

Introductie octrooien met PER.C6 voorbeeld

actuele versie van 10 januari 2025

COLOFON

Auteursrechthebbenden: Marco de Beurs, Octrooiencentrum Nederland
Auteurs: Marco de Beurs, Peter van Dongen, Antonino Saccà, Stef van
Gompel



Tenzij anders is aangegeven, is dit werk gelicenseerd onder een Creative Commons Naamsvermelding-GelijkDelen 4.0 Internationaal licentie. Bezoek <http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/> voor een kopie van de licentie of stuur een brief naar Creative Commons, PO Box 1866, Mountain View, CA 94042, USA.

Deze licentie is niet van toepassing op:

figuur 1.1 is in het publiek domein, figuur 1.3, figuur 3.1, figuur 5.1,
wetteksten in bijlage D, documenten in bijlage E

De broncode is gepubliceerd op Github.

Inhoudsopgave

1	Inleiding	6
1.1	Voor de lezer	6
1.2	Iedere dag IE	6
1.3	Waarom bestaan IE-rechten?	7
1.4	De bekendste IE	9
1.5	Meest gebruikte IE voor innovaties	10
1.6	Een voorbeeld	11
2	Knowhow en bedrijfsgeheimen	14
2.1	Inleiding	14
2.2	Wat is knowhow?	14
2.3	Gebruik van knowhow bij organisaties	15
2.3.1	Eigen toepassing en gebruik	15
2.3.2	Exploitatie door derden	16
2.4	Wet en regelgeving	16
3	Octrooien	18
3.1	Inleiding	18
3.2	Octrooiwetten en verdragen	19
3.3	Octrooirechten	19
3.4	Uitvindingen	20
3.5	Waaraan moet een octrooi voldoen	21
3.5.1	Nieuwheid	21
3.5.2	Stand van de techniek	22
3.5.3	Inventief	22

3.5.4	Duidelijk en volledig	23
3.6	Inhoud octrooiaanvraag	23
3.7	Publicatie octrooiaanvraag	24
3.8	Claims	26
3.8.1	Claim van het PER.C6 voorbeeld	27
3.8.2	Test voor nieuwheid	27
3.9	Procedures octrooiaanvraag	29
3.9.1	EP octrooiaanvraag	29
3.9.2	NL octrooiaanvraag	30
3.9.3	PCT octrooiaanvraag	31
3.9.4	Prioriteitsjaar	32
3.9.5	Procedure van het PER.C6 octrooi	32
3.9.6	Verleende PER.C6 octrooi	33
3.9.7	Octrooifamilie	34
3.10	Na de verlening van het octrooi	34
4	Gebruik IE om geld te verdienen bij technische innovaties	36
4.1	Inleiding	36
4.2	Innovatieproces	37
4.3	Gebruik van IE-informatie bij keuzes in het innovatieproces	38
4.3.1	Patent landscape analyse	38
4.3.2	Freedom to Operate (FTO) analyse	40
4.4	Strategisch IE gebruik	40
4.5	Inkoop en verkoop van IE	41
4.5.1	Het in licentie nemen van een octrooi	42
4.5.2	Het verlenen van octrooilicenties voor het gebruik van een technologie	44
4.5.3	Het gebruik van octrooien in verschillende IE strategieën	44
4.6	Voorbeeld van IE gebruik van de PER.C6 technologie	45
4.6.1	Octrooien	45
4.6.2	Inkoop en overdracht van octrooien	45

5	Gebruik van IE bij bepaalde onderwerpen	47
5.1	Inleiding	47
5.2	Software	47
5.2.1	Auteursrecht op software	47
5.2.2	Octrooirecht op software	50
5.2.3	Overige manieren om software te beschermen	51
5.3	Voorbeeld van IE gebruik bij open source software	52
5.4	Voorbeeld van IE gebruik bij standaarden	52
5.4.1	VESA (Video Electronics Standards Association)	52
5.4.2	Displayport	53
A	Woordenlijst	54
B	Links	60
B.1	Nationale en internationale IE-bureaus	60
B.2	Verdere informatie	60
B.3	Interessante publicaties van het WIPO	61
B.4	IE-databanken	61
B.5	Octrooi classificatieschema's	62
C	Bibliografie	64
D	Gedeeltes IE-wetteksten	65
D.1	Gedeeltes Rijsoctrooiwet 1995	65
D.2	Gedeeltes Europees Octrooi verdrag	70
D.3	Gedeeltes Patent Cooperation Treaty	73
E	Documenten	77
E.1	WO 9700326A1	77
E.2	WO 94/28152	168

Lijst van figuren

1.1	Het Venetiaanse patentstatuut, dat in 1474 door de Senaat van Venetië werd uitgevaardigd, wordt algemeen aanvaard als de basis voor het vroegste patentsysteem ter wereld.	8
1.2	Nut voor ondernemingen en maatschappij	9
1.3	Gentherapie met een adenovirus vector	12
2.1	Knowhow: daar staat het en daar gaat het.	17
3.1	Voorkant van WO 97/00326 A1	25
3.2	EP procedure	29
3.3	NL procedure	30
3.4	PCT procedure	31
3.5	Procedure van het PER.C6 octrooi	32
4.1	Proces van onderzoek tot verkoop product	37
4.2	IE informatie in het proces voor nieuw product	39
4.3	IE genereren bij een nieuw product	41
4.4	IE in en uit	43
5.1	Displayport logo	53

Hoofdstuk 1

Inleiding

1.1 Voor de lezer

Dit document is een inleiding en beschrijft het nut en gebruik van know-how en intellectueel eigendom (IE) voor studenten in de technische, exacte, medische en bedrijfseconomische wetenschappen. We beschrijven een aantal basiskennmerken en begrippen van IE, en we gaan in op het doel en gebruik van verschillende IE-rechten.

De verschillende IE onderwerpen worden uitgelegd met een voorbeeld dat past bij jouw achtergrond.

Wil je meer weten over IE dan wat in dit document wordt behandeld? In bijlage B vindt je links met extra informatie.

1.2 Iedere dag IE

Vrijwel elke dag heb je te maken met producten en diensten waarvoor intellectuele eigendomsrechten (IE-rechten) zoals merken, modellen, octrooien, auteursrechten, etc. gelden.

Producten die je koopt zijn meestal van een bepaald merk. Een merk zorgt ervoor dat je weet welke producent een bepaald product heeft gemaakt. Denk hierbij bijvoorbeeld aan het bedrijf Coca-Cola dat de frisdrank cola produceert. In het algemeen zijn merken daarmee voor organisaties belangrijk om hun producten en diensten te vermarkten.

Producenten en de meeste organisaties maken gebruik van handelsnamen waarmee ze zijn ingeschreven bij de Kamer van Koophandel.

Een boek dat je leest of de muziek waarnaar je luistert zijn werken van schrijvers en musici. De makers van deze werken willen daar graag aan kunnen

verdienen en zonder hun toestemming mag je hun werk niet vermenigvuldigen omdat er auteursrechten op zitten.

In producten als fietsen of auto's zijn veel technische ontwikkelingen verwerkt die zijn geoctrooieerd. Ontwikkelaars en producenten van deze technologie willen uiteraard hun investeringen in deze ontwikkelingen kunnen terugverdienen en octrooien bieden daarvoor de mogelijkheid.

Of je nu al of in de toekomst zelf producten gaat ontwikkelen of daarbij betrokken bent, de kans is groot dat je met verschillende IE in aanraking komt en ze ook zal moeten kunnen gebruiken. Daarom is het belangrijk dat je als student voldoende leert over IE. Tijdens je studie kom je namelijk nu niet alleen in aanraking met IE maar kan je er ook al gebruik van maken voor bepaalde ontwerp opdrachten.

1.3 Waarom bestaan IE-rechten?

Honderden jaren geleden werd er nauwelijks gebruik gemaakt van intellectuele eigendomsrechten. Met de komst van de boekdrukkunst werd het mogelijk om boeken en andere schriftelijke werken makkelijk te vermenigvuldigen en vervolgens te verspreiden. Vanaf dat moment ontstond zowel bij schrijvers als uitgevers voor het eerst de behoefte om eigenaar te worden van deze werken. Met de komst van latere technieken tijdens de industriële revolutie werd het steeds makkelijker in grote hoeveelheden te produceren. Daarmee ontstond bij producenten van deze werken de behoefte om eigenaar te kunnen worden van hun werken, ideeën en uitvindingen en daarmee namaak te voorkomen.

Het moderne octrooi (patent) in Venetië

In de vijftiende eeuw was Venetië een rijke en bloeiende stad. Een van de redenen voor deze welvaart was het glas-in-lood dat op het eiland Murano werd geproduceerd.

Dit was een zeldzaam en duur product dat een belangrijk economisch bezit voor de stad werd.

De formule voor het maken van gekleurd glas was echter slechts bij een paar mensen bekend: de glasmakers van Murano.

De Senaat van Venetië begon zich zorgen te maken over de mogelijkheid dat de glasmakers zouden sterven of naar andere landen zouden vluchten, waardoor dit kostbare geheim verloren zou gaan.

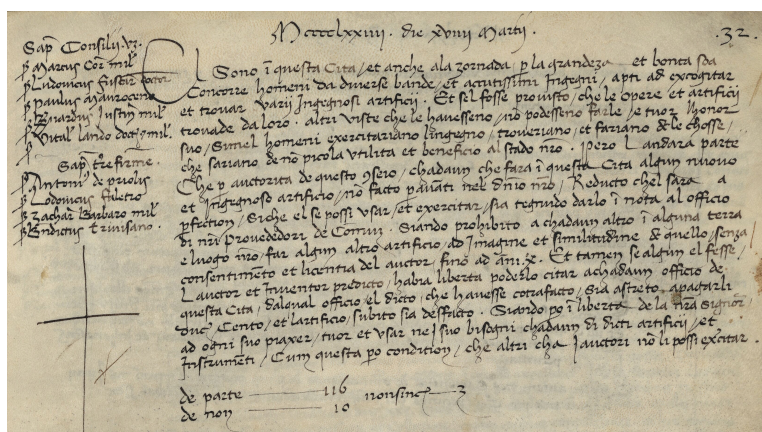
Om een dergelijke hypothese te voorkomen, bood Venetië de glasmakers aan om enkele leerlingen op te leiden die door de stad

werden gestuurd. De glasmakers weigerden echter omdat het accepteren van het aanbod zou betekenen dat ze hun monopolie zouden verliezen en potentiële concurrenten zouden creëren.

Omdat ze de bezorgdheid van Murano begrepen, bood Venetië in ruil voor het geheim een exclusief recht voor een beperkte tijd aan om het monopolie van de glasmakers te garanderen. Het document dat dit recht verleende, werd een “patent” genoemd, van het Latijnse werkwoord “patere”, wat bekendmaken betekent.

Dankzij dit accepteerden de ambachtslieden het aanbod en wist Venetië het geheim te bewaren, zodat we vandaag de dag nog steeds kunnen genieten van het prachtige gekleurde glas van Murano.

In 1474 publiceerde Venetië het eerste patentstatuut in de geschiedenis om de kwestie te regelen. Zie afbeelding 1.1.



Figuur 1.1: Het Venetiaanse patentstatuut, dat in 1474 door de Senaat van Venetië werd uitgevaardigd, wordt algemeen aanvaard als de basis voor het vroegste patentsysteem ter wereld.

Het centrale idee achter het gebruik van intellectuele eigendomsrechten is namelijk dat de maker of bedenker van werken en uitvindingen een tijdelijk exclusief recht kan aanvragen waarmee concurrenten op afstand worden gehouden. Dit recht geeft dan de eigenaar de mogelijkheid om te verdienen aan de exploitatie van de (niet-tastbare) zaken die anders gemakkelijk te kopiëren zijn of na te maken. Daarmee biedt het recht aan de ene kant de mogelijkheid aan mensen die tijd en geld hebben geïnvesteerd om een nieuw product te ontwikkelen de kosten voor deze investeringen terug te verdienen en meer. Aan de andere kant hebben concurrenten dan niet de mogelijkheid om het werk of de uitvinding gemakkelijk, dat wil zeggen zonder zelf te investeren en dus goedkoper, na te maken en te verkopen.

Voor consumenten die producten kopen waarvoor IE-rechten zijn aangevraagd betekent dit vaak dat zij een hogere prijs moeten betalen. Wanneer er geen intellectuele eigendomsrechten zouden zijn voor die producten kunnen concurrenten ze immers goedkoper namaken en aanbieden. De waarde van de invoering van het gebruik van intellectuele eigendomsrechten voor een maatschappij ligt dus niet in het aanbieden van de goedkoopste producten, maar in de mogelijkheid om toegang te krijgen tot nieuwe producten en voldoende innovaties. Door gebruik te maken van intellectuele eigendomsrechten kunnen bedrijven tijdelijk hogere prijzen rekenen en daarmee de aanloopinvesteringen terugverdienen. Dit is weergegeven in figuur 1.2.



Figuur 1.2: Nut voor ondernemingen en maatschappij

1.4 De bekendste IE

Organisaties, ondernemers, auteurs, ontwikkelaars en uitvinders kunnen gebruik maken van IE-rechten zoals auteursrechten, merken, octrooien, bedrijfsnamen, modellen, databankrechten, kwekersrechten, chips- of topografieright en bedrijfsgeheimen.

Hieronder worden de bekendste IE-rechten weergegeven;

Auteursrecht Geeft de maker (auteur) na het maken automatisch wereldwijde bescherming voor originele werken zoals een artikel, boek, een tekst, muziek of afbeelding. Dit recht beperkt de distributie.

Merken Na registratie krijgt de merkhouder het alleenrecht om het merk voor bepaalde waren en goederen of diensten te gebruiken. Een merkrecht kan gebruikt worden om op te treden tegen concurrenten die eenzelfde of overeenstemmend merk willen exploiteren in dezelfde markt.

Octrooien Na aanvraag, registratie en eventuele toetsing van een octrooi kunnen anderen worden uitgesloten om de geoctrooieerde uitvinding

commercieel te gebruiken.

Handelsnamen Handels- en bedrijfsnamen worden gebruikt om een bedrijf bekend te maken bij klanten in de markt en zorgen voor een reputatie en daarmee klantenbinding. Een ander bedrijf mag met zijn handelsnaam geen verwarring zaaien door gebruik te maken van een handelsnaam dat te veel overeenkomt met een reeds eerder geregistreerde handelsnaam.

Modellen Na registratie krijgt de modelhouder het alleenrecht om het model te gebruiken. Een modelrecht kan gebruikt worden om op te treden tegen concurrenten die een gelijkend model willen exploiteren.

1.5 Meest gebruikte IE voor innovaties

In dit document zullen we niet de juridische aspecten van IE behandelen. Zie hiervoor links naar de wetsartikelen in bijlage D. We behandelen wel het gebruik van IE, specifiek voor innovatie. Voor een overzicht van het belang van de verschillende IE-rechten voor innovaties zie de onderstaande tabel.

Tabel 1.1: Effectiviteit van mechanismen voor toe-eigening voor productinnovaties; % product innovaties waarbij geacht effectief.

Sector	n	Se- crecy	Pa- tents	Other IPRs	Lead time	Comple- mentary sales services	Comple- mentary manufac- turing
Food	89	59	18	21	53	40	51
Petro- leum	15	62	33	6	49	40	36
Basic chemicals	35	48	39	12	38	46	45
Drugs	49	54	50	21	50	33	49
Machi- nery tools	10	62	36	9	61	43	35
Compu- ters	25	44	41	27	61	40	38
Electrical equip- ment	22	39	35	15	33	32	32
Semicon- ductors	18	60	27	23	53	42	48

Sector	n	Se- crecy	Pa- tents	Other IPRs	Lead time	Comple- mentary sales services	Comple- mentary manufac- turing
Medical equip- ment	67	51	55	29	58	52	49
Autop- arts	30	51	44	16	64	45	53
All	1118	51	35	21	53	43	46

From: Scotchmer [Sco04] Table 9.1, page 260.

Source: Cohen, Nelson en Walsh [CNW00], table 1. Note: Each number is a mean response, representing the percentage of product innovations in the row category for which the type of protection in the column is deemed “effective”. The response categories are <10%, 10%–40%, 41%–60%, 61%–90%, >90%.

Over het algemeen kunnen we zien dat geheimhouding (inclusief wat we knowhow noemen) een van de meest gebruikte mechanismen voor toe-eigening is. Tegelijkertijd zijn octrooien belangrijk in de sectoren geneesmiddelen en medische apparatuur.

Andere IE-rechten (bijvoorbeeld merken of modellen) worden minder vaak gebruikt voor innovaties, maar zijn natuurlijk erg belangrijk voor verkoop en marketing.

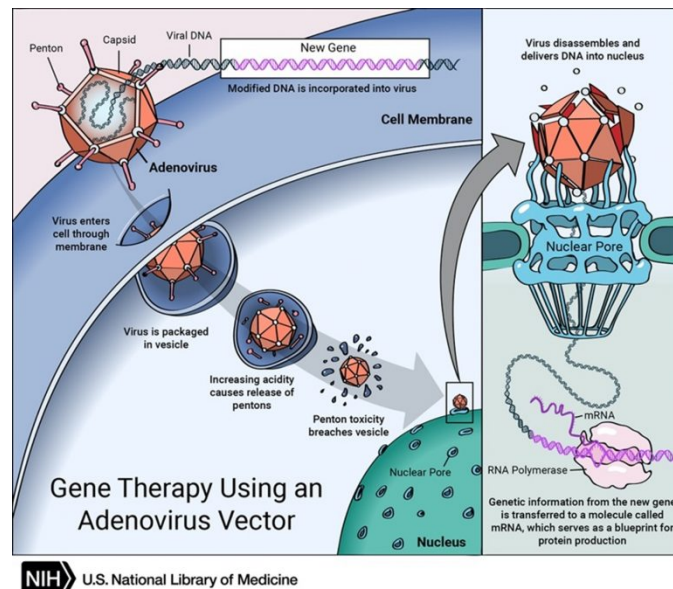
1.6 Een voorbeeld

In deze paragraaf introduceren we een voorbeeld dat in de volgende hoofdstukken verder wordt uitgewerkt.

Het hoofdvoorbeeld is hier het onderzoek naar- en vervolgens de ontwikkeling en het gebruik van de PER.C6 technologie. Het betreft een vector voor het maken van adenovirussen en een cellijn om het virus te verpakken. In de jaren tussen 1992 en 1996 is deze technologie doorontwikkeld op basis van wetenschappelijk onderzoek over gentherapie aan de Universiteit Leiden. Dit is een interessant voorbeeld van valorisatie van wetenschappelijke kennis via spinoff bedrijf Introgene en later Crucell. Het was prof. Dinko Valerio die als een van de eersten in Nederland tijdens zijn promotie onderzoek al in 1984 was begonnen met experimenten voor deze technologie. Na terugkomst uit de Verenigde Staten richtte hij samen met prof. van Bekkum in 1993 het gentherapie bedrijf Introgene bv. op. In samenwerking met de onderzoeksgroep van prof. Van der Eb en dr. Hoeben aan de Universiteit Leiden

zette het bedrijf in de periode tussen 1990 en 1999 in op de ontwikkeling van cellijnen met verbeterde eigenschappen. Hierbij bleek dat verscheidene soorten virussen, waaronder het adenovirus, zowel kunnen worden gebruikt voor gentherapie en ook voor de productie van verscheidene geneesmiddelen. Op zich was al bekend dat adenovirussen voor gentherapie gebruikt kunnen worden maar de resultaten uit hun onderzoek werden gebruikt om enkele verbeteringen mogelijk te maken. Frits Fallaux en dr. Bram Bout waren als wetenschappers en uitvinders betrokken bij een aantal experimenten.

De uitvinding heeft betrekking op het maken van adenovirussen die als vector gebruikt kunnen en een cellijn om dat virus in te verpakken. Het idee van de uitvinding is om de problemen van de bestaande productie van het adenovirus als transportmiddel op te lossen (zie voor het transportmiddel als voorbeeld 1.3). In 1996 heeft de Universiteit Leiden een octrooi (WO 97/00326) aangevraagd voor deze vinding.



Figuur 1.3: Gentherapie met een adenovirus vector

Diverse studies van de Wereldgezondheidsorganisatie WHO laten zien dat ca. 4 procent van de wereldbevolking gezondheidsproblemen heeft die verholpen kunnen worden met behulp van gentherapie. Deze in Leiden ontwikkelde PER.C6 technologie kan daarbij een interessante mogelijkheid bieden als oplossing voor dit maatschappelijk gezondheidsprobleem. Aan de andere kant is bekend dat het traject van onderzoek naar-, ontwikkeling en marktintroductie van een therapie, vaccin of geneesmiddel zeer kostbaar is en zelden door een bedrijf of organisatie alleen bekostigd kan worden. Het is daarom dat in afgelopen decennia het steeds gebruikelijker is geworden dat onderzoekers werkzaam aan kennisinstellingen zoals universiteiten en medi-

sche centra samenwerken met farma of spin off bedrijven. Het voorbeeld van spin off bedrijf Introgene bv. kan hierbij als zodanig als een interessante casus worden beschouwd. Daarbij komt dat IE en duidelijke afspraken over het eigendom en gebruik daarvan tijdens het proces van de ontwikkeling van vaccins, medicijnen en therapieën een belangrijke rol spelen. In eerste instantie gaat het dan vaak om octrooien en merken.

De belangrijkste octrooiaanvraag voor de PER.C6 technologie is te zien en te lezen in paragraaf E.1. De behandeling- en uitleg van deze octrooiaanvraag wordt in hoofdstuk 3 verder uitgewerkt.

Over het idee om adenovirussen te gebruiken voor genterapie is dan al eerder gepubliceerd. De nieuwe vector en cellijn van de groep van Valerio hebben verscheidende voordelen ten opzichte van de bestaande technieken:

- De kans op het ontstaan van competente virussen door homologe recombinitie is sterk verlaagd. Dit wordt voorkomen door geen overlappende sequenties tussen de vector en de adenovirus sequentie in de cellijn te hebben,
- Er kunnen tot 38 kb vreemd DNA in adenovirussen worden ingevoegd. Voorheen was dit beperkt tot 7 kb.
- Een mutatie in de gastheer variatie zorgt ervoor dat het adenovirus niet beperkt blijft tot de gastheer
- De expressie van het toxische adenovirus proteïne E2 is sterk gecontroleerd door
 - (1) een mutatie zodat het proteïne E2 alleen onder bepaalde temperaturen aan DNA kan binden en
 - (2) door een induceerbare promotor
- De virale replicatie proteïnen E1A en E1B komen alleen voor in de verpakkingscellen PER.C6 (PGK-E1-Retinoblasts) en niet in het adenovirus construct.
- Het adenovirus bestaat alleen uit een beperkt aantal onderdelen: encapsulation signal, inverted terminal repeat, een gemuteerd E2 proteïne en target DNA,
- Er is geen expressie van virale proteïnen in de cellen, waarin het genetisch materiaal is ingevoerd, zodat er geen ontsteking in de cellen ontstaat.

Hoofdstuk 2

Knowhow en bedrijfsgeheimen

2.1 Inleiding

In de huidige kenniseconomie wordt regelmatig gesproken over knowhow en bedrijfsgeheimen waarover bedrijven beschikken.

Ondernemers beschouwen knowhow als een van de belangrijkste aspecten van innovaties. Ondanks dat knowhow geen IE recht is behandelen we het toch in dit hoofdstuk.

2.2 Wat is knowhow?

Bij knowhow hebben we het alleen over die kennis waarover specifieke personen beschikken voor productie en verkoop en waarover derden niet ongehinderd en onbeperkt kunnen beschikken.

Algemene kennis zoals bijvoorbeeld bekend is uit leerboeken rekenen we niet tot knowhow. Zie voor deze definitie van knowhow bijvoorbeeld Nieuwenhoven Helbach, Huydecoper en Nispen [NHN02] hoofdstuk 5.

Onder derden wordt verstaan anderen dan diegene die over deze knowhow beschikken. Vaak beschikken slechts enkele personen binnen een bedrijf of een organisatie over specifieke knowhow. Duidelijk moet zijn dat knowhow dus niet zo maar toegankelijk is. Derden zullen altijd eigen inspanningen moeten verrichten om vergelijkbare knowhow op te bouwen. Je kunt stellen dat knowhow daarmee voor anderen een geheim is.

Het is logisch dat personen die in staat zijn om een bepaalde taken of processen uit te voeren daarvoor moeten (kunnen) beschikken over specifieke

vaardigheden en kennis. Denk bijvoorbeeld aan de assemblage of het ontwerp van een product, het opstellen van een algoritme, het verwerken van data. De combinatie van bepaalde technische vaardigheden, het verwerken van informatie in combinatie met bepaalde technische kennis noemt men dan knowhow. Daarnaast kan ook niet-technische kennis zoals marktgegevens, marketingtechnieken, politieke verhoudingen, regelgeving en uitvoeringspraktijk, kennis over relaties en ‘netwerken’ tot de knowhow behoren.

Investerings in onderzoek en ontwikkeling dragen bij aan de opbouw van knowhow en dat geldt ook voor werkervaring en het volgen van opleidingen. Denk bijvoorbeeld aan de opbouw en opslag van informatie zoals technische data, formules, standaarden, specificaties, processen, methoden, recepten, tekeningen en het gebruik daarvan door professioneel personeel.

2.3 Gebruik van knowhow bij organisaties

Veel grotere organisaties, kennisinstellingen en internationaal opererende bedrijven hebben een IE-afdeling. Ze hanteren vaak interne regels, procedures en voorwaarden over de gewenste omgang van hun (nieuwe) personeel met IE en maken daarbij ook afspraken over de omgang met knowhow. Deze afspraken worden dan ook vaak expliciet vermeld in de arbeidsovereenkomst. Denk daarbij bijvoorbeeld ook aan een geheimhoudingsclausule.

In het midden-en kleinbedrijf of bij starters zonder IE-afdeling is het raadzaam om vergelijkbare afspraken over IE en knowhow met (nieuw) personeel op te stellen. Voor bedrijven die als toeleverancier werken, zijn afspraken over omgang met specifieke knowhow en geheimen in het algemeen nog belangrijker. Zonder die afspraken loop je namelijk het risico dat je eigen medewerkers te veel kunnen delen met afnemers.

2.3.1 Eigen toepassing en gebruik

IE-rechten geven bedrijven de mogelijkheid om aanloopinvesteringen in onderzoek, ontwikkeling, marketing en productie met een zekere marge terug te verdienen. Het is belangrijk om te begrijpen dat de combinatie van het gebruik van knowhow en octrooien bijdraagt aan een succesvolle introductie van nieuwe technische innovaties in de markt. De knowhow is daarbij essentieel want die maakt het mogelijk dat bedrijven producten en diensten kunnen maken en leveren aan klanten en afnemers. In de economie vertonen knowhow en octrooien veel overeenkomsten. Beide zijn bronnen van (technische) kennis die de gebruiker in staat stellen om technische ontwikkelingen en verworvenheden toe te passen die voor concurrenten niet voor handen zijn. De bezitter van de knowhow kan deze technische voorsprong zelf exploiteren in de markt. Denk bijvoorbeeld aan productieprocessen.

2.3.2 Exploitatie door derden

Veel bedrijven hebben geen productiefaciliteiten in alle landen van de wereld. In die landen waar bedrijven zelf niet operationeel zijn, maar waar wel een markt is voor hun producten en diensten kunnen zij als licentieverlener werken met licentieovereenkomsten. Deze licenties met andere bedrijven (licentienemers) worden vaak afgesloten voor zowel de IE-rechten als de knowhow. De IE-rechten zorgen daarbij voor een tijdelijk exclusief recht dat houders en licentienemers kunnen gebruiken tegen namaak. Tussen licentieverlener en licentienemer worden daarbij van tevoren afspraken gemaakt over het gebruik daarvan en de te betalen royalties. Denk hierbij aan een toepassing, een geografisch gebied en een bepaalde periode.

2.4 Wet en regelgeving

De relevante wet- en regelgeving voor knowhow is te vinden in EU-richtlijn 2016/943 en de Wet Bescherming Bedrijfsgeheimen.

De wet voorziet in de bescherming tegen onrechtmatig gebruik van knowhow en bedrijfsinformatie en het openbaar maken daarvan. Deze combinatie van knowhow en bedrijfsinformatie wordt bedrijfsgeheim genoemd.

Hierbij moet een bedrijf of organisatie aan een aantal voorwaarden voldoen. Het betreft daarbij informatie die:

- a. geheim is omdat zij niet algemeen bekend is of toegankelijk voor derden, en
- b. waarde heeft voor de handel of transacties van het bedrijf of organisatie, en
- c. door het bedrijf geheim wordt gehouden door voldoende maatregelen (denk aan een registratiesysteem en toegang voor bepaalde personen op 'need-to-know' basis).

Al met al is wel duidelijk dat knowhow ligt opgeslagen bij personen. Bij het beëindigen van een arbeidsovereenkomst verdwijnt deze knowhow niet (zie figuur 2.1). Dit roept de vraag op of deze knowhow wel kan worden opgeëist door de werkgever?



Figuur 2.1: Knowhow: daar staat het en daar gaat het.

Hoofdstuk 3

Octrooien

3.1 Inleiding

Met een octrooi word je eigenaar van jouw uitvinding.

Een octrooi is dus eigendom en daarmee kan je:

- a. anderen stoppen jouw uitvinding te gebruiken (exclusief gebruik), of
- b. anderen toestemming geven om jouw uitvinding te gebruiken.

Eigendom is per land via (inter-) nationale wet- en regelgeving vastgelegd. Dit geldt dus ook voor octrooien die immers onderdeel uitmaken van de industriële eigendomsrechten. Dit recht op een octrooi en het gebruik van de uitvinding is altijd afhankelijk van de wetgeving in het betreffende land.

De toepassing van een uitvinding is meestal niet alleen nuttig in een bepaald land, maar kan in vele landen nuttig worden gebruikt.

De wereld van uitvindingen is daarom multinationaal of wereldwijd.

Vanwege het wereldwijd gebruik van octrooien zijn er naast nationale wetten ook verscheidene belangrijke internationale verdragen. Deze worden geïntroduceerd in paragraaf 3.2.

In daaropvolgende paragrafen worden de belangrijkste eigenschappen van octrooien behandeld.

Vanaf paragraaf 3.6 beschrijven we een uitgewerkt octrooi aan de hand van het algemeen voorbeeld (zie paragraaf 1.6).

3.2 Octrooiwetten en verdragen

Ieder land heeft een eigen octrooiwet. Daarnaast zijn er verdragen voor regionale en internationale samenwerkingen. Een voorbeeld daarvan is het Europese Octrooiverdrag (EOV). Deze samenwerking zorgt ervoor dat de octrooiwetten van de 38 deelnemende landen geharmoniseerd zijn. Er is ook een wereldwijd verdrag voor een centrale wereldwijde octrooiaanvraag via de Wereldorganisatie voor de Intellectuele Eigendom (WIPO) (193 deelnemende landen).

- Het Nederlandse octrooirecht is vastgelegd in de Rijsoctrooiwet 1995 (ROW) Het Octrooiencentrum Nederland verleent Nederlandse octrooien.
- Het Europese octrooirecht is vastgelegd in het Europees Octrooiverdrag (EOV). Een Europees octrooi wordt door het Europees Octrooi-bureau (EOB) verleend. Deze Europese octrooien worden door de aanvrager in gewenste deelnemende landen geregistreerd en zijn alleen in die landen geldig.
- De wereldwijde octrooiaanvraag is vastgelegd in de Patent Cooperation Treaty (PCT). Uit deze procedure komt echter geen verleend octrooi. Na deze centrale aanvraag gaat de octrooiaanvraag door naar de gewenste landen of regio's.

3.3 Octrooirechten

Het octrooirecht regelt dat anderen de uitvinding niet commercieel mogen:

- maken,
- gebruiken,
- verkopen, of
- op voorraad mogen hebben.

Het octrooi is voor een periode van maximaal 20 jaar na de indieningsdatum van de octrooiaanvraag geldig.

De beperkingen die een octrooi uitoefent worden door de wetgeving van een betreffend land bepaald en kunnen dus sterk verschillen. Aan de andere kant zorgt het verdrag van Parijs (1883) voor harmonisatie.

In Europa beperkt een octrooi in het algemeen het commercieel maken, gebruiken, verkopen en op voorraad houden van de uitvinding, maar is het is wel toegestaan de uitvinding voor eigen gebruik (niet-commercieel) te gebruiken.

Je kan dus voor jezelf een Ferrari nabouwen, maar verkoop die niet aan je buurman, want dat is een commerciële handeling.

Het is onder voorwaarden ook toegestaan de uitvinding voor wetenschap en onderzoek te gebruiken, zonder vervolgd te worden voor inbreuk.

De rechtsgevolgen van een octrooi in Nederland staan beschreven in artikel 53 ROW.

Het octrooirecht kan niet meer worden gebruikt als de octrooihouder, of een ander met toestemming van de octrooihouder, het geoctrooierde product heeft verkocht. Je mag dan met het geoctrooierde product doen wat je wilt. Dit wordt uitputting genoemd. Dit is beschreven in artikel 53 lid 5 ROW.

3.4 Uitvindingen

Veel mensen hebben wel een beeld van wat een uitvinding is en wat uitvinders doen. Ze beschrijven dan een uitvinding bijvoorbeeld als een:

- nieuwe ontwikkeling,
- vaak ook technisch en
- meestal een verbetering ten opzichte van bestaande technieken.

In formeler jargon wordt een uitvinding dan vaak ook beschreven als een technische oplossing voor een probleem.

In beschrijvingen over het octrooirecht is een uitvinding echter niet gedefinieerd!

De wetgever definieert wat niet als uitvinding wordt gezien. Theorieën en wiskundige methoden zijn bijvoorbeeld geen uitvindingen en daarmee uitgesloten van octrooien.

Verder moet een uitvinding ook industrieel toepasbaar zijn. Deze eis van industriële toepasbaarheid bakent het octrooirecht af van andere intellectuele eigendomsrechten.

De definities en vereisten van nieuwheid en inventiviteit zorgen ervoor dat technische ontwikkelingen en uitvindingen alleen als octrooieerbare uitvinding kunnen worden beschouwd als ze nog niet bekend zijn gemaakt en niet voor de hand liggen.

Voor een beschrijving van de uitzonderingen en de basisvereisten, zie artikel 2 ROW, artikel 52 EOV of artikel 33(1) PCT.

3.5 Waaraan moet een octrooi voldoen

Er zijn vele vereisten waaraan een octrooi moet voldoen. Naast formele vereisten, zijn er inhoudelijke vereisten. Formele vereisten zijn nodig voor de juiste verwerking van de aanvraag. Het octrooibureau moet bijvoorbeeld contact met de aanvrager kunnen opnemen en de aanvraag moet in de juiste taal zijn geschreven.

Om een octrooi te krijgen zijn de belangrijkste inhoudelijke vereisten dat de uitvinding:

- nieuw,
- inventief,
- voldoende duidelijk beschreven moet zijn.

De uitvinding moet nieuw en inventief zijn, anders zou het octrooi niet bijdragen aan de algemene kennis en verbetering van de techniek. Het moet daarom ook duidelijk genoeg beschreven zijn.

3.5.1 Nieuwheid

Nieuw betekent dat de uitvinding niet eerder bekend is gemaakt. Om dit bepalen kan alle informatie worden gebruikt die openbaar toegankelijk is voor de vakman. Het is een objectief criterium, waarbij de vakman geacht wordt alle stand van de techniek te kennen.

Bij de beoordeling van nieuwheid (en inventiviteit) wordt alle informatie voor de indieningsdatum van de aanvraag meegenomen. Dit is de datum van eerste indiening: 'first to file'.

Tot voor kort kende de Verenigde Staten een ander systeem: 'first to invent'. Het moment waarop de uitvinder de uitvinding concipieert, was het moment van waaruit gerekend werd. Hoewel principieel juist, brengt dit allerlei problemen in bewijsvoering met zich mee als er conflicten ontstaan. Vandaar dat men in 2011 in de Verenigde Staten ook op het 'first to file'-principe is overgestapt.

Documenten met een latere publicatiedatum dan de indieningsdatum kunnen niet de nieuwheid en ook niet de inventiviteit wegnemen.

Dus als niet alle eigenschappen van de uitvinding bekend zijn, is de uitvinding nieuw:

Een uitvinding wordt als nieuw beschouwd, indien zij geen deel uitmaakt van de stand van de techniek (zie ook artikel 4 lid 1 ROW, artikel 54 lid 1 EOV of artikel 33(2) PCT).

3.5.2 Stand van de techniek

De stand van de techniek is precies gedefinieerd in de octrooiwet:

De stand van de techniek wordt gevormd door al hetgeen voor de dag van indiening van de octrooiaanvraag openbaar toegankelijk is gemaakt door een schriftelijke of mondelinge beschrijving, door toepassing of op enige andere wijze (zie ook artikel 4 lid 2 ROW, artikel 54 lid 2 EO of Regel 64 PCT).

Deze definitie bepaalt dat alle informatie, die op de wereld openbaar toegankelijk is, tot de stand van de techniek wordt gerekend. Dus ook de documenten in een kleine bibliotheek in een Chinees bergdorp. Een belangrijke beperking is dat de informatie *openbaar* toegankelijk moet zijn. Documentatie, zoals bijvoorbeeld technische tekeningen die in een bedrijf worden gebruikt, zijn normaal gesproken niet openbaar toegankelijk (wegens geheimhoudingsplicht). Deze documenten kunnen daardoor niet voor het beoordelen van de nieuwheid worden gebruikt.

De indieningsdatum is daarbij een belangrijke datum, want alles wat na deze datum openbaar is geworden heeft geen invloed op de octrooiaanvraag. Als dezelfde uitvinding op verschillende data wordt aangevraagd, dan heeft diegene die het eerste de aanvraag indient het recht op de uitvinding.

Iedere octrooiaanvraag wordt 18 maanden na de eerste indiening gepubliceerd. Het wordt daarmee ook een onderdeel van de stand van de techniek.

3.5.3 Inventief

Inventief zijn, betekent dat het voor de *vakman* niet voor de hand ligt om de verbetering of verandering, waarvoor bescherming wordt gevraagd, zo uit te voeren:

Een uitvinding wordt als het resultaat van uitvinderswerkzaamheid aangemerkt (=inventief), indien zij voor een deskundige niet op een voor de hand liggende wijze voortvloeit uit de stand van de techniek (zie ook artikel 6 ROW, artikel 56 EO of artikel 33(3) PCT).

In de praktijk van de toetsing van octrooien betekent het niet inventief zijn, dat alle geclaimde eigenschappen bekend zijn uit een combinatie van twee uitvoeringen, beschreven in een of twee documenten. De vakman heeft daarbij ook een duidelijke aanwijzing om de twee uitvoeringen te combineren.

of

Als het enige verschil met een bekende uitvoering een voor de vakman voor de hand liggend alternatief is, dat hij op grond van zijn algemene kennis kent, dan wordt de uitvinding als niet inventief beschouwd. Bijvoorbeeld: Om iets op een muur op te hangen is een schroef een bekend alternatief voor een spijker.

3.5.4 Duidelijk en volledig

Bij een octrooi moet de uitvinding openbaar gemaakt worden. Dit moet op zo een wijze gedaan worden, dat het door de vakman kan worden uitgevoerd. Het is dus niet mogelijk om een octrooi te krijgen en je uitvinding geheim te houden. Zie ook artikel 25 lid 1 ROW, artikel 83 EOv en artikel 5 PCT.

Een perpetuum mobile is dan ook per definitie niet octrooieerbaar.¹

Zaken die de vakman weet hoeven daarbij niet beschreven te worden. Bijvoorbeeld: Het is niet nodig om te beschrijven hoe iets moet worden vastgemaakt, als het voor de vakman duidelijk is dat het bijvoorbeeld kan worden gelast of gelijmd.

De vakman is gedefinieerd in het octrooirecht als kundige op het gebied van de uitvinding met brede vakkennis. De vakman kent alleen voor de hand liggende oplossingen voor problemen, maar kan zelf niet inventief worden.

3.6 Inhoud octrooiaanvraag

Een octrooiaanvraag bestaat uit de volgende onderdelen:

Beschrijving De beschrijving bestaat uit een inleiding en een gedeelte met ten minste één complete uitvoering van de uitvinding. In de inleiding wordt kort beschreven wat de bekende stand van de techniek is, welke probleem deze bekende stand van de techniek nog heeft en een korte beschrijving van de oplossing (de uitvinding) voor dit probleem.

Claims (Conclusies in formeel Nederlands) De claims definiëren de octrooibeschermt. Deze claims zijn normaal als een set van claims opgezet. Er is een hoofdclaim en meerdere hiervan afhankelijke claims. De hoofdclaim biedt daarmee de grootste beschermingsomvang. De afhankelijke claims voegen verdere kenmerken toe en hebben daardoor een kleinere beschermingsomvang dan de hoofdclaim.

¹ Waarom is een perpetuum mobile niet voldoende openbaar gemaakt? Klik voor uitleg.

Figuren De figuren zijn er om de uitvinding te verduidelijken.

De claims bepalen de omvang en soort van bescherming. De juridische bescherming van het octrooi wordt dus bepaald door de claims. De claims zijn daarom op een juridische manier geschreven.

Voor een maximale bescherming probeert men de uitvinding zo algemeen mogelijk te beschrijven in de claims. Maar als de uitvinding te algemeen wordt beschreven, dan is de kans groter dat het niet nieuw of niet inventief is.

3.7 Publicatie octrooiaanvraag

18 maanden na de eerste indiening wordt de octrooiaanvraag gepubliceerd. In figuur 3.1 is de voorkant van de publicatie van de aanvraag van het PER.C6 voorbeeld te zien. Na de voorpagina volgen de pagina's van de aanvraag zoals deze is ingediend. De hele publicatie is te zien in paragraaf E.1.

Dit is de A publicatie (zie de A1 code in het publicatienummer WO 97/00326 A1). De A publicatie is de publicatie van de octrooiaanvraag. De volgende publicatie is de B publicatie. De B publicatie is de publicatie van het verleende octrooi.

Bibliografische gegevens staan op de eerste pagina van de octrooi-publicatie. De volgende gegevens zijn de meest interessante:

Titel (Title) geeft een snelle indicatie van de inhoud.

Samenvatting (Abstract) is een korte samenvatting van de inhoud.

Figuur naast de samenvatting is meestal een afbeelding die representatief is voor de uitvinding.

Andere gegevens zijn interessant om de juridische eigenschappen van het octrooidocument te controleren:

Aanvrager (Applicant) is diegene die de octrooiaanvraag heeft ingediend en is normaal ook diegene die de octrooirechten bezit.

Uitvinder (Inventor) is een of zijn meerdere personen die significant hebben bijgedragen aan de uitvinding. In het octrooirecht van de VS is de uitvinder diegene die de octrooirechten heeft, terwijl in andere landen dat de aanmelder is.

PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12N 15/86, 5/10 // A61K 48/00		A1	(11) International Publication Number: WO 97/00326
			(43) International Publication Date: 3 January 1997 (03.01.97)
(21) International Application Number: PCT/NL96/00244	(22) International Filing Date: 14 June 1996 (14.06.96)	(30) Priority Data: 95201611.1 15 June 1995 (15.06.95) EP (34) Countries for which the regional or international application was filed: NL et al. 95201728.3 26 June 1995 (26.06.95) EP (34) Countries for which the regional or international application was filed: NL et al.	(74) Agent: SMULDERS, Th., A., H., J.; Verenigde Octrooibureaux, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).
(71) Applicants (for all designated States except US): INTROGENE B.V. [NL/NL]; Lange Kleiweg 151, NL-2288 GJ Rijswijk (NL). RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN [NL/NL]; Stationsweg 46, NL-2312 AV Leiden (NL).	(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): FALLAUX, Frits, Jacobus [NL/NL]; Peppelschans 77, NL-2352 BE Leiderdorp (NL). HOEBEN, Robert, Cornelis [NL/NL]; Gerbrandylaan 43, NL-2314 EX Leiden (NL). BOUT, Abraham [NL/NL]; Coymansstraat 24, NL-2751 AR Moerkapelle (NL). VALERIO, Domenico [NL/NL]; Gerbrandylaan 12, NL-2314 EZ Leiden (NL). VAN DER EB, Alex, Jan [NL/NL]; Prinses Beatrixlaan 53, NL-2341 TW Oegstgeest (NL).	(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	Published With international search report.
(54) Title: PACKAGING SYSTEMS FOR HUMAN RECOMBINANT ADENOVIRUS TO BE USED IN GENE THERAPY			
(57) Abstract <p>The invention provides improved methods and products based on adenoviral materials which can advantageously be used in for instance gene therapy. In one aspect an adenoviral vector is provided which has no overlap with a suitable packaging cell line which is another aspect of invention. This combination excludes the possibility of homologous recombination, thereby excluding the possibility of the formation of replication competent adenovirus. In another aspect an adenovirus based helper construct which by its size is incapable of being encapsidated. This helper virus can be transferred into any suitable host cell making it a packaging cell. Further a number of useful mutations to adenovirus based materials and combinations of such mutations are disclosed, which all have in common the safety of the methods and the products, in particular avoiding the production of replication competent adenovirus and/or interference with the immune system. Further a method of intracellular amplification is provided.</p>			

Figuur 3.1: Voorkant van WO 97/00326 A1

Prioriteitsdatum (Priority data) is de datum van de eerste octrooiaanvraag waarvoor een prioriteit wordt gevraagd. De octrooirechten beginnen vanaf deze datum. In dit geval zijn er twee Europese documenten (EP 95201611 van 15 en 9521728 van 26 juni 1995) waarmee prioriteit is aangevraagd.

Datum van de aanvraag (Filing date) is de datum van indiening van de octrooiaanvraag.

Aangewezen landen (Designated states) zijn de landen waarvoor octrooibescherming is gevraagd op het moment van indiening van de PCT aanvraag. De PCT procedure wordt gebruikt om een wereldwijde octrooiaanvraag te doen.

Publicatie datum (Publication date) is de datum waarop de octrooiaanvraag is gepubliceerd. Het is vanaf deze datum zichtbaar voor iedereen. Voor deze datum was de aanvraag nog geheim.

Er zijn ook administratieve gegevens genoemd:

Document nummer (Publication number) is een uniek nummer om het octrooidocument te identificeren. Het geeft ook informatie over het type document. De eerste letters zijn een landcode. In dit geval WO, voor een PCT aanvraag. Andere codes zijn bijvoorbeeld EP voor de Europese procedure bij het Europees Octrooi Bureau (EOB), NL voor Nederland, US voor de Verenigde Staten, DE voor Duitsland, etc. Er is ook een kind code. In dit geval A1. Deze code wordt gebruikt voor een octrooiaanvraag met search report. Als een octrooi wordt verleend, dan wordt vaak een B code gebruikt.

Aanvraag nummer (Application number) is een nummer dat de aanvraag krijgt wanneer het wordt ingediend.

Er staan ook classificatiecodes op het document. Deze worden gebruikt bij het zoeken.

3.8 Claims

De claims (conclusies in formeel Nederlands) bepalen de omvang van de bescherming van het octrooi. Meestal is er een hoofdclaim met meerdere afhankelijke claims. De afhankelijke claims definiëren verdere kenmerken van de uitvinding.

De functie van de afhankelijke claims is specifiekere claims te hebben in het geval de hoofdclaim niet stand houdt in de toetsing van de octrooiaanvraag of bij een rechtszaak.

3.8.1 Claim van het PER.C6 voorbeeld

De hoofdclaim in deze lifesciences and health octrooiaanvraag is als volgt opgesteld (WO 97/00326 A):

A recombinant nucleic acid molecule based on or derived from an adenovirus having at least a functional encapsidating signal and at least one functional Inverted Terminal Repeat or a functional fragment or derivative thereof and having no overlapping sequences which allow for homologous recombination leading to replication competent virus in a cell into which it is transferred.

De taal in de claim is een stuk ingewikkelder dan de taal die je normaal zou kunnen gebruiken om de uitvinding te beschrijven. De uitvinding is ook te beschrijven als:

De minimale onderdelen (functional inverted repeats, functional incapsidated signals) van een adenovirus DNA die nodig is om in cellen te vermenigvuldigen.

Een reden voor deze ingewikkelde taal in claims is dat de tekst een juridische tekst is. De uitvinding moet juridisch duidelijk beschreven worden. De formulering in de claim beschrijft een functionele groep en een signaal die nodig zijn om de therapie mogelijk te maken. Er zijn bepaalde woorden gebruikt zoals ‘based on’ of ‘derived from’ en ‘derivative thereof’ waarmee de vinding wel wordt gedefinieerd maar meteen niet teveel wordt beperkt.

3.8.2 Test voor nieuwheid

Zoals eerder genoemd, moet een octrooi nieuw zijn. In het search report in de publicatie van de octrooiaanvraag in paragraaf E.1, is te zien dat er meerdere documenten als stand van de techniek zijn geciteerd. Het search report, rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek genoemd in formeel Nederlands, wordt door de examiner gebruikt voor de toetsing van nieuwheid en inventiviteit van de octrooiaanvraag. Meerdere documenten beschrijven de kenmerken van de claims waardoor ze schadelijk zijn voor de nieuwheid van de geclaimde vinding in de octrooiaanvraag.

Hieronder wordt gedemonstreerd hoe het bepalen van de nieuwheid kan worden uitgevoerd. Het begint met het opdelen van de claim in afzonderlijke kenmerken. Daarna wordt bepaald of deze kenmerken gezamenlijk bekend zijn in een document van de stand van de techniek. Voor deze oefening wordt het eerste document in het search report gebruikt. Dit document met nummer WO 94/28152 is in paragraaf E.2 te vinden.

Probeer zelf het antwoord te vinden voordat je het antwoord bekijkt.

Kenmerken claim 1 van de octrooiaanvraag

Waar te zien in WO 94/28152 A?

A recombinant nucleic acid molecule based on or derived from an adenovirus

Klik voor antwoord.

having at least a functional encapsidating signal

Klik voor antwoord.

and at least one functional Inverted Terminal Repeat or a functional fragment or derivative thereof

Klik voor antwoord.

having no overlapping sequences which allow for homologous recombination leading to replication competent virus in a cell into which it is transferred

Klik voor antwoord.

Na het lezen van deze tabel is duidelijk dat claim 1 kan niet worden verleend vanwege gebrek aan nieuwheid, immers alle kenmerken zijn al beschreven document WO 94/28152.

Bovendien geeft de examiner aan dat er een essentieel kenmerk ontbreekt. In de claim wordt een recombinant adenovirus beschreven waarbij bepaalde aanpassing zijn gemaakt om te voorkomen dat er competente adenovirussen kunnen ontstaan. Maar voor het produceren van de recombinant adenovirussen wordt gebruik gemaakt van een specifieke cellijn die dus ook moet worden beschreven in de claim.

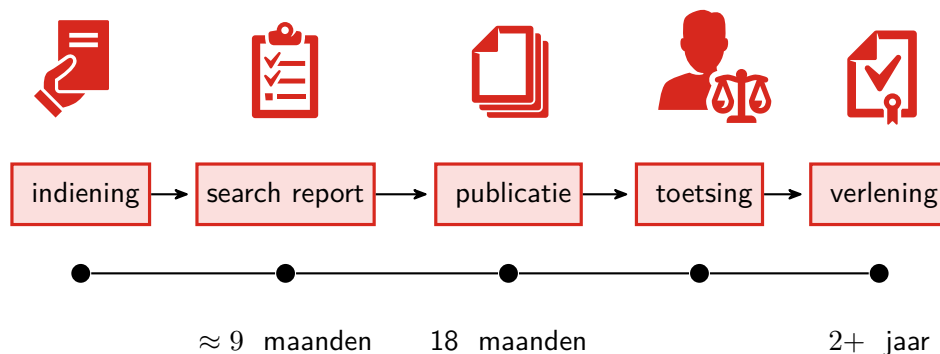
3.9 Procedures octrooiaanvraag

Octrooien kunnen in verschillende landen, maar ook regionaal worden aangevraagd. In Europa kan een Europees octrooi worden aangevraagd bij het Europees Octrooibureau (EOB). Een wereldwijde octrooiaanvraag kan via de PCT procedure worden aangevraagd bij het WIPO.

Deze verschillende procedures voor aanvraag van een octrooi hebben grote overeenkomsten, maar ze zijn niet hetzelfde. Daarom worden hieronder de verschillende procedures beknopt beschreven. Als laatste worden de gekozen procedures van het voorbeeld beschreven.

3.9.1 EP octrooiaanvraag

Als eerste wordt de procedure voor een octrooiaanvraag voor een Europees octrooi (EP) behandeld. Deze procedure is vergelijkbaar met de procedure voor een octrooiaanvraag in vele landen. In figuur 3.2 is een overzicht van de EP procedure weergegeven.



Figuur 3.2: EP procedure

De aanvraag begint met de indiening van de aanvraag bij het octrooibureau. Het eerste inhoudelijke antwoord op de aanvraag is een search report. In het search report is de meest relevante stand van de techniek genoemd. Deze stand van de techniek wordt gebruikt bij de beoordeling van de vereisten. Deze beoordeling van de vereisten vindt tijdens de toetsing plaats. Naast het search report wordt ook een schriftelijke opinie meegestuurd. In de schriftelijke opinie zijn eventuele bezwaren tegen de verlening opgeschreven. Niet nieuw zijn of een gebrek aan inventiviteit zijn de meest bekende bezwaren.

De aanvraag wordt 18 maanden na de eerste indieningsdatum gepubliceerd. Tot dit moment is de aanvraag geheim. Vanaf dit moment is de uitvinding in de hele wereld bekend.

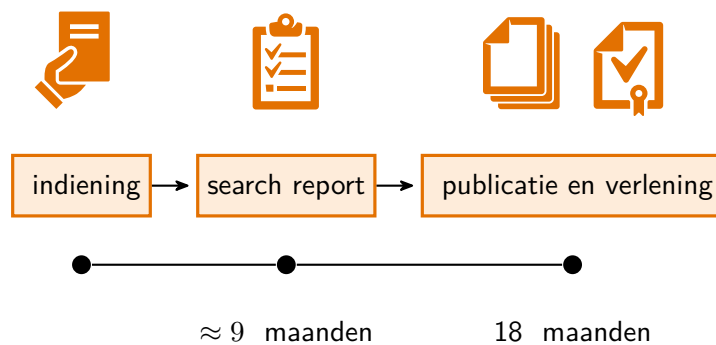
Voordat het octrooi verleend wordt, wordt er eerst getoetst of de aanvraag aan alle voorwaarden voldoet. Indien niet aan alle voorwaarden voldaan is, wordt een brief geschreven door de examiner en naar de aanvrager gestuurd. In deze brief staan de bezwaren en dat de aanvraag dus niet verleend kan worden. De aanvrager heeft de mogelijkheid deze bezwaren weg te nemen door bijvoorbeeld de claims aan te passen. Deze ronde van bezwaren en wijzigingen kan meerdere keren plaats vinden. Eventueel kan er ook nog een mondelinge zitting plaats vinden om tot een besluit te kunnen komen.

Als er geen bezwaren zijn, dan wordt de aanvraag verleend. Er is ook de mogelijkheid dat de aanvraag wordt afgewezen als de bezwaren niet worden overkomen.

Na de verlening moet het octrooi in de gewenste landen in Europa worden gevalideerd bij de nationale octrooibureaus. Het Europese octrooi wordt dan dus een bundel nationale octrooien.

3.9.2 NL octrooiaanvraag

De Nederlandse procedure voor een octrooi is eenvoudiger dan bijvoorbeeld de Europese procedure. De Nederlandse procedure is weergegeven in figuur 3.3. Een vergelijkbare procedure wordt ook toegepast in andere landen, zoals bijvoorbeeld België.

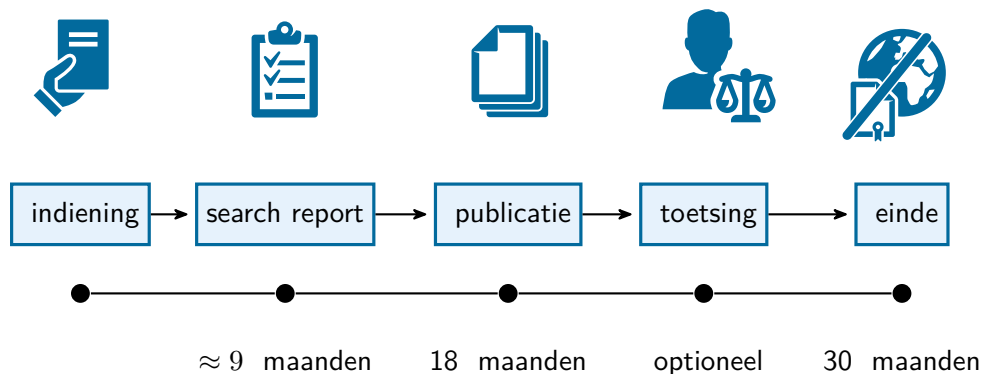


Figuur 3.3: NL procedure

Het grote verschil met bijvoorbeeld de EP procedure is dat er geen toetsing plaats vindt. De octrooien worden automatisch samen met de publicatie verleend. Dus ook octrooien die niet aan de vereisten voldoen. Met de gegevens van het search report en de bijbehorende schriftelijke opinie moet dan worden ingeschat in hoeverre de octrooihouder zijn octrooirechten kan uitoefenen. Een eventuele rechtszaak hierover geeft dan meer duidelijkheid.

3.9.3 PCT octrooiaanvraag

De PCT (Patent Cooperation Treaty) procedure, voor de wereldwijde octrooiaanvraag, is schematisch weergegeven in figuur 3.4. De enkele centrale aanvraag voor de meest relevante landen in de wereld is het voordeel van de PCT procedure ten opzichte van de nationale of regionale procedures.



Figuur 3.4: PCT procedure

Er zijn echter 2 kenmerken die een belangrijk verschil zijn met de andere procedures:

1. De PCT procedure eindigt na 30 maanden. Er is dan geen verleend octrooi.
2. De toetsing is optioneel.

De procedure om een octrooi te krijgen moet worden voortgezet in regionale of nationale procedures. Dus de PCT procedure is alleen het begin van de octrooiprocedure. De optionele toetsing is daarom ook geen besluit tot verlening of afwijzing, maar een opinie over de octrooierbaarheid.

Het uitstel van de keuze van de gewenste landen en daarmee ook een uitstel van kosten is een reden waardoor veel voor de PCT procedure wordt gekozen. Verder hoeft er maar 1 keer voor een search report betaald te worden, omdat het search report uit de PCT fase in de latere nationale of regionale toetsing wordt gebruikt. Als in verschillende landen parallel zou worden aangevraagd, dan moeten deze kosten in al deze landen worden gemaakt.

De PCT procedure is daarom interessant als verwacht wordt dat octrooirechten in meerdere landen in verschillende regio's gewenst zijn.

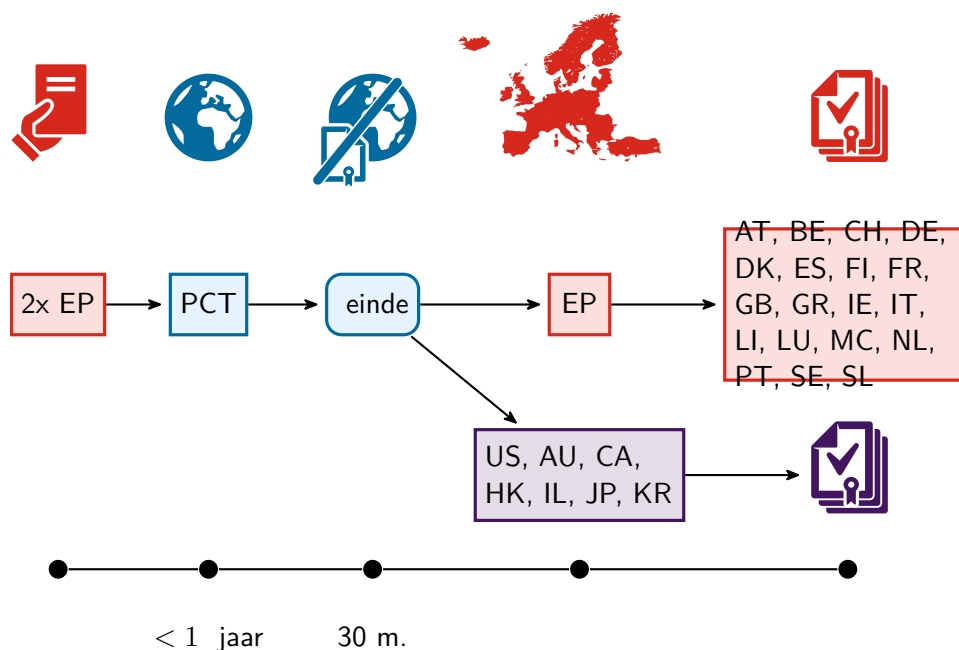
3.9.4 Prioriteitsjaar

Meestal kan pas na de ontvangst van het search report beoordeeld worden of het voortzetten van de aanvraag nut heeft. Daarom hebben de meeste landen de regel dat gedurende 1 jaar de prioriteit van een eerdere aanvraag uit een ander (of zelfde) land kan worden gebruikt. De aanvrager heeft dan een jaar de tijd om te bepalen in welke landen nog een octrooi gewenst is. De latere aanvraag krijgt dan de prioriteitsdatum van de eerdere aanvraag. Het is dan alsof de latere aanvraag toch op de eerdere datum is ingediend. (zie ook artikel 9 ROW, artikel 87 – 89 EOV of artikel 8 PCT).

Dit prioriteitsrecht kan ook voor regionale procedures zoals de EP procedure of voor de PCT procedure gebruikt worden. Het is dus mogelijk om in een land te beginnen met de octrooiaanvraag en dan binnen 1 jaar de wereldwijde aanvraag te doen. Je hebt dan de mogelijkheid om het nut van de octrooiaanvraag in te kunnen schatten voordat er grotere kosten gemaakt moeten worden.

3.9.5 Procedure van het PER.C6 octrooi

In figuur 3.5 is een overzicht van de aanvraag van de uitvinding tot aan de verlening weergegeven.



Figuur 3.5: Procedure van het PER.C6 octrooi

Er zijn eerst twee EP aanvragen ingediend voor de uitvinding. Deze heeft men laten vervallen voor de publicatie.

Binnen de periode van een jaar na deze eerste aanvragen is op 14 juni 1996 de octrooiaanvraag via de PCT procedure ingediend. Deze aanvraag heeft daarbij de prioriteit van de twee EP aanvragen gebruikt. Deze aanvraag bevat naast een korte samenvatting ook een meer algemene beschrijving, met daarnaast wetenschappelijke artikelen en resultaten van onderliggend onderzoek.

Een aanvraag wordt 18 maanden na de indiening gepubliceerd en kan binnen het prioriteitsjaar worden voortgezet via verschillende aanvraagprocedures. De PCT procedure eindigt na 30 maanden.

Er is besloten om na de PCT fase door te gaan via verschillende nationale octrooiaanvraagprocedures en de EP aanvraagprocedure. Via de EP procedure zijn uiteindelijk in 19 Europese landen octrooien verleend: Oostenrijk (AT), België (BE), Zwitserland (CH), Duitsland (DE), Denemarken (DK), Estland (ES), Finland (FI), Frankrijk (FR), Verenigd Koninkrijk (GB), Griekenland (GR), Ierland (IE), Italië (IT), Liechtenstein (LI), Luxemburg (LU), Monaco (MC), Nederland (NL), Portugal (PT), Zweden (SE) en Slovenië (SL). Daarnaast zijn er ook in Australië (AU), Canada (CA), Hong Kong (HK), Israël (IL), Japan (JP), Korea (KR), en de Verenigde Staten (US) octrooien verleend.

Hoewel we dat niet weten kunnen we er in eerste instantie vanuit gaan dat het marktpotentieel voor het gebruik van de PER.C6 technologie een belangrijke rol heeft gespeeld in de keuze om octrooien aan te vragen in bovengenoemde landen.

3.9.6 Verleende PER.C6 octrooi

Uit het international report van de octrooiaanvraag voor de PER.C6 technologie blijkt dat er drie documenten gevonden zijn die een deel van de nieuwheid van de uitvinding wegnemen. Tijdens de examination zijn de ingediende claims aangepast. De hoofdclaim zoals beschreven in het verleende octrooi luidt als volgt (waarbij de tekst in italics het verschil aangeeft ten opzichte van de ingediende claim):

A packaging system comprising: a recombinant nucleic acid molecule based on or derived from an adenovirus, said nucleic acid molecule having at least a functional encapsidating signal and at least one functional Inverted Terminal Repeat or a functional derivative thereof, and having a packaging cell said recombinant nucleic acid and said packaging cell together comprising all elements which are necessary to generate a a recombinant adenoviral

particle comprising said recombinant nucleic acid molecule wherein said recombinant nucleic acid molecule has no overlapping sequences which allow for homologous recombination leading to replication competent virus in said packaging cell.

Er zijn een aantal kenmerken aan de hoofdclaim toegevoegd op basis van het nieuwheidsonderzoek en examination. Nadat eerder in de examination was geconstateerd dat de vinding een essentieel kenmerk miste is dit in de nieuwe hoofdclaim toegevoegd.

Je kunt zien dat de beschermingsomvang zoals beschreven in de conclusies in het uiteindelijk verleend octrooi kleiner is dan in de eerste octrooiaanvraag.

De claims kunnen worden aangepast met aanvullende kenmerken die worden genoemd in de afhankelijke claims of de beschrijving. Met deze extra kenmerken is het mogelijk de bezwaren tegen de verlening van het octrooi te overkomen. Deze kenmerken moeten al in de octrooiaanvraag beschreven zijn, omdat deze niet later, na de indiening van de aanvraag, mogen worden toegevoegd.

3.9.7 Octrooifamilie

Uit het voorbeeld heb je gezien, dat vanuit een eerste octrooiaanvraag meerdere gelijke verleende octrooien in de verschillende landen zijn voortgekomen. Deze octrooiaanvragen en verleende octrooien hebben praktisch dezelfde inhoud. Ze zijn echter wel allemaal apart gepubliceerd.

De meeste van deze publicaties zijn in de octrooidatabanken opgenomen. Echter, als je gaat zoeken, dan wil je niet iedere publicatie met dezelfde inhoud apart zien. Dat is niet nuttig. Als je eentje hebt gezien, dan weet je ook de inhoud van de andere publicaties.

In de octrooidatabanken zijn de publicaties daarom per familie gegroepeerd. Een familie van octrooien is dus een verzameling van octrooiaanvragen en octrooien die dezelfde inhoud hebben. De groepering wordt automatisch uitgevoerd, waarbij de relatie met de eerste indiening wordt gebruikt om de documenten te groeperen. Dit kan echter soms niet correct zijn, als er een niet standaard procedure gevolgd is.

3.10 Na de verlening van het octrooi

Na de verlening van het octrooi is pas duidelijk wat precies de omvang van de octrooibeschermt is. Daarom is het octrooi pas echt te gebruiken om anderen te stoppen als het octrooi verleend is. Het werk aan het octrooi en ook de kosten en zelfs risico's zijn dan echter nog niet voorbij.

De volgende activiteiten vragen nog het nodige:

1. Potentieel inbreuk op je octrooi moet je zelf ontdekken. Je moet dus goed opletten welke concurrent eventueel inbreuk maakt.
2. Het stoppen van een mogelijke inbreuk moet je ook zelf organiseren. Eerst de potentiële inbreuk pleger waarschuwen en misschien uiteindelijk een rechtszaak aanspannen. Een rechtszaak zal het nodige kosten. Daar zal rekening mee moeten worden gehouden bij beslissingen bij de te volgen strategie.
3. Ook als je octrooi verleend is, dan kan je deze nog verliezen. In de EP procedure is er nog een oppositie procedure mogelijk binnen 9 maanden na de verlening. Bij een oppositie procedure kunnen derden bezwaar maken tegen het verleende octrooi. Het kan dan gebeuren dat het octrooi alsnog wordt afgewezen. Het is ook mogelijk dat het octrooi moeten worden aangepast. Dit is vergelijkbaar met de toetsing voor het verlenen van het octrooi.

Het octrooi kan ook later via de rechter worden aangevallen door derden. Ook dan is het mogelijk dat het octrooi nietig wordt verklaard. Deze stap wordt meestal door derden genomen als ze beschuldigd worden van inbreuk.
4. Om ervoor te zorgen dat de octrooirechten niet onnodig lang blijven bestaan, moet er een jaarlijkse instandhouding worden betaald. Als er niet betaald wordt, dan vervalt het octrooi. Indien het octrooi niet genoeg economische waarde heeft, dan is het waarschijnlijk beter om het niet langer in stand te houden.

Uit het voorgaande wordt duidelijk dat de publicaties in de octrooidatabanken geen informatie over de status van een octrooi geven. Deze status moet in de octrooiregisters worden opgezocht. Ieder land heeft een eigen octrooi-register om deze status te administreren. Enkele links naar deze registers zijn in paragraaf B.4 te vinden.

Hoofdstuk 4

Gebruik IE om geld te verdienen bij technische innovaties

4.1 Inleiding

In dit hoofdstuk gaan we verder in op het bedrijfsmatig gebruik van industriële eigendomsrechten. Auteursrechten behoren niet tot de industriële eigendomsrechten, dit betekent overigens niet dat producten die middels auteursrecht zijn toegeëigend niet bedrijfsmatig gebruikt kunnen worden.

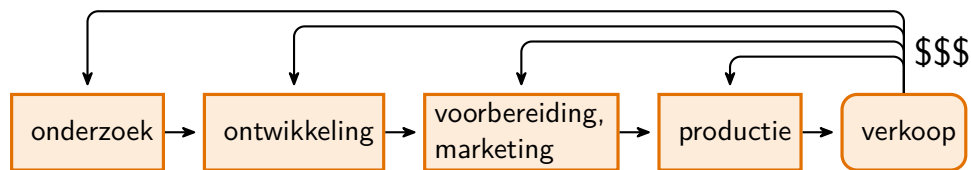
Hoewel deze begrippen vaak naast of door elkaar worden gebruikt is het belangrijk om onderscheid te maken tussen de aard en het belang van ideeën, uitvindingen en innovaties. De definitie van een uitvinding is al eerder beschreven in paragraaf 3.4. We merken op dat er veel ideeën kunnen zijn om producten te verbeteren of te vernieuwen, maar dat zij lang niet altijd worden meegenomen in de onderzoeks- of ontwikkelingsfase van een innovatieproces. Daarmee leiden ze niet tot nieuwe uitvindingen die economisch pas echt van meerwaarde zijn als ze zijn verwerkt in een innovatie die verkocht kan worden op de markt. Want in het algemeen spreken we over een innovatie als een bedrijf een nieuw product of dienst op de markt heeft gebracht en deze vervolgens gekocht wordt door klanten of afnemers. Zodoende dragen innovaties bij aan economische groei.

In de volgende paragraaf beschrijven we veel voorkomende stappen in een innovatieproces van bedrijven. In de daaropvolgende paragrafen gaan we verder in op het gebruik- en de toepassing van IE-rechten in diverse stappen in het innovatieproces.

4.2 Innovatieproces

Voorafgaand aan de afzet van een nieuw product is er al een lange weg afgelegd in een innovatieproces vanaf het eerste idee over- tot de marktintroductie van een verkoopbaar eindproduct. Tijdens de verschillende stappen en fasen in dat proces is het nuttig om gebruik te maken van (informatie over) intellectueel eigendom.

In figuur 4.1 is dit proces schematisch weergegeven.



Figuur 4.1: Proces van onderzoek tot verkoop product

Bedrijven beginnen een kostbaar innovatieproces meestal met grondig marktonderzoek. Afhankelijk van de economische sector waarin het bedrijf opereert is een onderzoek naar de stand van de techniek relevant en duurt de productvernieuwing langer of korter. Voor langlopend onderzoek en productontwikkeling wordt vaak samengewerkt met een universiteit en waarbij een of meerdere onderzoekers een groot deel van het onderzoek uitvoeren. Bijvoorbeeld door een promovendus.

Het doel van de fase van ontwikkeling is om een productidee naar een dusdanige status te brengen waarbij het zijn eindvorm krijgt. Hierbij krijgt het product de eerste vorm zoals het uit het eindproduct eruit kan komen zien, zonder dat de exacte productie al bepaald is. Met name dit deel van het proces is voor veel producten lang en erg kostbaar omdat veel mensen vanuit meerdere disciplines bij deze ontwikkeling betrokken moeten zijn.

Bij de productievoorbereiding moet op voorhand het productieniveau bepaald worden en de daarbij behorende inrichting van de fabriek. De kosten van deze stap zijn zowel afhankelijk van het product als de economische sector waarin het bedrijf opereert. Voor de productie van een nieuw model auto kan deze investering in de miljarden euro's lopen.

Hoewel marketing en verkoop op zich geen logische volgende stap in dit proces lijken, zijn ze van cruciaal belang. Immers, de kans dat de aanloopinvesteringen en kosten die zijn gemaakt voor onderzoek en ontwikkeling, productie en marketing kunnen worden terugbetaald, zijn volledig afhankelijk van een succesvolle marktintroductie van het product en dus van het succes van de afdeling verkoop. Voorafgaand daaraan is een effectieve marketing belangrijk.

Pas bij de verkoop van het product worden inkomsten gegene-reerd!

In alle fasen in het innovatieproces voorafgaand aan de verkoop van het nieuwe product moet een bedrijf tijd en geld investeren. Deze aanloopinvesteringen zijn vaak aanzienlijk en het te verwachten bijbehorend rendement kan pas bij de verkoop worden gemaakt. Het gebruik van intellectuele eigendomsrechten maakt het mogelijk om voldoende marges te maken bij de verkoop om deze investeringen terug te verdienen. Op deze wijze dragen intellectuele eigendomsrechten bij aan het terugverdienvermogen van de organisatie. Omgekeerd heeft intellectueel eigendom alleen waarde als een product naar de markt wordt gebracht.

4.3 Gebruik van IE-informatie bij keuzes in het innovatieproces

Tijdig gebruik van openbaar beschikbare informatie over intellectueel eigen-dom kan vaak voorkomen dat er tijdens een innovatieproces onnodig kosten worden gemaakt of dat er na marktintroductie problemen kunnen voorko-men. In deze paragraaf gaan we daar verder op in.

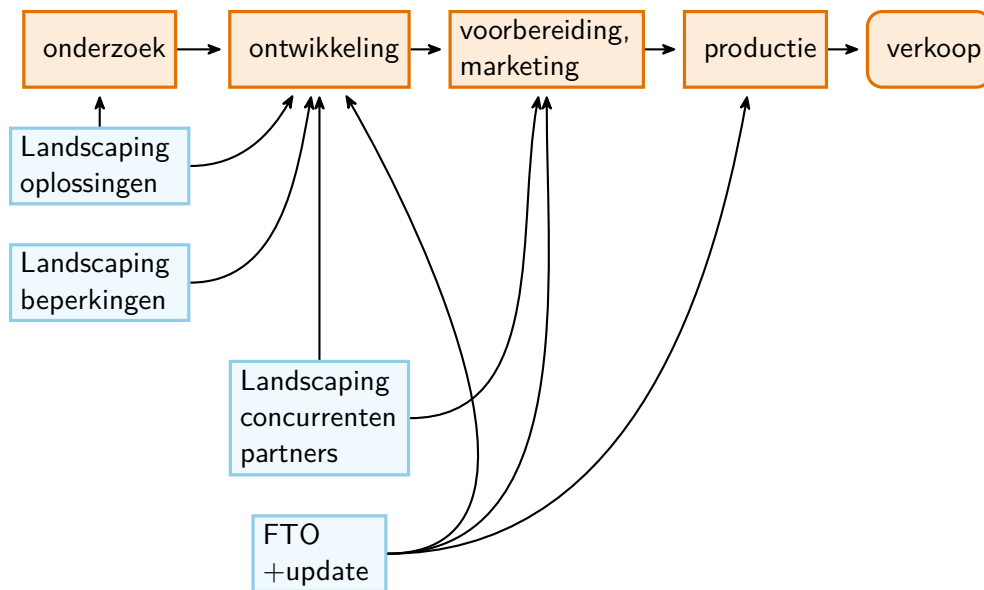
In figuur 4.2 is schematisch weergegeven welke soort informatie gebruikt kan worden en wanneer.

Met behulp van twee soorten onderzoek kan volgende informatie worden verzameld voor verschillende doelen:

1. patent landscape-analyse
 - a. bevat technische informatie over reeds bekende oplossingen,
 - b. reeds bekende oplossingen waarvan moet worden nagegaan of er nog eigendomsrechten waarmee rekening moet worden gehouden,
 - c. voor een marktanalyse op zoek naar concurrenten en mogelijke partners
2. Freedom to Operate (FTO) analyse
Informatie en analyse over mogelijk inbreukrisico.

4.3.1 Patent landscape analyse

Bedrijven en kennisinstellingen werken internationaal. Tijdens een innova-tieproces kan je een patent landscape-analyse gebruiken om te onderzoeken welke geoctrooieerde technologie er wereldwijd al is ontwikkeld en door wie.



Figuur 4.2: IE informatie in het proces voor nieuw product

Data uit een patent landscape analyse worden op drie manieren geanalyseerd. Dit is nodig om de juiste informatie voor de verschillende fasen in het innovatieproces te kunnen gebruiken bij te nemen keuzes.

A. Om te bepalen welke problemen en oplossingen technisch onderzocht en ontwikkeld moeten worden, is een overzicht van bekende oplossingen en de daarbij opgeloste problemen nodig. Voor het uitvoeren hiervan zijn daarom de personen nodig die het technische inzicht van de problemen en oplossingen hebben.

B. Voorafgaand aan de beslissing om te beginnen met de ontwikkeling van een nieuw product, is het nuttig om oplossingsrichtingen beschreven in bestaande of toekomstige octrooien in kaart te brengen. Hierbij wordt gezocht naar bestaande technische oplossingen of oplosrichtingen die in de buurt komen van wat het onderzoek en de ontwikkeling die je zelf wilt gaan uitvoeren. Voor de analyse van deze data is zowel kennis over technologie als over octrooien nodig. Hoe een bedrijf om wil gaan met de resultaten van deze analyse, als ze bijvoorbeeld een zelfstandige productontwikkeling lijken te beperken, is geheel afhankelijk met de te volgen bedrijfsstrategie. Een mogelijkheid is het stoppen van voorgenomen productontwikkeling als er beperkingen zijn. Een andere mogelijkheid is om de nodige rechten op de technologie te verkrijgen of zelfs als partners te gaan werken. Deze mogelijkheden worden in de volgende paragrafen verder uitgewerkt.

C. Naast de technische- en juridische informatie uit een patent landscape-analyse kan je ook nuttige data halen voor verder marktonderzoek. Deze

informatie kan je gebruiken om interessante landen, markten en eventuele partners in kaart te brengen voor de afzet van nieuwe producten. Ook is het mogelijk interessante markten te analyseren waarop je niet zelf actief wilt of kunt zijn, maar bijvoorbeeld wel via een partner.

4.3.2 Freedom to Operate (FTO) analyse

Als een product een duidelijke vorm krijgt tegen het einde van de ontwikkeling, dan is het belangrijk om het risico in kaart te brengen op mogelijke inbreuk op rechten van derden. Bij een inbreuk op rechten van derden kan de productie of verkoop van dat product ernstig gehinderd of zelfs onmogelijk gaan worden. Een dergelijke risico-analyse wordt een Freedom to Operate analyse genoemd.

Tijdens de uitvoering van een patent landscape analyse is het risico op mogelijke inbreuk al enigszins bepaald. Echter pas als een product een meer definitieve en duidelijke vorm krijgt, is het mogelijk de analyse van het risico op inbreuk met voldoende zekerheid uit te voeren. Tot aan het moment dat een product tot de stand van de techniek gaat behoren bijvoorbeeld door middel van verkoop of publicatie in bijvoorbeeld een eigen octrooi, is het mogelijk dat derden rechten krijgen die de verkoop daarvan kunnen verhinderen. Het is daarom nuttig om een FTO analyse ook tussentijds een update te geven.

Voor het uitvoeren van een FTO analyse is naast technische- en octrooi-kennis ook aanvullende kennis nodig op juridisch en financieel gebied. Dit maakt dat de uitvoering van een FTO analyse multidisciplinaire kennis vereist en dat deze analyse duur kan zijn. De omvang van het FTO onderzoek moet daarom ook in verhouding tot de risico's staan.

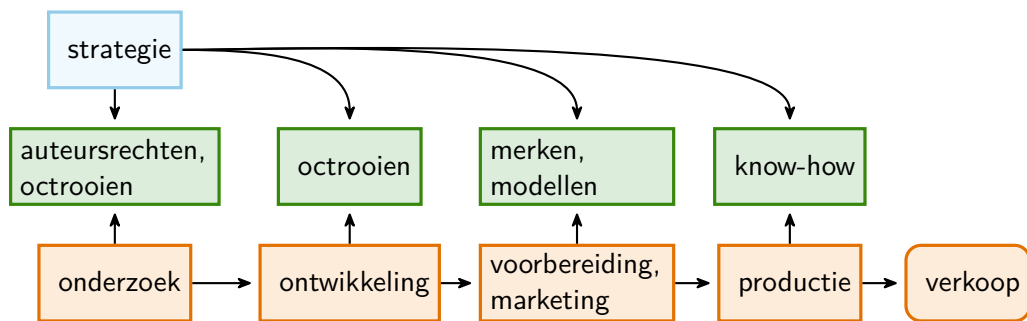
4.4 Strategisch IE gebruik

Het is van belang om als eerste te bepalen welke soort IE nodig is voor een succesvolle innovatie. Grotere, gevestigde bedrijven hebben hiervoor een eigen afdeling en gebruiken een IE strategie. Deze afdeling maakt de keuze om verscheidene IE rechten te benutten tijdens de fases van hun innovatieproces. Voor meer informatie over het gebruik van de verscheidene IE rechten in diverse economische sectoren per product of proces, zie Cohen, Nelson en Walsh [CNW00] en Scotchmer [Sco04] hoofdstuk 9.

Om voldoende marge te kunnen genereren bij de verkoop van een nieuw product en daarmee eerdere investeringen terug te verdienen is het meestal nodig zelf intellectueel eigendom te hebben. Als eigenaar van IE-rechten kan de innovator er immers voor zorgen dat concurrenten niet makkelijk

hetzelfde product tegen een lagere prijs op de markt gaan brengen. Dit heet een defensieve IE-strategie en wordt regelmatig gehanteerd door bedrijven werkzaam in de farma sector. Meer economische literatuur over het prijsmechanisme dat mogelijk wordt gemaakt door product- en proces octrooien staat in Greenhalgh en Rogers [GR10], zie hoofdstuk 1 en 2.

In figuur 4.3 is schematisch weergegeven welke IE per fase van een innovatieproces relevant kan zijn.



Figuur 4.3: IE genereren bij een nieuw product

Bij onderzoek, technologische ontwikkeling en innovatie zullen vooral octrooien relevant kunnen zijn. Bij onderzoek aan universiteiten spelen ook auteursrechten voor de wetenschappelijke publicaties van het onderzoek een belangrijke rol. Afhankelijk van de economische sector en industrie waarin het bedrijf opereert zal het gebruik van modelrechten interessant zijn. Namelijk als het product zijn uiterlijke vorm gaat krijgen dat met een eigen karakter immers goed herkenbaar moet zijn voor klanten.

Daarnaast zijn merken voor de marketing en marktintroductie van nieuwe producten van primair belang. Daarnaast kan marketing ook een belangrijke reden zijn bij afweging om modelrechten te gebruiken.

Geheimen (know-how) over en kennis van de productietechniek en het gebruik van onderdelen bij de productie en marktintroductie van een nieuw product vormen op zich weer een andere bron van intellectueel eigendom. Bij de productie kunnen daarnaast octrooien een rol spelen als het bedrijf een offensieve IE-strategie hanteert en daarbij op zoek is naar licentienemers. Denk hierbij aan octrooien op nieuwe productiemethoden in bijvoorbeeld de chemische industrie.

4.5 Inkoop en verkoop van IE

In veel sectoren van de economie is de technologie tegenwoordig zover ontwikkeld dat veel onderdelen of processen al beschikbaar zijn. Het is daarom

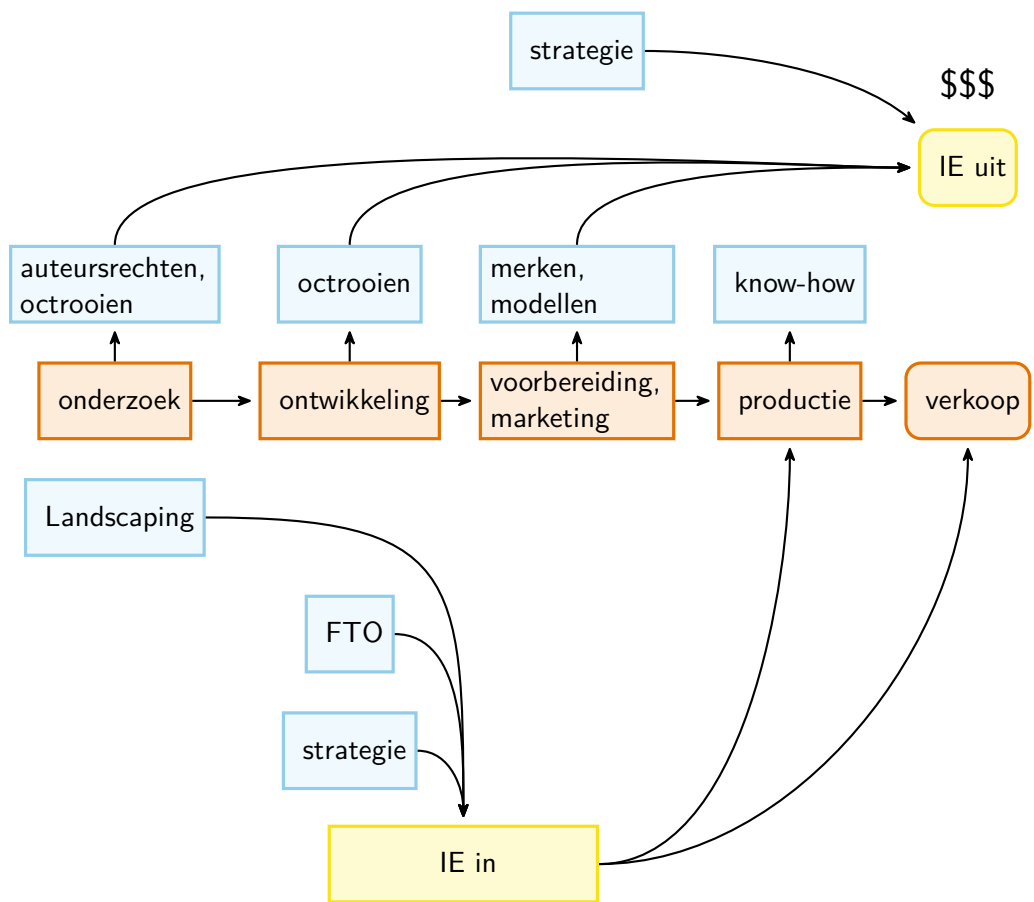
niet meer nodig om deze zelf nog een keer te ontwikkelen of te produceren. Dit is een groot verschil ten opzichte van de opkomende economie aan het begin van de industriële revolutie waarin producenten voor de assemblage en productontwikkeling vrijwel alle technologie en halffabricaten of onderdelen zelf in huis moesten hebben. Voorbeeld: Ford wilde in de dertiger jaren van de vorige eeuw eigen rubberplantages oprichten voor de rubber productie voor autobanden.

Tijdens onderzoek en ontwikkeling is het nuttig om in deze fase te verkennen welke technologie, halffabricaten of onderdelen kunnen worden ingekocht van andere bedrijven. Daarmee kan het bedrijf bepalen wat vervolgens zelf ontwikkeld en geproduceerd moet worden. Deze aanpak is ook relevant voor het vinden van interessante technologie en oplossingen voor bepaalde problemen die andere (internationale) partijen al hebben ontwikkeld maar die bijvoorbeeld nu in het eigen product of productieproces kunnen worden toegepast. Als er IE-rechten op deze oplossingen rusten, dan kan er niet zomaar gebruik gemaakt worden van deze oplossingen. Het is dan misschien mogelijk om deze IE-rechten in eigendom over te nemen, of om een toestemming van gebruik te krijgen. Toestemming om een oplossing te kunnen gebruiken wordt dan via een licentie geregeld.

4.5.1 Het in licentie nemen van een octrooi

De reden dat een bedrijf een technologie wil inlicenseren kan zijn dat het dan sneller kan opstarten met de productie en verkoop van het eigen product. Na uitvoering van een patent landscape-analyse of een Freedom to Operate analyse is duidelijk dat er een technologie bestaat die een bedrijf zou willen inlicenseren of dat het zelfs noodzakelijk is om inbreuk op octrooien van derden te voorkomen. Uiteraard is het hierbij van belang hierbij na te gaan of het desbetreffende octrooi niet alleen is verleend maar ook in stand wordt gehouden in het land waar het bedrijf opereert (=octrooilicentienemer). Met andere woorden, als een Nederlandse producent met producten voor de Nederlandse markt een nieuwe technologie wil gaan gebruiken moet worden nagegaan of het octrooi op desbetreffende technologie van een licentieverlener ook in Nederland geldig en daarmee van kracht is.

De bedrijfsstrategie en te bedienen markten zijn vaak bepalend voor de beslissing om een bepaalde technologie in licentie te nemen van derden. Voor bedrijven met weinig financiële middelen voor eigen onderzoek en ontwikkeling of productontwikkeling is het nuttig om eerst een patent landscape-analyse uit te (laten) voeren. Afhankelijk van de resultaten daarvan kan de vervolgstap worden genomen om contact op te nemen met een octrooihouder en na te gaan of dat bedrijf (organisatie) bereid is octrooilicenties te verlenen aan anderen.



Figuur 4.4: IE in en uit

In figuur 4.4 staat het inlicenseren “IE in” van een technologie als stap in een innovatieproces weergegeven.

4.5.2 Het verlenen van octrooilicenties voor het gebruik van een technologie

Voorafgaand aan de beslissing om voor een bepaalde markt of in een bepaald land zelf een productielijn op te zetten of een productieproces te ontwikkelen moet een bedrijf al besloten hebben om dat in eigen beheer te doen, of door anderen te laten doen. Dat laatste is mogelijk door anderen in licentie of franchise de productie en verkoop te laten uitvoeren. Deze strategische beslissingen worden overwegend op centraal niveau in de onderneming genomen om vervolgens decentraal te worden uitgevoerd.

Als een onderneming niet in staat is of er vanaf wil zien om een eigen product op een bepaalde markt zelf te introduceren bestaat er afhankelijk van de omvang van de octrooiportefeuille en octrooifamilie vaak nog de mogelijkheid om dit via licenties door derden te (laten) doen. Dit is een voorbeeld van uitlicenseren. In figuur 4.4 is ook het proces van uitlicenseren “IE uit” weergegeven. In de praktijk werkt het uitlicenseren vaak succesvol met andere bedrijven die al in diverse, meestal buitenlandse, regio’s opereren en het geoctrooierde product in hun pakket kunnen opnemen als vorm van diversificatie. Voor de octrooihouder betekent dit meestal wel dat deze al in de thuismarkt heeft bewezen het geoctrooierde product succesvol te kunnen verkopen.

4.5.3 Het gebruik van octrooien in verschillende IE strategieën

Afhankelijk van bedrijfsstrategie en het gebruik van intellectuele eigendomsrechten kan een bedrijf ervoor kiezen om het andere bedrijven middels uitlicenseren mogelijk te maken om het product te introduceren in hun markt. Dat andere bedrijf heeft dan het voordeel dat zij omzet kunnen maken uit de verkoop van ingelicenseerde technologie zonder alle daaraan voorafgaande investeringen (in onderzoek en ontwikkeling, productie, marketing, etc.) hiervoor te maken die de octrooihouder immers al heeft gemaakt. Dit noemen we een offensieve IE strategie. Dit is een interessante strategie voor bedrijven met geoctrooierde producten gebaseerd op een brede, onderliggende platformtechnologie of samenstelling met een brede scope aan toepassingsmogelijkheden.

Aan de andere kant zijn er bedrijven die een defensieve IE strategie voeren en het concurrenten onmogelijk willen maken om hetzelfde product tegen een lagere prijs in hun markt te kunnen aanbieden aan hun klantgroepen. Dit

vereist in eerste instantie de opbouw van een grote octrooiportefeuille met octrooien die zijn verleend in veel landen. Voor bedrijven met geoctrooieerde producten gebaseerd op een zeer concrete technologie en samenstelling die relatief eenvoudig kunnen worden nagemaakt kan dit een nuttige strategie zijn.

Hoe een onderneming zich het best kan positioneren en welke IE strategie daarbij kan worden gebruikt is afhankelijk van de huidige- en toekomstige gewenste marktpositie ten opzichte van die van concurrenten. Een patent landscape-analyse geeft een interessant inzicht en overzicht over de ontwikkeling van een bepaalde technologie in afgelopen jaren. Bijbehorende data kunnen niet alleen helpen bij het bepalen van de eigen octrooipositie maar ook bij het nemen van toekomstige strategische beslissingen. Deze informatie kan ook nuttig zijn om de octrooi-strategie van concurrenten in kaart te brengen.

4.6 Voorbeeld van IE gebruik van de PER.C6 technologie

Crucell heeft gebruik gemaakt van verscheidene IE-rechten voor de exploitatie van hun PERC6 technologie. Naast de octrooien spelen bijvoorbeeld ook de merkenrechten een grote rol. In volgende paragrafen worden de door gebruikte IE-rechten kort beschreven om een indruk te krijgen van de strategie.

4.6.1 Octrooien

Crucell heeft reeds vanaf het begin van het bestaan van het bedrijf gebruik gemaakt van octrooien. In figuur is een overzicht gemaakt van het aantal octrooiaanvragen per regio in de tijd. Deze informatie is uit de openbaar toegankelijke databases te halen (zie hiervoor de links in bijlage B).

Hieruit is te zien dat Crucell vooral regelmatig octrooien heeft aangevraagd in veel Europese landen, Australië, Canada, Japan, Nieuw Zeeland en in de Verenigde Staten. In de eerste jaren van het bedrijf zijn er enkele octrooien aangevraagd. Het octrooi dat we hebben beschreven in het algemene voorbeeld, dat onder andere de basis van de PERC6 technologie vormt, behoort hiertoe.

4.6.2 Inkoop en overdracht van octrooien

Crucell heeft na de combinatie van startups Introgene en Ubisys de octrooi-families (check) van beide startups op naam verkregen. De combinatie van

deze octrooien was waarschijnlijk nodig voor de ontwikkeling van een productieplatform vaccins en medicijnen in opdracht van derden.

Vanaf 2012 is te zien dat Crucell bezig is met diversificatie. Een octrooifamilie beschrijft de onderliggende technologie voor deze diversificatie.

Hoofdstuk 5

Gebruik van IE bij bepaalde onderwerpen

5.1 Inleiding

In dit hoofdstuk wordt het gebruik van IE voor bepaalde onderwerpen beschreven. Deze onderwerpen zijn niet gekoppeld aan een specifieke activiteit zoals genoemd in hoofdstuk 4 en zijn van algemeen nut.

Omdat software tegenwoordig van groot belang is in veel onderdelen van innovatie en in de samenleving, wordt specifiek dit onderwerp behandeld in paragraaf 5.2 en open-source software in paragraaf 5.3.

5.2 Software

Computerprogramma's worden primair auteursrechtelijk beschermd.

Soms kan er ook een octrooi worden verkregen op software-gerelateerde uitvindingen. Computerprogramma's als zodanig zijn niet octrooirechtelijk te beschermen.

5.2.1 Auteursrecht op software

Historisch gezien is lang gediscussieerd over de vraag of software bescherming zou moeten krijgen binnen het octrooirecht, het auteursrecht of een apart rechtsregime. Uiteindelijk is er voor gekozen om software eerst en vooral auteursrechtelijk te beschermen. Dit was een praktische keuze. Omdat software wordt geschreven in programmeertaal kan het worden uitgedrukt als een soort tekst. Daarom worden computerprogramma's als letterkundige werken onder het auteursrecht beschermd. Dit uitgangspunt is neergelegd

in artikel 10 lid 1 van de TRIPs-Overeenkomst en artikel 4 van het WIPO Auteursrechtverdrag.

De auteursrechtelijke bescherming van software ziet op de concrete uitdruktingswijze van het computerprogramma, d.w.z. de specifieke vorm waarin de programmeur zijn geestelijke schepping in de broncode tot uitdrukking heeft gebracht. De broncode (source code) betreft de door de programmeur in een programmeertaal geschreven en door mensen leesbare instructies. Ook de doelcode is voorwerp van auteursrechtelijke bescherming. De doelcode (object code) omvat de binaire, voor een computer leesbare en uitvoerbare instructies die uit de broncode zijn gegenereerd door een compiler of interpreter. De doelcode betreft dus in feite de vertaling van de broncode in een voor de computer leesbare vorm.

Voor auteursrechtelijke bescherming van software gelden dezelfde voorwaarden als voor elk ander werk. De broncode en doelcode moeten getuigen van oorspronkelijkheid. Ze mogen niet ontleend zijn aan eerdere software en de programmeur moet bij het schrijven van de broncode creatieve keuzes hebben gemaakt. Is aan deze voorwaarden voldaan, dan is het computerprogramma van rechtswege beschermd onder het auteursrecht.¹

Het auteursrecht beschermt niet een aan een werk ten grondslag liggend idee. Dit betekent dat de functionaliteit, logica, werkwijze of doelstelling van een computerprogramma en de processen, procedures, algoritmes, programmeertalen en indeling van gegevensbestanden die in het kader van een computerprogramma worden gebruikt om bepaalde functies van het programma te kunnen benutten, niet auteursrechtelijk worden beschermd.

Auteursrecht creëert dus geen monopolie op de functionaliteit van software. Het verleent de maker of rechthebbende exclusieve rechten om het verveelvoudigen (kopiëren of bewerken) en openbaar maken (uitgeven, in het verkeer brengen, uitlenen, verhuren of on-demand beschikbaar stellen) van een computerprogramma toe te staan of te verbieden. De maker of rechthebbende kan anderen evenwel niet verbieden om eigen computerprogramma's te ontwikkelen die eenzelfde of soortgelijk doel of functionaliteit nastreven.

Het auteursrecht op software volgt grotendeels dezelfde regels als die gelden voor elk ander werk. Zo zijn de regels voor makerschap en rechtsopvolging gelijk, maken rechthebbenden aanspraak op dezelfde brede exploitatierechten en wordt de beschermingsduur op gelijke wijze bepaald. Toch zijn er enkele bijzondere bepalingen betreffende computerprogramma's die zijn opgetekend in Hoofdstuk VI Aw.

Op grond van het verveelvoudigingsrecht mag de rechthebbende anderen verbieden om het computerprogramma geheel of gedeeltelijk te kopiëren of

¹Ook voorbereidend ontwerp materiaal kan auteursrechtelijk zijn beschermd, mits geen programmeerslag met creatieve stappen meer nodig is om van dat materiaal een computerprogramma te maken.

over te nemen of de broncode te wijzigen. De wet bepaalt daarnaast dat het verveelvoudigingsrecht ook reproducties omvat die nodig zijn voor het laden, in beeld brengen, uitvoeren, doorgeven of opslaan van het computerprogramma. Iemand die de software rechtmatig heeft verkregen, zoals de persoon die een computerprogramma heeft gekocht, mag deze reproducties wel maken voor zover nodig met het oog op het gebruik van het computerprogramma. De rechtmatige verkrijger mag ook een reservekopie maken indien dat voor het beoogde gebruik noodzakelijk is.

Daarnaast staat de wet toe dat de werking van software wordt waargenomen, bestudeerd en getest om de daaraan ten grondslag liggende ideeën en beginselen te achterhalen. Er bestaat dus een expliciete bevoegdheid tot ‘reverse-engineering’ van de software.

Verder is het ‘decompileren’ van een computerprogramma, het reconstrueren van een broncode op basis van de doelcode, onder omstandigheden toegestaan. De wet bepaalt dat een computerprogramma’s mag worden gedecompileerd, niet om een concurrerend programma te maken dat de gedecompileerde software nabootst, maar wel om compatibele programma’s te maken die met de gedecompileerde software kunnen communiceren en daarmee interoperabel zijn. Verder volgt uit de rechtspraak dat decompilatie is toegestaan om fouten in de goede werking van een computerprogramma te herstellen.

Grafische gebruikersinterface en andere elementen

Gebruikers krijgen bij de uitvoering van een computerprogramma op een computer vooral te maken met de grafische gebruikersinterface (GUI). Dat zijn de visuele elementen die de gebruiker in staat stellen om met een computerprogramma te communiceren en aldus het programma (software) te instrueren om de computer (hardware) aan te sturen. Denk aan de verschillende icoontjes in de taakbalk of het menu van een computerprogramma.

De GUI zelf is echter geen computerprogramma. De bijzondere bepalingen betreffende computerprogramma’s gelden daarom niet voor GUIs. Een GUI kan wel zelfstandig auteursrechtelijk beschermd zijn, als het ontwerper creatieve keuzes heeft gemaakt in de vormgeving van de interface. Bij decompilatie van een computerprogramma ten behoeve van interoperabiliteit of fouterstel mag de broncode dus wel worden gereconstrueerd op basis van de doelcode, maar mag de GUI voor zover daar auteursrecht op rust niet ook worden overgenomen. Dat zou inbreuk maken op het auteursrecht op de GUI.

Hetzelfde geldt voor de grafische en geluidselementen van bijvoorbeeld videogames. Die kunnen zelfstandig auteursrechtelijk beschermd zijn als ze een eigen intellectuele schepping van de maker vormen, maar kwalificeren zelf niet als een computerprogramma.

Videogames

Videogames bestaan over het algemeen uit verschillende soorten werken. Naast software (bron- en doelcode) bevatten veel videogames een verhaallijn, personages, afbeeldingen, animaties, video, muziek en teksten. Mits aan de vereisten is voldaan geniet elk van deze werken auteursrechtelijke bescherming. Het auteursrecht op de verschillende werken kan in principe bij verschillende makers liggen. Aan een enkele videogame kunnen soms wel honderden mensen een creatieve bijdrage hebben geleverd. Omdat voor het uitbrengen van de videogame van iedere rechtshabende toestemming moet worden verkregen, kan de grote hoeveelheid rechthebbenden de exploitatie enorm belemmeren.

In de praktijk wordt daarom geregeld dat alle auteursrechten op de videogame zoveel als mogelijk in handen komen van de producent van de videogame. Voor een deel zorgt de Auteurswet daar al voor. Voor zover makers in dienstverband aan een videogame hebben meegewerkt, liggen de auteursrechten op grond van de wet in beginsel al bij de producent als werkgever. Voor onderdelen van een videogame die door freelancers in opdracht zijn gemaakt zal de producent zich meestal de auteursrechten contractueel laten overdragen. Daarnaast kan de producent bedingen dat de maker afstand doet van naamsvermelding, zodat de rechten van rechtswege aan zijn/haar onderneming toekomen. Voor bestaande werken die in een videogame zijn opgenomen, zoals de muziek die op de achtergrond van een videogame klinkt, zal de producent doorgaans toestemming regelen door het sluiten van een licentieovereenkomst met de betrokken auteursrechthebbenden.

5.2.2 Octrooirecht op software

Uitgangspunt van het octrooirecht is dat er op software als zodanig geen octrooi kan worden verkregen, omdat computerprogramma's niet als uitvinding worden aangemerkt. In de term uitvinding ligt echter het vereiste van technisch karakter besloten. Een computerprogramma dat bij de uitvoering op een computer een 'verder technisch effect' heeft, buiten het effect van de

normale aansturing van de computer, kan daarom wel worden geoctrooieerd. Het computerprogramma moet daarbij wel een technische oplossing bieden voor een technisch probleem. Uitvindingen met software moeten daarnaast voldoen aan de octrooirechtelijke vereisten van nieuwheid, inventiviteit en industriële toepasbaarheid (zie paragraaf 3.5).

Voorbeelden van computerprogramma's die bij de uitvoering op een computer een 'verder technisch effect' hebben zijn programma's voor de aansturing van een antiblokkeersysteem (ABS) in auto's, de vaststelling van emissies van röntgenapparaten, het comprimeren van data, de encryptie van elektronische communicatie, het herstellen van vervormd digitaal beeld of de training van kunstmatige intelligentie. Een 'verder technisch effect' kan ook de interne werking of beveiliging van de computer betreffen. Zo bieden programma's voor het verdelen van de processorbelasting, geheugentoe wijzing of de beveiliging van de integriteit bij het opstarten, een technische oplossing voor een technisch probleem.

Octrooirechtelijke bescherming is ruimer dan auteursrechtelijke bescherming in de zin dat het octrooirecht wel degelijk een tijdelijk monopolie verleent op de technische functionaliteit van de software-gerelateerde uitvinding. Het octrooirecht geeft de houder het exclusieve recht om anderen te verbieden de geoctrooieerde uitvinding toe te passen en te gebruiken voor bedrijfsmatige doeleinden. Het is dus niet toegestaan om computerprogramma's met eenzelfde 'verder technisch effect', of een effect dat min of meer gelijkwaardig (equivalent) is, op de markt te brengen gedurende de periode dat het octrooi geldig is.

5.2.3 Overige manieren om software te beschermen

Naast de auteursrechtelijke bescherming van computerprogramma's en octrooirechtelijke bescherming van software-gerelateerde uitvindingen kan software of onderdelen daarvan ook worden beschermd door andere intellectuele eigendomsrechten. Zo kan de broncode van computerprogramma's als bedrijfsgeheim worden beschermd. Grafische kenmerken van computerprogramma's, zoals iconen of pictogrammen van de grafische gebruikersinterface, kunnen als tekeningen worden beschermd onder het tekeningen- en modellenrecht, mits uiteraard aan de specifieke beschermingsvoorwaarden is voldaan.

Daarnaast kan de producent van software natuurlijk contractueel aanvullende bescherming overeenkomen met derden, bijvoorbeeld in licentieovereenkomsten.

Ook kan software natuurlijk technologisch worden beschermd, door beveiligingsmaatregelen zoals encryptiemethoden en kopieerbescherming. De Auteurswet biedt bescherming tegen het omzeilen van dergelijke technologische

beschermingsmaatregelen.

5.3 Voorbeeld van IE gebruik bij open source software

Open source software of alternatief ook free software (free als vrijheid en niet als noodzakelijk gratis) genoemd, heeft als doel dat de software voor iedereen beschikbaar is en ook gezamenlijk ontwikkeld kan worden.

Een gedeelte van deze software zit in de public domain en een ander deel valt onder een licentie. Bekende licenties zijn de GPL (GNU General Public License) of de BSD (Berkely Software Distribution) licentie. Deze licenties staan het gebruik van de software onder bepaalde voorwaarden toe. De gebruiker moet zich dus aan die voorwaarden houden en kan niet alles doen.

Vraag:

Hoe kunnen de voorwaarden van de open source licenties worden afgedwongen als de broncode openbaar is? [Klik voor antwoord.](#)

Hoewel de open source beweging vooral in de academische wereld ontstaan is, zijn er tegenwoordig veel en ook grote bedrijven die open source software ontwikkelen. Deze bedrijven gebruiken de gezamenlijke ontwikkeling om producten en diensten rond de open source software aan te bieden.

5.4 Voorbeeld van IE gebruik bij standaarden

5.4.1 VESA (Video Electronics Standards Association)

Vesa is een non-profitorganisatie die meer dan 300 bedrijven vertegenwoordigt. Deze bedrijven zijn lid van de organisatie. Het stelt interfacestandaarden vast voor de computer en consumentenelectronica.

De visie van VESA (van de website):

VESA's vision is continual growth in technical standards development and evolution into an international trade association, with world-wide membership driving standards initiatives, product implementations, and market implementation.

5.4.2 Displayport

De displayport verbinding tussen computer en monitor is een belangrijke standaard van Vesa. De leden van Vesa mogen het displayport logo gebruiken op hun producten als die voldoen aan de standaard. In figuur 5.1 is het logo weergegeven.



Figuur 5.1: Displayport logo

Vraag:

Hoe kan het gebruik van het logo tot alleen leden die voldoen aan de standaard worden beperkt? [Klik voor antwoord.](#)

Bijlage A

Woordenlijst

B

BOIP

Benelux-Bureau voor de Intellectuele Eigendom. Het Benelux-bureau voor de Intellectuele Eigendom (in het Engels BOIP: Benelux Office for Intellectual Property, in het Frans: Office Benelux de la Propriété intellectuelle) registreert merken en modellen voor de Benelux. 60

C

claims

Claims worden in formeel Nederlands conclusies genoemd. De claims zijn een onderdeel van een octrooi om de beschermingsomvang te definiëren. Meestal bestaat de verzameling claims uit een hoofdclaim met meerdere afhankelijke claims. 23, 26

D

diversificatie

Diversificatie geeft bedrijven de kans hun aanbod aan producten en diensten uit te breiden. 44, 46

DPMA

Deutsches Patent- und Markenamt. Het Duitse octrooibureau is belast met het verlenen van octrooien en merken voor Duitsland. 60

E

EOB

Europees Octrooibureau. Het Europees Octrooibureau (in het Engels EPO: European Patent Office) is belast met het verlenen van de Europese octrooien volgens het Europees Octrooiverdrag (EOV). De hoofdvestiging in München met nevenvestigingen in Rijswijk, Berlijn en Wenen. 19, 26, 29, 60

EOV

Europees Octrooiverdrag. In het Engels: European Patent Convention (EPC), Duits: Europäisches Patentübereinkommen (EPÜ), Frans: Convention sur le brevet européen (CBE). Een multilateraal verdrag dat het systeem definieert voor het verkrijgen van een Europees octrooi. Naast de artikelen en regels voor het verkrijgen van een octrooi, is het EOV ook de basis voor de Europese Octrooi Organisatie. Het Europees Octrooibureau (EOB) is belast met het verlenen van de Europese octrooien. 19, 55, 70

EUIPO

European Union Intellectual Property Office. Het European Union Intellectual Property Office registreert merken en modellen voor de gehele EU. Ook wel uniemerken en uniemodellen genoemd. 60

examiner

In het Nederlands onderzoeker of technisch onderzoeker genoemd. Deze persoon werkt bij een octrooibureau en heeft als hoofdtaak een octrooiaanvraag inhoudelijk te behandelen. Dit is vooral het search report opstellen en het octrooi verlenen. 27

F

Freedom to Operate

Freedom to Operate (afkorting FTO) is een onderzoek waarin mogelijke risico's worden geanalyseerd van de marktintroductie van een nieuw product op inbreuk op octrooien van derden. 38, 40, 42

I

IE

Intellectueel Eigendom. Zie ook de beschrijving van intellectueel eigendom in de woordenlijst. 2, 6, 7, 9, 14, 47, 56

industriële eigendomsrechten

Industriële eigendomsrechten zijn alle soorten intellectuele eigendomsrechten behalve auteursrecht. 36

inlicenseren

Inlicenseren biedt de onderneming de mogelijkheid om aanzienlijk te besparen op de investering in onderzoek, ontwikkeling, productie en marketing. Door een octrooilicentie af te sluiten met de octrooihouder kan de licentienemer de octrooieerde technologie op de markt brengen. 42

innovatie

Het toepassen van nieuwe technologieën in producten, diensten en processen. 36

intellectueel eigendom

Tot intellectueel eigendom behoren voortbrengselen van de geest. Intellectueel eigendom wordt vaak als synoniem voor intellectuele eigendomsrechten gebruikt. 6, 37, 38, 40, 55, 56

intellectuele eigendomsrechten

Intellectuele eigendomsrechten (IE-rechten) zijn de exclusieve rechten van rechthebbenden op een voortbrengsel van de menselijke geest. Tot de intellectuele-eigendomsrechten behoren sterk uiteenlopende rechten als het auteursrecht, naburige rechten, het databankenrecht, het octrooirecht, het merkenrecht, het tekeningen- en modellenrecht, het handelsnaamrecht, het kwekersrecht en het chipsrecht. 6, 38, 56

J

JPO

Japan Patent Office. Het Japanse octrooibureau is belast met het verlenen van octrooien en merken voor Japan. 60

L

licentie

Betekenis van licentie bij het gebruik in de IE: Het recht om een product of dienst waar een andere rechtspersoon intellectueel eigendom op heeft, commercieel te gebruiken op basis van een financiële of materiële vergoeding. 42

O

octrooi

Octrooi wordt ook patent genoemd. Een intellectueel eigendomsrecht op een uitvinding. 9, 18

Octrooicentrum Nederland

Octrooicentrum Nederland is de octrooiverlener voor Nederland. Het Octrooicentrum is een onderdeel van de Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO) en valt onder het Nederlandse ministerie van Economische Zaken en Klimaat. Het Octrooicentrum geeft ook voorlichting over het octrooisysteem en behartigt de belangen van Nederland in Europese en mondiale organisaties voor intellectueel eigendom. 19, 60

P

patent landscape-analyse

Een patent landscape-analyse geeft een wereldwijd overzicht van octrooihouders die technologie hebben in de economische sector van jouw organisatie. Daarmee heb je zowel markt- als productinformatie over al bestaande technologie. Met deze analyse kan je op tijd onderzoek en ontwikkeling bijsturen, of besluiten om een licentie aan te vragen van de octrooihouder voor jouw markt. 38, 39, 42, 45

PCT

Patent Cooperation Treaty. Dit Octrooisamenwerkingsverdrag is om verleningsprocedures gedeeltelijk te stroomlijnen en in vorm en inhoud te harmoniseren. Met de PCT-procedure hoeft een aanvrager slechts een enkele aanvraag in te dienen, die dan rechtsgevolgen heeft in alle bij de PCT aangesloten staten. 19, 26, 29, 31, 73

prioriteit

Een octrooiaanvraag kan het recht van voorrang verkrijgen van een eerdere aanvraag. Dit heeft het effect alsof de octrooiaanvraag op de datum van de eerdere aanvraag is ingediend. 32

R

rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek

Dit rapport wordt opgesteld door het octrooibureau waar de octrooiaanvraag is ingediend. Bij de toetsing in de octrooiprocedure worden de nieuwigheid en de inventiviteit beoordeeld aan de hand van de documenten in dit rapport. Het bevat daarom de meest relevante documenten voor de toetsing. 27, 58

ROW

Rijksoctrooiwet 1995. Wet voor octrooien geldig binnen Nederland, inclusief Caribisch gebied, Curaçao en Sint Maarten. 19, 65

S

search report

In het Nederlands: rapport van het onderzoek naar de stand van de techniek. 27, 29

stand van de techniek

De stand van de techniek wordt gevormd door alles wat voor de dag van indiening van de octrooiaanvraag openbaar toegankelijk is gemaakt door een schriftelijke of mondelinge beschrijving, door toepassing of op een andere manier. 21, 22, 27, 37

U

uitlicenseren

Uitlicenseren biedt een organisatie de mogelijkheid om anderen gebruik te laten maken van een geoctrooieerde technologie. Dit kan voor de octrooihouder rendabel zijn omdat bij het opstellen van een licentie overeenkomst meteen afspraken worden gemaakt over de afdracht van inkomsten door de licentienemer. 44

uitputting

Als een merk-, model- of octrooihouder, of een ander met toestemming van de houder, een product heeft verkocht, dan heeft hij hiervoor geld ontvangen en kan hij het recht niet meer gebruiken voor dat product. Dit geldt voor merken, modellen, octrooien en andere IE-rechten. 20

USPTO

United States Patent and Trademark Office. Het United States Patent and Trademark Office is belast met het verlenen van octrooien en merken voor de Verenigde Staten. 60

V

vakman

De term vakman, zoals gebruikt in het octrooirecht, is een geconstrueerde virtueel persoon met kennis en kunde van een (breed) technisch gebied. De vakman kent de gehele stand van de techniek, maar heeft geen enkel vermogen tot inventiviteit. Deze virtuele vakman wordt gebruikt bij het opstellen van argumentatie bij vooral inventiviteit (uitvinderswerkzaamheid), volledigheid en duidelijkheid van de octrooiaanvraag. 21-23

W

WIPO

World Intellectual Property Organisation. Wereldorganisatie voor intellectuele eigendom. WIPO is een gespecialiseerde organisatie van de Verenigde Naties. WIPO bestaat uit 193 lidstaten, en beheert 26 internationale verdragen. Het hoofdkwartier is in Genève. 19, 29, 60

Bijlage B

Links

B.1 Nationale en internationale IE-bureaus

Octrooicentrum Nederland:

<https://www.rvo.nl/onderwerpen/innovatief-ondernemen/octrooien-ofwel-patenten>

Benelux-Bureau voor de Intellectuele Eigendom (BOIP):

<https://www.boip.int/>

Europees Octrooibureau (EOB):

<https://www.epo.org/>

European Union Intellectual Property Office (EUIPO):

<https://www.euipo.europa.eu/>

World Intellectual Property Organisation (WIPO):

<https://www.wipo.int/>

Duits octrooibureau (DPMA):

<https://www.dpma.de/>

Octrooibureau van de Verenigde Staten (USPTO):

<https://www.uspto.gov/>

Japanse octrooibureau (JPO):

<https://www.jpo.go.jp/e/>

B.2 Verdere informatie

ThatsIP E-learning over intellectuele eigendom:

<https://www.thatsip.nl/nl/>

Octrooicentrum Nederland, video's met uitleg over octrooien:

<https://www.rvo.nl/onderwerpen/octrooien-ofwel-patenten/uitlegvideos>

UK Intellectual Property Office, video's voor IP basic, case studies en andere:

<https://www.youtube.com/user/ipogovuk>

Werkgemeenschap Octrooi-informatie Nederland (WON):

<http://www.won-nl.org>

B.3 Interessante publicaties van het WIPO

What is Intellectual Property?

<https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4528&plang=EN>

Intellectual Property Basics: A Q&A for Students

<https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4410&plang=EN>

Understanding Industrial Property

<https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4080&plang=EN>

Inventing the Future

An Introduction to Patents for Small and Medium-sized Enterprises

<https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4350&plang=EN>

Enterprising Ideas

A Guide to Intellectual Property for Startups

<https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4545&plang=EN>

Guide to the International Patent Classification (2022)

<https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4593&plang=EN>

International Patent Classification (IPC)

<https://www.wipo.int/publications/en/details.jsp?id=4582&plang=EN>

B.4 IE-databanken

Espacenet:

<https://worldwide.espacenet.com/patent/>

Espacenet pocket guide:

<https://www.epo.org/espacenet-pocket-guide>

Handleiding Espacenet:

https://www.rvo.nl/sites/default/files/2021/03/Handleiding%20Espacenet_februari2021.pdf

European Patent Register:

<https://register.epo.org/>

European Patent Bulletin:

<https://data.epo.org/expert-services/index.html>

Google patents:

<https://patents.google.com/>

Depatisnet (DPMA):

<https://depatisnet.dpma.de/DepatisNet/depatisnet>

Patentscope:

<https://patentscope.wipo.int/>

The lens:

<https://www.lens.org/>

Trademark view en Design view:

<https://www.tmdn.org/>

EUIPO register (eSearch plus):

<https://euipo.europa.eu/eSearch/>

BBIE merkenregister:

<https://www.boip.int/nl/merkenregister>

BBIE modellenregister:

<https://www.boip.int/nl/modellenregister>

Octrooiregister Nederland:

<https://mijnocrooi.rvo.nl/fo-eregister-view/>

Duits octrooiregister (DPMA register):

<https://register.dpma.de/DPMAregister/pat/basis>

UK Intellectual Property Office, online patent information and document inspection service:

<https://www.ipo.gov.uk/p-ipsum.htm>

Japan platform for patent information:

<https://www.j-platpat.inpit.go.jp/>

B.5 Octrooiclassificatieschema's

CPC classificatieschema bij de USPTO (US patent and trademark office):

<https://www.uspto.gov/web/patents/classification/cpc/html/cpc.html>

CPC classificatieschema in tabelvorm om schema en definities te downloaden:

<https://www.cooperativepatentclassification.org/cpcSchemeAndDefinitions/table>

Bijlage C

Bibliografie

- [CNW00] Wesley M Cohen, Richard R Nelson en John P Walsh. *Protecting Their Intellectual Assets: Appropriability Conditions and Why U.S. Manufacturing Firms Patent (or Not)*. Working Paper 7552. National Bureau of Economic Research, feb 2000. DOI: 10.3386/w7552. URL: <http://www.nber.org/papers/w7552>.
- [GR10] C. Greenhalgh en M. Rogers. *Innovation, Intellectual Property, and Economic Growth*. Princeton University Press, 2010. ISBN: 9781400832231. URL: <https://press.princeton.edu/books/paperback/9780691137995/innovation-intellectual-property-and-economic-growth>.
- [NHN02] E.A. van Nieuwenhoven Helbach, J.L.R.A. Huydecoper en C.J.J.C. van Nispen. *Industriële eigendom, Deel 1 Bescherming van technische innovatie*. Industriële eigendom. Kluwer, 2002. ISBN: 9789026840418. URL: <https://books.google.nl/books?id=a8k1a5u4jXQC>.
- [Sco04] S. Scotchmer. *Innovation and Incentives*. MIT Press, 2004. ISBN: 9780262195157. URL: <https://mitpress.mit.edu/9780262693431/innovation-and-incentives/>.

Bijlage D

Gedeeltes IE-wetteksten

D.1 Gedeeltes Rijsoctrooiwet 1995

Hieronder zijn de meest relevante gedeeltes van de Rijsoctrooiwet (ROW) te vinden.

- Artikel 2
 1. Vatbaar voor octrooi zijn uitvindingen op alle gebieden van de technologie die nieuw zijn, op uitvinderswerkzaamheid berusten en toegepast kunnen worden op het gebied van de nijverheid.
 2. In de zin van het eerste lid worden in het bijzonder niet als uitvindingen beschouwd:
 - a. ontdekkingen, alsmede natuurwetenschappelijke theorieën en wiskundige methoden;
 - b. esthetische vormgevingen;
 - c. stelsels, regels en methoden voor het verrichten van geestelijke arbeid, voor het spelen of voor de bedrijfsvoering, alsmede computerprogramma's;
 - d. presentaties van gegevens.
 3. Het tweede lid geldt alleen voor zover het betreft de aldaar genoemde onderwerpen of werkzaamheden als zodanig.
- Artikel 4
 1. Een uitvinding wordt als nieuw beschouwd, indien zij geen deel uitmaakt van de stand van de techniek.
 2. De stand van de techniek wordt gevormd door al hetgeen voor de dag van indiening van de octrooiaanvraag openbaar toegankelijk is gemaakt door een schriftelijke of mondelinge beschrijving, door toepassing of op enige andere wijze.

3. Tot de stand van de techniek behoort tevens de inhoud van eerder ingediende octrooiaanvragen, die op of na de in het tweede lid bedoelde dag overeenkomstig artikel 31 in het octrooiregister zijn ingeschreven.
4. Tot de stand van de techniek behoort voorts de inhoud van Europese octrooiaanvragen en van internationale aanvragen als bedoeld in artikel 153, derde tot en met vijfde lid, van het Europees Octrooiverdrag, waarvan de datum van indiening, die geldt voor de toepassing van artikel 54, tweede en derde lid, van dat verdrag, ligt voor de in het tweede lid bedoelde dag, en die op of na die dag zijn gepubliceerd op grond van artikel 93 van dat verdrag onderscheidenlijk van artikel 21 van het Samenwerkingsverdrag.
5. Niettegenstaande het bepaalde in het eerste tot en met vierde lid zijn tot de stand van de techniek behorende stoffen of samenstellingen vatbaar voor octrooi, voor zover zij bestemd zijn voor de toepassing van een van de in artikel 3, onderdeel f, bedoelde methoden, mits de toepassing daarvan voor enige in dat lid bedoelde methode niet tot de stand van de techniek behoort.
6. Onverminderd het eerste tot en met het vierde lid, zijn stoffen of samenstellingen als bedoeld in het vijfde lid, vatbaar voor octrooi voor een specifieke toepassing in een werkwijze als bedoeld in artikel 3, onderdeel f, mits die toepassing niet tot de stand van de techniek behoort.

- Artikel 6

Een uitvinding wordt als het resultaat van uitvinderswerkzaamheid aangemerkt, indien zij voor een deskundige niet op een voor de hand liggende wijze voortvloeit uit de stand van de techniek. Indien documenten als bedoeld in artikel 4, derde en vierde lid, tot de stand van de techniek behoren, worden deze bij de beoordeling van de uitvinderswerkzaamheid buiten beschouwing gelaten.

- Artikel 9

1. Degene die in een der landen, aangesloten bij de Internationale Unie tot bescherming van de industriële eigendom of aangesloten bij de Wereld Handelsorganisatie, overeenkomstig de in dat land geldende wetten, en degene die, overeenkomstig de tussen twee of meer voornoemde landen gesloten verdragen, octrooi of een gebruikscertificaat dan wel bescherming van een gebruiksmodel heeft aangevraagd, geniet gedurende een termijn van twaalf maanden na de dag van die aanvraag in Nederland, Curaçao en Sint Maarten een recht van voorrang ter verkrijging van octrooi voor datgene, waarvoor door hem de in de aanhef bedoelde be-

scherming werd aangevraagd. Met een der landen als bedoeld in de eerste volzin wordt gelijkgesteld een land dat op grond van een mededeling van de bevoegde autoriteit in dat land een recht van voorrang erkent onder gelijkwaardige voorwaarden en met gelijkwaardige rechtsgevolgen als die, bedoeld in het op 20 maart 1883 te Parijs tot stand gekomen Verdrag tot bescherming van de industriële eigendom (Trb. 1974, 225 en Trb. 1980, 31). Het voorgaande vindt overeenkomstige toepassing ten aanzien van degene, die een uitvinderscertificaat heeft aangevraagd, indien de betrokken wetgeving de keus laat tussen verkrijging van zodanig certificaat of een octrooi.

2. Onder aanvraag in de zin van het eerste lid wordt iedere aanvraag verstaan, waarvan de datum van indiening kan worden vastgesteld, ongeacht het verdere lot van die aanvraag.
3. Indien de rechthebbende meer aanvragen voor hetzelfde onderwerp heeft ingediend, komt voor het recht van voorrang slechts de eerst ingediende in aanmerking. Niettemin kan het recht van voorrang ook berusten op een later ingediende aanvraag ter verkrijging van bescherming in hetzelfde land, mits de eerst ingediende aanvraag voor de indiening van de latere aanvraag is ingetrokken, vervallen of afgewezen zonder ter kennis van het publiek te zijn gebracht en zonder rechten te hebben laten bestaan en mits zij nog niet als grondslag heeft gediend voor de oproeping van een recht van voorrang. Indien een recht van voorrang, berustend op een later ingediende aanvraag, is ingeroepen, zal de eerst ingediende aanvraag niet meer als grondslag kunnen dienen voor de oproeping van een recht van voorrang.
4. De voorrang heeft voor de toepassing van de artikelen 4, tweede, derde en vierde lid, en 6 ten gevolge, dat de aanvraag waarvoor dit recht bestaat, wordt aangemerkt als te zijn ingediend op de dag van indiening van de aanvraag waarop het recht van voorrang berust.
5. De aanvrager kan een beroep doen op meer dan één recht van voorrang, zelfs wanneer de rechten van voorrang uit verschillende landen afkomstig zijn. Ook kan de aanvraag, waarbij een beroep op een of meer rechten van voorrang wordt gedaan, elementen bevatten, waarvoor in de conclusies van de aanvraag, waarvan de voorrang wordt ingeroepen, geen rechten werden verlangd, mits de tot de laatste aanvraag behorende stukken het betrokken product of de betrokken werkwijze voldoende nauwkeurig aangeven.
6. Degene die van het recht van voorrang gebruik wil maken, moet daarop schriftelijk beroep doen bij de indiening van de aanvraag of binnen zestien maanden na de datum van indiening van de aanvraag waarop hij zich beroept, onder vermelding van die da-

tum van indiening en van het land waarin of waarvoor deze werd ingediend.

7. Een verbetering van of toevoeging aan een eerder ingeroepen recht van voorrang moet worden verzocht binnen zestien maanden na de datum van indiening van de aanvraag waarop hij zich beroept.
8. Binnen zestien maanden na indiening van de aanvraag waarop hij zich beroept als bedoeld in het zesde en zevende lid, moet hij het nummer alsmede een in de Nederlandse, Franse, Duitse of Engelse taal gesteld afschrift van de aanvraag waarop hij zich beroept of een vertaling van die aanvraag in een van die talen aan het bureau verstrekken, tenzij de eerdere aanvraag bij het bureau of het bureau, bedoeld in artikel 99, is ingediend, alsmede, als hij niet degene is die de aanvraag, op grond waarvan de voorrang wordt ingeroepen heeft ingediend, een document waaruit zijn rechten blijken. Het bureau kan verlangen dat de in de vorige volzin bedoelde vertaling wordt gewaarmerkt indien het bureau redelijke twijfel heeft ten aanzien van de juistheid van die vertaling.
9. Het recht van voorrang vervalt, indien niet aan het zesde, zevende of achtste lid is voldaan

- Artikel 25

1. De beschrijving van de uitvinding is duidelijk en volledig en wordt zodanig opgesteld dat de uitvinding daaruit door een deskundige kan worden begrepen en aan de hand daarvan kan worden toegepast. De omschrijving, gegeven in een of meer conclusies aan het slot van de beschrijving, is nauwkeurig. De beschrijving gaat zo nodig van daarmee overeenstemmende tekeningen vergezeld.
2. Indien een uitvinding betrekking heeft op biologisch materiaal dat niet openbaar toegankelijk is en in de beschrijving niet zodanig kan worden omschreven dat de uitvinding aan de hand daarvan door een deskundige kan worden toegepast, dan wel indien een uitvinding het gebruik van dergelijk biologisch materiaal impliceert, is de beschrijving slechts toereikend indien het biologisch materiaal uiterlijk op de dag van indiening van de aanvraag is gedeponeerd bij een bij of krachtens algemene maatregel van rijksbestuur aan te wijzen instelling.
3. Indien een uitvinding betrekking heeft op een sequentie of een partiële sequentie van een gen, bevat de beschrijving een concrete omschrijving van de functie en de industriële toepassing van deze sequentie of partiële sequentie. Ingeval voor de productie van een eiwit of partieel eiwit een sequentie of partiële sequentie van een gen is gebruikt, bevat de beschrijving van de industriële toepasbaarheid een precisering van het eiwit of partieel eiwit dat is

geproduceerd en de functie daarvan.

4. Bij algemene maatregel van rijksbestuur worden nadere regels gesteld ten aanzien van:
 - a. de gegevens die in de aanvraag worden opgenomen met betrekking tot de kenmerken en identificatie van het gedeponeerde biologisch materiaal, en
 - b. de toegankelijkheid en beschikbaarheid van het gedeponeerde biologisch materiaal.

- Artikel 53

1. Een octrooi geeft de octrooihouder, behoudens de bepalingen van de artikelen 53a tot en met 60, het uitsluitend recht:
 - a. het geoctrooieerde voortbrengsel in of voor zijn bedrijf te vervaardigen, te gebruiken, in het verkeer te brengen of verder te verkopen, te verhuren, af te leveren of anderszins te verhandelen, dan wel voor een of ander aan te bieden, in te voeren of in voorraad te hebben;
 - b. de geoctrooieerde werkwijze in of voor zijn bedrijf toe te passen of het voortbrengsel, dat rechtstreeks verkregen is door toepassing van die werkwijze, in of voor zijn bedrijf te gebruiken, in het verkeer te brengen of verder te verkopen, te verhuren, af te leveren of anderszins te verhandelen, dan wel voor een of ander aan te bieden, in te voeren of in voorraad te hebben.
2. Het uitsluitend recht wordt bepaald door de conclusies van het octrooischrift, waarbij de beschrijving en de tekeningen dienen tot uitleg van die conclusies.
3. Het uitsluitend recht strekt zich niet uit over handelingen, uitsluitend dienende tot onderzoek van het geoctrooieerde, daaronder begrepen het door toepassing van de geoctrooieerde werkwijze rechtstreeks verkregen voortbrengsel. Het uitsluitend recht strekt zich evenmin uit tot de bereiding voor direct gebruik ten behoeve van individuele gevallen op medisch voorschrift van geneesmiddelen in apotheken, noch tot handelingen betreffende de aldus bereide geneesmiddelen.
4. Het uitvoeren van de noodzakelijke studies, tests en proeven met het oog op de toepassing van artikel 10, eerste tot en met vierde lid, van Richtlijn 2001/83/EG tot vaststelling van een communautair wetboek betreffende geneesmiddelen voor menselijk gebruik (PbEG L 311) of artikel 13, eerste tot en met het vijfde lid van Richtlijn 2001/82/EG tot vaststelling van een communautair wetboek betreffende geneesmiddelen voor diergeneeskundig gebruik (PbEG L 311) en de daaruit voortvloeiende praktische vereisten

worden niet beschouwd als een inbreuk op octrooien met betrekking tot geneesmiddelen voor menselijk gebruik, respectievelijk geneesmiddelen voor diergeneeskundig gebruik.

5. Is een voortbrengsel als in het eerste lid, onder a of b, bedoeld, in Nederland, Curaçao of Sint Maarten rechtmatig in het verkeer gebracht, dan wel door de octrooihouder of met diens toestemming in één der Lid-Statens van de Europese Gemeenschap of in een andere staat die partij is bij de Overeenkomst betreffende de Europese Economische Ruimte in het verkeer gebracht, dan handelt de verkrijger of latere houder niet in strijd met het octrooi, door dit voortbrengsel in of voor zijn bedrijf te gebruiken, te verkopen, te verhuren, af te leveren of anderszins te verhandelen, dan wel voor een of ander aan te bieden, in te voeren of in voorraad te hebben.
6. Een voortbrengsel als in het eerste lid, onder a of b, bedoeld, dat voor de verlening van het octrooi, of, indien het een Europees octrooi betreft, voor de dag, waarop overeenkomstig artikel 97, derde lid, van het Europees Octrooiverdrag de vermelding van de verlening van het Europees octrooi is gepubliceerd, in een bedrijf is vervaardigd, mag niettegenstaande het octrooi ten dienste van dat bedrijf worden gebruikt.

D.2 Gedeeltes Europees Octrooiverdrag

Hieronder zijn de meest relevante gedeeltes van het Europees Octrooiverdrag te vinden (EOV).

- Artikel 52. Octrooieerbare uitvindingen
 1. Europese octrooien worden verleend voor uitvindingen, op alle gebieden van de technologie, mits zij nieuw zijn, op uitvinderswerkzaamheid berusten en industrieel toepasbaar zijn.
 2. In de zin van het eerste lid worden in het bijzonder niet als uitvindingen beschouwd:
 - a. ontdekkingen, wetenschappelijke theorieën en wiskundige methoden;
 - b. esthetische vormgevingen;
 - c. stelsels, regels en methoden voor het verrichten van geestelijke arbeid, voor spelen of voor de bedrijfsvoering, alsmede computerprogramma's;
 - d. presentatie van informatie.
 3. Het tweede lid sluit de octrooieerbaarheid van de aldaar genoemde onderwerpen of werkzaamheden alleen dan uit voor

zover de Europese octrooiaanvraag of het Europees octrooi betrekking heeft op een van die onderwerpen of werkzaamheden als zodanig.

- Artikel 54. Nieuwheid

1. Een uitvinding wordt als nieuw beschouwd indien zij geen deel uitmaakt van de stand van de techniek.
2. De stand van de techniek wordt gevormd door al hetgeen vóór de datum van indiening van de Europese octrooiaanvraag openbaar toegankelijk is gemaakt door een schriftelijke of mondelinge beschrijving, door toepassing of op enige andere wijze.
3. Als behorend tot de stand van de techniek wordt tevens aangemerkt de inhoud van Europese octrooiaanvragen, zoals die zijn ingediend, waarvan de datum van indiening gelegen is vóór de in het tweede lid genoemde datum en die op of na die datum zijn gepubliceerd.
4. Het tweede en derde lid sluiten de octrooieerbaarheid van stoffen of mengsels, behorend tot de stand van de techniek, voor toepassing bij een in artikel 53, onderdeel c, bedoelde methode niet uit, mits de toepassing ervan bij een dergelijke methode niet behoort tot de stand van de techniek.
5. Het tweede en derde lid sluiten voorts niet de octrooieerbaarheid uit van stoffen of mengsels als bedoeld in het vierde lid voor een specifieke toepassing in een werkwijze bedoeld in artikel 53, onderdeel c, mits die toepassing niet tot de stand van de techniek behoort.

- Artikel 56. Uitvinderswerkzaamheid

Een uitvinding wordt als het resultaat van uitvinderswerkzaamheid aangemerkt, indien zij voor de vakman niet op een voor de hand liggende wijze voortvloeit uit de stand van de techniek. Indien documenten bedoeld in artikel 54, derde lid, tot de stand van de techniek behoren, worden deze bij de beoordeling van de uitvinderswerkzaamheid buiten beschouwing gelaten.

- Artikel 83. Openbaring van de uitvinding

De uitvinding dient in de Europese octrooiaanvraag zodanig duidelijk en volledig te zijn geopenbaard, dat zij door de vakman kan worden toegepast.

- Artikel 87. Recht van voorrang

1. Degene die op regelmatige wijze in of voor

- a. een Staat die partij is bij het Verdrag van Parijs tot bescherming van de industriële eigendom of
 - b. een lid van de Wereldhandelsorganisatie,
- een aanvraag heeft ingediend voor een octrooi, een gebruiksmodel of een gebruikscertificaat, of zijn rechtsopvolger, geniet voor het indienen van een Europese octrooiaanvraag voor dezelfde uitvinding een recht van voorrang gedurende een termijn van twaalf maanden vanaf de datum van indiening van de eerste aanvraag.
2. Elke aanvraag die de waarde heeft van een regelmatige nationale aanvraag, overeenkomstig de nationale wetgeving van de Staat waarin de aanvraag is ingediend, dan wel overeenkomstig bilaterale of multilaterale overeenkomsten, met inbegrip van dit Verdrag, wordt erkend dat deze een recht van voorrang doet ontstaan.
 3. Onder een regelmatige nationale aanvraag dient te worden verstaan iedere aanvraag waarvan de datum van indiening kan worden vastgesteld, ongeacht het verdere lot van die aanvraag.
 4. Met een eerste aanvraag waarvan de datum van indiening het begintijdstip van de termijn van voorrang is, dient te worden gelijkgesteld een latere aanvraag die betrekking heeft op hetzelfde onderwerp als een eerder gedane aanvraag en die is ingediend in of voor dezelfde Staat, mits de eerder gedane aanvraag op de datum van indiening van de latere aanvraag is ingetrokken, prijsgegeven of afgewezen, zonder voor het publiek ter inzage te hebben gelegen en zonder rechten te hebben laten bestaan, en mits zij niet als grondslag heeft gediend voor een beroep op het recht van voorrang. De eerder gedane aanvraag kan dan niet meer als grondslag dienen voor het beroep op een recht van voorrang.
 5. Indien de eerste aanvraag is ingediend bij een instantie voor de industriële eigendom die niet onder het Verdrag van Parijs tot bescherming van de industriële eigendom valt of het Verdrag tot oprichting van de Wereldhandelsorganisatie, zijn het eerste tot en met het vierde lid van toepassing, wanneer die instantie, volgens een mededeling van de President van het Europees Octrooibureau, erkent dat een eerste indiening gedaan bij het Europees Octrooibureau een recht van voorrang doet ontstaan onder de voorwaarden en met vergelijkbare werking als bedoeld in het Verdrag van Parijs.

- Artikel 88. Beroep op voorrang

1. De aanvrager die zich wil beroepen op de voorrang van een eerdere aanvraag, dient een verklaring van voorrang en andere eventueel

vereiste stukken in overeenstemming met het Uitvoeringsreglement in te dienen.

2. Voor een Europese octrooiaanvraag kan op meerdere rechten van voorrang een beroep worden gedaan, zelfs indien de rechten van voorrang uit verschillende landen afkomstig zijn. Ook kan voor eenzelfde conclusie op meer dan één recht van voorrang een beroep worden gedaan. Indien op meer dan één recht van voorrang een beroep wordt gedaan, worden de termijnen, die beginnen op de voorrangdatum, berekend vanaf de vroegste voorrangdatum.
3. Indien voor de Europese octrooiaanvraag op een of meer rechten van voorrang een beroep wordt gedaan, geldt het recht van voorrang alleen voor die elementen van de Europese octrooiaanvraag, die zijn vervat in de aanvraag of aanvragen, waarvoor een beroep op het recht van voorrang is gedaan.
4. Indien bepaalde elementen van de uitvinding waarvoor een beroep op een recht van voorrang is gedaan, niet voorkomen in de conclusies vermeld in de eerdere aanvraag, kan desondanks het recht van voorrang worden erkend, indien uit de gezamenlijke stukken van de eerdere aanvraag deze elementen duidelijk blijken.

- Artikel 89. Werking van het recht van voorrang

Het recht van voorrang heeft ten gevolge dat de voorrangdatum wordt beschouwd als de datum van indiening van de Europese octrooiaanvraag voor de toepassing van artikel 54, tweede en derde lid, en artikel 60, tweede lid.

D.3 Gedeeltes Patent Cooperation Treaty

Hieronder zijn de meest relevante gedeeltes van de Patent Cooperation Treaty (PCT) te vinden.

- Artikel 5. De beschrijving

De beschrijving dient de uitvinding voldoende duidelijk en volledig weer te geven om door een deskundige te kunnen worden toegepast.

- Artikel 6. De conclusies

De conclusie of conclusies omschrijven datgene waarvoor bescherming wordt gevraagd. De conclusies dienen duidelijk en beknopt te zijn. Zij dienen volledig steun te vinden in de beschrijving.

- Artikel 8. Beroep op een recht van voorrang

- (1) De internationale aanvraag kan een verklaring bevatten, zoals voorgeschreven in het Reglement, waarin een beroep op een recht van voorrang wordt gedaan op grond van één of meer aanvragen, die eerder zijn ingediend in of voor een land dat partij is bij het Verdrag van Parijs tot bescherming van de industriële eigendom.
 - (2)
 - a) Onverminderd het bepaalde onder b) zijn de vereisten voor en de rechtsgevolgen van een ingevolge het eerste lid gedaan beroep op een recht van voorrang die, welke zijn voorzien in artikel 4 van de Akte van Stockholm van het Verdrag van Parijs tot bescherming van de industriële eigendom.
 - b) De internationale aanvraag waarvoor een beroep wordt gedaan op het recht van voorrang op grond van een of meer aanvragen, die eerder in of voor een Verdragsluitende Staat zijn ingediend, kan de aanwijzing van die Staat bevatten. Indien in de internationale aanvraag een beroep wordt gedaan op het recht van voorrang op grond van een of meer nationale aanvragen, ingediend in of voor een aangewezen Staat of indien een beroep wordt gedaan op het recht van voorrang van een internationale aanvraag waarin slechts één Staat is aangewezen, worden de vereisten voor en de rechtsgevolgen van het beroep op het recht van voorrang in die Staat geregeld door de nationale wetgeving van die Staat.
- Artikel 33. De internationale voorlopige beoordeling
 - (1) Het doel van de internationale voorlopige beoordeling is een voorlopig oordeel zonder verplichting te formuleren over de vragen of de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden verlangd, nieuw lijkt, op uitvinderswerkzaamheid lijkt te berusten, (niet voor de hand lijkt te liggen) en vatbaar lijkt voor toepassing op het gebied van de nijverheid.
 - (2) Voor de internationale voorlopige beoordeling wordt een uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden verlangd, als nieuw beschouwd indien zij niet bekend is uit de stand van de techniek zoals omschreven in het Reglement.
 - (3) Voor de internationale voorlopige beoordeling wordt een uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden verlangd, beschouwd op uitvinderswerkzaamheid te berusten indien zij, met inachtneming van de stand van de techniek zoals omschreven in het Reglement niet, op het voorgeschreven toepasselijke tijdstip, voor een deskundige voor de hand ligt.
 - (4) Voor de internationale voorlopige beoordeling wordt aangenomen dat een uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden verlangd, vatbaar is voor toepassing op het gebied van de nij-

verheid, indien zij, al naar haar aard, kan worden vervaardigd of toegepast (in technologische zin) op enig gebied van de nijverheid. „Nijverheid” wordt opgevat in de ruimste zin, zoals in het Verdrag van Parijs tot bescherming van de industriële eigendom.

- (5) De hiervoor beschreven maatstaven gelden alleen voor de internationale voorlopige beoordeling. Een Verdragsluitende Staat kan bijkomende of andere maatstaven toepassen voor de beslissing of de uitvinding waarvoor uitsluitende rechten worden verlangd, in die Staat al dan niet octrooieerbaar is.
 - (6) Bij de internationale voorlopige beoordeling wordt rekening gehouden met alle in het verslag van het internationale nieuwheids-onderzoek aangehaalde literatuurplaatsen. Er kan rekening worden gehouden met alle andere literatuurplaatsen die in het desbetreffende geval van belang worden geacht.
- Regel 64. Stand van de techniek voor de internationale voorlopige beoordeling

64.1 Stand van de techniek

- a) Voor de toepassing van artikel 33, tweede en derde lid, wordt alles wat, waar ook ter wereld, ter beschikking van het publiek is gesteld door middel van schriftelijke publikatie (met inbegrip van tekeningen en andere illustraties) als stand van de techniek beschouwd, mits dit ter beschikking stellen van het publiek plaatsvond voor de van belang zijnde datum.
- b) Voor de toepassing van paragraaf a is de van belang zijnde datum:
 - i. onverminderd ii en iii, de datum van internationale indiening van de internationale aanvraag die het voorwerp is van een internationale voorlopige beoordeling;
 - ii. indien in de internationale aanvraag die het voorwerp is van een internationale voorlopige beoordeling een beroep wordt gedaan op een recht van voorrang van een eerdere aanvraag en die aanvraag een datum van internationale indiening heeft die valt binnen de termijn van voorrang, de datum van indiening van de eerdere aanvraag, tenzij de Instantie voor de Internationale Voorlopige Beoordeling oordeelt dat het beroep op een recht van voorrang niet rechtsgeldig is;
 - iii. indien in de internationale aanvraag die het voorwerp is van een internationale voorlopige beoordeling een beroep wordt gedaan op een recht van voorrang van een eerdere aanvraag en die aanvraag een datum van internationale indiening heeft die later valt dan de datum waarop de termijn van voorrang verstreek maar minder dan twee maanden na die datum, de

datum van indiening van die eerdere aanvraag, tenzij de Instantie voor de Internationale Voorlopige Beoordeling oordeelt dat het beroep op een recht van voorrang niet rechtsgeldig is om andere redenen dan het feit dat de internationale aanvraag een datum van internationale indiening heeft die later valt dan de datum waarop de termijn van voorrang verstreekt.

64.2 Niet-schriftelijke openbaarmakingen

In gevallen waarin het ter beschikking stellen van het publiek plaatsvond door middel van een mondelinge uiteenzetting, een gebruik, een tentoonstelling of op andere niet-schriftelijke wijze („niet-schriftelijke openbaarmaking”) voor de van belang zijnde datum als omschreven in Regel 64.1 b en de datum van deze niet-schriftelijke openbaarmaking is aangegeven in een schriftelijke publikatie die ter beschikking van het publiek is gesteld op een datum die dezelfde is als, of later valt dan, de van belang zijnde datum, wordt de niet-schriftelijke openbaarmaking voor de toepassing van artikel 33, tweede en derde lid, niet tot de stand van de techniek gerekend. Niettemin dient het verslag van de internationale voorlopige beoordeling de aandacht op deze niet-schriftelijke openbaarmaking te vestigen op de in Regel 70.9 voorgeschreven wijze.

64.3 Bepaalde gepubliceerde literatuurplaatsen

In gevallen waarin een aanvraag die, of een octrooi dat voor de toepassing van artikel 33, tweede en derde lid, zou behoren tot de stand van de techniek, indien zij of het zou zijn gepubliceerd voor de in Regel 64.1 bedoelde van belang zijnde datum, werd gepubliceerd op een datum die dezelfde is als, of later valt dan, de van belang zijnde datum, doch werd ingediend voor de van belang zijnde datum of daarbij een beroep werd gedaan op een recht van voorrang ten aanzien van een eerdere aanvraag die was ingediend voor de van belang zijnde datum, wordt deze gepubliceerde aanvraag of dit gepubliceerde octrooi voor de toepassing van artikel 33, tweede en derde lid, niet tot de stand van de techniek gerekend. Niettemin dient het verslag van de internationale voorlopige beoordeling de aandacht op deze aanvraag of dit octrooi te vestigen op de in Regel 70.10 voorgeschreven wijze.

Bijlage E

Documenten

E.1 WO 9700326A1

PCTWORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION
International Bureau

INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(51) International Patent Classification ⁶ : C12N 15/86, 5/10 // A61K 48/00		A1	(11) International Publication Number: WO 97/00326
			(43) International Publication Date: 3 January 1997 (03.01.97)
(21) International Application Number: PCT/NL96/00244		(74) Agent: SMULDERS, Th., A., H., J.; Vereenigde Octrooibureaux, Nieuwe Parklaan 97, NL-2587 BN The Hague (NL).	
(22) International Filing Date: 14 June 1996 (14.06.96)		(81) Designated States: AL, AM, AT, AU, AZ, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, ARIPO patent (KE, LS, MW, SD, SZ, UG), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(30) Priority Data: 95201611.1 15 June 1995 (15.06.95) EP <i>(34) Countries for which the regional or international application was filed:</i> 95201728.3 26 June 1995 (26.06.95) EP <i>(34) Countries for which the regional or international application was filed:</i> NL et al.		Published <i>With international search report.</i>	
(71) Applicants (for all designated States except US): INTROGENE B.V. [NL/NL]; Lange Kleiweg 151, NL-2288 GJ Rijswijk (NL). RIJKSUNIVERSITEIT LEIDEN [NL/NL]; Stationsweg 46, NL-2312 AV Leiden (NL).			
(72) Inventors; and (75) Inventors/Applicants (for US only): FALLAUX, Frits, Jacobus [NL/NL]; Peppelschans 77, NL-2352 BE Leiderdorp (NL). HOEBEN, Robert, Cornelis [NL/NL]; Gerbrandylaan 43, NL-2314 EX Leiden (NL). BOUT, Abraham [NL/NL]; Coymansstraat 24, NL-2751 AR Moerkapelle (NL). VALERIO, Domenico [NL/NL]; Gerbrandylaan 12, NL-2314 EZ Leiden (NL). VAN DER EB, Alex, Jan [NL/NL]; Prinses Beatrixlaan 53, NL-2341 TW Oegstgeest (NL).			
(54) Title: PACKAGING SYSTEMS FOR HUMAN RECOMBINANT ADENOVIRUS TO BE USED IN GENE THERAPY			
(57) Abstract <p>The invention provides improved methods and products based on adenoviral materials which can advantageously be used in for instance gene therapy. In one aspect an adenoviral vector is provided which has no overlap with a suitable packaging cell line which is another aspect of invention. This combination excludes the possibility of homologous recombination, thereby excluding the possibility of the formation of replication competent adenovirus. In another aspect an adenovirus based helper construct which by its size is incapable of being encapsidated. This helper virus can be transferred into any suitable host cell making it a packaging cell. Further a number of useful mutations to adenoviral based materials and combinations of such mutations are disclosed, which all have in common the safety of the methods and the products, in particular avoiding the production of replication competent adenovirus and/or interference with the immune system. Further a method of intracellular amplification is provided.</p>			

FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AM	Armenia	GB	United Kingdom	MW	Malawi
AT	Austria	GE	Georgia	MX	Mexico
AU	Australia	GN	Guinea	NE	Niger
BB	Barbados	GR	Greece	NL	Netherlands
BE	Belgium	HU	Hungary	NO	Norway
BF	Burkina Faso	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BG	Bulgaria	IT	Italy	PL	Poland
BJ	Benin	JP	Japan	PT	Portugal
BR	Brazil	KE	Kenya	RO	Romania
BY	Belarus	KG	Kyrgystan	RU	Russian Federation
CA	Canada	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CF	Central African Republic	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CG	Congo	KZ	Kazakhstan	SG	Singapore
CH	Switzerland	LI	Liechtenstein	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LK	Sri Lanka	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LR	Liberia	SN	Senegal
CN	China	LT	Lithuania	SZ	Swaziland
CS	Czechoslovakia	LU	Luxembourg	TD	Chad
CZ	Czech Republic	LV	Latvia	TG	Togo
DE	Germany	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DK	Denmark	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
EE	Estonia	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	UG	Uganda
FI	Finland	MN	Mongolia	US	United States of America
FR	France	MR	Mauritania	UZ	Uzbekistan
GA	Gabon			VN	Viet Nam

Title: Packaging systems for human recombinant adenovirus to be used in gene therapy.

The invention relates to the field of recombinant DNA technology, more in particular to the field of gene therapy. In particular the invention relates to gene therapy using materials derived from adenovirus, in particular human recombinant adenovirus. It especially relates to novel virus derived vectors and novel packaging cell lines for vectors based on adenoviruses.

Gene therapy is a recently developed concept for which a wide range of applications can be and have been envisaged.

In gene therapy a molecule carrying genetic information is introduced into some or all cells of a host, as a result of which the genetic information is added to the host in a functional format.

The genetic information added may be a gene or a derivative of a gene, such as a cDNA, which encodes a protein. In this case the functional format means that the protein can be expressed by the machinery of the host cell.

The genetic information can also be a sequence of nucleotides complementary to a sequence of nucleotides (be it DNA or RNA) present in the host cell. The functional format in this case is that the added DNA (nucleic acid) molecule or copies made thereof in situ are capable of base pairing with the complementary sequence present in the host cell.

Applications include the treatment of genetic disorders by supplementing a protein or other substance which is, through said genetic disorder, not present or at least present in insufficient amounts in the host, the treatment of tumors and (other) acquired diseases such as (auto)immune diseases or infections, etc.

As may be clear from the above, there are basically three different approaches in gene therapy, one directed towards compensating a deficiency present in a (mammalian) host; the second directed towards the removal or elimination of unwanted substances (organisms or cells) and the third towards application of a recombinant vaccine (tumors or foreign micro-organisms).

For the purpose of gene therapy, adenoviruses carrying deletions have been proposed as suitable vehicles. Adenoviruses are non-enveloped DNA viruses. Gene-transfer vectors derived from adenoviruses (so-called adenoviral vectors) have a number of features that make them particularly useful for gene transfer for such purposes. Eg. the biology of the adenoviruses is characterized in detail, the adenovirus is not associated with severe human pathology, the virus is extremely efficient in introducing its DNA into the host cell, the virus can infect a wide variety of cells and has a broad host-range, the virus can be produced in large quantities with relative ease, and the virus can be rendered replication defective by deletions in the early-region 1 (E1) of the viral genome.

The adenovirus genome is a linear double-stranded DNA molecule of approximately 36000 base pairs with the 55-kDa terminal protein covalently bound to the 5' terminus of each strand. The Ad DNA contains identical Inverted Terminal Repeats (ITR) of about 100 base pairs with the exact length depending on the serotype. The viral origins of replication are located within the ITRs exactly at the genome ends. DNA synthesis occurs in two stages. First, the replication proceeds by strand displacement, generating a daughter duplex molecule and a parental displaced strand. The displaced strand is single stranded and can form a so-called "panhandle" intermediate, which allows replication initiation and generation of a daughter duplex molecule. Alternatively, replication may proceed from both ends of the genome simultaneously, obviating the requirement to form the

panhandle structure. The replication is summarized in Figure 14 adapted from (Lechner and Kelly, 1977).

During the productive infection cycle, the viral genes are expressed in two phases: the early phase, which is the period upto viral DNA replication, and the late phase, which coincides with the initiation of viral DNA replication. During the early phase only the early gene products, encoded by regions E1, E2, E3 and E4, are expressed, which carry out a number of functions that prepare the cell for synthesis of viral structural proteins (Berk, 1986). During the late phase the late viral gene products are expressed in addition to the early gene products and host cell DNA and protein synthesis are shut off. Consequently, the cell becomes dedicated to the production of viral DNA and of viral structural proteins (Tooze, 1981).

The E1 region of adenovirus is the first region of adenovirus expressed after infection of the target cell. This region consists of two transcriptional units, the E1A and E1B genes, which both are required for oncogenic transformation of primary (embryonal) rodent cultures. The main functions of the E1A gene products are:

- i) to induce quiescent cells to enter the cell cycle and resume cellular DNA synthesis, and
- ii) to transcriptionally activate the E1B gene and the other early regions (E2, E3, E4). Transfection of primary cells with the E1A gene alone can induce unlimited proliferation (immortalization), but does not result in complete transformation. However, expression of E1A in most cases results in induction of programmed cell death (apoptosis), and only occasionally immortalization is obtained (Jochemsen et al., 1987). Co-expression of the E1B gene is required to prevent induction of apoptosis and for complete morphological transformation to occur. In established immortal cell lines, high level expression of E1A can cause complete transformation in the absence of E1B (Roberts et al., 1985).

The E1B encoded proteins assist E1A in redirecting the cellular functions to allow viral replication. The E1B 55 kD and E4 33kD proteins, which form a complex that is essentially localized in the nucleus, function in

5 inhibiting the synthesis of host proteins and in facilitating the expression of viral genes. Their main influence is to establish selective transport of viral mRNAs from the nucleus to the cytoplasm, concomittantly with the onset of the late phase of infection. The E1B 21

10 kD protein is important for correct temporal control of the productive infection cycle, thereby preventing premature death of the host cell before the virus life cycle has been completed. Mutant viruses incapable of expressing the E1B 21 kD gene-product exhibit a shortened

15 infection cycle that is accompanied by excessive degradation of host cell chromosomal DNA (*deg*-phenotype) and in an enhanced cytopathic effect (*cyt*-phenotype) (Telling et al., 1994). The *deg* and *cyt* phenotypes are suppressed when in addition the E1A gene is mutated,

20 indicating that these phenotypes are a function of E1A (White et al., 1988). Furthermore, the E1B 21 kDa protein slows down the rate by which E1A switches on the other viral genes. It is not yet known through which mechanisms) E1B 21 kD quenches these E1A dependent functions.

25 Vectors derived from human adenoviruses, in which at least the E1 region has been deleted and replaced by a gene of interest, have been used extensively for gene therapy experiments in the pre-clinical and clinical phase.

30 As stated before all adenovirus vectors currently used in gene therapy have a deletion in the E1 region, where novel genetic information can be introduced. The E1 deletion renders the recombinant virus replication defective (Stratford-Perricaudet and Perricaudet, 1991).

35 We have demonstrated that recombinant adenoviruses are able to efficiently transfer recombinant genes to the rat liver and airway epithelium of rhesus monkeys (Bout et

al., 1994b; Bout et al., 1994a). In addition, we (Vincent et al., 1996a; Vincent et al., 1996b) and others (see e.g. Haddada et al., 1993) have observed a very efficient *in vivo* adenovirus mediated gene transfer to a variety of tumor cells *in vitro* and to solid tumors in animals models (lung tumors, glioma) and human xenografts in immunodeficient mice (lung) *in vivo* (reviewed by Blaese et al., 1995).

In contrast to for instance retroviruses, adenoviruses a) do not integrate into the host cell genome; b) are able to infect non-dividing cells and c) are able to efficiently transfer recombinant genes *in vivo* (Brody and Crystal, 1994). Those features make adenoviruses attractive candidates for *in vivo* gene transfer of, for instance, suicide or cytokine genes into tumor cells.

However, a problem associated with current recombinant adenovirus technology is the possibility of unwanted generation of replication competent adenovirus (RCA) during the production of recombinant adenovirus (Lochmüller et al., 1994; Imler et al., 1996). This is caused by homologous recombination between overlapping sequences from the recombinant vector and the adenovirus constructs present in the complementing cell line, such as the 293 cells (Graham et al., 1977). RCA in batches to be used in clinical trials is unwanted because RCA i) will replicate in an uncontrolled fashion; ii) can complement replication defective recombinant adenovirus, causing uncontrolled multiplication of the recombinant adenovirus and iii) batches containing RCA induce significant tissue damage and hence strong pathological side effects (Lochmüller et al., 1994). Therefore, batches to be used in clinical trials should be proven free of RCA (Ostrove, 1994). In one aspect of the invention this problem in virus production is solved in that we have developed packaging cells that have no overlapping sequences with a new basic vector and thus are suited for safe large scale

production of recombinant adenoviruses one of the additional problems associated with the use of recombinant adenovirus vectors is the host-defence reaction against treatment with adenovirus.

5 Briefly, recombinant adenoviruses are deleted for the E1 region (see above). The adenovirus E1 products trigger the transcription of the other early genes (E2, E3, E4), which consequently activate expression of the late virus genes. Therefore, it was generally thought that E1 deleted
10 vectors would not express any other adenovirus genes. However, recently it has been demonstrated that some cell types are able to express adenovirus genes in the absence of E1 sequences. This indicates, that some cell types possess the machinery to drive transcription of adenovirus
15 genes. In particular, it was demonstrated that such cells synthesize E2A and late adenovirus proteins.

In a gene therapy setting, this means that transfer of the therapeutic recombinant gene to somatic cells not only results in expression of the therapeutic protein but
20 may also result in the synthesis of viral proteins. Cells that express adenoviral proteins are recognized and killed by Cytotoxic T Lymphocytes, which thus a) eradicates the transduced cells and b) causes inflammations (Bout et al., 1994a; Engelhardt et al., 1993; Simon et al., 1993). As
25 this adverse reaction is hampering gene therapy, several solutions to this problem have been suggested, such as a) using immunosuppressive agents after treatment; b) retainment of the adenovirus E3 region in the recombinant vector (see patent application EP 95202213) and c) and
30 using ts mutants of human adenovirus, which have a point mutation in the E2A region (patent WO/28938).

However, these strategies to circumvent the immune response have their limitations.

The use of ts mutant recombinant adenovirus
35 diminishes the immune response to some extent, but was less effective in preventing pathological responses in the lungs (Engelhardt et al., 1994a).

The E2A protein may induce an immune response by itself and it plays a pivotal role in the switch to the synthesis of late adenovirus proteins. Therefore, it is attractive to make recombinant adenoviruses which are mutated in the E2 region, rendering it temperature sensitive (ts), as has been claimed in patent application WO/28938.

A major drawback of this system is the fact that, although the E2 protein is unstable at the non-permissive temperature, the immunogenic protein is still being synthesized. In addition, it is to be expected that the unstable protein does activate late gene expression, albeit to a low extent. ts125 mutant recombinant adenoviruses have been tested, and prolonged recombinant gene expression was reported (Yang et al., 1994b; Engelhardt et al., 1994a; Engelhardt et al., 1994b; Yang et al., 1995). However, pathology in the lungs of cotton rats was still high (Engelhardt et al., 1994a), indicating that the use of ts mutants results in only a partial improvement in recombinant adenovirus technology. Others (Fang et al., 1996) did not observe prolonged gene expression in mice and dogs using ts125 recombinant adenovirus. An additional difficulty associated with the use of ts125 mutant adenoviruses is that a high frequency of reversion is observed. These revertants are either real revertants or the result of second site mutations (Kruijer et al., 1983; Nicolas et al., 1981). Both types of revertants have an E2A protein that functions at normal temperature and have therefore similar toxicity as the wild-type virus.

In another aspect of the present invention we therefore delete E2A coding sequences from the recombinant adenovirus genome and transfect these E2A sequences into the (packaging) cell lines containing E1 sequences to complement recombinant adenovirus vectors.

Major hurdles in this approach are a) that E2A should be expressed to very high levels and b) that E2A protein is very toxic to cells.

The current invention in yet another aspect therefore
5 discloses use of the ts125 mutant E2A gene, which produces a protein that is not able to bind DNA sequences at the non permissive temperature. High levels of this protein may be maintained in the cells (because it is not toxic at this temperature) until the switch to the permissive
10 temperature is made. This can be combined with placing the mutant E2A gene under the direction of an inducible promoter, such as for instance tet, methallothionein, steroid inducible promoter, retinoic acid β -receptor or other inducible systems. However in yet another aspect of
15 the invention, the use of an inducible promoter to control the moment of production of toxic wild-type E2A is disclosed.

Two salient additional advantages of E2A-deleted recombinant adenovirus are the increased capacity to
20 harbor heterologous sequences and the permanent selection for cells that express the mutant E2A. This second advantage relates to the high frequency of reversion of ts125 mutation: when reversion occurs in a cell line harboring ts125 E2A, this will be lethal to the cell.
25 Therefore, there is a permanent selection for those cells that express the ts125 mutant E2A protein. In addition, as we in one aspect of the invention generate E2A-deleted recombinant adenovirus, we will not have the problem of reversion in our adenoviruses.

30 In yet another aspect of the invention as a further improvement the use of non-human cell lines as packaging cell lines is disclosed.

For GMP production of clinical batches of recombinant viruses it is desirable to use a cell line that has been
35 used widely for production of other biotechnology products. Most of the latter cell lines are from monkey origin, which have been used to produce e.g. vaccines.

These cells can not be used directly for the production of recombinant human adenovirus, as human adenovirus can not or only to low levels replicate in cells of monkey origin. A block in the switch of early to late phase of adenovirus lytic cycle is underlying defective replication. However, host range mutations in the human adenovirus genome are described (hr400 - 404) which allow replication of human viruses in monkey cells. These mutations reside in the gene encoding E2A protein (Klessig and Grodzicker, 1979; Klessig et al., 1984; Rice and Klessig, 1985)(Klessig et al., 1984). Moreover, mutant viruses have been described that harbor both the hr and temperature-sensitive ts125 phenotype (Brough et al., 1985; Rice and Klessig, 1985).

We therefore generate packaging cell lines of monkey origin (e.g. VERO, CV1) that harbor:

- a. E1 sequences, to allow replication of E1/E2 defective adenoviruses, and
- b. E2A sequences, containing the hr mutation and the ts 125 mutation, named ts400 (Brough et al., 1985; Rice and Klessig, 1985) to prevent cell death by E2A overexpression, and/or
- c. E2A sequences, just containing the hr mutation, under the control of an inducible promoter, and/or
- d. E2A sequences, containing the hr mutation and the ts 125 mutation (ts400), under the control of an inducible promoter

Furthermore we disclose the construction of novel and improved combinations of (novel and improved) packaging cell lines and (novel and improved) recombinant adenovirus vectors. We provide:

1. a novel packaging cell line derived from diploid human embryonic retinoblasts (HER) that harbors nt. 80 - 5788 of the Ad5 genome. This cell line, named 911, deposited under no 95062101 at the ECACC, has many characteristics that make it superior to the commonly used 293 cells (Fallaux et al., 1996).

2. novel packaging cell lines that express just E1A genes and not E1B genes.
Established cell lines (and not human diploid cells of which 293 and 911 cells are derived) are able to
5 express E1A to high levels without undergoing apoptotic cell death, as occurs in human diploid cells that express E1A in the absence of E1B.
Such cell lines are able to trans-complement E1B-defective recombinant adenoviruses, because viruses
10 mutated for E1B 21 kD protein are able to complete viral replication even faster than wild-type adenoviruses (Telling et al., 1994). The constructs are described in detail below, and graphically represented in Figures 1-5. The constructs are
15 transfected into the different established cell lines and are selected for high expression of E1A. This is done by operatively linking a selectable marker gene (e.g. NEO gene) directly to the E1B promoter. The E1B promoter is transcriptionally activated by the E1A
20 gene product and therefore resistance to the selective agent (e.g. G418 in the case NEO is used as the selection marker) results in direct selection for desired expression of the E1A gene
- 3 Packaging constructs that are mutated or deleted for
25 E1B 21 kD, but just express the 55 kD protein.
4. Packaging constructs to be used for generation of
30 complementing packaging cell lines from diploid cells (not exclusively of human origin) without the need of selection with marker genes. These cells are immortalized by expression of E1A. However, in this
particular case expression of E1B is essential to prevent apoptosis induced by E1A proteins.
Selection of E1 expressing cells is achieved by
35 selection for focus formation (immortalization), as described for 293 cells (Graham et al., 1977) and 911 cells (Fallaux et al, 1996), that are E1-transformed

human embryonic kidney (HEK) cells and human embryonic retinoblasts (HER), respectively.

5. After transfection of HER cells with construct pIG.E1B (Fig. 4), seven independent cell lines could be established. These cell lines were designated PER.C1, PER.C3, PER.C4, PER.C5, PER.C6, PER.C8 and PER.C9. PER denotes PGK-E1-Retinoblasts. These cell lines express E1A and E1B proteins, are stable (e.g. PER.C6 for more than 57 passages) and complement E1 defective adenovirus vectors. Yields of recombinant adenovirus obtained on PER cells are a little higher than obtained on 293 cells. One of these cell lines (PER.C6) has been deposited at the ECACC under number 96022940.
6. New adenovirus vectors with extended E1 deletions (deletion nt. 459 - 3510). Those viral vectors lack sequences homologous to E1 sequences in said packaging cell lines. These adenoviral vectors contain pIX promoter sequences and the pIX gene, as pIX (from its natural promoter sequences) can only be expressed from the vector and not by packaging cells (Matsui et al., 1986, Hoeben and Fallaux, pers.comm.; Imler et al., 1996).
7. E2A expressing packaging cell lines preferably based on either E1A expressing established cell lines or E1A - E1B expressing diploid cells (see under 2 - 4). E2A expression is either under the control of an inducible promoter or the E2A ts125 mutant is driven by either an inducible or a constitutive promoter.
8. Recombinant adenovirus vectors as described before (see 6) but carrying an additional deletion of E2A sequences.
9. Adenovirus packaging cells from monkey origin that are able to trans-complement E1-defective recombinant adenoviruses. They are preferably co-transfected with pIG.E1AE1B and pIG.NEO, and selected for NEO resistance. Such cells expressing E1A and E1B are able

to transcomplement E1 defective recombinant human adenoviruses, but will do so inefficiently because of a block of the synthesis of late adenovirus proteins in cells of monkey origin (Klessig and Grodzicker, 5 1979). To overcome this problem, we generate recombinant adenoviruses that harbor a host-range mutation in the E2A gene, allowing human adenoviruses to replicate in monkey cells. Such viruses are generated as described in Figure 12, -except DNA from a 10 hr-mutant is used for homologous recombination.

10. Adenovirus packaging cells from monkey origin as described under 9, except that they will also be co-transfected with E2A sequences harboring the hr mutation. This allows replication of human 15 adenoviruses lacking E1 and E2A (see under 8). E2A in these cell lines is either under the control of an inducible promoter or the tsE2A mutant is used. In the latter case, the E2A gene will thus carry both the ts mutation and the hr mutation (derived from ts400).

20 Replication competent human adenoviruses have been described that harbor both mutations (Brough et al., 1985; Rice and Klessig, 1985).

A further aspect of the invention provides otherwise 25 improved adenovirus vectors, as well as novel strategies for generation and application of such vectors and a method for the intracellular amplification of linear DNA fragments in mammalian cells.

The so-called "minimal" adenovirus vectors according 30 to the present invention retain at least a portion of the viral genome that is required for encapsidation of the genome into virus particles (the encapsidation signal), as well as at least one copy of at least a functional part or a derivative of the Inverted Terminal Repeat (ITR), that 35 is DNA sequences derived from the termini of the linear adenovirus genome. The vectors according to the present invention will also contain a transgene linked to a

promoter sequence to govern expression of the transgene. Packaging of the so-called minimal adenovirus vector can be achieved by co-infection with a helper virus or, alternatively, with a packaging deficient replicating helper system as described below.

Adenovirus-derived DNA fragments that can replicate in suitable cell lines and that may serve as a packaging deficient replicating helper system are generated as follows. These DNA fragments retain at least a portion of the transcribed region of the "late" transcription unit of the adenovirus genome and carry deletions in at least a portion of the E1 region and deletions in at least a portion of the encapsidation signal. In addition, these DNA fragments contain at least one copy of an inverted terminal repeat (ITR). At one terminus of the transfected DNA molecule an ITR is located. The other end may contain an ITR, or alternatively, a DNA sequence that is complementary to a portion of the same strand of the DNA molecule other than the ITR. If, in the latter case, the two complementary sequences anneal, the free 3'-hydroxyl group of the 3' terminal nucleotide of the hairpin-structure can serve as a primer for DNA synthesis by cellular and/or adenovirus-encoded DNA polymerases, resulting in conversion into a double-stranded form of at least a portion of the DNA molecule. Further replication initiating at the ITR will result in a linear double-stranded DNA molecule, that is flanked by two ITR's, and is larger than the original transfected DNA molecule (see Fig. 13). This molecule can replicate itself in the transfected cell by virtue of the adenovirus proteins encoded by the DNA molecule and the adenoviral and cellular proteins encoded by genes in the host-cell genome. This DNA molecule can not be encapsidated due to its large size (greater than 39000 base pairs) or due to the absence of a functional encapsidation signal. This DNA molecule is intended to serve as a helper for the

production of defective adenovirus vectors in suitable cell lines.

The invention also comprises a method for the amplification of linear DNA fragments of variable size in suitable mammalian cells. These DNA fragments contain at least one copy of the ITR at one of the termini of the fragment. The other end may contain an ITR, or alternatively, a DNA sequence that is complementary to a portion of the same strand of the DNA molecule other than the ITR. If, in the latter case, the two complementary sequences anneal, the free 3'-hydroxyl group of the 3' terminal nucleotide of the hairpin-structure can serve as a primer for DNA synthesis by cellular and/or adenovirus-encoded DNA polymerases, resulting in conversion of the displaced strand into a double stranded form of at least a portion of the DNA molecule. Further replication initiating at the ITR will result in a linear double-stranded DNA molecule, that is flanked by two ITR's, which is larger than the original transfected DNA molecule. A DNA molecule that contains ITR sequences at both ends can replicate itself in transfected cells by virtue of the presence of at least the adenovirus E2 proteins (viz. the DNA-binding protein (DBP), the adenovirus DNA polymerase (Ad-pol), and the preterminal protein (pTP). The required proteins may be expressed from adenovirus genes on the DNA molecule itself, from adenovirus E2 genes integrated in the host-cell genome, or from a replicating helper fragment as described above.

Several groups have shown that the presence of ITR sequences at the end of DNA molecules are sufficient to generate adenovirus minichromosomes that can replicate, if the adenovirus-proteins required for replication are provided in trans e.g. by infection with a helpervirus (Hu et al., 1992); (Wang and Pearson, 1985); (Hay et al., 1984). Hu et al., (1992) observed the presence and replication of symmetrical adenovirus minichromosome-dimers after transfection of plasmids containing a single

ITR. The authors were able to demonstrate that these dimeric minichromosomes arise after tail-to-tail ligation of the single ITR DNA molecules. In DNA extracted from defective adenovirus type 2 particles, dimeric molecules of various sizes have also been observed using electron-microscopy (Daniell, 1976). It was suggested that the incomplete genomes were formed by illegitimate recombination between different molecules and that variations in the position of the sequence at which the illegitimate base pairing occurred were responsible for the heterogeneous nature of the incomplete genomes. Based on this mechanism it was speculated that, in theory, defective molecules with a total length of up to two times the normal genome could be generated. Such molecules could contain duplicated sequences from either end of the genome. However, no DNA molecules larger than the full-length virus were found packaged in the defective particles (Daniell, 1976). This can be explained by the size-limitations that apply to the packaging. In addition, it was observed that in the virus particles DNA-molecules with a duplicated left-end predominated over those containing the right-end terminus (Daniell, 1976). This is fully explained by the presence of the encapsidation signal near that left-end of the genome (Gräble and Hearing, 1990; Gräble and Hearing, 1992; Hearing et al., 1987).

The major problems associated with the current adenovirus-derived vectors are:

- A) The strong immunogenicity of the virus particle
- B) The expression of adenovirus genes that reside in the adenoviral vectors, resulting in a Cytotoxic T-cell response against the transduced cells.
- C) The low amount of heterologous sequences that can be accommodated in the current vectors (Up to maximally approx. 8000 bp. of heterologous DNA).

Ad A) The strong immunogenicity of the adenovirus particle results in an immunological response of the host, even after a single administration of the adenoviral vector. As a result of the development of neutralizing
5 antibodies, a subsequent administration of the virus will be less effective or even completely ineffective. However, a prolonged or persistent expression of the transferred genes will reduce the number of administrations required and may bypass the problem.

10 Ad B) Experiments performed by Wilson and collaborators have demonstrated that after adenovirus-mediated gene transfer into immunocompetent animals, the expression of the transgene gradually decreases and disappears approximately 2 - 4 weeks post-infection (Yang
15 et al., 1994a; Yang et al., 1994b). This is caused by the development of a Cytotoxic T-Cell (CTL) response against the transduced cells. The CTLs were directed against adenovirus proteins expressed by the viral vectors. In the transduced cells synthesis of the adenovirus DNA-binding
20 protein (the E2A-gene product), penton and fiber proteins (late-gene products) could be established. These adenovirus proteins, encoded by the viral vector, were expressed despite deletion of the E1 region. This demonstrates that deletion of the E1 region is not
25 sufficient to completely prevent expression of the viral genes (Engelhardt et al., 1994a).

Ad C) Studies by Graham and collaborators have demonstrated that adenoviruses are capable of
30 encapsidating DNA of up to 105% of the normal genome size (Bett et al., 1993). Larger genomes tend to be instable resulting in loss of DNA sequences during propagation of the virus. Combining deletions in the E1 and E3 regions of the viral genomes increases the maximum size of the
35 foreign that can be encapsidated to approx. 8.3 kb. In addition, some sequences of the E4 region appear to be dispensable for virus growth (adding another 1.8 kb to the maximum encapsidation capacity). Also the E2A region can

be deleted from the vector, when the E2A gene product is provided in trans in the encapsidation cell line, adding another 1.6 kb. It is, however, unlikely that the maximum capacity of foreign DNA can be significantly increased
5 further than 12 kb.

We developed a new strategy for the generation and production of helperfree-stocks of recombinant adenovirus vectors that can accommodate up to 38 kb of foreign DNA. Only two functional ITR sequences, and sequences that can
10 function as an encapsidation signal need to be part of the vector genome. Such vectors are called minimal adenovectors. The helper functions for the minimal adenovectors are provided in trans by encapsidation defective-replication competent DNA molecules that contain
15 all the viral genes encoding the required gene products, with the exception of those genes that are present in the host-cell genome, or genes that reside in the vector genome.

The applications of the disclosed inventions are
20 outlined below and will be illustrated in the experimental part, which is only intended for said purpose, and should not be used to reduce the scope of the present invention as understood by the person skilled in the art.

25 Use of the IG packaging constructs Diploid cells.

The constructs, in particular pIG.E1A.E1B, will be used to transfect diploid human cells, such as Human Embryonic Retinoblasts (HER), Human Embryonic Kidney cells
30 (HEK), and Human Embryonic Lung cells (HEL). Transfected cells will be selected for transformed phenotype (focus formation) and tested for their ability to support propagation of E1-deleted recombinant adenovirus, such as IG.Ad.MLPI.TK. Such cell lines will be used for the
35 generation and (large-scale) production of E1-deleted recombinant adenoviruses. Such cells, infected with recombinant adenovirus are also intended to be used

in vivo as a local producer of recombinant adenovirus, e.g. for the treatment of solid tumors.

911 cells are used for the titration, generation and production of recombinant adenovirus vectors (Fallaux et al., 1996).

HER cells transfected with pIG.E1A.E1B has resulted in 7 independent clones (called PER cells). These clones are used for the production of E1 deleted (including non-overlapping adenovirus vectors) or E1 defective recombinant adenovirus vectors and provide the basis for introduction of e.g. E2B or E2A constructs (e.g. ts125E2A, see below), E4 etc., that will allow propagation of adenovirus vectors that have mutations in e.g. E2A or E4.

In addition, diploid cells of other species that are permissive for human adenovirus, such as the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) (Pacini et al., 1984), Syrian hamster (Morin et al., 1987) or chimpanzee (Levrero et al., 1991), will be immortalized with these constructs. Such cells, infected with recombinant adenovirus, are also intended to be used *in vivo* for the local production of recombinant adenovirus, e.g. for the treatment of solid tumors.

Established cells.

The constructs, in particular pIG.E1A.NEO, can be used to transfect established cells, e.g. A549 (human bronchial carcinoma), KB (oral carcinoma), MRC-5 (human diploid lung cell line) or GLC cell lines (small cell lung cancer) (de Leij et al., 1985; Postmus et al., 1988) and selected for NEO resistance. Individual colonies of resistant cells are isolated and tested for their capacity to support propagation of E1-deleted recombinant adenovirus, such as IG.Ad.MLPI.TK. When propagation of E1 deleted viruses on E1A containing cells is possible, such cells can be used for the generation and production of E1-deleted recombinant adenovirus. They are also be used

for the propagation of E1A deleted/E1B retained recombinant adenovirus.

Established cells can also be co-transfected with pIG.E1A.E1B and pIG.NEO (or another NEO containing
5 expression vector). Clones resistant to G418 are tested for their ability to support propagation of E1 deleted recombinant adenovirus, such as IG.Ad.MLPI.TK and used for the generation and production of E1 deleted recombinant adenovirus and will be applied *in vivo* for local
10 production of recombinant virus, as described for the diploid cells (see above).

All cell lines, including transformed diploid cell lines or NEO-resistant established lines, can be used as the basis for the generation of 'next generation'
15 packaging cells lines, that support propagation of E1-defective recombinant adenoviruses, that also carry deletions in other genes, such as E2A and E4. Moreover, they will provide the basis for the generation of minimal adenovirus vectors as disclosed herein.

20

E2 expressing cell lines

Packaging cells expressing E2A sequences are and will be used for the generation and (large scale) production of
25 E2A-deleted recombinant adenovirus.

The newly generated human adenovirus packaging cell lines or cell lines derived from species permissive for human adenovirus (E2A or ts125E2A; E1A + E2A; E1A + E1B + E2A; E1A + E2A/ts125; E1A + E1B - E2A/ts125) or non-
30 permissive cell lines such as monkey cells (hrE2A or hr + ts125E2A; E1A + hrE2A; E1A + E1B - hrE2A; E1A + hrE2A/ts125; E1A - E1B + hrE2A/ts125) are and will be used for the generation and (large scale) production of E2A deleted recombinant adenovirus vectors. In addition, they
35 will be applied *in vivo* for local production of recombinant virus, as described for the diploid cells (see above).

Novel adenovirus vectors.

The newly developed adenovirus vectors harboring an E1 deletion of nt. 459-3510 will be used for gene transfer purposes. These vectors are also the basis for the development of further deleted adenovirus vectors that are mutated for e.g. E2A, E2B or E4. Such vectors will be generated e.g. on the newly developed packaging cell lines described above (see 1-3).

Minimal adenovirus packaging system

We disclose adenovirus packaging constructs (to be used for the packaging of minimal adenovirus vectors) may have the following characteristics:

- a. the packaging construct replicates
- b. the packaging construct can not be packaged because the packaging signal is deleted
- c. the packaging construct contains an internal hairpin-forming sequence (see section 'Experimental; suggested hairpin' see Fig. 15)
- d. because of the internal hairpin structure, the packaging construct is duplicated, that is the DNA of the packaging construct becomes twice as long as it was before transfection into the packaging cell (in our sample it duplicates from 35 kb to 70 kb). This duplication also prevents packaging. Note that this duplicated DNA molecule has ITR's at both termini (see e.g. Fig. 13)
- e. this duplicated packaging molecule is able to replicate like a 'normal adenovirus' DNA molecule
- f. the duplication of the genome is a prerequisite for the production of sufficient levels of adenovirus proteins, required to package the minimal adenovirus vector

- g. the packaging construct has no overlapping sequences with the minimal vector or cellular sequences that may lead to generation of RCA by homologous recombination.

5

This packaging system will be used to produce minimal adenovirus vectors. The advantages of minimal adenovirus vectors e.g. for gene therapy of vaccination purposes, are well known (accommodation of up to 38 kb; gutting of all potentially toxic and immunogenic adenovirus genes).

10

Adenovirus vectors containing mutations in essential genes (including minimal adenovirus vectors) can also be propagated using this system.

15 Use of intracellular E2 expressing vectors.

Minimal adenovirus vectors are generated using the helper functions provided in trans by packaging-deficient replicating helper molecules. The adenovirus-derived ITR sequences serve as origins of DNA replication in the presence of at least the E2-gene products. When the E2 gene products are expressed from genes in the vector genome (N.B. the gene(s) must be driven by an E1-independent promoter), the vector genome can replicate in the target cells. This will allow a significantly increased number of template molecules in the target cells, and, as a result an increased expression of the genes of interest encoded by the vector. This is of particular interest for approaches of gene therapy in cancer.

20
25
30

Applications of intracellular amplification of linear DNA fragments.

A similar approach could also be taken if amplification of linear DNA fragments is desired. DNA fragments of known or unknown sequence could be amplified

35

in cells containing the E2-gene products if at least one ITR sequence is located near or at its terminus. There are no apparent constraints on the size of the fragment. Even fragments much larger than the adenovirus genome (36 kb) should be amplified using this approach. It is thus possible to clone large fragments in mammalian cells without either shuttling the fragment into bacteria (such as *E. coli*) or use the polymerase chain reaction (P.C.R.). At the end stage of an productive adenovirus infection a single cell can contain over 100,000 copies of the viral genome. In the optimal situation, the linear DNA fragments can be amplified to similar levels. Thus, one should be able to extract more than 5 μ g of DNA fragment per 10 million cells (for a 35-kbp fragment). This system can be used to express heterologous proteins (equivalent to the Simian Virus 40-based COS-cell system) for research or for therapeutic purposes. In addition, the system can be used to identify genes in large fragments of DNA. Random DNA fragments may be amplified (after addition of ITRs) and expressed during intracellular amplification. Election or selection of those cells with the desired phenotype can be used to enrich the fragment of interest and to isolate the gene.

25 EXPERIMENTAL

Generation of cell lines able to transcomplement E1 defective recombinant adenovirus vectors.

1. 911 cell line

30 We have generated a cell line that harbors E1 sequences of adenovirus type 5, able to trans-complement E1 deleted recombinant adenovirus (Fallaux et al., 1996).

This cell line was obtained by transfection of human diploid human embryonic retinoblasts (HER) with pAd5XhoIC, that contains nt. 80 - 5788 of Ad5; one of the resulting transformants was designated 911. This cell line has been shown to be very useful in the propagation of E1 defective

recombinant adenovirus. It was found to be superior to the 293 cells. Unlike 293 cells, 911 cells lack a fully transformed phenotype, which most likely is the cause of performing better as adenovirus packaging line:

- 5 plaque assays can be performed faster (4 - 5 days instead of 8-14 days on 293)
monolayers of 911 cells survive better under agar overlay as required for plaque assays
higher amplification of E1-deleted vectors

10

In addition, unlike 293 cells that were transfected with sheared adenoviral DNA, 911 cells were transfected using a defined construct. Transfection efficiencies of 911 cells are comparable to those of 293.

15

New packaging constructs.
Source of adenovirus sequences.

- Adenovirus sequences are derived either from
20 pAd5.SalB, containing nt. 80 - 9460 of human adenovirus type 5 (Bernards et al., 1983) or from wild-type Ad5 DNA.
pAd5.SalB was digested with SalI and XhoI and the large fragment was religated and this new clone was named pAd5.X/S.

- 25 The pTN construct (constructed by Dr. R. Vogels, IntroGene, The Netherlands) was used as a source for the human PGK promoter and the NEO gene.

Human PGK promoter and NEO^R gene.

30

- Transcription of E1A sequences in the new packaging constructs is driven by the human PGK promoter (Michelson et al., 1983; Singer-Sam et al., 1984), derived from plasmid pTN (gift of R. Vogels), which uses pUC119 (Vieira and Messing, 1987) as a backbone. This plasmid was also
35 used as a source for NEO gene fused to the Hepatitis B Virus (HBV) poly-adenylation signal.

Fusion of PGK promoter to E1 genes (Fig. 1)

In order to replace the E1 sequences of Ad5 (ITR, origin of replication and packaging signal) by
5 heterologous sequences we have amplified E1 sequences (nt.459 to nt. 960) of Ad5 by PCR, using primers Ea1 and Ea2 (see Table I). The resulting PCR product was digested with ClaI and ligated into Bluescript (Stratagene), predigested with ClaI and EcoRV, resulting in construct
10 pBS.PCRI.

Vector pTN was digested with restriction enzymes EcoRI (partially) and ScaI, and the DNA fragment containing the PGK promoter sequences was ligated into
15 pBS.PCRI digested with ScaI and EcoRI. The resulting construct pBS.PGK.PCRI contains the human PGK promoter operatively linked to Ad5 E1 sequences from nt.459 to nt. 916.

Construction of pIG.E1A.E1B.X (Fig. 2)

20

pIG.E1A.E1B.X was made by replacing the ScaI-BspEI fragment of pAT-X/S by the corresponding fragment from pBS.PGK.PCRI (containing the PGK promoter linked to E1A sequences).

25 pIG.E1A.E1B.X contains the E1A and E1B coding sequences under the direction of the PGK promoter.

As Ad5 sequences from nt.459 to nt. 5788 are present in this construct, also pIX protein of adenovirus is encoded by this plasmid.

30

Construction of pIG.E1A.NEO (Fig. 3)

In order to introduce the complete E1B promoter and to fuse this promoter in such a way that the AUG codon of
35 E1B 21 kD exactly functions as the AUG codon of NEO^R, we amplified the E1B promoter using primers Ea3 and Ep2, where primer Ep2 introduces an NcoI site in the PCR

fragment. The resulting PCR fragment, named PCRII, was digested with HpaI and NcoI and ligated into pAT-X/S, which was predigested with HpaI and with NcoI. The resulting plasmid was designated pAT-X/S-PCR2. The NcoI - StuI fragment of pTN, containing the NEO gene and part of the Hepatitis B Virus (HBV) poly-adenylation signal, was cloned into pAT-X/S-PCR2 (digested with NcoI and NruI). The resulting construct: pAT-PCR2-NEO. The poly-adenylation signal was completed by replacing the ScaI-SalI fragment of pAT-PCR2-NEO by the corresponding fragment of pTN (resulting in pAT.PCR2.NEO.p(A)). The ScaI - XbaI of pAT.PCR2.NEO.p (A) was replaced by the corresponding fragment of pIG.E1A.E1B-X, containing the PGK promoter linked to E1A genes.

15 The resulting construct was named pIG.E1A.NEO, and thus contains Ad5 E1 sequences (nt.459 to nt 1713) under the control of the human PGK promoter.

Construction of pIG.E1A.E1B (Fig. 4)

20 pIG.E1A.E1B was made by amplifying the sequences encoding the N-terminal amino acids of E1B 55kd using primers Ebl and Eb2 (introduces a XhoI site). The resulting PCR fragment was digested with BglII and cloned into BglII/NruI of pAT-X/S, thereby obtaining pAT-PCR3.

25 pIG.E1A.E1B was constructed by introducing the HBV poly(A) sequences of pIG.E1A.NEO downstream of E1B sequences of pAT-PCR3 by exchange of XbaI - SalI fragment of pIg.E1A.NEO and the XbaI XhoI fragment of pAT.PCR3.

30 pIG.E1A.E1B contains nt. 459 to nt. 3510 of Ad5, that encode the E1A and E1B proteins. The E1B sequences are terminated at the splice acceptor at nt.3511. No pIX sequences are present in this construct.

Construction of pIG.NEO (Fig. 5)

pIG.NEO was generated by cloning the HpaI - ScaI fragment of pIG.E1A.NEO, containing the NEO gene under the control of the Ad.5 E1B promoter, into pBS digested with EcoRV and ScaI.

This construct is of use when established cells are transfected with E1A.E1B constructs and NEO selection is required. Because NEO expression is directed by the E1B promoter, NEO resistant cells are expected to co-express E1A, which also is advantageous for maintaining high levels of expression of E1A during long-term culture of the cells.

15 Testing of constructs.

The integrity of the constructs pIG.E1A.NEO, pIG.E1A.E1B.X and pIG.E1A.E1B was assessed by restriction enzyme mapping; furthermore, parts of the constructs that were obtained by PCR analysis were confirmed by sequence analysis. No changes in the nucleotide sequence were found.

The constructs were transfected into primary BRK (Baby Rat Kidney) cells and tested for their ability to immortalize (pIG.E1A.NEO) or fully transform (pAd5.XhoIC, pIG.E1A.E1B.X and pIG.E1A.E1B) these cells.

Kidneys of 6-day old WAG-Rij rats were isolated, homogenized and trypsinized. Subconfluent dishes (diameter 5 cm) of the BRK cell cultures were transfected with 1 or 5 µg of pIG.NEO, pIG.E1A.NEO, pIG.E1A.E1B, pIG.E1A.E1B.X, pAd5XhoIC, or with pIG.E1A.NEO together with PDC26 (Van der Elsen et al., 1983), carrying the Ad5.E1B gene under control of the SV40 early promoter. Three weeks post-transfection, when foci were visible, the dishes were fixed, Giemsa stained and the foci counted.

An overview of the generated adenovirus packaging constructs, and their ability to transform BRK, is

presented in Fig. 6. The results indicate that the constructs pIG.E1A.E1B and pIG.E1A.E1B.X are able to transform BRK cells in a dose-dependent manner. The efficiency of transformation is similar for both
5 constructs and is comparable to what was found with the construct that was used to make 911 cells, namely pAd5.XhoIC.

As expected, pIG.E1A.NEO was hardly able to immortalize BRK. However, co-transfection of an E1B
10 expression construct (PDC26) did result in a significant increase of the number of transformants (18 versus 1), indicating that E1A encoded by pIG.E1A.NEO is functional.

We conclude therefore, that the newly generated packaging constructs are suited for the generation of new
15 adenovirus packaging lines.

Generation of cell lines with new packaging constructs Cell lines and cell culture

20 Human A549 bronchial carcinoma cells (Shapiro et al., 1978), human embryonic retinoblasts (HER), Ad5-E1-transformed human embryonic kidney (HEK) cells (293; Graham et al., 1977) cells and Ad5-transformed HER cells (911; Fallaux et al, 1996) and PER cells were grown in
25 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Calf Serum (FCS) and antibiotics in a 5% CO₂ atmosphere at 37°C. Cell culture media, reagents and sera were purchased from Gibco Laboratories (Grand Island, NY). Culture plastics were purchased from Greiner (Nürtingen,
30 Germany) and Corning (Corning, NY).

Viruses and virus techniques

The construction of adenoviral vectors
35 IG.Ad.MLP.nls.lacZ, IG.Ad.MLP.luc, IG.Ad.MLP.TK and IG.Ad.CMV.TK is described in detail in patent application EP 95202213.

The recombinant adenoviral vector IG.Ad.MLP.nls.lacZ contains the E.coli lacZ gene, encoding β -galactosidase, under control of the Ad2 major late promoter (MLP). IG.Ad.MLP.luc contains the firefly luciferase gene
5 driven by the Ad2 MLP. Adenoviral vectors IG.Ad.MLP.TK and IG.Ad.CMV.TK contain the Herpes Simplex Virus thymidine kinase (TK) gene under the control of the Ad2 MLP and the Cytomegalovirus (CMV) enhancer/promoter, respectively.

10 Transfections

All transfections were performed by calcium-phosphate precipitation DNA (Graham and Van der Eb, 1973) with the GIBCO Calcium Phosphate Transfection System (GIBCO BRL
15 Life Technologies Inc., Gaithersburg, USA), according to the manufacturers protocol.

Western blotting

20 Subconfluent cultures of exponentially growing 293,911 and Ad5-E1-transformed A549 and PER cells were washed with PBS and scraped in Fos-RIPA buffer (10 mM Tris (pH 7,5), 150 mM NaCl, 1% NP40, 0,1% sodium dodecyl sulphate (SDS), 1% NA-DOC, 0,5 mM phenyl methyl sulphonyl fluoride
25 (PMSF), 0,5 mM trypsin inhibitor, 50 mM NaF and 1 mM sodium vanadate). After 10 min. at room temperature, lysates were cleared by centrifugation. Protein concentrations were measured with the Biorad protein assay kit, and 25 μ g total cellular protein was loaded on a
30 12.5% SDS-PAA gel. After electrophoresis, proteins were transferred to nitrocellulose (1h at 300 mA). Prestained standards (Sigma, USA) were run in parallel. Filters were blocked with 1% bovine serum albumin (BSA) in TBST (10 mM Tris, pH 8, 15 mM NaCl, and 0.05% Tween-20) for 1 hour.
35 First antibodies were the mouse monoclonal anti-Ad5-E1B-55-kDa antibody A1C6 (Zantema et al., unpublished), the rat monoclonal anti-Ad5-E1B-221-kDa antibody C1G11

(Zantema et al., 1985). The second antibody was a horseradish peroxidase-labeled goat anti-mouse antibody (Promega). Signals were visualized by enhanced chemoluminescence (Amersham Corp, UK).

5

Southern blot analysis

High molecular weight DNA was isolated and 10 µg was digested to completion and fractionated on a 0.7% agarose gel. Southern blot transfer to Hybond N+ (Amersham, UK) was performed with a 0.4 M NaOH, 0.6 M NaCl transfer solution (Church and Gilbert, 1984). Hybridization was performed with a 2463-nt SspI-HindIII fragment from pAd5.SalB (Bernards et al., 1983). This fragment consists of Ad5 bp. 342-2805. The fragment was radiolabeled with α -³²P-dCTP with the use of random hexanucleotide primers and Klenow DNA polymerase. The southern blots were exposed to a Kodak XAR-5 film at -80°C and to a Phospho-Imager screen which was analyzed by B&L systems Molecular Dynamics software.

10
15
20

A549

Ad5-E1-transformed A549 human bronchial carcinoma cell lines were generated by transfection with pIG.E1A.NEO and selection for G418 resistance. Thirty-one G418 resistant clones were established. Co-transfection of pIG.E1A.E1B with pIG.NEO yielded seven G418 resistant cell lines.

25
30

PER

Ad5-E1-transformed human embryonic retina (HER) cells were generated by transfection of primary HER cells with plasmid pIG.E1A.E1B. Transformed cell lines were established from well-separated foci. We were able to

35

establish seven clonal cell lines, which we called PER.C1, PER.C3, PER.C4, PER.C5, PER.C6, PER.C8 and PER.C9.

One of the PER clones, namely PER.C6, has been deposited at the ECACC under number 96022940.

5

Expression of Ad5 E1A and E1B genes in transformed A549 and PER cells

Expression of the Ad5 E1A and the 55-kDa and 21 kDa E1B proteins in the established A549 and PER cells was studied by means of Western blotting, with the use of monoclonal antibodies (mAb). Mab M73 recognizes the E1A products, whereas Mabs A1C6 and C1G11 are directed against the 55-kDa and 21 kDa E1B proteins, respectively.

The antibodies did not recognize proteins in extracts from the parental A549 or the primary HER cells (data not shown). None of the A549 clones that were generated by co-transfection of pIG.NEO and pIG.E1A.E1B expressed detectable levels of E1A or E1B proteins (not shown). Some of the A549 clones that were generated by transfection with pIG.E1A.NEO expressed the Ad5 E1A proteins (Fig. 7), but the levels were much lower than those detected in protein lysates from 293 cells. The steady state E1A levels detected in protein extracts from PER cells were much higher than those detected in extracts from A549-derived cells. All PER cell lines expressed similar levels of E1A proteins (Fig. 7). The expression of the E1B proteins, particularly in the case of E1B 55 kDa, was more variable. Compared to 911 and 293, the majority of the PER clones express high levels of E1B 55 kDa and 21 kDa. The steady state level of E1B 21 kDa was the highest in PER.C3. None of the PER clones lost expression of the Ad5 E1 genes upon serial passage of the cells (not shown). We found that the level of E1 expression in PER cells remained stable for at least 100 population doublings. We decided to characterize the PER clones in more detail.

Southern analysis of PER clones

To study the arrangement of the Ad5-E1 encoding sequences in the PER clones we performed Southern analyses. Cellular DNA was extracted from all PER clones, and from 293 and 911 cells. The DNA was digested with HindIII, which cuts once in the Ad5 E1 region. Southern hybridization on HindIII-digested DNA, using a radiolabeled Ad5-E1-specific probe revealed the presence of several integrated copies of pIG.E1A.E1B in the genome of the PER clones. Figure 8 shows the distribution pattern of E1 sequences in the high molecular weight DNA of the different PER cell lines. The copies are concentrated in a single band, which suggests that they are integrated as tandem repeats. In the case of PER.C3, C5, C6 and C9 we found additional hybridizing bands of low molecular weight that indicate the presence of truncated copies of pIG.E1A.E1B. The number of copies was determined with the use of a Phospho-Imager. We estimated that PER.C1, C3, C4, C5, C6, C8 and C9 contain 2, 88, 5, 4, 5, 5 and 3 copies of the Ad5 E1 coding region, respectively, and that 911 and 293 cells contain 1 and 4 copies of the Ad5 E1 sequences, respectively.

25 Transfection efficiency

Recombinant adenovectors are generated by co-transfection of adaptor plasmids and the large ClaI fragment of Ad5 into 293 cells (see patent application EP 95202213). The recombinant virus DNA is formed by homologous recombination between the homologous viral sequences that are present in the plasmid and the adenovirus DNA. The efficacy of this method, as well as that of alternative strategies, is highly dependent on the transfectability of the helper cells. Therefore, we compared the transfection efficiencies of some of the

PER clones with 911 cells, using the E.coli β -galactosidase-encoding lacZ gene as a reporter (Fig. 9).

Production of recombinant adenovirus

5

Yields of recombinant adenovirus obtained after inoculation of 293, 911, PER.C3, PER.C5 and PER.C6 with different adenovirus vectors are presented in Table II.

The results indicate that the yields obtained on PER
10 cells are at least as high as those obtained on the existing cell lines.

In addition, the yields of the novel adenovirus vector IG.Ad.MLPI.TK are similar or higher than the yields obtained for the other viral vectors on all cell lines
15 tested.

Generation of new adenovirus vectors (Fig. 10).

The used recombinant adenovirus vectors (see patent
20 application on EP 95202213) are deleted for E1 sequences from 459 to nt. 3328.

As construct pE1A.E1B contains Ad5 sequences 459 to nt. 3510 there is a sequence overlap of 183 nt. between E1B sequences in the packaging construct pIG.E1A.E1B and
25 recombinant adenoviruses, such as e.g. IG.Ad.MLP.TK. The overlapping sequences were deleted from the new adenovirus vectors. In addition, non-coding sequences derived from lacZ, that are present in the original constructs, were deleted as well. This was achieved (see Fig. 10) by PCR
30 amplification of the SV40 poly(A) sequences from pMLP.TK using primers SV40-1 (introduces a BamHI site) and SV40-2 (introduces a BglII site). In addition, Ad5 sequences present in this construct were amplified from nt 2496 (Ad5, introduces a BglII site) to nt. 2779 (Ad5-2). Both
35 PCR fragments were digested with BglII and were ligated. The ligation product was PCR amplified using primers SV40-1 and Ad5-2. The PCR product obtained was cut with

BamHI and AflII and was ligated into pMLP.TK predigested with the same enzymes. The resulting construct, named pMLPI.TK, contains a deletion in adenovirus E1 sequences from nt 459 to nt. 3510.

5

Packaging system

The combination of the new packaging construct pIG.E1A.E1B and the recombinant adenovirus pMLPI.TK, which do not have any sequence overlap, are presented in Fig. 11. In this figure, also the original situation is presented, where the sequence overlap is indicated.

The absence of overlapping sequences between pIG.E1A.E1B and pMLPI.TK (Fig. 11a) excludes the possibility of homologous recombination between packaging construct and recombinant virus, and is therefore a significant improvement for production of recombinant adenovirus as compared to the original situation.

In Fig. 11b the situation is depicted for pIG.E1A.NEO and IG.Ad.MLPI.TK. pIG.E1A.NEO when transfected into established cells, is expected to be sufficient to support propagation of E1-deleted recombinant adenovirus. This combination does not have any sequence overlap, preventing generation of RCA by homologous recombination. In addition, this convenient packaging system allows the propagation of recombinant adenoviruses that are deleted just for E1A sequences and not for E1B sequences.

Recombinant adenoviruses expressing E1B in the absence of E1A are attractive, as the E1B protein, in particular E1B 19kD, is able to prevent infected human cells from lysis by Tumor Necrosis Factor (TNF) (Gooding et al., 1991).

Generation of recombinant adenovirus derived from pMLPI.TK.

35

Recombinant adenovirus was generated by co-transfection of 293 cells with SalI linearized pMLPI.TK

DNA and ClaI linearized Ad5 wt DNA. The procedure is schematically represented in Fig. 12.

5 Outline of the strategy to generate packaging systems for minimal adenovirus vector

Name convention of the plasmids used:

p plasmid
10 I ITR (Adenovirus Inverted Terminal Repeat)
C Cytomegalovirus (CMV) Enhancer/Promoter Combination
L Firefly Luciferase Coding Sequence hac,haw Potential hairpin that can be formed after digestion with restriction endonuclease Asp718 in its correct and in the.
15 reverse orientation, respectively (Fig. 15).

Eg. pICLhaw is a plasmid that contains the adenovirus ITR followed by the CMV-driven luciferase gene and the Asp718 hairpin in the reverse (non-functional)
20 orientation.

1.1 Demonstration of the competence of a synthetic DNA sequence, that is capable of forming a hairpin-structure, to serve as a primer for reverse strand
25 synthesis for the generation of double-stranded DNA molecules in cells that contain and express adenovirus genes.

Plasmids pICLhac, pICLhaw, pICLI and pICL were generated using standard techniques. The schematic representation of
30 these plasmids is shown in Figs. 16-19.

Plasmid pICL is derived from the following plasmids:
nt.1 - 457 pMLP10 (Levrero et al., 1991)
nt.458 - 1218 pCMV β (Clontech, EMBL Bank No. U02451)
nt.1219 - 3016 pMLP.luc (IntroGene, unpublished)
35 nt.3017 - 5620 pBLCAT5 (Stein and Whelan, 1989)

The plasmid has been constructed as follows:

The tet gene of plasmid pMLP10 has been inactivated by deletion of the BamHI-SalI fragment, to generate
 5 pMLP10ΔSB. Using primer set PCR/MLP1 and PCR/MLP3 a 210 bp fragment containing the Ad5-ITR, flanked by a synthetic SalI restriction site was amplified using pMLP10 DNA as the template. The PCR product was digested with the enzymes EcoRI and SgrAI to generate a 196 bp. fragment.
 10 Plasmid pMLP10ΔSB was digested with EcoRI and SgrAI to remove the ITR. This fragment was replaced by the EcoRI-SgrAI-treated PCR fragment to generate pMLP/SAL. Plasmid pCMV-Luc was digested with PvuII to completion and recirculated to remove the SV40-derived poly-adenylation
 15 signal and Ad5 sequences with exception of the Ad5 left-terminus. In the resulting plasmid, pCMV-lucΔAd, the Ad5 ITR was replaced by the Sal-site-flanked ITR from plasmid pMLP/SAL by exchanging the XmnI-SacII fragments. The resulting plasmid, pCMV-lucΔAd/SAL, the Ad5 left
 20 terminus and the CMV-driven luciferase gene were isolated as an SalI-SmaI fragment and inserted in the SalI and HpaI digested plasmid pBLCATS, to form plasmid pICL. Plasmid pICL is represented in Fig 19; its sequence is presented in Fig. 20.

25 Plasmid pICL contains the following features:

nt. 1-457	Ad5 left terminus (Sequence 1-457 of human adenovirus type 5)
30 nt. 458-969	Human cytomegalovirus enhancer and immediate early promoter (Boshart et al., 1985)(from plasmid pCMVβ, Clontech, Palo Alto, USA)
nt. 970-1204	SV40 19S exon and truncated 16/19S intron (from plasmid pCMVβ)
35 nt. 1218-2987	Firefly luciferase gene (from pMLP.luc)

- nt. 3018-3131 SV40 tandem poly-adenylation signals from late transcript, derived from plasmid pBLCAT5)
- 5 nt. 3132-5620 pUC12 backbone (derived from plasmid pBLCAT5)
- nt. 4337-5191 β -lactamase gene (Amp-resistance gene, reverse orientation)

Plasmid pICLhac and pICLhaw

10

Plasmids pICLhac and pICLhaw were derived from plasmid pICL by digestion of the latter plasmid with the restriction enzyme Asp718. The linearized plasmid was treated with Calf-Intestine Alkaline Phosphatase to remove 15 the 5' phosphate groups. The partially complementary synthetic single-stranded oligonucleotide Hp/asp1 and Hp/asp2 were annealed and phosphorylated on their 5' ends using T4-polynucleotide kinase.

20 The phosphorylated double-stranded oligomers were mixed with the dephosphorylated pICL fragment and ligated. Clones containing a single copy of the synthetic oligonucleotide inserted into the plasmid were isolated and characterized using restriction enzyme digests. Insertion of the 25 oligonucleotide into the Asp718 site will at one junction recreate an Asp718 recognition site, whereas at the other junction the recognition site will be disrupted. The orientation and the integrity of the inserted oligonucleotide was verified in selected clones by 30 sequence analyses. A clone containing the oligonucleotide in the correct orientation (the Asp718 site close to the 3205 EcoRI site) was denoted pICLhac. A clone with the oligonucleotide in the reverse orientation (the Asp718 site close to the SV40 derived poly signal) was designated pICLhaw. Plasmids pICLhac and pICLhaw are represented in 35 Figs. 16 and 17.

Plasmid pICLI was created from plasmid pICL by insertion of the Sali-SgrAI fragment from pICL, containing

the Ad5-ITR into the Asp718 site of pICL. The 194 bp Sali-SgrAI fragment was isolated from pICL, and the cohesive ends were converted to blunt ends using E.coli DNA polymerase I (Klenow fragment) and dNTP's. The Asp718 cohesive ends were converted to blunt ends by treatment with mungbean nuclease. By ligation clones were generated that contain the ITR in the Asp718 site of plasmid pICL. A clone that contained the ITR fragment in the correct orientation was designated pICLI (Fig. 18).

5

10 Generation of adenovirus Ad-CMV-hcTK. Recombinant adenovirus was constructed according to the method described in Patent application 95202213. Two components are required to generate a recombinant adenovirus. First, an adaptor-plasmid containing the left terminus of the

15 adenovirus genome containing the ITR and the packaging signal, an expression cassette with the gene of interest, and a portion of the adenovirus genome which can be used for homologous recombination. In addition, adenovirus DNA is needed for recombination with the aforementioned

20 adaptor plasmid. In the case of Ad-CMV-hcTK, the plasmid PCMV.TK was used as a basis. This plasmid contains nt. 1-455 of the adenovirus type 5 genome, nt. 456-1204 derived from pCMV β (Clontech, the PstI-StuI fragment that contains the CMV enhancer promoter and the 16S/19S intron from Simian Virus 40), the Herpes Simplex Virus thymidine kinase gene (described in Patent application 95202213), the SV40-derived polyadenylation signal (nt. 2533-2668 of the SV40 sequence), followed by the BglII-ScaI fragment of Ad5 (nt. 3328-6092 of the Ad5 sequence). These fragments

25 are present in a pMLP10-derived (Levrero et al., 1991) backbone. To generate plasmid pAD-CMVhc-TK, plasmid pCMV.TK was digested with ClaI (the unique ClaI-site is located just upstream of the TK open readingframe) and dephosphorylated with Calf-Intestine Alkaline Phosphate.

30

35 To generate a hairpin-structure, the synthetic oligonucleotides HP/cia2 and HP/cia2 were annealed and phosphorylated on their 5'-OH groups with T4-

polynucleotide kinase and ATP. The double-stranded oligonucleotide was ligated with the linearized vector fragment and used to transform E.coli strain "Sure". Insetion of the oligonucleotide into the ClaI site will disrupt the ClaI recognition sites. In the oligonucleotide contains a new ClaI site near one of its termini. In selected clones, the orientation and the integrity of the inserted oligonucleotide was verified by sequence analyses. A clone containing the oligonucleotide in the correct orientation (the ClaI site at the ITR side) was denoted pAd-CMV-hcTK. This plasmid was co-transfected with ClaI digested wild-type Adenovirus-type5 DNA into 911 cells. A recombinant adenovirus in which the CMV-hcTK expression cassette replaces the El sequences was isolated and propagated using standard procedures.

To study whether the hairpin can be used as a primer for reverse strand synthesis on the displaced strand after replication had started at the ITR, the plasmid pICLhac is introduced into 911 cells (human embryonic retinoblasts transformed with the adenovirus El region). The plasmid pICLhaw serves as a control, which contains the oligonucleotide pair HP/asp 1 and 2 in the reverse orientation but is further completely identical to plasmid pICLhac. Also included in these studies are plasmids pICLI and pICL. In the plasmid pICLI the hairpin is replaced by an adenovirus ITR. Plasmid pICL contains neither a hairpin nor an ITR sequence. These plasmids serve as controls to determine the efficiency of replication by virtue of the terminal-hairpin structure. To provide the viral products other than the El proteins (these are produced by the 911 cells) required for DNA replication the cultures are infected with the virus IG.Ad.MLPI.TK after transfection. Several parameters are being studied to demonstrate proper replication of the transfected DNA molecules. First, DNA extracted from the cell cultures transfected with aforementioned plasmids and infected with IG.Ad.MLPI.TK virus is being analyzed by Southern blotting for the

presence of the expected replication intermediates, as well as for the presence of the duplicated genomes. Furthermore, from the transfected and IG.Ad.MLPI.TK infected cell populations virus is isolated, that is

5 capable to transfer and express a luciferase marker gene into luciferase negative cells.

Plasmid DNA of plasmids pICLhac, pICLhaw, pICLI and pICL have been digested with restriction endonuclease Sall and treated with mungbean nuclease to remove the 4

10 nucleotide single-stranded extension of the resulting DNA fragment. In this manner a natural adenovirus 5'ITR terminus on the DNA fragment is created. Subsequently, both the pICLhac and pICLhaw plasmids were digested with restriction endonuclease Asp718 to generate the terminus

15 capable of forming a hairpin structure. The digested plasmids are introduced into 911 cells, using the standard calcium phosphate co-precipitation technique, four dishes for each plasmid. During the transfection, for each plasmid two of the cultures are infected with the

20 IG.Ad.MLPI.TK virus using 5 infectious IG.Ad.MLPI.TK particles per cell. At twenty-hours post-transfection and fort hours post-transfection one Ad.tk-virus-infected and one uninfected culture are used to isolate small molecular-weight DNA using the procedure devised by Hirt.

25 Aliquots of isolated DNA are used for Southern analysis. After digestion of the samples with restriction endonuclease EcoRI using the luciferase gene as a probe a hybridizing fragment of approx. 2.6kb is detected only in the samples from the adenovirus infected cells transfected

30 with plasmid pICLhac. The size of this fragment is consistent with the anticipated duplication of the luciferase marker gene. This supports the conclusions that the inserted hairpin is capable to serve as a primer for reverse strand synthesis. The hybridizing fragment is

35 absent if the IG.Ad.MLPI.TK virus is omitted, or if the hairpin oligonucleotide has been inserted in the reverse orientation.

The restriction endonuclease DpnI recognizes the tetranucleotide sequence 5'-GATC-3', but cleaves only methylated DNA, (that is, only (plasmid) DNA propagated in, and derived, from E.coli, not DNA that has been replicated in mammalian cells). The restriction endonuclease MboI recognizes the same sequences, but cleaves only unmethylated DNA (viz. DNA propagated in mammalian cells). DNA samples isolated from the transfected cells are incubated with MboI and DpnI and analysed with Southern blots. These results demonstrate that only in the cells transfected with the pICLhac and the pICLI plasmids large DpnI-resistant fragments are present, that are absent in the MboI treated samples. These data demonstrate that only after transfection of plasmids pICLI and pICLhac replication and duplication of the fragments occur.

These data demonstrate that in adenovirus-infected cells linear DNA fragments that have on one terminus an adenovirus-derived inverted terminal repeat (ITR) and at the other terminus a nucleotide sequence that can anneal to sequences on the same strand, when present in single-stranded form thereby generate a hairpin structure, and will be converted to structures that have inverted terminal repeat sequences on both ends. The resulting DNA molecules will replicate by the same mechanism as the wild type adenovirus genomes.

1.2 Demonstration that the DNA molecules that contain a luciferase marker gene, a single copy of the ITR, the encapsidation signal and a synthetic DNA sequence, that is capable of forming a hairpin structure, are sufficient to generate DNA molecules that can be encapsidated into virions.

To demonstrate that the above DNA molecules containing two copies of the CMV-luc marker gene can be encapsidated into virions, virus is harvested from the remaining two cultures via three cycles of freeze-thaw

crushing and is used to infect murine fibroblasts. Forty-eight hours after infection the infected cells are assayed for luciferase activity. To exclude the possibility that the luciferase activity has been induced by transfer of free DNA, rather than via virus particles, virus stocks are treated with DNaseI to remove DNA contaminants. Furthermore, as an additional control, aliquots of the virus stocks are incubated for 60 minutes at 56°C. The heat treatment will not affect the contaminating DNA, but will inactivate the viruses. Significant luciferase activity is only found in the cells after infection with the virus stocks derived from IG.Ad.MLPI.TK-infected cells transfected with the pICLhc and pICLI plasmids. Neither in the non-infected cells, nor in the infected cells transfected with the pICLhw and pICL significant luciferase activity can be demonstrated. Heat inactivation, but not DNaseI treatment, completely eliminates luciferase expression, demonstrating that adenovirus particles, and not free (contaminating) DNA fragments are responsible for transfer of the luciferase reporter gene.

These results demonstrate that these small viral genomes can be encapsidated into adenovirus particles and suggest that the ITR and the encapsidation signal are sufficient for encapsidation of linear DNA fragments into adenovirus particles. These adenovirus particles can be used for efficient gene transfer. When introduced into cells that contain and express at least part of the adenovirus genes (viz. E1, E2, E4, and L, and VA), recombinant DNA molecules that consist of at least one ITR, at least part of the encapsidation signal as well as a synthetic DNA sequence, that is capable of forming a hairpin structure, have the intrinsic capacity to autonomously generate recombinant genomes which can be encapsidated into virions. Such genomes and vector system can be used for gene transfer.

1.3 Demonstration that DNA molecules which contain nucleotides 3510 - 35953 (viz. 9.7 - 100 map units) of the adenovirus type 5 genome (thus lack the E1 protein-coding regions, the right-hand ITR and the encapsidation sequences) and a terminal DNA sequence that is complementary to a portion of the same strand of the DNA molecule when present in single-stranded form other than the ITR, and as a result is capable of forming a hairpin structure, can replicate in 911 cells.

5
10 In order to develop a replicating DNA molecule that can provide the adenovirus products required to allow the above mentioned ICLhac vector genome and alike minimal adenovectors to be encapsidated into adenovirus particles by helper cells, the Ad-CMV-hcTK adenoviral vector has
15 been developed. Between the CMV enhancer/promoter region and the thymidine kinase gene the annealed oligonucleotide pair HP/cia 1 and 2 is inserted. The vector Ad-CMV-hcTK can be propagated and produced in 911 cell using standard procedures. This vector is grown and propagated
20 exclusively as a source of DNA used for transfection. DNA of the adenovirus Ad-CMV-hcTK is isolated from virus particles that had been purified using CsCl density-gradient centrifugation by standard techniques. The virus DNA has been digested with restriction endonuclease ClaI.
25 The digested DNA is size-fractionated on an 0.7% agarose gel and the large fragment is isolated and used for further experiments. Cultures of 911 cells are transfected large ClaI-fragment of the Ad-CMV-hcTK DNA using the standard calcium phosphate co-precipitation technique.
30 Much like in the previous experiments with plasmid pICLhac, the AD-CMV-hc will replicate starting at the right-hand ITR. Once the 1-strand is displaced, a hairpin can be formed at the left-hand terminus of the fragment. This facilitates the DNA polymerase to elongate the chain
35 towards the right-hand-side. The process will proceed until the displaced strand is completely converted to its double-stranded form. Finally, the right-hand ITR will be

recreated, and in this location the normal adenovirus replication-initiation and elongation will occur. Note that the polymerase will read through the hairpin, thereby duplicating the molecule. The input DNA molecule of 33250
5 bp, that had on one side an adenovirus ITR sequence and at the other side a DNA sequence that had the capacity to form a hairpin structure, has now been duplicated, in a way that both ends contain an ITR sequence. The resulting DNA molecule will consist of a palindromic structure of
10 approximately 66500 bp.

This structure can be detected in low-molecular weight DNA extracted from the transfected cells using Southern analysis. The palindromic nature of the DNA fragment can be demonstrated by digestion of the low-
15 molecular weight DNA with suitable restriction endonucleases and Southern blotting with the HSV-TK gene as the probe. This molecule can replicate itself in the transfected cells by virtue of the adenovirus gene products that are present in the cells. In part, the
20 adenovirus genes are expressed from templates that are integrated in the genome of the target cells (viz. the E1 gene products), the other genes reside in the replicating DNA fragment itself. Note however, that this linear DNA fragment cannot be encapsidated into virions. Not only
25 does it lack all the DNA sequences required for encapsidation, but also is its size much too large to be encapsidated.

1.4 Demonstration that DNA molecules which contain nucleotides 3503 - 35953 (viz. 9.7 - 100 map units) of the
30 adenovirus type 5 genome (thus lack the E1 protein-coding regions, the right-hand ITR and the encapsidation sequences) and a terminal DNA sequence that is complementary to a portion the same strand of the DNA molecule other than the ITR, and as a result is capable of
35 forming a hairpin structure, can replicate in 911 cells and can provide the helper functions required to encapsidate the pICLI and pICLhac derived DNA fragments.

The next series of experiments aim to demonstrate that the DNA molecule described in part 1.3 could be used to encapsidate the minimal adenovectors described in part 1.1 and 1.2.

5 In the experiments the large fragment isolated after endonuclease ClaI-digestion of Ad-CMV-hcTK DNA is introduced into 911 cells (conform the experiments described in part 1.3) together with endonuclease SallI, mungbean nuclease, endonuclease Asp718-treated plasmid
10 pICLhac, or as a control similarly treated plasmid pICLhaw. After 48 hours virus is isolated by freeze-thaw crushing of the transfected cell population. The virus-preparation is treated with DNaseI to remove contaminating free DNA. The virus is used subsequently to infect Rat2
15 fibroblasts. Forty-eight hours post infection the cells are assayed for luciferase activity. Only in the cells infected with virus isolated from the cells transfected with the pICLhac plasmid, and not with the pICLhaw plasmid, significant luciferase activity can be
20 demonstrated. Heatinactivation of the virus prior to infection completely abolishes the luciferase activity, indicating that the luciferase gene is transferred by a viral particle. Infection of 911 cell with the virus stock did not result in any cytopathological effects,
25 demonstrating that the pICLhac is produced without any infectious helper virus that can be propagated on 911 cells. These results demonstrate that the proposed method can be used to produce stocks of minimal-adenoviral vectors, that are completely devoid of infectious helper
30 viruses that are able to replicate autonomously on adenovirus-transformed human cells or on non-adenovirus transformed human cells.

Besides the system described in this application, another approach for the generation of minimal adenovirus
35 vectors has been disclosed in WO 94/12649. The method described in WO 94/12649 exploits the function of the protein IX for the packaging of minimal adenovirus vectors

(Pseudo Adenoviral Vectors (PAV) in the terminology of WO 94/12649). PAVs are produced by cloning an expression plasmid with the gene of interest between the left-hand (including the sequences required for encapsidation) and the right-hand adenoviral ITRs. The PAV is propagated in the presence of a helper virus. Encapsidation of the PAV is preferred compared the helper virus because the helper virus is partially defective for packaging. (Either by virtue of mutations in the packaging signal or by virtue of its size (virus genomes greater than 37.5 kb package inefficiently). In addition, the authors propose that in the absence of the protein IX gene the PAV will be preferentially packaged. However, neither of these mechanisms appear to be sufficiently restrictive to allow packaging of only PAVs/minimal vectors. The mutations proposed in the packaging signal diminish packaging, but do not provide an absolute block as the same packaging-activity is required to propagate the helper virus. Also neither an increase in the size of the helper virus nor the mutation of the protein IX gene will ensure that PAV is packaged exclusively. Thus, the method described in WO 94/12649 is unlikely to be useful for the production of helper-free stocks of minimal adenovirus vectors/PAVs.

References

- Berk, A. J. (1986): *Ann. Rev. genet.* 20, 45-79.
- Bernards, R., Schrier, P. I., Bos, J.L., and Eb,
5 A.J. v. d. (1983): Role of adenovirus types 5 and 12
early region 1b tumor antigens in oncogenic
transformation. *Virology* 127, 45-53.
- Bett, A.J., Prevec, L., and Graham, F.L. (1993): Packaging
Capacity and Stability of Human Adenovirus Type-5
10 Vectors. *J Virol* 67, 5911-5921.
- Blaese, M., Blankenstein, T., Brenner, M., Cohen-
Haguenauer, O., Gansbacher, B., Russell, S.,
Sorrentino, B., and Velu, T. (1995). Vectors in cancer
therapy: how will they deliver? *Cancer Gene Ther.* 2,
15 291-297.
- Boshart, M., Weber, F., Jahn, G., Dorsch-Häler, K.,
Fleckenstein, B., and Scaffner, W. (1985): A very
strong enhancer is located upstream of an immediate
early gene of human Cytomegalovirus. *Cell* 41,
20 521-530.
- Bout, A., Imler, J.L., Schulz, H., Perricaudet, M.,
Zurcher, C., Herbrink, P., Valerio, D., and Pavirani,
A. (1994a): *In vivo* adenovirus-mediated transfer of
human CFTR cDNA to Rhesus monkey airway epithelium:
25 efficacy, toxicity and safety. *Gene Therapy* 1,
385-394.
- Bout, A., Perricaudet, M., Baskin, G., Imler, J. L.,
Scholte, B.J., Pavirani, A., and Valerio, D. (1994b):
Lung gene therapy: *in vivo* adenovirus mediated gene
30 transfer to rhesus monkey airway epithelium.
Human Gene Therapy 5, 3-10.
- Brody, S.L., and Crystal, R.G. (1994): Adenovirus-mediated
in vivo gene transfer. *Ann N Y Acad Sci* 716, 90-101.
- Brough, D.E., Cleghon, V., and Klessig, D.F. (1992).
35 Construction, characterization, and utilization of
cell lines which inducibly express the adenovirus
DNA-binding protein. *Virology* 190(2), 624-34.

- Brough, D.E., Rice, S.A., Sell, S., and Klessig, D.F. (1985): Restricted changes in the adenovirus DNA-binding protein that lead to extended host range or temperature-sensitive phenotypes. *J. Virol.* 55, 206-212.
- 5
- Daniell, E. (1976): Genome structure of incomplete particles of adenovirus. *J. Virol.* 19, 685-708.
- Elsen, P.J.V. d., Houweling, A., and Eb, A. J.V. d. (1983). Expression of region ElB of human adenoviruses in the absence of region ElA is not sufficient for complete transformation. *Virology* 128, 377-390.
- 10
- Engelhardt, J.F., Litzky, L., and Wilson, J.M. (1994a): Prolonged transgene expression in cotton rat lung with recombinant adenoviruses defective in E2A. *Hum. Gene Ther.* 5, 1217-1229.
- 15
- Engelhardt, J.F., Simon, R.H., Yang, Y., Zepeda, M., Weber-Pendleton, S., Doranz, B., Grossman, M., and Wilson, J.M. (1993): Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: biological efficacy study. *Human Gene Therapy* 4, 759-769.
- 20
- Engelhardt, J.F., Ye, X., Doranz, B., and Wilson, J.M. (1994b): Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 6196-200.
- 25
- Fang, B., Wang, H., Gordon, G., Bellinger, D.A., Read, M.S., Brinkhous, K.M., Woo, S.L.C., and Eisensmith, R.C. (1996). Lack of persistence of E1-recombinant adenoviral vectors containing a temperature sensitive E2A mutation in immunocompetent mice and hemophilia dogs. *Gene Ther.* 3, 217-222.
- 30
- Fallaux, F.J., Kranenburg, O., Cramer, S.J., Houweling, A., Ormond, H. v., Hoeben, R.C., and Eb, A.J. v.d. (1996). Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early-region-1-deleted adenoviral vectors. *Hum. Gene Ther.* 7, 215-222.
- 35

- Gooding, L.R., Aquino, L., Duerksen-Hughes, P.J., Day, D., Horton, T.M., Yei, S., and Wold, W.S.M. (1991): The E1B 19,000-molecular-weight protein of group C adenoviruses prevents tumor necrosis factor cytotoxicity of human cells but not of mouse cells. *J. Virol.* 65, 3083-3094.
- 5
- Gräble, M., and Hearing, P. (1990): Adenovirus type 5 packaging domain is composed of a repeated element that is functionally redundant. *J. Virol.* 64, 2047-2056.
- 10
- Gräble, M., and Hearing, P. (1992): cis and trans Requirements for the Selective Packaging of Adenovirus Type-5 DNA. *J Virol* 66, 723-731.
- Graham, F.L., and van der Eb, A.J. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* 52, 456-467.
- 15
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C., and Nairn, R. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from adenovirus type 5. *J. Gen. Virol.* 36, 59-72.
- 20
- Haddada, H., Ragot, T., Cordier, L., Duffour, M.T., and Perricaudet, M. (1993): Adenoviral interleukin-2 gene transfer into P815 tumor cells abrogates tumorigenicity and induces antitumoral immunity in mice. *Hum Gene Ther* 4, 703-11.
- 25
- Hay, R.T., Stow, N.D., and McDougall, I.M. (1984): Replication of adenovirus minichromosomes. *J. Mol. Biol.* 174, 493-510.
- Hearing, P., Samulski, R.J., Wishart, W.L., and Shenk, T. (1987): Identification of a repeated sequence element required for efficient encapsidation of the adenovirus type 5 chromosome. *J. Virol.* 61, 2555-2558.
- 30
- Horwitz, M.S. (1990): Adenoviridae and their replication, pp. 1679-1740. In B.N. Fields, and D.M. Knipe (Eds): *Virology*, Raven Press, Ltd, New York.
- 35
- Hu, C.H., Xu, F.Y., Wang, K., Pearson, A. N., and Pearson, G. D. (1992): Symmetrical Adenovirus Minichromosomes

- Have Hairpin Replication Intermediates. *Gene* 110, 145-150.
- 5 Imler, J.L., Chartier, C., Dreyer, D., Dieterle, A., Sainte-Marie, M., Faure, T., Pavirani, A., and Mehtali, M. (1996). Novel complementation cell lines derived from human lung carcinoma A549 cells support the growth of E1-deleted adenovirus vectors. *Gene Ther.* 3, 75-84
- 10 Jochemsen, A.G., Peltenburg, L.T.C., Pas, M.F.W.T., Wit, C.M. d., Bos, J.L., and Eb, A.J. v.d. (1987): *EMBO J.* 6, 3399-3405.
- 15 Klessig, D.F., and Grodzicker, T. (1979): Mutations that allow human Ad2 and Ad5 to express late genes in monkey cells maps in the viral gene encoding the 72K DNA-binding protein. *Cell* 17, 957-966.
- 20 Klessig, D.F., Grodzicker, T., and Cleghon, V. (1984): Construction of human cell lines which contain and express the adenovirus DNA binding protein gene by cotransformation with the HSV-1 tk gene. *Virus Res.* 1, 169-188.
- 25 Kruijer, W., Nicolas, J.C., Schaik, F.M. v., and Sussenbach, J.S. (1983): Structure and function of DNA binding proteins from revertants of adenovirus type 5 mutants with a temperature-sensitive DNA replication. *Virology* 124, 425-433.
- Lechner, R.L., and Kelly Jr., T.J. (1977): The structure of replicating adenovirus 2 DNA molecules. *J. Mol. Biol.* 174, 493-510.
- 30 Leij, L. de, Postmus, P. E., Buys, C.H.C.M., Elema, J.D., Ramaekers, F., Poppema, S., Brouwer, M., Veen, A.Y. v.d., Mesander, G., and The, T.H. (1985): Characterization of three new variant type cell lines derived from small cell carcinoma of the lung. *Cancer Res.* 45, 6024-6033.
- 35 Levrero, M., Barban, V., Manteca, S., Ballay, A., Balsamo, C., Avantaggiati, M.L., Natoli, G., Skellekens, H., Tiollais, P., and Perricaudet, M. (1991): Defective

- and nondefective adenovirus vectors for expressing foreign genes *in vitro* and *in vivo*. *Gene* 101, 195-202.
- Lochmüller, H., Jani, A., Huard, J., Prescott, S.,
5 Simoneau, M., Massie, B., Karpati, G., and Acsadi, G.
(1994): Emergence of early region 1-containing replication-competent adenovirus in stocks of replication-defective adenovirus recombinants ($\Delta E1 + \Delta E3$) during multiple passages in 293 cells.
10 *Hum. Gene Ther.* 5, 1485-1492.
- Matsui T, Murayama M. and Mita T. (1986) Adenovirus 2 peptide IX is expressed only on replicated DNA molecules. *Mol. Cell Biol.* 6, 4149-4154.
- Michelson, A.M., Markham, A.F., and Orkin, S.H. (1983):
15 Isolation and DNA sequence of a full-length cDNA clone for human X-chromosome encoded phosphoglycerate kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80, 472-476.
- Morin, J.E., Lubeck, M.D., Barton, J. E., Conley, A.J.,
20 Davis, A.R., and Hung, P.P. (1987): Recombinant adenovirus induces antibody response to hepatitis B virus surface antigens. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 4626-4630.
- Nicolas, J.C., Suarez, F., Levine, A.J., and Girard, M.
25 (1981): Temperature-independent revertants of adenovirus H5ts125 and H5ts107 mutants in the DNA binding protein: isolation of a new class of host range temperature conditional revertants. *Virology* 108, 521-524.
- Ostrove, J.M. (1994): Safety testing programs for gene
30 therapy viral vectors. *Cancer Gene Ther.* 1, 125-131.
- Pacini, D.L., Dubovi, E.J., and Clyde, W.A. (1984):
J. Infect. Dis. 150, 92-97.
- Postmus, P.E., Ley, L.d., Veen, A.Y. v.d., Mesander, G.,
35 Buys, C.H.C.M., and Elema, J.D. (1988): Two small cell lung cancer cell lines established from rigid bronchoscope biopsies. *Eur. J. Clin. Oncol.* 24, 753-763.

- Rice, S.A., and Klessig, D.F. (1985): Isolation and analysis of adenovirus type 5 mutants containing deletions in the gene encoding the DNA-binding protein. *J. Virol.* 56, 767-778.
- 5 Roberts, B.E., Miller, J.S., Kimelman, D., Cepko, C.L., Lemischka, I. R., and Mulligan, R. C. (1985): *J. Virol.* 56, 404-413.
- Shapiro, D.L., Nardone, L.L., Rooney, S.A., Motoyama, E.K., and Munoz, J.L. (1978). Phospholipid biosynthesis and secretion by a cell line (A549) which resembles type II alveolar epithelial cells. *Biochim. Biophys. Acta* 530, 197-207.
- 10 Simon, R. H., Engelhardt, J.F., Yang, Y., Zepeda, M., Weber-Pendleton, S., Grossman, M., and Wilson, J.M. (1993): Adenovirus-mediated transfer of the CFTR gene to lung of nonhuman primates: toxicity study. *Human Gene Therapy* 4, 771-780.
- 15 Singer-Sam, J., Keith, D.H., Tani, K., Simmer, R.L., Shively, L., Lindsay, S., Yoshida, A., and Riggs, A.D. (1984): Sequence of the promoter region of the gene for X-linked 3-phosphoglycerate kinase. *Gene* 32, 409-417.
- 20 Stein, R.W., and Whelan, J. (1989): Insulin gene enhancer activity is inhibited by adenovirus 5 E1A gene products. *Mol Cell Biol* 9, 4531-4.
- 25 Stratford-Perricaudet, L.D., and Perricaudet, M. (1991): Gene transfer into animals: the promise of adenovirus, pp. 51-61. In O. Cohen-Adenauer, and M. Boiron (Eds): *Human Gene Transfer*, John Libbey Eurotext.
- 30 Telling, G.C., Perera, S., Szatkowski, O.M., and Williams, J. (1994): Absence of an essential regulatory influence of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein on viral growth and early gene expression in human diploid WI38, HeLa, and A549 cells. *J. Virol* 68, 541-7.
- 35 Tooze, J. (1981): *DNA Tumor Viruses (revised)*. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, New York.

- Vieira, J., and Messing, J. (1987): Production of single stranded plasmid DNA, pp. 3-11: *Methods in Enzymology*, Acad. Press Inc.
- 5 Vincent, A.J.P.E., Esandi, M. d. C., Someren, G.D. v., Noteboom, J.L., C.J.J, A., Vecht, C., Smitt, P.A.E.S., Bekkum, D.W. v., Valerio, D., Hoogerbrugge, P.M., and Bout, A. (1996a). Treatment of Lepto-meningeal metastasis in a rat model using a recombinant adenovirus containing the HSV-tk gene. *J. Neurosurg.* in press.
- 10 Vincent, A.J.P.E., Vogels, R., Someren, G. v., Esandi, M. d. C., Noteboom, J.L., Avezaat, C.J.J., Vecht, C., Bekkum, D.W. v., Valerio, D., Bout, A., and Hoogerbrugge, P.M. (1996b). Herpes Simplex Virus Thymidine Kinase gene therapy for rat malignant brain tumors. *Hum. Gene Ther.* 7, 197-205.
- 15 Wang, K., and Pearson, G.D. (1985): Adenovirus sequences required for replication *in vivo*. *Nucl. Acids Res.* 13, 5173-5187.
- 20 White, E., Denton, A., and Stillman, B. (1988): *J. Virol.* 62, 3445-3454.
- Yang, Y., Li, Q., Ertl, H.C.J., and Wilson, J.M. (1995): Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses. *J. Virol.* 69, 2004-2015.
- 25 Yang, Y., Nunes, F.A., Berencsi, K., Furth, E.E., Gonczol, E., and Wilson, J.M. (1994a): Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4407-11.
- 30 Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Gonczol, E., Engelhardt, J.F., and Wilson, J. M. (1994b): Inactivation of E2A in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* 7, 362-9.
- 35

Zantema, A., Fransen, J.A.M., Davis-Olivier, A.,
Ramaekers, F.C.S., Vooijs, G.P., Deleys, B., and
Eb, A.J. v.d. (1985). Localization of the E1B proteins
of adenovirus 5 in transformed cells, as revealed by
5 interaction with monoclonal antibodies. *Virology* 142,
44-58.

Table I

Primers used for PCR amplification of DNA fragments used for generation of constructs described in this patent application.

Ea-1	CGTGTAGTGTATTTATACCCG	PCR amplification Ad5 nt459 ->
Ea-2	TCGTCCTGGGTGGAAAGCCA	PCR amplification Ad5 nt960 <-
Ea-3	TACCCGCCGTCCTAAAATGGC	nt1284-1304 of Ad5 genome
Ea-5	TGGACTTGAGCTGTAAACGC	nt1514-1533 of Ad5 genome
Ep-2	GCCTCCATGGAGGTCAGATGT	nt1721-1702 of Ad5; introduction of NcoI site
Eb-1	GCTTGAGCCCGAGACATGTC	nt3269-3289 of Ad5 genome
Eb-2	CCCCTCGAGCTCAATCTGTATCTT	nt3508-3496 of Ad5 genome; introduction of XhoI site
SV40-1	GGGGGATCCGAAGTGTATTATGCAGC	Introduction BamHI site (nt2182-2199 of pMLP.TK) adaption of recombinant adenoviruses
SV40-2	GGGAGATCTAGACATGATAAGATAC	Introduction BglII site (nt2312-2297 of pMLP.TK)
Ad5-1	GGGAGATCTGTACTGAAATGTGTGGGC	Introduction BglII site (nt2496-2514 of pMLP.TK)
Ad5-2	GGAGGCTGCAGTCTCCAACGGCGT	nt2779-2756 of PMLP.TK
ITR1	GGGGGATCCCTCAATCGTCACTTCCGT	nt35737-35757 of Ad5 (introduction of BamHI site)
ITR2	GGGGTCTAGACATCATCAATAATATAC	nt35935-35919 of Ad5 (introduction of XbaI site)

PCR primers sets to be used to create the SalI and Asp718 sites juxtaposed to the ITR sequences.

PCR/MLP1	GGCGAATTCGTCGACATCATCAATAATATACC	(Ad5 nt. 10-18)
PCR/MLP2	GGCGAATTCGGTACCATCATCAATAATATACC	(Ad5 nt. 10-18)
PCR/MLP3	CTGTGTACACCGGCGCA	(Ad5 nt.200-184)

Synthetic oligonucleotide pair used to generate a synthetic hairpin, recreates an Asp718 site at one of the termini if inserted in Asp718 site:

HP/asp1 5'-GTACACTGACCTAGTGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGGCACTAGGTCAG

HP/asp2 5'-GTACCTGACCTAGTGCCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCACTAGGTCAGT

Synthetic oligonucleotide pair used to generate a synthetic hairpin, contains the ClaI recognition site to be used for hairpin formation.

HP/clal 5'-GTACATTGACCTAGTGCCGCCCGGGCAAAGCCCGGGCGGCACTAGGTCAATCGAT

HP/clal2 5'-GTACATCGATTGACCTAGTGCCGCCCGGGCTTTGCCCGGGCGGCACTAGGTCAAT

TABLE II

Cell	Passagenumber	IG.Ad.CMV.lacZ	IG.Ad.CMV.TK	IG.Ad.ML.P1.TK	d1313	Producer Mean
293		6,0	5,8	2,4	3,4	17,5
911		8	14	3,4	180	59,5
PER.C3	17	8	11	4,1	40	25,8
PER.C5	15	6	17	3,6	200	64,7
PER.C6	36	10	22	5,8	320	102

56

Yields x 10⁻⁸ pfu/T175 flask.

Table II.

Yields of different recombinant adenoviruses obtained after inoculation of adenovirus E1 packaging cell lines 293, 911, PER.C3, PER.C5 and PER.C6. The yields are the mean of two different experiments.

IG.Ad.CMV.lacZ and IG.Ad.CMV.TK are described in patent application EP 95 20 2213

The construction of IG.Ad.ML.P1.TK is described in this patent application.

Yields of virus per T80 flask were determined by plaque assay on 911 cells, as described [Fallaux, 1996 #1493]

CLAIMS

1. A recombinant nucleic acid molecule based on or derived from an adenovirus having at least a functional encapsidating signal and at least one functional Inverted Terminal Repeat or a functional fragment or derivative thereof and having no overlapping sequences which allow for homologous recombination leading to replication competent virus in a cell into which it is transferred.
2. A recombinant nucleic acid molecule according to claim 1 being in a linear form and comprising an Inverted Terminal Repeat at or near both termini.
3. A recombinant nucleic acid molecule according to claim 1 being in a linear and essentially single stranded form and comprising at the 3' terminus a sequence complementary to an upstream part of the same strand of said nucleic acid molecule, said sequence being capable of base-pairing with said part in a way to be able to function as a start-site for a nucleic acid polymerase.
4. A recombinant nucleic acid molecule according to claim 3, comprising all adenovirus derived genetic information necessary for replication, except for a functional encapsidation signal.
5. A recombinant nucleic acid molecule derived from the nucleic acid molecule according to claim 4 resulting from the action of a nucleic acid polymerase on said nucleic acid molecule according to claim 4.
6. A recombinant nucleic acid molecule according to claim 5 having an Inverted Terminal Repeat at both termini.
7. A recombinant nucleic acid molecule according to anyone of the foregoing claims comprising a host range mutation.
8. A recombinant nucleic acid molecule according to anyone of the foregoing claims comprising a mutated E2

region rendering at least one of its products temperature sensitive.

9. A recombinant nucleic acid molecule according to anyone of the foregoing claims comprising an E2 region
5 under the control of an inducible promoter.

10. A packaging cell for packaging adenovirus derived nucleic acid molecules, which packaging cell has been provided with one or more recombinant nucleic acid molecules which provide said cell with the ability to
10 express adenoviral gene products derived from at least the E1A region.

11. A packaging cell for packaging adenovirus derived nucleic acid molecules, which packaging cell has been provided with one or more recombinant nucleic acid
15 molecules which provide said cell with the ability to express adenoviral gene products derived from at least both the E1A and the E2A region.

12. A packaging cell according to claim 11, wherein the recombinant nucleic acid molecule encoding the E2A region
20 is under control of an inducible promoter.

13. A packaging cell according to claim 11 or 12, wherein the recombinant nucleic acid molecule encoding the E2A region is mutated so that at least one of its products is temperature sensitive.

25 14. A cell according to anyone of claims 10-13, which does not have the ability to express E1B products.

15. A cell according to claim 14, wherein the genetic information encoding E1B products is not present.

30 16. A cell according to claim 10, further comprising the region coding for E1B.

17. A cell according to claim 10, further comprising a marker gene.

18. A cell according to claim 17, whereby the marker gene is under control of the E1B responsive promoter.

35 19. A packaging cell harbouring nucleotides 80-5788 of the human Adenovirus 5 genome.

20. A packaging cell harbouring nucleotides 459-1713 of the human Adenovirus 5 genome.
21. A packaging cell harbouring nucleotides 459-3510 of the human Adenovirus 5 genome.
- 5 22. A cell according to anyone of claims 10-13, which does not have the ability to express the 21kD E1B product.
23. A cell according to claim 22, wherein the genetic information encoding the 21kD E1B product is not present.
24. A cell according to anyone of claims 10-23 which is a
10 diploid cell.
25. A cell according to anyone of claims 10-24 which is of non-human origin.
26. A cell according to anyone of claims 10-25 which is of monkey origin.
- 15 27. A cell according to claim 19 as deposited under no. 95062101 at the ECACC.
28. A recombinant nucleic acid molecule according to anyone of claims 1-9 being a DNA molecule.
29. A recombinant nucleic acid molecule based on or
20 derived from an adenovirus, having at least a deletion of nucleotides 459-3510 of the E1 region.
30. A recombinant nucleic acid molecule based on or derived from an adenovirus, having a deletion of nucleotides 459-1713 of the E1 region.
- 25 31. An adenovirus-like particle comprising a recombinant nucleic acid molecule according to anyone of claims 1-9.
32. A cell comprising a recombinant nucleic acid molecule according to anyone of claims 1-9.
33. A recombinant nucleic acid according to claims 1-3,
30 comprising functional E2A and E2B genes or functional fragments or derivatives thereof under control of an E1A independent promoter.
34. A cell according to claim 26 which comprises a host range mutated E2A region of an adenovirus.
- 35 35. A method for intracellular amplification comprising the steps of providing a cell with a linear DNA fragment to be amplified, which fragment is provided with at least

- a functional part or derivative of an Inverted Terminal Repeat at one terminus and providing said cell with functional E2 derived products necessary for replication of said fragment and allowing said fragment to be acted
- 5 upon by a DNA polymerase.
36. A method according to claim 35 whereby the cell is provided with genetic material encoding both E2A and E2B products.
- 10 37. A method according to claim 35 or 36 whereby a hairpin-like structure is provided at the terminus of the DNA fragment opposite the Inverted Terminal Repeat.

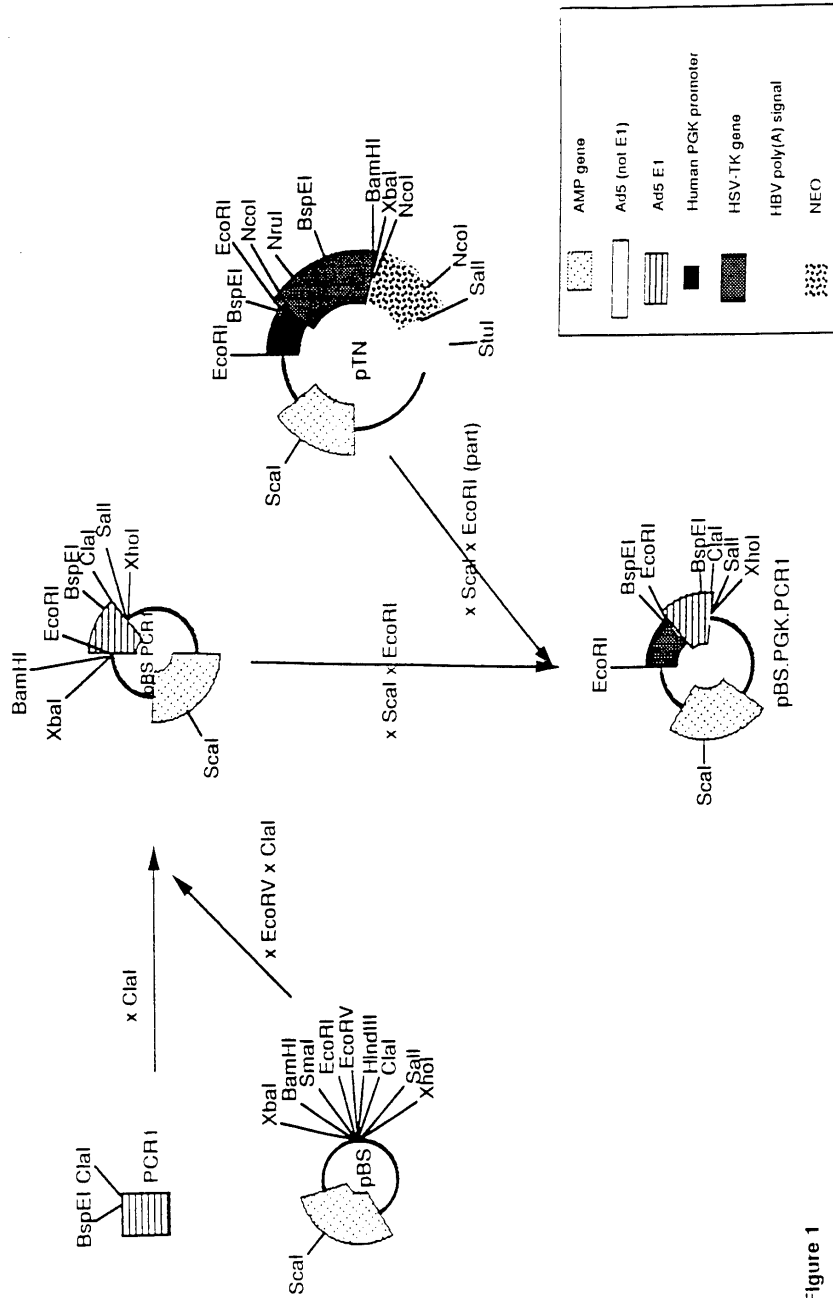


Figure 1
Construction of pBS.PGK.PCR1

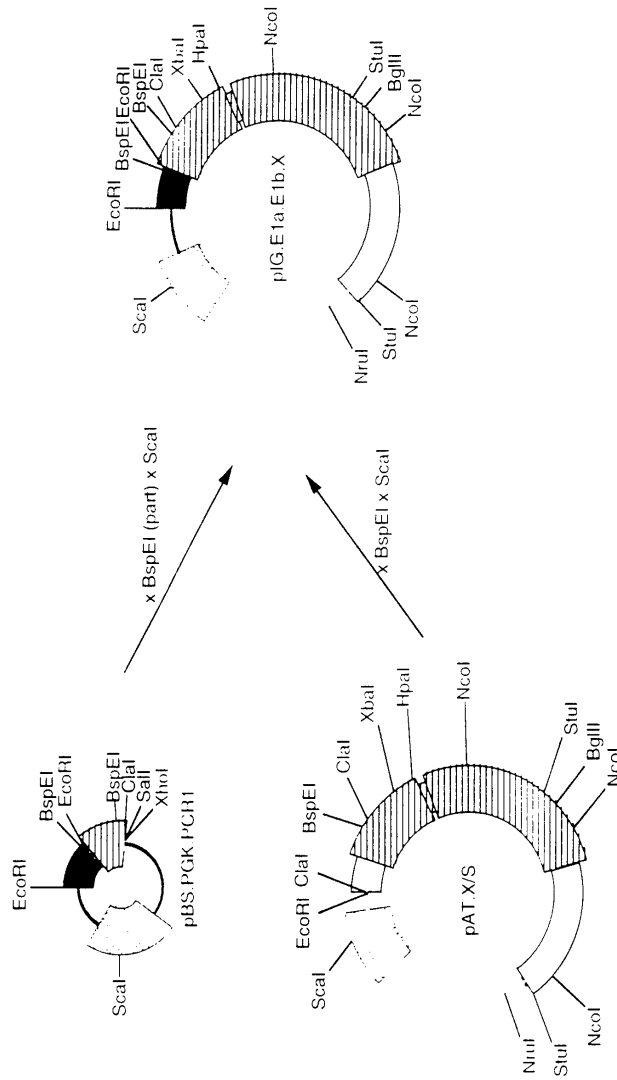
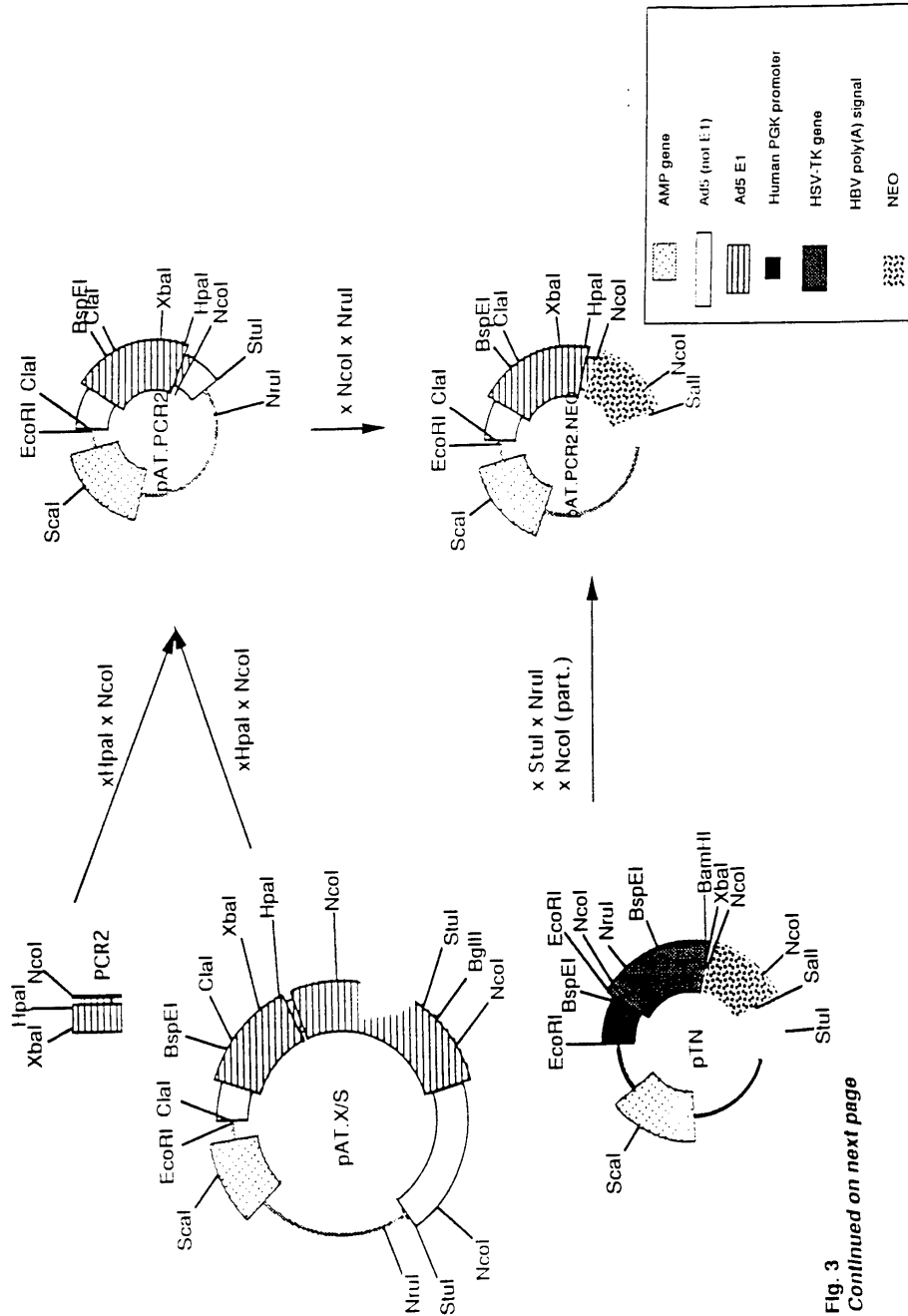


Figure 2
Construction of plG.E1a.E1b.X



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 3
Continued on next page

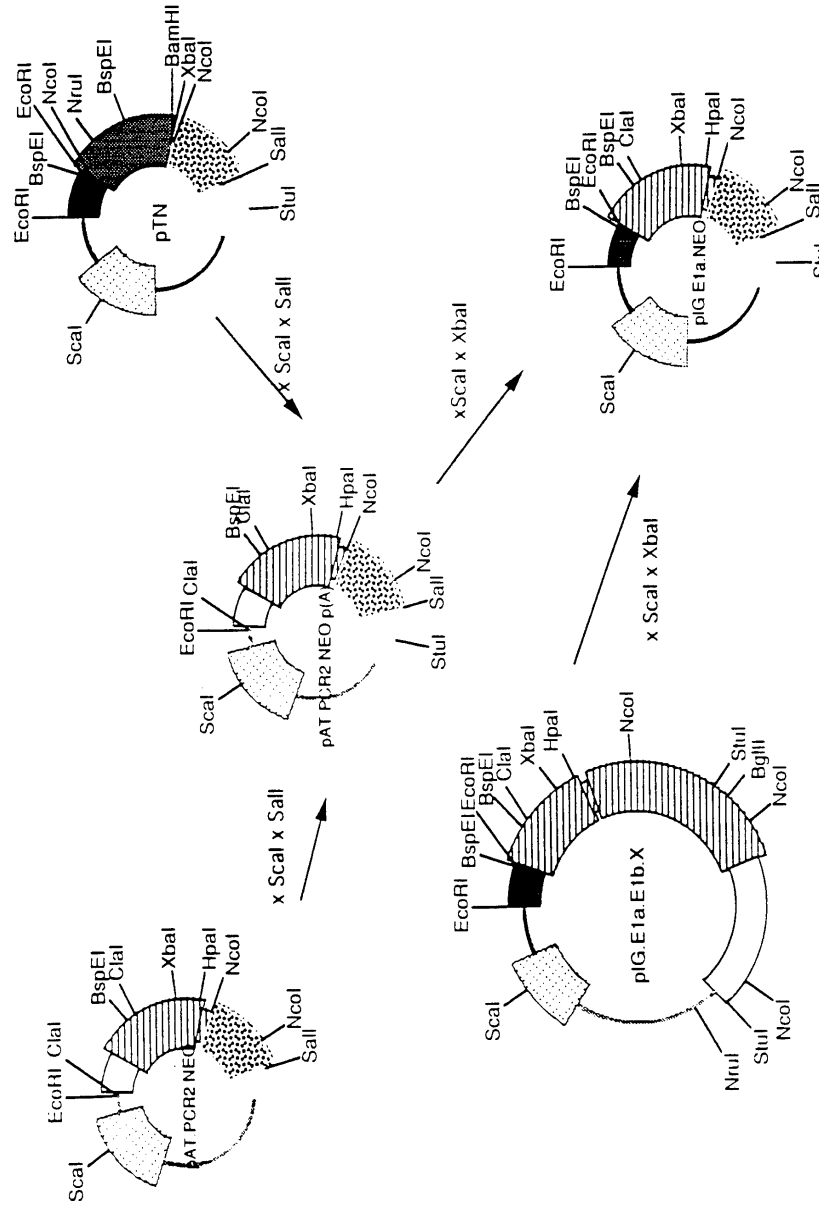
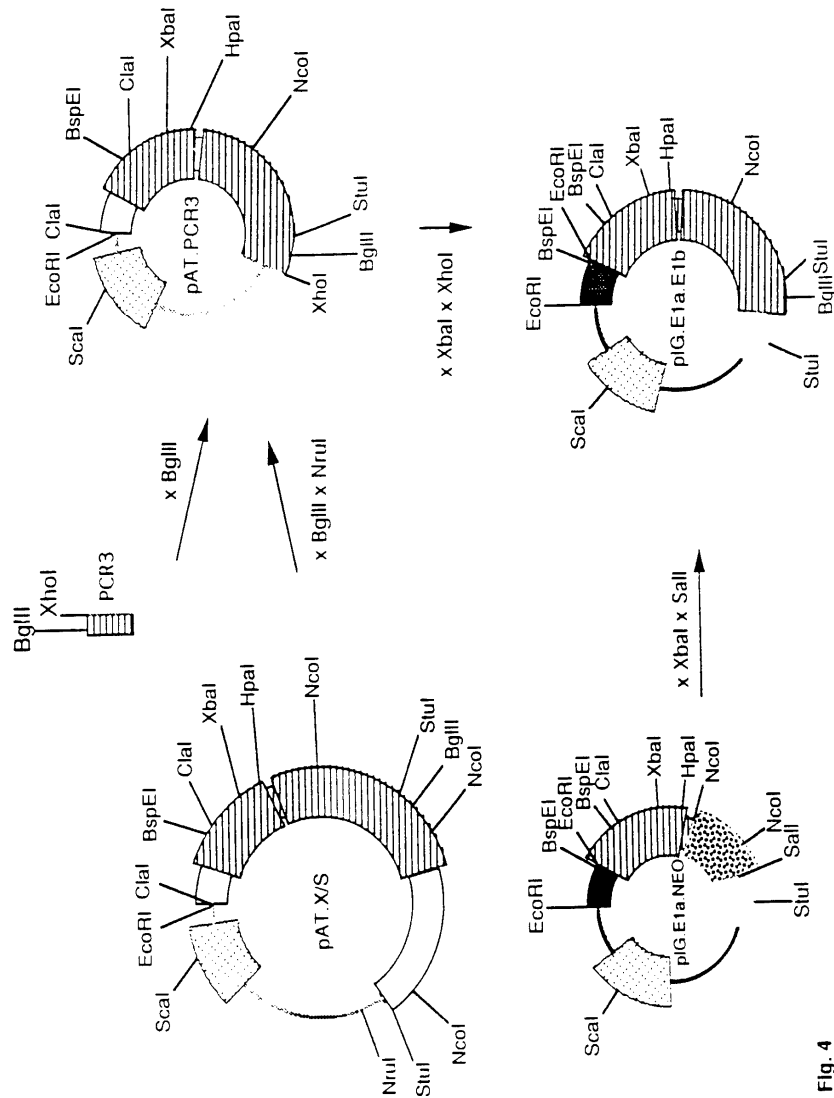
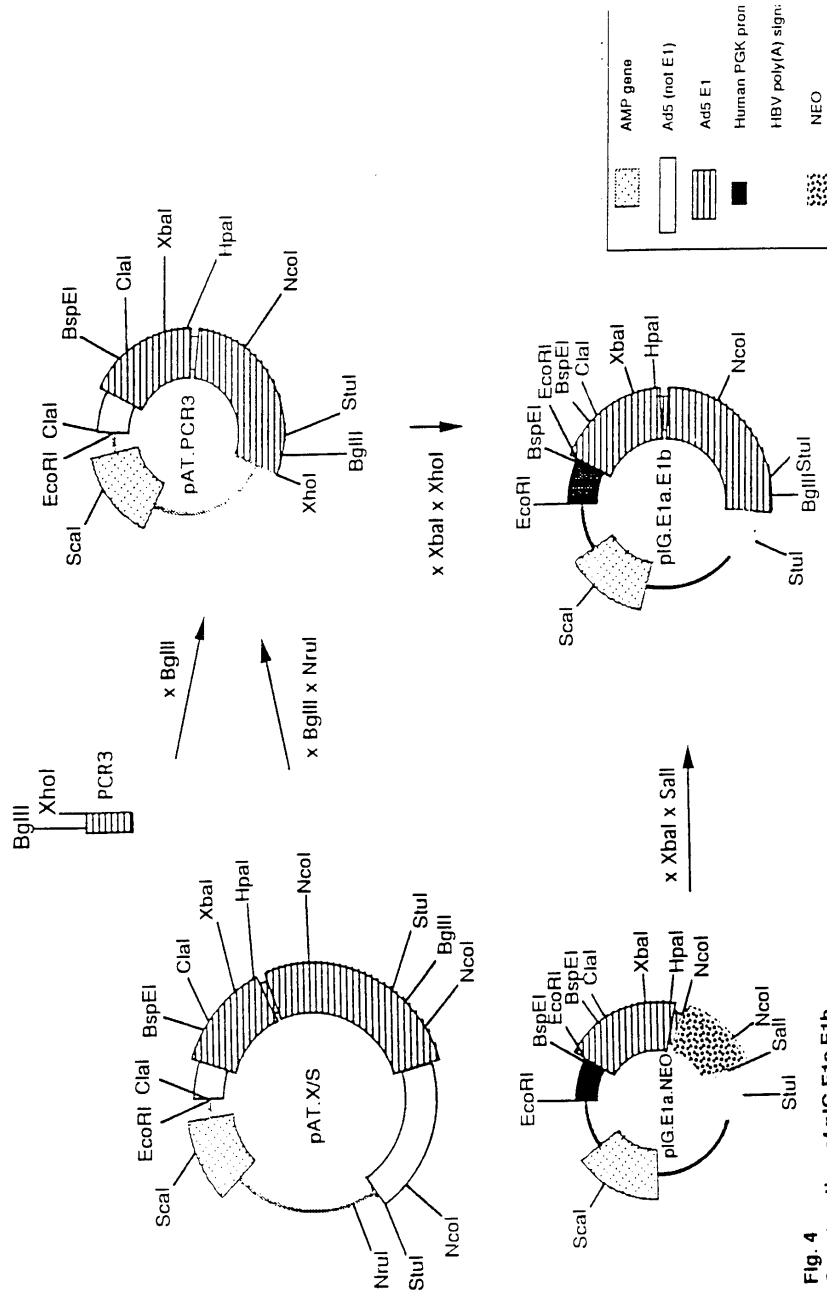


Fig. 3. Construction of pIG.E1a.NEO



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 4
Construction of plG.E1a.E1b



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Fig. 4
Construction of p(G.E1a.E1b)

7/25

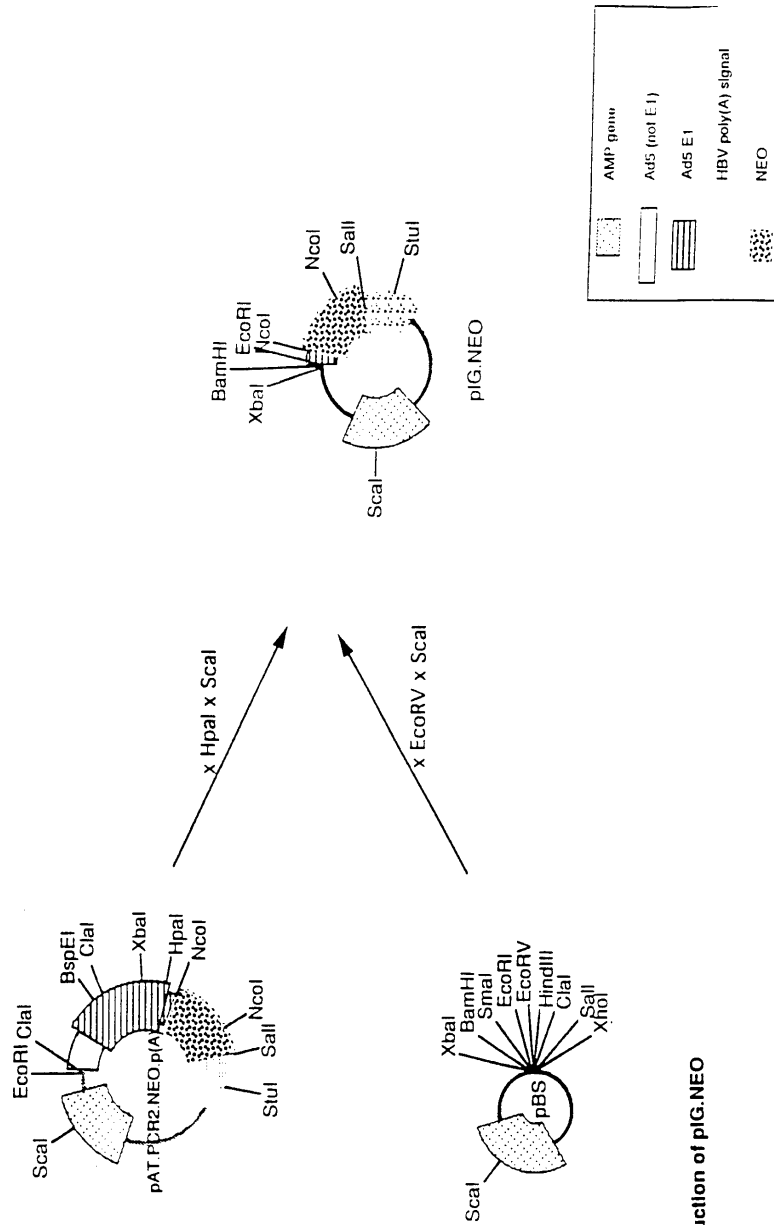


Fig. 5
Construction of pIG.NEO

8/25

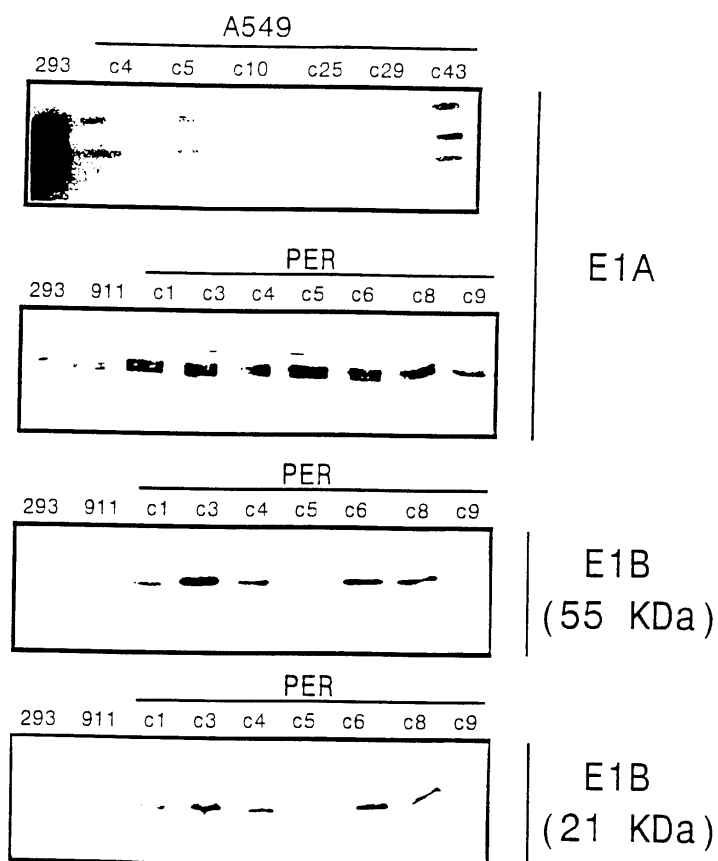


Figure 6
Overview of available adenovirus packaging constructs and assessment of their capacity to transform primary kidney cells

9/25

Figure 7

Western blotting analysis of A549 clones transfected with pIG.E1A.NEO and PER clones (HER cells transfected with pIG.E1A.E1B)

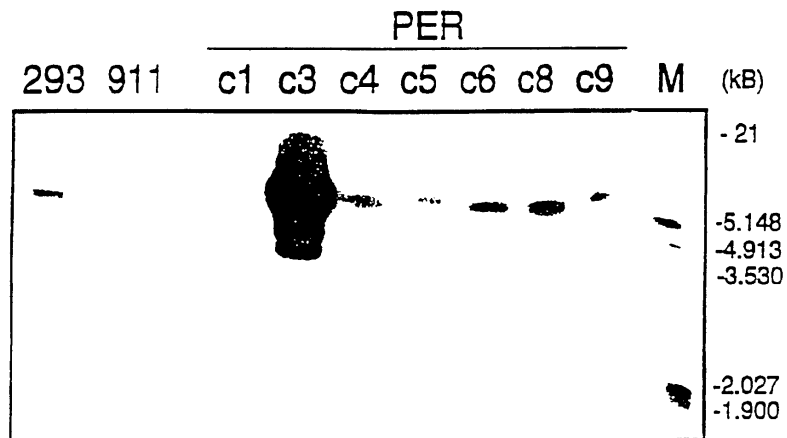


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

10/25

Figure 8

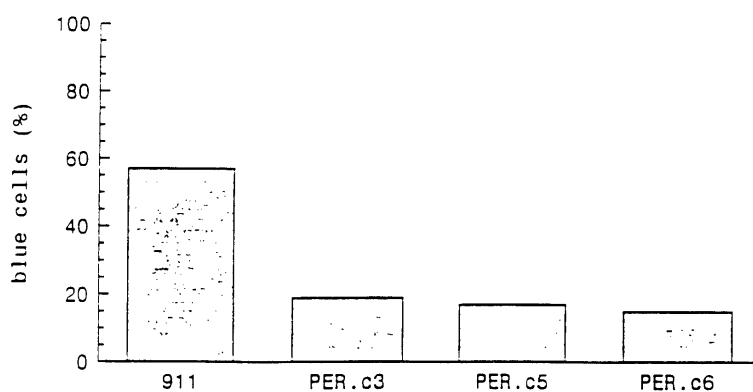
Southern blot analyses of 293, 911 and PER cell lines



11/25

Figure 9

Transfection efficiency of PER.C3, PER.C5, PER.C6 and 911 cells. Cells were cultured in 6-well plates and transfected (n=2) with 5 μ g pRSV.lacZ by calcium-phosphate co-precipitation. Forty-eight hours later the cells were stained with X-GAL. The mean percentage of blue cells is shown.



12/25

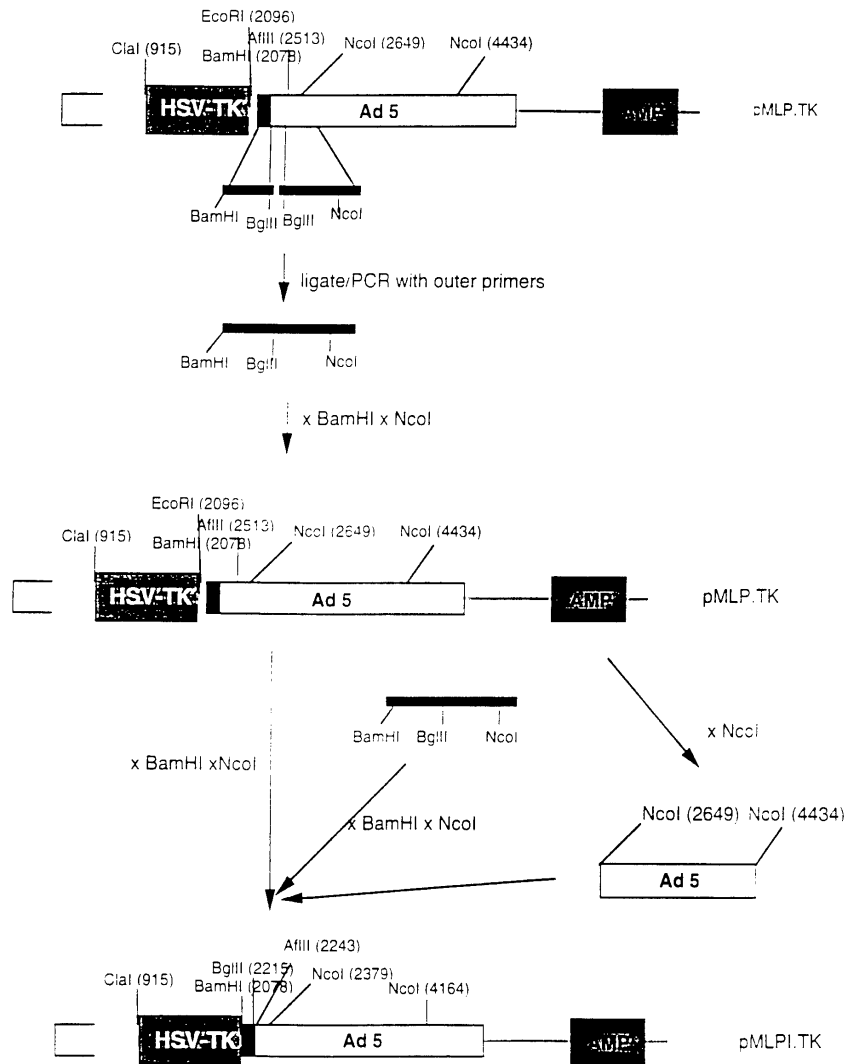


Figure 10.
Construction of pMLPI.TK from pMLP.TK

New recombinant adenoviruses and packaging constructs without sequence overlap

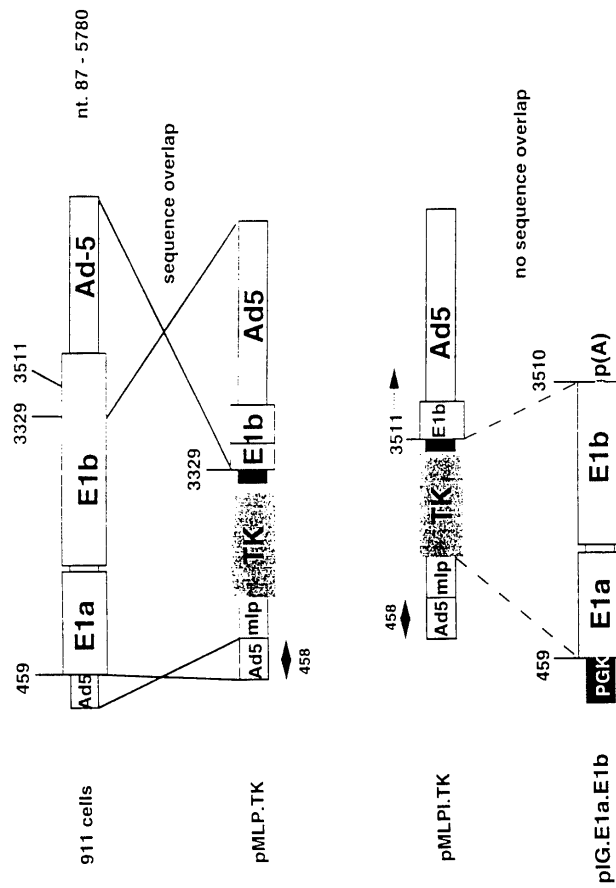


Figure 11a
Packaging system based on primary cells

New recombinant adenoviruses and packaging constructs without sequence overlap



Figure 11.b
Packaging system based on established cell lines: transfection with E1a and selection with G418

Generation of recombinant adenovirus

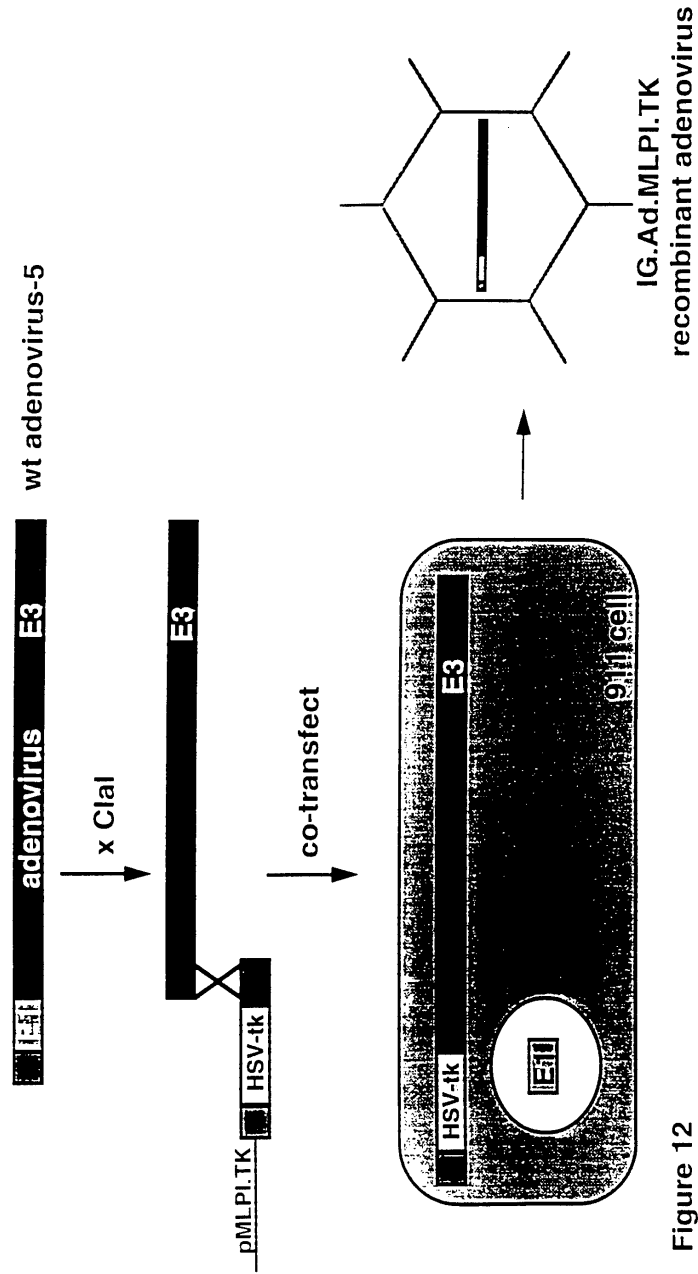


Figure 12

16/25

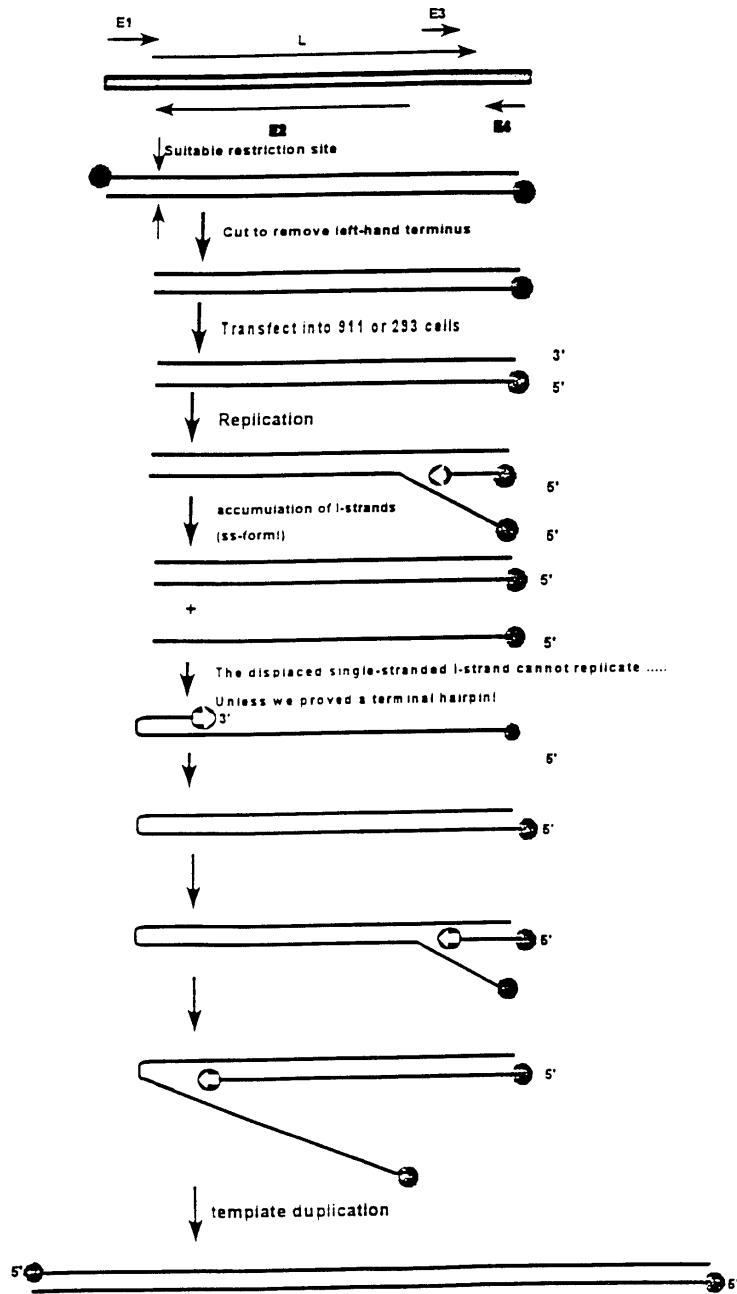


Figure 13
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

Replication of Adenovirus

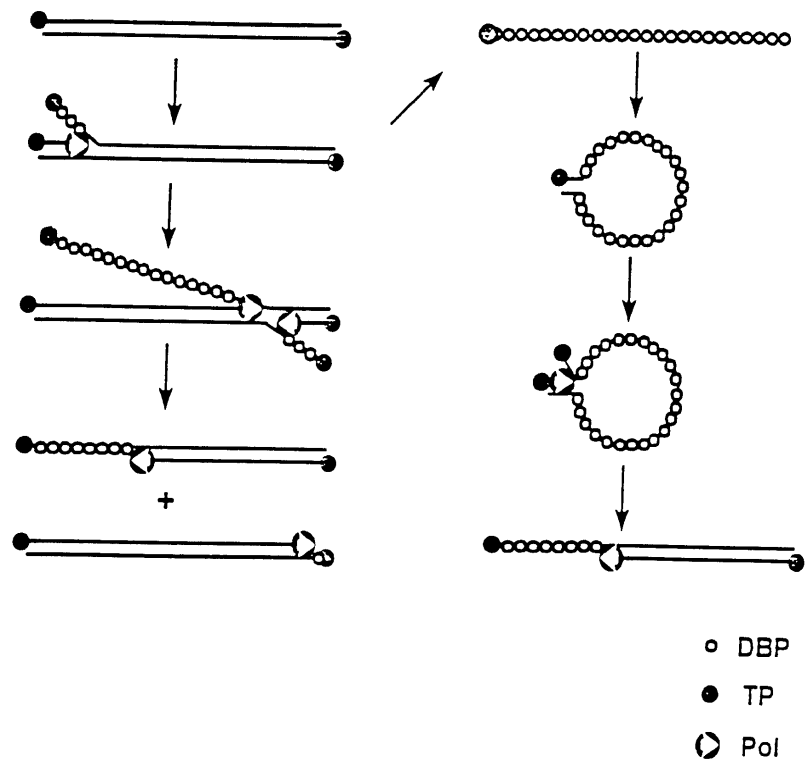


Figure 14

18/25

```
5'-GTACTGACCTAGTGCCGCGGGGCA
   ||||| A
3'-GATCACGGCGGGCCGA
```

Fig 15. The potential hairpin conformation of a single-stranded DNA molecule that contains the HP/asp sequences used in these studies. Restriction with the restriction endonuclease Asp718I of plasmid pICLha₂, containing the annealed oligonucleotide pair HP/asp1 en HP/asp2 will yield a linear double-stranded DNA fragment. In cells in which the required adenovirus genes are present, replication can initiate at the terminus that contains the ITR sequence. During the chain elongation, the one of the strands will be displaced. The terminus of the single-stranded displaced- strand molecule can adopt the conformation depicted above. In this conformation the free 3'-terminus can serve as a primer for the cellular and/or adenovirus DNA polymerase, resulting in conversion of the displaced strand in a double-stranded form.

Figure 15

19/25

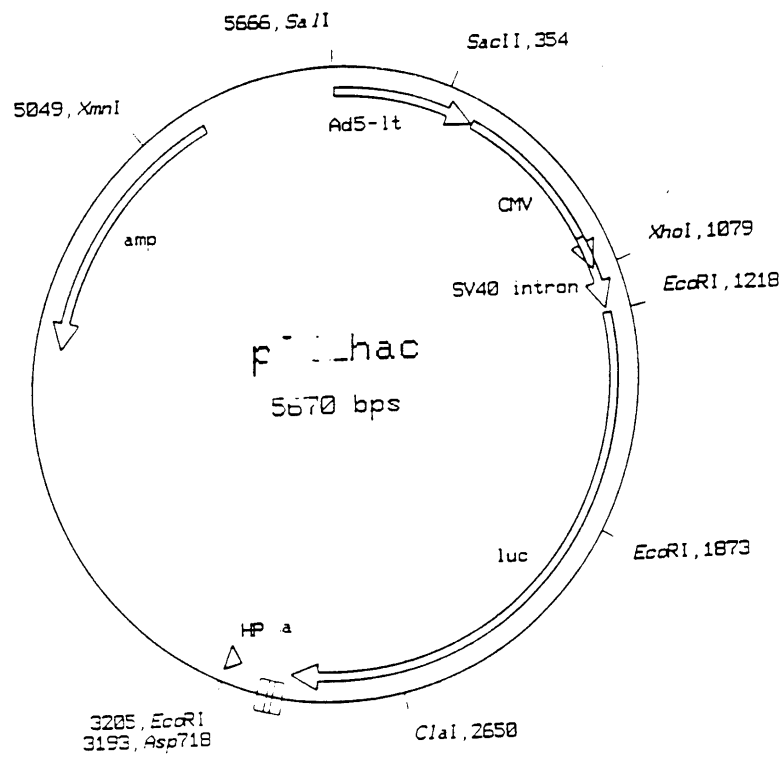


Figure 16

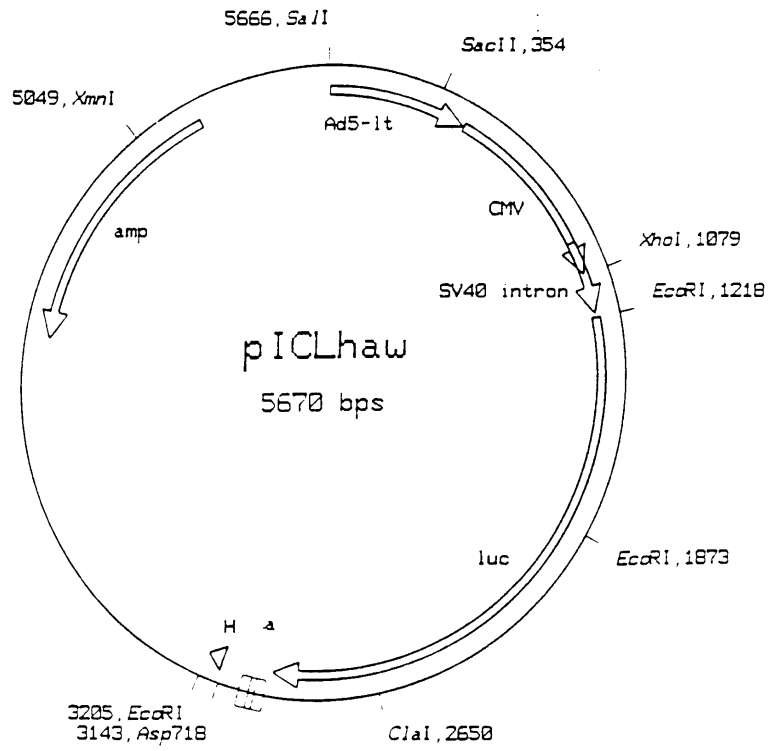


Figure 17

21/25

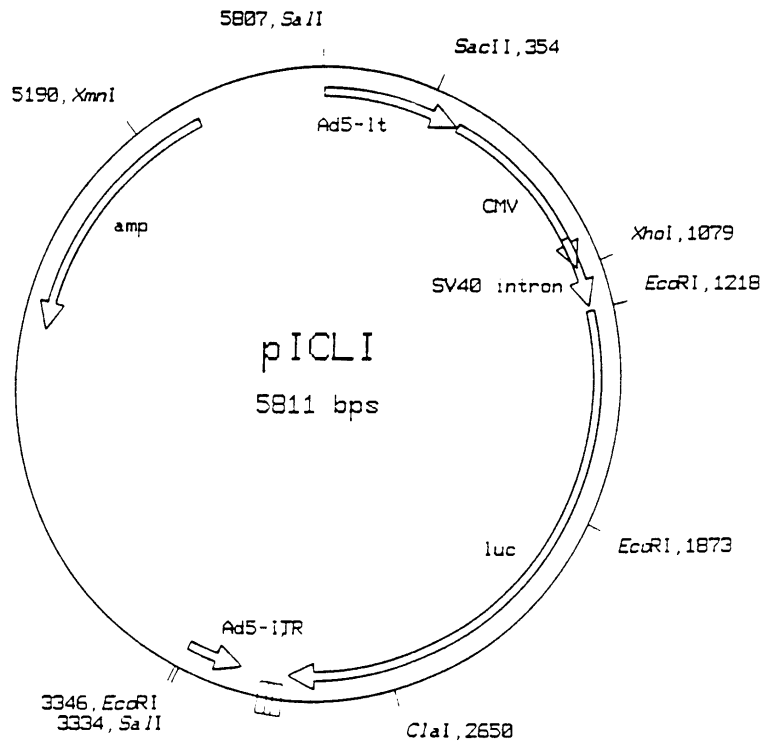


Figure 18

22/25

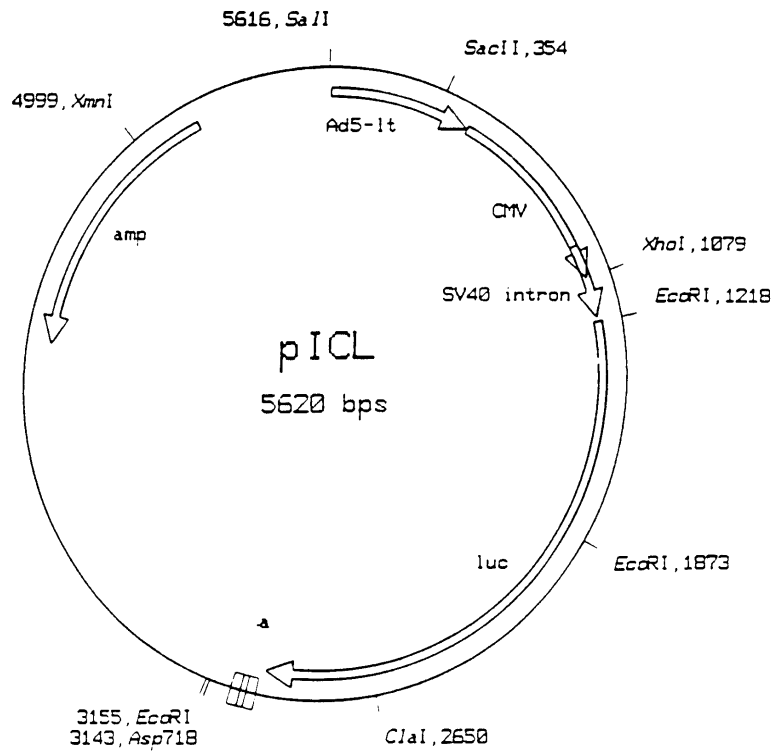


Figure 19

23/25

Plasmid pICL is derived from the following plasmids:

nt.1 - 457 pMLP10 (Levrerno et al.,)
 nt.458 - 1218 pCMV8 (Clontech, EMBL Bank no. U02451)
 nt.1219 - 3016 pMLP.luc (Introgene, unpublished)
 nt.3017 - 5620 pBLCAT5 (Stein et al., 1989)

The plasmid has been constructed as follows:

The tet gene of plasmid pMLP10 has been inactivated by deletion of the BamHI-SalI fragment, to generate pMLP10ASB. Using primer ser PCR/MLP1 and PCR/MLP3 a 210 bp fragment containing the Ad5-ITR, flanked by a synthetic SalI restriction site was amplified using pMLP10 DNA as the template. The PCR product was digested with the enzymes EcoRI and SgrAI to generate a 196 bp. fragment. Plasmid pMLP10ASB was digested with EcoRI and SgrAI to remove the ITR. This fragment was replaced by the EcoRI-SgrAI-treated PCR fragment to generate pMLP/SAL.

Plasmid pCMV-Luc was digested with PvuII to completion and recirculated to remove the SV40-derived poly-adenylation signal and Ad5 sequences with exception of the Ad5 left-terminus. In the resulting plasmid, pCMV-lucΔAd, the Ad5 ITR was replaced by the SalI-site-flanked ITR from plasmid pMLP/SAL by exchanging the XmnI-SacII fragments. The resulting plasmid, pCMV-lucΔAd/SAL, the Ad5 left terminus and the CMV-driven luciferase gene were isolated as an SalI-SmaI fragment and inserted in the SalI and HpaI digested plasmid pBLCAT5, to form plasmid pICL. Plasmid pICL is represented in figure 19

Plasmid pICL contains the following features:

nt. 1-457 Ad5 left terminus (Sequence 1-457 of human adenovirus type 5)
 nt. 458-969 Human cytomegalovirus enhancer and immediate early promoter (Bosthart et al., 1985; from plasmid pCMV8)
 nt. 970-1204SV40 19S exon and truncated 16/19S intron (from plasmid pCMV8)
 nt. 1218-2987 Firefly luciferase gene (from pMLP.luc)
 nt. 3018-3131SV40 tandem poly-adenylation signals from late transcript, derived from plasmid pBLCAT5)
 nt. 3132-5620 pUC12 backbone (derived from plasmid pBLCAT5)
 nt. 4337-5191β-lactamase gene (Amp-resistance gene, reverse orientation)

NAME: pICL 5620 BPS DNA CIRCULAR UPDATED 5/01/95

DESCRIPTION: 1 x Ad5-ITR, CMV-luciferase, minimal vector

SEQUENCE: sequence based on the on available information;

Constructions verified by restriction enzyme digests;

Sequence of regions derived from amplified DNA verified by sequence analyses

* * * S E Q U E N C E * * *

```

1  CATCATCAAT AATATACCTT ATTTTGGATT GAAGCCAATA TGATAATGAG GGGGTGGAGT
61  TTGTGACGTG GCGCGGGGCG TGGGAACGGG CCGGGTGACC TAGTAGTGTG GCGGAAGTGT
121  GATGTTGCAA GTGTGGCGGA ACACATGTAA GCGACGGATG TGGCAAAAGT GACGTTTTTG
181  GTGTGCGCGG GTGTACACAG GAAGTGACAA TTTTGGCGCG GTTTTAGCGG GATGTTGTAG
241  TAAATTTGGG CGTAACCGAG TAAGATTTGG CCATTTTCGC GGGAAAAC TG AATAAGAGGA
301  AGTGAATCTT GAATAATTTT GTGTTACTCA TAGCCCGTAA TATTTGCTA GGGCCGCGGG
361  GACTTTGACC GTTTACGTGG AGACTCGCCC AGGTGTTTTT CTCAGGTGTT TTCCCGGTTT
421  CCGGTCAAAG TTGGCGTTTT ATTAATTATG TCAGGGGCTG CAGGTCOTTA CATAACTTAC
481  GGTAAATGGC CCGCCCTGCT GACCGCCCAA CGACCCCGCC CCATTGACGT CAATAATGAC
541  GTATGTTCCC ATAGTAACGC CAATAGGGAC TTTCCATTGA CGTCAATGGG TGGAGTATTT
601  ACGGTAAACT GCCCACTTGG CAGTACATCA AGTGTATCAT ATGCCAAGTA CGCCCCCTAT
661  TGACGTCAAT GACGGTAAAT GCGCCGCGCT GCATTTATGCC CAGTACATGA CCTTATGGGA
721  CTTTCTACTT TGCCAGTACA TCTACGTATT AGTCATCGCT ATTACCATGG TGATGCGGTT
781  TTGGCAGTAC ATCAATGGGC GTGGATAGCC GTTTGACTCA CCGGGATTTT CAAGTCTCCA

```

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

841 CCCCATTGAC GTCAATGGGA GTTTGTITTTG GCACCAAAAT CAACGGGACT TTCCAAAATG
 901 TCGTAACAAC TCCGCCCCAT TGACGCCAAAT GGGCGGTAGG CGTGTACGGT GGGAGGTCTA
 961 TATAAGCAGA GCTCGTTTAG TGAACCGTCA GATCGCCTGG AGACGCCATC CACGCTGTIT
 1021 TGACCTCCAT AGAAGACACC GGGACCGATC CAGCCTCCGG ACTCTAGAGG ATCCGGTACT
 1081 CGAGGAACCTG AAAAACCAGA AAGTTAACTG GTAAGTTTAG TCTTTTGTCT TTTTATTTC A
 1141 GGTCCCGGAT CCGGTGGTGG TGCAAATCAA AGAACTGCTC CTCAGTGGAT GTTGCCTTTA
 1201 CTTCTAGTAT CAAGCTTGAA TTCCTTTGTG TTACATTCTT GAATGTCCGT CGCAGTGACA
 1261 TTAGCATTCC GGTACTGTTG GTAAAAATGA AGACGCCAAA AACATAAAGA AAGGCCCGCG
 1321 GCCATTCTAT CCTCTAGAGG ATGGAACCGC TGGAGAGCAA CTGCATAAGG CTATGAAGAG
 1381 ATACGGCTCG GTTCTCTGAA CAATTGCTTT TACAGATGCA CATATCGAGG TGAACATCAC
 1441 GTACGCGGAA TACTTCGAAA TGTCCGTTCC GTTGGCAGAA GCTATGAAAC GATATGGGCT
 1501 GAATACAAAT CACAGAATCG TCGTATGCAG TGAAACTCTT CTTCAATTCT TTATGCCGGT
 1561 GTTGGGCGCG TTAATTTATCG GAGTTGCAGT TGCGCCCGCG AACGACATTT ATAAATGAACG
 1621 TGAATTGCTC AACAGTATGA ACATTTCCGA GCCTACCGTA GTGTTTGTIT CCAAAAAGGG
 1681 GTTGCAAAAA ATTTTGAACG TGCAAAAAA ATTACCAATA ATCCAGAAAA TTATTATCAT
 1741 GGAATCTAAA ACGGATTACC AGGGATTTC A GTCCGATGTAC ACGTTCGTC CATCTCATCT
 1801 ACCTCCCGGT TTTAATGAAT ACGATTTGT ACCAGAGTCC TTTGATCTGT ACAAACAAT
 1861 TGCAGTGATA ATGAATTCCT CTGGATCTAC TGGGTTACCT AAGGGTGTGG CCTTCCGCA
 1921 TAGAAGTGGC TGGCTCAGAT TCTCCGATGC CAGAGATCCT ATTTTGGCA ATCAATCAT
 1981 TCCGATACT GCGATTTTAA GTGTTGTTC ATTCCATCAC GGTTTTGSAA TGTATTACT
 2041 ACTCGGATAT TTGATATGT GATTTGAGT CGTCTTAATG TATAGATTTG AAGAAGAGCT
 2101 GTTTTACGA TCCCTTCAGG ATTACAAAAT TCAAAGTGGC TTGCTAGTAC CAACCTTATT
 2161 TTCATTCTTC GCCAAAAGCA CTCTGATTGA CAAATACGAT TTATCTAATT TACACGAAAT
 2221 TGCTTCTGGG GCGCCACCTC TTTGAAAAGA AGTCGGGGAA GCGGTTCGAA AACGCTTCCA
 2281 TCTTCCAGGG ATACGACAAG GATATGGGCT CACTGAGACT ACATCAGCTA TTCTGATTAC
 2341 ACCCGAGGGG GATGATAAAC CGGGCGCGGT CGGTAAAGTT GTTCCATTTT TTGAAGCGAA
 2401 GGTGTGGGAT CTGGATACCG GGAACACGCT GGGCTTAAT CAGAGAGCGG AATTATGTGT
 2461 CAGAGGACCT ATGATTATGT CCGGTTATGT AAACAATCCG GAAGCGACCA ACGCCTTGAT
 2521 TGACAAGGAT GGATGGCTAC ATTCGAGAGA CATAGCTTAC TGGGACGAGG ACGAACACTT
 2581 CTTCATAGTT GACCGCTTGA AGTCTTTAAT TAAATACAAA GGATATCAGG TGCCCCCGCG
 2641 TGAATPGGAA TCGATATTGT TACAACACCC CAACATCTTC GACCGGGGCG TGGCAGGTCT
 2701 TCCCGACGAT GACCGCGGTG AACTTCCCGC CGCGGTTGTT GTTTTGGAGC ACGGAAAGAC
 2761 GATGACGGAA AAAGAGATCG TGGATTACGT CGCCAGTCAA GTAACAACCG CGAAAAGTT
 2821 GCGCGGAGGA GTTGTGTTTG TGGACGAAAT ACCGAAAGGT CTTACCGGAA AACTCGACGC
 2881 AAGAAAAATC AGAGAGATCC TCATAAAGGC CAAGAAGGGC GGAAGTCCA AATTGTAAAA
 2941 TGTAACGTGA TTCAGCGATG ACGAAATTC TAGCTATGT AATGGGGAT AATTAATGTG
 3001 TTTATTGACG CTTATAATGG TTACAAATAA AGCAATAGCA TCACAAATTT CACAAATAA
 3061 GCATTTTTTT CACTGCATTC TAGTTGTGTT TGTCCAAAC TCATCAATGT ATCTTATCAT
 3121 GTCTGGATCG GATCGATCCC CCGGTACCGA GCTCGAATTC GTAATCATGG TCATAGCTGT
 3181 TTCTGTGTG AAATGTATT CCGCTCACAA TTCCACACAA CATACGAGCC GGAAGCATAA
 3241 AGTGTAAAGC CTGGGGTCCC TAATGAGTGA GCTAACTCAC ATTAATTTGG TTGCGCTCAC
 3301 TGCCCGCTTT CCAGTCCGGA AACCTGTCTT GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACCGG
 3361 CGGGAGAGG CCGTTCGCTT ATTGGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGCTGC
 3421 GCTCGGTCGT TCGGCTCGCG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGSTA ATACGGTTAT
 3481 CCACAGAAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC AAAAGGCGCG CAAAAGGCCA
 3541 GGAACCGTAA AAAGCCCGCG TTGCTGGCGT TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCGACGAGC
 3601 ATCAGAAAAA TCGACGCTCA AGTCAGAGGT GCGGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC
 3661 AGCGGTTTCC CCTTGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCGT CCGCTTACCG
 3721 GATACCTGTC CGCCTTTCTC CCTTCCGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC TCACGCTGTA
 3781 GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTCCGT CCAAGCTGGG CTGTGTGCAC GAACCCCGCG
 3841 TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGTA ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC
 3901 ACGACTTATC GCCACTGGCA GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG
 3961 GCGGTGCTAC AGAGTTCTTG AAGTGTGGC CTAACACTCG CTACACTAGA AGGACAGTAT
 4021 TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGTT AGCTCTTGAT
 4081 CCGGCAAAAC AACCACCGCT GGTAGCGGTG GTTTTITTTG TTGCAAGCAG CAGATTACCG
 4141 GCAGAAAAAA AGGATCTCAA GAAGATCCTT TGATCTTTTC TACGGGGTCT GACGCTCAGT
 4201 GGAACGAAAA CTCACGTTAA GGGATTTTGG TCATGAGATT ATCAAAAAGG ATCTTCACCT
 4261 AGATCCTTTT AAATTAATAA TGAAGTTTTA AATCAATCTA AAGTATATAT GAGTAAACTT
 4321 GGTCTGACAG TTACCAATGC TTAATCAGTG AGGCACCTAT CTCAGCGATC TGCTATTTT
 4381 GTTCATCCAT AGTTGCCTGA CTCCCGCTCG TGTAGATAAC TACGATACCG GAGGGCTTAC
 4441 CATCTGGCCC CAGTGTGCA ATGATACCGC GAGACCCACG CTCACCGGCT CCAGATTAT
 4501 CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGCGCG AGCGCAGAAG TGGTCTGCA ACTTTATCCG
 4561 CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTTCGCGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCC CCAGTTAATA

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

4621	GTTTGCGCAA	CGTTGTTGCC	ATTGCTACAG	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	TCGTTTGSTA
4681	TGGCTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT	CAAGGCGAGT	TACATGATCC	CCCATGTTGT
4741	GCAAAAAAGC	GGTTAGCTCC	TTCGGTCCTC	CGATCGTTGT	CAGAAGTAAG	TTGGCCGCAG
4801	TGTTATCACT	CATGGTTATG	GCAGCACTGC	ATAATTCTCT	TACTGTCAATG	CCATCCGTAA
4861	GATGCTTTTC	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA	CCAAGTCATT	CTGAGAATAG	TGTATGCCGC
4921	GACCCAGTTG	CTCTTGCCCG	GCCTCAATAC	GGGATAATAC	CGCGCCACAT	AGCAGAACCT
4981	TAAAAGTGCT	CATCATTGGA	AAACGTTCTT	CGGGGCGAAA	ACTCTCAAGG	ATCTTACCCG
5041	TGTTGAGATC	CAGTTCGATG	TAACCCACTC	GTGCACCCAA	CTGATCTTCA	GCATCTTTTA
5101	CTTTCACCAG	CGTTTCTGGG	TGAGCAAAAA	CAGGAAGGCA	AAATGCCGCA	AAAAGGGGAA
5161	TAAGGGCGAC	ACGGAAATGT	TGAATACTCA	TACTCTTCCT	TTTTCAATAT	TATTGAAGCA
5221	TTTATCAGGG	TTATTGTCTC	ATGAGCCGAT	ACATATTTGA	ATGTATTTAG	AAAATAAAC
5281	AAATAGGGGT	TCCGCGCACA	TTCCCCGAA	AAGTGCCACC	TGACGTCTAA	GAAACCATTA
5341	TTATCATGAC	ATTAACCTAT	AAAAATAGGC	GTATCACGAG	GCCTATGCGG	TGTGAAATAC
5401	CGCACAGATG	CGTAAGGAGA	AAATACCGCA	TCAGGCGCCA	TTCGCCATTC	AGGCTGCCGA
5461	ACTGTTGGGA	AGGGCGATCG	GTCCGGCCCT	CTTCGCTATT	ACGCCAGCTG	GCGAAAGGGG
5521	GATGTGCTGC	AAGGCGATTA	AGTTGGGTAA	CGCCAGGGTT	TTCCCAGTCA	CGACGTTGTA
5581	AAACGACGGC	CAGTGCCAAG	CTTGCAATGCC	TGCAGGTCCA		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International Application No.
 PCT/NL 96/00244

 A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
 IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 //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 6 C12N C07K

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

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO,A,94 28152 (TRANSGENE S.A.) 8 December 1994 see page 9, last paragraph ---	1-6, 28-33
X	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, vol. 91, WASHINGTON US, pages 6196-6200, XP002012303 ENGELHARDT ET AL.: "Ablation of E2A in recombinant adenoviruses improves transgene persistence and decreases inflammatory response in mouse liver" cited in the application see page 6200, right-hand column ---	8,35-37
X	WO,A,95 02697 (RHONE-POULENC RORER) 26 January 1995 see example 4 ---	9-12, 14-24
	-/--	

 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

2 September 1996

Date of mailing of the international search report

06.09.96

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

Cupido, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/NL 96/00244

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	WO,A,95 34671 (GENVEC INC.) 21 December 1995 see figure 1 ---	1-6, 9-12, 14-24, 28-33, 35-37
P,X	WO,A,95 27071 (BOARDS OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 12 October 1995 see page 7, line 9 - page 16; claims 1-27; examples 3-7 ---	1-3, 9-12, 16-24, 28-33, 35-37
A	JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 55, pages 206-212, XP002012304 BROUGH ET AL.: "Restricted changes in the adenovirus DNA-binding protein that lead to extended host range or temperature-sensitive phenotypes" cited in the application see the whole document -----	7,25,26, 34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/NL 96/00244

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9428152	08-12-94	FR-A- 2705686	02-12-94
		AU-B- 6850394	20-12-94
		CA-A- 2141212	08-12-94
		EP-A- 0652968	17-05-95
		JP-T- 7509616	26-10-95

WO-A-9502697	26-01-95	FR-A- 2707664	20-01-95
		FR-A- 2718749	20-10-95
		AU-B- 7264694	13-02-95
		CA-A- 2144040	26-01-95
		CN-A- 1113390	13-12-95
		CZ-A- 9500639	15-11-95
		EP-A- 0667912	23-08-95
		FI-A- 951138	13-04-95
		HU-A- 72558	28-05-96
		JP-T- 8501703	27-02-96
		NO-A- 950939	10-03-95
		NZ-A- 269156	26-03-96
		PL-A- 308122	24-07-95
ZA-A- 9405012	20-02-95		

WO-A-9534671	21-12-95	AU-B- 2770495	05-01-96

WO-A-9527071	12-10-95	AU-B- 2238695	23-10-95

E.2 WO 94/28152

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE
Bureau international



DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<p>(51) Classification internationale des brevets ⁵ : C12N 15/86, 15/34, 5/10, A61K 48/00, C12N 15/12, 7/04, 15/23, A61K 39/235, C12N 15/31</p>	<p>A1</p>	<p>(11) Numéro de publication internationale: WO 94/28152 (43) Date de publication internationale: 8 décembre 1994 (08.12.94)</p>
<p>(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR94/00624 (22) Date de dépôt international: 27 mai 1994 (27.05.94) (30) Données relatives à la priorité: 93/06482 28 mai 1993 (28.05.93) FR (71) Déposant (pour tous les Etats désignés sauf US): TRANSGENE S.A. [FR/FR]; 11, rue de Molsheim, F-67000 Strasbourg (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): IMLER, Jean-Luc [FR/FR]; 5a, rue des Mineures, F-67000 Strasbourg (FR). METHALI, Majid [FR/FR]; 10, boulevard Tauler, F-67000 Strasbourg (FR). PAVIRANI, Andréa [FR/FR]; 13, avenue du Général-de-Gaulle, F-67000 Strasbourg (FR). (74) Mandataire: WARCOIN, Jacques; Cabinet Regimbeau, 26, avenue Kléber, F-75116 Paris (FR).</p>	<p>(81) Etats désignés: AU, CA, JP, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Publiée <i>Avec rapport de recherche internationale.</i></p>	

(54) Title: DEFECTIVE ADENOVIRUSES AND CORRESPONDING COMPLEMENTATION LINES

(54) Titre: ADENOVIRUS DEFECTIFS ET LIGNEES DE COMPLEMENTATION CORRESPONDANTES

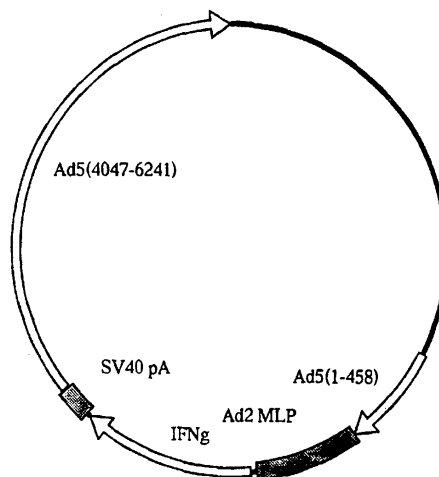
(57) Abstract

Novel defective adenoviruses for the transfer and expression of an exogenous nucleotide sequence in a host cell or organism. The invention also relates to novel complementation lines and to the process for the preparation of these novel defective adenoviruses and their use in therapy and to a pharmaceutical composition containing same.

(57) Abrégé

La présente invention a pour objet de nouveaux adénovirus défectifs pour le transfert et l'expression d'une séquence nucléotidique exogène dans une cellule ou un organisme hôte. L'invention est également relative à de nouvelles lignées de complémentation et le procédé de préparation de ces nouveaux adénovirus défectifs ainsi que leur usage thérapeutique et une composition pharmaceutique les contenant.

pTG6303



UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brésil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

5

10

ADENOVIRUS DEFECTIFS ET LIGNEES DE COMPLEMENTATION CORRESPONDANTES

15

L'invention a pour objet de nouveaux vecteurs adénoviraux défectifs permettant le transfert et l'expression de gènes d'intérêt dans une cellule ou un organisme eucaryote hôte ainsi que de nouvelles lignées de complémentation complétant *en trans* les fonctions virales essentielles qui ont été délétées du génome de ces adénovirus recombinants. L'invention présente un intérêt tout particulier pour des perspectives de thérapie génique, notamment chez l'homme.

Les adénovirus sont des virus à ADN qui présentent un large spectre d'hôte. Ils ont été mis en évidence dans de nombreuses espèces animales et de nombreux types cellulaires. Il existe plusieurs sérotypes qui diffèrent notamment au niveau de la séquence de leurs génomes. La plupart des adénovirus humains sont peu pathogènes et ne produisent généralement que des symptômes bénins.

L'adénovirus pénètre dans la cellule hôte permissive par l'intermédiaire d'un récepteur spécifique, puis il est internalisé et passe dans des endosomes. Leur acidification contribue à un changement de conformation du virus et à sa sortie dans le cytoplasme. Puis, l'ADN viral associé à certaines protéines virales nécessaires aux premières étapes du cycle répliatif, pénètre dans le noyau des cellules infectées où sa transcription est initiée par des enzymes cellulaires. La réplication de l'ADN adénoviral a lieu dans le noyau des cellules infectées et ne nécessite pas la réplication cellulaire. L'assemblage des nouveaux virions prend également place dans le noyau. Dans un premier temps, les protéines virales s'assemblent de manière à former des capsides vides de structure

icosaédrique, dans lesquelles l'ADN adénoviral est ensuite encapsidé. Les particules virales ou virions sont libérés des cellules infectées et sont susceptibles d'infecter d'autres cellules permissives.

5 Le cycle infectieux de l'adénovirus s'effectue en 2 étapes :

- la phase précoce qui précède l'initiation de la réplication du génome adénoviral et qui permet la production des protéines régulatrices intervenant au niveau de la réplication et de la transcription de l'ADN viral, et
- la phase tardive qui conduit à la synthèse des protéines structurales.

15 D'une manière générale, le génome adénoviral est constitué d'une molécule d'ADN linéaire, bicaténaire et d'environ 36kb de long qui contient les séquences codant pour plus de 30 protéines. A chacune de ses extrémités, est présente une courte séquence de 100 à 150 nucléotides selon les sérotypes, inversée et désignée ITR (Inverted Terminal Repeat). Les ITRs sont impliqués dans la réplication du génome adénoviral. La région d'encapsidation, d'environ 300 nucléotides, est située à l'extrémité 5' du génome juste après l'ITR 5'.

25 Les gènes précoces sont répartis en 4 régions qui sont dispersées dans le génome adénoviral, désignées E1 à E4 (E pour "Early" signifiant précoce en anglais). Les régions précoces comprennent au moins six unités transcriptionnelles qui possèdent leurs propres promoteurs. L'expression des gènes précoces est elle même régulée, certains gènes étant exprimés avant d'autres. Trois régions, respectivement E1, E2 et E4, sont essentielles à la replication virale. Ainsi, si un adénovirus est déficient pour l'une de ces fonctions, c'est à dire s'il ne peut pas produire au moins une protéine codée par l'une de ces régions, celle-ci devra lui être fournie *en trans*.

30 La région précoce E1 est située à l'extrémité 5' du génome adénoviral et contient 2 unités de transcription virales, respectivement E1A et E1B. Cette région code pour des protéines qui interviennent très précocement dans le cycle viral et sont essentielles à l'expression de presque tous les autres gènes de l'adénovirus. En particulier, l'unité de transcription E1A code pour une protéine trans-activatrice de la transcription des autres gènes viraux, qui induit la transcription à partir des promoteurs des régions E1B, E2A, E2B et E4.

Les produits de la région E2, laquelle comprend également deux unités de transcription E2A et E2B, sont directement impliqués dans la réplication de l'ADN viral. Cette région gouverne notamment la synthèse d'une protéine de 72kDa, qui présente une forte affinité pour l'ADN simple brin et d'une ADN polymérase.

5

La région E3 n'est pas essentielle à la réplication du virus. Elle code pour au moins six protéines qui seraient responsables de l'inhibition de la réponse immunitaire de l'hôte vis à vis d'une infection par adénovirus. En particulier, la glycoprotéine gp19kDa empêcherait la réponse CTL, responsable de la cytolyse des cellules infectées par les cellules T cytotoxiques de l'hôte.

10

La région E4 est située à l'extrémité 3' du génome adénoviral. Elle code pour de nombreux polypeptides qui sont impliqués dans l'expression des gènes tardifs, la stabilité des messagers (ARNm) tardifs, le passage de la phase précoce à la phase tardive ainsi que l'inhibition de la synthèse protéique cellulaire.

15

Une fois la réplication de l'ADN viral initiée, la transcription des gènes tardifs débute. Ceux-ci occupent la majorité du génome adénoviral et recouvrent en partie les unités de transcription des gènes précoces. Mais ils sont transcrits à partir de promoteurs différents et selon un mode d'épissage alternatif, de sorte que les mêmes séquences sont utilisées à des fins différentes. La plupart des gènes tardifs sont transcrits à partir du promoteur majeur tardif MLP (Major Late Promoter). Ce promoteur permet la synthèse d'un long transcrite primaire qui est ensuite mûri en une vingtaine d'ARN messagers (ARNm) à partir desquels sont produites les protéines capsidaires du virion. Le gène codant pour la protéine structurale IX composant la capsid est situé à l'extrémité 5' du génome adénoviral et recouvre la région E1B à son extrémité 3'. L'unité transcriptionnelle de la protéine IX utilise le même signal de terminaison de la transcription que l'unité transcriptionnelle E1B.

20

25

Un certain nombre d'adénovirus sont maintenant bien caractérisés génétiquement et biochimiquement. Tel est le cas de l'adénovirus humain de type 5 (Ad5) dont la séquence est divulguée dans la banque de données Genbank sous la référence M73260. Les différents gènes ont pu être localisés précisément sur le génome adénoviral qui comprend de 5' vers 3' l'ITR 5' de 103 bp suivi de la région d'encapsidation (Hearing et al., 1987, J. Virol., 61, 2555-2558) d'environ 300 pb, puis des régions précoces et tardives dont l'emplacement est schématiquement représenté dans la Figure 1, et enfin de l'ITR 3'.

30

35

- Il ressort de ce qui précède que les adénovirus possèdent des caractéristiques intéressantes qui font d'eux des vecteurs de choix pour le transfert de gènes d'intérêt. De nombreux adénovirus recombinants sont décrits dans la littérature (Rosenfeld et al., 1991, *Science*, 252, 431-434 ; Rosenfeld et al., 1992, *Cell*, 68, 143-155). D'une manière générale, ils dérivent de l'Ad5 et sont défectifs pour la fonction E1, afin d'éviter leur dissémination dans l'environnement et l'organisme hôte. En outre, la région E3 non-essentielle peut également être déléetée. Les séquences exogènes sont intégrées à la place de la région E1 ou E3.
- 5
- 10 Ainsi, ces adénovirus défectifs ne peuvent être propagés que dans une lignée cellulaire complétant *en trans* la fonction E1 essentielle à la réplication virale. A l'heure actuelle, la seule lignée de complémentation utilisable est la lignée de rein embryonnaire 293 (Graham et al., 1977, *J. Gen. Virol.*, 36, 59-72), qui résulte de l'intégration dans ses chromosomes, d'un fragment du génome de l'Ad5 comprenant notamment l'extrémité 5'
- 15 du génome viral ; de sorte que la lignée 293 complémente les adénovirus défectifs pour la fonction E1. Les cellules 293 contiennent des séquences qui se trouvent aussi dans l'adénovirus recombinant défectif, comme l'ITR 5', la région d'encapsidation et la partie en 3' de la région E1B comportant des séquences codant pour les protéines précoces .
- 20 La faisabilité du transfert de gènes en utilisant des adénovirus est maintenant établie. Mais, la question de leur innocuité reste posée. En effet, ils sont capables de transformer certaines lignées cellulaires en culture, ce qui reflète le pouvoir potentiellement oncogène de certains des produits d'expression du génome adénoviral, essentiellement de la région E1 et probablement E4, au moins pour certains sérotypes. De plus, la probabilité de
- 25 recombinaison génétique entre un adénovirus défectif de l'art antérieur, notamment un adénovirus recombinant, et soit un adénovirus naturel ou sauvage (issu d'une contamination accidentelle ou d'une infection opportuniste d'un organisme hôte), soit un fragment de génome adénoviral intégré dans la lignée de complémentation 293 n'est pas négligeable. En effet, il suffit d'un événement de recombinaison pour restaurer la fonction
- 30 E1 et générer un adénovirus recombinant non-défectif capable de se disséminer dans l'environnement. Il est aussi envisageable qu'un adénovirus naturel sauvage co-infectant la même cellule qu'un adénovirus défectif puisse compléter ce dernier pour la fonction E1 provoquant une co-dissémination des deux virus. Enfin, certains types de cellules eucaryotes produisent des protéines présentant une activité E1A-like également
- 35 susceptibles de compléter partiellement les adénovirus défectifs qui les infectent.

Il est donc souhaitable de disposer de vecteurs adénoviraux performants présentant le minimum de risque, en vue de leur utilisation en thérapie génique pour corriger *in vivo*

des défauts génétiques graves et traiter certaines maladies pour lesquelles on ne dispose pas d'approches thérapeutiques efficaces. C'est de leur obtention que dépend le succès de la thérapie génique appliquée à l'homme.

5 De plus, il existe des interrogations à propos de l'obtention de la lignée 293. Ces interrogations peuvent être de nature à compromettre l'acceptabilité des produits destinés à un usage humain qui en seront dérivés. Il serait utile de disposer de lignées de complémentation dont l'origine et l'histoire sont exactement connues pour produire des particules d'adénovirus recombinants destinées à un usage humain.

10

On a maintenant trouvé (1) de nouveaux vecteurs adénoviraux défectifs délétés de certaines régions spécifiques du génome adénoviral et plus adaptés au transfert d'une séquence nucléotidique exogène *in vivo* et (2) de nouvelles lignées de complémentation caractérisées, acceptables d'un point de vue pharmaceutique et donc offrant toutes les caractéristiques de sécurité requises pour la production de produits destinés à un usage

15

humain.

L'intérêt de ces nouveaux vecteurs est qu'ils présentent une capacité de clonage accrue permettant l'insertion d'un ou plusieurs gènes d'intérêt de grande taille et une sécurité

20

d'emploi maximale. Ces mutations délétères rendent ces adénovirus incapables de réplication autonome et de transformation cellulaire et ceci sans altérer leur capacité à transférer et exprimer un gène d'intérêt.

C'est pourquoi la présente invention a pour objet un vecteur adénoviral défectif pour la

25

réplication, capable d'être encapsidé dans une cellule de complémentation, qui dérive du génome d'un adénovirus comprenant de 5' en 3', un ITR 5', une région d'encapsidation, une région E1A, une région E1B, une région E2, une région E3, une région E4 et un ITR 3', par délétion :

30

(i) de tout ou partie de la région E1A, et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces ; ou

(ii) de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins une région sélectionnée parmi les régions E2 et E4 ; ou

35

(iii) de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.

Au sens de la présente invention, l'expression "délétion" ou "dépourvu" se réfère à la suppression d'au moins un nucléotide dans la région ciblée et bien entendu il peut s'agir d'une délétion continue ou discontinue. Par tout ou partie, on entend soit l'intégralité soit une partie seulement de la région considérée. On préfère les délétions qui empêche la production d'au moins un produit d'expression codé par ladite région. Elles peuvent donc se situer dans une région codante ou dans une région régulatrice comme la région promotrice et concerner au moins un nucléotide de manière à détruire le cadre de lecture d'un gène ou rendre une région promotrice non-fonctionnelle. Il peut également s'agir de délétions partielles d'un ou plusieurs gènes de ladite région ou de l'ensemble de la région.

10

Un vecteur adénoviral selon l'invention est déficient pour la replication mais capable d'être répliqué et encapsidé dans une cellule de complémentation lui fournissant *en trans* le ou les produit(s) pour lesquels il est déficient afin de générer une particule adénovirale (encore désignée adénovirus déficient) incapable de réplication autonome dans une cellule hôte mais néanmoins infectieuse car ayant la capacité de délivrer le vecteur dans une cellule hôte.

15

Selon une première variante, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion de tout ou partie de la région E1A et de la partie de la région E1B comprenant l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces. Selon un mode préféré, elle concerne le promoteur et les séquences codant pour les produits d'expression de la région E1B c'est à dire les protéines précoces et n'inclut pas tout ou partie du signal de terminaison de la transcription qui recouvre les séquences codant pour la protéine tardive IX. S'agissant d'un vecteur adénoviral selon l'invention dérivant d'un adénovirus humain de type 5, ladite délétion comprend au moins les séquences comprises entre les nucléotides 1634 et 3509 du génome adénoviral dont la séquence est telle que divulguée dans la banque de donnée Genbank sous la référence M73260. Cette délétion a pour but de réduire ou supprimer les séquences communes entre un vecteur adénoviral selon l'invention et le fragment de génome adénoviral intégré dans une lignée de complémentation, par exemple la lignée 293. De plus, elle élimine d'un vecteur adénoviral selon l'invention des séquences dont les produits d'expression sont potentiellement oncogènes, du moins en conjonction avec les produits d'expression de la région E1A.

20

25

30

35

Par ailleurs, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive en outre du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion de tout ou partie :

- de la région E3 et/ou

- de la région E2 et/ou
- de la région E4.

5 Il va de soi qu'un vecteur adénoviral selon l'invention peut comporter une des trois délétions ci-dessus énoncées ou deux d'entre elles selon n'importe quelles combinaisons ou encore l'ensemble des délétions.

10 Selon un mode particulièrement avantageux, un vecteur adénoviral selon l'invention est délété d'une partie seulement de la région E3 et préférentiellement de la partie qui ne comprend pas les séquences codant pour la protéine gp19kDa. La présence de la
séquence codant pour la protéine gp19kDa dans un vecteur adénoviral selon l'invention, permettra aux cellules infectées d'échapper à l'immunosurveillance de l'hôte ; un critère important lorsque le protocole thérapeutique nécessite plusieurs administrations répétées. On choisira, de préférence, de placer les séquences codant pour la gp19kDa sous le
15 contrôle d'éléments appropriés permettant leur expression dans la cellule hôte, à savoir les éléments nécessaires à la transcription desdites séquences en ARNm et la traduction de ce dernier en protéine. Ces éléments comprennent en particulier un promoteur. De tels promoteurs sont bien connus de l'homme de l'art et sont insérés en amont de ladite
séquence codante par les techniques conventionnelles du génie génétique. Le promoteur
20 retenu sera, de préférence, un promoteur constitutif non activable par un des produits d'expression de la région E1A. A titre d'exemples, on peut citer le promoteur du gène HMG (Hydroxy-Methyl-Glutaryl coenzyme A réductase), le promoteur précoce du virus SV40 (Simian Virus 40), le LTR (Long Terminal Repeat) du RSV (Rous Sarcoma Virus) ou le promoteur d'un gène PGK (phospho-glycerate kinase) d'eucaryote
25 supérieur.

Par ailleurs, un vecteur adénoviral selon l'invention, peut, de façon optionnelle, être délété de la partie de la région E3 correspondant à la région promotrice, laquelle sera substituée par une région promotrice hétérologue, telles l'une de celles mentionnées ci-
30 dessus.

Selon une deuxième variante, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage par délétion continue ou discontinue de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins la région E2 et/ou E4. Une telle
35 délétion permet d'accroître les possibilités de clonage de gènes d'intérêt. D'autre part, éliminer tout ou partie de la région E4 permet également de réduire ou supprimer des séquences codant pour des produits potentiellement oncogènes.

Comme précédemment, un vecteur adénoviral selon l'invention peut, en outre être dépourvu de tout ou partie des régions E1B et/ou E3 et, en particulier, selon un mode de réalisation tel que mentionné précédemment (comme la délétion de la partie de la région E1B comprenant l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces et de la

5 partie de la région E3 ne codant pas pour la protéine gp19kDa).

Enfin selon une troisième variante, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.

10

Une délétion partielle de la région d'encapsidation permet de réduire notablement la probabilité de dissémination incontrôlée d'un vecteur adénoviral selon l'invention, lorsque ce dernier est en présence d'un adénovirus sauvage. Une telle délétion permet d'affecter ses fonctions d'encapsidation de telle sorte que même en cas de complémentation *en*

15 *trans* de la fonction défective de celui-ci par un adénovirus sauvage, il ne pourra être encapsidé efficacement par rapport au génome de l'adénovirus sauvage compétiteur.

Les délétions de la région d'encapsidation sera choisies en fonction de 2 critères : une capacité réduite à être encapsidé mais simultanément une efficacité résiduelle compatible

20 avec une production industrielle. En d'autres termes, la fonction d'encapsidation d'un vecteur adénoviral selon l'invention est substantiellement maintenue quoique à un degré moindre. L'atténuation peut être déterminée par les techniques conventionnelles de titrage par infection d'une lignée adéquate et évaluation du nombre de plages de lyse. De telles techniques sont connues de l'homme de l'art. Dans le cadre de l'invention,

25 l'efficacité d'encapsidation est réduite d'un facteur 2 à 50, avantageusement 3 à 20 et de préférence 5 à 10 par rapport à un adénovirus témoin ayant une région d'encapsidation de type sauvage.

Bien entendu, un vecteur adénoviral atténué selon l'invention, peut en outre comprendre

30 au moins une ou une quelconque combinaison des délétions précédemment citées.

Un vecteur adénoviral selon la présente invention dérive du génome d'un adénovirus naturel ou sauvage, avantageusement d'un adénovirus canin, aviaire ou humain, de préférence d'un adénovirus humain de type 2, 3, 4, 5 ou 7 et, de manière tout à fait

35 préférée, d'un adénovirus humain de type 5 (Ad5). Dans ce dernier cas, les délétions du vecteur adénoviral selon l'invention sont indiquées par référence à la position des nucléotides du génome de l'Ad5 spécifiée dans la banque de donnée Genbank sous la référence M73260.

On préfère tout particulièrement un vecteur adénoviral selon l'invention dérivant du génome d'un adénovirus humain de type 5, par délétion :

- 5 (i) de l'intégralité de la partie codant pour les protéines précoces de la région E1B et s'étendant du nucléotide 1634 et se terminant au nucléotide 4047 ;
et/ou
- 10 (ii) de la région E4 s'étendant des nucléotides 32800 à 35826 ; et/ou
- (iii) de la partie de la région E3 s'étendant des nucléotides 27871 à 30748 ;
et/ou
- 15 (iv) de la partie de la région d'encapsidation :
- allant du nucléotide 270 au nucléotide 346, ou
- allant du nucléotide 184 au nucléotide 273, ou
- 20 - allant du nucléotide 287 au nucléotide 358.

De préférence, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus sauvage ou naturel par délétion d'au moins 18 % dudit génome, d'au moins 22 %, d'au moins 25 %, d'au moins 30 %, d'au moins 40 %, d'au moins 50 %, d'au moins 60 %, d'au moins 70 %, d'au moins 80 %, d'au moins 90 % ou encore d'au moins 95 % et notamment de 98,5%.

Selon un mode particulièrement préféré, un vecteur adénoviral selon l'invention dérive du génome d'un adénovirus par délétion de l'ensemble du génome adénoviral à l'exclusion des ITRs 5' et 3' et de tout ou partie de la région d'encapsidation. Selon cette variante, il ne comprend que le minimum de séquences virales afin de limiter les risques de recombinaison, les risques d'oncogénéité et avoir une capacité de clonage maximale. On parlera alors d'un vecteur adénoviral "minimum" dans lequel il sera alors possible d'insérer jusqu'à 30kb de séquence nucléotidique exogène. Un vecteur adénoviral préféré

35 selon l'invention dérive d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie du génome viral s'étendant des nucléotides 459 à 35832.

Dans le cadre de la présente invention, un vecteur adénoviral selon l'invention a pour objet le transfert et l'expression d'une séquence nucléotidique exogène dans une cellule hôte. Par "séquence nucléotidique exogène", on entend un acide nucléique qui comprend des séquences codantes et des séquences régulatrices permettant l'expression desdites séquences codantes et dans lequel les séquences codantes sont des séquences qui ne sont normalement pas présentes dans le génome d'un adénovirus. Les séquences régulatrices peuvent être d'origine quelconque. La séquence nucléotidique exogène est introduite dans un vecteur adénoviral selon l'invention par les techniques classiques du génie génétique, entre la région d'encapsidation et l'ITR 3'.

10 Une séquence nucléotidique exogène peut être constituée d'un ou plusieurs gène(s) d'intérêt et, de manière préférée, d'intérêt thérapeutique. Dans le cadre de la présente invention, un gène d'intérêt peut coder soit pour un ARN anti-sens, soit pour un ARNm qui sera ensuite traduit en protéine d'intérêt. Un gène d'intérêt peut être de type 15 génomique, de type ADN complémentaire (ADNc) ou de type mixte (minigène, dans lequel au moins un intron est délété). Il peut coder pour une protéine mature, un précurseur d'une protéine mature, notamment un précurseur destiné à être sécrété et comprenant de ce fait un peptide signal, une protéine chimérique provenant de la fusion de séquence d'origine diverse ou un mutant d'une protéine naturelle présentant des 20 propriétés biologiques améliorées ou modifiées. Un tel mutant peut être obtenu par mutation, délétion, substitution et/ou addition d'un ou plusieurs nucléotide(s) du gène codant pour la protéine naturelle.

25 Un gène d'intérêt peut être placé sous le contrôle d'éléments appropriés à son expression dans une cellule hôte. Par "éléments appropriés", on entend l'ensemble des éléments nécessaires à sa transcription en ARN (ARN anti-sens ou ARNm) et à la traduction d'un ARNm en protéine. Parmi les éléments nécessaires à la transcription, le promoteur revêt une importance particulière. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif ou d'un promoteur régulable et il peut être isolé d'un gène quelconque d'origine eucaryote ou virale et même 30 adénovirale. Alternativement, il peut s'agir du promoteur naturel du gène d'intérêt en question. D'une façon générale, un promoteur en usage dans la présente invention, peut être modifié de manière à contenir des séquences régulatrices. A titre d'exemples, un gène d'intérêt en usage dans la présente invention, est placé sous le contrôle du promoteur des gènes d'immunoglobuline lorsque l'on cherche à cibler son transfert dans 35 des cellules hôtes lymphocytaires. On peut également citer le promoteur du gène TK-HSV-1 (thymidine kinase du virus de l'herpès de type 1) ou encore le promoteur adénoviral MLP, notamment de l'adénovirus humain de type 2, permettant une expression dans un grand nombre de types cellulaires.

Parmi les gènes d'intérêt utilisables dans le cadre de la présente invention, on peut citer :

- 5 - les gènes codant pour des cytokines, comme l'interféron alpha, l'interféron gamma, les interleukines ;
- 10 - les gènes codant pour des récepteurs membranaires, comme les récepteurs reconnus par des organismes pathogènes (virus, bactéries, ou parasites), de préférence par le virus VIH (Virus de l'Immunodéficience Humain) ;
- 15 - les gènes codant pour des facteurs de coagulation, comme le facteur VIII et le facteur IX ;
- le gène codant pour la dystrophine ;
- 20 - le gène codant pour l'insuline ;
- les gènes codant pour des protéines participant directement ou indirectement aux canaux ioniques cellulaires, comme la protéine CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) ;
- 25 - les gènes codant pour des ARN anti-sens ou des protéines capables d'inhiber l'activité d'une protéine produite par un gène pathogène, présent dans le génome d'un organisme pathogène, ou par un gène cellulaire, dont l'expression est dérégulée, par exemple un oncogène ;
- 30 - les gènes codant pour une protéine inhibant une activité enzymatique, comme l' α 1- antitrypsine ou un inhibiteur d'une protéase virale ;
- 35 - les gènes codant pour des variants de protéines pathogènes qui ont été mutées de façon à altérer leur fonction biologique, comme par exemple des variants trans-dominants de la protéine TAT du virus VIH capables de compétition avec la protéine naturelle pour la liaison à la séquence cible, empêchant ainsi l'activation du VIH ;
- les gènes codant pour des épitopes antigéniques afin d'accroître l'immunité de la cellule hôte ;

- les gènes codant pour les protéines de complexe majeur d'histocompatibilité des classes I et II, ainsi que les gènes codant pour les protéines inductrices de ces gènes ;
- 5 - les gènes codant pour des enzymes cellulaires ou produites par des organismes pathogènes ; et
- les gènes suicides. On peut citer plus particulièrement le gène suicide TK-
10 HSV-1. L'enzyme TK virale présente une affinité nettement supérieure par rapport à l'enzyme TK cellulaire pour certains analogues de nucléosides (comme l'acyclovir ou le gancyclovir). Elle les convertit en molécules monophosphatées, elles-mêmes convertibles, par les enzymes cellulaires, en précurseurs de nucléotides, qui sont toxiques. Ces
15 analogues de nucléotides sont incorporables dans les molécules d'ADN en voie de synthèse, donc principalement dans l'ADN des cellules en état de réplication. Cette incorporation permet de détruire spécifiquement les cellules en division comme les cellules cancéreuses.

20 Cette liste n'est pas limitative et d'autres gènes d'intérêt peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

Par ailleurs, selon un autre mode de mise en oeuvre de l'invention, un vecteur adénoviral selon l'invention peut en outre comprendre un gène non-thérapeutique codant pour une protéine trans-activatrice de la transcription non-adénovirale. Bien entendu, on évitera le
25 ou les gène(s) de la région E1A codant pour une protéine trans-activatrice, dont l'expression risquerait de rendre l'adénovirus non-défectif. On choisira, de préférence, le gène codant pour la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Son expression permettra la propagation du vecteur dans une lignée de complémentation telle que celle décrite ci-après. Une telle lignée est plus sophistiquée et permet de pallier à d'éventuels
30 problèmes de toxicité due à la production en continue des protéines adénovirales de complémentation. Le gène codant pour une protéine trans-activatrice de la transcription peut être placé, si nécessaire, sous le contrôle d'éléments appropriés à son expression ; par exemple ceux qui permettent l'expression d'un gène d'intérêt.

35 L'invention a également trait à une particule adénovirale ainsi qu'à une cellule eucaryote hôte comprenant un vecteur adénoviral selon l'invention. Ladite cellule est avantageusement une cellule de mammifère et, de préférence, une cellule humaine et peut

comprendre ledit vecteur sous forme intégrée dans le génome ou, de préférence, sous forme non-intégrée (épisode).

5 Une particule adénovirale selon l'invention peut être préparée par passage dans toute lignée de complémentation fournissant *en trans* les fonctions pour lesquelles un vecteur adéno viral selon l'invention est déficient, par exemple la lignée 293 de l'art antérieur. Ces techniques de préparation sont connues de l'homme de l'art (Graham et Prevec, 1991, Methods in Molecular Biology, vol 7, 109-128, Ed : E.J. Murey, The Human Press Inc.). D'une manière optionnelle, une particule adéno virale selon l'invention peut être générée
10 dans une lignée de complémentation selon l'invention telle que décrite ci-après.

C'est pourquoi la présente invention concerne également une lignée de complémentation comportant un élément de complémentation, comprenant notamment une partie de la région E1 du génome d'un adénovirus à l'exclusion de l'ITR 5' ; ledit élément de
15 complémentation étant capable de compléter *en trans* un vecteur adéno viral déficient et étant intégré dans le génome de ladite lignée de complémentation ou inséré dans un vecteur d'expression.

Dans le cadre de la présente invention, le terme "lignée de complémentation" se réfère à
20 une cellule eucaryote capable de fournir *en trans* la ou les fonction(s) pour la(les)quelle(s) un vecteur adéno viral est déficient. En d'autres termes, elle est capable de produire l'une ou les protéine(s) nécessaire(s) à la replication et à l'encapsidation dudit vecteur adéno viral, protéines précoces et/ou tardives qu'il ne peut lui même produire et qui sont nécessaires à la constitution d'une particule virale. Bien entendu, ladite partie
25 peut être modifiée par mutation, délétion et/ou addition de nucléotides, du moment que ces modifications n'altèrent pas sa capacité de complémentation. Ainsi, un vecteur adéno viral déficient pour la fonction E1 devra être propagé dans une lignée de complémentation pour E1 (capable de fournir *en trans* la ou l'ensemble des protéines codées par la région E1 que le vecteur ne peut produire), un vecteur déficient pour les
30 fonctions E1 et E4 le sera dans une lignée de complémentation pour E1 et E4 (fournissant les protéines nécessaires codées par les régions E1 et E4) et, enfin, un vecteur déficient pour les fonctions E1, E2 et E4 le sera dans une lignée de complémentation pour les trois fonctions. Comme indiqué dans l'introduction, la région E3 est non essentielle, et ne nécessite pas d'être spécifiquement complétée.

35 Une lignée de complémentation selon l'invention peut être dérivée soit d'une lignée cellulaire immortalisée, capable de se diviser indéfiniment, soit d'une lignée primaire. Conformément aux buts poursuivis par la présente invention, une lignée de

complémentation selon l'invention est utile pour l'encapsidation de n'importe quel vecteur adénoviral défectif et, en particulier, d'un vecteur adénoviral défectif selon l'invention. Ainsi, lorsqu'on utilisera ci-après le terme "vecteur adénoviral défectif", il doit être entendu qu'il fait référence à un vecteur défectif quelconque, de l'art antérieur ou de la présente invention.

Par "élément de complémentation", on entend un acide nucléique comprenant au moins la partie du génome adénoviral en usage dans le cadre de la présente invention. Il peut être inséré sur un vecteur, par exemple de type plasmidique ou viral, par exemple rétroviral, adénoviral ou dérivé d'un poxvirus. On préférera néanmoins le cas où il est intégré dans le génome d'une lignée de complémentation selon l'invention. Les méthodes pour introduire un vecteur ou un acide nucléique dans une lignée cellulaire et éventuellement l'intégrer dans le génome d'une cellule constituent des techniques conventionnelles bien connues de l'homme de l'art, de même que les vecteurs utilisables à de telles fins. L'élément de complémentation peut être introduit dans une lignée de complémentation selon l'invention, de façon préalable ou concomitante à un vecteur adénoviral défectif.

Selon un mode de réalisation spécifique, une lignée de complémentation selon l'invention est destinée à compléter *en trans* un vecteur adénoviral défectif pour la fonction E1. Une telle lignée présente l'avantage de diminuer les risques de recombinaison puisque, contrairement à la lignée conventionnelle 293, elle est dépourvue de l'ITR 5' présent dans les vecteurs.

Dans le cadre de la présente invention, une lignée de complémentation selon l'invention peut comprendre tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus et :

- (i) tout ou partie d'au moins une région du génome adénoviral sélectionnée parmi les régions E1B, E2 et E4, ou
- (ii) tout ou partie d'au moins deux des régions E1B, E2 et E4 dudit génome, ou
- (iii) tout ou partie des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.

Dans le cadre de l'invention, lesdites régions peuvent être placées, si nécessaire, sous le contrôle d'éléments appropriés permettant leur expression. mais, on préfère les placer sous le contrôle de leur propre promoteur, inductible par la protéine trans-activatrice de transcription codée par la région E1A.

A titre indicatif, une lignée de complémentation selon la variante (ii) comprenant les régions E1A, E1B et E4 est destinée à la préparation d'un adénovirus déficient pour les fonctions E1 et E4 délété de tout ou partie des régions correspondantes.

5

Selon un mode avantageux, une lignée de complémentation selon l'invention, comprend notamment tout ou partie de la région E1A et l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1B.

10 Par ailleurs, selon une variante de ce mode de réalisation, une lignée de complémentation selon l'invention peut, en outre, être dépourvue de la région promotrice de la région E1A. Dans ce cas, la partie du génome adénoviral codant pour les protéines précoces de ladite région E1A sera placée sous le contrôle d'un promoteur hétérologue approprié et fonctionnel dans ladite lignée de complémentation. Il peut être isolé de n'importe quel
15 gène eucaryote ou viral. On évitera, cependant, d'avoir recours à un promoteur adénoviral d'une région précoce. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif. A titre d'exemples, on peut citer les promoteurs du virus SV40, du gène TK-HSV-1 et du gène murin PGK.

20 D'une manière alternative, le promoteur retenu peut être régulable et avantageusement, inductible par une protéine trans-activatrice de transcription non adénovirale. Il peut s'agir d'un promoteur isolé d'un gène naturellement inductible ou d'un promoteur quelconque modifié par l'addition de séquences d'activation (ou UAS, pour Upstream
25 Activating Sequence en anglais) répondant à ladite protéine trans-activatrice. De manière plus particulière, on préfère utiliser un promoteur inductible par la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* et, de préférence, un promoteur hybride constitué d'un promoteur dit "minimum" contenant uniquement les séquences d'initiation de la transcription (TATA box et site d'initiation) d'un gène quelconque (par exemple du gène TK-HSV-1 ou MLP d'Ad2), en amont duquel on a inséré au moins une séquence
30 d'activation du gène Gal10 de *Saccharomyces cerevisiae* (Webster et al., 1988, Cell, 52, 169-178). Cette dernière peut être synthétisée chimiquement ou isolée du gène Gal10, selon les techniques classiques du génie génétique. Ainsi, le promoteur hybride ne sera activé et n'induirait l'expression des gènes codés par la région E1A placés sous son contrôle, qu'en présence de la protéine Gal4. Puis, les produits d'expression de la région
35 E1A pourront à leur tour, induire l'expression des autres régions précoces E1B, E2 et/ou E4 éventuellement comprises dans une lignée de complémentation selon l'invention. Ce mode de réalisation particulier de l'invention, évite la production d'une manière constitutive (éventuellement toxique) des protéines adénovirales nécessaires à la

complémentation. Ainsi, l'induction peut être déclenchée en présence d'un vecteur adénoviral défectif selon l'invention exprimant la protéine Gal4. Cependant une telle lignée peut également être utilisée pour préparer n'importe quel vecteur adénoviral défectif, à la condition toutefois de fournir *en trans* la protéine Gal4. Les moyens de
5 fournir *en trans* une protéine sont connus de l'homme du métier.

D'une manière générale, une lignée de complémentation comprend une partie du génome d'un adénovirus qui dérive avantageusement d'un adénovirus animal, comme un adénovirus canin ou aviaire ou, de préférence, d'un adénovirus humain et, tout
10 particulièrement, du type 2 ou 5.

Une lignée de complémentation selon l'invention comprend notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant :

- 15 (i) du nucléotide 100 au nucléotide 5297 de la séquence telle que divulguée dans la banque de donnée Genbank sous la référence M73260, ou
- (ii) du nucléotide 100 au nucléotide 4034, ou
- 20 (iii) du nucléotide 505 au nucléotide 4034.

Avantageusement, la partie du génome selon (ii) est insérée en amont d'un signal de terminaison de la transcription, comme par exemple le signal de polyadénylation du virus SV40 (Simian Virus 40) ou du gène β -globine de lapin. Alors que la partie selon (iii) qui
25 ne comprend ni les séquences promotrices de la région E1A, ni le signal de terminaison de la transcription de la région E1B est placée sous le contrôle d'un promoteur approprié, notamment d'un promoteur inductible par la protéine Gal4, et d'un signal de terminaison de la transcription, par exemple celui du gène β -globine de lapin. Une telle
30 lignée de complémentation est considérée comme particulièrement sûre car dépourvue de la majorité des séquences communes avec un adénovirus défectif.

D'autre part, une lignée de complémentation selon l'invention peut comporter la partie de la région E4 d'un adénovirus humain de type 5 allant du nucléotide 32800 et se terminant
35 au nucléotide 35826 de la séquence telle que divulguée dans la banque de donnée Genbank sous la référence M73260.

Par ailleurs, une lignée de complémentation selon l'invention peut comporter l'ensemble du génome d'un adénovirus naturel, à l'exception de la région d'encapsulation et des ITRs

- 5' et 3' et, de manière tout à fait préférée, la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 allant du nucléotide 505 et se terminant au nucléotide 35826 de la séquence telle que divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence M73260. Aux fins de la présente invention, celle-ci est placée sous le contrôle d'un promoteur approprié.
- 5 On aura, de préférence, recours à un promoteur inductible par la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*. Une telle lignée permettra de compléter *en trans* l'ensemble des fonctions essentielles à la replication et l'encapsidation d'un vecteur adénoviral déficient pour les fonctions E1, E2 et E4, notamment d'un vecteur adénoviral minimum selon l'invention.
- 10 Selon un mode préféré, une lignée de complémentation selon l'invention peut comporter un élément de complémentation comprenant, en outre, un gène codant pour un marqueur de sélection permettant la détection et l'isolement des cellules le comportant. Dans le contexte de la présente invention, il peut s'agir de n'importe quel gène codant pour un
- 15 marqueur de sélection, ceux-ci étant généralement connus de l'homme de l'art, avantageusement d'un gène de résistance à un antibiotique et, de préférence, du gène codant pour la puromycine acetyl-transférase (gène pac) conférant la résistance à la puromycine.
- 20 Dans le cadre de la présente invention, le gène codant pour un marqueur de sélection peut être placé sous le contrôle des éléments appropriés permettant son expression. Il peut s'agir d'un promoteur constitutif, comme le promoteur précoce du virus SV40. Cependant, on préférera un promoteur inductible par la protéine trans-activatrice codée par la région E1A, en particulier le promoteur adénoviral E2A. Une telle combinaison
- 25 introduira une pression de sélection pour maintenir l'expression des gènes de la région E1A dans une lignée de complémentation selon l'invention. Aux fins de la présente invention, le promoteur retenu peut être modifié par délétion, mutation, substitution et/ou addition de nucléotides.
- 30 Selon un mode de réalisation tout à fait préféré, une lignée de complémentation selon l'invention est dérivée d'une lignée cellulaire acceptable d'un point de vue pharmaceutique. Par "lignée cellulaire acceptable d'un point de vue pharmaceutique", on entend une lignée cellulaire caractérisée (dont on connaît l'origine et l'histoire) et/ou ayant déjà été utilisée pour la production à grande échelle de produits destinés à un usage
- 35 humain (constitution de lots pour des essais cliniques avancés ou de lots destinés à la vente). De telles lignées sont disponibles dans des organismes tels que l'ATCC. A cet égard, on peut mentionner les lignées de rein de singe vert d'Afrique Vero, de rein de hamster doré ou syrien BHK, humaine dérivée d'un carcinome de poumon A549,

humaine pulmonaire MRC5, humaine pulmonaire W138 et d'ovaire de hamster chinois CHO.

5 D'une manière alternative, une lignée de complémentation selon l'invention peut dériver de cellules primaires et notamment de cellules de rétine prélevées d'un embryon humain.

L'invention concerne également un procédé de préparation d'une particule adénovirale selon l'invention, selon lequel :

- 10 - on introduit un vecteur adénoviral selon l'invention dans une lignée de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur, de manière à obtenir une lignée de complémentation transfectée,
- 15 - on cultive ladite lignée de complémentation selon des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule adénovirale, et
- on récupère ladite particule dans la culture cellulaire.

20 Bien entendu, la particule adénovirale peut être récupérée du surnageant de culture mais, également des cellules selon les protocoles conventionnels.

25 D'une manière préférée, un procédé selon l'invention met en oeuvre une lignée de complémentation selon l'invention.

L'invention a également pour objet l'usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral, d'une particule d'adénovirus, d'une cellule eucaryote hôte ou d'une lignée de complémentation selon l'invention.

30 La présente invention est enfin relative à une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur adénoviral, une particule d'adénovirus, une cellule eucaryote ou une cellule de complémentation selon l'invention, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

35 La composition selon l'invention, est en particulier destinée au traitement préventif ou curatif de maladies telles que :

- des maladies génétiques, comme l'hémophilie, la mucoviscidose ou la myopathie, celle de Duchène et de Becker,
- des cancers, comme ceux induits par des oncogènes ou des virus,
- 5 - des maladies rétrovirales, comme le SIDA (syndrome de l'immunodéficience acquise résultant de l'infection par le VIH), et
- des maladies virales récurrentes, comme les infections virales provoquées par le virus de l'herpès.

Une composition pharmaceutique selon l'invention peut être fabriquée de manière conventionnelle. En particulier, on associe une quantité thérapeutiquement efficace d'un agent thérapeutique ou prophylactique à un support tel qu'un diluant. Une composition
15 selon l'invention peut être administrée par aérosol ou par n'importe quelle voie conventionnelle en usage dans le domaine de l'art, en particulier par voie orale, sous-cutanée, intramusculaire, intraveineuse, intrapéritonéale intrapulmonaire ou intratrachéale. L'administration peut avoir lieu en dose unique ou répétée une ou plusieurs fois après un certain délai d'intervalle. La voie d'administration et le dosage appropriés
20 varient en fonction de divers paramètres, par exemple, de l'individu traité ou de la maladie à traiter ou encore du ou des gène(s) d'intérêt à transférer. D'une manière générale, une composition pharmaceutique selon l'invention comprend une dose d'adénovirus selon l'invention comprise entre 10^4 et 10^{14} , avantageusement 10^5 et 10^{13} et de préférence 10^6 et 10^{11} . Une composition pharmaceutique, en particulier à visée
25 prophylactique, peut comprendre en outre un adjuvant acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

L'invention s'étend également à une méthode de traitement selon laquelle on administre
30 une quantité thérapeutiquement efficace d'un vecteur adénoviral, d'une particule adénovirale, d'une cellule eucaryote ou d'une lignée de complémentation selon l'invention à un patient ayant besoin d'un tel traitement.

La présente invention est plus complètement décrite en référence aux Figures suivantes et à l'aide des exemples suivants.

35 La Figure 1 est une représentation schématique du génome de l'adénovirus humain de type 5 (représenté en unités arbitraires de 0 à 100), indiquant l'emplacement des différents gènes.

La Figure 2 est une représentation schématique du vecteur pTG6546.

La Figure 3 est une représentation schématique du vecteur pTG6581.

5

La Figure 4 est une représentation schématique du vecteur pTG6303.

La Figure 5 est une représentation schématique des vecteurs pTG1660 et pTG1661.

10 La Figure 6 est une représentation schématique des vecteurs pTG1653, pTG1654 et pTG1655.

La Figure 7 est une représentation schématique du vecteur pTG5913.

15 La Figure 8 est une représentation schématique du vecteur pTG8512.

La Figure 9 est une représentation schématique du vecteur pTG8513.

La Figure 10 est une représentation schématique du vecteur pTG8514.

20

La Figure 11 est une représentation schématique du vecteur pTG8515.

EXEMPLES

25 Les exemples suivants n'illustrent qu'un mode de réalisation de la présente invention.

Les constructions décrites ci-dessous sont réalisées selon les techniques générales de génie génétique et de clonage moléculaire, détaillées dans Maniatis et al., (1989, Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).

30 L'ensemble des étapes de clonage mettant en oeuvre des plasmides bactériens est réalisé par passage dans la souche *Escherichia coli* (*E. coli*) 5K ou BJ, alors que celles qui mettent en oeuvre des vecteurs dérivés du phage M13 sont réalisées par passage dans *E. coli* NM 522. En ce qui concerne les étapes d'amplification par PCR, on applique le protocole tel que décrit dans PCR Protocols-A guide to methods and applications, 35 (1990, édité par Innis, Gelfand, Sninsky and White, Academic Press Inc.).

D'autre part, les cellules sont transfectées selon les techniques standards bien connues de l'homme du métier. On peut citer la technique au phosphate de calcium (Maniatis et al.,

supra). Mais d'autres protocoles permettant d'introduire un acide nucléique dans une cellule peuvent également être employés, tels que la technique au DEAE dextran, l'électroporation, les méthodes basées sur les chocs osmotiques, la microinjection d'une cellule sélectionnée ou les méthodes basées sur l'emploi de liposomes.

5

Les fragments insérés dans les différentes constructions décrites ci-après, sont indiqués précisément selon leur position dans la séquence nucléotidique :

- 10 - du génome de l'Ad5 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence M73260,
- du génome de l'adénovirus de type 2 (Ad2), telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence J01949,
- 15 - du génome du virus SV40 telle que divulguée dans la banque de données Genebank sous la référence J02400.

EXEMPLE 1 : Génération d'un adénovirus "atténué" comprenant une délétion d'une partie de la région d'encapsidation.

20

1. Construction d'un vecteur "atténué" comprenant une délétion du nucléotide 184 au nucléotide 273 de la région d'encapsidation

On construit un vecteur comprenant

25

- l'ITR 5' du génome de l'Ad5 (du nucléotide 1 au nucléotide 103),
- la région d'encapsidation de l'Ad5 comprise entre les nucléotides 104 à 458 dans laquelle la portion allant du nucléotide 184 au nucléotide 273 est délétée et la thymine (T) en position 176 est modifiée en une cytosine (C) afin de créer un site de restriction *AatII*,
- 30 - une cassette d'expression d'un gène d'intérêt comprenant de 5' vers 3' le MLP de l'Ad2 (nucléotides 5779 à 6038), les sites de restriction *KpnI-XbaI-HindIII* et *BamHI*, l'ADNc humain codant pour la protéine CFTR, (la composition en acides aminés correspond à la séquence publiée par Riordan et al, 1989, Science, 245, 1066-1073 ; à l'exception d'une valine à la place de la méthionine en position 470),
- 35

les sites *PstI*, *XhoI* et *SaII* et enfin le signal de terminaison de la transcription du virus SV40 (nucléotides 2665 à 2538), et

- le fragment du génome de l'Ad5 s'étendant du nucléotide 3329 au nucléotide 6241.

5

Dans un premier temps, on clone entre les sites *EcoRI* et *EcoRV* du vecteur M13TG131 (Kieny et al., 1983, *Gene*, 26, 91-99) le fragment *EcoRI SmaI* isolé de pMLP11. Cette construction est issue de pMLP10 (Levrero et al., 1991, *Gene*, 101, 195-202) et diffère du vecteur parental par l'introduction d'un site *SmaI* au niveau du site *HindIII*. On obtient le vecteur M13TG6501. Celui-ci est soumis à une mutagenèse dirigée afin de

10 déléter les séquences comprises entre les nucléotides 184 à 273 de la région d'encapsidation. La mutagenèse dirigée est réalisée à l'aide d'un kit commercial (Amersham) selon les recommandations du fournisseur, et met en oeuvre l'oligonucléotide OTG4174 reporté dans l'identificateur de séquence n°1 (SEQ ID NO:

15 1). Le vecteur muté est désigné M13TG6502. La région d'encapsidation ainsi déléetée est réintroduite sous forme d'un fragment *EcoRI-BgIII*, le site *BgIII* étant rendu franc par traitement à l'ADN polymérase Klenow, dans le vecteur pMLP11 digéré par *EcoRI* et *SmaI*.

20

Le vecteur obtenu, pTG6500, est digéré partiellement par *PstI*, traité à l'ADN polymérase du phage T4 puis digéré par *PvuI*. On insère dans ce vecteur le fragment *PvuI-HpaI* isolé de pTG5955 (dérivé de pMLP11). Ce fragment comporte le signal de terminaison de la transcription du virus SV40 et la partie du génome de l'Ad5 s'étendant du nucléotide 3329 au nucléotide 6241. Le vecteur pTG6505 ainsi généré est digéré

25 partiellement par *SphI*, traité à l'ADN polymérase du phage T4 et reliqué, ceci afin de détruire le site *SphI* situé en 5' du polylinker. Il résulte le pTG6511, dans lequel on clone, après digestion par *BamHI* et traitement à l'ADN polymérase Klenow, l'ADNc CFTR humain sous forme d'un fragment aux extrémités franches généré par digestion *XhoI* et *AvaI* et traitement à l'ADN polymérase Klenow. On obtient pTG6525. A titre indicatif,

30 l'ADNc CFTR est isolé d'un plasmide de l'art antérieur, tel que pTG5960 (Dalemans et al., 1991, *Nature*, 354, 526-528).

2. Construction d'un vecteur "atténué" comprenant une délétion du nucléotide 270 au nucléotide 346 de la région d'encapsidation.

35

Le vecteur M13TG6501 est soumis à une mutagenèse dirigée mettant en oeuvre l'oligonucléotide OTG4173 (SEQ ID NO: 2). Puis le fragment muté est réintroduit dans pMLP11, comme indiqué précédemment, pour générer le vecteur pTG6501. Ce dernier

est digéré par *SphI*, traité à l'ADN polymérase du phage T4, puis par *PvuI*. On obtient pTG6546 (Figure 2) par clonage du fragment *PvuI-KpnI* (le site *KpnI* ayant été rendu franc) isolé de pTG6525 et comportant l'ADNc CFTR humain.

5 3. Construction d'un vecteur "atténué" comprenant une délétion du nucléotide 287 au nucléotide 358 de la région d'encapsidation.

Le vecteur M13TG6501 est soumis à une mutagenèse dirigée afin de déléter les séquences comprises entre les nucléotides 287 et 358 de la région d'encapsidation et de modifier les thymines en position 275 et 276 en guanines pour introduire un site *NcoI*. La
10 mutagenèse est réalisée à l'aide de l'oligonucléotide OTG4191 (SEQ ID NO: 3) pour donner M13TG6507. Ce dernier est clivé par *BglII*, traité à l'ADN polymérase Klenow puis digéré par *EcoRI* et on purifie le fragment correspondant muté que l'on introduit dans pMLP11 digéré par *EcoRI* et *SmaI*. On génère pTG6504, duquel on isole le
15 fragment *SphI* (site rendu franc par traitement à l'ADN polymérase du phage T4)-*PvuI* que l'on insère entre les sites *KpnI* (rendu franc par traitement à la T4 polymérase) et *PvuI* de pTG6511. On obtient pTG6513 qui est traité par *BamHI* et l'ADN polymérase Klenow avant d'insérer le fragment *AvaI* et *XhoI* de pTG5960 pour donner pTG6526.

20 4. Génération d'un adénovirus recombinant défectif et atténué.

Les adénovirus défectifs recombinants sont générés par co-transfection dans les cellules 293 de soit pTG6525, pTG6526 ou pTG6546 linéarisé par *Clal* et d'ADN génomique de l'Ad-dl324 (Thimmappaya et al., 1982, Cell, 31, 543-551) également digéré par *Clal*, de
25 manière à générer un virus recombinant par recombinaison homologue. Après 8 à 10 jours, les plages individuelles sont isolées, amplifiées dans les cellules 293 et analysées par cartographie de restriction. Des stocks viraux (AdTG6525, AdTG6526 et AdTG6546) sont constitués et leur titre déterminé selon les techniques conventionnelles.

30 Le virus AdTG6546 est placé en situation de compétition par co-infection avec l'Ad-CFTR (Rosenfeld et al., 1992, Cell, 68, 143-155) qui comporte une région d'encapsidation de type sauvage. On infecte les cellules 293 par 5 ufp (unité formant des plages) d'Ad-CFTR et 5 ufp d'AdTG6546 par cellule. On isole en parallèle l'ADN viral total par la méthode de Hirt (Gluzman et Van Doren, 1983, J. Virol., 45, 91-103) et
35 l'ADN viral encapsidé après traitement des cellules avec 0,2 % déoxydrolate puis avec 10 µg/ml de déoxyribonucléase (DNase) I, pour éliminer les ADN non protégés dans les virions. Alors que la quantité d'ADN total d'Ad-CFTR et d'AdTG6546 est identique, il y a environ 3 fois moins d'ADN d'AdTG6546 que d'ADN d'Ad-CFTR encapsidé.

On mesure le niveau d'expression de la protéine CFTR dans les extraits cellulaires de cellules 293 infectées par AdTG6546. L'analyse est effectuée par Western blot selon la technique décrite dans Dalemans et al. (1991, Nature, *supra*) en mettant en oeuvre l'anticorps monoclonal MATG1031. Mais, tout autre anticorps reconnaissant des épitopes antigéniques de la protéine CFTR peut être utilisé. On révèle un produit d'une masse moléculaire attendue d'environ 170 kDa. A titre indicatif, le niveau de production est à peu près équivalent à celui obtenu dans les extraits cellulaires infectés par le virus non atténué Ad-CFTR.

10

EXEMPLE 2 : Génération d'un adénovirus déficient déléte de la région E1A et de l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1B.

1. Obtention d'un adénovirus recombinant pour l'expression de la protéine CFTR (AdTG6581)

15

Un tel adénovirus est généré à partir d'un vecteur plasmidique pTG6581 comprenant de 5' vers 3' :

- 20 - l'ITR 5' de l'Ad5 (des nucléotides 1 à 103),
- la région d'encapsulation de l'Ad5 (des nucléotides 104 à 458),
- une séquence nucléotidique exogène comportant une cassette d'expression, laquelle
25 comprend les éléments suivants :
 - * le MLP de l'Ad2 (nucléotides 5779 à 6038), suivi des trois leaders tripartites également de l'Ad2 (nucléotides 6039-6079 ; nucléotides 7101-7175 ; nucléotides 9637-9712) ; ces leaders sont inclus afin d'augmenter l'efficacité
30 de traduction des séquences insérées en aval,
 - * un polylinker comprenant de 5' vers 3' les sites de restrictions *XbaI*, *HindIII*, *BamHI* *EcoRV*, *HpaI* et *NotI* utilisables pour le clonage d'un gène d'intérêt,
 - 35 * un gène d'intérêt, comme le gène codant pour la protéine CFTR,
 - * le signal de terminaison de la transcription isolé du virus SV40 (nucléotides 2543 à 2618),

- la portion du génome adénoviral de l'Ad5 allant des nucléotides 4047 à 6241.

5 Le fragment du génome de l'Ad5 s'étendant du nucléotide 4047 au nucléotide 4614 est amplifié par PCR à partir de l'ADN génomique d'Ad5. La réaction PCR met en oeuvre l'amorce sens OTG5021 (SEQ ID NO: 4), comprenant en son extrémité 5' un site *Bam*HI destiné à faciliter les étapes de clonage ultérieures, et l'amorce anti-sens OTG5157 (SEQ ID NO: 5.) Le fragment ainsi généré est traité à l'ADN polymérase Klenow, avant d'être cloné dans le site *Sma*I de M13mp18 (Gibco BRL), donnant lieu au M13TG6517. La
10 séquence du fragment généré par PCR est vérifiée selon la méthode enzymatique classique (Sanger et al., 1977, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74, 5463).

Par ailleurs, le fragment *Pvu*I-*Sma*I est isolé de pMLP11. Il est cloné entre les sites *Pvu*I et *Kpn*I de pTG6511 (exemple 1.1), le site *Kpn*I ayant été rendu franc par un traitement
15 à l'ADN polymérase du phage T4 selon les méthodes standards. On génère ainsi le vecteur pTG6547.

Ce dernier est digéré par les enzymes *Sal*I et *Bst*XI et ligué à deux fragments, d'une part le fragment *Bam*HI-*Bst*XI purifié de M13TG6517 et, d'autre part, le fragment *Xho*I-*Bg*III de pTG6185. Ce dernier comprend notamment le signal de terminaison de la
20 transcription du virus SV40 encadré par les sites de restriction *Xho*I et *Bg*III. Mais, tout autre plasmide comportant la même séquence de terminaison et des sites de restriction adéquates pourrait être utilisé. On obtient le vecteur pTG6555, dans lequel on insère dans le site unique *Bam*HI un adaptateur contenant deux sites de restriction générant des
25 extrémités franches, *Eco*RV et *Hpa*I. Cet adaptateur provient de la réassociation des oligonucléotides OTG5564 et OTG5565 (SEQ ID NO: 6 et 7). On obtient pTG6580. Enfin, le fragment *Sac*I-*Pst*I de pTG6525 dont les extrémités ont été rendues franches et comportant l'ADNc CFTR humain, est cloné dans le site *Eco*RV de pTG6580. On génère pTG6581 (Figure 3).

30 L'adénovirus recombinant correspondant AdTG6581 est généré par co-transfection de pTG6581 et Ad dl324 clivés par *Cla*I dans une lignée de complémentation pour la fonction E1, comme la lignée 293 ou une lignée de l'exemple 6, selon le protocole classique.

35 2. Obtention d'un adénovirus recombinant pour l'expression de l'IFN γ .

Le vecteur pTG6303 (Figure 4) est obtenu par clonage dans le site *HpaI* de pTG6580 du fragment *HpaI-SmaI* de M13TG2437. Ce dernier provient du clonage dans un vecteur M13TG130 (Kieny et al., 1983, *supra*) du gène codant pour l'interféron gamma (IFN γ) dont la séquence est telle que spécifiée dans Gray et al. (1982, *Nature*, 295, 503-508).

5 L'adénovirus recombinant AdTG6303 est obtenu selon les techniques classiques par recombinaison homologue résultant de la co-transfection de pTG6303 et de l'Ad dl324 linéarisé par *ClaI* dans une lignée de complémentation pour la fonction E1.

3. Construction d'un adénovirus délété de la région E1 et dans lequel la région E3 est placée sous le contrôle d'un promoteur constitutif.

15 Le vecteur pTG1670 est obtenu par clonage entre les sites *AatII* et *BamHI* du vecteur p polyII (Lathe et al., 1987, *Gene* 57, 193-201), d'un fragment PCR comportant le LTR3' (Long Terminal Repeat) du virus RSV (Rous Sarcoma Virus). La réaction PCR met en oeuvre le vecteur pRSV/L (De Wet et al., 1987, *Mol. Cell. Biol.* 7, 725-737) à titre de matrice et les amorces OTG5892 et OTG5893 (SEQ ID NO: 8 et 9).

20 Par ailleurs, la partie 5' de la région E3 (nucléotides 27588 à 28607) est amplifiée par PCR à partir du vecteur pTG1659 et à l'aide des amorces OTG5920 et OTG5891 (SEQ ID NO: 10 et 11). Ce dernier est construit en plusieurs étapes. Le fragment *BamHI-AvrII* (nucléotides 21562 à 28752) est obtenu de l'ADN génomique d'Ad5 puis cloné entre les mêmes sites de pTG7457 pour générer pTG1649. Le vecteur pTG7457 est un pUC19 (Gibco BRL) modifié au niveau du polylinker de manière à contenir notamment un site *AvrII*. Puis on introduit le fragment *EcoRI* (Klenow)-*AvrII* de M13TG1646 (exemple 8) dans pTG1649 clivé par *AvrII-NdeI* (Klenow), ce qui donne le vecteur pTG1651. Enfin, pTG1659 est généré par l'insertion du fragment *AvrII* (nucléotides 28752 à 35463) purifié de l'ADN génomique d'Ad5 dans pTG1651 linéarisé par *AvrII*. Le fragment PCR est intégré entre les sites *XbaI* et *BamHI* et de p poly II, pour donner pTG1671. On insère ensuite dans le site *AatII* de ce dernier, un fragment *EcoRV-AatII* obtenu de pTG1670, pour donner pTG1676.

35 Le fragment *EcoRI* de l'Ad5 correspondant aux nucléotides 27331 à 30049, est isolé à partir d'une préparation d'ADN génomique et sous-cloné dans le pBluescript-Sk+ (Stratagène) préalablement clivé par *EcoRI*. On obtient pTG1669. Celui-ci est muté (kit Amersham) par introduction d'un site *BamHI* soit en position 27867 (oligonucléotide mutagène OTG6079 ; SEQ ID NO: 12) ou en position 28249 (oligonucléotide mutagène OTG6080 ; SEQ ID NO: 13). On obtient respectivement pTG1672 et pTG1673. On isole du vecteur pTG1676, le fragment *BamHI-BsWI* comportant le LTR 3' de RSV

suivi de la partie 5' de la région E3 et on l'insère entre les sites *Bam*HI (position 27331 ou 30049) et *Bst*W (position 28390) des vecteurs obtenus à l'étape précédente pour générer pTG1977 et pTG1978. Puis le fragment *Eco*RI obtenu de chacun de ces deux vecteurs est intégré dans pTG1679, en remplacement du fragment *Eco*RI sauvage. On obtient pTG1679-E3+. A titre indicatif, le vecteur pTG1679 résulte du clonage du fragment *Bst*EII-*Kpn*I (site rendu franc par traitement à la T4 polymérase) de pTG6590 (exemple 3.1) entre les sites *Bst*EII-*Bam*HI (site rendu franc par traitement à la Klenow polymérase) de pTG6584 (exemple 3.1).

- 10 On génère une particule d'adénovirus par recombinaison homologue dans une lignée de complémentation pour la fonction E1, entre le fragment *Aat*II de pTG1679-E3+ et un vecteur adénoviral tel que l'Ad dl324 ou Ad-RSV β -gal. Ce dernier contient le gène de la β -galactosidase à la place de la région E1 (Stratford-Perricaudet et al., 1992, J. Clin. Invest., 90, 626-630).

15

EXEMPLE 3 : Construction d'un vecteur adénoviral recombinant à capacité de clonage améliorée par délétion partielle des régions E1 et E3

1. Construction de pTG6590 Δ E3

20

Le fragment portant la partie du génome de l'Ad5 comprise entre les nucléotides 27325 et 27871, est amplifié par PCR à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et à l'aide des amorces OTG6064 et OTG6065 (SEQ ID NO: 14 et 15). OTG6065 comprend à son extrémité 5' un site *Bsm*I, également présent dans la région E3 (en position 30750).

25

Le fragment amplifié est cloné dans le site *Sma*I de M13mp18, pour donner M13TG6523. Le fragment *Eco*RI-*Bsm*I est isolé de ce dernier pour être introduit dans le vecteur pTG6590 clivé par les mêmes enzymes. On obtient pTG6590 Δ 3, lequel contient la partie 3' du génome adénoviral (des nucléotides 27082 à 35935) déletée de la région E3 comprise entre les nucléotides 27872 à 30740, alors que pTG6590 est déleté d'une partie plus petite de la région E3 (position 28592 à 30470). Le vecteur pTG6590 est obtenu de la façon suivante : on génère par PCR un fragment s'étendant des nucléotides 35228 à 35935 (comportant l'ITR 3') à partir d'une préparation génomique d'Ad5 et à l'aide des amorces OTG5481 et OTG5482 (SEQ ID NO: 16 et 17). Celui-ci est, ensuite, cloné dans le site *Sma*I de M13mp18 pour donner M13TG6519. D'autre part, le vecteur pTG6584 est digéré par *Xba*I puis religué afin d'éliminer le fragment correspondant de la région E3. On obtient pTG6589, lequel est clivé par *Bam*HI, traité à la Klenow puis

35

digéré par *Bst*EII. On introduit dans le vecteur ainsi traité le fragment *Eco*RI (Klenow)-*Bst*EII purifié de M13TG6519, pour générer pTG6590.

5 A titre indicatif, le vecteur pTG6584 est un vecteur pUC19 (Gibco BRL) qui contient les séquences d'Ad5 s'étendant du site unique *Spe*I (position 27082) jusqu'au début de la région promotrice de la région E4 (position 35826). Il est obtenu par digestion de pTG1659 (exemple 2.3) par *Sa*II et *Spe*I, traité à l'ADN polymérase Klenow puis religation.

10 2. Construction d'un vecteur adénoviral délété de la région E1 et de la partie de E3 n'exprimant pas la protéine gp19kDa

15 La partie de la région E3 de l'Ad5 codant pour la gp19kDa (nucléotides 28731 à 29217) est obtenue par PCR à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et en mettant en oeuvre les amorces OTG5455 et OTG5456 (SEQ ID NO: 18 et 19). Le fragment généré est introduit dans le site *Sma*I de M13mp18 pour donner M13TG6520. On isole le fragment *Eco*RI-*Xba*I de ce dernier, que l'on clone dans le site *Aat*II de pTG1670 (exemple 2.3), les sites ayant été rendus francs par traitement à l'ADN polymérase Klenow. Puis, le fragment *Xba*I purifié du vecteur de l'étape précédente est inséré dans le site *Xba*I du vecteur pTG6590ΔE3 (exemple 3.1.).

20 3. Obtention de particules adénovirales.

25 Les particules virales recombinantes sont obtenues par ligation des fragments *Spe*I isolés de l'ADN génomique d'AdTG6303 ou AdTG6581 et de l'un ou l'autre des vecteurs des exemples 3.1 et 3.2. Puis, le mélange de ligation est transfecté dans une lignée de complémentation pour la fonction E1.

30 EXEMPLE 4 : Construction d'un adénovirus délété des régions E1 et E4.

35 On amplifie les parties du génome adénoviral s'étendant des nucléotides 31803 à 32799 et 35827 à 35935 à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et des amorces OTG5728 et OTG5729 (SEQ ID NO: 20 et 21) et OTG5730 et OTG5481 (SEQ ID NO: 22 et 16) respectivement. Après une dizaine de cycles d'amplification, la réaction est poursuivie à partir d'une aliquote des deux mélanges réactionnels en mettant en oeuvre les oligonucléotides OTG5728 et OTG5781. Le fragment amplifié s'étend des nucléotides 31803 à 35935 avec une délétion de l'intégralité de la région E4 (positions

32800 à 35826). Après digestion par *EcoRI* et *HindIII*, il est cloné entre les mêmes sites de M13mp18 pour donner M13TG6521.

5 M13TG6521 est digéré par *EcoRI*, traité à l'ADN polymérase klenow puis clivé par *BstXI*. Le fragment de 0,46 kb comportant l'ITR 3' est inséré entre le site *BamHI* rendu franc par traitement à l'ADN polymérase klenow et le site *BstXI* de pTG6584 (exemple 3.1). On obtient pTG6587, qui est digéré par *XbaI* puis reliqué sur lui-même, pour donner pTG6588 (délétion de E3).

10 On introduit dans le site *PacI* de pTG6588 un fragment d'ADN synthétique provenant de la réassociation des oligonucléotides OTG6060, OTG6061, OTG6062 et OTG6063 (SEQ ID N°: 23 à 26). Il résulte pTG8500 dans lequel les signaux de terminaison de la transcription des gènes tardifs L5 sont améliorés.

15 On génère une particule adénovirale (AdΔE4) dont le génome est délété de l'intégralité de la région E4 (nucléotides 32800 à 35826) et du fragment *XbaI* de la région E3 (nucléotides 28592 à 30470), par ligation des fragments *SpeI* isolés de pTG8500 ou pTG6588 et de l'Ad5. Le mélange de ligation est transfecté dans une lignée cellulaire de complémentation pour la fonction E4, par exemple la lignée W162 (Weinberg et Ketner,
20 1983, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80, 5383-5386). On obtient un adénovirus défectif pour les fonctions E1 et E4 (ΔE1, ΔE4) par transfection dans une lignée de complémentation pour E1 et E4 (par exemple la lignée de l'exemple 8) du mélange de ligation entre le génome de l'Ad dl324 et le plasmide pTG8500 ou pTG6588 linéarisé par *SpeI*.

25 D'autre part, on peut également procéder de la manière suivante. On clone le fragment *SpeI-ScaI* isolé de pTG1659 (exemple 2.3) dans le vecteur pTG6588 clivé par ces mêmes enzymes, pour obtenir pTG6591. Ce dernier comporte les séquences de l'Ad5 des nucléotides 21062 à 35935 mais, comme précédemment, délétées de l'intégralité de la
30 région E4 et du fragment *XbaI* de la région E3. On introduit dans le vecteur pTG6591 digéré par *PacI*, le fragment d'ADN synthétique décrit ci-dessus et on génère pTG6597. Les particules adénovirales peuvent être obtenues par recombinaison homologue entre l'ADN génomique de l'Ad dl324 clivé par *SpeI* et les plasmides pTG6591 ou pTG6597 clivé par *BamHI*.

35

EXEMPLE 5 : Construction d'un virus "minimum"

Un vecteur adénoviral dit "minimum" est constitué par clonage dans un plasmide des éléments suivants :

- 5 - l'ITR 5' de l'Ad5 (des nucléotides 1 à 103) ;
- la région d'encapsidation de l'Ad5 (des nucléotides 104 à 458) ;
- une séquence nucléotidique exogène comprenant :
 - 10 * un premier gène d'intérêt thérapeutique placé de préférence sous le contrôle de son propre promoteur afin d'obtenir une régulation de l'expression la plus proche possible de la régulation naturelle,
 - * un deuxième gène d'intérêt constitué du gène TK-HSV-1, et
 - 15 * de manière facultative, des séquences nucléotidiques quelconques ajoutées pour des raisons d'efficacité de replication ou d'encapsidation de manière à ce que la taille totale du génome à encapsider soit comprise entre 30 et 36kb ;
 - 20 * les séquences codant pour la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae* (Laughon et Gesteland, 1984, Mol. Cell. Biol., 4, 260-267) placées sous le contrôle d'un promoteur fonctionnel dans une cellule eucaryote supérieure ;
et
- 25 - l'ITR 3' de l'Ad5 (des nucléotides 35833 à 35935).

L'assemblage de ces différents éléments est réalisé selon les techniques standards de biologie moléculaire. L'obtention de virions infectieux comprenant un tel vecteur se fait comme décrit précédemment dans une lignée de complémentation de l'exemple 7.

30

EXEMPLE 6 : Constitution d'une cellule de complémentation capable de compléter en trans la fonction E1.

- 35 1. Constitution d'une cellule de complémentation comprenant la région E1 des nucléotides 100 à 5297 (pTG6533)

Celle-ci comporte :

- 5 - une cassette d'expression du gène *pac*, lequel est placé sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40 (nucléotides 5171 à 5243) et comprend en 3' le signal de terminaison de la transcription de SV40 (nucléotides 2543 à 2618). Le gène *pac* utilisé correspond à un fragment allant du nucléotide 252 au nucléotide 905 de la séquence divulguée par Lacalle et al. (1989, *Gene*, 79, 375-380) et comportant 4 mutations par rapport à la séquence publiée (C en position 305 remplacé par A ; C en position 367 remplacé par T ; insertion d'un G en position 804 ; délétion d'un G en position 820),
- 10 - un fragment du génome de l'Ad5 allant des nucléotides 100 à 5297. Ce fragment comprend les régions E1A et E1B munies de leur propre promoteur et de leur signal de terminaison de la transcription ainsi qu'une fraction de la région E2, recouvrant ainsi les séquences codant pour la protéine IX - A titre indicatif, il semble que la lignée 293 ne soit pas capable de produire une protéine IX
- 15 fonctionnelle.

La construction est réalisée en plusieurs étapes détaillées ci-après. Le vecteur p polyIII-I* (Lathe et al., 1987, *Gene*, 57, 193-201) est soumis à une digestion par les enzymes *AccI* et *EcoRI*. On clone dans le vecteur ainsi traité le fragment *EcoRI-ClaI* isolé du plasmide pTG6164. On obtient le vecteur pTG6528.

20

Le plasmide pTG6164 est issu de pLXSN (Miller D, 1989, *Bio/Techniques*, 7, 980) et comprend le gène *pac* placé sous le contrôle du promoteur précoce du virus SV40. Brièvement, le fragment *HindIII-KpnI* de pLXSN est introduit dans M13TG131 pour

25 produire M13TG4194. On insère dans ce dernier, digéré par *NheI* et *KpnI*, le fragment *NheI-KpnI* de pMPSV H2 K IL2R (Takeda et al., 1988, *Growth Factors*, 1, 59-66) pour produire M13TG4196. Celui-ci est digéré par *HindIII-KpnI* et on clone le fragment issu d'une digestion *HindIII* et d'une digestion partielle *KpnI* et purifié de pLXSN. On obtient pTG5192. Ce dernier est digéré par *HindIII* et partiellement par *NheI* et on introduit le

30 fragment *HindIII-NheI* de pBabe Puro (Land et al., 1990, *Nucleic Acids Res.*, 18, 3587), donnant lieu à pTG6164.

Le vecteur pTG6528 est digéré par *PstI* et on introduit au niveau de ce site le fragment *PstI* isolé de pTG6185 (exemple 2.1) comportant le signal de terminaison de la

35 transcription de SV40. On obtient pTG6529. Ce dernier est soumis à une digestion *EcoRI-HpaI* et ligé à deux fragments, d'une part un fragment *BspEI-BcgI* (positions 826 à 5297) purifié de l'ADN génomique d'Ad5 et d'autre part un fragment généré par PCR aux extrémités *EcoRI* et *BspEI*, pour donner pTG6531. Le fragment PCR est

général, on procède de la façon suivante : les cellules sont infectées à une multiplicité d'infection) de 10. Environ 48 heures après l'infection, l'effet cytopathique étant visible, on lyse les cellules et on dose l'activité β -galactosidase selon le protocole

5

Le vecteur pTG6531 comprend les 2 unités de transcription (celle de la région E1 et celle du gène pac) dans la même orientation. Pour éviter des interférences au niveau de la transcription, on les place dans une orientation tête bêche (réverse l'une par rapport à l'autre) en traitant le pTG6531 par *Bam*HI et en religant. Le vecteur pTG6533 correspond à un clone présentant l'orientation reverse des deux unités.

10

Le vecteur pTG6533 est transfecté dans une lignée cellulaire mammifère, par exemple la lignée Vero (ATCC, CCL81) ou A549 (ATCC, CCL185) par la technique au phosphate de calcium. Les cellules transfectées sont cultivées selon les recommandations du fournisseur et sont placées 24 heures après la transfection en milieu sélectif contenant de la puromycine (concentration 6 μ g/ml). On sélectionne les clones résistants sur lesquels on évalue l'expression des gènes de la région E1 afin de déterminer le clone le plus producteur, qui pourra être utilisé à titre de lignée de complémentation pour la préparation d'un adénovirus défectif pour la fonction E1, tel que celui détaillé dans l'exemple 2.

15

20

On analyse l'expression des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1 par Northern blot en utilisant des sondes appropriées marquées à l'isotope 32 P. La production des protéines codées par la région E1A est détectée par immunoprécipitation après marquage des cellules à l'isotope 35 S et à l'aide d'un anticorps commercial (Oncogène Science Inc., référence DP11).

25

On peut également vérifier la capacité des produits d'expression de la région E1A à activer le promoteur de la région E1B (par analyse des ARNm E1B par Northern blot) ou à activer le promoteur de la région E2 (par dosage de l'activité enzymatique après transfection transitoire d'un plasmide "reporteur" comprenant le gène CAT (Chloramphénicol Acétyl Transférase) placé sous le contrôle du promoteur E2).

30

Enfin, on peut infecter ces cellules par l'Ad-RSV- β gal (Stratford-Perricaudet et al., 1992, *supra*) et titrer le virus par la technique agar dès qu'on observe un effet cytopathique. En général, on procède de la façon suivante : les cellules sont infectées à une multiplicité d'infection) de 10. Environ 48 heures après l'infection, l'effet cytopathique étant visible, on lyse les cellules et on dose l'activité β -galactosidase selon le protocole

35

conventionnel (voir par exemple Maniatis et al., 1989, *supra*). Les clones positifs sont réinfectés à une moi plus faible. 48 heures après l'infection, on récolte le surnageant et les cellules selon les techniques classiques. On détermine le titre viral par la méthode sous agar en utilisant des cellules 293. Le rapport du titre obtenu sur le titre de départ

5 constitue le facteur d'amplification.

2. Construction d'une lignée de complémentation comprenant la région E1 des nucléotides 505 à 4034 (pTG6557, pTG6558, pTG6559, pTG6564 et pTG6565)

10 Les vecteurs pTG6557, pTG6558 et pTG6559 comprennent :

(i) une cassette d'expression du gène pac (nucléotides 252 à 905 comme précédemment) sous le contrôle :

- 15 - du promoteur E2A de l'Ad2 (nucléotides 27341 à 27030) (dans pTG6558),
- 20 - du promoteur E2A de l'Ad2 délété des séquences comprises entre les nucléotides 27163 à 27182 (pour pTG6557). Une telle mutation permet de diminuer le niveau de base du promoteur E2A, sans affecter l'inductibilité par la protéine trans-activatrice codée par E1A, ou
- du promoteur précoce SV40 pour pTG6559.

25 Dans les trois cas, elle comporte également en 3' le signal de terminaison de la transcription du virus SV40 (nucléotides 2543 à 2618) ; et

(ii) une cassette d'expression comportant la partie de la région E1 de l'Ad5 allant des nucléotides 505 à 4034. Cette portion du génome adénoviral contient l'intégralité des séquences codant pour les protéines précoces de la région E1A, le signal de terminaison de la transcription de l'unité E1A, le promoteur E1B (inductible par la protéine trans-activatrice codée par E1A) et l'intégralité des séquences codantes de la région E1B. Elle inclut également les séquences codant pour la protéine IX, qui chevauchent la région E1B. Cependant, elle est dépourvue du promoteur de la région E1A et du signal de terminaison de la transcription des unités transcriptionnelles E1B et IX. Afin de permettre l'expression des séquences de la région E1, on introduit en 5' du fragment adénoviral, le promoteur du gène murin PGK et en 3' le signal de terminaison de la transcription du gène β -globine de lapin

30

35

(nucléotides 1542 à 2064 de la séquence divulguée dans la banque de donnée Genebank sous la référence K03256).

5 De manière facultative, on peut également introduire des séquences nucléotidiques quelconques, par exemple isolées de pBR322 (Bolivar et al., 1977, *Gène*, 2, 95-113), entre les cassettes d'expression du gène *pac* et de la région E1 ; afin d'éviter d'éventuelles interférences transcriptionnelles.

La construction de ces vecteurs s'effectue en plusieurs étapes reportées ci-dessous.

10

En premier lieu, on amplifie par PCR, la partie du génome de l'Ad5 allant du nucléotide 505 au nucléotide 826 à partir d'une préparation génomique et des amorces OTG5013 qui comprend en 5' un site *PstI* utile pour les étapes de clonage ultérieures (SEQ ID NO: 29) et OTG4565 chevauchant le site *BspE1* (SEQ ID NO: 28). Le fragment généré par
15 PCR, est traité à l'ADN polymérase Klenow puis introduit dans le site *SmaI* de M13mp18 donnant lieu à M13TG6512. La séquence du fragment PCR est vérifiée.

20 Le vecteur pTG6533 (exemple 6.1) est digéré par les enzymes *EcoRI* et *BspE1*. On lie le vecteur ainsi traité avec, d'une part, le fragment *PstI-BspE1* isolé de M13TG6512 et, d'autre part, le fragment *EcoRI-PstI* isolé de pKJ-1. Ce dernier comprend la portion du promoteur du gène murin PGK, située entre les nucléotides -524 et -19, dont la séquence est reportée dans Adra et al. (1987, *Gene*, 60, 65-74). Cette étape donne lieu au pTG6552 et permet d'insérer le promoteur du gène murin PGK en amont de la région E1 de l'Ad5 débutant au nucléotide 505.

25

Par ailleurs, le fragment *XhoI-BamHI*, dont l'extrémité générée par *XhoI* est rendue franche suite au traitement par l'ADN polymérase Klenow, est purifié de pBCMG Neo (Karasuyama et al., 1989, *J. Exp. Med.*, 169, 13-25). Ce fragment, qui comprend le signal de terminaison de la transcription du gène β -globine de lapin, est introduit entre les
30 sites *SmaI* et *BamHI* du vecteur p polyII-Sfi/Not-14* (Lathe et al., 1987, *Gene*, 57, 193-201). Le vecteur pTG6551 qui résulte, est quant à lui digéré par les enzymes *SphI* et *EcoRV* afin d'y insérer un fragment du génome de l'Ad5 allant du nucléotide 3665 au nucléotide 4034. Ce fragment est généré par PCR selon le protocole standard. On utilise une préparation d'ADN génomique d'Ad5 à titre de matrice et les amorces OTG5015 qui recouvre le site interne *SphI* en position 3665 (SEQ ID NO: 30) et OTG 5014
35 comprenant en 5' un site *BglII* (SEQ ID NO: 31).

Le fragment PCR est traité par l'ADN polymérase Klenow avant d'être cloné dans le site *SmaI* de M13mp18, générant M13TG6516. Après vérification de sa séquence, le fragment PCR est ressorti par digestion par *BglIII*, traitement à l'ADN polymérase Klenow et digestion par *SphI*. Il est inséré entre les sites *SphI* et *EcoRV* de pTG6551. Il en résulte pTG6554.

D'autre part, le vecteur pTG6529 (exemple 6.1) est soumis à une digestion par les enzymes *HpaI* et *HindIII*. On purifie le fragment de 2,9 kb comportant le gène pac suivi du signal de terminaison de la transcription du virus SV40. Celui-ci est ligé au fragment *SmaI-HindIII* isolé de pE2 Lac (Boeuf et al., 1990, *Oncogene*, 5, 691-699) qui porte le promoteur E2A de l'Ad2. On obtient le vecteur pTG6556. De manière alternative, il peut être ligé au fragment *SmaI-HindIII* isolé de pE2 Lac D9170 (Zajchowski et al., 1985, *EMBO J.*, 4, 1293-1300) qui porte le promoteur E2A muté de l'Ad2. On obtient, dans ce cas, pTG6550.

pTG6556 est digéré par les enzymes *EcoRI* et *BamHI*. On insère entre ces sites, le fragment *EcoRI-SacII* isolé de pTG6552 et le fragment *SacII-BamHI* isolé de pTG6554. On obtient le vecteur pTG6558. La même étape réalisée sur pTG6550 et pTG1643 (exemple 7.1) génère pTG6557 et pTG6559 respectivement.

pTG6557 et pTG6558 sont digérés par *EcoRV*, site unique situé entre les deux cassettes d'expression (gène pac et région E1). On clone dans ce site, un fragment *EcoRV-PvuII* de 1,88kb isolé de pBR322 (Bolivar et al., *supra*), afin d'éloigner les deux promoteurs. On génère respectivement pTG6564 et pTG6565.

Les vecteurs pTG6557, pTG6558, pTG6559, pTG6564 et pTG6565 sont transfectés dans la lignée cellulaire A549. Comme précédemment, on sélectionne les clones résistant à la puromycine et on vérifie l'expression de la région E1. Les clones exprimant E1 sont destinés à amplifier et propager des adénovirus défectifs pour la fonction E1. La production des produits d'expression de E1 s'accompagne d'un effet cytotoxique mais l'analyse par Southern ne permet pas de mettre en évidence des réarrangements de vecteurs. Après infection par l'Ad-RSV - β gal, plusieurs clones sont capables d'amplifier le virus d'un facteur supérieur à 100.

3. Construction d'une cellule de complémentation inductible par la protéine Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.

Ces vecteurs comprennent comme précédemment la partie de la région E1 de l'Ad5 allant du nucléotide 505 à 4034. Cependant l'expression des séquences de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible constituée d'une part du promoteur minimal MLP d'Ad2 (TATA box et signal d'initiation de la transcription ; nucléotides -34 à +33) et d'autre part d'une séquence d'activation du gène Gal 10 activable par la protéine Gal4. La séquence consensus d'activation de 17 nucléotides (17MX), qui correspond au site de fixation de Gal4 est spécifiée dans Webster et al. (1988, Cell, 52, 169). Le signal de terminaison de la transcription du gène de la β -globine de lapin est placé en 3' de l'unité transcriptionnelle E1B.

10

On synthétise un premier fragment d'ADN comprenant un dimère de la séquence 17MX (SEQ ID NO: 32 et 33) suivi du promoteur minimal MLP d'Ad2 et muni en son extrémité 5' d'un site *SalI* et en son extrémité 3' d'un site *BamHI*. Le site *SalI* est rendu franc par traitement à l'ADN polymérase klenow. Par ailleurs, on synthétise un second fragment d'ADN comprenant un pentamère de la séquence suivi du même promoteur et muni en 5' et 3' des sites *XbaI* et *BamHI*. Après digestion par *XbaI*, l'extrémité est rendue franche par traitement à la Klenow polymérase.

15

Chacun de ces fragment est introduit dans le site *BgIII* de p poly II pour générer respectivement pTG1656 et pTG1657. Puis on introduit dans chacun des vecteurs préalablement digérés par *PstI-BamHI*, les deux fragments suivants : le fragment *PstI-XbaI* isolé de pTG6552 (Exemple 6.2) et le fragment *XbaI-BamHI* isolé de pTG6559 (exemple 6.2). On obtient pTG1660 et pTG1661 respectivement (Figure 5).

20

Les cellules A549 sont co-transfectées avec pTG1643 (vecteur d'expression du gène pac) et soit pTG1660 soit pTG1661. Les clones sont sélectionnés pour leur résistance à la puromycine et étudiés comme indiqué précédemment. Environ 50% des clones A549-1660 et A549-1661 produisent des produits d'expression de la région E1. Cependant, la production s'accompagne d'un effet cytotoxique, modifiant l'aspect morphologique des cellules.

30

L'intégration et le non réarrangement des plasmides dans le génome cellulaire est vérifié par Southern. Aucune modification substantielle des plasmides intégrés (pTG1643, pTG1660 et pTG1661) ne peut être mise en évidence dans les clones producteurs analysés. On peut également vérifier l'inductibilité de l'expression des séquences codées par la région E1A en présence de Gal4 (par transformation par un plasmide permettant l'expression constitutive de la protéine Gal4).

35

Après l'infection de plusieurs clones producteurs par l'Ad-RSV-Bgal à une moi d'environ 2, deux clones A549-1660 sont capables d'amplifier le stock viral d'un facteur supérieur à 100.

5 EXEMPLE 7 : Constitution d'une lignée de complémentation pour l'ensemble des fonctions essentielles à la réplication d'un adénovirus.

On construit un vecteur comprenant l'ensemble du génome adénoviral de l'Ad5 à l'exception de l'ITR 5', l'ITR 3' et la région d'encapsidation.

10

Le vecteur pTG6528 (exemple 6.1) est digéré par les enzymes *Pst*I et *Bgl*II entre lesquels on insère un fragment d'ADN synthétisé chimiquement selon le protocole standard constitué des oligonucléotides des OTG5039 et OTG5040 (SEQ ID NO: 34 et 35). La séquence des oligonucléotides est conçue de manière à ne pas reconstituer le site de clonage *Pst*I et introduire un site *Eco*RV. On obtient pTG1639, lequel est linéarisé par digestion par *Eco*RV et ligué à un fragment *Xba*I-*Bam*HI dont les extrémités sont rendues franches par traitement à l'ADN polymérase Klenow. Ce fragment est porteur du signal de terminaison de la transcription du virus SV40. Tout plasmide comportant un signal entouré des sites de restriction adéquates peut être utilisé à cette étape.

20

Le vecteur pTG1640 ainsi généré, est digéré par *Bam*HI et *Bgl*II et le fragment porteur de la cassette d'expression du gène pac est introduit dans le site *Bgl*II du vecteur pPolyII-Sfi/Not-14*. On obtient le pTG1641. Celui-ci est linéarisé par *Not*I et traité à l'ADN polymérase Klenow. On introduit le fragment *Bam*HI-*Sa*I de 0,276 kb isolé de pBR322 (Bolivar et al., *supra*) également traité à l'ADN polymérase Klenow. Ceci donne lieu à pTG1643.

25

Le pTG1643 est linéarisé par *Xho*I et on insère dans ce site un fragment hybride *Xho*I comportant un dimère 17MX suivi du promoteur minimum du gène TK-HSV-1 (nucléotides 303 à 450 de la séquence divulguée dans la banque de donnée Genbank sous la référence V00467 et complétée en 3' d'un site *Xho*I). On obtient le pTG1647 dans lequel le promoteur hybride 2x17MX-TK-HSV-1 est inséré dans la même orientation que la cassette d'expression du gène pac.

30

Cette construction, pTG1647, sert de vecteur de base pour introduire entre les sites *Pst*I et *Bam*HI un fragment du génome de l'Ad5 allant du nucléotide 505 au nucléotide 35826. Dans un premier temps, le pTG1647 est digéré par *Pst*I et *Bam*HI puis ligué, d'une part, au fragment *Pst*I-*Cla*I de pTG6552 (exemple 6.2) comportant la partie du

35

génomique de l'Ad5 des nucléotides 505 à 918 et, d'autre part, au fragment *ClaI-BamHI* (positions 918 à 21562) préparé à partir de l'ADN génomique de l'Ad5. Le vecteur ainsi obtenu, comporte la partie 5' de l'Ad5 à l'exception de l'ITR5' et de la région d'encapsidation.

5

Par ailleurs, la partie 3' du génome de l'Ad5 est assemblée dans le vecteur ppolyII-Sfi/Not-14*. Ce dernier est linéarisé par *BamHI* et on introduit le fragment *BamHI-AvrII* (nucléotides 21562 à 28752) du génome de l'Ad5 et un fragment PCR correspondant aux nucléotides 35463 à 35826 de l'Ad5. Ce dernier est généré à partir de l'ADN génomique de l'Ad5 et des amorces OTG5024 (SEQ ID NO: 36) et OTG5025 (SEQ ID NO: 37) et comporte en 5' un site *BamHI*. Le vecteur obtenu est digéré par *AvrII* et on insère le fragment *AvrII* isolé de l'ADN génomique de l'Ad5 et s'étendant des positions 28753 à 35462.

10

15 Le fragment *BamHI* comportant les séquences adénovirales est introduit dans le site *BamHI* du vecteur de l'étape précédente comportant la partie 5' du génome adénoviral dépourvu de l'ITR 5' et la région d'encapsidation.

20 Une lignée de complémentation capable de compléter l'ensemble des fonctions d'un adénovirus déficient est générée par transfection dans une lignée cellulaire, comme A549, selon le protocole décrit dans les exemples précédents.

On peut également procéder en construisant quatre vecteurs comportant la quasi totalité du génome adénoviral qui sera réassemblé sur un seul vecteur lors de l'étape finale.

25

- pTG1665 correspond au clonage du fragment *BspE1* (nucléotides 826 à 7269) isolé d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5, dans le site *XmaI* de p poly II-Sfi/Not-14 * ;

30

- pTG1664 est généré par l'insertion du fragment *NotI* (nucléotides 6503 à 1504) isolé d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5, dans le site *NotI* du même vecteur.

35

- pTG1662 est obtenu par introduction du fragment *AatII* (nucléotides 10754 à 23970) isolé d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 dans le site *AatII* de p polyII.

- pTG1659 comportant la partie 3' du génome d'Ad5 (exemple 2.3).

Puis on introduit un fragment comportant un système d'expression inductible comme le promoteur décrit à l'exemple 6.3 ou 7 inductible par Gal4 ou un promoteur de l'art antérieur comme le promoteur métallothionéine ou tétracycline. Un tel fragment est placé

5 en amont des séquences 5' de l'Ad5 (nucléotides 505 à 918) dans le vecteur pTG1665 digéré par *AatII* et *ClaI*. Enfin, on clone successivement dans le vecteur précédent et aux sites correspondants les fragments *NotI* de pTG1664, *AatII* de pTG1662 et enfin *BamHI* de pTG1659.

10 Une lignée de complémentation est générée par co-transfection du vecteur précédent et de pTG1643 et on isole les clones résistants à la puromycine. Cette lignée est plus particulièrement destinée à amplifier et encapsider les vecteurs adénoviraux de l'exemple 5 défectifs pour les fonctions E1, E2 et E4 et les fonctions tardives.

15 EXEMPLE 8 : Constitution d'une lignée de complémentation pour les fonctions E1 et E4.

Le vecteur pTG1647 (exemple 7) est digéré par les enzymes *PstI*-*BamHI* et on introduit dans le vecteur ainsi traité 3 fragments :

20

- le fragment *PstI*-*XbaI* de pTG6552 (exemple 6.2) portant les séquences d'Ad5 du nucléotide 505 au nucléotide 1339,
- le fragment *XbaI*-*SphI* de pTG6552 portant les séquences d'Ad5 du
- 25 nucléotide 1340 au nucléotide 3665, et
- le fragment *SphI*-*BamHI* de pTG6554 (exemple 6.2) portant les séquences d'Ad5 du nucléotide 3665 à 4034 et un signal de terminaison de la transcription.

30

Le vecteur ainsi obtenu est coupé par *BamHI* et on introduit dans ce site trois fragments qui sont les suivants :

35

- un fragment digéré par *BamHI*-*AflIII* généré par PCR correspondant à la séquence de l'Ad5 situé entre les positions 32800 à 33104. On utilise l'ADN génomique d'Ad5 comme matrice et les amorces OTG5078 (SEQ ID NO: 38) et OTG5079 (SEQ ID NO: 39),

- le fragment *AfIII-AvrII* isolé de l'ADN génomique d'Ad5 (nucléotides 33105 à 35463),
- le fragment *AvrII-BamHI* généré par PCR à l'aide des amorces OTG5024 et OTG5025 (voir exemple 7).

Le vecteur ainsi généré est introduit dans une lignée cellulaire selon le protocole décrit précédemment, pour constituer une lignée de complémentation pour les fonctions E1 et E4.

Par ailleurs, une telle lignée peut également être obtenue selon le protocole suivant :

La région E4 du génome de l'Ad5 (nucléotides 32800 à 35826) est reconstituée en plusieurs étapes. La partie allant des nucléotides 33116 à 32800 est synthétisée par PCR à partir de l'ADN génomique d'Ad5 avec le couple d'amorces OTG5078 et OTG5079 (SEQ ID NO: 38 et 39), puis insérée dans le site *EcoRV* de M13TG130, pour générer M13TG1645.

Le fragment *BamHI-AfIII* de ce dernier est engagé dans une réaction de ligation avec le fragment *AfIII-AvrII* d'Ad5 (nucléotides 33104 à 35463) et le vecteur pTG7457 digéré par *BamHI* et *AvrII*. On obtient pTG1650.

Puis on complète la région E4 par obtention du fragment correspondant aux nucléotides 35826 à 35457 par PCR à partir d'une préparation d'ADN génomique d'Ad5 et des amorces OTG5024 et OTG5025 (SEQ ID NO: 36 et 37). Celui-ci est inséré dans le site *SmaI* de M13mp18 pour donner M13TG1646. Le fragment *AvrII-EcoRI* est isolé de ce dernier et cloné entre les sites *AvrII* et *EcoRI* de pTG1650. On obtient pTG1652.

Le fragment *BamHI* comportant la région E4 d'Ad5 est isolé de pTG1652 et cloné dans le site *BamHI* de pTG1643, de pTG6559 (exemple 6.2) ou dans le site *SspI* de pTG6564 (exemple 6.2) après avoir rendu les sites francs, pour générer pTG1653, pTG1654 et pTG1655 (Figure 6) respectivement.

On génère par des techniques conventionnelles une cellule de complémentation capable de compléter *en trans* les fonctions E1 et E4, par :

- (1) transformation de pTG1653 dans la lignée cellulaire 293, ou
- (2) transformation de pTG1654 ou pTG1655 dans la lignée cellulaire A549.

D'une manière générale, l'expression des produits des régions E1 et E4 s'accompagne d'un effet cytotoxique. Un certain nombre de clones 293-1653 est capable de compléter à la fois des adénovirus délétés de E1 et des adénovirus délétés de E4.

5 Une autre alternative consiste à procéder de la manière suivante.

Le vecteur M13TG1646 est soumis à une mutagenèse dirigée avec l'oligonucléotide mutagène OTG5991 (SEQ ID NO: 40) dans le but de déléter le promoteur de la région E4 et d'insérer un site *HpaI*. Le vecteur muté est désigné M13TG6522. Il est digéré par
10 *PstI*, traité à l'ADN polymérase du phage T4 puis par *AvrII* et mis en ligation avec un fragment *EcoRI* (Klenow)-*AvrII* purifié de pTG1652 (exemple 8), pour donner pTG6595. Ce dernier est clivé par *HpaI* et on introduit le fragment de 0,8 kb obtenu de pTG5913 (Figure 7) après digestion *BglII* et *BamHI* et traitement à la Klenow. On
15 génère pTG6596 dans lequel la région E4 (positions 32800 à 35826) est placée sous le contrôle du promoteur TK. A titre indicatif, pTG5913 porte le gène TK-HSV-1 et le fragment *BglII*-*BamHI* correspond au promoteur de ce gène (Wagner et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 78, 1441 - 1445).

Parallèlement, les vecteurs pTG1643 et pTG6559 (exemple 6) sont linéarisés par *BamHI*
20 et on insère un fragment synthétique issu de la réassociation des oligonucléotides OTG6141 et OTG6142 (SEQ ID NO: 41 et 42), pour obtenir respectivement pTG8508 et pTG8507. Ces derniers sont clivés par *BamHI* avant d'introduire le fragment *BamHI* purifié de pTG6596 comportant la cassette d'expression de E4. On génère les vecteurs pTG8512 (Figure 8) et pTG8513 (Figure 9).

25 D'autre part, l'introduction du fragment *BamHI* de pTG1652 dans le vecteur pTG8508 ou pTG8507 linéarisé par la même enzyme aboutit à pTG8514 et pTG8515 respectivement (Figures 10 et 11).

30 Les lignées cellulaires transfectées par pTG8512 ou pTG8515 permettront de compléter un adénovirus défectif pour la fonction E4, alors que celles résultant de la transfection de pTG8513 ou pTG8514 sont destinées à amplifier et propager des adénovirus défectifs pour les fonctions E1 et E4. De même, la transfection de pTG8512 ou pTG8515 dans les cellules 293 permettront de compléter des adénovirus défectifs
35 pour E1 et E4.

LISTE DE SEQUENCES

(1) INFORMATION GENERALE:

(i) DEPOSANT:

- (A) NOM: TRANSGENE
- (B) RUE: 11, rue de Molsheim
- (C) VILLE: STRASBOURG
- (E) PAYS: FRANCE
- (F) CODE POSTAL: 67082
- (G) TELEPHONE: (33) 88.27.91.00
- (H) TELECOPIE: (33) 88.22.58.07

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Nouveaux adenovirus defectifs et lignes de complementation correspondantes

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 42

(iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Tape
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4174)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

GTGACGTCTT TGGTGTTC GCGGAAAAC

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4173)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ACCGAGTAAG ATTTGTCTAG GGCCGCGGGG

30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 33 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4191)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

GGCCATGGTC GCGGAAAGG GACTTTGACC GTT

33

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5021)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

GAACGGATCC CCAGACTCTG TTTGGATTG G

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 30 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5157)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

CCAGAAATAT CTTGCCCCAG GCCGCCGCC

30

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5564)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

GATCCGATAT CCCGTTAACC

20

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5565)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:

GATCGGTTAA CGGATATCG

20

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 47 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5892)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

GTCGTAGGAT CCAGCTGCTC CCTGCTTGTG TGTTGGAGGT CGCTGAG

47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 47 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5893)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

GTAGCTGACG TCCCAGGTGC ACACCAATGT GGTGAATGGT CAAATGG

47

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 46 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5920)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

ACGGTAGGAT CCGACGTCGG TGAGCTCCTC GCTTGGTCTC CGTCCG

46

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
- (B) TYPE: acide nucléique
- (C) NOMBRE DE BRINS: simple
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5891)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

CAACCCCGAT TCTAGAGAAA CCTG

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 35 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6079)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

GCGCAGTTGC TCTGCGGATC CACTTAACAT TCAGT

35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 38 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6080)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

TAAAAGTACC AGGTAAGGAT CCCCTTGTT TGCTTGGG

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 21 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6064)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:
GAAACCGAAT TCTCTGGAA C 21
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:
 - (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
 - (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
 - (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 - (iii) ANTI-SENS: OUI
 - (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6065)

 - (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:
ACGAATGCAG CTCTCCACTT AACATTCAGT CG 32
 - (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:
 - (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 27 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire
 - (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
 - (iii) HYPOTHETIQUE: NON
 - (iii) ANTI-SENS: OUI
 - (vi) ORIGINE:
 - (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5481)

 - (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:
CAGTGAATTC ATCATCAATA ATATACC 27
 - (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:
 - (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5482)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 17:

AAACTGGTCA CCGTGATTAA AAAG

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 25 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5455)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

ATCGGAATTC AAGATGATTA GGTAC

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 28 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5456)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

ATCGTCTAGA TTAAGGCATT TTCTTTTC

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 18 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5728)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

TGTAGCAGGA GGACTAAG

18

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 21:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 39 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5729)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 21:

CCGCATTAAT TAACCGCGAC AAACGATTCT TTATTCTTG

39

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 22:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 36 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (5730)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 22:

CGCGGTTAAT TAATGCGGTA AACCTACGT CACCCG

36

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 23:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6060)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 23:
AATAAAAGAT CATTATTTTC ATTAGAAGCTG 30
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 24:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: NON
- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6061)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 24:
TGTGTTGGTT TTTTGTGTGT TAAT 24
- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 25:
- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 30 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire
- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)
- (iii) HYPOTHETIQUE: NON
- (iii) ANTI-SENS: OUI
- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6062)
- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 25:
TAACACACAA AAAACCAACA CACAGTTCTA 30

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 26:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 24 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6063)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 26:

ATGAAAATAA TGATCTTTTA TTAT

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 27:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 32 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4564)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 27:

TCCGTGAATT CTAGTAGTGT GCGGAAGTG TG

32

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 28:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 23 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG4565)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 28:

TCCAGTCCGG AGAACCGGGC GCC

23

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 29:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 28 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5013)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 29:

TAACCTGCAG GAGTGCCAGC GAGTAGAG

28

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 30:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 21 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonuclotide de synthese (OTG5015)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 30:

CAACGCGCAT GCCCCATGG G

21

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 31:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
 - (A) LONGUEUR: 31 paires de bases
 - (B) TYPE: acide nucléique
 - (C) NOMBRE DE BRINS: simple
 - (D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:

- (A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5014)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 31:

TAGGAGATCT GTTTTAAACC GCATTGGGAG G

31

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 32:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 34 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 32:

CGGAGTACTG TCCTCCGCGG AGTACTGTCC TCCG

34

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 33:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 34 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 33:

CGGAGGACAG TACTCCGCGG AGGACAGTAC TCCG

34

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 34:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 16 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5039)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 34:

TGCTGGATAT CAGTCA

16

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 35:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 24 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5040)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 35:

GATCTGACTG ATATCCAGCA TGCA

24

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 36:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:

(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5024)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 36:

CTCCTGCCTA GGCAAATAG

20

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 37:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 32 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5025)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 37:

GCAGATGGAT CCGGGCGGAG TAACTTGTAT GT

32

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 38:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 31 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5078)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 38:

GTCGCGGATC CGTTATGTTT CAACGTGTTT A

31

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 39:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 20 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: OUI

- (vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5079)

- (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 39:

ACATGAACTT AAGCGAGCTG

20

- (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 40:

- (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 38 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

- (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

- (iii) HYPOTHETIQUE: NON

- (iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG5991)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 40:

CACGGCACCA GCTCAAGTTA ACGGATCCAT CTGCGGGT

38

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 41:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: NON

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6141)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 41:

GATCCTGTGT GTTGTTTTT TGIGTGC

27

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 42:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:
(A) LONGUEUR: 27 paires de bases
(B) TYPE: acide nucléique
(C) NOMBRE DE BRINS: simple
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(iii) HYPOTHETIQUE: NON

(iii) ANTI-SENS: OUI

(vi) ORIGINE:
(A) ORGANISME: Oligonucleotide de synthese (OTG6142)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 42:

GATCGCACAC AAAAAACCAA CACACAG

27

Revendications

1. Un vecteur adénoviral défectif pour la réplication, capable d'être encapsidé dans une cellule de complémentation, qui dérive du génome d'un adénovirus comprenant de 5' en 3', un ITR 5', une région d'encapsidation, une région E1A, une région E1B, une région E2, une région E3, une région E4 et un ITR 3', par délétion :
 - (i) de tout ou partie de la région E1A, et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces ; ou
 - (ii) de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie d'au moins une région sélectionnée parmi les régions E2 et E4 ; ou
 - (iii) de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.
2. Un vecteur adénoviral selon la revendication 1, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et de l'intégralité de la partie de la région E1B codant pour les protéines précoces.
3. Un vecteur adénoviral selon la revendication 2, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E3.
4. Un vecteur adénoviral selon la revendication 2 ou 3, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E2.
5. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 2 à 4, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E4.
6. Un vecteur adénoviral selon la revendication 1, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie de la région E2.
7. Un vecteur adénoviral selon la revendication 1, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et de tout ou partie de la région E4.

8. Un vecteur adénoviral selon la revendication 6 ou 7, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1B.
9. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 6 à 8, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E3.
10. Un vecteur adénoviral selon la revendication 6, 8 ou 9, qui dérive en outre du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E4.
11. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 3 à 5, 9 ou 10, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion partielle de la région E3 dudit génome en maintenant la partie de ladite région E3 codant pour la protéine gp19kDa.
12. Un vecteur adénoviral selon la revendication 11, dans lequel la partie de la région E3 codant pour la protéine gp19kDa est placée sous le contrôle des éléments appropriés à l'expression de ladite protéine dans la cellule hôte.
13. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 12, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de tout ou partie de la région E1A et d'une partie de la région d'encapsidation.
14. Un vecteur adénoviral selon la revendication 13, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région d'encapsidation :
 - (i) s'étendant du nucléotide 270 au nucléotide 346 ;
 - (ii) s'étendant du nucléotide 184 au nucléotide 273 ; ou
 - (iii) s'étendant du nucléotide 287 au nucléotide 358.
15. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 14, qui dérive du génome d'un adénovirus sélectionné parmi les adénovirus canins aviaires et humains.
16. Un vecteur adénoviral selon la revendication 15, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5.

17. Un vecteur adénoviral selon la revendication 16, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région E1B s'étendant du nucléotide 1634 jusqu'au nucléotide 4047 au moins.
18. Un vecteur adénoviral selon la revendication 16 ou 17, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 notamment par délétion de la partie de la région E3 s'étendant du nucléotide 27871 jusqu'au nucléotide 30748.
19. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 16 à 18, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie de la région E4 s'étendant du nucléotide 32800 au nucléotide 35826.
20. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 19, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 18 % du génome dudit virus.
21. Un vecteur adénoviral selon la revendication 20, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 22 % du génome dudit virus.
22. Un vecteur adénoviral selon la revendication 21, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 40 % du génome dudit virus.
23. Un vecteur adénoviral selon la revendication 22, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion d'au moins 95 % du génome dudit virus.
24. Un vecteur adénoviral selon la revendication 23, qui dérive du génome d'un adénovirus par délétion de l'ensemble du génome dudit adénovirus à l'exclusion des ITRs 5' et 3' et de tout ou partie de la région d'encapsidation.
25. Un vecteur adénoviral selon la revendication 24, qui dérive du génome d'un adénovirus humain de type 5 par délétion de la partie du génome viral s'étendant des nucléotides 459 à 35832.
26. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 25, qui comprend en outre une séquence nucléotidique exogène.
27. Un vecteur adénoviral selon la revendication 26, qui comprend en outre un gène d'intérêt placé sous le contrôle des éléments nécessaires à son expression.

28. Un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 26 ou 27, qui comprend en outre un gène codant pour une protéine trans-activatrice de transcription non adénovirale ; ledit gène étant placé sous le contrôle des éléments nécessaires à l'expression de ladite protéine dans une cellule hôte.
29. Un vecteur adénoviral selon la revendication 28, comprenant le gène codant pour la protéine trans-activatrice de transcription Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.
30. Une particule d'adénovirus comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29.
31. Une cellule hôte eucaryote comprenant un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29 ou une particule d'adénovirus selon la revendication 30.
32. Une lignée de complémentation comportant un élément de complémentation, comprenant notamment une partie de la région E1 du génome d'un adénovirus à l'exclusion de l'ITR 5' ; ledit élément de complémentation étant capable de compléter *en trans* un vecteur adénoviral défectif et étant intégré dans le génome de ladite lignée de complémentation ou inséré dans un vecteur d'expression.
33. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et
 - (ii) tout ou partie d'au moins une région dudit génome sélectionnée parmi les régions E1B, E2 et E4.
34. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et
 - (ii) tout ou partie d'au moins deux des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.
35. Une lignée de complémentation selon la revendication 32, comprenant notamment :
 - (i) tout ou partie de la région E1A du génome d'un adénovirus ; et

- (ii) tout ou partie des régions E1B, E2 et E4 dudit génome.
36. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 33 à 35, comprenant notamment tout ou partie de la région E1A et l'intégralité de la région E1B du génome d'un adénovirus codant pour les protéines précoces.
 37. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 36, comprenant notamment une partie du génome d'un adénovirus sélectionné parmi les adénovirus canins, aviaires et humains.
 38. Une lignée de complémentation selon la revendication 37, comprenant notamment une partie du génome d'un adénovirus humain de type 5.
 39. Une lignée de complémentation selon la revendication 38, comprenant notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 :
 - (i) s'étendant du nucléotide 100 au nucléotide 5297 ;
 - (ii) s'étendant du nucléotide 100 au nucléotide 4034 ; ou
 - (iii) s'étendant du nucléotide 505 au nucléotide 4034.
 40. Une lignée de complémentation selon la revendication 38 ou 39, comprenant notamment la partie de la région E4 du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant du nucléotide 32800 au nucléotide 35826.
 41. Une lignée de complémentation selon la revendication 38, comprenant notamment la partie du génome d'un adénovirus humain de type 5 s'étendant du nucléotide 505 au nucléotide 35826.
 42. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 41, comprenant une partie de la région E1A du génome d'un adénovirus dépourvue de son promoteur naturel ; ladite partie étant placée sous le contrôle d'un promoteur approprié.

43. Une lignée de complémentation selon la revendication 42, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription non-adéovirale.
44. Une lignée de complémentation selon la revendication 43, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription codée par un vecteur adéoviral selon la revendication 28 ou 29.
45. Une lignée de complémentation selon la revendication 43 ou 44, dans laquelle ladite partie de la région E1A est placée sous le contrôle d'un promoteur inductible par la protéine trans-activatrice de transcription Gal4 de *Saccharomyces cerevisiae*.
46. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 45, comprenant en outre un gène codant pour un marqueur de sélection.
47. Une lignée de complémentation selon la revendication 46, dans laquelle le gène de sélection code pour la puromycine acetyl-transférase.
48. Une lignée de complémentation selon la revendication 46 ou 47, dans laquelle le gène de sélection est placé sous le contrôle d'un promoteur inductible par une protéine trans-activatrice de transcription codée par la région E1A du génome d'un adéovirus sauvage, notamment sous le contrôle du promoteur de la région E2 dudit génome.
49. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 48, dérivée d'une lignée cellulaire acceptable d'un point de vue pharmaceutique.
50. Une lignée de complémentation selon la revendication 49, dérivée d'une lignée cellulaire sélectionnée parmi les lignées Vero, BHK, A549, MRC5, W138 et CHO.
51. Une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 48, dérivée d'une cellule de la rétine d'un embryon humain.
52. Un procédé de préparation d'une particule d'adéovirus selon la revendication 30, selon lequel :

- (i) on introduit un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29 dans une lignée de complémentation capable de compléter *en trans* ledit vecteur adénoviral pour obtenir une lignée de complémentation transfectée ;
 - (ii) on cultive ladite lignée de complémentation transfectée dans des conditions appropriées pour permettre la production de ladite particule d'adénovirus ; et
 - (iii) on récupère ladite particule d'adénovirus dans la culture cellulaire.
53. Un procédé selon la revendication 52, selon lequel on met en oeuvre une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51.
54. Usage thérapeutique ou prophylactique d'un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29, d'une particule d'adénovirus selon la revendication 30 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé selon la revendication 52 ou 53, d'une cellule hôte eucaryote selon la revendication 31 ou d'une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51.
55. Une composition pharmaceutique comprenant à titre d'agent thérapeutique ou prophylactique un vecteur adénoviral selon l'une des revendications 1 à 29, une particule d'adénovirus selon la revendication 30 ou obtenue en mettant en oeuvre un procédé selon la revendication 52 ou 53, une cellule eucaryote selon la revendication 31 ou une lignée de complémentation selon l'une des revendications 32 à 51, en association avec un support acceptable d'un point de vue pharmaceutique.

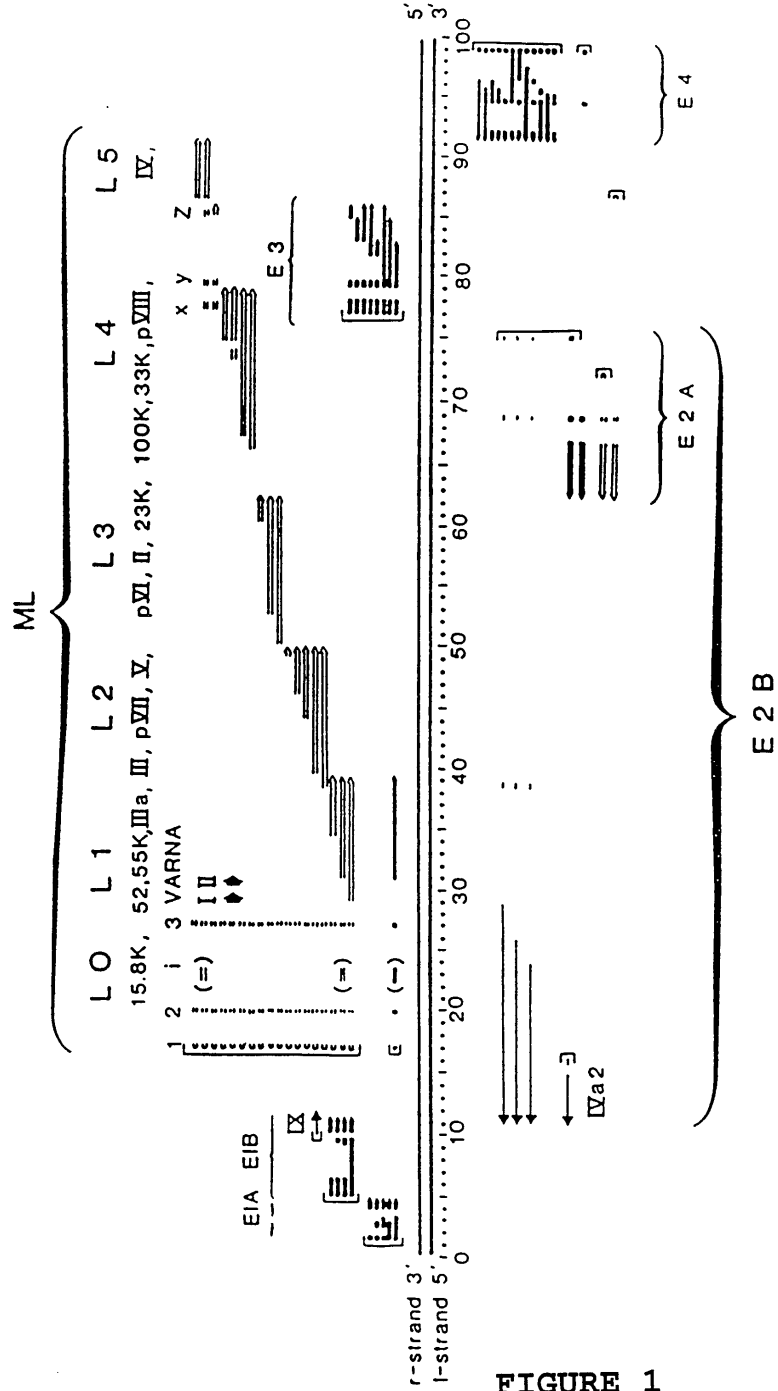


FIGURE 1

2 / 11

pTG6546

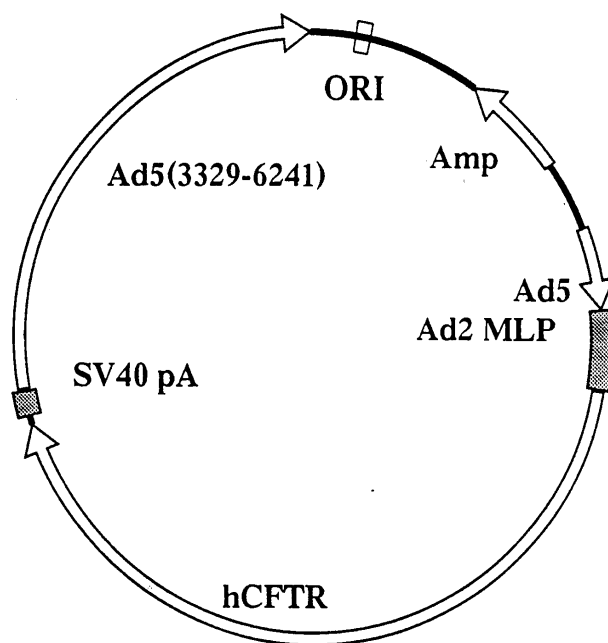


FIGURE 2

3 / 11

pTG6581

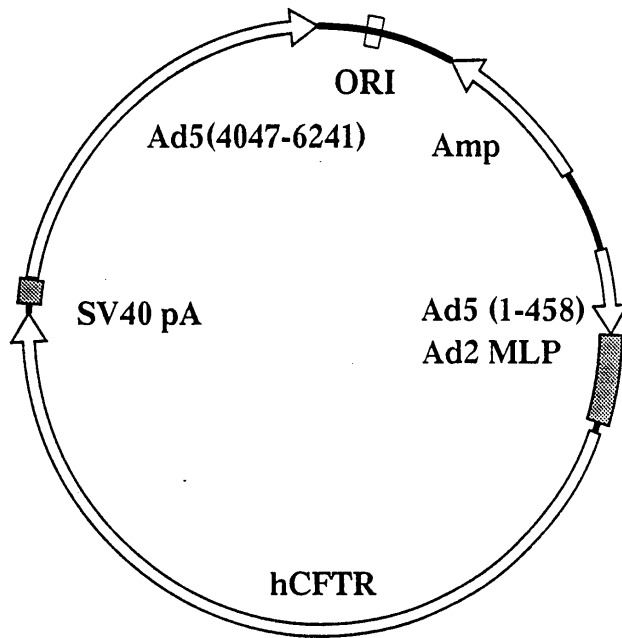


FIGURE 3

4 / 11

pTG6303

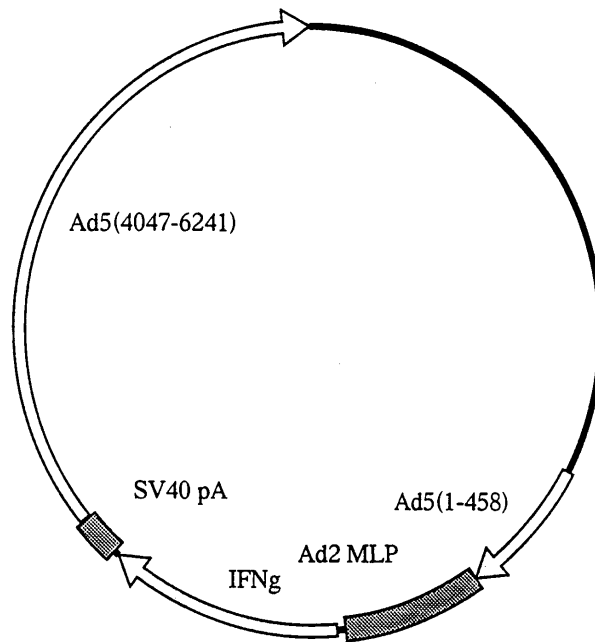


FIGURE 4

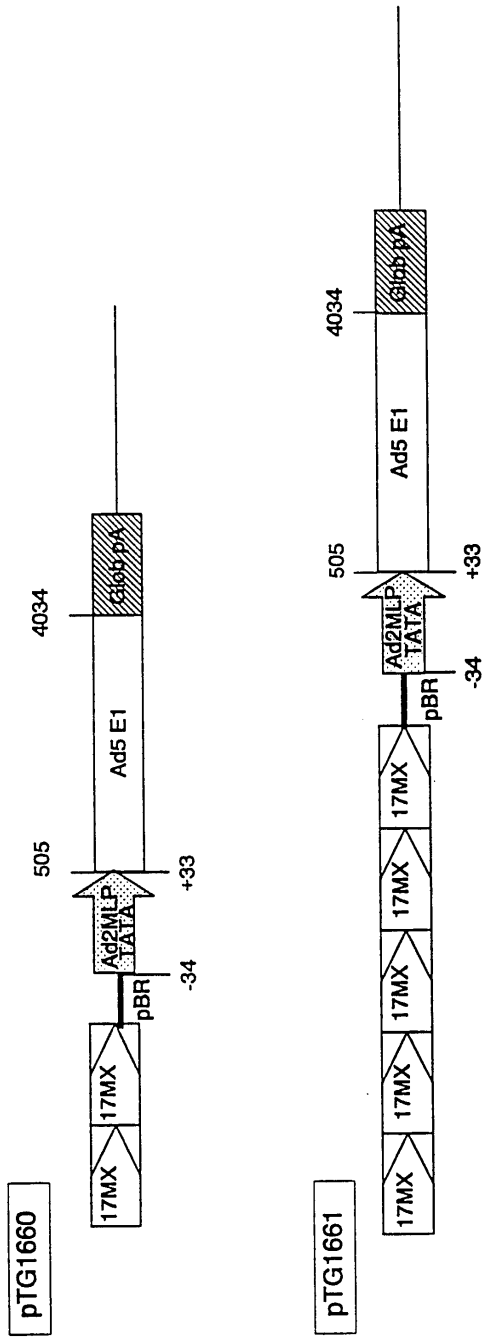


FIGURE 5

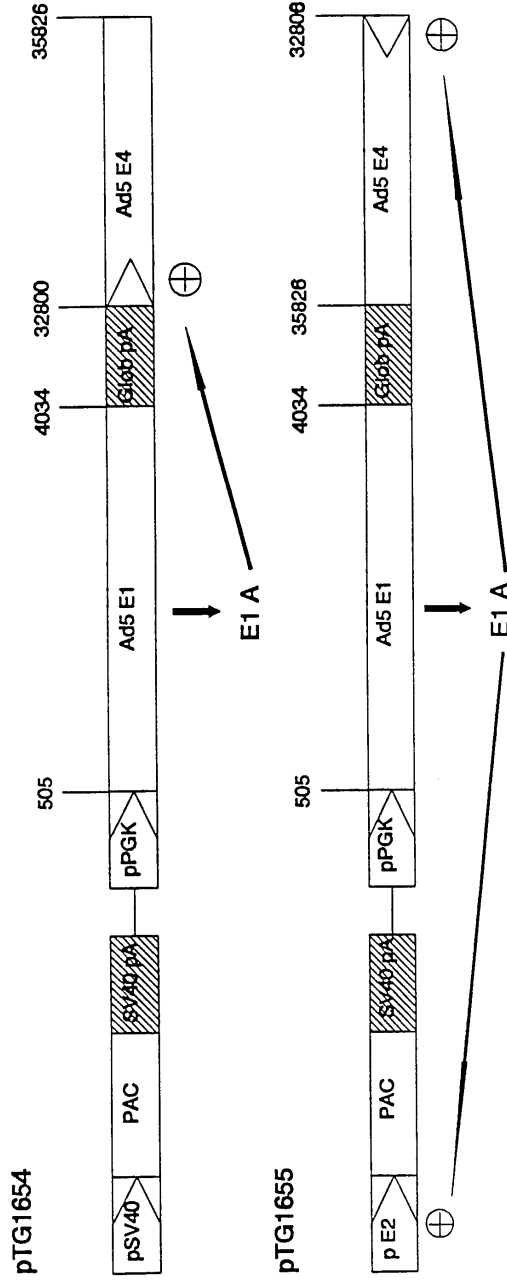
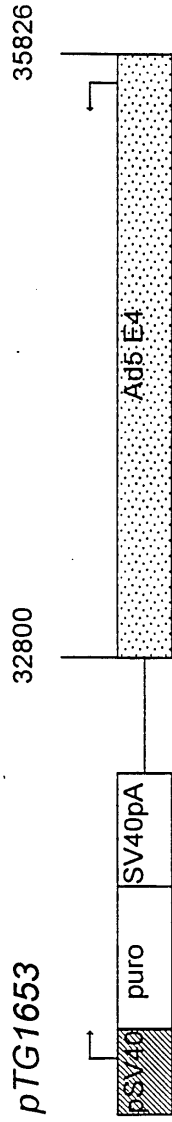


FIGURE 6

7/11

pTG5913

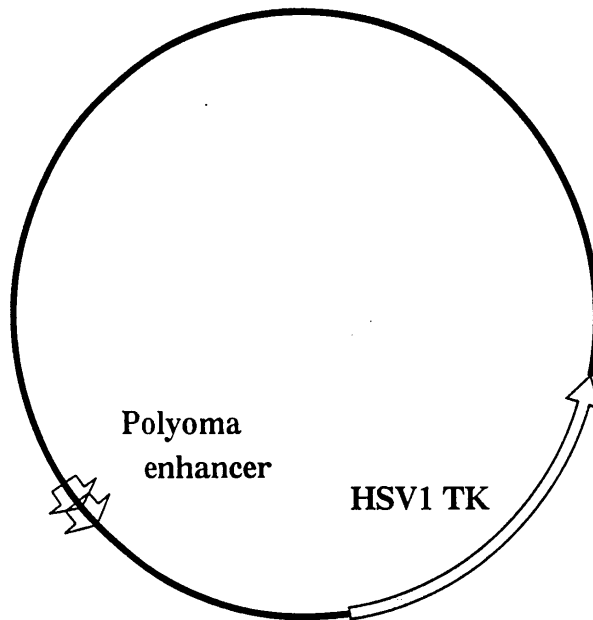


FIGURE 7

8 / 11

pTG8512

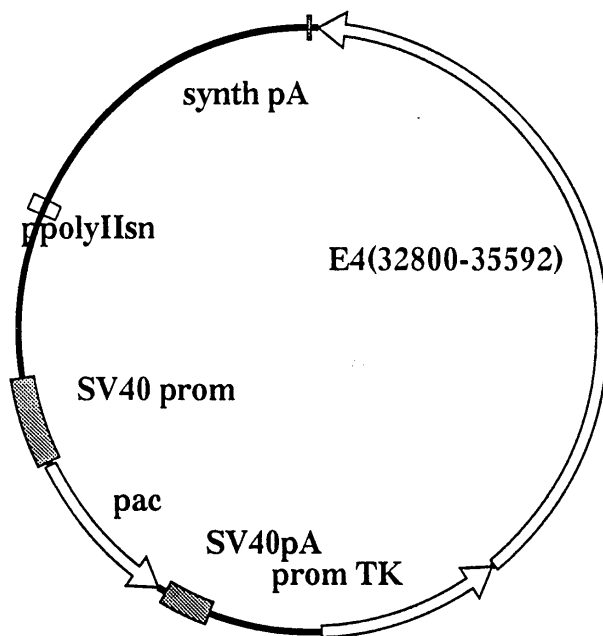


FIGURE 8

9/11

pTG8513

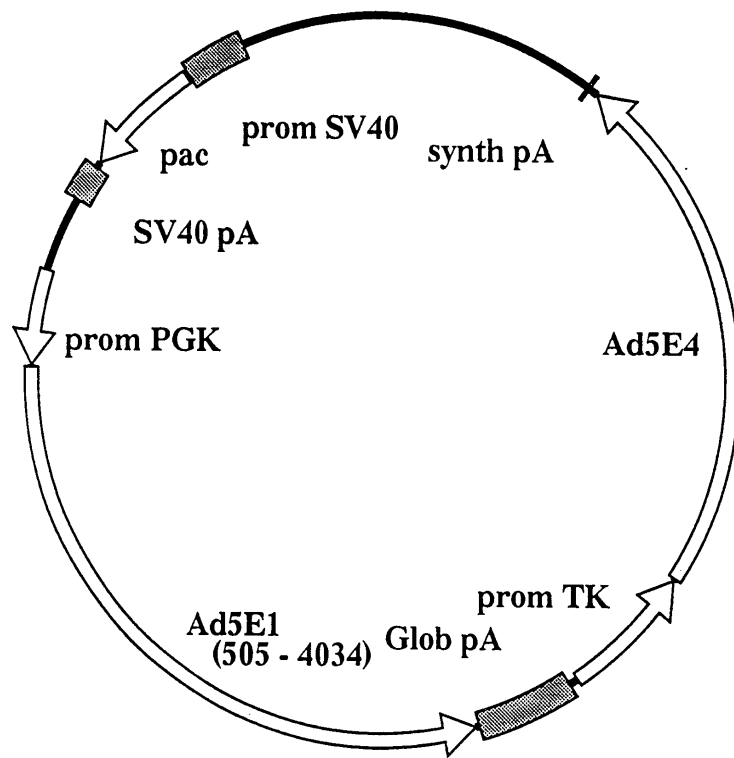


FIGURE 9

10/11

pTG8514

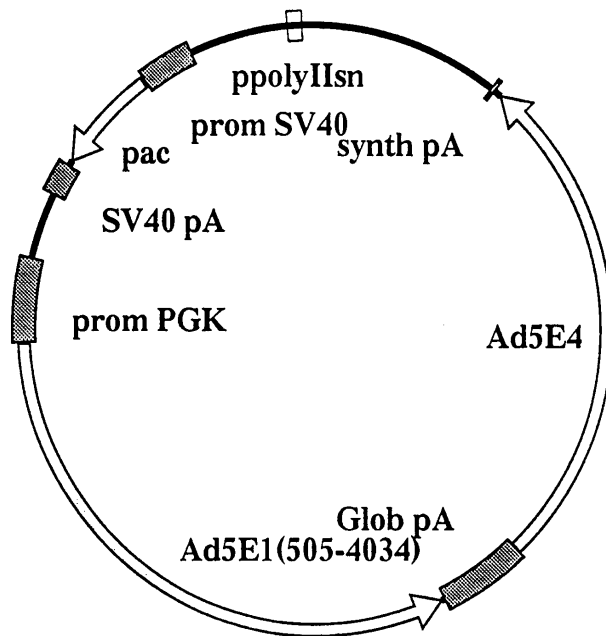


FIGURE 10

11/11

pTG8515

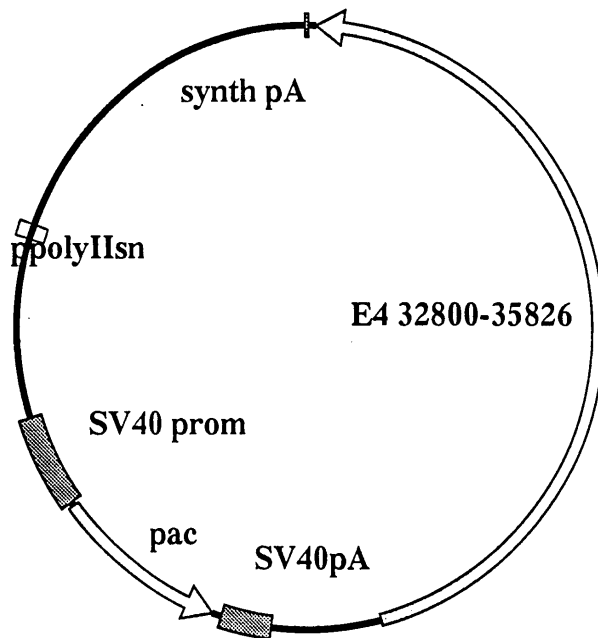


FIGURE 11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00624

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER			
IPC 5	C12N15/86	C12N15/34	C12N5/10
	C12N7/04	C12N15/23	A61K39/235
			A61K48/00
			C12N15/31
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 5 C12N C07K 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.
A	<p>JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6, June 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2F requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' see page 2715, column 2, line 53 - line 54 see page 2716, column 1, line 6 - line 9 ---</p>		1,2
A	<p>HUMAN GENE TRANSFER vol. 219, 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' see page 58, paragraph 6 ---</p>		1
-/--			
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C.		<input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.	
* Special categories of cited documents :			
<p>'A' document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>'E' earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>'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)</p> <p>'O' document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>'P' document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>		<p>'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</p> <p>'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</p> <p>'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.</p> <p>'&' document member of the same patent family</p>	
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report	
24 August 1994		05. 09. 94	
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 Chambonnet, F	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR 94/00624

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CELL. vol. 68, no. 1 , 10 January 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 143 - 155 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance gene to the airway epithelium' see the whole document ---	9-11
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 April 1993 see claim 3 ---	1
E	WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 June 1994 see the whole document -----	1-10,15, 24,26, 27, 30-32, 42,43, 46,49, 50,52-55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/FR 94/00624

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Remark: Although claim 54 is directed to a method for treatment of the human or animal body, the research has been carried out and based on the the alleged effects of the product (composition)

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on Protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No
PCT/FR 94/00624

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786	02-04-93
		AU-A- 2790292	27-04-93
		EP-A- 0559884	15-09-93
		JP-T- 6502771	31-03-94

WO-A-9412649	09-06-94	NONE	

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den	Internationale No
	PCT/FR 94/00624

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE					
CIB 5	C12N15/86	C12N15/34	C12N5/10	A61K48/00	C12N15/12
	C12N7/04	C12N15/23	A61K39/235	C12N15/31	

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
 CIB 5 C12N C07K A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	JOURNAL OF VIROLOGY vol. 63, no. 6, Juin 1989 pages 2709 - 2717 BABISS, L.E. 'The cellular transcription factor E2F requires viral E1A and E4 gene products for increased DNA-binding activity and functions to stimulate adenovirus E2A gene expression' voir page 2715, colonne 2, ligne 53 - ligne 54 voir page 2716, colonne 1, ligne 6 - ligne 9 --- -/--	1,2

Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *&* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée	Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale
24 Août 1994	05. 09. 94
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Fonctionnaire autorisé Chambonnet, F

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Den . Internationale No
PCT/FR 94/00624

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		
Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	HUMAN GENE TRANSFER vol. 219 , 1991 pages 51 - 61 STATFORD-PERRICAUDET, L. & PERRICAUDET, M. 'Gene transfer into animals: the promise of adenovirus' voir page 58, alinéa 6 ---	1
A	CELL. vol. 68, no. 1 , 10 Janvier 1992 , CAMBRIDGE, MA US pages 143 - 155 ROSENFELD, M.A. ET AL. 'In vivo transfer of the human cystic fibrosis transmembrane conductance gene to the airway epithelium' voir le document en entier ---	9-11
A	WO,A,93 06223 (CNRS) 1 Avril 1993 voir revendication 3 ---	1
E	WO,A,94 12649 (GENZYME CORPORATION) 9 Juin 1994 voir le document en entier -----	1-10,15, 24,26, 27, 30-32, 42,43, 46,49, 50,52-55

1

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

emande internationale n°

PCT/FR 94/00624

Cadre I Observations - lorsqu'il a été estimé que certaines revendications ne pouvaient pas faire l'objet d'une recherche (suite du point 1 de la première feuille)

Conformément à l'article 17.2)a), certaines revendications n'ont pas fait l'objet d'une recherche pour les motifs suivants:

1. Les revendications n°^s se rapportent à un objet à l'égard duquel l'administration n'est pas tenue de procéder à la recherche, à savoir:
Remarque: Pour autant que la revendication 54 concerne une méthode de traitement du corps humain/animal, la recherche a été effectuée et basée sur les effets imputés au produit (à la composition)
2. Les revendications n°^s se rapportent à des parties de la demande internationale qui ne remplissent pas suffisamment les conditions prescrites pour qu'une recherche significative puisse être effectuée, en particulier:
3. Les revendications n°^s sont des revendications dépendantes et ne sont pas rédigées conformément aux dispositions de la deuxième et de la troisième phrases de la règle 6.4.a).

Cadre II Observations - lorsqu'il y a absence d'unité de l'invention (suite du point 2 de la première feuille)

L'administration chargée de la recherche internationale a trouvé plusieurs inventions dans la demande internationale, à savoir:

1. Comme toutes les taxes additionnelles ont été payées dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale porte sur toutes les revendications pouvant faire l'objet d'une recherche.
2. Comme toutes les recherches portant sur les revendications qui s'y prêtaient ont pu être effectuées sans effort particulier justifiant une taxe additionnelle, l'administration n'a sollicité le paiement d'aucune taxe de cette nature.
3. Comme une partie seulement des taxes additionnelles demandées a été payée dans les délais par le déposant, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur les revendications pour lesquelles les taxes ont été payées, à savoir les revendications n°^s:
4. Aucune taxe additionnelle demandée n'a été payée dans les délais par le déposant. En conséquence, le présent rapport de recherche internationale ne porte que sur l'invention mentionnée en premier lieu dans les revendications; elle est couverte par les revendications n°^s:

Remarque quant à la réserve

- Les taxes additionnelles étaient accompagnées d'une réserve de la part du déposant.
- Le paiement des taxes additionnelles n'était assorti d'aucune réserve.

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Den : Internationale No

PCT/FR 94/00624

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9306223	01-04-93	FR-A- 2681786	02-04-93
		AU-A- 2790292	27-04-93
		EP-A- 0559884	15-09-93
		JP-T- 6502771	31-03-94

WO-A-9412649	09-06-94	AUCUN	
