(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 669 T2** 2008.12.04

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 772 689 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 669.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/05789**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 920 386.0**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/030763**
(86) PCT-Anmeldetag: **09.05.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **16.11.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **14.05.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **19.12.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **04.12.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/86*** (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 7/04 (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 14/005 (2006.01)
C07K 14/15 (2006.01)
C07K 14/54 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
240030 **09.05.1994** **US**

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

(73) Patentinhaber:
Oxford Biomedica (UK) Ltd., Oxford, GB

(72) Erfinder:
RESPESS, James G., San Diego, CA 92109, US

(74) Vertreter:
Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183 Wiesbaden

(54) Bezeichnung: **RETROVIRALE VEKTOREN MIT VERMINDERTER REKOMBINATIONSRATE**

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

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Erfindung bezieht sich allgemein auf retrovirale Vektoren zur Verwendung beim Gentransfer, und genauer, um retrovirale Vektoren, die so konstruiert sind, dass die Bildung von replikationsfähigen Viren durch Rekombination verhindert wird.

Hintergrund der Erfindung

[0002] Retroviren sind RNA-Viren, die sich replizieren können und in ein Genom einer Wirtszelle durch DNA-Intermediate eingebaut werden können. Diese DNA-Intermediate oder Proviren können stabil in die zelluläre DNA des Wirtes eingebaut werden. Es ist bekannt, dass Retroviren für eine große Bandbreite an Krankheiten bei sowohl Mensch als auch Tieren verantwortlich sind, einschließlich z. B. AIDS und eine große Bandbreite an Krebsarten.

[0003] Obwohl Retroviren Erkrankungen verursachen können, haben sie auch eine Anzahl an Eigenschaften, die dazu führen, dass sie als eine der vielversprechendsten Techniken zur genetischen Therapie von Erkrankungen erachtet werden. Diese Eigenschaften umfassen: (1) Effizientes Eindringen des genetischen Materials (des Vektorgenoms) in Zellen, (2) ein aktiver effizienter Vorgang des Eindringens in den Zielzellkern, (3) verhältnismäßig hohe Niveaus an Genexpression, (4) ein minimaler pathologischer Effekt auf Zielzellen und (5) die Möglichkeit auf bestimmte zelluläre Subtypen zu zielen durch Kontrolle der Vektor-Ziel-Zellbindung und gewebespezifische Kontrolle der Genexpression. Bei der Verwendung eines Retrovirus zur Gentherapie kann ein fremdes interessierendes Gen in den Retrovirus anstelle von normaler retroviraler RNA eingebaut werden. Wenn der Retrovirus seine RNA in eine Zelle freigibt, wird das fremde Gen ebenfalls in die Zelle eingebracht und kann dann in die zelluläre DNA des Wirtes eingebaut werden, als wäre es der Retrovirus selbst. Eine Expression dieses fremden Gens in dem Wirt bewirkt eine Expression eines fremden Proteins durch die Wirtszelle.

[0004] Die meisten retroviralen Vektorsysteme, die für Gentherapie entwickelt wurden, basieren auf Maus-Retroviren. Kurz gesagt existieren diese Retroviren in zwei Formen: als in die zelluläre DNA eines Wirtes integrierte Proviren oder als freie Virionen. Die Virionform des Virus enthält die strukturellen und enzymatischen Proteine des Retrovirus (einschließlich reverse Transkriptase), zwei RNA-Kopien des viralen Genoms und Teile der Plasmamembran der Zelle, in welche das virale Hüllglycoprotein eingebettet ist. Das Genom ist in vier Hauptregionen organisiert: Die lange terminale Wiederholung (LTR) und die gag-, pol- und env-Gene. Die LTR kann an beiden Enden des proviralen Genoms vorkommen, ist eine Zusammensetzung der 5'- und 3'-Enden des RNA-Genoms und enthält cis-wirkende Elemente, die für den Start und den Abbruch der Transkription benötigt werden. Die drei Gene gag, pol und env befinden sich zwischen den endständigen LTRs. Die gag- und pol-Gene codieren interne virale Strukturen bzw. enzymatische Proteine (wie Integrase). Das env-Gen codiert das Hüllglycoprotein (genannt gp70 und p15e) welches Ansteckungsfähigkeit und Wirtsauswahlspezifität des Virus verleiht, sowie das "R"-Peptid mit unbestimmter Funktion.

[0005] Eine bedeutende Erwägung bei der Verwendung von Retroviren bei Gentherapie ist die Erhältlichkeit von "sicheren" Retroviren. Verpackungszelllinien und vektorerzeugende Zelllinien wurden entwickelt, um diesen Bedenken gerecht zu werden. Kurz gesagt verwendet diese Methode die Verwendung von zwei Komponenten, einem retroviralen Vektor und einer Verpackungszelllinie (PCL). Der retrovirale Vektor enthält lange terminale Wiederholungen (LTRs), die fremde, zu transferierende DNA und eine Verpackungssequenz (ψ). Der retrovirale Vektor wird sich nicht selbst vermehren, da die Gene, welche strukturelle und Hüllproteine codieren nicht in das Vektorgenom eingefügt sind. Die PCL enthält Gene, die gag-, pol- und env-Proteine codieren, enthält aber nicht das Verpackungssignal "ψ". Eine PCL kann selbst nur leere Virionpartikel bilden. Innerhalb dieses allgemeinen Verfahrens wird der retrovirale Vektor in die PCL eingebracht, wodurch eine vektorerzeugende Zelllinie (VCL) geschaffen wird. Diese VCL stellt Virionpartikel her, die nur das (fremde) Genom des Retrovirusvektors enthalten, und wurde daher bisher als ein sicherer Retrovirusvektor zur therapeutischen Verwendung erachtet.

[0006] Es gibt jedoch einige Mängel bei der derzeitigen Verwendung von VCLs. Ein Problem umfaßt die Bildung von einem "lebenden Virus" (d. h. einem replikationsfähigen Retrovirus, RCR) durch die VCL. Kurz gesagt kann ein RCR in gewöhnlichen Produzentenzellen hergestellt werden wenn: (1) das Vektorgenom und die Helfergenome miteinander rekombinieren, (2) das Vektorgenom oder Helfergenom mit homologen, kryptischen, endogenen, retroviralen Elementen in der Produzentenzelle rekombinieren oder (3) kryptische, endo-

gene, retrovirale Elemente reaktiviert werden (z. B. xenotrope Retroviren in Mauszellen).

[0007] Ein anderes Problem ist die Neigung von Maus-basierten VCLs, endogene, retrovirusähnliche Elemente zu verpacken (die onkogene Gensequenzen enthalten können), mit Effizienzen, die nahe an denen liegen, mit welchen sie erwünschte retrovirale Vektoren verpacken. Solche Elemente werden aufgrund ihrer retrovirusähnlichen Struktur an die Zielzelle vermittelt, wobei sie mit Frequenzen behandelt werden, die der Überführung der gewünschten retroviralen Vektorsequenz entsprechen.

[0008] Ein drittes Problem ist die Fähigkeit, ausreichend retrovirale Vektorpartikel bei geeigneten Konzentrationen herzustellen um (1) eine große Anzahl an Zellen zu behandeln (z. B. 10^8–10^{10}) und (2) Vektorpartikel zu wirtschaftlich gangbaren Kosten herzustellen.

[0009] Um sicherere PCLs herzustellen haben Forscher Deletionen der 5'-LTR und Teile der 3'-LTR der Helferelemente erzeugt (siehe Miller und Buttimore, Mol. Cell. Biol. 6:2895–2902, 1986). Werden solche Zellen verwendet, sind zwei Rekombinationsvorgänge nötig, um das replikationsfähige Genom des Wildtyps zu bilden. Dennoch haben Ergebnisse von mehreren Laboren gezeigt, dass selbst wenn mehrere Deletionen vorhanden sind, immer noch RCR gebildet werden können (siehe Bosselmann et al., Mol. Cell. Biol 7:1797–1806, 1987; Danos und Mulligan, Proc Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6460–6464, 1988). Zusätzlich haben sich Zelllinien, die sowohl 5'- als auch 3'-LTR-Deletionen enthalten, die konstruiert wurden, bisher als nicht nützlich erwiesen, da sie verhältnismäßig geringe Titer erzeugen (Dougherty et al., J. Virol. 63:3209–3212, 1989).

[0010] Einer der neuesten Ansätze, sicherere Verpackungszelllinien zu konstruieren, umfaßt die Verwendung von komplementären Teilen von Helferviruselementen, die auf zwei getrennte Plasmide verteilt sind, wobei eines gag und pol und das andere env enthält (siehe Markowitz et al., J. Virol. 62:1120–1124 und Markowitz et al., Virology 167:600–606, 1988). Ein Vorteil dieses Doppelplasmidsystems ist, dass drei Rekombinationsvorgänge benötigt werden, um ein replikationsfähiges Genom zu erzeugen. Dennoch leiden diese Doppelplasmidvektoren an dem Nachteil, Teile der retroviralen LTRs zu umfassen und daher in der Lage zu verbleiben, infektiöse Viren herzustellen.

[0011] Die vorliegende Erfindung überwindet die Schwierigkeiten von Rekombination und geringem Titer, die mit vielen der früheren Verpackungszelllinien in Verbindung gebracht werden, und stellt weiterhin andere dadurch bedingte Vorteile zur Verfügung.

Zusammenfassung der Erfindung

[0012] Gemäß einem Gesichtspunkt der Erfindung wird ein retrovirales Vektorkonstrukt zur Verfügung gestellt, welches eine 5'-LTR, eine tRNA-Bindungsstelle, ein Verpackungssignal, eine oder mehrere heterologe Sequenzen, einen Ursprung für die Zweitstrang-DNA-Synthese und eine 3'-LTR umfaßt, wobei das Vektorkonstrukt weniger als 20 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, die in den Genen gag/pol und env zu finden sind, wobei dem Vektor ein verlängertes Verpackungssignal fehlt und wobei die heterologen Sequenzen aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus einem Gen, welches ein cytotoxisches Protein codiert, einer Antisense-Sequenz, einer Sequenz, welche ein akzessorisches Immunmolekül codiert, einer Sequenz, welche ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus HSVTK und VZVTK, einer Sequenz, welche ein therapeutisches Protein codiert, das eine ererbte oder nicht-ererbte genetische Wirkung verhindern, hemmen, stabilisieren oder umkehren kann, und einer Sequenz, welche einen immunogenen Teil eines Virus, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus HBV, HCV, EBV, FeLV, VIV und HIV, codiert. Gemäß einem anderen Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung wird eine gag/pol-Expressionskassette zur Verfügung gestellt, welche einen Promotor, der funktionsfähig mit einem gag/pol-Gen verknüpft ist, und eine Polyadenylierungssequenz umfaßt, wobei das 5'-terminale Ende des gag/pol-Gens so modifiziert wurde, dass es wenigstens 25 Codons enthält, die für gag degeneriert sind.

[0013] Kurz gesagt stellt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zur Herstellung von Verpackungszelllinien zur Verfügung, welche die Bildung von RCR durch homologe Rekombination verhindern. Gemäß einem Gesichtspunkt der Erfindung werden rekombinante retrovirale Vektorkonstrukte (RETROVECTOR™) zur Verfügung gestellt, die eine 5'-LTR, eine tRNA-Bindungsstelle, ein Verpackungssignal, eine oder mehrere heterologe Sequenzen, einen Ursprung für die Zweitstrang-DNA-Synthese und eine 3'-LTR umfassen, wobei dem retroviralen Vektorkonstrukt codierende Sequenzen für gag/pol und env fehlen, wobei das Verpackungssignal kein verlängertes Verpackungssignal ist, und wobei die heterologen Sequenzen aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus einem Gen, welches ein cytotoxisches Protein codiert, einer Antisense-Sequenz und einem akzessorischen Immunmolekül. Bei einer bevorzugten Ausführungsform fehlt dem re-

troviralen Vektorkonstrukt eine env-codierende Sequenz stromaufwärts 5'-LTR. Retrovirale Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung können aus einem oder mehreren Retroviren hergestellt werden, einschließlich z. B. einer großen Bandbreite an amphotropen, ökotropen, xenotropen und polytropen Viren (siehe z. B. Fig. 17A, B und C).

[0014] Wie oben angegeben, umfassen retrovirale Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung eine oder mehrere heterologe Sequenz(en). Bei bestimmten Ausführungsformen der Erfindung ist die heterologe Sequenz wenigstens x kb lang, wobei x aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8. Bei einer Ausführungsform ist die heterologe Sequenz ein ein cytotoxisches Protein codierendes Gen, wie z. B. Ricin, Abrin, Diphtherietoxin, Choleratoxin, Gelonin, antivirales Protein der Kermesbeere, Tritin, Shigellatoxin und Pseudomonas Exotoxin A. Bei anderen Ausführungsformen kann die heterologe Sequenz eine Antisense-Sequenz oder ein akzessorisches Immunmolekül sein. Typische Beispiele für akzessorische Immunmoleküle umfassen IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-13 und IL-14. Besonders bevorzugte akzessorische Immunmoleküle können aus der Gruppe ausgewählt werden, bestehend aus IL-2, IL-12, IL-15 und Gamma-Interferon, oder der Gruppe, bestehend aus ICAM-1, ICAM-2, β-Mikroglobin, LFA3, HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Moleküle.

[0015] Bei anderen Ausführungsformen der Erfindung kann die heterologe Sequenz ein Genprodukt codieren, welches eine Verbindung mit wenig oder keiner Toxizität zu einem toxischen Produkt aktiviert. Typische Beispiele solcher Genprodukte umfassen Typ I-Thymidinkinasen, wie HSVTK und VZVTK. Bei einer anderen Ausführungsform kann die heterologe Sequenz ein Ribozym sein. Bei noch anderen Ausführungsformen ist die heterologe Sequenz ein Ersatzgen, welches Proteine wie Faktor VIII, ADA, HPRT, CF und den LDL-Rezeptor codiert. Bei anderen Ausführungsformen codiert die heterologe Sequenz einen immunogenen Teil eines Virus aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus HBV, HCV, HPV, EBV, FeLV, FIV und HIV.

[0016] Diese und andere Gesichtspunkte der vorliegenden Erfindung werden in Bezug auf die folgende ausführliche Beschreibung und angefügten Zeichnungen einleuchten. Zusätzlich werden unten zahlreiche Verweise angegeben, die bestimmte Verfahren und Zusammensetzungen ausführlicher beschreiben (z. B. Plasmide etc.).

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0017] Fig. 1 ist eine schematische Darstellung von pKS2+Eco571-LTR(+).

[0018] Fig. 2 ist eine schematische Darstellung von pKS2+Eco571-LTR(–).

[0019] Fig. 3 ist eine schematische Darstellung von pKS2+LTR-EcoR1.

[0020] Fig. 4 ist eine schematische Darstellung von pR1.

[0021] Fig. 5 ist eine schematische Darstellung von pR2.

[0022] Fig. 6 ist eine schematische Darstellung von pKT1.

[0023] Fig. 7 ist eine schematische Darstellung von pR1-HIVenv.

[0024] Fig. 8 ist eine schematische Darstellung von pR2-HIVenv.

[0025] Fig. 9 ist eine typische "präwobble"-Sequenz für ein MoMLV gag/pol (siehe auch SEQ ID. Nr. 11 und 12).

[0026] Fig. 10 ist eine typische "wobble"-Sequenz für ein MoMLV-gag/pol (siehe auch SEQ ID. Nr. 9 und 10).

[0027] Fig. 11 ist eine schematische Darstellung von pHCMV-PA.

[0028] Fig. 12 ist eine schematische Darstellung von pCMV gag/pol.

[0029] Fig. 13 ist eine schematische Darstellung von pCMVgpSma.

[0030] Fig. 14 ist eine schematische Darstellung von pCMVgp-X.

[0031] Fig. 15 ist eine schematische Darstellung von pCMV env-X.

[0032] Fig. 16 ist eine schematische Darstellung von pRgpNeo.

[0033] Fig. 17A, B und C umfassen eine Tabelle, die eine Bandbreite an Retroviren zeigt, die bei der Konstruktion der retroviralen Vektorkonstrukte verwendet werden können, gag/pol- Expressionskassetten und env-Expressionskassetten der vorliegenden Erfindung.

[0034] Fig. 18 ist eine schematische Darstellung von pCMV Envam-Eag-X-less.

[0035] Fig. 19A ist eine graphische Darstellung eines "wobble"-gag-Konstrukts.

[0036] Fig. 19B ist eine graphische Darstellung eines "normalen"-gag-Konstrukts.

Ausführliche Beschreibung der Erfindung

[0037] Vor dem Darlegen der Erfindung kann es für deren Verständnis hilfreich sein, zunächst Definitionen bestimmter Begriffe darzulegen, die nachfolgend verwendet werden.

[0038] "Retrovirales Vektorkonstrukt" bezieht sich auf eine Zusammensetzung, welche bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung in der Lage ist, die Expression einer Sequenz/von Sequenzen oder eines Gens/von Genen von Interesse zu steuern. Kurz gesagt muß das retrovirale Vektorkonstrukt eine 5'-LTR, eine tRNA-Bindungsstelle, ein Verpackungssignal, eine oder mehrere heterologe Sequenz(en), einen Ursprung für die Zweitstrang-DNA-synthese und eine 3'-LTR umfassen. Eine große Vielfalt an heterologen Sequenzen kann von dem Vektorkonstrukt umfaßt sein, einschließlich z. B. Sequenzen, welche ein Protein codieren (z. B. ein cytotoxisches Protein, krankheitsassoziiertes Antigen, akzessorisches Immunmolekül oder Ersatzgen), oder welche als Molekül selbst geeignet sind (z. B. als ein Ribozym oder Antisense-Sequenz). Alternativ kann die heterologe Sequenz nur eine "Ausfüll-" oder "Füll-" Sequenz sein, welche eine ausreichende Größe hat, um die Herstellung von das RNA-Genom enthaltenden, viralen Partikeln zu ermöglichen. Bevorzugt hat die heterologe Sequenz eine Länge von wenigstens 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 oder 8 kb.

[0039] Das retrovirale Konstrukt kann auch einen transkriptionellen Promotor/Verstärker oder ein ortsbestimmendes Element/ortsbestimmende Elemente oder andere Elemente, die Genexpression kontrollieren, durch Mittel wie alternatives Spleißen, RNA-Export aus dem Zellkern, posttranslationale Modifikation des Messenger oder posttranskriptionale Modifikation von Protein, umfassen. Optioqnal kann das retrovirale Vektorkonstrukt auch selektierbare Marker wie Neo, TK, Hygromycin, Phleomycin, Histidinol oder DHFR umfassen sowie eine oder mehrere spezifische Restriktionsstelle(n) und eine Translationsterminationssequenz.

[0040] "Expressionskassette" bezieht sich auf eine Zusammenstellung, welche in der Lage ist, die Expression von der Sequenz/den Sequenzen oder dem Gen/den Genen von Interesse zu steuern. Die Expressionskassette muß einen Promotor umfassen, welcher bei der Transkription funktionsfähig an die Sequenz(en) oder das Gen/die Gene von Interesse sowie eine Polyadenylierungssequenz geknüpft ist. Bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung stammen sowohl der Promotor als auch die Polyadenylierungssequenz von einer Quelle, welche heterolog zu den Hilfselementen (d. h. gag/pol und env) ist. Expressionskassetten der vorliegenden Erfindung können zum Exprimieren eines gag/pol-Gens oder eines env-Gens verwendet werden. Zusätzlich können die Expressionskassetten zum Exprimieren von einer oder mehreren heterologen Sequenz(en) verwendet werden, entweder von einer gag/pol- und/oder env-Expressionskassette oder von einer völlig anderen Expressionskassette.

[0041] Bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung können die hier beschriebenen Expressionskassetten in einem Plasmidkonstrukt enthalten sein. Zusätzlich zu den Bestandteilen der Expressionskassette kann das Plasmidkonstrukt einen bakteriellen Replikationsursprung, einen oder mehrere selektierbare(n) Marker, ein Signal, welches dem Plasmidkonstrukt ermöglicht, als Einzelstrang-DNA zu existieren (z. B. ein M13 Replikationsursprung), eine multiple Klonierungsstelle und einen "Säuger"-Replikationsursprung (z. B. einen SV40 oder Adenovirus-Replikationsursprung) enthalten.

HERSTELLUNG VON RETROVIRALEN VEKTORKONSTRUKTEN, GAG/POL-EXPRESSIONSKASSETTEN UND ENV-EXPRESSIONSKASSETTEN

[0042] Wie oben angegeben stellt die vorliegende Erfindung Zusammensetzungen und Verfahren zur Verfü-

gung zum Konstruieren von Verpackungszellen, welche die Bildung von replikationsfähigen Viren durch homologe Rekombination verhindern. Die folgenden Abschnitte beschreiben die Herstellung von retroviralen Retrokonstrukten, gag/pol-Expressionskassetten und env-Expressionskassetten.

1. Konstruktion von retroviralen Vektorkonstrukten

[0043] Gemäß einem Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung werden retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, welche eine 5'-LTR, eine tRNA-Bindungsstelle, ein Verpackungssignal, eine oder mehrere heterologe Sequenz(en), einen Ursprung für die Zweitstrang-DNA-Synthese und eine 3'-LTR umfassen, wobei dem Vektorkonstrukt gag/pol- oder env-codierende Sequenzen fehlen. Kurz gesagt werden lange terminale Wiederholungen ("LTRs") in drei Elemente unterteilt, welche U5, R und U3 genannt werden. Diese Elemente enthalten eine Vielzahl an Signalen, welche für die biologische Aktivität eines Retrovirus verantwortlich sind, einschließlich z. B. Promotor- und Verstärkerelemente, welche in U3 liegen. LTRs können aufgrund ihrer genauen Duplikation an jedem Ende des Genoms einfach in dem Provirus identifiziert werden.

[0044] Die tRNA-Bindungsstelle und der Ursprung der Zweitstrang-DNA-Synthese sind auch für die biologische Aktivität eines Retrovirus von Bedeutung und können von einem Fachmann in dem Gebiet einfach identifiziert werden. Zum Beispiel bindet tRNA durch Watson-Crick-Basenpaarung an eine retrovirale tRNA-Bindungsstelle und wird mit dem Retrovirusgenom in ein virales Partikel transportiert. Die tRNA wird dann als Primer für DNA-Synthese durch reverse Transkriptase verwendet. Die tRNA-Bindungsstelle kann einfach aufgrund ihrer Lage genau stromabwärts von der 5'-LTR identifiziert werden. Ähnlich ist der Ursprung der Zweitstrang-DNA-Synthese, wie der Name sagt, bedeutend für die Zweitstrang-DNA-Synthese eines Retrovirus. Diese Region, die auch Polypurin-Teil genannt wird, befindet sich genau stromaufwärts der 3'-LTR.

[0045] Zusätzlich zu den 5'- und 3'-LTRs, einer tRNA-Bindungsstelle und eines Ursprungs der Zweitstrang-DNA-Synthese enthalten retrovirale Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung auch ein Verpackungssignal sowie eine oder mehrere heterologe Sequenz(en), die jeweils unten genauer besprochen werden.

[0046] Retrovirale Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung können einfach aus einer großen Bandbreite an Retroviren einschließlich Typ B-, C- und D-Retroviren sowie Spumaviren und Lentiviren konstruiert werden (siehe RNA Tumor Viruses, 2. zweite Ausgabe, Cold Spring Harbor Laborstory, 1985). Kurz gesagt werden Viren oft entsprechend ihrer Morphologie wie sie unter dem Elektronenmikroskop gesehen werden, klassifiziert. Typ "B"-Retroviren scheinen eine exzentrische Innenstruktur zu haben, während Typ "C"-Retroviren eine zentrale Innenstruktur haben. Typ "D"-Retroviren haben eine zwischen Typ B- und Typ C-Retroviren liegende Morphologie. Typische Beispiele für geeignete Retroviren umfassen diejenigen, die unten in **Fig. 17A**, B und C gezeigt sind (siehe RNA Tumor Viruses auf Seite 2–7) sowie eine Vielzahl an xenotropen Retroviren (z. B. NZB-X1, NZB-X2 und NZB_{9-1} (siehe O'Neill et al., J. Vir. 53:100–106, 1985)) und polytropen Retroviren (z. B. MCF und MCF-MLV (siehe Kelly et al. J. W. 45(1):291–298, 1983)). Solche Retroviren können einfach von Aufbewahrungsorten und Sammlungen wie der American Type Culture Collection ("ATCC", Rockvill, Maryland) erhalten werden oder aus bekannten Quellen unter Verwendung üblich erhältlicher Techniken isoliert werden.

[0047] Besonders bevorzugte Retroviren für die Herstellung oder Konstruktion von retroviralen Vektorkonstrukten der vorliegenden Erfindung umfassen Retroviren aus der Gruppe ausgewählt, bestehend aus Vogel-Leukosevirus, Rinder-Leukämievirus, Maus-Leukämievirus, Nerzzellen-Fokusinduzierender Virus, Maus-Sarkomvirus, Reticuloendotheliosevirus, Gibbon-Affen-Leukämievirus, Mason-Pfitzer Affenvirus und Rous-Sarkomvirus. Besonders bevorzugte Maus-Leukämieviren umfassen 4070A und 1504A (Hartley und Rowe, J. Virol. 19:19–25, 1976), Abelson (ATCC Nr. VR-999), Friend (ATCC Nr. VR-245), Graffi, Gross (ATCC Nr. VR-590), Kirsten, Harvey-Sarkomvirus und Rauscher (ATCC Nr. VR-998) und Moloney-Maus-Leukämievirus (ATCC Nr. VR-190). Besonders bevorzugte Rous-Sarkomviren umfassen Bratislava, Bryan high titer (z. B. ATCC Nr. VR-334, VR-657, VR-726, VR-659 und VR-728), Bryan standard, Carr-Zilber, Engelberth-Holm, Harris, Prague (z. B. ATCC Nr. VR-772 und 45033), und Schmidt-Ruppin (z. B. ATCC Nr. VR-724, VR-725, VR-354).

[0048] Jeder der oben genannten Retroviren kann leicht verwendet werden um retrovirale Vektorkonstrukte, Verpackungszellen oder Produzentenzellen der vorliegenden Erfindung mit der zur Verfügung gestellten Offenbarung und rekombinanten Standardtechniken (z. B. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laborstory Manual, zweite Ausg., Cold Spring Harbor Laborstory Press, 1989, Kunkle, PNAS 82:488, 1985) zusammenzusetzen oder zu konstruieren. Weiter können bei bestimmten Ausführungsformen der Erfindung Teile des retroviralen Vektorkonstrukts von verschiedenen Retroviren stammen. Zum Beispiel können bei einer Ausführungs-

form der Erfindung die Retrovektor-LTRs von einem Maus-Sarkomvirus stammen, eine tRNA-Bindungsstelle von einem Rous-Sarkomvirus, ein Verpackungssignal von einem Maus-Leukämievirus und ein Ursprung der Zweitstrangsynthese von einem Vogel-Leukosevirus. Ähnlich können Teile einer Verpackungszelllinie von unterschiedlichen Viren stammen (z. B. eine gag/pol-Expressionskassette kann aus einem Moloney-Maus-Leukämievirus und eine env-Expressionskassette aus einem Mason-Pfizer-Affenvirus konstruiert werden).

[0049] Wie oben angegeben werden gemäß zahlreicher Gesichtspunkte der vorliegenden Erfindung retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, die ein Verpackungssignal haben und welchen sowohl gag/pol- als auch env-codierende Sequenzen fehlen. Wie vor dem Hintergrund der vorliegenden Erfindung verwendet, soll ein Verpackungssignal so verstanden werden, dass es sich auf die Sequenz an Nukleotiden bezieht, welche nicht für Synthese, Prozessierung oder Translation von viraler RNA oder Zusammensetzung von Virionen benötigt wird, welche aber in cis zur Enkapsidierung von genomischer RNA benötigt wird (siehe Mann et al., Cell 33:153–159, 1983, RNA Tumor Viruses, zweite Ausgabe, siehe oben). Weiter soll der Ausdruck "gag/pol- oder env-codierende Sequenzen fehlen", wie hier verwendet, so verstanden werden, dass er sich auf Retrovektoren bezieht, die weniger als 20, bevorzugt weniger als 15 mehr bevorzugt weniger als 10 und am meisten bevorzugt weniger als 8 aufeinanderfolgende Nukleotide enthalten, die in gag/pol- oder env-Genen vorkommen, und insbesondere in gag/pol- oder env-Expressionskassetten, die zur Konstruktion von Verpackungszelllinien für das retrovirale Vektorkonstrukt verwendet werden. Typische Beispiele solcher retroviraler Vektorkonstrukte werden unten und in Beispiel 1 genauer gezeigt.

[0050] Als Veranschaulichung kann bei einer Ausführungsform der Erfindung die Konstruktion von retroviralen Vektorkonstrukten, denen gag/pol- oder env-Sequenzen fehlen, durch Herstellen von retroviralen Retrokonstrukten, denen ein verlängertes Verpackungssignal fehlt, erreicht werden. Die Formulierung "verlängertes Verpackungssignal", wie hier verwendet, bezieht sich auf eine Sequenz an Nukleotiden über die minimale Kernsequenz hinaus, die für das Verpacken benötigt wird, die aufgrund von verbessertem Verpacken erhöhte virale Titer ermöglicht. Als Beispiel wird das minimale Kernverpackungssignal bei dem Maus-Leukämievirus MoMLV durch die Sequenz (gezählt von der 5'-LTR-cap-Stelle) von etwa Nukleotid 144 von SEQ. ID. Nr. 1 bis zu der Pst I-Stelle (Nukleotid 567 von SEQ. ID. Nr. 1) codiert. Das verlängerte Verpackungssignal von MoMLV umfaßt die Sequenz jenseits von Nukleotid 567 bis zum Start des gag/pol-Gens (Nukleotid 621) und jenseits von Nukleotid 1040. Daher können bei dieser Ausführungsform retroverale Vektorkonstrukte, denen ein verlängertes Verpackungssignal fehlt, aus dem MoMLV durch Deletieren oder Verkürzen des Verpackungssignals stromabwärts von Nukleotid 567 konstruiert werden.

[0051] Bei anderen Ausführungsformen der Erfindung werden retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, wobei das Verpackungssignal, das sich in die retrovirale gag/pol-Sequenz erstreckt oder mit ihr überlappt, deletiert oder verkürzt ist. Zum Beispiel ist in dem typischen Fall von MoMLV das Verpackungssignal stromabwärts des Starts des gag/pol-Gens (Nukleotid 621 von SEQ. ID. Nr. 1) deletiert oder verkürzt. Bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung wird das Verpackungssignal bei Nukleotid 570, 575, 580, 585, 590, 595, 600, 610, 615 oder 617 von SEQ. ID. Nr. 1 beendet.

[0052] Gemäß anderen Gesichtspunkten der Erfindung werden retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, die ein Verpackungssignal umfassen, das sich jenseits des Starts des gag/pol-Gens erstreckt (z. B. bei MoMLV jenseits Nukleotid 621 von SEQ. ID. Nr. 1). Werden solche retroviralen Vektorkonstrukte verwendet, ist es bevorzugt, Verpackungszelllinien zur Herstellung von rekombinanten viralen Partikeln zu verwenden, bei denen das 5'-terminale Ende des gag/pol-Gens in einer gag/pol-Expressionskassette modifiziert wurde, so dass es Codons enthält, welche für gag degeneriert sind. Solche gag/pol-Expressionskassetten werden unten in Abschnitt 2 und in Beispiel 3 genauer beschrieben.

[0053] Gemäß anderen Gesichtspunkten der Erfindung werden retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, die eine 5'-LTR, eine tRNA-Bindungsstelle, ein Verpackungssignal, einen Ursprung für die Zweitstrang-DNA-Synthese und eine 3'-LTR umfassen, wobei das Retrovektorplasmidkonstrukt keine retrovirale Nukleinsäuresequenz stromaufwärts der 5'-LTR enthält. Die Formulierung "enthält keine retrovirale Nukleinsäuresequenz stromaufwärts der 5'-LTR", wie sie vor dem Hintergrund der vorliegenden Erfindung verwendet wird, soll so verstanden werden, dass das Retrovektorplasmidkonstrukt weniger als 20, bevorzugt weniger als 15, mehr bevorzugt weniger als 10 und am meisten bevorzugt weniger als 8 aufeinanderfolgende Nukleotide, welche in einem Retrovirus vorkommen, und spezifischer in einem Retrovirus, welcher homolog zu dem retroviralen Vektorkonstrukt ist, stromaufwärts von und/oder angrenzend an die 5'-LTR enthält. Bei bevorzugten Ausführungsformen enthalten die Retrovektorplasmidkonstrukte keine env-codierende Sequenz (wie unten besprochen) stromaufwärts der 5'-LTR. Eine besonders bevorzugte Ausführungsform solcher Retrovektorplasmidkonstrukte wird unten in Beispiel 1 genauer gezeigt.

[0054] Gemäß einem weiteren Gesichtspunkt der vorliegenden Erfindung werden Retrovektorplasmidkonstrukte zur Verfügung gestellt, welche eine 5'-LTR, eine tRNA-Bindungsstelle, ein Verpackungssignal, einen Ursprung für die Zweitstrang-DNA-Synthese und eine 3'-LTR umfassen, wobei das Retrovektorplasmidkonstrukt keine retrovirale Verpackungssignalsequenz stromabwärts der 3'-LTR enthält. Der Begriff "Verpackungssignalsequenz", wie hier verwendet, soll so verstanden werden, dass eine Sequenz gemeint ist, die ausreicht, um das Verpacken des RNA-Genoms zu ermöglichen. Ein typisches Beispiel eines solchen retroviralen Vektorkonstrukts wird unten in Beispiel 1 genauer gezeigt.

2. Konstruktion von gag/pol-Expressionskassetten

[0055] Eine Vielzahl von gag/pol-Expressionskassetten in Kombination mit den retroviralen Vektorkonstrukten und env-Expressionskassetten der vorliegenden Erfindung können die Konstruktion von Verpackungszelllinien und Produzentenzelllinien ermöglichen, die die Bildung eines replikationsfähigen Virus verhindern. Kurz gesagt enthalten retrovirale gag/pol-Gene eine gag-Region, die eine Vielzahl von strukturellen Proteinen codiert, die die Kernmatrix und das Nukleokapsid herstellen, und eine pol-Region, welche Gene enthält, die (1) eine Protease für die Prozessierung von gag/pol- und env-Proteinen, (2) eine reverse Transkriptase-Polymerase, (3) eine RNase H und (4) eine Integrase codieren, welche für die Integration des retroviralen Provektors in das Wirtsgenom benötigt wird. Obwohl retrovirale gag/pol-Gene verwendet werden können, um gag/pol-Expressionskassetten zu konstruieren, können auch eine Bandbreite anderer nicht-retroviraler (und nicht-viraler) Gene verwendet werden, um die gag/pol-Expressionskassette zu konstruieren. Zum Beispiel kann ein Gen, welches retrovirale RNase H codiert, mit Genen ersetzt werden, welche bakterielle (z. B. E. coli oder Thermus thermophilus) RNase H codieren. Ähnlich kann ein retrovirales Integrasegen durch andere Gene mit ähnlicher Funktion (z. B. Hefe-Retrotransposon TY3-Integrase) ersetzt werden.

[0056] Gag/pol-Expressionskassetten können einen Promotor umfassen, der funktionsfähig an ein gag/pol-Gen geknüpft ist, und eine Polyadenylierungssequenz, wobei das gag/pol-Gen so modifiziert wurde, dass es Codons enthält, welche degeneriert für gag sind. Kurz gesagt, wie oben angegeben, überlappt das verlängerte Verpackungssignal des Retrovirus bei einem Wildtyp-Retrovirus mit Sequenzen, welche gag und pol codieren. Daher sollten überlappende Sequenzen eliminiert werden, um die Möglichkeit eines Crossover zwischen dem retroviralen Vektorkonstrukt und der gag/pol-Expressionskassette zu eliminieren, sowie die Möglichkeit der Koenkapsidierung der gag/pol-Expressionskassette und des replikationsfähigen Virus oder retroviralen Vektorkonstrukts zu eliminieren. Eine Elimination einer solchen Überlappung kann durch Modifizieren des gag/pol-Gens erreicht werden (und spezifischer der mit dem retroviralen Vektorkonstrukt überlappenden Regionen, wie das verlängerte Verpackungssignal), so dass es degenerierte Codons (d. h., die abweichen ("wobblen")) für gag sind. Insbesondere können Codons selektiert werden, welche ein biologisch aktives gag/pol-Protein codieren (d. h. das in der Lage ist, ein kompetentes retrovirales Teilchen in Kombination mit einem env-Expressionselement und einem RNA-Genom herzustellen) und denen jegliche Verpackungssignalsequenz fehlt, einschließlich insbesondere einer verlängerten Verpackungssignalsequenz. Die Formulierung "jegliche retrovirale Verpackungssignalsequenz fehlt", wie hier verwendet, soll so verstanden werden, dass die gag/pol-Expressionskassette weniger als 20, bevorzugt weniger als 15, mehr bevorzugt weniger als 10 und am meisten bevorzugt weniger als 8 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, welche identisch mit einer Sequenz sind, die in einem retroviralen Verpackungssignal vorkommt (sich z. B. im Fall von MoMLV bis und jenseits der Xho I-Stelle bei ungefähr Nukleotid Nr. 1561 erstreckt). Ein besonders bevorzugtes Beispiel solcher modifizierter Codons, welche degeneriert für gag sind, ist in **Fig. 10** und in Beispiel 3 gezeigt. Insbesondere wenigstens 25, 50, 75, 100, 125 oder 135 gag-Codons können modifiziert werden oder von der nativen gag-Sequenz in den gag/pol-Expressionskassetten abweichen ("wobbeln").

[0057] Zusätzlich zur Eliminierung einer Überlappung zwischen dem retroviralen Vektorkonstrukt und dem gag/pol-Gen ist es auch bevorzugt, jegliche mögliche Überlappung zwischen dem gag/pol-Gen und dem env-Gen zu eliminieren, um die Möglichkeit der homologen Rekombination zu verhindern. Dies kann durch wenigstens zwei Hauptwege erreicht werden: (1) Deletieren eines Teils des gag/pol-Gens, welches das Integraseprotein codiert und insbesondere des Teils des Gens, welches das Integraseprotein codiert, welches mit der env-codierenden Sequenz überlappt, oder (2) Selektieren von Codons, welche für Integrase und/oder env degeneriert sind.

[0058] Es können daher gag/pol-Expressionskassetten zur Verfügung gestellt werden, die einen Promotor umfassen, welcher funktionsfähig an ein gag/pol-Gen geknüpft ist, und ein(e) Polyadenylierungssequenz oder -signal, wobei ein 3'-terminales Ende des Gens ohne Beeinflussung der biologischen Aktivität der Integrase deletiert wurde. (Die biologische Aktivität von Integrase kann einfach durch Nachweisen eines Integrationsvorgangs bestimmt werden, entweder durch DNA-Analyse oder durch Expression eines transduzierten Gens, sie-

he Roth et al., J. Vir. 65(4):2141–2145, 1991). Als ein Beispiel wird das gag/pol-Gen in dem Maus-Leukämievirus MoMLV (SEQ. ID. Nr. 1) durch die Nukleotide 621 bis 5834 codiert. Innerhalb dieser Sequenz wird das Protein Integrase durch die Nukleotide 4610 bis Nukleotid 5834 codiert. Ein Teil der gag/pol-Sequenz, welche Integrase codiert, codiert auch env (welches bei Nukleotid 5776 beginnt). Daher kann das 3'-terminale Ende des gag/pol-Gens deletiert oder verkürzt werden, um einen Crossover mit dem env-Gen zu verhindern, ohne die biologische Aktivität der Intergrase zu beeinflussen. Das gag/pol-Gen kann bei irgendeinem Nukleotid stromabwärts (3') vom Anfang der Integrasecodierenden Sequenz deletiert werden und bevorzugt vor dem Start der env-Gensequenz. Die gag/pol-codierende Sequenz kann eine MoMLV-Sequenz sein, und das gag/pol-Gen kann an irgendeinem Nukleotid zwischen den Nukleotiden 4610 und 5576 (von SEQ. ID. Nr. 1) deletiert werden, einschließlich z. B. bei den Nukleotiden 5775, 5770, 5765, 5760, 5755, 5750.

[0059] Die gag/pol-Expressionskassette kann Sequenzen enthalten, welche gag/pol codieren (und Integrase umfassen), während jegliche in einem env-Gen vorkommende Sequenz fehlt. Die Formulierung "jegliche in einem env-Gen vorklmmende Sequenz fehlt" soll so verstanden werden, dass die gag/pol-Expressionskassette nicht wenigstens 20, bevorzugt wenigstens 15, mehr bevorzugt wenigstens 10 und am meisten bevorzugt wenigstens 8 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, welche identisch zu einer env-Sequenz sind und bevorzugt, welche in einer env-Expressionskassette vorkommen, welche zusammen mit der gag/pol-Expressionskassette verwendet werden wird, um eine Verpackungszelle zu bilden. Solche Expressionskassetten können einfach hergestellt werden, indem Codons selektiert werden, welche degeneriert für Integrase sind und welche nicht biologisch aktives env codieren. (Siehe Morgenstern und Land, Nuc. Acids res. 18:3587–3596, 1990.)

[0060] Die gag/pol-Expressionskassette kann einen heterologen Promotor enthalten und/oder eine heterologe Polyadenylierungssequenz. "Heterologe" Promotoren oder Polyadenylierungssequenzen, wie hier verwendet, bezieht sich auf Promotoren und Polyadenylierungssequenzen, welche von einer unterschiedlichen Quelle im Vergleich zu dem gag/pol-Gen stammen (und bevorzugt dem env-Gen und retroviralen Vektorkonstrukt). Typische Beispiele für geeignete Promotoren umfassen den Cytomegalovirus Immediate Early ("CMV IE")-Promotor, den Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase ("HSVTK")-Promotor, den Rous-Sarkomvirus ("RSV")-Promotor, den Adenovirus Major Late-Promotor und den SV 40-Promotor. Typische Beispiele für geeignete Polyadenylierungssignale umfassen das späte SV 40-Polyadenylierungssignal und das frühe SV 40-Polyadenylierungssignal.

[0061] Gag/pol-Expressionskassetten, wie die oben beschriebenen, können nicht mit einem replikationsfähigen Virus koenkapsidiert werden. Ein typisches Verfahren zur Bestimmung von Koenkapsidierung ist unten in Beispiel 8 gezeigt.

3. Konstruktion von env-Expressionskassetten

[0062] Env-Expressionskassetten können zur Verfügung gestellt werden, welche in Kombination mit den oben beschriebenen gag/pol-Expressionskassetten und retroviralen Vektorkonstrukten die Bildung eines replikationsfähigen Virus durch homologe Rekombination verhindern, sowie eine bestimmte Spezifität des sich ergebenden Vektorpartikels vermitteln (z. B. amphotrop, ökotrop, xenotrop oder polytrop, siehe **Fig.** 17 sowie die obige Erörterung). Kurz gesagt codiert das env-Gen in einem Wildtyp-Retrovirus zwei Hauptproteine, das Oberflächenglycoprotein "SU" und das Transmembranprotein "TM", welches als ein Polyprotein translatiert wird und anschließend durch proteolytische Spaltung getrennt wird. Typische Beispiele der SU- und TM-Proteine sind das gp120-Protein und gp41-Protein in HIV und das gp70-Protein und p15e-Protein in MoMLV. In einigen Retroviren wird auch ein drittes Protein mit unbestimmter Funktion von dem env-Gen exprimiert, welches das "R-Peptid" genannt wird und von dem Polyprotein durch proteolytische Spaltung getrennt wird. In dem Maus-Leukämievirus MoMLV wird das R-Peptid "p2" genannt.

[0063] Eine große Bandbreite an env-Expressionskassetten kann basierend auf der hier zur Verfügung gestellten Offenbarung konstruiert werden und zur Verhinderung homologer Rekombination verwendet werden. Env-Expressionskassetten können zur Verfügung gestellt werden, welche einen Promotor umfassen, der funktionsfähig an ein env-Gen geknüpft ist, worin nicht mehr als 6, 8, 10, 15 oder 20 aufeinanderfolgende retrovirale Nukleotide stromaufwärts (5') von und/oder benachbart zu dem env-Gen umfaßt sind. Env-Expressionskassetten können zur Verfügung gestellt werden, welche einen Promotor umfassen, welcher funktionsfähig an ein env-Gen geknüpft ist, wobei die env-Expressionskassette nicht eine aufeinanderfolgende Sequenz von mehr als 20, bevorzugt weniger als 15, mehr bevorzugt weniger als 10 und am meisten bevorzugt weniger als 8 oder 6 aufeinanderfolgenden Nukleotiden enthält, welche in einem gag/pol-Gen vorkommen, und insbesondere in einer gag/pol-Expressionskassette, die zusammen mit der env-Expressionskassette zur Erzeugung einer Verpackungzelllinie verwendet werden wird.

[0064] Env-Expressionskassetten können zur Verfügung gestellt werden, welche einen Promotor, der funktionsfähig an ein env-Gen geknüpft ist, und eine Polyadenylierungssequenz umfassen, wobei ein 3'-terminales Ende des env-Gens deletiert wurde ohne die biologische Aktivtat von env zu beeinflussen. Die Formulierung "biologische Aktivität von env", wie hier verwendet, bezieht sich auf die Fähigkeit des Hüllproteins auf der Oberfläche eines Virus oder Vektorpartikels exprimiert zu werden und eine erfolgreiche Infektion einer Wirtszelle zu ermöglichen. Ein praktisches Verfahren zur Bestimmung der biologischen Aktivität ist, die env-Expressionskassette vorübergehend in eine Zelle zu transfizieren, die eine zuvor bestimmte funktionelle gag/pol-Expressionskassette enthält und ein retrovirales Vektorkonstrukt, welches einen selektierbaren Marker exprimiert. Eine biologisch funktionelle env-Expressionskassette ermöglicht es den in der transfizierten Zelle hergestellten Vektorpartikeln, den selektierbaren Marker an eine natürliche sensitive Zelle zu vermitteln, so dass diese resistent gegenüber der Markerwirkstoffselektion wird. Das 3'-terminale Ende des env-Gens kann deletiert oder verkürzt sein, so dass ein vollständiges R-Peptid nicht durch die Expressionskassette hergestellt wird. In dem typischen Beispiel von MoMLV ist die Sequenz, welche das R-Peptid codiert (welche bei Nukleotid 7734 beginnt), deletiert, verkürzt oder z. B. durch Einbringen eines Stopcodons bei Nukleotid 7740, 7745, 7747, 7750, 7755, 7760, 7765, 7770, 7775, 7780 oder irgendeinem dazwischenliegenden Nukleotid terminiert.

[0065] Es können env-Expressionskassetten zur Verfügung gestellt werden, welche einen heterologen Promotor und/oder eine heterologe Polyadenylierungssequenz enthalten. "Heterologer" Promotor oder Polyadenylierungssequenzen, wie hier verwendet, bezieht sich auf Promotoren und Polyadenylierungssequenzen, welche von einer unterschiedlichen Quelle stammen als das gag/pol-Gen (und bevorzugt das env-Gen und retrovirale Vektorkonstrukt). Typische Beispiele für geeignete Promotoren umfassen den CMV IE-Promotor, den HSVTK-Promotor, den RSV-Promotor, den Adenovirus Major Late-Promotor und den SV 40-Promotor. Typische Beispiele für geeignete Polyadenylierungssignale umfassen das späte SV 40-Polyadenylierungssignal und das frühe SV 40-Polyadenylierungssignal.

HETEROLOGE SEQUENZEN

[0066] Wie oben angegeben können die hier beschriebenen retroviralen Vektorkonstrukte, gag/pol-Expressionskassetten und env-Expressionskassetten eine oder mehrere heterologe Sequenz(en) enthalten (und exprimieren). Eine große Bandbreite an heterologen Sequenzen kann im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung verwendet werden, einschließlich z. B. cytotoxischen Genen, Antisense-Sequenzen, Sequenzen, welche Genprodukte codieren, die eine Verbindung mit wenig oder keiner Cytotoxizität (d. h. ein "Wirkstoffpräkursor") zu einem toxischen Produkt aktivieren, Sequenzen, welche immunogene Teile von krankheitsassoziierten Antigenen codieren, und Sequenzen, welche akzessorische Immunmoleküle codieren. Typische Beispiele für cytotoxische Gene umfassen die Gene, welche Proteine wie Ricin (Lamb et al., Eur. J. Biochem. 148:265–270, 1985), Abrin (Wood et al., Eur. J. Biochem. 198:723–732, 1991, Evensen et al., J. of Biol. Chem. 266:6848–6852, 1991, Collins et al., J. of Biol. Chem. 265:8665–8669, 1990, Chen et al., Fed. of Eur. Biochem. Soc. 309:115–118, 1992), Diphtherietoxin (Tweten et al., J. Biol. Chem. 260:10392–10394, 1985), Choleratoxin (Mekalanos et al., Nature 306:551–557, 1983, Sanchez & Holmgren, PNAS 86:481–485, 1989), Gelonin (Stirpe et al., J. Biol. Chem. 255:6947–6953, 1980), Kermesbeere (Irvin, Pharmac. Ther. 21:371–387, 1983), antivirales Protein (Barbieri et al., Biochem. J. 203:55–59, 1982, Irvin et al., Arch. Biochem. & Biophys. 200:418–425, 1980, Irvin, Arch. Biochem. & Biophys. 169:522–528, 1975), Tritin, Shigellatoxin (Calderwood et al., PNAS 84:4364–4368, 1987, Jackson et al., Micro Path. 2:147–153, 1987) und Pseudomonas Exotoxin A (Carroll und Collier, J. Biol. Chem. 262:8707–8711, 1987) codieren.

[0067] Bei weiteren Ausführungsformen der Erfindung kann Antisense-RNA als ein cytotoxisches Gen verwendet werden, um eine starke beschränkte Klasse I-Antwort zu induzieren. Kurz gesagt können zusätzlich zum Binden von RNA und dadurch Verhindern von Translation einer spezifischen mRNA hohe Niveaus an spezifischen Antisense-Sequenzen verwendet werden, um die erhöhte Expression von Interferonen (einschließlich Gamma-Interferon) aufgrund der Bildung großer Mengen an doppelsträngiger RNA zu induzieren. Die erhöhte Expression von Gamma-Interferon verstärkt wiederum die Expression von Klasse I-MHC-Antigenen. Bevorzugte Antisense-Sequenzen zur Verwendung in dieser Beziehung umfassen Aktin-RNA, Myosin-RNA und Histon-RNA. Antisense-RNA, welche eine Fehlpaarung mit Aktin-RNA bildet, ist besonders bevorzugt.

[0068] Bei anderen Ausführungsformen der Erfindung werden Antisense-Sequenzen zur Verfügung gestellt, welche z. B. Tumorzellwachstum, virale Replikation oder eine genetische Erkrankung durch Verhindern der zellulären Synthese von entscheidenden, für das Zellwachstum benötigten Proteinen hemmen. Beispiele für solche Antisense-Sequenzen umfassen Antisense-Thymidinkinase, Antisense-Dihydrofolatreduktase (Maher und Dolnick, Arch. Biochem. & Biophys. 253:214–220, 1987, Bzik et al., PNAS 84:8360–8364, 1987), Antisense-HER2 (Coussens et al., Science 230: 1132–1139, 1985), Antisense-ABL (Fainstein, et al., Oncogene

4:1477–1481, 1989), Antisense-Myc (Stanton et al., Nature 310:423–425, 1984) und Antisense-ras sowie Antisense-Sequenzen, welche irgendeines der Enzyme im Nukleotidbiosyntheseweg blockieren.

[0069] Gemäß anderen Gesichtspunkten der Erfindung werden retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, welche die Expression eines Genprodukts steuern, das eine Verbindung aktiviert, mit geringeroder keiner Cytotoxität (d. h. ein "Wirkstoffpräkursor") zu einem toxischen Produkt aktiviert. Typische Beispiele solcher Genprodukte umfassen Varicella zoster-Virus-Thymidinkinase (VZVTK), Herpes simplex-Virus-Thymidinkinase (HSVTK) (Field et al., J. Gen. Virol. 49:115–124, 1980, Munir et al., Protein Engineering 7(1):83–89, 1994, Black und Loeb, Biochem. 32(43):11618–11626, 1993) und E. coli Guaninphosphoribosyltransferase (siehe US-Patentanmeldung Nr. 08/155,944 mit dem Titel "Compositions and Methods for Utilizing Conditionally Lethal Genes", eingereicht am 18. November 1993, siehe auch WO 93/10218 mit dem Titel "Vectors Including Foreign Genes and Negative Selection Markers", WO 93/01281 mit dem Titel "Cytosine Deaminase Negative Selection System for Gene Transfer Techniques and Theraeies", WO 93/08843 mit dem Titel "Trapped Cells and Use Thereof as a Drug", WO 93/08844 mit dem Titel "Transformant Cells for the Prophylaxis or Treatment of Diseases Caused by Viruses, Particularly Pathogenic Retroviruses" und WO 90/07936 mit dem Titel "Recombinant Theraeies for Infection and Hyperproliferative Disorders"). Bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung steuern die retroviralen Vektorkonstrukte die Expression eines Genproduktes, das eine Verbindung mit geringer oder keiner Cytotoxität in Anwesenheit eines pathogenen Agens in ein toxisches Produkt aktiviert, wobei eine örtlich begrenzte Therapie auf das pathogene Agens wirkt (siehe WO 94/13304).

[0070] Bei einer Ausführungsform der Erfindung werden retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, welche die Expression eines HSVTK-Gens stromabwärts und unter der transkriptionellen Kontrolle eines HIV-Promotors steuern (von dem bekannt ist, dass er transkriptionell stumm ist, es sei denn, er wird durch HIV tat-Protein aktiviert). Kurz gesagt verursacht die Expression des tat-Genprodukts in humanen, mit HIV infizierten Zellen, die das Vektorkonstrukt tragen, eine verstärkte Herstellung von HSVTK. Die Zellen werden dann (entweder in vitro oder in vivo) einem Wirkstoff wie Ganciclovir, Acyclovir oder dessen Analogen (FIAU, FIAC, DHPG) ausgesetzt. Von solchen Wirkstoffen ist bekannt, dass sie durch HSVTK (aber nicht durch zelluläre Thymidinkinase) zu ihren entsprechenden aktiven Nukleotidtriphosphatformen phosphoryliert werden. Acyclovir und FIAU-Triphosphate hemmen zelluläre Polymerasen im allgemeinen, was zur spezifischen Zerstörung von HSVTK exprimierenden Zellen in transgenen Mäusen führt (siehe Borrelli et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:7572, 1988). Diese den rekombinanten Vektor enthaltenden und HIV tat-Protein exprimierenden Zellen werden selektiv durch die Anwesenheit einer spezifischen Dosierung dieser Wirkstoffe getötet.

[0071] Gemäß weiterer Gesichtspunkte der vorliegenden Erfindung können retrovirale Vektorkonstrukte der vorliegenden Erfindung auch die Expression von einer oder mehreren Sequenz(en) steuern, welche immunogene Teile von krankheitsassoziierten Antigenen codieren. Wie im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung verwendet, werden Antigene als "krankheitsassoziiert" erachtet, wenn sie entweder damit in Verbindung gebracht werden, zur Erkrankung einer Zelle (oder eines Organismus) zu führen, oder mit dem Erkrankungsstadium im allgemeinen in Verbindung gebracht werden, aber nicht für die Erkrankung der Zelle benötigt werden oder essentiell sind. Darüberhinaus werden Antigene als "immunogen" erachtet, wenn sie in der Lage sind, unter geeigneten Bedingungen eine Immunantwort zu verursachen (entweder zellvermittelt oder humoral). Immunogene "Teile" können unterschiedlicher Größe sein, sind aber bevorzugt wenigstens 9 Aminosäuren lang und können das vollständige Antigen umfassen.

[0072] Eine große Bandbreite an „krankheitsassoziierter" Antigene werden im Rahmen der vorliegenden Erfindung in Erwägung gezogen, einschließlich z. B. immunogener, nicht-tumorigener Formen von veränderten zellulären Bestandteilen, welche normalerweise mit Tumorzellen in Verbindung gebracht werden (siehe WO 93/10814). Typische Beispiele veränderter zellulärer Bestandteile, welche normalerweise mit Tumorzellen in Verbindung gebracht werden, umfassen ras* (wobei "*" so verstanden wird, dass es sich auf ein Antigen bezieht, welches verändert wurde, so dass es nicht-tumorigen ist), p53*, Rb*, verändertes Protein, das durch Wilms' Tumorgen codiert wird, Ubiquitin*, Mucin, durch das DCC codiertes Protein. APC- und MCC-Gene sowie Rezeptoren und rezeptorähnliche Strukturen wie Neu, Thyroidhormonrezeptor, aus Blutplättchen gewonnener Wachstumsfaktor („PDGF")-Rezeptor, Insulinrezeptor, epidermaler Wachstumsfaktor („EGF")-Rezeptor und koloniestimulierender Faktor („CSF")-Rezeptor.

[0073] „Krankheitsassoziierte" Antigene sollen auch so verstanden werden, dass alle oder Teile von zahlreichen eukaryontischen und prokaryontischen oder viralen Pathogenen umfasst sind. Typische Beispiele viraler Pathogene umfassen das Hepatitis B-Virus („HBV") und Hepatitis C-Virus („HCV", siehe WO 93/15207), Humanes Papilomvirus („HPV", siehe WO 92/05248, WO 90/10459, EPO 133,123), Epstein-Barr-Virus („EBV", siehe EPO 173,254, JP 1,128,788 und US-Patent Nr. 4,939,088 und 5,173,414), Katzen-Leukämievirus

(„FeLV", siehe WO 93/09070, EPO 377,842, WO 90/08832, WO 93/09238), Katzen-Immundefizienzvirus („FIV", US-Patent Nr. 5,037,753, WO 92/15684, WO 90/13573 und JP 4,126,085), HTLV I und II und humanes Immundefizienzvirus („HIV", siehe WO 93/02805).

[0074] Die oben beschriebenen retroviralen Vektorkonstrukte, gag/pol-Expressionskassetten und env-Expressionskassetten können auch die Expressionen von einem oder mehreren akzessorischen Immunmolekül(en) steuern. Die Formulierung „akzessorische Immunmoleküle", wie hier verwendet, bezieht sich auf Moleküle, welche die Erkennung, Präsentation oder Aktivierung einer Immunantwort (entweder zellvermittelt oder humoral) entweder verstärken oder schwächen. Typische Beispiele für akzessorische Immunmoleküle umfassen α-Interferon, β-Interferon, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7 (US-Patent Nr. 4,965,195), IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12 (Wolf et al., J. Immun. 46:3074, 1991, Gubler et al., PNAS 88:4143, 1991, WO 90/05147, EPO 433,827), IL-13 (WO 94/04680), IL-14, IL-15, GM-CSF, M-CSF-1, G-CSF, CD3 (Krissanen et al., Immunogenetics 26:258–266, 1987), CD8, ICAM-1 (Simmons et al., Nature 331:624–627, 1988), ICAM-2 (Singer, Science 255:1671, 1992), β-Microglobulin (Parnes et al., PNAS 78:2253–2257, 1981), LFA-1 (Altmann et al., Nature 338:521, 1989), LFA3 (Wallner et al., J. Exp. Med. 166(4):923–932, 1987), HLA-Klasse I-, HLA-Klasse II-Moleküle, B7 (Freeman et al., J. Immun. 143:2714, 1989) und B7-2. Bei einer bevorzugten Ausführungsform codiert das heterologe Gen Gamma-Interferon.

[0075] Gemäß bevorzugter Gesichtspunkte der vorliegenden Erfindung können die hier beschriebenen retroviralen Vektorkonstrukte die Expression von mehr als einer heterologen Sequenz steuern. Solche multiplen Sequenzen können entweder durch einen einzelnen Promotor oder bevorzugt durch zusätzliche sekundäre Promotoren kontrolliert werden (z. B. interne Ribosomenbindungsstellen oder „IRBS"). Bei bevorzugten Ausführungsformen der Erfindung steuern retrovirale Vektorkonstrukte die Expression heterologer Sequenzen, welche synergistisch wirken. Zum Beispiel werden bei einer Ausführungsform retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, welche die Expression eines Moleküls steuern, wie IL-15, IL-12, IL-2, Gamma-Interferon, oder eines anderen Moleküles, welches die Verstärkung der zellvermittelten Präsentation im T_H1-Weg steigert, zusammen mit einem immunogenen Teil eines krankheitsassoziierten Antigens. Bei solchen Ausführungsformen werden Immunpräsentation und Prozessierung des krankheitsassoziierten Antigens aufgrund des Vorhandenseins von akzessorischen Immunmolekülen verstärkt.

[0076] Gemäß anderen Gesichtspunkten der Erfindung werden retrovirale Vektorkonstrukte zur Verfügung gestellt, welche die Expression von einer oder mehreren heterologen Sequenz(en) steuern, welche „Ersatz"-Gene codieren. Es sollte verstanden werden, dass der Begriff „Ersatzgene", wie hier verwendet, sich auf ein Nukleinsäuremolekül bezieht, welches ein therapeutisches Protein codiert, welches in der Lage ist, einen ererbten oder nicht-ererbten genetischen Defekt zu verhindern, zu hemmen, zu stabilisieren oder umzukehren. Typische Beispiele solcher genetischer Defekte umfassen Erkrankungen des Metabolismus, der Immunregulation, der hormonellen Regulation und der enzymatischen oder membranassoziierten strukturellen Funktionen. Typische Beispiele von Erkrankungen, die durch solche Defekte verursacht werden, umfassen cystische Fibrose („CF", siehe Dorin et al., Nature 326:614), Parkinsonkrankheit, Adenosindeaminasemangel („ADA"; Hahma et al., J. Bact. 173:3663–3672, 1991), β-Globinerkrankungen, Hämophilie A & B (Faktor VIII-Mängel, siehe Wood et al., Nature 312:330, 1984), Gaucher-Krankheit, Diabetes, Formen von Gichtarthritis und Lesch-Nylan-Erkrankung (aufgrund von „HPRT"-Mängeln, siehe Jolly et al., PNAS 80:477–481, 1983) und familiäre Hypercholesterinämie (LDL-Rezeptor-Mutationen, siehe Yamamoto et al., Cell 39:27–38, 1984).

[0077] Sequenzen, welche die oben beschriebenen heterologen Gene codieren können einfach von einer Bandbreite an Quellen erhalten werden. Zum Beispiel können Plasmide, welche Sequenzen enthalten, die akzessorische Immunmoleküle codieren, von einem Aufbewahrungsort wie der American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, Maryland) erhalten werden oder von kommerziellen Quellen wie der British Bio-Technology Limited (Cowley, Oxford, England). Typische Quellsequenzen, die die oben angegebenen akzessorischen Immunmoleküle codieren, umfassen BBG 12 (das das GM-CSF-Gen enthält, das das reife Protein von 127 Aminosäuren codiert), BBG 6 (welches Sequenzen enthält, die Gamma-Interferon codieren), ATCC Nr. 39656 (welches Sequenzen enthält, die TNF codieren), ATCC Nr. 20663 (welches Sequenzen enthält, die Alpha-Interferon codieren), ATCC Nr. 31902, 31902 und 39517 (welche Sequenzen enthält, die Beta-Interferon codieren), ATCC Nr. 67024 (welche eine Sequenz enthalten, die Interleukin-1 codiert), ATCC Nr. 39405, 39452, 39516, 39626 und 39673 (welche Sequenzen enthalten, die Interleukin-2 codieren), ATCC Nr. 59399, 59398 und 67326 (welche Sequenzen enthalten, die Interleukin-3 codieren), ATCC Nr. 57592 (welches Sequenzen enthält, die Interleukin-4 codieren), ATCC Nr. 59394 und 59395 (welche Sequenzen enthalten, die Interleukin-5 codieren) und ATCC Nr. 67153 (welches Sequenzen enthält, die Interleukin-6 codieren). Es wird einem Fachmann in dem Gebiet offensichtlich sein, dass man entweder die gesamte Sequenz des Proteins oder einen geeigneten Teil davon verwenden kann, welcher den biologisch aktiven Teil des Proteins codiert.

[0078] Alternativ können bekannte cDNA-Sequenzen, die cytotoxische Gene oder heterologe Gene codieren, von Zellen erhalten werden, die solche Sequenzen exprimieren oder enthalten. Kurz gesagt wird in einer Ausführungsform von einer Zelle, die das Gen von Interesse exprimiert, mRNA mit reverser Transkriptase revers transkribiert, unter Verwendung von Oligo-dT oder Zufallsprimern. Die einsträngige cDNA kann dann durch PCR vervielfältigt werden (siehe US-Patent Nr. 4,683,202, 4,683,195 und 4,800,159. Siehe auch PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich (Hrsg.), Stockton Press, 1989, wobei Oligonukleotidprimer verwendet werden, die komplementär zu Sequenzen auf jeder Seite der gewünschten Sequenzen sind. Insbesondere wird eine doppelsträngige DNA durch Erhitzen in Anwesenheit einer hitzestabilen Taq-Polymerase, sequenzspezifischer DNA-Primer, ATP, CTP, GTP und TTP denaturiert. Doppelsträngige DNA wird hergestellt, wenn die Synthese fertig ist. Dieser Zyklus kann viele Male wiederholt werden und führt zu einer faktoriellen Vervielfältigung der gewünschten DNA.

[0079] Sequenzen, die die oben beschriebenen Gene codieren, können auch zum Beispiel mit einem Applied Biosystems Inc. DNA-Synthesegerät hergestellt werden (z. B. ABI DNA Synthesizer Modell 392 (Foster City, California)).

HERSTELLUNG RETROVIRALER VERPACKUNGSZELLLINIEN UND ERZEUGUNG REKOMBINANTER VIRALER PARTIKEL

[0080] Wie oben angegeben können die gag/pol-Expressionkassetten und env-Expressionkassetten zur Erzeugung transduktionskompetenter retroviraler Vektorpartikel verwendet werden, indem diese in geeignete Vorläuferzelllinien eingebracht werden, um eine Verpackungszelllinie zu schaffen, gefolgt von Einbringen eines retroviralen Vektorkonstrukts, um eine Produzentenzelllinie zu schaffen (siehe WO 92/05266). Solche Verpackungszelllinien erzeugen nach Einbringen eines N2-Typ Vektorkonstrukts (Armentann et al., J. of Vir. 61(5):1647–1650, 1987) einen Titer von mehr als 10^5 cfu/ml und bevorzugt einen mehr als 10-fach, 20-fach, 50-fach oder 100-fach höheren Titer als ähnlich transduzierte PA317-Zellen (Miller und Buttimore, Mol. and Cell. Biol. 6(8):2895–2902, 1986).

[0081] Verfahren zur Schaffung von Verpackungszelllinien können zur Verfügung gestellt werden, die die folgenden Stufen umfassen: (a) Einbringen einer gag/pol-Expressionskassette entsprechend in eine Tierzelle, (b) Selektieren einer Zelle, die eine gag/pol-Expressionskassette enthält, welche hohe Niveaus an gag/pol exprimiert, (c) Einbringen einer env-Expressionskassette in die selektierte Zelle und (d) Selektieren einer Zelle, welche hohe Niveaus an env exprimiert, und dadurch Schaffen der Verpackungszelllinie. Verfahren zur Schaffung von Verpackungszelllinien können zur Verfügung gestellt werden, welche die folgenden Stufen umfassen: (a) Einbringen einer env-Expressionkassette in eine Tierzelle, (b) Selektieren einer Zelle, welche hohe Niveaus an env exprimiert, (c) Einbringen einer gag/pol-Expressionkassette in die selektierte Zelle und (d) Selektieren einer Zelle, die eine gag/pol-Expressionskassette enthält, welche hohe Niveaus an gag/pol exprimiert, und dadurch Schaffen der Verpackungszelllinie. Es sollte verstanden werden, dass „hohe" Niveaus an gag/pol oder env, wie hier verwendet, sich auf Verpackungszelllinien bezieht, die wenigstens z-mal mehr gag/pol- oder env-Protein als PA317-Zellen herstellen, wobei z aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10.

[0082] Eine große Vielfalt an Tierzellen kann zur Herstellung der Verpackungszellen verwendet werden, einschließlich zum Beispiel humaner, Makaken-, Hunde-, Ratten- und Mauszellen. Besonders bevorzugte Zelllinien zur Verwendung bei der Herstellung von Verpackungszelllinien sind solche, denen genomische Sequenzen fehlen, welche homolog zu dem retroviralen Vektorkonstrukt, der gag/pol-Expressionkassette und der env-Expressionkassette, die verwendet werden sollen, sind. Verfahren zum Bestimmen von Homologie können einfach zum Beispiel durch Hybridisierungsanalyse erreicht werden (siehe Martin et al., PNAS 78:4892–4896, 1981, siehe auch WO 92/05266).

[0083] Expressionskassetten können in Zellen durch zahlreiche Techniken eingebracht werden, einschließlich zum Beispiel Transfektion mit verschiedenen physikalische Verfahren, wie Elektroporation, DEAE-Dextran, Lipofektion (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413–7417, 1989), direkte DNA-Injektion (Acsadi et al., Nature 352:815–818, 1991), Mikroprojektilbeschuss (Williams et al., PNAS 88:2726–2730, 1991), Liposomen verschiedener Typen (siehe z. B. Wang et al., PNAS 84:7851–7875, 1987), $CaPO_4$ (Dubensky et al., PNAS 81:7529–7533, 1984), DNA-Ligand (Wu et al., J. of Biol. Chem. 264:16985–16987, 1989), Verabreichung von ausschließlich Nukleinsäuren (WO 90/11092) oder Verabreichung von an einen getöteten Adenovirus geknüpfter DNA (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147–154, 1992).

[0084] Produzentenzelllinien (die auch vektorerzeugende Zelllinien oder „VCLs" genannt werden) können,

wie oben beschrieben, einfach durch Einbringen eines retroviralen Vektorkonstrukts in eine Verpackungszelllinie hergestellt werden. Produzentenzelllinien können zur Verfügung gestellt werden, welche eine gag/pol-Expressionkassette, eine env-Expressionskassette und ein retrovirales Vektorkonstrukt enthalten, wobei der gag/pol-Expressionkassette, der env-Expressionkassette und dem retroviralen Vektorkonstrukt eine gemeinsame, aufeinanderfolgende Sequenz von mehr als 20, bevorzugt 15, mehr bevorzugt 10 und am meisten bevorzugt 10 oder 8 Nukleotiden fehlen.

PHARMAZEUTISCHE ZUSAMMENSETZUNGEN

[0085] Pharmazeutische Zusammensetzungen können zur Verfügung gestellt werden, welche einen rekombinanten viralen Partikel, wie oben beschrieben, umfassen, zusammen mit einem pharmazeutisch geeigneten Träger oder Verdünnungsmittel. Solche pharmazeutische Zusammensetzungen können entweder als eine flüssige Lösung oder als eine feste Form (z. B. lyophilisiert), die in einer Lösung vor der Verabreichung suspendiert wird, hergestellt werden. Zusätzlich kann die Zusammensetzung mit geeigneten Trägern oder Verdünnungsmitteln für die lokale Verabreichung, Injektion oder orale, nasale, vaginale, sublinguale, Inhalations- oder rektale Verabreichung hergestellt werden.

[0086] Pharmazeutisch geeignete Träger oder Verdünnungsmittel sind bei den verwendeten Dosierungen und Konzentrationen ungiftig für die Empfänger. Typische Beispiele für Träger oder Verdünnungsmittel für injizierbare Lösungen umfassen Wasser, isotone Salzlösungen, welche bevorzugt bei einem physiologischen pH gepuffert sind (wie Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung oder Tris-gepufferte physiologische Kochsalzlösung), Mannitol, Dextrose, Glycerin und Ethanol sowie Polypeptide oder Proteine, wie humanes Serumalbumin. Eine besonders bevorzugte Zusammensetzung umfasst ein retrovirales Vektorkonstrukt oder rekombinantes virales Partikel in 10 mg/ml Mannitol, 1 mg/ml HSA, 20 mM Tris, pH 7,2 und 150 mM NaCl. Da der rekombinante Vektor ungefähr 1 mg Material darstellt, kann er in diesem Fall weniger als 1% des Materials mit hohem Molekulargewicht ausmachen und weniger als 1/100.000 des gesamten Materials (einschließlich Wasser). Die Zusammensetzung ist bei –70°C für wenigstens sechs Monate stabil.

[0087] Pharmazeutische Zusammensetzungen können zusätzlich auch Faktoren umfassen, die die Zellteilung stimulieren und dadurch die Aufnahme und den Einbau eines rekombinanten Vektors. Typische Beispiele umfassen Melanocyten stimulierendes Hormon (MSH) für Melanome oder epidermalen Wachstumsfaktor für Brust- oder andere epitheliale Karzinome.

[0088] Besonders bevorzugte Verfahren und Zusammensetzungen zur Aufbewahrung rekombinanter Viren werden in der US-Anmeldung mit dem Titel „Methods for Preserving Recombinant Viruses" beschrieben (siehe WO 94/11414).

VERFAHREN ZUR VERABREICHUNG

[0089] Verfahren können zur Verfügung gestellt werden zur Hemmung oder Zerstörung pathogener Agenzien in einem warmblütigen Tier, welche das Verabreichen eines rekombinanten viralen Partikels, wie oben beschrieben, an ein warmblütiges Tier umfassen, so dass das pathogene Agens gehemmt oder zerstört wird. Rekombinante virale Partikel können in vivo oder ex vivo verabreicht werden. Typische Wege für die in vivo-Verabreichung umfassen intradermal ("i. d."), intracranial ("i. c."), intraperitoneal ("i. p."), intrathecal ("i. t."), intravenös ("i. v."), subcutan ("s. c."), intramusculär ("i. m.") oder sogar direkt in einen Tumor.

[0090] Alternativ können die cytotoxischen Gene, Antisense-Sequenzen, Genprodukte, retroviralen Vektorkonstrukte oder viralen Partikel auch durch eine Vielzahl anderer Verfahren an ein warmblütiges Tier verabreicht werden. Typische Beispiele umfassen Transfektion durch verschiedene physikalische Verfahren wie Lipofektion (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sd. USA 84:7413–7417, 1989), direkte DNA-Injektion (Acsadi et al., Nature 352:815–818, 1991), Mikroprojektilbeschuss (Williams et al., PNAS 88:2726–2730, 1991), Liposomen verschiedener Typen (siehe z. B. Wang et al., PNAS 84:7851–7855, 1987), $CaPO_4$ (Dubensky et al., PNAS 81:7529–7533, 1984), DNA-Ligand (Wu et al. J. of Biol. Chem. 264:16985–16987, 1989), Verabreichung von ausschließlich Nukleinsäuren (WO 90/11092) oder Verabreichung von an einen getöteten Adenovirus geknüpfte DNA (Curiel et al., Hum. Gene Ther. 3:147–154, 1992).

[0091] Retrovirale Partikel (oder retrovirale Vektorkonstrukte alleine) können verwendet werden, um direkt pathogene Agenzien wie einen Tumor zu behandeln. Die oben beschriebenen retroviralen Partikel oder retroviralen Vektorkonstrukte können direkt an einen Tumor verabreicht werden, z. B. durch direkte Injektion an mehreren verschiedenen Orten innerhalb des Tumorkörpers. Alternativ können Arterien identifiziert werden,

die einen Tumor versorgen, und der Vektor in solch eine Arterie injiziert werden, um den Vektor direkt in den Tumor zu liefern. Ein Tumor, welcher ein nekrotisches Zentrum besitzt, kann abgesaugt werden und der Vektor direkt in das nun leere Zentrum des Tumors injiziert werden. Das retrovirale Vektorkonstrukt kann direkt auf die Oberfläche des Tumors aufgebracht werden, z. B. durch Verwendung einer lokalen pharmazeutischen Zusammensetzung, welche das retrovirale Vektorkonstrukt enthält, oder bevorzugt ein rekombinantes retrovirales Partikel.

[0092] Verfahren können zur Verfügung gestellt werden zur Hemmung des Wachstums eines ausgewählten Tumors in einem warmblütigen Tier, welches die folgenden Schritte umfaßt: (a) Entfernen von Tumorzellen, die mit dem ausgewählten Tumor von einem warmblütigen Tier verbunden sind, (b) Infizieren der entfernten Zellen mit einem retroviralen Vektorkonstrukt, welches die Expression von wenigstens einem Antitumormittel steuert, und (c) Verabfolgen der infizierten Zellen an ein warmblütiges Tier, so dass das Wachstum des ausgewählten Tumors durch Immunantworten, die gegen die genverändeten Tumorzellen erzeugt werden, gehemmt wird. "Hemmen des Wachstums eines ausgewählten Tumors" bezieht sich auf entweder (1) die direkte Hemmung der Tumorzellteilung oder (2) immunzellvermittelte Tumorzelllyse oder beides, was zu einer Unterdrückung der Nettoausdehnung von Tumorzellen führt. Hemmung von Tumorwachstum durch jeden dieser beiden Mechanismen kann leicht durch einen Fachmann in dem Gebiet bestimmt werden, basierend auf einer Vielzahl bekannter Verfahren (siehe US-Seriennr. 08/032,846). Beispiele für Verbindungen oder Moleküle, welche als Antitumormittel wirken, umfassen akzessorische Immunmoleküle, cytotoxische Gene und Antisense-Sequenzen, wie oben erörtert (siehe auch US-Seriennr. 08/032,846).

[0093] Zellen können von einer Bandbreite an Orten entfernt werden, z. B. von einem ausgewählten Tumor. Zusätzlich kann ein Vektorkonstrukt in nicht-tumorigene Zellen eingebracht werden, einschließlich z. B. Zellen der Haut (dermale Fibroblasten) oder aus dem Blut (z. B. periphere Blutleukocyten). Sofern gewünscht können bestimmte Zellfraktionen, wie eine T-Zelluntergruppe oder Stammzellen, auch spezifisch aus dem Blut entfernt werden (siehe z. B. PCT WO 91/16116, eine Anmeldung mit dem Titel "Immunoselection Device and Method"). Vektorkonstrukte können dann mit den entfernten Zellen in Kontakt gebracht werden, unter Verwendung von irgendeiner der oben beschriebenen Techniken, gefolgt von der Rückführung der Zellen an das warmblütige Tier, bevorzugt an einen Tumor oder in die Umgebung. Anschließend an das Entfernen der Tumorzellen von einem warmblütigen Tier kann eine Einzelzellsuspension erzeugt werden, z. B. durch physikalische Disruption oder proteolytischen Verdau. Zusätzlich kann die Teilung der Zellen durch Zugabe zahlreicher Faktoren, wie Melanocyten stimulierenden Faktor für Melanome oder epidermalen Wachstumsfakor für Brustkarzinome, erhöht werden, um die Aufnahme, den genomischen Einbau und die Expression des rekombinanten viralen Vektors zu verstärken.

[0094] Es versteht sich, dass die entfernten Zellen nicht nur an dasselbe Tier zurückgegeben werden können, sondern auch zur Hemmung des Wachstums ausgewählter Tumorzellen in einem anderen allogenen Tier verwendet werden können. In einem solchen Fall ist es im allgemeinen bevorzugt, histokompatibel zusammenpassende Tiere zu haben (wenn auch nicht immer, siehe z. B. Yamamoto et al., "Efficacy of Experimental FIV Vaccines", 1. Internationale Konferenz von FIV-Forschern, University of California at Davis, September 1991).

[0095] Die oben beschriebenen Verfahren können zusätzlich die Stufen umfassen, bei welchen Fibroblasten oder andere nicht-kontaminierende Tumorzellen anschließend an das Entfernen der Tumorzellen aus einem warmblütigen Tier verarmt werden, und/oder die Stufe, bei welcher die Zellen z. B. durch Bestrahlung inaktiviert werden.

[0096] Wie oben angegeben können mehrere Antitumoragenzien nebeneinander oder aufeinanderfolgend verabreicht werden, um das Wachstum eines ausgewählten Tumors gemäß der Verfahren der vorliegenden Erfindung zu hemmen. Zum Beispiel kann ein Antitumoragens wie γ-IFN zusammen oder nacheinander mit anderen Antitumoragenzien wie IL-2 oder IL-12 an ein warmblütiges Tier verabreicht werden, um ein pathogenes Agens zu hemmen oder zu zerstören. Solche therapeutischen Zusammensetzungen können direkt, unter Verwendung eines einzelnen Vektorkonstruktes verabreicht werden, welches direkt die Expression von wenigstens zwei Antitumoragenzien steuert, oder die von unabhängigen Vektorkonstrukten exprimiert werden. Alternativ kann ein Antitumoragens (z. B. γ-IFN) unter Verwendung eines Vektorkonstrukts verabreicht werden, während andere Tumoragenzien (z. B. IL-2) direkt verabreicht werden (z. B. als eine intravenöse pharmazeutische Zusammensetzung).

[0097] Retrovirale Vektorkonstrukte, welche sowohl ein γ-IFN-Gen als auch ein anderes IL-2 codierendes Gen liefern und exprimieren, können an den Patienten verabreicht werden. In solchen Konstrukten kann ein Gen von der Retrovektor-LTR exprimiert werden und das andere kann einen zusätzlichen transkriptionellen

Promotor verwenden, der sich zwischen den LTRs befindet, oder kann als eine polycisteronische mRNA exprimiert werden, die möglicherweise eine interne Ribosomenbindungsstelle verwendet. Nach dem in vivo-Gentransfer wird das Immunsystem des Patienten aufgrund der Expression von γ-IFN aktiviert. Eine Infiltration des sterbenden Tumors mit inflammatorischen Zellen verstärkt wiederum die Immunpräsentation und verbessert weiter die Immunantwort des Patienten gegen den Tumor.

[0098] Verfahren zur Erzeugung einer Immunantwort gegen einen immunogenen Teil eines Antigens können zur Verfügung gestellt werden, um eine Erkrankung zu verhindern oder zu behandeln (siehe z. B. US-Seriennr. 08/104,424, 08/102,132, 07/948,358, 07/965,084), zur Unterdrückung einer Transplantatabstoßung (siehe US-Seriennr. 08/116,827), zur Unterdrückung einer Immunantwort (siehe US-Seriennr. 08/116,828) und zur Unterdrückung einer Autoimmunantwort (siehe US-Seriennr. 08/116,983).

[0099] Es ist verständlich für einen Fachmann in dem Gebiet mit der hier zur Verfügung gestellten Offenbarung, dass jeder der hier beschriebenen retroviralen Vektorkonstrukte nicht nur als rekombinantes virales Partikel verabfolgt werden kann, sondern auch als direkte Nukleinsäurevektoren. Solche Vektoren können unter Verwendung irgendeines geeigneten physikalischen Verfahrens zum Gentransfer verabfolgt werden, einschließlich z. B. der oben erörterten.

[0100] Die folgenden Beispiele werden zum Zweck der Veranschaulichung und nicht zur Beschränkung angeboten.

BEISPIEL 1

KONSTRUKTION VON RETROVEKTORRÜCKGRATEN

A. Herstellung eines retroviralen Vektorkonstrukts, das keine verlängerte Verpackungssequenz ψ) enthält

[0101] Dieses Beispiel beschreibt die Konstruktion eines retroviralen Vektorkonstrukts unter Verwendung ortsspezifischer Mutagenese. Bei diesem Beispiel wird ein retrovirales MoMLV-Vektorkonstrukt hergestellt, wobei das Verpackungssignal "ψ" des Retrovektors bei Rasenpaar 617 von SEQ ID Nr. 1 terminiert ist, wodurch der ATG-Start von gag eliminiert wird. Daher kann kein Crossover zwischen dem retroviralen Vektorkonstrukt und der gag/pol-Expressionskassette erfolgen, welche unten in Beispiel 3 beschrieben wird.

[0102] Kurz gesagt wird pMLV-K (Miller, J. Virol. 49:214–222, 1984 – ein infektiöser Klon, welcher von pMLV-I, Shinnick et al., Nature 293:543–548, 1981, abgeleitet ist) mit Eco571 verdaut und ein 1,9 kb Fragment isoliert. (Eco571 schneidet stromaufwärts der 3'-LTR, wobei alle env-codierenden Segmente aus dem retroviralen Vektorkonstrukt entfernt werden.) Das Fragment wird dann mit T4-Polymerase (New England Biolabs) und allen vier Desoxynukleotiden abgestumpft und in die EcoRV-Stelle von Phagemid pBluescript II KS+ (Stratagene, San Diego, California) kloniert. Dieses Verfahren führt zu zwei Konstrukten, welche pKS2+Eco571-LTR(+) (**Fig. 1**) und pKS2+Eco571-LTR(–) (**Fig. 2**) genannt werden, welche durch Restriktionsanalyse untersucht werden. Wird das einsträngige Phagemid (+) erzeugt, so wird die codierende Sequenz von MoMLV isoliert.

[0103] Eine neue EcoRI-Stelle wird dann in Konstrukt pKS2+Eco571-LTR(+) erzeugt, um das ATG-Startcodon von gag zu entfernen. Insbesondere wird eine EcoRI-Stelle unter Verwendung des Einzelstrang-Mutageneseverfahrens von Kunkle (PNAS 82:488, 1985) geschaffen. pKS2+Eco571-LTR(+) ist ein pBluescript™ II + Phagemid (Stratagene, San Diego, California), welches ein Eco571-Fragment von pMLV-K enthält. Es umfaßt die MoMLV-LTR und Sequenzen stromabwärts von Rasenpaar 1378. Wird ein einsträngiges Phagemid erzeugt, so wird die codierende Sequenz von MoMLV isoliert. Das Oligonukleotid 5'-GGT AAC AGT CTG GCC CGA ATT CTC AGA CAA ATA CAG (SEQ ID Nr. 2) wird geschaffen und zur Erzeugung einer EcoRI-Stelle bei den Basenpaaren 617–622 verwendet. Dieses Konstrukt wird pKS2+LTR-EcoRI (**Fig. 3**) genannt.

B. Substitution von Nonsense-Codons in der verlängerten Verpackungssequenz (ψ+)

[0104] Dieses Beispiel beschreibt die Modifikation des verlängerten Verpackungssignals (ψ+) durch ortsspezifische Mutagenese. Insbesondere wird die Modifikation ein Stopcodon TAA an der normalen ATG-Startstelle von gag (Position 631–633 von SEQ ID Nr. 1) und ein zusätzliches Stopcodon TAG bei Position 637-639 von SEQ ID Nr. 1 substituieren.

[0105] Kurz gesagt wird ein Eco571-EcoRI-Fragment (Basenpaare 7770 bis ungefähr 1040 in MoMVL) aus pN2 (Amentano et al., J. Virol. 61:1647–1650, 1987) in pBluescript II KS+ Phagemid an den SacII und Eco-

RI-Stellen (kompatibel) kloniert. Ein einzelsträngiges Phagemid, welches die Antisense-Sequenz von MoMLV enthält, wird unter Verwendung von Helferphage M13K07 (Stratagene, San Diego, California) erzeugt. Das Oligonukleotid 5'-CTG TAT TTG TCT GAG AAT TAA GGC TAG ACT GTT ACC AC (SEQ ID Nr. 3) wird synthetisiert und wie oben beschrieben gemäß des Verfahrens von Kunkle verwendet, um die Sequenz innerhalb der ψ-Region zu modifizieren, um Stopcodons bei den Nukleotiden 631–633 und 637–639 zu codieren.

C. Entfernen der retroviralen Verpackungssequenz stromabwärts der 3'-LTR

[0106] Eine retrovirale Verpackungssequenz, die sich stromabwärts der 3'-LTR befindet, wird im wesentlichen wie oben beschrieben entfernt. Kurz gesagt wird pKS2+Eco571-LTR(–) (Fig. 2) mit Ball und HincII verdaut und unter Ausschluß der Ball bis HincII-DNA, die die Verpackungsregion von MoMLV enthält, zurückversetzt.

D. Konstruktion von Vektorrückgraten

[0107] In den obigen Abschnitten A und C oder alternativ in Abschnitten B und C hergestellte Konstrukte werden mit einem Plasmidvektor, wie unten beschrieben, zusammengegeben, um ein Retrovektorrückgrat zu schaffen, welches alle benötigten Elemente in cis enthält, und unter Ausschluß aller Sequenzen von 8 Nukleinsäuren oder mehr, die in dem retroviralen Teil der gag-pol- und env-Expressionselemente enthalten sind (siehe Beispiele 3 und 4).

1. Teile A und C werden wie folgt zusammengegeben: Das Produkt von A wird mit NheI und EcoRI verdaut und ein Fragment von 1034 Basenpaaren, welches die LTR und das minimale ψ enthält, isoliert. Das Fragment wird in das Produkt von Teil C an den einmalig vorhandenen (kompatiblen) Restriktionsstellen SpeI und EcoRI ligiert. Das sich ergebende Konstrukt wird pR1 (Fig. 4) genannt.
2. Teile B und C werden wie folgt kombiniert: Das Produkt von B wird mit NheI und EcoRI verdaut und ein Fragment von 1456 Basenpaaren, welches die LTR und dies modifizierte ψ+-Region enthält, isoliert. Das Fragment wird in das Produkt von C an den einmalig vorhandenen (kompatiblen) Restriktionsstellen SpeI und EcoRI ligiert. Das sich ergebende Konstrukt wird pR2 (Fig. 5) genannt.

BEISPIEL 2

EINBRINGEN EINES INTERESSIERENDEN GENS IN PR1 UND PR2

[0108] Dieses Beispiel beschreibt das Einbringen eines interessierenden Gens gp120, gp41 und rev zusammen mit einem selektierbaren Marker in entweder pR1 oder pR2. Kurz gesagt wird die gp120, gp41 und rev codierende Sequenz aus dem Konstrukt pKT1 (Fig. 6, siehe auch Chada et al., J. Vir. 67:3409–3417, 1993) genommen; beachten Sie, dass dieser Vektor auch N2IIIBenv genannt wird. Insbesondere wird pKT1 zunächst an der einmalig vorhandenen AsuII-Stelle (Position 5959) verdaut. Die Enden werden abgestumpft und ein XhoI-Verbindungsstück wird an diese Stelle ligiert. (New England Biolabs). Dieses Konstrukt wird dann mit XhoI verdaut und ein Fragment von 4314 bp, welches HIV-Envelope (gp120 und gp41), rev, frühen SV40-Promotor und G418-Resistenzgene enthält, wird isoliert.

[0109] pR1 oder pR2 wird an der einmalig vorhandenen EcoRI-Restriktionsstelle verdaut, abgestumpft, und SalI-Verbindungsstücke (New England Biolabs) werden einligiert. Das KT1-Fragment von 4314 bp wird dann in pR1 oder pR2 an den Sal1-Stellen ligiert und die richtige Orientierung wird bestimmt (siehe Fig. 7 und Fig. 8). In beiden dieser Konstrukte (pR1-HIVenv und pR2-HIVenv) werden die HIV-Gene von der MLV-LTR exprimiert und die G418-Resistenz wird von dem SV40-Promotor exprimiert.

BEISPIEL 3

KONSTRUKTION VON GAG-POL-EXPRESSIONSKASSETTEN

A. Konstruktion eines Expressionskassettenrückgrats pHCMU-PA

[0110] Zunächst wird ein Vektor geschaffen, um das Rückgrat für sowohl die gag/pol- als auch env-Expressionskassetten zu bilden. Kurz gesagt wird pBluescript SK-Phagemid (Stratagene, San Diego, California, GenBank-Zugangsnummer 52324, "SK-" genannt) mit SpeI verdaut und mit Klenow abgestumpft. Das abgestumpfte DraI-Fragment von SV40 (Fiers et al., "Complete nucleotide sequence of SV40 DNA" Nature 273:113–120, 1978) von DraI (bp2366) bis DraI (bp2729) wird dann in SK-eingebracht und ein Konstrukt isoliert, bei welchem das späte SV40-Polyadenylierungssignal umgekehrt zu dem LacZ-Gen von SK-orientiert ist. Dieses Konstrukt wird SK-SV40A genannt.

[0111] Ein Major Immediate Early Promotor des humanen Cytomegalievirus ("HCMV-IE", Boshart et al., Cell 41:521–530, 1985) (HincII, bp 140 bis EagI, bp814) wird nach Verdau mit HincII und EagI isoliert und die EagI-Stelle abgestumpft. Das abgestumpfte Fragment 674 wird in SK-SV40A ligiert. Das endgültige Konstrukt, welches pHCMV-PA genannt wird, wird dann isoliert (siehe **Fig. 11**). Dieses Konstrukt enthält den HCMV-Promotor, welcher in entgegengesetzte Orientierung zu dem LacZ-Gen und stromaufwärts des späten Polyadenylierungssignals von SV40 angeordnet ist.

B. Schaffung des neuen Codons für das 5'-Gag

[0112] Dieses Beispiel beschreibt gag/pol-Expressionskassetten, denen nicht-codierende Sequenzen stromaufwärts das gag-Starts fehlen, wodurch die Rekombinationsmöglichkeit zwischen dem gag-pol-Expressionselement und der ψ+Sequenz eines retroviralen Vektorkonstrukts reduziert wird und eine gemeinsame Verpackung des gag-pol-Expressionselementes zusammen mit dem Retrovektor gehemmt wird. Um eine solche Expressionskassette zu konstruieren, werden 448 bp DNA mit den folgenden Merkmalen synthetisiert: 5' ATATATATATATCGAT (ClaI-Stelle) ACCATG (Startcodon, Position 621) (SEQ ID Nr. 4), gefolgt von 410 bp, welche unter Verwendung alternativer Codons 136+ Aminosäurereste codieren (siehe **Fig. 9** und **Fig. 10**), gefolgt von GGCGCC (NarrStelle) AAACCTAAAC 3' (SEQ ID Nr. 5).

[0113] Kurz gesagt wird jedes der Oligonukleotide 15 bis 24 (unten in Tabelle 1 gezeigt) in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben, so dass die Endkonzentration für jedes 1 μM beträgt. Die Oligonukleotide 25 und 26 werden in das Gefäß gegeben, so dass die Endkonzentration für jedes 3 μM beträgt. 1,2 μl 2,5 mM Desoxynukleotidtriphosphat-Stammlösung (dG, dA, dT, dC) werden in das Gefäß gegeben. 5 μl 10 × PCR-Puffer (Perkin-Elmer). Wasser wird bis zu einem Volumen von 50 μl zugegeben. Wachskügelchen werden zugegeben und bei 55°C über die wäßrige Schicht geschmolzen und dann auf 22°C abgekühlt. Eine obere wäßrige Schicht wird wie folgt zugegeben: 5 μl 10 × PCR-Puffer, 7,5 μl Dimethylsulfoxid, 1,5 μl Taq-Polymerase (Perkin-Elmer) und 36 μl Wasser. 40 PCR-Zyklen werden dann wie folgt durchgeführt: 94°C, 30 Sekunden, 56°C 30 Sekunden und 72°C, 30 Sekunden. Das PCR-Produkt wird bei –20°C bis zum Zusammensetzen der gag/pol-Expressionskassette gelagert.

Tabelle 1

SEQ. ID. Nr.	Sequenz
15	5' ATA TAT ATA TAT CGA TAC CAT GGG GCA AAC CGT GAC TAC CCC TCT GTC CCT CA C ACT GGC CCA A 3'
16	5' TTG ATT ATG GGC AAT TCT TTC CAC GTC CTT CCA ATG GCC CAG TGT GAG GGA C 3'
17	5' AGA ATT GCC CAT AAT CAA AGC GTG GAC GTC AAA AAA CGC AGG TGG GT G ACA TTT TGT AGC GCC GAG TGG CCC 3'
18	5' AAG TTC CAT CCC TAG GCC AGC CAA CAT TGA ATG TGG GCC ACT CGG CGC TAC A 3'
19	5' GGC CTA GGG ATG GAA CTT TCA ATC GCG ATC TGA TTA CTC AAG TGA AA A TTA AAG TGT TCA GCC CCG GAC CCC 3'
20	5' GTG ACA ATA TAA GGA ACT TGA TCG GGA TGG CCG TGG GGT CCG GGG CTG AAC A 3'
21	5' AGT TCC TTA TAT TGT CAC ATC GGA GGC TCT CGC TTT CGA TCC ACC ACC TTG GGT GAA ACC ATT CGT GCA TCC 3'
22	5' AGG AGC GCT GGG TGG GAG GGG TGG AGG TGG TTT GGG ATG CAC GAA TGG TTT C 3'
23	5' CTC CCA CCC AGC GCT CCT AGC CTG CCC TTG GAG CCC CCA CGA AGC ACA CCA CCC AGG AGC AGC TTG TAC CCT 3'
24	5' GTT TAG GTT TGG CGC CGA GGC TGG GGG TCA GAG CAG GGT ACA AGC TGC TCC T 3'
25	5' ATA TAT ATA TAT CGA TAC C 3'
26	5' GTT TAG GTT TGG CGC CGA GG 3'

C. Schaffung eines neuen 3'-Endes für Pol

[0114] Um eine gag/pol-Expressionskassette herzustellen, welche gag/pol in ganzer Länge exprimiert, wird pCMVgag/pol konstruiert. Kurz gesagt wird eine MoMLV-Sequenz von PstI (bp 567) bis NheI (bp 7847) in die PstI-XbaI-Stellen von pUC19 (New England Biolabs) kloniert. Das sich ergebende Intermediat wird mit HindIII und XhoI verdaut und ein Fragment von 1008 bp isoliert, welches die gag-Leitsequenz enthält. Dasselbe Zwischenprodukt wird auch mit XhoI und ScaI verdaut und ein Fragment von 4312 bp isoliert, welches die verbleibenden gag- und pol-Sequenzen enthält. Die beiden isolierten Fragmente werden dann in die HindIII- und SmaI-Stellen von pHCMV-PA, der oben beschrieben wird, kloniert. Das sich ergebende Konstrukt, welches CMVgag/pol (**Fig. 12**) genannt wird, exprimiert gag- und pol-Gene von MoMLV.

[0115] Um das in pCMV gag-pol vorkommende 3'-Ende des pol-Gens zu verkürzen, wird ein SnaBI-XmaI-Fragment von 5531 Basenpaaren aus pCMV gag-pol isoliert, welches einen Teil des CMV IE-Promotors und das gesamte gag-pol mit Ausnahme der letzten 28 Codons enthält. Dieses Fragment wird in die SnaBI- und XmaI-Stellen von pHCMV-PA kloniert. Dieses Konstrukt exprimiert fünf neue Aminosäuren am Carbo-

xyende (Ser-Lys-Asn-Tyr-Pro) (SEQ ID Nr. 6) (pCMV gpSma).

[0116] Alternativ können diese fünf Aminosäuren durch Verdauen von pCMVgp SmaI mit SmaI und Anfügen eines NheI (Terminationscodons in drei Phasen)-Verbindungsstücks (5'-CTA GCT AGC TAG, SEQ ID Nr. 14, New England Biolabs) am Ende der abgestumpften pol-Sequenz eliminiert werden. Dieses Konstrukt wird pCMV gp Nhe genannt. Beide dieser Konstrukte beheben die Möglichkeit eines Crossover zwischen gag/pol- und env-Expressionskassetten.

D. Gag-Pol-Expressionskassette

[0117] Teile B und C von oben werden kombiniert, um einen Expressionsvektor zur Verfügung zu stellen, der einen CMV IE-Promotor, eine gag-pol-Sequenz, beginnend bei der neuen ClaI-Stelle (gefolgt von ACC ATG und 412 bp einer alternativen oder "wobble"-gag-codierenden Sequenz) und endend bei der SmaI-Stelle (MoMLV Position 5750), gefolgt von einem SV40-Polyadenylierungssignal enthält, im wesentlichen wie unten beschrieben. Kurz gesagt wird das doppelsträngige wobble-Fragment von ungefähr 451 bp aus Teil A in einen pCR™II TA-Klonierungsvektor (Invitrogen Corp.) ligiert. Das wobble-PCR-Produkt enthält natürlicherweise einen 3'-A-Überhang an jedem Ende, welches die Klonierung in den 3'-T-Überhang von pCR™II ermöglicht. Das ClaI-NarI-wobble-Fragment von 422 bp aus dem pCR™II-Klon wird entfernt und in die ClaI-(Position 679, Figur pCMV gp Sma) und NarI-(Position 1585)-Stellen von pCMV gp SmaI ligiert (Teil B) (oder pCMV gp Nhe). (Die ClaI-Stelle bei Position 5114 ist methyliert und wird nicht mit ClaI geschnitten). Das Produkt dieser Legation wird mit NarI verdaut, und das MLV-K NarI-Fragment (Positionen 1035 bis 1378) wird eingefügt (SEQ ID Nr. 1). Dieses Konstrukt wird pCMVgp-X genannt (**Fig. 14**).

BEISPIEL 4

KONSTRUKTION VON ENV-EXPRESSIONSKASSETTEN

A. Schaffung einer neuen 5'-EagI-Restriktionsstelle

[0118] Ausgehend von einem EagI-EcoRI Subfragment von 626 bp von einem amphotropen Envelope 4070 A (Chattopodhyay et al., J. Vir. 39:777, 1981; GenBank Zugangsnummer ML V4070A und Nummer MLVENVC; SEQ ID Nr. 12), das in einen pBluescript II Ks$^+$ Vektor (der ein Startcodon enthält) kloniert ist, wird eine ortsspezifische Mutagenese stromaufwärts der Translationsstartstelle durchgeführt, um ACCATCCTCTGGACGGACATG...(SEQ ID Nr. 7, Positionen 20–40 von Genbanksequenz Nr. MLVENVC) in ACCCGGCCGTGGACGGACATG...(SEQ ID Nr. 8) zu ändern, und eine neue EagI-Stelle an Position 23 zu schaffen. Diese Modifikation ermöglicht die Klonierung der amphotropen Envelope-Sequenz in einen Expressionsvektor, wobei eine stromaufwärts gelegene Sequenz 4070A die homolog zu dem in Beispiel 2A beschriebenen gag-pol-Expressionselement ist, eliminiert wird.

B. Schaffung eines neuen 3'-Endes für Env

[0119] Ein neues 3'-Ende des Envelope-Expressionselementes wird durch Beenden der Sequenz, die das R-Peptid stromabwärts des Endes der Transmembranregion (p15E) codiert, geschaffen. Kurz gesagt wird das oben beschriebene Konstrukt pHCMV-PA zunächst durch Verdau mit NotI (Position 1097) modifiziert, abgestumpft und zum Auslöschen der überlappenden Bluescript EagI-Stelle an derselben Position zurückversetzt. pCMV Envam-Eag-X-less wird dann durch Verdauen des modifizierten pHCMV-PA mit EagI (Position 671 und SmaI (Position 712)) und Einligieren von zwei Fragmenten konstruiert. Das erste ist ein EagI-NcoI-Fragment von 4070A (Positionen 1–1455) (SEQ ID Nr. 12). Das zweite ist ein MLV-K-Envelope-Fragment NcoI-PvoII (Positionen 7227–7747) (SEQ ID Nr. 12). Das sich ergebende Konstrukt aus der 3-Wege-Ligation enthält den HCMV-Promotor, gefolgt von der codierende SU-Sequenz (GP70) des 4070A-Envelopes, der codierenden TM-Sequenz (p15e) von MoMLV und einer 8 Reste des R-Peptids codierenden Sequenz. Zusätzlich teilt diese Envelope-Expressionskassette (pCMV Env am-Eag-X-less) (**Fig. 18**) keine Sequenz mit den in Beispiel 1 beschriebenen Crossless-Retrovektorrückgraten.

C. Envelope-Expressionselement

[0120] Teile A und B von oben werden zu einem kompletten amphotropen Expressionselement zusammengefügt, das den CMV-Promotor, 4070A SU MoMLV TM und das SV40-Polyadenylierungssignal in einem Bluescript SK-Plasmidvektor enthält. Dieses Konstrukt wird pCMVenv-X genannt (**Fig. 15**). Kurz gesagt wird das in Teil A beschriebene Konstrukt mit einer neuen EagI-Restriktionsstelle mit EagI und XhoI verdaut und ein Frag-

ment von 571 bp wird isoliert. pCMV Envam-Eag-X-less (aus Teil B) wird mit KpnI und EagI verdaut und das Fragment von 695 bp zurückbehalten. pCMV Envam-Eag-X-less (aus Teil B) wird mit KpnI und XhoI verdaut und das Fragment von 4649 bp wird zurückbehalten. Diese zwei Fragmente werden zusammen mit dem EagI bis XhoI-Fragment von 571 bp, welches aus dem PCT-Konstrukt aus Teil A verdaut wurde, ligiert. pCMVenv-X teilt keine Sequenz mit Crossless Retrovektorrückgraten noch mit dem gag-pol-Expressionselement pCMVgp-X.

BEISPIEL 5

FUNKTIONALITÄTSTESTS FÜR GAG-POL- UND ENV-EXPRESSIONSKASSETTEN

[0121] Schnelle Tests wurden entwickelt, um sicherzustellen, dass die gag-pol- und env-Expressionskassetten biologisch aktiv sind. Die Materialien für diese Untersuchungen bestehen aus einer Zelllinie, die für vorübergehende Expression verwendet wird (üblicherweise 293-Zellen, ATCC #CRL 1573), einer Zielzelllinie, die empfänglich für Infektionen ist (üblicherweise HT 1080-Zellen, ATCC #CCL 121), und entweder pRgpNeo (Fig. 16) oder pLARNL (Emi et al., J. Virol 65:1202–1207, 1991). Die zwei letztgenannten Plasmide exprimieren wiedergewinnbare Retrovektoren, die G418-Resistenz vermitteln und auch gag-pol exprimieren, im Fall von RgpNeo, oder env, im Fall von pLARNL. Zur Vereinfachung ist der Aufbau von RgpNeo (Fig. 16) unten angegeben.

[0122] Um die Expressionskassette wie pCMVgp-X auf Funktionalität von gag/pol zu testen, wird das Plasmid mit pLARNL bei einem Verhältnis von 1:1 in 293-Zellen kotransfiziert. Nach 12 Stunden wird das Medium durch normales Wachstumsmedium ersetzt. Nach zusätzlichen 24 Stunden wird die überstehende Flüssigkeit von den 293-Zellen entfernt, durch einen 0,45 µm Filter filtriert und auf HT 1080-Zielzellen aufgebracht. 24 Stunden nach dieser Behandlung wird das Medium durch Wachstumsmedium ersetzt, welches 800 µg/ml G418 enthält. G418-resistente Kolonien werden nach einer Woche bewertet. Das Erscheinen von Kolonien gibt an, dass alle Elemente bei der ursprünglichen Cotransfektion funktional und aktiv sind.

[0123] Zur Vereinfachung ist der Aufbau von RgpNeo (Fig. 16) unten angegeben:
Position 1 = linkes Ende von 5'-LTR, Positionen 1-6320 = MoMLV-Sequenz von 5'-LTR bis ScaI-Restriktionsstelle, Positionen 6321–6675 = früher SV40-Promotor, Positionen 6676–8001 = Neo-Resistenzgen aus Tn 5 (einschließlich prokaryontischer Promotor) und Positionen 8002–8606 = pBR Replikationsursprung.

BEISPIEL 6

VERPACKUNGSZELLLINIEN- UND PRODUZENTENZELLLINIENENTWICKLUNG

[0124] Dieses Beispiel beschreibt die Herstellung von Verpackungs- und Produzentenzelllinien, unter Verwendung der oben beschriebenen retroviralen Vektorkonstrukte, gag/pol-Expressionskassetten und env-Expressionskassetten, welche die Bildung eines replikationsfähigen Virus verhindern.

[0125] Kurz gesagt wird für amphotrope MoMLV-basierende retrovirale Vektorkonstrukte eine Vorläuferzelllinie ausgewählt, der Sequenzen fehlen, die homolog zu Maus-Leukämieviren sind, wie die Hundezelllinie D-17 (ATCC Nr. CCL 183). Die gag/pol-Expressionskassetten werden dann in die Zelle durch Elektroporation eingebracht, zusammen mit einem selektierbaren Markerplasmid wie DHFR (Simonsen et al., PNAS 80:2495–2499, 1983). Resistente Kolonien werden dann selektiert, in Platten mit 6 Vertiefungen bis zur Konfluenz vermehrt und auf die Expression von gag/pol durch Western-Blot untersucht. Klone werden auch auf die Herstellung von hohen Titern an Vektorpartikeln nach Transduktion mit pLARNL durchmustert.

[0126] Die Klone mit den höchsten Titern werden dann mit einer env-Expressionskassette und einem selektierbarem Markerplasmid, wie Hygromycin (siehe Gritz und Davies, Gene 25:179–188, 1983) elektroporiert. Resistente Kolonien werden selektiert, in Platten mit 6 Vertiefungen bis zur Konfluenz vermehrt und durch Western-Blots auf die Expression von env untersucht. Klone werden auch auf die Produktion von hohen Titern an Vektorpartikeln nach Transduktion mit einem retroviralen Vektorkonstrukt durchmustert.

[0127] Die sich ergebenden Verpackungszelllinien können in flüssigem Stickstoff bei 10×10^6 Zellen pro Gefäß in DMEM, welches 10% bestrahltes fötales Rinderserum und 8% DMSO enthält, gelagert werden. Weitere Untersuchungen können durchgeführt werden, um die Sterilität und ein Fehlen der Helfervirusherstellung zu bestätigen. Bevorzugt sollte sowohl eine S+L-Untersuchung als auch eine Mus dunni-Genrettungsuntersuchung durchgeführt werden, um ein Fehlen einer Helfervirusherstellung zu bestätigen.

[0128] Um eine Produzentenzelllinie zu konstruieren wird ein wie oben in Beispiel 1 beschriebenes retrovirales Vektorkonstrukt in eine xenotrope Verpackungszelllinie unter Verwendung der oben beschriebenen Verfahren elektroporiert. Nach 24–48 Stunden wird die überstehende Flüssigkeit von der xenotropen Verpackungszelllinie abgenommen und zur Transduktion einer zweiten Verpackungszelllinie verwendet, wobei die endgültige Produzentenzelllinie geschaffen wird.

BEISPIEL 7

HELFERNACHWEISUNTERSUCHUNG-KOKULITVIERUNG UND IGENRETTUNG

[0129] Dieses Beispiel beschreibt eine empfindliche Untersuchung für den Nachweis eines replikationsfähigen Retrovirus ("RCR"). Kurz gesagt werden 5×10^5 vektorproduzierende Zellen mit einer gleichen Anzahl an Mus dunni-Zellen (Lander und Chattopadhyay, J. Virol. 52:695, 1984) kokultiviert. Mus dunni-Zellen sind besonders bevorzugt für einen Helfervirusnachweis, da sie empfänglich gegenüber nahezu allen Maus-Leukämie-verwandten Viren sind und keine bekannten endogenen Viren enthalten. Drei, sechs und neun Tage nach der ursprünglichen Kultur werden die Zellen etwa 1 zu 10 aufgeteilt und 5×10^5 frische Mus dunni-Zellen werden zugegeben. Fünfzehn Tage nach der ursprünglichen Kokultivierung von Mus dunni-Zellen mit vektorproduzierenden Zellen wird die überstehende Flüssigkeit von den Kulturen entfernt, durch einen 0,45 µm Filter filtriert und einer Genrettungsuntersuchung unterzogen.

[0130] Kurz gesagt wird Kulturflüssigkeit von einer MdH-Testzelllinie (Mus dunni-Zeilen, die pLHL enthalten (einen retroviralen Vektor mit Hygromycinresistenzmarker, siehe Palmer et al., PNAS 84 (4): 1055–1059, 1987)) und mit der zu testenden Kulturflüssigkeit ersetzt. Polybren wird zu einer Endkonzentration von 4 µg/ml zugegeben. An Tag 2 wird das Medium entfernt und mit 2 ml frischem DMEM ersetzt, das 10% fötales Kalbsserum enthält, ersetzt. An Tag 3 wird die überstehende Flüssigkeit entfernt, filtriert und auf HT1080-Zellen gegeben. Polybren wird bis zu einer Endkonzentration von 4 µg/ml zugegeben. An Tag 4 wird das Medium der HT1080-Zellen mit frischem DMEM ersetzt, dass 10 % fötales Kalbserum und 100 µg/ml Hygromycin enthält. Die Selektion wird von Tag 5 bis 20 fortgesetzt, bis hygromycinresistente Kolonien bewertet werden können und alle negativen Kontrollen (z. B. scheininfizierte MdH-Zellen) tot sind.

BEISPIEL 8

UNTERSUCHUNG AUF ENKAPSIDIERUNG EINER WOBBLE-RNA-SEQUENZ

[0131] Dieses Beispiel beschreibt eine empfindliche Untersuchung zum Nachweis von Enkapsidierung von RNA von Konstrukten, die eine wobble- oder normale gag-Sequenz enthalten. Kurz gesagt wird ein DNA-Fragment von einer "wobble"-gag/pol-Expressionskassette (Beispiel 3), die den CMV-Promotor und gag-Sequenz bis zur XhoI-Stelle (MoMLV Position 1561) enthält, in ein SV40 neo-3'-LTR-DNA-Fragment von N2 (Armentann et al., siehe oben) oder KT-3 (siehe WO 91/02805 oder WO 92/05266) ligiert. Dieses Konstrukt ist graphisch in **Fig. 19A** dargestellt, und es wird nicht erwartet, dass es in Verpackungszelllinien wie DA oder HX (siehe WO 92/05266) enkapsidiert wird, da ihm eine 5'-LTR und Primerbindungsstelle fehlt.

[0132] Ein zweites Konstrukt wird ebenso hergestellt, ähnlich zu dem ersten, außer dass die wobble-Sequenz durch eine normale gag-Sequenz ersetzt wird. Ähnlich zu dem ersten Konstrukt wird nicht erwartet, dass die von dieser DNA transkribierte RNA enkapsidiert wird. Dieses Konstrukt ist graphisch in **Fig. 19B** dargestellt.

[0133] Die obigen Konstrukte werden getrennt in eine Verpackungszelllinie transfiziert. Die Kultur wird dann auf die Fähigkeit untersucht, transformierbare G418 resistene Retrovektoren zu erzeugen. Keines der Konstrukte führt zu einem transformierbaren Vektor.

[0134] Die obigen Konstrukte enthaltende Zellkulturen werden dann mit dem Retrovektor LHL transduziert (siehe Beispiel 7). Die Zellkulturen werden nun nach Selektion Retroviren erzeugen, die den Zielzellen eine Hygromycinresistenz vermitteln. Weiterhin, sofern eine Koenkapsidierung durch Interaktion zwischen LHL-RNA und den Transkripten der obigen Konstrukte ermöglicht wird, kann eine statistisch signifikante RT-vermittelte Rekombination auftreten, die zur Übertragung von G418-Resistenz an die Zielzellen führt.

[0135] Aus dem vorangehenden versteht es sich, dass, obwohl spezifische Ausführungsformen der Erfindung hier zum Zweck der Veranschaulichung beschrieben wurden, für den Fachmann in dem Gebiet zahlreiche Abwandlungen offensichtlich sein werden, ohne vom Umfang der Erfindung abzuweichen. Daher ist die Erfindung außer durch die beigefügten Ansprüche nicht beschränkt.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATION:

(i) ANMELDER: Respess, James

(ii) TITEL DER ERFINDUNG: Überkreuzungsfreie retrovirale Vektoren

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 26

(iv) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) EMPFÄNGER: Seed & Berry
(B) STRASSE: 6300 Columbia Center: 701 Fifth Avenue
(C) STADT: Seattle
(D) BUNDESSTAAT: Washington
(E) LAND: USA
(F) POSTLEITZAHL: 98104

(v) COMPUTERLESBARE FORM:

(A) MEDIENTYP: Diskette
(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0. Version #1.25

(vi) DERZEITIGE ANMELDUNGSDATEN:

(A) ANMELDENUMMER:
(B) ANMELDETAG:
(C) KLASSIFIZIERUNG:

(viii) VERTRETER:

(A) NAME: McMasters, David D.
(B) REGISTRIERUNGSNUMMER: 33.963
(C) AKTENZEICHEN: 930049.424C1

(ix) TELEKOMMUNIKATIONSINFORMATIONEN:

(A) TELEFON: (206)622-4900
(B) TELEFAX: (206)682-6031

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:1:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 8332 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:1:

GCGCCAGTCC TCCGATTGAC TGAGTCGCCC GGGTACCCGT GTATCCAATA AACCCTCTTG 60

CAGTTGCATC CGACTTGTGG TCTCGCTGTT CCTTGGGAGG GTCTCCTCTG AGTGATTGAC 120

TACCCGTCAG CGGGGGTCTT TCATTTGGGG GCTCGTCCGG GATCGGGAGA CCCCTGCCCA 180

GGGACCACCG ACCCACCACC GGGAGGTAAG CTGGCCAGCA ACTTATCTGT GTCTGTCCGA 240

TTGTCTAGTG TCTATGACTG ATTTTATGCG CCTGCGTCGG TACTAGTTAG CTAACTAGCT 300

CTGTATCTGG CGGACCCGTG GTGGAACTGA CGAGTTCGGA ACACCCGGCC GCAACCCTGG 360

GAGACGTCCC AGGGACTTCG GGGGCCGTTT TTGTGGCCCG ACCTGAGTCC AAAAATCCCG 420

ATCGTTTTGG ACTCTTTGGT GCACCCCCCT TAGAGGAGGG ATATGTGGTT CTGGTAGGAG 480

ACGAGAACCT AAAACAGTTC CCGCCTCCGT CTGAATTTTT GCTTTCGGTT TGGGACCGAA 540

GCCGCGCCGC GCGTCTTGTC TGCTGCAGCA TCGTTCTGTG TTGTCTCTGT CTGACTGTGT 600

TTCTGTATTT GTCTGAGAAT ATGGGCCAGA CTGTTACCAC TCCCTTAAGT TTGACCTTAG 660

GTCACTGGAA AGATGTCGAG CGGATCGCTC ACAACCAGTC GGTAGATGTC AAGAAGAGAC 720

GTTGGGTTAC CTTCTGCTCT GCAGAATGGC CAACCTTTAA CGTCGGATGG CCGCGAGACG 780

GCACCTTTAA CCGAGACCTC ATCACCCAGG TTAAGATCAA GGTCTTTTCA CCTGGCCCGC 840

ATGGACACCC AGACCAGGTC CCCTACATCG TGACCTGGGA AGCCTTGGCT TTTGACCCCC 900

CTCCCTGGGT CAAGCCCTTT GTACACCCTA AGCCTCCGCC TCCTCTTCCT CCATCCGCCC 960

CGTCTCTCCC CCTTGAACCT CCTCGTTCGA CCCCGCCTCG ATCCTCCCTT TATCCAGCCC 1020

TCACTCCTTC TCTAGGCGCC AAACCTAAAC CTCAAGTTCT TTCTGACAGT GGGGGGCCGC 1080

TCATCGACCT ACTTACAGAA GACCCCCCGC CTTATAGGGA CCCAAGACCA CCCCCTTCCG 1140

ACAGGGACGG AAATGGTGGA GAAGCGACCC CTGCGGGAGA GGCACCGGAC CCCTCCCCAA 1200

TGGCATCTCG CCTACGTGGG AGACGGGAGC CCCCTGTGGC CGACTCCACT ACCTCGCAGG 1260

CATTCCCCCT CCGCGCAGGA GGAAACGGAC AGCTTCAATA CTGGCCGTTC TCCTCTTCTG 1320

ACCTTTACAA CTGGAAAAAT AATAACCCTT CTTTTTCTGA AGATCCAGGT AAACTGACAG 1380

CTCTGATCGA GTCTGTTCTC ATCACCCATC AGCCCACCTG GGACGACTGT CAGCAGCTGT 1440

TGGGGACTCT GCTGACCGGA GAAGAAAAAC AACGGGTGCT CTTAGAGGCT AGAAAGGCGG 1500

TGCGGGGCGA TGATGGGCGC CCCACTCAAC TGCCCAATGA AGTCGATGCC GCTTTTCCCC 1560

TCGAGCGCCC AGACTGGGAT TACACCACCC AGGCAGGTAG GAACCACCTA GTCCACTATC 1620

GCCAGTTGCT CCTAGCGGGT CTCCAAAACG CGGGCAGAAG CCCCACCAAT TTGGCCAAGG 1680

TAAAAGGAAT AACACAAGGG CCCAATGAGT CTCCCTCGGC CTTCCTAGAG AGACTTAAGG 1740

AAGCCTATCG CAGGTACACT CCTTATGACC CTGAGGACCC AGGGCAAGAA ACTAATGTGT 1800

CTATGTCTTT CATTTGGCAG TCTGCCCCAG ACATTGGGAG AAAGTTAGAG AGGTTAGAAG 1860

ATTTAAAAAA CAAGACGCTT GGAGATTTGG TTAGAGAGGC AGAAAAGATC TTTAATAAAC 1920

GAGAAACCCC GGAAGAAAGA GAGGAACGTA TCAGGAGAGA AACAGAGGAA AAAGAAGAAC 1980

GCCGTAGGAC AGAGGATGAG CAGAAAGAGA AAGAAAGAGA TCGTAGGAGA CATAGAGAGA 2040

TGAGCAAGCT ATTGGCCACT GTCGTTAGTG GACAGAAACA GGATAGACAG GGAGGAGAAC 2100

GAAGGAGGTC CCAACTCGAT CGCGACCAGT GTGCCTACTG CAAAGAAAAG GGGCACTGGG 2160

CTAAAGATTG TCCCAAGAAA CCACGAGGAC CTCGGGGACC AAGACCCCAG ACCTCCCTCC 2220

TGACCCTAGA TGACTAGGGA GGTCAGGGTC AGGAGCCCCC CCCTGAACCC AGGATAACCC 2280

TCAAAGTCGG GGGGCAACCC GTCACCTTCC TGGTAGATAC TGGGGCCCAA CACTCCGTGC 2340

TGACCCAAAA TCCTGGACCC CTAAGTGATA AGTCTGCCTG GGTCCAAGGG GCTACTGGAG 2400

GAAAGCGGTA TCGCTGGACC ACGGATCGCA AAGTACATCT AGCTACCGGT AAGGTCACCC 2460

ACTCTTTCCT CCATGTACCA GACTGTCCCT ATCCTCTGTT AGGAAGAGAT TTGCTGACTA 2520

AACTAAAAGC CCAAATCCAC TTTGAGGGAT CAGGAGCTCA GGTTATGGGA CCAATGGGGC 2580

AGCCCCTGCA AGTGTTGACC CTAAATATAG AAGATGAGCA TCGGCTACAT GAGACCTCAA 2640

AAGAGCCAGA TGTTTCTCTA GGGTCCACAT GGCTGTCTGA TTTTCCTCAG GCCTGGGCGG 2700

AAACCGGGGG CATGGGACTG GCAGTTCGCC AAGCTCCTCT GATCATACCT CTGAAAGCAA 2760

CCTCTACCCC CGTGTCCATA AAACAATACC CCATGTCACA AGAAGCCAGA CTGGGGATCA 2820

AGCCCCACAT ACAGAGACTG TTGGACCAGG GAATACTGGT ACCCTGCCAG TCCCCCTGGA 2880

ACACGCCCCT GCTACCCGTT AAGAAACCAG GGACTAATGA TTATAGGCCT GTCCAGGATC 2940

TGAGAGAAGT CAACAAGCGG GTGGAAGACA TCCACCCCAC CGTGCCCAAC CCTTACAACC 3000

TCTTGAGCGG GCTCCCACCG TCCCACCAGT GGTACACTGT GCTTGATTTA AAGGATGCCT 3060

TTTTCTGCCT GAGACTCCAC CCCACCAGTC AGCCTCTCTT CGCCTTTGAG TGGAGAGATC 3120

CAGAGATGGG AATCTCAGGA CAATTGACCT GGACCAGACT CCCACAGGGT TTCAAAAACA 3180

GTCCCACCCT GTTTGATGAG GCACTGCACA GAGACCTAGC AGACTTCCGG ATCCAGCACC 3240

CAGACTTGAT CCTGCTACAG TACGTGGATG ACTTACTGCT GGCCGCCACT TCTGAGCTAG 3300

ACTGCCAACA AGGTACTCGG GCCCTGTTAC AAACCCTAGG GAACCTCGGG TATCGGGCCT 3360

CGGCCAAGAA AGCCCAAATT TGCCAGAAAC AGGTCAAGTA TCTGGGGTAT CTTCTAAAAG 3420

AGGGTCAGAG ATGGCTGACT GAGGCCAGAA AAGAGACTGT GATGGGGCAG CCTACTCCGA 3480

AGACCCCTCG ACAACTAAGG GAGTTCCTAG GGACGGCAGG CTTCTGTCGC CTCTGGATCC 3540

CTGGGTTTGC AGAAATGGCA GCCCCCTTGT ACCCTCTCAC CAAAACGGGG ACTCTGTTTA 3600

ATTGGGGCCC AGACCAACAA AAGGCCTATC AAGAAATCAA GCAAGCTCTT CTAACTGCCC 3660

CAGCCCTGGG GTTGCCAGAT TTGACTAAGC CCTTTGAACT CTTTGTCGAC GAGAAGCAGG 3720

GCTACGCCAA AGGTGTCCTA ACGCAAAAAC TGGGACCTTG GCGTCGGCCG GTGGCCTACC 3780

TGTCCAAAAA GCTAGACCCA GTAGCAGCTG GGTGGCCCCC TTGCCTACGG ATGGTAGCAG 3840

CCATTGCCGT ACTGACAAAG GATGCAGGCA AGCTAACCAT GGGACAGCCA CTAGTCATTC 3900

TGGCCCCCCA TGCAGTAGAG GCACTAGTCA AACAACCCCC CGACCGCTGG CTTTCCAACG 3960

CCCGGATGAC TCACTATCAG GCCTTGCTTT TGGACACGGA CCGGGTCCAG TTCGGACCGG 4020

TGGTAGCCCT GAACCCGGCT ACGCTGCTCC CACTGCCTGA GGAAGGGCTG CAACACAACT 4080

GCCTTGATAT CCTGGCCGAA GCCCACGGAA CCCGACCCGA CCTAACGGAC CAGCCGCTCC 4140

CAGACGCCGA CCACACCTGG TACACGGATG GAAGCAGTCT CTTACAAGAG GGACAGCGTA 4200

AGGCGGGAGC TGCGGTGACC ACCGAGACCG AGGTAATCTG GGCTAAAGCC CTGCCAGCCG 4260

GGACATCCGC TCAGCGGGCT GAACTGATAG CACTCACCCA GGCCCTAAAG ATGGCAGAAG 4320

GTAAGAAGCT AAATGTTTAT ACTGATAGCC GTTATGCTTT TGCTACTGCC CATATCCATG 4380

GAGAAATATA CAGAAGGCGT GGGTTGCTCA CATCAGAAGG CAAAGAGATC AAAAATAAAG 4440

ACGAGATCTT GGCCCTACTA AAAGCCCTCT TTCTGCCCAA AAGACTTAGC ATAATCCATT 4500

GTCCAGGACA TCAAAAGGGA CACAGCGCCG AGGCTAGAGG CAACCGGATG GCTGACCAAG 4560

CGGCCCGAAA GGCAGCCATC ACAGAGACTC CAGACACCTC TACCCTCCTC ATAGAAAATT 4620

CATCACCCTA CACCTCAGAA CATTTTCATT ACACAGTGAC TGATATAAAG GACCTAACCA 4680

AGTTGGGGGC CATTTATGAT AAAACAAAGA AGTATTGGGT CTACCAAGGA AAACCTGTGA 4740

TGCCTGACCA GTTTACTTTT GAATTATTAG ACTTTCTTCA TCAGCTGACT CACCTCAGCT 4800

TCTCAAAAAT GAAGGCTCTC CTAGAGAGAA GCCACAGTCC CTACTACATG CTGAACCGGG 4860

ATCGAACACT CAAAAATATC ACTGAGACCT GCAAAGCTTG TGCACAAGTC AACGCCAGCA 4920

AGTCTGCCGT TAAACAGGGA ACTAGGGTCC GCGGGCATCG GCCCGGCACT CATTGGGAGA 4980

TCGATTTCAC CGAGATAAAG CCCGGATTGT ATGGCTATAA ATATCTTCTA GTTTTTATAG 5040

ATACCTTTTC TGGCTGGATA GAAGCCTTCC CAACCAAGAA AGAAACCGCC AAGGTCGTAA 5100

CCAAGAAGCT ACTAGAGGAG ATCTTCCCCA GGTTCGGCAT GCCTCAGGTA TTGGGAACTG 5160

ACAATGGGCC TGCCTTCGTC TCCAAGGTGA GTCAGACAGT GGCCGATCTG TTGGGGATTG 5220

ATTGGAAATT ACATTGTGCA TACAGACCCC AAAGCTCAGG CCAGGTAGAA AGAATGAATA 5280

GAACCATCAA GGAGACTTTA ACTAAATTAA CGCTTGCAAC TGGCTCTAGA GACTGGGTGC 5340

TCCTACTCCC CTTAGCCCTG TACCGAGCCC GCAACACGCC GGGCCCCCAT GGCCTCACCC 5400

CATATGAGAT CTTATATGGG GCACCCCCGC CCCTTGTAAA CTTCCCTGAC CCTGACATGA 5460

CAAGAGTTAC TAACAGCCCC TCTCTCCAAG CTCACTTACA GGCTCTCTAC TTAGTCCAGC 5520

ACGAAGTCTG GAGACCTCTG GCGGCAGCCT ACCAAGAACA ACTGGACCGA CCGGTGGTAC 5580

CTCACCCTTA CCGAGTCGGC GACACAGTGT GGGTCCGCCG ACACCAGACT AAGAACCTAG 5640

AACCTCGCTG GAAAGGACCT TACACAGTCC TGCTGACCAC CCCCACCGCC CTCAAAGTAG 5700

ACGGCATCGC AGCTTGGATA CACGCCGCCC ACGTGAAGGC TGCCGACCCC GGGGGTGGAC 5760

CATCCTCTAG ACTGACATGG CGCGTTCAAC GCTCTCAAAA CCCCTTAAAA ATAAGGTTAA 5820

CCCGCGAGGC CCCCTAATCC CCTTAATTCT TCTGATGCTC AGAGGGGTCA GTACTGCTTC 5880

GCCCGGCTCC AGTCCTCATC AAGTCTATAA TATCACCTGG GAGGTAACCA ATGGAGATCG 5940

GGAGACGGTA TGGGCAACTT CTGGCAACCA CCCTCTGTGG ACCTGGTGGC CTGACCTTAC 6000

CCCAGATTTA TGTATGTTAG CCCACCATGG ACCATCTTAT TGGGGGCTAG AATATCAATC 6060

CCCTTTTTCT TCTCCCCCGG GGCCCCCTTG TTGCTCAGGG GGCAGCAGCC CAGGCTGTTC 6120

CAGAGACTGC GAAGAACCTT TAACCTCCCT CACCCCTCGG TGCAACACTG CCTGGAACAG 6180

ACTCAAGCTA GACCAGACAA CTCATAAATC AAATGAGGGA TTTTATGTTT GCCCCGGGCC 6240

CCACCGCCCC CGAGAATCCA AGTCATGTGG GGGTCCAGAC TCCTTCTACT GTGCCTATTG 6300

GGGCTGTGAG ACAACCGGTA GAGCTTACTG GAAGCCCTCC TCATCATGGG ATTTCATCAC 6360

AGTAAACAAC AATCTCACCT CTGACCAGGC TGTCCAGGTA TGCAAAGATA ATAAGTGGTG 6420

CAACCCCTTA GTTATTCGGT TTACAGACGC CGGGAGACGG GTTACTTCCT GGACCACAGG 6480

ACATTACTGG GGCTTACGTT TGTATGTCTC CGGACAAGAT CCAGGGCTTA CATTTGGGAT 6540

CCGACTCAGA TACCAAAATC TAGGACCCCG CGTCCCAATA GGGCCAAACC CCGTTCTGGC 6600

AGACCAACAG CCACTCTCCA AGCCCAAACC TGTTAAGTCG CCTTCAGTCA CCAAACCACC 6660

CAGTGGGACT CCTCTCTCCC CTACCCAACT TCCACCGGCG GGAACGGAAA ATAGGCTGCT 6720

AAACTTAGTA GACGGAGCCT ACCAAGCCCT CAACCTCACC AGTCCTGACA AAACCCAAGA 6780

GTGCTGGTTG TGTCTAGTAG CGGGACCCCC CTACTACGAA GGGGTTGCCG TCCTGGGTAC 6840

CTACTCCAAC CATACCTCTG CTCCAGCCAA CTGCTCCGTG GCCTCCCAAC ACAAGTTGAC 6900

CCTGTCCGAA GTGACCGGAC AGGGACTCTG CATAGGAGCA GTTCCCAAAA CACATCAGGC 6960

CCTATGTAAT ACCACCCAGA CAAGCAGTCG AGGGTCCTAT TATCTAGTTG CCCCTACAGG 7020

TACCATGTGG GCTTGTAGTA CCGGGCTTAC TCCATGCATC TCCACCACCA TACTGAACCT 7080

TACCACTGAT TATTGTGTTC TTGTCGAACT CTGGCCAAGA GTCACCTATC ATTCCCCCAG 7140

CTATGTTTAC GGCCTGTTTG AGAGATCCAA CCGACACAAA AGAGAACCGG TGTCGTTAAC 7200

CCTGGCCCTA TTATTGGGTG GACTAACCAT GGGGGGAATT GCCGCTGGAA TAGGAACAGG 7260

GACTACTGCT CTAATGGCCA CTCAGCAATT CCAGCAGCTC CAAGCCGCAG TACAGGATGA 7320

TCTCAGGGAG GTTGAAAAAT CAATCTCTAA CCTAGAAAAG TCTCTCACTT CCCTGTCTGA 7380

AGTTGTCCTA CAGAATCGAA GGGGCCTAGA CTTGTTATTT CTAAAAGAAG GAGGGCTGTG 7440

TGCTGCTCTA AAAGAAGAAT GTTGCTTCTA TGCGGACCAC ACAGGACTAG TGAGAGACAG 7500

CATGGCCAAA TTGAGAGAGA GGCTTAATCA GAGACAGAAA CTGTTTGAGT CAACTCAAGG 7560

ATGGTTTGAG GGACTGTTTA ACAGATCCCC TTGGTTTACC ACCTTGATAT CTACCATTAT 7620

GGGACCCCTC ATTGTACTCC TAATGATTTT GCTCTTCGGA CCCTGCATTC TTAATCGATT 7680

AGTCCAATTT GTTAAAGACA GGATATCAGT GGTCCAGGCT CTAGTTTTGA CTCAACAATA 7740

TCACCAGCTG AAGCCTATAG AGTACGAGCC ATAGATAAAA TAAAAGATTT TATTTAGTCT 7800

CCAGAAAAAG GGGGGAATGA AAGACCCCAC CTGTAGGTTT GGCAAGCTAG CTTAAGTAAC 7860

GCCATTTTGC AAGGCATGGA AAAATACATA ACTGAGAATA GAGAAGTTCA GATCAAGGTC 7920

AGGAACAGAT GGAACAGCTG AATATGGGCC AAACAGGATA TCTGTGGTAA GCAGTTCCTG 7980

CCCCGGCTCA GGGCCAAGAA CAGATGGAAC AGCTGAATAT GGGCCAAACA GGATATCTGT 8040

GGTAAGCAGT TCCTGCCCCG GCTCAGGGCC AAGAACAGAT GGTCCCCAGA TGCGGTCCAG 8100

CCCTCAGCAG TTTCTAGAGA ACCATCAGAT GTTTCCAGGG TGCCCCAAGG ACCTGAAATG 8160

ACCCTGTGCC TTATTTGAAC TAACCAATCA GTTCGCTTCT CGCTTCTGTT CGCGCGCTTC 8220

TGCTCCCCGA GCTCAATAAA AGAGCCCACA ACCCCTCACT CGGGGCGCCA GTCCTCCGAT 8280

TGACTGAGTC GCCCGGGTAC CCGTGTATCC AATAAACCCT CTTGCAGTTG CA 8332

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 36 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:2:
GGTAACAGTC TGGCCCGAAT TCTCAGACAA ATACAG 36

2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 38 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:3:
CTGTATTTGT CTGAGAATTA AGGCTAGACT GTTACCAC 38

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 22 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:4:
ATATATATAT ATCGATACCA TG 22

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 16 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:5:
GGCGCCAAAC CTAAAC 16

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:6:

Ser Lys Asn Tyr Pro 5

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:7:
ACCATCCTCT GGACGGACAT G 21

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 21 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:8:
ACCCGGCCGT GGACGGACAT G 21

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 449 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(ix) EIGENSCHAFT:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) ORT: 20..439

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:9:

```
ATATATATAT ATCGATACC ATG GGG CAA ACC GTG ACT ACC CCT CTG TCC CTC        52
                      Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu
                        1               5                  10

ACA CTG GGC CAT TGG AAG GAC GTG GAA AGA ATT GCC CAT AAT CAA AGC        100
Thr Leu Gly His Trp Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser
            15                  20                  25

GTG GAC TGC AAA AAA CGC AGG TGG GTG ACA TTT TGT AGC GCC GAG TGG        148
Val Asp Cys Lys Lys Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp
        30                  35                  40

CCC ACA TTC AAT GTT GGC TGG CCT AGG GAT GGA ACT TTC AAT CGC GAT        196
Pro Thr Phe Asn Val Gly Trp Pro Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp
    45                  50                  55

CTG ATT ACT CAA GTG AAA ATT AAA GTG TTC AGC CCC GGA CCC CAC GGC        244
Leu Ile Thr Gln Val Lys Ile Lys Val Phe Ser Pro Gly Pro His Gly
60                  65                  70                  75

CAT CCC GAT CAA GTT CCT TAT ATT GTC ACA TGG GAG GCT CTC GCT TTC        292
His Pro Asp Gln Val Pro Tyr Ile Val Thr Trp Glu Ala Leu Ala Phe
                80                  85                  90

GAT CCA CCA CCT TGG GTG AAA CCA TTC GTG CAT CCC AAA CCA CCT CCA        340
Asp Pro Pro Pro Trp Val Lys Pro Phe Val His Pro Lys Pro Pro Pro
            95                  100                 105

CCC CTC CCA CCC AGC GCT CCT AGC CTG CCC TTG GAG CCC CCA CGA AGC        388
Pro Leu Pro Pro Ser Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Pro Pro Arg Ser
        110                 115                 120

ACA CCA CCC AGG AGC AGC TTG TAC CCT GCT CTG ACC CCC AGC CTC GGC        436
Thr Pro Pro Arg Ser Ser Leu Tyr Pro Ala Leu Thr Pro Ser Leu Gly
    125                 130                 135

GCC AAACCTAAAC                                                        449
Ala
140
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 10:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 140 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:10:

```
Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Gly His Trp
 1               5                  10                  15

Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser Val Asp Cys Lys Lys
            20                  25                  30

Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro Thr Phe Asn Val
        35                  40                  45

Gly Trp Pro Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp Leu Ile Thr Gln Val
    50                  55                  60

Lys Ile Lys Val Phe Ser Pro Gly Pro His Gly His Pro Asp Gln Val
65                  70                  75                  80

Pro Tyr Ile Val Thr Trp Glu Ala Leu Ala Phe Asp Pro Pro Pro Trp
                85                  90                  95

Val Lys Pro Phe Val His Pro Lys Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ser
            100                 105                 110

Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Pro Pro Arg Ser Thr Pro Pro Arg Ser
        115                 120                 125

Ser Leu Tyr Pro Ala Leu Thr Pro Ser Leu Gly Ala
    130                 135                 140
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 11:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 420 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(ix) EIGENSCHAFT:

(A) NAME/SCHLÜSSEL: CDS
(B) ORT: 1..420

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:11:

```
ATG GGC CAG ACT GTT ACC ACT CCC TTA AGT TTG ACC TTA GGT CAC TGG        48
Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Gly His Trp
 1               5                  10                  15

AAA GAT GTC GAG CGG ATC GCT CAC AAC CAG TCG GTA GAT GTC AAG AAG        96
Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser Val Asp Val Lys Lys
            20                  25                  30

AGA CGT TGG GTT ACC TTC TGC TCT GCA GAA TGG CCA ACC TTT AAC GTC       144
Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro Thr Phe Asn Val
        35                  40                  45

GGA TGG CCG CGA GAC GGC ACC TTT AAC CGA GAC CTC ATC ACC CAG GTT       192
Gly Trp Pro Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp Leu Ile Thr Gln Val
    50                  55                  60

AAG ATC AAG GTC TTT TCA CCT GGC CCG CAT GGA CAC CCA GAC CAG GTC       240
Lys Ile Lys Val Phe Ser Pro Gly Pro His Gly His Pro Asp Gln Val
65                  70                  75                  80

CCC TAC ATC GTG ACC TGG GAA GCC TTG GCT TTT GAC CCC CCT CCC TGG       288
Pro Tyr Ile Val Thr Trp Glu Ala Leu Ala Phe Asp Pro Pro Pro Trp
                85                  90                  95

GTC AAG CCC TTT GTA CAC CCT AAG CCT CCG CCT CCT CTT CCT CCA TCC       336
Val Lys Pro Phe Val His Pro Lys Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ser
            100                 105                 110

GCC CCG TCT CTC CCC CTT GAA CCT CCT CGT TCG ACC CCG CCT CGA TCC       384
Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Pro Pro Arg Ser Thr Pro Pro Arg Ser
        115                 120                 125

TCC CTT TAT CCA GCC CTC ACT CCT TCT CTA GGC GCC                       420
Ser Leu Tyr Pro Ala Leu Thr Pro Ser Leu Gly Ala
    130                 135                 140
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:12:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 140 Aminosäuren
(B) TYP: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:12:

```
Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Gly His Trp
 1               5                  10                  15

Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser Val Asp Val Lys Lys
            20                  25                  30

Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro Thr Phe Asn Val
```

```
          35                  40                  45

Gly Trp Pro Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp Leu Ile Thr Gln Val
     50                  55                  60

Lys Ile Lys Val Phe Ser Pro Gly Pro His Gly His Pro Asp Gln Val
 65                  70                  75                  80

Pro Tyr Ile Val Thr Trp Glu Ala Leu Ala Phe Asp Pro Pro Pro Trp
                85                  90                  95

Val Lys Pro Phe Val His Pro Lys Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ser
            100                 105                 110

Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Pro Pro Arg Ser Thr Pro Pro Arg Ser
        115                 120                 125

Ser Leu Tyr Pro Ala Leu Thr Pro Ser Leu Gly Ala
    130                 135                 140
```

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:13:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 2001 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

```
GGCCGACACC CAGAGTGGAC CATCCTCTGG ACGGACATGG CGCGTTCAAC GCTCTCAAAA      60
CCCCCTCAAG ATAAGATTAA CCCGTGGAAG CCCTTAATAG TCATGGGAGT CCTGTTAGGA     120
GTAGGGATGG CAGAGAGCCC CCATCAGGTC TTTAATGTAA CCTGGAGAGT CACCAACCTG     180
ATGACTGGGC GTACCGCCAA TGCCACCTCC CTCCTGGGAA CTGTACAAGA TGCCTTCCCA     240
AAATTATATT TTGATCTATG TGATCTGGTC GGAGAGGAGT GGGACCCTTC AGACCAGGAA     300
CCGTATGTCG GGTATGGCTG CAAGTACCCC GCAGGGAGAC AGCGGACCCG GACTTTTGAC     360
TTTTACGTGT GCCCTGGGCA TACCGTAAAG TCGGGGTGTG GGGGACCAGG AGAGGGCTAC     420
TGTGGTAAAT GGGGGTGTGA AACCACCGGA CAGGCTTACT GGAAGCCCAC ATCATCGTGG     480
GACCTAATCT CCCTTAAGCG CGGTAACACC CCCTGGGACA CGGGATGCTC TAAAGTTGCC     540
TGTGGCCCCT GCTACGACCT CTCCAAAGTA TCCAATTCCT TCCAAGGGGC TACTCGAGGG     600
GGCAGATGCA ACCCTCTAGT CCTAGAATTC ACTGATGCAG GAAAAAAGGC TAACTGGGAC     660
```

GGGCCCAAAT CGTGGGGACT GAGACTGTAC CGGACAGGAA CAGATCCTAT TACCATGTTC 720

TCCCTGACCC GGCAGGTCCT TAATGTGGGA CCCCGAGTCC CCATAGGGCC CAACCCAGTA 780

TTACCCGACC AAAGACTCCC TTCCTCACCA ATAGAGATTG TACCGGCTCC ACAGCCACCT 840

AGCCCCCTCA ATACCAGTTA CCCCCCTTCC ACTACCAGTA CACCCTCAAC CTCCCCTACA 900

AGTCCAAGTG TCCCACAGCC ACCCCCAGGA ACTGGAGATA GACTACTAGC TCTAGTCAAA 960

GGAGCCTATC AGGCGCTTAA CCTCACCAAT CCCGACAAGA CCCAAGAATG TTGGCTGTGC 1020

TTAGTGTCGG GACCTCCTTA TTACGAAGGA GTAGCGGTCG TGGGCACTTA TACCAATCAT 1080

TCCACCGCTC CGGCCAACTG TACGGCCACT TCCCAACATA AGCTTACCCT ATCTGAAGTG 1140

ACAGGACAGG GCCTATGCAT GGGGGCAGTA CCTAAAACTC ACCAGGCCTT ATGTAACACC 1200

ACCCAAAGCG CCGGCTCAGG ATCCTACTAC CTTGCAGCAC CCGCCGGAAC AATGTGGGCT 1260

TGCAGCACTG GATTGACTCC CTGCTTGTCC ACCACGGTGC TCAATCTAAC CACAGATTAT 1320

TGTGTATTAG TTGAACTCTG GCCCAGAGTA ATTTACCACT CCCCCGATTA TATGTATGGT 1380

CAGCTTGAAC AGCGTACCAA ATATAAAAGA GAGCCAGTAT CATTGACCCT GGCCCTTCTA 1440

CTAGGAGGAT TAACCATGGG AGGGATTGCA GCTGGAATAG GGACGGGGAC CACTGCCTTA 1500

ATTAAAACCC AGCAGTTTGA GCAGCTTCAT GCCGCTATCC AGACAGACCT CAACGAAGTC 1560

GAAAAGTCAA TTACCAACCT AGAAAAGTCA CTGACCTCGT TGTCTGAAGT AGTCCTACAG 1620

AACCGCAGAG GCCTAGATTT GCTATTCCTA AAGGAGGGAG GTCTCTGCGC AGCCCTAAAA 1680

GAAGAATGTT GTTTTTATGC AGACCACACG GGGCTAGTGA GAGACAGCAT GGCCAAATTA 1740

AGAGAAAGGC TTAATCAGAG ACAAAAACTA TTTGAGACAG GCCAAGGATG GTTCGAAGGG 1800

CTGTTTAATA GATCCCCCTG GTTTACCACC TTAATCTCCA CCATCATGGG ACCTCTAATA 1860

GTACTCTTAC TGATCTTACT CTTTGGACCT TGCATTCTCA ATCGATTGGT CCAATTTGTT 1920

AAAGACAGGA TCTCAGTGGT CCAGGCTCTG GTTTTGACTC AGCAATATCA CCAGCTAAAA 1980

CCCATAGAGT ACGAGCCATG A 2001

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 12 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:
CTAGCTAGCT AG 12

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:15:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 64 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:15:

ATATATATAT ATCGATACCA TGGGGCAAAC CGTGACTACC CCTCTGTCCC TCACACTGGC 60
CCAA 64

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:16:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 51 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:16:
TTGATTATGG GCATTTCTTT CCACGTCCTT CCAATGGCCC AGTGTGAGGG A 51

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:17:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 72 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:17:

AGAATTGCCC ATAATCAAAG CGTGGACGTC AAAAAACGCA GGTGGGTGAC ATTTTGTAGC 60
GCCGAGTGGC CC 72

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:18:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 52 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:18:
AAGTTCCATC CCTAGGCCAG CCAACATTGA ATGTGGGCCA CTCGGCGCTA CA 52

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:19:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 71 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:19:

GGCCTAGGGA GGAACTTTCA ATCGCGATCT GATTACTCAA GTGAAAATTA AAGTGTTCAG 60
CCCCGGACCC C 71

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:20:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 52 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:20:
GTGACAATAT AAGGAACTTG ATCGGGATGG CCGTGGGGTC CGGGGCTGAA CA 52

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:21:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 72 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:21:

AGTTCCTTAT ATTGTCACAT CGGAGGCTCT CGCTTTCGAT CCACCACCTT GGGTGAAACC 60
ATTCGTGCAT CC 72

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:22:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 52 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG SEQ ID NO:22:
AGGAGCGCTG GGTGGGAGGG GTGGAGGTGG TTTGGGATGC ACGAATGGTT TC 52

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:23:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 72 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:23:

CTCCCACCCA GCGCTCCTAG CCTGCCCTTG GAGCCCCCAC GAAGCACACC ACCCAGGAGC 60

AGCTTGTACC CT 72

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:24:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 52 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:24:
GTTTAGGTTT GGCGCCGAGG CTGGGGGTCA GAGCAGGGTA CAAGCTGCTC CT 52

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:25:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 19 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:25:
ATATATATAT ATCGATACC 19

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO:26:

(i) SEQUENZCHARAKTERISTIKEN:

(A) LÄNGE: 20 Basenpaare
(B) TYP: Nukleinsäure
(C) STRANGFORM: Einzelstrang
(D) TOPOLOGIE: Linear

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:26:
GTTTAGGTTT GGCGCCGAGG 20

Patentansprüche

1. Retrovirales Vektorkonstrukt, welches eine 5'-LTR, eine tRNA-Bindungsstelle, ein Verpackungssignal, eine oder mehrere heterologe Sequenzen, einen Ursprung für die Zweitstrang-DNA-Synthese und eine 3'-LTR umfaßt, wobei das Vektorkonstrukt weniger als 20 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, die in den Genen gag/pol und env zu finden sind, wobei dem Vektor ein verlängertes Verpackungssignal fehlt und wobei die he-

terologen Sequenzen aus der Gruppe ausgewählt sind, bestehend aus einem Gen, welches ein cytotoxisches Protein codiert, einer Antisense-Sequenz, einer Sequenz, welche ein akzessorisches Immunmolekül codiert, einer Sequenz, welche ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus HSVTK und VZVTK, einer Sequenz, welche ein therapeutisches Protein codiert, das eine ererbte oder nicht-ererbte genetische Wirkung verhindern, hemmen, stabilisieren oder umkehren kann, und einer Sequenz, welche einen immunogenen Teil eines Virus, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus HBV, HCV, EBV, FeLV, FIV und HIV, codiert.

2. Retrovirales Vektorkonstrukt nach Anspruch 1, wobei das Konstrukt weniger als 20 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, die in dem env-Gen aufstromig zu der 5'-LTR zu finden sind.

3. Retrovirales Vektorkonstrukt nach Anspruch 1, wobei dem Konstrukt eine retrovirale Verpackungssignalsequenz abstromig zu der 3'-LTR fehlt.

4. Retrovirales Vektorkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Retrovirusvektor aus einem Retrovirus konstruiert ist, ausgewählt aus der Gruppe, bestehend aus amphotropen, ökotropen, xenotropen oder polytropen Viren.

5. Retrovirales Vektorkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Retrovirusvektor aus einem Maus-Leukämievirus konstruiert ist.

6. Retrovirales Vektorkonstrukt nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die heterologe Sequenz wenigstens x kb lang ist, wobei x aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus 2, 3, 4, 5, 6, 7 und 8.

7. Retrovirales Vektorkonstrukt nach Anspruch 1, wobei das cytotoxische Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Ricin, Abrin, Diphtherietoxin, Choleratoxin, Gelonin, antiviralem Protein der Kermesbeere, Tritin, Shigellatoxin und Pseudomonas Exotoxin A.

8. Retrovirales Vektorkonstrukt nach Anspruch 1, wobei das akzessorische Immunmolekül aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus IL-1, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11 und IL-13.

9. Retrovirales Vektorkonstrukt nach Anspruch 1, wobei das akzessorische Immunmolekül aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus IL-2, IL-12, IL-15 und Gamma-Interferon.

10. Retrovirales Vektorkonstrukt nach Anspruch 1, wobei das akzessorische Immunmolekül aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus ICAM-1, ICAM-2, β-Mikroglobin, LFA3, HLA-Klasse I- und HLA-Klasse II-Molekülen.

11. Retrovirales Vektorkonstrukt nach Anspruch 6, wobei die heterologe Sequenz ein Ribozym ist.

12. Retrovirales Vektorkonstrukt nach Anspruch 1, wobei das therapeutische Protein aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus Faktor VIII, ADA, HPRT, CF und dem LDL-Rezeptor.

13. gag/pol-Expressionskassette, welche einen Promotor, der funktionsfähig mit einem gag/pol-Gen verknüpft ist, und eine Polyadenylierungssequenz umfaßt, wobei das 5'-terminale Ende des gag/pol-Gens so modifiziert wurde, dass es wenigstens 25 Codons enthält, die für gag degeneriert sind.

14. gag/pol-Expressionskassette nach Anspruch 13, wobei das 5'-terminale Ende des gag/pol-Gens weniger als 20 aufeinanderfolgende Nukleotide enthält, die zu einer Sequenz, die in einem retroviralen Verpackungssignal zu finden ist, identisch sind.

15. gag/pol-Expressionskassette nach Anspruch 13 oder 14, wobei der Promotor ein heterologer Promotor ist.

16. gag/pol-Expressionskassette nach Anspruch 15, wobei der Promotor aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus CMV IE, dem HSVTK-Promotor, dem RSV-Promotor, dem späteren Adenovirus-Hauptpromotor und dem SV40-Promotor.

17. gag/pol-Expressionskassette nach Anspruch 13 oder 14, wobei die Polyadenylierungssequenz eine heterologe Polyadenylierungssequenz ist.

18. gag/pol-Expressionskassette nach Anspruch 17, wobei die heterologe Polyadenylierungssequenz aus der Gruppe ausgewählt ist, bestehend aus dem späten SV40-Poly-A-Signal und dem frühen SV40-Poly-A-Signal.

Es folgen 19 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

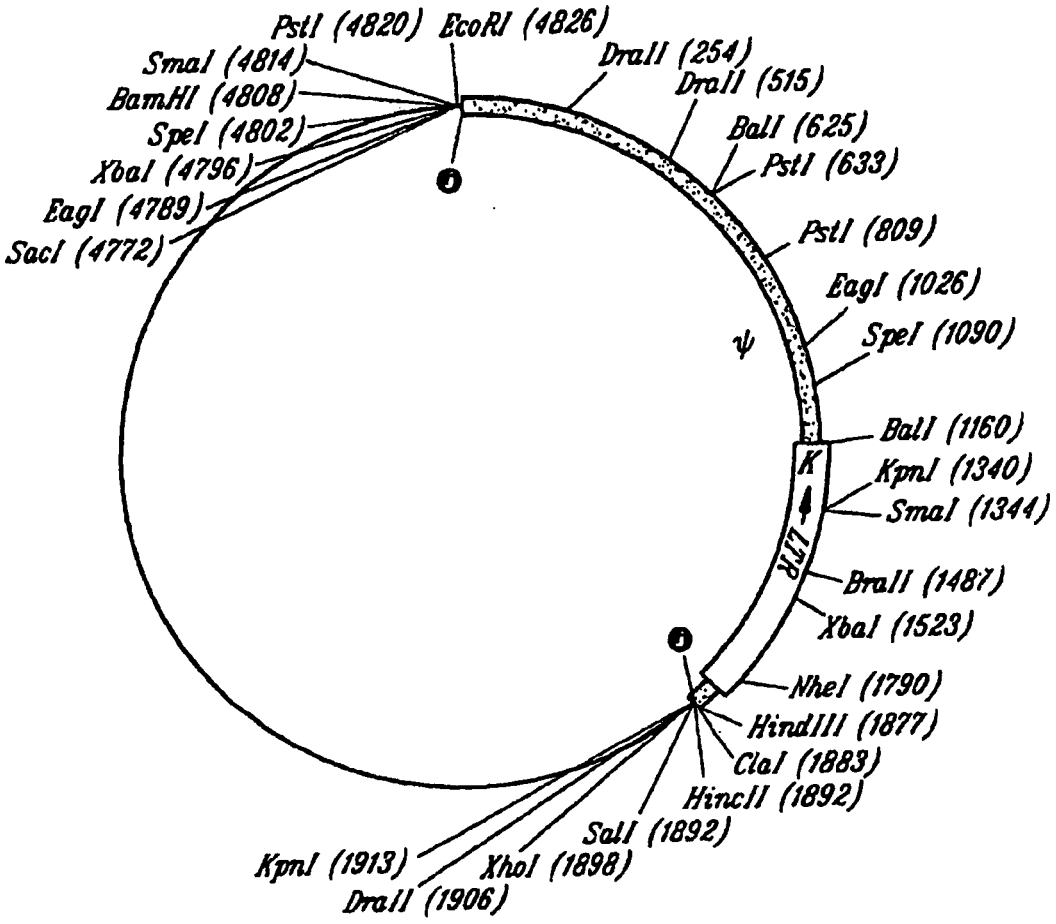


Fig. 1

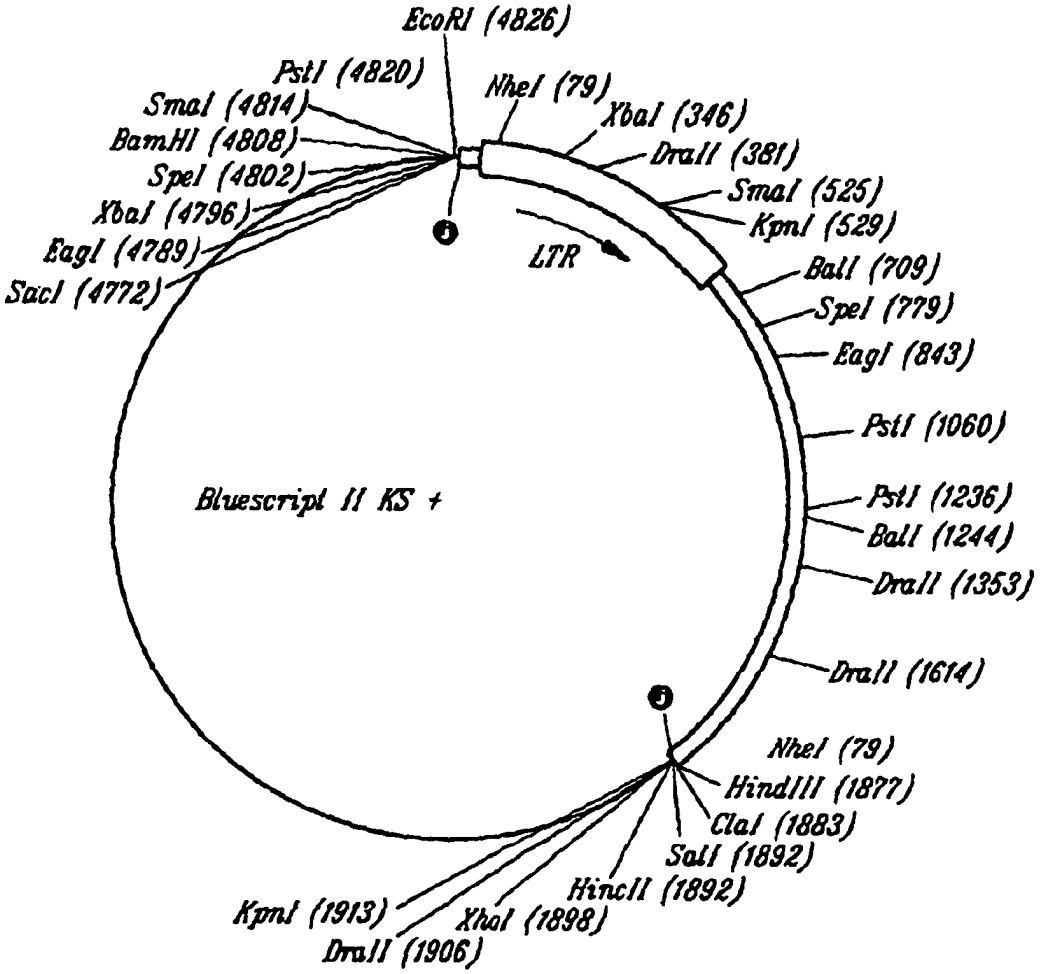

EcoRI (4826)
PstI (4820)
SmaI (4814)
BamHI (4808)
SpeI (4802)
XbaI (4796)
EagI (4789)
SacI (4772)
NheI (79)
XbaI (346)
DraII (381)
SmaI (525)
KpnI (529)
LTR
BalI (709)
SpeI (779)
EagI (843)
PstI (1060)
Bluescript II KS +
PstI (1236)
BalI (1244)
DraII (1353)
DraII (1614)
NheI (79)
HindIII (1877)
ClaI (1883)
SalI (1892)
HincII (1892)
KpnI (1913)
XhoI (1898)
DraII (1906)

Fig. 2

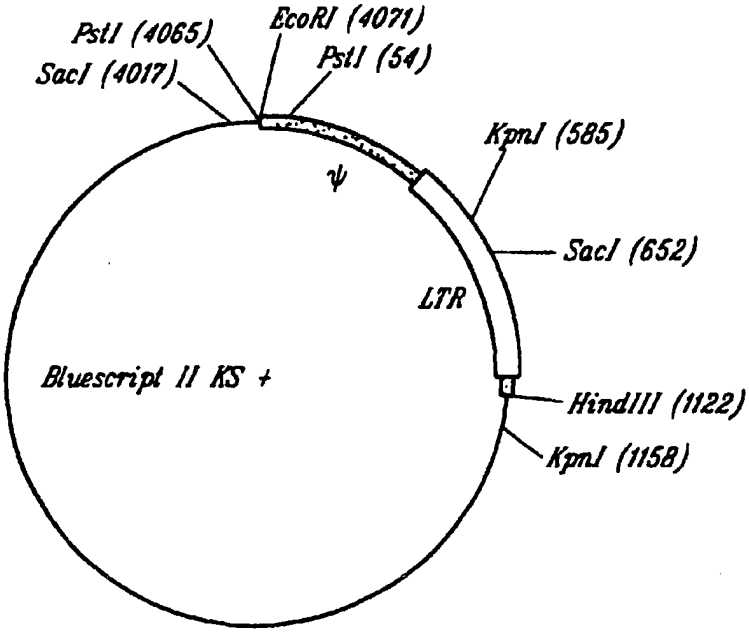

PstI (4065)
EcoRI (4071)
SacI (4017)
PstI (54)
KpnI (585)
ψ
SacI (652)
LTR
Bluescript II KS +
HindIII (1122)
KpnI (1158)

Fig. 3

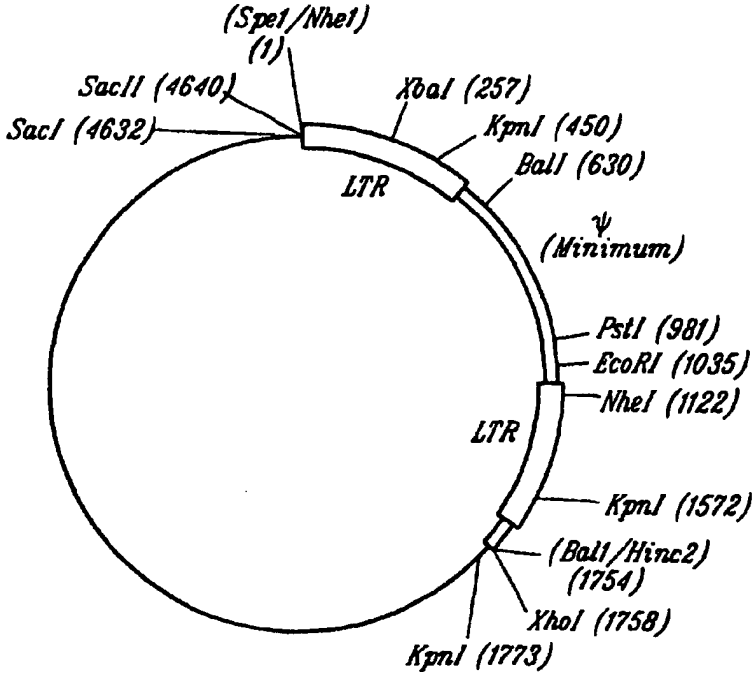

(Spe1/Nhe1)
(1)
SacII (4640)
XbaI (257)
SacI (4632)
KpnI (450)
BalI (630)
LTR
ψ
(Minimum)
PstI (981)
EcoRI (1035)
NheI (1122)
LTR
KpnI (1572)
(BalI/HinC2)
(1754)
XhoI (1758)
KpnI (1773)

Fig. 4

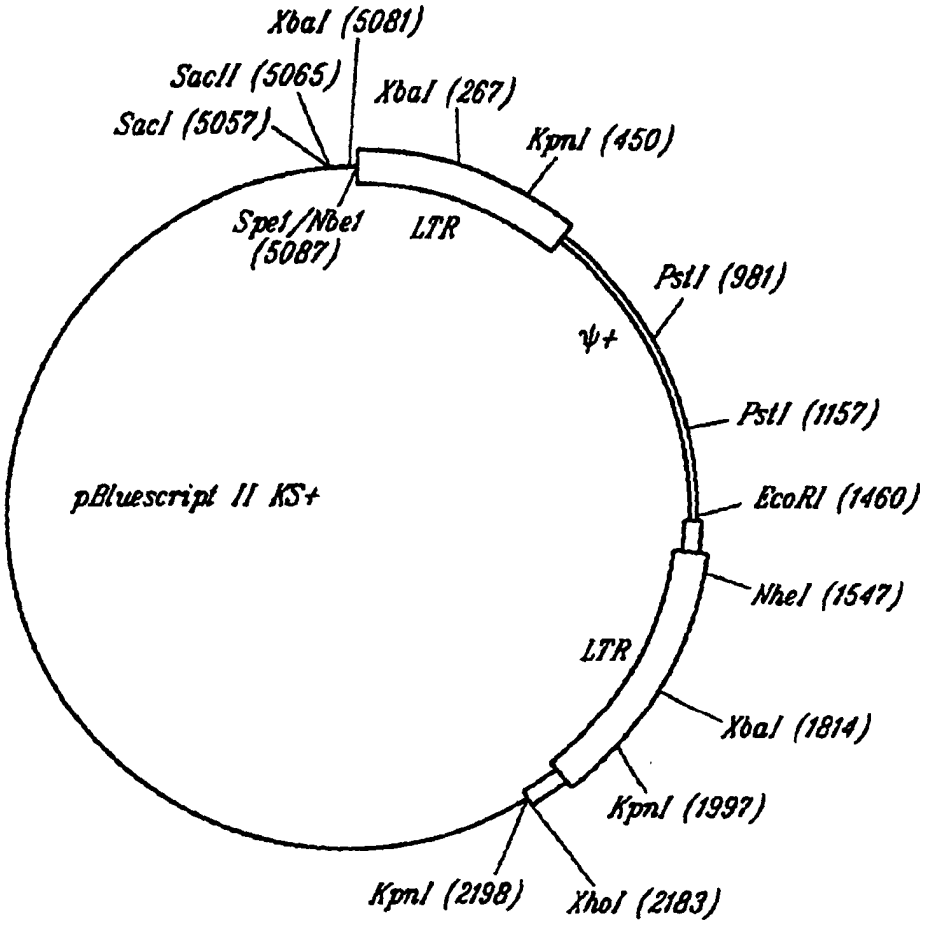

XbaI (5081)
SacII (5065)
XbaI (267)
SacI (5057)
KpnI (450)
SpeI/NheI (5087)
LTR
PstI (981)
ψ+
PstI (1157)
pBluescript II KS+
EcoRI (1460)
NheI (1547)
LTR
XbaI (1814)
KpnI (1997)
KpnI (2198)
XhoI (2183)

Fig. 5

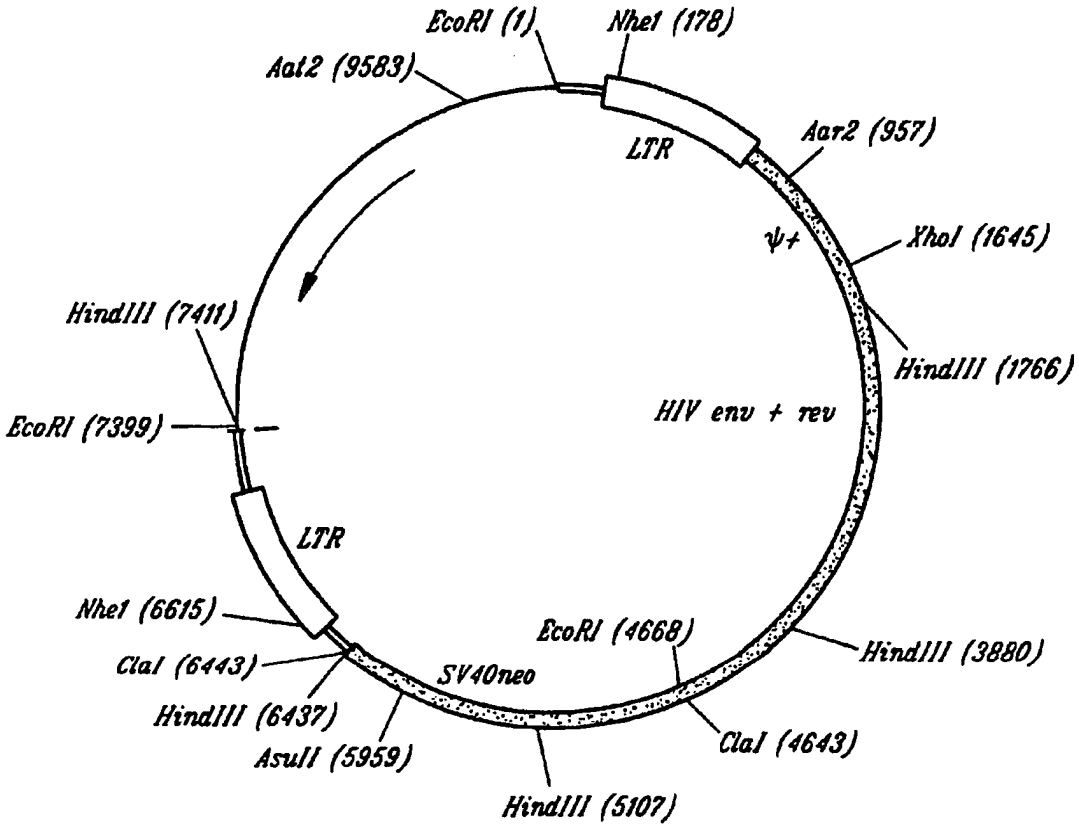

EcoRI (1)
Nhe1 (178)
Aat2 (9583)
LTR
Aar2 (957)
ψ+
Xho1 (1645)
HindIII (7411)
HindIII (1766)
EcoRI (7399)
HIV env + rev
LTR
Nhe1 (6615)
EcoRI (4668)
HindIII (3880)
Cla1 (6443)
SV40neo
HindIII (6437)
Cla1 (4643)
AsuII (5959)
HindIII (5107)

Fig. 6

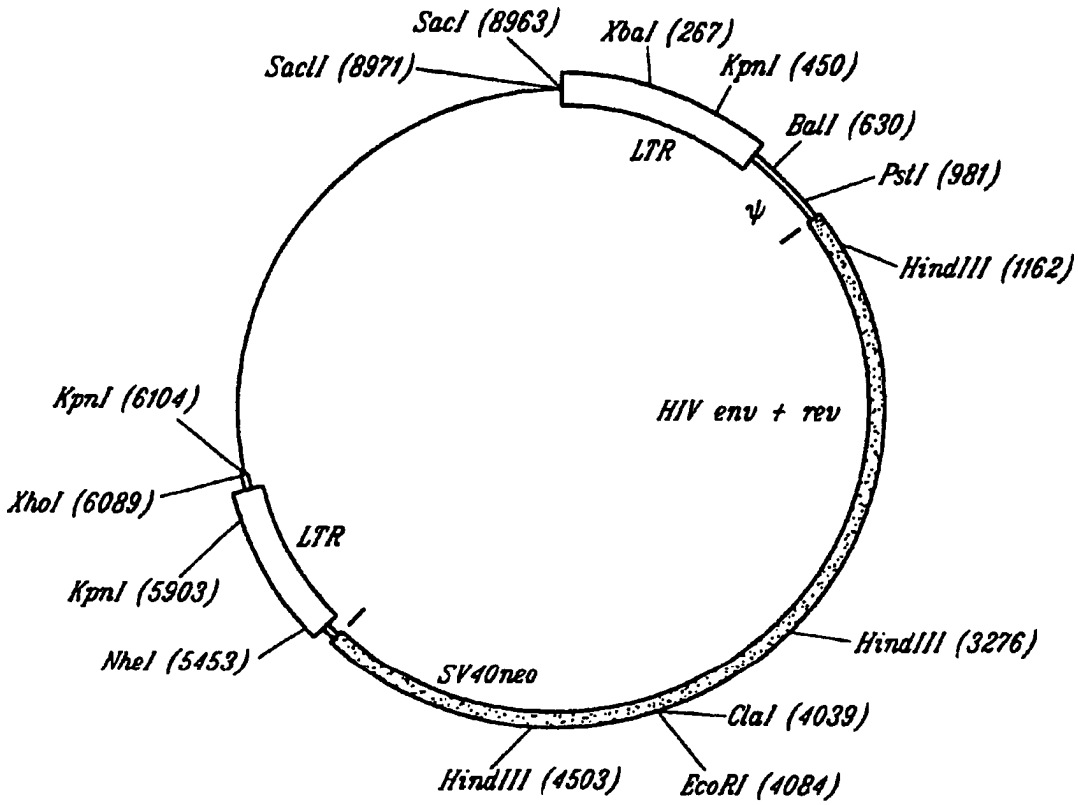

SacI (8963)
XbaI (267)
SacII (8971)
KpnI (450)
BalI (630)
LTR
PstI (981)
ψ
HindIII (1162)
KpnI (6104)
HIV env + rev
XhoI (6089)
LTR
KpnI (5903)
HindIII (3276)
NheI (5453)
SV40neo
ClaI (4039)
HindIII (4503)
EcoRI (4084)

Fig. 7

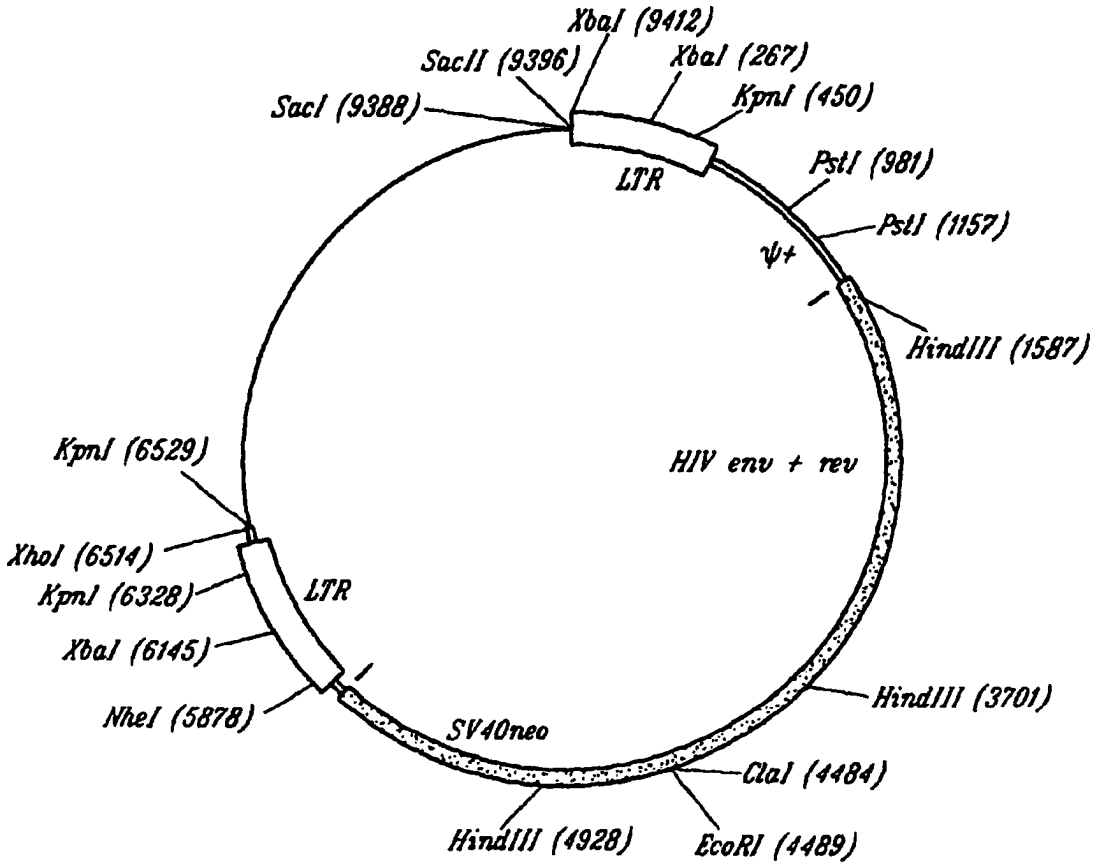

XbaI (9412)
SacII (9396)
XbaI (267)
SacI (9388)
KpnI (450)
LTR
PstI (981)
PstI (1157)
ψ+
HindIII (1587)
KpnI (6529)
HIV env + rev
XhoI (6514)
KpnI (6328)
LTR
XbaI (6145)
NheI (5878)
HindIII (3701)
SV40neo
ClaI (4484)
HindIII (4928)
EcoRI (4489)

Fig. 8

```
   1 ATG GGC CAG ACT GTT ACC ACT CCC TTA AGT TTG ACC TTA GGT CAC TGG AAA
     1►Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser Leu Thr Leu Gly His Trp Lys

  52 GAT GTC GAG CGG ATC GCT CAC AAC CAG TCG GTA GAT GTC AAG AAG AGA CGT
    18►Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser Val Asp Val Lys Lys Arg Arg

 103 TGG GTT ACC TTC TGC TCT GCA GAA TGG CCA ACC TTT AAC GTC GGA TGG CCG
    35►Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro Thr Phe Asn Val Gly Trp Pro

 154 CGA GAC GGC ACC TTT AAC CGA GAC CTC ATC ACC CAG GTT AAG ATC AAG GTC
    52►Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp Leu Ile Thr Gln Val Lys Ile Lys Val

 205 TTT TCA CCT GGC CCG CAT GGA CAC CCA GAC CAG GTC CCC TAC ATC GTG ACC
    69►Phe Ser Pro Gly Pro His Gly His Pro Asp Gln Val Pro Tyr Ile Val Thr

 256 TGG GAA GCC TTG GCT TTT GAC CCC CCT CCC TGG GTC AAG CCC TTT GTA CAC
    86►Trp Glu Ala Leu Ala Phe Asp Pro Pro Pro Trp Val Lys Pro Phe Val His

 307 CCT AAG CCT CCG CCT CCT CTT CCT CCA TCC GCC CCG TCT CTC CCC CTT GAA
   103►Pro Lys Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ser Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu

 358 CCT CCT CGT TCG ACC CCG CCT CGA TCC TCC CTT TAT CCA GCC CTC ACT CCT
   120►Pro Pro Arg Ser Thr Pro Pro Arg Ser Ser Leu Tyr Pro Ala Leu Thr Pro

                  NarI (415)
 409 TCT CTA GGC GCC
   137►Ser Leu Gly Ala
```

Fig. 9

```
A TAT ATA TAT ATC GAT ACC  ATG GGG CAA ACC GTG ACT ACC CCT CTG TCC
                        ▸Met Gly Gln Thr Val Thr Thr Pro Leu Ser

  CTC ACA CTG GGC CAT TGG AAG GAC GTG GAA AGA ATT GCC CAT AAT CAA AGC
▸Leu Thr Leu Gly His Trp Lys Asp Val Glu Arg Ile Ala His Asn Gln Ser

  GTG GAC GTC AAA AAA CGC AGG TGG GTG ACA TTT TGT AGC GCC GAG TGG CCC
▸Val Asp Val Lys Lys Arg Arg Trp Val Thr Phe Cys Ser Ala Glu Trp Pro

  ACA TTC AAT GTT GGC TGG CCT AGG GAT GGA ACT TTC AAT CGC GAT CTG ATT
▸Thr Phe Asn Val Gly Trp Pro Arg Asp Gly Thr Phe Asn Arg Asp Leu Ile

  ACT CAA GTG AAA ATT AAA GTG TTC AGC CCC GGA CCC CAC GGC CAT CCC GAT
▸Thr Gln Val Lys Ile Lys Val Phe Ser Pro Gly Pro His Gly His Pro Asp

  CAA GTT CCT TAT ATT GTC ACA TGG GAG GCT CTC GCT TTC GAT CCA CCA CCT
▸Gln Val Pro Tyr Ile Val Thr Trp Glu Ala Leu Ala Phe Asp Pro Pro Pro

  TGG GTG AAA CCA TTC GTG CAT CCC AAA CCA CCT CCA CCC CTC CCA CCC AGC
▸Trp Val Lys Pro Phe Val His Pro Lys Pro Pro Pro Pro Leu Pro Pro Ser

  GCT CCT AGC CTG CCC TTG GAG CCC CCA CGA AGC ACA CCA CCC AGG AGC AGC
▸Ala Pro Ser Leu Pro Leu Glu Pro Pro Arg Ser Thr Pro Pro Arg Ser Ser

                                        NarI
  TTG TAC CCT GCT CTG ACC CCC AGC CTC GGC GCC AAA    CCT AAA C
▸Leu Tyr Pro Ala Leu Thr Pro Ser Leu Gly Ala Lys ? ????????
```

Fig. 10

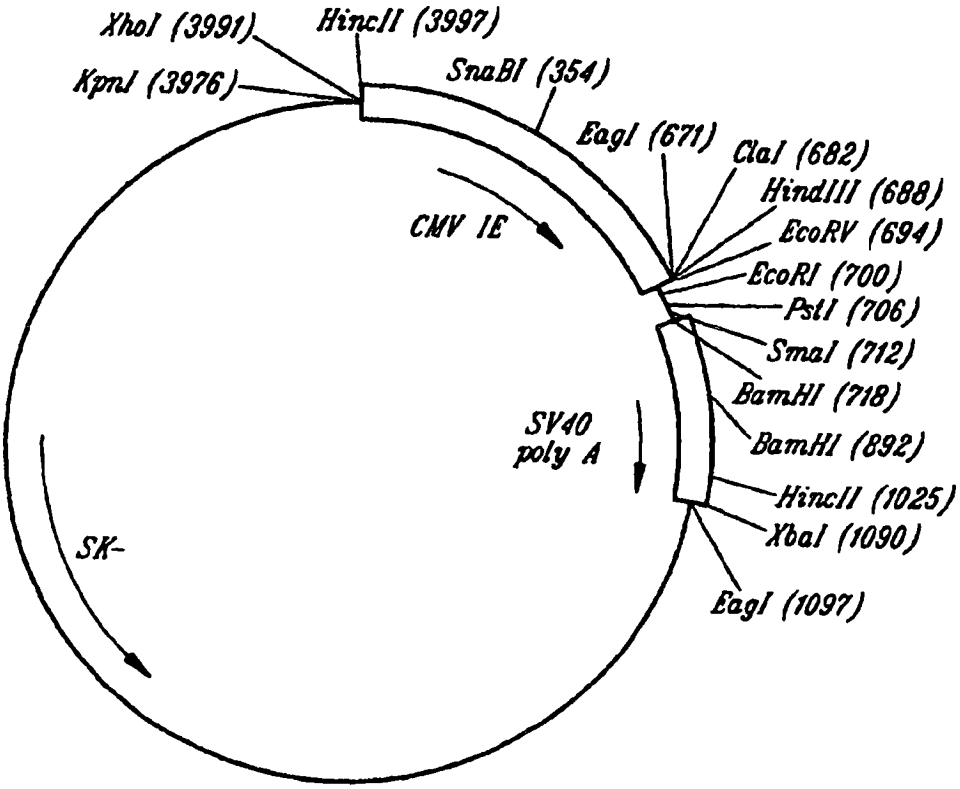

XhoI (3991)
HincII (3997)
KpnI (3976)
SnaBI (354)
EagI (671)
ClaI (682)
HindIII (688)
EcoRV (694)
EcoRI (700)
PstI (706)
SmaI (712)
BamHI (718)
BamHI (892)
HincII (1025)
XbaI (1090)
EagI (1097)
CMV IE
SV40
poly A
SK-

Fig. 11

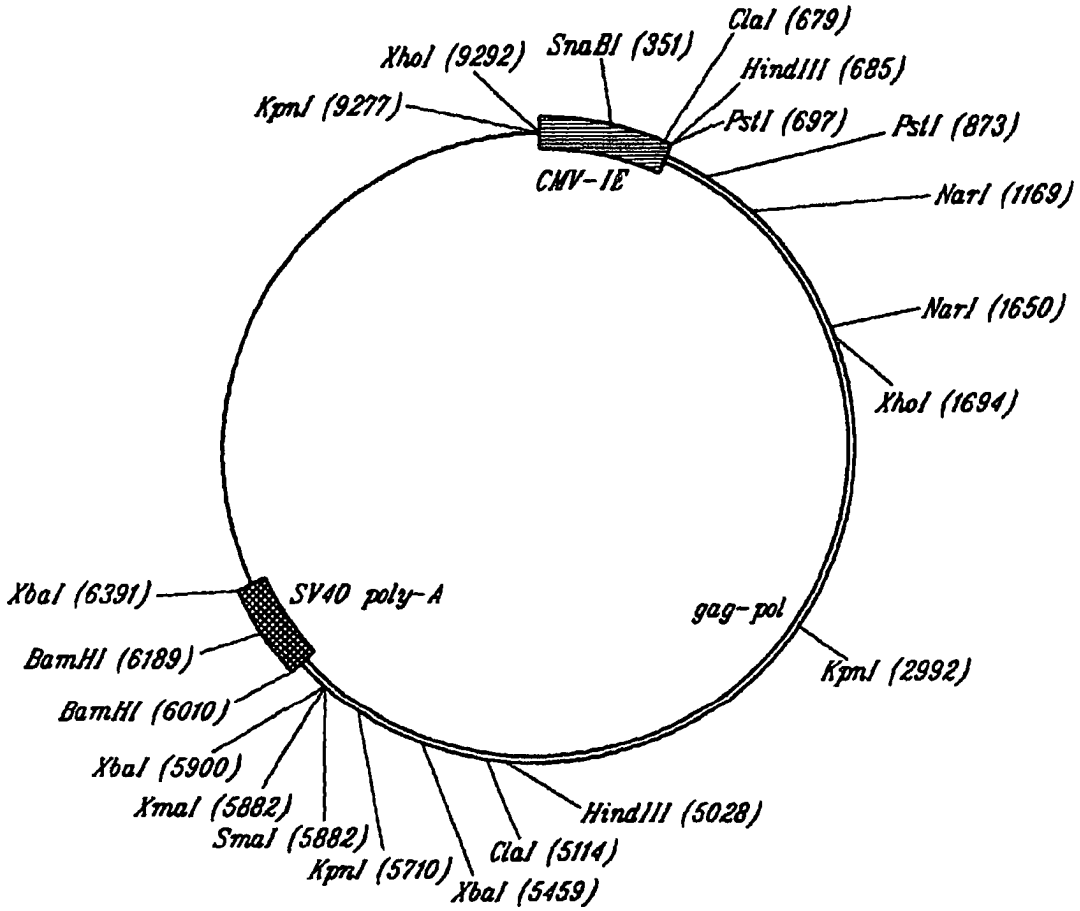

ClaI (679)
SnaBI (351)
XhoI (9292)
HindIII (685)
KpnI (9277)
PstI (697)
PstI (873)
CMV-IE
NarI (1169)
NarI (1650)
XhoI (1694)
XbaI (6391)
SV40 poly-A
gag-pol
BamHI (6189)
KpnI (2992)
BamHI (6010)
XbaI (5900)
XmaI (5882)
HindIII (5028)
SmaI (5882)
ClaI (5114)
KpnI (5710)
XbaI (5459)

Fig. 12

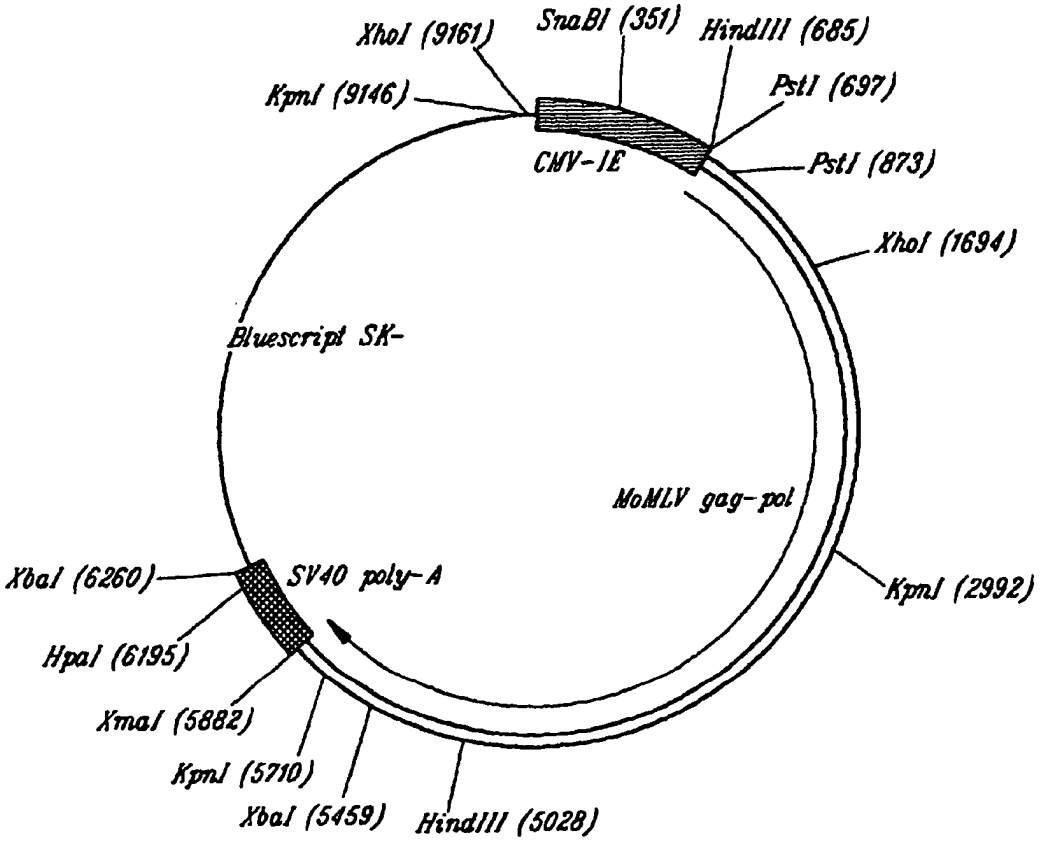

XhoI (9161)
SnaBI (351)
HindIII (685)
KpnI (9146)
PstI (697)
CMV-IE
PstI (873)
XhoI (1694)
Bluescript SK-
MoMLV gag-pol
XbaI (6260)
SV40 poly-A
KpnI (2992)
HpaI (6195)
XmaI (5882)
KpnI (5710)
XbaI (5459)
HindIII (5028)

Fig. 13

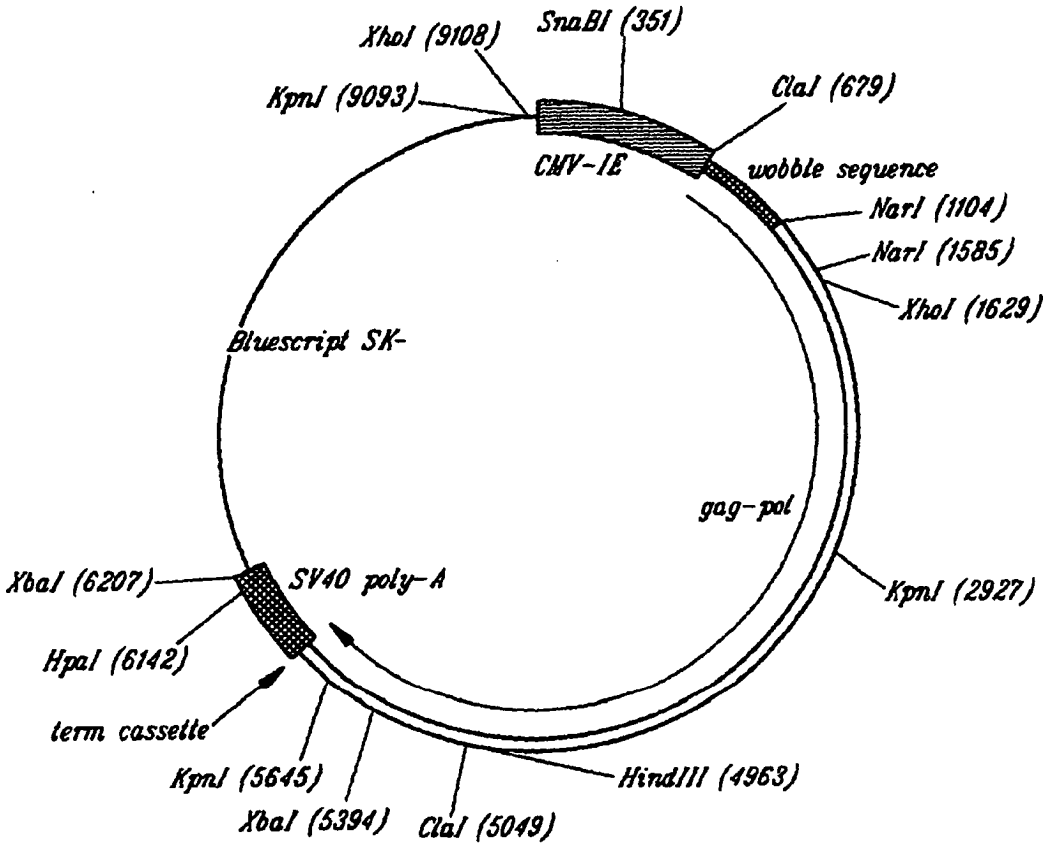

XhoI (9108)
SnaBI (351)
KpnI (9093)
ClaI (679)
CMV-IE
wobble sequence
NarI (1104)
NarI (1585)
XhoI (1629)
Bluescript SK-
gag-pol
XbaI (6207)
SV40 poly-A
KpnI (2927)
HpaI (6142)
term cassette
KpnI (5645)
HindIII (4963)
XbaI (5394)
ClaI (5049)

Fig. 14

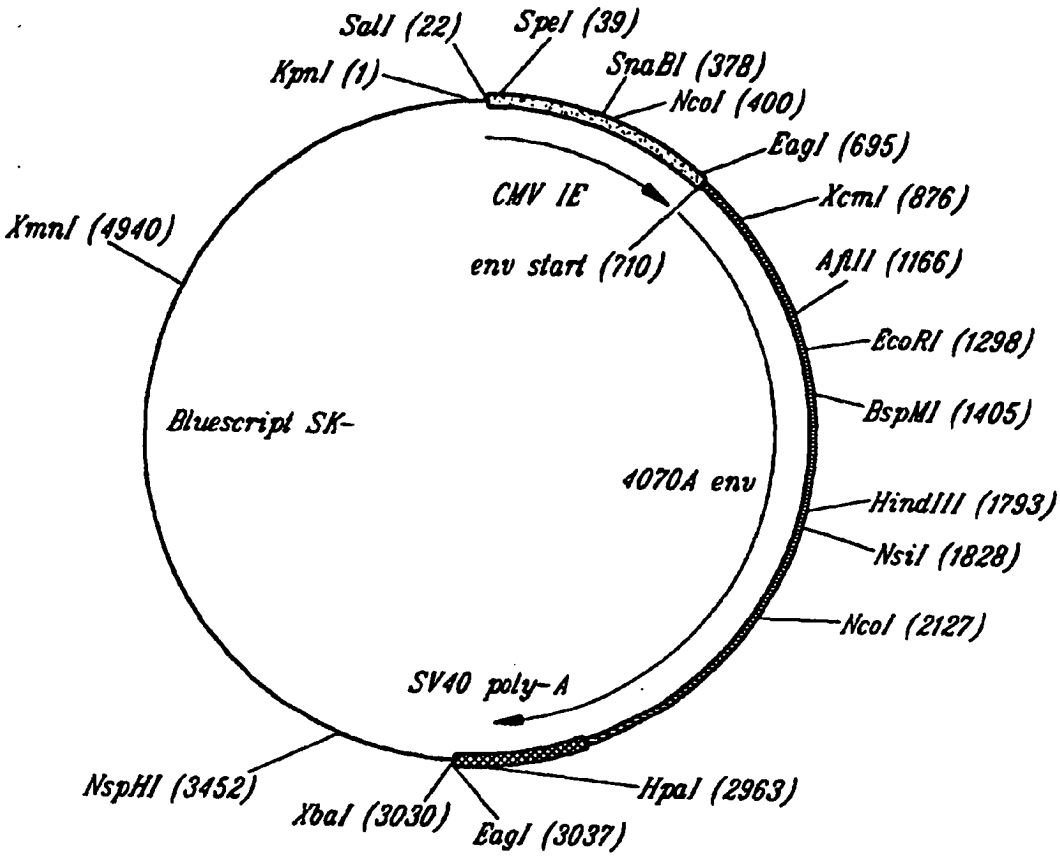

SalI (22)
SpeI (39)
KpnI (1)
SnaBI (378)
NcoI (400)
EagI (695)
CMV IE
XcmI (876)
XmnI (4940)
env start (710)
AflII (1166)
EcoRI (1298)
BspMI (1405)
Bluescript SK-
4070A env
HindIII (1793)
NsiI (1828)
NcoI (2127)
SV40 poly-A
NspHI (3452)
HpaI (2963)
XbaI (3030)
EagI (3037)

Fig. 15

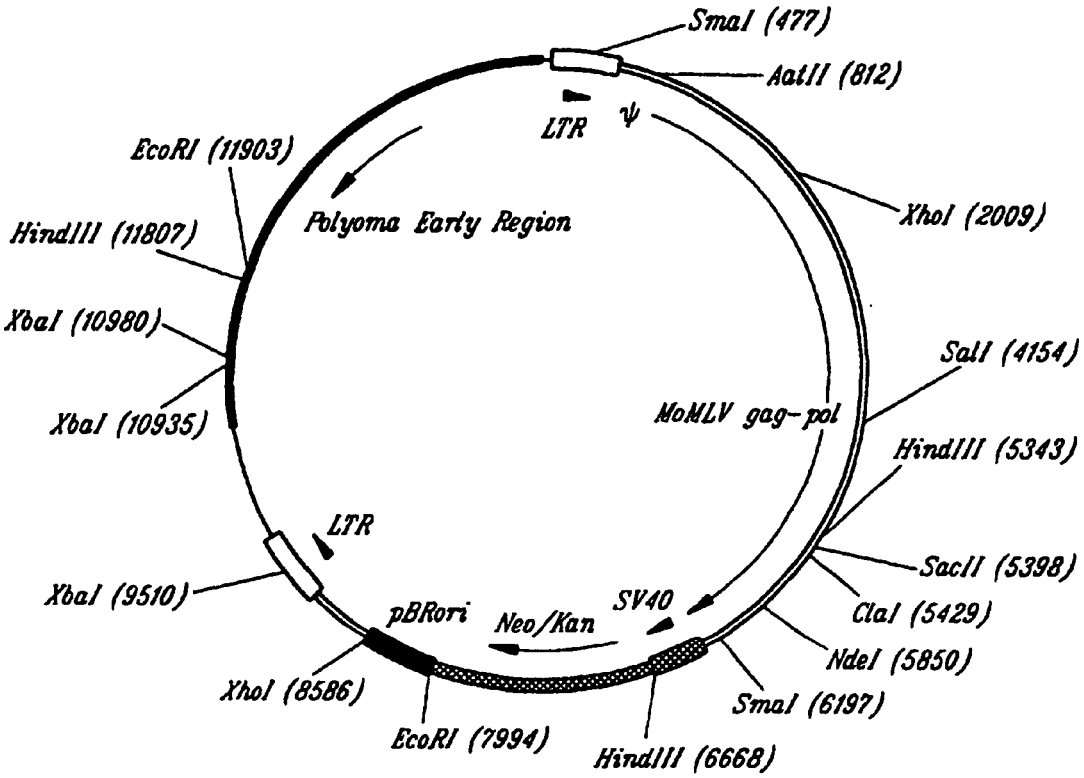

SmaI (477)
AatII (812)
LTR
ψ
XhoI (2009)
SalI (4154)
HindIII (5343)
SacII (5398)
ClaI (5429)
NdeI (5850)
SmaI (6197)
HindIII (6668)
EcoRI (7994)
XhoI (8586)
pBRori
Neo/Kan
SV40
LTR
XbaI (9510)
XbaI (10935)
XbaI (10980)
HindIII (11807)
EcoRI (11903)
Polyoma Early Region
MoMLV gag-pol

Fig. 16

Fig. 17A

VIRUS	SPEZIES ZUR ISOLIERUNG	TYP[1]
AEV (Vogel-Erthroblastosevirus)	Huhn	C, X, T
ALV (Vogel-Leukosevirus)	Huhn	C, N, oder X, N
AMV (Vogel-Myeloblastosevirus)	Huhn	C, X, T
ASV (Vogel-Sarkomvirus)	Huhn	C, N, N
BaEV (Endogener Pavian-Virus)	Pavian *(Papio ssp)*	
B1LN	*P. hamadryas*	
M7	*P. cynocephalus*	
M28	*P. cynocephalus*	
PP-1-Lu	*P. papio*	
TG-1-K	Gelada	
BLV (Rinder-Leukämievirus)	Kuh	C, X, N
BSV (Syncytialer Rindervirus)	Kuh	S, X, N
CAEV (Ziegen-Arthritis-Encephalitis-Virus)	Ziege	L, X, N
CERV-CI, CERV C-II	*Mus cervicolor*	C, N, N
CCC	Katze	C, N, N
CPC-1	Colobus-Affe	C, N, N
CSRV (Kornnatter-Retrovirus)	Kornnatter	C,
CSV (Syncytialer Hühnervirus)	Huhn	C, X, N
DIAV (Infektiöser Enten-Anämievirus)	Ente	C, X, N
DKV (Rentier-Nierenvirus)	Schwarzschwanz-Hirsch	C, N, N
DPC-1	Aguti	C, N, N
EIAV (Infektiöser Pferde-Anämievirus)	Pferd	C, X, N
ESV (Esh-Sarkomvirus)	Huhn	C, X, T
FeLV (Katzen-Leukämievirus)	Katze	C, N oder X, N
FeSV (Katzen-Sarkomvirus)	Katze	C, X, T
GA (Gardner-Arnstein)		
SM (McDonough)		
ST (Snyder-Theilen)		
FS-1	*Felis sylvestris* (Wildkatze)	C, N, N
FSFV (Syncytien bildender Katzenvirus)	Katze	S, X, N
FuSV (Fujinami-Sarkomvirus)	Huhn	C, X, T
GALV (Gibbonaffen-Leukämievirus)	Gibbon	C, X, N
GLV (Ziegen-Leukoencephalitisvirus)	siehe CAEV	
GPV (Goldfasan-Virus)	Goldfasan	C, N, N
HaLV (Hamster-Leukämievirus)	Hamster	C, N, N
IVL (Induzierter Leukämievirus)	Huhn	C, N, N
LLV (Lymphoider Leukosevirus)	siehe ALV	
LPDV (Lymphoproliferative Erkrankung von Truthähnen)	Truthahn	C, X, T
M432	*Mus cervicolor*	B, N, N
M832	*Mus caroli*	B, N, N

[1] Der erste Buchstabe gibt die Klassifikation an: (B) Typ B Onkovirus, (C) Typ C Onkovirus, (D) Typ D Onkovirus, (L) Lentivirus, (S) Spumavirus. Der zweite Buchstabe gibt die Quelle an: (N) endogen, (X) exogen, (R) rekombinant. Der dritte Buchstabe gibt die Fähigkeit an, morphologische Transformation zu verursachen: (T) transformierend (d.h. enthält eine *onc*-Sequenz), (N) nicht-transformierend, (?) unbekannt.

MAC-1	Stummelschwanzaffe	C, N, N
Maedi	Schaf	L, X, N
MAV (Myeloblastose-assoziiertes Virus)	Huhn	C, X, N
MC29 (Myelocytomatose-Virus)	Huhn	C, X, T
MCF (Nerzzellen-Fokus-induzierender Virus)	Maus	C, NR, N
MH2 (Myelocytomatose-Virus)	Huhn	C, X, T
MiLV (Nerz-Leukämievirus)	Nerz	C, N, N
MLV (Maus-Leukämievirus)	Maus	C, X oder N, N
Ab (Abelson)		C, X, T
Fr (Friend)		C, X, N
Graffi		C, X, N
Gross		C, N, N
Ki (Kirsten)		C, X, N
Mo (Moloney)		C, X, N
Ra (Rauscher)		C, X, N
MMC-1	Rhesusaffe	C, N, N
MMTV (Maus-Brusttumorvirus)	Maus	B, X oder N, N
MPMV (Mason-Pfizer-Affenvirus)	Rhesusaffe	D, X, N
MSV (Maus-Sarkomvirus)	Maus	C, X, T
BALB		
FBJ (Finkel-Biskis-Jinkins)		
FBR		
Gz (Gazdar)		
Ha (Harvey)		
Ki (Kirsten)		
Mo (Moloney)		
MPV[1] (Myeloproliferativ)		
OS2 (Osteosarkom)		
MyLV (Myeloidleukämie)	Maus	C, X, N
OK10 (Myelocytomatosevirus)	Huhn	C, X, T
OMC-1	Eulenaffe	C, N, N
PK-15	Schwein	C, N, N
PO-1-Lu	Langur	D, N, N
PPV (Progressiver Pneumonievirus)	Schaf	L, X, N
PRCII, PRCIV (Poultry Research Center)	Huhn	C, X, T
R-35	Ratte	C, X?, T
RaLV (Ratten-Leukämievirus)	Ratte	C, X, N
RaSV (Ratten-Sarkomvirus)	Ratte	C, X, T
RAV-*n* (Rous-assoziiertes Virus)	siehe ALV	
RAV-0 (Rous-assoziiertes Virus 0)	Huhn	C, N, N
RAV-60 (Rous-assoziiertes Virus 60)	Huhn	C, R, N
RAV-61 (Rous-assoziiertes Virus 61)	Fasan mit farbigen Halsstreifen	C, R, N
RD114	Katze	C, N, N
REAV (Reticuloendotheliose-assoziiertes Virus)	Truthahn	C, X, N

Fig. 17B

REV (Reticuloendotheliosevirus)	Vögel	C, X, N
REV-T (transformierender Reticuloendotheliosevirus)	Truthahn	C, X, T
RIF (Rous-Interference Faktor)	siehe ALV	
RPL-*n* (Regional Poultry Laboratory)	siehe ALV	
RPV (Ring-necked Pheasant Virus)	Fasan mit farbigen Halsstreifen	C, R, N
RSV (Rous-Sarkomivirus)	Huhn	C, X, T
B77 (Bratislava)		
BH (Bryan high titer)		
BS (Bryan standard)		
CZ (Carr-Zilber)		
EH (Engelbreth-Holm)		
HA (Harris)		
PR (Prag)		
SR (Schmidt-Ruppin)		
SFV-*n* (Schaumbildender Affenvirus)	Affe	S, X, N
SFFV (Spleen Fokus-bildender Virus)	Maus	C, X oder R, N, oder T
Friend		
MPV		
Rauscher		
SiSV (Affen-Sarkomvirus)	siehe SSV	
SLV (Affen-Lymphomvirus)	siehe GALV	
SMRV (Totenkopfäffchen-Retrovirus)	Squirrel monkey	D, N, N
SMV (Myelogener Affen-Leukämievirus)	siehe GALV	
SSAV (Sarkom-assoziierter Affen-Virus)	Wollaffe	C, X, N
SSV (Affen-Sarkomvirus)	Wollaffe	C, X, T
TRV-1	Spitzhörnchen	C, N, N
UR-*n* (University of Rochester)	Huhn	C, X, T
Vand C-I	Baummaus	C, N, N,
Visna	Schaf	L, X, N
VRV (Viper Retrovirus)	Russell's Viper	C, N, ?
WMV (Wollaffe-Virus)	siehe SSV	
WoLV (Wollaffe-Leukämievirus)	siehe SSAV	
Y73 (Yamaguchi 73)	Huhn	C, X, T

Fig. 17C

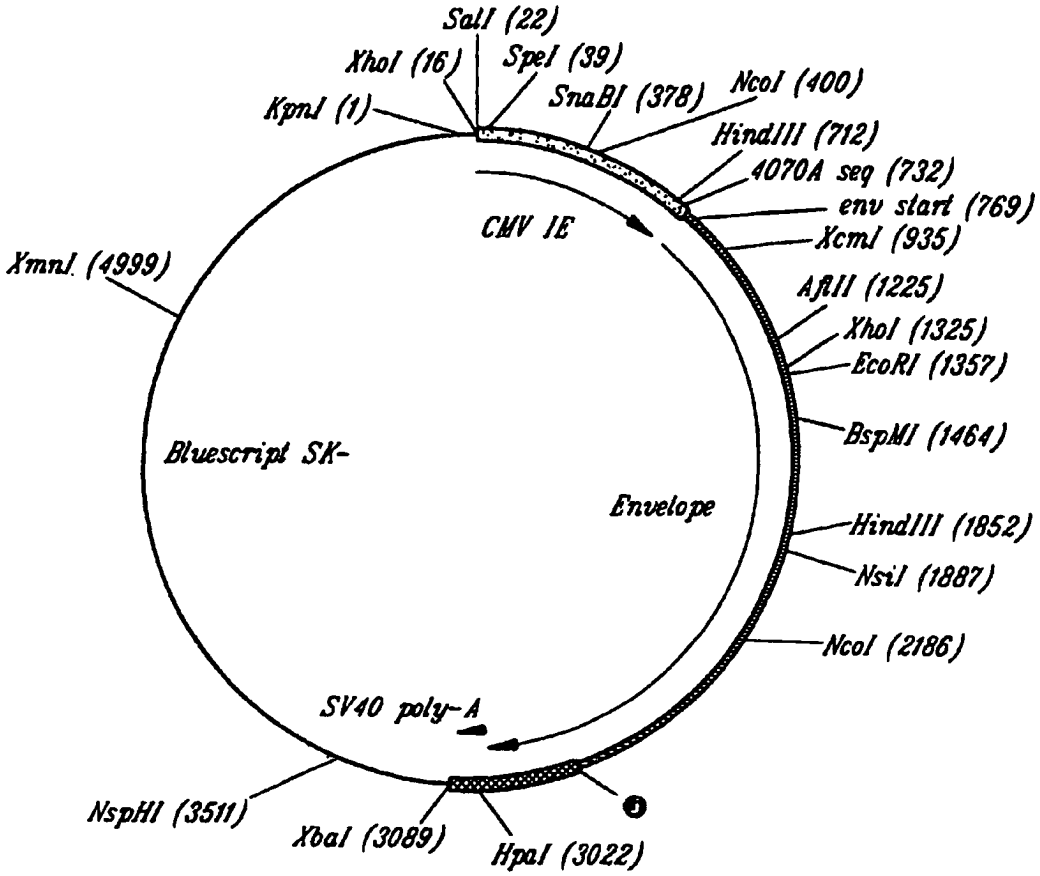


Fig. 18



Fig. 19A



Fig. 19B