



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(52) СПК

C12N 7/00 (2013.01); C12N 2740/15043 (2013.01); C12N 2740/15051 (2013.01); A61K 48/0091 (2013.01)

(21)(22) Заявка: 2015144057, 17.03.2014

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
17.03.2014Дата регистрации:
19.12.2019

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
15.03.2013 US 61/787,818

(43) Дата публикации заявки: 27.04.2017 Бюл. № 12

(45) Опубликовано: 19.12.2019 Бюл. № 35

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
национальной фазе: 15.10.2015(86) Заявка РСТ:
US 2014/030370 (17.03.2014)(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2014/145578 (18.09.2014)Адрес для переписки:
129090, Москва, ул. Б.Спасская, 25, строение 3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

(72) Автор(ы):

ЦЮЙ Гуан (US),
РАЙТ Джон Фрейзер (US)

(73) Патентообладатель(и):

ДЗЕ ЧИЛДРЕН'З ХОСПИТАЛ ОФ
ФИЛАДЕЛЬФИЯ (US)(56) Список документов, цитированных в отчете
о поиске: US 20070269856 A1, 22.11.2007.
ZHOU J. ET AL. PEG-modulated column
chromatography for purification of recombinant
adeno-associated virus serotype 9. Journal of
Virological Methods. 2011, V.173, P.99-107; WO
2011086509 A1, 21.07.2011. WO 2011097447 A2,
11.08.2011. ANSORGE S. ET AL. Recent progress
in lentiviral vector mass production. Biochemical
(см. прод.)(54) МАСШТАБНЫЙ ПРОИЗВОДСТВЕННЫЙ СПОСОБ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ
ЛЕНТИВИРУСНЫХ ВЕКТОРОВ В СИСТЕМЕ КУЛЬТИВИРОВАНИЯ КЛЕТОК В
БЕССЫВОРОТОЧНОЙ СУСПЕНЗИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к биотехнологии.
Описаны способы очистки рекомбинантного
лентивирусного вектора (rLV). Изобретение
позволяет получать высокоочищенные составыrLV векторов в масштабах, необходимых для
удовлетворения требований для генной терапии
человека. 3 н. и 35 з.п. ф-лы, 9 ил., 1 пр.

(56) (продолжение):

Engineering Journal. 2010. V.48, P.362-377; US 20070275449 A1, 29.11.2007. RU 2011116124 A, 27.10.2012.



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(52) CPC

C12N 7/00 (2013.01); C12N 2740/15043 (2013.01); C12N 2740/15051 (2013.01); A61K 48/0091 (2013.01)(21)(22) Application: **2015144057, 17.03.2014**(24) Effective date for property rights:
17.03.2014Registration date:
19.12.2019

Priority:

(30) Convention priority:
15.03.2013 US 61/787,818(43) Application published: **27.04.2017 Bull. № 12**(45) Date of publication: **19.12.2019 Bull. № 35**(85) Commencement of national phase: **15.10.2015**(86) PCT application:
US 2014/030370 (17.03.2014)(87) PCT publication:
WO 2014/145578 (18.09.2014)Mail address:
**129090, Moskva, ul. B.Spasskaya, 25, stroenie 3,
OOO "Yuridicheskaya firma Gorodisskij i
Partnery"**

(72) Inventor(s):

**TSYUJ Guan (US),
RAJT Dzhon Frejzer (US)**

(73) Proprietor(s):

**DZE CHILDREN'Z KHOSPITAL OF
FILADELFIYA (US)**(54) **SCALE PRODUCTION METHOD OF PRODUCING RECOMBINANT LENTIVIRAL VECTORS IN CELL CULTURE SYSTEM IN SERUM-FREE SUSPENSION**

(57) Abstract:

FIELD: biotechnology.

SUBSTANCE: invention relates to biotechnology.
described are methods of purifying the recombinant
lentiviral vector (rLV).EFFECT: invention enables to obtain highly purified
rLV vector compositions on a scale required to satisfy
requirements for human gene therapy.

38 cl, 9 dwg, 1 ex

Информация о родственных заявках

По этой заявке испрашивается приоритет заявки 61/787818, поданной 15 марта 2013 года, которая специально полностью включена в настоящую заявку посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Это изобретение относится к областям молекулярной биологии и генной терапии. Более конкретно, изобретение относится к усовершенствованным способам крупномасштабного получения вирусных векторов, предпочтительно лентивирусных и аденоассоциированных вирусных векторов, включая трансгены, которые кодируют полезные в медицине продукты для клинического применения.

ВВЕДЕНИЕ

По всему описанию цитируется несколько публикаций и патентных документов с целью описания состояния техники, к которой относится это изобретение. Каждая из этих цитат включена в настоящую заявку посредством ссылки, как если бы она была изложена в полном объеме.

Рекомбинантные основанные на лентивирусах (rLenti) векторы были разработаны и широко используются в качестве экспериментальных продуктов доставки генов при некоторых тяжелых болезнях человека. Было доказано, что лентивирусные векторы являются весьма продуктивными в отношении трансдукции благодаря их способности заражать как реплицирующиеся, так и нереплицирующиеся клетки, включая стволовые клетки.

По всему миру инициировано множество клинических испытаний с применением основанных на ВИЧ-1, VSVG-псевдотипированных лентивирусных векторов, и наблюдается многообещающая клиническая польза. Однако значительной проблемой в данной области в настоящее время является отсутствие методологии изготовления достаточных количеств rLenti, которые понадобятся в перспективных клинических исследованиях. Данные исследований и клинических испытаний показали, что rLenti вектор является многообещающим носителем для доставки генов для генной терапии человека при генетических заболеваниях, таких как первичные иммунодефициты (Fischer и коллеги), а также иммунотерапевтическими средствами при раке (June и коллеги).

Однако в данной области имеется острая потребность в развитии способов масштабного получения и очистки, которые были бы пригодными для соответствующего стандартам GMP получения больших количеств rLenti векторов, которые соответствуют объемам производительности и требованиям к качеству исследуемого продукта для поддержки последних стадий клинических способов применения. Например, для одной из многообещающих программ в фазе I для лечения лейкозов предполагается, что для исследований фазы III и ранней стадии запуска лицензионного продукта потребуются по меньшей мере во 100 раз большие объемы производительности относительно существующих способов. Таким образом, срочно необходимы способы увеличения производства данного вектора для генной терапии.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Изобретение относится к способам получения векторов rLenti с высоким титром при масштабном культивировании клеток в бессывороточной суспензии и очистке вектора с применением методик масштабной, соответствующей промышленным стандартам колоночной хроматографии. Может быть получена лекарственная форма rLV вектора, включающая частицы rLV, полученные в соответствии со способами, и необязательно включенная в фармацевтический приемлемый носитель.

В одном варианте изобретения способ очистки вирусного вектора включает: а)

получение рекомбинантных вирусных векторов, включая трансген, из бессывороточной суспензии культуры; б) очистку сбора стадии а) посредством фильтрации; с) получение фильтрата на стадии б) и необязательно подвергание указанного фильтрата нуклеазному расщеплению для устранения примесей ДНК/РНК; д) 5 подвергание фильтрата стадии с) PEG-модулированной аффинной или ионнообменной колоночной хроматографии, выделяя посредством этого указанные вирусные векторы; е) дополнительную очистку вирусных векторов, полученных на стадии д) посредством тангенциальной поточной фильтрации для уменьшения объема и замены буфера; ф) подвергание фильтрата стадии е) эксклюзионной колоночной хроматографии 10 для дополнительной очистки указанных вирусных векторов; г) подвергание векторов стадии ф) тангенциальной поточной фильтрации и получение посредством этого итогового титра вектора; х) фильтрование раствора вектора, полученного на стадии г) с помощью фильтра; и сбор указанных очищенных вирусных векторов.

В другом варианте изобретения способ очистки вирусного вектора включает: а) 15 получение рекомбинантных вирусных векторов, включая трансген, из бессывороточной суспензии культуры; б) очистка сбора стадии а) посредством фильтрации; с) подвергание очищенной суспензии стадии б) тангенциальной поточной фильтрации для уменьшения объема и буферного обмена; д) получение фильтрата на стадии с) и необязательно подвергание указанного фильтрата нуклеазному расщеплению для устранения примесей 20 ДНК/РНК; е) подвергание фильтрата стадии д) PEG-модулированной аффинной или ионнообменной колоночной хроматографии, выделяя посредством этого указанные вирусные векторы; ф) подвергание вирусных векторов, полученных на стадии е), эксклюзионной колоночной хроматографии для дополнительной очистки указанных вирусных векторов; г) подвергание векторов стадии ф) тангенциальной поточной 25 фильтрации и получение посредством этого итогового титра вектора; х) фильтрование раствора вектора, полученного на стадии г), с помощью фильтра; и и) сбор указанных очищенных вирусных векторов.

В дополнительном варианте изобретения способ очистки вирусного вектора включает: а) получение рекомбинантных вирусных векторов, включая трансген, из 30 бессывороточной суспензии культуры; б) очистку сбора стадии а) посредством фильтрации; с) подвергание очищенной суспензии стадии б) тангенциальной поточной фильтрации для уменьшения объема и буферного обмена; д) получение фильтрата на стадии с) и необязательно подвергание указанного фильтрата нуклеазному расщеплению для устранения примесей ДНК/РНК; е) подвергание фильтрата стадии д) PEG- 35 модулированной аффинной или ионнообменной колоночной хроматографии, выделяя посредством этого указанные вирусные векторы; ф) дополнительную очистку вирусных векторов, полученных на стадии е), посредством тангенциальной поточной фильтрации для уменьшения объема и замены буфера; г) подвергание фильтрата стадии ф) эксклюзионной колоночной хроматографии для дополнительной очистки указанных 40 вирусных векторов; х) подвергание векторов стадии г) тангенциальной поточной фильтрации и получение посредством этого итогового титра вектора; и) фильтрование раствора вектора, полученного на стадии х), с помощью фильтра; и j) сбор указанных очищенных вирусных векторов.

Способы по изобретению получения применимы к лентивирусным векторам (rLV).

В особых вариантах осуществления rLV вектор включает рекомбинантный 45 лентивирусный вектор (rLV), которым является вектор псевдотипа ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВИЧ-1/ВИЧ-2, ВИЧ-1/SIV, FIV, лентивируса артроэнцефалита козлов (CAEV), вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита крупного рогатого скота,

ВИЧ и их псевдотипов или вируса везикулярного стоматита G-псевдотипированного лентивируса (VSVG-псевдотипированного).

Вирусные векторы в соответствии с изобретением содержат трансгены. В особых вариантах осуществления трансген кодирует нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из миРНК, нечувствительной молекулы и микроРНК рибозима и коротких РНК, образующих шпильки. В дополнительных отдельных вариантах осуществления трансген кодирует генный продукт (белок или полипептид).

В отдельных аспектах генный продукт (белок или полипептид) представляет собой инсулин, глюкагон, гормон роста (GH), паратиреоидный гормон (PTH), соматотропин-релизинг-фактор (GRF), фолликулстимулирующий гормон (FSH), лютеинизирующий гормон (LH), человеческий хорионический гонадотропин (hCG), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтины, ангиостатин, колониестимулирующий фактор гранулоцитов (GCSF), эритропоэтин (EPO), фактор роста соединительной ткани (CTGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), кислотный фактор роста фибробластов (aFGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий ростовой фактор- α (TGF α), фактор роста тромбоцитов (PDGF), инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF-I и IGF-II), TGF β , активины, ингибины, костный морфогенетический белок (BMP), фактор роста нервной ткани (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофины NT-3 и NT4/5, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), нейротурин, агрин, нетрин-1 и нетрин-2, фактор роста гепатоцитов (HGF), эфрины, ноггин, «звуковой ежик» или тирозингидроксилаза. В дополнительных отдельных аспектах генный продукт (белок или полипептид) представляет собой тромбопоэтин (TPO), интерлейкины (с IL-1 по IL-17), моноцитарный хемоаттрактантный белок, фактор, ингибирующий лейкоз, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, лиганд Fas, факторы некроза опухоли α и β , интерфероны α , β и γ , фактор стволовой клетки, flk-2/flt3 лиганд, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, химерные иммуноглобулины, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, рецепторы Т-клеток, рецепторы химерных Т-клеток, одноцепочечные рецепторы Т-клеток, рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), CCR5 и молекулы МНС класса I и класса II.

В дополнительных отдельных аспектах генный продукт (белок или полипептид) представляет собой нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, пригодный для коррекции врожденного нарушения обмена веществ, выбранный из группы, состоящей из карбамоилсинтетазы-I, орнитинтранскарбамилазы, аргининосукцинатсинтетазы, аргининосукцинатлиазы, аргиназы, фумарилацетоацетатгидролазы, фенилаланингидролазы, альфа-1 антитрипсина, глюкоза-6-фосфатазы, порфобилиногендезаминазы, Фактора V, Фактора VIII, Фактора IX, цистатионин-бета-синтетазы, декарбоксилазы кетокислоты с разветвленной цепью, альбумина, изовалерил-КоА-дегидрогеназы, пропионил-КоА-карбоксилазы, метилмалонил-КоА-мутаза, глутарил-КоА-дегидрогеназы, инсулина, бета-глюкозидазы, пируваткарбоксилазы, печеночной фосфорилазы, фосфорилазы-киназы, глициндекарбоксилазы, белка, специфичного для пигментного эпителия сетчатки, с молекулярной массой 65 кДа (RPE65), Н-белка, Т-белка, последовательности трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR) или последовательности кДНК дистрофина. В дополнительных отдельных аспектах генный продукт (белок или полипептид) представляет собой Фактор VIII или Фактор IX.

В дополнительных отдельных аспектах трансген кодирует опухолеспецифический антиген (ТАА). В дополнительных отдельных аспектах трансген кодирует генный

продукт любого из CAIX, CD19, CD20, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44v7/8, CEA, EGF-RIII (варианта 3 рецептора эпидермального фактора роста) EGP-2, erb-B2, erb-B2, 3, 4, FBP, ацетилхолинового рецептора фетального типа, GD2, Her2/neu, IL-13R-a2, KDR, к-
 5 легкой цепи, LeY, L1 молекулы клеточной адгезии, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, NKG2D, раково-эмбрионального антигена (h5T4), PSCA, PSMA, mAb IgE, меченного TAA, TAG-72 или VEGF-R2.

Вирусные векторы в соответствии с изобретением могут продуцироваться клетками. В особых вариантах осуществления рекомбинантные вирусные векторы продуцируются
 10 клетками млекопитающих. В отдельных аспектах рекомбинантные вирусные векторы продуцируются клетками HEK293T (ATCC); HEK293F (Life Technologies); HEK293(ATCC); 293S (ATCC), BHK (ATCC), BHK-21 (ATCC), CHO (ATCC), CHO/dhFr- (ATCC)I или CHO K1 (ATCC).

Клетки, продуцирующие рекомбинантные вирусные векторы в соответствии с изобретением, обычно культивируют в суспензии в среде для выращивания. Среды для
 15 выращивания клеток содержат бессывороточную среду для выращивания клеток. В отдельных аспектах бессывороточная среда для выращивания представляет собой FreeStyle™293 (Gibco^R, Life Technologies), DMEM/F12 (Gibco^R, Life Technologies), SFM4Transfx-293 (HyClone™, ThermoScientific), CDM4HEK293 (HyClone™,
 20 ThermoScientific), StemPro-34SFM (Gibco^R, Life Technologies), FreeStyle F17 (Gibco^R, Life Technologies), 293SFM II (Gibco^R, Life Technologies) или CD293 (Gibco^R, Life Technologies) или их комбинации.

В способах по изобретению могут быть задействованы нуклеазы. В особых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой эндонуклеазу, экзонуклеазу или их
 25 комбинации. В дополнительных отдельных вариантах осуществления нуклеаза представляет собой дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу или их комбинации. В дополнительных отдельных вариантах осуществления нуклеаза представляет собой бензоназу или ДНКазу.

Также в способах по изобретению могут быть задействованы различные смолы или
 30 субстраты для хроматографии (среды). В особых вариантах осуществления может быть задействована аффинная или ионнообменная смола или субстрат (среда). В отдельных аспектах ионнообменная колоночная хроматография представляет собой анионно- или катионнообменную колоночную хроматографию, с сильным или слабым обменом анионов или с сильным или слабым обменом катионов.

Способы по изобретению также включают дополнительные стадии связывания, отмывания и/или элюирования с использованием колоночной хроматографии. Такие
 35 стадии связывания, отмывания и/или элюирования могут быть выполнены один или много раз (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 раз). В различных вариантах осуществления способ включает регулирование фильтрата предыдущей стадии, чтобы он был связывающим раствором (для связывания вируса со смолой или средой колонки); и/
 40 или приведение в контакт фильтрата с аффинной или ионнообменной колонкой, связывая посредством этого вирусные векторы с аффинной или ионнообменной колонкой, и/или отмывание связанных вирусных векторов для устранения примеси отмывающим раствором, при этом раствор необязательно включает PEG или PEG и соль; и/или
 45 элюирование вирусных векторов из аффинной или ионнообменной колонки элюирующим раствором.

В отдельных аспектах связывающий раствор содержит PEG в количестве от приблизительно 0% до 10% вес/объем, или от приблизительно 0% до 5% вес/объем, или

от приблизительно 0% до 2% вес/объем. В дополнительных отдельных аспектах связывающий раствор содержит PEG, имеющий молекулярную массу от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 40000 кДа.

В отдельных аспектах отмывающий раствор содержит PEG в количестве от 5 приблизительно 1% до 10% вес/объем, или от приблизительно 1% до 5% вес/объем, или от приблизительно 1% до 2% вес/объем. В дополнительных отдельных аспектах отмывающий раствор содержит PEG, имеющий молекулярную массу от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 40000 кДа.

В отдельных аспектах элюирующий раствор содержит PEG в количестве от 10 приблизительно 0% до 20% вес/объем. В дополнительных отдельных аспектах элюирующий раствор содержит PEG, имеющий молекулярную массу от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 40000 кДа.

В способах по изобретению связывающий, отмывающий и/или элюирующий растворы могут необязательно содержать одну или более солей. В особых вариантах 15 осуществления связывающий, отмывающий и/или элюирующий растворы содержат одну или более солей в количестве от приблизительно 20 мМоль до приблизительно 1000 мМоль (1М). Не ограничивающие соли включают натрия хлорид и/или калия хлорид.

В дополнительных вариантах осуществления способ очистки вирусного вектора 20 включает одну или более стадий фильтрования. В особых вариантах осуществления фильтрование происходит с помощью фильтра, имеющего диаметр пор, составляющий приблизительно 0,20-0,5 мкм. В отдельных аспектах фильтрование происходит посредством фильтра с диаметром пор 0,20 мкм, фильтра с диаметром пор 0,22 мкм, или фильтра с диаметром пор 0,45 мкм.

Как раскрыто в настоящем описании, способы по изобретению способны производить 25 высокие титры очищенных вирусных векторов, например, от 1×10^5 инфекционных единиц (IU)/мл вирусного вектора, вплоть до приблизительно 1×10^9 инфекционных единиц (IU)/мл вирусного вектора. В особых вариантах осуществления производят 30 приблизительно 5×10^5 инфекционных единиц (IU)/мл вирусного вектора, производят приблизительно 6×10^6 инфекционных единиц (IU)/мл вирусного вектора, или производят приблизительно 3×10^8 инфекционных единиц (IU)/мл вирусного вектора.

ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

35 Фигуры 1A-1D. Блок-схемы иллюстративных способов очистки лентивирусных векторов изобретения.

Фигура 2. Определение характеристики роста адаптированных клеток НЕК293Т в 40 бессывороточной суспензии культуры. А: Изображение, полученное в световом микроскопе, показывающее клеточную популяцию, приспособленную к бессывороточной среде CD293, агрегации клеток не наблюдается. В. Оптимизация условий культивирования клеток с применением флаконов с перемешиванием. В условиях 8% CO₂ и 130 вращений в минуту клетки можно культивировать в течение четырех дней и приблизительно 3×10^6 клеток в 1 мл. С. Скорость клеточного роста соответствует 45 времени удвоения, т.е. приблизительно 20 часам.

Фигура 3. Изображения, полученные в флуоресцентном микроскопе, показывающие экспрессию eGFP в трансфицированных PEI клетках НЕК293-Т в бессывороточной суспензии культуры. Панели А, В, С и D представляют клетки в различных бессывороточных культуральных средах. eGFP-позитивные клетки обнаружены только

в Панели D.

Фигура 4. Изображения, полученные в флуоресцентном микроскопе, показывающие экспрессию eGFP в трансфицированных PEI клетках HEK293-T в бессывороточной суспензии культуры. Панель A трансфицирована PEI 25000 кДа; В трансфицирована PEI MAX (40000 кДа); Панель C трансфицирована PEI pro. PEI Max привел к наивысшей эффективности трансфекции.

Фигура 5. Изображения, полученные в флуоресцентном микроскопе, показывающие эффективность трансфекции PEI HEK 293-T в бессывороточной суспензии культуры (A) и трансдукцию лентивирусным вектором клеток HEK293. Панель A трансфицирована с применением оптимизированных условий PEI MAX (40000 кДа); Панель B показывает трансдукцию лентивектором (применили 50 мкл собранного супернатанта).

Фигура 6. Анализ извлечения лентивекторов при колоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе и PEG-модулированной колоночной хроматографии на DEAE-целлюлозе. Верхняя панель иллюстрирует экспрессию eGFP образцов из фракций колоночной хроматографии. A: Хроматография не содержит модулирование PEG; B, C и D содержат дополнительный этап отмывания с применением 4% PEG (4K); 4% PEG (6K) и 8% PEG (4K). 100 мкл каждой фракции применяли для трансфицирования клеток HEK293, eGFP-позитивные клетки были обнаружены с применением флуоресцентного микроскопа и FACS (Нижняя панель). Почти 100% лентивекторов было обнаружено в элюированных фракциях.

Фигура 7. Анализ элюирования лентивектора с применением УФ-абсорбции 280 нм. 30 мл сбора очищенных лентивекторов загрузили в 16 мл колонку DEAE Sepharsoe FF. Лентивекторы очищали PEG-модулированием (Панель B, C, D) или без PEG-модулирования (A). Пик элюирования вектора интегрировали с применением УФ-абсорбции 280 нм, при этом площадь пика уменьшилась от 5 раз до почти 20 раз. Интересно отметить, что скорость УФ-абсорбции UV280/UV260 изменилась от доминирования UV280 (панель A) до доминирования UV260 (панель B, C и D), указывая на улучшенную чистоту вектора.

Фигура 8. SDS-PAGE-анализ чистоты лентивектора, элюированного при колоночной хроматографии. 10 мкл каждого образца загрузили в 4-12% NuePage Bis-Tris гель и окрасили серебром после электрофореза. Элюирование A представляет собой образец элюирования лентивектора при колоночной хроматографии без PEG-модулирования; Элюирование B, C и D представляют собой фракции элюирования при PEG-модулированной колоночной хроматографии с применением 4% 4K PEG; 4% 6K PEG и 8% 4K PEG соответственно. При том, что восстановление лентивектора является высоко сравнимыми для всех данных элюированных образцов, белковые примеси являются значительно уменьшенными в PEG-модулированных фракциях.

Фигура 9. FACS-анализ продуктивности rLenti вектора. Рекомбинантный лентивектор, экспрессирующий eGFP, получали с применением оптимизированного способа трансфекции в бессывороточной суспензии культуре клеток из 12-луночного планшета (1,5 мл культуры клеток) или флакона с перемешиванием (40 мл культуры клеток). Сбор вектора определяли с применением FACS-анализа. Продуктивность вектора вплоть до 6×10^6 единиц трансдукции (TU) на миллилитр наблюдали как культуре клеток из 12-луночного планшета, так и из флакона с перемешиванием.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Рекомбинантные лентивирусные векторы в исследовании обычно получают путем применения способов трансфекции. Существует несколько способов, которые известны в данной области для создания rLV вирионов: например, трансфекции с применением

вектора и rLV-хелперных последовательностей (см., например, Merten et al 2011). Однако, при производстве rLenti векторов для клинического применения, в частности для последних стадий клинического применения, является высоко преимущественным изготовление векторов с применением системы производства бессывороточной суспензии, которую можно масштабировать вплоть до обеспечения соответствующих объемов производительности и обеспечивая превосходные показатели безопасности изготовленного вектора.

Здесь раскрыт основанный на трансфекции способ производства для производства высокого титра лентивирусных векторов в системе масштабного бессывороточного культивирования клеток. Клетки из коммерческого источника, предлагаемые в качестве приспособленных к адгезивному росту, были успешно адаптированы к бессывороточной среде для культивирования клеток. Авторы изобретения оценили более пяти различных сред для культивирования клеток, которые, как заявлено, поддерживают культивирование клеток в бессывороточной суспензии, но выявили только одну среду, которая поддерживает рост неагрегированных, здоровых клеток после адаптации к быстрой скорости роста. Адаптированные клетки культивировали в состоянии культуры в бессывороточной суспензии в течение нескольких месяцев и разработали банк клеток исследования.

Лентивирусы представляют собой оболочечные вирусы, которые значительно отличаются в отношении структуры вируса и жизненного цикла от других вирусов, применяющихся для доставки нуклеиновой кислоты в клетки, таких как аденоассоциированные вирусы (AAV). Лентивирусы состоят из 2 копий РНК, ядерного капсида (NC), капсида (CA) мембраноассоциированной матрицы (MA), белков оболочки, таких как поверхностные гликопротеины, и трансмембранных белков и ферментов, таких как интегразы (IN), протеазы (PR), обратная транскриптаза (RT), и аксессуарных белков (например, Nef, Vif, Vpr, Vpr). Лентивирусы инфицируют клетки посредством связывания поверхностного гликопротеина вируса с рецептором клетки. Мембраны оболочки вируса и клетка затем растворяются, позволяя вирусу попасть в клетку. После попадания происходит декапсидация вирусной РНК и обратная транскрипция, что приводит к образованию прединтеграционного комплекса, который содержит двухспиральную ДНК, RT, IN, Vpr (или Vpx в ВИЧ-2) NC, и несколько копий MA (Suzuki и Craigie 2007, Depienne et al., 2000, Bukrinsky et al., 1993 и Miller et al., 1997). Как только провирус проникает в ядерную оболочку, вирусная ДНК интегрируется с геномом клетки. Нормальные клеточные функции транскрипции и трансляции сопровождаются сборкой структурных вирусных белков с вирусной РНК и последующей активной репликацией вируса.

Лентивирусы являются желательными для доставки нуклеиновой кислоты в клетки отчасти потому, что они могут инфицировать неделящиеся клетки посредством активного внедрения в ядро через ядерную оболочку. Напротив, другим ретровирусам для инфицирования требуется деление клеток вследствие того факта, что они не могут проникать через ядерную оболочку неделящейся клетки.

«Лентивирусы» включают в себя члены группы лентивирусов крупного рогатого скота, группы лентивирусов лошадей, группы лентивирусов кошек, группы лентивирусов коз и овец и группы лентивирусов приматов. Примеры лентивирусов, пригодных для способов и применения изобретения включают, но без ограничения, ВИЧ и их псевдотипы, такие как ВИЧ-1, ВИЧ-2, псевдотип ВИЧ-1/ВИЧ-2, ВИЧ-1/SIV, FIV, вирус артрита-энцефалита коз (CAEV), вирус инфекционной анемии лошадей, вирус иммунодефицита крупного рогатого скота и вирус везикулярного стоматита G-

псевдотипированный лентивирус (VSVG-псевдотипированный).

Разработка лентивирусных векторов для генной терапии рассмотрена у Klimatcheva et al., 1999, *Frontiers in Bioscience* 4: 481-496. Конструкция и применение лентивирусных векторов, пригодных для генной терапии, описано, например, в Патенте США № 6207455, выданном 27 марта 2001 года, и Патенте США № 6165782, выданном 26 декабря 2000 года. Дополнительные системы раскрыты у Merten et al. (2011).

Термины «полипротеин gag», «полипротеин pol», и «полипротеин env» относятся к разнообразным белкам, кодируемым ретровирусными генами gag, pol и env, которые обычно экспрессируются в виде единственного предшественника «полипротеина».

Например, gag ВИЧ кодирует, наряду с другими белками, p17, p24, p9 и p6. pol ВИЧ кодирует, наряду с другими белками, протеазу (PR), обратную транскриптазу (RT) и интегразу (IN). env ВИЧ кодирует, наряду с другими белками, Vpr, gp120 и gp41. Как используется здесь, термин «полипротеин» будет содержать все или любую часть полипротеинов gag, pol и env.

Термины «Vpr» и «Vprg» относятся соответственно к лентивирусным белкам Vpr и Vprg, описанным, например, в WO 96/07741, включенной настоящим посредством ссылки во всей своей полноте. Данные термины также относятся к фрагментам, мутантам, гомологам и вариантам Vpr и Vprg, которые сохраняют способность ассоциировать с p6.

Термин «фузоген» относится к молекуле, включающей в себя два или более белка, связанных вместе. Обычно фузоген представляет собой аминокислотную последовательность, включающую в себя две или более белковых последовательностей.

Под «вектором» подразумевается генетический элемент, такой как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, вирус, вирион и т.д., которые способны к репликации при ассоциации с правильно регулируемые элементы и которые могут переносить нуклеотидные последовательности гена между клетками. Таким образом, термин содержит клонирующие и экспрессивные носители, а также вирусные векторы.

Как используется здесь, термин «рекомбинантный», в качестве модификатора последовательностей, такого как вектор, а также модификатора вируса, обозначает, что композициями манипулировали (т.е., рекомбинировали) способом, который обычно не встречается в природе.

«Рекомбинантный лентивирусный вектор», или «rLV», представляет собой генетический элемент, включающий в себя геном лентивируса из линейной, двухспиральной нуклеиновой кислоты. Геном лентивируса из линейной, двухспиральной нуклеиновой кислоты был генетически изменен, например, посредством добавления или вставки конструкта гетерологичной нуклеиновой кислоты.

Под «рекомбинантным вирусом» подразумевается вирус, который был генетически изменен, например, посредством добавления или вставки в частицу конструкта гетерологичной нуклеиновой кислоты. Рекомбинантный вирус не содержит инфекционных вирусов в том виде, в котором они существуют в природе.

«Вирион LV» подразумевает полноценную вирусную частицу, такую как вирусная частица LV дикого типа (wt), ассоциированная с оболочкой rLV. Под «вирионом rLV» подразумевают полноценную вирусную частицу, такую как вирусная частица rLV, включающая в себя геном LV из линейной, двухспиральной нуклеиновой кислоты и гетерологичную нуклеотидную последовательность, представляющую интерес, ассоциированную с оболочкой rLV. Примеры rLV, пригодных для способов и вариантов использования изобретения, включают, но без ограничения, ВИЧ и их псевдотипы, такие как псевдотип ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВИЧ-1/ВИЧ-2, ВИЧ-1/SIV, FIV, вирус артрита-

энцефалита коз (CAEV), вирус инфекционной анемии лошадей, вирус иммунодефицита крупного рогатого скота и вирус везикулярного стоматита G-псевдотипированный лентивирус (VSVG-псевдотипированный).

5 Термины «рекомбинантный вирион rLV», «частица вектора rLV», и «полные частицы» определяются здесь как инфекционный вирус с дефективной репликацией, включающий мембранную оболочку rLV, и трансген, включающий в себя представляющую интерес гетерологичную нуклеотидную последовательность. Обзор, описывающий особенности молекул rLV, предоставлен у Dropulic (2011). Как изложено здесь, «рекомбинантный вирион rLV» не содержит инфекционных LV, в том виде, в котором они существуют в
10 природе.

Термин «клетка-хозяин» обозначает, например, микроорганизмы, дрожжевые клетки, клетки насекомых и клетки млекопитающих, которые могут, или применяются в качестве реципиентов конструктора хелперного rLV, rLV векторной плазмиды, вектора добавочной функции или другого переноса ДНК. Термин включает потомство исходной клетки,
15 которая была трансфицирована. Таким образом, «клетка-хозяин», как используется здесь, в целом относится к клетке, которая была трансфицирована последовательностью экзогенной ДНК. Понятно, что потомство единственной родительской клетки необязательно может быть полностью идентичным по морфологии или по геномному или общему ДНК комплементу исходному родителю, вследствие природной, случайной
20 или умышленной мутации.

Вектор добавочной функции в целом относится к нуклеиновой кислоте, которая содержит последовательность, обеспечивающую добавочную или хелперную функцию. Вектор добавочной функции может быть трансфицирован в клетку-хозяин, и вектор может предоставлять или кодировать белок (белки), чья функция состоит в поддержке
25 производства вектора rLV вириона в клетке-хозяине. Вектор добавочной функции может быть в форме плазмиды, фага, транспозона, космиды, эписомы или интегрированным в геном клетки-хозяина.

Термин «трансфекция» применяют по отношению к поглощению чужеродной нуклеиновой кислоты (например, ДНК) клеткой, и клетка была «трансфицирована»,
30 когда экзогенная нуклеиновая кислота (например, ДНК) была введена внутрь клеточной мембраны. В данной области в общем известен ряд методик трансфекции. См., например, Graham et al. (1973) Virology, 52:456, Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratories, New York, Davis et al. (1986) Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier, и Chu et al. (1981) Gene 13:197. Данные методики можно
35 применять для введения одного или более фрагментов экзогенной ДНК в пригодные клетки-хозяева.

Как используется здесь, термин «клеточная линия» относится к популяции клеток, способных к непрерывному или длительному росту и делению *in vitro*. Часто клеточные линии представляют собой клональные популяции, производные единственной клетки-предшественника. В данной области дополнительно известно, что спонтанные или индуцированные изменения в кариотипе могут возникать во время хранения или переноса данных клональных популяций. Вследствие этого клетки, являющиеся производными упоминаемой клеточной линии, могут не быть в точности идентичными предковым клеткам или культурам, и упоминаемая клеточная линия содержит данные
45 варианты.

Клетки и клеточные линии подходящие для бессывороточного роста в суспензии в соответствии со способами изобретения содержат клетки млекопитающих. Иллюстративные не имеющие ограничительного характера клетки содержат, например,

клетки HEK293T (ATCC); HEK293F (Life Technologies); HEK293(ATCC); 293S (ATCC), ВНК (ATCC), ВНК-21 (ATCC), CHO (ATCC), CHO/dhFr- (ATCC)1 и CHO K1 (ATCC).

Бессывороточные среды для выращивания клеток для примерения в соответствии со способами изобретения являются коммерчески доступными или могут быть
5 изготовлены. Не имеющие ограничительного характера иллюстративные бессывороточные среды для выращивания содержат, например, среды FreeStyle™293 (Gibco^R, Life Technologies), DMEM/F12 (Gibco^R, Life Technologies), SFM4Transfx-293 (HyClone™, ThermoScientific), CDM4HEK293 (HyClone™, ThermoScientific), StemPro-34SFM
10 (Gibco^R, Life Technologies), FreeStyle F17 (Gibco^R, Life Technologies), 293SFM II (Gibco^R, Life Technologies) и CD293 (Gibco^R, Life Technologies).

В способах по изобретению этап лечения или способа могут применять для уменьшения или снижения количества примеси нуклеиновой кислоты. В особых вариантах осуществления для уменьшения или снижения количества примеси
15 нуклеиновой кислоты в собранных рекомбинантных вирусных векторах или их препарате применяют нуклеазу. В особых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой эндонуклеазу, такую как бензоназа, экзонуклеазу или их комбинации. В особых вариантах осуществления нуклеаза представляет собой дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу или их комбинации. В особых вариантах осуществления нуклеаза
20 представляет собой ДНКазу.

В способах по изобретению выполняют один или более стадий колоночной хроматографии. Пригодными являются различные субстраты, такие как смола или среда (неподвижная фаза) для колоночной хроматографии. Данные смола или среда (неподвижная фаза) содержат основанную на заряде (ионнообменную) или аффинную
25 смолу или среду.

В особых вариантах осуществления ионнообменная колоночная хроматография представляет собой анионно- (сильных кислот или слабых кислот) обменную колоночную хроматографию, или катионно- (сильных оснований или слабых оснований) обменную колоночную хроматографию. В более конкретных вариантах осуществления
30 ионнообменная колонка представляет собой кватернизованную смолу или среду на основе полиэтиленимина; или четвертичную аминую смолу или среду. В дополнительных более конкретных вариантах осуществления ионнообменная колонка представляет собой смолу на основе полиэтиленимина; смолу на основе диэтиламиноэтила (DEAE); или смолу на основе диэтиламинопропила.

В особых вариантах осуществления аффинная колонка представляет собой смолу или среду на основе сульфопропила, или смолу или среду на основе карбоксиметила. В дополнительных отдельных вариантах осуществления аффинная колонка представляет собой многофункциональную хроматографическую смолу или среду; металло-хелатную аффинную смолу или среду; смолу или среду на основе гепарина, или
40 группоспецифическую аффинную смолу или среду.

Дополнительные смолы или среды, пригодные для колоночной хроматографии в способах по изобретению, содержат смолу или среду на основе гидроксипатита ((Ca₅(PO₄)₃OH)₂); мультимодальную слабую катионнообменную смолу или среду; смолу или среду на основе N-бензил-n-метилэтанолamina; или смолу или среду на основе октиламина.
45

В способах по изобретению применяют растворы, такие как связывающие, отмывающие и элюирующие растворы. Термины применяют для удобства с целью ссылки на назначение раствора в контексте хроматографии.

Данные растворы могут необязательно содержать ингредиенты, такие как полиэтиленгликоль (PEG). Данные растворы также могут необязательно содержать ингредиенты, такие как соли. В дополнение, данные растворы могут необязательно содержать ингредиенты, такие как буферные агенты (трис- или фосфатный буфер).

5 Кроме того, данные растворы могут содержать ингредиенты, такие как хелатообразующие агенты, например, EDTA.

В особых вариантах осуществления количество PEG в связывающем растворе составляет от приблизительно 0% до 10% вес/объем, или от приблизительно 0% до 5% вес/объем, или от приблизительно 0% до 2% вес/объем. В особых вариантах
10 осуществления количество PEG в отмывающем растворе составляет от приблизительно 1% до 10% вес/объем, или от приблизительно 1% до 5% вес/объем, или от приблизительно 1% до 2% вес/объем. В особых вариантах осуществления количество PEG в элюирующем растворе составляет от приблизительно 0% до 20% вес/объем.

В особых вариантах осуществления PEG в связывающем, отмывающем или
15 элюирующем растворах имеет молекулярную массу от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 40000 кДа. В других отдельных вариантах осуществления PEG в связывающем, отмывающем или элюирующем растворах имеет молекулярную массу от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 10000 кДа.

В особых вариантах осуществления соль включает в себя или состоит из натрия
20 хлорида (NaCl), калия хлорида (KCl) или кальция хлорида. В особых вариантах осуществления количество соли в связывающем, отмывающем или элюирующем растворах составляет от приблизительно 20 мМоль до приблизительно 1 Моль. В более конкретных вариантах осуществления количество соли в связывающем растворе составляет от приблизительно 20 мМоль до приблизительно 200 мМоль (такое как
25 приблизительно 100 мМоль). В более конкретных вариантах осуществления количество соли в отмывающем растворе составляет от приблизительно 20 мМоль до приблизительно 200 мМоль (такое как 100 мМоль). В более конкретных вариантах осуществления количество соли в элюирующем растворе составляет от приблизительно
30 200 мМоль до приблизительно 1М (такое как 200 мМоль, 250 мМоль, 300 мМоль, 350 мМоль, 400 мМоль, 450 мМоль, или мМоль) или от приблизительно 500-1 000 мМоль или 600-800 мМоль.

В способах по изобретению могут быть задействованы фильтры. Фильтры могут иметь различные размеры диаметра пор. Размеры диаметра пор могут условно быть представлены числовым значением. Иллюстративные размеры пор варьируют от
35 приблизительно 0,20-0,5 мкм (микрон). Иллюстративные размеры пор варьируют от приблизительно 0,20 мкм (микрон) до приблизительно 0,22 мкм (микрон), или более конкретно приблизительно 0,22 мкм (микрон). Дополнительно иллюстративные размеры пор варьируют от приблизительно 0,22 мкм (микрон) до приблизительно 0,30 мкм (микрон), или приблизительно 0,30 мкм (микрон) до приблизительно 0,45 мкм (микрон)
40 диаметра пор, или более конкретно приблизительно 0,45 мкм (микрон).

Способы по изобретению обеспечивают повышение титров rLV при крупномасштабном производстве при уменьшении, снижении или элиминации связанных с вектором rLV примесей (например, примесей нуклеиновой кислоты, ассоциированной с rLV) содержащихся в очищенных запасах вирионов rLV, с минимальной потерей
45 содержащихся в них векторных частиц rLV или вирионов. Примеси включают белок, нуклеиновую кислоту (ДНК, РНК), детрит и другой материал, отличный от rLV векторных частиц или вирионов, которые могут присутствовать. Способы по изобретению служат для повышения количества rLV векторных частиц/вирионов при

уменьшении, снижении или элиминации примесей.

В особых вариантах осуществления способ по изобретению приводит к получению приблизительно 5×10^5 инфекционных единиц (IU)/мл или более вирусного вектора. В

особых вариантах осуществления способ по изобретению приводит к получению приблизительно 6×10^6 инфекционных единиц (IU)/мл или более вирусного вектора. В
особых вариантах осуществления способ по изобретению приводит к получению
приблизительно 3×10^8 инфекционных единиц (IU)/мл вирусного вектора.

Как используется здесь, термин «около» или «приблизительно» при использовании
в отношении к количеству или единице измерения относится к диапазону статистического
отклонения, допустимого для представленных числовых значений. Обычно диапазон
составляет приблизительно +/- 10%, или +/- 5% представленных числовых значений.

Как раскрыто в данной заявке, рекомбинантный (вирусный) вектор может содержать
нуклеиновую кислоту, такую как трансген. Последовательность «нуклеиновую кислоты»
относится к последовательности ДНК или РНК. Термин охватывает последовательности,
которые содержат любой из известных основных аналогов ДНК и РНК, таких как, но
не ограничиваясь, 4-ацетилцитозин, 8-гидрокси-N6-метиладенозин, азиридилилцитозин,
псевдоизоцитозин, 5-(карбоксигидроксиметил) урацил, 5-фторурацил, 5-бром урацил,
5-карбоксиметиламинометил-2-тиоурацил, 5-карбоксиметиламинометилурацил-,
дигидроурацил, инозин, N6-изопентениладенин, 1-метиладенин, 1-метилпсевдоурацил,
1-метилгуанин, 1-метилюинозин, 2,2-диметилгуанин, 2-метиладенин, 2-метилгуанин, 3-
метилцитозин, 5-метилцитозин, N6-метиладенин, 7-метилгуанин, 5-
метиламинометилурацил, 5-метоксиаминометил-2-тиоурацил, бета-D-маннозилквеозин,
5'-метоксикарбонилметилурацил, 5-метоксиурацил, 2-метилтио-N6-изопентениладенин,
метилловый эфир урацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-5-оксиуксусная кислота,
оксибутоксозин, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, 5-метил-2-тиоурацил, 2-тиоурацил,
4-тиоурацил, 5-метилурацил, метилловый эфир бурацил-5-оксиуксусной кислоты, урацил-
5-оксиуксусная кислота, псевдоурацил, квеозин, 2-тиоцитозин, и 2,6-диаминопурин.

«Кодирующая последовательность», или последовательность, которая «кодирует»
выбранный полипептид, представляет собой молекулу нуклеиновой кислоты, которая
транскрибируется (в случае ДНК) и транслируется (в случае мРНК) в полипептид *in vivo*
при помещении под контролем соответствующих регуляторных
последовательностей. Границы кодирующей последовательности определяются
инициирующим кодоном на 5'- (амино-) конце и терминирующим трансляцию кодоном
на 3'- (карбокси-) конце. Последовательность терминации транскрипции может
локализоваться 3' в кодирующей последовательности.

Термин «контрольные последовательности» ДНК собирательно относится к
промоторным последовательностям, сигналам полиаденилирования,
последовательностям терминации транскрипции, регуляторным доменам апстрим,
точкам начала репликации, участкам внутренней посадки рибосомы («IRES»),
энхансерам и другим, которые в совокупности обеспечивают репликацию, транскрипцию
и трансляцию кодирующей последовательности в клетке реципиента. Не всегда
необходимо присутствие всех из данных контрольных последовательностей, при условии,
что выбранная кодирующая последовательность способна реплицироваться,
транскрибироваться и транслироваться в соответствующей клетке-хозяине.

Термин «промоторный» применяют здесь в обычном смысле для обозначения
нуклеотидной области, включающей в себя регуляторную последовательность ДНК,
при этом регуляторная последовательность является производной гена, который

способен связывать РНК-полимеразу и инициировать транскрипцию кодирующую последовательность даунстрим (3'-направление). Промотеры транскрипции могут содержать «индуцируемые промотеры» (где экспрессия полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с промотером, индуцируется аналитом, кофактором, регуляторным белком и т.д.), «репресслируемые промотеры» (где экспрессия полинуклеотидной последовательности, функционально связанной с промотером, индуцируется аналитом, кофактором, регуляторным белком и т.д.), и «конститутивные промотеры».

«Функционально связанный» относится к расположению элементов, при этом компоненты, описанные таким образом, сконфигурированы таким образом, чтобы выполнять свою обычную функцию. Таким образом, контрольные последовательности, функционально связанные с кодирующей последовательностью, являются способными к осуществлению экспрессии кодирующей последовательности. Контрольные последовательности не должны быть смежными с кодирующей последовательностью при условии, что они функционируют для направления их экспрессии. Таким образом, например, вставка еще нетранслируемых транскрибируемых последовательностей может присутствовать между промотерной последовательностью и кодирующей последовательностью, и промотерная последовательность, тем не менее, может считаться «функционально связанной» с кодирующей последовательностью.

С целью описания относительного расположения нуклеотидных последовательностей в отдельной молекуле нуклеиновой кислоты на всем протяжении настоящей заявки, например, когда отдельная нуклеотидная последовательность описана расположенной «апстрим», «даунстрим», «3'», или «5'» относительно другой последовательности, следует понимать, что в качестве общепринятого в данной области упоминается именно расположение последовательностей в «смысловой» или «кодирующей» нити молекулы ДНК.

Термин «гетерологичный» в силу того относится к последовательностям нуклеиновых кислот, таких как кодирующие последовательности и контрольные последовательности, обозначает последовательности, которые не соединены нормально друг с другом, и/или не связаны нормально с конкретной клеткой. Таким образом, «гетерологичная» область конструкта нуклеиновой кислоты или вектора представляет собой сегмент нуклеиновой кислоты в составе или прикрепленная к другой молекуле нуклеиновой кислоты, которая не обнаружена в ассоциации с другой молекулой в природе. Например, гетерологичная область конструкта нуклеиновой кислоты может содержать кодирующую последовательность, окруженную последовательностями, не обнаруженными в ассоциации с кодирующей последовательностью в природе. Другим примером гетерологичной кодирующей последовательности является конструкт, где сама кодирующая последовательность не найдена в природе (например, синтезированные последовательности, имеющие кодоны, отличающиеся от природного гена). Подобным образом, клетка, трансформированная конструктом, который обычно не присутствует в клетке, мог бы считаться гетерологичным для целей данного изобретения. Аллельное разнообразие или встречающиеся в природе мутационные события не являются источником гетерологичной ДНК, как используется здесь.

«Терапевтическая молекула» в одном варианте изобретения представляет собой пептид или белок, который может ослаблять или уменьшать симптомы, являющиеся результатом отсутствия или дефекта белка в клетке или у больного. В качестве альтернативы, «терапевтический» пептид или белок, кодируемый трансгеном, представляет собой пептид или белок, который обеспечивает пользу для больного,

например, для коррекции генетического дефекта, для коррекции дефицита (экспрессии или функционального) гена, или противораковое действие. Соответственно, трансген, содержащий гетерологичную нуклеиновую кислоту, может кодировать ряд полезных продуктов. Они могут содержать мРНК, нечувствительные молекулы и микроРНК,

например.

Трансгены могут кодировать гормоны и факторы роста и дифференцировки, включая, без ограничения, инсулин, глюкагон, гормон роста (GH), паратиреоидный гормон (PTH), соматотропин-рилизинг-фактор (GRF), фолликулстимулирующий гормон (FSH), лютеинизирующий гормон (LH), человеческий хорионический гонадотропин (hCG), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтины, ангиостатин, колониестимулирующий фактор гранулоцитов (GCSF), эритропоэтин (EPO), фактор роста соединительной ткани (CTGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), кислотный фактор роста фибробластов (aFGF), эпидермальный фактор роста (EGF), трансформирующий ростовой фактор- α (TGF α), фактор роста тромбоцитов (PDGF), инсулиноподобные факторы роста I и II (IGF-I и IGF-II), любой из суперсемейства трансформирующего ростового фактора β , включая TGF β , активины, ингибины, или любой из костных морфогенетических белков (BMP) BMP 1-15, любой из херегулин/нейрегулин/ARIA/neu фактор дифференцировки (NDF) семейства факторов роста, фактор роста нервной ткани (NGF), нейротрофический фактор головного мозга (BDNF), нейротрофины NT-3 и NT-4/5, цилиарный нейротрофический фактор (CNTF), нейротрофический фактор глиальной клеточной линии (GDNF), нейротурин, агрин, любой из семейства семафоринов/коллапсинов, нетрин-1 и нетрин-2, фактор роста гепатоцитов (HGF), эфрины, ноггин, «звуковой ежик» и тирозингидроксилаза.

Другие трансгенные продукты, которые можно использовать, включают белки, которые регулируют иммунную систему, включая, без ограничения, цитокины и лимфокины, такие как тромбопоэтин (TPO), интерлейкины (IL) от IL-1 до IL-17, моноцитарный хемоаттрактантный белок, фактор, ингибирующий лейкоз, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, лиганд Fas, факторы некроза опухоли α и β , интерфероны α , β и γ , фактор стволовой клетки, лиганд flk-2/flt3. Генные продукты, продуцируемые иммунной системой, также используются в изобретении. Они включают в себя, без ограничения, иммуноглобулины IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, химерные иммуноглобулины, гуманизированные антитела, одноцепочечные антитела, рецепторы Т-клеток, рецепторы химерных Т-клеток, одноцепочечные рецепторы Т-клеток (например Kalos et al. 2011; Porter et al. 2011), рецепторы, связанные с G-белком (GPCR), такие как CCR5, молекулы МНС класса I и класса II, а также иммуноглобулины и молекулы МНС, полученные методами генной инженерии. Используемые генные продукты также включают регуляторные белки, такие как комплементарные регуляторные белки, мембранный кофакторный белок (MCP), стимулятор гемолиза (DAF), CR1, CF2 и CD59.

Другие генные продукты, которые могут использоваться, содержат генные продукты, которые могут корректировать врожденные нарушения обмена веществ. Данные трансгены могут кодировать, например, карбамоилсинтетазу I, орнитинтранскарбамилазу, аргининосукцинатсинтетазу, аргининосукцинатлиазу, аргиназу, фумарилацетоацетатгидролазу, фенилаланингидролазу, альфа-1-антитрипсин, глюкоза-6-фосфатазу, порфибилиногендезаминазу, факторы свертывания крови, такие как Фактор V, Фактор VIIa, Фактор VIII, Фактор IX, Фактор X, Фактор XIII или белок C, цистатионин-бета-синтетазу, разветвленную цепь кетоацидодекарбоксилазы, альбумин, изовалерил-КоА-дегидрогеназу, пропионил-КоА-карбоксилазу,

метилмалонил-КоА-мутаза, глутарил-КоА-дегидрогеназа, инсулин, бета-глюкозидазу, пируваткарбоксилазу, печеночную фосфорилазу, фосфорилазу-киназу, глициндекарбоксилазу, Н-белок, Т-белок, последовательность трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR) и последовательность дистрофина кДНК.

5 Дополнительные генные продукты, которые могут использоваться, содержат генные продукты, которые могут обеспечивать дефектную, недостаточную или утраченную функцию или активность, например, антитело, белок, специфичный для пигментного эпителия сетчатки, с молекулярной массой 65 кДа (RPE65), эритропоэтин, LDL-рецептор, липопротеинлипазу, орнитинтранскарбамилазу, β -глобин, α -глобин, спектрин, α -
 10 антитрипсин, аденозиндеаминазу (ADA), транспортер металлов (ATP7A или ATP7), сульфамидазу, фермент, участвующий в лизосомной болезни накопления (ARSA), гипоксантин-гуанинфосфорибозилтрансферазу, β -25 глюкоцереброзидазу, сфингомиелиназу, лизосомальную гексоаминидазу, кетоацидегидрогеназу с разветвленной цепью, гормон, факторы роста (например, инсулиноподобные факторы
 15 роста I и II, фактор роста тромбоцитов, эпидермальный фактор роста, фактор роста нервной ткани, нейротрофический фактор-3 и -4, нейротрофический фактор головного мозга, глиальный нейротрофический фактор, трансформирующий ростовой фактор- α и - β и т.д.), цитокин (например, α -интерферон, β -интерферон, γ -интерферон, интерлейкин-2, интерлейкин-4, интерлейкин-12, гранулоцитарно-макрофагальный
 20 колониестимулирующий фактор, лимфотоксин и т.д.), продукт ген «самоубийства» (например, тимидинкиназу вируса простого герпеса, цитозиндеаминазу, дифтерийный токсин, цитохром P450, дезоксицитидинкиназу, фактор некроза опухоли и т.д.), белок, резистентный к лекарственным препаратам (например, который обеспечивает устойчивость к препаратам, применяемым в лечении рака), белок-супрессор опухолевого
 25 роста (например, p53, Rb, Wt-1, NF1, Von Hippel-Lindau (VHL), аденоматозный полипоз толстой кишки (APC)), пептид с иммуномодулирующими свойствами, толерогенный или иммуногенный пептид или белок Tregitopes, или hCDR1, инсулин, глюкокиназу, гуанилатциклазу 2D (LCA-GUCY2D), белок эскорта Рэба 1 (хороидеремия), LCA 5 (LCA-леберцилин), орнитинкетоацетиламинотрансферазу (гиратная атрофия), ретиношизин 1
 30 (X-связанный ретиношизис), USH1C (синдром Ашера 1C), ГТФазу при X-связанном пигментном ретините (XLRP), MERTK (AR формы RP: пигментного ретинита), DFNB1 (глухота, опосредованная коннексином-26), ACHM 2, 3 и 4 (ахроматопсия), PKD-1 или PKD-2 (поликистозная болезнь почек), TPP1, CLN2, недостаточность генов, вызывающая лизосомные болезни накопления (например, сульфатазы, ацетилглюкозамин-1-
 35 фосфаттрансферазы, катепсина А, GM2-AP, NPC1, VPC2, белки-активаторы сфинголипидов и т.д.), одну или более цинк-пальцевых нуклеаз для редактирования генома или донорные последовательности, применяемые в качестве матриц для восстановления при редактировании генома.

Трансгены также могут кодировать опухолеспецифические антигены (ТАА). Без
 40 ограничения, ТАА содержат: опухолеассоциированный тестикулоспецифический антиген (например, MAGE, BAGE и GAGE), меланоцитарный дифференцировочный антиген (например, tyrosinase, Melan-A/MART-1), CDK4, MUM-1, бета-катенин, gp100/pmel 17, TRP-1, TRP-2, MITF, MITF-A и MITF-M (King, et al. (1999). Am J Pathol 155:731).

Экспрессируются опухолями дополнительные не имеющие ограничительного характера
 45 примеры ТАА, включая меланома-ассоциированный GP75, Аннексин I, Аннексин II, белок, связывающий аденозиндеаминазу (ADAbp), PGP 9,5 (Rode, et al. (1985).

Histopathology 9:147), колоректальный ассоциированный антиген (CRC)--C017-1A/GA733, Ab2 BR3E4, CI17-1A/GA733, Hsp70 (Chen, et al. (2002). Immunol Lett 84:81), Hsp90, Hsp96,

Hsp105, Hsp110, HSPPC-96 (Caudill, M. M. и Z. Li (2001). *Expert Opin Biol Ther* 1:539), белок стрессов gp96 (Heike et al. (2000). *Int J Can* 86:489), gp96-ассоциированные клеточные пептиды, G250, дипептидилпептидазу IV (DPPIV), маммоглобин (Tanaka, et al. (2003). *Surgery* 133:74), тиреоглобулин, STn (Morse, M. A. (2000). *Curr Opin Mol Ther* 2:453),
 5 раковоэмбриональный антиген (CEA), эпитоп раковоэмбрионального антигена (CEA) CAP-1, эпитоп раковоэмбрионального антигена (CEA) CAP-2, etv6, aml1, простатспецифический антиген (PSA), эпитопы PSA PSA-1, PSA-2, PSA-3 (Correale, et al. (1998). *J Immunol* 161:3186), Ad5-PSA, белок, родственный паратгормону (PTH-rP), EGFR (Plunkett, et al. (2001). *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:467), PLU1 (Plunkett, et al. (2001).
 10 *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 6:467), раково-эмбриональный антиген-незрелый рецептор ламинина (OFA-iLR), MN/CA IX (CA9) (Shimizu et al., (2003). *Oncol. Rep.* Sep-Oct; 10:1307), HP59, цитохромоксидазу 1, sp100, msa (Devine, et al. (1991). *Cancer Res* 51:5826), белок, активирующий Ran ГТФазу, Rab-GAP (активирующий Rab ГТФазу) белок, PARIS-1 (Zhou, et al. (2002). *Biochem Biophys Res Commun* 290:830), Т-клеточный рецептор/CD3-
 15 зета-цепь, сTAGE-1, SCP-1, гликолипидный антиген GM2, GD2 или GD3, GM3 (Bada, et al. (2002). *Hum Exp Toxicol* 21:263), фукозил-GM1, гликопротеин (муцин)-Tn антигены, сиалил-Tn (Lundin, et al. (1999). *Oncology* 57:70), TF и Муцин-1 (Mukherjee, et al. (2003). *J Immunother* 26:47), CA125 (MUC-16) (Reinartz, et al. (2003). *Cancer Res* 63:3234), семейство антигенов MAGE, GAGE-1,2, BAGE, RAGE, LAGE-1 (Eichmuller, et al. (2003). *Int J Cancer*
 20 104:482) (Chen, et al. (1998). *Proc Natl Acad Sci USA* 95:6919), GnT-V (Murata, et al. (2001). *Dis Colon Rectum* 44:A2-A4), MUM-1 (Kawakami, et al. (1996). *Keio J Med* 45:100), EP-CAM/KSA (Ullenhag, et al. (2003). *Clin Cancer Res* 9:2447), CDK4, семейство антигенов MUC, HER2/neu, ErbB-2/neu, p21ras, RCAS1, α -фетопротеин, Е-кадгерин, α -катенин, β -катенин и γ -катенин, NeuGcGM3 (Carr, et al. (2003). *J Clin Oncol* 21:1015), Fos-родственный антиген
 25 (Luo, et al. (2003). *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8850), циклофилин В (Tamura, et al. (2001). *Jpn J Cancer Res* 92:762), RCAS1, S2 (Koga, et al. (2003). *Tissue Antigens* 61:136), L10a (Koga, et al. (2003). *supra*), L10a, теломеразный пептид rt (Wang, et al. (2001). *Oncogene* 20:7699), cdc27, фодрин, p120ctn, PRAME, GA733/EoCam (Ross, et al. (1986). *Biochem Biophys Res Commun* 135:297), NY-BR-1, NY-BR-2 NY-BR-3, NY-BR-4 NY-BR-5, NY-BR-6 NY-BR-7
 30 (Jager, et al. (2001). *Cancer Res* 61:2055), NY-ESO-1, L19H1, MAZ (Daheron, et al. (1998). *Leukemia* 12:326), PINCH (Greiner, et al. (2000). *Exp Hematol* 28:1413), PRAME (Ikeda, et al. (1997). *Immunity* 6:199), Prp1p/Zer1p, WT1 (Oka, et al. (2002). *Curr Cancer Drug Targets* 2:45), белок аденоматозного полипоза толстой кишки (APC), PHF3, LAGE-1, SART3 (Miyagi, et al. (2001). *Clin Cancer Res* 7:3950), SCP-1 (Jager, et al. (2002). *Cancer Immun* 2:5), SSX-1,
 35 SSX-2, SSX-4, TAG-72 (Buchsbaum, et al. (1999). *Clin Cancer Res* 5(10 Suppl): 3048s-3055s), TRAG-3 (Chen, et al. (2002). *Lung Cancer* 38:101), MBTAA (Basu, et al. (2003). *Int J Cancer* 105:377), опухолевый антиген Smad, Imp-1, HPV-16 E7, c-erbB-2, ядерный антиген вируса Эпштейна-Барра (EBNA)-1, тимидинкиназу вируса простого герпеса (HSVtk), в качестве альтернативы сплайсированную изоформу XAGE-1 (L552S; Wang, (2001). *Oncogene* 20:
 40 7699), мутация со сдвигом рамки генетического кода TGF-бета RII (Saeterdal, et al. (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13255), мутация со сдвигом рамки генетического кода BAX (Saeterdal, et al. (2001). *Proc Natl Acad Sci USA* 98:13255).

Трансгены дополнительно могут кодировать генный продукт, такой как CAIX, CD19, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44v7/8, CEA, EGF-RIII (вариант 3 рецептора
 45 эпидермального фактора роста) EGP-2, erb-B2, erb-B2, 3, 4, FBP, ацетилхолиновый рецептор фетального типа, GD2, Her2/neu, IL-13R- α 2, KDR, к-легкую цепь, LeY, молекулу клеточной адгезии L1, MAGE-A1, мезотелин, MUC1, NKG2D, раковоэмбриональный антиген (h5T4), PSCA, простатспецифический мембранный антиген (PSMA),

простатическую кислую фосфатазу (PAP), фактор транскрипции Ets, продуцируемый простатическим эпителием (PDEF), mAb IgE, меченное ТАА, TAG-72 и VEGF-R2.

В качестве альтернативы, трансгены могут содержать миРНК, нечувствительные молекулы и микроРНК, например. Лентивирусные векторы, которые могут применяться в клинической практике, могут также экспрессировать антисмысловой ген, направленный против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) (Levine et al 2006) и других важных патогенов человека. Данные и другие полезные использования rLV и родственных векторов были недавно рассмотрены и приведены Naldini (2011).

Антисмысловые гены, которые могут быть включены в rLV вектор, могут подавлять экспрессию: гена хантингтина (НТТ), гена, ассоциированного с денторубропаллидолуизиановой атрофией (например, атрофин 1, ATN1); андрогенного рецептора на X-хромосоме при спинобульбарной мышечной атрофии, человеческого атаксина-1, -2, -3 и -7, потенциалзависимого кальциевого канала Ca_v2.1 P/Q, кодируемого (CACNA1A), ТАТА-связывающего белка, атаксина 8 противоположной цепи, также известного как ATXN8OS, серинтреонинпротеинфосфатазы 2A 55 кДа регуляторной субъединицы В изоформы бета при спинальном мышечном атрофии (1, 2, 3, 6, 7, 8, 12 17 типа), FMR1 (синдром умственной отсталости, сцепленный с ломкой X-хромосомой 1) при синдроме ломкой X-хромосомы, FMR1 (синдром умственной отсталости, сцепленный с ломкой X-хромосомой 1) при синдроме ломкой X-хромосомы с тремором и атаксией, FMR1 (синдром умственной отсталости, сцепленный с ломкой X-хромосомой 2) или члена 2 семейства AF4/FMR2 при умственной отсталости при XE-ломком участке; миотонинпротеинкиназы (MT-PK) при миотонической дистрофии; фратаксина при наследственной атаксии Фридрейха; мутантного гена супероксиддисмутазы 1 (SOD1) при боковом амиотрофическом склерозе; гена, участвующего в патогенезе болезни Паркинсона и/или болезни Альцгеймера; аполипопротеина В (APOB) и пропротеинконвертазы субтилизина/кексина 9 типа (PCSK9), гиперхолестеринемии; tat ВИЧ, трансаktиватора транскрипции гена вируса иммунодефицита человека, при ВИЧ-инфекции; TAR ВИЧ, TAR ВИЧ, элемента гена трансаktиватора ответа вируса иммунодефицита человека, при ВИЧ-инфекции; хемокинового рецептора (CCR5) при ВИЧ-инфекции; нуклеокапсидного белка вируса саркомы Рауса (RSV) при инфицировании RSV, печеночноспецифической микроРНК (miR-122) при инфицировании вирусом гепатита С; p53, при остром повреждении почек или отсроченной функции почечного трансплантата или острой почечной недостаточности при остром повреждении почек; протеинкиназы N3 (PKN3) при прогрессирующих рецидивирующих или метастатических солидных злокачественных опухолях; LMP2, LMP2, также известных как протеасомная субъединица бета-типа 9 (PSMB 9), метастатической меланомы; LMP7, также известной как протеасомная субъединица бета-типа 8 (PSMB 8), метастатической меланомы; MECL1, также известной как протеасомная субъединица бета-типа 10 (PSMB 10), метастатической меланомы; фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) в солидных опухолях; белка веретена деления кинезина при солидных опухолях, супрессора апоптоза В-клеточной CLL/лимфомы (BCL-2) при хроническом миелоидном лейкозе; рибонуклеотидредуктазы M2 (RRM2) при солидных опухолях; фурина при солидных опухолях; Polo-подобной киназы 1 (PLK1) при опухолях печени, диацилглицеринацилтрансферазы 1 (DGAT1) при инфицировании вирусом гепатита С, бета-катенина при семейном аденоматозном полипозе; бета₂-адренергического рецептора, глаукомы; RTP801/Redd1, также известного как индуцируемый повреждением ДНК транскрипт 4 белок, при диабетическом макулярном отеке (DME) или возрастной макулярной дегенерации; рецептора I фактор роста эндотелия сосудов (VEGFR1) при

возрастной макулярной дегенерации или хориоидальной неоваскуляризации, каспазы 2 при неартериитной ишемической невропатии зрительного нерва; мутантного белка кератина 6A N17K при врожденной пахионихии; генома/генных последовательностей вируса гриппа А при инфицировании гриппом; тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) генома/генных последовательностей коронавируса при инфицировании SARS; генома/генных последовательностей респираторно-синцитиального вируса при инфицировании респираторно-синцитиальным вирусом; генома/генной последовательности филовirusа Эбола при инфицировании Эбола; генома/генных последовательностей вирусов гепатита В и С при инфицировании вирусами В и С; генома/генных последовательностей вируса простого герпеса (HSV) при инфицировании HSV, генома/генных последовательностей вируса Коксаки В3 при инфицировании вирусом Коксаки В3; сайленсинга патогенной аллели гена (аллелеспецифический сайленсинг) наподобие торсина А (TOR1A) при первичной дистонии, ran-class I и HLA-аллели, специфичной для трансплантации; гена мутантного родопсина (RHO) при аутосомно-доминантном наследственном пигментном ретините (adRP); или ингибировать связывание нуклеиновой кислоты с транскриптом любого из вышеизложенных генов или последовательностей.

Под «изолированной» по отношению к нуклеотидной последовательности подразумевается, что указанная молекула присутствует при фактическом отсутствии других биологических макромолекул такого же типа. Таким образом, «изолированная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный полипептид», относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая по существу является свободной от молекул других нуклеиновых кислот, которые не кодируют рассматриваемый полипептид; однако молекула может содержать некоторые дополнительные пары оснований или фрагменты, которые не причиняют вред основным характеристикам композиции.

Если не указано иное, все технические и научные термины, применяемые здесь, имеют такие же значения, которые обычно понятны любому рядовому специалисту в области, к которой принадлежит данное изобретение. Здесь описаны подходящие способы и материалы, хотя при практической реализации или тестировании настоящего изобретения могут применяться способы и материалы, аналогичные или эквивалентные способам и материалам, описанным здесь.

Все заявки, публикации, патенты и другие ссылки, упоминания GenBank и упоминания ATCC, раскрытые здесь, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В случае конфликта преимущественное право будет иметь описание изобретения, включая определения.

Все признаки, раскрытые здесь, могут комбинироваться в любой комбинации. Каждый признак, раскрытый в описании, может быть заменен альтернативным признаком, служащим той же, эквивалентной или сходной цели. Таким образом, если специально не оговорено иное, раскрытые признаки (например, рекомбинантный вектор (например, rLV вектор), или рекомбинантная вирусная частица являются примером рода эквивалентных или сходных признаков.

Как используется здесь, формы единственного числа «а», «и» и «the» включают множественные объекты ссылки, если контекст ясно не указывает на другое. Таким образом, например, ссылка на «полинуклеотид» содержит множество данных полинуклеотидов, ссылка на «вектор» содержит множество данных векторов, и ссылка «вирус» или «частицу» содержит множество данных вирионов/частиц.

Как используется здесь, все числовые значения или диапазоны числовых значений содержат числа в пределах данных диапазонов и фракций значений или чисел в пределах

диапазонов, если контекст ясно не указывает на другое. Таким образом, для иллюстрации, ссылка на идентичность по меньшей мере 1-10% включает 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, а также 1,1%, 1,2%, 1,3%, 1,4%, 1,5% и т.д., 2,1%, 2,2%, 2,3%, 2,4%, 2,5% и т.д. и так далее.

5 Ссылка на число с более (выше) или менее чем содержит любое число, большее или меньшее, чем ссылочное число, соответственно. Таким образом, например, ссылка на менее чем 40000 включает 39999, 39998, 39997 и т.д., все вплоть до числа один (1); и менее чем 100 содержит 99, 98, 97 и т.д., все вплоть до числа один (1).

10 Как используется здесь, все числовые значения или диапазоны содержат доли значений и чисел в пределах данных диапазонов и долей чисел в пределах данных диапазонов, если контекст ясно не указывает на другое. Таким образом, для иллюстрации, ссылка на диапазон чисел, такой как 2000-40000, содержит 2000; 3000; 4000; 5000, 6000 и т.д., а также 2100; 3100; 4100; 5100; 6100 и так далее. Ссылка на диапазон от 20 до 100 вследствие этого содержит 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31,
15 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40 и т.д., вплоть до и включая 100, а также 21,1, 21,2, 21,3, 21,4, 21,5 и т.д., 22,1, 22,2, 22,3, 22,4, 22,5 и так далее.

Ссылка на серию диапазонов содержит диапазоны, которые сочетают значения границ различных диапазонов в пределах серии. Таким образом, для иллюстрации, ссылка на серию диапазонов 20-100 или 100-1000 (например, 20 мМоль - 100 мМоль;
20 или 100 мМоль - 1 Моль) содержит 20-30, 30-40, 40-50, 50-60, 60-75, 75-100, 100-150, 150-200, 200-250, 250-300, 300-400, 400-500, 500-750, 750-1000, и т.д.

Изобретение в целом раскрыто здесь с применением утвердительного языка для описания многочисленных вариантов осуществления и аспектов. Изобретение также специально содержит варианты осуществления, в которых конкретный объект
25 изобретения полностью или частично исключен, такой как вещества или материалы, стадии и условия способа, протоколы или манипуляции. Например, в определенных вариантах осуществления или аспектах изобретения исключены материалы и/или стадии способа. Таким образом, даже если изобретение в целом не отражено здесь в терминах того, что изобретение не содержит, тем не менее здесь раскрыты аспекты, которые
30 прямо не включены в изобретение.

Описан ряд вариантов осуществления изобретения. Тем не менее, квалифицированный специалист в данной области, без выхода за пределы сущности и объема правовых притязаний изобретения, может создать различные изменения и модификации изобретения, чтобы приспособить его к различным способам применения и условиям.
35 Соответственно, следующие примеры предназначены, чтобы проиллюстрировать, но не ограничивать объем правовых притязаний изобретения.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

Лентивирусные векторы обычно получают посредством способов трансфекции с
40 применением способа осаждения кальция фосфата в системе адгезивной культуры клеток (3, 4). Однако при производстве лентивекторов для клинического применения, конкретно для последних стадий клинического применения, особо важно изготавливать векторы в системе производства бессывороточной суспензии, которая может быть масштабирована, чтобы обеспечить большое количество получения вектора и улучшить
45 профиль безопасности изготавливаемого вектора.

Чтобы преодолеть существующие ограничения имеющихся систем производства Лентивектора, раскрытых здесь, представлена масштабная система культивирования клеток в бессывороточной суспензии, продуцирующая высокие титры лентивекторов.

Первым этапом в данной новой масштабной системе производства является создание клеточной линии, которую можно культивировать в бессывороточном состоянии и которая продуцирует высокие уровни лентивекторов. Авторы изобретения предположили, что адаптация клеток НЕК293Т к бессывороточной суспензии культуры должно быть оправданным, поскольку данные клетки в настоящее время широко используются в продуцировании вирусных векторов. Для достижения данной цели авторы изобретения разработали пошаговый протокол адаптации и систематически оценили несколько коммерчески доступных бессывороточных сред для культивирования клеток и способность клеток НЕК293Т активно расти в данных средах. Было обнаружено, что одна среда (CD293) превосходит все остальные, протестированные для поддержки неагрегированного роста здоровых клеток после адаптации к быстрой скорости роста (Фигура 2, Панель А). Оптимизированное состояние культуры клеток поддерживает высокую плотность клеток и согласованный клеточный рост (Фигура 2, Панель В и С). Адаптированные клетки культивировали в условиях бессывороточной суспензии культуры в течение нескольких месяцев, и для исследования был разработан банк клеток.

Лентивирусные векторы получили путем котрансфекции осаждением кальция фосфата 2-5 плазмид в намеченные клетки. При том, что наиболее позднее поколение систем производства мультиплазмид (самоинактивирующаяся система), как было показано, является неустойчивым в производстве лентивекторов со сниженным риском генерирования компетентного по репликации вируса, соосаждение кальция создает ограничение на крупномасштабное изготовление. Соосаждение ДНК фосфатом кальция, разработанное более 40 лет назад (5), хорошо работает для адгезивной культуры клеток в лабораторном масштабе. Однако, оно не предоставляет эффективных уровней трансфекции в бессывороточной суспензии культур клеток и является весьма трудным для выхода на промышленные масштабы.

Полиэтиленимин (PEI) является коммерчески доступным и был протестирован на эффективное введение плазмиды ДНК в только что адаптированные клетки НЕК293Т (6). Первичные эксперименты выявили, что среды, выбранные для бессывороточной культуры клеток, не поддерживают трансфекцию с применением PEI в качестве трансфекционного реагента, затем усилия направили на выявление бессывороточной среды, которая будет поддерживать трансфекцию клеток с применением PEI. При том, что один отдельный отобранный тип среды поддерживал трансфекцию (Фигура 3 Панель D), данная среда не поддерживает рост суспензии клеток в долговременной культуре клеток (данные не показаны). Авторы изобретения вследствие этого наметили и разработали двухэтапную систему производства лентивекторов в бессывороточной суспензии: первое, клетки растут в среде, которая поддерживает активный и быстрый рост в суспензии в бессывороточном состоянии. Второе, среду для культивирования клеток либо заменяют, либо смешивают со средой второго типа, которая поддерживает трансфекцию на основе PEI. При попытках оптимизировать эффективность PEI-трансфекции оценили несколько различных форм молекул PEI от различных коммерческих продавцов. Несмотря на то, что в нескольких случаях при изготовлении биологических продуктов (6) применяли линейный PEI небольшой молекулярной массы, например, 25-кДа линейный PEI, авторы изобретения предполагают, что разветвленный PEI может демонстрировать большую эффективность доставки для трансфекции разнообразных плазмид благодаря доступности разнообразных функциональных групп на молекуле. Среди различных оцененных молекул PEI в среде идентифицировали малый разветвленный PEI, PEI MAX (40000 кДа, Polyscience.com), приводящий к наивысшей

эффективности трансфекции адаптированных клеток НЕК293Т (Фигура 4). Оптимизируя состояние трансфекции с применением PEI MAX, авторы изобретения достигли стопроцентной трансфекции клеток (Фигура 5 Панель А). Предварительные

полуколичественные данные авторов изобретения показали, что лентивирусные векторы
были получены на уровне приблизительно 1×10^6 единиц трансдукции на мл в настоящем
способе производства. Насколько нам известно, авторы изобретения считают, что
методики, введенные в лаборатории авторов изобретения представляют первый
действительно масштабный способ производства лентивектора в системе
культивирования клеток в бессывороточной суспензии.

Дополнительные усилия были предприняты для улучшения удельной продуктивности
вектора. Оценивали такие параметры, как плотность клеток при трансфекции, общее
количество ДНК, применяемое для трансфекции, способы приготовления комплекса
ДНК/PEI, время сбора вектора. Адаптированные НЕК293Т клетки культивировали в
среде CD293 (дополненной 4 мМоль глутамина) до плотности $3E+06$ /мл; среду для
культивирования клеток заменили на SFM4Transfx-293 (дополненную 4 мМоль
глутамина) (HyClone™, ThermoScientific) посредством либо центрифугированием и
ресуспендированием, или с применением методики тангенциальной поточной
фльтрации, плотность клеток довели до $1,5E+06$ клеток в 1 мл и инкубировали в
инкубаторе. Для флакона с перемешиванием культуры клеток применяли 130 об/мин
и 8% CO₂. Всего использовали 12 мкг ДНК для трансфекции $1,5E+06$ клеток и ДНК
молярное отношение четырех плазмид составило 1:1:1:1. Полиэтиленимин «MAX»
(Polysciences.com) приготовили с применением Tris-буферного раствора в концентрации
1 мг/мл и pH, доведенного 7,15. К раствору PEI добавили смесь ДНК с массовым
отношением 1:1, и раствор осторожно перемешали и дополнительно недолго
инкубировали; коктейль смешанных ДНК/PEI дополнительно разбавили с применением
5 мМоль Tris-раствора, pH 7,15; итоговый объем разбавленного раствора ДНК/PEI
составил 1/15 среды культуры клеток, подлежащих трансфекции. Раствор ДНК/PEI
затем добавили к суспензии культуры клеток в объемной части, составляющей 1/15,
среду для культивирования клеток затем собирали через 48 часов, 72 часов и 96 часов
после трансфекции. Затем клетки НЕК293 трансдуцировали со сборами собранной
клеточной культуры и анализировали на экспрессию eGFP с применением FACS.
Наблюдали более крупный вектор производства, более чем $6E+06$ TU/мл получили из
планшетов и флаконов с перемешиванием, платформе для более масштабного
культивирования клеток.

Методики колоночной хроматографии широко используются в промышленности
для крупномасштабной очистки биологических материалов. В настоящее время
лентивекторы очищают либо посредством методик центрифугирования для осаждения
векторов (3), или посредством методик колоночной хроматографии для выделения
частиц (6). Способы на основе колоночной хроматографии решают проблемы
крупномасштабного производства, с применением методик классического
центрифугирования, однако, это все еще остается задачей для выделения лентивекторов
высокой чистоты. При обычной анионнообменной колоночной хроматографии
собранный лентивектор загружали в колонку, промытую низкой концентрацией соли
(такой как 100 мМоль NaCl), затем векторы элюировали высокосолевым буфером (от
650 мМоль NaCl до 1M NaCl) (6). С применением процедур хроматографии данного
типа было коэлюировано много клеточных белков (Фигура 8, строка 2). Авторы
изобретения сообщают о процедуре PEG-модулированной колоночной хроматографии
для очистки аденоассоциированных вирусных векторов (7), при этом чистота rAAV

вектора, выделенного при PEG-модулированной хроматографии, была значительно улучшена. Авторы изобретения предположили, что PEG-модулированная хроматография также может применяться для отделения лентивекторов от клеточных белков для улучшения чистоты вектора, поскольку отделение основывается на размерах молекул, даже если применяемые смолы не являются эксклюзионными смолами.

Способ PEG-модулированной колоночной хроматографии был разработан с применением быстропоточных смол DEAE-сефарозы. В результате данной процедуры лентивирусные векторы извлекали при более чем 95% единиц трансдукции, основываясь на FACS-анализе клеток, экспрессирующих eGFP (Фигура 5), при этом чистота вектор улучшена в 20 раз по сравнению с чистотой с применением традиционной колоночной хроматографии (Фигура 6 и 7). При том, что авторы изобретения использовали слабую анионнообменную смолу для усовершенствования протокола PEG-модулированной очистки лентивекторов, авторы изобретения верят, что принципы, стоящие в основе данного протокола, можно использовать для любой смолы для колоночной хроматографии, включая аффинную смолу, сильную и слабую анионнообменные, сильную и слабую катионнообменные и другие смолы, при условии, что вектор связывается со смолой. Основываясь на инновационной PEG-модулированной колоночной хроматографии, был разработан и полностью создан процесс масштабной очистки. Блок-схема процедур, описанных здесь, предоставлена на Фигуре 1.

Методики, описанные выше, представляют собой стадии полностью масштабируемого процесса, который позволит получать достаточные количества высококачественных rLenti векторов, которые необходимы для поддержки появляющихся впечатляющих способов клинического применения. Неожиданно, полученные способы и композиции rLV превосходят существующие объемы производительности лентивирусных векторов и удовлетворяют требованиям к качеству исследуемого продукта.

(57) Формула изобретения

1. Способ очистки рекомбинантного лентивирусного вектора (rLV), включающий:

- a) получение бессывороточной культуральной среды, содержащей суспензию клеток, продуцирующих векторы rLV, включающие трансген;
- b) сбор указанной бессывороточной суспензии культуры;
- c) очистку сбора стадии b) посредством фильтрации;
- d) сбор фильтрата со стадии c) и необязательно подвергание указанного фильтрата нуклеазному расщеплению для устранения примесей ДНК/РНК;
- e) подвергание фильтрата стадии d) PEG-модулированной анионнообменной колоночной хроматографии с получением посредством этого раствора указанных векторов rLV;
- f) дополнительную очистку векторов rLV, полученных на стадии e), посредством тангенциальной поточной фильтрации для уменьшения объема и буферного обмена;
- g) подвергание фильтрата стадии f) эксклюзионной колоночной хроматографии для получения раствора указанных дополнительно очищенных векторов rLV;
- h) подвергание раствора векторов rLV стадии g) тангенциальной поточной фильтрации для получения концентрированного раствора вектора rLV;
- i) фильтрацию концентрированного раствора вектора rLV, полученного на стадии h), с помощью фильтра с диаметром пор 0,2-0,5 мкм с получением очищенных векторов rLV; и
- j) хранение указанных очищенных векторов rLV.

2. Способ очистки рекомбинантного лентивирусного вектора (rLV), включающий:

а) получение бессывороточной культуральной среды, содержащей суспензию клеток, продуцирующих векторы rLV, включающие трансген;

б) сбор указанной бессывороточной суспензии культуры;

в) очистку сбора стадии б) посредством фильтрации;

5 д) подвергание очищенной суспензии стадии в) тангенциальной поточной фильтрации для уменьшения объема и буферного обмена;

е) сбор фильтрата со стадии д) и необязательно подвергание указанного фильтрата нуклеазному расщеплению для устранения примесей ДНК/РНК;

ф) подвергание фильтрата стадии е) PEG-модулированной анионнообменной

10 колоночной хроматографии с получением посредством этого раствора указанных векторов rLV;

г) подвергание векторов rLV, полученных на стадии ф) эксклюзионной колоночной хроматографии для получения раствора дополнительно очищенных векторов rLV;

15 х) подвергание раствора векторов стадии г) тангенциальной поточной фильтрации для получения концентрированного раствора вектора rLV;

и) фильтрацию концентрированного раствора вектора rLV, полученного на стадии х), с помощью фильтра с диаметром пор 0,2-0,5 мкм с получением очищенных векторов rLV; и

ж) хранение указанных очищенных векторов rLV.

20 3. Способ очистки рекомбинантного лентивирусного вектора (rLV), включающий:

а) получение бессывороточной культуральной среды, содержащей суспензию клеток, продуцирующих векторы rLV, включающие трансген;

б) сбор указанной бессывороточной суспензии культуры;

в) очистку сбора стадии б) посредством фильтрации;

25 д) подвергание очищенной суспензии стадии в) тангенциальной поточной фильтрации для уменьшения объема и буферного обмена;

е) сбор фильтрата со стадии д) и необязательно подвергание указанного фильтрата нуклеазному расщеплению для устранения примесей ДНК/РНК;

ф) подвергание фильтрата стадии е) PEG-модулированной анионнообменной

30 колоночной хроматографии с получением посредством этого раствора указанных векторов rLV;

г) дополнительную очистку векторов rLV, полученных на стадии ф), посредством тангенциальной поточной фильтрации для уменьшения объема и буферного обмена;

35 х) подвергание фильтрата стадии г) эксклюзионной колоночной хроматографии для получения раствора указанных дополнительно очищенных векторов rLV;

и) подвергание векторов стадии х) тангенциальной поточной фильтрации для получения концентрированного раствора вектора rLV;

ж) фильтрацию концентрированного раствора вектора rLV, полученного на стадии и), с помощью фильтра с диаметром пор 0,2-0,5 мкм с получением очищенных векторов

40 rLV; и

з) хранение указанных очищенных векторов rLV.

4. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный вектор rLV выбран из ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВИЧ-1/ВИЧ-2 псевдотипа, ВИЧ-1/SIV, FIV, лентивируса артроэнцефалита козлов (CAEV), вируса инфекционной анемии лошадей, вируса иммунодефицита

45 крупного рогатого скота, ВИЧ и их псевдотипов или вируса везикулярного стоматита G-псевдотипированного лентивируса (VSVG-псевдотипированного) вектора.

5. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный трансген кодирует нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из миРНК, нечувствительной молекулы и

микроРНК рибозима и коротких РНК, образующих шпильки.

6. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный трансген кодирует генный продукт, выбранный из группы, состоящей из инсулина, глюкагона, гормона роста (GH), паратиреоидного гормона (PTH), соматотропин-рилизинг-фактора (GRF),
 5 фолликулстимулирующего гормона (FSH), лютеинизирующего гормона (LH), человеческого хорионического гонадотропина (hCG), фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), ангиопоэтинов, ангиостатина, колониестимулирующего фактора гранулоцитов (GCSF), эритропоэтина (EPO), фактора роста соединительной ткани (CTGF), основного фактора роста фибробластов (bFGF), кислотного фактора роста фибробластов (aFGF),
 10 эпидермального фактора роста (EGF), трансформирующего ростового фактора- α (TGF α), фактора роста тромбоцитов (PDGF), инсулиноподобных факторов роста I и II (IGF-I и IGF-II), TGF β , активинов, ингибинов, костного морфогенетического белка (BMP), фактора роста нервной ткани (NGF), нейротрофического фактора головного мозга (BDNF), нейротрофинов NT-3 и NT4/5, цилиарного нейротрофического фактора
 15 (CNTF), нейротрофического фактора глиальной клеточной линии (GDNF), нейротурина, агрина, нетрина-1 и нетрина-2, фактора роста гепатоцитов (HGF), эфринов, ноггина, «звукового ежика» и тирозингидроксилазы.

7. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный трансген кодирует генный продукт, выбранный из группы, состоящей из тромбопоэтина (TPO), интерлейкинов (с
 20 IL-1 по IL-17), моноцитарного хемоаттрактантного белка, фактора, ингибирующего лейкоз, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора, лиганда Fas, факторов некроза опухоли α и β , интерферонов α , β и γ , фактора стволовой клетки, flk-2/flt3 лиганда, IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, химерных иммуноглобулинов, гуманизированных антител, одноцепочечных антител, рецепторов Т-клеток, рецепторов
 25 химерных Т-клеток, одноцепочечных рецепторов Т-клеток, рецепторов, связанных с G-белком (GPCRs), CCR5 и молекул МНС класса I и класса II.

8. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный трансген включает нуклеиновую кислоту, кодирующую белок, пригодный для коррекции врожденного нарушения обмена веществ, выбранный из группы, состоящей из карбамоилсинтетазы I,
 30 орнитинтранскарбамилазы, аргининосукцинатсинтетазы, аргининосукцинат-лиазы, аргиназы, фумарилацетоацетатгидролазы, фенилаланингидролазы, альфа-1 антитрипсина, глюкоза-6-фосфатазы, порфобилиногендезаминазы, Фактора V, Фактора VIII, Фактора IX, цистатионин-бета-синтетазы, разветвленной цепи кетоацидодекарбоксилазы, альбумина, изовалерил-КоА-дегидрогеназы, пропионил-КоА-карбоксилазы,
 35 метилмалонил-КоА-мутаза, глутарил-КоА-дегидрогеназы, инсулина, бета-глюкозидазы, пируваткарбоксилазы, печеночной фосфоорилазы, фосфоорилазы-киназы, глициндекарбоксилазы, белка, специфичного для пигментного эпителия сетчатки, с молекулярной массой 65 кДа (RPE65), Н-белка, Т-белка, последовательности трансмембранного регулятора муковисцидоза (CFTR) и последовательности дистрофина
 40 кДНК.

9. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный трансген кодирует генный продукт, выбранный из Фактора VIII и Фактора IX.

10. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный трансген кодирует опухолеспецифический антиген (ТАА).

45 11. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанный трансген кодирует генный продукт, выбранный из группы, состоящей из CAIX, CD19, CD20, CD20, CD22, CD30, CD33, CD44v7/8, CEA, EGF-RIII (варианта 3 рецептора эпидермального фактора роста) EGP-2, erb-B2, erb-B2, 3, 4, FBP, ацетилхолинового рецептора фетального типа, GD2,

Her2/neu, IL-13R-a2, KDR, к-легкой цепи, LeY, L1 молекулы клеточной адгезии, MAGE-A1, мезотелина, MUC1, NKG2D, раково-эмбрионального антигена (h5T4), PSCA, PSMA, mAb IgE, меченного ТАА, TAG-72 или VEGF-R2.

12. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанные векторы rLV продуцируются клетками млекопитающих.

13. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанные векторы rLV продуцируются клетками HEK293T (ATCC); HEK293F (Life Technologies); HEK293(ATCC); 293S (ATCC), ВНК (ATCC), ВНК-21 (ATCC), CHO (ATCC), CHO/dhFr- (ATCC)I или CHO K1 (ATCC).

14. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная бессывороточная суспензия культуры включает бессывороточную среду для выращивания клеток.

15. Способ по п. 14, в котором указанная бессывороточная среда для выращивания выбрана из: FreeStyle™293 (Gibco^R, Life Technologies), DMEM/F12 (Gibco^R, Life Technologies), SFM4Transfx-293 (HyClone™, ThermoScientific), CDM4HEK293 (HyClone™, ThermoScientific), StemPro-34SFM (Gibco^R, Life Technologies), FreeStyle F17 (Gibco^R, Life Technologies), 293SFM II (Gibco^R, Life Technologies) и CD293 (Gibco^R, Life Technologies).

16. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная нуклеаза включает эндонуклеазу, экзонуклеазу или их комбинации.

17. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная нуклеаза включает дезоксирибонуклеазу, рибонуклеазу или их комбинации.

18. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная нуклеаза включает бензоназу или ДНКазу.

19. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная анионнообменная колоночная хроматография включает сильную или слабую анионнообменную колоночную хроматографию.

20. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная анионнообменная колонка включает кватернизированную смолу на основе полиэтиленимина; или четвертичную аминую смолу.

21. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная анионнообменная колонка включает в себя смолу на основе полиэтиленимина; смолу на основе диэтиламиноэтила (DEAE); или смолу на основе диэтиламинопропила.

22. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная анионнообменная колонка включает смолу на основе гидроксиапатита ((Ca₅(PO₄)₃OH)₂); смолу на основе N-бензил-п-метилэтаноламина; или смолу на основе октиламина.

23. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанная PEG-модулированная анионнообменная колоночная хроматография включает:

i) регулирование фильтрата стадии d) или e) к связывающему раствору, при этом указанный связывающий раствор необязательно включает PEG, и приведение в контакт указанного фильтрата с анионнообменной колонкой со связыванием таким образом векторов rLV с анионнообменной колонкой,

ii) отмывание связанных векторов rLV для устранения примеси отмывающим раствором, включающим PEG, или раствором, включающим в себя PEG и соль; и

iii) элюирование векторов rLV из анионнообменной колонки элюирующим раствором.

24. Способ по п. 23, в котором указанный связывающий раствор включает PEG в количестве от приблизительно 0% до 10% вес/объем, или от приблизительно 0% до 5% вес/объем, или от приблизительно 0% до 2% вес/объем.

25. Способ по п. 23, в котором указанный связывающий раствор включает PEG, имеющий молекулярную массу от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 40000

кДа.

26. Способ по п. 23, в котором указанный отмывающий раствор включает PEG в количестве от приблизительно 1% до 10% вес/объем, или от приблизительно 1% до 5% вес/объем, или от приблизительно 1% до 2% вес/объем.

5 27. Способ по п. 23, в котором указанный отмывающий раствор включает PEG, имеющий молекулярную массу от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 40000 кДа.

28. Способ по п. 23, в котором указанный элюирующий раствор включает PEG в количестве от приблизительно 0% до 20% вес/объем.

10 29. Способ по п. 23, в котором указанный элюирующий раствор включает PEG, имеющий молекулярную массу от приблизительно 2000 кДа до приблизительно 40000 кДа.

30. Способ по п. 23, в котором указанный связывающий, отмывающий или элюирующий раствор дополнительно включает соль.

15 31. Способ по п. 23, в котором указанный элюирующий раствор включает соль в количестве от приблизительно 500 мМоль до приблизительно 1000 мМоль.

32. Способ по п. 30 или 31, в котором указанная соль включает натрия хлорид или калия хлорид.

20 33. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанную стадию фильтрации i) осуществляют через фильтр с диаметром пор 0,20 мкм.

34. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанную стадию фильтрации i) осуществляют через фильтр с диаметром пор 0,22 мкм.

35. Способ по любому из пп. 1-3, в котором указанную стадию фильтрации i) осуществляют через фильтр с диаметром пор 0,45 мкм.

25 36. Способ по любому из пп. 1-3, в котором получают приблизительно 5×10^5 инфекционных единиц (IU)/мл указанных очищенных векторов rLV.

37. Способ по любому из пп. 1-3, в котором получают приблизительно 6×10^6 инфекционных единиц (IU)/мл указанных очищенных векторов rLV.

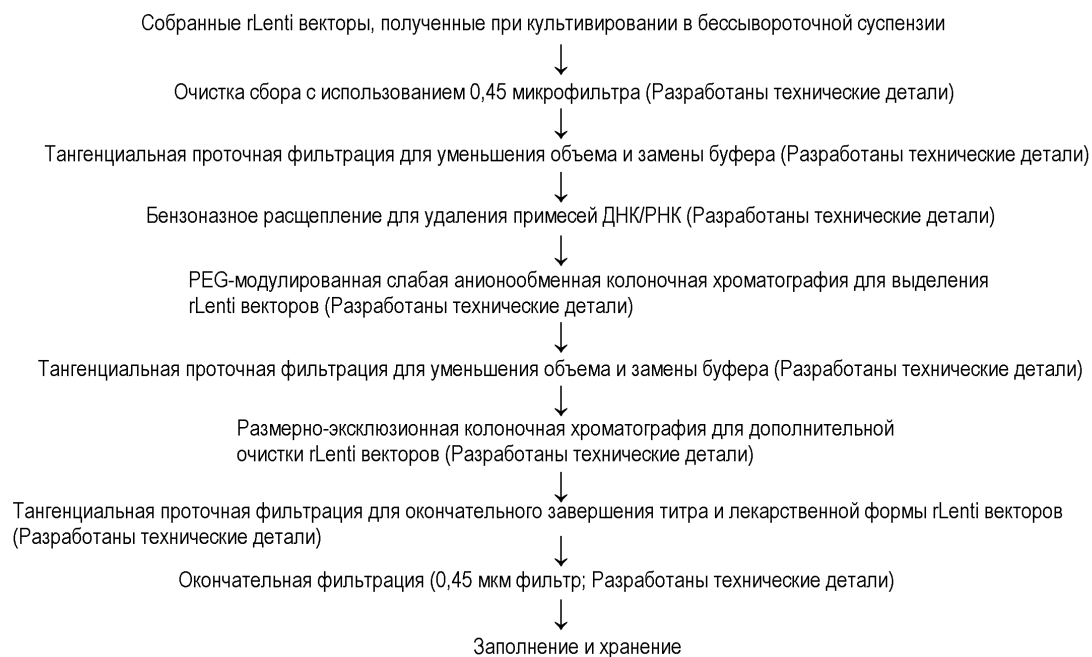
30 38. Способ по любому из пп. 1-3, в котором получают приблизительно 3×10^8 инфекционных единиц (IU)/мл указанных очищенных векторов rLV.

35

40

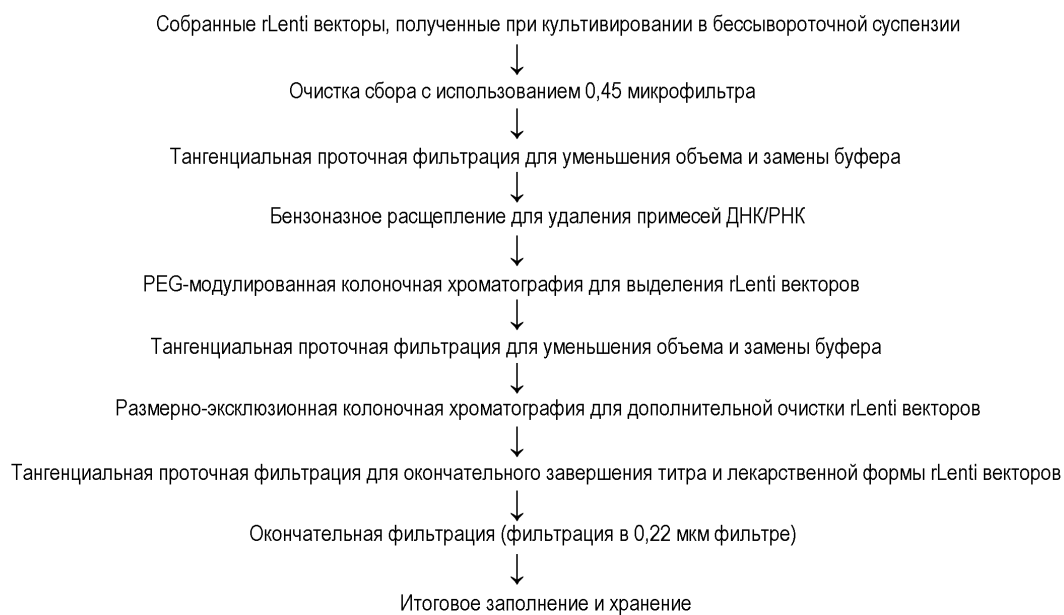
45

1 / 9



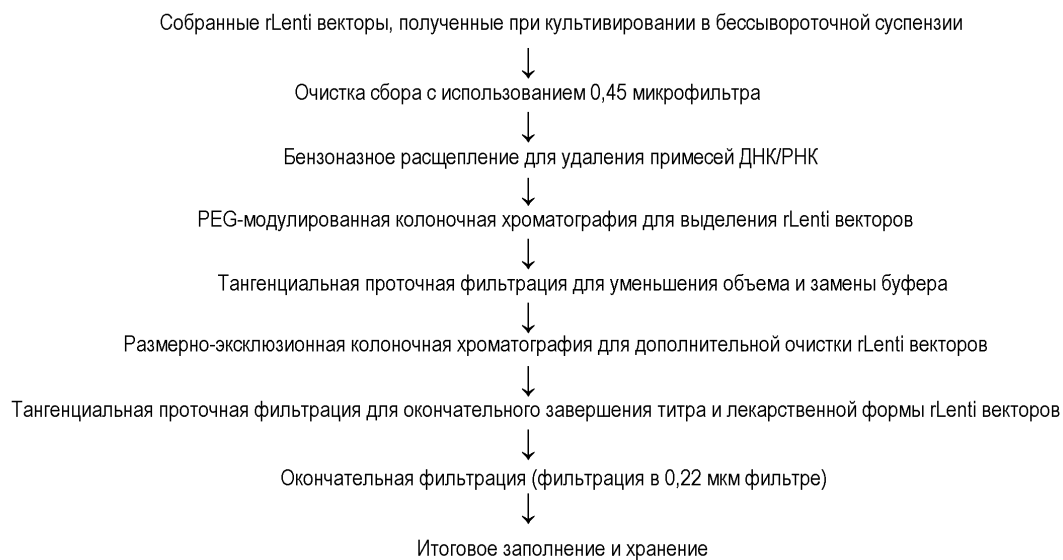
Фиг. 1А

2 / 9



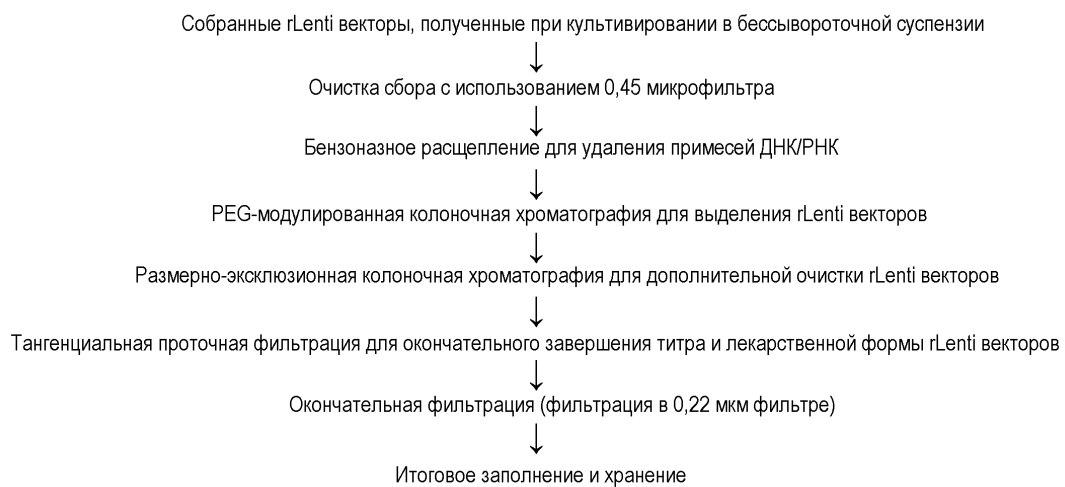
Фиг. 1В

3 / 9

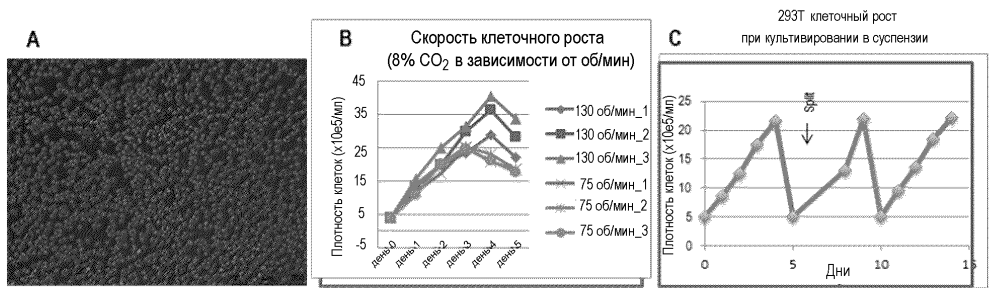


Фиг. 1С

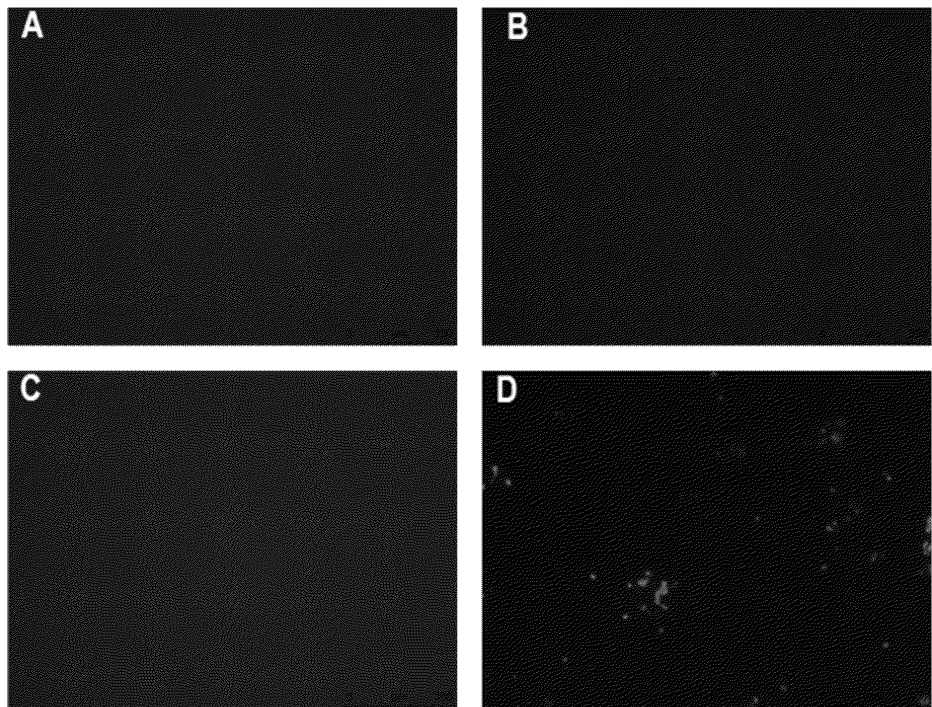
4 / 9



Фиг. 1D

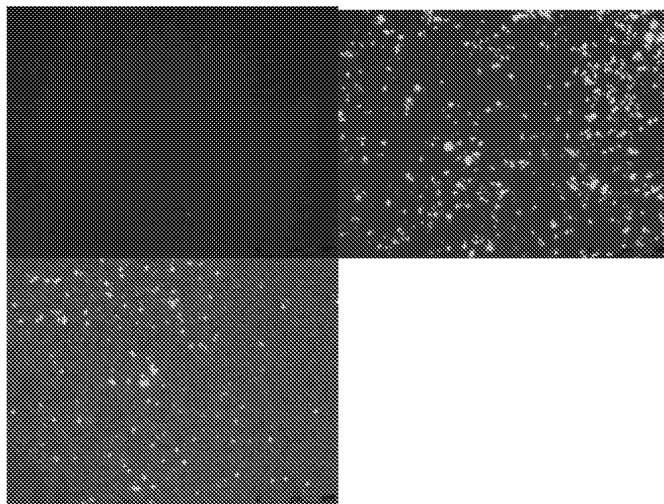


Фиг. 2

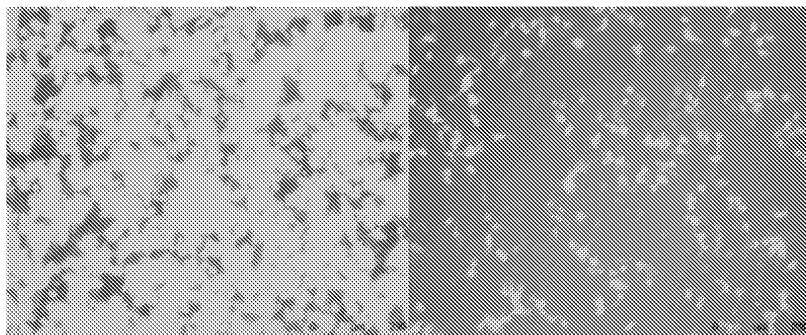


Фиг. 3

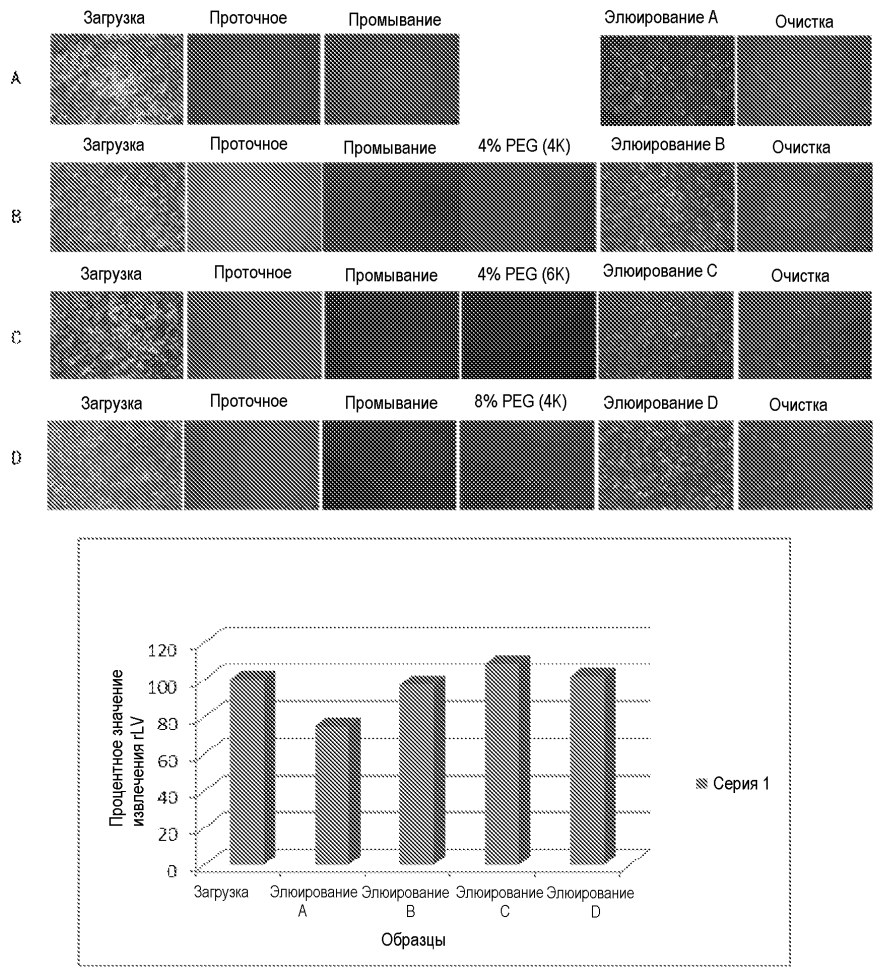
6 / 9



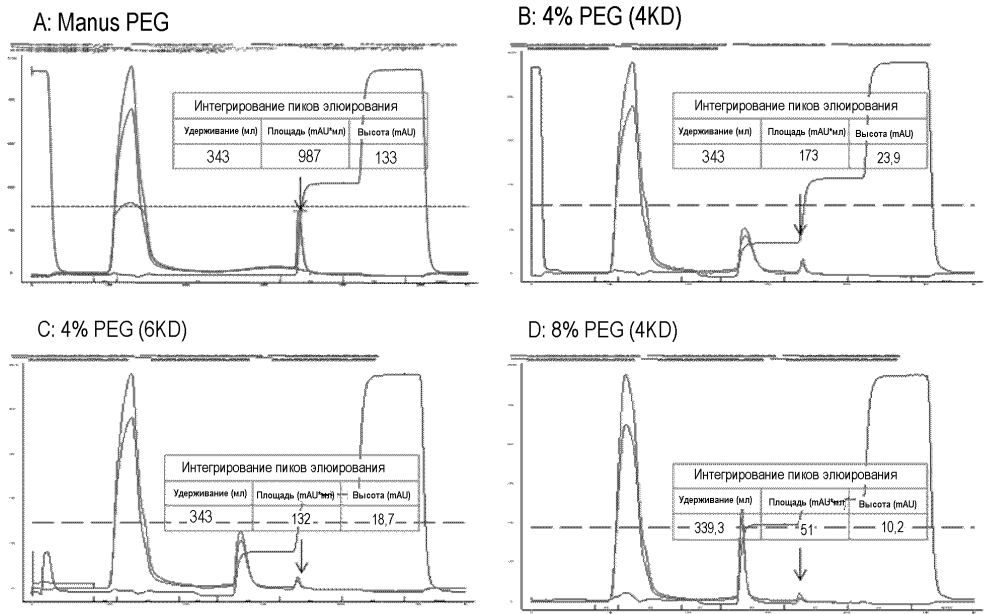
Фиг. 4



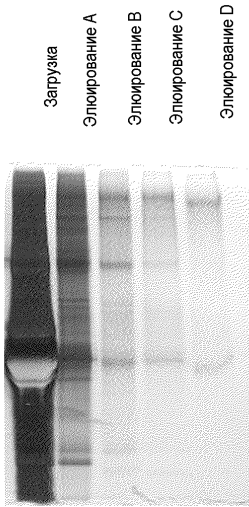
Фиг. 5



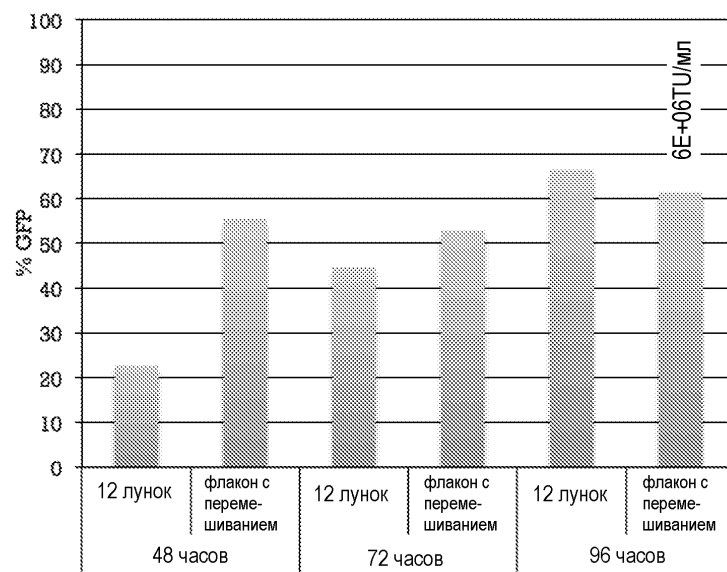
Фиг. 6



Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9