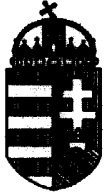




H U 0 0 0 2 2 1 6 0 7 B 1

(19) Országkód

HU



**MAGYAR
KÖZTÁRSASÁG**

**MAGYAR
SZABADALMI
HIVATAL**

SZABADALMI LEÍRÁS

(11) Lajstromszám:

221 607 B1

(21) A bejelentés ügyszáma: P 97 01764
(22) A bejelentés napja: 1995. 09. 01.
(30) Elsőbbségi adatok:
1017/94 1994. 09. 02. DK
(86) Nemzetközi bejelentési szám: PCT/EP 95/03445
(87) Nemzetközi közzétételi szám: WO 96/07748

(51) Int. Cl.⁷

C 12 N 15/867

C 12 N 7/00

C 12 N 15/11

A 61 K 48/00

(40) A közzététel napja: 1998. 01. 28.
(45) A megadás meghirdetésének dátuma a Szabadalmi
Közlönyben: 2002. 11. 28.

(72) Feltalálók:

Günzburg, Walter Henry, Ainhofen (DE)
Saller, Robert Michael, München (DE)

(73) Szabadalmas:

GSF-Forschungszentrum für Umwelt und
Gesundheit GmbH, Oberschleissheim (DE)

(74) Képviseelő:

dr. Pethő Árpád, DANUBIA Szabadalmi és
Védjegy Iroda Kft., Budapest

(54)

Önmagukat nem inaktiváló, célzott expressziót biztosító retrovírusvektorok

KIVONAT

A találmány tárgyát retrovírusvektorok képezik, többek között egy olyan vektor, mely promoter konverziót megy keresztül (ProCon-vektor). A találmány tárgyát képezik továbbá retrovirális vektorrendszerek, melyeknek első komponense egy retrovírusvektor, második komponense pedig egy csomagoló-sejtvonal, amely legalább egy, az említett retrovírusvektor becsomagolásához szükséges fehérjéket kódoló retrovirális vagy rekombináns retrovirális konstrukciót tartalmaz.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy célzott génevitelre szolgáló eljárás, melynek során a vektorrend-

szer segítségével előállított rekombináns retrovírus-részecskékkel célsejteket fertőznek.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti retrovírusvektorok és retrovirális vektorrendszerek alkalmazásai például gyógyászati készítmények előállítására, valamint olyan gyógyászati készítmények, melyek a találmány szerinti rekombináns retrovírus-részecskéket terápiásan hatékony mennyiségben tartalmazzzák.

A találmány szerinti megoldás elsősorban célzott génterápia során történő génevitelre alkalmas.

A találmány tárgyát retrovírusvektorok képezik, többek között egy olyan vektor, mely promoter konverzió megy keresztül (ProCon-vektor). A találmány tárgyát képezik továbbá retrovirális vektorrendszerek, melyeknek első komponense egy retrovírusvektor, második komponense pedig egy csomagoló-sejtvonal, amely legalább egy, az említett retrovírusvektor becsomagolásához szükséges fehérjét kódoló retrovirális vagy rekombináns retrovirális konstrukciót tartalmaz.

A találmány tárgyát képezi továbbá egy célzott génevitelre szolgáló eljárás, melynek során a vektorrendszer segítségével előállított rekombináns retrovírus-részecskékkel célsejteket fertőznek.

A találmány tárgyát képezik továbbá a találmány szerinti retrovírusvektorok és retrovirális vektorrendszerek alkalmazásai például gyógyászati készítmények előállítására, valamint olyan gyógyászati készítmények, melyek a találmány szerinti rekombináns retrovírus-részecskéket terápiásan hatékony mennyiségben tartalmazzák.

A találmány szerinti megoldás elsősorban célzott génterápia során történő génevitelre alkalmas.

Retrovírusvektorok génterápiában való alkalmazásának jelentős figyelmet szenteltek, és jelenleg mind az USA-ban, mind Európában számos elfogadott kezelési előiratban ez a választott módszer terápiás gének bevitelére [Kotani és munkatársai, (1994)]. Ezen kezelési előiratok legtöbbször azonban megköveteli, hogy a célsejtek a terápiás gént hordozó retrovírusvektorral történő fertőzése *in vitro* történjék, és a sejteket az érintett személybe juttassák vissza [Rosenberg és munkatársai, (1992), összefoglaló munkaként lásd: Anderson, (1992)]. Az ilyen *ex vivo* génterápiás protokollok ideálisak a gyógyászati körülmények korrekciója szempontjából, amely körülmények között a célsejt-populáció könnyűszerrel izolálható (mint például a limfociták). Ráadásul a célsejtek *ex vivo* fertőzése lehetővé teszi nagy mennyiségű víruskoncentrátum bevitelét, amit alkalmazás előtt alaposan tesztelni lehet biztonsági szempontból.

Sajnos, a génterápiás alkalmazásoknak csupán egy részében szerepelnek olyan célsejtek, amelyeket könnyűszerrel lehet izolálni, tenyésztetni, majd újra visszajuttatni. Ráadásul a komplex technológia és az ehhez járuló magas költségek jelentős mértékben akadályozzák az *ex vivo* génterápia alkalmazásának elterjedését világszerte. A jövő könnyen kivitelezhető és költség-takarékos génterápiája *in vivo* megközelítést követel meg, amelyben a vírusvektort, vagy a vírusvektort termelő sejteket közvetlenül adjuk be a betegnek injekció, vagy a retrovírusokat termelő sejtek egyszerű beültetése segítségével.

Ez a fajta *in vitro* megközelítés természetesen számos új problémát vet fel. Mindenekelőtt és mindenképp a biztonsági megfontolásokat kell szem előtt tartanunk. Vírusokat fogunk termelni, amelyek elképzelhető, hogy beültetett vírustermelő sejtekből származnak, és nem lesz lehetőség arra, hogy a termelt vírusokat előzetesen leellenőrizzük. Fontos tudatában lenni a – behatárolható – kockázatnak, amely egy ilyen rendszer al-

kalmazásával jár éppúgy, mint megkísérelni olyan új rendszereket előállítani, amelyek minimumra csökkentik ezt a kockázatot.

A retrovirális rendszerek két komponensből állnak (1. ábra):

1. a retrovírusvektor maga egy módosított retrovírus (vektorplazmid), amelyben a vírusfehérjéket kódoló géneket terápiás génekkel és markergénekkkel helyettesítettünk, amelyeket a célsejtbe kívánunk bejuttatni. Mivel a vírusfehérjéket kódoló gének helyettesítése hatékonyan bénítja a vírust, így azt meg kell mentenünk a rendszer második komponensével, amelyik a hiányzó vírusfehérjéket biztosítja a módosított retrovírus számára.

A második komponens:

2. egy nagy mennyiségű vírusfehérjét termelő sejtvonal, amelynek azonban nincs meg az a képessége, hogy replikációra képes vírusokat termeljen. Ez a sejtvonal csomagoló-sejtvonalaként ismert, és egy második plazmida transzfektált sejtvonalból áll. Ez a plazmid a módosított retrovírusvektor becsomagolódását lehetővé tevő géneket hordoz.

Egy becsomagolt vektor előállításához a vektorplazmidot a csomagoló-sejtvonalba juttatjuk be transzfekcióval. Ilyen körülmények között a módosított retrovírusgenom, beleértve a terápiás és markergéneket is, átíródik a vektorplazmidról, és a módosított retrovírus-részecskébe csomagolódik be (rekombináns vírus-részecské). Ezt a rekombináns vírust használjuk fel azután, hogy célsejteket fertőzzünk, amelyekben a vektor genomja és a hordozott marker- vagy a terápiás gének integrálódnak a célsejt DNS-ébe. Egy sejt, amelyet egy ilyen rekombináns vírus-részecskével fertőztünk, nem tud új vektorvírusokat termelni, mivel ezekben a sejtekben nincsenek jelen vírusfehérjék. A vektor DNS-e azonban, amely a terápiás és a markergéneket hordozza, integrálódik a sejt DNS-ébe, és most már a fertőzött sejtben expresszáltatható.

A retrovírusgenom provírus formájának lényegében random integrálódása a fertőzött sejt genomjába [Varmus, (1988)] számos celluláris protoonkogén azonosításához vezetett inszerciós aktivitásuk révén [Varmus, (1988); van Lohuizen és Berns, (1990)]. Az a lehetőség, hogy egy hasonló mechanizmus esetleg különféle rákokat okozhat betegekben, akiket valamilyen korábban már meglévő gyógyítandó állapot kezelésére szánt terápiás gént hordozó vektorral kezeltek, visszatérő etikai problémát vetett fel. A legtöbb kutató egyetértene abban, hogy annak valószínűsége, hogy egy replikáció szempontjából hiányos retrovírusvektor, éppúgy, mint bármely jelenleg használatos egy olyan celluláris génebe vagy annak közelébe épüljön be, amely a sejtek proliferációjának kontrolljában játszik szerepet, elenyészően kicsi. Azonban szintén általánosan feltételezik azt is, hogy egyetlen fertőzési eseményből kiindulva egy replikációra képes retrovírus-populáció robbanásszerű expanziója végül is elegendő integrálódási eseményt hoz létre ahhoz, hogy egy ilyen fenotípusos integrálódást nagyon is reális lehetőséggé tegyen.

A retrovírusvektor-rendszerek optimalizálva vannak abból a szempontból, hogy minimumra csökkent-

sék a replikációra képes vírusok jelenlétének esélyét. Jól dokumentált azonban az a tény, hogy a retrovírusvektor-rendszer komponensei közötti rekombinációs események potenciálisan patogén replikációra képes vírus keletkezéséhez vezethetnek, és a vektorrendszerek számos generációját alkották meg, hogy csökkentsek a rekombinációnak ezt a kockázatát [Salmons és Günzburg összefoglaló munkája, (1993)].

Az *in vivo* génterápia alkalmazását tekintve figyelembe kell vennünk továbbá – mind biztonsági, mind tisztán gyakorlati nézőpontból – a retrovírusvektor célba juttatásának problémáját. Világos, hogy a vektorok hordozta terápiás gének jobb, ha csupán a kívánt célsejtben expresszálódnak, és nem előnyös, ha válogatás nélkül minden szövetben és sejtben teszik ezt. Ez különösen akkor fontos, ha a bejuttatandó gének toxinok génjei, amelyek specifikus tumorsejtek eltávolítását célozzák. Egyéb, nem célsejtek eltávolítása nyilvánvalóan nagyon nem kívánatos.

Számos retrovírusvektor-rendszert leírtak, amelyek feltehetőleg lehetővé teszik a hordozott terápiás gének célba juttatását [Salmons és Günzburg, (1993)]. Ezen megközelítések legtöbbje magában hordozza vagy az infekciós események előzetesen meghatározott sejt típusokra való korlátozását, vagy heterológ promoterek alkalmazását, amelyek a kapcsolt heterológ terápiás vagy marker-gének expresszióját specifikusan meghatározott sejt típusokban teszik lehetővé. Olyan heterológ promotereket alkalmaznak, amelyek a kapcsolt gének expresszióját csupán olyan sejt típusokban vezérlik, amelyekben ez a promoter normális esetben aktív. Ezeket a promotereket előzetesen marker- vagy terápiás génekkel együtt inszertálják a retrovírusvektor belsejébe, a *gag*, a *pol* vagy az *env* gének helyére.

Az ezeket a géneket szegélyező retrovirális „Long Terminal Repeat” (LTR, hosszú terminális ismétlődés) hordozza a retrovirális promotert, amelyik általában nem specifikus abból a szempontból, hogy sok különböző sejt típusban képes az expresszió vezérlésére [Majors, (1990)]. Promoter interferenciát írtak le az LTR promoter és a heterológ belső promoterek között, mint amilyenek a fent említett szövetspecifikus promoterek. Ismert ráadásul, hogy a retrovirális LTR-ek erős enhanszereket tartalmaznak, amelyek vagy függetlenül, vagy a retrovirális promoterral együtt képesek befolyásolni a celluláris gének expresszióját a retrovírus integrálódási helye közelében. Erről a mechanizmusról kimutatták, hogy hozzájárul tumorok keletkezéséhez állatokban [van Lohuizen és Bems]. Ezek a megfigyelések ösztönözték az önmagukat inaktíváló vektorok („Self-Inactivating-Vectors”, SIN) kifejlesztését, amelyekben a retrovirális promoterek funkcionálisan inaktíválódnak a célsejtben (PCT WO94/29437). Az említett vektorokat tovább módosították például a promotergén expressziós egységek LTR régióba történő inszerciójával, és így úgynevezett kettős kópiájú („double copy”) vektorokat állítottak elő (PCT WO89/11539). Az ilyen vektorokban azonban a heterológ promoter közvetlenül kapcsolva van a marker/terápiás génnel, akár a vektor belsejébe, akár az LTR-régióba inszertálták azt.

A korábban leírt, fent ismertetett – egy deletált 3’ – LTR-t (PCT WO94/29437) hordozó – SIN-vektor ezenfelül egy olyan erős heterológ promotert hasznosít, mint a citomegalovírusé („Cytomegalvirus”, CMV) a retrovirális 5’ LTR-promoter (U3-mentes 5’ LTR) helyett, hogy a vektor-konstrukció expresszióját vezérelje a csomagoló-sejtvonalban. A 3’-LTR-ben (PCT WO94/29437) ugyanakkor tartalmaz egy heterológ poliadenilációs jelet is.

A találmány szerinti megoldás kidolgozásakor célul tűztük ki egy olyan új retrovirális vektor előállítását, amely biztonságos génátviteli eszközként alkalmazható célzott génterápia során, és amelynek a csomagoló konstrukcióval történő rekombinációra való hajlama erősen redukált. Ez az új vektor a 3’ LTR-ben heterológ promotert és/vagy regulációs elemeket hordoz, amelyek az infekció után megduplázódnak és a célsejtben az 5’ LTR-be helyeződnek át végül is kontrollálva a marker/terápiás gének expresszióját, amelyek nincsenek közvetlenül kapcsolva a promoterhez, hanem inkább a vektor belsejébe vannak inszertálva. Ezek a vektorok nem mennek át öninaktiváción – ehelyett átmennek azonban promoterkicserélődésen, ezért ProCon-nak nevezzük őket, ami a promoterkonverzió („Promoter Konverzion”) rövidítése.

Mivel a promoterkonverzió nem eredményez öninaktivációt, a retrovírusvektor transzkripció szempontjából aktív lesz a célsejtben. Mindazonáltal mindkét LTR nagymértékben heterológ promoter, illetve enhanszer szekvenciákból fog állni a célsejtben. Ez csökkenti majd a valószínűségét annak, hogy az integrálódott vektor a célsejtben hosszú idő alatt ugyanúgy inaktíválódjon, ahogy azt hagyományos vektorok esetében leírták [Xu és munkatársai, (1989)], valamint csökkenti az endogén retrovírus-szekvenciákkal való rekombináció esélyét is, amely potenciálisan patogén replikációra képes vírusokat eredményezhetne. Így tehát nő a rendszer biztonságossága.

A találmány szerinti megoldás során a retrovírusvektor-konstrukció 5’-LTR-ét nem módosítottuk, és a virális vektor expresszióját a csomagolósejtekben a normális retrovirális U3-promoter vezérli. A normális retrovirális poliadeniláció megengedett, és a 3’-LTR nem tartalmaz heterológ poliadenilációs jelet. Ennek az *in vivo* génterápiás stratégiák kidolgozása során lényeges a szerepe, mivel a vírus normális fiziológiás szabályozása a normális virális promoter révén – esetleg az adeniláció normális virális kontrollját is beleértve – hosszú időn keresztül érvényre jut *in vivo* miközben a csomagolósejtek rekombináns vírusokat termelnek.

Ennek az új retrovirális vektorok további módosítása előrevetíti a lehetőségét celluláris szekvenciák beépítésének heterológ promoter és/vagy regulációs elemek helyett. Ez nagyobb szelektivitást kell hogy jelentsen a celluláris szekvenciákkal történő helyspecifikus rekombináció során így lehetővé téve a retrovírusvektorok a gazdasejt genomjának adott helyére való integrálódásának elérését [Saller, (1994)].

A találmány szerinti megoldás említett és egyéb céljait a találmány tárgyát képező, promoterkonverzió ke-

resztülmenő retrovírusvektor valósítja meg, amely vektor az alábbi összetevőket tartalmazza: egy U3-R-U5 szerkezetű 5'-LTR-régiót; egy vagy több kódoló vagy nemkódoló szekvenciát; valamint egy teljesen vagy részben deletált U3-régiót tartalmazó 3'-LTR-régiót, amelyben az említett U3-régiót egy polilinker szekvenciával helyettesítettük, melyet az R- és az U5-régió követ.

Az említett polilinker szekvencia legalább egy restrikciós hasítási helyet hordoz, és előnyösen a heterológ DNS-fragmens legalább egy inszertjét tartalmazza. Az említett heterológ DNS-fragmenseket előnyösen az expresszió szempontjából előnyösen célsejtspecifikus regulációs elemek és a promoterek közül választjuk ki, de lehet olyan DNS-fragmens is, amely nem bír szabályozó funkcióval.

Az említett heterológ DNS-fragmens előnyösen homológ egy vagy több celluláris szekvenciával. A regulációs elemek és a promoterek előnyösen távolba ható („transacting”) molekulákkal szabályozhatók.

A találmány szerinti megoldás további céljai, jellegzetességei és előnyei nyilvánvalóak lesznek a találmány előnyös megvalósítási módjainak soron következő leírásából.

A célsejtspecifikus regulációs elemek és promoterek az alábbiak lehetnek: savóeredetű savas fehérjére („Whey Acidic Protein”, WAP), egér-emlőtumorvírusra („Mouse Mammary Tumour Virus”, MMTV), β -laktoglobulinra és kazeinre specifikus regulációs elemek és promoterek, hasnyálmirigy-specifikus regulációs elemek és promoterek, beleértve a szénsav-anhidráz-II és a β -glükokináz regulációs elemeit és promotereit, limfocitaspecifikus regulációs elemek és promoterek beleértve immunglobulin és MMTV-limfocitaspecifikus regulációs elemeket és promotereket, vagy olyan MMTV-specifikus regulációs elemek és promoterek, amelyek glükokortikoid hormonokra való érzékenységet biztosítanak vagy amelyek az expressziót specifikusan az emlőmirigyben vezérlik. Az említett regulációs elemek és promoterek előnyösen szabályozzák az említett retrovírusvektor kódolószekvenciái közül legalább egynek az expresszióját. Az LTR-régiók például a következők lehetnek: az egér-leukémiavírus („Murine Leukaemia Virus” MLV), az egér-emlőtumorvírus („Mouse Mammary Tumour Virus”, MMTV), az egér-szarkómavírus („Murine Sarcoma Virus”, MSV), az immunhiányos tünetegyüttest okozó majomvírus („Simian Immunodeficiency Virus”, SIV) az emberi immunhiányos tünetegyüttest okozó vírus („Human Immunodeficiency Virus”, HIV), az emberi T-sejtes leukémiát okozó vírus („Human T-cell Leukaemia Virus”, HTLV), az immunhiányos tünetegyüttest okozó macskavírus („Feline Immunodeficiency Virus”, FIV), a macska-leukémiavírus („Feline Leukaemia Virus”, FELV), a marha-leukémiavírus („Bovine Leukaemia Virus”, BLV) vagy a Mason-Pfizer-féle majomvírus („Mason-Pfizer-Monkey Virus”, MPMV) LTR-régiói.

A retrovírusvektor előnyösen vagy egy BAG-víruson [Price és munkatársai, (1987)] vagy egy LXS-víruson alapul [Miller és Rosman, (1989)].

A kódolószekvencia előnyösen a következők közül bármelyik lehet: markergének, terápiás gének, antivirális gének, antitumorgének vagy citokingének.

Az említett marker- és terápiás gének előnyösen a következők lehetnek: β -galaktozidáz génje, neomincingén, herpesz szimplex vírus timidin kináz génje, puromicingén, citozin deamináz génje, hygromicingén, szekretált alkalikus foszfatáz génje, guanin foszforibozil transzferáz (gpt) génje, alkohol-dehidrogenáz génje vagy a hipoxantin foszforibozil transzferáz (HPRT) génje.

A találmány szerinti megoldás egy másik megvalósítási módja szerint úgy járhatunk el, hogy megváltoztattunk vagy részlegesen deletáltunk legalább egy retrovirális szekvenciát, ami a retrovírusok integrálódásához szükséges.

A találmány egy további megvalósítási módja egy retrovírusvektor-rendszer, amelynek első komponensét egy retrovírusvektor képezi, amint azt fent leírtuk, második komponense pedig egy csomagoló-sejtvonal, amely legalább egy retrovirális vagy rekombináns retrovirális konstrukciót tartalmaz, amely olyan fehérjéket kódol, amelyek az említett retrovírusvektor becsomagolásához szükségesek.

A csomagoló-sejtvonal egy olyan retrovirális vagy rekombináns retrovirális konstrukciót tartalmaz, amely azokat a retrovirális fehérjéket tartalmazza, amelyeket az említett retrovírusvektor nem kódol. A csomagoló-sejtvonal előnyösen a következő lehet: psi-2, psi-Crypt, psi-AM, GP+E-86, PA317 és GP+envAM-12, vagy ezek bármelyike olyan rekombináns konstrukciókkal transzfectálva, amelyek lehetővé teszik más becsomagolt vírusok felszíni fehérjéinek expresszióját.

A találmány egy másik megvalósítási módja magában foglalja egy csomagoló-sejtvonal alkalmazását, amely sejtvonal egy az integráz funkcióban hiányos rekombináns retrovirális konstrukciót tartalmaz.

Miután a találmány szerinti retrovirális vektort a fent leírtak szerint bejuttattuk egy retrovírust csomagoló-sejtvonalba, valamint a célsejt fertőzése után – amint azt fent szintén leírtuk – egy retrovirális provírus keletkezik, amelyben az említett polilinker és bármilyen szekvencia, amit a 3'-LTR-régióban levő említett polilinkerbe inszertálunk, megduplázódik a fertőzött célsejtben a reverz transzkripció folyamata során, és a kapott provírusnak mind a 3'-LTR-, mind az 5'-LTR-régiójában megjelenik.

A találmány tárgyát képezi a találmány szerinti retrovirális provírus mRNS-e, valamint bármely RNS, amely egy a találmány szerinti retrovírusvektorból származik.

A találmány egy további megvalósítási módja egy nem terápiás eljárás homológ és/vagy heterológ nukleotidszekvenciák bejuttatására emberi vagy állati sejtekbe *in vitro* vagy *in vivo*, amely egy a találmány szerinti retrovírusvektor-rendszer csomagoló-sejtvonalának a találmány szerinti retrovírusvektorral történő transfectálásából, és a célsejt-populáció a csomagoló-sejtvonal által termelt rekombináns retrovírusokkal való fertőzésből áll. A nukleotidszekvenciák lehetnek fehérjéket

kódoló gének vagy azok részei, szabályozó szekvenciák vagy promoterek.

A retrovírusvektor, a retrovírusvektor-rendszert és a retrovirális provírusról, valamint annak RNS-ét alkalmazzuk egy génterápiában használható gyógyászati készítmény előállítására emlősökben, az embert is beleértve. Továbbá ugyanezeket alkalmazzuk homológ celluláris szekvenciákba történő célzott integrálódás érdekében.

A találmány szerinti megoldás megvalósítása során a retrovírusokra jellemző promoterkonverzió elvét alkalmazzuk.

A retrovírusgenom egy RNS-molekulából áll, amelynek szerkezete a következő: R-U5-gag-pol-env-U3-R (2. ábra). A reverz transzkripció folyamata során az U5-régió megduplázódik, és az új szakasz a keletkezett DNS-molekula jobb oldali végén helyezkedik el, míg az U3-régió szintén megduplázódik és az új szakasz a keletkezett DNS-molekula bal oldali végén helyezkedik el (2. ábra). Az így keletkezett U3-R-U5 struktúrát LTR-nek (hosszú terminális ismétlődésnek, angolban „Long Terminal Repeat”) nevezzük, és így a provírus DNS-szerkezetének két vége azonos és ismétlődő [Varnus, (1988)]. Az U3-régió a provírus bal oldali végén tartalmazza a promotert (lásd lent). Ez a promotor vezérli az RNS transzkriptum szintézisét, ami a bal oldali U3-régió és az R-régió határán kezdődik, és a jobb oldali R- és U5-régió határán fejeződik be (2. ábra). Ez az RNS csomagolódnak be retrovírus-részecskékké és transzportálódik a fertőzendő célsejtbe. A célsejtben az RNS ismét reverz módon átíródik, amint azt fent leírtuk.

A találmány szerinti megoldás megvalósítása során egy retrovírusvektort készítünk, amelyben a jobb oldali U3-régiót megváltoztatjuk (3. ábra), de a bal oldali U3-régiót változatlan formában hagyjuk (3. ábra). A vektor normális módon átíródhat RNS-sé a normális, bal oldali U3-régióban elhelyezkedő retrovirális promotert használva (3. ábra). A keletkezett RNS azonban csak a megváltoztatott jobb oldali U3-struktúrát tartalmazza. A fertőzött célsejtben a reverz transzkripció után ez a megváltoztatott U3-régió foglal majd helyet a retrovirális struktúra mindkét végén (3. ábra).

Ha a megváltoztatott régió egy polilinkert hordoz (lásd lent) az U3-régió helyén, akkor bármely promotor, beleértve azokat, amelyek szövetspecifikus expressziót vezérelnek, mint például a WAP-promoter (lásd lent) könnyűszerrel beinszertálható. A célsejtben azután kizárólag ez a promotor vezérli majd a retrovírusvektor által hordozott kapcsolt gének expresszióját. Ezenfelül vagy helyett egy vagy több celluláris szekvenciával homológ DNS-szegmenst inszertálhatunk a polilinkerbe gének célba juttatása céljából homológ rekombinációval (lásd lent).

A leírásban használt értelemben a „polilinker” kifejezés egy olyan mesterségesen szintetizált rövid DNS-szakaszt jelöl, amely számos egyedi restriktions hasítási helyet tartalmaz így lehetővé téve bármely promotor vagy DNS-szegmens könnyű beinszertálását. A „heterológ” kifejezés a leírásban használt értelemben DNS-

szekvenciák bármely kombinációjára vonatkozik, amelyek ilyen módon társulva normálisan nem fordulnak elő a természetben.

A génexpressziót promoterek szabályozzák. Promoterfunkció hiányában a gén nem expresszálódik. A normális MLV retrovirális promotor elég kevésbé szelektív, tehát a legtöbb sejttípusban aktív [Majors, (1990)]. Számos promotor létezik azonban, amely csupán egy nagyon jól meghatározott sejttípusban mutat aktivitást. Az ilyen szövetspecifikus promoterek ideális jelöltek a génexpresszió szabályozására retrovírusvektorokban, mivel a terápiás gének expresszióját specifikus célsejtekre korlátozzák.

A csomagoló-sejtvonalban a retrovírusvektor expresszióját a normális, nem szelektív U3-régióban levő retrovírus-promoter szabályozza. Azonban amint a vektor belép a célsejtbe, promoterkonverzió megy végbe, és a terápiás vagy a markergén – például β -galaktoszidáz génje – a polilinkerbe bejuttatott általunk választott szövetspecifikus promotor segítségével megy végbe. (3. ábra). Nem csupán arról van szó, hogy gyakorlatilag bármely szövetspecifikus promotor beépíthető a rendszerbe a különböző sejttípusok széles skálájába lehetővé téve a célzott génbejuttatást, hanem a konverziót követően a retrovírusvektor szerkezete és tulajdonságai többé nem emlékeztetnek a víruséra. Ennek természetesen rendkívül fontos következményei vannak biztonságossági szempontból, mivel a közönséges vagy a technika állása szerinti retrovírusvektorok készségesen átmennek genetikai rekombináció a retrovirális csomagoló konstrukcióval, és/vagy endogén retrovírusokkal úgy, hogy annak eredményeképpen potenciálisan patogén vírusok keletkeznek. A promoterkonverziós vektorok (ProCon) nem emlékeztetnek a retrovírusokra, mivel a továbbiakban nem hordoznak az U3-régiós retrovirális promotert a konverzió után, így a genetikai rekombináció lehetősége redukált.

A retrovírus promotorstruktúrája az LTR U3-régiójában van. Az LTR-ek jeleket hordoznak, amelyek lehetővé teszik számukra, hogy a célsejt genomjába integrálódjanak. A retrovirális provírusok integrálódása szintén hozzájárulhat patogén változásokhoz [van Lohuizen és Berns, (1990)]. A találmány egyik megvalósítási módja szerint a ProCon-vektorok módosított LTR-eket hordozhatnak, amelyek már nem hordoznak az integrálódáshoz szükséges jelet. Ez szintén növeli a vektorrendszerek potenciális biztonságát.

A találmány szerinti megoldásban más szempontból nézve a retrovírusvektort a célsejtbe történő célzott integrálódás végett alkalmazzuk. A retrovírusgenom provírus DNS-változatának integrálódása a célsejtbe jelentős előrelépés a retrovírusok vektorként való alkalmazásában, ha más vírusokkal, mint például az adenovírusokkal vetjük össze őket, mivel a bejuttatott gének hosszan tartó stabil expresszióját teszi lehetővé. Az integrálódási esemény véletlenszerű természete azonban ugyanakkor igen jelentős hátrányt is jelent a retrovírusvektorok alkalmazása során, mivel megnöveli a lehetőségét a celluláris tumorgátló gének (szuppresszorgének) vagy a protoonkogének inszerció (in)aktiválódásának

és ezzel a tumor keletkezésének is [van Lohuizen és Berns, (1990)].

A homológ rekombinációt sikerrel alkalmazták transzfektált vagy mikroinjektált DNS specifikus DNS-lokuszra történő célzott integrálására és rutinszerűen alkalmazták „knock-out” (bizonyos gént vagy géneket h

átalantának, „kiütnek”) transzgenikus egerek vagy egyéb állatok előállítására [Capecchi összefoglaló munkája, (1989), Bradley és munkatársai, (1992), Morrow és Kucherlapati, (1993)]. Sajnos a DNS bevitelének hatékonysága ilyen tisztán fizikai módszerekkel szélsőségesen kicsi. Ezzel szemben a retrovírus közvetítette génbevitel nagyon hatékony, egy sejtpopuláció közel 100%-a fertőzhető. A retrovirális génbevitel kombinálása homológ rekombinációval várhatóan lehetővé teszi egy a lokusz-célzott integrálás szempontjából ideális rendszer megalkotását.

Megvizsgáltuk, hogy hosszú homológ DNS-szakaszok retrovírusvektorok különböző helyeire történő bejuttatása homológ rekombináció elősegítette integrálás céljából [Saller, (1994)] megvalósítható-e és hogyan. Mind a génkonverzióra, mind a homológ rekombinációra kapott eredményt értékeltük. A HSV-tk-gén mint célgén egyetlen kópiáját hordozó sejtvonalat alkalmazva képesek voltunk a célgént a korábban mások által leírtnál [Ellis és Bernstein, (1989)] 15-ször nagyobb gyakorisággal eltalálva működésképtelenné tenni. A DNS-fragmenseket – amelyeken a rekombinációt végrehajtottuk – klónozva mind a célzott tk-szekven

cia, mind a retrovírusvektor jelenlétére fény derült [Saller, (1994)].

A celluláris szekvenciákkal homológ DNS-szegmenseket célzott integrálásuk érdekében a ProCon-vektorok polilinker régióiba inszertáljuk. A célsejt fertőzése és a reverz transzkripció után ezek a szekvenciák a provírus 5'-terminális végénél jelennek meg. A terminális homológiaikról kimutatták hogy elősegítik a homológ rekombinációt [Bradley, (1991)], izogenikus celluláris szekvenciákkal [Bradley, (1991)]. A homológ szekvenciák mutáns változatait hordozó célsejtek fertőzése rekombinációt és így a mutáns szekvencia kijavítását kell hogy eredményezze, akár csupán a homológ szekvencia rekombinálódik a sejt genomjába, akár a teljes vektor inszertálódik [Saller, (1994)]. Ez a vektortípus azonban nemcsak gének kijavítására képes, hanem alkalmas retrovírusvektorok által hordozott terápiás gének integrálásának vezérlésére a genom olyan specifikus helyeire, amelyekről tudjuk, hogy nem tartalmaznak aktív géneket. Ez jelentős mértékben csökkenti a lehetőségét a fent leírtak szerinti inszerciós aktiválódásnak és inaktiválódásnak, és így hozzájárul a retrovírusvektorok alkalmazásának biztonságosságához.

A találmány szerinti megoldást az alábbi példák segítségével részletesebben is ismertetjük. A példák révén ismertetettekkel azonban semmilyen módon nem korlátozzuk a találmány szerinti oltalmi igényünket, mivel a magától értetődő módosítások, valamint egyéb módosítások és helyettesítések is szakember számára nyilvánvalóak.

A rekombináns DNS-technikák, amelyeket a találmány szerinti megoldás megvalósítása során alkalmazunk, standard eljárások, szakember számára jól ismertek, és részletesen ismertetve vannak például a következő publikációkban: „Molecular Cloning” [Sambrook és munkatársai, (1989)], valamint „A Practical Guide to Molecular Cloning” [Perbal, (1984)].

Itt megadjuk az ábrák rövid leírását, amelyekre az alábbi példák ismertetése során hivatkozunk.

1. ábra Retrovírusvektor-rendszer.
2. ábra Retrovírusgenom, reverz transzkripció.
3. ábra A ProCon-vektorok elve.
4. ábra PCR (polimeráz láncreakció)-analízis, MLV-próba.
5. ábra PCR-analízis, MMTV-próba.
6. ábra β -galaktozidáz expressziója fertőzött NIH- és EF43-sejtekben.
7. ábra β -galaktozidáz expressziója terhes egértől származó fertőzött elsődleges emlőmirigy-sejtekben.
8. ábra β -galaktozidáz expressziója miután vírusokat injektáltunk egy terhes Balb/c eger emlőmirigyébe és bőrébe.
9. ábra β -galaktozidáz expressziója fertőzött emlőtumorsejtekben.
10. ábra Retrovírusvektor célzott integrálódása homológ rekombináció révén.

1. példa

Emlőmirigy-specifikus expresszió emlőspecifikus promotereket hordozó ProCon-vektorral történt fertőzés után

Az eger-leukémiavírus (MLV) retrovírusvektorban, ami BAG néven ismeretes [Price és munkatársai, (1987)], a β -galaktozidáz génjét a nem szövetspecifikus MLV-promoter kontrollálja. Ez a promoter az LTR U3-régiójában helyezkedik el (3. ábra.). A találmány szerinti megoldás megvalósítása során egy BAG-vektorból származó vektort készítettünk el, amelyben a 3'-LTR-régió

belül elhelyezkedő MLV promotert (U3) deletáltuk és egy polilinker szekvenciával helyettesítettük, amely polilinker lehetővé teszi heterológ promoterek kényelmes beépítését. Az U3-ban hiányos BAG-vektort az 5'-LTR-ben található MLV-promotertől (U3) vezéreltetve expresszáltattuk, miután bejuttattuk a csomagoló-sejtvonalba. A retrovírusgenom életciklusa során bekövetkező átrendeződések eredményeképpen, miután fertőztük vele a célsejtet, a polilinker a fent leírtak szerint megduplázódik a retrovírusgenom mindkét végén megjelenve. Így tehát egy retrovírusvektort készíthetünk, amelyben a BAG β -galaktozidáz génjét a célsejtben bármely heterológ promoter kontrollálhatja, amelyet a polilinkerbe inszertáltunk (3. ábra).

A fenti elv alapján a következő specifikus promotereket inszertáltuk a módosított BAG-vektor polilinker régiójába:

Inszertáltuk az eger-emlőtumorvírus-promoter (MMTV) számos al régióját, amelyek között van egy régió, amely glükokortikoid hormonokra való érzékenysé-

get eredményez, és egy régió, amely biztosítja, hogy az expresszió az emlőmirigyben menjen végbe.

Inszeráltuk továbbá a savóeredetű savas fehérje (WAP) promoterét. Ez a promoter kontrollálja a WAP expresszióját, így az csupán terhes és szoptatós rágcsálók emlőmirigyében termelődik.

A polilinkerbe inszerált promoterek β -galaktozidáz génexpressziója felett gyakorolt kontrollját az elkészített MMTV és WAP retrovírusvektorok alkalmazásával különböző sejteken végzett fertőzési vizsgálatok segítségével ellenőriztük.

A retrovírusvektor-részecskék előállítására érdekében az MMTV és a WAP ProCon-vektorokkal a GP+E86 csomagoló-sejtvonalat [Markowitz és munkatársai, (1988)] transzfektáltuk. A vektor által kódolt neomicinrezisztenciára történt szelekció után a rekombináns ProCon-vírust termelő sejtek stabil populációit és klónjait kaptuk. Az EF43 egér-mlősejtvonal [Günzburg és munkatársai, (1988)] és egy egérfibroblast-sejtvonal [Jainchill és munkatársai, (1969)] fertőzésére ezen populációk vírustartalmú felülűszóit alkalmaztuk. Négy nappal a fertőzés után a célsejtek lízise megtörtént, és a kvantitatív mérési eljárás β -galaktozidázra nem mutatott ki expressziót egyik sejtvonalban sem, amelyet WAP-ot hordozó ProCon-vektorokkal fertőztünk, de az MMTV-t hordozó ProCon-vektorokkal fertőzött mindkét sejtvonalat jól expresszálódnak mértük. (6. ábra). Ez az eredmény összhangban van azzal, hogy a WAP-promoter *in vivo* csupán a terhesség késői szakaszában és a tejelválasztás időszakában működik, és a legegyszerűbb *in vitro* emlősejtkultúrákban mint például az EF43-sejtek nem. Ahhoz, hogy megvizsgálhassuk, vajon a WAP-ot hordozó ProCon-vektorok aktívak lennének-e egy komplex, emlőeredetű sejtkultúrárendszerben, 8–10 napja terhes egérből (7. ábra) származó elsődleges magzati szervekdeményekből vagy emlőtumorból (9. ábra) sejtkultúrát készítettünk, és a transzfektált sejtvonalak ugyanazon transzfektált populációjával felülűszójával fertőztük azokat. Mind a WAP-, mind az MMTV-promoter fragmenseit hordozó ProCon-vektor aktív volt ezekben az elsődleges sejtekben (7. ábra), és az emlőtumorból származó sejtekben is (9. ábra), amint azt a β -galaktozidáz-aktivitás révén kimutattuk.

Abból a célból, hogy megvizsgáljuk, vajon a WAP-ot és az MMTV-t hordozó ProCon-vektorok aktívak-e *in vivo*, és vajon a β -galaktozidáz expressziója csupán az emlőmirigyre korlátozódik-e *in vivo*, rekombináns ProCon-vírust tartalmazó tápoldatot injektáltunk *in situ* 8–10 napja terhes egerek emlőmirigyébe vagy bőrébe. Öt nappal később az egereket feláldoztuk, sejtkivonatokat készítettünk és a galaktozidázaktivitást mértük. Mind a WAP-, mind az MMPV-fragmenst hordozó ProCon-vektor csupán a terhes állatok emlőmirigyében expresszálódott, a bőrben nem (8. ábra, cf M és S). Így tehát *in vivo* mindkét promoter regulációs elemei csupán az emlőmirigyben engedik meg az expressziót, míg *in vitro* a WAP-promoter regulációs elemei megtartják szigorú szövetspecifitásukat, míg az MMTV-éi nem.

Ezek a ProCon-vektorok, amennyiben szövetspecifikus promotereket és regulációs elemeket hordoznak, al-

kalmassak lesznek terápiás gének előre meghatározott sejttípusban, szövetben és szervben expresszió vezérlésére. Ezen terápiás gének közé tartozik potenciálisan a melittiné, aminek anti-HIV és antitumor hatása is van, valamint gének, amelyek termékei sejthalált indítanak el, mint például a timidin kináz, a guanin foszforibozil-transzferáz és a citozin deamináz génje, a citokróm P450 génje éppúgy, mint azok a gének, amelyek a sejtciklus szabályozásában vesznek részt, mint például az SDI/WAF-1/CIP-1.

2. példa

A promoterkonverzió igazolása az MMTV-promotert eredetileg a 3'-LTR-ben hordozó ProCon-vektorral fertőzött sejtekben

Egér-mlőtumorvírus (MMTV) promoterrégióját hordozó ProCon-vektorral csomagoló-sejtvonalat transzfektáltunk, és a kapott rekombináns vektorrészecskéket használtuk egy izolált emberi hólyagkarcinóma-sejtvonal (EJ) fertőzésére. A fertőzött sejtek klónjait a G418 neomicinanalógot tartalmazó táptalajon szelektáltuk (mivel a vektor egy belső SV40-promoter révén vezérelt neomicin-rezisztenciagént hordoz). A fertőzött klónok egyikéből, és fertőzetlen szülői EJ-sejtekből is DNS-t tisztítottunk, amit polimeráz láncreakcióban használtunk fel (PCR). A PCR-eket két lánccindító alkalmazásával végeztük el, amelyek közül az egyik specifikusan felismeri az LTR MMTV-szekvenciáit (4. és 5. ábra, A, B) vagy MLV R-régióját és kötődik a megfelelő régióhoz, míg a másik lánccindító a markergénen lokalizálódik (4. és 5. ábra). Mivel a markergén lánccindítója az MMTV-szekvenciától (vagy az MLV R-régiójától) csupán 3' irányban helyezkedik el, amennyiben megtörténik a promoterkonverzió, az MMTV lánccindítók és a markergén lánccindítójának kombinálásával kapott pozitív PCR-jel ezt jelzi. A 4. ábrán az A, B, vagy C lánccindítók alkalmazásával kapott PCR-termékek láthatók, az MLV-szekvenciából származó jelölt fragmenssel végzett hibridizáció után, igazolva, hogy mindhárom PCR-termék MLV-eredetű. A fragmensek mérete igazolja, hogy megtörtént a promoterkonverzió. Az 5. ábrán az A vagy B lánccindítók alkalmazásával kapott PCR-termékek láthatók, amelyeket egy MMTV-specifikus próbához hibridizáltattunk, ismét igazolva, hogy promoterkonverzió következett be.

3. példa

ProCon-vektorok megalkotása célzott integráció érdekében

Az első példában leírt BAG-vektort alkalmazva egy retrovírusvektort készíthetünk, amelynek LTR-régiójába egy celluláris szekvenciával homológ DNS-szekvenciát inszerálhatunk. A kapott vektort alkalmazhatjuk arra, hogy akár a vektorba inszerált homológ szekvenciának, akár a vektorok egészének a gazdasejt genomjában jelen levő homológ szekvenciába történő integrálódását célzottan hajtsuk végre.

A fent vázolt elv alapján a herpesz szimplex vírus (HSV) timidin kináz (tk) génjének egy fragmensét inszeráltuk a módosított BAG-vektor (tk-mutáns, 10. ábra) [Saller, (1994)] polilinker régiójába.

Létrehoztunk egy sejtvonalat is, amelyből hiányzik az emlős tk-gén működőképes kópiája, helyette a HSV-tk-gén egy kópiáját hordozza [Saller, (1994)]. Ezt a sejtvonalat a tk-gént hordozó BAG-vektorral fertőztük, és a sejteket, amelyekben a HSV-tk-gén működésképtelenné vált, kiszelektáltuk (10. ábra).

A fenti példák szemléltetik a találmány szerinti promoterkonverziós vektorok működésének elveit és következményeit.

Hivatkozások

Anderson, W. F. 1992. Human gene therapy. *Science* 256: 808–813.

Bradley, A. 1991. Modifying the mammalian genome by gene targeting. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2: 823–829.

Bradley, A., P. Hasty, A. Davis, and R. Ramirez-Solis. 1992. Modifying the mouse: design and desire. *BioTechnology* 10: 534–539.

Capecchi, M. R. 1989. Altering the genome by homologous recombination. *Science* 244: 1288–1292.

Ellis, J. and A. Bernstein. 1989. Gene Targeting with Retroviral Vectors Recombination by Gene Conversion into Regions of Nonhomology. *Mol. Cell Biol.* 9: 1621–1627.

Emerman, M. and H. M. Temin. 1986. Comparison of promoter suppression in avian and murine retrovirus vectors. *Nucl. Acids Res.* 14: 9381–9396.

Günzburg, W. H., B. Salmons, A. Schlaeffli, S. Moritz-Légrand, W. Jones, N. H. Sarkar, and R. Ullrich. 1988. Expression of the oncogenes *myb* and *ras* abolishes the *in vivo* differentiation of mammary epithelial cells. *Carcinogenesis* 9: 1849–1856.

Jainchill, J. L., S. A. Anderson, and G. J. Todaro. 1969. Murine sarcoma and leukaemia viruses: assay using clonal lines of contact-inhibited mouse cells. *J. Virol* 4: 549–553.

Kotani, H., P. B. Newton, S. Zhang, Y. L. Chiang, E. Otto, L. Weaver, R. M. Blaese, W. F. Anderson, and G. J. McGarrity. 1994. Improved methods of retroviral vector transduction and production for gene therapy. *Human Gene Therapy* 5: 19–28.

Majors, J. 1990. The structure and function of retroviral long terminal repeats. *Curr. Topics in Micro. Immunol.* 157: 49–92.

Markowitz, D., S. Goff, and A. Bank. 1988. A safe packaging line for gene transfer: separating viral genes on two different plasmids. *J. Virol.* 62: 1120–1124.

Miller, A. D. and G. J. Rossman. 1989. Improved retroviral vectors for gene transfer and expression. *Bio-techniques* 7: 980–990.

Morrow, B. and R. Kucherlapati. 1993. Gene targeting in mammalian cells by homologous recombination. *Current Opinion in Biotechnology* 4: 577–582.

Perbal, B. 1984. *A Practical Guide to Molecular Cloning*, John Wiley & Sons.

Price, J., D. Tumer, and C. Cepko. 1987. Lineage analysis in the vertebrate nervous system by retrovirus-mediated gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 156–160.

Rosenberg, S. A., Anderson, W. F., Blaese, R. M. et al. 1992. Immunization of cancer patients using auto-

logous cancer cells modified by insertion of the gene for interleukin-2. *Hum. Gene Ther.* 3: 75–90.

Saller, R. M. 1994. Design von locus- und gewebespezifischen retroviralen Vektoren fuer eine *in vivo* Genterapie. Doctoral thesis, Ludwigs-Maximilians University Munich, Germany.

Salmons, B. and W. H. Günzburg. 1993. Targeting of retroviral vectors for gene therapy. *Human Gene Therapy* 4: 129–141.

10 Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA

van Lohuizen and Berns. 1990. Tumorigenesis by slow-transforming retroviruses – an update. *Biochim. Biophys. Acta*, 1032: 213–235.

15 Varmus, H. 1988. Retroviruses. *Science* 240: 1427–1435.

Xu, L., J.-K. Yee, J. A. Wolff and T. Friedmann. 1989. Factors Affecting Long-Term Stability of Moloney Murine Leukemia Virus-Based Vectors. *Virology* 171: 331–341.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

25 1. Promoterkonverzió kerestülmenő retrovírusvektor, amely a következő összetevőket tartalmazza:

a) egy U3-R-U5 szerkezetű 5'-LTR-régiót;

30 b) egy vagy több – a vektor belsejébe inszertált – kódoló vagy nemkódoló szekvenciát; valamint

35 c) egy teljesen vagy részben deletált U3-régiót tartalmazó 3'-LTR-régiót, amely deletált U3-régióba heterológ promotert tartalmazó polilinker szekvencia van beépítve, amely heterológ promotor – a célsejt megfertőzését követően – képes szabályozni az egy vagy több kódoló vagy nemkódoló szekvencia expresszióját.

40 2. Az 1. igénypont szerinti retrovírusvektor, amely legalább egy egyedi restriktációs helyet tartalmazó polilinkerszekvenciát tartalmaz.

3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti retrovírusvektor, amely további szabályozó elemet is tartalmaz.

45 4. Az 1–3. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, amely célsejtspecifikus expressziót vezérlő regulációs elemet és/vagy promotert tartalmaz.

50 5. A 4. igénypont szerinti retrovírusvektor, amely célsejtspecifikus regulációs elemként és/vagy promoterként a következők bármelyikét tartalmazza: WAP-ra, MMTV-re, laktoglobulinra és kazeinre specifikus regulációs elemek és/vagy promoterek, hasnyálmirigyspecifikus regulációs elemek és/vagy promoterek, beleértve a szénsav-anhidráz-II és a β -glükokináz regulációs elemeket és promotereit, limfocitaspecifikus regulációs elemek és/vagy promoterek, beleértve immunoglobulin és MMTV-limfocitaspecifikus regulációs elemeket és promotereket, és/vagy olyan MMTV-specifikus regulációs elemek és/vagy promoterek, amelyek glükokortikoid hormonokra való érzékenységet biztosítanak és/vagy amelyek az expressziót specifikusan az emlőmirigyben vezérlik.

6. Az 1–5. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, amely LTR-régióként a következők bármelyikét tartalmazza: az MLV, az MMTV, az MSV, a SIV, a HIV, a HTLV, a FIV, az FeLV, a BLV és/vagy az MPMV LTR-régiói.

7. Az 1–6. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, amely BAG-vektor.

8. Az 1–7. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, amely kódolószekvenciaként markergént, terápiás gént, antivirális gént, antitumorgént és/vagy citokingént tartalmaz.

9. A 8. igénypont szerinti retrovírusvektor, amely marker- vagy terápiás géneként a következők bármelyikét tartalmazza: β -galaktozidáz gén, neomicingén, a herpesz szimplex vírus timidin kináz génje, puromicingén, a citozin deamináz génje, hygromicingén, a szekretált alkalikus foszfatáz génje, a guanin foszforibozil transzferáz (gpt) génje, az alkohol-dehidrogenáz génje és/vagy a hipoxantin foszforibozil transzferáz (HPRT) génje.

10. Az 1–9. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, amely a retrovírusfehérjét kódoló szekvenciák közül legalább egyet megváltoztatva vagy legalább részben deletálva tartalmaz.

11. Az 1–10. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, amely a retrovírusok integrálódásáért felelős retrovirális szekvenciákat megváltoztatva vagy legalább részben deletálva tartalmazza.

12. Az 1–11. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, amely tartalmaz egy – egy vagy több celluláris szekvenciával vagy azok egy részletével homológ – heterológ DNS-fragmenst.

13. Az 1–12. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, amely távolba ható molekulák által szabályozható szabályozó elemeket tartalmaz.

14. Retrovirális vektorrendszer, amely első komponensként 1–13. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektort,

második komponensként pedig egy, legalább egy – a retrovírusvektor becsomagolásához szükséges fehérjét kódoló – retrovirális vagy rekombináns retrovirális konstrukciót hordozó csomagoló-sejtvonalat tartalmaz.

15. A 14. igénypont szerinti retrovirális vektorrendszer, amely az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor által kódoltaktól eltérő retrovirális fehérjét kódoló retrovirális vagy rekombináns retrovirális konstrukciót hordozó csomagoló-sejtvonalat tartalmaz.

16. A 14. vagy 15. igénypont szerinti retrovirális vektorrendszer, amely csomagoló-sejtvonalaként a következők bármelyikét tartalmazza: psi-2, psi-Crypt, psi-AM, GP+E-86, PA317 és GP+envAM-12.

17. Eljárás homológ vagy heterológ nukleotidszekvenciák emberi vagy állati sejtekbe juttatására *in vitro*, *azzal jellemezve*, hogy 14–16. igénypontok bármelyike szerinti retrovirális vektorrendszer részét képező csomagoló-sejtvonalat 1–13. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektorral transzfektálunk, majd a csomagoló-sejtvonal által termelt rekombináns retrovírusokkal célsejt-populációt fertőzünk.

18. A 17. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a nukleotidszekvenciaként fehérjéket kódoló géneket, azok részeit, szabályozó szekvenciákat és/vagy promotereket juttatunk be.

19. Retrovirális provírus, amely egy 1–13. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor 14–16. igénypontok bármelyike szerinti retrovirális vektorrendszerben történő replikáltatása útján lett előállítva, és amely provírus 3'-LTR- és 5'-LTR-régiójában egyaránt megtalálható a fertőzött célsejtben a reverz transzkripció folyamata során megduplázódott, a retrovírusvektor 3'-LTR-régiójában elhelyezkedő polilinker és a polilinkerbe inszertált bármely szekvencia.

20. Rekombináns retrovírus-részecske, amely egy 14–16. igénypontok bármelyike szerinti retrovirális vektorrendszer részét képező csomagoló-sejtvonal 1–13. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektorral történő transzfektálása és a sejtek megfelelő körülmények közötti tenyésztése útján állítható elő.

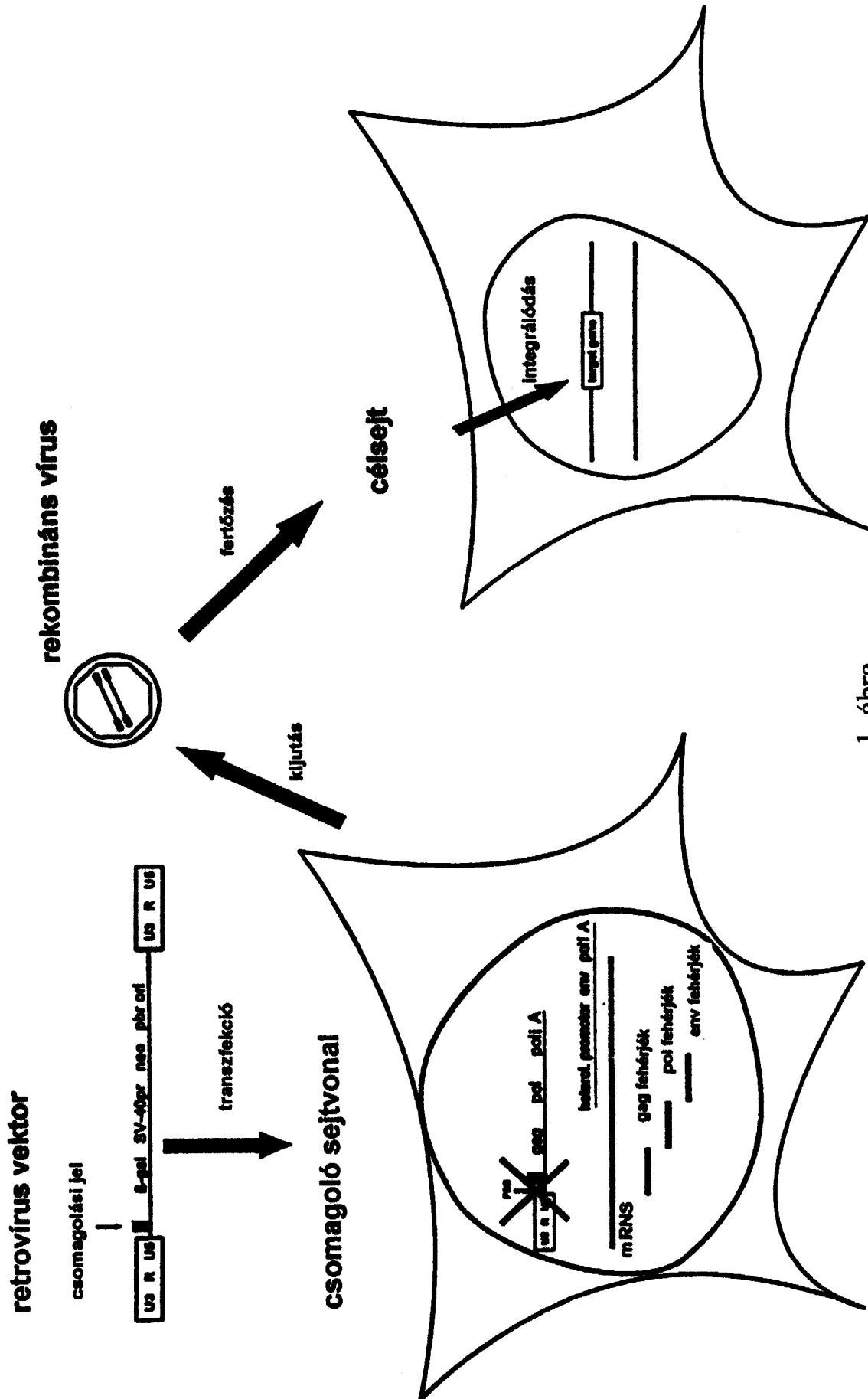
21. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor, a 14–16. igénypontok bármelyike szerinti retrovirális vektorrendszer, a 19. igénypont szerinti retrovirális provírus és/vagy a 20. igénypont szerinti rekombináns retrovírus-részecske alkalmazása emlőszökön – az embert is beleértve – végzett génterápiás kezelésre alkalmas gyógyászati készítmény előállítására.

22. A 19. igénypont szerinti retrovirális provírus mRNS-e.

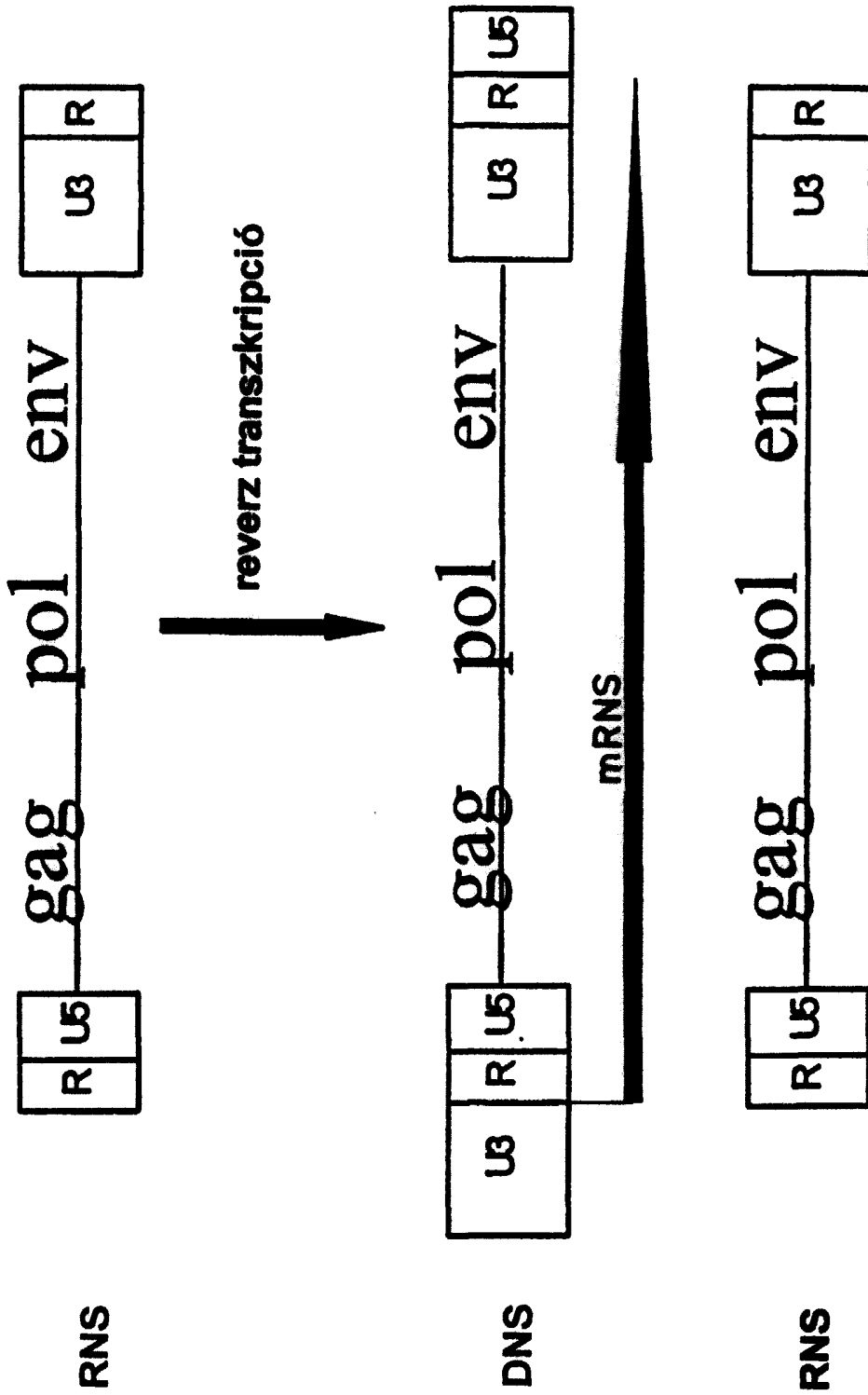
23. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti retrovírusvektor RNS-e.

24. Gyógyászati készítmény, amely 1–13. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns retrovírusvektor, 14–16. igénypontok bármelyike szerinti retrovirális vektorrendszer, 19. igénypont szerinti rekombináns retrovirális provírus és/vagy 20. igénypont szerinti rekombináns retrovírus-részecske terápiás célra hatékony mennyiségét tartalmazza.

25. Az 1–13. igénypontok bármelyike szerinti rekombináns retrovírusvektor, a 14–16. igénypontok bármelyike szerinti retrovirális vektorrendszer, a 19. igénypont szerinti rekombináns retrovirális provírus és/vagy a 20. igénypont szerinti rekombináns retrovírus-részecske, génterápiában történő alkalmazásra.

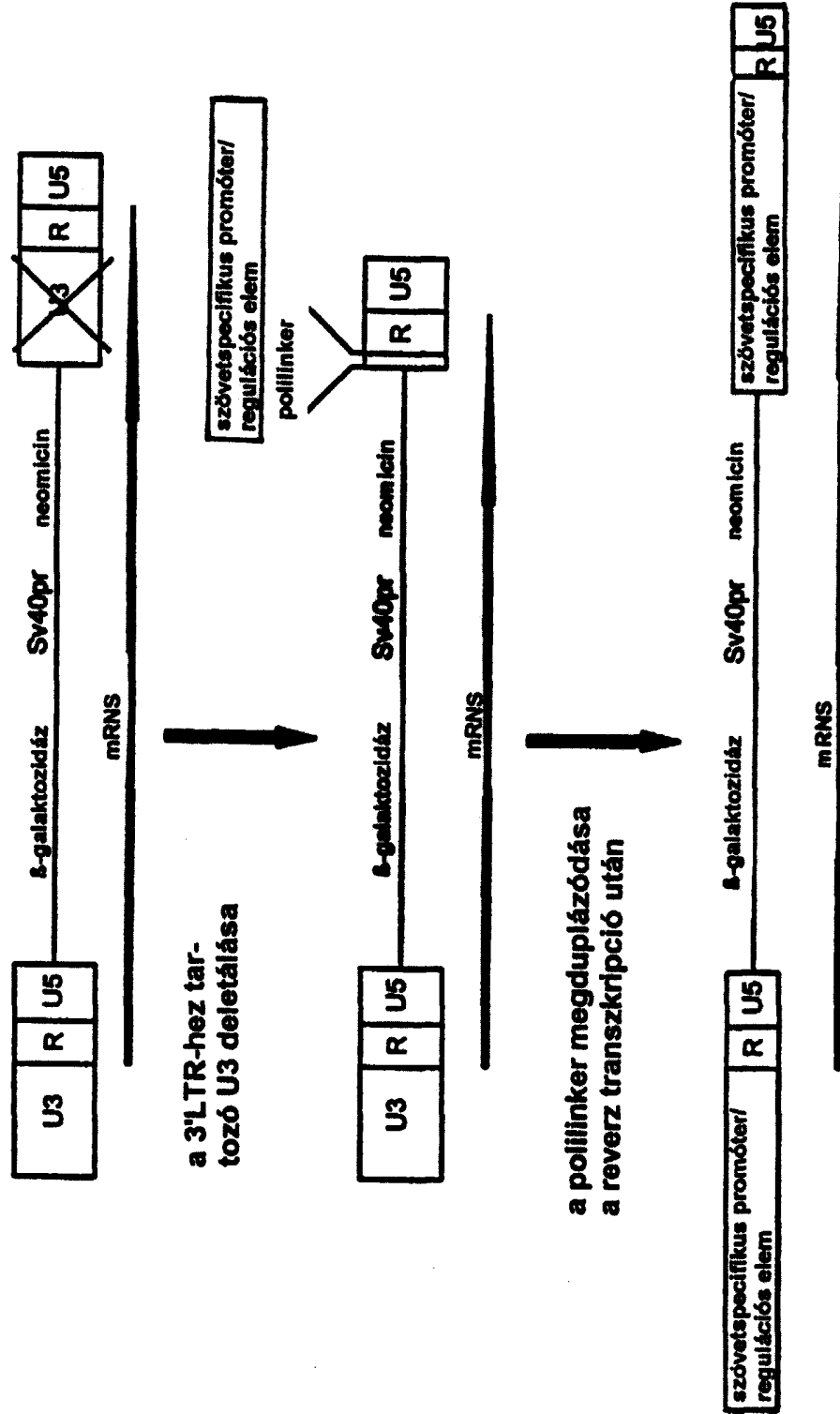


1. ábra

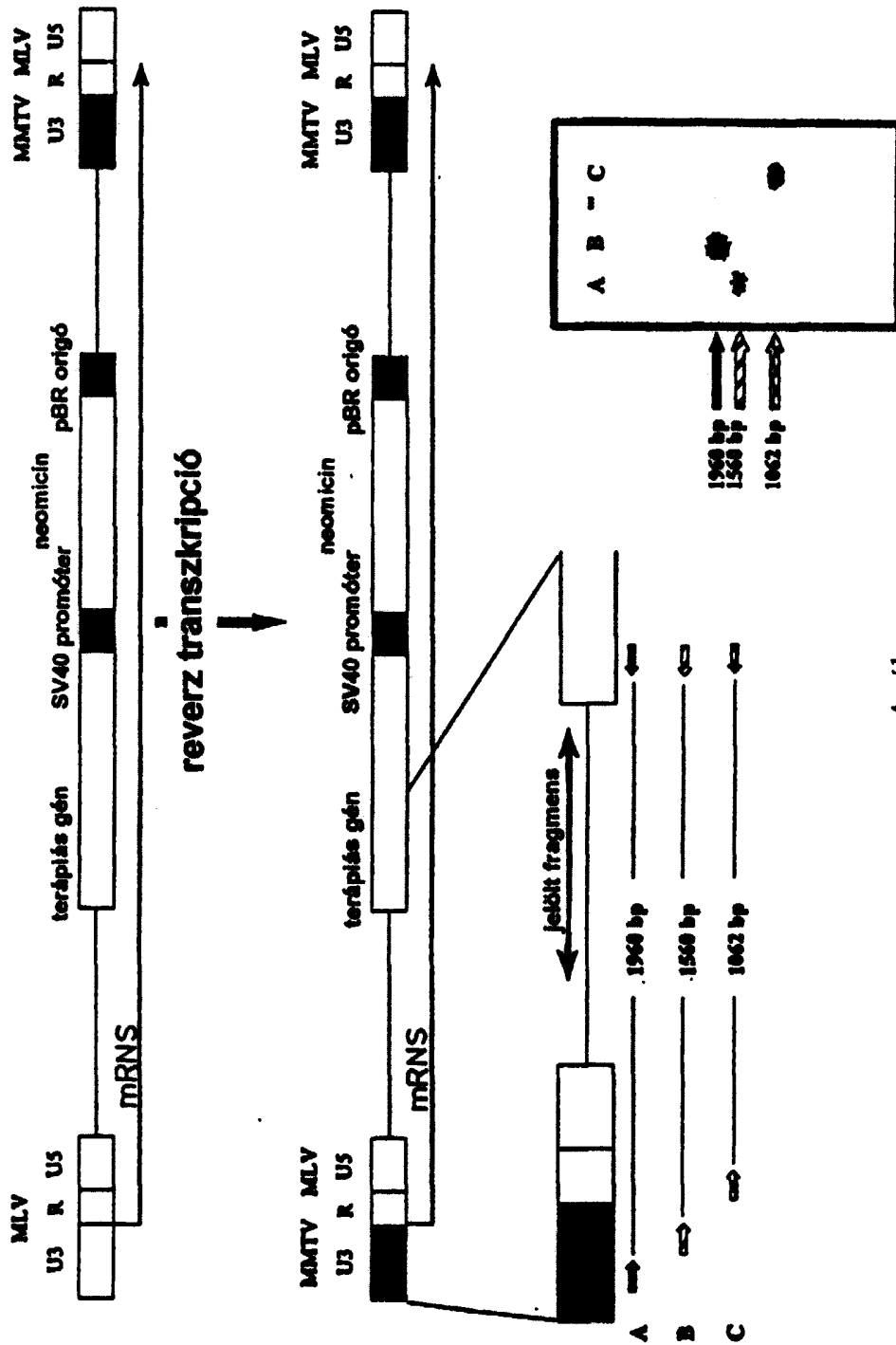


2. ábra

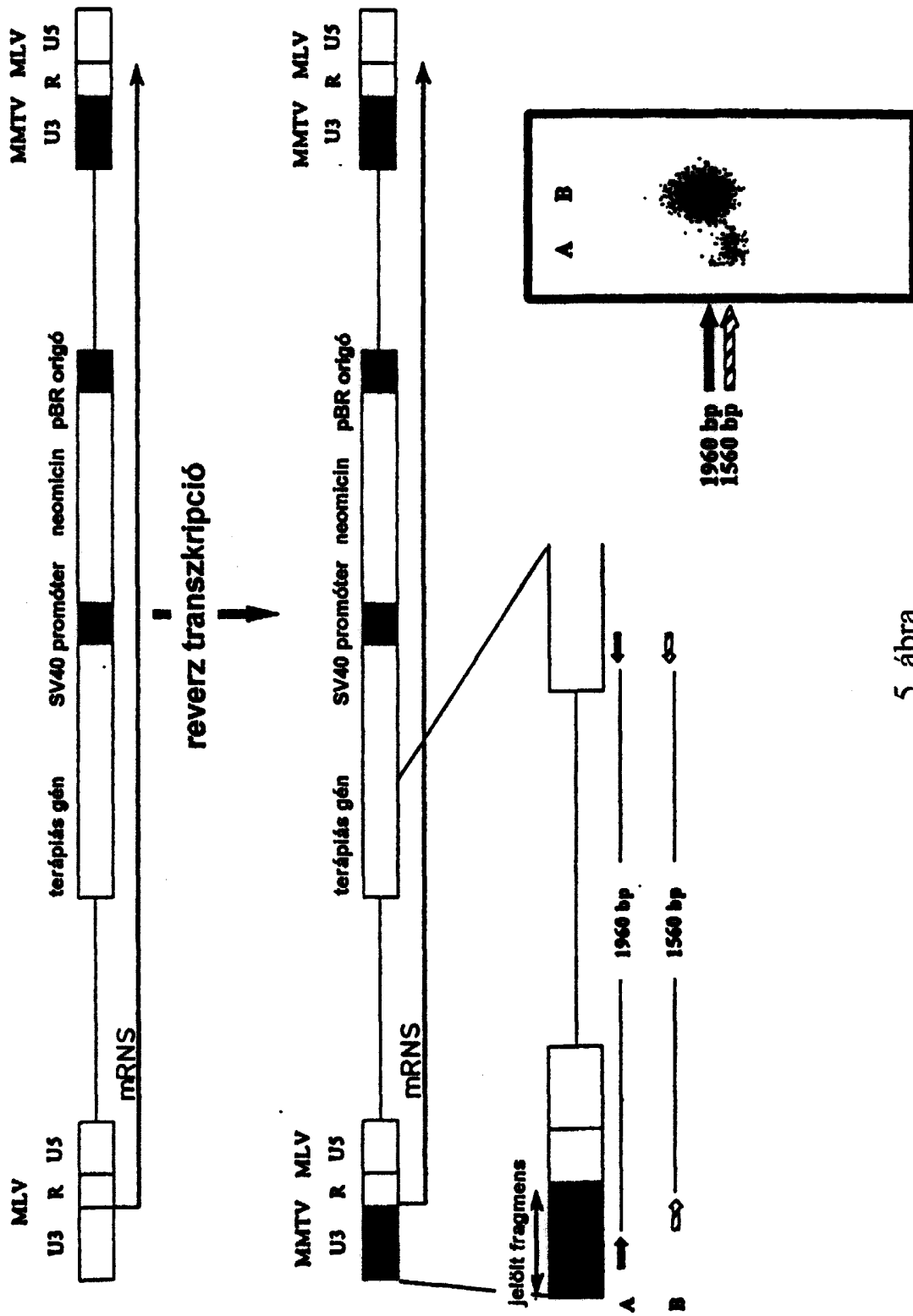
U3-negatív BAG-vektor elkészítése (MLV)



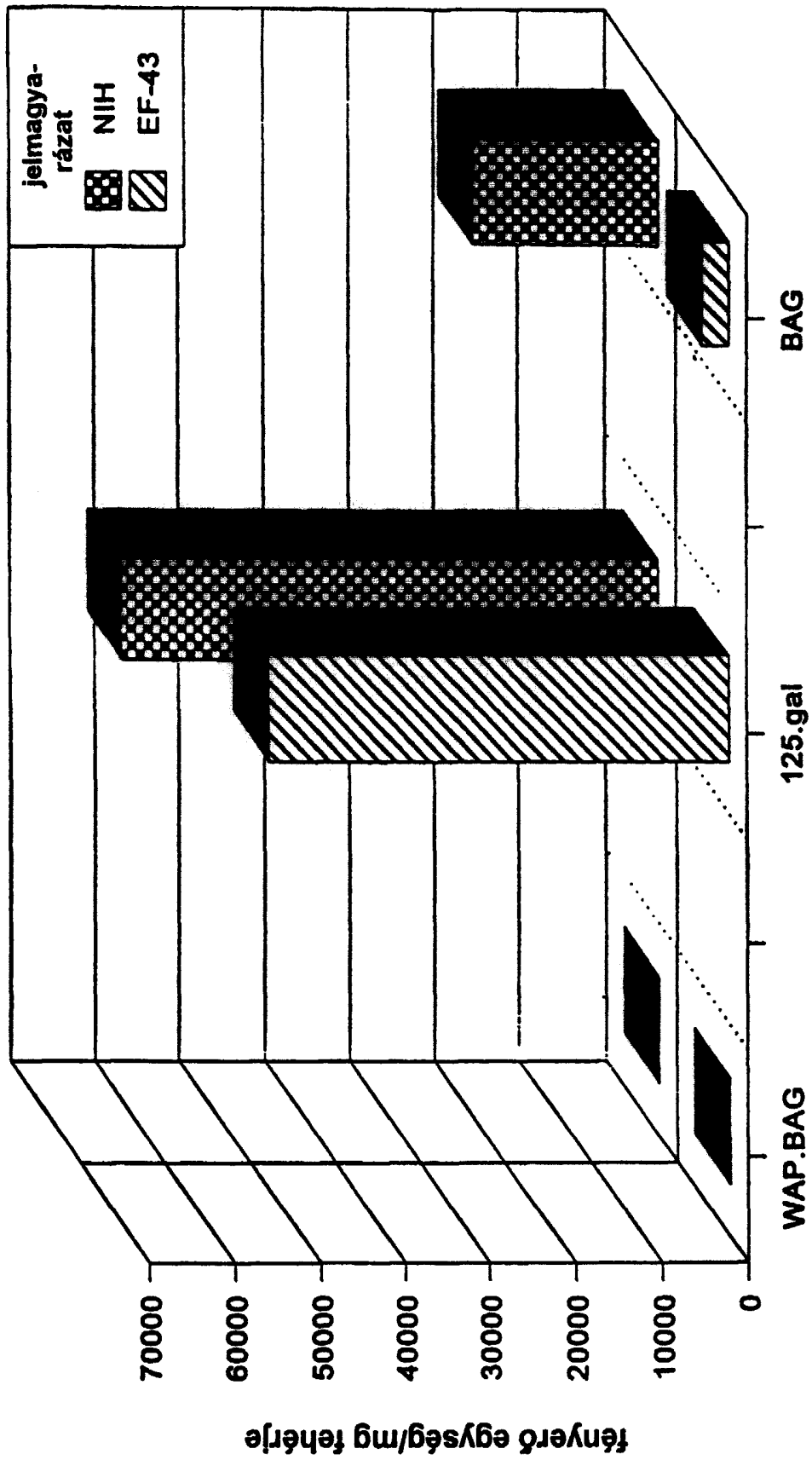
3. ábra



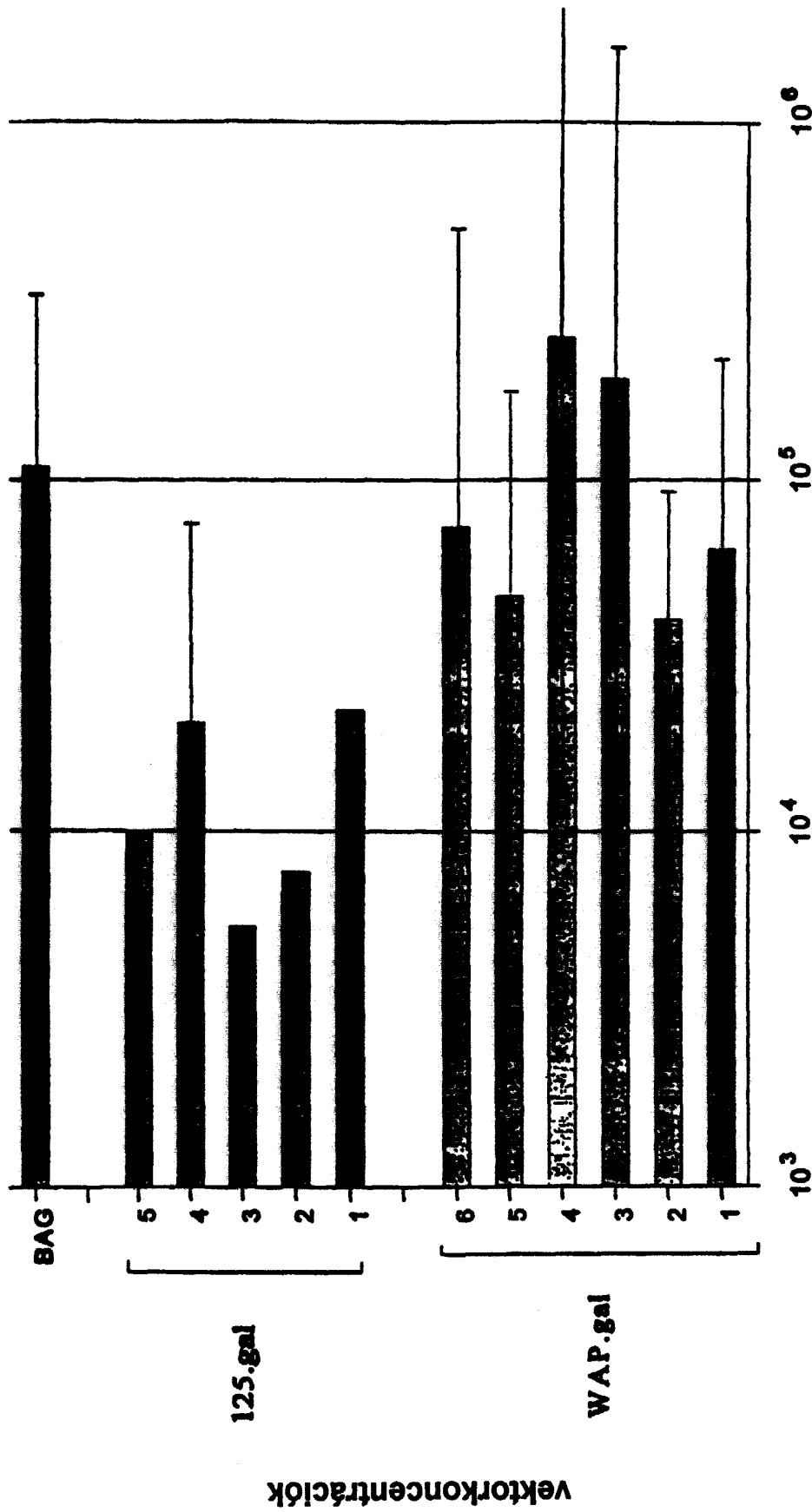
4. ábra

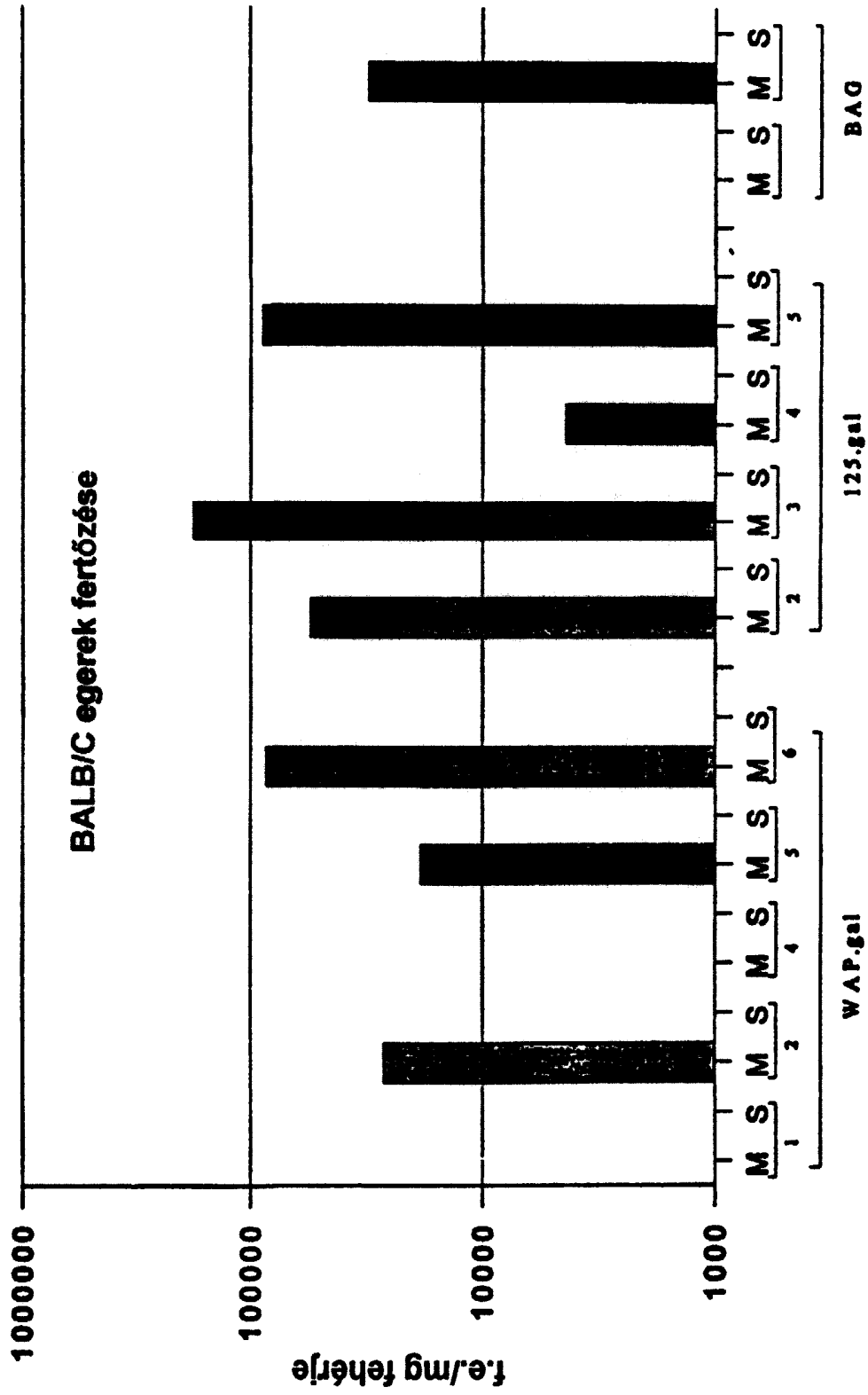


5. ábra



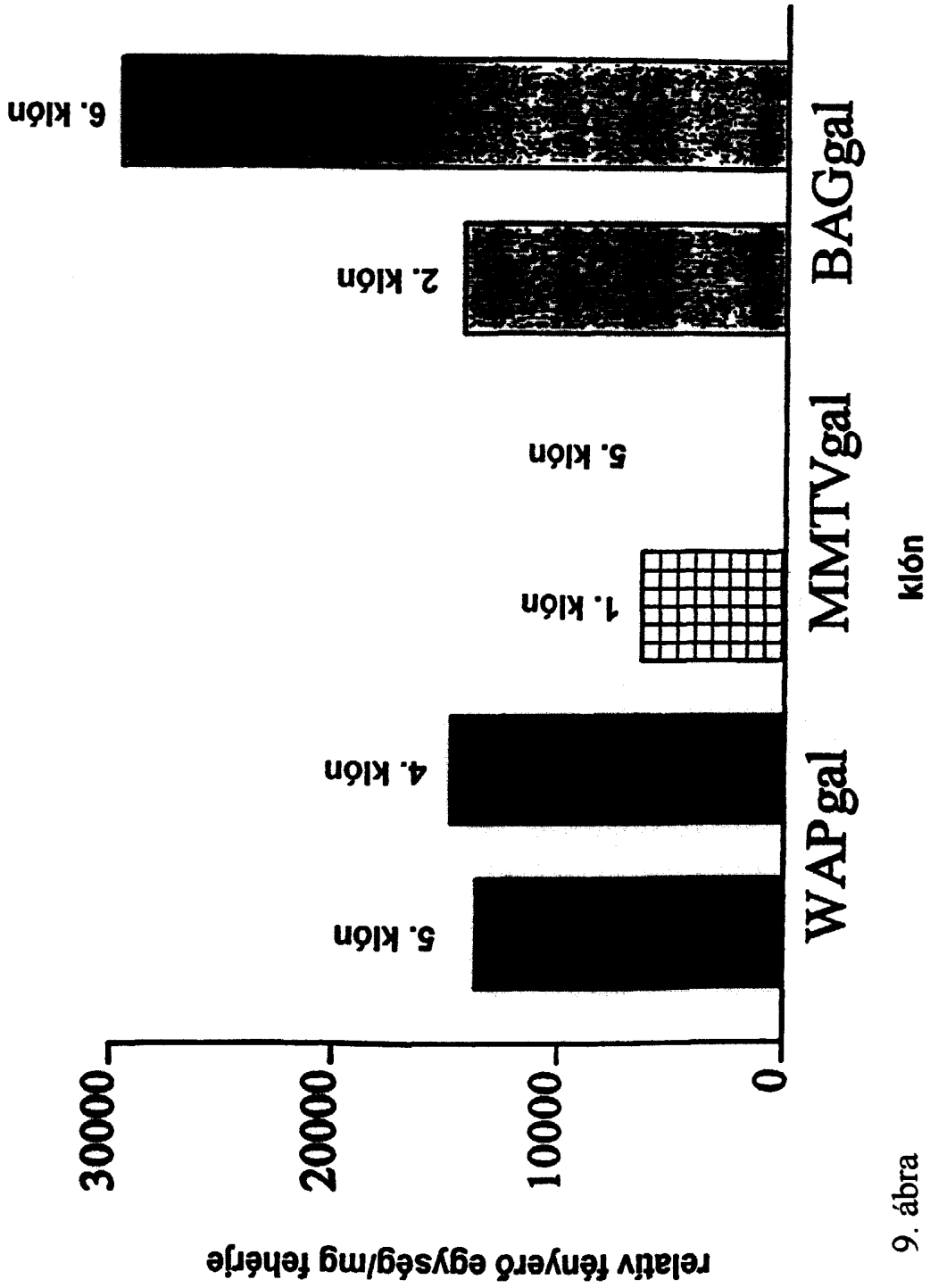
6. ábra



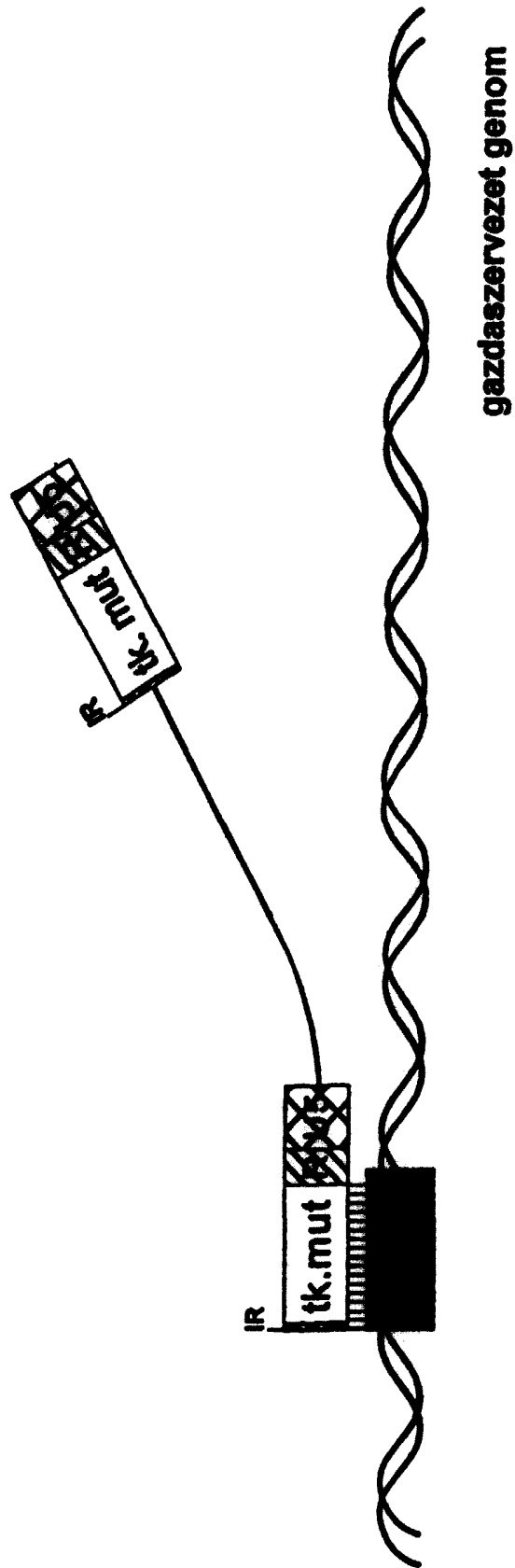


8. ábra

**β -gal kimutatási eljárás fertőzött egér emlőtumor
sejtek esetén**



9. ábra



10. ábra