

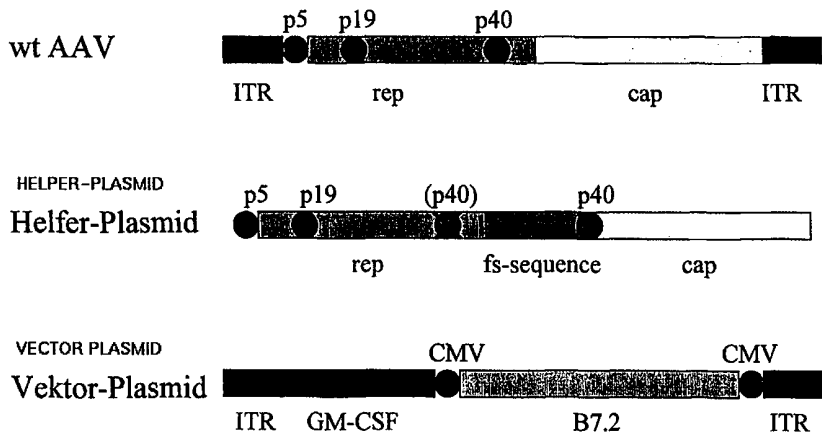
<p>(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup> : <b>C12N 15/864, 5/10, 15/19, A61K 48/00</b></p>	<b>A1</b>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: <b>WO 00/47757</b></p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 17. August 2000 (17.08.00)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/01090</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 10. Februar 2000 (10.02.00)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 199 05 501.7      10. Februar 1999 (10.02.99)      DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): MEDI-GENE AG [DE/DE]; Lochhamer Strasse 11, D-82152 Planegg (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): HÖRER, Markus [DE/DE]; Röntgenstr. 15, D-82152 Planegg/Martinsried (DE). HALLEK, Michael [DE/DE]; Brunnenstrasse 40, D-89638 Schondorf (DE).</p> <p>(74) Anwalt: BÖSL, Raphael; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Galileiplatz 1, D-81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p><b>Veröffentlicht</b> <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	

(54) Title: METHOD OF PRODUCING A RECOMBINANT ADENO-ASSOCIATED VIRUS, SUITABLE MEANS FOR PRODUCING THE SAME AND USE THEREOF FOR PRODUCING A MEDICAMENT

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG EINES REKOMBINANTEN ADENO-ASSOZIIERTEN VIRUS, GEEIGNETE MITTEL HIERZU SOWIE VERWENDUNG ZUR HERSTELLUNG EINES ARZNEIMITTELS

(57) Abstract

The invention relates to a method of producing a recombinant adeno-associated virus (rAAV). According to the inventive method, a helper construct and a vector construct are introduced into a suitable cell at different times. The helper construct contains no nucleic acid sequences, especially except for the AAV promoters, to which at least one rep protein can substantially specifically bind. The vector construct preferably contains ITR sequences in flop orientation. The recombinant adeno-associated viruses produced according to the inventive method are especially useful for producing a tumor cell into which additionally nucleic acids encoding GM-CSF and B7.2 were introduced. Said tumor cell can in turn be used in the form of a medicament for the treatment of cancer.



Said tumor cell can in turn be used in the form of a medicament for the treatment of cancer.

### (57) Zusammenfassung

Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (rAAV), wobei in eine geeignete Zelle zeitlich versetzt ein Helferkonstrukt sowie ein Vektorkonstrukt eingebracht wird, wobei vorzugsweise das Helferkonstrukt, insbesondere mit Ausnahme der AAV-Promotoren, keine Nukleinsäuresequenzen enthält, an die mindestens ein Rep-Protein im wesentlichen spezifisch binden kann, sowie vorzugsweise das Vektorkonstrukt ITR-Sequenzen in Flop-Orientierung enthält. Die gemäss dem erfindungsgemässen Verfahren hergestellten rekombinanten Adeno-assoziierten Viren eignen sich insbesondere zur Herstellung einer Tumorzelle, in die zusätzlich Nukleinsäuren kodierend für GM-CSF und B7.2 eingebracht wurden, welche wiederum in Form eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen verwendet werden kann.

### LEDIGLICH ZUR INFORMATION

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

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

5

**Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus, geeignete Mittel hierzu sowie Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels**

10 Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (rAAV), wobei in eine geeignete Zelle zeitlich versetzt ein Helferkonstrukt sowie ein Vektorkonstrukt eingebracht wird, wobei vorzugsweise das Helferkonstrukt, insbesondere mit Ausnahme der AAV-Promotoren, keine Nukleinsäuresequenzen enthält, an die mindestens ein Rep-

15 Protein im wesentlichen spezifisch binden kann, sowie vorzugsweise das Vektorkonstrukt ITR-Sequenzen in Flop-Orientierung enthält. Die gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten rekombinanten Adeno-assoziierten Viren eignen sich insbesondere zur Herstellung einer Tumorzelle, in die zusätzlich Nukleinsäuren kodierend für GM-CSF und B7.2 eingebracht wurde,

20 welche wiederum in Form eines Arzneimittels zur Behandlung von Krebserkrankungen verwendet werden kann.

Für die genetische Veränderung von therapeutisch wirksamen Zellen, die beispielsweise als Tumolvakzine verwendet werden können, sind geeignete Verfahren

25 zur Übertragung von Nukleinsäuren, d.h. von DNA oder RNA, notwendig, die die genetische Veränderung der Zelle verursachen. Die zu übertragenden Nukleinsäuren werden häufig auch als sog. Transgene bezeichnet, selbst wenn sie nicht die Funktion eines Gens ausüben, zum Beispiel bei den sog. Anti-Sense-Nukleinsäuren. Neben dem direkten Gentransfer von sog. nackten Nukleinsäuren haben

30 sich auch genetisch veränderte Viren für den Gentransfer als geeignet erwiesen.

Zur Zeit werden unter anderem Retroviren, Adenoviren oder Adeno-assoziierte Viren (AAV) genetisch verändert, damit sie als Träger (virale Vektoren) des oder der Transgene für den Gentransfer verwendet werden können. Ein wesentlicher Gesichtspunkt bei der Entwicklung geeigneter viraler Vektoren sind Sicherheitsaspekte bei der Anwendung dieser Vektoren in der Gentherapie. Daher werden im allgemeinen sog. replikationsdefiziente Viren entwickelt, also Viren, die zwar eine Zelle befallen, und das oder die Transgene auf die Zelle übertragen können, sich in dieser Zelle jedoch nicht selbst vermehren können. Dies wird beispielsweise dadurch erreicht, daß man für die Virusvermehrung wichtige Gene, beispielsweise die für Strukturproteine kodierenden Gene, deletiert und ggf. an deren Stelle das oder die Transgene einbaut. Bei der Herstellung größerer, für die gentherapeutische Verwendung geeigneter Mengen von nicht vermehrungsfähigen Viren sind sog. Helfer-Gene notwendig, die den Defekt bei einem nicht vermehrungsfähigen Virus in der Zelle kompensieren.

15

AAV beispielsweise ist ein humanes Virus, das entweder in Form eines in das Genom integrierten Provirus vorliegt, oder eine lytische Infektion verursacht. Daher ist AAV als ein allgemeiner Transduktionsvektor von Säugierzellen interessant. AAV ist ein Mitglied der Parvovirusfamilie, von dem sechs verschiedene Serotypen AAV-1, AAV-2, AAV-3, AAV-4, AAV-5 und AAV-6 derzeit bekannt sind. AAV-2 beispielsweise enthält eine einzelsträngige lineare DNA mit einer Länge von ca. 4,7 Kilobasen (kb). Die viralen Partikel, die aus drei viralen Proteinen, VP1, VP2 und VP3 aufgebaut sind, enthalten einen Strang von viraler DNA, der entweder die eine Polarität (+) oder die andere Polarität (-) aufweist.

25

Für die Verwendung von AAV als viralen Transduktionsvektor werden im allgemeinen größere Mengen an rekombinanten AAV-Partikeln benötigt. Ein vorteilhaftes Verfahren zur Herstellung größerer Mengen an rAAV-Partikeln ist die Kotransfektion einer eukaryotischen Zelle mit zwei rekombinanten AAV-Plasmiden in Form einer Mischung und der Infektion mit einem Helfervirus

30

(Chiorini, J.A. et al. (1995) Human Gene Therapy, 6, 1531). Das erste rekombinante AAV-Plasmid enthält das oder die Transgene, welche von den beiden ITR-Regionen begrenzt, d.h. flankiert werden. Gemäß der vorliegenden Erfindung wird dieses AAV-Plasmid auch als Vektorkonstrukt bezeichnet. Das

5 zweite rekombinante AAV-Plasmid enthält die AAV-Gene, die für die Herstellung der Partikel benötigt werden (Rep- und Cap-Gene). Dieser Vektor wird gemäß der vorliegenden Erfindung auch als Helferkonstrukt bezeichnet. Das Fehlen der ITR-Regionen im Helferkonstrukt soll die Verpackung der rep- und cap-Gene in AAV-Partikel und damit die Entstehung von unerwünschtem

10 Wildtyp-AAV verhindern. Anschließend werden geeignete Zellen, die sowohl für die rekombinanten AAV-Konstrukte als auch für das Helfervirus permissiv, d.h. zugänglich sind, mit den beiden AAV-Konstrukten transfiziert. Nach Infektion der transfizierten Verpackungszellen mit Adenoviren erfolgt die Expression der AAV-Gene, die Replikation von Transgen-DNA und die Verpackung und der

15 Zusammenbau der rekombinanten AAV-Partikel (rAAV-Partikel). Die rAAV-Partikel enthalten das oder die Transgene, beidseitig flankiert von den ITR-Regionen, in Form einzelsträngiger DNA. Gleichzeitig repliziert das Helfervirus in diesen Zellen, was im Falle von Adenoviren als Helferviren nach einigen Tagen im allgemeinen mit der Lyse und dem Tod der infizierten Zellen endet. Die

20 entstandenen rAAV-Partikel sowie die Helferviren werden hierbei teilweise in den Zellkulturüberstand freigesetzt oder verbleiben in den lysierten Zellen. Eine Übersicht über die Verwendung von AAV als allgemeiner Transduktionsvektor für Säugierzellen gibt beispielsweise Muzyczka, N. in Current Topics in Microbiology and Immunology, 158, 97 (1992).

25

Ein wesentlicher Nachteil bei der Herstellung von rAAV-Partikeln ist die begleitende Entstehung von Wildtyp-AAV und die Anwesenheit von Helferviren. Im Hinblick auf die Sicherheit bei der Verwendung rekombinanter AAV-Partikel, beispielsweise bei der Gentherapie, ist es jedoch notwendig, daß die Präparationen

30 aus folgenden Gründen im wesentlichen frei von Helferviren und Wildtyp-AAV

sind: Adenoviren als Helferviren sind für Zellen lytisch und verursachen zelluläre Immunantworten gegen adenovirale Proteine. Zudem sind Adenoviren für den Menschen pathogen, da sie unspezifische Erkältungssymptome hervorrufen. Replikationskompetente Wildtyp-AAV können sich bei Anwesenheit eines Helfervirus, wie zum Beispiel Adenovirus oder HSV, vermehren und sich im Körper ausbreiten, ohne jedoch pathogen zu sein. Zudem würden unter solchen Bedingungen rep- und cap- Gene exprimiert werden, welche wiederum rAAV- Genome in derselben Zelle amplifizieren und zu neuen rAAV- Partikeln verpacken würden. Hierdurch könnten sich die rAAV- Genome im gesamten Körper ausbreiten.

Eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es daher, ein Verfahren und geeignete Konstrukte bereitzustellen, die die Entstehung von Wildtyp-AAV im wesentlichen verhindern.

15

Es wurde nun gefunden, daß bei einer zeitversetzten Transfizierung von Zellen mit einem oder mehreren Helferkonstrukten (erstes Konstrukt) und einem Vektorkonstrukt (zweites Konstrukt), unabhängig davon, ob zuerst das Helferkonstrukt oder das Vektorkonstrukt transfiziert wird, im wesentlichen gleiche Verpackungseffizienzen erreicht werden können wie mit der gleichzeitigen Kotransfektion beider Konstrukte, wobei jedoch aufgrund einer Verringerung der homologen oder nicht homologen Rekombination beider Konstrukte die mögliche Entstehung von Wildtyp-AAV deutlich, insbesondere um ca. das 10-fache, reduziert werden kann. Vorzugsweise werden die Zellen zuerst mit dem Helferkonstrukt und anschließend mit dem Vektorkonstrukt transfiziert, da überraschenderweise eine Steigerung der Verpackungseffizienz um einen Faktor von ca. 1.5 - 3 erreicht werden konnte.

Ein Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus, wobei in eine geeignete Zelle zeitlich versetzt ein oder mehrere Helferkonstrukte, enthaltend Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein, vorzugsweise für Rep 68, Rep 52 und Rep 40, insbesondere für Rep 68 und Rep 52 und für die Cap-Proteine, sowie ein Vektorkonstrukt enthaltend ein oder mehrere zu AAV heterologe Nukleinsäuren, die von ITR-Sequenzen flankiert werden, eingebracht werden.

Die rep- und cap-Gene können hierbei auf ein und demselben Helferplasmid oder auf mehreren Helferplasmiden liegen, z. B. ein Helferplasmid kodiert für mindestens eines der Rep Proteine und ein zweites Helferplasmid kodiert für die Cap-Proteine. Die Verwendung von mehreren Helferplasmiden hat den Vorteil, daß für die Rekombination aller Plasmide zu unerwünschtem wt AAV mehrere Rekombinationsereignisse erforderlich sind, z. B. ein Rekombinationsereignis zwischen den Helferplasmiden und ein weiteres zwischen dem rekombinierten Helfer und dem Vektorplasmid. Mehrere erforderliche Rekombinationsereignisse machen die Generierung von unerwünschtem wt AAV während der Verpackung der rAAV-Vektoren somit noch unwahrscheinlicher.

20

Geeignete Zellen sind im allgemeinen Zellen, die für die genannten Konstrukte permissiv sind, vorzugsweise Säugerzellen, beispielsweise COS-7, HeLa, C33a oder 293 Zellen. Für das Einbringen der Konstrukte eignet sich beispielsweise die Calciumphosphat-Transfektionsmethode in der klassischen oder modifizierten Form (Chen, C. & Okayama, H. (1987) Mol. Cell. Biol., 7 (8), 2745). Ein Vorteil der modifizierten Calciumphosphat-Transfektionsmethode ist, daß in Kombination mit dem erfindungsgemäßen Verfahren reproduzierbar sehr hohe Transfektionseffizienzen von bis zu 100% transfizierter Zellen zu erreichen sind.

Unter Nukleinsäure versteht man gemäß der vorliegenden Erfindung im allgemeinen DNA oder RNA und Varianten davon, die in Form von AAV-Kapsiden verpackbar und geeignet sind in eine geeignete Zelle eingebracht zu werden. Beispiele von Varianten sind z.B. in Uhlmann, E. & Peyman, A. (1990) Chemical Reviews, 90, 543-584, No. 4 aufgeführt.

In einer bevorzugten Ausführungsform werden die Zellen nach dem Einbringen des ersten Konstruktes und vor dem Einbringen des zweiten Konstruktes gereinigt. Die Reinigung kann beispielsweise auf einfache Art und Weise dadurch erfolgen, daß das Medium gewechselt wird. Vorteilhaft ist es jedoch, die Zellen vor dem zweiten Schritt mit einer Lösung, beispielsweise PBS-Puffer (Phosphatgepufferte Kochsalzlösung) zu spülen, um eventuell nicht internalisierte Reste des ersten Konstrukts im wesentlichen vollständig zu entfernen.

Die Produktion der rAAV-Partikel erfolgt anschließend entweder durch Zugabe geeigneter Helferviren, wie z.B. Adenoviren, Herpesviren, Vaccinia-Viren, oder in Anwesenheit deren Helfergene. Bei Adenoviren sind die Helfergene E1A, E1B, E4, E2A und VA. Alternativ kann auch eine Zelle verwendet werden, die konstitutiv Helfergenprodukte exprimiert, beispielsweise die 293-Zelle, die das E1A-Gen konstitutiv exprimiert. Die Genprodukte E1B und E4 dienen hierbei zur Verstärkung der AAV mRNA-Akkumulation und die Genprodukte E2A und VA dienen zur Verstärkung des AAV mRNA-Spleißens und der Translation. Die Verwendung eines Helfervirus anstelle der einzelnen Helfergene, beispielsweise des Adenovirus Ad-5, ist besonders vorteilhaft, da dies der authentischen Situation einer AAV-Vermehrung in Gegenwart von Helferviren am ehesten entspricht und somit die Verpackung von rekombinanten AAV-Partikeln sehr effizient ist.



Die Zeitabstände zwischen den einzelnen Schritten betragen vorzugsweise unabhängig voneinander mindestens ca. 1 Stunde, vorzugsweise mindestens ca. 12 Stunden, insbesondere mindestens ca. 1 Tag, vor allem ca. 1 bis 2 Tage. Anschließend kann die Produktion der rAAV-Partikel ohne Verlust an rAAV vorteil-

5 hafterweise in serumfreien Medium, wie DMEM, erfolgen, wodurch ein Reinigungsschritt bei der weiteren Aufreinigung der rAAV-Partikel wegfallen kann, da im wesentlichen keine Kontamination von Protein aus beispielsweise 10 % Serumanteil vorliegt.

10 Die Produktionszeit der Zellen beträgt etwa 4 bis 6 Tage, wobei aufgrund der Adenovirus-vermittelten Zell-Lyse etwa ab dem dritten Tag rAAV-Vektoren in den Überstand entlassen werden. Allerdings ist auch in den Zellen immer ein Anteil an rAAV-Partikeln zu finden. Der Anteil von rAAV-Kapsiden, die in das Medium entlassen werden, ist im allgemeinen bis zu 90%, wobei ca. mindestens

15 10% in den Zellen verbleiben. Es ist daher vorteilhaft, die rAAV-Partikel sowohl aus den Zellen als auch aus dem Überstand zu ernten und aufzureinigen.

Die anschließende Reinigung kann beispielsweise über einen CsCl-Gradienten (Chiorini, J.A. et al. (1995), supra) erfolgen oder vorzugsweise mit Hilfe einer

20 Filtration (siehe WO 98/3920). Nach der Reinigung erhält man eine im wesentlichen von Helfervirus befreite Präparation an rAAV-Partikeln. Anschließend können die rAAV-Partikel mittels Ultrafiltration konzentriert und gelagert werden.

Das oder die für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Helferkonstrukte

25 enthalten Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein und/oder die Cap-Proteine. Bekannte Rep-Proteine sind Rep78, Rep68, Rep52 und Rep40. Bekannte Cap-Proteine sind VP1, VP2 und VP3. Die Gene hierzu sowie die ITR-Sequenzen können aus Wildtyp-AAV isoliert werden, die in Form von Klonen allgemein erhältlich sind. So ist beispielsweise der Klon pSM620 bei

Samulski, R.J. et al. (1982) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79, 2077, der Klon pAV1 bei Laughlin, C.A. et al. (1983) Gene, 23, 65 oder der Klon sub201 bei Samulski, R.J. (1987) J. Virol. 61, 3096 beschrieben.

- 5 In einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung werden die Rep- und Cap-Gene durch ihre natürlichen Promotoren p5, p19 und p40 kontrolliert. Es hat sich nun gezeigt, daß nicht nur die natürlich vorkommenden AAV-Promotoren Rep-Bindungsstellen enthalten, sondern daß auch Rep-Bindungsstellen auf anderen Teilen des Konstruktes, beispielsweise im Vektorrückgrat des
- 10 Vektors pUC19 oder des Vektors pBR322 (McCarty, D.M. et al. (1994) J. Virol., 68, 4988) vorhanden sind, die für eine nicht-homologe Rekombination und somit für die Bildung von Wildtyp-AAV verantwortlich sein können.

- Die großen Rep-Proteine Rep 78 und Rep 68 sind beispielsweise in der Lage,
- 15 Proteinkomplexe auszubilden, die mehrere RBS-Sequenzen gleichzeitig binden können. Aufgrund der Endonuklease und Helikase Aktivitäten von Rep ist daher eine Rekombination zweier Nukleinsäuresequenzen im Bereich von RBS-Stellen möglich.

- 20 Die Erfindung bezieht sich daher auch auf ein oder mehrere, vorzugsweise zwei Helferkonstrukte, enthaltend Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein und für die Cap-Proteine, wobei das oder die Helferkonstrukte vorzugsweise mit Ausnahme der AAV-Promotoren keine Nukleinsäuresequenzen enthalten, an die mindestens ein Rep-Protein, vorzugsweise Rep 78 und/oder Rep
- 25 68, im wesentlichen spezifisch binden können. Die RBS-Konsensussequenz ist z.B. in McCarty, D.M. et al. (1994), supra, beschrieben und lautet:

CGCTTCCTCGCTCACTGA.

Eine Verminderung bzw. Verhinderung der Bindung von Rep-Proteinen an Rep-Bindungsstellen (RBS) wird beispielsweise dadurch erreicht, daß die drei bekannten RBS in den Rep-Promotoren p5 und p19 einzeln oder in verschiedenen Kombinationen mutiert wurden, ohne vorzugsweise hierdurch die Aminosäuresequenzen von Rep zu verändern.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform sind die Rep-Proteine Rep 68, Rep 52 und Rep 40, nicht aber Rep 78, weil überraschenderweise festgestellt werden konnte, daß neben Rep 52, Rep 40 sowie den drei Cap-Proteinen VP1, VP2 und VP3 die zusätzliche Expression nur des Rep 68 für die Verpackung von AAV Vektoren ausreichend ist. Der Vorteil dieser Rep 78-defizienten Helferkonstrukte liegt darin, daß dieses Rep-Protein, das für die Verpackungszellen am meisten toxisch ist, überhaupt nicht exprimiert wird. Ferner wurde herausgefunden, daß Rep 78 unter den Rep-Proteinen die größte hemmende Aktivität auf zelluläre Abläufe wie beispielsweise die Transkription besitzt. Daher kann bei Verwendung dieses Helferkonstruktes aufgrund der Abwesenheit von Rep 78 die Verpackungseffizienz gesteigert werden. Ebenso wird die Herstellung stabiler Zelllinien, die Rep- und Cap-Proteine exprimieren, vereinfacht, weil das toxischste Protein Rep 78 nicht exprimiert wird. Sowohl Rep 68 als auch Rep 78 werden im natürlichen System durch den Promotor p5 exprimiert. Die Verwendung dieses Rep 78-defizienten Helferkonstruktes ist weiterhin deshalb vorteilhaft, weil Rep 68 im Vergleich zu Rep 78 in Adenovirus-infizierten Zellen den stärkeren Transaktivator der AAV Promotoren p19 und p40 darstellt (Hörer et al. (1995) J. Virol. 69, 5485-5496; Weger et al. (1997) J. Virol. 71, 8437-8447). Daher führt die Verwendung dieses Rep 78-defizienten Helferkonstruktes zu einer gesteigerten Expression der kleineren Rep-Proteine Rep 40 und Rep 52 sowie der Kapsidproteine und damit der gewünschten höheren Verpackungseffizienz. Schließlich wird aufgrund der für die Klonierung Rep 78-defizienter Helferkonstrukte erforderlichen Verdopplung des rep-Gens bzw. Teile

des rep-Gens durch die Übergröße der AAV Gene die Entstehung von wt AAV nach Rekombination mit dem Vektorkonstrukt verhindert.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung können die erfindungsgemäßen  
5 Helferkonstrukte und insbesondere das Rep 78-defiziente Helferkonstrukt nicht nur für transiente Transfektionsexperimente, die mit der Lyse und dem Tod der transfizierten Zelle enden, verwendet werden, sondern auch für die dauerhafte (=stabile) Expression der Cap- und Rep-Proteine, die durch gerichtete oder ungerichtete Integration der Helferkonstrukte in das Genom der Wirtszelle  
10 erreicht wird. Hierbei ist wiederum die Expression der Proteine Rep 68, Rep 52 und Rep 40 aufgrund der toxischen Wirkung von Rep 78 besonders bevorzugt.

Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Helferkonstrukte in eine Wirtszelle einzubringen ist neben den bereits beschriebenen transienten und  
15 stabilen Transfektionen die Infektion unter Verwendung eines Virus als Vehikel für die Helferkonstrukte. Das Virus tritt hierfür mit der Wirtszelle über deren Zelloberfläche in Wechselwirkung (Adhäsion), anschließend werden die im Virus verpackten Nukleinsäuren, insbesondere die erfindungsgemäßen Helferkonstrukte und besonders bevorzugt das Rep 78-defiziente Helferkonstrukt in die Wirtszelle  
20 aufgenommen (Penetration). Beispielsweise kann ein rekombinantes Adenovirus durch den Austausch der E1A-Region durch ein erfindungsgemäßes Helferkonstrukt in E1A komplementierenden Zellen hergestellt werden.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsfunktion enthalten das oder die  
25 Helferkonstrukte zwischen der Nukleinsäuresequenz kodierend für mindestens ein Rep-Protein und der Nukleinsäuresequenz kodierend für die Cap-Proteine eine zusätzliche Nukleinsäuresequenz, die eine Verpackung des Helferkonstruktes in ein AAV-Kapsid verschlechtert. Die zusätzliche Nukleinsäuresequenz dient hierbei zur Erhöhung der Gesamtlänge des AAV-Konstruktes, wodurch eine

effiziente Verpackung verschlechtert bzw. sogar verhindert wird. Eine Verhinderung der Verpackung wird im allgemeinen dann erreicht, wenn die Größe der Wildtyp-AAV-DNA von 4680 Basenpaaren deutlich überschritten wird. Dies wird vorzugsweise dann erreicht, wenn die zusätzliche  
5 Nukleinsäuresequenz eine Mindestlänge von ca. 300 Nukleotiden, insbesondere von mindestens ca. 500 Nukleotiden, vor allem von mindestens ca. 600 bis ca. 700 Nukleotiden besitzt.

Aufgrund der Überlappung der Rep- und Cap-Gene in Wildtyp-AAV kann die  
10 Herstellung eines Helferkonstruktes mit der genannten zusätzlichen Nukleinsäure beispielsweise wie folgt hergestellt werden: In einem ersten Schritt wird die AAV-Sequenz von 1691 bis 2328, die den Rep C-Terminus bzw. den AAV p40-Promotor einschließlich Cap-Sequenzen und alle für p40 essentiellen regulatorischen Sequenzen enthält, verdoppelt und hinter das Stop-Kodon für die gespleiß-  
15 ten Rep-Versionen (Position 2329) inkloniert. Anschließend wird der p40-Promotor im Rep-Gen zerstört, ohne die Rep-Aminosäuresequenz zu verändern. Dies kann durch eine Mutation der p40 TATA-Box gewährleistet werden. Insgesamt können für die Klonierungsschritte folgende AAV-Nukleotide verändert werden, ohne dabei die Aminosäuresequenz von Rep und Cap zu  
20 verändern: 1693 (T → A), 1694 (T → G), 2330 (G → C), 2331 (G → T), 2332 (G → A), 1625 (C → T), 1628 (A → G), 1826 (A → C), 1827 (A → T) und 1828 (G → C).

Zur weiteren Verringerung der Wahrscheinlichkeit, daß sich während der Her-  
25 stellung von rAAV Wildtyp-AAV bildet, ist es vorteilhaft, ein Helferkonstrukt herzustellen, das keine zu dem Vektorkonstrukt homologen Nukleinsäuresequenzen enthält, die eine homologe Rekombination erlauben. Dies kann beispielsweise dadurch geschehen, daß aus Wildtyp-AAV mittels einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) die AAV-Nukleotide 190 bis 1060 amplifiziert werden. Dabei soll der  
30 5'-Primer so gewählt werden, daß an Position 199 eine singuläre XbaI-Schnitt-

stelle eingeführt wird. Das PCR-Fragment kann anschließend mit XbaI und BamHI geschnitten und in einen analog geschnittenen Vektor, zum Beispiel pUC19, kloniert werden. Die Position 199 im AAV-Genom gewährleistet, daß alle wichtigen p5-Promotorelemente im Helferplasmid vorhanden sind. Anschließend wird Wildtyp-AAV mit BamHI und SnaBI geschnitten und das Insert-Fragment anschließend in die BamHI- und SmaI-Positionen des Zwischenproduktes einkloniert. Auf diese Weise kann beispielsweise das Helferkonstrukt mit der Bezeichnung pUC "Rep/Cap" hergestellt werden. Dieses Helferkonstrukt enthält die AAV-Sequenzen 201 bis 4497, während das Vektorkonstrukt die AAV-Sequenzen 1 bis 191 (linker ITR) und 4498 bis 4671 (rechter ITR) trägt. Auf diese Weise existieren keine homologen AAV-Sequenzüberlappungen mehr auf den Konstrukten.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform können vom 3'-Ende des AAV-Genoms in beispielsweise pUC "Rep/Cap" bis zu ca. 37 Basen, vorzugsweise die AAV-2 Basen 4461-4497, deletiert werden, die für eine optimale Expression der AAV-Rep- und Cap-Gene nicht benötigt werden. Das resultierende Helferkonstrukt wird gemäß der vorliegenden Erfindung mit pUC "Rep/Cap"  $\Delta 37$  bezeichnet und enthält die minimalisierte AAV-Sequenz von Position 201 bis 4460.

Für die Herstellung des Rep 78-defizienten Helferkonstruktes pUC"Rep68,52,40Cap"(RBS) $\Delta 37$  (vgl. Fig. 6) wurden die AAV Sequenzen von Nukleotid 201 bis Nukleotid 4497 einschließlich der Deletion der Intronsequenz sowie von Nukleotid 658 bis Nukleotid 4460 in das bakterielle Expressionsplasmid pUC19 kloniert, wobei die Bindestellen für das Rep-Protein in der Plasmidsequenz deletiert wurden. Durch Anwendung dieser Strategie sind zwei rep- sowie wenigstens zwei cap-Gene mit jeweils einer eigenen Poly(A)-Sequenz für die Termination der Transkription hintereinander angeordnet. Ausgehend vom ersten Abschnitt (AAV-Sequenz Nukleotid 201 bis Nukleotid

4497) können die Rep-Proteine Rep68 und Rep40 sowie die Cap-Proteine VP2 und VP3 exprimiert werden, während ausgehend vom zweiten Abschnitt (AAV-Sequenz Nukleotid 658 bis Nukleotid 4460) die Rep-Proteine Rep52 und Rep40 sowie die Cap-Proteine VP1 VP2 und VP3 exprimiert werden. Insgesamt werden  
5 damit alle AAV-2 Proteine mit Ausnahme von Rep78 kodiert.

Für die Herstellung des ebenfalls Rep 78-defizienten Helferkonstrukts pUC“ΔRep78Cap“(RBS)Δ37 (vgl. Fig. 7) wurden die genannten AAV-Sequenzen (nt 201-2310; nt 658-4460 einschließlich der Deletion der Intronsequenz)  
10 ebenfalls in das bakterielle Expressionsplasmid pUC19 kloniert. Dabei wurde wiederum die Bindestellen für das Rep-Protein in der Plasmidsequenz deletiert. Auf diese Weise wurde das rep-Gen partiell dubliziert. Das so entstandene Helferkonstrukt enthält nur eine Poly(A)-Sequenz, so daß alle mRNA-Transkripte dasselbe 3'-Ende besitzen. Ausgehend vom ersten Abschnitt (AAV-Sequenz  
15 Nukleotid 201 bis Nukleotid 2310) können die Rep-Proteine Rep68 und Rep40 exprimiert werden, während ausgehend vom zweiten Abschnitt (AAV-Sequenz Nukleotid 658 bis Nukleotid 4460) die Rep-Proteine Rep52 und Rep40 sowie die Cap-Proteine VP1 VP2 und VP3 exprimiert werden. Insgesamt werden damit auch durch dieses Vektorkonstrukt alle AAV-2 Proteine mit Ausnahme von  
20 Rep78 kodiert.

Gemäß der vorliegenden Erfindung können die homologen AAV-Promotoren, die die Expression der Rep- und Cap-Proteine kontrollieren, auch unabhängig voneinander durch einen heterologen Promotor und/oder Enhancer ersetzt werden. Im  
25 allgemeinen können die selben Promotoren bzw. Enhancer verwendet werden, die auch die Expression der heterologen Nukleinsäuresequenzen im Vektorkonstrukt (Transgen) kontrollieren, wie unten näher beschrieben. Besonders bevorzugt ist der HPV 18 Enhancer, der vor allem in HeLa- und C33a-Zellen hohe Aktivitäten aufweist (Butz, K. & Hoppe-Seyler, F. (1993) J. Virol., 67, 6476-6486; Hoppe-Seyler, F. & Butz, K. (1994) Mol. Carcinog., 10, 134-141).  
30

Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein für das erfindungsgemäße Verfahren optimiertes Helferkonstrukt erhalten, das einerseits die Rep-Gene kodierend für die Replikationsproteine und andererseits die Cap-Gene kodierend für die Hüllproteine enthält. Ein besonders bevorzugtes erfindungsgemäßes Helferkonstrukt ist replikations-inkompetent, da es keine ITR-Sequenzen enthält. Zudem ist das Helferkonstrukt dahingehend optimiert, daß die Entstehung von Wildtyp-AAV aufgrund der oben beschriebenen vorteilhaften Modifikationen verringert bzw. im wesentlichen verhindert werden kann. Im allgemeinen führt jedoch die Trennung der ITR-Sequenzen von den AAV-Promotoren zu einer Deregulation der Rep- und Cap-Expression im Helferkonstrukt.

Modifikationen im Vektorkonstrukt sind vorzugsweise so anzulegen, daß sie im wesentlichen keinen negativen Einfluß auf die Verpackungseffizienz der Vektorkonstrukte ausüben können, sondern im Gegenteil die Vektorkonstrukte stabilisieren, unerwünschte Rekombinationsereignisse verringern bzw. im wesentlichen vermeiden und/oder zu einer Erhöhung der Expressionsrate der eingebauten Transgene führen.

Es ist bekannt, daß die ITR-Sequenzen von AAV-2, welche 145 Basenpaare lang sind, aus einem großen Palindrom (A) und zwei kleineren internen Palindromen (B und C) aufgebaut sind. Hierbei bilden die ersten 125 Basen der ITR-Sequenz eine Haarnadelstruktur in T-Form (siehe z.B. Muzyczka, N. (1992), supra). Hierbei kann die terminale Sequenz in einer von zwei Konfigurationen vorliegen. Bei der ersten Konfiguration, auch "Flip" genannt, ist das B-Palindrom näher am 3'-Ende und bei der zweiten Konfiguration, auch "Flop" genannt, ist das C-Palindrom näher am 3'-Ende (siehe auch Svivastava, A. et al. (1983) J. Virol. 45(2), 555).



Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß eine Flop-Flop-Orientierung beider ITR-Sequenzen in den Vektorkonstrukten deutlich stabiler ist als eine Flip-Flop oder Flip-Flip-Orientierung. Zudem neigt die Flop-Flop-Orientierung seltener zu unerwünschten Rekombinationsereignissen als die Flip-Flop-Orientierung.

5

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher ein Vektorkonstrukt, enthaltend ein oder mehrere zu AAV heterologe Nukleinsäuren, die von ITR-Sequenzen flankiert werden, wobei die ITR-Sequenzen in Flop-Orientierung vorliegen.

10

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die Expression der heterologen Nukleinsäuren von einem zu AAV heterologen Promotor kontrolliert. Überraschenderweise wurde hierbei gefunden, daß die Expressionsrate dadurch gesteigert werden kann, daß der heterologe Promotor zur 3'-lokalisierten ITR-Sequenz orientiert ist.

15

Als Promotoren eignen sich alle zu AAV homologen und vorzugsweise heterologen Promotoren. Zu AAV homologe Promotoren sind die Promotoren p5, p19 und/oder p40 und zu AAV heterologe Promotoren eignen sich alle konstitutiv aktiven oder induzierbaren Promotoren, die in eukaryotischen Zellen, vorzugsweise Säugerzellen, aktiv sind. Diese sind beispielsweise der SV40-Promotor (Samulski, R.J. (1989) J. Virol. 63, 3822), der SV40ori-Enhancer, der CMV-Promotor/Enhancer (Vincent, K.A. et al. (1990) Vaccine, 90, 353) oder der LTR-Promotor (Lebkowski, J.S. (1988) Mol. Cell. Biol. 8, 3988). Besonders bevorzugt ist der CMV-Promotor/Enhancer.

20  
25

Für eine effiziente Verpackung der Vektorkonstrukte in AAV-Kapside mit Hilfe der Helferkonstrukte ist es vorteilhaft, daß das Vektorkonstrukt eine Größe von

ca. 4700 Basenpaaren +/- 5% nicht wesentlich unter- oder überschreitet. Beispielsweise kann das Plasmid pAV2 (Laughlin, C.A. et al. (1983) supra) mit der Restriktionsendonuklease BglII geschnitten werden und die hierdurch erhaltenen AAV-Sequenzen in den Vektor pUC19 (Yannish-Perron, C. et al. (1985) Gene, 5 33, 103) subkloniert werden. Dies geschieht beispielsweise dadurch, daß pUC19 mit BamHI geschnitten und direkt mit dem BglII-Fragment aus pAV2 ligiert wird. Eine Kontrollsequenzierung der ITRs hat ergeben, daß das linke ITR bis auf einen Basenaustausch an Position 2 (T → G) vollkommen intakt ist, während dem rechten ITR 8 terminale Basen fehlen. Die Replikationsfähigkeit des Konstruktes wird jedoch hierdurch nicht beeinträchtigt, da während der Replikation des AAV-Genoms die Defekte repariert werden können, so daß die Konstrukte zwei intakte ITRs tragen können. 10

Anschließend können die AAV-Sequenzen 192 bis 4497 entfernt werden und durch eine CMV-PolyA-Expressionskassette ersetzt werden. Hierzu werden beispielsweise durch Doppelstrangmutagenesen PpuMI- und EcoRV-Schnittstellen vor dem CMV-Promotor/Enhancer bzw. hinter die PolyA-Stelle im Vektor pCI (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) eingeführt, die CMV-PolyA-Expressionskassette ausgeschnitten und direkt in das mit PpuMI und SnaBI 20 geschnittene Vektorkonstrukt inkloniert. Die optimale Orientierung der Expressionskassette kann beispielsweise mit Hilfe des Luciferase-Reportergens ermittelt werden. Wie bereits oben erwähnt, ist die Expressionsrate am größten, wenn der heterologe Promotor, insbesondere der CMV-Promotor/Enhancer am rechten ITR, d.h. zur 3'-lokalisierten ITR-Sequenz orientiert ist.

25

Die erfindungsgemäßen Helferkonstrukte und/oder Vektorkonstrukte eignen sich besonders bevorzugt in dem erfindungsgemäßen Verfahren zur Herstellung von rekombinanten AAV-Partikeln. Als besonders vorteilhaft hat sich hierbei folgendes Verfahren erwiesen:

Zuerst werden geeignete Zellen, beispielsweise HeLa-Zellen in einer bevorzugten Menge von ca.  $1-2 \times 10^8$  Zellen, in Medium mit ca. 10% Serum ausgesät. Vorzugsweise am darauffolgenden Tag erfolgt die Transfektion der Zellen mit dem Helferkonstrukt insbesondere mit Hilfe der Calciumphosphat-Transfektionsmethode. Anschließend werden die Zellen vorzugsweise am darauffolgenden Tag mit Puffer, beispielsweise PBS-Puffer, gespült und mit frischem Medium mit ca. 10% Serum befüllt. Gleichzeitig oder kurz anschließend erfolgt die Transfektion der Zellen mit vorzugsweise der gleichen Menge an Vektorkonstrukt. Nach einiger Zeit, vorzugsweise am darauffolgenden Tag, werden die Zellen mit Helferviren, vorzugsweise mit Adenoviren, z.B. Ad-5, infiziert. Vorzugsweise am darauffolgenden Tag erfolgt ein weiterer Medienwechsel gegen serumfreies Medium. Danach werden die Zellen beispielsweise für weitere 3 Tage inkubiert, ehe die rAAV-Partikel aus den Zellen und dem Medienüberstand geerntet werden können.

15

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß eine wesentliche Reduktion der Rekombination beider Konstrukte zu Pseudo-Wildtyp AAV sowie eine um den Faktor 1,5-3 bessere Verpackungseffizienz erreicht werden kann. Die Ausbeute an rAAV-Partikeln liegt bei ca.  $10^{12}-10^{13}$  und die Ausbeute an transduzierenden rAAV-Partikeln bei wenigsten  $10^9-10^{10}$ . Ein weiterer wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, daß die nachfolgende Reinigung der rAAV-Partikel wesentlich erleichtert ist, insbesondere da durch den Austausch gegen Serum-freies Medium im wesentlichen kein Serum-haltiges Medium mit einem unerwünschten Proteinanteil im Ansatz vorhanden ist.

25

Als heterologe Nukleinsäuresequenz kann gemäß der vorliegenden Erfindung im wesentlichen jede beliebige kodierende wie auch nicht kodierende Nukleinsäuresequenz verwendet werden, beispielsweise Gene kodierend für pharmazeutisch wirksame Proteine, wie zum Beispiel Erythropoietin (siehe z.B. EP 0 148 605 B1)

oder Insulin (siehe z.B. EP 0 001 929 B1) oder die Gene kodierend für Blutgerinnungsfaktoren, Interferone, Cytokine, Hormone, Wachstumsfaktoren, z.B. IL-2, IL-4, IL-12, p53 oder  $\gamma$ -Interferon (siehe z.B. WO94/16716), Antikörper usw., oder sog. Antisense-Oligonukleotide als Beispiel für nicht-kodierende  
5 Nukleinsäuren. Vorzugsweise wird eine oder mehrere heterologe Nukleinsäuresequenz(en) in ein replikationsdefizientes Vektorkonstrukt eingebracht. Bei der Verwendung replikationsdefizienter Vektoren wird vorzugsweise in der Nähe der Sättigungskonzentration von Helfer- und Vektorkonstrukt in der Zelle gearbeitet. Eine bevorzugte Menge an Helfer- und  
10 Vektorkonstrukt ist beispielsweise ca. 3,5-4 mg Konstrukt für ca.  $2-3 \times 10^8$  Zellen.

Bei Verwendung von Genen kodierend für pharmazeutisch wirksame Proteine, wie z.B. die oben erwähnten Proteine, ist es jedoch im allgemeinen auch möglich, insbesondere für das Helferplasmid, selbstreplizierende Konstrukte zu verwenden,  
15 die beispielsweise das SV40ori tragen, vorzugsweise wenn die gewählte Transfektionsmethode keine Sättigung mit den einzelnen Konstrukten ermöglicht. Insbesondere ist es bevorzugt, Konstrukte zu verwenden, die sowohl SV40ori-Nukleinsäuresequenzen (Mellon et al. (1981) Cell, 27, 279-288) als auch Nukleinsäuresequenzen kodieren für das SV40 T-Antigen (Gerard, R. D. &  
20 Gluzman, Y. (1985) Mol. Cel. Biol., 5, 3231-3240) enthalten, da dadurch unabhängig von stabil T-Antigen-exprimierenden Zellen, wie z.B. COS-7, eine Replikation erzielt wird. Ebenso können in die Helfer- und/oder Vektorplasmide auch andere bekannte Sequenzen zur Plasmidreplikation eingebaut werden, wie z. B. den viralen Replikationsursprung oriP von EBV (Epstein Barr Virus) oder die  
25 Expressionskassette für das EBV Replikationsprotein EBNA.

Aus WO 98/06746 ist beispielsweise bekannt, daß eine gentechnisch veränderte Melanomzelllinie, die beispielsweise GM-CSF exprimiert, als Vakzine verwendet werden könnte. Aus WO 94/16716 ist die Verwendung eines rekombinanten  
30 Virus in der Krebstherapie unter Verwendung mindestens eines Cytokins, bei-

spielsweise GM-CSF oder B7 und/oder eines Tumor-assoziierten Antigens bekannt. Das B7-Gen bezieht sich hierbei auf das sog. B7.1-Gen. Aus WO 94/04196 ist ein DNA-Konstrukt zur Behandlung von Tumorerkrankungen offenbart, das ein Cytokin und des weiteren B7 kodiert, wobei auch hier B7.1  
5 gemeint ist. Aus WO 92/00092 ist die Nukleinsäuresequenz kodierend für B7.1, aus WO 94/03408 bzw. WO 95/06738 ist die Nukleinsäuresequenz kodierend für B7.2 und aus EP-B1-0 188 479 ist die Nukleinsäuresequenz für GM-CSF bekannt.

In Verbindung mit dem erfindungsgemäßen Vektorkonstrukt ist die Verwendung  
10 von B7.2 besonders vorteilhaft, da in vitro Untersuchungen gezeigt haben, daß im Gegensatz zu B7.2 Interferon-gamma oder IL-12 inhibitorische Wirkungen in Zusammenhang mit B7.1 auf die Aktivierung von T-Lymphozyten haben (Rudy et al. (1997) Int. Immunol, 9, 853). In Anwesenheit eines zweiten Transgens kodierend für GM-CSF kann die tumorzerstörende Wirkung eines B7-Moleküls  
15 (B7.1 oder B7.2) gesteigert werden.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist daher eine Tumorzelle, vorzugsweise eine Melanomzelle, in der eine heterologe Nukleinsäuresequenz kodierend für GM-CSF und B7.2 eingebracht wurde, und deren Verwendung als  
20 Arzneimittel, insbesondere zur Behandlung von Krebserkrankungen, vor allem von bösartigen Krebserkrankungen, wie Melanome.

Aufgrund der einfacheren Handhabbarkeit sind sogenannte Doppelvektoren, die sowohl die Nukleinsäuresequenz kodierend für GM-CSF wie auch die  
25 Nukleinsäuresequenz kodierend für B7.2 enthalten, besonders bevorzugt. Die Verwendung von Doppelvektoren reduziert insbesondere die Zahl der Verpackungsvorgänge. Überraschenderweise erlauben die erfindungsgemäßen Doppelvektoren eine vergleichbar effiziente Expression beider Transgene wie die Koinfektion mit zwei Einzelvektoren.

Vorzugsweise wird ein Primärtumor, insbesondere ein frisch isolierter Primärtumor oder eine etablierte proliferierende Tumorzelllinie mit einem rekombinanten AAV-Konstrukt gemäß der vorliegenden Erfindung transduziert. Vor der  
5 Verwendung als Tumorstoff, vorzugsweise vor der Transduktion, werden die Tumorzellen üblicherweise bestrahlt, beispielsweise mit einer Gesamtdosis von ca. 100 Gy bis 300 Gy, um die Tumorzelle abzutöten, ohne jedoch ihre wesentlichen immunstimulierenden Eigenschaften zu verlieren. Anschließend werden dem Patienten vorzugsweise dreimal ca.  $1 \times 10^6$  bis ca.  $1 \times 10^9$   
10 Tumorzellen, vorzugsweise Melanomzellen, insbesondere ca.  $1 \times 10^6$  bis ca.  $1 \times 10^7$  Tumorzellen, beispielsweise ca.  $3 \times 10^6$  Tumorzellen verabreicht. Die Tumorzellen (Primärtumor oder Tumorzelllinie) können entweder vom behandelten Patienten (autolog) oder von fremden Patienten (allogen) abstammen.

15 Die erfindungsgemäßen Konstrukte können auch allgemein zur Behandlung von beliebigen Erkrankungen, vorzugsweise von Tumorerkrankungen, wie z. B. von Ovar-, Brust-, Colon-, Prostata-, Bronchial-, Kopf- und/oder Halstumor neben dem Malignen Melanom, wie oben bereits näher ausgeführt, verwendet werden. Als therapeutische Gene eignen sich die oben beispielhaft aufgeführten Gene.  
20 Neben der ex vivo Modifikation von dem Patienten entnommenen Zellen, wie z. B. Tumorzellen, mit den erfindungsgemäßen Konstrukten nach vorzugsweise dem erfindungsgemäßen Verfahren, kann der Patient auch in vivo mit Hilfe der erfindungsgemäßen Konstrukte behandelt werden (siehe z. B. U.S. 5,858,351 oder U.S. 5,846,528).

25

Die nachfolgenden Figuren und Beispiele sollen die Erfindung näher erläutern, ohne sie zu beschränken:

### Beschreibung der Figuren

Figur 1 gibt einen Überblick über die einzelnen Verfahrensschritte zur Herstellung von rAAV-Partikeln und deren Verwendung zur Herstellung einer autologen  
5 Vaccine zur Behandlung von Melanomen.

Figur 2 zeigt schematisch eine Auswahl der erfindungsgemäßen Helferkonstrukte.

Figur 3 zeigt einen Vergleich der Genomstrukturen von Wildtyp AAV (wt AAV),  
10 Helferkonstrukt (=Helferplasmid) und Vektorkonstrukt (=Vektorplasmid).

Figur 4 zeigt schematisch Einzel- und Doppel-Expressionsvektoren.

Figur 5 zeigt schematisch die 5'-lokalisierte ITR-Sequenz der AAV  
15 Vektorkonstrukte mit den Konfigurationen Flip und Flop.

Figur 6 zeigt schematisch das Rep78-defiziente Helferplasmid  
pUC“Rep68,52,40Cap“(RBS)Δ37.

20 Figur 7 zeigt schematisch das weitere Rep78-defiziente Helferplasmid  
pUC“ΔRep78Cap“(RBS)Δ37.

Figur 8 zeigt das Ergebnis einer T-Zell-Proliferation durch Transduktion von  
Mel63-Zellen mit verschiedenen Konstrukten kodierend für B7.1, B7.2 und GFP.

Beispiele

## 1. Revitalisierung von HeLa-t-Zellen

Ein Fläschchen HeLa-t-Zellen ( $5 \times 10^6$  Zellen pro Fläschchen pro ml) wurde  
5 im Wasserbad bei  $37^\circ\text{C}$  aufgetaut. Die Zellen wurden sofort auf ca. 10 ml  
kaltes DMEM-Medium (Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium)  
tropfenweise pipettiert und 5 Minuten bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet  
wurde in 10 ml DMEM resuspendiert und die Zellen erneut bei 200 g  
10 pelletiert. Schließlich wurden die Zellen in 20 ml DMEM (mit 10% FKS,  
(fötales Kälberserum), Pen/Strep (Penicillin/Streptomycin) und Glutamin)  
suspendiert und in einer Nunc T80-Flasche bei  $37^\circ\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  kultiviert.

## 2. Vorkultivierung und Kultivierung der HeLa-t-Zellen

Eine konfluente Kulturflasche wurde zur Expansion der HeLa-t-Zellen und  
15 zur Beibehaltung der Flaschengröße 1:10 (3 Tage bis zur erneuten Konflu-  
enz) bis 1:20 (4 Tage bis zur erneuten Konfluenz) gesplittet. Beim Übergang  
von T80 auf T175 Flaschen wurde 1:5 bis 1:10 gesplittet. Dies geschah durch  
eine etwa 5-minütige Trypsinbehandlung der Zellen bei  $37^\circ\text{C}$  bis zum  
Ablösen der Zellen. Die abgelösten Zellen wurden in Medienüberschuß (ca.  
20 5faches Volumen) suspendiert, 6 Minuten bei 200 g abzentrifugiert, nach  
Bedarf in frischem Medium aufgenommen und auf neue Kulturflaschen  
verteilt. Bei Verwendung einer konfluenten T80-Flasche (erste Passage frisch  
aufgetauter Zellen) wurden die Zellen zuerst mit Trypsin behandelt und  
anschließend auf fünf T175-Flaschen mit je 50 ml Medium 1:10 aufgeteilt.  
25 Nach drei Tagen wuchsen die Zellen wieder konfluent in den Flaschen.  
Anschließend wurden die Zellen aller fünf T175-Flaschen mit Trypsin  
behandelt und in einem Wannenstapel (10 Ebenen,  $6320 \text{ cm}^2$  Kulturfläche,  
900 ml Medium) ausgesät (ca.  $1-2 \times 10^8$  HeLa-t-Zellen). Hierzu wurde der  
Wannenstapel über ein Schlauchsystem mit einem sterilen Glasbehälter



verbunden, wobei der Zufuhrschlauch zum Wannenstapel zunächst geschlossen blieb. Der Glasbehälter wurde mit der Zellsuspension in 900 ml DMEM befüllt. Anschließend wurde die Suspension durch Öffnen der Schlauchklemme in den Wannenstapel überführt. Der Druckausgleich wurde durch  
5 Verwendung von Luftfiltern hergestellt.

### 3. Herstellung der Transfektionslösungen

#### (1) CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung

Eine 3-molare CaCl<sub>2</sub>-Stammlösung wurde hergestellt und vor Gebrauch  
10 auf 260 mM verdünnt und steril gefiltert.

#### (2) 2 x BBS-Transfektionspuffer

Der zweifache Transfektionspuffer ist wie folgt zusammengesetzt:

280 mM NaCl, 50 mM BES, 0,75 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,75 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
(pH 7,8-8,0).

15

### 4. Herstellung der Vektorplasmide

Ausgangsplasmid war das Plasmid pAV2 (ATCC 37216; Laughlin, L.A. et al. (1983) Gene, 23(1), 65), welches das AAV-Genom in einem modifizierten pBR322-Vektor enthält. Die Integrität der AAV-ITRs wurde durch Sequenzierung überprüft. Nach Hydrolyse von pAV2 mit BglII war die Subklonierung der AAV-Sequenz in pUC19 möglich. Hierzu wurde pUC19 mit BamHI geschnitten und direkt mit dem AAV-enthaltenden BglII-Fragment von pAV2  
20 ligiert. Das daraus resultierende Plasmid wird mit pUCAV2 bezeichnet. Die Sequenzierung der ITRs in pUCAV2 und in pAV2 ergab, daß das linke ITR  
25 bis auf einen Basenaustausch an Position 2 (T → G) vollkommen intakt ist, während im rechten ITR 8 terminale Basen fehlen.

Anschließend wurde pUCAV2 mit PpuMI und SnaBI geschnitten, wodurch die AAV-Sequenzen 192 bis 4497 entfernt wurden, was der AAV-Expressionskassette entspricht. Diese Sequenzen wurden durch eine CMV-PolyA-Expressionskassette aus pCI (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) ersetzt. Hierzu wurden in pCI zunächst durch Doppelstrangmutagenesen PpuMI und EcoRV-Schnittstellen vor dem CMV-Promotor bzw. hinter die PolyA-Schnittstelle eingeführt und zwar in beiden Orientierungen (PpuMI vor CMV und EcoRV hinter PolyA und umgekehrt). Danach wurde die Expressionskassette durch doppelte Hydrolyse mit PpuMI und EcoRV aus pCI ausgeschnitten und direkt in das mit PpuMI, SnaBI geschnittene pUCAV2-Vektorfragment in beiden Orientierungen kloniert (pCI-Sequenzen: Orientierung 1 (CMV am rechten ITR): (4002 bis 4008) + (1 bis 1351 + 5 neue Basen bzw. Orientierung 2 (CMV am linken ITR): (4001 bis 4008) + (1 bis 1351) + 7 neue Basen). In diese Basisvektoren wurden anschließend die unterschiedlichen Transgene inkloniert.

Die optimale Orientierung der Expressionskassette wurde mit Hilfe des Luciferase-Reporter-Gens ermittelt. Das Ergebnis war, daß die Orientierung offensichtlich keinen Einfluß auf die Verpackungseffizienz der Vektorkonstrukte ausübte, jedoch war die Expressionskassette aktiver, wenn der CMV-Promotor zum rechten ITR hin orientiert ist. Bei allen Klonierungs- und Sequenzierungsarbeiten wurde festgestellt, daß eine Flop-Flop-Orientierung beider ITR-Strukturen in den Vektorplasmiden deutlich stabiler ist als eine Flip-Flop-Orientierung. Die Flop-Flop-Orientierung war in Bakterien viel stabiler und neigte seltener zu unerwünschten Rekombinationsereignissen als die Flip-Flop-Orientierung. Eine theoretisch mögliche Flip-Flip-Orientierung wurde in keinem einzigen Klon gefunden. Aus diesem Grunde wurden alle Transgene in einen Basisvektor kloniert, dessen ITRs die Flop-Flop-Orientierung aufweisen (Fig. 4).

Vektor-plasmid	Orientierung der ITRs	Lage des CMV Promotors	Promotor-aktivität (pAAV-luc)	Promotor-aktivität (rAAV-luc)
pAAV-luc Klon 1	5'-ITR: flip 3'-ITR: flop	am 5'-ITR	1,13	1,36
pAAV-luc Klon 3	5'-ITR: flop 3'-ITR: flop	am 5'-ITR	1	1
pAAV-luc Klone 3b, 11	5'-ITR: flip 3'-ITR: flop	am 3'-ITR	1,37	2,54
pAAV-luc Klone 10,15,24	5'-ITR: flop 3'-ITR: flop	am 3'-ITR	1,5	2,88

\* = 6 µg Vektorplasmid wurden in  $4 \times 10^5$  HeLa-t Zellen transfiziert. 40  
 5 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Promotoraktivität  
 über die Messung der Luciferasecounts ermittelt. Angegeben ist die relative  
 Promotoraktivität ( $1 = 2 \times 10^8$  counts).

\*\* = 4 µg Vektorplasmid wurden mit 12 µg Helferplasmid (pUC"rep/cap")  
 10 in  $1 \times 10^6$  HeLa-t Zellen transfiziert. 2 Tage später wurden die Zellen mit  
 AdV-5 (MOI=2) infiziert. 3 Tage nach Infektion wurden die Zellen im  
 Medium durch Frier/Tau-Lyse aufgeschlossen, Zelltrümmer pelletiert und das  
 rAAV-Lysat 10 min bei 60°C Hitze inaktiviert. Mit 10% des Lysats wurden  
 3  $\times 10^5$  bestrahlte HeLa-t Zellen (100 Gy) infiziert. 40 Stunden nach Infektion  
 15 der Zellen mit rAAV wurden die Zellen lysiert und die Luciferaseaktivität  
 ermittelt. Angegeben ist die relative Aktivität ( $1 = 1 \times 10^6$  counts).

Spalte 4 (rel. Promotoraktivität nach transienter Transfektion der Konstrukte) spiegelt direkt, Spalte 5 indirekt die Aktivität des CMV-Promotors in Abhängigkeit von der Lage innerhalb des AAV-Genoms wider. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, steigt die Aktivität des Promotors etwa um den Faktor 1,5 - 3, wenn dieser am 3'-ITR gelegen ist. Die erzielten rAAV Titer nach Verpackung der verschiedenen Klone sind etwa vergleichbar (genomische Titer wurden über Dotblot Analysen bestimmt). Dies bedeutet, daß die Orientierung der ITRs (flip/flop) bzw. des CMV-Promotors zu den ITRs für die Verpackbarkeit der Konstrukte in rAAV Partikel keine Rolle spielt. Ferner ist anzumerken, daß Klone mit flip/flop Orientierung der ITRs (1, 3b und 11) sehr viel seltener gefunden wurden, als solche mit flop/flop Orientierung.

#### 5. Herstellung des Helferplasmids

Aus Wildtyp-AAV-DNA wurden mittels PCR die AAV-Basen 190 bis 1060 amplifiziert. Dabei wurde der 5'-Primer so gewählt, daß an Position 199 eine singuläre XbaI-Schnittstelle eingeführt wurde. Das PCR-Fragment wurde dann mit XbaI und BamHI nachgeschnitten und in den ebenso geschnittenen Vektor pUC19 kloniert. Position 199 im AAV-Genom wurde gewählt, um sicherzustellen, daß alle wichtigen p5-Promotorelemente im Helferplasmid vorhanden sind. Nach einer Kontrollsequenzierung wurde Wildtyp-AAV-DNA mit BamHI und SnaBI geschnitten und das Insert-Fragment anschließend in die BamHI und SmaI-Position des Zwischenproduktes inkloniert. Auf diese Weise wurde das Basis-Helferplasmid pUC "rep/cap" gewonnen (Fig. 2). Dieses Helferplasmid enthält die AAV-Sequenzen 201 bis 4497, während das oben beschriebene Vektorplasmid die AAV-Sequenzen 1 bis 191 bzw. 1-60/83-191 (linker ITR) und 4498 bis 4671 (rechter ITR) trägt. Auf diese Weise wurde sichergestellt, daß keine homologen AAV-Sequenzüberlappungen auf den Plasmiden existieren. Anschließend

wurde vom 3'-Ende des AAV-Genoms in pUC "rep/cap"  $\Delta 37$  Basen deletiert, die für eine optimale Expression der AAV-Rep und Cap-Gene nicht benötigt werden. Das resultierende Helferplasmid wird mit pUC "rep/cap"  $\Delta 37$  bezeichnet und enthält die minimalisierte AAV-Sequenz von  
5 Position 201 bis 4460 (Fig. 2).

Anschließend wurde die Rep-Bindungsstelle (RBS) im Vektorrückgrat pUC19 (Position 684 bis 708 einschließlich; Sequenz: 5'-CTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGAC-3) deletiert, um eine nicht-homologe Rekombination an dieser Position zu vermeiden. Das Plasmid trägt die Bezeichnung pUC "rep/cap"(RBS) $\Delta 37$ . In einigen Plasmiden wurden zudem die drei RBS im Rep-Gen (p5- und p19-Promotor) einzeln und in verschiedenen Kombinationen mutiert, ohne die Aminosäuresequenzen des Rep-Proteins zu verändern (Fig. 2).

15 In einem weiteren Helferplasmid wurde eine sog. "functional separation"-Sequenz (fs) von 638 Basenpaaren Länge zwischen das Rep- und Cap-Gen eingeführt. Hierzu wurde zuerst die AAV-Sequenz 1691 bis 2328, die den Rep C-Terminus bzw. den AAV p40-Promotor einschließlich Cap-Sequenzen und alle für p40 essentiellen regulatorischen Sequenzen enthält, verdoppelt  
20 und hinter das Stop-Kodon für die gespleißten Rep-Versionen (Position 2329) kloniert. Dadurch wurde der AAV p40-Promotor, welcher das cap-Gen kontrolliert, verdoppelt und hinter das rep-Gen eingesetzt. Anschließend wurde der p40-Promotor im rep-Gen zerstört, ohne die Rep-Aminosäuresequenz zu verändern. Diese wurde durch eine Mutation der p40 TATA-Box gewährleistet. Insgesamt wurden für die erforderlichen Klonierungsschritte folgende AAV-Nukleotide verändert, ohne dabei jedoch die Aminosäuresequenz von Rep und Cap zu verändern: 1693 (T  $\rightarrow$  A), 1694 (T  $\rightarrow$  G), 2330 (G  $\rightarrow$  C), 2331 (G  $\rightarrow$  T), 2332 (G  $\rightarrow$  A), 1625 (C  $\rightarrow$  T), 1628 (A  $\rightarrow$  G), 1826

(A → C), 1827 (A → T) und 1828 (G → C). Das resultierende Helferplasmid wird mit pUC "rep/fs/cap" Δ37 bezeichnet (Fig. 2).

5 Analog wurde eine zusätzliche Sequenz in pUC "rep/cap"(RBS)Δ37 eingefügt, wobei ein Helferplasmid mit der Bezeichnung pUC "rep/fs/cap" (RBS) Δ37 resultierte (Fig. 2).

Die weiteren Rep78-defizienten Helferkonstrukte wurden hergestellt, indem im Helferkonstrukt pUC"rep/cap"(RBS)Δ37 (vgl. Fig. 2) die AAV  
10 Nukleotide 1907 bis 2227, die dem rep Intron entsprechen, durch Doppelstrangmutagenese deletiert wurden, wodurch das Plasmid pUCAAVSpleiß als Zwischenprodukt erhalten wurde. Das Plasmid pUCAAVSpleiß wurde mit dem Restriktionsenzym NdeI linearisiert, mit einer Exonuklease, beispielsweise Mung Bean Nuclease (Boehringer  
15 Mannheim, Deutschland) behandelt und anschließend mit dem Restriktionsenzym SphI versetzt. Das so erhaltene Fragment mit einer Länge von 4222 bp wurde mit einem Vektorfragment zum Rep78-defizienten Helferkonstrukt pUC"Rep68,52,40Cap"(RBS)Δ37 (10657 bp) durch Ligation verbunden (vgl. Fig. 6). Für die Gewinnung dieses Vektorfragments kann  
20 beispielsweise pUC"rep/cap"(RBS)Δ37 verwendet werden, das nach einer Behandlung mit den Restriktionsenzymen NruI und SphI in einer Länge von 6435 bp erhalten wird.

Dasselbe Vektorfragment kann weiterhin zur Herstellung eines weiteren  
25 Rep78-defizienten Helferkonstruktes pUC"ΔRep78Cap"(RBS)Δ37 verwendet werden (vgl. Fig. 7). Hierfür wurde das Zwischenprodukt pUCAAVSpleiß mit den Restriktionsenzymen AseI, BsrBI sowie SphI behandelt. Das 1808 bp lange BsrBI-SphI-Fragment wurde mit dem 6435 bp langen Vektorfragment

zu besagtem Helferkonstrukt pUC $\Delta$ Rep78Cap“(RBS) $\Delta$ 37 zu einer Gesamtlänge von 8243 bp durch Ligation verbunden. Durch diese Klonierungsstrategie wird in beiden Rep78-defizienten Helferkonstrukten das rep Gen teilweise dupliziert, so daß eine verstärkte Expression der Rep-Proteine Rep68, Rep52 und Rep40 von beiden rep Genen ermöglicht wird.

Die oben beschriebenen und in Fig. 2 schematisch dargestellten Helferplasmide besitzen alle in etwa vergleichbare Verpackungskapazitäten.

10 Im Rahmen der Kotransfektionsexperimente wurden 4  $\mu$ g Vektorplasmid (pAAV-GFP) mit 12  $\mu$ g Helferplasmid in  $1 \times 10^6$  HeLa-t Zellen kotransfiziert. Lediglich im Falle des mit (seq) bezeichneten Experiments wurden zunächst 16  $\mu$ g Helferplasmid, einen Tag darauf 16  $\mu$ g Vektorplasmid sequentiell transfiziert. 2 Tage nach (der ersten) Transfektion wurden die Zellen mit 15 AdV-5 (MOI=2) infiziert. 3 Tage später wurden die Zellen im Medium durch Frier/Tau-Lyse aufgeschlossen, Zelltrümmer pelletiert und das rAAV-Lysat 10 min bei 60°C Hitze-inaktiviert. Mit verschiedenen Verdünnungen des Lysats wurden  $3 \times 10^5$  bestrahlte HeLa-t Zellen (100 Gy) infiziert. 40 Stunden 20 hinsichtlich der GFP Expression analysiert und hieraus die transduzierenden Titer der rAAV Rohlysate ermittelt. Jedes Helferplasmid wurde in mindestens 5 unabhängigen Experimenten getestet. In der Tabelle sind gemittelte Werte dargestellt.

Helferplasmid	Transduzierender rAAV-GFP Titer (tP / ml)
pUC"rep/cap"	1,38x10 <sup>7</sup>
pUC"rep/cap"Δ37	1,49 x10 <sup>7</sup>
pUC"rep/fs/cap"Δ37	1,26 x10 <sup>7</sup>
pUC"rep/cap"(RBS) Δ37	1,46 x10 <sup>7</sup>
pUC"rep/fs/cap"(RBS) Δ37	9,11 x10 <sup>6</sup>
pUC"rep/cap"Δ37 (seq)	2,48 x10 <sup>7</sup>

tP = transduzierende Partikel

seq = sequentielle Transfektion

5

Die Verpackung und Titerbestimmung für die folgenden Experimente 1 bis 3 erfolgte wie oben beschrieben. Bei den Experimenten 1 und 3 handelte es sich um sequentielle Transfektionen, bei Experiment 2 um eine Kotransfektion von Helfer- und Vektorkonstrukt.

10

Rep78-defiziente Helferkonstrukte zeigen bei sequentieller Transfektion von Helfer- und Vektorkonstrukt (Experimente 1 und 3, in der nachfolgenden Tabelle dargestellt) in etwa gleich gute Verpackungseffizienzen verglichen mit Rep78-kodierenden Helferkonstrukten. Alle transduzierenden Titer lagen im gleichen logarithmischen Bereich. Bei Experiment 2 wurden Kotransfektionen durchgeführt, wodurch andere Versuchsbedingungen gewählt wurden und Experiment 2 daher auch hinsichtlich der Verpackungseffizienzen nicht mit

15



Experiment 1 und 3 verglichen werden kann. Die Ergebnisse dieser Experimente sind in der folgenden Tabelle gezeigt.

	Experiment 1	Experiment 2	Experiment 3
Helferkonstrukt	transd. Titer (tP / ml)	transd. Titer (tP / ml)	transd. Titer (tP / ml)
pUC"rep/cap"Δ37	4,87E+06	7,80E+07	4,90E+07
pUC"rep/cap"(RBS)Δ37	8,13E+06	2,60E+07	3,80E+07
pUC"rep/fs/cap"Δ37	7,26E+06	2,50E+07	4,10E+07
pUC"rep/fs/cap"(RBS)Δ37	2,74E+06	3,50E+06	5,20E+07
pUC"Rep68,52,40Cap"(RBS)Δ37	1,98E+06	2,50E+06	2,40E+07
pUC"ΔRep78Cap"(RBS)Δ37	n.d.	2,50E+06	1,80E+07

5

## 6. Verpackung rekombinanter AAV-Vektoren

Tag 1: Aussäen von HeLa-t-Zellen in Wannentapeln

1 Nunc Wannentapel (10 Ebenen, 6320 cm<sup>2</sup> Kulturfläche) wurde mit ca. 2 x 10<sup>8</sup> HeLa-t-Zellen in 900 ml DMEM, wie oben bereits näher beschrieben, befüllt und über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

10

Tag 2: Calciumphosphattransfektion nach Chen, T. & Okayama, H. (1987), supra, der HeLa-t-Zellen mit dem Helferplasmid:

1800 µg Helferplasmid wurden mit 45 ml sterilem 260 mM CaCl<sub>2</sub> vermischt, 45 ml steriles 2 x BBS zugegeben, vorsichtig vermischt und 15 Min. bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Medium aus dem Wannentapel in ein steriles 1 bis 2 l großes Gefäß überführt, das Transfektionsgemisch zupipettiert und das Medium wieder in den Wannentapel zurückgeleitet. Die Transfektion wurde bei 35°C, 3% CO<sub>2</sub> über Nacht durchgeführt.

15

Tag 3: Transfektion der HeLa-t-Zellen mit dem Vektorplasmid:

18 Stunden nach der Transfektion mit Helferplasmid wurden die Zellen auf 37°C, 5% CO<sub>2</sub> gebracht, und nach weiteren 3 bis 5 Stunden das Medium  
5 gegen ein neues Medium (900 ml DMEM mit 10% FKS, Glutamin und Pen/Strep) ausgetauscht sowie das Vektorplasmid in das frische Medium, wie oben beim Helferplasmid bereits näher beschrieben, überführt.

Tag 4: Infektion der HeLa-t-Zellen mit Adenoviren:

10 18 Stunden nach Transfektion mit dem Vektorplasmid wurden die Zellen erneut auf 37°C, 5% CO<sub>2</sub> gebracht, und nach weiteren 3 bis 5 Stunden mit Adenoviren infiziert. Hierzu wurde das Kulturmedium gegen 900 ml DMEM-Medium (DMEM mit 10% FKS, Glutamin und Pen/Strep), welches mit 2 bis 3 x 10<sup>9</sup> (MOI = 5) Adenoviren (Ad-5) versetzt wurde, ausgetauscht.  
15 Anschließend erfolgte die Kultivierung über Nacht bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>,

Tag 5: Medienwechsel

Am anderen Tag wurde das Kulturmedium durch 900 ml DMEM-Medium (mit Glutamin, Pen/Strep sowie Gentamicin, aber ohne FKS) ersetzt.

20

Tag 8: Ernte der rAAV-Partikel

Am achten Tag erfolgte die Ernte der rAAV-Partikel.

25 Für die Ernte der rAAV Partikel wird der komplette Wannenstapel dreimal in Folge bei -20°C eingefroren und bei 4°C wieder aufgetaut. Das Lysat wird in sterile Zentrifugenbecher überführt und Zelltrümmer bei 5000g

abzentrifugiert. Das geklärte Lysat ist dann Ausgangsmaterial für nachfolgende Reinigungsschritte.

7. T-Zellaktivierung durch B7.2 transduzierte Melanomzellen

- 5 Melanomzelllinie Mel63 wurde bestrahlt (100 Gy) und mit rAAV-B7.2 transduziert. Nach 48 Stunden wurden die transduzierten Melanomzellen (Mel63-rAAV-B7.2,  $10^4$  pro well) mit peripheren Blut-Lymphozyten ( $10^5$  pro well) eines gesunden Spenders inkubiert. Die Lymphozytenproliferation wurde mittels Einbau an radioaktivem Thymidin an Tag 5 gemessen.
- 10 Wohingegen T-Lymphozyten ohne Stimulation (Medium) bzw. nach Inkubation mit unmodifizierten Mel63 Zellen (Mel63) nicht proliferieren, kam es infolge der B7.2 Transduktion zu einer Aktivierung der T-Zellen. Diese Reaktion war so stark wie die, die nach Inkubation der T-Lymphozyten mit stabil exprimierenden B7.1<sup>+</sup> bzw B7.2<sup>+</sup> Varianten der Melanom Zelllinien
- 15 Mel63 beobachtet wurde.

Patentansprüche

5

1. Verfahren zur Herstellung eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus (rAAV), dadurch gekennzeichnet, daß in eine geeignete Zelle zeitlich versetzt ein oder mehrere Helferkonstrukte enthaltend Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein und/oder für die Cap-Proteine  
10 (erstes Konstrukt) sowie ein Vektorkonstrukt (zweites Konstrukt) enthaltend ein oder mehrere zu AAV heterologe Nukleinsäuren, die von ITR-Sequenzen flankiert werden, eingebracht werden, vorzugsweise wird zuerst das oder die Helferkonstrukte in eine geeignete Zelle eingebracht.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß nach dem Einbringen des oder der genannten ersten Konstrukte und vor dem Einbringen des genannten zweiten Konstruktes die Zelle gereinigt wird.
- 20 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-2, dadurch gekennzeichnet, daß in einem weiteren Schritt zeitlich versetzt ein Helfervirus hinzugegeben wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-3, dadurch gekennzeichnet, daß der Zeitabstand der einzelnen Schritte unabhängig voneinander mindestens ca. 1 Stunde, vorzugsweise mindestens ca. 12 Stunden, insbesondere mindestens  
25 ca. 1 Tag, vor allem ca. 1-2 Tage beträgt.

5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-4, dadurch gekennzeichnet, daß die gentechnisch veränderten Zellen in einem Serum-freien Medium kultiviert werden.
- 5 6. Helferkonstrukt enthaltend Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein und für die Cap-Proteine, dadurch gekennzeichnet, daß das Helferkonstrukt vorzugsweise mit Ausnahme der AAV-Promotoren keine Nukleinsäuresequenzen enthält, an die mindestens ein Rep-Protein im wesentlichen spezifisch binden kann.
- 10 7. Helferkonstrukt nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Konstrukt keine Sequenz der Formel CGCTTCCTCGCTCACTGA im Vektorrückgrat enthält.
- 15 8. Helferkonstrukt nach Anspruch 6 oder 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Rep-Proteine Rep 68, Rep 52 und Rep 40, insbesondere Rep 68 und Rep 52 sind und unabhängig davon die Cap-Proteine VP 1, VP 2 und VP 3.
- 20 9. Helferkonstrukt enthaltend Nukleinsäuresequenzen kodierend für mindestens ein Rep-Protein dadurch gekennzeichnet, daß die Rep-Proteine Rep 68, Rep 52 und/oder Rep 40 und insbesondere nicht Rep 78 sind.
- 25 10. Helferkonstrukt nach einem der Ansprüche 6-9, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen der Nukleinsäuresequenz kodierend für rep und cap eine zusätzliche Nukleinsäuresequenz eingebaut wird, die eine Verpackung des Helferkonstruktes in ein AAV-Kapsid verschlechtert.

11. Helferkonstrukt nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß die zusätzliche Nukleinsäuresequenz eine Länge von mindestens ca. 300 Nukleotiden, vorzugsweise von mindestens ca. 500 Nukleotiden, insbesondere von mindestens ca. 600-700 Nukleotiden besitzt.
- 5
12. Helferkonstrukt nach einem der Ansprüche 6-11, dadurch gekennzeichnet, daß das Helferkonstrukt keine zu dem Vektorkonstrukt homologen Nukleinsäuresequenzen enthält, die eine homologe Rekombination erlauben.
- 10
13. Helferkonstrukt nach einem der Ansprüche 6-12, dadurch gekennzeichnet, daß die AAV-2 Basen 4461-4497 deletiert sind.
14. Helferkonstrukt nach einem der Ansprüche 6-13, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der Rep-Proteine und/oder Cap-Proteine durch die AAV-Promotoren oder durch einen heterologen Promotor und/oder Enhancer kontrolliert werden.
- 15
15. Vektorkonstrukt enthaltend ein oder mehrere zu AAV heterologe Nukleinsäure/n, die von ITR-Sequenzen flankiert werden, dadurch gekennzeichnet, daß die ITR-Sequenzen in flop-Orientierung vorliegen.
- 20
16. Vektorkonstrukt nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die Expression der heterologen Nukleinsäure/n von einem zu AAV heterologen Promotor und/oder Enhancer kontrolliert werden.

17. Vektorkonstrukt nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß der heterologe Promotor und/oder Enhancer zur 3'-lokalisierten ITR-Sequenz orientiert ist.
- 5 18. Konstrukt nach einem der Ansprüche 6-17, dadurch gekennzeichnet, daß das Konstrukt replikationsdefizient ist.
19. Konstrukt nach einem der Ansprüche 6-17, dadurch gekennzeichnet, daß das Konstrukt selbstreplizierend ist.
- 10
20. Konstrukt nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das Konstrukt sowohl SV40ori-Nukleinsäuresequenzen als auch Nukleinsäuresequenzen kodierend für das SV40 T-Antigen oder alternativ sowohl EBV oriP-Nukleinsäuresequenzen als auch EBV EBNA-Sequenzen enthält.
- 15
21. Verwendung mindestens eines Helferkonstruktes gemäß einem der Ansprüche 6-14 und/oder eines Vektorkonstruktes gemäß einem der Ansprüche 15-17 und/oder eines Konstruktes gemäß einem der Ansprüche 18-20 zur Herstellung von rAAV.
- 20
22. Verwendung nach Anspruch 21 in einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-5.
- 25 23. Tumorzelle, vorzugsweise eine Melanomzelle, dadurch gekennzeichnet, daß in die Tumorzelle eine oder mehrere heterologe Nukleinsäuresequenz/en kodierend für GM-CSF und B7.2 eingebracht wurde.

24. Arzneimittel enthaltend eine Tumorzelle gemäß Anspruch 23.
25. Verfahren zur Herstellung einer Tumorzelle gemäß Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, daß eine oder mehrere Nukleinsäuresequenz/en kodierend für GM-CSF und B7.2 in die Tumorzelle eingebracht wird.
- 5
26. Verfahren nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die genannte/n Nukleinsäuresequenz/en mit Hilfe eines rekombinanten Adeno-assoziierten Virus herstellbar nach einem Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1-5 eingebracht wird, und die Tumorzelle vorzugsweise bestrahlt wird.
- 10
27. Verwendung einer Tumorzelle gemäß Anspruch 23 zur Behandlung von Krebserkrankungen, insbesondere von bösartigen Krebserkrankungen, vorzugsweise von Melanomen.
- 15
28. Verwendung eines Konstruktes gemäß einem der Ansprüche 6-20 zur Behandlung von Erkrankungen, vorzugsweise Tumorerkrankungen, insbesondere Malignem Melanom, Ovar-, Brust-, Colon-, Prostata-, Bronchial-, Kopf- und/oder Halstumor.



## Fig. 1

- Tag 1: Kultivierung von HeLa-t-Zellen in DMEM-Medium mit fötalem Kälberserum (FCS)
- Tag 2: Calciumphosphattransfektion mit Helferplasmid pUC"rep/cap"(RBS) $\Delta$ 37
- Tag 3: Calciumphosphattransfektion mit Vektorplasmid pAAV-(B7.2/GM-CSF)
- Tag 4: Infektion mit Adenovirus Ad-5
- Tag 5: Austausch des Kulturmediums gegen Serum-freies DMEM-Medium
- Tag 8 ff:
1. Ernten des Zellpellets und des Überstandes
  2. Herstellung eines Rohlysates
  3. Trennen von rAAV-Partikeln von Adenovirus mittels Filtration
  4. Konzentrierung der rAAV-Partikel mittels Ultrafiltration
  5. Transduktion von autologen Melanomzellen mit rAAV-Partikeln
  6. Bestrahlung der transduzierten Melanomzellen
  7. Behandlung des Patienten mit den bestrahlten und transduzierten Melanomzellen

Fig. 2

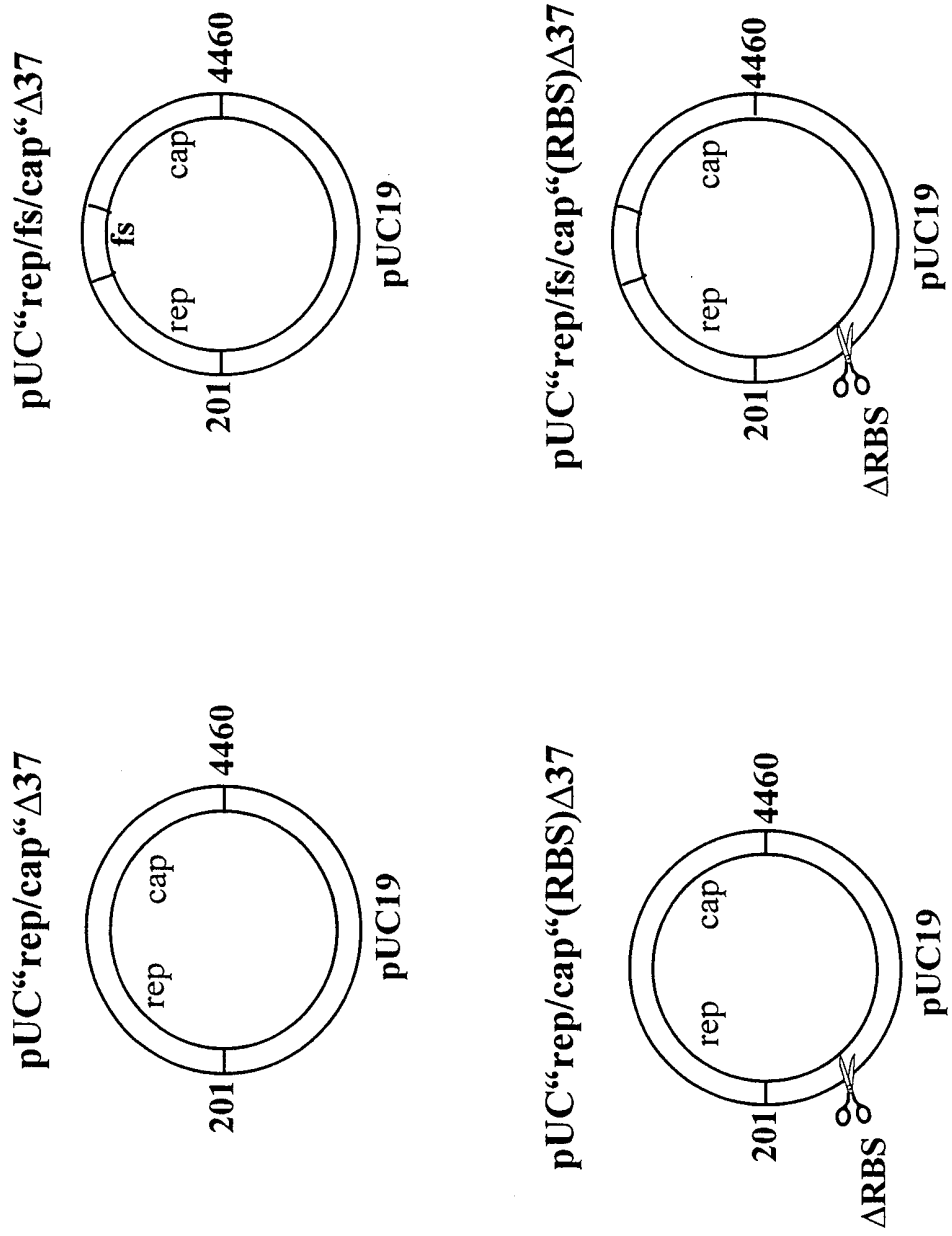


Fig. 3

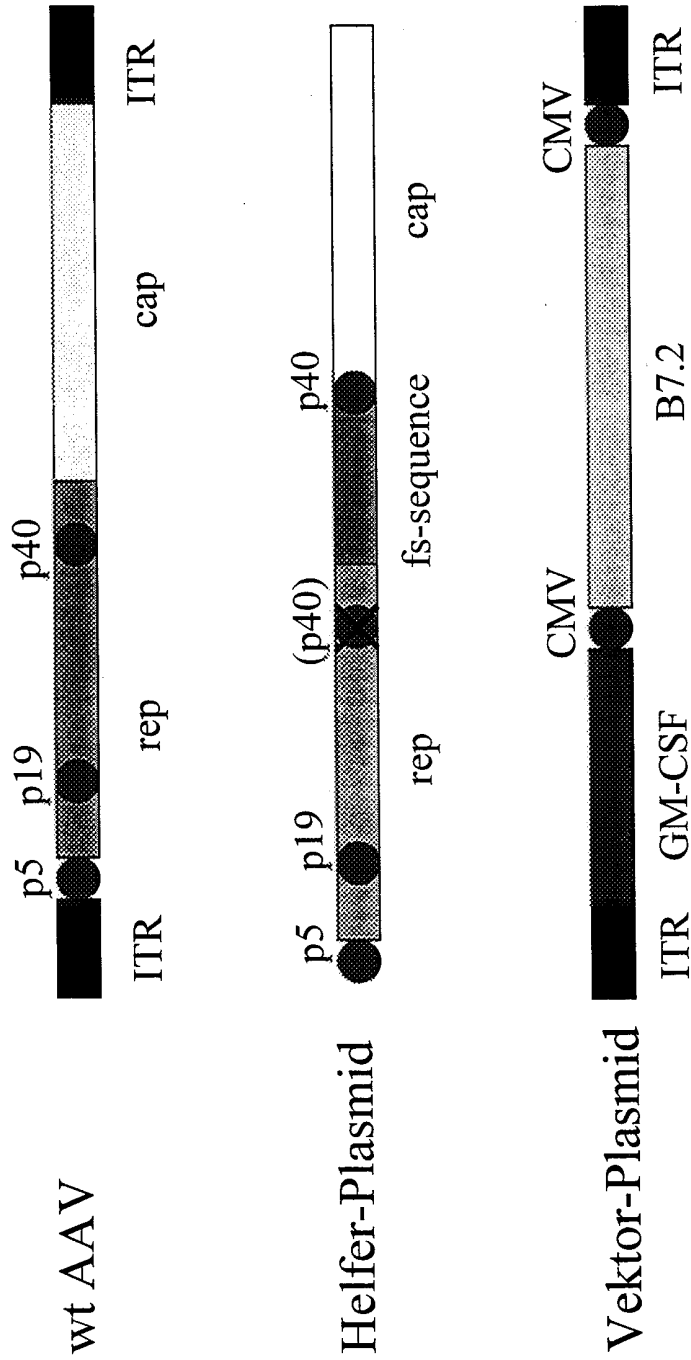
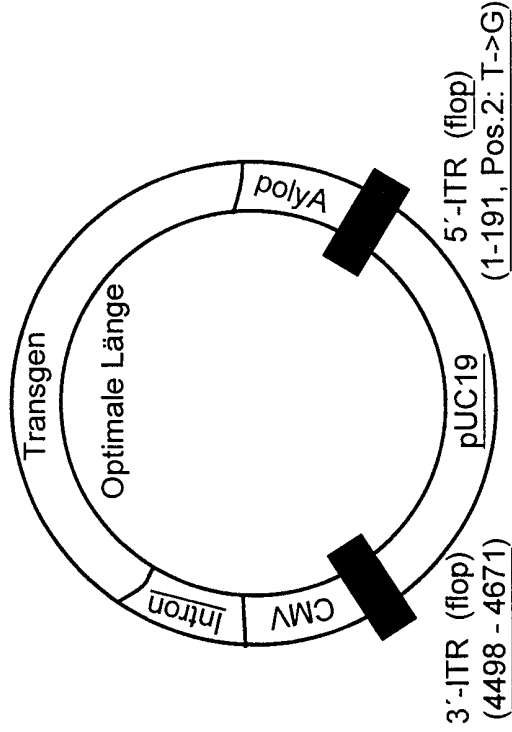


Fig. 4

Einzelexpressions-  
Vektoren



Doppelexpressions-  
Vektoren

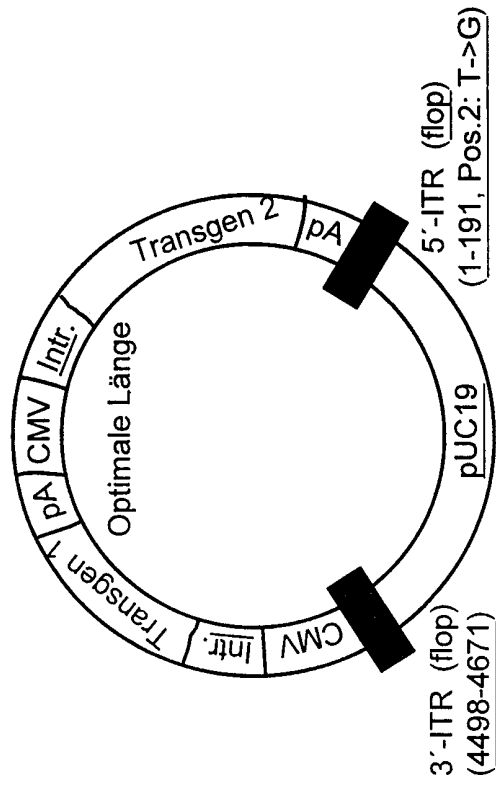


Fig. 5

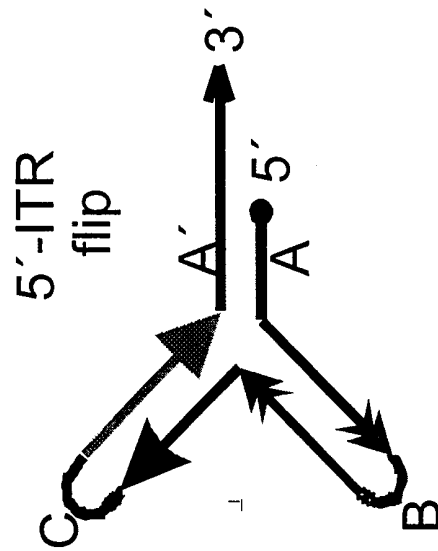
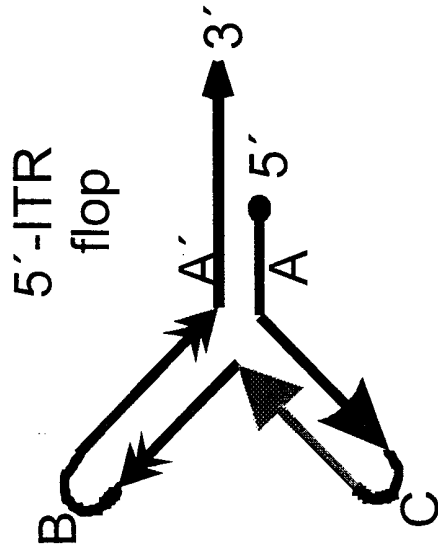


Fig. 6 pUC"Rep68,52,40Cap"(RBS) $\Delta$ 37

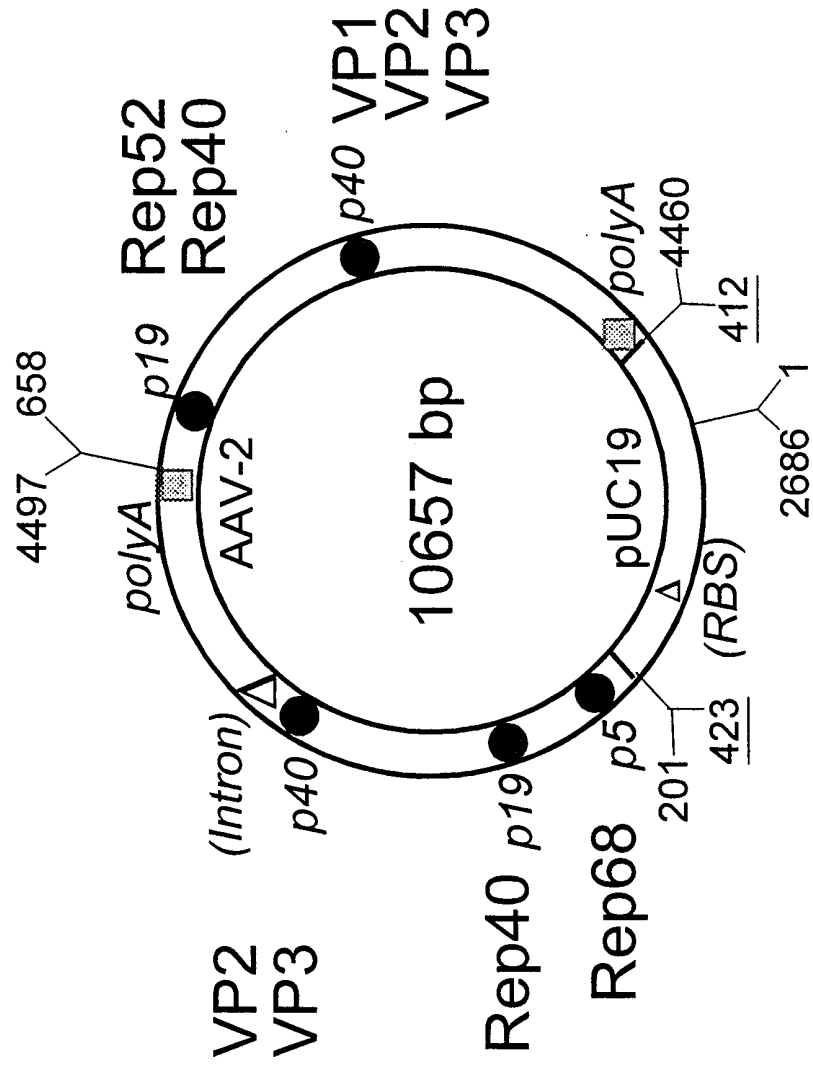


Fig. 7 pUC $\Delta$ Rep78Cap“(RBS) $\Delta$ 37

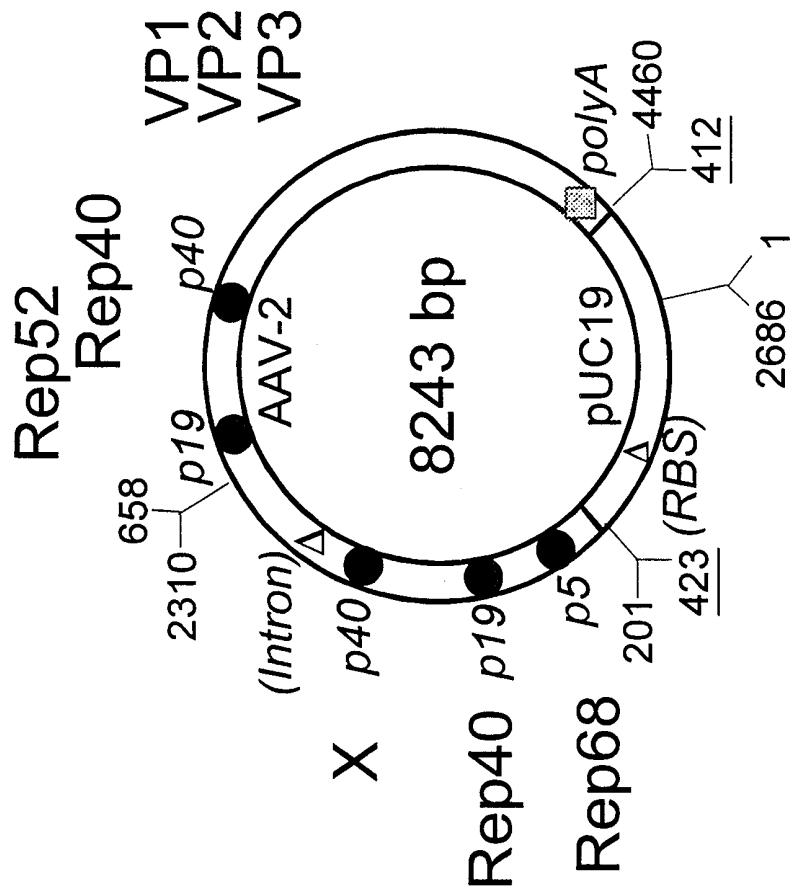
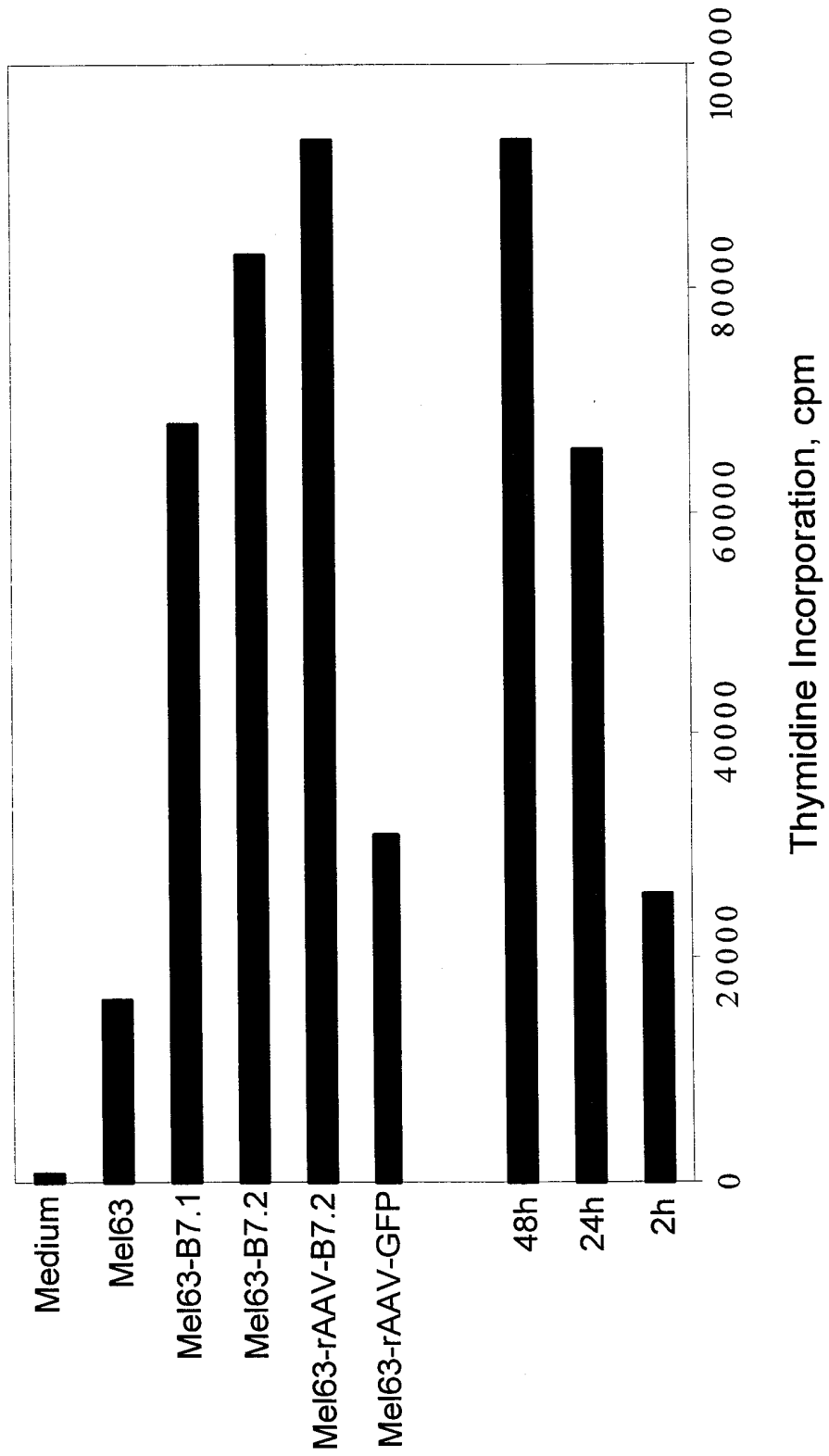


Fig. 8





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter. Application No  
PCT/EP 00/01090

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
IPC 7 C12N15/864 C12N5/10 C12N15/19 A61K48/00

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N A61K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 97 49824 A (MEDIGENE AG ;BOGEDAIN CHRISTOPH (DE); MAASS GERD (DE); HALLEK MICH) 31 December 1997 (1997-12-31)	1-6, 12-14, 16-19, 21,22
Y	the whole document, in particular page 5, lines 20-26	8-11,15
Y	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." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 69, no. 11, 1995, pages 6880-6885, XP002139919 ISSN: 0022-538X the whole document	8,9

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 June 2000

Date of mailing of the international search report

19/07/2000

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

Mandl, B

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/01090

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 97 09441 A (PIRAINO SUSAN ;VINCENT KAREN (US); GENZYME CORP (US); KYOSTIO SIRK) 13 March 1997 (1997-03-13) page 16, line 8 - line 21	10,11
Y	WO 98 45462 A (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO ;CILIBERTO GENNARO (IT); RIZZUTO GAB) 15 October 1998 (1998-10-15) page 29, line 20, paragraph 25	15
X	WO 97 32988 A (HALLEK MICHEL ;MAASS GERHARD (DE); MEDIGENE GMBH (DE); BOGEDAIN CH) 12 September 1997 (1997-09-12)	6,12-14, 16-22
Y	the whole document	23-28
Y	WO 98 06746 A (US GOVERNMENT ;UNIV JOHNS HOPKINS MED (US)) 19 February 1998 (1998-02-19) cited in the application the whole document	23-28
X	EP 0 488 528 A (APPLIED IMMUNESCIENCES) 3 June 1992 (1992-06-03)  the whole document, in particular page 4, lines 55-58 and claim 9	1-4,6, 12-14, 16-22
A	MCCARTY D. M. ET AL.: "Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus rep protein." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 68, no. 8, 1994, pages 4988-4997, XP002139920 ISSN: 0022-538X cited in the application the whole document	7

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/01090

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9749824	A	31-12-1997	DE 19625188 A	08-01-1998
			EP 0954592 A	10-11-1999
WO 9709441	A	13-03-1997	AU 715543 B	03-02-2000
			AU 6917396 A	27-03-1997
			CA 2230758 A	13-03-1997
			EP 0850313 A	01-07-1998
			JP 11514853 T	21-12-1999
WO 9845462	A	15-10-1998	IT RM970200 A	08-10-1998
			AU 7077898 A	30-10-1998
WO 9732988	A	12-09-1997	DE 19608751 A	11-09-1997
			EP 0888457 A	07-01-1999
WO 9806746	A	19-02-1998	AU 3889997 A	06-03-1998
			EP 0929318 A	21-07-1999
EP 0488528	A	03-06-1992	US 5173414 A	22-12-1992
			AT 130870 T	15-12-1995
			CA 2054517 A,C	01-05-1992
			DE 69114997 D	11-01-1996
			DE 69114997 T	18-04-1996
			DK 488528 T	27-12-1995
			HK 1007765 A	23-04-1999
			JP 2655771 B	24-09-1997
			JP 5308975 A	22-11-1993
			US 5681731 A	28-10-1997
			US 5691176 A	25-11-1997
			US 5780280 A	14-07-1998
			US 5589377 A	31-12-1996
US 5354678 A	11-10-1994			

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationale Aktenzeichen  
PCT/EP 00/01090

**A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 C12N15/864 C12N5/10 C12N15/19 A61K48/00

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

**B. RECHERCHIERTE GEBIETE**

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationsymbole)  
 IPK 7 C12N A61K

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

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

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 49824 A (MEDIGENE AG ;BOGEDAIN CHRISTOPH (DE); MAASS GERD (DE); HALLEK MICH) 31. Dezember 1997 (1997-12-31)	1-6, 12-14, 16-19, 21,22
Y	das ganze Dokument, insbesondere Seite 5, Zeilen 20-26	8-11,15
Y	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." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 69, Nr. 11, 1995, Seiten 6880-6885, XP002139919 ISSN: 0022-538X das ganze Dokument	8,9

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 erfindertischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- \*Y\* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfindertischer 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	Abschließdatum des internationalen Recherchenberichts
9. Juni 2000	19/07/2000

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  Mandl, B
---	---

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

inter.inales Aktenzeichen

PCT/EP 00/01090

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 97 09441 A (PIRAINO SUSAN ;VINCENT KAREN (US); GENZYME CORP (US); KYOSTIO SIRK) 13. März 1997 (1997-03-13) Seite 16, Zeile 8 - Zeile 21 ---	10,11
Y	WO 98 45462 A (ANGELETTI P IST RICHERCHE BIO ;CILIBERTO GENNARO (IT); RIZZUTO GAB) 15. Oktober 1998 (1998-10-15) Seite 29, Zeile 20, Absatz 25 ---	15
X	WO 97 32988 A (HALLEK MICHEL ;MAASS GERHARD (DE); MEDIGENE GMBH (DE); BOGEDAIN CH) 12. September 1997 (1997-09-12)	6,12-14, 16-22
Y	das ganze Dokument ---	23-28
Y	WO 98 06746 A (US GOVERNMENT ;UNIV JOHNS HOPKINS MED (US)) 19. Februar 1998 (1998-02-19) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument ---	23-28
X	EP 0 488 528 A (APPLIED IMMUNESCIENCES) 3. Juni 1992 (1992-06-03)  das ganze Dokument, insbesondere Seite 4, Zeilen 55-58 und Anspruch 9 das ganze Dokument ---	1-4,6, 12-14, 16-22
A	MCCARTY D. M. ET AL.: "Identification of linear DNA sequences that specifically bind the adeno-associated virus rep protein." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 68, Nr. 8, 1994, Seiten 4988-4997, XP002139920 ISSN: 0022-538X in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument -----	7

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Intern. Aktenzeichen

PCT/EP 00/01090

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9749824 A	31-12-1997	DE 19625188 A	08-01-1998
		EP 0954592 A	10-11-1999
WO 9709441 A	13-03-1997	AU 715543 B	03-02-2000
		AU 6917396 A	27-03-1997
		CA 2230758 A	13-03-1997
		EP 0850313 A	01-07-1998
		JP 11514853 T	21-12-1999
WO 9845462 A	15-10-1998	IT RM970200 A	08-10-1998
		AU 7077898 A	30-10-1998
WO 9732988 A	12-09-1997	DE 19608751 A	11-09-1997
		EP 0888457 A	07-01-1999
WO 9806746 A	19-02-1998	AU 3889997 A	06-03-1998
		EP 0929318 A	21-07-1999
EP 0488528 A	03-06-1992	US 5173414 A	22-12-1992
		AT 130870 T	15-12-1995
		CA 2054517 A,C	01-05-1992
		DE 69114997 D	11-01-1996
		DE 69114997 T	18-04-1996
		DK 488528 T	27-12-1995
		HK 1007765 A	23-04-1999
		JP 2655771 B	24-09-1997
		JP 5308975 A	22-11-1993
		US 5681731 A	28-10-1997
		US 5691176 A	25-11-1997
		US 5780280 A	14-07-1998
		US 5589377 A	31-12-1996
US 5354678 A	11-10-1994		