



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial

División de Nuevas Creaciones

PCT
SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

06-110667

54. TÍTULO

VECTORES VIRALES POLIVALENTES Y SISTEMA PARA LA PRODUCCION DE ESTOS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL

C12Q 1/68

71. SOLICITANTE

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA.

DOMICILIO

PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

74. APODERADO

JIMENA ESCOBAR URIBE

22. BOGOTÁ, D. C.,

OCTUB. 31-2006

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

1 SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☒ Capítulo I. ☐ Capítulo II.

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: **The Trustees of the University
of Pennsylvania**
Dirección: 3160 Chestnut Street, Suite 200,
Philadelphia, Pennsylvania 19104, Estados
Unidos de América.
Nacionalidad o Domicilio: Philadelphia,
Pennsylvania, Estados Unidos de América.
Lugar de Constitución: Pennsylvania,
Estados Unidos de América.
Teléfono: Fax:
E-mail:

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número

3
REPRESENTANTE
O APODERADO
(74)

Nombre: **JIMENA ESCOBAR URIBE**
Dirección: Cra. 11A No. 94-76 (Of. 305)
Teléfono: 6 162051/61 Fax: 6 161889
E-mail: tm-patent@escobaruribe.com

IDENTIFICACIÓN
C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐
Número 39.779 452 T.P 68.228

4
INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **VER ANEXOS**
Dirección:
Nacionalidad o domicilio:

5 PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2005/014485 Fecha 27 de abril de 2005
Publicación Internacional No. WO 2005/106002 A3 Fecha 10 de noviembre de 2005

6 TÍTULO (54) VECTORES VIRALES POLIVALENTES Y SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTOS.

7 Clasificación Internacional (51) C12Q 1/68

8 Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen
Estados Unidos de América

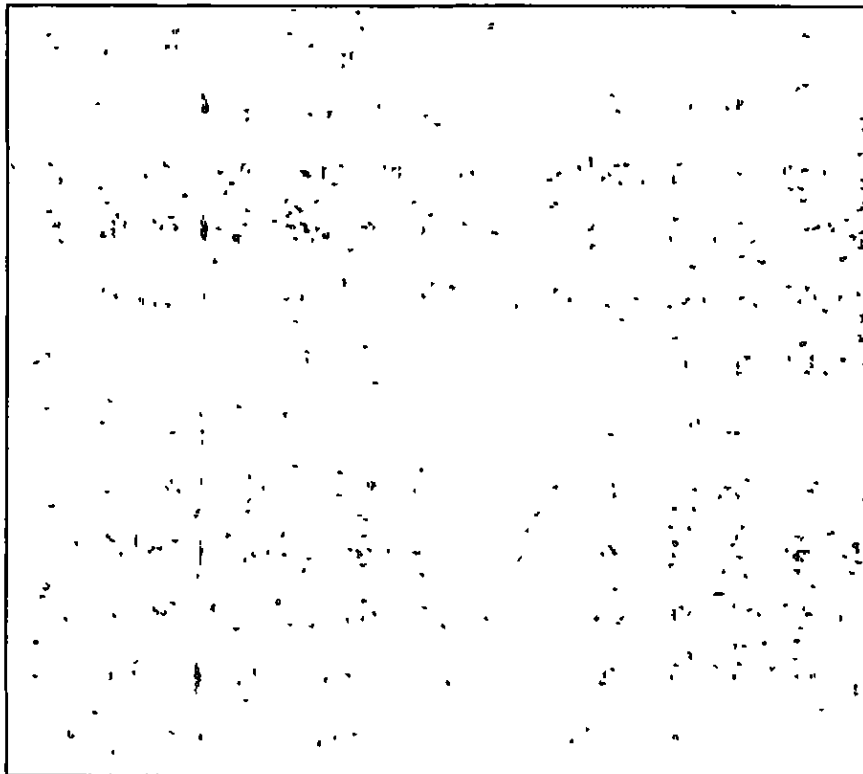
(32) Fecha
28 de abril de 2004

(31) Número de Solicitud
60/565.941

9 Comprobante de pago No. 06 - 83.266 Fecha 27 de octubre de 2006

- ☐ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☐ Copia de la solicitud internacional (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de depósito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☐ Otros " Copia de la cesión presentada en fase internacional "

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12. Solicito la concesión de la patente

NOMBRE: JIMENA ESCOBAR URIBE

FIRMA: *Jimena Escobar Uribe*

C.C. 39.779.452 de Usaquén, T.P. 68.228

3012/PCT

2

30/2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 06 - 83,266
FECHA : OCTUBRE 27 DE 2006

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
Rad 06-110667-00000-0000
Fec 2006-10-31 15:48:26 Dep 2020 NUECREACIONES
Tra. 11 PATENTE/II
Eve 378 FASENACIONAL
Act 411 PRESENTACION Folios: 117

***** CONSIGNACION *****

DEBITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
ESCOBAR URIBE ASOCIADOS	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	50107592	27/10/2006	4,541,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1	TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN
			TOTAL : \$ 463,000.00

SON: CUATROCIENTOS SESENTA Y TRES MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

APOSTILLE**(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)**

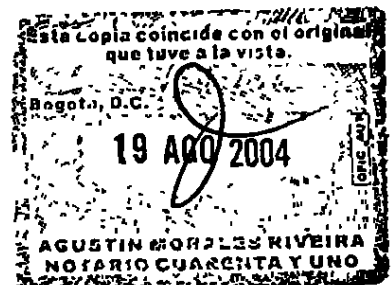
1. Country : United States Of America
2. This public document has been signed by **TERESA M DUNN**
3. acting in the capacity of **NOTARY PUBLIC**
4. bears the seal/stamp **TERESA M DUNN, NOTARY PUBLIC, PHILADELPHIA COUNTY, COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA**

Certified

5. at Harrisburg, Pennsylvania
6. The 19th day of July, 2004
7. by Pedro A. Cortés, Secretary of the Commonwealth of Pennsylvania
8. No : 200427732
9. Seal/Stamp
10. Signature

Pedro A. Cortés

Pedro A. Cortés



POWER OF ATTORNEY

The undersigned

acting on behalf of and representing
The Trustees of the University of Pennsylvania
a company organized under the laws of PA, United States
domiciled in

3160 Chestnut Street, Philadelphia, Pennsylvania 19104 US

hereby appoint
JIMENA ESCOBAR-URIBE Y/O IGNACIO
ESCOBAR-URIBE y/o JULIANA ESCOBAR-URIBE
domiciled in Bogotá, Colombia
CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

as our true and legal attorneys with the necessary powers: 1. to apply to the administrative, judicial and police authorities of the Republic of Colombia, in any instance or appeal, for obtaining registration of patents, utility models, industrial designs, commercial emblems and names, trademarks, copyrights and neighbouring rights, plant varieties, health licenses as well as their assignments, extensions, renewals, changes of name and domicile; 2. to prepare, apply for, obtain, execute and register contracts, licenses, authorizations and registrations of any kind, 3. to intervene as plaintiffs or defendants, in any instance or appeal, before any judge, court, tribunal, corporation, public officer or authority in any judicial, administrative or police action, such as: actions dealing with commercial emblems and names, oppositions against trademark registrations, caducity and nullity actions; recovery actions, actions arising from obtainment and working of license agreements, actions dealing with unfair competition; criminal actions; actions claiming indemnity for damages, complaints or remarks on all sort of industrial property matters; the performance of precautionary measures, and in any other similar action, measure or appeal related to industrial property matters, copyrights and neighbouring rights and obtention of plant variety's rights.

To this effect, we hereby authorize them to file applications, make descriptions, amendments, protests, declarations, oppositions, cancellations, appeals and claims; to pay taxes, quotas and liens as provided by law; to waive or abandon granted rights or rights in process of being granted, to receive all kind of documents and securities; to issue the respective releases and, in general, to take, before said authorities, pertinent steps to the abovementioned purposes and take all measures they may deem advisable to protect our interests, with all other necessary legal faculties, and we hereby declare as good and valid whatever the attorneys should do to our benefit

This power comprises the authority to ratify or confirm on our behalf any action, as well as the faculty of receiving, desisting, transacting, compromising, conciliating, substituting and revoking substitutions, taking notifications and appointing judicial or extrajudicial attorneys.

Signed at Philadelphia, Pennsylvania USA

on

6/28/04

SIGNATURE Timothy J. Raynor
Director, Intellectual Property

DOCUMENTO DE PODER

El suscrito The Trustees of the University of Pennsylvania

obrando a nombre y representación de
organizada y existente bajo las leyes
de PA, Estados Unidos de América
con domicilio en

3160 Chestnut, Philadelphia, Pennsylvania
nombra a 19104 US

JIMENA ESCOBAR-URIBE Y/O IGNACIO
ESCOBAR-URIBE y/o JULIANA ESCOBAR-URIBE
domiciliados en Bogotá, Colombia
CARRERA 11 A No. 94-76 OF. 305-306

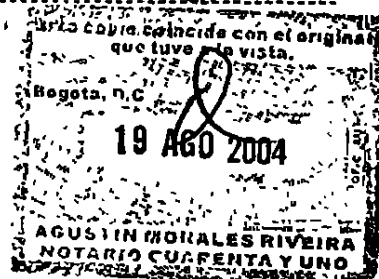
apoderados verdaderos y legales con poder especial, amplio y suficiente: 1. para recabar de las oficinas y autoridades colombianas administrativas, judiciales y de policía en cualquier instancia o recurso, la obtención de patentes de invención, modelos de utilidad, diseños industriales, registro de marcas, registro de derechos de autor y derechos conexos, registro de variedades vegetales, depósito de nombres comerciales y enseñanzas, registros sanitarios, así como sus traslados, prórrogas, renovaciones, cambios de nombre y de domicilio; 2. elaborar, tramitar, solicitar, obtener, realizar, ejecutar y registrar contratos, licencias, autorizaciones y registros de cualesquiera clase; 3. intervenir como demandante o como demandado en cualquier instancia y recurso, y ante cualquier juez, entidad, corporación, funcionario público o autoridad en acciones judiciales, administrativas y de policía, tales como acciones derivadas del nombre o enseña comerciales; observaciones u oposición al registro de marcas; acciones de caducidad y nulidad; acciones reivindicatorias; acciones derivadas de la obtención o explotación de licencias; acciones de competencia desleal; demandas penales y civiles; acciones de indemnización de perjuicios, reclamos u observaciones a cualquier asunto sobre propiedad industrial; el ejercicio de medidas cautelares y cualesquiera otras acciones, medidas o recursos similares relacionados con la propiedad industrial, los derechos de autor y derechos conexos y los derechos de obtention de variedades vegetales.

A este efecto, los facultamos para elevar solicitudes, formular descripciones, enmiendas, protestas, declaraciones, oposiciones, cancelaciones, apelaciones y reclamos; pagar impuestos, cuotas y gravámenes prescritos por la ley; renunciar o desistir a derechos concedidos o en curso de concesión; recibir toda clave de documentos y valores dando el descargo respectivo, y, en general, para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al efecto indicado y tomar todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses, con todas las demás facultades necesarias y por este documento desde ahora declaramos válido y bueno todo cuanto los apoderados hicieron en nuestro beneficio.

Este poder comprende la facultad de ratificar o confirmar en nuestro nombre lo actuado, así como la facultad de desistir, transigir, comprometer, conciliar, sustituir y revocar sustituciones, recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales.

Firmado TIMOTHY J. RAYNOR
DIRECTOR, INTELLECTUAL PROPERTY
CENTER FOR TECHNOLOGY TRANSFER

TRAMA



12

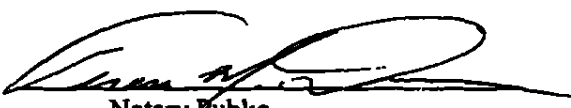
CERTIFICACIÓN NOTARIAL

El abajo firmante Notario Público certifica que el día de de compareció (cieron) ante mi , quien (s) me consta que es (son) la (s) persona (s) que firma (n) el instrumento que antecede en su calidad de de la compañía , sociedad existente, debidamente constituida y que ejerce su objeto social de conformidad con las leyes de , domiciliada en .
Certifico, además, que dicha persona está facultada para firmar el documento que antecede en nombre de la citada sociedad, y que los objetivos y finalidades para los que se otorga el mencionado instrumento están comprendidos dentro de los objetivos o actividades de la mencionada sociedad.

Notario Público

NOTARIAL CERTIFICATION

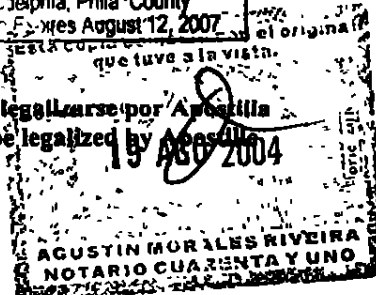
The undersigned Notary Public certifies that on June 28, 2004 before me personally appeared Timothy J. Raynor , who signed the forgoing instrument as Director, Intellectual Property of The Trustees of the University of Pennsylvania , a corporation existing, duly organized and complying with its corporate purposes in conformity with the laws of the state of Pennsylvania , whose home office is located at 3160 Chestnut Street, Philadelphia, Pennsylvania 19104 USA . I further certify that said individual is duly authorized to sign the forgoing instrument in the name of said corporation and that the purposes for which said instrument is granted are within the scope of the objects or activities of said corporation.


Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA

NOTARIAL SEAL
TERESA M. DUNN, Notary Public
City of Philadelphia, Phila. County
My Commission Expires August 12, 2007

Esta certificación notarial debe ser llenada en su totalidad y legalizarse por Apostilla
This notarial certification must be filled in completely and be legalized by Apostilla



BOGOTA D C AGOSTO 03, 2004

TRADUCCIÓN OFICIAL LEGALIZACIONES, EN PODER POR
TIMOTHY J. RAYNOR, DIRECTOR, PROPIEDAD INTELECTUAL DE LOS DEPOSITARIOS DE
LA UNIVERSIDAD DE PENSILVANIA, A JIMENA ESCOBAR-URIBE Y OTRO) APOSTILA
USA 200427732.

(NOTA DE TRADUCCION): SE TRATA DE UN PODER, EN IDIOMAS INGLES Y EN CASTELLANO, CONFERIDO POR TIMOTHY J. RAYNOR, DIRECTOR, PROPIEDAD INTELECTUAL DE LOS DEPOSITARIOS DE LA UNIVERSIDAD DE PENSILVANIA, A JIMENA ESCOBAR-URIBE Y/O IGNACIO ESCOBAR URIBE, DE FECHA 06/28/04. TIENE ANEXA UNA CERTIFICACIÓN NOTARIAL DE FECHA JUNIO 28, 2004, TAMBIEN EN IDIOMA CASTELLANO E INGLES, Y APOSTILLA 200427732, DEL ESTADO DE PENSILVANIA USA, QUE SE TRADUCE A CONTINUACIÓN:

APOSTILLE

(Convención de la Haya, Octubre 5, 1961)

1. PAIS: **ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**
ESTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR **TERESA M. DUNN**
3. ACTUANDO EN SU CALIDAD DE **NOTARIO PUBLICO**
4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE **TERESA M. DUNN, NOTARIO PUBLICO, CONDADO DE FILADELFIA, COMUNIDAD DE PENSILVANIA.**
CERTIFICADO
5. EN **HARRISBURG, PENSILVANIA**
6. EL DIA **JULIO 19, 2004**
7. POR **PEDRO CORTES, SECRETARIO DE LA COMUNIDAD DE PENSILVANIA**
8. NR. **200427732**
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMADO

PEDRO A. CORTES

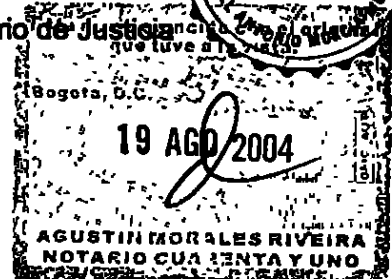
SELLO DORADO: SECRETARIO DE LA COMUNIDAD DE PENSILVANIA

CERTIFICADO DE AUTENTICIDAD El suscrito Traductor e Interprete Oficial juramentado, con el presente certifica que esta es una traducción auténtica, verdadera, y precisa al idioma Castellano, del documento en Ingles, anexo.

Fidel Murcia
FIDEL ANTONIO MURCIA MURCIA

Traductor e Interprete Oficial

Resolución No. 488/94 Ministerio de Justicia



ANEXOS

INVENTORES

- 1.) **GAO, Guangping**
(408 Yorkshire Road, Rosemont, Pennsylvania 19010, Estados Unidos de América);
- 2.) **WILSON, James, M.**
(1350 N. Avignon Drive, Gladwyne, Pennsylvania 19035, Estados Unidos de América);
- 3.) **ZHOU, Xiangyang**
(230 Tudor Drive, North Wales, Pennsylvania 19454, Estados Unidos de América).

4

Solicito expresamente a nombre de **The Trustees of the University of Pennsylvania**, sociedad constituida de conformidad con las leyes de Pennsylvania, Estados Unidos de América, domiciliada en 3160 Chestnut Street, Philadelphia, Pennsylvania 19104, Estados Unidos de América, el otorgamiento de Patente para la invención titulada **"VECTORES VIRALES POLIVALENTES Y SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTOS "**.

Clase: C12Q 1/68
/


JIMENA ESCOBAR URIBE
C.C. 39.779.452 de Usaquen.
T.P. 68.228

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT	
(21) N° de solicitud: (22) Fecha de solicitud: (30) Piondad Estadinense (31) No. Prioridad 60/565,941 (32) Fecha 28/04/04 (33) País US		(51) Int Cl. C12Q 1/68 (71) Solicitante(s) THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA. (72) Inventor(es) GAO, Guangping // WILSON, James, M. // ZHOU, Xiangyang. (74) Agente. JIMENA ESCOBAR URIBE	
(85) Fecha inicio fase nacional (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: Fecha 27/04/05 No de solicitud PCT/US2005/014485		(87) Publicación internacional Fecha: Fecha (dd/mm/aa) 10/11/05 N° publicación WO 2005/106002 A3	
(54) Título VECTORES VIRALES POLIVALENTES Y SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTOS.			

Reivindicación(es)

- 1 Una estructura de plásmido polivalente que comprende
- (a) un primer casete móvil ubicado en un pnmer locus de un genoma viral, dicho primer casete móvil comprende secuencias de ácido nucleico que comprenden un pnmer gen reportero detectable ligado a secuencias que dirigrán la expresión de este, dicho casete móvil se flanquea mediante un pnmer conjunto de sitios de enzima de restrcción raros compuestos de dos sitios de enzima de restrcción raros; y

(b) un segundo casete móvil ubicado en un segundo locus del genoma viral, dicho segundo casete móvil comprende secuencias de ácido nucleico que comprende un segundo gen reportero detectable ligado operablemente a las secuencias que dirigrán la expresión de este, dicho casete móvil se flanquea mediante un segundo conjunto de sitios de enzima de restrcción raros compuestos de dos sitios de enzima de restrcción raros;
- en donde el producto de dicho pnmer gen reportero detectable y el segundo gen reportero detectable son distinguibles, y
- en donde le primero y segundo conjunto de sitios de enzima de restrcción raros difieren

RESUMEN

Se suministra un sistema para generar vectores virales que portan dos distintos casetes de expresión. El sistema utiliza una estructura de plásmido polivalente única que permite la detección eficiente y la selección de los casetes de expresión insertados.

VECTORES VIRALES POLIVALENTES Y
SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTOS

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Se ha descrito el uso de vectores virales para expresar antígenos. Además, se ha descrito el uso de péptidos de fusión como antígeno.

Los vectores basadas en péptido de fusión simplifican el régimen de dosificación y crean más oportunidades para el refuerzo heterólogo. Sin embargo, la naturaleza impredecible del procesamiento del péptido de fusión y la presentación del epítipo, y las dificultades en creación y propagación de adenovirus que llevan grandes insertos han llegado a ser obstáculo para sus aplicaciones a gran escala.

Lo que se requiere son métodos predecibles para generar vectores virales útiles para el suministro de productos de gen.

RESUMEN DE LA INVENCION

Se suministra un sistema para generar vectores virales que llevan al menos dos casetes de expresión distintos. El sistema utiliza una estructura de plásmido polivalente única que permite la detección eficiente y la selección de los casetes de expresión insertados.

También se suministran métodos para generar partículas virales polivalentes que utilizan las estructuras polivalentes de la invención.

Estas y otras modalidades y ventajas de la invención se describen con más detalle adelante.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 ilustra el montaje de un vector adenoviral ΔE_1 - ΔE_3 .

La Figura 2 ilustra la introducción de los antígenos entre los locus de supresión E1 y E3 de los vectores adenovirales.

La Figura 3 es un diagrama de barras que proporciona los resultados de una comparación in vivo de la expresión de un adenovirus C9 de chimpancé recombinante que expresa el mismo transgén ($\alpha 1AT$) del locus E1 solamente (barras oscuras), o de ambos locus E1 y E3 (barras claras).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

La presente invención proporciona un sistema para generar un vector viral que lleva múltiples casetes de expresión a un objetivo. El sistema utiliza una molécula de ADN que lleva un

genoma viral que contiene casetes de clonación movibles que llevan genes marcadores. Esta molécula de ADN se utiliza para generar un vector de transferencia que lleva un genoma viral que contiene múltiples casetes de expresión heterólogos localizados en diferentes locus dentro del genoma viral. El genoma viral quien lleva los casetes de expresión heterólogos son rescatados del vector de transferencia de la invención y empacados en una proteína de cápsido o envoltura viral adecuada para producir vectores virales polivalentes.

Como se utiliza aquí, la molécula de ADN y/o el vector de transferencia se puede derivar de cualquier elemento genético que pueda llevar el genoma viral de acuerdo con la invención y que es capaz de transferir el genoma en una célula huésped. Cualquier elemento genético adecuado (o estructura) puede ser seleccionada, incluyendo, por ejemplo, un plásmido, fago, transposón, cósmido, epitoma, y similar. En una modalidad, el elemento genético es adecuado para la expresión procariótica, aunque se pueden utilizar otros sistemas de clonación.

Como se utiliza aquí, el término "diferentes locus" indican que el casete de expresión heterólogo para un primer producto objetivo seleccionado se localiza en la estructura viral en un sitio que no es contiguo con un segundo casete de expresión heterólogo, es decir, las secuencias virales están localizadas entre los casetes de expresión heterólogos. Estos locus pueden estar en diferentes regiones del gen o en diferentes estructuras

de lectura abierta diferente dentro de una región de gen simple. Alternativamente, los locus múltiples pueden estar dentro de una estructura de lectura abierta simple pero no contigua una con la otra, por ejemplo, separados por espaciadores, secuencias nativas, sitios de enzima de restricción, o similares.

Como se utiliza aquí un "casete de expresión" comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto para suministrarlo a una célula huésped. La secuencia de ácido nucleico que codifica el producto está bajo el control de la secuencias de control regulador que dirige la expresión del producto en el huésped. Adecuadamente, el casete de expresión es heterólogo a las secuencias del vector que flanquean el casete. En una modalidad, los elementos de control regulador en cada casete de expresión heterólogo difieren de los elementos de control regulador en los otros casetes de expresión heterólogos con el fin de minimizar (o eliminar) el riesgo de recombinaciones homólogas durante el proceso de clonación y en el proceso de manipulación viral en las células. En una modalidad, cada uno de los casetes de expresión heterólogos se suministra con diferentes promotores y/o mejoradores, y/o secuencias poli A. Sin embargo, en otras modalidades, un casete de expresión heterólogo en un vector polivalente de la invención puede tener uno o más elementos de control regulador en común con otro casete de expresión heterólogo en el vector polivalente. En tal modalidad, el elemento de control regulador es preferiblemente una secuencia corta, que no posibilite la recombinación.

Como se describe aquí, el producto codificado puede suministrar un objetivo para el sistema inmune, con el fin de inducir una respuesta humoral y/o inmune celular, puede ser un adyuvante para otro producto codificado, puede suministrar un efecto modulador inmune, y/o suministrar un efecto terapéutico. Las combinaciones de tales productos se pueden suministrar en un vector viral polivalente de acuerdo con la invención.

El término "funcionalmente suprimido" o "supresión funcional" significa que una cantidad suficiente de la región del gen se remueve o de otra forma se daña, por ejemplo, por mutación o modificación, de tal forma que la región del gen ya no es capaz de producir productos funcionales de la expresión del gen. Si se desea, la región del gen completa se puede remover. Otros sitios adecuados para la irrupción o supresión del gen se discuten en otras partes de la solicitud.

1. Construcción viral polivalente

A. Una Molécula de ADN que Lleva un Genoma Viral y Múltiples Genes Reporteros

En un aspecto, la presente invención suministra una molécula de ADN que lleva secuencias de un virus que debe ser empacado en un vector viral polivalente. En una modalidad, tal molécula de ADN es un plásmido. Sin embargo, otro elemento genético adecuado,

como se definió anteriormente se puede seleccionar. La introducción del vector en una célula se puede lograr por cualquier medio conocido en la técnica o como se describió aquí, incluyendo la transfección.

Las secuencias virales son seleccionadas de los tipos de virus que se desean para usar como un vehículo de suministro y que tienen suficiente espacio para acomodar múltiples casetes de expresión. Estas secuencias virales pueden ser fácilmente seleccionadas entre virus que tienen una proteína de cápsido, por ejemplo, adenovirus, o virus recubiertos, por ejemplo, retrovirus tales como el virus de la leucemia felina (FeLV), HTLVI y HTLVII], y lentivirinae [por ejemplo el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) el virus de la inmunodeficiencia de simios (VIS) el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), el virus de anemia infecciosa equina, y el spumavirinal]], los poxvirus (por ejemplo, canaripox), entre otros. Aún otros virus pueden ser fácilmente seleccionados por un experto en la técnica.

En una modalidad, las secuencias virales son de un adenovirus. Adecuadamente, la molécula de ADN polivalente contiene secuencias de ácido nucleico de un genoma adenoviral que contiene al menos la secuencia necesaria para empacar el genoma viral en un cápsido. Típicamente, una molécula adenoviral polivalente contendrá los cis-elementos adenovirales 5' y los cis-elementos adenovirales 3' y los terminales 5' y 3' del genoma adenoviral, respectivamente. El extremo 5' del genoma adenoviral

contienen los cis-elementos 5' necesarios para el empaquetamiento y la replicación; es decir, las secuencias repetidas terminales 5' (ITR) (que funcionan como orígenes de replicación) y los dominios del mejorador de empaque 5' (que contienen las secuencias necesarias para empaquetar los genomas Ad lineales y los elementos mejoradores para el promotor E1). El extremo 3' del genoma adenoviral incluye los cis-elementos 3' (que incluye los ITR) necesarios para el empaque y la encapsidación.

En además, la molécula de ADN polivalente puede contener secuencias adenovirales adicionales, o puede ser al menos funcionalmente suprimida en una o más regiones de gen adenoviral. En una modalidad, un vector adenoviral utilizado en la invención contendrá la región E2 o una porción funcional de esta (por ejemplo, la región que codifica E2a y/o E2b), y uno o más de los genes tardíos, por ejemplo, L1, L2, L3, L4 y L5. En algunas modalidades, los vectores de adenovirus utilizados en la invención pueden contener toda una porción de la región E4 (por ejemplo la E4 ORF6).

Por ejemplo, toda o una porción del gen temprano retrasado de adenovirus E3 se puede eliminar de la secuencia de adenovirus que forma una parte del vector. La función del E3 de simio se cree que es irrelevante para la función y producción de partícula de virus recombinante.

Por ejemplo, un vector Ad con E1 suprimido puede ser construido teniendo una supresión de al menos una región ORF6 del gen E4, o en razón de la redundancia en la función de esta región, la región E4 completa. Aún otro vector de esta invención contiene una supresión en el suprimido E2a. Adecuadamente, estos vectores retienen los genes tardíos (es decir L1, L2, L3, L4 y L5), y otros elementos esenciales para empacar los vectores adenovirales en partículas virales. La supresión también puede ser hecha en los genes intermedios IX y IVa₂ para algunos propósitos. Se pueden hacer otras supresiones en los otros genes adenovirales estructurales o no estructurales. Las supresiones discutidas anteriormente se pueden utilizar individualmente, es decir, la secuencia de adenovirus para uso en la presente invención puede contener supresiones o solamente una región simple. Alternativamente, la supresión de los genes o las porciones completas de estos efectivas para destruir su actividad biológica se pueden utilizar en cualquier combinación. Por ejemplo, en un vector de ejemplo, la secuencia de adenovirus puede tener supresiones de los genes E1, el gen E4, o los genes E1, con o sin la supresión de E3, y así sucesivamente.

En una modalidad, se utiliza el genoma lentiviral, típicamente, un plásmido de vector lentiviral contiene secuencias genéticas actuantes cis necesarias para que el vector infecte la célula objetivo ya para transferir los casetes de expresión heterólogos. Adecuadamente, las proteínas de recubrimiento original y el promotor de secuencia gag ha sido removido.

Las secuencias virales en la estructura del plásmido no necesitan estar limitadas a las secuencias por medio del tipo de cápsido o cubierta en al cual ellas están insertadas. Así, la estructura del plásmido puede contener secuencias virales de una fuente viral que están encapsidadas o empacadas en una cubierta desde otra fuente. Por ejemplo, un vector polivalente se puede empacar en una cubierta VIF; un vector VIF polivalente se puede empacar en una cubierta VIH; un vector adenoviral polivalente se puede empacar en un cápsido de otro serotipo. Aún otros vectores virales serotipo serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

Una vez que las secuencias virales son clonadas en un plásmido utilizando técnicas utilizadas por aquellos expertos en el arte, el genoma viral se altera para contener un primer casete movable localizado en una primera región suprimida de un genoma viral y un segundo casete movable localizado en una segunda región suprimida del genoma viral. Opcionalmente, el plásmido puede contener múltiples casetes movibles, cada uno localizado en un locus distinto del genoma viral. Cada uno de los casetes movibles está flanqueado por un único conjunto de sitios de enzima de restricción que permite su remoción selectiva del plásmido y la inserción fácil del casete de expresión heterólogo.

Cada uno de los casetes movibles utilizados en la invención contienen secuencias de ácido nucleico de un gen reportero

detectable operablemente a las secuencias que dirigirán la expresión de esta en una célula huésped. Adecuadamente, cada uno de los casetes movibles contiene un único gen reportero que es fácilmente distinguible de los genes reporteros llevados por otros casetes movibles llevados por la estructura del plásmido. En una modalidad, los genes reporteros expresan productos que son diferenciados uno del otro por el color.

Los genes reporteros adecuados incluyen aquellos que codifican productos que se pueden distinguir de otros genes reporteros llevados por la estructura del plásmido polivalente de la invención. Por ejemplo, las proteínas fluorescentes son distinguibles por el color luego de la excitación con la longitud de onda de luz apropiada, incluyendo, por ejemplo, proteína fluorescente roja, proteína fluorescente verde, proteína fluorescente azul, proteína fluorescente cian, proteína fluorescente amarilla-verde. Las proteínas fluorescentes adecuadas para uso para el tipo de célula huésped seleccionado están disponibles comercialmente, por ejemplo, de ClonTech. Aún otros genes reporteros adecuados que son distinguibles por el color incluyen, por ejemplo gusA (azul); DsRed (roja); luciferasa (rojo); y beta-galactosidasa. Alternativamente, un experto en la técnica puede suministrar otro gen reportero que se suministra con una etiqueta o marca, muchas de las cuales son conocidas por los expertos en la técnica.

Los genes reporteros adecuados se seleccionan con una vista al sistema de célula huésped utilizada para clonar. La célula huésped misma se puede seleccionar de cualquier organismo biológico, que incluye células procarióticas (por ejemplo bacterias), y células eucarióticas, que incluyen células de insectos, células de levadura y células de mamífero como se describe adelante con más detalle.

En una modalidad particularmente deseable, se utiliza el sistema procariótico. Además, la célula huésped es capaz de transfección del ADN y de la expresión del ADN transfectado, y de expresar el gen reportero seleccionado de la manera en la cual se desee, por ejemplo, colorimétricamente.

Ejemplos de sistemas procarióticos adecuados son bien conocidos, incluyendo células bacteriales. Por ejemplo, cepas de células bacteriales pueden incluir, por ejemplo, *Escherichia coli* C600 - F-, *el4*, *mcrA*, *thr-1 supE44*, *thi-1*, *leuB6*, *lacY1*, *tonA21*, *[[lambda]] [-]* [Huynh, Young, and Davis (1985) *DNA Cloning*, Vol. 1, 56-110]; DH1 - F[-], *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17* (*rk[-]*, *mk[+]*, *supE44*, *relA1*, *[[lambda]][-]* [-Hanahan (1983) *J Mol. Biol.* 166, 557-580; XL1Blue-MRF' - D(*mcrA*)182, D(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)172, *endA1*, *supE44*, *thi-1*, *recA*, *gyrA96*, *relA1*, *lac*, *1-*, [F'proAB, *lac I[q]ZDM15*, *Tn10 (tet[r])*]; SURE Cells [Stratagene]; *el4(mcrA)*, D(*mcrCB-hsdSMR-mrr*)171, *sbcC*, *recB*, *redJ*, *umuC::Tn5 (kan[r])*, *uvrC*, *supE44*, *lac*, *gyrA96*, *relA1*, *thi-1*, *endA1*[F'proAB, *lacI[q]DM15*, *Tn10(tet[r])*]; GM272 - F[-], *hsdR544*

(rk[-], mk[-]), supE44, supF58, lacY1 o [[Delta]]lacIZY6, galK2, galT22, metB1m, trpR55, [[lambda]][-]; HB101 -F[-], hsdS20 (rb[-], mb[-]), supE44, ara14, galK2, lacY1, proA2, rpsL20 (str[R]), xyl -5, mtl-1, [[lambda]] [-], recA13, mcrA(+), mcrB(-) [Raleigh and Wilson (1986) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 83, 9070-9074]; JM101 - supE, thi, [[Delta]] (lac-proAB) [F', traD36, proAB, lacIqZ[[Delta]]M15], restricción: (rk[+], mk[+]), mcrA+ [Yanisch-Perron et al. (1985) *Gene* 33, 103-119]; XL-1 blue recA1, endA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk[+], mk[+]), supE44, relA1, [[lambda]][-], lac, [F', proAB, lacIqZ[[Delta]]M15, Tn10 (tet[R])] [-Bullock, et al. (1987) *BioTechniques* 5, 376- 379]; GM2929 [from B. Bachman, Yale E.coli Genetic Stock Center (CSGC#7080)]; cepa M.Marinus; sex F[-]; (ara-14, leuB6, flvA13, lacY1, tsx-78, supE44, [glnV44], galK2, galT22, l[-], mcrA, dcm-6, hisG4, [Oc], rfbD1, rpsL136, dam-13::Tn9, xyl-5, mtl-1, recF143, thi-1, mcrB, hsdR2.); MC1000 - (araD139, D[ara-leu]7679, galU, galK, D[lac]174, rpsL, thi-1); ED8767 (F-, el4- [mcrA], supE44, supF58, hsdS3[rB[-]mB[-]], recA56, galK2, galT22, metB, lac-3 o lac3Y1. las células huéspedes procarióticas adecuadas están disponibles del American Type Culture Collection, Manassas, VA, Estados Unidos, otros depositarios públicos de células y una variedad de fuentes académicas y comerciales. La selección de un sistema o célula de clonación adecuado no es una limitación de la presente invención.

Cada uno de los casetes movibles utilizados en la construcción de la invención está flanqueado por un conjunto

único de sitios raros. Cada conjunto de sitios de enzima de restricción raros suministran un primer sitio de enzima de restricción raro en el extremo 5' del casete movable y un segundo sitio de enzima de restricción rara en el extremo 3' del casete movable. En una modalidad, el conjunto de sitios de enzima de restricción rara permite la clonación direccional de un casete de expresión en el locus. Sin embargo, la invención no está limitada a la dirección del inserto. En otras palabras, el casete movable y/o el casete de expresión heterólogo se puede localizar en el 5' a 3', o 3' a 5', con respecto a la orientación de la estructura de lectura del genoma viral circundante. Además, en ciertas modalidades, el conjunto de sitios de enzima de restricción raros puede permitir clonación no direccional del casete de expresión en el locus seleccionado.

En un ejemplo, la enzima de restricción rara I-SceI se puede seleccionar para los sitios de enzima de restricción tanto 5' como 3' que componen un conjunto simple. Esta enzima permite la clonación direccional, aún cuando el flanqueando ambos extremos de un casete. En otras modalidades, el I-SceI se puede utilizar en combinación con otra enzima de restricción rara para formar un conjunto de sitios de enzima de restricción. Adecuadamente, cada conjunto de enzimas de restricción raras es única, para permitir la digestión de solamente un locus simple y una inserción lista de un casete de expresión heterólogo en un sitio objetivo seleccionado.

En una modalidad adicional, la enzima de restricción rara se selecciona de tal forma que el o las localizaciones seleccionadas en el genoma viral son clivadas, es decir, se logra el clivaje solamente en los extremos 5' y 3' del casete movable y/o del casete de expresión heterólogo, y el elemento genético que lleva el genoma viral o las otras localizaciones en el genoma viral son cortadas.

En la presente solicitud, tal enzima de restricción es denominada cortador raro. Ejemplos de tales cortadores raros incluyen aquellos que tienen sitios de reconocimiento para siete, ocho, o más bases, incluyendo, por ejemplo, I-Ceu I, PI-Sce I, TevII, BmoI, DmoI, FseI, PacI, PmeI, PsrI, BcgI, BgII, BsabI, BstXI, DrdI, EcoNI, FseI, MaM I, Msi I, Mwo I, Psha I, Sfi I, Swa I, Xcm I, y Xmn I, y similares. Los cortadores raros adecuados se pueden identificar utilizando información fácilmente disponible para aquellos expertos en la técnica en la literatura y en una variedad de base de datos en línea, por ejemplo, las base de datos REBASE™. Los cortadores adecuados para el método se pueden utilizar fácilmente utilizando una variedad de programas de computador y/o bases de datos en línea. Las enzimas de restricción adecuada están disponibles de una variedad de fuentes comerciales incluyendo, por ejemplo, England Biolabs, Obiogene, Lift Technology, Roche, BB Clontech, Stratagene, Amersham Pharmacia, entre otros.

Así, el plásmido polivalente de la invención contiene al menos dos casetes movibles, cada uno de los cuales está flanqueado por un conjunto único de enzimas de restricción raras que permiten el reemplazo selectivo de los casetes movibles con un casete de expresión heterólogo. Estos plásmidos polivalentes son transfectados en células huéspedes que permiten la expresión de los marcadores llevados por los casetes movibles.

B. Vectores de Transferencia Polivalente que Llevan Casetes de Expresión Heterólogo

Una vez que la o las enzimas de digestión apropiadas se seleccionan, se utilizan técnicas de digestión y religación convencionales. Típicamente, el ADN del plásmido se mezcla con el o las enzimas de restricción y se incuba durante aproximadamente 12 a 48 horas. Luego de esto, una etapa de extracción de fenol/cloroformo convencional se desarrolla. Por ejemplo, la extracción de fenol/cloroformo se puede utilizar, seguida por la precipitación con etanol, y al disolver el precipitado (por ejemplo en TE u otro amortiguador adecuado) para uso en el resto de las etapas del método. Ver, Sambrook, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., 5.28-5.32, Appendix E.3-E.4 (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989). Otros métodos adecuados se pueden suministrar por el fabricante o vendedor de la enzima de restricción utilizada. O conocida de otra forma por el experto en la técnica

Típicamente, con el fin de asegurar la inserción adecuada del casete de expresión heterólogo los casetes de expresión heterólogo están flanqueados en sus extremos 5' y 3' con sitios de restricción de enzima de restricción que son complementarios al conjunto de sitios de enzima de restricción que flanquean el casete movable para el sitio en el cual está insertado los casetes de expresión.

Así, típicamente, un primer casete de expresión heterólogo se clona en el sitio del casete movable extirpado. Ventajosamente, el método de la invención posibilita la rápida identificación de plásmidos que contienen el primer casete de expresión heterólogo. A tales plásmidos les falta la expresión del primer gen marcador pero expresaran el segundo producto de gen marcador (así como también otros productos de gen marcador presentes). En otras palabras, si el primer casete movable expresaba proteína fluorescente verde, la ausencia del color verde luego de la digestión y la religación indicará la remoción exitosa del casete movable en el sitio del primer gen marcador.

En una modalidad, la digestión y las etapas de religación son repetidas secuencialmente para cada uno de los casetes movibles. En otras palabras, la primer etapa de digestión se desarrolla utilizando un primer conjunto de enzima de restricción para remover el casete movable simple, con el fin de asegurar el casete de expresión heterólogo se inserte en locus deseado. Posteriormente, se desarrolla una segunda etapa de digestión

utilizando un segundo conjunto de enzima de restricción único al conjunto flanqueando el segundo casete movable. Un segundo casete de expresión heterólogo flanqueado por los sitios de enzima de restricción correspondientes al conjunto que flanquea el segundo casete movable se liga en la estructura del plásmido y se seleccionan los clones a los que les falta la expresión del segundo gen marcador. Opcionalmente, una o más etapas de digestión se desarrollan con el fin de remover uno o más casetes movibles adicionales.

Así, el método de la invención permite la producción eficiente de un vector de transferencia polivalente útil para la producción de partículas virales infecciosas.

II. Método para Producir Vector Viral Polivalente

Un vector de transferencia polivalente de la invención se puede utilizar para generará partículas virales, que tienen un cápsido o una cubierta, utilizando métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica. Tales técnicas incluyen técnicas de clonación convencionales de cADN tales como aquellas descritas en los textos [Sambrook et al, citados anteriormente], el uso de secuencias de oligonucleótido traslapante de los genomas de adenovirus, reacción de cadena de polimerasa y cualquier método adecuado que suministre la secuencia de nucleótido deseada. La transfección estándar y las técnicas de co-transfección son empleadas, por ejemplo, las técnicas de precipitación CaPO_4 .

Otros métodos convencionales empleados incluyen la recombinación homóloga de genomas virales, el plaqueo de virus en cubiertas de agar, métodos de medición de generación de señal, y similares.

Las líneas de células de producción adecuadas son fácilmente seleccionadas por un experto en la técnica. Por ejemplo, la célula huésped adecuada se puede seleccionar de cualquier organismo biológico, incluyendo células procarióticas (por ejemplo bacteriales), y células eucarióticas, que incluyen células de insectos, células de levadura y células de mamífero. Las células huésped se puede seleccionar de entre cualquier especie de mamífero, incluyendo, sin limitación células tales como A549, WEHI, 3T3, 10T1/2, HEK 293 o las células PERC6 (las cuales ambas expresan el El adenoviral funcional) [Fallaux, FJ et al, (1998), *Hum Gene Ther*, 9:1909-1917], Saos, C2C12, células L, HT1080, HepG2 y fibroblasto primario, hepatocito y células de mioblasto derivadas de mamífero que incluyen humano, mono, ratón, rata, conejo y hámster. La selección de las especies de mamífero que suministran las células no es una limitación de esta invención; y es el tipo de célula de mamífero, es decir, fibroblasto, hepatocito, célula tumoral etc.

Generalmente, cuando se suministra el vector de transferencia polivalente que comprende los casetes de expresión heterólogo a una célula huésped mediante la transfección, la estructura se suministra en una cantidad de aproximadamente 5 µg a aproximadamente 100 µg de ADN o aproximadamente 10 a

aproximadamente 50 μg de ADN a aproximadamente 1×10^4 células a aproximadamente 1×10^{13} células, o aproximadamente 1×10^5 células. Sin embargo, las cantidades relativas de ADN de plásmido a las células huésped se pueden ajustar, tomando en consideración tales factores como el vector seleccionado, el método de suministro y las células huéspedes seleccionadas.

Típicamente, los vectores de transferencia polivalente son cultivados en células huésped que expresan la proteína de cápsido y/o la proteína de cubierta. En las células huésped, los genomas virales polivalentes que expresan los casetes de expresión heterólogo son rescatados y empacados en la proteína de cápsido o la proteína de cubierta para formar una partícula viral infecciosa.

A. Vectores Virales que tiene Proteína de de Cápsido



En una modalidad, la invención suministra un método para empacar genoma viral polivalente en un cápsido viral infeccioso.

En una modalidad, el cápsido viral se deriva de un adenovirus. La partícula adenoviral o vector de la presente invención está compuesta de un cápsido con proteína de adenovirus infeccioso que tiene empacado en el un genoma viral polivalente que contiene dos o más casetes de expresión heterólogos, cada uno de estos casetes lleva un producto para ser expresado en el huésped. En una modalidad, adicional, estos vectores adenovirales

son defectuosos en replicación, evitando de esta manera la replicación en una célula huésped.

La selección del serotipo de las secuencias adenovirales presentes en el vector no es una limitación de la presente invención. Una variedad de cepas de adenovirus están disponibles de la American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, o disponible al solicitar de una variedad de fuentes comerciales e institucionales. Además, las secuencias de muchas cepas están disponibles de una variedad de bases de datos que incluyen, por ejemplo, PubMed™ y GenBank™. Los vectores de adenovirus homólogos preparados de otros adenovirus de simio o de humano se describen en la literatura publicada [ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 5,240,846]. La secuencia de ADN de un número de tipos de adenovirus están disponibles del GenBank, incluyendo el tipo Ad5 [GenBank™ Accession No. M73260]. Las secuencias de adenovirus se pueden obtener de cualquier serotipo de adenovirus conocido, tales como los serotipos 2, 3, 4, 7, 12 y 40, e incluyendo adicionalmente cualesquier tipos humanos actualmente identificados. Similarmente los adenovirus conocidos por infectar animales no humanos (por ejemplo simios) también se pueden emplear en las construcciones de vector de esta invención. En una modalidad, al menos uno de los adenovirus utilizados en la invención se deriva de un primate no humano. Ejemplos de secuencias de primates no humanos adecuadas incluyen adenovirus de simio tal como, Pan5 (también C5), Pan6 (también C6), Pan7 (también C7), Pan 9 (también C68) y C1. Los adenovirus

recombinantes se han descrito para suministro de las moléculas a las células huésped. Ver, Patente Estadounidense No. 6,083,716, que suministra vectores adenovirales derivados de dos adenovirus de chimpancé, C1 y C8 (también denominado Pan9) y la Solicitud de Patente Internacional No. WO 02/33645 [los vectores derivados Pan5, Pan6, Pan7 y Pan9]. Sin embargo, la invención no está limitada así.

Una variedad de métodos de producción para partículas adenovirales son conocidos por el experto en la técnica. La solución de los métodos de producción apropiados no son una limitación de la presente invención. Ver, por ejemplo Patente Estadounidense No. 6,083,716; Solicitud de Patente Internacional No. WO 02/33645; y Solicitud de Patente Estadounidense No. 10/465,302 y su contraparte internacional, WO 2005/001103.

En resumen, el vector de transferencia adenoviral polivalente de la invención al que le falta la capacidad de expresar una versión funcional de cualquier producto de gen adenoviral esencial (por ejemplo, E1a, E1b, E2a, E2b, y/o E4 ORF6) se puede cultivar en la presencia de productos de gen adenoviral faltantes que se requieren para la infectividad viral y la propagación de una partícula adenoviral. Estas funciones ayudantes se pueden suministrar al cultivar la estructura en la presencia de uno o más construcciones ayudantes (por e, un plásmido o virus) o una célula huésped de empaque. Ver, por ejemplo, las técnicas descritas para la reparación de un vector

(Ad) de adenovirus humano "mínimo" en la Publicación de Patente Estadounidense No. WO96/13597, publicada en Mayo 9, 1996.

1. Virus Ayudante

Así, como entendiendo el contenido de gen de adenovirus de el vector de transferencia polivalente empleado para llevar en los casetes de expresión, un adenovirus ayudante o un fragmento de virus no replicante puede ser necesario para suministrar secuencias de gen de adenovirus suficientes necesarias para producir una partícula viral recombinante infecciosa que contiene el casete de expresión. Los virus ayudante útiles contienen secuencias de gen de adenovirus seleccionadas no presentes en la construcción del vector de adenovirus y/o no expresadas en la línea celular de empaque en la cual el vector es transfectado. En una modalidad, el virus ayudante es defectuoso en replicación y contiene una variedad de genes de adenovirus además de las secuencias descritas anteriormente. Tales virus ayudante son deseablemente utilizados en combinación con una línea celular que expresa E1.

Los virus ayudantes también se puede formar en conjugados de polimerización como se describe en Wu et al, *J. Biol. Chem.*, **264**:16985-16987 (1989); K. J. Fisher and J. M. Wilson, *Biochem. J.*, **299**:49 (Abril 1, 1994). Los virus ayudante pueden contener opcionalmente un segundo casete de expresión reportero. Un número de tales genes reporteros son conocidos en la técnica. La

presencia del gen reportero sobre el virus ayudante es diferente del producto del gen sobre el vector de adenovirus permite tanto el vector de estructura Ad como el virus ayudante sean independientemente monitoreados. Este segundo reportero es utilizado para posibilitar la separación entre el virus recombinante resultante y el virus ayudante luego de purificación.

2. Líneas Celulares de Complementación

Para generar los adenovirus recombinantes (Ad) suprimidos en cualquiera de los genes descritos anteriormente, la función de la región del gen suprimido, si es esencial para la replicación e infectividad del virus, se debe suministrar al virus recombinante mediante un virus ayudante o línea celular, es decir, una complementación o línea celular de empaque. En muchas circunstancias, la línea celular que expresa el El humano se puede utilizar para transcomplementar un vector Ad de chimpancé. Esto es particularmente ventajoso porque, debido a la diversidad entre las secuencias Ad de chimpancé de la invención y las secuencias Ad El humanas encontradas en células de empaque habitualmente disponibles, el uso de las células que contienen El humano habituales evita la generación de adenovirus competentes para replicación durante los procesos de replicación de producción. Sin embargo, en ciertas circunstancias, será deseable utilizar una línea celular que exprese el o los productos de gen El para la producción de un adenovirus de simio con El suprimido.

Tales líneas celulares se han descrito. Ver, por ejemplo, Patente Estadounidense No. 6,083,716.

Si se desea, uno puede utilizar las secuencias suministradas aquí para generar una célula de empaque o una línea celular que exprese, como mínimo, el gen E1 de adenovirus bajo el control transcripcional de un promotor para la expresión en una línea celular pariente seleccionada. Los promotores inducibles o constitutivos se pueden emplear para este propósito. Ejemplos de tales promotores se describen en detalle en cualquier parte en esta especificación. Una célula padre se selecciona para la generación de una línea celular novedosa que expresa cualquier gen Ad deseado. Sin limitación, tal línea celular padre puede ser HeLa [Acceso ATCC No. CCL 2], A549 [Acceso ATCC No. CCL 185], HEK 293, KB [CCL 17], Detroit [por ejemplo Detroit 510, CCL 72] y WI-38 [CCL 75], entre otros. Estas líneas celulares están todas disponibles en el American Type Culture Collection, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209. Otras líneas celulares padre adecuadas se pueden obtener de otras fuentes.

Tales líneas celulares que expresan E1 son útiles en la generación de vectores con E1 suprimido de adenovirus recombinante. Adicionalmente, o alternativamente, la invención suministra líneas celulares que expresan uno o más productos de gen adenoviral de simio, por ejemplo, E1a, E1b, E2a, y/o E4 ORF6, pueden ser construidas utilizando esencialmente los mismos procedimientos para el uso en la generación de vectores virales

de simio recombinantes. Tales líneas celulares se pueden utilizar para transcomplementar vectores de adenovirus suprimidos en los genes esenciales que codifican aquellos productos. La preparación de una célula huésped de acuerdo con esta invención involucra técnicas tales como el montaje de secuencias de ADN seleccionados. Este montaje se puede lograr utilizando técnicas convencionales. Tales técnicas incluyen cADN y clonación genómica, que son bien conocidas y se describen en Sambrook et al., citadas anteriormente, el uso de secuencias de oligonucleótido traslapantes de los genomas de adenovirus, combinadas son reacción de cadena de polimerasa, métodos sintéticos, en cualquiera otros métodos adecuados que suministran la secuencia de nucleótido deseada.

En aún otra alternativa, los productos de gen adenoviral esenciales se suministran en trans por un vector y/o virus ayudante. En tal caso, una célula huésped adecuada se puede seleccionar de cualquier organismo biológico, que incluye células procarióticas (por ejemplo bacterianas), y células eucarióticas, que incluyen células de insectos, células de levadura y células de mamífero. Las células huéspedes adecuadas incluyen aquellas conocidas en la técnica, así como también aquellas identificadas aquí.

3. Montaje de partícula viral y transfección de una línea celular

Uno o más de los genes adenovirales faltantes pueden ser establemente integrados en el genoma de la célula huésped, establemente expresado como episomas, o expresado transitoriamente. Los productos de gen se pueden expresar todos transitoriamente, sobre un episoma o establemente integrados, o algunos de los productos de gen se pueden expresar establemente mientras otros son expresados transitoriamente.

Adicionalmente, los promotores para cada uno de los genes adenovirales se pueden seleccionar independientemente de un promotor constitutivo, un promotor inducible o un promotor adenoviral nativo. Los promotores se pueden regular como por ejemplo, mediante un estado fisiológico específico del organismo o de la célula (es decir, por el estado de diferenciación o en células replicantes o quiescentes) o mediante factores agregados exógenamente. La introducción de moléculas (como plásmidos o virus) en la célula huésped también se logra utilizando técnicas conocidas por el experto como se discute a través de la especificación. En una modalidad, se utilizan técnicas de clonación directa. Tales técnicas se han descrito [G. Gao et al, *Gene Ther.* 2003 Oct; 10(22):1926-1930; Publicación de Patente No. 2003-0092161-A, May 15, 2003; Solicitud de Patente Internacional No. PCT/US03/12405]. En otra modalidad, son utilizadas técnicas de transfección estándar, por ejemplo, transfección o electroporación CaPO_4 . El montaje de la secuencia de ADN seleccionadas de la adenovirus (así como también las secuencia que codifican el producto y los otros elementos del vector) en

varios plásmidos intermedios, y en uso de los plásmidos y vectores para producir una partícula viral recombinante son todas logradas utilizando técnicas convencionales. Por ejemplo, luego de la construcción y montaje del vector viral polivalente deseado, el vector se transfecta *in Vitro* en la presencia de un virus ayudante en la línea celular de empaque. La recombinación homologa ocurre entre el ayudante y la secuencia de vector, que le permite a las secuencias de adenovirus-gen en el vector se replicada y empacadas en cápsidos de virión, que resultan en partículas de vector viral recombinantes. El método habitual para producir tales partículas de virus está basado en la transfección. Sin embargo, la invención no está limitada a tales métodos.

Los adenovirus recombinantes resultantes son útiles para transferir dos o más casetes de expresión heterólogos seleccionados a una célula seleccionada.

B. VECTORES VIRALES QUE TIENEN PROTEÍNAS DE CUBIERTA

En otra modalidad, los vectores de transferencia de la invención son utilizados para empacar un vector viral en una partícula infecciosa de un virus que tiene una proteína de cubierta, por ejemplo, in lentivirus o un poxvirus. Ejemplos de lentivurs adecuados incluyen, por ejemplo, el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), el virus de la inmunodeficiencia de simio (VIS), el virus de la artritis y la encefalitis caprina,

el virus de la anemia infecciosa equina, el virus de la inmunodeficiencia bovina, el virus visna, y el virus de la inmunodeficiencia felina (VIF). Los ejemplos suministrados aquí ilustran el uso de minigenes derivados de VIH y VIF. Sin embargo, otros lentivirus de origen humano o no animal también se pueden utilizar. Las secuencias utilizadas en las construcciones de la invención se pueden derivar de fuentes académicas, sin ánimo de lucro (por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassas, Virginia) o comerciales de lentivirus.

Los métodos para generar tales vectores virales son conocidos por aquellos expertos en la técnica.

Los métodos para producir vectores lentivirales han sido descritos métodos para producir vectores lentivirales. Ver, por ejemplo, JE Coleman, et al, *Physiol Genomics*. 2003 Feb 6;12(3):221-8., que describe la producción de un sistema lentiviral basado en VIH-1 que utiliza vectores lentivirales autoinactivantes. En un ejemplo, los vectores lentivirales son creados en un sistema de transfección transitorio en el cual la línea celular es transfectada con tres sistemas de expresión de plásmidos separados. Estos incluyen el plásmido de vector de transferencia, que se produce de acuerdo con la presente invención y contienen porciones del provirus lentiviral seleccionado y los casetes de expresión heterólogos, el plásmido de empaque o la construcción, y un plásmido con un gen de cubierta lentiviral (ENV) que puede ser una proteína de cubierta

o el mismo lentivirus o un virus diferente [Amado y Chen, *Lentiviral Vectors - the Promise of Gene Therapy Within Reach?* Science. **285** (5428): 674-76 (1999)]. Los tres componentes de plásmido del vector son puestos en una célula de empaque que es luego insertada en una cubierta lentiviral.

En una modalidad, el plásmido de vector de transferencia contiene secuencias genéticas actuantes cis necesarias para que el vector inserte la célula objetivo y para transferir el gen terapéutico (o reportero) y contiene sitios de restricción para la inserción de los genes deseados. Los LTR 3' y 5', las proteínas de cubierta original, y el promotor de secuencia gag han sido removidos. Los plásmidos de empaque contienen los elementos requeridos para el empaque del vector tal como proteínas estructurales, genes de VIH (excepto el gen env que codifica para la infección de células T, o el vector sería solamente capaz de infectar estas células), y las enzimas que generan partículas de vector. Típicamente, las señales de empaque y sus señales adyacentes son removidas de tal forma que las partes responsables para empacar el ADN viral se han separado de las partes que las activa. Así, las secuencias de empaque no se incorporaran en el genoma viral y el virus no se reproducirá después de que este ha infectado la célula huésped.

El tercer gen de cubierta de plásmido de un virus diferente específica que tipo de célula al objetivo e infectada del lugar de las células T, por ejemplo, la glicoproteína de virus de

estomatitis vesicular, conocida como VSV, MLV, entre otros. Normalmente el VIH puede infectar solamente células T ayudantes por que ellos utilizan su proteína gp120 para unirse al receptor CD4. Sin embargo, es posible intercambiar genéticamente la proteína de unión de receptor de CD4 para otra proteína que codifica para diferente tipo de célula sobre el cual será desarrollada la terapia de gen. Este le da al vector lentiviral un amplio rango de células objetivo posible. Otro método de producción lentiviral y elementos de vector se describen en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 03/092582, que se incorpora como referencia.

Aún otros vectores virales recubiertos se pueden producir utilizando los métodos de estructura virales polivalentes de la invención. Ver, por ejemplo, "The Uses of Poxviruses as Vectors", *Current Gene Therapy*, vol. 3, no. 6, pp. 583-595 (December 2003); M. E. Perkus, et al, "Poxvirus-based vaccine candidates for cancer, AIDS, and other infectious diseases", *Journal of Leukocyte Biology*, Vol 58, Issue 1 1-13, (1995).

III. Usos de Vector Viral Polivalente

Los vectores virales polivalentes de la invención son formulados en la composición que contiene una vehiculo fisiológicamente compatible. Estas composiciones son útiles en una variedad de regimenes terapéuticos y de inmunización. Ventajosamente, la expresión de los productos de gen múltiples

provenientes de vectores virales polivalentes puede reducir la cantidad del vector u otra droga como necesaria para suministrar al sujeto para lograr el efecto biológico deseado.

En una modalidad, el vector viral polivalente de la invención contiene un casete de expresión heterólogo que lleva un producto terapéutico. Tal vector viral polivalente puede llevar además uno o más productos terapéuticos. Un producto terapéutico adicional puede ser dirigido al tratamiento de las mismas condiciones o síntomas relacionados con el primer producto terapéutico, o a una indicación diferente. Cuando se desea, el producto de gen terapéutico seleccionado se puede suministrar par modular cualquier reacción al vector viral polivalente.

En otra modalidad, el vector viral polivalente de la invención contiene un casete de expresión heterólogo que lleva un producto que induce una respuesta humoral y/o citotóxica a un objetivo. Tal vector viral polivalente puede además llevar uno o más adicionales de tales productos inmunogénicos. Este segundo producto puede ser dirigido para inducir una respuesta inmune al objetivo, o un objetivo de reactivo al cruce. En otra modalidad, el segundo producto puede ser un producto terapéutico diseñado para tratar síntomas asociados con la condición subyacente. En aún otra modalidad, en el segundo producto puede ser un adyuvante para otro producto de gen suministrado por el vector viral polivalente. En aún otra modalidad, el segundo producto es un

producto terapéutico suministrado para modular cualquier reacción del vector viral polivalente.

Como se utiliza aquí, los moduladores inmunes incluyen productos que modifican la reacción del sistema inmune, por ejemplo, a un vector viral. Ejemplos de moduladores inmunes incluyen, por ejemplo, citoquinas e interleuquinas.

Como se utilizan aquí, los compuestos inmunomodulatorios adecuados pueden incluir, por ejemplo, inmunoglobulinas CTLA4; anticuerpos anti-CD4; FK506; e interleuquinas (IL), que incluye cualquiera de IL1-21, por ejemplo, IL-2, IL-3, IL-4, IL-10, IL-12, y IL-18. Por ejemplo, el IL-10 puede ser útil para submodular una respuesta antiinflamatoria local; el ligando Fas puede ser útil en subregular respuesta de células T mediadas por adenovirus.

Aún otras combinaciones adecuadas de productos para ser suministradas en un vector viral polivalente de la invención, en un cóctel que contiene uno o más vectores virales polivalentes de la invención, o en régimen que involucra el suministro de uno o más vectores virales polivalente de la invención, será evidente para aquellos expertos en la técnica de la presente especificación.

A. Vector Viral Polivalente-Suministro Mediado De Moléculas Terapéuticas

En una modalidad, los vectores polivalentes se administran a humanos de acuerdo a los métodos publicados para la terapia génica. Un vector polivalente viral que lleva múltiples de casete de expresión heterólogos puede ser administrado a un paciente, preferiblemente suspendido en una solución biológicamente compatible o un vehículo de suministro farmacéuticamente aceptable. Un vehículo adecuado incluye solución salina estéril. Otras soluciones de inyección estériles acuosas e isotónicas no acuosas y suspensiones estériles acuosas y no acuosas conocidas por ser vehículos farmacéuticamente aceptables y bien conocidos por aquellos expertos en la técnica se pueden emplear para este propósito.

Los vectores polivalentes fueron administrados en cantidades suficientes para transducir las células blancas y para suministrar niveles suficientes de transferencia de gen y expresión para suministrar un beneficio terapéutico sin efectos fisiológicos adversos indebidos o médicamente aceptables, que se pueden determinar por aquellos expertos en las ciencias médicas. Las rutas convencionales y farmacéuticamente aceptables de administración incluyen, pero no están limitados a, suministro directo a la retina y otros métodos de administración intraocular, suministro directo al hígado, inhalación intranasal, intravenosa, intramuscular, intratraqueal, subcutánea, intradérmica, rectal, oral y otras rutas parentales de administración. Las rutas de administración se pueden combinar,

si se desea, o ajustar dependiendo del producto del gen o la condición. La ruta de administración dependerá principalmente de la naturaleza de la condición a ser tratada.

Las dosis del vector viral dependerán principalmente de factores tales como la condición a ser tratada, la edad, peso y salud del paciente, y puede variar de esta manera entre pacientes. Por ejemplo, una dosis veterinaria o de humano adulto efectiva terapéuticamente del vector viral está generalmente en el rango de aproximadamente 100 μ L a aproximadamente 100 mL de un portador que contiene concentraciones de aproximadamente 1×10^6 a aproximadamente 1×10^{15} partículas, aproximadamente 1×10^{11} a 1×10^{13} partículas, o aproximadamente 1×10^9 a 1×10^{12} partículas de virus. Las dosis variaran de rango dependiendo del tamaño del animal y la ruta de administración. Por ejemplo, una dosis veterinaria o para humano adecuada (un animal de aproximadamente 80kg) para inyección intramuscular está en el rango de aproximadamente 1×10^9 a aproximadamente 5×10^{12} partículas por mL, para un sitio sencillo. Opcionalmente múltiples sitios de administración se pueden suministrar. En otro ejemplo una dosis veterinaria o para humano adecuada puede estar en el rango de aproximadamente 1×10^{11} a aproximadamente 1×10^{15} partículas para una formulación oral. Un experto en la técnica puede ajustar estas dosis, dependiendo de la ruta de administración, y la aplicación terapéutica o de vacuna para la cual se emplea el vector recombinante. Los niveles de expresión del producto terapéutico, o para un inmunógeno, el nivel de

anticuerpo circulatorio, se puede monitorear para determinar la frecuencia de administración de dosis. Todavía otros métodos para determinar el tiempo de frecuencia de administración serán fácilmente evidentes para un experto en la técnica.

En una modalidad, el vector viral polivalente contiene un casete de expresión heterólogo que codifica un producto terapéutico y un casete de expresión heterólogo que codifica un modulador inmune. El modulador inmune seleccionado se define aquí como un agente capaz de inhibir la formación de anticuerpos neutralizantes dirigidos contra el vector recombinante de esta invención o capaces de inhibir la eliminación del linfocito T citolítico (CTL) del vector. El modulador inmune puede interferir con las interacciones entre los subconjuntos auxiliares T (T_{H1} o T_{H2}) y las células B inhibir la formación de anticuerpo neutralizante. Alternativamente, el modulador inmune puede inhibir la interacción entre las células T_{H1} y CTL para reducir la ocurrencia de eliminación CTL del vector. Una variedad de moduladores inmunes útiles y dosis para uso del mismo se describen, por ejemplo, en Yang et al., *J.Virol*, 70(9) (Sept., 1996); Publicación de Patente Internacional No. WO 96/12406, publicada en Mayo 2, 1996; y Publicación de Patente Internacional No. WO 96/26285.

1. Producto Terapéutico

Los productos terapéuticos útiles codificados por el casete de expresión heterólogo incluyen hormonas y factores de crecimiento y diferenciación que incluyen, sin limitación, insulina, glucagón, hormona de crecimiento (GH), hormona paratiroide (PTH), factor de liberación de hormona de crecimiento (GRF), hormona de estimulación de folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), gonadotropina coriónica humana (hCG), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angiopoyetinas, angioestatinas, factor de estimulación de colonia de granulocito (GCSF), eritropoyetina (EPO), factor de crecimiento de tejido conector (CTGF), factor de crecimiento de fibroblasto básico (bFGF), factor de crecimiento de fibroblasto ácido (aFGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento de transformación α (TGF α), factor de crecimiento derivado de plaqueta (PDGF), factores de crecimiento de insulina I y II (IGF-I y IGF-II), una cualquiera de la superfamilia de factor de crecimiento de transformación, que incluye TGF, activinas, inhibinas o cualquiera de las proteínas morfogénicas de hueso (BMP) BMPs 1-15, uno cualquiera de la familia de factor de diferenciación heregluin/neuregulin/ARIA/neu (NDF) de factores de crecimiento, factor de crecimiento de nervios (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), neurotrofinas NT-3 y NT-4/5, factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico derivado de líneas de células gliales (GDNF), neurturina, agrina, una cualquiera de la familia de semaforinas/colapsinas, nentrin-1 y nentrin-2, factor de crecimiento hepatocito (HGF), efrinas, noggin, gamua sónica e hidroxilasa tirosina.

Otros productos de gen útiles incluyen proteínas que regulan el sistema inmune que incluyen, sin limitación, citoquinas y linfoquinas tales como trombopoyetina (TPO), interleuquinas (IL) IL-1 a IL-25 (que incluyen, por ejemplo, IL-2, IL-4, IL-12 y IL-18), proteína timioattractiva monocito, factor de inhibidor de leucemia, factor de estimulación de colonia macrófago-granuloso, ligando Fas, factores de necrosis de tumor y, interferones, y, factor de célula madre, ligando flk-2/flt3. Productos de gen producidos por el sistema inmune también son útiles en la invención. Estos incluyen, sin limitación, inmunoglobulinas IgG, IgM, IgA, IgD e IgE, inmunoglobulinas quiméricas, anticuerpos humanizados, anticuerpos de cadena sencilla, receptores de célula T, receptores de célula T quiméricos, receptores de célula T de cadena sencilla, moléculas MHC clase I y clase II, así como también inmunoglobulinas construidas por ingeniería y moléculas MHC. Productos de gen útiles también incluyen proteínas reguladoras de complemento tales como proteínas reguladoras de complemento, proteínas de cofactor de membrana (MCP), factor acelerante de descomposición (DAF), CR1, CF2 y CD59.

Todavía otros productos de gen útiles incluyen uno cualquiera de los receptores para las hormonas, factores de crecimiento, citoquinas, linfoquinas, proteínas reguladoras y proteínas de sistema inmune. La invención abarca receptores para regulación de colesterol, que incluyen receptor de lipoproteína

46

de baja densidad (LDL), receptor de lipoproteína de alta densidad (HDL), receptor de lipoproteína de muy baja densidad (VLDL), y el receptor necrófago. La invención también abarca productos de gen tales como miembros de la superfamilia de receptores de hormona esteroide que incluye receptores de glicocorticoide y receptores de estrógeno, receptores de vitamina D y otros receptores nucleares. Adicionalmente, los productos de gen útiles incluyen factores de transcripción tales como factor de respuesta de suero, *jun*, *fos*, *max*, *mad*, AP-I, AP2, *myb*, MyoD y miogenina, proteínas que contienen ETS-box, TFE3, E2F, ATF1, ATF2, ATF3, ATF4, ZF5, NFAT, CREB, HNF-4, C/EBP, SP1, proteínas de unión CCAAT-box, factor de regulación de interferon (IRF-1), proteína de tumor Wilms, proteína de unión ETS, proteínas de unión STAT, GATA-box por ejemplo, GATA-3, y familia "forkhead" de proteínas de hélice aladas.

Otros productos de gen útiles incluyen, sintasa carbamoilo I, ornitina transcarbamilasa, sintasa arginosuccinato, liasa arginosuccinato, arginasa, hidrolasa fumarilacetato, hidroxilasa fenilalanina, α -1 antitripsina, glucosa-6-fosfatasa, deaminasa porfobilinogeno, factor VIII, factor IX, cistationa beta-sintasa, descarboxilasa setoacida de cadena ramificada, albumina, deshidrogenasa isovaleril-CoA, carboxilasa CoA propionilo, metil malonilo CoA mutasa, deshidrogenasa CoA glutarilo, insulina, beta-glucosidasa, carboxilato piruvato fosforilasa hepática, quinasa fosforilasa, descarboxilasa glicina, H-proteína, T-proteína, una secuencia reguladora de

transmembrana de fibrosis cística (CFTR), y una secuencia de cADN distrofina.

Otros productos de gen útiles incluyen polipéptidos de ocurrencia no natural, tal como polipéptidos quiméricos o híbridos que tienen una secuencia de aminoácido de ocurrencia no natural que contiene inserciones, eliminaciones o sustituciones de aminoácidos. Por ejemplo, pueden ser útiles inmunoglobulinas construidas por ingeniería de cadena sencilla en ciertos pacientes inmunocomprometidos. Otros tipos de secuencias de gen de ocurrencia no natural incluyen moléculas de antisentido y ácidos nucleicos catalíticos tales como ribosomas que se pueden utilizar para reducir la sobre expresión de un objetivo. La reducción y/o modulación de la expresión de un gen es particularmente deseable para tratamiento de trastornos hiperproliferativos caracterizados por células hiperproliferativas, como son los cánceres y soriasis. Polipéptidos objetivo incluyen aquellos polipéptidos que se producen exclusivamente o en niveles mayores en células hiperproliferativas comparadas con células normales. Antígenos objetivo incluyen polipéptidos codificados oncógenos tales como myb, myc, fyn, y el gen de translocación bcr/abl, ras, src, P53, neu, trk y EGRF. Adicionalmente a los productos oncogen como los antígenos objetivos, polipéptidos objetivo para tratamiento anticáncer y regímenes protectores incluyen regiones variables de anticuerpos hechos por linfomas de célula B y regiones variables de receptores de célula T de linfomas de células T que, en

algunas modalidades, también se utilizan como antígenos objetivos para enfermedades autoinmunes. Otros polipéptidos asociados con tumor se pueden utilizar como polipéptidos objetivo tales como polipéptidos que se encuentran en niveles mayores de células de tumor que incluyen el polipéptido reconocido por el anticuerpo monoclonal 17-1a y polipéptidos de unión de folato.

Otros polipéptidos terapéuticos adecuados y proteínas que pueden ser útiles par tratar individuos que sufren de enfermedades y trastornos autoinmunes al conferir una respuesta inmune protectora de amplio espectro contra objetivos que se asocian con receptores de célula que incluyen autoinmunidad y células que producen anticuerpos autodirigidos. Las enfermedades autoinmunes mediadas por célula T incluyen artritis reumatoide (RA), esclerosis múltiple (MS), síndrome de Sjögren, sarcoidosis, diabetes melitus dependiente de insulina (IDDM), tiroiditis autoinmune, artritis reactiva, espundiritis anquilosante, escleroderma, poliomiositis dermatomiositis, soriasis, vasculitis, granulomatosis de Wegener, enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa. Cada una de estas enfermedades se caracteriza por receptores de célula T (TCR) que se unen a antígenos endógenos e inician la cascada inflamatoria asociadas con enfermedades autoinmunes.

Los vectores virales polivalentes de la invención son particularmente bien adecuados para regimenes terapéuticos en los que múltiples suministros mediados-virales de productos de gen se

desea, por ejemplo, en regimenes que involucran readministración del mismo producto o regimenes de combinación que involucran suministro de otros productos de gen.

B. Suministro Mediado Por Viral Polivalente de Productos de Gen Inmunogénico

Los vectores virales polivalentes de la invención también se pueden emplear como composiciones inmunogénicas. Como se utiliza aquí, una composición inmunogénica es una composición a la que una respuesta humoral (por ejemplo, anticuerpos) o celular (por ejemplo, una célula T citotóxica) se monta a un producto administrado mediante la composición inmunogénica luego de administrar a un mamífero, y preferiblemente un primate. La presente invención suministra un vector viral polivalente que puede contener en cualquiera de sus eliminaciones de secuencia de adenovirus un primer casete de expresión heterólogo que codifica un inmunógeno deseado. El vector viral polivalente puede adicionalmente contener un casete de expresión heterólogo que codifica un adyuvante para el inmunógeno, productos inmunogénicos adicionales, un producto terapéutico, o un producto que subregula una respuesta inmune al vector viral polivalente.

Cuando el vector viral polivalente es un vector adenoviral polivalente adecuado para uso como una vacuna de virus recombinante viva en especies animales diferentes comparada con un adenovirus de origen humano, pero no se limita a tal un uso.

Los virus polivalentes recombinantes se pueden utilizar como vacunas terapéuticas o profilácticas contra cualquier patógeno para el cual el antígeno crucial para inducción de una respuesta inmune y capaz de limitar la extensión del patógeno se ha identificado y para el cual el cADN está disponible.

Tales composiciones de vacuna (u otros inmunogénicos) se formulan en un vehículo de suministro adecuado, como se describió anteriormente. De forma general las dosis para las composiciones inmunogénicas están en el rango definido anteriormente para las composiciones terapéuticas. Los niveles de inmunidad del gen seleccionados se pueden monitorear para determinar la necesidad, si existe, de refuerzo. Luego de una evaluación de los títulos de anticuerpo en el suero, puede ser deseable inmunizaciones por refuerzos opcionales.

Opcionalmente, una composición de vacuna de la invención se puede formular para contener otros componentes, que incluye, por ejemplo, adyuvantes, estabilizadores, ajustadores de pH, preservativos y similares. Tales componentes son bien conocidos por aquellos expertos en la técnica de vacunas. Ejemplos de adyuvantes adecuados incluyen, sin limitación, liposomas, alúmina, lípido A monofosforilo, y cualquier factor biológicamente activo, tal como citoquina, una interleocina, una quimosina, unos ligandos, y opcionalmente combinaciones de estos. Ciertos de estos efectos biológicamente activos se pueden expresar *in vivo*, por ejemplo, por vía de un plasmido o vector

viral. Por ejemplo, tal un adyuvante se puede administrar con una vacuna de ADN iniciadora que codifica un antígeno para mejorar la respuesta inmune específica de antígeno comparada con la respuesta inmune generada luego de iniciación con una vacuna de ADN que codifica solo el antígeno.

Los vectores virales polivalentes se administran en una "cantidad inmunogénicas", que es, una cantidad del vector viral polivalentes que es efectiva en una ruta de administración para transfectar las células deseadas y suministrar niveles suficientes de expresión del gen seleccionado para inducir una respuesta inmune. En donde se suministre una inmunidad protectora, los vectores virales polivalentes se considera que son composiciones de vacuna útiles en la prevención de infección y/o enfermedades recurrentes.

Alternativamente, o en adición, los vectores de la invención pueden contener un gen que codifica un péptido, polipéptido o proteína que induce una respuesta inmune a un inmunógeno seleccionado. Los vectores adenovirales polivalentes de esta invención se espera que sean altamente eficaces en inducir células T citolíticas y anticuerpos para ser insertados en la proteína antigénica heterólogo expresada por el vector.

Por ejemplo, se pueden seleccionar inmunógenos de una variedad de familias virales. Ejemplos de familias virales contra tal una respuesta inmune podría ser deseable incluir, la familia

picornavirus, que incluye el Norwalk rinovirus, que son responsables de cerca del 50% de los casos del resfriado común; el género enterovirus, que incluye poliovirus, coxsackievirus, ecovirus, y enterovirus humano tal como virus de la Hepatitis A; y el género aptovirus, que son responsables de enfermedades de pie y boca, principalmente en animales no humanos. Dentro de la familia picornavirus, los antígenos objetivos incluyen el VP1, VP2, VP3, VP4, y VPG. Otra familia viral incluye, la familia calcivirus, que abarca el grupo Norwalk de virus, que son un agente causante de gastroenteritis epidérmica. Todavía otra familia viral deseable para uso en antígenos objetivo para inducir respuesta inmune en humanos y animales no humanos es la familia togavirus, que incluye el género alfavirus, que incluye virus Sindbis, virus RossRiver, y virus de la encefalitis equina del este y oeste Venezolano, y rubivirus, que incluyen virus de la rubéola. La familia flaviviridae incluye dengue, fiebre amarilla, encefalitis Japonesa, encefalitis de St. Louis y virus de la encefalitis y virus de la fiebre ocurrenciente de África. Otros antígenos objetivos se pueden generar a partir del virus de la Hepatitis C [ver, por ejemplo, Solicitud De Patente Estadounidense Publicada No. US2003/190606 (Octubre 9, 2003); US 2002/081568 (Junio 27, 2002)] o la familia de conoravirus, que incluyen un número de virus no humano tal como virus de la bronquitis infecciosa (aves de corral), virus gastroentérico transmisible a porcinos (cerdos), virus de la encefalomiелitis hemaglutinante porcina (cerdos), virus de la peritonitis infecciosa de felinos (gatos), coronavirus entérico felino

(gatos), coronavirus canino (perro), y coronavirus respiratorio humano, que puede originar el resfriado común y/o Hepatitis A, B o C, y el agente causante putativo del síndrome respiratorio repentino agudo (SARS). Dentro de la familia de coronavirus, los antígenos objetivos incluyen el E1 (también llamado M o proteína matriz), E2 (también llamado S o proteína Spike), E3 (también llamado HE o elterosa-hemaglutinina) glicoproteína (no presente en todos los coronavirus), o N (nucleocápsidos). Todavía otros antígenos se pueden objetivar contra la familia rabdovirus que incluye el género vesiculovirus (por ejemplo, Virus De La Estomatitis Vesicular), y el lisavirus general (por ejemplo, rabia). Dentro de la familia rabdovirus, se pueden derivar antígenos adecuados a partir de la proteína G o la proteína N. la familia folivoridae, que incluye virus de la fiebre hemorrágica tal como virus Marburg y Ébola, pueden ser fuente adecuada de antígenos. La familia paramixovirus incluye parainfluenza Virus Tipo 1, parainfluenza Virus Tipo 3, Virus parainfluenza bovino Tipo 3, rubulavirus (virus de la paperas), Virus parainfluenza Tipo 2, Virus de parainfluenza Tipo 4, virus de la enfermedad Newcastle (gallinas), peste bobina, morbilivirus, que incluyen sarampión y moquillo canino, y neumovirus, que incluyen virus respiratorio sincitial. El virus de la influenza se clasifica dentro de la familia ortomixovirus y es fuente adecuada de antígeno (por ejemplo, la proteína HA, la proteína N1). La familia bunyavirus incluye el género bunyavirus (encefalitis de California, la Crosse), flebovirus (Fiebre del Valle Rift), hantavirus (puremala es un virus de la fiebre de hemahagina),

nairovirus (virus de las orejas de Nairobi) y varios bungavirus no asignados. La familia arenavirus suministra una fuente de antígenos contra virus de la fiebre LCM y Lassa. La familia reovirus incluye el género reovirus, rotavirus (que origina gastroenteritis aguda en niños), orbivirus, cultivirus (fiebre de la Garrapata de Colorado, Lebombo (humanos), encefalitis equina, lengua azul).

La familia retrovirus incluye la subfamilia oncorivirinal que abarca tales enfermedades veterinarias y de humanos como virus de la leucemia felina, HTLVI y HTLVII, lentivirinal (que incluye virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la inmunodeficiencia de simios (SIV), virus de la inmunodeficiencia felina (VIF), virus de anemia infecciosa equina, y espumavirinal). Entre los lentivirus, muchos antígenos adecuados se han descrito y se pueden seleccionar fácilmente. Ejemplos de antígenos VIH y SIV adecuados incluyen, sin limitación el gag, pol, Vif, Vpx, VPR, Env, Tat, Nef, y proteínas Rev, así como también varios fragmentos de estos. Por ejemplo, fragmentos adecuados de la proteína Env pueden incluir cualquiera de sus subunidades tales como el gp120, gp160, gp41, o fragmentos más pequeños de estos, por ejemplo, de al menos aproximadamente 8 aminoácidos de longitud. De forma similar fragmentos de esa proteína se pueden seleccionar. [Ver, Patente Estadounidense 5,891,994 y Patente Estadounidense 6,193,981]. Ver, también, las proteínas VIH y SIV descritas en D. H. Barouch et al, J. Virol., 75(5):2462-2467 (Marzo 2001), y R. R. Amara, et al, Science,

292:69-74 (6 Abril 2001). En otro ejemplo, las proteínas inmunogénicas VIH y/o SIV o péptidos se pueden utilizar para formar proteínas de fusión y otras moléculas inmunogénicas. Ver, por ejemplo, el VIH-1 Tat y/o proteínas de fusión Nef y regímenes de inmunización descritos en la Publicación de Patente Internacional No. WO 01/54719, publicada en Agosto 2, 2001, y la Publicación de Patente Internacional No. WO 99/16884, publicada en Abril 8, 1999. La invención no se limita a las proteínas inmunogénicas VIH y/o SIV o péptidos descritos aquí. Adicionalmente, una variedad de modificaciones a estas proteínas se ha descrito o se puede hacer fácilmente por un experto en la técnica. Ver, por ejemplo, la proteína gag modificada que se describe en la Patente Estadounidense No. 5,972,596. Adicionalmente, cualquier inmunógeno VIH y/o SIV deseado se puede suministrar solo o en combinación. Tales combinaciones pueden incluir la expresión de un vector sencillo o de múltiples vectores.

Opcionalmente, otra combinación puede incluir el suministro de uno o más inmunógenos expresados con el suministro de una o más inmunógenos en forma de proteína. Tales combinaciones se discuten en más detalle adelante. La familia papovavirus incluye la subfamilia poliomavirus (virus BKU y JCU) y la subfamilia papilomavirus (asociada con cánceres o progresión maligna de papilomas). Por ejemplo, los antígenos de papilomavirus y combinaciones de estos se han descrito. Ver, por ejemplo, Solicitud Estadounidense Publicada No. 2003/129199 (Julio 10,

2003); Solicitud Estadounidense Publicada No. 2002/18221 (Diciembre 15 2002); Patente Estadounidense No. 6,342,224.

La familia adenovirus incluye virus (EX, AD7, ARD, O.B.) que originan enfermedades respiratorias y/o enteritis. El parvovirus felino de la familia parvovirus (enteritis felina), panleucopeniavirus felina, parvovirus canina, y parvovirus porcina. La familia herpesvirus incluye la subfamilia alfa herpesvirinae, que abarca el género simplexvirus (HSV I, HSV II), varicellovirus (seudorabia, varicela zoster) y la subfamilia beta herpesvirinae, que incluye el género citomegalovirus (HCMV, muromegalovirus) y la subfamilia gamma herpesvirinae, que incluye el género limfocriptovirus, EBV (linfoma de Burkitts), rinotraqueitis infecciosa, virus de la enfermedad de Marek, y radinovirus. La familia poxvirus incluye la subfamilia cordopoxvirinae, que abarca el género ortopoxvirus (Variola (Smallpox) y Vaccinia (viruela vacuna)), parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporipoxvirus, suipoxvirus, y la subfamilia entomopoxvirinae. La familia hepadnavirus incluye el virus de la Hepatitis B. Un virus no clasificado puede ser fuente adecuada de antígenos es el virus delta de la Hepatitis. Todavía otras fuentes virales pueden incluir virus de la bursitis infecciosa aviar y virus del síndrome reproductivo y respiratorio porcino. La familia alfavirus incluye virus de arteritis equina y varios virus de encefalitis.

La presente invención también abarca inmunógenos que son útiles para inmunizar un humano o animal no humano contra otros patógenos que incluyen bacterias, hongos, microorganismos parásitos o parásitos multicelulares que infectan a los vertebrados humanos y no humanos, o de una célula de cáncer o célula de tumor. Ejemplos de patógenos bacteriales incluyen cocci gran positivo patogénico incluye pneumococci; staphylococci; y streptococci. Cocci patogenico gran negativo incluye meningococcus, gonococcus. Bacili gran negativo enterico patogenico incluye enterobacteriaceae; seudomonas, acinotobacteria y eikenella; melioidosis; salmonella; shigella; haemophilus; moraxella; *H. ducreyi* (que origina chancro); brucella; *Francisella tularensis* (que origina tularemia); yersinia (pasteurella); streptobacillus moniliformis y spirillum; bacilos gran positivos incluyen listeria monocitogenes; erysipelothrux rhusiopathiae; *Corynebacterium diphtheria* (difteria); colera; *B. anthracis* (antrax); donovanosis (granuloma inguinal); y bartonellosis. Enfermedades originadas por bacterias anaeróbicas patogénicas incluyen tetano; botulismo; otro Clostridia; tuberculosis; lepra; y otras micobacterias. Enfermedades espirocetales patogénicas incluyen sífilis; treponematosas: sífilis frambesia, pinta y endémica; y leptospirosis. Otras infecciones originadas por bacterias patógenos mayores y hongos patogénicos incluyen actinomicosis; nocardiosis; criptococcosis, blastomicosis, histoplasmosis y coccidioidomicosis; candidiasis, aspergilosis, y mucormicosis; sporotrichosis; paracoccidioidomicosis, petrieliidiosis, torulopsosis, micetoma y

cromomycosis; y dermatofitosis. Infecciones Rickettsial incluyen fiebre de Tifus, fiebre maculosa de las Montañas Rocosas, fiebre Q, y Rickettsialpox. Ejemplos de infecciones por micoplasma y clamidial incluyen: *Mycoplasma pneumoniae*; linfogranuloma venereum; serratosis; e infecciones clamidial perinatales. Eucariotes patógenos abarcan protozoos patógenos y helmintos e infecciones producidas por esos incluyen: amibiasis; malaria; leishmaniasis; tripanosomiasis; toxoplasmosis; *Pneumocystis carinii*; *Trichans*; *Toxoplasma gondii*; babesiosis; giardiasis; trichinosis; filariasis; squistosomiasis; nematodos; trematodos o "flukes"; e infecciones por "cestode" (tenia).

Muchos de estos organismos y/o toxinas producidas por estos se han identificado por lo centro de control de enfermedades [(CDC), Departamento de Salud y Servicios Humanos, USA], como agentes que tiene potencial para uso en ataques biológicos. Por ejemplo, algunos de estos agentes biológicos, incluyen, *Bacillus anthracis* (antrax), *Clostridium botulinum* y su toxina (botulismo), *Yersinia pestis* (peste), variola mayor (viruela), *Francisella tularensis* (tularemia), y fiebre hemorrágica viral [filovirus (por ejemplo, Ebola, Marburg], y arenavirus [por ejemplo, Lassa, Machupo]), todos los cuales se clasifican actualmente como agentes de categoría A; *Coxiella burnetii* (fiebre Q); especies *Brucella* (brucelosis), *Burkholderia mallei* (muermo), *Burkholderia pseudomallei* (meloidosis), *Ricinus communis* y su toxina (toxina ricina), *Clostridium perfringens* y su toxina (toxina epsilon), especies *Staphylococcus* y sus toxinas

(enterotoxina B), *Chlamydia psittaci* (sitacosis), amenazas de seguridad al agua {por ejemplo, *Vibrio cholerae*, *Cryptosporidium parvum*}, fiebre Tifo (*Rickettsia powazekii*), y encefalitis viral (alfavirus, por ejemplo, encefalitis equina Venezolana; encefalitis equina del este; encefalitis equina del oeste); todas las cuales se clasifican actualmente como agentes de Categoría B; y virus Nipán y hantavirus, que se clasifican actualmente como agentes de Categoría C. Adicionalmente, otros organismos, que también se clasifican o se clasifican en forma diferente, se pueden identificar y/o utilizar para tal un propósito en el futuro. Se entenderá fácilmente que los vectores virales y otras construcciones descritas aquí son útiles para suministrar antígenos a partir de estos organismos, virus, sus toxinas u otros subproductos, que evitaren y/o trataran la infección u otras reacciones adversas con esos agentes biológicos.

Administración de los vectores de la invención para suministrar inmunógenos contra la región variable de las células T elicitaba una respuesta inmune que incluye linfocitos T citotóxicos (CTL) para eliminar aquellas células T. en la artritis reumatoide (RA), varias regiones variables específicas del receptor de célula T (TCR) que se involucra en la enfermedad se han caracterizado. Estos TCR incluyen V-3, V-14, V-17 y V α -17. Así, el suministro de una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos uno de estos polipéptidos elicitará una respuesta inmune que objetivara a la célula T involucradas en RA. En esclerosis múltiple (MS), varias regiones específicas de TCR

que están involucradas en la enfermedad se han caracterizado. Estos TCR incluyen V-7 y V α -10. Así, el suministro de una secuencia que ácido nucleico que codifica al menos uno de estos polipéptidos elicitará una respuesta inmune que objetivara las células T involucradas en MS. En escleroderma, varias regiones específicas de TCR que están involucradas en la enfermedad se han caracterizado. Estos TCR incluyen V-6, V-8, V-14 y V α -16, V α -3C, V α -7, V α -14, V α -15, V α -16, V α -28 y V α -12. Así, el suministro de un adenovirus de simio recombinante que codifica al menos uno de estos polipéptidos elicitará una respuesta inmune que objetivará las células T involucradas en la escleroderma.

Los siguientes ejemplos ilustran la clonación de los adenovirus polivalentes y la construcción de vectores adenovirus polivalentes de ejemplo de la presente invención. Estos ejemplos son solo ilustrativos, y no limitan el alcance de la presente invención.

EJEMPLOS

Como se ilustra en las Figuras 1 y 2, el vector basado en Pan9 de adenovirus de chimpancé se construye como un vector de transferencia de polivalente de acuerdo con la presente invención.

A. CONSTRUCCIÓN DE MOLÉCULA DE ADN CON CASETES MÓVILES

Con referencia a la Figura 1, se selecciona un plásmido de estructura que lleva el genoma viral Pan9 de adenovirus de chimpancé, que tiene un casete marcador de proteína fluorescente verde mutante (GFP) en el sitio de la región del gen E1 Pan9, la hormona poli A de crecimiento bovino, y una eliminación E3 parcial. Este plasmado se describe en más detalle en la Publicación de Patente Internacional WO 2003/046124.

El pPan9-pkGFP se digiere con AvrII (Figura 1A) para remover la región E3 del Pan9 que se clona en pSL1180 [obtenido comercialmente de Pharmacia], para formar pSL1180-Pan9-Avr(II), que contiene el gen de resistencia a la ampicilina.

El plásmido RSV-Red2 contiene un promotor RSV, un promotor lac que controla el producto AsRed2 (Lac-AsRed2), flanqueado por un sitio I-SceI y PI-PspI, seguido por SV40 poli A. este plasmado pRSV-Red2 se construye al clonar el promotor RCV en una construcción de plásmido de pUC19 y pkRFP (Clontech). El plásmido pSL 1180-Pan9-Avr(II) se digiere por NruI (Figura 1B) para liberar el fragmento Pan9 E3, se digiere el pRSV-Red2 con PvuII y HpaI (Figura 1C) para liberar el casete I-SceI-RSV-lac-AsRed2-PI-SceI y religar para formar un plásmido SL 1180-Pan9-Avr(II) pkRFP, que contiene el gen de resistencia a la ampicilina, y el casete I-SceI-RSV-lac-AsRed2-PI-SceI en el sitio de la región E3.

También resultando de la digestión del AvrII del pPan9-pkGFP descrita anteriormente está un plásmido que contiene el genoma

viral Pan9 que tiene eliminación en la región E3 (Figura 1D); luego de la religación, el plásmido resultante se denomina pPan9-pkGFP-Avr(II). Este plásmido y el plásmido pSL 1180-Pan9-Avr(II)pkRFP se digieren con AvrII (Figura 1E) y se religan para formar un plásmido sencillo que contiene el gen reportero GFP en el locus E1 y el gen reportero RFP en el locus E3. El plásmido resultante se denomina pPan9-(E1)-pkGFP-(E3)pkRFP. Al seleccionar colonias que expresan proteínas amarillas, selecciona una para vectores que expresan las proteínas fluorescentes verde y amarilla.

Este diseño permite el lanzamiento fácil en los casetes de expresión de antígeno y la selección de colonia basada en color conveniente de recombinantes, que serán adecuados para la creación de vector de alto rendimiento.

B. CONSTRUCCIÓN DE VECTOR DE TRANSFERENCIA POLIVALENTE

Con el fin de construir un vector de transferencia polivalente de la invención, un primer casete de expresión heterólogo seleccionado se clona en un sitio apropiado en un vector de lanzamiento.

Con referencia a la Figura 2, esta se ilustra al clonar "antígeno 1" en un plásmido que contiene múltiples sitios de clonación, seleccionar el sitio flanqueado por los sitios de enzima de restricción que corresponde a aquellas en la región

deseada de la molécula de ADN producida de acuerdo con la parte A anterior, es decir flanqueada por los sitios I-CeuI y PI-SceI.

Un segundo casete de expresión heterólogo (antígeno 2) se clona en un vector apropiado (por ejemplo, pUC19-RSV) entre los sitios I-SceI.

Luego de la digestión con las enzimas apropiadas, los vectores que contienen los casetes de expresión heterólogos deseado se pueden seleccionar por medios colorimétricos. Más particularmente, así colonias que expresan el rojo luego de excitación con la longitud de onda apropiada de luz indican la presencia de vectores en los que los casetes de móviles que contienen el GFP se han reemplazado con antígeno 1, pero el casete móvil que contiene el RFP se ha retenido. Las colonias que expresan verde luego de excitación con la longitud de onda apropiada de luz indican la presencia de vectores en los que el casete móvil que contiene el RFP se ha reemplazado con el antígeno, pero el casete móvil que contienen el GFP se ha retenido. Las colonias que aparecen objetivos después de excitación con luz de la longitud de onda apropiada para el GFP y el RFP indican vectores en los que ambos casetes móviles se han reemplazado con casete de expresión heterólogo. Así, al seleccionar las colonias blancas, uno puede rápidamente y exactamente seleccionar los vectores de transferencia polivalente de la invención.

C. ESTUDIO DE IMPACTO DE UBICACIÓN (E1 O E3) Y ORIENTACIÓN DE CASETES DE TRANSGÉN EN LA EXPRESIÓN DE ANTÍGENO

Se clonan casetes de expresión CMV-hAlAT idénticos en el locus E1 del vector Pan9 E1-eliminado (también denominados en C9) y el locus E3 del vector C9 E1/E3 eliminado separadamente. Los virus C9 recombinantes que expresan AlAT de diferentes lugares se producen e inyectan en ratones C57BL/6 intravenosamente en una dosis de 1×10^{11} pts/ratón. Se extrae sangre de los animales en los días 3 y 7 postransferencia de gen y niveles de suero hAlAT se miden para comparación. Los datos revelan que el hAlAT expresado de locus E3 actualmente fue al menos dos veces mayor que aquel del locus E1. Ver, Figura 3:

El proceso de clonación de la invención tiene un sistema de selección de color dual conveniente para los recombinantes del vector mono o polivalente. Adicionalmente, estos datos demuestran que no hay efecto de pendiente de locus negativo en la expresión del transgén en vectores de adenovirus de simio.

Todas las publicaciones citadas en esta especificación, y la lista de secuencias, se incorporan aquí como referencia. Mientras que no se ha descrito la invención con referencia a modalidades particulares, se apreciara que se pueden hacer modificaciones sin apartarse del espíritu de la invención. Tales modificaciones se pretende caigan dentro del alcance de las reivindicaciones adjuntas.

REIVINDICACIONES

1. Una estructura de plásmido polivalente que comprende:

(a) un primer casete móvil ubicado en un primer locus de un genoma viral, dicho primer casete móvil comprende secuencias de ácido nucleico que comprenden un primer gen reportero detectable ligado a secuencias que dirigirán la expresión de este, dicho casete móvil se flanquea mediante un primer conjunto de sitios de enzima de restricción raros compuestos de dos sitios de enzima de restricción raros; y

(b) un segundo casete móvil ubicado en un segundo locus del genoma viral, dicho segundo casete móvil comprende secuencias de ácido nucleico que comprende un segundo gen reportero detectable ligado operablemente a las secuencias que dirigirán la expresión de este, dicho casete móvil se flanquea mediante un segundo conjunto de sitios de enzima de restricción raros compuestos de dos sitios de enzima de restricción raros;

en donde el producto de dicho primer gen reportero detectable y el segundo gen reportero detectable son distinguibles, y

68

en donde el primero y segundo conjunto de sitios de enzima de restricción raros difieren.

2. La estructura de plásmido polivalente de acuerdo con la reivindicación 1, comprende adicionalmente tres o más lugares.

3. La estructura de plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primero y segundo locus de ubican en diferentes regiones de gen dentro del genoma viral.

4. La estructura de plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primero y segundo locus de ubican en diferentes cuadros de lectura abierta dentro de una región de genoma <único del genoma viral.

5. La estructura de plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el primero y segundo locus de ubican dentro de un cuadro de lectura abierto único de una región de gen del genoma viral y no son contiguos con otro.

7. La estructura de plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, se diferencian de otro por color de producto.

8. La estructura de plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los genes reporteros detectables se seleccionan independientemente del grupo que consiste de proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, y beta-galactosidasa.
9. La estructura de plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el genoma viral es un genoma adenoviral.
10. La estructura de plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el genoma viral se selecciona del grupo que consiste un genoma lentiviral, genoma retroviral y genoma poxvirus.
11. La estructura de plásmido de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los dos sitios de enzima de restricción raros en el primer grupo se selecciona independientemente del grupo que consiste de I-Ceu I, PI-Sce I, TevII, BmI, y DmI, y difieren el uno del otro.
12. Un cultivo celular que comprende células transfectadas con la estructura de plásmido polivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Un método para generar un vector de transferencia polivalente, dicho método comprende las etapas de:

- (a) mezclar, en la presencia del primer conjunto de enzima, una estructura de plásmido polivalente de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y una primer molécula de ácido nucleico que comprende un primer casete de expresión heterólogo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto objetivo bajo el control de la secuencia reguladora que controla la expresión del producto, en donde dicho casete de expresión heterólogo se flanquea por el primer conjunto de sitios de enzima de restricción;
- (b) seleccionar para la ausencia del primer reportero detectable para suministrar estructuras de plásmido que contienen el primer casete de expresión heterólogo;
- (c) mezclar, en la presencia del segundo conjunto de enzima, una estructura de plásmido polivalente y una segunda molécula de ácido nucleico que comprende un segundo casete de expresión heterólogo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un producto objetivo bajo el control de la secuencia reguladora que controla la expresión del producto, en donde dicho casete de expresión heterólogo se flanquea por el segundo conjunto de sitios de enzima de restricción raros; y

(d) seleccionar para la ausencia del segundo reportero detectable para suministrar estructuras de plásmido que contienen el segundo casete de expresión heterólogo,

suministrar por lo tanto un vector de transferencia polivalente que contiene un genoma polivalente que comprende un primer casete de expresión en un primer locus y un segundo casete de expresión en un segundo locus.

14. El método de acuerdo a la reivindicación 13, en donde el primer gen reportero detectable es proteína fluorescente verde y el segundo gen reportero detectable es proteína fluorescente roja.

.

15. El método de acuerdo a la reivindicación 13, en donde el primer conjunto de enzimas es I-Ceu I y PI-Sce I.

16. El método de acuerdo a la reivindicación 13, en donde el segundo conjunto de enzimas difiere del primer conjunto de enzimas.

17. El método de acuerdo a la reivindicación 13, en donde el vector de transferencia polivalente comprende secuencias de un genoma viral seleccionado del grupo que consiste de un adenovirus, un lentivirus, un retrovirus, un poxvirus.

18. El método de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el vector de transferencia polivalente comprende secuencias adenovirales en las que el primer casete de expresión se ubica en una región E1 de adenovirus.

.

19. El método de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el vector de transferencia polivalente comprende secuencias adenovirales in las que el segundo casete de expresión se ubica en una región E4 de adenovirus.

20. El método de acuerdo a la reivindicación 16, en donde el vector de transferencia polivalente comprende secuencias adenovirales in las que el segundo casete de expresión se ubica en la región E3 de adenovirus.

21. Un vector de transferencia polivalente producido por el método de cualquiera de las reivindicaciones 13 a 20.

22 Una célula huésped que comprende un vector de transferencia polivalente de acuerdo con la reivindicación 21

23. Un método para generar un virus polivalente que comprende la etapa de cultivar el vector de transferencia polivalente de acuerdo con la reivindicación 21 en la presencia de secuencias virales suficientes para permitir

empaquetado del genoma viral polivalente en una envoltura viral infecciosa.

24. Un virus polivalente producido de acuerdo con el método de la reivindicación 23.

25. El virus polivalente de acuerdo con la reivindicación 24, en donde dicho virus se empaqueta en una envoltura infecciosa que comprende una proteína de envoltura lentivirus, una proteína de envoltura retrovirus y una proteína de envoltura poxvirus.

26. El virus polivalente de acuerdo con la reivindicación 25, en donde el poxvirus es canaripox.

27. Un método para generar un virus polivalente que comprende la etapa de cultivar la estructura de plásmido polivalente de acuerdo con la reivindicación 13 en la presencia de secuencias virales suficientes para permitir el empaquetado de la estructura viral polivalente dentro de un cápsido viral infeccioso.

28. Un vector viral polivalente producido de acuerdo con el método de la reivindicación 27.

29. Un vector viral polivalente de acuerdo con la reivindicación 28 que comprende una proteína de cápsido adenoviral.

30. Una composición que contiene:

(a) Un vector viral polivalente que comprende:

(i) un primer casete de expresión heterólogo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un primer producto objetivo bajo el control de la secuencia reguladora que controla la expresión del producto; y

(ii) un segundo casete de expresión heterólogo que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica un segundo producto objetivo bajo el control de la secuencia reguladora que controla la expresión del producto;

en donde dicho primero y segundo casete de expresión se ubican en lugares distintos de un genoma de vector viral y los productos objetivo se expresan independientemente; y

(b) un portador fisiológicamente compatible

31. La composición de acuerdo con la reivindicación 30, en donde dichos primeros y segundos productos se seleccionan independientemente del grupo que consiste de un antígeno y una citoquina.

32. La composición de acuerdo con la reivindicación 30, en donde el primer o segundo producto es un inmuno modulador.

33. La composición de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el segundo producto es un adyuvante para el primer producto.

34. La composición de acuerdo con la reivindicación 32, en donde el primer o segundo producto es un gen terapéutico.

Fig. 2

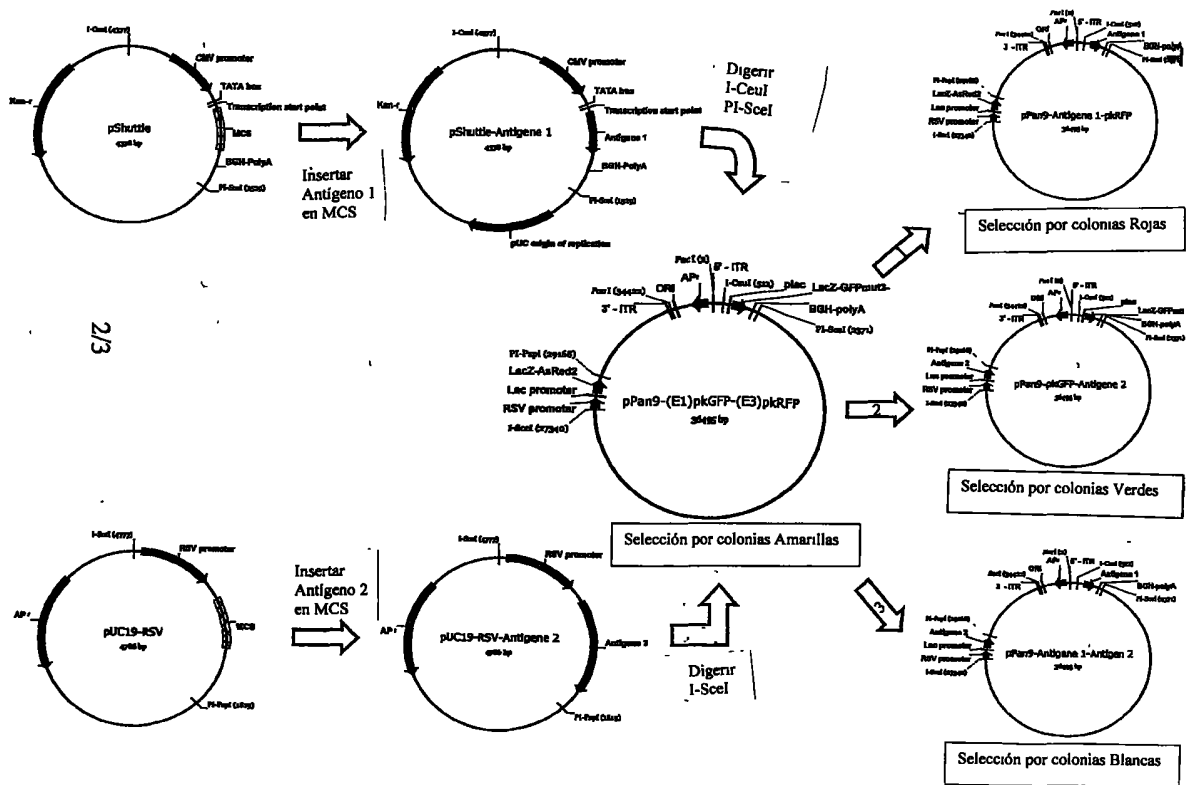
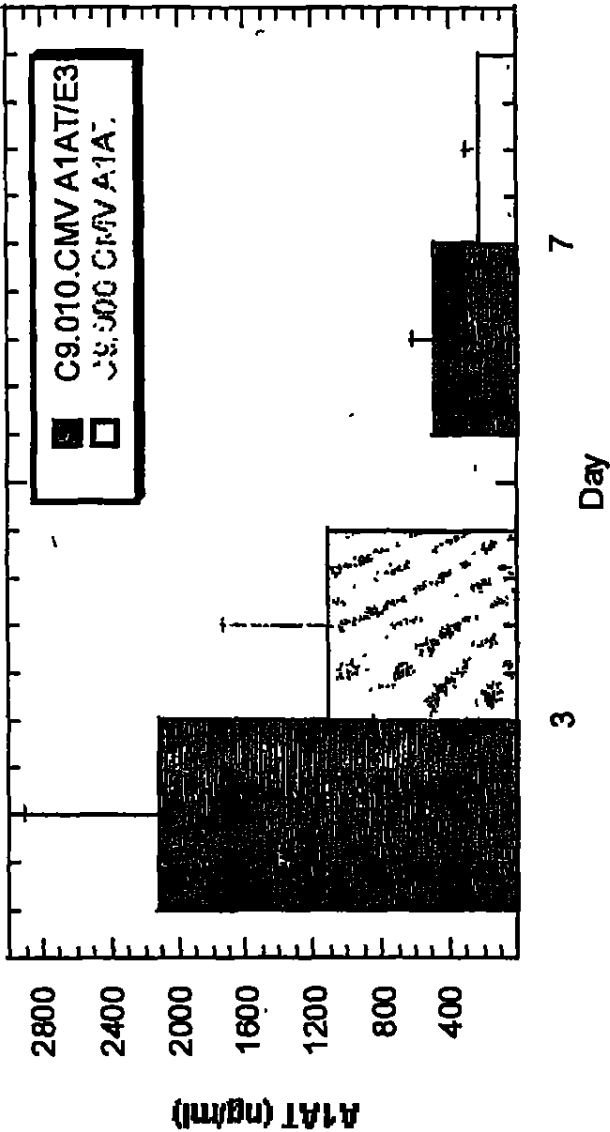


Fig. 3



PCT

REQUEST

The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty

For receiving Office use only

International Application No

International Filing Date

Name of receiving Office and "PCT International Application"

Applicant's or agent's file reference
(if desired) (12 characters maximum) UPN-Q3402PCT

Box No. I TITLE OF INVENTION

POLYVALENT VIRAL VECTORS AND A SYSTEM FOR PRODUCTION THEREOF

Box No. II APPLICANT

☐ This person is also inventor

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation)
The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

The Trustees of the University of Pennsylvania
3160 Chestnut Street
Suite 200
Philadelphia, Pennsylvania 19104 US

Telephone No
215-573-4508Facsimile No
215-898-9519

Teleprinter No

Applicant's registration No with the Office

State (that is, country) of nationality
USState (that is, country) of residence
USThis person is applicant
for the purposes of☐ all designated
States☒ all designated States except
the United States of America☐ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box

Box No. III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S)

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation)
The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)

Gao, Guangping
408 Yorkshire Road
Rosemont, Pennsylvania 19010 US

This person is

☐ applicant only☒ applicant and inventor☐ inventor only (If this check-box is
marked, do not fill in below)

Applicant's registration No with the Office

State (that is, country) of nationality
USState (that is, country) of residence
USThis person is applicant
for the purposes of☐ all designated
States☐ all designated States except
the United States of America☒ the United States
of America only☐ the States indicated in
the Supplemental Box☒ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on a continuation sheet

Box No. IV AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE; OR ADDRESS FOR CORRESPONDENCE

The person identified below is hereby/has been appointed to act on behalf
of the applicant(s) before the competent International Authorities as

☒ agent☐ common
representative

Name and address (Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation)
The address must include postal code and name of country)

Kodroff, Cathy
Howson and Howson
Spring House Corporate Center
P.O. Box 457
Spring House, Pennsylvania 19477 US

Telephone No
215-540-9200Facsimile No
215-540-5818

Teleprinter No

Agent's registration No with the Office
33,980

☐ Address for correspondence. Mark this check-box where no agent or common representative is/has been appointed and the
space above is used instead to indicate a special address to which correspondence should be sent

Continuation of Box No III FURTHER APPLICANT(S) AND/OR (FURTHER) INVENTOR(S) <i>If none of the following sub-boxes is used, this sheet should not be included in the request</i>	
Name and address <i>(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> Wilson, James M. 1350 N Avignon Drive Gladwyne, Pennsylvania 19035 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below)</i> Applicant's registration No with the Office
State (that is, country) of nationality US	State (that is, country) of residence US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address <i>(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> Zhou, Xiangyang 230 Tudor Drive North Wales, Pennsylvania 19454 US	This person is ☐ applicant only ☒ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below)</i> Applicant's registration No with the Office
State (that is, country) of nationality CN	State (that is, country) of residence US
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☒ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address <i>(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> 	This person is ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below)</i> Applicant's registration No with the Office
State (that is, country) of nationality 	State (that is, country) of residence
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
Name and address <i>(Family name followed by given name, for a legal entity, full official designation. The address must include postal code and name of country. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below.)</i> 	This person is ☐ applicant only ☐ applicant and inventor ☐ inventor only <i>(If this check-box is marked, do not fill in below)</i> Applicant's registration No with the Office
State (that is, country) of nationality 	State (that is, country) of residence
This person is applicant for the purposes of ☐ all designated States ☐ all designated States except the United States of America ☐ the United States of America only ☐ the States indicated in the Supplemental Box	
☐ Further applicants and/or (further) inventors are indicated on another continuation sheet	

Supplemental Box *If the Supplemental Box is not used, this sheet should not be included in the request*

1 *If, in any of the Boxes, except Boxes Nos VIII(i) to (v) for which a special continuation box is provided, the space is insufficient to furnish all the information in such case, write "Continuation of Box No " (indicate the number of the Box) and furnish the information in the same manner as required according to the captions of the Box in which the space was insufficient, in particular*

"Continuation of Box No IV"

Kita, Stanley B , Reg No 24,561
Smith, Jr , George A , Reg No 24,442
Bak, Mary E , Reg No 31,215
Bak, William, Reg No 37,277
Duminiak, Robert J , Reg No 51,636
Palovich, Tracy, Reg No 47,840 (patent agent)

(i) *if more than two persons are to be indicated as applicants and/or inventors and no "continuation sheet" is available in such case, write "Continuation of Box No III" and indicate for each additional person the same type of information as required in Box No III. The country of the address indicated in this Box is the applicant's State (that is, country) of residence if no State of residence is indicated below,*

All above attorneys are members of the firm of
Howson and Howson

(ii) *if, in Box No II or in any of the sub-boxes of Box No III, the indication "the States indicated in the Supplemental Box" is checked in such case, write "Continuation of Box No II" or "Continuation of Box No III" or "Continuation of Boxes No II and No III" (as the case may be), indicate the name of the applicant(s) involved and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is applicant,*

Address of all is indicated in Box No IV

(iii) *if, in Box No II or in any of the sub-boxes of Box No III, the inventor or the inventor/applicant is not inventor for the purposes of all designated States or for the purposes of the United States of America in such case, write "Continuation of Box No II" or "Continuation of Box No III" or "Continuation of Boxes No II and No III" (as the case may be), indicate the name of the inventor(s) and, next to (each) such name, the State(s) (and/or, where applicable, ARIPO, Eurasian, European or OAPI patent) for the purposes of which the named person is inventor,*

(iv) *if, in addition to the agent(s) indicated in Box No IV, there are further agents in such case, write "Continuation of Box No IV" and indicate for each further agent the same type of information as required in Box No IV,*

(v) *if, in Box No VI, there are more than three earlier applications whose priority is claimed in such case, write "Continuation of Box No VI" and indicate for each additional earlier application the same type of information as required in Box No VI*

2 *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in certain designated States, as an application for a patent of addition, certificate of addition, inventor's certificate of addition or utility certificate of addition in such a case, write the name or two-letter code of each designated State concerned and the indication "patent of addition," "certificate of addition," "inventor's certificate of addition" or "utility certificate of addition," the number of the parent application or parent patent or other parent grant and the date of grant of the parent patent or other parent grant or the date of filing of the parent application (Rules 4.11(a)(iii) and 49bis 1(a) or (b))*

3 *If the applicant intends to make an indication of the wish that the international application be treated, in the United States of America, as a continuation or continuation-in-part of an earlier application in such a case, write "United States of America" or "US" and the indication "continuation" or "continuation-in-part" and the number and the filing date of the parent application (Rules 4.11(a)(iv) and 49bis 1(d))*

Box No V DESIGNATIONS

The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents. However,

- ☐ DE Germany is not designated for any kind of national protection
- ☐ KR Republic of Korea is not designated for any kind of national protection
- ☐ RU Russian Federation is not designated for any kind of national protection

(The check-boxes above may be used to exclude (irrevocably) the designations concerned in order to avoid the ceasing of the effect, under the national law, of an earlier national application from which priority is claimed. See the Notes to Box No V as to the consequences of such national law provisions in these and certain other States)

Box No. VI PRIORITY CLAIM

The priority of the following earlier application(s) is hereby claimed

Filing date of earlier application (day/month/year)	Number of earlier application	Where earlier application is		
		national application country or Member of WTO	regional application * regional Office	international application receiving Office
item (1) 28 April 2004 (28/04/04)	60/565,941	United States		
item (2)				
item (3)				

☐ Further priority claims are indicated in the Supplemental Box

The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) (only if the earlier application was filed with the Office which for the purposes of this international application is the receiving Office) identified above as

☒ all items ☐ item (1) ☐ item (2) ☐ item (3) ☐ other, see Supplemental Box

* Where the earlier application is an ARIPO application, indicate at least one country party to the Paris Convention for the Protection of Industrial Property or one Member of the World Trade Organization for which that earlier application was filed (Rule 4 10(b)(ii))

Box No. VII INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

Choice of International Searching Authority (ISA) (if two or more International Searching Authorities are competent to carry out the international search, indicate the Authority chosen, the two-letter code may be used)

ISA / EP

Request to use results of earlier search; reference to that search (if an earlier search has been carried out by or requested from the International Searching Authority)

Date (day/month/year)

Number

Country (or regional Office)

Box No. VIII DECLARATIONS

The following declarations are contained in Boxes Nos VIII (i) to (v) (mark the applicable check-boxes below and indicate in the right column the number of each type of declaration)

Number of declarations

- ☐ Box No VIII (i) Declaration as to the identity of the inventor
- ☐ Box No VIII (ii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent
- ☐ Box No VIII (iii) Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application
- ☐ Box No VIII (iv) Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)
- ☐ Box No VIII (v) Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty

Box No IX CHECK LIST, LANGUAGE OF FILING																																																
This international application contains (a) in paper form, the following number of sheets <table style="width: 100%;"> <tr> <td>request (including declaration sheets)</td> <td style="text-align: right;">5</td> </tr> <tr> <td>description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)</td> <td style="text-align: right;">35</td> </tr> <tr> <td>claims</td> <td style="text-align: right;">6</td> </tr> <tr> <td>abstract</td> <td style="text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td>drawings</td> <td style="text-align: right;">3</td> </tr> <tr> <td>Sub-total number of sheets</td> <td style="text-align: right;">50</td> </tr> </table> sequence listing tables related thereto <i>(for both, actual number of sheets if filed in paper form, whether or not also filed in computer readable form, see (c) below)</i> Total number of sheets 50 (b) ☐ only in computer readable form (Section 801(a)(i)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto (c) ☐ also in computer readable form (Section 801(a)(ii)) (i) ☐ sequence listing (ii) ☐ tables related thereto Type and number of carriers (diskette, CD-ROM, CD-R or other) on which are contained the ☐ sequence listing ☐ tables related thereto <i>(additional copies to be indicated under items 9(ii) and/or 10(ii), in right column)</i>	request (including declaration sheets)	5	description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	35	claims	6	abstract	1	drawings	3	Sub-total number of sheets	50	This international application is accompanied by the following item(s) (mark the applicable check-boxes below and indicate in right column the number of each item) <table style="width: 100%;"> <tr> <td>1 ☒ fee calculation sheet</td> <td style="text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td>2 ☐ original separate power of attorney</td> <td></td> </tr> <tr> <td>3 ☐ original general power of attorney</td> <td></td> </tr> <tr> <td>4 ☒ copy of general power of attorney, reference number, if any</td> <td style="text-align: right;">1</td> </tr> <tr> <td>5 ☐ statement explaining lack of signature</td> <td></td> </tr> <tr> <td>6 ☐ priority document(s) identified in Box No VI as item(s)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7 ☐ translation of international application into (language)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>8 ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material</td> <td></td> </tr> <tr> <td>9 ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column</td> <td></td> </tr> <tr> <td>10 ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)</td> <td></td> </tr> <tr> <td style="margin-left: 20px;">(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column</td> <td></td> </tr> <tr> <td>11 ☒ other (specify) transmittal letter to the USRO</td> <td style="text-align: right;">1</td> </tr> </table>	1 ☒ fee calculation sheet	1	2 ☐ original separate power of attorney		3 ☐ original general power of attorney		4 ☒ copy of general power of attorney, reference number, if any	1	5 ☐ statement explaining lack of signature		6 ☐ priority document(s) identified in Box No VI as item(s)		7 ☐ translation of international application into (language)		8 ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material		9 ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)		(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column		10 ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)		(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)		(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)		(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column		11 ☒ other (specify) transmittal letter to the USRO	1	Number of items
request (including declaration sheets)	5																																															
description (excluding sequence listing and/or tables related thereto)	35																																															
claims	6																																															
abstract	1																																															
drawings	3																																															
Sub-total number of sheets	50																																															
1 ☒ fee calculation sheet	1																																															
2 ☐ original separate power of attorney																																																
3 ☐ original general power of attorney																																																
4 ☒ copy of general power of attorney, reference number, if any	1																																															
5 ☐ statement explaining lack of signature																																																
6 ☐ priority document(s) identified in Box No VI as item(s)																																																
7 ☐ translation of international application into (language)																																																
8 ☐ separate indications concerning deposited microorganism or other biological material																																																
9 ☐ sequence listing in computer readable form (indicate type and number of carriers)																																																
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Rule 13ter only (and not as part of the international application)																																																
(ii) ☐ (only where check-box (b)(i) or (c)(i) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Rule 13ter																																																
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the sequence listing mentioned in left column																																																
10 ☐ tables in computer readable form related to sequence listing (indicate type and number of carriers)																																																
(i) ☐ copy submitted for the purposes of international search under Section 802(b-quater) only (and not as part of the international application)																																																
(ii) ☐ (only where check-box (b)(ii) or (c)(ii) is marked in left column) additional copies including, where applicable, the copy for the purposes of international search under Section 802(b-quater)																																																
(iii) ☐ together with relevant statement as to the identity of the copy or copies with the tables mentioned in left column																																																
11 ☒ other (specify) transmittal letter to the USRO	1																																															
Figure of the drawings which should accompany the abstract	Language of filing of the international application English																																															
Box No. X SIGNATURE OF APPLICANT, AGENT OR COMMON REPRESENTATIVE <i>Next to each signature, indicate the name of the person signing and the capacity in which the person signs (if such capacity is not obvious from reading the request)</i>																																																
By <u>Cathy A. Kodros</u> Cathy A. Kodros Attorney for the Applicants																																																

For receiving Office use only	
1 Date of actual receipt of the purported international application	2 Drawings ☐ received
3 Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	☐ not received
4 Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	6 ☐ Transmittal of search copy delayed until search fee is paid
5 International Searching Authority (if two or more are competent) ISA /	

For International Bureau use only
Date of receipt of the record copy by the International Bureau

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100

(43) International Publication Date
10 November 2005 (10.11.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/106002 A3

(51) International Patent Classification:
C12N 15/86 (2006.01) C12Q 1/68 (2006 01)

(21) International Application Number:
PCT/US2005/014485

(22) International Filing Date: 27 April 2005 (27 04 2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/565,941 28 April 2004 (28 04 2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US], 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104 (US)

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): GAO, Guangping [US/US], 408 Yorkshire Road, Rosemont, PA 19010 (US) WILSON, James, M. [US/US], 1350 N Avignon Drive, Gladwyne, PA 19035 (US) ZHOU, Xiangyang [CN/US], 230 Tudor Drive, North Wales, PA 19454 (US)

(74) Agents: KODROFF, Cathy et al., Howson and Howson, Spring House Corporate Center, P.O. Box 457, Spring House, PA 19477 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AB, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— with international search report

(88) Date of publication of the international search report:
22 June 2006

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette

(54) Title: POLYVALENT VIRAL VECTORS AND A SYSTEM FOR PRODUCTION THEREOF

(57) Abstract: A system for generating viral vectors carrying two distinct expression cassettes is provided. The system utilizes a unique polyvalent transfer vector that permits efficient detection and selection of inserted expression cassettes



WO 2005/106002 A3

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/86 C12Q1/68

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)
C12N C12Q

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)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	CONTRERAS JUAN L ET AL: "Double genetic modification of adenovirus fiber with RGD polylysine motifs significantly enhances gene transfer to isolated human pancreatic islets." TRANSPLANTATION (HAGERSTOWN), vol. 76, no. 1, 15 July 2003 (2003-07-15), pages 252-261, XP002347132 ISSN: 0041-1337 the whole document	1-12
X	WO 01/55371 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE; MAURO, VINCENT, P; EDELMAN, GERALD, M;) 2 August 2001 (2001-08-02) claim 98 ----- -/--	1-8, 10-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C

☒ See patent family 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
"S" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2005

Date of mailing of the international search report

05. 04. 2006

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

Wimmer, G

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	KAPTURCZAK MATTHIAS H ET AL: "Transduction of human and murine pancreatic islet cells using a bicistronic recombinant adeno-associated viral (rAAV) vector" MOLECULAR THERAPY, vol. 5, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 154-160, XP002347274 ISSN: 1525-0016 the whole document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/014485

47

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 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.
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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows.

see additional sheet

- 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.

1-12

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12

A vector comprising a first expression cassette encoding a first reporter protein and being flanked by a first set of restriction sites, and a second expression cassette encoding a second reporter protein and being flanked by a second set of restriction sites.

2. claims: 13-29

A method for generating a transfer vector comprising the steps of

- a) mixing, in the presence of a first set of enzymes, a plasmid according to above defined group 1 with a first heterologous expression cassette flanked by the first set of restriction enzymes
- b) selecting for the absence of the first reporter
- c) mixing, in the presence of a second set of enzymes, the plasmid with a second heterologous expression cassette flanked by the second set of restriction enzymes
- d) selecting for the absence of the second reporter.

3. claims: 30-34

a composition containing a viral vector, the vector comprising a first and a second heterologous expression cassette, wherein the expression cassettes are independently expressed.

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 0155371	A	02-08-2001	AU	3117101 A	07-08-2001
			AU	3120601 A	07-08-2001
			BR	0107930 A	15-06-2004
			BR	0107943 A	28-01-2003
			CA	2398541 A1	02-08-2001
			CA	2398790 A1	02-08-2001
			EP	1274838 A1	15-01-2003
			EP	1259602 A1	27-11-2002
			WO	0155369 A1	02-08-2001

(19) World Intellectual Property
Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
10 November 2005 (10.11.2005)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2005/106002 A2

- (51) International Patent Classification⁷: C12N 15/86, C12Q 1/68
- (21) International Application Number: PCT/US2005/014485
- (22) International Filing Date: 27 April 2005 (27.04.2005)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/565,941 28 April 2004 (28.04.2004) US
- (71) Applicant (for all designated States except US): THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA [US/US], 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104 (US)
- (72) Inventors; and
- (75) Inventors/Applicants (for US only): GAO, Guangping [US/US], 408 Yorkshire Road, Rosemont, PA 19010 (US). WILSON, James, M. [US/US]; 1350 N Avignon Drive, Gladwyne, PA 19035 (US) ZHOU, Xiangyang [CN/US], 230 Tudor Drive, North Wales, PA 19454 (US).
- (74) Agents: KODROFF, Cathy et al., Howson and Howson, Spring House Corporate Center, P.O. Box 457, Spring House, PA 19477 (US).
- (81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)
- Published:
— without international search report and to be republished upon receipt of that report
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: POLYVALENT VIRAL VECTORS AND A SYSTEM FOR PRODUCTION THEREOF

(57) Abstract: A system for generating viral vectors carrying two distinct expression cassettes is provided. The system utilizes a unique polyvalent transfer vector that permits efficient detection and selection of inserted expression cassettes.

WO 2005/106002 A2

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 17 June 2005 (17 06 2005)	To KODROFF, Cathy Howson and Howson Spring House Corporate Center P O Box 457 Spring House, PA 19477 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
Applicant's or agent's file reference UPN-Q3402PCT	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No PCT/US2005/014485	International filing date (day/month/year) 27 April 2005 (27 04 2005)
International publication date (day/month/year)	Priority date (day/month/year) 28 April 2004 (28 04 2004)
Applicant THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA et al	

- 1 By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- 2 (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- 3 (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
28 April 2004 (28 04 2004)	60/565,941	US	06 June 2005 (06 06 2005)

JUL - 1 2005

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20 Switzerland

Authorized officer

Beate Giffo-Schmitt (Fax 338-87-20)

Facsimile No +41 22 338 82 70

Facsimile No (41-22) 338 87 20

Telephone No +41 22 338 9241

Form PCT/IB/304 (January 2004)

CHF6YO3B

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47 1(c))

to

KODROFF, Cathy
Howson and Howson
Spring House Corporate Center
P O Box 457
Spring House, PA 19477
ETATS-UNIS D'AMERIQUEDate of mailing (day/month/year)
31 August 2006 (31 08 2006)Applicant's or agent's file reference
UPN-Q3402PCT

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2005/014485International filing date (day/month/year)
27 April 2005 (27 04 2005)Priority date (day/month/year)
28 April 2004 (28 04 2004)

Applicant

THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA et al

1 **ATTENTION** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does not apply, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.

Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis 1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below
10 November 2005 (10 11 2005)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MZ, NA, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47 1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s)

3 The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis 1

AE, AG, AL, AM, AP, AT, BA, BB, BG, BR, BW, BZ, CA, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, SC, SD, SG, SK, SL, SM, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZW

In accordance with Rule 47 1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application

4. **TIME LIMITS** for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 30 MONTHS from the priority date

In practice, time limits other than the 30-month time limit will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For regular updates on the applicable time limits (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Beate Giffo-Schmitt

Facsimile No. +41 22 338 82 70

e-mail pt03@wipo.int

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

FIRST NOTICE INFORMING THE APPLICANT OF
THE COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES WHICH
DO NOT APPLY THE 30 MONTH TIME LIMIT
UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47 1(c))

To

KODROFF, Cathy
Howson and Howson
Spring House Corporate Center
P O Box 457
Spring House, PA 19477
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

Date of mailing (day/month/year) 01 December 2005 (01 12 2005)		IMPORTANT NOTICE	
Applicant's or agent's file reference UPN-Q3402PCT			
International application No PCT/US2005/014485	International filing date (day/month/year) 27 April 2005 (27 04 2005)	Priority date (day/month/year) 28 April 2004 (28 04 2004)	
Applicant THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA et al			

- 1 **ATTENTION** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), does apply, please see Form PCT/IB/308(Second and Supplementary Notice) (to be issued promptly after the expiration of 28 months from the priority date)

Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1) as in force from 1 April 2002 does not apply, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1 The International Bureau has effected that communication on the date indicated below
10 November 2005 (10 11 2005)

CH

In accordance with Rule 47 1(c-bis)(i) those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s)

- 3 The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, does not apply, have not requested, as at the time of mailing of the present notice that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1

LU, SE, TZ, UG, ZM

In accordance with Rule 47 1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application

4. **TIME LIMITS** for entry into the national phase

For the designated Office(s) listed above, and unless a demand for international preliminary examination has been filed before the expiration of 19 months from the priority date (see Article 39(1)) the applicable time limit for entering the national phase will, subject to what is said in the following paragraph, be 20 MONTHS from the priority date

In practice time limits other than the 20-month time limit will continue to apply for various periods of time, in respect of certain of the designated Offices listed above. For regular updates on the applicable time limits (20 or 21 months, or other time limit), Office by Office refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide* Volume II National Chapters, all available from WIPO's Internet site at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>

It is the applicant's sole responsibility to monitor all these time limits

JSC - c

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20 Switzerland	Authorized officer Beate Giffo-Schmitt
Facsimile No +41 22 740 1435	Facsimile No +41 22 338 8720



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

APPL NO	FILING OR 371 (e) DATE	ART UNIT	FIL FEE REC'D	ATTY DOCKET NO	DRAWINGS	TOT CLMS	IND CLMS
60/565,941	04/28/2004		160	UPN-Q3402USA	2		

00270
HOWSON AND HOWSON
ONE SPRING HOUSE CORPORATION CENTER
BOX 457
321 NORRISTOWN ROAD
SPRING HOUSE, PA 19477

CONFIRMATION NO. 4896

FILING RECEIPT

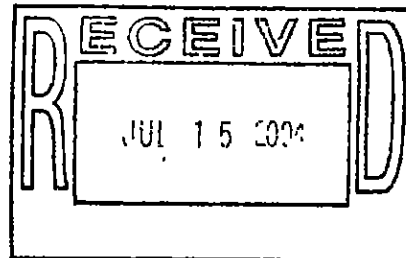


Date Mailed 07/12/2004

Receipt is acknowledged of this provisional Patent Application. It will not be examined for patentability and will become abandoned not later than twelve months after its filing date. Be sure to provide the U.S. APPLICATION NUMBER, FILING DATE, NAME OF APPLICANT, and TITLE OF INVENTION when inquiring about this application. Fees transmitted by check or draft are subject to collection. Please verify the accuracy of the data presented on this receipt. If an error is noted on this Filing Receipt, please write to the Office of Initial Patent Examination's Filing Receipt Corrections, facsimile number 703-746-9195. Please provide a copy of this Filing Receipt with the changes noted thereon. If you received a "Notice to File Missing Parts" for this application, please submit any corrections to this Filing Receipt with your reply to the Notice. When the USPTO processes the reply to the Notice, the USPTO will generate another Filing Receipt incorporating the requested corrections (if appropriate).

Applicant(s)

Guangping Gao, Rosemont, PA,
James M. Wilson, Gladwyne, PA,
Xiangyang Zhou, North Wales, PA,



Projected Publication Date: None, application is not eligible for pre-grant publication

Non-Publication Request: No

Early Publication Request: No

Title

Polyvalent viral vectors and a system for production thereof

LICENSE FOR FOREIGN FILING UNDER
Title 35, United States Code, Section 184
Title 37, Code of Federal Regulations, 5.11 & 5.15

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference UPN-Q3402PCT	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below	
International application No PCT/US2005/014485	International filing date (day/month/year) 27/04/2005	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 28/04/2004
Applicant THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 6 sheets.

☒ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1 Basis of the report

a With regard to the language, the international search was carried out on the basis of

- ☒ the international application in the language in which it was filed
☐ a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))

b ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I

2 ☐ Certain claims were found unsearchable (See Box No. II)

3 ☒ Unity of invention is lacking (see Box No. III)

4 With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established by this Authority to read as follows

5 With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant
☐ the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6 With regard to the drawings,

- a the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
☐ as suggested by the applicant
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
- b ☒ none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2005/014485

96

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 2 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
- 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 III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows

see additional sheet

- 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

1-12

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-12

A vector comprising a first expression cassette encoding a first reporter protein and being flanked by a first set of restriction sites, and a second expression cassette encoding a second reporter protein and being flanked by a second set of restriction sites.

2. claims: 13-29

A method for generating a transfer vector comprising the steps of
a) mixing, in the presence of a first set of enzymes, a plasmid according to above defined group 1 with a first heterologous expression cassette flanked by the first set of restriction enzymes
b) selecting for the absence of the first reporter
c) mixing, in the presence of a second set of enzymes, the plasmid with a second heterologous expression cassette flanked by the second set of restriction enzymes
d) selecting for the absence of the second reporter.

3. claims: 30-34

a composition containing a viral vector, the vector comprising a first and a second heterologous expression cassette, wherein the expression cassettes are independently expressed.

A CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C12N15/86 C12Q1/68

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)
C12N C12Q

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)

EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data

C DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	CONTRERAS JUAN L ET AL: "Double genetic modification of adenovirus fiber with RGD polylysine motifs significantly enhances gene transfer to isolated human pancreatic islets." TRANSPLANTATION (HAGERSTOWN), vol. 76, no. 1, 15 July 2003 (2003-07-15), pages 252-261, XP002347132 ISSN: 0041-1337 the whole document	1-12
X	WO 01/55371 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE; MAURO, VINCENT, P; EDELMAN, GERALD, M;) 2 August 2001 (2001-08-02) claim 98	1-8, 10-12
	----- -/--	

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C

☒ See patent family 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
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

8 December 2005

Date of making of the international search report

05.04.2006

Name and mailing address of the ISA/

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

Authorized officer

Wimmer, G

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No
X	KAPTURCZAK MATTHIAS H ET AL: "Transduction of human and murine pancreatic islet cells using a bicistronic recombinant adeno-associated viral (rAAV) vector" MOLECULAR THERAPY, vol. 5, no. 2, February 2002 (2002-02), pages 154-160, XP002347274 ISSN: 1525-0016 the whole document	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2005/014485

100

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 0155371	A	02-08-2001	AU 3117101 A	07-08-2001
			AU 3120601 A	07-08-2001
			BR 0107930 A	15-06-2004
			BR 0107943 A	28-01-2003
			CA 2398541 A1	02-08-2001
			CA 2398790 A1	02-08-2001
			EP 1274838 A1	15-01-2003
			EP 1259602 A1	27-11-2002
			WO 0155369 A1	02-08-2001

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No
PCT/US2005/014485

International filing date (day/month/year)
27 04 2005

Priority date (day/month/year)
28 04.2004

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
C12N15/86, C12Q1/68

Applicant
THE TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF PENNSYLVANIA

1 This opinion contains indications relating to the following items.

- ☒ Box No I Basis of the opinion
☒ Box No II Priority
☒ Box No III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☒ Box No IV Lack of unity of invention
☒ Box No V Reasoned statement under Rule 43bis 1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability, citations and explanations supporting such statement
☐ Box No VI Certain documents cited
☐ Box No VII Certain defects in the international application
☐ Box No VIII Certain observations on the international application

2 FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA"). However, this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66 1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of three months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220

3 For further details, see notes to Form PCT/ISA/220

Name and mailing address of the ISA



European Patent Office
D-80298 Munich
Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d
Fax +49 89 2399 - 4465

Authorized Officer

Wimmer, G

Telephone No +49 89 2399-7347



**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No
PCT/US2005/014485

Box No. I Basis of the opinion

- 1 With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of the international application in the language in which it was filed, unless otherwise indicated under this item
- ☐ This opinion has been established on the basis of a translation from the original language into the following language , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rules 12.3 and 23.1(b))
- 2 With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:
- a type of material
- ☐ a sequence listing
- ☐ table(s) related to the sequence listing
- b format of material
- ☐ in written format
- ☐ in computer readable form
- c time of filing/furnishing
- ☐ contained in the international application as filed
- ☐ filed together with the international application in computer readable form
- ☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search
- 3 ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished
- 4 Additional comments

Box No. II Priority

- 1 ☒ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or, where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date
- 2 ☐ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date
- 3 Additional observations, if necessary

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No
PCT/US2005/014485

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, Inventive step and Industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of.

☐ the entire international application,

☒ claims Nos 13-34

because

☐ the said international application, or the said claims Nos relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*)

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*).

☐ the claims, or said claims Nos are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos 13-34

☐ the nucleotide and/or amino acid sequence listing does not comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions in that

the written form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

the computer readable form

☐ has not been furnished

☐ does not comply with the standard

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in computer readable form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-bis of the Administrative Instructions

☐ See separate sheet for further details

1 of 4

Box No. IV Lack of unity of invention

- 1 ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has
- ☐ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest
 - ☒ not paid additional fees
- 2 ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees
- 3 This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons
see separate sheet
- 4 Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application
- ☐ all parts
 - ☒ the parts relating to claims Nos. 1-12

Box No. V Reasoned statement under Rule 43b/s.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

- 1 Statement
- | | | |
|-------------------------------|-------------|----------|
| Novelty (N) | Yes: Claims | 11 |
| | No: Claims | 1-10, 12 |
| Inventive step (IS) | Yes: Claims | |
| | No: Claims | 1-12 |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | 1-12 |
| | No: Claims | |
- 2 Citations and explanations
- see separate sheet**

Re Item IV.

The separate inventions/groups of inventions are:

I) Claims 1-12

A vector comprising a first expression cassette encoding a first reporter protein and being flanked by a first set of restriction sites, and a second expression cassette encoding a second reporter protein and being flanked by a second set of restriction sites, and methods employing such vectors.

II) Claims 13-29

A method for generating a transfer vector comprising the steps of

a) mixing, in the presence of a first set of enzymes, a plasmid according to above defined group 1 with a first heterologous expression cassette flanked by the first set of restriction enzymes

b) selecting for the absence of the first reporter

c) mixing, in the presence of a second set of enzymes, the plasmid with a second heterologous expression cassette flanked by the second set of restriction enzymes

d) selecting for the absence of the second reporter.

III) Claims 30-34

a composition containing a viral vector, the vector comprising a first and a second heterologous expression cassette, wherein the expression cassettes are independently expressed.

They are not so linked as to form a single general inventive concept (Rule 13.1 PCT) for the following reasons:

The concept common to all of the above defined groups is a vector comprising two independent heterologous expression cassettes, the concept common to groups 1 and 2 is a vector comprising two independent reporter genes, flanked by restriction sites. However, a plethora of such constructs has been described in the prior art; see e.g. Contreras et al (2003) or WO0155371. A common inventive concept is therefore lacking.

It should be noted that due to the lack of novelty for the common concept of group 1, dependent claims may be regarded as separate inventions; this search report however

could be established for subject-matter of all of claims 1-12

Re Item V.

1. Reference is made to the following documents:

- D1. CONTRERAS JUAN L ET AL. "Double genetic modification of adenovirus fiber with RGD polylysine motifs significantly enhances gene transfer to isolated human pancreatic islets." TRANSPLANTATION (HAGERSTOWN), vol. 76, no. 1, 15 July 2003 (2003-07-15), pages 252-261, XP002347132 ISSN: 0041-1337
- D2: WO 01/55371 A (THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE; MAURO, VINCENT, P; EDELMAN, GERALD, M;) 2 August 2001 (2001-08-02)
- D3: KAPTURCZAK MATTHIAS H ET AL: "Transduction of human and murine pancreatic islet cells using a bicistronic recombinant adeno-associated viral (rAAV) vector" DIABETES, vol 50, no Supplement 2, June 2001 (2001-06), page A86, XP002347274 & 61ST SCIENTIFIC SESSIONS OF THE AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA, USA; JUNE 22-26, 2001 ISSN: 0012-1797

2 A variety of expressions in claim 1 and its dependent claims are unclear.

The term "polyvalent", for instance, may have a variety of meanings; in the present case, it was assumed that it was meant to refer to a plasmid carrying multiple expression cassettes.

Likewise, it appears that a "plasmid backbone" would be not physically different from a "plasmid", but rather refers to a preferred use (as a generic cloning vector).

A "movable cassette" is also unclear, since *any* nucleic acid sequence is "movable", i.e. can be excised, using the proper means. Further, from the expression "located within a first locus of a viral genome" it is not clear whether the plasmid contains an entire viral genome, or just a part of it, in the latter case, the plasmid may be interpreted to comprise e.g. only a single nucleotide of a viral genome.

A "detectable reporter gene" is either redundant or unclear, the examiner is at least unaware of any "undetectable reporter gene"

Most importantly, the term "rare restriction enzyme" is unclear, since one would not know which enzymes are considered "rare".

Furthermore, it is not clear what is meant by the term "comprising three or more loci" (claim 2), since any nucleic acid can be considered to have as many "loci" as nucleotides (it may however be speculated, that the applicant meant to refer to restriction sites which may be used to insert reporter genes).
Likewise, the term "a gene region" (claims 3-5) may e.g. refer to a single gene, or a large region comprising or adjacent to one gene.

In the light of this, claim 1 was interpreted to refer to
A plasmid comprising a first and a second expression cassette located within a viral genome, each of the expression cassettes being flanked by a set of restriction sites and encoding a reporter gene, wherein the set of restriction sites flanking the first and the second expression cassettes differ.

3. The prior art describes a variety of such plasmids, for instance, D1 describes adenoviral constructs carrying two reporter genes (GFP and Luciferase), D2 describes retroviral constructs expressing one or, in embodiments, two reporter genes (see e.g. claim 98), D3 describes an Adeno-associated viral vector comprising two independent fluorescent reporter expression cassettes. Although not explicitly stated in these documents, it is clear that the reporter gene cassettes are or may be flanked by different restriction sites, since the skilled person would routinely use different restriction sites in constructing a multi-component plasmid.

Moreover, since *any* gene may be used as a reporter gene, even wild-type viral constructs compromise novelty of the claim, since they encode two or more genes, which are naturally flanked by various restriction sites (at least within an undefined distance)

At least claims 1-10 and 12 therefore lack novelty in the light of the prior art.

4. Concerning subject-matter of claim 11, it cannot be assessed for all virus derived constructs of the prior art, whether expression cassettes therein are flanked by restriction sites as listed in the claim,
however, the prior art describes numerous viral constructs with two or more heterologous genes (and in particular "standard" reporter genes such as GFP,

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No

PCT/US2005/014485

Luciferase, lacZ etc.). It is therein obvious to the skilled person that such heterologous genes may be inserted (and thereby flanked) by *any* restriction sites, in particular unique restriction sites; the choice of the sites listed in claim 11 therein represents an arbitrary choice and does not lead to a surprising effect, and therefore lacks inventive activity (Art. 56 EPC)

ASSIGNMENT

WHEREAS, Guangping Gao, James M. Wilson, and Xiangyang Zhou hereinafter referred to as ASSIGNORS, have invented and are the owners of an invention entitled POLYVALENT VIRAL VECTORS AND A SYSTEM FOR PRODUCTION THEREOF said invention being fully set forth and described in the application for Letters Patent of the United States which has been prepared in connection with said invention, and filed on April 28, 2004;

WHEREAS, The Trustees of the University of Pennsylvania, a corporation organized and existing under and by virtue of the laws of the Commonwealth of Pennsylvania and engaged in business at 3160 Chestnut Street, Suite 200, Philadelphia, PA 19104-6283, United States of America, hereinafter referred to as ASSIGNEE, is desirous of acquiring the said invention and any and all applications for Letters Patent and any and all Letters Patent of the United States and foreign countries which may be issued therefore;

NOW, THEREFORE, THIS IS TO WITNESS that in consideration of the sum of One Dollar (\$1.00) paid to ASSIGNORS by ASSIGNEE, the receipt of which is hereby acknowledged, and for other good and valuable consideration, ASSIGNORS have sold, assigned and set over, and hereby do sell, assign and set over, unto ASSIGNEE, its successors and assigns, the entire right, title and interest for, to and within the United States and all foreign countries, in and to the aforesaid invention and in and to any application for Letters Patent which ASSIGNEE at its expense may cause to be filed in the United States, under an international treaty, or in any foreign country, and in any United States or foreign patent which may be granted on said invention, including any extensions, non-provisionals, divisions, reissues, continuations, or continuations-in-part.

And ASSIGNORS hereby authorize and request the Director of the USPTO to issue any and all Letters Patent of the United States to ASSIGNEE, its successors and assigns, as owner of all right, title and interest therein;

And for said consideration, it is hereby covenanted and agreed that at the request and expense of ASSIGNEE, its successors and assigns, ASSIGNORS will execute any further papers and do such other acts and things as may be necessary and proper to procure Letters Patent of said invention in the United States and in such foreign countries as ASSIGNEE, its successors and assigns may elect, and vest the full title thereto in ASSIGNEE, its successors and assigns;

And ASSIGNORS hereby authorize and direct its attorneys to insert, in the space provided below, the serial number of the aforesaid application for Letters Patent of the United States when the same shall have been made known to them by the United States Patent and Trademark Office.

IN WITNESS WHEREOF, this assignment has been executed on the dates indicated below

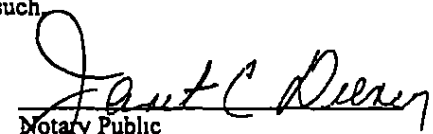
Date 5/7/04


Guangping Gao

NOTARIAL CERTIFICATE

State of Pa
County of Phila ss.

Before me, the undersigned, a notary public, in and for the county aforesaid, on this 7th day of May, 2004, personally appeared Guangping Gao to me know to be the person described in and who executed the foregoing instrument and who acknowledged the execution of the same as a free act and deed and desired the same to be recorded as such.


Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
NOTARIAL SEAL
JANET C. DEENEY, Notary Public
City of Philadelphia, Phila County
My Commission Expires April 8, 2008

Date 5-10-04

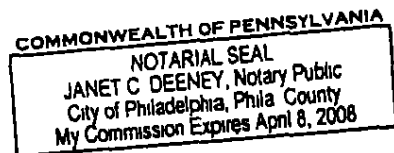
James M. Wilson
James M. Wilson

NOTARIAL CERTIFICATE

State of Pa :
County of Phila : ss.

Before me, the undersigned, a notary public, in and for the county aforesaid, on this 10th day of May, 2004, personally appeared **James M. Wilson** to me know to be the person described in and who executed the foregoing instrument and who acknowledged the execution of the same as a free act and deed and desired the same to be recorded as such.

Janet C. Deeney
Notary Public



Date May 07, 2004

Xiangyang Zhou

NOTARIAL CERTIFICATE

State of Phila ss.
County of Phila

Before me, the undersigned, a notary public, in and for the county aforesaid, on this 7th day of May, 2004, personally appeared Xiangyang Zhou to me know to be the person described in and who executed the foregoing instrument and who acknowledged the execution of the same as a free act and deed and desired the same to be recorded as such

Janet C Deeney
Notary Public

COMMONWEALTH OF PENNSYLVANIA
NOTARIAL SEAL
JANET C. DEENEY Notary Public
City of Philadelphia, Phila County
My Commission Expires April 8, 2008

Application for United States Letters Patent Serial Number 60/565,94 filed April 28, 2004

Carl for Howson and Howson
Howson and Howson



UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D C 20231



MAY 18, 2004

PTAS

700084163A

HOWSON AND HOWSON
CATHY A. KODROFF
SPRING HOUSE CORPORATE CENTER
BOX 457
SPRING HOUSE, PA 19477

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 05/12/2004

REEL/FRAME: 014622/0677

NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

WILSON, JAMES M.

DOC DATE: 05/10/2004

ASSIGNEE:

TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA, THE
3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA

19104-6283

SERIAL NUMBER: 60565941

FILING DATE:

PATENT NUMBER:

ISSUE DATE:

TITLE:

DOCKET NUMBER: NIL



114

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
Patent and Trademark Office
ASSISTANT SECRETARY AND COMMISSIONER
OF PATENTS AND TRADEMARKS
Washington, D.C. 20231



MAY 18, 2004

PTAS

700084161A

HOWSON AND HOWSON
CATHY A KODROFF
SPRING HOUSE CORPORATE CENTER
BOX 457
SPRING HOUSE, PA 19477

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
NOTICE OF RECORDATION OF ASSIGNMENT DOCUMENT

THE ENCLOSED DOCUMENT HAS BEEN RECORDED BY THE ASSIGNMENT DIVISION OF THE U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE. A COMPLETE MICROFILM COPY IS AVAILABLE AT THE ASSIGNMENT SEARCH ROOM ON THE REEL AND FRAME NUMBER REFERENCED BELOW.

PLEASE REVIEW ALL INFORMATION CONTAINED ON THIS NOTICE. THE INFORMATION CONTAINED ON THIS RECORDATION NOTICE REFLECTS THE DATA PRESENT IN THE PATENT AND TRADEMARK ASSIGNMENT SYSTEM. IF YOU SHOULD FIND ANY ERRORS OR HAVE QUESTIONS CONCERNING THIS NOTICE, YOU MAY CONTACT THE EMPLOYEE WHOSE NAME APPEARS ON THIS NOTICE AT 703-308-9723. PLEASE SEND REQUEST FOR CORRECTION TO: U.S. PATENT AND TRADEMARK OFFICE, ASSIGNMENT DIVISION, BOX ASSIGNMENTS, CG-4, 1213 JEFFERSON DAVIS HWY, SUITE 320, WASHINGTON, D.C. 20231.

RECORDATION DATE: 05/12/2004

REEL/FRAME: 014622/0642
NUMBER OF PAGES: 5

BRIEF: ASSIGNMENT OF ASSIGNOR'S INTEREST (SEE DOCUMENT FOR DETAILS).

ASSIGNOR:

GAO, GUANGPING

DOC DATE: 05/07/2004

ASSIGNOR:

ZHOU, XIANGYANG

DOC DATE: 05/07/2004

ASSIGNEE:

TRUSTEES OF THE UNIVERSITY OF
PENNSYLVANIA, THE
3160 CHESTNUT STREET, SUITE 200
PHILADELPHIA, PENNSYLVANIA

19104-6283

014622/0642 PAGE 2

SERIAL NUMBER: 60565941
PATENT NUMBER:
TITLE:
DOCKET NUMBER: NIL

FILING DATE:
ISSUE DATE:

JEFFREY OLSEN, EXAMINER
ASSIGNMENT DIVISION
OFFICE OF PUBLIC RECORDS

 Industria y Comercio		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO	
		DIVISION DE NUEVAS CREACIONES	
		TARJETA ARCHIVO TEMATICO	
SUPERINTENDENCIA		PATENTE DE INVENCION	PCT ☒ MODELO DE UTILIDAD
		DISEÑO INDUSTRIAL	
(21) N° de solicitud		(22) Fecha de solicitud	
(51) Clasificación Internacional: C12Q 1/68			
(71) Solicitante (es) The Trustees of the University of Pennsylvania			
(72) Inventor (es) GAO, Guangping // WILSON, James, M // ZHOU, Xiangyang			
(74) Agente JIMENA ESCOBAR URIBE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) Pais
Estados Unidos de América	60/565,941	28/04/04	US
(85) Fecha inicio fase nacional		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc PCT		Fecha 10/11/05	
Fecha de presentación de la solicitud 27/04/05		No Publicacion WO 2005/106002 A3	
No. de solicitud PCT/US2005/014485			
(54) Título		VECTORES VIRALES POLIVALENTES Y SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTOS.	
Resumen			
Se suministra un sistema para generar vectores virales que portan dos distintos casetes de expresión. El sistema utiliza una estructura de plásmido polivalente única que permite la detección eficiente y la selección de los casetes de expresión insertados.			

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISION DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS	
PATENTE DE INVENCION <u>X</u> PCT <u> </u> MODELO DE UTILIDAD <u> </u> DISEÑO INDUSTRIAL <u> </u>			
(21) N° de solicitud		(22) Fecha de solicitud	
(51) Clasificación internacional C12Q 1/68			
(71) Solicitante (es) The Trustees of the University of Pennsylvania			
(72) Inventor (es) GAO, Guangping // WILSON, James, M // ZHOU, Xiangyang			
(74) Agente JIMENA ESCOBAR URIBE			
(30) Pnondad	(31) No. Prioridad	32) Fecha	(33) País
Estados Unidos de América	60/565,941	28/04/04	US
(85) Fecha inicio fase nacional		(87) Publicación internacional	
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT		Fecha Fecha (dd/mm/aa)	
Fecha de presentación de la solicitud Fecha (dd/mm/aa)		N° publicación WO 2005/106002 A3	
No de solicitud PCT/US2005/014485 de 27/04/05			
(54) Título			
VECTORES VIRALES POLIVALENTES Y SISTEMA PARA LA PRODUCCIÓN DE ESTOS.			

**REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT**

PATENTE DE INVENCION

☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒
- ◆ Descripción de la invención ☒
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☒

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

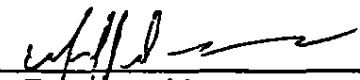
INCOMPLETA ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado ☐
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☐
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado ☐
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecha 31 de Oct 2008

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia