



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 699 35 714 T2 2007.12.27

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 1 054 988 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 699 35 714.4

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/GB99/00325

(96) Europäisches Aktenzeichen: 99 904 956.2

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1999/041397

(86) PCT-Anmeldetag: 17.02.1999

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 19.08.1999

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 29.11.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 04.04.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 27.12.2007

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

C12N 9/00 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

9803351 17.02.1998 GB

(73) Patentinhaber:

Oxford Biomedica (UK) Ltd., Oxford, GB

(74) Vertreter:

Dr. Weber, Dipl.-Phys. Seiffert, Dr. Lieke, 65183  
Wiesbaden

(84) Benannte Vertragsstaaten:

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

(72) Erfinder:

KINGSMAN, Alan John Greystones, Islip, Oxon  
OX5 2SF, GB; MITROPHANOUS, Kyriacos, Oxford  
OX4 1SZ, GB; KIM, Narry Pul-Kwang 2-,  
Eunopyung-gu, Seoul 122-042, KR

(54) Bezeichnung: ANTI-VIRALE VEKTOREN

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

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

## Beschreibung

### Gebiet der Erfindung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf neuartige virale Vektoren, die antivirale inhibitorische RNA-Moleküle zu Zielzellen bringen können.

### Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Die Anwendung der Gentherapie zur Behandlung von AIDS und HIV-Infektion wurde ausführlich behandelt (14). Die Arten der vorgeschlagenen therapeutischen Gene fallen in der Regel unter zwei umfassende Kategorien. In der ersten Kategorie codiert das Gen Proteinprodukte, die das Virus über eine Reihe von möglichen Wegen hemmen. Ein Beispiel eines solchen Proteins ist das RevM10-Derivat des HIV-Rev-Proteins (16). Das RevM10-Protein wirkt als eine transdominant negative Mutante und hemmt so kompetitiv die Rev-Funktion des Virus. Wie bei vielen Strategien auf Proteinbasis, ist das RevM10-Protein ein Derivat von nativem HIV-Protein. Einerseits liefert dies die Grundlage für die Anti-HIV-Wirkung, aber andererseits ergeben sich daraus ernsthafte Nachteile. Insbesondere erfordert diese Art von Strategie, dass in Abwesenheit des Virus das Gen nur geringfügig oder nicht exprimiert wird. Andernfalls werden gesunde Zellen, die das Gen beherbergen, ein Ziel für das zytotoxische-T-Lymphozyten-(CTL-)System des Wirts, welches das fremde Protein erkennt (17, 25). Die zweite umfassende Kategorie der therapeutischen Gene umgeht diese Probleme der CTL. Das therapeutische Gen codiert inhibitorische RNA-Moleküle. Die RNA wird nicht als Ziel von den CTL erkannt. Die RNA-Moleküle können sein: Antisense-RNA (15, 31), Ribozyme (5) oder "kompetitive Attrappen" (1).

**[0003]** Ribozyme sind enzymatisch aktive RNA-Moleküle, welche die sequenz-spezifische RNA-Prozessierung katalysieren. Der Aufbau und die Struktur der Ribozyme wurde in den letzten Jahren ausführlich in der Literatur beschrieben (3, 7, 31). Unter den wirkungsvollsten Systemen befinden sich jene, die Multitarget-Ribozyme liefern, die Ziel-Virus-RNA an mehreren Stellen spalten (5, 21).

**[0004]** In den letzten Jahren haben einige Labors retrovirale Vektorsysteme auf HIV-Basis entwickelt (2, 4, 18, 19, 22-24, 27, 32, 35, 39, 43). Im Zusammenhang mit einer Anti-HIV-Gentherapie haben diese Vektoren eine Reihe von Vorteilen gegenüber den konventionelleren Vektoren auf Maus-Basis, wie zum Beispiel, murine Leukämie-Virus-(MLV-)Vektoren. Erstens, HIV-Vektoren würden auf genau jene Zellen, die für eine HIV-Infektion empfänglich sind, zielen (22, 23). Zweitens, der Vektor auf HIV-Basis würde Zellen, wie zum Beispiel Makrophagen, die normalerweise gegenüber einer Transduktion durch murine Vektoren nicht empfänglich sind, transduzieren (19, 20). Drittens, das Anti-HIV-Vektorgenom würde sich in der Zellpopulation CD4+ durch jedes Virus (HIV), das der therapeutischen Strategie entkommen ist, ausbreiten (7). Das liegt daran, dass das Vektorgenom das Verpackungssignal besitzt, das von dem Viruspartikel-Verpackungssystem erkannt werden wird. Diese unterschiedlichen Attribute machen HIV-Vektoren zu einem wirkungsvollen Werkzeug auf dem Gebiet der Anti-HIV-Gentherapie.

**[0005]** Eine Kombination aus dem Multitarget-Ribozym und einem Vektor auf HIV-Basis wäre als therapeutische Strategie interessant. Das war jedoch bis jetzt nicht möglich. Die Herstellung von Vektorpartikeln findet in Erzeugerzellen statt, welche die Verpackungskomponenten der Partikel exprimieren und das Vektorgenom verpacken. Die Ribozyme, die konzipiert wurden um die virale RNA zu zerstören, würden daher auch die Expression der Komponenten des Vektorsystems auf HIV-Basis während der Vektorherstellung unterbrechen. Ziel der vorliegenden Erfindung ist es, dieses Problem zu überwinden.

**[0006]** WO-A-97/20060 beschreibt einen konditional replizierenden viralen Vektor, welcher Ribozyme codiert, die den Wildtyp spalten, jedoch nicht virale RNA.

### Zusammenfassung der Erfindung

**[0007]** Daher ist es eine Aufgabe der Erfindung ein System und ein Verfahren zum Erzeugen von Viruspartikeln, insbesondere von HIV-Partikeln, bereit zu stellen, welche Nukleotid-Konstrukte tragen, die inhibitorische RNA-Moleküle, wie beispielweise gegen ein entsprechendes Virus, wie HIV, in einer Zielzelle gerichtete Ribozyme und/oder Antisense-RNA, codieren, welches die oben erwähnten Probleme löst. Das System umfasst sowohl ein Virusgenom, welches inhibitorische RNA-Moleküle codiert, als auch Nukleotid-Konstrukte, die die für die Verpackung des Virusgenoms in einer Erzeugerzelle benötigten Komponenten codieren. Aber im Gegensatz zum Stand der Technik, obwohl die Verpackungskomponenten im Wesentlichen die gleiche Amino-

säuresequenz wie die entsprechenden Komponenten des Zielvirus haben, beeinflussen die inhibitorischen RNA-Moleküle die Herstellung von Viruspartikeln in den Erzeugerzellen nicht, weil die im viralen System verwendete Nukleotidsequenz der Verpackungskomponenten verändert wurde, um die inhibitorischen RNA-Moleküle davon abzuhalten, die Spaltung oder den Abbau der aus den Konstrukten hergestellten RNA-Transkripte zu verhindern. Ein derartiges Viruspartikel kann für die Behandlung von Virusinfektionen, insbesondere von HIV-Infektionen, verwendet werden.

**[0008]** Dementsprechend, stellt die vorliegende Erfindung einen Lentivirusvektor bereit, welcher folgendes umfasst:

- (i) ein Virusgenom, umfassend wenigstens eine erste Nukleotidsequenz, die ein Ribozym oder eine Antisense-Ribonukleinsäure codiert, wobei die Sequenz an eine zweite Nukleotidsequenz oder deren Transkriptionsprodukt binden und deren bzw. dessen Spaltung bewirken kann, wobei die zweite Nukleotidsequenz ein Viruspolypeptid codiert, welches für das Zusammensetzen von Viruspartikeln erforderlich ist,
- (ii) eine dritte Nukleotidsequenz, welche das Viruspolypeptid, das für den Einbau des Virusgenoms in Viruspartikel erforderlich ist, codiert, wobei die dritte Nukleotidsequenz eine andere Nukleotidsequenz hat als die zweite Nukleotidsequenz, so dass die dritte Nukleotidsequenz oder deren Transkriptionsprodukt für die Expression in Erzeugerzellen Codon-optimiert und gegenüber einer durch das Ribozym oder die Antisense-Ribonukleinsäure gesteuerten Spaltung resistent ist.

**[0009]** Vorzugsweise ist der Lentivirusvektor ein HIV-Vektor. Die zweite Nukleotidsequenz und die dritte Nukleotidsequenz sind üblicherweise von der gleichen Virusspezies, noch bevorzugter vom gleichen Virusstamm. Im Allgemeinen ist das Virusgenom ebenfalls von der gleichen Virusspezies, noch bevorzugter vom gleichen Virusstamm.

**[0010]** Im Fall der Lentivirusvektoren wird das für das Zusammensetzen von Viruspartikeln erforderliche Polypeptid unter gag-, pol- und env-Proteinen ausgewählt. Vorzugsweise sind wenigstens die gag- und pol-Sequenzen Lentivirus-Sequenzen, noch bevorzugter HIV-Sequenzen. Wahlweise oder zusätzlich ist die env-Sequenz eine Lentivirus-Sequenz, noch bevorzugter eine HIV-Sequenz.

**[0011]** In einer bevorzugten Ausführungsform ist die dritte Nukleotidsequenz als Ergebnis einer oder mehrerer konservativer Veränderungen in der Nukleotidsequenz, welche Spaltungsstellen, die von dem wenigstens einen Genprodukt erkannt werden, und/oder Bindungsstellen für das wenigstens eine Genprodukt, entfernen, gegenüber einer durch das Ribozym oder die Antisense-Ribonukleinsäure gesteuerten Spaltung resistent. Wenn das Genprodukt zum Beispiel ein Ribozym ist, wird die dritte Nukleotidsequenz so verändert, dass sie gegenüber einer Spaltung durch das Ribozym resistent wird.

**[0012]** Die dritte Nukleotidsequenz ist für die Expression in Wirtszellen Codon-optimiert. Die Wirtszellen, die Erzeugerzellen und Verpackungszellen umfassen, sind üblicherweise Säugerzellen.

**[0013]** In einer besonders bevorzugten Ausführungsform, (i) ist das Virusgenom ein HIV-Genom, welches Nukleotidsequenzen umfasst, die Anti-HIV-Ribozyme und/oder Anti-HIV-Antisense Sequenzen codieren, die gegen HIV-Verpackungskomponenten-Sequenzen (wie beispielsweise gag-pol) in einem Ziel-HIV gerichtet sind, und (ii) darüber hinaus umfasst das virale System, zur Herstellung von verpackten HIV-Partikeln Nukleotid-Konstrukte, die die gleichen Verpackungskomponenten (wie beispielsweise gag-pol-Proteine) wie im Ziel-HIV codieren, wobei die Sequenz der Nukleotid-Konstrukte sich von der des Ziel-HIV unterscheidet, so dass die Anti-HIV-Ribozym- und/oder Antisense-HIV-Sequenzen die Spaltung oder den Abbau der gag-pol-Transkripte während des Herstellens von HIV-Partikeln in Erzeugerzellen nicht ausführen können.

**[0014]** Die vorliegende Erfindung stellt außerdem ein Lentiviruspartikel bereit, welches einen Lentivirusvektor gemäß der vorliegenden Erfindung und ein oder mehrere Polypeptide, die durch die dritten Nukleotidsequenzen gemäß der vorliegenden Erfindung codiert sind, umfasst. Zum Beispiel stellt die vorliegende Erfindung ein Lentiviruspartikel bereit, das mit Hilfe des Lentivirusvektor-Herstellungssystems der Erfindung hergestellt wurde.

**[0015]** In einem weiteren Aspekt stellt die vorliegende Erfindung ein Verfahren zum Herstellen eines Lentiviruspartikels bereit, wobei das Verfahren umfasst, dass man (i) einen Virusgenomvektor gemäß der vorliegenden Erfindung, (ii) eine oder mehrere dritte Nukleotidsequenzen gemäß der vorliegenden Erfindung und (iii) Nukleotidsequenzen, die die anderen wesentlichen Virusverpackungskomponenten, die nicht durch die eine oder die mehreren dritten Nukleotidsequenzen codiert werden, codieren, in eine Wirtszelle einbringt.

**[0016]** Darüber hinaus erörtert die vorliegende Erfindung ein mit Hilfe des Verfahrens der Erfindung hergestelltes Lentiviruspartikel.

**[0017]** Außerdem stellt die vorliegende Erfindung eine pharmazeutische Zusammensetzung, welche ein Lentiviruspartikel gemäß der vorliegenden Erfindung zusammen mit einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel umfasst, bereit.

**[0018]** Das Lentivirussystem der Erfindung oder Viruspartikel der Erfindung können zur Behandlung von Virusinfektionen verwendet werden, insbesondere Retrovirusinfektionen, wie beispielsweise Lentivirusinfektionen einschließlich HIV-Infektionen. Dadurch stellt die vorliegende Erfindung folgendes bereit: die Verwendung eines Lentivirussystems, Lentiviruspartikel oder eine pharmazeutische Zusammensetzung der vorliegenden Erfindung für die Herstellung eines Medikaments zur Behandlung einer Virusinfektion bei Mensch oder Tier, die eine Virusinfektion erleiden.

**[0019]** Die Erfindung bezieht sich insbesondere auf Vektoren auf HIV-Basis, die Anti-HIV-Ribozyme tragen. Die Erfindung kann jedoch für alle anderen Lentiviren angewandt werden, bei welchen eine Gentherapie sinnvoll erscheint. Die Erfindung wird hier für HIV veranschaulicht, aber dies soll die Anwendung der Erfindung nicht auf Anti-HIV-Vektoren auf HIV-Basis begrenzen.

#### Ausführliche Beschreibung der Erfindung

**[0020]** Die Bezeichnung „Virusvektor“ bezieht sich auf ein Nukleotid-Konstrukt, das ein Virusgenom, welches in einer Wirtszelle transkribiert werden kann, umfasst, dessen Genom ausreichende virale genetische Information umfasst, um die Verpackung des viralen RNA-Genoms bei Vorhandensein von Verpackungskomponenten in ein Viruspartikel, das eine Zielzelle infizieren kann, zu gestatten. Die Infektion einer Zielzelle umfasst eine reverse Transkription und, gegebenenfalls für bestimmte Viren, Einbau in das Genom der Zielzelle. Der Virusvektor, der üblicherweise verwendet wird, trägt heterologe Codierungssequenzen (Nukleotide von Interesse), die durch den Vektor zur Zielzelle gebracht werden, beispielsweise eine erste Nukleotidsequenz, die ein Ribozym codiert. Ein Virusvektor kann sich nicht selbstständig replizieren um infektiöse Viruspartikel in der endgültigen Zielzelle herzustellen.

**[0021]** Der Begriff „Virusvektor-System“ soll ein Kit bezeichnen, das aus Teilen besteht, welche kombiniert mit anderen notwendigen Komponenten für die Herstellung von Viruspartikeln zum Herstellen von Viruspartikeln in Wirtszellen verwendet werden können. Zum Beispiel kann die erste Nukleotidsequenz üblicherweise in einem Plasmidvektor-Konstrukt vorliegen, welches für die Klonierung der ersten Nukleotidsequenz in das Virusgenom-Vektorkonstrukt geeignet ist. Wenn in einem Kit eine dritte Nukleotidsequenz kombiniert wird, welche üblicherweise ebenfalls in einem separaten Plasmidvektor-Konstrukt enthalten ist, umfasst die resultierende Kombination des Plasmids, welches die erste Nukleotidsequenz enthält, mit dem Plasmid, welches die dritte Nukleotidsequenz enthält, die wesentlichen Bestandteile der Erfindung. Solch ein Kit kann dann vom Fachmann für die Herstellung von geeigneten Virusvektor-Genom-Konstrukten verwendet werden, welche, wenn sie zusammen mit dem Plasmid, welches die dritte Nukleotidsequenz enthält und wahlweise mit Nukleinsäurekonstrukten, die andere für das Zusammensetzen von Viren erforderliche Komponenten codieren, in eine Wirtszelle transfiziert werden, zur Herstellung von infektiösen Viruspartikeln führen.

**[0022]** Wahlweise kann die dritte Nukleotidsequenz dauerhaft in einer Verpackungszelllinie, die zum Kit hinzugefügt wird, enthalten sein.

**[0023]** Das Kit kann die anderen Komponenten, die für die Herstellung von Viruspartikeln erforderlich sind, wie beispielsweise Wirtszellen und andere Plasmide, die für das Zusammensetzen von Viren erforderlichen Polypeptide codieren, umfassen. Beispielhaft kann das Kit folgendes enthalten: (i) ein Plasmid, welches eine erste Nukleotidsequenz, die ein Anti-HIV-Ribozym codiert, enthält und (ii) ein Plasmid, welches eine dritte Nukleotidsequenz, die ein modifiziertes gag-pol-Konstrukt, welches nicht durch das Anti-HIV-Ribozym gespalten werden kann, codiert, enthält. Optionale Komponenten wären dann: (a) ein HIV-Virusgenom-Konstrukt, welches geeignete Erkennungsstellen für Restriktionsenzyme für die Klonierung von der ersten Nukleotidsequenz in das Virusgenom besitzt, (b) ein Plasmid, welches ein VSV-G-env-Protein codiert. Wahlweise können Nukleotidsequenzen, welche Viruspolypeptide codieren, die für das Zusammensetzen von Viruspartikeln erforderlich sind, in dem Kit in Form von Verpackungszelllinien, die die Nukleotidsequenzen umfassen, zum Beispiel eine VSG-G-Expressionszelllinie, bereitgestellt werden.

**[0024]** Die Bezeichnung „Virusvektor-Herstellungssystem“ bezieht sich auf das oben beschriebene Virusvek-

tor-System, wobei die erste Nukleotidsequenz bereits in ein geeignetes Virusvektor-Genom eingefügt wurde.

**[0025]** Virusvektoren sind üblicherweise Retrovirusvektoren, insbesondere Lentivirusvektoren, wie beispielsweise HIV-Vektoren. Der Lentivirusvektor der vorliegenden Erfindung kann von einem beliebigen geeigneten Lentivirus abgeleitet werden oder ableitbar sein. Eine große Anzahl verschiedener Retroviren sind identifiziert worden. Die Beispiele umfassen: das Murine-Leukämievirus (MLV), das Humane-Immundefizienz-Virus (HIV), das Simiane-Immundefizienz-Virus, das Humane-T-Zell-Leukämie-Virus (HTLV), das Equine-Infektiöse-Anämie-Virus (EIAV), Maus-Mammatumorvirus (MMTV), Rous-Sarkom-Virus (RSV), Fujinami-Sarkom-Virus (FuSV), Moloney-Maus-Leukämie-Virus (Mo-MLV), FBR-Maus-Osteosarkom-Virus (FBR-MSV), Moloney-Maus-Sarkom-Virus (Mo-MSV), Abelson-Maus-Leukämie-Virus (A-MLV), Vogel-Myelocytomatose-Virus-29 (MC29) und Vogel-Erythroblastose-Virus (AEV). Eine detaillierte Liste von Retroviren ist unter Coffin et al., 1997, „Retroviruses“, Cold Spring Harbour Laboratory Press. Hrsg.: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus S. 758-763 zu finden.

**[0026]** Einzelheiten über den Aufbau des Genoms einiger Retroviren sind im Fachgebiet zu finden. Beispielsweise können Einzelheiten über HIV und Mo-MLV in der NCBI-Genbank (Zugriffsschlüssel für die Genome AF033819 beziehungsweise AF033811) gefunden werden.

**[0027]** Die Gruppe der Lentiviren kann noch weiter aufgeteilt werden in „Primaten-“ und „Nicht-Primaten-Lentiviren“. Beispiele für Primaten-Lentiviren umfassen das humane Immundefizienz-Virus (HIV), den verursachenden Erreger des erworbenen Immundefekt-Syndroms (AIDS) und das Simiane Immundefizienz-Virus (SIV). Die Gruppe der Nicht-Primaten-Lentiviren umfasst sowohl den Prototypen eines „langsam“en Virus, das Visna-Maedi-Virus (VMV), als auch das verwandte Caprine Arthritis-Encephalitis-Virus (CAEV), das Equine Infektiöse-Anämie-Virus (EIAV) und das erst in letzter Zeit beschriebene Feline Immundefizienz-Virus (FIV) und das Bovine Immundefizienz-Virus (BIV).

**[0028]** Der Grundaufbau eines Retrovirusgenoms ist eine 5' LTR und eine 3' LTR, dazwischen oder innerhalb liegen die Verpackungssignale, die das Genom dazu befähigen verpackt zu werden, eine Primerbindungsstelle, Integrationsstellen um die Integration in das Wirtszellengenom zu erlauben und gag-, pol- und env-Gene, die die Verpackungskomponenten codieren – das sind Polypeptide, die für das Zusammensetzen der Viruspartikel erforderlich sind. Komplexere Retroviren haben weitere Eigenschaften, beim HIV beispielsweise rev- und RRE-Sequenzen, die einen effizienten Export der RNA-Transkripte des integrierten Provirüs vom Kern zum Zytoplasma einer infizierten Zielzelle ermöglichen.

**[0029]** Im Provirüs werden diese Gene an beiden Enden durch Elemente, den sogenannten „langen endständigen Wiederholungssequenzen“ (LTRs) flankiert. Die LTRs sind für die Integration des Provirüs und die Transkription verantwortlich. Außerdem dienen LTRs als Verstärker der Promotor-Sequenzen und können die Expression von Virusgenen kontrollieren. Die Verpackung der retroviralen RNA findet aufgrund der psi-Sequenz, die am 5' Ende des Virusgenoms lokalisiert ist, statt.

**[0030]** Die LTRs selbst sind identische Sequenzen, die in drei Elemente unterteilt werden können, welche U3, R und U5 genannt werden. U3 stammt von der für das 3'-Ende der RNA einzigartigen Sequenz ab. R stammt von einer Sequenz, die an beiden Enden der RNA wiederholt wird, ab und U5 stammt von der für das 5'-Ende einzigartigen Sequenz ab. Die Länge der drei Elemente kann zwischen verschiedenen Retroviren erheblich variieren.

**[0031]** In einem schadhaften Retrovirusvektor-Genom können gag, pol und env fehlen oder nicht funktionsfähig sein. Die R-Regionen an beiden Enden der RNA sind Wiederholungssequenzen. U5 und U3 repräsentieren jeweils am 5'- und am 3'-Ende des RNA-Genoms einzigartige Sequenzabschnitte.

**[0032]** Bei einem üblicherweise in einer Gentherapie verwendeten Retrovirusvektor kann wenigstens ein Teil einer oder mehrerer Codierungsregionen für die gag-, pol- und env-Proteine, die wesentlich für die Replikation sind, aus dem Virus entfernt werden. Dadurch entsteht ein Retrovirusvektor mit einem Replikationsfehler. Die entfernten Abschnitte können sogar durch eine Nukleotidsequenz von Interesse (NOI) ersetzt werden, wie beispielsweise durch eine erste Nukleotidsequenz der Erfindung, um ein Virus zu erzeugen, das fähig ist sein Genom in ein Wirtsgenom zu integrieren, wobei das modifizierte Virusgenom unfähig ist, sich aufgrund der fehlenden Strukturproteine selbst zu vermehren. Nach der Integration in das Wirtsgenom, wird die NOI exprimiert, wodurch sich beispielsweise ein therapeutischer und/oder diagnostischer Effekt ergibt. Dementsprechend wird der Transfer der NOI in eine Stelle von Interesse üblicherweise folgendermaßen erreicht: Integration der NOI in einen rekombinanten Virusvektor, Verpackung des modifizierten Virusvektors in eine Virionenhülle und Zu-

lassung der Transduktion der Stelle von Interesse, beispielsweise einer gezielten Zelle oder einer gezielten Zellpopulation.

**[0033]** Das in der vorliegenden Erfindung verwendete Retrovirusgenom wird daher mindestens umfassen: (5')-R-U5 – eine oder mehrere erste Nukleotidsequenzen – U3-R(3'). Der Plasmidvektor jedoch, welcher verwendet wird, um das Retrovirusgenom innerhalb der Wirtszelle/Verpackungszelle zu erzeugen, wird außerdem transkriptionale regulatorische Kontrollsequenzen umfassen, die funktionsfähig mit dem Retrovirusgenom verbunden sind, um die Transkription des Genoms in einer Wirtszelle/Verpackungszelle zu steuern. Diese regulatorischen Sequenzen können die natürlichen Sequenzen sein, die mit der transkribierten Retrovirussequenz assoziiert sind, zum Beispiel die 5' U3-Region, oder sie können heterologe Promotoren, beispielsweise ein weiterer viraler Promotor, zum Beispiel der CMV-Promotor, sein.

**[0034]** Einige Retrovirusgenome benötigen zusätzliche Sequenzen für eine effiziente Virusherstellung. Im Fall von HIV werden zum Beispiel rev- und RRE-Sequenz bevorzugt eingeschlossen. Durch Codon-Optimierung kann der Bedarf an rev und RRE reduziert oder eliminiert werden.

**[0035]** Wenn das Retrovirusgenom erst einmal als provirale DNA in das Genom der Zielzelle integriert ist, müssen die Ribozymsequenzen exprimiert werden. In einem Retrovirus ist der Promotor in der 5' LTR U3-Region des Provirus lokalisiert. In Retrovirusvektoren kann der Promotor, der die Expression eines therapeutischen Gens steuert, ein nativer Retrovirus-Promotor in der 5' U3-Region oder ein alternativer in den Vektor eingefügter Promotor sein. Der alternative Promotor kann den nativen 5' U3-Promoter des Retrovirus räumlich ersetzen oder er kann an einer anderen Stelle des Vektorgenoms, beispielsweise zwischen den LTRs, eingefügt werden.

**[0036]** Dementsprechend wird die erste Nukleotidsequenz außerdem mit einer transkriptionalen regulatorischen Kontrollsequenz funktionsfähig verbunden sein, um das Auftreten von Transkription der ersten Nukleotidsequenz in der Zielzelle zu ermöglichen. Die Kontrollsequenz wird üblicherweise in Säugerzellen aktiv sein. Die Kontrollsequenz kann zum Beispiel ein viraler Promotor, wie beispielsweise ein natürlicher viraler Promotor oder ein CMV-Promotor, oder ein Säugetier-Promotor sein. Die Verwendung eines Promotors, der bevorzugt in einem bestimmten Zelltyp oder Gewebetyp, welche das zu behandelnde Virus primär infiziert, aktiv ist, wird besonders bevorzugt. Dementsprechend kann in einer Ausführungsform eine gewebespezifische regulatorische Sequenz verwendet werden. Die regulatorischen Kontrollsequenzen, die die Expression der einen oder mehreren Nukleotidsequenzen steuern, können konstitutive oder regulierte Promotoren sein.

**[0037]** Retrovirusvektoren mit einem Replikationsfehler werden üblicherweise vermehrt, um beispielsweise geeignete retrovirale Vektortiter für eine anschließende Transduktion herzustellen, indem eine Verpackungs- oder Helferzelllinie mit dem rekombinanten Vektor kombiniert wird. Das heißt, dass die drei Verpackungsproteine in trans bereitgestellt werden können.

**[0038]** Eine „Verpackungzelllinie“ enthält ein oder mehrere der retroviraalen gag-, pol- und env-Gene. Die Verpackungzelllinie stellt die für die Verpackung retroviraler DNA erforderlichen Proteine her, kann aber aufgrund einer fehlenden psi-Region die Verpackung nicht herbeiführen. Wenn jedoch ein rekombinanter Vektor, der eine NOI und eine psi-Region trägt, in eine Verpackungzelllinie eingebracht wird, können die Helferproteine den psi-positiven rekombinanten Vektor verpacken, um einen rekombinanten Virusstamm herzustellen. Dieser Virusstamm kann dafür verwendet werden Zellen zu transduzieren, um NOI in das Genom der Zielzellen einzubringen. Es wird bevorzugt, dass ein psi-plus genanntes psi-Verpackungssignal verwendet wird, dass zusätzliche von stromaupwärts des Spleiß-Spenders bis stromabwärts des gag-Startcodons (Bender et al. (46)) umfassende Sequenzen enthält, weil gezeigt wurde, dass dadurch die viralen Titer gesteigert werden.

**[0039]** Das rekombinante Virus, dessen Genom alle Gene fehlen, die für die Herstellung von Virusproteinen erforderlich sind, kann nur einmal transduzieren und kann sich nicht vermehren. Diese Virusvektoren, die nur zu einer Runde der Transduktion von Zielzellen fähig sind, sind als in der Replikation defekte Vektoren bekannt. Infolgedessen wird NOI in das Wirts-/Zielzellen-Genom eingebracht ohne potentiell gefährliche Retroviren zu generieren. Eine Zusammenfassung der verfügbaren Verpackungslinien ist unter Coffin et al., 1997 aufgeführt (ebenda).

**[0040]** Vorzugsweise werden retrovirale Verpackungzelllinien verwendet, in denen die gag-, pol- und env-Codierungsregionen des Virus auf separate „Expressionsplasmide“, welche unabhängig in eine Verpackungzelllinie transfiziert werden, getragen werden. Diese Strategie, manchmal als das drei-Plasmide-Transfektions-Verfahren (Soneoka et al. (33)) bezeichnet, verringert das Potential einen replikationskompetenten Vi-

rus herzustellen, weil drei Rekombinationsvorgänge für das Herstellen von Wildtyp-Viren erforderlich sind. Rekombination wird erheblich durch Homologie begünstigt. Die Verringerung oder Beseitigung der Homologie zwischen den Genomen des Vektors und des Helfers kann ebenfalls dazu verwendet werden, die Gefahr einen replikationskompetenten Helfervirus herzustellen, zu reduzieren.

**[0041]** Eine Alternative zu stabil transfizierten Verpackungszelllinien ist die Verwendung von transient transfizierten Zelllinien. Transiente Transfektionen können vorzugsweise verwendet werden, um die Niveaus der Vektorherstellung zu messen, während die Vektoren entstehen. In dieser Hinsicht vermeiden transiente Transfektionen die größere Zeitspanne, die erforderlich ist, um stabile Vektorproduzierende Zelllinien zu erzeugen und können außerdem verwendet werden, falls der Vektor oder retrovirale Verpackungskomponenten toxisch für die Zellen sind. Die Komponenten, die üblicherweise verwendet werden, um Retrovirusvektoren zu erzeugen, umfassen ein gag-/pol-Proteine codierendes Plasmid, ein env-Protein codierendes Plasmid und ein eine NOI enthaltendes Plasmid. Die Vektorherstellung umfasst die transiente Transfektion von Zellen mit einer oder mehreren dieser Komponenten, wobei die Zellen weitere erforderliche Komponenten enthalten. Wenn der Vektor toxische Gene codiert oder Gene, die die Replikation der Wirtszelle stören, beispielsweise Inhibitoren des Zellzyklus oder Gene, die Apoptose induzieren, kann es schwierig sein, stabile Vektorproduzierende Zelllinien zu erzeugen, eine transiente Transfektion jedoch kann verwendet werden, um den Vektor herzustellen bevor die Zelle stirbt. Außerdem sind Zelllinien entwickelt worden, die mittels transakter Transfektion Vektortiter erzielen, die mit den von stabilen Vektor-produzierenden Zelllinien erreichten Niveaus vergleichbar sind (Pear et al. (47)).

**[0042]** Erzeugerzellen/Verpackungszellen können von jedem geeigneten Zelltyp sein. Am häufigsten werden Erzeugerzellen von Säugetieren verwendet, andere Zellen jedoch, wie beispielsweise Insektenzellen, werden nicht ausgeschlossen. Zweifelsfrei werden die Erzeugerzellen fähig sein müssen, die env- und gag-, pol-mRNA effizient zu translatieren. Viele geeignete Erzeuger-/Verpackungszelllinien sind dem Fachmann bekannt. Der Fachmann kann außerdem geeignete Verpackungszelllinien herstellen, indem zum Beispiel ein Verpackungskomponenten codierendes Nukleotid-Konstrukt stabil in eine Zelllinie eingebracht wird.

**[0043]** Wie weiter unten erläutert werden wird, wo das Retrovirusgenom ein inhibitorisches RNA-Molekül codiert, welches gag-, pol- und/oder env-RNA-Transkripte spalten kann, werden die Nukleotidsequenzen, die in der Verpackungszelllinie entweder integriert oder in einem Plasmid oder in der transient transfizierten Erzeugerzelllinie, welche für gag-, pol- und/oder env-Proteine codieren, vorliegen, so verändert werden, dass die Bindung des/der inhibitorischen RNA-Moleküls bzw. RNA-Moleküle verringert oder verhindert wird. Auf diese Weise, wird das bzw. werden die inhibitorische(n) RNA-Molekül(e) die Expression von Verpackungszelllinien-Komponenten, die wesentlich für die Verpackung von Viruspartikeln sind, nicht verhindern.

**[0044]** Die Verwendung von hochtitrigen Viruspräparationen sowohl in experimentellen als auch in praktischen Anwendungen ist sehr erstrebenswert. Verfahren um den Virustiter zu erhöhen, umfassen die Verwendung von einem psi-plus-Verpackungssignal, wie weiter oben erläutert und die Konzentrierung des Virusstocks. Außerdem hat die Verwendung von unterschiedlichen Hüllproteinen, wie beispielsweise des G-Proteins des Vesikuläre-Stomatitis-Virus, die Titer nach der Konzentrierung auf  $10^9$  pro ml erhöht (Cosset et al. (48)). Üblicherweise jedoch wird das Hüllprotein so ausgewählt, dass das Viruspartikel vorzugsweise Zellen, die mit dem Virus, welches behandelt werden soll, infiziert sind, infizieren wird. Zum Beispiel, wenn ein HIV-Vektor zur Behandlung einer HIV-Infektion verwendet wird, so wird das verwendete env-Protein ein HIV-env-Protein sein.

**[0045]** Erste Nukleotidsequenzen für die Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung codieren Genprodukte, die die Spaltung und/oder enzymatische Degradation einer Ziel-Nukleotidsequenz zur Folge haben und Ribonukleotide, wie beispielsweise ein Ribozym oder eine Antisense-Sequenz.

**[0046]** Ribozyme sind RNA-Enzyme, welche RNA an spezifischen Stellen spalten. Ribozyme können so konstruiert werden, dass sie für jede gewählte Sequenz, die eine Ribozym-Spaltungsstelle enthält, spezifisch sind. Dementsprechend können Ribozyme konstruiert werden, welche ausgewählte Erkennungsstellen in transkribierten Virussequenzen besitzen. Zum Beispiel, erkennen und spalten Ribozyme, die durch die erste Nukleotidsequenz codiert sind, wesentliche Elemente des Virusgenoms, die für das Herstellen von Viruspartikeln, wie beispielsweise Verpackungskomponenten, erforderlich sind. Dementsprechend umfassen solche wesentlichen Elemente für Retrovirusgenome gag-, pol- und env-Genprodukte. Ein geeignetes Ribozym, welches wenigstens eine der gag-, pol- und env-Gensequenzen erkennen kann oder noch üblicher, die transkribierten RNA-Sequenzen dieser Gene, kann an eine solche Sequenz binden und sie spalten. Dies wird die Herstellung von gag-, pol- und env-Protein dementsprechend verringern oder verhindern und dadurch die Herstellung von Retroviruspartikeln verringern oder verhindern.

**[0047]** Es gibt verschiedene Formen von Ribozymen, die Hammerkopf-, Haarnadel- und antigenomische Hepatitis-Delta-Ribozyme umfassen. Bevorzugt werden hier die Hammerkopf-Ribozyme verwendet, zum Teil weil sie relativ klein sind, weil die Sequenzanforderungen für ihre Ziel-Spaltungsstelle minimal sind, und weil sie gut charakterisiert worden sind. Die in der Forschung derzeit meist verwendeten Ribozyme sind Hammerkopf- und Haarnadel-Ribozyme.

**[0048]** Jedes einzelne Ribozym besitzt ein Motiv, welches eine Erkennungsstelle in der Ziel-RNA erkennt und an sie bindet. Dieses Motiv nimmt die Form von einem oder mehreren „Bindungssarmen“ an, gewöhnlich sind es zwei Bindungssarme. Die Bindungssarme in Hammerkopf-Ribozymen sind die flankierenden Sequenzen Helix I und Helix III, welche Helix II flankieren. Diese können unterschiedlich lang sein, in der Regel jede zwischen 6 und 10 Nukleotiden, sie können jedoch kürzer oder länger sein. Die Länge der flankierenden Sequenzen kann die Spaltungsrate beeinflussen. Zum Beispiel wurde festgestellt, dass sich durch Reduzierung der Gesamtzahl von Nukleotiden in den flankierenden Sequenzen von 20 auf 12, die Umsatzrate der Spaltung einer HIV-Sequenz durch das Ribozym um das 10-fache erhöht (44). Ein katalytisches Motiv in dem Ribozym Helix II in Hammerkopf-Ribozymen spaltet die Ziel-RNA an einer Stelle, welche als Spaltungsstelle bezeichnet wird. Ob das Ribozym eine RNA spalten wird oder nicht, wird durch die Präsenz oder das Fehlen einer Erkennungsstelle für das Ribozym, welche eine geeignete Spaltungsstelle enthält, bestimmt.

**[0049]** Jeder Typ Ribozym erkennt seine eigene Spaltungsstelle. An der Spaltungsstelle des Hammerkopf-Ribozyms liegt direkt stromaufwärts das Basentriplett GUX, wobei das G Guanin, U Uracil und X irgendeine Nukleobase ist. Haarnadel-Ribozyme haben die Spaltungsstelle BCUGNYR, wobei B jede Nukleobase außer Adenin sein kann, N jedes beliebige Nukleotid sein kann, Y Cytosin oder Thymin sein kann, und R Guanin oder Adenin sein kann. Die Spaltung durch Haarnadel-Ribozyme findet zwischen G und N der Spaltungsstelle statt.

**[0050]** Die Nukleinsäuresequenzen, welche die Verpackungskomponenten codieren (die „dritten Nukleotidsequenzen“) können resistent gegen das Ribozym oder Ribozyme sein, weil ihnen Spaltungsstellen für das Ribozym oder die Ribozyme fehlen. Dadurch wird die enzymatische Aktivität durch das Ribozym oder die Ribozyme unterbunden und daher gibt es dort keine effektive Erkennungsstelle für das Ribozym oder die Ribozyme. Alternativ oder zusätzlich können die potentiellen Erkennungsstellen in den flankierenden Sequenzen, welche einen Teil der Erkennungsstelle bilden, an die das Ribozym bindet, verändert werden. Dies beseitigt entweder die Bindung des Ribozym-Motivs an die Erkennungsstelle oder verringert die Bindungsfähigkeit so weit, dass alle Ribozym-Ziel-Komplexe destabilisiert werden und dadurch die Spezifität und katalytische Aktivität des Ribozys verringert werden. Falls die flankierenden Sequenzen nur verändert werden, sollten sie vorzugsweise so verändert werden, dass die katalytische Aktivität des Ribozys an der modifizierten Zielsequenz vernachlässigbar ist und tatsächlich entfernt wird.

**[0051]** Vorzugsweise wird eine Reihe von verschiedenen Anti-HIV-Ribozymen in der Erfindung verwendet (5, 7, 10, 13, 21, 36, 38, 40). Diese können beliebige Anti-HIV-Ribozyme sein, müssen aber ein oder mehrere umfassen, welche die RNA spalten, die für die Expression von gag, pol oder env erforderlich ist. Vorzugsweise wird eine Vielzahl von Ribozymen verwendet, die zusammen gag-, pol- und env-RNA des nativen Retrovirus an einer Vielzahl von Stellen spalten können. Da HIV als eine Population von Quasispezies vorliegt, werden nicht alle Zielsequenzen für die Ribozyme in allen HIV-Varianten enthalten sein. Das Problem, das sich durch diese Vielfalt ergibt, kann durch die Verwendung mehrerer Ribozyme gelöst werden. Mehrere Ribozyme können in Serie in einem einzelnen Vektor enthalten sein und können unabhängig funktionieren, wenn sie als einzelne RNA-Sequenz exprimiert werden. Eine einzelne RNA, die zwei oder mehr Ribozyme, die unterschiedliche Ziel-Erkennungsstellen haben, enthält, kann als Multitarget-Ribozym bezeichnet werden. Die Anordnung von Ribozymen in Serie hat eine verbesserte Spaltung gezeigt. Die Verwendung einer Vielzahl von Ribozymen ist nicht auf die Behandlung einer HIV-Infektion begrenzt, sondern kann im Zusammenhang mit anderen Viren, Retroviren oder anderweitig eingesetzt werden.

**[0052]** Die Antisense-Technologie ist dem Fachmann gut bekannt. Es gibt mehrere Mechanismen, von denen angenommen wird, dass Antisense-Sequenzen auf diese Art die Genexpression hemmen. Ein Mechanismus, von dem angenommen wird, dass Antisense-Sequenzen auf diese Art funktionieren, ist die Rekrutierung des Zellproteins RNaseH zu der Zielsequenz-/Antisense-Konstrukt-Heteroduplex, was zur Spaltung und zum Abbau der Heteroduplex führt. Daher kann gesagt werden, dass das Antisense-Konstrukt, im Gegensatz zu Ribozymen, indirekt zu Spaltung/Abbau der Zielsequenz führt. Dementsprechend kann gemäß der vorliegenden Erfindung eine erste Nukleotidsequenz eine Antisense-RNA codieren, die entweder an ein Gen, welches eine wesentliche/Verpackungs-Komponente codiert, bindet oder an die vom besagten Gen transkribierte RNA, so dass die Expression des Gens gehemmt wird, zum Beispiel als ein Ergebnis eines RNaseH-Abbaus eines resultierenden Heteroduplexes. Es ist nicht notwendig, dass das Antisense-Konstrukt die vollständige komple-

mentäre Sequenz des Gens, welches eine wesentliche/Verpackungs-Komponente codiert, codiert – ein Teil kann ausreichen. Der Fachmann wird keine Probleme haben, zu bestimmen, wie ein geeignetes Antisense-Konstrukt konzipiert wird.

**[0053]** Im Gegensatz dazu sind die Nukleinsäuresequenzen, die wesentliche/Verpackungskomponenten der Viruspartikel, die für die Verpackung von Viruspartikeln in den Wirtszellen/Erzeugerzellen/Verpackungszellen erforderlich sind (die dritten Nukleotidsequenzen), codieren, resistent gegenüber den inhibitorischen RNA-Molekülen, welche durch die erste Nukleotidsequenz codiert werden. Zum Beispiel in dem Fall von Ribozymen, ist Resistenz üblicherweise durch Veränderungen der Sequenzen, welche die Ribozym-Erkennungsstellen beseitigen, bedingt. Dabei wird die Aminosäuren-Codierungssequenz für die wesentlichen/Verpackungskomponenten beibehalten, so dass die Viruskomponenten, welche durch die Sequenzen codiert werden, sich nicht verändern oder nur so wenig, dass die Funktion der wesentlichen/Verpackungskomponenten nicht beeinträchtigt wird.

**[0054]** Die Bezeichnung „virale Polypeptide, die für das Zusammensetzen von Viruspartikeln erforderlich sind“ bedeutet, dass wenn ein normalerweise durch das in Viruspartikel zu verpackende Virusgenom codierte Polypeptid fehlt, das Virusgenom nicht verpackt werden kann. Zum Beispiel, im Kontext der Retroviren würden solche Polypeptide gag, pol und env umfassen. Die Bezeichnungen „Verpackungskomponente“ und „wesentliche Komponente“ werden von dieser Definition ebenfalls umfasst.

**[0055]** Im Fall von Antisense-Sequenzen unterscheidet sich die dritte Nukleotidsequenz von der zweiten Nukleotidsequenz, die die Zielvirus-Verpackungskomponenten-Antisense-Sequenz codiert, soweit, dass obwohl die Antisense-Sequenz an die zweite Nukleotidsequenz oder deren Transkript binden kann, die Antisense-Sequenz nicht effektiv an die dritte Nukleotidsequenz oder der davon transkribierten RNA binden kann. Die Unterschiede zwischen der zweiten und der dritten Nukleotidsequenz werden üblicherweise konservative Änderungen sein, obwohl eine geringe Anzahl von Aminosäureänderungen toleriert werden können, vorausgesetzt dass, wie oben erörtert, die Funktion der wesentlichen/Verpackungskomponenten nicht erheblich beeinträchtigt ist.

**[0056]** Vorzugsweise und zusätzlich zu der Entfernung von Ribozymerkennungsstellen, verbessern die Modifizierungen der Codierungssequenzen für die Viruskomponenten die Sequenzen für die Codonverwendung in den Säugerzellen oder anderen Zellen, welche als Erzeugerzellen für die Herstellung von Retrovirusvektorpartikeln agieren sollen. Diese Verbesserung der Codonverwendung wird als „Codonoptimierung“ bezeichnet. Viele Viren, HIV und andere Lentiviren umfassend, verwenden eine große Anzahl von seltenen Codons und durch Anpassung dieser an üblicherweise verwendete Säugercodons, kann eine erhöhte Expression von Verpackungskomponenten in Säuger-Erzeugerzellen erreicht werden. Codonverwendungstabellen sind sowohl für Säugerzellen als auch für eine Vielzahl anderer Organismen bekannt.

**[0057]** Dementsprechend sind die Sequenzen, die die Verpackungskomponenten codieren, vorzugsweise Codon-optimiert. Noch bevorzugter sind in ihrer Gesamtheit Codon-optimierte Sequenzen. Anschließend an eine Codonoptimierung wurde festgestellt, dass es zahlreiche Stellen in den Wildtyp-Sequenzen gag, pol und env gibt, welche als Ribozymerkennungsstellen dienen können und die in den Sequenzen, die Verpackungskomponenten codieren, nicht mehr vorhanden sind. Bei einer weiteren, jedoch weniger zweckmäßigen Strategie, können die Sequenzen, die Verpackungskomponenten codieren, modifiziert werden, indem sie durch gezielte konservative Änderungen gegenüber ausgewählten Ribozymen, die die Wildtyp-Sequenzen spalten können, resistent gemacht werden.

**[0058]** Ein weiterer Vorteil der Codonoptimierung von HIV-Verpackungskomponenten ist, dass dies die Genexpression steigern kann. Insbesondere kann es die gag-, pol-Expression Rev-unabhängig machen, so dass rev und RRE nicht in das Genom eingeschlossen werden müssen (11). Rev-unabhängige Vektoren sind daher möglich. Dies wiederum ermöglicht die Verwendung von Anti-rev- oder RRE-Faktoren im Retrovirusvektor.

**[0059]** Wie oben beschrieben, umfassen die Verpackungskomponenten für einen Retrovirusvektor die Expressionsprodukte der gag-, pol- und env-Gene. In Übereinstimmung mit der vorliegenden Erfindung, sind die im Verpackungssystem verwendeten gag und pol vom Ziel-Retrovirus auf den das Vektorgenom basiert, abgeleitet. Daher wären gag und pol in der RNA-Transkriptform normalerweise durch die im Vektorgenom vorhandenen Ribozyme spaltbar. Das im Verpackungssystem angewendete env-Gen kann von einem unterschiedlichen Virus abgeleitet sein, umfassend sowohl andere Retroviren, wie beispielsweise MLV, als auch Nicht-Retroviren, wie beispielsweise VSV (ein Rhabdovirus), in welchem Fall möglicherweise keine Sequenzänderung, um es resistent gegenüber einer Ribozymspaltung zu machen, notwendig ist. Alternativ kann env

von dem gleichen Retrovirus wie gag und pol abgeleitet sein, in welchem Fall alle Erkennungsstellen für die Ribozyme durch eine Sequenzänderung entfernt werden müssen.

**[0060]** Der Herstellungsprozess eines Retrovirusvektors, in welchem das Hüllprotein nicht die native Hülle des Retrovirus ist, ist als „Pseudotypisierung“ bekannt. Bestimmte Hüllproteine, wie beispielsweise das MLV-Hüllprotein und das Vesikuläre-Stomatitis-Virus-G-(VSV-G-)Protein pseudotypisieren Retroviren sehr gut. Pseudotypisierung kann verwendet werden, um die Zielzellauswahl des Retrovirus zu ändern. Wahlweise, um die Zielzellspezifität für Zielzellen, die mit dem jeweiligen Virus, der behandelt werden soll, infiziert sind, zu erhalten, kann das Hüllprotein das gleiche sein, wie das des Zielvirus, zum Beispiel HIV.

**[0061]** Weitere therapeutische Codierungssequenzen können zusammen mit der/den ersten Nukleotidsequenz oder -sequenzen vorliegen. Weitere therapeutische Codierungssequenzen umfassen ohne Beschränkung darauf Zytokine codierende Sequenzen, Hormone, Antikörper, Immunoglobulin-Fusionsproteine, Enzyme, costimulierende Immunmoleküle, Antisense-RNA, eine transdominant negative Mutante eines Zielproteins, ein Toxin, ein konditionales Toxin, ein Antigen, ein Einzelketten-Antikörper, ein Tumorsuppressor-Protein und Wachstumsfaktoren. Falls umfasst, sind solche Codierungssequenzen mit einem geeigneten Promotor, welches der Promotor, der die Expression der ersten Nukleotidsequenz steuert oder ein anderer Promotor oder andere Promotoren sein kann/können, operativ verknüpft.

**[0062]** Dementsprechend umfasst die Erfindung zwei Komponenten. Die Erste ist eine Genomkonstruktion, die durch Virusverpackungskomponenten verpackt werden wird und welche eine Reihe von antiviralen inhibitorischen RNA-Molekülen, wie beispielsweise Anti-HIV-Ribozyme, trägt (5, 7, 10, 13, 21, 36, 38, 40). Diese können jegliche Anti-HIV-Ribozyme sein, der Schlüsselpunkt der Erfindung ist jedoch, dass einige von ihnen RNA, die für die Expression der nativen oder Wildtyp-HIV-gag-, pol-, oder env-Codierungssequenzen erforderlich ist, spalten. Die zweite Komponente ist das Verpackungssystem, welches eine Expressionskassette für HIV-gag, -pol und eine Kassette entweder für HIV-env oder ein Hüllprotein codierendes Gen, das ein pseudotypisierendes Hüllprotein codiert, umfasst – wobei das Verpackungssystem gegenüber inhibitorischen RNA-Molekülen resistent ist.

**[0063]** Die Lentiviruspartikel der vorliegenden Erfindung und das Lentivirusvektorsystem und verwendete Herstellungsverfahren können daher dafür verwendet werden, Virusinfektionen zu behandeln oder vorzubeugen, vorzugsweise Lentivirus-, insbesondere HIV-, Infektionen. Insbesondere die Lentiviruspartikel der Erfindung, üblicherweise unter Verwendung des Lentivirusvektorsystems der vorliegenden Erfindung hergestellt, können verwendet werden, um inhibitorische RNA-Moleküle für Menschen oder Tiere, die eine Behandlung einer Virusinfektion benötigen, zur Verfügung zu stellen.

**[0064]** Alternativ oder zusätzlich kann das Lentivirusherstellungssystem verwendet werden, um Zellen, die von einem Patienten gewonnen wurden, ex vivo zu transfizieren und sie dem Patienten wieder zuzu führen. Ex vivo transfizierte Patientenzellen können als eine pharmazeutische Zusammensetzung (siehe unten) formuliert werden, bevor sie dem Patienten wieder verabreicht werden.

**[0065]** Vorzugsweise werden die Lentiviruspartikel mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger oder Verdünnungsmittel kombiniert, um eine pharmazeutische Zusammensetzung herzustellen. Dementsprechend stellt die vorliegende Erfindung außerdem eine pharmazeutische Zusammensetzung zur Behandlung eines Individuums bereit, wobei die Zusammensetzung eine therapeutisch effektive Menge des Lentiviruspartikels der vorliegenden Erfindung, zusammen mit einem pharmazeutisch annehmbaren Träger, Verdünnungsmittel, Hilfsstoff oder Adjuvans umfasst. Die pharmazeutische Zusammensetzung kann bei Menschen oder Tieren verwendet werden.

**[0066]** Die Wahl des pharmazeutischen Trägers, Hilfsstoffs oder Verdünnungsmittels kann in Bezug auf den beabsichtigten Verabreichungsweg und die pharmazeutische Standardpraxis vorgenommen werden. Geeignete Träger und Verdünnungsmittel umfassen isotonische Salzlösungen, zum Beispiel Phosphat-gepufferte Salzlösung. Die pharmazeutischen Zusammensetzungen können als den/das oder zusätzlich zu dem Träger, Hilfsstoff oder Verdünnungsmittel, jegliche geeignete Bindemittel, Gleitmittel, Suspensionsmittel, Überzugsmittel, Lösungsmittel und andere Trägermittel, die den Eintritt des Virus in die Zielstelle erleichtern oder steigern (wie zum Beispiel ein Lipid-Zuführungssystem) umfassen.

**[0067]** Die pharmazeutische Zusammensetzung kann für die parenterale, intramuskuläre, intravenöse, intrakraniale, subkutane, intraokulare oder transkutane Verabreichung formuliert werden.

**[0068]** Gegebenenfalls, kann die pharmazeutische Zusammensetzung auf jede einzelne oder mehrere Arten verabreicht werden: Inhalation, in Form von Zäpfchen oder Vaginalzäpfchen, topisch in Form einer Lotion, Lösung, Creme, Salbe, Puder, durch Hautpflaster, oral in Form von Tabletten, die als Trägerstoff beispielsweise Stärke oder Laktose enthalten oder in Kapseln oder als Ovulum entweder allein oder als Beimischung mit Trägerstoffen oder in Form von Elixieren, Lösungen oder Suspensionen, die Geschmacks- oder Farbstoffe enthalten oder sie können parenteral injiziert werden, zum Beispiel intrakavernös, intravenös, intramuskulär oder subkutan. Für eine parenterale Verabreichung kann die Zusammensetzung am besten in Form einer sterilen wässrigen Lösung, die andere Substanzen enthalten kann, zum Beispiel ausreichend Salze oder Monosaccharide, um eine zum Blut isotonische Lösung zu erhalten. Für eine bukkale oder sublinguale Verabreichung können die Zusammensetzungen in Form von Tabletten oder Pastillen, welche auf eine konventionelle Art formuliert werden können, verabreicht werden.

**[0069]** Die Menge des verabreichten Virus befindet sich üblicherweise in dem Bereich zwischen  $10^3$  und  $10^{10}$  pfu, vorzugsweise zwischen  $10^5$  und  $10^8$  pfu, noch bevorzugter zwischen  $10^6$  und  $10^7$  pfu. Wenn injiziert, werden üblicherweise 1-10 µl des Virus in einem pharmazeutisch geeigneten Träger oder Verdünnungsmittel verabreicht.

**[0070]** Wenn das Polynukleotid/der Vektor als nackte Nukleinsäure verabreicht wird, befindet sich die üblicherweise verabreichte Menge an Nukleinsäure im Bereich zwischen 1 µg und 10 mg, vorzugsweise zwischen 100 µg und 1 mg.

**[0071]** Wo die erste Nukleotidsequenz (oder andere therapeutische Sequenz) sich unter Kontrolle einer induzierbaren regulatorischen Sequenz befindet, kann es ausreichen die Genexpression für die Dauer der Behandlung zu induzieren. Nach abgeschlossener Behandlung, wird der Induktor entfernt und die Expression der NOI wird gestoppt. Dies bringt eindeutige klinische Vorteile. So ein System kann zum Beispiel die Verabreichung des Antibiotikums Tetracyclin umfassen, um die Genexpression durch seine Wirkung auf das Tet-Represor/VP16-Fusionsprotein zu aktivieren.

**[0072]** Die Erfindung wird anschließend anhand von Beispielen, welche bei der Ausführung der Erfindung durch den Fachmann hilfreich sein sollen, jedoch keineswegs die Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung beschränken sollen, weiter beschrieben. Die Beispiele beziehen sich auf die Figuren.

**[0073]** [Fig. 1](#) zeigt schematisch die in vier verschiedene HIV-Vektoren eingefügten Ribozyme.

**[0074]** [Fig. 2](#) zeigt schematisch, wie eine geeignete 3'LTR durch eine PCR erstellt werden kann.

**[0075]** [Fig. 3](#) zeigt die Codonverwendungstabelle für Wildtyp-HIV-gag, -pol des Stammes HXB2 (Zugriffs-schlüssel: K03455).

**[0076]** [Fig. 4](#) zeigt die Codonverwendungstabelle für die Codon-optimierte gag-, pol-SYNgp bezeichnete Sequenz.

**[0077]** [Fig. 5](#) zeigt die Codonverwendungstabelle für Wildtyp-HIV-env, genannt env-mn.

**[0078]** [Fig. 6](#) zeigt die Codonverwendungstabelle für die Codon-optimierte Sequenz von HIV-env, bezeichnet als SYNgp160mn.

**[0079]** [Fig. 7](#) zeigt drei Plasmidkonstrukte für die Verwendung in der Erfindung.

**[0080]** [Fig. 8](#) zeigt das Prinzip zweier Herstellungssysteme für Retrovirusvektor-Partikel.

**[0081]** Die Erfindung wird anschließend anhand der folgenden Beispiele, welche nur als Veranschaulichung dienen und nicht die Anwendungsmöglichkeiten der Erfindung beschränken sollen, weiter beschrieben.

## BEISPIELE

### Beispiel 1 – Konstruktion eines Genoms

**[0082]** Die HIV-gag.pol-Sequenz wurde Codon-optimiert ([Fig. 4](#) und SEQ I.D. No.1) und durch Verwendung überlappender Oligos, die ungefähr aus 40 Nukleotiden bestehen, synthetisiert. Dies hat drei Vorteile. Erstens,

ein Vektor auf HIV-Basis kann Ribozyme und andere therapeutische Faktoren tragen. Zweitens, erzeugt die Codonoptimierung einen höheren Vektortiter aufgrund einer höheren Genexpression. Drittens, wird die gag.pol-Expression Rev-unabhängig, was die Verwendung von Anti-rev oder RRE-Faktoren erlaubt.

**[0083]** Innerhalb von gag.pol konservierte Sequenzen wurden durch Bezugnahme auf die HIV-Sequenz-Datenbank des Los Alamos National Laboratory (<http://hiv-web.lanl.gov/>) identifiziert und für die Konstruktion von Ribozymen verwendet. Aufgrund der Variabilität zwischen HIV-1-Subtypen, wurden die Ribozyme so konzipiert, dass sie den in Nordamerika, Lateinamerika und der Karibik, Europa, Japan und Australien vorherrschenden Subtyp spalten, das ist der Subtyp B. Die ausgewählten Stellen wurden mit der synthetischen gagpol-Sequenz verglichen, um zu gewährleisten, dass eine geringe Möglichkeit besteht, dass die Codon-optimierte gagpol-mRNA geschnitten wird. Die Ribozyme wurden mit Xhol- und Sall-Stellen am 5'- beziehungsweise 3'-Ende konstruiert. Dies erlaubt die Konstruktion von separaten und Tandem-Ribozymen.

**[0084]** Die Ribozyme sind Hammerkopf-Strukturen (25) mit der folgenden allgemeinen Struktur:

Helix I	Helix II	Helix III
5' - NNNNNNNN~	CUGAUGAGGCCGAAAGGCCGAA	~NNNNNNNN~

**[0085]** Die katalytische Domäne des Ribozyms (Helix II) kann einige Veränderungen tolerieren ohne den katalytischen Umsatz zu verringern.

**[0086]** Die Spaltungsstellen, die auf gag und pol zielen, mit dem wesentlichen GUX-Triplet (wobei X eine beliebige Nukleotidbase ist) sind wie folgt:

GAG1 5' UAGUAAGAAUGUUAUAGCCCUAC  
 GAG2 5' AACCCAGAUUGUAAGACUAAA  
 GAG3 5' UGUUUCAAUUGUGGCAAAGAAG  
 GAG4 5' AAAAAGGGCUGUUGGAAAUGUG  
 POL1 5' ACGACCCCCUCGUCACAUAAG  
 POL2 5' GGAAUUGGAGGUUUUAUCAAAG  
 POL3 5' AUAUUUUUCAGUUUCCUUAGAU  
 POL4 5' UGGAUGAUUUGUAUGUAGGAUC  
 POL5 5' CUUUGGAUGGGUUAUGAACUCC  
 POL6 5' CAGCUGGACUGUCAAUGACAUA  
 POL7 5' AACUUUCUAUGUAGAUGGGGCAG  
 POL8 5' AAGGCCGCCUGUUGGUGGGCAG  
 POL9 5' UAAGACAGCAGUACAAUAGGCAG

**[0087]** Die Ribozyme sind in vier verschiedene HIV-Vektoren (pH4 (10), pH6, pH4.1 oder pH6.1) ([Fig. 1](#)) eingefügt. In pH4 und pH6 wird die Transkription der Ribozyme durch einen internen HCMV-Promotor gesteuert (9). Von pH4.1 und pH6.1 werden die Ribozyme von der 5'-LTR exprimiert. Der größte Unterschied zwischen pH4 und pH6 (und pH4.1 und pH6.1) liegt in der 3'-LTR im Produktionsplasmid. PH4 und pH4.1 haben die HIV-U3 in der 3'-LTR. pH6 und pH6.1 haben HCMV in der 3'-LTR. Der HCMV-Promotor ersetzt das meiste der U3 und wird die Expression auf hohem konstitutiven Niveau steuern, während die HIV-1-U3 ein hohes Expressionsniveau nur in Anwesenheit von Tat fördern wird.

**[0088]** Die HCMV/HIV-1-Hybrid 3'-LTR entsteht durch rekombinante PCR mit drei PCR-Primern ([Fig. 2](#)). Die erste PCR-Runde wird mit RIB1 und RIB2 und pH4 (12) als Template durchgeführt, um die HIV-1-HXB2-Sequenz 8900-9123 zu amplifizieren. Die zweite PCR-Runde erstellt die Verbindung zwischen dem 5'-Ende der HIV-1-U3 und dem HCMV-Promotor durch Amplifizierung der hybriden 5'-LTR von pH4. Das PCR-Produkt der ersten PCR-Reaktion und RIB3 dienen als 5'-Primer beziehungsweise 3'-Primer.

RIB1: 5'-CAGCTGCTCGAGCAGCTGAAGCTTGCATGC-3'

RIB2: 5'-GTAAGTTATGTAACGGACGATATCTGTCTTCTT-3'

RIB3: 5'-CGCATAGTCGACGGGCCACTGCTAGAGATTTTC-3'

**[0089]** Anschließend wird das PCR-Produkt mit SphI und Sall geschnitten und in pH4 eingefügt, dadurch die 3'-LTR ersetzt. Das resultierende Plasmid erhielt die Bezeichnung pH6. Um pH4.1 und pH6.1 zu konstruieren, wird der interne HCMV-Promotor (Spel-Xhol) in pH4 und pH6 durch die Polyklonierungsstelle des pBluescript II KS+ (Stratagene) (Spel-Xhol) ersetzt.

**[0090]** Die Ribozyme werden in die Xhol-Stellen im Genomvektor-Grundgerüst eingefügt. Jegliche Art von Ribozymen in jeglicher Konfiguration können auf ähnliche Weise verwendet werden.

## Beispiel 2 – Konstruktion eines Verpackungssystems

**[0091]** Das Verpackungssystem kann verschiedene Formen annehmen. In einer ersten Form eines Verpackungssystems, werden die HIV-gag-, pol-Komponenten mit der HIV-env-Codierungssequenz co-exprimiert. In diesem Fall, sind beide die gag-pol- und die env-Codierungssequenzen so verändert, dass sie den in das Genom eingebauten Anti-HIV-Ribozymen gegenüber resistent sind. Zur gleichen Zeit, wie die Codon-Verwendung, um eine Resistenz zu erzielen, geändert wird, können die Codons so gewählt werden, dass sie mit dem Verwendungsmuster der höchst-exprimierten Säugergene übereinstimmen. Dadurch erhöht sich das Expressionsniveau dramatisch (28, 29) und somit der Titer. Eine Codon-optimierte HIV-env-Codierungssequenz wurde von Haas et al(9) beschrieben. In dem vorliegenden Beispiel wird eine modifizierte Codon-optimierte HIV-env-Sequenz verwendet (SEQ I.D. No.3). Das entsprechende env-Expressionsplasmid erhält die Bezeichnung pSYNgp160mn. Die modifizierte Sequenz enthält Extra-Motive, die nicht von Haas et al verwendet wurden. Die Extra-Sequenzen wurden der HIV-env-Sequenz des MN-Stamms entnommen und Codon-optimiert. Alle gleichartigen Änderungen der Nukleinsäuresequenz würden gleichartig funktionieren, solang Codons, die häufig vorkommenden tRNAs (42) entsprechen, verwendet werden und zu Resistenzen gegenüber den Ribozymen im Genom führen.

**[0092]** In einem Beispiel einer gag-pol-Codierungssequenz mit Codon-optimierter Verwendung, werden überlappende Oligonukleotide synthetisiert und anschließend zusammen ligiert, um die synthetische Codierungssequenz herzustellen. Die Sequenz der Wildtyp-(Genbank Zugriffsschlüssel K03455) und der synthetischen (gagpol-SYNgp) gagpol-Sequenz wird in SEQ I.D. Nr. 1 beziehungsweise 2 aufgezeigt und die Codon-Verwendung wird in den [Fig. 3](#) beziehungsweise 4 gezeigt. Die Sequenz einer Wildtyp-env-Codierungssequenz (Genbank Zugriffsschlüssel M17449) ist in SEQ I.D. Nr. 3 angegeben, die Sequenz einer synthetischen Codon-optimierten Sequenz ist in SEQ I.D. Nr. 4 angegeben und ihre Codon-Verwendungstabellen sind in den [Fig. 5](#) beziehungsweise 6 angegeben. Wie auch bei der env-Codierungssequenz kann jede gag-pol-Sequenz, die eine Resistenz gegenüber Ribozymen erzielt, verwendet werden. Die gezeigte synthetische Sequenz erhält die Bezeichnung gag-pol-SYNgp und enthält eine EcoRI-Stelle am 5'-Ende und eine NotI-Stelle am 3'-Ende. Es ist in pCneo (Promega) eingefügt, um das Plasmid pSYNgp herzustellen.

**[0093]** In einer zweiten Form eines Verpackungssystems wird eine gag-pol-Expressionskassette mit einer Nicht-HIV-Hüllprotein-Codierungssequenz, die ein Oberflächenprotein produziert, das HIV pseudotypisiert, co-exprimiert. Das könnte beispielsweise VSV-G (20, 41), amphotropes MLV-env (6, 34) oder jedes andere Protein, welches in das HIV-Partikel eingebaut werden würde (37), sein. Das umfasst Moleküle, die fähig wären den Vektor auf spezifische Gewebe zu zielen. Codierungssequenzen für Nicht-HIV-Hüllproteine, die nicht von Ribozymen gespalten werden, erfordern keine Modifizierung (obwohl eine gewisse Sequenzmodifizierung aus anderen Gründen, wie beispielsweise Optimierung für Codon-Verwendung in Säugerzellen, wünschenswert sein könnte).

## Beispiel 3 – Herstellung von Vektorpartikeln

**[0094]** Vektorpartikel können entweder von einem transienten drei-Plasmide-Transfektionssystem, ähnlich dem von Soneoka et al. (33) beschriebenen, produziert werden oder von Erzeugerzelllinien, ähnlich denen, die für andere Retrovirusvektoren verwendet werden (20, 35, 39). Diese Prinzipien sind in den [Fig. 7](#) und [Fig. 8](#) veranschaulicht. Zum Beispiel, durch Verwendung von pH6Rz, pSYNgp und pRV67 (VSV-G-Expressionsplasmid) in einer drei-Plasmide-Transfektion von 293T-Zellen ([Fig. 8](#)), wie von Soneoka et al (33) erläutert, werden als H6Rz-VSV bezeichnete Vektorpartikel produziert. Diese transduzieren das H6Rz-Genom in CD4+-Zellen, wie beispielsweise C1866 oder Jurkat, und produzieren die Multitarget-Ribozyme. Eine HIV-Replikation in diesen Zellen ist somit stark eingeschränkt.

## Referenzen

1. Bahner, I., K. Kearns, Q. L. Hao, E. M. Smogorzewska, und D. B. Kohn. 1996. Transduction of human CD34+ hematopoietic progenitor cells by a retroviral vector expressing an RRE decoy inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication in myelomonocytic cells produced in long-term culture. J Virol. 70:4352-60.
2. Blomer, U., L. Naldini, T. Kafri, D. Trono, I. M. Verma, und F. H. Gage. 1997. Highly efficient and sustained gene transfer in adult neurons with a lentivirus vector. J Virol. 71:6641-6649.
3. Breaker, R.R. und Joyce, G.F. 1994. Inventing and improving ribozyme function: rational design versus interactive selection methods. TIBTECH. 12: 268-75.
4. Buchschacher, G. L., Jr., und A. T. Panganiban. 1992. Human immunodeficiency virus vectors for inducible expression of foreign genes. J Virol. 66:2731-2739.

5. Chen, C. J., A. C.:Banerjea, G. G. Harmison, K. Haglund, and M. Schubert. 1992. Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication-potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates. *Nucleic Acids Res.* 20:4581-9.
6. Chesebro, B., K. Wehrly, and W. Maury. 1990. Differential expression in human and mouse cells of human immunodeficiency virus pseudotyped by murine retroviruses. *J Virol.* 64:4553-7.
7. Couture, L.A. and Stinchcomb, D.T. 1996. Anti-gene therapy: the use of ribozymes to inhibit gene function. *TIG* 12: 510-5.
8. Dropulic, B., M. Hermankova, and P. M. Pitha. 1996. A conditionally replicating HIV-1 vector interferes with wild-type HIV-1 replication and spread. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11103-8.
9. Foecking, M. K., and H. Hofstetter. 1986. Powerful and versatile enhancerpromoter unit for mammalian expression vectors. *Gene.* 45:101-105.
10. Gervais, A., X. Li, G. Kraus, and F. Wong Staal. 1997. Multigene antiviral vectors inhibit diverse human immunodeficiency virus type 1 clades. *J Virol.* 71 :3048-53.
11. Haas, J., E.-C. Park, and B. Seed. 1996. Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein. *Current Biology.* 6:315.
12. Kim, V. N., K. Mitrophanous, S. M. Kingsman, and K. A. J. 1998. Minimal Requirement for a Lentiviral Vector Based on Human Immunodeficiency Virus Type 1. *J Virol* 72: 811-816.
13. Larsson, S., G. Hotchkiss, J. Su, T. Kebede, M. Andang, T. Nyholm, B. Johansson, A. Sonnerborg, A. Vahine, S. Britton, und L. Ahrlund Richter. 1996. A novel ribozyme target site located in the HIV-1 nef open reading frame. *Virology.* 219: 161
14. Lever, A. M. 1995. Gene therapy for HIV infection. *Br Med Bull.* 51:149-66.
15. Liu, D., J. Donegan, G. Nuovo, D. Mitra, and J. Laurence. 1997. Stable human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) resistance in transformed CD4+ monocytic cells treated with multitargeting HIV-1 antisense sequences incorporated into U1 snRNA. *J Virol.* 71:4079-85.
16. Malim, M. H., S. Bohnlein, J. Hauber, and B. R. Cullen. 1989. Functional dissection of the HIV-1 Rev trans-activator-derivation of a trans-dominant repressor of Rev function. *Cell.* 58:205-14.
17. Miller, N., and J. Whelan. 1997. Progress in transcriptionally targeted and regulatable vectors for genetic therapy. *Hum Gene Ther.* 8:803-15.
18. Naldini, L., U. Blomer, F. H. Gage, D. Trono, and I. M. Verma. 1996. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11382-11388.
19. Naldini, L., U. Blomer, P. Gallay, D. Ory, R. Mulligan, F. H. Gage, I. M. Verma, and D. Trono. 1996. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector [see comments]. *Science.* 272:263-7.
20. Ory, D. S., B. A. Neugeboren, und R. C. Mulligan. 1996. A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11400-6.
21. Paik, S. Y., A. Banerjea, C. J. Chen, Z. Ye, G. G. Harmison, and M. Schubert. 1997. Defective HIV-1 provirus encoding a multitarget-ribozyme inhibits accumulation of spliced and unspliced HIV-1 mRNAs, reduces infectivity of viral progeny, and protects the cells from pathogenesis. *Hum Gene Ther.* 8:1115-24.
22. Poeschla, E., P. Corbeau, and F. Wong Staal. 1996. Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93:11395-9.
23. Poznansky, M., A. Lever, L. Bergeron, W. Haseltine, und J. Sodroski. 1991. Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol.* 65:532-6.
24. Ramezani, A., and S. Joshi. 1996. Comparative analysis of five highly conserved target sites within the HIV-1 RNA for their susceptibility to hammerhead ribozymemediated cleavage in vitro and in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:229-35.
25. Riddell, S. R., M. Elliott, D. A. Lewinsohn, M. J. Gilbert, L. Wilson, S. A. Manley, S. D. Lupton, R. W. Overell, T. C. Reynolds, L. Corey, and P. D. Greenberg. 1996. T-cell mediated rejection of gene-modified HIV specific cytotoxic T lymphocytes in HIV-infected patients [see comments]. *Nat Med.* 2:216-23.
26. Ruffner, D. E., S. C. Dahm, and O. C. Uhlenbeck. 1989. Studies on the hammerhead RNA self-cleaving domain. *Gene.* 82:31-41.
27. Sarver, N., E. M. Cantin, P. S. Chang, J. A. Zaia, P. A. Ladne, D. A. Stephens, und J. J. Rossi. 1990. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science.* 247:1222.
28. Schneider, R., M. Campbell, G. Nasioulas, B. K. Felber, und G. N. Pavlakis. 1997. Inactivation of the human immunodeficiency virus type 1 inhibitory elements allows Rev-independent expression of Gag and Gag/protease and particle formation. *J Virol.* 71 :4892-903.
29. Schwartz, S., M. Campbell, G. Nasioulas, J. Harrison, B. K. Felber, and G. N. Pavlakis. 1992. Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression. *J Virol.* 66:7176-82.

30. Scott, W.G. and Klug, A. 1996. Ribozymes: structure and mechanism in RNA catalysis. *TIBS.* 21: 220-4.
31. Sczakiel, G., and M. Pawlita. 1991. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells stably expressing antisense RNA. *J Virol.* 65:468-72.
32. Shimada, T., H. Fujii, H. Mitsuya, and A. W. Nienhuis. 1991. Targeted and highly efficient gene transfer into CD4+ cells by a recombinant human immunodeficiency virus retroviral vector. *Journal of Clinical Investigation.* 88:1043-47.
33. Soneoka, Y., P. M. Cannon, E. E. Ramsdale, J. C. Griffiths, G. Romano, S. M. Kingsman, and A. J. Kingsman. 1995. A transient threeplasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.* 23:628-33.
34. Spector, D. H., E. Wade, D. A. Wright, V. Koval, C. Clark, D. Jaquish, and S. A. Spector. 1990. Human immunodeficiency virus pseudotypes with expanded cellular and species tropism. *J Virol.* 64:2298-2308.
35. Srinivasakumar, N., N. Chazal, C. Helga Maria, S. Prasad, M. L. Hammarskjold, and D. Rekosh. 1997. The effect of viral regulatory protein expression on gene delivery by human immunodeficiency virus type 1 vectors produced in stable packaging cell lines. *J Virol.* 71 :5841-8.
36. Sun, L. Q., L. Wang, W. L. Gerlach, und G. Symonds. 1995. Target sequencespeciEc inhibition of HIV-1 replication by ribozymes directed to tat RNA. *Nucleic Acids Res.* 23:2909-13.
37. Valsesia Wittmann, S., A. Drynda, G. Deleage, M. Aumailley, J. M. Heard, O. Danos, G. Verdier, and F. L. Cosset. 1994. Modifications in the binding domain of avian retrovirus envelope protein to redirect the host range of retroviral vectors. *J Virol.* 68:4609-19.
38. Yamada, O., G. Kraus, M. C. Leavitt, M. Yu, and F. Wong Staal. 1994. Activity and cleavage site specificity of an anti-HIV-1 hairpin ribozyme in human T cells. *Virology.* 205:121-6.
39. Yu, H., A. B. Rabson, M. Kaul, Y. Ron. and J. P. Dougherty. 1996. Inducible human immunodeficiency virus type 1 packaging cell lines. *J Virol.* 70:4530-37.
40. Zhou, C., I. Bahner, J. J. Rossi, and D. B. Kohn. 1996. Expression of hammerhead ribozymes by retroviral vectors to inhibit HIV-1 replication: comparison of RNA levels and viral inhibition. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:17-24.
41. Zhu, Z. H., S. S. Chen, and A. S. Huang. 1990. Phenotypic mixing between human immunodeficiency virus and vesicular stomatitis virus or herpes simplex virus. *J Acquir Immune Defic Syndr.* 3:215-9.
42. Zolotukhin, S., M. Potter, W. W. Hauswirth, J. Guy, und N. Muzyczka. 1996. A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level expression in mammalian cells. *J Virol.* 70:4646-54.
43. Zufferey, R., D. Nagy, R. J. Mandel, L. Naldini, and D. Trono. 1997. Multiply attenuated lentiviral vector achieves efficient gene delivery in vivo. *Nat Biotechnol.* 15: 871-875.
44. Goodchild, J., V. Kohli. 1991. Ribozymes that cleave an RNA sequence from human immunodeficiency virus: the effect of flanking sequence on rate. *Arch Biochem Biophys Feb 1;* 284(2):386-391.
45. Hertel, Klemens J., Alessio Peracchi, Olke C. Uhlenbeck and Daniel Herschlag. 1997. Use of intrinsic binding energy for catalysis by an RNA enzyme. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol.* 94, pp. 8497-8502, August.
46. Bender et al., 1987, *J Virol* 61: 1639-1646
47. Pear et al., 1993, *Proc Natl Acad Sci* 90: 8392-8396
48. Cosset et al., 1995, *J. Virol.* 69: 7430-7436

## Sequenzprotokoll als Teil der Beschreibung

SEQ. ID. NO. 1 - Wild-Typ-gagpol-Sequenz des Stammes HXB2 (Zugangsnummer K03455)

ATGGGTGCGA GAGCGTCAGT ATTAAGCGGG GGAGAATTAG ATCGATGGGA AAAAATTCGG 60  
TTAAGGCCAG GGGGAAAGAA AAAATATAAA TTAAACATA TAGTATGGC AAGCAGGGAG 120  
CTAGAACGAT TCGCAGTTAA TCCTGGCCTG TTAGAAACAT CAGAAGGCTG TAGACAAATA 180  
CTGGGACAGC TACAACCAC TCGCAGTTAA TCCTGGCCTG TTAGAAACAT CAGAAGGCTG TAGACAAATA 240  
ACAGTAGCAA CCCTCTATTG TGTGCATCAA AGGATAGAGA TAAAAGACAC CAAGGAAGCT 300  
TTAGACAAGA TAGAGGAAGA GCAAAACAAA AGTAAGAAAA AAGCACAGCA AGCAGCAGCT 360  
GACACAGGAC ACAGCAATCA GGT CAGCCAA ATTACCTA TAGTGCAGAA CATCCAGGG 420  
CAAATGGTAC ATCAGGCCAT ATCACCTAGA ACTTTAAATG CATGGGTAAA AGTAGTAGAA 480  
GAGAAGGCTT TCAGCCCAGA AGTGATACCC ATGTTTCAG CATTATCAGA AGGAGCCACC 540  
CCACAAGATT TAAACACCAT GCTAAACACA GTGGGGGGAC ATCAAGCAGC CATGCAAATG 600  
TTAAAAGAGA CCATCAATGA GGAAGCTGCA GAATGGGATA GAGTGCATCC AGTGCATGCA 660  
GGGCCTATTG CACCAGGCCA GATGAGAGAA CCAAGGGGAA GTGACATAGC AGGAACTACT 720  
AGTACCCCTTC AGGAACAAAT AGGATGGATG ACAAATAATC CACCTATCCC AGTAGGAGAA 780  
ATTTATAAAA GATGGATAAT CCTGGGATTA AATAAAATAG TAAGAATGTA TAGCCCTACC 840  
AGCATTCTGG ACATAAGACA AGGACCAAAG GAACCCTTA GAGACTATGT AGACCGGTT 900  
TATAAAACTC TAAGAGCCGA GCAAGCTTCA CAGGAGGTAA AAAATTGGAT GACAGAAACC 960  
TTGTTGGTCC AAAATGCGAA CCCAGATTGT AAGACTATT TAAAAGCATT GGGACCAGCG 1020  
GCTACACTAG AAGAAATGAT GACAGCATGT CAGGGAGTAG GAGGACCCGG CCATAAGGCA 1080  
AGAGTTTGG CTGAAGCAAT GAGCCAAGTA ACAAAATTAG CTACCCATAAT GATGCAGAGA 1140  
GGCAATTITA GGAACCAAAG AAAGATTGTT AAGTGTTC AATTGTCAGA AGAAGGGCAC 1200  
ACAGCCAGAA ATTGCAGGGC CCCTAGGAA AAGGGCTGTT GGAAATGTGG AAAGGAAGGA 1260  
CACCAAATGA AAGATTGTAC TGAGAGACAG GCTAATTTC TAGGAAAGAT CTGGCCTTCC 1320  
TACAAGGGAA GGCCAGGGAA TTTTCTTCAG AGCAGACAG AGCCAACAGC CCCACCAGAA 1380  
GAGAGCTTCA GGTCTGGGT AGAGACAACA ACTCCCCCTC AGAACGAGGA GCCGATAGAC 1440  
AAGGAACGTG ATCCTTAAC TTCCCTCAGG TCACTCTTG GCAACGACCC CTCGTCACAA 1500  
TAAAGATAGG GGGCAACTA AAGGAAGCTC TATTAGATAC AGGAGCAGAT GATACTGT 1560  
TAGAAGAAAT GAGTTGCCA GGAAGATGGA AACCAAAAAT GATAGGGGA ATTGGAGGTT 1620  
TTATCAAAGT AAGACAGTAT GATCAGATAC TCATAGAAAT CTGTGGACAT AAAGCTATAG 1680  
GTACAGTATT AGTAGGACCT ACACCTGTCA ACATAATTGG AAGAAATCTG TTGACTCAGA 1740  
TTGGTTGCAC TTTAAATTTC CCCATTAGCC CTATTGAGAC TGTACCAGTA AAATTAAAGC 1800  
CAGGAATGGA TGGCCAAAAA GTAAACAAAT GGCCATTGAC AGAACAAAAA ATAAAAGCAT 1860  
TAGTAGAAAT TTGTACAGAG ATGAAAAGG AAGGGAAAAT TTCAAAAATT GGGCCTGAA 1920  
ATCCATACAA TACTCCAGTA TTGCCATAA AGAAAAAAAAGA CAGTACTAAA TGGAGAAAAT 1980  
TAGTAGATTT CAGAGAACTT AATAAGAGAA CTCAGACTT CTGGGAAGTT CAATTAGGAA 2040  
TACCACATCC CGCAGGGTTA AAAAAGAAAA AATCAGTAAC AGTACTGGAT GTGGGTGATG 2100  
CATATTTCAGA AGTTCCCTTA GATGAAGACT TCAGGAAGTA TACTGCATT ACCATACCTA 2160  
GTATAAACAA TGAGACACCA GGGATTAGAT ATCAGTACAA TGTGCTTCA CAGGGATGGA 2220  
AAGGATCACC AGCAATATTC CAAAGTAGCA TGACAAAAAT CTTAGAGCCT TTTAGAAAAC 2280  
AAAATCCAGA CATAGTTATC TATCAATACA TGGATGATT GTATGTAGGA TCTGACTTAG 2340  
AAATAGGGCA GCATAGAACAA AAAATAGAGG AGCTGAGACA ACATCTGTT AGGTGGGGAC 2400  
TTACCACACC AGACAAAAAA CATCAGAAAG AACCTCCATT CCTTGGATG GGTTATGAAAC 2460  
TCCATCCTGA TAAATGGACA GTACAGCCTA TAGTGCTGCC AGAAAAAGAC AGCTGGACTG 2520  
TCAATGACAT ACAGAAGTTA GTGGGAAAT TGAATTGGGC AAGTCAGATT TACCCAGGGA 2580

TTAAAGTAAG GCAATTATGT AAACCTCTTA GAGGAACCAA AGCACTAACAA GAAGTAATAC 2640  
 CACTAACAGA AGAAGCAGAG CTAGAACTGG CAGAAAACAG AGAGATTCTA AAAGAACCCAG 2700  
 TACATGGAGT GTATTATGAC CCATCAAAAG ACTTAATAGC AGAAATACAG AAGCAGGGC 2760  
 AAGGCCAATG GACATATCAA ATTATCAAG AGCCATTAA AAATCTGAAA ACAGGAAAAT 2820  
 ATGCAAGAAT GAGGGGTGCC CACACTAATG ATGTAAAACA ATTAACAGAG GCAGTGAAA 2880  
 AAATAACCAC AGAAAGCATA GTAATATGGG GAAAGACTCC TAAATTTAAA CTGCCCATAC 2940  
 AAAAGGAAAC ATGGGAAACA TGGTGGACAG AGTATTGGCA AGCCACCTGG ATTCCCTGAGT 3000  
 GGGAGTTTGT TAATACCCCT CCCCTAGTGA ATTATGGTA CCAGTTAGAG AAAGAACCCA 3060  
 TAGTAGGAGC AGAAACCTTC TATGTAGATG GGGCAGCTAA CAGGGAGACT AAATTAGGAA 3120  
 AACAGGATA TGTTACTAAT AGAGGAAGAC AAAAGTTGT CACCCTAACT GACACAACAA 3180  
 ATCGAAGAC TGAGTTACAA GCAATTATC TAGCTTGCA GGATTGGGA TTAGAAGTAA 3240  
 ACATAGTAAC AGACTCACAA TATGCATTAG GAATCATTCA AGCACAACCA GATCAAAGTG 3300  
 AATCAGAGTT AGTCAATCAA ATAATAGAGC AGTTAATAAA AAAGGAAAAG GTCTATCTGG 3360  
 CATGGGTACC AGCACACAAA GGAATTGGAG GAAATGAACA AGTAGATAAA TTAGTCAGTG 3420  
 CTGGAATCAG GAAAGTACTA TTTTAGATG GAATAGATAA GGCCCAAGAT GAACATGAGA 3480  
 AATATCACAG TAATTGGAGA GCAATGGCTA GTGATTTAA CCTGCCACCT GTAGTAGCAA 3540  
 AAGAAATAGT AGCCAGCTGT GATAATGTC AGCTAAAAGG AGAACCCATG CATGGACAAG 3600  
 TAGACTGTAG TCCAGGAATA TGGCAACTAG ATTGTACACA TTTAGAAGGA AAAGTTATCC 3660  
 TGGTAGCAGT TCATGTAGCC AGTGGATATA TAGAAGCAGA AGTTATTCCA GCAGAAACAG 3720  
 GGCAGGAAAC AGCATATTTT CTTTAAAT TAGCAGGAAG ATGGCCAGTA AAAACAATAC 3780  
 ATACTGACAA TGGCAGCAAT TTCACCGGTG CTACGGTTAG GGCCGCTGT TGGTGGCGG 3840  
 GAATCAAGCA GGAATTGGGA ATTCCCTACA ATCCCCAAAG TCAAGGAGTA GTAGAATCTA 3900  
 TGAATAAAGA ATTAAAGAAA ATTATAGGAC AGGTAAGAGA TCAGGCTGAA CATCTTAAGA 3960  
 CAGCAGTACA AATGGCAGTA TTCATCCACA ATTTTAAAG AAAAGGGGG ATTGGGGGGT 4020  
 ACAGTGCAGG GGAAAGAATA GTAGACATAA TAGCAACAGA CATAACAACT AAAGAATTAC 4080  
 AAAAACAAAT TACAAAAATT CAAAATTTTC GGGTTTATTA CAGGGACAGC AGAAATTAC 4140  
 TTTGGAAAGG ACCAGCAAAG CTCCCTCTGGA AAGGTGAAGG GGCAGTAGTA ATACAAGATA 4200  
 ATAGTGACAT AAAAGTAGTGT CCAAGAAGAA AAGCAAAGAT CATTAGGGAT TATGGAAAAC 4260  
 AGATGGCAGG TGATGATTGT GTGGCAAGTA GACAGGATGA GGATTAG 4307

## SEQ I.D. NO. 2 - gagpol-SYNgp - Codon-optimierte gagpol-Sequenz

ATGGGCGCCC GCGCCAGCGT GCTGTCGGGC GGCGAGCTGG ACCGCTGGGA GAAGATCCGC 60  
 CTGCGCCCG GCGGCAAAAA GAAGTACAAG CTGAAGCACA TCGTGTGGC CAGCCGCGAA 120  
 CTGGAGCGCT TCGCCGTGAA CCCCAGGGCTC CTGGAGACCA GCGAGGGGTG CCGCCAGATC 180  
 CTCGGCCAAC TGCAGCCCAG CCTGCAAACC GGCAGCGAGG AGCTGCGCAG CCTGTACAAC 240  
 ACCGTGGCCA CGCTGTACTG CGTCCACCAG CGCATCGAAA TCAAGGATAC GAAAGAGGCC 300  
 CTGGATAAAA TCGAAGAGGA ACAGAATAAG AGCAAAAGA AGGCCCAACA GGCCGCCCG 360  
 GACACCGGAC ACAGCAACCA GGTCAAGCCAG AACTACCCCA TCGTGCAGAA CATCCAGGGG 420  
 CAGATGGTGC ACCAGGCCAT CTCCCCCCCAC ACGCTGAACG CCTGGGTGAA GGTGGTGGAA 480  
 GAGAAGGCTT TTAGCCCGGA GGTGATAACCC ATGTTCTCAG CCCTGTCAG GGGAGCCACC 540  
 CCCCAAGATC TGAACACCAT GCTAACACAA GTGGGGGAC ACCAGGCCGC CATGCAGATG 600  
 CTGAAGGAGA CCATCAATGA GGAGGCTGCC GAATGGGATC GTGTGCATCC GGTGCACGCA 660  
 GGGCCCATCG CACCGGGCCA GATGCGTGAG CCACGGGCT CAGACATCGC CGGAACGACT 720  
 AGTACCCCTTC AGGAACAGAT CGGCTGGATG ACCAACAAACC CACCCATCCC GGTGGGAGAA 780  
 ATCTACAAAC GCTGGATCAT CCTGGGCCTG AACAAAGATCG TGCGCATGTA TAGCCCTACC 840  
 AGCATCCTGG ACATCCGCCA AGGCCCGAAG GAACCCCTTC GCGACTACGT GGACCGGTT 900

TACAAAACGC TCCGCGCCGA GCAGGGCTAGC CAGGAGGTGA AGAACTGGAT GACCGAAACC 960  
 CTGCTGGTCC AGAACGCGAA CCCGGACTGC AAGACGATCC TGAAGGCCCT GGGCCCAGCG 1020  
 GCTACCCTAG AGGAAATGAT GACCGCCTGT CAGGGAGTGG CGGGACCCGG CCACAAGGCA 1080  
 CGCGTCCTGG CTGAGGCCAT GAGCCAGGTG ACCAACTCCG CTACCATCAT GATGCAGCGC 1140  
 GGCAACTTTC GGAACCAACG CAAGATCGTC AAGTGTCTCA ACTGTGGCAA AGAAGGGCAC 1200  
 ACAGCCCGCA ACTGCAGGGC CCCTAGGAAA AAGGGCTGCT GGAAATGCGG CAAGGAAGGC 1260  
 CACCAGATGA AAGACTGTAC TGAGAGACAG GCTAATTTC TAGGAAAGAT CTGGCCTTCC 1320  
 TACAAGGGAA GGCCAGGGAA TTTTCTTCAG AGCAGACCAG AGCCAACAGC CCCACCAGAA 1380  
 GAGAGCTTCA GGTCTGGGT AGAGACAACA ACTCCCCCTC AGAACAGGAA GCCGATAGAC 1440  
 AAGGAACCTGT ATCCTTAAC TTCCCTCAGA TCACTCTTG GCAACGACCC CTCGTACAA 1500  
 TAAAGATAGG GGGGCAGCTC AAGGAGGCTC TCCTGGACAC CGGAGCAGAC GACACCGTGC 1560  
 TGGAGGAGAT GTCGTTGCCA GGCGCTGGA AGCCGAAGAT GATCGGGGAA ATCGGCGGTT 1620  
 TCATCAAGGT GCGCCAGTAT GACCAAGATCC TCATCGAAAT CTGCGGCCAC AAGGCTATCG 1680  
 GTACCGTGCT GGTGGGCCAC ACACCCGTCA ACATCATCGG ACGCAACCTG TTGACGCAGA 1740  
 TCGGTTGCAC GCTGAACCTC CCCATTAGCC CTATCGAGAC GGTACCGGTG AAGCTGAAGC 1800  
 CCGGGATGGA CGGCCCCGAAG GTCAAGCAAT GGCCATTGAC AGAGGAGAAG ATCAAGGCAC 1860  
 TGGTGGAGAT TTGACACAGAG ATGAAAAGG AAGGGAAAAT CTCCAAGATI GGGCCTGAGA 1920  
 ACCCGTACAA CACGCCGGTG TTCGAATCA AGAAGAAGGA CTCGACGAAA TGGCGCAAGC 1980  
 TGGTGGACTT CCGCGAGCTG AACAAAGCGCA CGCAAGACTT CTGGGAGGTT CAGCTGGCA 2040  
 TCCCGCACCC CGCAGGGCTG AAGAAGAAGA AATCCGTGAC CGTACTGGAT GTGGGTGATG 2100  
 CCTACTTCTC CGTCCCCCTG GACGAAGACT TCAGGAAGTA CACTGCCTTC ACAATCCCTT 2160  
 CGATCAACAA CGAGACACCG GGGATTGAT ATCAGTACAA CGTGTGCCC CAGGGCTGGA 2220  
 AAGGCTCTCC CGCAATCTTC CAGAGTAGCA TGACCAAAAT CCTGGAGCCT TTCCGCAAAC 2280  
 AGAACCCCCGA CATCGTCATC TATCAGTACA TGGATGACTT GTACGTGGGC TCTGATCTAG 2340  
 AGATAGGGCA GCACCGCACC AAGATCGAGG AGCTGCGCCA GCACCTGTTG AGGTGGGGAC 2400  
 TGACCACACC CGACAAGAAG CACCAAGG AGCCTCCCTT CCTCTGGATG GGTTACGAGC 2460  
 TGCACCCCTGA CAAATGGACC GTGCAGCCTA TCGTGTGCC AGAGAAAGAC AGCTGGACTG 2520  
 TCAACGACAT ACAGAAGCTG GTGGGAAGT TGAACTGGC CAGTCAGATT TACCCAGGGA 2580  
 TTAAGGTGAG GCAGCTGTG AAACCTCTCC GCGGAACCAA GGCACTCACA GAGGTGATCC 2640  
 CCTTAACCGA GGAGGCCGAG CTCGAACCTGG CAGAAAACCG AGAGATCCTA AAGGAGCCCG 2700  
 TGACCGCGT GTACTATGAC CCCTCCAAGG ACCTGATCGC CGAGATCCAG AAGCAGGGGC 2760  
 AAGGCCAGTG GACCTATCAG ATTACCAAGG AGCCCTTCAA GAACCTGAAG ACCGGCAAGT 2820  
 ACGCCCGGAT GAGGGGTGCC CACACTAACG ACGTCAAGCA GCTGACCGAG GCCGTGCAGA 2880  
 AGATCACCAC CGAAAGCATC GTGATCTGGG GAAAGACTCC TAAGTTCAAG CTGCCCACCC 2940  
 AGAAGGAAAC CTGGAAACC TGGTGGACAG AGTATTGCA GGCCACCTGG ATTCTGAGT 3000  
 GGGAGTTCGT CAACACCCCT CCCCTGGTGA AGCTGTGGTA CCAGCTGGAG AAGGAGCCCA 3060  
 TAGTGGCGC CGAAACCTTC TACGTGGATG GGGCCGCTAA CAGGGAGACT AAGCTGGCA 3120  
 AAGCCGGATA CGTCACTAAC CGGGGCAGAC AGAAGGTTGT CACCCCTCACT GACACCACCA 3180  
 ACCAGAAGAC TGAGCTGCAG GCCATTACC TCGCTTGCA GGACTCGGGC CTGGAGGTGA 3240  
 ACATCGTACAG AGACTCTCAG TATGCCCTGG GCATCATTCA AGCCCAAGCCA GACCAGACTG 3300  
 AGTCCGAGCT GGTCAATCAG ATCATCGAGC AGCTGATCAA GAAGGAAAAG GTCTATCTGG 3360  
 CCTGGGTACC CGCCCCACAA GGCATTGGCG GCAATGAGCA GGTGACAAG CTGGTCTCGG 3420  
 CTGGCATCAG GAAGGTGCTA TTCCTGGATG GCATCGACAA GGCCCAGGAC GAGCACGAGA 3480  
 AATACCACAG CAACTGGCGG GCCATGGCTA GCGACTTCAA CCTGCCCCCT GTGGTGGCCA 3540  
 AAGAGATCGT GGCCAGCTGT GACAAGTGTG AGCTCAAGGG CGAACCCATG CATGGCCAGG 3600  
 TGGACTGTAG CCCCCGGCATC TGGCAACTCG ATTGCACCCA TCTGGAGGGC AAGGTTATCC 3660  
 TGGTAGCCGT CCATGTGGCC AGTGGCTACA TCGAGGCCGA GGTCAATTCCC GCCGAAACAG 3720  
 GGCAAGGAGAC AGCCTACTTC CTCCCTGAAGC TGGCAGGCCG GTGGCCAGTG AAGACCATCC 3780

ATACTGACAA TGGCAGCAAT TTCACCAGTG CTACGGTTAA GGCCGCCTGC TGTTGGCGG 3840  
 GAATCAAGCA GGAGTTCGGG ATCCCCTACA ATCCCCAGAG TCAGGGCGTC GTCGAGTCTA 3900  
 TGAATAAGGA GTTAAAGAAG ATTATCGGCC AGGTAGAGA TCAGGCTGAG CATCTAAGA 3960  
 CCGCGGTCCA AATGGCGGTAA TTCATCCACA ATTTCAAGCG GAAGGGGGGG ATTGGGGGGT 4020  
 ACAGTGCAGGG GGAGCGGATC GTGGACATCA TCGCGACCGA CATCCAGACT AAGGAGCTGC 4080  
 AAAAGCAGAT TACCAAGATT CAGAATTCC GGGTCTACTA CAGGGACAGC AGAAAATCCCC 4140  
 TCTGGAAAGG CCCAGCGAAG CTCCTCTGGA AGGGTGAGGG GGCAGTAGTG ATCCAGGATA 4200  
 ATAGCGACAT CAAGGTGGTG CCCAGAAGAA AGGCGAAGAT CATTAGGGAT TATGGCAAAC 4260  
 AGATGGCGGG TGATGATTGC GTGGCGAGCA GACAGGATGA GGATTAG 4307

## SEQ. ID. NO. 3 - Hüll-Gen aus HIV-1 MN (Genbank-Zugangsnummer M17449)

ATGAGAGTGA AGGGGATCAG GAGGAATTAT CAGCACTGGT GGGGATGGGG CACGATGCTC 60  
 CTTGGGTTAT TAATGATCTG TAGTGCTACA GAAAAATTGT GGGTCACAGT CTATTATGGG 120  
 GTACCTGTGT GGAAAGAACG AACCAACCT CTATTTGTG CATCAGATGC TAAAGCATAT 180  
 GATACAGAGG TACATAATGT TTGGGCCACA CAAGCCTGTG TACCCACAGA CCCCAACCCA 240  
 CAAGAAGTAG AATTGGTAAA TGTGACAGAA AATTTAACCA TGTGGAAAAA TAACATGGTA 300  
 GAACAGATGC ATGAGGATAT AATCAGTTA TGGGATCAAA GCCTAAAGCC ATGTGTAAAA 360  
 TTAACCCAC TCTGTGTTAC TTTAAATTGC ACTGATTGTA GGAATACTAC TAATACCAAT 420  
 AATAGTACTG CTAATAACAA TAGTAATAGC GAGGGAAACAA TAAAGGGAGG AGAAAATGAAA 480  
 AACTGCTCTT TCAATATCAC CACAAGCATA AGAGATAAGA TGCAAGAAAGA ATATGCACCT 540  
 CTTTATAAAC TTGATATAGT ATCAATAGAT AATGATAGTA CCAGCTATAG GTTGATAAGT 600  
 TGTAAACCT CAGTCATTAC ACAAGCTTGT CCAAAGATAT CCTTGAGCC AATTCCCATA 660  
 CACTATTGTG CCCCAGCTGG TTTTGCATT CTAAAATGTA ACGATAAAAAA GTTCAGTGG 720  
 AAAGGATCAT GTAAAAATGT CAGCACAGTA CAATGTACAC ATGGAATTAG GCCAGTAGTA 780  
 TCAACTCAAC TGCTGTTAAA TGGCAGTCTA GCAGAAGAAAG AGGTAGTAAT TAGATCTGAG 840  
 AATTCACTG ATAATGCTAA AACCATCATA GTACATCTGA ATGAATCTGT ACAAAATTAAT 900  
 TGTACAAGAC CCAACTACAA TAAAAGAAAA AGGATACATA TAGGACCAGG GAGAGCATT 960  
 TATACACAA AAAATATAAT AGGAACATATA AGACAAGCAC ATTGTAACAT TAGTAGAGCA 1020  
 AAATGGAATG ACACCTTAAG ACAGATAGTT AGCAAATTAA AAGAACAAATT TAAGAATAAA 1080  
 ACAATAGTCT TTAATCAATC CTCAGGAGGG GACCCAGAAA TTGTAATGCA CAGTTTTAAT 1140  
 TGTGGAGGGG AATTTCCTA CTGTAATACA TCACCACTGT TTAATAGTAC TTGGAATGGT 1200  
 AATAATACCT GGAATAATAC TACAGGGTCA AATAACAATA TCACACTTCA ATGCAAATA 1260  
 AAACAAATTA TAAACATGTG GCAGGAAGTA GGAAAAGCAA TGTATGCCCT TCCCATTGAA 1320  
 GGACAAATTA GATGTTCATC AAATATTACA GGGCTACTAT TAACAAGAGA TGGTGGTAAG 1380  
 GACACGGACA CGAACGACAC CGAGATCTTC AGACCTGGAG GAGGAGATAT GAGGGACAAT 1440  
 TGGAGAAGTG AATTATATAA ATATAAAGTA GTAACAATTG AACCATTAGG AGTAGCACCC 1500  
 ACCAAGGCAA AGAGAAGAGT GGTGCAGAGA GAAAAAAAGAG CAGCGATAGG AGCTCTGTT 1560  
 CTTGGGTTCT TAGGAGCAGC AGGAAGCACT ATGGGCGCAG CGTCAGTGAC GCTGACGGTA 1620  
 CAGGCCAGAC TATTATTGTC TGGTATAGTG CAACAGCAGA ACAATTGCT GAGGGCCATT 1680  
 GAGGCGCAAC AGCATATGTT GCAACTCACA GTCTGGGGCA TCAAGCAGCT CCAGGCAAGA 1740  
 GTCCTGGCTG TGGAAAGATA CCTAAAGGAT CAACAGCTCC TGGGGTTTG GGGTTGCTCT 1800  
 GGAAAACCTCA TTTGCACCC TACTGTGCTT TGGAAATGCTA GTTGGAGTAA TAAATCTCTG 1860  
 GATGATATTT GGAATAACAT GACCTGGATG CAGTGGAAA GAGAAATTGA CAATTACACA 1920  
 AGCTTAATAT ACTCATTACT AGAAAAATCG CAAACCCAAC AAGAAAAGAA TGAACAAGAA 1980  
 TTATTGGAAT TGGATAAATG GGCAAGTTG TGGAAATTGGT TTGACATAAC AAATTGGCTG 2040  
 TGGTATATAA AAATATTCAT AATGATAGTA GGAGGCTTGG TAGGTTAAG AATAGTTTT 2100

GCTGTACTTT CTATAGTGAA TAGAGTTAGG CAGGGATACT CACCATTGTC GTTGCAGACC 2160  
 CGCCCCCCAG TTCCGAGGGG ACCCGACAGG CCCGAAGGAA TCGAAGAAGA AGGTGGAGAG 2220  
 AGAGACAGAG ACACATCCGG TCGATTAGTG CATGGATTCT TAGCAATTAT CTGGGTCGAC 2280  
 CTGCGGAGCC TGTTCTCTT CAGCTACCAC CACAGAGACT TACTCTTGAT TGCAGCGAGG 2340  
 ATTGTGGAAC TTCTGGGACG CAGGGGGTGG GAAGTCCTCA AATATTGGTG GAATCTCCTA 2400  
 CAGTATTGGA GTCAGGAAC AAAGAGTAGT GCTGTTAGCT TGCTTAATGC CACAGCTATA 2460  
 GCAGTAGCTG AGGGGACAGA TAGGGTTATA GAAGTACTGC AAAGAGCTGG TAGAGCTATT 2520  
 CTCCACATAC CTACAAGAAC AAGACAGGGC TTGGAAAGGG CTTTGCTATA A 2571

## SEQ. I.D. NO. 4 - SYNgp-160mn - Codon-optimierte env-Sequenz

ATGAGGGTGA AGGGGATCCG CCGCAACTAC CAGCACTGGT GGGGCTGGGG CACGATGCTC 60  
 CTGGGGCTGC TGATGATCTG CAGCGCCACC GAGAAGCTGT GGGTGACCGT GTACTACGGC 120  
 GTGCCCGTGT GGAAGGAGGC CACCACCACCT GTGTTCTGCG CCAGCGACGC CAAGGCGTAC 180  
 GACACCGAGG TGCAACAACGT GTGGGCCACC CAGGCGTGCG TGCCCACCGA CCCCACCCCC 240  
 CAGGAGGTGG AGCTCGTGA CGTGACCGAG AACTTCAACA TGTGGAAGAA CAACATGGTG 300  
 GAGCAGATGC ATGAGGACAT CATCAGCCTG TGGGACCAGA GCCTGAAGCC CTGCGTGAAG 360  
 CTGACCCCCC TGTCGTGAC CCTGAACACTGC ACCGACCTGA GGAACACCCAC CAACACCAAC 420  
 AACAGCACCG CCAACAACAA CAGCAACAGC GAGGGCACCA TCAAGGGCGG CGAGATGAAG 480  
 AACTGCAGCT TCAACATCAC CACCAGCATC CGCGACAAGA TGCAAGAGGA GTACGCCCTG 540  
 CTGTACAAGC TGGATATCGT GAGCATCGAC AACGACAGCA CCAGCTACCG CCTGATCTCC 600  
 TGCAACACCA GCGTGTACAC CCAGGCCTGC CCCAAGATCA GCTTCGAGCC CATCCCCATC 660  
 CACTACTGCG CCCCCGCCGG CTTGCCATC CTGAAGTGCA ACGACAAGAA GTTCAGCGGC 720  
 AAGGGCAGCT GCAAGAACGT GAGCACCGTG CAGTGCACCC ACGGCATCCG GCCGGTGGTG 780  
 AGCACCCAGC TCCTGCTGAA CGGCAGCCTG GCGGAGGAGG AGGTGGTGT CCGCAGCGAG 840  
 AACTTCACCG ACAACGCCAA GACCATCATC GTGCACCTGA ATGAGAGCGT GCAGATCAAC 900  
 TGCACCGTC CCAACTACAA CAAGCGCAAG CGCATCCACA TCGGCCCCGG GCGCGCCTTC 960  
 TACACCACCA AGAACATCAT CGGCACCAC CGCCAGGCC ACTGCAACAT CTCTAGAGCC 1020  
 AAGTGGAACG ACACCCCTGCG CCAGATCGT AGCAAGCTGA AGGAGCAGTT CAAGAACAAAG 1080  
 ACCATCGTGT TCAACCAGAG CAGCGCGGC GACCCCGAGA TCGTGATGCA CAGCTTCAAC 1140  
 TGCGGCGGCG AATTCTTCTA CTGCAACACC AGCCCCCTGT TCAACAGCAC CTGGAACGGC 1200  
 AACAAACACCT GGAACAACAC CACCGGCAGC AACAAACAATA TTACCTCCA GTGCAAGATC 1260  
 AAGCAGATCA TCAACATGTG GCAGGAGGTG GGCAAGGCCA TGTACGCCCC CCCCATCGAG 1320  
 GGCCAGATCC GGTGCAGCAG CAACATCACC GGTCTGCTGC TGACCCCGCA CGGCAGCGAAG 1380  
 GACACCGACA CCAACGACAC CGAAATCTTC CGCCCCGGCG GCGGCAGACAT GCGCGACAAC 1440  
 TGGAGATCTG AGCTGTACAA GTACAAGGTG GTGACGATCG AGCCCCCTGG CGTGGCCCC 1500  
 ACCAAGGCCA AGCGCCGCGT GGTGCAGCGC GAGAAGCGGG CCGCCATCGG CGCCCTGTTC 1560  
 CTGGGCTTCC TGGGGGCCGGC GGGCAGCACC ATGGGGGCCG CCAGCGTGAC CCTGACCGTG 1620  
 CAGGCCCGCC TGCTCCTGAG CGGCATCGT CAGCAGCAGA ACAACCTCT CCGCGCCATC 1680  
 GAGGCCCGAGC AGCATATGCT CCAGCTCACC GTGTGGGCA TCAAGCAGCT CCAGGCCCGC 1740  
 GTGCTGGCCG TGGAGCGCTA CCTGAAGGAC CAGCAGCTCC TGGGCTTCTG GGGCTGCTCC 1800  
 GGCAAGCTGA TCTGCACAC CACGGTACCC TGGAAACGCT CCTGGAGCAA CAAGAGCCTG 1860  
 GACGACATCT GGAACAACAT GACCTGGATG CAGTGGGAGC GCGAGATCGA TAACTACACC 1920  
 AGCCTGATCT ACAGCCTGCT GGAGAAGAGC CAGACCCAGC AGGAGAAGAA CGAGCAGGAG 1980  
 CTGCTGGAGC TGGACAAGTG GGCAGCCTG TGGAACTGGT TCGACATCAC CAACTGGCTG 2040  
 TGGTACATCA AAATCTTCAT CATGATTGTG GGCAGCCTGG TGGGCTCCG CATCGTGTTC 2100  
 GCCGTGCTGA GCATCGTGA CCGCGTGCAGC CAGGGCTACA GCCCCCTGAG CCTCCAGACC 2160

CGGGCCCCCG TGCCGCGCGG GCCCGACCGC CCCGAGGGCA TCGAGGGAGGA GGGCGGGCGAG 2220  
 CGCGACCGCG ACACCAGCGG CAGGCTCGT CACGGCTTCC TGCGATCAT CTGGGTGAC 2280  
 CTCCGCAGCC TGTTCTGTT CAGCTACCAC CACCGCGACCC TGCTGCTGAT CGCCGCCCGC 2340  
 ATCGTGGAAC TCCTAGGCCG CCGCGGCTGG GAGGTGCTGA AGTACTGGTG GAACCTCCTC 2400  
 CAGTATTGGA GCCAGGAGCT GAAGTCCAGC GCCGTGAGCC TGCTAACGC CACCGCCATC 2460  
 GCGTGGCCG AGGGCACCGA CCGCGTGATC GAGGTGCTCC AGAGGGCCGG GAGGGCGATC 2520  
 CTGCACATCC CCACCCGCAT CCGCCAGGGG CTCGAGAGGG CGCTGCTGTA A 2571

### Patentansprüche

1. Lentivirusvektor, welcher folgendes umfaßt:

- (i) ein Virusgenom, umfassend wenigstens eine erste Nukleotidsequenz, die ein Ribozym oder eine Antisense-Ribonukleinsäure codiert, wobei die Sequenz an eine zweite Nukleotidsequenz oder deren Transkriptionsprodukt binden und deren Spaltung bewirken kann, wobei die zweite Nukleotidsequenz ein Viruspolypeptid codiert, welches für das Zusammensetzen von Viruspartikeln erforderlich ist,
- (ii) eine dritte Nukleotidsequenz, welche das Viruspolypeptid, das für das Zusammensetzen des Virusgenoms zu Viruspartikeln erforderlich ist, codiert, wobei die dritte Nukleotidsequenz eine andere Nukleotidsequenz hat als die zweite Nukleotidsequenz, so daß die dritte Nukleotidsequenz oder deren Transkriptionsprodukt für die Expression in Erzeugerzellen Codon-optimiert und gegenüber einer durch das Ribozym oder die Antisense-Ribonukleinsäure gesteuerten Spaltung resistent ist.

2. Vektor nach Anspruch 1, wobei der Lentivirusvektor ein HIV-Vektor ist.

3. Vektor nach einem der Ansprüche 1 oder 2, wobei das für das Zusammensetzen von Viruspartikeln erforderliche Polypeptid unter gag-, pol- und env-Proteinen ausgewählt ist.

4. Vektor nach Anspruch 3, wobei wenigstens das gag- und das pol-Protein von einem Lentivirus stammen.

5. Vektor nach Anspruch 3, wobei das env-Protein von einem Lentivirus stammt.

6. Vektor nach Anspruch 4 oder 5, wobei der Lentivirus HIV ist.

7. Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die dritte Nukleotidsequenz als Ergebnis einer oder mehrerer konservativer Veränderungen in der Nukleotidsequenz, die Bindungs-Spaltungsstellen, die von dem Ribozym oder einer Antisense-Ribonukleinsäure erkannt werden, entfernen, gegenüber einer durch das Ribozym oder die Antisense-Ribonukleinsäure gesteuerten Spaltung resistent ist.

8. Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, wobei die Erzeugerzellen Säugerzellen sind.

9. Vektor nach einem der vorangegangenen Ansprüche, welcher eine Mehrzahl erster Nukleotidsequenzen und dritter Nukleotidsequenzen, wie sie hierin definiert sind, umfaßt.

10. Vektor nach Anspruch 1, welcher von Rev unabhängig ist.

11. Vektor nach Anspruch 1, wobei Rev und/oder RRE fehlen.

12. Lentiviruspartikel, umfassend ein Virusgenom, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert ist, und eine oder mehrere dritte Nukleotidsequenzen, wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert sind.

13. Verfahren zum Herstellen eines Lentiviruspartikels, wobei das Verfahren umfaßt, daß man (i) ein Virusgenom, wie es in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert ist, (ii) eine oder mehrere dritte Nukleotidsequenzen, wie sie in einem der Ansprüche 1 bis 11 definiert sind, und (iii) Nukleotidsequenzen, die die anderen wesentlichen Virusverpackungskomponenten, die nicht durch die eine oder die mehreren dritten Nukleotidsequenzen codiert werden, codieren, in eine Wirtszelle einbringt.

14. Pharmazeutische Zusammensetzung, welche ein Lentiviruspartikel nach Anspruch 12 zusammen mit

einem pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel umfaßt.

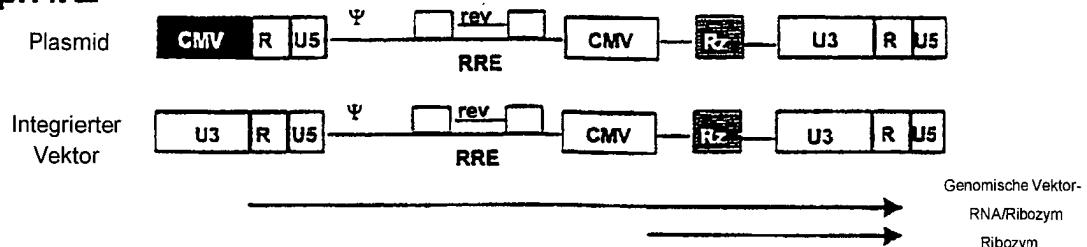
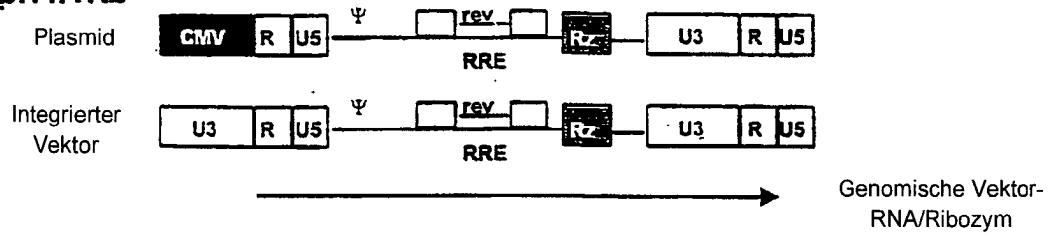
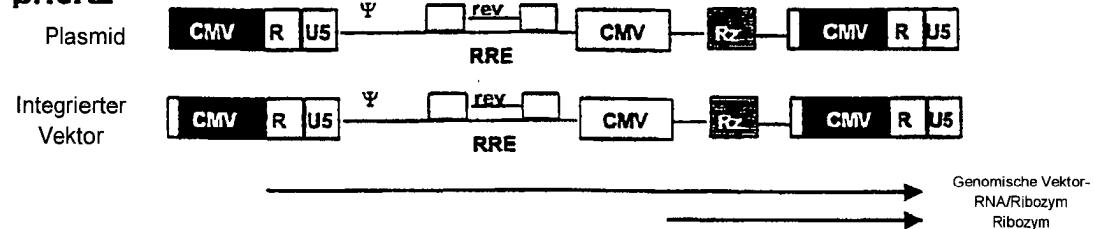
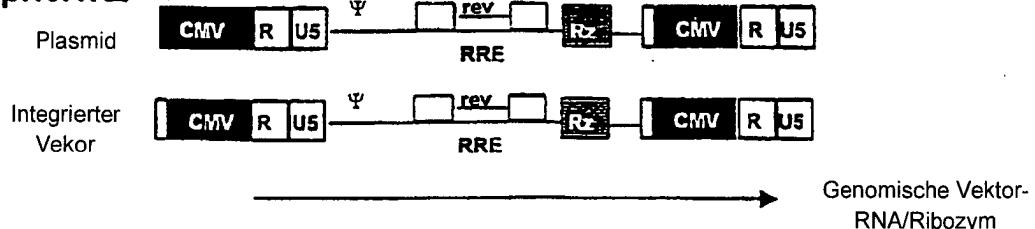
15. Lentivirusvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 11 oder Viruspartikel nach Anspruch 12 zur Behandlung einer Virusinfektion.

16. Lentivirusvektor nach einem der Ansprüche 1 bis 11 zur Verwendung in einem Verfahren zur Herstellung von Viruspartikeln.

Es folgen 8 Blatt Zeichnungen

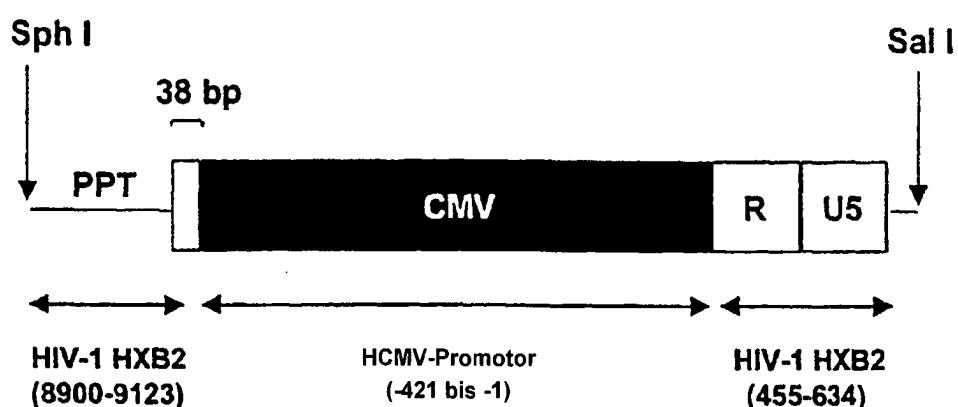
## Anhängende Zeichnungen

Figur 1

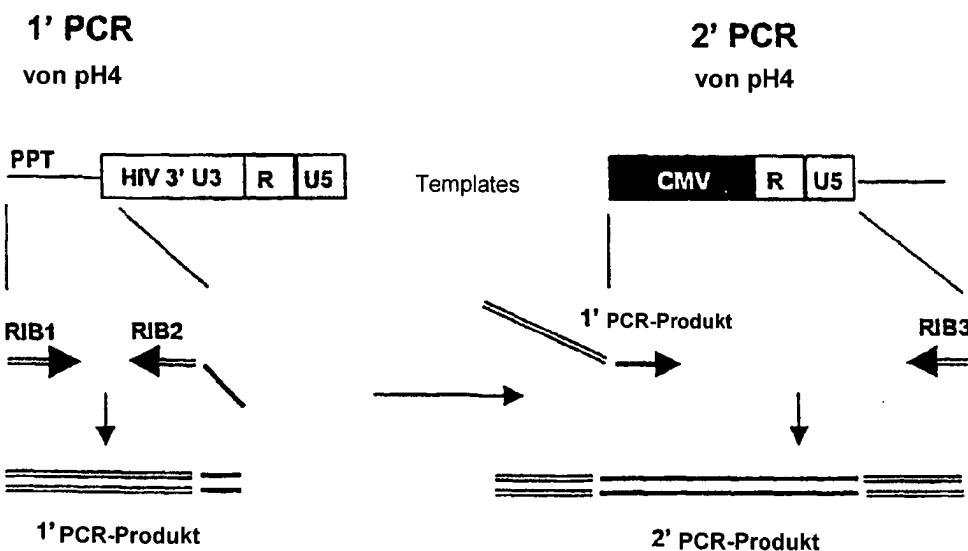
**pH4Rz****pH4.1Rz****pH6Rz****pH6.1Rz**

Figur 2

**A**



**B**



Figur 3

## gagpol-HXB2 -&gt; Codon-Verwendung

DNA-Sequenz 4308 b.p. ATCGGTGCGAGA ... GATGAGGATTAG linear

## 1436 Codons

MW : 161929 Dalton CAI(S.c.) : 0.083 CAI(E.c.) : 0.151

TTC phe F	21	TCT ser S	3	TAT tyr Y	30	TGT cys C	18
TTC phe F	14	TCC ser S	3	TAC tyr Y	9	TGC cys C	2
TTA leu L	46	TCA ser S	19	TAA OCH Z	-	TGA OPA Z	-
TTG leu L	11	TCG ser S	1	TAG AMB Z	1	TGG trp W	37
CTT leu L	13	CCT pro P	21	CAT his H	20	CGT arg R	-
CTC leu L	7	CCC pro P	14	CAC his H	7	CGC arg R	-
CTA leu L	17	CCA pro P	41	CAA gln Q	56	CGA arg R	3
CTG leu L	16	CCG pro P	-	CAG gln Q	39	CGG arg R	3
ATT ile I	30	ACT thr T	24	AAT asn N	42	AGT ser S	18
ATC ile I	14	ACC thr T	20	AAC asn N	16	AGC ser S	16
ATA ile I	56	ACA thr T	43	AAA lys K	88	AGA arg R	45
ATG met M	29	ACG thr T	1	AAG lys K	34	AGG arg R	18
GTT val V	15	GCT ala A	17	GAT asp D	37	GGT gly G	11
GTC val V	11	GCC ala A	19	GAC asp D	26	GGC gly G	10
GTA val V	55	GCA ala A	55	GAA glu E	75	GGA gly G	61
GTG val V	15	GCG ala A	5	GAG glu E	32	GGG gly G	26

Figur 4

gagpol-SYNgp [1 to 4308] -&gt; Codon-Verwendung

DNA-Sequenz 4308 b.p. ATGGGCGCCCGC ... GATGAGGATTAG linear

## 1436 Codons

MW : 161929 Dalton CAI(S.c.) : 0.080 CAI(E.c.) : 0.296

TTT phe F	5	TCT ser S	5	TAT tyr Y	10	TGT cys C	6
TTC phe F	30	TCC ser S	11	TAC tyr Y	29	TGC cys C	14
TTA leu L	2	TCA ser S	4	TAA och Z	-	TGA OPA Z	-
TTG leu L	7	TCG ser S	6	TAG AMB Z	1	TGG trp W	37
CTT leu L	3	CCT pro P	14	CAT his H	6	CGT arg R	2
CTC leu L	22	CCC pro P	39	CAC his H	21	CGC arg R	34
CTA leu L	6	CCA pro P	10	CAA gln Q	14	CGA arg R	3
CTG leu L	70	CCG pro P	13	CAG gln Q	81	CGG arg R	10
ATT ile I	17	ACT thr T	11	AAT asn N	13	AGT ser S	7
ATC ile I	79	ACC thr T	48	AAC asn N	45	AGC ser S	27
ATA ile I	4	ACA thr T	13	AAA lys K	25	AGA arg R	7
ATG met M	29	ACG thr T	16	AAG lys K	97	AGG arg R	13
GTT val V	5	GCT ala A	15	GAT asp D	19	GGT gly G	10
GTC val V	27	GCC ala A	56	GAC asp D	44	GGC gly G	54
GTA val V	6	GCA ala A	13	GAA glu E	29	GGA gly G	16
GTG val V	58	GCG ala A	12	GAG glu E	78	GGG gly G	28

Figur 5

env-mn [1 to 2571] -&gt; Codon-Verwendung

DNA-Sequenz 2571 b.p. ATGAGAGTGAAG ... GCTTGCTATAA linear

## 857 Codons

MW : 97078 Dalton CAI(S.c.) : 0.083 CAI(E.c.) : 0.140

TTT phe F	13	TCT ser S	7	TAT tyr Y	15	TGT cys C	16
TTC phe F	11	TCC ser S	3	TAC tyr Y	7	TGC cys C	5
TTA leu L	20	TCA ser S	13	TAA OCH Z	1	TGA OPA Z	-
TTG leu L	17	TCG ser S	2	TAG AMB Z	-	TGG trp W	30
CTT leu L	9	CCT pro P	5	CAT his H	8	CGT arg R	-
CTC leu L	11	CCC pro P	9	CAC his H	6	CGC arg R	2
CTA leu L	12	CCA pro P	12	CAA gln Q	22	CGA arg R	1
CTG leu L	15	CCG pro P	2	CAG gln Q	19	CGG arg R	1
ATT ile I	21	ACT thr T	16	AAT asn N	50	AGT ser S	18
ATC ile I	10	ACC thr T	14	AAC asn N	13	AGC ser S	11
ATA ile I	32	ACA thr T	28	AAA lys K	32	AGA arg R	30
ATG met M	17	ACG thr T	5	AAG lys K	14	AGG arg R	15
GTT val V	8	GCT ala A	16	GAT asp D	18	GGT gly G	10
GTC val V	9	GCC ala A	7	GAC asp D	14	GGC gly G	6
GTA val V	26	GCA ala A	20	GAA glu E	36	GGA gly G	28
GTG val V	12	GCG ala A	5	GAG glu E	10	GGG gly G	12

Figur 6

## SYNgp160mn -&gt; Codon-Verwendung

DNA-Sequenz 2571 b.p. ATGAGGGTGAAG ... GCGCTGCTGTAA linear

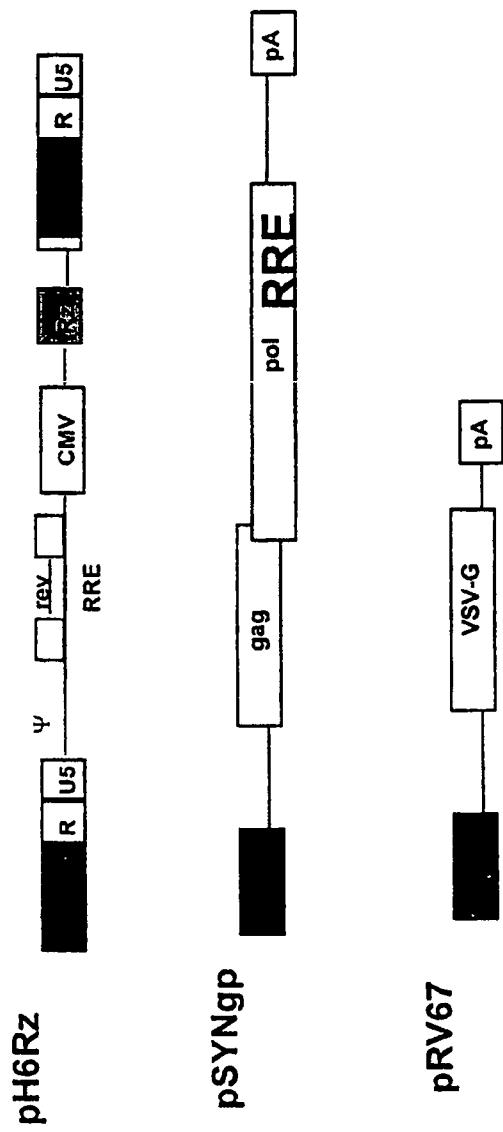
## 857 Codons

MW : 97078 Dalton CAI(S.c.) : 0.074 CAI(E.c.) : 0.419

TTT phe F	-	TCT ser S	2	TAT tyr Y	1	TGT cys C	-
TTC phe F	24	TCC ser S	4	TAC tyr Y	21	TGC cys C	21
TTA leu L	-	TCA ser S	-	TAA och Z	1	TGA opa Z	-
TTG leu L	-	TCG ser S	-	TAG amB Z	-	TGG trp W	30
CTT leu L	-	CCT pro P	-	CAT his H	2	CGT arg R	1
CTC leu L	20	CCC pro P	26	CAC his H	12	CGC arg R	36
CTA leu L	1	CCA pro P	-	CAA gln Q	-	CGA arg R	-
CTG leu L	63	CCG pro P	2	CAG gln Q	41	CGG arg R	4
ATT ile I	2	ACT thr T	-	AAT asn N	2	AGT ser S	-
ATC ile I	61	ACC thr T	59	AAC asn N	61	AGC ser S	48
ATA ile I	-	ACA thr T	-	AAA lys K	1	AGA arg R	2
ATG met M	17	ACG thr T	4	AAG lys K	45	AGG arg R	6
GTT val V	-	GCT ala A	-	GAT asp D	2	GGT gly G	1
GTC val V	1	GCC ala A	40	GAC asp D	30	GGC gly G	47
GTA val V	1	GCA ala A	-	GAA glu E	3	GGA gly G	-
GTG val V	53	GCG ala A	8	GAG glu E	43	GGG gly G	8

## HIV-Konstrukte

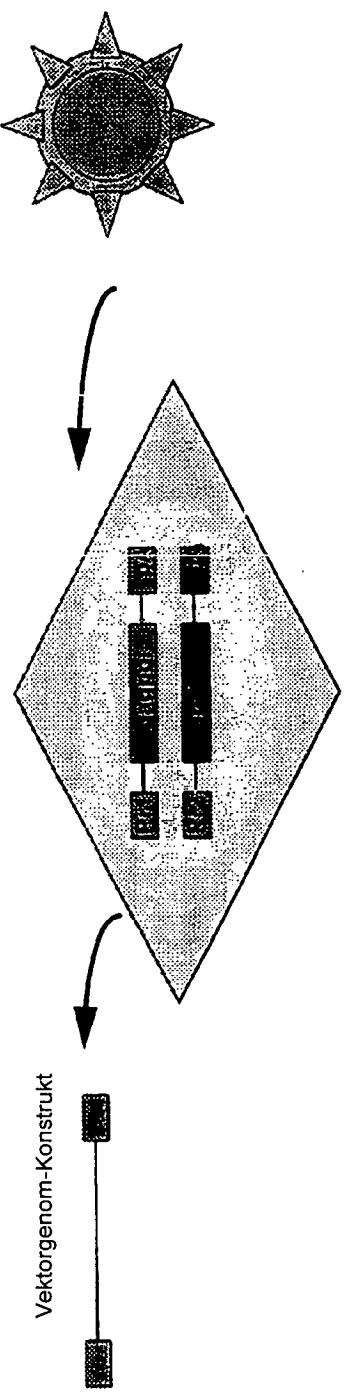
Figur 7



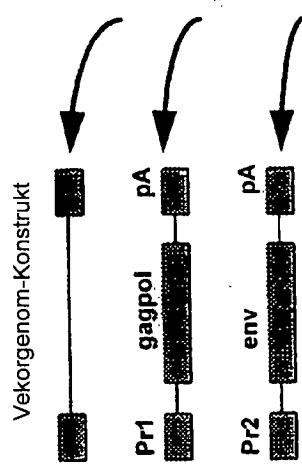
Figur 8

### Das Hit-Vektorsystem

#### Helper-Verpackungszelllinien



#### Drei-Plasmide-Cotransfektion (HIT)



e.g. 293T, COS