



<p>(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12M 3/00</p>	<p>A2</p>	<p>(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/07829</p> <p>(43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 26. Februar 1998 (26.02.98)</p>
<p>(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP97/04426</p> <p>(22) Internationales Anmeldedatum: 13. August 1997 (13.08.97)</p> <p>(30) Prioritätsdaten: 96113193.5 16. August 1996 (16.08.96) EP</p> <p>(34) Länder für die die regionale oder internationale Anmeldung eingereicht worden ist: DE usw.</p> <p>(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BOEHRINGER MANNHEIM GMBH [DE/DE]; Sandhofer Strasse 112-132, D-68305 Mannheim (DE).</p> <p>(72) Erfinder; und</p> <p>(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): KOCH, Stefan [DE/DE]; Lagoner Strasse 18, D-82377 Penzberg (DE). GOLLER, Bernhard [DE/DE]; Rosenstrasse 12, D-82377 Penzberg (DE). KUBBIES, Manfred [DE/DE]; Glaswandstrasse 7c, D-82377 Penzberg (DE).</p> <p>(74) Anwälte: WEICKMANN, H. usw.; Kopernikusstrasse 9, D- 81679 München (DE).</p>	<p>(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, GB, GE, GH, HU, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG).</p> <p>Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i></p>	
<p>(54) Title: USE OF FLEXIBLE PLASTIC TANKS IN GENE THERAPHY</p> <p>(54) Bezeichnung: ANWENDUNG VON FLEXIBLEN PLASTIKGEFÄSSEN IN DER GENTHERAPIE</p> <p>(57) Abstract</p> <p>The present invention relates to the use of flexible plastic tanks for extracorporeal operations in gene therapy.</p> <p>(57) Zusammenfassung</p> <p>Es wird die Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen zur Durchführung extrakorporealer Verfahrensschritte in der Genthherapie offenbart.</p>		

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidtschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Anwendung von flexiblen Plastikgefäßen in der Gentherapie

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft die Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen, beispielsweise von Blutbeuteln, in der Gentherapie.

10 Blutbeutel sind aufgebaut aus flexiblen geschlossenen Plastikgefäßen, die mindestens eine Zufuhr- oder Abflußöffnung enthalten. Sie werden in unterschiedlichen Größen von verschiedenen Firmen, z. B. Baxter, Biotrans, Cobe, Fresenius und Maco-
15 pharm angeboten und in Kliniken und Blutbanken für verschiedene Einsatzgebiete bzw. die Abnahme von Vollblut oder Knochenmark sowie bei der Leukapherese verwendet. Es ist bekannt, Blutzellen in den Beuteln zu lagern, einzufrieren und zu verarbeiten, wobei spezielle Geräte, z.B. für das Waschen und Zentrifugieren zur Verfügung stehen.

20

Auf dem Gebiet der Gentherapie besteht ein großer Bedarf an Verfahren, die es erlauben, die jeweiligen Produkte wie etwa Vektoren und Zellen in größeren Maßstab auf einfache Weise und in einer sicheren und leicht handhabbaren Form zur Verfügung
25 zu stellen. Bisher wurden für gentherapeutische Verfahren Reaktionsgefäße und Vorrichtungen aus Forschungslabors verwendet, mit denen jedoch erhebliche Probleme bei der Handhabung für klinische Zwecke auftreten.

30 WO 87/06119 betrifft ein System zum Sammeln von Blut, das geeignet ist, die Übertragung von Pathogenen im Blut zu verhindern. Dieses System enthält einen Blutbeutel zur Aufnahme des Blutes und einen zweiten Behälter zum regulierbaren Einbringen von neutralisierenden Reagenzien für Pathogene. Es
35 besteht keinerlei Zusammenhang mit dem Einsatz von Blutbeuteln in der Gentherapie.

- WO 92/19285 betrifft ein Verfahren zur Desinfektion einer in einem Blutbeutel enthaltenen Blutprobe, um Bakterien und Viren in der Probe zu zerstören. Das Desinfektionsmittel besteht aus einem anionischen oberflächenaktiven Mittel, mindestens einem nicht-anionischen oberflächenaktiven Mittel, einem Stabilisator, zwei Salzen und zwei Phosphaten. Ein Hinweis auf die Anwendung von Blutbeuteln in der Gentherapie findet sich nicht.
- 10 EP-A-0 471 947 beschreibt die Kultivierung von Zellen in Blutbeuteln, die gasdurchlässig sind. Es wird die Kultivierung von Hybridomzellen beschrieben. Ein Hinweis auf die Verwendung von Blutbeuteln in der Gentherapie findet sich nicht.
- 15 JP-3 007 575 betrifft eine Vorrichtung zur Kultivierung von aus Krebspatienten entnommenen Lymphozyten in einer Vorrichtung, die einen Blutbeutel auf einer dreh- und schwenkbaren Unterlage umfaßt. Ein Hinweis für die Verwendung in der Gentherapie findet sich nicht.
- 20 WO 96/00782 betrifft die Kultivierung von immobilisierten Stammzellen in Blutbeuteln, die mit einer Bindematrix für die Zellen beschichtet sind. Die Stammzellen werden einem Patienten entnommen und nach Kultivierung wieder zurückgeführt. Während der Kultivierung kann auch eine genetische Manipulation der Stammzellen in vitro stattfinden. Das in WO 96/00782 offenbarte Verfahren ist jedoch auf Stammzellen beschränkt und kann nicht ohne weiteres auf andere Zelltypen übertragen werden.
- 30 Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, in der Gentherapie neue Mittel und Verfahren bereitzustellen, die eine einfachere und sicherere Handhabung von Zellen und anderen Substanzen ermöglichen.
- 35 Diese erfindungsgemäße Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen zur Durchführung extrakorpo-

realer Verfahrensschritte in der Gentherapie. Der Schwerpunkt der vorliegenden Anmeldung liegt auf der Gentherapie mit suspendierten Zellen, insbesondere mit T-Zellen. Die in Suspension wachsenden Zellen können in flexiblen Plastikgefäßen 5 stimuliert, transduziert, kultiviert und markiert werden.

Die gentherapeutischen Verfahrensschritte, die unter Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen durchgeführt werden können, umfassen beispielsweise die Abfüllung von Vektoren, die zur 10 Einführung von genetischem Material in aus einem Spender stammende Zellen dienen, das Inkontaktbringen der Vektoren mit Zellen des Spenders zur Transfektion bzw. Transduktion der Zellen, die Stimulation oder/und Kultivierung von suspendierten Zellen, insbesondere von T-Zellen und die Befüllung 15 oder/und Elution von Zellseparationsvorrichtungen. Durch die erfindungsgemäße Verwendung von flexiblen Plastikbeuteln, die mindestens eine Öffnung für geeignete Verbindungselemente, z.B. Verbindungsschläuche, aufweisen, kann die extrakorporeale Behandlung von aus einem Spender stammenden Zellen teilweise 20 oder vollständig in einem geschlossenen System durchgeführt werden.

Die flexiblen Plastikgefäße, die im allgemeinen ein Volumen von 10 - 5000 ml und insbesondere von 10 - 2000 ml aufweisen, 25 sind vorzugsweise geschlossene Plastikbeutel, die mindestens eine Öffnung, z.B. ein Ansatzstück für Verbindungsschläuche aufweisen. Über diese Verbindungsschläuche, die vorzugsweise aus verschweißbarem Plastikmaterial bestehen, ist mit einem geeigneten Gerät, z.B. dem Sterilschweißgerät der Firma Terumo, das Verbinden und Trennen von Beuteln auf solche Weise 30 möglich, daß immer ein geschlossenes System erhalten bleibt. Dies führt dazu, daß die Handhabung mit biologischen Substanzen wie Zellen, Viren etc. unter einem erheblich reduzierten Kontaminationsrisiko möglich ist, so daß sogar auf die Ver- 35 wendung steriler Werkbänke verzichtet werden kann.

Eine erste Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Abfüllung von Transduktionsvektoren, z.B. retroviraler Vektoren, wie sie z.B. von Kotani et al. (Human Gene Therapy 5 (1994), 19-28) beschrieben sind und in Gentherapie-
5 studien eingesetzt werden (Anderson, Science 256 (1992), 808-813). Insbesondere bevorzugt sind retrovirale Vektoren, die die genetische Information für eine modifizierte Version des humanen LNGFR (Low affinity nerve growth factor receptor) enthalten (Mavilio et al., Blood 82 (1993), 1988-1997). Der-
10 zeit werden diese Vektoren in starren Propylengefäßen mit Schraubverschluß abgefüllt, wobei das offene Produkt in sterilen Werkbänken portioniert wird. Bei der erfindungsgemäßen Verwendung von Blutbeuteln kann hingegen eine die Vektoren enthaltende Flüssigkeit, z.B. ein Zellkulturüberstand, über
15 entsprechend vorbereitete sterile Schlauchverbindungen durch einen Filter, z.B. 0,22 μm oder 0,45 μm , direkt in kleine Beutel mit einem Volumen von z.B. 20 - 50 ml abgefüllt werden. Nach dem Abfüllen werden die Transduktionsvektoren vorzugsweise lyophilisiert oder/und eingefroren. Nach Abschweißen der
20 Beutel kann eine Lagerung wie bisher bei -80°C erfolgen. Überraschenderweise wurde festgestellt, daß retrovirale Vektoren in den Plastikbeuteln eine sehr hohe Haltbarkeit in eingefrorenem oder lyophilisiertem Zustand, z.B. von mehr als ein-
halb Jahren aufweisen. In der Klinik kann dann der Beutel mit
25 den Vektoren mit einem weiteren Beutel verbunden werden, welcher die zu transduzierenden Zellen enthält. Bei diesen Verfahren erfolgen alle Schritte im geschlossenen System, wodurch bei der Ernte und Abfüllung ein Kontaminationsrisiko weitgehend ausgeschlossen wird.

30

Eine zweite Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist die Transduktion von Zellen. Zur Transduktion werden die in einem Blutbeutel enthaltenen suspendierten Spenderzellen, vorzugsweise T-Zellen oder Subpopulationen davon oder durch
35 Leukapherese gewonnene periphere Blutlymphozyten oder Antigenpräsentierenden Zellen, wie etwa Tumorzellen, mit einem den Transduktionsvektor enthaltenden Beutel gekoppelt und so die

beiden Volumina vereinigt. In diesem vereinigten Volumen findet dann die Transduktion, d.h. die genetische Veränderung der Zellen durch den Vektor, statt. Sich daran anschließende Schritte wie Waschen und Zentrifugieren der Zellen können mit Hilfe von kommerziell erhältlichen Geräten vorzugsweise ebenfalls unter Verwendung eines Beutelsystems erfolgen.

Durch Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen bei der Transduktion von T-Zellen kann eine Verbesserung der Transduktionsrate durch Zentrifugation der Plastikgefäße erreicht werden. Überraschenderweise wurde eine besondere Effizienzsteigerung der Transduktion gefunden, wenn die Beutel nicht wie üblich mit dem Boden nach unten in einen Ausschwingrotor gesetzt werden, sondern derart angeordnet sind, daß die Zellen sich während der Zentrifugation über eine der größten verfügbaren Flächen verteilen können. Hierzu können die Beutel z.B. auf eine der beiden Beutelseiten gelegt werden. Dabei ist es möglich, daß auch mehrere Beutel übereinander gestapelt in den Rotor eingelegt werden. Die Beutel können dabei direkt aufeinander liegen oder in einer speziellen Halterung eingelegt werden, die aus parallel angeordneten Platten besteht.

Eine dritte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens betrifft die Vermehrung von suspendierten Zellen, insbesondere die Vermehrung von T-Zellen oder Antigen-präsentierenden Zellen. Diese Vermehrung von T-Zellen erfolgt im Anschluß an die Stimulation oder/und Transduktion und kann in gasdurchlässigen Beuteln durchgeführt werden, wie sie im Stand der Technik zur Herstellung von Thrombozyten bekannt sind. Die Kultivierung erfolgt in CO₂-Brutschränken, gegebenenfalls unter Verwendung von Schütteleinrichtungen. Bei der Vermehrung der Zellen kann die Kultur durch Ankopplung von mit frischem Medium gefüllten Beuteln nach Bedarf erweitert werden. Zur Probenentnahme für die Zellzählung in einer Zellkammer oder die Analyse von Mediumskomponenten kann nach Anschluß eines kleinen Beutels an den Kulturbeutel ein Aliquot steril entnommen werden. Nach Erreichen der gewünschten Zellzahl können die Zellen dann in Beu-

teln abzentrifugiert, in einem kleinen Volumen aufgenommen und für die Transplantation vorbereitet werden.

Eine vierte bevorzugte Ausführungsform der Erfindung ist die Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen zur Befüllung oder/und Elution von Zellseparationsvorrichtungen, z.B. Zellseparationssäulen (de Wynter et al., Stem Cells 13 (1995), 524-532). Bei der Separation können die Blutbeutel sowohl für das Befüllen des Systems als auch für die Entnahme der separierten Zellen verwendet werden. Um das ganze Verfahren zu einem völlig geschlossenen System zu machen, erfolgt vorzugsweise auch die Vorbereitung der Zellen, z.B. Waschen, Zentrifugieren, Zugabe von Antikörpern etc. innerhalb von Beuteln. Eine besonders bevorzugte Zellseparationsvorrichtung ist die von Audiotore-Hargreaves et al. (Bioconjugate Chem. 5 (1994), 287-300) beschriebene Avidin-Biotin-Immunoabsorptionssäule.

Eine fünfte bevorzugte Ausführungsform der vorliegenden Erfindung ist die Kultivierung oder/und Stimulierung von suspendierten Zellen, insbesondere von T-Zellen, z.B. in Graft-versus-Leukemia-Verfahren, für die adoptive Immuntherapie, für die Herstellung von Vakzinierungszelllinien oder zur Stimulierung von Killer-T-Zellen. Auch hier kann bei Verwendung von Blutbeuteln eine offene Handhabung der Zellen und damit ein Kontaminationsrisiko vermieden werden.

Für den Einsatz bei Graft-versus-Leukemia-Verfahren müssen die T-Zellen, die einem gesunden Spender entnommen wurden, nicht separat stimuliert werden. Zur Markierung der Zellen erfolgt eine Transduktion, vorzugsweise mit einem retroviralen Vektor wie zuvor beschrieben.

Bei der adoptiven Immuntherapie erfolgt eine Stimulierung der T-Zellen z.B. durch Tumorzellen, die dem Patienten entnommen wurden. Die Gewinnung und eventuelle Vermehrung der Tumorzellen ist von der Art des Tumors abhängig. Zur Stimulierung werden die Tumorzellen direkt in den Beutel mit den T-Zellen

des Spenders gegeben. Im Anschluß daran können alle nachfolgenden Schritte wie Transduktion mit einem Vektor, Vermehrung der T-Zellen und Zellseparation in Beuteln, d.h. in einem geschlossenen System durchgeführt werden.

5

Als Vakzinierungszelllinien kommen genetisch modifizierte Tumorzelllinien, z.B. Derivate der RCC-26 Zelllinie (Schendel et al., J. Immunol. 151 (1993), 4209-4220) in Frage. Diese Zelllinien, die z.B. von einem humanem renalem Karzinom abgeleitet
10 sind, können Patienten mit Tumoren, z.B. mit Nierentumoren, zur Immunantwort gegen metastasierende Nierentumorzellen verabreicht werden. Die Vakzinierungszelllinien werden dabei in Beuteln vermehrt und können anschließend direkt den Patienten verabreicht werden.

15

Auch mit inaktivierten humanen B-Zellen stimulierte T-Zellen können Tumorzellen angreifen. Dabei können die inaktivierten Zellen in kleinen Blutbeuteln abgefüllt und direkt an Blutbeutel mit den T-Zellen des Patienten angeschlossen werden. Die
20 weitere Vermehrung der T-Zellen verläuft dann wie zuvor beschrieben. Dieses Vorgehen hat gegenüber bisherigen Vorgehensweisen, bei denen die stimulierenden Zellen nach Kultivierung und Inaktivierung in Cryoröhrchen eingefroren waren, den Vorteil, daß in einem völlig geschlossenen System gearbeitet
25 wird.

Weiterhin können beim erfindungsgemäßen Verfahren auch beschichtete Plastikbeutel eingesetzt werden. Diese Beschichtung kann beispielsweise mit Tumorzellen oder Teilen von Tumorzellen, z.B. zellkernfreien Zellmembranenvesikeln erfolgen. Auf
30 diese Weise kann eine Stimulierung der T-Zellen erfolgen, ohne daß lebende Tumorzellen mit den T-Zellen in Berührung kommen. Außerdem können die Oberflächen der Plastikbeutel noch mit anderen Substanzen, z.B. Proteinen beschichtet werden, um die
35 T-Zellstimulierung auch weiter zu verbessern. Die Beschichtung der Plastikoberfläche kann z.B. durch die in der europäischen Patentanmeldung 96 108 288.0 beschriebenen Techniken erfolgen,

d.h. durch Immobilisierung von Zellen oder Vesikeln, die Teile der natürlichen Oberfläche einer Zelle enthalten. Die Zelle oder das Vesikel kann mit dem ersten Partner eines biologischen Bindepaars modifiziert werden und über den zweiten Partner des Bindepaars an die Festphase immobilisiert werden. Beispiele für geeignete Bindepaare sind hochaffine Bindepaare wie Biotin/Streptavidin, Zucker/Lectin, CD/Anti-CD-Antikörper, MHC-Moleküle oder Hapten/Anti-Hapten-Antikörper.

10 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zur adoptiven Immuntherapie, umfassend die extrakorporealen Schritte: Stimulierung von T-Zellen, Transduktion mit einem Vektor, Vermehrung der T-Zellen und Separation, um die gewünschten T-Zellen zu erhalten, wobei dieses Verfahren dadurch gekennzeichnet ist, daß man mindestens einen der
15 Verfahrensschritte mit einem flexiblen Plastikbeutel durchführt. Vorzugsweise werden alle Schritte in einem geschlossenen System durchgeführt.

20 Noch ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Plastikbeutel, insbesondere ein Blutbeutel mit verschweißbaren Zufuhr- oder/und Abflußöffnungen, der einen Transduktionsvektor, vorzugsweise einen retroviralen Vektor in einem geeigneten Puffer enthält. In eingefrorenen oder lyophilisiertem Zustand weist der Transduktionsvektor eine überraschend
25 hohe Haltbarkeit auf. Alternativ oder zusätzlich kann der Plastikbeutel auch stimulierende oder/und Antigen-präsentierende T-Zellen enthalten. Schließlich betrifft die Erfindung auch Plastikbeutel, die mit einem Transduktionsvektor genetisch modifizierte T-Zellen in einem geeigneten Puffer enthalten.
30

Abbildung 1 zeigt schematisch die Verwendung von Plastikbeuteln bei der ex-vivo Gentherapie. Die dem Spender entnommenen
35 T-Zellen werden durch Behandlung mit stimulierenden Agenzien einer Stimulation unterzogen. Anschließend erfolgt eine Transduktion, vorzugsweise mit viralen Vektoren. Nach der anschlie-

ßenden Kultivierung werden die Zellen mit einem Antikörper markiert und über eine Trennsäule separiert. Daran kann sich wiederum eine Kultivierung anschließen. Schließlich werden die T-Zellen einem Patienten transplantiert.

5

Von den einzelnen Verfahrensschritten können je nach Bedarf einige wegfallen oder auch einige anderen neu hinzukommen. So ist die Kultivierung nach der Separation nicht immer notwendig. Stattdessen können an anderen Stellen Kultivierungsschritte erfolgen oder die Lagerung der Zellen in tiefgefrorenen Beuteln notwendig werden.

Die Abbildung zeigt insbesondere ein Flußdiagramm für ein Graft-versus-Leukemia-Verfahren oder für eine adoptive Immuntherapie. Bei diesen beiden Anwendungen kommen die in den Beuteln abgefüllten retroviralen Vektoren zum Einsatz.

Bei der Kultivierung von Vakzinierungszelllinien kommt nur die Abfüllung der Zellen zur Anwendung, die dem Patienten anschließend direkt, z.B. über eine Kanüle injiziert werden.

Bei der Expansion von ex-vivo stimulierten Killer T-Zellen kommen die Verfahrensschritte der Leukapharese, Stimulation, Kultivierung und Transplantation zur Anwendung.

25

Wie aus der Abbildung ersichtlich ist, können bei Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen sämtliche Verfahrensschritte in einem geschlossenen System durchgeführt werden, wodurch eine erheblich vereinfachte Handhabung ermöglicht und ein Kontaminationsrisiko praktisch vollständig ausgeschlossen werden kann.

30

Patentansprüche

1. Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen zur Abfüllung von
5 Transduktionsvektoren für die Durchführung extrakorporea-
ler Verfahrensschritte in der Gentherapie.
2. Verwendung nach Anspruch 1 zur Abfüllung retroviraler
Vektoren.
- 10 3. Verwendung nach Anspruch 1 oder 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Transduktionsvektoren nach der Abfüllung
lyophilisiert oder/und einfriert.
- 15 4. Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen zur extrakorpo-
realen Transduktion von suspendierten Zellen in der Gen-
therapie.
- 20 5. Verwendung nach Anspruch 4 zur Transduktion von Leukozy-
ten oder Subpopulationen davon oder von Antigen-präsen-
tierenden Zellen.
6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
daß die Transduktion einen Zentrifugationsschritt umfaßt.
7. Verwendung nach Anspruch 6,
dadurch gekennzeichnet,
30 daß die Plastikgefäße so angeordnet werden, daß sich die
Zellen über eine der größten verfügbaren Flächen vertei-
len können.
8. Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen zur extrakorpo-
35 realen Vermehrung von T-Zellen in der Gentherapie.

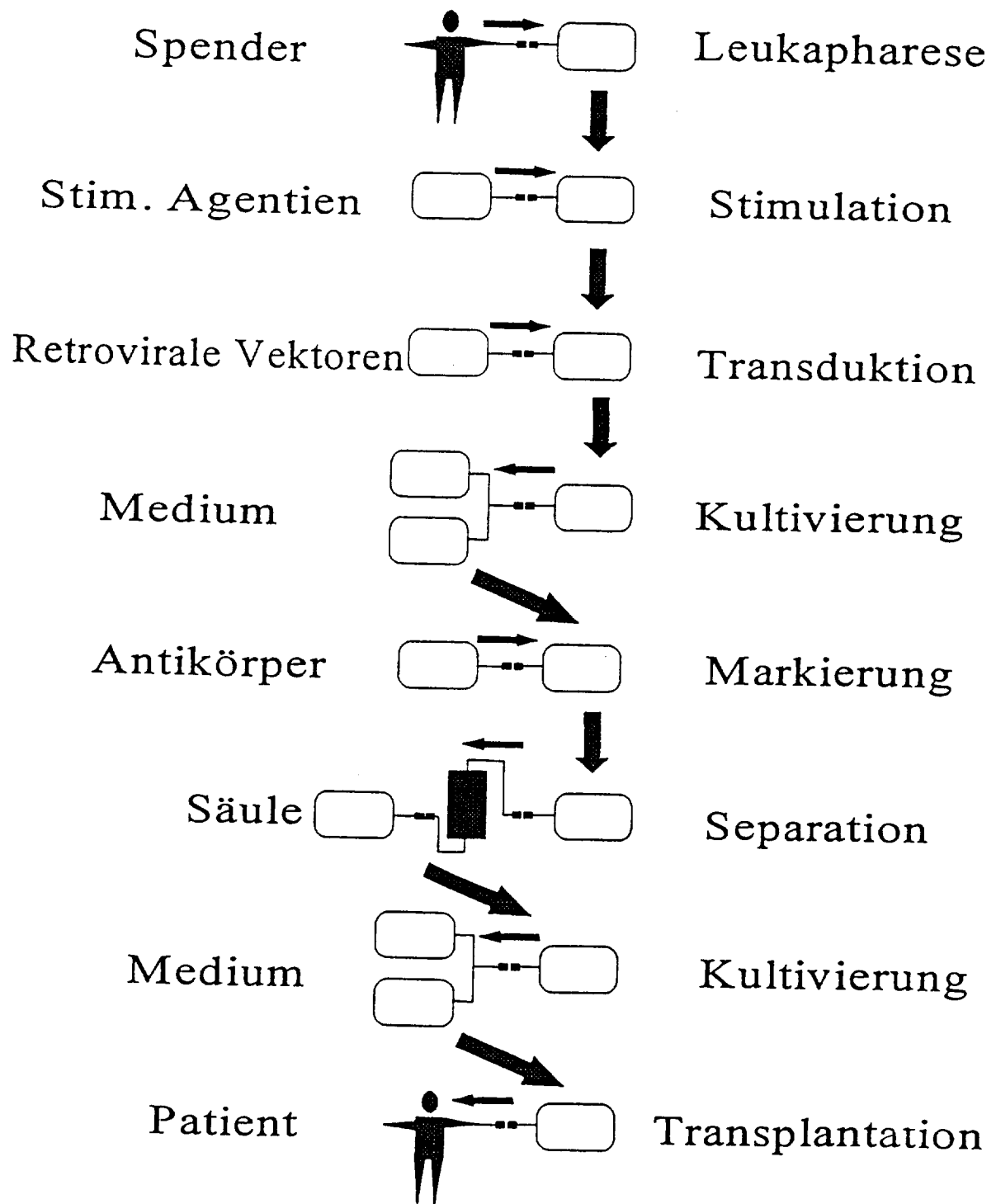
9. Verwendung nach Anspruch 8 zur Vermehrung von stimulierten oder/und transduzierten Zellen.
10. Verwendung nach Anspruch 8 oder 9,
5 **dadurch gekennzeichnet,**
daß man die Vermehrung der Zellen in gasdurchlässigen Plastikbeuteln durchführt.
11. Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen zur extrakorporalen Befüllung oder/und Elution von Zellseparationsvorrichtungen in der Gentherapie.
10
12. Verwendung von flexiblen Plastikgefäßen zur extrakorporalen Stimulierung oder/und Kultivierung von suspendierten Zellen in der Gentherapie.
15
13. Verwendung nach Anspruch 12 zur Stimulierung oder/und Kultivierung von T-Zellen für Graft-versus-Leukemia-Verfahren.
20
14. Verwendung nach Anspruch 12 zur Stimulierung oder/und Kultivierung von T-Zellen für die adoptive Immuntherapie.
15. Verwendung nach Anspruch 12 zur Stimulierung oder/und Kultivierung von Vakzinierungszellen.
25
16. Verwendung nach Anspruch 12 zur Stimulierung oder/und Kultivierung von Killer-T-Zellen.
- 30 17. Verwendung nach einem der Ansprüche 12 - 16,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eine Stimulierung in einem beschichteten Plastikbeutel durchführt.

18. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 17,
dadurch gekennzeichnet,
daß die flexiblen Plastikgefäße ein Volumen von 10 - 5000
ml aufweisen.
- 5
19. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 18,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Plastikgefäße geschlossene Beutel sind, die min-
destens ein Ansatzstück für verschweißbare Verbindungen
10 enthalten.
20. Verfahren zur adoptiven Immuntherapie oder Graft-versus-
Leukemia-Verfahren, umfassend die extrakorporealen
Schritte: Stimulierung von T-Zellen, Transduktion mit
15 einem Vektor, Vermehrung der T-Zellen und Separation,
dadurch gekennzeichnet,
daß man mindestens einen der Verfahrensschritte in einem
flexiblen Plastikbeutel durchführt.
- 20 21. Verfahren nach Anspruch 20,
dadurch gekennzeichnet,
daß man alle Schritte in einem geschlossenen System
durchführt.
- 25 22. Plastikbeutel,
dadurch gekennzeichnet,
daß er einen Transduktionsvektor in einem geeigneten
Puffer enthält.
- 30 23. Plastikbeutel nach Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß er einen retroviralen Vektor enthält.
- 35 24. Plastikbeutel nach Anspruch 22 oder 23 in eingefrorenem
oder lyophilisiertem Zustand.

- 13 -

25. Plastikbeutel,
dadurch gekennzeichnet,
daß mit einem Transduktionsvektor genetisch modifizierte
T-Zellen in einem geeigneten Puffer enthält.

Plastikbeutel bei der ex-vivo Gentherapie



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12M3/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12M

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 87 06119 A (AL SIOUFI HABIB) 22 October 1987 cited in the application see claims 1-16; figures ---	1-25
X	WO 96 00782 A (COMMON SERVICES AGENCY ;TURNER MARC LEIGHTON (GB); MURPHY WILLIAM) 11 January 1996 cited in the application see claims 1-10 ---	1-25
X	WO 92 19285 A (SHARMA YASH P) 12 November 1992 cited in the application see claims 13-33 ---	1-25
	-/--	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 January 1998

Date of mailing of the international search report

06/02/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Coucke, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 97/04426

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DATABASE WPI Section Ch, Week 9108 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 91-055749 XP002019056 & JP 03 007 575 A (SHIMADZU CORP) , 14 January 1991 cited in the application see abstract</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-25
X	<p>EP 0 471 947 A (SEKISUI CHEMICAL CO LTD) 26 February 1992 cited in the application see claims; figures</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-25
X	<p>EP 0 725 134 A (NPBI BV) 7 August 1996 see claims; figures</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-25
X	<p>WO 94 00133 A (GEN HOSPITAL CORP) 6 January 1994 see page 30, line 5 - line 21; claims</p> <p style="text-align: center;">---</p>	1-25
X	<p>WO 87 06952 A (BAXTER TRAVENOL LAB) 19 November 1987 see page 8, line 15 - page 9, line 26; claims; figures</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 97/04426

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 8706119 A	22-10-87	AU 7281487 A	09-11-87
		EP 0263873 A	20-04-88
		JP 1500012 T	12-01-89
		US 4938758 A	03-07-90

WO 9600782 A	11-01-96	AU 2892295 A	25-01-96
		EP 0770127 A	02-05-97

WO 9219285 A	12-11-92	AU 2024692 A	21-12-92

EP 0471947 A	26-02-92	JP 1975491 C	27-09-95
		JP 4063585 A	28-02-92
		JP 7004225 B	25-01-95
		AU 631746 B	03-12-92
		AU 7937791 A	02-01-92
		US 5225346 A	06-07-93
		CA 2045969 A	30-12-91

EP 0725134 A	07-08-96	NONE	

WO 9400133 A	06-01-94	EP 0646010 A	05-04-95
		US 5661126 A	26-08-97

WO 8706952 A	19-11-87	US 4829002 A	09-05-89
		AU 607915 B	21-03-91
		AU 7430487 A	01-12-87
		CA 1270467 A	19-06-90
		EP 0267266 A	18-05-88
		JP 63503201 T	24-11-88
		US 4937194 A	26-06-90

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04426

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12M3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 6 C12M

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoffgehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 87 06119 A (AL SIOUFI HABIB) 22. Oktober 1987 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1-16; Abbildungen ---	1-25
X	WO 96 00782 A (COMMON SERVICES AGENCY ; TURNER MARC LEIGHTON (GB); MURPHY WILLIAM) 11. Januar 1996 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 1-10 ---	1-25
X	WO 92 19285 A (SHARMA YASH P) 12. November 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche 13-33 ---	1-25
	-/--	

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

29. Januar 1998

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

06/02/1998

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Coucke, A

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE WPI Section Ch, Week 9108 Derwent Publications Ltd., London, GB; Class B04, AN 91-055749 XP002019056 & JP 03 007 575 A (SHIMADZU CORP) , 14.Januar 1991 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung ---	1-25
X	EP 0 471 947 A (SEKISUI CHEMICAL CO LTD) 26.Februar 1992 in der Anmeldung erwähnt siehe Ansprüche; Abbildungen ---	1-25
X	EP 0 725 134 A (NPBI BV) 7.August 1996 siehe Ansprüche; Abbildungen ---	1-25
X	WO 94 00133 A (GEN HOSPITAL CORP) 6.Januar 1994 siehe Seite 30, Zeile 5 - Zeile 21; Ansprüche ---	1-25
X	WO 87 06952 A (BAXTER TRAVENOL LAB) 19.November 1987 siehe Seite 8, Zeile 15 - Seite 9, Zeile 26; Ansprüche; Abbildungen -----	1-25

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 97/04426

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 8706119 A	22-10-87	AU 7281487 A	09-11-87
		EP 0263873 A	20-04-88
		JP 1500012 T	12-01-89
		US 4938758 A	03-07-90

WO 9600782 A	11-01-96	AU 2892295 A	25-01-96
		EP 0770127 A	02-05-97

WO 9219285 A	12-11-92	AU 2024692 A	21-12-92

EP 0471947 A	26-02-92	JP 1975491 C	27-09-95
		JP 4063585 A	28-02-92
		JP 7004225 B	25-01-95
		AU 631746 B	03-12-92
		AU 7937791 A	02-01-92
		US 5225346 A	06-07-93
		CA 2045969 A	30-12-91

EP 0725134 A	07-08-96	KEINE	

WO 9400133 A	06-01-94	EP 0646010 A	05-04-95
		US 5661126 A	26-08-97

WO 8706952 A	19-11-87	US 4829002 A	09-05-89
		AU 607915 B	21-03-91
		AU 7430487 A	01-12-87
		CA 1270467 A	19-06-90
		EP 0267266 A	18-05-88
		JP 63503201 T	24-11-88
		US 4937194 A	26-06-90
