

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

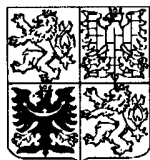
zveřejněná podle § 31 zákona č. 527/1990 Sb.

(21) Číslo dokumentu:

419-97

(19)

ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **11. 02. 97**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **13.02.96**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **96/19605279**

(33) Země priority: **DE**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **17. 09. 97**
(Věstník č. 9/97)

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.⁶:

C 12 N	15/79
C 12 N	15/63
C 12 N	15/85
A 61 K	38/19
A 61 K	39/395
A 61 K	39/42

(71) Přihlášovatel:

HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT,
Frankfurt am Main, DE;

(72) Původce:

Sedlacek Hans Harald prof. dr., Marburg,
DE;

Klenk Hans Dieter prof. dr., Linden, DE;

Kissel Thomas prof. dr., Marburg, DE;

Müller Rolf prof. dr., Marburg, DE;

(74) Zástupce:

Kubát Jan Ing., Přístavní 24, Praha 7,
17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Specifické vektory pro zavedení genů do
cílových buněk, léčiva obsahující takové
vektory a jejich použití**

(57) Anotace:

Popisují se specifické vektory pro zavedení alespoň jednoho genu do cílových buněk některého organismu, přičemž tyto vektory mají následující komponenty: a) nevirový nosič přenášeného genu b) ligand, který je schopen specifické vazby na požadované cílové buňky c) protein umožňující fúzi vektoru s buněčnou membránou a sloužící k proniknutí vektoru do cytoplasmy cílové buňky d) přenášený gen. Tyto vektory najdou uplatnění především v genové terapii.

CZ 419-97 A3

419-97

PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	URAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ	18. III. 97	DOŠLO	2113	č.j.
PŘÍL.					

Specifické vektory pro zavedení genů do cílových buněk, léčiva obsahující takové vektory a jejich použití

Oblast techniky

Vynález se týká specifických vektorů pro zavedení genů do cílových buněk, které jsou velmi výhodné pro genovou terapii. Genovou terapií vložený cizí gen má nahradit nebo vyřadit z činnosti defektní gen v cílových buňkách, nebo přinutit cílové buňky k produkci proteinu, který má profylaktické nebo terapeutické účinky.

Dosavadní stav techniky

Ze stavu techniky jsou dobře známy vektory pro použití v eukaryotických organismech, které byly zkonstruovány na virovém základě. Viry se specificky váží na povrchové proteiny cílových buněk, poté jsou pohlceny endozómem. Po proniknutí membránou endozómu vstupují do cílové buňky. Díky tomu lze použít virů jakožto nosičů k přenesení cizí genetické informace do buňky. Tyto způsoby a jejich variace, jakož i v nich použité viry jsou již známy, viz Hodgson, Bio/Technology 3, strana 222, (1995); Jolly, Cancer Gene Therapy 1, strana 51, (1994).

Podstatou této technologie je nahrazení části virového genomu požadovanými cizími geny za vzniku virového vektoru. Takovéto virové vektory zpravidla nejsou schopny normálního rozmnožování. K rozmnožování těchto virových vektorů jsou zapotřebí všechny geny kódující proteiny virového obalu a geny regulující expresi virového genomu.

Použití virových vektorů, zvláště pak u člověka, může přinést některé problémy. Existuje například nebezpečí rekombinace s divokými viry stejného druhu za vzniku patogenních virů. Dále mohou proteiny virového obalu vyvolat v hostiteli imunitní reakci. V případě, že se v buňce virové

vektory integrují stejným způsobem jako odpovídající viry divokého typu, vzniká nebezpečí mutací genů na hostitelském chromozómu (aktivace neexprimovaných genů, poškození aktivních genů).

Další nevýhodou virových vektorů je jejich omezená přenosová kapacita, která je daná malými rozměry samotného viru.

S ohledem na tato omezení a nebezpečí spojená s požitím virových vektorů byly již dříve zkoumány způsoby pro zavedení genetické informace do buněk bez použití virů. Podstatou těchto způsobů je, že se negativně nabitý gen rozpustí v negativně nabitě buněčné membráně tak, aby byl gen pohlcen buňkou a mohl poté proniknout endozomální respektive lysozomální membránou. Toto rozpuštění genu v buněčné membráně je vedle fyzikálních (uzavření genových partikulí, osmotická, tepelná nebo elektrická modifikace buněčné membrány) nebo chemických (organická rozpouštědla, detergenty, enzymy) způsobů modifikace buněčné membrány umožněno vyvinutím vhodných nosičů této genetické informace. Takovými vhodnými nosiči jsou například lipozómy, kationtové polypeptidy, dendrimerní polymery nebo kationtové amfifilní látky (viz Behr, Bioconjugate Chem. 5, strana 382 (1994), Afione a další, Clin. Pharmakokinet. 28, strana 181 (1995) a Felgner, Adv. Drug Delivery Rev. 5, strana 163 (1990)).

Velký význam pro přenos genů mají zejména syntetické amfifilní kationty jako například dioleoyloxypropyltri-methyl ammoniumbromid (DOTMA) ve směsi s dioleoylfosfatitdylethenol aminem (DOPE) nebo lipopolyaminem (viz viz Behr, Bioconjugate Chem. 5, strana 382 (1994)).

Přebytek kladného náboje způsobený těmito amfifilními látkami respektive směsmi umožní vznik komplexu jinak negativně nabitě DNA s negativně nabitým buněčným povrchem.

Amfifilní charakter tohoto nosiče pak vede k fúzi s buněčnou membránou.

Nicméně cílená transfekce pomocí těchto činidel je méně účinná než při použití virových vektorů. Navíc, jsou-li komplexy DNA a nevirového nosiče s přebytkem kladného náboje po aplikaci in vivo neutralizovány přirozenými látkami se záporným nábojem (proteiny, heparin atd.) dojde k oslabení vazby těchto komplexů na povrch buňky.

Podstata vynálezu

Vynález je založen na skutečnosti, že buňky mohou přijímat genetickou informaci endocytózou. Po endocytóze zpravidla dochází k enzymatickému odbourání cizích genů v endozómech respektive v lysozómech. Translačně exprimovat se mohou pouze ty geny, které se vyhnou tomuto enzymatickému rozkladu a podaří se jim proniknout endozomální respektive lysozomální membránou do cytoplazmy a/nebo do buněčného jádra. Při použití specifických vektorů podle vynálezu dojde k lokálnímu zvýšení koncentrace těchto vektorů u cílové buňky, že se některým vektorům se specifickými ligandy podaří proniknout dovnitř cytoplazmy

Předmětem vynálezu jsou specifické vektory pro zavedení alespoň jednoho genu do cílových buněk některého organismu, které sestávají z následujících komponent:

- a) nevirový nosič přenášeného genu
- b) ligand, který je schopen specifické vazby na požadované cílové buňky
- c) protein umožňující fúzi vektoru s buněčnou membránou a sloužící k proniknutí vektoru do cytoplazmy cílové buňky
- d) přenášený gen

Ve vektorech podle vynálezu jsou jednotlivé komponenty specifického vektoru udržovány pohromadě kovalentní vazbou nebo působením slabých vazebných interakcí (adsorbací).

Nevirové nosiče genů (a) použité ve vektoru podle vynálezu jsou výhodně proteiny, polypeptidy, polysacharidy, fosfolipidy, kationické lipidy, glykoproteiny, lipoproteiny nebo lipopolyaminy, které se mohou díky svým pozitivně nabitým skupinám stát kationty. Vazby mezi nevirovým nosičem a pozitivně nabitými postranními řetězci je dosaženo pomocí kovalentní vazby nebo adsorbací. Díky dodatečné adsorbční nebo kovalentní vazbě lipofilních postranních skupin může nosič získat další amfifilní vlastnosti.

Ve velmi výhodném provedení vynálezu je jako nevirového nosiče (a) použito albuminu nebo xylanu.

Ligandy (b) podle vynálezu se mohou specificky vázat na membrány zvířecích nebo lidských buněk.

Ve výhodném provedení vynálezu se může ligand (b) specificky vázat na buňky endothelu a je vybrán ze skupiny tvořené monoklonálními protilátkami se specifitou k endotheliálním buňkám, nebo jejich fragmenty, glykoproteiny, glykolipidy nebo polysacharidy obsahujícími sacharidové řetězce zakončené manózou, cytokiny, růstovými faktory, adhezivními molekulami a ve velmi výhodném provedení vynálezu obalovými glykoproteiny virů, které mají afinitu k endotheliálním buňkám.

V jiném výhodném provedení vynálezu se může ligand (b) specificky vázat na buňky hladkého svalstva a je vybrán ze skupiny tvořené monoklonálními protilátkami se specifitou k aktinu nebo buněčným membránovým receptorům, nebo jejich fragmenty, růstovými faktory nebo ve velmi výhodném provedení vynálezu obalovými glykoproteiny virů, které mají afinitu k hladkým svalovým buňkám.

V jiném výhodném provedení vynálezu se může ligand (b) specificky vázat na makrofágy a/nebo na lymfocyty a je vybrán ze skupiny tvořené monoklonálními protilátkami se specifitou k membránovým antigenům na povrch makrofágů a/nebo lymfocytů, intaktními imunoglobuliny nebo Fc fragmenty polyklonálních nebo monoklonálních protilátek specifických k membránovým antigenům makrofágů a/nebo lymfocytů, cytokiny, růstovými faktory, peptidy, proteiny, lipidy nebo polysacharidy obsahujícími sacharidové řetězce zakončené manózou a nebo ve velmi výhodném provedení vynálezu obalovými glykoproteiny virů. Zvláště výhodný je pak protein HEF z influenza-C viru (chřipkový virus typu C) mutovaný na nukleotidové pozici 872 nebo štěpný produkt proteinu HEF influenza-C viru, který obsahuje katalytickou triádu serin-71, histidin-368 nebo 369 a kyselinu asparagovou 261.

V jiném výhodném provedení vynálezu se může ligand (b) specificky vázat ke gliovým buňkám a je vybrán ze skupiny tvořené protilátkami se specifitou k membránovým strukturám gliových buněk nebo jejich fragmenty. Do této skupiny dále patří adhezivní molekuly, peptidy, proteiny, lipidy nebo polysacharidy obsahující sacharidové řetězce zakončené manózou, růstové faktory a ve zvláště výhodném provedení vynálezu obalové glykoproteiny virů s afinitou ke gliovým buňkám.

V dalším výhodném provedení vynálezu se může ligand (b) specificky vázat na krvetvorné buňky a je vybrán ze skupiny tvořené protilátkami se specifitou k některému receptoru pro faktor kmenových buněk, k receptoru pro IL-1 (zvláště pak k receptoru typu I nebo II), k receptoru pro IL-3 (zvláště pak k receptoru typu α nebo β), k receptoru pro IL-6 nebo GM-CSF. Do této skupiny dále patří intaktní imunoglobuliny nebo Fc fragmenty protilátek s výše uvedenou specifitou a dále pak růstové faktory jako SCF, IL-1, IL-3, IL-6 nebo GM-SCF, jakož i jejich fragmenty schopné vazby na příslušné receptory.

V jiném výhodném provedení vynálezu se může ligand (b) specificky vázat na leukemické buňky a je vybrán ze skupiny tvořené protilátkami, fragmenty protilátek, imunoglobuliny nebo Fc-fragmenty, které vykazují specifickou vazbu k membránovým strukturám na povrchu leukemických buněk jako jsou například CD13, CD14, CD15, CD33, CAMAL, Sialosyl-Le, CD5, CD1e, CD23, M38, IL-2 receptory, T-buněčné receptory, CALLA nebo CD19, jakož i růstové faktory či jejich fragmenty nebo retinoidy.

V jiném výhodném provedení vynálezu se může ligand (b) specificky vázat na buňky infikované virem a je vybrán ze skupiny tvořené protilátkami, fragmenty protilátek, intaktními imunoglobuliny nebo Fc-fragmenty, které vykazují specifickou vazbu k virovým antigenům, které se po infekci tímto virem exprimují na povrchu infikované buňky.

Konečně, specifickým ligandem (b) podle vynálezu může být takový ligand, který se specificky váže na buňky bronchiálního epitelu, jaterní sinusoidální buňky, jaterní buňky. Tento ligand je výhodně vybrán ze skupiny tvořené transferinem, asialoglykoproteiny jako asialoorosomukoidem, neoglykoproteinem, galaktózou, inzulinem, nebo peptidy, proteiny, lipidy nebo polysacharidy nesoucími manózové zbytky, dále pak intaktními imunoglobuliny nebo Fc-fragmenty, které se specificky vážou na cílové buňky a ve zvláště výhodném provedení vynálezu obalovými glykoproteiny virů s afinitou k cílovým buňkám.

Ve výhodném provedení vynálezu je protein umožňující fúzi vektoru s buněčnou membránou (c) vybrán ze skupiny tvořené hemaglutininem influenza-A nebo B viru, komponentou HA2 hemaglutininu influenza-A nebo B virů jakož i jejich peptidovými analogy, M2 proteinem influenza-A viru, proteinem HEF influenza-C viru, transmembránovými proteiny filovirů jako jsou virus Marburg nebo Ebola, transmembránovými glykoproteiny viru vztekliny, vesikulární stomatitidy, Semliki Forest viru,

viru klíšťové encefalitidy, penetračním proteinem viru HIV, viru Sendai (zvláště pak jeho F1 komponentou) nebo viru respirační syncytialidy (zvláště pak jeho komponentou gp37), jakož i fragmenty těchto virových proteinů nebo transmembránových glykoproteinů, které obsahují odpovídající fúzogenní peptidy.

Ve výhodném provedení vynálezu je přenášený gen (d) ve formě plazmidu.

Vektory podle vynálezu mohou být použity jako léčiva nebo jako součásti léčiv, přičemž ve výhodném provedení vynálezu jsou tyto vektory použity k přípravě léčiva pro interavenózní, intraarteriální, intraportální, intrakraniální, intrapleurální, intraperitoneální nebo lokální zavedení požadovaného genu do určité cílové buňky.

Parenterálním, výhodně pak intravenózním nebo intraarteriálním podáním vektorů podle vynálezu je dosaženo zvýšení koncentrace těchto vektorů na povrchu cílové buňky, čímž se může zvýšit i transfekční rychlost této buňky. Této výhody podle vynálezu je dosaženo synergickým působením jednotlivých, navzájem spojených komponent vektoru podle vynálezu.

Specifické ligandy podle vynálezu vykazují vysokou specifitu pro zvolené cílové buňky. Ve výhodném provedení vynálezu se jedná o obalové proteiny viru, který je specifický pro tento druh buněk. Konkrétní obalový virový protein se vybírá podle požadované cílové buňky. Tím, že se tyto specifické ligandy, zvláště pak virové obalové proteiny, navážou na nosič požadovaného genu, je dosaženo toho, že se požadovaný gen pomocí těchto specifických nosičů naváže na povrch cílové buňky a je na této bunce přítomen ve vysoké koncentraci.

Nevirové nosiče genetické informace jsou ve výhodném provedení vynálezu takové sloučeniny, o kterých je známo, že

mají v krevním oběhu dlouhý poločas rozpadu. Díky této dlouhé periodě, se zvyšuje expozice cílových buněk vysoce koncentrovaným vektorem podle vynálezu, čímž je dosaženo maximální možné vazby vektoru na povrch cílových buněk pomocí specifických ligandů. Ve zvláště výhodném provedení vynálezu nesou tyto nevirové nosiče kladný náboj, takže může dojít k tvorbě komplexů se záporně nabitou DNA.

Dále obsahují vektory podle vynálezu proteiny (fúzogenní) umožňující penetraci endozomální nebo lysozomální membrány a průnik vektoru do cytoplazmy hostitelské buňky. Fúzogenní proteiny podle vynálezu jsou takové proteiny, které umožní vstup vektoru do cytoplazmy cílové buňky. Takové fúzogenní proteiny jsou známy především u virů.

Přenášený gen může být ve formě nukleové kyseliny kódující požadovaný gen, který je doplněn odpovídajícími řídicími oblastmi jako jsou promotory a tak podobně. Ve výhodném provedení vynálezu je přenášený gen ve formě plazmidu.

Nevirové nosiče vhodné pro použití podle vynálezu jsou samy o sobě již známy. Nevirové nosiče jsou přehledně popsány, viz Cotten a další, Curr. Biol. 4, strana 705 (1993); Behr, Acc. Chem. Res. 26, strana 274 (1993); Felgner, Adv. Deliv. Rev. 5, strana 163 (1990); Behr, Bioconjugate Chem. 5, strana 382 (1994); Ledley, Hum. Gene Ther. 6, strana 1129 (1995). Ve výhodném provedení vynálezu jsou použity lipozómy, kationtové lipozómy. Tyto lipozómy lze připravit ze směsi kationtových lipidů jako jsou stearylaminy a neutrálních fosfolipidů, nebo ze směsi dioktadecyldimethyl-amonium bromidu (DDA) a neutrálních fosfolipidů. Dále je ve výhodném provedení vynálezu možno použít N[1(2,3,-dioleyloxy)-propyl]-N,N,N-trimethylamonium bromid (DOTMA), 3β[N-(N',N'-dimethylamino-ethan)-carbonyl] cholesterol (DC-Chol), 1,2,-Dimyristyloxy-propyl-3-dimethyl-hydroxyethyl-

amoniumbromid (DMRIE), dimethyldioktadecyl- amoniumbromid (DDAB), 1,2,-Dioleoyloxy-3-(trimethylamonio)- propan (DOTAP).

Jako nevirové nosiče mohou být rovněž použity kationtové polypeptidy a proteiny například polylysin, protaminsulfát, histony, polyornithin, polyarginin nebo kationtové amfifilní lipopolyaminy jako například dioctadecylamidoglycylspermin (DOGS), dipalmitoylfosfati- dylethanolamidospermin (DPPES), N-t-Butyl-N'- tetradecyl- 3-tretradecyl- aminopropionamid (diC14-amidin), DoTB, ChoTB, DoSC, ChoSC, LPLL, DEBDA, DTAB, TTAB, CTAB nebo TMAG nebo samčí kationtové polysaccharidy jako například diethylaminoethyl-dextran jakož i kationtové organické polymery jako je například polybren.

V dalším výhodném provedení vynálezu mohou být pro zvýšení účinnosti transfekce kationtové lipidy a lipopolyaminy (v komplexu s DNA) doplněny příměsí neutrálních fosfolipidů jako je dioleoylfosfatidylathanolamin (DOPE).

Ve zvláště výhodném provedení vynálezu jsou nevirové nosiče sloučeniny, jejichž základními stavebními složkami jsou kationtové, nebo kationty tvořící, polypeptidy, proteiny, glykoproteiny, lipoproteiny, nebo polysaccharidy rozpustné ve vodě, které zavedením doplňkové lipofilní skupiny získají amfifilní charakter. Takovými vhodnými základními stavebními složkami jsou především ve vodě rozustné nosiče jako jsou proteiny, glykoproteiny, lipoproteiny nebo polysaccharidy. V obzvláště výhodném provedení vynálezu je takovým nosičem albumin nebo xylan.

Kationtové skupiny jsou takové strukturní jednotky s kladným nábojem, které se mohou vázat na základní sloučeninu. Výhodně se jedná o skupiny, které mají za fyziologických podmínek kladný náboj jako třeba amino-, guanidino-, nebo imidazolylové skupiny. Takovéto kationtové skupiny lze na základní sloučeninu navázat známými způsoby. Například aminioskupinu lze navázat pomocí diaminů jako je například

ethylen diamin nebo hexamethylendiamin. Volné aminoskupiny mohou být také methylovány pomocí methyloididu, nebo mohou podstoupit reakci s jednostranně chráněným glutaraldehydem (chráněno Girardovým T činidlem, Roser, Dizertační práce, Bazilej, 1990).

Vložení guanidinové nebo imidazolové skupiny lze dosáhnout reakcí odpovídající bazické aminokyseliny následujícím způsobem. Výhodné je navazování na albumin pomocí glutaraldehydu (viz Roser, Dizertační práce, Bazilej, 1990).

Množství přidávaných kationtových skupin závisí na velikosti záporného náboje v daném genu, respektive v sekvenci nukleotidů, s nimiž má tento nosič vytvořit komplex. Ve výhodném provedení vynálezu je celkový náboj nosiče neutrální nebo kladný.

Za lipofilní skupiny lze považovat libovolné funkční skupiny, které vedou ke zvýšení rozpustnosti v organických rozpouštědlech, jako je například oktanol.

Lipofilní skupiny jsou vhodné například nenasycené mastné kyseliny jako je kyselina olejová, která je použitelná ve formě esterů, chloridu kyseliny olejové a anhydridu.

Zavádění lipofilních skupin se provádí známými způsoby konjugace, jako například acylací, (tzn. substitucí chloridů, anhydridů a esterů kyselin primárními a sekundárními aminy, viz Seebach, Agnew. Chemie 81, strana 690, (1969) a Satchell, Quart. Rev. 19, strana 160 (1963)).

Množství zavedených lipofilních skupin závisí na lipofilním charakteru základní sloučeniny.

Jako ligandů se specifickou vazbou k požadovaným cílovým buňkám lze použít velké množství chemických struktur. Výběr konkrétního ligandu se řídí požadovanou cílovou buňkou, pro kterou má být specifický připravovaný vektor. Zpravidla se jedná o proteiny, polypeptidy nebo glykoproteiny, které mají

vysokou specifickou afinitu k součástem membrán na vybrané cílové buňce. Podle vynálezu mohou být, v závislosti na cílové buňce, použity následující ligandy:

- 1) Ligandy pro endotheliální buňky
- a) nevirové ligandy

Jako ligandy slouží látky, které se přednostně vážou na vnější povrch endotheliálních buněk, ve výhodném provedení vynálezu pak proliferujících endotheliálních buněk. Takové látky mohou být monoklonálními protilátkami se specifitou k membránovým strukturám endotheliálních buněk, nebo jejich fragmenty, viz například Burrows a další (Farmac. Ther. 64, strana 155 (1994)); Hughes a další (Cancer Res. 49, strana 6214 (1989)) a Maruyama a další, (PNAS-USA 87, strana 5744 (1990)). Do této skupiny patří zvláště pak protilátky proti receptorům VEGF.

Je výhodné použít myší monoklonální protilátky v jejich humanizované podobě. Humanizaci protilátek je možné uskutečnit podle prací Winter a další (Nature 349, strana 293 (1991)) a Hoogenbooms a další (Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, 19 (1993)). Fragmenty protilátek se připraví způsobem známým ze stavu techniky, viz například Winter a další, Nature 349, strana 293 (1991); Hoggenbooms a další, Rev. Tr. Transfus. Hemobiol. 36, strana 19 (1993); Girol, Mol. Immunol. 28, strana 1379 (1991)) nebo Huston a další, Intern. Rev. Immunol.10, strana 195 (1993).

Mezi ligandy podle vynálezu patří dále všechny účinné látky, které se mohou vázat na membránové struktury nebo membránové receptory endotheliálních buněk. Do této skupiny látek patří například kinin a jeho analogy nebo homology, které jsou schopny vazby na kininové receptory, dále látky, které obsahují manózu na konci sacharidového řetězce, dále pak růstové faktory nebo jejich fragmenty respektive části jejich sekvencí, které se exprimují na receptorech a jsou vázány

endotheliálními buňkami. Takovými sloučeninami jsou například PDGF, bFGF, VEGF, TGF β (Pusztain a další, J. Pathol. 169, strana 191, (1993)). Dále je do této skupiny možno přiřadit adhezivní molekuly, které se vážou na aktivované a/nebo proliferující endotheliální buňky. Takovéto adhezivní molekuly jako například SLex, LFA-1, MAC-1, LECAM-1 nebo VLA-4 jsou již známy ze stavu techniky (viz Augustin-Voss a další, J. Cell. Biol. 119, strana 483 (1992); Pauli a další, Cancer Metast. Rev. 9, strana 175 (1990); Honn a další, Cancer Metast. Rev. 11, strana 353 (1992)).

b) Ligandy virového původu

- Ligandy virového původu podle vynálezu jsou především obalové glykoproteiny virů s afinitou k endotheliálním buňkám. K takovým virům náleží například:

- Filoviry, například

virus Marburg: jeho obalový glykoprotein GP (GlycoProtein) a druhý glykoprotein sGP (second GlycoProtein) jsou popsány, viz Kiley a další, J. General Virology 69, strana 1957 (1988); Will a další, J. Virol. 67, strana 1203 (1993); Schnittler a další, J. Clin. Invest. 91, strana 1301 (1993); Feldmann a další, Virus Res. 24,1 (1992)

virus Ebola: rovněž jeho obalové proteiny GP a sGP jsou posány, viz Schnittler a další, J. Clin. Invest. 91, strana 1301 (1993); Volchov a další, Virol. 214, strana 421 (1995); Jahrling a další, Lancet 335, strana 502 (1990), Feldmann a další, Arch. Virol. 7, strana 81 (1993); Geisbert a další, J. Comp. Path. 106, strana 137 (1992)

- cytomegalovirus: zvláště jeho gB-protein (Waldman a další, Transplant. Proc. 27, strana 1269 (1995); Sedmak a další, Transplant. 58,1379 (1994); Sedmak a další, Archives

Viol.140, strana 111 (1995); Koskines, Transplant. 56, strana 1103 (1993); Scholz a další, Hum. Immunol. 35, strana 230 (1992), Alcamí a další, J. Gen. Virol. 72, strana 2765 (1991); Poland a další, J. Infect. Dis.162, strana 1252 (1990); Ho a další, J. Infect. Dis.150, strana 956 (1984); Spaete a další, J. Virol. 64, 2922 (1990)

- herpes simplex-virus typu I: viz Etingin a další, PNAS 90, strana 5153 (1993); Key a další, Lab. Invest. 68, strana 645 (1993); Kubota a další, J. Immunol.138, strana 1137 (1987)
- virus HIV-1: viz Scheylovitova a další, Arch. Virol.140, strana 951 (1995); Lafon a další, AIDS 8, strana 747 (1994); Re a další, Microbiologica 14, strana 149 (1991)
- virus spalniček: viz Mazure a další, J. Gen. Virol. 75, strana 2863 (1994)
- virus Hantaan: viz Pensiero a další, J. Virol. 66, strana 5929 (1992); Zhu, Chinese Med. J. 68, strana 524 (1988)
- Alfaviry, jako je Semliki Forest-Virus: viz Jakob, J. Med. Microbiol. 39, strana 26 (1993)
- virus epidemické haemorrhagické horečky: viz Yi, Chinese J. Pathol. 21, strana 177 (1992)
- Poliovirus: viz Condere a další, Virol.174, strana 95 (1990))
- Enteroviry: jako například Echo 9, Echo 12, Cochsackie B3 viz Kirkpatrick a další, Am. J. Pathol.118, strana 15 (1985).

2) Ligandy vhodné pro hladké svalové buňky

a) Nevirové ligandy

Jako ligandů podle vynálezu může být použito například protilátek připravených proti membránovým strukturám hladkých svalových buněk, nebo jejich fragmentů. Do této skupiny patří:

- protilátka 10F3 (Printseva a další, Exp. Cell Res. 169, strana 85 (1987); American J. Pathol. 134, strana 305 (1989))
- protilátky proti aktinu
- protilátky proti angiotensinovým receptorům typu II
- protilátky proti receptorům pro růstové faktory nebo protilátky namířené například proti
 - proti receptorům pro EGF
 - proti receptorům pro PDGF
 - proti receptorům pro FGF
- proti receptorům pro endothelin A

Dále mezi tyto ligandy podle vynálezu patří všechny účinné látky, které se mohou vázat na membránové struktury nebo membránové receptory na povrchu hladkých svalových buněk (přehled takových látek viz Pusztai a další, J. Pathol. 169, strana 191 (1993), Harris, Current Opin. Biotechnol. 2, strana 260 (1991)). Patří sem například růstové faktory nebo jejich fragmenty respektive jejich částečné sekvence, které se vážou na receptory exprimované hladkými svalovými buňkami jako jsou například tyto faktory:

- PDGF
- EGF
- TGF β
- TGF α

- FGF
- Endothelin A

b) Ligandy virového původu

Mezi ligandy virového původu podle vynálezu patří především obalové glykoproteiny virů s afinitou k hladkým svalovým buňkám. K takovým virům patří například Cytomegalovirus (viz Speir a další, Science 265, strana 391 (1994)).

3) Výběr ligandů pro makrofágy a lymfocyty

a) Nevirové ligandy

Mezi ligandy podle vynálezu, které se specificky vážou na povrch makrofágů a lymfocytů patří protilátky, nebo jejich fragmenty, připravené proti membránovým strukturám imunitních buněk, viz například Powelson a další, Biotech. Adv.11, strana 725 (1993).

Dále mezi takové ligandy patří monoklonální nebo polyklonální protilátky nebo protilátkové fragmenty, které se svými konstantními doménami vážou na Fc-g nebo Fc-e receptory imunitních buněk, viz Rojanasakul a další, Farm. Res.11, strana 1731 (1994). Ve výhodném provedení vynálezu lze použít Fc-fragment lidských polyklonálních imunoglobulinů. Takové Fc-fragmenty lze připravit například způsobem podle prací Haupt a další, Klin. Wschr. 47, strana 270 (1969); Kranz a další, Dev. Biol. Standard 44, strana 19 (1979); Fehr a další, Adv. Clin. Farmac. 6, strana 64 (1974); Menninger a další, Immunochem.13, strana 633 (1976).

Dále mezi tyto ligandy patří všechny látky, které se vážou na membránové struktury nebo membránové receptory na vnějším povrchu imunitních buněk. Mezi takové látky patří například cytokiny IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, TNFa, GM-CSF, M-CSF dále růstové faktory jako EGF, TGF, FGF, IGF nebo PDGF, nebo jejich fragmenty respektive částečné sekvence,

které jsou schopny vazby na receptory exprimované na povrchu těchto buněk.

Mezi ligandy pro použití podle vynálezu patří například takové, které se vážou na receptor pro manóza 6-fosfát na povrchu makrofágů ve slezině, játrech, plicích a jiných tkáních. Tyto membránové struktury a ligandy jsou přehledně popsány v práci Perales a další, Eur. J. Biochem. 226, strana 255 (1994).

b) Ligandy virového původu

Mezi ligandy virového původu podle vynálezu patří především obalové glykoproteiny virů s afinitou k lymfocytům a/nebo makrofágům. K takovým virům infikujícím makrofágy patří například:

- HIV-1, zvláště pak kmeny s mutacemi ve V3-regionu proteinu gp120, což vede ke zvýšené afinitě k makrofágům, viz například Kim a další, J. Virol. 69, strana 1755 (1995); Valentin a další, J. Virol. 68, strana 6684 (1994); Collin a další, J. Gen. Virol. 75, strana 1597 (1994); Shoida a další, PNAS 89, strana 9434 (1992); Chesebro a další, J. Virol. 66, strana 6547, (1992), Shaw a další, J. Virol. 66, strana 2577 (1992); Liu a další, J. Virol. 64, strana 6148 (1990); Broder a další, PNAS 92, strana 9004 (1995); Cangué a další, Virol. 208, strana 779 (1995)
- HIV-2 viz například: Valentin a další, J. Virol. 68, strana 6684 (1994)
- Hantaviry, například Punmalavirus, viz Temony a další, Virol. 206, strana 8 (1995)
- Cytomegalovirus viz například: Fajac a další, Am. J. Resp. Crit. Care Med. 149, strana 495 (1994); Kondo a další, PNAS

91, strana 11879 (1994); Ibanez a další, J. Virol.65,6581(1991)

- Virus respirační syncytialidy, viz například Becker a další, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.6, strana 369 (1992); Roberts, Infect. Immun.35, strana 1142(1982)
- Herpes simplex-Virus, viz například Plaeger-Marshall a další, Pediatric Res.26, strana 135(1989)
- Filoviry, viz například Schnittler a další, J. Clin. Invest.91, strana 1301(1993); Zaki, Eur. Conf. Tropical Med. p2 (A22), Hamburg, Germany (1995).

Mezi viry infikující lymfocyty patří například:

- Varicella-Zoster-Virus (VZV), který infikuje především T-buňky, viz například Moffat a další, J. Virol. 69, strana 5236 (1995)
- Herpetický virus 6 (HHV-6), který infikuje především T-buňky, viz například Takahashi a další, J. Virol. 63, strana 3161 (1989); Lusso a další, J. Exp. Med.181, strana 1303 (1995); Frenkel a další, Adv. Exp. Med. Biol. 278, strana 1 (1990)
- Virus vztekliny, obalový glykoprotein tohoto viru se váže především na buňky TH2, viz například Martinez-Arends a další, Clin. Immunol. Immunopath. 77, strana 177 (1995)
- HIV-1, glykoprotein gp120 viru HIV-1 se váže především na molekuly CD4 na T-buňkách, viz například Heinkelein a další, J. Virol. 69, strana 6925 (1995)
- HTLV-II, který infikuje především B-buňky, viz například Casoli a další, Virol. 206, strana 1126 (1995)
- HTLV-I, který infikuje především T-buňky, viz například Persaud a další, J. Virol. 69, strana 6297 (1995); Boyer a další, Cell Immunol.129, strana 341 (1990)

- Chřipkové viry typu C, které se vážou pomocí hemaglutinin-esterázy-fúzogenního proteinu (HEF protein) na N-acetyl-9- β -acetylneuraminovou kyselinu (Neu 5,9 Ac), která se vyskytuje přednostně na B-lymfocytech, méně nebo vůbec ne na T-lymfocytech, viz například Herrler a další, EMBO-J. 4, strana 1503 (1985); Kamerling a další, BBA 714, strana 351 (1982); Rogers a další, J. Biol. Chem. 261, strana 5947 (1986)
- Chřipkové viry typu C, které mají mutaci na nukleotidové pozici 872 (ta kóduje 284 aminokyselinu v sekvenci proteinu HEF) například záměnu threoninu za isoleucin. Povrchový protein s touto mutací má výrazně vyšší afinitu k receptorům pro N-acetyl-9- β -acetylneuraminovou kyselinu, viz například Szepanski a další, Virol. 188, strana 85 (1992)
- Štěpné produkty proteinu HEF chřipkového viru C, které obsahují strukturu schopnou vazby na receptor pro N-acetyl-9- β -acetylneuraminovou kyselinu. Takové struktury jsou definovány katalytickou triádou serin-71, histidin 368 nebo 369 a kyselina asparagová 261, viz Pleschka a další, J. Gen. Virol. 76, strana 2529 (1995)
- Virus Epstein-Barrové (EBV), který infikuje především B-buňky viz Miller-Yale, J. Biol. Med. 55, strana 305 (1982); Garzelli a další, Immunol. Lett. 39, strana 277 (1994); Counter a další, J. Virol. 68, strana 3410 (1994); Wang a další, J. Virol. 62, strana 4173 (1988)
- Herpes simplex virus typu 2 (HSV-2), který infikuje především T-buňky viz Kucera a další, Viral Immun. 2, strana 11 (1989)
- Virus spalniček, viz Jacobson a další, J. Gen. Virol. 63, strana 351 (1982)

4) Výběr ligandů podle vynálezu pro gliové buňky

a) Nevirové ligandy

Mezi vhodné ligandy podle vynálezu patří takové látky, které se vážou na vnější povrch gliových buněk. Jsou to například protilátky nebo protilátkové fragmenty připravené proti membránovým strukturám gliových buněk, viz Mirsky a další, *Cell and Tissue Res.* 240, strana 723 (1985); von Coakham a další, *Prog. Exp. Tumor Res.* 29, strana 57 (1985) a McKeever a další, *Neurobiol.* 6, strana 119 (1991). Dále k takovým látkám patří nervové adhezivní molekuly jako například N-CAM, zvláště pak jeho polypeptidový řetězec C, viz Nybroe a další, *J. Cell Biol.* 101, strana 2310 (1985).

Dále mezi tyto látky patří všechny účinné látky, které se vážou na membránové struktury nebo membránové receptory gliových buněk. Takovými jsou například látky, které nesou na konci molekuly manózu a vážou se na receptor pro manóza-6-fosfát, viz Perales a další, *Eur. J. Biochem.* 226, strana 225 (1994), inzulin a inzulinu podobný růstový faktor, viz Merrill a další, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 71, strana 199 (1990)), PDGF (Ek a další, *Nature* 295, 419 (1982), a příslušné fragmenty těchto růstových faktorů, které jsou schopny vazby na své receptory.

b) Ligandy podle vynálezu virového původu

Mezi ligandy podle vynálezu virového původu patří především obalové glykoproteiny virů s afinitou ke gliovým buňkám. K takovým virům infikujícím gliové buňky patří například:

- Virus HIV-1 subtyp JRF1, viz Sharpless a další, *J. Virol.* 66, strana 2588 (1992)
- Herpes simplex-virus typu I, viz Xie a další, *Eye Science (Yen Ko Hsueh Pao)* 10, strana 67 (1994); Genis a další, *J. Exp. Med.* 176, strana 1703 (1992)

5) Výběr ligandů podle vynálezu pro krvetorné buňky

a) Nevirové ligandy

Mezi vhodné ligandy podle vynálezu patří například protilátky nebo protilátkové fragmenty připravené proti membránovým receptorům exprimovaným především na málo diferencovaných krevních buňkách.

Popsány jsou například protilátky proti následujícím receptorům:

- receptor pro faktor kmenových buněk
- receptor pro IL-1, typu I
- receptor pro IL-1, typu II
- receptor pro IL-3, typu a
- receptor pro IL-3, typu b
- receptor pro IL-6
- receptor pro GM-CSF

Dále mezi tyto ligandy patří monoklonální nebo polyklonální protilátky, které se svoji konstantní oblastí vážou na Fc- γ receptory na povrchu imunitních buněk, viz Rojanasakul a další, Pharm. Res. 11, strana 1731, (1994).

Dále mezi tyto ligandy patří látky, které se vážou na membránové struktury nebo membránové receptory na vnějším povrchu nediferencovaných krevních buněk nebo buněk v počátečních stádiích diferenciace. Mezi takové látky patří například růstové faktory jako je SCF, IL-1, IL-3, IL-6, GM-CSF, nebo jejich fragmenty respektive jejich částečné sekvence, které jsou schopny vazby na receptory exprimované krvetvornými buňkami.

6) Nevirové ligandy pro použití v leukemických buňkách a v buňkách tumorů

Mezi vhodné ligandy podle vynálezu, které se vážou na vnější povrch leukemických buněk patří protilátky nebo fragmenty protilátek připravené proti membránovým strukturám leukemických buněk. Takových protilátek je již připraveno velké množství pro diagnostické a terapeutické účely, přehledy viz Kristensen, Danish Medical Bulletin 41, strana 52 (1994); Schranz, Therapia Hungarica 38, strana 3 (1990); Drexler a další, Leuk. Rex.10, strana 279 (1986); Naeim, Dis. Markers 7, strana 1 (1989); Stickney a další, Current Op. Oncol. 4, strana 847 (1992); Drexler a další, Blut 57, strana 327 (1988); Freedment a další, Cancer Invest. 9, strana 69 (1991). Jako ligandy pro jednotlivé typy leukémie jsou vhodné následující protilátky nebo jejich fragmenty schopné vázat antigen:

Buňky	Membránový antigen	Monoklonální protilátka popsaná
AML	CD13	Kaneko a další, Leuk. Lymf.14, strana 219 (1994)
	-	Muroi a další, Blood 79, strana 713 (1992)
	CD14	Ball, Bone Marrow Transplnt.3, strana 387 (1988)
	CD15	Guyotat a další, Bone Marrow Transplant.6, strana 385 (1990)
	CD33	Jurcic a další, Leukemia 9, strana 244 (1995) Caron a další, Cancer 73, strana 1049 (1994)
	CAMAL	Shellard a další, Exp. Hematol. 19, strana 136 (1992)

Buňky	Membránový antigen	Monoklonální protilátka popsaná
	Sialosyl-Le	Muroi a další, Blood 79, strana 713 (1992)
B-CLL	CD5	Kaminski a další, Cancer Treat. Res. 38, strana 253 (1988) Tassone a další, Immunology Lett. 39, strana 137 (1994)
	CD1c	Orazi a další, Eur. J. Haematol. 47, strana 28, (1991)
	CD23	Idiotypy a izotypy membránových imunoglobulínů, Schroeder a další, Immunol. Today 15, strana 289 (1994)
T-CLL	CD33	Imai a další, J. Immunol. 151, strana 6470 (1993)
	receptory IL-2 receptory T-buněk	Waldmann a další, Blood 82, strana 1701, (1993)
ALL	CALLA	Morishima a další, Bone Marrow Transplant. 11, strana 255 (1993)
	CD19 Non-Hodgkin	Anderson a další, Blood 80, strana 84 (1993)
	Lymfomy	Lymfoma Okazaki a další, Blood 81, strana 84 (1993)

Mezi nevirové ligandy pro tumorové buňky patří protilátky a jejich fragmenty připravené proti membránovým strukturám tumorových buněk, viz přehled Sedlacek a další, Contrib. to Oncol. 32, Karger Verlag, München (1988) a Contrib. to Oncol. 43, Karger Verlag, München (1992)

Další příklady představují protilátky proti:

- antigenu Sialyl Lewis, viz Ohta a další, Immunol. Lett. 44, strana 35 (1995)
- peptidům, které se vyskytují na povrchu tumorů, a které jsou rozeznávány T-buňkami, viz Maeurer a další, Melanoma Res. 6, strana 11 (1996); Coulie, Stem Cells 13, strana 393 (1995); Stoh a další, J. Biochem, 119, strana 385 (1996), Slingluff a další, Curr. Opin. Immunol. 6, strana 733 (1994)
- proteinům exprimovaným onkogeny, viz Cheever a další, Immunol. Rev.145, strana 33 (1995); Talarico a další, PNAS 87, strana 4222 (1990)
- gangliosidům jako jsou GD3, GD2, GM2, 9-0-acetyl GD3, fukosyl GM1, viz Helling a další, Cancer Res. 55, strana 2783 (1995); Linvingston a další, Vaccin 11, strana 1199 (1993); Vaccin 12, strana 1275 (1994); Livingston a další, Cancer Immunol. Immunother. 29, strana 179 (1989); Gnewuch a další, Int. J. Cancer 8, strana 125 (1994); Jennemann a další, J. Biochem.115, strana 1047 (1994); Ravindranath a další, Cancer Res. 49, strana 3891 (1989)
- antigenům krevních skupin, viz Springer a další, Cancer 37, strana 169 (1976); Carbohydrate Res.179, strana 271 (1988); Molec. Immunol. 26, strana 1 (1989); Fung a další, Cancer Res. 50, strana 4308 (1990)
- antigenům polymorfního epitelového mucinu, viz PEM; Burchell a další, Cancer Surreys 18, strana 135 (1993)
- antigenům Heat-Shock proteinů, viz Blackere a další, J. Immunother.14, 352 (1993).

Myší monoklonální protilátky jsou výhodně použity v humanizované podobě. Způsoby humanizace protilátek, jakož i příprava fragmentů protilátek jsou známy ze stavu techniky.

Mezi vhodné ligandy podle vynálezu dále patří všechny účinné látky, které se vážou na membránové struktury nebo membránové receptory na leukemických nebo tumorových buňkách. Takovými látkami jsou například steroidní hormony nebo peptidové hormony, dále růstové faktory nebo jejich fragmenty respektive částečné sekvence, které jsou schopny vazby na receptory exprimované na leukemických nebo tumorových buňkách. Tyto růstové faktory jsou přehledně popsány v Cross a další, Cell 64, strana 271, (1991); Aulitzky a další, Drugs 48, strana 667, (1994); Moore, Clin. Cancer Res. 1, strana 3, (1995); van Kooten a další, Leuk. Lymph. 12, strana 27, (1993). Příklady vhodných růstových faktorů:

- IFN α pro Non-Hodgkinovy lymfomy
- IL-2 zvláště pro leukemie T-buněk
- FGF monocytární, myeloidní, erythroidní a megakaryoblastické leukémie T-buněk
- TGF β pro leukémie
- Retinoidy, například kyselina retinová pro akutní promyelocytární leukemie.

7) Nevirové ligandy pro infikované buňky

Pro terapii infekčních onemocnění jsou vhodné jako ligandy protilátky nebo jejich fragmenty, připravené proti původcům této infekce. U virových infekcí jsou to například protilátky proti virovým antigenům exprimovaným na povrchu membrán infikovaných buněk.

Jsou známy protilátky proti antigenům exprimovaným v buňkách infikovaných následujícími viry:

- HBV
- HCV

- HSV
- HPV
- HIV
- EBV
- HTLV

Dále mezi vhodné ligandy podle vynálezu patří monoklonální protilátky nebo polyklonální protilátky nebo jejich fragmenty, které se svými konstantními oblastmi mohou vázat na Fc-g nebo FC-e receptory na povrchu buněk imunitního systému.

Myší monoklonální protilátky jsou výhodně použity v humanizované formě. Způsob humanizace protilátek je znám ze stavu techniky.

Dále mezi vhodné ligandy podle vynálezu patří všechny látky, které se vážou na membránové struktury nebo receptory na povrchu virem infikovaných buněk. Takovými látkami jsou například růstové faktory jako jsou cytokiny, EGF, TGF, FGF, nebo PGDF, nebo jejich fragmenty respektive částečné sekvence, které jsou schopny vazby na receptory exprimované na povrchu infikovaných buněk.

8) Ligandy podle vynálezu pro další parenchymatické buňky

a) Nevirové ligandy

Mezi vhodné ligandy podle vynálezu patří takové látky, které se specificky vážou na struktury buněčných membrán určitých tkání. Takovými látkami jsou například:

Membránová struktura	Ligandy	Tkáň
receptor pro asialoglykoprotein	asialoorosomukoid neoglykoprotein galaktóza	jaterní buňky
receptor pro transferin	transferin	játra nebo jiné tkáně
receptor pro insulin	insulin	makrofágy ve slezině, játrech, plicích a jiných tkáních
Fc- γ receptory	imunoglobulin G	retikuloendotheliální systém, jiné tkáně

Tyto ligandy a membránové struktury jsou přehledně popsány v publikaci Perales a další, Eur. J. Biochem. 226, strana 255, (1994).

b) Ligandy virového původu

Mezi ligandy virového původu podle vynálezu patří především obalové glykoproteiny virů s afinitou k vybraným buňkám, jako například k:

buňkám bronchálního epitelu

- RSV (respiratory syncytial virus), viz Becker a další, Am. J. Resp. Cell Mol. Biol. 6, strana 369 (1992)

jaterním buňkám

- virus hepatitidy C, viz Uchida a další, Pathol. Internat. 44, strana 832 (1994); Carloni a další, Arch. Virol. 8, strana 31 (1993); Prince a další, Curr. Stud. Hemat. Blood Trans. 61, strana 195 (1994)

- filoviry, jaterní buňky se vážou například na virus Marburg pomocí receptoru pro asialoglykoprotein, viz Becker a další, J. Gen. Virol. 76, strana 393 (1995)
- virus hepatitidy B jaterní buňky se vážou pomocí receptoru pro asialoglykoprotein na preS2 a preS1 doméne viru HBV, viz Shimizu a další, J. Med. Virol. 20, strana 313 (1986); Treichel a další, J. Gen. Virol. 75, strana 3021 (1994); Gerlich a další, J. Hepatol. 17/3, strana 10 (1993); Gripon a další, Virol. 192, strana 534 (1993); Pontisso a další, Hepatol. 14, strana 405 (1991); Ochiya a další, PNAS 86, strana 1875 (1989)
- virus hepatitidy D, viz Colombo a další, J. Hepatol. 12, strana 64 (1991)

jaterním sinusoidálním buňkám

- virus hepatitidy B, HBV se váže pomocí receptoru pro fibronektin, viz Budhowska a další, J. Virol. 69, strana 840 (1995)

9) Ligandy použitelné k prevenci infekčních onemocnění

K prevenci infekčních onemocnění lze jako ligandů použít všech látek, které se vážou na struktury buněčných membrán makrofágů a/nebo lymfocytů. Takové ligandy jsou již známy ze stavu techniky.

Příprava ligandů virového původu

Ligandy virového původu podle vynálezu lze připravit buď rozpuštěním virových obalových proteinů z virového purifikátu pomocí některého detergentu (například pomocí β -D-oktylglukopyranosidu) a jejich následným centrifugačním oddělením, viz Mannino a další, Bio-Techniques 6, strana 682 (1988), nebo pomocí molekulárně biologických způsobů. Tyto způsoby jsou odborníkům dobře známy, viz například příprava

glykoproteinu viru HEF popisovaná v publikaci Pleschka a další, (J. Gen. Virol. 76, strana 2529 (1995) a Szepanski a další, Virology 188, strana 85 (1992).

Fúzogenní proteiny (c) podle vynálezu

Vynález používá proteiny, které mají fúzogenní účinky, t.j. jsou umožňují průnik buněčnou membránou. Proteiny podle vynálezu mohou fúzovat přímo s buněčnými membránami. Takové fúzogenní proteiny obsahuje celá řada virů, například paramyxoviry, retroviry a herpesviry, viz Gaudin a další, J. Gen. Virol. 76, strana 1541 (1995).

K fúzogenním proteinům podle vynálezu patří dále takové glykoproteiny, které umožňují fúzi s buněčnou membránou nebo endozómem teprve po svém pohlčení do endozómu a po okyselení prostředí v endozómu.

Takové proteiny, zodpovědné za zachycení viru na povrchu buňky, jakož i za následnou fúzi s buněčnou membránou, obsahuje celá řada virů, viz Gaudin a další, J. Gen. Virol. 76, strana 1541 (1995). Tyto proteiny tvoří například alfaviry, rhabdoviry a orthomyxoviry.

Virové fúzogenní proteiny

Virové fúzogenní proteiny podle vynálezu jsou přehledně popsány v publikacích Hughson, Current Biol. 5, strana 265 (1995); Hoekstra, J. Bioenergetics Biomembranes 22, strana 675 (1990); White, Ann. Rev. Fysiol. 52, strana 675 (1990)

Fúzogenními proteiny podle vynálezu jsou například:

- hemagglutinin influenza A nebo B viru, zvláště pak jeho komponenta HA2, viz Stegmann a další, J. Biol. Chem. 266, strana 18404 (1991); Klenk a další, Virol. 68, strana 426 (1975); Lazarowitz a další, Virol. 68, strana 440 (1975);

Skehel a další, PNAS 79, strana 968 (1982); Bosch a další, Virol. 113, strana 725 (1981)

- protein-M2 viru chřipkového viru A, viz Sugrue a další, Virol. 180, strana 617 (1991); Lamb a další, Cell 40, strana 627 (1985); Pinto a další, Cell 69, strana 517 (1992); Zebedee a další, J. Virol. 56, strana 502 (1985); Black a další, J. Gen. Virol. 74, strana 1673 (1993); Wharton a další, J. Gen. Virol. 75, strana 945 (1994), tento protein může být použit samostatně nebo v kombinaci s hemagglutininem chřipkového viru viz Ohuchi a další, J. Virol. 68, strana 920 (1994), nebo s mutovanou neuramidázou chřipkového viru A. Těto zmutované neuramidázy chybí enzymatická aktivita, která je potřeba k hemagglutinaci, viz Hausmann a další, J. Gen. Virol. 76, strana 1719 (1995)
- peptidová analoga hemagglutininu viru chřipky, viz Wharton a další, J. Gen. Virol. 69, strana 1847 (1988)
- protein HEF chřipkového viru-C, fúzogenní aktivita proteinu HEF se aktivuje rozštěpením HEF₀ na podjednotky HEF₁ a HEF₂, viz Herrler a další, J. Gen. Virol. 69, strana 839 (1988); Kitan a další, Arch. Virol. 73, strana 357 (1982); Ohuchi a další, J. Virol. 42, strana 1076 (1982)
- transmembránový glykoprotein filovirů jako je například virus Marburg, viz Feldmann a další, Virol. 182, strana 353 (1991); Will a další, J. Virol. 67, strana 1203 (1993); Kiley a další, J. Gen. Virol. 69, strana 1957 (1988); Geyer a další, Glycobiol. 2, strana 299 (1992). Dalším filovirem je virus Ebola, viz Elliott a další, Virol. 147, strana 169 (1985); Cox a další, J. Infect. Dis. 147, strana 272 (1983); (Kiley a další, J. Gen. Virol. 69, strana 1957 (1988); Feldmann a další, Arch.

- Viol. 7, strana 81 (1993); Volchkov a další, Virol. 214, strana 421 (1995)
- transmembránový glykoprotein viru vztekliny, viz Whitt a další, Virol. 185, strana 681 (1991); Gaudin a další, J. Virol. 65, strana 4853 (1991); 67, strana 1365 (1993); Virology 187, strana 627 (1992)
 - transmembránový glykoprotein (G) viru vesikulární stomatitidy, viz Balch a další, J. Biol. Chem. 261, strana 14681 (1986); Kreis a další, Cell 46, strana 929 (1986); Doms a další, J. Cell Biol. 105, strana 1957 (1987); Zhang a další, J. Virol. 68, strana 2186 (1994); Ohnishi, Curr. Topics Membr. Transp. 32, strana 257 (1988); Li a další, J. Virol. 67, strana 4070 (1993); Zagouras a další, J. Virol. 65, strana 1976 (1991); Herrmann a další, Biochem. 29, strana 4054 (1990)
 - fúzogenní protein viru HIV, zvláště pak jeho komponenta gp41, viz Stareich a další, Cell 45, strana 637 (1986); Kowalski a další, Science 237, strana 1351 (1987); Gallaker a další, Cell 50, strana 327 (1987)
 - fúzogenní protein viru Sendai, zvláště pak jeho komponenta F1, viz Blumberg a další, J. Gen Virol. 66, strana 317 (1985); Sechoy a další, J. Biol. Chem. 262, strana 11519 (1987); Homma a Ohuchi, J. Virol. 12, strana 1457 (1973); Scheid a Choppin, Virol. 57, strana 470 (1974)
 - transmembránový glykoprotein Semliki-Forest viru, zvláště pak jeho komponenta E1, viz Omar a další, Virol. 166, strana 17 (1988); Nieva a další, EMBO-J. 13, strana 2707 (1994); Falen a další, J. Cell Biol. 112, strana 615 (1991); Lobigs a další, J. Virol. 64, strana 1233 a strana 5214 (1990); Kenney a další, Structure 2, strana 823 (1994); Garoff a další, Nature 288, strana 236

(1980); Levy-Mintz a další, J. Virol. 65, strana 4292 (1991)

- transmembránový glykoprotein viru klíšťové encefalitidy, viz Guirakhoo a další, Virol. 169, strana 90 (1989); J. Gen. Virol. 72, strana 1323 (1991); Heinz a další, Virol. 198, strana 109 (1994)
- fúzogenní protein viru lidské respirační syncytialitidy, (RSV) zvláště pak jeho komponenta gp37, viz Collins a další, PNAS 81, strana 7683 (1984); Elango a další, Nucl. Acids Res. 13, strana 1559 (1985)

Příprava virových fúzogenních proteinů

Virové fúzogenní proteiny podle vynálezu lze připravit buď rozpuštěním virových obalových proteinů z virového purifikátu pomocí některého detergentu (například pomocí β -D-oktylglukopyranosidu) a jejich následným centrifugačním oddělením, viz Mannino a další, Bio-Techniques 6, strana 682 (1988), nebo pomocí molekulárně biologických způsobů. Příklady přípravy takovýchto fúzogenních proteinů jsou popsány v následujících publikacích:

- hemagglutinin influenza viru (chřipky), viz Bullough a další, J. Mol. Biol. 236, strana 1262 (1994); Nature 371, strana 37 (1994); Daniels a další, Cell 40, strana 431 (1985); Godley a další, Cell 68, strana 635 (1992); White a další, Nature 300, strana 658 (1982); Wiley a další, Ann. Rev. Biochem. 56, strana 365 (1987); Kawaoka a další, PNAS 85, strana 321 (1988); Kuroda a další, J. Virol. 63, strana 1677 (1989), EMBO-J. 5, strana 1359 (1986); Naeve a další, Virol. 129, strana 298 (1983); Porter a další, Nature 282, strana 471 (1972); Hughson, Curr. Biol. 5, strana 265 (1995)
- protein M2 influenza viru C, viz Black a další, J. Gen. Virol. 74, strana 1673 (1993); Pinto a další, Cell 69,

- strana 517 (1992); Zebedee a další, J. Virol. 56, strana 502 (1985)
- protein HEF viru chřipky C, viz Pfeifer a další, Virus Res. 1, 281 (1984); Herrler a další, Virol. 113, strana 439 (1981)
 - transmembránové glykoproteiny filovirů, například viru Marburg, viz Will a další, J. Virol. 67, strana 1203 (1993); Feldmann a další, Virus Res. 24, strana 1 (1992). Dalším filovirem je virus Ebola, viz Volchkow a další, FEBS Lett. 305, strana 181 (1992); Virol. 214, strana 421 (1995); Sanchez a další, Virus Res. 29, strana 215 (1993); Virol. 157, strana 414 (1987); Elliott a další, Virol. 163, strana 169 (1985)
 - transmembránový glykoprotein viru vztekliny, viz Gaudin a další, J. Virol. 65, strana 4853 (1991); Virol. 187, strana 627 (1992); Rose a další, J. Virol. 43, strana 361 (1982); Witte a další, Virol. 185, strana 681 (1991)
 - transmembránový glykoprotein viru vesikulární stomatitidy, viz Li a další, J. Virol. 67, strana 4070 (1993); Riedel a další, EMBO-J. 3, strana 1477 (1984); Lyles a další, Biochem. 29, strana 2442 (1990); Metsikko a další, EMBO-J. 5, strana 3429 (1986)
 - transmembránový glykoprotein Semliki Forest viru, viz Garoff a další, Nature 288, strana 236 (1980); Kielian a další, J. Virol. 64, strana 4614 (1990); Kondor-Koch, J. Cell Biol. 97, strana 644 (1983)
 - transmembránový glykoprotein viru klíšťové encefalitidy, viz Guirakkoo a další, J. Gen. Virol. 72, strana 1323 (1991); Heinz a další, Virol. 198, strana 109 (1994)

Dalšími molekulami s fúzogenními vlastnostmi jsou například

- peptidy obsahující translokační doménu (doménu II) exotoxinu A bakterií *Pseudomonas*, viz Weis a další, *Cancer Res.* 52, strana 6310 (1992); Fominaga a další, *J. Biol. Chem.* 271, strana 10560 (1996)
- peptidy obsahující peptid s aminokyselinovou sekvencí
GLFEALLELLESLWELLLEA
Gottschalk a další, *Gen Ther.* 3, strana 448 (1996)
- peptidy obsahující peptid s aminokyselinovou sekvencí
AALAEA[LAEA],LAAAAGC (Acm)
Wang a další, *Technol. Advances in Vector Syst. For Gen Ther.*, May 6-7, 1996, Coronado, Konference IBC)
- peptidy obsahující peptid s aminokyselinovou sekvencí
FAGV-VLAGAALGVAAAAQI
- fúzogenní protein viru spalniček, viz Yeagle a další, *Biochem. Biofys. Acta* 1065, strana 49 (1991)
- peptidy obsahující peptid s aminokyselinovou sekvencí
GLFGAIAGFIEGGWGMIDG
- proteiny HA2 viru chřipky typu A, viz Lüneburg a další, *J. Biol. Chem.* 270, strana 27606 (1995)
- peptidy obsahující peptid s aminokyselinovou sekvencí
GLFGAIAGFIENGWEGMIDGGLFGAIAGFIENGWEGMIDG
Burger a další, *Biochem* 30, strana 11173 (1991) nebo peptid
GLFGAIAGFIE;
ALFGAIAGFIE;
LFLGAIAGFIE;
LLLGAIAGFIE;
LLIGAIAGFIE;
GIFGAIAGFIE;
GLLAIAGFIE;
GLFAAIAGFIE;

GLFEAIAGFIE;

GLFGAMAGFIE;

GLFGAIAGLIE nebo peptid

GLFGAIAGFIY

viz Steinhauer a další, J. Virol 69, strana 6643 (1995)

nebo peptid

GLFEAIAEFIEGGWEGLIEG

nebo peptid

GLLEALAELEGGWEGLLEG

viz Ishiguro a další, Biochem. 32, 9792 (1993).

Konjugace ligandů a fúzogenních proteinů s nosičem

Konjugace ligandů a fúzogenních proteinů s nosičem se provádí způsoby, které jsou odborníkům dobře známy.

Příklady nekovalentní vazby na nosič jsou následující:

nosič-biotin ~ avidin-S-S-ligand Hashimoto a další, Immunol.132,
strana 129(1984)

nosič ~ bispecifická protilátka ~ Raso a další, Immunol. Rev.62,
ligand strana 93 (1982)

Příklady kovalentní vazby na nosič

**vazba na volné aminoskupiny
proteinu**

potřebné regencie: Carlson a další, Biochem. J. 173,
N-succinimidyl-3-(2-pyrdylthio) - strana 723 (1978)
propionát (SPDP)

SDDP-dithiothreitol Carlson a další, Biochem. J. 173,
strana 723 (1978)

2-iminothiolan King a další, Biochem. 17, strana
1499 (1978)

- 2,2-iminothiolan +
4,4-dithiopyridin King a další, Biochem.17, strana
1499(1978)
- 3-methyl-3(4-dithiopyridyl) -
merkpto-propionimidát
- N-acetylhomocystein thiolakton Reiner a další, J. Mol. Catal. 2,
strana 335 (1977)
- anhydrid acetylmercaptosuccinové
kyseliny + NH₂OH Klotz and Heineg, Arch. Biochem.
Biofys. 96, 690 (1979)
- m-maleimido-benzoyl-N-hydroxy
succinimid ester Liu a další, Biochem. 18, strana
690 (1979)
- succinimidyl-4-(N-maleimido-
methylcyklohexan)-1-karboxylát Yoshitake a další, Eur. J.
Biochem. 101, strana 395 (1979)
- N-succinimidylidoacetát Rector a další, J. Immun. Meth.
24, strana 321 (1978)
- 4-hydroxy,3-nitromethylbenzimidát Müller and Pfeleiderer, J. Appl.
+ acetimidát + Na₂S₂O₄ Biochem. 1, strana 301 (1979)
- 4-hydroxy,3-nitromethylbenzimidát Müller and Pfeleiderer, J. Appl.
+ acetimidát + NaNO₂ Biochem. 1, strana 301 (1979)
- oxidovaný Dextran + borohydrid Hurwith a další, Eur. J. Cancer
14, strana 1213 (1978)

**vazba na volné hydroxylové
skupiny proteinu**

- potřebné reagensie: Erlanger a další, Meth.
cystamin + karbodimid Imm.Immunochem.1, strana 144
(1967)
Gilliland, Cancer Res. 40, strana
3564 (1980)

**vazba na volné SH-skupiny
proteinu**

potřebné reagensie: Ghose and Blair, CRC Crit. Rev.
protein-SH Ther. Drug Carrier Syst. 3, strana
263 (1987)

protein-SH + Na₂S₄O₂ Masuko a další, BBRC 90, strana
320 (1979)

Ellmanovo činidlo Raso and Griffin, J. Immunol.125,
strana 2610 (1980)

**vazba na volné karbonylové
skupiny proteinu**

potřebné reagensie: Hurwitz a další, Cancer Res. 35
periodát strana 1175 (1975)

**vazba na volné karboxylové
skupiny proteinu**

potřebné reagensie: Gilliland, Cancer Res. 40, strana
cystamin + carbodiimid 3564 (1980)

Výběr nukleotidové sekvence vkládaného genu podle vynálezu

Nukleotidové sekvence podle vynálezu určené k tvorbě komplexu s nosičem mohou být jak ve formě DNA tak i RNA. V nejjednodušším případě jde o volná nukleotidová vlákna, která obsahují gen kódující požadovaný protein. Tento gen může být doplněn o promotorové sekvence nebo moduly specifické pro konkrétní buňku nebo virus.

Dále mohou být k tomuto genu přidány další virové promotorové sekvence a/nebo enhancery, které slouží k zesílení a/nebo prodloužení exprese tohoto genu. takové promotory a/nebo enhancery jsou přehledně popsány například Dillonem, TiBTech

11, strana 167, (1993). Příklady vhodných promotorů a/nebo enhancerů jsou následující:

- LTR-sekvence viru Rousova sarkomu
- LTR-sekvence retrovirů
- promotorová a enhancerová oblast viru CMV
- LTR-sekvence a/nebo promotorové sekvence p5, p19, p40 AAV virů
- LTR-sekvence a/nebo promotorové sekvence adenovirů
- LTR-sekvence a/nebo promotorové sekvence vakcinia viru
- LTR-sekvence a/nebo promotorové sekvence herpesvirů
- promotorové sekvence parvovirů
- promotorové sekvence (regulační oblast proti směru transkripce) papillomavirů

Ve výhodném provedení vynálezu je nukleotidová sekvence vložena do plazmidu.

Vznik komplexu konjugovaného nosiče a genu

Konjugovaný nosič dává po smíšení s genem, respektive s nukleotidovou sekvencí podle vynálezu vzniknout komplexu. Ve výhodném provedení vynálezu je vybrán takový vzájemný poměr jednotlivých složek, který vede ke vzniku komplexů s neutrálním nebo kladným nábojem. Výhodnými poměry výchozích složek jsou například:

- 1 μ mol lipidu/ 20 μ g plazmidu
- 1 až 5 mg lipidu/ 10 až 20 μ g DNA/RNA
- 6,2 mg lipidu/ 1,55 až 3,1 μ g DNA
- lipid/DNA-petid (5:1)

Celkového náboje je dosaženo inkubací pozitivně nabitého nosiče s geny ve vhodném poměru. Tento poměr lze stanovit změřením zeta-potenciálu, viz Dittgen a další, Farmazie 42, strana 541 (1987).

Příklady provedení vynálezu

Příklad 1: Příprava účinné látky pro transfekci endotheliálních buněk

a) Příprava obalového glykoproteinu filovirů jakožto ligandu

Obalový glykoprotein filovirů má vyšší afinitu k buňkám endothelu. Příprava tohoto glykoproteinu probíhá způsobem popsáným v publikacích Will a další, J. Virol. 67, strana 1203 (1993); Feldmann a další, Virus Res. 24, strana 1 (1992) a Volchkow a další, FEBS Lett. 305, strana 181 (1992).

Příprava glykoproteinu z viru Ebola

Virus Ebola kmene "Zaire" (EBO, Virologický Institut, Sergiev Posad, Rusko) byl pasážován v opicích makak rhesus. Z těchto opic byl převeden buněčné kultury (Vero-buňky) a poté byl izolován z kultivačního média, viz Volchkow a další, FEBS Lett. 305, strana 181 (1992).

Klonování a sekvenování virové DNA

Genomová RNA se izoluje z virového purifikátu centrifugací v cesiumchloridovém gradientu, viz Volchkow a další, (1992). Tato RNA byla použita pro přípravu cDNA knihovny pomocí náhodných primerů a reverzní transkriptázy viru kuřecí myeloblastózy. RNA-cDNA hybridy byly vzaty jako základ pro amplifikaci genů pro glykoprotein pomocí PCR a následujících syntetických primerů:

- primer N1

5'-GAAGGATCCTGTGGGGCAACAACACAATG (Sekvence Id. č.1), je komplementární s nukleotidy 114 až 142 mRNA po směru transkripce a je doplněná o 5'-terminální BamHI restriční místo

- primer N2

5'-AAAAAGCTTCTTTCCCTTGTCATAAA (Sekvence Id. č. 2), je komplementární s nukleotidy 2492 až 2466 na mRNA po směru transkripce a je doplněná o 5'-terminální restriční místo enzymu HindIII.

Sekvenování nukleotidové sekvence DNA genu GP bylo provedeno na obou vláknech způsobem podle Maxama a Gilberta (Methods in Enzymology 65, strana 499 (1980)). Sekvence genu GP viru Ebola kmene "Zaire" byla uložena v Genové bance pod číslem U31033, viz Volchkow a další (1992).

Sekvence genu GP viru Ebola kmene "Zaire" (EBO) byla do velké míry identická s dosud publikovanou sekvencí, viz Sanchez a další, Virus Res. 29, strana 215 (1993). Pouze v pozici 1019 až 1025 bylo nalezeno pouze sedm místo osmi po sobě jdoucích adeninů (v mRNA po směru transkripce).

Izolace, klonování a sekvenování mRNA pro EBO-GP

mRNA pro EBO-GP byla izolována z přibližně 7×10^7 buněk infikovaných EBO virem (1 až 10 PFU na jednu buňku, 1 den po infekci) pomocí kitu RNeasy firmy Qiagen. Pro syntézu cDNA bylo použito 10 μ l roztoku mRNA (což odpovídalo přibližně $1,4 \times 10^7$ infikovaných buněk). Toto množství mRNA bylo inkubováno s reverzní transkriptázou viru ptačí myeloblastózy v přítomnosti primeru:

- N3

oligo-d(T) 21 s vloženým restričníím místem pro HindIII na 5' konci

Po reverzní transkripci byla RNA odstraněna inkubací směsi v 1 µg/µl RNA-ázy (37°C, 30 minut).

K amplifikaci nukleotidové sekvence kódující GP bylo použito primerů N1 a N3.

PCR byla provedena při celkovém objemu reakční směsi 100 µl. Složení reakční směsi bylo následující: 1 až 5 µg cDNA v 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 8,3), 2 mM MgCl₂, s přidavkem 0,2 mM každého deoxynukleotidu a 0,3 µM každého z primerů.

Reakční směs byla nejprve zahřáta na 10 minut na teplotu 95°C a byla přidána Taq polymeráza (2,5 U/100 µl). Bylo provedeno celkem 35 amplifikačních cyklů, přičemž jeden cyklus sestával z 1 minutové inkubace při 94°C, 1 minuty při 70°C a 1 minuty při 72°C. Po 35 cyklech byly ke směsi přidány sondy na 10 minut při teplotě 72°C. Všechny komponenty pro PCR byly dodány firmou Perkin-Elmer Cetus. Produkty PCR byly přečištěny pomocí soupravy "QIA quick Spin" pro purifikaci produktů PCR, Qiagen. Přečištěná DNA byla neprodleně použita pro sekvenování, pro opakovanou PCR, a nebo pro klonování do plazmidových vektorů. Nukleotidová sekvence v oblasti proteinu GP, kde se překrývají čtecí rámce ORF I a ORF II, byla stanovena pomocí Sangerova způsobu (Sanger a další, PNAS 74, strana 5463, (1977), přičemž byl použit následující primery

- primer N4

5'-CGGACTCTGACCACTGAT (Sekvence Id. č.3)

je komplementární k nukleotidům 1108 až 1091

- primer N5

5'-TCGTGGCAGAGGGAGTGT (Sekvence Id. č.4)

je komplementární k nukleotidům 1412 až 1395

PCR-fragментy byly klonovány do vektoru pGEM2Zf(+) a tyto rekombinantní plazmidy byly enzymaticky sekvenovány, viz (Sanger a další, PNAS 74, strana 5463, (1977)).

Většina klonů vykazovala (podobně jako vRNA) 7 po sobě jdoucích adenosinů mezi pozicemi 1018 až 1026 (mRNA ve směru transkripce), zatímco přibližně 20 % mRNA pro GP protein z buněk měla v této pozici 8 adenosinů.

mRNA s osmi adenosiny kóduje kompletní protein GP o délce 676 aminokyselin. Osmý adenosin tedy umožňuje posun čtecího rámce od ORF I k ORF II.

mRNA se pouhými sedmi adenosiny kóduje naproti tomu nestrukturální druhý glykoprotein (sGP - second Glycoprotein). Díky tomu je sGP identický s N-koncovou částí (274 aminokyselin) proteinu GP a je doplněn dalšími 70 aminokyselinami, které kóduje konec čtecího rámce ORF I.

Tento konec není v GP obsažen, díky tomu, že osmý adenosin umožní přejít z ORF I k ORF II a ORF I tudíž není dočten do konce.

Konstrukce rekombinantních plazmidů

PCR produkty, které obsahují kompletní ORF genu pro protein GP viru EBO, se inkubují s restrikčními enzymy BamHI a Hind III. Restrikční štěp se pak liguje do plamidu pGEM3Zf(+), který byl předtím naštěpen stejnými enzymy. Plazmid obsahuje promotor RNA polymerázy fága T7, které je využito při syntéze EBO-GP RNA za využití expresivního systému vakciniaviru/T7 polymerázy.

Plazmidy, které obsahovaly nukleotidovou sekvenci EBO vRNA kódující protein GP o plné délce (sedm po sobě jdoucích adenosinů) byly označeny pGEM-mGP7, zatímco plazmidy obsahující osm adenosinů byly pojmenovány pGEM-mGP8.

Nukleotidové sekvence kódující protein GP byly vystřiženy restričními enzymy BamHI a HindIII z plazmidů pGEM-mGP7 a pGEM-mGP8, vzniklé konce byly doplněny působením Klenowova fragmentu DNA polymerázy I a vloženy do vektoru pSc11 (Promega, Madison, WI) naštěpeného restričním enzymem SmaI. Vzniklé rekombinantní plazmidy (pSc-mGP7 a pSc-mGP8) byly použity k přípravě rekombinantních vaccinia virů.

Konstrukce rekombinantních vaccinia virů

Rekombinantní vaccinia viry byly připraveny homologní rekombinací mezi tk oblastmi rekombinantního plazmidu pSc-mGP7 nebo pSc-mGP8 a genomické DNA vaccinia viru kmene WR, viz Chakrabarti a další, Mol. Cell. Biol. 5, strana 3403 (1985) a pomocí lipofekční transfekce, viz Felgner a další, PNAS 84, strana 7413 (1987).

Rekombinantní viry byly přečištěny jednoduchým pasážováním v buňkách TK-143 a čtyřnásobným pasážováním v buňkách CV-1. Pro selekci byly využity plaky pozitivní na β -galaktosidázu.

Rekombinantní vaccinia viry, vzniknuvší z plazmidu pSc-mGP7, byly označeny vSc-mGP7, zatímco viry z plazmidu pSc-mGP8 byly označeny vSc-mGP8.

Expres GP bylo dosaženo infekcí 1×10^6 buněk Hela nebo stejného množství buněk RK-13 10 PFU vSc-mGP7 nebo vSc-mGP8 na buňku.

Expres genového produktu byla stanovena imunoblotingem. Nejprve bylo pomocí 10% SDS-PAGE (denaturační elektroforéza v dodecylsulfátu sodném na akrylamidovém gelu) rozděleny lyzáty z 1×10^5 infikovaných Hela buněk nebo buněk RK-13, viz Laemmli, Nature 227, strana 680, (1970). Rozdělené proteiny byly pomocí polosuchého blotování přeneseny na PVDF membránu (Millipore). Sekretovaný sGP byl analyzován na gelu ze vzorku 20 μ l

infikovaných buněk z přebytku inkubačního média (2 ml, 1×10^6 buněk). Imunoanalýza byla provedena pomocí myšího-anti-EBO, koňského-anti-EBO a králičího-anti-EBO séra, přičemž jako sekundární protilátky bylo použito králičí-anti-myší, respektive anti-koňské protilátky, konjugované s křenovou peroxidázou. Sekundární protilátka byla detekována ECL-technikou (Amersham).

V buněčných lyzátech infikovaných buněk Hela, jakož i v lyzátech infikovaných RK-13 buněk, bylo možno dokázat produkci GP, jakož i sGP, přičemž po specifické infekci vSC-GP7 výrazně vzrostl podíl sGP a po infekci vSC-GP8 podíl GP.

Poté byly buněčné lyzáty inkubovány s endoklykosidázou H a podrobeny analýze na SDS-PAGE, která prokázala, že úplný GP má molekulovou hmotnost 125 až 140 kDa, a na rozdíl od neúplného GP je rezistentní proti štěpení endoklykosidázou H díky komplexně N-glykosidicky vázaným oligosacharidům.

Buňky RK-13 exprimují úplný GP s molekulovou hmotností 140 kDa, zatímco Hela buňky GP o hmotnosti 125 kDa. Rozdíl v hmotnosti jednotlivých glykoproteinů je dán buněčně specifickou rozdílnou N-glykosylací. 140 kDa GP produkovaný buňkami RK-13 jevil stejnou elektroforetickou pohyblivost jako GP ebolavirů (SDS-PAGE).

Buňky infikované vSC-GP7 vykazovaly pouze nepatrná množství sGP v buněčném lyzátu. Tento sGP měl jednotnou hmotnost 50 kDa. Převažující podíl sGP byl nalezen v kultivačním médiu (poměr mezi sekretovaným a intracelulárním sGP činil 25:1). Sekretovaný sGP má molekulovou hmotnost 50 až 55 kDa a je rezistentní k účinkům endoglukosidázy H.

Výběr GP a jeho přečištění

Pro přípravu nevirového vektoru podle vynálezu byl jako ligand vybrán glykoprotein EBO-GP o molekulové hmotnosti 140 kDa produkovaný buňkami RK-13.

Buňky RK-13 byly infikovány vSC-GP8 o koncentraci 10 PFU na jednu buňku. Proteiny v buněčném lyzátu byly rozděleny pomocí preparativní 8% SDS-PAGE a poté byly obarveny v Coomassie brilliant blue (CBB). Část gelu obsahující GP byla vyříznuta a umístěna do zařízení BioTrap (firma Schleicher a Schüll) a použita jako vzorek do další horizontální elektroforézy. Elektroeluce probíhala v pufru obsahujícím 100 mM glycin, 20 mM Tris a 0,01 % SDS po dobu 16 až 20 hodin při teplotě 4°C a konstantním napětí 200 V. Eluát byl zachycen a zakoncentrován pomocí mikrokonzentrační cely Centricon-100 firmy Amicon.

Vzorek koncentrovaného eluátu byl elektroforeticky rozdělen na 10% SDS-PAGE, obarven pomocí Coomassie brilliant blue a poté byla stanovena jeho čistota pomocí imunoblotu.

Poté byl GP protein ještě chromatograficky přečištěn pomocí HPLC na reverzní fázi, přičemž byla použita kolona Shandon WP300 (0,46x25 cm), C 4,5 μ m. Chromatografie probíhala v acetonitrilovém gradientu (0% až 100% složky B během 40 minut, složka A: 0,1% TFA (kyselina trifluorooctová), 10% acetonitril, složka B: 0,1 % TFA, 90% acetonitril). Během chromatografického dělení byla udržována teplota 60°C a průtoková rychlost elučního činidla 1 ml/min.

Příklad 2: Příprava fúzního proteinu M2 influenza A viru

Příprava fúzního proteinu M2 influenza A viru probíhala způsobem podrobně popsáným v publikacích Zebedee a další, J. Virol. 56, strana 502, (1985); Pinto a další, Cell 69, strana 517 (1992) a Black a další, J. Gen. Virol. 74, strana 1673, (1993).

Příklad 3: Příprava kationtového proteinového nosiče podle vynálezu

Příprava a charakterizace nosného systému byla popsána v dizertační práci Müller, Bazilej (1994). Částice byly charakterizovány podle své velikosti (stanoveno fotonovou korelační spektroskopií), podle svého povrchového náboje (stanoveno měřením zetapotenciálu) a své morfologie (stanovena rastrovací elektronovou mikroskopií). Jednotlivá stanovení byla prováděna dobře známymi způsoby, viz dizertační práce Müller, Bazilej (1994) a Junginger a další, Farm. Ztg. 25, strana 9 (1991).

Kationizace albuminu probíhala způsobem podrobně popsáným v publikacích Bergmann a další, Clin. Sci. 67, strana 35, (1984) a Kumagai a další, J. Biol. Chem. 262, strana 15214 (1987). Karboxylové skupiny lidského serového albuminu byly nejprve aktivovány N-ethyl-N'-3-(dimethylaminopropyl)-karbodiimid-hydrochloridem a pak byl celý protein kationizován navázáním hexamethylendiaminu. Oddělení přebytečného nezreagovaného činidla bylo prováděno dialýzou a pomocí sloupcové chromatografie. Míra kationizace byla určena měřením zetapotenciálu a elektroforeticky.

Příprava kationizovaného lidského sérového albuminu (CHSA)

K 67 ml 2M roztoku hexamethylendiaminu bylo přidáno 5 ml 20% roztoku sérového albuminu a hodnota pH byla upravena na 7,8. Směs byla míchána 30 minut při pokojové teplotě a 100 otáčkách zaminutu a poté byl přidán 1 g N-ethyl-N'-3-(dimethyl-aminopropyl)-karbodiimidhydrochloridu. Poté byla opět překontrolována hodnota pH a směs byla 4 h inkubována za pokojové teploty. Přehřívání směsi bylo zabráněno příležitostnou inkubací v ledové lázni. Konečný produkt byl zakoncentrován a oddělen od nízkomolekulárních složek pomocí koncentrátoru Amicon (s mezí propustnosti 30 kDa) v pěti centrifugačních krocích. Stav purifikace byl

monitorován fotometricky (při vlnové délce 280 nm) a osmometricky. Přečištěný derivát byl lyofilizován a uskladněn při 4°C.

Charakterizace cHSA

Charakterizace kationizovaného cHSA byla prováděna známými elektroforetickými způsoby. Izoelektrická fokusace v homogenním polyakrylamidovém gelu (5% T, 3% C) a s amfolity Pharmalyte[®] Carrier v rozsahu pI 3 až 9 (Phast Gel IEF 3 až 9) ukázala posun izoelektrického bodu od pI 4 k pI 7 až 9. SDS-PAGE na gradientu Phast Gel 10 až 15 % (Phast Gel buffer strips, neredukující prostředí) prokázala, že molekulová hmotnost 67 kDa nebyla kationizací pozměněna. Agragáty o vyšší molekulové hmotnosti nebyly touto technikou dokázány.

Kationizovaný albumin má absorpční maximum v UV oblasti při vlnové délce 276 až 278 nm. Míra kationizace byla stanovena flurometricky po substituci volných primárních aminoskupin fluoresceinaminem. Excitační vlnová délka byla 390 nm a emisní 475 nm, stanovování probíhalo při pH 7. Přepočítávací faktor 2,0 až 3,0 dokazoval úplnou substituci.

Kationizovaný albumin lze bez problémů fotometricky stanovit například ve směsi s plazmidy pomocí známého BCA-testu na proteiny při koncentracích 5 až 10 µg/ml. Fotometrické stanovování se provádí při vlnové délce 562 nm.

Stanovení funkčnosti cHSA

a) Příprava makromolekulárního komplexu cHSA/plazmid

22,95 µg plazmidu CMV-lacZ bylo inkubováno 10 minut v 1,4 ml 0,9% sterilního roztoku chloridu sodného. Roztok byl míchán při 100 otáčkách za minutu při pokojové teplotě. Pak byl k roztoku po kapkách (jedna kapka za sekundu) přidáván 1 ml sterilně filtrovaného roztoku kationizovaného lidského sérového albuminu v 0,9 % chloridu sodném. Směs byla za

stálého míchání ponechána 5 minut za pokojové teploty tak, aby se vytvořil požadovaný komplex.

b) Charakterizace vzniklého komplexu

Koncentrace cHSA nutná pro neutralizaci a kationizaci plazmidu byla stanovena pomocí elektroforézy na agarózovém gelu (1% agarózový gel, TAE pufr, pH7,4, 90 V, 3h). Nenavázané přebytky plazmidu byly detekovány přidavkem ethidiumbromidu, podíl proteinové složky pomocí následného barvení Coomassie modří. Komplexy plazmid-protein s celkovým kladným nábojem putovaly za uvedených podmínek zřetelně ke katodě. Komplexy připravené z 0,3 ml roztoku obsahujícího 8,3 mg/ml cHSA vykazovaly negativní celkový náboj, zatímco komplexy připravené z 0,6 ml; 1 ml; 1,5 ml a ze 2 ml vykazovaly celkový pozitivní náboj. Za žádné z vybraných koncentrací nebyly pozorovány volné plazmidy.

Desetiminutová inkubace ve fyziologickém roztoku plazmidu nijak viditelně neuškodila.

Velikost komplexů vhodná pro transfekci byla stanovena pomocí fotonové korelační spektroskopie (Zetasizer 1, AZ 110, 90°, vlnová délka 633 nm). Velikost komplexů byla nastavena na 310 až 360 nm pomocí změn v :

- v objemech jednotlivých reakčních složek
- složení a iontové síle inkubačního média
- koncentraci cHSA
- době inkubace cHSA
- rychlosti přidávání roztoku cHSA
- hodnotě pH inkubačního média.

Popsaným způsobem se získá opaleskující roztok komplexu plazmidu podle vynálezu.

c) Transfekce buněk pomocí komplexů cHSA/CMV-lacZ

Buňky 3T3 byly kultivovány v médiu DMEM s přidavkem 10 % fetálního telecího séra (FCS, fetal calf serum), pH 7,1. Kultivační médium neobsahovalo žádná antibiotika. Kultivace probíhal při 37°C v atmosféře 5% CO₂ a 89% vlhkosti.

d) Přenos genu

200.000 buněk 3T3 bylo vyseto na Petriho misky s želatinou (průměr misek 3 cm) a byly kultivovány 24 h do dosažení přibližně 50% konfluencie. Poté bylo médium odstraněno, buňky promyty PBS bez vápníku a hořčíku, pH 7,4. Poté byly buňky převedeny do 2 ml média DMEM bez fetálního séra nebo do 1 ml 150mM NaCl/10mM HEPES, pH 7,4. Poté bylo přidáno 0,84 ml výše popsaného komplexu plazmidu/cHSA (to odpovídá přibližně 8 µg DNA) a inkubováno 1 h (NaCl/HEPES) při teplotě 37°C, respektive 2 h (DMEM) při stejné teplotě.

Doplňkově byly k transfekční směsi přidávány různá činidla kvůli modifikaci fúzogenních a lysozómotropních vlastností. Takovým činidlem byl například 85% sterilizovaný glycerol (200 µl; 1,84 ml). Po inkubaci bylo transfekční médium odsáto a na 48 h nahrazeno médiem DMEM s fetálním telecím sérem. Pro simulaci lysozómotropního efektu byla část transfekční směsi odebrána po 1 hodinové, respektive 2 hodinové transfekční inkubaci, a poté byla další 3 hodiny inkubována v médiu DMEM s obsahem chlorochinu (DMEM, 2,5 % FCS, 0,1 mM chlorochin. Poté byl roztok chlorochinu nahrazen DMEM s 10 % FCS.

Jako kontrola transfekčních podmínek byla provedena transfekce buněk 3T3 lipofektaminem způsobem popsaným v literatuře (10 µl činidla, 2 µg DNA).

Po 48 hodinách bylo médium odstraněno, buňky jednou promyty PBS bez vápníku a hořčíku a 10 minut fixovány v 0,1% glutaraldehydu v PBS. Přebytný glutaraldehyd byl odstraněn

dvojnásobným promytím v PBS. Transfikované buňky byly obarveny inkubací v 0,003M roztoku ferrikyanidu draselného, 0,003M ferrokyanidu draselném a 0,08% X-Gal (zásobní roztok v 2% DMF) v PBS. Barvení bylo prováděno přes noc při pokojové teplotě. Vyhodnocení výsledků bylo prováděno mikroskopicky.

Čistý komplex plazmid/cHSA nevedl v žádném případě ke transfekci. Přídavek 85% glycerolu ke kultivačnímu médiu způsobil již po 1 h odumření buněk. V médiu pufrovaném NaCl/HEPES byly po chlorochinovém šoku pozorovány transfekční rychlosti odpovídající hodnotám uváděným v literatuře pro DAE-dextran. V médiu DMEM byl přenos genů podstatně slabší.

Tabulka 1: Přehled způsobů charakterizace lidského sérového albuminu

	Způsob	Výsledek
Rozpustnost		dobrá ve vodě a fyziologických médiích
pI	izoelektrická fokusace	pI 7 až 9
Molekulová hmotnost	SDS-PAGE	67.000
Vysokomolekulární agregáty	SDS-PAGE	žádné
Absorpční maximum	UV-spektroskopie	276 až 278 nm
Míra kationizace	Fluorimetrie (fluorescenamin)	teoreticky: 2,18 prakticky: 2,0 až 3,0
Stanovení celkového náboje	elektroforéza na agarovém gelu	pozitivní náboj
Stanovení množství	BCA- test na proteiny	-

Tabulka 2: Vyhodnocení podmínek pro vznik komplexu

Objemy reakční směsi pro inkubaci

- 110 μ l
- 1,4 ml

Složení a iontová síla inkubačního média

- redestilovaná voda
- PBS bez vápníku a hořčíku, pH 7,4
- fyziologický roztok (NaCl)
- 150mM NaCl, 10mM HEPES, pH7,4
- DMEM bez séra

Koncentrace cHSA

- Testované koncentrace:
0,1 μ g, 1 μ g, 10 μ g, 100 μ g, 0,5 mg, 1 mg, 1,5 mg, 2 mg, 2,5 mg, 3 mg, 5 mg, 10 mg vždy na 1 ml roztoku
- Vybrané koncentrace:
2,49 mg, 5,16 mg, 8,3 mg, 12,45 mg, 16,6 mg vždy na 1 ml roztoku

Doba inkubace

- 5, 30, 60, 120 a 180 minut

Hodnota pH v inkubačním médiu

- pH 4,0
- pH 7,4
- pH 9

Rychlost přidávání cHSA

- 1 kapka za sekundu

- okamžité přidání cHSA

Příklad 4: Příprava plazmidu

Lidský promotor endothelinu-1 (v pozici -170 až -10), viz Wilson a další, Mol. Cell Biol. strana 4654, (1990)) nebo jeho varianta zkrácená o TATA box (pozice -170 až -40) byl navázán na svém 3' konci na 5' konec modulu CDE-CHR-Inr (pozice -20 až +121) lidského genu cdc25C (UK 950.6466.3). K navázání byly použity běžně dostupné enzymy a způsoby odborníkům dobře známé.

Takto sestavená chiméra obsahující promotorový modul endothelinu-1/transkripční jednotku byla dále svým 3'koncem navázána na 5'konec DNA, která obsahovala kompletní kódující oblast lidské β -glukoronidázy (pozice 27 až 1982, viz Oshima a další, PNAS USA 84, strana 685 (1987)). Tato DNA obsahovala rovněž signální sekvenci důležitou pro sekreci (22 N-koncových aminokyselin). Pro usnadnění této buněčné sekrece byla tato signální sekvence nahrazena signální sekvencí imunoglobulinů (pozice 63 až 107, viz Reichmann a další, Nature 332, strana 323, (1988)). Sekvence pro kontrolu transkripce a DNA pro β -glukoronidázu byly vloženy do plazmidových vektorů odvozených od pUC18/19 nebo Bluescript. K tomuto vložení byly použity běžně dostupné enzymy a způsoby odborníkům dobře známé.

Příklad 5: Tvorba komplexu kationizovaného nosiče s plazmidem

Tvorba komplexu nosiče s plazmidem probíhala během inkubace obou komponent ve vhodném vzájemném poměru. Míra asociace byla ovlivňována změnou zetapotenciálu.

6,5 ml 20% roztoku kationizovaného HSA (příprava výše popsána, vybrán HSA z rozmezí 5 až 35 %) bylo přidáno k roztoku plazmidu (vybrán z rozmezí 1:1 až 1:10) v poměru 1:2. 93,5 ml organické fáze sestávající z dichlormethanu s methanolem v poměru 1:1 s 0,5% přísádkem Klucelu GF bylo 30

minut temperováno na 20°C a poté byla při průtokové rychlosti 500 ml/min smíchána s roztokem albuminu . Do emulze byly 15 minut pouštěny pulzy o velikosti 65 Wattů. Poté bylo ke směsi přidáno 6,6 mmol glutaraldehydu v methylenchloridu pro zesíťování. Během zesíťování byla směs promíchávána při 2200 otáčkách/min po dobu 80 až 100 minut.

Příklad 6: Zavedení lipofilních skupin

Zavedení lipofilních skupin bylo prováděno acylací za podmínek, které jsou odborníkům dobře známy. Při tomto postupu reaguje derivát karboxylové kyseliny s primárními aminoskupinami albuminu známým adičně-eliminačním mechanismem acylace za vzniku amidu karboxylové kyseliny.

0,1 g chloridu kyseliny olejové bylo smíšeno s 5 až 10 ml bezvodého dioxanu a po kapkách přidáno k suspenzi částic (připraveny tak, jak bylo popsáno části c)) v dioxanu v poměru 1:4 (vybráno z rozmezí 1:1 až 1:10). Směs byla intenzivně protřepávána. Po přidání nadbytku vodného roztoku amoniaku byla směs 10 minut míchána a lehce okyselena zředěnou kyselinou chlorovodíkovou. Částice byly odděleny centrifugací a zneutralizovány promytím vodou.

Příklad 7: Konjugace ligandů a fúzogenních proteinů na nosiči
Spojení ligandů a fúzogenních proteinů s nosným systémem bylo prováděno kovalentní konjugací podle metody SPDP, viz Khawli a další, Int. J. Rad. Appl. Instrum. B 19, strana 289, (1992) a Candiani a další, Cancer Res. 62, strana 623, (1992). Primární aminoskupiny lysinových zbytků albuminu při tomto postupu reagují se SPDP za vzniku derivátů obsahujících disulfidovou skupinu. Ty lze odborníkům známým způsobem kovalentně navázat na sulfhydrylové skupiny ligandu a fúzogenního proteinu za známých podmínek.

200 nmol činidla SPDP v 99,5% ethanolu bylo po dobu 30 minut při pokojové teplotě inkubováno spolu se 74 nmol kationizovaných a lipofilizovaných HSA částic (připraveny podle odstavce c) v PBS. Ke konjugační směsi byl přidán roztok glykoproteinu GP Ebolaviru (připraven podle odstavce a) a fúzogenního proteinu M2 chřipkového viru (připraven podle odstavce b) v poměru 1:1 (vybráno z rozmezí 1:1 až 1:10). Konjugační směs byla za stálého míchání inkubována přes noc při pokojové teplotě. Nenavázané složky byly odděleny centrifugací.

Příklad 8: Využitelnost specifických vektorů pro zavedení genů do cílových buněk podle vynálezu

Specifické vektory pro zavedení genů do cílových buněk připravené podle popsaných příkladů se po systémovém podání, výhodně po intravenózním nebo intraarteriálním podání, tkáňově specificky vážou díky svým ligandům přednostně na endotheliální buňky. Po přijetí těchto vektorů endozómy dochází k jejich proniknutí do cytoplazmy. Toto proniknutí je umožněno fúzogenním proteinem. Díky tkáňově specifické promotorové sekvenci a promotorovému modulu určenému k regulaci buněčného cyklu dochází k převážné expresi vloženého genu v proliferujících endotheliálních buňkách. Díky vloženému genu se z proliferujících buněk uvolňuje β -glukuronidáza, která štěpí farmakologicky inaktivní β -glukuronidy (promotor léčiva) na aktivní složky. Těmito aktivními složkami mohou být látky, které působí například jako antiproliferativa nebo cytostatika. Tím dojde k inhibici růstu proliferujících endotheliálních buněk a k inhibici okolních tumorů nebo zánětů. Znamená to, že účinná látka podle vynálezu omezí vznik antiproliferativní nebo cytostatické substance na místo tumorové nebo zánětlivé angiogenze, a díky tomu je i snesitelnost takové léčby dobrá.

Volbou (nevirových) nosičů pro vybraný gen nejsou způsobena žádná rizika mutace pacientových genů, ke kterým by mohlo dojít po aktivaci klidových genomických virů nebo po rekombinaci s divokými viry.

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 1:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 29 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 29

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 1:

GAAGG ATCCT GTGGG GCAAC AACAC AATG

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 2:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 27 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 27

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 2:

AAAAA GCTTC TTTCC CTTGT CACTA AA

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 3:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 18

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 3:

CGGAC TCTGA CCACT GAT

INFORMACE O SEKVENCI ID. Č. 4:

(i) CHARAKTERISTIKA SEKVENCE:

- (A) DÉLKA: 18 párů basí
- (B) TYP: nukleová kyselina
- (C) POČET VLÁKEN: jedno
- (D) TOPOLOGIE: lineární

(ii) TYP MOLEKULY: DNA (genomová)

(ix) CHARAKTERISTICKÉ RYSY:

- (A) JMÉNO/KLÍČ: exon
- (B) UMÍSTĚNÍ: 1 až 18

(xi) POPIS SEKVENCE ID.Č. 3:

TCGTG GCAGA GGGAG TGT

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Specifické vektory pro zavedení alespoň jednoho genu do cílových buněk některého organismu v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahují následující komponenty:
 - a) nevirový nosič přenášeného genu
 - b) ligand, který je schopen specifické vazby na požadované cílové buňky
 - c) protein nebo fúzogenní peptid umožňující proniknutí vektoru do cytoplazmy cílové buňky
 - d) přenášený gen
2. Vektor podle nároku 1 v y z n a č u j í c í s e t í m , že jednotlivé komponenty tohoto specifického vektoru jsou navzájem vázány kovalentní a/nebo adsorbční vazbou.
3. Vektor podle libovolného z nároků 1 nebo 2 v y z n a č u j í c í s e t í m , že nevirový nosič (a) je vybrán ze skupiny tvořené proteiny, polypeptidy, polysacharidy, fosfolipidy, kationickými lipidy, glykoproteiny, lipoproteiny nebo lipopolyaminy.
4. Vektor podle nároku 3 v y z n a č u j í c í s e t í m , že nevirový nosič (a) je kationizován pozitivně nabitými postranními skupinami a vazba mezi nevirovým nosičem a pozitivně nabitými postranními skupinami je kovalentní nebo adsorbční.
5. Vektor podle libovolného z nároků 1 až 4 v y z n a č u j í c í s e t í m , že nevirový nosič (a) má kovalentě nebo adsorbčně navázané lipofilní postranní skupiny, čímž získá amfifilní vlastnosti.

6. Vektor podle libovolného z nároků 1 až 5 v y z n a č u j í c í s e t í m , že nevirový nosič (a) je albumin nebo xylan.
7. Vektor podle libovolného z nároků 1 až 5 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na vnější buněčnou membránu zvířecí nebo lidské buňky.
8. Vektor podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na endotheliální buňky a je vybrán ze skupiny tvořené monoklonálními protilátkami se specifitou k endotheliálním buňkám, nebo jejich fragmenty, kininem nebo jeho analogy či homology, glykoproteiny, glykolipidy nebo polysacharidy obsahujícími sacharidové řetězce zakončené manózou, cytokiny, růstovými faktory, adhezivními molekulami nebo obalovými glykoproteiny virů, které mají afinitu k endotheliálním buňkám.
9. Vektor podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na buňky hladkého svalstva a je vybrán ze skupiny tvořené monoklonálními protilátkami se specifitou k aktinu nebo buněčným membránovým receptorům, růstovými faktory nebo obalovými glykoproteiny virů, které mají afinitu k hladkým svalovým buňkám.
10. Vektor podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na makrofágy a/nebo na lymfocyty a je vybrán ze skupiny tvořené monoklonálními protilátkami se specifitou k membránovým antigenům na povrchu makrofágů a/nebo lymfocytů, intaktními imunoglobuliny nebo Fc fragmenty polyklonálních nebo monoklonálních protilátek specifických k membránovým antigenům makrofágů a/nebo

lymfocytů, cytokiny, růstovými faktory dále pak peptidy, proteiny, lipidy nebo polysacharidy obsahujícími sacharidové řetězce zakončené manózou a nebo obalovými glykoproteiny virů, proteinem HEF z influenza-C viru mutovaným na nukleotidové pozici 872 nebo štěpným produktem proteinu HEF influenza-C viru, který obsahuje katalytickou triádu serin-71, histidin-368 nebo 369 a kyselinu asparagovou 261.

11. Vektor podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na gliové buňky a je vybrán ze skupiny tvořené protilátkami se specifitou k membránovým strukturám gliových buněk nebo jejich fragmenty, adhezivními molekulami a dále pak peptidy, proteiny, lipidy nebo polysacharidy obsahujícími sacharidové řetězce zakončené manózou, růstovými faktory a obalovými glykoproteiny virů s afinitou ke gliovým buňkám.
12. Vektor podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na krvetvorné buňky a je vybrán ze skupiny tvořené protilátkami nebo jejich fragmenty se specifitou k některému receptoru pro faktor kmenových buněk, k receptoru pro IL-1 (k receptoru typu I nebo II), k receptoru pro IL-3 (k receptoru typu α nebo β), k receptoru pro IL-6 nebo GM-CSF, jakož i intaktními imunoglobuliny nebo Fc fragmenty protilátek s výše uvedenou specifitou a dále pak růstovými faktory jakož i jejich fragmenty schopnými vazby na příslušné receptory.
13. Vektor podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na leukemické buňky nebo buňky tumoru a je vybrán ze skupiny tvořené steroidními hormony, peptidovými hormony, protilátkami, fragmenty protilátek, imunoglobuliny nebo

Fc-fragmenty, které vykazují specifickou vazbu k membránovým strukturám na povrchu leukemických buněk jako jsou například CD13, CD14, CD15, CD33, CAMAL, Sialosyl-Le, CD5, CD1e, CD23, M38, IL-2 receptory, T-buněčné receptory, CALLA nebo CD19, jakož i růstové faktory či jejich fragmenty nebo retinoidy.

14. Vektor podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na buňky infikované virem a je vybrán ze skupiny tvořené protilátkami, fragmenty protilátek, intaktními imunoglobuliny nebo Fc-fragmenty, které vykazují specifickou vazbu k virovým antigenům, které se po infekci tímto virem exprimují na povrchu infikované buňky.
15. Vektor podle nároku 7 v y z n a č u j í c í s e t í m , že se ligand (b) může specificky vázat na buňky bronchiálního epitelu, jaterní sinusoidální buňky, jaterní buňky a je vybrán ze skupiny tvořené transferinem, asialoglykoproteiny jako asialoorosomukoidem, neoglykoproteinem, galaktózou, inzulinem, nebo peptidy, proteiny, lipidy nebo polysacharidy zakončenými manóзовými zbytky, dále pak intaktními imunoglobuliny nebo Fc-fragmenty, které se specificky vážou na tyto cílové buňky a obalovými glykoproteiny virů s afinitou k cílovým buňkám.
16. Vektor podle libovolného z nároků 1 až 15 v y z n a č u j í c í s e t í m , že fúzogenní protein (c) je vybrán ze skupiny tvořené hemaglutininem influenza-A nebo B viru, komponentou HA2 hemaglutininu influenza-A nebo B viru, jakož i jejich peptidovými analogy, M2 proteinem influenza-A viru, proteinem HEF influenza-C viru, transmembránovými proteiny filovirů, transmembránovými glykoproteiny viru vztekliny, viru

vesikulární stomatitidy, Semliki Forest viru, viru klíšťové encefalitidy, fúzogenním proteinem viru HIV, viru Sendai nebo viru respirační syncytialidy, jakož i fragmenty těchto virových proteinů nebo transmembránových glykoproteinů u nichž byla odstraněna jejich transmembránová část.

17. Vektor podle libovolného z nároků 1 až 16 v y z n a č u j í c í s e t í m , že přenášený gen (d) je ve formě plazmidu.
18. Léčivo v y z n a č u j í c í s e t í m , že obsahuje vektor podle libovolného z nároků 1 až 17.
19. Použití vektoru podle libovolného z nároků 1 až 7 k výrobě léčiva pro intravenózní, intraarteriální, intraportální, intrakraniální, intrapleurální, intraperitoneální nebo lokální zavedení požadovaného genu do určité cílové buňky.