

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
9. Februar 2006 (09.02.2006)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2006/013103 A2

(51) Internationale Patentklassifikation:
C12N 15/63 (2006.01)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/008427

(22) Internationales Anmeldedatum:
3. August 2005 (03.08.2005)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
10 2004 037 611.5 3. August 2004 (03.08.2004) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): **GENEART GMBH** [DE/DE]; Josef-Engert-Strasse
9, 93053 Regensburg (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **NOTKA, Frank**
[DE/DE]; Franziskanerplatz 19, 93059 Regensburg
(DE). **WAGNER, Ralf** [DE/DE]; Roter Brachweg 29,
93049 Regensburg (DE). **HAMMER, Diana** [DE/DE];
Carl-Thiel-Strasse 9, 93053 Regensburg (DE).

(74) Anwalt: **WEICKMANN & WEICKMANN**; Postfach
860 820, 81635 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL,

AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,
CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES,
FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE,
KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA,
MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,
OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC,
VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (soweit nicht anders angegeben, für
jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW,
GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK,
EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC,
NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Erklärung gemäß Regel 4.17:

— *Erfindererklärung (Regel 4.17 Ziffer iv) nur für US*

Veröffentlicht:

— *ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu ver-
öffentlichen nach Erhalt des Berichts*

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Ab-
kürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Co-
des and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der
PCT-Gazette verwiesen.*

(54) Title: INDUCIBLE GENE EXPRESSION

(54) Bezeichnung: INDUZIERBARE GENEXPRESSION

(57) Abstract: The invention relates to vector constructs for an HIV-specific gene therapy. The expression of transgenes is coupled with an infection of the cell with HIV while the transcription of the transgene is controlled by a transcription control region derived from HIV. In addition, the transgene is improved with regard to RNA stability and expression efficiency by modifying the nucleotide sequence.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft Vektorkonstrukte für eine HIV-spezifische Gentherapie. Die Expression der Transgene ist an eine Infektion der Zelle mit HIV gekoppelt, indem die Transkription des Transgens durch eine von HIV abgeleitete Transkriptionskontrollregion kontrolliert wird. Das Transgen wird außerdem durch Modifikation der Nukleotidsequenz in der RNASTabilität und Expressionseffizienz verbessert.

WO 2006/013103 A2

- 1 -

Induzierbare Genexpression

Beschreibung

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren für die induzierbare Genexpression, wobei eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz auf Nukleinsäureebene so modifiziert wird, dass eine Steigerung der Expression erreicht wird, und die so modifizierte Nukleinsäuresequenz unter der Kontrolle einer induzierbaren Transkriptionskontrollsequenz exprimiert wird.

Verschiedenste Viren sind auf einen aktiven Export ihrer unvollständig gespleißten Transkripte aus dem Zellkern der infizierten Wirtszelle angewiesen. Dies kann entweder über die Verwendung eines cis-ständigen RNA-Signals innerhalb der viralen Transkripte (konstitutive Transportelemente) erfolgen oder geschieht mit Hilfe viraler Proteine.

Cis-aktive Transportelemente werden beispielsweise von MPMV-CTE (Mason-Pfizer Monkey Virus constitutive transport element), SRV-CTE (Simian Retrovirus constitutive transport element), Hepatitis B-Virus PRE (posttranscriptional regulatory element) und HSV (Herpes Simplex Virus) (innerhalb des TK (Thymidinkinase)-Gens) verwendet. Diese RNA-Elemente rekrutieren zelluläre Faktoren und Exportwege, um den Kernexport der viralen Transkripte zu ermöglichen.

Alternativ dazu kann der Kernexport auch über einen Exportfaktor vermittelt werden, der spezifisch an eine Zielsequenz innerhalb der viralen Transkripte bindet und diese im Zusammenspiel mit zellulären Faktoren in das Zytoplasma transportiert. So werden beispielsweise Ad-5 (Adenovirus 5)-Transkripte mit Hilfe der 34K- und E4orf6-Proteine, EBV (Epstein-Barr Virus)-Transkripte mit Hilfe des EB2-Proteins, Herpesvirus Saimiri-Transkripte mit Hilfe des ORF 57-Genproduktes, HSV-Transkripte mit Hilfe des ICP 27-Proteins, HTLV-I und II (human T-cell Leukemia Virus I und II)-Transkripte mit Hilfe der Rex-Proteine, EIAV (Equine Infectious Anaemia

- 2 -

Virus)-, SIV (Simian Immunodeficiency Virus)-, und HIV-1 und HIV-2 (human Immunodeficiency Virus 1 und 2)-Transkripte mit Hilfe der Rev-Proteine exportiert.

5 Am besten untersucht ist der HIV-1 Rev vermittelte Kernexport später HIV-1-Transkripte. Wie alle Lentiviren ist HIV-1 darauf angewiesen, aus nur einer proviralen Matrize mehrere Gene zu aktivieren und in einer zeitlich festgelegten Abfolge zu exprimieren. Durch alternative Spleißereignisse sowie weitere, auf RNA-Ebene stattfindende Regulationsmechanismen
10 werden unterschiedliche Gene aus nur einem ~9 kb großen Primärtranskript generiert. Diese viralen Transkripte können aufgrund ihrer Größe in 3 Klassen aufgeteilt werden: ~9 kb ungespleißte (*gag*, *pol*), ~4 kb einfach gespleißte (*env*, *vif*, *vpr*, *vpu*) und ~2 kb mehrfach gespleißte (*rev*, *tat*, *nef*) RNAs.

15 Neben dem Auftreten von unvollständig bis mehrfach gespleißten Transkripten kann zudem eine zeitliche Abfolge in der Expression dieser unterschiedlichen RNA-Spezies beobachtet werden. So sind in der frühen Phase der Replikation im Zytoplasma der infizierten Zellen nur die mehrfach
20 gespleißten ~2 kb RNAs, und ihre Genprodukte Rev, Tat und Nef nachweisbar. Erst zeitlich verzögert treten dort dann auch die un- (~9 kb) und einfach (~4 kb) gespleißten Transkripte und ihre Genprodukte Gag, Pol und Env in Erscheinung.

25 In Zellen, die mit Virus-Mutanten, denen ein aktives Rev-Protein fehlt, infiziert wurden, können die einfach- und nichtgespleißten Transkripte jedoch nie im Zytoplasma nachgewiesen werden. Die un- und einfach gespleißten Transkripte akkumulieren dann im Kern und die von ihnen translatierten späten Strukturproteine (Gag, Env) und Enzyme (Pol) können
30 nicht gebildet werden. Das virale Rev-Protein ist also in essentieller Weise an der zeitlich regulierten Expression der viralen Gene beteiligt.

HIV-1 Rev, ebenso wie die oben aufgeführten RNA-Transportmoleküle, sind

- 3 -

Shuttle-Proteine, die virale RNAs über die Wechselwirkung mit einer innerhalb viraler Transkripte gelegenen RNA-Zielsequenz diese aus dem Kern in das Zytoplasma transportieren. So bindet HIV-1 Rev im Kern spezifisch an seine RNA-Zielstruktur RRE, das "Rev-responsive-element".
5 Diese 351 Nukleotide (nt) lange Region ist innerhalb des Env-Leserahmens lokalisiert und damit Bestandteil aller un- und einfach gespleißten Transkripte. Anschließend wird dieser Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex über die Interaktion mit zellulären Faktoren aus dem Zellkern exportiert. Dazu ist eine C-terminal gelegene Leucin-reiche Sequenz notwendig, die als
10 Kernexportsequenz NES ("nuclear export sequence") die nukleäre Translokation des Rev-Proteins unter Verwendung zellulärer Mechanismen vermittelt (Pollard et al., 1998).

Immer noch umstritten ist der Grund, warum die späten Transkripte in
15 Abwesenheit von Rev im Kern zurückbleiben, was eine notwendige Voraussetzung für die Rev-Abhängigkeit und damit die zeitlich regulierte Expression von *gag*, *pol* und *env* ist. Im Prinzip dominieren zwei alternative Vorstellungen zur Kernretention später Transkripte.

20 Es wird angenommen, dass ein zelluläres Transkript den Zellkern erst dann verlassen kann, wenn der Spleißprozess vollständig abgeschlossen ist, respektive alle aktiven Spleißstellen aus dem Primärtranskript entfernt worden sind. Bei den späten viralen Transkripten handelt es sich um Intronhaltige, nur unvollständig gespleißte pre-mRNAs, die mit Hilfe von Rev und
25 RRE ins Zytoplasma transportiert werden. Deshalb wurde schon frühzeitig der Einfluss der zellulären Spleißmaschinerie auf die Kernretention der späten Transkripte untersucht (Mikaelian et al., 1996) (Kjems et al., 1991; Kjems et al., 1993; Chang et al., 1989; Powell et al., 1997; Lu et al., 1990; O'Reilly et al., 1995). Durch das Vorhandensein unterschiedlich aktiver
30 Spleißstellen scheint der Spleißprozess bei HIV-1-Transkripten nur suboptimal zu erfolgen. Deshalb wurde von mehreren Gruppen die Hypothese aufgestellt, dass Rev den Export von Transkripten ermöglicht, die innerhalb der Spleißmaschinerie durch Ausbildung ineffizienter

Spleißkomplexe festgehalten werden.

Konträr dazu konnte aber gezeigt werden, dass die späten HIV-1-Gene, wie beispielsweise *env*, auch in Abwesenheit von aktiven Spleißstellen in ihrer Expression reprimiert bleiben und damit der Einfluss der Spleißmaschinerie mehr indirekt zu sein scheint (Nasioulas et al., 1994). Daher wurden so genannte inhibitorische Sequenzen (INS) oder cis-aktive Repressor-Elemente (CRS) innerhalb der Leserahmen postuliert, welche die Expression negativ beeinflussen (Nasioulas et al., 1994; Olsen et al., 1992; Schwartz et al., 1992b; Maldarelli et al., 1991). Diese innerhalb der kodierenden mRNA gelegenen Repressor-Sequenzen besitzen jedoch kein gemeinsames Sequenzmotiv wie etwa das AUUUA-Instabilitätsmotiv innerhalb des 3'-UTR der instabilen GM-CSF mRNA (Chen et al., 1995), sondern fallen nur durch ihren durchweg hohen A/U Gehalt auf. So resultierte die Fusion der postulierten INS-haltigen Fragmente aus Leserahmen später Gene (wie *gag* und *env*) an ein CAT-Reportersystem in einer reduzierten Reporteraktivität (Cochrane et al., 1991; Rosen et al., 1988). Diese Reduktion der Expression von *gag* und *pol* konnte durch mehrfache stille Punktmutationen innerhalb der "wobble"-Positionen teilweise wieder aufgehoben werden (Schwartz et al., 1992a; Schneider et al., 1997). Die un- und einfach gespleißten HIV-1 mRNAs scheinen also cis-aktive Repressor-Elemente zu besitzen, die entweder durch multiples Spleißen entfernt oder durch einen Rev/RRE vermittelten Kernexport überwunden werden.

Eine elegante Methode, um die Rev-Abhängigkeit von HIV-Transkripten zu umgehen, wurde von Schwartz und Schneider, wie bereits erwähnt, in Form einer partiellen Änderung des Leserahmens von HIV-Genen entwickelt. Eine konsequente Weiterführung dieses Konzeptes führte zur Synthese eines kodonoptimierten HIV-*gag-pol*-Gens unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide (Wagner et al., 2000; Graf et al., 2000). Diese Form der Anpassung des G/C-Gehalts und des Kodongebrauchs an den von Säugerzellen ermöglichte eine konstitutive Synthese des Gag-Pol-

Polyproteins in Säugerzellen in großen Mengen. Der zugrunde liegende Mechanismus dieser Abkopplung der Proteinsynthese von der Rev-Abhängigkeit ist ein veränderter Kernexport der mRNA. Während die HIV-Wildtyp-RNA auf einen alternativen, durch das Crm1-Protein charakterisierten Exportweg, in Abhängigkeit des HIV Shuttle-Proteins Rev, angewiesen ist, wird die synthetische mRNA auf dem regulären Kernexportweg für zelluläre mRNAs konstitutiv in das Zytoplasma transportiert. Diese konstitutive Expression von HIV-Proteinen eröffnet neue Wege für eine HIV-Therapieform auf genetischer Ebene.

10

Die Publikation von Graf et al. (2000) offenbart jedoch kein Verfahren für eine mit Hilfe eines transaktiven Faktors induzierbare Genexpression.

15

Ebenso wie die genannte Publikation von Graf et al. befasst sich auch die DE 1 053 781 A1 mit dem RNA-Export aus dem Zellkern ins Cytoplasma. Diese Patentanmeldung befasst sich damit, Reportergene von Rev abhängig zu machen, um die Expression des Reportergens über den Kernexport steuern zu können.

20

Da eine Rev- bzw. RRE-Abhängigkeit der Entwicklung von HIV-basierten Vektoren gewisse Beschränkungen auferlegt, synthetisierten Kotsopoulou et al. (2000) ein kodonoptimiertes HIV-1-*gag-pol*-Gen. Dieses Gen wurde in einen Säuger-Expressionsvektor eingefügt und auf die Abhängigkeit von Rev hin untersucht. Die Autoren verwendeten jedoch keine mit Hilfe von transaktiven Faktoren induzierbare Promotoren. Ein erfindungsgemäßes Verfahren ist demnach nicht offenbart.

25

30

Die Expression von anti-HIV-Genen in Zellen kann effizient für eine intrazelluläre Hemmung der HIV-Replikation genutzt werden (Bunnell et al., 1998). Inzwischen wurde eine ganze Reihe von HIV-Gentherapie-Strategien entwickelt, die von Antisenskonstrukten und RNA-Decoys über spezifische RNA-abbauenden Ribozyme und RNA *interference* bis zu transdominant-negativen, von HIV abgeleiteten Proteinen reichen. Neben diesen

- 6 -

intrazellulären Hemmstoffen, die gezielt Schritte der HIV-Replikation stören, kann im Rahmen einer Gentherapie auch die Neuinfektion von Zellen oder die Verbreitung von Nachkommenviren verhindert werden. Verschiedene Ansätze befassen sich mit der Expression von sezernierbaren anti-HIV-Proteinen, immunstimulierenden oder unspezifische antiviralen Faktoren und nicht zuletzt mit der Expression von zelltoxischen Faktoren nach erfolgter Infektion (Übersicht siehe Mautino et al., 2002).

Neben diesen eher unspezifischen Hemmstrategien kann die Virusvermehrung durch eine Verhinderung der Virusfreisetzung auf sehr spezifische Weise, unter Verwendung HIV-eigener Proteinderivate erfolgen. Deletionen im Gag vermitteln einen transdominant-negativen (TDN) Effekt auf die Neubildung und Freisetzung von Nachkommenviren (von Poblitzki et al., 1993; Trono et al., 1989; Smythe et al., 1994; Furuta et al., 1997). Diese Deletionen liegen im p17MA, im Übergangsbereich von p17MA/p24CA und in der C-terminalen Domäne des p24CA. Der genaue Wirkmechanismus des transdominant-negativen Effektes ist nicht aufgeklärt. Einige Anhaltspunkte deuten jedoch auf einen Einfluss der reduzierten Cyclophilin A-Bindekapazität des mutierten p24CA (Chiu et al., 2002) und auf ein verändertes Membran Targeting, von der Plasmamembran zur ER Membran, bei Deletionen im p17MA (Facke et al., 1993; Gallina et al., 1994; Ono et al., 2004) hin. Da Gag ein sehr stark multimerisierendes Polyprotein ist und eine exakte Zusammenlagerung für die korrekte Ausbildung von HIV-Partikeln notwendig ist (Wilk et al., 2001), ist es naheliegend, dass TDN Gag-Deletionsderivate mit funktioneller *Assembly* Domäne (C-terminale Domäne des p24CA) durch eine Bindung an Wildtyp Gag-Proteine den Zusammenbau von HIV-Capsiden direkt beeinträchtigen und so nachweislich zu einer Hemmung der HIV-Replikation führen.

Gerade die letzte Strategie weist jedoch bei einer konstitutiven Protein-Expression einige Probleme auf. So kann die Expression des Fremdgens zu Zelltoxizität, einer Fehlregulation der zellulären Funktionen, einer Herabregulierung der Transkription und, gerade im Fall eines von HIV

- 7 -

abgeleiteten Proteins, zu einer unerwünschten Immunantwort führen (Smythe et al., 1994). Um diese Problematik zu umgehen, werden unterschiedliche Strategien verfolgt, die Expression des Transgens von einer HIV-Infektion abhängig zu machen.

5

In verschiedenen Ansätzen wurde eine Tat-, eine Rev- und eine Tat/Rev-abhängige Expression untersucht und teilweise die Hemmung der HIV-Vermehrung *in vitro* beschrieben (Caruso et al., 1992; Harrison et al., 1992; Liu et al., 1994). Übereinstimmend konnte die Expression von
10 Thymidinkinase (Marcello et al., 1998) bzw. Interferon $\alpha 2$ (Ragheb et al., 1999) durch Tat um den Faktor 5 bzw. 4 und durch Rev um den Faktor 3,3 bzw. <2 gesteigert werden. Die kombinierte Zugabe von Tat und Rev führte dagegen zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen: Die Expression der Thymidinkinase war um den Faktor 7 erhöht, während für Interferon $\alpha 2$ eine
15 Steigerung der Expression um den Faktor >300 angegeben wurde. Für HIV-1 TDN Gag-Derivate konnte eine deutliche Rev-vermittelte Induktion der Proteinsynthese (bei geringer Basalaktivität) gezeigt werden, die mit einer weitgehenden Hemmung der HIV-Replikation (bis 94 %) verbunden war (Smythe et al., 1994; Furuta et al., 1997). Für die Kombination von Tat- und
20 Rev-abhängiger Expression von TDN Gag konnte ebenfalls eine deutlich erhöhte Proteinsynthese durch Kotransfektion von tat- und rev-Expressionsplasmiden erzielt werden (Ding et al., 2002; Cara et al., 1998). Hier zeigte sich jedoch, dass die Hemmung der HIV-Replikation nur partiell erfolgte (Cara et al., 1998) und nur durch Kombination mit verschiedenen
25 Hemmstrategien auf ein hohes Niveau anstieg (Ding et al., 2002; Cara et al., 1998). Im Gegensatz dazu führte die LTR/Tat-induzierbare Expression von Suizidgenen, wie TK, mehrfach zu einer Hemmung der Virusreplikation (Marcello et al., 1998; Miyake et al., 2001; Ragheb et al., 1999).

30 Die Basalaktivität betreffend, ist übereinstimmend gezeigt worden, dass eine Abhängigkeit von Rev nicht zu einer absoluten Verhinderung der Proteinsynthese führt. Rev beeinflusst den Export der RNA aus dem Zellkern und ist nur in Verbindung mit entsprechenden cis-aktiven

- 8 -

Rückhaltesequenzen (INS, siehe oben) und einer cis-ständigen Erkennungssequenz (RRE) funktionell. Isolierte und in ihrer Größe (und damit auch in der Größe der INS) reduzierte gag-Gene werden unter einem entsprechend aktiven Promotor (z.B. CMV) effizient transkribiert und es liegt
5 nahe, dass ein gewisser Teil der RNA ohne die Unterstützung des Rev ins Zytoplasma gelangt und translatiert wird.

Für die Regulation durch LTR/Tat gibt es keine einheitlichen Daten. In den meisten Berichten wurde eine Basalaktivität der Gene unter LTR-Kontrolle
10 beschrieben (Caruso et al., 1992; Ding et al., 2002; Muratori et al., 2002; Cara et al., 1998). Mögliche Erklärungen dieser Expression in Abwesenheit von Tat sind eine Aktivierung des LTR-Promotors durch TNF α , das aus den entsprechenden transduzierten Zellen sezerniert wurde (Muratori et al., 2002) oder Elemente des Vektorkonstrukts, die von HIV abgeleitet sind
15 (Miyake et al., 2001).

Auch die Länge des verwendeten LTR kann einen Einfluss auf die Regulation haben. So wurde mit einem minimalen LTR eine komplette Abschaltung der Transkription in Abwesenheit von Tat nachgewiesen
20 (Miyake et al., 2001), also ein "dichter" induzierbarer Promotor beschrieben.

Für eine HIV-abhängige Transgen-Expression scheint daher das LTR/Tat-System das konsequentere Schaltermodul zu sein. Auch deswegen, weil eine Induktion durch Rev der durch Tat nachgeschaltet ist, was zu einer
25 initialen Virusvermehrung führen kann, und zwar kurz bevor die Hemmung durch das Transgen greifen kann. So wird unter anderem die beobachtete unvollständige Hemmung der Replikation nach Rev-Induktion erklärt (Smythe et al., 1994).

30 Allerdings konnte für eine Tat-induzierbare Expression von transdominant-negativen (TDN) Gag-Derivaten, im Gegensatz zu Suizidgenen, bisher noch keine hinreichende Hemmung der HIV-Replikation nachgewiesen werden (siehe oben). Für diesen Mangel gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten:

5 i) Die TDN-Wirkung korreliert mit der Menge des TDN-Proteins, d.h. es muss ein gewisses Limit überschritten werden, um eine wirkungsvolle Intervention zu erreichen. Die Proteinmenge ist aber in großem Maß abhängig von der Promotoraktivität. Diese ist im Vergleich zu hoch aktiven viralen Promotoren (z.B. CMV, SV40) im HIV-1 LTR relativ gering, also möglicherweise nicht ausreichend.

10 ii) Die bisher verwendeten TDN-Derivate sind vom HIV-1 Wildtyp-Genom abgeleitet, enthalten folglich INS-Motive und sind daher von einem Rev-vermittelten Kernexport abhängig. Wie oben beschrieben, setzt daher die eigentliche Hemmwirkung erst mit der Anwesenheit des REV im Zellkern ein, wodurch die ersten HIV-Transkripte ungehindert in das Zytoplasma gelangen und die Replikation vollenden können. Daher ist es nicht
15 verwunderlich, dass eine Kombination aus beiden Regulationssystemen zu einer sehr ineffizienten Hemmung der HIV-Replikation führt (Cara et al., 1998).

20 Außer dem LTR-tat-System sind viele andere induzierbare virale Promotoren bekannt. Auch andere induzierbare Expressionssysteme sind im Stand der Technik bekannt. Oftmals kann jedoch mit einem induzierbaren System nicht der gewünschte Grad der Genexpression erreicht werden. Daher war es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein verbessertes Verfahren zur induzierbaren Genexpression bereitzustellen.

25 Diese Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur induzierbaren Genexpression, umfassend

- (i) Bereitstellen einer zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz,
- (ii) Modifizieren der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz, so dass
30 eine Steigerung der Expression erreicht wird,
- (iii) operatives Verknüpfen der modifizierten Zielnukleinsäuresequenz mit einer induzierbaren Transkriptionskontrollsequenz,
- (iv) Exprimieren der modifizierten Zielnukleinsäuresequenz in einem

- 10 -

geeigneten Expressionssystem durch einen transaktiven Faktor.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass die induzierbare Expression eines in einer zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz kodierten Gens (nachfolgend auch Transgen) deutlich verbessert werden kann, wenn zum
5 einen seine Sequenz auf Nukleinsäureebene zu einer Steigerung der Genexpression modifiziert wird und andererseits die Zielnukleinsäure unter der Kontrolle einer durch einen transaktiven Faktor induzierbaren Transkriptionskontrollsequenz exprimiert wird.

10

Eine induzierbare Genexpression ist z.B. bei der Verwendung von toxischen Genprodukten essentiell und hat bei anderen, therapeutisch einsetzbaren Genen gegenüber einer konstitutiven Expression entscheidende Vorteile:

- Eine nicht infizierte Zelle wird in ihrer physiologischen Leistung nicht
15 durch eine hohe Expression zusätzlicher Faktoren unter Stress gesetzt.
- Unspezifische oder nicht absehbare Wechselwirkungen der Genprodukte könnten zu physiologischen Modifikationen, wie Aktivierung, Proliferation oder ähnlichem, auch bei benachbarten Zellen, in Geweben oder im gesamten Organismus führen.
- 20 – Von HIV stammende Proteine werden im Umfeld einer HIV-Infektion von Immunzellen erkannt und die entsprechenden Protein-exprimierenden Zellen eliminiert.
- Im Fall von toxischen Faktoren muss eine konstitutive Produktion vermieden werden.

25

Eine Transkriptionskontrollsequenz ist eine Nukleinsäuresequenz, welche die Expression einer damit operativ assoziierten Nukleinsäuresequenz, insbesondere eines Gen, ermöglicht. Es kann sich hierbei um einen Promotor handeln, zusätzlich kann die Transkriptionskontrollsequenz auch
30 weitere Elemente umfassen, wie etwa Enhancer und dergleichen. Vorzugsweise handelt es sich bei der induzierbaren Transkriptionskontrollsequenz um einen induzierbaren Promotor. Hierbei ist grundsätzlich jedes induzierbare Promotorsystem geeignet, das im Stand

- 11 -

der Technik bekannt ist. Es kann beispielsweise ein natürlicher oder
artifizeller induzierbarer Promotor verwendet werden, beispielsweise ein
durch Tetracyclin induzierbarer Promotor (Tet on/Tet off-System). Des
Weiteren kann aber auch ein induzierbarer viraler Promotor verwendet
5 werden.

Die Transkriptionskontrollsequenz wird durch einen transaktiven Faktor
induziert. Bei dem transaktiven Faktor handelt es sich um einen Faktor,
welcher *in trans* wirkt und einen Einfluss auf die Transkription hat.
10 Vorzugsweise handelt es sich hierbei um einen Transkriptionsfaktor.
Besonders bevorzugt ist der transaktive Faktor ein viraler transaktiver
Faktor.

Vorzugsweise ist die induzierbare Transkriptionskontrollsequenz durch
15 einen viralen transaktiven Faktor induzierbar. Eine virale induzierbare
Transkriptionskontrollsequenz, die durch einen viralen transaktiven Faktor
induzierbar ist, kann von einem beliebigen Virus abgeleitet sein.
Vorzugsweise werden hierfür Sequenzen von Retroviren, HCV (Hepatitis C-
Virus), HBV (Hepatitis B-Virus), HSV (Herpes simplex-Virus), EBV (Epstein-
20 Barr-Virus), SV40 (Simian-Virus 40), AAV (Adeno-assoziiierter Virus),
Adenovirus, Papillomviren oder Ebolavirus verwendet. Die hierbei
verwendeten transaktiven Faktoren sind demgemäß z.B. ausgewählt aus
den folgenden viralen Faktoren, jedoch nicht beschränkt auf diese: NS5A
(HCV), HB X (HBV), VP16/ICP4 (EBV), EBNA1/Rta (EBV), ART (HHV8),
25 Large T-Antigen (SV40), Rep78/68 (AAV), E1A (Adenovirus), E2
(Papillomvirus) und VP30 (Ebolavirus).

Als induzierbare Transkriptionskontrollsequenz, die durch einen viralen
transaktiven Faktor induzierbar ist, wird vorzugsweise ein retroviraler LTR-
30 Promotor oder eine funktionelle Teilsequenz davon verwendet.
Vorzugsweise ist daher der transaktive Faktor ein retrovirales Tat oder Tax
Protein. Der LTR-Promotor kann ausgewählt sein aus den LTRs von HIV-1,
HIV-2, SIV, HTLV und anderen verwandten Retroviren, die LTR-Promotoren

- 12 -

aufweisen. Insbesondere sind lentivirale Promotoren bevorzugt, insbesondere die von HIV.

Ein transaktiver Faktor im Sinne der vorliegenden Erfindung ist somit ein Faktor, welcher *in trans* einen Einfluss auf die Transkription ausübt, vorzugsweise indem der transaktive Faktor mit der induzierbaren Transkriptionskontrollsequenz wechselwirkt. Ein Beispiel für einen solchen transaktiven Faktor ist somit das oben bereits erwähnte Tat-Protein.

Zur Verbesserung der Genexpression wird die zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz modifiziert. Dies geschieht auf Nukleinsäureebene und bevorzugt so, dass die entsprechende Aminosäuresequenz nicht oder im wesentlichen nicht verändert wird. Wird die Aminosäuresequenz bei der Modifikation der Nukleinsäuresequenz zur Erhöhung der Genexpression verändert, so sollte dies keinen Einfluss auf die Funktion des resultierenden Proteins haben.

Die Modifikation der Zielnukleinsäuresequenz zur Erhöhung der Genexpression kann auf mehrere Arten durchgeführt werden.

Zum einen ist es möglich, den Kodongebrauch des Transgens an das verwendete Expressionssystem anzupassen. Ein eukaryontisches Expressionssystem, insbesondere eines auf Säugerbasis ist bevorzugt, insbesondere handelt es sich hierbei um Säugerzellen, vorzugsweise humane Zellen. Daher wird der Kodongebrauch des Transgens vorzugsweise an den Kodongebrauch von Säugerzellen, stärker bevorzugt den von humanen Zellen, angepasst.

Erfindungsgemäße und vorzugsweise für die Gentherapie geeignete modifizierte Zielnukleinsäuresequenzen lassen sich beispielsweise erzeugen, indem man die Kodonverteilung so wählt, wie sie in exportierter zellulärer mRNA auftritt. Bevorzugt soll hierbei eine Kodonwahl verwendet werden, wie in sie Säugerzellen am häufigsten oder am zweithäufigsten

- 13 -

verwendet wird (Ausubel et al., 1994), noch mehr bevorzugt wird die Kodonwahl an die von aktiv exprimierten Säugergenen angepasst. Vorzugsweise wird die Nukleinsäuresequenz unter Verwendung der Gene Optimizer-Technologie (deutsche Patentanmeldung DE 102 60 805.9, PCT/EP03/14850) für eine optimale Expression in Säugetieren modifiziert.

Anstelle der oder auch zusätzlich zur Anpassung der Kodonwahl, ist es aber auch möglich, den GC-Gehalt zu optimieren. Vorzugsweise wird dies erreicht, indem der GC-Gehalt des Transgens so genau wie möglich an den GC-Gehalt des verwendeten Expressionssystems angepasst wird. Dabei wird vorzugsweise die Degeneration des genetischen Codes ausgenutzt, sodass die Änderung der Nukleinsäuresequenz zwecks Erhöhung des GC-Gehalts nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führt. Der optimale Prozentsatz an G und C Nukleotiden in einer zu exprimierenden Sequenz hängt, wie bereits erwähnt, von dem jeweiligen Organismus, bzw. den jeweiligen Zellen ab, in denen die Sequenz exprimiert werden soll. Beispielsweise liegt der optimale GC-Gehalt bei Nukleinsäuren in Säugerzellen bei etwa 50 %. Es gibt bereits Referenzdokumente, in denen der Fachmann den optimalen GC-Gehalt für verschiedene Organismen bzw. Zellen nachschlagen kann. Es existiert die regelmäßig aktualisierte Codon Usage Database unter www.Kazusa.or.jp/codon/ von Y. Nakamura am Kazusa DNA Research Institute, siehe auch Nakamura, Y. et al. (2000) Nucl. Acids Res. 28, 292. Es ist dann für den Fachmann kein Problem, die Nukleinsäuresequenz der zu exprimierenden Zielnukleinsäure bezüglich des GC-Gehalts zu optimieren.

Die Optimierung des GC-Gehalts oder die Anpassung des Kodongebrauchs erfolgt vorzugsweise durch stumme Mutationen oder durch Mutationen, die die Aktivität des vom Transgen kodierten Proteins nicht beeinflussen. Der Kodongebrauch muss nicht unbedingt angepasst werden, wenn der GC-Gehalt des besagten Gens bereits über 50% beträgt. Gene mit vom Wildtyp abweichenden Kodongebrauch können, wie im Beispiel angegeben, aus langen Oligonukleotiden mit einer schrittweisen PCR hergestellt werden.

Eine weitere Möglichkeit, die zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz zwecks Verbesserung der Expression zu modifizieren, besteht darin, entweder anstelle der obigen Möglichkeiten oder zusätzlich dazu, Motive
5 gezielt zu eliminieren, welche die Transkription negativ beeinflussen. Dies umfasst z.B. die Deletion von Nukleinsäuremotiven wie etwa poly-A Sequenzen und dergleichen, die dem Fachmann bereits bekannt sein dürften. Weitere solcher die Expression negativ beeinflussenden Motive umfassen RNA-Instabilitätsmotive, adeninreiche Motive, Erkennungsmotive
10 für Endonukleasen, Motive, welche die RNA-Sekundärstruktur beeinflussen und dergleichen.

Die zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz kodiert vorzugsweise für ein therapeutisches und/oder diagnostisches Protein. Ein solches Protein kann
15 z.B. ausgewählt sein aus toxischen Genprodukten, Suizidfaktoren, Apoptose induzierenden Proteinen, Botenstoffen, transaktiven Faktoren, Regulatorproteinen, transdominant-negativen Proteinen, Cytokinen, Chemokinen etc. Spezifische Beispiele sind Interferon α , SDF-1 RANTES, MIP1 α , TNF und Interleukine, insbesondere die Interleukine 2, 6, 10, 12, 15
20 und 28. Vorzugsweise kodiert die zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz für ein Gen, das bei Verwendung des LTR/Tat-Systems, z.B. nach Aktivierung durch HIV-Infektion Proteine produziert, die geeignet sind, die natürlichen Abwehrmechanismen benachbarter Zellen zu induzieren oder durch Bindung an die entsprechenden Rezeptoren eine
25 Infektion mit HIV zu verhindern. Bei HIV sind dies insbesondere die Rezeptoren CD4, CCR5 oder CXCR4.

Weitere Beispiele sind Enzyme, wie z.B. Thymidinkinase, Cytosindeaminase, Purin Nukleosid Phosphorylase, Carboxypeptidase,
30 Carboxylesterase, Nitroreductase, Peroxidase, Xanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase, Glykosidase, Thymidinphosphorylase und dergleichen.

- 15 -

Besonders geeignet ist das Verfahren für die Expression von toxischen Genprodukten, z.B. Thymidinkinase aus Herpesviren, Nukleasen oder Apoptose-induzierende Proteine (z.B. FAS/FAS-Ligand, Kaspasen etc.). Neben den Kaspasen sind auch TNF-related Apoptosis-Inducing Ligand (TRAIL), Proteinkinase C (PKC), Tumornekrosefaktor (TNF), Apoptosis-Inducing Factor (AIF) und dergleichen geeignet. Nach Infektion mit HIV würde in diesem Fall die Expression von Genen induziert, die Zellen schädigen und somit die neue Produktion und Verbreitung von Nachkommenviren verhindern.

Weiterhin kann es sich bei dem Transgen um ein Regulatorgen handeln, das nach seiner induzierten Expression in einer Zelle als molekulares Schaltermolekül die Expression anderer Gene an- oder abschaltet. Als solches Regulatorgen kann beispielsweise ein Gen verwendet werden, das für einen Transkriptionsfaktor kodiert. Natürlich sind diese Anwendungsmöglichkeiten nicht auf die Infektion mit HIV beschränkt, der Fachmann ist in der Lage, entsprechende Systeme auch für andere Infektionen zu verwenden.

Vorzugsweise handelt es sich bei dem Transgen um ein virales Gen.

Weiterhin kann es sich bei der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz auch um ein Gen für ein transdominant-negatives (TDN) Protein handeln. Vorzugsweise handelt es sich dabei um ein virales TDN Protein, vorzugsweise ein retrovirales, am meisten bevorzugt ein lentivirales.

Insbesondere sind hierbei lentivirale TDN Proteine geeignet, z.B. Derivate von Pr55^{gag}, Gp41, Gp120, Rev, Protease, Integrase, Reverse Transkriptase, Nef, Vpr, Vpv oder jedes andere Lentivirus-Protein, das dazu geeignet ist, den Replikationszyklus von Lentiviren, insbesondere HIV zu unterbrechen oder die Freisetzung/Ablösung von Viruspartikeln zu verhindern.

Vorzugsweise wird HIV-1 gag (gruppenspezifisches Antigen) als Transgen

- 16 -

verwendet, wobei dessen Kodonwahl an die Kodonwahl, wie sie in humanen Genen vorzufinden ist, angepasst wird.

5 Besonders bevorzugt wird ein *gag*-Gen verwendet, das weitere Deletionen enthält. Dies kann die TDN Wirkung noch verstärken. Vorzugsweise handelt es sich dabei um weitere Deletionen im p24-Bereich oder einzelne oder mehrere Assembly-Domänen.

10 Beispielsweise wurde die Aminosäuresequenz des *gag*-Genprodukts in einen synthetischen Gag-kodierenden Leserahmen, unter Verwendung der Kodonwahl von humanen Genen, rückübersetzt. Dieser „syngag“ benannte Leserahmen wurde dann unter Verwendung von langen Oligonukleotiden und einer schrittweisen PCR als vollsynthetischer Leserahmen aufgebaut. Anschließend wurde der syngag-Leserahmen in einen Expressionsvektor
15 einkloniert. Der hergestellte syngag-Vektor erwies sich in der Expression des HIV-Gag als vollständig unabhängig von der Präsenz des Rev-Proteins, einer RRE-Sequenz, einer 5' untranslatierten Region (UTR) oder Spleißstellen. Das Ausgangs-*gag*-Gen, welches in seiner Kodonwahl dem HIV-1 Wildtyp-Gen entspricht (*wtgag*), erwies sich in seiner Expression
20 dagegen als abhängig von Rev, RRE und dem 5'-UTR inklusive Spleißdonor (Graf et al., 2000).

Des Weiteren betrifft die Erfindung daher vorzugsweise ein Verfahren zur Expression von transdominant-negativen (TDN) Lentivirus-Proteinen in
25 eukaryontischen Zellen, umfassend:

- 30 (a) Einbringen eines Vektors, umfassend eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz, die für ein TDN Lentivirus-Protein kodiert und deren Kodongebrauch an den von Säugern angepasst ist, und eine durch Lentivirus Tat-Protein induzierbare Promotorsequenz in operativer Verknüpfung mit der Zielnukleinsäuresequenz, in eine eukaryontische Zelle,
- (b) Bereitstellen des Tat-Proteins so dass eine Expression der Zielnukleinsäuresequenz induziert wird.

Überraschenderweise kann LTR/Tat-System trotz der genannten Limitation angewendet werden, wenn, wie oben beschrieben, die Expression des TDN-Derivats von Rev/RRE unabhängig ist. In der vorliegenden Erfindung wird dies erreicht durch die Anpassung des Kodongebrauchs an den von Säugerzellen.

In der Kombination von LTR- und synthetischen HIV-Leserahmen verbindet sich eine frühe Expression des TDN-Gens - in einer frühen Phase der HIV-Infektion - mit einem effizienten Kernexport (plus einer RNA-Stabilisierung) und damit einer Proteinbiosynthese, bevor HIV-eigene Struktur- und damit Targetproteine produziert werden. Insgesamt bietet diese Kombination i) eine hohe TDN-Proteinmenge mit ii) einem kinetisch günstigen Expressionsverlauf und iii) einer sehr effizienten Induzierbarkeit.

In Abgrenzung zu den bisher beschriebenen Verfahren ist i) die Induzierbarkeit der Expression auf die Anwesenheit von Tat beschränkt, wodurch die Notwendigkeit des HIV RRE/Rev im Transferkonstrukt vermieden wird und ii) die Rev-Unabhängigkeit des Transkripts durch eine geeignete Kodonwahl für das Transferkonstrukt gewährleistet.

Die Transkriptionskontrollsequenz wird zum Transgen bevorzugt analog zum natürlichen Auftreten positioniert.

Die Induzierung des Promotors erfolgt durch ein lentivirales Tat-Protein, vorzugsweise durch das HIV Tat-Protein, das als trans-aktiver Faktor fungiert. Dies ermöglicht es, dass eine Induzierung des Promotors, durch eine Infektion der Zelle, die den Vektor enthält, mit einem Lentivirus, insbesondere HIV, von selbst eintritt. Unter einem solchen *in trans* aktiven Faktor wird im Sinne dieser Anmeldung sowohl ein einzelnes Protein als auch ein Proteinkomplex verstanden.

Die Stabilisierung der RNA und die Verbesserung der

- 18 -

Kernexporteigenschaften sowie die Unabhängigkeit der Proteinproduktion von einer RRE/Rev-Wechselwirkung (im Fall von HIV-abgeleiteten Proteinen) kann beispielsweise erreicht werden durch eine entsprechende Kodonwahl, unter Berücksichtigung RNA-Stabilität-beeinflussender Motive.

5

Weiterhin betrifft die Erfindung einen Nukleinsäure-Vektor umfassend:

(a) eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz,

(b) eine durch einen transaktiven Faktor, vorzugsweise durch einen viralen transaktiven Faktor, induzierbare Transkriptionskontrollsequenz in operativer Verknüpfung mit der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz,

10

wobei die Sequenz gemäß (a) auf Nukleinsäureebene so modifiziert ist, dass eine Steigerung der Expression erreicht wird.

15

Unter einem Nukleinsäure-Vektor wird in diesem Zusammenhang ein Nukleinsäure-Konstrukt verstanden, welches zur Expression einer darauf enthaltenen Zielnukleinsäuresequenz in einem geeigneten Expressionssystem, z.B. einer Zelle, einem Organismus oder einem *in vitro* System, geeignet ist und mindestens eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz und eine mit dieser in operativer Verknüpfung stehende induzierbare Transkriptionskontrollsequenz umfasst. Ein solcher Vektor kann weitere kodierende Sequenzen enthalten, wie z.B. Selektionsmarkergene und dergleichen. Der Fachmann ist in der Lage, die zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz in Verknüpfung mit ihrer Transkriptionskontrollsequenz in einen geeigneten kommerziell erhältlichen Plasmid-Vektor oder dergleichen oder auch einen selbst konstruierten einzusetzen.

20

25

30

Die zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz und die induzierbare Transkriptionskontrollsequenz können auch hier wie oben beschrieben ausgewählt werden. Auch die Modifizierung der Sequenz kann wie oben erläutert erfolgen.

Eine bevorzugte Ausführungsform betrifft Vektoren, die in der HIV-Gentherapie eingesetzt werden können und sich dadurch auszeichnen, dass sie für ein therapeutisches Gen kodieren, das erst nach Infektion der Zelle mit HIV exprimiert wird. Die Transkription entsprechender Gene wird dabei von der HIV-eigenen LTR („long terminal repeat“)-Region kontrolliert und erfolgt erst in Anwesenheit des HIV-Tat-Proteins. Dabei werden vorzugsweise synthetische, an die Expression in humanen Zellen angepasste Leserahmen für die therapeutischen Gene verwendet, zur Steigerung der Genexpression, insbesondere der RNA-Stabilität und des RNA-Kernexportes. Diese Gene können vorzugsweise gegen unterschiedliche Schritte im HIV-Replikationszyklus gerichtet sein und intervenieren mit der Infektion von Zellen, der Replikation von HIV oder der Verbreitung von Nachkommenviren.

Der erfindungsgemäße Vektor kann zusätzlich ein weiteres Transgen enthalten, das vorzugsweise für ein therapeutisches, gentherapeutisches und/oder diagnostisches Protein kodiert. Dieses weitere Transgen kann sich ebenfalls unter der Kontrolle eines LTR-Promotors, z.B. desselben Promotors wie die Sequenz gemäß (a) befinden. Oder aber es kann durch einen separaten Promotor, der konstitutiv oder induzierbar sein kann, gesteuert sein.

Der Vektor kann z.B. viralen (z.B. Adeno-assoziierte Viren, Adenoviren, Retroviren, Herpesviren, Alphaviren etc.) oder bakteriellen Ursprungs oder ein Plasmid sein. Besonders bevorzugt wird die induzierbare Transkriptionskontrollsequenz so ausgewählt, dass die Expression des Fremdgens von der Anwesenheit des HIV-1 Tat-Proteins abhängig ist. Wird die Tat-Transaktivierung erfolgreich rekonstituiert, sollte vorzugsweise eine Steigerung der Expression des Tat-abhängigen Gens um mindestens das 3-fache, bevorzugt das 5-fache, noch mehr bevorzugt das 10-fache oder mehr zu messen sein.

- 20 -

Vorzugsweise umfasst der Vektor eine Sequenz gemäß SEQ ID NO. 1, 16 oder 17.

Die vorliegende Erfindung stellt weiterhin modifizierte
5 Zielnukleinsäuresequenzen bereit, welche, wenn sie in operativer
Verknüpfung mit einer geeigneten induzierbaren
Transkriptionskontrollsequenz stehen, eine gesteigerte Genexpression
bewirken. Vorzugsweise sind diese modifizierten
10 Zielnukleinsäuresequenzen ausgewählt aus den in dieser Erfindung in den
Beispielen und im Sequenzprotokoll angegebenen Sequenzen. Am meisten
bevorzugt sind die modifizierten Zielnukleinsäuresequenzen ausgewählt aus
den folgenden Sequenzen: SEQ ID NO. 1, 16 und 17.

Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind Zellen,
15 vorzugsweise eukaryontische Zellen, stärker bevorzugt Säugetierzellen, am
meisten bevorzugt humane Zellen, die mit einer Nukleinsäure oder einem
Vektor, wie oben beschrieben, transformiert sind, wobei die Nukleinsäure in
einer transkriptionsfähigen Form vorliegt. Die Nukleinsäure bzw. der Vektor
20 können beispielsweise episomal vorliegen oder stabil ins Chromosom
integriert sein. Dabei können in der Zelle ein oder mehrere Kopien vorliegen.

Die vorliegende Erfindung betrifft außerdem Arzneimittel auf der Basis der
hier offenbarten Vektoren und modifizierten Lentiviren und Zellen. Die
erfindungsgemäße Arzneimittel sind geeignet als therapeutische und
25 diagnostische Anwendungen, insbesondere sind sie geeignet zur Diagnose,
Prävention oder Therapie von Virus-assoziierten Erkrankungen oder/und
Tumorerkrankungen. Für diese Anwendungen kann z.B. die zu
exprimierende Zielnukleinsäuresequenz insbesondere ein Suizidgen sein
oder dergleichen.

30

Beispielsweise können die Arzneimittel zur Therapie eingesetzt werden,
vorzugsweise zur Therapie von lentiviralen Infektionen, z.B. HIV und SIV,
insbesondere HIV-1 und HIV-2. Der Fachmann ist in der Lage, die

- 21 -

Promotorsequenz an das System anzupassen, in dem die Expression stattfinden soll. Somit können nun lentivirale Infektionen bekämpft werden, indem infizierte Personen *in vitro*, *ex vivo* und natürlich *in vivo* behandelt werden, z.B. durch Einbringen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder Vektoren in PMLs aus diesen Patienten oder in T-Zellen in unterschiedlichen Differenzierungsstadien oder Stammzellen.

Die Erfindung soll durch die folgenden Figuren und Beispiele näher erläutert werden.

Abbildungen und Sequenzen

Abbildung 1 stellt alle hergestellten gag-kodierenden Konstrukte schematisch dar.

Abbildung 2 zeigt die Ergebnisse der Expression verschiedener gag-kodierender Konstrukte in H1299-Zellen.

Abbildung 2A zeigt einen HIV-1 p24-spezifischen Western Blot von transfizierten Zellen.

Abbildung 2B zeigt einen p24-ELISA-Test.

Abbildung 3 zeigt die Ergebnisse der Expression Wildtyp gag-exprimierenden Konstrukten in An- und Abwesenheit von Tat und/oder Rev.

Abbildung 3A zeigt einen HIV-1 p24-spezifischen Western Blot von transfizierten Zellen.

Abbildung 3B einen ELISA-Test.

Abbildung 4 zeigt die Wirkung der transdominanten negativen gag-Proteine auf die Freisetzung von HIV-Partikeln.

Abbildung 4A zeigt die Hemmung der Freisetzung von Partikeln in Prozent gemäß einem p24 ELISA-Test.

5 **Abbildung 4B** zeigt die Hemmung der Infektiösität der freigesetzten Viruspartikel in Prozent.

Abbildung 5 zeigt die Hemmung der Freisetzung von Viruspartikeln in Prozent, die in Anwesenheit von transdominant negativen gag-Konstrukten mit weiteren Deletionen im p24 gebildet wurden.

10

Abbildung 5A zeigt die Hemmung der Freisetzung in Prozent.

Abbildung 5B zeigt die Hemmung der Infektiösität in Prozent.

15

Abbildung 6 zeigt die Sequenzen von TDsyngag und TDwtgag sowie einen Sequenzvergleich zwischen TDwtgag und TDsyngag.

Abbildung 7 zeigt die Nukleinsäuresequenzen von TDsyngag delta 2 und TDsyngag delta 2 delta p7.

20

SEQ ID No. 1 zeigt die Nukleinsäuresequenz von TDsyngag.

SEQ ID No. 2 zeigt die Aminosäuresequenz von TDsyngag.

25

SEQ ID No. 3 zeigt die Nukleinsäuresequenz von TDwtgag.

SEQ ID No. 4 zeigt die Aminosäuresequenz von TDwtgag.

30 **SEQ ID No. 5 bis 15** zeigen verschiedene Oligonukleotide.

SEQ ID No. 16 zeigt die Nukleinsäuresequenz von TDsyngag delta 2.

SEQ ID No. 17 zeigt die Aminosäuresequenz von TDsyngag delta 2.

SEQ ID No. 18 zeigt die Nukleinsäuresequenz von TDsyngag delta 2 delta p7.

5

SEQ ID No. 19 zeigt die Aminosäuresequenz von TDsyngag delta 2 delta p7.

Beispiele

10

Beispiel 1

Herstellung von unabhängigen, Tat-abhängigen, Rev-abhängigen und Tat- und Rev-abhängigen Gag-Derivaten

15 HIV-1 transdominant-negative (TDN) Gag-Derivate wurden als konstitutiv, Tat-, Rev- oder Tat/Rev-abhängig exprimierende Genkonstrukte hergestellt. Die Rev-Abhängigkeit wurde durch die Verwendung von HIV Wildtyp(wt)-Gensequenzen, inklusive des 5'-nicht translatierten Bereiches (UTR), in Verbindung mit dem HIV Rev-Responsive-Element (RRE) erreicht. Die Rev-
20 Unabhängigkeit wurde durch synthetische, GC-reiche Gensequenzen ermöglicht, wobei die kodierte Aminosäuresequenz für beide Konstrukte identisch ist. Eine Abhängigkeit von Tat wurde durch die Verwendung des HIV-1 LTR als Transkriptionskontrolle erreicht. Demgegenüber wurde für eine konstitutive Transkription der CMV-Promotor/Enhancer verwendet.
25 Durch entsprechende Kombination der Elemente wurde eine konstitutive Expression (CMV-syngag), eine Tat-abhängige (LTR-syngag) eine Rev-abhängige (CMV-UTR-wtgag-RRE) und eine Tat- und Rev-abhängige (LTR-UTR-wtgag-RRE) Expression von identischen (auf Proteinebene) TDN Gag-Derivaten generiert.

30

Der Leserahmen des HIV-1 gruppenspezifischen Antigens (*gag*) (GenBank Accession Nummer: M15654.1 HIVBH102, Nukleotide 112-1650; Referenz: Ratner L, Haseltine W, Patarca R, Livak KJ, Starcich B, Josephs SF, Doran

ER, Rafalski JA, Whitehorn EA, Baumeister K, et al. Complete nucleotide sequence of the AIDS virus, HTLV-III. Nature. 1985 Jan 24-30; 313 (6000): 277-84) sollte unter Verwendung einer Kodonwahl, wie sie in humanen Zellen zu finden ist, künstlich aufgebaut werden. Dazu wurde die Aminosäuresequenz des Gag-Proteins (entspricht GenBank Accession Nummer: M15654 JIVBH102, Nukleotide 112-1408) mit einer Deletion von nt 304-489 in eine entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt. Für die Kodonoptimierung und Optimierung der RNA-Sequenz wurde ein entsprechendes Software-Paket (GeneOptimizer) verwendet. Zur Subklonierung sowie zum Anfügen weiterer Sequenzelemente innerhalb nicht translatierter Regionen wurden weitere Restriktionsschnittstellen eingefügt. Die Nukleinsäuresequenz, inklusive der Schnittstellen, ist in SEQ ID NO. 1 angegeben.

Diese Sequenz wurde als vollsynthetisches Gen unter Verwendung synthetischer Oligonukleotide nach einer bereits beschriebenen Methode (Zolotukhin et al., 1996) hergestellt.

In Abbildung 6 ist ein Vergleich der Nukleinsäuresequenzen von TDsyngag (Kodonwahl abgeleitet von Säugergenen) und TDwtgag (Kodonwahl abgeleitet von HIV-Strukturgenen) gezeigt. Das so hergestellte TDGag kodierende DNA-Fragment ("TDsyngag") wurde unter Verwendung der Schnittstellen *EcoRI* und *Xho I* in den Expressionsvektor pcDNA3.1(+) (Invitrogen) unter die transkriptionelle Kontrolle des Cytomegalo-Virus (CMV) early promotor/enhancer gestellt ("pc-CMV-TDsyngag").

Zur Herstellung eines analogen, jedoch in seiner Kodonwahl dem HIV-Wildtyp entsprechenden Expressionsplasmids, wurde die kodierende Region des HIV-1 *gag*, inklusive des 5'-nicht translatierten Bereichs (UTR), subkloniert und, um die Voraussetzungen für einen Rev-vermittelten Kernexport zu erfüllen, dem wtgag-kodierenden Bereich eine RNA-Zielsequenz (RRE) angefügt (Graf et al., 2000). Diese Zielsequenz interagiert auf RNA-Ebene mit einem viralen Kernexportprotein (im Falle von

HIV-1 das Rev-Protein) und zellulären Kernexportproteinen.

Um eine Anpassung auf Proteinebene zu gewährleisten, wurde das Wildtyp-Konstrukt durch Einführung von zwei aufeinander folgenden Stop-Kodons im gag Leserahmen C-terminal verkürzt (Kodons für 372F und 373L wurden mutiert). Die Mutationen wurden durch gerichtete Mutagenese (*QuickChange site-directed mutagenesis kit*, Stratagene) unter Verwendung der Oligonukleotide gag-stop1 und gag-stop2 eingeführt. Das resultierende Konstrukt wurde pc-CMV-UTR-wtgag-RRE bezeichnet. Unter Verwendung der Oligonukleotide Del1 und Del2 wurde in diesem Konstrukt - analog dem TDsyngag - eine Deletion von nt 304 bis nt 489 eingefügt (pc-UTR-TDwtgag-RRE). Die kodierende Sequenz ist in SEQ ID No. 3 angegeben.

Die kodierenden Sequenzen wurden unter die transkriptionelle Kontrolle des HIV-Promotors gestellt, um eine Tat-Abhängigkeit des Gag-Proteinderivats zu erreichen. Der HIV-1 Long Terminal Repeat (LTR) beinhaltet einen solchen Promotor. Diese Region wurde mittels PCR unter Verwendung der Oligonukleotide ltr1 und ltr2 aus proviraler HIV-1 DNA (HX10 siehe (Ratner et al., 1987)) amplifiziert und unter Verwendung der Schnittstellen *MluI* und *EcoRI* direkt 5' vor das ATG des gag-kodierenden Leserahmen im pc-CMV-TDsyngag kloniert, wobei der CMV-Promotor durch das LTR ersetzt wurde. Für den Austausch des Promotors im wtgag-Konstrukt wurden Teile des HIV-Genoms unter Verwendung der Oligonukleotide ltr1 und ltr3 in einer PCR-Reaktion amplifiziert und unter Verwendung der Schnittstellen *MluI* und *ClaI* der CMV-Promotor im pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE-Konstrukt ausgetauscht. Dabei wurde der natürliche Leserahmen des HIV-Provirus (mit der Reihenfolge LTR, UTR, gag) wieder hergestellt. Die resultierenden Konstrukte wurden im Weiteren als "pc-LTR-TDsyngag" bzw. "pc-LTR-UTR-TDwtgag-RRE" bezeichnet.

30

In Abbildung 1 sind alle hergestellten Gag-kodierenden Konstrukte schematisch dargestellt.

Beispiel 2**Die Expression der TDgag-Konstrukte kann durch HIV-Regulatorproteine kontrolliert werden**

Sämtliche Zellkulturprodukte waren von Life Technologies (Karlsruhe). Alle Säugerzelllinien wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert. Die humane Lungenkarzinomzelllinie H1299 wurden in Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit L-Glutamin, D-Glucose (4,5 mg/ml), Natriumpyruvat, 10% inaktiviertem fötalem Rinderserum, Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) kultiviert. Die Zellen wurden nach Erreichen der Konfluenz im Verhältnis 1:10 subkultiviert.

1 x 10⁶ Zellen wurden in Petrischalen (Durchmesser: 100 mm) ausgesät und 24 h später durch Calciumphosphat Kopräzipitation (Graham et al., 1973) mit 30 µg TDgag-Plasmiden und 15 µg pc-tat (Tat Expressionsplasmid) bzw. pc-rev (Rev-Expressionsplasmid) oder pcDNA 3.1 Vektor (Referenzplasmid) transfiziert. Bei Kotransfektionen von *gag*, *tat* und *rev* wurden je 15 µg Plasmid eingesetzt. Zellen und Kulturüberstände wurden 48 h nach der Transfektion geerntet. Die transfizierten Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS (10 mM Na₂HPO₄, 1,8 mM KH₂PO₄, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl) gewaschen, in eiskaltem PBS abgekratzt, 10 min bei 300 xg abzentrifugiert und in Lyse-Puffer (50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5% Triton X-100 (w/v)) 30 min auf Eis lysiert. Unlösliche Bestandteile des Zelllysates wurden 30 min bei 10000 xg und 4°C abzentrifugiert. Die Gesamtproteinmenge des Überstandes wurde mit dem Bio-Rad-Proteinassay (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben bestimmt.

Die Proben wurden mit gleichem Volumen an 2-fach Probenpuffer (Laemmli, 1970) versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. 50 µg Gesamtprotein aus Zelllysaten wurden über ein 12,5%-iges SDS/Polyacrylamidgel aufgetrennt (Laemmli, 1970), auf eine Nitrocellulose-Membran elektrotransferiert und mit

- 27 -

dem monoklonalen p²⁴-spezifischen Antikörper 13-5 (Wolf et al., 1990) analysiert und mittels einem sekundären, AP- (Alkalische Phosphatase) gekoppelten Antikörper detektiert und mittels chromogener Färbung nachgewiesen (Abb. 2A).

5

Ergänzend dazu wurden die Zelllysate in einem kommerziell erhältlichen p24 ELISA-Test (NEN) quantifiziert. Je 1 µg des Zelllysates wurden nach den Angaben des Herstellers ausgewertet und die Gesamtkonzentration an HIV-1 p24 bestimmt (Abb. 2B).

10

H1299 Zellen wurden transient mit den gag-Konstrukten transfiziert. Die erzielte Expression wurde in An- und Abwesenheit von Tat oder Rev analysiert (Abb. 2). Für das pc-CMV-TDsungag wurde eine konstitutive Expression des TDgag unabhängig von Tat oder Rev nachgewiesen (Abb. 2A, Spur 2 und 2B, 2). Die Expression des TDgag konnte für das pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE-Konstrukt durch Rev um den Faktor 7 (Abb. 2A, Spuren 3 und 4 und 2B 3 und 4) und für das pc-LTR-TDsungag-Konstrukt durch Cotransfektion von pc-tat um den Faktor 2,5 (Abb. 2A, Spuren 5 und 6 und 2B, 5 und 6) gesteigert werden. Die Basalaktivität der TDgag Expression war dabei für das pc-LTR-TDsungag-Konstrukt im Vergleich zu pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE etwas geringer, für beide Konstrukte aber gegenüber dem pc-CMV-TDsungag deutlich reduziert und nur geringfügig über der Negativkontrolle (ca. Faktor 2,5 für pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE und 1,5 für pc-LTR-TDsungag; Abb. 2B). Das Genprodukt von pc-LTR-UTR-TDwtgag-RRE konnte mit diesen Methoden nicht nachgewiesen werden. Die Deletion im Gag führt zu einer verringerten Erkennung durch den monoklonalen Antikörper und in Verbindung mit einer stark eingeschränkten Expression sind die erreichten TDgag Mengen unzureichend für einen Nachweis durch Antikörper. Daher wurde die Tat- und Rev-Abhängigkeit in einem Referenzkonstrukt (komplette wtgag-Sequenz) untersucht. Dieses Konstrukt (pc-LTR-UTR-wtgag-RRE) war sowohl von Tat als auch von Rev abhängig. Tat allein führte zu einer Expressionszunahme um den Faktor 4, Rev alleine um den Faktor 16 und die Kombination von Tat und Rev um den Faktor 47

30

- 28 -

(Abb. 3).

Beispiel 3

Die TDgag-Konstrukte haben auf die HIV-Partikelfreisetzung einen transdominant negativen Effekt

H1299 Zellen wurden, wie unter Beispiel 1 beschrieben, mit Kombinationen von Plasmiden transient transfiziert. Für eine Transfektion wurden 15 µg HX10 provirale DNA und je 30 µg der TDgag-Konstrukte oder 30 µg pcDNA3.1 als Kontrolle für eine ungehemmte Replikation eingesetzt. Nach 48 h wurden die Zellkulturüberstände geerntet, Zellbestandteile durch Zentrifugation (10 min bei 10000 xg) sedimentiert und die Überstände mit 10 % einer Triton x 100 Lösung (5 %) zur Lyse der HIV-Partikel im Überstand 15 min bei RT inkubiert. Die behandelten Überstände wurden in entsprechenden Verdünnungen in einen p24 ELISA-Test (NEN) eingesetzt und die p24-Menge quantifiziert. Die Reduktion der p24-Menge korreliert dabei direkt mit einer Hemmung der Partikelfreisetzung nach Transfektion mit einem HIV-Provirus. Die bestimmten p24-Mengen wurden in Relation zu der Kontrolle (Cotransfektion mit pcDNA3.1, ungehemmt) gesetzt und die Hemmung in Prozent berechnet. Für jede Kombination wurden mindestens 6 unabhängige Ansätze getestet.

Wie aus Abb. 4A zu ersehen ist, haben alle getesteten TDgag-Konstrukte zu einer erheblichen Hemmung der Partikelfreisetzung geführt. Die TDsyngag (TDsg)-Konstrukte hatten unabhängig vom vorgeschalteten Promoter eine sehr hohe Hemmung bewirkt. Die Hemmwirkung der TDwtgag (TDwtg)-Konstrukte war dagegen von der Promotorregion abhängig. Die Hemmung der Partikelfreisetzung war unter einer CMV-Promotorkontrolle deutlich höher als unter dem HIV LTR-Promotor.

30

Beispiel 4

Die TDgag-Konstrukte haben auf die HIV-Infektiösität einen transdominant negativen Effekt

H1299 Zellen wurden, wie unter Beispiel 3 beschrieben, mit Plasmidkombinationen transfiziert und die Überstände nach 48 h geerntet und aufgereinigt. Zur Überprüfung des Einflusses der TDgag-Konstrukte auf die Freisetzung infektiöser Nachkommenviren, wurden die konditionierten Zellkulturüberstände in einer entsprechenden Indikatorzelllinie (MAGI) überprüft (Kimpton et al., 1992).

Bei den eukaryontischen MAGI (multinuclear activation of a galactosidase indicator)-Zellen handelt es sich um eine Indikatorzelllinie, die eine Reporter genkassette enthält, welche durch HIV-Infektion induziert werden kann. Die MAGI-Zellen wurden vom UK Medical Research Council (MRC) zur Verfügung gestellt. In dieser Kassette ist der virale LTR (long terminal repeat)-Promotor dem *E. coli* β -Galactosidasegen (*lacZ*) vorgeschaltet. Die Expression des *lacZ* ist demnach von der Transkriptionsaktivität des LTR-Promotors durch das virale Tat abhängig.

Für die Infektion wurden am Vortag 3×10^4 Zellen pro 300 μ l Medium (in 48-Well-Platten) ausgesät. Nach Ernte der transfizierten H1299-Zellüberstände wurden die Magi-Zellen mit 100 μ l Überstand je Ansatz infiziert und 48 h kultiviert.

Zur Auswertung der Infektiosität wurde das Medium abgesaugt und die Wells mit PBS gewaschen. Die Monolayer wurden mit 200 μ l Fixierlösung (1 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS) fixiert und nach Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur noch mal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 200 μ l Färbelösung (16 mg X-Gal in 4 ml DMSO, ad 40 ml PBS; Zugabe von 400 μ l K-Ferricyamid (400 mM), 400 μ l K-Ferrocyanid (400 mM) und 80 μ l $MgCl_2$ (1 M)) auf die Zellen gegeben. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C zwischen 15 min und 3 h. Die blauen Zellen wurden im Lichtmikroskop ausgezählt.

Die Hemmung wurde als Reduktion blauer Zellen bestimmt und in Relation

- 30 -

zu der Zahl an blauen Zellen in der Positivkontrolle als Prozent-Hemmung der Infektiosität angegeben. Im Wesentlichen korrelieren die Ergebnisse mit den Daten der Hemmung der Partikelfreisetzung (Figur 4B). Nahezu vollständige Hemmung wurde für die Konstrukte pc-CMV-TDsyngag, pc-LTR-TDsyngag und pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE nachgewiesen, während das Konstrukt pc-LTR-UTR-TDwtgag-RRE eine etwa 50 %ige Hemmung bewirkte (abgebildet sind die Ergebnisse eines exemplarischen Experimentes aus zwei unabhängigen Ansätzen, Figur 4B).

Beispiel 5

Transdominant negativer Effekt von Tat-abhängigen TDgag-Derivaten mit einer weiteren Deletion im p24

Ausgehend von den Konstrukten pc-CMV-TDsyngag, pc-LTR-TDsyngag, pc-CMV-UTR-TDwtgag-RRE und pc-LTR-UTR-TDwtgag-RRE wurde durch die Verwendung der Oligonukleotide Del3 und Del4 (syngag) und Del5 und Del6 (wtgag) eine weitere Deletion in den gag-Leserahmen eingeführt. Diese Deletion betrifft die Aminosäuren 230 bis 300, ein Bereich in dem sehr viele CTL-Epitope identifiziert wurden. Die Expression des entsprechenden TDN Gag-Derivates nach Transfektion von H1299 Zellen mit den neu entstandenen Konstrukten pc-CMV-TDsyngagd2, pc-LTR-TDsyngagd2, pc-CMV-UTR-TDwtgagd2-RRE und pc-LTR-UTR-TDwtgagd2-RRE (schematische Übersicht siehe Abb. 1) konnte nicht nachgewiesen werden, da die Modifikationen die Affinität der verfügbaren gag-spezifischen Antikörper beeinflussen und weder im Western Blot noch im p24-ELISA spezifische Signale zu detektieren waren.

Wie unter 3. beschrieben, wurden H1299 Zellen zur Überprüfung der TDN-Wirkung mit Kombinationen aus HX10 (15 µg) und TDsyngagd2 bzw. pcDNA3.1 transfiziert (je 30 µg Plasmid DNA) und die Überstände, wie unter 3. beschrieben, im p24-ELISA und, wie unter 4. beschrieben, mittels der MAGI-Zellen ausgewertet. Eine Hemmung der Partikelfreisetzung (Ergebnisse der p24-ELISA-Auswertung, Abb. 5A, mindestens 6

- 31 -

unabhängige Ansätze) und der Infektiösität von Nachkommenviren (Ergebnisse der MAGI-Auswertung, Abb. 5B, zwei unabhängige Ansätze) wurde für alle eingesetzten Konstrukte gezeigt. Die Reihenfolge der Hemmeffekte (Partikelfreisetzung) ist hier pc-CMV-TDsyngagd2 (98,45 %) >pc-LTR-TDsyngagd2 (97,49 %) >pc-CMV-UTR-TDwtgagd2-RRE (80,99 %) >pc-LTR-UTR-TDwtgagd2-RRE (73,69 %) und entspricht damit im Wesentlichen den Ergebnissen der TDgag-Experimente. Die synthetischen Leserahmen zeigen auch hier offensichtlich eine Überlegenheit in der Hemmung in der Partikelfreisetzung. Die Reduktion von infektiösen Nachkommenviren war dagegen in diesem experimentellen Ansatz vergleichbar (Abb. 5B). Im direkten Vergleich der Rev-Abhängigkeit mit der Tat-Abhängigkeit ergeben sich für die Kombination LTR mit synthetischem Leserahmen klare Vorteile.

15 **Tabelle 1: Verwendete Oligonukleotide**

Bezeichnung	Sequenz 5' - 3'	SEQ ID NO
Del1	TAAAGCTTCCTTGGTGTC	5
Del2	TTCAGCCCAGAAGTAATACC	6
Del3	TACAAGACCCTGCGCGCCGAGCAGGCC	7
Del4	CTCCCTCATCTGGCCGGGGGCGATGGG	8
Del5	TTCTCTCATCTGGCCTGGTGCAATAGG	9
Del6	TATAAACTCTAAGAGCCGAGCAAGCT	10
Gag-stop1	GGAAGGCCAGATCTTCCCTCATTAATTAGCCTGTCTCTCAGTAC	11
Gag-stop2	GTAAGGAGAGACAGGCTAATTAATGAGGGAAGATCTGCCTTCC	12
ltr1	ATTGTCGACACGCGTTGGAAGGGCTAATCACTCC	13
ltr2	ATTGAATTCCTCTCTCCTTCTAGCCTC	14
ltr3	GCTTGCCCATACTATATG	15

Literatur

- 5 Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. und Struhl, K. (1994) Percentage of Codon Synonymous Usage and Frequency of Codon Occurrence in Various Organisms, Current Protocols in Molecular Biology 2, A1.8-A1.9
- 10 Bunnell, B.A. und Morgan, R.A. (1998) Gene therapy for infectious diseases, Clin.Microbiol.Rev. 11, 42-56
- 15 Cara, A., Rybak, S.M., Newton, D.L., Crowley, R., Rottschäfer, S.E., Reitz, M.S., Jr. und Gusella, G.L. (1998) Inhibition of HIV-1 replication by combined expression of gag dominant negative mutant and a human ribonuclease in a tightly controlled HIV-1 inducible vector, Gene Ther. 5, 65-75
- 20 Caruso, M. und Klatzmann, D. (1992) Selective killing of CD4+ cells harboring a human immunodeficiency virus-inducible suicide gene prevents viral spread in an infected cell population, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 182-186
- 25 Chang, D.D. und Sharp, P.A. (1989) Regulation by HIV Rev depends upon recognition of splice sites, Cell 59, 789-795
- 30 Chen, C.Y., Xu, N. und Shyu, A.B. (1995) mRNA decay mediated by two distinct AU-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation, Mol. Cell Biol. 15, 5777-5788
- Chiu, H.C., Wang, F.D., Yao, S.Y. und Wang, C.T. (2002) Effects of gag mutations on human immunodeficiency virus type 1 particle assembly, processing, and cyclophilin A incorporation, J. Med. Virol. 68, 156-163

Cochrane, A.W., Jones, K.S., Beidas, S., Dillon, P.J., Skalka, A.M. und Rosen, C.A. (1991) Identification and characterization of intragenic sequences which repress human immunodeficiency virus structural gene expression, .J. Virol. 65, 5305-5313

Ding, S.F., Lombardi, R., Nazari, R. und Joshi, S. (2002) A combination anti-HIV-1 gene therapy approach using a single transcription unit that expresses antisense, decoy, and sense RNAs, and trans-dominant negative mutant Gag and Env proteins, Front Biosci. 7, a15-a28

Facke, M., Janetzko, A., Shoeman, R.L. und Krausslich, H.G. (1993) A large deletion in the matrix domain of the human immunodeficiency virus gag gene redirects virus particle assembly from the plasma membrane to the endoplasmic reticulum, .J. Virol. 67, 4972-4980

Furuta, R.A., Shimano, R., Ogasawara, T., Inubushi, R., Amano, K., Akari, H., Hatanaka, M., Kawamura, M. und Adachi, A. (1997) HIV-1 capsid mutants inhibit the replication of wild-type virus at both early and late infection phases, FEBS Lett. 415, 231-234

Gallina, A., Mantoan, G., Rindi, G. und Milanesi, G. (1994) Influence of MA internal sequences, but not of the myristylated N-terminus sequence, on the budding site of HIV-1 Gag protein, Biochem. Biophys. Res. Commun. 204, 1031-1038

Graf, M., Bojak, A., Deml, L., Bieler, K., Wolf, H. und Wagner, R. (2000) Concerted action of multiple cis-acting sequences is required for rev dependence of late human immunodeficiency virus type 1 gene expression [In Process Citation], J. Virol. 74, 10822-10826

Graham, F.L. und van der Eb, A.J. (1973) Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5, Virology 54, 536-539

Harrison, G.S., Long, C.J., Maxwell, F., Glode, L.M. und Maxwell, I.H. (1992) Inhibition of HIV production in cells containing an integrated, HIV-regulated diphtheria toxin A chain gene, .AIDS Res. Hum. Retroviruses 8, 39-45

5

Kimpton, J. und Emerman, M. (1992) Detection of replication-competent and pseudotyped human immunodeficiency virus with a sensitive cell line on the basis of activation of an integrated beta-galactosidase gene, J. Virol. 66, 2232-2239

10

Kjems, J., Brown, M., Chang, D.D. und Sharp, P.A. (1991) Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 683-687

15

Kjems, J. und Sharp, P.A. (1993) The basic domain of Rev from human immunodeficiency virus type 1 specifically blocks the entry of U4/U6.U5 small nuclear ribonucleoprotein in spliceosome assembly, J. Virol. 67, 4769-4776

20

Kotsopoulou E., Kim V. N., Kingsman A. J., Kingsman S. M., Mitrophanous K. A. (2000) A Rev-Independent Human Immunodeficiency Virus Type (1) (HIV-1)-Based Vector That Exploits a Condon-Optimized HIV-1 gag-pol Gene, J. Virol. 74, Nr. 10, 4839-4852

25

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, .Nature 227, 680-685

30

Liu, J., Woffendin, C., Yang, Z.Y. und Nabel, G.J. (1994) Regulated expression of a dominant negative form of Rev improves resistance to HIV replication in T cells, Gene Ther 1, 32-37

Lu, X.B., Heimer, J., Rekosh, D. und Hammariskjold, M.L. (1990) U1 small

- 35 -

nuclear RNA plays a direct role in the formation of a rev- regulated human immunodeficiency virus env mRNA that remains unspliced, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 7598-7602

5 Maldarelli, F., Martin, M.A. und Strebel, K. (1991) Identification of posttranscriptionally active inhibitory sequences in human immunodeficiency virus type 1 RNA: novel level of gene regulation, J. Virol. 65, 5732-5743

10 Marcello, A. und Giaretta, I. (1998) Inducible expression of herpes simplex virus thymidine kinase from a bicistronic HIV1 vector, Res. Virol. 149, 419-431

15 Mautino, M.R. und Morgan, R.A. (2002) Gene therapy of HIV-1 infection using lentiviral vectors expressing anti-HIV-1 genes, AIDS Patient.Care STDS. 16, 11-26

20 Mikaelian, I., Krieg, M., Gait, M.J. und Karn, J. (1996) Interactions of INS (CRS) elements and the splicing machinery regulate the production of Rev-responsive mRNAs, J. Mol. Biol. 257, 246-264

25 Miyake, K., Iijima, O., Suzuki, N., Matsukura, M. und Shimada, T. (2001) Selective killing of human immunodeficiency virus-infected cells by targeted gene transfer and inducible gene expression using a recombinant human immunodeficiency virus vector, Hum. Gene Ther. 12, 227-233

30 Muratori, C., Schiavoni, I., Melucci-Vigo, G., Olivetta, E., Santarcangelo, A. C., Pugliese, K., Verani, P. und Federico, M. (2002) Inducible expression of the deltaNGFr/F12Nef fusion protein as a new tool for anti-human immunodeficiency virus type 1 gene therapy, Hum. Gene Ther. 13, 1751-1766

Nasioulas, G., Zolotukhin, A.S., Tabernero, C., Solomin, L., Cunningham, C.P., Pavlakis, G.N. und Felber, B.K. (1994) Elements distinct from human

- 36 -

immunodeficiency virus type 1 splice sites are responsible for the Rev dependence of env mRNA, J. Virol. 68, 2986-2993

5 O'Reilly, M.M., McNally, M.T. und Beemon, K.L. (1995) Two strong 5' splice sites and competing, suboptimal 3' splice sites involved in alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 RNA, Virology 213, 373-385

10 Olsen, H.S., Cochrane, A.W. und Rosen, C. (1992) Interaction of cellular factors with intragenic cis-acting repressive sequences within the HIV genome, Virology 191, 709-715

15 Ono, A. und Freed, E.O. (2004) Cell-type-dependent targeting of human immunodeficiency virus type 1 assembly to the plasma membrane and the multivesicular body, J. Virol. 78, 1552-1563

Pollard, V.W. und Malim, M.H. (1998) The HIV-1 Rev protein [In Process Citation], Annu. Rev. Microbiol. 52:491-532, 491-532

20 Powell, D.M., Amaral, M.C., Wu, J.Y., Maniatis, T. und Greene, W.C. (1997) HIV Rev-dependent binding of SF2/ASF to the Rev response element: possible role in Rev-mediated inhibition of HIV RNA splicing, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 973-978

25 Ragheb, J.A., Couture, L., Mullen, C., Ridgway, A. und Morgan, R.A. (1999) Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 by Tat/Rev-regulated expression of cytosine deaminase, interferon alpha2, or diphtheria toxin compared with inhibition by transdominant Rev, Hum. Gene Ther. 10, 103-112

30 Ratner, L., Fisher, A., Jagodzinski, L.L., Mitsuya, H., Liou, R.S., Gallo, R.C. und Wong Staal, F. (1987) Complete nucleotide sequences of functional clones of the AIDS virus, AIDS Res. Hum. Retroviruses 3, 57-69

Rosen, C.A., Terwilliger, E., Dayton, A., Sodroski, J.G. und Haseltine, W.A. (1988) Intragenic cis-acting art gene-responsive sequences of the human immunodeficiency virus, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2071-2075

5

Schneider, R., Campbell, M., Nasioulas, G., Felber, B.K. und Pavlakis, G.N. (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, 4892-4903

10

Schwartz, S., Campbell, M., Nasioulas, G., Harrison, J., Felber, B.K. und Pavlakis, G.N. (1992a) Mutational inactivation of an inhibitory sequence in human immunodeficiency virus type 1 results in Rev-independent gag expression, J. Virol. 66, 7176-7182

15

Schwartz, S., Felber, B.K. und Pavlakis, G.N. (1992b) Distinct RNA sequences in the gag region of human immunodeficiency virus type 1 decrease RNA stability and inhibit expression in the absence of Rev protein, J. Virol. 66, 150-159

20

Smythe, J.A., Sun, D., Thomson, M., Markham, P.D., Reitz, M.S., Jr., Gallo, R.C. und Lisziewicz, J. (1994) A Rev-inducible mutant gag gene stably transferred into T lymphocytes: an approach to gene therapy against human immunodeficiency virus type 1 infection, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 3657-3661

25

Trono, D., Feinberg, M.B. und Baltimore, D. (1989) HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus, Cell 59, 113-120

30

von Pöblitzki, A., Wagner, R., Niedrig, M., Wanner, G., Wolf, H. und Modrow, S. (1993) Identification of a region in the Pr55gag-polyprotein essential for HIV-1 particle formation, Virology 193, 981-985

- 38 -

Wagner, R., Graf, M., Bieler, K., Wolf, H., Grunwald, T., Foley, P. und
Uberla, K. (2000) Rev-independent expression of synthetic gag-pol genes of
human immunodeficiency virus type 1 and simian immunodeficiency virus:
5 implications for the safety of lentiviral vectors [In Process Citation], Hum
Gene Ther 11, 2403-2413

Wilk, T., Gross, I., Gowen, B.E., Rutten, T., de Haas, F., Welker, R.,
Krausslich, H.G., Boulanger, P. und Fuller, S.D. (2001) Organization of
10 immature human immunodeficiency virus type 1, J. Virol. 75, 759-771

Wolf, H., Modrow, S., Soutschek, E., Motz, M., Grunow, R. und Döbl, H.
(1990) Production, mapping and biological characterisation of monoclonal
antibodies to the core protein (p24) of the human immunodeficiency virus
15 type 1., AIFO 1, 24-29

Zolotukhin, S., Potter, M., Hauswirth, W.W., Guy, J. und Muzyczka, N.
(1996) A "humanized" green fluorescent protein cDNA adapted for high-level
expression in mammalian cells, J. Virol. 70, 4646-4654
20

Ansprüche

- 5 1. Verfahren zur verbesserten induzierbaren Genexpression, umfassend
 - (i) Bereitstellen einer zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz,
 - (ii) Modifizieren der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz, so
dass eine Steigerung der Expression erreicht wird,
 - (iii) operatives Verknüpfen der modifizierten Zielnukleinsäuresequenz
10 mit einer induzierbaren Transkriptionskontrollsequenz,
 - (iv) Exprimieren der modifizierten Zielnukleinsäuresequenz in einem
geeigneten Expressionssystem durch einen transaktiven Faktor.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei für die induzierbare
Transkriptionskontrollsequenz ein induzierbarer natürlicher viraler
Promotor oder ein induzierbarer artifizieller Promotor verwendet wird.
- 20 3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die induzierbare
Transkriptionskontrollsequenz ausgewählt wird aus viralen
Transkriptionskontrollsequenzen, insbesondere aus den folgenden
Viren: Retroviren, HCV, HBV, HSV, EBV, SV40, AAV, Adenovirus,
Papillomviren, Ebolavirus.
- 25 4. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine
induzierbare Transkriptionskontrollsequenz verwendet wird, die durch
ein retrovirales Tat oder Tax-Protein als transaktiven Faktor induzierbar
ist.
- 30 5. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der
Kodongebrauch der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz an das
Expressionssystem angepasst wird.

- 40 -

6. Verfahren nach Anspruch 5, wobei der Kodongebrauch an den von Säugern angepasst wird.
7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei der Kodongebrauch an den von Menschen angepasst wird.
8. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei der GC-Gehalt der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz an den des Expressionssystems angepasst wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der GC-Gehalt der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz für den von Säugern optimiert wird.
10. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei in der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz negative transkriptionsbeeinflussende Motive eliminiert werden.
11. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei die Modifikation der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz im Wesentlichen ohne Veränderung der entsprechenden Aminosäuresequenz durchgeführt wird.
12. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz verwendet wird, die für ein therapeutisches und/oder diagnostisches Protein kodiert.
13. Verfahren nach Anspruch 12, wobei das therapeutische und/oder diagnostische Protein ausgewählt ist aus toxischen Genprodukten, Suizidfaktoren, Apoptose induzierenden Proteinen, Botenstoffen, transaktiven Faktoren, Regulatorproteinen, transdominant-negativen Proteinen, Cytokinen, Chemokinen, Interleukinen, Interferon α , RANTES, MIP1 α , TNF, Thymidinkinasen, Nukleasen, FAS, FAS-Ligand,

Kaspasen und Transkriptionsfaktoren.

- 5 14. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, wobei eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz verwendet wird, die für ein virales transdominant-negatives (TDN) Protein kodiert.
15. Verfahren nach Anspruch 14, wobei eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz verwendet wird, die für ein retrovirales TDN-Protein kodiert.
16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz verwendet wird, die für ein TDN Lentivirus-Protein, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Gag, Env, Tat, Rev, Nef, Vpr, Vpv, Reverser Transkriptase, Protease und Integrase, kodiert.
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Expression von transdominant-negativen (TDN) Lentivirus-Proteinen in eukaryontischen Zellen, umfassend:
- 20 (a) Einbringen eines Vektors, umfassend eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz, die für ein TDN Lentivirus-Protein kodiert und deren Kodongebrauch an den von Säugern angepasst ist, und eine durch ein Lentivirus Tat-Protein induzierbare Promotorsequenz in operativer Verknüpfung mit der Zielnukleinsäuresequenz, in eine eukaryontische Zelle,
- 25 (b) Bereitstellen des Tat-Proteins, so dass eine Expression der Zielnukleinsäuresequenz induziert wird.
18. Nukleinsäure-Vektor umfassend:
- 30 (a) eine zu exprimierende Zielnukleinsäuresequenz,
- (b) eine durch einen transaktiven Faktor induzierbare Transkriptionskontrollsequenz in operativer Verknüpfung mit der zu exprimierenden Zielnukleinsäuresequenz, wobei die Sequenz gemäß (a) auf Nukleinsäureebene so modifiziert

- 42 -

ist, dass eine Steigerung der Expression erreicht wird.

19. Vektor nach Anspruch 18, wobei die Sequenz gemäß (a) so modifiziert ist, dass die entsprechende Aminosäuresequenz nicht verändert ist.

20. Vektor nach Anspruch 18 oder 19, wobei der Kodongebrauch der Sequenz gemäß (a) an den von Säugetieren angepasst ist.

10 21. Vektor nach einem der Ansprüche 18 bis 20, wobei die Sequenz gemäß (a) so modifiziert ist, dass der GC-Gehalt für den von Säugern optimiert ist.

22. Vektor nach Anspruch 21, wobei die Sequenz gemäß (a) so modifiziert ist, dass der GC-Gehalt für den von Menschen optimiert ist.

23. Vektor nach einem der Ansprüche 18 bis 22, wobei die Sequenz gemäß (a) für ein therapeutisches Protein und/oder diagnostisches Protein und/oder trans-dominant negatives (TDN) Virus-Protein, insbesondere ein TDN Lentivirus-Protein, kodiert.

24. Vektor nach Anspruch 23, wobei das diagnostische und/oder therapeutische Protein ausgewählt ist aus toxischen Genprodukten, Suizidfaktoren, Apoptose induzierenden Proteinen, Botenstoffen, transaktiven Faktoren, Regulatorproteinen, transdominant-negativen
25 Proteinen, Cytokinen, Chemokinen, Interleukinen, Interferon α , RANTES, MIP1 α , TNF, Thymidinkinasen, Nukleasen, FAS, FAS-Ligand, Kaspasen und Transkriptionsfaktoren.

25. Vektor nach Anspruch 23, wobei das TDN Virus-Protein ausgewählt ist
30 aus der Gruppe bestehend aus Gag, Env, Tat, Rev, Nef, Vpv, Vpu, Reverser Transkriptase, Protease und Integrase.

- 43 -

26. Vektor nach Anspruch 25, wobei das TDN Lentivirus-Protein das Gag-Protein ist.
27. Vektor nach Anspruch 25 oder 26, wobei das TDN Lentivirus-Protein ein
5 Gag-Protein mit Deletionen im p24-Bereich ist.
28. Vektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche 18 bis 27, wobei die Sequenz gemäß (a) die Sequenz der SEQ ID NO: 1, 16 und 18 umfasst.
- 10 29. Vektor nach einem der vorhergehenden Ansprüche 18 bis 28, wobei die Promotorsequenz eine lentivirale LTR-Sequenz oder eine funktionelle Teilsequenz davon ist.
30. Modifizierter Lentivirus, umfassend ein modifiziertes Genom, welches
15 eine oder mehrere stumme Mutationen in proteinkodierenden Bereichen enthält, welche den Kodongebrauch an den von Säugetieren anpassen.
31. Zelle, die einen Vektor oder einen modifizierten Lentivirus nach einem der Ansprüche 18 bis 30 enthält.
32. Arzneimittel, umfassend als Wirkstoff einen Vektor, einen modifizierten Lentivirus oder eine Zelle nach einem der Ansprüche 18 bis 31.
33. Verwendung eines Vektors und/oder eines modifizierten Lentivirus
25 und/oder einer Zelle nach einem der Ansprüche 18 bis 31 zur Herstellung eines Arzneimittels für die Gentherapie und/oder Diagnostik.
34. Verwendung nach Anspruch 33 für die Gentherapie und/oder Diagnose bei retroviralen Infektionen.

- 44 -

35. Verwendung nach Anspruch 33 zur Behandlung und/oder Diagnose von lentiviralen Infektionen.

5 36. Verwendung nach Anspruch 33 zur Behandlung und/oder Diagnose einer HIV-Infektion.

37. Verwendung nach Anspruch 33 zur *ex vivo* Transduktion von PMLs aus mit HIV infizierten Personen.

Abbildung 1

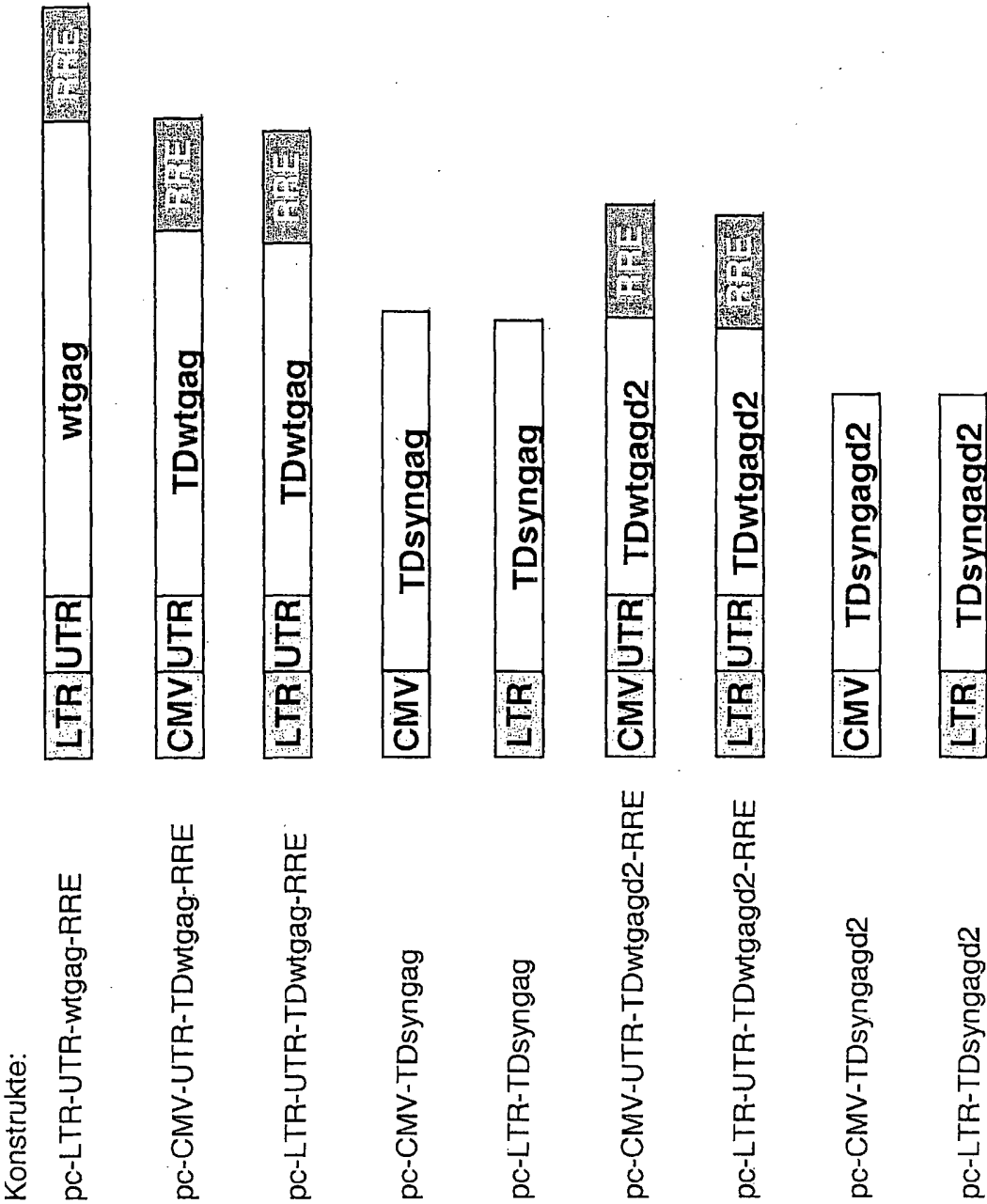


Abbildung 2

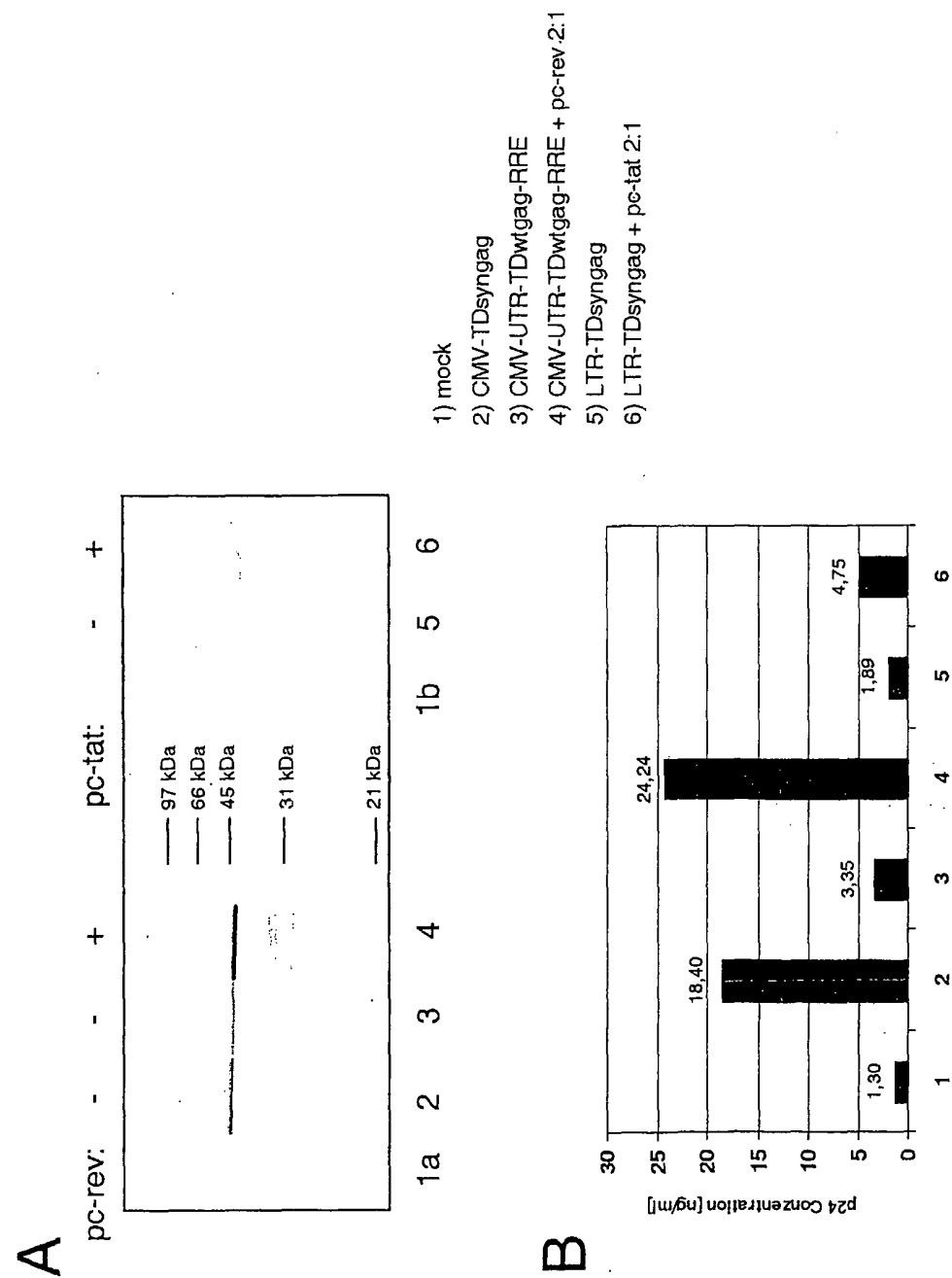
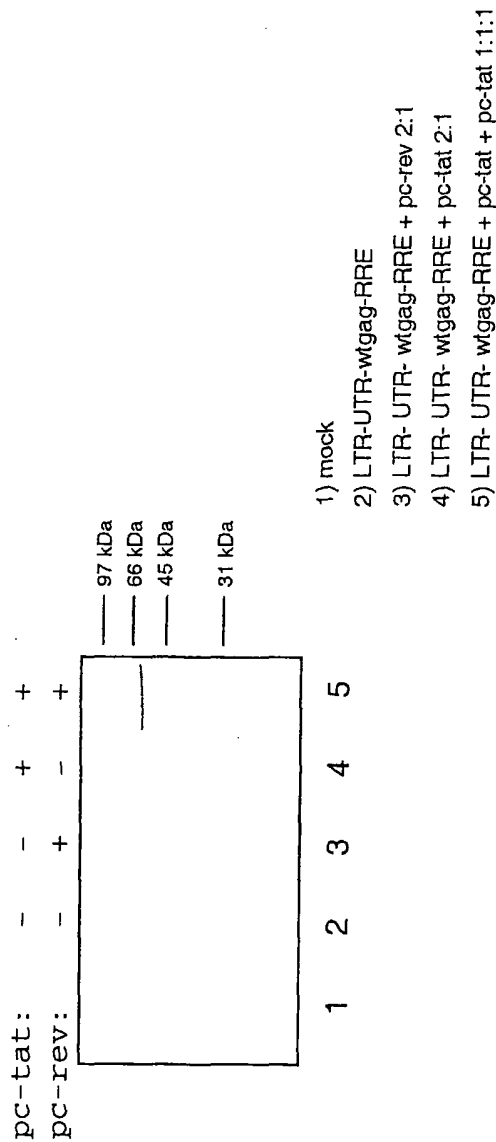
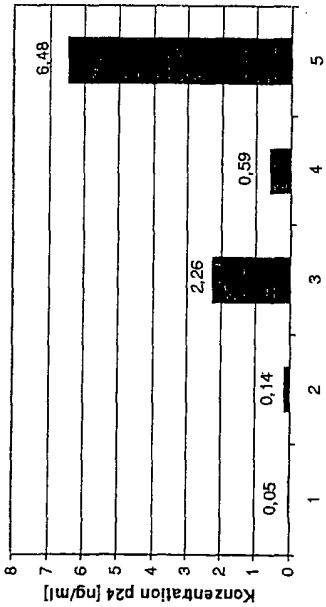


Abbildung 3

A



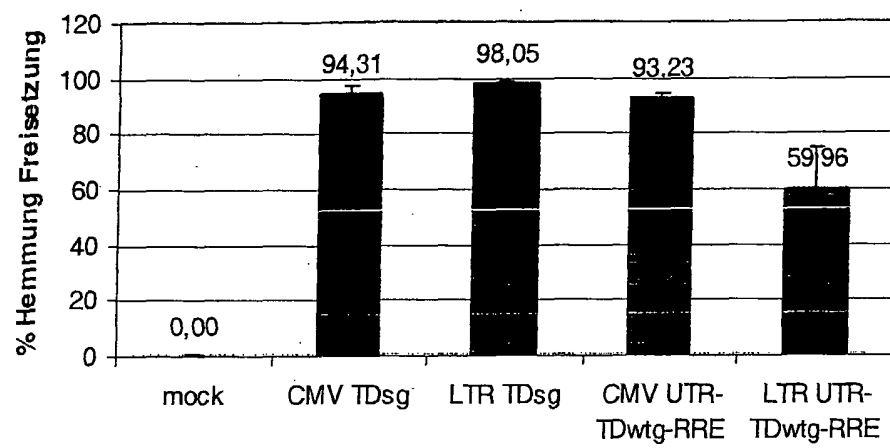
B



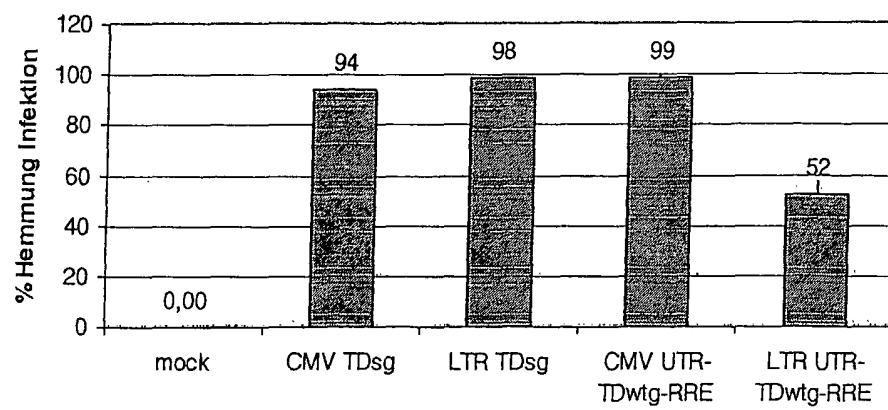
4/9

Abbildung 4

A



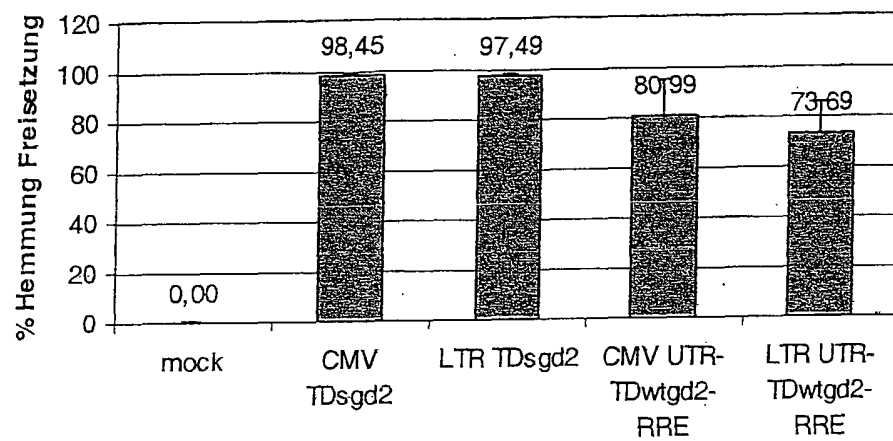
B



5/9

Abbildung 5

A



B

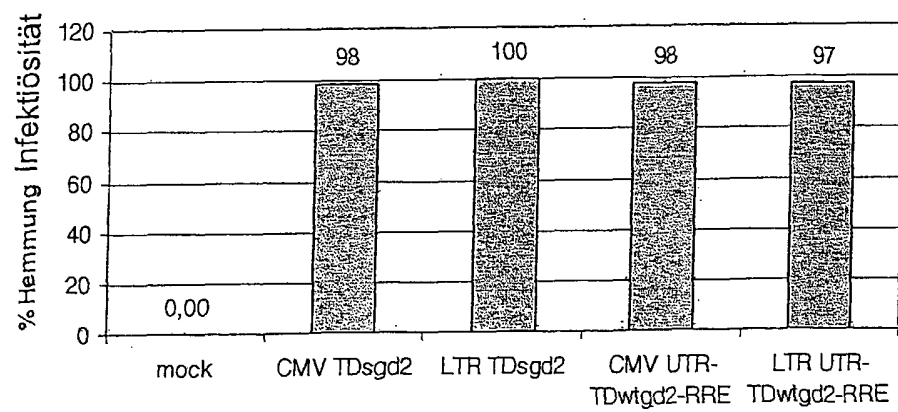


Abbildung 6: SEQ IDs und Alignments der verwendeten DNA Sequenzen

SEQ-ID der angegebenen Konstrukte:

SEQ-ID1: TDsyngag:

```

1      GAATTCGCCG CCAGCATGGG CGCCAGGGCC AGCGTGCTGA GCGGCGGCGA GCTGGACAGG
61     TGGGAGAAGA TCAGGCTGAG GCCCGGCGGC AAGAAGAAGT ATAAGCTGAA GCACATCGTG
121    TGGGCCAGCA GGGAGCTGGA GAGGTTTCGCC GTGAACCCCG GCCTGCTGGA GACCAGCGAG
181    GGCTGCAGGC AGATCCTGGG CCAGCTGCAG CCCAGCCTGC AGACCGGCAG CGAGGAGCTG
241    AGGAGCCTGT ACAACACCGT GGCCACCCTG TACTGCGTGC ACCAGAGGAT CGAGATCAAG
301    GACACCAAGG AGGCCCTGTT CAGCCCCGAG GTGATCCCCA TGTTTCAGCGC CCTGAGCGAG
361    GGAGCCACCC CCCAGGACCT GAACACCATG CTGAACACCG TGGGCGGCCA CCAGGCCGCC
421    ATGCAGATGC TGAAGGAGAC CATCAACGAG GAGGCCGCGG AGTGGGACAG GGTGCACCCC
481    GTGCACGCCG GCCCATCGC CCCCAGGCCG ATGAGGGAGC CCGCGGCGAG CGACATCGCC
541    GGCACCACCA GCACCCTGCA GGAGCAGATC GGCTGGATGA CCAACAACCC CCCCATCCCC
601    GTGGGCGAAA TCTACAAGAG GTGGATCATC CTGGGCCTGA ACAAGATCGT GAGGATGTAC
661    AGCCCCACCA GCATCCTGGA TATCAGGCAG GGCCCCAAAG AGCCCTTCAG GGACTACGTG
721    GACAGGTTCT ACAAGACCCT GCGCGCCGAG CAGGCCAGCC AGGAGGTGAA GAAGTGGATG
781    ACCGAGACCC TGCTGCTGCA GAACGCCAAC CCCGACTGCA AGACCATCCT GAAGGCCCTG
841    GGACCCGCCG CCACCCTGGA GGAGATGATG ACCGCCTGCC AGGGCGTGGG CGGCCCGGCC
901    CACAAGGCCA GGGTGCTGGC CGAGGCCATG AGCCAGGTGA CCAACACCGC CACCATCATG
961    ATGCAGAGGG GCAACTTCAG GAACCAGAGG AAGATGGTGA AGTGCTTCAA CTGCGGCAAG
1021   GAGGGCCACA CCGCCAGGAA CTGCCGCGCC CCCAGGAAGA AGGGCTGCTG GAAGTGCAGC
1081   AAGGAGGGCC ACCAGATGAA GGAATGCACC GAGAGGCAGG CCAACTAATA GTCCGGACTC
1141   GAG

```

SEQ ID3: TDwtgag (coding region):

```

1      ATGGGTGCGA GAGCGTCAGT ATTAAGCGGG GGAGAATTAG ATCGATGGGA AAAAATTCGG
61     TTAAGGCCAG GGGGAAAGAA AAAATATAAA TTAACACATA TAGTATGGGC AAGCAGGGAG
121    CTAGAACGAT TCGCAGTTAA TCCTGGCCTG TTAGAAACAT CAGAAGGCTG TAGACAAATA
181    CTGGGACAGC TACAACCATC CCTTCAGACA GGATCAGAAG AACTTAGATC ATTATATAAT
241    ACAGTAGCAA CCCTCTATTG TGTGCATCAA AGGATAGAGA TAAAAGACAC CAAGGAAGCT
301    TTATTCAGCC CAGAAGTAAT ACCCATGTTT TCAGCATTAT CAGAAGGAGC CACCCACAA
361    GATTTAAACA CCATGCTAAA CACAGTGGGG GGACATCAAG CAGCCATGCA AATGTTAAAA
421    GAGACCATCA ATGAGGAAGC TGCAGAATGG GATAGAGTAC ATCCAGTGCA TGCAGGGCCT
481    ATTGCACCGA GCCAGATGAG AGAACCAAGG GGAAGTGACA TAGCAGGAAC TACTAGTACC
541    CTTCAGGAAC AAATAGGATG GATGACAAAT AATCCACCTA TCCCAGTAGG AGAAATTTAT
601    AAAAGATGGA TAATCCTGGG ATTAATAAAA ATAGTAAGAA TGTATAGCCC TACCAGCATT
661    CTGGACATAA GACAAGGACC AAAAGAACCT TTTAGAGACT ATGTAGACCG GTTCTATAAA
721    ACTCTAAGAG CCGAGCAAGC TTCACAGGAG GTAAAAAATT GGATGACAGA AACCTTGTTG
781    GTCCAAAATG CGAACCCAGA TTGTAAGACT ATTTTAAAG CATTGGGACC AGCGGCTACA
841    CTAGAAGAAA TGATGACAGC ATGTCAGGGA GTAGGAGGAC CCGGCCATAA GGCAAGAGTT
901    TTGGCTGAAG CAATGAGCCA AGTAAACAA ACAGCTACCA TAATGATGCA GAGAGGCAAT
961    TTTAGGAACC AAAGAAAGAT GGTAAAGTGT TTCAATTGTG GCAAAGAAGG GCACACAGCC
1021   AGAAATTGCA GGGCCCCTAG GAAAAGGGC TGTTGGAAAT GTGGAAAGGA AGGACACCAA
1081   ATGAAAGATT GTACTGAGAG ACAGGCTAAT TAA

```

Alignment TDwtgag:TDsyngag (coding region)

TDwtgag:TDsyngag identity= 72.78%(821/1128) gap=0.00%(0/1128)

```

1      ATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGATGGGAAAAAATTCGG
      ||||| || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||
1      ATGGGCGCCAGGGCCAGCGTCTGAGCGGCGGCGAGCTGGACAGGTGGGAGAAGATCAGG

61     TTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAATATAAAATTAAACATATAGTATGGGCAAGCAGGGAG
      | ||||| || || || || || || || || || || || || || || || || || || ||

```

61 CTGAGGCCCGCGGCAAGAAGAAGTATAAGCTGAAGCACATCGTGTGGGCCAGCAGGGAG
121 CTAGAACGATTTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACATCAGAAGGCTGTAGACAAATA
|| || | |||| | || | |||| | || | || |||| | || | ||
121 CTGGAGAGGTTTCGCCGTGAACCCCGGCCTGCTGGAGACCAGCGAGGGCTGCAGGCAGATC
181 CTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATCAGAAGAACTTAGATCATTATATAAT
|||| | |||| | || | |||| | || | || |||| | || | ||
181 CTGGGCCAGCTGCAGCCAGCCTGCAGACCGGCAGCGAGGAGCTGAGGAGCCTGTACAAC
241 ACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAGGATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCT
|| || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
241 ACCGTGGCCACCCTGTACTGCGTGCACAGAGGATCGAGATCAAGGACACCAAGGAGGCC
301 TTATTCAGCCCAGAAGTAATACCCATGTTTTTCAGCATTATCAGAAGGAGCCACCCACAA
| |||| | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
301 CTGTTTCAGCCCCGAGGTGATCCCCATGTTTCAGCGCCCTGAGCGAGGGAGCCACCCCCAG
361 GATTTAAACACCATGCTAAACACAGTGGGGGGACATCAAGCAGCCATGCAAATGTTAAAA
|| | |||| | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
361 GACCTGAACACCATGCTGAACACCGTGGGCGGCCACCAGGCCGCGCATGCAGATGCTGAAG
421 GAGACCATCAATGAGGAAGCTGCAGAATGGGATAGAGTACATCCAGTGCATGCAGGGCCT
|||| | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
421 GAGACCATCAACGAGGAGGCCGCGAGTGGGACAGGGTGCACCCCGTGCACGCCGCGCCCC
481 ATTGCACCAGGCCAGATGAGAGAACCAAGGGGAAGTGACATAGCAGGAATACTAGTACC
|| || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
481 ATCGCCCCCGGCCAGATGAGGGAGCCCCGCGGCAGCGACATCGCCGGCACCACCAGCACC
541 CTTTCAGGAACAAATAGGATGGATGACAAATAATCCACCTATCCCAGTAGGAGAAATTTAT
|| |||| | || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
541 CTGCAGGAGCAGATCGGCTGGATGACCAACAACCCCCCATCCCCGTGGGCGAAATCTAC
601 AAAAGATGGATAATCCTGGGATTAAATAAAATAGTAAGAATGTATAGCCCTACCAGCATT
|| || | |||| | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
601 AAGAGGTGGATCATCCTGGGCCTGAACAAGATCGTGAGGATGTACAGCCCCACCAGCATC
661 CTGGACATAAGACAAGGACCAAAAGAACCTTTTATAGAGACTATGTAGACCGGTTCTATAAA
|||| | |||| | || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
661 CTGGATATCAGGCAGGGCCCCCAAAGAGCCCTTCAGGGACTACGTGGACAGGTTCTACAAG
721 ACTCTAAGAGCCGAGCAAGCTTCACAGGAGGTAAAAAATTGGATGACAGAAACCTTGTG
|| || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
721 ACCCTGCGCGCCGAGCAGGCCAGCCAGGAGGTGAAGAACTGGATGACCGAGACCCTGCTG
781 GTCCAAAATGCGAACCCAGATTGTAAGACTATTTTAAAAGCATTGGGACCAGCGGCTACA
|| || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
781 GTGCAGAACGCCAACCCGACTGCAAGACCATCCTGAAGGCCCTGGGACCCGCCGCCACC
841 CTAGAAGAAATGATGACAGCATGTCAGGGAGTAGGAGGACCCGGCCATAAGGCAAGAGTT
|| || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
841 CTGGAGGAGATGATGACCGCTGCCAGGGCGTGGGCGGCCCCGGCCACAAGGCCAGGGTG
901 TTGGCTGAAGCAATGAGCCAAGTAACAAATACAGCTACCATAATGATGCAGAGAGGCAAT
|||| | |||| | || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
901 CTGGCCGAGGCCATGAGCCAGGTGACCAACACCGCCACCATCATGATGCAGAGGGGCAAC
961 TTTAGGAACCAAGAAAGATGGTTAAGTGTTCATTGTGGCAAAGAAGGGCACACAGCC
|| |||| | || | |||| | || | |||| | || | |||| | || | ||
961 TTCAGGAACCAGAGGAAGATGGTGAAGTGCTTCAACTGCGCAAGGAGGGCCACACCGCC

Abbildung 7

SEQ-ID 16: TDsyngag delta 2:

```

1      ATGGGCGCCA GGGCCAGCGT GCTGAGCGGC GGCAGCTGG ACAGGTGGGA GAAGATCAGG
61     CTGAGGCCCG GCGGCAAGAA GAAGTATAAG CTGAAGCACA TCGTGTGGGC CAGCAGGGAG
121    CTGGAGAGGT TCGCCGTGAA CCCC GGCCCTG CTGGAGACCA GCGAGGGCTG CAGGCAGATC
181    CTGGGCCAGC TGCAGCCCAG CCTGCAGACC GGCAGCGAGG AGCTGAGGAG CCTGTACAAC
241    ACCGTGGCCA CCCTGTACTG CGTGCACCAG AGGATCGAGA TCAAGGACAC CAAGGAGGCC
301    CTGTTTCAGCC CCGAGGTGAT CCCCATGTTT AGCGCCCTGA GCGAGGGAGC CACCCCCCAG
361    GACCTGAACA CCATGCTGAA CACCGTGGGC GGCCACCAGG CCGCCATGCA GATGCTGAAG
421    GAGACCATCA ACGAGGAGGC CGCCGAGTGG GACAGGGTGC ACCCCGTGCA CGCCGGCCCC
481    ATCGCCCCCG GCCAGATGAG GGAGTACAAG ACCCTGCGCG CCGAGCAGGC CAGCCAGGAG
541    GTGAAGAACT GGATGACCGA GACCTTGCTG GTGCAGAACG CCAACCCCGA CTGCAAGACC
601    ATCCTGAAGG CCCTGGGACC CGCCGCCACC CTGGAGGAGA TGATGACCGC CTGCCAGGGC
661    GTGGGCGGCC CCGGCCACAA GGCCAGGGTG CTGGCCGAGG CCATGAGCCA GGTGACCAAC
721    ACCGCCACCA TCATGATGCA GAGGGGCAAC TTCAGGAACC AGAGGAAGAT GGTGAAGTGC
781    TTCAACTGCG GCAAGGAGGG CCACACCGCC AGGAACTGCC GCGCCCCCAG GAAGAAGGGC
841    TGCTGGAAGT GCGGCAAGGA GGGCCACCAG ATGAAGGACT GCACCGAGAG GCAGGCCAAC

```

SEQ-ID 18: TDsyngag delta 2 delta p7:

```

1      ATGGGCGCCA GGGCCAGCGT GCTGAGCGGC GGCAGCTGG ACAGGTGGGA GAAGATCAGG
61     CTGAGGCCCG GCGGCAAGAA GAAGTATAAG CTGAAGCACA TCGTGTGGGC CAGCAGGGAG
121    CTGGAGAGGT TCGCCGTGAA CCCC GGCCCTG CTGGAGACCA GCGAGGGCTG CAGGCAGATC
181    CTGGGCCAGC TGCAGCCCAG CCTGCAGACC GGCAGCGAGG AGCTGAGGAG CCTGTACAAC
241    ACCGTGGCCA CCCTGTACTG CGTGCACCAG AGGATCGAGA TCAAGGACAC CAAGGAGGCC
301    CTGTTTCAGCC CCGAGGTGAT CCCCATGTTT AGCGCCCTGA GCGAGGGAGC CACCCCCCAG
361    GACCTGAACA CCATGCTGAA CACCGTGGGC GGCCACCAGG CCGCCATGCA GATGCTGAAG
421    GAGACCATCA ACGAGGAGGC CGCCGAGTGG GACAGGGTGC ACCCCGTGCA CGCCGGCCCC
481    ATCGCCCCCG GCCAGATGAG GGAGTACAAG ACCCTGCGCG CCGAGCAGGC CAGCCAGGAG
541    GTGAAGAACT GGATGACCGA GACCTTGCTG GTGCAGAACG CCAACCCCGA CTGCAAGACC
601    ATCCTGAAGG CCCTGGGACC CGCCGCCACC CTGGAGGAGA TGATGACCGC CTGCCAGGGC
661    GTGGGCGGCC CCGGCCACAA GGCCAGGGTG CTGGCCGAGG CCATGAGCCA GGTGACCAAC
721    ACCGCCACCA TCATGATGCA GAGGGGCAAC TTCAGGAACC AGAGGAAGAT GGTGAAGTGC
781    TTCAACTGCG GCAAGGAGGG CCACACCGCC AGGAACTGCC GCGCCCCCAG GAAGAAGGGC
841    TGCTGGAAGT GCGGCAAGGA GGGCCACCAG ATGAAGGACT GCACCGAGAG GCAGGCCAAC

```

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Geneart GmbH

<120> Induzierbare Genexpression

<130> 33253PDE_GE

<140>

<141>

<160> 19

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1143

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz:vollsynthetisches Gen

<220>

<221> CDS

<222> (16)..(1125)

<220>

<223> TDsyngag

<400> 1

```

gaattcgccg ccagc atg ggc gcc agg gcc agc gtg ctg agc ggc ggc gag 51
      Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu
              1              5              10

```

```

ctg gac agg tgg gag aag atc agg ctg agg ccc ggc ggc aag aag aag 99
Leu Asp Arg Trp Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys
      15              20              25

```

```

tat aag ctg aag cac atc gtg tgg gcc agc agg gag ctg gag agg ttc 147
Tyr Lys Leu Lys His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe
      30              35              40

```

```

gcc gtg aac ccc ggc ctg ctg gag acc agc gag ggc tgc agg cag atc 195
Ala Val Asn Pro Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile
      45              50              55              60

```

ctg ggc cag ctg cag ccc agc ctg cag acc ggc agc gag gag ctg agg	243
Leu Gly Gln Leu Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu, Leu Arg	
65 70 75	
agc ctg tac aac acc gtg gcc acc ctg tac tgc gtg cac cag agg atc	291
Ser Leu Tyr Asn Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile	
80 85 90	
gag atc aag gac acc aag gag gcc ctg ttc agc ccc gag gtg atc ccc	339
Glu Ile Lys Asp Thr Lys Glu Ala Leu Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro	
95 100 105	
atg ttc agc gcc ctg agc gag gga gcc acc ccc cag gac ctg aac acc	387
Met Phe Ser Ala Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr	
110 115 120	
atg ctg aac acc gtg ggc ggc cac cag gcc gcc atg cag atg ctg aag	435
Met Leu Asn Thr Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys	
125 130 135 140	
gag acc atc aac gag gag gcc gcc gag tgg gac agg gtg cac ccc gtg	483
Glu Thr Ile Asn Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val	
145 150 155	
cac gcc ggc ccc atc gcc ccc ggc cag atg agg gag ccc cgc ggc agc	531
His Ala Gly Pro Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser	
160 165 170	
gac atc gcc ggc acc acc agc acc ctg cag gag cag atc ggc tgg atg	579
Asp Ile Ala Gly Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met	
175 180 185	
acc aac aac ccc ccc atc ccc gtg ggc gaa atc tac aag agg tgg atc	627
Thr Asn Asn Pro Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile	
190 195 200	
atc ctg ggc ctg aac aag atc gtg agg atg tac agc ccc acc agc atc	675
Ile Leu Gly Leu Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile	
205 210 215 220	
ctg gat atc agg cag ggc ccc aaa gag ccc ttc agg gac tac gtg gac	723
Leu Asp Ile Arg Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp	
225 230 235	
agg ttc tac aag acc ctg cgc gcc gag cag gcc agc cag gag gtg aag	771
Arg Phe Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys	
240 245 250	

aac tgg atg acc gag acc ctg ctg gtg cag aac gcc aac ccc gac tgc 819
 Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys
 255 260 265

aag acc atc ctg aag gcc ctg gga ccc gcc gcc acc ctg gag gag atg 867
 Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met
 270 275 280

atg acc gcc tgc cag ggc gtg ggc ggc ccc ggc cac aag gcc agg gtg 915
 Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val
 285 290 295 300

ctg gcc gag gcc atg agc cag gtg acc aac acc gcc acc atc atg atg 963
 Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn Thr Ala Thr Ile Met Met
 305 310 315

cag agg ggc aac ttc agg aac cag agg aag atg gtg aag tgc ttc aac 1011
 Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys Met Val Lys Cys Phe Asn
 320 325 330

tgc ggc aag gag ggc cac acc gcc agg aac tgc cgc gcc ccc agg aag 1059
 Cys Gly Lys Glu Gly His Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys
 335 340 345

aag ggc tgc tgg aag tgc ggc aag gag ggc cac cag atg aag gac tgc 1107
 Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys
 350 355 360

acc gag agg cag gcc aac taatagtcgcg gactcgag 1143
 Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 365 370

<210> 2

<211> 370

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> TDsyngag

<400> 2

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
 20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
 35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
 50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
 65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
 85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala
 100 105 110

Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr
 115 120 125

Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn
 130 135 140

Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro
 145 150 155 160

Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly
 165 170 175

Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro
 180 185 190

Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu
 195 200 205

Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg
 210 215 220

Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys
 225 230 235 240

Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr
 245 250 255

Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu
 260 265 270

Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys
 275 280 285

Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala
 290 295 300

Met Ser Gln Val Thr Asn Thr Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn
 305 310 315 320

Phe Arg Asn Gln Arg Lys Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu
 325 330 335

Gly His Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp
 340 345 350

Lys Cys Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
 355 360 365

Ala Asn
 370

<210> 3

<211> 1113

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
 Sequenz:vollsynthetisches Gen

<220>

<223> TDwtgag

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1113)

<400> 3

atg ggt gcg aga gcg tca gta tta agc ggg gga gaa tta gat cga tgg 48
 Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
 1 5 10 15

gaa aaa att cgg tta agg cca ggg gga aag aaa aaa tat aaa tta aaa 96
 Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
 20 25 30

cat ata gta tgg gca agc agg gag cta gaa cga ttc gca gtt aat cct 144
 His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
 35 40 45

ggc ctg tta gaa aca tca gaa ggc tgt aga caa ata ctg gga cag cta 192

Gly	Leu	Leu	Glu	Thr	Ser	Glu	Gly	Cys	Arg	Gln	Ile	Leu	Gly	Gln	Leu		
50						55					60						
caa	cca	tcc	ctt	cag	aca	gga	tca	gaa	gaa	ctt	aga	tca	tta	tat	aat	240	
Gln	Pro	Ser	Leu	Gln	Thr	Gly	Ser	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Leu	Tyr	Asn		
65					70					75					80		
aca	gta	gca	acc	ctc	tat	tgt	gtg	cat	caa	agg	ata	gag	ata	aaa	gac	288	
Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Gln	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Asp		
				85					90					95			
acc	aag	gaa	gct	tta	ttc	agc	cca	gaa	gta	ata	ccc	atg	ttt	tca	gca	336	
Thr	Lys	Glu	Ala	Leu	Phe	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Pro	Met	Phe	Ser	Ala		
			100					105					110				
tta	tca	gaa	gga	gcc	acc	cca	caa	gat	tta	aac	acc	atg	cta	aac	aca	384	
Leu	Ser	Glu	Gly	Ala	Thr	Pro	Gln	Asp	Leu	Asn	Thr	Met	Leu	Asn	Thr		
		115					120					125					
gtg	ggg	gga	cat	caa	gca	gcc	atg	caa	atg	tta	aaa	gag	acc	atc	aat	432	
Val	Gly	Gly	His	Gln	Ala	Ala	Met	Gln	Met	Leu	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn		
	130					135				140							
gag	gaa	gct	gca	gaa	tgg	gat	aga	gta	cat	cca	gtg	cat	gca	ggg	cct	480	
Glu	Glu	Ala	Ala	Glu	Trp	Asp	Arg	Val	His	Pro	Val	His	Ala	Gly	Pro		
145					150					155					160		
att	gca	cca	ggc	cag	atg	aga	gaa	cca	agg	gga	agt	gac	ata	gca	gga	528	
Ile	Ala	Pro	Gly	Gln	Met	Arg	Glu	Pro	Arg	Gly	Ser	Asp	Ile	Ala	Gly		
				165					170					175			
act	act	agt	acc	ctt	cag	gaa	caa	ata	gga	tgg	atg	aca	aat	aat	cca	576	
Thr	Thr	Ser	Thr	Leu	Gln	Glu	Gln	Ile	Gly	Trp	Met	Thr	Asn	Asn	Pro		
			180					185					190				
cct	atc	cca	gta	gga	gaa	att	tat	aaa	aga	tgg	ata	atc	ctg	gga	tta	624	
Pro	Ile	Pro	Val	Gly	Glu	Ile	Tyr	Lys	Arg	Trp	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu		
		195					200					205					
aat	aaa	ata	gta	aga	atg	tat	agc	cct	acc	agc	att	ctg	gac	ata	aga	672	
Asn	Lys	Ile	Val	Arg	Met	Tyr	Ser	Pro	Thr	Ser	Ile	Leu	Asp	Ile	Arg		
	210					215					220						
caa	gga	cca	aaa	gaa	cct	ttt	aga	gac	tat	gta	gac	cgg	ttc	tat	aaa	720	
Gln	Gly	Pro	Lys	Glu	Pro	Phe	Arg	Asp	Tyr	Val	Asp	Arg	Phe	Tyr	Lys		
225					230					235				240			
act	cta	aga	gcc	gag	caa	gct	tca	cag	gag	gta	aaa	aat	tgg	atg	aca	768	

Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr
 245 250 255
 gaa acc ttg ttg gtc caa aat gcg aac cca gat tgt aag act att tta 816
 Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu
 260 265 270
 aaa gca ttg gga cca gcg gct aca cta gaa gaa atg atg aca gca tgt 864
 Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys
 275 280 285
 cag gga gta gga gga ccc ggc cat aag gca aga gtt ttg gct gaa gca 912
 Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala
 290 295 300
 atg agc caa gta aca aat aca gct acc ata atg atg cag aga ggc aat 960
 Met Ser Gln Val Thr Asn Thr Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn
 305 310 315 320
 ttt agg aac caa aga aag atg gtt aag tgt ttc aat tgt ggc aaa gaa 1008
 Phe Arg Asn Gln Arg Lys Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu
 325 330 335
 ggg cac aca gcc aga aat tgc agg gcc cct agg aaa aag ggc tgt tgg 1056
 Gly His Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp
 340 345 350
 aaa tgt gga aag gaa gga cac caa atg aaa gat tgt act gag aga cag 1104
 Lys Cys Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
 355 360 365
 gct aat taa 1113
 Ala Asn
 370

<210> 4

<211> 370

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> TDwtgag

<400> 4

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
 20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
 35 40 45
 Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
 50 55 60
 Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
 65 70 75 80
 Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
 85 90 95
 Thr Lys Glu Ala Leu Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala
 100 105 110
 Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr
 115 120 125
 Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn
 130 135 140
 Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro
 145 150 155 160
 Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Pro Arg Gly Ser Asp Ile Ala Gly
 165 170 175
 Thr Thr Ser Thr Leu Gln Glu Gln Ile Gly Trp Met Thr Asn Asn Pro
 180 185 190
 Pro Ile Pro Val Gly Glu Ile Tyr Lys Arg Trp Ile Ile Leu Gly Leu
 195 200 205
 Asn Lys Ile Val Arg Met Tyr Ser Pro Thr Ser Ile Leu Asp Ile Arg
 210 215 220
 Gln Gly Pro Lys Glu Pro Phe Arg Asp Tyr Val Asp Arg Phe Tyr Lys
 225 230 235 240
 Thr Leu Arg Ala Glu Gln Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr
 245 250 255
 Glu Thr Leu Leu Val Gln Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu
 260 265 270
 Lys Ala Leu Gly Pro Ala Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys
 275 280 285

Gln Gly Val Gly Gly Pro Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala
 290 295 300
 Met Ser Gln Val Thr Asn Thr Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn
 305 310 315 320
 Phe Arg Asn Gln Arg Lys Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu
 325 330 335
 Gly His Thr Ala Arg Asn Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp
 340 345 350
 Lys Cys Gly Lys Glu Gly His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln
 355 360 365
 Ala Asn
 370

<210> 5
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>
 <223> DEL1

<400> 5
 taaagcttcc ttggtgtc

18

<210> 6
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>
 <223> Del2

<400> 6

ttcagcccag aagtaatacc

20

<210> 7

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>

<223> Del3

<400> 7

tacaagaccc tgcgcgccga gcaggcc

27

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>

<223> Del4

<400> 8

ctccctcatc tggccggggg cgatggg

27

<210> 9

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>

<223> Del5

<400> 9

ttctctcatc tggcctgggtg caatagg

27

<210> 10
<211> 27
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>
<223> Del6

<400> 10
tataaaactc taagagccga gcaagct

27

<210> 11
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>
<223> Gag-stop1

<400> 11
ggaaggccag atcttcctc attaattagc ctgtctctca gtac

44

<210> 12
<211> 44
<212> DNA
<213> Künstliche Sequenz

<220>
<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>
<223> Gag-stop2

<400> 12
gtactgagag acaggctaataa taatgagggga agatctggcc ttcc

44

<210> 13
<211> 35
<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>

<223> ltr1

<400> 13

attgtcgaca cgcgttgga gggctaattc actcc

35

<210> 14

<211> 27

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>

<223> ltr2

<400> 14

attgaattcc tctctccttc tagcctc

27

<210> 15

<211> 18

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:Primer 5'-3

<220>

<223> ltr3

<400> 15

gcttgcccat actatatg

18

<210> 16

<211> 900

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen
Sequenz: vollsynthetisches Gen

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(900)

<220>

<223> TDsyngag delta 2

<400> 16

atg ggc gcc agg gcc agc gtg ctg agc ggc ggc gag ctg gac agg tgg	48
Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp	
1 5 10 15	
gag aag atc agg ctg agg ccc ggc ggc aag aag aag tat aag ctg aag	96
Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys	
20 25 30	
cac atc gtg tgg gcc agc agg gag ctg gag agg ttc gcc gtg aac ccc	144
His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro	
35 40 45	
ggc ctg ctg gag acc agc gag ggc tgc agg cag atc ctg ggc cag ctg	192
Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu	
50 55 60	
cag ccc agc ctg cag acc ggc agc gag gag ctg agg agc ctg tac aac	240
Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn	
65 70 75 80	
acc gtg gcc acc ctg tac tgc gtg cac cag agg atc gag atc aag gac	288
Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp	
85 90 95	
acc aag gag gcc ctg ttc agc ccc gag gtg atc ccc atg ttc agc gcc	336
Thr Lys Glu Ala Leu Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala	
100 105 110	
ctg agc gag gga gcc acc ccc cag gac ctg aac acc atg ctg aac acc	384
Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr	
115 120 125	
gtg ggc ggc cac cag gcc gcc atg cag atg ctg aag gag acc atc aac	432
Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn	
130 135 140	
gag gag gcc gcc gag tgg gac agg gtg cac ccc gtg cac gcc ggc ccc	480

Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro
 145 150 155 160

 atc gcc ccc ggc cag atg agg gag tac aag acc ctg cgc gcc gag cag 528
 Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln
 165 170 175

 gcc agc cag gag gtg aag aac tgg atg acc gag acc ctg ctg gtg cag 576
 Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln
 180 185 190

 aac gcc aac ccc gac tgc aag acc atc ctg aag gcc ctg gga ccc gcc 624
 Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala
 195 200 205

 gcc acc ctg gag gag atg atg acc gcc tgc cag ggc gtg ggc gcc ccc 672
 Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro
 210 215 220

 ggc cac aag gcc agg gtg ctg gcc gag gcc atg agc cag gtg acc aac 720
 Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn
 225 230 235 240

 acc gcc acc atc atg atg cag agg ggc aac ttc agg aac cag agg aag 768
 Thr Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys
 245 250 255

 atg gtg aag tgc ttc aac tgc ggc aag gag ggc cac acc gcc agg aac 816
 Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Thr Ala Arg Asn
 260 265 270

 tgc cgc gcc ccc agg aag aag ggc tgc tgg aag tgc ggc aag gag ggc 864
 Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly
 275 280 285

 cac cag atg aag gac tgc acc gag agg cag gcc aac 900
 His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 290 295 300

<210> 17

<211> 300

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> TDsyngag delta 2

<400> 17

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp

1	5	10	15
Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys	20	25	30
His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro	35	40	45
Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu	50	55	60
Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn	65	70	75
Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp	85	90	95
Thr Lys Glu Ala Leu Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala	100	105	110
Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr	115	120	125
Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn	130	135	140
Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro	145	150	155
Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln	165	170	175
Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln	180	185	190
Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala	195	200	205
Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro	210	215	220
Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn	225	230	235
Thr Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys	245	250	255
Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Thr Ala Arg Asn			

	260		265		270										
Cys	Arg	Ala	Pro	Arg	Lys	Lys	Gly	Cys	Trp	Lys	Cys	Gly	Lys	Glu	Gly
	275						280					285			
His	Gln	Met	Lys	Asp	Cys	Thr	Glu	Arg	Gln	Ala	Asn				
	290						295				300				

<210> 18
 <211> 900
 <212> DNA
 <213> Künstliche Sequenz

<220>
 <223> Beschreibung der künstlichen
 Sequenz:vollsynthetisches Gen

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(900)

<220>
 <223> TDsyngag delta 2 delta p7

<400> 18

atg ggc gcc agg gcc agc gtg ctg agc ggc ggc gag ctg gac agg tgg	48
Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp	
1 5 10 15	
gag aag atc agg ctg agg ccc ggc ggc aag aag aag tat aag ctg aag	96
Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys	
20 25 30	
cac atc gtg tgg gcc agc agg gag ctg gag agg ttc gcc gtg aac ccc	144
His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro	
35 40 45	
ggc ctg ctg gag acc agc gag ggc tgc agg cag atc ctg ggc cag ctg	192
Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu	
50 55 60	
cag ccc agc ctg cag acc ggc agc gag gag ctg agg agc ctg tac aac	240
Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn	
65 70 75 80	
acc gtg gcc acc ctg tac tgc gtg cac cag agg atc gag atc aag gac	288

Thr	Val	Ala	Thr	Leu	Tyr	Cys	Val	His	Gln	Arg	Ile	Glu	Ile	Lys	Asp	
				85					90					95		
acc	aag	gag	gcc	ctg	ttc	agc	ccc	gag	gtg	atc	ccc	atg	ttc	agc	gcc	336
Thr	Lys	Glu	Ala	Leu	Phe	Ser	Pro	Glu	Val	Ile	Pro	Met	Phe	Ser	Ala	
			100					105					110			
ctg	agc	gag	gga	gcc	acc	ccc	cag	gac	ctg	aac	acc	atg	ctg	aac	acc	384
Leu	Ser	Glu	Gly	Ala	Thr	Pro	Gln	Asp	Leu	Asn	Thr	Met	Leu	Asn	Thr	
			115				120					125				
gtg	ggc	ggc	cac	cag	gcc	gcc	atg	cag	atg	ctg	aag	gag	acc	atc	aac	432
Val	Gly	Gly	His	Gln	Ala	Ala	Met	Gln	Met	Leu	Lys	Glu	Thr	Ile	Asn	
			130				135					140				
gag	gag	gcc	gcc	gag	tgg	gac	agg	gtg	cac	ccc	gtg	cac	gcc	ggc	ccc	480
Glu	Glu	Ala	Ala	Glu	Trp	Asp	Arg	Val	His	Pro	Val	His	Ala	Gly	Pro	
145					150					155					160	
atc	gcc	ccc	ggc	cag	atg	agg	gag	tac	aag	acc	ctg	cgc	gcc	gag	cag	528
Ile	Ala	Pro	Gly	Gln	Met	Arg	Glu	Tyr	Lys	Thr	Leu	Arg	Ala	Glu	Gln	
				165					170					175		
gcc	agc	cag	gag	gtg	aag	aac	tgg	atg	acc	gag	acc	ctg	ctg	gtg	cag	576
Ala	Ser	Gln	Glu	Val	Lys	Asn	Trp	Met	Thr	Glu	Thr	Leu	Leu	Val	Gln	
			180					185					190			
aac	gcc	aac	ccc	gac	tgc	aag	acc	atc	ctg	aag	gcc	ctg	gga	ccc	gcc	624
Asn	Ala	Asn	Pro	Asp	Cys	Lys	Thr	Ile	Leu	Lys	Ala	Leu	Gly	Pro	Ala	
			195				200					205				
gcc	acc	ctg	gag	gag	atg	atg	acc	gcc	tgc	cag	ggc	gtg	ggc	ggc	ccc	672
Ala	Thr	Leu	Glu	Glu	Met	Met	Thr	Ala	Cys	Gln	Gly	Val	Gly	Gly	Pro	
			210				215				220					
ggc	cac	aag	gcc	agg	gtg	ctg	gcc	gag	gcc	atg	agc	cag	gtg	acc	aac	720
Gly	His	Lys	Ala	Arg	Val	Leu	Ala	Glu	Ala	Met	Ser	Gln	Val	Thr	Asn	
225					230					235					240	
acc	gcc	acc	atc	atg	atg	cag	agg	ggc	aac	ttc	agg	aac	cag	agg	aag	768
Thr	Ala	Thr	Ile	Met	Met	Gln	Arg	Gly	Asn	Phe	Arg	Asn	Gln	Arg	Lys	
				245					250					255		
atg	gtg	aag	tgc	ttc	aac	tgc	ggc	aag	gag	ggc	cac	acc	gcc	agg	aac	816
Met	Val	Lys	Cys	Phe	Asn	Cys	Gly	Lys	Glu	Gly	His	Thr	Ala	Arg	Asn	
			260					265					270			
tgc	cgc	gcc	ccc	agg	aag	aag	ggc	tgc	tgg	aag	tgc	ggc	aag	gag	ggc	864

Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly
 275 280 285

cac cag atg aag gac tgc acc gag agg cag gcc aac 900
 His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
 290 295 300

<210> 19

<211> 300

<212> PRT

<213> Künstliche Sequenz

<223> TDsyngag delta 2 delta p7

<400> 19

Met Gly Ala Arg Ala Ser Val Leu Ser Gly Gly Glu Leu Asp Arg Trp
 1 5 10 15

Glu Lys Ile Arg Leu Arg Pro Gly Gly Lys Lys Lys Tyr Lys Leu Lys
 20 25 30

His Ile Val Trp Ala Ser Arg Glu Leu Glu Arg Phe Ala Val Asn Pro
 35 40 45

Gly Leu Leu Glu Thr Ser Glu Gly Cys Arg Gln Ile Leu Gly Gln Leu
 50 55 60

Gln Pro Ser Leu Gln Thr Gly Ser Glu Glu Leu Arg Ser Leu Tyr Asn
 65 70 75 80

Thr Val Ala Thr Leu Tyr Cys Val His Gln Arg Ile Glu Ile Lys Asp
 85 90 95

Thr Lys Glu Ala Leu Phe Ser Pro Glu Val Ile Pro Met Phe Ser Ala
 100 105 110

Leu Ser Glu Gly Ala Thr Pro Gln Asp Leu Asn Thr Met Leu Asn Thr
 115 120 125

Val Gly Gly His Gln Ala Ala Met Gln Met Leu Lys Glu Thr Ile Asn
 130 135 140

Glu Glu Ala Ala Glu Trp Asp Arg Val His Pro Val His Ala Gly Pro
 145 150 155 160

Ile Ala Pro Gly Gln Met Arg Glu Tyr Lys Thr Leu Arg Ala Glu Gln
 165 170 175

Ala Ser Gln Glu Val Lys Asn Trp Met Thr Glu Thr Leu Leu Val Gln
180 185 190

Asn Ala Asn Pro Asp Cys Lys Thr Ile Leu Lys Ala Leu Gly Pro Ala
195 200 205

Ala Thr Leu Glu Glu Met Met Thr Ala Cys Gln Gly Val Gly Gly Pro
210 215 220

Gly His Lys Ala Arg Val Leu Ala Glu Ala Met Ser Gln Val Thr Asn
225 230 235 240

Thr Ala Thr Ile Met Met Gln Arg Gly Asn Phe Arg Asn Gln Arg Lys
245 250 255

Met Val Lys Cys Phe Asn Cys Gly Lys Glu Gly His Thr Ala Arg Asn
260 265 270

Cys Arg Ala Pro Arg Lys Lys Gly Cys Trp Lys Cys Gly Lys Glu Gly
275 280 285

His Gln Met Lys Asp Cys Thr Glu Arg Gln Ala Asn
290 295 300