


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 ⁶ : C12N 15/87, 5/10, 15/86, C07K 14/00, 14/075</p>	A3	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 95/33062</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 7. Dezember 1995 (07.12.95)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP95/01989</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 26. Mai 1995 (26.05.95)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: P 44 18 825.0 30. Mai 1994 (30.05.94) DE P 44 42 587.2 30. November 1994 (30.11.94) DE</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH [DE/DE]; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): COTTEN, Matthew [US/AT]; Maxingstrasse 22-24/3/8, A-1130 Wien (AT). BAKER, Adam [GB/AT]; Hohlweggasse 23/5, A-1030 Wien (AT). CHIOCCA, Susanna [IT/AT]; Hegergasse 13/1/5, A-1030 Wien (AT).</p> <p>(74) Gemeinsamer Vertreter: BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH; Postfach 200, D-55216 Ingelheim am Rhein (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AU, BR, CA, CN, JP, KR, MX, PL, RU, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p> <p>(86) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 18. Juli 1996 (18.07.96)</p>	

(54) Title: **METHOD FOR INTRODUCING FOREIGN MATTER INTO HIGHER EUKARYOTIC CELLS**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUM EINBRINGEN VON FREMDMATERIAL IN HÖHERE EUKARYOTISCHE ZELLEN**

(57) Abstract

The toxicity problems arising when foreign matter is introduced into higher eukaryotic cells, especially with transfection with DNA, are obviated by expression in the cell of gene products that block the apoptosis induced by the transfection process and/or by treating the cells with anti-inflammatory substances. Preferred anti-apoptosis genes are Bcl-2, E1B 19K or an anti-apoptotic gene of the CELO avian adenovirus; used as preferred anti-inflammatory substance in the adenovirus VA1, which is introduced into the cell in the form of VA1 DNA. These measures help to achieve a long-lasting gene expression.

(57) Zusammenfassung

Den beim Einbringen von Fremdmaterial in höhere eukaryotische Zellen, insbesondere bei der Transfektion mit DNA, auftretenden Toxizitätsproblemen wird begegnet, indem in der Zelle Genprodukte zur Expression gebracht werden, die die durch den Transfektionsprozeß ausgelöste Apoptose blockieren und/oder indem die Zellen mit anti-inflammatorischen Substanzen behandelt werden. Bevorzugt werden als anti-Apoptose-Gene Bcl-2, E1B 19K oder ein anti-apoptotisch wirksames Gen vom Hühner-Adenovirus CELO, als anti-inflammatorisch wirkende Substanz Adenovirus VA1, das in Form von VA1-DNA in die Zelle eingebracht wird, verwendet. Mit Hilfe dieser Maßnahmen kann eine lang anhaltende Genexpression erzielt werden.

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. Application No
PCT/EP 95/01989

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 C12N15/87 C12N15/86 C12N5/10 C07K14/00 C07K14/075

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

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	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, vol. 89, August 1992, pages 7742-7746, XP002003023 RAO, L. ET AL.: "The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins"	1,3-5
Y	see the whole document	2,11-13, 20,33,34
X	---	1,4,5
Y	GENES & DEVELOPMENT, vol. 7, 1993, pages 546-554, XP002003024 DEBBAS, M. UND WHITE, E.: "Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B" see the whole document	2,11-13, 20,33,34
	---	-/--

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

14 May 1996

Date of mailing of the international search report

03.06.96

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

Donath, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Appl. Application No
PCT/EP 95/01989

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CANCER RESEARCH, vol. 52, October 1992, pages 5407-5411, XP002003025 MIYASHITA, T. UND REED, J.C.: "bcl-2 Gene Transfer Increases Relative Resistance of S49.1 and WEHI7.2 Lymphoid Cells to Cell Death and DNA Fragmentation Induced by Glucocorticoids and Multiple Chemotherapeutic Drugs"	1,3
Y	see the whole document	2,11-13, 33,34

X	EMBL Database ID-Nr.: AAORFSA Accession-Nr.: Z22864 XP002003029 Akopian, T.A. et al.: "Sequence of an Avian Adenovirus (CELO) DNA Fragment (11.2 - 19.2 %)	30,31

P,X	J.VIROLOGY, vol. 68, no. 10, October 1994, pages 6553-6566, XP002003026 CHIOU, S.-K. ET AL.: "Functional Complementation of the Adenovirus E1B 19-Kilodalton Protein with Bcl-2 in the Inhibition of Apoptosis in Infected Cells"	1,3-5
P,Y	see the whole document	2,11-13, 20,33,34

Y	WO,A,93 07283 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 15 April 1993 see the whole document	2,11-13, 33,34

Y	ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, vol. 660, 1992, pages 136-153, XP002003027 ZATLOUKAL, K. ET AL.: "Transferrinfection: A Highly Efficient Way to Express Gene Constructs in Eukaryotic Cells" see page 137, paragraph 2 see page 142, line 7 - page 142, line 36 see page 143, last paragraph - page 151, paragraph 1 see figures 1,2	2,11-13, 16-19, 33,34

Y	HUMAN GENE THERAPY, vol. 3, 1992, pages 147-154, XP002003028 CUIEL, D.T. ET AL.: "High-Efficiency Gene Transfer Mediated by Adenovirus Coupled to DNA-Polylysine Complexes" see the whole document	2,11-13, 16-19, 33,34

1

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte.inales Aktenzeichen

PCT/EP 95/01989

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
 IPK 6 C12N15/87 C12N15/86 C12N5/10 C07K14/00 C07K14/075

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

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
 IPK 6 C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehorende 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	PROC. NATL. ACAD. SCI. USA, Bd. 89, August 1992, Seiten 7742-7746, XP002003023 RAO, L. ET AL.: "The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B 19-kDa and Bcl-2 proteins"	1,3-5
Y	siehe das ganze Dokument	2,11-13, 20,33,34
X	---	1,4,5
Y	GENES & DEVELOPMENT, Bd. 7, 1993, Seiten 546-554, XP002003024 DEBBAS, M. UND WHITE, E.: "Wild-type p53 mediates apoptosis by E1A, which is inhibited by E1B"	2,11-13, 20,33,34
	---	-/--

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 erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- * "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung, die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher 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 <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">14. Mai 1996</p>	Abschließendes Datum des internationalen Recherchenberichts <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">03.06.96</p>
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 <p style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Donath, C</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Int. Patent Application No

PCT/EP 95/01989

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9307283	15-04-93	AU-B- 2652692	03-05-93
		BG-A- 98718	28-02-95
		BR-A- 9206559	08-11-94
		CA-A- 2118816	31-03-93
		CZ-A- 9400746	17-05-95
		EP-A- 0545016	09-06-93
		EP-A- 0607206	27-07-94
		FI-A- 941474	30-03-94
		HU-A- 71312	28-11-95
		NO-A- 941154	29-03-94
		NZ-A- 244306	26-07-95
		SK-A- 36894	10-08-94
		ZA-A- 9207460	21-02-94
CN-A- 1070946	14-04-93		

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	CANCER RESEARCH, Bd. 52, Oktober 1992, Seiten 5407-5411, XP002003025 MIYASHITA, T. UND REED, J.C.: "bcl-2 Gene Transfer Increases Relative Resistance of S49.1 and WEHI7.2 Lymphoid Cells to Cell Death and DNA Fragmentation Induced by Glucocorticoids and Multiple Chemotherapeutic Drugs"	1,3
Y	siehe das ganze Dokument	2,11-13, 33,34

X	EMBL Database ID-Nr.: AAORFSA Accession-Nr.: Z22864 XP002003029 Akopian, T.A. et al.: "Sequence of an Avian Adenovirus (CELO) DNA Fragment (11.2 - 19.2 %)	30,31

P,X	J.VIROLOGY, Bd. 68, Nr. 10, Oktober 1994, Seiten 6553-6566, XP002003026 CHIOU, S.-K. ET AL.: "Functional Complementation of the Adenovirus E1B 19-Kilodalton Protein with Bcl-2 in the Inhibition of Apoptosis in Infected Cells"	1,3-5
P,Y	siehe das ganze Dokument	2,11-13, 20,33,34

Y	WO,A,93 07283 (BOEHRINGER INGELHEIM INTERNATIONAL GMBH) 15.April 1993 siehe das ganze Dokument	2,11-13, 33,34

Y	ANNALS NEW YORK ACADEMY OF SCIENCES, Bd. 660, 1992, Seiten 136-153, XP002003027 ZATLOUKAL, K. ET AL.: "Transferrinfection: A Highly Efficient Way to Express Gene Constructs in Eukaryotic Cells" siehe Seite 137, Absatz 2 siehe Seite 142, Zeile 7 - Seite 142, Zeile 36 siehe Seite 143, letzter Absatz - Seite 151, Absatz 1 siehe Abbildungen 1,2	2,11-13, 16-19, 33,34

Y	HUMAN GENE THERAPY, Bd. 3, 1992, Seiten 147-154, XP002003028 CURIEL, D.T. ET AL.: "High-Efficiency Gene Transfer Mediated by Adenovirus Coupled to DNA-Polylysine Complexes" siehe das ganze Dokument	2,11-13, 16-19, 33,34

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int. nationales Aktenzeichen
PCT/EP 95/01989

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO-A-9307283	15-04-93	AU-B- 2652692	03-05-93
		BG-A- 98718	28-02-95
		BR-A- 9206559	08-11-94
		CA-A- 2118816	31-03-93
		CZ-A- 9400746	17-05-95
		EP-A- 0545016	09-06-93
		EP-A- 0607206	27-07-94
		FI-A- 941474	30-03-94
		HU-A- 71312	28-11-95
		NO-A- 941154	29-03-94
		NZ-A- 244306	26-07-95
		SK-A- 36894	10-08-94
		ZA-A- 9207460	21-02-94
		CN-A- 1070946	14-04-93