

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 06-127751- -00006-0000

Fecha: 2012-03-30 10:40:44

Dep. 2020 DIR.NUEVASCR

Tra. 11 PATENTEIYII

Eve: 378 FASENACIONALI

Act. 523 RESPUESTA

Folios: 31

Señores

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

E. _____ S. _____ D. _____

Re: Expediente N°. 06-127.751

Solicitud de Patente de Invención Titulada: "ADENOVIRUS QUIMERICOS PARA USO EN EL TRATAMIENTO DEL CANCER"

Solicitante: BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT

Nuestra Ref.: P2006/000264

RESPUESTA AL OFICIO No. 32 NOTIFICADO POR FIJACIÓN EN LISTA No. 03

DE FECHA 05 DE ENERO DE 2012

(PRIMER EXAMEN DE FONDO)

CARLOS R. OLARTE, mayor de edad y vecino de Bogotá, D.C., identificado tal como aparece al pie de mi firma, reasumiendo el poder a mi conferido por la sociedad **BAYER SCHERING PHARMA AKTIENGESELLSCHAFT**, me permito manifestar lo siguiente, ante el auto emanado por ese Despacho, dentro del plazo legal previsto en el artículo 45 de la Decisión 486, en los siguientes términos.

1. En primer lugar, con el ánimo de brindar mayor claridad a la materia reivindicada, me permito presentar un **Capítulo Reivindicatorio Modificado**, que reemplaza en su totalidad al Capítulo Reivindicatorio Modificado presentado al momento de radicar la presente solicitud.

Así entonces, el Capítulo Reivindicatorio Modificado contiene los siguientes cambios:

- se introduce en la Reivindicación 1 el significado del término "índice terapéutico", el cual encuentra soporte en el Capítulo Descriptivo, página 39, líneas 18 a 22, y página 13, líneas 15 a 17;

- se adicionan las Reivindicaciones 4 y 6, donde se especifica que la modificación realizada es una supresión, que encuentra soporte en el Capítulo Descriptivo, página 7, líneas 4 a 8;
- se adicionan las Reivindicaciones 7 a 9, de acuerdo con el Capítulo Descriptivo, páginas 6 a 8;
- las nuevas Reivindicaciones 10 a 13, 14 a 16 y 17 a 21 corresponden a las Reivindicaciones originales 5 a 8, 12 a 14 y 19 a 23, respectivamente;
- se eliminan las Reivindicaciones 9 a 11, 15 a 18 y 24 a 27.

Sin perjuicio de lo anterior, me permito señalar que me reservo el derecho de presentar una solicitud divisional para la materia eliminada de las presentes reivindicaciones.

Adicionalmente, valga anotar que las modificaciones efectuadas al Capítulo Reivindicatorio cumplen a cabalidad con lo estipulado en el Artículo 34 de la Decisión 486, ya que éstas de ninguna manera implican una ampliación de la protección correspondiente a la divulgación contenida en la solicitud inicial.

2. a- El Examinador señala que la presente invención carece de claridad y concisión por las siguientes razones:

- el Capítulo Reivindicatorio contiene tres reivindicaciones independientes que reclaman un adenovirus quimérico con modificaciones similares (Reivindicaciones 1, 9 y 24);
- se debe especificar el número de depósito de las poblaciones virales creadas para complementar la descripción de los adenovirus quiméricos;
- la Reivindicación 1 debe definir la estructura del adenovirus modificado, puesto que pueden haber múltiples opciones de estructura en la región E2b, que pueden no estar soportados en el Capítulo Descriptivo. El Examinador sugiere indicar los serotipos que comprenden la región y la secuencia que conforma cada uno de ellos;
- La Reivindicación 1 contiene términos ambiguos, tales como la expresión: “presenta un índice terapéutico mejorado para la célula tumoral”, que corresponde a resultados a alcanzar y no permite definir las propiedades del adenovirus;

- la Reivindicación 2 debe ser caracterizada indicando la secuencia nucleótida que conforma las regiones que codifican proteínas de fibras, exones y pentones;
- las Reivindicaciones 12 a 14, carecen de sustento en el Capítulo Descriptivo;
- la Reivindicación 24 repite la materia reclamada en las Reivindicaciones 1 y 19.

Por último, el Examinador sugiere caracterizar cada modificación realizada en el genoma del adenovirus indicando el origen (serotipo empleado) y secuencia de las regiones introducidas.

b- i) En primer lugar, me permito señalar que la nueva Reivindicación 1 ha sido limitada para definir el significado del término “índice terapéutico”. Por lo tanto, en dicha reivindicación se ha incluido la siguiente definición: “el índice terapéutico puede ser calculado por comparación de la potencia de dicho adenovirus en una línea de células cancerosas con la potencia del mismo adenovirus en una línea de células no cancerosas y donde la potencia se refiere al potencial lítico del adenovirus y representa la habilidad del adenovirus para replicarse, lisar o dispersarse”, con el fin de aclarar el alcance de dicho término.

Adicionalmente, las Reivindicaciones originales independientes 9 y 24 y las Reivindicaciones originales dependientes 10, 11 y 15 a 18 han sido eliminadas del Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto.

Es importante señalar, que la introducción de mayores limitaciones a la reivindicación principal daría lugar a una restricción injustificada del alcance solicitado en la presente solicitud, teniendo en cuenta la contribución que la presente invención hace al estado del arte con su materia reclamada.

ii) En segundo lugar, me permito indicar respecto a la sugerencia del Examinador de proporcionar un número de depósito para el adenovirus de la presente solicitud, que dicho depósito nunca ha sido efectuado, ya que la secuencia de polinucleótidos de la totalidad del genoma del virus al que refiere la presente invención es descrito de manera completa en la solicitud original. En consecuencia, la persona medianamente versada en la materia debe

ser capaz de reproducir el virus a partir de la información relativa a la secuencia polinucleotídica y no se necesita de un depósito de material biológico para reproducir la invención reivindicada.

iii) Ahora bien, me permito señalar que la presente solicitud enseña a la persona medianamente versada en la materia, por primera vez, la provisión de un virus que comprende una región E2B quimérica que posee material genético de **dos serotipos diferentes de virus** que proporcionan **virus oncolíticos con un índice terapéutico mejorado para una célula tumoral**.

El Capítulo Descriptivo de la presente invención suministra toda la información necesaria para soportar el conocimiento general en la materia y permitir a la persona medianamente versada en la materia obtener el virus definido dentro del alcance de la nueva Reivindicación 1. Los métodos para hacer y probar la actividad de los virus de acuerdo a la Reivindicación 1, han sido descriptos detalladamente en la solicitud originalmente presentada.

Adicionalmente, cabe resaltar, que el método descrito en la solicitud para la generación de los virus elimina aquellas combinaciones o mutaciones indeseadas que no tienen las propiedades requeridas, es decir, el método empleado para generar los virus seleccionados de aquellos virus con propiedades de replicación, lisis y propagación mejoradas. La persona medianamente versada en la materia debe ser capaz de obtener los virus adicionales que se encuentran dentro del alcance de la Reivindicación 1 empleando este método y utilizando sólo habilidades rutinarias.

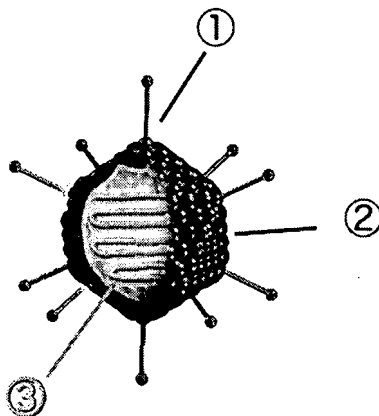
Me permito citar un aparte del Capítulo Descriptivo relacionado con éstos métodos, específicamente en la página 29:

“Los adenovirus quiméricos de la invención, o variantes o derivados de los mismos, se pueden producir usando una modificación de la técnica conocida como “bioselección”, en la cual un adenovirus con las propiedades deseadas, tal como una mayor oncogenicidad o especificidad para el tipo celular, es generado mediante el uso de una selección genética bajo condiciones controladas (Yan et al. (2003) J. Virol. 77: 2640-2650)”.

Adicionalmente, en la página 38 del Capítulo Descriptivo, en la sección titulada "Determinación del potencial terapéutico", se expone el modo en que los virus pueden ser evaluados por su potencial terapéutico.

En adición, el inventor Terry Hermiston y su grupo de investigadores fueron los líderes indiscutibles en el mundo en este campo tecnológico en el momento de la presentación de la presente solicitud. Por lo tanto, me permito manifestar que el alcance de las actuales reivindicaciones corresponde a la contribución que la invención realiza al arte y por ello, el mismo se encuentra plenamente justificado.

Los adenovirus fueron aislados por primera vez en 1953. A la fecha de presentación de la presente solicitud mucho se sabe acerca de su estructura. A continuación se muestra una representación esquemática de un adenovirus:



donde:

- 1 representa la fibra;
- 2 representa el hexón; y
- 3 representa el genoma.

Entre la página 1, línea 22 y página 2, línea 18 del Capítulo Descriptivo de la presente solicitud se explica lo que se conocía en el estado del arte:

"Los adenovirus son virus a ADN de cadena doble icosaédricos sin envoltura con un genoma lineal de 36 pares de kilobases aproximadamente. Cada extremo del genoma viral contiene una secuencia corta, conocida como repetición terminal invertida (o ITR), que es necesaria para la replicación viral. *Todos los genomas de*

adenovirus humanos examinados hasta la fecha presentan la misma organización general; es decir, los genes que codifican funciones específicas están ubicados en la misma posición en el genoma viral. Dicho genoma viral contiene cinco unidades de transcripción tempranas (E1A, E1B, E2, E3 y E4), dos unidades tempranas tardías (IX e Iva2) y una unidad tardía (tardía principal) que es procesada para generar cinco familias de ARNm tardíos (L1-L5). Las proteínas codificadas por los genes tempranos están comprometidas en la replicación, en tanto los genes tardíos codifican proteínas estructurales virales. Las porciones del genoma viral pueden ser sustituidas fácilmente por ADN de origen extraño y los adenovirus recombinantes son estructuralmente estables, siendo estas propiedades las que permiten que estos virus sean de potencial utilidad para una terapia genética (véase Jolly, D. (1994) Cancer Gene Therapy 1: 51-64)" (mi resaltado).

Considero respetuosamente que, la persona medianamente versada en la materia debe ser capaz de identificar la fibra, el hexón y el pentón de cualquier virus. Por lo anterior, no es apropiado incluir las secuencias en las reivindicaciones.

iv) De otra parte, la expresión "son del mismo serotipo" en la Reivindicación 2 se refiere al hecho de que las proteínas de la fibra, el hexón y pentón son del mismo serotipo que la otra. Lo anterior se señala en la página 5, último párrafo y página 6, primer párrafo, del Capítulo Descriptivo, que describe lo siguiente:

“En una realización, el adenovirus quimérico comprende además regiones que codifican proteínas de fibras, hexones y pentones, donde los ácidos nucleicos que codifican dichas proteínas provienen todos **del mismo serotipo adenoviral**” (mi resaltado).

La inclusión de genes heterólogos en vectores virales era bien conocida a la fecha de presentación de la presente solicitud. Fue, de hecho, una técnica rutinaria para la persona medianamente versada en la materia.

Como soporte de lo anterior, adjunto al presente memorial el documento Mizuguchi et al 2001, como Anexo 1, para su consulta.

Así, en la fecha de presentación de la presente solicitud, la incorporación de un gen heterólogo era una tarea de rutina para una persona medianamente versada en la materia. El Capítulo Descriptivo de la presente solicitud, en particular la página 45, línea 25 y página 46, líneas 1 a 22, proporciona detalles de los documentos técnicos publicados disponibles que proporcionan a la persona medianamente versada en la materia la información necesaria sobre los genes heterólogos que codifican proteínas terapéuticas:

"La terapia adenoviral que emplea los adenovirus de la presente invención como vectores adenovirales también se puede combinar con otros genes conocidos por ser de utilidad en una terapia basada en virus", véase la patente US5.648.478. En dichos casos, el adenovirus quimérico comprende además un gen heterólogo que codifica una proteína terapéutica, incorporada en el genoma viral, de modo tal que el gen heterólogo se expresa dentro de la célula infectada. Una proteína terapéutica, tal como se utiliza en la presente, se refiere a una proteína que podría proveer algún beneficio terapéutico cuando se expresa en una célula dada.

En una realización, el gen heterólogo es un gen activador de un profármaco, tal como la citosina deaminasa (CD) (Véase, las Patentes de EE.UU. N°: 5.631.236; 5.358.866; y 5.677.178). En otras realizaciones, el gen heterólogo es un inductor conocido de muerte celular, por ejemplo apoptina o proteína de muerte adenoviral (ADP), o una proteína de fusión, p.ej. una glicoproteína fusogénica de membrana (Danen-Van Oorschot et al.(1997) Proc. Nat. Acad.Sci.94: 5843-5847; Tollefson et al.(1996) J. Virol.70: 2296-2306; Fu et al.(2003) Mol. Therapy 7: 48-754, 2003; Ahmed et al.(2003) Gene Therapy 10: 1663-1671; Galanis et al.(2001) Human Gene Therapy 12(7): 811-821).".

Considero respetuosamente que es incorrecto afirmar que el concepto de genes heterólogos no se encuentra soportado en el Capítulo Descriptivo de la presente solicitud. Por lo expresado anteriormente, considero superada la anterior objeción.

v) Finalmente, la limitación de las reivindicaciones mediante la inclusión de las secuencias específicas conforme con lo solicitado por el Examinador, impediría a la

solicitante obtener una protección adecuada del concepto de la invención y por ello, no está justificada.

vi) Teniendo en cuenta todo lo anterior, considero que la presente invención es suficientemente clara y completa, por lo cual considero superadas las anteriores objeciones.

3. El Examinador argumenta que los documentos “Developing Novel Oncolytic Adenoviruses through Bioselection”¹ (D1) y “Conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy”² (D2) afectan el nivel inventivo de la presente invención.

El Examinador señala que D1 revela mutantes de adenovirus humanos 5 (Ad5) con actividad oncolítica aumentada. Adicionalmente, D1 enseña cómo se purifican dos mutantes ONYX-201 y ONYX-203, en placa de una mezcla de Ad5 mutagenizados aleatoriamente con pasajes repetidos en líneas de cáncer colorectal HT29, de la misma forma como se encuentra reclamado en la presente invención.

El Examinador argumenta que la diferencia entre D1 y la presente invención es que en D1 no se modifica el transcripto E2B, y los adenovirus modificados son mutantes ensayados puntualmente, más no por segmentos con regiones provenientes de diferentes serotipos.

El Examinador señala que a partir de la información revelada en D1, la presente invención logra incrementar la capacidad citolítica del vector adenoviral, modificando otra región de transcripto, sin embargo, la modificación en el transcripto E2B ya se encontraba sugerida en D2.

Adicionalmente el Examinador señala que D2 enseña el efecto que tiene la modificación por medio de mutaciones la región E2B sobre la capacidad de replicación del adenovector, produciendo especificidad en la célula blanco a infectar y permitiendo mínimos efectos nocivos en el tratamiento.

El Examinador concluye que aunque D1 solamente revela el método de bioselección con el cual se obtiene la población de virus, no revelaba la construcción de un adenovirus quimérico

¹ Yan W. et al. “Developing Novel Oncolytic Adenoviruses through Bioselection”. Journal of Virology. Junio de 2003. Vol 77, No 4, páginas 2640 a 2650.

² Rancourt C., Curiel D. “Conditionally replicative adenoviruses for cancer therapy”. Advanced Drug Delivery Reviews 27. 1997, páginas 67 a 81.

conformado por dos serotipos de adenovirus para la región E2B. Sin embargo, ésta modificación había sido divulgada en D2, por lo cual la persona medianamente versada en la materia habría podido combinar las enseñanzas de D1 y D2 y llegar de manera obvia a la presente invención.

b- i) En primer lugar, me permito señalar que D1 describe mutagénesis aleatoria de Ad5 con ácido nitroso. La infectividad de los virus resultantes se examinó mediante un ensayo de placa en 293 células por medio del proceso llamado de “*bioselection*” para identificar los virus con las propiedades deseadas. En D1 no se divulga un virus quimérico que contiene secuencias de ADN **de dos serotipos de adenovirus diferentes**, sino que más bien se da a conocer un virus mutado por medios químicos.

D1 tampoco enseña o le sugiere a la persona medianamente versada en la materia sobre la importancia de la **modificación de la región E2B** con el fin de proporcionar un virus oncolítico con un índice terapéutico mejorado. De hecho, los adenovirus de D1 se basan en la **sobreexpresión de p53** por las células tumorales para hacer su replicación competente. En contraste, los virus de la presente invención, tales como ColoAd1, son virus vivos plenamente capaces de replicación sin ayuda complementaria por medio de una célula huésped. Los virus de la presente invención actúan por medio de un mecanismo totalmente diferente a los virus de la técnica anterior, tales como ONYX-15 descrito en D1.

Así, D1 no enseña ni sugiere a la persona medianamente versada en la materia cómo llegar a la presente invención, tal y como se reivindica y por lo tanto, demuestra nivel inventivo sobre las enseñanzas de D1.

D2 tampoco completa la enseñanza defectuosa de D1 en dirección a la presente invención. D2 es un artículo de revisión y describe cómo generar vectores de adenovirus de replicación deficiente eliminados en la región E1 y, opcionalmente, en la región E4, *in vitro*, empleando una línea celular de complementación. La línea celular contiene la región que falta (trans-complementaria) E1 (y E4, si es necesario) transfectadas establemente en su genoma o transfectadas transitoriamente en el mismo, por ejemplo, donde se efectúa la transfección transitoria empleando un plásmido. D2 sugiere que los vectores de replicación deficiente podrían ser co-entregados a las células cancerosas, por ejemplo, con plásmidos de complementación que contienen la región E1 para suministrar una replicación competente del virus in vivo.

Dicha replicación, llamada condicional, podría efectuarse empleando cualquier gen en el genoma del virus que sea esencial para la replicación. Éste último, incluye genes tempranos que por convención se les da la designación E seguido de un número, por ejemplo E1, E2, E3 y E4. D2 sugiere que E2 y E4 pueden ser ideales para trans-complementación, porque estos dos genes son esenciales para la replicación. Lo anterior le sugiere a la persona medianamente versada en la materia la eliminación de los genes E2 y / o E4 y asegurar que el virus sólo es capaz de replicarse cuando se proporciona una copia complementaria del gen.

La enseñanza de D2, de hecho, se aleja de la presente invención, ya que sugiere a la persona medianamente versada en la materia que la región E2 es un gen adecuado para ser eliminado en lugar de mantener dicho gen E2 en una forma modificada.

Respetuosamente me permito recordar que la trans-complementación no se utiliza “*in vitro*” o “*in vivo*” para la replicación de los virus de la presente invención.

En conclusión, a partir de la combinación de las enseñanzas de D1 y D2 una persona medianamente versada en la materia no encontraría ninguna enseñanza o sugerencia que conduzca a la obtención de un virus oncolítico con una región E2B quimérica de acuerdo con la invención ahora reivindicada y que exhiba los beneficios terapéuticos declarados.

4. Finalmente, deseo poner bajo su conocimiento que para el concepto inventivo comprendido en la presente solicitud, el privilegio de patente ha sido otorgado hasta el momento por parte de la Oficina de Patentes de Europa (EP1749098 B1). De hecho, el Capítulo Reivindicatorio Modificado adjunto corresponde a la materia concedida en Europa.

Si bien es cierto que las concesiones de patentes en oficinas de otros países no son vinculantes en el sentido que obliguen a la SIC a tomar una decisión en el mismo sentido, considero que dichas concesiones sugieren el cumplimiento de los requisitos de patentabilidad de la materia reivindicada, ya que los criterios de evaluación y estudio aplicados para concluir la aceptación de dichas patentes resultan equivalentes a los que la SIC debe emplear.

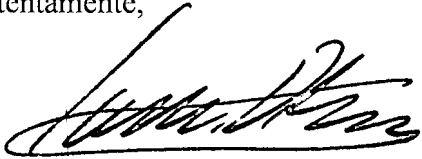
5. Por todo lo anterior, considero que las objeciones presentadas por el Examinador en su examen de fondo han sido resueltas y por consiguiente solicito respetuosamente que el Despacho

OLARTEMOURE

OLARTE MOURE & ASOCIADOS LTDA.

tengan por cumplidos los requisitos de patentabilidad, y se proceda con la concesión de la patente.

Atentamente,



CARLOS R. OLARTE

C.C. No. 79.782.747 de Bogotá

T.P. 74.295

Anexos:

- Capítulo Reivindicatorio Modificado.
- Anexo 1. Mizuguchi et al. "Approaches for generating recombinant adenovirus vectors". Advanced Drug Delivery Reviews 52 (2001), páginas 165–176.

CAPÍTULO REIVINDICATORIO MODIFICADO
(Primer Examen de Fondo)

1. Un adenovirus quimérico, o una variante o derivado del mismo que tiene un genoma que comprende una región E2B,
en el que dicha región E2B comprende una secuencia de ácido nucleico derivada de un primer serotipo adenoviral y una secuencia de ácido nucleico derivada de un segundo serotipo adenoviral;
en el que dicho primer y segundo serotipos se seleccionan cada uno entre los subgrupos adenovirales B, C, D, E, o F y son distintos entre sí; y
en el que dicho adenovirus quimérico es oncolítico y presenta un índice terapéutico mejorado para la célula tumoral, donde el índice terapéutico puede ser calculado por comparación de la potencia de dicho adenovirus en una línea de células de tumor con la potencia del mismo adenovirus en una línea de células no cancerosas y donde la potencia se refiere al potencial lítico del adenovirus y representa la habilidad del adenovirus para replicarse, lisar o dispersarse.
2. El adenovirus de la Reivindicación 1 que además comprende regiones que codifican proteínas de fibras, hexones y pentones, en el que el ácido nucleico que codifica las proteínas de fibras, hexones y pentones de dicho adenovirus proviene del mismo serotipo adenoviral.
3. El adenovirus de la Reivindicación 1 que además comprende una región E3 modificada.
4. El adenovirus de la Reivindicación 3, donde la modificación es una supresión.
5. El adenovirus de la Reivindicación 1, que además comprende una región E4 modificada.
6. El adenovirus de la Reivindicación 1, donde la modificación es una supresión.
7. El adenovirus de la Reivindicación 1, donde uno o más de los serotipos adenoviral son seleccionados del grupo B.
8. El adenovirus de la Reivindicación 1, donde el serotipo es Ad11.

9. El adenovirus de la Reivindicación 1, donde el serotipo es Ad3.
10. El adenovirus de la Reivindicación 1, en el que dicha célula tumoral es una célula de un tumor de colon, mama, páncreas, pulmón, próstata, ovario o hematopoyético.
11. El adenovirus de la Reivindicación 10, en el que dicha célula tumoral es una célula de tumor de colon.
12. El adenovirus de la Reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos de la región E2B de dicho adenovirus comprende la SEQ ID N°: 3, o una porción de la misma.
13. El adenovirus de la Reivindicación 1, en el que la secuencia de nucleótidos de dicho adenovirus comprende la SEQ ID N°: 1.
14. El adenovirus de la Reivindicación 1, que además comprende un gen heterólogo, donde dicho gen heterólogo se expresa dentro de la célula infectada con dicho adenovirus.
15. El adenovirus de la Reivindicación 14, en el que dicho gen heterólogo es de la timidina quinasa.
16. El adenovirus de la Reivindicación 14, en el que dicho gen heterólogo codifica una proteína terapéutica seleccionada del grupo formado por citoquinas y quimioquinas, anticuerpos, enzimas convertidoras de prodrogas y proteínas inmunorreguladoras.
17. Un método para aislar el adenovirus de la Reivindicación 1, que comprende
 - a) agrupar los serotipos adenovirales que representan los subgrupos adenovirales B-F, creando así una mezcla adenoviral;
 - b) someter la mezcla de adenovirus agrupados del paso (a) a pasajes con un cultivo de células tumorales en crecimiento activo a una relación de partícula por célula suficientemente alta como para promover la recombinación entre serotipos, pero no tan alta como para producir una muerte celular prematura;
 - c) cosechar el sobrenadante del paso (b);
 - d) infectar un cultivo quiescente de células tumorales con el sobrenadante cosechado en el paso (c);
 - e) cosechar el sobrenadante del cultivo celular del paso (d) antes de la aparición de algún signo de CPE;
 - f) infectar un cultivo quiescente de células tumorales con el sobrenadante cosechado en el paso (e); y

g) aislar el virus de la Reivindicación 1 a partir del sobrenadante cosechado en el paso (f) por purificación en placa.

18. El método de la Reivindicación 17, en el que el paso (b) se efectúa dos veces antes de cosechar el sobrenadante en el paso (c).

19. El método de la Reivindicación 17, en el que los pasos (e) y (f) se repiten hasta 20 veces antes del paso (g).

20. El método de la Reivindicación 17, en el que la segunda ronda de purificación en placa se efectúa después del paso (g).

21. El método de la Reivindicación 17, en el que la célula tumoral es una célula de tumor de colon, mama, páncreas, pulmón, próstata, ovario o hematopoyético.



[Signature]



N 007422051

CECBA - LEY 404 GCBA
LEGALIZACION
070312117346



12/03/2007 13:51:46 \$20.00

CECBA - LEY 404 GCBA
APOSTILLA
070312054713



12/03/2007 13:51:54 \$39.00

1 FOLIO 85.- PRIMERA COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: VEINTICUATRO.-
2 SUSTITUCIÓN PARCIAL DE PODER: MESSERER, Dagmar a favor de
3 OLARTE, Carlos Reinaldo y otro del Poder otorgado por BAYER SCHERING
4 PHARMA AG.- En la Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Capital de la República
5 Argentina, el día NUEVE de MARZO del año DOS MIL SIETE, ante mí María
6 Silvina Lasarte, Escribana Autorizante, titular del Registro Notarial número 1788,
7 COMPARECE: Dagmar MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968,
8 hija de Walter Messerer y Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Na-
9 cional de Identidad Número 20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-
10 20383892-7, con domicilio especial en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º,
11 de esta Ciudad de Buenos Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIE-
12 NE: por su propio derecho.- Y la compareciente EXPRESA: PRIMERO: Que la
13 Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse
14 178, 13353, Berlín, Alemania, le confirió con fecha 22 de enero de 2007 en dicho pa-
15 ís, un Poder, el cual mediante escritura número 14 de fecha 16 de febrero de 2007,
16 otorgada ante la Escribana Mariela Vanina Scardaccione, al folio 44, protocolo co-
17 rriente de este Registro Notarial interinamente a su cargo, fue incorporado y transcrip-
18 to al mismo, cuya primera copia tengo para este acto a la vista, doy fe y en lo perti-
19 nente transcribiré en la presente.- SEGUNDO: Manifiesta bajo juramento que el refe-
20 rido poder se encuentra plenamente vigente en virtud de no haberle sido revocado,
21 suspendido ni limitado en ninguna de sus partes.- TERCERO: En consecuencia, DI-
22 CE: Que en uso de la facultad conferida SUSTITUYE PARCIALMENTE el poder
23 mencionado a favor de Carlos Reinaldo OLARTE y/o James Ian RAISBECK, al
24 solo y único objeto de que en nombre y representación de la Sociedad "BAYER
25 SCHERING PHARMA AG", y actuando en forma individual, indistinta y/o alterna-



N 007422051

damente, se presente exclusivamente ante las autoridades de **COLOMBIA** que co-
rrespondan y realicen los actos enumerados en el citado poder y con las facultades que
surgen del mismo, el que transcripto en lo pertinente dice: "FOLIO 44.- PRIMERA
COPIA.- ESCRITURA NÚMERO: CATORCE.-- En la Ciudad Autónoma de
Buenos Aires, Capital de la República Argentina, el día DIECISÉIS de FEBRERO del
año DOS MIL SIETE, ante mí ..., Escribana Autorizante, ..., COMPARECE: Dagmar
MESSERER, argentina, nacida el 28 de mayo de 1.968, hija de Walter Messerer y
Elsa Onelia Romanelli, soltera, titular del Documento Nacional de Identidad Número
20.383.892, Clave Única de Identificación Tributaria 27-20383892-7, domiciliada
legalmente en la Avenida Leandro N. Alem 1.134, Piso 10º, de esta Ciudad de Buenos
Aires.- La compareciente es mayor de edad.- INTERVIENE: por su propio derecho.-
Y la compareciente EXPRESA: Que a los efectos que hubiere lugar, solicita de mí, la
Autorizante, LA INCORPORACIÓN y TRANSCRIPCIÓN en este protocolo del
PODER que le fuera conferido en Berlín, Alemania, el 22 de enero de 2007, por la
Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con domicilio en Müllerstrasse 178,
13353, Berlín, Alemania, sobre cuya plena vigencia responde la requirente bajo jura-
mento.- Yo, la Autorizante, hago constar: a) Que el instrumento de poder cuya incor-
poración y transcripción a este protocolo solicita la compareciente, se encuentra ex-
tendido en idioma castellano, certificadas las firmas por notario en idioma alemán,
debidamente legalizado en idioma alemán (Sello de Apostilla de la Convención de La
Haya del 5 de octubre de 1961) y traducido en lo pertinente al idioma nacional por la
Traductora Pública Laura Thieberger.- b) Que la compareciente en virtud de lo mani-
festado tiene interés legítimo en su requerimiento.- En consecuencia, me hace entrega
en este acto del original del instrumento de poder relacionado con su respectiva tra-
ducción al idioma nacional, el que agrego a la presente y transcripto dice: "MOE-

1 LL
2 BA
3 - A
4 plic
5 res
6 cas
7 efec
8 sari
9 prot
10 cior
11 cibi
12 orde
13 pue
14 en e
15 mar
16 de p
17 juici
18 cont
19 que
20 ción
21 mar
22 dom
23 senta
24 ridac
25 cual



ACTUACION NOTARIAL



N 007422052

1 LLER & CO. (Sigue aclaración en idioma inglés) - PODER Los abajo firmante/s
2 BAYER SCHERING PHARMA AG domiciliados en Müllerstrasse 178 13353 Berlín
3 - Alemania declaran por el presente otorgar a Dagmar MESSERER poder general am-
4 plio y suficiente para recabar de las autoridades ..., sud y centroamericanas ... que co-
5 rrespondan, la obtención de patentes de invención, el registro y la renovación de mar-
6 cas y modelos y/o derechos de propiedad intelectual y/o nombres de dominio, a cuyo
7 efecto los faculta/n para llevar a cabo ante dichas autoridades todas las gestiones nece-
8 sarias al objeto indicado, presentar solicitudes, formular descripciones, oposiciones,
9 protestos, declaraciones, apelaciones y reclamos, oblar impuestos, justificar explota-
10 ciones, solicitar testimonios, aceptar transferencias, recibir documentos y valores, per-
11 cibir y hacer cuanto fuere necesario ante las autoridades administrativas de cualquier
12 orden. Por otra parte, les confieren mandato para que en su nombre y representación
13 puedan iniciar y proseguir cualquier juicio que actualmente los que suscriben tengan o
14 en el futuro tuvieran ..., en Sudamérica, Centroamérica ..., con motivo de su nombre,
15 marcas de fábrica o de comercio, patentes de invención y modelos y/o de sus derechos
16 de propiedad intelectual que actualmente posean o adquieran en lo sucesivo, promover
17 juicios de cualquier jurisdicción, criminales, correccionales, civiles o comerciales,
18 contra los falsificadores, usurpadores o imitadores y contra los tenedores de artículos
19 que infrinjan su nombre, marcas o patentes de invención, seguir los juicios por oposi-
20 ción u otros en que fueran parte como actores o demandados, defender el nombre, las
21 marcas, patentes y modelos y/o de derechos de propiedad intelectual y/o nombres de
22 dominio, haciendo las protestas del caso o diciendo de nulidad. Al efecto, podrán pre-
23 sentarse con escritos, querellas, pedidos, y lo que fuere necesario ante cualquier auto-
24 ridad judicial, presentar testigos, documentos y demás justificativos, rendir pruebas de
25 cualquier especie, pedir nombramientos de peritos, pedir y absolver posiciones, asistir



N 007422052

a juicios verbales, declinar y prorrogar de jurisdicción, tachar, recusar, apelar, transar,
someter a arbitraje o mediación, hacer renunciaciones, exigir y dar cauciones, pedir embar-
gos preventivos, definitivos o inhibiciones y su levantamiento, pedir la venta de los
bienes de los deudores, solicitar y obtener el cumplimiento de sentencias, prestar ju-
ramentos, decir de nulidad, desistir, percibir, otorgar recibos y en general practicar
todos los actos y diligencias que sean precisos al desempeño de este mandato. Podrán
asimismo substituir el presente poder en todo o en parte.- Dado y firmado en Berlín
(Sigue fecha en idioma inglés). Bayer Schering Pharma AG (Sigue texto en idioma
inglés). ppa. Sigue una firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Noeske-Jungblut. ppa. Sigue
otra firma ilegible. (Aclarado:) Dr. Klose". ES COPIA FIEL, doy fe.- En hoja adjunta
consta la certificación notarial de las firmas obrantes en el poder en idioma alemán,
efectuado el 22 de enero de 2007 por el Escribano Dimitri Rempen, de Berlín, Alema-
nia, y a continuación consta la respectiva legalización de la firma y sello del nombra-
do Notario (Sello de Apostilla de la Convención de La Haya del 5 de octubre de
1961), en idioma alemán, efectuado por el Presidente del Tribunal Regional de Berlín,
Alemania.- En hojas adjuntas sigue la referida traducción al idioma nacional la que
transcripta textualmente, dice: "TRADUCCIÓN PUBLICA - (Sobre papel con mem-
brete de "MOELLER y CO" - América Latina - Agentes de la Propiedad Intelectual -
figura un Poder otorgado por la Sociedad "BAYER SCHERING PHARMA AG", con
sede en Berlín, Alemania, redactado en idioma nacional, luego del que aparecen los
siguientes textos, que traducidos dicen:) "BAYER SCHERING PHARMA AG" -
Patentes y licencias - (Firmado y Aclarado:) pp Dr. Noeske-Jungblut - pp (Firmado y
Aclarado:) Dr. Klose.- La versión en inglés es para su información únicamente.- Re-
gistro de Actas N° R 17/2007.- Me he referido a la prohibición de intervención según
el artículo 3, párrafo 1, N° 7, de la Ley de Certificaciones. Mi pregunta de si ha existi-

do u
va.-
de l
junio
cial
ticm
7 Corr
8 283,
9 lín,
10 la ar
11 está
12 Soci
13 de 2
14 oble
15 LLA
16 de A
17 su c
18 do e
19 lín,
20 gion
21 Juez
22 nent
23 al id
24 Hay
25 RES

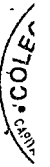


ACTUACION NOTARIAL
LEY 404



N 007422053

do una intervención previa en el sentido de la norma me fue contestada por la negativa.- Las firmas trazadas ante mí por el Dr. Walter Klose, que nació el 26 de diciembre de 1952, y de la Dra. Chistiane Noeske-Jungblut de soltera Noeske, que nació el 26 de junio de 1957 – Ambos de mi personal conocimiento – Ambos con domicilio comercial en 13353 Berlín, Müllerstrasse 178 son auténticas, de lo que doy fe.- Al mismo tiempo certifico en base a que tuve a la vista en el día de hoy las actas del Registro de Comercio del Tribunal de Primera Instancia de Charlottenburg, N° de Registro HR B 283, que la Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft”, con sede en Berlín, está inscrita con el número mencionado arriba en el Registro de Comercio y que la arriba mencionada Dra. Noeske-Jungblut y el arriba mencionado Dr. Walter Klose están facultados en su carácter de mandatarios a representar en forma conjunta a la Sociedad “Bayer Schering Pharma Aktiengesellschaft” de Berlín. Berlín, 22 de enero de 2007.- El escribano (firma ilegible) y liquidación de derechos. (Hay un sello en oblea sobre precinto:) Dimitri Rempen, Escribano de Berlín.- 9101ª E-F.- APOSTILLA – (Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961) - País: República Federal de Alemania - Este instrumento público fue firmado por Dimitri Rempen, actuando en su carácter de escribano de Berlín, estando provisto del sello del escribano.- Certificado en Berlín, el 24 de enero de 2007, por el Presidente del Tribunal Regional de Berlín, con el N° 9101 a E-F 536/07 - Sello (hay un sello:) el Presidente del Tribunal Regional de Berlín – Firma el Funcionario autorizado (firmado y aclarado:) Holldorf – Juez Principal del Tribunal Regional.- ES TRADUCCIÓN FIEL de las partes pertinentes en los idiomas alemán e inglés del documento que se acompaña, que he vertido al idioma nacional, en Buenos Aires, a 6 de febrero de 2007.- Hay una firma ilegible. Hay un sello que dice: “LAURA THIEBERGER – MATRÍCULA DE TRADUCTORES ALEMÁN – FRANCÉS – Tomo II Folio 254 (Cap.) Tomo III – 98 – (La Plata) –



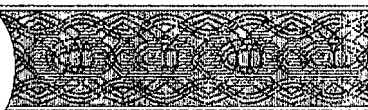
007 422053

N 007422053

INGLÉS – Tomo III: Folio 14 (Cap.) – Tomo III Folio 329 (La Plata) – COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS N° 173”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- A continuación hay un sello que dice: “COLEGIO DE TRADUCTORES PÚBLICOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES Corresponde a la Legalización N° T4-3278/07. Sigue una firma ilegible: Esteban Santiago Allegretti”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- Al dorso en el margen superior hay un sello timbrador ...”.- A continuación sigue la legalización de la firma de la nombrada traductora, ...”.- ES COPIA FIEL, doy fe.- En este estado la compareciente DICE: que en la forma expresada deja INCORPORADO y TRANSCRIPTO en este Protocolo el Poder que agrego a la presente, solicitando de mí, la Escribana Autorizante, expida primera copia de la presente para la nombrada apoderada Dagmar MESSERER.- Constancias Notariales: Identidad de la compareciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de la Autorizante.- ...- LEO esta escritura a la compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad, la firma ante mí, doy fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIELA VANINA SCARDACCIONE. Escribana. Está mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 44 del Registro Notarial número 1788, interinamente a mi cargo.- PARA LA APODERADA expido la presente PRIMERA COPIA en tres (3) sellos de actuación notarial numerados correlativamente desde el número N 007376153 al presente inclusive, que sello y firmo en la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.- Sigue una firma ilegible y un sello que dice: Mariela V. Scardaccione – Escribana – Mat. 4527.”.- ES COPIA FIEL, de las partes pertinentes de la escritura de referencia, doy fe.- CUARTO: Finalmente la compareciente expresa: a) Que el presente otorgamiento no significa renunciar al ejercicio de las facultades sustituidas; y b) Que los nombrados apoderados sustitutos no podrán sustituir el presente poder en ninguna de sus partes.- Constancias Notariales: Identidad de la Compare-

1 cien
2 la A
3 teno
4 404,
5 te es
6 com
7 fe.-
8 mi s
9 gistr
10 sentu
11 lativ
12 la fe
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

FRANCOS
ENTRADA

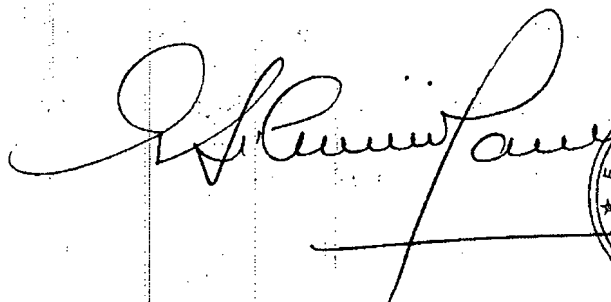
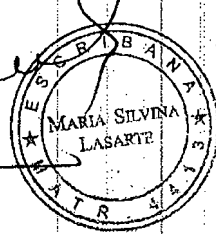


53

N 007422054

GIO 26
ua- 27
LA 28
gue 29
orso 30
iza- 31
este 32
O y 33
de 34
ada 35
are- 36
e la 37
ue- 38
IA- 39
con 40
88, 41
RA 42
el 43
su 44
ar- 45
e la 46
a) 47
us- 48
nte 49
re- 50

1 ciente (Artículo 1.002 del Código Civil): Se justifica la misma por conocimiento de
2 la Autorizante.-Yo, la Escribana Autorizante impongo y advierto a la compareciente, a
3 tenor de lo dispuesto en el artículo 77 inciso h) de la Ley Orgánica Notarial Número
4 404, respecto de los alcances y consecuencias de las cláusulas contenidas en la presen-
5 te escritura y del derecho de leer por sí este instrumento.- LEO esta escritura a la
6 compareciente, quien así la otorga y en prueba de conformidad la firma ante mí, doy
7 fe.- Dagmar MESSERER. Ante mí: MARIA SILVINA LASARTE. Escribana. Está
8 mi sello. CONCUERDA con su escritura matriz que pasó ante mí, al folio 85 del Re-
9 gistro Notarial número 1788, a mi cargo. PARA LA PODERDANTE expido la pre-
10 sente PRIMERA COPIA en cuatro (4) sellos de actuación notarial numerados corre-
11 lativamente desde el número N 007422051 al presente inclusive; que sello y firmo en
12 la fecha y lugar de su otorgamiento, doy fe.-



N 007422054



COLE
ESCRIBANOS
CIUDAD DE BUENOS AIRES
CAPITAL FEDERAL - REPUBLICA ARGENTINA

26

27

28

29

30

31

32

33

34

35

36

37

38

39

40

41

42

43

44

45

46

47

48

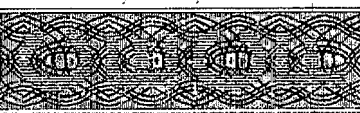
49

50



LEGALIZACION

LEY 1004



L 007495419

COLEGIO DE ESCRIBANOS
CIUDAD DE BUENOS AIRES

EL COLEGIO DE ESCRIBANOS de la Ciudad de Buenos Aires, Capital Federal de la República

Argentina, en virtud de las facultades que le confiere la ley vigente, **LEGALIZA** la firma

y sello del escribano **MARIA SILVINA LASARTE**

obrantes en el documento anexo, presentado en el día de la fecha bajo

el N° **070312117346/0** La presente legalización no juzga sobre

el contenido y forma del documento.

Buenos Aires, **Ejenes 12 de Marzo de 2007**



[Handwritten signature]

ESC. EDDA ENRIQUETA SINELLI
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERA



REPUBLICA
ARGENTINA

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

A 00115229

1. PAÍS: REPUBLICA ARGENTINA

El presente documento público

2. Ha sido firmado por EDDA ENRIQUETA SINELLI

3. Quien actúa en calidad de CONSEJERA

4. Lleva el sello / timbre de COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS
AIRES

5. En LA CIUDAD DE BUENOS AIRES 6. El día 12/03/2007

7. Por EL COLEGIO DE ESCRIBANOS DE LA CIUDAD DE BUENOS AIRES

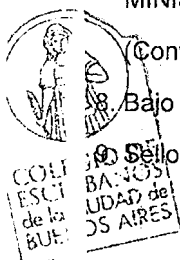
MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES, COMERCIO INTERNACIONAL Y CULTO

(Convenio 02/09/2003)

8. Bajo el número: 070312054713

10. Firma

ESC. HECTOR R. HOVARO
COLEGIO DE ESCRIBANOS
CONSEJERO



Approaches for generating recombinant adenovirus vectors

Hiroyuki Mizuguchi^{a,*}, Mark A. Kay^b, Takao Hayakawa^a

^a*Division of Biological Chemistry and Biologicals, National Institute of Health Sciences, Tokyo 158-8501, Japan*

^b*Departments of Pediatrics and Genetics, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA 94305, USA*

Abstract

Various methods have been developed to facilitate the generation of recombinant adenovirus vectors, and three commercially available methods have been most widely used: the homologous recombination method in E1-complement cell lines, the homologous recombination method in bacteria, and an in vitro ligation method based on simple routine plasmid construction. These methods can insert foreign genes not only into the E1 deletion region, but also into the E3 deletion region, thereby permitting the construction of a binary transgene expression system in which heterologous genes can be inserted into both the E1 and E3 regions. By modifying the latter two methods, fiber-mutant adenovirus vectors can be also constructed in order to modify vector tropism. In this paper, we review recent advances in the construction of first generation adenovirus vectors and fiber-modified adenovirus vectors. © 2001 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: Gene therapy; Adenovirus vector; Tetracycline; Gene regulation; Fiber; Targeting

Contents

1. Introduction	165
2. Construction of first generation adenovirus vectors	166
2.1. In vitro ligation method	166
2.2. Homologous recombination method in 293 cells	168
2.3. Homologous recombination method in bacteria	168
2.4. Improved in vitro ligation method	168
2.5. Other methods	169
3. Construction of E1/E3-substituted adenovirus vector	169
4. Construction of fiber-mutant adenovirus vectors	170
5. Conclusion	174
Acknowledgements	174
References	174

1. Introduction

Adenoviruses (Ad) are non-enveloped icosahedral particles and have a diameter of 70–100 nm [1]. Each virion consists of a DNA core surrounded by a protein shell composed of 252 subunits, called

*Corresponding author. Tel.: + 81-3-3700-9089; fax: + 81-3-3700-9084.

E-mail address: mizuguch@nihs.go.jp (H. Mizuguchi).

capsomeres (240 subunits, hexons; 12 subunits, pentons). So far, more than 49 serotypes of human Ad have been identified and classified in six distinct subgroups (A–F), many of which are associated with respiratory, gastrointestinal, or ocular disease [1]. Two of them, Ad types 2 and 5, which belong to subgroup C, have been the most extensively studied genetically and biochemically, and the studies have contributed to our knowledge of biological processes, such as viral and cellular gene expression and regulation, DNA replication, and cell cycle control. Because of the extensive knowledge of the genetic and biological characteristics of Ad type 2 and 5, they have been commonly used to prepare recombinant Ad vectors.

Human Ad contains a linear, approximately 36 kb, double-stranded DNA genome that encodes over 70 gene products [1]. The viral genome contains five early transcription units (E1A, E1B, E2, E3, E4), two early delayed (intermediate) transcription units (pIX and IVa2) and five late units (L1–L5), which mostly encode structural proteins for the capsid and the internal core. Inverted terminal repeats (ITR) at the ends of the viral chromosome function as replication origins. The E1A gene is the first transcription unit to be activated shortly after infection, and is essential to the activation of other promoters and replication of the viral genome. In the first generation Ad vector, the E1 (E1A and E1B) gene is replaced by the foreign gene and the virus is propagated in E1-transcomplementing cell lines, such as 293 [2], 911 [3], or PER.C6 cells [4]. The E3 region encodes products associated with host defense mechanisms, which are not required for viral replication *in vitro*, and, thus, the E3 region is not only often deleted to enlarge the packageable size limit for foreign genes, but also is replaced with foreign genes. Since up to 3.2 and 3.1 kb of the E1 and E3 region, respectively, can be deleted [5], and approximately 105% of the wild-type genome can be packaged into the virus without affecting the viral growth rate and titer [6], E1/E3-deleted Ad vectors allow the packaging of approximately 8.1–8.2 kb of foreign DNA [5].

Recombinant Ad vectors have been extensively used to deliver foreign genes to a variety of cell types and tissues both *in vitro* and *in vivo* [7–10]. They can be easily grown to high titer and can

efficiently transfer genes into both dividing and non-dividing cells. The viral genome persists as an episome in the nucleus of the transduced cells. Since they do not replicate extrachromosomally and rarely integrate into the host chromosome, Ad-mediated gene expression is variable and dependent on factors such as cellular turnover and immune responses directed against transduced cells. Ad vectors have not only become promising vectors for gene therapy, but also important tools for gene transfer into mammalian cells. Construction of Ad vectors, however, is a time-consuming and labor-intensive procedure, and several improved systems to facilitate the construction of the Ad vector have recently been developed. In this paper, we review recent advances in the methods of generating recombinant Ad vectors.

2. Construction of first generation adenovirus vectors

2.1. *In vitro* ligation method

About a decade ago, most Ad vectors were generated by an *in vitro* ligation method [11–13] (Fig. 1A). This method uses whole viral DNA genomes and a plasmid containing the left end of the Ad with the left inverted terminal repeat (ITR), the packaging signal, and the E1A enhancer sequence (map unit: 0–1.3). After the gene of interest has been inserted into the downstream of the viral sequence of the plasmid, the ClaI-digested fragment containing the left viral sequence and gene of interest is ligated with the Ad genome digested with ClaI, which is a unique site located in the E1 region of the Ad type 5 genome (map unit: 2.6), replacing a portion of the viral E1A gene. The ligated DNAs are then directly transfected into 293 cells to generate the recombinant virus. This method, however, is not very efficient and requires purification of the recombinant virus by plaque assay, because wild-type and transgene null viruses resulting from incomplete restriction digestion and self-religation are also generated. Moreover, the E1 region is not completely removed, limiting the space for insertion of a foreign gene. As a result, this method is rarely used today.

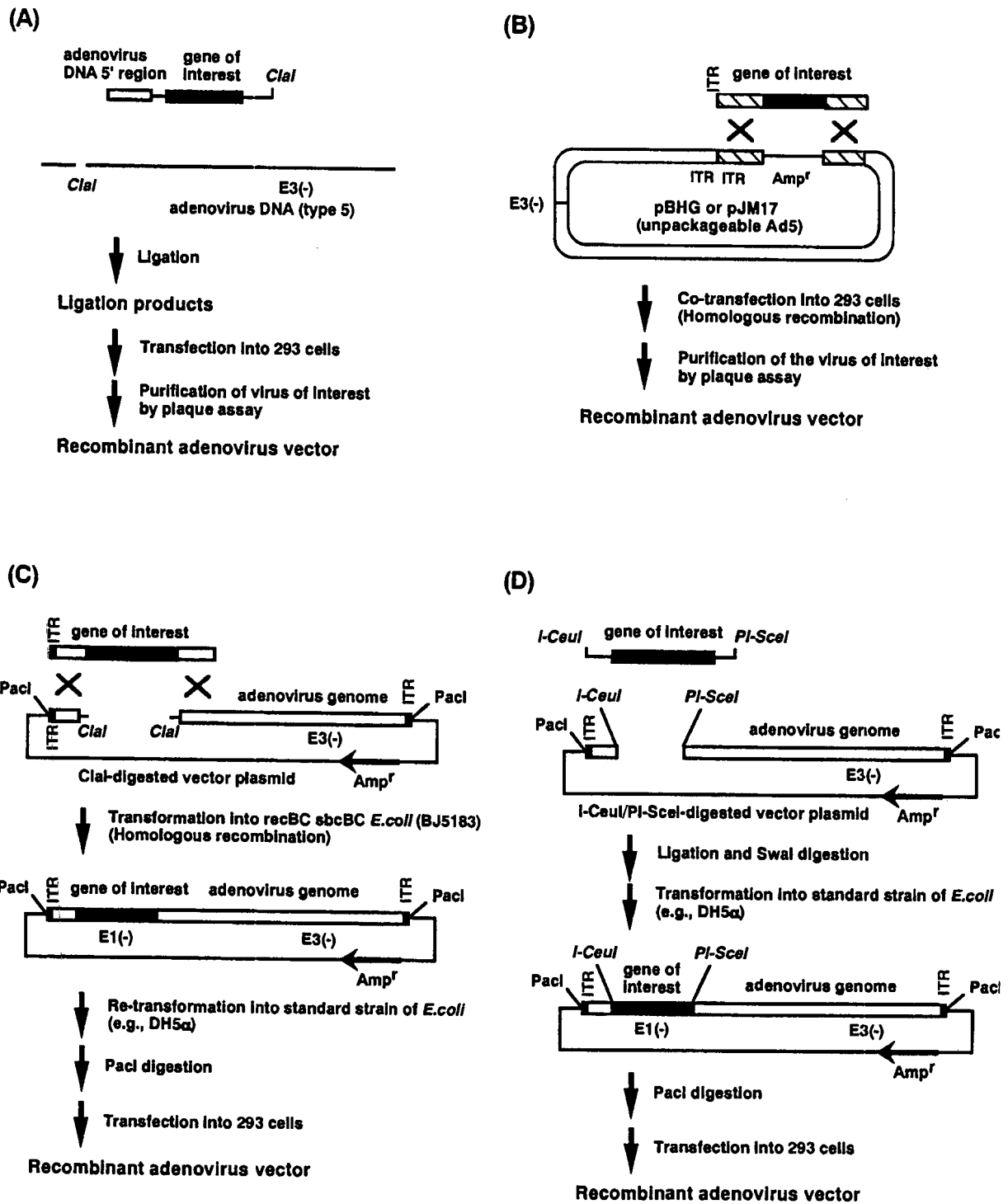


Fig. 1. Methods of constructing E1-substituted recombinant adenovirus vectors. (A) In vitro ligation method, (B) homologous recombination method in 293 cells, (C) homologous recombination method in bacteria, (D) improved in vitro ligation method.

2.2. Homologous recombination method in 293 cells

In 1994, Graham et al. developed the homologous recombination method in E1-complementing cell lines (293 cells) to generate recombinant Ad vectors [5] (Fig. 1B). Their method uses two plasmids containing overlapping fragments that recombine. The first plasmid contains most of the viral genome in circular form, but lacks the DNA packaging signals and E1 region. The second plasmid contains the left ITR, packaging signal, and sequence overlapping the first plasmid. After the gene of interest has been introduced into the second plasmid, the two plasmids are co-transfected into 293 cells, and the virus produced by recombination in 293 cells is isolated through plaque purification. This method has been the most widely used, and it has greatly contributed to the widespread use of the Ad vector.

Other systems based on homologous recombination in mammalian cells have been developed [14]. They use Ad DNA with a terminal protein to improve the viral generation after co-transfection of DNA into 293 cells. However, this method requires skill to prepare the Ad DNA with the terminal protein, which is isolated from the virus, and requires the extra step of lambda packaging.

The major limitations of these approaches are the low frequency of the recombination event and the tedious- and time-consuming plaque purification procedure required to select the recombinant virus of interest because a relatively higher percentage of the virus produced is the wild type (in most cases 20–70%) due to recombination with the Ad sequence integrated into the chromosome of the 293 cells. Several other systems that overcome these limitations have recently been developed and they are reviewed below.

2.3. Homologous recombination method in bacteria

A new method for generating the Ad vector has been developed based on the homologous recombination of two plasmids using bacteria [15,16] (Fig. 1C). This method takes advantage of the highly efficient homologous recombination machinery of specialized *E. coli* (BJ5183, recBCsbcBC). The vector plasmid contains the full length (or E3-de-

leted) Ad genome flanked by the PacI site, which is an 8-bp recognition restriction enzyme (rare cutter), and an ampicillin resistance gene, and a plasmid origin. The shuttle plasmid contains the left region of the viral genome including the left ITR, packaging signal, and overlapping sequence downstream of the E1 region. The vector plasmid cut by ClaI (a unique restriction enzyme), which is located in the E1 deletion region, and the shuttle plasmid, in which the gene of interest is cloned, are co-transformed with recBCsbcBC *E. coli*. The recombination event occurs through overlapping of the fragments of each plasmid. The plasmid is isolated, after independent *E. coli* clones are cultured for a short time (usually less than 8 h). Since recBCsbcBC *E. coli* is not suitable for large-scale preparation of the plasmid, the plasmid recovered is re-transformed and cultured with more standard strains of *E. coli* (e.g., DH5 α). The plasmid is then isolated, and positive clones are selected by restriction analysis. Transfection of linearized plasmids digested by PacI, which cuts at the end of the left and right ITRs, into 293 cells generates the recombinant Ad vector. Unlike the homologous recombination method in 293 cells, the generation of the wild-type virus is extremely low due to the transfection of homogeneous DNAs in which the E1 gene has already been replaced by the foreign gene. Thus, the time-consuming plaque purification procedure is not absolutely required to produce the virus.

A modified system using homologous recombination in bacteria has also been reported [17]. In this system, the incP-plasmid, which is capable of replicating in the polA mutant of *E. coli* and accommodating a large insert and the SacB gene of *Bacillus subtilis*, which is a lethal marker for *E. coli* in the presence of sucrose, is used to improve the selection of positive recombinant Ad plasmids.

2.4. Improved in vitro ligation method

We recently developed a two-plasmid in vitro ligation method that does not require a recombination step to produce Ad vectors [18,19] (Fig. 1D). Since Ad contains a large genome, unique and useful restriction sites are limited. This makes in vitro manipulation of Ad DNA difficult and explains why the method of simple in vitro ligation based on

plasmid construction has never been developed. We overcame this limitation by using the rare cutting enzymes, I-CeuI and PI-SceI. I-CeuI [20] and PI-SceI [21] are intron-encoded endonucleases that do not cut the Ad genome, and their sequence specificities are at least 9–10 and 11 bp, respectively.

The vector plasmid contains a complete E1/E3-deleted Ad type 5 genome with three unique restriction sites, I-CeuI, SmaI, and PI-SceI, in an E1 deletion site and an ampicillin resistance gene. SmaI is also a rare-cutting restriction enzyme with a sequence specificity of 8 bp. The shuttle plasmid contains a multi-cloning site between the I-CeuI and PI-SceI sites and a kanamycin resistance gene. A variety of vector plasmids and shuttle plasmids, which contain several types of E3 (and E4) deletion and a CMV or RSV promoter cassette, respectively, are constructed [19]. To introduce the foreign gene into the E1 deletion region of the Ad genome, the gene of interest is first inserted into the shuttle plasmid. The recombinant shuttle plasmid and vector plasmid are then digested with I-CeuI and PI-SceI, and the mixture is directly ligated without gel purification of either the transgene expression cassette sequence or the vector viral sequence. SmaI digestion of the ligation products is performed in order to prevent production of a plasmid containing a parental Ad genome (null vector). By transformation into standard strains of *E. coli* and growth in ampicillin, only the ligated Ad plasmid DNAs with inserts are selected for (more than 90% of the transformants have the correct insert). To generate an Ad vector, PacI-digested, linearized Ad DNAs are transfected into 293 cells, resulting in a homogeneous population of the recombinant virus. The time-consuming plaque purification procedure is not absolutely required to produce the virus as in the homologous recombination method in bacteria. Thus, recombinant Ad vectors are produced by simple molecular biology techniques, without the need for homologous recombination, in mammalian cells or bacteria.

A different in vitro ligation method based on plasmid construction has been developed [22]. In this method, however, only one unique restriction enzyme site is introduced into the vector plasmid containing most of the viral sequence, making it less efficient than the method described above.

The improved in vitro ligation method has several advantages over the homologous recombination method in bacteria: only simple molecular biology cloning techniques are required, no special *E. coli* strain is needed and no additional transformation is required (the *E. coli* system requires a two-step transformation using two different *E. coli* strains).

2.5. Other methods

Other methods to construct Ad vectors have been reported: a homologous recombination method in yeast [23], a cre-lox-mediated recombination method [24–28], a combination of the homologous recombination method in mammalian cells and bacteria [29], a method based on cosmid construction [30–33], and others [34]. Several variations of the cre-lox-mediated recombination method have been developed in 293 cells [25–28], which overcomes some of the inefficiencies of the homologous recombination method in mammalian cells described in Section 2.1 [26,27]. In addition, cre-lox-mediated recombination has been used to construct the whole Ad vector genome in the test tube eliminating the need for cellular recombination [24]. The usefulness of these systems depends on the experimental carrier used by the individual investigator, although additional steps, including yeast culture and manipulation, lambda packaging for cosmid construction, or purification of the virus of interest by plaque assay is required.

3. Construction of E1/E3-substituted adenovirus vector

Most first generation Ad vectors in current use are of the E1-substitution type. Sometimes, however, it may be preferable to insert foreign genes into the E3 deletion region as well as into the E1 deletion region. For example, when heterologous gene expression cassettes inserted into the E1 deletion region are co-expressed, promoter interference sometimes occurs, i.e., transcription from one promoter suppresses transcription from another [35–37]. Ad vectors containing foreign genes that can be introduced into both the E1 and E3 deletion regions eliminate such

problems because each of the genes can be efficiently expressed.

Some of the systems described in Section 2 allow for insertion of foreign genes into both the E1 and E3 deletion regions. In one method, developed by Graham et al., a unique *PacI* site in the E3 deletion region of the plasmid containing the Ad genome was used to clone the gene of interest into the E3 deletion region, and another gene of interest was then inserted into the E1 deletion region by homologous recombination in 293 cells [5,38] (Fig. 2A). However, insertion of foreign genes into the E3 deletion region is sometimes difficult because the vector plasmid contains long palindromic sequences of the inverted terminal repeat (ITR), which induces plasmid instability in *E. coli* (by contrast, the vector plasmids in Sections 2.3 and 2.4 do not contain palindromic sequences). Another method for generating an Ad vector that can carry foreign genes into both the E1 and E3 deletion regions is based on homologous recombination in bacteria [16] (Fig. 2B). This method uses the shuttle plasmid containing the Ad sequence around the E3 region. After the gene of interest is inserted into the E3 deletion region of the shuttle plasmid, the linearized shuttle plasmid and *SpeI* (or *SrfI*)-digested vector plasmid are co-transformed into *recBCSbcBC E. coli*, by the same procedure as for the cloning of foreign genes into the E1 deletion region described in Section 2.2 (the *SpeI* and *SrfI* sites located around the E3 region are unique to the Ad genome). Recently, Danthinne and Werth used *in vitro* ligation with cosmids, but this required lambda packaging, a more complicated procedure [30,31].

We recently developed a modified system to clone the gene of interest into both the E1 and the E3 deletion regions based on simple plasmid construction using *in vitro* ligation [39] (Fig. 2C). To do this, a unique restriction site, the *Csp45I*, *ClaI*, or *I-SceI* sites, is introduced into the E3 deletion region of the Ad vector plasmid containing the unique *I-CeuI*, *SwaI*, and *PI-SceI* sites in the E1 deletion region. Shuttle plasmids containing a multi-cloning site flanked by *Csp45I*, *ClaI*, or *I-SceI* sites are also constructed to assist introduction of the gene of interest into the E3 deletion region. *Csp45I* and *ClaI* produce compatible cohesive ends. Thus, if the gene of interest does not have both the *Csp45I* and *ClaI*

sites, the recombinant plasmid is produced from recleavable ligation products by *Csp45I* or *ClaI*. When the gene of interest contains both the *Csp45I* and *ClaI* sites, the rare cutter *I-SceI* site is ideal for use as an alternative cloning site [40,41]. In this method, Ad vectors containing heterologous genes in the E1 and E3 deletion region are generated by a procedure similar to that described in Section 2.4.

A major advantage of a binary transgene expression system in which heterologous genes can be inserted into both the E1 and E3 regions is that gene products that interact with each other can be expressed in a single vector. A typical example is a tetracycline-controllable expression system, which allows for regulatable transgene expression [42]. By inserting the gene of interest with a tetracycline-regulatable promoter and tetracycline-responsive transcriptional activator gene into the E1 and E3 deletion regions, respectively, Ad vectors containing a tetracycline-controllable expression system are generated [39].

Other examples of interacting transgene expression cassettes inserted into the E1 and E3 regions include an Ad vector containing bacteriophage T7 components having a T7 RNA polymerase expression unit and a marker gene expression unit driven by the T7 gene promoter [43], an Ad vector expressing interleukin 12 with a p35 and p40 expression unit split into two transcriptional units [38], and an Ad vector expressing interleukin 12 (p35 and p40 expression units are expressed as a single cistron using an internal ribosomal entry site) and the B7-1 costimulatory molecule expressed as a second transcriptional unit [44]. The systems described here offer great utility for generating such vectors.

4. Construction of fiber-mutant adenovirus vectors

One of the hurdles confronting Ad-mediated gene transfer is that gene transfer with Ad vectors is inefficient in cells lacking the primary receptor, the coxsackievirus and adenovirus receptor (CAR) [45–49]. CAR is a member of the immunoglobulin superfamily, whose normal function in host cells has not yet been elucidated [45,49]. Infection with Ad belonging to subgroup A, C, D, E, and F (Ad types 2



Fig. 2. Methods of constructing recombinant adenovirus vectors containing genes of interest in both the E1 and E3 deletion region. (A) Homologous recombination method in 293 cells, (B) homologous recombination method in bacteria, (C) improved in vitro ligation method.

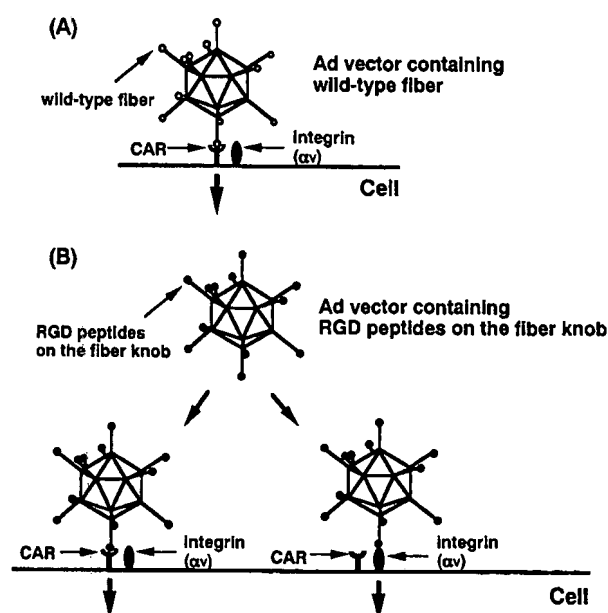


Fig. 3. Characteristics of gene delivery by adenovirus vectors containing wild-type fiber (A) or RGD peptides on the fiber knob (B).

and 5 belong to subgroup C) requires CAR (Fig. 3A).

Ad infection of susceptible cells requires two distinct steps. In the first step, the initial high-affinity binding of the virus to the CAR on the cell surface occurs via the C-terminal knob domain of the fiber protein [45,49]. In the second step, interaction between the RGD motif of the penton bases with secondary host cell receptors, $\alpha\text{v}\beta 3$ and $\alpha\text{v}\beta 5$ integrins, expressed on most cell types facilitates internalization via receptor-mediated endocytosis [50–52]. Therefore, the interaction of the fiber knob with CAR on the cell is the key mediators by which the Ad vector enters the cells.

Modification of fiber protein is an attractive strategy for overcoming the limitations imposed by the CAR dependence of Ad infection and two approaches have been used. One is the addition of foreign peptides to the C-terminal end of the fiber knob [53–56], and the other is the insertion of foreign peptides into the HI loop of the fiber knob [57–60]. Both approaches allow Ad tropism to be expanded by binding of the foreign ligand to the cellular receptor. However, based on several recent

reports, the latter system appears to be more desirable because modification of the C-terminal end sometimes prevents fiber trimerization and virus growth [61]. In addition, the C-terminus of the fiber points toward the virion [62], and is not the optimal site for the addition of a foreign ligand. By contrast, insertion of foreign peptides into the HI loop should not affect fiber trimerization [57,58] and leaves the peptides exposed on the outside of the virion [58,63]. We review the method of constructing the fiber-mutant Ad vector having foreign peptides on the HI loop of the fiber knob.

Curiel et al. first reported characterization of an Ad vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob [57,58]. They constructed a fiber-modified vector by the homologous recombination method in bacteria (Fig. 4A). To do this, they constructed a shuttle plasmid containing the fiber-coding region and a vector plasmid. The shuttle plasmid contains a mutated-fiber gene in which a unique EcoRV site is incorporated in place of the HI loop-coding region. The vector plasmid is constructed so that it contains a unique SmaI site in the fiber-coding region. Oligonucleotides corresponding to the peptide of interest are first inserted into the EcoRV site of the shuttle plasmid. The EcoRI-digested linearized shuttle plasmid containing the mutated-fiber gene and SmaI-digested linearized vector plasmid are then co-transformed with recBCsbcBC *E. coli* for homologous recombination [57,58]. The following steps are performed by a method similar to that described in Section 2.3. (see also Fig. 4A). This method requires at least five transformations, including transformation of the plasmid into different strains of bacteria to produce the fiber-mutant Ad vector that expresses the foreign gene.

We have developed a method of constructing fiber-modified Ad vectors by using simple in vitro ligation [60] (Fig. 4B). The vector plasmid contains a complete E1/E3-deleted Ad genome and extra 12-bp foreign DNAs, which are the recognition sequences produced by Csp45I and ClaI, in the HI-loop coding region. Oligonucleotides corresponding to the peptide of interest and containing a Csp45I and ClaI recognition site are ligated into the Csp45I- and ClaI-digested vector plasmid. The foreign transgene expression cassette is inserted into

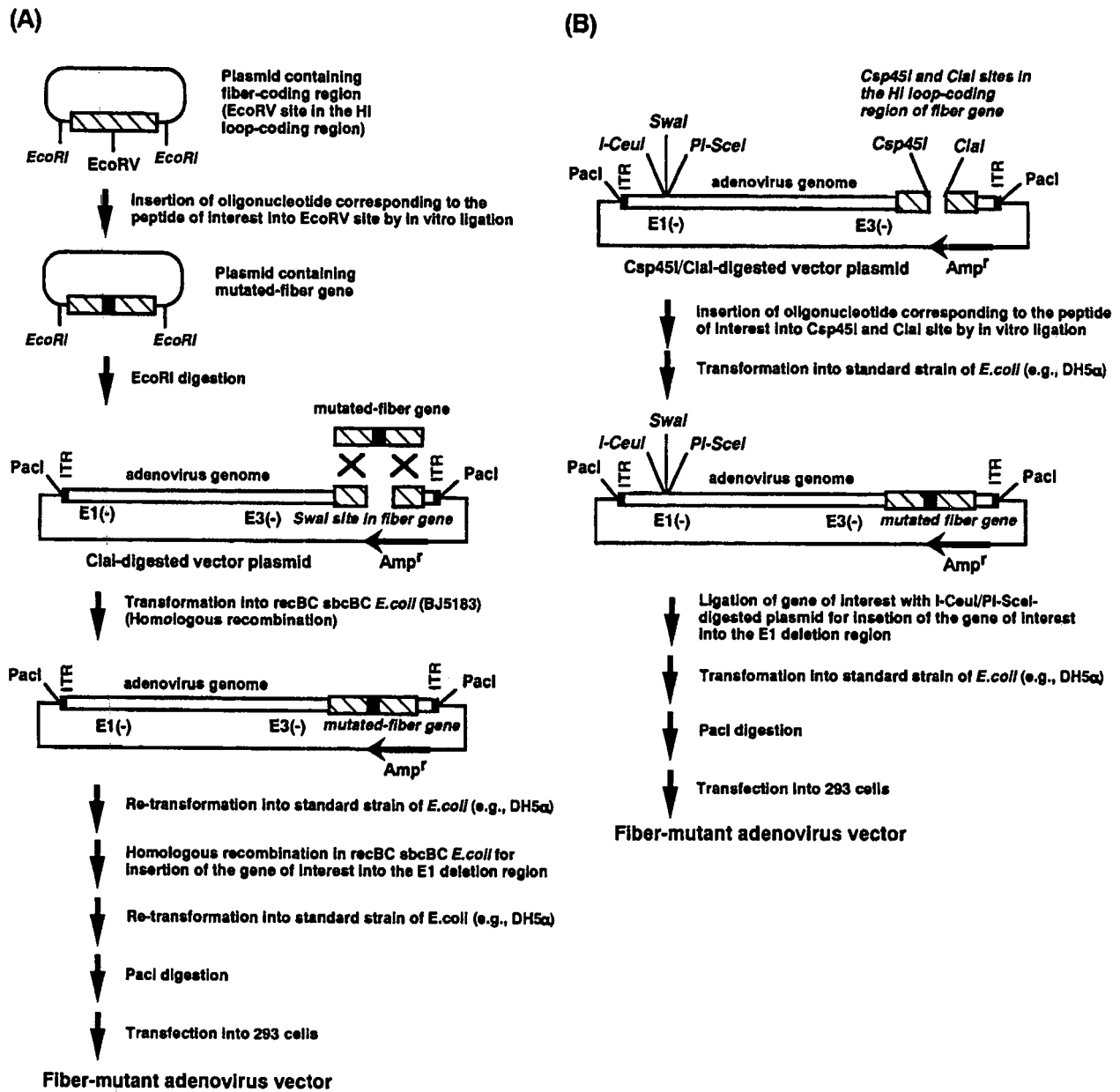


Fig. 4. Methods of constructing fiber-mutant recombinant adenovirus vectors. (A) Homologous recombination method in bacteria, (B) improved in vitro ligation method.

the E1 deletion site of the vector plasmid by an improved in vitro ligation method described in Section 2.4 [18,19]. The fiber-mutant Ad vector is produced by transfection of the PacI-digested recombinant vector plasmid into 293 cells. As a result, only a two-step, simple in vitro ligation and transforma-

tion using a standard strain of *E. coli* is required to construct a fiber-mutant Ad vector containing the gene of interest. In this method, two to three additional amino acids flanking the peptide of interest are introduced into the mutated-fiber by the additional nucleotides contained within the Csp45I

and ClaI recognition sites. However, these additional amino acids do not exert any effect on the function of the peptide of interest [60].

We and other groups have reported that Ad vectors containing the RGD peptide motif (CDCRGDCFC), which binds with high affinities to integrins ($\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$) on the cell surface [64–66] on the fiber knob mediate not only CAR-dependent gene delivery but CAR-independent, RGD-integrin ($\alpha\beta 3$ and $\alpha\beta 5$)-dependent gene delivery as well [57,59,60] (Fig. 3B). The virus containing the RGD peptide on the fiber knob was able to infect human glioma cells lacking CAR expression about 100–1000 times more efficiently than the virus containing a wild-type fiber [60]. Since $\alpha\beta 3$ or $\alpha\beta 5$ integrins are expressed on most types of cells, except some blood cells, Ad vectors containing RGD peptides on the fiber knob mediate efficient gene transfer into CAR-deficient cells.

Although Ad vectors can infect most cells because of insufficient expression of CAR, they mediate less efficient gene transfer in some of the important target tissues (cells) for gene therapy, including differentiated airway epithelium, skeletal muscle, smooth muscle, peripheral blood cells, and hematopoietic stem cells [47,48,67]. Fiber-mutant Ad vector containing appropriate foreign peptides on the fiber knob may transduce these cells efficiently and be a powerful tool for gene transfer into mammalian cells.

5. Conclusion

Many systems have been developed to generate Ad vectors, each with its own advantages and disadvantages, depending on the experimental carrier used by individual investigators. A major advantage of the homologous recombination method in bacteria is that any mutation can be introduced into the whole Ad genome, at a unique restriction site around the region to be mutated. The improved in vitro ligation method requires only routine molecular reagents and techniques and allows any laboratory to construct Ad vectors for gene transfer studies. Progress in the technology for the generation of Ad vectors should make this vector more attractive for gene therapy, gene transfer experiments, and studies of gene function in basic research.

Acknowledgements

This work was supported by grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare in Japan and a Grant-in-Aid for Scientific Research on Priority Areas (C) in Japan. M.A.K. was supported by NIH DK49022.

References

- [1] T. Shenk, Adenoviridae, in: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley (Eds.), *Fields Virology*, Vol. 2, Lippincott-Raven Publishing, Philadelphia, PA, 1996, pp. 2111–2148.
- [2] F.L. Graham, J. Smiley, W.C. Russell, R. Nairn, Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5, *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59–74.
- [3] F.J. Fallaux, O. Kranenburg, S.J. Cramer, A. Houweling, H. Van Ormondt, R.C. Hoeben, A.J. Van Der Eb, Characterization of 911: a new helper cell line for the titration and propagation of early region 1-deleted adenoviral vectors, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 215–222.
- [4] F.J. Fallaux, A. Bout, I. van der Velde, D.J. van den Wollenberg, K.M. Hehir, J. Keegan, C. Auger, S.J. Cramer, H. van Ormondt, A.J. van der Eb, D. Valerio, R.C. Hoeben, Helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998) 1909–1917.
- [5] A.J. Bett, W. Haddara, L. Prevec, F.L. Graham, An efficient and flexible system for construction of adenovirus vectors with insertions or deletions in early regions 1 and 3, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 8802–8806.
- [6] A.J. Bett, L. Prevec, F.L. Graham, Packaging capacity and stability of human adenovirus type 5 vectors, *J. Virol.* 67 (1993) 5911–5921.
- [7] K.F. Kozarsky, J.M. Wilson, Gene therapy: adenovirus vectors, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 3 (1993) 499–503.
- [8] I. Kovesdi, D. Brough, J. Bruder, T. Wickham, Adenoviral vectors for gene transfer, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8 (1997) 583–589.
- [9] K. Benihoud, P. Yeh, M. Perricaudet, Adenovirus vectors for gene delivery, *Curr. Opin. Biotechnol.* 10 (1999) 440–447.
- [10] P. Yeh, M. Perricaudet, Advances in adenoviral vectors: from genetic engineering to their biology, *FASEB J.* 11 (1997) 615–623.
- [11] K.L. Berkner, P.A. Sharp, Generation of adenovirus by transfection of plasmids, *Nucleic Acids Res.* 11 (1983) 6003–6020.
- [12] P. Gilardi, M. Courtney, A. Pavirani, M. Perricaudet, Expression of human alpha 1-antitrypsin using a recombinant adenovirus vector, *FEBS Lett.* 267 (1990) 60–62.
- [13] M.A. Rosenfeld, W. Siegfried, K. Yoshimura, K. Yoneyama, M. Fukayama, L.E. Stier, P.K. Paakko, P. Gilardi, L.D. Stratford Perricaudet, M. Perricaudet, S. Jallat, A. Pavirani, J.-P. Lecocq, R.G. Crystal, Adenovirus-mediated transfer of a

- recombinant alpha 1-antitrypsin gene to the lung epithelium in vivo, *Science* 252 (1991) 431–434.
- [14] S. Miyake, M. Makimura, Y. Kanegae, S. Harada, Y. Sato, K. Takamori, C. Tokuda, I. Saito, Efficient generation of recombinant adenoviruses using adenovirus DNA-terminal protein complex and a cosmid bearing the full-length virus genome, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93 (1996) 1320–1324.
 - [15] T.C. He, S. Zhou, L.T. da Costa, J. Yu, K.W. Kinzler, B. Vogelstein, A simplified system for generating recombinant adenoviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 (1998) 2509–2514.
 - [16] C. Chartier, E. Degryse, M. Gantzer, A. Dieterle, A. Pavirani, M. Mehtali, Efficient generation of recombinant adenovirus vectors by homologous recombination in *Escherichia coli*, *J. Virol.* 70 (1996) 4805–4810.
 - [17] J. Crouzet, L. Naudin, C. Orsini, E. Vigne, L. Ferrero, A. Le Roux, P. Benoit, M. Latta, C. Torrent, D. Branellec, P. Deneffe, J.F. Mayaux, M. Perricaudet, P. Yeh, Recombinational construction in *Escherichia coli* of infectious adenoviral genomes, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 1414–1419.
 - [18] H. Mizuguchi, M.A. Kay, Efficient construction of a recombinant adenovirus vector by an improved in vitro ligation method, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998) 2577–2583.
 - [19] H. Mizuguchi, M.A. Kay, A simple method for constructing E1 and E1/E4 deleted recombinant adenovirus vector, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 2013–2017.
 - [20] P. Marshall, C. Lemieux, Cleavage pattern of the homing endonuclease encoded by the fifth intron in the chloroplast large subunit rRNA-encoding gene of *Chlamydomonas eugametos*, *Gene* 104 (1991) 241–245.
 - [21] F.S. Gimble, J. Thorner, Homing of a DNA endonuclease gene by meiotic gene conversion in *Saccharomyces cerevisiae*, *Nature* 357 (1992) 301–306.
 - [22] D.W. Souza, D. Armentano, Novel cloning method for recombinant adenovirus construction in *Escherichia coli*, *Biotechniques* 26 (1999) 502–508.
 - [23] G. Ketner, F. Spencer, S. Tugendreich, C. Connelly, P. Hieter, Efficient manipulation of the human adenovirus genome as an infectious yeast artificial chromosome clone, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (1994) 6186–6190.
 - [24] K. Aoki, C. Barker, X. Danthinne, M.J. Imperiale, G.J. Nabel, Efficient generation of recombinant adenoviral vectors by Cre-lox recombination in vitro, *Mol. Med.* 5 (1999) 224–231.
 - [25] S. Hardy, M. Kitamura, T. Harris-Stansil, Y. Dai, M.L. Phipps, Construction of adenovirus vectors through Cre-lox recombination, *J. Virol.* 71 (1997) 1842–1849.
 - [26] P. Ng, R.J. Parks, D.T. Cummings, C.M. Eveleigh, U. Sankar, F.L. Graham, A high-efficiency Cre-loxP-based system for construction of adenoviral vectors, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 2667–2672.
 - [27] P. Ng, R.J. Parks, D.T. Cummings, C.M. Eveleigh, F.L. Graham, An enhanced system for construction of adenoviral vectors by the two-plasmid rescue method, *Hum. Gene Ther.* 11 (2000) 693–699.
 - [28] F. Tashiro, H. Niwa, J. Miyazaki, Constructing adenoviral vectors by using the circular form of the adenoviral genome cloned in a cosmid and the Cre-loxP recombination system, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 1845–1852.
 - [29] R.D. Anderson, R.E. Haskell, H. Xia, B.J. Roessler, B.L. Davidson, A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors, *Gene Ther.* 7 (2000) 1034–1038.
 - [30] X. Danthinne, New vectors for the construction of double recombinant adenoviruses, *J. Virol. Methods* 81 (1999) 11–20.
 - [31] X. Danthinne, E. Werth, New tools for the generation of E1- and/or E3-substituted adenoviral vectors, *Gene Ther.* 7 (2000) 80–87.
 - [32] S. Fu, A.B. Deisseroth, Use of the cosmid adenoviral vector cloning system for the in vitro construction of recombinant adenoviral vectors, *Hum. Gene Ther.* 20 (1997) 1321–1330.
 - [33] H. Kojima, N. Ohishi, K. Yagi, Generation of recombinant adenovirus vector with infectious adenoviral genome released from cosmid-based vector by simple procedure allowing complex manipulation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 246 (1998) 868–872.
 - [34] T. Okada, W.J. Ramsey, J. Munir, O. Wildner, R.M. Blaese, Efficient directional cloning of recombinant adenovirus vectors using DNA-protein complex, *Nucleic Acids Res.* 26 (1998) 1947–1950.
 - [35] B.R. Cullen, P.T. Lomedico, G. Ju, Transcriptional interference in avian retroviruses-implications for the promoter insertion model of leukaemogenesis, *Nature* 307 (1984) 241–245.
 - [36] M. Emerman, H.M. Temin, Genes with promoters in retrovirus vectors can be independently suppressed by an epigenetic mechanism, *Cell* 39 (1984) 459–467.
 - [37] M. Emerman, H.M. Temin, Quantitative analysis of gene suppression in integrated retrovirus vectors, *Mol. Cell. Biol.* 6 (1986) 792–800.
 - [38] J. Bramson, M. Hitt, W.S. Gallichan, K.L. Rosenthal, J. Gaudie, F.L. Graham, Construction of a double recombinant adenovirus vector expressing a heterodimeric cytokine: in vitro and in vivo production of biologically active interleukin-12, *Hum. Gene Ther.* 7 (1996) 333–342.
 - [39] H. Mizuguchi, M.A. Kay, T. Hayakawa, In vitro ligation-based cloning of foreign DNAs into the E3 and E1 deletion region for generation of recombinant adenovirus vector, *BioTechniques* 30 (2001) 1112–1116.
 - [40] L. Colleaux, L. D'Auriol, F. Galibert, B. Dujon, Recognition and cleavage site of the intron-encoded omega transposase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988) 6022–6026.
 - [41] C. Monteilhet, A. Perrin, A. Thierry, L. Colleaux, B. Dujon, Purification and characterization of the in vitro activity of I-Sce I, a novel and highly specific endonuclease encoded by a group I intron, *Nucleic Acids Res.* 18 (1990) 1407–1413.
 - [42] M. Gossen, H. Bujard, Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 5547–5551.
 - [43] R. Tomanin, A.J. Bett, L. Picci, M. Scarpa, F.L. Graham, Development and characterization of a binary gene expression system based on bacteriophage T7 components in adenovirus vectors, *Gene* 193 (1997) 129–140.

24
30

- [44] B.M. Putzer, M. Hitt, W.J. Muller, P. Emtage, J. Gauldie, F.L. Graham, Interleukin 12 and B7-1 costimulatory molecule expressed by an adenovirus vector act synergistically to facilitate tumor regression, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 10889–10894.
- [45] J.M. Bergelson, J.A. Cunningham, G. Droguett, E.A. Kurt-Jones, A. Krithivas, J.S. Hong, M.S. Horwitz, R.L. Crowell, R.W. Finberg, Isolation of a common receptor for Coxsackie B viruses and adenoviruses 2 and 5, *Science* 275 (1997) 1320–1323.
- [46] C.R. Miller, D.J. Buchsbaum, P.N. Reynolds, J.T. Douglas, G.Y. Gillespie, M.S. Mayo, D. Raben, D.T. Curiel, Differential susceptibility of primary and established human glioma cells to adenovirus infection: targeting via the epidermal growth factor receptor achieves fiber receptor-independent gene transfer, *Cancer Res.* 58 (1998) 5738–5748.
- [47] R.J. Pickles, D. McCarty, H. Matsui, P.J. Hart, S.H. Randell, R.C. Boucher, Limited entry of adenovirus vectors into well-differentiated airway epithelium is responsible for inefficient gene transfer, *J. Virol.* 72 (1998) 6014–6023.
- [48] J. Zabner, P. Freimuth, A. Puga, A. Fabrega, M.J. Welsh, Lack of high affinity fiber receptor activity explains the resistance of ciliated airway epithelia to adenovirus infection, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 1144–1149.
- [49] R.P. Tomko, R. Xu, L. Philipson, HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94 (1997) 3352–3356.
- [50] M. Bai, B. Harfe, P. Freimuth, Mutations that alter an Arg-Gly-Asp (RGD) sequence in the adenovirus type 2 penton base protein abolish its cell-rounding activity and delay virus reproduction in flat cells, *J. Virol.* 67 (1993) 5198–5205.
- [51] T.J. Wickham, P. Mathias, D.A. Cheresh, G.R. Nemerow, Integrins $\alpha v\beta 3$ and $\alpha v\beta 5$ promote adenovirus internalization but not virus attachment, *Cell* 73 (1993) 309–319.
- [52] T.J. Wickham, E.J. Filardo, D.A. Cheresh, G.R. Nemerow, Integrin $\alpha v\beta 5$ selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization, *J. Cell Biol.* 127 (1994) 257–264.
- [53] K. Bouri, W.G. Feero, M.M. Myerburg, T.J. Wickham, I. Kovesdi, E.P. Hoffman, P.R. Clemens, Poly-lysine modification of adenoviral fiber protein enhances muscle cell transduction, *Hum. Gene Ther.* 10 (1999) 1633–1640.
- [54] R. Gonzalez, R. Verecque, T.J. Wickham, M. Vanrumbeke, I. Kovesdi, F. Bauters, P. Fenaux, B. Quesnel, Increased gene transfer in acute myeloid leukemic cells by an adenovirus vector containing a modified fiber protein, *Gene Ther.* 6 (1999) 314–320.
- [55] T.J. Wickham, E. Tzeng, L.L. Shears II, P.W. Roelvink, Y. Li, G.M. Lee, D.E. Brough, A. Lizonova, I. Kovesdi, Increased in vitro and in vivo gene transfer by adenovirus vectors containing chimeric fiber proteins, *J. Virol.* 71 (1997) 8221–8229.
- [56] Y. Yoshida, A. Sadata, W. Zhang, K. Saito, N. Shinoura, H. Hamada, Generation of fiber-mutant recombinant adenoviruses for gene therapy of malignant glioma, *Hum. Gene Ther.* 9 (1998) 2503–2515.
- [57] I. Dmitriev, V. Krasnykh, C.R. Miller, M. Wang, E. Kashentseva, G. Mikheeva, N. Belousova, D.T. Curiel, An adenovirus vector with genetically modified fibers demonstrates expanded tropism via utilization of a Coxsackievirus and adenovirus receptor-independent cell entry mechanism, *J. Virol.* 72 (1998) 9706–9713.
- [58] V. Krasnykh, I. Dmitriev, G. Mikheeva, C.R. Miller, N. Belousova, D.T. Curiel, Characterization of an adenovirus vector containing a heterologous peptide epitope in the HI loop of the fiber knob, *J. Virol.* 72 (1998) 1844–1852.
- [59] P.N. Reynolds, I. Dmitriev, D.T. Curiel, Insertion of an RDG motif into the HI loop of adenovirus fiber protein alters the distribution of transgene expression of the systemically administered vector, *Gene Ther.* 6 (1999) 1336–1339.
- [60] H. Mizuguchi, N. Koizumi, T. Hosono, N. Utoguchi, Y. Watanabe, M.A. Kay, T. Hayakawa, A simplified system for constructing recombinant adenoviral vectors containing heterologous peptides in the HI loop of their fiber knob, *Gene Ther.* 8 (2001) 730–735.
- [61] J.S. Hong, J.A. Engler, Domains required for assembly of adenovirus type 2 fiber trimers, *J. Virol.* 70 (1996) 7071–7078.
- [62] D. Xia, L.J. Henry, R.D. Gerard, J. Deisenhofer, Crystal structure of the receptor-binding domain of adenovirus type 5 fiber protein at 1.7 Å resolution, *Structure* 2 (1994) 1259–1270.
- [63] D. Xia, L. Henry, R.D. Gerard, J. Deisenhofer, Structure of the receptor binding domain of adenovirus type 5 fiber protein, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 199 (1995) 39–46.
- [64] W. Arap, R. Pasqualini, E. Ruoslahti, Cancer treatment by targeted drug delivery to tumor vasculature in a mouse model, *Science* 279 (1998) 377–380.
- [65] R. Pasqualini, E. Koivunen, E. Ruoslahti, Alpha v integrins as receptors for tumor targeting by circulating ligands, *Nat. Biotechnol.* 15 (1997) 542–546.
- [66] E. Koivunen, B. Wang, E. Ruoslahti, Phage libraries displaying cyclic peptides with different ring sizes: ligand specificities of the RGD-directed integrins, *Biotechnology* 13 (1995) 265–270.
- [67] T.J. Wickham, Targeting adenovirus, *Gene Ther.* 7 (2000) 110–114.

2
31