

PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **26.03.2002**
(32) Datum podání prioritní přihlášky: **27.03.2001**
(31) Číslo prioritní přihlášky: **2001/819401**
(33) Země priority: **US**
(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **18.02.2004**
(Věstník č. 2/2004)
(86) PCT číslo: **PCT/US2002/009526**
(87) PCT číslo zveřejnění: **WO2002/078631**

(21) Číslo dokumentu:

2003 - 2574

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl. ⁷:

A 61 K 48/00
C 12 N 7/01
C 12 N 15/86
A 01 N 63/00
C 12 N 15/09
C 12 N 15/70

(71) Přihlašovatel:

VIRXSYS CORPORATION, Gaithersburg, MD, US;

(72) Původce:

Humeau Laurent, Gaithersburg, MD, US;
Li Yuexia, Gaithersburg, MD, US;
Merling Randall, North Potomac, MD, US;
Dropulic Boro, Ellicott City, MD, US;
Schonely Kathy L., Gaithersburg, MD, US;

(74) Zástupce:

Jírotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

**Zlepšené podmíněně se replikující vektory pro
inhibici virových infekcí**

(57) Anotace:

Řešení poskytuje vylepšené podmíněně se replikující vektory, které mají vylepšenou bezpečnost z hlediska generování replikace-kompetentního viru nebo vektoru. Také popisuje způsoby výroby, propagování a selektivního balení, modifikování a použití vektorů. Rovněž zahrnuje vylepšené pomocné konstrukty, hostitelské buňky, pro použití s vylepšenými vektory, stejně jako farmaceutické prostředky a hostitelské buňky obsahující vektory, použití hostitelských buněk obsahujících vektory pro skríníng léčiv, a způsoby použití vektorů pro určení funkce genu. Způsoby také zahrnují profylaktickou a terapeutickou léčbu onemocnění, zejména virových infekcí, a konkrétně HIV infekce.

Zlepšené podmíněně se replikující vektory pro inhibici virových infekcí

Oblast techniky

Předkládaný vynález poskytuje vylepšené podmíněně se replikující vektory a způsoby jejich použití při profylaktické a terapeutické léčbě virových infekcí, zejména virových infekcí, konkrétně HIV infekce, stejně jako onemocnění asociovaných s takovými infekcemi.

Dosavadní stav techniky

Objev viru lidské imunodeficiency (HIV), lentivirus, jako příčiny syndromu získané imunodeficiency (AIDS), vyvolal rozsáhlý výzkum mechanismů virového infekčního cyklu a virové patogenese. Výzkum těchto mechanismů poskytl výzkumníkům mnoho cílů pro vývoj antivirových činidel účinných nejen proti HIV, ale také proti produktům HIV, jeho genomu a také proti jiným virům. Tato antivirová činidla, zejména ta, která jsou namířena proti HIV, mohou být kategorizována do skupin podle mechanismu účinku. Takovými skupinami jsou inhibitory reversní transkriptasy, kompetitory vstupu viru do buněk, vakcíny a inhibitory proteasy, stejně jako nová skupina označená zde jako "genetická antivirová činidla".

Obvykle má každý typ virového činidla své vlastní výhody a nevýhody a musí být hodnoceno v souvislosti s potřebami konkrétní situace. Antivirová činidla, jako je zidovudin (3'-azido-3'-deoxythymidin, AZT), inhibitory proteasy a podobně, mohou být do buněk v těle pacienta dodány relativně snadno a byly podrobně studovány. Tato činidla cíleně ovlivňují jeden specifický faktor v infekčním cyklu viru a

ukázala se být relativně neúčinná proti HIV. Toto je primárně způsobeno skutečností, že kmeny HIV se rychle mění a stávají se resistantní na činidla mající jedno místo účinku (Richman, AIDS Res. and Hum. Retrovir., 8, 1065-1071 (1992)). Proto problémy s genetickou variabilitou a rychlými mutacemi HIV nutí ke hledání nových antivirových strategií pro léčbu HIV infekce. Mezi těmito strategiemi patří genetická antivirová činidla mezi atraktivní, protože účinkují intracelulárně na mnoha úrovních.

Genetická antivirová činidla se liší od jiných terapeutických činidel v tom, že jsou transformovány jako molekulární elementy do cílových buněk, kde mohou chránit buňky před virovou infekcí (Baltimore, Nature, 325, 395-396 (1988); a Dropulic' et al., Hum. Gene Ther., 5, 927-939 (1994)). Genetické antivirové činidlo může být jakákoliv genetická sekvence může jím být, například, protismyslná molekula, RNA návnada, transdominantní mutant, interferon, toxin, imunogen a ribozym. Konkrétně, ribozymy jsou genetická antivirová činidla podobná protismyslným činidlům, které mohou štěpit cílovou RNA, včetně HIV RNA, ve specifické sekvenci. Specifická ribozymem zprostředkovaného štěpení cílové RNA ukazuje na možné použití ribozymů jako terapeutických inhibitorů virové replikace, včetně replikace HIV. Různé typy ribozymů, jako jsou například kladívkové nebo vlásenkové ribozymy, byly použity v anti-HIV strategiích (viz, např., U.S. Pat. č. 5,144,019, 5,180,818 a 5,272,262, a PCT patentové přihlášky č. WO 94/01549 a WO 93/123569). Jak kladívkové, tak vlásenkové ribozymy mohou být upraveny tak, aby štěpily jakoukoliv cílovou RNA, která obsahuje GUC sekvenci (Haseloff et al., Nature, 334, 585-591 (1988); Uhlenbeck, Nature, 334, 585 (1987); Hampel et al., Nuc. Acids Res., 18, 299-304 (1990); a Symons, Ann. Rev. Biochem., 61, 641-671 (1992)). Obecně řečeno, kladívkové

ribozomy mají dva typy funkčních domén, konzervovanou katalytickou doménu obklopenou dvěma hybridizačními doménami. Hybridizační domény se váží na sekvence sousedící s GUC sekvencí a katalytická doména štěpí RNA cílovou sekvenci 3' ke GUC sekvenci (Uhlenbeck (1987), výše; Haseloff et al. (1988), výše; a Symons (1992), výše).

Mnoho pokusů potvrdilo, že ribozomy mohou být alespoň částečně účinné v inhibici propagace HIV ve tkáňových kulturách (viz, např., Sarver et al., *Science*, 247, 1222-1225 (1990); Sarver et al., *NIH Res.*, 5, 63-67 (1993a); Dropulic' et al., *J. Virol.*, 66, 1432-1441 (1992); Dropulic' et al., *Methods: Comp. Meth. Enzymol.*, 5, 43-49 (1993); Ojwang et al., *PNAS*, 89, 10802-10806 (1992); Yu et al., *PNAS*, 90, 6340-6344 (1993); a Weerasinghe et al., *J. Virol.*, 65, 5531-5534 (1991)). Konkrétně, Sarver et al. ((1990), výše) prokázali, že kladívkové ribozomy navržené tak, aby štěpily transkribovaný region HIV gag genu, tj. anti-gag ribozomy, mohou specificky štěpit HIV gag RNA in vitro. Dále, když byly buněčné linie exprimující anti-gag ribozomy vystaveny infekci HIV-1, tak byla pozorována 50- až 100-násobná inhibice replikace HIV. Obdobně, Weerasinghe et al. ((1991), výše) ukázali, že retrovirové vektory kódující ribozomy navržené tak, aby štěpily U5 sekvenci HIV-1 RNA, způsobí resistenci na HIV u transdukovaných buněk při následném infikování HIV. Ačkoliv různé klony transdukovaných buněk vykazovaly různé úrovně resistance na infekci, což bylo určeno promotorovým systémem použitým pro řízení exprese ribozymů, podlehl většina buněčných linií exprimujících ribozomy po určité době kultivace infekci HIV.

Transdukce buněk ve tkáňové kultuře provirem, do jehož nef genu (který není esenciální pro virovou replikaci ve tkáňové kultuře) byl vložen ribozym, jehož hybridizační

domény byly specifické pro U5 region HIV, inhibovala replikaci viru 100-násobně ve srovnání s buňkami transdukovanými přirozenými proviry (viz, např., Dropulic' et al. (1992) a (1993), výše). Obdobně, vlásenkové ribozymy inhibovaly HIV replikaci v T-lymfocytech transdukovaných vektory obsahujícími U5 vlásenkové ribozymy a vystavených infekci HIV (Ojwang et al. (1992), výše). Jiné pokusy ukázaly, že vektory obsahující ribozymy exprimované z tRNA promotoru také inhibují různé kmeny HIV (Yu et al. (1993), výše).

Dodání ribozymů nebo jiných genetických antivirových činidel do buněk cílových pro HIV infekci (např., CD4+ T-lymfocytů a monocytických makrofágů) je hlavní překážkou pro účinnou genetickou terapeutickou léčbu AIDS. Současné postupy pro cílené ovlivnění buněk hematopoetického systému (tj. primárních cílů pro HIV infekci) zahrnují vložení terapeutických genů do prekursorových multipotentních kmenových buněk, ze kterých, po diferenciaci, vznikají zralé T-lymfocyty, nebo, alternativně, vložení genů do zralých CD4+ T lymfocytů samotných. Cílené ovlivnění kmenových buněk je však problematické, protože tyto buňky se obtížně kultivují a transdukují in vitro. Cílené ovlivnění cirkulujících T-lymfocytů je také problematické, protože tyto buňky jsou tak široce distribuovány, že je obtížné postihnout všechny cílové buňky při použití v současnosti dostupných vektorových transportních systémů. Dále, Dále, makrofágy musí být považovány za cílové buňky, protože jsou hlavním zásobníkem viru pro jeho šíření do jiných orgánů. Protože však jsou makrofágy terminálně diferencované a proto se nedělí, nelze je snadno transdukovat za použití běžně užívaných vektorů.

Proto hlavní způsob pro léčbu HIV v současnosti využívá replikace-defektních virových vektorů a pomocných buněčných linií (viz, např., Buchschacher, JAMA, 269(22), 2880-2886 (1993); Anderson, Science, 256, 808-813 (1992); Miller, Nature, 357, 455-460 (1992); Mulligan, Science, 260, 926-931 (1993); Friedmann, Science, 244, 1275-1281 (1989); a Cournoyer et al., Ann. Rev. Immunol., 11, 297-329 (1993)) pro vložení cizorodého genu specificky interferujícího s virovou infekcí nebo způsobujícího smrt infikovaných buněk do buněk citlivých na virovou infekci (jako je HIV infekce) (přehled je uveden v Buchschacher (1993), výše). Takové replikace-defektní virové vektory obsahují, kromě daného cizorodého genu, cis-působící sekvence nutné pro virovou replikaci, ale neobsahují žádné sekvence kódující esenciální virové proteiny. Proto je takový vektor neschopný dokončit virový replikační cyklus a pomocná buněčná linie, která obsahuje a trvale exprimuje virové geny ve svém genomu, je použita pro jeho propagaci. Po vložení replikace-defektního virového vektoru do pomocné buněčné linie jsou proteiny nutné pro tvorbu virových částic dodány do vektoru v trans formě a jsou produkovány vektorové virové částice schopné infikovat cílové buňky a exprimovat v nich gen, který interferuje s replikací viru nebo způsobuje smrt virem infikovaných buněk.

Mezi takové replikace-defektní retrovirové vektory patří adenoviry a adeno-asociované viry, stejně jako retrovirové vektory použité v klinických studiích týkajících se genové terapie HIV, konkrétně myší amfotrofní retrovirový vektor známý jako Moloney virus myší leukemie (MuLV). Tyto defektní virové vektory byly použity pro transdukování CD4+ lymfocytů genetickými antivirovými činidly, jako jsou anti-HIV ribozymy, s různým úspěchem (Sarver et al. (1990), výše; Weerasinghe et al. (1991), výše; Dropulic' et al. (1993),

výše; Ojwang et al. (1992), výše; a Yu et al. (1993), výše). Nicméně, tyto vektory mají vlastní limitace pro aplikace anti-HIV genové terapie. Například, pro léčbu HIV je zásadní vysoká frekvence transdukce, kdy vektor musí transdukovat jak vzácné CD34+ progenitorové hematopoetické kmenové buňky, tak značně rozšířené CD4+ T-lymfocyty, z nichž většina je - během klinicky latentního stadia onemocnění - již infikována HIV. MuLV vektory je však obtížné získat ve vysokém titru a proto mají slabou transdukci. Dále, dlouhodobé exprese transdukované DNA nebylo dosaženo u CD34+ progenitorových kmenových buněk, zejména po jejich diferenciaci na zralé T-lymfocyty. Dále, použití defektních virových vektorů vyžaduje použití strategií pro genový přenos ex vivo (viz např., U.S. Pat. č. 5,399,346), které jsou nákladné a nad možností běžné populace.

Tyto nevýhody asociované se současnými vektory genetickou terapeutickou léčbu AIDS vedly výzkumníky ke hledání nových virových vektorů. Jedním takovým vektorem je HIV sám. HIV vektory byly použity pro výzkumy infekitivity (Page et al., J. Virol., 64, 5270-5276 (1990)) a pro zavádění genů (zejména sebevražedných genů) do CD4+ buněk, konkrétně do CD4+ HIV-infikovaných buněk (viz např., Buchschacher et al., Hum. Gener. Ther., 3, 391-397 (1992); Richardson et al., J. Virol., 67, 3997-4005 (1993); Carroll et al., J. Virol., 68, 6047-6051 (1994); a Parolin et al., J. Virol., 68, 3888-3895 (1994)). Tyto práce využívají HIV vektory pro zavádění do CD4+ T-lymfocytů a monocytů.

Dosud jsou však tyto vektory extrémně komplexní. Dále, použití těchto vektorů je doprovázeno rizikem generování normálního HIV během intracelulární rekombinace. Bylo pozorováno, že ko-transfekce/ko-infekce defektních virových sekvencí a pomocných virů vedla k rekombinaci mezi

homologními regiony virového genomu (Inoue et al., PNAS, 88, 2278-282 (1991)). Pozorovaná komplementace in vitro naznačuje, že podobný replikace-defektní HIV vektor by mohl rekombinovat in vivo, což by mohlo exacerbovat již existující HIV infekci. Skutečnost, že retroviry balí dva RNA genomy do jednoho virionu vedly výzkumníky k hypotéze, že retroviry obsahují dvě virové RNA pro zabránění jakýmkoliv genetickým defektům způsobeným komplementací a/nebo rekombinací (Inoue et al. (1991), výše).

Kromě rizika intracelulární rekombinace, která může vést ke vzniku přirozeného HIV, mají HIV vektory riziko mutace in vivo, která může zvýšit patogenicitu virového vektoru. Toto vedlo Sarvera et al. (AIDS Res. and Hum. Retrovir., 9, 483-487 (1993b)) ke spekulaci týkající se vývoje druhé generace rekombinantních HIV vektorů, které jsou replikace-kompetentní, ale nepatogenní. Takové vektory, ve srovnání s používanými nereplikujícími se vektory (tj. replikace-deficientními vektory) se dále replikují u pacienta, což způsobuje konstantní kompetici s přirozeným HIV. Dosud však takové vektory nejsou dostupné.

Nejlepším okamžikem pro léčbu infikovaných jedinců je doba inokulace, před tím, než viru stačí infikovat jedince. Toto je však obtížné provést, protože většina jedinců nezjistí, že je infikována HIV, až do klinicky latentní fáze onemocnění. Proto je nejvýznamnějším obdobím pro antivirovou intervenci fáze klinické latence. Terapie v tomto stadiu vyžaduje, aby byla likvidována infekce přítomná ve velkém počtu již infikovaných CD4+ lymfocytů, které obsahují virové genomy. Toto není jednoduché, jak dokazuje skutečnost, že dosud je HIV inkurabilní a pouze špatně léčitelný současnými způsoby léčby. Účinná vakcína není na obzoru a ačkoliv inhibitory reverzní transkriptasy a proteasy brání replikaci

HIV ve tkáňových kulturách, vznik virové resistance vedl k selhání terapie. Tak má HIV genové terapie malý přínos pro většinu jedinců infikovaných HIV, kterých je nyní více než 30 milionů.

Z výše uvedeného je jasné, že začíná být významné indukování dlouhodobých a trvalých imunologických reakcí proti určitým patogenům, zejména virům, zejména v kontextu AIDS a nádorů. Živé-atenuované (LA) vakcíny, využívající replikace-kompetentní, ale nepatogenní viry, jsou jednou možností (Daniel et al., *Science*, 258, 1938-1941 (1992); a Desrosiers, *AIDS Res. & Human Retrovir.*, 10, 331-332 (1994)). Nicméně, takové nepatogenní viry, které se liší od příslušných přirozených virů delecí jednoho nebo více genů, buď (i) nemohou vyvolat protektivní imunitní reakci, protože antigen nepersistuje (protože se LA-virus nereplikuje účinně); nebo (ii) LA-virus se replikuje, ale má jiný patogenní potenciál, jak je doloženo schopností LA-viru způsobovat onemocnění v modelu mladých zvířat (Baba et al., *Science*, 267, 1823-1825 (1995)).

Z výše uvedených důvodů trvá potřeba alternativní profylaktické a terapeutické léčby virových infekcí, zejména v kontextu AIDS a nádorů. Předkládaný vynález poskytuje takové alternativní metody tím, že poskytuje podmíněně se replikující vektor. Vynález také poskytuje další metody, ve kterých může být takový vektor použit. Dále vynález poskytuje pomocné vektorové konstrukty, které doplňují podmíněně se replikující vektor tak, aby byla umožněna jeho replikace a balení ve formě virových částic a virionů. Takové pomocné vektory jsou modifikovány tak, že je minimalizována replikace podmíněně se replikujícího vektoru. Jsou zde popsána různá provedení takových pomocných vektorových konstruktů. Tyto a další výhody předkládaného

vynálezu, stejně jako další nové charakteristiky, budou jasné z následujícího popisu.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje vylepšené podmíněně se replikující vektory, stejně jako vylepšené přípravky a způsoby pro produkci a použití uvedených vektorů. Podmíněně se replikující vektor je charakterizován schopností replikace pouze v hostitelské buňce, která je permissivní pro replikaci vektoru. Vylepšené vektory podle předkládaného vynálezu mají vyšší bezpečnost tím, že mají snížené riziko toho, že znovu získají schopnost replikace. Proto mohou být takové vektory také označovány jako vektory s "redukovanou rekombinací".

V jednom aspektu předkládaného vynálezu obsahuje vylepšený podmíněně se replikující vektor alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, jejíž přítomnost, transkripce nebo translace udílí vektoru v replikace-permissivní hostitelské buňce selektivní výhodu před přirozeným kmenem viru odpovídajícímu viru, ze kterého byl vektor odvozen. Výhodně obsahuje vylepšený podmíněně se replikující vektor alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, která udílí vektoru selektivní výhodu pro replikaci ve srovnání s jakýmkoliv jiným kompetujícím genomem nebo genomovým elementem. Genomový element, jak je zde použit, je definován jako sekvence nukleové kyseliny v hostitelské buňce, která není odvozena od žádného vektoru ani přirozeného viru, která může kompetovat, interferovat nebo ovlivňovat replikaci vektoru v hostitelské buňce. Genomový element není celý genom, jako je genom hostitelské buňky nebo jiný vektor nebo virus. Selektivní výhoda pro replikaci je způsobena

přítomností, transkripcí, nebo translací uvedené sekvence nukleové kyseliny.

V jiném výhodném provedení je podmíněně se replikujícím vektorem retrovirus, zejména lentivirus, a obsahuje alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, jejíž přítomnost, transkripce nebo translace udílí hostitelské buňce, která je infikována vektorem, selektivní výhodu nad buňkami infikovanými přirozeným kmenem viru odpovídajícímu viru, ze kterého byl vektor odvozen. Alternativně není vektor zcela odvozen od přirozeného kmenu, ale je chimérický a obsahuje složky odvozené od více než jednoho přirozeného viru. Tyto přirozené viry mohou být odlišné (nebo heterologní) viry nebo různé kmeny nebo izoláty jednoho viru. Výhodně může být uvedená sekvence nukleové kyseliny exprimována pro dosažení profylaktického efektu v uvedené hostitelské buňce. To vede k tomu, že buňka získá výhodu v přežití, protože sekvence nukleové kyseliny zabrání jakémukoliv infikujícímu viru v replikaci v úrovni, která by způsobila smrt buňky.

Jiné výhodné provedení je vylepšený podmíněně se replikující plasmidový vektor obsahující alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, která udílí vektoru selektivní výhodu pro replikaci ve srovnání s jakýmkoliv jiným kompetujícím vektorem nebo plasmidem. Například mohou takové vektory obsahovat sekvence (jako je například ribozymová nebo protismyslná sekvence) schopné štěpit nebo destruovat, nebo vést ke štěpení nebo destrukci, což vede ke štěpení nebo destrukci kompetujícího vektoru nebo plasmidu, když jsou kolokalizovány s vektorem. Pokud má být kompetující vektor a pomocný konstrukt destruován, tak je vektor podle předkládaného vynálezu upraven tak, aby obsahoval další sekvence, které mu poskytnou selektivní výhodu pro replikaci. Například může vektor podle předkládaného

vynálezu obsahovat protismyslnou sekvenci, která destruuje jako kompetující vektor, tak pomocný konstrukt, avšak tento vektor bude mít selektivní výhodu pro replikaci, protože dále obsahuje druhou první nukleotidovou sekvenci (např. promotor, který produkuje více vektorové RNA než kompetující vektorové RNA, počet kopií vektoru v transdukovaných buňkách je vyšší než počet kopií kompetujícího genomu, nebo balící signál, který je přítomen ve vektoru, ale ne v pomocném konstruktu), což poskytuje podmíněně se replikujícímu vektoru celkovou selektivní výhodu. Proto alespoň první nukleotidová sekvence poskytuje vektorům podle předkládaného vynálezu celkovou selektivní výhodu pro replikaci, protože dvě první nukleotidové sekvence (tj. první první nukleotidová sekvence je cíleně ovlivněná v kompetujícím vektoru a/nebo pomocném konstruktu a druhá první nukleotidová sekvence poskytuje selektivní výhodu pro replikaci) účinkují společně za dosažení celkové selektivní výhody. Proto mohou vést synergní efekty více prvních nukleotidových sekvencí k selekci na podmíněně se replikující vektor, kdy jakákoliv jednotlivá první nukleotidová sekvence poskytuje diskriminační selekci vzhledem ke kompetujícímu genomu.

Štěpení nebo destrukce kompetujícího vektoru nebo plasmidu také snižuje pravděpodobnost kompletní rekombinace vektoru, který má tak „sníženou rekombinační schopnost“. Vektor může být chráněn před štěpením degenerací své sekvence tak, aby nebyla cílem pro ribozym nebo protismyslné sekvence. Vektor může být dále chráněn před štěpením takovou úpravou vektoru, nebo genomové verze vektoru, aby odlišně vyhledával RNA, takže genomová vektorová RNA není významněji štěpena kompetujícím vektorem nebo pomocným konstruktem. Alternativně může být pomocný vektor upraven podobně, například, insertováním sestřihových prvků pro vložení

pomocného vektoru do spliceosomu, za současného upravení vektorové genomové RNA tak, aby obsahovala první sekvenci nukleové kyseliny, která je přítomna pouze v nesestřižené formě vektorové RNA. Takové příklady vylepšených vektorů jsou zejména výhodné, když jsou použité během produkce virového vektoru nebo plasmidového vektoru a při klonování nebo subklonování sekvencí nukleové kyseliny do takových vektorů, stejně jako jejich použití v mutagenesi, expresi indukovatelných genů a podobně.

Předkládaný vynález také poskytuje farmaceutický prostředek obsahující podmíněně se replikující vektor podle předkládaného vynálezu a farmaceuticky přijatelný nosič. Dále vynález poskytuje hostitelskou buňku obsahující podmíněně se replikující virový vektor. Vynález dále poskytuje vektor, kde uvedený vektor, pokud jde o DNA vektor, obsahuje nukleotidovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 14, ve kterých je alespoň jeden N mutovaný, 15 a 16, a kde uvedený vektor, pokud jde o RNA vektor, obsahuje nukleotidovou sekvenci kódovanou nukleotidovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 2, 3, 4, 5, 6, 14, ve kterých je alespoň jeden N mutovaný, 15 a 16, ve formě izolovaných a přečištěných molekul nukleové kyseliny. Dále vynález poskytuje způsoby pro opatření vektoru ribozymem, způsoby pro modifikování vektoru, a způsoby pro propagování a selektivní balení podmíněně se replikujícího vektoru bez použití podpůrné buněčné linie.

V ještě dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob pro terapeutickou a profylaktickou léčbu hostitelské buňky infikované virem. V konkrétním výhodném provedení je taková léčba provedena u uvedeného hostitele tak, že se mu dodá dominantní fenotyp, který inhibuje virovou infekci,

nebo fenotyp, který inhibuje infekci jinými viry. Výhodně patří mezi inhibované viry široká škála virových kmenů. Takové metody dále zahrnují použití pomocného expresního vektoru, dále též označovaného jako "pomocný vektor" nebo "pomocný vektorový konstrukt," a cytotoxického léku, proteinů/faktorů, nebo inhibitorů proteasy/reversní transkriptasy, jak je vhodné. Způsob může být použit, například, pro inhibici replikace viru, pro léčbu nemocí (včetně nádorových onemocnění, infekcí, cévních a jiných onemocnění), pro provádění účinného ex vivo a in vivo genového přenosu, pro umožnění bezpečné produkce vektorů, pro stanovení funkce genu nebo pro expresi daného genu v hostitelské buňce.

V dalším aspektu předkládaný vynález poskytuje způsob použití hostitelské buňky obsahující podmíněně se replikující vektor podle předkládaného vynálezu pro detekci interakcí mezi lékem/faktorem a proteinem. Takový způsob umožňuje charakterizaci proteinu a vyhledávání léků, faktorů nebo jiných proteinů, z hlediska jejich aktivity nebo fyzikálních interakcí s daným proteinem kódovaným vektorem. Způsob dále umožňuje identifikaci a charakterizaci proteinů, které jsou funkčně příbuzné s daným proteinem kódovaným vektorem. Například, pokud je kódovaný protein transkripční faktor, umožňuje jeho exprese vektorem identifikaci genů regulovaných transkripčním faktorem.

Vynález také poskytuje prostředky a podmínky pro skladování vektorů za různých podmínek před jejich použitím. Příkladem takových podmínek je skladování při -80°C , -20°C a 4°C za přítomnosti různých nosičů.

Dalšími provedeními předkládaného vynálezu jsou generické lentivirové vektory, modifikace pomocných vektorových

konstruktů, které slouží pro snížení, minimalizaci nebo eliminaci rekombinace pomocného vektoru s podmíněně se replikujícím vektorem vedoucí ke vzniku replikace-kompetentního vektoru nebo viru (RCV). Proto vynález zahrnuje pomocné vektory, které slouží pro přípravu vektorů s "redukovanou rekombinací". Pomocný vektor podle předkládaného vynálezu také výhodně zvyšuje titr produkovaného podmíněně se replikujícího vektoru na hodnoty větší než 10^7 transdukujících jednotek na ml. Další provedení zahrnují koncentrování vektoru za použití odstředění při vysoké rychlosti (ale ultracentrifugaci) a chromatografické, ultrafiltrační a diafiltrační metody pro koncentrování a přečištění.

Modifikace pomocného vektoru podle předkládaného vynálezu zahrnují inserci ribozymu, jako je anti-U5 ribozym, nebo protismyslné sekvence, která štěpí nebo vede k destrukci nebo inaktivaci podmíněně se replikujícího vektoru za situace, kdy jsou pomocný vektor a podmíněně se replikující vektor lokalizovány na stejném místě nebo sbaleny společně. V jednom provedení jsou pomocné složky integrovány zcela na jednom plasmidovém konstruktu za vzniku dvou plasmidového systému vektor-pomocný vektor, který produkuje titry vektoru v nekoncentrovaném supernatantu vyšší než 10^7 transdukujících jednotek na ml (viz obr. 3). V ještě jiném provedení je nukleotidová sekvence pomocného vektoru degenerována za účelem minimalizace rekombinace s podmíněně se replikujícím vektorem. V ještě jiném provedení obsahuje pomocný vektor heterologní trans-účinkující elementy pro použití v balení podmíněně se replikujícího vektoru. Příklady takových elementů jsou obalový protein VSV-G viru vesikulární stomatitidy, RD114 obalový protein, obalový protein viru vztekliny, obalový protein viru giboní leukemie (GALV) a chimérické obalové proteiny. Další modifikace

zahrnují heterologní rev-reaktivní elementy (RRE), post-transkripční regulační elementy (PRE) nebo konstitutivní transportní elementy (CTE).

V ještě dalším provedení pomocný vektorový konstrukt dále obsahuje donorová místa pro sestřih, akceptorová místa pro sestřih nebo místa pro degenerované nebo humanizované nukleotidové sekvence. Například, místo pro sestřih může být umístěno tak, že balící signál a/nebo RRE může být odstraněn z transkribované RNA pomocí sestřihu. Dále mohou být vložena místa pro inserci intronů do vektoru nebo do pomocných konstruktů, takže je minimalizována dimerizace, kolokalizace nebo rekombinace mezi podmíněně se replikujícím vektorem a pomocným vektorem, nebo jiným kompetujícím genomem nebo genomovým elementem. Inserce intronů může být prováděna za účelem přesunutí pomocné RNA do spliceosomů a pryč od vektorové RNA. Překvapivě bylo u některých pomocných vektorových konstruktů zjištěno, že zvyšují titr podmíněně se replikujícího vektoru.

Popis obrázků na připojených výkresech

Obr. 1A-1K jsou schématická znázornění specifických vylepšených podmíněně se replikujících vektorů podle předkládaného vynálezu: pN1(cPT), pN1(cPTc)ASenvGFP(464), pN1(cPT)ASenvGFP(452), pN1(cPT2)ASenvGFP, pN1(cPT)cGFP, pN1GFP(cPT)T, pN1(cPT)GFPTAR, pN1GFP(cPT)VT, pN2GFP, pN2ASenvGFP(418) a pN2(spe)ASenvGFP. Markerový gen pro zelený fluorescentní protein (GFP) může být samozřejmě odstraněn před použitím vektorů v popsáných aplikacích. OZkratky: Ni, minimální vektor odvozený od HIV-1 bez gag/pol sekvence, ale s balící sekvencí z gag označenou jako gag' nebo gag'' a terminačním kodonem umístěným přibližně 40 párů bazí od ATG gag sekvence; N2, vektor odvozený od HIV-1

schopný exprimovat gag/pol sekvenci; AS, protismyslná sekvence; ASenv, env sekvence v protismyslné orientaci; gag, pol a env, kódující sekvence pro proteiny, které tvoří jádro viru, reversní transkriptasu, a obal, v příslušném pořadí; tat, rev, rre, a nef, další virové geny; cPTc, minimální centrální polypyrimidinová sekvence; oPT, centrální polypyrimidinový úsek obsahující velký insert velikosti přibližně 548 párů bazí; cPT2, centrální polypyrimidinový úsek obsahující sekvenci velikosti přibližně 438 párů bazí (nezahrnuje gag sekvenci, stejně jako oPT); spe, gag/pol sekvence nejsou translatovány; GFP, kódovaný zelený fluorescentní protein.

Obr. 2 znázorňuje DNA sekvence přirozené HIV U5 RNA SEQ ID NO:1 (A) a modifikovanou crHIV U5 RNA SEQ ID NO:2 (B). Čísla označují počet bazí od začátku transkripce.

Obr. 3A-3E ilustrují vliv poměru pomocného vektoru k podmíněně se replikujícímu (cr) vektoru na produkováný titr cr vektoru. Obr. 3A ukazuje, že molární poměr 1:0,5 vede k nejvyššímu titru ori pN1(cPTc)GFP; 3B a 3C ukazují, že molární poměr 1:0,75 vede k zisku nejvyššího titru pro pN1(cPT)GFP a pN1(cPT2)ASenvGFP, v příslušném pořadí; a 3D a 3E ukazují, že molární poměr 1:1,5 vede k nejvyššímu titru pro pN1cGFP a pN2cGFP, v příslušném pořadí. Vektory jsou uvedeny na obr. 1 kromě pN1(cPT)GFP, který nemá protismyslnou env sekvenci a pN1cGFP a pN2cGFP, které mají insertovaný cytomegalovirový (CMV) promotor pro expresi GFP. Obrázky ukazují, že podmínky pro produkci titrů alespoň $1,5 \times 10^7$ transdukujících jednotek na ml byly dosaženy za použití dvou plasmidových systémů.

Obr. 4A a 4B ukazují mapy dvou podmíněně se replikujících vektorů na bázi HIV-2: pS1cGFP a pS2cGFP. Označení pS1 a pS2

označují nepřítomnost nebo přítomnost gag/pol sekvencí, jak bylo popsáno výše pro pN1 a pN2. c označuje přítomnost CMV promotoru pro řízení exprese GFP.

Obr.5A a 5B ilustrují efekt různých pomocných vektorových konstruktů na balení pS1cGFP a pS2cGFP. Efekt různých molárních poměrů mezi pomocným vektorem a podmíněně se replikujícím vektorem byl testován společně s efektem různých RRE na pomocném vektoru. Jak je ukázáno, poměr 1:1 pomocného vektoru k podmíněně se replikujícímu vektoru byl účinnější v produkci funkčních vektorových částic než jiné testované poměry.

Obr. 6A-6G ukazují struktury různých pomocných vektorových konstruktů: pVIRPAC-1, pVIRPAC-2, pVIRPAC-1.1Rz, pVIRPAC-1.2, VirPac1.2Rz, pVIRPAC-1.2Rz2, a pVIRPAC-1.2RzIn, navržených podle předkládaného vynálezu. Rz označuje přítomnost anti-US ribozymu, a 1.1 a 1.2 označuje, že pomocný vektor má RRE odvozené od HIV-1 nebo HIV-2, v příslušném pořadí.

Obr. 7 ilustruje vliv jednoho nebo více ribozymů na titry virového vektoru. pN1(cPT)GFP byl balen v HeLa-tat buňkách za přítomnosti pVirPac1.2 (neobsahujícího ribozymy), pVirPac1.2RzIn (obsahujícího jeden ribozym a intron), pVP1.2Rz (obsahujícího jeden ribozym) nebo pVP1.2Rz2 (obsahujícího dva ribozymy). Jak je ukázáno na grafu, přítomnost jednoho ribozymu (pVirPac1.2Rz) nebo ribozymu a intronu navrženého pro ovlivnění buněčného transportu pomocné RNA (pVirPac1.2RzIn) nemělo žádný významný vliv na titr vektoru. PCR analýza titrů vzorků pro současně balené pomocné konstrukty ukázala slabé současné balení za přítomnosti ribozymu versus silné současné za nepřítomnosti

ribozymu. Indikátor "VirPac" může být také označen jako "VIRPAC" nebo "VP".

Obr.8 ilustruje inhibiční efekt vektorů pN1 a pN2 série na replikaci přirozeného HIV v T-lymfocytech. T-lymfocyty byly nejprve transdukovány vektorem a potom byly infikovány přirozeným virem s multiplicitou infekce 0,1 se 100% transdukovaných buněk. Replikace viru byla testována p24 ELISA testem na zachycení antigenu. pN2ASenvGFP demonstroval silnou inhibici replikace přirozeného viru.

Obr. 9A a 9B ukazují účinnou inhibici replikace přirozeného HIV pomocí vektorů na bázi pN1 a pN2. Obr. 9A ukazuje silnou inhibici přirozeného HIV v lidských T-lymfocytech pomocí pN1GFP(cPT)VT a pN2ASenvGFP ve srovnání s kontrolními nádorovými buňkami infikovanými přirozeným HIV. Obr. 9B ukazuje podobné výsledky u T-lymfocytů s pN1(cPT)ASenvGFP a pN2ASenvGFP.

Obr. 10A a 10B ukazují vektory a jejich použití pro selekci transdukovaných buněk. Obr. 10A ukazuje organizaci použitých vektorů, kde pN1CMIG a pN1MCG obsahují interní CMV promotor, zatímco pN1MIG a pN1MIG-W exprimují MGMT gen pomocí HIV_LTR promotoru. Obr.10B ukazuje graf expanze SupT1 buněk transdukovaných výše uvedenými vektory a selektovaných pomocí BG a BCNU, jak je popsáno v příkladu 5.

Obr. 11, panely A-F, ukazují selekci transdukovaných primárních CD4+ buněk BG a BCNU. CD4+ buňky transdukované pN2MIG se kultivovaly s 0, 0,5, 2, 5, 10, a 10 pM BG (panely A-F, v příslušném pořadí) s uvedenými koncentracemi BCNU. Panel F dále ukazuje výsledky ředění 1:5 transdukovaných buněk 1:5 po ošetření 10 μ M BG a uvedenými koncentracemi BCNU. Výchozí hodnota 3% GFP+ buněk v panelu F se zvýšila

alespoň 32-násobně na 97%, což je hodnota předtím in vitro nepozorovaná.

Obr. 12 ukazuje vliv ribozymů na prevenci současného sbalení pomocné RNA do vektorových přípravků. Supernatanty obsahující viry se extrahovaly "nárazovou extrakcí" a zpracovaly se trávením DNAsou I a potom kvalitativní RT-PCR detekcí HIV-1 gag-pol regionu vyskytujícího se v pomocném konstruktu. Jak je uvedeno, přítomnost jednoho nebo více ribozymů v použitém pomocném konstruktu (pVP1.2Rz nebo pVP1.2Rz2) významně redukovala množství současně sbaleného pomocného vektoru ve srovnání s pomocným vektorem bez ribozymu (pVP1.2).

Obr. 13A a 13B ukazují schopnost vyčistit nádorové buňky pd CD34+ kmenových buněk. Obr. 13A ukazuje, že při MOI 10, pN1(cPT)ASenvGFP transdukoval 98,52% SupT1 nádorových buněk po jediném kole transdukce. Obr. 13B ukazuje, že při transdukci CD34+ buněk nebyla pozorována žádná významná transdukce po jednom kole transdukce. A6 po třech kolech byla pozorována významnější transdukce. Legenda: 1/2/A, například, označuje 1 kolo transdukce, MOI 2, a přítomnost virových pomocných proteinů na transdukovaném vektoru, zatímco 3/50, například, označuje tři kola transdukce a MOI 50.

Obr. 14A ukazuje struktury VSV-G přirozeného, RD114 přirozeného a chimérického obalového proteinu s uvedeným extracelulárními, transmembránovými a cytoplasmatickými doménami. Obr. 14B ukazuje titry HIV-1 vektorů pseudotypovaných v HT1080 s různými obalovými proteiny (přirozený VSV-G, virus vztekliny G, přirozený RD114, RD114E, chimérický VSV-G a RD114 konstrukt).

Obr. 15A-15E jsou schématická znázornění specifických balících konstruktů podle předkládaného vynálezu:

p(CGCRSRRE), p(TREtTA_{puro}), p(BI-RevTat), p(EH-GP) a p(CMV-GP). Obr. 15F ukazuje organizaci rev dependentních VSV-G konstruktů.

Obr.16 ukazuje výtěžek pN1(cPT)GFP vektorů na bunku před a po koncentrování v HeLa-tat buňkách. Jak je uvedeno, je výtěžek při všech podmínkách přibližně 10^{10} .

Obr. 17 ukazuje výsledky použití Rev/RRE/CRS systému pro řízení VSV-G exprese.

Obr. 18 ukazuje vliv skladovacího pufru a získání vektoru po skladování po dobu 3-5 týdnů při různých teplotách. Jak je uvedeno, přítomnost 10% trehalosy nebo 10% glukosy, v buď D-PBS nebo HBS, vede k dobrému zisku vektoru po skladování pro -20 nebo -80°C .

Obr. 19 ukazuje inhibici DNA přirozeného HIV-1 v buňkách obsahujících vektory podle předkládaného vynálezu.

Popis výhodných provedení

Předkládaný vynález poskytuje vylepšené podmíněně se replikující vektory, lentivirové vektory, a způsoby jejich použití. Kromě toho, že jsou selektivně replikovány, obsahují vektory specifické modifikace pro snížení pravděpodobnosti rekombinace vedoucí k tomu, že by se vektory staly schopné replikace. Vynález zahrnuje způsoby pro inhibici replikace přirozeného kmenu viru a způsoby pro přenos genů do buněk obsahujících takové vylepšené vektory.

Způsob obsahuje kontaktování hostitele, který může být infikován, nebo který již je infikován takovým přirozeným kmenem viru, s vylepšeným vektorem, který je propagován pouze v hostiteli, který je permissivní pro replikaci vektoru (tj. nepatogenního, nebo onemocnění nevyvolávajícího, podmíněně se replikujícího (cr) vektoru).

Jak je zde popsáno dále, je konkrétním cílem metody indukovat u hostitele kompetitivní infekci takovým nepatogenním, podmíněně se replikujícím vektorem. Obecně, podmíněně se replikující vektor podle předkládaného vynálezu obsahuje alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, která udílí selektivní výhodu pro replikaci a šíření podmíněně se replikujícímu vektoru ve srovnání s přirozeným virem, a/nebo alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, která udílí selektivní výhodu pro propagaci virových částic v hostitelské buňce obsahující podmíněně se replikující vektor ve srovnání s hostitelskou buňkou obsahující přirozený virus.

Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu vektor obsahuje HIV sekvenci a je použit pro léčbu HIV infekce. Tak vektor nebo hostitelské buňky obsahující vektor, obsahují alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, která (1) poskytuje crHIV genom se selektivní výhodou vůči přirozenému HIV genomu z hlediska balení do virionů (to znamená v buňkách, ve kterých jsou oba přítomny), a/nebo (2) poskytuje hostitelské buňky produkující podmíněně se replikující vektor (virus) se selektivní výhodou pro produkci crHIV virionů, ve srovnání s hostitelskými buňkami produkujícími přirozený virus. Jeden způsob (na který není vynález omezen) spočívá v dodání selektivní výhody pro balení do crHIV genomů pomocí dodání jednoho nebo více ribozymů schopných štěpit přirozený HIV genom.

V jiném aspektu předkládaného vynálezu jsou vektory upraveny tak, že mají redukovanou pravděpodobnost rekombinace s přirozenými a pomocnými konstrukty vedoucí ke vzniku vektorů schopných replikace. Dále vynález poskytuje pomocné vektory, buňky a balicí systémy, které také přispívají k redukci rekombinace a dále snižují pravděpodobnost rekombinace, která by z podmíněně se replikujících vektorů udělala nepodmíněně se replikující vektory.

Přirozený virus

"Virus" je v předkládaném vynálezu definován jako infekční agens, které se skládá z proteinu a nukleové kyseliny, a které využívá genetický aparát hostitelské buňky k produkci virových produktů specifikovaných nukleovou kyselinou viru. "Nukleová kyselina" je polymer DNA nebo RNA, který je jednořetězcový nebo dvouřetězcový, lineární nebo cirkulární a případně obsahuje syntetické, nepřirozené nebo modifikované nukleotidy, které mohou být inkorporovány do DNA nebo RNA polymerů. DNA polynukleotid se výhodně skládá z genomových nebo cDNA sekvencí.

"Přirozený kmen viru" je kmen, který neobsahuje žádné člověkem vytvořené mutace, jak jsou zde popsány, tj. virus, který může být izolován z přírody. Alternativně je přirozený kmen jakýkoliv virus, který byl kultivován v laboratoři, ale stále je schopen produkovat potomstvo nebo viriony podobné těm, které jsou izolovány z přírody. Například, pNL4-3 HIV-1 molekulární klon popsáný v následujících příkladech je přirozený kmen, který je dostupný z AIDS Research and Reference Reagent Program Catalog v National Institutes of Health (viz také Adachi et al., J. Virol., 59, 284-291

(1986)). pPSXB je HIV-2 molekulární klon, který byl poskytnut Dr Suresh Arya z National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, a byl popsán v Arya et al., Human immunodeficiency virus type 2 lentivirus vectors for gene transfer: expression and potential for helper virus-free packaging. Hum Gene Ther. 1998 Jun 10;9(9):1371-80.

Obecně je způsob podle předkládaného vynálezu použit pro léčbu virových onemocnění vznikajících v důsledku infekce virem. Výhodně je virus (stejně jako vektor, jako je popsáno dále) RNA virus, ale může být také DNA virem. RNA viry jsou různorodá skupina, která infikuje prokaryotické organismy (například bakteriofágy), stejně jako různé eukaryotické organismy, včetně savců, zejména lidí. Většina RNA virů má jako svůj genetický materiál jednořetězcovou RNA, ačkoliv alespoň jeden rod má jako svůj genetický materiál dvouřetězcovou RNA. RNA viry se dělí do tří hlavních skupin: viry s pozitivním řetězcem (tj. ty, jejichž genom přenášený virem je translatován na protein, a jejichž deproteinizovaná nukleová kyselina je dostatečná pro iniciaci infekce), viry s negativním řetězcem (tj. ty, jejichž genom přenášený virem je komplementární k mRNA a musí být transkribován enzymy asociovanými s virionem před tím, než může proběhnout translace), a dvouřetězcové RNA viry. Způsob podle předkládaného vynálezu je výhodně použit pro léčbu virů s pozitivním řetězcem, virů s negativním řetězcem a dvouřetězcových RNA virů.

Mezi RNA viry patří například Sindbis-like viry (např., Togaviridae, Bromovirus, Cucumovirus, Tobamovirus, flarvinis, Tobravirus, a Potexvirus), Picornavirus-like viry (např., Picornaviridae, Caliciviridae, Comovirus, Nepovirus, a Potyvirus), viry s minus řetězcem (např., Paramyxoviridae, Rhabdoviridae, Orthomyxoviridae, Bunyaviridae a

Arenaviridae), dvouřetězcové viry (např., Reoviridae a Birnaviridae), Flavivirus-like viry (např., Flaviviridae a Pestivirus), Retrovirus-like viry (např., Retroviridae), Coronaviridae, a jiné skupiny virů, včetně, například, Nodaviridae.

Výhodný RNA virus podle předkládaného vynálezu je virus čeledi Flaviviridae, výhodně virus rodu Filovirus, a zejména Marburg nebo Ebola virus. Výhodně je virus čeledi Flaviviridae virus rodu Flavivirus, jako je virus žluté zimnice, virus horečky dengue, virus západonilské horečky, virus St. Louiské encefalitidy, virus Japonské encefalitidy, virus Murray Valley encefalitidy, Rocio virus, virus klíšťové encefalitidy a podobně.

Také výhodné jsou viry čeledi Picornaviridae, výhodně virus hepatitidy A virus (HAV), virus hepatitidy B (HBV), nebo virus hepatitidy non-A nebo non-B.

Jiným výhodným RNA virem je virus čeledi Retroviridae (t.j. retrovirus), konkrétně virus rodu nebo podrodu Oncovirinae, Sptunavirinae, Spumavirus, Lentivirinae a Lentivirus. RNA virus podrodu Oncovirinae je výhodně lidský T-lymfotropní virus typu 1 nebo 2 (t.j., HTLV-1 nebo HTLV-2) nebo virus hovězí leukemie (BLV), virus ptačí leukemie/sarkomu (např., virus Rousova sarkomu (RSV), virus ptačí myeloblastosy (AMV), virus ptačí erytroblastosy (AEV), a Rous-asociovaný virus (RAV; RAV-0 až RAV-SO), a savčí virus typu C (např. Moloney virus myši leukemie (MuLV), Harvey virus myšího sarkomu (HaMSV), Abelson virus myši leukemie (A-MuLV), AKR-MuLV, virus kočičí leukemie (FeLV), virus opičího sarkomu, virus retikuloendoteliosy (REV), virus nekrosy sleziny (SNV)), virus B-typu (např., virus myších mamárních nádorů (MMTV)), virus D-typu (např. Mason-

Pfizer opičí virus (MPMV) a "SAIDS" viry). RNA virem podrodu Lentivirus je výhodně virus lidské imunodeficiency typu 1 nebo 2 (t.j., HIV-1 nebo HIV-2, kde HIV-1 byl dříve nazýván jako virus asociovaný s lymfadenopatií 3 (HTLV-III) a virus asociovaný se syndromem získané imunodeficiency (AIDS-related virus (ARV), nebo jiný virus příbuzný s HIV-1 nebo HIV-2, který byl identifikován a je asociován s AIDS nebo onemocněními souvisejícími s AIDS. Akronym "HIV" nebo termíny "AIDS virus" nebo "lidský virus" jsou zde použity pro označení těchto HIV virů, a HIV-příbuzných a -asociovaných virů. Dále, RNA virus podrodu Lentivirus je výhodně Visna/maedi virus (např. jako je virus infikující ovce), virus kočičí imunodeficiency (FLY), hovězí lentivirus, virus opičí imunodeficiency (SIV), virus koňské infekční anemie (EIAV), a virus kozí artritidy-encefalitidy (CAEV).

Virus podle předkládaného vynálezu je také výhodně DNA virus. Výhodně je DNA virem virus Epstein-Barrové, adenovirus, herpes simplex virus, papilloma virus a virus vaccinie, a podobně.

Mnoho z těchto virů se klasifikuje jako patogeny "stupně 4 biologické bezpečnosti" (t.j., World Health Organization (WHO) "Risk Group 4"), pro které je nutné maximální bezpečnostní opatření při práci v laboratoři. Odborníkům v oboru však budou známa všechna opatření nutná k práci s takovými viry.

„Hostitelské buňky“ mohou být jakékoliv buňky a výhodně se jedná o eukaryotické buňky. Výhodně je hostitelskou buňkou lymfocyt (jako je T lymfocyt) nebo makrofág (jako je monocytický makrofág), nebo prekursor jedné z těchto buněk, jako je hematopoetická kmenová buňka. Výhodně buňka obsahuje

na svém povrchu CD4+ glykoprotein, t.j., je CD4+. Je výhodné, aby CD4+ T lymfocyt, který byl infikován AIDS virem, nebyl ještě aktivovaný (t.j., výhodně ještě nedošlo k expresi nef a, ještě lépe, exprese CD4 genu nebyla snížena, jak je podrobněji popsáno dále). Dále, hostitelská buňka je výhodně buňka, která nemá CD4 marker, a je stále ještě schopná být infikována virem podle předkládaného vynálezu. Mezi takové buňky patří, například, astrocyty, kožní fibroblasty, epitelové buňky tlustého střeva, endotelové buňky, epitelové buňky, dendritické buňky, Langerhansovy buňky, monocyty, hematopoetické kmenové buňky, embryonální kmenové buňky, buňky, ze kterých vznikají spermatozoa nebo oocyty, stromální buňky, slizniční buňky a podobně. Výhodně jsou hostitelské buňky eukaryotické, z mnohobuněčného organismu (například v protikladu k jednobuněčným kvasinkám) a nejlépe se jedná o savčí buňky, např. o lidské buňky.

Buňky mohou být prezentovány buď jako jediná entita, nebo jako část většího souboru buněk. Takový "větší soubor buněk" může být například buněčná kultura (smíšená nebo čistá), tkáň (např., endotelová, epitelová, slizniční nebo jiná tkáň, včetně tkání obsahujících výše uvedené buňky bez CD4, orgán (např. srdce, plíce, játra, sval, žlučník, gonády, oko a jiné orgány), orgánový systém (např. oběhový systém, respirační systém, gastrointestinální systém, močový systém, nervový systém, pojivový systém nebo jiný orgánový systém), nebo organismus (např. pták, savec a podobně). Výhodně jsou orgány/tkáně/buňky, které jsou cíleně ovlivněny, součástí oběhového systému (např. srdce, cévy, krve, včetně krevních leukocytů a erytrocytů), respiračního systému (např., nosu, faryngu, laryngu, trachey, bronchů, bronchiolů, plic a podobně), gastrointestinálního systému (např. úst, faryngu, jícnu, žaludku, střeva, slinných žláz, slinivky řišní jater,

žlučníku a podobně), močového systému (např. ledvin, ureterů, močového měchýře, urethry a podobně), nervového systému (např. mozku a míchy, speciálních smyslových orgánů, jako je oko) a kožního systému (např. kůže, epidermis, a buněk podkožního vaziva nebo dermis). Ještě lépe jsou buňky, které mají být cíleně ovlivněny, vybrány ze skupiny zahrnující buňky, srdce, krve, krevních cév, plic, jater, žlučníku, močového měchýře a oka. Cílovými buňkami nemusí být normální buňky, může se jednat o buňky postižené onemocnění. Takové buňky postižené onemocněním jsou například nádorové buňky, infikované buňky, geneticky abnormální buňky nebo buňky v sousedství nebo v kontaktu s abnormální tkání, jako jsou endotelové buňky nádorové vaskulatury.

Vektor

"Vektor" je molekula nukleové kyseliny (typicky DNA nebo RNA), která slouží pro transfer a přenos sekvence nukleové kyseliny (t.j., DNA nebo RNA) v hostitelské buňce. Mezi tři obvyklé typy vektorů patří plasmidy, fágy a viry. Výhodně je vektorem virus, a může být ve formě enkapsidované formy vektorové nukleové kyseliny, virové částice, do které je sbalena vektorová nukleová kyselina.

Je žádoucí, aby vektorem nebyl přirozený kmen viru, protože obsahuje člověkem vyrobené mutace nebo modifikace. Tak je vektor obvykle odvozen od přirozeného virového kmene za použití genetických manipulací (t.j. delecí), které jsou navrženy tak, aby byl získán podmíněně se replikující virus, jak je zde popsán dále. Optimálně virový vektor obsahuje kmen viru stejný jako je přirozený virus způsobující léčené infekční onemocnění, a tímto přirozeným virem je výhodně jeden z výše uvedených přirozených virů. Proto je výhodně

vektor odvozen od RNA viru, ještě lépe od retroviru, a nejlépe je vektor odvozen od viru lidské imunodeficiency. Takový vektor odvozený od viru lidské imunodeficiency je zde genericky označován jako "crHIV" vektor.

Vektorem je také výhodně "chimérický vektor", např. kombinace virového vektoru s jinou sekvencí, jako je, například, kombinace HIV sekvence s jedním nebo více dalšími viry (které jsou výhodně odvozeny od přirozeného virového kmene tak, aby obsahovaly podmíněně se replikující vektor). Konkrétně, HIV sekvence může být výhodně navázána na sekvenci modifikovaného (tj. nepřirozeného) kmene adenoviru, adenoasociovaného viru, viru z Alphaviridae, virus z Flaviviridae, virus z Hepadnaviridae, virus z Papovaviridae, viru z Parvoviridae, viru z Herpesviridae, viru z Poxviridae, viru z Paramyxoviridae, viru z Rhabdoviridae nebo viru z Retroviridae, včetně Onko-retrovirů, Spuma-retrovirů a Lenti-retrovirů. Virové nebo virus-like genomy odvozené od nebo asociované s těmito virovými čeleděmi spadají také do rozsahu předkládaného vynálezu.

Výhodný chimérický vektor je takový vektor, kde jsou vektorové sekvence (t.j. sekvence buď kódující proteiny, fragmenty nebo nekódující sekvence) odvozeny od jiné čeledi než Lentivirů a jsou insertovány do Lentivirového vektoru. Výhodně jsou non-HIV sekvence jsou insertovány do vektoru odvozeného od HIV.

Vektor podle předkládaného vynálezu může obsahovat DNA nebo RNA. Například, DNA i RNA vektory mohou být použity pro modifikaci viru. Obdobně, může být vyrobena cDNA kopie virového RNA genomu. Alternativně může být cDNA (nebo virová genomová DNA) transkribována in vitro za zisku RNA. Tyto

techniky jsou dobře známé odborníkům v oboru a jsou také popsány v následujících příkladech.

"Podmíněně se replikující virus" je replikace-defektní virus, který je defektní pouze za určitých podmínek. Konkrétně, virus může dokončit svůj replikační cyklus v permissivní hostitelské buňce a nemůže dokončit svůj replikační cyklus v restriktivní hostitelské buňce. "Hostitelská buňka" je buňka, která může být nebo již je infikována přirozeným kmenem viru nebo pseudotypovaným vektorem. Taková infekce přirozeným virem se může vyskytnout před nebo po infekci podmíněně se replikujícím virem podle předkládaného vynálezu. Alternativně je "hostitelská buňka" buňkou, která kóduje produkt genu přirozeného viru nebo pomocného konstruktů nutný pro replikaci. Tak je podmíněně se replikující vektor podle předkládaného vynálezu virus (výhodně stejného typu jako původce léčené virové infekce), který se replikuje pouze po komplementaci přirozeným kmenem viru (nebo pomocného konstruktů) nebo když přirozený virus infikuje buňky obsahující genom podmíněně se replikujícího vektoru.

Ve výhodném provedení vektor obsahuje RNA virus (např. podmíněně se replikující HIV virus), který je vložen ve formě DNA. Toto výhodné provedení poskytuje replikační HIV-1 (crHIV) vektorovou strategii, která vede k zisku nepatogenního crHIV-1 vektorového genomu se selektivní výhodou nad patogenními přirozenými HIV genomy. Konkrétně, v buňkách obsahujících jak přirozený HIV, tak crHIV genom, má crHIV RNA selektivní výhodu pro balení do virionů, protože obsahuje, například, ribozymy, které štěpí přirozenou RNA, ale ne crHIV RNA. Takové nepatogenní crHIV se mohou šířit na neinfikované buňky, které jsou citlivé na HIV infekci (např. CD4+ buňky) za přítomnosti přirozeného

pomocného viru. Tímto způsobem selektivní balení a šíření crHIV interferuje s replikací přirozeného HIV.

Další výhodné provedení je nepatogenní crHIV vektor, který je nepatogenní proto, že neobsahuje jakoukoliv kombinaci pomocných virových sekvencí (jako je, například, Vif, Vpu, Vpr nebo Nef, nebo jejich kombinace nebo fragmenty), která by způsobovala patogenitu vektoru. Alternativně může být sekvence přítomna, ale může být transkripčně silentní nebo netranslatovaná. Volitelně vektor neobsahuje jakoukoliv kombinaci sekvencí regulačních proteinů (jako je, například, Tat nebo Rev, nebo jejich fragmenty), která by způsobovala patogenitu vektoru. Alternativně mohou být sekvence přítomné, ale mohou být transkripčně silentní nebo netranslatované.

Vektory však výhodně obsahují jakoukoliv kombinaci sekvencí pro strukturální proteiny (jako je gag, nebo a jejich fragmenty), sekvencí enzymatických proteinů (jako je pol, nebo jejich fragmenty), a/nebo sekvencí obalových proteinů (jako je env, nebo jejich fragmenty) ve formě, ve které jsou buď translačně aktivní, nebo silentní. Proto se mohou podmíněně se replikující vektory replikovat, ale nereplikují se v úrovni, která by byla patogenní pro daného hostitele. Místo toho vektor vyžaduje komplementaci pomocnou složkou (jako je pomocný vektor) obsahující nutné sekvence odvozené od přirozeného viru, aby byl schopen replikace v úrovni dostatečné pro indukci požadovaného terapeutického, profylaktického nebo biologického efektu. Stanovení přesné kombinace proteinů nebo nukleotidových sekvencí přítomných ve vektoru a pomocné složce pro dosažení optimálního biologického efektu vyžaduje použití skriningových postupů zahrnujících přidávání a odebrání různých kombinací nukleotidových sekvencí ve vektorech nebo pomocných

konstruktech, kde tyto skrínigové postupy jsou známé odborníkům v oboru.

Dále, výše uvedené nukleotidové sekvence mohou být modifikovány nebo mutovány tak, aby modifikovaly biologické efekt, nebo - například - pro snížení pravděpodobnosti rekombinace s pomocným konstruktem. V oboru jsou známy mnohé protokoly pro modifikaci nebo mutaci vektorů a pomocných konstruktů za účelem zisku optimalizovaných konstruktů (např. *Current Protocols in Molecular Biology*, Harcourt Brace and Jovanovich, 2000; *Molecular Cloning*, Sambrook et al, Cold Spring Harbor Press, 1989; a Soong et al., *Nature Genetics* 25: 436-439, 2000, kde obě publikace jsou zde uvedeny jako odkazy).

Způsob využívající výše uvedené vektory je odlišný od způsobů využívajících živé atenuované (LA) vakcíny, které využívají virus schopný replikace postrádající doplňkové proteiny (viz Daniel et al., *Science*, 258, 1938-1941 (1992); a Desrosiers, *AIDS Res. & Human Retrovir.*, 10, 331-332 (1994)), protože u LA vakcín není cílem komplementovat deficiency, které, například, brání účinné produkci účinné imunitní reakce, a zároveň zachovat bezpečnost. Například, je známo, že mnohotně deletované LA SW vakcíny nemohou vyvolat účinnou imunitní reakci, zatímco jedinkrát deletované (Nef negativní) LA SW vakcíny jsou patogenní u mladých makaků (Baba et al, 1995).

Alternativním přístupem k LA HIV vakcíně podle předkládaného vynálezu, jak byla popsána výše, je použití alespoň dvou vektorů, kde alespoň jeden je mnohonásobně deletovaný HIV vektor a druhý (pomocný) vektor exprimuje všechny pomocné proteiny kromě Nef. Proto se může mnohotně zeslabený HIV vektor replikovat podmíněným způsobem bez

toho, že by způsoboval onemocnění, protože je komplementován Vif, Vpr a Vpu z pomocného vektoru kontrolovaným způsobem. První vektor může být konstruován tak, aby obsahoval genetická antivirová činidla, která interferují s replikací a šířením přirozeného HIV. Alternativně může být takový první vektor použit pro vyvolání účinné imunitní reakce proti přirozenému viru. Odborníkům v oboru bude jasné, že jednoduchý skrínigový proces umožní hodnocení toho, která kombinace sekvencí deletovaných z prvního vektoru, ale přítomných v pomocném vektoru, umožní optimální terapeutickou nebo profylaktickou odpověď na první vektor, za zachování bezpečnosti ve smyslu nepatogenity.

Další výhodné provedení systému podmíněně se replikující vektor-pomocný prvek využívá HIV-1 vektor pro expresi gag, pol, env, tat a rev, a pomocný vektor odvozený od HIV-2 pro expresi Vif, Vpu, Vpr, a volitelně Nef genů. Vynález není omezen na tento příklad, protože jakákoliv kombinace výše uvedených genů umístěných v jakékoli kompatibilní kombinaci vektorů, včetně revertovaných HIV-1 a HIV-2 nebo chimérických HIV formátů, je také možná. Exprese Tat z HIV-1 skeletu bude transaktivovat jak HIV-1, tak HIV-2 LTR ke vzájemné komplementaci za produkce virových částic, které obsahují buď HIV-1 vektorové genomy, nebo HIV-2 vektorové genomy. Nicméně, tyto dvě genomové RNA nebudou účinně dimerizovat, což bude bránit současnému lokalizování vektorového a pomocného genomu, které by jinak byly sbaleny do jednoho virionu. Při sbalení do stejného virionu může rekombinace mezi vektorovým a pomocným genomem vést ke vzniku replikace-kompetentního vektoru (RCV, v důsledku reverzní transkripce, a potom mohou tyto částice infikovat další cílové buňky.

Pro další řešení možné produkce současně sbalených konstruktů mohou vektory dále obsahovat jednu nebo více sekvencí nukleové kyseliny, které redukuji riziko jakékoliv rekombinace. Například může první vektor obsahovat ribozymovou (nebo protismyslnou sekvenci/ribozym) sekvenci specifickou pro štěpení pomocného vektoru. Současná lokalizace takových vektorů, ve stejné celulární, subcelulární nebo extracelulární lokalizaci, povede ke štěpení pomocného vektoru, což zvýší bezpečnost tím, že dojde k destrukci dimerizace nebo současné lokalizace vektorů, což vede ke vzniku inaktivního genomu po rekombinaci nebo jinak zabrání produkci RCV. Tento přístup může být změně tak, že se ribozym vloží do pomocného vektoru, nebo může být dále vylepšen použitím ribozymů v obou vektorech, což dále zvýší bezpečnost.

Alternativně mohou být protismyslné molekuly použity pro nahrazení výše uvedených ribozymů, takže vytvořený dvouřetězcový RNA hybrid bude rychle degradován buněčnými endonukleasami. Dalším výhodným provedením je to provedení, kdy je protismyslná sekvence delší než 16-bazová ribozymová RNA použita pro cílené ovlivnění.

V modifikovaném způsobu může být pomocný vektor z výše uvedeného příkladu odvozen o heterologního viru (jako je jakýkoliv virus a čeleď virů popsané výše), ale výhodně je odvozen od adenoviru, adeno-asociovaného viru, myšího onkoretroviru nebo non-HIV lentiviru), takže proteiny mohou být exprimovány konstitutivně. Alternativně může být připraven heterologní pomocný vektor, který využívá HIV-LTR pro indukovatelnou nebo autoregulovanou expresi Tat, stejně jako pro transaktivaci exprese HIV vektoru. Výhodou poskytnutou heterologním virovým pomocným vektorem je restriktivní asociace mezi genomy prvního a druhého vektoru,

což dále snižuje pravděpodobnost rekombinace vedoucí ke vzniku RCV.

V jiném provedení vektor obsahuje protismyslnou sekvenci, která je přítomná na pomocném genomu nebo která je insertovaná do pomocného genomu. Příklad je možno vidět na pNlcptASgag vektoru, který je analogický s pNlcptASenv vektorem s tou výjimkou, že protismyslná sekvence je namířena na gag sekvenci přítomnou na pomocném vektoru společně s nebo místo env sekvence přítomné na přirozeném HIV. Anti-gag protismyslná sekvence je umístěna před sestřihové akceptorové místo, které je lokalizováno za RRE sekvencí přítomnou ve vektoru. Proto může být gag sekvence balena pouze v genomové a nebo v subgenomové nebo sestřižené formě vektorové RNA. Tak budou pomocné genomy obsahující introny, jako je VIRPAC systém, přednostně namířeny do spliceosomu buňky, zatímco genomové vektorové RNA, které obsahují anti-gag protismyslnou sekvenci, budou přednostně obcházet sestřihový aparát.

Různý transport vektorového a pomocného genomu v buňkách by měl mít minimální vliv na titr vektoru, a když budou náhodou vektorový a pomocný genom lokalizovány současně, tak hybridizace párů bazí vektorového a pomocného genomu povede k inaktivaci takových částic obsahujících vektorový a pomocný genom a k zabránění rekombinace vektor-pomocný genom vedoucí k vzniku RCV. V alternativním provedení bude vektor upraven tak, aby obsahoval anti-U5 vektorové protismyslné sekvence namířené pro U5 sekvenci přítomné v podmíněně se replikujícím vektoru. Bez omezení rozsahu vynálezu může být anti-U5 protismyslná sekvence insertována distálně k pomocné kódující sekvenci, ale před místem pro ukončení transkripce. Pokud se vektorová a pomocná RNA náhodně lokalizují současně a jsou současně sbaleny, což zvyšuje riziko rekombinace, tak

protismyslná sekvence zničí nebo inaktivuje takové současně sbalené virové částice a zabrání rekombinaci.

V ještě jiném provedení může pomocný vektor obsahovat cílové sekvence pro první nukleotidovou sekvenci přítomnou na vektoru. Příkladem je umístění kódujícího env fragmentu do pomocného genomu páru dvou plasmidů, které jsou obsaženy v pNlcptASenv vektoru. Když budou vektorová a pomocná RNA lokalizovány současně, tak dojde k párování bazí mezi env kódující sekvencí v pomocném genomu a protismyslnou sekvencí ve vektoru, což zabrání rekombinaci. Příklad uvedený výše není omezen na právě tyto dva typy genetických antivirových sekvencí. Odborníkům v oboru bude jasné, že různé genetické antivirové sekvence, stejně jako příslušné cílové sekvence, mohou být insertovány do vektorových a/nebo pomocných konstruktů. Dalším příkladem je pNlcptASgagASenV vektor a pomocný vektor, které obsahují fragmenty kódující gag a env sekvence, které mohou být současně použity pro zvýšení bezpečnosti tím, že redukují pravděpodobnost současného sbalení a rekombinace vedoucí ke vzniku RCV.

V jiném výhodném způsobu pro expresi vektorových nebo pomocných složek jsou tyto složky exprimovány dočasně. Jedním způsobem pro dočasné exprimování genomu nebo genomových složek je konstrukce vektoru nebo pomocného vektoru za použití - například - integrasa-negativního Pol genu. Takové lentivirové mutanty s mutací integrasy jsou známy v oboru a bylo popsáno, že nejsou infekční (Hirsch et al. 1989, Nature 341: 573-574). Proto se vektorové a/nebo pomocné genomy, které jsou produkovány z integrasa-negativních produkčních buněk, neintegrují, ale mohou být dočasně exprimovány tak, že je regulována úroveň replikace vektorového nebo pomocného genomu. Ještě dalším způsobem pro dosažení přechodné exprese vektoru nebo pomocného vektoru je

narušení AAT míst v LTR vektoru. Tato místa jsou odpovědná za aktivní integraci reverzně-transkribované genomové vektorové DNA do chromosomu hostitelské buňky.

Další způsob pro dosažení výše uvedeného cíle využívá fúzního proteinu pro balení funkční integrasové molekuly do virových částic. V tomto provedení ani podmíněně se replikující vektor, jako je lentivektor, ani pomocný vektor, nekódují integrasu, ale funkční integrasový fúzní protein je dostupný díky expresi z jiného plasmidového konstrukt, jako je pomocný vektor, nebo z integrované kopie v použité balící buňce, během produkce nebo balení pomocného konstrukt, což vede k zisku funkční integrasové aktivity při infekci. Alternativně je integrasový protein poskytnut ve trans formě díky expresi z pomocného konstrukt, který ho kóduje. V tomto provedení předkládaného vynálezu nekóduje podmíněně se replikující vektor nebo lentivektor integrasu. Fúzní protein může být například vpr-integrasový fúzní protein obsahující štěpící místo pro proteasu v místě spojení mezi vpr a integrasovou aminokyselinovou sekvencí.

Výše uvedený popis dvousložkového systému vektor-pomocná sekvence nijak neomezuje vynález na dva konstrukty, vektor a pomocný vektor. Může být použita jakákoliv kombinace dvou, tří nebo více vektorů a/nebo pomocných vektorů pro poskytnutí složek nutných pro produkci vektoru. Rozdělení nutných genomových elementů do více vektorů nebo pomocných komponent zvýší bezpečnost systému, protože pro více vektorových nebo pomocných genomů bude obtížnější rekombinace vedoucí k zisku RCV. Bezpečnost může být dále zvýšena konstruováním vektorů a pomocných složek obsahujících málo nebo žádné regiony homologie, což je dalším výhodným provedením. Rozdělení nutných genomových elementů do více složek může také dále omezit replikaci

podmíněně se replikujícího vektoru, protože je méně pravděpodobné, že více než dva genomy - oproti dvou genomům - budou simultánně přítomné v hostitelské buňce. Optimální počet vektorů a pomocných složek může být snadno určen testováním různých kombinací a může být různý pro různé použité virové vektory.

Jedním jednoduchým, ale nelimitujícím, příkladem omezení nebo odstranění homologie mezi vektorem a pomocným prvkem je prostá degenerace nukleotidové sekvence, za zachování kódované aminokyselinové sekvence. Techniky pro degenerování sekvence jsou známy v oboru. Jedním výhodným způsobem je humanizace sekvence, pokud je terapeutické použití plánováno u člověka. Použití kodonů u primátů bylo určeno a je popsáno ve Wada et al. (Nucleic Acids Research, Vol. 18 Supplement: 2367-2411, 1990), který je zde uveden jako odkaz.

Degenerace může být také použita pro chránění pomocného konstruktů před účinky jakéhokoliv činidla, které je navrženo pro ovlivnění vektoru, který má být balen pomocí pomocné složky. Toto může být provedeno degenerováním příbuzné cílové sekvence, pokud nějaká existuje, na pomocném konstruktě. Dále může být navržena degenerace vektoru a pomocného konstruktů redukující rekombinaci s jinými virovými sekvencemi, včetně jiných přirozených sekvencí, které se mohou současně vyskytovat ve vektoru či pomocné sekvenci v buňce. Například, použití páru vektor/pomocná složka v balicím systému na bázi HIV-1 a HIV-2 může být modifikováno tak, že pár vektor/pomocný konstrukt jsou také degenerovány v endogenním retro-elementu. Tak může degenerace nukleotidové sekvence na vektoru nebo pomocném konstruktě redukovat současnou lokalizaci možných rekombinantů a tím redukovat riziko vzniku viru schopného replikace z vektorového a pomocného genomu nebo

z vektorového nebo pomocného genomu a kompetujícího genomu, jako je endogenní retro-element.

Konkrétně, crHIV genomy jsou vloženy do buněk infikovaných virem nebo do neinfikovaných buněk. Infikované buňky dodávají crHIV genomu proteiny nutné pro jeho enkapsidaci a pro produkci virionů. CrHIV genomy se vnesou do neinfikovaných buněk výhodně přímou transdukcí (například liposomy-zprostředkovanou transdukcí crHIV DNA, nebo pomocí chimérického virového vektoru), nebo infekcí crHIV částicemi, které vznikají transfekcí buněk infikovaných přirozeným HIV. Neinfikované buňky obsahující vylepšený crHIV vektor podle předkládaného vynálezu neprodukuje kvantitu crHIV částic, které jsou patogenní pro hostitele. Některá provedení buněk obsahujících crHIV vektory nesuperinfikovaných wt-HIV produkují nějaké crHIV částice, ale v takových koncentracích, které nejsou patogenní pro hostitele. Buňky obsahující jakýkoliv vektor podle předkládaného vynálezu zůstávají citlivé k superinfekci přirozeným virem, který dodá proteiny nutné pro produkci crHIV částic. V tomto smyslu funguje podmíněně se replikující vektor podle předkládaného vynálezu, za přítomnosti komplementární přirozené superinfekce, také jako typ "virového přenosového vektoru", který může způsobit opakovaná kola crHIV infekce (t.j., za přítomnosti současné infekce přirozeným HIV). Takový vektor poskytuje zdroj viru pro více než jedno kolo virové replikace a tak pro infekci dalších buněk, nebo pro opakované cykly replikace za dosažení koncentrací, které vyvolají biologickou reakci, jako je imunologická reakce. Toto vylepšení je v kontrastu s jinými vektory, jako jsou vektory používané ve standardních balících buněčných liniích, které umožňují pouze jeden cyklus replikace nebo opakované cykly replikace,

které jsou buď nedostatečné pro vyvolání vhodné biologické reakce, nebo jsou patogenní pro hostitele.

Pokud je to žádoucí (např. pro usnadnění použití vektoru *in vitro*), mohou být genové produkty přirozeného viru dodány současně s buňkou infikovanou podmíněně se replikujícím vektorem. Genové produkty přirozeného genu mohou být dodány nejen pomocí současné infekce přirozeným kmenem viru (nebo cDNA nebo provirem RNA viru), ale také mohou být dodány do buňky ve formě jejich genů subklonovaných do expresního vektoru, například do pomocného expresního vektoru ("pomocného vektoru"), který může způsobit v hostitelské buňce transkripci nebo translaci sekvence (regulační nebo strukturální), nebo, alternativně, mohou být genové produkty dodány exogenně, t.j. přidáním proteinových produktů do buněk.

Například může být připraven crHIV vektor, který obsahuje všechny proteiny z přirozeného HIV, kromě - například - Tat kódující sekvence. Místo použití pomocného expresního konstruktu exprimujícího Tat může být Tat protein sám použit jako pomocná složka. Výhodou použití proteinu místo pomocného konstruktu je to, že neexistuje teoretická možnost generování přirozeného viru, protože nejsou přítomné žádné sekvence nukleové kyseliny vhodné pro rekombinaci. Tak může být crHIV propagován za použití Tat proteinu místo pomocného nukleokyselinového konstruktu. Tat1 nebo Tat2 (odpovídající prvnímu nebo prvnímu a druhému exonu tat, v příslušném pořadí), mohou být použity jako pomocné složky. Způsoby pro produkci a přečištění takových proteinů jsou dobře známy v oboru.

V jednom výhodném provedení je použit chimérický tat protein. Tat se připravil ve formě fúzního proteinu (např.

Tat-VP16) a zachoval si svou transaktivací aktivitu HIV-LTR promotoru. Jiné chimérické Tat proteiny mohou být generovány za účelem zvýšení požadovaného biologického účinku.

Například, pokud je požadovaným biologickým účinkem zesílení imunitní reakce, tak může být připraven Tat-GM-CSF fúzní protein. Tento přístup není omezen na jeden typ chimérických proteinů a může být vhodný pro přidání alespoň dalšího chimérického (nebo nechimérického) Tat proteinu (např. Tat-IFN-alfa, Tat-TNF-alfa, Tat-IL4, Tat-G-CSF, TNF-alfa, GM-CSF, IL-4, G-CSF, IFN-alfa). Odborníkům bude jasné, jak konstruovat a testovat další ekvivalentní chimérické proteiny a jak je vyšetřovat na jejich schopnost zesilovat imunitní reakci a zároveň poskytovat pomocnou funkci pro vektor. Jiným výhodným provedením je Tat-Rev fúzní protein, nebo nativní HIV Tat-Rev fúzní protein, například Trev. Proto není výše uvedený popis chimérických Tat proteinů omezen na použití pouze cytokinů nebo buněčných proteinů, ale pro dosažení biologického efektu mohou být použity také virové proteiny (produkující homologní nebo heterologní virové fúzní proteiny).

Expres "pomocného vektoru" může být specifická pro buňky nebo nespecifická pro buňky a tento vektor může být vložen do hostitelské buňky současně s podmíněně se replikujícím virovým vektorem, jak je zde definován, a může umožnit kontinuální replikaci podmíněně se replikujícího virového vektoru.

"Pomocné vektory" podle předkládaného vynálezu může dodávat genové produkty nezbytné pro replikaci, buď ve formě jediného vektoru, nebo jako více vektorů. Takové vektory jsou výhodně použity v systému dočasné transfekce. Alternativně mohou být genové produkty také integrovány do genomu hostitelské buňky nebo buněčné linie. V předkládaném

vynálezu je výhodné použití jediného vektoru nebo plasmidu (který může být v hostitelské buňce mono-, bi- nebo multicistronový) z důvodu zvýšených titrů vektoru vznikajících v důsledku zvýšené pravděpodobnosti ko-transfekce pomocného vektoru a podmíněně se replikujícího vektoru do stejné buňky. Redukovaná pravděpodobnost simultánní transfekce více než dvou různých vektorů do stejné buňky vede k přednostnímu použití jediného pomocného vektoru. Nižší počet vektorů nebo plasmidů použitých v transfekčním systému je také levnější, protože musí být vyrobeno méně plasmidů, ve srovnání s běžným tří-plasmidovým transfekčním systémem používaným pro balení retrovirových konstruktů.

Termín „komplementace“, jak je zde použit, označuje non-genetickou interakci virových genových produktů z různých zdrojů v buňce. Konkrétně, při smíšené infekci komplementace označuje zvýšení výtěžku viru jednoho nebo obou původních genomů, za zachování původních genomů beze změny. Komplementace může být nealelická (tj. intergenní, kdy si mutanty defektní v různých funkcích napomáhají při virové replikaci tím, že si dodávají funkce, které jsou defektní v druhém viru), nebo alelická (tj. intragenní, kdy mají dva původní viry defekty v různých doménách multimerního proteinu).

Typy buněk, které mohou být transfektovány (transdukovány) crHIV DNA (například pomocí liposomů nebo za použití heterologního vektoru pro přípravu chimérického vektoru, jak je popsáno výše), mohou být HIV-infikované nebo neinfikované buňky. Buňky infikované HIV mohou být aktivované nebo neaktivované. Pokud jsou aktivované, tak budou okamžitě exprimovat přirozenou HIV RNA a crHIV RNA, což povede k selektivnímu balení crHIV RNA do virionů. Pokud nejsou buňky infikované HIV aktivované, tak v nich bude

zůstávat crHIV DNA do té doby, než se stanou aktivovanými (například stimulací mitogeny, antigeny a podobně), což znovu povede k selektivnímu balení crHIV RNA do virionů. Jak aktivované, tak neaktivované infikované buňky, které jsou transfektovány crHIV DNA, nebudou produkovat viriony do té doby, než budou superinfikovány přirozeným HIV a aktivovány stimulací, což opět povede k selektivnímu balení crHIV RNA do virionů.

Jedním provedením hostitelské buňky transdukované vektorem podle předkládaného vynálezu je provedení, ve kterém buňka obsahuje maximální počet kopií vektoru, které není toxické pro hostitelskou buňku ani pro organismus obsahující takové buňky. Jiným provedením hostitelské buňky transdukované vektorem podle předkládaného vynálezu je provedení, ve kterém buňka obsahuje alespoň jednu kopii vektoru, ale výhodně obsahuje minimální počet kopií vektoru nutný pro generování biologického efektu. Počet kopií v buňce může být určen, například, TaqMan PCR, a přijatelný počet kopií nebo rozmezí počtu kopií, vhodný pro dosažení požadovaného biologického efektu, a bez toxicity, může být snadno určen odborníkem v oboru. Přijatelný počet kopií se liší v závislosti na faktorech, jako je typ transdukované buňky, charakter vektoru (například zda je virového původu) a požadovaný biologický účinek, ale přesto může být určen odborníkem v oboru za použití běžných skrínigových technik.

Superinfekce buněk obsahujících crHIV genomy (např. v důsledku transfekce nebo infekce) se vyskytuje proto, že crHIV genomy nekódují virové proteiny, které by blokovaly superinfekci (jako je env a net). Vzniklé crHIV viriony mohou infikovat neinfikované buňky, protože virové částice obsahují molekulu reverzní transkriptasy, kterou obsahují všechny HIV částice, aby mohly vytvořit DNA provirus ze své

genomové RNA. Tento proces se nazývá reverzní transkripce. Jakmile crHIV viriony infikují neinfikované buňky, může proběhnout reverzní transkripce a může dojít k produkci proviru z jejich genomové RNA. Tak jsou tyto buňky ekvivalentní těm neinfikovaným buňkám, které jsou přímo transdukovány crHIV DNA. Nemohou produkovat crHIV částice do té doby, než jsou superinfikovány přirozeným HIV a stanou se aktivovanými, a potom opět dojde k selektivnímu balení crHIV RNA do vzniklých virionů. Je možné, že crHIV částice mohou také infikovat některé buňky, které již jsou infikovány HIV (viz, např., Yunoki et al., Arch. Virol., 116, 143-158 (1991); Winslow et al., Virol., 196, 849-854 (1993); Chen et al., Nuc. Acids Res., 20, 4581-4589 (1992); a Kim et al., AIDS Res. & Hum. Retrovir., 9, 875-882 (1993)). Nicméně, aby toto proběhlo, nesmí tyto buňky infikované HIV exprimovat proteiny, které snižují expresi CD4, protože to by zbaránilo infekci těchto buněk crHIV viriony. Aktivované buňky infikované HIV obecně snižují expresi CD4. Proto, buňky infikované HIV, které nejsou aktivované, jsou potenciálně citlivé na superinfekci crHIV a proto mohou být dalším zdrojem produkce crHIV částic. Výhodný crHIV vektor podle předkládaného vynálezu obsahuje sekvencemi nutné pro RNA transkripci, vazbu tRNA primeru, dimerizaci a balení, a buď neobsahuje sekvence kódující proteiny, které blokují superinfekci přirozeným HIV (například nef nebo env proteiny), nebo obsahuje takové sekvence, které však nejsou transkribované nebo translatované na funkční protein, takže se jejich exprese jeví jako „silentní“. Ještě lépe vektor neobsahuje region nebo sekvence kódující region přirozeného HIV od gag genu po nef gen, včetně. Optimálně však vektor obsahuje rev reaktivní element (RRE), který je klonován do vektoru v regionu delece nebo v jiném běžném regionu. Takový výhodný HIV vektor je vektorem, který „postrádá region nebo sekvenci kódující region“, protože tento vektor může být

podán ve své RNA manifestaci, nebo alternativně ve formě DNA, jak bylo popsáno výše.

V předkládaném vynálezu musí být pro dosažení úspěšné komplementace v systému, který využívá pomocný vektor společně s podmíněně se replikujícím vektorem, jakákoliv virová složka nutná pro balení viru, ale neexprimovaná z podmíněně se replikujícího vektoru, dodána z pomocného vektoru. Protože tedy dva nebo více vektorů obsahuje všechny nezbytné virové složky, je složení jednotlivých vektorů značně variabilní. Každá z možných variant spadá do rozsahu předkládaného vynálezu. Například, gag a pol geny nutné pro úspěšné balení a replikaci mohou být oba obsaženy na pomocném vektoru nebo na podmíněně se replikujícím vektoru, nebo mohou být takové dva geny individuálně přítomny na jediném vektoru. Dále, jediný pomocný vektorový konstrukt může obsahovat gag/pol i env sekvenci, včetně heterologní env sekvence, pod kontrolou jediné sady transkripčních regulačních elementů, včetně promotorů, nebo pod kontrolou samostatných promotorových elementů. Například může být pro expresi genových produktů podle předkládaného vynálezu použit LTR. Použití různých promotorů, včetně indukovatelných promotorů, umožňuje možnost diferencované regulace gag/pol a env sekvence. Tak může být env sekvence, zejména heterologní env sekvence, jako je VSV-G obalová sekvence, exprimována ve vyšší hladině.

Konstrukce vektorů je dobře známá odborníkům v oboru. Tyto techniky mohou být použity pro konstrukci jak podmíněně se replikujícího vektoru, tak pomocného vektoru. Termín „vektor“, jak je zde použit, označuje oba typy vektorů. Dále termín vektor označuje jakýkoliv Lentivirový vektor, který nemusí nutně být podmíněně se replikující vektor. Takové vektory mohou být také označovány jako generické Lentivirové

vektory, Ve výhodných provedeních předkládaného vynálezu je však vektorem podmíněně se replikující Lentivirový vektor. Například, jak je popsáno v příkladu 1, DNA manifestace RNA viru, jako je HIV, je štěpena za použití restrikčních enzymů pro excidování HIV kódujících sekvencí mezi gag kódujícím regionem a U3 regionem, po nef genu. Klonovací kazeta obsahující polylinker obsahující více restrikčních míst se insertuje do regionu delece pře provedením ligace, za zisku běžných restrikčních míst pro klonování do vektoru. DNA fragment obsahující RRE se subklonuje do jednoho z těchto míst. Vzniklý vektor produkuje zkrácený gag transkript a neprodukuje přirozený Gag protein nebo jakýkoliv jiný protein přirozeného HIV. Kromě toho není nutné, aby vektor exprimoval pouze zkrácený gag protein, protože gag translační iniciační sekvence může být mutována tak, aby bylo zabráněno její translaci.

Za použití stejného postupu může být crHIV sekvence navázána na jiné sekvence, jako jsou sekvence jiného viru nebo vektoru, za zisku chimérického vektoru, jak byl popsán výše. Například může být crHIV sekvence ligována do sekvence Sindbis viru, AAV, adenoviru, nebo amfotropního retroviru, aby byly uvedeny nějaké příklady. Mezi další virové sekvence, které mohou být použity, patří sekvence z Herpes, Pox a jiných virů, které jsou zde popsány, včetně jakýchkoliv virů, které mohou být použity pro dodání crHIV sekvencí. Takový chimérický vektor může být vložen do buněk za použití připojeného virového mechanismu pro vstup do buněk (například receptorem-zprostředkovanou endocytosou pro adenovirus), nebo jiných mechanismem, například pomocí liposomů.

Výhodně vektor podle předkládaného vynálezu (t.j. podmíněně se replikující virus, kterým je výhodně crHIV

vektor) obsahuje alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, jejíž obsažení (t.j., přítomnost, transkripce nebo translace) uděluje selektivní výhodu. Existují dva typy takových sekvenci nukleové kyseliny, které mohou být použity ve vektoru: (1) sekvence nukleové kyseliny, jejíž přítomnost optimálně uděluje selektivní výhodu pro virovou replikaci a šíření vektoru obsahujícímu takovou sekvenci ve srovnání s přirozeným kmenem viru (t.j., výhodně, přirozeným kmenem, ze kterého byl vektor odvozen a který neobsahuje takovou sekvenci), a (2) sekvence nukleové kyseliny, jejíž přítomnost optimálně uděluje selektivní výhodu buňkám infikovaným vektorem obsahujícím sekvenci ve srovnání s buňkami neinfikovanými nebo infikovanými přirozeným kmenem viru (t.j., výhodně přirozeným kmenem, ze kterého byl vektor odvozen (a také například pomocným expresním vektorem, který podporuje replikaci viru a/nebo jeho funkci v neinfikovaných hostitelských buňkách), kde tato výhoda je v tom, že je, například, podporováno přežívání buněk, produkce a/nebo propagace vektorových částic, produkce crHIV vektorových virionů z buněk produkujících crHIV vektor, je podporována apoptosa, je usnadněna produkce proteinů nebo jsou podpořeny imunologické funkce nebo specifická imunitních funkcí, takže je dosaženo profylaktického, terapeutického nebo biologického výsledku. Každá z těchto sekvencí, nebo více těchto sekvencí, tj. sekvence, které samostatně nebo v kombinaci s dalšími faktory podporují propagaci vektoru a/nebo podporují určitou funkci hostitele tak, že je dosaženo výhodného profylaktického, terapeutického nebo biologického výsledku, může být obsažena ve vektoru, s nebo bez dalších sekvencí, tj. vektor může obsahovat "alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny" a "alespoň jednu další sekvenci nukleové kyseliny."

Třetím typem sekvence nukleové kyseliny je taková sekvence, která udílí hostitelské buňce fenotyp, který zmírňuje, minimalizuje nebo brání virové infekci. Mezi takové sekvence nukleové kyseliny patří ty sekvence, které kódují genový produkt, který – po exprimování – chrání hostitelské buňky před virovou infekcí. Například, jedinci homozygotní pro $\Delta 32$ alelu CCR5 proteinu byly chráněni před HIV-1 infekcí v důsledku chybění hlavního ko-receptoru pro vstup HIV-1 do buněk exprimujících zkrácený CCR5 protein na povrchu buněk. Studie s heterozygotními jedinci ukázaly, že $\Delta 32$ alela má transdominantní efekt na povrchovou buněčnou expresi přirozeného (wt) CCR5. Toto může být způsobeno schopností $\Delta 32$ alely dimerizovat s wt proteinem a bránit jeho správné expresi na povrchu buněk.

$\Delta 32$ alela obsahuje delecii 32 nukleotidů, která způsobuje posun čtecího rámce vedoucí ke vzniku zkráceného CCR5 proteinu. Protože v důsledku tohoto zkrácení vzniká 31 aminokyselin na C-konci $\Delta 32$ alely, které nejsou přítomny ve wt proteinu a mohou vyvolávat nežádoucí imunitní reakci, pokud jsou prezentovány na povrchu buněk, zahrnuje předkládaný vynález expresi zkráceného CCR5 $\Delta 32$ mutantního proteinu (CCR5 $\Delta 32$ T), který neobsahuje 31 potenciálně antigenních aminokyselin. Tento protein si zachovává schopnost transdominantního efektu v poskytnutí ochrany před HIV infekcí buňkám. Sekvence kódující CCR5 $\Delta 32$ T se snadno připraví vložением stop kodonu bezprostředně za poslední aminokyselinu společnou ve wtCCR5 a CCR5 $\Delta 32$ (po tyrosinu v pozici 184).

V dalším provedení je jiným třetím typem sekvence nukleové kyseliny taková sekvence, která dále dále zesiluje získaný fenotyp zmírněné infekce, minimalizované infekce

nebo zabráněné virové infekce. Taková sekvenční nukleová kyselina může kódovat genetické antivirové činidlo, které je, například, cílené na buněčný gen. Například může vektor exprimovat výše uvedený CCR5 Δ 32T mutantní protein a dále může exprimovat protismyslnou sekvenci nebo ribozym, z U1 promotoru, kde sekvenční je obsažena v U1 snRNA (jak je popsáno v U.S. Patentu 5,814,500), které jsou - například - namířeny proti přirozené CCR5 molekule. Protismyslný region, který je namířený proti přirozenému CCR5, bude degenerován ve vektorové CCR5 Δ 32T sekvenci, aby byla transdominantní mutantní RNA resistantní na účinky anti-CCR5 protismyslné sekvenční nebo ribozymu, ale aby byla translatována do správné aminokyselinové sekvenční za vzniku funkčního CCR5 Δ 32T proteinu.

Výše uvedená metoda současného exprimování ribozymu nebo protismyslné sekvenční cílených na genový produkt a degenerování genu v cílových místech za účelem snížení vazby nebo štěpení ribozymu nebo protismyslné sekvenční není limitována na CCR5 nebo na molekuly, které minimalizují replikaci viru. Dalším příkladem terapeutické aplikace je cílené ovlivnění onkogenního proteinu, jako je Bcr-Abl fúzní protein, který je etiologickým agens chronické myeloidní leukemie. Vektorový konstrukt obsahující Bcr nebo Abl gen, nebo oba, může exprimovat tyto geny současně s expresí protismyslné sekvenční nebo ribozymu, které jsou cíleny na jakékoliv místo v Bcr-Abl transkriptu. Proto bude abnormální Bcr-Abl fúzní transkript zničen, zatímco přirozený Bcr nebo Abl, nebo oba, budou exprimovány pro zmírnění abnormálního defektu. Tak budou mít Bcr nebo Abl geny selektivní výhodu pro amplifikaci vůči přirozenému nebo abnormálnímu Bcr-Abl fúznímu genu. Výhodný vektor bude exprimovat Bcr a/nebo Abl konstrukt ze svých přirozených promotorů, zatímco anti-Bcr-

Abl ribozymy nebo protismyslné sekvence budou xprimovány z U1 promotoru a obsaženy v U1 snRNA sekvenci.

Výše uvedený Bcr-Abl příklad neomezuje vynález v cíleném ovlivnění onkogenů a odborníkům v oboru bude jasné, že tento přístup může být použit pro terapeutickou nebo profylaktickou substituci jakéhokoliv exprimovaného abnormálního genu, nežádoucího genu nebo vybraného žádoucího genu. Cílový gen může být homologní nebo heterologní k modifikovanému genu, který je resistantní na účinky genetické antivirové molekuly. Další onemocnění, která mohou být ovlivněna tímto způsobem, budou jasná odborníkům v oboru. Například molekulární cíle ro léčbu hematologických onemocnění způsobem podle předkládaného vynálezu jsou popsány v "The molekular basis of blood diseases" (Stamatoyamiopoulos, Majerus, Perlmutter & Varmus, 3. vydání, Philadelphia: WB Saunders Co., copyrighted 1987, 1994 a 2001, kde všechna vydání jsou zde uvedena jako odkazy).

Předkládaný vynález není omezen na klinické aplikace. Způsob podle předkládaného vynálezu může být použit pro stanovení funkce vybrané genové sekvence. Například, vybraná genová sekvence modifikovaná v doméně, která byla vybrána, může být simultánně exprimována s protismyslnou sekvencí nebo ribozymem, které inhibují nebo ničí jakoukoliv nemodifikovanou genovou sekvenci tím, že jsou namířeny proti příslušnému nemodifikovanému regionu. Tak může mít vybraná modifikovaná genová sekvence selektivní výhodu pro amplifikovanou expresi ve srovnání s nemodifikovanou genovou sekvencí, což umožní určení funkce modifikované genové sekvence nebo kódovaného genového produktu za použití testů známých v oboru.

"Nukleové kyseliny" byly definovány dříve. "Sekvence nukleové kyseliny" obsahuje jakýkoliv gen nebo kódující sekvenci (t.j., DNA nebo RNA), potenciálně jakékoliv velikosti (t.j. velikosti limitované možnostmi vektoru), jejíž přítomnost udílí selektivní výhodu, jak je zde definována dále. "Gen" je jakákoliv sekvence nukleové kyseliny kódující protein nebo vznikající molekulu mRNA (bez ohledu na to, zda je sekvence transkribována a/nebo translatována). Zatímco gen obsahuje kódující sekvence, stejně jako nekódující sekvence (např. regulační sekvence), "kódující sekvence" neobsahuje žádnou nekódující DNA.

1. Sekvence nukleové kyseliny, jejichž přítomnost udílí v hostitelské buňce selektivní výhodu vektoru obsahujícímu takovou sekvenci vůči přirozenému kmenu viru nebo kompetující genomové sekvenci, které interferují nebo ovlivňují amplifikaci vektoru.

Sekvence nukleové kyseliny, která udílí v hostitelské buňce selektivní výhodu vektoru vůči přirozenému kmenu viru, je výhodně jakákoliv sekvence, která umožňuje, aby byly virové částice propagované z vektoru selektivně produkovány nebo baleny, ve srovnání s virovými částicemi produkoványmi přirozeným virem. Mezi takové sekvence patří, například, sekvence, které vedou ke zvýšení počtu vektorových genomů produkováných intracelulárně ve srovnání s přirozenými genomy, a antivirové sekvence nukleové kyseliny. Mezi takové sekvence také patří sekvence, které vedou ke zvýšení počtu, vlastností nebo charakteristik vektorových genomů produkováných intracelulárně, ve srovnání s přirozenými genomy, které nejsou odvozeny od analogického přirozeného viru.

První kategorií sekvencí nukleové kyseliny, které udílejí v hostitelské buňce selektivní výhodu vektoru obsahujícímu sekvenci ve srovnání s přirozeným kmenem viru jsou sekvence jako je promotor. "Promotor" je sekvence, která řídí vazbu RNA polymerasy a tak podporuje syntézu RNA a může obsahovat jeden nebo více zesilovačů transkripce. "Zesilovače transkripce" jsou cis-působící elementy, které stimulují nebo inhibují transkripci sousedních genů. Zesilovač, který inhibuje transkripci, se také označuje jako "utlumovač". Utlumovač může být "izolační" element, jak se nachází například v místech hypersensitivních na DNAsu v kuřecím erytroidním izolačním elementu. Zesilovače se liší od DNA-vazebných míst pro sekvence-specifické DNA vazebné proteiny vyskytující se pouze v promotorech (které se také označují jako „promotorové elementy“) v tom, že zesilovače mohou fungovat v jakékoliv orientaci a na vzdálenost až několika kilobází (kb), i z pozice za transkribovaným regionem.

Proto, a výhodně, je promotor (např. dlouhá terminální repetitivní sekvence (LTR)) podmíněně se replikujícího HIV vektoru modifikován tak, že vektor je více reaktivní na některé cytokiny než přirozený HIV kmen. Například je dostupný modifikovaný HIV promotor, který má zvýšenou transkripční aktivitu za přítomnosti interleukinu-2. Inkorporace tohoto promotoru do vektoru a vložení vektoru do přirozených buněk infikovaných HIV vede ke zvýšené produkci a balení virionů z vektorového genomu ve srovnání s přirozeným HIV genomem. Další cytokiny a/nebo chemokiny (např. interferon-alfa, tumor nekrosis faktor-alfa, RANTES, a podobně) mohou být použity podobným způsobem pro navození selektivního balení virionů kódovaných vektorem. Umístění takových elementů, které udílejí reaktivitu HIV-LTR na cytokiny, žádným způsobem neomezuje rozsah předkládaného vynálezu na taková provedení. Jakákoliv nukleotidová

sekvence může být insertována do HIV-LTR pro modifikaci reaktivity tohoto promotoru. Seznam faktorů, které se váží na místa v DNA a které mohou být použity pro inserci do HIV-LTR, je uveden v

<http://transfac.gbf.de/TRAINSFAC/lists/browse.html>,
zpřístupněné 8.9.2000, která je zde uvedena jako odkaz ve své úplnosti. Seznam DNA vazebných faktorů pro Homo sapiens (<http://transfac.gbf.de/TRANSFAC/lists/faktor/species/human/Homosapiens.html>), zpřístupněný 8.9.2000, je zde také uveden jako odkaz.

Obdobně, utlumovače transkripce nebo izolátory mohou být také insertovány do promotorových nebo zesilovačových regionů přirozeného nebo modifikovaného retrovirového LTR, jako je HIV-LTR, tak, aby jemně regulovaly expresi z tohoto promotoru. V některých případech může inserce elementů do do HIV-LTR vektoru udělit vektoru selektivní nevýhodu z hlediska infekce přirozeným virem. Nicméně, aplikace tohoto typu vektorů nesmí kompetovat s přirozeným virem o balení do virionů, ale musí exprimovat vybranou sekvenci nukleové kyseliny (nebo „vložený gen“), který, například, inhibuje replikaci HIV bez kompetice. V tomto případě první sekvence nukleové kyseliny neudílí vektoru selektivní výhodu, ale musí alespoň inhibovat rekombinaci mezi vektorem a pomocnou sekvencí během procesu produkce vektoru.

Druhou kategorií sekvencí nukleové kyseliny, které udílejí selektivní výhodu vektoru obsahujícímu sekvence, ve srovnání s přirozeným kmenem viru, jsou antivirové sekvence nukleové kyseliny. „Antivirová činidla“ jsou dělena podle způsobu účinku, např. na inhibitory reversní transkriptasy, kompetitory vstupu viru do buněk, vakcíny, inhibitory proteasy a genetická antivirová činidla. „Genetická antivirová činidla“ jsou DNA nebo RNA molekuly, které jsou

přenášeny do buněk a a ovlivňují intracelulární cíle buď přímo (t.j. tak, jak jsou vloženy do buněk), nebo po konverzi na RNA nebo protein (přehled je uveden v Dropulic et al. (1994), výše). Genetické antivirové sekvence jsou také výhodnými sekvencemi nukleové kyseliny. Mezi genetická antivirová činidla patří, například, protismyslná molekuly, RNA návnady, transdominantní mutanty, toxiny, modifikátory a modulátory sestřihu DNA, EGS (samostatně nebo v přímé asociaci s M1, U1, PRE nebo CTE elementy), imunogeny, RNAi (viz Zamore et al. Cell 101:25-33, 2000), nukleotidové sekvence nebo molekuly, které modifikují nebo modulují sestřih, konstitutivní transportní elementy (CTE), faktory ovlivňující jaderný export a import, DNA integrační faktory, RNA stabilizační nebo destabilizační elementy, post-transkripční regulační elementy (PRE), proteiny, které interferují s replikací viru, interferony, toxiny, imunogeny (definované jakýmkoliv genem, který je imunologicky relevantní), protilátky (celé protilátky, jednořetězcové protilátky nebo molekuly zobrazující ligand), ribozymy, nebo jakékoliv elementy, které ovlivňují jakýkoliv aspekt replikace vektoru nebo přirozeného viru, a ribozymy. Výhodně je genetickým antivirovým činidlem protismyslná molekula, transdominantní mutant, imunogen a ribozym. Proto je výhodnou sekvencí nukleové kyseliny, která udílí selektivní výhodu vektoru nad přirozeným kmenem viru, sekvence genetického antivirového činidla vybraná ze skupiny zahrnující protismyslné molekuly, imunogen a ribozym.

Genetické antivirové činidlo, jak je použito v předkládaném vynálezu, je omezeno pouze na cílené ovlivnění virové sekvence, zejména tehdy, když není umístěno v podmíněně se replikujícím virovém vektoru. Například může být genetická antivirová sekvence umístěna v lentivirovém vektoru, takže je činidlo namířeno proti virovému nebo

nevirovému cíli, například, buněčnému, bakteriálnímu nebo parazitárnímu cíli. V tomto případě lentivirový vektor obsahuje vybraný gen operativně navázaný na nemodifikovaný nebo modifikovaný HIV-LTR (pro exprese nesestřižené nebo sestřižené RNA) a dále obsahuje genetické antivirové činidlo nebo sekvenci, která je navázána na promotorovou sekvenci, která není operativně navázaná na HIV-LTR. Výhodnou sekvencí je protismyslná sekvence nebo ribozym, který je chimérický s snRNA, výhodně U1, U2, U3, U4, U5 nebo U6 snRNA.

Genetické antivirové činidlo není také omezeno na jedinou sekvenci nebo jediný typ sekvence, který je umístěn ve vektorové nebo pomocné sekvenci. Ve vektorovém nebo pomocném konstruktu může být umístěno simultánně dvě nebo více činidel, buď v určité vzdálenosti od sebe, nebo lépe v tandemu. Výhodně jsou tato dvě nebo více různých genetických antivirových činidel umístěna v tandemu. Další provedení genetických antivirových činidel pro použití v předkládaném vynálezu jsou jakákoliv provedení, která váží dohromady dva různé typy genetických antivirových činidel.

"Protismyslná molekula" je molekula, která je zrcadlovým obrazem (podle pravidel párování bazí) krátkého segmentu genu, jehož exprese má být blokována. Protismyslná molekula namířená proti HIV hybridizuje na RNA přirozeného HIV a umožňuje její přednostní degradaci buněčnými nukleasami. Protismyslné molekuly jsou výhodně DNA oligonukleotidy mající délku přibližně 20 až přibližně 200 párů bazí, výhodně přibližně 20 až přibližně 50 párů bazí, a - optimálně - méně než 25 párů bazí. Z crHIV RNA může být exprimována protismyslná molekula, která se přednostně váže na genomovou přirozenou RNA, čímž se dodá crHIV RNA selektivní výhoda pro balení do virionů.

Protismyslné molekuly exprimované ve vektorech jako RNA mají velikost výhodně alespoň 20 bazí, výhodněji do 2000 bazí, nejvýhodněji přibližně 50 až 500 bazí. Takové protismyslné molekuly se výhodně váží na genomovou přirozenou RNA a ne na vektorovou RNA, což poskytuje vektor selektivní výhodu nad přirozeným virem. Výhodným regionem pro generování protismyslné molekuly ve vektoru odvozeném od HIV je například obalový region (env), regiony Tat nebo Rev proteinu, regiony pomocných genů (Vif, Nef, Vpr, Vpu), regiony Gag, které jsou 3' k NsiI restričnímu místu na pNL4-3, a regiony Pol, které neobsahují region 545 bazí v Pol, jak bylo uvedeno výše.

„Imunogen“ je jakýkoliv imunologicky relevantní gen a jím kódovaný genový produkt. Ačkoliv historicky byl termín „imunogen“ používán pro označování adjuvans při vakcinaci, jsou zde termíny „imuno-“ a „-gen“ používány pro označení imunologicky relevantního genu a jím kódovaného genového produktu. Například může imunogen kódovat jednořetězcovou protilátku (scAb) namířenou proti strukturálnímu proteinu viru, nebo může kódovat protilátku, která je secernována buňkou extracelulárně. Imunogen je přenesen ve formě nukleové kyseliny a je exprimován intracelulárně. Imunogen může také kódovat jakýkoliv antigen, povrchový protein (včetně těch, které jsou restrihovány na určitou třídu) nebo zobrazovací protilátku, která usnadňuje selekci vektoru a/nebo hostitelské buňky. Ve výhodném vektoru sekvence nukleové kyseliny obsahuje scAb kódující sekvenci, která se váže na Rev protein. Toto výhodně brání maturaci Rev proteinu, což vede k jeho zachycení v endoplasmatickém retikulu. Konkrétně, Rev proteiny, samostatně nebo v kombinaci s jinými buněčnými faktory, exportují nesestřiženou a jednou sestřiženou HIV RNA z jádra do cytoplasmy tím, že se váží na RRE (vysoce strukturovanou

cis-působící RNA cílovou sekvencí pro Rev, označovanou jako Rev reaktivní element) a oligomerizují ji na ohraničenou HIV RNA. HIV RNA, které jsou v komplexu s Rev, jsou exportovány do cytoplasmy a obcházejí tak mechanismy sestřihu. Proto, pokud se přirozený Rev nenaváže na přirozený RRE, tak není přirozená HIV RNA exportována do cytoplasmy a není enkapsiodována do virionů.

Optimálně vektor obsahující scAb sekvenci nukleové kyseliny dále obsahuje modifikovanou RRE sekvenci, a kóduje mutovaný Rev protein, který rozpoznává modifikovaný, ale ne přirozený RRE. V souladu s tím v buňkách obsahujících přirozený HIV a vektor obsahující scAb sekvenci nukleové kyseliny je vektor výhodně balen do virionů. Podobná strategie je výhodně použita tehdy, když jsou proteiny matrix nebo nukleokapsidy přirozeného HIV (nebo jakéhokoliv proteinu podílejícího se na interakcích protein/HIV, které ovlivňují enkapsidaci virové RNA), cíly pro scAb.

"Ribozym" je protismyslná molekule s katalytickou aktivitou, která se místo vazby na RNA a inhibice translace váže na RNA a provádí ve specifickém místě štěpení navázané RNA molekuly. Obecně existují čtyři skupiny ribozymů: skupina I Tetrahymena intervenujících sekvencí, EGS (externí vodící sekvence), a kladívkové nebo vlásenkové ribozymy. Nicméně, v jiných RNA molekulách, např., viru hepatitidy delta a ribosomální RNA v mykotických mitochondriích také existují další katalytické motivy.

Výhodným ribozymem je ribozym, ve kterém katalytická doména štěpí 3'-nukleotidovou NUH sekvenci, kde N může být jakýkoliv nukleotid (t.j., G, A, U nebo C), a H může být A, C nebo U. Nicméně, protože je sekvencí, která je nejlépe

štěpena takovými ribozymy GUC místo, tak NUH sekvence výhodně obsahuje GUC místo.

Výhodné je, aby takový ribozym štěpil region přirozeného kmenu viru nebo jeho transkriptu, ale aby neštěpil region ve vektoru nebo jeho transkriptu. Ribozym štěpí virus nebo jeho transkripty tak, že mohou být RNA nebo DNA, jak bylo popsáno výše. Štěpením „v regionu“ se rozumí štěpení v cílové regionu, t.j., výhodně regionu viru, který je nutný pro propagaci viru. Výhodně je vektor modifikován tak, že tento cíleně ovlivňovaný region (tj. pokud je vůbec přítomný ve vektoru) není štěpen ribozymem. Volitelně může ribozym štěpit vektor, pokud štěpení neprobíhá v regionu nutném pro propagaci viru, např. crHIV částic.

Optimálně je ribozym kódovaný sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO:3: (t.j., CACACAACACTGATGAGGCCG-AAAGGCCGAAACGGGCACA) a SEQ ID NO:4 (t.j., ATCTCTAGTC-TGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACCAGAGTC). SEQ ID NO:3 obsahuje ribozym, který je cílený na +115 místo (t.j., v počtu bazí od začátku transkripce) přirozeného HIV U5 regionu, SEQ ID NO:4 obsahuje ribozym, který je cílený na +133 místo U5 regionu přirozeného HIV.

Takový ribozym je schopen štěpit přirozený HIV genom (nebo jeho transkripty), ale ne vektorový genom (nebo jeho transkripty), protože vektorová U5 sekvence je modifikovaná in vitro místně cílenou mutagenesí, jak je známá v oboru a jak je popsána v příkladu 1. Konkrétně jsou vektorové sekvence výhodně modifikovány tak, že vektor obsahuje sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO:2 (t.j., GTGTGCCCACCTGTTGTGTGACTCTGGCAGCTAGAGAAC), SEQ ID NO:5, (t.j., GTGTGCCCCGCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATC), SEQ ID NO:6 (t.j., GTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGCAACTAGAGATC), SEQ ID

NO:14, kde je alespoň jeden N mutovaný, SEQ ID NO:15 a SEQ ID NO:16. Ve formě RNA vektor výhodně obsahuje sekvenci kódovanou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:14, kde je alespoň jeden N mutovaný, SEQ ID NO:15 a SEQ ID NO:16. Naopak, přirozený HIV obsahuje U5 sekvenci kódovanou sekvencí SEQ ID NO: 1 (t.j., GTGTGCCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATC). Modifikace in toto a srovnání s přirozenou U5 sekvencí (ve formě DNA) jsou uvedeny na obr. 2.

Dále mohou být použity jiné ribozymy cílené na jiné regiony viru , konkrétně HIV genomu, samostatně nebo v kombinaci. Například může ribozym štěpit jiné RNA sekvence nutné pro virovou replikaci, např., v reversní transkriptase, protease nebo transaktivátorovém proteinu, v Rev, nebo jiné nutné sekvence, jak byly popsány výše. Výhodně vektor obsahuje více ribozymů, např. cílených na více míst. V takovém případě jsou analogické sekvence ve vektoru modifikované místně cílenou mutagenesí nebo nějakými jinými prostředky známými v oboru, za zisku vektoru, který je resistantní na takové štěpení ribozymy.

Když je vektorem virus lidské imunodeficience, tak s výhodou vektor neobsahuje gen a jeho 5' sestřihové místo, a místo toho obsahuje trojitou anti-Tat ribozymovou kazetu, kde katalytická doména každého ribozymu trojitě ribozymové kazety štěpí jiné místo na molekule nukleové kyseliny přirozeného viru lidské imunodeficience, konkrétně jiné místo v tat. Výhodně katalytická doména každého ribozymu štěpí nukleotidovou sekvenci v regionu molekuly nukleové kyseliny přirozeného viru lidské imunodeficience, pro které neexistuje analogické místo ve vektoru sensitivní na ribozym.

Dalším provedením ribozymů jako genetických antivirových činidel jsou ribozymy, které nezaměřují sekvence pouze pomocí Watson-Crickova párování bazí, ale také pomocí G-U "wobble" párování bazí. Pokusy ukázaly, že G-U "wobble" ve dvouřetězcové RNA má podobná pravidla jako Watson-Crickovo párování bazí. Za daného vysokého stupně mutací v HIV, i ve vysoce konzervovaných regionech, díky kterému vznikají jiné kmeny HIV, zvyšuje možnost vývoje ribozymu, který je namířený proti více kmenům, dramaticky výhody předkládaného vynálezu. Například, vysoce konzervovaný cílový region v tat genu, který může být použit jako cílová sekvence pro ribozymy podle předkládaného vynálezu, obsahuje "G" nebo "A" ve 40 dobře známých kmenech HIV-1. Tak může být ribozym namířený proti tomuto regionu navržen tak, aby obsahoval "U" místo "C" ve vhodné cílové sekvenci, což umožní párování s "G" nebo "A" zbytkem. Toto může být porovnáno s použitím "C" v cílené sekvenci, což omezí schopnost ribozymu cíleně ovlivnit kmeny HIV-1 mající "A" v příslušné pozici. Tento přístup využívající "U" kdekoli, kde v cílové pozici pro ribozym existuje variace G,A, významně zvyšuje použitelnost ribozymů podle předkládaného vynálezu.

Dalším provedením pro provádění předkládaného vynálezu je použití ribozymové kazety (která obsahuje více než jeden ribozym, které jsou navázány v tandemu) degenerované tak, že není přímo opakována ve vektoru. Přítomnost degenerovaných sekvencí brání delecí opakovaných sekvencí, jak je pozorována v retrovirových vektorech a v jiných nukleových kyselinách. Proto může být ribozymová kazeta složená z tandemově uspořádaných přímo se opakujících sekvencí deletována během více cyklů replikace. Degenerované ribozymové sekvence mohou být použity pro překonání tohoto problému, protože sekvence v katalytické doméně kladívkového ribozymu mohou být substituovány jinými nukleotidy, podle

"wobble" párování bazí, bez významnější ztráty aktivity. Mutagenese kladívkových ribozymů byla již provedena dříve a mohou být určena místa, která mohou být degenerována (Ruffner DE, Stormo GD, Uhlenbeck OC. Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. Biochemistry. 1990 Nov 27;29(47):10695-702). Jiným způsobem pro snížení pravděpodobnosti delecí je nasměrování jednotlivých ribozymů kazety na jiná místa cílové RNA. V takovém případě nebude kazeta obsahovat přímo se opakující sekvence.

"Transdominantní" nebo "dominantně negativní" sekvence nukleové kyseliny udílí jí kódovaný fenotyp i za přítomnosti přirozené sekvence. Popis zkráceného CCR5 proteinu (výše) je jedním příkladem. Dalšími příklady jsou jakékoliv mutantní retrovirové nebo lentivirové sekvence, které udílejí transdominantní fenotyp. Příklady jsou rev a gag geny.

Jedním příkladem poskytujícím selektivní výhodu, stejně jako inhibici infekčního přirozeného viru, je transdominantní gag sekvence, u které bylo prokázáno, že inhibuje replikaci HIV-1, pravděpodobně tím, že interferuje se setavováním kapsidy. Taková sekvence se výhodně použije v kombinaci s retrovirovým vektorem, který není na bázi HIV-1, aby byla umožněna její replikace a balení bez inhibice transdominantní sekvencí. Například, retrovirový vektor obsahující HIV-2 gag a pol geny může obsahovat transdominantní HIV-1 gag sekvenci. Takový vektor může být replikován a balen prostřednictvím komplementace s vhodným HIV-2 pomocným vektorovým konstruktem. Po umístění v buňce, která je infikovaná HIV-1 je transdominantní gag sekvence dostupná pro expresi při infekci HIV-1, kdy blokuje mobilizaci HIV-1 viru. Retrovirové vektory kódované HIV-2 gag a pol geny jsou však stále k dispozici pro enkapsidaci a mobilizaci vektoru.

2. Sekvence nukleové kyseliny, jejichž přítomnost udílí selektivní výhodu buňkám infikovaným nebo neinfikovaným vektorem obsahujícím sekvenci ve srovnání s buňkami infikovanými přirozeným kmenem viru.

Sekvencí nukleové kyseliny, která udílí selektivní výhodu buňce obsahující vektor obsahující sekvenci nad buňkou obsahující, nebo neobsahující, přirozený kmen viru (t.j. neobsahující sekvenci), je výhodně jakákoliv sekvence, která umožňuje buňce obsahující vektor přežít a propagovat virové částice (t.j., crHIV virové částice) ve srovnání s buňkou obsahující přirozený virus, nebo s buňkou neobsahující sekvenci nukleové kyseliny. Mezi takové sekvence patří, například, jakákoliv sekvence, která umožňuje buňce, nebo vektor obsaženému v buňce, uniknout destrukci, sekvence, která podporuje přežívání buňky, sekvence, která indukuje apoptosu, sekvence, která usnadňuje produkci proteinů nebo sekvence, která podporuje imunitní funkce nebo cílené zaměření.

Například, výhodně taková sekvence nukleové kyseliny obsažená ve vektoru kóduje geny pro mnohotnou lékovou resistenci (viz., např., Ueda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun., 141, 956-962 (1986); Ueda et al., J. Biol. Chem., 262, 505-508 (1987); a Ueda et al., PNAS, 84, 3004-3008 (1987)). V přítomnosti přidáných cytotoxických léčiv (například léčiv používaných v protinádorové chemoterapii) může buňka obsahující vektor přežít, zatímco buňka obsahující přirozený virus, jako je HIV, nikoliv. Mezi takové cytotoxické léky patří, například, aktinomycin D, vinblastin-sulfát, vinkristin-sulfát, BCNU (s nebo bez BG úpravy), daunomycin, adriamycin, VP-16 a AMSA.

Jiným příkladem takové sekvence nukleové kyseliny je jakákoliv varianta sekvence O⁶-methylguanin-DNA-methyltransferasy (MGMT). MGMT může být použita pro chránění hematopoetických progenitorů před toxicitou alkylačních léčiv. Přírozená MGMT je inhibována O⁶-benzylguaninem (BG), který potencuje toxicitu alkylačních činidel. MGMT varianty, které jsou resistantní na inaktivaci BG a schopné chránit před alkylačními činidly, mohou být poskytnuty jakýmkoliv typem buněk podle předkládaného vynálezu. Příkladem takové varianty je G156A MGMT.

Například, hematopoetické progenitorové buňky transdukované takovými variantami podle předkládaného vynálezu mohou být selektovány po podání BG a O⁶-guanin-methylujícího nebo chlorethylujícího činidla. Příklady takových methylačních činidel jsou pro použití v předkládaném vynálezu jsou například temozolomid, nitrosomočoviny, tetraziny, triaziny, dakarbazin, temozolomid, streptozotocin, prokarbazin. Příklady takových chlorethylačních činidel jsou, například, BCNU (1,3-bis(2-chlorethyl)-1-nitrosomočovina), CCNU (3-cyklohexyl-1-chlorethyl-nitrosomočovina), ACNU (1-(4-amino-2-methyl-5-pyrimidinyl)methyl-3-(2-chlor)-3-nitrosomočovina a MeCCNU (1-(2-chlorethyl)-3-(4-methylcyklohexyl)-1-nitrosomočovina. Výhodně je alkylačním činidlem BCNU.

Bylo prokázáno, že BCNU způsobuje permanentní, kovalentní meziřetězcové zesítnění DNA, jak v klidových, tak v dělicích se buňkách. Tyto léze jsou cytotoxické pro buňky během replikace DNA. MGMT je primárním mechanismem reparace BCNU lézí v DNA. V důsledku toxicity BCNU pro klidové buňky umožňuje selekce s MGMT variantami dodanými lentivirovými vektory podle předkládaného vynálezu také selekci totipotentních hematopoetických kmenových buněk v G₀ fázi

buněčného cyklu, který je však intermitentní, za účelem produkce více kmenových buněk a krevních progenitorových buněk. Kmenové buňky jsou obvykle resistantní na retrovirovou transdukcí, ale mohou být transdukovány retrovirovými vektory, pokud nejsou pouze v G₀ fázi buněčného cyklu. Stejně jako onko-retroviry mohou být lentivirové vektory podle předkládaného vynálezu použity pro transdukcí hematopoetických kmenových buněk, včetně testovatelných hematopoetických ELTC-IC a NOD-SCID nebo SCID-hu repopulujících buněk. Nicméně, oproti onko-retrovirům jsou podmínky z hlediska cytokinů nutné pro transdukcí kmenových buněk bez jejich diferenciací výhodnější pro lentivirové vektory, protože lentiviry (například HIV) mohou infikovat buňky, které se aktivně nedělí v době infekce. HSC selekce není možná při použití jiných strategií, které selektují cyklující hematopoetické progenitory. Tak může selekce zprostředkovaná MGMT variantami a lentivirovými vektory podle předkládaného vynálezu zvýšit přítomnost transdukovaných totipotentních HSC bez potřeby dlouhodobého podávání léčiv pro selekci.

Výše uvedený popis může být aplikován na hematopoetické buňky in vitro a ex vivo, stejně jako in vivo. Kromě transdukce buněk in vivo variantami MGMT mohou být hematopoetické buňky transdukovány ex vivo, po ošetření lékem ex vivo nebo in vivo. Takové buňky ošetřené ex vivo mohou být infusí podány jedinci, volitelně během repopulování kostní dřeně transdukovanými buňkami.

Před uskutečněním výše uvedeného postupu může být alkylační léčivo BCNU použito pro redukování CD4⁺ buněk infikovaných HIV u HIV-pozitivních jedinců. Jak bylo uvedeno výše, vytváří BCNU (po depleci endogenní MGMT) cytotoxické léze v klidových a proliferujících buňkách. Takové léze se

vytvářejí i bez významnější deplece MGMT, pokud dávka léku překoná koncentraci funkčního AGT proteinu. Opakované systémové podání BCNU způsobuje kumulativní myelosupresi a pancytopenii. Z lymfoidních buněk se CD4+ lymfocyty zdají být značně sensitivní na BCNU. Proto u jedinců infikovaných retroviry, jako jsou pacienti infikovaní HIV, vede podávání BCNU, včetně podávání nízkých dávek pro zabránění myelosupresi, snižuje celkovou populaci CD4+ lymfocytů a tím redukuje virovou nálož. Po této léčbě může následovat infuse hematopoetických progenitorů, jak byla popsána výše.

Protože může BCNU účinkovat "utajeným" způsobem, kdy vytváří cytotoxické léze v klidových buňkách, má tento postup další výhodu v tom, redukuje potřebu opakované léčby. Je samozřejmé, že tento postup může být kombinován s použitím BG pro potenciaci účinků BCNU. Alternativně může být tento postup použit v kombinaci se zavedením variant MGMT pomocí vektorů podle předkládaného vynálezu pro dodání ochrany pro transdukované CD4+ buňky. Tento poslední uvedený způsob může být nezávislý nebo může být provede společně s ošetřením hematopoetických buněk, jak bylo popsáno výše. Tak je výhodným provedením předkládaného vynálezu exprimování mutantního MGMT (druhé sekvence nukleové kyseliny) ve vektoru, který obsahuje anti-HIV protismyslnou sekvenci nebo ribozym (první sekvenci nukleové kyseliny) tak, že vektor poskytuje jak selektivní výhodu vůči buňkám infikovaným přirozeným HIV, tak selektivní výhodu vůči přirozenému HIV viru, v příslušném pořadí. Dalším výhodným provedením je provedení, ve kterém vektor exprimuje MGMT gen (nebo druhou sekvenci nukleové kyseliny) mimo HIV-LTR promotor, jako sestřiženou mRNA.

Konečně, ačkoliv vektory exprimují anti-HIV ribozymy nebo protismyslné sekvence, není vynález takto omezen, protože

odborník v oboru snadno insertuje jakoukoliv inhibiční nukleotidovou sekvenci do vektoru, pro dosažení konkrétního terapeutického, profylaktického nebo biologického efektu. Výhodnou metodou pro expresi inhibiční sekvence je použití této sekvence v U1 snRNA/promotorové kazetě, jak je popsáno v Dietz (USP 5,814,500).

Alternativně taková sekvence nukleové kyseliny obsahuje sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující sekvenci (nebo sekvenci, která kóduje) mutovanou (t.j., mutantní) proteasu, a sekvenci (nebo sekvenci, která kóduje) mutovanou (t.j., mutantní) reversní transkriptasu. Výhodně je mutovaná reversní transkriptasa upravena tak, aby byla resistantní na inhibitory reverzní transkriptasy, a mutovaná proteasa je upravena tak, aby byla resistantní na běžně používané inhibitory proteasy.

Podávání těchto inhibitorů proteasy nebo reversní transkriptasy hostitely společně s vektorem je použito pro selekci buněk produkujících vektor mezi buňkami produkujícími přirozený virus. Tento postup může být také modifikován pro použití s jakýmkoliv lékem, který inhibuje replikaci viru, kdy virus může být mutován tak, aby byl resistantní na inhibici. V souladu s tím při léčbě HIV selektivní sekvence nukleové kyseliny inkorporovaná do vektoru výhodně obsahuje mutovanou HIV sekvenci. Optimálně však tyto sekvence nebrání superinfekci přirozeným HIV.

Výhodně je vektorem jeden z vektorů uvedených výše, konkrétně vylepšený podmíněně se replikující vektor uvedený na obr. 1A-1K. Je samozřejmé, že při provádění způsobů podle předkládaného vynálezu může být GFP kódující sekvence deletována nebo nahrazena jinou sekvencí. GFP kódující sekvence jsou v těchto příkladných vektorech přítomny jako

marker nebo indikátor přítomnosti vektoru nebo genové exprese z vektoru.

Výhodné vektory podle předkládaného vynálezu mohou obsahovat různé prvky popsané v předkládaném vynálezu. Konkrétně, lentivirové vektory mohou postrádat tat gen a mohou obsahovat alespoň jednu protismyslnou sekvenci. Dále mohou vektory obsahovat sekvenci, jako je centrální polypyrimidinový úsek HIV nebo větší fragment nukleové kyseliny obsahující tento úsek.

Optimálně je vektor kompatibilní s buňkou, do které je vložen, například může v buče vyvolat expresi vektorem kódované sekvence nukleové kyseliny. Výhodně vektor obsahuje sekvenci rozpoznávající počátek replikace funkční v dané buňce. Když je sekvence nukleové kyseliny přenesena ve formě DNA kódující sekvence (např. místo formy kompletního genu obsahujícího vlastní promotor), tak vektor optimálně také obsahuje promotor, který může řídit expresi kódující sekvence a tento promotor je operativně navázán na kódující sekvenci. Kódující sekvence je "operativně navázaná" na promotor (např. když kódující sekvence a promotor tvoří dohromady přirozený nebo rekombinantní gen), když může promotor řídit transkripci kódující sekvence.

V rekombinantním vektoru podle předkládaného vynálezu jsou výhodně všechny transkripční (např., iniciační a terminační signály), translační (např. místa pro vstup nebo vazbu ribosomu a podobně), zpracovávací signály (např., donorová nebo akceptorová sestřihová místa, pokud jsou nutná, a polyadenylační signály), translokační místa, integrační místa, místa pro vstup ribonukleárního komplexu, stabilizační elementy a translokační elementy, v cis nebo trans formě, správně seřazeny ve vektoru, takže dochází ke

správné transkripci (a/nebo translaci, pokud je to vhodné) jakéhokoli genu nebo kódující sekvence v buňce, do které je vektor zaveden. Ovlivnění takových signálů pro zajištění vhodné exprese v hostitelských buňkách je dobře známé odborníkům v oboru.

Výhodně vektor obsahuje Pol sekvenci, která zvyšuje účinnost stabilní transdukce, a která je definovaná jako integrované kopie vektoru v genomu hostitelské buňky. Pro sekvenci identifikovanou Zennou et al. (Cell 101:173-185 (2000)) jako centrální úsek DNA (fragment velikosti 178 párů bazí od pozice 4793 do 4971 na pLAI3, odpovídá pozicím 4757 až 4935 na pNL4-3) bylo popsáno, že zvyšuje účinnost transdukce, ale v míře nedostatečné pro významnější zvýšení účinnosti stabilní transdukce. Předkládaný vynález zahrnuje objev, že zatímco tento malý fragment není dostatečný pro zvýšení účinnosti stabilní transdukce, větší fragment (545 párů bazí) (pozice 4551 až 5096 v pNL4-3), nebo ještě větší fragmenty obsahující tento fragment, jak jsou popsány v US patentu 5,885,806), jsou zvyšovat stabilní transdukci, což je součástí předkládaného vynálezu. Zvýšení účinnosti stabilní transdukce bylo detekováno pomocí exprese GFP a FACS analýzou, a Taqman analýzou integrovaných kopií vektorového genomu.

Další způsoby pro zvýšení účinnosti transdukce jsou popsány v související U.S. patentové přihlášce pořadové č. (ještě není přiděleno) podané 31.8.2000 jako spis č. 397272000400, která je zde uvedena v plném rozsahu jako odkaz.

Virové vektory použití v předkládaném vynálezu mohou také vznikat v důsledku tvorby "pseudotypu", kdy současná infekce buňky různými viry vede k produkci virionů

obsahujících genom jednoho viru obalený vnější vrstvou obsahující jeden nebo více obalových proteinů druhého viru. Tento fenomén se použil pro balení daných virových vektorů v "pseudotypovém" virionu pomocí současné transfekce nebo současné infekce pomocné buňky oběma danými virovými vektory a genetickým materiálem kódujícím alespoň jeden obalový protein jiného viru nebo molekulu buněčného povrchu. Viz U.S. patent 5,512,421. Takové smíšené viry mohou být neutralizovány anti-sérem proti jednomu nebo více použitých heterologních obalových proteinů. Jedním z virů běžně používaným při tvorbě pseudotypu je virus vesikulární stomatitidy (VSV), který je rhabdovirem. Použití pseudotypování rozšiřuje škálu hostitelských buněk pro virus, neboť jsou použity elementy mechanismu pro vstup viru z heterologního viru. Pseudotypování virových vektorů a VSV pro použití v předkládaném vynálezu vede ke vzniku virových částic obsahujících nukleovou kyselinu virového vektoru enkapsulovanou v nukleokapsidě, která je obklopena membránou obsahující VSV G protein. Nukleokapsida výhodně obsahuje proteiny normálně asociované s virovým vektor. Sousední VSV G protein tvořící části membrány tvoří virové částice poté, co je vyloučen z buňky použité k balení virového vektoru. Příklady balících buněk jsou popsány v U.S. Patentu 5,739,018. Ve výhodném provedení předkládaného vynálezu je virová částice odvozena od HIV a pseudotypována VSV G proteinem. Pseudotypované virové částice obsahující VSV G protein mohou infikovat různé typy buněk s vyšší účinností než amfotropní virové vektory. Mezi možné hostitelské buňky patří savčí i non-savčí buňky, jako jsou lidské, hlodavčí, rybí, hmyzí buňky a buňky obojživelníků.

Výhodně vektor také obsahuje určitý element, podle kterého je vektor nebo obsažená subklonovaná sekvence identifikována a selektována. Identifikace a/nebo selekce se

provede jedním ze způsobů známých v oboru. Například, vektory obsahující určité geny nebo kódující sekvence jsou výhodně identifikovány hybridizací, přítomností nebo absencí funkce takzvaného "markerového" genu kódovaného markerovým genem přítomným na vektoru, a/nebo expesí konkrétní sekvence. V prvním způsobu je přítomnost konkrétní sekvence ve vektoru detekována hybridizací (např. DNA-DNA hybridizací) za použití sond obsahujících sekvence, které jsou homologní k relevantní sekvenci. Ve druhém způsobu je systém rekombinantní vektor/hostitel identifikován a selektován podle přítomnosti nebo absence určité funkce markerového genu, jako je resistance na antibiotika, aktivita thymidin-kinasy a podobně, která je způsobena geny kódujícími tyto funkce přítomnými na vektoru. Ve třetím způsobu jsou vektory identifikované testováním na určitý genový produkt kódovaný vektorem. Takové testy jsou založeny na fyzikálních, imunologických nebo funkčních vlastnostech genového produktu.

V souladu s tím předkládaný vynález také poskytuje vektor, který - pokud jde o DNA vektor, obsahuje nukleotidovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17 a 18, a který - pokud jde o RNA vektor - obsahuje nukleotidovou sekvenci kódovanou nukleotidovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 4, 5, 6, 7.

Předkládaný vynález dále poskytuje způsob pro úpravu vektoru, který je odvozen od přirozeného viru lidské imunodeficiencie a který je schopen replikace pouze v hostitelské buňce, která je permissivní pro replikaci uvedeného vektoru, s ribozymem. Ribozyme, který je obsažený v nebo kódovaný vektorem, štěpí nukleovou kyselinu přirozeného viru lidské imunodeficiencie, ale ne vektor

samotný nebo jeho transkripty. Způsob zahrnuje získání vektoru, který je odvozen od přirozeného viru lidské imunodeficiencie a který je schopen replikace pouze v hostitelské buňce, která je permissivní pro replikaci uvedeného vektoru, a inkorporování sekvence nukleové kyseliny, která obsahuje nebo kóduje ribozym, jehož katalytická doména štěpí nukleovou kyselinu přirozeného viru lidské imunodeficiencie, ale ne vektor samotný nebo jeho transkripty, do vektoru. V takovém způsobu může být nukleotidová sekvence obsahující nebo kódující U5 sekvenci přirozeného viru lidské imunodeficiencie deletována z vektoru a může být nahrazena nukleotidovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 2, 5, 6, 14, ve kterých je alespoň jeden N mutovaný, 15 a 16, když je vektorem DNA, a nukleotidovou sekvencí kódovanou nukleotidovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 2, 5, 6, 14, ve kterých je alespoň jeden N mutovaný, 15 a 16, když je vektorem RNA. Výhodně se vektor replikuje v hostitelské buňce permissivní pro replikaci uvedeného vektoru více než jednou.

Předkládaný vynález také poskytuje způsob pro modifikování vektoru. Způsob zahrnuje získání vektoru a vložení nukleotidové sekvence vybrané ze skupiny zahrnující DNA sekvence SEQ ID NO: 2, 2, 3, 4, 5, 6, 14, ve kterých je alespoň jeden N mutovaný, 15 a 16, pokud je vektorem DNA, a nukleotidová sekvence kódované nukleotidovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 2, 4, 5, 6, 7, 15, 16, 17 a 18, když je vektorem RNA, do vektoru.

Předkládaný vynález také poskytuje způsob pro Propagování a selektivní balení podmíněně se replikujícího vektoru bez použití pomocné buněčné linie. Způsob zahrnuje kontaktování podmíněně se replikujícího vektoru s buňkami

schopnými být infikovány jiným vektorem, který je stejného typu jako podmíněně se replikující vektor a který se liší od podmíněně se replikujícího vektoru tím, že je přirozený z hlediska kompetence pro replikaci; potom kontaktování buněk s dalším vektorem; a potom kultivování buněk za podmínek umožňujících propagaci podmíněně se replikujícího vektoru. Pomocný vektor popsán výše a ještě podrobněji popsáný dále je jedním typem takového komplementárního vektoru.

Vynález také poskytuje izolovanou a přečištěnou molekulu nukleové kyseliny vybranou ze skupiny zahrnující DNA molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 2, 5, 6, 14, kde alespoň jeden N je mutovaný, 15 a 16, a RNA molekulu obsahující nukleotidovou sekvenci kódovanou nukleotidovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO: 2, 6, 7, 15, 16, 17 a 18.

Způsoby použití

Výše uvedené vektory jsou výhodně vloženy do hostitelské buňky za účelem profylaktické a terapeutické léčby virové infekce, z důvodu snadného udržování vektoru a také z jiných důvodů. V souladu s tím předkládaný vynález poskytuje hostitelské buňky obsahující vektor podle předkládaného vynálezu. Izolace hostitelských buněk, a/nebo udržování takových buněk nebo buněčné linie v kultuře je snadné pro odborníky v oboru.

Konkrétně, podmíněně se replikující virový vektor, nebo výhodně lentivirový vektor, jak byl popsán výše, je výhodně použit v profylaktické a terapeutické léčbě virové infekce, výhodně jako je infekce přirozeným virem, výhodně přirozeným

RNA virem, ještě výhodněji přirozeným retrovirem, a optimálně přirozeným HIV.

Způsob zahrnuje kontaktování hostitelské buňky, která může být infikována přirozeným virem, s podmíněně se replikujícím vektorem, který může být replikován pouze v hostitelské buňce permissivní replikací vektoru, jehož přítomnost, transkripce nebo translace inhibuje replikaci přirozeného kmene viru v hostitelské buňce. Výhodně se vektor replikuje více než jednou a obsahuje alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, jejíž vlastnictví (t.j. přítomnost, transkripce nebo translace) udělí selektivní výhodu vektoru v hostitelské buňce nad přirozeným kmenem viru, kterým je optimálně kmen, ze kterého byl vektor odvozen.

V tomto způsobu sekvence nukleové kyseliny výhodně obsahuje nukleotidovou sekvenci, která obsahuje nebo kóduje genetické antivirové činidlo, které nežádoucím způsobem ovlivňuje replikaci a/nebo expresi virů jiných než je uvedený vektor. Výhodně je genetické antivirové činidlo vybrané ze skupiny zahrnující protismyslnou molekulu, ribozym a imunogen. Optimálně je genetickým antivirovým činidlem ribozym, výhodně takový, jehož katalytická doména štěpí NUH sekvenci ve 3' místě (t.j. zejména GUC sekvenci). Volitelně je ribozym kódovaný, alespoň částečně, sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO:3 a SEQ ID NO:4. Výhodné je, aby ribozym štěpil sekvenci v regionu přirozeného kmene viru nebo jeho transkriptů, ale ne v regionu vektoru nebo jeho transkriptů. Výhodně je toto způsobeno tím, že přirozený kmen viru obsahuje sekvenci kódovanou SEQ ID NO:1, zatímco vektor, pokud jde o DNA, obsahuje nukleotidovou sekvenci vybranou ze skupiny zahrnující SEQ ID NO:2, 5, 6, 14, kde alespoň jeden N je

mutovaný, 15 a 16, a, pokud jde o RNA, obsahuje nukleotidovou sekvenci kódovanou nukleotidovou sekvencí vybranou ze skupiny zahrnující SEQ 1D NO:2, 5, 6, 14, kde alespoň jeden N je mutovaný, 15 a 16.

Výhodným způsobem je také ten, ve kterém vektor obsahuje alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, jejíž vlastnictví (t.j., přítomnost, transkripce nebo translace) udílí selektivní výhodu hostitelské buňce infikované vektorem nad buňkou infikovanou přirozeným kmenem viru, kterým je, optimálně, kmen viru, ze kterého byl vektor odvozen. Z tohoto hlediska může vektor obsahovat alespoň jednu sekvenci nukleové kyseliny, která udílí selektivní výhodu hostitelské buňce infikované virem, a alespoň sekvenci nukleové kyseliny, která udílí selektivní výhodu vektoru nad přirozeným kmenem viru odpovídajícím viru, ze kterého byl vektor odvozen.

V souladu s tím je způsob výhodně proveden tak, že sekvence nukleové kyseliny obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující gen pro mnohotnou lékovou resistenci. Alternativním provedením je způsob, kde sekvence nukleové kyseliny obsahuje nukleotidovou sekvenci kódující mutovanou (mutantní) proteasu a nukleotidovou sekvenci kódující mutovanou (mutantní) reverzní transkriptasu, jako je tomu tehdy, když je profylakticky nebo terapeuticky léčenou infekcí retrovirová infekce.

Způsob dále zahrnuje podání činidla vybraného ze skupiny zahrnující cytotoxická léčiva, inhibitory proteasy a inhibitory reverzní transkriptasy (t.j., kromě podání vektoru) hostitelské buňce.

Tak může být vektor použit ve výše uvedeném způsobu nejen pro terapeutickou léčbu virové infekce, ale také pro chránění potenciální hostitelské buňky před virovou infekcí, tj. v profylaktické léčbě virové infekce nebo ve "vakcinaci" proti danému viru, jako je RNA virus, konkrétně retrovirus, jako je HIV. Způsob v podstatě inhibuje replikaci přirozeného kmene viru před tím, než hostitelské buňky přijdou do kontaktu s přirozeným kmenem viru. Z tohoto hlediska může vektor obsahovat nebo kódovat proteiny, které blokují superinfekci přirozeným virem. Způsob zahrnuje kontaktování hostitelské buňky s podmíněně se replikujícím vektorem, jak je popsán výše, a "pomocným expresním vektorem" t.j., virovým genomem, který navozuje replikaci "vektoru" v neinfikované hostitelské buňce. Podmíněně se replikující vektor obsahuje selektivní výhodu pro balení a/nebo propagaci. Dále může vektor obsahovat sekvence, které zvyšují přežívání buňky, podporují produkci viru, indukují apoptosu, usnadňují produkci proteinů a/nebo podporují imunitní funkce a/nebo cílené ovlivnění. "Pomocný expresní vektor" je jakýkoliv expresní vektor, který komplementuje neschopnost vektoru replikovat se. Takové pomocné expresní vektory jsou snadno konstruovány odborníky v oboru. Pomocný expresní vektor může být balen do virionů, jako vektor, nebo může být exprimován bez nutnosti balení. Protože má vektor selektivní výhodu pro balení a/nebo propagaci, poskytuje tento systém bezpečný prostředek pro dosažení vysoké úrovně replikace viru bez možného patogenního efektu, který by potenciálně mohl mít živý atenuovaný virus. Dále může být vektor smísen s nespecifickým adjuvans, za účelem zvýšení imunogenity. Taková adjuvans jsou známá odborníkům v oboru a patří mezi ně, například, Freundovo nekompletní a kompletní adjuvans, emulze složené ze složek bakteriální a mykobakteriální stěny, a podobně.

Podmíněně se replikující virové vektory, nebo výhodně lentivirové vektory, podle předkládaného vynálezu, mohou být také použity pro imunoterapii v léčbě virové infekce nebo léčbě onkologických onemocnění. Dendritické buňky nebo jejich prekursory (např. CD34+ hematopoetické buňky nebo krevní monocyty, například), stejně jako buňky prezentující antigen, mohou být transdukovány vektorem, který exprimuje HIV proteiny nebo proteinové sekvence, které obsahují hlavní epitopy, pomocí kterých hostitel udržuje imunitní reakci proti cizorodému agens, jako je virus. Takové proteinové epitopy pro HIV jsou popsány v "HIV molecular immunology database", 1998, National Institutes of Allergy and Infectious Diseases, Maryland & Los Alamos National Laboratory, New Mexico, která je zde v plném rozsahu uvedena jako odkaz. Výhodné provedení pro HIV epitopový protein je integrovaná nebo kompozitní CTL sekvence (nebo její fragmenty) uvedené v následujícím příkladu 14. Další epitopy, které mohou být podobným způsobem exprimovány, jsou epitopy z jiných virů, bakterií, hub, parazitů, nádorových buněk a geneticky modifikovaných buněk. Do proteinové sekvence může být zapracován více než jeden epitop tak, aby byla vyloučena neimunogenní místa, za zisku vektoru s vyšší bezpečností, protože sekvence kódující proteiny jsou těžce narušené. Výhodným provedením diskontinuální sekvence je degenerovaná diskontinuální sekvence (s nebo bez vhodných spojovacích aminokyselinových sekvencí pro stabilizování struktury proteinu, pokud je to nutné) kódující imunologicky relevantní epitopy. Použití degenerovaných sekvencí snižuje riziko rekombinace. Dalším výhodným provedením je exprese popsané proteinové sekvence (nebo jejího fragmentu) pomocí sestřižené informace z retrovirového LTR, jako je HIV-LTR.

Obavou při použití retrovirových vektorů v léčbě lidských infekcí a onemocnění je možnost vzniku replikace-

kompetentního viru (RCV). Homologní rekombinace mezi pomocným vektorem a podmíněně se replikujícím vektorem je pravděpodobně hlavním způsobem vzniku RCV. Tak předkládaný vynález poskytuje modifikaci pomocného vektorového konstruktů tak, aby se minimalizovala nebo eliminovala možnost homologní rekombinace. Jakákoliv modifikace, která slouží pro snížení pravděpodobnosti dimerizace, současného balení a/nebo rekombinace pomocného vektoru a podmíněně se replikujícího vektoru, spadá do rozsahu předkládaného vynálezu.

Jedním provedením předkládaného vynálezu je inserce jednoho nebo více anti-vektorových ribozymů nebo protismyslných sekvencí (volitelně ve formě kazety, definované alespoň dvěmi takovými sekvencemi navázanými v tandemu pro ribozymy a definované jako alespoň dvě sekvence navázané v tandemu a cílené na diskontinuální region cílové vektorové nukleové kyseliny pro protismyslné sekvence) do 3' konce kódující sekvence pro pomocný gen, ale 5' k terminačnímu místu pro transkripci. Ačkoliv může dojít k nespecifickému balení pomocných genomů do vektoru, je pravděpodobné, že takové balení bude dependentní na vektoru. Proto může být mnoho strategií použito pro snížení balení vektoru do vektorových částic, což je jinak první krok v možném generování RCV.

Výhodný pomocný konstrukt obsahuje anti-vektorový ribozym nebo protismyslnou molekule na 3' konci sekvence kódující strukturální protein nebo sekvence kódující obal (homologní nebo heterologní). Výhodnější pomocný konstrukt obsahuje anti-vektorový ribozym nebo protismyslnou molekule na 3' konci sekvenci kódující strukturální protein a sekvenci kódující obal. Pokud je sekvencí nukleové kyseliny protismyslná molekula, tak může účinkovat intracelulárně,

kde destruuje ko-lokalizované dvojřetězcové molekuly pomocného vektoru prostřednictvím buněčných nukleas. Pokud je pomocný konstrukt balen s vektorovou RNA do virových částic, tak jsou tyto molekuly neschopné dokončit reverzní transkripci, která vede ke vzniku RCV.

Jiné výhodné provedení vkládá na pomocný konstrukt sekvence, které způsobují odlišný transport nebo lokalizaci pomocné nukleové kyseliny vzhledem k vektoru. Například, použití heterologního intronu a poly A sekvence v pomocných konstruktech, jak je uvedeno na obr. 6, je jedním takovým provedením. Tyto sekvence umožní odlišný transport vektoru a pomocných nukleových kyselin do různých buněčných nebo subcelulárních lokalizací. Výhodně není titr produkovaného vektoru ovlivněn více než 100-krát, lépe více než 10-krát a nejlépe není takovou modifikací pomocného vektoru ovlivněn vůbec.

Obr. 7 ukazuje, že přítomnost jednoho ribozymu (pVirPac1.2Rz) nebo ribozymu a intronu navrženého tak, aby se ovlivnil buněčný přenos pomocné RNA (pVirPac1.2RzIn) neměla žádný vliv na titr vektoru. Obr. 12 ukazuje, že PCR analýza titrů vzorků pro společně balené pomocné konstrukty ukázala redukované současné balení za přítomnosti ribozymu ve srovnání s vysokým stupněm současného balení za nepřítomnosti ribozymu. Přítomnost dvou ribozymů zcela bránila současnému balení pomocného vektoru do virových částic. Tak vynález obsahuje účinné prostředky pro použití dvoupiasmidového balicího systému pro produkci vysokých titrů vektoru, za zlepšené bezpečnosti takových vektorů, která je dosažena tím, že je sníženo nebo eliminováno současné balení pomocného vektoru.

Data naznačují, že balení pomocných konstruktů do virionů není náhodné, ale závislé na vektoru. Alternativním výhodným provedením bránicím současnému balení pomocných nukleových kyselin s vektorem je degenerování pomocného konstruktu v regionech, které jsou důležité pro asociaci pomocných a vektorových sekvencí. Tento postup může být dále modifikován tak, že se provede kompletní degenerování pomocné sekvence pro zabránění současného balení pomocných a vektorových sekvencí.

Například, nukleotidová sekvence pomocného vektoru může být částečně nebo zcela degenerována. Ačkoliv taková degenerace významně snižuje nebo eliminuje pravděpodobnost homologního párování a rekombinace pomocného vektoru a podmíněně se replikujícího vektoru, neovlivňuje schopnost pomocného vektoru kódovat proteinové produkty nutné pro replikaci a balení viru. Tato degenerace může být provedena v jakémkoliv možném genu a otevřeném čtecím rámci (ORF), který je homologní mezi pomocným vektorem a podmíněně se replikujícím vektorem, nebo je cíleněji provedena v konkrétních genech nebo ORF v pomocném vektoru. Je třeba si uvědomit, že kompletní degenerace není nutná pro redukci pravděpodobnosti homologní rekombinace a že chybění homologie sekvence v délce větší než 18 nukleotidů může být dostatečné. Proto bude degenerace, při které nebude v sekvenci identických více než 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8, 7 nebo 6 nukleotidů, bránit nebo snižovat rekombinaci. Sekvence může být degenerována za použití kodonů, které jsou přednostně exprimovány v konkrétním typu buněk, například v lidských buňkách.

Například, nukleotidová sekvence kódující gag, rev, a/nebo tat může být zcela nebo částečně degenerována. Mezi další příklady patří degenerování prvních 42 nukleotidů gag

sekvence, prvních 208 nukleotidů rev sekvence, posledních 183 nukleotidů tat sekvence, a posledních 545 nukleotidů Pol sekvence. Příklady pomocných vektorů s takovou degenerací jsou pVirPac1.2, pVirPac1.2Rz, pVirPac1.2Rz2 a pVirPac1.2RzIn nebo jejich deriváty. Je samozřejmé, že jakákoliv nukleotidová sekvence kódující jakýkoliv jiný virový produkt může být také degenerována způsobem podle předkládaného vynálezu, za účelem snížení, minimalizace nebo eliminace pravděpodobnosti homologní rekombinace.

Alternativním provedení předkládaného vynálezu je vložení takového prvku do pomocného vektoru, který je namířený na a degraduje podmíněně se replikující vektor za situace, kdy jsou tyto dva vektory lokalizovány současně, baleny současně nebo jinak spárovány. Ribozym je jedním příkladem takového prvku. Jakýkoliv ribozym, který selektivně ovlivňuje podmíněně se replikující vektor, spadá do rozsahu předkládaného vynálezu. Může být také použito více ribozymů, jako je dvojité nebo trojité ribozymová kazeta. Například může být ribozym namířen na U5 region (např. U5 region HIV-1, HIV-2, nebo jiného retroviru použitého v podmíněně se replikujícím vektoru) podmíněně se replikujícího vektoru. Štěpení podmíněně se replikujícího vektoru brání rekombinaci s podmíněně se replikujícím vektorem vedoucí ke vzniku RCV, ke které může dojít tehdy, když jsou dva baktory sbaleny společně. Příklady pomocných vektorů obsahujících ribozym jsou pVIRPAC-1.1Rz a pVIRPAC-1.2Rz2, které jsou uvedené na obr. 6.

Ještě dalším provedením předkládaného vynálezu je substituce heterologního RRE, včetně retrovirového RRE, ale nejlépe jiného lentivirového RRE, v pomocném vektoru, jako je substituce HIV-2 RRE za HIV-1 RRE, CTE nebo PRE. Toto přispívá k minimalizaci nebo eliminaci možnosti homologní

rekombinace v důsledku toho, že různé RRE mají různé sekvence. Další výhodou takové substituce podle předkládaného vynálezu je překvapivě neočekávané zvýšení produkce podmíněně se replikujícího vektoru, které je asi 5-násobné. Bez vazby na konkrétní teorii předpokládáme, že přítomnost různých REE v pomocném vektoru a podmíněně se replikujícím vektoru může být vázána na jeden nebo více různých buněčných faktorů, kterých může být omezené množství. Tak může použití různých RRE redukovat kompetici mezi dvěma vektory o limitované buněčné faktory. Příklady pomocných vektorů obsahujících HIV-2 RRE element pro balení retrovirových vektorů na bázi HIV-1 jsou pVIRPAC-1.2 a pVIRPAC-1.2Rz2, jak jsou uvedeny na obr. 6.

Ještě dalším provedením je inkorporace nukleotidové sekvence kódující heterologní env protein, jako je VSV-G viru vesikulární stomatitidy, Rabies G protein, GaLV, Alfavirovýs E1/2 glykoprotein, nebo RD114, env protein kočočího endogenního viru, do pomocného vektoru. Toto umožňuje, aby byl podmíněně se replikující vektor balen do částic s heterologním env proteinem. Dále, ligand může být případně insertován do obalového proteinu pro navození stimulace cílové buňky během transdukce, pokud je to žádoucí. Protože modifikování obalového proteinu může narušit jeho vazebnou schopnost, je výhodné exprimovat během produkce jak modifikovaný ligand obsahující chimérický obalový protein, tak nemodifikovaný pseudotypový obalový protein. Tak budou na povrchu buňky oba typy obalových proteinů, jeden pro stimulaci cílových buněk a druhý pro zprostředkování vazby a vstupu. Výhodný pseudotypový Lentivirový vektor je takový vektor, který také exprimuje chimérický receptor pro stimulaci buněk, kterým je VSV-G obalový protein a chimérický VSV-G obalový protein. Výhodnějším chimérickým obalovým proteinem je VSV-G/RD114

chimérický obalový protein (viz obr. 14A a 14B). Mezi další výhodné proteiny (nebo jejich fragmenty) pro tvorbu chimérických proteinů s VSV-G patří notch, delta, FLT-3 ligand, TPO, Kit ligand, ligand, který se váže na CD3, ligand, který se váže na CD28, a ligand, který se váže na GM-CSF.

Sekvence kódující heterologní env protein může být operativně navázaná na druhý indukovatelný promotor pro zajištění větších dodávek env proteinu pro balení viru. Tento způsob může být použit pro další zvýšení produkce viru, zejména za podmínek, kdy je produkce env proteinu limitujícím faktorem. Sekvence kódující heterologní env protein může být obsažena buď na stejném pomocném vektoru jako komplementární kódující sekvence pro virový protein, nebo na separátním vektoru. Tato sekvence může být také integrována do produkční hostitelské buňky nebo buněčné linie.

Dalším provedením předkládaného vynálezu je selektivní umístění sestřihových donorových nebo akceptorových míst v pomocném vektoru tak, že selektivní sestřih některých virových složek slouží pro minimalizaci nebo eliminaci možnosti homologní rekombinace při podmíněné replikaci. Například, místa pro sestřih mohou být umístěna tak, aby byla možná delece RRE a/nebo balení nebo dimerizace signálů v důsledku sestřihu. Tak mohou být okolnosti, při kterých jsou nukleové kyseliny exprimovány, řízeny umístěním sestřihových míst do vektoru. Například mohou být sestřihová místa umístěna distálně k ribozymu nebo protismyslné sekvenci tak, aby byly ribozymy nebo protismyslné sekvence inkorporovány v nesestřižené RNA. Alternativně mohou být ribozymy a protismyslné sekvence umístěny za místo sestřihu,

pokud je cílem exprimovat ribozymy nebo protismyslné molekuly ze všech molekul mRNA a ne z konkrétního podtypu.

Když je vektor použit ve výše uvedenému způsobu pro profylaktickou léčbu virové infekce, tak může vektor kódovat antigen proteinu, který není kódovaný přirozeným virem, jako je mutantní virový protein nebo nevirový protein. V souladu s tím může být antigen kódovaný vektorem bakteriálního původu nebo z nádorových buněk. Dále, podmíněně se replikující virový vektor, nebo výhodně lentivirový vektor, může také kódovat MHC gen pro správnou prezentaci antigenu imunitnímu systému hostitele. Takové vektory mohou být použity pro usnadnění persistující imunologické reakce proti různým sadám potenciálních patogenů a/nebo endogenních proteinů (například tumor-specifických antigenů), které jsou selektivně exprimovány v abnormálních buňkách.

Výše uvedené příklady neomezují použití předkládaného vynálezu na podání antigenu dendritickým buňkám za účelem imunoterapie. Naopak, vynález poskytuje způsoby a prostředky pro dodání jakéhokoli vybraného genu a pro jeho exprimování v jakémkoliv vybraném typu buněk. Dále vynález také umožňuje, aby bylo více genů podáno a exprimováno pomocí jednoho vektoru. Více genů může být exprimováno za použití jakéhokoli vhodné strategie pro genovou expresi. Příkladem je použití vnitřního ribosomálního vstupního místa (IRES), které může být umístěno distálně k prvnímu genu, který má být exprimován. Výhodným příkladem je exprimování vybraného genu pomocí IRES sekvence, která je umístěna distálně k variantě MGMT genu. Výhodnější provedení vektoru exprimují vybraný gen a vybraný gen vázaný na IRES z nemodifikovaného nebo modifikovaného HIV-LTR promotoru mimo sestřihovanou informaci. Další výhodný vektor exprimuje dva vybrané geny z nemodifikovaného nebo modifikovaného HIV-LTR promotoru,

který - pokud je modifikovaný - tak je modifikovaný v sekvencích, které se váží na transkripční faktory. Je samozřejmé, že kromě HIV LTR může být použita jakákoliv nemodifikovaná nebo modifikovaná lentivirová LTR.

Dalším příkladem je exprimování požadovaného genu z HIV-LTR za použití míst pro sestřih, která jsou odvozena od HIV. Například, jeden vybraný gen může být exprimovaný z Nef akceptorového sestřihového místa, zatímco druhý vybraný gen může být exprimovaný z Tat akceptorového sestřihového místa. Tímto způsobem mohou být exprimovány dva geny bez potřeby IRES elementu. Může být použito jakékoliv sestřihové místo, včetně míst Tat, Rev, Vif, Vpr, Vpu, Nef a Env genů. Env protein je exprimován z jednou sestřižené sekvence, takže exprimování požadovaného genu pomocí tohoto sestřihového místa může vyžadovat Rev, když je žádoucí významná exprese genu. Kromě toho, exprese z HIV-LTR může být upravena tak, aby byla Tat a Rev dependentní, pokud je to žádoucí.

Dále, "pomocný virový" (též "pomocný") expresní vektor může být upraven tak, aby byl exprimován pouze ve specifických typech buněk (jako jsou např. kmenové buňky, profesionální buňky prezentující antigen a nádorové buňky), pomocí adice nebo vynechání specifických genetických elementů/faktorů (buď ve vektoru nebo v pomocném expresním konstrukt), které způsobují replikaci a šíření viru specifickou pro určitý typ buněk. Tak se může vektor šířit pomocí komplementace s pomocným virovým konstrukt, ale toto šíření je specifické pro určitý typ buněk, podle toho, které genetické elementy/faktory jsou přidány do vektoru nebo vynechány ve vektoru nebo v pomocném virovém konstrukt. Toto může být provedeno samostatně nebo v kombinaci s jinými výše uvedenými strategiemi.

Například může být podmíněně se replikující HIV vektor navržen tak, aby se replikoval specificky makrofázích místo T-lymfocytů. Vektor, který bude tvořit Tat-defektní HIV (vektor kóduje další HIV proteiny, ale tyto nejsou exprimovány v důsledku absence Tat transkripčního transaktivátoru), může kódovat ribozym, který štěpí přirozený HIV, ale ne podmíněně se replikující HIV RNA. Pomocný expresní vektor pro tento vektor může kódovat tat gen exprimovaný mimo promotor specifický pro makrofágy. Tak se bude crHIV podmíněně replikovat pouze v makrofázích, a nebude schopen replikace v T-lymfocytech nebo buňkách jiného typu.

Alternativně může být tat gen operativně navázaný na tumor-specifický promotor; tak se crHIV bude replikovat pouze v nádorových CD4 buňkách a ne v normálních CD4 buňkách. Genetickým elementem/faktorem může být také modifikace promotorové sekvence vektoru tak, že je exprimována pouze ve specifických typech buněk a ne v jiných typech buněk, společně s pomocným virovým expresním konstruktem.

V jiném provedení mohou být obalové proteiny pomocného expresního konstruktu nebo vektorového konstruktu (pokud jsou tyto konstrukty připraveny tak, že obsahují obalové proteiny) modifikovány tak, že vektor-virion infikuje pouze určité typy buněk (například nádorové buňky), ale není schopen infikovat jiné typy buněk (například normální buňky). V ještě jiném provedení může být adenovirus, kterému chybí jeden nebo více klíčových faktorů pro replikaci, komplementován pomocí pomocného konstruktu, který poskytuje takové faktory vázané na tumor-specifický promotor. Tak budou faktory, které komplementují replikaci adenoviru exprimovány pouze v nádorových buňkách, což umožní replikaci

viru v nádorových buňkách (s expresí proteinů nutných pro usmrcení buňky), ale ne v normálních buňkách.

V dalším provedení může vektor exprimovat negativní selekční gen pro usmrcení buňky za použití O^6 -guaninového alkylačního činidla, jako je například BCNU (nebo funkční analog BCNU), jako léčiva pro negativní selekci. Lentivirový vektor exprimující protismyslnou sekvenci nebo ribozym cílený na MGMT gen může být dopraven do normálních buněk. Potom mohou být buňky ošetřeny BCNU nebo jeho analogem, ex vivo nebo in vivo, za účelem usmrcení buněk transdukovaných vektorem. Ve výhodném provedení jsou normální buňky transdukovány vektorem exprimujícím protismyslnou MGMT sekvenci profylakticky a potom jsou usmrceny, když se stanou abnormálními. Příkladem tohoto postupu je postup, kdy se z transdukovaných buněk stanou nádorové buňky, které mohou být potom usmrceny ošetřením buněk BCNU nebo jeho funkčním analogem. Jiným výhodným provedením je exprimování anti-MGMT protismyslné sekvence nebo ribozymu z U1 promotoru, kde tato sekvence je obsažena v U1 snRNA. Ještě výhodnějším provedením je transdukování anti-MGMT lentivirového vektoru do populace hematopoetických buněk, jako jsou lymfocyty, kmenové buňky a dendritické buňky.

V jiném výhodném provedení jsou normálními buňkami hematopoetické buňky, výhodně T-lymfocyty, a jsou transdukovány vektorem před transplantací allogenímu hostiteli. Takové buňky mohou být usmrceny léčbou BCNU nebo jeho funkčním analogem, pokud se stanou škodlivými pro hostitele (např. pokud dojde k reakci štěpu proti hostiteli). V ještě jiném provedení může být stejný lentivirový vektor exprimující anti-MGMT protismyslnou sekvenci nebo ribozym použit pro eliminaci nežádoucích buněk ze smíšené populace buněk. Příkladem tohoto provedení je

nádorovými buňkami kontaminovaná kostní dřeň, která se připravuje pro transplantaci. Bylo pozorováno, že nádorové buňky jsou velmi účinně transdukovány při relativně nízkých MOI v jednom kole transdukce (viz obr. 13A). Naopak, normální buňky, zejména CD34+ hematopoetické kmenové buňky, je obtížnější účinně transdukovat a pro dosažení vysoké účinnosti transdukce je potřeba více kol transdukce (viz obr. 13B). Proto je atraktivní strategií pro eliminaci nežádoucích buněk transdukce kontaminované kostní dřeně vektorem obsahujícím anti-MGMT protismyslnou molekulu v MOI, při které je dosaženo účinné transdukce kontaminujících nádorových buněk, ale ne normálních buněk. Tento příklad neomezuje předkládaný vynález pouze na použití ex vivo nebo na použití při nádorových onemocněních. Další aplikace selektivního genového přenosu in vivo, například při léčbě nádorů mozku, ale také při jakýchkoliv jiných onemocněních, kdy může být použita různá účinnost transdukce mezi chorobnými a normálními buňkami, spadají také do rozsahu předkládaného vynálezu.

Tak předkládaný vynález poskytuje způsob pro léčbu nádorových onemocnění, konkrétně pro léčbu T-lymfocytární leukemie. "Léčba nádorového onemocnění" podle předkládaného vynálezu zahrnuje podání modifikovaného vektoru podle předkládaného vynálezu hostiteli za účelem dosažení terapeutické odpovědi. Taková odpověď může být hodnocena, například, pomocí sledování zpomalení růstu nádoru a/nebo regrese nádoru. Růstem nádoru se rozumí zvětšení velikosti nádoru a/nebo zvýšení počtu nádorů. Regresí nádoru se rozumí redukce hmoty nádoru.

"Nádorem" je podle předkládaného vynálezu nádor, který je charakterizován abnormální buněčnou proliferací a nepřítomností kontaktní inhibice, což se může projevit

vznikem nádoru. Termín zahrnuje nádorové bujení lokalizované v nádorech, stejně jako nádorové bujení nelokalizované v nádorech, jako jsou například nádorové buňky expandující z nádoru lokální invazí nebo systémovým metastazováním. Teoreticky může být způsobem podle předkládaného vynálezu léčen jakýkoliv typ nádorového bujení. Výhodně je však nádor nádorem virového původu.

Konečně, výše uvedené vektory mohou být přímo použity pro genovou terapii in vivo. Současné strategie pro genovou terapii mají ten nedostatek, že nemohou dopravit geny do většího procenta buněk; obvykle je infikováno pouze určité procento buněk. Toto je zejména významné v protinádorových strategiích, ve kterých je zásadní, aby byla infikována celá populace buněk. Přidáním vektoru společně s pomocným konstruktem se dosáhne toho, že okamžitě transdukované buňky budou produkovat virové částice, které mohou potom infikovat sousední buňky a tak umožní dosažení vysoké, ne-li kompletní, účinnosti transdukce. V jednom provedení předkládaného vynálezu může být lidský retrovirus (kterým může být HIV nebo retrotransposonový element) dopraven do tkáně (nebo do buněk in vitro) s "pomocným konstruktem". Buňky okamžitě obsahující vektor a pomocný konstrukt budou produkovat virus a budou za určitých okolností balit vektor do virionů. Tyto viriony budou schopny způsobit vysoce účinnou transdukci sousedních buněk (protože kontakt buňka-buňka je nejúčinnějším způsobem transdukce buněk). Okamžitě transdukované mohou a nemusí zemřít, podle toho, zda kombinace vektor/pomocný konstrukt vede k cytolytické infekci. V případě retrotransposonu nemusí pomocný konstrukt obsahovat strukturální proteiny, protože normální nebo nádorové buňky mohou obsahovat proteiny/faktory nutné pro enkapsidaci do virionů. V tomto případě může pomocným konstruktem být, například, transaktivátorový protein, který

aktivuje transkripci faktorů nutných pro enkapsidaci retrotransposonu. V případě HIV mohou být pro enkapsidaci HIV genomu do virionů pro infikování/transdukci buněk nutné další faktory.

Výše popsané vektory mohou být použity také v boji proti biologickým nebo chemickým zbraním. Například může být podmíněně se replikující vektor podán jedinci nedávno infikovanému vysoce patogenním virem nebo bakterií nebo zasaženému chemickou látkou (například toxinem). Vektor bude interferovat s replikací patogenního viru, jak bylo popsáno výše. Nicméně, podmíněně se replikující vektor může být také použit ve strategiích proti bakteriím nebo chemickým látkám, společně s pomocným expresním vektorem.

Například může podmíněně se replikující vektor secernovat protilátky proti bakteriím nebo toxinům potom, co pomocný konstrukt umožní jeho expresi a propagaci. Pomocný konstrukt může být - například - řízen indukovatelným promotorem, který umožní jeho expresi po aktivaci bakterií, cytokinem (v reakci na bakteriální infekci), antibiotikem (jak je tomu například v tetracyklinem indukovatelném promotorovém systému (Paulus et al., J. Virol., 70, 62-67 (1996)) nebo chemickou látkou (např. toxinem samotným). Tak není podmíněně se replikující vektor pouze selektivně propagován s cílem pomoci "pomocnému konstruktu" v reakci na patogen nebo toxin (v důsledku aktivace pomocného konstrukt), ale také secernuje protilátky proti patogenu nebo toxinu, které inhibují patologické účinky nádorového antigenu, patogenu nebo chemické látky (například toxinu). Tak může být jakýkoliv protein, faktor nebo genetický element, který může být transkribován do mRNA a/nebo proteinu insertován do podmíněně se replikujícího vektoru pro inhibici patogenní reakce - současně s "pomocným konstruktem", který podporuje

jeho selektivní propagaci a expresi (selektivní proto, že produkty pomocného konstruktu jsou exprimovány podmíněně (například (a) systém indukovatelný promotor-faktor v nádorových buňkách aktivuje produkci faktoru pomocného konstruktu, sekvence reaktivní na toxin, která exprimuje faktor pomocného konstruktu, nebo promotor reagující na cytokiny, který indukuje produkci faktoru pomocného konstruktu, (b) pomocný RNA/protein/faktor je selektivně stabilizován v některých buňkách a ne v jiných), a (c) nepřímá indukce třetího genu, který ovlivňuje produkci pomocných proteinů, chaperonování, cílení, strukturu nebo jinou biologickou funkci). Takové strategie mohou být použity u transgenních rostlin a zvířat pro jejich chránění před patogenem. Obdobně mohou být takové strategie použity v transgenních systémech pro produkci požadovaných heterologních proteinů/proteinů/faktorů.

V jiném provedení způsobu podle předkládaného vynálezu může být vyvinuta buněčná linie pro skríníng léčiv/faktorů za účelem stanovení například toho, která část proteinu/faktoru je důležitá pro určitou funkci. Může být připraven vektor, který bude exprimovat vybraný mutagenizovaný protein v dané buněčné linii. RNA kódující mutagenizovaný protein bude však upravena tak, aby byla resistantní na ribozym, například pomocí inserce silentních bodových mutací. Exprese přirozeného proteinu však bude v buněčné linii inhibována. Také mohou být vyrobeny vektory exprimující ribozym k danému proteinu a mutantní testovaný protein. Když je vektor transdukován do buněk, tak je většina nativní RNA kódující normální protein rozštěpena, a je exprimován mutantní testovaný protein. Tento způsob může být použit s nově vyvinutými technikami selekce a genového přenosu jako rychlá a účinná technika pro určení toho, jak

daný protein funguje a jak daný faktor/léčivo interaguje s proteinem.

V ještě jiném provedení, kdy je vektor použit pro léčbu hematologických onemocnění, je pacientovi provedena leukoferesa pro získání dostatečného množství bílých krvinek z krve. Po leukoforese jsou izolovány požadované buňky, které jsou transdukovány vektorem a jsou kultivovány pro dosažení požadovaného počtu buněk. Během ex vivo expanze požadovaného typu buněk jsou pacientovi infuzně podány protilátky namířené proti povrchovému buněčnému proteinu na požadovaném typu buněk, s cílem destruovat tyto buňky během expanze buněk požadovaného typu. Transdukované buňky se potom infundují zpět pacientovi tak, aby se doplnila ztráta buněk způsobená protilátkami in vivo.

Výhodným provedením výše uvedené techniky je izolace CD4+ T-lymfocytů z leukoforesovaného materiálu a potom transdukování buněk HIV vektorem, který obsahuje anti-HIV protismyslnou sekvenci nebo ribozymovou sekvenci pro expanzi ex vivo. Během ex vivo expanze buněk se endogenní CD4+ buňky pacienta destruují podáním, například, Anti-thymocytárního Globulinu (ATG) (Pasteur Merieux Serums et Vaccins, Lyon, France, distribuovaný SangStat Medical Corporation, Menlo Park, CA, USA) nebo Atgam (Upjohn Company, Kalamazoo, MI, USA), ale odborník v oboru může použít jakoukoliv vhodnou cytoredukční protilátku. Po expanzi transdukováných CD4+ T-lymfocytů jsou buňky infundovány zpět pacientovi. Ve výhodném provedení jsou CD4 negativní buňky získané během izolace CD4 pozitivních buněk zachovány, zmrazeny a rozmrazeny pro infusní podání v době podání transdukováných CD4 pozitivních buněk zpět pacientovi.

Výše uvedené příklady neomezují rozsah předkládaného vynálezu na ATG nebo CD4+ T-lymfocyty. Buňky jakéhokoli typu mohou být cíleně ovlivněny za použití protilátky, která se váže na buněčný povrchový protein a je cytocidní. Protilátka může být pacientovi podána exogenně, nebo může být do těla vložen druhý vektor secernující protilátku. Tento vektor může produkovat protilátku buď konstitutivně (po dobu života buňky), dočasně (například jako integras-minus vektor) nebo indukovatelně (například jako tetracyklinem-indukovatelný promotorový systém).

V ještě jiném provedení předkládaného vynálezu může být jakýkoliv vektor podle předkládaného vynálezu použit pro prevenci nebo inhibici produktivní virové replikace tím, že interferuje s produkcí virové DNA. Bez vazby na konkrétní teorii může být takovou interferencí narušení produkce nebo replikace DNA, jako je narušení syntézy prvního nebo druhého řetězce DNA v procesu reverzní transkripce nebo replikace zprostředkované DNA polymerasou, inhibice nebo integrace virové DNA do genomu hostitelské buňky, nebo zvýšení degradace nebo nestability virové DNA.

Virová DNA je jakákoliv DNA, která je produkována během životního cyklu viru. Příkladem jsou retroviry včetně lentivirů, adenovirů a adeno-asociovaných virů, herpes virů a hepadna virů. Pro viry se životním cyklem, který zahrnuje integraci do genomu hostitelské buňky, označuje termín virová DNA také formu virového genomu, která má být nebo již je integrována do genomu hostitelské buňky.

Pro přímou interferenci s integrací viru předkládaný vynález zahrnuje použití příslušného virového vektoru, který má integrační krok ve svém replikačním cyklu. Výhodně probíhá integrace vektoru před tím, než dojde k virové

infekci. Integrace vektoru je výhodně provedena za použití dávky infekce ("MOI") vyšší než jedna, lépe od přibližně 2 do přibližně 10, přibližně 20, nebo přibližně 50. MOI do přibližně 100 nebo 200 může být také použita při použití vysoce koncentrovaných vektorových přípravků a určitých typů buněk. Zejména výhodné jsou hodnoty MOI od přibližně 2 do přibližně 20, přibližně 2 do přibližně 15, přibližně 2 do přibližně 10, nebo přibližně 2 do přibližně 5. Tyto hodnoty jsou vhodné pro použití s primárními buňkami. Terapeutické použití takových hodnot může být provedeno pomocí ošetření hostitelských buněk in vitro nebo ex vivo, po kterém následuje jejich podání nebo navrácení pacientovi nebo jedinci.

Vektor může být také konstruován tak, aby obsahoval antivirové genetické činidlo nebo aby mohl být zbaven takového činidla, když není nutné. Dále mohou být vektory použity pro inhibici produkce virové DNA přirozeného viru, který se liší od viru, od kterého je virový vektor odvozen. Například, vektor odvozený od viru lidské imunodeficiencie může inhibovat produkci nebo integraci DNA viru hepatitidy A nebo B v hepatocytech.

Bez vazby na konkrétní teorii mechanismu inhibice produkce virové DNA, a jak je uvedeno na obr. 19 a v příkladu 12, brání vektor produktivní replikaci přirozeného viru tím, že inhibuje tvorbu DNA přirozeného HIV-1 (wt-HIV) při infekci wt-HIV, čímž narušuje důležitý stupeň životního cyklu tohoto viru. Obr. 19 ukazuje efekty vektoru na bázi HIV (CPT2, jak je popsán výše) na tvorbu DNA wt-HIV vneseného do primárních lidských CD4 T-lymfocytů. Jelikož metoda pro detekci wt-HIV použitá na obr. detekuje také integrované formy DNA, může vektor interferovat s tvorbou wt-HIV DNA tím, že brání její integraci (například

saturováním integračních míst pro HIV) a tak umožňuje, aby byl degradován nebo jinak eliminován z buněk.

Vynález také není omezen na použití virových vektorů, ale může být kombinován s jinými anti-viroty, jako jsou léčiva, která inhibují produktivní virovou infekci v jakémkoliv bodě životního cyklu viru, včetně integrace přirozeného viru nebo produktivní replikace. Prevence integrace přirozeného viru alternativními a komplementárními modalitami (například léčivem + vektorem) umožňuje použití dávek vektoru a léčiva nižších než při samostatném použití, kde tyto dávky stále účinně inhibují produktivní virovou replikaci in vivo.

Existuje mnoho použití metod a vektorů podle předkládaného vynálezu in vitro. Například mohou být vektory použity pro objasnění určitých virové replikace a funkce ribozymu. Vektory obsahující ribozym mohou být také použity jako diagnostické nástroje, například pro hodnocení mutací přítomných v chorobou postižených buňkách, nebo pro hodnocení genetického driftu. Vektory mohou být také použity pro určení nebo potvrzení funkce genu, ať je jeho funkce známá, neznámá nebo pouze předpokládaná. Výše uvedený popis není vyčerpávající z hlediska použití předkládaného vynálezu.

Výhody předkládaného vynálezu

Výhody použití crHIV strategie pro genetickou terapeutickou léčbu AIDS a jiných onemocnění jsou značné. Například vynález řeší problémy zacílení vektoru na buňky infikované HIV. Po in vivo transfekci crHIV do infikovaných CD4+ buněk se crHIV balí do virionů za použití endogenních infekčních HIV obalových proteinů. Tak se crHIV RNA koncovky

společně s viriony přítomnými v buňce a infikují ty typy buněk, které jsou normálně infikovatelné tímto kmenem HIV, ovšem za produkce nepatogenních virionů. Sem patří též obtížné cílené ovlivnění buněk, jako jsou mikroglie v mozku, které jsou hlavním zásobníkem HIV infekce v centrálním nervovém systému. S crHIV vektory, které infikují neinfikované CD4+ buňky, je patrně spojena pouze slabá toxicita, protože crHIV vektory nekódují žádné virové proteiny. Dále, výsledkem kompetice crHIV vektorů s přirozenými HIV je produkce nepatogenních částic, což vede ke snížení virové nálože. Snížení nálože patogenního HIV-1 může nejen prodlužovat přežití infikovaných jedinců, ale také snižovat přenos na neinfikované jedince, protože crHIV částice se mohou také šířit systémově (tj. jako neinfekční HIV). Snížená nálož patogenního HIV-1 v krvi bude zejména významná u těhotných pacientek infikovaných HIV, protože produkce crHIV může také snižovat přenos od matek infikovaných HIV na jejich plody in utero.

Směs plasmidová DNA/lipidy, která může být použita pro vnesení crHIV vektor do hostitelských buněk, by měla být stabilní a levná, aby se obešli nákladné ex vivo postupy. Je jasné, že způsob podle předkládaného vynálezu je značně flexibilní, protože může být použit také pro přenos genů ex vivo, pokud je žádoucí. Nicméně, možnost liposomy-zprostředkovaného přenosu otevírá možnost pro léčbu obecné populace - tato možnost není dostupná při použití současných terapeutických genových strategií. crHIV vektory mohou být také upraveny tak, aby obsahovaly několik ribozymů, které mohou být namířeny na různé cíle v HIV genomu. Toto snižuje možnost toho, že bude infekční HIV mutovat a unikne účinkům anti-HIV ribozymů. Dále, strategie využívající virus s podmíněnou schopností replikace může být použita na léčbu

jiné virové infekce, zejména takové infekce, při které je obrat viru vysoký.

Zejména výhodnou vlastností crHIV vektorů je to, že mohou být použity pro exprimování genetických antivirových činidel, například, ribozymu, post-transkripčně. Tak vede infekce neinfikovaných buněk crHIV vektory k nízké toxicitě, protože za nepřítomnosti Tat proteinu dochází pouze k slabé expresi z promotoru dlouhé terminální repetitivní sekvence (LTR). K vysoké úrovni crHIV exprese - a tak k antivirové aktivitě - dojde pouze tehdy, když je dodán Tat protein z přirozeného HIV. Tak nejsou crHIV vektory navrženy tak, aby bránily buňky před infekcí HIV, ale tak, aby snižovaly velikost infekce přirozeným HIV v důsledku selektivní akumulace nepatogenních crHIV částic.

Bez vazby na jakoukoliv konkrétní teorii týkající se funkce a mechanismu účinku předkládaného vynálezu předpokládáme, že ribozymy mohou být použity (viz příklady) pro dodání selektivní výhody crHIV genomům v důsledku dvou výhodných vlastností: (1) mají vysoký stupeň specificity, a (2) mají relativní účinnost závisující na jejich schopnosti ko-lokalizace s cílovými RNA (Cech, Science, 236, 1532-1539 (1987)). Specificita ribozymů je způsobena jejich specifickou hybridizací na komplementární cílové sekvence obsahující XUY místo. Ribozymy jsou relativně účinné proto, že štěpí cílové RNA s vysokou účinností pouze tehdy, když jsou ko-lokalizovány s cílovými RNA. Při smíšené HIV/crHIV infekci musí docházet k současné lokalizaci ribozym-obsahující crHIV RNA s RNA přirozených HIV, protože HIV RNA genomy dimerizují před balením do virionů. Štěpení negenomových typů přirozené HIV RNA, nutné pro produkci virových proteinů, je pravděpodobně méně účinné než štěpení genomové RNA přirozeného HIV, protože negenomová RNA HIV

nedimerizuje. Ve zde popsaných pokusech bylo zjištěno, že selektivní výhoda udílená crHIV RNA byla způsobena selektivním balením crHIV do virových částic. Tyto výsledky naznačují, že nejúčinnější štěpení probíhá intracelulárně během dimerizace, což vede k selektivní destrukci RNA přirozeného HIV nukleasami hostitele. Toto umožňuje přednostní balení crHIC do virových částic.

Aplikace crHIV vektorů pro terapii HIV může zahrnovat nejen genomovou selekci crHIV, ale také buněčnou selekci buněk produkujících crHIV částice. Jinak řečeno, buňky produkující přirozený HIV budou produkovat částice přirozeného HIV se selektivní výhodou ve srovnání s buňkami produkujícími crHIV částice, a rychle začnou převládat. Selektivní výhoda může být udělena buňkám exprimujícím crHIV insercí genu do crHIV genomů (například genu pro mnohotnou lékovou resistenci), který dodá buňkám exprimujícím crHIV (za přítomnosti léčku) výhodu v přežívání ve srovnání s buňkami exprimujícími crHIV. Za těchto podmínek budou buňky exprimující přirozený HVI progresivně umírat, ale stále budou ještě produkovat určité množství přirozeného HIV, zatímco buňky exprimující crHIV, které selektivně produkují crHIV, budou přežívat. Infekce buněk obsahujících crHIV zbývajícím přirozeným HIV povede k další produkci virových částic obsahujících crHIV. Tak může vést posun virového genomu ke kumulativní infekci CD4+ buněk crHIV genomy, což změní virovou rovnováhu u jedince od patogenních přirozených HIV genomů k nepatogenním crHVI genomům. Taková strategie může vést k eliminaci přirozeného HIV v důsledku selektivního posunu rovnováhy HIV genomů od přirozeného HIV k crHIV. Virová replikace potom eventuálně ustane, protože crHIV se může replikovat pouze za přítomnosti pomocného genomu přirozeného HIV. Proto je za takových oboustranně restriktivních podmínek možné upravit crHIV vektory tak, aby

nejen snižovaly nálož přirozeného HIV viru, ale aby též eliminovaly virus z jedinců infikovaných HIV.

Způsoby produkce

Vektor může být produkován metodou komplementace, buď za použití dočasné transfekce vektorového a pomocného genomu do buněčné linie, výhodně do dobře nezámé 293T buněčné linie; nebo za použití balící buněčné linie. Výhodně je buňka dočasně transfektována při vysoké účinnosti transfekce za použití transfekčního činidla, výhodně fosforečnanu vápenatého, elektroporace nebo lipidového transfekčního činidla. Poté, co proběhne transfekce, se vektor získá ze supernatantu; výhodně se vektor získá ne méně než za 12 hodin po transfekci a ne více než 7 dnů po transfekci. Vektor může být koncentrován, pokud je to vhodné, tak odstředěním při vysoké rychlosti bez vysrážení nebo ultraodstředěním. Výhodnými podmínkami pro odstředění je odstředění při přibližně 5000-12000 x g, výhodněji při přibližně 10000 x g. Nejvýhodnějšími podmínkami pro odstředění je odstředění při 4°C přes noc.

Způsoby pro přečištění vektoru

Způsob 1

1. Pročištění virového supernatantu
2. Zahuštění ultrafiltrací
3. Diafiltrace s nebo bez zpracování benzonázou
4. Iontoměničová chromatografie
5. Chromatografie s vylučováním podle velikosti nebo diafiltrace
6. Volitelné zahuštění ultrafiltrací

Způsob 2

1. Pročištění virového supernatantu
2. Iontoměničová chromatografie
3. Diafiltrace nebo chromatografie s vylučováním podle velikosti
4. Volitelné zpracování benzoázou
5. Chromatografie s vylučováním podle velikosti nebo diafiltrace
6. Volitelné zahuštění ultrafiltrací

Pro výše uvedený postup mohou být použity různé pryskyřice, včetně Poros 50HQ od Perseptive Biosystems. Náplně z dutých vláken mohou být použity pro ultrafiltraci nebo diafiltraci, včetně náplní (UFP-750 série) od A/G Technologies.

Způsoby podání

Podle předkládaného vynálezu je vektor vnese do hostitelské buňky potřebující genovou terapii virové infekce, jak bylo popsáno výše. Mezi techniky pro vnesení vektoru patří kontaktování hostitele schopného být infikován virem s vektorem podle předkládaného vynálezu. Výhodně takové kontaktování zahrnuje jakékoliv prostředky, pomocí kterých je vektor vnesen do hostitelské buňky; způsob není závislý na jakýchkoliv konkrétních prostředcích použitých pro vnesení vektoru. Takové techniky jsou dobře známé odborníkům v oboru a jsou zde uvedeny jako příklady.

Takové vnesení vektoru může být provedeno buď in vitro (např. v genové terapii ex vivo) nebo in vivo, a může být použito elektroporace, transformace, transdukce, konjugace nebo triparentální množení, transfekce, infekce, fúze

membrány s kationtovými lipidy, ostřelování mikročásticemi potaženými DNA o vysoké rychlosti, inkubace se sraženinou DNA-fosforečnan vápenatý,, přímé injekce do jednotlivých buněk a podobně. Jsou dostupné i další metody a tyto mohou být použity.

Výhodně jsou však vektory nebo ribozymy vneseny za použití kationtových lipidů, např. liposomů. Takové liposomy jsou komerčně dostupné (např., LipofectinTM, LipofectamineTM a podobně, od Life Technologies, Gibco BRL, Gaithersburg, Md.). Dále mohou být v předládaném vynálezu použity liposomy mající zvýšenou přenosovou kapacitu a/nebo redukovanou toxicitu in vivo (např. jak je popsáno v PCT patentové přihlášce č. WO 95/21259). Pro podání liposomů jsou doporučení uvedena v PCT patentové přihlášce č. WO 93/23569 a tato doporučení mohou být použita. Obvykle je při takovém podání přípravek vychytán většinou lymfocytů během 8 hodin při 37 °C, a více než 50% injikované dávky je detekováno ve slezině jednu hodinu po intravenosním podání. Mezi další vhodná vehikula patří hydrogely a polymery s řízeným uvolňováním.

Forma vektoru vneseného do hostitelské buňky může být různá, částečně v závislosti na tom, zda je vektor vnesen in vitro nebo in vivo. Například mohou být nukleové kyseliny cirkulární, se zářezem nebo linearizované, podle toho, zda má být vektor uložen extragenomově (t.j. jako autonomně se replikující vektor), zda má být integrován jako provirus nebo profág, dočasně transfektován, dočasně infikován jako replikaci-deficitní nebo podmíněně se replikující virus, nebo stabilně vložen do genomu hostitelské buňky v důsledku dvojité nebo jediné překřížené rekombinace.

Před vnesením do hostitele může být vektor podle předkládaného vynálezu formulován do různých přípravků použitelných v terapeutické a profylaktické léčbě. Konkrétně, vektor může být připraven ve farmaceutickém prostředku, kde je kombinován s vhodnými farmaceuticky přijatelnými nosiči nebo ředidly, a může být formulován tak, aby byl vhodný pro použití v lidské nebo veterinární medicíně.

Tak mohou prostředky pro použití ve způsobech podle předkládaného vynálezu obsahovat jeden nebo více výše uvedených vektorů, výhodně v kombinaci s farmaceuticky přijatelnými nosiči. Farmaceuticky přijatelné nosiče jsou dobře známé odborníkům v oboru, stejně jako vhodné způsoby podání. Volba nosiče závisí na konkrétním vektoru, stejně jako na konkrétním způsobu použitém pro podání prostředku. Odborníkům v oboru bude jasné, že existují různé způsoby podání a že ačkoliv pro podání prostředku může být použit více než jednoho způsobu podání, povede jeden konkrétní způsob podání k okamžitější a účinnější reakci než jiný. Proto existuje více vhodných prostředků podle předkládaného vynálezu.

Přípravek obsahující vektor podle předkládaného vynálezu, samostatně nebo v kombinaci s jinými antivirovými sloučeninami, může být připraven ve formě prostředku vhodného pro parenterální podání, výhodně intraperitoneální podání. Takové prostředky mohou obsahovat vodné a non-vodné izotonické sterilní injekční roztoky, které mohou obsahovat antioxidační činidla, pufry, bakteriostatika a soluty, které upravují izotonicitu roztoku tak, aby odpovídala izotonicitě krve pacienta, a vodné a non-vodné sterilní suspenze, které obsahují suspendační činidla, solubilizační činidla, zahušťovací činidla a konzervační činidla. Prostředky mohou

být připraveny v zásobnících obsahujících jednu dávku nebo více dávek, jako jsou ampule a fioly, a mohou být uskladněny za lyofilizovaného stavu, ve kterém vyžadují pouze přidání sterilního kapalného nosiče, například vody pro injekce, před použitím. Injekční roztoky a suspenze k okamžitému použití mohou být připraveny ze sterilních prášků, granulí a tablet, jak je zde popsáno.

Vektor může být skladován v jakémkoliv vhodném roztoku, pufru nebo lyofilizované formě, pokud je to žádoucí. Výhodným skladovacím pufrem je Dulbecco fosfátem pufrovaný salinický roztok; Dulbecco fosfátem pufrovaný salinický roztok smíšený s 1-50% roztokem trehalosy ve vodě (1:1), výhodně 10% roztokem trehalosy ve vodě (1:1), kdy je dosaženo konečné koncentrace 5% trehalosy; Dulbecco fosfátem pufrovaný salinický roztok smíšený s 1-50% roztokem ve vodě (1:1), výhodně 10% roztokem glukosy ve vodě (1:1), takže konečná koncentrace glukosy je 5%; 20 mM HEPES-pufrovaný salinický roztok smíšený 1-50% roztokem trehalosy ve vodě (1:1), výhodně 10% roztokem trehalosy ve vodě (1:1), takže konečná koncentrace trehalosy je 5%; nebo Dulbecco fosfátem pufrovaný salinický roztok smíšený s 1-50% roztokem mannitolu ve vodě (1:1), výhodně s 5% roztokem mannitolu ve vodě (1:1), takže konečná koncentrace mannitolu je 2,5%.

Prostředek vhodný pro orální podání může být prostředek obsahující kapalně roztoky, například může být účinné množství sloučeniny rozpuštěno ve vodě, salinickém roztoku nebo ovocném džusu; nebo mohou být prostředkem kapsle, váčky s práškem nebo tablety, každá obsahující předem určené množství aktivní složky, ve formě pevné látky nebo granulí; roztoky nebo suspenze ve vodné kapalině; a emulze olej-ve-vodě nebo voda-v-oleji. Tabletové formy mohou obsahovat laktosu, mannitol, kukuřičný škrob, bramborový škrob,

mikrokrystalickou celulosu, arabskou klovatinu, želatinu, koloidní oxid křemičitý, kroskarmelloso sodnou, talek, magnesium-stearát, kyselinu stearovou a jiné přísady, barviva, ředidla, pufrovací činidla, zvlhčovací činidla, konzervační činidla, chuťová korigens a ofarmakologicky kompatibilní nosiče.

Také může být připraven aerosolový prostředek vhodný pro inhalační podání. Aerosolový prostředek může být umístěn do vhodného hnacího plynu, jako je dichlordifluormethan, propan, dusík a podobně.

Obdobně, prostředky vhodné pro orální podání mohou být ve formě bonbonů, které mohou obsahovat aktivní složku v ochuceném základu, obvykle v sacharose, arabské klovatině nebo tragantu; pastilek obsahujících aktivní složku v inertním základu, jako je želatina a glycerin, nebo sacharosa a arabská klovatina; a ústních vod obsahujících aktivní složku ve vhodném kapalném nosiči; stejně jako ve formě krémů, emulzí, gelů a podobně obsahujících, kromě aktivní složky, nosiče známé a používané v oboru.

Prostředky vhodné pro lokální podání mohou být ve formě krémů, mastí a pletových vod.

Prostředky pro rektální podání mohou být ve formě čípků využívající vhodných bazí, obsahujících, například, kakaové máslo nebo salicylát. Prostředky pro vaginální podání mohou být ve formě pesarů, tamponů, krémů, gelů, past. Pěny nebo spreje obsahujících, kromě aktivní složky, nosiče známé v oboru. Aktivní složka může být také kombinována s lubrikačním činidlem a použita pro nanesení na kondom.

Dávka podaná živočichovi, konkrétně člověku, ve způsobech podle předkládaného vynálezu, by měla být dávka dostatečná pro vyvolání terapeutické odpovědi u infikovaných jedinců za rozumnou dobu. Dávka bude určena účinností konkrétního vektoru použitého při léčbě, závažností onemocnění, stejně jako tělesnou hmotností a věkem postiženého jedince. Velikost dávky bude také určena existencí jakýchkoliv nežádoucích účinků doprovázejících konkrétní použitý vektor. Je žádoucí udržovat nežádoucí účinky na minimální úrovni.

Dávka může být ve formě dávkové jednotky, jako je tableta nebo kapsle. Termín "dávková jednotka", jak je zde použit, označuje fyzikálně diskretní jednotky vhodné pro použití jako jednotkové dávky u člověka nebo živočicha, kde každá jednotka obsahuje předem určené množství vektoru, samostatně nebo v kombinaci s jinými antivirovými činidly, kde toto množství je vypočteno tak, aby bylo dostatečné pro produkci požadovaného účinku, a dále obsahuje farmaceuticky přijatelné ředidlo, nosič nebo vehikulum. Specifikace pro jednotkové dávkové jednotky podle předkládaného vynálezu závisí na konkrétní použité sloučenině a na efektu, kterého má být dosaženo, stejně jako na farmakodynamice asociované s každou sloučeninou u hostitele. Podané množství by mělo být "antivirově účinné množství" nebo množství dostatečné pro dosažení "účinné koncentrace" u jedince.

Protože je "účinná koncentrace" použita jako cíl pro dávkování, může se skutečná dávka a dávkování značně lišit, v závislosti na interindividuálních rozdílech ve farmakokinetice, distribuci léku a metabolismu. "Účinná koncentrace" může být definována, například, jako koncentrace v krvi nebo ve tkáni požadovaná u pacienta, která odpovídá koncentraci jednoho nebo více vektorů podle předkládaného vynálezu, kde tato koncentrace inhibuje virus,

jako je HIV, v testu prediktivním pro klinickou antivirovou aktivitu chemické sloučeniny. "Účinná koncentrace" pro sloučeniny podle předkládaného vynálezu se může také lišit, když jsou sloučeniny podle předkládaného vynálezu použity v kombinaci se zidovudinem nebo jinými antivirovými sloučeninami nebo jejich kombinacemi.

Odborník v oboru snadno určí vhodnou dávku, protokol podávání a způsob podávání pro konkrétní použitý prostředek, které povedou k dosažení "účinné koncentrace" u konkrétního jedince. Odborník v oboru také snadno vybere a použije vhodný indikátor "účinné koncentrace" sloučeniny podle předkládaného vynálezu, pomocí přímé (např. analytické chemické analýzy) nebo nepřímé (např. pomocí vedlejších indikátorů virové infekce, jako je p24 nebo reverzní transkriptasa při léčbě AIDS nebo AIDS-like syndromu) analýzy vhodných vzorků od pacienta (například krve a/nebo tkáně).

Dále, při určování účinných koncentrací u pacientů při léčbě AIDS nebo AIDS like onemocnění jsou dostupné zvířecí modely a tyto modely se značně využívají při hodnocení in vivo účinnosti různých protokolů genové terapie proti HIV (Sarver et al. (1993b), výše). Mezi tyto modely patří, myši, opičí a kočičí modely. Ačkoliv nejsou tato zvířata přirozeně citlivá na HIV, mohou být chimérické myši (např., SCID, bg/nu/xid, NOD/SCID, SCID-hu, imunokompetentní SCID-hu, BALB/c s ablovanou kostní dření) rekonstituované lidskými mononukleárními buňkami periferní krve (PBMC), tkáněmi lymfatických uzlin, fetálních jater/thymu nebo jinými tkáněmi, infikovány vektorem nebo HIV a potom mohou být použity jako modely pro patogenesi HIV a genovou terapii. Obdobně, může být použit model virus opičí imunodeficiency

(SIV)/opice, stejně jako model virus kočičí imunodeficiency/kočka.

Tyto modely mohou být také použity pro určení bezpečnosti vektoru pro validaci vektorového systému pro klinické studie. Významnou aplikací je použití těchto zvířecích modelů pro studie biologické distribuce. Transdukované buňky, výhodně lidské buňky, obsahující vektor, jsou injikovány do zvířecího modelu a bezpečnost vektoru se určí podle absence genetického materiálu vektoru ve zvířecích tkáních. Absence genetického materiálu vektoru ve zvířecích tkáních znamená, že vektor se autonomně nereplikuje bez přítomnosti pomocného elementu nebo přirozeného virus a proto se považuje za bezpečný pro klinické použití u lidí. Přítomnost vektoru za nepřítomnosti pomocného vektoru nebo pomocného viru bude považována za bezpečnostní riziko, pokud se nepředpokládá, že by se vektor replikoval autonomně. Nicméně, v případě, že se předpokládá autonomní replikace vektoru, tak musí být vybrána jiná kritéria bezpečnosti, například nepřítomnost replikace v některých tkáních nebo úroveň replikace u živočicha. Přítomnost nebo absence vektoru může být určena PCR, nebo FACS analýzou, když testovaný vektor exprimuje markerový gen, který může být vizualizován FACS, ale existují i jiné způsoby detekce.

Obecně, výhodné je množství vektoru dostatečné pro dosažení tkáňové koncentrace podaného ribozymu (nebo vektoru) od přibližně 5 $\mu\text{g/kg}$ do přibližně 300 mg/kg tělesné hmotnosti a den, zejména od přibližně 10 $\mu\text{g/kg}$ do přibližně 200 mg/kg tělesné hmotnosti a den. V některých aplikacích, například při lokálním, očním nebo vaginálním podání, je výhodné podání více dávek za den. Dále, počet dávek se liší v závislosti na způsobu podání a konkrétním vektoru.

Při léčbě některých jedinců infikovaných virem je nutné použít "mega-dávkovací" režim, při kterém jsou aplikovány velké dávky vektoru, ponechá se určitá doba pro účinek vektoru a potom se podá jedinci vhodné činidlo pro inaktivaci aktivní složky. Ve způsobu podle předkládaného vynálezu je léčba (tj. replikace vektoru v kompetici s léčeným virem) nutně omezena. Jinými slovy, jak se koncentrace - například - HIV snižuje, tak se koncentrace vektoru závislého na HIV v produkci virionů také snižuje.

Farmaceutický prostředek může obsahovat další farmaceutická činidla společně s vektorem podle předkládaného vynálezu, když je použit pro terapeutickou léčbu AIDS. Tyto další farmaceutická činidla mohou být použita obvyklým způsobem (t.j. jako činidla pro léčbu HIV infekce), stejně jako mohou být použita pro selekci crHIV virů in vivo. Taková selekce, jak je zde popsána, podporuje šíření podmíněně se replikujícího HIV a umožňuje účinnější kompetici podmíněně se replikujícího HIV s přirozeným HIV, což nutně omezuje patogenitu přirozeného HIV. Konkrétně se předpokládá použití antivirového činidla, jako je zidovudin. Dalšími příklady činidel, která mohou být použita, jsou antivirové sloučeniny, imunomodulátory, imunostimulační činidla, antibiotika a další činidla a terapeutické režimy (včetně těch, které jsou označovány jako alternativní medicína), které mohou být použity pro léčbu AIDS. Mezi antivirové sloučeniny patří, například, ddI, ddC, gancyklovir, fluorované dideoxynukleotidy, non-nukleosidové analogy, jako je nevirapin (Shih et al., PNAS, 88, 9878-9882 (1991)), TIBO deriváty, jako je R82913 (White et al., Antiviral Research, 16, 257-266 (1991)), a BI-RJ-70 (Shih et al., Am. J. Med., 90(Suppl. 4A), 8S-17S (1991)). Mezi imunomodulační a imunostimulační sloučeniny patří například různé interleukiny, CD4, cytokiny, protilátkové přípravky,

krevní transfuze a buněčné transduce. Mezi antibiotika patří, například, antimykotika, antibakteriální sloučeniny a léčiva proti *Pneumocystis carinii*.

Podání sloučeniny inhibující virus s dalšími antivirovými činidly a konkrétně se známými RT inhibitory, jako je ddC, zidovudin, ddI, ddA, nebo jiné inhibitory, které účinkují proti dalším HIV proteinům, jako jsou anti-TAT činidla, bude inhibovat většinu nebo všechna replikační stadia životního cyklu viru. Dávky ddC a zidovudinu používané při AIDS nebo ARC byly publikovány. Virostatické rozmezí pro ddC je obecně mezi 0,05 μM a 1,0 μM . Rozmezí od přibližně 0,005 do 0,25 mg/kg tělesné hmotnosti je virostatické u většiny pacientů. Dávkové rozmezí pro orální podání je o něco širší, například 0,001 až 0,25 mg/kg v jedné nebo ve více dávkách v intervalech 2, 4, 6, 8 a 12 hodin atd.. Výhodně se 0,01 mg/kg tělesné hmotnosti podá každých 8 hodin. Při podání v kombinované terapii může být antivirová sloučenina podána například ve stejnou dobu jako vektor podle předkládaného vynálezu, nebo může být aplikace rozvržena podle potřeby. Vektor může být také kombinován v prostředku. Dávky každé složky budou při kombinovaném podání o něco nižší než při podání každé složky samotné.

Příklady provedení vynálezu

Sloučeniny a způsoby podle předkládaného vynálezu budou nyní popsány v následujících příkladech. Tyto příklady slouží pro ilustrování předkládaného vynálezu a nijak neomezují rozsah předkládaného vynálezu.

Příklad 1

Tento příklad popisuje konstrukci podmíněně se replikujících vektorů podle předkládaného vynálezu. Konkrétně tento příklad popisuje konstrukci podmíněně se replikujících vektorů na bázi HIV, tj. crHIV vektorů.

Jedním z nejvýraznějších aspektů patogenese HIV je produkce genetických variant viru. Rychlá produkce variant HIV in vivo naznačuje, že virus se musí zkoumat v rámci Darwinistického genetického modelu (viz, např., Coffin, Curr. Top. Microbiol. Immunol., 176, 143-164(1992); a Coffin, Science, 267, 483489 (1995)). Varianty vznikají v důsledku nespolehlivosti molekuly reverzní transkriptasy, která vytváří mutace v provirech nově transkribovaných z virové genomové RNA. Proto za in vivo podmínek postrádajících kritická místa a při množství replikačních cyklů dochází k významné genetické variaci s produkcí mnoha variant viru. Za těchto podmínek přirozený HIV predominuje, protože má největší selekční výhodu. Nicméně, za přítomnosti inhibitoru, například zidovudinu, bude selektována varianta viru, která má vyšší selekční výhodu než přirozený kmen, a tato varianta nakonec převládne (Coffin (1992) a (1995), výše). Na tomto základě předkládaný vynález poskytuje strategii podmíněně se replikujícího virového vektoru, který dodává nepatogením HIV-1 genomům selekční výhodu na patogením přirozeným HIV-1.

Tyto nepatogení, podmíněně se replikující HIV (crHIV) vektory jsou defektní HIV, které se replikují a balí pouze v buňkách, které jsou infikovány přirozeným HIV. CrHIV genomy kompetují s přirozeným HIV a snižují virovou nálož patogeního přirozeného HIV. Snížení virové nálože přirozeného HIV u infikovaného jedince vede ke zvýšené šanci na přežití. Toto snížení by mělo také snižovat schopnost infikovaného jedince přenášet přirozený HIV na neinfikované

jedinice. Pro úspěšnou kompetici crHVI s přirozeným HIV-1 jsou významné dva faktory: (1) selektivní výhoda crHIV genomů nad přirozenými HIV genomy, a (2) selektivní výhodu buněk exprimujících crHIV nad buňkami exprimujícími přirozený HIV (t.j. selektivní výhoda pro produkci crHIV virionů z crHIV-exprimujících buněk nad buňkami exprimujícími přirozený HIV).

crHIV vektory se podmíněně replikují v důsledku skutečnosti, že obsahují sekvence nutné pro expresi, dimerizaci a balení RNA, ale neexprimují funkční (t.j., přirozené) HIV-1 proteiny. Selektivní výhoda byla dodána crHIV vektorům insercí ribozymové kazety, která štěpí U5 region přirozeného HIV genomu, ale ne crHIV U5 RNA.

Ribozymy přítomné ve vektoru neštěpí crHIV RNA proto, že U5 region crHIV RNA byl modifikován substitucí konzervativní baze (substitucí baze přítomné na jiných kmenech HIV), která brání účinné vazbě ribozymu a štěpení v těchto místech. Dále, crHIV jsou nepatogenní, protože nekódují proteiny, které se považují za odpovědné za smrt CD4+ buněk. Když se buňky infikované HIV (které byly transfektovány crHIV vektorem) aktivují, tak mohou komplementovat genomové deficity crHIV, což vede k produkci crHIV virionů.

Obecně, crHIV genomy byly konstruovány z kompletního, infekčního klonu HIV, pNL4-3 (Adachi et al. (1986), výše). Všechny klonovací reakce, manipulace s DNA, RNA a proteiny, byly provedeny za použití metod dobře známých odborníkům v oboru, které jsou popsány, například, v Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. (Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1982)). Enzymy a činidla použitá v těchto reakcích byly získány od komerčních dodavatelů (např., New England Biolabs, Inc., Beverly, Mass.; Clontech,

Palo Alto, Calif.; a Boehringer Mannheim, Inc., Indianapolis, Ind.) a byly použity podle návodů výrobců. Dále, udržování a propagace vektorů se provedly za použití technik dobře známých v oboru, které byly popsány dříve (např., Dropulic' et al. (1992), výše; a Dropulic' et al. (1993), výše).

pNL4-3 byl štěpen enzymy Pst I (který štěpí v gag, přibližně v pozici +1000 od začátku transkripce) a XhoI (který štěpí v nef, přibližně v pozici +8400 od začátku transkripce), a byla insertována polylinkerová sekvence obsahující běžná restriční místa. 0,86 kb BglII až BamHI fragment obsahující rev responsivní element (RRE) se klonoval do Bam HI místa přítomného na polylinkerové sekvenci. Tyto úpravy vedly k deleci od gag kódujícího regionu do U3 kódujícího regionu (t.j., též k deleci nef genu) v sekvenci přirozeného HIV. Ačkoliv byl vektor schopen produkovat zkrácený gag transkript, nebyl kompletní funkční Gag protein produkován vektorem. Nicméně, protože jsou funkce přirozeného Gag nutné podle předkládaného vynálezu, může být gag sekvence mutována pro zabránění translaci Gag proteinu.

Ribozymová kazeta obsahující jeden nebo více zde popsaných ribozymů byla insertována do Sal I místa za Bam HI místo. Pro provedení tohoto byly syntetizovány komplementární deoxyoligonukleotidové sekvence kódující ribozym, ty byly tepelně zpracovány a potom klonovány do Sal I místa. Ribozymy použité pro konstrukci crHIV vektorů byly kladívkové ribozymy. Tyto ribozymy obsahovaly katalytickou doménu skládající se z 22 párů bazí a dvě hybridizační domény skládající se každá z 9 párů bazí. Ribozymy byly cílené na +115 nebo +133 místa (t.j. počet párů bazí od začátku transkripce) U5 RNA sekvence. Hybridizační domény a

katalytická doména (podtržená) ribozymů cílených na +115 místo a +133 místo jsou následující:

CACACAACACTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACGGGCACA (" +115 ribozym")

SEQ ID NO:3;

ATCTCTAGTCTGATGAGGCCGAAAGGCCGAAACCAGAGTC (" +133 ribozym")

SEQ ID NO:4.

Ribozymová kazeta se skládala z jediného, dvojitého nebo trojitého ribozymu umístěných v tandemu. Vektory obsahující jediný nebo trojitý ribozym mohou být snadno konstruovány a cíleny na U5 HIV RNA, v pozici +115. Vektory obsahující dvojité ribozymy mohou být snadno konstruovány a cíleny na stejné místo v pozici +115 nebo na různá místa v pozicích +115 a +133 U5 HIV RNA.

Pro dokončení konstrukce vektorů se crHIV vektory upravily tak, aby byly resistantní na štěpení ribozymy (t.j. v jejich RNA manifestaci) mutováním místa rozpoznávaného kladívkovými ribozymy v U5 regionu crHIV genomu. Pro provedení tohoto cíle se dvouřetězcový oligonukleotid (t.j. AAGCTTGCCTTGAGTGCTCAAAGTAGTGTGTGCCACCTGTTGTGTGACTGGCAG CTAGAGATCCCACAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCC SEQ ID NO:13) obsahující substituce bazí uvedené na Obr. 2 SEQ ID NO:2 použil pro vložení modifikovaných míst do vektoru. Konkrétně, substituce bazí byly vloženy do ribozymových hybridizačních a štěpících míst v bazích 115 a 133. Konkrétně, jak je uvedeno na obr. 2, byly voženy mutace v bazích 113, 114, 132, 134 a 142. Tato místa mohou být modifikována tak, aby obsahovaly jakékoliv mutace (t.j., GTGTGCCNNCTGTTGTGTGACTCTGGNANCTAGAGANC, kde N může být jakýkoliv mutantní nukleotid, SEQ ID NO:14). Výhodně, jsou však tyto sekvence mutovány tak, že obsahují, například, G

na A substituci v místě +113 (t.j., tak, že sekvence obsahuje GTGTGCCCATCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATC, SEQ ID NO:15), a U (t.j., T, pro DNA sekvence) na C substituci v místě +114 SEQ ID NO:5, a U (t.j., T v DNA sekvencích) na C substituci v místě +132 SEQ ID NO:6, A na G substituci v místě +134 (t.j., tak, že sekvence obsahuje GTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAGCTAGAGATC, SEQ ID NO:16) a U (t.j., T pro DNA sekvence) na A substituci v místě +142, kde tyto mutace mohou být samostatné nebo kombinované. Konkrétně, za absence jiných U5 mutací, brání U (t.j. T pro DNA sekvence) na C substituce v místě +114 SEQ ID NO:5 a/nebo místě +132 SEQ ID NO:6 v crHIV U5 RNA štěpení ribozymem (Uhlenbeck (1987), výše). Insertované substituce bazí jsou přítomné v různých jiných kmenech HIV (Myers et al., HIV Sequence Database, Los Alamos Nat. Lab. (1994)), což naznačuje, že tyto substituce nesnižují replikační kapacitu HIV genomu.

Uvedený způsob může být použit pro konstrukci dalších podmíněně se replikujících vektorů, například skládajících se z odlišných virových genomů (např. různých RNA virů), nebo obsahujících různá genetická antivirová činidla. Dále, podmíněně se replikující vektor může být dále modifikován tak, aby dodával hostitelské buňce, do které je vektor vložen, selektivní výhodu nad hostitelskou buňkou obsahující přirozený virus. Například může být takový vektor modifikován tak, aby dále kódoval mnohotnou lékovou resistenci, nebo mutovanou proteasu nebo reverzní transkriptasu.

Tyto metody mohou být také samozřejmě použity pro konstrukci různých pomocných vektorových konstruktů, jak jsou zde popsány.

Příklad 2

Tento příklad popisuje resistenci podmíněně se replikujících vektorů, konkrétně crHIV vektorů, na štěpení ribozymem.

Pro potvrzení resistance crHIV vektorů na štěpení ribozymem se provedla transkripce in vitr. Pro provedení tohoto cíle se ribozymové sekvence klonovaly do Xho I místa pBluescript KSII (Stratagene, La Jolla, Calif.). 0,21 kilobázový (kb) Bgl II fragment obsahující mutovaný crHIV U5 region se excidoval z crHIV vektoru a insertoval se do Bam HI místa pBluescript KSII. Vzniklé modifikované pBluescript KSII vektory se linearizovaly za použití Bss HII před tím, než se provedla transkripce in vitro. Podobný plasmid exprimující přirozenou HIV U5 RNA (popsaný v Myers et al. (1994), výše) se použil jako kontrola. Před transkripcí in vitro se linearizoval za použití Eco RI.

Radioaktivně značená U5 HVI RNA a ribozymová RNA se produkovaly in vitro transkripcí vektorů, jak bylo popsáno dříve (Dropulic' et al. (1992), výše). Radioaktivně značené transkripty se inkubovaly společně (v molárním poměru cílová sekvence:ribozym 1:2) v 1x transkripčním pufru obsahujícím 40 mM Tris-HCl, pH 7,5, 6 mM MgCl₂, 2 mM Spermidinu, a 10 mM NaCl. Vzorky se zahřály na teplotu 65°C a potom se ochladily na teplotu 37 °C 5 minut před přidáním roztoku stop pufru obsahujícím 95% formamid, 20 mM EDTA, 0,05% bromfenolovou modř a 0,05% Xylene Cyanol FF. Produkty se potom rozštěpily pomocí elektroforesy na denaturačním polyakrylamidovém gelu (PAGE) a detekovaly se autoradiograficky.

Když se přirozená U5 HIV RNA inkubovala s transkriptem obsahujícím jediný ribozym k místu +115, tak bylo jasné

pozorovatelné štěpení. Takové štěpení vede ke vzniku produktů P1 a P2. Štěpení bylo také pozorováno, když byla přirozená HIV RNA inkubována s RNA obsahujícími dvojité ribozymy buď ke stejnému místu, nebo k různým místům. Když byl transkript obsahující ribozym namířený proti dvěma různým místům v přirozené HIV RNA, tak vznikaly produkty P1, P2 a P3. P3 vznikal štěpením v +133 místě.

Pro srovnání, když byla modifikovaná US-obsahující crHIV RNA inkubována s jediným ribozymem namířeným k místu +115 nebo s dvojitým ribozymem namířeným k místům +115 nebo +133, tak nebyly detekovány produkty štěpení. Tyto výsledky tedy potvrzují, že crHIV U5 RNA jsou resistantní na štěpení ribozymy, zatímco přirozené U5 HIV RNA jsou štěpeny anti-U5 ribozymy. Dále výsledky potvrzují, že postupy podle předkládaného vynálezu mohou být použity pro dodání selektivní výhody v replikaci podmíněně se replikujícím vektorům (včetně vektorů jiných než jsou crHIV vektory), po jejich vnesení do hostitelské buňky, ve srovnání s přirozeným kmenem viru.

Příklad 3

Tento příklad stručně popisuje klíčové kroky v produkci pomocných vektorových konstruktů podle předkládaného vynálezu. Pokud není uvedeno jinak, byly sekvence nukleové kyseliny kódující různé retrovirové elementy získány z veřejně dostupných zdrojů. Všechny popsané kroky vyžadují sekvenování celého kódujícího regionu pro všechny proteiny za účelem detekování chyb a přímé opravy, pokud jsou nutné.

Pro degenerování tat sekvence a umožnění jejího ovlivnění anti-tat ribozymy se plasmid pTAT mutoval za použití QuickChange kit od Stratagene tak, aby obsahoval místo pro

cílené navázání anti-tat ribozymové kazety. Potom se mutovaná tat sekvence klonovala do expresního vektoru na bázi pMG plasmidu od InvitroGen. Tat sekvence se fúzovala na LRES v prvním ATG za použití NcoI místa. Vektor se dále modifikoval tak, aby obsahoval gen pro resistenci na ampicilin a SV40 sekvenci rozpoznávající počátek replikace.

Sekvence obsahující HIV-1 rev a RRE elementy se získaly excidováním třetího exonu rev společně s RRE z pNL4-3, a klonovaly se do pLITMUS38 plasmidu. Rev sekvence do nukleotidu 208, která zahrnuje druhý exon a část třetího exonu do BamHI místa, se sestavila ze 3 syntetických nukleotidů za použití ETR a PCR. PCR produkt se klonoval do pUC18 a potom se subklonoval do pLITIRRErev3. Dva úseky rev se fúzovaly za použití QuickChange kitu. RRE z HIV-2 se substituoval za HIV-1 RRE a oba konstrukty se klonovaly do gag/pol/Rz vektoru. Degenerovaná rev sekvence se také použila přímo pro subklonování do balícího konstruktu pro vektory, jako je pVLRPac-2.

Pro degenerování prvních 42 nukleotidů gag, které jsou nutné pro balení a které musí být součástí vektorového plasmidu se BssHII/SpeI fragment z pNL4-3 subklonoval do pLITMUS38. Gag sekvence se degenerovala za použití QuickChange kitu tak, že byly eliminovány všechny složky balícího signálu, a HIV hlavní sestřihové donorové místo se reinsertovalo místo prvního ATG kodonu gag. Degenerovaný gag se subklonoval do pNgp plasmidu, daru Dr. Conde, místo 5' LTR, za vzniku sousední gag sekvence. Toto vedlo k tomu, že si konstrukt stále ještě zachoval sestřihové akceptorové (SA) a sestřihové donorové (SD) sekvence používané k expresi vif proteinu. Tento sestřih může vést k přítomnosti ribozymové kazety v sestřižené mRNA, což je nežádoucí kvůli možnému štěpení sestřižené retrovirové (podmíněně se

replikující) vektorové RNA a z toho plynoucího snížení titru sbaleného transdukujícího vektoru. Překrývající se PCR se použila k mutování SA a SD sekvencí. PCR produkt se klonoval do gag/pol konstruktů a potom se provedla inserce anti-U5 ribozymové kazety a rev a RRE elementů.

Env protein viru vesikulární stomatitidy (VSV-G) se klonoval do prvního MCS pMG-tat vektoru za zisku obalové expresní kazety. Pro zjednodušení dalších klonovacích kroků se VSV-G klonoval jako lepivý fragment do BglIII místa doplněného Klenow polymerasou. Získal se konstrukt s SV40 sekvencí rozpoznávající počátek replikace (ori). Pro dokončení balení plasmidů jako pomocných vektorů se rev sekvence subklonovala do druhého MCS, což vedlo k zisku plasmidu označeného jako pVIRPAC-2 (viz obr. 6).

Pro přípravu pomocných vektorů ze stejných balících plasmidů se gag/pol/Rz/RRE/rev kazeta subklonovala do pMG-tat-G plasmidu (bez SV40 ori). Připravily se konstrukty s RRE z HIV-1 nebo HIV-2 (pVLRPac-1.1 a 1.2Rz na obr. 6). Pro kontrolu funkce ribozymu se ribozymové kazety deletovaly v konečném HIV-2 konstruktě obsahujícím RRE, za zisku pVIRPac-1.2. Nakonec se pro testování hypotézy, že umístění gag/pol RNA do sestřihového mechanismu může bránit štěpení retrovirové (podmíněně se replikující) vektorové genomové RNA, se intron z β -globinu insertoval místo SV40 poly A signálu (pVIRPac-1.2RzIn). V jiných provedeních předkládaného vynálezu je insertovaný intron odvozen od HIV, výhodně jde o kompletní HIV intron, který směřuje RNA do buněčného mechanismu sestřihu (například do spliceosomu).

Příklad 4

Tento příklad popisuje účinnost různých pomocných vektorových konstruktů. V těchto pokusech se použily standardizované protokoly pro produkci retrovirů dočasnou transfekcí. Megapřípravky plasmidové DNA se produkovaly za použití známých technik. Pro produkci viru se 293T buňky kointefektovaly retrovirovým vektorem a pomocným vektorem za použití kalcium-fosfátové metody. Buněčné supernatanty se odebíraly přibližně 40 hodin po transfekci, přefiltrovaly se přes 0,45 μm stříkačkové filtry a titrovaly se na HT1080 buňky. Titry vektoru se vypočetly na základě jeho transdukční účinnosti měřené průtokovou cytometrií přibližně za 72 hodin po infekci. Pro výpočty titrů se použil arbitrážní vzorec $N \cdot 400000^*$, kde N je frakce transdukovaných buněk; 400000 je přibližný počet buněk v době infekce; a F je faktor ředění.

Pro zvýšení bezpečnosti pomocného vektoru snížením možnosti generování RCV po rekombinaci s retrovirovým vektorem na bázi HIV-1 se anti-U5 ribozymová kazeta insertovala do některých pomocných vektorů. Ribozym štěpí a destruuje retrovirovou vektorovou RNA, pokud je současně sbalena do virionů. Je však možné, že ribozym bude štěpit také vektorovou RNA v produkčních buňkách, což by interferovalo s produkcí viru. Pro další zvýšení bezpečnosti obsahovaly pomocné konstrukty také RRE-2 element, který dále snižoval pravděpodobnost současného balení vektoru a pomocného elementu do virové částice. Tyto pomocné elementy byly použity pro balení pN1(cPT)GFP vektoru.

Jak je uvedeno na obr. 7, přítomnost ribozymu na pomocném konstruktu měla pouze malý vliv na titr vektoru. Významné je, že pomocný konstrukt (pVirPac1.2RzIn) obsahující intron

pro ovlivnění transportu pomocné RNA v buňce pryč od vektorové RNA, neměl také žádný významnější vliv na titr vektoru. Titr vektoru generovaný tímto 2-plasmidovým systémem byl srovnatelný s titrem získaným za použití běžného 3-plasmidového transfekčního systému. Podobné pokusy s pomocným konstruktem obsahujícím RRE-1, pVirPac1.1, ukázaly přibližně 5-násobné snížení účinnosti balení. Tak inkorporace RRE-2 do pomocného vektorového konstruktu nejen zvyšuje jeho bezpečnost, ale také zvyšuje jeho bezpečnost tím, že snižuje pravděpodobnost homologní rekombinace, ale také neočekávaně zvyšuje účinnost balení.

Příklad 5

Tento příklad testuje to, zda je exprese MGMT genu z HIV-LTR sestřižené mRNA dostatečná pro účinnou selekci MGMT transdukovaných buněk pomocí BG a BCNU. Obr. 10A ukazuje použité vektory. Obr. 10B ukazuje efektivní přežívání buněk a jejich expanzi za přítomnosti cytocidních koncentrací BG/BCNU. Zkratky jsou následující: M, MGMT; I, IRES; G, GFP; W, Woodchuck post-transkripční element; a C, CMV promotor. Všechny výše uvedené prvky se klonovaly do pN1 vektoru, za RRE element tak, že jakýkoliv gen přímo 3' za RRE elementem mohl být exprimován ze sestřižené RNA, protože sestřihové akceptorové místo bylo umístěno těsně proximálně k místu inserce genu. Obr. demonstruje, že zatímco kontrolní buňky netransdukované lentivirovým vektorem ("CGFP") nerostou ani nepřežívají, všechny vektory exprimující MGMT přežívají a rostou.

Buňky transdukované pN1CMIG byly mrtvé po 14 dnech, zatímco buňky transdukované pN1MCG byly mrtvé po 21 dnech. Důležité je, že buňky transdukované pN1MIG a pN1MIG-W zůstávaly živé po 29 týdnech, což ukazuje na dlouhodobé

přežívání buněk transdukovaných vektorem bez insertovaného interního promotoru.

Překvapivé je, že vektory exprimující MGMT z HIV-LTR sestřižené mRNA, byly selektovány velmi účinně. Exprese MGMT neomezuje škálu vložených genů na MGMT nebo selekční geny. Tyto výsledky naznačují, že v T-lymfocytech může být exprimován z HIV-LTR promotoru jakýkoliv gen. Obdobná data byla získána pro non-T buňky, což dokazuje, že exprese genů z HIV-LTR sestřižené mRNA může být aplikována na expresi genů v mnoha typech buněk.

Dále, bicistronický charakter "MIG" konstruktů demonstruje, že po vazbě na IRES může být exprimováno více genů. Příklady jsou MGMT nebo selekční geny s chemokiny, interferony nebo genetickými antivirovými činidly.

Příklad 6

Lidské CD4⁺ T-lymfocyty se testovaly na senzitivitu k BG a BCNU. CD14 depletované CD4⁺ buňky se přečistily z periferní krve s nebo bez mobilizace cytokiny. Buňky se kultivovaly v 3 $\mu\text{g/ml}$ PHA a 5 ng/ml IL-2 po dobu 4-7 dnů před ošetřením BG a BCNU. Za vhodných podmínek za absence BFG a BCNU mohou být CD4⁺ buňky expandovány během 10 denní kultivace na více než 100-násobek. Testované dávky byly 0, 0,2, 0,5, 2, 5, 10, 20, 30 a 40 μM BG a 0,2, 5, 10, 20, 30, a 40 μM BCNU. Provedly se série tří pokusů.

Obr. 11 ukazuje reprezentativní výsledky z výše uvedeného pokusu. Expan byla redukována na 20-násobek po 10 μM BG a μM BCNU, a na přibližně 10-násobek nebo méně po 20 μM nebo více BCNU. Ošetření CD4⁺ buněk BCNU nevedlo ke zpomalení růstu. Proto nejsou CD4 buňky, na rozdíl od SupT1 buněk použitých

ve výše uvedeném příkladu, sensitivní na nízké dávky BCNU samotného. Toto ukazuje na vyšší expresi MGMT v primárních CD4+ buňkách, ačkoliv se předpokládá variace v expresi MGMT na základě variace mezi dárci T-lymfocytů.

Přítomnost jak BG, tak BCNU, v koncentraci 10 μM nebo vyšší, byla nejlepší v senzibilizaci CD4+ buněk, a BG v koncentraci 0,5 μM a BCNU v koncentraci 15 μM senzibilizovaly buňky podobně. Zvyšující se dávka BG nevedla ke zvýšenému zabíjení buněk, ačkoliv se toxicita pro CD4+ buňky zvyšovala s rostoucí dávkou BCNU.

Jak je uvedeno na obr. 11, úroveň selekce se obvykle zvýšila 5-násobně ze základní hodnoty 20% na 100%. V jednom pokusu se selekce zvýšila z 3% na >90%. 10-100-násobná expanze byla pozorována po selekci a jednom týdnu; 20-400 násobná selekce byla pozorována při 2,5-násobku, s průměrem 80-násobku.

Příklad 7

Předchozí práce ukázaly na korelaci mezi přečištěním autotransplantátů kostní dřeně a zlepšením přežívání bez známek onemocnění po autologní transplantaci. D8le se přečištění normálních T-lymfocytů z allotransplantátů použilo pro snížení rizika reakce štěpu proti hostiteli. Obr. 13A ukazuje účinnost transdukujících transdukce nádorových buněk při jednom kole transdukce za použití pN1(cPT)ASenvGFP. Obr. 13B potvrzuje, že nádorové buňky mohou být selektivně a účinně usmrceny za přítomnosti CD34+ kmenových buněk, protože CD34+ buňky nevykazují žádnou významnější transdukci po jednom kole transdukce.

Aplikace výše uvedeného postupu na eliminaci nádorových buněk ze štěpů autologní kostní dřeně začíná získáním kostní dřeně odběrem kmenových buněk periferní krve. CD34+ buňky se přečistí za použití CD34-protilátkové kolony a potom se transdukuje podmíněně se replikujícím vektorem v MOI 2 až 400 během 2 až 16 hodin. Buňky se volitelně inkubují za přítomnosti jednoho nebo více faktorů aktivujících buňky, jako jsou cytokiny, pro usnadnění transdukce nebo pro udržování buněk. Buňky se potom podají léčenému jedinci.

Obdobný způsob pro cílené ovlivnění T-lymfocytů v allotransplantátech využívá podmíněně se replikujících vektorů, v kombinaci s protokolem stabilní transdukce s vysokou účinností, jako je protokol popsáný v související U.S. patentové přihlášce pořadové č. (ještě nepřirazeno) podané 31.8.2000 jako spis č. 397272000400, pro selektivní transduci T-lymfocytů.

Příklad 8

Obr. 14, panel B, ukazuje účinné pseudotypování HIV-1 různými obalovými proteiny za použití vektorů podle předkládaného vynálezu.

Podobné iniciální titry Lentivirového vektoru pseudotypovaného VSV-G obalovým proteinem mohou být účinně zvýšeny pomocí přečištění využívajícího odstředění při vysoké rychlosti nebo diafiltrace. Vektor pN1(cPT2)ASenvGFP byl balen s pVirPac1.2Rz2. Tabulka ukazuje (a) celkový protein ve vzorku, (b) titr vektoru ve vzorku; a (c) násobek přečištění vektoru z cizorodého materiálu ve vzorku.

Krok procesu	Celkový protein, mg	Titř vektoru, TU/ml	Přechišťění (násobek)
Začátek po projasnění	3207	$5,9 \times 10^6$	N.A.
Koncentrování	722	$8,2 \times 10^7$	61,7
Diafiltrace	224	$6,8 \times 10^8$	1650

Jak je patřné z tabulky, celkový protein v supernatantu vektoru po odstranění buněčné drtě je 3027 mg. Zatímco titř vektoru je v tomto stadiu $5,9 \times 10^6$. Vzorek se potom zahustí ultrafiltrací a potom je celkový protein ve vorku 722 mg a titř vektoru se zvýší na $8,2 \times 10^7$, což znamená 61,7-násobné přechišťění. Po zahustění ultrafiltrací se vzorek diafiltruje a potom se celkový obsah proteinu ve vzorku sníží na 224 mg, zatímco titř vektoru se zvýší na $6,8 \times 10^8$ na ml, což znamená 1650-násobné přechišťění. Toto demonstruje, že cizorodé proteiny mohou být odstraněny a lentivirový vektor pseudotypovaný VSV-G může být za použití výše uvedeného protokolu přechišťěn.

Výše uvedený postup může být použit také pro vektory produkované v Hela-tat buněčné linii generující titry přibližně 10^{10} , jak je uvedeno na Obr. 16.

Příklad 9

Alternativní pomocné konstrukty pro pseudotypování podmíněně se replikujících vektorů byly vyvinuty umístěním exprese VSV-G pod kontrolu dependentní na Rev. Protože mRNA obsahující RRE nejsou exprimovány za absence Rev, předpokládalo se, že jsou defektní v důsledku přítomnosti cis-represivních sekvencí (CRS) umístěných v gag/pol, pol a

env genech. Pro CRS bylo popsáno, že zachycuje mRNA v jádru, destabilizuje mRNA nebo brání asociaci mRNA s ribosomy. Tak může být přítomnost CRS a Rev v trans formě, v kombinaci se sestřihem mRNA, použita pro produkci regulované genové exprese.

Rev/RRE/CRS systém byl použit pro řízení exprese VSV-G Rev-dependentním způsobem. Pomocné konstrukty pro tento účel obsahovaly 5' sestřihové donor místo; HIV-2 RRE a 3' sestřihové akceptorové místo (výhodně pro tat/rev); a CRS fragment z HIV-2 pol regionu pro snížení pravděpodobnosti rekombinace s vektory na bázi HIV-1; a volitelně neindukovatelný promotor, jako je CMV okamžitý (IE) promotor, místo jakéhokoliv indukovatelného promotoru. RNA kódující VSV-G je i přesto, že je produkována bez indukce, regulována přítomností Rev, protože pouze nesestřižená RNA může být exportována a exprimována v cytoplasmě bez Rev. Exprese VSV-G zůstává zprostředkována Rev, protože Rev působí proti nukleární retenci transkriptů řízené sestřihem mRNA a CRS.

Výhodně není sestřihovým donorovým místem syntetické 5' β -globinové donorové místo, ale sestřihové donorové místo nativního HIV, nebo HIV analogu. HIV-2 RRE je 280 bp fragment obsahující jak HIV-2 RRE, tak sestřihové akceptorové místo pro Tat/Rev; a CRS je 550 bp interní fragment z HIV-2 pol sekvence. CRS a RRE elementy z HIV-2 mohou být připraveny PCR. Příklady takových pomocných konstruktů jsou pCGCRSRRE, pCGCRSRzRRE, a další uvedené na obd. 15A-15E. Konečné plasmidové konstrukty se ověřily trávením mnoha restrikčními enzymy. Zatímco pEH-GP a pCMV-GP jsou konstrukty, které konstitutivně exprimují gag-pol polyprotein, mohou být použity také jiné promotory, včetně lentivirového nebo HIV promotoru.

Obr. 17 ukazuje výsledky při použití různých donorových sestřihových kombinací pro Rev dependentní expresi VSV-G. Jak je uvedeno, odstranění tetracyklinu vede k Rev dependentní expresi.

Další příklady kombinací sestřihových donorových míst, stejně jako konvenčních sekvencí, jsou uvedeny dále. Ačkoliv mohou být použity všechny kombinace, jsou HIV major, HIV-1 env, HIV-2 major, a analogové donorové sestřihové kombinace výhodné.

KONVENČNÍ SESTŘIHOVÁ

DONOROVÁ SEKVENCE: NNNNAGGTAAGTNNN (SEQ ID NO:7)

BETA-GLOBINOVÁ SESTŘIHOVÁ

DONOROVÁ SEKVENCE: NGGGCAGGTAAGTAT (SEQ ID NO:8)

HIV MAJOR SESTŘIHOVÁ

DONOROVÁ SEKVENCE: NNGACTGQTGAGTAN (SEQ ID NO:9)

HIV-1 ENV SESTŘIHOVÁ

DONOROVÁ SEKVENCE: AAAGCAGTAAGTAGT (SEQ ID NO:10)

HIV-2 ENV SESTŘIHOVÁ

DONOROVÁ SEKVENCE: AGACAAGTGAGTAAG (SEQ ID NO: 11)

HIV-2 MAJOR SESTŘIHOVÁ

DONOROVÁ SEKVENCE: NNGAAGGTAAGTGCN (SEQ ID NO:12)

ANALGOVÁ SESTŘIHOVÁ

DONOROVÁ SEKVENCE: CTTTCAGGGTGAGTTNN (SEQ ID NO:17)

Příklad 10

Pro identifikování vhodných podmínek pro skladování vektorů před použitím se testovaly různé pufrы a podmínky. Výsledky jsou uvedeny na obr. 18. Možnost skladovat vektory při -20°C a ve farmaceuticky přijatelném pufru bez významnější ztráty vektorů je značnou výhodou při skladování

vektorů před použitím. Je samozřejmé, že může být také provedeno skladování vektorů při -80°C , přibližně -20°C a přibližně 4°C ve farmaceuticky přijatelných prostředcích.

Příklad 11

Tento příklad popisuje aminokyselinovou sekvenci chimérického HIV CTL epitopu pro použití v provádění předkládaného vynálezu (SEQ ID NO: 18). Sekvence obsahuje první methionin (M) pro iniciaci translace a potom následují různé navazující subsekvence odpovídající p17, p24, p15, Pol, Rev, gp120env, gp41env a nef, v příslušném pořadí.

M-

KIRLRPGGNKKYKLKHIVWASRELERFGSEELRSLYNTVAVLYCVHQ
KIEVKDTKEALDTENRNQESQNY-

PIVQNLGQMVHQALSPRTLNAWVKVIEEKAFSPEVIPMFSALSEGATP
QDLNTMLNTVGGHQAAMQMLKATINEEAAEWDRLHPVHAGPIAPGQ
MREPRGTSTLQEQIAWMTNPPPIPVGEIYKRWIILGLNKIVRMYSVSI
FRDYVDRFYKTLRAEQATQEVKNWMTETLLVQNANPDCKTILKALL
EDMMTACQGVGGPGHKARLV-

QEGHQMKDCTERQANFGNFPQSRLEPTAPPE-

ITLWQRPLVDTVLEDMNLVLVGPTPVNISPIETVPVKLGPKVKQWPLA
LVEICTEMEKEGKISKIGPTVLDVGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIPSIW
KGSPAIFQSSMTKNPDIVTYQYMDDLYVDLEEGQHRTKIEELRQHLLR
WGFTTPDKKPIKLPEKESWLVGKLNWASQIYAGIKVKQLIPITEEAELE
ILKEPVHGVYQIYQEPFKNLKTGDVKQLTEAVKITTESIVIWPIQKETW
ETWWTEYWPLVKLWYQLEPIVGAETFYVDGAANKALQDSGLEVNIV
TDSQYALGIESELVSQIIEQLLAWVPAHKGYEAEVIETAYFILKLLW
KGEGAV-

ISGWILNTY-

RVKGIRKNYAENLWVTVYYGVPVWKEATTTLFCASDAKAYDPNPQE
 VVLHEDIISLWDQSLKKLTPLCVTLNCSFNVTTLINTSYTLINCKSSIT
 QACPKCKNVSTVQCRPVVSTQLLNGSLAEEDIVSIEINCTRPNNNTRK
 KITLGPGRVLYTTGENNTLKQIVEKLREIKQFKPEIVMHSFNCGGEFFY
 CNSTQLFLPCRICKIINRWQEVGKAMYAPPIEGQIRCLSNITGVKIEPLG
 VAPTKAKRRVVQR-

RAIEAQQHLGIKQLQARVLAVERYLKDQQLLGITTVPWNASWWYIKI
 FIMIVGVLIVNRVRQGYSPLSFQTHRLVDGFLTLLYHRLIDLLIAKR
 GRRGWAALKYSLNATAIAVDRVIEIVQRTCRAILHIPRRIRQGLERAL
 L-

WPAIRERMVGFPVRPQVPLRPMTYKAAHDLSHFLKEKGGLEGLIYSQ
 KRQDILDLWVYHTQGFFPDWQNYTPGPGTRYPLCFGWCFLVPVVL
 MWKFDSKLAFHHVARELHPEYFKDC-

Příklad 12

Inhibice tvorby wt-HIV DNA v primárních CD4+ T-lymfocytech závislá na dávce byly pozorovány před vložením vektoru na bázi HIV (viz obr. 19). Primární CD4+ T-lymfocyty se transdukovaly vektorem a kultivovaly se po dobu 5 dnů za stimulačních podmínek a potom se vystavily infekci wt-HIV. Použil se vektor na bázi HIV (cPT2) v multiplicitě infekce 1 nebo 10 (na obr. označeno jako cPT2-1 nebo cPT2-10). Transdukované buňky se infikovaly wt-HIV (NL4-3 kmenem) v různých multiplicitách infekce (0,2, 0,01 a 0,001). Poslední dvě dráhy na obr. 19 jsou pozitivní kontroly tvořené pNL4-3 plasmidovou sestřiženou DNA vykazující amplifikaci přirozené HIV DNA. Buňky se lyzovaly v den 8 po

infekci a DNA se extrahovala za použití známých metod. Na extrahované buněčné DNA se provedla PCR za použití primerů specifických pro wt-HIV a vektorové sekvence pro odlišení mezi integrovanou wt-HIV a vektorovou DNA. Et-HIV specifické primery byly také namířené na nef sekvence, které nejsou přítomné v použitém vektoru. Data ukazují, že zatímco při MOI 1 pro transdukující vektor (cPT2-1) jsou buňky permissivní pro tvorbu wt-HIV DNA, jak je patrné podle viditelného signálu wt-HTV DNA ve vzorcích DNA, žádná tvorba wt-HIV DNA není pozorována při MOI 10 pro vektor (cPT-2-10). Toto naznačuje, že vektor může inhibovat produkci wt-HIV DNA a bránit její integraci do transdukované hostitelské buňky. Data také naznačují, že úroveň inhibice je závislá na dávce.

Příklad 13

Tento příklad poskytuje shrnutí provedení předkládaného vynálezu, jak bylo popsáno výše. Vynález zahrnuje podmíněně se replikující virový vektor obsahující gen (nebo nukleovou kyselinu), který má být exprimován, a jednu nebo více prvních nukleotidových sekvencí, kde vektor (a) se replikuje v hostitelské buňce pouze po komplementaci přirozeným kmenem viru, pomocným virem nebo pomocným vektorem, kde každý z nich je sensitivní na přítomnost uvedené jedné (nebo více) první nukleotidové sekvence; (b) je resistantní na přítomnost uvedené jedné (nebo více) první nukleotidové sekvence; a (c) obsahuje jednu nebo více substitucí, insercí nebo delecí, které snižují pravděpodobnost vzniku replikace-kompetentního vektoru.

Pro snížení pravděpodobnosti vzniku replikace-kompetentního vektoru poskytuje předkládaný vynález vektory obsahující degenerované sekvence s ohledem na jednu nebo více sekvencí v pomocném konstruktu, nukleové kyseliny

hostitelské buňky nebo jiné nukleové kyseliny. Dále vynález zahrnuje pomocné konstrukty pro použití v kombinování s takovými vektory pro jejich balení. Takové pomocné konstrukty mohou také obsahovat degenerované sekvence s ohledem na jednu nebo více sekvencí vektoru, nukleové kyseliny hostitelské buňky nebo jiné nukleové kyseliny.

Vektory podle předkládaného vynálezu mohou také obsahovat sekvence, které jsou namířené na pomocný konstrukt. Mezi takové sekvence patří genetická antivirová činidla a výhodně jsou takovými činidly (nebo je kódují) ribozymy nebo protismyslné nukleové kyseliny. Výhodné ribozymy a protismyslné sekvence se mohou párovat v důsledku komplementarity bazí s odpovídajícími cíly pomocí G-U párování a standardního A-T, A-U, a G-C párování bazí. Obdobně, pomocné konstrukty podle předkládaného vynálezu mohou také obsahovat stejný typ sekvence k cílenému ovlivnění vektoru.

Pomocné vektory podle předkládaného vynálezu mohou také obsahovat jednu nebo více sekvencí, které ovlivňují lokalizaci nebo buněčný transport RNA exprimované z pomocného konstruktu ve srovnání s vektorem. Například může pomocný vektor obsahovat intron, heterologní RRE ve srovnání s vektorem, nebo heterologní gag sekvenci ve srovnání s vektorem. Pomocné vektory mohou také obsahovat degenerované gag a/nebo pol sekvence ve srovnání s vektorem, takže je méně pravděpodobná ko-lokalizace vektorových RNA. Pomocné vektory mohou také obsahovat sestřihová donorová místa taková, že dojde k odstranění balících a RRE signálů (sekvencí) z RNA za účelem zabránění jejich ko-lokalizace s vektorovými RNA. Taková sestřihová donorová místa mohou být také přítomná v pomocných vektorech, za účelem dosažení

odlišného transportu vektoru ve srovnání s pomocným vektorem nebo přirozenými viry.

Pomocné vektory podle předkládaného vynálezu mohou také pseudotypovat vektory podle předkládaného vynálezu. Příklady takových vektorů jsou VSV-G, RD114, virus vztekliny, GALV a chimérické obalové proteiny. Pomocné vektory podle předkládaného vynálezu jsou také výhodně odvozeny od heterologního viru vzhledem k vektoru. Příkladem jsou pomocné vektory odvozené od HIV-2. Způsoby podle předkládaného vynálezu zahrnují použití takových pomocných vektorů pro replikaci vektorů podle předkládaného vynálezu.

Příklady vektorů podle předkládaného vynálezu jsou vektory pN1 a pN2 sérií uvedené na obr. 1A až 1K, zejména s odstraněním nebo substitucí GFP sekvence. Výhodně si vektory zachovávají alespoň protismyslnou sekvenci a cPT obsahující sekvenci. Příklady pomocných konstruktů podle předkládaného vynálezu jsou konstrukty pVirPac série, jak jsou uvedeny na obr. 6A-6G s nebo bez ribozymů.

Všechny vektory a pomocné konstrukty podle předkládaného vynálezu mohou být degenerovány výše uvedeným způsobem nebo v jiných místech konstruktů, pokud je to nutné. Výhodnou degenerací je degenerace na kodóny preferenčně používané v lidských buňkách. Vektory a pomocné konstrukty mohou mít také chimérický charakter, kdy jsou odvozeny od různých přirozených, stejně jako syntetických nukleových kyselin. Výhodné chimérické konstrukty obsahují HIV-1 i HIV-2 sekvence. Zejména výhodnými vektory však jsou vektory odvozené od HIV-1 nebo kódující HIV-1 Tat protein. Alternativně vektory nekódují Tat protein, který je dodáván pomocným vektorem, přirozeným virem, nebo hostitelskou buňkou.

Vektory podle předkládaného vynálezu také výhodně nekódují ani neexprimují virové pomocné proteiny. Vektory mohou obsahovat nukleové kyseliny, které zmenšují, zmírňují, minimalizují nebo brání virové infekci, jsou-li přítomné v hostitelské buňce, nebo udílejí uvedeným buňkám resistenci na toxická činidla. Příklady takových nukleových kyselin jsou buněčný povrchový protein nebo zkrácený CCR5 protein, výhodně CCR5Δ32T protein. Dalšími příklady jsou nukleové kyseliny kódující resistenci na léky nebo činidla poškozující DNA, výhodně mnohotnou lékovou resistenci nebo MGMT variantu, zejména G156A variantu. Dalšími příklady jsou nukleové kyseliny kódující transdominantní fenotyp. Příkladem je transdominantní HIV-1 gag sekvence.

Vektory podle předkládaného vynálezu mohou také obsahovat sekvence napomáhající expresi heterologní sekvence. Příkladem je izolační sekvence. Vektory mohou také obsahovat sekvence, které zlepšují transdukcii vektoru do buněk. Příkladem je sekvence délky 545 párů bází obsahující CRT, která je zde popsána, ačkoliv mohou být také použity menší nebo větší fragmenty obsahující cPT. Vektory mohou také obsahovat LTR pro expresi genů, stejně jako nukleových kyselin, včetně LTR modifikovaných ve vazebném místě pro transkripci umístěném v těchto sekvencích. Výhodně jsou takové modifikované LTR obsaženy v lentivirových vektorech. Způsoby podle předkládaného vynálezu zahrnují použití takových vektorů.

Vektory podle předkládaného vynálezu mohou také exprimovat alespoň dva geny za použití vhodně umístěných sestřihových míst nebo IRES elementů. Vektory mohou být také baleny do virových částic s jedním nebo více chimérickými obalovými proteiny, které stimulují cíl nebo hostitelské

buňky k transdukci. Dále mohou být vektory baleny v buňkách, kde pomocným konstruktem je protein nebo pomocný konstrukt obsahuje Rev/RRE/CRS systém pro regulování genové exprese. Způsoby podle předkládaného vynálezu zahrnují použití takových vektorů.

Všechny uvedené citace, včetně patentů, patentových přihlášek a publikací, jsou zde uvedeny ve své úplnosti jako odkazy. Všechny termíny uvedené v jednotném čísle jsou míněny tak, že zahrnují jednotné i množné číslo.

Ačkoliv byl vynález nyní popsán na svých výhodných provedeních, bude odborníkům v oboru jasné, že existují varianty výhodných provedení, které mohou být použity v provádění předkládaného vynálezu. Předkládaný vynález zahrnuje všechny takové varianty a alternativní provedení. Tak předkládaný vynález zahrnuje všechny modifikace spadající do rozsahu předkládaného vynálezu, jak je definován připojenými patentovými nároky.

P A T E N T O V É N Á R O K Y

1. Systém podmíněně se replikující vektor-pomocný konstrukt, zahrnující
 podmíněně se replikující vektor obsahující jednu nebo více sekvencí nukleové kyseliny, která redukuje riziko rekombinace s pomocným vektorem, a
 pomocný vektor.
2. Systém podle nároku 1, kde uvedené jedna nebo více sekvencí nukleové kyseliny, které redukují riziko rekombinace, jsou vybrány z ribozymu, který štěpí pomocný vektor, sekvencí, které obsahují jednu nebo více substitucí, insercí nebo delecí, které snižují pravděpodobnost rekombinace s pomocným vektorem, nebo sekvencí, které byla degenerovány tak, aby snižovaly pravděpodobnost rekombinace s pomocným vektorem.
3. Systém podle nároku 1, kde uvedený pomocný vektor obsahuje degenerované sekvence vzhledem k jedné nebo více sekvencím pomocného vektoru za účelem snížení pravděpodobnosti rekombinace s uvedeným podmíněně se replikujícím vektorem, nebo sestřihová donorová místa, takže jsou odstraněny balící a RRE sekvence pro zabránění současné lokalizaci s uvedeným podmíněně se replikujícím vektorem.
4. Systém podle nároku 1, kde uvedený vektor obsahuje MGMT gen.
5. Systém podle nároku 1, kde uvedený pomocný konstrukt kóduje heterologní obalový protein a/nebo obsahuje heterologní RRE ve srovnání s uvedeným podmíněně se replikujícím vektorem nebo heterologní gag sekvencí ve srovnání s uvedeným vektorem.
6. Systém podle nároku 5, kde uvedený heterologní obalový protein je pod Rev-dependentní kontrolou a/nebo je uvedený heterologní

obalový protein vybrán ze skupiny zahrnující VSV-G, RD114, virus vztekliny, GALV a chimérické obalové proteiny.

7. Systém podle nároku 1, kde uvedený podmíněně se replikující vektor nekóduje nebo neexprimuje virové pomocné proteiny.
8. Systém podle nároku 1, kde uvedený podmíněně se replikující vektor je odvozen od HIV-1.
9. Systém podle nároku 1, kde uvedený podmíněně se replikující vektor kóduje zkrácený CCR5 protein.
10. Systém podle nároku 1, kde uvedený podmíněně se replikující vektor obsahuje sekvenci, která zlepšuje transdukcii uvedeného vektoru.
11. Systém podle nároku 1, kde uvedený vektor kóduje chimérický HIV CTL epitop.
12. Buňka, která obsahuje systém podle kteréhokoliv z předchozích nároků.
13. Způsob balení podmíněně se replikujícího vektoru, vyznačující se tím, že zahrnuje inkubování buňky podle nároku 12 za podmínek, při kterých je uvedený vektor balen.
14. Podmíněně se replikující vektor, produkováný způsobem podle nároku 13.
15. Buňka, infikovaná vektorem podle nároku 14.
16. Způsob selekce buněk podle nároku 15, vyznačující se tím, že zahrnuje kontaktování uvedené buňky s BG a BCNU.

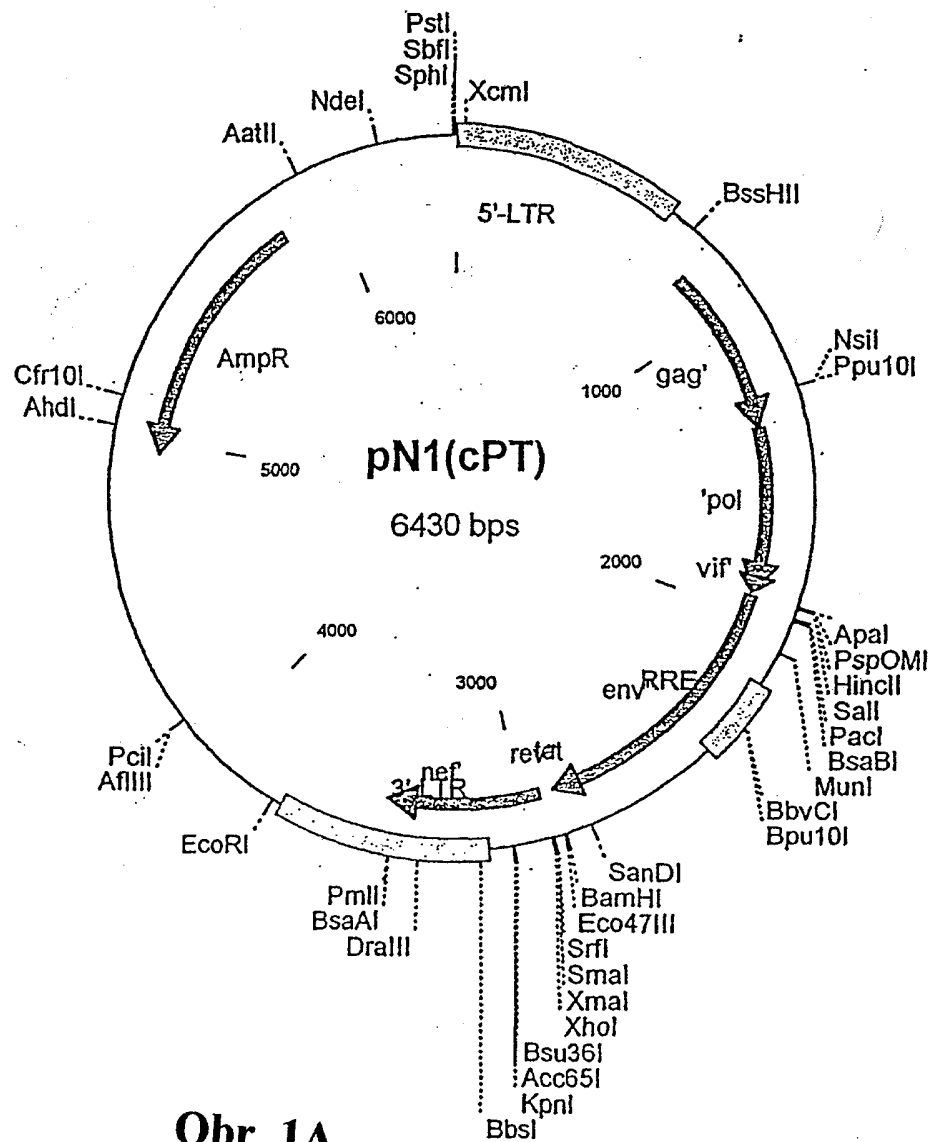
17. Způsob podle nároku 16, vyznačující se tím, že nádorové buňky neinfikované vektorem jsou usmrceny.
18. Způsob prevence nebo inhibice produkce virové DNA v buňkách infikovaných virem, vyznačující se tím, že zahrnuje:
vložení podmíněně se replikujícího virového vektoru do uvedené buňky před infikováním této buňky uvedeným virem,
kde uvedený vektor brání nebo inhibuje produkci virové DNA.
19. Způsob podle nároku 18, vyznačující se tím, že uvedená virová DNA je integrována do genomu buňky.
20. Způsob podle nároku 18, vyznačující se tím, že uvedený virus je přirozený virus.
21. Způsob podle nároku 18, vyznačující se tím, že uvedená buňka je CD4+ buňka.
22. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 18 až 21, vyznačující se tím, že uvedený virus je HIV-1.
23. Způsob podle nároku 18, vyznačující se tím, že uvedený vektor se integruje do genomu buňky stejným způsobem, který je používán uvedeným virem.
24. Způsob podle nároku 18, vyznačující se tím, že uvedený vektor obsahuje gen, který má být exprimován, a jednu nebo více prvních nukleotidových sekvencí, kde vektor:
- (a) se replikuje v hostitelské buňce pouze po komplementaci přirozeným kmenem viru, pomocným virem nebo pomocným vektorem, kde každý z nich je sensitivní na přítomnost uvedené jedné nebo více prvních nukleotidových sekvencí;
 - (b) je rezistentní na přítomnost uvedené jedné nebo více prvních nukleotidových sekvencí; a

(c) obsahuje jednu nebo více substitucí, insercí nebo delecí, které snižují pravděpodobnost vzniku replikačně kompetentního vektoru.

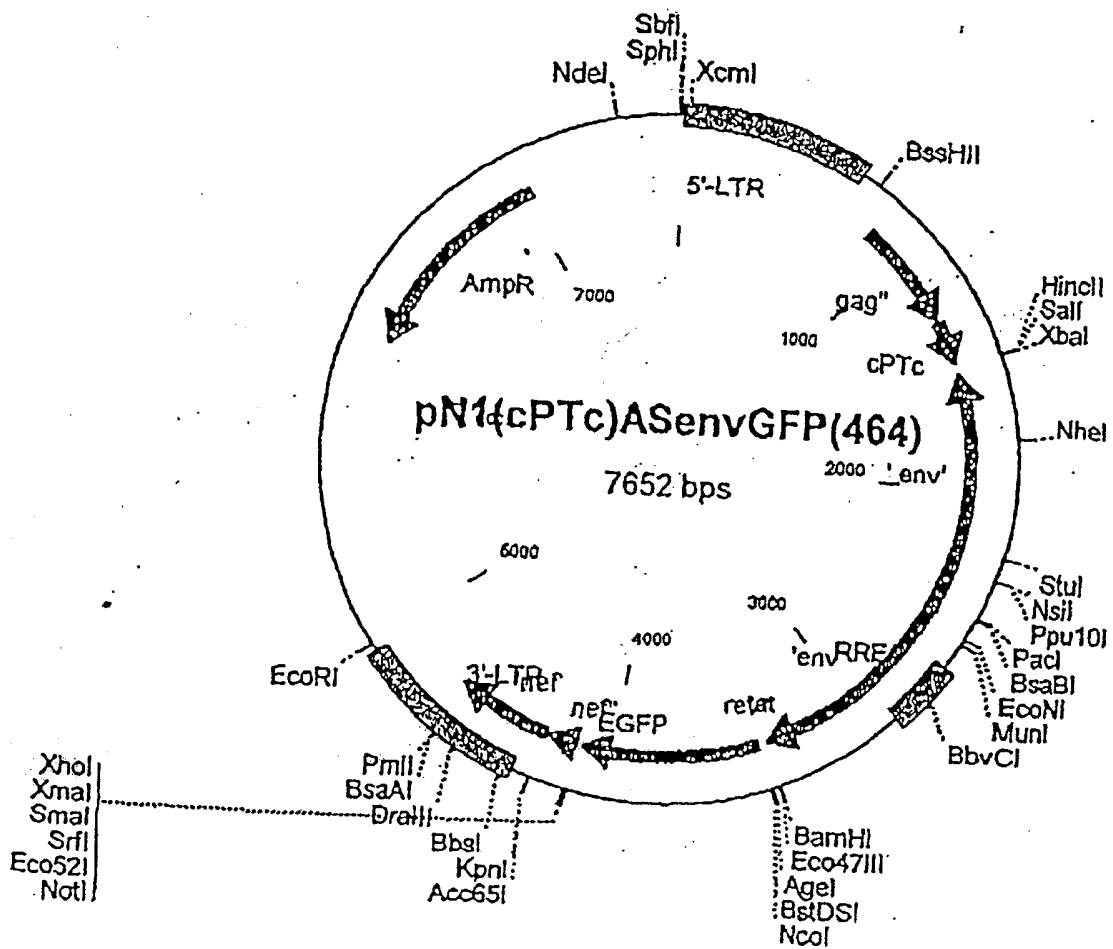
00:12:03

7/12/03-2574

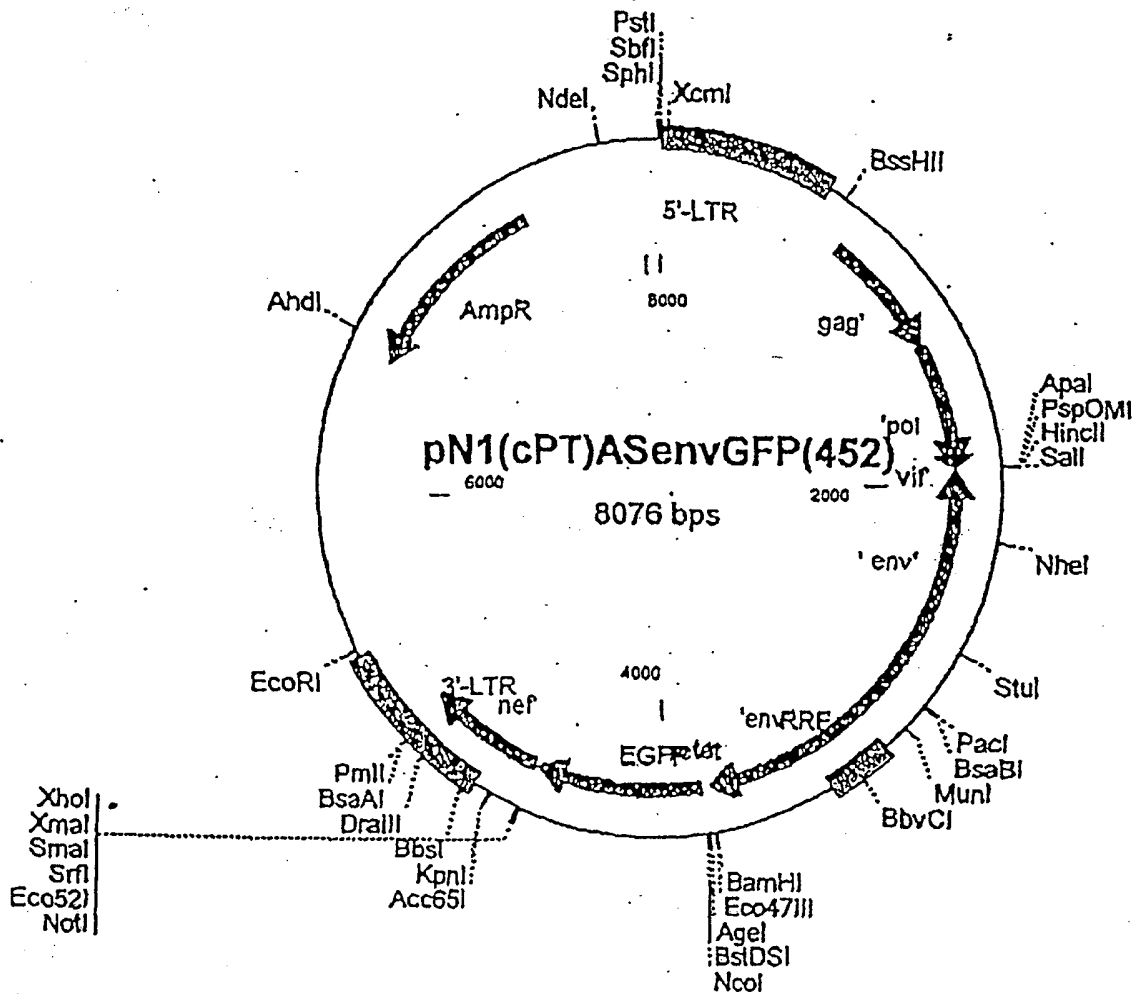
p44



Obr. 1A

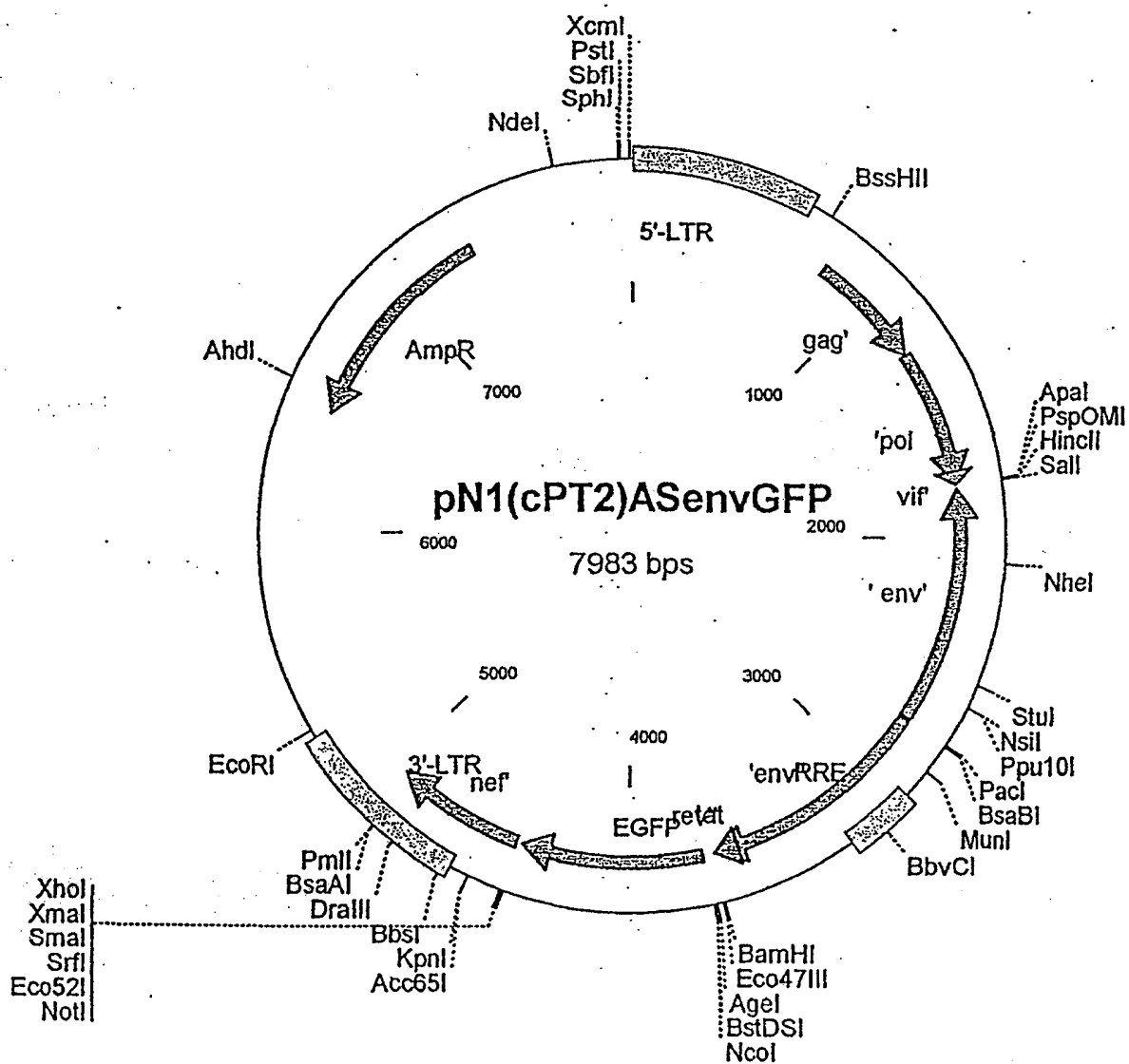


Obr. 1B

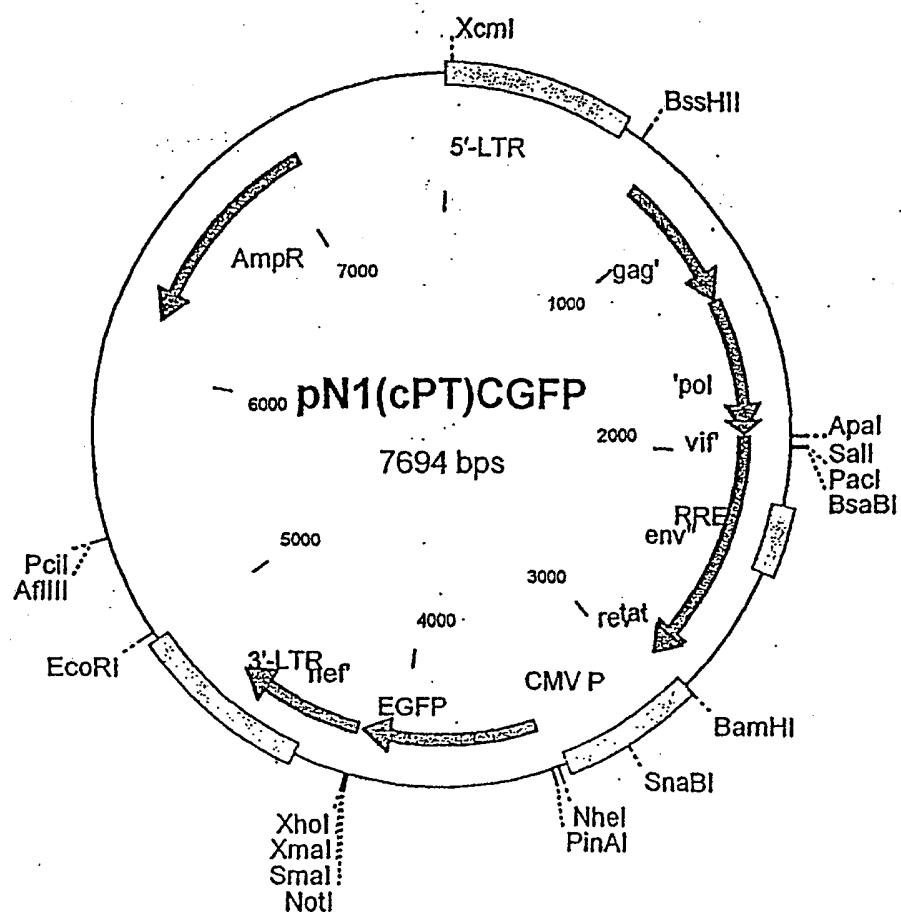


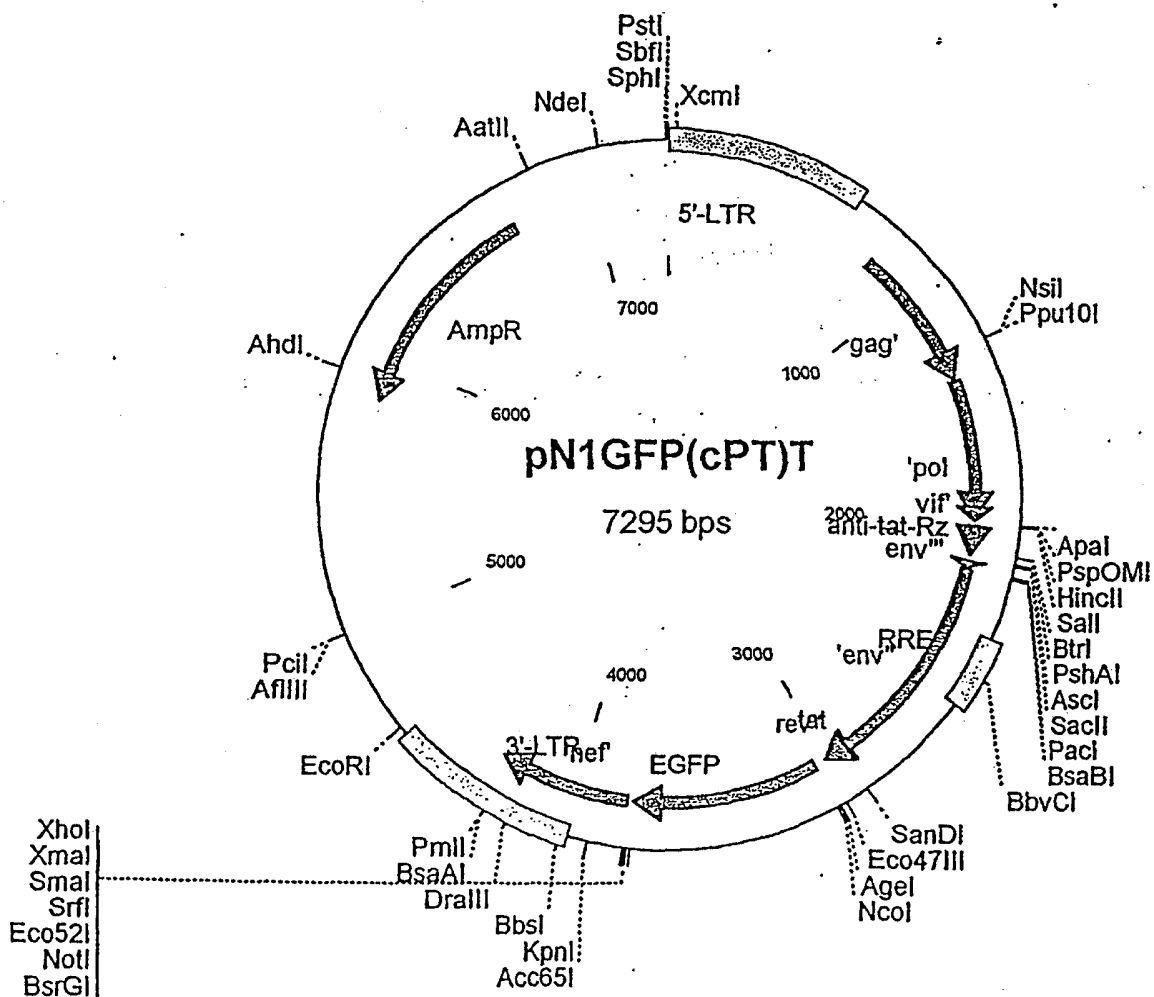
Obr.1C

00.10.03

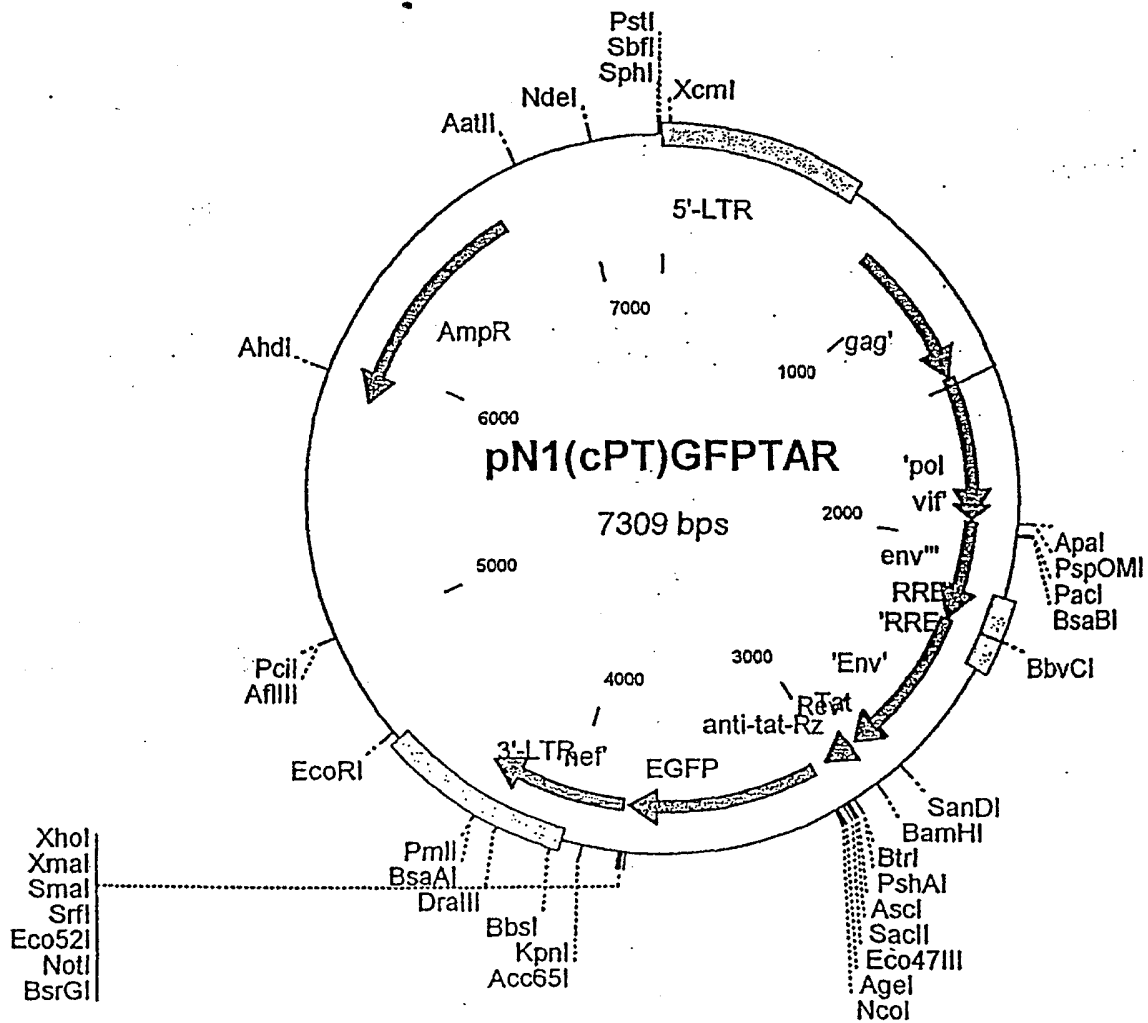


Obr.1D

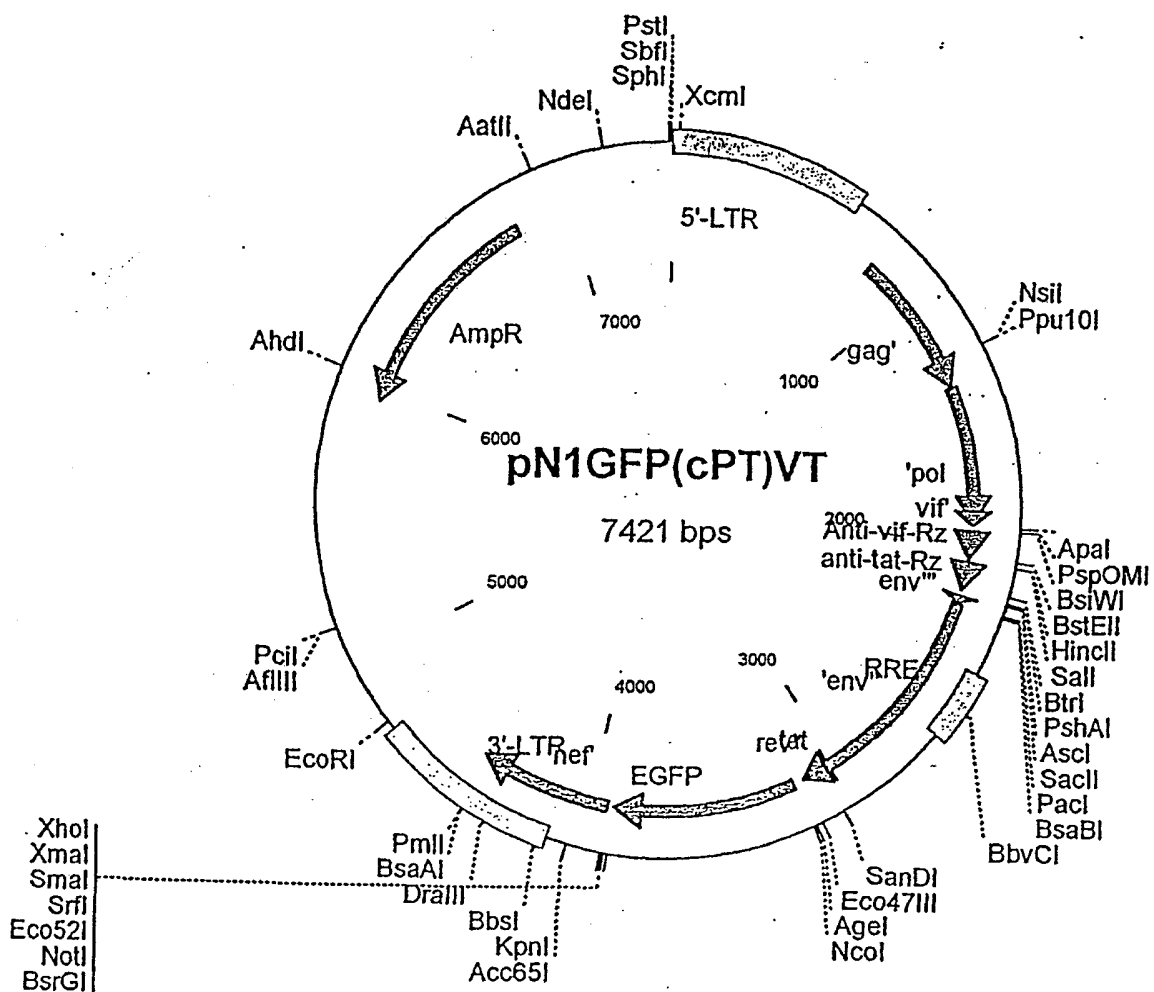
**Obr.1E**



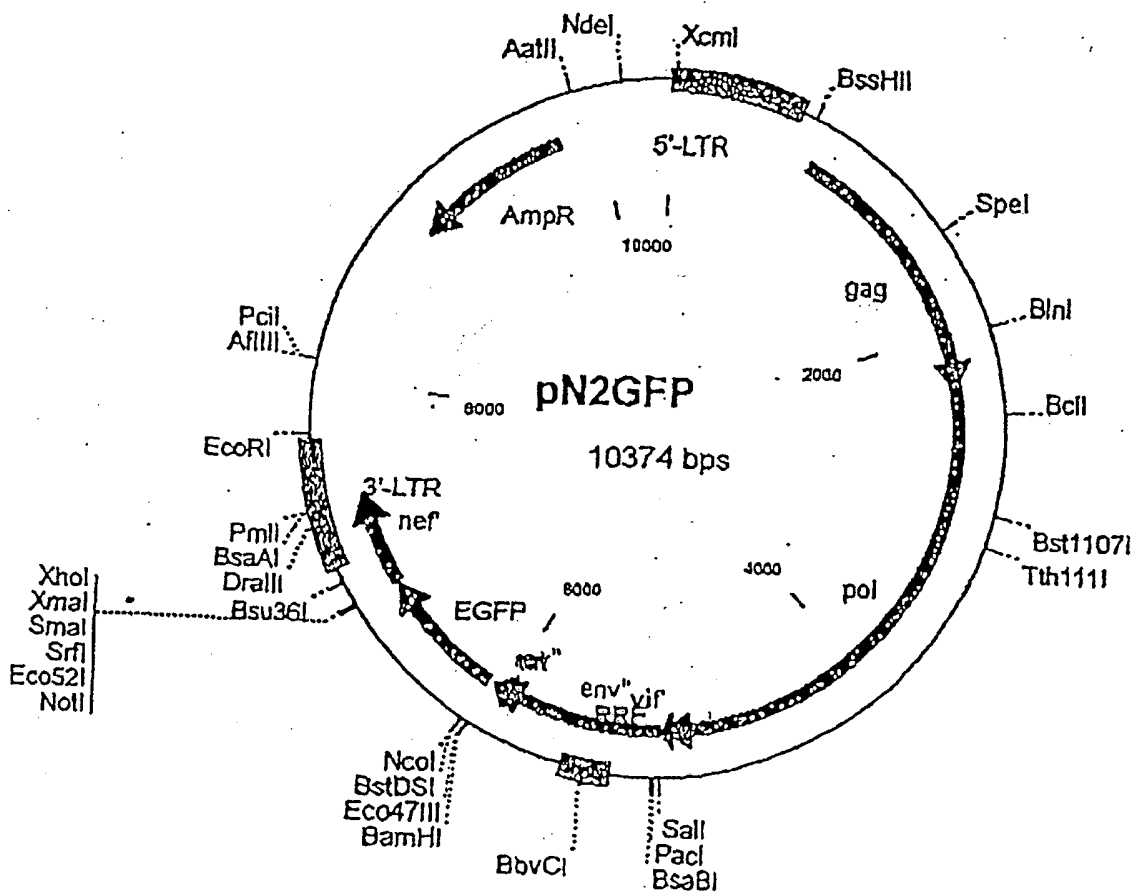
Obr.1F



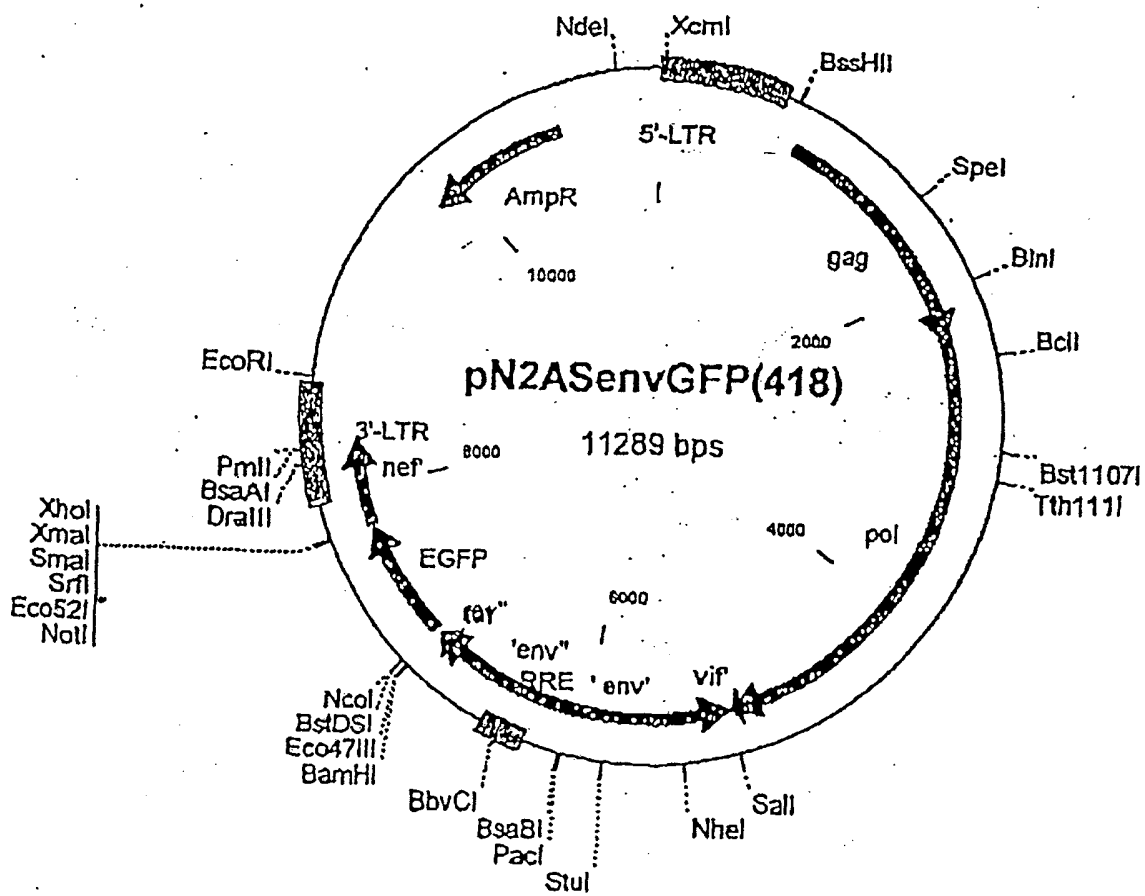
Obr.1G

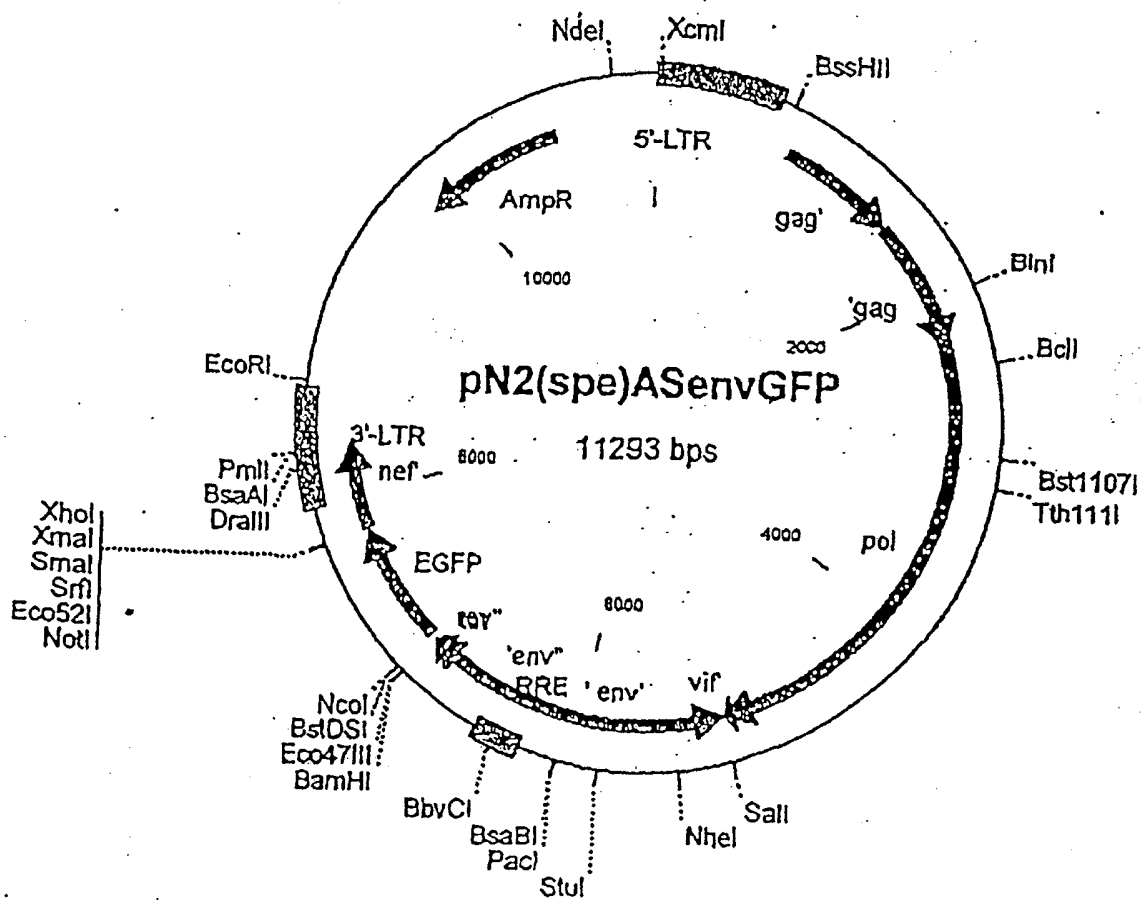


Obr.1H



Obr.1I

**Obr.1J**



Obr.1K

A +105 GTGTGCCCCGTCTG +117

BAC....

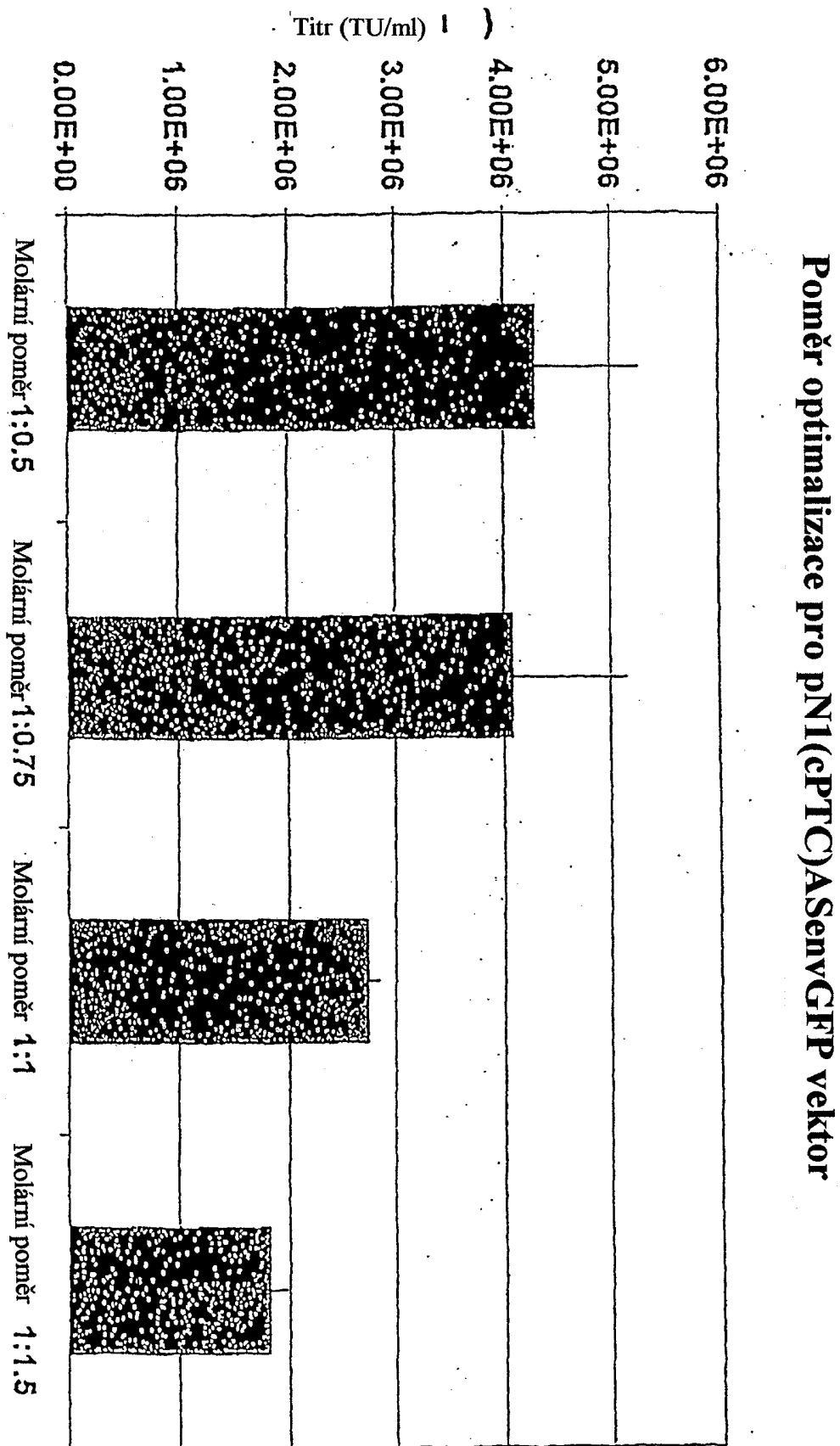
A +118 TTGTGTGACTCTG +130

B

A +131 GTAAC TAGAGATC +143

B .C.G.....A.

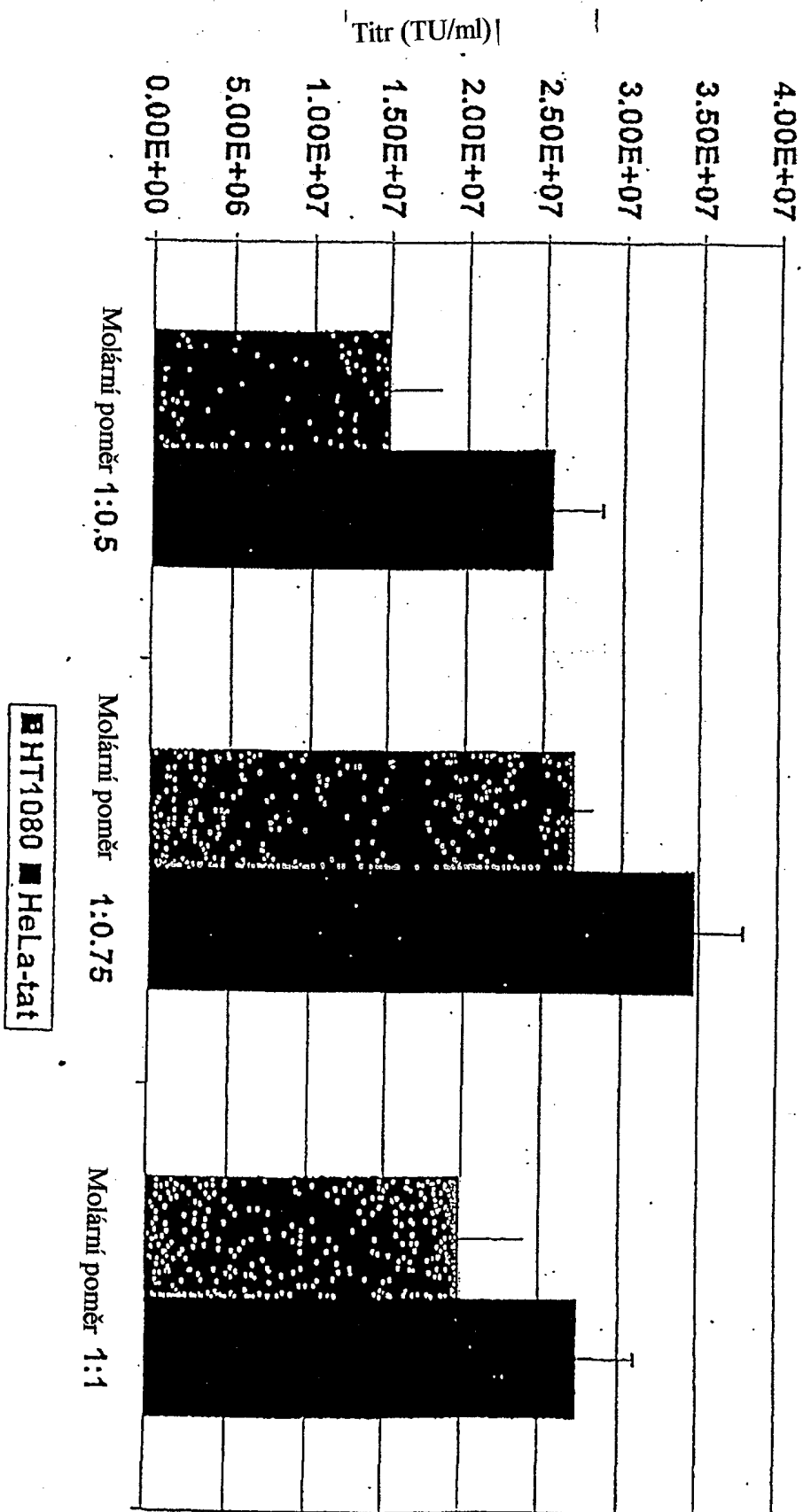
Obr.2



Obr.3A

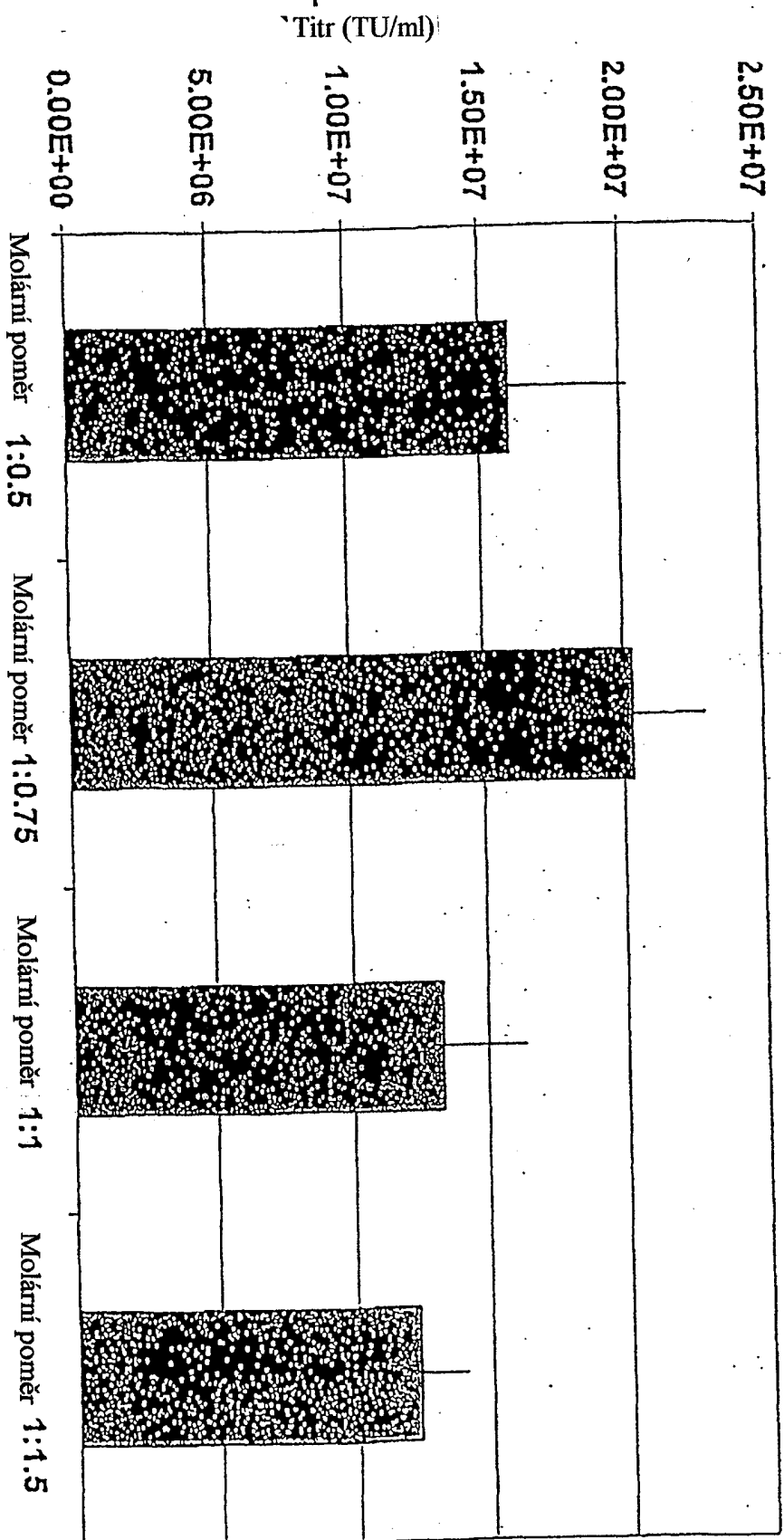
Poměr optimalizace pro pN1(cPT)GFP vektory

14/49



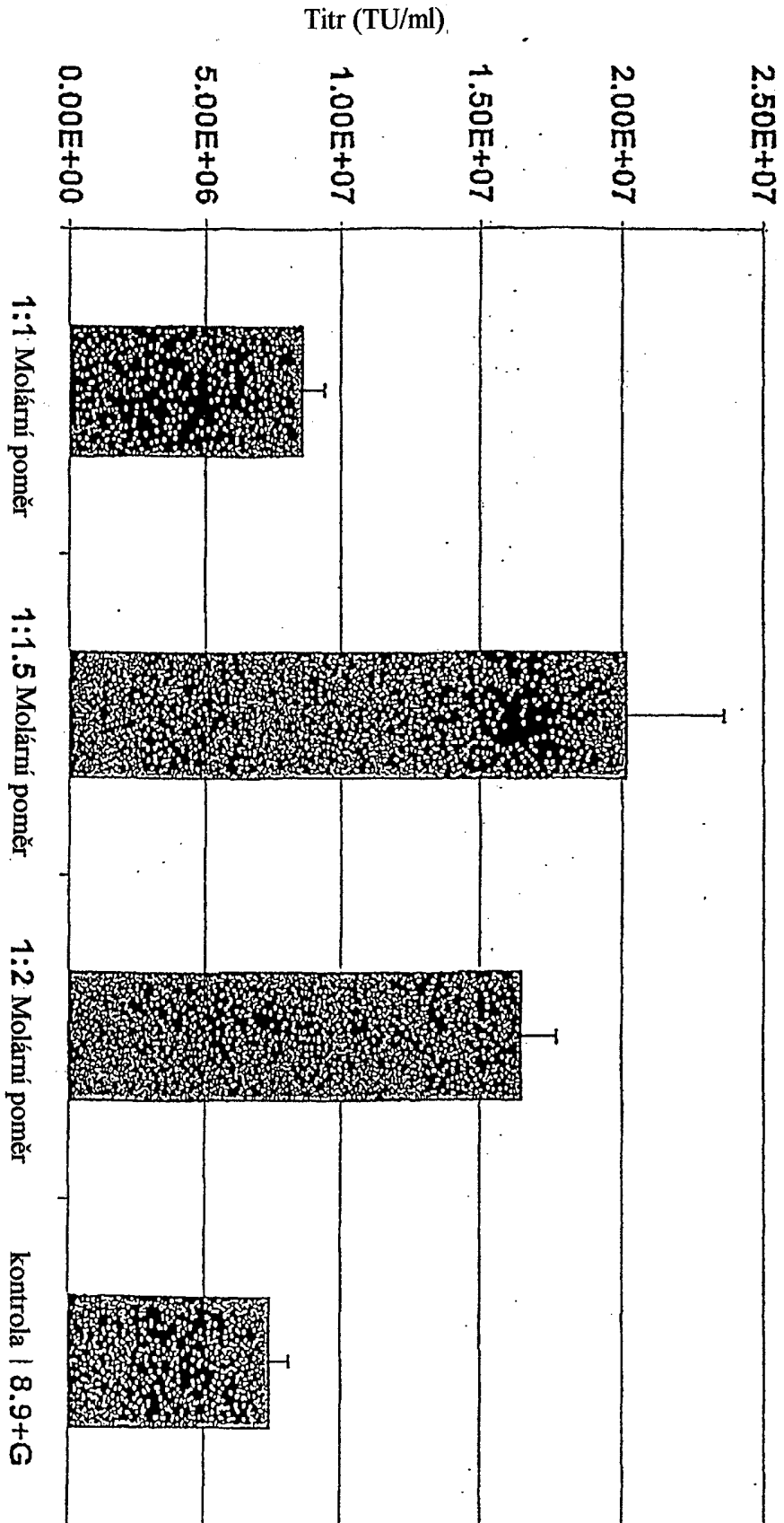
Obr.3B

Poměr optimalizace pro pN1(cPT2)ASenvGFP vektor



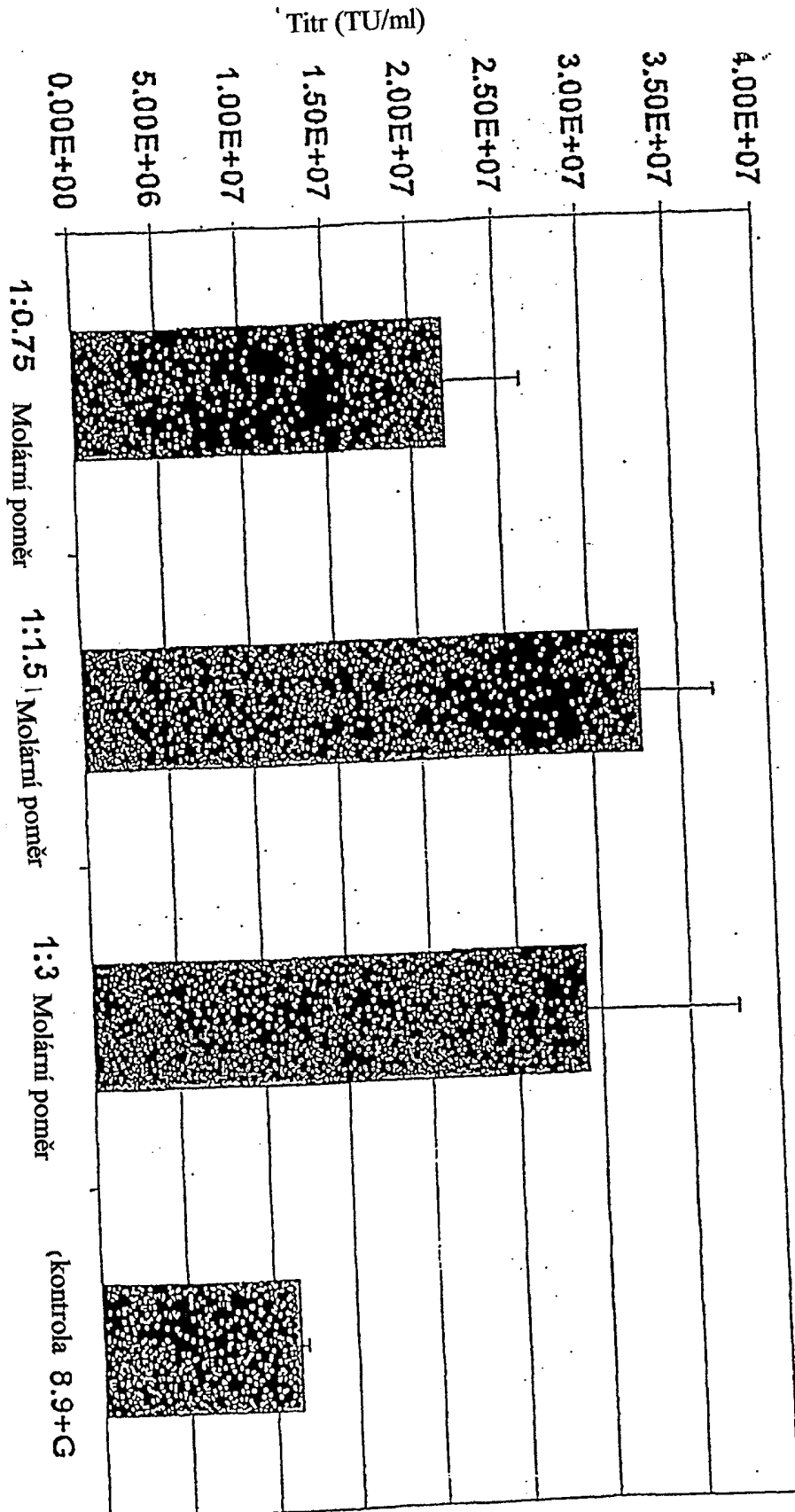
Obr.3C)

Nejlepší poměr vektoru ku balení pro pN1cGFP vektor

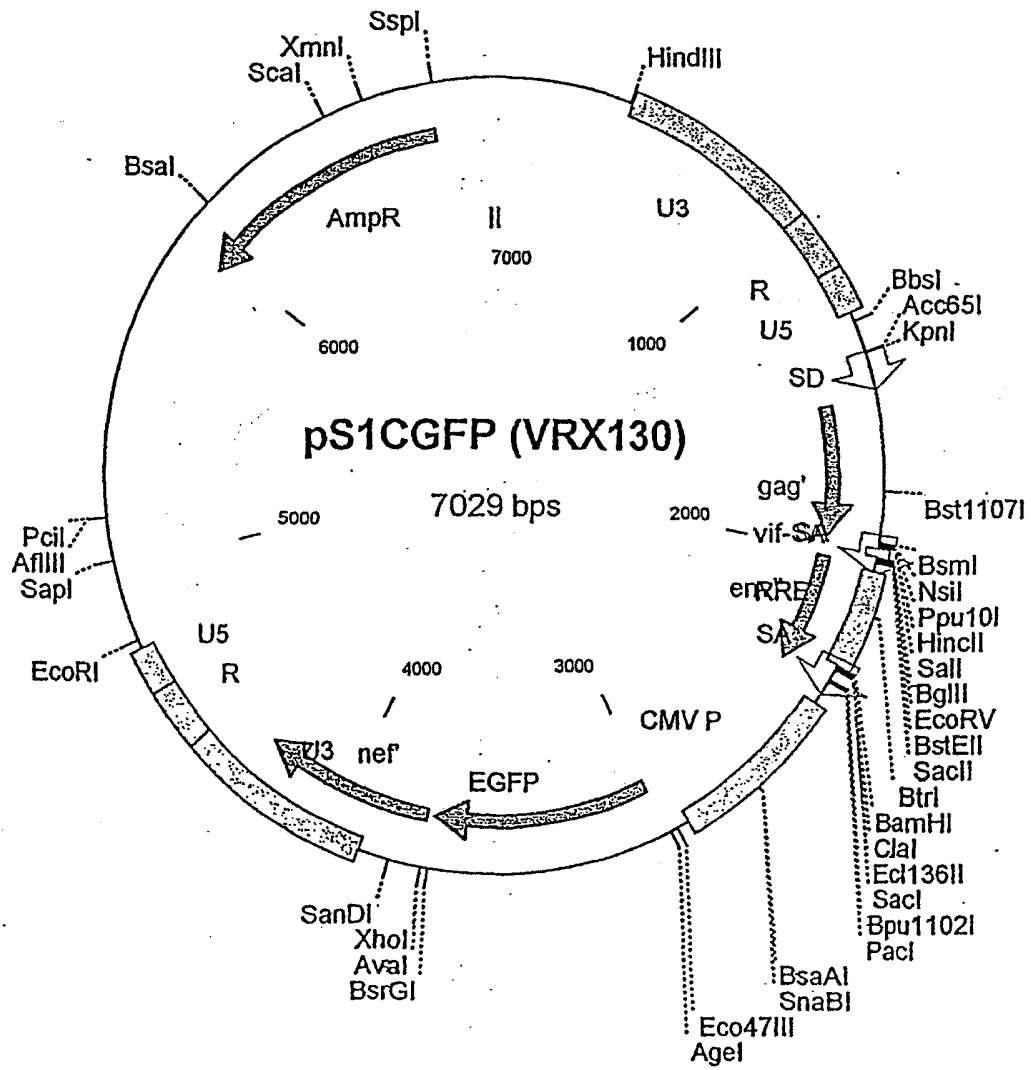


Obr.3D

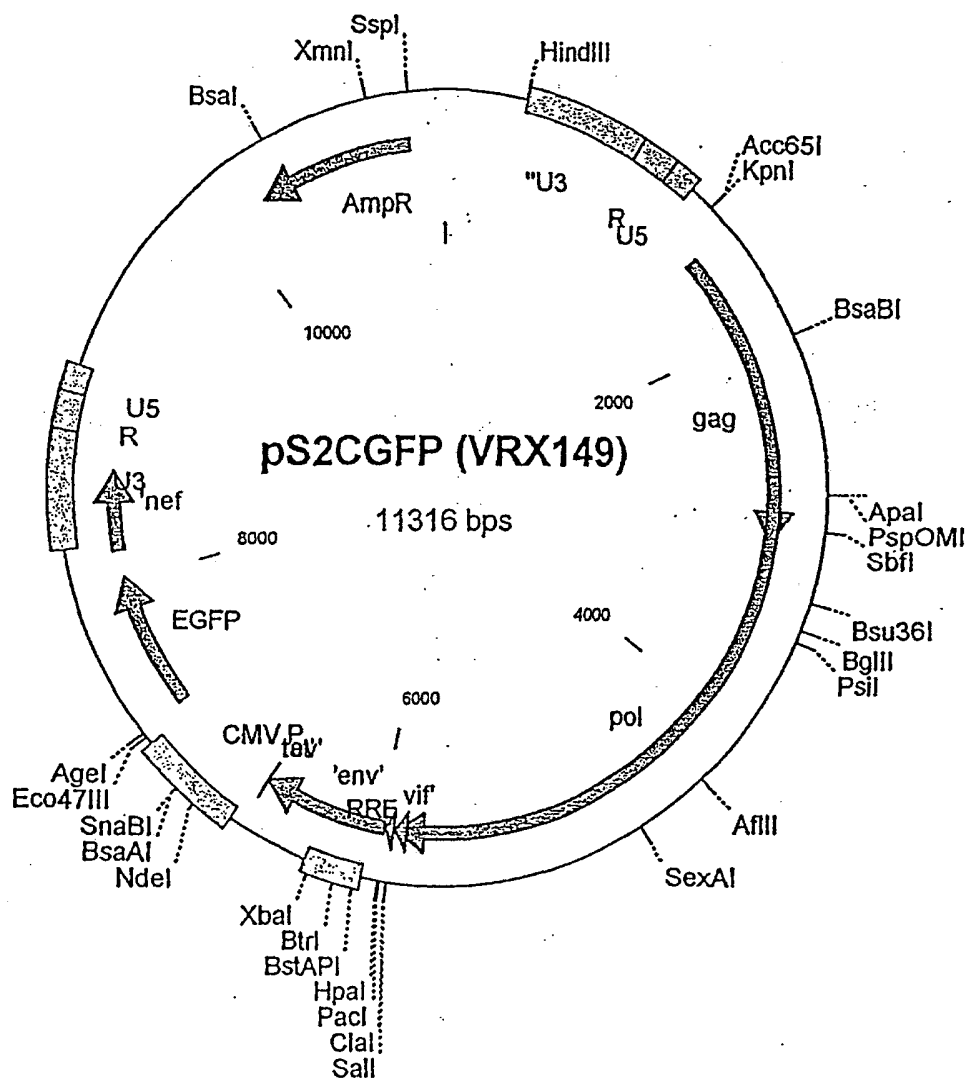
Optimalizace poměru vektoru k balení pro pN2cGFP



Obr.3E

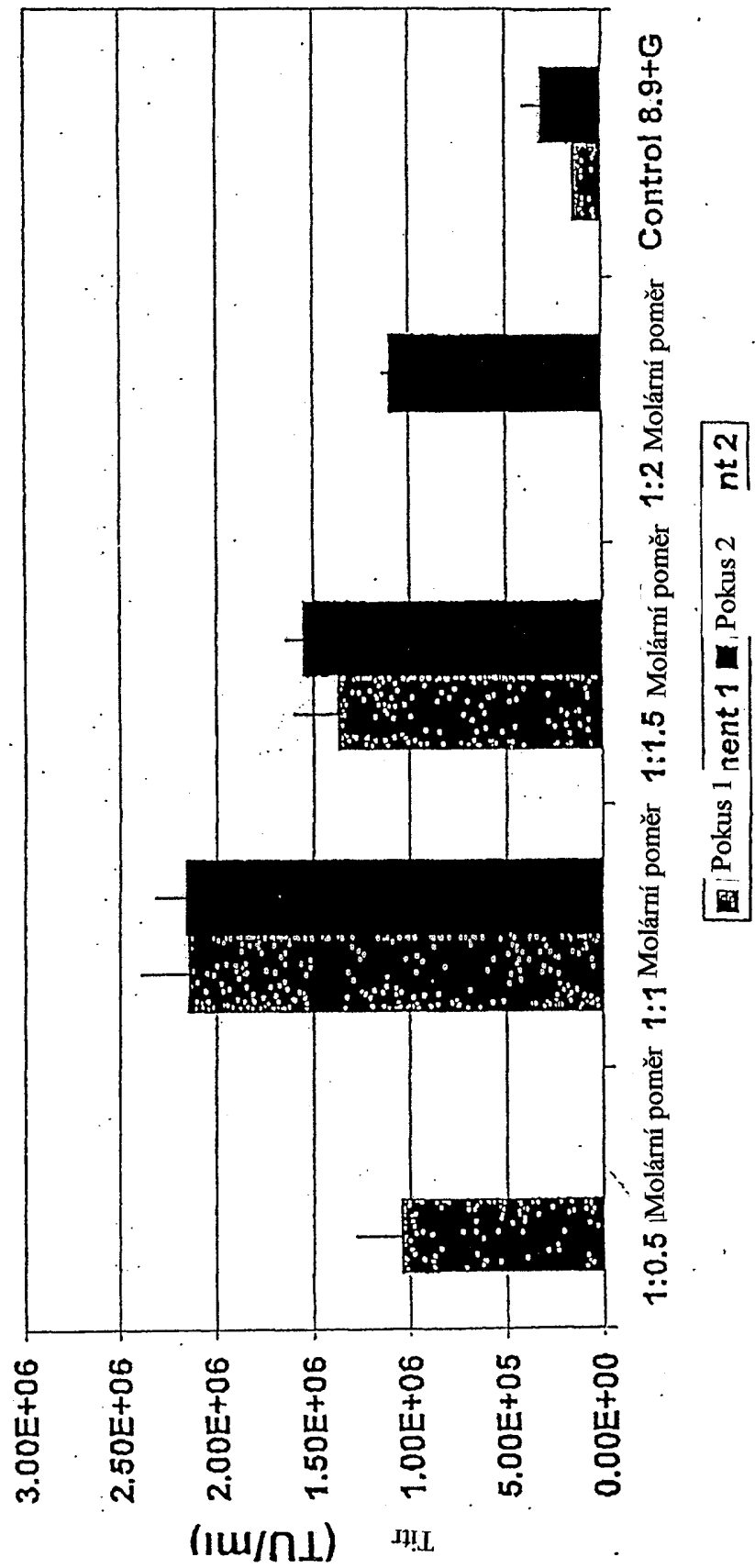


Obr.4A



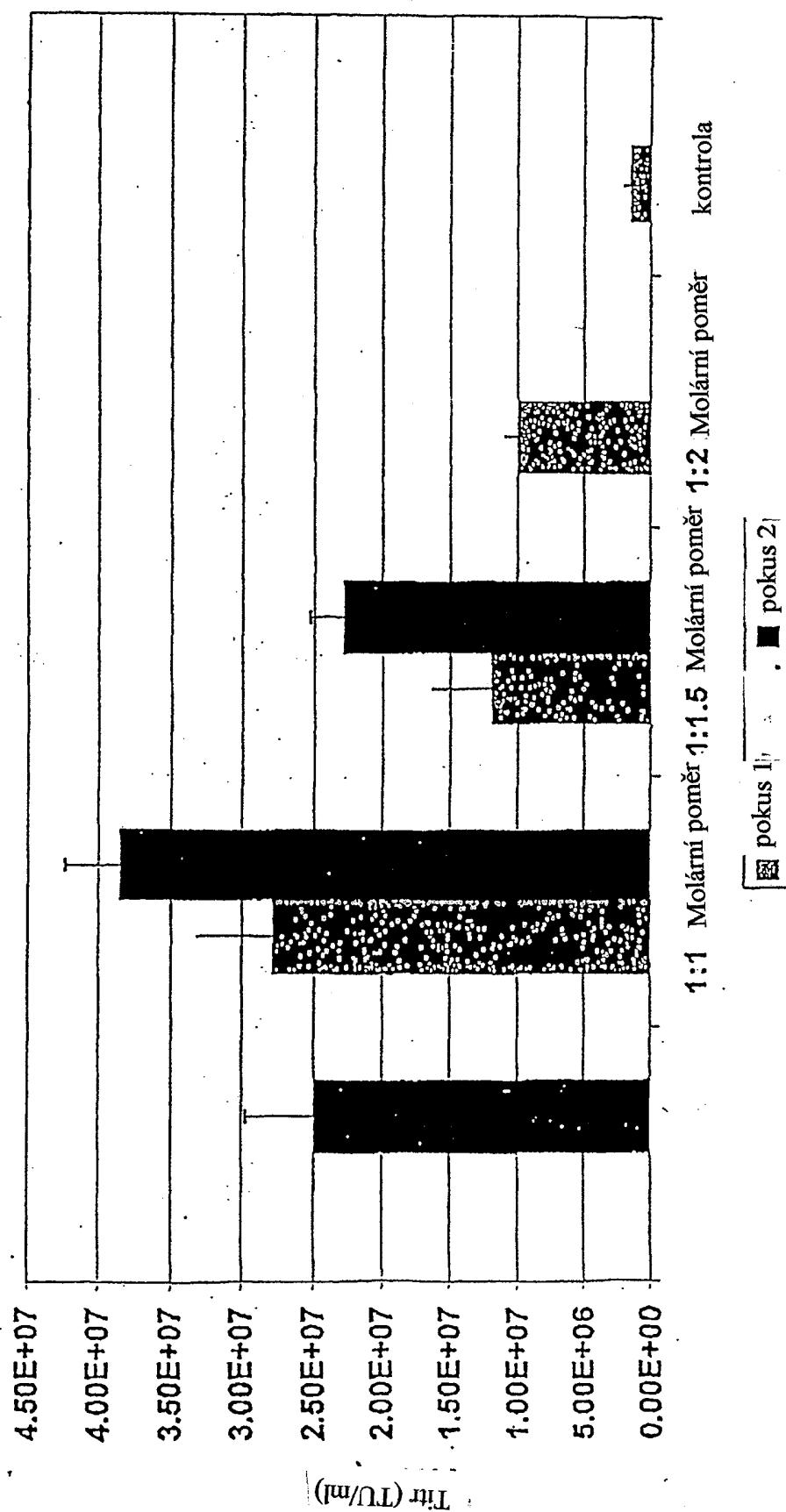
Obr.4B

Poměr optimalizace pro balení pS1cGFP vektorů



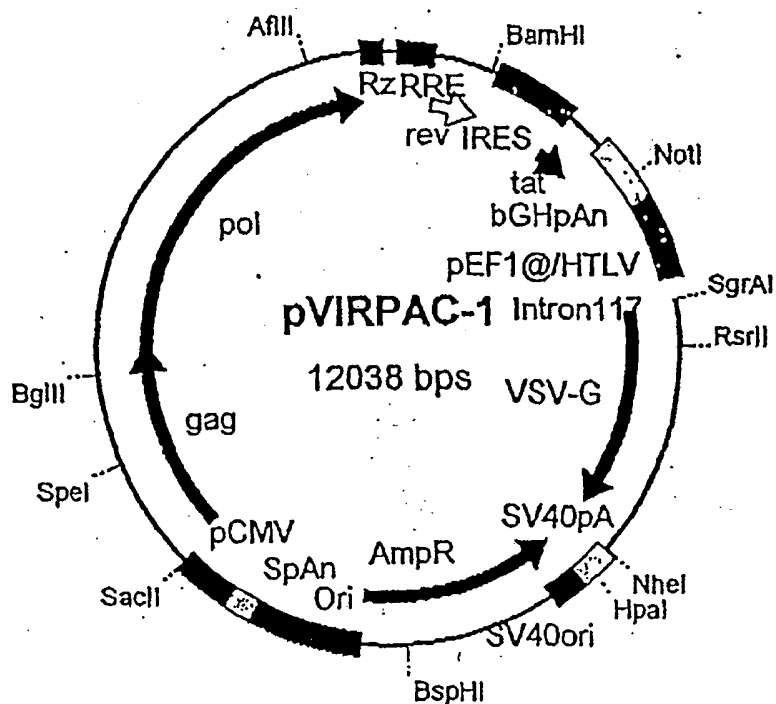
Obr.5A

Optimalizace poměru vektoru k balení pro pS2cGFP



Obr. 5B

Balící konstrukt



Nové charakteristiky

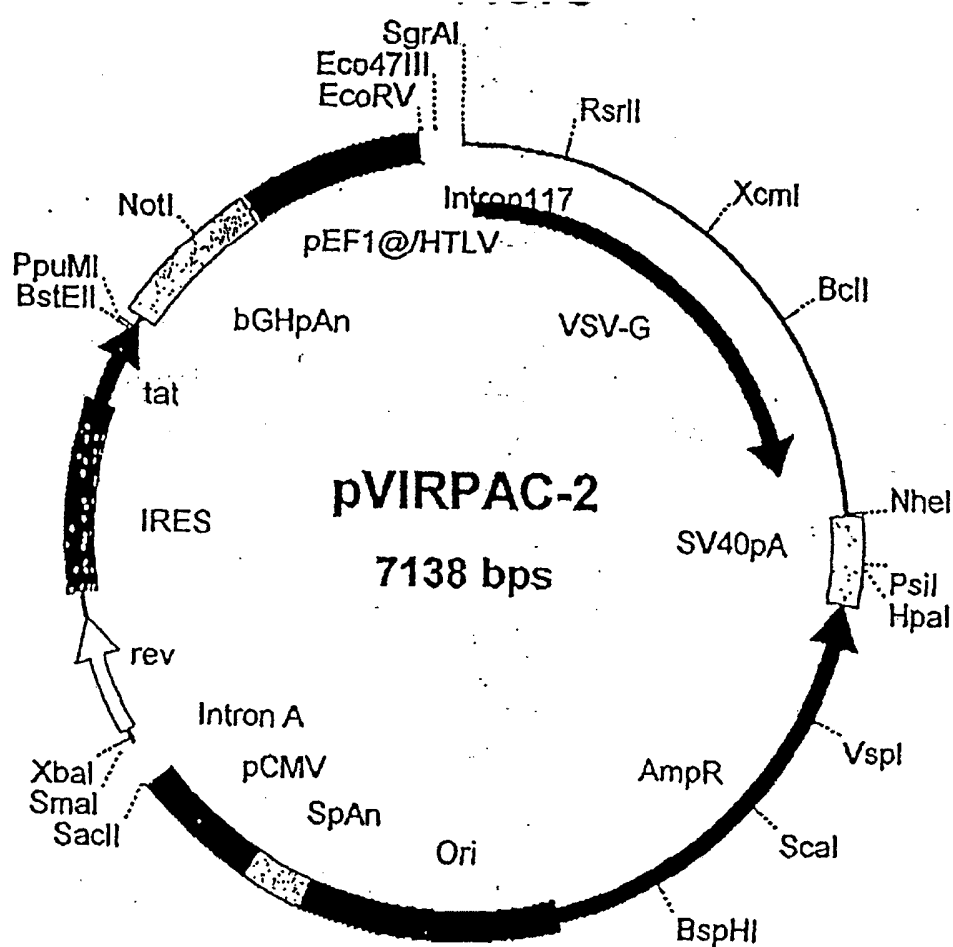
- prvních 42 nukleotidů gag je degenerovaných
- Tat a rev jsou representované jako cDNA
- Prvních 208 nukleotidů rev a posledních 183 nukleotidů tat je degenerováno
- RRE z Hiv-2 viru je použito místo HIV-1 RRE

Tyto rysy eliminují téměř veškerou homologii s vektorovým plasmidem, čímž je systém bezpečnější.

- Anti-U5 ribozym je exprimován v gag/pol/RRE kazetě, což dále zlepšuje bezpečnost
- Gag/pol/rev/tat/RRE kazeta a VSV-G jsou exprimovány ze stejného plasmidu. Toto může zvyšovat účinnost balení a titry vektoru.

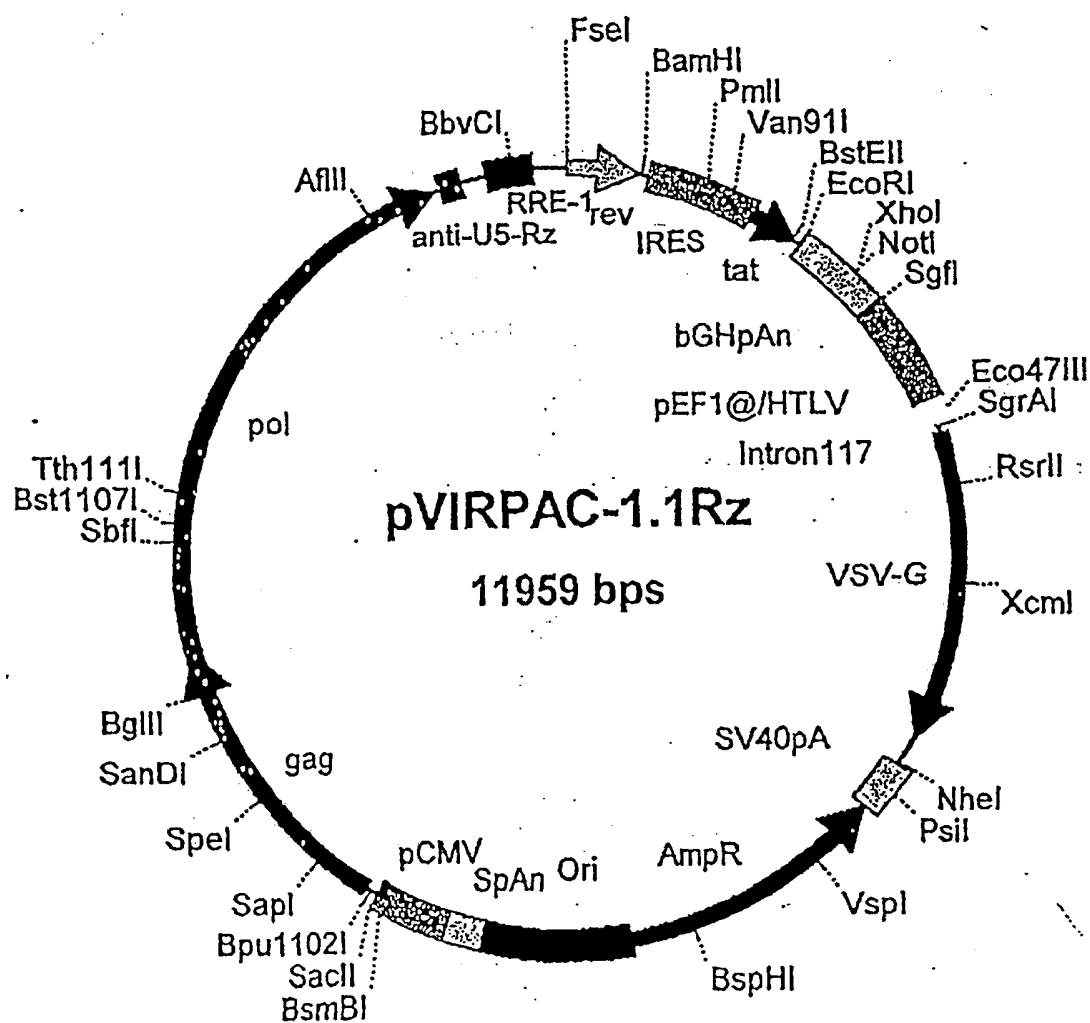
Obr. 6A

Balící plasmid pro druhou generaci vektorů

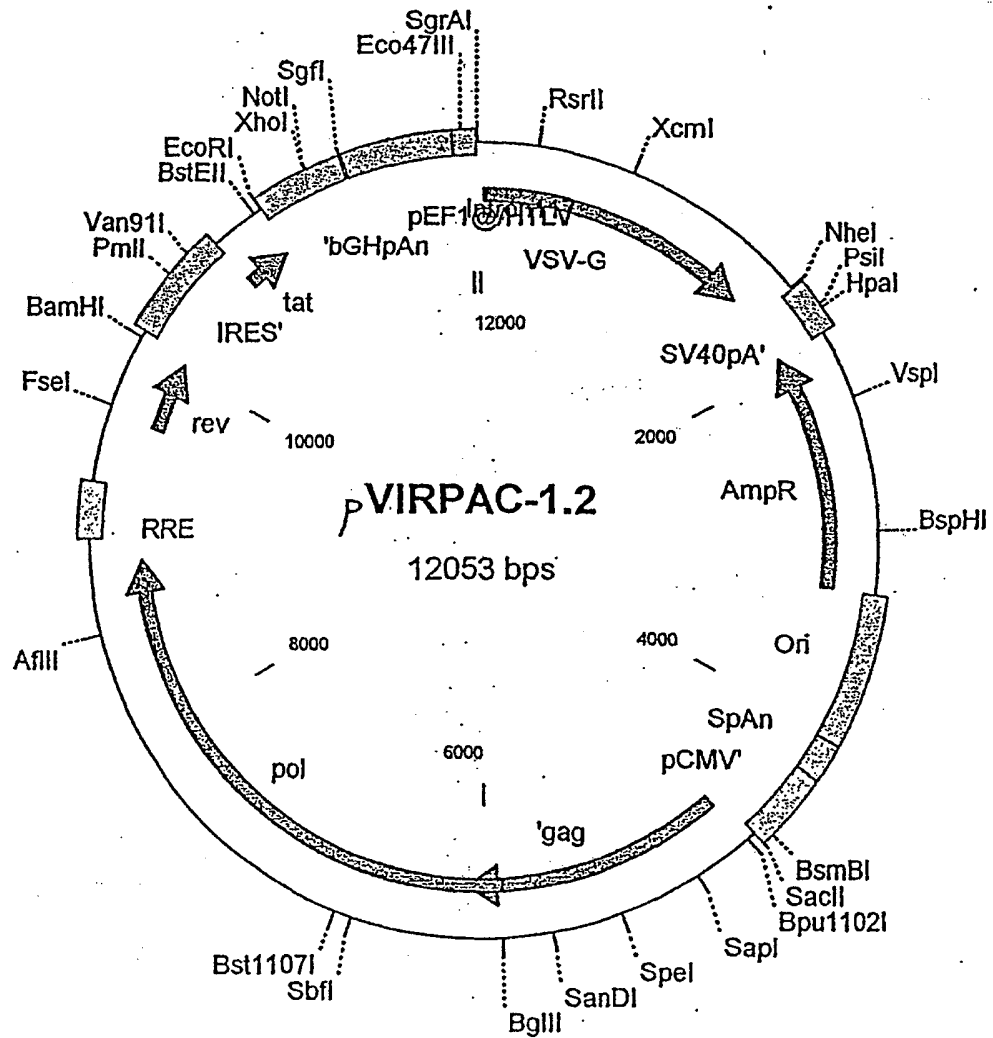


Obr.6B

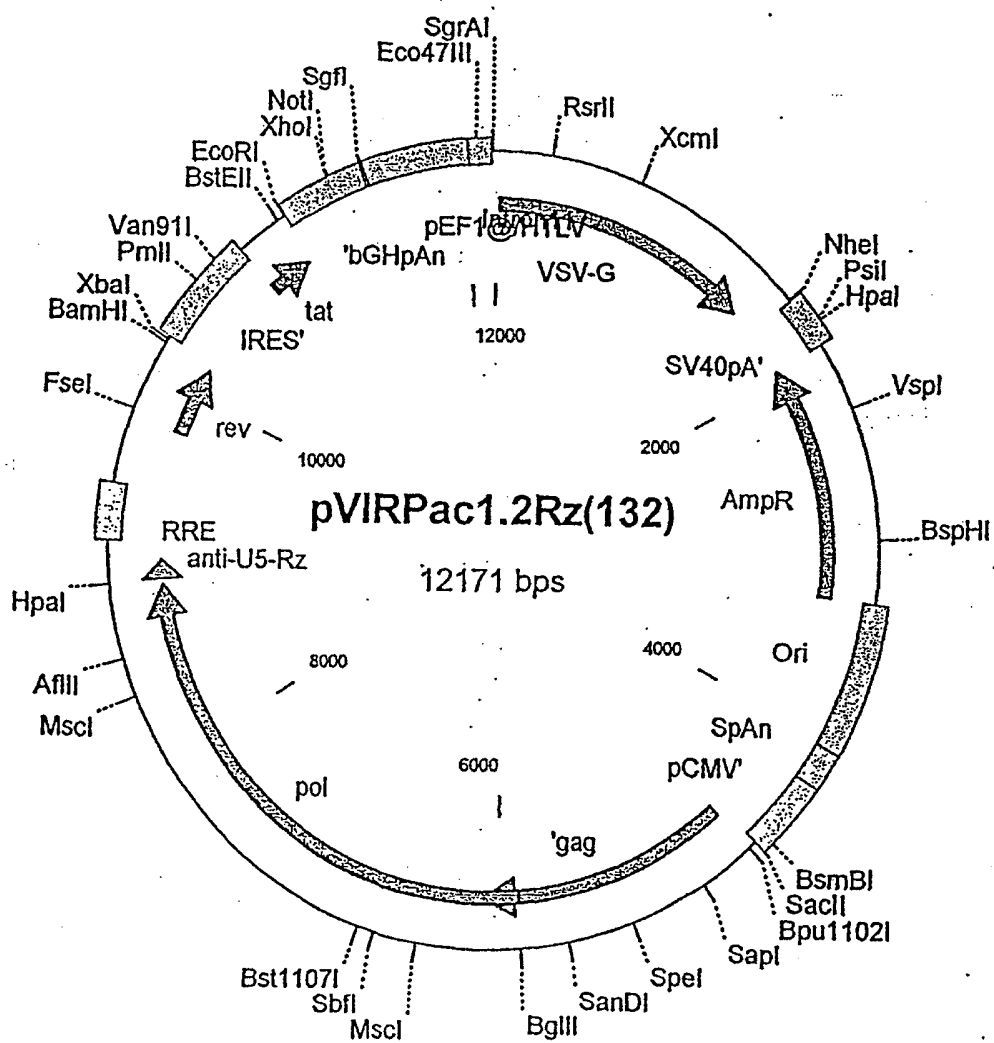
Balící plasmid pro první generaci vektorů



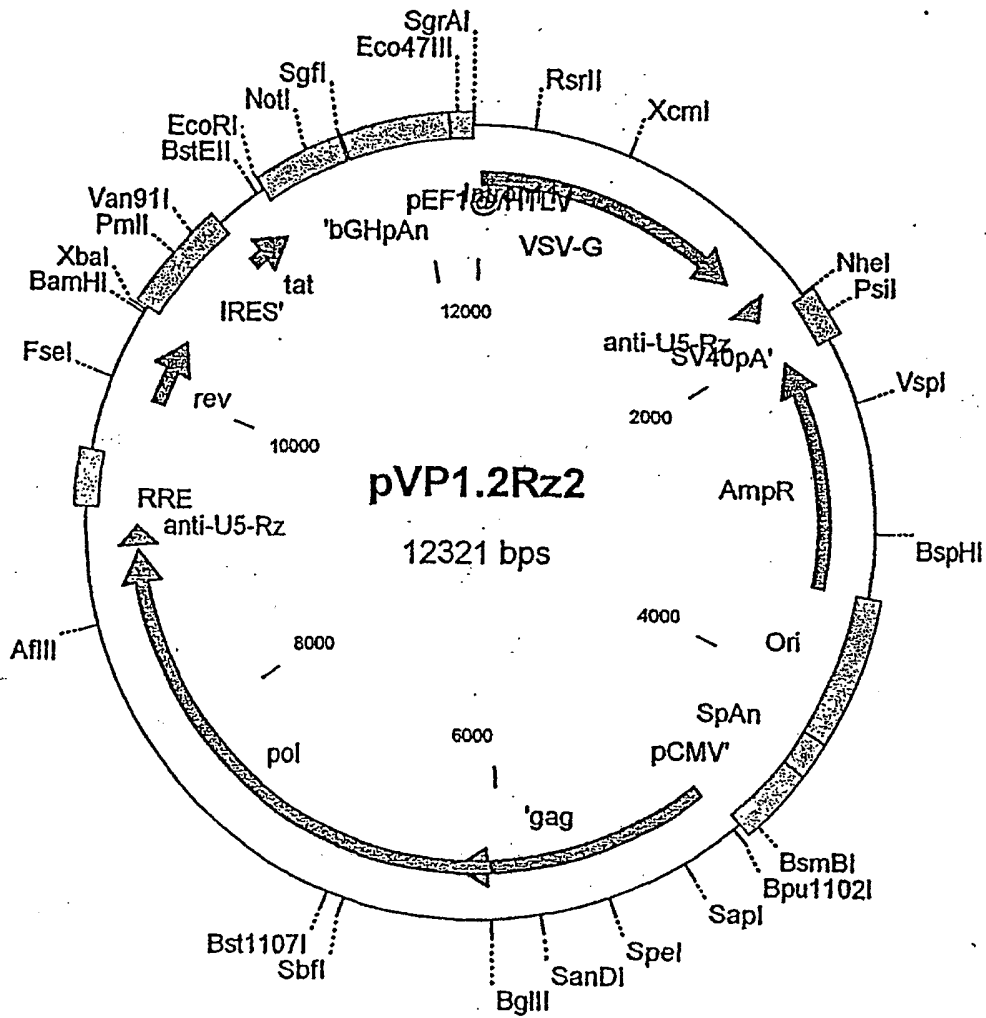
Obr.6C

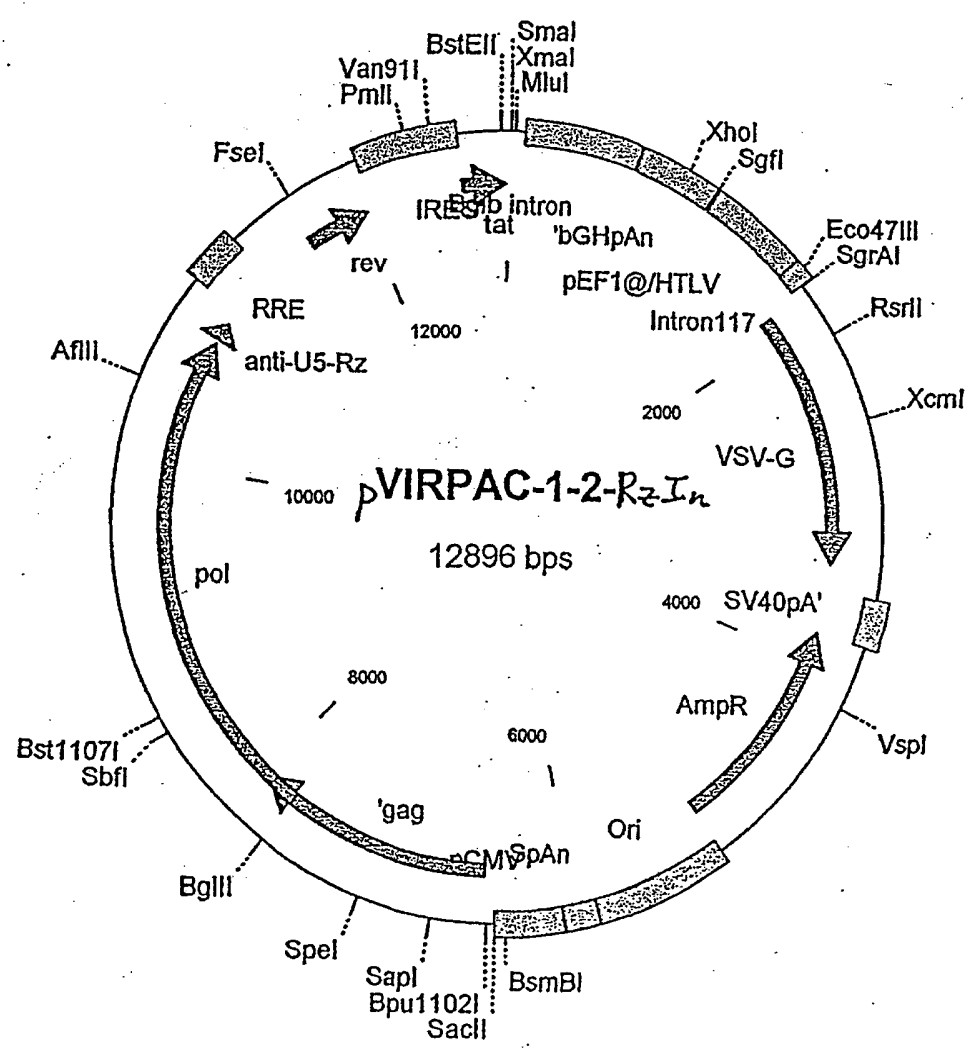


Obr.6D



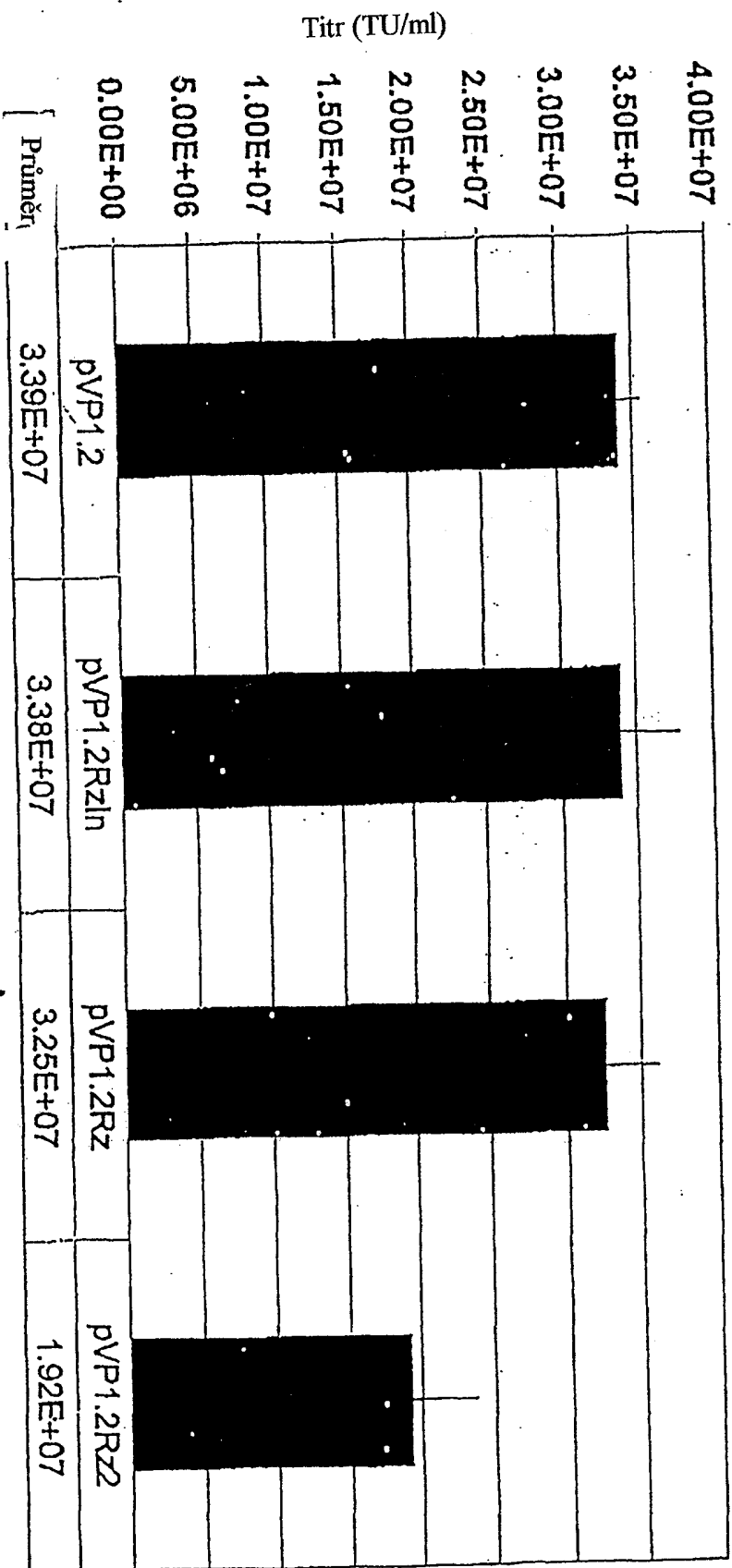
Obr.6E



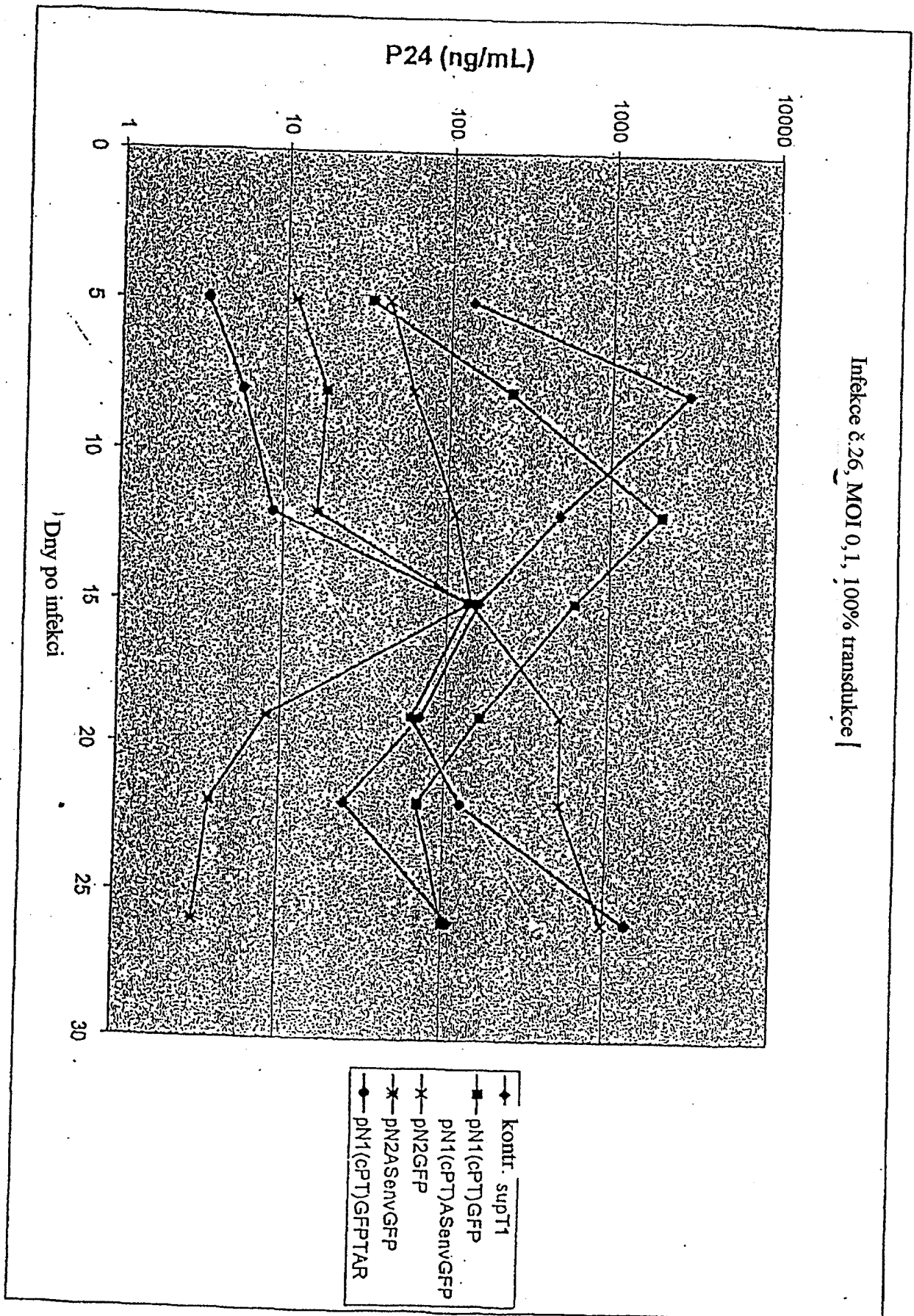


Obr.6G

Vliv ribozymu v balení na titry pN1(cPT)GFP vektoru v HeLa-tat buňkách

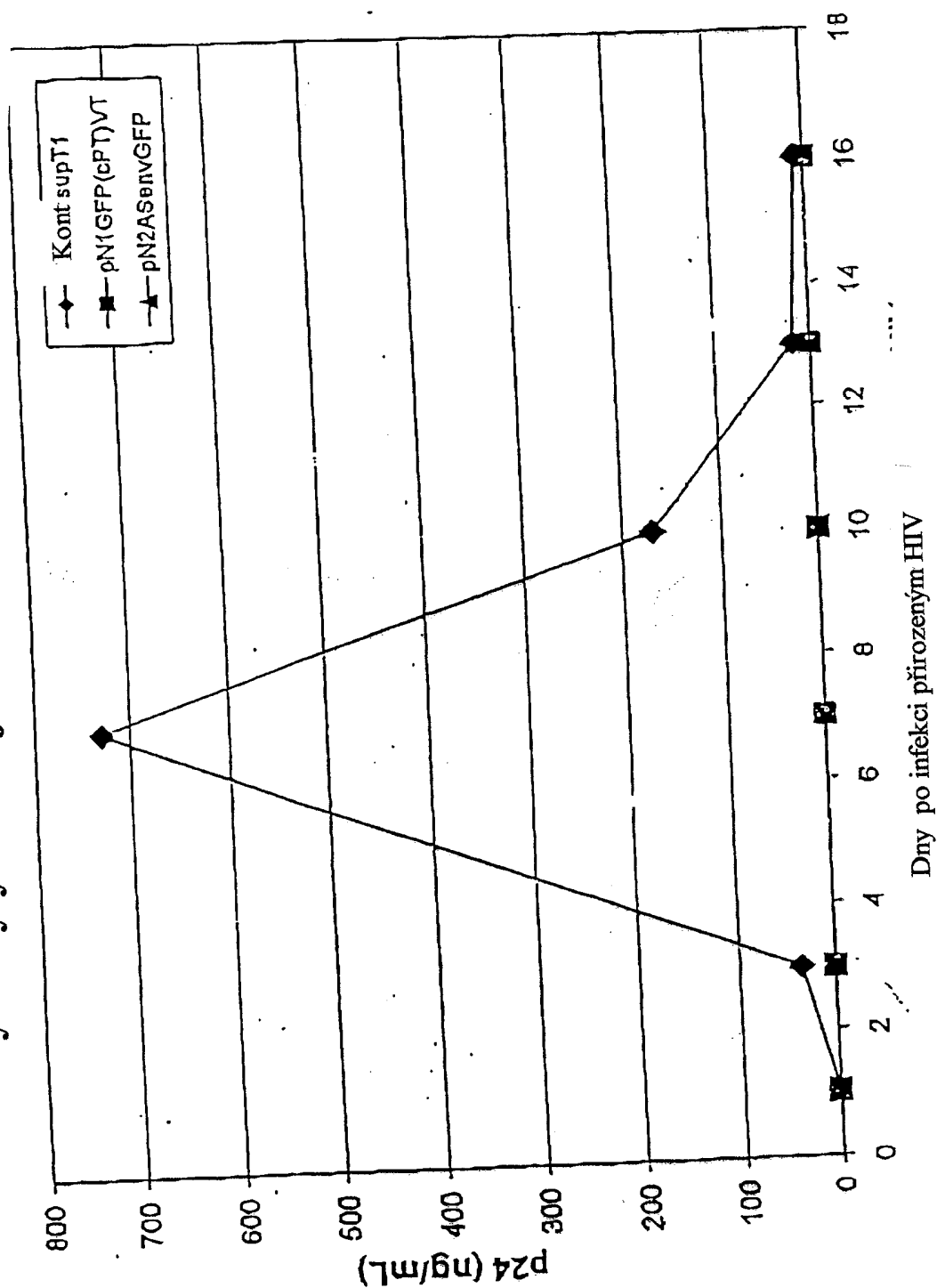


Obr. 7



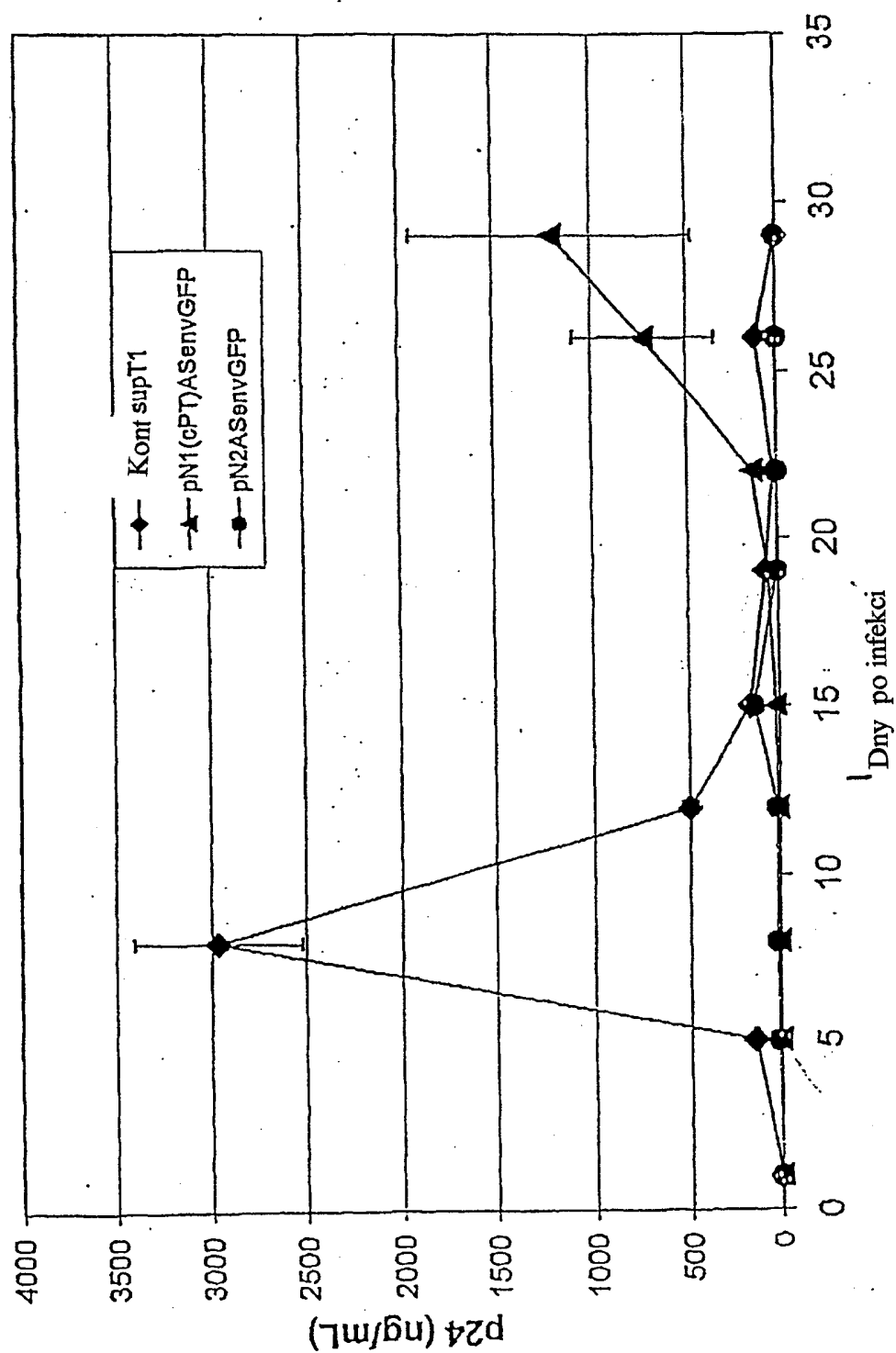
Obr. 8

**Účinná inhibice replikace přirozeného HIV lidskými T-
lymfocyty obsahujícími Smart vektor**

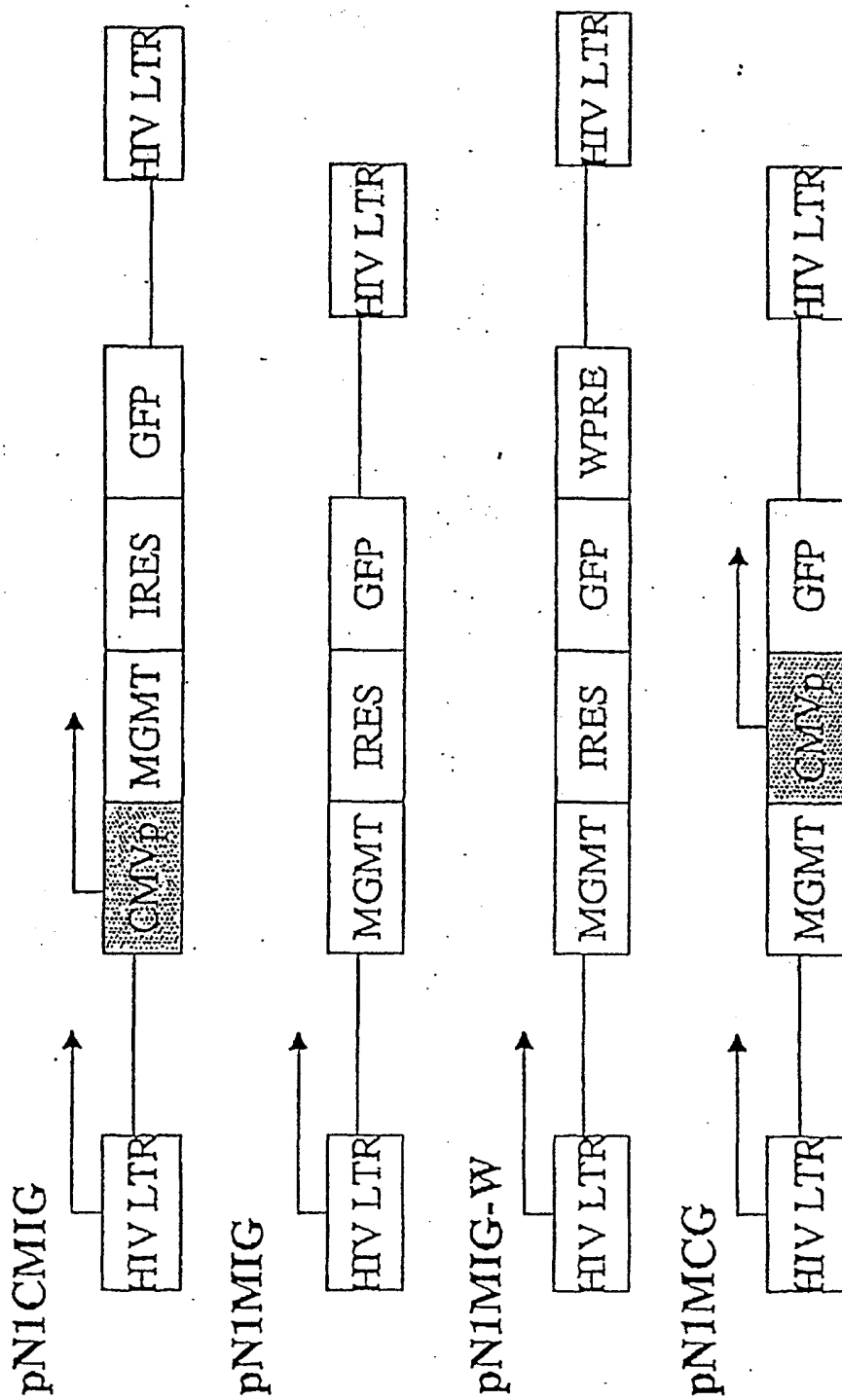


Obr. 9A

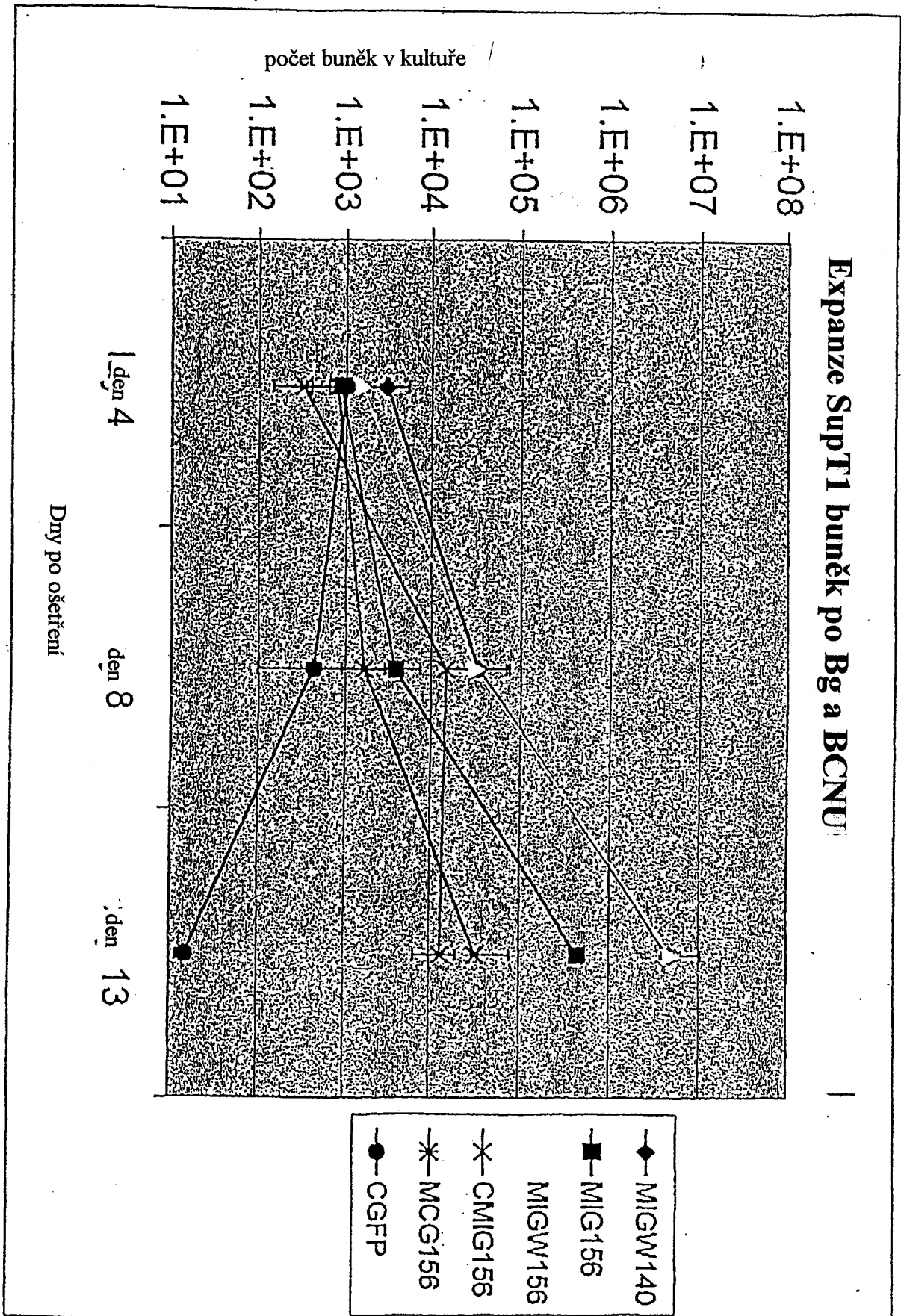
**Účinná inhibice replikace přirozeného HIV lidskými T-
lymfocyty obsahujícími Smart vektor**



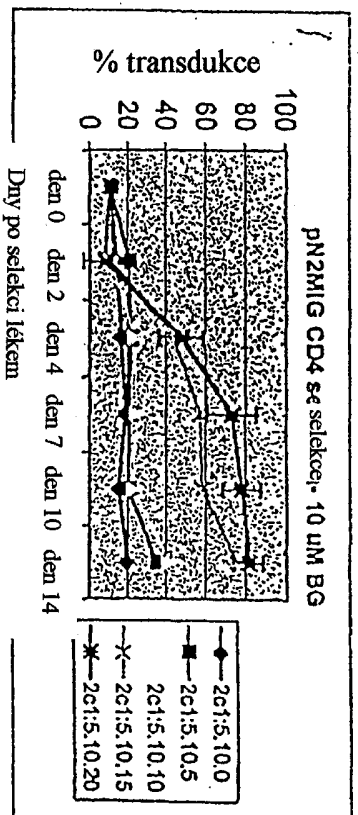
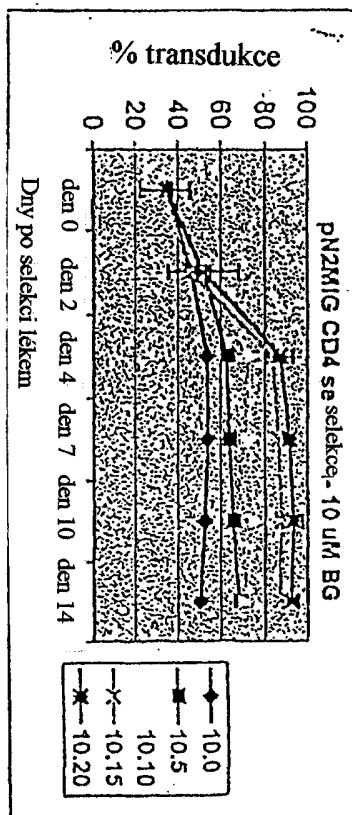
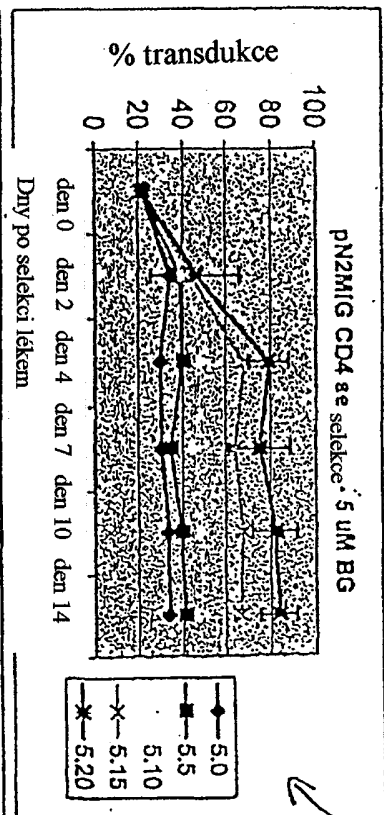
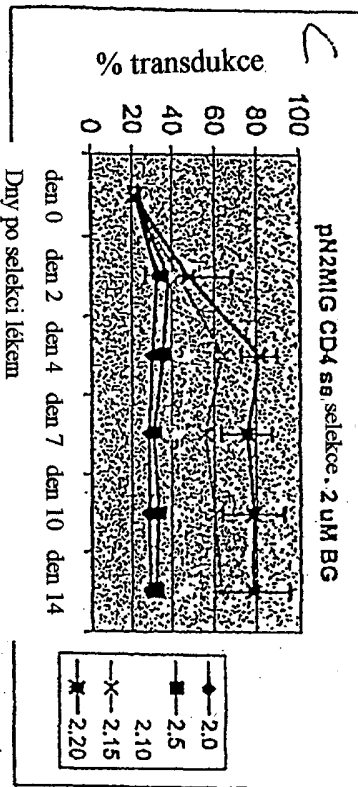
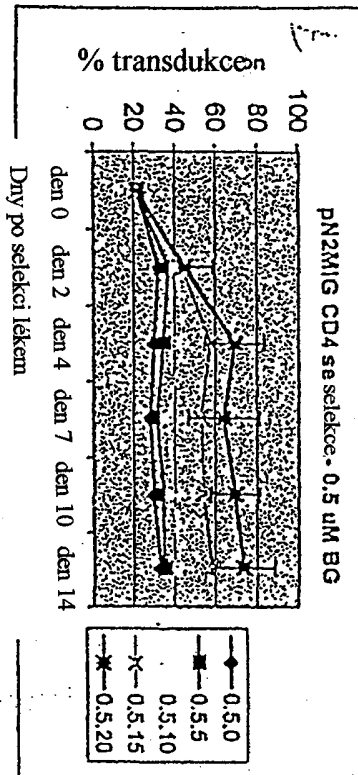
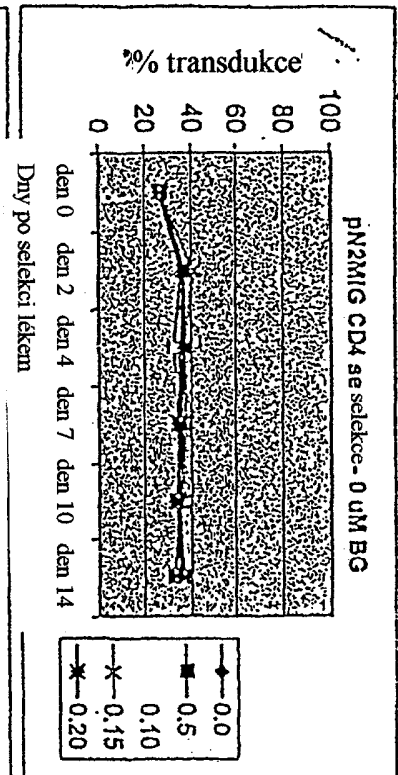
Obr. 9B

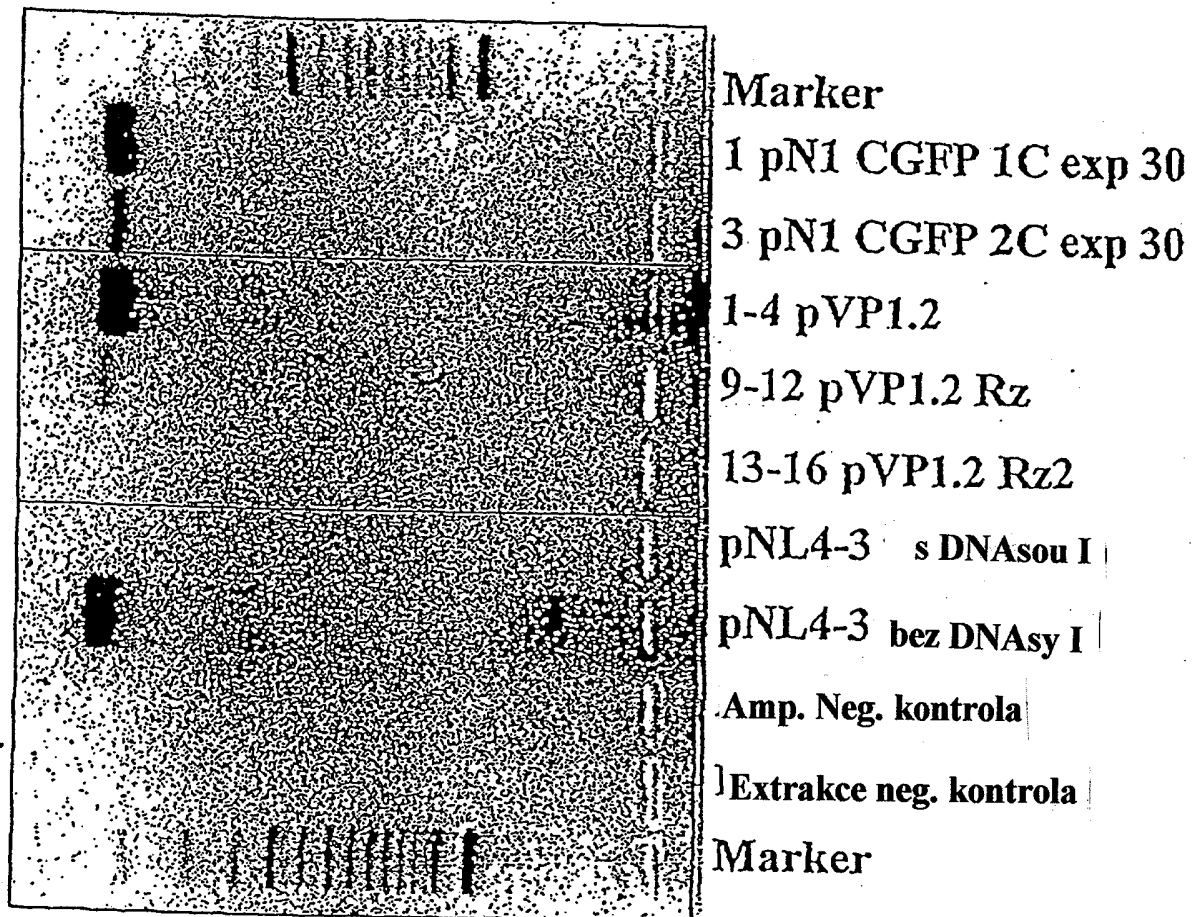


Obr. 10A

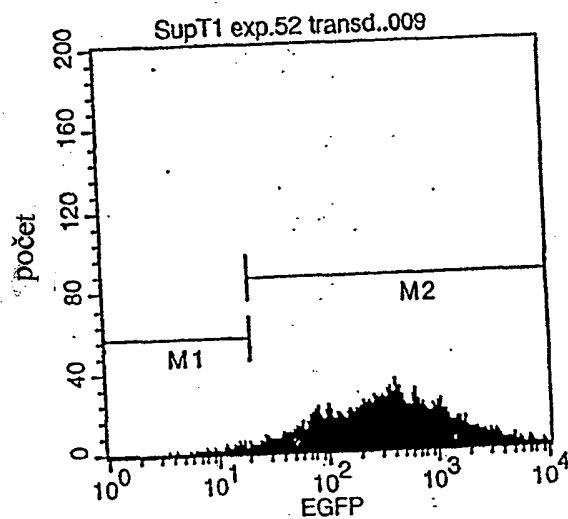


Obr. 10B





Obr.12

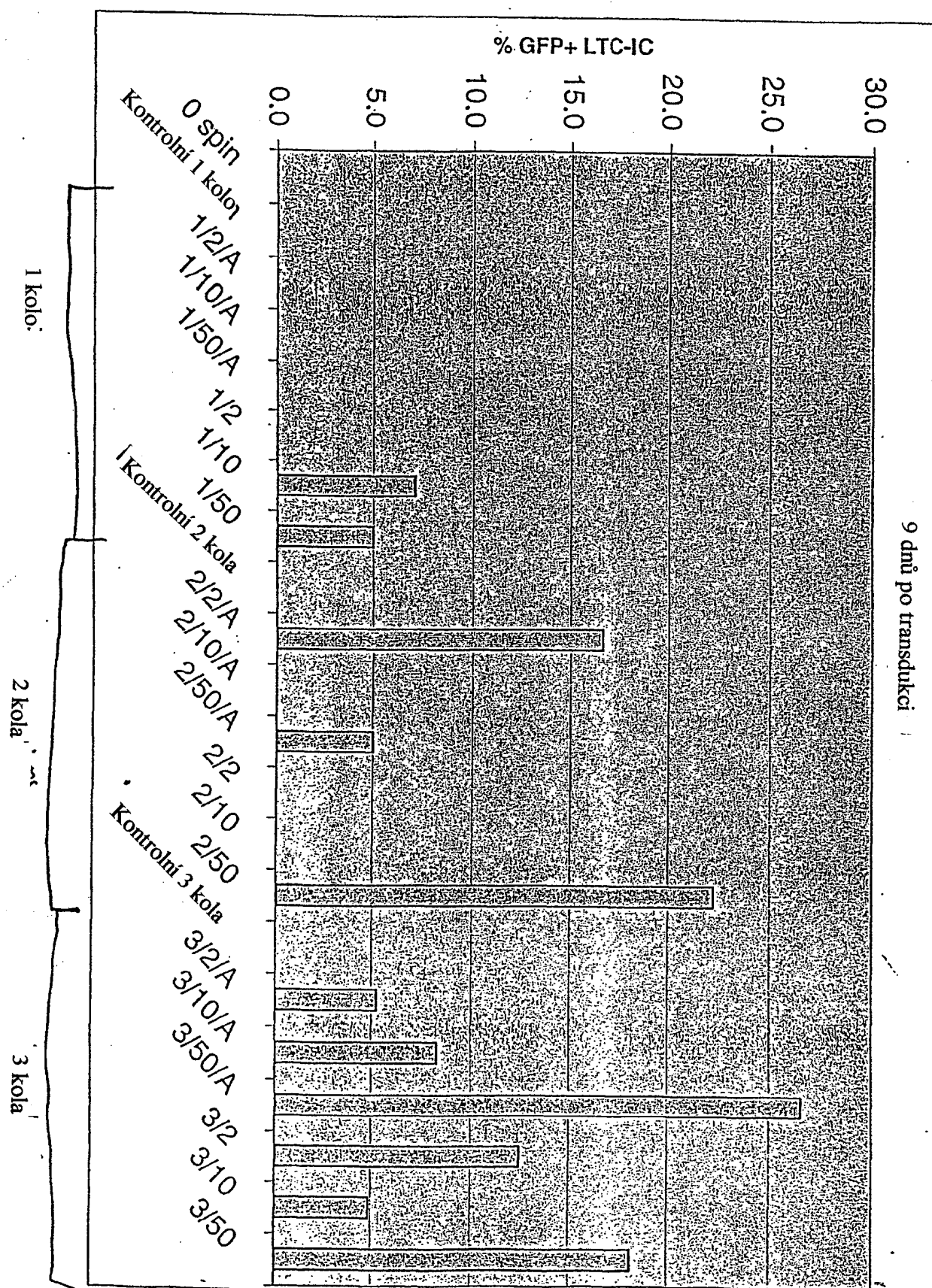


Histogramová statistika

Pole: SupT1 exp.52 transd..009 Vzorek ID: SupT1 ex
 Zkumavka: pN1(cPT)ASenvGFP 452 a Datum získání : 25-

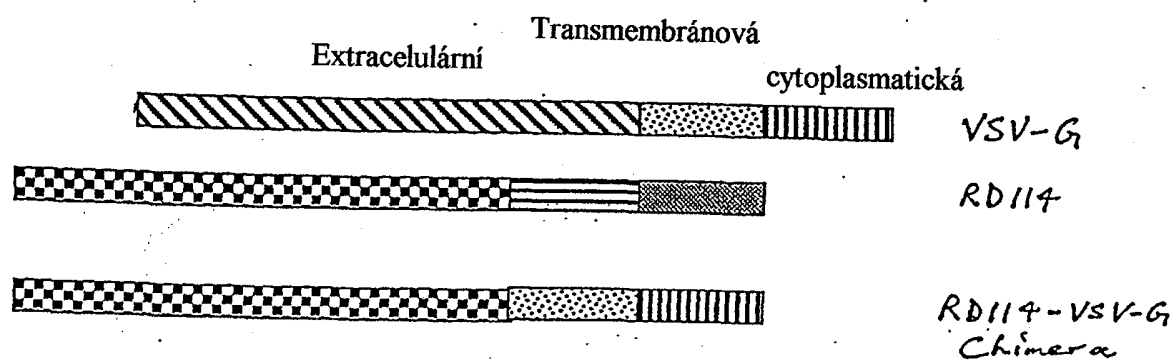
Marker	levá, pravá	Jev	% Gated	% Celkem	Průměr
All	1, 9910	6356	100.00	63.56	570.39
M1	1, 20	95	1.49	0.95	13.86
M2	20, 9910	6262	98.52	62.62	578.74

Obr.13A



Obr.13B

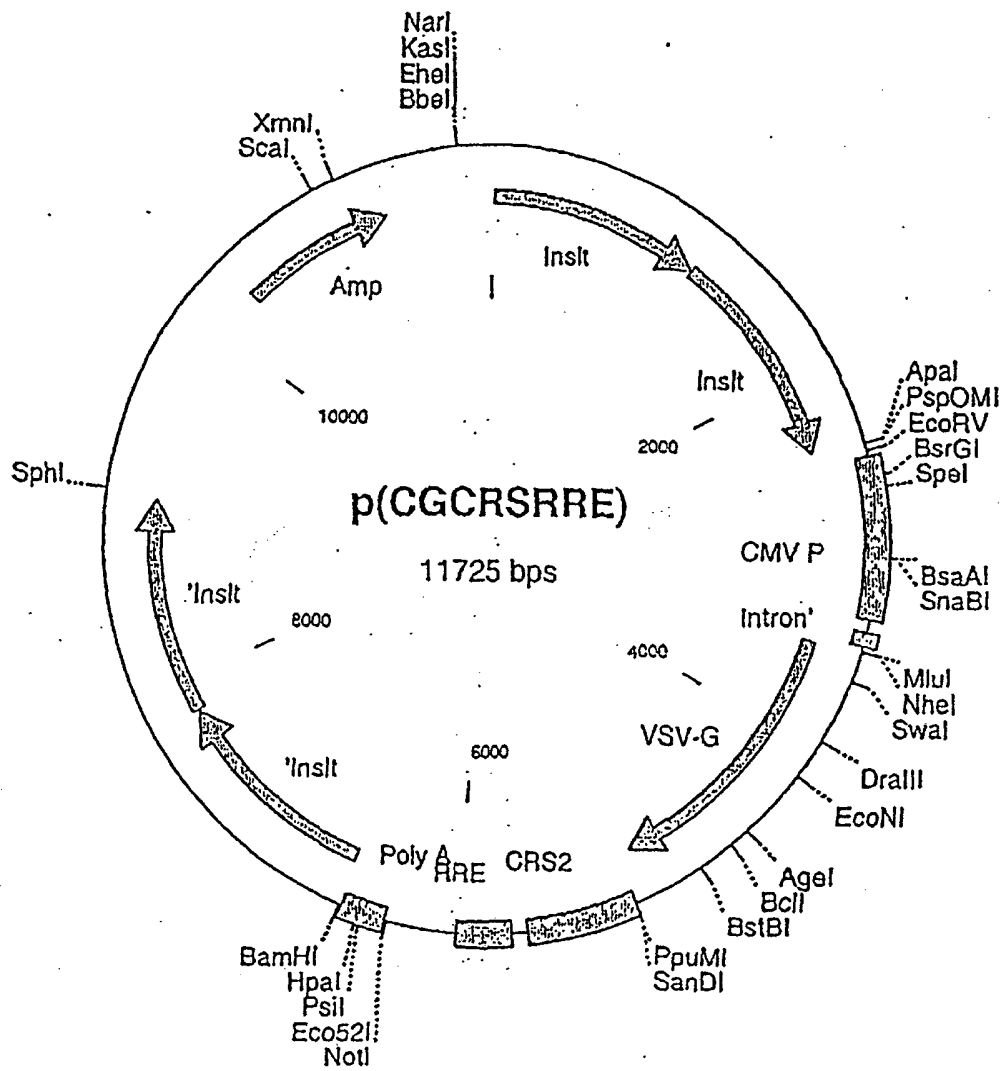
Obr.14A

Vsv-G, RD114 AND RD114-VSV-G chimérické obalové proteiny
ENVELOPE PROTEINS

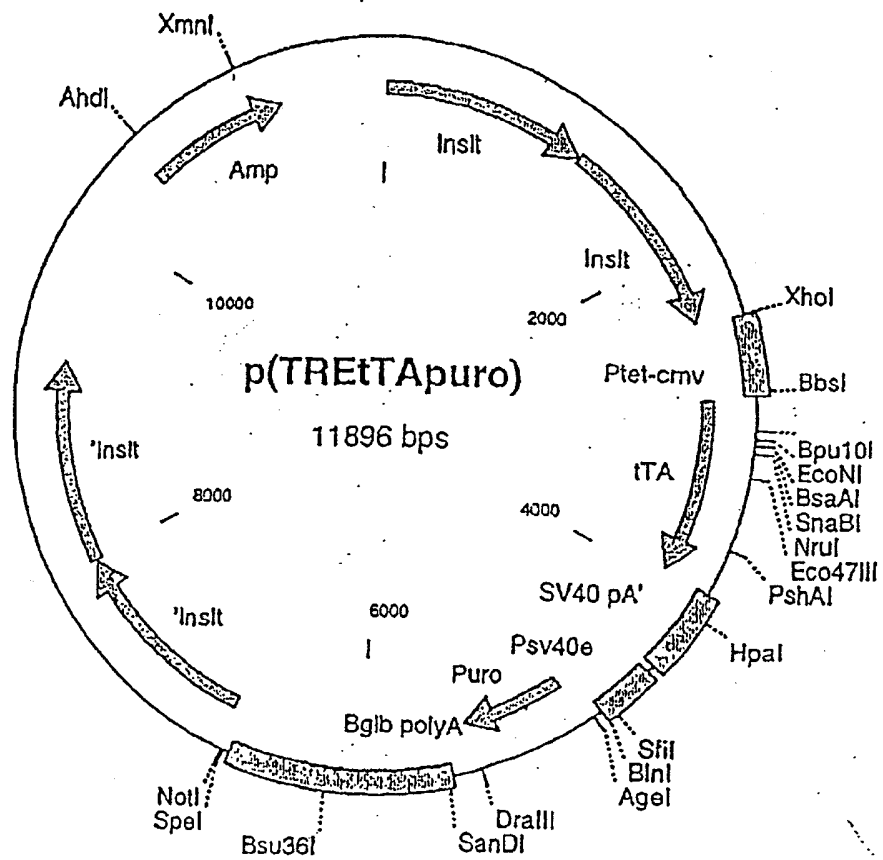
Obr.14B

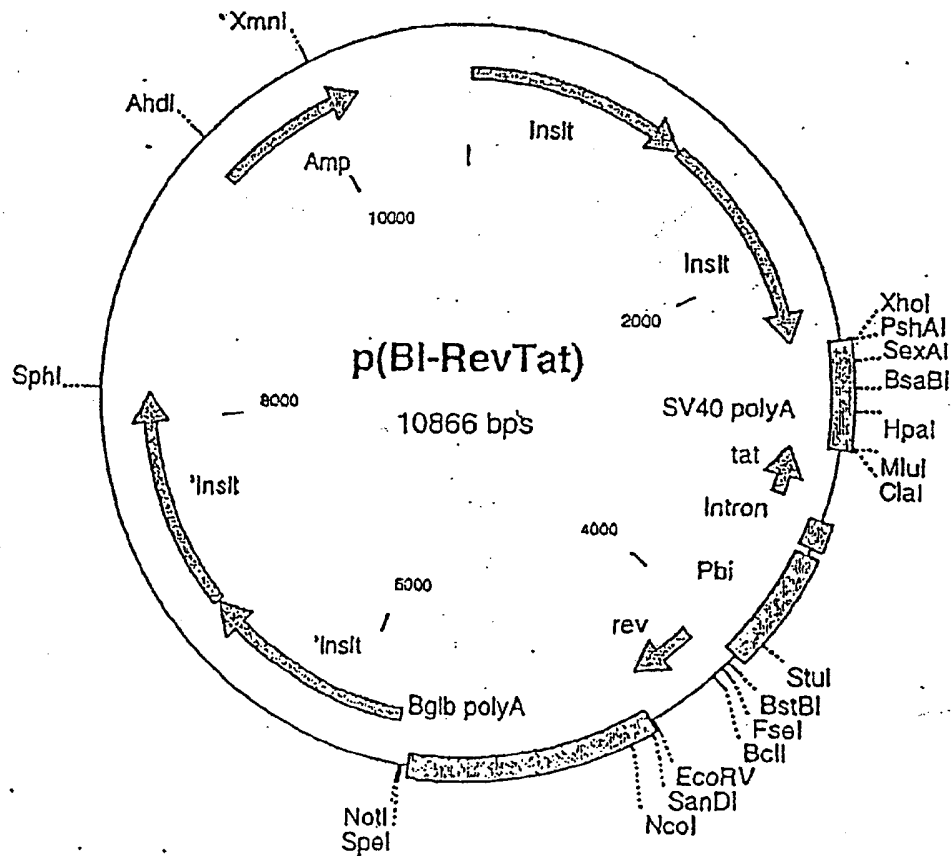
Titry RD114-pseudotypovaných HIV-1 vektorů v HT1080

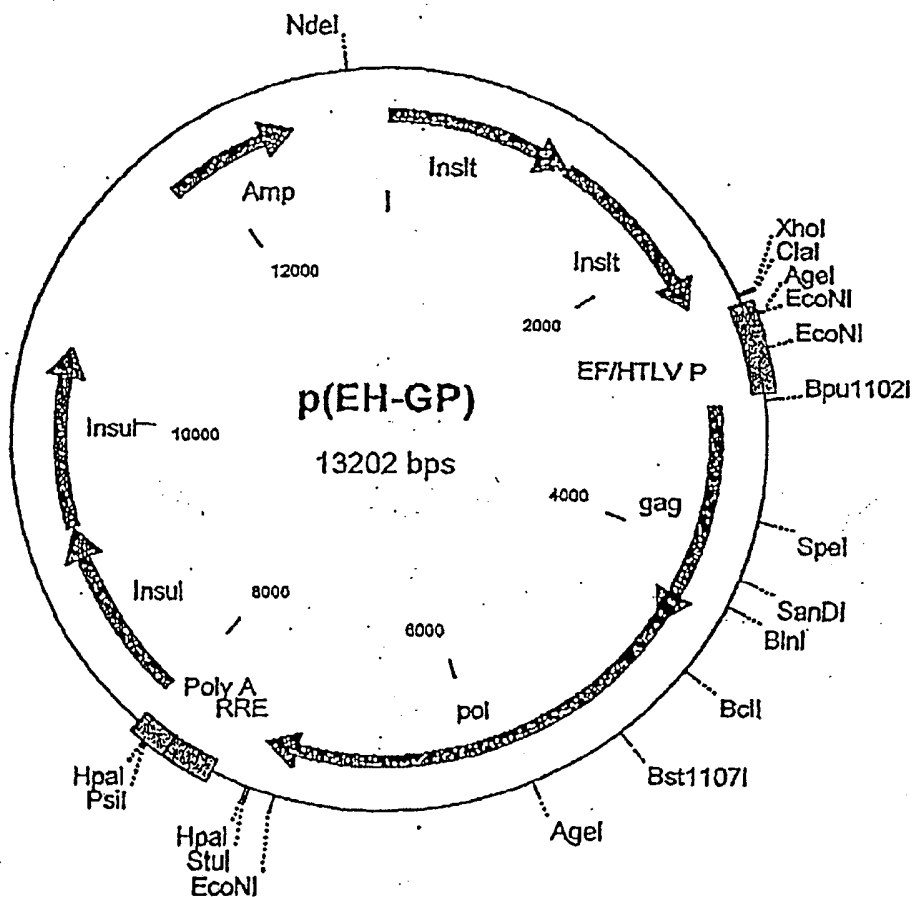
Obaly	IU/ml
VSV G	3.5x10e6
Rabies virus G	1.6x10e6
RD114WT env	1.5x10e5
RD114E env	3.8x10e4

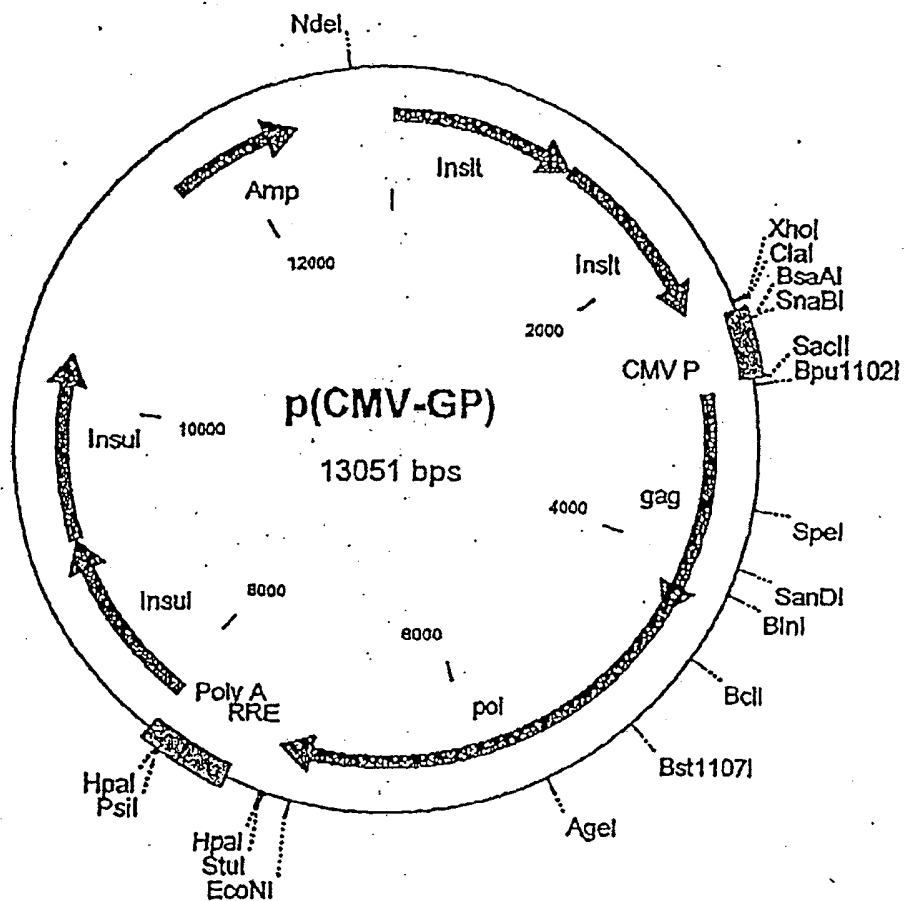


Obr.15A

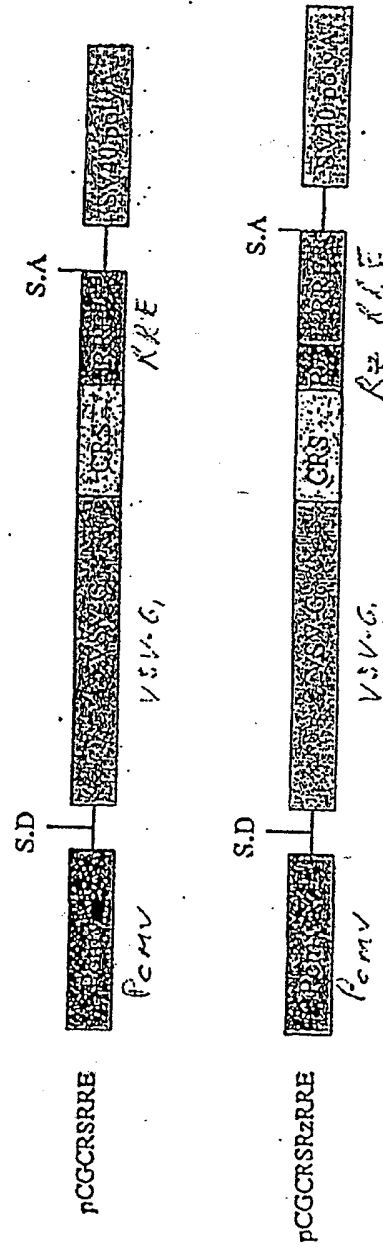








Rev dependentní VSV-G konstrukt

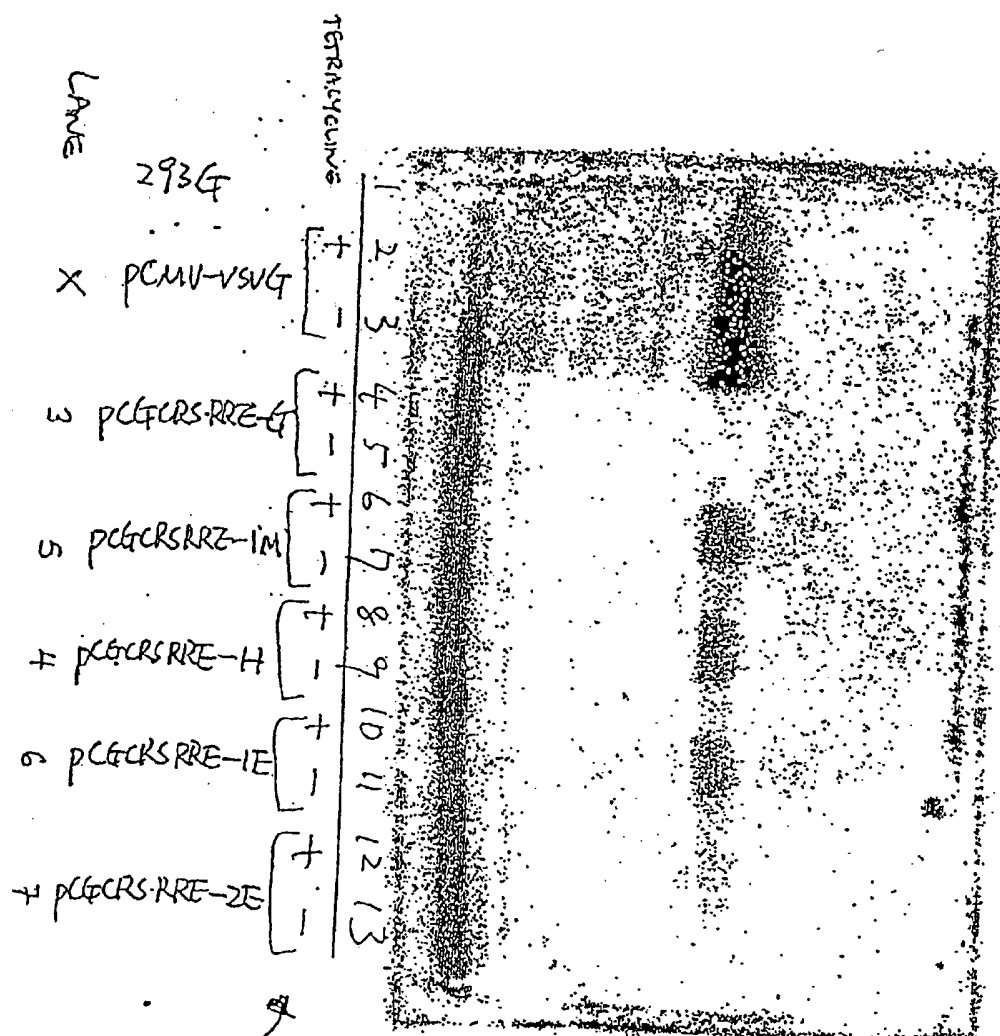


Obr.15F

Výtěžek pN1(cPT)GFP vektorů na buňku před a po koncentrováním v HeLa tat buňkách

7.00E+10			
6.00E+10			
5.00E+10			
4.00E+10			
3.00E+10			
2.00E+10			
1.00E+10			
0.00E+00			
	Celkový TU z jedné buňky po koncentrování	Celkový TU z jedné buňky před koncentrováním	before
■ 1.6 mg	2.42E+10	6.38E+10	

Obr.16

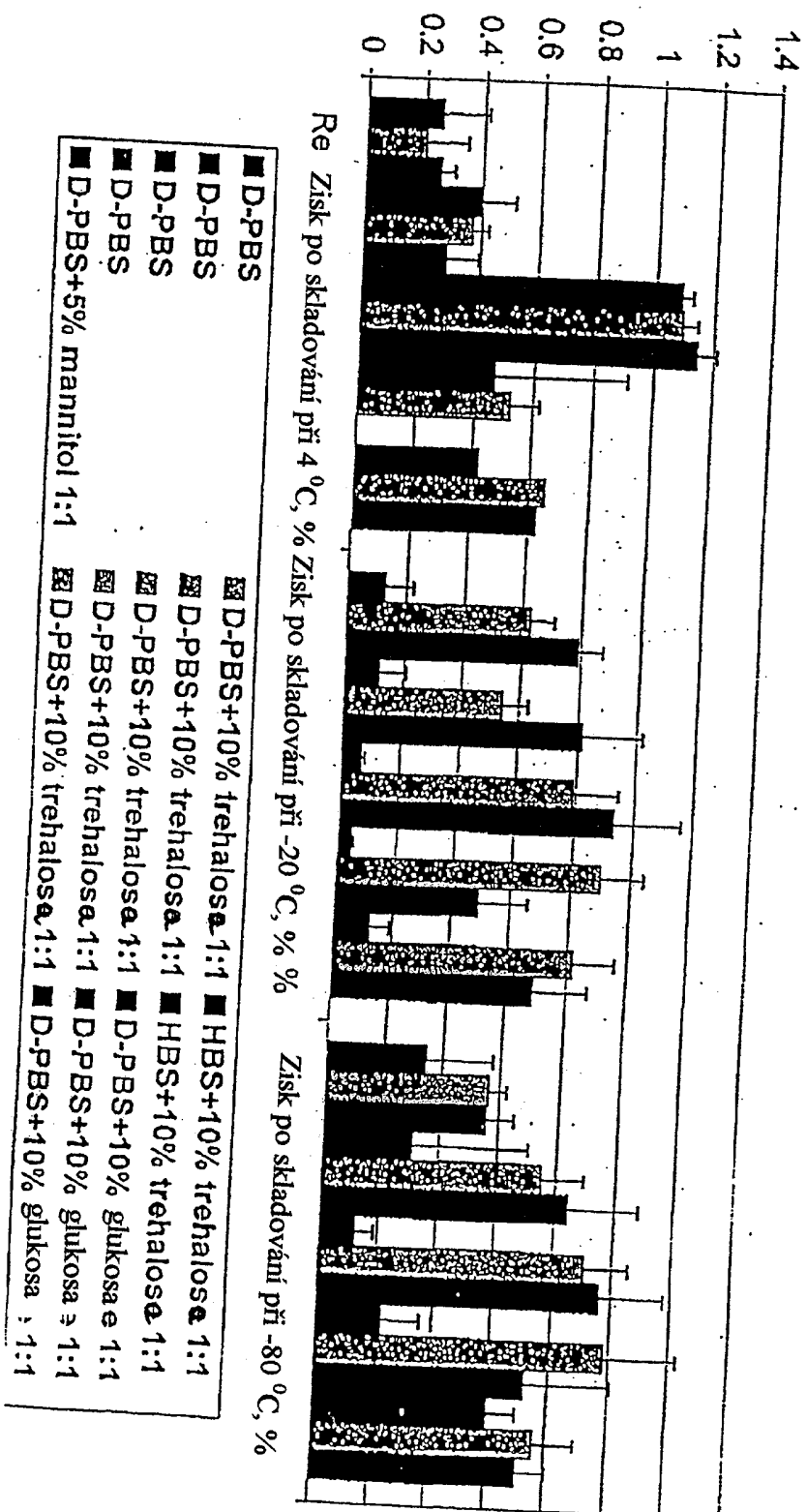


odstranění tetracyklinu
Pro indukci exprese VSV-G, která
je rev-dependentní

2E-HIV-2 env SD
IE-HIV-1 env SD
H-Humanuskyd's SD
IM-HIV-1 major SD
G-β-globin SD
- PCI
+ = pcuv-Rev

Obr.17

Vliv pufru na zisk vektoru po skladování po dobu 3-5 týdnů při různých teplotách



Obr.18

