



Patent- og  
Varemærkestyrelsen

---

(51) Int.Cl<sup>7</sup>: C 12 N 7/00 A 61 K 35/76 C 12 N 15/00 G 01 N 33/569

(21) Patentansøgning nr: PA 1990 02268

(22) Indleveringsdag: 1990-09-20

(24) Løbedag: 1989-03-20

(41) Alm. tilgængelig: 1990-11-20

(45) Patentets meddelelse bkg. den: 2005-04-11

(86) International ansøgning nr: PCT/US89/01139

(86) International indleveringsdag: 1989-03-20

(85) Videreførelsesdag: 1990-09-20

(30) Prioritet: 1988-03-21 US 170515

(73) Patenthaver: Chiron Corporation, 4560 Horton Street, Emeryville, Californien 94608, USA

(72) Opfinder: Harry E. Gruber, 13083 Maritime Place, San Diego, CA 92130, USA

Douglas J. Jolly, 30508 Via Alicante Dr., La Jolla, CA 92037, USA

James G. Respass, 4966 Lamont Street, San Diego, CA 92109, USA

Paul K. Laikind, 12433 Caminito Mira Del Mar, San Diego, CA 92130, USA

(74) Fuldmægtig: Zacco Denmark A/S, Hans Bekkevolds Allé 7, 2900 Hellerup, Danmark

---

(54) Benævnelse: **Rekombinant retrovirus**

(56) Fremdragne publikationer:  
**Ingen**

(57) Sammendrag:

Der beskrives rekombinante retrovira, der bærer en vektorkonstruktion, der er i stand til at forhindre, hæmme, stabilisere eller vende forløbet af infektions-, kræft- eller autoimmunsygdomme. De rekombinante retrovira ifølge den foreliggende opfindelse er mere specifikt nyttige til (a) stimulering af et specifikt immunrespons overfor et antigen eller et patogent antigen, (b) hæmning af en funktion af et patogent agens, såsom et virus, og (c) hæmning af vekselvirkningen mellem et agens og en værtscellereceptor. Dertil kommer eukaryote celler, der er inficeret med, og farmaceutiske sammensætninger, der indeholder sådan et rekombinant retrovirus. Der beskrives endvidere forskellige fremgangsmåder til fremstilling af rekombinante retrovira med enestående karakteristika, samt fremgangsmåder til fremstilling af transgene indpakkingsdyr eller -insekter.

## Teknisk område

Den foreliggende opfindelse angår generelt retrovirus og mere specifikt rekombinant retrovirus, der er i stand til at levere vektorkonstruktioner til modtagelige målceller. Sådanne vektorkonstruktioner er typisk udformet således, at de udtrykker de ønskede proteiner i målceller, f.eks. proteiner, der stimulerer immunogen aktivitet eller som er betinget aktive i et defineret cellemiljø.

## Opfindelsens baggrund

10

Selvom bakterielle sygdomme generelt er lette at behandle med antibiotika, eksisterer der meget få effektive behandlinger eller profylaktiske foranstaltninger til mange virus-, kræft- og andre ikke-bakterielle sygdomme, herunder genetiske sygdomme. Traditionelle forsøg på at behandle sådanne sygdomme har involveret anvendelse af kemiske medikamenter. Generelt har disse medikamenter manglet specificitet, de har udvist høj generel toksicitet og har således været terapeutisk ineffektive.

15

En anden klassisk teknik til behandling af en række ikke-bakterielle sygdomme omfatter, at der fremkaldes et immunrespons overfor et patogent agens, såsom et virus, gennem indgivelsen af en ikke-infektøs form af agenset, såsom et dræbt virus, hvorved der tilvejebringes antigener fra det patogene agens, som vil virke som immunstimulant.

20

En nyere fremgangsmåde til behandling af viralt fremkaldte sygdomme, såsom erhvervet immundefekt syndrom (AIDS) og beslægtede lidelser, omfatter blokering af receptorer på de celler, der er modtagelige overfor infektion med HIV, mod modtagelse eller dannelse af et kompleks med virale kappeproteiner. F.eks. er det i Lifson et al., (Science 232:1123-1127, 1986) blevet påvist, at antistoffer mod CD4 (T4) -receptorer hæmmede cellefusion (syncytia) mellem inficerede og ikke-inficerede CD4-fremvisende celler in vitro. En lignende CD4-blokerende virkning under anvendelse af monoclonale antistoffer er foreslået af McDougal et al., (Science 231:382-385, 1986). Alternativt

25  
30

har Pert et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:9254-9258, 1986) beskrevet anvendelse af syntetiske peptider til at binde T4-receptorer og blokere HIV-infektion i human T-celler, medens Lifson et al., (J. Exp. Med. 164:2101, 1986) har beskrevet blokering af såvel syncytia som virus/T4-cellefusion under anvendelse af et lectin, der vekselvirker med et viralt kappe-glycoprotein, hvorved det blokeres til ikke at blive modtaget af CD4-receptorer.

En fjerde og nyere teknik til hæmning af et patogent agens, såsom et virus, der transkriberer RNA, omfatter tilvejebringelse af antisens-RNA, der komplementerer mindst en del af det transkriberede RNA og binder sig dertil, således at translation hæmmes (To et al., Mol. Cell. Biol. 6:758, 1986).

De ovenfor beskrevne teknikker er imidlertid særdeles utilstrækkelige deri, at de ikke er umiddelbart anvendelige til styring af tid, lokalisering eller det omfang, i hvilket medikamentet, antigenet, det blokerende middel eller antisens-RNA anvendes. Navnlig responderer de ikke direkte på nærvær af det patogene agens, navnlig eftersom ovennævnte teknikker forudsætter eksogen brug af behandlingsmidlet (dvs. eksogen i forhold til prøven i en in vitro situation). Det kan eksempelvis være ønskeligt at have en immunstimulant udtrykt i stigende mængder umiddelbart efter infektion med det patogene agens. Dertil kommer, at ved antisens-RNA vil der kræves store mængder til nyttig behandling af dyr, hvilket med de til rådighed værende teknikker vil blive indgivet uden hensyntagen til den lokalisering, hvor der faktisk er behov for det, det vil sige, ved de celler, der er inficerede med det patogene agens.

Som et alternativ til eksogen brug er der blevet foreslået teknikker til endogen tilvejebringelse af behandlingsmidler. Mere specifikt er der blevet undersøgt proteiner, der er udtrykt fra virale vektorer baseret på DNA-vira, såsom adenovirus, simianvirus 40, kvægpapilloma og vaccinia vira. Eksempelvis har Panicali et al., (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:5364, 1983) indført influenzavirus-hæmagglutinin og hepatitis-B-overfladeantigener i vaccinia-genomet og inficeret dyr med de viruspartikler, der fremstilles ud fra sådanne rekombi-

nante gener. Efter inficering udviklede dyrene immunitet overfor både vacciniavirus og hepatitis-B-antigenet.

5 Imidlertid er man stødt på en række vanskeligheder i forbindelse med virale vektorer baseret på DNA-vira. Sådanne vanskeligheder består i (a) produktion af andre virale proteiner, der kan føre til patogenese eller suppression af det ønskede protein; (b) vektorens evne til ukontrollabelt at replikere sig i værten, og den patogene virkning af sådan ukontrollabel replikation; (c) nærvær af vildtype-virus, hvilket kan føre til viremia; og (d) den transitoriske natur af 10 ekspressionen i disse systemer. Disse vanskeligheder har faktisk udelukket anvendelse af virale vektorer baseret på DNA-vira til behandling af virus-, kræft- og andre ikke-bakterielle sygdomme, herunder genetiske sygdomme.

På grund af den ikke-transitoriske art af retroviras ekspression i inficerede 15 målceller er de blevet forslået som egnet vehikel til behandling af genetiske sygdomme (jvf. f.eks. F. Ledley, *The Journal of Pediatrics* 110:1, 1987). I betragtning af en række problemer er anvendelsen af retrovira til behandling af genetiske sygdomme imidlertid ikke blevet forsøgt. Sådanne problemer angår (a) det åbenbare behov for at inficere et stort antal celler i utilgængelige 20 væv (f.eks. hjernevæv); (b) behovet for at få vektorerne til at udtrykke sig på en meget kontrolleret og permanent måde; (c) manglen på klonede gener; (d) den irreversible skade på væv og organer som følge af metaboliske abnormiteter; og (e) tilgængeligheden af andre delvis effektive behandlinger i visse tilfælde.

25

Udover til behandling af genetiske sygdomme har andre forskere overvejet at anvende retrovirale vektorer til behandling af ikke-genetiske sygdomme (jvf. f.eks. EP 243.204 - Cetus Corporation; Sanford, *J. Theor. Biol.* 130:469, 1988; Tellier et al., *Nature* 318:414, 1985, og Bolognesi et al., *Cancer Res.* 30 45:4700, 1985.

Det er af Tellier et al. blevet foreslået at beskytte T-cellekloner ved tilsyneladende at inficere stam-celler med "defekt" HIV, som havde et genom, der kan

- udtrykke antisens-RNA til HIV-RNA. Bolognesi et al. har foreslået, at der dannes en ikke-virulent HIV-stamme til infektion af stem-celler, således at T4-celler dannet heraf vil bære interfererende ikke-virulente former af virus og derved beskytte disse celler mod infektion med virulent HIV. Det ser imidlertid ud til, at de "svækkede" eller "defekte" HIV-vira, der anvendes i begge
- 5 de foregående dokumenter, kan reproducere sig (dvs. de er ikke replikationsdefekte), således at de resulterende vira kan inficere andre celler med deraf følgende øget risiko for rekombination med tidligere tilstedeværende HIV eller andre sekvenser, hvilket vil føre til tab af attenuering. Ikke-
- 10 replikative former vil forudsætte en defekt hjælper eller pakningslinie for HIV. Eftersom styringen af HIV-genekspression er kompleks, er der imidlertid hidtil ikke blevet fremstillet sådanne celler. Idet de inficerende svækkede eller defekte vira ikke er kimære (et "ikke-kimært" retrovirus er et sådant, hvori i det væsentlige hele dets vektor kommer fra den samme retrovirusart), selv hvis
- 15 de var gjort replikationsdefekte for eksempel ved deletering af et væsentligt element fra deres genomer, eksisterer der stadig en betydelig mulighed for rekombination i værtscellerne med deraf følgende produktion af infektiøse virale partikler.
- 20 Selvom Sanford (J. Theor. Biol. 130:469, 1988) også har foreslået at anvende en genetisk behandling af HIV, bemærkes det, at på grund af det potentiale, der eksisterer for skabelse af hidtil ukendte virulente vira via genetisk rekombination mellem naturligt AIDS-virus og terapeutiske retrovirale vektorer, der bærer anti-HIV-gener, er behandling af AIDS med retroviralt gen ikke
- 25 praktisk. Skønt McCormick & Kriegler (EP 243,204 A2) har foreslået anvendelse af retrovirale vektorer til at levere gener til proteiner, såsom tumor necrose-faktor (TNF), har de teknikker, som beskrives deri, også en række ulemper.

### Kort beskrivelse af opfindelsen

Kort sagt er den foreliggende opfindelse rettet delvis på fremgangsmåder til stimulering af et specifikt cellemedieret immunrespons ved anvendelse af replikationsdetektive rekombinante retrovira.

Mere specifikt og ifølge et aspekt af den foreliggende opfindelse tilvejebringes der replikationsdefekt rekombinant retrovirus, som er i stand til at inficere humanceller som bærer en vektorkonstruktion, som er i stand til at forhindre, hæmme, stabilisere eller vende forløbet af infektions-, kræft- eller autoimmunsygdomme, der er ejendommelig ved, at vektorkonstruktionen dirigerer ekspresion af et sygdomsantigen fra et patogent middel eller er et kræftantigen eller modificeret form heraf i målceller, der er inficeret med retroviruset, hvilket antigen eller modificeret form heraf er i stand til at stimulere cellemedieret immunrespons i et menneske.

Når et immunrespons skal stimuleres overfor et patogent antigen, er det rekombinante retrovirus fortrinsvis udformet til at udtrykke en modificeret form af antigenet, som vil stimulere et cellemedieret immunrespons og som har reduceret patogenicitet i forhold til det native antigen.

Navnlig i tilfælde af sygdomme, der er forårsaget af HIV-infektion, hvor immunstimulering er ønskelig, er det antigen, som er dannet fra det rekombinante retrovirale genom af en sådan form, at det vil udløse enten eller både et HLA-klasse I- eller klasse II-begrænset immunrespons. I tilfælde af eksempelvis et HIV-kappeantigen, udvælges antigenet fortrinsvis blandt gp 160, gp 120 og gp 41, der er blevet modificeret til mindskelse af deres patogenicitet. Det udvalgte antigen er navnlig modificeret til mindskelse af risikoen for syncytia. Antigener fra andre HIV-gener, såsom gag, pol, vif, nef, osv., kan også tilvejebringe beskyttelse i specielle tilfælde.

Specificitet overfor den patogene tilstand kan også opnås eller yderligere forøges ved at målrette indtrængningen af de rekombinante retrovira til de

celler, der påvirkes af den patogene tilstand. Det vil forstås af den ovenstående omtale og af den foreliggende beskrivelse med krav, at når der henvises til, at den virale konstruktion "udtrykker" eller "fremstiller" en substans i en celle eller lignende, så menes der faktisk den virkning, som det resulterende provirus har efter revers transkribering af det virale RNA i cellen.

Uanset, på hvilken måde det rekombinante retrovirus udøver sin immunogene eller hæmmende virkning som beskrevet ovenfor, foretrækkes det, at det retrovirale genom er "replikationsdefekt" (dvs. ude af stand til at reproducere i celler, der er inficerede dermed). Der vil således kun forekomme et enkelt infektionsstadium i enten in vitro eller in vivo anvendelse, hvorved muligheden for insertional mutagenese mindskes væsentligt. Det rekombinante retrovirus mangler fortrinsvis, og for at bidrage hertil, mindst et af gag-, pol- eller env-generne. Endvidere er den rekombinante virale vektor fortrinsvis kimære (dvs., det gen, der skal frembringe det ønskede resultat, stammer fra en anden kilde end resten af retrovirus'et). En kimære konstruktion nedsætter yderligere muligheden for rekombinationshændelser i celler, der er inficeret med det rekombinante retrovirus, hvilket kan frembringe et genom, der kan danne virale partikler.

Ifølge et andet aspekt af den foreliggende opfindelse tilvejebringes også en fremgangsmåde til fremstilling af sådanne rekombinante retrovira, hvori det retrovirale genom er pakket i et kapsid og kappe, fortrinsvis under anvendelse af en "indpaknings"celle. "Indpaknings"cellerne tilvejebringes med viralproteinkodende sekvenser, fortrinsvis i form af to plasmider, der frembringer alle de proteiner, der er nødvendige til produktion af levedygtige retrovirale partikler, en RNA-viral konstruktion, der vil lede det ønskede gen sammen med et "indpaknings"signal, der vil dirigere indpakningen af RNA i de retrovirale partikler.

Nedenfor beskrives en række teknikker til fremstilling af rekombinante retrovira, der kan lette:

- i) produktionen af højere titere fra "indpaknings"celler,
- ii) indpakning af vektorkonstruktioner uden anvendelse af indpakningsceller,
- 5 iii) fremstilling af rekombinante retrovira, der kan målrettes mod forudvalgte cellelinier, og
- 10 iv) integration af provirale konstruktioner på et forud valgt sted eller steder i et cellegenom.

En teknik til fremstilling af højere titere fra indpakningsceller drager fordel af den erkendelse, at blandt de mange faktorer, der kan begrænse titere fra en indpakningscelle, er en af de mest begrænsende ekspressionsniveauet af indpakningsproteinerne, nemlig gag-, pol- og env-proteinerne, såvel som niveauet af ekspression af den retrovirale vektor-RNA fra den provirale vektor. Denne teknik muliggør selektion af indpakningsceller med højere ekspressionsniveauer (dvs. de producerer højere koncentrationer) af de foregående indpakningsproteiner og vektorkonstruktion-RNA. Mere specifikt gør denne teknik det muligt at udvælge indpakningsceller, der producerer høje niveauer af, hvad der betegnes et "primært agens", der enten er et indpakningsprotein (f.eks. gag-, pol-, eller env-proteiner) eller et relevant gen, der skal føres ind i målcellegenomet (typisk en vektorkonstruktion). Dette opnås ved tilvejebringelse i indpakningsceller af et genom, der bærer et gen ("primærgenet"), som udtrykker det primære agens i indpakningscellerne, sammen med et selekterbart gen, fortrinsvis nedenstrøms for det primære gen. Det selekterbare gen udtrykker et selekterbart protein i indpakningscellerne, fortrinsvis et sådant, der bibringer resistens til et ellers cytotoxisk medikament. Cellerne udsættes derefter for et selektionsmiddel, fortrinsvis det cytotoxiske medikament, hvilket muliggør identifikation af disse celler, som udtrykker det selekterbare protein ved et kritisk niveau (dvs. i tilfælde af et cytotoxisk medikament ved at dræbe de celler, der ikke frembringer det resistensniveau, der kræves for overlevelse).



I den ovenfor kort beskrevne teknik er ekspressionen af både de selekterbare og de primære gener fortrinsvis dirigeret af samme promoter. I denne henseende kan det være at foretrække at anvende et retroviralt 5'-LTR. For at maksimere titeret af et rekombinant retrovirus fra indpakningsceller, anvendes denne teknik først til at udvælge indpakningsceller, der udtrykker høje niveauer af alle de påkrævede indpakningsproteiner, og anvendes derefter til at udvælge, hvilke af disse celler, der efter transficering med den ønskede provirale konstruktion, frembringer de højeste titere af det rekombinante retrovirus.

Der tilvejebringes også teknikker til indpakning af vektorkonstruktioner uden anvendelse af indpakningsceller. Til disse teknikker anvendes der DNA-vira, såsom baculovirus, adenovirus eller vacciniavirus, fortrinsvis adenovirus. Disse vira kendes for deres ekspression af relativt høje niveauer af proteiner fra deri forekommende eksogene gener. For sådanne DNA-virusvektorer kan rekombinante DNA-vira fremstilles ved in vivo rekombination i vævskultur mellem viralt DNA og plasmider, der bærer retrovirale gener eller retrovirale vektorgener. De resulterende DNA viralvektorer, der bærer enten sekvenser, som koder for retrovirale proteiner eller for retroviralt vektor-RNA, er oprenset til udgangsmaterialer med højere titer. Alternativt kan konstruktionerne være konstrueret in vitro og efterfølgende transficeres ind i celler, der tilvejebringer de transvirale funktioner, der mangler i DNA-vektorerne. Uanset hvilken fremstillingsfremgangsmåde, der anvendes, kan der fremstilles udgangsmaterialer med højere titer ( $10^7$  til  $10^{11}$  enheder/ml), som ved infektion med modtagelige celler vil forårsage et højt niveau af ekspression af retrovirale proteiner (såsom gag, pol og env) eller RNA-retrovirale vektorgenomer eller begge. Infektion af celler i kultur med disse udgangsmaterialer, enkeltvis eller i kombination, vil føre til produktion på højt niveau af retrovirale vektorer, hvis udgangsmaterialerne bærer det virale protein og de virale vektorgener. Denne teknik gør det muligt, når den anvendes med adenovirus eller andre pattedyrsvektorer, at anvende primærceller (f.eks. fra vævsexplantater eller cel-

ler, såsom WI38, der anvendes i produktionen af vacciner) til fremstilling af rekombinante retrovirale vektorer.

5 Som et alternativ til den ovenfor beskrevne teknik fremstilles der rekombinante retrovira ved først at danne gag/pol- og env-proteiner fra en cellelinie, der er inficeret med et hensigtsmæssigt rekombinant DNA-virus på lignende måde som i de foregående teknikker, bortset fra at cellelinien ikke er inficeret med et DNA-virus, der bærer vektorkonstruktionen. Efterfølgende oprenses proteinerne og kontaktes med den ønskede virale vektor-RNA, der er fremstillet in vitro, transfer-RNA (tRNA), liposomer og et celleekstrakt til indarbejdning af env-proteinet i liposomerne, således at de rekombinante retrovira, der bærer den virale vektor-RNA, fremstilles. Med denne teknik kan det være nødvendigt at indarbejde env-proteinet i liposomerne, inden de kontaktes med resten af den forudgående blanding. gag/pol- Og env-proteinerne kan også fremstilles efter plasmidmedieret transficering i eukaryotceller, i gær eller i bakterier.

20 Den teknik til fremstilling af rekombinante retrovira, der kan målrettes mod forud valgte cellelinier, anvender rekombinante retrovira med et env-gen, der omfatter et cytoplasmatisk segment af en første retroviral fænotype og et extracellulært bindingsegment, der er eksogent for den første retrovirale fænotype. Bindingssegmentet er fra en anden viral fænotype eller fra et andet protein med ønskede bindingsegenskaber, der udvælges til at blive udtrykt som et peptid, der vil bindes til det ønskede mål.

25 Teknikker til integration af et retroviralt genom på et specifikt sted i DNA af en målcelle involverer anvendelse af homolog rekombination eller alternativt anvendelse af et modificeret integraseenzym, der vil genkende det specifikke sted på målcellegenomet. Sådan stedsspecifik indføring muliggør, at gener indføres på sådanne steder på målcellens DNA, hvilket vil minimere risikoen for insertional mutagenese, og minimere interferens fra andre sekvenser på DNA'et samt muliggøre insertion af sekvenser på specifikke målsteder, såle-

des at ekspressionen af et uønsket gen (såsom et viralt gen) reduceres eller elimineres i målcellens DNA.

5 Det vil forstås, at en hvilken som helst af de ovenfor beskrevne teknikker kan anvendes uafhængigt af hinanden i bestemte situationer eller kan anvendes i forbindelse med en eller flere af de øvrige teknikker.

Disse og andre aspekter ved den foreliggende opfindelse vil fremgå klart med henvisning til den følgende detaljerede beskrivelse og tegninger.

10

Kort beskrivelse af tegningen

Fig. 1 afbilder 3 forskellige vektorfamilier, som anvendes til fremstilling af HIV-env og som har eller ikke har indført den selekterbare SV-Neo-kasette.

15

Fig. 2 illustrerer de HIV-env-ekspressionsniveauer, der ses i polyacrylamid-gelelektroforese af HIV-env-specifikke radioimmunpræcipitationer af ekstrakter af human Sup T1-celler transficeret med de viste vektorer. Markørerne er angivet i kilodalton, gp 160 og gp 120 markerer de hensigtsmæssige proteiner, og 517 + tat er den positive kontrol (HIV-LTR driver env i nærvær af tat).

20

Fig. 3 afbilder protokollen for afprøvning af T-celle-drab induceret i mus, som er injicerede med syngene tumorceller, der udtrykker HIV-env (vektoren er pAF/env-SV-Neo).

25

Fig. 4 er en grafisk afbildning af resultaterne af forsøgsprotokollen i fig. 3. Det specifikke drab ses i den øverste graf med BC10MEenv-29-drab versus B/C10ME-resistens overfor drab.

30 Fig. 5 viser i diagramform antallet af celler, der overlever efter phleomycinselektion efter transficering af celler med et plasmid, der udtrykker phleomycinresistens-genet (PRG) direkte fra en promoter (til højre) og med et andet, der

udtrykker PRG med en kodende sekvens, der er indsat mellem sig og promoteren.

5 Fig. 6 viser 4 plasmider, der er udformet til at udtrykke retrovirale proteiner i pattedyrsceller. pSVgp Og pRSVenv cotransficeres med en selekterbar markør, medens pSVgp-DHFR og pRSVenv-phleo er de ækvivalente plasmider, hvori den selekterbare markør er placeret nedenstrøms for de viral-proteinkodende regioner.

10 Fig. 7 viser 3 steder for fusion mellem HIV env og MLV env efter sted-rettet mutagenese af begge kodende sekvenser for at skabe nye, kompatible restriktionsenzymsteder. De N-terminale sekvenser findes i begge tilfælde til venstre. Nummereringen følger nukleotidnummereringen. ST, SR, SE markerer begyndelsen til tat, rev og env, medens TT, TR og TE markerer de tilsvarende terminationssteder.

15 Fig. 8 viser substitutionen af U3 i en 5'LTR med en heterolog promoter/forstærker, der kan sammensmeltes med enten Sac I, Bst II eller andetsteds i regionen.

20

Fig. 9 illustrerer en repræsentativ fremgangsmåde til krydsning af transgenemus, der udtrykker viralt protein eller vektor-RNA.

Detaljeret beskrivelse af opfindelsen

25

#### I. Immunstimulering

30 Evnen til at genkende og forsvare mod fremmede patogener er centralt for immunsystemets funktionsdygtighed. Dette system skal, gennem immungenkendelse, være i stand til at skelne "sig selv" fra "ikke-sig selv" (fremmed), hvilket er afgørende, når det skal sikres, at forsvarsmekanismer rettes mod invaderende enheder snarere end mod værtsvæv. De grundlæggende træk ved immunsystemet består i nærvær af meget polymorfe celleoverfladegen-

kendelsesstrukturer (receptorer) og effektormekanismer (antistoffer og cytolytiske celler) til destruktion af invaderende patogener.

- 5 Cytolytiske T-lymfocytter (CTL) induceres normalt ved fremvisning af forarbejdede patogenspecifikke peptider i forbindelse med MHC klasse I- eller klasse II-celleoverfladeproteiner. Ifølge en udførelsesform for opfindelsen inducerer præsentation af immunogene virale determinanter sammen med hensigtsmæssige MHC-molekyer effektivt optimale CTL-responser uden, at patienten udsættes for patogenet. Denne vektorfremgangsmåde til immunstimulation tilvejebringer et mere effektivt middel til inducering af beskyttende og terapeutiske CTL-responser, fordi den type immunitet, der induceres med vektoren, i højere grad ligner den, som induceres ved udsættelse for naturlig infektion. På basis af den nu til rådighed værende viden om adskillige virus-systemer, er det usandsynligt, at ikke-replikerende virale antigener, såsom
- 10 peptider og oprensede rekombinante proteiner, når de tilføres eksogent, tilvejebringer tilstrækkelig stimulus til, at der induceres maksimal klasse I-begrænsede CTL-responser. Alternativt giver vektor-leveret ekspresion af udvalgte virale proteiner i målceller ifølge opfindelsen en sådan stimulus.
- 20 F.eks. i tilfælde af HIV-1-infektioner udvikler patienter antistoffer, der er specifikke for en række virale kappe-region-determinanter, hvoraf nogle er i stand til *in vitro* virusneutralisering. Ikke desto mindre fortsætter sygdommens forløb og patienten må til slut bukke under for sygdommen. Lavniveau CTL-responser mod inficerede patientceller (Plata et al., Nature 328:348-351, 25 1987) og mod målceller, der er inficeret med rekombinante vacciniavektorer, der udtrykker HIV gag, pol eller env (Walker et al., Nature 328:345-348, 1987; Walker et al., Science 240:64-66, 1988) er blevet påvist hos visse HIV-1 seropositive patienter. Dertil kommer, at det for nyligt er blevet påvist, at både muse- og human-CTL kan induceres ved autologe stimulatorceller, der
- 30 udtrykker HIV gp 120 via transficering (Langlade-Demoyan et al., J. Immunol. 141:1949, 1988). Forbedret CTL-induktion kunne være en behandlingsmæssig fordel for injicerede patienter og tilvejebringe effektiv forebyggende behandling for individer under ikke-infeksiøse betingelser. HIV-Infektion produ-

cerer måske ikke i sig selv tilstrækkeligt CTL-respons, fordi andre elementer, der er forbundet med HIV-infektion, kan forhindre korrekt immunstimulering. Dertil kommer, at det kan være, at stimulering af T-celler med inficerede celler udgør en vekselvirkning, der fører til infektion af de stimulerede T-celler.

5

Eksempel 1 beskriver fremgangsmåder til konstruktion af plasmider, der er i stand til at danne retrovirale vektorer i indpakningsceller, som derefter fører til ekspresion af virale HIV antigener.

10 Eksempel 1

Vektorer, der udtrykker HIV-antigener

A. env-Ekspressionsvektor (jvf. fig. 1)

15

Der isoleredes et 2,7 kb Kpn-Xho I DNA-fragment fra det provirale HIV-klon BH10-R3 (angående sekvens, se Ratner et al., Nature 313:277, 1985) og et ~400 bp Sal-Kpn I DNA-fragment fra IllexE7deltaenv (en Ba131-deletering til nt. 5496) blev ligeret i Sa1-stedet i plasmid SK<sup>+</sup>. Fra denne klon blev et 3,1 kb env DNA-fragment (Xho I-Cla I), der også koder for rev, væsentligt for env-ekspression, oprenset og ligeret i en retroviral vektor, benævnt pAFVXM (jvf. Kriegler et al., Cell 38:483, 1984). Denne vektor blev modificeret således, at Bgl II-stedet blev ændret ved indføring af en linker i et Xho I-sted til at gøre kloning af det HIV env-kodende DNA-fragment lettere.

25

Et dominerende selekterbart markørgen, der omfattede en tidlig SV40-promoter, der driver ekspresion af neomycinphosphotransferasegen, blev indført i vektoren ved Cla I-stedet for at lette isoleringen af inficerede og transficerede cellelinier.

30

Xho I-Stedet opstrøms for ENV-genet i vektoren tilvejebringer et sted, der er hensigtsmæssigt til indføring af yderligere promotere i vektorkonstruktionen som RSV-promoteren, tidlig eller sen SV40-promoter, umiddelbart tidlig (IE)

CMV-promoteren, human  $\beta$ -actinpromoter, og murin Moloney-MLV SL3-3-promoter.

5 En sådan promoter, umiddelbar tidlig CMV gen-promoter, et 673 bp DNA-fragment Hinc II til Eag I, resulterer i en tifold stigning i ENV-ekspressionen i en human T-cellelinie kaldet Sup T1, når den sammenlignes med den parenterale konstruktion pAF ENV<sup>r</sup> SV<sub>2</sub> Neo.

B. gag-Ekspressionsvektor:

10

Et 2,5 kb Sac I-Eco RV DNA-fragment blev isoleret fra pBH10-R3 (jvf. Ratner et al., op. cit.) og ligeret i Sac I-Sal I-stedet af pUC31, pUC31 Er afledt fra pUC19 med yderligere Xho I-, Bgl II-, Bst II- og Nco-steder indført mellem Eco R1- og Kpn I-stederne i polylinkeren. Denne konstruktion indeholdt imidlertid det vigtigste splejsningsdonor- (SD) sted fra HIV og kan således være problematisk ved virusdannelse. SD-Stedet fjernedes ved subkloning af et 70 bp Rsa I-Cla I-fragment med et 2,1 kb Cla I-Bam H1 DNA-fragment i Hinc II-Bam H1-stedet af SK<sup>+</sup>. Bam H1-Stedet blev konverteret til et Cla I-sted ved linkerindførelse. Denne konstruktion blev betegnet SK<sup>+</sup> gag protease SD  
20 delta.

Det 2,5 kb Xho I-Cla I DNA-fragment, der kom fra SK<sup>+</sup> gag protease SD delta blev indført i Xho I/Cla I-stederne i vektoren pAFVXM som beskrevet ovenfor.

25

Disse plasmider udtrykte, når de anbragtes i en egnet indpakningscelle, en retroviral vektorkonstruktion, der indeholdt et indpakningssignal. Indpakningssignalet styrede indpakning af vektorkonstruktionen i et kapsid og kappe sammen med alle de yderligere proteiner, der kræves til levedygtige retrovirale partikler. Kapsidet, kappe- og øvrige proteiner fremstilles fortrinsvis ud  
30 fra et eller flere plasmider, der indeholder passende genomer, som er anbragt i indpakningscellen. Sådanne genomer kan være provirale konstruktioner, der i et ukompliceret tilfælde blot kan have fået deleteret indpaknings-

signalet. Følgelig vil kun vektoren blive indpakket. Egnede indpakkings- eller indpakkingscellelinier og det genom, der er nødvendigt for at opnå en sådan indpakning, er beskrevet i Miller et al. (*Mol. Cell. Bio.* 6:2895, 1986).

- 5 Som beskrevet af Miller et al., er det at foretrække, at yderligere ændringer af den provirale konstruktion ud over simpel deletering af indpakkingssignalet til reduktion af risikoen for, at der indtræffer rekombinationshændelser i indpakkingscellelinien, hvilket vil kunne resultere i produktion af virale partikler, som ikke er replikationsdefekte.

10

- Det vil forstås, at eksempel 1 blot illustrerer en fremgangsmåde til dannelse af et HIV kappe-glycoprotein (gp) eller andet viralt antigen. Det er også muligt at frembringe en proviral vektorkonstruktion, der udtrykker et modificeret HIV kappe-gp på målceller, som ligeledes vil stimulere et immunrespons, men have færre cytopatiske T-cellevirksomheder. Kapppeglycoproteiner kan modificeres hensigtsmæssigt under anvendelse af inden for fagområdet velkendte teknikker, f.eks. ved anvendelse af dem som beskrevet i artikler, såsom af Kowalski et al. (*Science* 237:1351, 1987). Der kan således konstrueres en proviral konstruktion ved den ovenfor beskrevne teknik, der danner retrovirale konstruktioner, som udtrykker en sådan hensigtsmæssigt modificeret gp. Denne konstruktion anbringes derefter i en indpakkingscelle som beskrevet ovenfor. De resulterende rekombinante retrovira, der er fremstillet ud fra indpakkingscellelinier, kan anvendes *in vitro* og *in vivo* til stimulering af et immunrespons gennem infektion af modtagelige målceller. Det vil forstås, at andre proteiner udtrykt fra HIV-genomet, såsom gag, pol, vif, nef, osv., også kan udløse nyttige cellulære responser i HIV-inficerede individer. Provirale vektorer, såsom de nedenfor beskrevne, er udformet til at udtrykke sådanne proteiner, således at der tilskyndes til et klinisk nyttigt immunrespons. Det kan være nødvendigt for visse vektorers vedkommende at indføre revkodende sekvenser og et rev-responsivt element (Rosen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2071, 1988).



Følgende eksempel påviser denne behandlingstypes evne til at udløse CTL-responser hos mus.

## Eksempel 2

5

### Immunrespons overfor retrovirale vektor-kodende antigener

En muse-tumorcellelinie (B/C10ME) (H-2<sup>d</sup>) blev inficeret med pAF env<sup>r</sup>SV40 Neo-vektorkonstruktionen, der koder for HIV env. Et klonet HIV-env, der udtrykte cellelinie (B/C10ME-29) blev derpå anvendt til stimulering af HIV-env-specifik CTL i syngene (dvs. MHC-identisk) Balb/c (H-2<sup>d</sup>)-mus. Mus blev immuniseret ved intraperitoneal injektion med B/C10ME-29 celler ( $4 \times 10^7$  celler) og "boosted" på dag 7-14. Respons-miltcelle-suspensioner blev fremstillet ud fra disse immuniserede mus og cellerne blev dyrket in vitro i 4 dage i nærvær af enten B/C10ME-29 eller B/C10ME-mitomycin-C-behandlede celler i et stimulator:responscelleforhold på 1:50 (fig. 3). Effektorcellerne blev høstet fra disse kulturer, talt og blandet med radioaktivt mærkede (<sup>51</sup>Cr) målceller (dvs. B/C10MEenv-29 eller B/C10ME) i forskellige effektor:målcelle (E:T) -forhold i en standard 4-5 timers <sup>51</sup>Cr-frigivelsesanalyse. Efter inkubering blev mikrotiterpladerne centrifugeret, 100 µl kultursupernat blev fjernet og den mængde radioaktiv mærkning, der blev frigivet fra de lusede celler, blev kvantificeret i et Beckman γ-spektrometer. Måcellyse blev beregnet som: % målyse =  $\frac{\text{Eksp CPM} - \text{SR CPM}}{\text{MR CPM} - \text{SR CPM}} \times 100$ , hvor eksperimentelle tællinger per minut (Eksp CPM) betegner effektorer plus mål; spontan frigivelse (SR) CPM betegner mål alene; og maksimal frigivelse (MR) betegner mål i nærvær af 1 M HCL.

Resultaterne (fig. 4) illustrerer, at CTL-effektorer blev induceret med specifikt lusede HIV-env-udtrykkende målceller (B/C10MEenv-29) i betydeligt mere effektiv grad end B/C10ME mål. Primede miltceller, der var restimulerede in vitro med ikke-HIV-env-udtrykkende kontrolceller (B/C10ME) udviste ikke signifikant CTL-aktivitet på hverken B/C10MEenv-29- eller B/C10ME-mål, navnlig ved lavere E:T-celleforhold. Miltceller opnået fra nonimmuniserede

Balb/c mus, der ikke tidligere var anvendt til forsøg, og som var restimulerede in vitro med B/C10MEenv-29, dannede ikke CTL, hvilket antyder vigtigheden af indtræden af in vivo-priming og boosting. Dette eksperiment blev gentaget og lignende resultater blev opnået.

5

I et andet eksperiment var effektorceller opnået ud fra Balb/c-mus, immuniseret, boostet og restimuleret in vitro med en andet H-2<sup>d</sup> HIV-env-udtrykkende tumorcelleklon (L33-41) inficeret med det samme pAF env<sup>r</sup> SV40 Neo (HIV-env) vektorkonstruktion, i stand til at lysere B/C10MEenv-29 målceller. Dette understøtter yderligere, at det CTL, der dannes i disse mus, specifikt genkender en udtrykt form af HIV-env snarere end ganske enkelt et unikt tumorcelleantigen på disse celler. Dette resultat antyder endvidere, at det vektorleverede antigen præsenteres på lignende måde af de to tumorcellelinier.

15

Implementering af denne immunstimulantanvendelse i mennesker forudsætter, at (1) det gen, der koder for det relevante antigen, kan leveres til celler, (2) at antigenet kan udtrykkes i hensigtsmæssige celler, og (3) at MHC-restriktionskrav, dvs. klasse I- og klasse II-antigenvekselvirkning, skal opfyldes. Vektorpræparationer fremstilles ved at dyrke producentcellerne i normalt medium, vaske cellerne med PBS plus humanserum-albumin (HSA) ved 10 mg/ml, hvorefter cellerne dyrkes i 8-16 timer i PBS plus HSA. De opnåede titere er typisk  $10^4$  til  $10^6$ /ml afhængigt af vektoren, indpakningslinie- og specifik producentlinieklon. Vektorsupernatanterne filtreres til fjernelse af cellerne og koncentrerer op til 100 gange ved filtrering gennem 100.000 eller 25 300.000 "pass" Amicon filtre (Wolff et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:3344, 1987). Dette lader globulære proteiner på 100.000 eller 300.000 passere, men tilbageholder 99% af den virale vektor som infektiøse partikler. Råmaterialet kan fryses til opbevaring, idet de taber ca. 50% af de infektiøse enheder ved frysning og optøning. Den mest direkte levering involverer indgivelse af den passende gen-bærende vektor i individet samt tillid til vektorens evne til 30 på effektiv måde at målrettes mod de rette celler, der så kan initiere stimulering af immunresponset. Doseringen vil være  $10^5$ - $10^6$  infektiøse enheder/kg legemsvægt. Det vil dog være en mere praktisk fremgangsmåde at involvere

den ekstrakorporale behandling af patientens perifere blodlymfocytter (PBL), fibroblaster eller andre celler, som er opnået fra hvert individ med vektoren. PBL Kan opretholdes i kultur gennem anvendelse af mitogener (phytohemagglutinin) eller lymfokiner (f.eks. IL-2). Denne type fremgangsmåde muliggør direkte vektorinfektion, overvågning af ekspresion samt udvidelse af den antigenpræsenterende cellepopulation inden injektion, samt tilbagevenden af vektor-udtrykkende celler til den pågældende patient. Andre typer celler kan også explanteres, vektorintroduceres, hvorpå cellerne igen implanteres i patienten. Kun et moderat antal inficerede celler ( $10^5$ - $10^6$ /kg legemsvægt) er nødvendig for at udløse stærke immunrespons.

En anden indgivelsesmåde er implantation af producentlinier, der frembringer retrovirale vektorpartikler. Disse passer ikke nødvendigvis immunologisk med klassiske producentcellelinier eller patientens egne celler, der er blevet explanteret, behandlet og returneret (jvf. nedenstående afsnit VI: Alternative viral vektor-indpakningsteknikker). Begge typer implantater ( $10^5$ - $10^6$ /kg legemsvægt) vil have en begrænset levetid i patienten, men vil føre til, at den retrovirale vektor inficerede et stort antal ( $10^7$ - $10^{10}$ ) celler i deres lokale område i kroppen.

I alle tilfælde kan et heldigt udfald af behandlingen analyseres ved at udtage en lille mængde blod og måle CTL-responset under anvendelse af individets egne celler inficeret med vektor, der fører til env-ekspresion, som mål.

Når det ønskes at stimulere et MHC klasse I- eller klasse II-begrænset immunrespons til patogener, herunder andre patogene vira end HIV, kan en fagmand bestemme egnede former for kappe- eller andre antigener, der er forbundet med sådanne retrovira, hvilke vil stimulere et immunrespons. Generelt kan de egnede former af antigener, der er forbundet med patogene midler, nemt udvælges, hvilket vil stimulere et immunrespons overfor disse patogene midler.

Ex corpore-behandling af patientceller ville for eksempel rette sig mod ikke-inficerede potentielt modtagelige T-celler eller monocytter. En foretrukket fremgangsmåde til målmærkning af den modtagelige celle involverer vektorer, der bærer HIV-env eller hybrid-env (jvf. nedenstående afsnit VIII: Celleliniespecifikke retrovira) til direkte absorption af vektorpartikler i CD4<sup>+</sup>-celler.

- 5
- Normale voksne har ca.  $5 \times 10^9$  T4-celler i den samlede mængde blod og ca. det samme antal monocytter.
- 10 En foretrukket indgivelsesmåde vil være ved leukoforese, hvor ca. 20% af et individs PBL'er kan fjernes på et hvilket som helst tidspunkt og håndteres in vitro. Således vil ca.  $2 \times 10^9$  celler blive behandlet og erstattet. Eftersom de nuværende maksimale titere ligger på ca.  $10^6$ /ml, vil det forudsætte fra 2 til 20 liter viral startsupernatant. Gentagne behandlinger vil blive udført.
- 15 den måde, der kan anvendes, er udsugning af knoglemarv, infektion med retroviral vektor og genindsættelse af den inficerede marv (Gruber et al., Science 230:1057, 1985) i patienten. Marvreplikation vil forstærke vektor-ekspressionen gennem cellereplikation).
- 20 I alle tilfælde kan behandlingens effektivitet analyseres ved at måle de sædvanlige indikatorer for sygdommens fremskriden, herunder antistofniveau, viral antigenproduktion, infektiøs HIV-niveau, eller niveau for ikke-specifikke infektioner.

25 I. Indpakningscelleselektion

Basalt kan der postuleres mindst 5 faktorer, som årsag til frembringe lave rekombinante virus-titere:

- 30
1. den begrænsede tilgængelighed af virale indpakningsproteiner,
  2. den begrænsede tilgængelighed af retrovirale vektor-RNA-genomer,

3. den begrænsede tilgængelighed af cellemembran til celleafsnoering af rekombinante retrovira,
  4. den begrænsede iboende indpakningseffektivitet af det retrovirale vektorgenom, og
  5. massefylden af den receptor, der er specifik for kappen af et givet retrovirus.
- 10 Som bemærket ovenfor er den begrænsede tilgængelighed af virale indpakningsproteiner den første begrænsende faktor i rekombinant retrovirusproduktion ud fra indpakningsceller. Når niveauet af indpakningsprotein i indpakningscellerne forøges, stiger titeret til ca.  $10^5$  infektiøse enheder/ml, hvorefter stigende indpakningsproteinniveau ikke længere har nogen virkning
- 15 på titere. Titere kan imidlertid forøges yderligere ved også at forøge det niveau af retroviral vektorgenom, der er til rådighed for indpakning. Det er således, og som det er beskrevet heri, en fordel at udvælge producentceller, som fremstiller de maksimale niveauer af indpakningsproteiner og retrovirale vektorgenomer. Det er fundet, at fremgangsmåderne til identifikation og dermed udvælgelse af indpakningsceller og producentceller, beskrevet tidligere
- 20 under afsnittet med overskriften "Opfindelsens baggrund", har en tendens til at føre til udvælgelse af mange producentceller, der producerer lave titere, af de nedenfor anførte årsager.
- 25 Den foreliggende opfindelse drager fordel af det tidligere ikke-fordelagtige faktum, at proteinekspresionsniveauet af et gen nedenstrøms for 5'LTR eller anden promoter, og sat i afstand derfra at et intervenerende gen, er væsentligt lavere, end hvis det intervenerende gen ikke var til stede. Ifølge den foreliggende opfindelse er det selekterbare gen placeret nedenstrøms for et gen
- 30 af indpakningsgenomet eller det relevante gen båret af vektorkonstruktionen, men transkriberes stadig under styring af det virale 5'LTR eller anden promoter uden nogen splejsningsdonor eller splejsningsdonorsteder. Herved opnås to ting. For det første, eftersom indpakningsgenerne eller de relevante gener

nu er opstrøms uden noget intervenserende gen mellem sig og promoteren, vil deres tilsvarende proteiner (indpkningsproteiner eller relevant protein) blive udtrykt i et højere niveau (5 til 20 gange højere) end det selekterbare protein. For det andet vil det selekterbare protein blive udtrykt i gennemsnit på et lavere niveau, idet ekspressionsniveaufordelingen skifter til lavere niveauer. I tilfælde af phleo<sup>r</sup>-proteinet, er dette skift i fordeling illustreret ved den punkterede kurve angivet i fig. 16. Selektionsniveauet for resistens overfor phleomycin forbliver imidlertid det samme, således at kun de udtrykkende celler i den øverste ende overlever. Niveauerne af indpkningsproteinet eller det relevante protein vil stadig være proportionale, men i dette tilfælde svarer et højere niveau af selekterbar protein blot til et meget højere niveau af indpkningsprotein eller relevant protein.

Den ovenfor beskrevne fremgangsmåde udføres fortrinsvis under anvendelse af et plasmid, der bærer et af de provirale gag/pol- eller env-indpakkende gener sammen med et første selekterbart gen. Disse celler screenes derefter for de celler, der producerer de højeste proteinniveauer, ved reaktion med et antistof mod env (eller eventuelt gag/pol), et andet fluorescerende antistof, og sorteres derefter på et fluorescensaktiveret celle-sorteringsapparat (FACS). Alternativt kan der anvendes andre forsøg til bestemmelse af proteinniveau. Efterfølgende gentages fremgangsmåden og screeningen under anvendelse af de selekterede celler og det andet af de gag/pol- eller env-indpkningsgenerne. I dette trin kræves der et andet selekterbart gen (der er forskelligt fra det første) nedenstrøms for indpkningsgenet og de celler, der producerer den største mængde af det andet virale protein, udvælges. Fremgangsmåden og screeningen gentages derefter under anvendelse af de overlevende celler med et plasmid, der bærer den provirale vektorkonstruktion, som bærer det relevante gen og et tredje selekterbart gen, der er forskelligt fra det første eller andet selekterbare gen. Som et resultat af denne fremgangsmåde vil der blive selekteret de celler, der producerer høje titere af det ønskede rekombinante retrovirus, og disse kan dyrkes som det kræves for at levere rekombinant retrovirus. Dertil kommer, at gag og pol kan indføres uafhængigt og selekteres.

Eksempel 3 beskriver konstruktionen af gag/pol- og env-plasmider, der er udformet til anvendelse ved disse fremgangsmåder.

## 5 Eksempel 3

Plasmider, der er udformet til at give høje niveauer af indpakningsproteiner (fig. 6)

10 1. 2,7 kb Xba I-fragmentet fra pPAM (Miller et al., Mol. Cell. Biol. 5:431, 1985) der indeholder det amfotrope env-segment, blev klonet i pUC18 på Xba I-stedet, derefter fjernet med Hind III og Sma I. Dette fragment blev klonet ind i vektoren pRSV-neo (Gorman et al., Mol. Cell. Appl. Biol. 2:1044, 1982, Southern et al., J. Mol. Appl. Genet. 1:327, 1982) skåret med Hind III  
15 og Pvu II til opnåelse af pRSV-env. Et 0,7 kb Bam H1- til BstE II-fragment fra plasmidet pUT507 (Mulsant et al., Somat. Cell. Mol. Genet. 14:243, 1988) med BstE II-enden udfyldt, bærer den phleo-resistens-kodende sekvens. 4,2 kb Bam H1- til Xho I-fragmentet, de sammenhængende 1,6 kb Xho I- til Xba I (Xba I udfyldt) fra RSVenv samt phleo-fragmentet blev ligeret til afgivelse af  
20 pRSVenv-phleo.

2. Et fragment fra Pst I-stedet ved nukleotid 563 af MLY (RNA Tumor Viruses, Vol. II, 1985 Cold Spring Harbor) til Sca I-stedet ved 5870 blev afledt fra pMLV-K (Miller et al., 1985, op.cit.) og klonet i Pst I- til Bam H1- (Bam H1 udfyldt) fragmentet fra p4aA8 (Jolly et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80:477, 25 1983) som har SV40-promoterens, pBR322 ampicillin-resistens og replikationsorigin og SV40-poly-A-stedet. Dette giver pSVgp. pSVgpDHFR blev fremstillet under anvendelse af følgende fragmenter: 3,6 kb Hind III- til Sal I-fragmentet fra pSVgp indeholdende SV40-promoterens plus MLY-gag- og  
30 nogle pol-sekvenser, 2,1 kb Sal I- til Sca I-fragmentet fra pMLV-K med resten af pol-genet, 3,2 kb Xba I- (Xba I udfyldt) til Pst I-fragmentet fra pF400 med DHFR-genet plus poly-A-stedet, pBR322-oprindelsen og det halve af ampicillin-resistens-genet, 0,7 kb Pst I- til Hind III-fragmentet fra pBR322 med den

anden halvdel af ampicillinresistens-genet. Dette giver pSVgp-DHFR. Alle disse konstruktioner er vist i fig. 7. Disse plasmider kan transficeres til 3T3-celler eller andre celler og høje niveauer af gag, pol eller env kan opnås.

- 5 En yderligere fremgangsmåde til opnåelse af selektering er ved, at anvende genselektering i en omgang og antisens heraf i en efterfølgende omgang. For eksempel kan gag/pol blive indført i en HPRT-defekt celle med HPRT-genet og selekteres for nærvær af dette gen under anvendelse af det medium, der forudsætter HPRT til redning af puriner. I næste omgang kan antisens for
- 10 HPRT blive leveret nedenstrøms for env og cellen selekteres i 6 thioguanin for den HPRT-defekte fænotype. Der kræves store mængder antisens-HPRT for at inaktivere HPRT-gentranskriptionerne under forudsætning af, at der ikke indtraf reversion.

#### 15 Kappesubstitutioner

- Evnen til at udtrykke gagpol- og envfunktion giver hver for sig mulighed for manipulation af disse funktioner uafhængigt af hinanden. En cellelinie, der udtrykker rigelige mængder gag/pol kan anvendes f.eks. til at rette spørgsmål
- 20 angående titere med hensyn til env. En faktor, der resulterer i lave titere, er massefylden af de hensigtsmæssige receptormolekyler på målcellen eller væv. Hvis env-ekspression stammer fra en separat enhed kan en række kappegener (der kræver forskellige receptorproteiner), såsom xenotrope, polytrope eller amfotrope env'er fra en række kilder, blive afprøvet for højeste
- 25 titere på et specifikt målvæv. Endvidere kan kapper fra ikke-murine retroviruskilder anvendes til pseudotypebestemmelse af en vektor. Dertil kommer, at hybridkapper (som beskrevet nedenfor) også kan anvendes i dette system for at tilpasse tropisme (og på effektiv måde forøge titere) af en retroviral vektor. Omvendt kan en cellelinie, der udtrykker rigelige mængder af et givent
- 30 kappegen anvendes til at rette spørgsmål angående titer med hensyn til gag og pol.



## II. Alternative viral vektor-indpakningsteknikker

- To yderligere alternative systemer kan anvendes til at fremstille rekombinante retrovira, der bærer vektorkonstruktionen. Hvert af disse systemer drager fordel af, at insektvirus'et, baculovirus, og pattedyrsvira, vaccinia- og adenovirus for nylig er blevet tilpasset til at frembringe store mængder af et hvilket som helst givet protein, hvortil genet er blevet klonet. Se f.eks. Smith et al., (Mol. Cell. Biol. 3:12, 1983), Piccini et al. (Meth. Enzymology, 153:545, 1987), og Mansour et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:1359, 1985).
- Disse virale vektorer kan anvendes til at fremstille proteiner i vævskulturceller ved indførelse af hensigtsmæssige gener i den virale vektor og de kan følgelig tilpasses til at frembringe retrovirale vektorpartikler.
- Adenovirusvektorer er afledt fra nukleus-replikerende vira og kan være defekte. Gener kan indføres i vektorer og anvendes til at udtrykke proteiner i pattedyrsceller enten ved *in vitro*-konstruering (Ballay et al., EMBO J. 4:3861, 1985) eller ved rekombination i celler (Thummel et al., J. Mol. Appl. Genetics 1:435, 1982).
- En foretrukken fremgangsmåde er konstruering af plasmider under anvendelse af adenovirus'et Major Late Promoter (MLP), der driver: (1) gag/pol, (2) env, (3) en modificeret viral vektorkonstruktion. En modificeret viral vektorkonstruktion er mulig, fordi U3-regionen af 5'LTR, der indeholder den virale vektorpromoter, kan erstattes af andre promotersekvenser (se f.eks. Hartman, Nucl. Acids. Res. 16:9345, 1988). Denne del vil blive erstattet efter en omgang revers transkriptase af U3 fra 3'LTR.
- Plasmiderne kan så anvendes til at frembringe adenovirusgenomer *in vitro* (Ballay et al., *op.cit.*), og disse transficeres i 293-celler (en human cellelinie, der frembringer adenovirus E1A-protein), med hensyn til hvilke de adenovirale vektorer er defekte, til opnåelse af rene bestande af gag, pol, env og retroviral vektor, der bæres separat i defekte adenovirusvektorer. Eftersom titere

af sådanne vektorer typisk ligger på  $10^7$ - $10^{11}$ /ml, kan disse bestande anvendes til at inficere vævskulturceller samtidig ved høj multiplicitet. Cellerne vil så blive programmeret til at frembringe retrovirale proteiner og retrovirale vektorgenomer ved høje niveauer. Eftersom adenovirusvektorerne er defekte, vil der ikke forekomme store mængder direkte cellyse og retrovirale vektorer kan høstes fra cellesupernatanterne.

I et alternativt system (der er mere reelt ekstracellulært) anvendes der følgende komponenter:

10

1. gag/pol- og env-proteiner fremstillet i baculovirussystemet på lignede måde som beskrevet i Smith et al. (supra) (eller i andre proteinproduktions-systemer, såsom gær eller E. coli,
- 15 2. viralt vektor-RNA fremstillet i det kendte T7- eller SP6- eller andet in vitro RNA-dannende system (jvf. f.eks. Flamant og Sorge, J. Virol. 62:1827, 1988),
3. tRNA fremstillet som under (2) eller oprenset fra gær eller patte-  
20 dyrsvævskulturceller,
4. liposomer (med indlagt env-protein), og
5. celleekstrakter eller oprensede nødvendige komponenter (når de er  
25 identificerede) (typisk fra museceller) til frembringelse af env-forarbejdning, og en hvilken som helst af eller en anden nødvendig celle-afledt funktion.

Ifølge fremgangsmåden blandes (1), (2) og (3), og derefter tilsættes env-proteinet, celleekstrakt og præliposomblanding (lipid i et egnet opløsnings-  
30 middel). Det kan imidlertid være nødvendigt på et tidligere tidspunkt at indlægge env-proteinet i liposomerne inden tilsætning af det resulterende liposom-indlagte env til blandingen af (1), (2) og (3). Blandingen behandles (f.eks. ved ultralydbehandling, temperaturmanipulering eller roterende dialy-

se) for at tillade indkapsling af de virale partikler under udvikling med lipid plus indlagt env-protein på lignende måde som ved liposom-indkapsling af farmaceutiske midler som beskrevet af Gould-Fogerite et al., Anal. Biochem. 148:15, 1985). Denne fremgangsmåde muliggør fremstilling af høje titere af replikationsinkompetente rekombinante retrovira uden kontaminering med patogene retrovira eller replikationskompetente retrovira.

### III. Cellelinie-specifikke retrovira - "Hybridkappe"

- 10 Værtscelleområdespecificiteten af et retrovirus bestemmes delvis af env-genprodukterne. For eksempel bemærkes det i Coffin, J. (RNA Tumor Viruses 2:25-27, Cold Spring Harbor, 1985), at den ekstracellulære komponent af proteinerne fra murin leukæmivirus (MLV) og Rous Sarcoma virus (RSV) er ansvarlig for specifik receptorbinding. Det cytoplasmatiske område for kappeproteiner menes på den anden side at spille en rolle for virion-dannelse. Skønt pseudotypebestemmelse (dvs. indkapsling af viralt RNA fra en art med virale proteiner fra en anden art) finder sted med lav hyppighed, har kappeproteinet nogen grad af specificitet overfor virion-dannelse af et givent retrovirus. Det erkendes i den foreliggende opfindelse, at ved at skabe et hybrid-env-gen-produkt (dvs. specifikt et env-protein med cytoplasmatiske områder og eksogene bindingsområder, der ikke er det samme proteinmolekyle i naturen) kan værtsområdespecificiteten blive ændret uafhængigt af den cytoplasmatiske funktion.
- 20
- 25 Der kan således fremstilles rekombinante retrovira, der specifikt vil binde til forudselektede målceller.

For at frembringe hybridprotein, hvori den receptorbindende komponent og den cytoplasmatiske komponent kommer fra forskellige retrovira, ligger en foretrukken lokalitet for rekombination inden i det membranomspændende område af den cytoplasmatiske komponent. Eksempel 8 beskriver konstrueringen af et hybrid-env-gen, der udtrykker et protein med den CD4-bindende

30

del af HIV-kappeproteinet koblet til det cytoplasmatiske område af MLV-kappeproteinet.

#### Eksempel 4

5

#### Hybrid-HIV-MLV-kapper

Et hybrid-kappegen fremstilles under anvendelse af in vitro mutagenese (Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488-492, 1985) for at indføre et nyt restiktnssted på et hensigtsmæssigt sammenføjningssted. Hvis de to kappe-  
10 pesekvenser befinder sig på samme plasmid kan de alternativt sammenføjes direkte på et hvilket som helst ønsket sted under anvendelse af in vitro mutagenese. Slutresultatet bliver i alle tilfælde et hybridgen, der indeholder 5'-enden af HIV gp 160 og 3'-enden af MLB p15E. Det hybridprotein, der ud-  
15 trykkes af det resulterende rekombinante gen, er illustreret i fig. 18 og indeholder HIV gp120 (CD4-receptorbindende protein), den ekstracellulære del af HIV gp 41 (de gp 120-bindende og fusigene områder), og den cytoplasmatiske del af MLV p15E, hvor sammenføjnningen foregår ved et hvilket som helst af flere punkter indenfor værtscellemembranen. Et hybridgen, der er  
20 fremstillet ved det nye Eco R1-sted, som er vist i fig. 18, er udtrykt under styring af CMVIE-genet i human Sup T1-celler og fører til syncytia, som det er tilfældet med autentisk HIV-env-gen. Hybridgen bliver således korrekt transporteret til celleoverfladen og vises her.

25 Medens eksempel 4 illustrerer et hybridprotein, der er fremstillet ud fra to forskellige retrovira, begrænser mulighederne sig ikke til retrovira eller endog ganske enkelt til andre vira. For eksempel kan  $\beta$ -receptordelen af human interleukin-2 kombineres med kappeproteinet af MLV. I dette tilfælde vil en re-  
kombination fortrinsvis være lokaliseret til gp 70-positionen af MLV-env-genet, hvilket efterlader et intakt p15E-protein. Endvidere kan den ovenfor  
30 beskrevet teknik anvendes til at skabe et rekombinant retrovirus med et kappeprotein, der genkender antistof-Fc-segmenter. Monoklonale antistoffer, der kun genkender forudselektede målceller, kan så bindes til et sådant re-

kombinant retrovirus, der udviser disse kappeproteiner, således at retrovirus'et kun bindes til og inficerer disse forudselektede målceller.

#### IV. Stedsspecifik integration

5

Målretning af en retroviral vektor mod et forud bestemt locus (sted) på et kromosom forøger fordelene ved gen-leveringssystemer. Der opnås en sikkerhedsforanstaltning ved direkte integration i et "sikkert" sted på et kromosom, dvs. et, der har vist sig ikke at have nogen skadelig virkning som følge af insertionen af en vektor. En anden eventuel fordel er evnen til at dirigere et gen mod et "åbent" område af et kromosom, hvor ekspressionen heraf vil blive optimeret. To teknikker til integrering af retrovira på specifikke steder er beskrevet nedenfor.

##### 15 (i) Homolog rekombination

I en teknik til integrering af et eksogent gen for en vektorkonstruktion af et rekombinant retrovirus i et specifikt sted i et målcelle-DNA anvendes der homolog rekombination. Plasmider, der indeholder DNA-sekvenser, som er større end ca. 300 bp, der er homologe med genome sekvenser, har vist sig at vekselvirke (enten ved erstatning eller indførelse) med disse genome sekvenser i et omfang, som er højere end  $10^3$  gange en specifik vekselvirkning i fravær af sådan homologi (se Thomas og Capecchi, Cell 51:503-12, 1987, og Doetsheiman et al., Nature 330:576-78, 1987). Det har vist sig, at en insertionshændelse eller alternativt en erstatningshændelse kan drives af vektorens specifikke udformning.

For at anvende homolog rekombination i stedsspecifik retroviral integration, skal en vektorkonstruktion modificeres, således at (a) homologe sekvenser (til målcellegenomet) inkorporeres i konstruktionen på en hensigtsmæssig lokaliserings, og (b) den normale integrationsmekanisme ikke interfererer med den målretning, der opstår på grund af homologe sekvenser. En foretrukket fremgangsmåde i denne henseende er at tilføje homologe sekvenser (større

end ca. 300 bp) i 3'LTR, nedenstrøms for den U3-inverterede repeat. Ifølge denne fremgangsmåde fremstilles konstruktionen indledningsvis med et homologiområde indføjet i 3'LTR ved Nhe 1-stedet i U3. Revers transkriptase i værtscellen vil føre til duplikation af homologiområdet i 5'LTR inden for 31 bp af enden af det inverterede repeat (IR). Integration i værtsgenomet vil forekomme i nærvær eller fravær af den normale integrationsmekanisme. Genet i vektoren kan udtrykkes, hvad enten det er fra LTR eller fra en indre promoter. Denne fremgangsmåde har den virkning, at der placeres et homologiområde nær ved en potentiel fri ende af det dobbelt-strengede retrovirusvektorgenom. Frie ender vides at øge frekvensen af homolog rekombination med en faktor på ca. 10. Ved denne fremgangsmåde kan det være nødvendigt at overvinde den normale integrationsmekanisme eller i det mindste at modificere den for at decelerere processen, således at homologe DNA-er får tid til at komme frem. Hvorvidt denne sidste ændring er nødvendig i det specifikke tilfælde vil nemt kunne bestemmes af fagmanden.

#### (ii) Integrasemodifikation

En anden teknik til integrering af en vektorkonstruktion i specifikke, forudvalgte steder af et målcellegenom involverer integrasemodifikation.

Retrovirus-pol-genproduktet forarbejdes generelt til fire dele: (i) en protease, der forarbejder de virale gag- og pol-produkter, (ii) revers transkriptase, og (iii) RNase H, der nedbryder RNA af et RNA/DNA-dupleks, samt (iv) endonuklease eller "integrase".

Den generelle integrasestruktur er blevet analyseret af Johnson et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:7648-7652, 1986). Det er blevet foreslået, at dette protein har en zink-bindende finger, hvormed det vekselvirker med værts-DNA'et, før de retrovirale sekvenser integreres.

I andre proteiner gør sådanne "fingre" det muligt, at proteinet binder til DNA ved specifikke sekvenser. Et illustrativt eksempel er steroidreceptorer. I dette

tilfælde kan man frembringe en estrogenreceptor, der responderer på estrogener, som virker som glucocorticoid receptor, der responderer på glucocorticoider, ganske enkelt ved at substituere glucocorticoidreceptor-"fingeren" (dvs. det DNA-bindende segment) i stedet for estrogenreceptor-fingersegmentet i estrogenreceptorgenet. I dette eksempel er den position i 5 genomet, mod hvilken proteinerne er målrettet, blevet ændret. Sådanne dirigerende sekvenser kan også substitueres ind i integrasegenet i stedet for den omhandlede zinkfinger. For eksempel kan det segment, der koder for det DNA-bindende område af human estrogenreceptoren være substitueret der, 10 hvor den DNA-bindende region af integrase i et indpakningsgenom er. Indledningsvis bliver specifik integration afprøvet ved et in vitro integrationssystem (Brown et al., Cell 29:347-356, 1987). For at bekræfte, at specificiteten vil blive set in vivo, anvendes dette indpakningsgenom til at frembringe infektiøse vektorpartikler, og infektion af og integration ind i estrogen-sensitive og 15 estrogen-ikke-sensitive celler sammenlignet i kultur.

Gennem anvendelse af denne teknik kan indkommende virale vektorer rettes mod at integrere ind i forudselektede steder på målcellens genom, dirigeret af de genom-bindende egenskaber af de stedsspecifikke DNA-bindende proteinsegmenter, der er splejset ind i integrasegenomet. Det vil blive forstået af 20 fagmanden, at integrationsstedet faktisk skal være modtageligt over for fingrene af den modificerede integrase. Eksempelvis er de fleste celler følsomme overfor glucocorticoider og følgelig har deres kromatin-steder for glucocorticoid-receptorer. For de fleste celler vil en modificeret integrase med en glucocorticoid-receptorfinger således være egnet til at integrere den provirale 25 vektorkonstruktion på disse glucocorticoid-receptorbindingssteder.

#### V. Produktion af rekombinante retrovirale vektorer i transgene dyr

30 To problemer, der tidligere er blevet beskrevet i forbindelse med hjælpelinie-dannelse af retrovirale vektorer er: (a) vanskelighed med at danne store mængder vektorer, og (b) det for øjeblikket eksisterende behov for at anvende permanente celler i stedet for primærceller til at frembringe vektorer. Dis-

se problemer kan overvindes med producent- eller indpakningslinier, der er dannet i transgene dyr. Disse dyr vil bære indpakningsgenomerne og retrovirale vektorgenomer. Nutidig teknologi giver ikke mulighed for dannelse af indpakningscellelinier og ønskede vektorproducerende linier i primærceller

5 på grund af deres begrænsede levetid. Nutidig teknologi er sådan, at omfattende karakterisering er nødvendig, hvilket udelukker anvendelse af primærceller på grund af senescens. Imidlertid kan der dannes individuelle linier af transgene dyr ved de fremgangsmåder, der tilvejebringes heri, som frembringer indpakningsfunktionerne, såsom gag, pol eller env. Disse linier fra dyr

10 karakteriseres derefter for ekspression enten i hele dyret eller målmærket væv gennem selektiv anvendelse af husholdnings- eller vævsspecifikke promotere til at transkribere indpakningsfunktionerne. Den vektor, der skal leveres, indføres også i en linie af transgene dyr med en vævsspecifik eller husholdningspromoter. Som beskrevet ovenfor kan vektoren drives fra en sådan

15 promoter, der substituerer for U3-området af 5'LTR (fig. 8). Dette transgen kan være inducerbart eller ubikvitært forekommende i sin ekspression. Denne vektor er dog ikke indpakket. Disse linier fra dyr parres så med gag/pol/env-dyr og efterfølgende afkom producerer indpakket vektor. Afkommet, der er i alt væsentligt identisk, karakteriseres og frembyder en ubegrænset kilde for primært producerende celler. Alternativt kan primærceller, der frembringer gag/pol og env og som er afledt fra transgene dyr, inficeres eller transficeres i store partier med retrovirusvektorer til frembringelse af primærcelle-producentlinier. Mange forskellige transgene dyr eller insekter kan frembringe disse vektorer, såsom mus, rotter, kyllinger, grise, kaniner,

20 køer, får, fisk og fluer. Vektoren og indpakningsgenomerne vil blive tilpasset artsinfektionsspecificitet og vævsspecifik ekspression gennem anvendelse af vævsspecifikke promotere og forskellige kappeproteiner. Et eksempel på en sådan fremgangsmåde er illustreret i fig. 9.

25

30 Selv om følgende eksempler på transgen produktion af primære indpakningslinier kun er beskrevet for mus, kan disse fremgangsmåder af fagmanden udvides til at omfatte andre arter. I betragtning af homologi i MLV-sekvenser i musegenom vil de endeligt foretrukne dyr ikke være mus.



## Eksempel 5

Produktion af gag-pol-proteiner under anvendelse af husholdningspromotere for ubikvitær ekspression i transgene dyr

5

Et eksempel på en velkarakteriseret husholdningspromoter er HPRT-promoteren. HPRT er et purin-redningsenzym, der udtrykkes i alle væv. (Se Patel et al., Proc. Cell. Biol. 6:4-403, 1986 og Melton et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 81:2147-2151, 1984). Denne promoter vil blive indføjet foran forskellige gag/pol-fragmenter (f.eks. Bal I/Sca I; Aat II/Sca I, Pst I/Sca I af MoMLV, jvf. RNA Tumor Viruses 2, 1985, Cold Spring Harbor Laboratory, 1985), der er klonet i Blueskript plasmider (Stratagene, Inc.) under anvendelse af rekombinant DNA-teknikker (se Maniatis et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1982). De resulterende plasmider oprenses (Maniatis et al., op.cit.) og den relevante genetiske information isoleres under anvendelse af GeneClean (Bio 101) eller elektroeluering (se Hogan et al., (udg.) Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 1986).

20 Disse fuldt karakteriserede DNA'er vil være mikroinjicerede i pronukleus af frugtbare museæg i en koncentration på 2 µg/ml. Levendefødte mus bliver screenet ved tail-blot-analyser (jvf. Hogan et al. op.cit.) Transgent positive dyr bliver karakteriseret for ekspressionsniveauer af gag-pol-proteiner ved immunpræcipitation af radioaktivt mærkede primærceller, såsom fibroblast (se Harlow et al., udg. Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, 25 1988). Dyr vil så blive avlet til homozygositet til etablering af dyrelinier, der producerer karakteriserede niveauer af gag-pol.

30

## Eksempel 6

Produktion af env-proteiner/hybrid-kappeproteiner under anvendelse af husholdningspromotere til ubikvitær ekspression i transgene dyr

5

I dette eksempel anvendes HPRT-promoteren til ekspression af enten kappe- eller hybridkappeproteiner. Kappeproteinerne kan hidrøre fra et hvilket som helst retrovirus, der er i stand til at komplementere det relevante gag-pol, i dette tilfælde fra MLV. Eksempler er ekotrop MLV, amfotrop MLV, xenotrop MLV, polytrop MLV eller hybridkapper. Som ovenfor vil kappegenet blive klonet bag HPRT-promoteren under anvendelse af rekombinante DNA-teknikker (se Maniatis et al., op.cit.). Det resulterende "minigen" vil blive isoleret (se Hogan et al., op.cit.), og ekspression af kappeprotein vil blive bestemt (Harlow et al., op.cit.). De transgene kappedyr bliver avlet til homozygositet til etablering af et velkarakteriseret kappedyr.

10  
15

## Eksempel 7

Produktion af gag-pol-env-dyr under anvendelse af husholdningspromotere til ubikvitær ekspression i transgene dyr

20

Heri skal der anvendes de velkarakteriserede gag-pol-dyr, og også dyr til etablering af en permanent gag-poly/kappedyrlinie. Dette vil medføre avl til homozygositet og etablering af en velkarakteriseret linie. Disse linier vil så blive anvendt til at etablere primærmuseembryolinier, der vil kunne anvendes til indpakning af vektorer i vævskultur. Endvidere vil dyr, der indeholder den retrovirale vektor, kunne blive avlet i denne linie.

25

## Eksempel 8

Produktion af vævsspecifik ekspression af gag-pol-env- eller hybrid kappe i transgene dyr

5

Dette eksempel anviser, hvordan direkte vævsekspression af gagpol, kappe eller hybridkappe rettes mod specifikke væv, såsom T-celler. Dette medfører anvendelse af CD2-sekvenser (se Lang et al., EMBO J. 7: 1675-1682, 1988), der angiver position og kopiantalsafhængighed. 1,5 kb Bam H1/Hind III-Fragmentet fra CD2-genet indføres foran gag-pol-, kappe- eller hybridkappefragmenterne under anvendelse af rekombinante DNA-teknikker. Disse gener vil blive indført i frugtbare museæg ved mikroinjicering. Transgene dyr vil blive karakteriseret som før. Ekspression i T-celler vil blive etableret. Dyr vil blive avlet til homozygositet til etablering af velkarakteriserede linier af transgene dyr. Gag-pol-dyr bliver parret med kappedyr til etablering af gag-pol-env-dyr, der kun udtrykker i T-celler. T-cellerne af disse dyr vil så være en kilde for T-celler, der er i stand til at indpakke retrovirale vektorer. Igen kan vektordyr blive avlet i disse gag-pol-env-dyr til etablering af T-celler, der udtrykker vektoren.

20

Denne teknik gør det muligt at anvende andre vævs-specifikke promotere, såsom mælkespecifikke (hvede), pancreas- (insulin eller elastase) eller neuronale- (myelinbaseprotein) promotere. Gennem anvendelse af promotere, såsom mælke-specifikke promotere, kan rekombinante retrovira isoleres direkte fra afkommets biologiske væske.

25

## Eksempel 9

Produktion af enten husholdnings- eller vævsspecifikke retrovirale vektorer i transgene dyr

30

Insertionen af retrovira eller retrovirale vektorer i bakterielinien af transgene dyr resulterer i ringe eller ingen ekspression. Denne virkning, der er beskrevet

vet af Jaenisch (se Jahner et al., Nature 298:623-628, 1982) tilskrives methylering af 5'-retrovirale LTR-sekvenser. Med denne teknik vil man overvinde methyleringsvirkningen ved substituering af enten en husholdnings- eller en vævsspecifik promoter til at udtrykke den retrovirale vektor/retrovirus. U3-

5 Området af 5'LTR, der indeholder de forstærkende elementer, erstattes med regulerende sekvenser fra husholdnings- eller vævsspecifikke promotere (se fig. 8). 3'LTR tilbageholdes fuldstændigt, idet det indeholder de sekvenser, der er nødvendige for polyadenylering af det virale RNA og integration. Som resultat af de enestående egenskaber af retroviral replikation, dannes U3-

10 området af 5'LTR af det integrerede provirus ved U3-området af det inficerende virus. 3' Er således nødvendig, medens 5' U3 kan undværes. Substitution af 5'LTR U3-sekvenserne med promotere og indføring i bakterielinien af transgene dyr resulterer i linier af dyr, som er i stand til at producere retrovirale vektor-transkriberinger. Disse dyr vil så blive parret med gag-pol-env-dyr

15 til dannelse af retroviralt producerende dyr (se fig. 9).

## P a t e n t k r a v

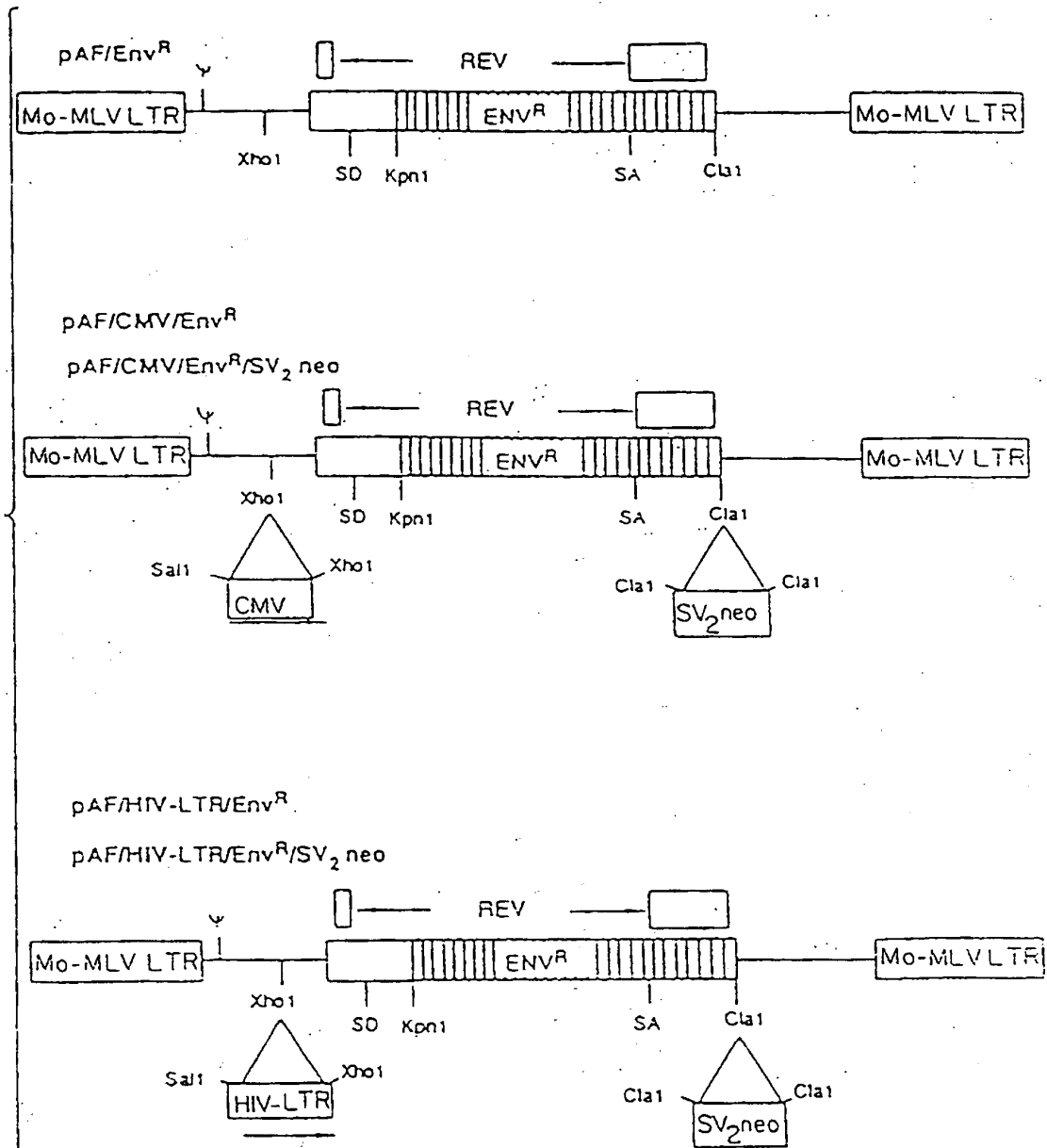
1. Replikationsdefekt rekombinant retrovirus, som er i stand til at inficere hu-  
manceller som bærer en vektorkonstruktion, som er i stand til at forhindre,  
5 hæmme, stabilisere eller vende forløbet af infektions-, kræft- eller autoim-  
munsygdomme, k e n d e t e g n e t ved, at  
vektorkonstruktionen dirigerer ekspression af et sygdomsantigen fra et  
patogent middel eller er et kræftantigen eller modificeret form heraf i målcel-  
ler, der er inficeret med retroviruset,  
10 hvilket antigen eller modificeret form heraf er i stand til at stimulere cel-  
lemedieret immunrespons i et menneske.
2. Rekombinant retrovirus ifølge krav 1, k e n d e t e g n e t ved, at vektor-  
konstruktionen dirigerer ekspression af en modificeret form af et sygdomsan-  
15 tigen fra et patogent middel i en målcelle, der er inficeret med retroviruset,  
hvilket modificeret antigen er i stand til at stimulere et immunrespons i et  
menneske, men med reduceret patogenicitet i forhold til det patogene middel.
3. Rekombinant retrovirus ifølge krav 1 eller 2, k e n d e t e g n e t ved, at det  
20 udtrykte antigen udløser et HLA-klasse I- eller klasse II-begrænset immunre-  
spons.
4. Rekombinant retrovirus ifølge et vilkårligt af kravene 1-3, k e n d e t e g -  
n e t ved, at det udtrykte antigen er et HIV-protein valgt blandt gruppen be-  
25 stående af gp160, gp120 og gp41, eller modificerede former heraf.
5. Farmaceutisk sammensætning, omfattende et rekombinant retrovirus iføl-  
ge et vilkårligt af kravene 1 til 4, i kombination med en fysiologisk acceptabel  
bærer eller fortyndingsmiddel.  
30
6. Rekombinant retrovirus ifølge et vilkårligt af kravene 1-4 eller en sammen-  
sætning ifølge krav 5 til anvendelse som en aktiv terapeutisk substans i en  
fremgangsmåde til behandling af menneskelegemet.

7. Fremgangsmåde til fremstilling af en rekombinant retrovirus som defineret i et vilkårligt af kravene 1 til 4 omfattende:

- 5 indpakning af en vektorkonstruktion i et kapsid og kappe, således at retroviruset fremstilles.
8. Ex vivo celler inficeret med et rekombinant retrovirus ifølge et vilkårligt af kravene 1 til 4.
- 10
9. Eukaryotisk celle, der er i stand til at fremstille en replikationsdefekt rekombinant retrovirus ifølge et vilkårligt af kravene 1 til 4, hvilken celle indeholder et retroviraltgenom for den rekombinante retrovirus med et paknings-signal og koder for et sygdomsantigen, som er fra et patogen middel eller er et
- 15 kræftantigen eller en modificeret form heraf, men mangler den kodende sekvens for et eller flere retrovirale proteiner, og cellen også er i stand til at udtrykke virale proteiner til fremstilling af det rekombinante retrovirus.
- 20
10. Celle ifølge krav 8 eller 9 til anvendelse i fremgangsmåder til behandling af et menneske- eller dyrelegeme.

RETROVIRALE KONSTRUKTIONER AF ENV<sup>R</sup>

FIG. 1



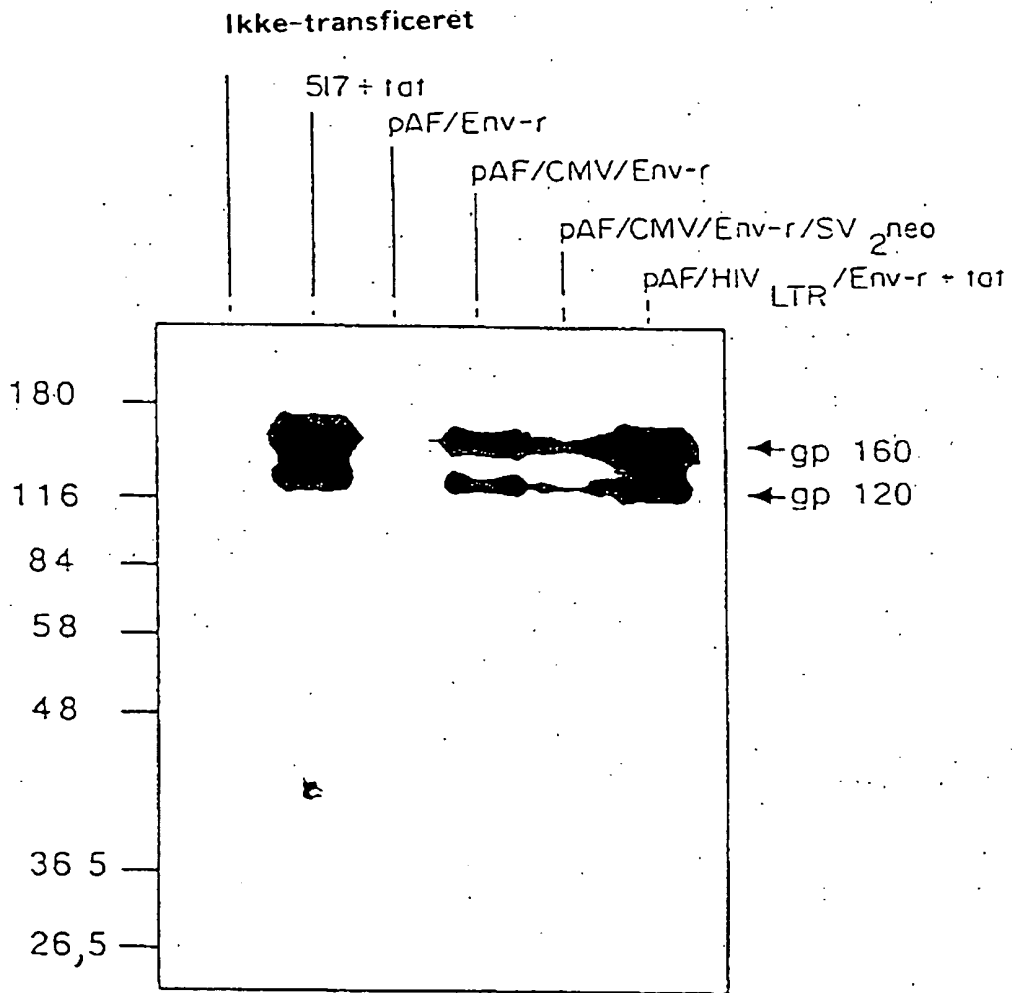
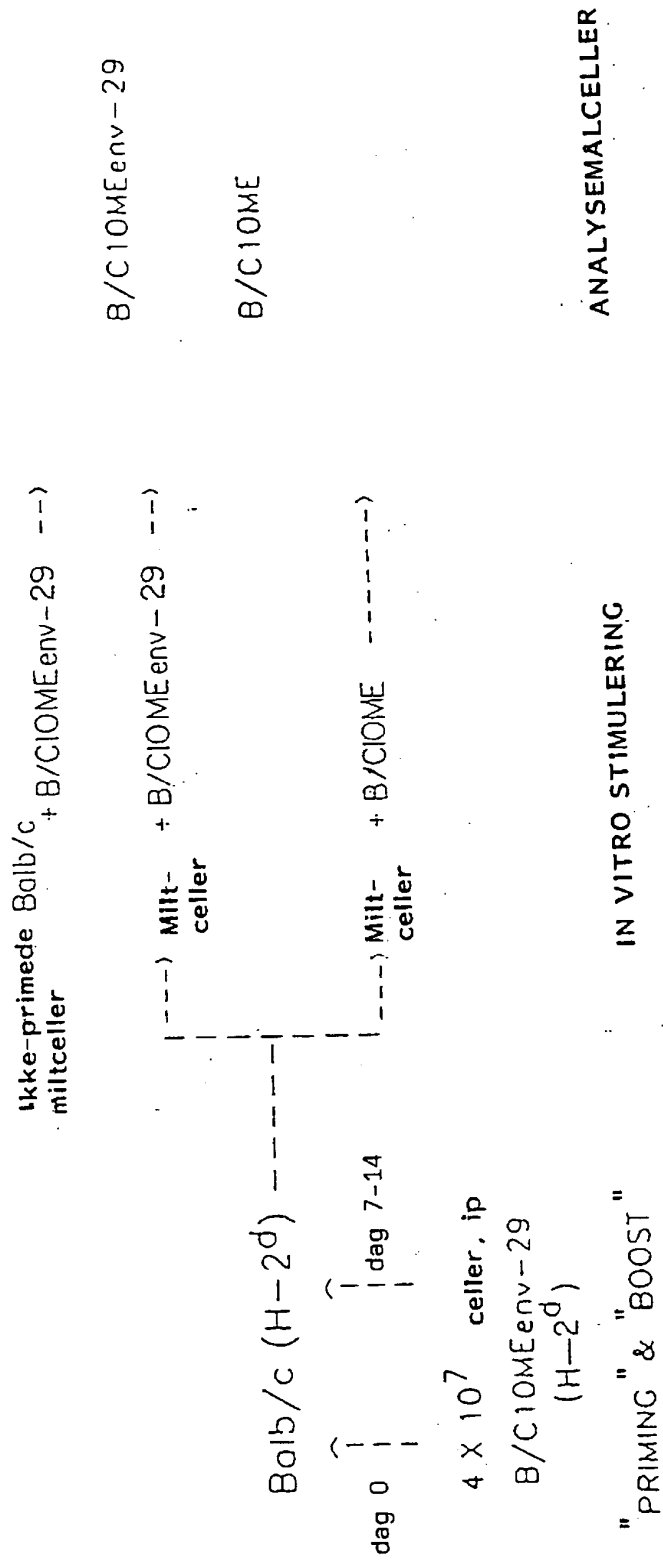


FIG. 2



INDUKTION AF ANTI-HIV env CTL i Balb/c-MUS  
 UNDER ANVENDELSE AF RETROVIRALT INFICEREDE  
 STIMULATORCELLER

FIG. 3



IN VIVO CTL-INDUKTION UNDER ANVENDELSE AF  
B/C10MEenv-29

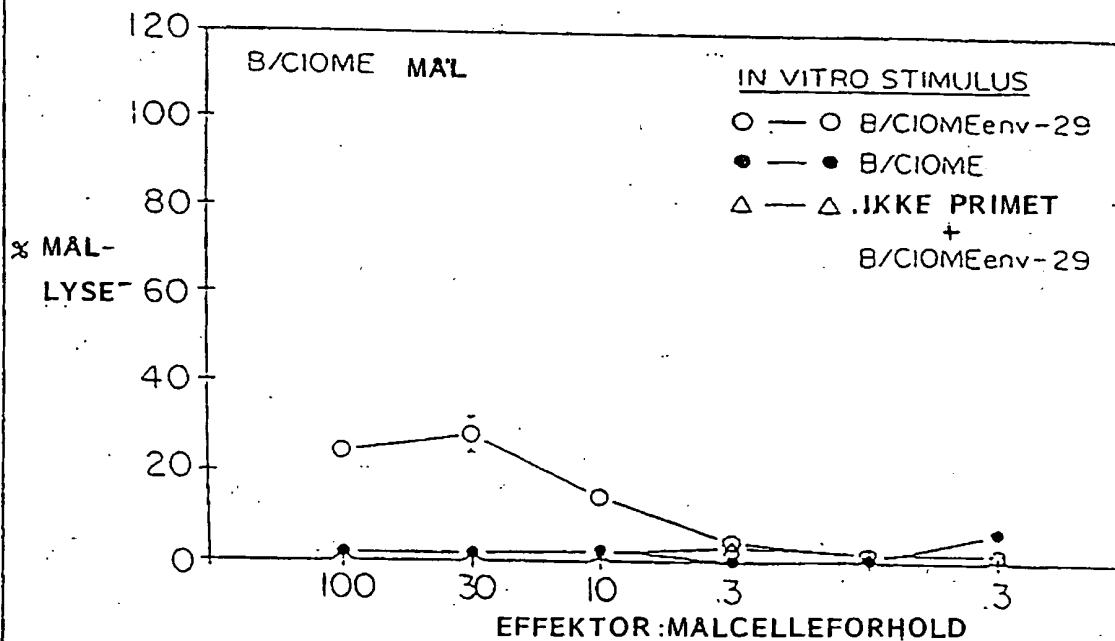
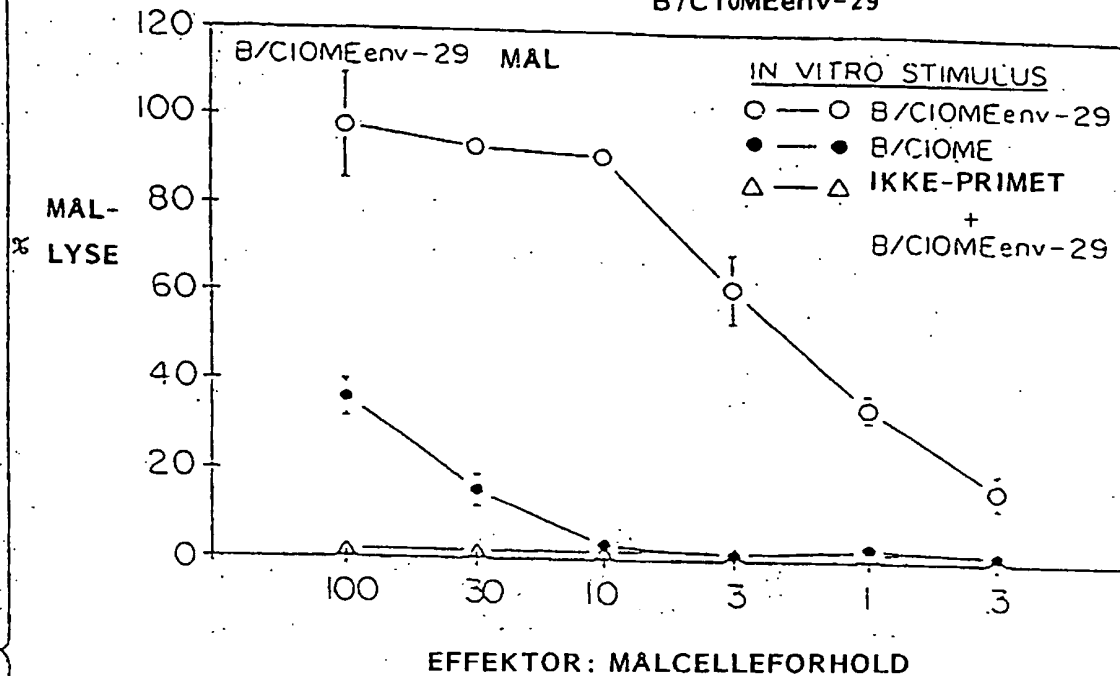
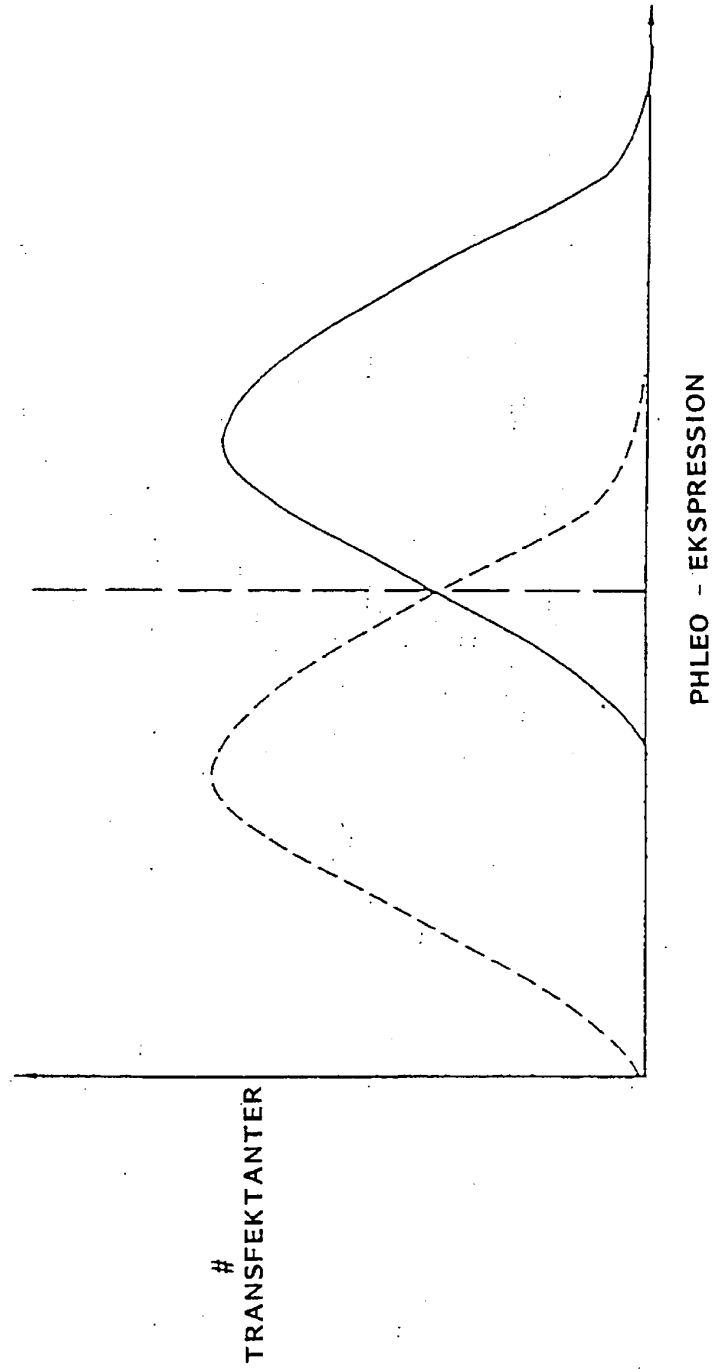


FIG. 4

FIG. 5  
Phleosensitiv      Phleoresistent



PLASMIDER UDFORMET TIL AT FØRØGE VIRAL PROTEINPRODUKTION

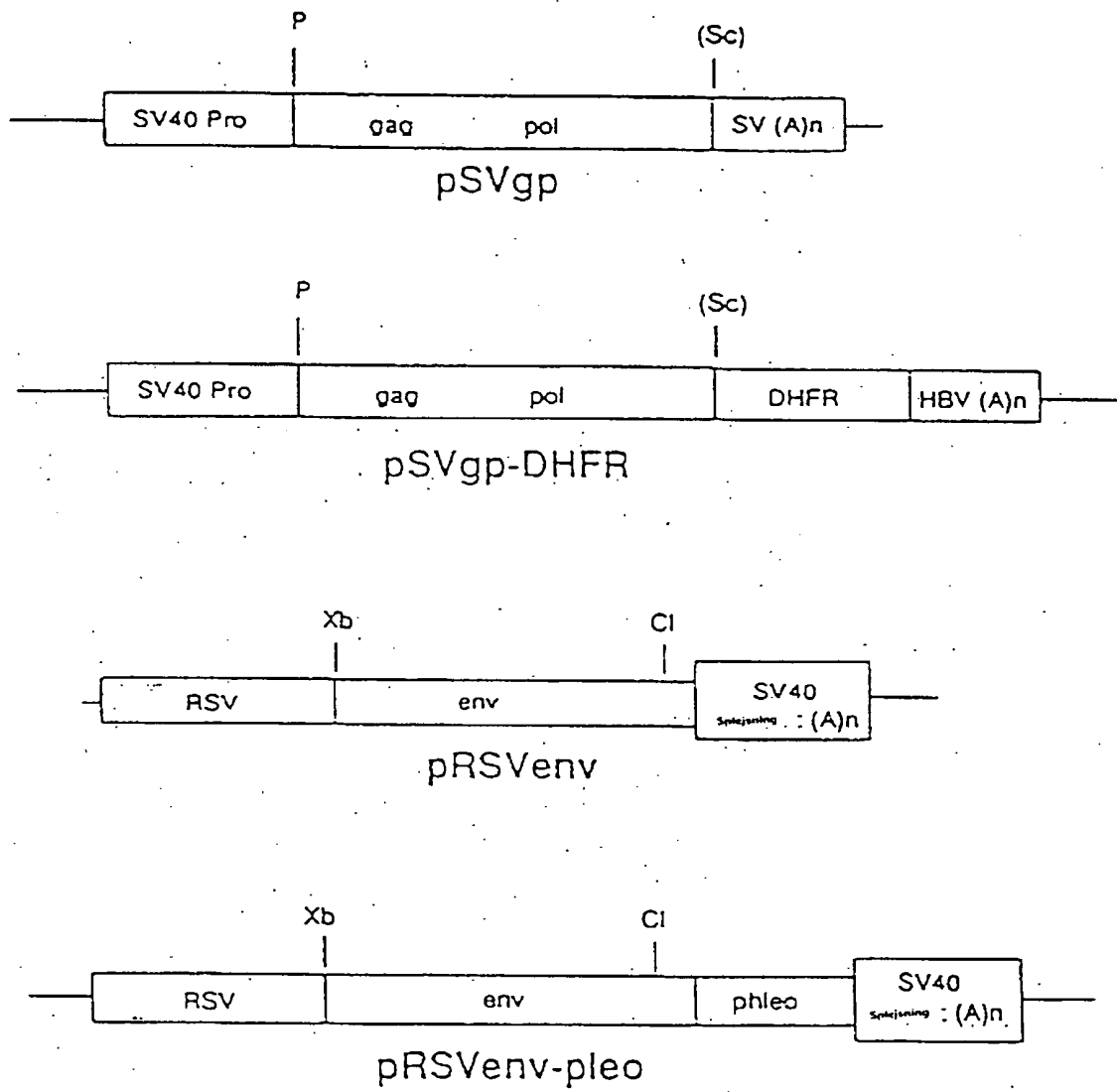
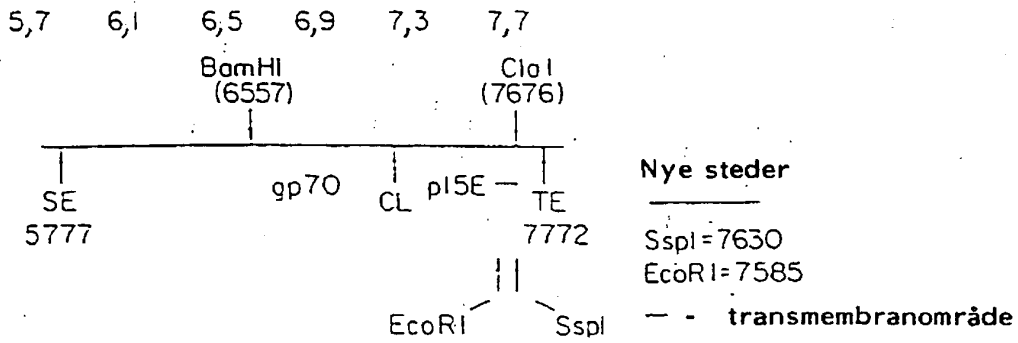


FIG. 6

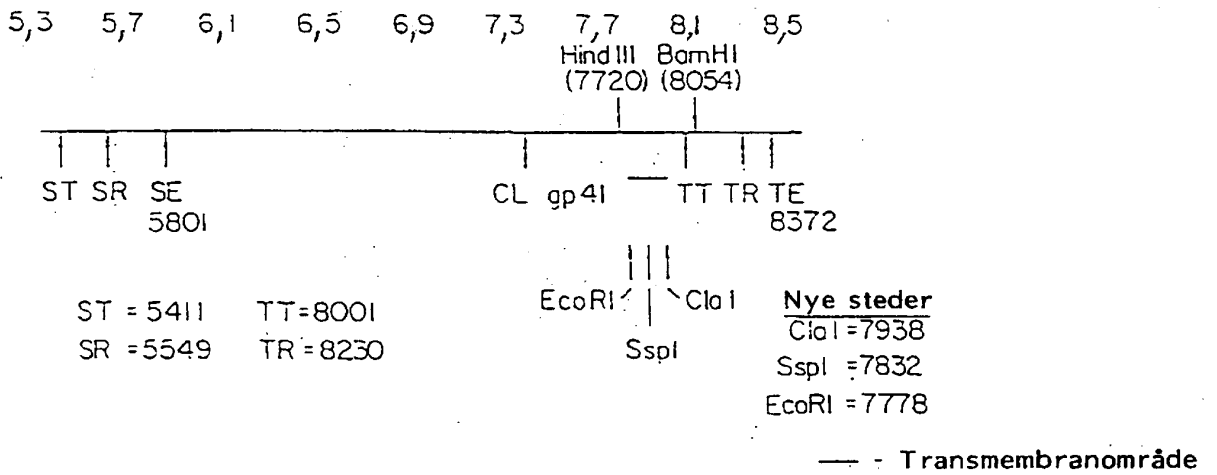
FIG. 7

SKABELSE AF FUSIONSSTEDER PÅ MLV OG HIV env-GENER

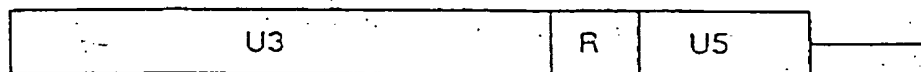
MLV



HIV



A. Normal 5' LTR



B. Hybrid 5' LTR

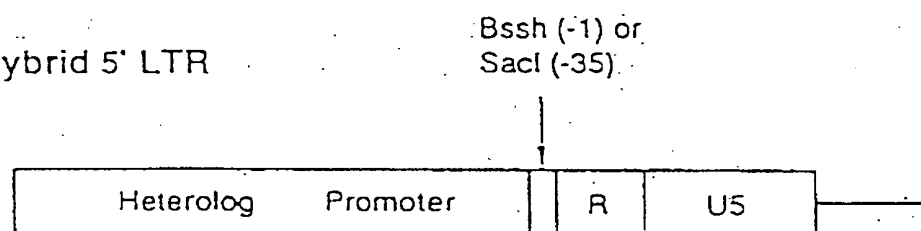


FIG. 8

FIG. 9

