



**PCT** WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM  
Internationales Büro  
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE  
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

<p>(51) Internationale Patentklassifikation <sup>6</sup> : C12N 5/10, 15/86, C07K 14/015</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 96/12010</b>  (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 25. April 1996 (25.04.96)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE95/01429 (22) Internationales Anmeldedatum: 12. Oktober 1995 (12.10.95) (30) Prioritätsdaten: P 44 36 665.5 13. Oktober 1994 (13.10.94) DE P 44 36 664.7 13. Oktober 1994 (13.10.94) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V. [DE/DE]; Königinstrasse 19, D-80539 München (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖLSCHER, Christina [DE/DE]; Furtwänglerstrasse 43, D-69121 Heidelberg (DE). BÜRKLE, Alexander [DE/DE]; Hans-Thoma-Strasse 18, D-69181 Leimen (DE). KLEINSCHMIDT, Jürgen [DE/DE]; Weihwiesenweg 5, D-69245 Bammental (DE). HÖRER, Markus [DE/DE]; Dossenheimer Landstrasse 75, D-69121 Heidelberg (DE). ZUR HAUSEN, Harald [DE/DE]; Im Scheibling 6, D-69493 Hirschberg (DE). CHAMBON, Pierre [FR/FR]; Institut de Génétique et</p>	<p>de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Boîte postale 163, F-64004 Illkirch Cédex (FR). HEILBRONN, Regine [DE/DE]; Egenhofenstrasse 4b, D-82152 Planegg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Müller-Boré &amp; Partner, Grafinger Strasse 2, D-81671 München (DE). (81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  <b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: PREPARATION OF REP-NEGATIVE AAV MUTANTS AND CELLS WHICH CAN BE USED THEREFOR (54) Bezeichnung: BEREITSTELLUNG VON REP-NEGATIVEN AAV-MUTANTEN UND HIERFÜR VERWENDBARE ZELLEN (57) Abstract The invention concerns the preparation of rep-negative AAV mutants and cells which can be used therefor. The invention also concerns an expression plasmid used to prepare the cells. (57) Zusammenfassung Die Erfindung betrifft die Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten und hierfür verwendbare Zellen. Ferner betrifft die Erfindung ein zur Herstellung der Zellen verwendbares Expressionsplasmid.</p>		

**LEDIGLICH ZUR INFORMATION**

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

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

### **Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten und hierfür verwendbare Zellen**

Die Erfindung betrifft die Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten und hierfür verwendbare Zellen. Ferner betrifft die Erfindung ein zur Herstellung der Zellen verwendbares Expressionsplasmid.

Adeno-assoziierte Viren (AAVs) sind einzelsträngige, zur Familie der Parvoviren gehörende DNA-Viren. Zu ihrer Replikation benötigen AAVs Helferviren, insbesondere Adenoviren oder Herpesviren. In Abwesenheit von Helferviren integrieren AAVs in das Wirtszell-Genom, insbesondere an einer spezifischen Stelle von Chromosom 19 bzw. 17.

Auf dem 4,65-kb großen, linearen Genom von humanem AAV-Typ 2 wurden drei virale Funktionen lokalisiert. Die 145 bp langen "inverted repeats" dienen als Replikationsursprung und als cis Signale für Integration und Verpackung. Das cap Gen codiert für drei Strukturproteine und das rep Gen für eine Familie multifunktionaler Regulatorproteine. Die mRNAs für Rep 78 und seine C-terminal gespleißte Version Rep 68 starten am p5 Promotor. Zwei N-terminal verkürzte Versionen von Rep 78 und Rep 68, nämlich Rep 52 bzw. Rep 40, werden unter der Kontrolle des p19 Promotors exprimiert. Rep Proteine sind für die DNA-Replikation von AAV notwendig. Ferner werden sie für die Genregulation von AAV benötigt.

AAVs unterdrücken die Tumorentwicklung in Tieren. Ferner unterdrücken sie die durch Onkogene bedingte Zelltransformation wie auch die induzierte DNA-Amplifikation. Desweiteren haben AAVs eine antiproliferative Wirksamkeit.

Rep-Proteine von AAV werden für vorstehende Aktivitäten verantwortlich gemacht. Eine Zuordnung dieser Aktivitäten zu den einzelnen Rep-Proteinen bzw. Domänen davon existiert jedoch nicht. Eine solche wäre aber notwendig, um AAVs therapeutisch einsetzen zu können. Eine Möglichkeit, diese Zuordnung zu erreichen, liegt in der Untersuchung von AAVs, die Mutationen in den Rep-Proteinen aufweisen. Viele Versuche wurden diesbezüglich durchgeführt. Bisher ist es allerdings nicht gelungen, rep-negative AAV-Mutanten bereitzustellen, die frei von Wildtyp-AAV sind. Solche sind aber für vorstehende Untersuchungen unerlässlich.

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem rep-negative AAV-Mutanten ohne vorstehende Nachteile erhalten werden können.

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

Gegenstand der Erfindung sind somit Zellen, welche die AAV-Rep-Proteine 78 und 52 sowie 40 und/oder 68 stabil exprimieren. Bevorzugt werden Zellen, welche die Rep-Proteine 78, 52 und 40 exprimieren.

Erfindungsgemäße Zellen können in üblicher Weise hergestellt werden. Günstigerweise werden Zellen der bekannten Linie HeM1 als Ausgangsmaterial verwendet (vgl. "5th Parvovirus Workshop", Crystal River, Florida, USA, Nov. 10-14, 1993). Diese Zellen exprimieren die AAV-Rep-Proteine 78 und 52, wobei die Rep 78-Expression unter der Kontrolle von Dexamethason-induzierbarem MMTV-LTR steht. Zellen von HeM1 werden mit einem für Rep 40 codierenden Expressionsplasmid und/oder einem für Rep 68 codierenden bzw. einem Expressionsplasmid transfiziert, das für beide Rep-Proteine codiert. Vorzugsweise wird ein Expressionsplasmid für Rep 40 verwendet, wobei das Expressionsplasmid pCMRep 40 ganz besonders bevorzugt ist. In diesem liegt die für Rep 40 codierende DNA zwischen den Schnittstellen NotI und XbaI des bekannten Vektors pKEX-2-XL vor (vgl. Rittner, K.H. et al., Methods Mol. Cell. Biol. 2 (1991), 176-181). pCMRep 40

wurde bei der DSM (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) unter DSM 9491 am 7. Okt. 1994 und DSM 9488 am 10. Okt. 1994 hinterlegt. Es stellt auch einen Gegenstand der Erfindung dar.

Die durch Transfektion von pCMRep 40 erhaltenen Zellen exprimieren stabil die AAV-Rep-Proteine Rep 78, Rep 52 und Rep 40. Diese Zellen wurden als Zelllinie He 10-1, He 22-2 und He 5-5 bei der DSM unter DSM ACC2193, DSM ACC2192 bzw. DSM ACC2191 am 28. Sept. 1994 hinterlegt. Ferner wurden die Zellen als Zelllinie HeCM1g bei der DSM unter DSM ACC2185 am 30. August 1994 hinterlegt. Vorstehende Zellen stellen ebenso einen Gegenstand der Erfindung dar.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten. Ein solches Verfahren umfaßt die folgenden Verfahrensschritte:

- (a) Transfektion erfindungsgemäßer Zellen mit der DNA einer rep-negativen AAV-Mutante,
- (b) Behandlung der transfizierten Zellen von (a) mit einem eine AAV-Replikation ermöglichenden Mittel, insbesondere einem AAV-Helfervirus, und
- (c) Isolierung der in (b) erhaltenen rep-negativen AAV-Mutanten.

In bevorzugter Ausführungsform erfolgt in Verfahrensschritt (a) eine Cotransfektion mit einem für einen Glukokortikoid-Rezeptor codierenden Expressionsplasmid. Ein solches ist dem Fachmann bekannt. Beispielsweise kennt er das Expressionsplasmid HGO (vgl. Kumar, V., et al., Cell 51 (1987), 941-951).

Ferner impliziert der Verfahrensschritt (a) die Infektion erfindungsgemäßer Zellen mit einer rep-negativen AAV-Mutante. Desweiteren kennt der Fachmann sämtliche zur Durchführung vorstehender Verfahrensschritte notwendigen Techniken. Ergänzend wird auf Maniatis et al., Molecular Cloning: A laboratory manual (1982), Cold Spring Harbor, New York, verwiesen.

Der Ausdruck "DNA einer rep-negativen AAV-Mutante" umfaßt ein, gegebenenfalls in einem Vektor vorliegendes, AAV-Genom, das Mutationen im rep-Gen hat. Solche Mutationen können insbesondere Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen von ein oder mehreren Nukleotiden sein. Auch kann die AAV-DNA eine Deletion des gesamten für Rep codierenden Bereichs aufweisen. Desweiteren kann die Rep codierende DNA teilweise oder ganz durch eine für ein Fremdprotein (-peptid) codierende DNA bzw. durch eine für eine "antisense"-RNA kodierende DNA ersetzt sein. Vorzugsweise eignet sich das Fremdprotein(-peptid) bzw. die "antisense"-RNA für gentherapeutische Maßnahmen. Der Ausdruck "rep-negative AAV-Mutante" impliziert somit auch den Begriff "rep-negativer AAV-Vektor".

Desweiteren umfaßt der Ausdruck "DNA einer rep-negativen AAV-Mutante" auch eine DNA, die neben den vorstehend angegebenen Mutationen weitere Mutationen in anderen Bereichen der AAV-DNA aufweist. Dies können z.B. Mutationen im cap-Gen sein. Für einen solchen Fall ist es gefordert, daß ein exprimierbares AAV-cap-Gen in den erfindungsgemäßen Zellen vorliegt. Dies kann durch das die AAV-Replikation ermöglichende Mittel, z.B. dem AAV-Helfervirus, eingebracht sein. Dem Fachmann sind Verfahren bekannt, ein AAV-cap Gen, z.B. in ein AAV-Helfervirus zu inserieren.

Der Ausdruck "AAV-Helfervirus" umfaßt Viren, die eine Replikation von AAVs ermöglichen. Dies sind insbesondere Adenoviren, wie Adenovirus-2, und Herpesviren.

Mit der vorliegenden Erfindung ist es möglich, rep-negative AAV-Mutanten bereitzustellen. Diese sind frei von Wildtyp-AAV, da Rekombinationsereignisse, wie sie bei transienter Expression von Rep-Proteinen in Zellen eintreten, vermieden werden. Die vorliegende Erfindung stellt somit die Basis dar, die den Rep-Proteinen zugeschriebenen Aktivitäten auf einzelne Rep-Proteine bzw. Domänen davon zu beschränken. Damit ist die Möglichkeit gegeben, den Wirkungsmechanismus von AAV als tumorsuppressives Prinzip eingehend zu untersuchen, was für den Einsatz von AAV in der Tumorthherapie unabdingbar ist. Desweiteren eröffnet die vor-

Rahmen der Gentherapie als virale Vektoren eingesetzt werden können. Erfindungsgemäße rep-negative AAV-Mutanten können hierfür verwendbare Gene bzw. Genabschnitte tragen. Diese können insbesondere in dem rep-Gen und/oder cap-Gen liegen. Die vorliegende Erfindung stellt somit einen Durchbruch auf dem Gebiet der Herstellung von für Gentherapien verwendbaren Vektoren dar.

Kurze Beschreibung der Zeichnung:

Fig. 1 zeigt eine schematische Darstellung der Rep-codierenden DNA im Expressionsplasmid pCMRep40. Das Start-ATG-Triplett und das Terminationscodon TGA sind angegeben, sie entsprechen denen des Wildtyp-AAV-Genoms. Durch gerichtete Mutagenese ist das Intron (Position: 1907-2227) entfernt, wodurch Rep 40 ohne Spleißen exprimiert werden kann.

Die Erfindung wird durch die Beispiele erläutert.

**Beispiel 1: Bereitstellung einer AAV-Rep-Mutante unter Verwendung der Zelllinie He10-1**

He10-1-Zellen werden mit der DNA der bekannten AAV-Rep-Mutante pTAV 2-3 transfiziert. pTAV2-3 weist eine "frameshift"-Mutation an der Position 1045 auf, wodurch alle vier Rep-Proteine inaktiviert sind (vgl. Heilbronn, R., et al., J.Virol. 64 (1990), 3012-3018). Die Zellen werden mit Adenovirus-2 (MOI = 10-20) infiziert. Danach werden sie mit  $10^{-6}$  M Dexamethason induziert.

Nach ca. 30 h werden ein Teil der Zellen geerntet und die Gesamtzell-DNA isoliert. Diese wird mit den Restriktionsenzymen XbaI bzw. DpnI gespalten und in einem Southern-Blot analysiert. Hierzu wird  $^{32}\text{P}$ -markierte AAV-DNA als Hybridisierungsprobe verwendet. Das Restriktionsenzym XbaI schneidet AAV-DNA nicht, ebenso spaltet das Restriktionsenzym DpnI keine in Eukaryoten replizierte DNA. Es wird replizierte pTAV2-3-DNA erhalten.

Desweiteren wird der Überstand der nicht geernteten Zellen abwechselnd eingefroren und aufgetaut sowie einer Ultraschallbehandlung unterzogen. Der Überstand wird auf He10-1-Zellen titriert. Der Nachweis infektiöser AAVs wird durch Hybridisierung mit einer  $^{32}\text{P}$ -markierten Sonde verfolgt, die für rep-negative AAVs spezifisch ist. Es werden infektiöse rep-negative AAV-Partikel nachgewiesen.

Vorstehendes Beispiel zeigt, daß mit erfindungsgemäßen Zellen rep-negative AAV-Mutanten bereitgestellt werden können.

**Beispiel 2: Bereitstellung einer rep-negativen AAV-Mutante unter Verwendung der Zelllinie HeCM1g**

HeCM1g-Zellen werden mit der vorstehenden AAV-Rep-Mutante pTAV 2-3 und dem Expressionsplasmid HGO kotransfiziert. Die Zellen werden mit Adenovirus-2 (MOI = 10-20) infiziert. Danach werden sie mit  $10^{-6}$  ( $10^{-7}$ ) M Dexamethason induziert.

Die Zellen werden bis zum vollständigen, durch Adenovirus ausgelösten zytopathischen Effekt (ca. 48 h) inkubiert und anschließend durch Frier-Tau-Lyse und Ultraschallbehandlung in einem hypotonen Puffer geerntet. Die Zellfragmente werden abzentrifugiert, die AAV-Partikel befinden sich im Überstand. Diese zeigen sich auch als infektiös.

Vorstehendes Beispiel unterstreicht, daß mit erfindungsgemäßen Zellen rep-negative AAV-Mutanten bereitgestellt werden können.

### Patentansprüche

1. Zellen, stabil exprimierend die AAV-Rep-Proteine 78 und 52 sowie 40 und/oder 68.
2. Zellen nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie die AAV-Rep-Proteine Rep 78,52 und 40 stabil exprimieren.
3. Zellen nach Anspruch 2, nämlich die Zelllinien He 10-1 (DSM ACC2193), He 22-2 (DSM ACC2192), He 5-5 (DSM ACC2191) und HeCM1g (DSM ACC2185).
4. Expressionsplasmid, nämlich pCMRep 40 (DSM 9491; DSM 9488).
5. Verfahren zur Bereitstellung von rep-negativen AAV-Mutanten, umfassend die folgenden Verfahrensschritte:
  - (a) Transfektion der Zellen nach einem der Ansprüche 1-3 mit der DNA einer rep-negativen AAV-Mutante,
  - (b) Behandlung der transfizierten Zellen von (a) mit einem eine AAV-Replikation ermöglichenden Mittel, insbesondere einem AAV-Helfervirus, und
  - (c) Isolierung der in (b) erhaltenen rep-negativen AAV-Mutanten.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß im Verfahrensschritt (a) eine Kotransfektion mit einem für einen Glukokortikoidrezeptor codierenden Expressionsplasmid erfolgt.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA der rep-negativen AAV-Mutante von Verfahrensschritt (a) ein oder mehrere Deletionen, Insertionen und/oder Substitutionen im rep Gen aufweist.

8. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA der rep-negativen AAV-Mutante von Verfahrensschritt (a) das rep Gen deletiert ist.
9. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß in der DNA der rep-negativen AAV-Mutante von Verfahrensschritt (a) das rep Gen zumindest teilweise durch ein Fremd-Gen ersetzt ist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-9, dadurch gekennzeichnet, daß das AAV-Helfervirus ein Adenovirus oder Herpesvirus ist.
11. Verfahren nach einem der Ansprüche 5-10, dadurch gekennzeichnet, daß die DNA der rep-negativen AAV-Mutante von Verfahrensschritt (a) eine weitere Mutation im cap-Gen aufweist, mit der Maßgabe, daß das die AAV-Replikation ermöglichende Mittel, insbesondere der AAV-Helfervirus, ein exprimierbares cap-Gen enthält.
12. rep-negative AAV-Mutante, erhalten durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 5-11.

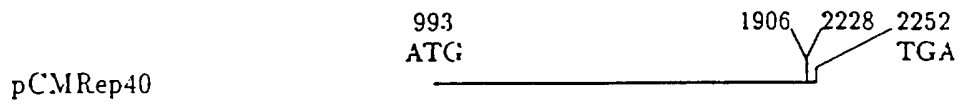


FIG. 1 Schematische Darstellung der Rep-codierenden DNA im Expressionsplasmid pCMRep40

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC1/DE 95/01429

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 6 C12N5/10 C12N15/86 C07K14/015		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 6 C12N 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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,92 01070 (US ARMY) 23 January 1992 see the whole document ---	12
X	J. VIROLOGY, vol. 62, no. 6, June 1988 AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, pages 1963-1973, S.K. MCLAUGHLIN ET AL. 'Adeno-associated virus general transduction vector: Analysis of proviral structures' see the whole document --- -/--	12
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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  28 February 1996		Date of mailing of the international search report  29.02.96
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+ 31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+ 31-70) 340-3016		Authorized officer  Hornig, H

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PC1/DE 95/01429

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>VIROLOGY, vol. 204, no. 1, October 1994 ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, pages 304-311, B.J. THOMSON ET AL. 'Human herpesvirus 6 HHV-6) is a helper for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression' see the whole document ---</p>	1,2,5, 7-12
X	<p>VACCINES 90, MODERN APPROACHES TO NEW VACCINES, vol. 90, 1990 CSH LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, pages 353-359, K.A. VINCENT ET AL. 'Replication and packaging of HIV envelope genes in a novel adeno-associated virus vector system' see the whole document ---</p>	1,2,5, 7-12
A	<p>DNA, vol. 8, no. 2, March 1989 MARY ANN LIEBERT, INC., PUBLISHERS, NEW YORK, US, pages 127-133, M.S.H. KO AND T. TAKANO 'A highly inducible system of gene expression by positive feedback production of glucocorticoid receptors' see the whole document ---</p>	6
A	<p>J GEN VIROL 73 (11). 1992. 2977-2981. CODEN: JGVIAI ISSN: 0022-1317, November 1992 RITTNER K ET AL 'ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2-MEDIATED INHIBITION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 HIV-1 REPLICATION INVOLVEMENT OF P78REP/P68REP AND THE HIV-1 LONG TERMINAL REPEAT.' see the whole document ---</p>	1-12
A	<p>J. VIROLOGY, vol. 65, no. 1, January 1991 AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, pages 396-404, B.A. ANTONI ET AL. 'Adeno-associated virus rep protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in human cells' see the whole document ---</p>	1-12
4	<p>---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 95/01429

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	<p>WO,A,95 13365 (TARGETED GENETICS CORP ;UNIV JOHNS HOPKINS (US); FLOTTE TERENCE R) 18 May 1995 see page 7, line 14 - page 15, line 16 see page 15, line 19 - page 18, line 5 see page 21, line 13 - page 23, line 15 see page 24, line 20 - line 25; claims 1-15</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,5, 7-12
P,X	<p>WO,A,95 13392 (MEDICAL COLLEGE OF OHIO) 18 May 1995 see page 7, line 19 - page 10, line 26</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,5, 7-12
P,X	<p>WO,A,95 14771 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES) 1 June 1995 see page 1, line 1 - page 7, line 8</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,2,5, 7-12
P,X	<p>JOURNAL OF VIROLOGY 68 (11). 1994. 7169-7177. ISSN: 0022-538X, November 1994 HOELSCHER C ET AL 'Cell lines inducibly expression the adeno-associated virus ( AAV ) rep gene: Requirements for productive replication of rep-negative AAV mutants.' see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-5,7-12
P,X	<p>VIROLOGY 206 (1). 1995. 254-262. ISSN: 0042-6822, 10 January 1995 KLEINSCHMIDT J A ET AL 'Sequence elements of the adeno-associated virus rep gene required for suppression of herpes-simplex-virus induced DNA amplification.' see the whole document</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1,12
T	<p>JOURNAL OF VIROLOGY 69 (11). 1995. 6880-6885. ISSN: 0022-538X, November 1995 HOELSCHER C ET AL 'High-level expression of adeno-associated virus (AAV) Rep78 or Rep68 protein is sufficient for infectious-particle formation by a rep -negative AAV mutant.' see the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 95/01429

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9201070	23-01-92	AU-B- 8200191	04-02-92
WO-A-9513365	18-05-95	AU-B- 1129395	29-05-95
WO-A-9513392	18-05-95	AU-B- 8130994	29-05-95
WO-A-9514771	01-06-95	NONE	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 95/01429

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES  
IPK 6 C12N5/10 C12N15/86 C07K14/015

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
IPK 6 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)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO,A,92 01070 (US ARMY) 23.Januar 1992 siehe das ganze Dokument ---	12
X	J. VIROLOGY, Bd. 62, Nr. 6, Juni 1988 AM.SOC.MICROBIOL.,WASHINGTON,US, Seiten 1963-1973, S.K. MCLAUGHLIN ET AL. 'Adeno-associated virus general transduction vector: Analysis of proviral structures' siehe das ganze Dokument --- -/--	12

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
- '&' Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche  28. Februar 1996	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts  29.02.96
Name und Postanschrift der Internationale 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

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/DE 95/01429

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	VIROLOGY, Bd. 204, Nr. 1, Oktober 1994 ACADEMIC PRESS, INC., NEW YORK, US, Seiten 304-311, B.J. THOMSON ET AL. 'Human herpesvirus 6 HHV-6) is a helper for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression' siehe das ganze Dokument ---	1,2,5, 7-12
X	VACCINES 90, MODERN APPROACHES TO NEW VACCINES, Bd. 90, 1990 CSH LABORATORY PRESS, NEW YORK, US, Seiten 353-359, K.A. VINCENT ET AL. 'Replication and packaging of HIV envelope genes in a novel adeno-associated virus vector system' siehe das ganze Dokument ---	1,2,5, 7-12
A	DNA, Bd. 8, Nr. 2, März 1989 MARY ANN LIEBERT, INC., PUBLISHERS, NEW YORK, US, Seiten 127-133, M.S.H. KO AND T. TAKANO 'A highly inducible system of gene expression by positive feedback production of glucocorticoid receptors' siehe das ganze Dokument ---	6
A	J GEN VIROL 73 (11). 1992. 2977-2981. CODEN: JGVIAI ISSN: 0022-1317, November 1992 RITTNER K ET AL 'ADENO-ASSOCIATED VIRUS TYPE 2-MEDIATED INHIBITION OF HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS TYPE 1 HIV-1 REPLICATION INVOLVEMENT OF P78REP/P68REP AND THE HIV-1 LONG TERMINAL REPEAT.' siehe das ganze Dokument ---	1-12
A	J. VIROLOGY, Bd. 65, Nr. 1, Januar 1991 AM.SOC.MICROBIOL., WASHINGTON, US, Seiten 396-404, B.A. ANTONI ET AL. 'Adeno-associated virus rep protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 production in human cells' siehe das ganze Dokument ---	1-12
4	--- -/--	

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,X	WO,A,95 13365 (TARGETED GENETICS CORP ;UNIV JOHNS HOPKINS (US); FLOTTE TERENCE R) 18.Mai 1995 siehe Seite 7, Zeile 14 - Seite 15, Zeile 16 siehe Seite 15, Zeile 19 - Seite 18, Zeile 5 siehe Seite 21, Zeile 13 - Seite 23, Zeile 15 siehe Seite 24, Zeile 20 - Zeile 25; Ansprüche 1-15 ---	1,2,5, 7-12
P,X	WO,A,95 13392 (MEDICAL COLLEGE OF OHIO) 18.Mai 1995 siehe Seite 7, Zeile 19 - Seite 10, Zeile 26 ---	1,2,5, 7-12
P,X	WO,A,95 14771 (GOVERNMENT OF THE UNITED STATES) 1.Juni 1995 siehe Seite 1, Zeile 1 - Seite 7, Zeile 8 ---	1,2,5, 7-12
P,X	JOURNAL OF VIROLOGY 68 (11). 1994. 7169-7177. ISSN: 0022-538X, November 1994 HOELSCHER C ET AL 'Cell lines inducibly expression the adeno-associated virus ( AAV ) rep gene: Requirements for productive replication of rep-negative AAV mutants.' siehe das ganze Dokument ---	1-5,7-12
P,X	VIROLOGY 206 (1). 1995. 254-262. ISSN: 0042-6822, 10.Januar 1995 KLEINSCHMIDT J A ET AL 'Sequence elements of the adeno-associated virus rep gene required for suppression of herpes-simplex-virus induced DNA amplification.' siehe das ganze Dokument ---	1,12
T	JOURNAL OF VIROLOGY 69 (11). 1995. 6880-6885. ISSN: 0022-538X, November 1995 HOELSCHER C ET AL 'High-level expression of adeno-associated virus (AAV) Rep78 or Rep68 protein is sufficient for infectious-particle formation by a rep -negative AAV mutant.' siehe das ganze Dokument -----	1-12

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 95/01429

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9201070	23-01-92	AU-B- 8200191	04-02-92
WO-A-9513365	18-05-95	AU-B- 1129395	29-05-95
WO-A-9513392	18-05-95	AU-B- 8130994	29-05-95
WO-A-9514771	01-06-95	KEINE	