PŘIHLÁŠKA VYNÁLEZU

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

(21) Číslo dokumentu:
2003 - 569

(13) Druh dokumentu: **A3**

(51) Int. Cl.[7]:
C 12 N 15/87
C 12 N 15/86
A 61 K 48/00

(19) ČESKÁ REPUBLIKA

ÚŘAD PRŮMYSLOVÉHO VLASTNICTVÍ

(22) Přihlášeno: **29.08.2001**

(32) Datum podání prioritní přihlášky: **31.08.2000**

(31) Číslo prioritní přihlášky: **2000/653088**

(33) Země priority: **US**

(40) Datum zveřejnění přihlášky vynálezu: **12.11.2003**
(Věstník č. 11/2003)

(86) PCT číslo: **PCT/US01/27091**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO02/018609**

(71) Přihlašovatel:
VIRXSYS CORPORATION, Gaithersburg, MD, US;

(72) Původce:
Humeau Laurent, Germantown, MD, US;
Han Wei, Newark, DE, US;
Lu Xiaobin, Germantown, MD, US;
Slepushkin Vladimir, Damascus, MD, US;
Lesher Mechelle, Columbia, MD, US;
Davis Brian, Gaithersburg, MD, US;
Chang Yung-Nien, Elkridge, MD, US;
Dropulic Boro, Ellicott City, MD, US;

(74) Zástupce:
Jirotková Ivana Ing., Nad Štolou 12, Praha 7, 17000;

(54) Název přihlášky vynálezu:

Způsoby stabilní transdukce buněk virálními vektory

(57) Anotace:

Řešení uvádí způsoby a prostředky pro účinnou transdukci buněk při použití virových vektorů. Účinnost transdukce je zvýšena kontaktem buněk, které mají být transdukovány, s jednou nebo více molekulami, které se váží na povrch buněk. Kontakt s buňkami, které se váží na buněčný povrch, může nastat před, po nebo současně s kontaktem mezi virovým vektorem a buňjkou. Transdukované vektory mohou být sestrojeny tak, aby exprimovaly zájmový gen, což umožňuje jejich použití jako terapeutických nebo profylaktických činidel.

CZ 2003 - 569 A3

31.03.03

PV 2003-379

Způsoby stabilní transdukce buněk virovými vektory

Oblast techniky

Předkládaný vynález se zabývá způsoby, rovněž jako jich se týkajícími prostředky pro účinnou a stabilní transdukci buněk pomocí virových vektorů. Tyto způsoby zvyšují účinnost transdukce kontaktem buněk, které mají být transdukovány, s jednou nebo více molekulami, které se váží na povrch těchto buněk. Kontaktní stupeň se může vyskytovat před, po nebo současně s introdukcí virového vektoru do buněk. Předkládaný vynález se také týká použití stabilně transdukovaných buněk v jiných aplikacích, včetně exprese nukleových kyselin, nesených vektorem nebo terapie živých organizmů.

Dosavadní stav techniky

Podstata techniky transfekce, která obecně popisuje způsoby introdukce genetického materiálu do buněk, odpovídá z velké míry za molekulární a rekombinantní revoluci v biologii. Příklady způsobů transfekce pro použití u vyšších eukaryontních buněk obsahují precipitaci fosforečnanem vápenatým, aplikaci DEAE-dextranu, elektroporaci, mikroinjekce, lipofekci, virové infekce a jiné způsoby, popsané v mnoha vědeckých učebnicích a časopisech.

V rámci způsobů transfekce je použití virové infekce unikátní v tom, že virový, přirozeně se vyskytující prostředek pro introdukci jeho genetického materiálu do buňky je vzat jako výhoda pro transfer požadované molekuly nukleové kyseliny do buňky. Příklady modifikovaných a pro tyto způsoby použitých virů zahrnují adenoviry, adenoasociované viry, herpes simplex viry a retroviry. Zájmové molekuly nukleové kyseliny mohou být obecně klonovány v genomu viru. Po replikaci a obalení virového genomu jsou výsledné virové částice schopny doručení zájmové nukleové kyseliny do buňky prostřednictvím virového vstupního mechanizmu.

Virový genom musí být obecně, dříve než se k němu přidá zájmová nukleová kyselina, nejprve manipulací nukleové kyseliny učiněn deficientním v replikaci. Výsledný virový genom neboli virový vektor, vyžaduje použití pomocného viru nebo obalového systému, aby byla kompletována struktura částic a uvolnění z buňky. Pokud je k přenosu zájmového genetického materiálu do buňky použit virový vektor nebo virová částice, je tento způsob nazýván „transdukcí". Obecně tedy, „transdukovat" buňku znamená použít virový vektor nebo virovou částici pro přenos genetického materiálu do buňky.

Mezi způsoby transdukce je použití retrovirů předmětem velkého zájmu pro genetickou modifikaci savčích buněk. Hlavně je zajímavé použití modifikovaných retrovirů pro přenos genetického materiálu do buněk za účelem léčby genetických poruch a jiných chorob. Příklad takového přístupu je vidět v oblasti buněk hematopoetického systému, kde jsou retrovirové a lentivirové vektory předmětem intenzívního výzkumu.

Movassagh et al. například diskutují své studie snahy zvýšit účinnost transdukce zprostředkované retroviry, zahrnutím výsledků studií buněčného cyklu aktivovaných T buněk. Jejich výsledky jsou jako takové závislé na dělení aktivních buněk v průběhu transdukce. Tato práce je rovněž omezena na použití myších onko-retrovirů a požadavek signifikantní prestimulace těchto buněk před transdukcí.

June et al. (WO 96/34 970) popisují použití stimulace T buněk jako prostředek pro zvýšení transfekce T buněk. Jinými pracemi na transdukci T buněk s aktivovanými nebo stimulovanými buňkami jsou Douglas et al., Hooijberg et al., Onodera et al., Klebba et al., Barry et al. a Unumatz et al.. Žádná z těchto prací však naneštěstí neprokázala vyšší účinnost transdukce než 65 %.

Costello et al. popisují transdukci jak stimulovaných, tak i nestimulovaných T buněk, použitím lentivirálních vektorů lidského viru imunodeficience – 1 (HIV-1). Pozorovali pouze maximálně 17% účinnost se stimulovanými primárními T buňkami a méně než 19% účinnost s nestimulovanými T buňkami. Zaznamenali rovněž omezenou schopnost zvyšovat účinnost na ne více než 36 % u stimulovaných buněk, zahrnutím přítomnosti HIV-1 přídatného proteinu.

Chinnasamy et al. také popisují účinnost transdukce v přítomnosti HIV-1 přídavného proteinu v jak nestimulovaných, tak i v mitogenem stimulovaných T buňkách. Podobně jako Movassagh et al., Chinnasamy et al. prestimulovali krevní lymfocyty po průkazné časové úseky před transdukcí lentivirálním vektorem. Zatímco Chinnasamy et al. původně pozorovali více než 96% transdukční účinnost tři dny po transdukci, bylo procento stabilně transdukovaných buněk sníženo na 71,2 % dva týdny po transdukci.

Haas et al. také pozorovali přechodnou transdukci a „pseudotransdukci" v buňkách, transdukovaných lentivirovým vektorem, schopným exprese markerového genu (zeleně fluoreskující protein). Každý třetí den po transdukci byla detekována signifikantní přechodná (více než 10%) transdukce, založená na neintegrativní expresi markerového genu v transdukovaných primárních CD31+ krevních buňkách. Takováto exprese z přechodné transdukce zůstala detekovatelná v 5 % vždy sedm dní po transdukci. Až po deseti dnech po transdukci klesla exprese z hladiny přechodné transdukce na hladinu v buňkách transdukovaných vektory bez markerů.

31.03.03

Chinnasamy et al tedy nebyli schopni dosáhnout stabilní transdukce, když byla integrovaná forma tohoto virového vektoru inzerována do chromozomové DNA transdukované buňky primárního lymfocytu, nad 71,2 %, jak ukazovala účinnost po dvou týdnech. Toto bylo bez ohledu na použití cytokinů na prestimulované buňky. Kromě toho Chinnasamy et al popisují jejich neschopnost signifikantně transdukovat (pouze 3,6 % 14 dní po transdukci) nestimulované lymfocyty s HIV vektorem, který neexprimuje přídavný protein (Vif, Vpr, Vpu a Nef), ani když byly tyto buňky stimulovány PHA mitogenem a IL-2 cytokinem po transdukci. I když byly tyto výsledky poněkud zlepšeny použitím nestimulovaných buněk a vektorů, obsahujících přídavné proteiny, v žádném případě nebyla účinnost stabilní transdukce stimulovaných ani nestimulovaných buněk vyšší než 75 % v den 14 po transdukci, bez ohledu na stimulační protokol použitý u vektoru.

Nízké frekvence stabilní transdukce s lentivirovými vektory byly také pozorovány u Hass et al., kteří dosáhli maximální účinnosti stabilní transdukce méně než 25 %, sedm dní po transdukci s primárními CD34 pozitivními krevními buňkami.

Tento 25% limit transdukce nebylo možno překvapivě zlepšit dokonce ani po extrémně vysoké multiciplitě infekce nebo koncentrace vektoru, jako jsou multiciplita infekce (MOI) do 9000 a koncentrace vektoru až do 108 infekčních jednotek na mililitr.

Follenzi et al. také použili velmi vysokou MOI 500 pro transdukci buněk v případě přítomnosti směsi třech cytokinů, obsahující interleukin-3 (IL-3), interleukin-6 (IL-6) a faktor kmenových buněk (SCF). Je zajímavé, že použití této směsi cytokinů učinilo tyto buňky nevhodnými pro lidskou klinickou transplantaci.

Stále zde tedy existuje potřeba získat účinnější prostředek pro stabilní transdukování buněk vektory při vysoké frekvenci. Kromě je zde potřeba účinnějších prostředků pro transdukci nestimulovaných buněk pro použití jako výzkumných prostředků i terapeutických činidel.

Citace shora uvedených dokumentů není myšlena jako přiznání, že kterýkoliv z nich souvisí se současným stavem techniky. Všechna prohlášení, jak ke dni podání, tak k obsahu těchto dokumentů jsou založena na informaci dostupné přihlašovateli a nezakládají jakékoliv přiznání se, co se týče správnosti těchto údajů nebo obsahů těchto dokumentů.

Podstata vynálezu

Předkládaný vynález poskytuje vysoce účinné způsoby a s nimi spojené prostředky pro stabilní transdukci buněk virovými vektory a virovými částicemi. Pod „stabilní transdukcí" je zde myšlen případ, když do chromozomální DNA transdukované buňky byla inzerována

integrovaná forma virového vektoru. Tyto způsoby zahrnují vystavení buněk, které mají být transdukovány, kontaktu s nejméně jednou molekulou, která se váže k buněčnému povrchu. Tento kontaktní krok se může vyskytovat před, v průběhu nebo poté, co jsou tyto buňky vystaveny virovému vektoru nebo virové částici. Termín „virový vektor" je tudíž používán pro označení jakékoliv formy nukleové kyseliny, odvozené od viru a použité pro přenos genetického materiálu do buňky *via* transdukcí. Tento termín zahrnuje nukleové kyseliny virových vektorů, jako jsou DNA a RNA, zapouzdřené formy těchto nukleových kyselin a virové částice, ve kterých jsou nukleové kyseliny virových vektorů zabaleny.

Předkládaný vynález také zahrnuje použití transdukovaných buněk v jiných aplikacích, včetně výroby použitelných genových produktů a proteinů expresí nukleové kyseliny přítomné ve vektoru nebo terapii postižených živých subjektů nebo při riziku napadení chorobou. Je výhodné, když tímto subjektem je člověk.

Nejméně jedna molekula, která se váže na povrch buněk, které mají být transdukovány, je molekulou, která fyzikálně interaguje s receptorem, markerem nebo jinou detekovatelnou částí na povrchu těchto buněk. Principiálně může být pro vysokou účinnost transdukce použita libovolná molekula, vážící se na povrch buněk. Aniž bychom vynález příliš spojovali s teorií, mohou molekuly vážící se na buněčný povrch mít za výsledek, že chromatin hostitelských buněk je více přístupnější pro integraci DNA; ve výhodné integraci virového vektoru na místě výhodném pro expresi vektorového genu; ve více účinném vstupu nukleové kyseliny obsahující kapsidu do cytoplazmy; v účinnějším průchodu viru přes buněčnou membránu nebo vnitřní membránové struktury, jako jsou endozomy nebo v tom, že jsou tyto buňky přístupnější pro jaderný import genetického materiálu virového vektoru. Způsoby podle tohoto vynálezu mohou také zahrnovat více než jednu ze shora uvedených možností. Jak je také zřejmé z počtu a z různosti shora uvedených možností, nemůže být tento vynález omezen na libovolnou jednu teorii. Místo toho a vzhledem k mimořádnosti vynálezu, co se týče stability transdukce až do 100 % buněk bez negativního ovlivňování možného použití těchto buněk v lidské terapii, můžeme na předkládaný vynález nahlížet jako na otevření nového přístupu v oblasti terapie lidských buněk.

Nikoliv všechny molekuly, vážící se na buněčný povrch, budou však mít za výsledek účinnou a stabilní transdukci virovými vektory. Vazba molekuly na buněčný povrch, která indukuje apoptosu, nebude mít za výsledek účinnou transdukci buňky, ale spíše buněčnou smrt.

I když může být buněčná smrt výhodná pro zabíjení buněk (např. tumorové buňky), není výhodná pro stabilní transdukci buněk vektory, které obsahují payload geny nebo sekvence nukleových kyselin. Výhodná molekula vážící se na buněčný povrch má za výsledek, že se tato buňka stane přístupnější pro transdukci virovým vektorem. Příklady takových molekul zahrnují

protilátku vůči specifickému povrchovému receptoru buněk nebo jeho části, rovněž jako ligand nebo jeho vazebné část pro tento receptor. Kromě toho jsou antigen vážící fragmenty protilátek, jako jsou Fab a Fv fragmenty, zamýšleny pro použití v předkládaném vynálezu. Vazebná oblast pro specifický receptor buněčného povrchu může obsahovat jeden epitop nebo dva nebo více epitopů.

Výhodnými příklady molekul, vážících se k buněčnému povrchu, pro použití v tomto vynálezu jsou anti-CD3 a anti-CD28 protilátky, které váží T buňky a činí je přístupnějšími pro vektorovou transdukci. Jinými, výhodnými molekulami vážícími se na povrch buněk, jsou protilátky nebo ligandy pro FLT-3 ligand, TPO a Kit ligand receptory, které buňky, exprimující receptory, jako jsou hematopoetické kmenové buňky, činí přístupnějšími pro vektorovou transdukci.

Dalšími výhodnými molekulami, které se váží na buněčné povrchy, jsou protilátky nebo ligandy pro receptory GM-CSF a IL-4, které činí dendritické buňky nebo jejich prekurzory, jako jsou monocyty, CD34 pozitivní kmenové buňky nebo jejich diferencovaní předchůdci po linii dendritických buněk, přístupnějšími vektorové transdukci. Jinými molekulami, které se váží na buněčný povrch, jsou molekuly nalezené na buněčných površích, které se váží na povrch jiné buňky.

Další příklady molekul vážících se na buněčný povrch zahrnují polypeptidy, nukleové kyseliny, cukry, lipidy a ionty, komplexně vázané nebo nevázané na jiné látky.

Je výhodné, když tyto molekuly se váží na faktory krevních buněk, jako jsou CD 1 a, CDlb, CDlc, CDld, CD2, CD3y, CD38, CD3s, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8a, CD8 (3, CD9, CD10, CDlla, CDllb, CDllc, CDwl2, CD13, CD14, CD15, CD15s, CD16a, CD16b, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45R, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD51, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CD79a, CD79p, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CDw92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107a, CD107b, CDwl08, CDwl09, CD114, CD115, CD116, CD117, CD118, CD119, CD120a, CD120b, CD121a, CD121b, CD122, CD123, CDw124, CD125, CD126, CDw127, CDwl28a, CDw128b, CDw130, CDw131, CD132,

CD133, CD134, CD135, CD136, CDw137, CD138, CD139, CD140a, CD140b, CD141, CD142, CD143, CD144, CDwl45, CD146, CD147, CD148, CDwl49, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158a, CD158b, CD161, CD162, CD163, CD164, CD165, CD166 a TCRζ. Malými písmeny (např., "a" nebo "b") jsou označeny komplexní CD molekuly složené z produktů mnohočetných genů nebo náležející do rodin strukturně příbuzných proteinů. Poznámka "w" označuje domnělé CD molekuly, které ještě nebyly zcela potvrzeny. Úplnější seznam CD molekul se nalézá v Kishimoto, T. (ed.). Aktuální informace o CD molekulách se rovněž nalézají u Shaw, S. (ed.), Protein Rewievs on the Web: An International WWW Resource/Journal na http://www.bsi.vt.edu/immunology.

Výhodnější jsou molekuly, které váží faktory, nalezené na povrchu lymfocytů, T buněk a leukocytů, jako jsou CD2, CD3y, CD38, CD3s, CD5, CD6, CD7, CD8a, CD8(3, CD9, CDlla, CD18, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD37, CD38, CD39, CD43, CD44, CD45R, CD46, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD53, CD54, CD56, CD57, CD58, CD59, CDw60, CD62L, CD68, CD69, CDw70, CD71, CD73, CDw75, CDw76, CD84, CD85, CD86, CD87, CD89, CD90,CD94, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD103, CD107a, CD107b, CDw108, CDwl09, CD118, CD119, CD120b, CD121a, CD122, CDwl24, CDwl27, CDwl28a,CDwl30, CD132, CD134, CDwl37, CD140a, CD140b, CD143, CD146, CD148, CD152,CD153, CD154, CD155, CD161, CD162, CD165j CD166, and TCRζ. Další protilátky a molekuly, které se váží na povrch buněk a jsou vhodné pro použití podle předkládaného vynálezu, jsou popsány v knize: Linscott´s Directory of Immunological and Biological Reagents, 11. vydání, leden 2000, vydavatel: W.D. Linscott, Petaluma, CA, kterou tímto začleňujeme citací, jak je doslovně uvedeno dále. V některých provedeních vynálezu však molekulou vážící se na povrch buněk není cytokin.

I když může být tento vynález realizován použitím rozpustných molekul, vážících se na buněčný povrch, které slouží jako promotory vektorové transdukce buněk, další výhodná uspořádání zahrnují použití imobilizovaných molekul, vážících se na buněčný povrch. Těmito imobilizovanými molekulami jsou výhodně protilátky. Alternativně může být imobilizace dosaženo použitím jiných buněk, které exprimují molekuly, vážící se na buněčný povrch. Výhodným způsobem účinné transdukce hematopoeitických buněk je začlenění kmenových buněk kostní dřeně, vylučujících na svém povrchu ligandy, které usnadňují udržení kmenových buněk, aniž by v průběhu transdukce diferencovaly. Stimulující buňky nejsou omezeny na nativní buňky, ale každá buňka může být upravena pro vylučování vhodných molekul vážících se na buněčný povrch, aby byl získán správný stimul pro transdukci.

31.03.03

Mohou být také začleněny další molekuly, které zvyšují nebo zesilují schopnost alespoň jedné molekuly vázat se na buněčný povrch. Například může být použita rozpustná forma (primární) protilátky proti specifickému receptoru buněčného povrchu ve spojení se sekundární protilátkou, která křížově reaguje s primární protilátkou, která je již navázána na buněčný povrch.

Při praktickém provádění tohoto vynálezu může být samozřejmě použita kterákoliv buňka. Je výhodné, když je buňkou, která má být transdukována, eukaryontní buňka. Výhodnější je primární buňka. Buněčné linie však také mohou být transdukovány způsobem podle tohoto vynálezu a v mnoha případech ještě snadněji. V jednom výhodném provedení je buňkou, určenou pro transdukci, primární lymfocyt (tak jako T lymfocyt) nebo makrofág (jako např. monocytický makrofág) nebo prekurzor některé z těchto buněk, jako je například hematopoetická kmenová buňka. Dalšími výhodnými buňkami pro transdukci jsou obecně buňky hematopoetického systému nebo, ještě obecněji, buňky vzniklé v tomto systému, tak jako kmenové buňky, ze kterých vznikají a buňky spojené s funkcí krevních buněk. Tyto buňky zahrnují granulocyty a lymfocyty vzniklé hematopoézou, rovněž jako předchůdci kmenových pluripotentních, lymfoidních a myeloidních buněk. Buňky spojené s funkcemi krevních buněk zahrnují buňky, které podporují fungování buněk imunitního systému, jako jsou antigen prezentující buňky, například dendritické buňky, endotelové buňky, monocyty a Langerhansovy buňky. Ve výhodném provedení jsou těmito buňkami T lymfocyty (nebo T buňky), jako ty, které exprimují CD4 a CD8 markery.

V hlavních výhodných provedeních je touto buňkou CD4+ T lymfocyt nebo primární CD34+ hematopoetická kmenová buňka. Předpokládáme-li však, že virový vektor pro použití v tomto vynálezu může být pseudotypován obálkovým G proteinem Vesicular Stomatitis Virus (jak je diskutováno dále), může být postupem podle tohoto vynálezu transdukována libovolná buňka, jako je, ale bez omezení na ně, astrocyt, fibroblast pokožky, epitelová buňka, neuron, dendritická buňka, lymfocyt, buňka spojená s imunitní reakcí, vaskulární endotelová buňka, tumorová buňka, tumorová vaskulární endotelová buňka, jaterní buňka, plicní buňka, buňka kostní dřeně, antigen prezentující buňka, stromální buňka, adipocyt, svalová buňka, buňka slinivky, ledvinová buňka, vajíčko nebo spermatocyt (např. pro tvorbu transgenních živočichů), buňka přispívající k zárodečné linii, embryonální pluripotentní kmenová buňka nebo její předchůdci, krevní buňky, včetně bezjaderných buněk, jako jsou krevní destičky, červené krvinky a jim podobné. Touto buňkou je s výhodou buňka eukaryotická mnohobuněčných druhů (např., jako protiklad jednobuněčné kvasničné buňky), výhodněji buňka savčí, například lidská.

31.03.03

Buňka, která má být transdukována, může být přítomna jako jednotlivá buňka nebo může být částí větší kolekce buněk. Tato "kolekce buněk" může například představovat buněčnou kulturu (buď čistou nebo směsnou), tkáň (např., epitelovou, stromální nebo jinou), orgán (např. srdce, plíce, játra, žlučník, močový měchýř, oko a jiné orgány), orgánový systém (např. oběhový systém, respirační systém, gastrointestinální systém, močový systém, nervový systém, kožní systém nebo jiný orgánový systém), blastocyst, embryonální kmenovou buňku nebo buňku plodu (např. pro léčbu genetických poruch/chorob nebo pro tvorbu transgenních živočichů), nemocné tkáně, jako je tumor nebo místo infekce nebo organizmus (např. pták, savec, mořský živočich, ryby, rostlina a jim podobné).

Je výhodné, když cílové orgány, tkáně nebo buňky jsou v oběhovém systému (včetně například ale bez omezení na, srdce, krevní řečiště a krev), respiračním systému (např. nos, hltan, hrtan, průdušnice, průdušky, plíce a jim podobné), gastrointestinální systému (včetně například ústa a ústní tkáně, hltan, esofagus, žaludek, střeva, slinná žláza, slinivka břišní, játra, žlučník a jim podobné), savčí systém (jako jsou epitelové a podpůrné buňky v prsní tkáni), močový systém (jako jsou ledviny, močovody, močový měchýř a jim podobné), nervový systém (včetně, ale bez omezení na, mozek, mícha, speciální smyslové orgány, jako jsou oči) a integumentární systém (např. kůže).

Ještě výhodnější je, když buňky, které mají být transdukovány, jsou vybrány ze skupiny skládající se z srdce, krevního řečiště, včetně tumoru krevního řečiště a krevního řečiště, spojeného s infikovanou nebo nemocnou tkání, kostní dřeně, krve, mozku, lymfatické tkáně, lymfatické uzliny, sleziny, plic, jater, žlučníku, močového měchýře a očních buněk. V jednom hlavním provedení vynálezu je buňka autologní k hostiteli, zamýšlenému pro použití, ale mohou být použity i buňky, které jsou alogenní, částečně chybné, zcela chybné nebo dokonce xenogenní vůči hostiteli. Kromě toho mohou být transdukovány univerzální donorové buňky, vhodné pro použití v libovolném hostitelském organizmu, příbuzné skupině organizmů nebo druhů, jako je člověk. Posledně uvedené provedení vynálezu je hlavně důležité při transplantaci buněk, tkání nebo orgánů, kdy může být zdroj transdukovaných buněk kritický při odmítnutí transplantátu.

Jinou výhodnou buňkou pro transdukci způsobem podle tohoto vynálezu je tumorová buňka, nemocná buňka nebo buňka, u které hrozí v průběhu času riziko v důsledku genetické výbavy nebo genetické výbavy jiných buněk, přítomných v tomto organizmu. Toto posledně uvedené provedení umožňuje použití transdukovaných buněk podle tohoto vynálezu při profylaxi. Jedním příkladem choroby, kdy by prognostická indikace umožnila léčbu genetickou intervencí transdukovanými buňkami podle tohoto vynálezu před vypuknutím choroby, je rakovina prsu. Způsoby podle tohoto vynálezu mohou být však také použity při terapeutické

31.03.03

léčbě rakoviny prsu po zjištění choroby. Existují mnohé další aplikace tohoto vynálezu v léčbě rakoviny a odborník v této oblasti techniky by měl být schopen používat zde uvedený vynález pro léčbu mnoha typů rakoviny bez zbytečného experimentování.

Neomezujícím příkladem předkládaného vynálezu je jeho jedna aplikace při estrogen dependentní rakovině prsu. Rakovinné buňky při estrogen dependentní rakovině prsu by byly výhodně transdukovány použitím protilátek nebo ligandů, které váží receptor estrogenu ve spojení s terapeutickým virovým vektorem. Tento vektor může například obsahovat tumor inhibující gen, jako je gen pro tymidinkinázu Herpes viru. Transdukované buňky mohou být tudíž selektivně usmrceny přidáním gancykloviru, proformy léčiva, která může být aktivovaná Herpes tymidinkinázou. Další příklady tumor inhibujících genů a jim odpovídajících proforem léčiv jsou početné a dobře známé v této oblasti techniky a mohou být školeným pracovníkem vybrány bez zbytečného experimentování. Použití aktivovatelných proforem léčiv ve spojení s aplikací transdukčních způsobů podle tohoto vynálezu může být v širokém rozsahu aplikováno na tumory jiných typů. Shora uvedené příklady neomezují tento vynález na tumory, které jsou hormonálně závislé nebo závislé na některých rozpustných faktorech pro růst a dělení.

Například, Her-2/neu pozitivní tumorové buňky nejsou estrogen dependentní a špatně se prognosticky indikují, protože na estrogenu nezávislé tumory obsahují buňky, které jsou vysoce rezistentní na léčbu léky, jako je taxol, antagonista estrogenu. Výhodné provedení tohoto vynálezu obsahuje protilátky nebo jiné molekuly, které váží Her2/neu nebo heregulin na virové vektorové preparáty v průběhu transdukce buněk zasažených tumorem, jako tomu je při transplantaci kostní dřeně. Transdukce může být případně provedena přímo v místě tumoru nebo vnitrosvalově *in vivo* s vektory, které mohou ovlivňovat genezi tumoru.

Ještě dalším provedením vynálezu je zacílení na tumorovou svalovinu, samotnou nebo v kombinace s cílením na tumorové buňky. St. Croix et al., jak je tímto začleněno referencí, jak je uvedeno dále, identifikovali geny, které jsou specificky nadexprimovány v tumorových endotelových buňkách ve srovnání s normálním endotelem, pomocí SAGE analýzy. Mnohé z těchto genů kódují molekuly buněčného povrchu, jako jsou antigen povrchu buněk Thy-1 nebo Endo 180 lektin. Všechny tyto nadregulované faktory buněčného povrchu mohou být vázány molekulami, vážícími se na buněčný povrch podle tohoto vynálezu, čímž je poskytnut stimul pro účinnou stabilní genovou transdukci. Přístupem pro terapii tumoru by mohlo tudíž být zničení svaloviny tumoru usmrcením endotelových buněk po jejich transdukování terapeutickým virovým vektorem v přítomnosti molekul, vážících se na buněčný povrch, které se selektivně váží ke svalovině tumoru a ne na normální endotelové buňky.

31.03.03

Ještě jiným provedením tohoto vynálezu je selektivní exprese antitumorového genu ve svalovině tumoru inkorporací prvků (např. promotorů nebo cis-účinkujících stabilizujících/degradujících prvků na mRNA) ve virovém vektoru, která selektivně promotuje expresi antitumorového genu v tumoru, ale ne v normálním svalovém endotelu. Tyto způsoby se mohou vyskytovat *in vivo, in vitro* nebo *ex vivo*. *In vivo* je výhodným provedením terapie, pokud je cílen svalový endotel. Alternativně a pokud je cílem zbavit kostní dřeň kontaminujících tumorových buněk, například pro transplantaci kostní dřeně, je výhodný způsob terapie *ex vivo* nebo *in vitro*.

Kromě toho, použití *in vivo* nejsou omezena na chorobné stavy a mohou být použita pro transdukci normálních buněk. Tento vynález může být například použit pro transdukci hematopoetických kmenových buněk v kostní dřeni *in vivo*. Libovolná kombinace protilátek nebo jiných molekul, vážících se na povrch buněk, jako jsou FLT-3 ligand, TPO a Kit ligand nebo jejich funkční analoga nebo stromatální buňky, exprimující molekuly, vážící se na buněčný povrch, mohou být dodány s vektorem přímou injekcí do kostní dřeně, aby došlo k vysoké účinnosti transdukce kostní dřeně. Termín "funkční analog" označuje libovolnou molekulu, která si uchovává vazebnou aktivitu vůči buněčnému povrchu molekul vážících se k buněčnému povrchu podle tohoto vynálezu.

Takováto funkční analoga zahrnují fragmenty LFT-3ligandu, TPO a Kit ligandu; molekuly LFT- -3 ligandu, TPO a Kit ligandu, obsahující jednu nebo více aminokyselinových substitucí, adicí nebo delecí a protilátky, které strukturně napodobují vazebnou aktivitu k povrchu buněk molekul, vážících se k buněčnému povrchu.

Alternativním přístupem ke shora uvedenému je použití buněk kostní dřeně jako buněk, produkujících virové vektory a tedy poskytnout vektor a molekulu vážící se k buněčnému povrchu cestou buněčné terapie a nikoliv formou preparátu vektoru. Jiným příkladem je transdukce T buněk nebo dendritických buněk přidáním funkčních analogů CD3 a CD28 protilátek nebo GM-CSF, případně IL-4, s vektorem při subkutánní injekci.

Lymfa v podkožní tkáni může rozvádět vektor a stimulující látky do lymfatických uzlin pro účinnou transdukci cílových buněk.

Předkládaný vynález je výhodný v tom, že někdy není nezbytná purifikace buněk, které mají být transdukovány. Transdukce, hlavně zájmového buněčného typu, může být provedena výběrem části povrchu buňky, která se má vázat. Ve smíšených populacích krevních buněk může být tudíž, například, transdukce buněk exprimujících CD3, jako určitý typ T buněk, zesílena, když jsou pro interakci s těmito buňkami použity CD3 specifické protilátky. Tento stav nastane s

31.03.03

výhodou u všech jiných typů buněk v populaci, jako jsou granulocyty a monocyty, které neexprimují CD3.

Tento vynález také zahrnuje v případě potřeby transdukci purifikovaných nebo izolovaných buněčných typů. Použití izolovaných nebo purifikovaných buněčných typů nabízí dodatečné výhody, jako jsou vyšší účinnosti transdukce v důsledku vyšší koncentrace vektoru vzhledem k buňkám které mají být transdukovány.

Pokud mají být transdukovány purifikované T buňky, nejméně jedna molekula výhodně váže molekulu buněčného povrchu, nalezenou na T buňkách. Příklady takovýchto molekul buněčného povrchu jsou CD3, CD28, CD25, CD71 a CD69. Příklady molekul, které se váží na tyto molekuly buněčného povrchu zahrnují protilátky a monoklonální protilátky, které je rozpoznávají, mnohé z nich jsou komerčně dostupné nebo snadno a rutinně připravitelné, použitím standardních způsobů, bez zbytečného experimentování. Ve výhodném provedení transdukce CD4+ nebo CD28+ buněk mohou být použity monoklonální protilátky, které rozpoznávají CD3 a/nebo CD28. Komerčně dostupné příklady takových protilátek zahrnují OKT3 pro CD3 a CD28.2 pro CD28. Tyto protilátkové molekuly mohou být použity v rozpustné formě, zesíťované nebo nezesíťované jinými molekulami nebo v jiné formě, jako jsou perly nebo jiné pevné povrchy. V hlavním výhodném provedení tohoto vynálezu jsou protilátky imobilizovány na povrchu nádoby, tak jako na stěnách kultivačních jamek, desek nebo sáčků použitých pro transdukci zprostředkovanou vektorem. Aniž by bylo svázáno s teoretickými základy, může použití imobilizovaných protilátek na takovém povrchu, kde dochází k adhezi nebo kontaktu s buňkami, zvýšit lokální koncentraci interakcí buněčného povrchu na buněčném povrchu.

Pokud mají být transdukovány hematopoetické buňky, mohou být jako molekuly, vážící se k buněčnému povrchu použity protilátky specifické vůči receptorům pro FTL-3 ligand, TPO (růstový a vývojový faktor trombopoetinu nebo megakaryocytu, Thrombopoietin or Megakaryocyte Growth and Development Factor) hematopoetických kmenových buněk nebo Kit ligand. Případně mohou být použity protilátky proti kmenovým buňkám pozitivních buněčných markerů, včetně ale bez omezení, na CD34 nebo AC133. Pokud je jako molekula, vážící se k buněčnému povrchu, použita sloučenina nebo prostředek obsahující ligand, mohou být použity ligandy nebo ligandy vázané k heterologním proteinům buď v rozpustné nebo v imobilizované formě. Imobilizované formy zahrnují připojení na mikroperly, přímo nebo nepřímo, použití například avidinu/biotinu.

Alternativně může být ligand exprimován ve virové obálce virového vektoru, může nebo ne být ve formě chimerního nebo fúzního proteinu a/nebo v komplexu (kovalentním nebo

31.03.03

nekovalentním) s jedním nebo více proteinem (proteiny). V těchto provedeních je molekula vážící se na buněčný povrch představována ve spojení s virovým vektorem jednoduchou sloučeninou pro transdukování buněk. Dodatečné příklady molekul, vážících se buněčný povrch, které mohou být exprimovány ve virových obálkách, zahrnují četné povrchové faktory, uvedené níže.

Jiné výhodné molekuly, vážící se na buněčný povrch, jako jsou protilátky nebo jejich fragmenty, jsou ty, které se váží k receptorům kmenových hematopoetických buněk Notch nebo Delta nebo k samotným Notch nebo Delta proteinům nebo ligandům Notch nebo Delta, které jsou vázány na heterologní proteiny. Delta a Notch kódují proteiny buněčného povrchu, které ovlivňují širokou škálu osudových rozhodnutí ve vývoji Drosophily. Homology Delta a Notch obratlovců jsou nezbytné pro normální vývoj embrya. Delta homology se významně účastní v regulaci hematopoézy. Delta-Serrate-lag2 (DCL), rozpustná forma homologu, zesiluje expanzi primitivních hematopoetických prekurzorů. DSL, pokud je spojen s hematopoetickými růstovými faktory, včetně interleukinu-3 (IL-3), granulocytové kolonie stimulujícího faktoru nebo (G-GSF) faktoru stimulujícího kolonie granulocytových makrofágů, promotuje expanzi primitivních hematopoetických prekurzorů a současně inhibuje diferenciaci primitivních prekurzorů na zralejší buněčné prekurzory, citlivé jenom na IL-3 (viz Han et al.,). DSL velmi pravděpodobně účinkuje aktivací Notch receptoru exprimovaného v hematopoetických buňkách, modulací buněčné kompetence vůči odpovědi na konvenční hematopoetické růstové faktory, selektivní blokací buněčné diferenciace, ale ne proliferačních signálů (viz Han a Moore, Blood 1999). Delta a Notch homology, protilátky které jsou funkčními analogy k těmto homologům, jsou tudíž dalšími výhodnými molekulami, vážícími se na buněčný povrch, pro použití pro dosažení více než 75% účinnosti vektorové transdukce buněk, hlavně kmenových hematopoetických buněk.

Předkládaný vynález zahrnuje virové vektory a je obsahující prostředky pro použití v popsaných způsobech. Tyto vektory jsou výhodně retrovirové (třída Retroviridae) a ještě výhodněji lentivirové vektory. Jiné retrovirové vektory, jako jsou onkovirové a myší retrovirové vektory, mohou být také použity. Další vektory mohou být odvozeny od jiných DNA virů nebo virů, které konvertují své genomy do DNA v průběhu některých údobí jejich životního cyklu. Tyto viry jsou výhodně z tříd Adenoviridae, Parvoviridae Hepadnaviridae (včetně delta viru hepatitidy a viru hepatitidy E, který normálně není klasifikován v Hepadnaviridae), Papoviridae (včetně polyomavirinae a papillomavirinae), Herpesviridae a Poxviridae.

Další viry třídy retrovidirae (t.j., retroviry) jsou rodu nebo podtřídy Oncovirinae, Spumavirinae, Spumavirus, Lentiviranae a Lentivirus. RNA viry podtřídy Oncovirinae jsou

31.03.03

lidské viry typu 1 nebo 2 T lymfotropického viru (t.j., HTVL-1 nebo HTVL-2) nebo virus hovězí leukemie (BLV), ptačí virus leukosis sarkomu (např. virus Rousova sarkomu (RSV), virus ptačí myeloblastózy (AMV), virus ptačí erytroblastózy (AEV) a virus asociovaný s Rousovým (RAV; RAV-0 až RAV-50), savčí virus typu C-50 (např., virus Moloneyho myší leukemie (MuLV), virus Harveyho myšího sarkomu (HaMSV), virus Abelsonovy myší leukemie (A-MuLV), AKR-MuLV, virus liščí leukemie (FeLV), virus opičího sarkomu, virus retikuloendotelózy (REV), virus nekrózy sleziny (SNV)), virus B-typu (např. virus tumoru myší mléčné žlázy (MMTV)) a virus D-typu (např., Mason-Pfizerův oslí virus (MPMV a "SAIDS" viry).

RNA virus podtřídy Lentivirus je virem lidské imunodeficience typu 1 nebo 2 (t.j., HIV-1 nebo HIV-2, kde HIV-1 byl dříve nazýván virem spojeným s lymfoadenopatií 3 (HTLV-III) a (ARV) virem spojeným se získaným syndromem imunodeficience (AIDS)) nebo jiným virem spojeným s HIV-1 nebo HIV-2, který byl identifikován a spojen s AIDS nebo s chorobami podobnými AIDS. Zkratka "HIV" nebo termíny "virus AIDS" nebo "virus lidské imunodeficience" jsou zde používány pro označení těchto HIV virů a genericky pro viry příbuzné a spojené s HIV. Kromě toho, je RNA virem podtřídy Lentivirus virus Visna/maedi (např., jako u infikovaných ovcí), virus imunodeficience lišek (FIV), hovězí lentivirus, virus opičí imunodeficience (SIV), virus koňské infekční anemie (EIAV) a virus srnčí encefalitické artritidy (CAEV).

Zvlášť výhodným lentivirovým vektorem je vektor odvozený od HIV, nejvýhodněji HIV-1, HIV-2 nebo od jejich chimerických kombinací. Různé sérologické typy retrovirů, zvláště HIV, mohou být samozřejmě použity samy nebo v libovolné kombinaci pro přípravu vektorů pro použití v tomto předkládaném vynálezu. Výhodné vektory podle tohoto vynálezu obsahují cis účinkující prvky, které jsou přítomny ve virech divokého typu, ale nejsou přítomny v "základních" lentivirových vektorech. "Základní" lentivirový vektor obsahuje minimálně LTRS a obálkové sekvence v 5´ začátku a gag kodujících sekvencích, ale obsahuje také nebo neobsahuje RRE element pro usnadnění nukleárního exportu vektorové RNA Rev závislým způsobem. Výhodný vektor kromě toho obsahuje nukleotidové sekvence, které zesilují účinnost transdukce do buněk.

Příkladem takového vektoru je pN2cGFP, vektor obsahující kompletní sekvence gag a pol. Jiným příkladem je vektor, který obsahuje sekvence od polohy 4551 do polohy 5096 v pol (referenční polohy od pNL4-3 sekvence, přístupové číslo M19 921, HIVNL439 709, laskavě poskytnuté C.E. Bucklerem, NIAID, NIH, Bethesda, MD). Mohou být však použity libovolné cis účinkující sekvence z wt-HIV, které mohou zlepšit účinnost vektorové transdukce. Jinými

31.03.03

příklady vektorů, schopných účinné transdukce podle předloženého vynálezu jsou konstrukce cr2HIV, jak jsou popsány v US patentu 5 885 806.

Dříve identifikovaná sekvence, která není dostačující pro průkazné zvýšení účinnosti transdukce, popsaná v Zennou et al. (2000) jako střední DNA sekvence (178 párů bazí od polohy 4793 do 4971 na pLAI3, odpovídající polohám 4757 až 4953 na pNL4-3), schopná zvýšení účinnosti transdukce. Předkládaný vynález zahrnuje jako součást předkládaného vynálezu objev, že zatímco tento malý fragment není dostatečný pro zvýšení účinnosti transdukce, větší fragment o 545 párech bazí v pNL4-3) nebo ještě větší fragment, který ho obsahuje, byl schopen zvýšení transdukce.

Další příklady konstruktů virového vektoru, které mohou být použity v předkládaném vynálezu, lze nalézt v US patentu 5 885 806, který je tímto začleněn referencí, jako by byl uveden dále úplně. Konstrukty v US patentu 5 885 806 jsou pouze příklady, které neomezují rozsah vektorů, účinně transdukujících buňky. Místo toho tyto konstrukty poskytují další vodítko pro vyškoleného pracovníka v tom smyslu, že virový vektor pro použití v předkládaném vynálezu může obsahovat minimální sekvence z viru divokého typu nebo obsahovat sekvence až do téměř celého genomu divokého typu, avšak s výjimkou esenciální nukleotidové sekvence, potřebné pro rozšíření a/nebo vznik choroby. Způsoby určení přesné sekvence, potřebné pro účinnou transdukci buněk, jsou rutinní a dobře známé v této oblasti techniky. Například systematické začlenění virových sekvencí zpět do "základního" vektoru nebo deletování sekvencí z vektorů, které obsahují virtuálně celý HIV genom, jako je cr2HIV, je rutinním a dobře známým postupem v tomto oboru.

Umístění sekvencí z jiných virových pozadí do zájmových virových vektorů, jako je cytomegalovirus (CMV), je také dobře známo v oboru. Nehledě na skutečně používaný virový vektor, jím kódované akcesorické proteiny a v něm přítomné sekvence, může být tento virový genetický materiál ponechán ve vektoru nebo pomocném genomu, pokud tyto proteiny nebo sekvence zvyšují transdukční účinnost v určitých typech buněk. Existují početné rutinní skríninky pro určení, jestli tento konkrétní genetický materiál zvyšuje transdukční účinnost při začlenění jeho sekvence buď do vektoru nebo do pomocného genomu. Výhodným provedením tohoto vynálezu je nezahrnovat akcesorické proteiny ani do vektoru, ani do pomocného genomu. Tato výhoda ale nevylučuje taková provedení tohoto vynálezu, kdy jsou akcesorické proteiny a jiné sekvence ponechány buď ve vektoru nebo v pomocném genomu pro zvýšení transdukční účinnosti.

Virové vektory, použité v předkládaném vynálezu, mohou také pocházet ze "pseudotypové" tvorby, kdy koinfekce buňky jinými viry produkuje populaci virionů,

31.03.03

obsahujících genom jednoho viru zapouzdřeného ve vnější vrstvě, obsahující jeden nebo více obálkových proteinů jiného viru. Tento jev byl použit pro obalení zájmových virových vektorů ve "pseudotypovém" virionu kotransfekcí nebo koinfekcí obalové buňky zájmovým virovým vektorem a genetickým materiálem, kódujícím nejméně jeden obálkový vektor jiného viru nebo molekulu buněčného povrchu. Viz US patent 5 512 421. Takovéto směsné viry mohou být neutralizovány antisérem proti jednomu nebo více heterologním použitým obálkovým proteinům. Jedním obecně používaným virem v pseudotypovém uspořádání je virus vesikulární stomatitidy (VSV), jímž je rhabdovirus. Použití pseudotypování rozšiřuje rozsah hostitelských buněk viru, začleněním prvků pro mechanizmy vstupu viru použitých heterologních virů.

Pseudotypování virových vektorů a VSV pro použití v předkládaném vynálezu má za výsledek virové částice, obsahující nukleové kyseliny virových vektorů, zapouzdřené v nukleokapsidě, která je obklopena membránou, obsahující VSV G protein. Tato nukleokapsida výhodně obsahuje proteiny, které jsou normálně spojené s virovými vektory. Obklopující VSV G protein, obsahující membrány, tvoří část virové částice nad jejím východem z buňky, použité pro obalení virového vektoru. Příklady obalujících buněk jsou uvedeny v US patentu 5 739 018. Ve výhodném provedení tohoto vynálezu je virová částice odvozena od HIV a pseudotypována s VSV G proteinem. Pseudotypované virové částice, obsahující VSV G protein, mohou infikovat diverzní uspořádání buněčných typů s vyšší účinností, než amfotropní virové vektory. Rozsah hostitelských buněk zahrnuje jak savčí, tak i nesavčí druhy, jako jsou člověk, hlodavci, ryby, obojživelníci a hmyz.

Virový vektor pro použití ve způsobech transdukce podle tohoto vynálezu může také obsahovat a exprimovat jednu nebo více sekvencí nukleové kyseliny za kontroly promotorem, přítomným v tomto viru nebo za kontroly heterologním promotorem, introdukovaným do tohoto vektoru. Tyto promotory mohou dále obsahovat izolující prvky, jako jsou místa hypersenzitivní na erytroidní DNAázu, když obklopují operon těsně kontrolující expresi genů. Výhodné promotory zahrnují HIV-LTR, CMV promotory, PGK, U1, EBER transkripční jednotky, Pol III promotory z viru Epstein-Barrové, tRNA, U6 a U7. I když výhodné jsou promotory Pol II, mohou být také použity Pol III. Výhodným provedením je také použití tkáňově specifických promotorů. Například promotory lokusu oblasti kontrolující zesilovač beta globinu (beta globin Locus Control Region) a alfa & beta globinu mohou poskytovat tkáňově specifickou expresi v erytrocytech a v erytroidních buňkách. Jiným dalším výhodným provedením je použití cis účinkujících sekvencí, které jsou spojeny s těmito promotory. Například gen U1 může být použit pro zesílení protisměrné exprese genu, kdy jsou použity nepromotorové sekvence pro zacílení

31.03.03

protisměrných ribozymových molekul na cíleně spojenou RNA, jak je uvedeno v US patentu 5 814 500, který je tímto začleněn referencí.

Do virového vektoru podle tohoto vynálezu může být samozřejmě začleněna libovolná cis účinkující nukleotidová sekvence. Hlavně jsou výhodné cis účinkující sekvence, nalezené v retrovirových genomech. Do virového genomu mohou být za účelem dalšího zvýšení účinnosti například začleněna cis účinkující nukleotidová sekvence, odvozená od gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat nebo rev genů. Je výhodné, když cis účinkující sekvence nekóduje exprimovaný polypeptid; není exprimován jako polypeptid nebo jako jeho část v důsledku genetické změny, jako je delece startovního místa translace; kóduje pouze část nebo fragment většího polypeptidu nebo je mutantní sekvencí, obsahující jednu nebo více substitucí, adicí nebo delecí nativní sekvence. Příkladem cis účinkující sekvence je sekvence cPPT (centrální polypurinová oblast, central polypurine tract), identifikovaná v HIV pol genu.

Uvedená jedna nebo více sekvencí nukleové kyseliny ve virových vektorech podle tohoto vynálezu může být nalezena ve viru, ze kterého je tento vektor odvozen nebo může být heterologní sekvencí. Tato sekvence je výhodně v plné délce nebo parciální sekvencí, která je nebo kóduje produkt zájmového genu. Tyto sekvence a produkty genu jsou výhodně biologickými aktivními činidly, schopnými produkovat biologické účinky v buňce. Příklady takových činidel zahrnují proteiny, ribonukleové kyseliny, enzymy, transportní nebo jiné biologicky aktivní molekuly.

V jednom výhodném provedení je tímto činidlem protein, tak jako toxin, transkripční faktor, růstový faktor nebo cytokin, strukturní protein nebo molekula buněčného povrchu. Tento protein může také obsahovat jednu nebo více domén, u kterých nebyla identifikována žádná funkce a může být homologní k transdukované buňce. Tento protein může kromě toho být v transdukované buňce nepřítomen, deficientní nebo změněný. Případně může být tento protein transdominantním negativním mutantem nebo nástrahou pro zabránění přirozenému proteinu ve vnášení jeho normální aktivity do transdukované buňky.

Například sekvence nukleové kyseliny může kódovat ribozóm, který váže, uvolňuje a odbourává exprimovanou RNA nebo RNA, která má být exprimována, v transdukované buňce. Případně může tato sekvence nukleové kyseliny kódovat protisměrnou molekulu, která je určena pro zacílení na určitou sekvenci nukleové kyseliny a má za účel její degradaci. Sekvence obsažené v tomto vektoru mohou být nadexprimovány, indukovatelně exprimovány nebo mohou být v transdukované buňce pod kontrolou buněčné nebo virové regulace transkripce. V závislosti na zamýšleném použití, může tato heterologní sekvence kódovat libovolný požadovaný protein, včetně markeru pro transdukované buňky. Tyto markery zahrnují

31.03.03

selektovatelné markery, jako jsou jednotlivé fenotypové rezistence, jako je neomycin, MDR-1 (P-glykoprotein), O^6-methylguanin-DNA-methyltransferáza (MGMT), dihydrofolátreduktáza (DHFR), aldehyddehydrogenáza (ALDH), glutathion-S-transferáza (GST), superoxiddismutáza SOD) a cytosindeamin——áza. Viz Koc et al., který je tímto začleněn referencí, jako přehled.

Ve způsobech podle tohoto vynálezu jsou buňky, které mají být transdukovány, vystaveny kontaktu s alespoň jednou molekulou, která se váže na buněčný povrch, před, po nebo současně s aplikací virového vektoru. Buňky mohou být například pěstovány v mediu s CD3 a CD28 protilátkami (povlečenými na povrchu kultivačních misek nebo imobilizované na částicích, přítomných v roztoku) před, po nebo v přítomnosti virového vektoru, který má být transdukován. Je výhodné, když jsou buňky vystaveny imobilizovanému CD3 a/nebo CD28 pouze po nebo pouze při počátečním kontaktu s virovým vektorem. Za těchto podmínek nejsou tyto buňky vystaveny molekule (molekulám) vážícím se na buněčný povrch před skutečnou transdukcí virovým vektorem. V provedeních, kdy kontakt s molekulou, vážící se na buněčný povrch, nastane po vystavení buněk virovému vektoru (transdukci), je výhodné, když kontakt nastane ve třech dnech po transdukci, ještě výhodněji do jednoho až dvou dní po transdukci.

Inkubace buněk s virovým vektorem může probíhat po různé časové úseky, v závislosti na podmínkách a použitých materiálech. Faktory, které ovlivňují inkubační dobu, zahrnují použitou buňku, vektor a MOI (mnohočetnost infekce), molekulu (molekuly) a množství použitá k vazbě na buněčný povrch, jestli a která uvedená molekula (molekuly) jsou imobilizovány nebo solubilizovány a požadovanou hladinu účinnosti transdukce. Je výhodné, když inkubace je od osmi do 72 hodin, výhodnější od 12 do 48 hodin. V hlavním výhodném provedení je inkubace 24 hodin a je popřípadě jednou opakována.

Kontakt mezi buňkami, které mají být transdukovány a virovým vektorem nastane nejméně jednou, ale může nastat více než jednou, v závislosti na buněčném typu. Například vysoká účinnost transdukce CD34 pozitivních kmenových buněk je dosažena s mnohočetnými transdukcemi vektorem. Výhodným způsobem podle tohoto vynálezu je současně introdukovat virový vektor ve spojení s molekulou vážící se na buněčný povrch (např., CD3 a/nebo CD28 protilátkami nebo FLT-3 ligandem, TPO nebo Kit ligandem) a vypustit změnu media mezi jedním a osmi dny po transdukci. Transdukce může pokračovat tak dlouho, jak dovolí podmínky, aniž by tento proces průkazně poškozoval buňky nebo je obsahující organizmy. Další příklady proteinů, vážících se na buněčný povrch pro tato použití, zahrnují případy uvedené shora.

Podobně použité MOI je od 1 do 400, výhodně menší než 500. MOI je obecně výhodné od 2 do 50. Výhodnější je když je MOI od 10 do 30, i když rozsahy od 1 do 10, 20, 30 nebo 40 jsou také uvažovány. Nejvýhodnější je MOI 20. Kromě toho, počet kopií virového vektoru na

31.03.03

buňku by měl být nejméně roven jedné. U shora popsaných způsobů může být však také mnoho kopií vektoru na buňku. Výhodný rozsah kopií na buňku je od 1 do 100. Výhodným počtem kopií je takový minimální počet kopií, který poskytuje terapeutický, profylaktický nebo biologický účinek, vedoucí k vektorové transdukci nebo nejúčinnější transdukci.

Pro terapeutické nebo profylaktické aplikace je výhodnějším počtem kopií maximální počet kopií, který je tolerován buňkou, aniž by došlo k průkaznému poškození této buňky nebo ji obsahujícího organizmu. Jak minimální, tak i maximální počet kopií na buňku bude záviset na buňce, která má být transdukována, tak i na buňkách, které mohou být přítomny. Optimální počet kopií je možno snadno určit odborníkem v této oblasti techniky pomocí rutinních způsobů. Buňky jsou například transdukovány se vzrůstajícím přírůstkem koncentrace nebo mnohočetnosti infekce. Buňky jsou analyzovány na počet kopií, terapeutický nebo biologický účinek a na škodlivé účinky na transdukované buňky nebo je obsahujícího hostitele (např. bezpečnost a toxicita).

Po inkubaci s virovým vektorem *in vitro* mohou být buňky kultivovány v přítomnosti molekuly (molekul), vážících se na buněčný povrch po různou dobu, před tím, než jsou analyzovány na účinnost transdukce nebo jiného použití. Případně mohou být tyto buňky kultivovány za jakýchkoliv podmínek, jejichž výsledkem je buněčný růst a proliferace, jako je inkubace s interleukinem-2 (IL-2) nebo inkubace s molekulou (molekulami), vážícími se na buněčný povrch, následovaná IL-2. Posttransdukční inkubace může trvat libovolnou dobu, ale je výhodná od jednoho do sedmi až deseti dnů. Delší časové úseky, jako je 14 dní, mohou být také použity, třebaže úseky, které jsou škodlivé pro buněčný růst, nejsou výhodné. V provedeních vynálezu, kde jsou buňky kultivovány s molekulou (molekulami), vážícími se na buněčný povrch před inkubací s virovým vektorem, mohou kultivační časy kolísat od 24 do 72 hodin, nejvýhodněji 24 hodin.

Taková předtransdukční kultivace může být srovnávána se stimulací buněk, například s cytokiny a/nebo mitogeny, před transdukcí, jak je chápána v této oblasti techniky. Předkládaný vynález zahrnuje výhody, které pramení z odstranění takovéto stimulace. Stimulace například zvětšuje počty buněk v důsledku proliferace, jako výsledek mnohem většího počtu buněk při poststimulaci než při prestimulaci. Transdukce takto zvětšeného souboru buněk vyžaduje mnohem více virového vektoru a spojených transdukčních materiálů (např. kontejnerů, media, cytokinů atd.) a zvýšené spojené náklady. Kromě toho, stimulace buněk ovlivňuje jejich kvalitu pro další použití. Movassagh et al. popisují použití třídenní pretransdukční stimulace, která měla za výsledek zhoršení diverzity souboru T buněk po transdukci a další kultivaci. Pretransdukční stimulace dále odstraňuje výhodu, která vyplývá z transdukce buněk, které se aktivně nedělí.

31.03.03

Účinnost transdukce, pozorovaná u předkládaného vynálezu je od 15 do 100 %. Je výhodné, když tato účinnost je alespoň 75 až 90 %. Výhodnější provedení tohoto vynálezu jsou, když je účinnost alespoň 90 až 100 %. Nejvýhodnější provedení mají transdukční účinnosti nejméně 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 a 100 %.

Kromě shora uvedeného mohou být transdukované buňky použity ve výzkumu nebo pro léčbu nebo pro prevenci chorobných stavů v živých objektech. Příkladem výzkumného použití jsou strukturně funkční studie, popsané Unumatz et al. Terapeutická použití pro transdukované buňky zahrnují introdukci buněk do živých organizmů. Například nestimulované primární T buňky, izolované z jedince, infikovaného nebo s rizikem infekce HIV, mohou být nejprve transdukovány vektorem, podobně jako je popsáno v US patentu 5 885 806, použitím uvedených způsobů a potom injekcí transdukovaných buněk zpět do jedince. Tyto buňky mohou být případně použity přímo pro expresi heterologních sekvencí, přítomných ve virovém vektoru.

Pokud jsou použity jako součást terapie nebo profylaxe HIV, mohou tyto vektory kódovat toxin nebo jiné antivirové činidlo, které bylo přizpůsobeno pro použití proti HIV. Případně může tento vektor kódovat činidlo, sestrojené pro zacílení na HIV, jako jsou transdominantní negativní mutanty *tat, rev, nef, vpu,* nebo *vpr* genů. V jiných aplikacích mohou být transdukované buňky opraveny, aby exprimovaly příslušný globinový gen pro opravu anémie srpkových buněk nebo talasemie. Imunitní buňky mohou být také transdukovány, aby modulovaly jejich imunitní funkci, jejich reakci na antigen nebo jejich interakci s jinými buňkami. Školený pracovník si je vědom shora uvedených použití způsobů podle předkládaného vynálezu, rovněž jako četných dalších použití a aplikací známých v této oblasti techniky.

Předkládaný vynález je zaměřen na způsoby a je obsahující prostředky pro stabilní transdukci buněk virovými vektory s účinnostmi vyššími než 75 %. Stabilně transdukované buňky lze odlišit od přechodně transdukovaných buněk nebo od pseudotransdukovaných buněk po sedmi až deseti dnech nebo případně po 14 dnech od transdukce. Tyto způsoby se vztahují ke skutečnosti, že kontakt buněk, které mají být transdukovány, s molekulami vážícími se k buněčnému povrchu, zvyšuje účinnost stabilní transdukce. Je překvapivé, že kontaktní krok může být i po transdukčním kroku. Ještě více překvapivé je, že nejvyšší hladiny stabilní transdukce byly vidět, když byla provedená transdukce nejprve následována kontaktem s imobilizovanými molekulami, vážícími se na buněčný povrch.

Způsoby tohoto vynálezu obsahují krok transdukce s virovým vektorem ve spojení s kontaktem s molekulou, vážící se na buněčný povrch. Jak bylo zmíněno shora, tento kontakt může proběhnout před, po nebo ve stejnou dobu jako transdukce vektorem. Tento vynález je široce použitelný na kterékoliv buňky a použití jakékoliv molekuly, vážící se na buněčný povrch.

31.03.03

Buňky pro použití v předkládaných způsobech zahrnují nestimulované primární buňky, které jsou čerstvě izolovány z *in vivo* zdroje, rovněž jako buněčné linie které mohou být předběžně kultivovány po různě dlouhou dobu v přítomnosti faktorů, které je udržují ve stavu dělení. Pokud jsou použity buněčné linie, mohou být nejprve kultivovány v nepřítomnosti stimulačních faktorů před transdukcí předkládanými způsoby.

V případě primárních buněk jsou tyto nejprve získány z *in vivo* zdroje s následující případnou selekcí určitých buněčných typů. Pokud jsou například použity primární T buňky CD4+ a/nebo CD8+, jsou nejprve získány vzorky periferní krve (PB) nebo krve z pupeční šňůry (CB) s následným obohacením buněčnými typy CD4+ a/nebo CD8+. Pro izolaci CD4+ a/nebo CD8+ buněk od kontaminujících PB buněk může být použita standardní magnetická perlově pozitivní selekce, plastická adherentní negativní selekce a/nebo jiný známý standardní způsob. Čistota izolovaných buněk může být určena imunofenotypově a použitím standardních způsobů průtokové cytometrie.

Po izolaci mohou být primární buňky použity v předkládaných způsobech pro transdukci virovými vektory při účinnostech větších než 75 %. Tento vynález je nejvýhodnější při použití primárních lymfocytů, jako jsou T buňky, transdukované vektorem odvozeným od HIV, schopným exprese zájmového heterologního genetického materiálu. Jiným výhodným použitím je v případě primárních hematopoetických kmenových buněk, jako jsou CD64 pozitivní buňky. V těch případech, kdy tento genetický heterologní materiál je nebo kóduje terapeutický nebo profylaktický produkt pro použití *in vivo* pro léčbu nebo prevenci choroby, může transdukovaná primární buňka být introdukována zpět do *in* vivo prostředí, jakým je pacient. Tento vynález jako takový uvažuje o použití těchto transfektovaných buněk v genové terapii pro léčbu nebo prevenci choroby pro boj s genetickými poruchami nebo pro cílení virové infekce.

Tento vynález je také zamýšlen pro použití v účinné transdukci buněk pro určení funkce genu, účinné exprese genu v savčích buňkách, exprese genetických knihoven (cDNA knihoven a knihoven protisměrných nebo ribozomálních) pro funkční skrínink na zájmový gen, použití v dvojhybridových detekčních strategiích protein-protein nebo protein-nukleová kyselina, přístupech genových pastí, vysoko výkonných genových skríninkových analýzách s mikrouspořádáním nebo proteinovým uspořádáním nebo studiích, využívajících SAGE, proteomice a jiných funkčních analytických způsobech.

Shora uvedené izolační a pufirikační kroky nemohou být použity pro transdukci primárních buněk ve směsných populacích. Místo toho mohou být tyto buňky určeny pro transdukci zacíleny selekcí alespoň jedné vhodné molekuly, vážící se na buněčný povrch nebo na část nalezenou na tomto buněčném typu a přípravou jedné nebo více molekul, schopných vazby

31.03.03

na uvedenou část. Částí buněčného povrchu může být receptor, marker nebo jiný rozpoznatelný epitop na povrchu cílové buňky. Pro použití v předkládaném vynálezu mohou být připraveny molekuly, o kterých již bylo zjištěno, že s touto částí interagují, jako například specifické protilátky.

CD4+ a/nebo CD8+ buňky mohou být například nejprve purifikovány a potom transdukovány způsoby podle tohoto vynálezu při použití imobilizovaných protilátek CD3 a CD28 nebo případně být transdukovány jako část směsné populace, podobně jako periferní krevní buňky (PBC) nebo periferní jednojaderné krevní buňky (PBMNC), použitím stejných protilátek. Hematopoetické kmenové buňky v celkové populaci bílých krvinek, které může být obtížné purifikovat nebo izolovat, mohou být transdukovány ve směsných populacích použitím imobilizovaných CD64 protilátek.

Molekuly podle tohoto vynálezu, vážící se na buněčný povrch, mohou být cíleny a navázány na libovolnou část, nalezenou na povrchu buňky, která má být transdukována. Je výhodné, pokud se tyto části nalézají jako součást receptorů, markerů nebo jiných proteinových nebo neproteinových faktorů na buněčném povrchu. Tyto části obsahují epitopy, rozpoznávané molekulami, vážícími se na buněčný povrch. Tyto epitopy zahrnují takové, které obsahují polypeptidovou sekvenci, sacharid, lipid, nukleovou kyselinu, ion nebo jejich kombinace.

Příklady molekul, vážících se na buněčný povrch, zahrnují protilátky nebo jejich antigen vážící fragmenty a ligand nebo vazebnou oblast pro receptor buněčného povrchu. Molekula, vážící se na buněčný povrch, může sama o sobě být polypeptidem, nukleovou kyselinou, cukrem, lipidem nebo iontem. Je výhodné, když tato molekula je protilátkou nebo jejím fragmentem, jako jsou fragmenty F_{ab} nebo F_v. Výhodnější je, když tato molekula není použita v rozpustné formě, ale naopak imobilizována na pevném mediu, jako je perla, se kterým mohou být buňky, které mají být transdukovány, kultivovány nebo na povrchu misek pro tkáňovou kultivaci, sáčků nebo desek, na kterých mohou být kultivovány buňky, které mají být transdukovány. Ve výhodném provedení pro transdukci CD4+ nebo CD8+ buněk mohou být v kultivačních sáčcích v přítomnosti virového vektoru použity monoklonální protilátky, které rozpoznávají CD3 a/nebo CD28.

Předkládaný vynález zahrnuje prostředky, obsahující molekulu, vážící se na buněčný povrch, pro použití jako součást uveřejněného způsobu. Vzorový prostředek obsahuje molekulu a virový vektor, který má být transdukován, buď v přítomnosti nebo v nepřítomnosti buněk, určených pro transdukci. Tyto virové vektory mohou být odvozeny od libovolného zdroje, ale výhodně jimi jsou retrovirové vektory. Výhodnější jsou lentivirové vektory. Zvláště výhodný lentivirový vektor je vektor odvozený od viru lidské imunodeficience (Human Deficiency Virus,

31.03.03

HIV), nejvýhodněji HIV-1, HIV-2 nebo jejich chimerické kombinace. Současně mohou být samozřejmě transdukovány do stejné buňky tímto postupem i jiné vektory. Například jeden vektor může být replikačně deficientní nebo podmíněně se replikující retrovirový vektor, zatímco druhý vektor může být obálkovou konstrukcí, která zaručuje prvnímu vektoru, že bude replikován/obalen a rozmnožen. Jsou-li virovým vektorem kódovány různé přídavné proteiny, mohou být přítomny v libovolném vektoru, který má být transdukován do buňky. případně mohou být tyto virové přídavné proteiny přítomny v transdukčním procesu *via* jejich přítomnost ve virových částicích, použitých pro transdukci. Takovéto virové částice mohou mít účinné množství těchto přídavných proteinů přibaleno, což má za výsledek zvýšení transdukční účinnosti. Ve výhodném provedení virový vektor nekóduje ani jeden doprovodný protein.

Virový vektor, určený pro použití v transdukčních způsobech podle tohoto vynálezu může také obsahovat a exprimovat jednu nebo více sekvencí nukleové kyseliny, za kontroly promotorem. V jednom provedení tohoto vynálezu sekvence nukleové kyseliny kóduje genový produkt, který po expresi by mohl zmírnit nebo upravit genetickou deficienci v buňce, která má být transdukována. V jiném provedení tato sekvence nukleové kyseliny kóduje nebo konstituuje genetické antivirové činidlo, které zabraňuje nebo léčí virovou infekci. Pod „genetickým antivirovým činidlem" je myšlena libovolná látka, která je kódována nebo konstituována genetickým materiálem. Příklady takových činidel jsou uvedeny v US patentu 5 885 806. Obsahují činidla, která účinkují přes inhibování virových proteinů, jako jsou reverzní transkriptázy nebo proteázy; kompeticí s virovými faktory o vazebná nebo cílová místa nebo cílení virových cílů pro přímou degradaci, jako tomu je v případě ribozymů a protisměrných konstruktů. Jiné příklady genetických antivirových činidel obsahují protisměry, RNA poutače, transdominantní mutanty, interferony, toxiny, nukleové kyseliny, které modulují nebo modifikují spojování RNA, imunogeny a ribozomy, jako jsou „hlava kladiva" a jejich formy, zprostředkované externími průvodními sekvencemi (EGS).

Případně může virový vektor kódovat marker transdukovaných buněk. V předkládaných příkladech uvedených na obrázcích a níže, je zeleně fluoreskující protein (GFP) markerem, který je kódován virovým vektorem, transdukovaným do CD4+ buněk. Dalšími markery jsou markery, které byly uvedeny shora. Detekce GFP může sloužit pro identifikaci počtu funkčně transdukovaných buněk, které nejsou jenom transdukovány vektorem, ale jsou také schopny funkčně exprimovat GFP na hladinách, které mohou být detekovány analýzou FACS. Je třeba se zmínit, že tato detekce nemůže představovat skutečný počet transdukovaných buněk, protože některé buňky sice mohou být transdukovány tímto vektorem, ale exprimují GFP v hladinách, které jsou pod limitem, použitým při FACS detekci.

31.03.03

Alternativním přístupem k detekci transdukční účinnosti je použití polymerázové řetězové reakce (PCR). Například může být použita TaqMan PCR pro určení skutečného počtu kopií stabilně integrovaného virového vektoru v transdukované buňce.

Buňky, které mají být transdukovány, mohou být vystaveny kontaktu s virovým vektorem buď před, po nebo současně s kontaktem s molekulou, která se váže na buněčný povrch. Buňky tedy mohou být nejprve vystaveny po určitou dobu vektoru s následující periodou začlenění molekuly vážící se na buněčný povrch. Takovými buňkami mohou být nově připravené nebo izolované primární buňky, které úmyslně nebyly stimulovány ke vstupu do buněčného cyklu. Obdobně mohou být buňky nejprve po určitou dobu vystaveny kontaktu s molekulou, vážící se na buněčný povrch, která je následována kontaktem s virovým vektorem. Po kontaktu s vektorem je výhodné přebytek vektoru neodstraňovat a kultivovat buňky za podmínek, vedoucích k buněčnému růstu a/nebo proliferaci. Tyto podmínky mohou být představovány přítomností molekul, vážících se na buněčný povrch nebo jiných stimulačních/aktivačních faktorů, jako jsou cytokiny a lymfokiny v případě T buněk. Případně může být také přebytek vektoru po kontaktu s buňkou a před další kultivací odstraněn.

Jiným provedením tohoto vynálezu je kultivace buněk za současné přítomnosti virového vektoru a molekuly, vážící se na buněčný povrch. Tyto buňky nejsou výhodně předem stimulovány. Po určité době jsou tyto buňky kultivovány za podmínek, indukujících růst a proliferaci, jako je kontinuální přítomnost molekuly, vážící se na buněčný povrch nebo jiných stimulačních/aktivačních faktorů. Přebytek vektoru může být alternativně odstraněn před další kultivací.

V kterékoliv ze shora uvedených kombinací podání virového vektoru a molekuly, vážící se na buněčný povrch, může, ale nemusí být inkubace s vektorem nejméně jednou opakována. Kontakt s vektorem může být také opakován více než jednou, jako dvakrát, třikrát, čtyřikrát nebo vícekrát.

Inkubace buněk, které mají být transdukovány s virovými vektory, může probíhat po různou dobu, v závislosti na podmínkách a použitých materiálech. Mezi faktory, ovlivňující inkubační dobu, patří buňka, vektor a použitá MOI (multiplicita infekce), molekula (molekuly) a množství použitá pro vazbu na buněčný povrch, jestli a jak je uvedená molekula (molekuly) imobilizována a požadovaná úroveň účinnosti transdukce. Ve vhodném provedení tohoto vynálezu jsou buňkami T lymfocyty, vektor je založen na HIV, MOI je rovna 20, molekulami, vážícími se na buněčný povrch jsou protilátky CD3 a CD28, imobilizované na perlách a výsledná účinnost je nejméně 93 %. Jak je zřejmé odborníkovi v této oblasti techniky, některé ze shora uvedených faktorů jsou přímo korelovány , zatímco jiné jsou nepřímo závislé. Například

31.03.03

snížení MOI bude spíše snižovat hladinu účinnosti, zatímco účinnost bude spíše zachovávána, když bude použito zvýšené množství molekul, vážících se na buněčný povrch.

Délka inkubace virového vektoru s buňkami, které mají být transformovány, je výhodně 24 hodin a může, ale nemusí být jedenkrát opakována v případě lymfocytů a až čtyřikrát v případě hematopoetických kmenových buněk. Podobně a v provedeních, kde jsou buňky inkubovány s molekulou, vážící se na buněčný povrch, před introdukcí virového vektoru, může být inkubace od 12 do 96 hodin. Je výhodné, když inkubace s molekulou, která se váže na buněčný povrch, probíhá současně s kontaktem buněk s virovým vektorem. Za těchto okolností mohou být molekuly, které se váží na buněčný povrch, ponechány v kontaktu s buňkami, poté co byl introdukován vektor. Alternativně může být přebytek molekul, vážících se na buněčný povrch, odstraněn před introdukcí vektoru do buněk.

Po kontaktu s vektorem jsou buňky kultivovány za podmínek vedoucích k jejich růstu a proliferaci. Je výhodné, když tyto podmínky pokračují při kultivaci za přítomnosti molekul, vážících se na buněčný povrch. Je také možné buňky nejprve kultivovat s molekulou, vážící se na buněčný povrch, potom v mediu obsahujícím jiný faktor, vedoucí k buněčnému růstu, tak jako je interleukin-2. V ještě jiném provedení by mohl být odstraněn jak nadbytek molekuly, vážící se na buněčný povrch, tak i nadbytek vektoru, s následnou kultivací v přítomnosti faktoru, vedoucího k růstu nebo proliferaci, a současně zesilujícího další vektorovou transdukci. Tyto faktory zahrnují mitogeny, jako je fytohemaglutinin (PHA) a cytokiny, růstové faktory, aktivátory, receptory buněčného povrchu, molekuly buněčného povrchu, rozpustné faktory nebo jejich kombinace, rovněž jako aktivní fragmenty těchto molekul, samy nebo v kombinaci s jiným proteinem nebo faktorem nebo jejich kombinací.

Příklady doplňkových faktorů zahrnují epidermální růstový faktor (EGF), transformační růstový faktor alfa (growth factor alpha (TGF-alfa)), angiotensin, transformační růstový faktor beta (TGF-beta), GDF, kostní morfogenní protein (BMP), fibroblastový růstový faktor (FGF kyselý a zásaditý), vaskulární endotelový růstový faktor (VEGF), PIGF, lidský růstový hormon (HGH), hovězí růstový hormon (BGH), hereguliny, amfiregulin, Ach receptor indukující aktivitu (ARIA), RANTES (regulovaný u aktivovaných, normálních T exprimovaných a vylučovaných), angiogeniny, hepatocytární růstový faktor, faktor beta tumorové nekrózy (TNF-beta), faktor alfa tumorové nekrózy (TNF-alfa), angiopoetiny 1 nebo 2, inzulin, inzulinové růstové faktory I nebo II (IGF-I nebo IGF-2), efriny, leptiny, interleukiny 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14, or 15 (IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14 nebo IL-15), G-CSF (granulocyte colony stimulating factor, granulocytové kolonie stimulující faktor), GM-CSF (granulocyte-macrophage colony stimulating factor, granulocytové makrofágové kolonie

31.03.03

stimulující faktor), M-CSF (macrophage colony stimulating factor, makrofágové kolonie stimulující faktor), LIF (leukemia inhibitory factor, leukemii inhibující faktor,), angiostatin, onkostatin, erytropoetin (EPO), interferon alfa (včetně subtypů), interferony beta, gama a omega, chemokiny, makrofágový zánětlivý faktor-1 protein alfa nebo beta (MIP-1 alfa nebo beta), monocytární chemotaktický protein-1 nebo-2 (MCP-1 nebo 2), GRO beta, MIF (macrophage migration inhibitory factor, faktor inhibující migraci makrofágů), MGSA (melanoma growth stimulatory activity, stimulační aktivita růstu melanomu), alfa inhibin HGF, PD-ECGF, bFGF, lymfotoxin, Mullerian inhibující substance, FAS ligand, osteogenní protein, pleiotropin/midkin, ciliární neurotrofní faktor, androgennní indudukovaný růstový faktor, autokrinní motilitní faktor, hedgehog protein, estrogen, progesteron, androgen, glukokortikoid receptor, RAR/RXR, tyroidní receptor, TRAP/CD40, EDF (erytroidní diferenciační faktor), Fic (chemokinem indukovatelný růstový faktor), IL-IRA, SDF, NGR nebo RGD ligand, NGF, tymozine-alfal, OSM, chemokin receptory, faktor kmenových buněk (SCF) nebo jejich kombinace. Jak je zřejmé odborníkovi v této oblasti techniky, bude výběr podmínek kultivace záviset na znalosti oblasti techniky, týkající se transdukovaných buněk, rovněž jako následného zamýšleného použití buněk. Například kombinace IIL-3, IL-6 a faktor kmenových buněk by neměly být vybrány pro transdukované buňky, které mají být použity při transplantaci u člověka. Podobně, výběr kultivačních podmínek by výhodně neměl být škodlivý vzhledem k životaschopnosti buněk nebo účinnosti transdukce.

Je výhodné, když posttransdukční inkubace probíhá po čtyři hodiny nebo po jednu hodinu od jednoho do sedmi nebo deseti dnů. Výhodnější je 16 až 20 hodin po čtyři, pět nebo šest dnů. Čtrnáctidenní posttransdukční inkubace je také uvažována.

Účinnost transdukce, pozorovaná u předkládaného vynálezu je od 75 % do 100 %. Výhodné je, když je účinnost 75 až 90 %. Výhodnější provedení vynálezu mají účinnost transdukce od 90 do 95 %. Nejvýhodnější provedení mají transdukční účinnosti nejméně 91, 92, 93, 94, 95,96, 97, 98, 99 a 100 %.

Kromě shora uvedeného mohou být transdukované buňky použity ve výzkumu nebo pro léčbu chorobných stavů v živých subjektech. Zvláště výhodná, jako součást tohoto vynálezu, jsou terapeutická použití transdukovaných buněk pro produkci zájmových genových produktů nebo pro přímou introdukci do živého organizmu, jako součást genové terapie. Například a jak je uvedeno níže, mohou být T buňky izolovány a transdukovány virovým vektorem. Úspěšná transdukce je indikována produkcí nebo nadprodukcí produktu genu, kódovaného vektorem nebo vznik fenotypů, přenášených tímto vektorem. Jako takové, mohou být T buňky nejprve transdukovány vektorem, který obsahuje požadovanou nebo použitelnou sekvenci nukleové

31.03.03

kyseliny a je schopen její exprese a potom vráceny do *in vivo* prostředí, jako do živého subjektu. Je výhodné, když tento živý objekt je jedinec infikovaný nebo ohrožený rizikem infekce HIV-1.

V jiném provedení jsou T buňky transdukovány geny nebo nukleovými kyselinami, schopnými podmíněného usmrcování T buněk při jejich transdukci do hostitelského organizmu. Toto má použití v alogenních transplantacích kostní dřeně, aby bylo zabráněno chorobám spojeným s reakcí hostitele na štěp, usmrcením T buněk použitím pro-léčiva.

Jinou možností je, že jsou primární buňky deficientní na genový produkt a tato deficience je opravitelná transdukovaným virovým vektorem. Tyto buňky mohou být zpětně introdukovány do živého organizmu po jejich transdukci virovým vektorem.

Přicházejí tedy v úvahu aplikace tohoto vynálezu *in vivo* i *in vitro*. Pro přenos do živých organizmů jsou výhodné transdukované buňky v biologicky přijatelném roztoku nebo farmaceuticky přijatelné lékové formě. Tento přenos může být učiněn intravenózně, intraperitoneálně nebo jiným injekčním nebo neinjekčním způsobem, známým v tomto oboru. Podávané dávky se budou měnit v závislosti na mnoha faktorech, ale mohou být zkušeným praktikem snadno určeny. Je mnoho aplikací předkládaného vynálezu se známým nebo dobře sestrojeným umístěním ve virovém vektoru, kde prospěch přinášený takto tranasdukovaným genetickým materiálem vyváží jakékoliv riziko negativních účinků.

Původně byl celkový počet transdukovaných buněk od 10^4 do 10^{10}. Mohou být také použita množství buněk 10^5, 10^6, 10^7, 10^8 nebo 10^9. Skutečné počty se budou měnit v závislosti na buňkách, které mají být transdukovány. Mnohonásobné přenosy, pokud jsou potřeba, transdukovaných buněk jsou výhodným provedením. Kromě toho, kondicionování hostitele před přenosem transdukovaných buněk, pokud je třeba, je výhodným provedením. Kondicionační režimy jsou v tomto oboru známy; příkladem je režim (režimy) pro transplantaci kostní dřeně.

Pokud máme obecně popsat tento vynález, bude to samé snáze pochopitelnější na základě následujících příkladů provedení, které jsou uvedeny pouze pro ilustraci a nikoliv jako jakékoliv omezení zde předkládaného vynálezu, pokud není výslovně uvedeno jinak.

Popis obrázků na výkresech

Obrázky 1A a 1B ukazují mapy pN2cGFP, případně pN1GFP(cPT). Jsou uvedena různá místa pro restrikční enzymy, rovněž jako komponenty odvozené od HIV. Konstrukt pN2cGFP obsahuje GFP kódující sekvenci, operativně navázanou na promotor CMV (cytomegalovirus), který kontroluje expresi GFP. PN1GFP(cPT) konstrukt je také níže označován jako

31.03.03

pN1(cpt)CGFP a obsahuje cPPT z HIV pol genu. Tyto konstrukty jsou použity v níže popsaných příkladech.

Obrázek 2 ukazuje výsledky transdukce primárních T buněk použitím perel povlečených imobilizovanými CD3 a CD28 protilátkami. Buňky byly přivedeny do kontaktu s vektorem buď před kontaktem s těmito perlami (panel A), do kontaktu s perlami před kontaktem s vektorem (panel B) nebo byly současně v kontaktu s vektorem i perlami (panel C). Výsledky průtokové cytometrie založené na fluorescenci GFP kódované transdukovaným vektorem ukazují, že buňky v panelu A byly transdukovány z 90,70; 81,19; případně z 79,14 %.

Obrázek 3 ukazuje srovnání transdukce použitím buď IL-2 a PHA-P nebo perel s imobilizovanými CD3 a CD28 protilátkami pro stimulaci CD4+ buněk před kontaktem s virovým vektorem. Použití imobilizovaných protilátek mělo za výsledek účinnosti transdukce vždy vyšší než 95 %. Použití IL-2 a PHA přineslo účinnosti pouze 70,2 až 84,5%.

Obrázek 4 je zobrazením frekvence transdukce lidských CD4+ buněk použitím předkládaných způsobů. Srovnání analýzy průtokové cytometrie kontrolních buněk s buňkami transdukovanými vektorem schopným exprese zeleného fluorescentního proteinu (GFP) při MOI rovno 20 patnáct dní po transdukci ukázalo, že 93 % transdukovaných buněk také vykazovalo zelenou fluorescenci.

Obrázek 4 ukazuje výsledky FACS analýzy buněk CD4+ a GFP+ 14 dní po transdukci použitím buď IL-2 nebo PHA-P nebo perel s imobilizovanými CD3 a CD28 protilátkami. 93 % buněk ovlivněných protilátkami zůstalo po 14 dnech stabilně transdukovaných. Po této době zůstalo stabilně transdukovaných pouze 75 % buněk z těch, které byly ovlivněny IL-2 a PHA.

Obrázek 5 ukazuje výsledky buněk transdukovaných různým virovými vektory.

Obrázek 6 ukazuje účinek použití různých MOI na účinnost transfekce.

Obrázek 7 dokazuje stabilní transdukci buněk CD34+, připravených z krve pupeční šňůry po mnohočetné transdukci virovým vektorem v přítomnosti molekul, vážících se na buněčný povrch.

Obrázek 8, panely A až D, ukazuje účinnost dlouhodobé transdukce po transplantaci u SCID (zlá kombinovaná imunodeficience) myší. Po přibližně osmi týdnech zůstává v průměru 91 % transdukovaných buněk, které setrvávají ve zralosti, pozitivních na expresi transdukovaného GFP markeru.

Obrázek 9, panely A a B, ukazuje účinnost transdukce dendritických buněk po sedmi dnech.

31.03.03

Příklady provedení vynálezu

Příklad I

Příprava primárních CD4+ T buněk

CD4+ T buňky byly izolovány z periferní krve použitím standardních postupů s malou modifikací. Přesněji řečeno, kontaminující monocyty byly odstraněny navázáním. Neadherující buňky byly v přítomnosti magnetických perel povlečeny protilátkami proti CD4+, pro pozitivní selekci CD4+ buněk. Magnetické perly byly odstraněny a CD4 buňky byly izolovány.

Čistota těchto vysoce vyčištěných CD4+ buněk byla průtokovou cytometrií stanovena na více než 90 %.

Příklad II

Transdukce primárních CD4+ T buněk při proměnlivé době kontaktu s molekulou, která se váže na buněčný povrch

Transdukce před vazbou na buněčný povrch

Primární CD4+ buňky (500 000) byly kultivovány s pN2cGFP při MOI rovné 20 po 24 hodin a do kultury byly následně na dobu dalších sedm dnů přidány perly povlečené αCD3 a αCD28. Obrázek 1 obsahuje mapu pN2cGFP.

Transdukce po vazbě na buněčný povrch

Primární CD4+ buňky (500 000) byly kultivovány po 24 hodin s perlami povlečenými αCD3 a αCD28 s následující introdukcí pN2cGFP při MOI rovné 20 do kultury po dalších 24 hodin. Buňky byly promyty, aby byl odstraněn přebytek vektoru a následně inkubovány v médiu neobsahujícím vektor a obsahujícím perly po dalších sedm dnů.

Současná transdukce a vazba na buněčný povrch

Primární buňky CD4+ (500 000) byly kultivovány s pN2cGFP při MOI rovné 20 po 24 hodin v přítomnosti perel, povlečených αCD3 a αCD28. Tyto buňky byly promyty, aby byl odstraněn přebytek vektoru a následně inkubovány v mediu obsahujícím perly a neobsahujícím vektor po dalších sedm dnů.

Náhradní postupy

Vektor pN2cGFP může být nahrazen jinými vektory. Kromě toho může být transdukce opakována celkem čtyřikrát před odstraněním nadbytku vektoru. Dále, perly povlečené αCD3 a

31.03.03

αCD28 mohou být nahrazeny interleukinem-2 (10 ng/ml) a PHA-P (3 mg/ml), po transdukci a odstranění nadbytku vektoru. Po sedmi dnech je médium nahrazeno médiem, neobsahujícím PHA-P a obsahujícím interleukin-2 (10 ng/ml) a inkubace pokračuje po dalších sedm dnů.

Jinou možností je, že sedm dnů po posttransdukční inkubaci s perlami povlečenými αCD3 a αCD28 jsou buňky promyty a inkubace pokračuje v přítomnosti interleukinu-2 (10 ng/ml).

Příklad III

Posttransdukční analýzy

Po transdukci a sedm nebo 14 dnů po inkubaci byly buňky analyzovány průtokovou cytometrií na CD4+ a/nebo zeleně fluoreskující protein (GFP).

Srovnání tří shora uvedených transdukčních protokolů je uvedeno na obrázku 2. Kontakt s perlami s imobilizovanými protilátkami CD3 a CD28 po transdukci s pN2cGFP a MOI s hodnotou 20 měl za výsledek 91% účinnost. Kontakt s perlami před transdukcí vyústil do 89% účinnosti a současný kontakt s perlami a transdukce vyústil do 80% účinnosti. V tomto experimentu byly CD4+ T buňky vybrány odstraněním adherovaných monocytů, odstraněním CD14 MACS a obohacením CD4 MACS. Tyto protilátky byly imobilizovány, jak je popsáno níže. Kontakt s vektorem proběhl při 37 °C a 5 % CO_2. Kultivační podmínky byly 500 000 CD4+ T buněk na jeden mililitr Ysselova média suplementovaného 2 % lidského sérumalbuminu. FACS analýzy proběhly v den sedm po transdukci. MF značí střední fluorescenci.

Výsledky experimentu po sedmi dnech srovnávající stimulační podmínky jsou uvedeny na Obrázku 3. CD4+ buňky byly ovlivněny buď s IL-2 nebo PHA-P nebo perlami s imobilizovanými protilátkami CD3 a CD28 po dobu 24 hodin, následovanou jedním cyklem transdukce s pN2cGFP při MOI rovném 20. Na straně uvedené použití imobilizovaných protilátek mělo za výsledek transdukční účinnosti přes 90 % v každém čase (indikace buňkami pozitivními na CD4 a GFP). Pro srovnání, výsledky se stimulací s IL-2 a PHA-P dosáhly účinností pouze 70,2 až 84,5 %. FACS analýzy byla provedena v den sedm po selekci.

Obrázek 4 ukazuje výsledky podobného experimentu v den 15 po selekci. Buňky byly opět ovlivněny buď IL-2 nebo PHA-P nebo CD3 a CD28 protilátkami vázánými na perlách po 24 hodin s následujícím jedním cyklem transdukce s pN2cGFP při MOI rovné 20. PHA-P a perly byly odstraněny v den sedm po transdukci a buňky byly kultivovány s pouze IL-2 při 500 000 buňkách na jeden mililitr do den 15 po transdukci. Po použití imobilizovaných protilátek bylo 93 % buněk pozitivních na CD4 i na GFP. Vůči CD4 a i GFP zůstalo po ovlivnění IL-2 a PHA

31.03.03

pouze 75 % buněk. Tyto výsledky naznačují, že malý počet buněk, detekovaný jako pozitivní po sedmi dnech (Obrázek 3), může být v důsledku „pseudotransfekce".

Příklad IV

Různé vektory stabilně transdukují buňky s vysokými účinnostmi:

Tento příklad je srovnáním vektorů, použitých pro transdukci. PN2cGFP obsahuje úplnou gag a pol kódující sekvenci, zatímco pN1(cpt)cGFP obsahuje 4551 až 5096 parciální (nekódující) pol sekvenci. Jak lze vidět z výsledků, uvedených na obrázku 5, oba vektory vykazují vysokou účinnost transdukce primárních buněk CD4 po současné stimulaci s perlami povlečenými imobilizovanými protilátkami CD3 a CD28 a vektorem při MOI o hodnotě 20. FACS analýza byla provedena v den 10 po selekci.

Příklad V

Vliv MOI na účinnost transfekce

Vliv různých hodnost MOI je uveden na obrázku 6, kde použití MOI s hodnotami od 2 do 20 mělo za výsledek transdukční účinnosti od 72,7 do 83,8 %. Buňky byly v kontaktu s perlami povlečenými imobilizovanými protilátkami CD3 a CD28 po 24 hodin před transdukcí s pN1(cpt)CGFP při různých hodnotách MOI.

Příklad VI

Transdukce CD34 pozitivních buněk

CD34 pozitivní buňky byly připraveny z pupečníkové krve a transdukovány čtyřikrát s pN1cptGFP za současné přítomnosti FLT-ligandu, TPO a Kit ligandu (100 ng/ml každého). Buňky byly kultivovány po pět týdnů v dlouhodobých kulturách (LTC-IC) a poté byly buňky kultivovány po 10 dnů v methylcelulóze před analýzou (výsledky jsou od prošlého času 6 týdnů v kultuře). Výsledky na obrázku 7 analyzují zralé CD45 pozitivní buňky, které pocházejí z nezralých CD34 buněk. Kontrolní buňky nevykazují žádnou průkaznou transdukci, zatímco vektorem transdukované buňky vykazují více než 88 % buněk CD45 a GFP pozitivních.

Příklad VII

Dlouhodobá transdukce CD34 pozitivních buněk

CD34 pozitivní buňky byly transdukovány s pN1(cpt)GFp, jak je popsáno shora a transplantovány do kostní dřeně částečně ozářených SCID myší. Po osmi týdnech byly buňky

31.03.03

izolovány a analyzovány na CD24 nesoucí zralé lidské buňky a GFP expresi pomocí FACS. Tyto výsledky jsou uvedeny na Obrázku 7, panely A až D.

Panel A ukazuje výsledky kontrolní myši s transplantovanými lidskými buňkami, netransdukovanými vektorem.

Panel B ukazuje výsledky u myší s transplantovanými transdukovanými buňkami, transdukovanými pN1(cpt)GFP vektorem při MOI o hodnotě 50 po 4 následující dny v přítomnosti 100 ng/ml FLT-ligandu, TPO a Kit ligandu. Tato myš vykazuje překvapivou 96,3% transdukční účinnost transdukovaných lidských buněk (CD45 pozitivních buněk) 8 týdnů po transdukci. Hladina lidských buněk transplantovaných v této myši byla 11,1%, v souhlasu s předběžně publikovanými výsledky.

Panely C a D ukazují výsledky u jiných dvou myší, ovlivněných jako v panelu B. Tyto výsledky potvrzují reprodukovatelnost vysoké účinnosti transdukce s 87,8 % a 89,6 % CD45 pozitivních buněk, které byly také GFP pozitivní.

Průměrná účinnost je 91,2 %, což odpovídá dlouhodobé stabilní transdukci.

Příklad VIII

Imobilizace molekul vážících se na buněčný povrch

Tento příklad popisuje přímou vazbu CD3 (B-11) protilátek a CD28 (B-T3) protilátek na epoxy dynal perly pro použití v níže uvedených příkladech.

1. Připrav 0,1 borátový roztok rozpuštěním 0,618 g kyseliny borité v 95 ml vody kvalitou odpovídající požadavkům na tkáňové kultury. Dobře promíchej a nastav pH pomocí p.a. NaOH. Doplň na konečný objem 100 ml a sterilizuj přes filtr 0,2 μm. Utěsni nádobu a uchovávej při 4 °C.

2. Přidej protilátku do shora uvedeného roztoku borátu do koncentrace 150 μg/ml. Obou, B-B11 i B-T3 protilátky, přidej po 75 μg na ml roztoku borátu. Doplň objem do 1 ml. Koncentrace borátu by po přidání protilátky neměla klesnout pod 0,05 M. Na každý 1 ml borátového roztoku protilátky přidej 4 x 10^8 Epoxy perel.

3. Inkubuj 24 hodin při 37 °C v rotační třepačce.

4. Promyj perly třikrát po 10 minutách, při 22 °C, promývacím roztokem pro perly: fosfátový fyziologický roztok bez vápníku a hořčíku, 3% lidský sérumalbumin, 5 mM EDTA a 0,1 azid sodný.

5. Promyj perly jedenkrát po 30 min při 22 °C.

6. Promyj přes noc při 4 °C.

31.03.03

7. Vyměň čerstvý promývací roztok pro perly, resuspenduj perly na koncentraci 2 x 10^8 perel/ml. IgG povlečené perly jsou stabilní nejméně šest měsíců při 4 °C.

Příklad IX

Transdukce dendritických buněk

Z periferní krve byly izolovány monocyty a potom transdukovány po tři následující dny při MOI rovno 50 s pN2cGFP, použitím dvou současných cytokinových stavů: GN-CSF (800 jednotek/ml), IL-4 (50 jednotek/ml) a TNF-alfa (100 jednotek/ml) nebo GM-CSF (500 jednotek/ml) a interferon-alfa (800 jednotek/ml). Obrázek 9, panel A, ukazuje výsledky sedm dnů po transdukci, kde první cytokinový stav měl za výsledek 90,2% účinnost. Buňky, transdukované vektorem za druhého vektorového stavu vykazují 92,9% účinnost po sedmi dnech (panel B). CD86 je pouze jedním možným markerem dendritických buněk a je třeba poznamenat, že CD86 negativní buňky mohou rovněž být dendritickými buňkami.

Citovaná literatura

Barry, S. C. et al. (2000)"Lentiviral and murine retroviral transduction of T cells for expression of human CD40 ligand"Human Gene Therapy 11: 323 až 332.

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

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

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

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

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

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

Kishimoto, T. (ed). Leucocyte Typing VI: White Cell Differentiation Antigens: Proceedings of the Sixth International Workshop and Conference Held in Kobe, Japan, 1014 November 1996. Garland Publishing, New York, 1998.

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

Koc, O. N., et al. (1999)"Transfer of drug resistance genes into hematopoietic progenitors"Chapter 11, Gene Therapy of Cancer, Academic Press, San Diego, pp. 177195.

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

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

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

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

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

31.03.03

Všechny citované reference jsou tímto začleněny citací v jejich úplnosti, ať byly již dříve výslovně začleněny nebo ne. Popisujeme-li nyní v úplnosti tento vynález, odborník na tomto poli techniky uzná, že toho samého lze dosáhnout širokým rozsahem ekvivalentních parametrů, koncentrací a stavů, aniž bychom se odchýlili od ducha a záměru tohoto vynálezu a bez zbytečného experimentování.

I když tento vynález byl popsán ve vztahu k jeho určitým provedením, je třeba si uvědomit, že existují možnosti dalších modifikací. Tato přihláška je zamýšlena tak, aby pokryla všechny variace, použití nebo úpravy tohoto vynálezu, obecně podle zásad tohoto vynálezu a včetně odchylek od předkládaného popisu, jak se vyskytují při známé nebo uživatelské praxi v rámci oblasti techniky, které se tento vynález dotýká a jaké mohou být aplikovány na základní, zde uvedené charakteristiky, jak následuje v rozsahu připojených patentových nároků.

Zde, shora a dále v patentových nárocích není použití termínů v jednotném čísle omezeno na označení čísla jednotného v gramatickém slova smyslu. Takový termín v sobě věcně zahrnuje i množné číslo. Například termín „protilátka" není omezen na jednotné číslo nebo na jednu jednotlivou molekulu, ale spíše v sobě obsahuje přítomnost plurality protilátkových molekul, pokud jsou identickými kopiemi protilátky, která je tímto myšlena. Podobně „virový vektor" není omezen na jednu jednotlivou molekulu virového vektoru nebo na jednu jednotlivou virovou částici.

31.03.03
PV 2003-569

PATENTOVÉ NÁROKY

1. Způsob stabilní transdukce buněk, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje kontakt těchto buněk s lentivirovým vektorem a s nejméně jednou molekulou, vážící se na buněčný povrch, kde je po 14 dnech stabilně transdukováno více než 75 % těchto buněk.

2. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že kontakt těchto buněk s lentivirovým vektorem probíhá před kontaktem těchto buněk s nejméně jednou molekulou, vážící se na buněčný povrch.

3. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že kontakt těchto buněk s lentivirovým vektorem probíhá současně s kontaktem těchto buněk s nejméně jednou molekulou, vážící se na buněčný povrch.

4. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že kontakt těchto buněk s lentivirovým vektorem probíhá po kontaktu těchto buněk s nejméně jednou molekulou, vážící se na buněčný povrch.

5. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že kontakt těchto buněk s lentivirovým vektorem probíhá více než jedenkrát.

6. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že těmito buňkami jsou primární buňky.

7. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou molekulou, vážící se na buněčný povrch je protilátka, ligand nebo molekula buněčného povrchu.

8. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený lentivirový vektor zahrnuje nejméně jednu cis-účinkující nukleotidovou sekvenci, odvozenou od gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat nebo rev genu.

9. Způsob podle nároku 8, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená sekvence není exprimována nebo je fragmentem nebo mutantem gag, pol, env, vif, vpr, vpu, tat nebo rev genu.

31.03.03

10. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným lentivirovým vektorem je vektor odvozený od HIV.

11. Způsob podle nároku 1, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedeným lentivirovým vektorem je pseudotypový vektor.

12. Způsob podle nároku 11, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený pseudotypový vektor obsahuje obálkový protein viru G vesikulární stomatitidy.

13. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 12, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou buňkou je hematopoetická buňka.

14. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou hematopoetickou buňkou je CD4 pozitivní buňka.

15. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou hematopoetickou buňkou je lymfocyt.

16. Způsob podle nároku 15, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedený lymfocyt je CD4 nebo CD8 pozitivní buňkou.

17. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou hematopoetickou buňkou CD34 pozitivní buňka.

18. Způsob podle nároku 13, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedenou hematopoetickou buňkou je kmenová hematopoetická buňka.

19. Způsob podle nároku 17, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená nejméně jedna molekula, vážící se na buněčný povrch, zahrnuje molekulu, vybranou z FLT-3 ligandu, TPO a Kit ligandu nebo protilátek, které jsou jejich funkčními analogy.

20. Způsob podle nároku 18, v y z n a č u j í c í s e t í m, že uvedená nejméně jedna molekula, vážící se na buněčný povrch, zahrnuje molekulu, vybranou z FLT-3 ligandu, TPO a Kit ligandu nebo protilátek, které jsou jejich funkčními analogy.

31.03.03

21. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedenou buňkou je dendritická buňka nebo buňka, která je schopna diferenciace na dendritickou buňku.

22. Způsob podle nároku 21, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená alespoň jedna molekula vážící se na buněčný povrch je vybrána z prostředků, zahrnujících GM-CSF, IL-4 a TNF-α; GM-CSF a interferon-α nebo protilátky, které jsou jejich funkčními analogy.

23. Způsob podle nároku 14, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená nejméně jedna molekula, vážící se na buněčný povrch je vybrána ze skupiny, která se skládá z CD3 protilátek a jejich fragmentů, CD28 protilátek a jejich fragmentů a z kombinací uvedených protilátek a jejich fragmentů.

24. Způsob podle nároku 23, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená nejméně jedna molekula, vážící se na buněčný povrch, zahrnuje kombinaci CD3 a CD28 protilátek, imobilizovaných na povlečených perlách.

25. Způsob podle nároku 3 nebo 4, v y z n a č u j í c í s e t í m , že tyto buňky se dále kultivují za podmínek, které vedou k růstu a/nebo proliferaci.

26. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedené podmínky zahrnují další kultivaci s molekulou, vážící se na buněčný povrch, nebo s cytokinem.

27. Způsob podle nároku 26, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedeným cytokinem je interleukin-2.

28. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená kultivace probíhá asi sedm dnů.

29. Způsob podle nároku 25, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedená kultivace probíhá asi 14 dnů.

31.03.03

30. Způsob podle nároku 3, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený kontakt těchto buněk s lentivirovým vektorem probíhá asi 24 hodin a je popřípadě nejméně jednou opakován.

31. Způsob podle kteréhokoli z nároků 1 až 12, v y z n a č u j í c í s e t í m , že uvedený lentivirový vektor je přítomen při mnohočetnosti infekce menší než 500.

32. Způsob introdukce genetického materiálu do živého subjektu, v y z n a č u j í c í s e t í m , že zahrnuje introdukci buněk transdukovaných způsobem podle kteréhokoliv z nároků 1 až 12.

31.03.03
PV 2003-569

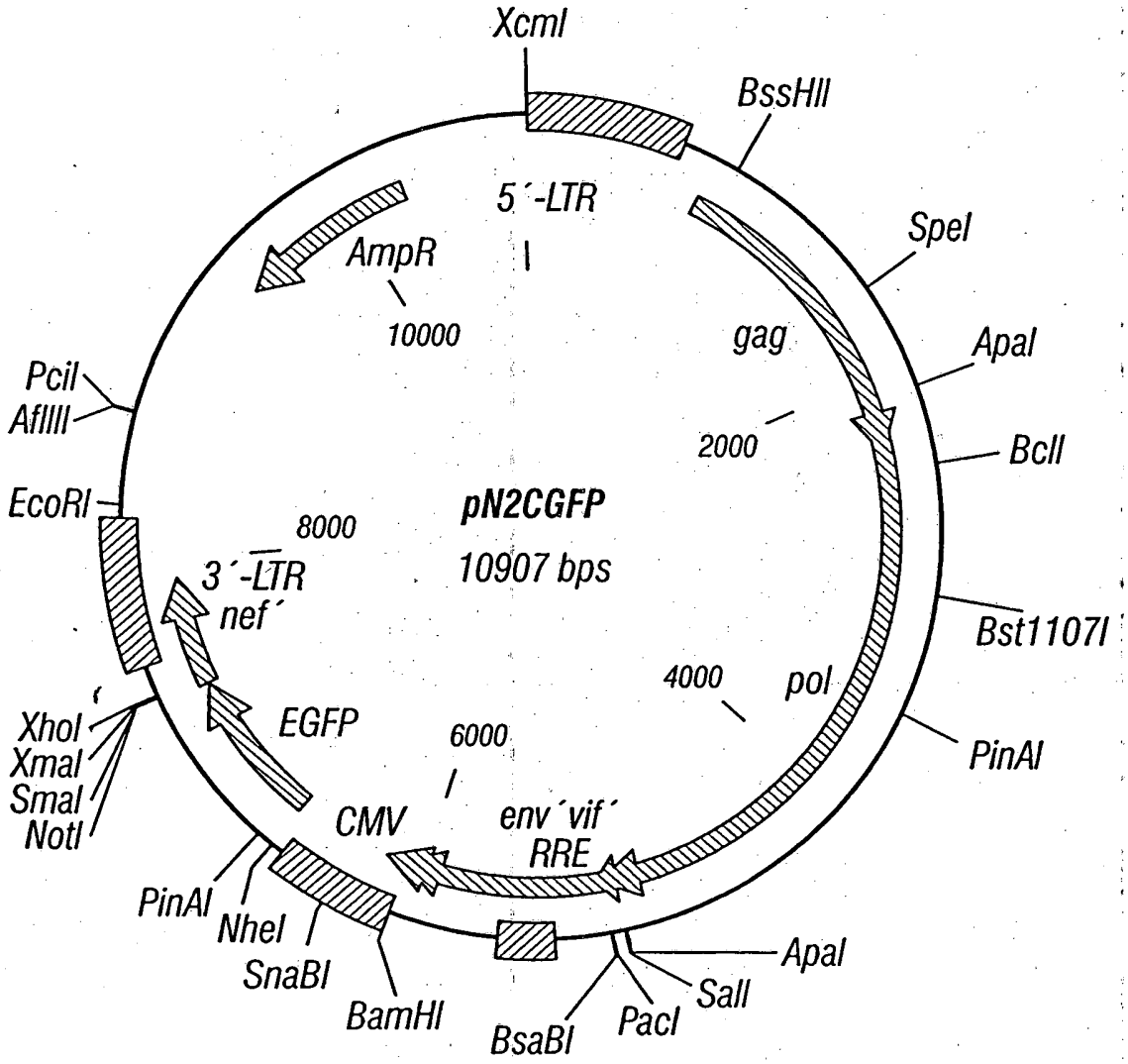


FIG. 1A

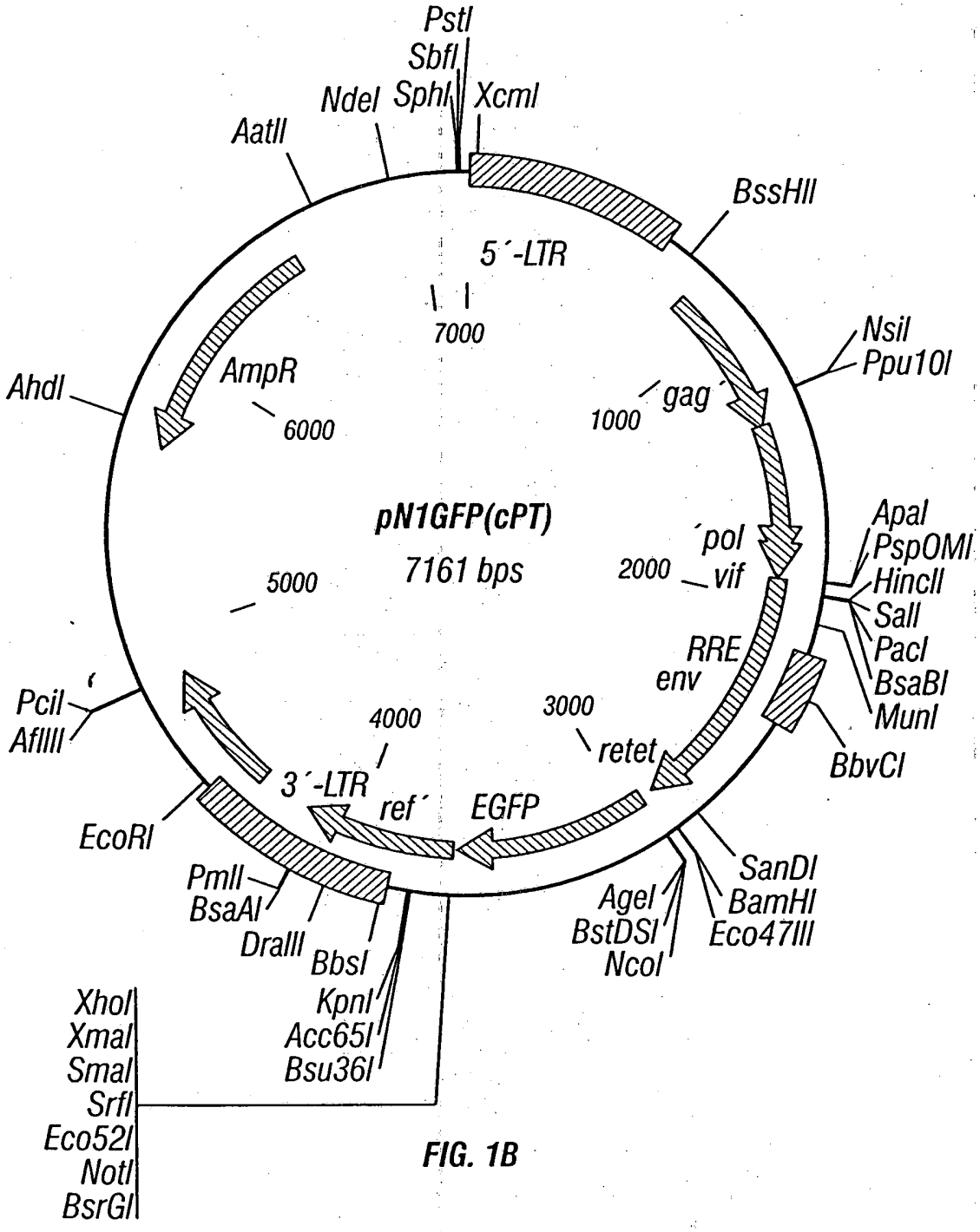
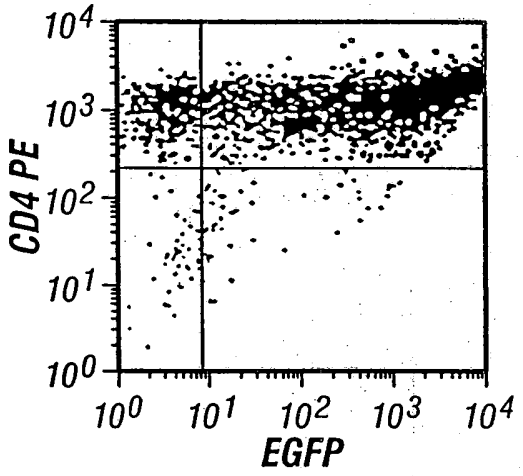

PstI
SbfI
SphI
XcmI
NdeI
AatII
BssHII
5´-LTR
7000
NsiI
Ppu10I
AmpR
6000
AhdI
1000
gag´
pN1GFP(cPT)
7161 bps
´pol
2000
vif
ApaI
PspOMI
HincII
SalI
PacI
BsaBI
MunI
BbvCI
5000
RRE
env
3000
retet
PciI
AflIII
4000
3´-LTR
ref´
EGFP
EcoRI
PmlI
BsaAI
DraIII
BbsI
KpnI
Acc65I
Bsu36I
AgeI
BstDSI
NcoI
SanDI
BamHI
Eco47III
XhoI
XmaI
SmaI
SrfI
Eco52I
NotI
BsrGI

FIG. 1B

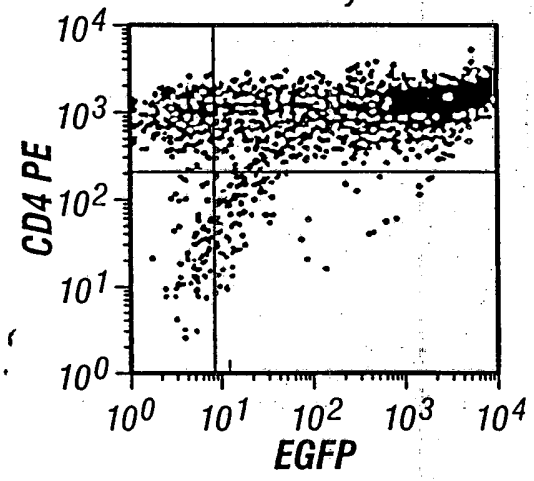


Stimulace: den 1

CD4+ EGFP+: 91.22%
MF: 3325

FIG. 2A

T#012.1Day7.005

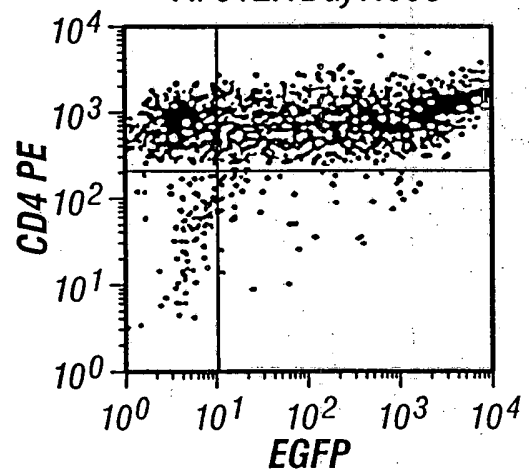


Stimulace: den 0
Transdukce: den 1

CD4+ EGFP+: 89.12%
MF: 2962

FIG. 2B

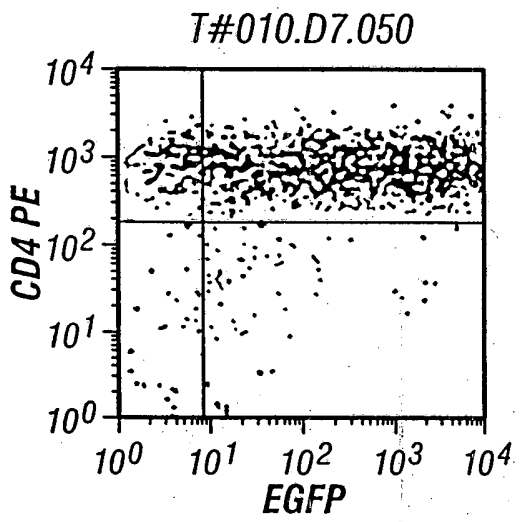
T#012.1Day7.005



Stimulace: den 0
Transdukce: den 0

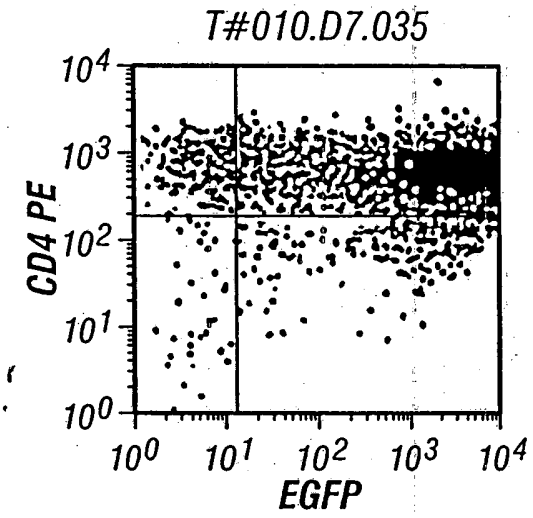
CD4+ EGFP+: 80.24%
MF: 1966

FIG. 2C



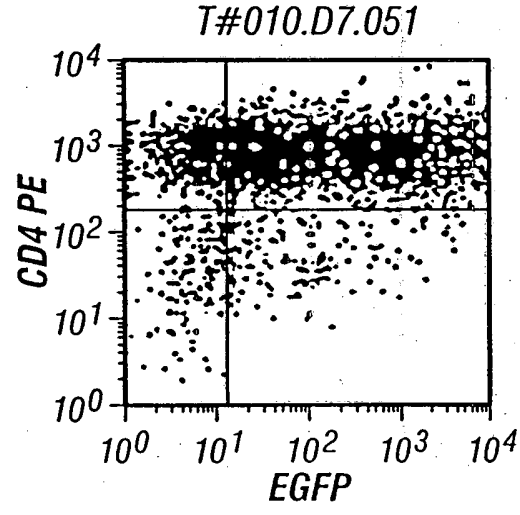
IL2/PHA-p
CD4+ EGFP+: 84.5%
MF: 1920

FIG. 3A



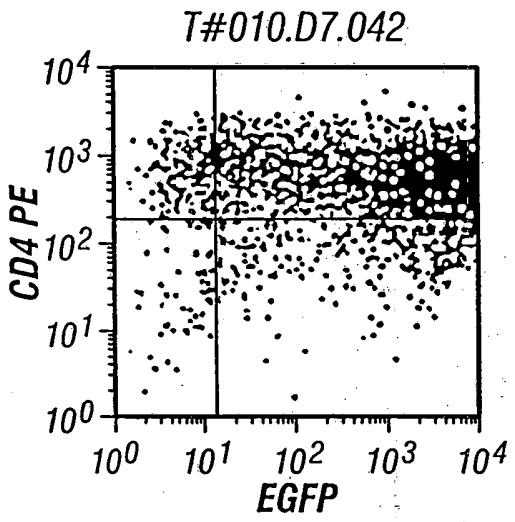
ICD3/ICD28
CD4+ EGFP+: 96%
MF: 5450

FIG. 3B



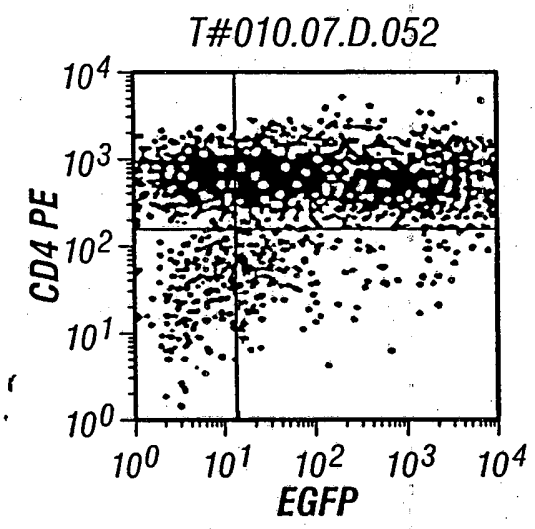
IL2/PHA-P
CD4+ EGFP+: 80.95%
MF: 1110

FIG. 3C



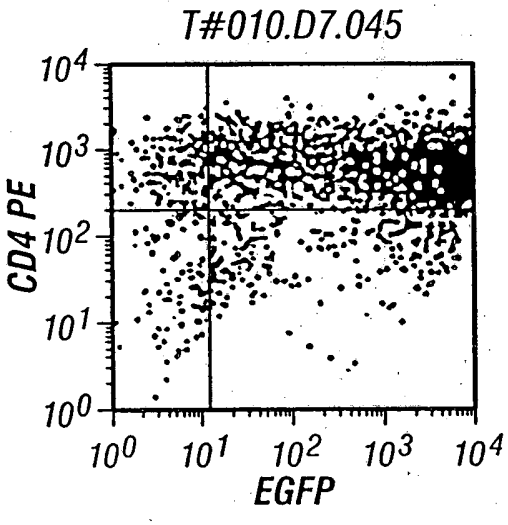
ICD3/ICD28
CD4+ EGFP+: 95.5%
MF: 5259

FIG. 3D



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

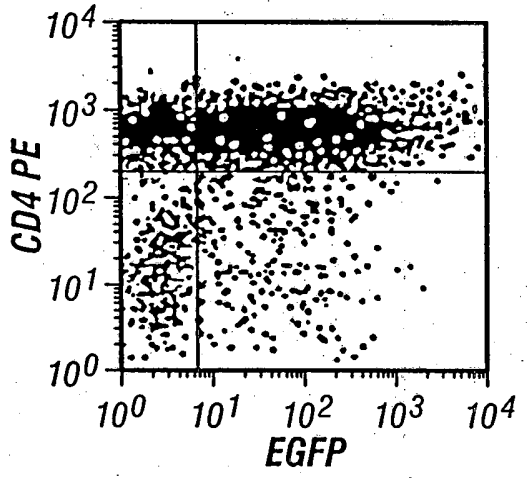
FIG. 3E



ICD3/ICD28
CD4+ EGFP+: 95.4%
MF: 5346

FIG. 3F

T#010.D15.004

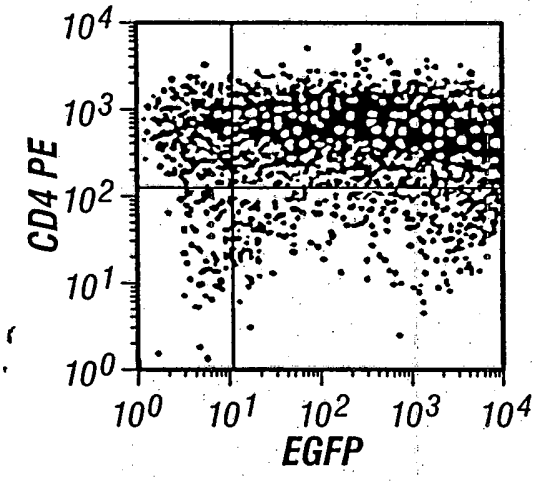


1st Wk: IL2/PHA-P
2nd Wk: IL2

CD4+ EGFP+: 75.3%
MF: 204

FIG. 4A

T#010.D15.009

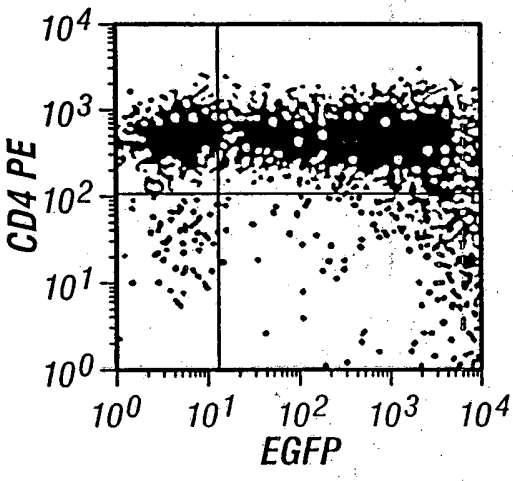


1st Wk: ICD3/ICD28
2nd Wk: IL2

CD4+ EGFP+: 92.8%
MF: 3054

FIG. 4B

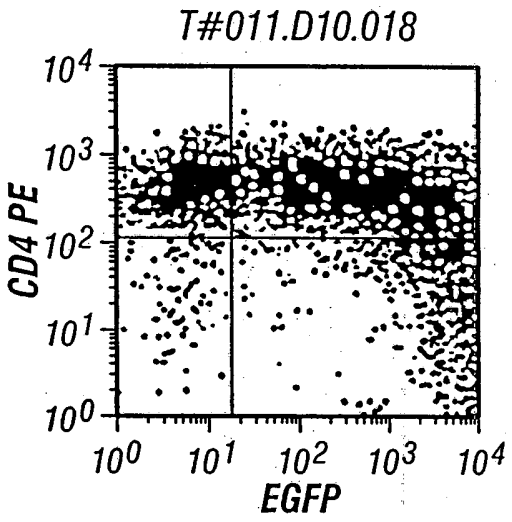
T#011.D10.017



pN1(cpt)CGFP at MOI20

CD4+ EGFP+: 77.1%
MF: 1591

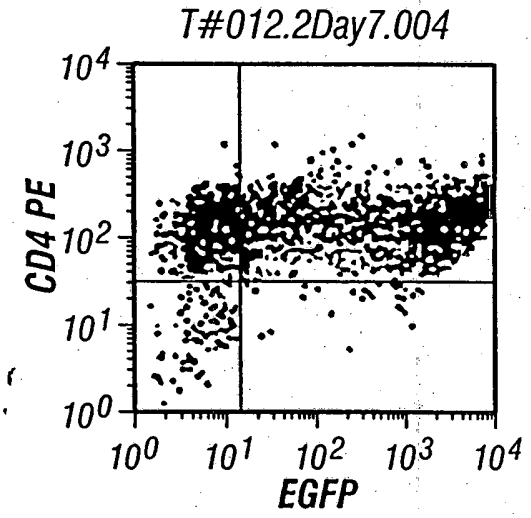
FIG. 5A



pN2CGFP at MOI 20

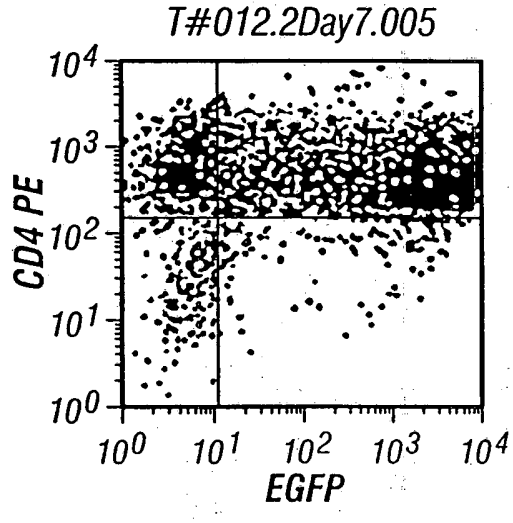
CD4+ EGFP+: 78.2%
MF: 1966

FIG. 5B



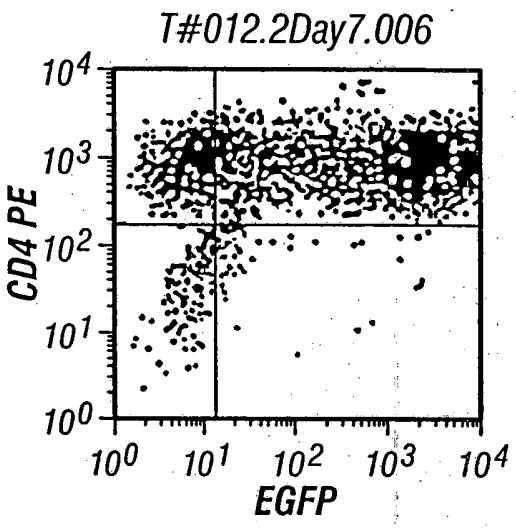
MOI 2
CD4+ EGFP+: 72.7%
MF: 3438

FIG. 6A



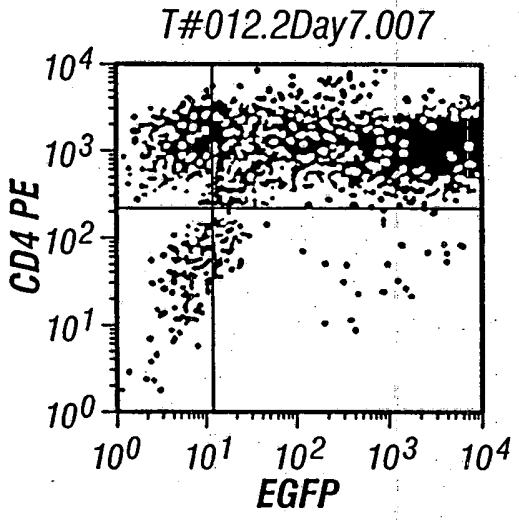
MOI 5
CD4+ EGFP+: 74.4%
MF: 2410

FIG. 6B



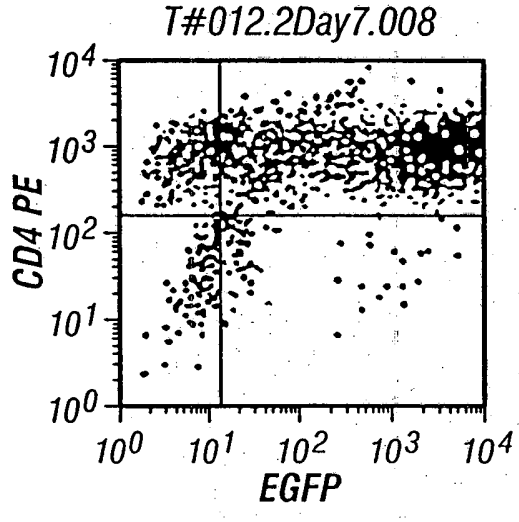
MOI 10
CD4+ EGFP+: 78.7%
MF: 2628

FIG. 6C



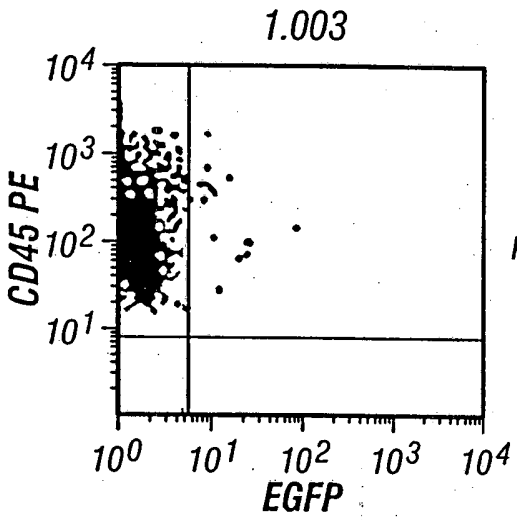
MOI 15
CD4+ EGFP+: 82.4%
MF: 2822

FIG. 6D



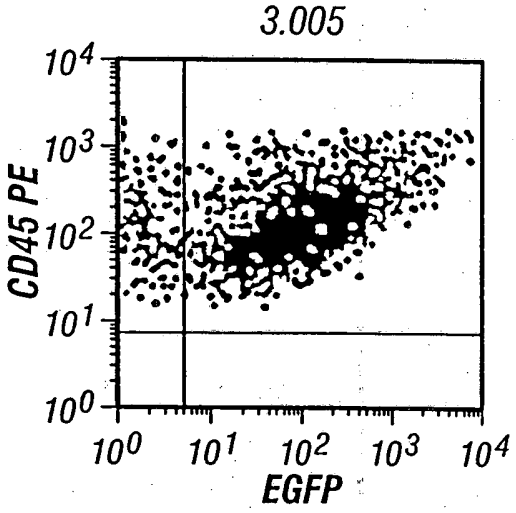
MOI 20
CD4+ EGFP+: 83.8%
MF: 2780

FIG. 6E



Kontrola

FIG. 7A



Transdukováno

FIG. 7B

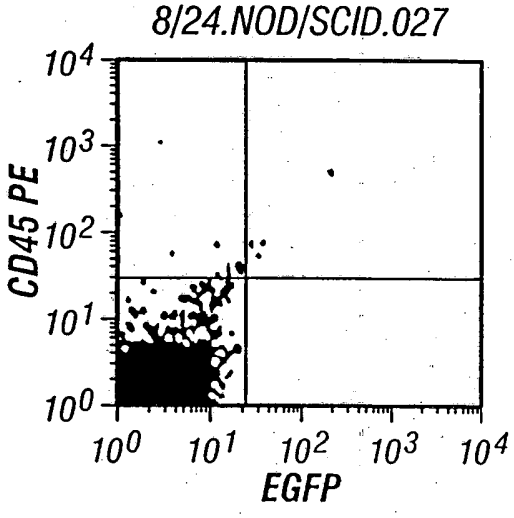


FIG. 8A

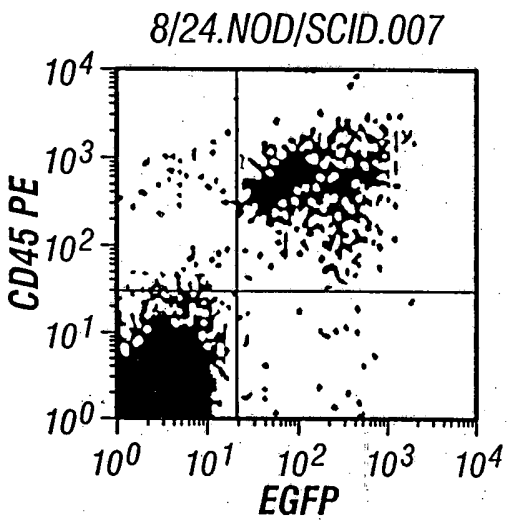


FIG. 8B

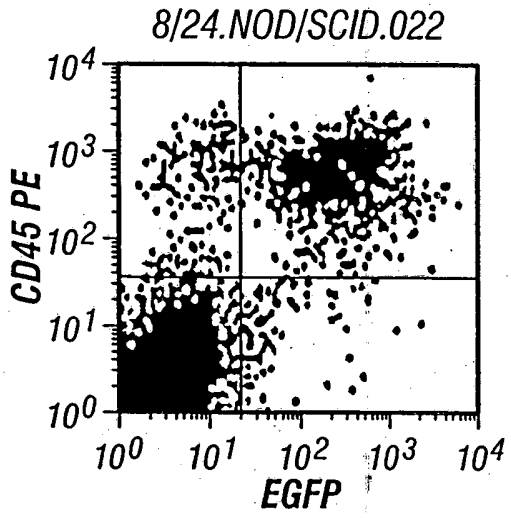


FIG. 8C

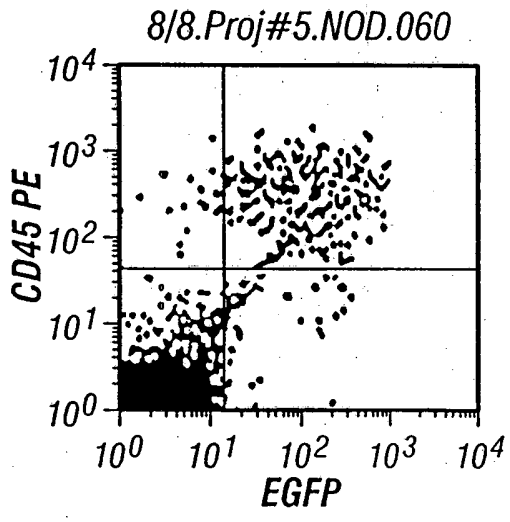


FIG. 8D

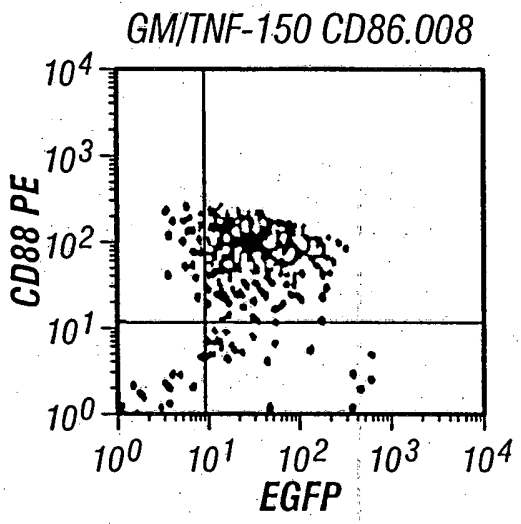

GM/TNF-150 CD86.008
CD88 PE
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
EGFP

FIG. 9A

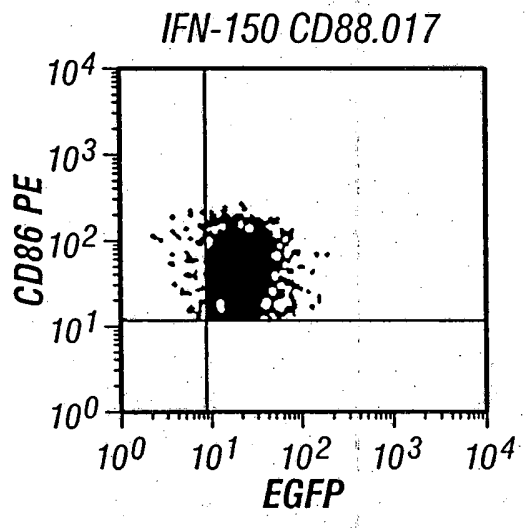

IFN-150 CD88.017
CD86 PE
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
10^0 10^1 10^2 10^3 10^4
EGFP

FIG. 9B