



ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21), (22) Заявка: 2003108736/13, 29.08.2001

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
29.08.2001(30) Конвенционный приоритет:
31.08.2000 (пп.1-40) US 09/653,088

(43) Дата публикации заявки: 10.02.2005

(45) Опубликовано: 20.07.2006 Бюл. № 20

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: UCHIDA N. et al., «HIV, but not murine leukemia virus, vectors mediate high efficiency gene transfer into freshly isolated GO/G1 human hematopoietic stem cells», Proc Nati Acad Sci USA. 1998 Sep 29; 95(20):11939-44. COSTELLO E. et al., «Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-I-derived lentiviral vectors», Gene Ther. (см. прод.)

(85) Дата перевода заявки РСТ на национальную фазу:
31.03.2003(86) Заявка РСТ:
US 01/27091 (29.08.2001)(87) Публикация РСТ:
WO 02/18609 (07.03.2002)Адрес для переписки:
129010, Москва, ул. Б.Спасская, 25, стр.3,
ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры", пат.пов. Е.Е.Назиной

(72) Автор(ы):

ЮМО Лоран (US),
ХАН Вей (US),
ЛУ Ксиаобин (US),
СЛЕПУШКИН Владимир (US),
ЛЕШЕР Мишель (US),
ДЭВИС Брайан (US),
ЧАНГ Юнг-Ниен (US),
ДРОПУЛИК Боро (US)

(73) Патентообладатель(и):

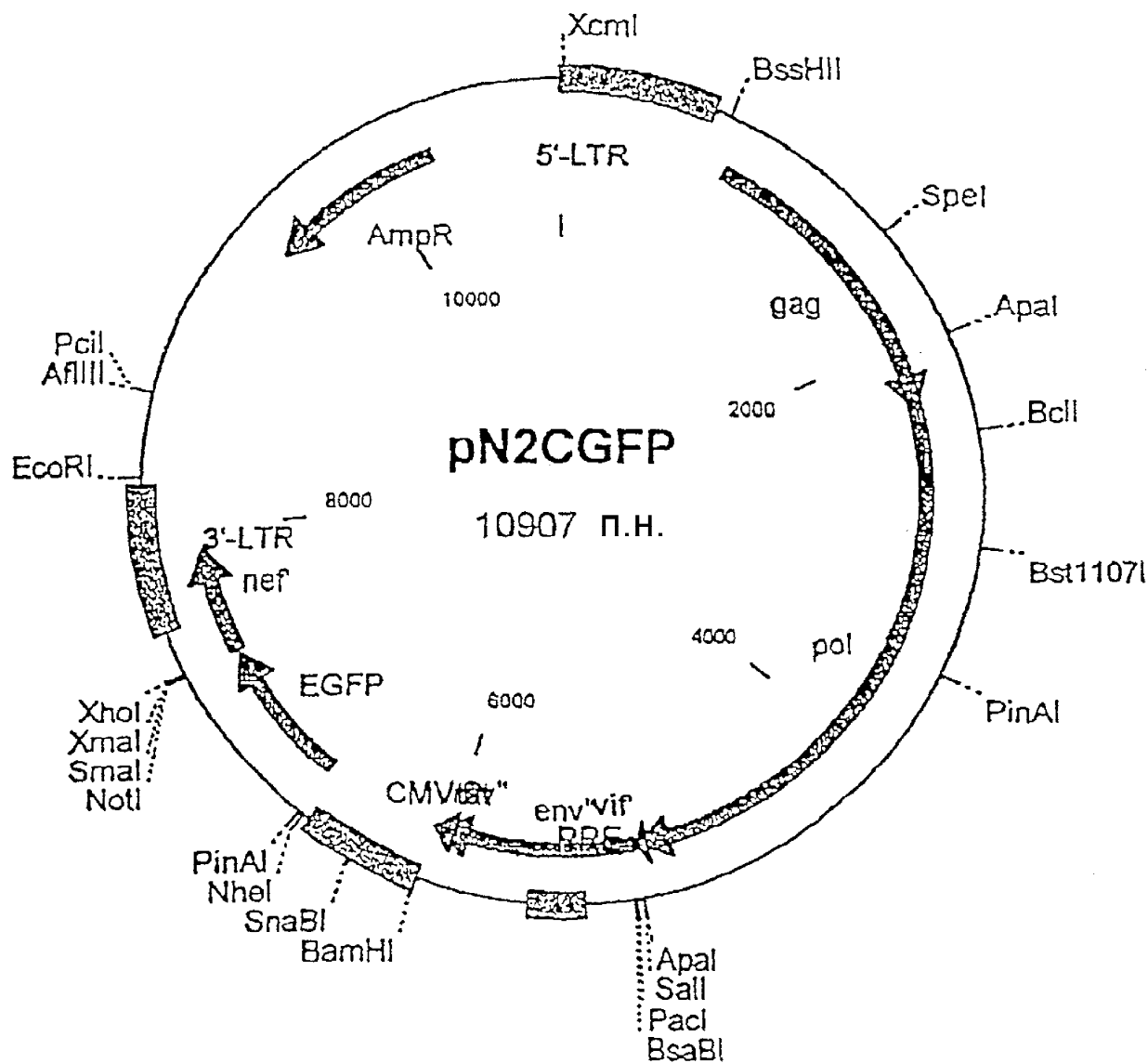
ВИРЭКССИС КОРПОРЕЙШН (US)

(54) СПОСОБЫ СТАБИЛЬНОЙ ТРАНСДУКЦИИ КЛЕТОК ВИРУСНЫМИ ВЕКТОРАМИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Предложен способ стабильной трансдукции первичных клеток гематопозитической системы или гематопозитических стволовых клеток. Способ предусматривает контактирование клетки в одно и то же время *in vitro* или *ex vivo* с лентивирусным вектором и молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью. При

осуществлении способа стабильно трансдуцируется более 75% клеток через 14 дней. Также предложены способ введения генетического материала в клетку и применение клеток, полученных с помощью таких способов. Изобретение может быть использовано в области медицины, вирусологии и генетической инженерии. 9 н. и 31 з.п. ф-лы, 9 ил.



ФИГ. 1А

(56) (продолжение):

2000 Apr; 7(7):596-604. DOUGLAS J. et al., «Efficient transduction of human lymphocytes and CD34+ cells via human immunodeficiency virus-based gene transfer vectors», Hum Gene Ther. 1999 Apr 10; 10(6):935-45.

RU 2280074 C2

RU 2280074 C2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

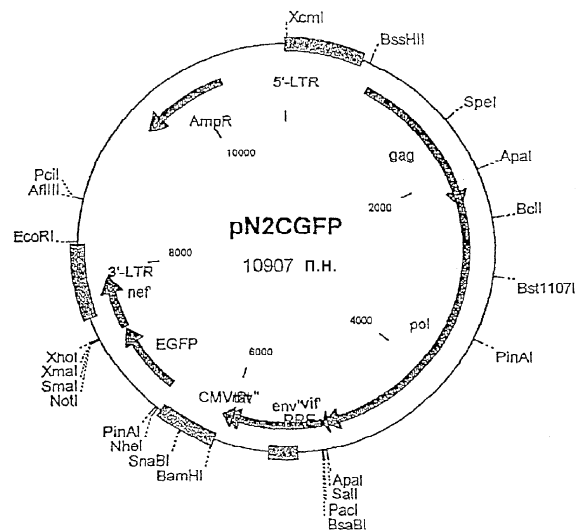
(21), (22) Application: **2003108736/13, 29.08.2001**
(24) Effective date for property rights: **29.08.2001**
(30) Priority:
31.08.2000 (cl.1-40) US 09/653,088
(43) Application published: **10.02.2005**
(45) Date of publication: **20.07.2006 Bull. 20**
(85) Commencement of national phase: **31.03.2003**
(86) PCT application:
US 01/27091 (29.08.2001)
(87) PCT publication:
WO 02/18609 (07.03.2002)

Mail address:
**129010, Moskva, ul. B.Spasskaja, 25, str.3,
OOO "Juridicheskaja firma Gorodisskij i
Partnery", pat.pov. E.E.Nazinoj**

(72) Inventor(s):
**JuMO Loran (US),
KhAN Vej (US),
LU Ksiaobin (US),
SLEPUSHKIN Vladimir (US),
LEShER Mishell' (US),
DEhVIS Brajan (US),
ChANG Jung-Nien (US),
DROPULIK Boro (US)**
(73) Proprietor(s):
VIREhKSSIS KORPOREJShN (US)

(54) **METHOD FOR STABLE CELL TRANSDUCTION BY VIRAL VECTORS**

(57) Abstract:
FIELD: biotechnology.
SUBSTANCE: invention relates to method for stable cell transduction of hematopoiesis system or hematopoiesis stem cells. Claimed method includes simultaneous cell in vivo or in vitro contact with lentivirus vector and molecule bonding to cell surface. Method of present invention allows stable transduction more 75 % of cells over 14 days. Method for introduction of gene material into cell also is disclosed.
EFFECT: new method useful in medicine, virology, and gene engineering.
40 cl, 28 dwg, 9 ex



ФИГ. 1А

RU 2 280 074 C2

RU 2 280 074 C2

Область, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к способам, а также к композициям, применяемым в этих способах, для эффективной и стабильной трансдукции клеток с использованием вирусных векторов. Эти способы позволяют увеличить эффективность трансдукции

5 посредством контактирования трансдуцируемой клетки с одной или несколькими молекулами, которые связываются с клеточной поверхностью. Стадия контактирования может быть осуществлена до или после введения или одновременно с введением вирусного вектора в эти клетки. Настоящее изобретение также относится к использованию стабильно трансдуцируемых клеток в других целях, включая экспрессию нуклеиновых

10 кислот, присутствующих в векторе, или лечение живых организмов.

Предпосылки создания изобретения

Методы "трансфекции", которые в основном относятся к введению генетического материала в клетку, внесли огромный вклад в молекулярную и рекомбинантную революцию в области биологии. Примерами методов трансфекции высших эукариотических клеток

15 являются преципитация фосфатом кальция, обработка DEAE-декстраном, электропорация, микроинъекция, липофекция, инфицирование вирусом и другие методы, описанные во многих научных руководствах и журналах.

Из методов трансфекции уникальным методом является использование вирусной инфекции, где природный вирус, используемый как средство введения его генетического

20 материала в клетку, имеет то преимущество, что он переносит желаемую молекулу нуклеиновой кислоты в клетку. Примерами вирусов, модифицированных и используемых в таких методах, являются аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, вирусы простого герпеса и ретровирусы. В общих чертах, в вирусный геном могут быть клонированы желаемые молекулы нуклеиновой кислоты. После репликации и упаковки вирусного генома

25 полученная вирусная частица способна доставлять желаемую нуклеиновую кислоту в клетку в соответствии с механизмом внедрения вируса в клетку.

В основном вирусный геном сначала делают дефектным по репликации посредством модификации нуклеиновой кислоты, а затем добавляют желаемую нуклеиновую кислоту. Полученный вирусный геном или вирусный вектор, для осуществления сборки вирусной

30 частицы и ее высвобождения из клетки, требует использования вируса-помощника или системы упаковки. Метод, в котором для переноса желаемого генетического материала в клетку используется вирусный вектор или вирусная частица, называется "трансдукцией". Таким образом, в общих чертах, "трансдукция" клетки предусматривает использование вирусного вектора или вирусной частицы для переноса генетического материала в клетку.

Из методов трансдукции особый интерес для генетической модификации клеток млекопитающих представляет использование ретровирусов. Особый интерес представляет использование модифицированных ретровирусов для введения генетического материала в

35 клетки в целях лечения заболеваний, связанных с генетическими дефектами, и других заболеваний. Такой метод может быть использован, например, в случае клеток гемопоетической системы, где ретровирусы и лентивирусные векторы являются объектом интенсивных исследований.

Так, например, Movassagh и др. в своих исследованиях обсуждают попытки повысить эффективность опосредуемой ретровирусом трансдукции путем использования результатов исследования клеточного цикла активированных Т-клеток. По существу, эти

45 результаты зависят от активного деления клеток в процессе трансдукции. Эта работа также ограничена использованием мышиноного онкоретровируса и требованием значительной предварительной стимуляции клеток перед трансдукцией клеток.

June et al. (WO 96/34970) описывают использование стимуляции Т-клеток в целях повышения уровня трансфекции Т-клеток. Другой работой, посвященной трансдукции Т-

50 клеток с использованием активированных или стимулированных клеток, является публикация Douglas et al., Hooijberg et al., Onodera et al., Klebba et al., Barry et al. и Unutmaz et al. К сожалению, ни в одной из этих работ не была продемонстрирована эффективность трансдукции более, чем примерно на 65%.

Costello и др. описали трансдукцию стимулированных и нестимулированных Т-клеток с использованием лентивирусных векторов на основе вируса-1 иммунодефицита человека (ВИЧ-1). Максимум эффективности, которую они наблюдали, составляла лишь примерно 17% для стимулированных первичных Т-клеток и менее 19% для нестимулированных Т-клеток. Эти авторы также отмечали ограниченную возможность увеличения эффективности до не более, чем 36% для стимулированных Т-клеток путем введения вспомогательных белков ВИЧ-1.

Chinnasamy и др. также описали увеличение эффективности трансдукции в присутствии вспомогательных белков ВИЧ-1 как в нестимулированных, так и в стимулированных митогеном Т-клетках. Подобно Movassagh и др., Chinnasamy и др. перед трансдукцией с использованием лентивирусного вектора осуществляли предварительную стимуляцию лимфоцитов крови в течение продолжительного периода времени. Сначала через 3 дня после трансдукции Chinnasamy и др. наблюдали эффективность трансдукции более чем на 96%, однако через две недели после трансдукции процент стабильно трансдуцируемых клеток снижался до 71,2%. Haas и др. также наблюдали кратковременную трансдукцию и "псевдотрансдукцию" в клетках, трансдуцированных лентивирусным вектором, способным экспрессировать маркерный ген (белок, флуоресцирующий в "зеленом" диапазоне спектра). Даже через три дня после трансдукции значительная (выше 10%) кратковременная трансдукция была детектирована на основе неинтеграционной экспрессии маркерного гена в трансдуцированных первичных CD34⁺-клетках пуповинной крови. Такая экспрессия в результате кратковременной трансдукции оставалась детектируемой на уровне примерно 5% даже через семь дней после трансдукции. В клетках, трансдуцированных вектором, не содержащим маркера, экспрессия, осуществляемая в результате кратковременной трансдукции, обнаруживалась только примерно через 10 дней после трансдукции.

Поэтому в случае, когда интегрированная форма вирусного вектора была встроена в хромосомную ДНК трансдуцированной клетки, Chinnasamy и др. не могли достичь стабильной трансдукции первичных лимфоцитов более чем на 71,2%, на что указывала эффективность трансдукции через две недели. Данный эффект наблюдался несмотря на применение цитокинов для престоимляции клеток. Кроме того, Chinnasamy и др. указывали, что они не смогли добиться значимой трансдукции (только 3,6% через 14 дней после трансдукции) нестимулированных лимфоцитов с использованием ВИЧ-вектора, который не экспрессировал вспомогательные белки (Vif, Vpr, Vpu и Nef) даже после более поздней стимуляции клеток митогеном РНА и цитокином IL-2 после трансдукции. Хотя эти результаты были несколько улучшены с использованием нестимулированных клеток и векторов, содержащих вспомогательные белки, однако ни в одном случае эффективность стабильной трансдукции стимулированных или нестимулированных клеток не превышала 75% на 14-й день после трансдукции указанным вектором, независимо от используемой схемы стимуляции.

Низкая частота стабильной трансдукции лентивирусными векторами также наблюдалась Haas и др., и максимальная эффективность стабильной трансдукции, которую им удалось достичь через семь дней после трансдукции с использованием первичных CD34-положительных клеток пуповинной крови, составляла лишь менее чем 25%. Поразительно то, что этот 25%-ный верхний предел трансдукции не мог быть улучшен даже после использования исключительно высокой множественности инфекции или концентрации вектора, например, множественности инфекции (MOI) вплоть до 9000 и концентраций вектора вплоть до 10⁸ инфекционных единиц на миллилитр.

Follenzi и др. также использовали очень высокую MOI=500 для трансдукции клеток в присутствии смеси из трех цитокинов, содержащей интерлейкин-3 (IL-3), интерлейкин-6 (IL-6) и фактор стволовых клеток (SCF). Интересно отметить, что использование указанной смеси не позволяет использовать эти клетки для клинической трансплантации человеку.

Таким образом, необходимо разработать более эффективные способы стабильной клеточной трансдукции высокой частоты с использованием векторов. Кроме того,

необходимо разработать более эффективные способы трансдукции нестимулированных клеток в целях их использования в качестве инструментов для исследования и в качестве терапевтического агента.

5 Цитирование вышеуказанных документов не означает, что любой из вышеуказанных документов относится к предмету заявки. Все утверждения, относящиеся как к дате представления, так и к содержанию этих документов, основаны на информации, доступной для заявителя, и за точность этих дат или содержания указанных документов заявитель ответственности не несет.

Описание изобретения

10 Настоящее изобретение относится к высокоэффективным способам и к применяемым в них композициям для стабильной трансдукции клеток вирусными векторами и вирусными частицами. Термин "стабильная трансдукция" означает, что интегрированная форма данного вирусного вектора была встроена в хромосомную ДНК трансдуцированной клетки. Указанные способы предусматривают контактирование трансдуцируемых клеток по 15 меньшей мере с одной молекулой, которая связывается с клеточной поверхностью. Эта стадия контактирования может быть осуществлена до или после введения, либо одновременно с введением вирусного вектора или вирусной частицы в эти клетки. Используемый далее термин "вирусный вектор" означает любую форму нуклеиновой кислоты, происходящей из вируса и используемой для переноса генетического материала в 20 клетку посредством трансдукции. Этот термин охватывает нуклеиновые кислоты вирусного вектора, такие как ДНК и РНК, инкапсулированные формы этих нуклеиновых кислот, и вирусные частицы, в которых были упакованы указанные нуклеиновые кислоты вирусного вектора.

Настоящее изобретение также относится к использованию трансдуцированных клеток в 25 других целях, включая продуцирование желаемых генных продуктов и белков путем экспрессии нуклеиновой кислоты, присутствующей в данном векторе, или терапию живых индивидуумов, страдающих заболеванием, или индивидуумов с риском возникновения указанного заболевания. Таким индивидуумом предпочтительно является человек.

По меньшей мере одной молекулой, которая связывается с поверхностью 30 трансдуцируемых клеток, является любая молекула, которая физически взаимодействует с рецептором, маркером или другим распознаваемым элементом на поверхности клеток. В принципе для высокоэффективной трансдукции клеток может быть использована любая молекула, связывающаяся с клеточной поверхностью. Не претендуя на какую-либо теорию, можно сказать, что молекулы, связывающиеся с клеточной поверхностью, могут 35 обеспечивать более высокую восприимчивость хроматина клетки-хозяина к интеграции ДНК; преимущественную интеграцию вирусного вектора в сайт, благоприятный для экспрессии векторного гена; более эффективное внедрение капсида, содержащего нуклеиновую кислоту, в цитоплазму; более эффективное внедрение вируса через клеточную мембрану или внутренние мембранные структуры, такие как эндосома; или 40 получение клеток, которые являются более толерантными для нуклеарного импорта генетического материала вирусного вектора. Способы согласно изобретению могут также предусматривать более, чем одну из вышеуказанных возможностей. Кроме того, как очевидно из количества и разнообразия указанных возможностей, настоящее изобретение не может быть ограничено какой-либо одной теорией. Напротив, принимая во внимание 45 уникальность открытия согласно изобретению, позволяющего достигать 100%-ной стабильной трансдукции обработанных клеток без какого-либо негативного влияния на возможное использование этих клеток в терапии человека, настоящее изобретение должно рассматриваться как открытие нового подхода в области клеточной терапии человека.

Однако не все молекулы, связывающиеся с клеточной поверхностью, будут 50 обеспечивать эффективную и стабильную трансдукцию вирусными векторами. Так, например, связывание с клеточной поверхностью молекулы, которая индуцирует апоптоз, не будет приводить к эффективной трансдукции данной клетки, а, скорее, оно будет приводить к ее гибели. Хотя гибель клеток может оказаться предпочтительной для лизиса

клеток (например, опухолевых клеток), однако она не является предпочтительной для стабильной трансдукции клеток векторами, содержащими гены или последовательности нуклеиновой кислоты с полезной нагрузкой. Предпочтительная молекула, связывающаяся с клеточной поверхностью, сообщает клетке большую восприимчивость к трансдукции вирусным вектором. Примерами таких молекул являются антитело, специфичное к рецептору клеточной поверхности или к его части, а также лиганд или домен, связывающийся с таким рецептором. Кроме того, в целях настоящего изобретения могут быть использованы антигенсвязывающие фрагменты антител, такие как Fab- и Fv-фрагменты. Связывающий домен для специфического рецептора клеточной поверхности может содержать один эпитоп либо два или более эпитопов.

Предпочтительными примерами молекул, связывающихся с клеточной поверхностью, которые могут быть использованы в настоящем изобретении, являются анти-CD3- и анти-CD28-антитела, связывающиеся с Т-клетками и сообщающие им большую восприимчивость к трансдукции вектором. Другими предпочтительными примерами молекул, связывающихся с клеточной поверхностью, являются антитела или лиганды, которые связываются с рецепторами лиганда FLT-3, TPO и лиганда Kit и которые сообщают клеткам, экспрессирующим эти рецепторы, таким как гемопоэтические стволовые клетки, большую восприимчивость к трансдукции вектором. Другими предпочтительными молекулами, связывающимися с клеточной поверхностью, являются антитела или лиганды для рецепторов GM-CSF и IL-4, которые сообщают дендритным клеткам или их предшественникам, таким как моноциты, CD34-позитивным стволовым клеткам или их дифференцированным клеткам-предшественникам линии дифференцировки дендритных клеток большую восприимчивость к трансдукции вектором. Другими молекулами, связывающимися с клеточной поверхностью, являются молекулы, находящиеся на клеточных поверхностях, которые связываются с поверхностью других клеток.

Дополнительными примерами молекул, связывающихся с клеточной поверхностью, являются полипептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы, липиды и ионы; причем все они, но не обязательно, образуют комплексы с другими веществами. Предпочтительно указанные молекулы связываются с факторами, присутствующими на поверхности клеток крови, такими как CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD2, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD4, CD5, CD6, CD7, CD8 α , CD8 β , CD9, CD10, GD11a, CD11b, CD11c, CDw12, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79 α , CD79 β , CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDw108, CDw109, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CDw124, CD125, CD126, CDw127, CDw128a, CDw128b, CDw130, CDw131, CD132, CD133, CD134, CD135, CD136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDw145, CD146, CD147, CD148, CDw149, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 и TCR ξ .

Строчные буквы (например, "a" или "b") указывают на комплексные молекулы CD, состоящие из множества генных продуктов или принадлежащие к семействам структурно родственных белков. Обозначение "w" относится к предполагаемым молекулам CD, которые еще не были полностью подтверждены. Более полный перечень молекул CD можно найти у Kishimoto T. (ed). Современные данные о молекулах CD имеются также в работе Shaw S. (ed). Protein Reviews on the Web: An International WWW Resource/Journal at <http://www.bsi.vt.edu/immunology>.

Более предпочтительными являются молекулы, которые связываются с факторами,

присутствующими на поверхности лимфоцитов, Т-клеток и лейкоцитов, такими как CD2, CD3 γ , CD3 δ , CD3 ϵ , CD5, CD6, CD7, CD8 α , CD8 β , CD9, CD11a, CD18, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD37, CD38, CD39, CD43, CD44, CD45R, CD46, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD53, CD54, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD62L, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD73, CDw75, CDw76, CD84, CD85, CD86, CD87, CD89, CD90, CD94, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD103, CD107a, CD107b, CDw108, CDw109, CD118, CD119, CD120b, CD121a, CD122, CDw124, CDw127, CDw128a, CDw130, CD132, CD134, CDw137, CD140a, CD140b, CD143, CD146, CD148, CD152, CD153, CD154, CD155, CD161, CD162, CD165, CD166 и TCR ξ .

Другие антитела и молекулы, связывающиеся с поверхностью клеток и подходящие для использования в настоящем изобретении, описаны в руководстве Linscott's Directory of Immunological and Biological Reagents, 11th Edition, January 2000, Publisher: W.D.

Linscott, Petaluma, CA, которое во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. Однако в некоторых вариантах осуществления изобретения

указанная молекула, связывающаяся с клеточной поверхностью, не является цитокином.

Хотя настоящее изобретение может быть осуществлено с использованием растворимых молекул, связывающихся с клеточной поверхностью и стимулирующих трансдукцию клеток вектором, имеются и другие предпочтительные варианты осуществления изобретения, которые относятся к использованию иммобилизованных молекул, связывающихся с

клеточной поверхностью. Предпочтительными иммобилизованными молекулами являются антитела. Альтернативно, иммобилизация может быть осуществлена с использованием других клеток, экспрессирующих молекулы, связывающиеся с клеточной поверхностью.

Предпочтительный способ эффективной трансдукции гемопоэтических стволовых клеток предусматривает использование стромальных клеток костного мозга, экспрессирующих лиганды на своей поверхности, которые облегчают поддержание стволовых клеток в процессе трансдукции без их дифференцировки. Стимулирующие клетки не ограничиваются нативными клетками, и любая клетка может быть сконструирована так, чтобы она экспрессировала соответствующую молекулу, связывающуюся с клеточной поверхностью, в целях обеспечения желаемой стимуляции для трансдукции.

Могут быть также включены дополнительные молекулы, повышающие или усиливающие способность по меньшей мере одной молекулы связываться с клеточной поверхностью.

Так, например, растворимая форма ("первого") антитела, специфичного к рецептору клеточной поверхности, может быть использована в комбинации со "вторым" антителом, которое может перекрестно реагировать с "первыми" антителами, уже связанными с клеточной поверхностью.

Разумеется, что для осуществления настоящего изобретения может быть использована любая клетка. Клеткой, предпочтительной для трансдукции, является эукариотическая клетка. Более предпочтительной клеткой является первичная клетка. Однако способами согласно изобретению могут быть также трансдуцированы клеточные линии, и во многих случаях эти клеточные линии более легко трансдуцируются. В одном предпочтительном варианте осуществления изобретения указанной трансдуцированной клеткой является первичный лимфоцит (такой как Т-лимфоцит) или макрофаг (такой как моноцит), либо предшественник любой из этих клеток, такой как гемопоэтическая стволовая клетка.

Другими предпочтительными для трансдукции клетками в основном являются клетки системы кроветворения или, в частности, клетки, образованные в результате гемопоэза, равно как и стволовые клетки, из которых они образуются, и клетки, связанные с функцией клеток крови. Такие клетки включают в себя гранулоциты и лимфоциты, образованные в результате кроветворения, а также плюрипотентные предшественники, лимфоидные и миелоидные стволовые клетки. Клетками, ассоциированными с функцией клеток крови, являются клетки, обеспечивающие функционирование клеток иммунной системы, таких как антигенпредставляющие клетки, например дендритные клетки, эндотелиальные клетки, моноциты и клетки Лангерганса. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанными клетками являются Т-лимфоциты (или Т-клетки),

такие как клетки, экспрессирующие CD4- и CD8-маркеры.

В особенно предпочтительных вариантах осуществления изобретения такой клеткой является первичный CD4⁺-Т-лимфоцит или первичная гемопоэтическая стволовая

5 CD34⁺-клетка. Однако с учетом факта, что вирусные векторы, используемые в настоящем изобретении, могут быть псевдотипированы оболочечным G-белком вируса везикулярного
10 стоматита (как обсуждается ниже), любая клетка может быть трансдуцирована способом согласно изобретению. Такими клетками являются, но не ограничиваются ими, астроцит, фибробласт кожи, эпителиальная клетка, нейрон, дендритная клетка, лимфоцит, клетка, ассоциированная с иммунным ответом, эндотелиальная сосудистая клетка, опухолевая
15 клетка, эндотелиальная клетка опухолевых сосудов, клетка печени, клетка легкого, клетка костного мозга, антигенпредставляющая клетка, стромальная клетка, адипоцит, мышечная клетка, панкреатическая клетка, почечная клетка, яйцеклетка или сперматоцит (например, для получения трансгенных животных), клетка, образующая зародышевую
20 линию, эмбриональная плюрипотентная стволовая клетка или ее предшественники, клетки крови, включая безъядерные клетки, такие как тромбоциты и эритроциты, и т.п.

Предпочтительными являются эукариотическая клетка, многоклеточные микроорганизмы (в противоположность одноклеточным дрожжам, например) и даже более предпочтительно, клетки млекопитающих, например клетки человека.

Трансдуцируемая клетка может присутствовать как отдельная клетка или как часть

20 более крупной коллекции клеток. Такая "более крупная коллекция клеток" может включать в себя, например, клеточную культуру (смешанную или чистую), ткань (например, эпителиальную, стромальную или другую ткань), орган (например, сердце, легкие, печень, желчный пузырь, мочевой пузырь, глаз и другие органы), систему органов
25 (например, систему кровообращения, дыхательную систему, систему пищеварения, мочевыделительную систему, нервную систему, систему покровов тела или другую систему органов), бластоцист, зародышевую стволовую клетку плода (например, для лечения наследственного расстройства/заболевания или для создания трансгенных животных), пораженные ткани, такие как опухоль или очаг инфекции, или организм (например, птица, млекопитающее, морской организм, рыба, растение или т.п.). Предпочтительно,
30 органами/тканями/клетками-мишенями являются система кровообращения (включая, например, но не ограничиваясь ими, сердце, кровеносные сосуды и кровь), дыхательная система (например, нос, глотка, гортань, трахея, бронхи, бронхиолы, легкие и т.п.), система пищеварения (включая, например, ротовую полость и ткани желудочно-кишечного тракта, глотку, пищевод, желудок, тонкий кишечник, слюнные железы, поджелудочную
35 железу, печень, желчный пузырь и т.п.), система продуцирования молока (такая как эпителиальные клетки молочных желез и поддерживающие клетки (стромальные) в ткани), мочевыделительная система (такая как почки, мочеточники, мочевой пузырь, уретра и т.п.), нервная система (включая, но не ограничиваясь ими, головной и спинной мозг, и конкретные органы чувств, такие как глаза) и система покровов тела (например, кожа).

40 Еще более предпочтительно, если клетки, предназначенные для трансдукции, выбирают из группы, состоящей из клеток сердца, кровеносных сосудов, включая опухолевые кровеносные сосуды и кровеносные сосуды, ассоциированные с инфицированной или пораженной тканью, костного мозга, крови, головного мозга, лимфатической ткани, лимфатических узлов, селезенки, легких, печени, желчного пузыря, мочевого пузыря и
45 глаз. В одном конкретном варианте осуществления изобретения могут быть использованы клетки, которые являются аутологичными по отношению к используемому хозяину, но аллогенными, частично не соответствующими, полностью не соответствующими или даже ксеногенными по отношению к данному хозяину. Кроме того, могут быть трансдуцированы универсальные донорные клетки, подходящие для использования в данном организме-
50 хозяине, в родственной группе организмов или видов, таких как человек. Этот последний вариант осуществления изобретения является особенно важным при трансплантации клеток, тканей или органов, где источник трансдуцированных клеток может иметь критическое значение для полученного трансплантата.

Другой предпочтительной клеткой для трансдукции, осуществляемой способом согласно изобретению, является опухолевая клетка, патологическая клетка или клетка с риском стать аномальной с течением времени вследствие организации ее генетического материала или генетического материала другой клетки, присутствующей в том же самом 5 организме. Этот последний вариант позволяет использовать трансдуцированные клетки согласно изобретению в профилактических целях. Рак молочной железы является одним из примеров патологического процесса, при котором прогностический показатель позволяет 10 проводить лечение трансдуцированными клетками согласно изобретению в качестве ранней генетической манипуляции перед появлением негативных последствий. Однако методы согласно изобретению могут быть также использованы для терапевтического 15 лечения рака молочной железы после обнаружения данного заболевания. Имеются и другие многочисленные применения согласно изобретению, и сам специалист, без излишнего экспериментирования, может использовать описанное здесь изобретение для 20 лечения рака многих типов.

В качестве одного неограничивающего примера осуществления настоящего изобретения 15 может служить лечение эстрогензависимого рака молочной железы. Раковые клетки эстрогензависимого рака молочной железы могут быть преимущественно трансдуцированы с использованием антител или лигандов, связывающихся с рецептором эстрогена, в комбинации с терапевтическим вирусным вектором. Этот вектор может содержать, 20 например, ген ингибирования опухоли, такой как ген тимидинкиназы вируса герпеса. Таким образом, трансдуцированные клетки могут быть подвергнуты селективному лизису путем добавления ганцикловира, то есть пролекарства, которое может быть активировано тимидинкиназой вируса герпеса. Имеются и другие многочисленные примеры генов ингибирования опухоли и соответствующих пролекарств, которые хорошо известны 25 специалистам и могут быть выбраны самим специалистом без излишнего экспериментирования. Использование активируемых пролекарств в комбинации с использованием способов трансдукции согласно изобретению может широко применяться в отношении других типов опухолей, и настоящее изобретение не ограничивается 30 опухолями, рост или пролиферация которых зависят от гормонов или от определенного растворимого фактора.

Так, например, Her-2/neu-позитивные опухолевые клетки не являются эстрогензависимыми, и являются плохим прогностическим показателем, поскольку эстрогеннезависимые опухоли, содержащие такие клетки, являются в высокой степени 35 резистентными к лечению лекарственными средствами, такими как таксол, антагонист эстрогена. В предпочтительном варианте осуществления изобретения предусматривается использование антител или других молекул, которые обеспечивают связывание Her-2/neu или герегулина с векторными препаратами в процессе трансдукции контаминирующих 40 опухолевых клеток, например, в соответствии с протоколом трансплантации костного мозга. Альтернативно, такая трансдукция может быть осуществлена непосредственно в области локализации опухоли или внутрисосудисто *in vivo* с использованием векторов, которые должны обеспечивать модуляцию онкогена.

Еще в одном варианте настоящее изобретение нацелено как отдельно на сосудистую сеть опухоли, так и на сосудистую сеть в комбинации с опухолевыми клетками. В работе St Croix и др., вводимой в настоящее описание посредством ссылки, с помощью SAGE- 45 анализа были идентифицированы гены, которые подвергаются сверхэкспрессии преимущественно в опухолевых эндотелиальных клетках по сравнению с нормальным эндотелием. Многие из этих генов кодируют молекулы клеточной поверхности, такие как антиген Thy-1 клеточной поверхности или лектин Endo180. Все эти позитивно регулируемые факторы клеточной поверхности могут связываться с молекулами согласно 50 изобретению, связывающимися с клеточной поверхностью, и, тем самым, обеспечивать эффективную стабильную трансдукцию гена. Таким образом, способ опухолевой терапии должен быть направлен на разрушение сосудистой сети опухоли путем лизиса опухолевых эндотелиальных клеток после их трансдукции терапевтическим вирусным вектором в

присутствии связывающихся с клеточной поверхностью молекул, которые селективно связываются с сосудистой сетью опухоли, но не с нормальными эндотелиальными клетками.

5 Еще в одном варианте своего осуществления настоящее изобретение предусматривает экспрессию противоопухолевого гена в сосудистой сети опухоли путем введения в вирусный вектор элементов (например, промоторов или цис-действующих элементов стабилизации/деградации на мРНК), которые селективно стимулируют экспрессию противоопухолевого гена в опухоли, но не в нормальной эндотелии сосудов. Такие способы могут быть осуществлены *ex vivo*, *in vitro* или *in vivo*. Способ *in vivo* является предпочтительным в случае, когда данная терапия направлена на эндотелий опухолевых сосудов. Альтернативно, если целью такой терапии является очистка костного мозга от контаминирующих опухолевых клеток, например, для трансплантации костного мозга, то предпочтительным способом является терапия *ex vivo* или *in vitro*.

10 Кроме того, способ *in vitro* не ограничивается патологическими состояниями и может быть использован для трансдукции нормальных клеток. Так, например, настоящее изобретение может быть использовано для трансдукции гемопоэтических стволовых клеток *in vivo* в костном мозге. Любая комбинация антител или других молекул, связывающихся с клеточной поверхностью, таких как лиганд FLT-3, TPO и лиганд Kit, или их функциональные аналоги, или стромальные клетки, экспрессирующие связывающую молекулу клеточной поверхности, могут быть добавлены вместе с вектором после направленной инъекции в костный мозг для высокоэффективной трансдукции костного мозга. Термин "функциональный аналог" означает любую молекулу, которая сохраняет связывающую активность молекулы согласно изобретению, связывающуюся с клеточной поверхностью. Такими функциональными аналогами являются фрагменты лиганда FLT-3, TPO и лиганда Kit; молекулы лиганда FLT-3, TPO и лиганда Kit, содержащие одну или несколько аминокислотных замен, добавлений или делеций; и антитела, которые имитируют связывающую активность молекул, связывающихся с клеточной поверхностью.

15 20 25 30 35 Альтернативой вышеуказанному способу является использование стромальных клеток костного мозга в качестве клеток-продуцентов для вирусного вектора и, тем самым, получения вектора и молекул, связывающихся с клеточной поверхностью, посредством клеточной терапии, а не путем использования векторного препарата. Другим примером может служить трансдукция Т-клеток или дендритных клеток путем подкожной инъекции вектора при добавлении функциональных аналогов анти-CD3- или анти-CD28-антител или GM-CSF и IL-4, соответственно. Указанный вектор и стимуляторы проникают в лимфу подкожной ткани и в лимфатические узлы и обеспечивают эффективную трансдукцию клеток-мишеней.

40 45 Настоящее изобретение имеет то преимущество, что очистка трансдуцированных клеток не является обязательной и не имеет решающего значения. Трансдукция, главным образом, представляющих интерес клеток может быть осуществлена путем выбора той части клеточной поверхности, с которой связываются желаемые молекулы. Так, например, в смешанной популяции клеток крови трансдукция клеток, экспрессирующих CD3, например некоторых Т-клеток, может быть усилена путем использования CD3-специфических антител, которые взаимодействуют с этими клетками. Трансдукция этих клеток будет преимущественной по сравнению с клетками других типов в данной популяции, таких как гранулоциты и моноциты, которые не экспрессируют CD3.

50 Настоящее изобретение также относится к трансдукции очищенных или выделенных желаемых клеток, если это необходимо. Использование очищенных или выделенных клеток дает дополнительное преимущество, такое как более высокая эффективность трансдукции, которая обусловлена более высокими концентрациями вектора по отношению к трансдуцируемой клетке.

При трансдукции очищенных Т-клеток предпочтительно, чтобы по меньшей мере одна молекула связывалась с молекулой клеточной поверхности, присутствующей на Т-клетках. Примерами таких молекул клеточной поверхности являются CD3, CD28, CD25, CD71 и

CD69. Примерами молекул, которые связываются с этими молекулами клеточной поверхности, являются распознающие их антитела и моноклональные антитела, многие из которых являются коммерчески доступными или могут быть легко получены с использованием стандартной техники без излишнего экспериментирования. В

5 предпочтительном варианте, относящемся к трансдукции CD4⁺- или CD8⁺-клеток, могут быть использованы моноклональные антитела, которые распознают CD3 и/или CD28. Коммерчески доступными примерами таких антител являются антитело ОКТ3 против CD3 и антитело CD28.2 против CD28. Эти молекулы антител могут быть использованы в растворимой форме, после чего могут быть, но необязательно, перекрестно связаны с
10 другими молекулами, либо в иммобилизованной форме, например, они могут быть иммобилизованы на сферах или на других твердых поверхностях. В особенно предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанные антитела иммобилизуют на поверхности сосуда, такого как стенки лунки для культивирования тканей, планшет или пакет, используемого для трансдукции, опосредованной вирусным
15 вектором. Не претендуя на конкретную теорию, можно сказать, что использование антител, иммобилизованных на поверхности, к которой прилипают или с которой контактируют клетки, может приводить к увеличению локальных концентраций взаимодействий с клеточной поверхностью.

При трансдукции гемопоэтических стволовых клеток антитела, специфичные к рецептору
20 гемопоэтических стволовых клеток для лиганда FLT-3, TPO (тромбопоэтин или фактор роста и развития мегакариоцитов) или лиганда Kit, могут быть использованы в качестве молекул, связывающихся с клеточной поверхностью. Альтернативно, могут быть использованы антитела, специфичные к клеточным маркерам, положительным в отношении стволовых клеток, включая, но не ограничиваясь ими, CD34 или AC133. Если в
25 качестве молекулы, связывающейся с клеточной поверхностью, используется лигандсодержащее соединение или лигандсодержащая композиция, то целые нативные лигандсодержащие белки, лиганды или лиганды, связанные с гетерологичными белками, могут быть использованы либо в растворимой, либо в иммобилизованной форме. Иммобилизованные формы получают путем присоединения к микросферам прямым
30 методом или опосредованно, с использованием, например, авидина/биотина.

Альтернативно, лиганд может быть экспрессирован в вирусной оболочке вирусного вектора, необязательно в форме химерных или гибридных белков, и/или комплексов (ковалентно или нековалентно связанных) с одним или несколькими другими белками. В
35 таких вариантах осуществления изобретения молекула, связывающаяся с клеточной поверхностью, представлена в комбинации с вирусным вектором в виде одной композиции для трансдукции клеток. Другими примерами молекул, связывающихся с клеточной поверхностью, которые могут быть экспрессированы в вирусной оболочке, являются многочисленные поверхностные факторы, перечисленные выше.

Другими предпочтительными молекулами, связывающимися с клеточной поверхностью,
40 такими как антитела или их фрагменты, являются молекулы, которые связываются с рецепторами Notch или Delta гемопоэтических стволовых клеток, либо сами белки Notch или Delta, либо лиганды Notch или Delta, которые связываются с гетерологичными белками. Notch и Delta кодируют белки клеточной поверхности, которые влияют на широкий ряд возможных решений судьбы клеток в развитии Drosophila. Гомологи Notch и
45 Delta играют важную роль для нормального развития эмбриона. Важно вовлечение дельта-гомологов в регуляцию кроветворения. Delta-Serrate-lag2 (DSL), растворимая форма гомолога, усиливает размножение примитивных предшественников гемопоэтических клеток. При объединении с гемопоэтическими факторами роста, включая интерлейкин-3 (IL-3), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF) или гранулоцитарный-
50 макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), DSL стимулирует размножение примитивных предшественников гемопоэтических клеток и в то же самое время ингибирует дифференцировку примитивных предшественников в более зрелые клетки-предшественники, восприимчивые лишь к одному IL-3 (см. Han et al.). По всей

вероятности, DSL действует путем активации рецептора Notch, экспрессируемого в гемопозитических клетках, модулируя компетентность клетки в отношении ответа на действие обычных факторов роста гемопозитических клеток посредством селективного блокирования дифференцировки клеток, но не сигналов пролиферации (см. Han & Moore, Blood, 1999). Поэтому гомологи Delta и Notch и антитела, которые представляют собой функциональные аналоги этих гомологов, являются более предпочтительными связывающимися с клеточной поверхностью молекулами, использование которых позволяет достичь более чем 75%-ную эффективность векторной трансдукции клеток, особенно гемопозитических стволовых клеток.

Настоящее изобретение относится к вирусным векторам и к композициям, содержащим эти векторы, и к их использованию в описанных способах. Предпочтительными векторами являются ретровирусные векторы (относящиеся к семейству ретровирусов), а более предпочтительно, лентивирусные векторы. Могут быть также использованы и другие ретровирусные векторы, такие как онковирусные и мышинные ретровирусные векторы. Дополнительные векторы могут быть получены на основе других ДНК-вирусов или вирусов, которые могут включать свой геном в ДНК во время определенной стадии их жизненного цикла. Предпочтительными являются вирусы, принадлежащие к семейству аденовирусов, парвовирусов, гепаднавирусов (включая вирус гепатита дельта и вирус гепатита Е, которые обычно не классифицируются как гепаднавирусы), паповавирусов (включая полиомавирусы и папилломавирусы), герпесвирусов и поксвирусов.

Другими вирусами семейства Retroviridae (то есть ретровирусы) являются вирусы, принадлежащие к роду или подсемейству Oncovirinae, Spumavirinae, Spumavirus, Lentivirinae и Lentivirus. РНК-вирусом подсемейства онковирусов является желательный Т-лимфотропный вирус типа 1 или 2 (то есть HTLV-1 или HTLV-2) или вирус лейкоза коров (BLV), вирус лейкоза-саркомы птиц (например, вирус саркомы Рауса (RVS), вирус миелобластома птиц (AMV), вирус эритробластома птиц (AEV), вирус, ассоциированный с саркомой Рауса (RAV; RAV-0 - RAV-50); вирус С-типа млекопитающих (например, вирус лейкоза мышей Молони (MuLV), вирус саркомы мышей Харви (HaMSV), вирус саркомы мышей Абельсона (A-MuLV), AKR-MuLV, вирус лейкоза кошек (FeLV), вирус саркомы обезьян, вирус ретикулоэндотелиоза (REV), вирус некроза селезенки (SNV)), вирус В-типа (например, вирус опухоли молочных желез мышей (MMTV)) и вирус D-типа (например, обезьяний вирус Мейсона-Пфизера (MPMV) и вирусы "SAIDS").

РНК-вирусом подсемейства лентивирусов предпочтительно является вирус иммунодефицита человека типа 1 или 2 (то есть ВИЧ-1 или ВИЧ-2, причем ВИЧ-1 ранее назывался "ассоциированным с лимфаденопатией вирусом 3" (HTLV-III) и "вирусом, ассоциированным с приобретенным синдромом иммунодефицита (СПИД) (ARV)", или другой вирус, ассоциированный с ВИЧ-1 или ВИЧ-2, который был идентифицирован и который ассоциируется со СПИД или подобным СПИД заболеванием. Используемый здесь акроним "ВИЧ" или термины "вирус СПИД" или "вирус иммунодефицита человека" означают указанные вирусы ВИЧ и вирусы, родственные ВИЧ и ассоциированные с ВИЧ, которые принадлежат к одному и тому же роду. Кроме того, РНК-вирусом подсемейства лентивирусов является, предпочтительно, вирус Висна/мэди (например, вызывает инфекции у овец), вирус иммунодефицита кошек (FIV), бычий лентивирус, вирус иммунодефицита обезьян (SIV), вирус инфекционной анемии лошадей (EIAV) и вирус артрита-энцефалита коз (CAEV).

Особенно предпочтительным лентивирусным вектором является один из вирусов ВИЧ, а наиболее предпочтительно, ВИЧ-1, ВИЧ-2 или их химерные комбинации. Само собой разумеется, что в целях настоящего изобретения могут быть использованы различные серотипы ретровирусов, а в частности ВИЧ, как отдельно, так и в комбинации друг с другом. Предпочтительные векторы согласно изобретению содержат цис-действующие элементы, которые присутствуют в вирусе дикого типа, но отсутствуют в "базовом" лентивирусном векторе. "Базовый" лентивирусный вектор содержит, как минимум, LTR (длинные концевые повторы) и последовательности для упаковки в 5'-лидерной и в gag-

кодирующих последовательностях, и кроме того, он может также, но необязательно, содержать RRE-элемент для облегчения транспорта векторной РНК в ядро Rev-зависимым способом. Предпочтительный вектор, кроме того, содержит нуклеотидные последовательности, повышающие эффективность трансдукции клетки.

5 Примером такого вектора является рN2сGFP, который содержит полные последовательности gag и pol. Другим примером является вектор, который содержит последовательности примерно от положения 4551 до положения 5096 в pol (стандартные положения последовательности рNL4-3, регистрационный номер M19921, HIVNL43, 9709 п.н., любезно предоставленной С.Е. Buckler, NIAID, NIH, Bethesda, MD). Однако может
10 быть использована любая цис-действующая последовательность от ВИЧ дикого типа, которая способна повышать эффективность трансдукции вектором. Другими примерами векторов согласно изобретению, способных повышать трансдукцию, являются конструкции сг2HIV, описанные в патенте США 5885806.

Ранее идентифицирована последовательность, которая оказалась недостаточной для
15 значительного увеличения эффективности трансдукции и которая была описана Zennou et al. (2000) как центральный ДНК-фрагмент (фрагмент из 178 пар оснований от положения 4793 до положения 4971 на рLAI3 и от положения 4757 до положения 4935 на рNL4-3), способный увеличивать эффективность трансдукции. Настоящее изобретение отчасти
20 основано на обнаружении того факта, что этот небольшой фрагмент является недостаточным для повышения эффективности трансдукции, тогда как больший фрагмент, состоящий из 545 пар оснований (от положения 4551 до положения 5096 на рNL4-3), или его содержащие еще большие фрагменты способны повышать эффективность трансдукции.

Дополнительные примеры вирусных векторных конструкций, которые могут быть
25 использованы в настоящем изобретении, можно найти в патенте США № 5885806, который во всей своей полноте вводится в настоящее описание посредством ссылки. Конструкции, описанные в патенте № 5885806, приводятся лишь в качестве примеров, которые не ограничивают объем векторов, эффективно трансдуцирующих клетки. Напротив, указанные конструкции могут служить специалисту дополнительным ориентиром для получения
30 вирусного вектора, используемого в настоящем изобретении, который может содержать минимальные последовательности вируса дикого типа или последовательности полного генома вируса дикого типа, но который не содержит главной последовательности нуклеиновой кислоты, необходимой для репликации вируса и/или стимуляции развития заболевания. Способы точного определения последовательностей, необходимых для
35 эффективной трансдукции клеток, являются рутинными и хорошо известны специалистам. Так, например, способы системного введения вирусных последовательностей обратно в "базовый" вектор или делеция последовательностей из векторов, которые содержат фактически целый геном ВИЧ, таких как сг2HIV, являются рутинными и хорошо известны специалистам.

40 Кроме того, способ переноса последовательностей из других вирусных каркасов в желаемые вирусные векторы, такие как цитомегаловирус (CMV), также хорошо известен специалистам. Независимо от реально используемого вирусного вектора различные вспомогательные белки, кодируемые указанным вирусным генетическим материалом, и последовательности, присутствующие в этом генетическом материале, могут быть
45 оставлены в геномах данного вектора или хелперов, если эти белки или последовательности способствуют повышению эффективности трансдукции в клетках некоторых типов. Для того, чтобы определить, повышает ли определенный генетический материал эффективность трансдукции благодаря введению данной последовательности в геномы вектора или хелпера, может быть осуществлен рутинный скрининг.

50 Предпочтительный вариант осуществления изобретения не предусматривает включение вспомогательных белков в геномы вектора или хелпера. Но этот предпочтительный вариант не исключает вариантов согласно изобретению, в которых для повышения эффективности трансдукции вспомогательные белки и другие последовательности

присутствуют либо в геноме вектора, либо в геноме хелпера.

Вирусные векторы, используемые в настоящем изобретении, могут быть также получены из образования "псевдотипа", где коинфицирование клетки различными вирусами приводит к продуцированию вирионов потомства, содержащих геном одного вируса,

5 инкапсулированного во внешнем слое, содержащем один или несколько белков оболочки другого вируса. Этот феномен был использован для упаковки желаемых вирусных векторов в "псевдотипированном" вирионе путем котрансфекции или коинфицирования клетки, используемой для упаковки желаемым вирусным вектором и генетическим материалом, кодирующим по меньшей мере один оболочечный белок другого вируса или молекулы
10 клеточной поверхности. См. патент США 5512421. Такие смешанные вирусы могут быть нейтрализованы антисывороткой против одного или нескольких используемых гетерологичных белков оболочки. Одним из вирусов, обычно используемых в образовании псевдотипа, является вирус везикулярного стоматита (VSV), который является
15 рабдовирусом. Применение псевдотипирования позволяет расширить круг клеток-хозяев данного вируса благодаря включению элементов, ответственных за механизм внедрения используемого гетерологичного вируса.

Псевдотипирование вирусных векторов и VSV для использования в настоящем изобретении приводит к образованию вирусных частиц, содержащих нуклеиновую кислоту вирусного вектора, инкапсулированную в нуклеокапсид, который окружен мембраной,
20 содержащей G-белок VSV. Этот нуклеокапсид предпочтительно содержит белки, обычно ассоциированные с вирусным вектором. Окружающая мембрана, содержащая G-белок VSV, образует часть вирусной частицы после ее выхода из клетки, используемой для упаковки вирусного вектора. Примеры клеток для упаковки описаны в патенте США 5739018. В предпочтительном варианте осуществления изобретения вирусная частица
25 происходит от ВИЧ и является псевдотипированной G-белком VSV. Псевдотипированные вирусные частицы, содержащие G-белок VSV, могут инфицировать массивы клеток различных типов с более высокой эффективностью, чем амфотропные вирусные векторы. Круг клеток-хозяев включает в себя клетки млекопитающих и не млекопитающих, такие как клетки человека, грызунов, рыб, амфибий и насекомых.

30 Вирусный вектор, используемый в способах трансдукции согласно изобретению, может также включать в себя и экспрессировать одну или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты, находящихся под контролем промотора, присутствующего в вирусе, или под контролем гетерологичного промотора, встроенного в вектор. Эти промоторы могут, кроме того, содержать изолирующие элементы, такие как гиперчувствительные
35 сайты эритроидной ДНКазы, так чтобы они фланкировали оперон для строго контролируемой экспрессии гена. Предпочтительными промоторами являются LTR ВИЧ, промотор CMV, PGK, U1, транскрипционные единицы EBER, происходящие от вируса Эпштейна-Барр, тРНК, U6 и U7. Хотя промоторы Pol II являются предпочтительными, однако могут быть также использованы промоторы Pol III. Также предпочтительными
40 являются тканеспецифические промоторы. Так, например, энхансер регуляторной области локуса бета-глобина и промоторы альфа- и бета-глобина могут обеспечивать тканеспецифическую экспрессию в эритроцитах и в эритроидных клетках. Другим более предпочтительным вариантом осуществления изобретения является использование цис-действующих последовательностей, ассоциированных с этими промоторами. Так,
45 например, ген U1 может быть использован для усиления экспрессии антисмыслового гена, в случае, если для доставки антисмысловой или рибозимной молекулы в сплайсированную РНК-мишень, используются непромоторные последовательности, как описано в патенте США 5814500, который вводится в настоящее описание посредством ссылки.

Разумеется, что в вирусные векторы согласно изобретению могут быть включены любые
50 цис-действующие нуклеотидные последовательности вируса. В частности, предпочтительными являются цис-действующие последовательности, находящиеся в ретровирусных геномах. Так, например, для еще большего повышения эффективности трансдукции, в вирусные векторы согласно изобретению могут быть включены цис-

действующие нуклеотидные последовательности, происходящие от генов gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat или rev. Предпочтительно, если цис-действующая последовательность не кодирует экспрессированный полипептид; не экспрессируется в виде полипептида или его части из-за генетической альтерации, такой как делеция в сайте инициации

5 трансляции; кодирует только часть или фрагмент более крупного полипептида; или представляет собой мутантную последовательность, содержащую одну или несколько замен, добавлений или делеций в нативной последовательности. Примером цис-действующей последовательности является последовательность сРТТ (центрального полипуринового пути), идентифицированная в гене pol ВИЧ.

10 Указанная одна или несколько последовательностей нуклеиновой кислоты в вирусных векторах согласно изобретению могут быть обнаружены в вирусе, от которого происходит данный вектор или который представляет собой гетерологичную последовательность. Указанная последовательность предпочтительно представляет собой полноразмерную или неполную последовательность, которой является желаемый генный продукт или которая

15 его кодирует. Такие последовательности и генные продукты предпочтительно являются биологически активными агентами, способными продуцировать биологический эффект в клетке. Примерами таких агентов являются белки, рибонуклеиновые кислоты, ферменты, транспортные молекулы или другие биологически активные молекулы.

В одном из предпочтительных вариантов осуществления изобретения указанными

20 агентами является белок, такой как токсин, фактор транскрипции, фактор роста или цитокин, структурный белок или молекула клеточной поверхности. Этот белок может содержать один или несколько доменов, функции которых не были идентифицированы и которые могут быть гомологичными для трансдуцируемой клетки. Кроме того, указанный белок может отсутствовать, может быть дефектным или модифицированным в

25 трансдуцируемой клетке. Альтернативно, указанный белок может представлять собой трансдоминантный негативный мутант или "ловушку" для предупреждения осуществления нормальной активности природного белка в трансдуцированной клетке.

Так, например, последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать рибозим, который связывается, расщепляет и разрушает экспрессированную либо экспрессируемую

30 РНК в трансдуцированной клетке. Альтернативно, указанная последовательность нуклеиновой кислоты может кодировать антисмысловую молекулу, сконструированную так, чтобы она была нацелена на конкретную последовательность нуклеиновой кислоты и приводила к ее разрушению. Вектор, содержащий эту последовательность, может быть сверхэкспрессирован, индуцибельно экспрессирован, либо он может находиться под

35 клеточным или вирусным транскрипционным контролем в трансдуцированной клетке. В зависимости от целей использования указанная гетерологичная последовательность может кодировать любой желаемый белок, включая маркер для трансдуцированных клеток. Такими маркерами являются селективные маркеры, например, маркер резистентности, проявляющейся в конкретном фенотипе, такой как резистентность к неомицину; MDR-1 (P-

40 гликопротеин); O⁶-метилгуанин-ДНК-метилтрансфераза (MGMT); дигидрофолатредуктаза (DHFR); альдегиддегидрогеназа (ALDH); глутатион-S-трансфераза (GST); супероксиддисмутаза (SOD) и цитозиндезаминаза. См. обзор Кос и др., вводимый в настоящее описание посредством ссылки.

В способах согласно изобретению трансдуцируемые клетки подвергают контакту по

45 меньшей мере с одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой до или после введения или одновременно с введением вирусного вектора. Так, например, указанные клетки могут быть культивированы в средах с анти-CD3- и анти-CD28-антителами (нанесенными на поверхность чашки для культивирования или иммобилизованными на сферах, присутствующих в этой культуре) до или после трансдукции, либо в присутствии

50 трансдуцирующего вектора. Предпочтительно эти клетки подвергать контактированию с иммобилизованными CD3 и/или CD28 только после или только при начальном контакте с вирусным вектором. В этих условиях указанные клетки не подвергаются контакту со связывающейся(имися) с клеточной поверхностью молекулой(ами) до фактической

трансдукции вирусным вектором. В вариантах осуществления изобретения, где контакт с молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью, происходит после обработки клеток вирусным вектором (трансдукции), этот контакт предпочтительно происходит во время трансдукции в течение трех дней, а более предпочтительно - в течение одного-двух дней после трансдукции.

Инкубирование клеток с вирусным вектором может быть проведено в течение различных периодов времени, в зависимости от используемых условий и материалов. Факторами, которые влияют на время инкубирования, являются используемые клетки, вектор или MOI (множественность заражения), молекула(ы) и ее количества, используемые для связывания с клеточной поверхностью, независимо от того, являются ли указанные молекулы иммобилизованными или солюбилизованными, и каким образом осуществляется такая иммобилизация или солюбилизация, и от уровня желаемой эффективности трансдукции. Предпочтительно, указанное инкубирование осуществляют примерно в течение 8-72 часов, а более предпочтительно - примерно в течение 12-48 часов. В особенно предпочтительном варианте осуществления изобретения такое инкубирование осуществляют в течение примерно 24 часов и повторяют, но необязательно, один раз.

Контакт между трансдуцируемыми клетками и вирусным вектором происходит по меньшей мере один раз, но он может происходить и более одного раза, в зависимости от типа клетки. Так, например, высокоэффективная трансдукция CD34-позитивных стволовых клеток была осуществлена путем многократной трансдукции вектором. Предпочтительный способ согласно изобретению предусматривает одновременное введение вирусного вектора в комбинации с молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью (например, анти-CD3- и/или анти-CD28-антитела или лиганд FLT-3, TPO и лиганд Kit), и не требует замены среды в течение примерно от одного до восьми дней после трансдукции. Более предпочтительно, если указанную среду не меняют в течение трех дней после трансдукции. Трансдукция может происходить, если только позволяют данные условия, без значительного негативного влияния на данные клетки или на организм, содержащий эти клетки. Дополнительные примеры белков, связывающихся с клеточной поверхностью и подходящих для использования в этих целях, описаны выше.

Аналогичным образом, используемая множественность заражения (MOI) составляет примерно от 1 до 400, а предпочтительно менее 500. В основном предпочтительная MOI составляет примерно от 2 до 50. Более предпочтительно, MOI составляет примерно от 10 до 30, хотя могут быть также рассмотрены величины примерно от 1 до 10, примерно 20, примерно 30 или примерно 40. Наиболее предпочтительно, MOI составляет примерно 20. Кроме того, число копий вирусного вектора на клетку должно быть равно по меньшей мере 1. Однако в вышеописанных способах может быть использовано множество копий данного вектора на клетку. Предпочтительное число копий на клетку составляет примерно от 1 до 100. Более предпочтительным числом копий является минимальное число копий, обеспечивающих терапевтический, профилактический или биологический эффект трансдукции вектором или более эффективную трансдукцию.

Для терапевтического или профилактического применения более предпочтительным числом копий является максимальное число копий, которое является толерантным для клеток и не оказывает значительного негативного влияния на клетку или на организм, содержащий эту клетку. Минимальное и максимальное число копий на клетку может варьироваться в зависимости от трансдуцируемой клетки, а также от других клеток, которые могут присутствовать. Оптимальное число копий может быть легко определено любым специалистом рутинными методами. Так, например, клетки трансдуцируют с использованием возрастающих концентраций вектора или более высокой множественности заражения. Затем клетки анализируют на число копий, на терапевтический или биологический эффект и негативное действие на трансдуцируемые клетки или содержащие их хозяева (например, на безопасность и токсичность).

После инкубирования с вирусным вектором *in vitro* клетки могут быть культивированы в

присутствии связывающейся с клеточной поверхностью молекулы (молекул) в различные периоды времени, а затем эти клетки анализируют на эффективность трансдукции или какие-либо другие эффекты. Альтернативно, указанные клетки могут быть культивированы в любых условиях, способствующих росту и пролиферации клеток, таких как инкубирование с интерлейкином-2 (IL-2) или инкубирование с молекулой(ами), связывающейся с клеточной поверхностью, а затем с IL-2. После трансдукции инкубирование может быть проведено в течение любого интервала времени, но предпочтительно, примерно от одного до 7-10 дней. Инкубирование может быть также проведено в течение более длительных периодов времени, таких, примерно, как 14 дней, хотя периоды времени, которые негативно влияют на рост клеток, не являются предпочтительными. В вариантах осуществления согласно изобретению, где указанные клетки культивируют со связывающейся с клеточной поверхностью молекулой(ами), до инкубирования с вирусным вектором, время культивирования может составлять примерно от 24 до 72 часов, более предпочтительно - в течение 24 часов.

Такое претрансдукционное культивирование можно сравнить со стимуляцией клеток, например, цитокинами и/или митогенами, осуществляемой перед трансдукцией, как описано в литературе. Настоящее изобретение имеет то преимущество, что оно позволяет избежать такой стимуляции. Так, например, стимуляция приводит к увеличению числа клеток благодаря пролиферации, в результате чего после стимуляции присутствует гораздо больше клеток, чем до стимуляции. Для трансдукции такого увеличенного числа клеток требуется гораздо большее количество вирусного вектора и других материалов, связанных с трансдукцией (например, контейнеров, сред, цитокинов и т.п.), что повышает стоимость этого процесса. Кроме того, стимуляция клеток влияет на их качество, необходимое для их дальнейшего применения. Movassagh и др. описали проведение трехдневной претрансдукционной стимуляции, которая приводила к негативному воздействию на разнообразие Т-клеточной популяции после трансдукции и последующего культивирования. Кроме того, проводимая перед трансдукцией стимуляция сводит на нет преимущество, имеющееся при трансдукции клеток, которые не являются активно делящимися.

Эффективность трансдукции, наблюдаемая в соответствии с настоящим изобретением, составляет примерно 75-100%. Предпочтительно эта эффективность составляет по меньшей мере примерно 75-90%. В более предпочтительных вариантах осуществления изобретения эффективность трансдукции составляет по меньшей мере примерно 90-100%. В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения эффективность трансдукции составляет по меньшей мере примерно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и 100%.

В дополнение к вышеуказанному, трансдуцированные клетки могут быть использованы для проведения исследований или для лечения или предупреждения патологических состояний у индивидуумов. Примером использования в исследовательских целях являются исследования структуры-функции, описанные Unutmaz и др. Терапевтическое использование трансдуцированных клеток предусматривает введение клеток в живой организм. Так, например, нестимулированные первичные Т-клетки, выделенные у индивидуумов, инфицированных ВИЧ, или у индивидуумов с риском ВИЧ-инфицирования, могут быть сначала трансдуцированы вектором, как описано в патенте США 5885806, с использованием способов согласно изобретению, а затем трансдуцируемые клетки могут быть введены обратно индивидууму. Альтернативно, указанные клетки могут быть использованы непосредственно для экспрессии гетерологичной последовательности, присутствующей в вирусном векторе.

Вектор, используемый для ВИЧ-терапии или профилактики, может кодировать токсин или другой противовирусный агент, который был адаптирован для применения, направленного против ВИЧ. Альтернативно, указанный вектор может кодировать агент, сконструированный для нацеливания на ВИЧ, например, на трансдоминантные негативные мутанты генов tat, rev, nef, vpr или vpr. В других применениях указанная трансдуцированная клетка может

быть скорректирована так, чтобы она экспрессировала соответствующий ген глобина для коррекции серповидноклеточной анемии или талассемии. Иммуные клетки могут быть также трансдуцированы для модуляции их иммунной функции, их ответа на антиген или их взаимодействия с другими клетками. Вышеуказанные применения способов трансдукции
5 согласно изобретению, а также многочисленные другие известные применения трансдукции понятны каждому специалисту.

Краткое описание графического материала

На фиг.1А и 1В представлены карты рN2сGFP и рN1GFP(сPT), соответственно.

Показаны различные сайты рестриктирующих ферментов, а также компоненты,
10 происходящие от ВИЧ. Конструкция рN2сGFP содержит GEP-кодирующую последовательность, функционально присоединенную с промотору CMV (цитомегаловируса), которая, тем самым, регулирует экспрессию GFP. Конструкция рN1GFP(сPT), также называемая далее рN1(сpt)CGFP, содержит сPPT от гена pol ВИЧ. Эти конструкции используются в нижеприведенных примерах.

15 На фиг.2 представлены результаты трансдукции первичных Т-клеток с использованием сфер, покрытых иммобилизованными анти-CD3- и анти-CD28-антителами. Эти клетки либо подвергаются контакту с вектором до контакта со сферами (панель А), либо подвергаются контакту со сферами до контакта с вектором (панель В), либо подвергаются одновременному контакту с векторами и со сферами (панель С). Результаты проточной цитометрии,
20 полученные на основе флуоресценции от GFP, кодируемого трансдуцированным вектором, указывают на то, что клетки в панелях А-С были трансдуцированы на 90,70%; 87,19% и 99,14%, соответственно.

На фиг.3 показано сравнение трансдукции с использованием либо IL-2 и РНА-Р, либо сфер с иммобилизованными анти-CD3- и анти-CD28-антителами для стимуляции
25 CD4⁺-клеток перед контактом с вирусным вектором. Использование иммобилизованных антител каждый раз приводило к более чем 95%-ной эффективности трансдукции. Использование IL-2 и РНА приводило лишь к 70,2-84,5%-ной эффективности трансдукции.

На фиг.4 показана частота трансдукции CD4⁺-Т-клеток способами согласно изобретению. Через пятнадцать дней после трансдукции сравнение результатов
30 проточного цитометрического анализа для контрольных клеток с клетками, трансдуцированными вектором, способным экспрессировать белок, флуоресцирующий в "зеленом" диапазоне спектра (GFP) при MOI=20, показало, что примерно 93% трансдуцированных клеток также флуоресцируют в "зеленом" диапазоне спектра.

35 На фиг.4 представлены результаты FACS-анализов для CD4⁺- и GFP⁺-клеток через 14 дней после трансдукции, осуществленной с использованием либо IL-2 и РНА-Р, либо сфер с иммобилизованными анти-CD3- и анти-CD28-антителами. Приблизительно 93% обработанных антителом клеток оставались стабильно трансдуцированными через 14 дней после трансдукции. И лишь примерно 75% клеток, обработанных IL-2 и РНА, оставались стабильно трансдуцированными через 14 дней после трансдукции.

40 На фиг.5 представлены результаты клеток, трансдуцированных различными вирусными векторами.

На фиг.6 показано влияние различных MOI на эффективность трансфекции.

45 На фиг.7 продемонстрирована стабильная трансдукция CD34⁺-клеток, взятых из пуповинной крови после многократной трансдукции вирусным вектором в присутствии молекул, связывающихся с клеточной поверхностью. Через 6 недель после трансдукции свыше 88% клеток оставались позитивными.

50 На фиг.8, на панелях А-Д, показана эффективность продолжительной трансдукции после трансплантации клеток мышам SCID (с тяжелым комбинированным иммунодефицитом). Примерно через восемь недель в среднем свыше 91% трансдуцированных клеток, которые продолжали созревать, оставались позитивными в отношении экспрессии трансдуцированного маркера GFP.

На фиг.9, на панелях А и В, показана эффективность трансдукции дендритных клеток через 7 дней.

Способы осуществления согласно изобретению

Настоящее изобретение относится к способам и к используемым в них композициям для стабильной трансдукции клеток вирусными векторами с эффективностью примерно более чем 75%. Стабильно трансдуцированные клетки могут быть дифференцированы от

5 кратковременно трансдуцируемых или псевдотрансдуцируемых клеток примерно через 7-10 дней или - необязательно - примерно через 14 дней после трансдукции. Эти способы основаны на том факте, что контактирование трансдуцируемых клеток по меньшей мере с одной молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью, повышает эффективность стабильной трансдукции. Неожиданно было обнаружено, что стадия контактирования

10 может быть осуществлена после стадии трансдукции. Еще более неожиданным является тот факт, что наиболее высокие уровни стабильной трансдукции наблюдались в случае, когда сначала осуществляли трансдукцию, а затем контактирование с иммобилизованными молекулами, связывающимися с клеточной поверхностью.

Способы согласно изобретению включают в себя стадию трансдукции вирусным вектором в комбинации со стадией контактирования с молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью. Как упоминалось выше, контактирование может быть осуществлено до, после или во время трансдукции вектором. Настоящее изобретение относится к клеткам широкого ряда и к использованию любой молекулы, связывающейся с клеточной поверхностью. Клетками, используемыми в способах согласно изобретению,

20 являются нестимулированные первичные клетки, свежeweделенные из *in vivo* источника, а также клеточные линии, которые могут быть предварительно культивированы в различные периоды времени в присутствии факторов, которые поддерживают их в состоянии пролиферации. При использовании клеточных линий они могут быть сначала культивированы в отсутствие стимулирующих факторов, а затем трансдуцированы

25 способами согласно изобретению.

В случае первичных клеток их сначала получают из *in vivo* источника, а затем, но необязательно, отбирают на клетки конкретных типов. Так, например, при использовании первичных CD4⁺- и/или CD8⁺-Т-клеток сначала получают образцы периферической крови (ПК) или пуповинной крови ("СВ" от пуповинного источника), а затем их обогащают

30 клетками CD4⁺- и/или CD8⁺-типов. Для отделения CD4⁺- и/или CD8⁺-клеток от примесных клеток ПК может быть осуществлен позитивный отбор с использованием стандартных магнитных сфер, негативный отбор по адгезии к пластику и/или другие хорошо известные стандартные методы. Чистота выделенных клеток указанных типов может быть определена стандартными методами иммунофенотипирования и проточной цитометрии.

После выделения первичные клетки могут быть использованы в способах согласно изобретению для трансдукции вирусными векторами с эффективностью более, чем 75%. В настоящем изобретении преимущественно используются первичные лимфоциты, такие как Т-клетки, трансдуцированные вектором на основе ВИЧ-1, способным экспрессировать желаемый гетерологичный генетический материал. Другим предпочтительным

40 использованием является использование первичных гемопоэтических стволовых клеток, таких как CD34-позитивные клетки. В случаях, если указанный гетерологичный генетический материал представляет собой терапевтический или профилактический продукт или кодирует этот продукт, используемый *in vivo* для лечения или предупреждения заболевания, то трансдуцированная первичная клетка может быть

45 введена обратно в ее *in vivo*-окружение, такое как пациент. По существу, настоящее изобретение относится к использованию трансфицированных клеток в генной терапии для лечения или предупреждения заболевания путем устранения генетического дефекта или вирусной инфекции.

Настоящее изобретение также относится к использованию эффективной трансдукции клеток для определения функции гена, эффективной экспрессии генов в клетках

50 млекопитающих, экспрессии генных библиотек (библиотек кДНК и библиотек генных антисмысловых последовательностей или рибозимов) для функционального скрининга желаемых генов; а также к использованию в стратегиях детекции двухкомпонентных

гибридов, таких как "белок-белок" или "белок-нуклеиновая кислота", в методах генных ловушек, в высокоэффективных скрининг-анализах генов с использованием микромассива или массива белков или в исследованиях с использованием SAGE, в протеомике и в других методах функционального анализа.

5 Для трансдукции первичных клеток в смешанной популяции вышеуказанные стадии выделения/очистки не должны использоваться. Напротив, трансдуцируемые клетки должны служить мишенью для отбора по меньшей мере одной соответствующей молекулы
10 клеточной поверхности или элемента, присутствующего на клетке данного типа, и для получения одной или нескольких молекул, способных связываться с этим элементом. Такой молекулой клеточной поверхности может быть рецептор, маркер или другой
15 распознаваемый эпитоп на поверхности клеток-мишеней. После отбора молекулы, которая взаимодействует с данным элементом, такой как специфические антитела, могут быть получены для использования в настоящем изобретении.

15 Так, например, CD4⁺- и/или CD8⁺-клетки могут быть либо сначала очищены, а затем трансдуцированы способами согласно изобретению с использованием иммобилизованных анти-CD3- и анти-CD28-антител или, альтернативно, они могут быть трансдуцированы как часть смешанной популяции, подобно клеткам периферической крови (КПК) или
20 мононуклеарным клеткам периферической крови (МКПК) с использованием тех же самых антител. Гемопозитические стволовые клетки во всей популяции лейкоцитов, очистка или выделение которых может представлять определенные трудности, могут быть
25 трансдуцированы в смешанных популяциях с использованием иммобилизованных анти-CD34-антител.

Молекулы, связывающиеся с клеточной поверхностью, могут быть нацелены на любой элемент и могут связываться с любым элементом, присутствующим на поверхности
25 трансдуцируемой клетки. Предпочтительно, эти элементы могут быть частью рецепторов, маркеров или других белковых или небелковых факторов, присутствующих на клеточной поверхности. Указанными элементами являются эпитопы, распознаваемые молекулами, связывающимися с клеточной поверхностью. Такими эпитопами являются эпитопы,
30 содержащие полипептидную последовательность, углевод, липид, нуклеиновую кислоту, ион и их комбинации.

Примерами молекул, связывающихся с клеточной поверхностью, являются антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или лиганд или связывающий домен для рецептора
35 клеточной поверхности. Молекула, связывающаяся с клеточной поверхностью, сама может быть полипептидом, нуклеиновой кислотой, углеводом, липидом или ионом. Предпочтительной молекулой является антитело или его фрагмент, такой как Fab- или Fv-фрагмент. Более предпочтительно, если данная молекула не используется в ее
40 растворимой форме, а лучше, если она будет иммобилизована на твердой среде, такой как сфера, в присутствии которой могут быть культивированы трансдуцируемые клетки, либо на поверхности чашки, пакета или планшета, после чего трансдуцированные клетки могут
45 быть культивированы. В предпочтительном варианте осуществления изобретения трансдукция CD4⁺- или CD8⁺-клеток может быть осуществлена с использованием антител, распознающих CD3 и/или CD28, в пакете для культивирования клеток в присутствии вирусного вектора.

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим связывающуюся с
45 клеточной поверхностью молекулу, используемую при осуществлении описанных способов. Типичная композиция содержит указанную молекулу и вирусный вектор, используемый для трансдукции, необязательно в присутствии трансдуцируемых клеток. Указанный вирусный вектор может быть получен из любого источника, но предпочтительными являются ретровирусные векторы. Более предпочтительными являются лентивирусные векторы.
50 Особенно предпочтительный лентивирусный вектор происходит от вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), а наиболее предпочтительно - от ВИЧ-1, ВИЧ-2 или их химерных комбинаций. Очевидно, что различные вирусные векторы могут быть одновременно перенесены в одну и ту же клетку способами согласно изобретению. Так,

например, одним вектором может быть вектор, дефектный по репликации, или ретровирусный вектор, реплицирующийся в зависимости от внешних условий, а вторым вектором может быть конструкция для упаковки, которая позволяет первому вектору реплицироваться/упаковываться и размножаться. Если вирусный вектор кодирует

5 различные вирусные вспомогательные белки, то они могут присутствовать в любом одном из векторов, переносимых в клетку. Альтернативно, указанные вирусные вспомогательные белки могут присутствовать в процессе трансдукции, поскольку они находятся в вирусных частицах, используемых для трансдукции. Такие вирусные частицы могут содержать эффективное количество совместно упакованных вспомогательных белков, что приводит к
10 повышению эффективности трансдукции. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанный вирусный вектор не кодирует один или несколько вспомогательных белков.

Вирусный вектор, используемый в способах трансдукции согласно изобретению, может также включать в себя и экспрессировать одну или несколько последовательностей
15 нуклеиновой кислоты, находящихся под контролем промотора. В одном из вариантов осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты кодирует генный продукт, который после экспрессии будет устранять или корректировать генетический дефицит в трансдуцируемых клетках. В другом варианте осуществления изобретения последовательность нуклеиновой кислоты кодирует или представляет собой генетический
20 противовирусный агент, который может быть использован для лечения или предупреждения вирусных инфекций. Термин "генетический противовирусный агент" означает любое вещество, кодируемое генетическим материалом или содержащееся в нем. Примеры таких агентов приводятся в патенте США 5885806. Такими агентами являются агенты, которые действуют путем ингибирования вирусных белков, таких как
25 обратная транскриптаза или протеаза; путем конкурирования с вирусными факторами за связывание с сайтами-мишенями; или путем непосредственного нацеливания на вирусные мишени для их деградации, так, например, как в случае рибозимов и антисмысловых конструкций. Другими примерами генетических противовирусных агентов являются антисмысловые последовательности, РНК-ловушки, трансдоминантные мутанты,
30 интерфероны, токсины, нуклеиновые кислоты, которые модулируют или модифицируют сплайсинг РНК, иммуногены и рибозимы, такие как "молоткообразные" рибозимы и их формы, действующие посредством внешней вспомогательной последовательности (EGS).

Альтернативно, вирусный вектор может кодировать маркер для трансдуцируемых клеток. В примерах, представленных на графиках и ниже, белок, флуоресцирующий в
35 "зеленом" диапазоне спектра (GFP), представляет собой маркер, кодируемый вирусным вектором, трансдуцированным в CD4⁺-клетки. Другие маркеры перечислены выше. Детекция GFP может служить для идентификации ряда функционально трансдуцированных клеток, которые не только трансдуцированы данным вектором, но также способны функционально экспрессировать GFP до уровней, которые могут детектироваться с
40 помощью FACS-анализа. Следует отметить, что такая детекция не может выявить фактическое число трансдуцированных клеток, поскольку некоторые клетки могут быть трансдуцированы вектором, но при этом они могут экспрессировать GFP на уровнях, которые составляют ниже пределов FACS-детекции.

Альтернативным способом детекции эффективности трансфекции является
45 полимеразная цепная реакция (ПЦР). Так, например, для определения фактического числа копий стабильно интегрированного вирусного вектора в трансдуцированной клетке может быть использована ПЦР TaqMan.

Трансдуцируемые клетки могут быть подвергнуты контакту с вирусным вектором до или после контакта с молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью, или одновременно
50 с таким контактом. Так, например, указанные клетки могут быть сначала подвергнуты контакту с вектором в течение определенного периода времени, а затем могут быть введены молекулы, связывающиеся с клеточной поверхностью. Такими клетками могут быть только что выделенные или полученные первичные клетки, которые не были

специально стимулированы для вступления в клеточный цикл. Альтернативно, эти клетки могут быть сначала подвергнуты контакту с молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью, в течение определенного периода времени, а затем они могут быть подвергнуты контакту с вирусным вектором. После контакта с указанным вектором избыток вектора предпочтительно не удаляют, и клетки культивируют в условиях, способствующих их росту и/или пролиферации. В случае Т-клеток такие условия могут быть осуществлены в присутствии молекулы, связывающейся с клеточной поверхностью, или других стимулирующих/активирующих факторов, таких как цитокины и лимфокины. Альтернативно, избыток вектора может быть удален после контактирования с клеткой или перед последующим ее культивированием.

В другом варианте осуществления изобретения предусматривается культивирование клеток в присутствии как вирусного вектора, так и молекулы, связывающейся с клеточной поверхностью, одновременно. Предпочтительно, чтобы такие клетки не были предварительно стимулированы. По истечении определенного периода времени клетки культивируют в условиях, способствующих росту или пролиферации клеток, таких как непрерывное присутствие молекулы, связывающейся с клеточной поверхностью, или других стимулирующих/активирующих факторов. Альтернативно, избыток вектора может быть удален перед культивированием клеток.

В любой из вышеописанных комбинаций введения вирусного вектора и молекулы, связывающейся с клеточной поверхностью, инкубирование с вектором можно, но необязательно, повторить по меньшей мере один раз. Контактное взаимодействие с вектором может быть также осуществлено более чем один раз, например два, три, четыре или более раз.

Инкубирование трансдуцируемых клеток с вирусным вектором может быть проведено в течение различных периодов времени в зависимости от используемых условий и материалов. Факторами, которые влияют на время инкубирования, являются используемые клетки, вектор и MOI (множественность заражения), молекула(ы) и ее количества, используемые для связывания с клеточной поверхностью, независимо от того, является ли указанная молекула(ы) иммобилизованной или нет, и от уровня желаемой эффективности трансдукции. В предпочтительном варианте осуществления изобретения указанными клетками являются Т-лимфоциты; указанным вектором является вектор на основе ВИЧ; MOI составляет примерно 20; молекулами, связывающимися с клеточной поверхностью, являются анти-CD3- и анти-CD28-антитела, иммобилизованные на сферах; а полученная эффективность трансдукции составляет по меньшей мере 93%. Как очевидно для каждого специалиста, некоторые из вышеуказанных факторов находятся в прямой зависимости друг от друга, тогда как другие - в обратной зависимости. Так, например, со снижением MOI, вероятно, снижается уровень эффективности, тогда как эффективность может, вероятно, поддерживаться с использованием возрастающего количества молекул, связывающихся с клеточной поверхностью.

Продолжительность инкубирования вирусного вектора и трансформированных клеток составляет предпочтительно 24 часа, и такое инкубирование можно повторить, но необязательно, один раз для лимфоцитов и до четырех раз для гемопоэтических стволовых клеток. Аналогичным образом, в тех вариантах осуществления изобретения, где клетки инкубируют с молекулами, связывающимися с клеточной поверхностью, перед введением вирусного вектора, указанное инкубирование может быть проведено в течение примерно от 12 до 96 часов. Инкубирование предпочтительно проводить в присутствии молекулы, связывающейся с клеточной поверхностью, и одновременно с контактированием клеток с вирусным вектором. В этих случаях, при введении вектора, молекулы, связывающиеся с клеточной поверхностью, могут оставаться в контакте с данными клетками. Альтернативно, избыток молекул, связывающихся с клеточной поверхностью, может быть удален из культуры перед введением вектора в указанные клетки.

После контактирования с вектором клетки культивируют в условиях, способствующих их росту или пролиферации. Предпочтительно, чтобы эти условия сохранялись в процессе всего культивирования в присутствии молекул, связывающихся с клеточной поверхностью.

Альтернативно, клетки сначала культивируют с молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью, а затем эту среду заменяют средой, содержащей другой фактор, способствующий росту клеток, такой как интерлейкин-2. Еще в одном варианте осуществления изобретения сначала удаляют избыток связывающихся с клеточной

5 поверхностью молекул и избыток вектора, а затем проводят культивирование в присутствии фактора, способствующего росту или пролиферации клеток, а также усиливающего последующую трансдукцию вектором. Указанными факторами являются митогены, такие как фитогемагглютинин (PHA) и цитокины, факторы роста, активаторы, рецепторы клеточной поверхности, молекулы клеточной поверхности, растворимые

10 факторы или их комбинации, а также активные фрагменты этих молекул, взятые отдельно или в комбинации с другим белком или фактором, или их комбинации.

Примерами других факторов являются эпидермальный фактор роста (EGF); трансформирующий фактор роста альфа (TGF-альфа); ангиотензин; трансформирующий фактор роста бета (TGF-бета); GDF; белок, участвующий в остеогенезе (BMP); фактор

15 роста фибробластов (кислотный и основной FGF); васкулярный эндотелиальный фактор роста (VEGF); PIGF; человеческий гормон роста (HGH); бычий гормон роста (BGH); герегулины; амфирегулин; фактор, индуцирующий рецептор Ach (ARIA); RANTES (регулируемый после активации, экспрессируемый и секретируемый нормальными T-клетками); ангиогенины; фактор роста гепатоцитов; фактор некроза опухоли бета (TNF-

20 бета); фактор некроза опухоли альфа (TNF-альфа); ангиопоэтины 1 или 2; инсулин; инсулиноподобные факторы роста I или II (IGF-1 или IGF-2); эфрины; лептины; интерлейкины 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 или IL-15); G-CSF (гранулоцитарный колониестимулирующий фактор); GM-CSF (гранулоцитарный-

25 макрофагальный колониестимулирующий фактор); M-CSF (макрофагальный колониестимулирующий фактор); LIF (фактор ингибирования лейкоза); ангиостатин; онкостатин; эритропоэтин (EPO); интерферон-альфа (включая подтипы); интерферон-бета; -гамма и -омега; хемокины; макрофагальный белок воспаления -1 альфа или -бета (MIP-1, альфа или бета); моноцитарный хемотаксический белок -1 или -2 (MCP-1 или MCP-2); GRO-

30 бета; MIF (фактор, ингибирующий миграцию макрофагов); MGSA (фактор, стимулирующий рост меланомы); альфа-ингибин; HGF; PD-ECGF; bFGF; лимфотоксин; фактор, ингибирующий развитие мюллеровских протоков; FAS-лиганд; остеогенный белок; плейотропин/мидкин; циллиарный нейротропный фактор; индуцируемый андрогеном фактор роста; аутокринный фактор подвижности; белок hedgehog; эстроген; прогестерон;

35 андроген; глюкокортикоидный рецептор; RAR/RXR; тироидный рецептор; TRAP/CD40; EDF (эритроидный дифференцирующий фактор); Fc (индуцируемый хемокинами фактор роста); IL-1RA; SDF; NGR- или RGD-лиганд; NGF; тимозин-альфа-1; OSM; рецепторы хемокинов; фактор стволовых клеток (SCF) или их комбинации. Как очевидно для каждого специалиста, выбор условий культивирования зависит от имеющихся у специалиста

40 данных о трансдуцируемых клетках, а также от целей использования этих клеток. Так, например, комбинация IL-3, IL-6 и фактора стволовых клеток не может быть выбрана для трансдуцирования клеток, предназначенных для трансплантации человеку. Аналогичным образом, выбор условий культивирования предпочтительно не должен негативно влиять на жизнеспособность клеток или эффективность трансдукции.

45 Предпочтительно, инкубирование после трансдукции проводят примерно в течение четырех часов или примерно от одного до 7-10 дней. Более предпочтительно, этот период составляет примерно от 16 до 20 часов или примерно четыре, пять или шесть дней. Инкубирование после трансдукции может быть также проведено примерно в течение четырнадцати дней.

50 Эффективность трансдукции, достигаемая в соответствии с настоящим изобретением, составляет примерно 75-100%. Предпочтительно эта эффективность составляет по меньшей мере примерно 75-90%. В более предпочтительных вариантах осуществления изобретения эффективность трансдукции составляет по меньшей мере примерно 90-95%.

В наиболее предпочтительных вариантах осуществления изобретения, эффективность трансдукции составляет по меньшей мере примерно 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 и 100%.

В дополнение к вышеуказанному, трансдуцированные клетки могут быть использованы в исследованиях или для лечения или предупреждения патологических состояний у индивидуумов. В особенно предпочтительном варианте своего осуществления настоящее изобретение относится к терапевтическому использованию трансдуцированных клеток для продуцирования желаемых генных продуктов или для их непосредственного введения в живой организм в процессе генной терапии. Так, например, как проиллюстрировано ниже, первичные Т-клетки могут быть выделены и трансдуцированы вирусным вектором. Успешная трансдукция характеризуется продуцированием или сверхпродуцированием генного продукта, кодируемого данным вектором, или генерированием фенотипа, сообщаемого данным вектором. По существу, первичные Т-клетки могут быть сначала трансдуцированы вектором, содержащим и способным экспрессировать желаемые или полезные последовательности нуклеиновой кислоты, а затем они могут быть возвращены в *in vivo*-окружение, такое как живой организм.

Предпочтительным живым организмом является индивидуум, инфицированный ВИЧ-1, или индивидуум с риском инфицирования ВИЧ-1.

В другом варианте осуществления изобретения Т-клетки трансдуцируют генами или нуклеиновыми кислотами, способными в зависимости от условий "убивать" Т-клетку после введения в организм хозяина. Такой способ может быть применен при аллогенной трансплантации костного мозга для предупреждения реакции "трансплантат против хозяина" путем лизиса Т-клеток с использованием пролекарства.

Альтернативно, первичные клетки могут быть дефицитными по генному продукту, и этот дефицит может быть скорректирован введением вирусного вектора. Такие клетки должны быть снова введены в живой организм после их трансдукции вектором.

Таким образом, настоящее изобретение предусматривает применение как *in vitro*, так и *ex vivo*. Для переноса в живой организм трансдуцированные клетки предпочтительно помещают в биологически приемлемый раствор или в фармацевтически приемлемую композицию. Такой перенос может быть осуществлен внутривенно, внутрибрюшинно или другими способами инъекций, а также способами без инъекций, известными специалистам. Вводимые дозы могут варьироваться в зависимости от ряда факторов, но они могут быть легко определены любым практикующим врачом. Настоящее изобретение может быть использовано в различных целях с применением известного или хорошо разработанного состава вирусного вектора, где благоприятный эффект, сообщаемый указанным трансдуцированным генетическим материалом, перевешивает риск возникновения негативных эффектов.

Сначала полное число вводимых трансдуцированных клеток должно составлять примерно от 10^4 до 10^{10} . В принципе может быть использовано 10^5 , 10^6 , 10^7 , 10^8 или 10^9 клеток. Фактическое число клеток может варьироваться в зависимости от трансдуцируемых клеток. В предпочтительном варианте осуществления изобретения предусматривается, если это необходимо, множество переносов трансдуцированных клеток. Кроме того, кондиционирование хозяина перед переносом трансдуцированных клеток, если это необходимо, является предпочтительным вариантом осуществления изобретения. Способы такого кондиционирования известны специалистам, и примером является схема(ы) трансплантации костного мозга.

Для лучшего понимания согласно изобретению, помимо представленного здесь его общего описания, приводятся нижеследующие примеры, которые лишь иллюстрируют, но не ограничивают объема изобретения, если это не оговорено особо.

Пример I

Получение первичных CD4⁺-Т-клеток

CD4⁺-Т-клетки выделяли из периферической крови в соответствии со стандартными протоколами, в которые были внесены небольшие модификации. Более конкретно,

контаминирующие моноциты могут быть устранены путем их фиксации. Неприлипшие клетки подвергали контактированию с магнитными сферами, сенсibilизированными анти-CD4-антителами для позитивного отбора CD4⁺-клеток. Магнитные сферы удаляли и выделяли CD4⁺-клетки.

5 С помощью проточной цитометрии было подтверждено, что высокоочищенные CD4⁺-клетки составляли более 90%.

Пример II

Трансдукция первичных CD4⁺-Т-клеток при различных периодах контактирования с молекулой, связывающейся с клеточной поверхностью

10 Трансдукция перед связыванием с клеточной поверхностью

Первичные CD4⁺-клетки (примерно 500000) культивировали с pN2cGFP при MOI 20 в течение 24 часов, а затем инкубировали с добавленными в культуру сферами, покрытыми α CD3 и α CD28, в течение еще семи дней. На фиг.1 показана карта pN2cGFP.

15 Трансдукция после связывания с клеточной поверхностью

Первичные CD4⁺-клетки (примерно 500000) культивировали в течение 24 часов со сферами, покрытыми α CD3 и α CD28, с последующим введением в культуру pN2cGFP при MOI 20 в течение еще 24 часов. Эти клетки промывали для удаления избытка вектора, а затем еще семь дней инкубировали в среде, не содержащей вектора и включающей в себя 20 указанные сферы.

Одновременная трансдукция и связывание с клеточной поверхностью

Первичные CD4⁺-клетки (примерно 500000) культивировали с pN2cGFP при MOI 20 в течение 24 часов в присутствии сфер, сенсibilизированных α CD3 и α CD28. Эти клетки промывали для удаления избытка вектора, а затем еще семь дней инкубировали в среде, 25 не содержащей вектора и содержащей указанные сферы.

Протокол необязательных замен pN2cGFP может быть заменен другими вирусными векторами. Кроме того, эту трансдукцию можно повторить в целом два раза перед удалением избытка вектора. Более того, сферы, покрытые α CD3 и α CD28, могут быть 30 заменены интерлейкином-2 (10 нг/мл) и РНА-Р (3 мг/мл) после трансдукции и удаления избытка вектора. Через семь дней эти среды заменяли средой, не содержащей РНА-Р и включающей в себя интерлейкин-2 (10 нг/мл), и продолжали инкубирование еще семь дней.

Альтернативно, через семь дней после посттрансдукционного инкубирования со сферами, покрытыми α CD3 и α CD28, клетки промывали и инкубирование продолжали в присутствии интерлейкина-2 (10 нг/мл).

35 Пример III

Посттрансдукционный анализ

После трансдукции и через семь дней или через 14 дней после инкубирования клетки анализировали с помощью проточной цитометрии на CD4⁺ и/или на белок, флуоресцирующий в "зеленом" диапазоне спектра (GFP).

40 Сравнение вышеописанных трех протоколов трансдукции проиллюстрировано на фиг.2. Контактное с анти-CD3- и анти-CD28-антителами, иммобилизованными на сферах, после трансдукции вектором pN2cGFP при MOI 20 давало примерно 91%-ную эффективность трансдукции. Контактное с этими сферами перед трансдукцией давало примерно 89%-ную эффективность, а контактирование с этими сферами 45 одновременно с трансдукцией давало примерно 80%-ную эффективность. В этом эксперименте CD4⁺-Т-клетки отбирали по истощению моноцитов в результате их адгезии, по истощению CD14 MACS и обогащению CD4 MACS. Антитела иммобилизовывали, как описано ниже. Контактное с вектором осуществляли при 37 °C и в 5% CO₂. Культивирование 500000 CD4⁺-Т-клеток проводили в среде Yssel, в 50 которую был добавлен 2% альбумин человеческой сыворотки. FACS-анализ осуществляли на седьмой день после отбора. MF означает среднюю интенсивность флуоресценции.

Сравнение результатов эксперимента, проводимого через 7 дней, с результатами, полученными в различных условиях стимуляции, проиллюстрировано на фиг.3.

CD4⁺-клетки обрабатывали либо IL-2 и PHA-P, либо анти-CD3- и анти-CD28-антителами, иммобилизованными на сферах, в течение 24 часов, а затем проводили один раунд трансдукции вектором рN2сGFP при MOI 20. Как показало последовательное сравнение, использование иммобилизованных антител дает эффективность трансдукции более 95% в каждом случае (как показано для CD4⁺- и GFP-положительных клеток). При сравнении результатов с использованием IL-2- и PHA-стимуляции наблюдалась лишь 70,2-84,5%-ная эффективность. FACS-анализ был проведен на седьмой день после отбора.

На фиг.4 показаны результаты аналогичного эксперимента на 15-й день после отбора. Клетки снова обрабатывали либо IL-2 и PHA-P, либо анти-CD3- и анти-CD28-антителами, иммобилизованными на сферах, в течение 24 часов, а затем проводили один раунд трансдукции вектором рN2сGFP при MOI 20. PHA-P и сферы удаляли на седьмой день после трансдукции, и клетки при плотности 500000 клеток на мл культивировали лишь в присутствии IL-2 в течение 15 дней после отбора. Приблизительно 93% клеток были положительными как на CD4, так и на GFP после использования иммобилизованных антител. Лишь примерно 75% клеток, обработанных IL-2 и PHA, оставались CD4- и GFP-положительными. Эти результаты показали, что трансдукция небольшой фракции клеток, детектируемая как положительная через семь дней (фиг.3), может быть обусловлена "псевдотрансфекцией".

Пример IV

Различные векторы стабильно трансдуцируют клетки с высокой эффективностью. Этот пример иллюстрирует сравнение векторов, используемых для трансдукции. Вектор рN2сGFP содержит полную gag- и pol-кодирующую последовательность, а вектор рN1(cpt)сGFP содержит неполную (некодирующую) последовательность pol 4551-5096. Как показали результаты, представленные на фиг.5, оба вектора продемонстрировали высокоэффективную трансдукцию первичных CD4-клеток после одновременной стимуляции анти-CD3- и анти-CD28-антителами, иммобилизованными на сферах, и вектором при MOI 20. FACS-анализ осуществляли на 10-й день после отбора.

Пример V

Влияние MOI на эффективность трансфекции

Влияние различных MOI показано на фиг.6, где использование MOI 2-20 приводило к эффективности трансдукции от 72,7 до 83,8%. Клетки подвергали контакту с анти-CD3- и анти-CD28-антителами, иммобилизованными на сферах, за 24 часа до трансдукции вектором рN1(cpt)сGFP при различных MOI.

Пример VI

Трансдукция CD34-положительных клеток CD34-положительные клетки получали из пуповинной крови и четыре раза трансдуцировали вектором рN1cptGFP одновременно в присутствии лиганда FLT-3, TPO и лиганда Kit (100 нг/мл каждого). Эти клетки культивировали в течение пяти недель в долгоживущей культуре (LTC-IC), а затем эти клетки культивировали в метилцеллюлозе в течение 10 дней, после чего проводили анализ (результаты получены в культуре возрастом более 6 недель). Результаты, приведенные на фиг.7, представляют собой результаты анализа зрелых CD45-положительных клеток, полученных из незрелых CD34-клеток. Контрольные клетки не обнаруживали какой-либо значимой трансдукции, тогда как среди клеток, трансдуцированных вектором, обнаруживалось 88% CD45- и GFP-положительных клеток.

Пример VII

Продолжительная трансдукция CD34-положительных клеток

CD34-положительные клетки трансдуцировали вектором рN1(cpt)GFP, как описано выше, и трансплантировали в костный мозг частично облученных мышей SCID. Через восемь недель клетки выделяли и с помощью FACS-анализа, анализировали на CD45-несущие зрелые человеческие клетки и на экспрессию GFP. Результаты представлены на фиг.7, на панелях A-D.

На панели A показаны результаты, полученные с использованием контрольных мышей, которым были трансплантированы человеческие клетки, не трансдуцированные вектором.

На панели В показаны результаты трансплантации мышей клетками, трансдуцированными вектором рN1(cpt)GFP при MOI 50 в течение 4 дней подряд в присутствии 100 нг/мл лиганда FLT-3, TPO и лиганда Kit. Через 8 недель после трансдукции было неожиданно обнаружено, что у этих мышей наблюдалась 96,3%-ная
 5 эффективность трансдукции человеческих клеток (CD45-положительных клеток). Уровень трансплантации человеческих клеток у этих мышей составлял 11,1%, что соответствовало опубликованным ранее данным.

На панелях С и D показаны результаты с использованием двух других мышей, обработанных, как проиллюстрировано на панели В. Эти результаты подтверждают
 10 воспроизводимость высокой эффективности трансдукции, при этом 87,8% и 89,6% CD45-положительных клеток были также GFP-положительными.

Средняя эффективность составляла 91,2%, что указывало на продолжительную стабильную трансдукцию.

Пример VIII

15 Иммобилизация молекул, связывающихся с клеточной поверхностью

В этом примере описано непосредственное связывание анти-CD3 (В-В11) и анти-CD28 (В-Т3)-антител с эпоксидными гранулами Dynal, используемыми в нижеописанных
 экспериментах.

1. Получают 0,1М боратный раствор путем растворения 0,618 г борной кислоты в 95 мл
 20 воды высшей степени очистки, используемой для культивирования тканей. Затем раствор тщательно перемешивают и доводят до pH 9,5 с использованием NaOH наивысшего качества. Конечный объем доводят до 100 мл и стерилизуют, пропуская через 0,2 мкм-фильтр. Контейнер герметично закрывают и хранят при 4°C.

2. К вышеуказанному боратному раствору добавляют антитело при концентрации 150
 25 мкг/мл. Каждое из антител В-В11 и В-Т3 добавляют в концентрации 75 мкг на мл боратного раствора. Весь раствор доводят до объема 1 мл. После добавления антитела концентрация бората должна быть не ниже 0,05М. К каждому 1 мл раствора бората/антитела добавляют $4 \cdot 10^8$ эпоксидных гранул.

3. Инкубирование проводят в течение 24 часов при 37°C на вращающемся диске.

30 4. Гранулы три раза промывают в течение 10 минут, каждый раз при 22°C, следующей промывочной средой: забуференным фосфатом физиологическим раствором, не содержащим кальция и магния и содержащим 3% альбумина бычьей сыворотки, 5 мМ EDTA и 0,1 азида натрия.

5. Гранулы один раз промывают в течение 30 минут при 22°C.

35 6. Промывку проводят в течение ночи при 4°C.

7. Среду заменяют свежей промывочной средой для гранул, после чего гранулы ресуспендируют до $2 \cdot 10^8$ гранул/мл. Гранулы, покрытые IgG, являются стабильными в течение по меньшей мере 6 месяцев при 4°C.

40 Пример IX

Трансдукция дендритных клеток

Моноциты из периферической крови выделяют, а затем трансдуцируют вектором рN2сGFP при MOI 50 в течение трех дней подряд в условиях использования одновременно
 45 двух цитокинов: GM-CSF (800 ед./мл), IL-4 (500 ед./мл) и TNF- α (100 ед./мл) или GM-CSF (500 ед./мл) и интерферона-альфа (800 ед./мл). На фиг.9, панели А, показаны результаты, полученные через семь дней после трансдукции, где условия присутствия первого цитокина давали 90,2%-ную эффективность. Клетки, трансдуцированные вектором в условиях присутствия второго цитокина, проявляли 92,9%-ную эффективность через семь
 50 дней (панель В). CD86 является лишь единственным маркером, который может быть использован для дендритных клеток, однако при этом следует отметить, что дендритные клетки также могут быть CD86-негативными клетками.

Библиография

Barry, S.C. et al. (2000) "Lentiviral and murine retroviral transduction of T cells

for expression of human CD40 ligand" Human Gene Therapy 11:323-332.

Costello, E. et al. (2000) "Gene transfer into stimulated and unstimulated T lymphocytes by HIV-1-derived lentiviral vectors" Gene Therapy 7:596-604.

5 Douglas, J. et al. (1999) "Efficient transduction of human lymphocytes and CD34+ cells via human immunodeficiency virus-based gene transfer vectors" Human Gene Therapy 10:935-945.

Follenzi, A. et al. (2000) "Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences" Nature Genetics 25:217-222.

10 Han, W. et al. (2000) "A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells" Blood 95:1616-1625.

Haas, D.L., et al. (2000) "Critical factors influencing stable transduction of human CD34+ cells with HTV-1-derived lentiviral vectors" Molecular Therapy 2:71-80.

Hooijberg E. et al. (2000) "NFAT-controlled expression of GFP permits visualization and isolation of antigen-stimulated primary human T cells" Blood 96:459-466.

15 Kishimoto, T. (ed). Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens: Proceedings of the Sixth International Workshop and Conference Held in Kobe, Japan, 10-14 November 1996. Garland Publishing, New York, 1998.

Klebba, C. et al. (2000) "Retrovirally expressed anti-HTV ribozymes confer a selective survival advantage on CD4+ T cells in vitro" Gene Therapy 7:408-416.

20 Koc, O.N., et al. (1999) "Transfer of drug resistance genes into hematopoietic progenitors" Chapter 11, Gene Therapy of Cancer. Academic Press, San Diego, pp. 177-195.

Movassagh, M. et al. (2000) "Retrovirus-mediated gene transfer into T cells: 95% transduction efficiency without further in vitro selection" Human Gene Therapy 11:1189-1200.

25 Onodera, M. et al. (1998) "Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency" Blood 91:30-36.

St. Croix, B., et al. (2000) "Genes expressed in human tumor endothelium" Science 289:1197-1202.

30 Unutmaz, D. et al. (1999) "Cytokine signals are sufficient for HIV-1 infection of resting human T lymphocytes" J. Exp. Med. 11:1735-1746.

Zennou, V., et al. (2000) "HIV-1 genome Nuclear import is mediated by a central DNA flap" Cell 101:173-185.

Все цитируемые работы во всей своей полноте вводятся в настоящее описание посредством ссылки, независимо от того, было об этом указано ранее или нет.

35 Для каждого специалиста очевидно, что в соответствии с приведенным здесь описанием настоящее изобретение может быть осуществлено без излишнего экспериментирования с использованием широкого диапазона эквивалентных параметров, концентраций и условий, не выходящих за рамки объема и существа настоящего изобретения.

40 Хотя настоящее изобретение описано на конкретных примерах его осуществления, очевидно, что в него могут быть внесены дополнительные модификации. Настоящая заявка может охватывать любые изменения, применения или приспособления настоящего изобретения в основном соответствующие его идее, включая те, которые выходят за пределы настоящего описания, но не выходят за рамки известной или общепринятой практики в той области техники, к которой относится настоящее изобретение, и те, 45 которые могут относиться к существенным признакам изобретения, сформулированными в формуле изобретения, представленной ниже.

В соответствии с описанием, приведенным выше, и формулой изобретения, представленной ниже, использование единственного числа не ограничивается лишь единственным числом определяемого объекта. Напротив, оно может охватывать 50 существительные во множественном числе. Так, например, термин "антитело" не ограничивается антителом в единственном числе, то есть лишь одной молекулой, но может означать присутствие множества молекул антитела, если только они являются идентичными копиями указанного антитела. Аналогичным образом, термин "вирусный

вектор" не ограничивается лишь одной молекулой вирусного вектора или одной вирусной частицей.

Формула изобретения

- 5 1. Способ стабильной трансдукции первичных клеток гематопозитической системы или гематопозитических стволовых клеток, предусматривающий контактирование первичной клетки или гематопозитической стволовой клетки в одно и то же время *in vitro* или *ex vivo* с лентивирусным вектором и по меньшей мере с одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой,
- 10 где связывающаяся с клеточной поверхностью молекула не индуцирует апоптоз в первичной клетке-мишени или гематопозитической стволовой клетке-мишени, и связывающаяся с клеточной поверхностью молекула способствует тому, что клетка становится более чувствительной к трансдукции под действием вирусного вектора, и необязательно связывающаяся с клеточной поверхностью молекула содержит
- 15 полипептид, липид, нуклеиновую кислоту, углевод или ион.
2. Способ по п.1, дополнительно предусматривающий непрерывное контактирование *in vitro* или *ex vivo* первичных клеток или гематопозитических стволовых клеток с лентивирусным вектором после одновременного контактирования первичных клеток с лентивирусным вектором и по меньшей мере с одной связывающейся с клеточной
- 20 поверхностью молекулой.
3. Способ по п.1, дополнительно предусматривающий непрерывное контактирование *in vitro* или *ex vivo* первичных клеток или гематопозитических стволовых клеток по меньшей мере с одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой после одновременного контактирования лентивирусного вектора и по меньшей мере с одной связывающейся с
- 25 клеточной поверхностью молекулы.
4. Способ по п.1, дополнительно предусматривающий непрерывное контактирование *in vitro* или *ex vivo* первичных клеток или гематопозитических стволовых клеток с лентивирусным вектором и по меньшей мере с одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой после первоначального одновременного контактирования
- 30 лентивирусного вектора и по меньшей мере одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулы.
5. Способ по п.1, где указанное контактирование с лентивирусным вектором происходит более одного раза.
6. Способ по любому из пп.1-5, где указанными клетками являются первичные клетки гематопозитической системы человека или гематопозитические стволовые клетки человека.
- 35 7. Способ по любому из пп.1-6, где указанной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой является антитело, антигенсвязывающий фрагмент, лиганд или молекула клеточной поверхности.
8. Способ по любому из пп.1-7, где указанный лентивирусный вектор включает в себя по меньшей мере одну цис-действующую нуклеотидную последовательность, происходящую от генов *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat* или *rev*.
- 40 9. Способ по п.8, где указанная цис-действующая нуклеотидная последовательность не экспрессируется или представляет собой фрагмент или мутант генов *gag*, *pol*, *env*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat* или *rev*.
- 45 10. Способ по любому из пп.1-9, где указанным лентивирусным вектором является вектор, происходящий от ВИЧ.
11. Способ по любому из пп.1-9, где указанным лентивирусным вектором является псевдотипированный вектор.
12. Способ по п.11, где указанный псевдотипированный вектор содержит G-белок
- 50 оболочки вируса везикулярного стоматита.
13. Способ по любому из пп.1-12, где указанной первичной клеткой или гематопозитической стволовой клеткой является первичная клетка человека или гемопоэтическая стволовая клетка человека.

14. Способ по любому из пп.1-12, где указанной первичной клеткой гематопозитической системы или гематопозитической стволовой клеткой является CD4-положительная клетка или ее предшественник.

5 15. Способ по любому из пп.1-12, где указанной первичной клеткой гематопозитической системы или гематопозитической стволовой клеткой является лимфоцит или его предшественник.

16. Способ по п.15, где указанным лимфоцитом является CD4- или CD8-положительная клетка или ее предшественник.

10 17. Способ по любому из пп.1-12, где указанной первичной клеткой гематопозитической системы или гематопозитической стволовой клеткой является CD34-положительная клетка или первичная CD34⁺-гематопозитическая стволовая клетка или ее предшественник.

18. Способ по любому из пп.1-12, где указанной первичной клеткой гематопозитической системы является человеческая гематопозитическая стволовая клетка или ее предшественник.

15 19. Способ по п.1, где указанная по меньшей мере одна связывающаяся с клеточной поверхностью молекула включает в себя молекулу, выбранную из

(а) группы, состоящей из лиганда CD3; лиганда CD28; лиганда CD25; лиганда CD71; лиганда CD69; лиганда FLT-3; лиганда TPO; и лиганда Kit; или

20 (b) антител, которые имеют такую же специфичность связывания с клеточной поверхностью, что и лиганд FLT-3, TPO, Kit, CD3, CD25, CD28, CD69 или CD71.

25 20. Способ по п.1, где указанная по меньшей мере одна связывающаяся с клеточной поверхностью молекула включает в себя молекулу, выбранную из группы, состоящей из лиганда FLT-3, лиганда TPO и лиганда Kit или полипептидов или других связывающих молекул, которые имеют такую же специфичность связывания с клеточной поверхностью, что и лиганд FLT-3, лиганд TPO или лиганд Kit.

21. Способ по любому из пп.1-12, где указанной первичной клеткой или гематопозитической стволовой клеткой является дендритная клетка, или клетка, способная дифференцироваться в дендритную клетку, или ее предшественник.

30 22. Способ по п.1, где указанная по меньшей мере одна связывающаяся с клеточной поверхностью молекула выбрана из группы композиций, содержащих CD34, CD3, CD28, GM-CSF, IL-4, TNF-альфа; GM-CSF, интерферон-альфа, и антитела или другие связывающие молекулы, которые имеют такую же специфичность связывания с клеточной поверхностью, что и CD34, CD3, CD28, GM-CSF, IL-4 и TNF-альфа; GM-CSF или интерферон-альфа.

35 23. Способ по п.1, где указанная по меньшей мере одна связывающаяся с клеточной поверхностью молекула выбрана из группы, состоящей из анти-CD3-антител и их связывающихся с клеточной поверхностью фрагментов, анти-CD28-антител и их связывающихся с клеточной поверхностью фрагментов, комбинаций указанных антител и их связывающихся с клеточной поверхностью фрагментов, и связывающихся молекул, которые имеют такую же специфичность связывания с клеточной поверхностью, что и антитела, и необязательно, чтобы по меньшей мере две связывающиеся с клеточной поверхностью молекулы были иммобилизованы на сфере или поверхности.

45 24. Способ по п.23, где указанная по меньшей мере одна связывающаяся с клеточной поверхностью молекула включает в себя комбинацию анти-CD3- и анти-CD28-антител, иммобилизованных на сфере или поверхности, где необязательно, чтобы сфера или поверхность включала в себя сферы с покрытием.

25. Способ по п.1, дополнительно предусматривающий культивирование первичных клеток или гематопозитических стволовых клеток в условиях, способствующих их росту или пролиферации или росту и пролиферации.

50 26. Способ по п.25, где указанные условия дополнительно включают в себя стадию инкубирования со связывающейся с клеточной поверхностью молекулой или с цитокином.

27. Способ по п.26, где указанным цитокином является интерлейкин-2.

28. Способ по п.25, где указанное культивирование проводят примерно в течение семи

дней.

29. Способ по п.25, где указанное культивирование проводят примерно в течение 14 дней.

30. Способ по любому из пп.1-12, где указанное контактирование первичных клеток или гематопозитических стволовых клеток с лентивирусным вектором осуществляют примерно в течение 24 ч и повторяют, но необязательно, по меньшей мере один раз.

31. Способ по любому из пп.1-12, где указанный лентивирусный вектор присутствует при MOI менее 500.

32. Способ введения генетического материала в клетку, предусматривающий введение *ex vivo* клетки, трансдуцированной способом по п.1, в ткань, орган, бластоцист или эмбриональную стволовую клетку.

33. Применение первичной клетки гематопозитической системы или гематопозитической стволовой клетки, трансдуцированной способом по любому из пп.1-12, для получения фармацевтической композиции для генной терапии с целью лечения или профилактики заболевания.

34. Способ превращения первичных клеток гематопозитической системы и/или гематопозитических стволовых клеток в более чувствительные к трансдукции под действием лентивирусного вектора, предусматривающий

контактирование указанных клеток в одно и то же время *in vitro* или *ex vivo* с лентивирусным вектором и по меньшей мере с одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой, которая физически взаимодействует с рецептором, маркером или иной узнаваемой частью структурой на поверхности клеток,

где по меньшей мере одна молекула не индуцирует апоптоз в первичной клетке-мишени или гематопозитической стволовой клетке-мишени, а связывающаяся с клеточной поверхностью молекула способствует тому, что клетка становится более чувствительной к трансдукции под действием вирусного вектора.

35. Способ по п.34, где указанная молекула представляет собой полипептид, нуклеиновую кислоту, углевод, липид или ион.

36. Способ введения генетического материала в клетку, предусматривающий введение *ex vivo* клетки, трансдуцированной способом по любому из пп.1-12, в ткань, орган, бластоцист или эмбриональную стволовую клетку.

37. Способ стабильной трансдукции первичных клеток гематопозитической системы и/или гематопозитических стволовых клеток, выделенных из ВИЧ-инфицированного индивида, предусматривающий следующие стадии:

(а) выделение первичных клеток гематопозитической системы или гематопозитических стволовых клеток из ВИЧ-инфицированного индивида;

(b) предварительную стимуляцию первичных клеток или гематопозитических стволовых клеток по меньшей мере одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой, где молекула клеточной поверхности не индуцирует апоптоз в первичной клетке-мишени или гематопозитической стволовой клетке-мишени, и связывающаяся с клеточной поверхностью молекула приводит в тому, что клетка становится более чувствительной к трансдукции под действием вирусного вектора,

где необязательно первичные клетки или гематопозитические стволовые клетки предварительно стимулированы по меньшей мере одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой в течение двадцати четырех (24) часов до стадии (с), или необязательно предварительная стимуляция по меньшей мере одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой составляет от 12 до 96 часов; и

(с) одновременное контактирование *in vitro* или *ex vivo* гематопозитической системы клеток или гематопозитических стволовых клеток с лентивирусным вектором и по меньшей мере с одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой,

где необязательно связывающаяся с клеточной поверхностью молекула содержит полипептид, липид, нуклеиновую кислоту, углевод или ион.

38. Применение первичной клетки гематопозитической системы или гематопозитической

стволовой клетки, трансдуцированной способом по любому из пп.1-12, для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики у субъекта вирусной инфекции.

5 39. Применение первичной клетки гематопозитической системы или гематопозитической стволовой клетки, трансдуцированной способом по пункту 1, для получения фармацевтической композиции для лечения или профилактики у субъекта ВИЧ-инфекции.

40. Способ стабильной трансдукции клетки лентивирусным вектором, предусматривающий

10 контактирование клетки в одно и то же время *in vitro* или *ex vivo* с лентивирусным вектором и по меньшей мере с одной связывающейся с клеточной поверхностью молекулой,

где связывающаяся с клеточной поверхностью молекула не индуцирует апоптоз в первичной клетке-мишени или гематопозитической стволовой клетке-мишени, и связывающаяся с клеточной поверхностью молекула способствует тому, что клетка 15 становится более чувствительной к трансдукции под действием вирусного вектора,

где лентивирусный вектор псевдотипирован, и

где псевдотипирование предусматривает котрансфекцию или коинфицирование клетки, используемой для упаковки, как лентивирусным генетическим материалом, так и генетическим материалом, кодирующим по меньшей мере оболочечный белок другого 20 вируса или молекулу клеточной поверхности.

25

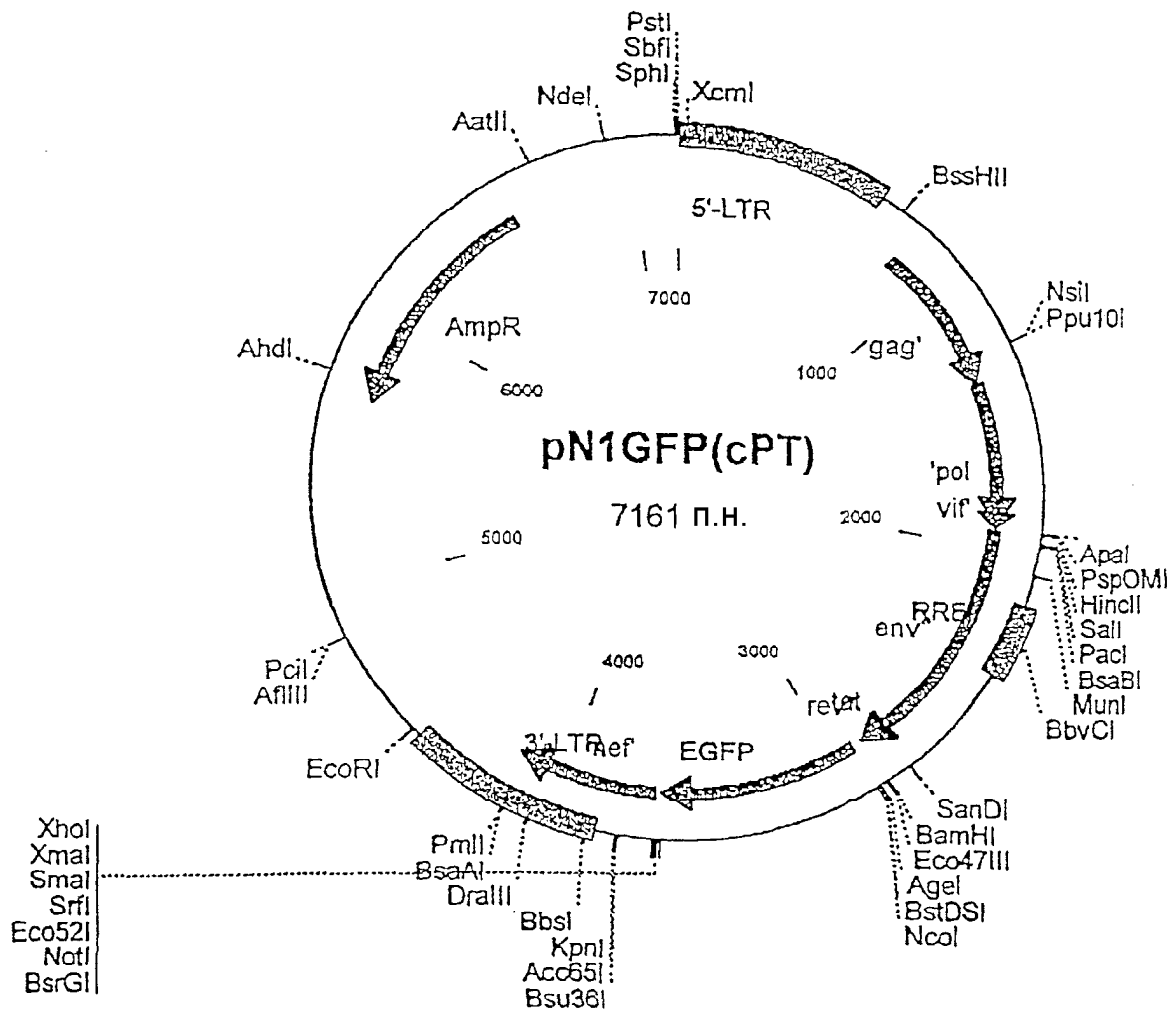
30

35

40

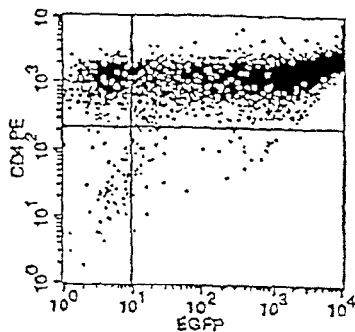
45

50



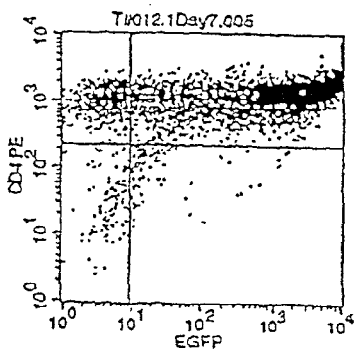
ФИГ. 1В

Панель А



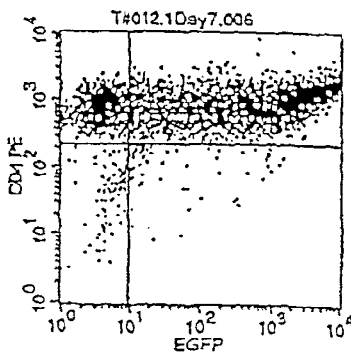
День стимуляции 1
 CD4+ EGFP+: 91.22%
 MF: 3325

Панель В



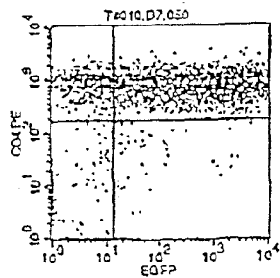
День стимуляции 0
 День трансдукции 1
 CD4+ EGFP+: 89.12%
 MF: 2952

Панель С

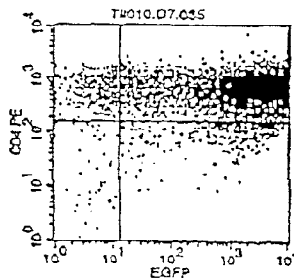


День стимуляции 0
 День трансдукции 0
 CD4+ EGFP+: 80.24%
 MF: 1956

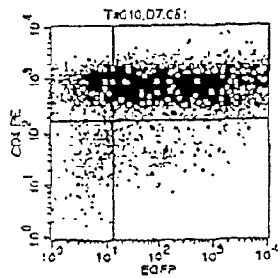
ФИГ. 2



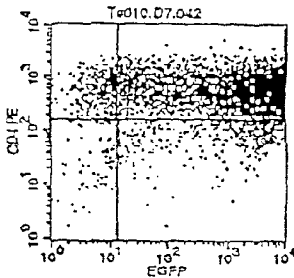
IL2/PHA-p
CD4+ EGFP+: 84.5%
MF: 1920



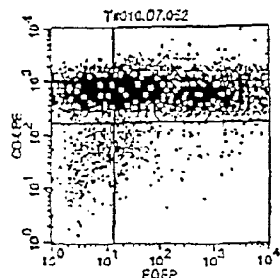
iCD3/iCD28
CD4+ EGFP+: 96%
MF: 5450



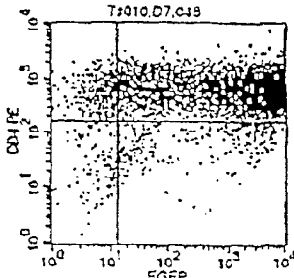
IL2/PHA-P
CD4+ EGFP+: 80.95%
MF: 1110



iCD3/iCD28
CD4+ EGFP+: 95.5%
MF: 5259

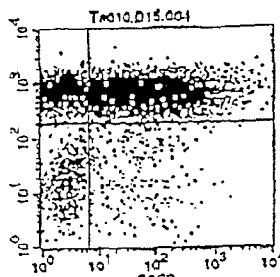


IL2/PHA-P
CD4+ EGFP+: 70.2%
MF: 863

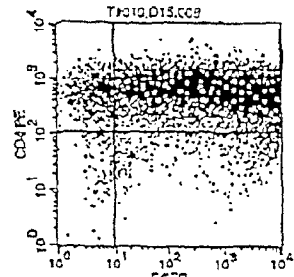


iCD3/iCD28
CD4+ EGFP+: 95.4%
MF: 5346

ФИГ. 3

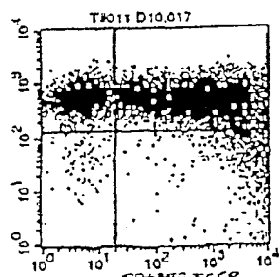


1st wk:IL2/PHA-P
2nd wk: IL2
CD4+ EGFP+: 75.3%
MF: 204

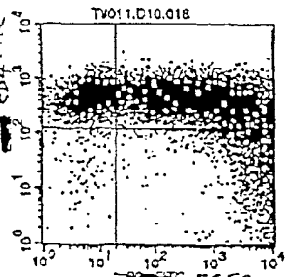


1st wk:iCD3/iCD28
2nd wk: IL2
CD4+ EGFP+: 92.8%
MF: 3054

ФИГ. 4

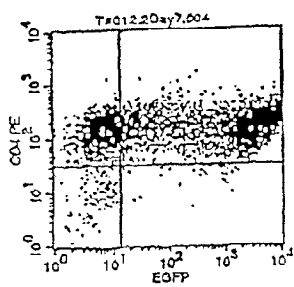


pN1(cpt)CGFP @ MOI20
CD4+ EGFP+: 77.1%
MF: 1591

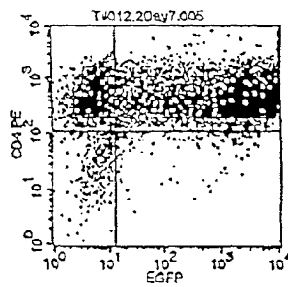


pN2CGFP @ MOI 20
CD4+ EGFP+: 78.2%
MF: 1966

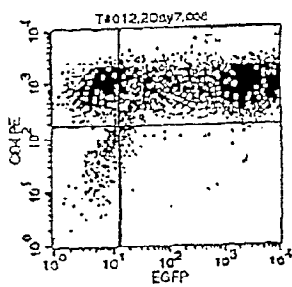
ФИГ. 5



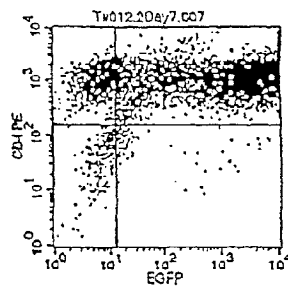
MOI 2
CD4+ EGFP+: 72.7%
MF: 3438



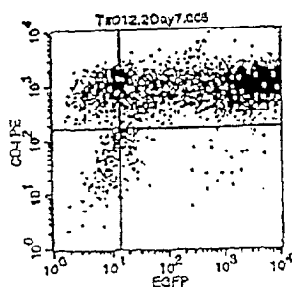
MOI 5
CD4+ EGFP+: 75.4%
MF: 2410



MOI 10
CD4+ EGFP+: 78.7%
MF: 2628



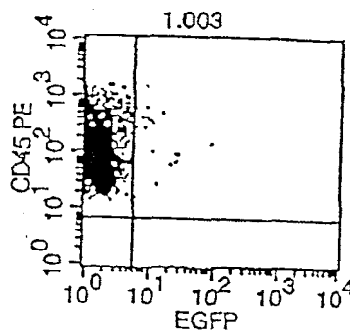
MOI 15
CD4+ EGFP+: 82.4%
MF: 2822



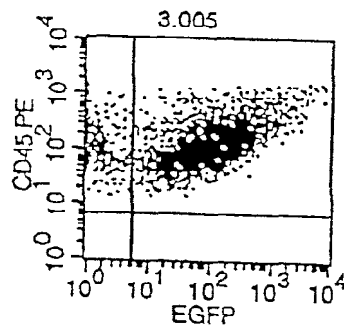
MOI 20
CD4+ EGFP+: 83.8%
MF: 2780

ФИГ. 6

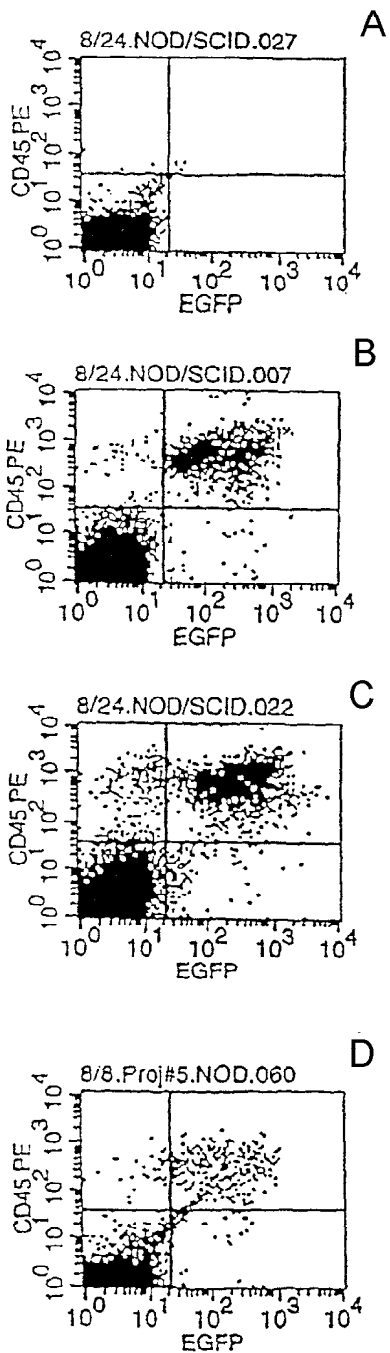
Контроль



Трансдуцированные

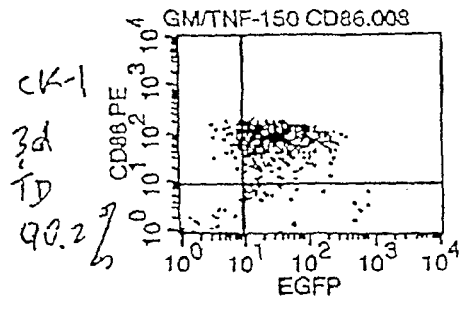


ФИГ. 7

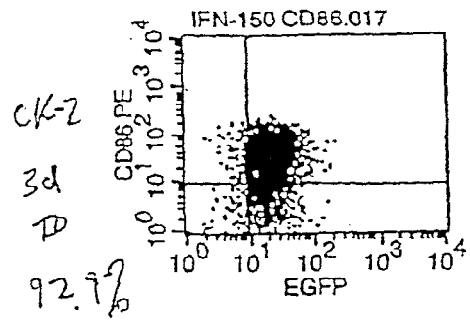


ФИГ. 8

A



B



ФИГ. 9