

PCT
WELTORGANISATION FÜR G
Internationales
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENT
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF D



(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, 7/01, 5/10, A61K 48/00		A1	(11) Ir WO 9607747A1
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	14. März 1996 (14.03.96)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/03175 (22) Internationales Anmeldedatum: 10. August 1995 (10.08.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 31 973.8 8. September 1994 (08.09.94) DE 195 03 952.1 7. Februar 1995 (07.02.95) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 116, D-68305 Mannheim (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BAUM, Christopher [DE/DE]; Op'n Hainholt 51, D-22589 Hamburg (DE). STOCKING-HARBERS, Carol [US/DE]; Woldsenweg 13, D-20249 Hamburg (DE). OSTERTAG, Wolfram [DE/DE]; Kakenhanerweg 147, D-22397 Hamburg (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AM, AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LT, LU, LV, MD, MG, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TT, UA, UG, US, UZ, VN, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO Patent (KE, MW, SD, SZ, UG). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	

(54) Title: RETROVIRAL VECTOR HYBRIDS AND THE USE THEREOF FOR GENE TRANSFER

(54) Bezeichnung: RETROVIRALE VEKTORHYBRIDE UND DEREN VERWENDUNG ZUM GENTRANSFER

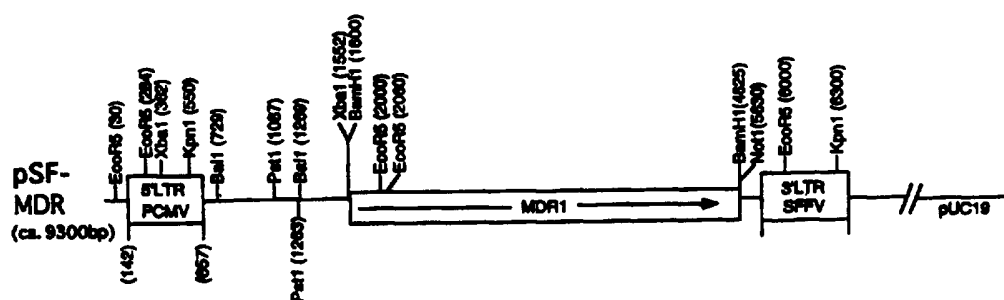


CHART IS NON-LINEAR; INTERFACES FROM XbaI (1552) ONWARDS ESTIMATED
Karte ist nicht linear; Schnittstellen ab XbaI (1552) geschätzt

MESV-Sequenzen (aus R224) MESV SEQUENCES (FROM R224)	SFFV-Sequenzen (aus pSF5-3) SFFV SEQUENCES (FROM pSF5-3)
Start 5'LTR (142) bis XbaI (1552) START 5'LTR (142) TO XbaI (1552)	NotI (ca.4630) bis Ende 3'LTR NOTI (CA.4630) TO END OF 3'LTR

(57) Abstract

The disclosure relates to replication defective retroviral vector hybrids characterized by the fact that they contain: (a) in the leader region as U5 region and/or tRNA primer binding site of MESV; and (b) as U3 and R regions in 3'-LTR, the U3 and R regions from a Friend murine leukaemia virus (F-MuLV). The proposed hybrids are particularly suitable for effective gene transfer in haematopoietic stem cells.

(57) Zusammenfassung

Replikationsdefekte, retrovirale Vektorhybride, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie a) in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) enthalten, sind insbesondere für einen effektiven Gentransfer in hämatopoietische Stammzellen geeignet.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	GA	Gabon	MR	Mauretanien
AU	Australien	GB	Vereinigtes Königreich	MW	Malawi
BB	Barbados	GE	Georgien	NE	Niger
BE	Belgien	GN	Guinea	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	NZ	Neuseeland
BJ	Benin	IE	Irland	PL	Polen
BR	Brasilien	IT	Italien	PT	Portugal
BY	Belarus	JP	Japan	RO	Rumänien
CA	Kanada	KE	Kenya	RU	Russische Föderation
CF	Zentrale Afrikanische Republik	KG	Kirgisistan	SD	Sudan
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SE	Schweden
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SI	Slowenien
CI	Côte d'Ivoire	KZ	Kasachstan	SK	Slowakei
CM	Kamerun	LI	Liechtenstein	SN	Senegal
CN	China	LK	Sri Lanka	TD	Tschad
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	TG	Togo
CZ	Tschechische Republik	LV	Lettland	TJ	Tadschikistan
DE	Deutschland	MC	Monaco	TT	Trinidad und Tobago
DK	Dänemark	MD	Republik Moldau	UA	Ukraine
ES	Spanien	MG	Madagaskar	US	Vereinigte Staaten von Amerika
FI	Finnland	ML	Mali	UZ	Usbekistan
FR	Frankreich	MN	Mongolei	VN	Vietnam

Retrovirale Vektorhybride und deren Verwendung zum Gentransfer

Die Erfindung betrifft retrovirale Vektorhybride und deren Verwendung zum Gentransfer, insbesondere für den Gentransfer in hämatopoietischen Stammzellen (ES).

Replikationsdefekte retrovirale Vektoren sind gegenwärtig Standard in Gentransfer- und Gentherapieapplikationen an Zellen des menschlichen blutbildenden Systems (A.D. Miller (1992) (1), R.C. Mulligan (1993) (2), R. Vile und S.J. Russell (1994) (3)). Ihre wesentlichen Vorteile sind:

- die Infektion führt zu einer stabilen Integration des Vektors und der durch ihn übertragenen DNA-Sequenzen in das Wirtsgenom mitotisch aktiver Zellen
- die Anzahl der Integrationen in das Wirtsgenom ist über die Infektionsbedingungen steuerbar
- die sicherheitsrelevanten Aspekte des retroviralen Gentransfers sind gut erforscht; Komplikationen traten bei zahlreichen Anwendungen am Menschen bisher nicht auf.

Der meistgenannte Vorteil von retroviralen Vektoren, die hohe Gentransfereffizienz, trifft auf die Anwendung am blutbildenden System nur bedingt zu. Mit konventionellen, auf dem Moloney murine sarcoma Virus (MoMuSV) basierenden Vektoren lassen sich bevorzugt nur späte, ausreifende blutbildende Vorläuferzellen infizieren; 30-95% der mit diesen Vektoren transduzierten Vorläuferzellen zeigen infolge primärer Silencing-Mechanismen keine oder unzureichende Expression der übertragenen Gene (4); nach längerer Verweildauer in vivo wird zudem in einem hohen Prozentsatz der initial exprimierenden Zellen die retroviral gesteuerte Genexpression bis zur Funktionsunfähigkeit durch sekundäres Silencing abgeschwächt (Palmer et al. (1991) (5), Brenner et al. (1993) (6)).

Es hat sich gezeigt, daß auch in embryonalen Zellen, wie embryonalen Carcinomazellen (myeloischen (nicht lymphatischen) Abkömmlingen von hämatopoietischen Stammzellen), die Viren zwar integriert werden, aber die Expression des integrierten Provirus geblockt wird.

Aus Stocking et al. (1993) (21) sind Mutationen und Derivate von MoMuSV bekannt, mit denen die retrovirale Genexpression in derartigen Zellen verbessert werden kann. Solche

- 2 -

Hybride werden durch Punktmutationen in den LTRs, insbesondere in der U3-Region erhalten. Beispielsweise kann durch eine Punktmutation bei -345 von MoMuLV die Bindung des ECF-1 Repressors verringert werden. Ebenso vorteilhaft ist eine Punktmutation, welche eine Bindungsstelle für SP-1 schafft (z.B. Punktmutation bei -166 (S. McKnight und R. Tijan (1986) (16)). Weiter vorteilhaft ist es, auch außerhalb der LTR-Bereiche Mutationen anzubringen. Es hat sich gezeigt, daß eine 18 bp Region, die sich direkt downstream an das 5'-LTR anschließt, ein negatives Regulationselement (NRE, Silencerbindungselement) darstellt. Durch Punktmutationen in diesem Element ist es möglich, die retrovirale Transkription zu verbessern (murines embryonales Stammzellvirus, MESV; M. Grez et al (1990) (22)).

Aufgabe der Erfindung ist es, retrovirale Vektorhybride zur Verfügung zu stellen, mit denen die retrovirale Genexpression insbesondere in hämatopoietischen Stammzellen und ihren myeloischen (nicht-lymphatischen) Abkömmlingen weiter verbessert werden kann.

Gegenstand der Erfindung sind retrovirale Vektorhybride, die dadurch gekennzeichnet sind, daß sie

- a) in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und/oder MoMuSV und
 - b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV)
- enthalten.

Vorzugsweise enthalten die erfindungsgemäßen Vektorhybride als Leaderregion die Leaderregion von MESV. In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können U5-Region und/oder vorzugsweise tRNA primer binding site auch von MoMuSV stammen.

Ebenso bevorzugt enthalten die erfindungsgemäßen Vektorhybride als 3'-LTR das LTR aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) und damit, außer den U3- und R-Regionen aus MoMuLV bzw. MESV, auch die U5-Region aus F-MuLV.

Die Vektorhybride können sowohl replikationsdefekt als auch replikationskompetent sein.

Unter einem replikationsdefekten Vektor ist ein Vektor zu verstehen, der keine retroviralen Gen-Funktionen (gag, env, pol) enthält und dadurch nicht selbständig Viruspartikel bilden kann. Üblicherweise enthält der Vektor jedoch eine packaging-Funktion (psi). Zur Bildung von infektiösen retroviralen Partikeln wird eine packaging-Zelllinie, welche die Gen-

- 3 -

Funktionen gag, env und pol stabil (als Episom oder ins Genom integriert) enthält, mit dem replikationsdefekten erfindungsgemäßen DNA-Vektor transfiziert. Es werden RNA-Transkripte gebildet, die aufgrund der gag- und env-Funktionen in Viruspartikel verpackt werden. Diese Viruspartikel sind replikationsdefizient, weil das in ihnen enthaltene RNA-Genom keine retroviralen Gen-Funktionen trägt.

Replikationsfähige, retrovirale Vektorhybride enthalten zusätzlich die Genregionen gag, pol und env. Diese Genregionen können aus beliebigen Retroviren stammen. Lediglich die env-Region muß, entsprechend der zu infizierenden Zelle, ausgewählt werden. Derartige Verfahren sind dem Fachmann jedoch bekannt. Auf diese Weise sind replikationsfähige ecotrope, xenotrope, amphotrope oder polytrope Retroviren herstellbar.

Näheres hierzu sowie zur Herstellung von Vektoren, Viruspartikeln und Helferzellen ist beschrieben in M. Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman & Co., New York (1990), 47-55 und 161-164) (31). Diese Publikation ist Gegenstand der Offenbarung der vorliegenden Anmeldung.

Unter Silencerproteinen im Sinne der Erfindung sind zelluläre (z.B. aus der mutierten Zelle stammende) nukleäre Proteine, beispielsweise aus hämatopoietischen Stammzellen, zu verstehen, welche vorzugsweise an die unmittelbar dem 5'-LTR folgenden, ersten 450 bp, vorzugsweise die ersten 18 bp, von MoMuLV und MoMuSV binden und durch Interaktion mit cis-regulatorischen Sequenzen des Provirus die retrovirale Transkription inhibieren.

Unter Leaderregion von MESV ist die Summe von Sequenzen aus dem kurzen direkten terminalen Repeat (R), der U5-Region und der unmittelbar an das 5'-LTR von MESV anschließenden Sequenz zu verstehen, welche sowohl die tRNA primer binding site als auch die packaging-Region (ψ) enthält. Die Leadersequenz kann maximal aus der vollständigen Sequenz bestehen, die im Virus von R bis zum Translationsstart enthalten ist. Vorzugsweise wird jedoch eine verkürzte Leaderregion verwendet, die neben R und U5 vorzugsweise aus in etwa den ersten 450 Basen downstream vom Ende der 5'-LTR-Region besteht. Ebenso ist es bevorzugt, daß ausschließlich oder im wesentlichen die U5-Region und die tRNA primer binding site von MESV und die anderen Teile der Leadersequenz aus MoMuLV oder MoMuSV stammen. Ein geeigneter MESV-Bereich ist in den Abbildungen (Fig. 1 - 5) von KpnI (ca. 550) bis BallI (ca. 729) gezeigt.

- 4 -

Die Leaderregion von MESV entspricht der Leaderregion von MoMuLV oder MoMuSV (Sequenz von U3, U5 und R von MoMuLV und PCMV, siehe (22) und (23)), in der Punktmutationen eingefügt sind, mit denen die Bindung von Silencerproteinen vermindert oder verhindert wird. Die Leaderregion von MESV enthält gegenüber MoMuLV und PCMV in der 18 bp Region, welche sich direkt an das 5'-LTR anschließt, 5 Punktmutationen (C. Stocking et al. (1993) (21)). Dadurch wird die inhibitorische Bindungsfähigkeit von Kernproteinen aus den infizierten Zellen drastisch vermindert und die Expression eines im Vektorhybrid enthaltenen Gens entsprechend verbessert (R. Petersen et al., Mol. Cell. Biol. 11 (1991) 1213-1221 (8)). Anstelle dieser Punktmutationen sind auch andere (mindestens eine) Punktmutationen in der Leaderregion (vorzugsweise innerhalb der ersten 450 Basen downstream vom Ende der 5'-LTR-Region, und besonders bevorzugt in der 18 bp Region) geeignet, die inhibitorische Bindung von Silencerproteinen z.B. an die Leaderregion zu vermindern oder zu verhindern. Damit ist im Sinne der Erfindung unter einer Leaderregion von MESV außer der obengenannten und in SEQ ID NO:1 beschriebenen Sequenz auch eine Sequenz zu verstehen, die im wesentlichen diesem Abschnitt von SEQ ID NO:1 entspricht, eine tRNA-Bindungsstelle und eine psi-Funktion enthält und durch Punktmutationen so modifiziert ist, daß die inhibitorische Bindung von Silencerproteinen aus den Zellen, die zur Transfektion vorgesehen sind, vermindert oder verhindert wird.

Zur Überprüfung, ob eine Punktmutation geeignet ist, die Bindung von Silencerproteinen an die Leaderregion zu verhindern, wird üblicherweise ein Plasmid hergestellt, welches ein LTR, die zu überprüfende Leaderregion und ein Indikatorgen, vorzugsweise das CAT-Gen, enthält. Die zu überprüfenden Zellen werden mit diesem Plasmid transfiziert und die CAT-Aktivität nach vorzugsweise 48 Stunden bestimmt (transiente Transfektion). Ist die CAT-Aktivität deutlich vorhanden, so ist die Punktmutation geeignet, die Bindung des Silencerproteins in diesen Zellen zu verhindern (P. Artelt et al. (1991) (32)).

Mit transienten Transfektionsexperimenten zeigt sich, daß in der Leadersequenz von MoMuSV cis-regulatorische Sequenzen lokalisiert sind, die einen inhibitorischen Einfluß auf die Genexpression insbesondere in frühen, multipotenten myeloischen Zellen haben (primäres Silencing). Austausch dieses Bereiches gegen Leader-sequenzen des murinen embryonalen Stammzellvirus [MESV (22)] hebt den inhibitorischen Einfluß in myeloischen Stammzellen vollständig auf. Die Leader-Sequenz von MESV geht zurück auf das endogene Mausretrovirus dl-587rev (23) und wurde in MESV eingeführt, um das am MoMuSV-Leader beobachtete Silencing in embryonalen Stammzellen aufzuheben (22). Entscheidend für die

Aufhebung des Silencings sind Mutationen der retroviralen primer binding site (PBS), die unmittelbar 3' des 5'LTRs gelegen ist (22).

Retroviren der F-MuLV-Gruppe sind dem Fachmann bekannt und beispielsweise in D. Linnemeyer et al. (1981) (7), J. Friel et al. (1990) (9), S.P. Clark und T.W. Mak (1982) (10), L. Wolff et al. (1985) (11), R.K. Bestwick et al. (1984) (12), W. Koch et al. (1984) (13) und A. Adachi et al. (1984) (14) beschrieben. Eine Übersicht findet sich in W. Ostertag et al. (1987) (15). Vorzugsweise werden die 3'-LTRs vom malignen Histiosarkomvirus (MHSV) (9), SFFVp Lilly-Steeves (10), SFFVa (11), Rauscher SFFV (12), F-MuLV c157 (13) und Friend-mink cell focus forming Virus (F-MCFV FrNx (14), F-MCFV pFM548 (13)) verwendet.

Erfindungsgemäß sind als 3'-LTR Sequenzen der genomischen Vektor-RNA geeignet, welche in der U3-Region eine hochgradige Sequenzhomologie zu den 3'-LTR Bereichen der obengenannten Friend-Virus-Familie zeigen. Die LTR-Sequenz von SFFVp ist in SEQ ID NO:1 beschrieben (Nucleotide 1707 - 2283).

Die erfindungsgemäßen Vorteile zeigen sich bei transienten Transfektionen von Reportergenkonstrukten in einer Vielzahl von repräsentativen Zelllinien von Mensch und Maus. Es hat sich überraschenderweise gezeigt, daß U3-Sequenzen von Mausretroviren der Friend murine leukemia virus (F-MuLV) Familie in Kombination mit Leadersequenzen (vorzugsweise tRNA binding site) von MESV eine insbesondere effiziente Genexpression in myeloischen Stamm- und Vorläuferzellen ermöglichen. Die Steigerung der Genexpression mit erfindungsgemäßen Vektorhybriden gegenüber MoMuSV beträgt mehr als eine Zehnerpotenz. Dies trifft sowohl für relativ späte Vorläuferzellen der Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten als auch für frühe, multipotente Vorläufer und auch Stammzellen des myeloischen Systems zu. Insbesondere bei den unreifen, multipotenten myeloischen Zellen, bei denen MoMuSV-LTR ein ausgeprägtes primäres Silencing zeigt, erlauben die erfindungsgemäßen Vektorhybride eine effiziente Genexpression. Auch im lymphatischen System sowie in Fibroblasten ist die Aktivität hoch.

Besonders bevorzugt ist ein frühes Isolat des Polyzythämie-induzierenden spleen focus forming virus (SFFVp (7)), dessen LTR-Sequenz in SEQ ID NO:1 (bp 2654-3230) beschrieben ist, sowie das maligne Histiosarkomvirus (MHSV (9), LTR SEQ ID NO:4, bp 1707-2324). In der U3-Region dieser Viren besteht eine hochgradige Sequenzhomologie zu anderen Vertretern der Friendvirus-Familie wie SFFVp Lilly-Steeves (10), SFFVa (11),

- 6 -

Rauscher SFFV (12), F-MuLV c157 (13) und Friend-mink cell focus forming Virus [F-MCFV FrNx (14), F-MCFV pFM548 (13)]. Diese und ähnliche Friend-verwandte Retroviren weisen aufgrund der Sequenzhomologie der U3-Regionen ein ähnliches Expressionsmuster wie SFFVp und MHSV auf.

Besonders vorteilhaft für die im Vergleich zu MoMuSV ausgeprägte Steigerung der Genexpression in myeloischen Stamm- und Vorläuferzellen durch die erfindungsgemäßen Vektoren sind Mutationen in der Enhancerregion von U3 [340 bis 140 Nukleotide 5' des Transkriptionsstarts gelegen (10)]. Von Bedeutung ist die partielle Duplikation des sogenannten direct-repeat Elements bei SFFVp (ähnlich F-MCFV FrNx) und MHSV. Möglicherweise sind hier Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisiert, die in myeloischen Zellen für effiziente Genexpression sorgen.

Unmittelbar 5' des direct repeats tragen SFFVp und MHSV sowie Friend MCFV eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor Sp1 (16). Sp1 ist zu multiplen Interaktionen mit umgebenden Transkriptionsfaktoren fähig, die in der Regel zu einer erheblichen Steigerung der Genexpression führen. Bei den MoMuSV-Derivaten Myeloproliferatives Sarkomvirus (MPSV (17), (18)) und PCC4-Zell passagiertes MPSV (PCMV (19)) ist das Auftreten einer Sp1-Bindungsstelle in der U3-Region außerdem notwendig für die Aufhebung des Silencings des MoMuSV-LTRs in embryonalen Stammzellen (20) sowie wahrscheinlich auch in Blutstammzellen (21). Eine analoge Funktion könnte auch der Sp1-Bindungsstelle von SFFVp, MHSV sowie Friend-MCF-Viren zukommen.

In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung können die retroviralen Vektorhybride als U3- und R-Regionen in 3'-LTR die U3- und R-Regionen aus MPSV enthalten. MPSV unterscheidet sich von MoMuSV bzw. MoMuLV durch Punktmutationen im LTR (21). Dabei sind A(-381) deletiert und die Austausche C→T, -345; T→A, -326; T→A, -249 und A→C, -166 (Bezifferung gemäß (21)) durchgeführt. In diesem Fall enthält das retrovirale Vektorhybrid in der Leaderregion als U5-Region und tRNA primer binding site die U5-Region und tRNA primer binding site von MESV. Es hat sich gezeigt, daß derartige MPSV/MESV-Hybridvektoren (im weiteren auch mit MPEV bezeichnet) deutliche Vorteile gegenüber Vektoren auf Basis von MoMuLV besitzen und von großer Bedeutung für eine Vielzahl von Anwendungen in der somatischen Gentherapie sind.

In 5'-LTR können beliebige U3- und R-Regionen verwendet werden, da nach der Integration des Virus das U3 aus 3'-LTR in der Zielzelle nach Ablauf des retroviralen Lebenszyklus auch

- 7 -

an die 5'-LTR-Position kopiert wird und die Genexpression treibt. U3- und R-Regionen stammen beispielsweise aus MoMuLV- oder MoMuSV-Derivaten, wie beispielsweise MPSV, PCMV und MESV. Ebenso geeignet als 5'-LTR sind 5'-LTRs von F-MuLV.

Die erfindungsgemäßen Vektorhybride zeigen nach retroviraler Transduktion von myeloischen Stamm- und Vorläuferzellen eine hohe gewebsspezifische Expression. Diese Vektoren haben daher das Potential, die Gentransfereffizienz in myeloische Stamm- und Vorläuferzellen gegenüber MoMuSV-Vektoren deutlich zu erhöhen. Die erfindungsgemäßen Vektoren haben außerdem das Potential, in wesentlich geringerem Ausmaß Silencingvorgängen in myeloischen Zellen unterworfen zu sein als MoMuSV-Vektoren. Die hohe und eventuell auch persistierende Genexpression dieser Vektoren in myeloischen Zellen kann die Grundlage schaffen für die erfolgreiche Applikation zahlreicher Gentransferprotokolle am blutbildenden System des Menschen. Die in den Beispielen beschriebenen Konstrukte sind so aufgebaut, daß die vom Vektor übertragenen cDNAs problemlos durch andere Gene ersetzt werden können.

Die Gewebsspezifität der Expression ist geeignet, das bei konventionellen MoMuSV-Vektoren beobachtete *primäre* Silencing im myeloischen System aufzuheben. Dies führt zu einer deutlichen Steigerung der funktionellen Gentransferraten in myeloische Zellen. Da eine hohe funktionale Gentransferrate bei den meisten Gentransfer-/Gentherapie-applikationen am myeloischen System erwünscht ist, liegt hier ein generell nutzbarer Vorteil der erfindungsgemäßen Konstrukte.

Die Friendvirus-verwandten U3-Regionen wurden im myeloischen System der Maus auch auf Persistenz der Genexpression in vivo selektioniert. *Sekundäres* Silencing tritt mit diesen Vektoren in wesentlich geringerem Ausmaß auf als bei MoMuSV-Vektoren. Die Exklusion von inhibitorischen Leadersequenzen durch Austausch gegen MESV-Sequenzen wird diesbezüglich zusätzlich von Vorteil sein. Dies ist von Bedeutung für alle Gentransfer-/Gentherapieapplikationen, bei denen eine langanhaltende (womöglich lebenslange) Expression der retroviral übertragenen Sequenzen im myeloischen System erwünscht ist (Genmarkierungsstudien, Korrektur metabolischer Defekte).

Hierfür können die erfindungsgemäßen Vektorhybride mindestens ein für das Virus heterologes, in eukaryontischen Zellen exprimierbares Gen enthalten. Derartige Gene sind beispielsweise das multiple drug resistance-Gen (MDR-Gen), ein Antibiotikaresistenzgen wie das neo^R-Gen, das LNGFR-Gen, das Cerebrosidasegen oder das Herpes simplex TK-Gen. In einer bevorzugten Ausführungsform können auch mehrere, vorzugsweise zwei oder drei

- 8 -

heterologe Gene im Vektorhybrid enthalten sein. Um eine Expression dieser getrennten Gene zu ermöglichen, wird zweckmäßig vor das zweite bzw. dritte Gen ein Promotor, eine splicing site (vorzugsweise von SF7Vp) oder eine internal ribosomal entry site (IRES, vorzugsweise von Polio-Viren (I.R. Ghattas et al. (1991) (26))) eingefügt.

Die Erzeugung hoher Virustiter in fibroblastoiden Verpackungszelllinien ist eine weitere wichtige Anforderung an retrovirale Vektoren, die für den Gentransfer in myeloische Zellen eingesetzt werden sollen. Die Aktivität der Friend-verwandten U3-Regionen in fibroblastischen Retrovirus-Verpackungszelllinien reicht bei den unten aufgeführten Beispielkonstrukten in jedem Fall aus, die erforderlichen Titer von 10^5 bis 10^6 vektorübertragenden retroviralen Partikeln/ml Zellkulturüberstand zu erzeugen.

Gegenstand der Erfindung ist demnach auch ein Verfahren zur Herstellung einer retroviral transduzierten, eukaryontischen Zelle, welche ein aktives exogenes Gen enthält, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß die eukaryontische Zelle transduziert wird mit einem replikationsdefekten, retroviralen Vektorvirus, der in seinem Genom als

- a) Leaderregion die Leaderregion von MESV oder MoMuSV,
- b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) und
- c) das genannte exogene Gen enthält.

Vorzugsweise wird als 3'-LTR das LTR aus F-MuLV verwendet, welches dann die genannten U3- und R-Regionen enthält.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind retroviral transduzierte, eukaryontische Zellen, dadurch erhältlich, daß die eukaryontische Zelle transduziert wird mit einem replikationsdefekten, retroviralen Vektorvirus, der in seinem Genom als

- a) Leaderregion die Leaderregion von MESV und/oder MoMuSV
- b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) enthält.

Gegebenenfalls enthält dieser Vektor ein oder mehrere (bis zu drei) exogene Gene, die in der eukaryontischen Zelle exprimierbar sind. Vorzugsweise werden als eukaryontische Zellen Säugerzellen, vorzugsweise hämatopoietische Zellen, insbesondere hämatopoietische Stammzellen verwendet.

Vorzugsweise wird als 3'-LTR das LTR aus F-MuLV verwendet, welches dann die genannten U3- und R-Regionen enthält.

Unter einem aktiven exogenen Gen ist ein Gen zu verstehen, welches von außen in die Zelle eingebracht wird und in dieser Zelle nach Integration ins Genom exprimiert wird (aktiv ist). Das exogene Gen kann ein im Zellgenom nicht enthaltenes Gen (z.B. ein Antibiotikaresistenzgen wie neo^R , LNGFR-Rezeptor (D. Johnson et al. (1986) (33)), das Cerebrosidase-Gen oder das Herpes simplex TK-Gen) sein oder ein im Genom enthaltenes, dort aber nicht oder nur ungenügend exprimiertes Gen sein, wie das multiple drug resistance (MDR) gene.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein replikationsdefektes, infektiöses Viruspartikel, welches als Genom eine retrovirale RNA enthält, wobei das Genom eine Leaderregion aus MESV enthält, welche eine packaging-Funktion und eine t-RNA-Bindungsstelle enthält, ein in einer eukaryontischen Zelle exprimierbares und für den Virus heterologes Gen und am 3'-Ende U3 und R aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV), jedoch keine aktiven gag-, env- und pol-Sequenzen enthält.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung eines replikationsdefekten, infektiösen Viruspartikel durch Transfektion einer eukaryontischen Helferzelle, welche die Helferfunktionen gag, env und pol besitzt, mit einem Vektorhybrid, welches als Leaderregion die Leaderregion von MESV und als 3'-LTR das LTR aus einem Friend murine leukemia virus enthält, Produktion von der DNA des Vektorhybrids entsprechender RNA als Virusgenom in der Zelle (beispielsweise durch zelluläre Polymerasen), Verpackung der genannten RNA in in der Zelle entstandene, replikationsdefiziente, leere Virushüllen und Isolation der infektiösen Viruspartikel, welche das genannte Virusgenom enthalten.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen replikationsdefekten, retroviralen Vektorhybrids, welches als Leaderregion die Leaderregion von MESV und als U3- und R-Regionen in 3'LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) enthält, zur Herstellung eines Arzneimittels zur ex vivo oder in vivo Gentherapie.

- 10 -

Ebenso geeignet für die erfindungsgemäßen Verfahren und Verwendungen sind Vektorhybride, die in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA binding site die U5-Region und/oder tRNA binding site von MESV oder MoMuLV/MoMuSV enthalten.

Anwendungsgebiete

I. Alle somatischen Gentransfer-/Gentherapieverfahren, bei denen myeloische Stamm- und Vorläuferzellen Zielpopulation für retrovirale Vektoren sind.

Die individuellen Protokolle werden jeweils unterschiedliche cDNAs in die Vektoren integrieren. Beispiele sind

— Genmarkierungsstudien (1): Selektionierbare Markergene wie neoR oder verkürzter nerve growth factor receptor werden übertragen um das Schicksal der markierten Zellpopulation im Organismus unter den Voraussetzungen der jeweils untersuchten Erkrankung/Therapie zu verfolgen. Die neoR-Vektoren pSF1N und pMH1N, die neoR unter Kontrolle des SFFVp U3 bzw. MHSV U3 tragen (MESV-Leader) zeigen im Vergleich zu neoR-übertragenden Moloney-Vektoren eine deutliche Steigerung der funktionalen Gentransferrate im Modellsystem der Maus-Stammzelllinie FDCPmix. Sie sind für den neoR-Transfer in humane myeloische Stammzellen geeignet.

— Schutz des Knochenmarks gegen die Nebenwirkungen einer Hochdosis-Chemotherapie (28): Chemotherapieresistenz-vermittelnde Gene wie MDR1 oder Alkyltransferasen werden übertragen. Hohe Transferrate und Expression über die optimierten Friendvirus-verwandten Vektoren verhindern myelosuppressive Nebenwirkungen und evtl. auch Zweitumorinduktion der Chemotherapie.

— Korrektur metabolischer Erkrankungen: Bei monogenen Erbkranken werden über retroviralen Gentransfer in myeloische Stammzellen intakte Kopien der defekten Gene eingebracht. Anwendungen sind z.B. denkbar bei Erbkranken, deren Gendefekt Auswirkungen im myeloischen System hat (Speicherkrankheiten wie Hurler-Syndrom; M. Gaucher (29)).

II. Klonierung replikationskompetenter Friend-verwandeter Retroviren

Die erfindungsgemäßen Viren sind aufgrund ihres in Richtung auf frühe myeloische Stamm- und Vorläuferzellen erweiterten Wirtsspektrums besonders gut für die Insertionsmutagenese in

diesen Zellen geeignet. Über Insertionsmutagenese lassen sich Gene klonieren, die eine wichtige Funktion bei der physiologischen Wachstumsregulation des myeloischen Systems haben.

Das Prinzip, Retroviren als Insertionsmutagen zu verwenden, wurde schon mehrfach beschrieben (Review: Kung et al. (1991) (34)). Retroviren integrieren DNA-Sequenz-unspezifisch ins Genom und können dabei Gene aktivieren oder inaktivieren. Replizierbare Retroviren infizieren Gewebe mit einer sehr hohen Effizienz und können daher die Wahrscheinlichkeit steigern, daß durch Integration Mutationen erzeugt werden. Solche Mutationen können wiederum zu einer Entartung der mutierten Zellen führen, d.h. Tumoren entstehen.

Bei in vivo Experimenten mit Mäusen (gewöhnlich an neugeborenen Mäusen, da sie noch kein effizient arbeitendes Immunsystem haben und daher gegen Retroviren sehr empfindlich sind) zur Identifizierung regulatorischer Gene werden jene mit Retroviren infiziert, und nach einer Latenzperiode von ca. 3 Monaten können spezifische Tumoren (abhängig vom Virustyp) entdeckt und untersucht werden. Analysen der klonalen, retroviralen Integrationsstellen enthüllen Gene, deren Aktivierung bzw. Inaktivierung zu Zellen veränderten bzw. entarteten Phänotypen führen kann. Damit ist es möglich, eine große Zahl verschiedenster Gen-Typen zu entdecken, wie Gene für Liganden, Rezeptoren, Signal-Transduktoren und Transkriptionsfaktoren. Signifikanterweise existiert eine hohe Korrelation zwischen dem gefundenen Tumortypus, der durch bestimmte Viren erzeugt wird, und dem aktivierten/inaktivierten Gen (z.B. bei der Erythroleukämie, die durch Friend-MuLV induziert wird, zeigen ca. 80% der Tumoren Integrationsereignisse im Fli-1 Locus und transkriptionelle Aktivierung des Transkriptionsfaktor PU-1-Gens: Interagierende Oncogene konnten identifiziert werden, indem transgene Mäuse mit ecotroper Expression eines Oncogens (z.B. *myc*) infiziert und die Tumorgenese beobachtet wurde. Nach deutlich verkürzter Latenzzeit entstanden Tumoren durch Sekundärmutationen ("Second Hit", z.B. im *pim-1*-Gen)).

Dennoch konnte mit bisherigen Retroviruskonstrukten lediglich ein Ausschnitt an möglichen Genen identifiziert werden. Das Spektrum an Genen, das mit diesem Ansatz, durch Aktivierung/Inaktivierung und die damit verbundene, phänotypische Veränderung der Zelle, auffindbar ist, hängt stark von der Spezifität der verwendeten Retroviren für bestimmte Zelltypen ab. So zeigen bisher verwendete Retroviren nur sehr geringe Infektiosität in hämatopoietischen und embryonalen Stammzellen (vgl. Review: Stocking et al. (1993) (21)). Dies ist auf mehrere Ursachen zurückführbar; primär auf Transkriptionskontrollelemente in

den retroviralen LTRs (Stocking et al. (1985) (18)), sekundär aber auch auf, für die Virusreplikation notwendige, Proteininteraktionen zwischen zellulären und viralen Proteinen.

Replikationskompetente Retroviren erzeugen durch Infektion neue Retrovirusproduzentenzellen, was zu einer vollständigen Infektion der gesamten Zellpopulation und mit einer weit größeren Wahrscheinlichkeit zur Ausbildung von Mutationen führt. Ähnliche Effizienz läßt sich nur durch eine aufwendigere und zeitraubendere Cokultivierung der Retrovirusverpackungslinie mit der Zielzelllinie erreichen.

Friend-verwandte replikationskompetente Viren können außerdem zur Erzeugung von forced-passage-Mutanten eingesetzt werden, die eine zusätzliche Verbesserung der Infizierbarkeit von Blutstammzellen aufweisen. Mutationen in retroviralen Strukturproteinen dieser Viren können Verwendung finden bei der Erzeugung optimierter Verpackungszelllinien für den Gentransfer in myeloische Zellen. Mutationen in cis-regulatorischen Sequenzen dieser Viren können eingesetzt werden zur weiteren Optimierung retroviraler Vektoren für den Blutstammzellgentransfer.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung sind replikationsfähige, ecotrope, xenotrope, amphotrope oder polytrope Retroviren, mit den regulatorischen Elementen (Leaderregion) von MESV und gegebenenfalls MoMuLV oder MoMuSV, kombiniert mit U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV), die dadurch in der Lage sind, murine (in vivo und in vitro) oder humane (in vitro) Vorläuferzellen effizienter zu infizieren und Mutationen auszulösen. Vorzugsweise enthalten die Retroviren als 3'-LTR das LTR aus F-MuLV.

Die Kombination beider Komponenten führt zu retroviralen Insertionsmutagenese-konstrukten einer neuen Qualität, mit deren Hilfe neue, mit herkömmlichen, replikationsfähigen Retroviren nicht auffindbare Gene, identifiziert werden können. Sie sind mit einem sehr hohen Titer erzeugbar und ergeben eine nahezu 100 %ige Infektionsrate, da jede befallene Zelle zur Produzentenzelle für neue Viren wird. In ihnen kann das Neomycin-Resistenzgen, das in retroviralen Vektoren zur Selektion Verwendung findet, deletiert werden. Dies führt zu einer höheren Transkription der LTR-Promotoren, da neo^R als Silencer funktioniert (Artelt et al. (1991) (32)), und demzufolge zu einer verbesserten Insertionsrate.

Durch die erfindungsgemäßen Retroviren können murine als auch humane hämatopoietische und embryonale Stammzellen in vitro mit hoher Effizienz infiziert und durch Insertion ins

Genom Mutanten (Aktivierung bzw Inaktivierung von Genen) erzeugt werden. Es ist daher auch für in vivo-Ansätze zu erwarten, daß die erfindungsgemäßen Viren frühe hämatopoietische und embryonale Zellen mit höherer Effizienz infizieren und Gene durch Integration ins Genom aktivieren bzw. inaktivieren.

Eine Genaktivierung kann auf mehrere Weisen passieren. So kann eine Integration stromaufwärts eines Genes jenes unter der transkriptionellen Kontrolle des 3'-LTR-Promotors aktivieren. Es kann auch die Bindungsstellen von negativen Kontrollelementen inaktiviert werden, was zu einer Genaktivierung führen kann. Es existieren aber auch mehrere Beispiele (Kung et al. (1991) (34)), die belegen, daß der 5'-LTR-Promotor direkt über Durchlesen oder aber über seine Enhancer-Wirkung auch viele Basen stromaufwärts, aber auch innerhalb eines Introns, nach erfolgter Insertion, ein Gen aktivieren kann.

Eine Integration innerhalb eines Genes oder in der zugehörigen Promotor/Enhancer-Region kann aber auch zu einer Inaktivierung des entsprechenden Genes führen.

Sind für die Regulation der Zelle wichtige Gene betroffen, können die Zellen entarten, d.h. es können Tumoren entstehen. Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Viren können daher andere Gene, z.B. Gene, welche bei der Zellregulation von hämatopoietischen oder embryonalen Stammzellen involviert sind, gefunden werden, als mit herkömmlichen Viren, welche in jenen Zelltypen nicht oder nur sehr schlecht replizieren können.

Die erfindungsgemäßen replikationskompetenten Viren können in vitro beispielsweise folgendermaßen angewendet werden:

Faktorenabhängige, promyelocytische Zelllinien wurden durch retrovirale Insertionsmutagenese faktorunabhängig gemacht, d.h. das Wachstumsfaktorgen wurde durch retrovirale Integration aktiviert. Die Retrovirusinfektion erfolgte durch Cokultivierung der Zielzelllinie mit MPSV-Vektor produzierenden Verpackungslinien. Dieser in vitro-Ansatz läßt sich mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konstrukte effizienter gestalten. Des weiteren sind mit den erfindungsgemäßen Viren murine oder humane, embryonale und hämatopoietische Stammzellen obigen Untersuchungen zugänglich.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht in Experimenten, die das Ziel haben, bessere Vektorvirusverpackungslinien z.B. für die Gentherapie herzustellen, die Viren mit einer höheren Infektionseffizienz in Vorläuferzellen produzieren können. In jenen Zellen existieren

- 14 -

mehrere Blocks, die mit der retroviralen Infektion/Replikation interferieren. Die Verwendung der erfindungsgemäßen Konstrukte hat gegenüber replikationsfähigen Wildtyp MoMuLV oder AM4070 den Vorteil, daß die transkriptionellen Blocks bereits beseitigt sind. Verbesserungen in der Infektionseffizienz lassen sich daher auf entsprechende Mutationen in den viralen Proteinen zurückführen.

Eine weitere Anwendungsmöglichkeit der erfindungsgemäßen Konstrukte liegt in der Erzeugung von "Knock Out"-Mäusen durch Insertionsinaktivierung eines oder mehrerer Gene in embryonalen Stammzellen.

Die folgenden Beispiele, Zeichnungen und Sequenzprotokolle erläutern die Erfindung weiter.

Die Sequenzprotokolle zeigen:

SEQ ID NO:1	Sequenz von pSF1
SEQ ID NO:2	Sequenz von pSF2
SEQ ID NO:3	Sequenz von pSF3
SEQ ID NO:4	Sequenz von pMH1
SEQ ID NO:5	Sequenz von pSF-MDR
SEQ ID NO:6	Sequenz von pMP-MDR

(dargestellt ist jeweils nur der provirale Teil der Sequenzen)

Fig. 1A	zeigt die Plasmidkarte von pSF-MDR. (orientierende Angabe der Restriktionsstellen)
Fig. 1B	zeigt die Plasmidkarte von pSF-MDR (genaue Angabe der Restriktionsstellen)
Fig. 2A	zeigt die Restriktionskarte von pSF1.
Fig. 2B	zeigt die Restriktionskarte von pSF1N. Dieser Vektor entspricht pSF1, in den in die multiple cloning site (MCS) das neo ^R Gen insertiert wurde.
Fig. 3A	zeigt die Restriktionskarte von pSF2.
Fig. 3B	zeigt die Restriktionskarte von pSF2N, welche pSF2 nach Integration des neo ^R Gens entspricht.
Fig. 4A	zeigt die Restriktionskarte von pSF3.
Fig. 4B	zeigt die Restriktionskarte von pSF3N, welche pSF3 nach Integration des neo ^R Gens entspricht.
Fig. 5A	zeigt die Restriktionskarte von pMH1.

- Fig. 5B** zeigt die Restriktionskarte von pMH1N, welches pMH1 nach Integration des neo^R Gens entspricht.
- Fig. 6** zeigt das Entstehungsschema des Vektors pSF-MDR1.
- Fig. 7** zeigt das Entstehungsschema der Vektoren pSF1N, pSF2N, pSF3N und pMH1N.
- Fig. 8** zeigt die Protektion von myeloiden Zellen durch FMEV und MPEV - mdr1-Vektoren im Vergleich zu Standard MoMuLV-Vektoren. Angegeben ist die mittlere relative Transduktionshäufigkeit (korrigiert um Fibroblastentiter und Klonierungseffizienz). Fibroblastentiter variierten um weniger als Faktor 3 zwischen den verschiedenen Vektoren. A: Zelllinie K-562, B: Zelllinie TF-1.
- Fig. 9** zeigt die Restriktionskarte von pMP-MDR.

Beispiel 1

a) Konstruktionsbeschreibung

Tabelle 1 zeigt die Klonierungsstrategien der erfindungsgemäßen Konstrukte.

I. pSF-MDR (Fig. 1, 6, Tabelle 1, SEQ ID NO:5)

Dieser Vektor wurde kloniert auf der Basis des MESV-Vektors R224 (Basis pUC 19), bei dem Teile der env-Region sowie die komplette U3-Region des 3'LTR durch SFFVp-Sequenzen ersetzt wurden. Auf diese Weise wurde der Vektor pSF5 + 3 (vgl. Fig. 6) erhalten. In einem zweiten Schritt erfolgte die Insertion der für MDR1 kodierenden cDNA (aus pMDR2000XS (25)) in die multiple cloning site (Not1, Xba1, BamH1, Hind3).

II. pSF1N, pSF2N, pSF3N, pMH1N (Fig. 2-5, 7, Tabelle 1)

Das Rückgrat dieser Plasmide basiert auf dem MESV-Vektor R224, bei dem eine große Deletion zwischen der Xba1-Schnittstelle des 5'LTR und der Kpn1-Schnittstelle im 3'LTR vorgenommen wurde. Über Dreifragmentligationen wurden die komplementierenden Sequenzen eingeführt; es resultierten die Basisvektoren pSF1, pSF2, pSF3 und pMH1 (Entstehungsschema und Klonierungsstrategie, Fig. 7, Tabelle 1, Sequenzen in SEQ ID NO:1-4 beschrieben). Die für die Dreifragmentligation eingesetzten Fragmente werden aus Hilfskonstrukten gewonnen (s. Entstehungsschema, Fig. 6), in denen leicht Modifikationen zur weiteren Optimierung der Vektoren vorgenommen werden können. Denkbar sind Austausch

- 16 -

der SFFVp bzw. MHSV U3-Regionen gegen analoge Sequenzen anderer Friend-verwandter Retroviren oder die oben erwähnten Modifikationen des Leaders zur Titeroptimierung. Nach Insertion der neoR cDNA (aus R229) entstanden die Beispielkonstrukte pSF1N, pSF2N, pSF3N, pMH1N. Die Beispielkonstrukte tragen Polylinker mit singulären Restriktionsschnittstellen, die zum Austausch der zu transferierenden Gene verwendet werden können. An diesen Schnittstellen können außerdem regulatorische Sequenzen für eine eventuell notwendige Zweitgenexpression wie der splice acceptor von SFFVp oder die sog. interne Ribosomeneintrittsstelle IRES (I.R. Ghattas et al. (1991) (26)) eingeführt werden.

Die in den Beispielkonstrukten als U3 und R klonierten Friend-verwandten Regionen (im 3'LTR) sind nach Ablauf eines retroviralen Lebenszyklus auch an die 5'LTR-Position kopiert und treiben dann die Genexpression in den Zielzellen. Die Beispielkonstrukte enthalten alle für retroviralen Gentransfer und retrovirale Genexpression notwendigen cis-regulatorischen Elemente. Bei diesen Konstrukten sind Eigenschaften von SFFVp (bzw. MHSV), MESV und MoMuSV kombiniert. Als sicherheitsrelevante Modifikationen sind integriert die Punktmutation des Startcodons für das retrovirale gag-Protein zu einem Stopcodon (A.D. Miller und G.J. Rosman (1990) (27)) sowie -bei pSF1N, pSF2N, pSF3N, pMH1N- die Deletion überflüssiger env-Sequenzen (27).

- 17 -

Tabelle 1. Klonierungsstrategien der erfindungsgemäßen Konstrukte und Hilfskonstrukte.

Konstrukt	Rückgrat	Fragment 1	Fragment 2
pSFMDR	SF5+3 SalI/notI	pMDRSX1 SalI/NotI	
pSF5+3	R224ΔNB XhoI/NruI	pSFpoly Hind3 blunt end	
pMDRΔSX1	Bluescript KS SalI/SmaI	pMDR2000XS SalI/SspI	
pSF1N	pSF1 NotI/BamHI	neoR NotI/BamHI (R229)	
pSF2N	pSF2 NotI/BamHI	neoR NotI/BamHI (R229)	
pSF3N	pSF3 NotI/BamHI	neoR NotI/BamHI (R229)	
pMH1N	pMH1 NotI/BamHI	neoR NotI/BamHI (R229)	
pSF1	R229ΔXbaI/KpnI	pL1 XbaI/NotI	pΔenvSF NotI/KpnI
pSF2	R229ΔXbaI/KpnI	pL2 XbaI/NotI	pΔenvSF NotI/KpnI
pSF3	R229ΔXbaI/KpnI	pL3 XbaI/NotI	pΔenvSF NotI/KpnI
pMH1	R229ΔXbaI/KpnI	pL1 XbaI/NotI	pΔenvMH NotI/KpnI
pL1	Bluescript KS XbaI/NotI	R224 XbaI/NotI	
pL2	pL1ΔBamI	pV-MDR1 BamI	
pL3	pL1ΔKpnI-PstI	pV-MDR1 kpnI/PstI	
pΔenvMO	Bluescript KS BamHI/KpnI	pV-MDR1 BamHI/KpnI	
pΔenvSF	pΔenvMO NheI/KpnI	pSFU3 XbaI/KpnI	
pΔenvMH	pΔenvSF EcoR5/KpnI	pBR-MHSV EcoR5/KpnI	
pSFU3	pUC19 Hinc2	pSFenv SfaNI/KpnI	

Beispiel 2**Steigerung der funktionalen Gentransferrate gegenüber konventionellen Moloney-Vektoren**

Das multiple drug resistance 1 (MDR1) Gen kodiert für eine membranständige Effluxpumpe (P-Glycoprotein), die Resistenz gegen eine Reihe klinisch wichtiger Zytostatika vermittelt (I. Pastan et al. (1988) (25)). Der Grad der Resistenz ist eng an die Expressionshöhe von P-Glycoprotein geknüpft. Gelingt es, myeloische Stammzellen durch retroviralen MDR1-Transfer zytostatikaresistent zu machen, könnte ein wichtiger Beitrag zur Senkung der Nebenwirkungsrate einer Tumor-Chemotherapie geleistet werden.

In dem Experiment wurden K562-Zellen (ATCC CLL243) und TF1-Zellen (humane myeloide Progenitorzelllinien) mit retroviralen Vektoren infiziert, die MDR1 unter Kontrolle des SFFV-LTRs exprimieren (Virus SF-MDR hervorgegangen aus Konstrukt pSF-MDR mit MESV-Leader sowie MPSV/MESV-Hybridvektor pMP-MDR).

Die TF1-Zelllinie wurde wie bei T. Kitamura et al. (1989) (30) beschrieben von einem Patienten mit Erythroleukämie erhalten. Die Zellen werden in RPMI-Medium (supplementiert mit 20% fötalem Kälberserum, 1 mM Na-Pyruvat, 4 mM Glutamin und 20 U/ml rekombinantem GM-CSF) in Kultur gehalten.

In einem identischen Ansatz erfolgte die Infektion von K562-Zellen und TF1-Zellen mit einem Moloney-MDR1 Vektor (Virus V-MDR hervorgegangen aus dem Konstrukt pVMDR), der in einem klinischen Gentransferprotokoll unter Leitung von Prof. A. Deisseroth am MD Anderson Cancer Center, Houston, Texas, eingesetzt wird. Wie aus Tabelle 2 ersichtlich ist, führt SF-MDR bei K562 zu einer ca. 20fachen Steigerung der Gentransferrate gegenüber VMDR, gemessen an der Zahl der unter Zytostatikaapplikation (ca. 10fache LD50 bei K562) wachsenden Kolonien.

Die Erhöhung der funktionalen Gentransferrate bei myeloischen Zellen ist Ausdruck der durchschnittlichen Erhöhung der Genexpressionsrate in den transduzierten Zellen. Dies ist von Bedeutung bei Gentransferapplikationen, deren Erfolg auch von der Höhe der Genexpression abhängt (s. Anwendungsbeispiel: Knochenmarksschutz bei Hochdosis-Chemotherapie). Werden bei dem oben beschriebenen Experiment (Infektion von humanen myeloischen Zellen mit SFMDR oder V-MDR) die Zellen unter sehr hohen Zytostatikadosen plattiert (ca. 20fache

LD50 bei TF1), sind nur SF-MDR infizierte Zellen in der Lage, Kolonien zu bilden (Tabelle 2).

Tabelle 2. Kolonienzahl unter Colchicinselektion nach Infektion von humanen hämatopoetischen Zellen K562 und TF1 durch MDR1-transduzierende retrovirale Vektoren. Die Vektoren pSF, MDR und pMP-MDR steigern die funktionelle Gentransferrate im Vergleich zum konventionellen MoMuLV-Vektor deutlich.

			Kolonienzahl unter Selektion	
Virus	U3-Region von 3'LTR	Leader	K562 (20 ng Colchicin)	TF1 (80 ng Colchicin)
SF-MDR	SFFV _p	MESV	948 +/- 98	13 +/- 3
V-MDR	MoMuLV	MoMuSV	38 +/- 4	0
MP-MDR	MPSV	MESV	410 ± 28	9 ± 3

Die Zellen wurden mit retroviralem Überstand von amphotropen Verpackungszelllinien infiziert. Der Titer auf Fibroblasten war für beide Vektoren zum Zeitpunkt des Experiments ca. 2×10^4 /ml. Das Verhältnis Vektor/Zielzelle war bei der Infektion < 1 . 24 Stunden nach Infektion wurden 5×10^4 Zellen in Colchicinhaltigem Weichagarmedium plattiert. Die Auswertung erfolgte am Tag 8 der Agarkloierung. Die Klonierungseffizienz ohne Selektion betrug für beide Zelllinien ca. 15%. Die Experimente erfolgten in Duplikaten.

Für einen Vektor, dessen U3-Region aus MoMuLV und dessen Leader aus MESV stammt, werden analoge Ergebnisse wie mit dem Vektor pV-MDR erhalten.

Im MDR1-System haben Konstrukte mit einem MESV-Leader gegenüber konventionellen MoMuSV-Vektoren etwas reduzierte Titer. Dies könnte auf Mutationen im Packagingbereich von MESV zurückzuführen sein. Hybride zwischen den Leadersequenzen von MESV und MoMuSV haben das Potential, Vektoren mit höherem Titer aufgrund verbesserter Verpackungsfunktion in retroviralen Verpackungszelllinien unter gleichzeitigem Ausschluß cis-inhibitorischer Sequenzen zu erzeugen. Dies wurde bei der Klonierung der Beispielskonstrukte pSF2N und pSF3N berücksichtigt.

- 20 -

Anmerkung: Provirale Vektoren werden z. B. mit SF-MDR, MP-MDR etc. bezeichnet, um sie von den korrespondierenden Plasmiden pSF-MDR, pMP-MDR etc. zu unterscheiden.

Beispiel 3

Konstruktion von replikationsfähigen Insertionsmutagenese-Vektoren basierend auf den erfindungsgemäßen Friend-/MESV-Vektorkonstrukten

Das Beispielkonstrukt eines replikationsfähigen, amphotropen Friend-/MESV-Vektors zur Insertionsmutagenese wurde durch Klonierung der zur retroviralen Replikation notwendigen gag-pol-env-Gene in dem Friend-/MESV-Vektor pSF1 und pSF3 (siehe Fig. 2A und 4A) hergestellt.

Dazu wurde die gesamte 7,2 kb umfassende gag-pol-env-Genkassette aus pAM (Miller et al. (1985) (35)) mit Hilfe des "Expand long template PCR Systems" (Boehringer Mannheim, siehe auch: W.M. Barns (1994) (36)) amplifiziert und in pSF1 und pSF3 eingebaut.

pAM stellt ein Fusionskonstrukt aus dem ecotropen MoMuLV-Vektor pMLV-K (gag-pol bis SalI-Schnittstelle) und aus dem amphotropen Virus 4070A-Vektor p4070A (pol ab SalI-Schnittstelle und env^{amphotrop}) dar. Der obere PCR-Primer wurde 60 bp stromaufwärts des gag-Startcodons (direkt angrenzend an PstI-Schnittstelle), der untere PCR Primer direkt ans Ende des env^{amphotrop}-Gens gelegt. Das 7,2 kb gag-pol-env^{amphotrop} PCR-Amplifikat wurde ungeschnitten, d.h. mit stumpfen Enden, in den mit PstI und HindIII geschnittenen und zur Beseitigung der Überhänge mit Klenow-Enzym behandelten (Sambrook et al. (1989) (37)) Vektor pSF1 und pSF3 eingebaut. Die resultierenden Vektoren erhielten die Bezeichnungen pSF1-AM, pSF3-AM und haben folgenden prinzipiellen Aufbau: 5'-LTR^{MESV}-PBS(-)-MESV-gag-pol-env^{amphotrop}-3'-LTR^{SFFV} (pSF1-AM) und 5'-LTR^{MESV}-PBS(-)-MUSV-gag-pol-env^{amphotrop}-3'-LTR^{SFFV} (pSF3-AM). Nach Transfektion in humane oder murine Zellen sind sie in der Lage, replikationskompetente Retroviren (RCR) zu bilden, die zur Insertionsmutagenese in hämatopoietischen Stamm- und Progenitorzellen eingesetzt werden können.

Beispiel 4**Konstruktion von replikationsfähigen Insertionsmutagenese-Vektoren basierend auf den erfindungsgemäßen MPSV/MESV-Vektorkonstrukten**

Im Vektor MoMuLV-TAT (Hilberg, F. et al, Prog. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 5232 -5236) (38) wird das NheI-KpnI-Fragment durch das entsprechende LTR-Fragment von MPSV (-416 - +31) ersetzt. Der entstehende Vektor wird mit MP-CAT bezeichnet. Dieses Plasmid kann als Reportergenplasmid verwendet werden, indem die Expression des Chloramphenicol-Transferase (CAT)Gens unter der Kontrolle des retroviralen LTR-Fragments erfolgt.

Als MPSV/MESV-Basisvektor wird der Vektor p50-M verwendet. Dieser Vektor enthält das MPSV-U3 im 3'-LTR. Er ist ein Derivat von p5Gneo, welches ein 537 bp großes Leaderfragment von dl587rev enthält (Grez M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 9202 - 9206 (39), Colicelli J. und Goff S.P., J. Virol. 57 (1987) 37 - 45 (40)). NeoR-env codierende Regionen von p5Gneo wurden durch einen Polylinker aus p Bluescript KS (Stratagene) ersetzt, und das AUG von gag wurde durch Punktmutation zerstört. Die mdr-1 cDNA wurde als SacI/SspI-Fragment aus pMDR2000XS (Basenpaar -138 - +3878) (Chen C. et al., Cell 47 (1986) 381 - 389 (41)) ausgeschnitten. Nach Subcloning in p Bluescript II KS wurde die cDNA als BamHI-Fragment isoliert und p50-M eingefügt. Der so hergestellte Vektor wird mit pMP-MDR bezeichnet. Die Sequenz von p-MDR, pMP-MDR ist in Fig. 9 und SEQ ID NO:6 dargestellt.

Referenzliste

- (1) Miller A.D., Nature 357, 455-460 (1992)
- (2) Mulligan R.C., Science 260, 926-932 (1993)
- (3) Vile R. and Russell S.J., Gene Therapy 1, 88-98 (1994)
- (4) Lu M. et al., Human Gene Therapy 5, 203-208 (1994)
- (5) Palmer T.D. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 88, 1330-1334 (1991)
- (6) Brenner M.K. et al., The Lancet 342, 1134-1137 (1993)
- (7) Linemeyer D.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 78, 1401-1405 (1981)
- (8) R. Petersen et al., Mol. Cell. Biol. 11, 1213-1221 (1991)
- (9) Friel J. et al., J. Virol. 64, 369-378 (1990)
- (10) Clark S.P. and Mak T.W., Nucl. Acid Res. 10, 3315-3330 (1982)

- 22 -

- (11) Wolff L. et al., J. Virol. 53, 570-578 (1985)
- (12) Bestwick R.K. et al., J. Virol. 51, 695-705 (1984)
- (13) Koch W. et al., J. Virol. 49, 828-840 (1984)
- (14) Adachi A. et al., J. Virol. 50, 813-821 (1984)
- (15) Ostertag W. et al., Adv. Cancer Res. 48, 193-355 (1987)
- (16) McKnight S. and Tijan R., Cell 46, 795-805 (1986)
- (17) Ostertag W. et al., J. Virol. 33, 573-582 (1980)
- (18) Stocking C. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 5746-5750 (1985)
- (19) Franz T. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 83, 3292-3296 (1986)
- (20) Grez M. et al., J. Virol. 65, 4691-4698 (1991)
- (21) Stocking C. et al., in Virus Strategies, ed. by W. Doerfler and P. Böhm, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany (1993)
- (22) Grez M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 87, 9202-9206 (1990)
- (23) Colicelli J. and Goff S.P., J. Virol. 57, 37-45 (1987)
- (24) Bilello J.A. et al., Virology 107, 331-344 (1980)
- (25) Pastan I. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 85, 4486-4490 (1988)
- (26) Ghattas I.R. et al., Mol. Cell. Biol. 11, 5848-5859 (1991)
- (27) Miller A.D. and Rosman G.J., Biotechniques 7, 980-990 (1990)
- (28) Anderson W.F., Human Gene Therapy 5, 1-2 (1994)
- (29) Ohashi T. et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 89, 11332-11336 (1992)
- (30) T. Kitamura et al., J. Cell. Physiol. 140, 323-334 (1989)
- (31) M. Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, W.H. Freeman & Co., New York (1990), 47-55 und 161-164
- (32) P. Artelt et al., Gene 99, 249-254 (1991)
- (33) D. Johnson et al., Cell 47, 545-554 (1986)
- (34) H.J. Kung et al., Current Topics in Microbiol. & Immunol. 171 (1991) 1-25
- (35) A.D. Miller et al., Molecular and Cell Biology, Vol. 5, No. 3 (1985) 431-437
- (36) W.M. Barns, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91 (1994) 2216-2220
- (37) J. Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, second edition (1989), CSH Laboratory Press
- (38) Hilberg, F. et al, Prog. Natl. Acad. Sci. USA 84 (1987) 5232 -5236
- (39) Grez M. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 (1990), 9202 - 9206
- (40) Colicelli J. und Goff S.P., J. Virol. 57 (1987) 37 - 45
- (41) Chen C. et al., Cell 47 (1986) 381 - 389

- 23 -

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: BOEHRINGER MANNHEIM GMBH
- (B) STRASSE: Sandhofer Str. 116
- (C) ORT: Mannheim
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: D-69305
- (G) TELEFON: 08856/60-3446
- (H) TELEFAX: 08856/60-3451

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Retrovirale Vektorhybride und deren Verwendung zum Gentransfer

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 6

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30B (EPA)

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE P 44 31 973.8
- (B) ANMELDETAG: 08-SEP-1994

(vi) DATEN DER URANMELDUNG:

- (A) ANMELDENUMMER: DE 195 03 952.1
- (B) ANMELDETAG: 07-FEB-1995

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5323 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

```
CGATTAGTCC AATTTGTTAA AGACAGGATA TCAGGTGGTC CAGGCTCTAG TTTTGACTCA    60
ACAATATCAC CAGCTGAAGC CTATAGAGTA CGAGCCATAG ATAGAATAAA AGATTTTATT    120
TAGTCTCCAG AAAAAGGGGG GAATGAAAGA CCCACCTGT AGGTTTGGCA AGCTAGCTTA    180
AGTAACGCCA TTTTGCAAGG CATGGAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA GTTCAGATCA    240
```

ERSATZBLATT (REGEL 26)

AGGTTAGGAA CAGAGAGACA GCAGAATATG GGCCAAACAG GATATCTGTG GTAAGCAGTT 300
CCTGCCCCGC TCAGGGCCAA GAACAGATGG TCCCCAGATG CGGTCCCGCC CTCAGCAGTT 360
TCTAGAGAAC CATCAGATGT TTCCAGGGTG CCCCAGGAC CTGAAAATGA CCCTGTGCCT 420
TATTTGAACT AACCAATCAG TTCGCTTCTC GCTTCTGTTC GCGCGCTTCT GCTCCCCGAG 480
CTCAATAAAA GAGCCCACAA CCCCTCACTC GGCGCGCCAG TCCTCCGATT GACTGCGTCG 540
CCCGGGTACC CGTATTCCCA ATAAAGCCTC TTGCTGTTTG CATCCGAATC GTGGACTCGC 600
TGATCCTTGG GAGGTCTCC TCAGATTGAT TGACTGCCCA CCTCGGGGGT CTTTCATTTG 660
GAGGTTCCAC CGAGATTTGG AGACCCAGC CCAGGGACCA CCGACCCCCC CGCCGGGAGG 720
TAAGCTGGCC AGCGGTCGTT TCGTGTCTGT CTCTGTCTTT GTGCGTGTTT GTGCCGGCAT 780
CTAATGTTTG CGCCTGCGTC TGTACTAGTT GGCTAACTAG ATCTGTATCT GGCGGTCCCG 840
CGGAAGAACT GACGAGTTCG TATTCCCGGC CGCAGCCCCT AGGAGACGTC CCAGCGGCCT 900
CGGGGGCCCCG TTTTGTGGCC CGTTCTGTGT CGTTAACCAC CCGAGTCGGA CTTTTTGGAG 960
CTCCGCCACT GTCCGAGGGG TACGTGGCTT TGTGTTTTGA CGAGAGACAG AGACACTTCC 1020
CGCCCCCGTC TGAATTTTTG CTTTCGGTTT TACGCCGAAA CCGCGCCGCG CGTCTTGTCT 1080
GCTGCAGCAT CGTTCTGTGT TGTCTCTGTC TGACTGTGTT TCTGTATTTG TCTGAAAATT 1140
AGGGCCAGAC TGTTACCACT CCCTTAAGTT TGACCTTAGA TCACTGGAAA GATGTCGAGC 1200
GGATCGCTCA CAACCAGTCG GTAGATGTCA AGAAGAGACG ATGGGTTACC TTCTGCTCTG 1260
CAGAATGGCC AACCTTTAAC GTCGGATGGC CGCGAGACGG CACCTTTAAC CGAGACCTCA 1320
TCACCCAGGT TAAGATCAAG GTCTTTTCAC CTGGCCCGCA TGGACACCCA GACCAGGTCC 1380
CCTACATCGT GACCTGGGAA GCCTTGGCTT TTGACCCCCC TCCCTGGGTC AAGCCCTTTG 1440
TACACCCTAA GCCTCCGCCT CCTCTTCCTC CATCCGCCCC GTCTCTCCCC CTTGAACCTC 1500
CTCTTTTCGAC CCCGCCTCGA TCCTCCCTTT ATCCAGCCCT CACTCCTTCT CTAGGCGGCT 1560
CCACCGCGGT GGCGGCCGCT CTAGAACTAG TGGATCCAAG CTTATCGATA GGCCTAGGCC 1620
TATCGATAGG CCTAGGCCTA TCGATAGGCC TAACACGAGC CATAGATAGA ATAAAAGATT 1680
TTATTTAGTC TCCAGAAAAA GGGGGGAATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT TGGCAAGCTA 1740
GAGTCGCTTA GCCTGATAGC CGCAGTAACG CCATTTTGCA AGGCATGGAA AAATACCAAA 1800
CCAAGAATAG GGAAGTTCAG ATCAAGGGCG GGTACATGAA AATAGCTAAC GTTGGGCCAA 1860

ACAGGATATC TGCGGTGAGC AGTTTCGGCC CCGGCCCCGGG GCAAGAACAG ATGGTCACCG 1920
CAGTTTCGGC CCCGGCCCGA GGCCAAGAAC AGATGGTCCC CAGATATGGC CCAACCCTCA 1980
GCAGTTTCTT AAGACCCATC AGATGTTTCC AGGCTCCCCC AAGGACCTGA AATGACCCTG 2040
CGCCTTATTT GAATTAACCA ATCAGCCTGC TTCTCGCTTC TGTTCGCGCG CTTCTGCTTC 2100
CCGAGCTCTA TAAAAGAGCT CACAACCCCT CACTCGGCGC GCCAGTCCTC CGATTGACTG 2160
AGTCGCCCCG GTACCCGTGT TCTCAATAAA CCCTCTTGCA GTTGCATCCG ACTCGTGGTC 2220
TCGCTGTTCC TTGGGAGGGT CTCCTCTGAG TGATTGACTA CCCGTCAGCG GGGGTCTTTC 2280
AGTTTCTCCC ACCTACACAG GTCTACTAA CATTCCTGAT GTGCCGAGG GACTCCGTCA 2340
GCCCCGTTTG TGTTTATAAT AAAATGCAAG AACAGTGTTT CCTTCAAGCC AGACTACATC 2400
CTGACTCTCG GCTTTATAAA AGAATGTTGA AGGGCTCTGT GGACTATCTG CCACACGACT 2460
TTTAAGATTT TTATGCCTCC TGGATGAGGG ATTTAGTCAA TCTATCCTCG TCTATTTTGC 2520
TGGCTTCTCC GTATTTTAAA TTTCTAGTTT GCACTCCCTT CCTGAGAGCA CGGCGATTGC 2580
AGAGTAGTTA ATACTCTGAG GGCAGGCTTC TGTGAAAAGG TTGCCTGGGC TCAGTGTGAG 2640
ATTTTGCCAT AAAAAGGGGT CCTGCCCTG TGTACAGACA GATCGGAATC TAGAGTGCAT 2700
ACTCAGAGTC CCCGCGGTTT CGGGGCTCTG ATCTCAGGGC ATCTTTGCCT AGAGATCCTC 2760
TACGCCGGAC GCATCGTGGC CGGCATCACC GGCGCCACAG GTGCGGTTGC TGGCGCCTAT 2820
ATCGCCGACA TCACCGATGG GGAAGATCGG GCTCGCCACT TCGGGCTCAT GAGCGCTTGT 2880
TTCGGCGTGG GTATGGTGGC AGGCCCCGTG GCCGGGGGAC TGTGCGCGC CATCTCCTTG 2940
CATGCACCAT TCCTTGCGGC GCGGTGCTC AACGGCCTCA ACCTACTACT GGGCTGCTTC 3000
CTAATGCAGG AGTCGCATAA GGGAGAGCGT CCTGCATTAA TGAATCGGCC AACGCGCGGG 3060
GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GCGCTCTTC CGCTTCCTCG CTCCTGACT CGCTGCGCTC 3120
GGTCGTTTCG CTGCGGCGAG CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC 3180
AGAATCAGGG GATAACGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAAA AGGCCAGGAA 3240
CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG ACGAGCATCA 3300
CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA GGACTATAAA GATACCAGGC 3360
GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCCTC TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCGGATA 3420
CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT CGGGAAGCGT GGCGCTTTCT CAATGCTCAC GCTGTAGGTA 3480
TCTCAGTTCG GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCGTTCA 3540

GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAAC TA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG TAAGACACGA 3600
CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG 3660
TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA CTACGGCTAC ACTAGAAGGA CAGTATTTGG 3720
TATCTGCGCT CTGCTGAAGC CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG 3780
CAAACAAACC ACCGCTGGTA GCGGTGGTTT TTTTGTTC AAGCAGCAGA TTACGCGCAG 3840
AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT CTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA 3900
CGAAAACTCA CGTTAAGGGA TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT 3960
CCTTTTAAAT TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAACCTGGTC 4020
TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC TATTTCTGTT 4080
ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG ATACGGGAGG GCTTACCATC 4140
TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC 4200
AATAAACCAG CCAGCCGGAA GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC 4260
CATCCAGTCT ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT 4320
GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT TTGGTATGGC 4380
TTCATTCAGC TCCGGTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA TGATCCCCCA TGTTGTGCAA 4440
AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT CGTTGTCAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT 4500
ATCACTCATG GTTATGGCAG CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG 4560
CTTTTCTGTG ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC 4620
GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA GAACTTTAAA 4680
AGTGCTCATC ATTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACTC TCAAGGATCT TACCGCTGTT 4740
GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT 4800
CACCAGCGTT TCTGGGTGAG CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG 4860
GGCGACACGG AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA 4920
TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA ATAAACAAAT 4980
AGGGGTTCCG CGCACATTTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAC GTCTAAGAAA CCATTATTAT 5040
CATGACATTA ACCTATAAAA ATAGGCGTAT CACGAGGCC TTTCTGCTCG CGCGTTTCGG 5100
TGATGACGGT GAAAACCTCT GACACATGCA GCTCCCGGAG ACGGTCACAG CTTGTCTGTA 5160

- 27 -

AGCGGATGCC GGGAGCAGAC AAGCCCGTCA GGGCGCGTCA GCGGGTGTG GCGGGTGTG 5220
 GGGCTGGCTT AACTATGCGG CATCAGAGCA GATTGTACTG AGAGTGCACC ATATGCGGTG 5280
 TGAAATACCG CACAGATGCG TAAGGAGAAA ATACCGCATC AGG 5323

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5294 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

CGATTAGTCC AATTTGTTAA AGACAGGATA TCAGGTGGTC CAGGCTCTAG TTTTGACTCA 60
 ACAATATCAC CAGCTGAAGC CTATAGAGTA CGAGCCATAG ATAGAATAAA AGATTTTATT 120
 TAGTCTCCAG AAAAAGGGGG GAATGAAAGA CCCACCTGT AGGTTTGGCA AGCTAGCTTA 180
 AGTAACGCCA TTTTGCAAGG CATGGAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA GTTCAGATCA 240
 AGGTTAGGAA CAGAGAGACA GCAGAATATG GGCCAAACAG GATATCTGTG GTAAGCAGTT 300
 CCTGCCCCGC TCAGGGCCAA GAACAGATGG TCCCAGATG CGGTCCCGCC CTCAGCAGTT 360
 TCTAGAGAAC CATCAGATGT TTCCAGGGTG CCCAAGGAC CTGAAAATGA CCCTGTGCCT 420
 TATTTGAACT AACCAATCAG TTCGCTTCTC GCTTCTGTTC GCGCGCTTCT GCTCCCCGAG 480
 CTCAATAAAA GAGCCCACAA CCCCTCACTC GGCGCGCCAG TCCTCCGATT GACTGCGTCG 540
 CCCGGGTACC CGTATTCCCA ATAAAGCCTC TTGCTGTTTG CATCCGAATC GTGGACTCGC 600
 TGATCCTTGG GAGGGTCTCC TCAGATTGAT TGA CTGCCCCA CCTCGGGGGT CTTTCATTTG 660
 GAGGTTCCAC CGAGATTGAG AGACCCCAGC CCAGGGACCA CCGACCCCCC CGCCGGGAGG 720
 TAAGCTGGCC AGCAACTTAT CTGTGTCTGT CCGATTGTCT AGTGTCTATG TTTGATGTTA 780
 TGCGCCTGCG TCTGTACTAG TTAGCTAACT AGCTCTGTAT CTGGCGGACC CGTGGTGGAA 840
 CTGACGAGTT CTGAACACCC GGCCGCAACC CTGGGAGACG TCCCAGGGAC TTTGGGGGCC 900
 GTTTTTGTGG CCCGACCTGA GGAAGGGAGT CGATGTGGAA TCCGACCCCG TCAGGATATG 960
 TGGTTCTGGT AGGAGACGAG AACCTAAAC AGTTCCCGCC TCCGTCTGAA TTTTGTCTTT 1020
 CGGTTTGGAA CCGAAGCCGC GCGTCTTGTC TGCTGCAGCA TCGTTCTGTG TTGTCTCTGT 1080

- 28 -

CTGACTGTGT TTCTGTATTT GTCTGAAAAT TAGGGCCAGA CTGTTACCAC TCCCTTAAGT 1140
TTGACCTTAG ATCACTGGAA AGATGTCGAG CGGATCGCTC ACAACCAGTC GGTAGATGTC 1200
AAGAAGAGAC GATGGGTTAC CTTCTGCTCT GCAGAATGGC CAACCTTTAA CGTCGGATGG 1260
CCGCGAGACG GCACCTTTAA CCGAGACCTC ATCACCAGG TTAAGATCAA GGTCTTTTCA 1320
CCTGGCCCGC ATGGACACCC AGACCAGGTC CCCTACATCG TGACCTGGGA AGCCTTGGCT 1380
TTTGACCCCC CTCCCTGGGT CAAGCCCTTT GTACACCCTA AGCCTCCGCC TCCTCTTCCT 1440
CCATCCGCCC CGTCTCTCCC CTTGAACCT CCTCTTTCGA CCCC GCCTCG ATCCTCCCTT 1500
TATCCAGCCC TCACTCCTTC TCTAGGCGGC TCCACCGCGG TGGCGGCCGC TCTAGAACTA 1560
GTGGATCCAA GCTTATCGAT AGGCCTAGGC CTATCGATAG GCCTAGGCCT ATCGATAGGC 1620
CTAACACGAG CCATAGATAG AATAAAAGAT TTTATTTAGT CTCCAGAAAA AGGGGGGAAT 1680
GAAAGACCCC ACCTGTAGGT TTGGCAAGCT AGAGTCGCTT AGCCTGATAG CCGCAGTAAC 1740
GCCATTTTGC AAGGCATGGA AAAATACCAA ACCAAGAATA GGGAAGTTCA GATCAAGGGC 1800
GGGTACATGA AAATAGCTAA CGTTGGGCCA AACAGGATAT CTGCGGTGAG CAGTTTCGGC 1860
CCCGGCCCGG GGCAAGAACA GATGGTCACC GCAGTTTCGG CCCC GGCCCG AGGCCAAGAA 1920
CAGATGGTCC CCAGATATGG CCCAACCCTC AGCAGTTTCT TAAGACCCAT CAGATGTTTC 1980
CAGGCTCCCC CAAGGACCTG AAATGACCCT GCGCCTTATT TGAATTAACC AATCAGCCTG 2040
CTTCTCGCTT CTGTTGCGGC GCTTCTGCTT CCCGAGCTCT ATAAAAGAGC TCACAACCCC 2100
TCACTCGGCG CGCCAGTCCT CCGATTGACT GAGTCGCCCC GGTACCCGTG TTCTCAATAA 2160
ACCCTCTTGC AGTTGCATCC GACTCGTGGT CTCGCTGTTT CTTGGGAGGG TCTCCTCTGA 2220
GTGATTGACT ACCCGTCAGC GGGGGTCTTT CAGTTTCTCC CACCTACACA GGTCTCACTA 2280
ACATTCTTGA TGTGCCGCAG GGACTCCGTC AGCCCGGTTT GTGTTTATAA TAAAATGCAA 2340
GAACAGTGTT CCCTTCAAGC CAGACTACAT CCTGACTCTC GGCTTTATAA AAGAATGTTG 2400
AAGGGCTCTG TGGACTATCT GCCACACGAC TTTTAAGATT TTTATGCCTC CTGGATGAGG 2460
GATTTAGTCA ATCTATCCTC GTCTATTTTG CTGGCTTCTC CGTATTTTAA ATTTCTAGTT 2520
TGCACTCCCT TCCTGAGAGC ACGGCGATTG CAGAGTAGTT AATACTCTGA GGGCAGGCTT 2580
CTGTGAAAAG GTTGCCTGGG CTCAGTGTGA GATTTTGCCA TAAAAGGGG TCCTGCCCCCT 2640
GTGTACAGAC AGATCGGAAT CTAGAGTGCA TACTCAGAGT CCCC GCGGTT CCGGGGCTCT 2700

GATCTCAGGG CATCTTTGCC TAGAGATCCT CTACGCCGGA CGCATCGTGG CCGGCATCAC 2760
CGGCGCCACA GGTGCGGTTG CTGGCGCCTA TATCGCCGAC ATCACCGATG GGGAAGATCG 2820
GGCTCGCCAC TTCGGGCTCA TGAGCGCTTG TTTCGGCGTG GGTATGGTGG CAGGCCCCGT 2880
GGCCGGGGGA CTGTTGGGCG CCATCTCCTT GCATGCACCA TTCCTTGCGG CGGCGGTGCT 2940
CAACGGCCTC AACCTACTAC TGGGCTGCTT CCTAATGCAG GAGTCGCATA AGGGAGAGCG 3000
TCCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT 3060
CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTCGTTCG GCTGCGGCGA GCGGTATCAG 3120
CTCACTCAAA GGCGGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA GGAAAGAACA 3180
TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT 3240
TCCATAGGCT CCGCCCCCTT GACGAGCATC ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC 3300
GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT 3360
CTCCTGTTCC GACCCTGCCG CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG 3420
TGGCGCTTTC TCAATGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC GTTCGCTCCA 3480
AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCGTTT AGCCCGACCG CTGCGCCTTA TCCGGTAACT 3540
ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA 3600
ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA 3660
ACTACGGCTA CACTAGAAGG ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT 3720
TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT AGCGGTGGTT 3780
TTTTTGT TTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA 3840
TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGGA ACGAAACTC ACGTTAAGGG ATTTTGGTCA 3900
TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA TTAAAAATGA AGTTTTAAAT 3960
CAATCTAAAG TATATATGAG TAACTTGGT CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG 4020
CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTTCTGT CATCCATAGT TGCCTGACTC CCCGTCGTGT 4080
AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG 4140
ACCCACGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACCA GCCAGCCGGA AGGGCCGAGC 4200
GCAGAAGTGG TCCTGCAACT TTATCCGCCT CCATCCAGTC TATTAATTGT TGCCGGGAAG 4260
CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT TGCGCAACGT TGTGCGCATT GCTACAGGCA 4320
TCGTGGTGTC ACGCTCGTCG TTTGGTATGG CTTCAATCAG CTCCGGTTCC CAACGATCAA 4380

- 30 -

GGCGAGTTAC ATGATCCCCC ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCCTTC GGTCTCCGA 4440
TCGTTGTCAG AAGTAAGTTG GCCGCAGTGT TATCACTCAT GGTTATGGCA GCACTGCATA 4500
ATTCTCTTAC TGTCATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGGTGAG TACTCAACCA 4560
AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGGCGAC CGAGTTGCTC TTGCCCCGGC TCAATACGGG 4620
ATAATACCGC GCCACATAGC AGAACTTTAA AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTTCGG 4680
GGCGAAAACT CTCAAGGATC TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG 4740
CACCCAACCTG ATCTTCAGCA TCTTTTACTT TCACCAGCGT TTCTGGGTGA GCAAAAACAG 4800
GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG GAAATGTTGA ATACTCATAC 4860
TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATTT ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA 4920
TATTTGAATG TATTTAGAAA AATAAACAAA TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAAAG 4980
TGCCACCTGA CGTCTAAGAA ACCATTATTA TCATGACATT AACCTATAAA AATAGGCGTA 5040
TCACGAGGCC CTTTCGTCTC GCGCGTTTCG GTGATGACGG TGAAAACCTC TGACACATGC 5100
AGCTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT AAGCGGATGC CGGGAGCAGA CAAGCCCGTC 5160
AGGGCGCGTC AGCGGGTGTT GCGGGGTGTC GGGGCTGGCT TAACTATGCG GCATCAGAGC 5220
AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC GTAAGGAGAA 5280
AATACCGCAT CAGG 5294

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5292 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

CGATTAGTCC AATTTGTTAA AGACAGGATA TCAGGTGGTC CAGGCTCTAG TTTTGACTCA 60
ACAATATCAC CAGCTGAAGC CTATAGAGTA CGAGCCATAG ATAGAATAAA AGATTTTATT 120
TAGTCTCCAG AAAAAGGGGG GAATGAAAGA CCCACCTGT AGGTTTGGCA AGCTAGCTTA 180
AGTAACGCCA TTTTGCAAGG CATGGAAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA GTTCAGATCA 240

AGGTTAGGAA CAGAGAGACA GCAGAATATG GGCCAAACAG GATATCTGTG GTAAGCAGTT 300
 CCTGCCCCGC TCAGGGCCAA GAACAGATGG TCCCCAGATG CGGTCCCGCC CTCAGCAGTT 360
 TCTAGAGAAC CATCAGATGT TTCCAGGGTG CCCCAGGAC CTGAAAATGA CCCTGTGCCT 420
 TATTTGAACT AACCAATCAG TTCGCTTCTC GCTTCTGTTC GCGCGCTTCT GCTCCCCGAG 480
 CTCAATAAAA GAGCCCACAA CCCCTCACTC GGCGCGCCAG TCCTCCGATT GACTGCGTCG 540
 CCCGGGTACC GTATTCCCAA TAAAGCCTCT TGCTGTTTGC ATCCGAATCG TGGTCTCGCT 600
 GTTCCTTGGG AGGGTCTCCT CTGAGTGATT GACTACCCAC GACGGGGGTC TTTCATTTGG 660
 GGGCTCGTCC GGGATTTGGA GACCCCTGCC CAGGGACCAC CGACCCACCA CCGGGAGGTA 720
 AGCTGGCCAG CAACTTATCT GTGTCTGTCC GATTGTCTAG TGTCTATGTT TGATGTTATG 780
 CGCCTGCGTC TGTA TAGT AGCTAACTAG CTCTGTATCT GGCGGACCCG TGGTGGA ACT 840
 GACGAGTTCT GAACACCCGG CCGCAACCTT GGGAGACGTC CCAGGGACTT TGGGGGCCGT 900
 TTTTGTGGCC CGACCTGAGG AAGGGAGTCG ATGTGGAATC CGACCCCGTC AGGATATGTG 960
 GTTCTGGTAG GAGACGAGAA CCTAAAACAG TTCCCGCCTC CGTCTGAATT TTTGCTTTTCG 1020
 GTTTGGAACC GAAGCCGCGC GTCTTGTCTG CTGCAGCATC GTTCTGTGTT GTCTCTGTCT 1080
 GACTGTGTTT CTGTATTTGT CTGAAAATTA GGGCCAGACT GTTACCACTC CCTTAAGTTT 1140
 GACCTTAGAT CACTGGAAAG ATGTCGAGCG GATCGCTCAC AACCAGTCGG TAGATGTCAA 1200
 GAAGAGACGA TGGGTTACCT TCTGCTCTGC AGAATGGCCA ACCTTTAACG TCGGATGGCC 1260
 GCGAGACGGC ACCTTTAACC GAGACCTCAT CACCCAGGTT AAGATCAAGG TCTTTTCACC 1320
 TGGCCCGCAT GGACACCCAG ACCAGGTCCC CTACATCGTG ACCTGGGAAG CCTTGGCTTT 1380
 TGACCCCCCT CCCTGGGTCA AGCCCTTTGT ACACCCTAAG CCTCCGCCTC CTCTTCCTCC 1440
 ATCCGCCCCG TCTCTCCCCC TTGAACCTCC TCTTTCGACC CCGCCTCGAT CCTCCCTTTA 1500
 TCCAGCCCTC ACTCCTTCTC TAGGCGGCTC CACCGCGGTG GCGGCCGCTC TAGAACTAGT 1560
 GGATCCAAGC TTATCGATAG GCCTAGGCCT ATCGATAGGC CTAGGCCTAT CGATAGGCCT 1620
 AACACGAGCC ATAGATAGAA TAAAGATTT TATTTAGTCT CCAGAAAAAG GGGGGAATGA 1680
 AAGACCCAC CTGTAGGTTT GGCAAGCTAG AGTCGCTTAG CCTGATAGCC GCAGTAACGC 1740
 CATTTTGCAA GGCATGGAAA AATACCAAAC CAAGAATAGG GAAGTTCAGA TCAAGGGCGG 1800
 GTACATGAAA ATAGCTAACG TTGGGCCAAA CAGGATATCT GCGGTGAGCA GTTTCGGCCC 1860
 CGGCCCGGGG CAAGAACAGA TGGTCACCGC AGTTTCGGCC CCGGCCCGAG GCCAAGAACA 1920

GATGGTCCCC AGATATGGCC CAACCCTCAG CAGTTTCTTA AGACCCATCA GATGTTTCCA 1980
GGCTCCCCCA AGGACCTGAA ATGACCCTGC GCCTTATTTG AATTAACCAA TCAGCCTGCT 2040
TCTCGCTTCT GTTCGCGCGC TTCTGCTTCC CGAGCTCTAT AAAAGAGCTC ACAACCCCTC 2100
ACTCGGCGCG CCAGTCCTCC GATTGACTGA GTCGCCCCGG TACCCGTGTT CTCAATAAAC 2160
CCTCTTGACG TTGCATCCGA CTCGTGGTCT CGCTGTTCCCT TGGGAGGGTC TCCTCTGAGT 2220
GATTGACTAC CCGTCAGCGG GGGTCTTTCA GTTTCTCCCA CCTACACAGG TCTCACTAAC 2280
ATTCCGTGATG TGCCGCAGGG ACTCCGTCAG CCCGGTTTGT GTTTATAATA AAATGCAAGA 2340
ACAGTGTTCC CTTCAAGCCA GACTACATCC TGACTCTCGG CTTTATAAAA GAATGTTGAA 2400
GGGCTCTGTG GACTATCTGC CACACGACTT TTAAGATTTT TATGCCTCCT GGATGAGGGA 2460
TTTAGTCAAT CTATCCTCGT CTATTTTGCT GGCTTCTCCG TATTTTAAAT TTCTAGTTTG 2520
CACTCCCTTC CTGAGAGCAC GCGGATTGCA GAGTAGTTAA TACTCTGAGG GCAGGCTTCT 2580
GTGAAAAGGT TGCCTGGGCT CAGTGTGAGA TTTTGCCATA AAAAGGGGTC CTGCCCCCTGT 2640
GTACAGACAG ATCGGAATCT AGAGTGCATA CTCAGAGTCC CCGCGGTTCC GGGGCTCTGA 2700
TCTCAGGGCA TCTTTGCCTA GAGATCCTCT ACGCCGGACG CATCGTGGCC GGCATCACCG 2760
GCGCCACAGG TGCGGTTGCT GCGGCCTATA TCGCCGACAT CACCGATGGG GAAGATCGGG 2820
CTCGCCACTT CGGGCTCATG AGCGCTTGTT TCGGCGTGGG TATGGTGGCA GGCCCCGTGG 2880
CCGGGGGACT GTTGGGCGCC ATCTCCTTGC ATGCACCATT CCTTGCGGCG GCGGTGCTCA 2940
ACGGCCTCAA CCTACTACTG GGCTGCTTCC TAATGCAGGA GTCGCATAAG GGAGAGCGTC 3000
CTGCATTAAT GAATCGGCCA ACGCGCGGGG AGAGGCGGTT TGCGTATTGG GCGCTCTTCC 3060
GCTTCCTCGC TCACTGACTC GCTGCGCTCG GTCGTTCCGGC TGCGGCGAGC GGTATCAGCT 3120
CACTCAAAGG CGGTAATACG GTTATCCACA GAATCAGGGG ATAACGCAGG AAAGAACATG 3180
TGAGCAAAAAG GCCAGCAAAA GGCCAGGAAC CGTAAAAAGG CCGCGTTGCT GGCGTTTTTC 3240
CATAGGCTCC GCCCCCTGA CGAGCATCAC AAAAATCGAC GCTCAAGTCA GAGGTGGCGA 3300
AACCCGACAG GACTATAAAG ATACCAGGCG TTTCCCCCTG GAAGCTCCCT CGTGCGCTCT 3360
CCTGTTCCGA CCCTGCCGCT TACCGGATAC CTGTCCGCCT TTCTCCCTTC GGAAGCGTG 3420
GCGCTTTCTC AATGCTCACG CTGTAGGTAT CTCAGTTCGG TGTAGGTCGT TCGCTCCAAG 3480
CTGGGCTGTG TGCACGAACC CCCC GTTCAG CCCGACCGCT GCGCCTTATC CGGTAACAT 3540

CGTCTTGAGT CCAACCCGGT AAGACACGAC TTATCGCCAC TGGCAGCAGC CACTGGTAAC 3600
AGGATTAGCA GAGCGAGGTA TGTAGGCGGT GCTACAGAGT TCTTGAAGTG GTGGCCTAAC 3660
TACGGCTACA CTAGAAGGAC AGTATTTGGT ATCTGCGCTC TGCTGAAGCC AGTTACCTTC 3720
GGAAAAAGAG TTGGTAGCTC TTGATCCGGC AAACAAACCA CCGCTGGTAG CGGTGGTTTTT 3780
TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT CTCAAGAAGA TCCTTTGATC 3840
TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC GAAAACTCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG 3900
AGATTATCAA AAAGGATCTT CACCTAGATC CTTTTAAATT AAAAATGAAG TTTTAAATCA 3960
ATCTAAAGTA TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA 4020
CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTTCGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC CGTCGTGTAG 4080
ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG CTGCAATGAT ACCGCGAGAC 4140
CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC 4200
AGAAGTGGTC CTGCAACTTT ATCCGCCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT 4260
AGAGTAAAGTA GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC 4320
GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTCAGCT CCGGTTCCCA ACGATCAAGG 4380
CGAGTTACAT GATCCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA GTCCTTCGG TCCTCCGATC 4440
GTTGTCAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT 4500
TCTCTTACTG TCATGCCATC CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG 4560
TCATTCTGAG AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT 4620
AATACCGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG TTCTTCGGGG 4680
CGAAAACCTCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT CGATGTAACC CACTCGTGCA 4740
CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC ACCAGCGTTT CTGGGTGAGC AAAAACAGGA 4800
AGGCAAAATG CCGCAAAAAA GGAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC 4860
TTCCTTTTTT AATATTATTG AAGCATTTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA 4920
TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCGCG GCACATTTCC CCGAAAAGTG 4980
CCACCTGACG TCTAAGAAAC CATTATTATC ATGACATTAA CCTATAAAAA TAGGCGTATC 5040
ACGAGGCCCT TTCGTCTCGC GCGTTTCGGT GATGACGGTG AAAACCTCTG ACACATGCAG 5100
CTCCCGGAGA CGGTCACAGC TTGTCTGTAA GCGGATGCCG GGAGCAGACA AGCCCGTCAG 5160
GGCGCGTCAG CGGGTGTGG GGGTGTCTCGG GGCTGGCTTA ACTATGCGGC ATCAGAGCAG 5220

- 34 -

ATTGTACTGA GAGTGCACCA TATGCGGTGT GAAATACCGC ACAGATGCGT AAGGAGAAAA 5280
TACCGCATCA GG 5292

(2) INFORMATION ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 5364 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

CGATTAGTCC AATTTGTTAA AGACAGGATA TCAGGTGGTC CAGGCTCTAG TTTTGACTCA 60
ACAATATCAC CAGCTGAAGC CTATAGAGTA CGAGCCATAG ATAGAATAAA AGATTTTATT 120
TAGTCTCCAG AAAAAGGGGG GAATGAAAGA CCCCACCTGT AGGTTTGGCA AGCTAGCTTA 180
AGTAACGCCA TTTTGCAAGG CATGGAAAAT ACATAACTGA GAATAGAGAA GTTCAGATCA 240
AGGTTAGGAA CAGAGAGACA GCAGAATATG GGCCAAACAG GATATCTGTG GTAAGCAGTT 300
CCTGCCCCGC TCAGGGCCAA GAACAGATGG TCCCCAGATG CCGTCCCGCC CTCAGCAGTT 360
TCTAGAGAAC CATCAGATGT TTCCAGGGTG CCCCAAGGAC CTGAAAATGA CCCTGTGCCT 420
TATTTGAACT AACCAATCAG TTCGCTTCTC GCTTCTGTTC GCGCGTTCT GCTCCCCGAG 480
CTCAATAAAA GAGCCCACAA CCCCTCACTC GGCGCGCCAG TCCTCCGATT GACTGCGTCG 540
CCCGGGTACC CGTATTCCCA ATAAAGCCTC TTGCTGTTTG CATCCGAATC GTGGACTCGC 600
TGATCCTTGG GAGGGTCTCC TCAGATTGAT TGACTGCCCA CCTCGGGGGT CTTTCATTTG 660
GAGGTTCCAC CGAGATTTGG AGACCCCAGC CCAGGGACCA CCGACCCCCC CGCCGGGAGG 720
TAAGCTGGCC AGCGGTGCGT TCGTGTCTGT CTCTGTCTTT GTGCGTGTTT GTGCCGGCAT 780
CTAATGTTTG CGCCTGCGTC TGTACTAGTT GGCTAACTAG ATCTGTATCT GGCGGTCCCG 840
CGGAAGAACT GACGAGTTCG TATTCCCGGC CGCAGCCCCT AGGAGACGTC CCAGCGGCCT 900
CGGGGGCCCG TTTTGTGGCC CGTTCTGTGT CGTTAACCAC CCGAGTCGGA CTTTTTGGAG 960
CTCCGCCACT GTCCGAGGGG TACGTGGCTT TGTTGGGGGA CGAGAGACAG AGACACTTCC 1020
CGCCCCCGTC TGAATTTTTG CTTTCGGTTT TACGCCGAAA CCGCGCCGCG CGTCTTGTCT 1080

GCTGCAGCAT CGTTCTGTGT TGTCTCTGTC TGACTGTGTT TCTGTATTTG TCTGAAAATT 1140
AGGGCCAGAC TGTTACCACT CCCTTAAGTT TGACCTTAGA TCACTGGAAA GATGTCGAGC 1200
GGATCGCTCA CAACCAGTCG GTAGATGTCA AGAAGAGACG ATGGGTTACC TTCTGCTCTG 1260
CAGAATGGCC AACCTTTAAC GTCGGATGGC CGCGAGACGG CACCTTTAAC CGAGACCTCA 1320
TCACCCAGGT TAAGATCAAG GTCTTTTCAC CTGGCCCCGA TGGACACCCA GACCAGGTCC 1380
CCTACATCGT GACCTGGGAA GCCTTGGCTT TTGACCCCCC TCCCTGGGTC AAGCCCTTTG 1440
TACACCCTAA GCCTCCGCCT CCTCTTCCTC CATCCGCCCC GTCTCTCCCC CTTGAACCTC 1500
CTCTTTCGAC CCCGCCTCGA TCCTCCCTTT ATCCAGCCCT CACTCCTTCT CTAGGCGGCT 1560
CCACCGCGGT GGCGGCCGCT CTAGAAGTAG TGGATCCAAG CTTATCGATA GGCCTAGGCC 1620
TATCGATAGG CCTAGGCCTA TCGATAGGCC TAACACGAGC CATAGATAGA ATAAAAGATT 1680
TTATTTAGTC TCCAGAAAAA GGGGGGAATG AAAGACCCCA CCTGTAGGTT TGGCAAGCTA 1740
GAGTCGCTTA GCCTGATAGC CGCAGTAACG CCATTTTGCA AGGCATGGAA AAATACCAAA 1800
CCAAGAATAG GGAAGTTCAG ATCAAGGGCG GTACATGAA AATAGCTAAC GTTGGGCCAA 1860
ACAGGATATC TGCGGTGAGC AGTTTCGGCC CCGGCCCGGG GCAAGAACAG ATGGTCACCG 1920
CAGTTTCGGC CCCGGCCCGG GCCAAGAACA GATGGTCACC GCAGTTTCGG CCCCGGCCCG 1980
GGGCCAAGAA CAGATGGTCC CCAGATATGG CCCAACCCTC AGCAGTTTCT TAAGACCCAT 2040
CAGATGTTTC CAGGCTCCCC CAAGGACCTG AAATGACCCT GCGCCTTATT TGAATTAACC 2100
AATCAGCCTG CTTCTCGCTT CTGTTCGCGC GCTTCTGCTT CCCGAGCTCT ATAAAAGAGC 2160
TCACAACCCC TCACTCGGCG CGCCAGTCCT CCGATTGACT GAGTCGCCCC GGTACCCGTG 2220
TTCTCAATAA ACCCTCTTGC AGTTGCATCC GACTCGTGGT CTCGCTGTTT CTTGGGAGGG 2280
TCTCCTCTGA GTGATTGACT ACCCGTCAGC GGGGGTCTTT CAGTTTCTCC CACCTACACA 2340
GGTCTCACTA ACATTCTGA TGTGCCGAG GGAATCCGTC AGCCCGGTTT GTGTTTATAA 2400
TAAAATGCAA GAACAGTGTT CCCTTCAAGC CAGACTACAT CCTGACTCTC GGCTTTATAA 2460
AAGAATGTTG AAGGGCTCTG TGGACTATCT GCCACACGAC TTTTAAGATT TTTATGCCTC 2520
CTGGATGAGG GATTTAGTCA ATCTATCCTC GTCTATTTTG CTGGCTTCTC CGTATTTTAA 2580
ATTTCTAGTT TGCACTCCCT TCCTGAGAGC ACGGCGATTG CAGAGTAGTT AATACTCTGA 2640
GGGCAGGCTT CTGTGAAAAG GTTGCCTGGG CTCAGTGTGA GATTTTGCCA TAAAAGGGG 2700
TCCTGCCCCT GTGTACAGAC AGATCGGAAT CTAGAGTGCA TACTCAGAGT CCCCGCGGTT 2760

- 36 -

CCGGGGCTCT GATCTCAGGG CATCTTTGCC TAGAGATCCT CTACGCCGGA CGCATCGTGG 2820
CCGGCATCAC CGGCGCCACA GGTGCGGTTG CTGGCGCCTA TATCGCCGAC ATCACCGATG 2880
GGGAAGATCG GGCTCGCCAC TTCGGGCTCA TGAGCGCTTG TTTCGGCGTG GGTATGGTGG 2940
CAGGCCCCGT GGCCGGGGGA CTGTTGGGCG CCATCTCCTT GCATGCACCA TTCCTTGCGG 3000
CGGCGGTGCT CAACGGCCTC AACCTACTAC TGGGCTGCTT CCTAATGCAG GAGTCGCATA 3060
AGGGAGAGCG TCCTGCATTA ATGAATCGGC CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT 3120
GGGCGCTCTT CCGCTTCCTC GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTGCTTCG GCTGCGGCGA 3180
GCGGTATCAG CTCACTCAA GCGGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA 3240
GGAAAGAACA TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA GGCCGCGTTG 3300
CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCT GACGAGCATC ACAAAAATCG ACGCTCAAGT 3360
CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA AGATACCAGG CGTTTCCCC TGGGAAGCTCC 3420
CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC GACCCTGCCG CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT 3480
TCGGGAAGCG TGGCGCTTTC TCAATGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC 3540
GTTGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCGTTT AGCCCGACCG CTGCGCCTTA 3600
TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG ACTTATCGCC ACTGGCAGCA 3660
GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG 3720
TGGTGGCCTA ACTACGGCTA CACTAGAAGG ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG 3780
CCAGTTACCT TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT 3840
AGCGGTGGTT TTTTTGTTTG CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA 3900
GATCCTTTGA TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGGA ACGAAAATC ACGTTAAGGG 3960
ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA TTAAAAATGA 4020
AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG TAACTTGGT CTGACAGTTA CCAATGCTTA 4080
ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT CTATTTTCGTT CATCCATAGT TGCCTGACTC 4140
CCCGTCGTGT AGATAACTAC GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG 4200
ATACCGCGAG ACCCACGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACCA GCCAGCCGGA 4260
AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTGCAACT TTATCCGCCT CCATCCAGTC TATTAATTGT 4320
TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT TGCGCAACGT TGTGCCATT 4380

- 37 -

GCTACAGGCA TCGTGGTGTC ACGCTCGTCG TTTGGTATGG CTTTCATTCAG CTCCGGTTCC 4440
 CAACGATCAA GGCGAGTTAC ATGATCCCCC ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCCTTC 4500
 GGTCTCCGA TCGTTGTCAG AAGTAAGTTG GCCGCAGTGT TATCACTCAT GGTTATGGCA 4560
 GCACTGCATA ATTCTCTTAC TGTCATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT GACTGGTGAG 4620
 TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGGCGAC CGAGTTGCTC TTGCCCCGGC 4680
 TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC AGAACTTTAA AAGTGCTCAT CATTGGAAAA 4740
 CGTTCTTCGG GGCGAAAACT CTCAAGGATC TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTCGATGTAA 4800
 CCCACTCGTG CACCCAACTG ATCTTCAGCA TCTTTTACTT TCACCAGCGT TTCTGGGTGA 4860
 GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG GAAATGTTGA 4920
 ATACTCATAC TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATTT ATCAGGGTTA TTGTCTCATG 4980
 AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA AATAAACAAA TAGGGGTTCC GCGCACATTT 5040
 CCCCCAAAAG TGCCACCTGA CGTCTAAGAA ACCATTATTA TCATGACATT AACCTATAAA 5100
 AATAGGCGTA TCACGAGGCC CTTTCGTCTC GCGCGTTTCG GTGATGACGG TGAAAACCTC 5160
 TGACACATGC AGCTCCCGGA GACGGTCACA GCTTGTCTGT AAGCGGATGC CGGGAGCAGA 5220
 CAAGCCCGTC AGGGCGCGTC AGCGGGTGTT GGCGGGTGTC GGGGCTGGCT TAACTATGCG 5280
 GCATCAGAGC AGATTGTACT GAGAGTGCAC CATATGCGGT GTGAAATACC GCACAGATGC 5340
 GTAAGGAGAA AATACCGCAT CAGG 5364

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 6505 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

TCGAGGGGGG GCCCGGTACC GATTAGTCCA ATTTGTTAAA GACAGGATAT CAGGTGGTCC 60
 AGGCTCTAGT TTTGACTCAA CAATATCACC AGCTGAAGCC TATAGAGTAC GAGCCATAGA 120
 TAGAATAAAA GATTTTATTT AGTCTCCAGA AAAAGGGGGG AATGAAAGAC CCCACCTGTA 180
 GGTTCGGCAA GCTAGCTTAA GTAACGCCAT TTTGCAAGGC ATGGAAAATA CATAACTGAG 240

AATAGAGAAG TTCAGATCAA GGTTAGGAAC AGAGAGACAG CAGAATATGG GCCAAACAGG 300
ATATCTGTGG TAAGCAGTTC CTGCCCCGCT CAGGGCCAAG AACAGATGGT CCCCAGATGC 360
GGTCCCGCCC TCAGCAGTTT CTAGAGAACC ATCAGATGTT TCCAGGGTGC CCCAAGGACC 420
TGAAAATGAC CCTGTGCCTT ATTTGAACTA ACCAATCAGT TCGCTTCTCG CTTCTGTTCG 480
CGCGCTTCTG CTCCCCGAGC TCAATAAAAG AGCCCACAAC CCCTCACTCG GCGCGCCAGT 540
CCTCCGATTG ACTGCGTCGC CCGGGTACCC GTATTCCCAA TAAAGCCTCT TGCTGTTTGC 600
ATCCGAATCG TGGACTCGCT GATCCTTGGG AGGGTCTCCT CAGATTGATT GACTGCCCAC 660
CTCGGGGGTC TTTCATTTGG AGGTTCACC GAGATTTGGA GACCCAGCC CAGGGACCAC 720
CGACCCCCC GCCGGGAGGT AAGCTGGCCA GCGGTCGTTT CGTGTCTGTC TCTGTCTTTG 780
TGCGTGTTTG TGCCGGCATC TAATGTTTGC GCCTGCGTCT GTACTAGTTG GCTAACTAGA 840
TCTGTATCTG GCGGTCCCGC GGAAGAACTG ACGAGTTCGT ATTCCCGGCC GCAGCCCCTA 900
GGAGACGTCC CAGCGGCCTC GGGGGCCCGT TTTGTGGCCC GTTCTGTGTC GTTAACCACC 960
CGAGTCGGAC TTTTGGAGC TCCGCCACTG TCCGAGGGT ACGTGGCTTT GTTGGGGGAC 1020
GAGAGACAGA GACACTTCCC GCCCCGTCT GAATTTTTGC TTTCGGTTTT ACGCCGAAAC 1080
CGCGCCGCGC GTCTTGCTG CTGCAGCATC GTTCTGTGTT GTCTCTGTCT GACTGTGTTT 1140
CTGTATTTGT CTGAAAATTA GGGCCAGACT GTTACCACTC CCTTAAGTTT GACCTTAGAT 1200
CACTGGAAAG ATGTCGAGCG GATCGCTCAC AACCAGTCGG TAGATGTCAA GAAGAGACGA 1260
TGGGTACCT TCTGCTCTGC AGAATGGCCA ACCTTTAACG TCGGATGGCC GCGAGACGGC 1320
ACCTTTAACC GAGACCTCAT CACCCAGGTT AAGATCAAGG TCTTTTCACC TGGCCCGCAT 1380
GGACACCCAG ACCAGGTCCC CTACATCGTG ACCTGGGAAG CCTTGGCTTT TGACCCCCCT 1440
CCCTGGGTCA AGCCCTTTGT ACACCTAAG CCTCCGCTC CTCTTCCTCC ATCCGCCCCG 1500
TCTCTCCCC TTGAACCTCC TCTTTCGACC CCGCCTCGAT CCTCCCTTTA TCCAGCCCTC 1560
ACTCCTTCTC TAGGCGGCTC CACCGCGGTG GCGGCCGATC CCCCAGGCTG CAGGAATTCG 1620
ATATCAAGCT TATCGATACC GTCGACTCTA GAGGATCCCG CCGCGGCGGG TACCGAGCTC 1680
ATTCGAGTAG CGGCTCTTCC AAGCTCAAAG AAGCAGAGGC CGCTGTTCGT TTCCTTTAGG 1740
TCTTCCACT AAAGTCGGAG TATCTTCTTC CAAGATTTCA CGTCTTGGTG GCCGTTCCAA 1800
GGAGCGCGAG GTCGGGATGG ATCTTGAAGG GGACCGCAAT GGAGGAGCAA AGAAGAAGAA 1860

CTTTTTTAAA CTGAACAATA AAAGTGAAAA AGATAAGAAG GAAAAGAAAC CAACTGTCAG 1920
TGTATTTTCA ATGTTTCGCT ATTCAAATTG GCTTGACAAG TTGTATATGG TGGTGGGAAC 1980
TTTGGCTGCC ATCATCCATG GGGCTGGACT TCCTCTCATG ATGCTGGTGT TTGGAGAAAT 2040
GACAGATATC TTTGCAAATG CAGGAAATTT AGAAGATCTG ATGTCAAACA TCACTAATAG 2100
AAGTGATATC AATGATACAG GGTTCCTTCAT GAATCTGGAG GAAGACATGA CCAGGTATGC 2160
CTATTATTAC AGTGGAATTG GTGCTGGGGT GCTGGTTGCT GCTTACATTC AGGTTTCATT 2220
TTGGTGCCCTG GCAGCTGGAA GACAAATACA CAAAATTAGA AAACAGTTTT TTCATGCTAT 2280
AATGCGACAG GAGATAGGCT GGTTTGATGT GCACGATGTT GGGGAGCTTA ACACCCGACT 2340
TACAGATGAT GTCTCTAAGA TTAATGAAGT TATTGGTGAC AAAATTGGAA TGTTCTTTCA 2400
GTCAATGGCA ACATTTTTTCA CTGGGTTTAT AGTAGGATTT ACACGTGGTT GGAAGCTAAC 2460
CCTTG TGATT TTGGCCATCA GTCCTGTTCT TGGACTGTCA GCTGCTGTCT GGGCAAAGAT 2520
ACTATCTTCA TTTACTGATA AAGAACTCTT AGCGTATGCA AAAGCTGGAG CAGTAGCTGA 2580
AGAGGTCTTG GCAGCAATTA GAACTGTGAT TGCATTTGGA GGACAAAAGA AAGAACTTGA 2640
AAGGTACAAC AAAAATTTAG AAGAAGCTAA AAGAATTGGG ATAAAGAAAG CTATTACAGC 2700
CAATATTTCT ATAGGTGCTG CTTTCCTGCT GATCTATGCA TCTTATGCTC TGGCCTTCTG 2760
GTATGGGACC ACCTTGGTCC TCTCAGGGGA ATATTCTATT GGACAAGTAC TCACTGTATT 2820
CTTTTCTGTA TTAATTGGGG CTTTTAGTGT TGGACAGGCA TCTCCAAGCA TTGAAGCATT 2880
TGCAAATGCA AGAGGAGCAG CTTATGAAAT CTTCAAGATA ATTGATAATA AGCCAAGTAT 2940
TGACAGCTAT TCGAAGAGTG GGCACAAACC AGATAATATT AAGGGAAATT TGGAAATCAG 3000
AAATGTTTAC TTCAGTTACC CATCTCGAAA AGAAGTTAAG ATCTTGAAGG GCCTGAACCT 3060
GAAGGTGCAG AGTGGGCAGA CGGTGGCCCT GGTGGAAC AGTGGCTGTG GGAAGAGCAC 3120
AACAGTCCAG CTGATGCAGA GGCTCTATGA CCCACAGAG GGGATGGTCA GTGTTGATGG 3180
ACAGGATATT AGGACCATAA ATGTAAGGTT TCTACGGGAA ATCATTGGTG TGGTGAGTCA 3240
GGAACCTGTA TTGTTTGCCA CCACGATAGC TGAAAACATT CGCTATGGCC GTGAAAATGT 3300
CACCATGGAT GAGATTGAGA AAGCTGTCAA GGAAGCCAAT GCCTATGACT TTATCATGAA 3360
ACTGCCTCAT AAATTTGACA CCCTGGTTGG AGAGAGAGGG GCCCAGTTGA GTGGTGGGCA 3420
GAAGCAGAGG ATCGCCATTG CACGTGCCCT GGTTCGCAAC CCCAAGATCC TCCTGCTGGA 3480
TGAGGCCACG TCAGCCTTGG ACACAGAAAG CGAAGCAGTG GTTCAGGTGG CTCTGGATAA 3540

GGCCAGAAAA GGTCCGACCA CCATTGTGAT AGCTCATCGT TTGTCTACAG TTCGTAATGC 3600
TGACGTCATC GCTGGTTTCG ATGATGGAGT CATTGTGGAG AAAGGAAATC ATGATGAACT 3660
CATGAAAGAG AAAGGCATTT ACTTCAAAC TGTCACAATG CAGACAGCAG GAAATGAAGT 3720
TGAATTAGAA AATGCAGCTG ATGAATCCAA AAGTGAAATT GATGCCTTGG AAATGTCTTC 3780
AAATGATTCA AGATCCAGTC TAATAAGAAA AAGATCAACT CGTAGGAGTG TCCGTGGATC 3840
ACAAGCCCCA GACAGAAAGC TTAGTACCAA AGAGGCTCTG GATGAAAGTA TACCTCCAGT 3900
TTCCTTTTGG AGGATTATGA AGCTAAATTT AACTGAATGG CCTTATTTTG TTGTTGGTGT 3960
ATTTTGTGCC ATTATAAATG GAGGCCTGCA ACCAGCATTT GCAATAATAT TTTCAAAGAT 4020
TATAGGGGTT TTTACAAGAA TTGATGATCC TGAAACAAAA CGACAGAATA GTAAC TTGTT 4080
TTCCTATTG TTTCTAGCCC TTGGAATTAT TTCTTTTATT ACATTTTTCCT TTCAGGGTTT 4140
CACATTTGGC AAAGCTGGAG AGATCCTCAC CAAGCGGCTC CGATACATGG TTTTCCGATC 4200
CATGCTCAGA CAGGATGTGA GTTGGTTTGA TGACCCTAAA AACACCACTG GAGCATTGAC 4260
TACCAGGCTC GCCAATGATG CTGCTCAAGT TAAAGGGGCT ATAGGTTCCTA GGCTTGCTGT 4320
AATTACCCAG AATATAGCAA ATCTTGGGAC AGGAATAATT ATATCCTTCA TCTATGGTTG 4380
GCAACTAACA CTGTTACTCT TAGCAATTGT ACCCATCATT GCAATAGCAG GAGTTGTTGA 4440
AATGAAAATG TTGTCTGGAC AAGCACTGAA AGATAAGAAA GAACTAGAAG GTGCTGGGAA 4500
GATCGCTACT GAAGCAATAG AAAACTTCCG AACCGTTGTT TCTTTGACTC AGGAGCAGAA 4560
GTTTGAACAT ATGTATGCTC AGAGTTTGCA GGTACCATAC AGAAACTCTT TGAGGAAAGC 4620
ACACATCTTT GGAATTACAT TTTCCCTCAC CCAGGCAATG ATGTATTTTTT CCTATGCTGG 4680
ATGTTTCCGG TTTGGAGCCT ACTTGGTGGC ACATAAACTC ATGAGCTTTG AGGATGTTCT 4740
GTTAGTATTT TCAGCTGTTG TCTTTGGTGC CATGGCCGTG GGGCAAGTCA GTTCATTTGC 4800
TCCTGACTAT GCCAAAGCCA AAATATCAGC AGCCCACATC ATCATGATCA TTGAAAAAAC 4860
CCCTTTGATT GACAGCTACA GCACGGAAGG CCTAATGCCG AACACATTGG AAGGAAATGT 4920
CACATTTGGT GAAGTTGTAT TCAACTATCC CACCCGACCG GACATCCCAG TGCTTCAGGG 4980
ACTGAGCCTG GAGGTGAAGA AGGGCCAGAC GCTGGCTCTG GTGGGCAGCA GTGGCTGTGG 5040
GAAGAGCACA GTGGTCCAGC TCCTGGAGCG GTTCTACGAC CCCTTGGCAG GGAAAGTGCT 5100
GCTTGATGGC AAAGAAATAA AGCGACTGAA TGTTCAAGTG CTCCGAGCAC ACCTGGGCAT 5160

- 41 -

```

CGTGTCCCAG GAGCCCATCC TGTGTGACTG CAGCATTGCT GAGAACATTG CCTATGGAGA 5220
CAACAGCCGG GTGGTGTACAG AGGAAGAGAT CGTGAGGGCA GCAAAGGAGG CCAACATACA 5280
TGCCTTCATC GAGTCACTGC CTAATAAATA TAGCACTAAA GTAGGAGACA AAGGAACTCA 5340
GCTCTCTGGT GGCCAGAAAC AACGCATTGC CATAGCTCGT GCCCTTGTTA GACAGCCTCA 5400
TATTTTGCTT TTGGATGAAG CCACGTCAGC TCTGGATACA GAAAGTGAAA AGGTTGTCCA 5460
AGAAGCCCTG GACAAAGCCA GAGAAGGCCG CACCTGCATT GTGATTGCTC ACCGCCTGTC 5520
CACCATCCAG AATGCAGACT TAATAGTGGT GTTTCAGAAT GGCAGAGTCA AGGAGCATGG 5580
CACGCATCAG CAGCTGCTGG CACAGAAAGG CATCTATTTT TCAATGGTCA GTGTCCAGGC 5640
TGGAACAAAG CGCCAGTGAA CTCTGACTGT ATGAGATGTT AAATACTTTT TAATGGGATC 5700
CACTAGTTCT AGAGCGGCCG CCACCGCGGT GGAGCTATCC ACCATCATGG GGCTTCTCAT 5760
TATACTCCTA CTCCTACTAA TTCTGCTTTT GTGGACCCTG CATTCTTAAT CGATTAGTTC 5820
AATTTGTTAA AGACAGGATC TCAGTAGTCC AGGCTTTAGT CCTGACTCAA CAATACCACC 5880
AGCTAAAACC ACTAGAATAC GAGCCACAAT AAATAAAAGA TTTTATTTAG TTTCCAGAAA 5940
AAGGGGGGAA TGAAAGACCC CACCAAGTTG CTTAGCCTGA TGCCGCTGTA ACGCCATTTT 6000
GCAAGGCATG GAAAAATACC AAACCAAGAA TAGAGAAGTT CAGATCAAGG GCGGGTACAT 6060
GAAAATAGCT AACGTTGGGC CAAACAGGAT ATCTGCGGTG AGCAGTTTCG GCCCCGGCCC 6120
GGGGCAAGAA CAGATGGTCA CCGCAGTTTC GGCCCCGGCC CGAGGCCAAG AACAGATGGT 6180
CCCCAGATAT GGCCCAACCC TCAGCAGTTT CTTAAGACCC ATCAGATGTT TCCAGGCTCC 6240
CCCAAGGACC TGAAATGACC CTGCGCCTTA TTTGAATTAA CCAATCAGCC TGCTTCTCGC 6300
TTCTGTTCGC GCGCTTCTGC TTCCCGAGCT CTATAAAAGA GCTCACAACC CCTCACTCGG 6360
CGCGCCAGTC CTCCGATTGA CTGAGTCGCC CGGGTACCCG TGTTCCCAAT AAAGCCTCTT 6420
GCTGATTGCA TCCGAATCGT GGACTCGCTG ATCCTTGGGA GGGTCTCCTC AGATTGATTG 6480
ACTGCCCACC TGGGGGTCTT TCAGT 6505

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 9318 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: ringförmig

- 42 -

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

```

TCGAGGGGGG GCCCGGTACC GATTAGTCCA ATTTGTTAAA GACAGGATAT CAGGTGGTCC 60
AGGCTCTAGT TTTGACTCAA CAATATCACC AGCTGAAGCC TATAGAGTAC GAGCCATAGA 120
TAGAATAAAA GATTTTATTT AGTCTCCAGA AAAAGGGGGG AATGAAAGAC CCCACCTGTA 180
GGTTTGGCAA GCTAGCTTAA GTAACGCCAT TTTGCAAGGC ATGGAAAATA CATAACTGAG 240
AATAGAGAAG TTCAGATCAA GGTTAGGAAC AGAGAGACAG CAGAATATGG GCCAAACAGG 300
ATATCTGTGG TAAGCAGTTC CTGCCCCGCT CAGGGCCAAG AACAGATGGT CCCAGATGC 360
GGTCCCGCCC TCAGCAGTTT CTAGAGAACC ATCAGATGTT TCCAGGGTGC CCCAAGGACC 420
TGAAAATGAC CCTGTGCCTT ATTTGAACTA ACCAATCAGT TCGCTTCTCG CTTCTGTTCG 480
CGCGCTTCTG CTCCCCGAGC TCAATAAAAG AGCCCACAAC CCCTCACTCG GCGCGCCAGT 540
CCTCCGATTG ACTGCGTCGC CCGGGTACCC GTATTCCCAA TAAAGCCTCT TGCTGTTTGC 600
ATCCGAATCG TGGACTCGCT GATCCTTGGG AGGGTCTCCT CAGATTGATT GACTGCCCAC 660
CTCGGGGGTC TTTCATTTGG AGGTCCACC GAGATTGGA GACCCAGCC CAGGGACCAC 720
CGACCCCCC GCCGGGAGGT AAGCTGGCCA GCGGTCGTTT CGTGTCTGTC TCTGTCTTTG 780
TGCGTGTTTG TGCCGGCATC TAATGTTTGC GCCTGCGTCT GTAGTAGTTG GCTAACTAGA 840
TCTGTATCTG GCGGTCCCGC GGAAGAACTG ACGAGTTCGT ATTCCCGGCC GCAGCCCCTA 900
GGAGACGTCC CAGCGGCCTC GGGGGCCCGT TTTGTGGCCC GTTCTGTGTC GTTAACCACC 960
CGAGTCGGAC TTTTGGAGC TCCGCCACTG TCCGAGGGGT ACGTGGCTTT GTTGGGGGAC 1020
GAGAGACAGA GACACTTCCC GCCCCGTCT GAATTTTGC TTTCGGTTTT ACGCCGAAAC 1080
CGCGCCGCGC GTCTTGTCTG CTGCAGCATC GTTCTGTGTT GTCTCTGTCT GACTGTGTTT 1140
CTGTATTTGT CTGAAAATTA GGGCCAGACT GTTACCACTC CCTTAAGTTT GACCTTAGAT 1200
CACTGGAAAG ATGTCGAGCG GATCGCTCAC AACCAGTCGG TAGATGTCAA GAAGAGACGA 1260
TGGGTACCT TCTGCTCTGC AGAATGGCCA ACCTTTAACG TCGGATGGCC GCGAGACGGC 1320
ACCTTTAACC GAGACCTCAT CACCCAGGTT AAGATCAAGG TCTTTTCACC TGGCCCGCAT 1380
GGACACCCAG ACCAGGTCCC CTACATCGTG ACCTGGGAAG CCTTGGCTTT TGACCCCCCT 1440
CCCTGGGTCA AGCCCTTTGT ACACCCTAAG CCTCCGCCTC CTCTCCTCC ATCCGCCCCG 1500

```

ERSATZBLATT (REGEL 26)

TCTCTCCCC TTGAACCTCC TCTTTCGACC CCGCCTCGAT CCTCCCTTTA TCCAGCCCTC 1560
ACTCCTTCTC TAGGCGGCTC CACCGCGGTG GCGGCCGCTC TAGAACTAGT GGGATCCCGC 1620
CGCGGCGGGT ACCGAGCTCA TTCGAGTAGC GGCTCTTCCA AGCTCAAAGA AGCAGAGGCC 1680
GCTGTTCGTT TCCTTTAGGT CTTTCCACTA AAGTCGGAGT ATCTTCTTCC AAGATTTTAC 1740
GTCTTGGTGG CCGTTCCAAG GAGCGCGAGG TCGGGATGGA TCTTGAAGGG GACCGCAATG 1800
GAGGAGCAAA GAAGAAGAAC TTTTTTAAAC TGAACAATAA AAGTGAAAAA GATAAGAAGG 1860
AAAAGAAACC AACTGTCAGT GTATTTTCAA TGTTCGCTA TTCAAATTGG CTTGACAAGT 1920
TGTATATGGT GGTGGGAACT TTGGCTGCCA TCATCCATGG GGCTGGACTT CCTCTCATGA 1980
TGCTGGTGTT TGGAGAAATG ACAGATATCT TTGCAAATGC AGGAAATTTA GAAGATCTGA 2040
TGTCAAACAT CACTAATAGA AGTGATATCA ATGATACAGG GTTCTTCATG AATCTGGAGG 2100
AAGACATGAC CAGGTATGCC TATTATTACA GTGGAATTGG TGCTGGGGTG CTGGTTGCTG 2160
CTTACATTCA GGTTTCATTT TGGTGCCTGG CAGCTGGAAG ACAAATACAC AAAATTAGAA 2220
AACAGTTTTT TCATGCTATA ATGCGACAGG AGATAGGCTG GTTTGATGTG CACGATGTTG 2280
GGGAGCTTAA CACCCGACTT ACAGATGATG TCTCTAAGAT TAATGAAGTT ATTGGTGACA 2340
AAATTGGAAT GTTCTTTCAG TCAATGGCAA CATTTTTCAC TGGGTTTATA GTAGGATTTA 2400
CACGTGGTTG GAAGCTAACC CTTGTGATTT TGGCCATCAG TCCTGTTCTT GGAAGTGCAG 2460
CTGCTGTCTG GGCAAAGATA CTATCTTCAT TTAGTGATAA AGAACTCTTA GCGTATGCAA 2520
AAGCTGGAGC AGTAGCTGAA GAGGTCTTGG CAGCAATTAG AACTGTGATT GCATTTGGAG 2580
GACAAAAGAA AGAACTTGAA AGGTACAACA AAAATTTAGA AGAAGCTAAA AGAATTGGGA 2640
TAAAGAAAGC TATTACAGCC AATATTTCTA TAGGTGCTGC TTTCTGCTG ATCTATGCAT 2700
CTTATGCTCT GGCCCTTCTGG TATGGGACCA CCTTGGTCCT CTCAGGGGAA TATTCTATTG 2760
GACAAGTACT CACTGTATTC TTTTCTGTAT TAATTGGGGC TTTTAGTGTT GGACAGGCAT 2820
CTCCAAGCAT TGAAGCATTT GCAAATGCAA GAGGAGCAGC TTATGAAATC TTCAAGATAA 2880
TTGATAATAA GCCAAGTATT GACAGCTATT CGAAGAGTGG GCACAAACCA GATAATATTA 2940
AGGGAAATTT GGAATTCAGA AATGTTCACT TCAGTTACCC ATCTCGAAAA GAAGTTAAGA 3000
TCTTGAAGGG CCTGAACCTG AAGGTGCAGA GTGGGCAGAC GGTGGCCCTG GTTGGAAACA 3060
GTGGCTGTGG GAAGAGCACA ACAGTCCAGC TGATGCAGAG GCTCTATGAC CCCACAGAGG 3120

GGATGGTCAG TGTTGATGGA CAGGATATTA GGACCATAAA TGTAAGGTTT CTACGGGAAA 3180
TCATTGGTGT GGTGAGTCAG GAACCTGTAT TGTTTGCCAC CACGATAGCT GAAAACATTC 3240
GCTATGGCCG TGAAAATGTC ACCATGGATG AGATTGAGAA AGCTGTCAAG GAAGCCAATG 3300
CCTATGACTT TATCATGAAA CTGCCTCATA AATTTGACAC CCTGGTTGGA GAGAGAGGGG 3360
CCCAGTTGAG TGGTGGGCAG AAGCAGAGGA TCGCCATTGC ACGTGCCCTG GTTCGCAACC 3420
CCAAGATCCT CCTGCTGGAT GAGGCCACGT CAGCCTTGGA CACAGAAAGC GAAGCAGTGG 3480
TTCAGGTGGC TCTGGATAAG GCCAGAAAAG GTCGGACCAC CATTGTGATA GCTCATCGTT 3540
TGTCTACAGT TCGTAATGCT GACGTCATCG CTGGTTTCGA TGATGGAGTC ATTGTGGAGA 3600
AAGGAAATCA TGATGAACTC ATGAAAGAGA AAGGCATTTA CTTCAAACCTT GTCACAATGC 3660
AGACAGCAGG AAATGAAGTT GAATTAGAAA ATGCAGCTGA TGAATCCAAA AGTGAAATTG 3720
ATGCCTTGGA AATGTCTTCA AATGATTCAA GATCCAGTCT AATAAGAAAA AGATCAACTC 3780
GTAGGAGTGT CCGTGGATCA CAAGCCCAAG ACAGAAAGCT TAGTACCAAA GAGGCTCTGG 3840
ATGAAAGTAT ACCTCCAGTT TCCTTTTGGA GGATTATGAA GCTAAATTTA ACTGAATGGC 3900
CTTATTTTGT TGTTGGTGTA TTTTGTGCCA TTATAAATGG AGGCCTGCAA CCAGCATTTG 3960
CAATAATATT TTCAAAGATT ATAGGGGTTT TTACAAGAAT TGATGATCCT GAAACAAAAC 4020
GACAGAATAG TAACTTGTTT TCACTATTGT TTCTAGCCCT TGGAATTATT TCTTTTATTA 4080
CATTTTTCCT TCAGGGTTTC ACATTTGGCA AAGCTGGAGA GATCCTCACC AAGCGGCTCC 4140
GATACATGGT TTTCCGATCC ATGCTCAGAC AGGATGTGAG TTGGTTTGAT GACCCTAAAA 4200
ACACCACTGG AGCATTGACT ACCAGGCTCG CCAATGATGC TGCTCAAGTT AAAGGGGCTA 4260
TAGGTTCCAG GCTTGCTGTA ATTACCCAGA ATATAGCAAA TCTTGGGACA GGAATAATTA 4320
TATCCTTCAT CTATGGTTGG CAACTAACAC TGTTACTCTT AGCAATTGTA CCCATCATTG 4380
CAATAGCAGG AGTTGTTGAA ATGAAAATGT TGTCTGGACA AGCACTGAAA GATAAGAAAG 4440
AACTAGAAGG TGCTGGGAAG ATCGCTACTG AAGCAATAGA AACTTCCGA ACCGTTGTTT 4500
CTTTGACTCA GGAGCAGAAG TTTGAACATA TGTATGCTCA GAGTTTGCAG GTACCATACA 4560
GAAACTCTTT GAGGAAAGCA CACATCTTTG GAATTACATT TTCCTTCACC CAGGCAATGA 4620
TGTATTTTTC CTATGCTGGA TGTTTCCGGT TTGGAGCCTA CTTGGTGGCA CATAAACTCA 4680
TGAGCTTTGA GGATGTTCTG TTAGTATTTT CAGCTGTTGT CTTTGGTGCC ATGGCCGTGG 4740
GGCAAGTCAG TTCATTTGCT CCTGACTATG CCAAAGCCAA AATATCAGCA GCCCACATCA 4800

TCATGATCAT TGAAAAAACC CCTTTGATTG ACAGCTACAG CACGGAAGGC CTAATGCCGA 4860
ACACATTGGA AGGAAATGTC ACATTTGGTG AAGTTGTATT CAACTATCCC ACCCGACCGG 4920
ACATCCCAGT GCTTCAGGGA CTGAGCCTGG AGGTGAAGAA GGGCCAGACG CTGGCTCTGG 4980
TGGGCAGCAG TGGCTGTGGG AAGAGCACAG TGGTCCAGCT CCTGGAGCGG TTCTACGACC 5040
CCTTGGCAGG GAAAGTGCTG CTTGATGGCA AAGAAATAAA GCGACTGAAT GTTCAGTGGC 5100
TCCGAGCACA CCTGGGCATC GTGTCCCAGG AGCCCATCCT GTTTGACTGC AGCATTGCTG 5160
AGAACATTGC CTATGGAGAC AACAGCCGGG TGGTGTCAACA GGAAGAGATC GTGAGGGCAG 5220
CAAAGGAGGC CAACATACAT GCCTTCATCG AGTCACTGCC TAATAAATAT AGCACTAAAG 5280
TAGGAGACAA AGGAACTCAG CTCTCTGGTG GCCAGAAACA ACGCATTGCC ATAGCTCGTG 5340
CCCTTGTTAG ACAGCCTCAT ATTTTGCTTT TGGATGAAGC CACGTCAGCT CTGGATACAG 5400
AAAGTGAAAA GGTGTGCTCA GAAGCCCTGG ACAAAGCCAG AGAAGGCCGC ACCTGCATTG 5460
TGATTGCTCA CCGCCTGTCC ACCATCCAGA ATGCAGACTT AATAGTGGTG TTTCAGAATG 5520
GCAGAGTCAA GGAGCATGGC ACGCATCAGC AGCTGCTGGC ACAGAAAGGC ATCTATTTTT 5580
CAATGGTCAG TGTCCAGGCT GGAACAAAGC GCCAGTGAAC TCTGACTGTA TGAGATGTTA 5640
AATACTTTTT AATGGGGATC CCCCAGGCTG CAGGAATTCG ATATCAAGCT TATCGATACC 5700
GTCGACCTCG AGGGGGGGCC CGGTACAGAT TAGTCCAATT TGTTAAAGAC AGGATATCAG 5760
GTGGTCCAGG CTCTAGTTTT GACTCAACAA TATCACCAGC TGAAGCCTAT AGAGTACGAG 5820
CCATAGATAG AATAAAAGAT TTTATTTAGT CTCCAGAAAA AGGGGGGAAT GAAAGACCCC 5880
ACCTGTAGGT TTGGCAAGGC TAGCTTAAGT AAGCCATTTT GCAAGGCATG GAAAAATACA 5940
TAACTGAGAA TAGAGAAGTT CAGATCAAGG TTAGGAACAG AGAGACAGGA GAATATGGGC 6000
CAAACAGGAT ATCTGTGGTA AGCAGTTCCT GCCCCGGCTC AGGGCCAAGA ACAGTTGGAA 6060
CAGCAGAATA TGGGCCAAAC AGGATATCTG TGGTAAGCAG TTCCTGCCCC GGCTCAGGGC 6120
CAAGAACAGA TGGTCCCCAG ATGCGGTCCC GCCCTCAGCA GTTTCTAGAG AACCATCAGA 6180
TGTTTCCAGG GTGCCCCAAG GACCTGAAAT GACCCTGTGC CTTATTTGAA CTAACCAATC 6240
AGTTCGCTTC TCGCTTCTGT TCGCGCGCTT CTGCTCCCCG AGCTCAATAA AAGAGCCCAC 6300
AACCCTCAC TCGGCGCGCC AGTCCTCCGA TAGACTGCGT CGCCCGGGTA CCCGTATTCC 6360
CAATAAAGCC TCTTGCTGTT TGCATCCGAA TCGTGGACTC GCTGATCCTT GGGAGGGTCT 6420

CCTCAGATTG ATTGACTGCC CACCTCGGGG GTCTTTCAGT AGGATCTCGA CCGATGCCCT 6480
TGAGAGCCTT CAACCCAGTC AGCTCCTTCC GGTGGGCGCG GGGCATGACT ATCGTCGCCG 6540
CACTTATGAC TGTCTTCTTT ATCATGCAAC TCGTAGGACA GGTGCCGGCA GCGCTCTGGG 6600
TCATTTTCGG CGAGGACCGC TTTCGCTGGA GCGCGACGAT GATCGGCCTG TCGCTTGCGG 6660
TATTCGGAAT CTTGCACGCC CTCGCTCAAG CCTTCGTCAC TGGTCCCGCC ACCAAACGTT 6720
TCGGCGAGAA GCAGGCCATT ATCGCCGGCA TGGCGGCCGA CGCGCTGGG TACGTCTTGC 6780
TGGCGTTCGC GACGCGAGGC TGGATGGCCT TCCCCATTAT GATTCTTCTC GCTTCCGGCG 6840
GCATCGGGAT GCCCGCGTTG CAGGCCATGC TGTCCAGGCA GGTAGATGAC GACCATCAGG 6900
GACAGCTTCA AGGATCGCTC GCGGCTCTTA CCAGCCTAAC TTCGATCACT GGACCGCTGA 6960
TCGTCACGGC GATTTATGCC GCCTCGGCGA GCACATGGAA CGGGTTGGCA TGGATTGTAG 7020
GCGCCTGATG CGGTATTTTC TCCTTACGCA TCTGTGCGGT ATTTACACC GCATATGGTG 7080
CACTCTCAGT ACAATCTGCT CTGATGCCGC ATAGTTAAGC CAGCCCCGAC ACCCGCCAAC 7140
ACCCGCTGAC GCGCCCTGAC GGGCTTGTCT GCTCCCGGCA TCCGCTTACA GACAAGCTGT 7200
GACCGTCTCC GGGAGCTGCA TGTGTCAGAG GTTTTCACCG TCATCACCGA AACGCGCGAG 7260
ACGAAAGGGC CTCGTGATAC GCCTATTTTT ATAGGTTAAT GTCATGATAA TAATGGTTTC 7320
TTAGACGTCA GGTGGCACTT TTCGGGGAAA TGTGCGCGGA ACCCCTATTT GTTTATTTTT 7380
CTAAATACAT TCAAATATGT ATCCGCTCAT GAGACAATAA CCCTGATAAA TGCTTCAATA 7440
ATATTGAAAA AGGAAGAGTA TGAGTATTCA ACATTTCCGT GTCGCCCTTA TTCCCTTTTT 7500
TGCGGCATTT TGCCTTCCTG TTTTGTCTCA CCCAGAAACG CTGGTGAAAG TAAAGATGC 7560
TGAAGATCAG TTGGGTGCAC GAGTGGGTTA CATCGAACTG GATCTCAACA GCGGTAAGAT 7620
CCTTGAGAGT TTTCGCCCCG AAGAAGTTTT TCCAATGATG AGCACTTTTA AAGTTCTGCT 7680
ATGTGGCGCG GTATTATCCC GTATTGACGC CGGGCAAGAG CAACTCGGTC GCCGCATACA 7740
CTATTCTCAG AATGACTTGG TTGAGTACTC ACCAGTCACA GAAAAGCATC TTACGGATGG 7800
CATGACAGTA AGAGAATTAT GCAGTGCTGC CATAACCATG AGTGATAACA CTGCGGCCAA 7860
CTTACTTCTG ACAACGATCG GAGGACCGAA GGAGCTAACC GCTTTTTTGC ACAACATGGG 7920
GGATCATGTA ACTCGCCTTG ATCGTTGGGA ACCGGAGCTG AATGAAGCCA TACCAAACGA 7980
CGAGCGTGAC ACCACGATGC CTGTAGCAAT GGCAACAACG TTGCGCAAAC TATTAAGTGG 8040
CGAACTACTT ACTCTAGCTT CCCGGCAACA ATTAATAGAC TGGATGGAGG CGGATAAAGT 8100

TGCAGGACCA CTTCTGCGCT CGGCCCTTCC GGCTGGCTGG TTTATTGCTG ATAAATCTGG 8160
AGCCGGTGAG CGTGGGTCTC GCGGTATCAT TGCAGCACTG GGGCCAGATG GTAAGCCCTC 8220
CCGTATCGTA GTTATCTACA CGACGGGGAG TCAGGCAACT ATGGATGAAC GAAATAGACA 8280
GATCGCTGAG ATAGGTGCCT CACTGATTAA GCATTGGTAA CTGTCAGACC AAGTTTACTC 8340
ATATATACTT TAGATTGATT TAAAACTTCA TTTTAAATTT AAAAGGATCT AGGTGAAGAT 8400
CCTTTTTGAT AATCTCATGA CCAAATCCC TTAACGTGAG TTTTCGTTCC ACTGAGCGTC 8460
AGACCCCGTA GAAAAGATCA AAGGATCTTC TTGAGATCCT TTTTTCTGC GCGTAATCTG 8520
CTGCTTGCAA ACAAAAAAAC CACCGCTACC AGCGGTGGTT TGTTTGCCGG ATCAAGAGCT 8580
ACCAACTCTT TTTCCGAAGG TAACTGGCTT CAGCAGAGCG CAGATACCAA ATACTGTCCT 8640
TCTAGTGTAG CCGTAGTTAG GCCACCACTT CAAGAACTCT GTAGCACCGC CTACATACCT 8700
CGCTCTGCTA ATCCTGTTAC CAGTGGCTGC TGCCAGTGGC GATAAGTCGT GTCTTACCGG 8760
GTTGGACTCA AGACGATAGT TACCGGATAA GGCGCAGCGG TCGGGCTGAA CGGGGGGTTC 8820
GTGCACACAG CCCAGCTTGG AGCGAACGAC CTACACCGAA CTGAGATACC TACAGCGTGA 8880
GCATTGAGAA AGCGCCACGC TTCCCGAAGG GAGAAAGGCG GACAGGTATC CGGTAAGCGG 8940
CAGGGTCGGA ACAGGAGAGC GCACGAGGGA GCTTCCAGGG GGAAACGCCT GGTATCTTTA 9000
TAGTCCTGTC GGGTTTCGCC ACCTCTGACT TGAGCGTCGA TTTTGTGAT GCTCGTCAGG 9060
GGGGCGGAGC CTATGGAAAA ACGCCAGCAA CGCGGCCTTT TTACGGTTCC TGGCCTTTTG 9120
CTGGCCTTTT GCTCACATGT TCTTTCCTGC GTTATCCCCT GATTCTGTGG ATAACCGTAT 9180
TACCGCCTTT GAGTGAGCTG ATACCGCTCG CCGCAGCCGA ACGACCGAGC GCAGCGAGTC 9240
AGTGAGCGAG GAAGCGGAAG AGCGCCCAAT ACGCAAACCG CCTCTCCCCG CGCGTTGGCC 9300
GATTCATTAA TGCAGNNG 9318

Patentansprüche

1. Retrovirales Vektorhybrid, dadurch gekennzeichnet, daß es
 - a) in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und/oder MoMuSV und
 - b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) enthält.
2. Retrovirales Vektorhybrid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es als 3'-LTR das LTR aus F-MuLV enthält.
3. Vektorhybrid nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß es als Leaderregion die Leaderregion von MESV enthält.
4. Vektorhybrid nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das 3'-LTR vom malignen Histiosarkomvirus (MHSV), SFFVp Lilly-Steeves, SFFVa, Rauscher SFFV, F-MuLV c157 oder Friend-mink cell focus forming Virus (F-MCFV FrNx, F-MCFV pFM548) verwendet wird.
5. Vektorhybrid nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß im 5'-LTR als U3- und R-Regionen die U3- und R-Regionen aus MPSV, MESV oder PCMV verwendet werden.
6. Vektorhybrid nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß als 5'-LTR das LTR aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) verwendet wird.
7. Vektorhybrid nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß als 5'-LTR bp 142 - 657 aus SEQ ID NO:1 und/oder als 3'-LTR bp 1707 - 2283 aus SEQ ID NO:1 verwendet wird.
8. Vektorhybrid nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein für das Virus heterologes, in eukaryontischen Zellen exprimierbares Gen enthält.
9. Vektorhybrid nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß es als heterologes Gen ein multiple drug resistance Gen (MDR Gen), ein Antibiotikaresistenzgen wie das neo^R-

- Gen, das LNGFR-Gen, das Cerebrosidase-Gen oder das Herpes simplex TK-Gen enthält.
10. Vektorhybride pSF1, pSF2, pSF3, pHM1.
 11. Replikationsdefektes Vektorhybrid nach den Ansprüchen 1 bis 10.
 12. Replikationskompetentes Vektorhybrid nach den Ansprüchen 1 bis 7.
 13. Verfahren zur Herstellung einer retroviral transduzierten, eukaryontischen Zelle, welche ein aktives exogenes Gen enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryontische Zelle transduziert wird mit einem retroviralen Vektorvirus, der in seinem Genom
 - a) in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und/oder MoMuSV,
 - b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) und
 - c) das genannte exogene Genenthält.
 14. Verfahren zur Herstellung nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das retrovirale Vektorvirus als 3'-LTR das LTR aus F-MuLV enthält.
 15. Verfahren nach den Ansprüchen 12 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß als Leaderregion die Leaderregion von MESV verwendet wird.
 16. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 15, dadurch gekennzeichnet, daß ein replikationsdefektes, retrovirales Vektorvirus verwendet wird.
 17. Retroviral transduzierte, eukaryontische Zelle, dadurch erhältlich, daß die eukaryontische Zelle transduziert wird mit einem retroviralen Vektorvirus, das in seinem Genom
 - a) in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und/oder MoMuSV
 - b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV)enthält.

18. Zellen nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, daß das retrovirale Vektorvirus in seinem Genom als 3'-LTR das LTR aus F-MuLV enthält.
19. Zelle nach den Ansprüchen 17 oder 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Leaderregion die Leaderregion von MESV verwendet wird.
20. Zelle nach den Ansprüchen 17 bis 19, dadurch gekennzeichnet, daß ein replikationsdefektes, retrovirales Vektorvirus verwendet wird.
21. Verfahren nach den Ansprüchen 13 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß als eukaryontische Zellen hämatopoietische Stammzellen verwendet werden.
22. Replikationsdefektes, infektiöses Viruspartikel, welches als Genom eine retrovirale RNA enthält, wobei das Genom als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und/oder MoMuSV, eine packaging-Funktion, ein in einer eukaryontischen Zelle exprimierbares und für das Virus heterologes Gen und am 3'-Ende U3 und R aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV), jedoch keine aktiven gag-, env- und pol-Sequenzen enthält.
23. Verfahren zur Herstellung eines replikationsdefekten, infektiösen Viruspartikel durch Transfektion einer eukaryontischen Helferzelle, welche die Helferfunktionen gag, env und pol besitzt, mit einem Vektorhybrid, welches in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und/oder MoMuSV und als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) enthält, Produktion der DNA des Vektorhybrids entsprechender RNA als Virusgenom in der Zelle, Verpackung des Virusgenoms in in der Zelle entstandene replikationsdefiziente, leere Virushüllen und Isolation der infektiösen Viruspartikel, welche das genannte Virusgenom enthalten.
24. Verfahren nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß als 3'-LTR das LTR aus F-MuLV verwendet wird.
25. Verfahren nach den Ansprüchen 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß als Leaderregion die Leaderregion von MESV verwendet wird.

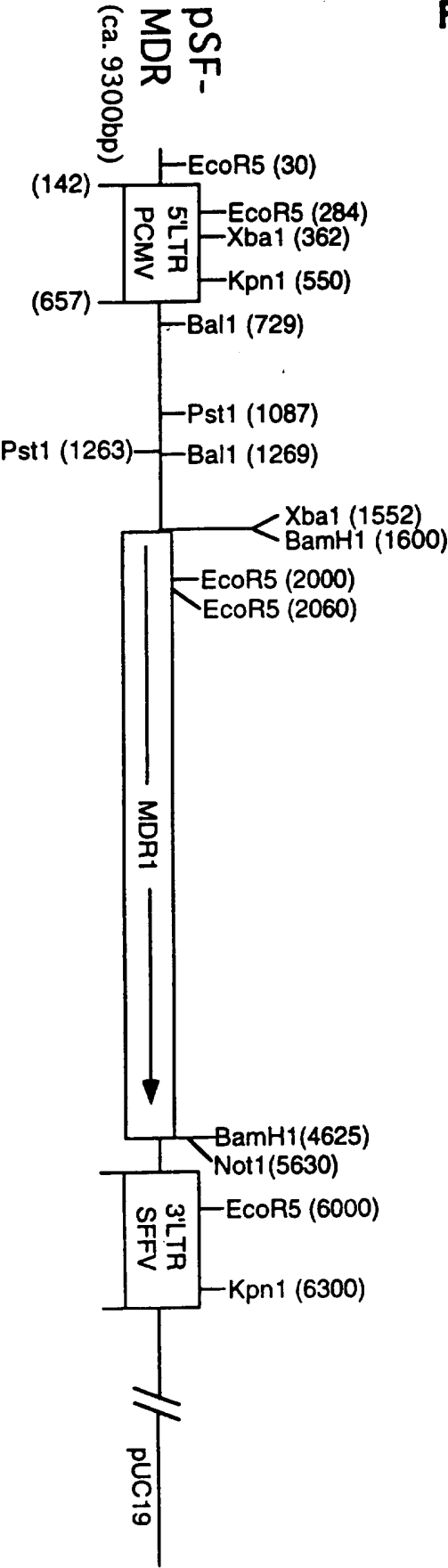
26. Verwendung eines replikationsdefekten, retroviralen Vektorhybrids, welches in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und/oder MoMuSV und als U3- und R-Regionen in 3'-LTR, die U3- und R-Regionen aus einem Friend murine leukemia virus (F-MuLV) enthält, zur Herstellung eines Arzneimittels zur ex vivo oder in vivo Gentherapie.
27. Verwendung eines Vektorhybrids nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß es als 3'-LTR das LTR aus F-MuLV verwendet wird.
28. Verwendung nach den Ansprüchen 26 oder 27, dadurch gekennzeichnet, daß als Leaderregion die Leaderregion von MESV verwendet wird.
29. Retrovirales Vektorhybrid, dadurch gekennzeichnet, daß es
 - a) in der Leaderregion als U5-Region und tRNA primer binding site die U5-Region und tRNA primer binding site von MESV und
 - b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR die U3- und R-Regionen aus Myeloproliferative Sarkomavirus (MPSV) enthält.
30. Verfahren zur Herstellung einer retroviral transduzierten eukaryontischen Zelle, welche ein aktives exogenes Gen enthält, dadurch gekennzeichnet, daß die eukaryontische Zelle transduziert wird mit einem retroviralen Vektorvirus, der in seinem Genom
 - a) in der Leaderregion als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV,
 - b) als U3- und R-Regionen in 3'-LTR die U3- und R-Regionen aus Myeloproliferative Sarkomavirus (MPSV) und
 - c) das genannte exogene Gen enthält.
30. Replikationsdefektes infektiösen Viruspartikel, welches als Genom eine retrovirale RNA enthält, wobei das Genom als U5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV, eine packaging-Funktion in einer eukaryontischen Zelle exprimierbares und für den Virus heterologes Gen und am 3'-Ende U3 und R aus dem Myeloproliferative Sarkomavirus (MPSV), jedoch keine aktiven gag-, env- und pol-Sequenzen enthält.

31. Verwendung eines replikationsdefekten retroviralen Vektorhybrids, welche in der Leaderregion als 5-Region und/oder tRNA primer binding site die U5-Region und/oder tRNA primer binding site von MESV und als U3- und R-Regionen im 3'-LTR die U3- und R-Regionen aus dem Myeloproliferative Sarkomavirus (MPSV) enthält, zur Herstellung eines Arzneimittels zur ex vivo- oder in vivo-Gentherapie.

Fig. 1A

MESV-Sequenzen (aus R224)	SFFV-Sequenzen (aus pSF5+3)
Start 5'LTR (142) bis Xba1 (1552)	Not1 (ca.4630) bis Ende 3'LTR

Karte ist nicht linear; Schnittstellen ab Xba1 (1552) geschätzt



0 2 / 1 4

Fig. 1B

MESV-Sequenzen (aus R224)	SFFV-Sequenzen (aus pSF5+3)
Start 5'LTR (161) bis Xba1 (1648)	Not1 (5716) bis Ende 3'LTR (6505)

Karte ist nicht linear

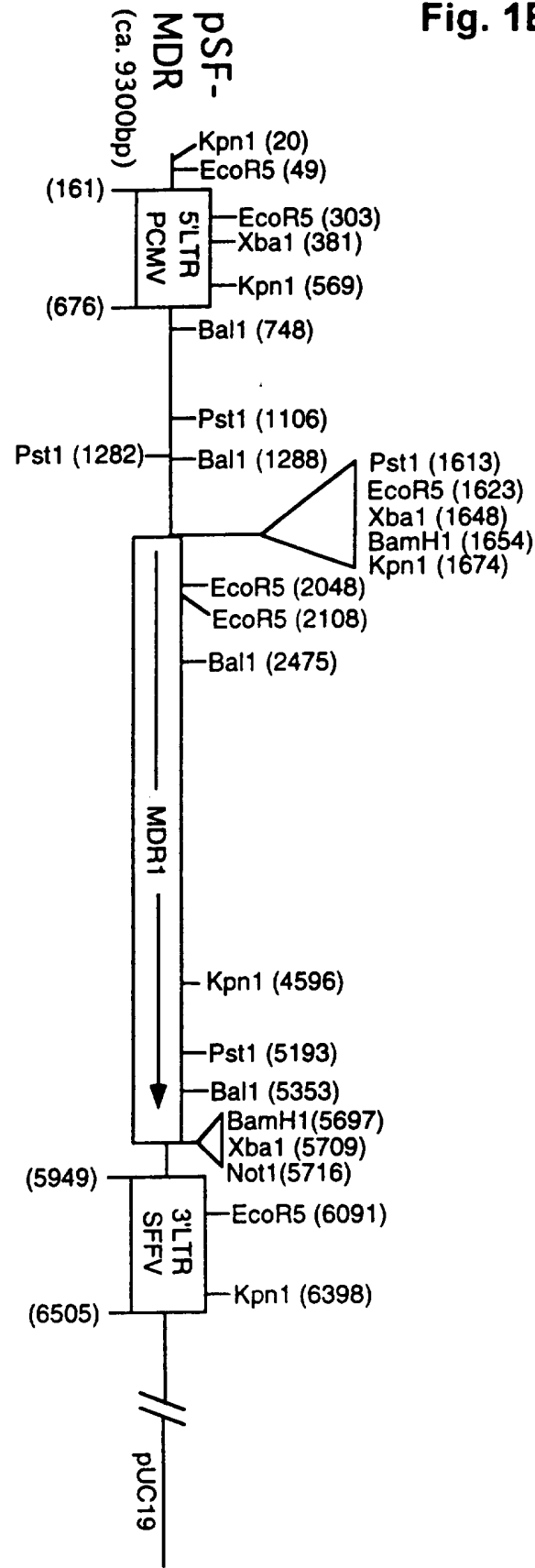


Fig. 2A

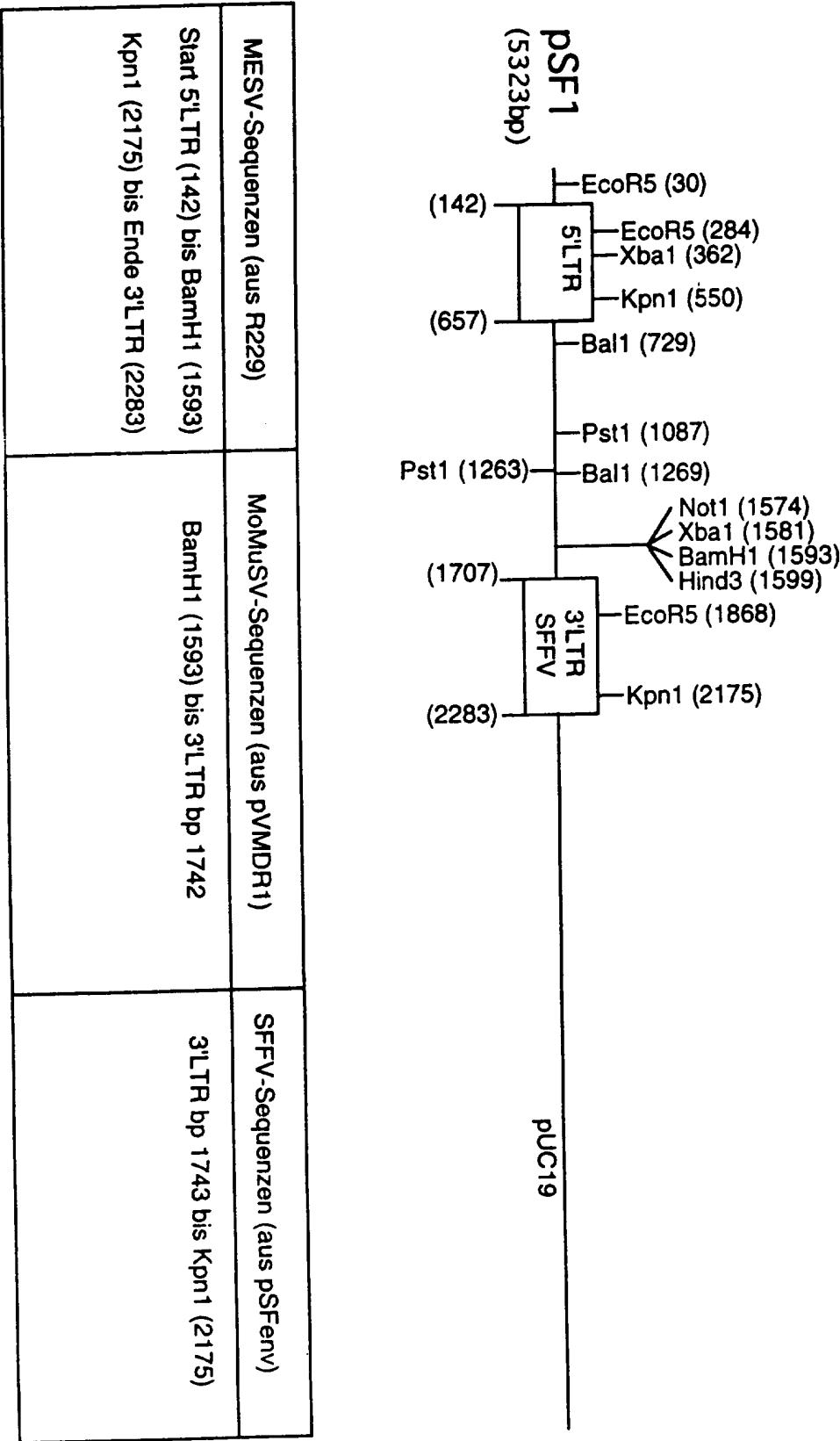


Fig. 2B

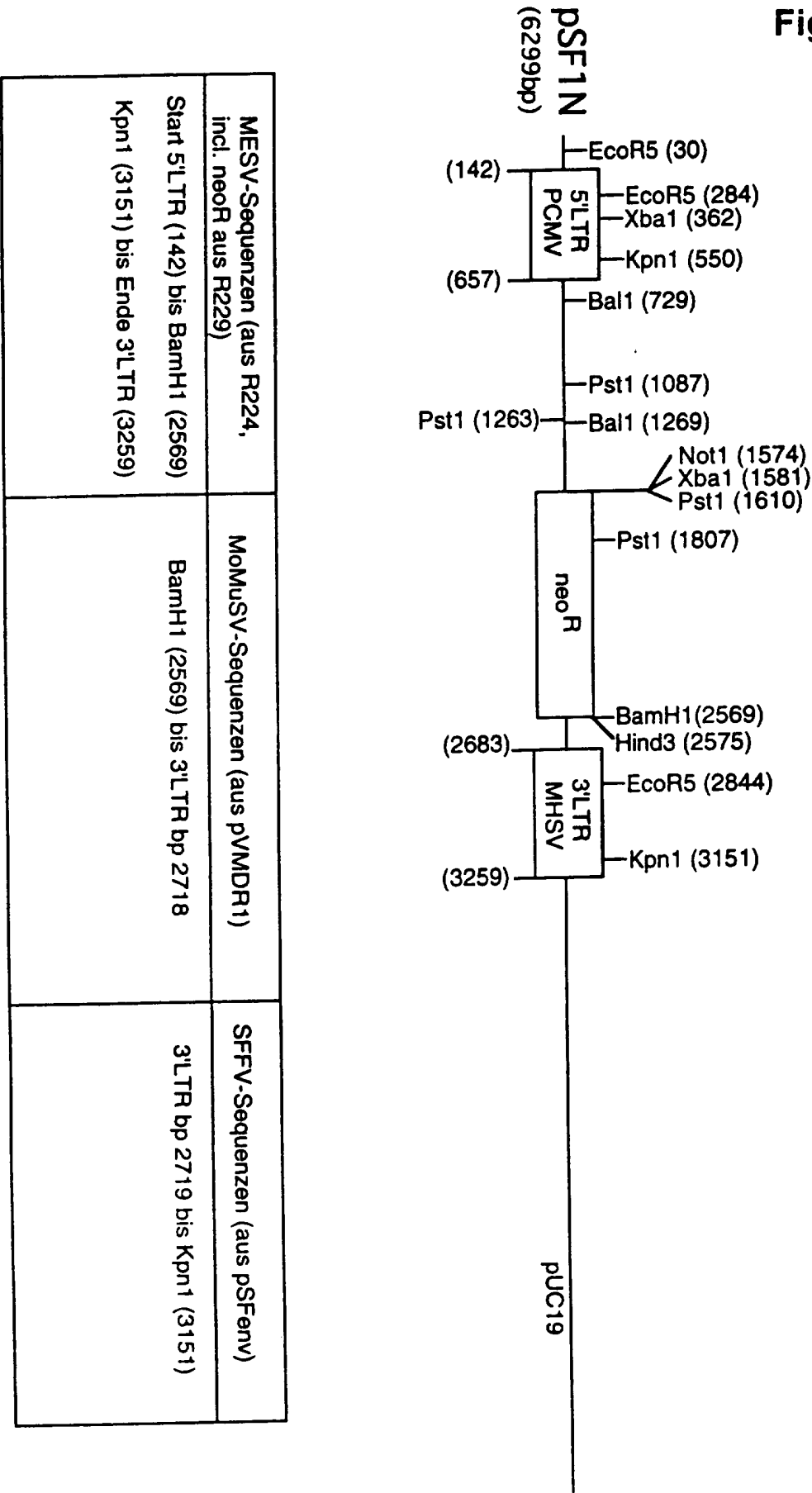


Fig. 3A

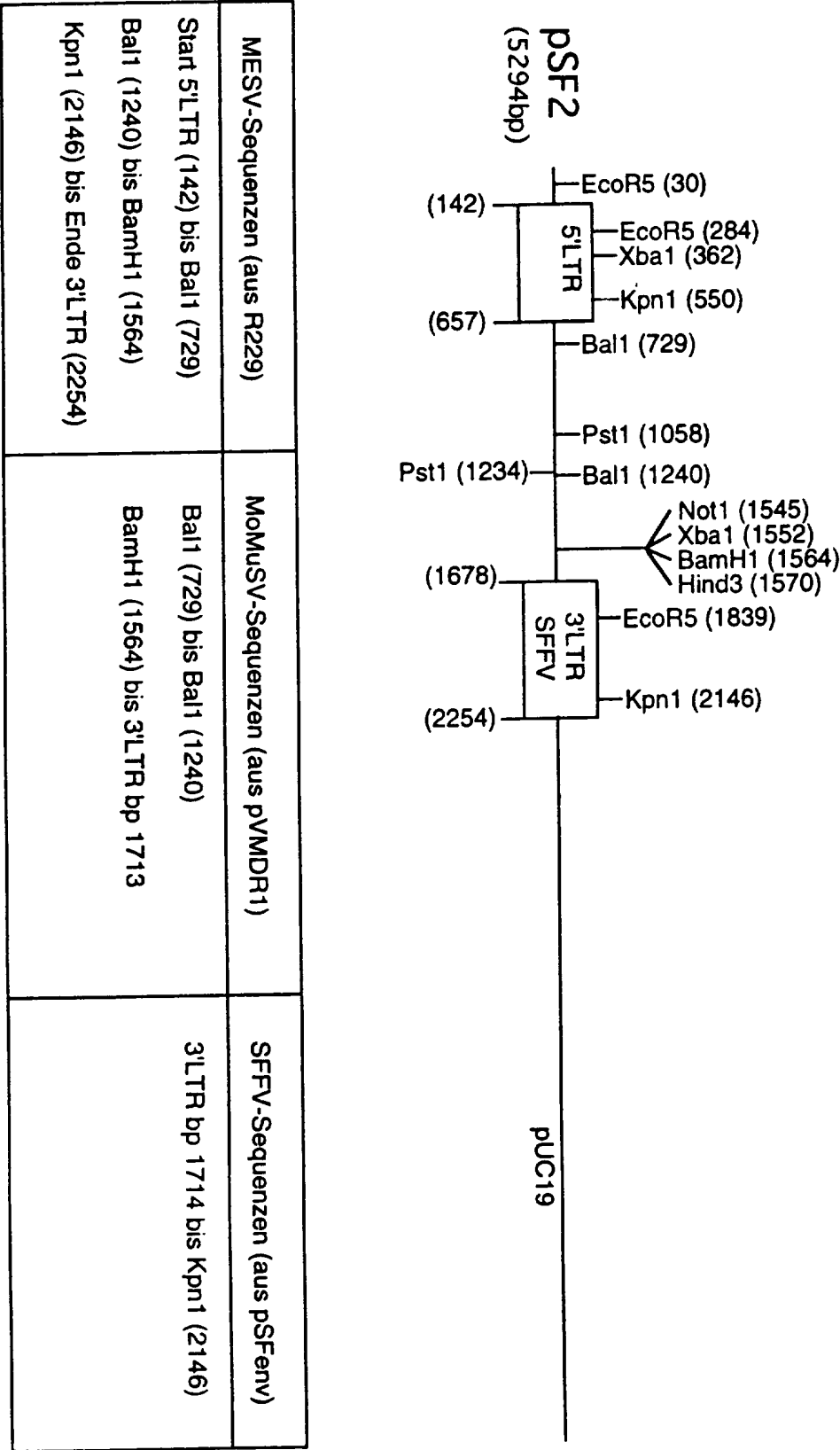
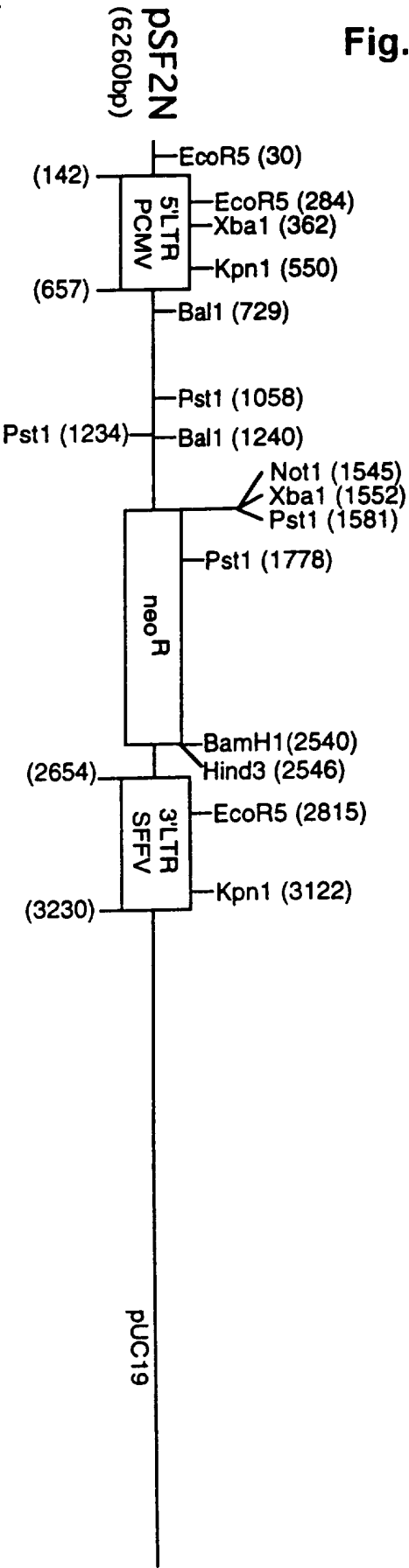
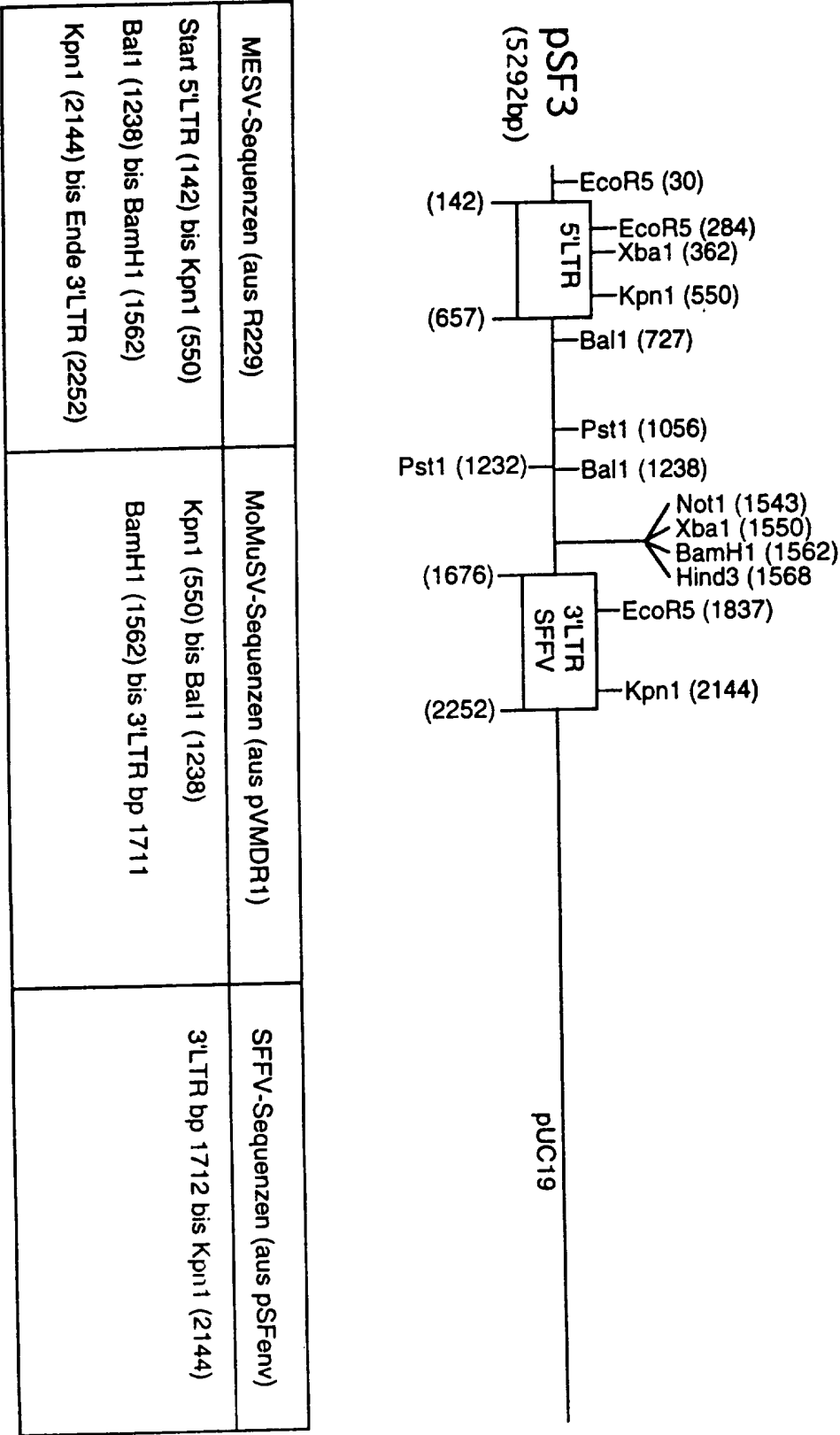


Fig. 3B



MESV-Sequenzen (aus R224, incl. neoR aus R229)	MoMuSV-Sequenzen (aus pVMDR1)	SFFV-Sequenzen (aus pSFenv)
Start 5'LTR (142) bis Bal1 (729)	Bal1 (729) bis Bal1 (1240)	3'LTR bp 2690 bis Kpn1 (3122)
Bal1 (1240) bis BamH1 (2540)	BamH1 (2540) bis 3'LTR bp 2689	
Kpn1 (3122) bis Ende 3'LTR (3230)		

Fig. 4A



0.8 / 1.4

Fig. 4B

MESV-Sequenzen (aus R224, incl. neoR aus R229)	MoMuSV-Sequenzen (aus pVMDR1)	SFFV-Sequenzen (aus pSFenv)
Start 5'LTR (142) bis Kpn1 (550) Not1 (1543) bis BamH1 (2538) Kpn1 (3120) bis Ende 3'LTR (3228)	Kpn1 (550) bis Not1 (1543) BamH1 (2538) bis 3'LTR bp 2687	3'LTR bp 2688 bis Kpn1 (3120)

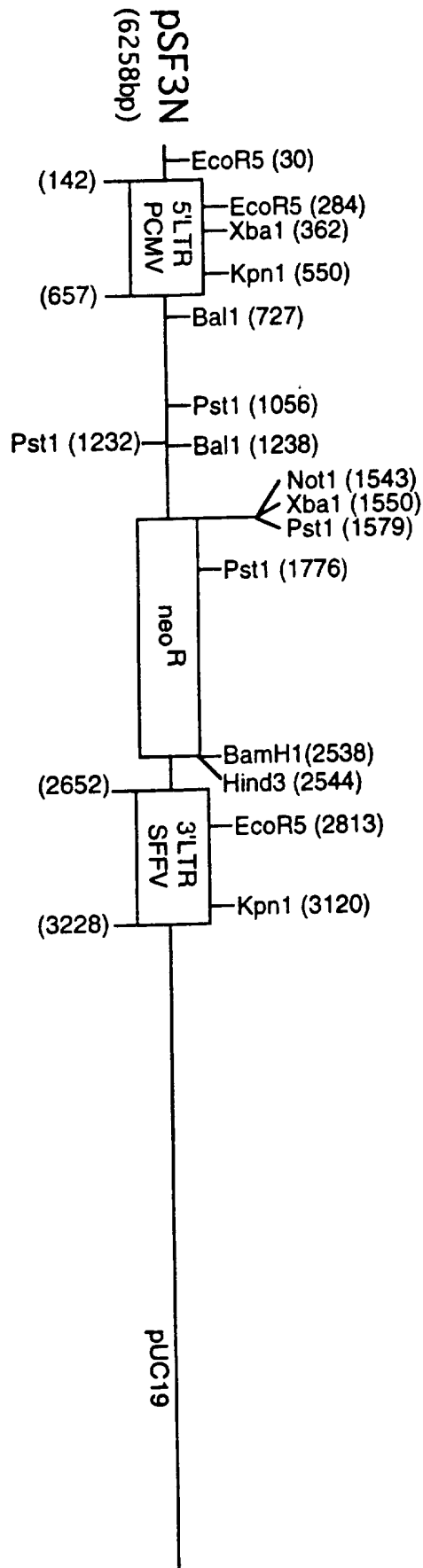


Fig. 5A

MESV-Sequenzen (aus R229)	MoMuSV-Sequenzen (aus pVMdR1)	MHSV-Sequenzen (aus pBR-MHSV)
Start 5'LTR (142) bis BamH1 (1593) Kpn1 (2216) bis Ende 3'LTR (2324)	BamH1 (1593) bis 3'LTR bp 1742	3'LTR bp 1743 bis Kpn1 (2216)

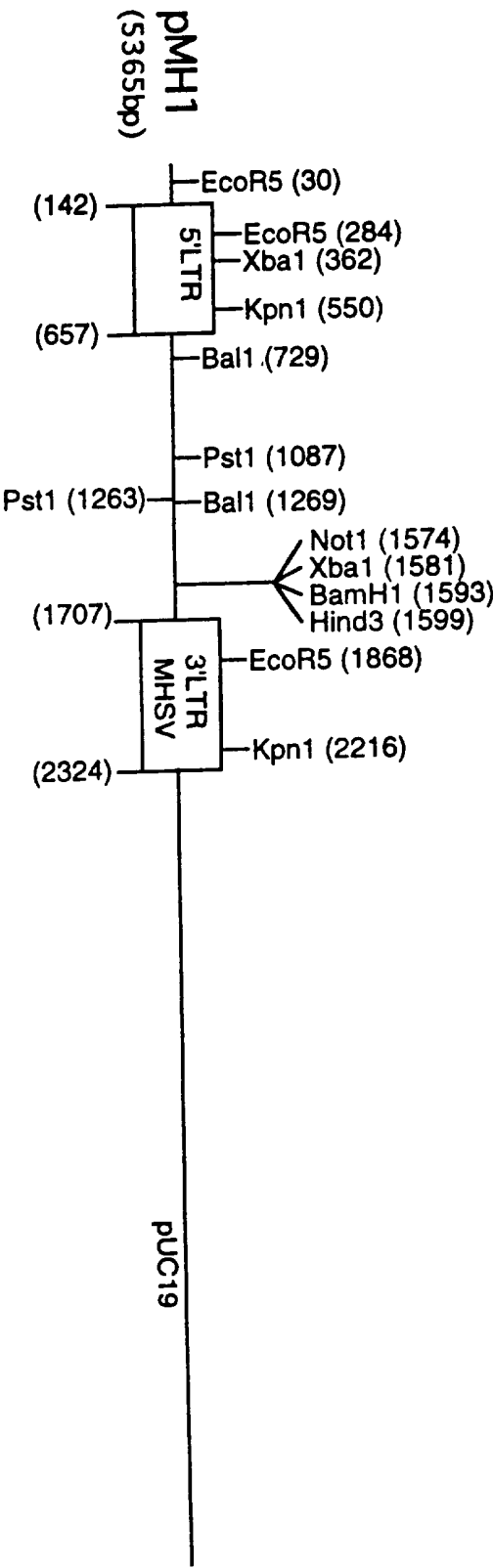


Fig. 5B

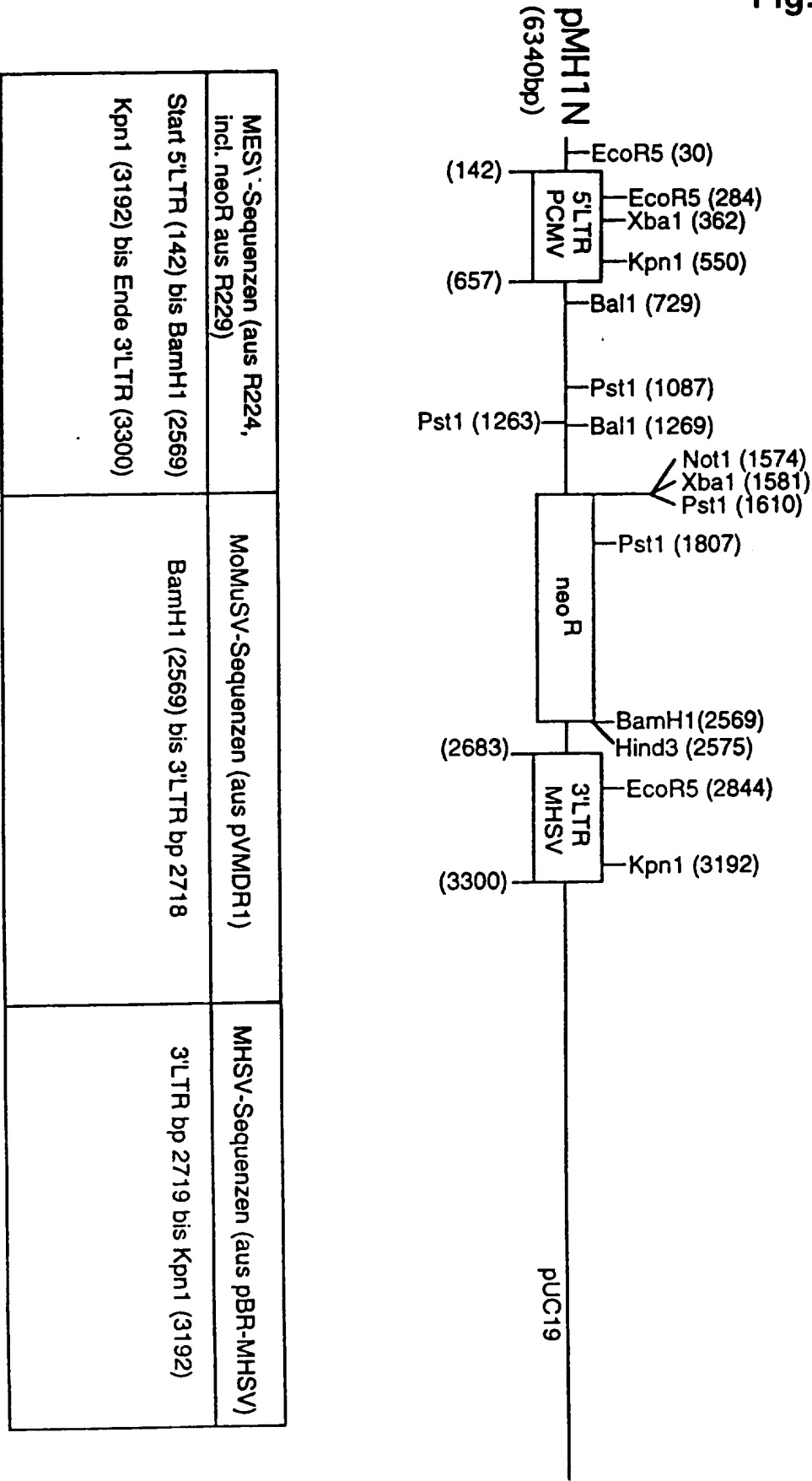
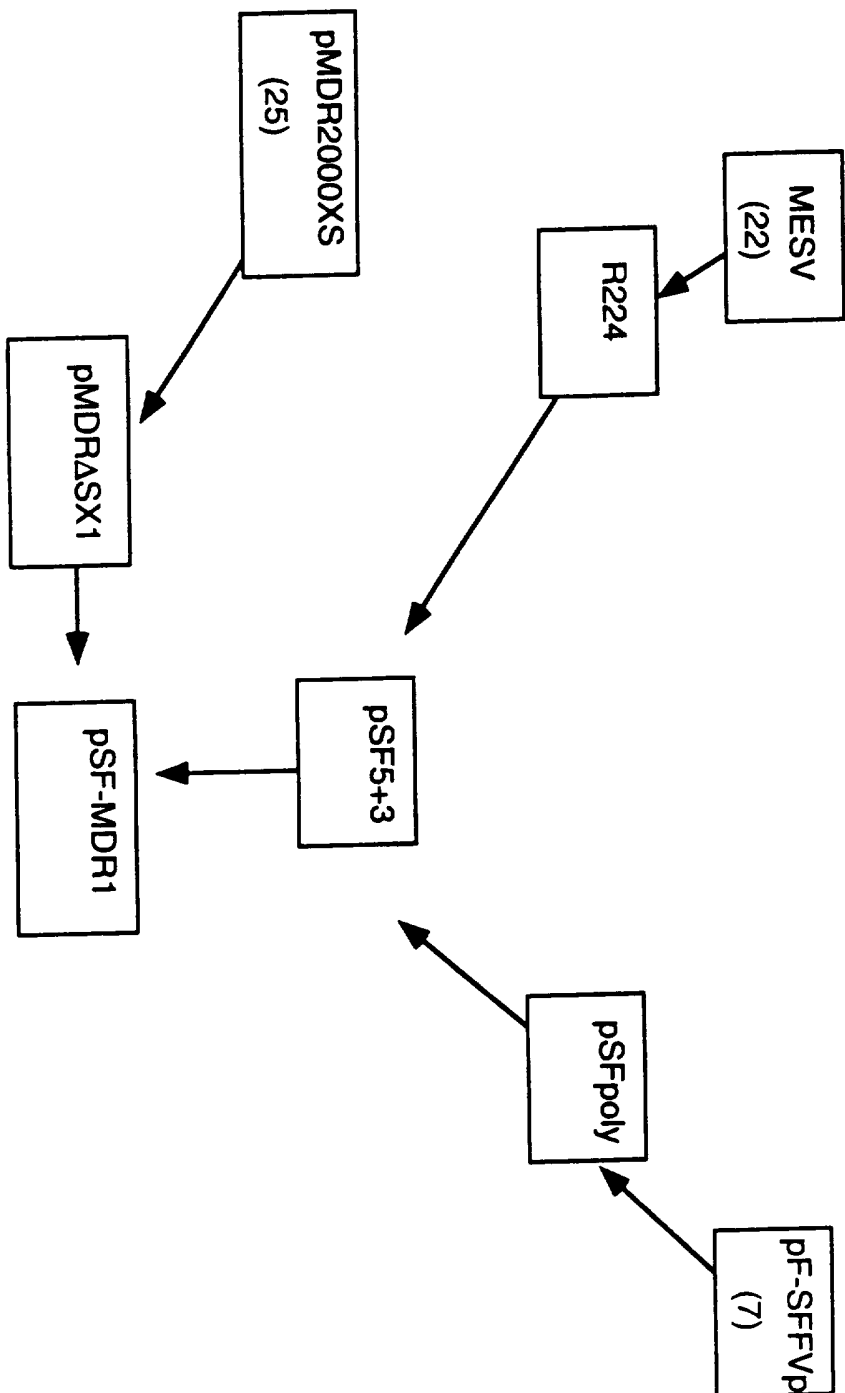


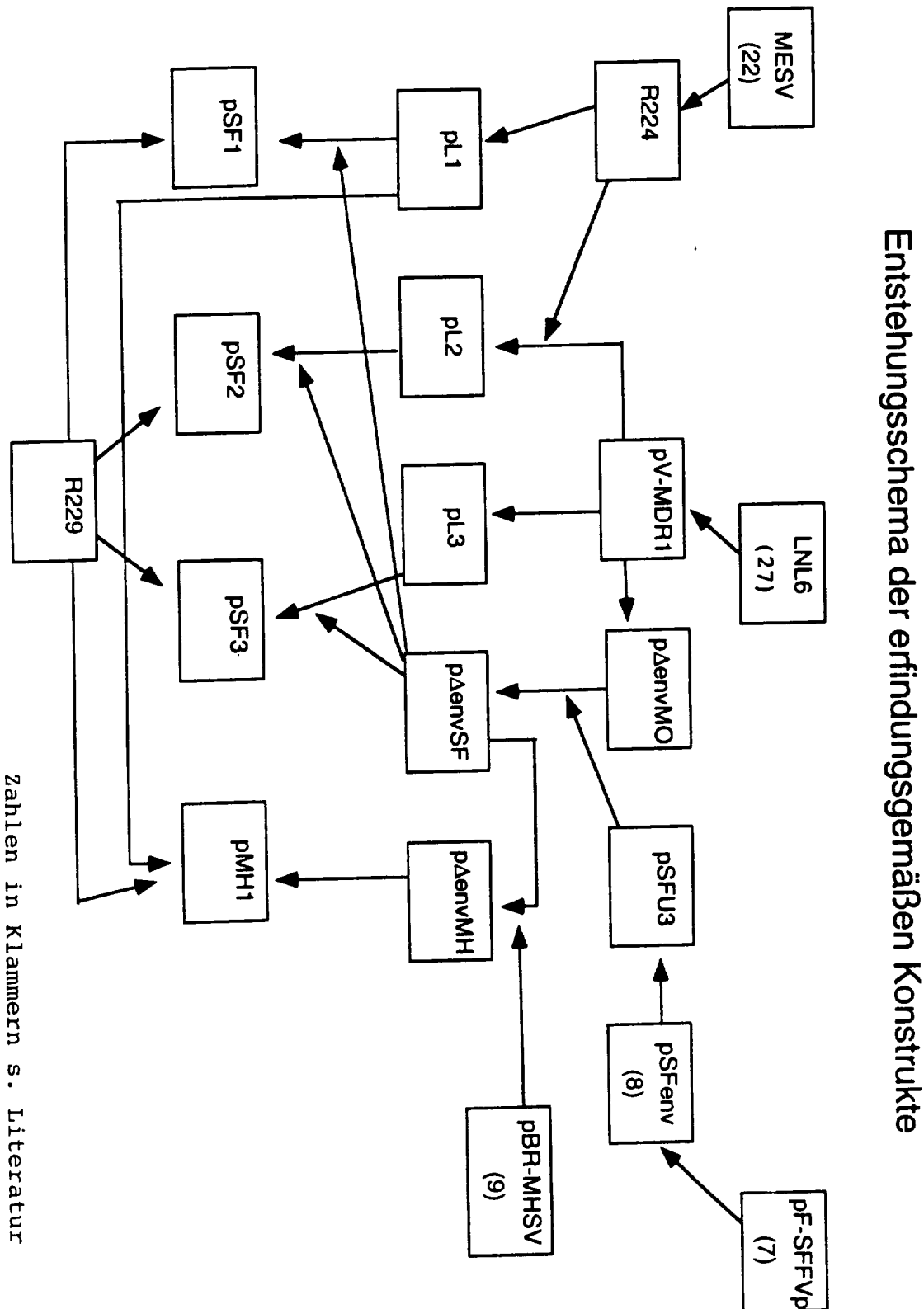
Fig. 6

Entstehungsschema des SFFVp-MDR1 Vektors



Zahlen in Klammern s. Literatur

Fig. 7



1 3 / 1 4

Fig. 8

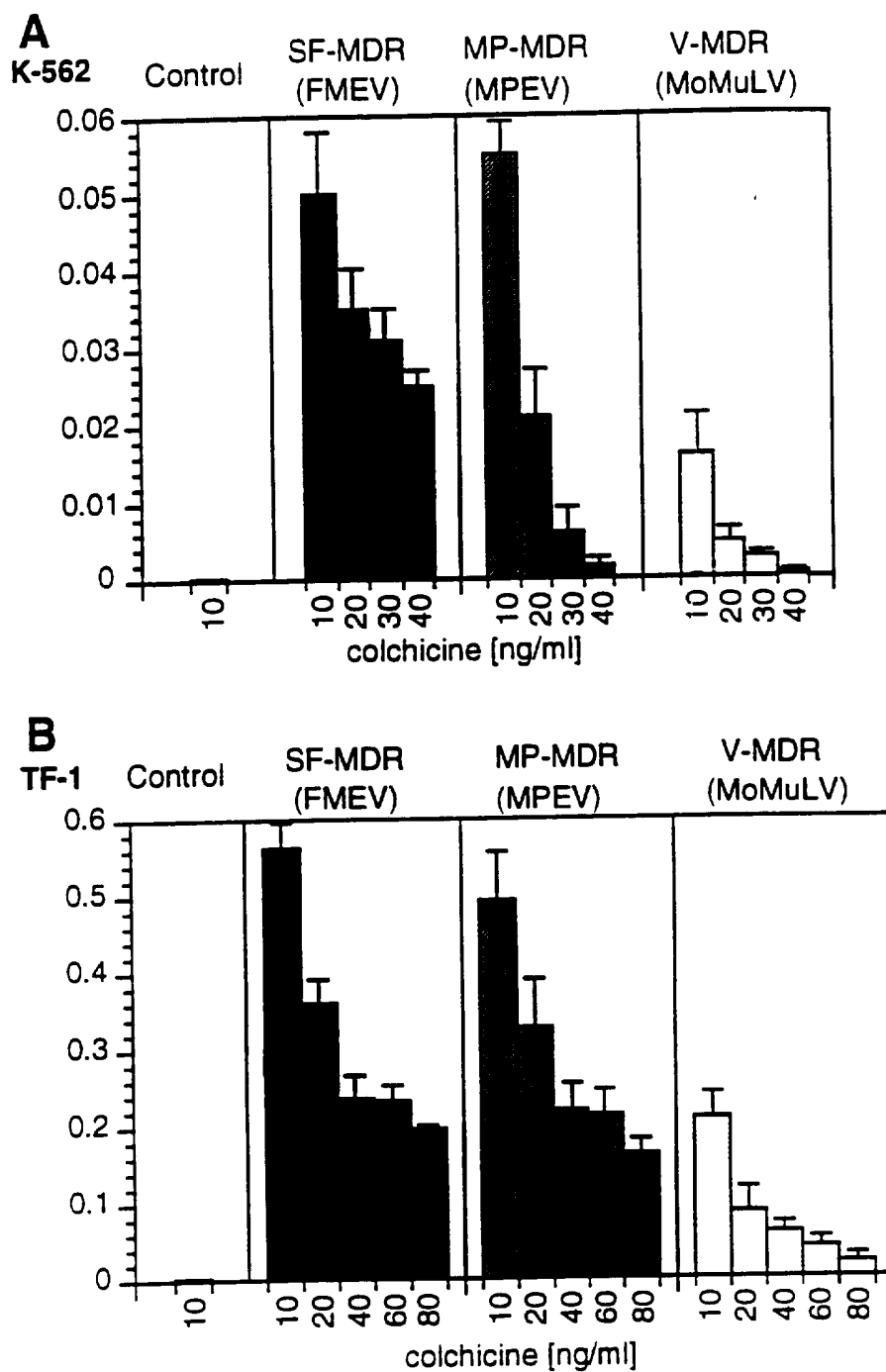
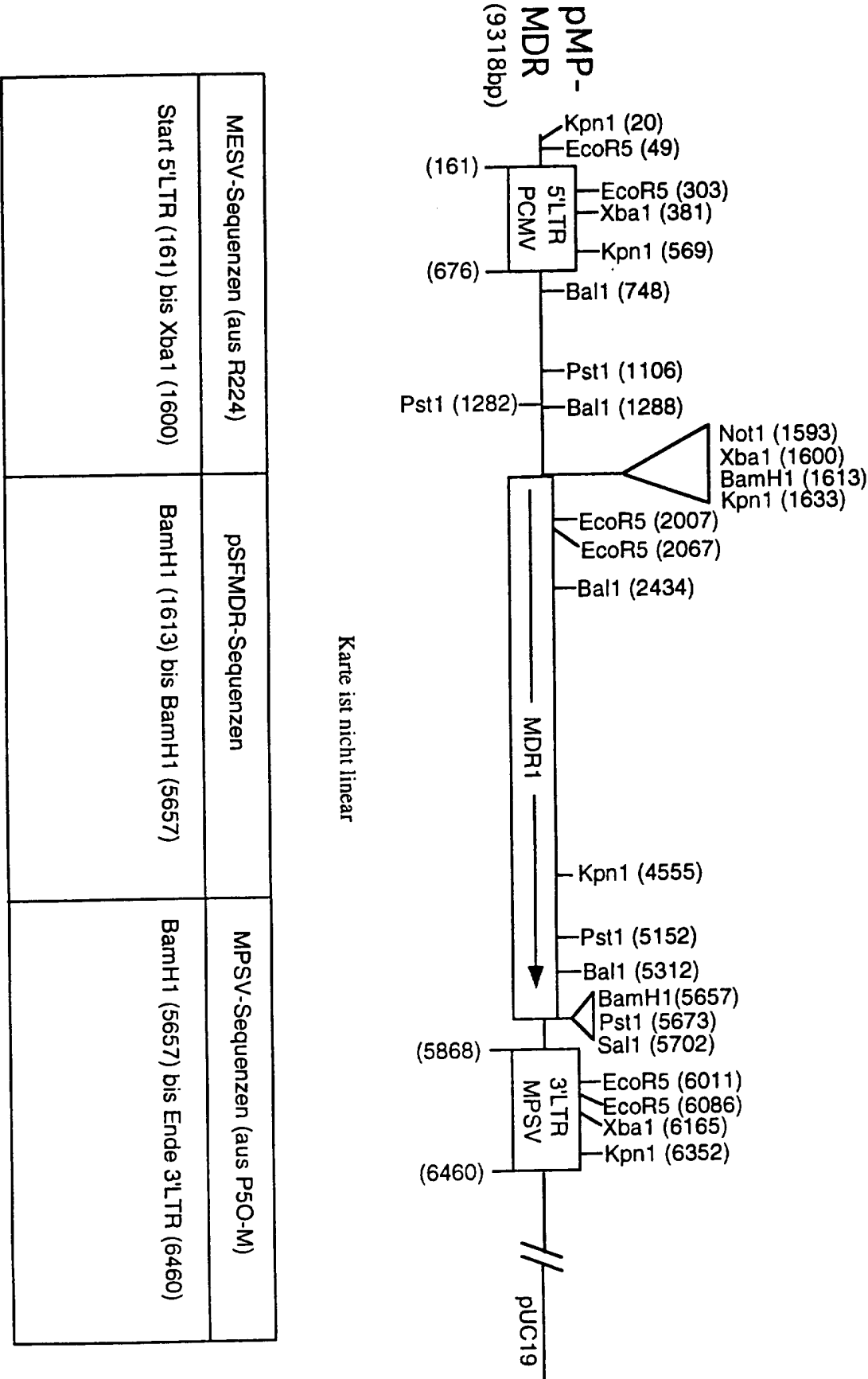


Fig. 9



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/EP 95/03175

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N7/01 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 80, July 1983 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 4408-4411, P.A. CHATIS ET AL. 'Role for the 3' end of the genome in the determining disease specificity of Friend and Moloney murine leukemia virus' see the whole document --- -/--	1-6,8,9, 11-25



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

20 December 1995

Date of mailing of the international search report

05.01.96

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+ 31-70) 340-3016

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat. Application No.

PCT/EP 95/03175

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., vol. 87, December 1990 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, pages 9202-9206, M. GREZ ET AL. 'Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells' cited in the application see the whole document ---	1-6,8,9, 11-25
Y	J. VIROLOGY, vol. 61, no. 3, March 1987 AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 693-700, Y. LI ET AL. 'Disease specificity of non defective Friend and Moleney murine leukemia viruses is controlled by a small number of nucleotides' see the whole document ---	1-6,8,9, 11-25
Y	COHEN-HAGUENAUER, O. AND M. BOIRON (ED.). COLLOQUE INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE), VOL. 219. TRANSFERT DE GENES CHEZ L'HOMME; (INSERM (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH AND MEDICAL RESEARCH) COLLOQUIUM), VOL. 219. HUMAN , 1991 pages 273-274, VELU T J ET AL. 'HIGHLY EFFICIENT RETROVIRAL VECTORS DERIVED FROM HARVEY AND FRIEND MURINE VIRUSES.' see the whole document ---	1-6,8,9, 11-25
Y	WO,A,94 09120 (UNIV COLUMBIA ;BANK ARTHUR (US); GOFF STEPHEN P (US); WARD MAUREEN) 28 April 1994 see the whole document ---	9
Y	WO,A,94 13824 (UNIV PARIS CURIE ;KLATZMANN DAVID (FR); CARUSO MANUEL (FR)) 23 June 1994 see the whole document ---	9
Y	VIRUS STRATEGIES, MOLECULAR BIOLOGY AND PATHOGENESIS, ED., W. DOERFLER AND P. BÖHM, 1993 VCH, WEINHEIM, BRD, pages 433-455, C.STOCKING ET AL. 'Regulation of retrovirus infection and expression in embryonic and hematopoietic stem cells' cited in the application see the whole document ---	1-6,8,9, 11-25

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internat'l Application No

PCT/EP 95/03175

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MOL. CELL. BIOL., vol. 10, no. 8, August 1990 ASM WASHINGTON, DC,US, pages 4045-4057, T.P. LOH ET AL. 'Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells' see the whole document ---	1-31
A	GENE, vol. 84, 1989 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,B.V.,AMSTERDAM,NL;; pages 419-427, D. VALERIO ET AL. 'Retrovirus-mediated gene transfer into embryonal carcinoma and hemopoietic stem cells: expression from a hybrid long terminal repeat' see the whole document ---	1-31
A	J. VIROLOGY, vol. 65, no. 1, January 1991 AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 382-388, E. AKGÜN ET AL. 'Determinants of retrovirus gene expression in ambryonal carcinoma cells' see the whole document ---	1-31
A	HUMAN GENE THERAPY, vol. 5, no. 6, June 1994 MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 667-677, L.A. COUTURE ET AL. 'Retroviral vectors containing chimeric promoter/enhancer elements exhibit cell-type-specific gene expression' see the whole document ---	1-31
A	HUMAN GENE THERAPY, vol. 2, no. 1, 1991 MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 61-70, G. BECK-ENGESER ET AL. 'Retroviral vectors related to the Myeloproliferative sarcoma virus allow efficient expression in hematopoietic stem and precursor cell lines, but retroviral infection is reduced in more primitive cells' see the whole document ---	1-31

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Internz Application No
PCT/EP 95/03175

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	J. VIROLOGY, vol. 51, no. 2, August 1984 AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 306-314, M.A. GONDA ET AL. 'Heteroduplex analysis of molecular clones of the pathogenic Friend virus complex: Friend murine leukemia virus, friend mink cell focus-forming virus, and the polycythemia- and anemia-inducing strains of Friend spleen focus-forming virus' see the whole document ---	1-31
P,X	J. VIROLOGY, vol. 68, no. 11, November 1994 AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 7235-7243, N. AHLERS ET AL. 'Selectable retrovirus vector encoding Friend virus gp55 or erythropoietin induce polycythemia with different phenotypic expression and disease progression' see the whole document ---	5
P,Y	see the whole document ---	1-4,8, 11-25
T	24TH ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, DUESSELDORF, GERMANY, AUGUST 27-31, 1995. EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE) 23 (8). 1995. 841. ISSN: 0301-472X, 30 August 1995 OSTERTAG W ET AL 'Novel and efficient retroviral vectors for somatic gene therapy and for stem cell protection.' abstract no. 344 -----	1-31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/EP 95/03175

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9409120	28-04-94	AU-B- 5444594	09-05-94
		CA-A- 2146929	28-04-94
		EP-A- 0672119	20-09-95

WO-A-9413824	23-06-94	FR-A- 2699191	17-06-94
		CA-A- 2150536	23-06-94
		EP-A- 0674716	04-10-95

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03175

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/86 C12N7/01 C12N5/10 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PROC. NATL. ACAD. SCI., Bd. 80, Juli 1983 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, Seiten 4408-4411, P.A. CHATIS ET AL. 'Role for the 3' end of the genome in the determining disease specificity of Friend and Moloney murine leukemia virus' siehe das ganze Dokument --- -/--	1-6,8,9, 11-25

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

20. Dezember 1995

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

05.01.96

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
 NL - 2280 HV Rijswijk
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	PROC. NATL.ACAD SCI., Bd. 87, Dezember 1990 NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US;, Seiten 9202-9206, M. GREZ ET AL. 'Embryonic stem cell virus, a recombinant murine retrovirus with expression in embryonic stem cells' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-6,8,9, 11-25
Y	J. VIROLOGY, Bd. 61, Nr. 3, März 1987 AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, Seiten 693-700, Y. LI ET AL. 'Disease specificity of non defective Friend and Moloney murine leukemia viruses is controlled by a small number of nucleotides' siehe das ganze Dokument ---	1-6,8,9, 11-25
Y	COHEN-HAGUENAUER, O. AND M. BOIRON (ED.). COLLOQUE INSERM (INSTITUT NATIONAL DE LA SANTÉ ET DE LA RECHERCHE MÉDICALE), VOL. 219. TRANSFERT DE GENES CHEZ L'HOMME; (INSERM (NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH AND MEDICAL RESEARCH) COLLOQUIUM), VOL. 219. HUMAN , 1991 Seiten 273-274, VELU T J ET AL 'HIGHLY EFFICIENT RETROVIRAL VECTORS DERIVED FROM HARVEY AND FRIEND MURINE VIRUSES.' siehe das ganze Dokument ---	1-6,8,9, 11-25
Y	WO,A,94 09120 (UNIV COLUMBIA ;BANK ARTHUR (US); GOFF STEPHEN P (US); WARD MAUREEN) 28.April 1994 siehe das ganze Dokument ---	9
Y	WO,A,94 13824 (UNIV PARIS CURIE ;KLATZMANN DAVID (FR); CARUSO MANUEL (FR)) 23.Juni 1994 siehe das ganze Dokument ---	9
Y	VIRUS STRATEGIES, MOLECULAR BIOLOGY AND PATHOGENESIS, ED., W. DOERFLER AND P. BÖHM, 1993 VCH, WEINHEIM, BRD, Seiten 433-455, C.STOCKING ET AL. 'Regulation of retrovirus infection and expression in embryonic and hematopoietic stem cells' in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-6,8,9, 11-25

-/--

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	J. VIROLOGY, Bd. 51, Nr. 2, August 1984 AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, Seiten 306-314, M.A. GONDA ET AL. 'Heteroduplex analysis of molecular clones of the pathogenic Friend virus complex: Friend murine leukemia virus, friend mink cell focus-forming virus, and the polycythemia- and anemia-inducing strains of Friend spleen focus-forming virus' siehe das ganze Dokument ---	1-31
P,X	J. VIROLOGY, Bd. 68, Nr. 11, November 1994 AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, Seiten 7235-7243, N. AHLERS ET AL. 'Selectable retrovirus vector encoding Friend virus gp55 or erythropoietin induce polycythemia with different phenotypic expression and disease progression' siehe das ganze Dokument ---	5
P,Y	---	1-4,8, 11-25
T	24TH ANNUAL MEETING OF THE INTERNATIONAL SOCIETY FOR EXPERIMENTAL HEMATOLOGY, DUESSELDORF, GERMANY, AUGUST 27-31, 1995. EXPERIMENTAL HEMATOLOGY (CHARLOTTESVILLE) 23 (8). 1995. 841. ISSN: 0301-472X, 30.August 1995 OSTERTAG W ET AL 'Novel and efficient retroviral vectors for somatic gene therapy and for stem cell protection.' abstract no. 344 -----	1-31

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	MOL. CELL. BIOL., Bd. 10, Nr. 8, August 1990 ASM WASHINGTON, DC,US, Seiten 4045-4057, T.P. LOH ET AL. 'Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells' siehe das ganze Dokument ---	1-31
A	GENE, Bd. 84, 1989 ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS,B.V.,AMSTERDAM,NL;, Seiten 419-427, D. VALERIO ET AL. 'Retrovirus-mediated gene transfer into embryonal carcinoma and hemopoietic stem cells: expression from a hybrid long terminal repeat' siehe das ganze Dokument ---	1-31
A	J. VIROLOGY, Bd. 65, Nr. 1, Januar 1991 AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, Seiten 382-388, E. AKGÜN ET AL. 'Determinants of retrovirus gene expression in ambryonal carcinoma cells' siehe das ganze Dokument ---	1-31
A	HUMAN GENE THERAPY, Bd. 5, Nr. 6, Juni 1994 MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, NEW YORK, US, Seiten 667-677, L.A. COUTURE ET AL. 'Retroviral vectors containing chimeric promoter/enhancer elements exhibit cell-type-specific gene expression' siehe das ganze Dokument ---	1-31
A	HUMAN GENE THERAPY, Bd. 2, Nr. 1, 1991 MARY ANN LIEBERT, INC. PUBLISHERS, NEW YORK, US, Seiten 61-70, G. BECK-ENGESER ET AL. 'Retroviral vectors related to the Myeloproliferative sarcoma virus allow efficient expression in hematopoietic stem and precursor cell lines, but retroviral infection is reduced in more primitive cells' siehe das ganze Dokument ---	1-31

-/--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichung, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 95/03175

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO-A-9409120	28-04-94	AU-B-	5444594	09-05-94
		CA-A-	2146929	28-04-94
		EP-A-	0672119	20-09-95

WO-A-9413824	23-06-94	FR-A-	2699191	17-06-94
		CA-A-	2150536	23-06-94
		EP-A-	0674716	04-10-95
