

(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
25. Mai 2001 (25.05.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/36629 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C12N 15/12,
15/62, 15/87, 5/10, 1/21, C07K 14/47

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/11482

(22) Internationales Anmeldedatum:
17. November 2000 (17.11.2000)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 55 576.1 18. November 1999 (18.11.1999) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von
US): FORSCHUNGSZENTRUM BORSTEL [DE/DE];
Parkallee 1-40, 23845 Borstel (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERDES, Jo-
hannes [DE/DE]; Steinfeld 79, 23858 Feldhorst (DE).
SCHOLZEN, Thomas [DE/DE]; Herrenweg 3, 23843
Neritz (DE). WOHLBERG, Claudia [DE/DE];
Kupfersteichweg 22, 22399 Hamburg (DE).

(74) Anwalt: FÜCHSLE, Klaus; Hoffmann . Eitle, Arabellas-
trasse 4, 81925 München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT,
AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU,
CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM,
HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK,
LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX,
MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH,
GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK,
ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR),
OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML,
MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen
eintreffen.

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

(54) Title: TRANSFER COMPOUNDS, THE PRODUCTION AND THE USE THEREOF

(54) Bezeichnung: TRANSFERVERBINDUNGEN, IHRE HERSTELLUNG UND IHRE VERWENDUNG

(57) Abstract: The invention relates to the use of a carboxy-terminal fragment of the Ki-67 protein or of an active part, fragment or
homologue thereof as a compound that can be used for intracellular transfer and for the introduction in and the release by the cells.
The invention further relates to transfer compounds that contain the above-mentioned Ki-67 protein and to the vectors encoding the
same. The invention also relates to corresponding pharmaceutical compositions and to the use of the transfer protein as an excipient
or active agent in the treatment of diseases.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung eines carboxyterminalen Fragments des Ki-67 Prote-
ins oder eines aktiven Teils, Fragments oder Homologs davon als eine Verbindung, die für den Transfer in Zellen und die Aufnahme
und das Ausschleusen durch Zellen geeignet ist. Weiterhin umfasst die vorliegende Erfindung Transferverbindungen, die das o.g.
carboxyterminale Ende des Ki-67 Proteins enthalten, sowie Vektoren kodierend dafür. Außerdem fallen pharmazeutische Zusam-
mensetzungen unter diese Anmeldung, sowie die Verwendung des Transferproteins als Träger oder als Wirkstoff bei der Behandlung
von Krankheiten.

WO 01/36629 A1

Transferverbindungen, ihre Herstellung und ihre Verwendung

BESCHREIBUNG

Technisches Gebiet

Die vorliegende Erfindung betrifft Verbindungen, die in der Lage sind assoziierte Verbindungen in eine Zelle zu bringen. Insbesondere betrifft die vorliegende Erfindung eine Transferverbindung die das carboxyterminale Fragment des Ki-67 Proteins umfasst. Des weiteren umfasst diese Anmeldung Vektoren, die die für die Transferverbindung kodierende Sequenz enthalten, Transferverbindungen und pharmazeutische Zusammensetzungen enthaltend diese Transferverbindungen und/oder Vektoren. Weiterhin werden Verfahren zu deren Herstellung, sowie die Verwendung dieser Transferverbindungen beansprucht. Entsprechende Verfahren zur Behandlung oder Vorbeugung von Erkrankungen durch Gentherapie unter Zuhilfenahme dieser Transferverbindungen liegen im Rahmen der Erfindung.

Stand der Technik

Die Zielsteuerung von Proteinen (protein targeting) ist ein biologischer Prozess von fundamentaler Bedeutung, der durch hochgradig koordinierte Mechanismen gesteuert wird.

So geschieht der Proteinexport bzw. die Proteinsekretion auf spezifischen Reaktionswegen, für die charakterisierte Signalsequenzen genutzt werden, um die Proteine in die beteiligten subzellulären Kompartimente, wie endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Komplex und Vesikel, zu leiten. Auch für den intrazellulären Transfer werden Signalsequenzen verwendet. So sind z.B. für den Transfer von Proteinen in den Zellkern Kernlokalisationssequenzen (NLS) beschrieben, die große Proteine, die nicht durch Diffusion in den Kern gelangen können, durch die Kernporen in den Zellkern dirigieren.

Die Aufnahme von Proteinen in eine Zelle ist ebenfalls komplex reguliert. Exemplarisch sei hier nur die rezeptorvermittelte Endozytose erwähnt, die dem Import spezifischer Proteine durch Bindung an Rezeptoren auf der Zellmembran und anschließendem Einschluss in Vesikel dient. Dieser Prozess dient zum einen zur Versorgung von Zellen mit stoffwechselnotwendigen Metaboliten, zum anderen zum Abbau von Proteinen. Ferner vermittelt die rezeptorvermittelte Endozytose die zellulären Antworten auf viele Mediatoren, wie z.B. Peptidhormone oder Wachstumsfaktoren. Schließlich wird dieser Prozess von Viren und Toxinen genutzt, um in Zellen zu gelangen.

Für viele Anwendungsbereiche in der biomedizinischen Forschung, Diagnostik und Therapie ist es wünschenswert, Stoffe, bevorzugt Proteine, Nukleinsäuren, Nicht-Peptidmoleküle wie Oligosaccharide, Lipide oder Arzneimittel oder Markermoleküle, in Zellen einzuschleusen. Da viele der genannten Stoffe die Zellmembran nicht passieren können, werden verschiedene Methoden für das Einschleusen respektive die intrazelluläre Produktion dieser Substanzen angewandt.

Neben mechanischen Methoden, wie z.B. der Mikroinjektion, sind dem Fachmann zu diesem Zwecke z.B. molekularbiologische Expressionstechniken wohlbekannt. Die letztgenannten Methoden sind jedoch nur wenig effizient; in der Regel gelingt die Expression in nur 2-20 % der Zellen, was z.B. eine in vivo Applikation sehr problematisch macht. Dieser Nachteil konnte kürzlich durch den Einsatz eines Strukturproteins (VP22) des Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1) aufgehoben werden. Nach klassischer Transfektion mit Expressionsvektoren zeigte sich, dass im Gegensatz zu einem anderen HSV-1 Protein, das (erwartungsgemäß) nur in 2-5% der Zellen nachgewiesen werden konnte, das VP22 dagegen in 100% der Zellen nachgewiesen werden konnte (PCT Anmeldung No. WO 97/05265). Es wurde ferner gezeigt, dass dieses virale Protein als Fusionsprotein verschiedene Polypeptide in Zielzell-Populationen einschleusen

kann (WO 97/05265). Dem Fachmann ist jedoch wohl bekannt, dass virale Proteine bevorzugt in Säugetierzellen, Zellverbänden bzw. dem Gesamtorganismus, pleiotrope Effekte auslösen können.

So lösen das ElA-Protein der Adenoviren sowie das T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) in den Zellen eine Vielzahl von Prozessen aus. Dazu zählen beispielsweise die Initiation der DNA-Synthese sowie die Aktivierung verschiedener Enzyme, wie der Dihydrofolat-Reduktase, der Thymidin-Kinase und der DNA-Polymerase (Nevins, J.R. Adenovirus ElA: Transcription regulation and alteration of cell growth control, in Doerfler, W. und Böhm, P., The molecular repertoire of Adenovirus III: Biology and pathogenesis, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1995). Ein weiteres Beispiel sind die pleiotropen Eigenschaften der Strukturproteine der Reoviren (Yue, Z. und Shatkin, A.J., Enzymatic and control functions of Reovirus structural proteins, in Tyler, K.L. und Oldstone, M.B.A., Reoviruses I: Structure, Proteins, and Genetics, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1998).

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Transfervehikel für Verbindungen zur Verfügung zu stellen, um diese Nachteile zu überwinden. Die Transferverbindungen sind in der Gentherapie verwendbar.

Das erfindungsgemäße Transfervehikel ist aus einem Säugetier, bevorzugt humanen Ursprungs.

Zusammenfassung der Erfindung

Die vorliegende Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein carboxyterminales Fragment des humanen Ki-67 Proteins gelöst.

Ein weiterer Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft einen Vektor, der für dieses Fragment kodiert.

Weiterhin wird ein Transferprotein beschrieben, das das carboxyterminale Fragment des Ki-67 Proteins aufweist.

Das erfindungsgemäße Transferprotein kann dabei das carboxyterminale Fragment des Ki-67 Proteins des Menschen, der Maus, der Ratte oder einer anderen Spezies sein.

Außerdem betrifft die Erfindung Verfahren zur Herstellung von Transferverbindungen und zur Herstellung von Vektoren, die für diese Transferverbindungen kodieren.

Ein weiterer Aspekt ist ein Verfahren zum Transfer von Verbindungen in eine Zielgruppe, ausgewählt aus Zelllinien, Zellen in vitro, Tumorzellen, Gewebe usw., mit Hilfe des oben genannten, erfindungsgemäßen Transferproteins oder einem Vektor der die Sequenz kodierend für ein erfindungsgemäßes Transferprotein enthält.

Weiterhin schließt die vorliegende Erfindung die Verwendung der o.g. Verbindungen für den Transfer von assoziierten Verbindungen ein, sowie Verfahren zur Therapie und Vorbeugung von Erkrankungen, insbesondere die Verwendung in der Gentherapie.

Auch wird eine pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend das erfindungsgemäße Transferprotein allein oder assoziiert mit einer weiteren Verbindung bereitgestellt, sowie ein Verfahren zu deren Herstellung.

Beschreibung der Abbildungen:

Abbildung 1: Darstellung der Nukleotidsequenz des Kon21-DNA-Inserts. Oberhalb der Nukleotidsequenz sind die Nummerierung der Basenpaare sowie die zur Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen angegeben. Unterhalb der Nukleotidsequenz ist die Aminosäuresequenz des abgeleiteten Kon21-Proteins dargestellt. In Fettdruck wiedergegebene

Nukleotide sind Bestandteil der verwendeten Restriktionsschnittstellen. Unterstrichene Nukleotide sind durch die verwendeten Desoxyoligonukleotid-Primer in das Konstrukt eingeführt worden. Zur besseren Übersicht wurde nur einer der beiden DNA-Stränge in 5'-3'-Richtung angegeben.

Abbildung 2:Karte des verwendeten Vektors, pCEP4-Kon21

Abbildung 3: Mikroskopische Aufnahmen von Zellen 6 Stunden (a-d), 10 Stunden (e-h) und 24 Stunden (i-l) nach Transfektion, Versuchsbedingungen, siehe Beispiel 1. Färbung mit MIB-21 (a, e, i, c, g, k) sowie die Gegenfärbung mit Propidiumjodid (b, f, j, d, h, l). Die Zellen in der linken Bildhälfte wurden mit pCEP4-Kon21 (a, b, e, f, i, j) und die Zellen in der rechten Bildhälfte mit pCEP4 (c, d, g, h, k, l) transfiziert.

Abbildung 4: Mikroskopische Aufnahmen von Zellen 5 Minuten (a-d) und 1 Stunde (e-h) nach Zugabe des Hochsalzlysates, siehe Beispiel 2. Die Zellen in der linken Bildhälfte wurden mit MIB-21 gefärbt (a, c, e, g). Die rechte Bildhälfte zeigt dieselben Zellen in der Gegenfärbung mit Propidiumjodid (b, d, f, h). Die obere Bildhälfte zeigt Zellen nach 5 Minuten (a-d), die untere Bildhälfte Zellen nach 1 Stunde Inkubation mit dem Hochsalzlysate (e-h). Zellen nach Zugabe von Hochsalzlysate aus pCEP4-Kon21 transfizierten Zellen (a, b, e, f) bzw. Hochsalzlysate aus pCEP4 transfizierten Zellen (c, d, g, h).

Ausführliche Darstellung der Erfindung

Das erfindungsgemäße Fragment, nämlich der carboxyterminale Bereich des Ki-67 Proteins umfasst den Bereich der Aminosäuren von 3037 bis 3256 des Ki-67 Proteins, wie in Swiss Prot unter der Accession Nr. P46013 hinterlegt, bzw. Fragmente des Bereichs, wie sie durch die natürliche Variation des Genoms vorhanden sind. Das Fragment kann auch nur Teile des o.g.

Fragments oder Homologe davon umfassen, solange die Funktion als Transferprotein erhalten bleibt.

Homolog bedeutet hier, das mindestens eine 80 %ige Homologie in den Aminosäureresten besteht, die für die Funktion des carboxyterminalen Bereiches als Transferverbindung essentiell sind.

Das humane Ki-67 Protein wird in allen Kernen von proliferierenden Zellen in allen aktiven Phasen des Zellzyklus, d.h. in G1, S, G2 und Mitose exprimiert, nicht jedoch in Ruhephase- G0-Zellen (Gerdes et al. *Cell cycle analysis of a cell proliferation -associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67 J. Immunol.* 133:1710-15, 1984). Die cDNA des humanen Ki-67 und des murinen Äquivalents sind bekannt und weisen keinerlei signifikante Homologien mit anderen Proteinen auf (Schlüter et al. *The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins J. Cell Biol.* 123:513 - 522, 1993, Starborg et al. *The murine Ki-67 cell proliferation antigen accumulates in the nucleolar and heterochromatic regions of interphase cells and at the periphery of the mitotic chromosomes in a process essential for cell cycle progression J. Cell Sci.* 109:143 - 153, 1996). Das humane Ki-67 Protein besitzt mehrere NLS und ist physiologischerweise, außer in der Mitose, nur im Zellkern nachweisbar. Erst nach Mikroinjektion von Antikörpern konnte gezeigt werden, dass das Ki-67 Protein im Zytoplasma gebildet wird und sehr rasch, vermutlich in supramolekularen Komplexen in den Zellkern transferiert wird (Heyden et al. *Cytoplasmic observation of the Ki-67 protein and immunofluorescence staining of its transport to the nucleus Eur. J. Cell Biol.* Vol.42: 33, 1996). Ein Transfer aus dem Kern heraus oder gar aus der Zelle heraus wurde bislang nicht beobachtet oder beschrieben. Um so überraschender war unser Befund, den wir

bei der Untersuchung zur Funktion von Partialstrukturen des Ki-67 Proteins, erhielten.

Ein in CHO-K1 (Chinese Hamster Ovarian-K1, ATTC Nr. CRL 9618) - Zelllinien-Zellen transient exprimiertes, carboxyterminales Fragment des humanen Ki-67 Proteins, KON-21 genannt (Abbildung 1), zeigte ein völlig unerwartetes immunzytologisches Verteilungsmuster des produzierten Polypeptids. In 5-20% der Zellen war das KON-21, wie bei Kontroll-Proteinen, erwartungsgemäß stark zytoplasmatisch exprimiert. Darüber hinaus war das KON-21 aber auch noch in 100% der Zellkerne nachweisbar. Es konnte gezeigt werden, dass das Kon-21 Peptid zunächst in 5-20% der Zellen im Zytoplasma produziert wird und, da es eine NLS enthält, rasch in den Zellkern dieser Produzentenzellen transferiert wird (Beispiel 1 und Abbildung 3). Darüber hinaus wird das KON-21 an benachbarte, nicht transfizierte Zellen weitergegeben und in diesen Rezipienten-Zellen im Zellkern lokalisiert. Dieser interzelluläre Transfer des KON-21 folgt vermutlich keinem der oben beschriebenen konventionellen Protein-Export- oder Protein-Import-Wege, da dem KON-21 klassische Signalsequenzen für diese Prozesse fehlen. Der intrazelluläre Transfer in die Zellkerne wird vermutlicht über das Ran-GTP-Importin-alpha System (Goerlich D. *Transport into and out of the cell nucleus EMBO J. Vol.17: 2721-27 1998*) mit Hilfe der NLS des KON-21 bewerkstelligt.

Experimente mit Konstrukten, die für ein Fusionsprotein mit dem KON-21 Protein kodieren, zeigten, dass diese Fusionsproteine effizient exprimiert und interzellulär transferiert werden.

In Experimenten, in denen das KON-21 in Zellextrakten dem Kulturmedium von Zielzellen beigemischt wurde, wurde das KON-21 allein oder in Verbindung mit einem Fusionsprotein hoch effizient und sehr rasch in die Ziel-Zellen transferiert (Beispiel 2 und Abbildung 4). Dieser Aspekt ermöglicht des

weiteren den Transfer von nicht-peptidischen Stoffen, die nicht intrazellulär exprimiert werden können.

Diese oben genannten Aspekte erlauben die Verwendung dieser Transfervverbindungen in der Gentherapie von Erkrankungen wie Krebs, Allergie, Autoimmunerkrankungen usw. D.h. die Erfindung schließt auch Verfahren zur Behandlung aber auch zur Vorbeugung von Erkrankungen mit ein.

Das Kon21-DNA-Konstrukt wurde mit Hilfe von molekularbiologischen Standardtechniken hergestellt. Dazu wurde cDNA der Zelllinie HeLa S3 mittels PCR amplifiziert. Die Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Klonierung in einen Plasmidvektor, sowie die zur effizienten Translation der mRNA notwendigen Sequenzmotive wurden durch Verwendung von Desoxyoligonukleotid-primern eingeführt, die zusätzliche Nukleotidsequenzen an ihren 5'-Enden trugen (siehe Abbildung 1). Das Kon21-DNA-Konstrukt wurde zunächst in den Klonierungsvektor pBluescript SK der Firma Stratagene (La Jolla, CA, USA) kloniert. Nach Sequenzierung der Insert-DNA ergaben sich zwei Abweichungen zu der bereits publizierten DNA-Sequenz der Ki-67-cDNA (Schlüter et al. supra). Die Sequenzanalyse mehrerer unabhängiger Klone bestätigte die Richtigkeit der erhaltenen Sequenzen. Zur Expression wurde die Insert-DNA mittels der Restriktionsenzyme *HindIII* und *NotI* aus dem Klonierungsvektor geschnitten und in den eukaryotischen Expressionsvektor pCEP4 der Firma Invitrogen Corporation (Carlsbad, CA, USA) kloniert. Abbildung 1 zeigt die vollständige Nukleotidsequenz des DNA-Inserts und die davon kodierte Aminosäuresequenz des Expressionsprodukts. Abbildung 2 gibt schematisch die Struktur des Kon21-Expressionskonstruktes wieder.

Beispiele

Beispiel 1

Das Kon21-Protein wird nach Transfektion an alle Zellen einer Kultur weitergegeben.

CHO-Zellen wurden mit dem Konstrukt pCEP4-Kon21 transient transfiziert und zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Dazu wurden die mit den Zellen bewachsenen Objektträger in PBS / 10% FCS gespült, für ca. 6 Stunden luftgetrocknet und dann in Chloroform / Aceton fixiert. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper MIB-21, der spezifisch das KON-21-Protein erkennt. Die Bindung des Antikörpers MIB-21 wurde anschließend mittels eines Alexa488 konjugierten Goat-Anti-Maus-Antikörpers (Firma Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) nachgewiesen. Zur besseren Orientierung wurde die DNA der Zellen zusätzlich mit Propidiumjodid gegengefärbt. Zur Kontrolle der Färbung wurden außerdem CHO-Zellen mit dem Expressionsvektor pCEP4 transfiziert. Mikroskopische Aufnahmen von Zellen 6 Stunden (a-d), 10 Stunden (e-h) und 24 Stunden (i-l) nach Transfektion. Die Färbung erfolgte mit MIB-21 (a, e, i, c, g, k) sowie die Gegenfärbung mit Propidiumjodid (b, f, j, d, h, l). Die Zellen in der linken Bildhälfte wurden mit pCEP4-Kon21 (a, b, e, f, i, j) und die Zellen in der rechten Bildhälfte mit pCEP4 (c, d, g, h, k, l) transfiziert. Während nach 6 Stunden nur einige Kerne pCEP4-Kon21 transfizierter Zellen eine Anfärbung mit MIB-21 zeigen, nimmt die Färbung nach 10 Stunden zu, bis nach 24 Stunden alle Zellkerne mit MIB-21 angefärbt werden. Zellen, die zur Kontrolle mit pCEP4 transfiziert wurden zeigen dagegen über den gesamten Zeitraum nur eine sehr schwache unspezifische Hintergrundfärbung.

Beispiel 2

Nach Zugabe in das Kulturmedium wird das KON-21-Protein von allen Zellen einer Kultur aufgenommen.

Rund 500.000 CHO-Zellen wurden mit dem Konstrukt pCEP4-Kon21 transient transfiziert. Zur Kontrolle wurden ebenfalls 500.000 CHO-Zellen mit dem Expressionsvektor pCEP4 transfiziert. Nach 24 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen geerntet, sedimentiert und das Zellsediment bei -70°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde das Zellsediment in 500 µl eiskaltem Hochsalzpuffer (10 mM HEPES, pH 7,9, 400 mM NaCl, 0,1 mM EDTA, 0,5 mM DTT, 5% Glyzerin) resuspendiert und nach 5 Minuten Inkubation bei 0°C erneut sedimentiert. Der Überstand wurde zu CHO-Zellen in 15 ml Kulturmedium gegeben und die Zellen zu unterschiedlichen Zeitpunkten analysiert. Dazu wurden die mit den Zellen bewachsenen Objektträger in PBS / 10% FCS gespült, für ca. 6 Stunden luftgetrocknet und dann in Chloroform / Aceton fixiert. Es folgte eine Immunfluoreszenzfärbung mit dem monoklonalen Antikörper MIB-21, der spezifisch das KON-21-Protein erkennt. Die Bindung des Antikörpers MIB-21 wurde anschließend mittels eines Alexa488 konjugierten Goat-Anti-Maus-Antikörpers (Firma Molecular Probes Inc., Eugene, Oregon, USA) nachgewiesen. Zur besseren Orientierung wurde die DNA der Zellen zusätzlich mit Propidiumjodid gegengefärbt. Mikroskopische Aufnahmen von Zellen 5 Minuten (a-d) und 1 Stunde (e-h) nach Zugabe des Hochsalzlysates. Die Zellen in der linken Bildhälfte wurden mit MIB-21 gefärbt (a, c, e, g). Die rechte Bildhälfte zeigt dieselben Zellen in der Gegenfärbung mit Propidiumjodid (b, d, f, h). Die obere Bildhälfte zeigt Zellen nach 5 Minuten (a-d), die untere Bildhälfte Zellen nach 1 Stunde Inkubation mit dem Hochsalzlysate (e-h). Zellen nach Zugabe von Hochsalzlysate aus pCEP4-Kon21 transfizierten Zellen (a, b, e, f) bzw. Hochsalzlysate aus pCEP4 transfizierten Zellen (c, d, g, h). Nach Zugabe von Hochsalzlysate aus pCEP4-Kon21 transfizierten Zellen ist schon nach 5 Minuten eine schwache Anfärbung der Zellkerne mit MIB-21 zu erkennen. Nach einer Stunde zeigen

alle Zellkerne eine starke Anfärbung mit MIB-21. Zellen, die mit Hochsalzlysate aus pCEP4 transfizierten Zellen inkubiert wurden, zeigen dagegen nur eine sehr schwache unspezifische Hintergrundfärbung.

PATENTANSPRÜCHE

1. Verwendung eines carboxyterminalen Fragments des Ki-67 Proteins oder eines aktiven Teils, Fragments oder Homologs davon als eine Verbindung, die für den Transfer in Zellen und die Aufnahme durch und Abgabe aus Zellen geeignet ist.
2. Verwendung gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass das carboxyterminale Fragment die Aminosäuren 3037 bis 3256 der Sequenz des Ki-67 Proteins, wie es in Swiss Prot unter der Acc. Nr. P46013 dargestellt ist, oder homologe Sequenzen davon enthält.
3. Verwendung gemäß Anspruch 1, wobei das carboxyterminale Fragment, der aktive Teil, ein Fragment oder Homologe davon mit einer zweiten oder mehreren Komponente(n), deren Transfer in die Zielzelle gewünscht wird, verbunden ist.
4. Verwendung gemäß Anspruch 3, wobei die weitere(n) Komponente(n) Peptide oder Nicht-Peptide sind.
5. Verwendung gemäß einem der vorherigen Ansprüche 1 bis 4, wobei die Transferverbindung, assoziiert mit einer oder mehreren weiteren Verbindung(en), einer Zielpopulation an Zellen hinzugegeben wird und diese von der Zielpopulation aufgenommen wird.
6. Verwendung gemäß den Ansprüchen 1 bis 4, wobei die Transferverbindung, assoziiert mit einer oder mehreren weiteren Verbindung(en), aus einer Zelle, die diese Verbindung enthält und gegebenenfalls produziert, auf eine andere Zelle transferiert und von dieser aufgenommen wird.

7. Transferprotein, umfassend das carboxyterminale Ende des Ki-67 Proteins, den aktiven Teil, ein Fragment oder ein Homolog davon, in Verbindung mit einer oder mehreren weiteren Komponente(n), die transferiert werden soll(en).
8. Transferprotein gemäß Anspruch 7, wobei die weitere Komponente/weiteren Komponenten Peptide und nicht-Peptide umfasst.
9. Transferprotein gemäß Anspruch 7 oder 8, wobei das Transferprotein von einer ersten Zelle hergestellt wird und von einer anderen Zelle aufgenommen wird, die aber nicht selbst dieses Transferprotein produziert.
10. Transferprotein gemäß Anspruch 7 oder 8, wobei das Transferprotein rekombinant hergestellt wird.
11. Nukleinsäure oder Homologe davon, die das in den Ansprüchen 7 bis 9 genannte Transferprotein kodiert.
12. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 11, der die Expression eines Transferprotein gemäß einem der Ansprüche 7 bis 9 erlaubt.
13. Expressionsvektor gemäß Anspruch 12 mit dem eine erste Zelle transfiziert oder transformiert wird und dessen Produkt dann auf eine zweite/weiteren Zelle(n) übertragen wird.
14. Eu- oder prokaryotische Wirtszelle, enthaltend einen Vektor gemäß Anspruch 12 oder 13, eine Nukleinsäure gemäß Anspruch 11 und die das Transferprotein gemäß Ansprüche 7 bis 10 herstellt.

15. Verwendung des carboxyterminalen Endes des Ki-67 Proteins oder des Transferproteins gemäß den Ansprüchen 7 bis 10 als ein Träger für Wirkstoffe in pharmazeutischen Zusammensetzungen.
16. Pharmazeutische Zusammensetzung enthaltend das carboxyterminale Ende des Ki-67 Proteins gemäß den Ansprüchen 7 bis 10 als Träger und Transferpartner für andere pharmazeutisch wirksame Wirkstoffe.
17. Verwendung des carboxyterminalen Endes des Ki-67 Proteins gemäß Anspruch 7 bis 10 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung bei der Gentherapie.
18. Verfahren für den Transfer einer Verbindung auf eine Zellpopulation als Zielpopulation, umfassend die Schritte:
 - a) Einbringen des Expressionsvektors gemäß Anspruch 12 oder 13 in eine Wirtszelle,
 - b) Expression des durch den Vektor kodierten Transferproteins gemäß einem der Ansprüche 7 bis 10 in der Wirtszelle und ausscheiden desselben und
 - c) Übergang des Transferproteins auf eine andere Zellpopulation.
19. Verfahren gemäß Anspruch 18, wobei das Einbringen des Expressionsvektors in die Wirtszelle durch Transformation, Transfektion oder Mikroinjektion erfolgt.
20. Verfahren für den Transfer von Verbindungen in Zellen in vitro, wobei das Transferprotein in die Umgebung der Zielzelle gebracht wird.

21. Verfahren für den Transfer von Verbindungen in Zellen, umfassend die Schritte:
 - a) Rekombinante Expression des Transferproteins gemäß den Ansprüchen 7 bis 10 mit Hilfe eines Expressionsvektors gemäß den Ansprüchen 12 oder 13 und
 - b) Zusammengeben der Zielzellen und des in Schritt a.) hergestellten Transferproteins in vitro, so dass die Zielzellen dieses aufnehmen.
22. Verfahren zur Behandlung, Vorbeugung und Therapie von Krankheiten, wobei mittels Transferprotein gemäß den Ansprüchen 7 bis 10 oder mit Hilfe des Expressionsvektors gemäß den Ansprüchen 12 oder 13 assoziierte Verbindungen in Zellen eingebracht werden.
23. Verfahren gemäß Anspruch 22, wobei die Krankheiten Krebs, Allergie, Autoimmunerkrankungen, Entzündungen, rheumatische Erkrankungen sind.
24. Verwendung des Transferproteins gemäß den Ansprüchen 7 bis 10 oder des Expressionsvektors gemäß den Ansprüchen 12 oder 13 in der Gentherapie.

*Hind*III 10 20 30 *Bam*HI 40 50 60
AAGCTTGATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCAGCATTCCGGTACTGTTGGTAAAA

70 80 90 100 110 120
TGGCAAGAGGCAAATCATCCGAACCCGTGGTCATCATGAAGAGAAGTTTGAGGACTTCTG
M A R G K S S E P V V I M K R S L R T S

130 140 150 160 170 180
CAAAAAGAATTGAACCTGCGGAAGAGCTGAACAGCAACGACATGAAAACCAACAAAGAGG
A K R I E P A E E L N S N D M K T N K E

190 200 210 220 230 240
AACACAAATTACAAGACTCGGTCCCTGAAAATAAGGGAATATCCCTGCGCTCCAGACGCC
E H K L Q D S V P E N K G I S L R S R R

250 260 270 280 290 300
AAGATAAGACTGAGGCAGAACAGCAAATAACTGAGGTCTTTGTATTAGCAGAAAGAATAG
Q D K T E A E Q Q I T E V F V L A E R I

310 320 330 340 350 360
AAATAAACAGAAATGAAAAGAAGCCCATGAAGACCTCCCAGAGATGGACATTCAGAATC
E I N R N E K K P M K T S P E M D I Q N

370 380 390 400 410 420
CAGATGATGGAGCCCGGAAACCCATACCTAGAGACAAAGTCACTGAGAACAAAAGGTGCT
P D D G A R K P I P R D K V T E N K R C

430 440 450 460 470 480
TGAGGTCTGCTAGACAGAATGAGAGCTCCAGCCTAAGGTGGCAGAGGAGAGCGGAGGGC
L R S A R Q N E S S Q P K V A E E S G G

490 500 510 520 530 540
AGAAGAGTGCGAAGGTTCTCATGCAGAATCAGAAAGGGAAAGGAGAAGCAGGAAATTCAG
Q K S A K V L M Q N Q K G K G E A G N S

550 560 570 580 590 600
ACTCCATGTGCCTGAGATCAAGAAAGACAAAAAGCCAGCCTGCAGCAAGCACTTTGGAGA
D S M C L R S R K T K S Q P A A S T L E

610 620 630 640 650 660
GCAAATCTGTGCAGAGAGTAACGCGGAGTGTCAGAGGTGTGCAGAAAATCCAAAGAAGG
S K S V Q R V T R S V K R C A E N P K K

670 680 690 700 710 720
CTGAGGACAATGTGTGTGTCAAGAAAATAAGAACCAGAAGTCATAGGGACAGTGAAGATA
A E D N V C V K K I R T R S H R D S E D

*Not*I 733
TTTGAGCGGCCGC
I *

Fig. 1

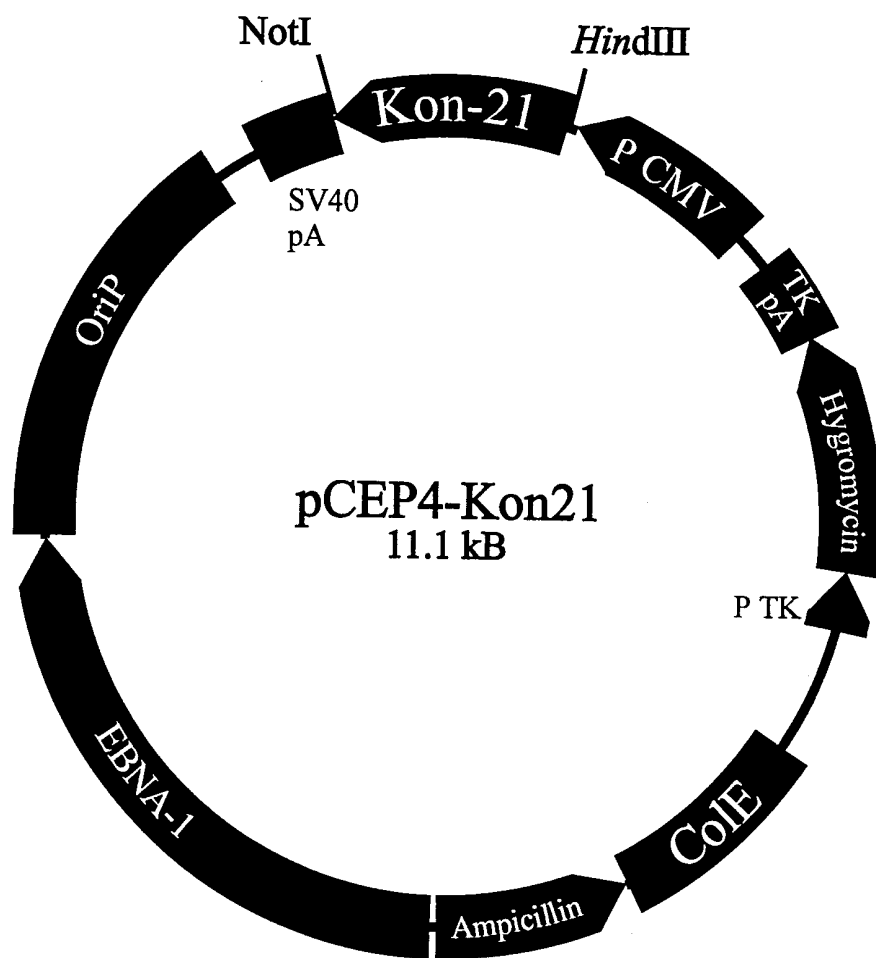


Abbildung 2 : Karte des verwendeten Vektors, pCEP4-Kon21

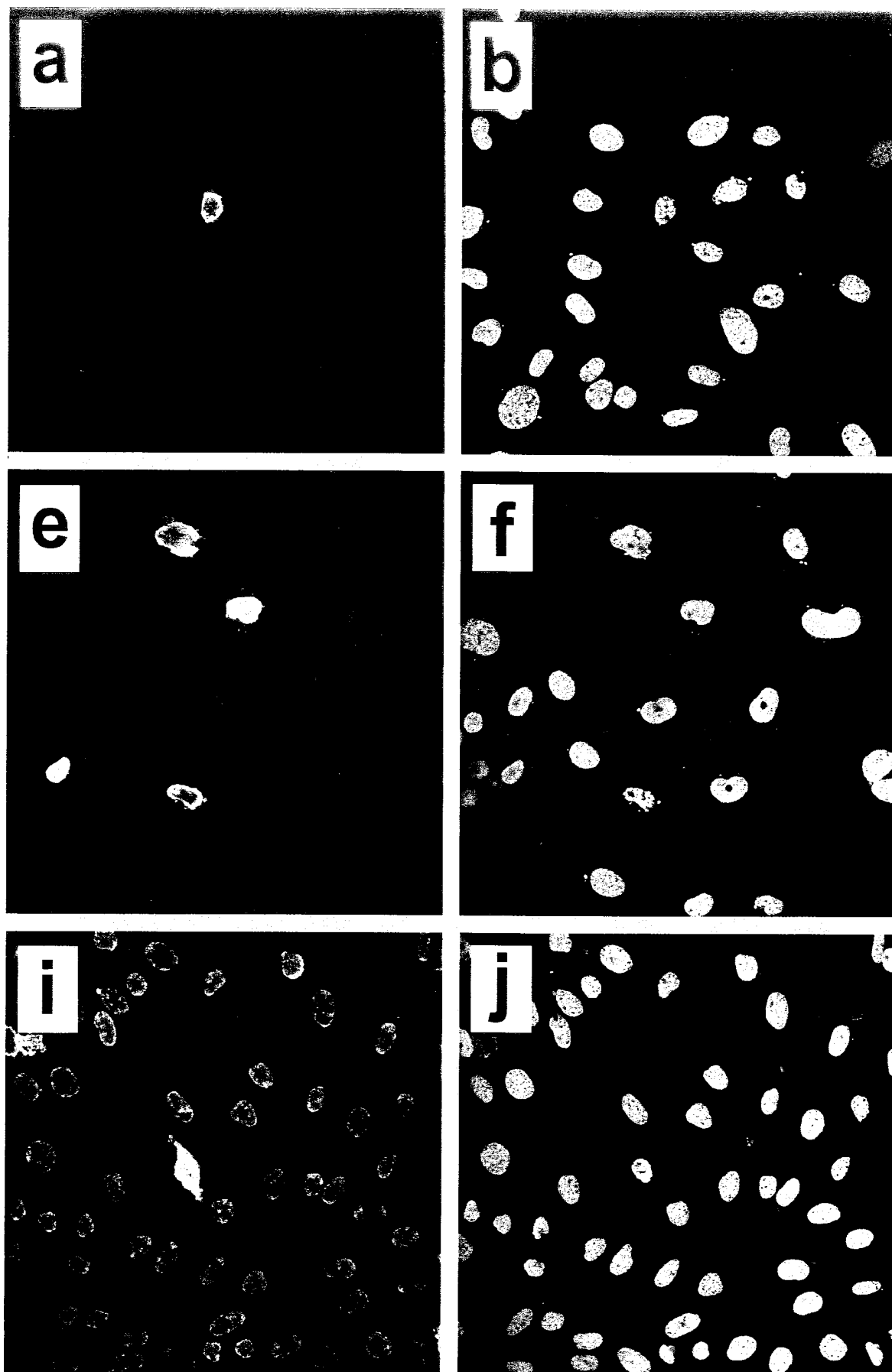


Fig. 3

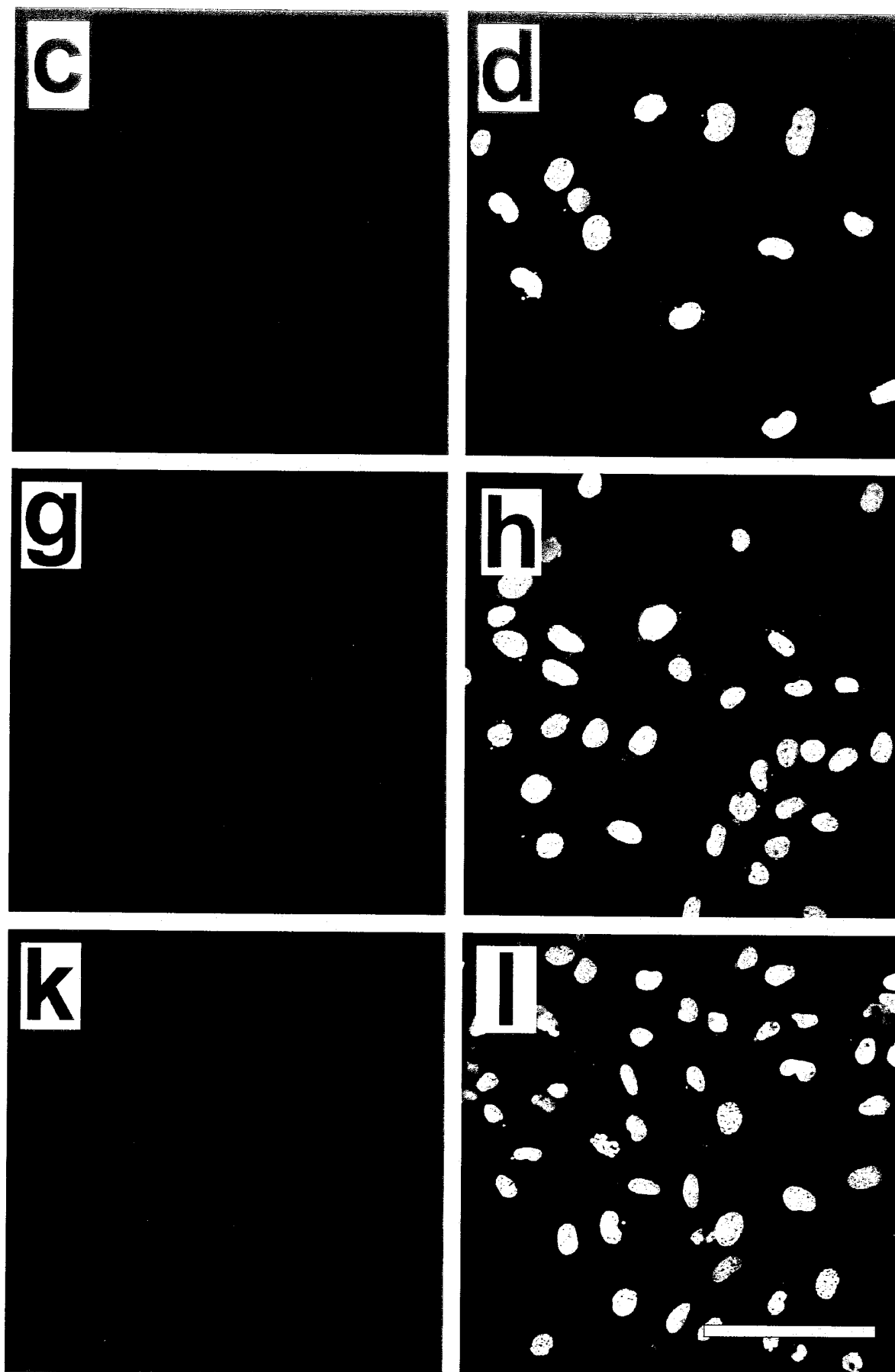


Fig. 3

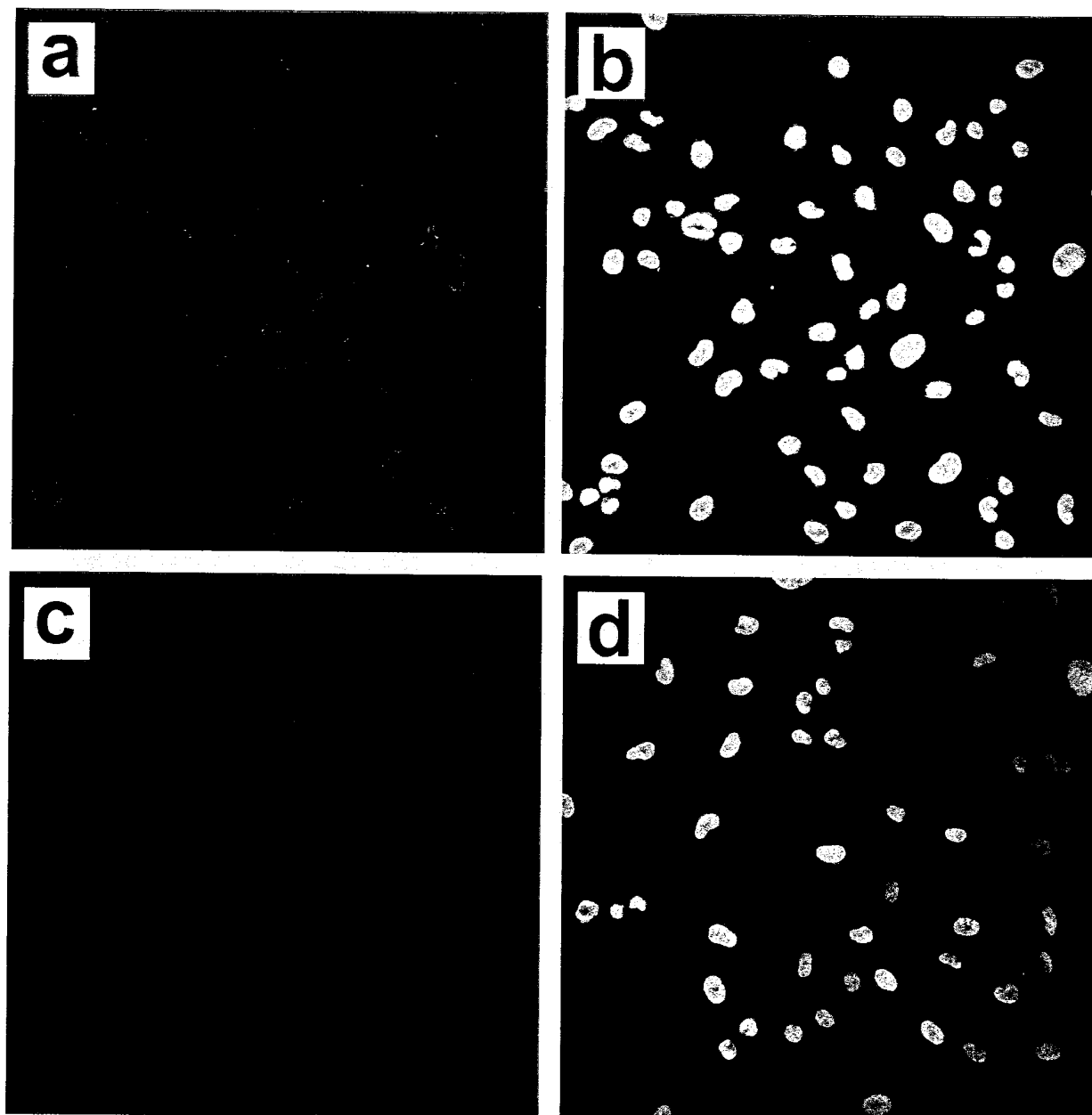


Fig. 4

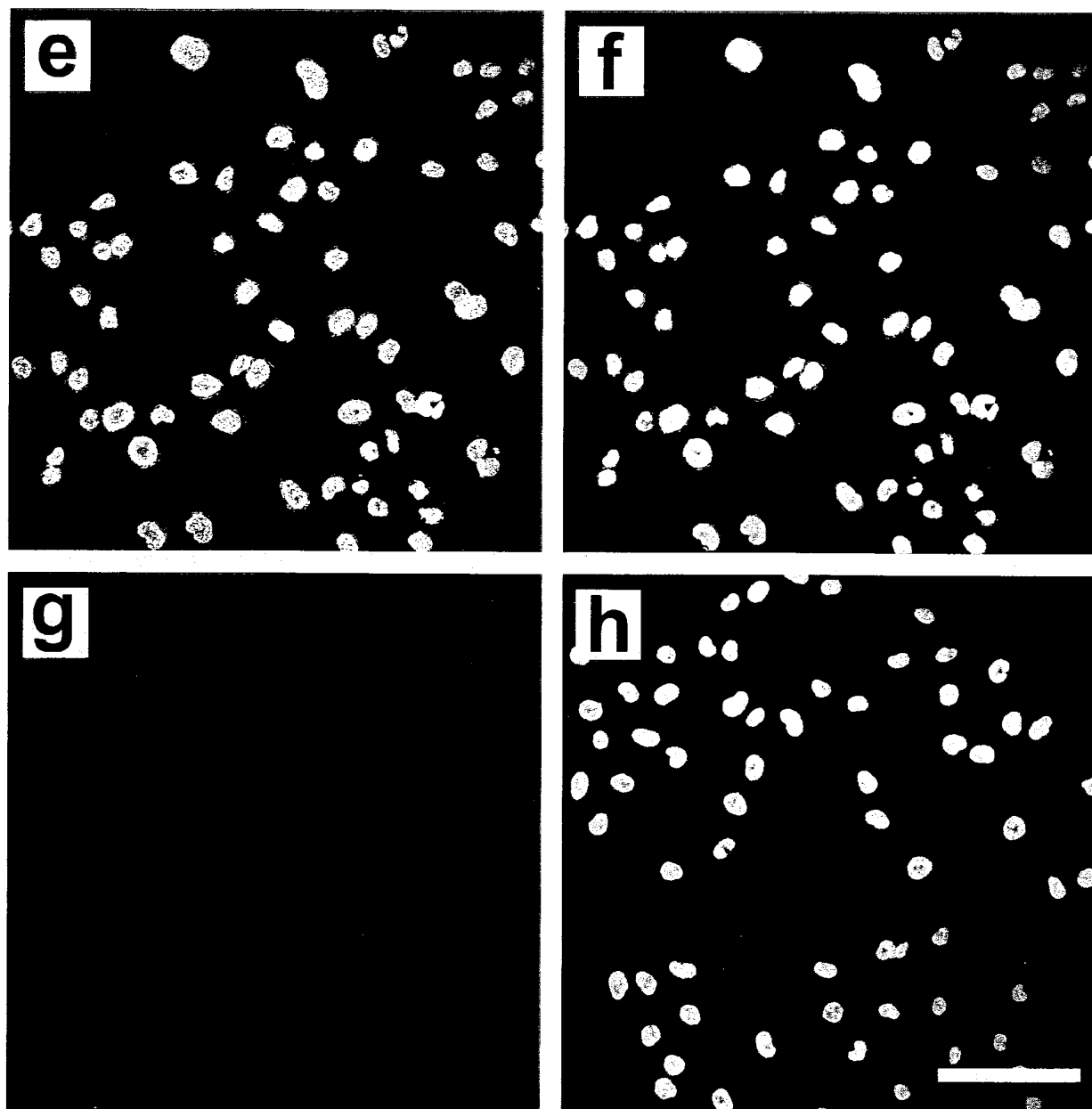


Fig. 4

1/1
SEQUENZPROTOKOLL

<110> Forschungszentrum Borstel

<120> Transferverbindungen, ihre Herstellung und ihre
Verwendung

<130> 84528m3

<140>

<141>

<150> DE199 55 576.1

<151> 1999-11-18

<160> 1

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 733

<212> DNA

<213> Künstliche Sequenz

<220>

<223> Beschreibung der künstlichen Sequenz:

Kon21-DNA-Insert, enthaltend einen Teilbereich der
für das Ki-67 Protein kodierenden Sequenz und
Restriktionsstellen

<400> 1

```
aagcttgata tcgaattcct gcagcccggt ggatccagca ttccggtact gttggtaaaa 60
tggcaagagg caaatcatcc gaaccctgtg tcatcatgaa gagaagtttg aggacttctg 120
caaaaagaat tgaacctgct gaagagctga acagcaacga catgaaaacc aacaaagagg 180
aacacaaatt acaagactcg gtccctgaaa ataagggaat atccctgcgc tccagacgcc 240
aagataagac tgaggcagaa cagcaaataa ctgaggtctt tgtattagca gaaagaatag 300
aaataaacag aatgaaaag aagcccatga agacctcccc agagatggac attcagaatc 360
cagatgatgg agcccggaac ccctaccta gagacaaagt cactgagaac aaaagggtgct 420
tgaggtctgc tagacagaat gagagctccc agcctaaggt ggcagaggag agcggagggc 480
agaagagtgc gaaggttctc atgcagaatc agaaagggaa aggagaagca ggaaattcag 540
actccatgtg cctgagatca agaaagacaa aaagccagcc tgcagcaagc actttggaga 600
gcaaactctg gcagagagta acgcggagtg tcaagaggtg tgcagaaaat ccaaagaagg 660
ctgaggacaa tgtgtgtgtc aagaaaataa gaaccagaag tcatagggac agtgaagata 720
tttgagcggc cgc
```

733

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11482

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/87 C12N5/10 C12N1/21
C07K14/47

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N C07K

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

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

WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>SCHOLZEN T ET AL: "Evidence for a role of the Ki-67 repeats in guiding the Ki-67 protein to the nucleoli and the perichromosomal layer." EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, vol. 75, no. SUPPL. 48, 1998, page 52 XP000992640 22nd Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft fuer Zellbiologie;Saarbruecken, Germany; March 15-19, 1998 ISSN: 0171-9335 Abstract no. 139; abstract</p> <p style="text-align: center;">--- -/--</p>	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

E earlier document but published on or after the international filing date

L document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

P document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

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

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

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

& document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

9 April 2001

Date of mailing of the international search report

04/05/2001

Name and mailing address of the ISA

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

Authorized officer

Hornig, H

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/11482

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>WO 97 05265 A (HARE PETER FRANCIS JOSEPH O ;ELLIOTT GILLIAN DAPHNE (GB)) 13 February 1997 (1997-02-13) cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>SHAYAN P ET AL: "The proliferation-associated nuclear protein Ki-67 in the bovine system: Partial characterisation and its application for determination of the proliferation of Theileria-infected bovine cells." PARASITOLOGY RESEARCH, vol. 85, no. 8-9, August 1999 (1999-08), pages 613-620, XP000992638 ISSN: 0932-0113 the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>DUCHROW MICHAEL ET AL: "Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: A new kind of cell cycle-maintaining proteins." ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS, vol. 43, no. 2, 1995, pages 117-121, XP000867383 ISSN: 0004-069X the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>SCHLUETER C ET AL: "THE CELL PROLIFERATION-ASSOCIATED ANTIGEN OF ANTIBODY KI-67: A VERY LARGE, UBIQUITOUS NUCLEAR PROTEIN WITH NUMEROUS REPEATED ELEMENTS, REPRESENTING A NEW KIND OF CELL CYCLE-MAINTAINING PROTEINS" JOURNAL OF CELL BIOLOGY, US, ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, US, vol. 123, no. 3, November 1993 (1993-11), pages 513-522, XP000867381 ISSN: 0021-9525 cited in the application the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	
A	<p>"PRODUCT CATALOG 1999" INVITROGEN , pages 1-236, XP002164868 Carlsbad, CA, US Voyager Vectors pVP22/myc-His; page 105 Episomal Mammalian Expression Vectors pCEP4; page 109</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Application No

PCT/EP 00/11482

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category °	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	<p>WO 99 61607 A (DEINERT IRINA ;BOEHLE ANDREAS (DE); GERDES JOHANNES (DE); FLAD HAN) 2 December 1999 (1999-12-02) the whole document</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Application No

PCT/EP 00/11482

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9705265 A	13-02-1997	AU 705563 B	27-05-1999
		AU 6623996 A	26-02-1997
		BR 9610058 A	27-07-1999
		CA 2227786 A	13-02-1997
		CN 1208438 A	17-02-1999
		EP 0845043 A	03-06-1998
		JP 11510386 T	14-09-1999
		US 6184038 B	06-02-2001
WO 9961607 A	02-12-1999	DE 19822954 A	25-11-1999
		AU 4363699 A	13-12-1999
		EP 1080192 A	07-03-2001

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11482

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C12N15/12 C12N15/62 C12N15/87 C12N5/10 C12N1/21
C07K14/47

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12N C07K

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

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

WPI Data, PAJ, STRAND, BIOSIS, EPO-Internal

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	SCHOLZEN T ET AL: "Evidence for a role of the Ki-67 repeats in guiding the Ki-67 protein to the nucleoli and the perichromosomal layer." EUROPEAN JOURNAL OF CELL BIOLOGY, Bd. 75, Nr. SUPPL. 48, 1998, Seite 52 XP000992640 22nd Annual Meeting of the Deutsche Gesellschaft fuer Zellbiologie;Saarbruecken, Germany; March 15-19, 1998 ISSN: 0171-9335 Abstract no. 139; Zusammenfassung ----- -/--	



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

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

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

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

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

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

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

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

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

Z Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

9. April 2001

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/05/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

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

Bevollmächtigter Bediensteter

Hornig, H

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>WO 97 05265 A (HARE PETER FRANCIS JOSEPH O ;ELLIOTT GILLIAN DAPHNE (GB)) 13. Februar 1997 (1997-02-13) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
A	<p>SHAYAN P ET AL: "The proliferation-associated nuclear protein Ki-67 in the bovine system: Partial characterisation and its application for determination of the proliferation of Theileria-infected bovine cells." PARASITOLOGY RESEARCH, Bd. 85, Nr. 8-9, August 1999 (1999-08), Seiten 613-620, XP000992638 ISSN: 0932-0113 das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
A	<p>DUCHROW MICHAEL ET AL: "Cell proliferation-associated nuclear antigen defined by antibody Ki-67: A new kind of cell cycle-maintaining proteins." ARCHIVUM IMMUNOLOGIAE ET THERAPIAE EXPERIMENTALIS, Bd. 43, Nr. 2, 1995, Seiten 117-121, XP000867383 ISSN: 0004-069X das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
A	<p>SCHLUETER C ET AL: "THE CELL PROLIFERATION-ASSOCIATED ANTIGEN OF ANTIBODY KI-67: A VERY LARGE, UBIQUITOUS NUCLEAR PROTEIN WITH NUMEROUS REPEATED ELEMENTS, REPRESENTING A NEW KIND OF CELL CYCLE-MAINTAINING PROTEINS" JOURNAL OF CELL BIOLOGY,US,ROCKEFELLER UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, US, Bd. 123, Nr. 3, November 1993 (1993-11), Seiten 513-522, XP000867381 ISSN: 0021-9525 in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument</p> <p>----</p>	
A	<p>"PRODUCT CATALOG 1999" INVITROGEN , Seiten 1-236, XP002164868 Carlsbad, CA, US Voyager Vectors pVP22/myc-His; Seite 105 Episomal Mammalian Expression Vectors pCEP4; Seite 109</p> <p>----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/11482

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	<p>WO 99 61607 A (DEINERT IRINA ;BOEHLE ANDREAS (DE); GERDES JOHANNES (DE); FLAD HAN) 2. Dezember 1999 (1999-12-02) das ganze Dokument</p> <p>-----</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 00/11482

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9705265 A	13-02-1997	AU 705563 B	27-05-1999
		AU 6623996 A	26-02-1997
		BR 9610058 A	27-07-1999
		CA 2227786 A	13-02-1997
		CN 1208438 A	17-02-1999
		EP 0845043 A	03-06-1998
		JP 11510386 T	14-09-1999
		US 6184038 B	06-02-2001
WO 9961607 A	02-12-1999	DE 19822954 A	25-11-1999
		AU 4363699 A	13-12-1999
		EP 1080192 A	07-03-2001