(19) **Bundesrepublik Deutschland**
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 35 560 T2** 2008.04.30

(12) # Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) **EP 0 752 874 B1**
(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 35 560.0**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/US95/03817**
(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 914 912.1**
(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 1995/026200**
(86) PCT-Anmeldetag: **27.03.1995**
(87) Veröffentlichungstag der PCT-Anmeldung: **05.10.1995**
(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.01.1997**
(97) Veröffentlichungstag der Patenterteilung beim EPA: **15.08.2007**
(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **30.04.2008**

(51) Int Cl.[8]: ***C12N 15/10*** (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12N 9/78 (2006.01)
C07K 14/78 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61K 38/39 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
218355 **25.03.1994** **US**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:
Indiana University Research and Technology Corp., Bloomington, ind., US; Northwestern University, Evanston, Ill., US

(72) Erfinder:
WILLIAMS, David A., Indianapolis, IN 46278, US; PATEL, Vikram P., Germantown, MD 20876, US

(74) Vertreter:
derzeit kein Vertreter bestellt

(54) Bezeichnung: **EIN VERSTÄRKTER, DURCH VIREN VERMITTELTER DNA-TRANSFER**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

GEBIET DER ERFINDUNG

[0001] Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind im Allgemeinen Verfahren zur Steigerung der Transduktionseffizienz von Zellen durch Viren und insbesondere Verfahren zur Förderung des Virus-vermittelten Gentransfers in Zellen, das sich Fibronektin und/oder Fibronektinfragmente zu Nutze macht.

HINTERGRUND DER ERFINDUNG

[0002] Fortschritte beim Verständnis der molekularen Basis vieler humaner Erkrankungen ebenso wie die Verbesserung der Gentransfer-Technologie hat vor kurzem zu Versuchen der Entwicklung von Protokollen für die somatische Gentherapie für schwerwiegende genetische Erkrankungen geführt. Zurzeit schließen viel versprechende Krankheitskandidaten für die humane Gentherapie diejenigen ein, bei denen ein Enzym oder ein anderes Protein defekt ist oder fehlt, bei denen der Enzym- oder Proteinspiegel nicht genau reguliert zu werden braucht, besonders diejenigen, die konstitutiv reguliert werden, und die Defekte, die im Knochenmark des Patienten gefunden werden.

[0003] Bin Krankheitskandidat für die Gentherapie stellt zum Beispiel die Adenosindesaminase-Defizienz (ADA-Defizienz) dar, die zur schwerwiegenden kombinierten Immundefizienzkrankheit (SCID) führt. Bei ADA-defizienten Patienten findet sich wenig oder kein nachweisbares Enzym in den Knochenmarkzellen. Die ADA-Defizienz wurde jedoch durch eine übereinstimmende Knochenmarktransplantation geheilt. Normale ADA-Zellen weisen gegenüber ADA-defizienten Zellen einen selektiven Vorteil auf und siedeln sich in der Regel wieder im Knochenmark des Patienten an.

[0004] Knochenmarkzellen stellen ein gutes Target für die somatische Gentherapie dar, weil das Knochenmarkgewebe in vitro leicht zu manipulieren ist und sich wieder ansiedelnde Zellen enthält. Als Alternative wurde zuvor auch nachgewiesen, dass humanes Nabelschnurblut eine große Anzahl primitiver Vorläuferzellen enthält. Der erfolgreiche Gentransfer in hämatopoetische Stammzellen, der sich langzeitig wieder ansiedelnden Zellen, kann zu lebenslangen Heilungen für viele verschiedene Krankheiten führen, die sich in den Nachkommen dieser Zellen manifestiert haben.

[0005] Der Gentransfer in sich wieder ansiedelnde Stammzellen und die langzeitige Genexpression in den sich wieder ansiedelnden Stammzellen wurde in murinen Modellen von einer Anzahl von Untersuchern erreicht. In in vivo-Experimenten mit größeren Tieren, wie zum Beispiel Hunden und Primaten, war jedoch nur ein begrenzter Erfolg beschieden, was größtenteils auf die geringe Infektionseffizienz von primitiven hämatopoetischen Stammzellen zurückzuführen war. Die Limitationen der derzeitigen Gentransfer-Technologie sind weiter durch mehrere Faktoren kompliziert, wenn sie auf humane Protokolle angewendet werden, einschließlich der geringen Anzahl von im adulten Knochenmark (ABM) vorhandenen Stammzellen, des Mangels geeigneter Verfahren zum Reinigen dieser Zellen und die geringe Fraktion dieser primitiven Zellen im Zellzyklus.

[0006] Sowohl in Experimenten mit Mäusen als auch großen Tieren unter Beteiligung von Knochenmarkzellen wurde bemerkt, dass sich die erfolgreichsten Protokolle die Cokultivierung von Targetzellen mit retroviralen Producerzelllinien zu Nutze machen. Überdies verlassen sich auch die meisten der von der FDA zugelassenen Gentransfer-Studien an Menschen auf rekombinante retrovirale Vektoren für die Gentransduktion. Rekombinante retrovirale Vektoren sind für die Gentherapie erstrebenswert, weil sie exogene DNA in Zell-DNA effizient transferieren und genau und stabil integrieren. Diese Vektoren enthalten exogene DNA zum Gentransfer und werden überdies zur Elimination der viralen Pathogenität modifiziert. Aufgrund dieser Modifikationen wird die Virusproduktion im Allgemeinen unter Verwendung von Retrovirus-Verpackungszellen erreicht. Für die klinische Gentherapie ist jedoch die zellfreie Transduktion aufgrund der Bedenken hinsichtlich der Biosicherheit und der Qualitätskontrolle erstrebenswerter. Bedauerlicherweise ist der effiziente Gentransfer in hämatopoetische Zellen, wie zum Beispiel Stammzellen, ohne die Cokultivierung mit Virus-produzierenden Zellen im Allgemeinen nicht möglich gewesen.

[0007] Vor kurzem wurde gezeigt, dass die Gentransfer-Effizienz durch Exposition der Targetzellen gegenüber Stromazellen während der Infektion gesteigert werden kann. Stromazellen stellen eine bedeutende Komponente der hämatopoetischen Mikroumgebung (HM) dar. Die HM besteht aus einem organisierten Netz von Makrophagen, Stromazellen, Endothelzellen, Adipozyten und einer komplexen extrazellulären Matrix (ECM), die aus vielen verschiedenen definierten Adhäsionsmolekülen aufgebaut ist. ECM-Moleküle, wie zum Beispiel Laminin, Kollagen, Thrombospondin, Proteoglykane, Glycosaminoglykane und Fibronektin, stellen Veranke-

rungsstellen sowohl für die hämatopoetischen Zellen als auch Wachstumsfaktoren bereit. Der dieser fördernden Wirkung von Stroms auf die retrovirale Infektion zugrunde liegende Mechanismus ist unklar, es ist aber seit einiger Zeit bekannt gewesen, dass die physiologische Regulation der Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen auftritt, wenn sich diese Zellen in direktem Kontakt mit Zellen aus der HM befinden.

[0008] Der effiziente Gentransfer in sich langzeitig wieder ansiedelnde hämatopoetische Stammellen und andere Zellen bleibt problematisch, wodurch die weit verbreitete Applikation der Gentransfer-Protokolle für die kurative Therapie von hämatopoetischen und anderen Krankheiten zurzeit verhindert ist. Es bleibt ein Bedarf an Verfahren für den effizienten Transfer von genetischem Material in Säugerzellen ohne die Gefahren und Limitationen der in der Vergangenheit eingesetzten Verfahren bestehen. Die vorliegende Erfindung spricht diese Bedürfnisse an.

ZUSAMMENFASSUNG DER ERFINDUNG

[0009] Eine erfindungsgemäße bevorzugte Ausführungsform ist, kurz zusammengefasst, die Bereitstellung eines Verfahrens zur Steigerung der Transduktionsfrequenz hämatopoetischer Zellen durch einen Retrovirus-Vektor. Das Verfahren schließt die Infektion lebensfähiger hämatopoetischer Zellen mit einem replikationsdefekten rekombinanten Retrovirus-Vektor in der Anwesenheit von im Wesentlichen reinem Fibronektin und/oder von Fibronektinfragmenten ein, die zur Steigerung der Frequenz der Zelltransduktion durch das Retrovirus wirksam sind. Das Fibronektin und/oder die Fibronektinfragmente können sich von in der Natur vorkommenden Materialien herleiten oder sich von einer synthetischen Quelle herleiten (z. B. mittels rekombinanter oder chemischer Syntheseverfahren genetisch manipuliert sein) oder sich von einer Kombination von aus in der Natur vorkommenden und synthetischen Materialien herleiten. Außerdem sollte man zur Kenntnis nehmen, dass das erfindungsgemäß verwendete Fibronektin-Polypeptid oder die erfindungsgemäß verwendeten Fibrinpolypetide Mutationen an der in der Natur vorkommenden Fibronektin-Aminosäuresequenz einschließen kann, die trotzdem funktionelle Polypeptide mit den Adhäsionseigenschaften bereitstellen, die zum Erreichen der verbesserten erfindungsgemäßen Transduktion notwendig sind.

[0010] Eine andere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform stellt ein Verfahren zur Produktion transduzierter hämatopoetischer Zellen bereit, das die Infektion lebensfähiger hämatopoetischer Zellen mit einem replikationsdefekten rekombinanten Retrovirus einschließt, das die exogene DNA in Anwesenheit von immobilisiertem Fibronektin, immobilisierten Fibronektinfragmenten oder einem immobilisierten Gemisch davon in Mengen trägt, die zur Steigerung der Frequenz der Zelltransduktion durch das Retrovirus wirksam sind.

[0011] Eine andere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform stellt ein verbessertes Verfahren für die Zelltransplantation bereit. Das Verfahren schließt die Schritte zum Erhalt lebensfähiger hämatopoetischer Zellen aus einem Tierdonor; Infizieren der hämatopoetischen Zellen mit einem rekombinanten Retrovirus-Vektor zum Produzieren transduzierter lebensfähiger hämatopoetischer Zellen ein, wobei das Infizieren in Anwesenheit von Fibronektin und/oder einem Fragment davon in immobilisierter Form stattfindet und zur Steigerung der Transduktionsfrequenz wirksam ist; und Einführen der transduzierten lebensfähigen hämatopoetischen Zellen in einen tierischen Empfänger als ein Zelltransplantat. In einer bevorzugten Form können die infizierten Zellen in einen autologen Donor eingeführt werden.

[0012] Eine andere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform stellt ein Verfahren zum Erhalt transduzierter Zellen aus dem Nabelschnurblut bereit, die für ein Engraftment-Verfahren von Zellen geeignet sind. Das Verfahren schließt das Infizieren hämatopoetischer Zellen aus dem Nabelschnurblut mit einem replikationsdefekten rekombinanten Retrovirus-Vektor in Anwesenheit einer wirksamen immobilisierten Menge von Fibronektin und/oder Fibronektinfragmenten zur Steigerung der Transduktionsfrequenz der hämatopoetischen Zellen durch den Retrovirus-Vektor ein. Erfindungsgemäß eingeschlossen sind auch lebensfähige transduzierte Zellpopulationen aus dem Nabelschnurblut, die mithilfe eines solchen Verfahrens erhältlich sind, und Zelltransplantationsverfahren, die das Einfahren der transduzierten Zellpopulationen in ein Tier als ein Zelltransplantat einschließen.

[0013] Gemäß den spezifischeren Aspekten der vorstehend erwähnten erfindungsgemäßen Ausführungsformen enthält das verwendete Fibronektin oder Fibronektinfragment eine erste Aminosäuresequenz, die die retrovirale Bindungsaktivität der Heparin II-Bindungsdomäne von Fibronektin bereitstellt, und eine zweite Aminosäuresequenz, die die Zellbindungsaktivität der CS-1-Domäne von Fibronektin bereitstellt. Die Verwendung dieser beiden Bindungsdomänen des Fibronektins zusammen weist eine erwiesene bis sehr signifikante Förderung der Transduktionseffizienz der Targetzellen durch das Retrovirus auf.

[0014] Eine andere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform stellt ein Verfahren zur Herstellung eines Konstrukts zur Förderung der Transduktionsfrequenz einer prädeterminierten Targetzelle durch einen Retrovirus-Vektor bereit. Das Verfahren schließt den Schritt der kovalenten Kopplung eines an die Targetzelle bindenden Liganden an ein Polypeptid ein, enthaltend eine Aminosäuresequenz, die die retrovirale Bindungsaktivität der Heparin II-Bindungsdomäne von Fibronektin bereitstellt. Gegenstand der Erfindung sind auch Verfahren, die die Verwendung dieser Konstrukte zur Steigerung der Transduktionsfrequenz der prädeterminierten Targetzellen durch einen Retrovirus-Vektor und für Engraftment-Verfahren, welche die transduzierten Zellen nutzen, beinhalten.

[0015] Eine andere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform stellt ein Verfahren zur Lokalisierung einer Menge eines Virus bereit, umfassend die Inkubation eines Mediums, das das Virus in Anwesenheit einer wirksamen immobilisierten Menge von Fibronektin oder Fragmenten von Fibronektin enthält, welche die Virus-Bindungsaktivität der Heparin II-Bindungsdomäne von Fibronektin zur Lokalisierung einer Menge des Virus enthält.

[0016] Noch andere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsformen stellen im Allgemeinen transduzierte lebensfähige hämatopoetische und andere zelluläre Kulturen, enthaltend im Wesentlichen reine(s) und/oder immobilisierte(s) Fibronektin oder Fragmente davon, ebenso wie für Kits zur Durchführung des retroviral-vermittelten DNA-Transfers in Zellen bereit, wie weiter in den folgenden Passagen beschrieben ist.

[0017] Gegenstand dieser Erfindung ist die Bereitstellung von Verfahren zur effizienten retroviralen Infektion von Säugerzellen.

[0018] Gegenstand dieser Erfindung ist weiter die Bereitstellung von Verfahren für den Gentransfer mit retroviralen Vektoren, welche die Notwendigkeit für die Cokultivierung umgehen.

[0019] Gegenstand der Erfindung ist überdies die Bereitstellung verbesserter Verfahren und Zellkulturen für die autologe und/oder allogene Zelltransplantation.

[0020] Diese und andere erfindungsgemäße Aufgaben, Vorteile und Merkmale werden vom Fachmann aus der folgenden Beschreibung ohne weiteres erkannt werden.

BESCHREIBUNG DER FIGUREN

[0021] Fig. 1 stellt eine schematische Darstellung eines Fibronektinmoleküls, das chymotryptische Fragmente einschließt, bereit.

[0022] Fig. 2 zeigt die Infektionseffizienz von determinierten humanen Vorläuferzellen in Anwesenheit von Fibronektinfragmenten unter Verwendung des TKNEO-Vektors, wie weiter in Beispiel 1 nachstehend beschrieben wird.

[0023] Fig. 3 vergleicht die Infektionseffizienz verschiedener determinierter humaner hämatopoetischer Vorläuferzellen in Anwesenheit von Fibronektinfragmenten davon unter Verwendung des TKNEO-Vektors, wie weiter in Beispiel 1 nachstehend beschrieben wird

[0024] Fig. 4 vergleicht die Anwesenheit von hADA in Mäusen, die mit Knochenmarkzellen „engrafted" wurden, die transduziert wurden durch (i) das Cokulturverfahren (Spuren 2-4), (ii) die Überstandsinfektion in Anwesenheit von immobilisierten Fibronektinfragmenten (Spuren 5-7) und die Überstandsinfektion auf BSA (Spuren 8-10), wie im nachstehenden Beispiel 7 weiter beschrieben ist. Kontrollen für hADA werden in Spuren 1 und 12 und für murine ADA in Spur 11 gezeigt.

[0025] Fig. 5 weist die retrovirale Bindung an Fibronektinfragmente nach, wie weiter im nachstehenden Beispiel 8 beschrieben ist.

[0026] Fig. 6 weist nach, dass die retrovirale Bindung an Fibronektinfragmente dosisabhängig ist, wie weiter im nachstehenden Beispiel 8 beschrieben ist.

[0027] Fig. 7 stellt ein schematisches Diagramm bereit, das die in den nachstehenden Beispielen 9-11 verwendeten verschiedenen rekombinanten Fibronektinfragmente erläutert

[0028] Fig. 8 zeigt die Retrovirus-Bindung an verschiedene Fibronektinfragmente, einschließlich an mehrere rekombinante Fragmente, wie nachstehend in Beispiel 9 beschrieben ist.

[0029] Fig. 9 weist nach, dass Heparin die Retrovirus-Bindung an Fibronektinfragmente blockiert, wie nachstehend in Beispiel 9 beschrieben ist

[0030] Fig. 10 zeigt die Effizienz der Retrovims-Infektion von murinen hämatopoetischen Zellen in Anwesenheit verschiedener Fibronektinfragmente, wie weiter nachstehend in Beispiel 10 berichtet wird.

[0031] Fig. 11 vergleicht die Anwesenheit von hADA in Mäusen, die mit Knochenmarkzellen engrafted wurden, die transduziert wurden durch (i) das Cokulturverfahren, (ii) die Überstandsinfektion auf verschiedenen Fibronektinfragmenten und (iii) die Überstandsinfektion auf BSA, wie nachstehend in Beispiel 11 beschrieben ist.

BESCHREIBUNG DER BEVORZUGTEN AUSFÜHRUNGSFORMEN

[0032] Für den Zweck der Förderung des Verständnisses der erfindungsgemäßen Prinzipien, wird nun auf bestimmte Ausführungsformen davon verwiesen, und es wird die entsprechende Fachsprache zur Beschreibung derselben verwendet. Mann sollte dennoch zur Kenntnis nehmen, dass dadurch keine Beschränkung des erfindungsgemäßen Umfangs beabsichtigt ist, wobei solche Änderungen, weitere Modifikationen und solche Applikationen der erfindungsgemäßen Prinzipien wie hierin erläutert in Betracht gezogen werden, als würden sie einem Fachmann, auf den sich die Erfindung bezieht, der Regel in den Sinn kommen.

[0033] Wie vorstehend darauf hingewiesen wurde, stellt die vorliegende Erfindung Verfahren zur Steigerung der Transduktionsfrequenz lebensfähiger Zellen durch Viren, wie zum Beispiel Retroviren bereit. Die Erfindung stellt auch Verfahren zum effizienten Gentransfer in lebensfähige Zellen unter Verwendung rekombinanter retroviraler Vektoren, Verfahren zum Erhalt transduzierter Zellen und Verfahren und Materialien zum Erreichen autologer und anderer zellulärer Transplantate bereit.

[0034] Ein erfindungsgemäßes Merkmal stellt die Entdeckung dar, dass Fibronektin (FN) und Fragmente von Fibronektin, die die CS-1-Zelladhäsionsdomäne von FN enthalten, den retroviral-vermittelten Gentransfer in Zellen, wie zum Beispiel hämatopoetische Zellen, z. B. determinierte Vorläuferzellen und primitive hämatopoetische Stammzellen oder langzeitige Kultur-initiierende Zellen (LTC-IC), die einen Fibronektin-Rezeptor tragen und dadurch die Kapazität zur Bindung an Fibronektin oder Fragmente davon aufweisen, signifikant fördern. Vorteilhafterweise macht diese gesteigerte Effizienz die Cokultivierung mit Virus-produzierenden Zellen unnötig. Andere erfindungsgemäße Merkmale kapitalisieren aus der Entdeckung einer Virus-Bindungsdomäne von Fibronektin, die sich in der Heparin II-Bindungsdomäne befindet. Diese Virus-Bindungsdomäne kann zum Lokalisieren von Viruspartikeln in vielen Applikationen, einschließlich zum Beispiel in einer breiten Reihe von Konstrukten zur Abgabe des Virus an eine Targetzelle verwendet werden.

[0035] Rekombinante virale Vektoren gemäß bestimmten bevorzugten erfindungsgemäßen Aspekten enthalten exogene DNA und sind nicht pathogen, d. h. replikationsdefekt Diese Vektoren transferieren effizient und integrieren präzise und stabil exogene DNA in zelluläre DNA von Wirtszellen, wie zum Beispiel Tierzellen, insbesondere Säugerzellen. So kann zum Beispiel in der vorliegenden Erfindung eine Nukleotidsequenz, die eine Basenfolge aus der Kodierungssequenz des Gens von Interesse aufweist, in einen rekombinanten retroviralen Vektor unter der Kontrolle eines geeigneten Promotors zum Antreiben des Gens, in der Regel eines exogenen Promotors, inkorporiert werden. In dieser Hinsicht kann die exogene DNA eine DNA enthalten, die entweder natürlich oder artifiziell produziert wurde, und kann aus Teilen stammen, die sich von heterologen Quellen herleiten, welche Teile in der Natur vorkommen können oder chemisch synthetisierte Moleküle darstellen können, und worin diese Teile durch Ligation oder andere im Stand der Technik bekannte Mittel miteinander verbunden wurden. Wie darauf hingedeutet wurde, befindet sich die eingeführte Nukleotidsequenz unter der Kontrolle eines Promotors und befindet sich folglich im Allgemeinen stromabwärts vom Promotor. Als Alternative wird angegeben, dass sich die Promotorsequenz im Allgemeinen stromaufwärts (d. h. am 5'-Ende) der Kodierungssequenz befindet. Diesbezüglich ist überall bekannt, dass andere Regulatorelemente (wie z. B. Enhancer-Sequenzen), die mit dem Promotor kooperieren, und ein transkriptionales Startcodon zum Erreichen der Transkription der exogenen Kodierungssequenz vorhanden oder nicht vorhanden sein können. Die Phrase „unter Kontrolle von" erwägt die Anwesenheit solcher anderer Elemente wie sie zum Erreichen der Transkription des eingeführten Gens notwendig sind. Außerdem schließt die rekombinante DNA bevorzugt eine Terminationssequenz stromabwärts von der eingeführten Kodierungssequenz ein.

[0036] Retrovirale Vektoren, die exogene DNA einschließen, die einen selektierbaren Marker oder anderen selektierbaren Vorteil bereitstellt, können verwendet werden. So können die Vektoren zum Beispiel ein oder mehr exogene(s) Gen(e) enthalten, das/die Resistenz gegen verschiedene Selektionsmittel, einschließlich Antibiotika, wie zum Beispiel Neomycin, bereitstellen. Repräsentative Vektoren, die erfindungsgemäß verwendet werden können, schließen zum Beispiel folgende ein: den N_2/ZipTKNEO-Vektor (TKNEO) (Titer: 1×10^5 $G418^r$ CFU/ml auf NIH 3T3-Zellen), den ZipPGK-hADA-Vektor und den ZipPGK-mADA-Vektor, alle wie zuvor von Moritz et al. (1993) J. Exp. Med 178:529, berichtet. Im TKNEO-Vektor werden Neo-Phosphotransferase-Sequenzen in der Sense-Orientierung (relativ zu den sich am 5' Ende befindenden langen terminalen Wiederholungen (long terminal repeat – LTR)) über den Thymidinkinase-Promotor von Herpes simplex exprimiert. Dieser Sektor enthält ein selektierbares Markergen, das Neomycin-Resistenz zur Erleichterung der Identifikation transduzierter Zellen bereitstellt. Im ZipPGK-hADA-Vektor wird die humane ADA-cDNA („hADA"-cDNA) in der Sense-Orientierung relativ zur 5'-LTR über den humanen Phosphoglyceratkinase-Promotor (PGK-Promotor) exprimiert. Er enthält nur eine exprimierbare genetische Sequenz und es mangelt ihm ein dominanter selektierbarer Marker. Der ZipPGK-mADA-Vektor (PGK-mADA-Vektor) ist mit dem ZipPGK-hADA-Vektor identisch, außer dass die humane ADA-cDNA durch murine ADA-DNA („mADA"-DNA) ersetzt wurde. Diese und andere Virus-Vektoren und Verfahren für ihre Produktion sind überall bekannt und ihre erfindungsgemäße Implementierung und Verwendung gehören durchaus zu den Fähigkeiten des Fachmanns im Bereich des hierin offenbarten Standes der Technik.

[0037] Erfindungsgemäß verwendete Virus-Vektoren weisen die Kapazität zur Bindung an eine Aminosäuresequenz der Heparin II-Bindungsdomäne von Fibronektin, einschließlich der von humanem Fibronektin auf. Obwohl die vorliegende Erfindung nicht durch jedwede Theorie eingeschränkt ist, besteht – wie in den folgenden Passagen besprochen wird – die Annahme, dass die Colokalisierung des Virus und der Targetzelle über die Bindung des Virus und der Zelle an entsprechende funktionelle Domänen, ein Enhancement bei der Transduktion der Zelle durch das Virus fördert. In dieser Hinsicht kann die Kapazität eines Virus, an die Aminosäuresequenz der Heparin H-Bindungsdomäne zu binden und folglich, um der Erfinding auf wirksame Weise dienlich zu sein, ohne weiteres unter Verwendung von Routineverfahren, wie zum Beispiel den in den Beispielen 8 und 9 nachstehend beschriebenen, ermittelt werden. Allgemein gesprochen bestimmen diese Assays das Ausmaß, in dem Viruspartikel an immobilisierte Polypeptide, enthaltend die Heparin II-Bindungsdomäne, gebunden werden, um auf diese Weise dem Auswaschen aus der immobilisierten Polypeptidmatrix standzuhalten. Ein Virus-enthaltender Überstand kann, kurz zusammengefasst, in einem Well, enthaltend immobilisiertes Polypeptid, das die Heparin II-Bindungsdomäne des Fibronektins einschließt, inkubiert werden. Das Well wird dann gründlich mit physiologischem Kochsalzpuffer gewaschen, wonach die Targetzellen an dem Virus in dem Well inkubiert werden, um den Grad der im Well verbleibenden infektiösen Aktivität zu bestimmen. Die Reduktion der infektiösen Aktivität, oder des Titers, relativ zum initialen Virusüberstand wird beurteilt und mit dem eines ähnlichen Kontrolllaufs (z. B. unter Verwendung eines mit BSA-beschichteten Wells) verglichen. Ein signifikant höherer Titer, der in dem Well, enthaltend die Heparin II-Domäne zurückbleibt, lässt im Vergleich zum Kontroll-Well erkennen, dass das gegenständliche Virus zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Aspekten geeignet ist. Zur Erleichterung dieses Screening-Verfahrens kann der Virus-Vektor ein selektierbares Markergen, wie vorstehend besprochen, enthalten.

[0038] Fibronektinfragmente zur erfindungsgemäßen Verwendung können von natürlichem oder synthetischem Ursprung sein und können in weitgehender Reinheit aus in der Natur vorkommenden Materialien, wie zum Beispiel zuvor von Ruoslahti et al. (1981) J. Biol. Chem. 256: 7277; Patel und Lodish (1986) J. Cell. Biol. 102:449; und Bernardi et al. (1987) J. Cell. Biol. 105:489, beschrieben, hergestellt werden. In dieser Hinsicht ist beabsichtigt, dass man unter Verweis hierin auf ein im Wesentlichen reines Fibronektin oder reine Fibronektinfragmente versteht, dass sie im Wesentlichen frei von anderen Proteinen sind, mit denen das Fibronektin in der Natur vorkommt. Im Wesentlichen reines Fibronektin oder reine Fibronektinfragmente zur erfindungsgemäßen Verwendung können auch rekombinant produziert werden, wie zum Beispiel im Allgemeinen in US-Patent Nr. 5198423, erteilt am 30. März 1993 an Taguchi et al. und das an die Fa. Takara Shuzo Co., Ltd., Kyoto, Japan, übertragen wurde, beschrieben wird. Insbesondere werden die in den nachstehenden Beispielen als H-271, H-296, CH-271, CH-296 und C-CS1 identifizierten rekombinanten Fragmente und Verfahren zu ihrem Erhalt, in diesem Patent '423 ausführlich beschrieben. Das in den nachstehenden Beispielen verwendete Fragment C274 wurde wie im US-Patent Nr. 5102988 beschrieben, erhalten. Diese Fragmente oder Fragmente, aus denen sie sich routinemäßig herleiten können, stehen durch das Kultivieren von E. coli, die beim Fermentation Research Institute of the Agency of Industrial Science and Technology, Japan, als FERM P-10721 (H-296), FERM BP-2799 (C-277 gebunden über Methionin an H-271), FERM BP-2800 (C-277 gebunden über Methionin an H-296) und FERM BP-2264 (H-271) hinterlegt sind, wie auch im US-Patent Nr. 5198423 beschrieben ist, zur Verfügung. Außerdem können nützliche Informationen in Bezug auf hierin verwendbare Fibronektinfragmente, oder in Bezug auf Ausgangsmaterialien für solche Fragmente wie folgt gefunden werden:

in Kimizuka et al., J. Biochem. 110, 284-291 (1991), die weiter in Bezug auf die vorstehend angemerkten Fragmente berichten; in EMBO J., 4, 1755-1759 (1985), das die Struktur des humanen Fibronektingens mitteilt; und in Biochemistry, 25, 4936-4941 (1986), das über die Heparin II-Bindungsdomäne von humanem Fibronektin berichtet. Es wurde gefunden, dass Fibronektinfragmente, die sowohl die CS-1-Zelladhäsionsdomäne als auch die Heparin II-Bindungsdomäne enthalten, wie sie zum Beispiel in einem Fragment von ca. 30 oder 35 kD (30/35 FN) und in verschiedenen rekombinanten Fragmenten, wie in den nachstehenden Beispielen berichtet, eingeschlossen sind, die Effizienz des Gentransfers in hämatopoetische Zellen in bisher durchgeführten Arbeiten signifikant fördern und zur erfindungsgemäßen Verwendung bevorzugt sind. Man sollte folglich allgemein gesprochen zur Kenntnis nehmen, dass das/die erfindungsgemäß verwendete(n) Fibronektin-bezogene(n) Polypeptid oder Polypeptide eine Aminosäuresequenz bereitstellt/bereitstellen, die die zellbindende Aktivität der CS-1-Zelladhäsionsdomäne von Fibronektin ebenso wie eine Aminosäuresequenz der Heparin II-Bindungsdomäne von Fibronektin bereitstellt, welche das Virus bindet. Der Fachmann wird erkennen, dass die notwendigen zell- und virusbindenden Aktivitäten sowohl von den nativen Aminosäuresequenzen dieser funktionellen Fibronektindomänen bereitgestellt werden können als auch durch Aminosäuresequenzen, die sich von den nativen Sequenzen unterscheiden, aber dennoch ausreichend ähnlich sind, um die zell- und virusbindenden Aktivitäten aufzuweisen. Diese ähnlichen Aminosäuresequenzen weisen eine weitgehende Sequenzhomologie zu ihren entsprechenden nativen Sequenzen auf und können die einschließen, in denen die Aminosäuren deletiert, substituiert und/oder modifiziert wurden, während sie dennoch eine Aminosäuresequenz mit dem gewünschten zell- oder virusbindenden Merkmal bereitstellen.

[0039] In dieser Hinsicht ist der pertinente Stand der Biotechnologie fortgeschritten auf einen Stand, in dem die Deletion, Substitution, Addition oder andere Modifikation der Aminosäuren in den gegenständlichen funktionellen Domänen routinemäßig durchgeführt werden kann. Die sich ergebenden Aminosäuresequenzen können dann routinemäßig auf die gewünschte zellbindende oder virusbindende Aktivität durchsucht werden. So können zum Beispiel die virusbindende Aktivität von mutanten oder modifizierten Formen der Heparin II-Bindungsdomäne von Fibronektin durchsucht werden, wie im Allgemeinen vorstehend und spezifischer nachstehend in den Beispielen 8 und 9, unter Verwendung der Virusinkubation, des Waschens und der Virustiter-Assays zur Bestimmung der Beibehaltung der Infektiosität im Vergleich zu einer Kontrolle besprochen wurde. Unter Berücksichtigung der hierin bereitgestellten Lehren stellen diese Bindungsassays für den Fachmann lediglich Routineexperimente dar.

[0040] Die Zellbindung an modifizierte oder mutante Formen der CS-1-Zelladhäsionsdomäne von Fibronektin oder an andere zellbindende Polypeptide kann gleichermaßen unter Verwendung üblicher Verfahren bestimmt werden. Solche Verfahren schließen zum Beispiel die ein, die in Nature 352: 438-441 (1991), beschrieben sind. Das zellbindende Polypeptid wird, kurz zusammengefasst, zur Beschichtung von Kunststoffschalen verwendet und die zu bestimmende Zellpopulation wird 30 Minuten bis 2 Stunden in Medium überschichtet. Nach dieser Inkubationsperiode wurden nicht am Protein adhärente Zellen gewonnen, gezählt und auf Lebensfähigkeit getestet. Am Polypeptid adhärente Zellen werden auch unter Verwendung von Trypsin oder Zelldissoziationspuffer (z. B. Gibco) gewonnen, gezahlt und auf Lebensfähigkeit getestet. In einigen Fällen, wie zum Beispiel für hämatopoetische kolonienbildende Zellen, wurden die Zellen weiter zusätzliche 12 bis 14 Tage kultiviert, um die kolonienbildenden Merkmale der Zellen zu ermitteln. Der prozentuale Anteil der adhärenten Zellen wird dann berechnet und mit einer Standardkontrolle, wie zum Beispiel mit bovinem Serumalbumin (BSA) beschichteten Kunststoffplatten, verglichen. Eine erhebliche Bindung der Targetzellen an das getestete Polypeptid stellt einen Hinweis dafür bereit, dass die Kombination von Polypeptid/Zelle erfindungsgemäß geeignet ist, und das Polypeptid kann an das retrovirale Bindungsfragment aus Fibronektin zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Konstrukts zur Förderung der Infektion der Targetzellen durch den Virus-Vektor gekoppelt werden.

[0041] Gemäß den spezifischeren erfindungsgemäßen Aspekten umfasst das virusbindende Polypeptid, das zur Förderung der Transduktion durch retrovirale Vektoren verwendet wird, Folgendes: (i) eine erste Aminosäuresequenz, die dem Ala^{1690} – Thr^{1960} der Heparin II-Bindungsdomäne des humanen Fibronektins entspricht, die durch die Formel (SEQ ID NO: 1) wie folgt dargestellt ist:

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser
Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val
Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala
Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr
Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln
Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val
Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu
Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro
Ile Gln Arg Thr Ile Sys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln
Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg
Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn
Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro
Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Sys Pro Gly Sev Pro
Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys
Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr;

oder eine ausreichend ähnliche Aminosäuresequenz dazu, um die Fähigkeit zur Bindung des Retrovirus aufzuweisen;
und (ii) eine zweite Aminosäuresequenz, die einem Anteil der IIICS-Bindungsdomäne des humanen Fibronektins (der CS-1-Zellbindungsdomäne) entspricht; die durch die folgende Formel (SEQ ID NO: 2) dargestellt ist:
Asp Glu Leu Pro Gin Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr;
oder eine ausreichend ähnliche Aminosäuresequenz dazu, um die Fähigkeit zur Bindung hämatopoetischer Zellen, wie zum Beispiel primitiver Vorläufer- und/oder langzeitig sich wieder ansiedelnder (Stamm-)Zellen, aufzuweisen.

[0042] Man sollte, wie zuvor erwähnt, zur Kenntnis nehmen, dass bestimmte Modifikationen und/oder Mutationen dieser nativen Sequenzen im Rahmen der erfindungsgemäßen praktischen Ausführung möglich sind, so lange die sich ergebende Aminosäuresequenz eine ausreichende Ähnlichkeit mit der nativen Sequenz hat, um ihre Fähigkeit zur Bindung des Virus (im Fall der Heparin II-Bindungsdomäne) und die Fähigkeit zur Bindung der Targetzellen (im Fall der CS-1-Domäne) aufzuweisen.

[0043] Ein erfindungsgemäßer Aspekt stellt ein Verfahren zur somatischen Gentherapie bereit, das die in vitro-Zelltherapie und sich anschließende Transplantation von Targetzellen in einen Wirt beinhaltet, das auch als „Engraftment" des Wirts mit den transduzierten Targetzellen bekannt ist. Hämatopoetische oder andere Zellen können aus einer humanen Quelle oder anderen Säugetierquelle unter Verwendung von Standardprotokollen gesammelt werden. Die hämatopoetischen Zellen können zum Beispiel aus dem Knochenmark oder dem peripheren Blut eines humanen Donors oder aus dem humanen fetalen Nabelschnurblut gesammelt werden. Sobald sie gesammelt sind, können die hämatopoetischen Zellen optional mithilfe von Standardverfahren zu ihrer Anreicherung in Stammzellen und/oder primitiven Vorläuferzellen behandelt werden. Die hämatopoetischen Zellen können dann auf geeignete Weise, zum Beispiel auf Gewebekulturplatten, inkubiert werden. Während dieser Periode können optional Adhärenznegative, mononukleäre Zellen von niederer Dichte vor der retroviralen Infektion vorstimuliert werden. Die wie im Stand der Technik bekannte und wie hierin verwendete Vorstimulierung verweist auf das Verfahren der Exposition der Zellen gegenüber wachstumsstimulierenden Faktoren vor der Exposition gegenüber Retroviren. Es hat sich erwiesen, dass eine derartige Vorstimulierung zur Verbesserung der Transduktion hämatopoetischer Zellen durch Retroviren führt.

[0044] Im Anschluss an die Vorstimulierung können die Zellen, wie hierin beschrieben, geerntet und mit Fibronektin oder Fragmenten davon, welche die Frequenz der Zelltransduktion durch Retroviren fördern, inkubiert werden. Die Zellen werden bevorzugt mit gereinigtem und/oder unlöslichem, z. B. immobilisiertem Fibronektin

oder Fibronektinfragmenten, inkubiert. Die Zellen können dann mit dem rekombinanten Virus, zum Beispiel einem Retrovirus, das ein Gen zum Korrigieren eines Enzyms oder eines anderen Proteinmangels oder einer anderen Anomalie in den Zellen enthält, in Anwesenheit einer Fibronektin- oder Fibronektinfragmentmenge, die bei der Steigerung der Transduktionsfrequenz der Zellen durch das Virus wirksam ist, infiziert werden. Die sich ergebenden transduzierten hämatopoetischen Zellen können dann wie üblich eingeführt werden, z. B. intravenös, in einen tierischen Zelltransplantatempfänger, bevorzugt einen autologen Donor, aber auch einschließlich allogener Transplantate, die Letzteren insbesondere dort, wo Zellen aus dem Nabelschnurblut für das Transplantat wie nachstehend besprochen verwendet werden.

[0045] Erfindungsgemäße Verfahren können in der Genmarkierung oder in Gentherapieprotokollen für viele verschiedene Erkrankungen, einschließlich Knochenmarkerkrankungen, einschließlich zum Beispiel Krebserkrankungen, Leukämien, Erkrankungen, an denen Proteinmangel oder -anomalien beteiligt sind, und Therapien zum Modifizieren hämatopoetischer Zellen zur Verbesserung der Resistenz gegen andere therapeutische Protokolle, wie zum Beispiel Chemotherapie, verwendet werden. Repräsentative Erkrankungen, bei denen die Erfindung eingesetzt werden kann, schließen folglich einen ADA-Mangel, wie z. B. SCID mit ADA-Mangel, die pädiatrische akute myeloische Leukämie, Neuroblastom und die AML bei Erwachsenen und die akute lymphatische Leukämie (ALL) ein.

[0046] In einer besonders bevorzugten erfindungsgemäßen Ausführungsform werden die für eine Zelltransplantation verwendeten Zellen aus dem humanen Nabelschnurblut erhalten. Das humane Nabelschnurblut kann folglich gesammelt und in lebensfähigen primitiven hämatopoetischen Vorläufer- und/oder Stammzellen, zum Beispiel durch Erhalt einer Adhärenz-negativen, mononukleären Zellpopulation von niederer Dichte, angereichert werden. Diese Population wird dann optional vorstimuliert und in Anwesenheit eines retroviralen Vektors und immobilisierten und/oder gereinigten Fibronektins oder von Fibronektinfragmenten zur Förderung der Transduktionseffizienz der Zellen durch den Vektor inkubiert. Es wurde in dieser Hinsicht gefunden, dass die Transduktion der primitiven hämatopoetischen Zellen und/oder Stammzellen aus dem Nabelschnurblut größtenteils in Anwesenheit des Fibronektins oder der Fibronektinfragmente gefördert wird, obwohl Fibronektin keinen Teil der ECM in Nabelschnurblut ausmacht und obwohl primitive Vorläufer- und Stammzellen aus dem Nabelschnurblut als sich von denen aus dem Knochenmark unterscheidend charakterisiert wurden. Die Stammzellen im Nabelschnurblut wurden insbesondere als $CD34^+$, $HLA\text{-}DR^+$ charakterisiert, wohingegen die Stammzellen aus dem Knochenmark als $CD34^+$, $HLA\text{-}DR^-$ charakterisiert wurden. Die Entdeckung der Anmelder, dass primitive Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut wirksam auf eine verbesserte Weise in Anwesenheit des Fibronektins oder der Fibronektinfragmente transduziert werden können, ermöglicht die Verwendung einer zweckmäßigen und stark mit Stammzellen angereicherten Quelle von hämatopoetischen Zellen. Außerdem macht die Evidenz eines erfolgreichen Engraftments von zahlreichen Patienten mit allogenen Transplantaten aus mit primitiven Vorläufer- und Stammzellen angereichertem Nabelschnurblut, das Nabelschnurblut zu einer hoch bevorzugten Quelle für hämatopoetische Zellen. Siehe Kohli-Kummer et al., Brit. Haematol. 85:419-422 (1993); Broxmeyer et al., Blood Cell 17:313-329 (1991); Gluckman et al., Br. J. Haematol. 45:557 (1980); Heidelberg: Springer-Verlag, S. 60-68 (1989); Wagner et al., Blood 79:1874-1881 (1992); und Wagner et al. Blood 82-86a (Abstract).

[0047] Gegebenenfalls können die geernteten transduzierten hämatopoetischen oder anderen Zellen auf Transduktionseffizienz und Genexpression getestet werden. So werden zum Beispiel die signifikanten Verbesserungen des erfindungsgemäß bereitgestellten Retrovirus-vermittelten Gentransfers in den nachstehenden spezifischen Beispielen nachgewiesen, die mehrere Tests beschreiben, die eine hohe Infektions- und Gentransfereffizienz durch Retroviren in Anwesenheit von Fibronektin oder wirksamen Fibronektinfragmenten nachweisen. Insbesondere exprimierten mit dem PGK-hADA-Retrovirus infizierte murine hämatopoetische Zellen hohe Spiegel der transferierten ADA-cDNA. Auf ähnliche Weise exprimierte das mit humanen Vorläuferkolonien infizierte individuelle PGK-mADA-Virus murine ADA-Spiegel, die um das 10fache höher waren als das endogene humane ADA-Protein. Zur stringenten Analyse der Transfereffizienz wurden Vorläuferkolonien nur als transduziert erachtet, wenn die Expression der transferierten mADA gleich oder größer als die endogenen humanen ADA-Spiegel waren. Hohe Expressionsspiegel von neo aus dem TKNEO-Vektor wurden mittels der G418-Arzneimittelresistenz, als ein Assay auf die Aktivität der Neo-Phosphotransferase (des neo-Genprodukts) nachgewiesen.

[0048] Erfindungsgemäße Verfahren werden, wie vorstehend angegeben, ohne die Notwendigkeit zur Cokultivierung in Anwesenheit von retroviralen Producerzellen, vorteilhaft durchgeführt. Gemäß einem erfindungsgemäßen Aspekt kann der retroviral-vermittelte Gentransfer folglich in der weitgehenden Abwesenheit von Zellen mit Ausnahme der hämatopoetischen Targetzellen oder anderen Zellen durchgeführt werden. Producerzellen, die zum Beispiel das retrovirale Vektorplasmid enthalten, können kultiviert und der Überstand gesammelt

werden. Der Retrovirus-enthaltende Überstand kann dann zum Infizieren der hämatopoetischen Zellen in Anwesenheit des Fibronektins und/oder der Fibronektinfragmente, die sich bevorzugt in immobilisierter Form, z. B. beschichtet auf ein Substrat, auf dem die Infektion durchgeführt wird oder sich anderweitig in Kontakt mit dem Medium zur Infektion befinden, verwendet werden. In dieser Hinsicht werden jedwede Producerzellen, die Helfer-freie Retroviren mit hohen Titern produzieren, als geeignet zur erfindungsgemäßen Verwendung in Betracht gezogen. Diese schließen zum Beispiel Verpackungszellen, wie zum Beispiel Psi-2, C2, PA12, PA317 und GP+envAM12 ebenso wie viele andere im Stand der Technik bekannte Verpackungszelllinien ein.

[0049] Gemäß den anderen erfindungsgemäßen Merkmalen kann die starke Virusbindung an Aminosäuren in der Heparin II-Bindungsdomäne von Fibronektin zur Konstruktion von Abgabesystemen für die Virustherapie über eine breite Reihe von Zelltypen verwendet werden. Um dies zu erreichen, kann ein Polypeptid, das die Retrovirus-Bindungsdomäne von Fibronektin einschließt, an jedweden Liganden, der diesem Konstrukt Spezifität für die Targetzellen verleiht, kovalent gekoppelt werden. Dieser Ansatz umgeht die vorherige Notwendigkeit zur Konstruktion spezifischer Retrovirus-Zelllinien für jede Targetzelle (Kasahara, N., A. M. Dozy und Y. W. Kan, Science, Vol. 266, S. 1373-1376 (1994) und Valsesia-Wittmann, S., A. Drynda, G. Deleage, M. Aumailley, J. M. Heard, O. Danos, G. Verdier und F. L. Cosset, J. Virol., Vol. 68, S. 4609-4619 (1994)). Die Spezifität des Targetkonstrukts kann durch den Einsatz von Liganden, einschließlich zum Beispiel 1) zelladhäsives Protein, 2) Hormone oder Cytokine, 3) monoklonale Antikörper gegen die Targetzellen, 4) Kohlenhydrate, welche die Targetzellen binden (G. Ashwell, et al., Annu. Rev. Biochem., Vol. 51, S. 531-554 (1982)), 5) Metaboliten für die Targetzellen oder 6) funktionelle Polypeptide, welche die Targetzellen binden, bereitgestellt werden. Die Effizienz des Konstrukts für die Genabgabe kann durch Einschluss mehrerer Heparin II-Virus-Bindungsdomänen verbessert werden und deshalb die Menge der Viruspartikel steigern, die an die Targetzellen abgegeben werden. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass die Zellbindungsdomäne von humanem Fibronektin, das Pro^{1239} – Ser^{1515}, wie in US-Patent Nr. 5198423 beschrieben ist, entspricht, an Zellen, einschließlich BHK- und B16-F10-Zellen, bindet (Kimizuka et al., J. Biochem. Vol. 110, S. 285-291 (1991)). Außerdem wurde gezeigt, dass die Heparin II-Domäne selbst an Fibroblasten, Endothelzellen und Tumorzellen bindet. Diese Polypeptidsequenzen können an die Retrovirus-Bindungsdomäne von Fibronektin gekoppelt werden, um prädeterminierte Zellen zur Infektion durch das Retrovirus zu targetieren.

[0050] Beispielhafte Applikationen im hämatopoetischen System schließen auch ein Konstrukt von Erythropoetin oder G-CSF, gekoppelt an die Retrovirus-Bindungsdomäne von Fibronektin zum Targeting hoch spezifischer erythrozytärer bzw. granulozytärer Präkursorzellen ein. Ein andere allgemeine erfindungsgemäße Applikation besteht in der Kombination der Retrovirus-Bindungsdomäne oder -domänen mit einem Liganden, der spezifisch oder vorwiegend an maligne Zellen bindet. Es wurde zum Beispiel gezeigt, dass in vitro und selbst in vivo das Wachstum von Mammakarzinomzellen durch den Einsatz von Substanzen beeinflusst werden kann, die an Rezeptoren auf den Targetzellen wie Luteinisierungshormon ausschüttende Derivate, Emons, G. et al., Hum. Reprod. 9:1364-1379 (1994), Estrogene, Tolcher, A. W., Oncol. 8:39-43 (1994), oder Antiestrogene, Howell, A. et al., Lancet 345:29-30 (1995), Progestogene oder Antiprogestogene, Klijn, F. G. et al., Hum. Reprod 9 Suppl. 1:181-189 (1994); Griffiths, K. et al., Semin. Oncol. 21:672-687 (1994) binden, die als Liganden in erfindungsgemäßen Konstrukten, enthaltend eine oder mehr Virus-Bindungsomäne(n) aus Fibronektin, dienen. Als weitere Beispiele können gegebenenfalls Schilddrüsen(krebs)zellen unter Verwendung von Konstrukten mit Iodid hoch spezifisch targetiert werden und Leber(krebs)zellen können mithilfe von Konstrukten, die HDL oder Teile davon enthalten, targetiert werden. Konstrukte aus monoklonalen Antikörpern und die Retrovirus-Bindungsdomäne von Fibronektin ermöglichen schließlich das Targeting von jedweder Zelle und jedwedem Organ gegen die ein Antikörper zur Verfügung steht. Eine breite Reihe von Säugerzelltypen sind folglich durch Kapitalisierung aus der Fähigkeit der Retrovirus-Bindungsdomäne von Fibronektin zur Bindung und Lokalisierung von Virus-Vektoren targetierbar.

[0051] Demgemäß beinhaltet eine andere bevorzugte erfindungsgemäße Ausführungsform die Herstellung eines Konstrukts, das zur Förderung der viralen Transduktion einer Targetzelle verwendet werden kann. Die virusbindende Aminosäuresequenz der Heparin H-Bindungsdomäne von Fibronektin wird an einen Liganden gekoppelt, an den die Targetzelle bindet. Wie vorstehend besprochen wird, kann der Ligand zum Beispiel ein Polypeptid aus Fibronektin oder aus einem anderen Protein (einschließlich eines zelladhäsiven Proteins, zum Beispiel Laminin, Kollagen, Vitronektin, Osteopontin oder Thrombospondin), einem Hormon, einem Metaboliten, einem Antikörper (einschließlich monoklonaler Antikörper) oder jedweden anderen Liganden darstellen, der die Kapazität aufweist, bevorzugt mit Spezifität, an die Targetzelle zu binden. Das sich ergebende Gesamtkonstrukt kann in der immobilisierten Form auf eine Weise verwendet werden, die der ähnlich ist, die für die in den nachstehenden Beispielen spezifisch erläuterten Fibronektin-Polypeptide verwendet wird.

[0052] Solche Konstrukte und Zelltargeting-Ansätze können, wie vorstehend besprochen, in vitro und auch

beim in vivo Targeting von Retroviren verwendet werden, wobei die verschiedenen Faktoren, wie zum Beispiel die Stabilität und Spezifität des Konstrukts und die Interaktion des Retroviruskonstrukts unter physiologischen Bedingungen berücksichtigt werden müssen. Die Spezifität kann auch durch das Modifizieren des Abgabesystems zum Lokalisieren der Abgabe des Konstrukts an die Targetzellen, zum Beispiel durch Katheterisieren der Portalvene zum Targeting der Leberzellen, verbessert werden.

[0053] Es wird in Betracht gezogen, dass der hoch zweckmäßige retroviral-vermittelte DNA-Transfer unter Verwendung von Kits durchgeführt wird, die speziell zur praktischen Ausführung erfindungsgemäßer Verfahren bestimmt sind. Demgemäß stellt ein anderer erfindungsgemäßer Aspekt Kits bereit, die eine Menge des im Wesentlichen reinen Polypeptids oder Konstrukts wie vorstehend besprochen einschließt, das die Transduktion von Targetzellen durch Retroviren fördert, zusammen mit einem artifiziellen Substrat, auf dem die retrovirale Infektion durchgeführt werden kann. Das Polypeptid oder ein anderes Konstrukt kann getrennt bereitgestellt werden oder auf das artifizielle Substrat beschichtet werden. Im Fall von Infektionsprotokollen für humane hämatopoetische Zellen schließen die Kits auch hämatopoetische Zellwachstumsfaktoren zur Vorstimulierung der Zellen ein. Die Kits können außerdem die rekombinanten Retrovirusvektoren, wie vorstehend besprochen, für die Transduktion einschließen. Allgemein gesprochen schließen die Kits eine sterile Verpackung ein, welche diese verschiedenen Kitkomponenten in räumlicher Beziehung voneinander ausreichend sicher festhält, um das Zerbrechen der Komponenten während der Handhabung des Kits zu verhindern. Es ist zum Beispiel allgemein üblich, geformte Kunststoffartikel mit mehrfachen Kompartimenten oder Bereichen zum Halten der Kit-Komponenten in räumlicher Beziehung zueinander zu verwenden.

[0054] Zur Förderung des weiteren Verständnisses und der Anerkennung der Erfindung werden die folgenden spezifischen Beispiele bereitgestellt. Man sollte zur Kenntnis nehmen, dass diese Beispiele in ihrer Beschaffenheit erläuternd und nicht einschränkend sind.

BEISPIEL 1

GENTRANSFER IN KNOCHENMARKZELLEN UNTER VERWENDUNG VON TKNEO

1.1. HERSTELLUNG VON VIRUSÜBERSTAND

[0055] GP+EnvAM 12-Producerzellen (siehe Markowitz et al. (1988) Virology 167:400), enthaltend den auf einem Plasmid basierenden retroviralen TKNEO-Vektor wurden in Iscove's modifiziertem Dulbecco-Medium (IMDM, Gibco, Gaithersburg, MD), enthaltend 10 % fetales Kalbserum (FCS, Hyclone, Logan, UT) und 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (P/S, beide von Gibco), kultiviert. Ein Virus enthaltender Überstand wurde durch Zufügen von 10 ml IMDM, enthaltend 20 % FCS, zu konfluierenden Platten, über Nacht gesammelt. Das geerntete Medium wurde durch Filter von 0,45 µm (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) filtriert und bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert.

1.2. HERSTELLUNG VON FIBRONEKTINFRAGMENTEN

[0056] FN wurde, wie zuvor in Ruoslahti et al., Methods Enzymol. 82:803-831 (1982) beschrieben, aus humanem Plasma (Lifesource, Glenview, IL) gereinigt, außer dass die Gelatine-Agarose-Säule vor der Elution von FN mit 4 M Harnstoff mit 1 M Harnstoff gewaschen wurde. Gereinigtes FN wurde bei 4°C gegen 10 mM 3-(Cyclohexylamino)-1-propan-sulfonsäure (CAPS), 150 mM NaCl, 2 mM $CaCl_2$, pH 11,0, gründlich dialysiert und in Aliquoten bei –80°C gelagert. Die chymotryptische Zellbindungsdomäne (CBD) (CS-1) und Heparin-II-bindende Fragmente von FN wurden wie zuvor beschrieben gereinigt (Ruoslahti et al. (1982), vorstehend, Patel und Lodish, J. Cell. Biol. 102, S. 449-456 (1986) und Bernardi et al., J. Cell. Biol. 105, S. 489-498 (1987). Drei bedeutende Heparin-Bindungsfragmente (30 kD, 35 kD und 42 kD) wurden im Eluat von 1 M NaCl aus der Heparin-Agarose-Säule erhalten. Zur weiteren Reinigung dieser Heparin-Bindungsfragmente wurde das Eluat von 1 M NaCl über Nacht bei 4°C gegen 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, dialysiert und über eine Anionenaustauschsäule laufen lassen (2 ml DEAE-Sepharose-Schnellfluss (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden)/mg Protein), die mit 10 mM Tris-HCl, pH 7,0, äquilibriert wurde. Die Fragmente von 30/35kD wurden in der ungebundenen Fraktion gesammelt, während das Fragment von 42 kD mit 100 mM NaCl aus der Säule eluiert wurde. Von 500 mg FN wurden ca. 26 mg der Fragmente von 30/35 kD und 4 mg des Fragments von 42 kD erhalten. Das Fragment von 42 kD, aber nicht die Fragmente von 30/35kD, wurden von einem Antikörper gegen die Fibrin-Bindungsdomäne erkannt, wie anhand des Western Blotting-Verfahrens bestimmt wurde. Das Fragment von 42 kD bindet auch an eine Fibrin-Sepharose-Affinitätssäule.

[0057] Zur Verwendung im Infektionsprotokoll wurden die Fibronektinfragmente auf Petrischalen von 35 oder

100 mm (Falcon, Lincoln Park, NJ) bei einer Konzentration von 75 pmol/cm^2, wie von Patel und Lodish (1986) vorstehend beschrieben wurde, immobilisiert. Die Kontrollplatten wurden auf analoge Weise mit 2 %igem (FN-freiem) bovinem Serumalbumin (BSA, Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland) beschichtet.

1.3. RETROVIRALES INFEKTIONSPROTOKOLL

[0058] Knochenmarkproben von gesunden adulten Donoren wurden gemäß den vom Institutional Review Board of Indiana University School of Medicine zugelassenen Protokollen in Röhrchen gesammelt, die steriles, Konservierungsmittel-freies Heparinsulfat enthielten. Mononukleäre Zellen von niederer Dichte wurden mittels der Ficoll-Hypaque-Zentrifugation (Dichte 1,077 g/ml, Pharmacia, Piscataway, NJ) 45 Minuten bei 25°C hergestellt. Die am Kunststoff adhärenten Zellen wurden von Knochenmarkzellen niederer Dichte durch eine zusätzliche Inkubation auf Gewebekulturplatten 4 bis 16 Stunden bei 37°C in 5 % CO_2 in IMDM mit 2 % FCS entfernt.

[0059] Adhärenz-negative mononukleäre Zellen niederer Dichte wurden vor der retroviralen Infektion wie zuvor von Luskey et al. (1992) Blood 80:396, beschrieben, 48 Stunden bei 37°C und 5 % CO_2 in IMDM, enthaltend 20 % FCS, 100 U/ml rhIL-6, 100 ng/ml rhSCF (beide von Amgen, Thousand Oaks, CA) und P/S bei einer Zelldichte von 1 × 10^6 Zellen/ml in Petrischalen vorstimuliert. Vorstimulierte Zellen wurden durch kräftiges Pipettieren zur Entfernung der lose am Kunststoff adhärenten Zellen geerntet.

[0060] Vorstimulierte Zellen (5 × 10^5 Zellen/ml) wurden 6 Stunden auf mit BSA beschichteten Platten (Kontrollplatten) oder Fibronektin oder Fragmenten davon inkubiert (zur besseren Adhärenz der Proteine an der Kunststoffplatte der UV-Strahlung ausgesetzt) und dann mit dem Virusüberstand in Anwesenheit von Wachstumsfaktoren (wie vorstehend) und 7,5 µg/ml Polybren (Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI) infiziert. Der Virusüberstand wurde nach 2 Stunden (einschließlich Wachstumsfaktoren und 5,0 µg/ml Polybren) ausgetauscht und die Zellen wurden zusätzliche 12 bis 24 Stunden inkubiert. Nicht adhärente Zellen wurden mit jedem Mediumwechsel wieder zugefügt.

[0061] Unter Befolgung des Infektionsprotokolls wurden nicht adhärente Zellen dekantiert und adhärente hämatopoetische Zellen wurden aus den Kulturen unter Verwendung von Zelldissoziationspuffer (Cell Dissociation Buffer (CDB)) (Enzym-frei/auf PBS basierend, Gibco) nach Anleitung des Herstellers gesammelt. Die adhärenten Zellen wurden der nicht adhärenten Fraktion zugefügt, zweimal gewaschen und gezählt. Die geernteten Zellen wurden entweder in Methylcellulose-Assays auf klonogene Vorläuferzellen oder für Langzeit-Knochenmarkkulturen ausplattiert.

1.4. LANGZEIT-KNOCHENMARKKULTUREN

[0062] LTC-IC-Assays (humane Stammzellen) wurden gemäß den zuvor beschriebenen Verfahren mit geringgradigen Modifikationen durchgeführt, Sutherland et al. Blood 74:1563 (1989). Es wurden, kurz zusammengefasst, 0,5-1 × 10^6 infizierte Zellen in Langzeit-Knochenmarkkulturen (LTMC) auf konfluierenden, vorbestrahlten (wie vorstehend) allogenen humanen Knochenmarkfibroblasten (BMF) in 5 ml IMDM, enthaltend 10 % FCS, 10 % Pferdeserum (Sigma) und P/S, 1 × 10^{-5} M Hydrocortison (Upjohn, Kalamazoo, MI) und 320 mosmol Natriumchlorid in 6 Well-Gewebekulturplatten (Costar, Cambridge, MA) geimpft. Die LTMC wurden bei 33°C in 5 % CO_2 inkubiert und wöchentlich durch Entfernen von 50 % des Mediums und nicht adhärenten Zellen „gefüttert". Nach fünf Wochen wurden die LTC-IC-Kulturen unter Verwendung von CDB zur Entfernung adhärenter hämatopoetischer Zellen aus BMF geopfert. Sowohl nicht adhärente als auch adhärente hämatopoetische Zellen wurden kombiniert und zum Erhalt von sich aus LTC-IC herleitenden Kolonien in Methylcellulose ausplattiert.

1.5. KLONOGENE METHYLCELLULOSE-ASSAYS

[0063] Methylcellulose-Assays wurden wie von Toksoz et al. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, Vol. 89, S. 7350 (1992) zuvor beschrieben, mit geringfügigen Modifikationen durchgeführt. Es wurden, kurz zusammengefasst, 2-5 × 10^4 infizierte adulte Knochenmarkzellen mit 5 Einheiten/ml Erythropoetin (Epo, Amgen), 100 ng/ml rhSCF, 10 ng/ml rhIL-3 (Genzyme, Cambridge, MA) in 1 ml 2,4 %iger IMDM-Methylcellulose (Fluka, Ronkonkoma, NY), enthaltend 25 % FCS, 10 % humanes Plasma, 10^{-5} M β-Mercaptoethanol (Sigma) und P/S ausplattiert. Die Kulturen wurden bei 37°C in 5 % CO_2/95 % Luft inkubiert, und die Kolonien (> 50 Zellen) wurden am Tag 13 durch Ansehen unter einem invertierten Mikroskop als CFU-GM (enthaltend Granulozyten und Makrophagen), CFU-Mix (enthaltend myeloische und erythrozytäre Elemente) oder BFU-E (enthaltend nur erythrozytäre Elemente) bewertet.

1.6. ANALYSE DER RETROVIRALEN INFEKTION

[0064] Die Effizienz der Infektion mit dem TKNEO-Virus wurde mittels Bestimmung des prozentualen Anteils von Methycellulose-Kolonien, die gegen 1,5 mg/ml G418 (Trockenpulver, Gibco) resistent waren, am Tag 13 bestimmt. In jedem Experiment wurden durch Inkubation von Knochenmark auf der GP+EnvAM 12-Verpackungslinie, Scheininfektionen durchgeführt, die kein rekombinantes Virus ergaben. Die Kultur dieser mit 1,5 mg/ml G418 scheininfizierten Zellen wies konsistent < 1 % Hintergrundkolonien auf.

1.7. GENTRANSFER-EFFIZIENZ IN DETERMINIERTEN VORLÄUFERZELLEN

[0065] Die Transduktionseffizienz wurde durch Infektion der Knochenmarkzellen verglichen, während sie auf mit 30/35-FN- oder BSA-beschichtete Platten ausplattiert wurden. Es wurde zwischen diesen Bedingungen kein Unterschied hinsichtlich der Zahl der nach der Infektion ohne Selektion erhaltenen Kolonien beobachtet. Fig. 2 weist den prozentualen Anteil der G418^r-Kolonien nach der Infektion nach. Es wurde ein höherer prozentualer Anteil von G418^r-Kolonien auf 30/35 FN von allen Vorläufertypen, einschließlich derer, die sich von Linien-restriktierten (BFU-E und CFU-GM) herleiten ebenso wie Vorläuferzellen von Multilinien (CFU-Mix) bemerkt. Die Infektion in alle determinierten Vorläuferzellen war auf 30/35-FN vs. BSA um das 9fache gesteigert.

1.8. EFFIZIENZ DES GENTRANSFERS IN LANGZEITKULTUR-INITIIERENDE ZELLEN

[0066] Der Gentransfer in LTC-IC (long-term culture initiating cells) wurde unter Verwendung des TKNEO-Vektors beurteilt. Der Gentransfer in sich von LTC-IC herleitenden Kolonien wurde nur nach der Infektion auf 30/35 FN (16 % G418^r- vs. 0 % G418^r-Kolonien, 30/35 FN vs. BSA) nachgewiesen.

1.9. SPEZIFITÄT VON 30/35 FN EFFEKTEN AUF DIE INFEKTIONSEFFIZIENZ VON HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN

[0067] Zur Bestimmung der Spezifität der gesteigerten Effizienz des auf 30/35-FN gesehenen Gentransfers wurde die Infektion mit TKNEO auf Platten durchgeführt, die mit Folgendem beschichtet waren: BSA, 30/35 FN, intaktem Fibronektin, einem FN-Fragment von 115 kD, welches die zentrale Zellbindungsdomäne (CBD) enthält, die die RGDS-Tetrapeptidsequenz enthält, und einem C-terminalen FN-Fragment von 42 kD (42 FN), das durch die Heparin II-Bindungsdomäne gekennzeichnet ist, dem aber die CS-1-Sequenz (Fig. 1) mangelt. Die Infektion auf BSA ergab 3 ± 1 % G418^r BFU-E, 1 ± 1 % G418^r CFU-GM und 0 ± 0 % G418^r CFU-MIX. An der CBD wurde keine signifikante Steigerung der Proportion von G418^r-Kolonien bemerkt, während eine geringgradig höhere Infektion von BFU-E (6,0 ± –1 %) auf 42 FN (Fig. 3) gesehen wurde. Intaktes FN förderte jedoch den gesteigerten Gentransfer in alle determinierten Vorläuferzellen. Der prozentuale Anteil der G418^r-Kolonien nach der Infektion auf intaktem FN war in allen Linien geringer als auf 30/35 FN, einschließlich BFU-E (16 ± –2 vs. 24 + 4 %), CFU-GM (5 + 2 vs. 20 + 4 %) bzw. CFU-Mix (6 ± 1 vs. 9 ± 1; intaktem FN vs. 30/35 FN).

BEISPIEL 2

GENTRANSFER IN KNOCHENMARKZELLEN UNTER VERWENDUNG VON PGK-mADA

2.1. ALLGEMEINE VERFAHREN

[0068] Der PGK-mADA-Virusüberstand wurde wie für TKNEO in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Chymotryptische Fragmente von Fibronektin (Fig. 1) wurden wie zuvor in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, und es wurde das retrovirale Infektionsprotokoll von Beispiel 1 befolgt. LTC-IC-Assays (humane Stammzellen) und Methylcellulose-Assays wurden gemäß Beispiel 1 durchgeführt.

2.2. ANALYSE DER RETROVIRALEN INFEKTION

[0069] Die Effizienz der Infektion mit dem PGK-mADA-Vektor wurde mittels der Proteinanalyse unter Verwendung der ADA-Isoenzym-Elektrophorese bestimmt. Die Analyse der individuellen Vorläuferzellkolonien wurde wie zuvor von Moritz (1993) und Lim et al. (1989) Proc. Natl. Acad Sci. USA, Vol. 86, S. 8892, beschrieben, durchgeführt. Zur stringenten Analyse der Transfereffizienz wurden nur Kolonien, die mADA bei dem gleichen Spiegel oder einem höheren Spiegel als endogene humane ADA exprimierten, als transduziert erachtet. Zur Analyse von gepoolten Kolonien, wurden von der Methylcellulose-Kultur ausgewählte Kolonien in 1,5 ml fassenden Mikroröhrchen (Rainin, Woburn, MA) kombiniert, mit warmem Medium und phosphatgepufferter Salz-

lösung (PBS) gewaschen, zentrifugiert und bei –20°C gelagert. Für die ADA-Analyse wurden die Zellen in 5 µl Lysepuffer durch wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen lysiert, und die Isoenzym-Elektrophorese wurde wie zuvor beschrieben durchgeführt.

2.3. GENTRANSFER-EFFIZIENZ IN DETERMINIERTEN VORLÄUFERZELLEN

[0070] Es wurde die Transduktionseffizienz durch Infizieren der Knochenmarkzellen verglichen, während sie auf 30/35 FN- oder BSA-beschichtete Platten ausplattiert wurden. Es wurde kein Unterschied hinsichtlich der erhaltenen Kolonienzahl nach der Infektion ohne Selektion zwischen diesen Bedingungen beobachtet. Wie in Tabelle 1 ersichtlich ist, war die Effizienz der Infektion in alle determinierten Vorläuferzellen auf 30/35 FN vs. BSA erheblich gesteigert. Wie mit dem Vektor mit hohem Titer (ca. 1×10^7 Vironen/ml) erwartet wurde, war die Transduktionseffizienz von determinierten Vorläuferzellen extrem hoch. Unter Bezugnahme auf Tabelle 1 ergab die Infektion von Knochenmark auf 30/35 FN mit PGK-mADA eine nahezu 100 %ige Transduktion von determinierten Vorläuferzellen in zwei getrennten Experimenten.

TABELLE 1

Infektionseffizienz von determinierten humanen Vorläuferzellen auf Fragmenten von Fibronektin 30/35 unter Verwendung des PGK-mADA-Vektors

EXPERIMENT	BSA	30/35FN
Experiment 1	1/18*	13/14
Experiment 2	2/13	12/13

* Anzahl von mADA-exprimierenden Kolonien/analysierten Gesamtkolonien

2.4. EFFIZIENZ DES GENTRANSFERS IN LANGZEITKULTUR-INITIIERENDE ZELLEN

[0071] In vier mit PGK-mADA durchgeführten unabhängigen Experimenten exprimierte ein signifikanter Anteil von Vorläuferzellkolonien, die sich von 5 Wochen alten LTMC (d. h. sich von LTC-IC herleitenden Kolonien) herleiteten, das transferierte murine ADA-Gen. Die Expression lag im Bereich von 2/12 (17 %) bis 6/6 (100 %) der analysierten Kolonien (Tabelle 2). Die Expression des eingeführten mADA-Gens ging über die Menge der endogenen humanen ADA-Aktivität in allen als positiv erachteten Kolonien hinaus oder war mit dieser zumindest gleich. Die Infektionseffizienz für PGK-mADA war höher als für TKNEO. Wie in Tabelle 2 ersichtlich ist, ergab die Infektion des Knochenmarks auf 30/35 FN mit PGK-mADA eine nahezu 100 %ige Transduktion von determinierten Vorläuferzellen in zwei getrennten Experimenten.

TABELLE 2

Infektionseffizienz von humanen Langzeitkultur-initiierende Zellen (LTC-IC) unter Verwendung des PGK-mADA-Vektors

EXPERIMENT	BSA	30/35FN
Experiment 1	0/14*	10/19
Experiment 2	N/A	2/12
Experiment 3	0/4	3/5
Experiment 4	0/4	6/6
Insgesamt	0/22	21/42

* Anzahl von mADA-positiven Kolonien/analysierten Gesamtkolonien; N/A: nicht analysiert

2.5. SPEZIFITÄT DER 30/35 FN-EFFEKTE AUF DIE INFEKTIONSEFFIZIENZ VON HÄMATOPOETISCHEN ZELLEN

[0072] Die Effizienz des Gentransfers in LTC-IC war auf 30/35 FN gesteigert. Auf Grund der relativ kleinen Größe dieser sich von sekundären LTC-IC herleitenden Kolonien war die Fähigkeit zur Durchführung einer Proteinanalyse an Einzelkolonien begrenzt. Nach der Infektion mit PGK-mADA auf BSA wiesen intaktes Fibronektin und sich von 42 FN 0/6, 0/4 bzw. 0/3 LTC-IC-herleitende Kolonien die Expression von muriner ADA nach, während sich von 3/5 LTC-IC-herleitende Kolonien, die auf 30/35 FN infiziert wurden, mADA exprimierten. Wenn sich von multiplen LTC-IC herleitende Kolonien außerdem vor der Analyse in zwei zusätzlichen Experimenten gepoolt wurden, wurde eine mADA-Expression nur nach der Infektion auf 30/35 FN und in einem geringeren Ausmaß auf intaktem FN, aber nicht auf 42 FN oder BSA nachgewiesen.

BEISPIEL 3

GENTRANSFER IN KNOCHENMARKZELLEN UNTER VERWENDUNG VON PGK-hADA

3.1. ALLGEMEINES VERFAHREN

[0073] Der PGK-hADA-Virusüberstand wird wie für TKNEO in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Die chymotryptischen Fragmente von Fibronektin (Fig. 1) werden wie zuvor in Beispiel 1 beschrieben hergestellt, und es wurde das retrovirale Infektionsprotokoll von Beispiel 1 befolgt. Es wurden LTC-IC- und Methylcellulose-Assays wie in Beispiel 1 beschrieben durchgeführt.

3.2. ANALYSE DER RETROVIRALEN INFEKTION

[0074] Zur Analyse gepoolter Kolonien wurden aus der Methylcellulose-Kultur ausgewählte Kolonien in 1,5 ml fassenden Mikroröhrchen (Rainin, Woburn, MA) kombiniert, mit warmem Medium und PBS gewaschen, zentrifugiert und bei –20°C gelagert. Zur ADA-Analyse werden die Zellen in 5 µl Lysepuffer durch wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen lysiert und die Isoenzym-Elektrophorese wird wie zuvor beschrieben durchgeführt.

BEISPIEL 4

GENTRANSFER IN ZELLEN AUS NABELSCHNURBLUT UNTER VERWENDUNG VON TKNEO

4.1. ALLGEMEINES VERFAHREN

[0075] Der TKNEO-Virusüberstand und die chymotryptischen Fragmente von Fibronektin (Fig. 1) wurden wie zuvor in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Es wurde das retrovirale Infektionsprotokoll in Beispiel 1 befolgt, außer dass Nabelschnurblut aus gesunden, termingerechten Neugeborenen in heparinisierten Röhrchen gemäß den vom Institutional Review Board of Indiana University School of Medicine zugelassenen Protokollen gesammelt und anstelle der Knochenmarkzellen verwendet wurde. LTC-IC- (humane Stammzellen) und Methylcellulose-Assays wurden gemäß Beispiel 1 durchgeführt.

4.2. EFFIZIENZ DES GENTRANSFERS IN DETERMINIERTE VORLAUFERZELLEN

[0076] Die Infektion auf FN 30/35 war in drei getrennten Experimenten im Vergleich zu BSA um mehr als das Vierfache gesteigert (Tabelle 3).

TABELLE 3	
Infektionseffizienz von Vorläuferzellen aus dem Nabelschnurblut unter Verwendung des 30/35 FN-Fragments und TKNEO-Vektors	
BSA	12 ± 17
30/35	55 ± 16

BEISPIEL 5

GENTRANSFER IN ZELLEN AUS DEM NABELSCHNURBLUT UNTER VERWENDUNG VON PGK-mADA

5.1. ALLGEMEINES VERFAHREN

[0077] Der PGK-mADA-Virusüberstand und chymotryptische Fragmente von Fibronektin (Fig. 1) wurden wie zuvor in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Das retrovirale Infektionsprotokoll in Beispiel 1 wurde befolgt, außer dass Nabelschnurblut aus gesunden, termingerechten Neugeborenen gemäß den vom Institutional Review Board of Indiana University School of Medicine zugelassenen Protokollen in heparinisierten Röhrchen gesammelt wurde. Die LTC-IC- und Methylcellulose-Assays wurden gemäß Beispiel 1 durchgeführt.

5.2. EFFIZIENZ DES GENTRANSFERS IN LANGZEITKULTUR-INITIIERENDE ZELLEN

[0078] Unter Verwendung des PGK-mADA-Vektors mit höherem Titer wies die Analyse von sich von LTC-IC herleitenden Kolonien eine hochgradige Expression der eingeführten mADA-cDNA nur auf Kulturen nach, die aus Nabelschnurblut, das unter Verwendung des Überstands auf FN 30/35 infiziert wurde, etabliert wurden. Es

wurde wenig Expression von mADA in sich von LTC-IC herleitenden Kolonien, die in BASA-Kontrollplatten infiziert wurden, nachgewiesen.

[0079] Die in Beispielen 4 und 5 gezeigten Ergebnisse weisen nach, dass eine verbesserte Infektionseffizienz unter Verwendung von FN30/35 auch erreicht werden kann, wenn Vorläufer- und Stammzellen am dem Nabelschnurblut verwendet werden.

BEISPIEL 6

GENTRANSFER IN ZELLEN AUS DEM NABELSCHNURBLUT UNTER VERWENDUNG VON PGK-hADA

[0080] Der PGK-hADA-Virusüberstand und chymotryptische Fragmente von Fibronektin (Fig. 1) werden wie für TKNEO in Beispiel 1 beschrieben hergestellt. Das retrovirale Infektionsprotokoll in Beispiel 1 wird befolgt, außer dass Nabelschnurblut aus gesunden, termingerechten Neugeborenen gemäß den vom Institutional Review Board of Indiana University School of Medicine zugelassenen Protokollen in heparinisierten Röhrchen gesammelt und anstelle der Knochenmarkzellen verwendet wird. Es wurden LTC-IC- und Methylcellulose-Assays gemäß Beispiel 1 durchgeführt.

BEISPIELE 7-11

RETROVIRALE VEKTOREN UND PRODUCERZELLLINIEN FÜR BEISPIELE 7-11

[0081] Für die Beispiele 7-11 wurden zwei Retrovirus-produzierende Verpackungszelllinien eingesetzt: die ekotropen GP + E86- (Markowitz, D., S. Goff und A. Bank, J. Virol., Vol. 62, S. 1120-1124 (1988)) bzw. die amphotropen GP+envAM12-Zelllinien (Markowitz, D., S. Goff und A. Bank, Virology, Vol. 167, S. 400-406 (1988)). Die in den hier beschriebenen Studien verwendeten retroviralen Vektoren und Producer-Klone sind in Tabelle 4 ersichtlich.

TABELLE 4

VEKTOR	PRODUCER/KLON	EXPRIMIERTE cDNA
PGK-hADA	GP+E86/EPHA-5	humane ADA
PM5neo	GP+E86/EAL2a	Neo-Phosphotransferase, LAC-Z
TKNeo	GP+E86/TKNeo	Neo-Phosphotransferase
PGK-mADA	GP+EnvAM12/55/6	murine ADA

[0082] Alle Zelllinien wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagles-Medium (DME, Gibco, Grand Island, NY), enthaltend 10 % fetales Kalbserum (FCS, Hyclone, Logan, UT) und 100 Einheiten/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (P/S, beide von Gibco) kultiviert, außer für EAL2a-Zellen, die in DME-F12 (Gibco) mit 10 % FCS plus P/S gezüchtet wurden. Der das Virus enthaltende Überstand wurde durch Zufügen von 10 ml von alpha-minimalem essenziellem Medium (αMEM, Gibco) für murine Zellen oder Iscove's Dulbecco-Medium (IMDM, Gibco) für humane Zellen, die jeweils 10 % FCS plus P/S enthalten, zu 10 cm messenden konfluierenden Platten über Nacht, gesammelt. Das geerntete Medium wurde durch Filter von 0,45 µm (Gelman Sciences, Ann Arbor, MI) filtriert und bis zum Gebrauch bei –80°C gelagert.

BEISPIEL 7

TRANSDUKTION PRIMÄRER MURINER HÄMATOPOETISCHER ZELLEN

7.1. EXPERIMENTELL

[0083] Für Studien mit murinen Zellen wurde Knochenmark aus den Femora und den Tibiae von 6 bis 8 Wochen alten C3H/HeJ-Mäusen 2 Tage nach der Verabreichung von 150 mg/kg 5-Fluoruracil geerntet (SoloPack Laboratories, Franklin Park, IL) (Lim, B., J. F. Apperley, S. H. Orkin und D. A. Williams, Proc. Natl. Acad Sci. USA, Vol. 86, S. 8892-8896 (1989)). Die Zellen wurden bei einer Konzentration von 5×10^5 Zellen/ml in IMDM/20 % FCS plus P/S mit 100 ng/ml rekombinantem Stammzellfaktor von der Rate (rrSCF; Amgen, Thousands Oaks, CA) und 100 Einheiten/ml rekombinantem humanem Interleukin-6 (rhIL-6; Pepro Tech Inc., Rock Hill, NJ) 48 Stunden (Luskey, B. D., M. Rosenblatt, K. Zsebo und D.A. Williams, Blood, Vol. 80, S. 396-402

(1992)) vorstimuliert. Anschließend daran wurde die Effizienz des Gentransfers mit dem PGK-hADA-Vektor, produziert von EPHA-5-Producerzellen, unter Verwendung von drei verschiedenen Infektionsprotokollen verglichen: 1) Überstandsinfektion; 2) Überstandsinfektion auf FN 30/35; 3) Cokultivierung auf EPHA-5-Producerzellen. Deshalb wurden 100 mm messende Bakterienplatten mit 2,5 μg/cm^2 FN 30/35 (entspricht 75 pmol/cm^2), aufgelöst in 5 ml phosphatgepufferter Salzlösung (PBS; Gibco), 1 Stunde bei Raumtemperatur unter UV-Licht mit offenem Plattendeckel und eine weitere Stunde mit geschlossenem Plattendeckel beschichtet. Nach dem Blockieren mit 2 % bovinem Serumalbumin (BSA, Fraktion V; Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) 30 Minuten bei Raumtemperatur wurden die Platten einmal mit Hank's Balanced Salzlösung (HBSS), supplementiert mit 2,5 % (v/v) 1 M HEPES (beide von Gibco) gewaschen. Zur Überstandsinfektion wurden die Platten nur mit BSA beschichtet. Vorstimulierte Donor-Zellen (5 × 10^6) wurden mit 10 ml Virusüberstand inkubiert, der aus EPHA-5-Zellen, wie vorstehend beschrieben, supplementiert mit 100 U/ml rhIL-6, 100 ng/ml hrSCF und 7,5 μg/ml Polybren, erhalten wurde. Nicht adhärente Zellen wurden gesammelt und mit dem frischen Virusüberstand wieder zugefügt. Für die Cokultur wurden EPHA-5-Zellen in 4 ml Medium mit 10 μg/ml Mitomycin C 2 Stunden bei 37°C inkubiert, gewaschen, trypsiniert und auf 100 mm messende Gewebekulturplatten in einer Konzentration von 3 × 10^6 Zellen in 10 ml αMEM/20 % FCS plus P/S ausgeimpft. Am nächsten Tag wurden 5 × 10^6 vorstimulierte Knochenmarkzellen mit 100 U/ml rhIL-6, 100 ng/ml rrSCF und 4 μg/ml Polybren für die Dauer von 48 Stunden zugefügt. Unter Befolgung des Infektionsprotokolls wurden nicht adhärente Zellen dekantiert und adhärente hämatopoetische Zellen wurden nach Anleitung des Herstellers unter Verwendung von Zelldissoziationspuffer (CDB) (Enzymfrei/PBS basiert, Gibco) aus den Kulturen gesammelt. Die adhärenten Zellen wurden der nicht adhärenten Fraktion zugefügt, zweimal gewaschen und in ca. 1 ml HBSS/HEPES suspendiert. Die aus 5 × 10^6 vorstimulierten Zellen erhaltenen Gesamtzellen wurden in die Schwanzvenen von drei Empängermäusen injiziert, die einer letalen Ganzkörperbestrahlung (mit 700 plus 400 cGy, ^{137}Cs-Quelle) unterzogen wurden (Luskey, B. D., M. Rosenblatt, K. Zsebo und D. A. Williams, Blood, Vol. 80, S. 396-402 (1992)). Die Transduktion hämatopoetischer Stammzellen wurde mittels Untersuchung von rekonstituierten Mäusen auf Expression der eingeführten humanen ADA-cDNA analysiert. Diese ADA-Isoenzym-Analyse wurde an transplantierten Mäusen durch Untersuchung der peripheren Blutzellen auf Anwesenheit des hADA-Proteins durch die in situ-Enzymanalyse auf Celluloseacetat durchgeführt (Lim, B., D. A. Williams und S. H. Orkin, Mol. Cell. Biol., Vol. 7, S. 3459-3465 (1987)). Die Untersuchung wurde beginnend 4 Monate nach der Transplantation durchgeführt und wurde monatlich wiederholt.

7.2 ERGEBNISSE

[0084] Die Langzeit-Knochenmark-Rekonstitution von Mäusen mit genetisch manipulierten hämatopoetischen Stammzellen ist im Allgemeinen zur Bestimmung der Effizienz der Stammzellen-Transduktion nach einer Periode von 4 Monaten nach der Transplantation als angemessen zugelassen. Die Analyse von Empfängern von transduziertem Knochenmark nach 7 Monaten mittels der Isoenzym-Analyse ließ erkennen, dass: 1) die humane ADA-cDNA-Expression unter Verwendung von entweder einer Infektion der Cokultur oder des Überstands auf FN 30/35 vorhanden war, aber nicht in der Gruppe vorhanden war, die nach der Überstandsinfektion ohne FN 30/35 transplantiert wurde und dass: 2) die Expressionsspiegel für die Cokultur- und FN 30/35-Gruppen vergleichbar waren. Wie aus **Fig. 4**, Spuren 2-4, hervorgeht, wiesen drei Mäuse, denen das mittels Cokultur auf EPHA-5-Zellen transduzierte Knochenmark transplantiert wurde, leicht nachweisbare humane ADA nach. Ähnliche Spiegel von humaner ADA wurden in drei Mäusen nachgewiesen, die mit durch Überstandsinfektion von FN 20/35 transduzierten hämatopoetischen Zellen transplantiert wurden (**Fig. 4**, Spuren 5-7). Im Gegensatz dazu wurde in den drei Mäusen, die mit durch Überstandsinfektion auf BSA transduzierte hämatopoetische Zellen transplantiert wurden, keine humane ADA nachgewiesen (**Fig. 4**, Spuren 8-10). Kontrollen für die Position von humaner ADA sind in Spuren 1 und 12 und murine ADA in Spur 11 von **Fig. 4** zu sehen. Die murine Bande in den Spuren 2-10 lässt erkennen, dass gleiche Mengen von Protein geladen wurden. Diese Daten weisen nach, dass die Transduktion von langzeitig rekonstituierenden hämatopoetischen Stammzellen durch Überstandsinfektion auf FN 30/35 der Cokultur entspricht und der Überstandsinfektion ohne FN 30/35 weit überlegen ist.

BEISPIEL 8

MECHANISMUS DER VERBESSERTEN TRANSDUKTION DURCH DIE BINDUNG VON RETROVIRUS-VEKTOREN AN FN 30/35

8.1. EXPERIMENTELL

[0085] Zum Testen, ob eine gesteigerte Transduktion auf die Colokalisierung von viralen und hämatopoetischen Zellen zurückzuführen ist, wurde analysiert, ob rekombinante retrovirale Partikel eine Bindung an FN

30/35 aufwiesen. Deshalb wurden mit FN 30/35 beschichtete Platten mit Überstand, enthaltend das TKNeo-Virus, 30 Minuten vorinkubiert und danach gründlich gewaschen. Der Virustiter des Überstands wurde unter Verwendung von NIH/3T3-Zellen gemäß den Standardverfahren bestimmt (Markowitz, D., S. Goff und A. Bank, J. Virol., Vol. 62, S. 1120-1124 (1988)). Die 3T3-Zellen wurden, kurz zusammengefasst, bei einer Konzentration von 1000 Zellen/Well in einer 6-Well-Gewebekulturplatte ausplattiert und über Nacht gezüchtet. Jedem Well wurden Reihenverdünungen des Virusüberstands mit 7,5 µg/ml Polybren zugefügt und 2,5 Stunden bei 37°C inkubiert, wonach 2 ml des Mediums zugefügt wurden. Nach 24 Stunden wurde das Medium durch Medium ersetzt, das G418 (0,75 mg/ml, Trockenpulver, Gibco) enthielt, und die Platten 10-12 Tage inkubiert. Die G418-resistenten Kolonien ($G418^r$) wurden nach 10-12 Tagen gefärbt und bewertet. Die Zahl der Kolonien/Well multipliziert mit der Verdünnung des Virusüberstands wurde als die infektiösen Partikel (CFU)/ml Überstand verwendet. Es wurde die Menge der retroviralen Partikel, die auf mit FN 30/35 beschichteten oder mit BSA beschichteten 35 mm messenden Platten nach der Vorinkubation mit dem Virusüberstand und intensivem Waschen durch Zufügen von 1000 NIH/3T3-Zellen plus Polybren pro bakteriologische Platte von 35 mm beurteilt/„titriert". Vierundzwanzig Stunden später wurden die Kulturen mit Medium „gefiltert", das 0,75 mg/ml G418 (Trockenpulver) enthielt und die Zellen 10-12 Tage weiter inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Anwesenheit von adhärentem Virus durch zahlenmäßige Bestimmung der G418-resistenten NIH/3T3-Kolonien quantifiziert.

[0086] Zur Beurteilung, ob die Virusbindung an FN 30/35 auf dosisabhängige Weise auftritt, wurden die vorstehenden Experimente mit zunehmenden Konzentrationen der FN 30/35-Beschichtung der Platten wiederholt. Deshalb wurden 35 mm messende bakteriologische Platten mit 1, 4, 10 und 20 µg/cm^2 FN 30/35, wie vorstehend beschrieben, beschichtet. Eine Verdünnung von 1:50 eines TKNeo-Virusstamms, zuvor bei 1×10^4 infektiösen Partikeln/ml titriert, wurde auf mit FN 30/35 beschichteten Platten 30 Minuten inkubiert. Nach intensivem Waschen wurden jedem Well 2000 NIH/3T3-Zellen zugefügt. Die Selektion wurde wie vorstehend durchgeführt und 10 Tage nach der Selektion G418-resistente MH/3T3-Kolonien gezählt.

8.2. ERGEBNISSE

[0087] In Fig. 5 sind die Ergebnisse von einem der drei repräsentativen Experimente ersichtlich. Unter Verwendung des TKNeo-Überstandes waren die anhand der $G418^r$-Kolonen von NIH/3T3-Zellen gemessenen retroviralen Titer um mehr als 3 log (4×10^3 bis 0) auf mit BSA beschichteten Platten reduziert, während die Titerreduktion nur 1 log auf mit 30/35 FN beschichteten Platten betrug. Diese Daten weisen nach, dass das Retrovirus quantitativ an FN 30/35, aber nicht an mit BSA beschichtete Platten (Kontrollplatten) bindet. Fig. 6 zeigt, dass gesteigerte Zahlen der G418-resistenten Kolonien nachgewiesen wurden, wenn Virus-enthaltender Überstand auf Platten, die mit zunehmenden Konzentrationen von FN 30/35 beschichtet waren, inkubiert wurde. Deshalb tritt die Virusbindung an FN 30/35 in einer dosisabhängigen Weise auf.

BEISPIEL 9

VIRUSBINDUNG AN REKOMBINANTE FIBRONEKTINFRAGMENTE

9.1. EXPERIMENTELL

[0088] Kimizuka et al. haben die Expression klonierter FN-DNA-Sequenzen in E. coli zuvor mitgeteilt (Kimizuka, F., Y. Taguchi, Y. Ohdate, Y. Kawase, T. Shimojo, D. Hashino, I. Kato, K. Sekiguchi und K Titan, J. Biochem., Vol. 110, S. 284-291 (1991)). Klonierte und chimäre Peptide schließen eine oder eine Kombination von mehreren wichtigen Sequenzen in Fibronektin ein, von dem bekannt ist, dass es an der Zelladhäsion (einschließlich der RGDS-, CS-1- und Heparin-Bindungsstelle) beteiligt ist, siehe Fig. 7. Zur Analyse, ob das Retrovirus an diese rekombinanten FN-Fragmente binden kann, wurden Kolonien-Bildungsassays von 3T3-Zellen auf Platten wiederholt, die mit den rekombinanten Fragmenten C-274, H-271, H-296, CH-271, CH-296 und C-CS1 ebenso wie FN 30/35 als positive Kontrolle, unter Verwendung von zwei verschiedenen Verdünnungen (1:10 und 1:100) des gefrorenen TKNeo-Retrovirusstamms mit 1×10^4 infektiösen Partikeln/ml, beschichtet waren. Die FN-Fragmente wurden in einer Konzentration von 120-130 pmol/cm^2 (entspricht 4 µg/cm^2 für C-274, H-271, H-296, C-CS1, FN 30/35 und 8 µg/cm^2 für CH-271 und CH-296) verwendet. Die Platten wurden, kurz zusammengefasst, beschichtet, das Virus wurde zugefügt, die Platten wurden gründlich gewaschen, die NIH/3T3-Zellen wurden 24 Stunden zugefügt und dann in Selektionsmedium 10 Tage gezüchtet, anschließend daran wurden die Kolonien gefärbt und gezählt.

9.2. ERGEBNISSE

[0089] Fig. 8 weist nach, dass die Zahl der G418-resistenten Kolonien (und deshalb die Virusadhäsion) in den Fragmenten H-271, H-296, CH-271 und CH-296 erhöht war. Sie zeigt überdies, dass die Menge des gebundenen Virus zwischen diesen rekombinanten Fragmenten und FN 30/35 ungefähr vergleichbar war, obwohl in dieser Arbeit das CH-271-Fragment den höchsten Grad der Virusbindung aufwies. Allen diesen 5 FN-Fragmenten sind jedoch die Typ III-Wiederholungen 12-14 gemein, die die hochaffine Heparin-Bindungsstelle aufweisen (Ruoslahti, E., Ann. Rev. Biochem., Vol. 57, S. 375-413 (1988) und Kimizuka, F., Y. Taguchi, Y. Ohdate, Y. Kawase, T. Shimojo, K. Hashino, I. Kato, K. Sekiguchi und K. Titan, J. Biochem., Vol. 110, S. 284-291 (1991)), die sich wahrscheinlich in Wiederholung 13 befindet (Kimizuka, F., Y. Taguchi, Y. Ohdate, Y. Kawase, T. Shimojo, K. Hashino, I. Kato, K. Sekiguchi und K. Titan, J. Biochem., Vol. 110, S. 284-291 (1991)). Dies deutet darauf hin, dass die Virusbindung über diese bekannte Adhäsionsstelle auftritt. Dies wurde durch die Vorinkubation von Platten belegt, die mit 4 μg/cm^3 CH-271 in zunehmenden Konzentrationen (10-1000 μg/ml) Heparinsulfat, einem hoch geladenen Molekül, von dem bekannt ist, dass es die Zellbindung an die Heparin-Bindungsstelle inhibiert, beschichtet waren. Wie aus Fig. 9 hervorgeht, ist die Zahl der G418-resistenten Kolonien nach der Vorinkubation von CH-271 mit zunehmenden Konzentrationen von Heparinsulfat verringert. Diese Daten deuten darauf hin, dass die Virusbindung an FN durch die hochaffine Heparin-Bindungsstelle, die sich unmittelbar benachbart zur CS-1-Stelle in den carboxylterminalen Domänen von FN befindet, vermittelt.

BEISPIEL 10

TRANSDUKTION HÄMATOPOETISCHER ZELLEN AUF REKOMBINANTEN FIBRONEKTINFRAGMENTEN

10.1. EXPERIMENTELL

[0090] Zur Analyse, ob die gesteigerte Transduktion von hämatopoetischen Zellen, die zuvor auf FN 30/35 beschrieben wurde, auch mit rekombinanten FN-Fragmenten gesehen werden könnte, wurde die Effizienz der Transduktion von Überstandsinfektionen in vitro unter Verwendung von Assays auf hoch proliferative potenziell kolonienbildende Zellen (HPP-CFC) beurteilt. Unter Einsatz von EAL2a-Vektoren wurde der Einfluss verschiedener rekombinanter FN-Fragmente vs. der FN 30/35-Überstandsinfektion auf BSA auf die Transduktion hämatopoetischer Zellen unter Verwendung des Züchten G418-resistenter Kolonien als ein Indikator des Gentransfers verglichen. Überdies wurde auch die Fähigkeit der Viruspartikel, die bereits an FN-Fragmenten (vs. Überstandsvirus) hafteten, zur Transduktion hämatopoetischer Zellen verglichen. Vorstimulierte Knochenmarkzellen (0,5 bis 1 × 10^6) wurden auf 35 mm messende, mit FN beschichteten Petrischalen in 1-2 ml EAL2a-Virus enthaltendem Überstand mit Wachstumsfaktoren und 5 μg/ml Polybren, wie vorstehend besprochen wurde, inkubiert. Zur Beurteilung der Transduktion hämatopoetischer Zellen durch das an FN-Fragmente gebundene Virus wurden 35 mm messende, mit FN beschichtete Platten, die mit dem Virus enthaltenden Überstand inkubiert wurden, dreimal mit jeweils 2 ml PBS gewaschen. Im Anschluss daran wurden 0,5 bis 1 × 10^6 vorstimulierte Knochenmarkzellen in 2 ml Medium, supplementiert mit Wachstumsfaktoren und Polybren, zugefügt. 22 Stunden später wurden die Zellen geerntet und in HPP-CFC-Assays mit und ohne 1,5 mg/ml G418, wie beschrieben, ausplattiert (Bradley, T. R. und D. Metcalf, Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci., Vol. 44, S. 287-293 (1966)). Die Kulturen wurden 14 Tage in 7 % CO_2 bei 33°C inkubiert, und die Effizienz des Gentransfers wurde als der prozentuale Anteil von G418-resistenten Kolonien berechnet.

10.2. ERGEBNISSE

[0091] Die Transduktion primitiver hämatopoetischer Zellen über die Überstandsinfektion (Fig. 10) war signifikant höher als die Überstandsinfektion auf BSA für alle Fragmente, die die Heparin-Bindungsstelle (HBS) und mindestens eine weitere aktive Zelladhäsionsstelle einschlossen (ausgefüllte Balken). Die Wirksamkeit der Transduktion der rekombinanten Fragmente CH-271, H-296, CH-296 und C-CS1 war der Wirkung von FN 30/35 ähnlich, wobei alle drei Fragmente sowohl die Heparin-Bindungs- als auch die CS-1-Stelle einschließen. In allen anderen Fällen war die Transduktion dramatisch reduziert. Diese Daten weisen nach, dass die gesteigerte Transduktion primitiver hämatopoetischer Zellen, die zuvor auf FN 30/35 gezeigt wurde, auf rekombinanten FN-Fragmenten reproduziert werden kann. Sie weisen weiter nach, dass das Virus, das direkt an Fibronektin gebunden ist, zur genetischen Transduktion hämatopoetischer Zellen fähig ist. Letztendlich wird die Nützlichkeit der Anwesenheit von sowohl der CS-1- als auch der Heparin-Bindungsstelle zur Transduktion von primitiven hämatopoetischen Präkursorzellen (Stammzellen) bestätigt.

BEISPIEL 11

LANGZEIT-KNOCHENMARKREKONSTITUTION VON MÄUSEN UNTER VERWENDUNG DER TRANSDUKTION MURINER DONORZELLEN AUF REKOMBINANTEN FIBRONEKTINFRAGMENTEN

11.1. EXPERIMENTELL

[0092] Die vorstehenden in vitro-Studien (von Beispiel 10) wurden für primitive hämatopoetische Vorläuferzellen zum Vergleich der Überstandsinfektion auf BSA vs. FN 30/35 vs. rekombinanter FN-Fragmente vs. der Cokultur unter Verwendung der Kochenmarktransplantation zur Analyse der Wirkungen auf die rekonstituierenden hämatopoetischen Stammzellen wiederholt. Letal bestrahlte Mäuse wurden, kurz zusammengefasst, mit Donorzellen injiziert, die mit den EPHA-5-Vektoren, enthaltend die humane ADA-cDNA, transduziert wurden. Nach einem Monat wurde die Wirksamkeit des Gentransfers aus peripherem Blut in ADA-Isoenzym-Assays analysiert.

11.2. ERGEBNISSE

[0093] Fig. 11 zeigt deutlich das Fibronektinfragment H-296, das sowohl die Heparin-Bindungsstelle als auch die von CS-1 enthält, die ähnliche Ergebnisse wie FN 30/35 und die Cokultur ergibt. Fragmente, die diese beiden Stellen nicht enthalten, sind bei der Transduktion einer transplantierbaren hämatopoetischen Zelle weniger wirksam. Diese Daten weisen nach, dass die Colokalisierung primitiver hämatopoetischer Zellen/Stammzellen und des Retrovirus, das an rekombinante FN-Fragmente gebunden ist, die sowohl die CS-1- als auch die Heparin-Bindungsstellen enthalten, transplantierbare hämatopoetische Zellen wirksam transduziert.

[0094] Während die Erfindung in der vorstehenden Beschreibung erläutert und ausführlich beschrieben wurde, ist dieselbe als erläuternd und nicht als einschränkend zu erachten, wobei man zur Kenntnis nehmen sollte, dass nur die bevorzugte Ausführungsform beschrieben wurde und dass für alle Änderungen und Modifikationen, die in den Umfang der Ansprüche fallen, Schutz begehrt wird.

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE INFORMATIONEN:

(i) ANMELDER: (1) Indiana University Foundation

(2) Northwestern University

(ii) ERFINDER: Williams, David,

A. Patel, Vikram, P.

(iii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Ein verstärkter, durch Viren vermittelter DNA-Transfer

(iv) ANZAHL DER SEQUENZEN: 2

(v) KORRESPONDENZADRESSE:

(A) NAME: P.B. Atkinson

(B) FIRMA: Marks & Clerk

(C) STRASSE: Sussex House, 83-85 Mosley Street

(D) STADT: Manchester

(E) LAND: GB

(F) POSTLEITZAHL: M3 3JY

(vi) MASCHINENLESBARE FORM:

(A) DATENTRÄGER: Diskette

(B) COMPUTER: IBM PC-kompatibel

(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS

(vii) VORLIEGENDE PATENTANMELDUNG:

(A) ANMELDENUMMER: EP 95914912.1

(B) ANMELDETAG: 27. MÄRZ 1995

(C) KLASSIFIKATION

(viii) ANGABEN ZUM PATENTANWALT/VERTRETER:

(A) NAME: Atkinson, Peter B.

(B) REGISTRIERUNGSNUMMER:

(C) REFERENZ/DOCKET-NUMMER: D002337PEP

(ix) ANGABEN ZUR TELEKOMMUNIKATION:

(A) TELEFON: +44 161 236 2275

(B) TELEFAX: +44 161 236 5846

(C) TELEX:

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 271 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: I:

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser Leu Ser Ala Gln Trp
Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys
Glu Ile Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr Glu Val
Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val
Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr
Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Sys
Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu
Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg
Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile
Lys Tyr Glu Sys Pro Gly Sev Pro Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr
Ile Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu
Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr 271

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:2:

(i) SEQUENZMERKMALE:

(A) LÄNGE: 25 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(C) STRÄNGIGKEIT:

(D) TOPOLOGIE:

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO:2:

Patentansprüche

1. Ex vivo-Verfahren zur Steigerung der Transduktionsfrequenz lebensfähiger hämatopoetischer Zellen durch einen replikationsdefekten rekombinanten Retrovirus-Vektor, umfassend das Infizieren lebensfähiger hämatopoetischer Zellen mit einem replikationsdefekten rekombinanten Retrovirus-Vektor in Anwesenheit des im Wesentlichen reinen rekombinanten Fibronektinfragments CH-296, um auf diese Weise die Transduktionsfrequenz der hämatopoetischen Zellen durch den Retrovirus-Vektor zu steigern.

2. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen einen Proteinmangel oder eine -anomalie aufweisen und der rekombinante Retrovirus-Vektor ein das Protein kodierendes exogenes Gen einschließt.

3. Verfahren nach Anspruch 2, worin das exogene Gen ein die Adenosindesaminase kodierendes Gen darstellt.

4. Verfahren nach Anspruch 3, worin das exogene Gen ein die humane Adenosindesaminase kodierendes Gen darstellt.

5. Verfahren nach Anspruch 1, worin die hämatopoetischen Zellen humane Stammzellen umfassen.

6. Verfahren nach Anspruch 5, worin die hämatopoetischen Zellen als Adhärenz-negative, mononukleäre Zellen von niederer Dichte gekennzeichnet sind.

7. Kit zur Verwendung beim Durchführen des retroviral-vermittelten DNA-Transfers in humane hämatopo-

etische Zellen, umfassend:
(a) das im Wesentlichen reine rekombinante Fibronektinfragment CH-296;
(b) ein artifizielles Substrat, auf dem ein retroviraler Vektor in Kontakt mit humanen hämatopoetischen Zellen inkubiert werden kann; und
(c) hämatopoetische Zellwachstumsfaktoren zur Prästimulation der hämatopoetischen Zellen.

8. Kit nach Anspruch 7, worin das rekombinante Fibronektinfragment CH-296 auf dem artifiziellen Substrat immobilisiert wird.

9. Kit nach Anspruch 8, das auch Folgendes einschließt:
(e) einen rekombinanten retroviralen Vektor zur Transduktion der humanen hämatopoetischen Zellen.

Es folgen 11 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

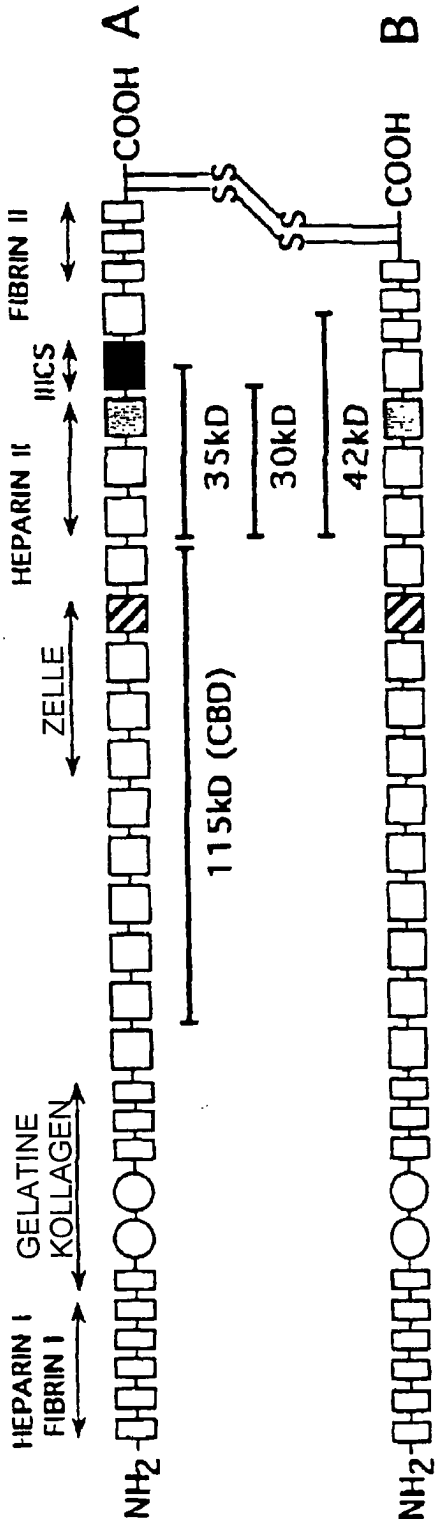

FIG. 1

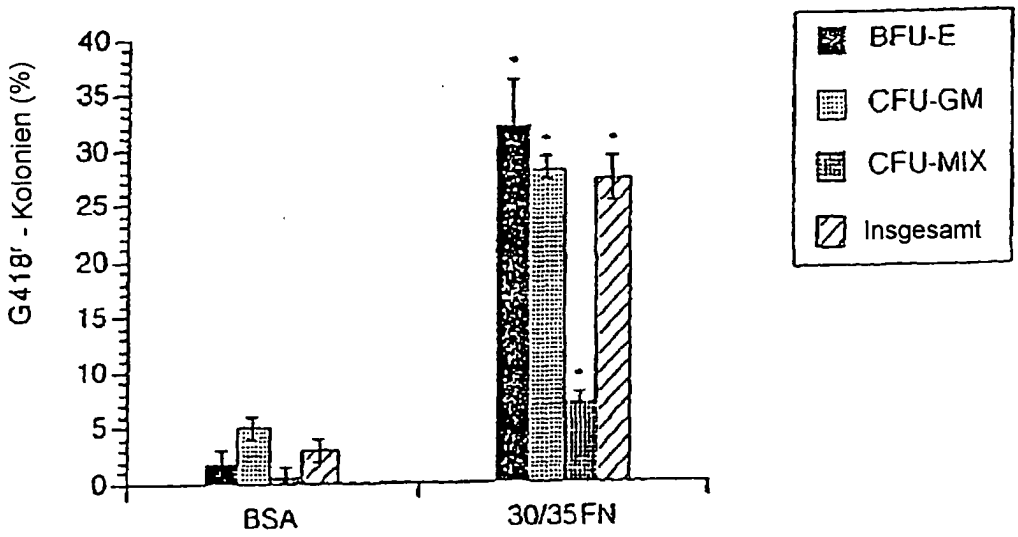
G418r - Kolonien (%)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
BSA
30/35FN
BFU-E
CFU-GM
CFU-MIX
Insgesamt

FIG. 2

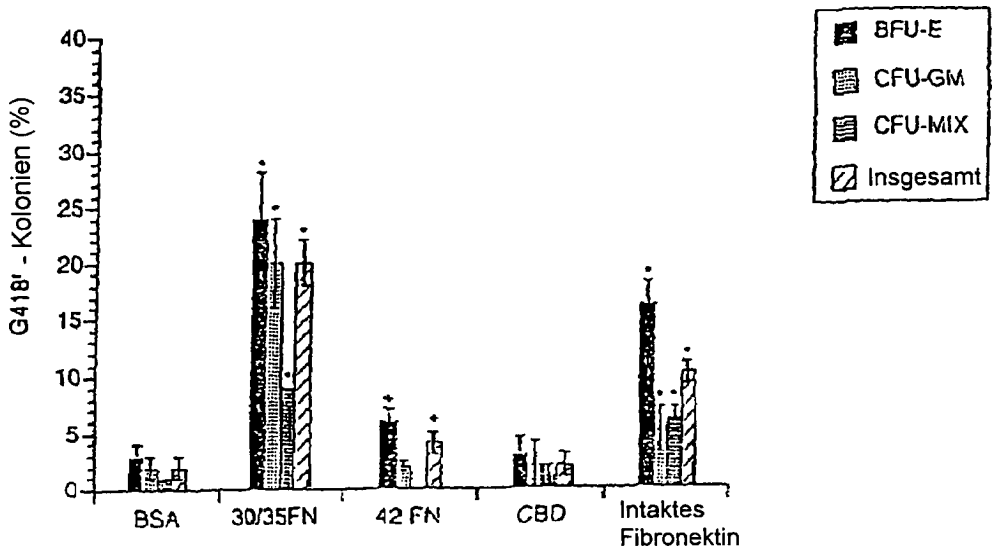
G418r - Kolonien (%)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
BSA
30/35FN
42 FN
CBD
Intaktes Fibronektin
BFU-E
CFU-GM
CFU-MIX
Insgesamt

FIG. 3

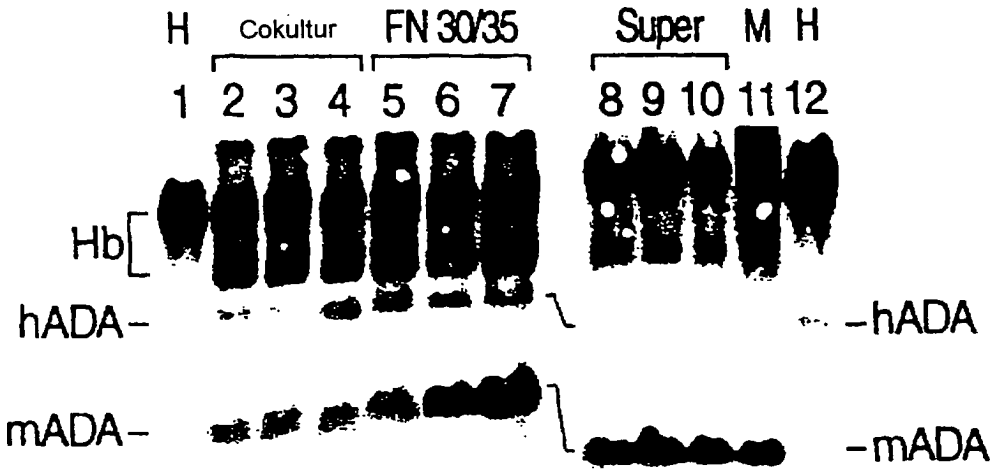
H
Cokultur
FN 30/35
Super
M
H
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
Hb
hADA-
-hADA
mADA-
-mADA

FIG. 4

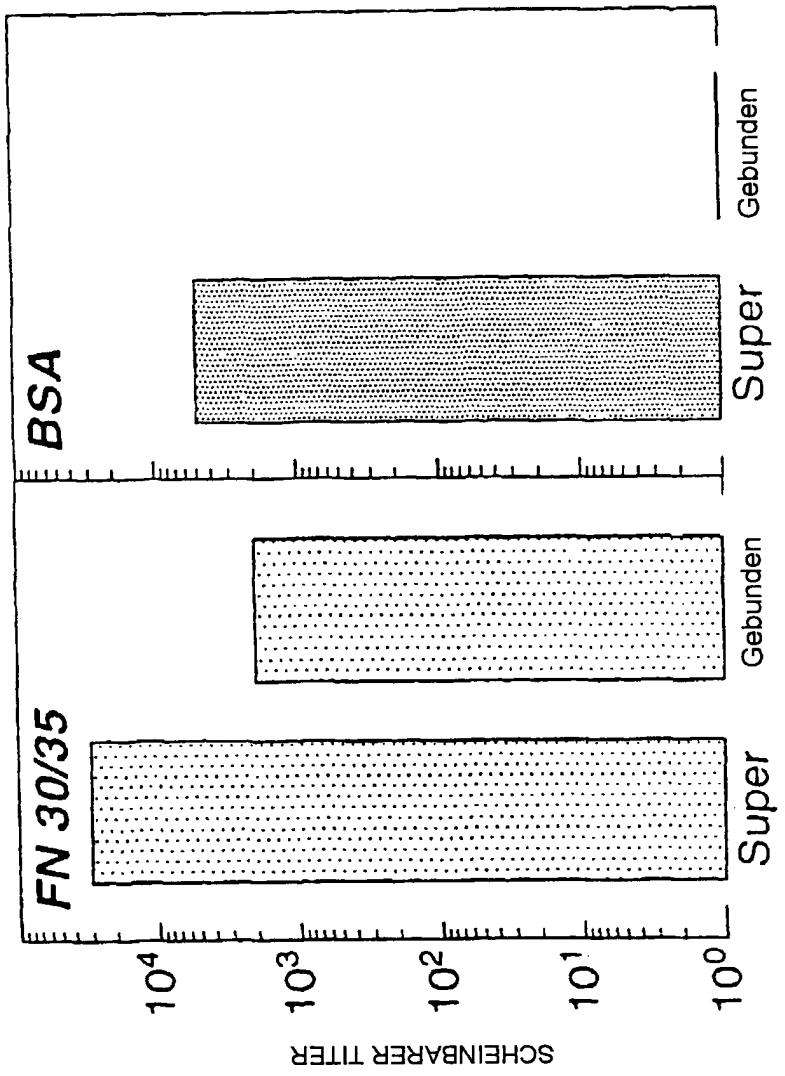
BSA
FN 30/35
Super
Gebunden
Super
Gebunden
10^4
10^3
10^2
10^1
10^0
SCHEINBARER TITER

FIG. 5

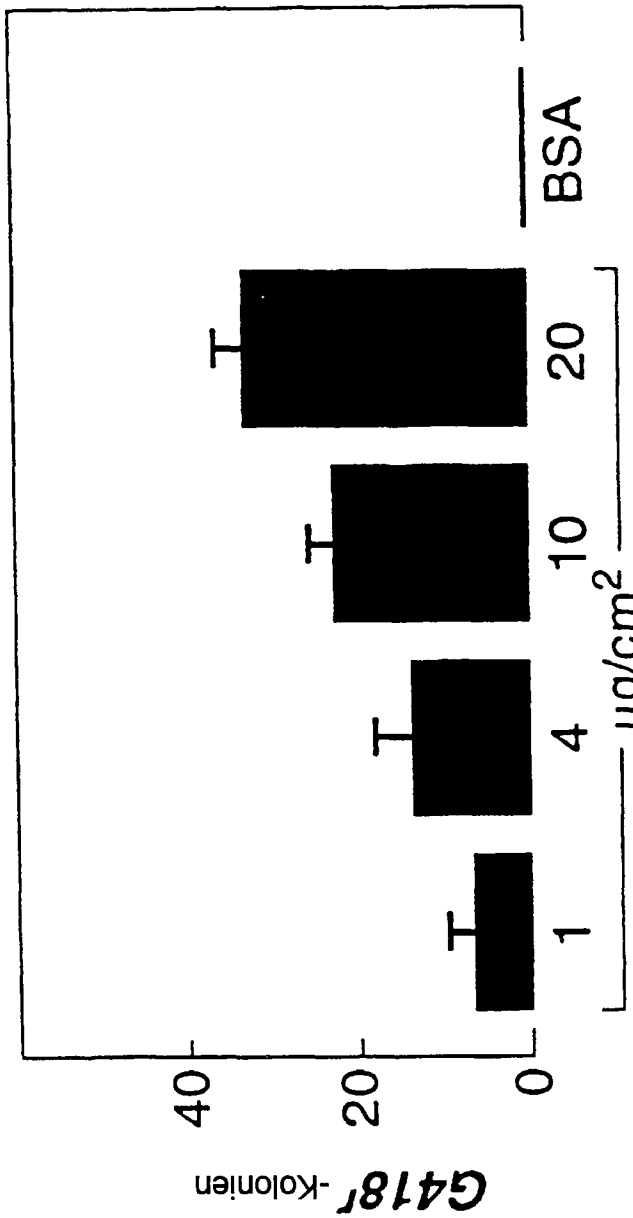

FIG. 6

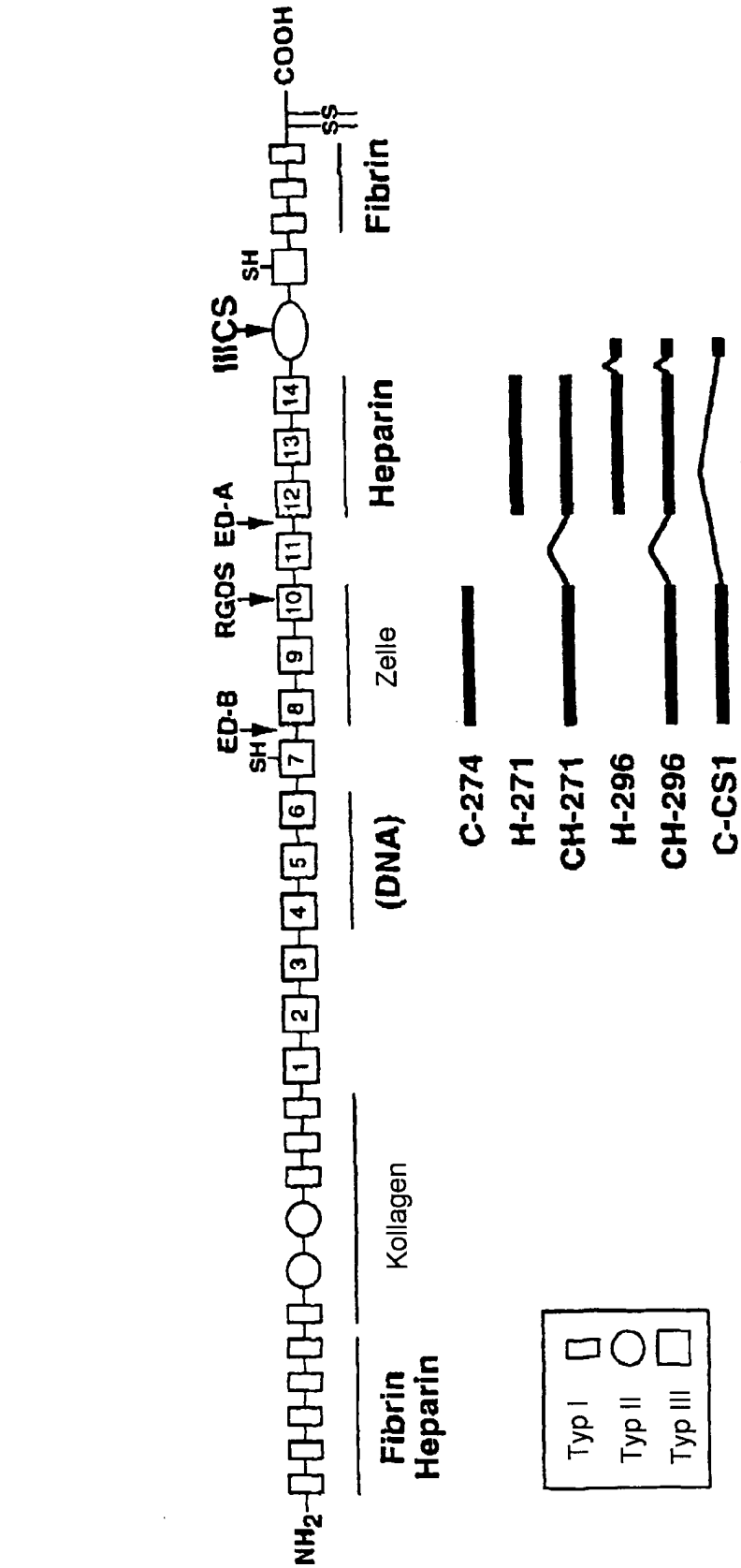
NH2
Fibrin
Heparin
Kollagen
(DNA)
Zelle
Heparin
Fibrin
ED-B
RGDS
ED-A
IIICS
SH
SH
SS
COOH
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
C-274
H-271
CH-271
H-296
CH-296
C-CS1
Typ I
Typ II
Typ III

FIG. 7

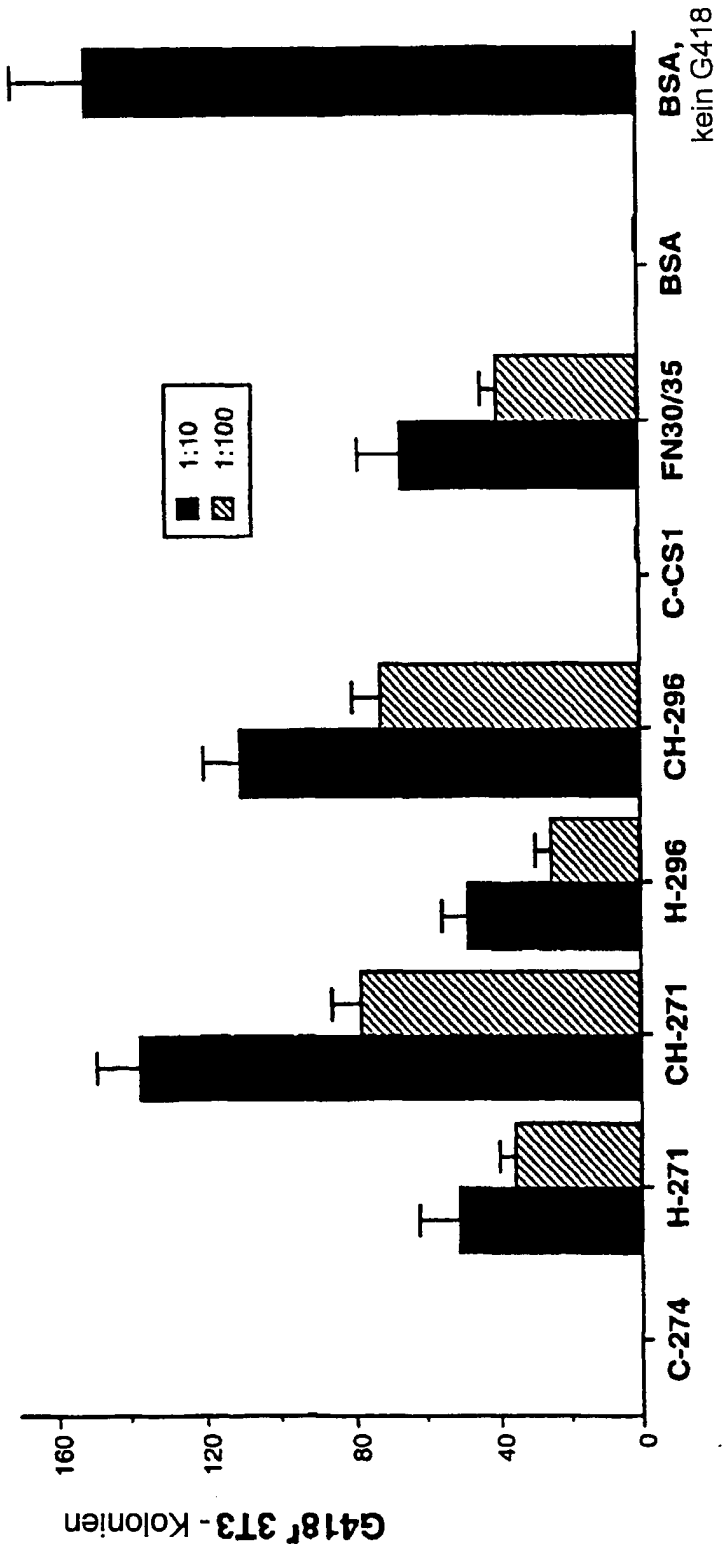
G418r 3T3 - Kolonien
160
120
80
40
0
C-274
H-271
CH-271
H-296
CH-296
C-CS1
FN30/35
BSA
BSA, kein G418
1:10
1:100

FIG. 8

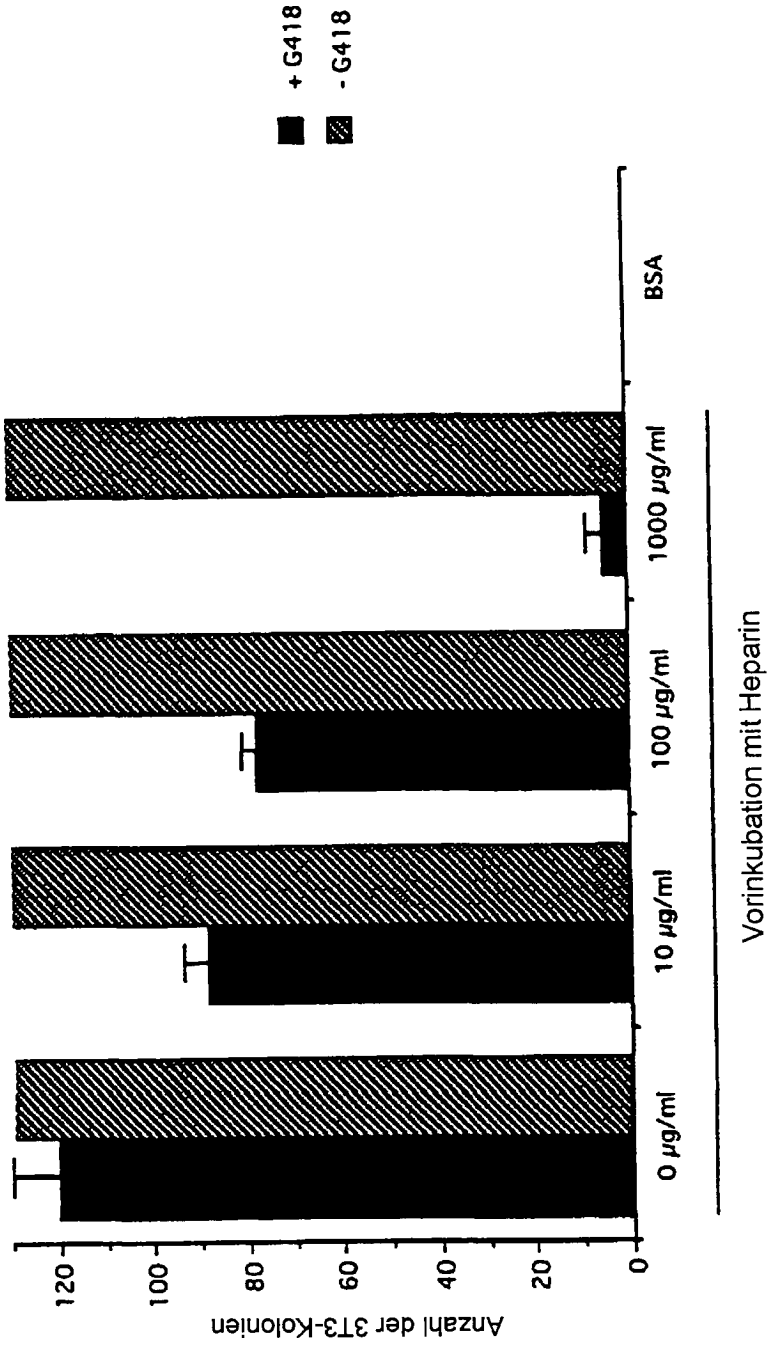
+ G418
- G418
Anzahl der 3T3-Kolonien
0
20
40
60
80
100
120
0 µg/ml
10 µg/ml
100 µg/ml
1000 µg/ml
BSA
Vorinkubation mit Heparin

FIG. 9

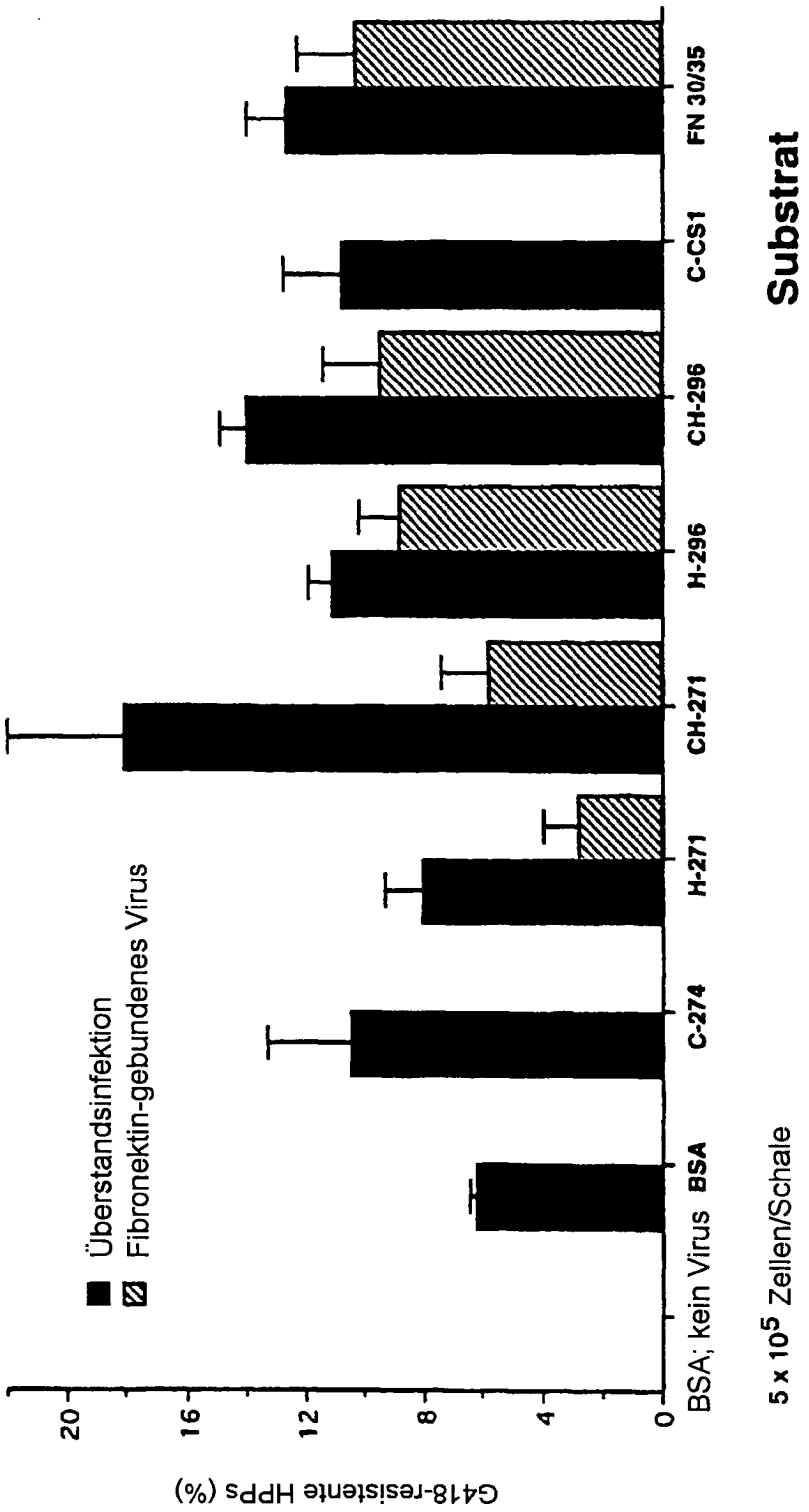
G418-resistente HPPs (%)
20
16
12
8
4
0
Überstandsinfektion
Fibronektin-gebundenes Virus
BSA; kein Virus
BSA
C-274
H-271
CH-271
H-296
CH-296
C-CS1
FN 30/35
Substrat
5 x 10^5 Zellen/Schale

FIG. 10

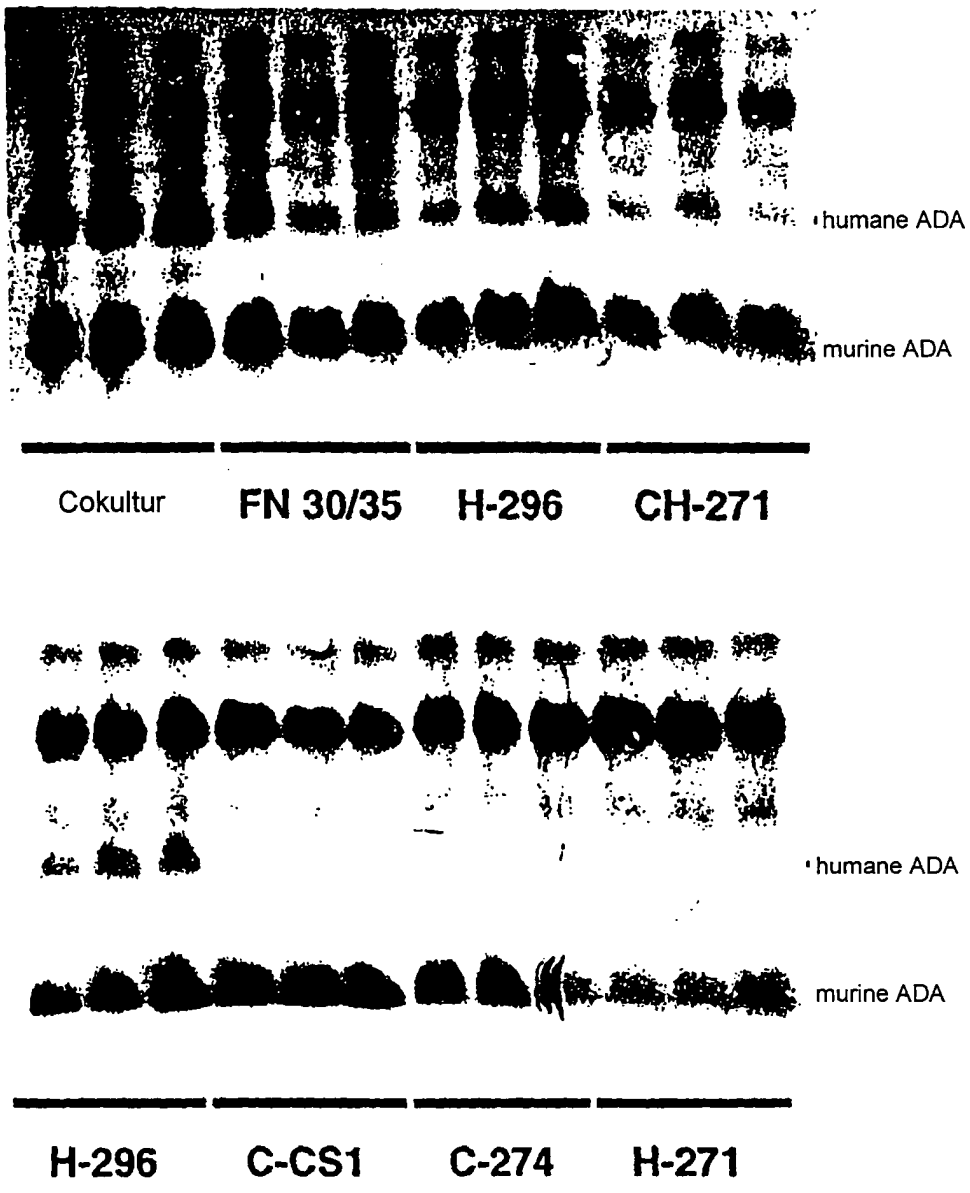
humane ADA
murine ADA
Cokultur
FN 30/35
H-296
CH-271
humane ADA
murine ADA
H-296
C-CS1
C-274
H-271

FIG. 11