nach Inkubation für 1 Woche wurden die Zellen geerntet und die Lysate wurden wie in Beispiel 3 erzeugt. Ein 10 % Anteil von jedem Lysat wurde dann verwendet, um eine frische Monoschicht von HEK-293 Zellen zu infizieren. Das davon erzielte Lysat wurde auf CAT Aktivität getestet.

**[0075]** Die Ergebnisse von diesen CAT Tests zeigten, dass die Transfektion von 4,8 mg des großen Fragmentes, das mit etwa einer gleichen Masse von zirkulärem Plasmid kombiniert war, zu einer starken CAT Aktivität in einem zweiten Lysat führt, was das Ergebnis der viralen Aktivität der Nachkommenschaft der anfangs geernteten, rekombinanten Viruspartikel ist.

**[0076]** Ausgewählte Zelllysate wurden dann charakterisiert durch die Infektion von HEK-293 Zellen und die Ernte der viralen DNA durch ein modifiziertes Hirt-Verfahren (Falck-Pedersen, supra). Gereinigte, virale DNA wurde mit Aat II geschnitten, um die rekombinante DNA zu charakterisieren. Kontroll-DNA wurde aus Wildtyp Ad7a und aus Wildtyp Ad5 Adenoviren genommen. Die visuelle Analyse der Restriktionsfragmentgrößen (getrennt durch Agarosegel-Elektrophorese) bestätigte, dass geeignete DNA Konstrukte erzielt worden waren.

#### Beispiel 5

**[0077]** Ein modifiziertes Virusausbeuteexperiment in 293 und A549 Zellen wurde durchgeführt, um die gemäß den vorangegangenen Beispielen hergestellte Ad7-CAT zu charakterisieren. Die CAT Aktivität von Ad7-CAT wurde mit einer homologen Ad5-CAT (abstammend von Ad5 und nach einer identischen Weise hergestellt) in den 293 und A549 Zellen verglichen. Wenn 293 Zellen mit einem Partikel von Ad5-CAT infiziert waren, gab es, wie erwartet, eine signifikante CAT Aktivität in den zellulären Lysaten, die 18 Stunden nach Infektion geerntet wurden. Auch wuchs die CAT Aktivität gemäß der Erwartung in einer Ad5-CAT dosisabhängiger Weise an. Im Gegensatz dazu produzierte Ad7-CAT keine nachweisbare CAT Aktivität in den 293 Zellen bis das Verhältnis von Viruspartikel zu Zelle auf etwa 10 : 1 anstieg. Bei einem Verhältnis von Viruspartikel zu Zelle von 10 : 1 ist Ad5-CAT etwa 35-fach effektiver hinsichtlich der Produktion von CAT als Ad7-CAT. Ferner ist die CAT Aktivität, die von Ad7-CAT bei einem Verhältnis von Viruspartikel zu Zelle von 1.000 : 1 hergestellt wurde, etwa die gleiche Aktivität wie die, die erzielt wird von Ad5-CAT bei einem Verhältnis von Viruspartikel zu Zelle von 10 : 1. Sowohl Ad5-CAT als auch Ad7-CAT ergab nur ein niedriges (zwei Größenordnungen niedriger als Ad7-CAT in 293 Zellen) Niveau an CAT Aktivität in A549 Zellen. Dieses Beispiel zeigt, dass Ad7-CAT durch 293 Zellen nicht wirksam komplementiert wird, und dass Ad7-CAT in einer essentiellen Genfunktion der E1 Region des adenoviralen Genoms defizient ist.

#### Beispiel 6

**[0078]** Dieses Beispiel zeigt die gestiegene Effizienz der Komplementation eines E1 defizienten Adenovirus der Nicht-Gruppe C in 293/ORF6 Zellen im Vergleich zu der Effizienz der Komplementation in 293 Zellen.

**[0079]** Unter Verwendung eines Standardplaqueprotokolls wurde die Fähigkeit eines Ad7a Wildtypvirus, auf einer Reihe von Zelllinien Plaques zu erzeugen, gezeigt. Der cytopathische Effekt der Viren auf Basis von Ad7a und Ad5 war jedoch während der Infektion auf den A549 Zellen oder den 293 Zellen unterschiedlich. Die Plaquebildung dauerte ferner bei Ad7a im Vergleich zu Ad5 etwas länger. Die Verhältnisse von Partikel zu plaqueformender Einheit für Ad7a Viren (etwa 2.000 Partikel/plaqueformende Einheit oder mehr) infizierende 293 Zellen ist deutlich höher als die Verhältnisse von Partikel zu plaqueformende Einheit von Ad5 infizierende 293 Zellen (etwa 40–50 Partikel/plaqueformende Einheit).

**[0080]** Eine Mischung von Ad7-CAT und Wildtyp Ad7a wurde auf 293 Zellen gegeben. Bei mehreren Versuchen wurden keine Plaques, die das E1 defiziente Ad7 enthielten und das kontaminierende Wildtypvirus nicht enthielten, identifiziert. Wiederholte Plaqueherstellung erhöhte kaum das Verhältnis von Wildtypvirus zu E1 defizientem Virus.

**[0081]** Das gleiche Plaqueverfahren wurde dann durchgeführt unter Verwendung einer modifizierten 293 Zelle (die für E1A und E1B komplementiert), und die das ORF6 Genprodukt der E4 Region des adenoviralen Genoms exprimiert (d. h., 293/ORF6 Zellen). Dieses Verfahren führte zu einem signifikanten Anstieg der Plaquezahl im Vergleich zu der Plaquebildung auf normalen 293 Zellen. Ferner wurde eine sichtbare Verbesserung der Plaquemorphologie beobachtet, was ein größeres Maß der Komplementation in den 293/ORF6 Zellen als in den 293 Zellen vermuten lässt. Ferner wurde keine E1A DNA mittels PCR in den viralen Stämmen nachgewiesen (d. h., kein kontaminierendes Wildtypvirus wurde in den Plaque-gereinigten Stämmen gefunden). Einige von diesen replikationskompetenten, Adenovirus-freien (RCA-frei) Ad7-CAT Stämmen förderten die Bildung von großen Mengen von CAT in infizierten A549 Zellen. Eine Viruskonzentration von  $10^{12}$  Partikel/ml wurde ferner ohne Schritte zur Erhöhung des viralen Titers beobachtet. Eine virale Ausbeute von etwa  $2 \times 10^{12}$  viralen Partikeln von einer zusammenfließenden Kultur von 293/ORF6 Zellen in einer 35 mm Schale war im Wesentlichen die gleiche Ausbeute, wie dies für Ad5 Infektionen erwartet würde.

**[0082]** Dieses Beispiel zeigt somit, dass die Bereitstellung einer Genfunktion der E4 Region des adenoviralen Genoms zusätzlich zu den essentiellen Genfunktionen der E1 Region des adenoviralen Genoms in überraschender Weise die Wirksamkeit der Komplementation der E1 defizienten Adenoviren ansteigen lässt, wenn die in trans bereitgestellten E1 Genprodukte aus einem Adenovirus einer Serogruppe erzielt werden, die verschieden ist von der des replikationsdefizienten Adenovirus.

## Beispiel 7

**[0083]** Dieses Beispiel belegt die gestiegene Komplementation der E1 Defizienzen durch die Bereitstellung in trans eines E4 Genproduktes, das nicht ORF6 ist. Die Produktion und das Maß der Komplementation der E1 defizienten Ad7 wird zwischen 293 Zellen und 293/E4-ORF4 Zellen verglichen.

**[0084]** 293/ORF4 Zellen werden durch den Einbau einer ORF4 Expressionskassette in das Genom der 293 Zellen hergestellt. Die ORF4 Expressionskassette enthält entweder den Schaf-Metallothioneinpromotor oder den Promotor von LTR von MMTV, der operabel mit einem DNA-Segment, das für das ORF4 Genprodukt von Ad5 codiert, verbunden ist. Wenn der MMTV Promotor verwendet wird, wird auch eine zweite Expressionskassette in die Zelle eingebaut, die konstitutiv hohe Mengen des Glucokortikoidrezeptors bereitstellt. Alternativ werden eine Expressionskassette für die essentiellen Genfunktionen der E1 Region von Ad5 und die oben beschriebene ORF4 Expressionskassette in eine zweite Zelllinie eingebaut, wie COS-1 Zellen, A549 Zellen, HeLa Zellen oder 293 Zellen. Die erzielte Zelllinie wird 293/ORF4 genannt.

**[0085]** Eine Mischung von Ad7-CAT und Wildtyp Ad7 wird auf 293/ORF4 gegeben, um individuelle Plaques zu erzielen, die nur E1 defiziente Ad7 enthalten.

## Beispiel 8

**[0086]** Dieses Beispiel untersucht die Ähnlichkeiten zwischen den Adenoviren der Nicht-Gruppe C und den Adenoviren der Gruppe C.

**[0087]** Die Ähnlichkeiten und die Unterschiede zwischen den verschiedenen Adenovirengruppen wurden durch Vergleich der Aminosäureähnlichkeit und -Identität zwischen den E1A und E1B Genprodukten von Ad2 (Gruppe C), Ad5 (Gruppe C), Ad7 (Gruppe B), Ad12 (Gruppe A) und Ad40 (Gruppe F) Adenoviren untersucht. Hinsichtlich der Viren innerhalb der gleichen Gruppe, spezifisch zwischen Ad2 und Ad5 innerhalb der Gruppe C, gab es eine 99 % Ähnlichkeit und 98 % Identität zwischen den E1A und E1B Genprodukten von Ad2 und Ad5. Im Gegensatz dazu ergaben die Vergleiche zwischen Viren von unterschiedlichen Gruppen eine deutlich reduzierte Ähnlichkeit und eine geringere Identität. Zum Beispiel gab es eine 63 bis 75 % Ähnlichkeit und eine 40 bis 53 % Identität zwischen den E1A und E1B Genprodukten von Ad7, Ad12 und Ad40 im Vergleich zu den E1A und E1B Genprodukten von Ad2 und Ad5.

**[0088]** Signifikanterweise wurden jedoch besondere Domänen gefunden, die innerhalb der Viren von unterschiedlichen Gruppen konserviert sind, z. B. zwischen den E1A und E1B Genprodukten der Adenoviren der Nicht-Gruppe C und Gruppe C. Unterschiede zwischen besonderen Viren der Nicht-Gruppe C im Vergleich zu den Viren der Gruppe C wurden als ähnlich befunden, so dass zum Beispiel die Demonstration einer Fähigkeit von Adenoviren der Gruppe B bezeichnend für die gleiche Fähigkeit ist, die andere Adenoviren der Nicht-Gruppe C aufweisen. Die Demonstration der Fähigkeit eines E1 defekten Adenovirus der Gruppe B, zum Beispiel Ad7, durch HEK-293 Zellen (wie im Beispiel 3 gezeigt) komplementiert zu werden, zeigt insbesondere die Fähigkeit an, von anderen Adenoviren der Nicht-Gruppe C von HEK-293 Zellen komplementiert zu werden.

**[0089]** Jeder bekannte Serotyp des Adenovirus kann von einem Fachmann erzielt und vermehrt werden. Mit einem Stamm von vermehrten Viren kann der Fachmann die DNA von dem Virus erhalten und diese mittels einer der zahlreichen Routinetechniken sequenzieren, das heißt, ohne Anwendung von etwas Außergewöhnlichem. Dies führt dann direkt zu Identifikation von Standardregionen des adenoviralen Genoms durch einen Routinesequenzvergleich. In ähnlicher Weise können dann Oligonukleotide aufgebaut und Restriktionsenzymstellen routinemäßig identifiziert werden. Während die Verfahren, die in den hier vorliegenden Beispielen benutzt wurden, die Verwendung von Ad7 zeigen, sind diese Verfahren auch direkt auf andere adenovirale Serotypen anwendbar.

### Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellen eines replikationsdefizienten Adenovirus, das ein Passagiergen umfasst, wobei das replikationsdefiziente Adenovirus einen ersten Serotyp hat, der zu einer ersten Serogruppe gehört, und ein Genom hat, welches defizient in einer essentiellen Genfunktion der E1 Region des adenoviralen Genoms ist, wobei das Verfahren umfasst

(a) Transfer einer ersten DNA, welche das adenovirale Genom und das Passagiergen umfasst, in eine Zelle, wobei die Zelle eine zweite DNA umfasst, die stabil in das Genom der Zelle eingebaut ist, wobei die zweite DNA eine oder mehrere essentielle Genfunktionen der E1 Region eines adenoviralen Genoms umfasst, das

von einem Adenovirus abstammt, welches einen zweiten Serotyp hat, der zu einer zweiten Serogruppe gehört, (b) Transfer einer oder mehrerer Genfunktionen der E4 Region eines adenoviralen Genoms, das von einem Adenovirus abstammt, welches einen dritten Serotyp hat, der zu der zweiten Serogruppe gehört, in die Zelle, wobei die Genfunktionen der E4 Region aus der Gruppe ausgewählt werden, welche aus der E4/ORF6 Genfunktion, der E4/ORF3 Genfunktion, der E4/ORF4 Genfunktion und der E4/ORF6/7 Genfunktion besteht, wobei die erste Serogruppe verschieden von der zweiten Serogruppe ist, und (c) Erhaltung der Zelle, um das replikationsdefiziente Adenovirus zu produzieren.

2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die erste Serogruppe aus der Gruppe ausgewählt wird, die aus A, B, D, E und F besteht.

3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei der zweite Serotyp und der dritte Serotyp gleich sind.

4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–3, wobei die Genfunktionen der E4 Region des adenoviralen Genoms die E4/ORF6 Genfunktion umfassen.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–4, wobei die essentiellen Genfunktionen der E1 Region des adenoviralen Genoms eine essentielle Genfunktion der E1B Region des adenoviralen Genoms umfassen.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–5, wobei eine Genfunktion der E1 und E4 Regionen eines adenoviralen Genoms von der DNA exprimiert wird, die in das Genom der Zelle eingebaut ist.

7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei alle Genfunktionen der E1 und E4 Regionen eines adenoviralen Genoms von der DNA exprimiert werden, die in das Genom der Zelle eingebaut ist.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–7, wobei die Zelle eine 293/ORF6 Zelle ist.

9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–5, wobei zumindest eine Genfunktion der E1 und E4 Regionen eines adenoviralen Genoms von der DNA exprimiert wird, die von einem Helfervirus bereitgestellt wird.

10. Verfahren nach Anspruch 9, wobei alle Genfunktion der E4 Region eines adenoviralen Genoms von der DNA exprimiert werden, die von einem Helfervirus bereitgestellt wird.

11. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–10, wobei die DNA, welche das adenovirale Genom umfasst, mittels Infektion in die Zelle transferiert wird.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei die Zelle mit einer Mischung von Adenoviren infiziert wird und das replikationsdefiziente Adenovirus Plaquegereinigt wird.

13. Verfahren nach einem der Ansprüche 1–10, wobei die DNA, die das adenovirale Genom umfasst, mittels Transfektion in die Zelle transferiert wird.

14. Verfahren nach Anspruch 13, wobei die DNA, die das adenovirale Genom umfasst, auf wenigstens zwei getrennten DNA-Segmenten bereitgestellt wird.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen