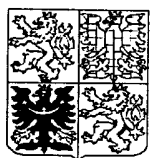


PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

286 979

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLUVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **1997 - 4195**

(22) Přihlášeno: **24.06.1996**

(30) Právo přednosti:
27.06.1995 DK 1995/740

(40) Zveřejněno: **18.03.1998**
(Věstník č. 3/1998)

(47) Uděleno: **07.06.2000**

(24) Oznámeno udělení ve Věstníku: **16.08.2000**
(Věstník č. 8/2000)

(86) PCT číslo: **PCT/EP96/02748**

(87) PCT číslo zveřejnění: **WO 97/01357**

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.⁷:
A 61 K 48/00
C 12 N 11/04
A 61 K 9/50
A 61 P 35/00
A 61 P 43/00

(73) Majitel patentu:

BAVARIAN NORDIC RESEARCH INSTITUTE
A/S, Glostrup, DK;
GSF-FORSCHUNGSZENTRUM FÜR UMWELT
UND GESUNDHEIT GMBH, Oberschleissheim,
DE;

(72) Původce vynálezu:

Saller Robert Michael, München, DE;
Günzburg Walter H., Ainhofen, DE;
Salmons Brian, Ainhofen, DE;

(74) Zástupce:

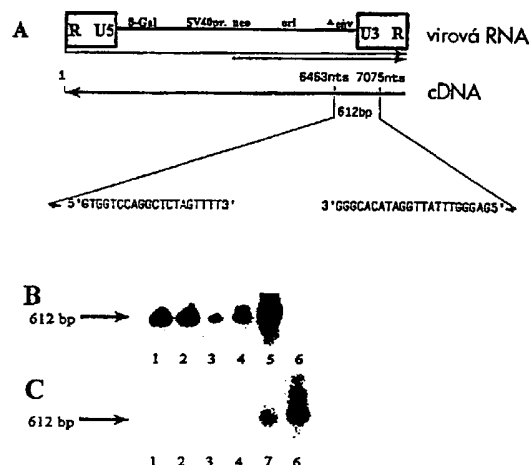
Hakr Eduard Ing., Přístavní 24, Praha 7, 17000;

(54) Název vynálezu:

**Kapsule zapouzdřující buňky, produkující
virové částice, způsob její přípravy a
farmaceutický prostředek pro genovou terapii**

(57) Anotace:

Popisují se zapouzdřené buňky, produkující virové částice,
zejména částice retrovirů, obsahující retrovirový vektor,
nesoucí terapeutický gen, způsoby přípravy těchto
zapouzdřených buněk a jejich použití pro dodání genů,
zejména terapeutických genů, do cílových orgánů nebo buněk.



Kapsule zapouzdřující buňky, produkující virové částice, způsob její přípravy a farmaceutický prostředek pro genovou terapii

5 Oblast techniky

Základem genové terapie je dodání terapeuticky výhodného genu do cílových buněk. Má-li se stát genová terapie rutinním postupem, je nanejvýše důležité vyvinout systémy, které budou schopny účinně dodávat terapeutické geny in vivo cílovým buňkám.

10

Dosavadní stav techniky

15 Virové vektory, zejména retrovirové vektory, jsou v genové terapii neobvyklejším prostředníkem (Morgan a Anderson, 1993). Nejběžnější způsob genové terapie využívá přístup ex vivo, kdy buňky odebrané pacientovi jsou in vitro geneticky modifikovány a poté vráceny pacientovi. Tento postup je těžkopádný, drahý a jeho použití je limitováno použitím špičkových technologií. Navíc je tento způsob použitelný pouze pro buňky, které je možno lehce izolovat, kultivovat a reimplantovat (Günzburg a spol., 1995). Ačkoliv dodání terapeutických genů in vivo 20 by nabízela mnoho výhod, je tento postup v současné době problematický a neefektivní. Hlavním problémem je malá účinnost genového přenosu, a je proto nutno použít opakovaného dodání virového vektoru. Opakovaná aplikace vektoru je však nejen pracná, ale pravděpodobně i neúspěšná, vzhledem k imunitní odpovědi na virové částice.

25 Jeden ze způsobů, kterými by bylo možno tyto potíže překonat, je přímá implantace buněk, které produkují virové částice. Implantace buněk, produkujících virové částice, obsahující genom virového vektoru in situ blízko cílového orgánu nebo cílových buněk by také umožnila přímé působení virového vektoru na tyto cílové buňky nebo orgány.

30 Navíc, je-li použitý virový vektor vektorem retroviru, je tento přístup výhodný proto, že ve srovnání s použitím opakovaných dávek zvyšuje naději, že vektor bude přítomen v době, kdy cílová buňka prochází stadiem replikace, čímž se zvýší pravděpodobnost infekce. Dále, plynulé uvolňování virových částic v menších množstvích by mohlo příznivě ovlivnit možnost úniku virových částic imunitní odpovědi hostitele.

35

Má-li být dodání virového vektoru účinné, buňky produkující virové partikule musí být schopné přežít dlouhou dobu po implantaci a virové částice musí být po tuto dobu produkovány a uvolňovány z buněk. Nedojde-li k významné imunitní odpovědi, na příklad po implantaci do mozku, jsou tyto buňky schopny přežít dlouhou dobu (Culver a spol., 1992; Ram a spol., 40 1993). K dosažení úspěšné implantace do jiných částí těla je však nutno produkční buňky chránit před reakcí imunitního systému.

Dlouhodobá účinnost tohoto postupu tedy závisí na (1) ochraně buněk před hostitelským imunitním systémem, který za normálních okolností eliminuje buňky, produkující virové částice, 45 a to zejména tehdy, pocházejí-li buňky, produkující virové částice, z jiného živočišného druhu, což je pro tyto buňky obvyklý případ, a (2) prodloužené době přežití buněk in situ, která bývá nutná pro jejich vaskularizaci.

Do jisté míry se ukázalo úspěšné zapouzdření buněk do propustných struktur, průchodných pro 50 některé biologicky aktivní molekuly, ale zároveň chránících buňky, produkující tyto látky, před imunitní odpovědí hostitele (přehled viz Chang, 1995). Byly již zapouzdřeny buňky, které byly geneticky modifikovány tak, aby produkovaly lidský růstový hormon (hGH) (Tai a Sun, 1993) nebo sekretovanou formu lidské adenosin deaminázy (Hughes a spol., 1994). V obou studiích byly buňky zapouzdřeny do poly-L-lyzin-alginátové mikrokapsule a ukázalo se, že v kultuře

přežívají dlouhou dobu. Tyto buňky byly po dlouhou dobu schopny vylučovat enzym nebo hormon. Dále (Tai a Sun, 1993) prokázali, že po transplantaci těchto mikrokapsulí do myši byly tyto buňky schopny života 1 rok a po tuto dobu pokračovaly v produkci hGH, což dokazuje schopnost mikrokapsule chránit transfektovanou buňku před zničením hostitelským imunitním systémem.

Bylo rovněž publikováno zapouzdření buněk s použitím jiných materiálů. Geneticky byly modifikovány ledvinové buňky mladých křečků tak, aby produkovaly nervový růstový faktor, byly zapouzdřeny do chloridu polyakrylonitrilu nebo polyakrylovinylochloridu a implantovány do krysího mozku. Zapouzdřené buňky přežívaly nejméně 6 měsíců a pokračovaly v produkci NGF (Win a spol., 1994; Deglon a spol., 1995).

Hepatocyty byly úspěšně zapouzdřeny do polyelektrolytického komplexu síranu celulózy a polydimetyl diallylaminia (Stange a spol., 1993). Více než 90 % zapouzdřených hepatocytů rostoucích v monovrstvě, byly metabolicky aktivnější. Tím nechceme tvrdit, že kapsule, vytvořené síranem celulózy a polydimetyldiallylamoniem, mohou podporovat růst buněk jiných typů, nebo umožňovat průchod virových částic těmito kapsulemi.

Postup přípravy kapsulí ze síranu celulózy, použitých v předkládaném vynálezu, byl podrobně popsán v DE 40 21 050 A1. Rovněž syntéza síranu celulózy je popsána v tomto patentu. Postupy k celkové charakterizaci kapsulí se rozsáhle zabývá H. Dautzengerg a spol., Biomat., Art. Cells & Immob. Biotech., 21 (3), 399–405 (1993). Jiné kapsule, používající síran celulózy, jsou popsány v GB 2 135 954. Vlastnosti celulózových kapsulí, t.j. jejich velikost, velikost pórů, síla stěny a mechanické vlastnosti, závisící na několika faktorech, jako na příklad na fyzikálních podmínkách, za kterých byly kapsule připraveny, viskozita srážecí lázně, její iontová síla, teplota, rychlost přidávání suspenze buněk nebo síranu celulózy, složení síranu celulózy a další parametry jsou popsány Dautzengergovou skupinou.

Překvapivé bylo zjištění, že nepřetržitou produkci virových částic z implantovaných buněk lze dosáhnout zapouzdřením buněk do polyelektrolytového komplexu. Ačkoliv póry těchto kapsulí jsou dostatečně velké, aby umožnily průchod protilátek a komplementu, o kterých je známo, že inaktivují virus (Welsh a spol., 1975, Cornetta a spol., 1990), nenalezli jsme viditelné důkazy imunitní nebo zánětlivé odpovědi v okolí implantovaných kapsulí. Překvapivé bylo navíc zjištění, že kapsule, připravené podle předloženého vynálezu, dobře v hostiteli přirůstají a jsou rychle vaskularizovány. Zapouzdřené buňky, připravené podle předloženého vynálezu, tedy dovolují in vivo dlouhodobé dodávání virového vektoru, nesoucího terapeutické geny.

Podstata vynálezu

Vynález se týká následujících bodů nebo jejich kombinací:

Zapouzdřených buněk, produkujících virové částice, sestávajících z vnitřku, obsahujícího buňky; a porézní stěny kapsule, která obklopuje buňky a umožňuje průchod příslušným virovým částicím;

zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, kdy porézní stěna této kapsule je tvořena polyelektrolytovým komplexem, obsahujícím opačně nabitě polyelektrolyty;

zapouzdřených buněk, jak shora uvedené, kdy porézní stěna této kapsule je tvořena polyelektrolytovým komplexem z polysacharidů nebo polysacharidových derivátů, obsahujících síranovou skupinu, nebo syntetických polymerů, obsahujících sulfonové skupiny, a polymerů, obsahujících kvarterní amoniové skupiny;

zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, kdy polysacharid nebo derivát polysacharidu, obsahující síranovou skupinu, je síran celulóza, síran acetylcelulózy, síran karboxymethylcelulózy, síran dextranu nebo síran škrobu, a syntetický polymer, obsahující sulfonovou skupinu, je sulfopolystyren;

5

zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, kdy polymer, obsahující kvarterní amoniovou skupinu, je polydimetyldiallylamonium nebo polyvinylbenzotrimetylamonium;
zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, kdy stěna porézní kapsule se skládá z komplexu, tvořeného síranem celulózy a polydimetyldiallylamonia;

10

zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, majících tvar mikrokapsule o průměru mezi 0,01 a 1 mm;

15

zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, kdy vnitřní stěna kapsule sestává z houbovitého skeletu, tvořeného síranem celulózy a je obklopena vnějším porézním povrchem; uvedený houbovitý skelet je naplněn buňkami;

20

zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, s velikostí pórů ve stěně porézní kapsule mezi 80 a 150 nm, lépe mezi 100–120nm;

25

zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, kdy virové částice, produkované zapouzdřenými buňkami, jsou částice retrovirů, obsahující genom retrovirového vektoru;

30

zapouzdřených buněk, jak shora uvedeno, kdy zapouzdřenými buňkami, produkujícími retrovirové částice, je buněčná linie, obsahující pomocný virus [termín „buňka (nebo buněčná linie), obsahující pomocný virus“ je použit na tomto místě a v celé přihlášce místo anglického „packaging cell“, (packaging cell line“); výstižný krátký český termín nebyl dosud vytvořen; význam termínu je vysvětlen v přihlášce na str. 12 řádek 1], transfekovaná expresním vektorem, tento expresní vektor, obsahující konstrukt retrovirového vektoru, schopný infekce a řízení exprese jedné nebo více kódovaných sekvencí, obsažených v tomto konstrukt vektoru v cílových buňkách; zmíněná buněčná linie, obsahující pomocný virus, nese alespoň jeden expresní vektor, obsahující geny, kódující bílkoviny, nutné ke sbalení retrovirového konstrukt;

35

zapouzdřené buňky, jak shora uvedeno, ve kterých jedna ze zmíněných sekvencí kóduje heterologní peptidy, vybrané ze značkových genů, terapeutických genů, protinádorových genů nebo cytokininových genů;

40

zapouzdřené buňky, jak shora uvedeno, v nichž je uvedený značkový gen vybrán ze skupiny značkových genů, kódujících bílkoviny, jako β -galaktosidázu, neomycin, alkohol dehydrogenázu, puromycin, hypoxantin fosforibosyltransferázu, (HPRT) . hygromycin, vylučované alkalické fosfatázy, a zmíněný terapeutický gen je vybrán z genů, které kódují bílkoviny, jako jsou Herpes simplex virus tymidin kináza, cytosin deamináza, guanin fosforibosyltransferáza (gpt), cytochrom P 450 a cyklické regulační geny, jako SDI, nádory potlačující geny, které kódují bílkoviny, jako p53 nebo antiproliferační geny, které kódují bílkoviny jako melittin, cecropin nebo cytokininy, jako IL-2;

45

zapouzdřené buňky, jak shora uvedeno, kdy buněčná linie, obsahující pomocný virus, je vybrána z psi-2, psi-crypt, psi-AM, GP+E-86, PA317 a GP+envAM-12;

50

zapouzdřené buňky, jak shora uvedeno, u nichž je expresní vektor transfekovaný do buněčné linie, obsahující pomocný virus, jako je pBAG, pLXSN, p125LX, pLX2B1 nebo pc3/2B1 nebo jejich deriváty;

postup přípravy zapouzdřených buněk sestává v suspendování buněk, produkujících virové částice, ve vodném roztoku polyelektrolytu, poté je nově vzniklá suspenze ve formě částic vnesena do srážecí lázně, obsahující vodný roztok opačně nabitého polyelektrolytu;

5 postup uvedený shora, při kterém se částice tvoří rozprašením;

postup uvedený shora, při kterém se buňky suspendují ve vodném roztoku polysacharidu, nebo derivátu polysacharidu, obsahujícího síranové skupiny, nebo roztoku syntetického polymeru, obsahujícího sulfonové skupiny;

10

postup uvedený shora, kdy použité polysacharidy, nebo polysacharidové deriváty, obsahující síranové skupiny, jsou vybrány ze síranu celulózy, síranu acetylcelulózy, síranu karboxymethylcelulózy, síranu dextran nebo síranu škrobu, a syntetický polymer, obsahující sulfoskupinu, je sulfopolystyren

15

postup uvedený shora, kdy srážecí lázeň obsahuje vodný roztok polymeru, majícího kvartérní amoniové skupiny;

20

postup uvedený shora, kdy polymerem, obsahujícím kvartérní amoniové skupiny, je polydimetyldiallylamonium nebo polyvinylbenzyltrimetylamonium;

postup uvedený shora, kdy buňky jsou suspendovány ve vodném roztoku sodné soli síranu celulózy a jsou vnášeny do srážecí lázně, obsahující vodný roztok chloridu polydimetyldiallylamonia;

25

metoda uvedená shora, kdy vodný roztok síranu celulózy obsahuje 0,5–50 % sodné soli síranu celulózy a 2–10 %, přednostně 5 % fetálního telecího séra v pufovaném fyziologickém roztoku;

30

metoda uvedená shora, kdy vodný roztok srážecí lázně obsahuje 0,5–50 %, lépe 2–5 %, ještě lépe 3 % chloridu polydimetyldiallylamonia v pufovaném fyziologickém roztoku;

jakékoliv zapouzdřené buňky, připravené kterýmkoli ze shora uvedených postupů;

35

použití zapouzdřených buněk, jak je shora uvedeno, pro dodání genů do cílových orgánů nebo buněk, sestávající z:

a) růstu zapouzdřených buněk ve vhodném médiu, a

b) implantace zapouzdřených buněk do živého zvířecího těla, včetně těla lidského;

40

použití, jak je shora uvedeno, do cílových orgánů nebo buněk savčích žláz nebo pankreatu; a

použití, jak je shora uvedeno, do cílových orgánů nebo buněk hladkého svalstva a jiných typů buněk, obklopujících arterie.

45

Předmětem předkládaného vynálezu je získání zapouzdřených buněk, umožňujících uvolnění virových částic, produkovaných těmito buňkami z kapsulí, a které po implantaci kapsulí nevzbudí významnou imunitní nebo zánětlivou reakci hostitelského organismu.

50

Dalším předmětem vynálezu je uvedení postupu přípravy těchto zapouzdřených buněk, produkujících virové částice.

Předmětem tohoto vynálezu je také metoda pro dodání genů, zvláště genů terapeutických, cílovým orgánům nebo buňkám implantací zapouzdřených buněk, produkujících virové částice,

do hostitelského organismu a tedy zajištění stálé produkce a uvolňování virových částic v cílových orgánech nebo v blízkosti cílových buněk.

- 5 Podle předloženého vynálezu zapouzdřené buňky produkují a umožňují uvolnit virové částice, které byly buňkami produkovány, z kapsulí, a současně nevyvolají významnou imunitní reakci nebo zánět v hostitelském organismu.

- 10 Zapouzdřené buňky podle tohoto vynálezu mohou být připraveny suspendováním buněk, produkujících virové částice, ve vodném roztoku polyelektrolytu (např. podle výběru polysacharidy, nebo deriváty polysacharidů, obsahující síranové skupiny nebo syntetické polymery, obsahující sulfonové skupiny) a dále vnesením suspenze, obsahující vzniklé částice, do srážecí lázně, obsahující vodný roztok opačně nabitého polyelektrolytu (jakým je např. polymer, obsahující kvartérní amoniové skupiny).

- 15 Polysacharidy nebo deriváty polysacharidů, obsahující síranové skupiny, včetně síranu celulózy, síranu acetylcelulózy, síranu karboxymetylcelulózy, síranu dextranu nebo síranu škrobu ve formě solí, zejména sodných. Syntetickým polymerem, obsahujícím sulfo-skupiny, může být sůl sulfopolystyrenu, lépe jeho sodná sůl.

- 20 Polymery, obsahující kvartérní amoniové skupiny, mohou být polydimetyldiallylamonium nebo polyvinylbenzyltrimethylamonium ve formě solí, lépe jako chloridy.

- 25 V přednostním provedení vynálezu jsou buňky, produkující virové částice, zapouzdřeny v komplexu, sestávajícím z komplexu, tvořeného síranem celulózy a polydimetyldiallylamonia.

- 30 Tyto kapsule jsou přednostně připraveny suspendováním buněk, produkujících virové částice, v roztoku, obsahujícím 0,5–50 %, lépe 2–5 %, síranu celulózy a 5 % fetálního hovězího séra ve zvoleném pufru. Suspenze je potom vnášena po kapkách dávkovacím zařízením (např. rozstříkáváním vzduchem pomocí trysky nebo piezoelektrickým systémem) za stálého míchání do srážecí lázně, obsahující 0,5–50 %, lépe 2–10 %, nebo nejlépe 3 % chloridu polydimetyldiallylamonia ve zvoleném pufru. Tvorba kapsulí trvá milisekundy a kapsule, obsahující buňky, jsou ponechány ve srážecí lázni 30 sekund až 5 minut a poté jsou promyty. Rychlost metody zaručuje, že buňky nejsou vystaveny během postupu škodlivému stresu. (Stange a spol., 1993).

- 35 Kapsule, připravené podle vynálezu, mají průměry v rozmezí mezi 0,01 a 5 mm, lépe mezi 0,1 a 1 mm. V závislosti na velikosti mohou být kapsule připraveny tak, aby obsahovaly různé množství buněk. S použitím postupu podle vynálezu je možno zapouzdřením do polyelektrolytového komplexu připravit kapsule, obsahující až 10^{10} , lépe 10^5 – 10^7 buněk, produkujících virové částice.

Kapsule, vytvořené síranem celulózy a polydimetyldiallylamoniem, mají výborné mechanické vlastnosti a mohou být připraveny v jednotné velikosti a s jednotnou velikostí pórů.

- 45 Velikost pórů kapsulí je mezi 80 a 150 nm, lépe mezi 100 a 120 nm.

- 50 Zapouzdřené buňky mohou být kultivovány v normálním buněčném médiu (jehož složení závisí na druhu zapouzdřených buněk) za standardních podmínek vlhkosti, teploty a koncentrace CO_2 . Po dobu kultivace je možno dokázat, že dochází k uvolňování virových částic z kapsulí do kultivačního média použitím buď RT-PCR technologií, nebo přenosem bezbuněčného (0,45 μm filtrace) supernatantu do cílových buněk a následným důkazem virové infekce stanovením aktivity značkových bílkovin, kódovaných geny konstruktů virového vektoru, obsaženého ve virových částicích. Je-li značkový gen, obsažený ve virovém vektoru, genem nesočím

specifickou rezistenci k nějaké látce v cílových buňkách, je možno titr viru, produkovaného systémem, stanovit také tímto způsobem.

Po vhodné době kultivace (normálně na kratší než 1 hodina a delší než 30 dní) mohou být kapsule, obsahující buňky, chirurgicky implantovány, a to buď přímo, nebo injekčně s použitím injekční stříkačky do různých částí těla.

Podle tohoto vynálezu mohou být virové částice, produkované zapouzdřenými buňkami, jakéhokoli druhu, vhodného pro genovou terapii, zahrnující v to, ale neomezuji se pouze na, adenoviry, viry sdružené s adenoviry, herpetické viry nebo retroviry; přehled viz Günzburg a Salmons, 1995.

V přednostním provedení vynálezu jsou zapouzdřené buňky buněčná linie, obsahující pomocný virus, produkující retrovirové částice, které obsahují ve svém genomu konstrukt retrovirového vektoru, nesoucí markerový a terapeutický gen.

Systémy retrovirového vektoru se skládají ze dvou částí:

1) expresní vektor (plazmidový vektor) nesoucí retrovirový vektorový konstrukt, který je modifikovaným retrovirem, u něhož byly geny kódující virové bílkoviny nahrazeny terapeutickými geny a podle rozhodnutí i zvoleným značkovým genem za účelem jejich přenosu do cílové buňky. Protože záměna genů, kódujících virové bílkoviny, virus značně poškozuje, je nutno jej ochránit druhou složkou systému, která zajistí syntézu chybějících virových bílkovin.

Druhá složka je:

2) buněčná linie, produkující velké množství virových bílkovin, která ale neprodukuje replikace schopný virus. Tato buněčná linie se nazývá buněčná linie, obsahující pomocný virus, a je to buněčná linie, která byla transfektována plazmidy, nesoucími geny, umožňující sbalení modifikovaného retrovirového genomu do virové částice. Tyto plazmidy řídí syntézu virových bílkovin, nutných pro produkci virionů.

K získání sbaleného retrovirálního vektoru je vektorový plazmid transfektován do buněčné linie, obsahující pomocný virus. Za těchto podmínek je modifikovaný retrovirový genom, obsahující vložený terapeutický gen a zvolený značkový gen, přepsán z vektorového plazmidu a výsledný modifikovaný retrovirový genom je sbalen do retrovirové částice. Buňka, infikovaná takovou virovou částicí, není schopna vytvářet virové částice, protože žádné virové bílkoviny nejsou v těchto buňkách obsaženy. Avšak retrovirový konstrukt, nesoucí terapeutický a značkový gen, je přítomen a může být v infikovaných buňkách exprimován.

WO 94/29437, WO89/11539 a WO96/07748 popisují různé typy systémů retrovirových vektorů, použitelných k účelům tohoto předloženého vynálezu

Virové částice, produkované zapouzdřenými buňkami podle tohoto vynálezu, mohou být navrženy tak, aby obsahovaly genom virového vektoru, nesoucího geny kódující značku a/nebo terapeutické geny.

Značkové nebo terapeutické geny, nesené virovým vektorem, mohou být např. geny kódující bílkoviny, jako β -galaktosidázu, neomycin, alkoholdehydrogenázu, puromycin, hypoxantin fosforibosyl transferázu (HPRT), hygromycin a vylučovanou alkalickou fosfatázu, nebo terapeutické geny, kódující bílkoviny, jako je virová Herpes Simplex tymidin kináza, cytosin deamináza, guanin fosforibosyltransferáza (get), cytochrom P 450, regulační geny buněčného

cyklu, jako je SDI, geny potlačující nádory, kódující bílkoviny, jako je p53, antiproliferační geny, které kódují bílkoviny, jako je melitin, cecropin nebo cytokininy jako IL-2.

5 Ve zvláštním spojení se použití vynálezu týká užití zapouzdřených buněk, připravených podle vynálezu, k léčení nádorů.

Mnoho maligních nádorů nereaguje dobře na chemoterapii. Protirakovinná léčiva, používaná v léčení nádorů, jsou v mnoha případech používána systematicky a jsou tedy rozšiřována do celého organismu pacienta. Soustavná podávání vysokých dávek takových léčiv, vyžadovaná
10 k léčení rakoviny, jsou často doprovázena pro pacienta nepříjemnými vedlejšími efekty. Jedna ze strategií, které by mohly obejít tyto problémy vysokých systematických koncentrací, je přímá aplikace nebo aktivace léčiva v blízkém okolí nádoru. Toho může být dosaženo podle tohoto vynálezu implantací zapouzdřených buněk, produkujících virové částice, obsahující genom plánovitě pozměněného viru, zvláště retroviru, nesoucího gen, kódující léčivo proti rakovině,
15 např. aktivační enzym, schopný převést prekursor léčiva na cytotoxickou látku, buď přímo v nádorových buňkách, nebo v buňkách v jejich blízkém okolí.

V jednom z použití tohoto vynálezu zapouzdřené buňky skýtají možnost produkce retrovirových částic, obsahujících genom retrovirového vektoru nesoucí enzymy, významné pro nádorovou tkáň, jako jsou cytochrom P 450, nebo sebevražedné geny, jako jsou, ale ne pouze, tymidin
20 kináza, která přeměňuje netoxická léčiva na jeden nebo několik toxických metabolitů. Takové zapouzdřené buňky podle tohoto vynálezu mohou být využity k léčbě rakovin implantací těchto kapsulí do / nebo blízko nádorů, např. nádorů pankreatu nebo mléčných žláz.

25 Dalšího cíleného působení může být dosaženo použitím specifických regulačních prvků a promotorů v cílových buňkách, jimiž lze dosáhnout řízení exprese připojených terapeutických genů ve specifických typech buněk.

Tyto specifické regulační prvky a promotory cílových buněk zahrnují např. specifické pankreatické regulační prvky a promotory, počítající do nich regulační elementy a promotory anhydrazy kyseliny, uhličitě II a β -glukokinázy; lymfocytární specifické regulační prvky a promotory, zahrnující lymfocytární specifické regulační prvky a promotory imunoglobulinu a MMTV,; specifické regulační prvky a promotory mléčných žláz, počítající do nich Whey Acidic Protein (WAP) a virus myších mléčných žláz (MMTV) Mouse Mammary Tumor Virus,
35 specifické regulační prvky a promotory β -laktoglobulinu a kaseinu a specifické regulační prvky a promotory MMTV, udělující citlivost na glukokortikoidní hormony nebo řídící expresi v mléčných žlázách. Jiné promotory zahrnuje například promotory CD4, CD34 a IL2. Uvedené regulační prvky a promotory regulují přednostní expresi zmíněných retrovirových vektorů.

40 Mohou být rovněž použity radiačně induktivní promotory, například promotor intracelulární adhezivní molekuly-1 (ICAM-1), promotor epidermálního růstového faktoru (EGFR) nebo promotor nádorového nekrotického faktoru (TNF).

Následující příklady dále ilustrují tento vynález, avšak není je možno chápat jako příklady
45 vynálezu omezující.

Příklady provedení vynálezu

5 Příklad 1

Lipofekce PA317 pomocí pBAG a izolace rezistentních buněk G418:

10 Amfotropické buňky NIH3T3, založené na buňkách P317, obsahujících pomocný virus (Miller a Bultimore, 1986), byly kultivovány na Dubescem modifikovaném médiu podle Eagle (DMEM), obsahujícím 10 % fetálního telecího séra. Buňky byly naočkovány do 10 cm misek na tkáňové kultury v hustotě 3×10^5 jeden den před lipofekcí a byly lipofektovány 2 μ g vektoru pBAG (Price a spol., 1987), nesoucím retrovirální vektor MLV (virus myši leukemie), s použitím komerční lipofektaminové sady činidel od GIBCO/BRL podle návodu výrobce. Buňky byly poté zředěny
15 jedna ku deseti a kultivovány v obvyklém médiu, obsahujícím navíc 400 μ g/ml G418 (GIBCO/BRL). Po 14 dnech byly kolonie, obsahující G418 rezistentní buňky, spojeny.

20 Příklad 2

Mikrozapouzdření:

10⁷ buněk bylo suspendováno v 1 ml pufovaného fyziologického roztoku, obsahujícího 2–5 % sodné soli síranu celulózy a 5 % fetálního telecího séra a vzniklá suspenze byla po kapkách
25 pomocí dávkovacího systému (rozstřikováním vzduchem pomocí trysky) vnášena do srážecí lázně, obsahující 2–3 % polydimetyldiallylamonia v pufovaném fyziologickém roztoku. Tvorba mikrokapsulí, probíhající v milisekundách, byla následována tvorbou porézní, pro mechanickou odolnost důležité, vnitřní vrstvy, v zásadě složené ze síranu celulózy. Kapsule, obsahující buňky, byly ponechány ve srážecí lázni 30 sekund až 5 minut a potom promyty DMEM (Stange a spol.,
30 1993). Jednotlivé preparáty, získané za různých podmínek, t.j. různé koncentrace síranu celulózy, různého průtoku tryskou dávkovacího systému a časem, po který byly kapsule ponechány ve srážecí lázni, byly použity k biologickým studiím. Reprezentativní příklady podmínek jsou například: 2,5 % sodné soli síranu celulózy, 2 % polydimetyldiallylamonia a 1 minuta ve srážecí lázni, nebo 1,5 % sodné soli síranu celulózy, 2 % polydimetyldiallylamonia a 0,5 minuty ve
35 srážecí lázni, nebo 3 % sodné soli síranu celulózy a 3 % polydimetyldiallylamonia a 2 minuty ve srážecí lázni. Přesné podmínky byly voleny s ohledem na přesnou velikost žádaných kapsulí, sílu stěny kapsule a jiné vlastnosti.

40 Příklad 3

Implantace mikrokapsulí do mléčných žláz myši:

45 Mikrokapsule byly chirurgicky vloženy do mléčných žláz 2 měsíce starých samic BALB/c myši metodou „klíčové dírky“ a otvor byl uzavřen jedním stehem. Až 6 kapsulí o průměru 0,5–2 mm bylo umístěno do každého operačního místa.

Uvolnění virových částic ve studiích in vitro, struktura mikrokapsulí a vliv implantace kapsulí do imunokompetentních myši byly studovány následujícími metodami:

A) β -galaktosidázová aktivita

Provedení histochemického barvení, použitého pro detekci v infikovaných buňkách, bylo uvedeno již dříve (Cepko, 1989). Buňky, kapsule nebo tkáňové řezy byly promyty chladným PBS a fixovány 2 % paraformaldehydem 20 minut–24 hodin, podle tloušťky vzorku. Po extenzivním promytí PBS byly buňky, kapsule nebo tkáňové řezy inkubovány v roztoku, obsahujícím substrát X-gal (20 mM K_3FeCN_6 , 20 mM $K_4FeCN_6 \cdot 3H_2O$, 2 mM $MgCl_2$ a 1 mg/ml X-gal) nejméně 2 hodiny při 37 °C.

B) Infekce

4×10^4 cílových buněk bylo vyseto do 6-ti jamkových misek na tkáňové kultury 6 hodin před infekcí. Kapsule, obsahující virus produkující buňky, byly umístěny na buňky a k médiu byl přidán polybren (8 μ g/ml). Čtyři hodiny později bylo médium vyměněno, aby se odstranil zbývající polybren. Po pěti dnech byly některé jamky obarveny testem na β -galaktosidázovou aktivitu, jak shora uvedeno, jiné byly trypsinizovány do větších tkáňových misek a kultivovány v médiu, obsahujícím 400 μ g/ml G418. Po 16 dnech byly detekovány G418 rezistentní kolonie.

C) RT-PCR analýza

Virové částice z 5 ml supernatantu kultivačního média byly paletovány na ultracentrifuze (240 000xg, 1 hodinu, 4 °C). Pelety byly suspendovány v lyzujícím pufru (1 % Triton 100, 0,5 % desoxycholátu, 0,1 % dodecylsiranu sodného, PBS) a RNK byla extrahována fenolem s následným srážením etanolem, jak bylo dříve popsáno (Salmons a spol., 1986). RNK byla reverzně přepsána do DNK s použitím soupravy: Read-To-Go T-primed first strand kit (Pharmacia). PCR amplifikace byla provedena s použitím primerů, umístěných uvnitř env a R MLV, pozmeněného BAG vektorem LTR (Obr. 2A). PCR amplifikace byla provedena v 100 μ l reakční směsi, sestávající z 500 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH=8,3) 1,5 mM $MgCl_2$, 0,01 % (W/v) želatiny a 100 μ l každého dNTB, 40 pM každého primeru a 2,5 jednotek Tag polymerázy (Perkin Elmer). Reakce byla prováděna v cykleru Perkin Elmer Cetus Therma Cyclor 9600 za těchto podmínek: 1 min. při 94 °C, 2 min. při 53 °C, 3 min. při 72 °C, celkový počet cyklů byl 35. Produkty PCR byly rozděleny na 0,8 % agarózovém gelu a potom přeneseny na Zeta probe membrány (BIORAD) a hybridizovány, jak popsáno (Indaccolo a spol., 1995), s ^{32}P -značeným 612 PCR fragmentem genomu MLV, získaného se stejnými primery a pBAG jako templátem. MLV specifická sekvence byla zviditelněna s použitím Fuji phosphoimaging systém (BAS 1000).

D) PCR analýza

Genomová DNK (1 μ g) byla amplifikována metodou PCR s použitím jednoho primeru, umístěného ve zbytkové části env sekvence vektoru BAG a druhého primeru v polyomové části plazmidu mimo sekvenci retrovirového vektoru (Obr. 3B). PCR reakce byly provedeny, jak shora popsáno, za použití těchto reakčních podmínek: 1.min. při 94 °C, 2.min. při 50 °C, 3.min. při 68 °C, celkový počet cyklů byl 35. Produkt PCR byl hybridizován s ^{32}P -značeným fragmentem 1,5 kb XbaI DNK ze pBAG, specifickým pro sekvence polyomu.

E) Elektronová mikroskopie

Vzorky pro skenovací elektronovou mikroskopii (SEM) a transmisní elektronovou mikroskopii (TEM) byly promyty PBS (pH 7,3) a předfixovány 1% glutaraldehydem po dobu 15 minut a potom 15 minut fixovány 2 % OsO_4 . Vzorky byly odvodněny roztoky etanolu se stoupající koncentrací a rozděleny do dvou skupin. A) vzorky pro SEM byly sušeny metodou kritického

bodu CO₂, a pokoveny 3 nm platiny (Emscope SC 500 Ashford, England). Pokovené vzorky byly hodnoceny v 10 kV emisním skenujícím mikroskopu (Jeol JSM-6300F; Tokyo, Japan), s urychlujícím napětím 5–10 kV v sekundárním modu, b) Vzorky pro TEM byly zality do Eponu. Ultratenké řezy byly dvojité barveny octanem uranyle a citrátem olovnatým, a hodnoceny na transmissním elektronovém mikroskopu Zeiss EM-10C (Oberkochen, Germany).

Výsledky

Uvolňování viru z mikrokapsulí - studie in vitro:

- Barvení mikrokapsulí, získaných podle postupu, uvedeného v příkladu 2, se substrátem X-gal, jak je popsáno v testu na β -galaktosidázu kódovanou pBAG (Obr. 1), stejně jako nezapouzdřené vektor produkující buňky (není ukázáno).
- Uvolňování virových částic do kultivačního média z buněk v mikrokapsulích bylo prokázáno tak, že z peletovaných virionů, získaných ze supernatantu kapsulí, byla v různých časových intervalech kultivace připravena RNK. Tato RNK byla analyzována RT-PCR technikou s použitím doplňkových primerů k env a R oblastem virového genomu, jak je popsáno v odstavci RT-PCR analýza. Vznik fragmentu o předpokládané délce (612 bp), specifického pro MLV, generovaného PCR metodou z kultivačního média mikrokapsulí, byl pozorován nejméně 6 týdnů (Obr. 2B, řádky 1–4), kdy bylo stanovení přerušeno. Tento fragment nevznikl vlivem znečištění DNK, protože po působení ribonukleázy na virovou RNK před RT-PCR nedalo pozitivní výsledky. (Obr. 2C; 1–4).
- Produkce a uvolnění infekčního viru z kapsulí mohlo být ověřeno společnou kultivací s cílovými buňkami, jak je shora popsáno, v testech na infekčnost, např. s buňkami NIH3T3 (Janchill a spol., 1969) nebo CRFK (Crandell a spol., 1973). Po 4 dnech společné kultivace alikvoty cílových buněk stejně jako zapouzdřené buňky, obsahující pomocný virus, byly barveny na β -galaktosidázovou aktivitu způsobem shora uvedeným. Zbylé cílové buňky byly selektovány na rezistenci proti G418. Mnoho buněk NIH3T3 a CRFK společně kultivovaných NIH3T3 a CRFK prokázalo expresi genu β -gal (Obr. 3A).

- Aby bylo možno potvrdit, že cílové buňky získaly β -gal infekci, byly cílové buňky testovány metodou PCR. BAG produkující buněčné linie, obsahující pomocný virus, jsou založeny na buněčné linii PA317 (Miller a Baltimore, 1986) a nesou gen tymidin kinázy viru Herpes simplex (HSV-TK), působením které je převáděn prekurzor genclavir na cytotoxický prostředek. Cílové buňky NIH3T3 nebo CRFK běžně tento gen nemají. Pokusně může být demonstrováno, že společně kultivované cílové buňky NIH3T3 nebo CRFK, které jsou schopny exprimovat β -gal, jsou rezistentní k GCV, což znamená, že nedošlo k úniku buněk, produkujících BAG, genomová DNK byla extrahována z cílových buněk, analyzována na přítomnost plazmidové sekvence mimo vektor metodou PCR. Tyto sekvence jsou přítomny v buněčných liniích, obsahujících pomocný virus, poněvadž vektor BAG byl lipofektován do těchto buněk ve formě plazmidu pBAG. Virus produkovaný buňkami, obsahujícími pomocný virus, nemá tyto plazmidové sekvence, takže by neměly být přítomny ani v cílových infikovaných buňkách. Obr. 3B ukazuje, že takové plazmidové sekvence nebyly detekovatelné, v souladu s infekcí těchto buněk vektorem BAG.
- Struktura mikrokapsulí:

- Byly připraveny řezy mikrokapsulí a jejich struktura byla analyzována elektronovou mikroskopií. Vnitřek mikrokapsulí tvoří houbovitá matrice, naplněná buňkami (Obr. 4). Skenující elektronová mikroskopie ukázala, že na povrchu mikrokapsulí jsou otvory dostatečně velké, aby umožnily průchod vektorům retrovirových částic z mikrokapsulí, bílá úsečka na obr. 4 odpovídá svou velikostí průměrnému průměru retrovirových částic (Obr. 4).

Stabilita in vivo u imunokompetentních myší.

Ke stanovení stability mikrokapsulí a zjištění, zda-li mikrokapsule nebo virus, který je jimi
 5 produkován, způsobuje pozorovatelnou imunitní odpověď, byly mikrokapsule implantovány do
 mléčných žláz 2 měsíce starých myších samic BALB/c. Myši byly po různých dobách implantace
 utráceny a byl sledován vzhled mikrokapsulí a produkce infekčního viru. Implantované
 mikrokapsule byly jasně viditelné, obalené polštářky tuku mléčných žláz nejméně 6 týdnů po
 implantaci (Obr. 5B). K vaskularizaci došlo v okolí mikrokapsulí u všech analyzovaných zvířat
 10 (Obr. 5A), pravděpodobně jako výsledek produkce angiogenického nebo růstového faktoru
 buňkami, obsahujícími pomocný virus.

Řezy mikrokapsulí a je obklopující tkáň mléčných žláz potvrdily, že je možno nalézt cévy
 v bezprostřední blízkosti kapsulí (Obr. 5B). Tyto řezy také ukázaly vrstvu spojovací tkáň mezi
 15 mikrokapsulemi a tkání mléčných žláz. Nebyla pozorována viditelná známka větší zánětlivé nebo
 imunitní reakce na mikrokapsule, nebo virus produkující buňky, v nich obsažené.

Na důkaz toho, že infekční retrovirové vektory byly uvolněny z kapsulí a infikovaly je
 obklopující tkáň mléčných žláz, byly některé řezy analyzovány na expresi β -gal barvením X-
 gal. Buňky, exprimující β -gal, byly jasně viditelné mimo mikrokapsule (Obr. 5C).

20

Příklad 4

Tento příklad popisuje konstrukci retrovirového expresního vektoru, obsahujícího gen krysího
 25 cytochromu P450 2B1, pro intratumorální infekci.

Expresní vektor pLX2B1, viz obr. 6, byl konstruován ligací fragmentů, získaných z plazmidu
 pLX125 a pSW1 (Kedzie a spol. 1991). Plazmid pLX125 byl linearizován HpaI a výsledné
 zarovnané konce byly defosforylovány telecí střevní fosfatázou. DNK byla separována na 1%
 30 agarózovém gelu, vyříznuta a získána podle komerčního postupu QiaQuick (Qiagen). Po srážení
 etanolem byla DNK resuspendována ve vodě.

Klonovací vektor pSW1 po štěpení SmaI a HincII poskytl dva zarovnané konce. Štěpená směs
 byla rozdělena na 1% agarózovém gelu. Kratší fragment (1,5 kb), obsahující krysí cytochrom
 35 P450 2B1 (Fuji-Kuriyama a spol., 1982), byl vyříznut a eluován podle Qiaquick DNK
 extrakčního protokolu, sražen etanolem a resuspendován ve vodě.

7,6 fMolů pLX125 a 24 fMolů SmaI/HindIII-fragmentu ze pSW1 bylo smícháno a ligováno po 3
 dny při 12 °C pomocí T-4 ligázy (Boehringer). Ligáza byla inaktivována při teplotě 65 °C
 40 10 min. a DNK sražena 10 objemy butanolu. Sražená DNK byla resuspendována ve vodě a
 metodou elektroporace zavedena do DH10B-bakterií (Gibco). Kolonie, které byly rezistentní
 vůči ampicilinu, byly vybrány, byla z nich připravena DNK, která byla štěpena SspBI/SaII,
 BamHI/SspBI, PvuI a BamHI. Výsledný správný plazmid byl označen pLX2B1.

45 Lipofekce

Jeden den před lipofekcí bylo 3×10^5 retrovirových buněk, obsahujících pomocný virus PA317
 (Miller a Buttimore, 1986), vyseto na 6 cm Petriho nebo tkáňové kultivační misky. V den infekce
 byl smíchán 1 μ g pLX2B1 se 100 μ l média prostého séra. Paralelně 15 μ l Lipofectaminu (Gibco
 50 BRL) bylo smícháno s 100 μ l média prostého séra. Roztok obsahující plazmid byl přidán
 k lipofektaminové směsi a inkubován 45 min. Po 35 minutách byly buňky promyty jednou 2 ml
 média, neobsahujícího sérum. 800 μ l média neobsahujícího sérum bylo přidáno
 k lipofektaminové směsi a výsledný 1 ml reakční směsi byl přidán k připraveným buňkám. Po 6

hodinách byl přidán 1 ml Dulbeccem modifikovaného Eaglova média, obsahujícího 10 % FCS. Příštího dne byly buňky trypsinizovány, zředěny 1:10 a vysety na 100 mm miskou. Po 24 hodinách bylo médium vyměněno za médium, obsahující analog neomycinu G418. Jednotlivé populace buněčných klonů byly izolovány a analyzovány na expresi cytochromu P450.

5

Zapouzdření

Buňky, produkující retrovirový vektor a obsahující pomocný virus, byly získány a zapouzdřeny postupem, popsaným shora v příkladu 2.

10

Implantace

Získané kapsule byly chirurgicky implantovány postupem „klíčové dirky“ blízko nebo přímo do transplantovaných nebo spontánních nádorů myši BALB/c nebo GR. Asi 6 kapsulí o průměru 1 mm bylo vloženo do každého z operačních míst. Operační pole bylo uzavřeno jedním stehem. Myši byl potom místně vystaveny působení cyklofosfamidů nebo ifosfamidů přímou intratumorální infekční aplikací 100 μ l 20 mg/ml nebo systémové koncentraci 130 mg CPA/kg váhy, aplikované i.p. a 40–60 mg IFO/kg váhy rovněž i.p. aplikované, a to maximálně po dobu 10 týdnů. Po tuto dobu byl denně monitorován makroskopický vzhled nádoru. Potom byly myši utráceny, tkáň, obsahující vložené kapsule a nádor, byla vyňata a byly připraveny histologické řezy pro světelný a elektronový mikroskop. Tyto řezy jasně ukázaly dobré vhojení kapsulí a vaskularizaci, nebyla pozorována přítomnost lymfocytů, která by indikovala buněčnou imunitní reakci. V těchto řezech nebyla pozorována přítomnost odumřelých buněk nebo nekrózy uvnitř kapsulí. Nádor naopak nekrotické změny vykazoval a makroskopicky bylo jasně patrné zmenšení jeho velikosti během pokusu.

25

Příklad 5

Tento příklad popisuje konstrukci stálé buněčné linie, přirozeně exprimující cytochrom P450 2B1.

30

Expresní vektor pc3/2B1 byl konstruován ligací fragmentů, získaných z plazmidu pcDNA3 (Invitrogen) a pSW (Kedzie a spol., 1991).

35

Plazmid pcDNA3 byl štěpen XhoI/XbaI a vzniklé kohezní konce fragmentů defosforylovány telecí střevní fosfatázou. Řetězec vektorové DNK byl izolován a čistěn na 1% agarózovém gelu, DNK byla vyříznuta a extrahována podle Qiaquick postupu (Qiagen). Po srážení etanolem byla DNK resuspendována ve vodě.

40

Klonovací vektor pSW1 byl štěpen XhoI a XbaI na dva fragmenty. Štěpená směs byla rozdělena na 1% agarózovém gelu. Nejkratší fragment (1,5 kb), obsahující krysí cytochrom P 450 2B1 cDNK (Fuji-Kuriyama a spol., 1982), byl vyříznut, eluován extrakčním postupem Qiaquick DNK, sražen etanolem a resuspendován ve vodě.

45

8,3 fMolů hlavního řetězce pcDNA3 a 24,8 fMolů XhoI/XbaI-fragmentu p SW1 bylo smícháno a ligováno 1 den při 12 °C T4-ligázou (Boehringer). Ligáza byla inaktivována při 65 °C 10 min. a DNK byla srážena 10 násobným nadbytkem butanolu. Sražená DNK byla resuspendována ve vodě a metodou elektroevaporace zavedena do bakterií DH10b (Gibco). Vybrány byly kolonie rezistentní k ampicilinu, z nich byla připravena DNK a zkušebně štěpena EcoRI, BamHI, EcoRV a XhoI. Výsledný správný plazmid byl označen pc3/2B1.

50

Lipofekce

1 den před infekcí bylo vyseto 3×10^5 buněk na 35 mm misky. V den infekce byly smíseny 2 μ g pc3/2B1 se 100 μ l média neobsahujícího sérum. Roztok obsahující plazmid byl přidán k lipofektaminové směsi a inkubován 45 minut. Po 35 minutách byly buňky jednou promyty 2 ml média neobsahujícího sérum. 800 μ l média neobsahujícího sérum bylo přidáno k lipofekční směsi a výsledný 1 ml směsi byl přidán nalitím na připravené buňky. Po 6 hodinách byl přidán 1 ml DMEM (Glutamax) s 10 % FCS. Příští den byly buňky trypsinizovány, desetkrát zředěny a vysety na 100 mm miskou. Po 24 hodinách bylo médium vyměněno za neomycinové médium. Po 14 dnech neomycin rezistentní klony byly izolovány a testovány na přítomnost a aktivitu vektoru.

Kapsule, obsahující tyto buňky, byly připraveny podle příkladu 2 a implantovány do myši blízko nádorů. Po působení cyclofosfamidem nebo ifosfamidem byla účinnost působení hodnocena shora popsáním způsobem.

Obrázky

Obr. 1: Histologické barvení zapouzdřených PA317 buněk stabilně transfektovaných pBAG jako důkaz exprese β -galaktosidázy.

Obr. 2: Analýza RT-PCR virových částic uvolněných z kapsulí. (2B; vzorky 1–4; médium odebráno po 2, 3, 5 a 6 týdnech kultivace kapsulí). Kultivační médium buněk nezapouzdřených, produkujících virus BAG, bylo použito jako pozitivní kontrola (vzorek 5) a médium z netransfektovaných PA317 jako negativní kontrola (vzorek 6). Negativní odpovědi byly získány u vzorků štěpených RNázou před provedením RT-PCR analýzy, což je důkazem, že amplifikované pásy pocházejí z virové RNK (2C; vzorky 1–4). Virová RNK, připravená z nezapouzdřených buněk, produkujících virus BAG, bez štěpení ribonukleázou, byla použita při reakci RT-PCR jako pozitivní kontrola (vzorek 7).

Obr. 3: Společná kultivace zapouzdřených buněk, produkujících virus a buněk NIH3T3. (A) Cílové buňky byly vysety s nízkou hustotou jeden den před přidáním kapsulí s buňkami, obsahujícími pomocný virus a produkujícími retrovirový vektor. Buňky a kapsule byly několik dní později histologicky barveny na průkaz β -galaktosidázové aktivity. (B) Za účelem ověření, že cílové buňky, exprimující β -galaktosidázu, vznikly infekcí spíše než únikem viru z produkčních buněk, byla z buněk extrahována genomová DNK a byla analyzována metodou PCR.

Obr. 4: Snímek skenovacího elektronového mikroskopu, ukazující povrch částice (mikro-kapsule), na kterém jsou při vysokém zvětšení ($\times 75\,000$) patrné porézní struktury. Bílá úsečka, reprezentující 100 nm (průměr částice retrovinu), je důkazem, že tyto struktury mohou být póry, kterými je virus z kapsule uvolňován.

Obr. 5: Histologická analýza kapsule, implantované do mléčné žlázy myši. (A) řez kapsulí, implantované do myši mléčné žlázy po čtyřech týdnech na světelném mikroskopu ($133 \times$ zvětšeno). (C) Infekce buněk myši mléčné žlázy po implantaci kapsulí, obsahujících buňky PA317, produkující vektor BAG.

Obr. 6: Struktura expresního vektoru pLX2B1, obsahující gen pro krysí cytochrom P450 2B1, který je kontrolován po konverzi promotoru promotorem U3-MMTV.

Lineární odkazy:

- 5 Cepko, C. (1989). Liniová analýza nervového systému obratlovců genovým transferem, zprostředkovaným retrovirem. *Meth. Neurosci.* 1, 367–392.
- 10 Chang, P. L. (1995). Neautologní somatická genová terapie. *Somatická genová terapie*. P. L. Chang, ed (CRC press, Boca Raton) pp. 203–223.
- 15 Cornetta, K., Moen, R. C., Culver, K., Morgan, R. A., McLachlin, J. R., Sturm, S., Selegue, J., London, W., Blaese, R. M., and Anderson, W. F. (1990). Amfotropický retrovirus myší leukemie není akutním patogenem primátů. *Hum. Gene Ther.* 1, 15–30.
- 15 Crandell, R. A., Fabricant, C. G., a Nelson-Rees, W. A. (1973). Vývoj charakterizace a virová citlivost lišících (*Felis catus*) ledvinových buněčných linií (CRFK) *In vitro* 9, 176–185.
- 20 Culver, K. W., Ram, Z., Wallbridge, S., Ishii, H., Oldfield, E. H., a Baese, R. M. (1992) Genový transfer in vivo pomocí buněk, produkujících retrovirový vektor, k léčení experimentálních mozkových nádorů. *Science* 256, 1550–1552.
- 25 Deglon, N., Zurn, A., Baetge, E., a Aebischer, P. (1995) Vývoj genové terapie pro léčení neurodegenerativních chorob; Parkinsonovy nemoci, Alzheimerovy choroby a terapie amyotropické laterální sklerózy; intratekální transplantace neurotropinsekretujících buněk, zapouzdřených v polymeru. *Gene Ther.* 2, 563.
- 30 Fuji-Kuryama, Y., Mizukami, Y., Kawajiri, K., Sogawa, K., a Muramatsu, M.: Primární struktura cytochromu P-450; Kódující nukleotidová sekvence cDNK cytochromu P-450 z krysích jater, indukovatelného fenobarbitálem, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1982 May; 79:2793–97.
- 35 Günzburg, W. H., Saller, R., a Salmons, B. (1995). Retrovirové vektory řízené k předdefinovaným buněčným typům pro genovou terapii. *Biologicals* 23, 5–12.
- 35 Günzburg, W. H., a Salmons, B. (1995) Návrh virového vektoru pro genovou terapii. *Molecular Medicine Today*, 1, 410–417.
- 40 Hughes, M., Vassilakos, A., Andrews, D. W., Hortelano, G., Belmont, J. W., a Chang, P. L. (1994) Dodání sekretované adenosin deaminázy mikrokapsulemi – nový přístup k somatické genové terapii. *Hum. Gene Ther.* 4, 1445–1455.
- 45 Indraccolo, S., Gönzburg, W. H., Leib-Mosch, C., Erfle, V., a Salmons, B. (1995) Identifikace tří lidských sekvencí s virovými specifickými primery superantigenů. *Mammalian Genome* 6, 339–344.
- 50 Jainchill, J. L., Andeson, S. A., a Torado, G. J. (1969) Myší sarkomové a leukemické viry: stanovení s použitím klonových linií stykem-inhibovaných myších buněk. *J. Virol.* 4, 549–553.
- 50 Kedzie, J. L., balfour, C. A., Wscobar, G. Y., Grimm, S. W., He, Y. A., Pepperl, D. J, Reagan, J. W. Stevens, J. C., Halpert, J. H.: Molekulární základ unikátní varianty cytochromu P450IIB1. *J. Biol. Chem.* 1991 Nov 25 263, (33) 22515–21.

- Miller, A. D. a Buttimore, C. (1986). Změna buněčné linie, obsahující virus, znemožňující rekombinaci, vedoucí k produkci pomocného viru. *Mol. Cell. Biol.* 6,2895–2902.
- 5 Morgan, R. A. a Anderson, W. F. (1993). Lidská genová terapie. *Ann. Rev. Biochem.* 62,191–217.
- Price, J., Turner, D. a Cepko, C. (1987) Liniová analýza nervového systému obratlovců pomocí retrovirem zprostředkovaného genového transferu. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84,156–160.
- 10 Ram, Z., Culver, K. W., Walbridge, S., Blaese, R. M. a Oldfield, E. H. (1993). Retrovirem zprostředkovaný transfer in situ při léčení mozkových nádorů krys. *Cancer Res.* 5,83–88.
- Salmons, B., Knedlitschek, G., Kennedy, N., Groner, B. a Ponta, H. (1986). Endogenní lokus Mtv-8 viru nádorů myších mléčných žláz obsahuje obálový (env) gen. *Virus Res.* 4,377–389.
- 15 Stange, J., Mitzner, S., Dautzenberg, H., Ramlow, W., Knippel, M., Steiner, M., Ernst, B., Schmidt, R. a Klinkmann, H. (1993) Prodloužená biochemická a morfologická stabilita zapouzdřených jaterních buněk – nová metoda. *Art. Cells & Immob. Biotech.* 21,343–352.
- 20 Tai, I. T. a Sun, A. M. (1993) Mikrozapouzdření rekombinantních buněk: nový dodávající systém pro genovou terapii. *FASEB J.* 7,1061–1069.
- Welsh, R. M., Cooper, N. R., Jensen, F. C. a Oldstone, M. B. A. (1975). Lidské sérum lyzuje nádorové RNK viry. *Nature* 257,612–614.
- 25 Winn, S. R., Hammang, J. P., Emerich, D., F., Lee, A., Palmiter, R. D. and Baetge, E. E. (1994). V polymeru zapouzdřené buňky, geneticky modifikované tak, aby produkovaly lidský nervový růst, podporují přežívání axotomizovaných septálních cholinergických neuronů. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91,2324–2328.
- 30

PATENTOVÉ NÁROKY

35

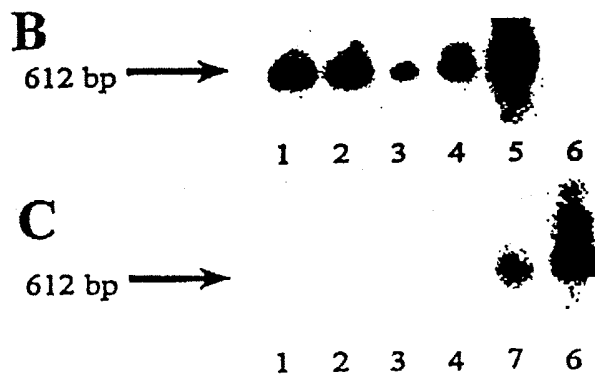
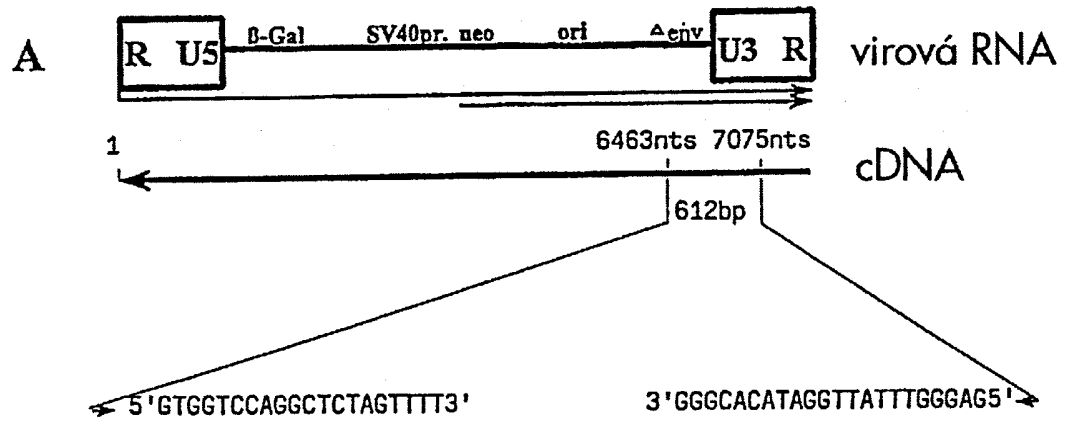
1. Kapsule zapouzdřující buňky, produkující virové částice, **vyznačující se tím**, že obsahuje porézní stěnu kapsule, která má póry takové velikosti, že umožňuje uvolnění v podstatě všech virových částic, produkovaných zapouzdřenými buňkami.
- 40 2. Kapsule podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že porézní stěna kapsule obsahuje polyelektrolytový komplex, tvořený opačně nabitými polyelektrolyty.
3. Kapsule podle nároků 1 až 2, **vyznačující se tím**, že porézní stěna kapsule obsahuje polyelektrolytový komplex, tvořený polysacharidy nebo deriváty polysacharidů, obsahujícími sulfátové skupiny, nebo syntetickými polymery, obsahujícími sulfonátové skupiny a polymery s kvartérními amoniiovými skupinami.
- 45 4. Kapsule podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že polysacharidy nebo deriváty polysacharidů, obsahující sulfátové skupiny, jsou vybrány z jednoho nebo několika prvků ze skupiny, obsahující sulfát celulózy, acetátsulfát celulózy, sulfát karboxymethylcelulózy, sulfát dextranu nebo sulfát škrobu, a syntetickým polymerem, obsahujícím sulfonátové skupiny, je polystyren-sulfonát.
- 50

5. Kapsule podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že polymerem s kvartérními amoniovými skupinami je polydimetyldiallylamonium nebo polyvinylbenzyltrimetylamonium.
- 5 6. Kapsule podle nároků 1 až 5, **vyznačující se tím**, že porézní stěna kapsule obsahuje komplex, tvořený sulfátem celulózy a polydimetyldiallylamoniem.
7. Kapsule podle nároků 1 až 6, **vyznačující se tím**, že jsou ve formě mikrokapsulí o průměru 0,01 mm až 5 mm, výhodně 0,1 mm až 1 mm.
- 10 8. Kapsule podle nároků 1 až 7, **vyznačující se tím**, že uvedená kapsule obsahuje houbovitou síť-matrix ze sulfátu celulózy, tvořící vnitřek kapsule, obklopenou stěnou kapsule, ve které jsou póry, přičemž uvedená houbovitá síť je naplněná buňkami.
- 15 9. Kapsule podle nároků 1 až 8, **vyznačující se tím**, že velikost pórů v povrchu porézní stěny kapsule je 80 nm až 150 nm, výhodně 100 nm až 120 nm.
- 20 10. Kapsule podle kteréhokoliv z nároků 1 až 9, **vyznačující se tím**, že virovou částicí, produkovanou zapouzdřenými buňkami, je retrovirová částice, která obsahuje genom retrovirového vektoru.
- 25 11. Kapsule podle nároku 10, **vyznačující se tím**, že zapouzdřenými buňkami, produkujícími retrovirové částice, je sbalovací pakázovací buněčná linie, obsahující pomocný virus, transfektovaná expresním vektorem, kterýžto expresní vektor nese retrovirový vektorový konstrukt schopný infikovat a řídit expresi jedné nebo několika kódujících sekvencí, které obsahuje, v cílových buňkách, přičemž uvedená sbalovací buněčná linie, obsahuje pomocný virus, který obsahuje alespoň jeden expresní vektor nesoucí geny, kódující bílkoviny, nutné pro sbalení genomu uvedeného retrovirového vektorového konstrukt.
- 30 12. Kapsule podle nároku 11, **vyznačující se tím**, že nejméně jedna z uvedených kódujících sekvencí kóduje heterologní peptidy, vybrané ze značkových genů, terapeutických genů, antivirových genů, protinádorových genů, a cytokinových genů.
- 35 13. Kapsule podle nároků 10 až 12, **vyznačující se tím**, že retrovirový vektor je replikačně defektní.
- 40 14. Kapsule podle nároku 13, **vyznačující se tím**, že retrovirový vektor obsahuje úsek 5'LTR, který má strukturu U3-R-U5, jednu nebo několik sekvencí, vybraných z kódujících nebo nekódujících sekvencí, a úsek 3'LTR, který obsahuje částečně nebo úplně odstraněný úsek U3, po kterém následují úseky R a U5, přičemž úsek U3 je nahrazen sekvencí polylinkeru a regulačním prvkem nebo promotorem.
- 45 15. Kapsule podle kteréhokoliv z předchozích nároků 10 až 14, **vyznačující se tím**, že retrovirový expresní vektor je vektor obsahující krysí gen pro cytochrom p450 2B1.
- 50 16. Způsob přípravy kapsule podle nároků 1 až 15, **vyznačující se tím**, že se buňky produkující virové částice suspendují ve vodném roztoku polyelektrolytu a suspenze ve formě preformovaných částic se vnese do srážecí lázně, obsahující vodný roztok opačně nabitého polyelektrolytu.
17. Způsob podle nároku 16, **vyznačující se tím**, že částice se vytvářejí rozprášením.

18. Způsob podle nároku 16 nebo 17, **vyznačující se tím**, že se buňky suspendují ve vodném roztoku polysacharidu nebo derivátu polysacharidu, obsahujícího sulfátové skupiny, nebo syntetického polymeru, obsahujícího sulfonátové skupiny.
- 5 19. Způsob podle nároku 18, **vyznačující se tím**, že se použije polysacharid nebo derivát polysacharidu, obsahující sulfátové skupiny, vybraný z jednoho nebo několika prvků skupiny, obsahující sulfát celulózy, acetaťsulfát celulózy, sulfát karboxymethylcelulózy, sulfát dextranu a sulfát škrobu, a jako syntetický polymer, obsahující sulfonátové skupiny, se použije polystyren-sulfonát.
- 10 20. Způsob podle nároků 16 až 17, **vyznačující se tím**, že srážecí lázeň obsahuje vodný roztok polymeru s kvartérními amoniovými skupinami.
- 15 21. Způsob podle nároku 20, **vyznačující se tím**, že jako polymer s kvartérními amoniovými skupinami se použije polydimetyldiallylamonium nebo polyvinylbenzyltrimethylamonium.
- 20 22. Způsob podle nároků 16 až 17, **vyznačující se tím**, že buňky se suspendují ve vodném roztoku sodné soli sulfátu celulózy a vnesou se do srážecí lázně, obsahující vodný roztok chloridu polydimetyldiallylamonia.
- 25 23. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím**, že se použije vodný roztok sulfátu celulózy, obsahující 0,5 až 50 %, výhodně 2 až 5 %, sodné solisulfátu celulózy a 2 až 10 %, výhodně 5 %, fetálního telecího séra v pufrovaném fyziologickém roztoku.
- 30 24. Způsob podle nároku 22, **vyznačující se tím**, že se ve srážecí lázni použije vodný roztok, obsahující 0,5 až 50 %, výhodně 2 až 10 %, a ještě výhodněji 3 %, chloridu polydimetyldiallylamonia v pufrovaném fyziologickém roztoku.
- 35 25. Kapsule podle nároků 1 až 15 pro použití v genové terapii a/nebo v léčení rakoviny a nádorových onemocnění.
26. Použití kapsule podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 15 pro přípravu farmaceutického přípravku.
- 40 27. Farmaceutický přípravek, **vyznačující se tím**, že obsahuje kapsule podle kteréhokoliv z předchozích nároků 1 až 15.
28. Farmaceutický přípravek podle nároku 27, **vyznačující se tím**, že má formu vhodnou pro injekci a/nebo implantaci do cílového orgánu/buněk a/nebo do sousedství daného cílového orgánu/buněk.
- 45 29. Farmaceutický přípravek podle nároku 28, **vyznačující se tím**, že cílový orgán/buňky je rakovinná tkáň nebo jsou to buňky hladkého svalstva, obklopující arterie.



Obr. 1

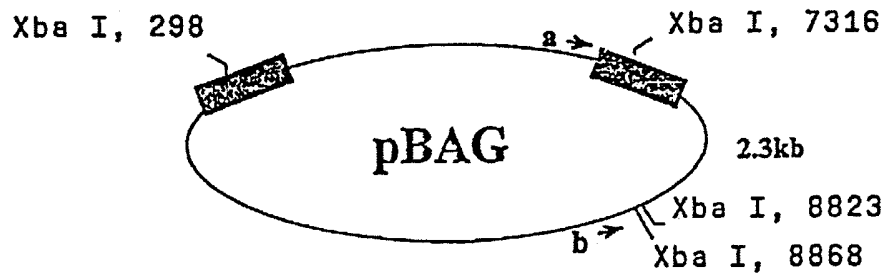


Obr. 2



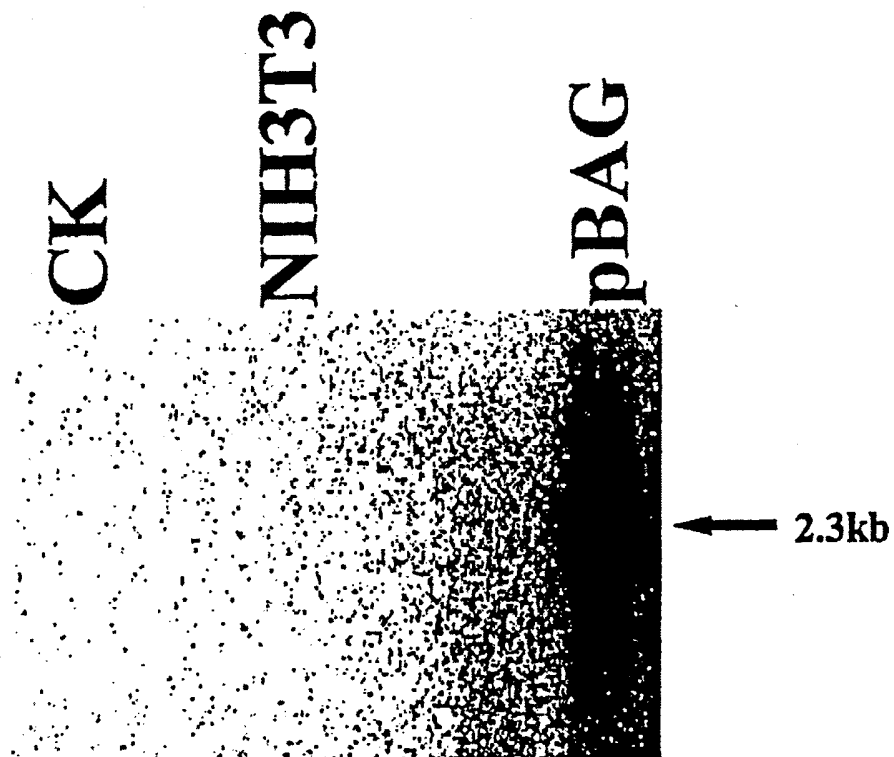
Obr. 3A

integrováný BAG po infekci

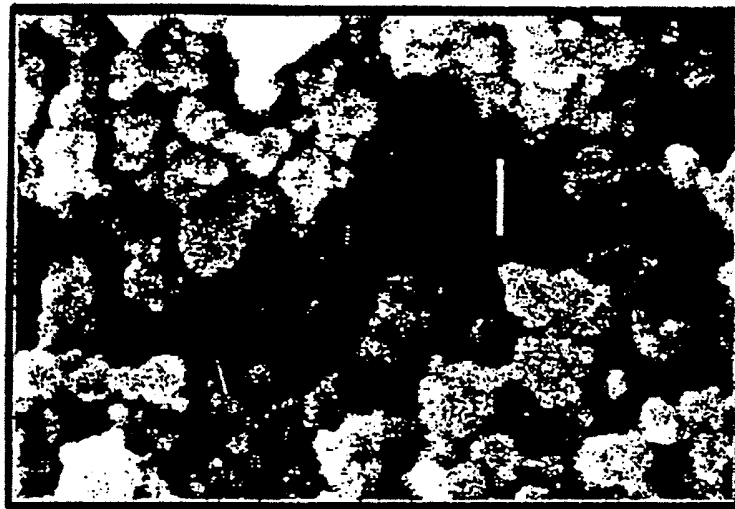


a) 5'TGTTGCTTCTATGCGGACCA 3'

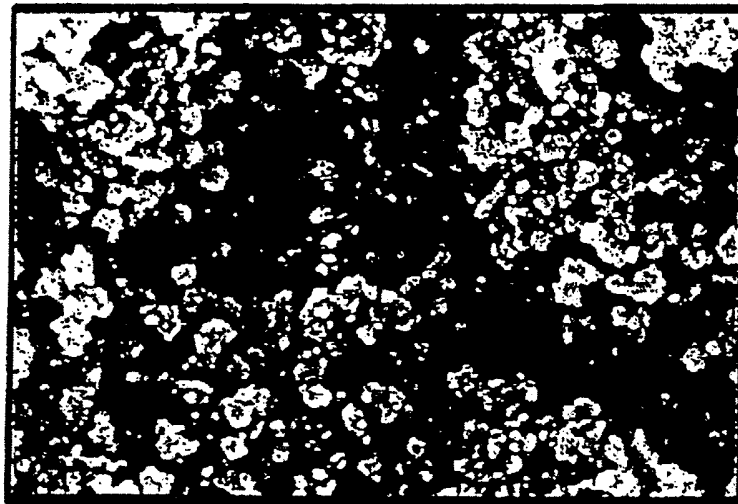
b) 5'CCGCGCTTATTAGCCTGTTA 3'



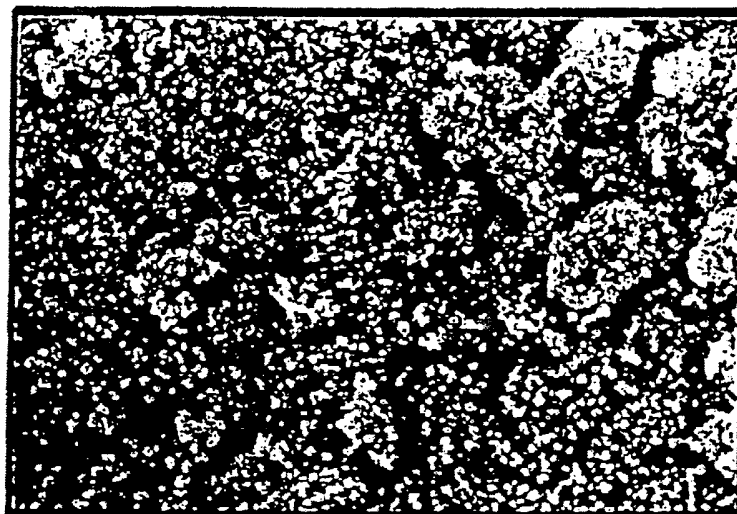
Obr. 3B



x 75000



x 37000



x 10000

Obr. 4



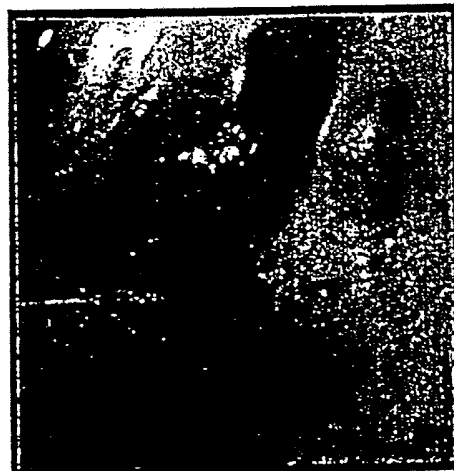
1 týden



2 týdny



3 týdny



4 týdny

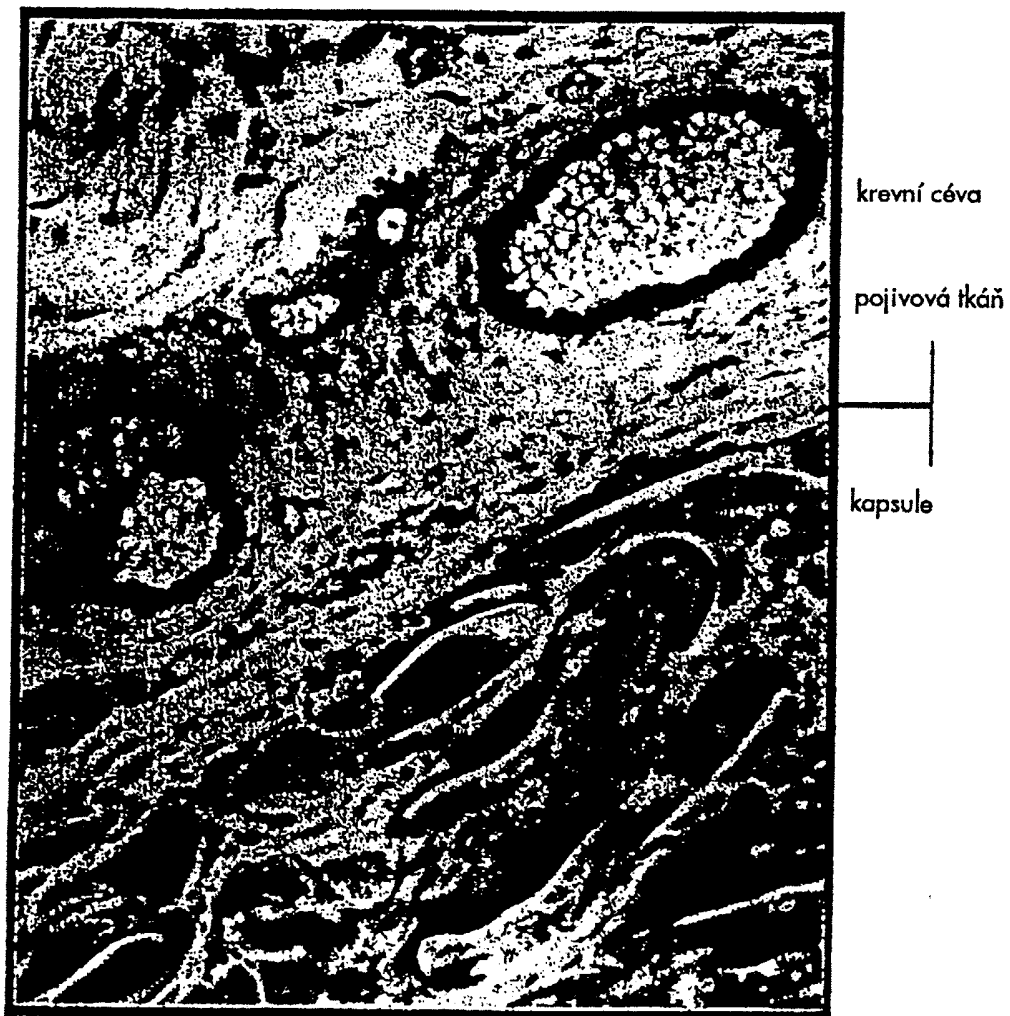


5 týdnů



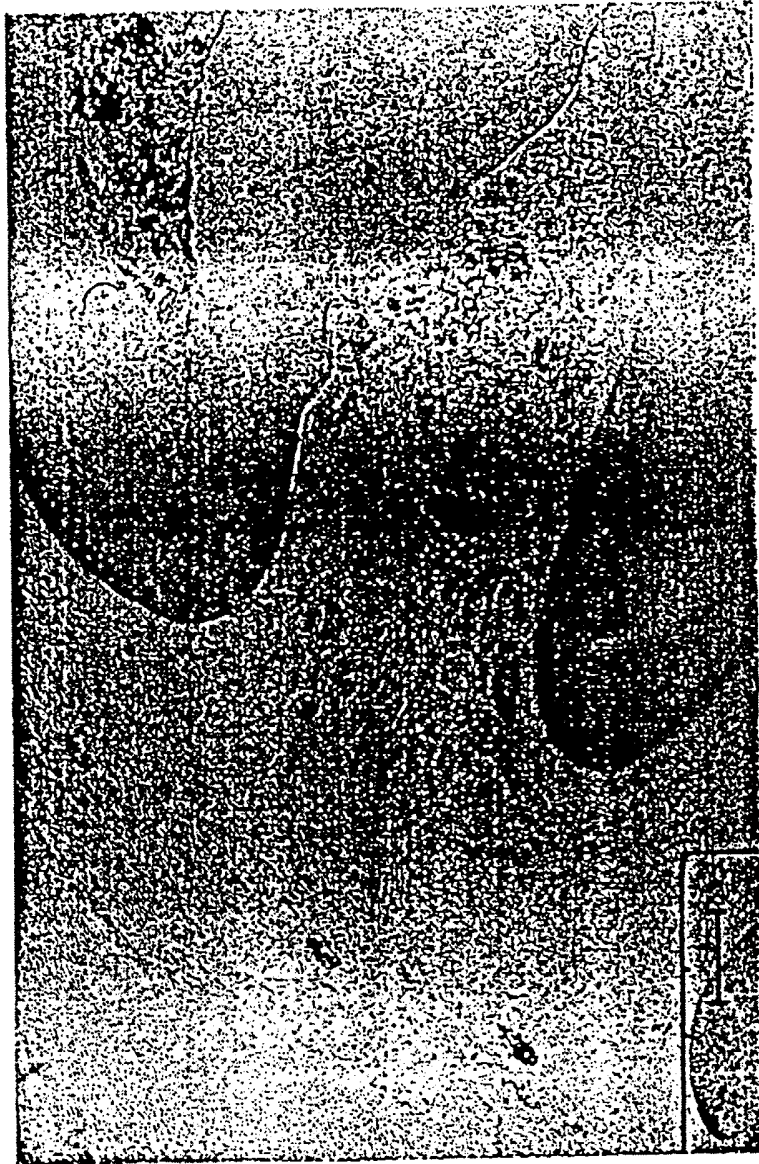
6 týdnů

Obr. 5A

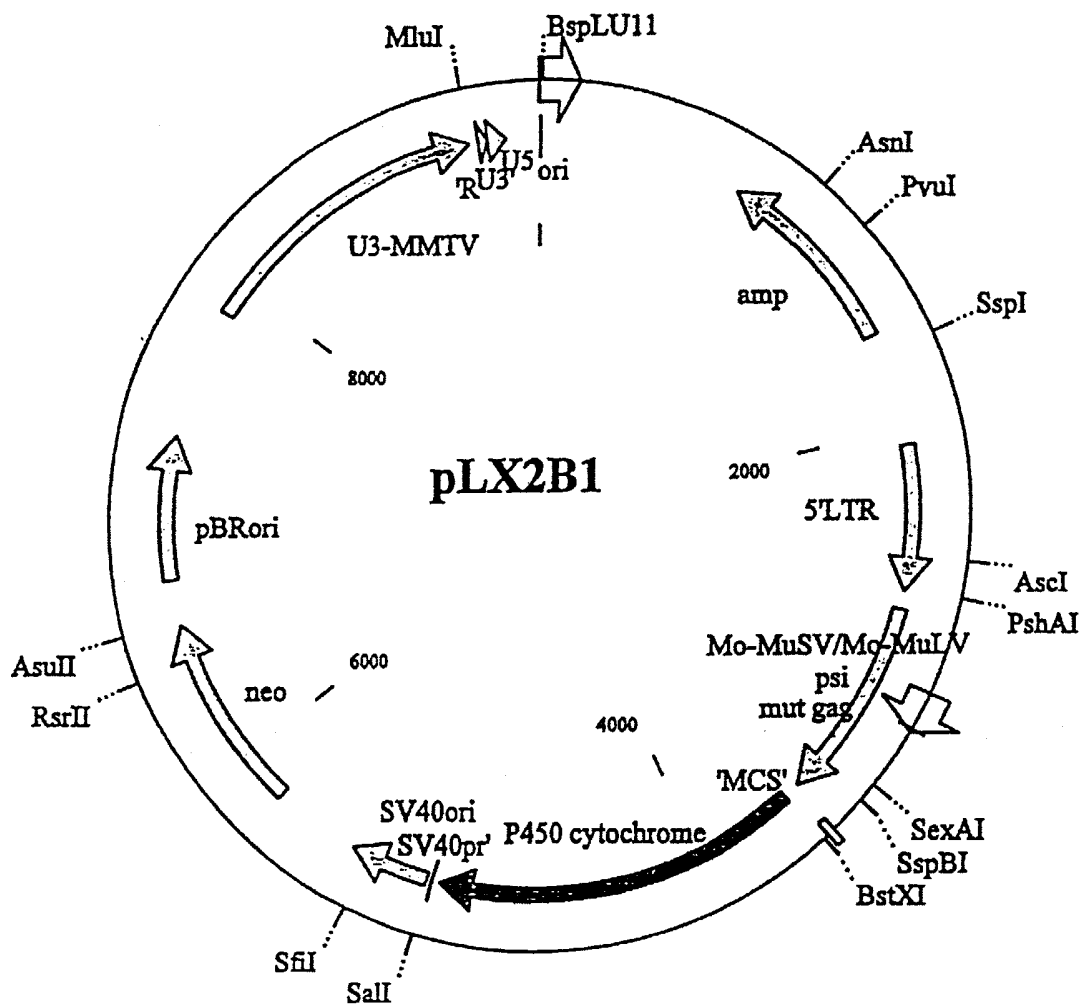


Zvětšení: 320 x

Obr. 5B



Obr. 5C



Obr. 6

Konec dokumentu