



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **114796** (13) **C2**
(51) МПК

C12N 5/071 (2010.01)

C12N 5/074 (2010.01)

C12N 5/0735 (2010.01)

C12N 5/0789 (2010.01)

C12N 15/49 (2006.01)

МІНІСТЕРСТВО
ЕКОНОМІЧНОГО
РОЗВИТКУ І ТОРГІВЛІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВИНАХІД

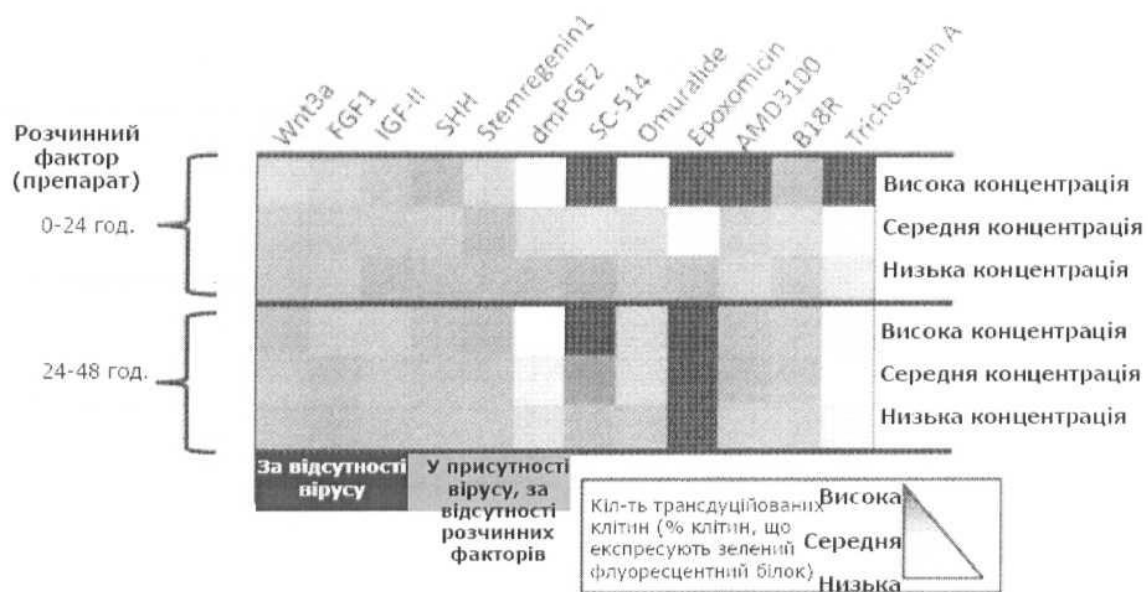
(21) Номер заявки: а 2014 03867	(72) Винахідник(и): Хеффнер Гарретт Коллінз (US), Бейссен Абрахам Айзек (US)
(22) Дата подання заявки: 28.09.2012	(73) Власник(и): БЛУБЬОД БАЙО, ІНК., 60 Binney St., Cambridge, MA 02142, USA (US)
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: 10.08.2017	(74) Представник: Ошарова Ірина Олександрівна, реєстр. №9
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 61/541,736	(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою: WO 2010054271 A1, 14.05.2010 Prostaglandin E2 enhances engraftment of human cord blood stem cells and shows long-term safety in preclinical non-human primate translat models / Wolfram Goessling, Robyn S Allen, Xiao Guan et al. // Cell stem cell. - 2011. Vol. 8. - P. 445-458 US 20090092589 A1, 09.04.2009 WO 2004098531 A2, 18.11.2004 Efficiency of transduction of highly purified murine hematopoietic stem cells by lentiviral and oncoretroviral vectors under conditions of minimal in vitro manipulation //Gustavo Mostoslavsky, Darell N. Kotton, Attila J. Fabian/ Molecular therapy. - 2005. - Vol. 11. - No. 6. - P. 932-940 Pelus Louis M. Pleiotropic effects of prostaglandin E2 in hematopoiesis; prostaglandin E2 and other eicosanoids regulate hematopoietic stem and progenitor cell function //Louis M. Pelus and Jonathan Hoggatt /Prostaglandins & other lipid mediators. - 2011. - Vol. 96. - P. 3-9
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: 30.09.2011	
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: US	
(41) Публікація відомостей про заявку: 11.08.2014, Бюл.№ 15	
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: 10.08.2017, Бюл.№ 15	
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: PCT/US2012/057987, 28.09.2012	

(54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЕФЕКТИВНОСТІ ТРАНСДУКЦІЇ

(57) Реферат:

Винахід стосується способу підвищення трансдукції кровотворних стовбурових клітин або клітин-попередників, культивованих з лентівірусом, який включає культивування стовбурових клітин або клітин-попередників і лентівірусу в культуральному середовищі, що містить сполуку, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP.

UA 114796 C2



ФІГ. 1

ПЕРЕХРЕСНЕ ПОСИЛАННЯ НА СПОРІДНЕНІ ЗАЯВКИ

Ця заявка, відповідно до §119(е) Глави 35 Зводу Законів США, заявляє пріоритет згідно з попередньою заявкою на патент США № 61/541, 736, поданою 30 вересня 2011 р., зміст якої повністю включено в дану заявку шляхом посилання.

КОМЕНТАР ДО ЗАЗНАЧЕНОЇ ПОСЛІДОВНОСТІ

Послідовність, прикладена до цієї заявки, надана в текстовому форматі як заміна екземпляру на папері, і включена в опис винаходу шляхом посилання. Назва файлу, що містить послідовність, - BLBD_006_01WO_ST25.txt. Розмір файлу 30 кілобайт, дата створення 27 вересня 2012 р., файл підготовлений за допомогою шифрувальної файлової системи EFS-Web.

РІВЕНЬ ТЕХНІКИ

Галузь техніки

Цей винахід відноситься до способу підвищення ефективності трансдукції клітин. Зокрема, цей винахід забезпечує способи і матеріали, що підвищують ефективність трансдукції клітин, таких, як кровотворні стовбурові клітини людини (ГСК), вірусами і/або векторами, які можуть бути застосовані в терапевтичних цілях.

Опис рівня техніки

Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів (FDA) дотепер не санкціонувало продаж жодного з препаратів для генної терапії людини. На сьогоднішній день, генна терапія залишається експериментальною дисципліною і не зарекомендувала себе досить ефективною в процесі клінічних випробувань. З перших клінічних випробувань препаратів для генної терапії, що почалися в 1990 році, значного прогресу не відзначено. В 1999 році, після смерті 18-літнього Джессі Гелсінгера, генна терапія була відкинута на крок назад. Джессі Гелсінгер брав участь у клінічних випробуваннях препаратів для генної терапії недостатності орнітинтранскарбамілази (OTCD). Смерть настала в результаті поліорганої недостатності, що настала через 4 дні після початку терапії. Можливо, смерть викликала інтенсивна імунна відповідь на аденовірусний носій.

Інший серйозний скандал відбувся в січні 2003, коли Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів тимчасово призупинило проведення всіх клінічних випробувань препаратів для генної терапії із застосуванням ретровірусних векторів у кровотворних стовбурових клітинах. Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів і медикаментів пішло на цей крок, коли була отримана інформація про те, що в другій дитини, що брала участь у випробуваннях препаратів для генної терапії у Франції розвився лейкемієподібний синдром. Як ця дитина, так й інша, у якій розвився такий же синдром у серпні 2002, успішно проходили лікування із застосуванням генної терапії з приводу Х-зчепленого синдрому важкого комбінованого імунodefіциту (ТКИН, Х-SCID). Консультативний комітет по модифікаторам біологічного відгуку керування (Biological Response Modifiers Advisory Committee, BRMAC) провів засідання в лютому 2003, для визначення можливих заходів, які дозволили б продовжувати деякі клінічні випробування із застосуванням генної терапії для лікування захворювань, небезпечних для життя, з достатнім ступенем безпеки. У квітні 2003 управління зняло заборону на застосування ретровірусних векторів у стовбурових кровотворних клітинах при проведенні випробувань препаратів для генної терапії.

Хоч би як, останнім часом кілька груп досягли певних успіхів у застосуванні генної терапії при лікуванні деяких серйозних захворювань. У 2008 британські дослідники з Інституту Офтальмології Університетського Коледжу Лондона (the UCL Institute of Ophthalmology) і Центру Біомедицинських досліджень Національного НДІ охорони здоров'я (NIHR) при офтальмологічній лікарні Мурфілдс (Moorfields Eye Hospital) оголосили про успішні клінічні випробування із застосуванням генної терапії для лікування амаврозу Лебера, одного з видів уродженої сліпоті. Результати показали, що експериментальне лікування безпечне і може поліпшити зір (Maguire et al., N Engl J Med. 358(21):2240 (2008)).

У 2001, компанія Neurologix, Inc. оголосила про позитивні результати другої фази досліджень застосування генної терапії на пізній стадії хвороби Паркінсона (PD), NLX-P101. В учасників досліджень, що приймали NLX-P101, відзначили статистично значимі і клінічно важливі поліпшення показників рухової активності при відсутності медикаментозного лікування, у порівнянні з контрольною групою, що одержує лікування за допомогою плацебо-хірургії. Поліпшення було відзначено через місяць після початку дослідження, і практично не мінялося протягом шести місяців спостереження з маскуванням критеріїв оцінки. Результати також показали позитивні характеристики безпеки NLX-P101, серйозних побічних ефектів, пов'язаних із застосуванням генної терапії і хірургічного втручання, зареєстровано не було. Пацієнти, притягнуті до дослідження, страждали хворобою Паркінсона в середній і пізній стадії і не піддавалися лікуванню загальноновідомими способами.

У 2009 група французьких дослідників привела інформацію про те, що застосування генної терапії з використанням кровотворних стовбурових клітин ефективно в лікуванні Х-зчепленої аденолейкоцистозної (ALD). Узяті у пацієнтів аутологічні стовбурові клітини "відкоригували" генетично *ex vivo* і ввели назад пацієнтам, що пройшли мієлоаблятивну терапію. За період від 24 до 30 місяців наступного спостереження, відзначили відновлення багатьох типів клітин: 9-14 % гранулоцитів, моноцитів, а також Т-Т- і В-лімфоцитів, що експресують ALD-білок. Ці результати підтверджують, що кровотворні клітини пацієнтів піддалися трансдукції. Через 14-16 місяців після введення "відкоректованих" клітин, прогресуюча церебральна демієлінізація у двох пацієнтів повністю припинилася.

Недавній прогрес в області генної терапії дозволяє сподіватися, що пацієнти, що страждають від гемоглобінопатій, таких як β -таласемія і серпоподібноклітинна анемія, зможуть одержувати ефективне лікування завдяки новітнім науковим розробкам. Трансплантація кровотворних клітин, модифікованих лентивірусним вектором, що несе ген β -глобіну, привела до тривалого поліпшення в моделях порушення синтезу і обміну гемоглобіну в мишей Imren et al., *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(22):14380-14385; Malik et al., *Ann NY Acad Sci*. 2005;1054:238-249; May et al., *Nature*. 2000;406(6791):82-86; Pawliuk et al., *Science*. 2001;294(5550): 2368-2371), але при цьому, залежність від переливань крові зникла лише у випадку одного пацієнта, що страждає β -таласемією (Cavazzana-Calvo et al., *Nature*. 2010;467(7313):318-322).

Незважаючи на те, що головними перевагами введення генетично модифікованих аутологічних клітин є мінімальний ризик виникнення реакції "трансплантат проти хазяїна" і необхідності проведення імуносупресивної терапії перед трансплантацією, а також відсутність необхідності добору сумісного донора, сучасні методи лікування зустрічаються щонайменше з трьома серйозними проблемами: необхідно проводити токсичну процедуру мієлоабляції (Dunbar et al., *Hum Gene Ther*. 1998;9(17):2629-2640); сучасні способи трансдукції можуть забезпечити трансдукцію лише незначної частини кровотворних стовбурових клітин (Santoni de Sio and Naldini, *Methods Mol Biol*. 2009;506:59-70); а також, різні доступні способи селекції *in vivo* характеризуються недостатнім ступенем ефективності і безпеки (Beard et al., *J Clin Invest*. 2010;120(7):2345-2354; Cornetta et al., *Cancer Gene Ther*. 2006;13(9):886-895; Milsom et al., *Cancer Res*. 2008;68(15): 6171-6180). Зокрема, у випадку порушень, при яких застосовується генна терапія з використанням кровотворних стовбурових клітин, наприклад, серпоподібноклітинної анемії, β -таласемії, аденолейкоцистозної і адреномієлонеуропатії, обмеження в застосуванні включають, але не обмежуються недостатньою ефективністю трансдукції стовбурових кровотворних клітин або клітин-попередників, необхідністю проведення токсичної мієлосупресивної або мієлоаблятивної терапії і відсутністю оптимальних способів селекції трансдуційованих клітин *in vivo*.

Таким чином, у даній галузі техніки виникла необхідність розробити поліпшені способи застосування генної терапії і, зокрема, способи застосування для лікування або профілактики порушень кровотворення. У цьому винаході запропоновані способи вирішення основних проблем у даній галузі техніки.

КОРОТКИЙ ОПИС ВІНАХОДУ

Загалом, цей винахід забезпечує способи і композиції, що містять сполуку, яка підсилює сигнальні шляхи рецептора простагландину EP для підвищення ефективності трансдукції. Крім того, композиції і способи згідно з винаходом забезпечують більш безпечні і надійні способи трансдукції клітин, таких як кровотворні стовбурові клітини людини, вірусами і/або вірусними векторами. Композиції і способи можуть застосовуватися для лікування за допомогою генної терапії з використанням кровотворних стовбурових клітин при відповідних терапевтичних показаннях.

Згідно з різними варіантами реалізації, цей винахід відноситься, зокрема, до способу підвищення ефективності трансдукції клітин, що культивуються з ретровірусом. Зазначений спосіб включає культивування клітин і ретровіруса, що містить одну або кілька сполук, які підсилюють сигнальні шляхи рецептора простагландину EP. Відповідно до одного з варіантів реалізації, зазначена сполука являє собою невелику молекулу.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, зазначені клітини являють собою клітини-попередники.

Згідно з певним варіантом реалізації, стовбурові клітини або клітини-попередники вибирають із групи, що складається з: ембріональних стовбурових клітин та індукованих плюріпотентних стовбурових клітин.

Згідно з іншим варіантом реалізації, стовбурові клітини або клітини-попередники вибирають із групи, що складається з: мезенхімальних стовбурових клітин, стовбурових кровотворних

клітин, стовбурових клітин нервової тканини, стовбурових клітин сітківки, стовбурових клітин міокарда, стовбурових клітин кісткових м'язів, стовбурових клітин жирової тканини, стовбурових клітин хрящової тканини, стовбурових клітин печінки, стовбурових клітин нирок і стовбурових клітин підшлункової залози.

5 Згідно з певним варіантом реалізації, кровотворні стовбурові клітини або клітини-попередники являють собою стовбурові клітини або кровотворні клітини-попередники.

Згідно з іншим варіантом реалізації, зазначені клітини вибирають із групи, що складається з: остеобластів, хондроцитів, адипоцитів, клітин кісткових м'язів, кардіоміоцитів, нейронів, астроцитів, олігодендроцитів, шванівських клітин, клітин сітківки, клітин роговиці, клітин шкіри, моноцитів, макрофагів, нейтрофілів, базофілів, еозинофілів, еритроцитів, мегакаріоцитів, дендритних клітин, Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, NK-клітин, клітин шлунку, клітин кишечника, гладком'язових клітин, клітин судин, клітин сечового міхура, α -клітин підшлункової залози, β -клітин підшлункової залози, дельта-клітин підшлункової залози, гепатоцитів, клітин нирок, клітин надниркової залози і клітин легенів.

15 Відповідно до іншого певного варіанту реалізації, зазначені клітини являють собою кровотворні стовбурові клітини або кровотворні клітини-попередники.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, щонайменше, 50 % стовбурових кровотворних клітин або кровотворних клітин-попередників є трансдуційованими.

Згідно з іншим варіантом реалізації, щонайменше, 75 % кровотворних стовбурових клітин або кровотворних клітин-попередників є трансдуційованими.

20 Згідно з іншим варіантом реалізації, щонайменше, 90 % кровотворних стовбурових клітин або кровотворних клітин-попередників є трансдуційованими.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає одну або кілька сполук, які підсилюють сигнальні шляхи рецептора простагландину EP і вибирають із групи, що складається з: PGA_2 ; PGB_2 ; PGD_2 ; PGE_1 ; PGE_2 ; PGF_2 ; PGL_2 ; PGH_2 ; PGJ_2 ; а також їх попередників, метаболітів, похідних і аналогів.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає одну або кілька сполук, які підсилюють сигнальні шляхи рецептора простагландину EP і вибирають із групи, що складається з: 15d-PGJ₂; дельта-12-PGJ₂; 2-гідроксигептадекатрієнової кислоти (ННТ); тромбоксану A2; тромбоксану B2; ілопросту; трепростинілу; травопросту; карбопрост трометаміну; тафлупросту; латанопросту; біматопросту; унопростон ізопропілу; клопростенолу; естрофану; суперфану; мізопростолу; бутапросту; лінолевої кислоти; 13(s)-HODE; LY171883; мідової кислоти; ейкозатрієнової кислоти; епоксиейкозатрієнової кислоти; ONO-259; Cay1039; агоніста рецептора PGE_2 ; 16,16-диметил PGE_2 ; 19(R)-гідрокси PGE_2 ; 16,16-диметил PGE_2 p-(p-ацетамідобензамідо) фенілового ефіру; 11-дезоксид-16,16-диметил PGE_2 ; 9-дезоксид-9-метил-16,16-диметил PGE_2 ; 9-дезоксид-9-метил-16,16-диметил PGE_2 ; сульпростону; сериоламиду PGE_2 ; метилового ефіру PGE_2 ; 16-феніл-тетранор PGE_2 ; 15(S)-15-метил PGE_2 ; 15(R)-15-метил PGE_2 ; BIO; 8-бром-цАМФ; форсколіну; ацетоксиметилового ефіру 1,2-біс етан-N,N,N,N-тетраоцтової кислоти; фенділіну; нікардипіну; ніфедипіну; пімозиду; строфантиніду; ланатозиду; L-аргініну; нітропрусида натрію; ванадату натрію; брадикініну; мебеверину; флурандреноліду; атенололу; піндололу; габоксадолу; оксигінолінкарбонової кислоти; гідралазину; тіабендазолу; бікукуліну; везаміколу; перувозиду; іміпраміну; хлорпропаміду; 1,5-пентаметилентетразолу; 4-амінопіридину; діазоксиду; бенфотіаміну; 12-метоксидодецевої кислоти; N-форміл-метіоніл-лейцил-фенілаланіну; галаміну; IAA 94; і хлортрианізену.

Згідно з деякими варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає одну або кілька сполук, які підсилюють сигнальні шляхи рецептора простагландину EP і вибирають із групи, що складається з: простагландину $\text{E}_2(\text{PGE}_2)$ або 16,16-диметил PGE_2 .

50 Згідно з іншими варіантами реалізації, будь-який зі способів, зазначених у цій заявці, включає культивування клітин і ретровірусу в присутності інгібітора деацетилази гістонів (HDAC).

Відповідно до одного з варіантів реалізації, інгібітор деацетилази гістонів (HDAC) вибирають із групи, що складається з: трихостатину А (TSA), вальпроєвої кислоти (VPA), бутирату натрію, субероїланіліду гідроксамової кислоти (SAHA), фенілбутирату натрію, депсипептидів, трапоксину (TPX), пептиду 1, що містить циклічну гідроксамову кислоту (CHAPI), MS-275, LBH589 і PXD-101.

Згідно з різними варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає ретровірус, який являє собою лентівірус.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає ретровірус, який являє собою вірус імунодефіциту людини (ВІЛ).

Згідно з конкретними варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає ретровірус, псевдотипований білком G оболонки вірусу везикулярного стоматиту (VSV-G).

Згідно з іншими варіантами реалізації, будь-який зі способів, зазначених у цій заявці, включає культивування клітин у присутності сполуки, яка підсилює сигнальні шляхи рецептора простагландину EP до початку процесу трансдукції.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом щонайменше 2 годин.

Згідно з іншими варіантами реалізації, клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом щонайменше 4 годин.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, клітини культивують у присутності сполуки, яка підсилює сигнальні шляхи рецептора простагландину EP, одночасно з процесом трансдукції.

Згідно з іншими варіантами реалізації, клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом щонайменше 24 годин.

Згідно з іншими варіантами реалізації, клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом щонайменше перших 24 годин після початку процесу трансдукції.

Згідно з деякими варіантами реалізації, клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом щонайменше перших 48 годин після початку процесу трансдукції.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає ретровірус, який містить вектор, що складається з: лівого (5') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) ретровірусу; послідовності контролю експресії, функціонально пов'язаної з геном, що представляє інтерес; і

правого (3') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) ретровірусу.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає ретровірус, який містить вектор, що складається з: лівого (5') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) ВІЛ-1; псі-послідовності для упаковки (Ψ); елемента, що зв'язується з білком *rev* (RRE-структури); промотору β -глобіну і локус контролюючої області (LCR) β -глобіну, функціонально зв'язаних з геном, що представляє інтерес, і правого (3') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності), що включає: один або декілька інсуляторів або поліаденілової послідовності β -глобіну кролика (β grA).

Згідно з різними варіантами реалізації, кровотворні стовбурові клітини або клітини-попередники вводяться в організм пацієнта, що страждає від гемоглобінопатії.

Відповідно до різних певних варіантів реалізації, гемоглобінопатія являє собою β -таласемію або серпоподібноклітинну анемію.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, кожна з композицій або способів, зазначених у цій заявці, включає ретровірус, що складається з: лівого (5') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) ВІЛ-1; псі-послідовності для упаковки (Ψ); елемента, що зв'язується з білком *rev* (RRE-структури); промотор MND (синтетичного промотору, що містить область U3 довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) вірусу мишачого лейкозу Молоні (MoMmkpV) і енхансер вірусу мієлопроліферативної саркоми мишей), функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, що кодує поліпептид ABCD1 людини; правого (3') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) ВІЛ-1 і поліаденілової послідовності β -глобіну кролика (β grA).

Згідно з різними варіантами реалізації, стовбурові кровотворні клітини або клітини-попередники вводять пацієнтові, що страждає адренолейкодистрофією або адреномієлонеуропатією.

Згідно з різними варіантами реалізації, ретровірус являє собою реплікативно-дефектний вірус.

КОРОТКИЙ ОПИС КРЕСЛЕНЬ

Фігура 1 ілюструє результати визначення сполук, що стимулюють трансдукцію клітин CD34+. Клітини піддали процесу відтавання і попередньо стимулювали фактором стовбурових клітин (SCF), тромбопоетином (TPO), білком FltL і інтерлейкіном-3 (IL3), а потім піддали трансдукції GFP+ лентивірусом (що містить зелений флуоресцентний білок). Крім того, клітини піддали

впливу розчинних факторів у високій, середній і низькій концентрації (див. Таблицю 1) у процесі попередньої стимуляції (0-24 години), або в процесі трансдукції (24-48 годин). Потім клітини промили і культивували протягом приблизно 1 тижня, після чого досліджували за допомогою проточної цитометрії. Потім визначили кількість GFP+ клітин і ілюстрували його на тепловій карті (двомірній колірній карті). Сірі області відповідають приблизно 45 %-вій кількості трансдуційованих клітин, при динамічному діапазоні від 0 % (чорні області) до ~92 % (білі області).

КОРОТКИЙ ОПИС ІДЕНТИФІКАТОРІВ ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

SEQ ID NO: 1 описує полінуклеотидну послідовність кДНК α -глобіну людини

SEQ ID NO: 2 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга α -глобіну людини

SEQ ID NO: 3 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга α -глобіну миші

SEQ ID NO: 4 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга α -глобіну пацюка

SEQ ID NO: 5 описує полінуклеотидну послідовність кДНК β -глобіну людини

SEQ ID NO: 6 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга β -глобіну людини

SEQ ID NO: 7 описує амінокислотну послідовність мутантного поліпептидного ланцюга β -глобіну людини

SEQ ID NO: 8 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга β -глобіну миші

SEQ ID NO: 9 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга β -глобіну пацюка

SEQ ID NO: 10 описує полінуклеотидну послідовність кДНК γ -глобіну людини

SEQ ID NO: 11 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга γ -глобіну людини

SEQ ID NO: 12 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга γ -глобіну миші

SEQ ID NO: 13 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга γ -глобіну пацюка

пацюка

SEQ ID NO: 14 описує полінуклеотидну послідовність кДНК дельта-глобіну людини

SEQ ID NO: 15 описує амінокислотну послідовність поліпептидного ланцюга дельта-глобіну людини

людини

SEQ ID NO: 16 далі описує послідовність кДНК, що кодує полінуклеотид ACBD1

SEQ ID NO: 17 далі описує послідовність кДНК, що кодує полінуклеотид ACBD1

SEQ ID NO: 18 далі описує амінокислотну послідовність поліпептиду ACBD1.

ДОКЛАДНИЙ ОПИС ВИНАХОДУ

А. Короткий опис

Цей винахід відноситься до вдосконалених композицій, що застосовуються у генній терапії для лікування, профілактики або поліпшення перебігу генетичних порушень. Одним з важливих завдань генної терапії є підвищення ефективності трансдукції клітин, що містять гени, які будуть введені в організм суб'єкта, в умовах, коли "відкоректовані" клітини не мають природної переваги при відборі перед нетрансдуційованими клітинами.

Цей винахід, зокрема, ґрунтується на несподівано отриманій інформації про те, що новітні способи трансдукції клітин згідно з винаходом можуть застосовуватися для одержання більшої кількості "лікувальних" або "відкоректованих" клітин *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo* і, відповідно, підвищення ефективності генної терапії. Не обмежуючись якою-небудь певною теорією, цей винахід, зокрема, припускає, що завдяки підвищенню ефективності трансдукції більше клітин стають "відкоректованими" і, таким чином, способи проведення генної терапії згідно з цим винаходом вимагають введення меншої кількості клітин для забезпечення лікувального, профілактичного ефекту або для поліпшення перебігу порушень у пацієнтів, що піддаються генній терапії. Крім того, оскільки пацієнтові вводиться більша кількість трансдуційованих клітин, для одержання лікувального, профілактичного ефекту або для поліпшення перебігу порушень може відпасти необхідність у застосуванні місесупресивної або міслоаблятивної терапії.

Відповідно до цього, цей винахід задовольняє клінічну потребу підвищення ефективності генної терапії при лікуванні генетичних захворювань, через те, що більше число "лікувальних" клітин з популяції трансдуційованих клітин можуть бути введені пацієнтові для досягнення лікувального, профілактичного ефекту або для поліпшення перебігу порушення. Зокрема, винахід відноситься до несподівано ефективних способів трансдукції клітин, до векторів і генномодифікованих клітин, що сприяють одержанню бажаних клінічних ефектів при застосуванні генної терапії.

Якщо не зазначено інакше, цей винахід відноситься до загальноприйнятих способів, застосовуваних у молекулярній біології і у технології рекомбінантних ДНК у рамках даних галузей знань, деякі з яких описані в цій заявці для ілюстрації. Зазначені способи і технології докладно описані у відповідних джерелах. Див., наприклад, Sambrook, et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd Edition, 1989); Maniatis et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*

(1982); DNA Cloning: A Practical Approach, vol. I & II (D. Glover, ed.); Oligonucleotide Synthesis (N. Gait, ed., 1984); Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins, eds., 1985); Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins, eds., 1984); Animal Cell Culture (R. Freshney, ed., 1986); A Practical Guide to Molecular Cloning (B. Perbal, ed., 1984).

Зміст усіх зазначених публікацій, патентів і патентних заявок повністю включено в цей опис шляхом посилання.

В. Терміни (визначення)

Якщо не зазначено інакше, усі технічні і наукові терміни в цій заявці мають значення, прийняте середніми фахівцями в даній галузі техніки. У рамках опису цього винаходу, нижче визначені наступні терміни.

У цій заявці термін "ретровірус" відноситься до вірусу, що містить РНК, який за допомогою зворотної транскрипції копіює свою геномну РНК у вигляді дволанцюгового ланцюга лінійної ДНК і потім ковалентно впроваджує її в геном клітини-хазяїна. Ретровіруси традиційно використовуються як засоби впровадження генів (Miller, 2000, Nature. 357: 455-460). Як тільки вірус впровадився в геном клітини-хазяїна, його називають "провірусом". Провірус служить матрицею для РНК-полімерази II і обумовлює експресію молекул РНК, що кодують структурні білки і ферменти, необхідні для репродукції нових вірусних частинок.

Типові ретровіруси включають, але не обмежуються: вірусом мишачого лейкозу Молоні (M-MuLV), вірусом мишачої саркоми Молоні (MoMSV), вірусом саркоми мишей Харві (HaMuSV), вірусом пухлини молочної залози мишей (MmMTV), вірусом лейкемії гібонів (GaLV), вірусом лейкемії котятчих (FLV), спума вірусом, вірусом лейкемії мишей Френда, вірусом стовбурових клітин мишей (MSCV), вірусом саркоми Рауса (RSV) і лентивірусом.

У цій заявці термін "лентивірус" відноситься до групи (або роду) складних (комплексних) ретровірусів. Типові ретровіруси включають, але не обмежуються: ВІЛ (вірусом імунodefіциту людини, у тому числі ВІЛ-1 і ВІЛ-2); вірусом вісна-меді (VMV); вірусом козячого артрити-енцефаліту (CAEV); вірусом інфекційної анемії коней (EIAV); вірусом імунodefіциту котятчих (FIV); вірусом імунodefіциту великої рогатої худоби (BIV) і вірусом імунodefіциту мавп (SIV). Відповідно до одного з варіантів реалізації, кращі основні кодуючі послідовності векторів-похідних ВІЛ (напр., цис-діючі елементи ланцюга ВІЛ).

У процесі реалізації цього винаходу можуть застосовуватися ретровірусні і, зокрема, лентивірусні вектори. Відповідно до цього, терміни "ретровірус" або "ретровірусний вектор" у цій заявці також включають "лентивірус" або "лентивірусний вектор", відповідно.

Згідно з цією заявою, термін "вектор" відноситься до молекули нуклеїнової кислоти, здатної переносити іншу молекулу нуклеїнової кислоти. Як правило, стерпна молекулярна кислота зв'язана, тобто, вставлена в молекулу нуклеїнової кислоти вектора. Вектор може містити послідовності, що опосередковують самостійну реплікацію в клітині, або послідовності, що дозволяють нуклеїновій кислоті, що представляє інтерес, впроваджуватися в ДНК клітини-хазяїна. Вектори, що застосовуються, наприклад, містять плазмід (наприклад, плазмід, що містять ДНК, або, що містять РНК), транспозони, косміди, штучні бактеріальні хромосоми і вірусні вектори. Застосовні вірусні вектори містять, наприклад, реплікативно-дефектні ретровіруси і лентивіруси.

Як буде очевидно фахівцям у даній галузі техніки, термін "вірусний вектор" широко застосовується для позначення молекули нуклеїнової кислоти (наприклад, плазмід-переносника), яка містить елементи нуклеїнової кислоти вірусного походження, що, як правило забезпечують перенесення молекули нуклеїнової кислоти або інтеграцію в геном клітини, або для позначення вірусної частинки, що опосередковує перенесення нуклеїнової кислоти. Як правило, вірусні частинки містять різні компоненти вірусу, а іноді й компоненти клітини-хазяїна, крім нуклеїнової кислоти (нуклеїнових кислот).

Термін "вірусний вектор" може відноситися до вірусу або вірусної частинки, здатної переносити нуклеїнову кислоту в клітини, або до самої стерпної нуклеїнової кислоти. Вірусні вектори і плазмід-переносники містять структурні і/або функціональні генетичні елементи, переважно вірусного походження. Термін "ретровірусний вектор" відноситься до вірусного вектора або плазмід, що містить структурні і функціональні елементи повністю або частково, переважно ретровірусного походження. Термін "лентивірусний вектор" відноситься до вірусного вектора або плазмід, що містить структурні і функціональні елементи повністю або частково, включаючи LTR-послідовності, переважно лентивірусного походження. Термін "гібрид" відноситься до вектора, LTR-послідовності або іншої нуклеїнової кислоти, що містить як ретровірусні, наприклад, лентивірусні послідовності, так і вірусні послідовності не лентивірусного походження. Відповідно до одного з варіантів реалізації, гібридний вектор відноситься до вектора або плазмід-переносника, що містить ретровірусні, наприклад,

лентивірусні послідовності, що забезпечують зворотну транскрипцію, реплікацію, інтеграцію і/або упаковку.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, терміни "лентивірусний вектор", "лентивірусний експресійний вектор" можуть відноситися до лентивірусних плазмід-переносників і/або інфекційних лентивірусних частинок. Слід розуміти, що посилання на такі елементи, як сайти вбудовування, промотори, що регулюють елементи, гетерологічні нуклеїнові кислоти і т.п., у цій заявці, мають на увазі, що послідовності таких елементів присутні у формі РНК у лентивірусних частинках згідно з винаходом, і у формі ДНК у плазмідах, що містять ДНК, згідно з винаходом.

На кожному кінці провірусу присутні структури, що називаються "довгими кінцевими повторами" або "LTR-послідовностями". Термін "довгий кінцевий повтор" ("LTR-послідовність") відноситься до доменів комплементарних пар основ на кінцях ретровірусних ДНК, що представляють собою в контексті природних послідовностей безпосередні повтори, які містять області U3, R і U5. LTR-послідовності, як правило, виконують основні функції в процесі експресії ретровірусних генів (наприклад, у процесі індукції, ініціації і поліаденілювання генних транскриптів), а також у процесі реплікації вірусу. LTR-послідовність містить численні регулюючі області, що включають елементи регуляції на рівні транскрипції, сигнали поліаденілювання і послідовності, необхідні для реплікації та інтеграції вірусного генома. Вірусні LTR-послідовності складаються з трьох областей: U3, R і U5. Область U3 містить енхансерні і промоторні елементи. Область U5 являє собою послідовність між ділянкою зв'язування праймера і областю R, і містить сайт поліаденілювання. Область R (repeat - повтор) перебуває між областями U3 і U5. LTR-послідовність складається з областей U3, R і U5 і присутня як на 5'-, так і на 3'-кінці вірусного генома. Безпосередньо до 5'-кінця LTR-послідовності прилягають послідовності, необхідні для зворотної транскрипції генома (ділянка зв'язування тРНК-праймера) і для ефективного упакування вірусної РНК у частинки (Psi-послідовність).

У цій заявці термін "сигнал упакування" або "послідовність упакування" відноситься до послідовностей у складі ретровірусного генома, необхідним для вставки вірусної РНК у вірусний капсид або частинку, див., наприклад, Clever et al., 1995. J. of Virology, Vol. 69, No. 4; pp. 2101-2109. Багато ретровірусних векторів використовують мінімальний сигнал упакування (що позначається також як psi [Ψ] або [Ψ+] послідовність), необхідний для капсидування вірусного генома. Таким чином, у цій заявці термін "послідовність упакування", "сигнал упакування", "psi" і символ «Ψ» застосовуються відносно некодуєчої послідовності, необхідної для капсидування ретровірусних ланцюжків РНК в процесі формування вірусної частинки.

Згідно з різними варіантами реалізації, вектори містять модифіковані 5'-кінцеві і/або 3'-кінцеві LTR-послідовності. 3'-кінцеві LTR-послідовності часто піддаються модифікації для забезпечення безпеки лентивірусних або ретровірусних систем шляхом досягнення реплікативної дефектності вірусів. У цій заявці, термін "реплікативно дефектний" відноситься до вірусу, не здатного до повної, ефективної реплікації таким чином, що утворюються неінфекційні віріони (наприклад, реплікативно-дефектні дочірні лентивіруси). Термін "реплікативно-компетентний" відноситься до вірусу дикого типу або до мутантного вірусу, здатного до реплікації, таким чином, що в результаті реплікації вірусу утворюються інфекційні віріони (наприклад, реплікативно-компетентні дочірні лентивіруси).

Вектори, що "самоінактивуються" (SIN) відносяться до реплікативно-дефектних векторів, наприклад, ретровірусних або лентивірусних векторів, праві (3'-кінцеві) енхансерні і промоторні елементи LTR-послідовності яких, що називаються також областю U3, піддаються модифікації (наприклад, за допомогою делеції або заміщення) для запобігання вірусній транскрипції після першого циклу вірусної реплікації. Це відбувається через те, що 3'-кінцева U3 область LTR-послідовності служить матрицею для лівої (5'-кінцевої) області U3 LTR-послідовності в процесі вірусної реплікації і, таким чином, вірусний транскрипт не може бути отриманий через відсутність енхансерного і промоторного елемента області U3. Згідно з іншим варіантом реалізації винаходу, 3'-кінцева LTR-послідовність модифікується таким чином, що область U5 заміщається, наприклад, гетерологічною або штучною полі-А послідовністю, одним або декількома ізоляторними елементами і/або індукційним промотором. Слід зазначити, що модифікації LTR-послідовностей, такі як 3'-кінцевих LTR-послідовностей, 5'-кінцевих LTR-послідовностей або й тих, і інших, також включені в обсяг цього винаходу.

Для підвищення рівня безпеки, область U3 5'-кінцевої LTR-послідовності заміщається гетерологічним промотором, що запускають транскрипцію вірусного генома в процесі реплікації вірусних частинок. Приклади застосованих гетерологічних промоторів включають, наприклад, промотори вірусу мавп 40 (вірусу SV40) (наприклад, ранні або пізні), цитомегаловірусу (CMV) (наприклад, негайно-ранні), вірусу мишачого лейкозу Молоні (MoMLV), вірусу саркоми Рауса (RSV) і вірусу простого герпеса (HSV) (тимідинкіназу). Типові промотори здатні підтримувати

високий рівень транскрипції незалежно від транс-діючих транскрипційних факторів. Таке заміщення знижує ймовірність рекомбінації з одержанням реплікативно-компетентних вірусів, тому що в системі реплікації вірусів відсутня повна послідовність області U3. Згідно з конкретними варіантами реалізації, гетерологічний промотор може бути індукцибельним, таким

5 чином, що транскрипція всього вірусного генома або його частини може відбуватися тільки в присутності одного або декількох факторів індукції. Фактори індукції включають, але не обмежуються однією або декількома хімічними сполуками або фізіологічними умовами, наприклад, температурою або кислотністю, у яких культивуються клітини.

Згідно з деякими варіантами реалізації, вірусні вектори містять TAR-елемент. Термін "TAR" відноситься до генетичного елемента "відповіді на трансактивацію", розташованому в області R лентивірусних (наприклад, ВІЛ) LTR-послідовностей. Цей елемент взаємодіє з лентивірусними транс-діючими транскрипційними факторами (tat), підвищуючи рівень вірусної реплікації. Проте, згідно з варіантами реалізації, у яких область U3 5'-кінцевої LTR-послідовності заміщається гетерологічним промотором, цей елемент не є необхідним.

15 "Область R" відноситься до області ретровірусної LTR-послідовності між кеп-структурою (кеп-угрупованням, тобто, областю початку транскрипції) і початком полі-А послідовності. Область R також визначається розташованими безпосередньо по її кінцях областями U3 і U5. Область R бере участь у процесі зворотної транскрипції, дозволяючи переносити ДНК, що утворюється, з однієї області генома в іншу.

20 У цій заявці, термін "ДНК-флеп елемент" відноситься до нуклеїнової кислоти, послідовність якої включає центральний поліпуриновий тракт і центральну термінуючу послідовність (сРРТ і СТС) ретровірусу, наприклад, ВІЛ-1 або ВІЛ-2. Застосовні ДНК-флеп елементи описані в патенті США № 6,682,907 і у Zennou, et al., 2000, Cell, 101:173. У процесі зворотної транскрипції ВІЛ-1, центральна ініціація "плюс -ланцюга" ДНК в області центрального поліпуринового тракту (сРРТ) і центральна термінація в області центральної термінуючої послідовності (СТС) приводять до формування трохланцюгової структури ДНК: центрального ДНК-флеп елемента. Не обмежуючись існуючими теоріями, ДНК-флеп елемент може бути цис-діючим фактором імпорту лентивірусного геному в ядро і/або збільшити титр вірусу. Згідно з конкретними варіантами реалізації, основна кодуєча послідовність ретровірусного або лентивірусного вектора містить

30 один або декілька ДНК-флеп елементів, розташованих проти ходу або по ходу транскрипції гетерологічних генів вектора, що представляють інтерес. Наприклад, згідно з конкретними варіантами реалізації, плазміда-переносник містить ДНК-флеп елемент. Відповідно до одного з варіантів реалізації, вектор згідно з винаходом містить ДНК-флеп елемент ВІЛ-1.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, ретровірусні або лентивірусні вектори-переносники містять один або декілька "елементів експорту". Термін "елемент експорту" відноситься до цис-діючого посттранскрипційного регуляторного елемента, що регулює транспорт РНК-транскрипту з ядра клітини в цитоплазму. Приклади елементів експорту РНК включають, але не обмежуються елементом, що зв'язується з білком rev вірусу імунodefіциту людини (RRE) (див., наприклад, Cullen et al., 1991. J. Virol. 65: 1053; і Cullen et al., 1991. Cell 58: 423), і посттранскрипційним регуляторним елементом вірусу гепатиту В (HPRE). Як правило, елемент експорту РНК розташований з 3'-кінця нетрансльованої області (UTR) гена і може бути присутнім в одній або декількох копіях.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, рівень експресії гетерологічних послідовностей у вірусних векторах підвищується за допомогою вставки у вектори посттранскрипційних регуляторних елементів, ефективних полі-А послідовностей і, при необхідності, сигналів термінації транскрипції. Безліч посттранскрипційних регуляторних елементів можуть підвищити експресію гетерологічних нуклеїнових кислот, наприклад, посттранскрипційний регуляторний елемент вірусу гепатиту бабаків (WPRE; Zufferey et al., 1999, J. Virol., 73:2886), посттранскрипційний регуляторний елемент вірусу гепатиту В (HPRE) (Huang and Yen, 1995, Mol. Cell. Biol., 5:3864) і т.п. (Liu et al., 1995, Genes Dev., 9:1766). Згідно з визначеними варіантами реалізації, вектори згідно з винаходом не містять посттранскрипційні регуляторні елементи, такі як WPRE або HPRE, тому що в деяких випадках ці елементи підвищують ризик трансформації клітин і/або не підвищують кількість транскрипта іРНК і стабільність іРНК в істотному ступені. Тому, згідно з деякими варіантами реалізації, вектори згідно з винаходом не

55 містять WPRE або HPRE як додаткових факторів безпеки.

Елементи, що опосередковують ефективну термінацію і поліаденілювання транскриптів гетерологічних нуклеїнових кислот, підвищують експресію гетерологічних генів. Сигнали термінації транскрипції, як правило, розташовані по ходу транскрипції від сигналу поліаденілювання. Термін "полі-А сайт" або "полі-А послідовність" у цій заявці відноситься до

60 послідовності ДНК, що опосередковує термінацію і поліаденілювання первинного РНК-

іранскрипта РНК-полімеразою II. З огляду на те, що транскрипти, позбавлені поліаденілового "хвоста", нестабільні і швидко руйнуються, краще ефективно поліаденілювання рекомбінантних транскриптів. Типові сигнали поліаденілювання, які можуть застосовуватися у векторах згідно з винаходом, включають "ідеальні" полі-А послідовності (наприклад, ААТААА, АТТААА АГТААА),

5 послідовність поліаденілювання з бичачого гормону росту (BGHrA), послідовність поліаденілювання β-глобіну кролика (rβgrA), або іншу гетерологічну або ендегенну полі-А послідовність, відому в даній галузі техніки.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, ретровірусний або лентивірусний вектор також включає один або декілька інсуляторів. Інсулятори беруть участь у захисті послідовностей, що експресуються лентивірусами, наприклад, поліпептидів, що мають терапевтичні властивості, від впливу сайтів інтеграції, яке може бути опосередковане цис-діючими елементами геномної ДНК, що порушують регуляцію експресії перенесених послідовностей (тобто, ефект положення; див., наприклад, Burgess-Beusse et al., 2002, Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 99:16433; and Zhan et al., 2001, Hum. Genet., 109:471). Згідно з деякими варіантами реалізації, вектори-переносники

10 включають один або декілька інсуляторів на 3'-кінці LTR-послідовності; у процесі інтеграції провірусу в геном клітини-хазяїна, провірус здобуває один або декілька інсуляторів як на 5'-кінцевих, так і на 3'-кінцевих LTR-послідовностях, у результаті репродукції 3'-кінцевих LTR-послідовностей. Застосовні інсулятори згідно з винаходом включають, але не обмежуються курячим β-глобіновим інсулятором (див. Chung et al., 1993. Cell 74:505; Chung et al., 1997. PNAS 94:575; і Bell et al., 1999. Cell 98:387, включені в цю заявку шляхом посилання). Приклади інсуляторів включають, але не обмежуються інсулятором локусу β-глобіну, такого як курячий інсулятор HS4.

Відповідно до певних особливих варіантів реалізації цього винаходу, більша частина основних кодуючих послідовностей векторів має лентивірусне походження, наприклад, такі,

25 отримані з B1L-1. Проте, слід розуміти, що в рамках винаходу можуть застосовуватися різні лентивірусні джерела; більше того, певні послідовності нуклеїнових кислот лентивірусів можуть бути піддані всляким заміщенням і змінам за умови збереження здатності вектора-переносника виконувати функції, описані в цій заявці. Крім того, у даній галузі техніки відомі різні лентивірусні вектори, див. Naldini et al., (1996a, 1996b, and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенти США №№ 6,013,516; і 5,994,136, багато з яких можуть застосовуватися для створення вірусного вектора або плазмиди-переносника згідно з цим винаходом.

У цій заявці, термін "сполука" відноситься до низькомолекулярних органічних сполук, простагландинів, активаторів цАМФ, агоністів сигнального шляху Wnt, агоністів сигнальних шляхів цАМФ/фосфоінозитид-3-кінази (PI3K)/серин-треонінової кінази (AKT), агоністів

30 сигнального шляху Ca²⁺, агоністів сигнального шляху NO/ангіотензину і неорганічних речовин, що включають усі без винятку аналоги і похідні вищевказаних сполук.

Терміни "невелика молекула", "невелика органічна молекула", "невелика молекулярна сполука" відносяться до низькомолекулярних сполук, що характеризуються молекулярною масою, що не перевищує приблизно 5 кДа, приблизно 4 кДа, приблизно 3 кДа, приблизно 2 кДа,

40 приблизно 1 кДа, або приблизно 0,5 кДа. Згідно з конкретними варіантами реалізації, невеликі молекули можуть являти собою нуклеїнові кислоти, пептиди, пептидоміметики, пептоїди та інші невеликі органічні сполуки, препарати і т.п. Бази даних хімічних і/або біологічних сполук, таких як бактеріальні, грибові або водоростяні екстракти, відомі в даній галузі знань і можуть бути вивчені в процесі будь-якого роду випробувань у рамках винаходу. Приклади способів одержання молекулярних баз даних можуть бути вивчені в наступних джерелах: (Carell et al., 1994a; Carell et al., 1994b; Cho et al., 1993; Dewitt et al., 1993; Gallop et al., 1994; Zuckermann et al., 1994).

Бази даних сполук можуть бути представлені у вигляді розчинів (Houghten et al., 1992) на гранулах (Lam et al., 1991), на кристалах (Fodor et al., 1993), бактерій, спор (Ladner et al., патент США № 5,223,409, 1993), на плазмідах (Cull et al., 1992) або на фагах (Cwirla et al., 1990; Devlin et al., 1990; Felici et al., 1991; Ladner et al., патент США № 5,223,409, 1993; Scott and Smith, 1990). Описаний в цій заявці винахід має на увазі застосування різних баз даних для визначення невеликих молекул, що забезпечують посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP на кожному з етапів. Бази даних, застосовні з метою реалізації цього

50 винаходу, включають, але не обмежуються: (1) базами даних хімічних речовин, (2) базами даних природних речовин і (3) сполученими (комбінованими) базами даних, що містять довільні пептиди, олігонуклеотиди і/або органічні сполуки.

Бази даних хімічних речовин складаються зі структурних аналогів і похідних відомих сполук або сполук, що визначаються як "hits" або "leads" за класифікацією природних сполук. Бази

60 даних природних речовин складаються з безлічі мікроорганізмів, тварин, рослин або водних

організмів, що використовуються при одержанні комбінацій для класифікування шляхом: (1) культивування і виділення з рідких екстрактів ґрунтових, рослинних і морських мікроорганізмів або (2) виділення з рослин або морських організмів. Бази даних природних речовин включають поліпептиди, нерибосомні пептиди і їх варіанти (штучного походження). Див. Cane, D. E., et al., (1998) *Science* 282:63-68. Сполучені (комбіновані) бази даних складаються з комбінації великої кількості пептидів, олігонуклеотидів або органічних молекул. Такі бази досить просто створити за допомогою традиційних способів автоматизованого синтезу баз даних, ПЦР, клонування або за допомогою запатентованих способів. Особливий інтерес представляють сполучені (комбіновані) бази даних пептидів і олігонуклеотидів.

Зокрема, сполучена (комбінована) база даних хімічних речовин являє собою групу різних хімічних сполук, отриманих шляхом хімічного або біологічного синтезу з декількох хімічних "цеглинок", таких як реагенти. Наприклад, лінійна сполучена (комбінована) база даних хімічних речовин, така як база даних пептидів, створюється шляхом з'єднання хімічних "цеглинок" (амінокислот) у будь-якому можливому порядку при заданій довжині сполуки (тобто, кількості амінокислот у поліпептидному ланцюжку). Мільйони хімічних сполук можуть синтезуватися за допомогою такого роду комбінування хімічних "цеглинок".

Для більш докладних даних про комбінаторну хімію і створених на її основі баз даних, див. Huc, I. and Hruyen, R. (2001) *Comb. Chem. High Throughput Screen* 4:53-74; Lepre, C. A. (2001) *Drug Discov. Today* 6:133-140; Пенг, S. X. (2000) *Biomed. Chromatogr.* 14:430-441; Bohm, H. J. and Stahl, M. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:283-286; Barnes, C. and Balasubramanian, S. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:346-350; Lepre, Enjalbal, C, et al., (2000) *Mass Spectrom Rev.* 19:139-161; Hall, D.G., (2000) *Nat. Biotechnol.* 18:262-262; Lazo, J.S., and Wipf, P. (2000) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 293:705-709; Houghten, R.A., (2000) *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 40:273-282; Kobayashi, S. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* (2000) 4:338-345; Kopylov, A.M. and Spiridonova, V.A. (2000) *Mol. Biol. (Mosk)* 34:1097-1113; Weber, L. (2000) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 4:295-302; Dolle, R.E. (2000) *J. Comb. Chem.* 2:383-433; Floyd, C. D., et al., (1999) *Prog. Med. Chem.* 36:91-168; Kundu, B., et al., (1999) *Prog. Drug Res.* 53:89-156; Cabilly, S. (1999) *Mol. Biotechnol.* 12:143-148; Lowe, G. (1999) *Nat. Prod. Rep.* 16:641-651; Dolle, R.E. and Nelson, K.H. (1999) *J. Comb. Chem.* 1:235-282; Czarnick, A.W. and Keene, J.D. (1998) *Curr. Biol.* 8:R705-R707; Dolle, R.E. (1998) *Mol. Divers.* 4:233-256; Myers, P.L., (1997) *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:701-707; and Pluckthun, A. and Cortese, R. (1997) *Biol. Chem.* 378:443.

Устаткування для створення сполучених баз даних комерційно доступне (див., наприклад, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville Ky., Symphony, Rainin, Woburn, Mass., 433A Applied Biosystems, Foster City, Calif., 9050 Plus, Millipore, Bedford, Mass.). Крім того, комерційно доступна безліч готових сполучених баз даних (див., наприклад, Comgenex, Princeton, N.J., Asinex, Moscow, Ru, Tripos, Inc., St. Louis, Mo., Chemstar, Ltd., Moscow, RU, 3D Pharmaceuticals, Exton, Pa., Martek Biosciences, Columbia, Md. і т.п.).

У цій заявці, термін "метаболічний попередник" відноситься до форми сполуки, у процесі метаболізму, що перетворюється у сполуку, що представляє інтерес.

У цій заявці, термін "метаболіт" відноситься до форми сполуки, отриманої в результаті метаболічних перетворень.

У випадку хімічних сполук, таких як органічних хімічних сполук, терміни "аналог" і "похідне" відносяться до молекул хімічних сполук, споріднених іншій хімічній сполуці структурно і функціонально, нерідко структурно відрізняючись одним елементом або групою; у той же час, такі молекули можуть відрізнятися модифікацією декількох груп (наприклад, 2, 3 або 4-х груп) за умови збереження функції вихідної хімічної сполуки. Зазначені модифікації добре знайомі фахівцям у даній галузі і включають, наприклад, приєднання або заміщення хімічних груп, таких як складні ефіри або амідні кислот, захисні групи, такі як бензильна група спирту або тіолу, або трет-бутоксикарбонільна група амінів. Також, модифікації включають бічні алкільні ланцюги, які, як алкільні замісники (наприклад, метильні, диметильні, етильні і т.п.), зміни в рівні насиченості або ненасиченості бічних ланцюгів і приєднання модифікованих груп, таких як заміщена фенільна або феноксигрупа. Похідні можуть включати кон'югати, такі, як біотинові або авідинові групи, ферменти, такі як пероксидаза хрину і їй подібні, включаючи також радіоізотопно-мічені, біоломінісцентні, хемолюмінісцентні або флуоресцентні групи. Також, до агентів, зазначених у цій заявці, можуть бути приєднані групи, що змінюють їх фармакокінетичні характеристики, наприклад, що підвищують період напіввиведення *in vivo* або *ex vivo*, або підвищують здатність проникнення в клітини, у числі інших бажаних характеристик. Також, сюди включені пролікарські препарати, що як відомо поліпшують багато бажаних характеристик лікарських препаратів (наприклад, розчинність, біодоступність, простоту виробництва і т.п.) (див., наприклад,

WO/2006/047476, включену в цю заявку шляхом посилання, де зазначені приклади пролікарських препаратів-агоністів простагландину).

У цій заявці, терміни "полінуклеотид" або "нуклеїнова кислота" відносяться до інформаційної РНК (іРНК), РНК, геномної РНК (гРНК), плюс -ланцюга РНК (RNA(+)), мінус-ланцюга РНК (RNA(-)), геномної ДНК (гДНК), комплементарної ДНК (кДНК) або ДНК. Полінуклеотиди включають одно- і дволанцюгові полінуклеотиди. Краще, полінуклеотиди згідно з винаходом включають полінуклеотиди або їх варіанти, послідовності яких ідентичні, щонайменше, приблизно на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % стандартним послідовностям, зазначеним у цій заявці (див., наприклад, ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ), у той же час, як правило, зазначений варіант зберігає щонайменше одну біологічну функцію стандартної послідовності. Відповідно до різних показових варіантів реалізації, цей винахід, зокрема, відноситься до полінуклеотидних послідовностей вірусних векторів і плазмід-переносників, а також до композицій зазначених агентів. Згідно з конкретними варіантами реалізації, винахід забезпечує полінуклеотиди, що кодують один або декілька терапевтично поліпептидів, і/або інші гени, що викликають інтерес. Згідно з конкретними варіантами реалізації, цей винахід забезпечує полінуклеотиди, що кодують поліпептид глобіну або АТФ-зв'язувальну касету підроддини D (ALD), поліпептид (ABCD1), як описано в цій заявці.

У цій заявці, терміни "варіант полінуклеотиду" і "варіант" відносяться до полінуклеотидів, що характеризуються значною схожістю послідовності з послідовностями стандартних полінуклеотидів або до полінуклеотидів, що гібридизуються зі стандартними полінуклеотидами в строгих умовах, зазначених у заявці. Ці терміни включають полінуклеотиди, що піддаються вставці, делеції або заміщенню одного або декількох нуклеотидів, у порівнянні зі стандартним полінуклеотидом. Щодо цього, фахівцям у даній галузі очевидно, що стандартний полінуклеотид може піддаватися певним мутаціям, таким як вставки, делеції або заміщення за умови, що модифікований полінуклеотид зберігає біологічні функції стандартного полінуклеотиду.

У цій заявці, термін "виділений" відноситься до матеріалу, наприклад, полінуклеотиду, поліпептиду, клітині, у значній мірі або абсолютно позбавленому компонентів, пов'язаних з ним у його природному стані. Згідно з конкретними варіантами реалізації, терміни "отриманий" або "утворений від" застосовуються як синоніми терміна "виділений". Наприклад, "виділений полінуклеотид" у цій заявці відноситься до полінуклеотиду, отриманого за допомогою видалення послідовностей з обох його кінців, що присутні у його природному стані, наприклад, до фрагмента ДНК, відщепленого від послідовностей, між якими він розташований у природному стані.

Терміни, що описують орієнтацію полінуклеотидів, включають: 5' (як правило, кінець полінуклеотиду, що несе вільну фосфатну групу) і 3' (як правило, кінець полінуклеотиду, що несе вільну гідроксильну (-ОН) групу). Полінуклеотидні послідовності можуть бути зазначені, як орієнтовані в напрямку 5' → 3' або в напрямку 3' → 5'.

Терміни "комплементарний" і "комплементарність" відносяться до полінуклеотидів (тобто, нуклеотидних послідовностей), що мають спорідненість згідно з правилами спарювання основ. Наприклад, послідовність ДНК 5' A G T C A T G 3' комплементарна послідовності 3' T C A G T A C 5'. Остання нерідко записується у зворотному напрямку, зліва направо від 5'-кінця до 3'-кінця: 5' C A T G A C T 3'. Послідовність, що збігається сама з собою при читанні у зворотному порядку, називається паліндромною послідовністю. Комплементарність може бути "частковою", коли лише деякі з основ нуклеїнових кислот відповідають правилам спарювання основ; також, комплементарність двох послідовностей нуклеїнових кислот може бути "повною".

Термін "касета експресії нуклеїнової кислоти" у цій заявці відноситься до послідовностей вектора, здатних експресувати РНК і, слідом за цим, поліпептид. Відповідно до одного з варіантів реалізації, касета експресії нуклеїнової кислоти містить ген(и), що представляє(ють) інтерес, наприклад, полінуклеотид(и), що представляє(ють) інтерес. Згідно з іншим варіантом реалізації, касета експресії нуклеїнової кислоти містить одну або кілька регуляторних послідовностей і ген(и), що представляє(ють) інтерес, наприклад, полінуклеотид(и), що представляє(ють) інтерес. Вектори можуть містити одну, дві, три, чотири, п'ять або більше касет експресії. Касета експресії розташована і орієнтована в послідовності вектора таким чином, що нуклеїнова кислота в касеті може бути транскрибована в РНК і, при необхідності, далі трансльована в білок або поліпептид, який може бути підданий відповідній посттрансляційній модифікації, необхідній для забезпечення виконання біологічної функції в трансформованій клітині, і може бути доставлений у відповідний відділ клітини для виконання цієї функції або за допомогою спрямованої доставки усередині клітини, або експортований з клітини в позаклітинний простір. Краще, 3' і 5'-кінці касети пристосовані для безпосередньої інтеграції у вектор, наприклад, на обох кінцях присутні сайти, що розпізнаються рестрикційними

ендонуклеазами. Згідно з кращим варіантом реалізації винаходу, касета експресії нуклеїнової кислоти включає послідовність терапевтичного гена для лікування, профілактики або поліпшення перебігу генетичних порушень, таких як порушень кровотворення. Касета експресії може бути виділена та інтегрована в плазмиду або вірусний вектор як єдиний елемент.

5 Полінуклеотиди включають полінуклеотиди, що представляють інтерес. У цій заявці, термін "полінуклеотид(и), що представляє(ють) інтерес" відноситься до одного або декількох полінуклеотидів, наприклад, полінуклеотиду, що кодує поліпептид (тобто, полінуклеотиду, що представляє інтерес), інтегрованому у вектор експресії, експресія якого бажана. Згідно з кращими варіантами реалізації, вектори і/або плазмиди згідно з винаходом включають один або 10 декілька полінуклеотидів, що представляють інтерес, наприклад, ген глобіну або ген ABCD1. Згідно з конкретними варіантами реалізації, полінуклеотид, що представляє інтерес, кодує поліпептид, який забезпечує терапевтичний, профілактичний ефект або поліпшує перебіг захворювання кровотворної системи або порушення, тобто, відноситься до "терапевтичного поліпептиду", що наприклад, кодується геном глобіну. Див., наприклад, патенти США №№ 6,051,402 і 7,901,671, опис і формула винаходу яких повністю включені в цю заявку шляхом 15 посилання. Див., наприклад, SEQ ID Nos: 1, 5, 10 і 14.

Згідно з іншими варіантами реалізації, полінуклеотид, що представляє інтерес, кодує поліпептид, який забезпечує терапевтичний, профілактичний ефект або поліпшує перебіг адренолейкодистрофії або адреномієлонеуропатії, тобто, відноситься до "терапевтичного 20 поліпептиду", що наприклад, кодується геном ABCD1. Див., наприклад, SEQ ID Nos: 16-17. Див., наприклад, патенти США №№ 5,869,039 і 6,013,769, опис і формула винаходу яких повністю включені в цю заявку шляхом посилання.

У цій заявці, термін "глобін" відноситься до всіх білків або їх субодиниць, здатних ковалентно або нековалентно зв'язуватися гемовою групою і, таким чином, переносити або 25 запасати кисень. Термін глобін включає субодиниці гемоглобіну, міоглобіну або їх мутантних варіантів хребетних і безхребетних. Приклади глобінів включають α -глобін і його варіанти, β -глобін і його варіанти, γ -глобін і його варіанти, а також δ -глобін і його варіанти.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, полінуклеотид, що представляє інтерес, являє собою ген, що кодує поліпептид, який забезпечує терапевтичний ефект у процесі лікування 30 гемоглобінопатії, наприклад, α -глобін, β -глобін або β -глобінA-T87Q. Полінуклеотиди, що представляють інтерес, а також поліпептиди, що ними кодуються, включають як полінуклеотиди, що кодують поліпептиди дикого типу, так і їх функціональні варіанти та фрагменти. Згідно з конкретними варіантами реалізації, послідовність функціонального варіанта щонайменше на 80 %, 90 %, 95 % або 99 % ідентична послідовності відповідного стандартного 35 полінуклеотиду дикого типу. Згідно з конкретними варіантами реалізації, біологічна активність функціонального варіанта або фрагмента відповідного поліпептиду дикого типу становить щонайменше 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 % або 110 % біологічної активності поліпептиду дикого типу. Типові представники полінуклеотидів, застосовних згідно з цим винаходом, включають, але не обмежуються полінуклеотидами, що кодують α -глобін, β -глобін і β -глобінA-T87Q. 40

Полінуклеотиди згідно з цим винаходом, незалежно від довжини власної кодуєчої послідовності можуть бути зв'язані з іншими послідовностями ДНК, такими як промотори і/або енхансери, нетрансльовані області (UTR), послідовності Козака, сигнали поліаденілювання, додаткові сайти, що розпізнаються рестрикційними ендонуклеазами, сайти множинного 45 клонування, ділянки внутрішньої посадки рибосоми (IRES), сайти, що розпізнаються рекомбіназами (наприклад, LoxP, FRT і Att), стоп-кодони, кодони, що термінують транскрипцію, і полінуклеотиди, що кодують поліпептиди, що саморозщеплюються, епітопні мітки, описані в цій заявці або відомі в даній галузі, таким чином, що їх довжина може суттєво варіювати. Тому мається на увазі, що може застосовуватися полінуклеотид практично будь-якої довжини, краще, 50 довжини, що забезпечує достатню простоту одержання і застосування в рамках протоколу рекомбінантної ДНК згідно з винаходом.

Термін "послідовність, що регулює експресію" відноситься до полінуклеотидної послідовності, яка включає один або кілька промоторів, енхансерів та інших елементів, що регулюють транскрипцію, а також їх комбінації, здатні стимулювати, регулювати і контролювати 55 транскрипцію або експресію функціонально зв'язаних полінуклеотидів. Згідно з конкретними варіантами реалізації, вектори згідно з винаходом містять одну або кілька послідовностей, що регулюють експресію, специфічних відносно певних клітин, типів клітин або послідовностей клітинних поколінь, наприклад, клітин-мішеней; таким чином, експресія полінуклеотидів, функціонально зв'язаних з послідовностями, що регулюють експресію, специфічними відносно 60 певних клітин, типів клітин або послідовностей клітинних поколінь, відбувається винятково в

клітинах-мішенях, але не в інших клітинах. Кожна з послідовностей, що регулюють експресію і мають специфічність у відношенні певних клітин, у векторах може функціонувати в клітинах одного або різних типів, залежно від того, якого роду терапія повинна проводитися. Згідно з кращими варіантами реалізації, вектори містять одну або кілька послідовностей, що регулюють експресію, специфічних відносно кровотворних клітин, наприклад, кровотворних стовбурових клітин або кровотворних клітин-попередників. Відповідно до інших кращих варіантів реалізації, вектори містять одну або кілька послідовностей, що регулюють експресію і специфічних у відношенні еритроїдних клітин.

Термін "промотор" у цій заявці відноситься до сайту полінуклеотиду (ДНК або РНК), який розпізнає і з яким зв'язується РНК-полімераза. Термін "енхансер" відноситься до сегмента ДНК, що включає послідовності, здатні забезпечити підвищений рівень транскрипції і, у певних умовах, функціонувати незалежно від їхньої орієнтації у відношенні інших регулюючих послідовностей. Енхансер може функціонувати спільно або підсилювати дію промоторів і/або інших енхансерів. Термін "промотор/енхансер" відноситься до сегментів ДНК, здатних виконувати функції як промотору, так і енхансера.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, вектор згідно з винаходом містить екзогенні, ендегенні або гетерологічні регулюючі послідовності, такі як промотори і/або енхансери. "Ендегенна" регулююча послідовність пов'язана з певним геном у природних умовах. "Екзогенна" регулююча послідовність поміщується безпосередньо по сусідству з геном шляхом маніпуляції з генами (тобто, за допомогою способів, що застосовуються у молекулярній біології) таким чином, що транскрипція такого гена стимулюється пов'язаним з ним енхансером/промотором. "Гетерологічна" регулююча послідовність являє собою екзогенну послідовність, отриману з видів, відмінних від виду клітини, гени якої зазнають маніпуляції. "Синтетична" регулююча послідовність може включати елементи однієї або декількох ендегенних і/або екзогенних послідовностей і/або послідовностей, дослідження яких *in vitro* або *in silico* показали, що дані послідовності оптимально функціонують як промотор і/або енхансер для проведення певної генної терапії.

Термін "функціонально зв'язаний" відноситься до розташування описаних компонентів безпосередньо по сусідству один з одним таким чином, що вони можуть взаємодіяти у заданий спосіб. Відповідно до одного з варіантів реалізації, термін відноситься до функціонального зв'язку між послідовністю, що регулює експресію нуклеїнової кислоти (такої, як промотор і/або енхансер, або іншою послідовністю, що регулює експресію), і другою полінуклеотидною послідовністю, наприклад, полінуклеотидом, що представляють інтерес, таким чином, що послідовність, що регулює експресію, стимулює транскрипцію нуклеїнової кислоти, що відповідає другій послідовності.

У цій заявці термін "конститутивна послідовність, що регулює експресію" відноситься до промотора, енхансера або промотора/енхансера, що постійно стимулює транскрипцію функціонально зв'язаної послідовності. Конститутивна послідовність, що регулює експресію може являти собою "універсальний" промотор, енхансер або промотор/енхансер, що стимулює експресію в багатьох різних типах клітин і тканин; також вона може являти собою промотор, енхансер або промотор/енхансер, специфічний для певних клітин або тканин, який стимулює експресію в певних типах клітин і тканин, відповідно. Типові універсальні послідовності, що регулюють експресію, включають, але не обмежуються: негайно-ранній промотор цитомегаловірусу (CMV), промотор вірусу мавп 40 (SV40) (наприклад, ранній або пізній), LTR-промотор вірусу мишачого лейкозу (MoMLV) Молоні, LTR-послідовність вірусу саркоми Рауса (RSV), промотор (тимідинкіназу) вірусу простого герпеса (HSV), промотори H5, P7.5 і P11 вірусу осповакцини (вірусу вакцинії), промотор фактора елонгації 1-альфа (EF1a), білок ранньої відповіді EGR1, феритин H (FerH), феритин L (FerL), гліцеральдегід-3-фосфатдегідрогеназу (GAPDH), еукаріотичний фактор ініціації трансляції 4A1 (EIF4A1), білок теплового шоку 70 кДа 5 (HSPA5), білок теплового шоку 90 кДа бета 1 (HSP90B1), білок теплового шоку 70 кДа (HSP70), β -кінезин (β -KIN), локус ROSA 26 людини (Irions et al., (2007) Nature Biotechnology 25, 1477-1482), промотор убіквітину C (UBC), промотор фосфогліцераткінази-1 (PGK), енхансер цитомегаловірусу/промотор β -актину курей (CAG) і промотор β -актину.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, може бути кращим застосування послідовностей, що регулюють експресію, специфічних до клітин або тканин, для експресії бажаної полінуклеотидної послідовності відповідно до типу клітин або тканин (наприклад, для експресії певної нуклеїнової кислоти, що кодує поліпептид лише в певних типах клітин або тканин, або лише у певні фази життєвого циклу).

Типові приклади промоторів, специфічних до тканин, включають, але не обмежуються: промотор B29 (експресія в В-клітинах), промотор транскрипційного фактора карликовості

(CBFa2) (експресія в стовбурових клітинах), промотор CD14 (експресія в моноцитах), промотор CD43 (експресія в лейкоцитах і тромбоцитах), промотор CD45 (експресія в кровотворних клітинах), промотор CD68 (експресія в макрофагах), промотор CYP450 3A4 (експресія в гепатоцитах), промотор десміну (експресія в м'язових клітинах), промотор еластази 1 (експресія в ацинарних клітинах підшлункової залози), промотор ендокліну (експресія в ендотеліальних клітинах), промотор фібробласт-специфічного білка 1 (FSP1) (експресія у фіброблестах), промотор фібронектину (експресія у фіброблестах), промотор тирозинкінази FLT1 (експресія в ендотеліальних клітинах), промотор гліального фібрилярного кислого білка (GFAP) (експресія в астроцитах), промотор інсуліну (експресія в β -клітинах підшлункової залози), промотор інтегрину α -2b (ITGA2B) (експресія в мегакаріоцитах), промотор фактора міжклітинної адгезії 2 (ICAM-2) (експресія в ендотеліальних клітинах), промотор інтерферону-бета (IFN- β) (експресія в кровотворних клітинах), промотор кератину 5 (експресія в кератиноцитах), промотор міоглобіну (MB) (експресія в м'язових клітинах), промотор міогенного фактора 1 (MYOD1) ((експресія в м'язових клітинах), промотор нефрину (експресія в подоцитах), промотор γ -карбоксиглутамат-білка 2 кісток (OG-2) (експресія в остеобластах), промотор 3-оксоацил-KoA-трансферази (Oxct2B), (експресія в гаплоїдних сперматидях), промотор сурфактантного білка В (SP-B) (експресія в клітинах легенів), промотор синапсину (експресія в нейронах), промотор білка синдрому Віскотта-Олдріча (WASP) (експресія в кровотворних клітинах).

Відповідно до одного з варіантів реалізації, вектор згідно з цим винаходом містить один або кілька промоторів і/або енхансерів, специфічних до кровотворних клітин або тканин, обраних із групи, яка включає: промотор β -глобіну людини, LCR-послідовність β -глобіну людини, енхансер HS40 α -глобіну людини і промотор анкірину-1, функціонально зв'язаних з полінуклеотидом, що кодує поліпептид глобіну.

Згідно з іншим варіантом реалізації, згідно з цим винаходом включає промотор, активний у клітинах мікроглії, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, що кодує поліпептид АТФ-зв'язувальної касети підродино D, члена 1 (ABCD1). Згідно з конкретними варіантами реалізації, промотор включає енхансер вірусу мієлопроліферативної саркоми з делецією ділянки негативного контролю, промотор dl587rev із заміщеною ділянкою зв'язування праймера (MND), або їх транскрипційно активні фрагменти.

У цій заявці термін "умовна експресія" може відноситися до будь-якого виду умовної експресії, включаючи, не обмежуючись: експресію, що репресується, експресію в клітинах або тканинах, що характеризуються особливим фізіологічним, біологічним, патологічним статусом і т.п. Дане визначення не виключає експресію, специфічну до клітин або тканин. Деякі варіанти реалізації винаходу забезпечують умовну експресію полінуклеотидів, що викликають інтерес, наприклад, експресія регулюється за допомогою обробки конкретними препаратами, або шляхом створення умов, що стимулюють експресію або підвищують/понижують рівень експресії полінуклеотиду, що кодується полінуклеотидом, що викликає інтерес.

Типові приклади індукційних промоторів/систем включають, але не обмежуються: промотори, що активуються стероїдами, такі як промотори генів, що кодують рецептори глюкокортикоїдів або естрогену (що активуються відповідними гормонами), промотор металотіонеїну (що активується різними важкими металами), промотор MX-1 (що активується інтерфероном), система "GeneSwitch", регульована міфепристоном (Sirin et al., (2003) Gene, 323:67), перемикач гена, що активується куматом (низькомолекулярна сполука, що зв'язується з репресором CyMR) (WO 2002/088346), тертациклин-залежні регуляторні системи і т.п.

Умовна експресія також може здійснюватися за допомогою сайт-специфічних ДНК рекомбіназ. Згідно з конкретними варіантами реалізації винаходу, вектор включає щонайменше один (як правило, два) сайт рекомбінації, що розпізнається сайт-специфічними рекомбіназами. У цій заявці, термін "рекомбіназа" або "сайт-специфічна рекомбіназа" включає білки, що сприяють вирізанню, або інтегративні білки, ферменти, кофактори, або білки, що зв'язуються з нуклеїновими кислотами, які беруть участь у реакціях рекомбінації, що включають один або кілька сайтів рекомбінації (наприклад, два, три, чотири, п'ять, сім, десять, дванадцять, п'ятнадцять, двадцять, тридцять, п'ятдесят і т.д.), у числі яких можуть бути білки дикого типу (див. Landy, (1993) Current Opinion in Biotechnology 3:699-707), мутантні білки, їх похідні (наприклад, білки злиття, що включають послідовності рекомбінантних білків і їх фрагменти), фрагменти і варіанти. Типові приклади рекомбіназ, застосовних згідно з конкретними варіантами реалізації цього винаходу, включають, але не обмежуються: Cre, Int, IHF, Xis, Flp, Fis, Hin, Gin, FC31, Cin, резолвазой Tn3, TndX, XerC, XerD, TnpX, Hjc, Gin, SpCCE1 і ParA.

Вектори можуть містити один або кілька сайтів рекомбінації, що розпізнаються будь-якою з широкого спектра сайт-специфічних рекомбіназ. Слід розуміти, що сайт-мішень сайт-специфічної рекомбінази поряд з іншими сайтами необхідний для інтеграції вектора, наприклад,

ретровірусного або лентивірусного вектора. У цій заявці терміни "рекомбінантна послідовність", "сайт рекомбінації", "сайт сайт-специфічної рекомбінації" відносяться до певної послідовності нуклеїнової кислоти, яку розпізнає і з якою зв'язуються рекомбінази.

Наприклад, одним з сайтів рекомбінації рекомбінази Cre є loxP, що представляє собою послідовність з 34 пар основ, що включає два інвертовані повтори з 13 пар основ (що грають роль сайтів рекомбінації), між якими розташована коро́ва (серцевинна) послідовність з 8 пар основ (Див. Фіг. 1 в Sauer, B., (1994) *Current Opinion in Biotechnology* 5:521-527). Інші приклади сайтів loxP включають, але не обмежуються: lox511 (Hoess et al., 1996; Bethke and Sauer, 1997), lox5171 (Lee and Saito, 1998), lox2272 (Lee and Saito, 1998), m2 (Langer et al., 2002), lox71 (Albert et al., 1995) і lox66 (Albert et al., 1995).

Відповідні сайти рекомбінації рекомбінази FLP включають, але не обмежуються: FRT (McLeod, et al., 1996), F1, F2, F3 (Schlake and Bode, 1994), F4, F5 (Schlake and Bode, 1994), FRT(LE) (Senecoff et al., 1988), FRT(RE) (Senecoff et al., 1988).

Інші приклади рекомбінантних послідовностей включають послідовності attB, attP, attL і attR, що розпізнаються рекомбіназами сімейства λ Integrase (γ -інтегрази), наприклад, phi-c31 (ϕ C31). Сайт-специфічна рекомбіназа ϕ C31 опосередковує рекомбінацію тільки між гетеротиповими сайтами attB (довжиною в 34 пари основ) і attP (довжиною в 39 пар основ) (Groth et al., 2000). attB і attP, що позначаються так за сайтами приєднання інтегрази фагу в геномах бактерії і фагу, відповідно, включають недосконалі інвертовані повтори, до яких з високою долею ймовірності приєднуються гомодимери ϕ C31 (Groth et al., 2000). Сайти attL і attR, що утворюються в результаті, практично не піддаються подальшій рекомбінації, опосередкованій ϕ C31 (Belteki et al., 2003), таким чином реакція є необоротною. Відносно каталізу процесу вставлення, виявилось, що ДНК, що містить attB, вставляється в сайт attP генома з більшою ймовірністю, ніж сайт attP у сайт attB генома (Thyagarajan et al., 2001; Belteki et al., 2003). Таким чином, типовий алгоритм полягає в гомологічній рекомбінації "сайту установки", що несе attP, з певною ділянкою, яка потім взаємодіє з attB-несучою послідовністю, що приєднується, для наступної вставки.

У цій заявці термін "ділянка внутрішньої посадки рибосоми" або "IRES" відноситься до елемента, що забезпечує пряме проникнення кодону ініціації цистрону (області, що кодує білок), наприклад, АТГ (ATG), у рибосому, таким чином, забезпечуючи трансляцію незалежно від кепа (5'-нетрансльованої області). Див., наприклад, Jackson et al., (1990) *Trends Biochem Sci* 15(12):477-83), а також Jackson and Kaminski, (1995) *RNA* 1(10):985-1000. Згідно з конкретними варіантами реалізації, вектори згідно з винаходом включають один або декілька полінуклеотидів, що представляють інтерес, які кодують один або кілька поліпептидів. Згідно з певним варіантом реалізації, для забезпечення ефективної трансляції кожного з безлічі поліпептидів, полінуклеотидні послідовності можуть розділятися однією або декількома послідовностями IRES або полінуклеотидів, що кодують поліпептиди, що саморозщеплюються.

У цій заявці термін "послідовність Козака" відноситься до короткої нуклеотидної послідовності, що значною мірою полегшує початкове приєднання іРНК до малої субодиниці рибосоми і підвищує рівень трансляції. Консенсусна послідовність Козака являє собою послідовність (GCC)RCCATGG, де R - це пуринова основа (A або G) (Kozak, (1986) *Cell*. 44(2):283-92 і Kozak, (1987) *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-48). Згідно з конкретними варіантами реалізації, вектори згідно з винаходом містять полінуклеотиди, що містять послідовність Козака і кодуючий поліпептид, що представляє інтерес.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, вектори містять ген, що селектується, який також позначається як селективний маркер. Типові селективні гени кодують білки, які (a) забезпечують стійкість до антибіотиків або інших токсинів, наприклад, до ампіциліну, неоміцину, гігromіцину, метотрексату, зеоцину, бластицидину або тетрацикліну, (b) компенсують ауксотрофні порушення, або (c) забезпечують живильні елементи, відсутні в комплексному живильному середовищі, наприклад, що кодують D-аланінрацемазу в бацилах. Для виділення ліній трансформованих клітин може застосовуватися скільки завгодно систем селекції, включаючи, але не обмежуючись: гени тимідинкінази вірусу простого герпесу (Wigler et al., (1977) *Cell* 11:223-232) і аденінфосфорибозилтрансферази (Lowy et al., (1990) *Cell* 22:817-823), які можуть бути використані у відповідно tk- і aprt- клітинах.

Згідно з різними варіантами реалізації, вектори згідно з винаходом можуть застосовуватися для підвищення, стимуляції або підтримки рівня експресії одного або декількох поліпептидів, наприклад, глобінів. У цій заявці терміни "поліпептид" і "білок" взаємозамінні і відносяться до полімерів амінокислотних залишків, а також до їхніх варіантів і синтетичних аналогів. Таким чином, ці терміни відносяться до полімерів амінокислот, у яких один або кілька амінокислотних залишків являють собою синтетичні неприродні амінокислоти, такі як хімічні аналоги відповідних

природних амінокислот, а також до природних полімерів амінокислот. Типові приклади застосовних поліпептидів глобіну наведені в способах і композиціях певних варіантів реалізації цього винаходу, наприклад, SEQ ID NOs: 2-4, 6-9, 11-13 і 15. Також див., наприклад, патенти США №№ 6,051,402 і 7,901,671, повний опис і формула винаходу яких включені в цю заявку шляхом посилання.

Типові приклади застосовних поліпептидів ABCD1 наведені в способах і композиціях певних варіантів реалізації цього винаходу, наприклад, SEQ ID NO: 18. Також див., наприклад, патенти США №№ 5,869,039 і 6,013,769, повний опис і формула винаходу яких включені в цю заявку шляхом посилання.

Певні варіанти реалізації цього винаходу також включають "варіанти" поліпептидів. Термін "варіант" поліпептиду відноситься до поліпептидів, що відрізняються від стандартного поліпептиду наявністю вставки, делеції, процесінгу і/або заміни щонайменше одного амінокислотного залишку при збереженні поліпептидом біологічної активності. Згідно з конкретними варіантами реалізації, варіант поліпептиду відрізняється від стандартного поліпептиду наявністю однієї або декількох заміни, консервативних або неконсервативних, як відомо фахівцям у даній галузі.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, амінокислотна послідовність варіанта поліпептиду щонайменше приблизно на 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % ідентична або схожа з відповідною послідовністю стандартного поліпептиду. Згідно з конкретними варіантами реалізації, вставки або делеції амінокислот відбуваються на С-кінці і/або на N-кінці стандартного поліпептиду.

Як зазначено вище, поліпептиди згідно з винаходом можуть бути модифіковані різними способами, включаючи заміни, делеції, процесінг і вставки амінокислот. Способи таких маніпуляцій добре відомі в даній галузі. Наприклад, варіанти амінокислотних послідовностей стандартних поліпептидів можуть бути отримані за допомогою мутування ДНК. Способи мутагенезу і зміни нуклеотидних послідовностей добре відомі в даній галузі. Див., наприклад Kunkel (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 488-492, Kunkel et al., (1987) Methods in Enzymol, 154: 367-382, U.S. Pat. No. 4,873,192, Watson, J.D. et al., (1987) Molecular Biology of the Gene, Fourth Edition, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif. і включені в ці джерела посилання. З керівництвом з прийнятих заміни амінокислот без втрати білком, що представляє інтерес, біологічної активності, можна ознайомитися в Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

Термін "клітина-хазяїн" відноситься до клітин, трансфіційованих, інфікованих або трансдуційованих рекомбінантним вектором або полінуклеотидом згідно з винаходом *in vivo*, *ex vivo*, або *in vitro*. Клітини-хазяї можуть включати клітини, що упаковують, клітини-продуценти і клітини, інфіковані вірусним вектором. Згідно з конкретними варіантами реалізації, клітини-хазяї, інфіковані вірусним вектором згідно з винаходом, вводяться суб'єктові в терапевтичних цілях. Згідно з конкретними варіантами реалізації, термін "клітина-мішень" взаємозамінний з терміном "клітина-хазяїн" і відноситься до трансфіційованих, інфікованих або трансдуційованих клітин певного типу. Згідно з кращими варіантами реалізації, клітина-мішень являє собою стовбурову клітину або клітину-попередник. Відповідно певним кращим варіантам реалізації, клітина-мішень являє собою соматичну клітину, наприклад, зрілу стовбурову клітину, клітину-попередник або диференційовану клітину. Відповідно до певних кращих варіантів реалізації, клітина-мішень являє собою кровотворну клітину, наприклад, кровотворну стовбурову клітину або кровотворну клітину-попередник. Інші клітини-мішені, застосовні в терапевтичних цілях, описані нижче.

Термін "стовбурова клітина" відноситься до недиференційованої клітини, здатної (1) до самовідновлення протягом тривалого часу або до розподілу з одержанням щонайменше однієї копії, ідентичної материнській клітині, (2) до диференціювання на рівні однієї клітини в безліч, або, у деяких випадках, в один спеціалізований тип клітин і (3) до функціональної регенерації тканин *in vivo*. Стовбурові клітини, відповідно до їх диференціального потенціалу, на тотипотентні, плюрипотентні, мультипотентні і оліго/уніпотентні. "Самовідновлення" відноситься до специфічної здатності клітини ділитися з одержанням ідентичних їй дочірніх клітин і утворювати спеціалізовані типи клітин (потентність). Самовідновлення може відбуватися двома способами. При асиметричному розподілі клітин одна з дочірніх клітин ідентична материнській клітині, у той час як друга дочірня клітина відрізняється від неї і являє собою клітину-попередник або диференційовану клітину. При асиметричному розподілі популяція клітин не збільшується. При симетричному розподілі клітин обидві дочірні клітини ідентичні материнській. "Проліферація" або "розмноження" клітин відноситься до симетричного розподілу.

У цій заявці термін "тотіпотентний" відноситься до здатності клітини дати початок будь-якій клітинній лінії організму. Наприклад, у ссавців лише зигота і бластомери, що утворюються після

першого дроблення, є плуріпотентними. У цій заявці, термін "плуріпотентний" відноситься до здатності клітини дати початок будь-якій клітинній лінії тіла або сом (тобто, власне ембріона). Наприклад, ембріональні стовбурові клітини являють собою тип плуріпотентних клітин, здатних дати початок кожному з трьох зародкових листків: ектодермі, мезодермі і ентодермі. У цій заявці, термін "мультипотентний" відноситься до здатності зрілої стовбурової клітини дати початок різним типам клітин однієї клітинної лінії. Наприклад, стовбурові кровотворні клітини здатні дати початок лінії клітин крові, наприклад, лімфоїдним або мієлоїдним клітинам. У цій заявці, термін "олігопотентний" відноситься до здатності зрілої стовбурової клітини диференціювати лише в деякі різні типи клітин. Наприклад, лімфоїдні або мієлоїдні стовбурові клітини здатні дати початок відповідно лінії лімфоїдних або лінії мієлоїдних клітин. У цій заявці, термін "уніпотентний" відноситься до здатності клітини дати початок тільки одному типу клітин. Наприклад, сперматогоніальні стовбурові клітини здатні дати початок тільки чоловічим статевим клітинам.

У цій заявці, термін "попередник" або "клітина-попередник" відноситься до клітин, здатних до самовідновлення і до диференціювання в більш зрілі клітини. Багато клітин-попередників диференціюють у клітини однієї клітинної лінії, але мають високий проліферативний потенціал.

Стовбурові кровотворні клітини (HSCs) дають початок комітованим кровотворним клітинам-попередникам (HPCs), здатним диференціювати в будь-які зрілі кров'яні клітини протягом усього життя організму. Термін "стовбурова кровотворна клітина" або "HSC" відноситься до мультипотентних стовбурових клітин, здатних дати початок будь-яким кров'яним клітинам організму, включаючи мієлоїдні (наприклад, моноцити або макрофаги, нейтрофіли, базофіли, еозинофіли, еритроцити, мегакаріоцити/тромбоцити, дендритні клітини) і мієлоїдні клітинні лінії (наприклад, Т-клітини, В-клітини, NK-клітини), а також інші клітинні лінії, відомі в даній галузі техніки (див. Fei, R., et al., патент США № 5,635,387; McGlave, et al., U.S. Patent No. 5,460,964; Simmons, P., et al., патент США № 5,677,136; Tsukamoto, et al., патент США № 5,750,397; Schwartz, et al., патент США № 5,759,793; DiGiusto, et al., патент США № 5,681,599; Tsukamoto, et al., патент США № 5,716,827). Трансплантація кровотворних стовбурових клітин і кровотворних клітин-попередників тваринам, що піддалися впливу смертельних доз радіації, може відновити популяцію еритроцитів, нейтрофілів-макрофагів і мегакаріоцитів.

Для досягнення достатнього титру вірусу нерідко виникає необхідність в одержанні великої кількості вірусних частинок. Вірусні частинки одержують за допомогою трансфекції в пакувальні клітини вектора-переносника, що несе структурні і/або додаткові гени вірусу, наприклад, гени gag, pol, env, tat, rev, vif, vpr, vpu, vpx або nef, або інші ретровірусні гени.

У цій заявці, термін "пакувальний вектор" відноситься до вектора експресії або вірусного вектора, що позбавлений пакувального сигналу і містить полінуклеотид, який кодує один, два, три, чотири або більше структурних і/або додаткових генів вірусу. Як правило, пакувальні вектори включені в пакувальні клітини і вводяться за допомогою трансфекції, трансдукції або інфікування. Способи трансфекції, трансдукції та інфікування добре відомі в даній галузі знань. Ретровірусний/лентівірусний вектор-переносник згідно з цим винаходом може бути введений у пакувальну клітинну лінію за допомогою трансфекції, трансдукції або інфікування для одержання клітин-продуцентів або лінії клітин-продуцентів. Пакувальні вектори згідно з цим винаходом можна вводити в клітини або в лінії клітин людини за допомогою стандартних способів, включаючи, наприклад, кальцій-фосфатну трансфекцію, ліпофекцію або електропорацію. Згідно з деякими варіантами реалізації, пакувальний вектор вводять у клітини разом з домінантним маркером, що селектується, таким як неоміцин, гіроміцин, пуроміцин, бластицидин, зеоцин, тимідинкіназа, дигідрофолатредуктаза (DHFR), глутамінсинтетаза або аденозиндеаміназа (ADA), з наступним селектуванням з присутністю відповідного субстрату і виділенням клонів. Маркер, що селектується, може бути фізично пов'язаний з генами пакувального вектора, наприклад, за допомогою IRES або вірусних пептидів, що саморозщепляються.

Вірусні оболонкові білки (env) визначають спектр клітин, які можуть бути інфіковані і трансформовані рекомбінантними ретровірусами, отриманими з клітинних ліній. У випадку лентівірусів, таких як ВІЛ-1, ВІЛ-2, вірусу імунодефіциту мавп (SIV), вірусу імунодефіциту котятчих (FIV) і вірусу кінського грипу (EIV), білки env включають gp41 і gp120. Краще, вірусні оболонкові білки, що експресуються пакувальними клітинами згідно з винаходом, кодуються особливим вектором, окремо від вірусних генів gag і pol, як було зазначено вище.

Типові приклади ретровірусних генів env, застосовних згідно з винаходом, включають, але не обмежуються генами оболонкових білків: вірусу лейкозу мишей (MLV), вірусу лейкозу мишей (10A1), ендемічного вірусу бабуїнів (BAEV), вірусу лейкозу котятчих- В (FeLV-B), RD114, вірусу, асоційованого з вірусом саркоми (SSAV), вірусу Ебола, вірусу Сендай, вірусу "пташиної чуми"

(FPV) і вірусу грипу. Також, можливе застосування генів, що кодують оболонкові білки вірусів, що містять РНК (наприклад, сімейства пікорнавірусів, кальцивірусів, астровірусів, тогавірусів, флавівірусів, коронавірусів, параміксовірусів, рабдовірусів, філовірусів, ортоміксовірусів, буньявірусів, аренавірусів, реовірусів, бірнавірусів, ретровірусів), і генів вірусів, що містять ДНК (сімейства гепаднавірусів, цирковірусів, парвовірусів, паповавірусів, аденовірусів, герпесвірусів, поксвірусів та іридовірусів). Типові приклади включають: вірус лейкозу котятих (FeLV), вірус венесуельського енцефаліту коней (VEE), вірус гепатиту F (HFV), вірус дермальної саркоми (глаукоми) (WDSV), вірус лісу Семліки (SFV), вірус сказу, вірус лейкозу птахів (ALV), вірус імунodefіциту великої рогатої худоби (BIV), вірус лейкозу великої рогатої худоби (BLV), вірус Епштейна-Барра (EBV), вірус козячого артрити-енцефаліту (CAEV), вірус некрозу селезінки (SNV), вірус ChTLV, Т-лімфотропний вірус мавп (STLV), вірус пухлини молочних залоз мишей (MPMV), ретровірус білячої мавпи (SMRV), вірус, асоційований з вірусом Рауса (RAV), вірус саркоми Фуджинамі (FuSV), вірус карциноми птахів (MH2), вірус еритробластозу птахів (AEV), вірус мієлобластозу птахів (AMV), вірус саркоми птахів (CT10) і вірус інфекційної анемії коней (EIAV).

Згідно з іншими варіантами реалізації, оболонкові білки для псевдотипування вірусу згідно з цим винаходом включають, але не обмежуються білки наступних вірусів: вірусів грипу А, такі як H1N1, H1N2, H3N2 і H5N1 (пташиний грип), вірусу грипу В, вірусу грипу С, вірусу гепатиту А, вірусу гепатиту В, вірусу гепатиту С, вірусу гепатиту D, вірусу гепатиту Е, ротавірусу, норовірусу, кишкових аденовірусів серотипу 40 і 41, парвовірусу, вірусу лихоманки Денге, вірусу віспи мавп, мононегавірусів, лісавірусу, такого як вірус сказу, лагоського вірусу кажанів, вірусу Мокола, вірусу Дювенхаге, європейського вірусу кажанів 1 і 2, австралійського вірусу кажанів, вірусу ефемерної лихоманки великої рогатої худоби, везикуловірусу, вірусу везикулярного стоматиту (VSV), вірусів герпесу, таких як вірус простого герпесу типів 1 і 2, вірусу вітряної віспи, цитомегаловірусу, вірусу Епштейна-Барра (EBV), герпесвірусу людини (HHV), герпесвірусу людини типів 6 і 8, ВІЛ (HIV), папіломавірусу, γ герпес-вірусу мишей, аренавірусів, таких як вірус аргентинської геморагічної лихоманки, вірус болівійської геморагічної лихоманки, вірус Сабіа, вірус венесуельської геморагічної лихоманки, вірус лихоманки Ласса, вірус Мачупо, вірус лімфоцитарного хоріоменінгіту (LCMV), буньявірусів, таких як вірус кримсько-конголезької геморагічної лихоманки, хантавірус, вірус геморагічної лихоманки з нирковим синдромом, вірус лихоманки долини Ріфт, філовірусів, включаючи вірус Ебола і вірус Марбург, флавівірусів, включаючи вірус хвороби Кьясанурського лісу, вірус омської геморагічної лихоманки, вірус кліщового енцефаліту і параміксовірусів, таких як вірус Хендра і вірус Ніпах, вірусів чорної і білої віспи (натуральної віспи) альфавірусів, таких як венесуельський вірус енцефаліту коней, східний вірус енцефаліту коней, західний вірус енцефаліту коней, коронавірусу, асоційованого з важким гострим респіраторним синдромом (SARS-CoV), вірусу лихоманки Західного Нілу і будь-яких вірусів, що викликають енцефаліт.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, винахід забезпечує упакування клітин, що виробляють частинки рекомбінантного ретровірусу, наприклад, лентивірусу, псевдотипованого з глікопротеїном вірусу везикулярного стоматиту (VSV-G).

У цій заявці терміни "псевдотип" або "псевдотипування" відносяться до вірусів, оболонкові білки яких замінені оболонковими білками інших вірусів, що мають бажані властивості. Наприклад, ВІЛ може бути псевдотипованим з оболонковими глікопротеїнами вірусу везикулярного стоматиту, що дозволяє ВІЛ інфікувати більш широкий спектр клітин, оскільки оболонкові білки ВІЛ (що кодуються геном env), як правило, націлюють вірус на клітини, що експресують CD4 (CD4+ клітини). Згідно з кращим варіантом реалізації, лентивірусні оболонкові білки зазнають псевдотипування з VSV-G. Відповідно до одного з варіантів реалізації, винахід забезпечує упакування клітин, що виробляють рекомбінантний ретровірус, наприклад, лентивірус, псевдотипований з оболонковим глікопротеїном вірусу везикулярного стоматиту.

У цій заявці, термін "пакувальна клітинна лінія" відноситься до клітинних ліній, що не містять пакувальний сигнал, але постійно, або тимчасово експресують вірусні структурні білки і реплікативні ферменти (наприклад, gag, pol і env), необхідні для коректного упакування вірусних частинок. Для одержання пакувальних клітин згідно з винаходом може використовуватися будь-яка клітинна лінія. Як правило, клітини являють собою клітини ссавців. Згідно з певним варіантом реалізації, клітини, що використовуються для одержання пакувальних клітин, являють собою клітини людини. Застосовні клітинні лінії включають, але не обмежуються, наприклад наступними клітинами: CHO, BHK, MDCK, C3H 10T1/2, FLY, Psi-2, BOSC 23, PA317, WENI, COS, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, W138, MRC5, A549, HT1080, 293, 293T, B-50, 3T3, NIH3T3, Hepg2, Saos-2, Huh7, Hela, W163, 211i 211A. Згідно з кращими варіантами реалізації,

пакувальні клітини являють собою клітини 293, 293Т або А549. Відповідно до іншого кращого варіанту реалізації, використовуються клітини А549.

У цій заявці, термін "клітинних ліній-продуцентів" відноситься до клітинних ліній, здатних робити рекомбінантні ретровірусні частинки, що містять пакувальні клітинні лінії і конструкції вектора-переносника, що несуть сигнал упакування. Виробництво інфекційних вірусних частинок і вихідних розчинів вірусів може здійснюватися із застосуванням стандартних методів. Способи одержання вихідних розчинів вірусів добре відомі в даній галузі техніки і описані, наприклад, у Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633 і N.R. Landau et al. (1992) J. Virol. 66:5110-5113. Інфекційні вірусні частинки можуть бути виділені з пакувальних клітин із застосуванням стандартних методів. Наприклад, інфекційні частинки можуть бути виділені за допомогою лізису клітин, або з надосадової рідини культур клітин, як відомо в даній галузі знань. При необхідності, виділені вірусні частинки можуть піддатися додатковому очищенню. Застосовні способи очищення добре відомі фахівцям у даній галузі техніки.

Терміни "підсилювати", "стимулювати", "підвищувати", "збільшувати" відносяться до здатності композицій і/або способів згідно з винаходом викликати, служити причиною або сприяти продукції більшої кількості трансдуційованих клітин у порівнянні з кількістю клітин, одержуваних у присутності переносника або контрольної молекули/композиції окремо. Відповідно до одного з варіантів реалізації, стовбурова кровотворна клітина, трансдуційована за допомогою композицій і способів згідно з винаходом, дає початок більшій кількості трансдуційованих клітин у порівнянні з клітинами, трансдуційованими за допомогою існуючих композицій і способів. Підвищення рівня трансдукції клітин може бути зафіксоване за допомогою методів, відомих у даній галузі, таких як аналіз по гену-репортеру, ПЦР у масштабі реального часу і експресія поверхневих білків клітини і т.п. "Підвищений" або "посилений" рівень трансдукції, як правило, вказує на "статистично значиме" підвищення кількості трансдуційованих клітин, наприклад, в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 або більше разів (наприклад, в 500 або 1000 разів) (включаючи всі цілі і дробові множники >1, наприклад, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 і т.п.) разів перевищує кількість клітин, трансдуційованих у присутності вектора, контрольної композиції окремо або трансдуційованих інших існуючим способом.

Терміни "послаблювати", "знижувати", "зменшувати", "придушувати" відносяться композиціям і/або способам, у результаті застосування яких кількість трансдуційованих клітин суттєво нижче у порівнянні з кількістю клітин, одержуваних за допомогою композицій і/або способів згідно з цим винаходом. "Знижена" або "менша" кількість, як правило, вказує на "статистично значиме" зниження кількості трансдуційованих клітин, наприклад, в 1,1, 1,2, 1,5, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 або більше разів (наприклад, в 500 або 1000 разів) (включаючи всі цілі і дробові множники >1, наприклад, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8 і т.п.) разів нижче кількості клітин, трансдуційованих за допомогою композицій і/або способів згідно з цим винаходом.

Терміни "зберігається", "підтримується", "не міняється", "без істотних змін", "без істотного зниження" відносяться, як правило, до фізіологічних реакцій у певних клітинних лініях, по інтенсивності порівнянним з реакціями в присутності переносника або контрольної молекули/композиції окремо. Порівнянний рівень інтенсивності реакції вказує на відсутність істотної відмінності від рівня реакції в стандартних умовах.

Застосування термінів і понять в однині може відноситися також і до безлічі описуваних об'єктів. Наприклад, "елемент" може відноситися і до безлічі елементів.

Розділові/пояснювальні союзи "або" і "чи то" можуть мати на увазі як об'єкти окремо, так і разом, а також їх комбінації. У цій заявці терміни "включає", "містить" і "несе" є синонімами.

У цій заявці, термін "приблизно" відноситься до кількості, рівня, оцінки, числа, частоти, процентної частки, розміру, величини, маси або довжини, що відрізняються від стандартної кількості, рівня, оцінки, числа, частоти, процентної частки, розміру, величини, маси або довжини на 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 % або 1 %. Відповідно до одного з варіантів реалізації, термін "приблизно" відноситься до діапазону в межах $\pm 15\%$, $\pm 10\%$, $\pm 9\%$, $\pm 8\%$, $\pm 7\%$, $\pm 6\%$, $\pm 5\%$, $\pm 4\%$, $\pm 3\%$, $\pm 2\%$ або $\pm 1\%$ від стандартної кількості, рівня, оцінки, числа, частоти, процентної частки, розміру, величини, маси або довжини.

У цьому описі, якщо не домовлено інакше, терміни "включає", "містить", "що включає" мають на увазі перерахування зазначених етапів, елементів або сукупностей етапів або елементів, не виключаючи будь-які інші етапи, елементи або сукупності етапів або елементів. "Складається з" означає, що узагальнююче слово обмежується перерахованими далі однорідними членами. Таким чином, фраза "складається з" означає, що перераховані елементи є необхідними, і ніякі інші елементи, крім перерахованих, не можуть бути додані. Фраза "головним чином складається з" означає, що узагальнююче слово обмежується перерахованими елементами та іншими елементами, чия присутність не впливає на активність або функцію перерахованих елементів.

Таким чином, фраза "складається з" означає, що перераховані елементи є необхідними, у той час як присутність інших елементів необов'язкова і залежить від їхнього впливу на активність або функцію перерахованих елементів.

У цьому описі посилання на "варіант реалізації" означають, що певна властивість, структура або характеристика, описана у зв'язку з даним варіантом реалізації, включена щонайменше в один з варіантів реалізації згідно з цим винаходом. Таким чином, фрази "відповідно до одного з варіантів реалізації" у цьому описі необов'язково відносяться до одного і того ж варіанту реалізації. Більше того, певні властивості, структури і характеристики можуть матися на увазі у різних прийнятних комбінаціях в описі одного або різних варіантів реалізації.

В подальшому описі для більш повного розуміння різних варіантів реалізації винаходу наведені деякі конкретні деталі. Проте, фахівцям у даній галузі буде очевидно, що застосування винаходу не вимагає опису цих деталей. Крім того, слід розуміти, що окремі вектори або групи векторів, що є похідними описаних у цій заявці різних комбінацій структур і замісників, вважаються об'єктами винаходу так само, як якби вони були описані окремо. Таким чином, вибір певних векторних структур або певних замісників також входить в обсяг винаходу.

С. Вірусні вектори

Випробування показали, що ретровірусні і лентивірусні вектори є переносниками, які з високою долею надійності забезпечують інтегрування генів, що представляють інтерес, наприклад, кодуючі терапевтичні поліпептиди, у широкий спектр клітин-мішеней. Зокрема, цей винахід відноситься до поліпшеної системи доставки векторів у популяції клітин, що вводяться суб'єктам у рамках проведення генної терапії.

Цей винахід забезпечує вектори-переносники, застосовні в способах згідно з винаходом. Фахівцям у даній галузі техніки очевидно, що такого роду вектори-переносники можуть бути отримані з різних вірусних векторів; згідно з конкретними варіантами реалізації, вектор-переносник являє собою ретровірусний або лентивірусний вектор, зокрема тому, що лентивірусні вектори здатні забезпечити ефективну доставку, інтеграцію і тривалу експресію трансгенів у клітинах, що перебувають у стані спокою як *in vitro*, так і *in vivo*. У даній галузі техніки відомі різні лентивірусні вектори, див. Naldini et al., (1996a, 1996b, and 1998); Zufferey et al., (1997); Dull et al., 1998, патенти США №№ 6,013,516 і 5,994,136, будь-який з котрих може застосовуватися для одержання вектора-переносника згідно з цим винаходом.

Як правило, зазначені вектори конструюються на основі плазмід або вірусів таким чином, щоб забезпечувати перенесення і доставку послідовностей нуклеїнових кислот, що кодують терапевтичні поліпептиди, у клітину-мішень.

Згідно з типовими варіантами реалізації, ретровірусний вектор являє собою лентивірусний вектор. Таким чином, вектори можуть бути похідними ВІЛ-1, ВІЛ-2, вірусу імунодефіциту мавп (SIV), вірусу імунодефіциту котятих (FIV), вірусу імунодефіциту великої рогатої худоби (BIV), вірусу хвороби Джембрана (JDV), вірусу інфекційної анемії коней (EIAV), вірусу артрити-енцефаліту кіз (CAEV) і т.п. Основні кодуючі послідовності вектора-похідного ВІЛ (тобто, цис-діючі елементи ланцюга і гени *gag*, *pol* і *rev* ВІЛ), як правило, є кращими згідно з більшістю аспектів цього винаходу через те, що ВІЛ-Конструкти відрізняються найбільшою ефективністю в трансдукції клітин людини.

Незважаючи на те, що окремі типові варіанти реалізації включають більш детальний опис векторів, композицій і способів, застосовних для терапії порушень кровотворення, наприклад, гемоглобінопатій, винахід не обмежується зазначеними описами. Фахівцям у даній галузі техніки очевидно, що принципи, описані в цій заявці, можуть застосовуватися в генній терапії інших систем організму, наприклад, нервової системи, включаючи око, центральну і периферичну нервову систему; системи кровопостачання; м'язового апарату; кісткової системи; органів, включаючи шкіру, серце, легені, підшлункову залозу, печінку, нирки, кишечник і т.п.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, цей винахід забезпечує вектори, наприклад, лентивірусні вектори, що містять послідовності, що регулюють експресію полінуклеотидів, що представляють інтерес, наприклад, генів глобіну, у певних клітинах або клітинних лініях. Застосування послідовностей, що регулюють експресію і специфічних до типу клітин або лінії клітин, забезпечує додаткову безпеку, дозволяючи експресувати полінуклеотиди лише в певну стадію диференціації клітин у клітинній лінії; таким чином, вектори згідно з винаходом знижують імовірність ектопічної експресії в клітинах, для яких експресія цих полінуклеотидів нехарактерна.

Відповідно до одного з їхніх прикладів, що не обмежують застосування винаходу, послідовність, що регулює експресію, може являти собою універсальну послідовність, як зазначено в цій заявці.

Згідно з іншим прикладом, що не обмежує застосування винаходу, послідовність, що регулює експресію, може мати специфічність до стовбурових клітин і стимулювати експресію

полінуклеотидів, що представляють інтерес, в ембріональних стовбурових клітинах, стовбурових клітинах нервової тканини, мезенхімальних стовбурових клітинах, стовбурових клітинах печінки, стовбурових клітинах підшлункової залози, стовбурових клітинах серця, стовбурових клітинах нирок або стовбурових кровотворних клітинах.

5 Згідно з іншим прикладом, що не обмежує застосування винаходу, послідовність, що регулює експресію, може мати специфічність до певних клітин або клітинних ліній і стимулювати експресію полінуклеотидів, що представляють інтерес, у кровотворних стовбурових клітинах, кровотворних клітинах-попередниках, мієлоїдних клітинах, лімфоїдних клітинах, клітинах-попередників тромбоцитів, гладких клітинах, клітинах-попередників еритроцитів, клітинах-попередників гранулоцитів і клітинах-попередників моноцитів.

10 Згідно з конкретними варіантами реалізації, вектор згідно з винаходом може застосовуватися для експресії полінуклеотиду, наприклад, полінуклеотиду, що представляє інтерес, у кровотворних клітинах одного або декількох типів, включаючи, але не обмежуючись: кровотворні стовбурові клітини, кровотворні клітини-попередники, мієлоїдні клітини-попередники, лімфоїдні клітини-попередники, клітини-попередники тромбоцитів, клітини-попередники еритроцитів, клітини-попередники гранулоцитів, клітини-попередники моноцитів, мегакаріобласти, промегакаріоцити, мегакаріоцити, тромбоцити, проеритробласти, базофільні еритроцити, поліхроматичні еритроцити, ортохроматичні еритроцити, поліхроматичні еритроцити, еритроцити (червоні кров'яні клітини), базофільні промієлоцити, базофільні мієлоцити, базофільні метамієлоцити, базофілі, нейтрофільні промієлоцити, нейтрофільні мієлоцити, нейтрофільні метамієлоцити, нейтрофілі, еозинофільні промієлоцити, еозинофільні мієлоцити, макрофаги, дендритні клітини, лімфобласти, пролімфоцити, натуральні кілери (NK-клітини), малі лімфоцити, Т-лімфоцити, В-лімфоцити, плазматичні клітини і лімфоїдні дендритні клітини.

25 Згідно з кращими варіантами реалізації, вектор згідно з винаходом може застосовуватися для експресії полінуклеотидів, наприклад, генів, що представляють інтерес, в одному або декількох типах еритроїдних клітин, наприклад, у проеритробластах, базофільних еритробластих, поліхроматичних еритробластих, ортохроматичних еритробластих, поліхроматичних еритроцитах і еритроцитах (червоних кров'яних клітинах).

30 Відповідно до одного з варіантів реалізації, вектор містить промотор, енхансер або промотор/енхансер кровотворних клітин, функціонально зв'язаний з геном, що представляє інтерес, наприклад, глобіном.

Застосовні послідовності, що регулюють експресію, специфічні до певних клітин або типів клітин, включають, але не обмежуються: послідовності, що регулюють експресію, специфічні до кровотворних клітин, наприклад, промотор стовбурових кровотворних клітин і промотор кровотворних клітин-попередників. Згідно з варіантами реалізації, де експресія генів, що викликають інтерес, повинна відбуватися в одному або декількох типах еритроїдних клітин, застосовна послідовність, що регулює експресію, може включати, не обмежуючись: промотор, специфічний до еритроїдних клітин, і, можливо, енхансер, специфічний до еритроїдних клітин, промотор β -глобіну людини, LCR-послідовність β -глобіну людини, енхансер HS40 α -глобіну людини і промотор анкірину-1.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, послідовності, що регулюють експресію, специфічні до типу клітин або до клітинної лінії, включають, але не обмежуються клітинами мікроглії. Згідно з конкретними варіантами реалізації, промотор включає промотор MND (синтетичного промотору, що містить область U3 LTR-послідовності, або його транскрипційно активний фрагмент, функціонально зв'язаний з геном, що представляє інтерес, наприклад, ABCD1).

Застосування послідовностей, що регулюють експресію і специфічних до типу клітин або лінії клітин, забезпечує додаткову безпеку, дозволяючи експресувати полінуклеотиди лише в певну стадію диференціації клітин у клітинній лінії; таким чином, вектори згідно з винаходом знижують імовірність ектопічної експресії в клітинах, для яких експресія цих полінуклеотидів нехарактерна. Відповідно до одного з варіантів реалізації, винахід забезпечує вектор, що включає одну або декілька LTR-послідовностей і послідовність, що регулює експресію, функціонально пов'язані з геном, що представляє інтерес. Згідно з супутнім варіантом реалізації, послідовність, що регулює експресію, представляє собою послідовність, специфічну до еритроїдних клітин, включаючи: промотор β -глобіну людини, LCR-послідовність β -глобіну людини, енхансер α -глобіну HS40 людини і промотор анкірину-1.

Згідно з різними варіантами реалізації, вектор сконструйований таким чином, щоб забезпечити лікування, профілактику або поліпшити перебіг певних захворювань, порушень і станів кровотворної системи. Наприклад, цей винахід забезпечує вектори для генної терапії

гемоглобінопатій, пов'язаних з генами, що представляють інтерес, обраними із групи, що складається з: α -глобіну людини, β -глобіну людини, дельта-глобіну людини, γ -глобіну людини, а також їх біологічно активних варіантів і фрагментів. Відповідно до одного з варіантів реалізації, ген глобіну вибирають із групи, що складається з: гена β -глобіну дикого типу, гена β -глобіну людини з однією або декількома делеціями інтронних послідовностей і мутованого гену β -глобіну людини, що кодує щонайменше один амінокислотний залишок, що запобігає серпоподібно-клітинній анемії.

Згідно з певним варіантом реалізації, де стан, при якому застосовується генна терапія – серпоподібна-клітинна анемія, ген, що представляє інтерес, може кодувати білок, що запобігає серпоподібно-клітинній анемії. У цій заявці, "білок, що запобігає серпоподібно-клітинній анемії" відноситься до поліпептиду, що запобігає або сприяє усуненню патологічних процесів, що ведуть до утворення серпоподібно-клітинних форм еритроцитів. Відповідно до одного з варіантів реалізації винаходу, трансдуційовані клітини забезпечують доставку білків, що запобігають серпоподібно-клітинній анемії, суб'єктові, що страждає серпоподібно-клітинною анемією. Білки, що запобігають серпоподібно-клітинній анемії, також включають мутовані форми β -глобіну, що містять амінокислотні залишки, які запобігають серпоподібно-клітинній анемії.

Згідно з кращим варіантом реалізації, одним із зазначених варіантів глобіну є ген β A-глобіну людини із заміною треоніну на глутамін у позиції 87 (β A-T87Q) або ген β A-глобіну людини (де зріла форма поліпептиду піддалася процесінгу з відщепленням N-кінцевого метіоніну, кодон 87 зрілого поліпептиду кодує треонін; у нерозщепленому поліпептиді глобіну треонін кодує кодон 88). Згідно з цим винаходом, як амінокислотні залишки, що запобігають серпоподібно-клітинній анемії, можуть служити й інші залишки, відомі в даній галузі. Наприклад, див. патент США № 6,051,402; патент США № 5,861,488; патент США № 6,670,323; патент США № 5,864,029; патент США № 5,877,288; Levasseur et al., Blood 102:4312-4319 (2003), зміст яких включено в даний опис шляхом посилання.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, вектор, що містить послідовність, що регулює експресію в еритроїдних клітинах, застосовується для лікування, профілактики або поліпшення перебігу великої кількості порушень, крім гемоглобінопатій. Попередники червоних кров'яних клітин являють собою зручну для застосування клітинну популяцію для експресії поліпептидів, які можуть бути введені в циркуляцію і, у такий спосіб доставлені до клітин-мішеней системно. Такого роду доставку білка *in vivo* забезпечує, наприклад, фактор IX людини - фактор згортання крові, що не виробляється у пацієнтів, що страждають від гемофілії В, див., наприклад, А. Н. Chang, et al., Molecular Therapy (2008), включений у цю заявку шляхом посилання.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, клітини, трансдуційовані згідно з винаходом, можуть застосовуватися як "фабрики" по секреції білків *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo*. Наприклад, вектор, що включає послідовність, що регулює експресію в еритроїдних клітинах, може застосовуватися для одержання білків еритроїдних клітин, диференційованих з стовбурових кровотворних клітин або стовбурових ембріональних клітин, у великих кількостях *in vitro*.

Полінуклеотиди, що представляють інтерес, які експресуються зазначеним способом, включають, але не обмежуються: аденозиндеаміназу, ферменти, пов'язані з лізосомними хворобами накопичення, аполіпропротеїн Е, нейротрофічний фактор головного мозку (BDNF), кістковий морфогенетичний білок 2 (BMP-2), кістковий морфогенетичний білок 6 (BMP-6), кістковий морфогенетичний білок 7 (BMP-7), кардіотрофін 1 (CT-1), CD22, CD40, циліарний нейротрофічний фактор (CNTF), CCL1-CCL28, CXCL1-CXCL17, CXCL1, CXCL2, CX3CL1, фактор росту ендотелію судин (VEGF), допамін, еритропоетин, фактор IX, фактор VIII, епідермальний фактор росту (EGF), естроген, FAS-ліганд, фактор росту фібробластів 1 (FGF-1), фактор росту фібробластів 2 (FGF-2), фактор росту фібробластів 4 (FGF-4), фактор росту фібробластів 5 (FGF-5), фактор росту фібробластів 6 (FGF-6), фактор росту фібробластів 7 (FGF-7), фактор росту фібробластів 10 (FGF-10), Flt-3, гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GM-CSF), гормон росту, фактор росту гепатоцитів (HGF), інтерферон альфа (IFN-a), інтерферон бета (IFN-b), інтерферон γ (IFN γ), інсулін, глюкагон, інсуліноподібний фактор росту 1 (IGF-1), інсуліноподібний фактор росту 2 (IGF-2), інтерлейкін 1 (IL-1), інтерлейкін 2 (IL-2), інтерлейкін 3 (IL-3), інтерлейкін 4 (IL-4), інтерлейкін 5 (IL-5), інтерлейкін 6 (IL-6), інтерлейкін 7 (IL-7), інтерлейкін 8 (IL-8), інтерлейкін 9 (IL-9), інтерлейкін 10 (IL-10), інтерлейкін 11 (IL-11), інтерлейкін 12 (IL-12), інтерлейкін 13 (IL-13), інтерлейкін 15 (IL-15), інтерлейкін 17 (IL-17), інтерлейкін 19 (IL-19), макрофагальний колонієстимулюючий фактор (M-CSF), білок хемотаксису моноцитів 1 (MCP-1), макрофагальний білок запалення 3a (MIP-3a), макрофагальний білок запалення 3b (MIP-3b), фактор росту нервової тканини (NGF), нейротрофін 3 (NT-3), нейротрофін 4 (NT-4), паратиреоїдний гормон,

фактор росту тромбоцитів AA (PDGF-AA), фактор росту тромбоцитів AB (PDGF-AB), фактор росту тромбоцитів BB (PDGF-BB), фактор росту тромбоцитів CC (PDGF-CC), фактор росту тромбоцитів DD (PDGF-DD), хемокін, що виділяється Т-клітинами при активації RANTES, фактор стовбурових клітин (SCF), фактор стромальних клітин 1 (SDF-1), тестостерон, що трансформує фактор росту альфа (TGF- α) трансформуючий фактор росту бета (TGF- β), фактор некрозу пухлин альфа (TNF- α), Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15, Wnt16, їжак Сонік (Sonic hedgehog), ефіопський їжак (Desert hedgehog) і індійський їжак (Indian hedgehog).

Відповідно до одного з варіантів реалізації, вектор згідно з винаходом містить щонайменше одну модифіковану або немодифіковану ретровірусну LTR-послідовність, наприклад, лентивірусну LTR-послідовність, промотор β -глобіну і локус контролюючу область β -глобіну, функціонально пов'язані з полінуклеотидом, що представляє інтерес, наприклад, що кодує поліпептид глобіну. Можливі модифікації LTR-послідовностей включають, але не обмежуються: заміну 5'-кінцевої LTR-послідовності гетерологічним промотором, наприклад, промотором цитомегаловірусу, промотором вірусу саркоми Рауса, промотором тимідинкінази, промотором вірусу SV40; а також одну або кілька модифікацій, вставок і/або делецій 3'-кінцевої LTR-послідовності, як описано в цій заявці.

Згідно з певним варіантом реалізації, експресія полінуклеотиду в еритроїдних клітинах забезпечується за допомогою використання промотору β -глобіну людини, локус контролюючої області β -глобіну людини, що містить надчуттєві до ДНКазі І сайти 2, 3 і 4, і/або 3'-кінцевий енхансер β -глобіну. Згідно з різними варіантами реалізації, вектор згідно з винаходом включає один або кілька елементів з групи, що складається з: псі-послідовності для упаковки (Ψ^+), центрального поліпуринового тракту /ДНК-флеп елементу(cPPT/FLAP), елементу експорту ретровірусу, посттранскрипційного регулюючого елемента, маркера, що селектується, і апоптотичного гена, як описано в цій заявці.

Згідно з різними варіантами реалізації, вектори згідно з винаходом містять промотор, функціонально зв'язаний з генами, що кодують поліпептид, який забезпечує лікування гемоглобінопатій у кровотворних клітинах. Вектори можуть містити одну або декілька LTR-послідовностей, що піддалися одній або декільком модифікаціям, таким як одна або кілька заміні, вставок або делецій нуклеотидів. Крім того, вектори можуть містити один або кілька додаткових елементів для підвищення ефективності трансдукції (наприклад, центральний поліпуриновий тракт/ДНК-флеп елемент(cPPT/FLAP), псі-послідовність для упаковки (Ψ^+), елемент, що зв'язується з білком rev (RRE-структуру) і/або інші елементи, що підвищують рівень експресії терапевтичних генів (наприклад, полі-А послідовності).

Відповідно до одного з варіантів реалізації, вектор містить: ретровірусний лівий (5') довгий кінцевої повтор (LTR-послідовність), псі-послідовність для упаковки (Ψ^+), центральний поліпуриновий тракт/ДНК-флеп елементу(cPPT/FLAP), елемент експорту ретровірусу, промотор β -глобіну і локус контролюючої області (LCR) β -глобіну і, можливо, 3'-кінцевий енхансер β -глобіну, функціонально зв'язані з полінуклеотидом, що представляє інтерес, і ретровірусний правий (3') довгий кінцевої повтор (LTR-послідовність), що включає один або декілька інсуляторів або полі-А послідовність.

Згідно з певним варіантом реалізації, вектор згідно з винаходом являє собою лентивірусний вектор, що складається з: лівого (5') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) ВІЛ-1; псі-послідовності для упаковки (Ψ^+); центрального поліпуринового тракту ВІЛ-1/ДНК-флеп елементу(cPPT/FLAP); елемента, що зв'язується з білком rev (RRE-структури); промотору β -глобіну і локус контролюючої області (LCR) β -глобіну, функціонально зв'язаних з геном, що представляє інтерес, і правого (3') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності), що включає: один або декілька інсуляторів і

полі-А послідовність β -глобіну кролика (r β grA).

Згідно з різними варіантами реалізації, вектори згідно з винаходом містять промотор, функціонально зв'язаний з генами, що кодують поліпептид, який забезпечує лікування адренолейкодистрофій і/або адреномієлонеуропатій у клітинах мікроглії. Вектори можуть містити одну або декілька LTR-послідовностей, що піддалися одній або декільком модифікаціям, таким як одна або кілька заміні, вставок або делецій нуклеотидів. Крім того, вектори можуть містити один або кілька додаткових елементів для підвищення ефективності трансдукції (наприклад, центральний поліпуриновий тракт/ДНК-флеп елемент(cPPT/FLAP), псі-послідовність для упаковки (Ψ^+), елемент, що зв'язується з білком rev (RRE-структуру) і/або інші елементи, що підвищують рівень експресії терапевтичних генів (наприклад, полі-А послідовності).

Згідно з певним варіантом реалізації, вектор-переносник згідно з винаходом містить: ретровірусний лівий (5') довгий кінцевої повтор (LTR-послідовність), центральний поліпуриновий тракт/ДНК-флеп елемента (сPPT/FLAP), елемент експорту ретровірусу, промотор, активний у клітинах мікроглії, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, що кодує АТФ-зв'язувальну касету під родини D (ALD), поліпептид (ABCD1), і ретровірусний правий (3') довгий кінцевої повтор.

Згідно з певним варіантом реалізації, винахід забезпечує лентивірусний вектор, що складається з: лівого (5') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) ВІЛ-1; псі-послідовності для упаковки (Ψ+); центрального поліпуринового тракту ВІЛ-1/ДНК-флеп елемента (сPPT/FLAP); елемента, що зв'язується з білком rev (RRE-структури); промотору MND (синтетичного промотору, що містить область U3 довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності), функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, що кодує поліпептид ABCD1 людини; правого (3') довгого кінцевого повтору (LTR-послідовності) ВІЛ-1, що самоінактивується, і полі-А послідовності β-глобіну кролика (gβprA).

Фахівцеві в даній галузі техніки очевидно, що різні інші варіанти реалізації можуть бути сформульовані на основі варіантів реалізації згідно з цим винаходом, у яких, наприклад, терапевтичний трансген або ген, що представляє інтерес експресуються в клітинах-мішенях або в клітинних лініях, відмінних від лінії кровотворних клітин, наприклад, у лінії клітин нервової тканини.

D. Способи трансдукції

Цей винахід забезпечує, зокрема, способи і композиції, що суттєво підвищують ефективність трансдукції клітин-мішеней. Не обмежуючись ніякою певною теорією, мається на увазі, що способи і композиції згідно з винаходом можуть застосовуватися для трансдукції суттєво більшого числа клітин, використовуючи суттєво менше число вірусів, у такий спосіб мінімізуючи ризик геномних змін і/або активації протоонкогенів у геномі терапевтичних клітин. Мінімізація ризику активації протоонкогенів при інтеграції в геном та інших геномних змін у терапевтичних клітинах є важливим чинником при створенні застосовного протоколу генної терапії, оскільки це мінімілізує імовірність того, що трансдуційовані клітини, що мають характеристики, схожі з раковими клітинами, будуть клонально розмножуватися *in vivo* і дадуть початок злоякісним і доброякісним пухлинам або захворюванням, що характеризуються аномальною клітинною проліферацією. Крім того, у даній галузі відзначено, що трансдукція великим числом вірусів, як правило, має цитотоксичний ефект у відношенні трансдуційованих клітин. Таким чином, композиції і способи згідно з цим винаходом також підвищують виживаність і життєздатність трансдуційованих клітин. Відповідно до цього, цей винахід забезпечує більш безпечні і ефективні способи застосування генної терапії.

Застосування ретровірусних або лентивірусних векторів для доставки генів або інших полінуклеотидів за допомогою інфікування вірусом, а не за допомогою трансфекції відомо як "трансдукція". Відповідно до одного з варіантів реалізації, ретровірусні вектори трансдуціюються в клітини шляхом інфікування та інтеграції провірусів. Згідно з конкретними варіантами реалізації, клітина, наприклад, клітина-мішень, є "трансдуційованою", якщо вона містить послідовність гена або іншого полінуклеотиду, доставлену в клітину шляхом інфікування вірусним або ретровірусним вектором. Згідно з конкретними варіантами реалізації, трансдуційована клітина містить одну або кілька послідовностей гену або іншого полінуклеотиду, доставленого в клітинний геном ретровірусним або лентивірусним вектором.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, клітини-хазяї або клітини-мішені, трансдуційовані вірусним вектором згідно з винаходом, експресують терапевтичний поліпептид і вводять суб'єктові для лікування і/або профілактики захворювань, порушень або патологічних станів.

Одержання інфекційних вірусних частинок і вихідних розчинів вірусу може здійснюватися стандартними способами. Способи одержання вихідних розчинів вірусів відомі в даній галузі техніки і описані, наприклад, Y. Soneoka et al. (1995) Nucl. Acids Res. 23:628-633 і N.R. Landau et al. (1992) J. Virol. 66:5110-5113.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, вірусні частинки-похідні ВІЛ-1 можуть бути отримані шляхом одночасної експресії пакувальних елементів віріону і вектора-переносника в клітині-продуценті. Зазначені клітини можуть бути тимчасово трансфіційовані різними плазмідами. Як правило, для трансфекції застосовують три-чотири плазміди, але це число може зрости залежно від ступеня роздроблення лентивірусних компонентів на окремі одиниці. Наприклад, одна плазміда може кодувати корові і ферментні компоненти віріону-похідного ВІЛ-1. Таку плазмідку називають пакувальною плазмідкою. Інша плазміда, як правило, кодує оболонкові білки (білок), найчастіше, білок G вірусу везикулярного стоматиту (VSV G), через

його високо стабільність і широкий тропізм. Ця плазміда може називатися плазмідною експресії оболонки. Ще одна плазміда кодує геном, що переноситься у клітину-хазяїн, тобто, власне вектор, і називається вектором-переносником. Пакувальні плазміди можуть бути доставлені в клітину-хазяїн стандартними способами, включаючи кальцій-фосфатну трансфекцію, ліпофекцію або електропорацію. За допомогою цього способу, а також його варіантів, можна досягнути титру рекомбінантних вірусів порядку декількох мільйонів трансдуціюючих одиниць на мілілітр (ТУ/мл). Після центрифугування, можна одержати вихідні концентрації порядку приблизно 10^8 ТУ/мл, 10^9 ТУ/мл, 10^{10} ТУ/мл, 10^{11} ТУ/мл, 10^{12} ТУ/мл або 10^{13} ТУ/мл.

Інфекційні вірусні частинки можуть бути виділені з пакувальних клітин стандартними способами. Наприклад, інфекційні частинки можна виділити за допомогою лізису клітин або з надосадової рідини клітинної культури, як відомо в даній галузі. При необхідності, виділені вірусні частинки можуть піддатися додатковому очищенню. Застосовні способи очищення добре відомі фахівцям у даній галузі.

Віруси можуть застосовуватися для інфікування клітин способами, добре відомими в даній галузі техніки *in vivo*, *ex vivo* або *in vitro*. Зокрема, коли клітини, наприклад, CD34⁺ клітини, дендритні клітини, клітини периферійної крові або стовбурові клітини трансдуціюються *ex vivo*, векторні частинки можуть інкубуватися з клітинами в дозах з величиною множинності зараження (MOI) порядку 1-50, 1×10^5 - 50×10^5 трансдуціюючих одиниць вірусного вектора на 10^5 клітин. Очевидно, що ця величина відповідає числу векторних одиниць у межах 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 і 50 MOI.

Також віруси можуть вводитися суб'єктові *in vivo*, безпосередньо шляхом ін'єкції в клітини, тканини і органи, що потребують терапії. Множинність зараження при прямій ін'єкції повинна становити порядку 1-50, що також відповідає 1×10^5 - 50×10^5 трансдуціюючим одиницям вірусного вектора на 10^5 клітин.

Також віруси можуть доставлятися з урахуванням вірусного титру (ТУ/мл), що вимірюється, наприклад, із застосуванням комерційно доступного антигену р24, тобто, ІФА вірусного оболонкового білка р24. Наступна формула може застосовуватися для вимірювання величини пг/мл р24: у наявності приблизно 2000 молекул р24 на одну фізичну частинку (РР) лентівірусу: $(2 \times 10^3) \times (24 \times 10^3 \text{ Да р24 на РР}) / (48 \times 10^6 / \text{число Авогадро}) = (48 \times 10^6) / (6 \times 10^{23}) = 8 \times 10^{-17} \text{ г р24 на РР}$, приблизно 1 РР на $1 \times 10^{-16} \text{ г р24}$, 1×10^4 РР на пг р24. Належним чином упакований, псевдотипований VSV-G лентівірусний вектор буде мати індекс інфективності від 1 ТУ на 1000 фізичних частинок (РР) до 1 ТУ на 100 РР (або менше). Таким чином, границі інтервалу визначаються величинами приблизно від 10 до 100 ТУ/пг р24. Таким перетворенням можна одержати величину в ТУ/мл.

Ґрунтуючись на отриманому досвіді, кількість лентівірусу, що безпосередньо вводиться, визначається величиною загального ТУ і може варіювати залежно від припустимого об'єму композиції, що вводиться, і від типу тканини, куди лентівірус вводиться. Наприклад, у мозкову тканину припустиме введення досить невеликого об'єму композиції, що містить лентівірус, тому кращий високий титр, з величиною ТУ порядку приблизно 1×10^6 - 1×10^7 , приблизно 1×10^6 - 1×10^8 , 1×10^6 - 1×10^9 , приблизно 1×10^7 - 1×10^{10} , 1×10^8 - 1×10^{11} , приблизно 1×10^8 - 1×10^{12} , або приблизно 1×10^{10} - 1×10^{12} або більше, для кожної ін'єкції. У свою чергу, системне введення дозволяє використовувати значно більші кількості, з величиною ТУ порядку 1×10^8 , 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} , 1×10^{13} , 1×10^{14} або 1×10^{15} .

Цей винахід має на увазі способи і композиції, що забезпечують більшу ефективність трансдукції клітин *in vitro*, *ex vivo* і *in vivo*, використовуючи більш низькі титри вірусу для досягнення ефективності трансдукції, порівнянної з описаними вище способами.

Певні аспекти цього винаходу виникли завдяки тому, що несподівано було виявлено істотне підвищення ефективності трансдукції *in vitro*, *ex vivo* або *in vivo* у присутності ретровірусу і однієї або декількох сполук, що забезпечують посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, таких як низькомолекулярні сполуки або сполуки, описані в WO 2007/112084 і WO2010/108028, кожна з яких повністю включена в цю заявку шляхом посилання. У цій заявці, термін "підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP", як правило, відноситься до здатності сполуки підсилювати клітинний сигнальний шлях у напрямку по ходу транскрипції рецептора простагландину EP у клітині в присутності однієї або декількох зазначених сполук у порівнянні з активністю сигнального шляху рецептора простагландину EP у їхній відсутності. Способи вимірювання посилення або стимуляції активності сигнального шляху простагландину EP відомі в даній галузі і описані, наприклад, в WO2010/108028, повністю включений в цю заявку шляхом посилання.

Типові приклади сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландину EP, включають, але не обмежуються зазначеними: низькомолекулярні сполуки, наприклад, низькомолекулярні

органічні сполуки, простагландіни, агоністи сигнального шляху Wnt, агоністи сигнального шляху цАМФ/фосфоінозитид-3-кінази (PI3K)/серин-треонінової кінази (АКТ), агоністи сигнального шляху Ca^{2+} , агоністи сигнального шляху NO/ангіотензину та інші сполуки, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну, обрані із групи, що складається з: мебеверину; флурандреноліду; атенололу; піндололу; габоксадолу; оксихінолінкарбонової кислоти; гідралазину; тіабендазолу; бікукуліну; везаміколу; перувозиду; іміпраміну; хлорпропаміду; 1,5-пентаметилентетразолу; 4-амінопіридину; діазоксиду; бенфотіаміну; 12-метоксидодеценної кислоти; N-форміл-метіоніл-лейцил-фенілаланіну; галаміну; IAA 94 і хлортрианізену, а також їх похідних.

Згідно з кращим варіантом реалізації, сполука, що підсилює сигнальний шлях простагландіну, являє собою природну або хімічно синтезовану молекулу або поліпептид, який зв'язується і/або взаємодіє з рецептором EP, як правило, активуючи або стимулюючи одну або кілька наступних реакцій сигнального шляху, пов'язаного з рецептором простагландіну EP, як описано в цій заявці і відомо в даній галузі техніки.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, сполука, що підсилює сигнальний шлях простагландіну, обрана із групи, що складається з: PGA_2 ; PGB_2 ; PGD_2 ; PGE_1 (альпростадил (Caverjecttm; Edexttm; Musettm; Prostin VRTM)); PGE_2 ; PGF_2 ; PGI_2 (епропростенол (Flolanttm; Prostacyclinttm)); PGH_2 ; PGJ_2 , а також їх попередників, метаболітів, похідних і аналогів.

Інші типові сполуки, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну, включають, але не обмежуються зазначеними: 15d-PGJ_2 ; дельта12- PGJ_2 ; 2-гідроксигептадекатрієнову кислоту (ННТ); тромбосан (TXA2 і TXB2); аналоги PGI_2 , наприклад, ілопрост (VentavisTM) і трепростиніл RemodulinTM; аналоги PGF_2 , наприклад, травопрост (TravatanTM), карбопрост трометамін (HemabateTM), тафлупрост (ZioptanTM), латанопрост (XalatanTM), біматопрост (LumiganTM; LatisseTM), унопростон ізопропіл (ResculaTM), клопростенол (CiosinTM, CyclixTM, EstrumateTM, LutaprostTM, OnsettTM, PlanateTM), естрофан і суперфан; аналоги PGE_1 , наприклад, мізопростол (CytotecTM) і бутапрост; також "Corey alcohol-A" $[[3\alpha, 4\alpha, 5\beta, 6\alpha](-)-[\text{гексагідро-4-(гідроксиметил)-2-оксо-2H-циклопентафуран-5-іл}][1,1'\text{-біфеніл}]\text{-4-карбоксилат}]$; "Corey alcohol-B" $[2H\text{-циклопентафуран-2-он, 5-(бензоилокси)гексагідро-4-(гідроксиметил)}[3\alpha R\text{-(}3\alpha, 4\alpha, 5\beta, 6\alpha)]]$; і "Corey diol" $((3\alpha R, 4S, 5R, 6aS)\text{-гексагідро-5-гідрокси-4-(гідроксиметил)-2H-циклопентафуран-2-он})$.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, сполука являє собою ліганд рецептора простагландіну EP, включаючи, але не обмежуючись зазначеними: простагландин E2 (PGE_2), а також його аналоги і похідні. Як правило, простагландіни відносяться до гормоноподібних молекул-похідних жирних кислот, що складаються з 20 атомів вуглецю, включаючи 5-атомне кільце, як описано в цій заявці і відомо фахівцям у даній галузі.

Типові приклади "аналогів" або "похідних" PGE_2 включають, але не обмежуються зазначеними: 16,16-диметил PGE_2 , 16-16 диметил PGE_2 p-(p-ацетамідобензамідо) феніловий ефір, 11-дезоксид-16,16-диметил PGE_2 , 9-дезоксид-9-метил-16, 16-диметил PGE_2 , 9-дезоксид-9-метил PGE_2 , 9-кето флупростенол, 5-транс PGE_2 , 17-феніл-омега-тринор PGE_2 , PGE_2 сериноламід, метиловий ефір PGE_2 , 16-феніл тетранор PGE_2 , 15(S)- 15- метил PGE_2 , 15 (R)-15-метил PGE_2 , 8-ізо-15-кето PGE_2 , ізопропіловий ефір 8-ізо PGE_2 , 20-гідроксид PGE_2 , 11-дезоксид PGE_2 , "nocloprost", "sulprostone", "butaprost", 15-кето PGE_2 і 19-(R)-гідроксид PGE_2 .

Також, аналоги і похідні простагландіну включають сполуки, подібні за будовою з PGE_2 , де атом галогену є замісником по позиції 9 (див., наприклад, WO 2001/12596, включений у цю заявку повністю шляхом посилання), а також 2- декарбокси-2-фосфініко похідні, наприклад, описані в публікації США № 2006/0247214, включеної в цю заявку шляхом посилання.)

Згідно з деякими варіантами реалізації, сполука не являє собою ліганд, відмінний від PGE_2 . Згідно з конкретними варіантами реалізації, зазначений ліганд вибирають із групи, що складається з агоністів EP1, EP2, EP3 або EP4.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, рецептор простагландіну вибирають із групи, що складається з EP1, EP2, EP3 і EP4.

Типові приклади агоністів EP1, що не відносяться до похідних PGE_2 , включають, але не обмежуються зазначеними: ONO-DI-004 і ONO-8713. Типові приклади агоністів EP2, що не є похідними PGE_2 , включають, але не обмежуються зазначеними: CAY10399, ONO_8815Ly, ONO-AE1-259 і CP-533,536. Інші приклади агоністів EP2, що не відносяться до похідних PGE_2 , включають карбазоли і флуорени, описані в WO 2007/071456, повністю описані в даній заявці шляхом посилання. Типові приклади агоністів EP3, що не відносяться до похідних PGE_2 , включають, але не обмежуються зазначеними: AE5-599, MB28767, GR 63799X, ONO-NT012 і ONO-AE-248. Типові приклади агоністів EP4, що не відносяться до похідних PGE_2 , включають, але не обмежуються зазначеними: ONO-4819, APS-999 Na, AH23848 і ONO-AE 1-329. Інші приклади агоністів EP2, що не відносяться до похідних PGE_2 , описані в WO/2000/038663;

патенті США № 6,747,037 і U.S. Patent No. 6,610,719, кожний з яких повністю включений у цю заявку шляхом посилання.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, сполука, що підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP, являє собою агоніст Wnt. Типові приклади агоністів Wnt включають, але не обмежуються поліпептидами-похідними Wnt і інгібіторами глікоген-синтази-кінази-3 (GSK3). Типові приклади поліпептидів-похідних Wnt, застосовні як сполуки, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP, включають, але не обмежуються: Wnt1, Wnt2, Wnt2b/13, Wnt3, Wnt3a, Wnt4, Wnt5a, Wnt5b, Wnt6, Wnt7a, Wnt7b, Wnt7c, Wnt8, Wnt8a, Wnt8b, Wnt8c, Wnt10a, Wnt10b, Wnt11, Wnt14, Wnt15, Wnt15, а також їх біологічно активні фрагменти.

Інгібітори GSK3 застосовуються як сполуки, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP, приєднуючись і знижуючи активність GSK3 α або GSK3 β . Типові приклади інгібіторів GSK3 включають, але не обмежуються зазначеними: BIO (6-броміндирубін-3'-оксим), LiCl, або інші інгібітори GSK3, як описано в патентах США №№ 6,057,117 і 6,608,063; у заявках на патент США №№ 2004/0092535 і 2004/0209878; АТФ-конкурентні, селективні інгібітори GSK3 CHIR-911 і Chir-837 (що також позначаються як CT-99021 і CT-9802, відповідно). Chiron Corporation (Emeryville, CA).

Згідно з іншим варіантом реалізації, сполука, що підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP, діє через шлях вторинних месенджерів cAMP/P13K/AKT і його вибирають із групи, що складається з дибутирил цАМФ, форболового ефіру, форсколіну, склареліну (sclareline), 8-бром-цАМФ, холерного токсину (CTx), амінофіліну, 2,4-динітрофенолу (DNP), норепінефрину, епінефрину, ізопротеренолу, ізобутилметилксантину (IBMX), кофеїну, теофіліну (диметилксантину), дофаміну, роліпраму, ілопросту, гіпофізарного пептиду-активатора аденілатциклази (PACAP) і вазоактивного інтестинального поліпептиду (VIP), а також їх похідних.

Згідно з іншим варіантом реалізації, сполука, що підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP, діє через шлях вторинних месенджерів Ca²⁺ і її вибирають із групи, що складається з Варпа-АМ, фендиліну, нікардипіну і їх похідних.

Згідно з іншим варіантом реалізації, сполука, що підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP, діє через сигнальний шлях NO/ангіотензину і її вибирають із групи, що складається з L-аргініну, нітропрусиду натрію, ванадату натрію, брадикініну і їх похідних.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, цей винахід забезпечує спосіб підвищення ефективності трансдукції, що включає культивування популяції клітин у присутності ретровірусу і однієї або декількох сполук, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP, обраних із групи, що складається з: простагландину, PGE₂, PGD₂, PGI₂, лінолевої кислоти; 13(s)-HODE; LY171883; мідової кислоти; ейкозатрієнової кислоти; епоксиейкозатрієнової кислоти; ONO-259; Cay1039; агоніста рецептора PGE₂; 16,16-диметил PGE₂; 19(R)-гідрокси PGE₂; 16,16-диметил PGE₂ p-(p-ацетамідобензамідо) фенілового ефіру; 11-дезокс-16,16-диметил PGE₂; 9-дезокс-9-метил-16,16-диметил PGE₂; 9-дезокс-9-метил-16,16-диметил PGE₂; сульпростону; сериноламиду PGE₂; метилового ефіру PGE₂; феніл-тетранор PGE₂; 16-феніл-тетранор PGE₂; 15(S)-15-метил PGE₂; 15(R)-15-метил PGE₂; BIO; 8-бром-цАМФ; форсколіну; ацетоксиметилового ефіру 1,2-біс етан-N,N,N,N-тетраоцтової кислоти; фендиліну; нікардипіну; ніфедипіну; пімозиду; строфантинину; ланатозиду; L-аргініну; нітропрусиду натрію; ванадату натрію; брадикініну; мебеверину; флурандреноліду; атенололу; піндололу; габоксадолу; оксигінолінкарбонової кислоти; гідралазину; тіабендазолу; бікукуліну; везаміколу; перувозиду; іміпраміну; хлорпропаміду; 1,5-пентаметилентетразолу; 4-амінопіридину; діазоксиду; бенфотіаміну; 12-метоксидодецевої кислоти; N-форміл-метіоніл-лейцил-фенілаланіну; галаміну; IAA 94; і хлортрианізену.

Згідно з варіантом реалізації, цей винахід забезпечує спосіб підвищення ефективності трансдукції, що включає культивування популяції клітин у присутності ретровірусу і однієї або декількох сполук, що є лігандами рецептора простагландину EP, обраних із групи, що складається з: 16,16-диметил PGE₂; 16,16-диметил PGE₂ p-(p-ацетамідобензамідо) фенілового ефіру; 11-дезокс-16,16-диметил PGE₂; 9-дезокс-9-метил-16,16-диметил PGE₂; 9-дезокс-9-метил-16,16-диметил PGE₂; 9-кетопропростену, 5-транс PGE₂, 17-феніл-омега-тринол PGE₂, сериноламиду PGE₂, метилового ефіру PGE₂, 16-фенілтетранор PGE₂, 15(S)-15-метил PGE₂, 15(R)-15-метил PGE₂, 8-ізо-15-кето PGE₂, 8-ізопропілового ефіру PGE₂, 20-гідрокси PGE₂, 11-дезокс PGE₂, ноклопросту, сульпростону, бутапросту, 15-кето PGE₂ і 19-(R)-гідрокси PGE₂.

Цей винахід також має на увазі, що ефективність трансдукції клітин може бути підвищена шляхом культивування клітин у присутності ретровірусу, сполуки, що підсилює сигнальний шлях

рецептора простагландину EP, наприклад, PGE₂, і одного або декількох інгібіторів деацетилази гістонів (HDAC).

Типові приклади інгібіторів HDAC, застосовні відповідно до композицій і способів згідно з цим винаходом, включають, але не обмежуються зазначеними: TSA (трихостатин А) (див., наприклад, Adcock, (2007) *British Journal of Pharmacology* 150:829-831), VPA (вальпроєву кислоту) (див., наприклад, Munster, et al, (2007) *Journal of Clinical Oncology* 25:18S: 1065), бутират натрію (NaBu) (див., наприклад, Han, et al., (2007) *Immunology Letters* 108: 143-150), SAHA (субероїланлід гідроксамової кислоти або воріностат) (див., наприклад, Kelly, et al., (2005) *Nature Clinical Practice Oncology* 2: 150-157), фенілбутират натрію (див., наприклад, Gore, et al., (2006) *Cancer Research* 66:6361-6369), депсипептид (FR901228, FK228) (див., наприклад, Zhu, et al., (2003) *Current Medicinal Chemistry* 3(3): 187-199), трапоксин (TPX) (див., наприклад, Furumai, et al., (2001) *PNAS* 98(1): 87-92), пептид 1, що містить циклічну гідроксамову кислоту (CHAP1) (див., Furumai supra), MS-275 (див., наприклад, Caminci, et al., WO2008/126932, включений у цю заявку шляхом посилання), LBH589 (див., наприклад, Goh, et al., WO2008/108741, включений у цю заявку шляхом посилання) і PXD-101 (див., Goh, supra).

Цей винахід має на увазі, що клітини можуть культивуватися в присутності ретровірусу і сполуки, що підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або інгібітора HDAC протягом проміжку часу, що приблизно становить від 10 хвилин до 72 годин, від 30 хвилин до 72 годин, від 30 хвилин до 48 годин, від 30 хвилин до 24 годин, від 30 хвилин до 12 годин, від 30 хвилин до 8 годин, від 30 хвилин до 6 годин, від 30 хвилин до 4 годин, від 30 хвилин до 2 годин, від 1 до 2 годин, або рівного будь-якому проміжному значенню в межах, зазначених вище.

Цей винахід має на увазі, що клітини можуть культивуватися в присутності ретровірусу і сполуки, що підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або інгібітора HDAC протягом приблизно 30 хвилин, приблизно 1 години, приблизно 2 годин, приблизно 4 годин, приблизно 5 годин, приблизно 6 годин, приблизно 7 годин, приблизно 8 годин, приблизно 9 годин, приблизно 10 годин, приблизно 11 годин, приблизно 12 годин, приблизно 13 годин, приблизно 14 годин, приблизно 15 годин, приблизно 16 годин, приблизно 17 годин, приблизно 18 годин, приблизно 19 годин, приблизно 20 годин, приблизно 21 години, приблизно 22 годин, приблизно 23 годин, приблизно 24 годин, приблизно 48 годин, приблизно 72 годин, або протягом будь-якого проміжного часового інтервалу в межах, зазначених вище.

Цей винахід має на увазі, що клітини можуть культивуватися в присутності однієї або декількох сполук, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або один або кілька інгібіторів HDAC до культивування з ретровірусом, під час культивування або після нього, або комбінуючи ці альтернативи в будь-якій стадії з описаних процесів.

Крім того, цей винахід має на увазі, що клітини можуть культивуватися в присутності однієї або декількох сполук, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP, і ретровірусу до культивування, під час культивування або після культивування в присутності одного або декількох інгібіторів, або комбінуючи ці альтернативи в будь-якій стадії з описаних процесів.

Цей винахід також має на увазі, що клітини можуть культивуватися в присутності ретровірусу до їхнього культивування в присутності сполук, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або в присутності одного або декількох інгібіторів HDAC, під час їх культивування в присутності сполук, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або в присутності одного або декількох інгібіторів HDAC або після їхнього культивування в присутності сполук, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або в присутності одного або декількох інгібіторів HDAC, або комбінуючи ці альтернативи в будь-якій стадії з описаних процесів.

Крім того, фахівцям у даній галузі техніки очевидно, способи підвищення ефективності трансдукції згідно з винаходом включають культивування клітин у присутності ретровірусу, однієї або декількох сполук, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або в присутності одного або декількох інгібіторів HDAC протягом перших 6 годин трансдукції, перших 12 годин трансдукції, перших 24 годин трансдукції, перших 48 годин трансдукції, перших 72 годин трансдукції, або протягом будь-якого проміжного часового інтервалу в межах, зазначених вище.

Крім того, цей винахід має на увазі, що клітини можуть трансдуціюватися в присутності ретровірусу і сполуки, що підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або інгібітора HDAC одноразово, дворазово, триразово або більшу кількість разів. Згідно з іншим варіантом реалізації, цей винахід має на увазі, що клітини можуть трансдуціюватися в присутності ретровірусу одноразово, дворазово, триразово або більшу кількість разів і в

присутності сполуки, що підсилює сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або інгібітора HDAC лише одноразово або дворазово.

5 Згідно з певним варіантом реалізації, винахід має на увазі культивування клітин у присутності ретровірусу, однієї або декількох сполук, що підсилюють сигнальний шлях рецептора простагландину EP і/або одного або декількох інгібіторів HDAC, де культивування із зазначеними агентами відбувається протягом однакового або різних проміжків часу, як описано в цій заявці.

10 Цей винахід також має на увазі, що композиції і способи згідно з винаходом можуть підвищити рівень трансдукції практично будь-якого типу клітин на щонайменше приблизно 30 %, щонайменше приблизно 40 %, щонайменше приблизно 50 %, щонайменше приблизно 60 %, щонайменше приблизно 65 %, щонайменше приблизно 70 %, щонайменше приблизно 75 %, щонайменше приблизно 80 %, щонайменше приблизно 85 %, щонайменше приблизно 90 %, щонайменше приблизно 91 %, щонайменше приблизно 92 %, щонайменше приблизно 93 %, щонайменше приблизно 94 %, щонайменше приблизно 95 %, щонайменше приблизно 96 %, щонайменше приблизно 97 %, щонайменше приблизно 98 %, щонайменше приблизно 99 % або щонайменше приблизно 100 %.

20 Згідно з конкретними варіантами реалізації, ефективність трансдукції росте щонайменше в 2 рази, щонайменше в 5 разів, щонайменше в 10 разів, щонайменше в 25 разів, щонайменше в 50 разів, щонайменше в 100 разів, або значніше, у порівнянні з клітинами, що трансдуціюються лише в присутності вектора.

25 Перед трансдукцією, у її процесі або після неї клітини можуть культивуватися в живильному середовищі, прийнятному для підтримки життєдіяльності, росту або проліферації клітин. Застосовні живильні середовища і умови культивування добре відомі в даній галузі техніки. Зазначені середовища включають, але не обмежуються зазначеними: Dulbecco's Modified Eagle's Medium® (DMEM), DMEM F12 medium®, Eagle's Minimum Essential Medium®, F-12K medium®, Iscove's Modified Dulbecco's Medium®, RPMI-1640 medium® і безсироваткове середовище для культивування і розмноження кровотворних клітин SFEM®. Різні середовища також доступні в сполуках з низьким вмістом глюкози, що включають піруват натрію або не містять його.

30 Для забезпечення клітин додатковими агентами, що дозволяють оптимізувати процес росту, можуть застосовуватися й інші компоненти. Зазначені сполуки включають інсулін, трансферин, сполуки натрію і селен, а також їх комбінації. Вони можуть входити до складу розчинів солей, що включають, але не обмежуваних: Hanks' Balanced Salt Solution® (HBSS), Earle's Salt Solution®, антиоксидантні агенти, агенти MCDB-201®, фосфатно-сольовий буферний розчин (PBS), аскорбінову кислоту і 2-фосфат аскорбінової кислоти, а також амінокислоти. Багато живильних середовищ містять амінокислоти, однак деякі потребують додавання додаткових амінокислот. Зазначені амінокислоти включають, але не обмежуються: L-аланін, L-аргінін, L-аспарагінову кислоту, L-аспарагін, L-цистеїн, L-цистин, L-глутамінову кислоту, L-глутамін, L-гліцин, L-гістидин, L-ізолейцин, L-лейцин, L-лізин, L-метіонін, L-фенілаланін, L-пролін, L-серин, L-треонін, L-трипрофан, L-тирозин і L-валін. Необхідні концентрації зазначених добавок можуть бути визначені фахівцями в даній галузі техніки.

45 Гормони також можуть ефективно застосовуватися в клітинних культурах згідно з цим винаходом і включають, не обмежуючись: D-альдостерон, диетилstilбестрол (DES), дексаметазон, β-естрадіол, гідрокортизон, інсулін, пролактин, прогестерон, соматостатин/гормон росту людини (HGH), тиротропін, тироксин і L-тиронін.

50 Ліпіди і ліпідні переносники також можуть використовуватися як додаткові агенти клітинної культури, залежно від типу клітини і її шляху диференціації. Зазначені ліпіди і переносники можуть включати, не обмежуючись: циклодекстрин (α, β, γ), холестерин, лінолеву кислоту, пов'язану з альбуміном, вільну лінолеву кислоту, лінолеву-олеїнову-арахідонову кислоту, пов'язану з альбуміном, та інші варіанти.

Клітини також можуть культивуватися в середовищі з низьким вмістом сироватки або в середовищі, без вмісту сироватки. Середовища без вмісту сироватки описані, наприклад, у патенті США № 7,015,037. Різні типи клітин можуть культивуватися в середовищах з низьким вмістом або без вмісту сироватки.

55 Після трансдукції клітини можуть культивуватися в умовах, що прийнятні для їхнього росту і проліферації. Згідно з конкретними варіантами реалізації, трансдуційовані клітини культивуються протягом приблизно 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 або 14 до трансплантації.

60 До, у процесі або після трансдукції клітини можуть культивуватися в умовах, що стимулюють ріст стовбурових клітин, або клітин-попередників. При цьому може застосовуватися будь-який зі

способів, відомих у даній галузі техніки. Згідно з конкретними варіантами реалізації, до, у процесі або після трансдукції клітини культивуються в присутності одного або декількох факторів росту, що стимулюють ріст стовбурових клітин або клітин-попередників. Приклади факторів росту, що стимулюють ріст стовбурових клітин або клітин-попередників, включають, але не обмежуються зазначеними: ліганд тирозинкінази Flt3, фактор стовбурових клітин, а також інтерлейкіни 6 і 11, що стимулюють самовідновлення стовбурових кровотворних клітин мишей. Інші приклади включають Sonic hedgehog, що стимулює проліферацію ранніх кровотворних клітин-попередників шляхом активації кісткового морфогенетичного білка 4, Wnt3a, що стимулює самовідновлення стовбурових кровотворних клітин, нейротрофічний фактор головного мозку (BDNF), епідермальний фактор росту (EGF), фактор росту фібробластів (FGF), циліарний нейротрофічний фактор (CNF), трансформуючий фактор росту- β (TGF- β), фактор росту фібробластів (FGF, наприклад, основний FGF, кислий FGF, FGF-17, FGF-4, FGF-5, FGF-6, FGF-8b, FGF-8c, FGF-9), гранулоцитарний колонієстимулюючий фактор (GCSF), фактор росту тромбоцитів (PDGF, наприклад, PDGFAA, PDGFAB, PDGFBB), гранулоцитарно-макрофагальний колонієстимулюючий фактор (GMCSF), фактор стовбурових клітин (SCF), фактор стромальних клітин (SCDF), інсуліноподібний фактор росту (IGF), тромбопоетин (TPO) або інтерлейкін-3 (IL-3). Згідно з конкретними варіантами реалізації, до, у процесі або після трансдукції клітини культивуються в присутності одного або декількох факторів росту, що стимулюють ріст стовбурових клітин або клітин-попередників.

У той час, як опис і приклади, наведені в цій заявці, фокусуються на трансдукції і селекції мультипотентних клітин, таких як стовбурові кровотворні клітини, зокрема, способи і композиції згідно з винаходом можуть також застосовуватися для трансдукції і селекції інших типів клітин, включаючи інші типи плюрипотентних і мультипотентних стовбурових клітин, а також клітин, що легко ушкоджуються, які раніше не підлягають селекції з трансдуційованих клітин для терапевтичного застосування.

Клітини, застосовувані згідно зі способами цього винаходу можуть бути отримані від будь-якої тварини, краще, ссавця, наприклад, від примата або людини, більш краще, від людини, і можуть бути трансплантовані в будь-яку тварину, краще, ссавця, ще краще, у людину.

Клітини, застосовні для трансдукції і введенні згідно зі способами генної терапії згідно з винаходом включають, але обмежуються стовбурові клітини, клітини-попередники і диференційовані клітини.

Типові приклади стовбурових клітин, застосовних для трансдукції з композиціями і способами згідно з винаходом включають, але не обмежуються зазначеними, ембріональні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, мезодермальні стовбурові клітини, ентодермальні стовбурові клітини і ектодермальні стовбурові клітини.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, популяція або джерело клітин, що трансдуціюються способами і композиціями, описаними в цій заявці, включає мезенхімальні стовбурові клітини і/або клітини-попередники, мезодермальні стовбурові клітини і/або клітини-попередники, ентодермальні стовбурові клітини і/або клітини-попередники або ектодермальні стовбурові клітини і/або клітини-попередники. Згідно з конкретними варіантами реалізації, популяція або джерело клітин, що трансдуціюються способами і композиціями, описаними в цій заявці, включає стовбурові клітини кісткового мозку, кров'яні стовбурові клітини і/або клітини-попередники пуповини, кісткові стовбурові клітини і/або клітини-попередники, м'язові стовбурові клітини і/або клітини-попередники, кровотворні стовбурові клітини і/або клітини-попередники, жирові стовбурові клітини і/або клітини-попередники, хрящові стовбурові клітини і/або клітини-попередники, нервові стовбурові клітини і/або клітини-попередники, стовбурові клітини і/або клітини-попередники шкіри, стовбурові клітини і/або клітини-попередники печінки, стовбурові клітини і/або клітини-попередники підшлункової залози, стовбурові клітини і/або клітини-попередники нирок, стовбурові клітини і/або клітини-попередники шлунку і стовбурові клітини і/або клітини-попередники кишечника.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, популяція або джерело клітин, що трансдуціюються способами і композиціями, описаними в цій заявці, включає, але не обмежує: остеобласти, хондроцити, адипоцити, кісткові м'язи, кардіоміоцити, нейрони, гліальні клітини (астроцити, олігодендроцити, шванівські клітини), клітини клітковини (палички і колбочки), клітини рогамиці, клітини шкіри, моноцити і макрофаги, нейтрофіли, базофіли, еозинофіли, еритроцити, мегакаріоцити/тромбоцити, дендритні клітини, Т-клітини, В-клітини, NK-клітини, клітини шлунку, клітини кишечника, гладком'язові клітини, клітини судин, клітини сечового міхура, островкові клітини підшлункової залози (α -, β - і дельта-клітини), гепатоцити, клітини нирок, клітини надниркової залози та клітини легенів.

Згідно з різними варіантами реалізації, застосування стовбурових клітин краще через їхню здатність диференціювати у відповідний тип клітин при введенні в певну біологічну нішу *in vivo*.

Згідно з кращими варіантами реалізації, композиції і способи згідно з винаходом застосовуються для підвищення рівня трансдукції кровотворних стовбурових клітин або клітин-попередників.

Цей винахід також має на увазі виділення і трансдукцію клітинних популяцій. У цій заявці, термін "клітинна популяція" відноситься до групи клітин, що складається з будь-якого числа і/або комбінації гомогенних або гетерогенних типів клітин, як описано в цій заявці. Наприклад, для трансдукції кровотворних стовбурових клітин або клітин-попередників клітинна популяція може бути виділена їх пуповинної крові, плацентарної крові, кісткового мозку або периферичної крові. Клітинна популяція може складатися з приблизно 10 %, приблизно 20 %, приблизно 30 %, приблизно 40 %, приблизно 50 %, приблизно 60 %, приблизно 70 %, приблизно 80 %, приблизно 90 %, або приблизно 100 % клітин-мішеней, що трансдуціюються. Згідно з конкретними варіантами реалізації, кровотворні стовбурові клітини і клітини-попередники можуть бути виділені з гетерогенної клітинної популяції способами, відомими в даній галузі техніки. Згідно з конкретними варіантами реалізації, кровотворні стовбурові клітини і клітини-попередники можуть бути виділені після трансдукції клітинної популяції, згідно з іншими варіантами реалізації, клітини можуть бути виділені до трансдукції.

Клітини згідно з винаходом можуть бути кріоконсервовані до або після трансдукції способами, відомими в даній галузі. Будучи поміщеними в живильне середовище, клітини можуть використовуватися замороженими або не замороженими і зберігатися в заморожених вихідних розчинах, наприклад, у модифікованому за способом Дульбекко середовищі Ігла (DMEM) з вмістом 40 %вої ембріональної телячої сироватки (FCS) і 10 %-вим диметилсульфоксидом (DMSO). Інші способи приготування заморожених вихідних розчинів для культивування клітин також доступні фахівцям у даній галузі техніки.

Згідно з конкретними варіантами реалізації в клітинну популяцію, що складається зі стовбурових клітин або клітин-попередників, додається ретровірус, наприклад, лентівірус, а також одна або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну, наприклад, лігандів рецептора простагландіну EP, такий як PGE₂, або його аналог або похідне. Згідно з конкретними варіантами реалізації в клітинну популяцію згодом додається один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів (HDAC). Згідно з різними варіантами реалізації зазначені агенти додаються в клітинну популяцію *ex vivo* або *in vivo*.

Згідно з кращими варіантами реалізації стовбурові клітини і клітини-попередники являють собою кровотворні стовбурові клітини і клітини-попередники.

Е. Композиції клітинних культур

Цей винахід також має на увазі клітинні композиції, що містять клітинні культури в живильних середовищах і ретровірус, а також одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну. Як описано в цій заявці, згідно з конкретними варіантами реалізації, зазначені композиції і способи застосовуються для клітинної генної терапії *ex vivo* і *in vivo*. Згідно з деякими варіантами реалізації, живильне середовище являється фармацевтично прийнятним живильним середовищем.

Терапевтична культура, клітинна культура, система культур або композиція клітинної культури, що містить клітинну композицію згідно з винаходом, може вводиться парентерально або перорально, окремо або в комбінації з іншими застосовними сполуками для досягнення бажаного терапевтичного ефекту, як, наприклад, одним або декількома факторами росту.

Відповідно до одного з типових варіантів реалізації, терапевтична культура, клітинна культура, система культур або композиція клітинної культури, що містить трансдуційовані клітини згідно з винаходом, вводиться системно шляхом ін'єкції в тканину.

Ф. Композиції і лікарські форми

Лікарські форми і композиції згідно з винаходом можуть містити комбінації будь-якої кількості трансдуційованих або нетрансдуційованих клітин, або їх комбінацій, вірусні вектори, поліпептиди, полінуклеотиди і одну або кілька сполук, наприклад, сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну і/або інгібітори деацетилази гістонів, описані в цій заявці, у формі фармацевтично і фізіологічно прийнятних розчинів (наприклад, живильних середовищ), для введення в клітини, тканини, органи або тваринний організм окремо або у комбінації відповідно до певних терапевтичних способів.

Певні лікарські форми і композиції *ex vivo* і *in vitro* згідно з винаходом можуть містити комбінації будь-якої кількості трансдуційованих або нетрансдуційованих клітин, або їх комбінацій, вірусні вектори і одну або кілька сполук, наприклад, сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну і/або інгібітори деацетилази гістонів, описані в цій заявці, у

формі фармацевтично і фізіологічно прийнятних розчинів (наприклад, живильних середовищ), для введення в клітини, тканини, органи або тваринний організм окремо або в комбінації відповідно до певних терапевтичних способів.

Певні лікарські форми і композиції *in vitro* згідно з винаходом можуть містити комбінації вірусних векторів і однієї або декількох сполук, наприклад, сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландину і/або інгібітори деацетилази гістонів, описані в цій заявці, у формі фармацевтично і фізіологічно прийнятних розчинів (наприклад, живильних середовищ), для введення в клітини, тканини, органи або тваринний організм окремо або в комбінації відповідно до певних терапевтичних способів.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, винахід забезпечує композиції, що містять терапевтично ефективну кількість трансдуційованих клітин, як описано в цій заявці, включену в лікарську форму разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними переносниками (добавками) і/або розчинниками (наприклад, у фармацевтично прийнятному живильному середовищі).

Згідно з конкретними варіантами реалізації цей винахід забезпечує композиції, що містять ретровірусний вектор і одон або кілька компонентів, що підсилюють сигнальний шлях простагландину EP, як описано в заявці, включені в лікарську форму разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними переносниками (добавками) і/або розчинниками (наприклад, у фармацевтично прийнятному живильному середовищі).

Згідно з конкретними варіантами реалізації цей винахід забезпечує композиції, що містять клітинні популяції, що містять стовбурові клітини або клітини-попередники, ретровірусний вектор і одон або кілька компонентів, що підсилюють сигнальний шлях простагландину EP, як описано в заявці, включені в лікарську форму разом з одним або декількома фармацевтично прийнятними переносниками (добавками) і/або розчинниками (наприклад, у фармацевтично прийнятному живильному середовищі). Згідно з певним варіантом реалізації клітинна популяція складається з кровотворних стовбурових клітин і клітин-попередників.

Цей винахід також відноситься до фармацевтичних композицій, що містять трансдуційовані клітини, отримані за допомогою способів, описаних у цій заявці, і фармацевтично прийнятних переносників. Згідно з іншими варіантами реалізації цей винахід забезпечує фармацевтичні композиції, що містять ретровірусний вектор і одну або кілька сполук, наприклад, сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландину і/або інгібіторів деацетилази гістонів, як описано в заявці.

Термін "фармацевтично прийнятний" відноситься до сполук, що не викликають алергічну або іншу подібну реакцію при введенні людині. Способи приготування водних композицій, що містять білок як активний компонент, добре відомі в даній галузі техніки. Як правило, такі композиції приготуються для ін'єкцій, у формі розчинів або суспензій; у формі твердих сполук для розчинів, суспензій або рідин, до введення. Крім того, для введення можна застосовувати емульсії.

У цій заявці, термін "переносник" відноситься до будь-якого роду розчинників, дисперсій, носіїв, обволікаючих речовин, розріджувачів, антибактеріальних і антигрибкових агентів, ізотонічних і сповільнюючих абсорбцію агентам, буферам, розчинам-переносникам, суспензіям, колоїдним розчинам і т.п. Застосування зазначених середовищ і агентів разом з фармацевтично активними речовинами добре відомо в даній галузі. Застосування будь-якого прийнятного середовища або агента мається на увазі винаходом, за умови його сумісності з активним інгредієнтом. Допоміжні активні інгредієнти також можуть входити до складу композицій.

У цій заявці термін "фармацевтично прийнятний переносник" відноситься до будь-якого роду розчинників, дисперсій, носіїв, обволікаючих речовин, розріджувачів, антибактеріальних і антигрибкових агентів, ізотонічних і сповільнюючих абсорбцію агентів і т.п., включаючи фармацевтично прийнятні живильні середовища, фізіологічно сумісний з композиціями згідно з винаходом. Відповідно до одного з варіантів реалізації композиція, що містить переносник, застосовна для парентерального введення, наприклад, внутрішньосудинного (внутрішньовенного або внутрішньоартеріального), інтраперитонеального або внутрішньом'язового. Фармацевтично прийнятні переносники включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для негайного приготування стерильних розчинів або дисперсій для ін'єкцій. Застосування таких середовищ і агентів для фармацевтично активних речовин добре відомо в даній галузі. Застосування будь-якого прийнятного середовища або агента для фармацевтичних композицій згідно з винаходом мається на увазі винаходом, за умови його сумісності з трансдуційованими клітинами.

Композиції згідно з винаходом можуть містити один або кілька поліпептидів, полінуклеотидів, векторів, що включають сполуки, що підсилюють сигнальний шлях простагландину EP, інгібіторів

деацетилази гістонів і трансдуційовані клітини і т.п., як описано в цій заявці, у формі фармацевтично і фізіологічно прийнятних розчинів для введення в клітини або у тваринний організм окремо, або в комбінації з іншими терапевтичними формами. Очевидно також, що при необхідності композиції згідно з винаходом можуть вводитися в комбінації з іншими агентами, такими як цитокіни, фактори росту, гормони, низькомолекулярні сполуки та різні фармацевтично активні агенти. За умови, що допоміжні агенти не порушують здатність композицій ефективно виконувати відповідну геннотерапевтичну функцію, не існує обмежень для агентів, які можуть входити до складу композицій згідно з винаходом.

Відносно фармацевтичних композицій згідно з винаходом лікарські форми фармацевтично прийнятних допоміжних речовин і розчинів-переносників добре відомі в даній галузі техніки, також як і визначення доз і схем лікування, включаючи, наприклад, пероральне, парентеральне, внутрішньовенне, інтраназальне і внутрішньом'язове введення препарату.

У певних умовах необхідно вводити композиції, описані в цій заявці, парентерально, внутрішньовенно, внутрішньом'язово або навіть інтраперитонеально, як описано, наприклад, у патентах США №№ 5,543,158; 5,641,515 і 5,399,363 (зміст кожного з яких повністю включено в цю заявку шляхом посилання). Розчини активних сполук можуть бути приготовлені шляхом перемішування у воді, змішаній з поверхнево-активною речовиною, такою як гідроксипропілцелюлоза, у формі вільних основ або фармацевтично прийнятних солей. Дисперсії також можуть бути приготовлені в гліцерині, рідкому поліетилен гліколі, а також їх сумішах і оліях. У стандартних умовах зберігання і застосування зазначені препарати містять агенти, що запобігають росту мікроорганізмів.

Фармацевтичні форми, застосовні для ін'єкцій, включають стерильні водні розчини або дисперсії і стерильні порошки для негайного приготування стерильних розчинів і дисперсій для ін'єкцій (патент США № 5,466,468, повністю включений у цю заявку шляхом посилання). При будь-яких умовах форма повинна бути стерильною і досить рідкою для введення через голку. Також форма повинна бути стійкою в умовах виробництва та зберігання і повинна бути захищена від контамінації мікроорганізмами, такими як бактерії або гриби. Переносник може являти собою розчинник або дисперсне середовище, що містить, наприклад, воду, етанол, поліол (наприклад, гліцерин, пропілен гліколь, рідкий поліетилен гліколь і т.п.), їх суміші і/або рослинні олії. Відповідна текучість може бути досягнута, наприклад, за допомогою обволікаючої речовини, такої як лецитин, частинки якого мають певний розмір, або за допомогою ПАВ. Запобігання контамінації мікроорганізмів може забезпечуватися різними антибактеріальними і антигрибковими агентами, наприклад, парабеном, хлорбутанолом, фенолом, сорбіновою кислотою, тімеросалом і т.п. Як правило, краще застосування ізотонічних агентів, наприклад, цукрів або хлориду натрію. Уповільнена абсорбція композицій, що вводяться, може бути забезпечена за допомогою агентів, що сповільнюють абсорбцію, наприклад, моностеарату алюмінію і желатину.

Для парентерального введення водного розчину розчин повинен при необхідності бути в достатній мірі розведений буфером, а рідкий розчинник розведений відповідною кількістю сольового розчину або глюкози для досягнення ізотонічності. Зазначені водні розчини, зокрема, застосовні для внутрішньовенного, внутрішньом'язового, підшкірного та інтраперитонеального введення. У цьому випадку, застосовні стерильні водні середовища в контексті цього винаходу добре відомі фахівцям у даній галузі. Наприклад, одна доза може бути розчинена в 1 мл ізотонічного розчину NaCl і або додана в 1000 мл рідини для введення або введена у відповідне місце ін'єкції (див., наприклад, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2005). Залежно від стану суб'єкта, що піддається лікуванню, дозування може мінятися. Відповідальний за введення фахівець у будь-якому випадку визначає необхідну дозу у випадку кожного окремого суб'єкта. Крім того, при введенні людині препарати повинні відповідати стандартам стерильності, апірогенності і очищення Відділу Біологічних Стандартів FDA.

Стерильні розчини для ін'єкцій можуть бути приготовлені шляхом змішування активних сполук у відповідному об'ємі прийнятного розчинника з різними іншими інгредієнтами, зазначеними вище, з наступною стерилізацією фільтрацією. Як правило, дисперсії приготують шляхом введення різних стерильних активних інгредієнтів у стерильний контейнер, що містить основне дисперсне середовище і різні необхідні додаткові інгредієнти, зазначені вище. У випадку стерильних порошків для одержання стерильних розчинів для ін'єкцій, кращими способами приготування є сушіння у вакуумі і заморожування-висушування, з одержанням порошку активного інгредієнта і будь-який необхідний додатковий інгредієнт з вихідного розчину, що піддався стерилізації фільтрацією.

Композиції, описані в цій заявці, можуть бути в нейтральній формі або у формі солі. Фармацевтично прийнятні солі включають солі, отримані за допомогою додавання кислоти (при зв'язуванні вільних аміногруп білка), при додаванні мінеральних кислот, наприклад, соляної або фосфорної кислоти, або органічних кислот, наприклад, оцтової, щавлевої, винної, мигдальної і т.п. Солі, одержувані при зв'язуванні вільних карбоксильних груп, можуть бути отримані при додаванні неорганічних основ, наприклад, гідроксиду натрію, калію, амонію, кальцію або заліза, або органічних основ, наприклад, ізопропіламіну, триметиламіну, гістидину, прокаїну і т.п. Готові лікарські форми вводяться в терапевтично ефективних формах і кількостях. Лікарські форми можуть вводитися у різний спосіб: у вигляді розчинів для ін'єкцій, у вигляді капсул з вивільненням активної речовини і т.п.

Композиції можуть вводитися за допомогою інтраназальних спреїв, інгаляцій і/або інших типів аерозолів. Способи введення композицій, що містять гени, полінуклеотиди і поліпептиди, безпосередньо в легені за допомогою назальних аерозолів описані, наприклад, у патентах США № 5,756,353 і 5,804,212 (кожний з яких повністю включений у цю заявку шляхом посилання). Також, у фармацевтиці добре відомі способи введення препаратів за допомогою інтраназальних полімерних мікрочастинок (Takenaga et al., 1998) і сполук лізофосфатилділгліцерину (патент США № 5,725,871, повністю включений у цю заявку шляхом посилання). Також, у патенті США № 5,780,045 (повністю включеному в цю заявку шляхом посилання) описане кризьслизове введення у формі політетрафторетиленової матриці-носія.

Згідно з конкретними варіантами реалізації доставка здійснюється за допомогою ліпосом, нанокapsул, мікрочастинок, мікросфер, жирових частинок, пухирців, при необхідності, пов'язаних з поліпептидом казеїну (CPP) і т.п., для введення композицій згідно з винаходом у відповідні клітини-хазяї. Зокрема, композиції згідно з винаходом для введення можуть бути інкапсульовані в жирову частинку, ліпосому, пухирець, наносферу, наночастинку і т.п. Одержання і застосування таких лікарських форм здійснюється способами, відомими в даній галузі. Лікарські форми і композиції згідно з винаходом можуть містити один або декілька репресорів і/або активаторів, що включають комбінацію з будь-якої кількості поліпептидів, полінуклеотидів і низькомолекулярних сполук, як описано в цій заявці, у формі фармацевтично і фізіологічно прийнятних розчинів (наприклад, живильних середовищ) для введення в клітини або у тваринний організм окремо або в комбінації з іншими терапевтичними способами. Очевидно також, що при необхідності композиції згідно з винаходом можуть вводитися в комбінації з іншими агентами, наприклад, клітинами, іншими білками або поліпептидами, або різними фармацевтично активними агентами.

Згідно з конкретними варіантами реалізації цей винахід забезпечує лікарські форми або композиції, застосовні для доставки систем вірусних векторів (тобто, вірусної трансдукції), включаючи, але не обмежуючись, ретровірусні (наприклад, лентивірусні) вектори.

Типові лікарські формули для доставки ex vivo можуть також включати різні агенти для трансфекції, такі як фосфат кальцію, електропорацію, тепловий шок і різні форми ліпосом (тобто, ліпідна трансфекція). Ліпосоми, як описано докладно нижче, являють собою ліпідний бішар з укладеною всередині рідкою водною фракцією. ДНК мимоволі зв'язується із зовнішньою катіонною поверхнею ліпосом (завдяки своєму заряду), і ліпосоми взаємодіють з клітинною мембраною.

Згідно з деякими аспектами цей винахід забезпечує фармацевтично прийнятні композиції, що містять терапевтично ефективну кількість одного або декількох полінуклеотидів або поліпептидів, описаних у цій заявці, у комбінації з одним або декількома фармацевтично прийнятними переносниками (добавками) і/або розріджувачів (наприклад, фармацевтично прийнятним живильним середовищем).

Окремі варіанти реалізації можуть включати інші лікарські форми, відомі в даній галузі і описані, наприклад, в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20th Edition. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2005.

Згідно з конкретними варіантами реалізації композиції згідно з винаходом містять ефективну кількість композиції і, при необхідності, один або декілька додаткових терапевтичних агентів. Згідно з конкретними варіантами реалізації цього винаходу композиції, що містять клітини і, при необхідності, один або декілька додаткових терапевтичних агентів, можуть також містити стерильний соляний розчин, розчин Рінгера, збалансований соляний розчин Хенкса (HBSS) або Isolyte S, pH 7,4, живильне середовище, що не містить сироватку або інше фармацевтично прийнятне середовище (наприклад, живильне середовище), як описано в цій заявці.

Згідно з конкретними варіантами реалізації композиція містить клітинну популяцію, а також одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів, кожний з яких перебуває в підсумковій концентрації,

приблизно рівній від 1 мкМ до 100 мкМ. Згідно з конкретними варіантами реалізації композиція містить клітинну популяцію, а також одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів, кожний з яких перебуває в підсумковій концентрації, приблизно рівній від 1×10^{-14} М до 1×10^{-3} М, від 1×10^{-13} М до 1×10^{-4} М, від 1×10^{-12} М до 1×10^{-5} М, від 1×10^{-11} М до 1×10^{-4} М, від 1×10^{-11} М до 1×10^{-5} М, від 1×10^{-10} М до 1×10^{-4} М, від 1×10^{-10} М до 1×10^{-5} М, від 1×10^{-9} М до 1×10^{-4} М, від 1×10^{-9} М до 1×10^{-5} М, від 1×10^{-8} М до 1×10^{-4} М, від 1×10^{-7} М до 1×10^{-4} М, від 1×10^{-6} М до 1×10^{-4} М, або рівній будь-якому проміжному значенню в межах зазначених вище.

Відповідно до іншого певного варіанту реалізації композиція містить клітинну популяцію, а також одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів, кожний з яких перебуває в підсумковій концентрації, приблизно рівній 1×10^{-14} М, 1×10^{-13} М, 1×10^{-12} М, 1×10^{-10} М, 1×10^{-9} М, 1×10^{-8} М, 1×10^{-7} М, 1×10^{-6} М, 1×10^{-5} М, 1×10^{-4} М, 1×10^{-3} М, або рівній будь-якому проміжному значенню в межах зазначених вище. У композиціях, що містять одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів, концентрації цих агентів можуть бути рівними або відрізнятися одна від одної.

Фахівець у даній галузі техніки стандартними способами визначить прийнятний спосіб введення і ефективну дозу композиції, що містить трансдуційовані клітини і/або одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів згідно з винаходом. Також фахівцеві в даній галузі техніки стане очевидно, що при певних методиках лікування для досягнення необхідного ефекту необхідне кількаразове введення фармацевтичних композицій згідно з винаходом.

Наприклад, композиція може вводитися 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 або більше разів протягом 1, 2, 3, тижнів, 1, 2, 3, 4, 5, 6 місяців, 1, 2, 5, 10 або більше років.

Крім того, курс багаторазового введення тих самих або різних композицій згідно з винаходом може повторюватися кілька разів протягом тривалого проміжку часу, як зазначено вище.

Крім того, введення композиції, що містить трансдуційовані клітини і/або одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів може проводитися тим самим або різними способами, як описано в цій заявці. Введення композиції, що містить трансдуційовані клітини і/або одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів може також здійснювати в різних місцях введення тим самим або різними способами. Крім того, введення композиції, що містить трансдуційовані клітини і/або одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів може здійснюватися в тому самому місці введення тим самим способом, одночасно або в різний час.

G. Способи генної терапії

Трансдуційовані клітини і відповідні ретровірусні вектори забезпечують удосконалені способи проведення генної терапії. У цій заявці, термін "генна терапія" відноситься до впровадження гена в геном клітини. Згідно з різними варіантами реалізації, вірусний вектор згідно з винаходом містить послідовність, що регулює експресію в кровотворних клітинах, що експресує терапевтичний трансген, який кодує поліпептид, що забезпечує лікувальний, профілактичний ефект, або полегшуючий перебіг порушень у суб'єкта, що страждає, або підозрюваного на наявність моногенного захворювання, порушення або патологічного стану, що підлягає терапії кровотворними стовбуровими клітинами.

Відповідно до одного з кращих варіантів реалізації винахід забезпечує трансдуційовані клітини, потенційно здатні диференціювати в клітини мікроглії головного мозку. Згідно з конкретними варіантами реалізації, кровотворні стовбурові клітини трансдуціюються вектором згідно з винаходом і вводяться суб'єктові, що потребує лікування аденолейкодистрофії або аденомієлонеуропатії. Кровотворні стовбурові клітини є попередниками клітин мікроглії головного мозку і тому є кращими.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, трансдуційовані кровотворні стовбурові клітини або клітини-попередники містять вірусний вектор, що містить послідовність, що регулює експресію в кровотворних клітинах, що експресує терапевтичний трансген, який кодує поліпептид, що забезпечує лікувальний, профілактичний ефект, або полегшуючий перебіг порушень у суб'єкта, що страждає, або підозрюваного на наявність моногенного захворювання, порушення або патологічного стану системи кровотворення.

Композиції, що містять вірус, наприклад, лентівірус і/або одну або кілька сполук, що підсилюють сигнальний шлях простагландіну EP і/або один або кілька інгібіторів деацетилази гістонів, можуть інфікувати і трансдуціювати клітини *in vivo*, *ex vivo* або *in vitro* з більшою

ефективністю, ніж вектор у відсутності зазначених сполук. Згідно з варіантами реалізації *ex vivo* і *in vitro*, трансдуційовані клітини можуть вводитися пацієнтові, що потребує лікування. Цей винахід має на увазі, що вектор, вірусні частинки і трансдуційовані клітини згідно з винаходом застосовуються для лікування, профілактики або полегшення плинного моногенного захворювання, порушення або патологічного стану, або захворювання, порушення або патологічного стану системи кровотворення суб'єкта, наприклад, гемоглобінопатії.

У цій заявці, термін "кровотворення" відноситься до утворення і розвитку кров'яних клітин з клітин-попередників, а також клітин-попередників зі стовбурових клітин. Кров'яні клітини включають, але не обмежуються зазначеними: еритроцити (червоні кров'яні клітини), ретикулоцити, моноцити, нейтрофіли, мегакаріоцити, еозинофіли, базофіли, В-клітини, макрофаги, гранулоцити, гладкі клітини, тромбоцити і лейкоцити.

У цій заявці, термін "гемоглобінопатія" відноситься до будь-якого роду порушень, що характеризуються присутністю в крові аномальних молекул гемоглобіну. Приклади гемоглобінопатій включають, але не обмежуються: гемоглобіноз С, серпоподібноклітинну анемію і таласемію. Також, сюди входять гемоглобінопатії, при яких у крові присутні різні типи аномального гемоглобіну (наприклад, серпоподібноклітинна анемія/гемоглобіноз С).

Термін "серпоподібноклітинна анемія" у цій заявці відноситься до будь-якого стану з симптомами анемії, викликаного присутністю в крові еритроцитів серпоподібної форми. Прояви серпоподібноклітинної анемії включають: анемію, болі і/або дисфункцію органів, наприклад, ниркову недостатність, ретинопатію, гострий грудний синдром, ішемію, приапізм та інсульт. У цій заявці термін "серпоподібноклітинна анемія" відноситься до різних клінічних проявів захворювання, зокрема у пацієнтів, гомозиготних по заміщенню в гені HbS. У числі характерних проявів серпоподібноклітинної анемії, описаних у цій заявці, відставання в рості і розвитку, схильність до важких інфекційних захворювань, що зокрема, викликаються пневмококом, виражені ураження селезінки, що призводить до порушення функції виведення бактерій з циркуляції, з рецидивуючим інфарктом і, зрештою, руйнуванням тканини селезінки. Також термін "серпоподібноклітинна анемія" має на увазі гострі епізоди скелетно-м'язового болю, особливо вираженого в поперековій області хребта, у черевній області і у тілі стегнової кістки, за механізмом і виразністю подібні з болями при декомпресійній хворобі. У дорослих це, як правило, проявляється в невисокій або середній інтенсивності короточасних нападах з інтервалом у кілька тижнів або місяців, і щорічному нападі нестерпного болю щорічно, що тривають приблизно 5-7 днів. Причини, що викликають такі напади, включають ацидоз, гіпоксію і зневоднювання, що є, у свою чергу, причиною внутрішньоклітинної полімеризації HbS (J.H. Jandl, Blood: Textbook of Hematology, 2nd Ed., Little, Brown and Company, Boston, 1996, pages 544-545). У цій заявці термін "таласемія" охоплює вроджені анемії, викликані мутаціями, що порушують синтез гемоглобіну. Таким чином, цей термін включає усі випадки анемії, що протікають симптомно, викликані таласемічними станами, наприклад, важку або β -таласемію, велику таласемію, середню таласемію, α -таласемію, як гемоглобіноз Н.

У цій заявці "таласемія" відноситься до спадкоємного порушення, що характеризується виробленням дефектного гемоглобіну. Приклади таласемії включають α - і β -таласемію. β -таласемії викликаються мутацією в β -ланцюзі глобіну і можуть проявлятися у великій і малій формах. При великій формі діти народжуються нормальними, а захворювання розвивається протягом першого року життя. При малій формі виробляються еритроцити маленького розміру. Мала форма розвивається, якщо дефектний ген передано одним з батьків. Особи, що страждають цією формою таласемії, є носіями захворювання, яке, як правило, протікає безсимптомно.

α -таласемія, як правило, викликана делеціями в генах HBA1 і HBA2. Обоє ці гени кодують α -глобін, що є субодиницею гемоглобіну. У кожному клітинному геномі присутні по дві копії гена HBA1 і HBA2. У результаті, α -глобін кодується чотирма алелями. Різні форми α -таласемії викликаються втратою декількох або всіх цих алелей. Синдром гемоглобіну Барта, будучи найбільш важкою формою α -таласемії, виникає при втраті всіх чотирьох алелей α -глобіну. Гемоглобіноз Н виникає при втраті трьох із чотирьох алелей α -глобіну. При обох цих станах недолік α -глобіну не дозволяє клітинам виробляти нормальний гемоглобін. Замість цього, клітини виробляють дефектні форми гемоглобіну, відомі як гемоглобін Барта або гемоглобін Н. Зазначені дефектні форми гемоглобіну нездатні ефективно забезпечувати тканини киснем. Заміщення нормального гемоглобіну гемоглобіном Барта або гемоглобіном Н викликає анемію та інші важкі порушення організму, асоційовані з α -таласемією.

Згідно з кращим варіантом реалізації способи генної терапії згідно з винаходом застосовуються для лікування, профілактики або полегшення перебігу гемоглобінопатій, що

входять у групу, що включає: гемоглобіноз ІЗ, серпоподібноклітинну анемію, уроджену анемію, таласемію, β -таласемію, велику таласемію, середню таласемію, α -таласемію і гемоглобіноз Н.

Згідно з різними варіантами реалізації, ретровірусний вектор вводиться безпосередньо в клітини, у тканини, в органи або в організм суб'єкта, що піддається генній терапії, *in vivo*.
 5 Відповідно до інших різних варіантів реалізації, клітини трансдуціюються векторами згідно з винаходом *in vitro* або *ex vivo* і, при необхідності культивуються *ex vivo*. Після цього клітини вводять суб'єктові, що піддається генній терапії.

Клітини, застосовні для трансдуції і введення способами генної терапії згідно з винаходом, включають, але не обмежуються зазначеними: стовбурові клітини, клітини-попередники і
 10 диференційовані клітини, як описано в цій заявці. Згідно з конкретними варіантами реалізації трансдуційовані клітини являють собою ембріональні стовбурові клітини, індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, стовбурові клітини кісткового мозку, стовбурові клітини пуповини, плацентарні стовбурові клітини, мезенхімальні стовбурові клітини, стовбурові нервові клітини, стовбурові клітини печінки, стовбурові клітини підшлункової залози, стовбурові клітини
 15 серця, стовбурові клітини нирок, кровотворні стовбурові клітини, як описано в цій заявці.

Згідно з кращими варіантами реалізації трансдуційовані клітини являють собою кровотворні стовбурові клітини і/або клітини-попередники, виділені з кісткового мозку, крові пуповини або периферичної крові. Відповідно до певних кращих варіантів реалізації трансдуційовані клітини
 20 являють собою кровотворні стовбурові клітини, виділені з кісткового мозку, крові пуповини або периферичної крові.

Кровотворні стовбурові клітини можуть розпізнаватися за певним фенотиповим або генотиповим маркером. Наприклад, кровотворні стовбурові клітини можуть бути розпізнані за їхнім невеликим розміром, відсутністю маркерів клітинної лінії (lin), слабким фарбуванням (бічної популяції) вітальними барвниками, такими як родамін 123 (rhodamineDULL, що також
 25 позначається як rholo) або Hoechst 33342, і присутністю різних антигенних маркерів на поверхні, багато з яких належать до сімейства кластерів диференціації (наприклад, CD34, CD38, CD90, CD133, CD105, CD45, Ter119 і c-kit, рецептор фактора стовбурових клітин). Кровотворні стовбурові клітини, як правило, не несуть маркери, що застосовуються для виявлення детермінації диференціювання і, таким чином, часто позначаються як Lin(-) клітини.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, кровотворні стовбурові клітини людини характеризуються як CD34+, CD59+, Thy1/CD90+, CD38lo/-, C-kit/CD117+ і Lin(-). Проте, деякі з них є CD34-/CD38-. Також деякі дослідження показали, що найменш зрілі стовбурові клітини можуть не нести c-kit на поверхні. У випадку кровотворних стовбурових клітин людини, CD133 може вважатися раннім маркером, через те, що як CD34+, так і CD34- клітини є CD133+. У даній
 35 галузі техніки відомо, що CD34+ і Lin(-) клітини також включають кровотворні клітини-попередники.

Згідно з іншим варіантом реалізації, ієрархія кровотворних клітин визначається за допомогою коду сигнальної молекули активації лімфоцитів (SLAM). Сімейство SLAM (Signaling lymphocyte activation molecule) являє собою групу з більш 10 молекул, чиї гени розташовані, як
 40 правило, тандемами в межах одного локусу на хромосомі 1 (миші), що належать до підгрупи суперсімейства імуноглобулінів, і які первісно, як передбачається, брали участь в активації Т-клітин. Це сімейство включає CD48, CD150, CD244 і т.п., де CD150 вважається основним членом сімейства і також позначається як slamF1, тобто, перший член сімейства (SLAM family member 1). Позначення SLAM визначає ієрархію кровотворних клітин: стовбурова кровотворна клітина (HSC) - CD150+CD48-CD244-; мультипотентна клітина-попередник (MPP) - CD150-CD48-CD244+;
 45 лінійно-специфічна клітина-попередник (LRP) - CD150-CD48+CD244+; загальна мієлоїдна клітина-попередник (CMP) - lin-SCA-1-c-kit+CD34+CD16/32mid; гранулоцитарно-макрофагальна клітина-попередник (GMP) - lin-SCA-1-c-kit+CD34+CD16/32hi; і еритро-мегакаріоцитарна клітина-попередник (MEP) - lin-SCA-1-c-kit+CD34-CD16/32low.

Група Ірвінга Ваймана (Irving Weissman) уперше виділила стовбурові кровотворні клітини миші в Стенфордському університеті у 1988 і вперше виявила маркери, що дозволяють визначити ієрархію кровотворних клітин мишей. Маркери довгоіснуючої стовбурової кровотворної клітини long-term hematopoietic stem cells (LT-HSC) - CD34-, SCA-1+, Thy1.1+lo, C-kit+, lin-, CD135-, Slamf1/CD150+; короткоіснуючої стовбурової кровотворної клітини short-term hematopoietic stem cells (ST-HSC) - CD34+, SCA-1+, Thy1.1+lo, C-kit+, lin-, CD135-, Slamf1/CD150+, Mac-1 (CD11b)lo; ранніх поліпотентних попередників early multipotent progenitors – (Early MPP) - CD34+, SCA-1+, Thy1.1-, C-kit+, lin-, CD135+, Slamf1/CD150-, Mac-1 (CD11b)lo, CD4lo; і пізніх поліпотентних попередників late multipotent progenitors (Late MPP) - CD34+, SCA-1+, Thy1.1-, C-kit+, lin-, CD135high, Slamf1/CD150-, Mac-1 (CD11b)lo, CD4lo.
 55

Відповідно до одного з варіантів реалізації кровотворні клітини являють собою CD105+Sca1+ клітини.

Клітини згідно з винаходом можуть бути аутологічними/аутогенними ("власними"), або неаутологічними ("не власними", наприклад, алогенними, сингенними або ксеногенними). "Аутологічний" у даній заявці відноситься до клітини самого суб'єкта. "Алогенний" у даній заявці відноситься до клітини, організму того ж виду, але генетично відмінної від клітин суб'єкта. "Сингенний" у даній заявці відноситься до клітини іншого суб'єкта, генетично ідентичної клітинам самого суб'єкта. "Ксеногенний" у даній заявці відноситься до клітини організму іншого виду. Згідно з кращими варіантами реалізації, клітини згідно з винаходом є алогенними.

"Суб'єкт" у цій заявці відноситься до будь-якої тварини, що страждає моногенним захворюванням, порушенням або патологічним станом, який може виліковуватися геннотерапевтичними векторами, клітинної терапії або іншими способами, описаними в цій заявці. Згідно з кращими варіантами реалізації суб'єкт може бути будь-якою твариною, у якій виявлені симптоми захворювання, порушення або патологічного стану кровотворної системи, наприклад, гемоглобінопатії, яка може виліковуватися геннотерапевтичними векторами, клітинної терапії або іншими способами, описаними в цій заявці. Суб'єкти згідно з винаходом (наприклад, пацієнти) включають лабораторних тварин (таких як миші, пацюки, кролики або морські свинки), сільськогосподарських тварин і свійських тварин (таких як кішки і собаки). Примати і, краще, люди також можуть бути пацієнтами. Як правило, суб'єкти відносяться до тварин, що характеризуються аномальними фізіологічними характеристиками (якісно і/або кількісно відмінними від таких, властивих "нормальним" або "здоровим" суб'єктам), які можуть бути приведені в норму за допомогою генної терапії.

У цій заявці терміни "лікування", "вилікування" включають будь-які бажані або позитивні ефекти відносно симптомів або патологічних станів і можуть включати навіть мінімальні помітні поліпшення перебігу зазначеного захворювання або патологічного стану. Вилікування може включати ослаблення симптомів або поліпшення плинності захворювання або патологічного стану, а також затримку прогресування захворювання або патологічного стану. "Лікування" не обов'язково означає повне лікування захворювання або патологічного стану або повне зникнення симптомів.

У цій заявці, "профілактика" і т.п. відноситься до запобігання, придушення або зниження ймовірності виникнення або рецидиву захворювання або патологічного стану. Також, профілактика відноситься до затримки початку або рецидиву захворювання або патологічного стану, а також прояву симптомів. У цій заявці "профілактика" і т.п. також відносяться до зниження тяжкості перебігу захворювання або патологічного стану до його початку або рецидиву.

У цій заявці термін "число" або "кількість" відноситься до "ефективної кількості" вірусу або терапевтичних клітин, достатньої для досягнення позитивного або бажаного профілактичного або терапевтичного результату, включаючи клінічні наслідки.

"Профілактично ефективна кількість" відноситься до кількості вірусу або трансдуційованих терапевтичних клітин, достатньої для досягнення бажаного профілактичного результату. Як правило, але не обов'язково, оскільки профілактична доза застосовується до прояву або на ранній стадії захворювання, профілактично ефективна доза нижче терапевтично ефективної дози.

"Терапевтично ефективна кількість" вірусу або трансдуційованих терапевтичних клітин може варіювати залежно від ряду факторів, таких як стадія захворювання, вік, стать і вага суб'єкта, а також від здатності стовбурових клітин або клітин-попередників викликати бажаний ефект в організмі суб'єкта. Також, терапевтично ефективна кількість відноситься до кількості, при застосуванні якої будь-якого роду токсичні або негативні ефекти відіграють якісно меншу роль у порівнянні з терапевтично позитивними ефектами. Термін "терапевтично ефективна кількість" означає кількість, достатню для "ефективного" лікування суб'єкта (наприклад, пацієнта).

Не обмежуючись ніякою з існуючих теорій, важливою перевагою векторів, композицій і способів згідно з цим винаходом є висока ефективність генної терапії, що досягається введенням клітинних популяцій, що містять високу частину трансдуційованих клітин, у порівнянні з існуючими способами.

Трансдуційовані клітини можуть вводитися як частина кісткового мозку або трансплантата крові пуповини суб'єктові, що пройшов або не пройшов аблятивну терапію кісткового мозку. Відповідно до одного з варіантів реалізації, трансдуційовані клітини згідно з винаходом вводяться в складі трансплантата кісткового мозку суб'єктові, що пройшов аблятивну хіміо- або радіотерапію кісткового мозку.

Відповідно до одного з варіантів реалізації, трансдуційовані клітини вводяться внутрішньовенно. Згідно з кращими варіантами реалізації, суб'єктові внутрішньовенно вводяться трансдуційовані кровотворні стовбурові клітини.

Відповідно до одного типового варіанту реалізації ефективна кількість трансдуційованих клітин, що вводяться суб'єктові, становить менш ніж 1×10^{12} клітин на 100 кг, менш ніж 1×10^{11} клітин на 100 кг, менш ніж 1×10^{10} клітин на 100 кг, менш ніж 1×10^9 клітин на 100 кг, менш ніж 1×10^8 клітин на 100 кг, менш ніж 1×10^7 клітин на 100 кг, менш ніж 5×10^6 клітин на 100 кг, менш ніж 4×10^6 клітин на 100 кг, менш ніж 3×10^6 клітин на 100 кг, менш ніж 2×10^6 клітин на 100 кг, менш ніж 1×10^6 клітин на 100 кг, менш ніж 5×10^5 клітин на 100 кг, менш ніж 4×10^5 клітин на 100 кг, менш ніж 3×10^5 клітин на 100 кг, менш ніж 2×10^5 клітин на 100 кг, менш ніж 1×10^5 клітин на 100 кг, менш ніж 5×10^4 клітин на 100 кг або менш ніж 1×10^4 клітин на 100 кг ваги суб'єкта.

Відповідно до іншого типового варіанту реалізації ефективна кількість трансдуційованих клітин, що вводяться суб'єктові, становить приблизно 1×10^{12} клітин на 100 кг, приблизно 1×10^{11} клітин на 100 кг, приблизно 1×10^{10} клітин на 100 кг, приблизно 1×10^9 клітин на 100 кг, приблизно 1×10^8 клітин на 100 кг, приблизно 1×10^7 клітин на 100 кг, приблизно 5×10^6 клітин на 100 кг, приблизно 4×10^6 клітин на 100 кг, приблизно 3×10^6 клітин на 100 кг, приблизно 2×10^6 клітин на 100 кг, приблизно 1×10^6 клітин на 100 кг, приблизно 5×10^5 клітин на 100 кг, приблизно 4×10^5 клітин на 100 кг, приблизно 3×10^5 клітин на 100 кг, приблизно 2×10^5 клітин на 100 кг, приблизно 1×10^5 клітин на 100 кг, приблизно 5×10^4 клітин на 100 кг або приблизно 1×10^4 клітин на 100 кг.

Відповідно до іншого типового варіанту реалізації ефективна кількість трансдуційованих клітин, що вводяться суб'єктові, становить приблизно від 1×10^1 клітин на 100 кг до приблизно 1×10^{12} клітин на 100 кг, від приблизно 1×10^2 клітин на 100 кг до приблизно 1×10^{11} клітин на 100 кг, від приблизно 1×10^3 клітин на 100 кг до приблизно 1×10^{10} клітин на 100 кг, від приблизно 1×10^4 клітин на 100 кг до приблизно 1×10^9 клітин на 100 кг, від приблизно 1×10^5 клітин на 100 кг до приблизно 1×10^8 клітин на 100 кг, від приблизно 1×10^6 клітин на 100 кг до приблизно 1×10^7 клітин на 100 кг, або будь-яке інше проміжне значення в межах зазначених на 100 кг.

Згідно з різними варіантами реалізації спосіб згідно з винаходом забезпечує більш ефективну і безпечну генну терапію у порівнянні з існуючими способами і включає введення суб'єктові клітинної популяції, що містить приблизно 5 % трансдуційованих клітин, приблизно 10 % трансдуційованих клітин, приблизно 15 % трансдуційованих клітин, приблизно 20 % трансдуційованих клітин, приблизно 25 % трансдуційованих клітин, приблизно 30 % трансдуційованих клітин, приблизно 35 % трансдуційованих клітин, приблизно 40 % трансдуційованих клітин, приблизно 45 % трансдуційованих клітин, приблизно 50 % трансдуційованих клітин, приблизно 55 % трансдуційованих клітин, приблизно 60 % трансдуційованих клітин, приблизно 65 % трансдуційованих клітин, приблизно 70 % трансдуційованих клітин, приблизно 75 % трансдуційованих клітин, приблизно 80 % трансдуційованих клітин, приблизно 85 % трансдуційованих клітин, приблизно 90 % трансдуційованих клітин, приблизно 95 % трансдуційованих клітин, приблизно 98 % трансдуційованих клітин або приблизно 100 % трансдуційованих клітин.

Згідно з різними варіантами реалізації вектори, композиції і способи згідно з винаходом забезпечують поліпшені способи генної терапії за допомогою застосування генної терапії ex vivo і аутологічної трансплантації. Відповідно до одного з кращих варіантів реалізації винахід забезпечує трансдуційовані клітини, такі як стовбурові клітини, наприклад, кровотворні стовбурові клітини. Згідно з конкретними варіантами реалізації, кровотворні стовбурові клітини трансдуціюються вектором згідно з винаходом і вводяться суб'єктові, що потребує лікування гемоглобінопатії.

Згідно з конкретними варіантами реалізації, кровотворні стовбурові клітини трансдуціюються вектором згідно з винаходом і вводяться суб'єктові, що потребує лікування адренолейкодистрофії або адреномієлонеуропатії.

Відповідно до одного з кращих варіантів реалізації винахід забезпечує вдосконалені системи вірусних векторів, оптимізованих для експресії великої кількості одного або декількох терапевтичних білків в еритроїдних клітинах і в еритроїдних клітинах-попередниках. Більше того, ретровірусні вектори (включаючи лентівірусні вектори) згідно з винаходом містять полінуклеотид, що представляє інтерес, включаючи, наприклад, ген глобіну або ген, що запобігає серпоподібноклітинній анемії. Відповідно до одного з варіантів реалізації ген глобіну, що експресується у ретровірусному векторі згідно з винаходом, являє собою β -глобін, α -глобін або γ -глобін. Згідно з іншим варіантом реалізації, ген β -глобіну людини являє собою ген β -глобіну дикого типу або ген β^A -глобіну людини. Згідно з іншим варіантом реалізації ген β -глобіну людини піддається одній або декільком делеціям в інтронних послідовностях або являє собою

мутований ген β -глобіну людини, що кодує щонайменше один амінокислотний залишок, що запобігає серпоподібноклітинній анемії. Амінокислоти, що запобігають серпоподібноклітинній анемії, можуть походити з дельта-глобіну або γ -глобіну людини. Згідно з іншим варіантом реалізації мутований ген β -глобіну людини характеризується заміною треоніну глутаміном у кодоні 87 87 (β^{A-T87Q}).

Ретровірусні вектори (включаючи лентивірусні вектори) згідно з винаходом можуть застосовуватися в генній терапії, у тому числі в лікуванні гемоглобінопатій. Згідно з конкретними варіантами реалізації винахід забезпечує способи застосування векторів для досягнення стійкої інтенсивної експресії генів в еритроїдних клітинах, наприклад, для лікування захворювань, специфічних до еритроїдних клітин. Згідно з певним варіантом реалізації вектори для генної терапії застосовуються для лікування гемоглобінопатій, включаючи, наприклад, серпоподібноклітинну анемію. Відповідно до іншого кращого варіанту реалізації вектори для генної терапії застосовуються для лікування таласемій, включаючи, але не обмежуючись, β -таласемію.

Відповідно до іншого кращого варіанту реалізації кровотворні стовбурові клітини трансдуціюються вектором згідно з винаходом, що містить ген ABCD1 для лікування адренолейкодистрофії і/або адреномієлонеуропатії.

Цей винахід більш докладно описується в прикладах, представлених нижче. Винахід, проте, може бути реалізований в різних варіантах і не обмежується наведеними варіантами реалізації; навпаки, зазначені варіанти реалізації наведені для більш повного і докладного опису, що дозволяє повною мірою оцінити обсяг винаходу фахівцям у даній галузі техніки.

ПРИКЛАДИ

ПРИКЛАД 1

ПОПЕРЕДНЯ СТИМУЛЯЦІЯ КЛІТИН ПЕРЕД ТРАНСДУКЦІЄЮ

CD34⁺ клітини (AllCells) у контейнері розтоплювали, витримуючи при 37 °C 1-2 хвилини, після чого вміст поміщали в 10 мл Живильного Середовища для Росту Стовбурових Клітин (далі - SCGM) в 15-мл конічній пробірці. Клітини центрифугували при 1500 об/хв 5 хвилин у стандартній настільній центрифугі, зважили в 10 мл SCGM і підраховували на гематометрі. Об'єм, відповідний до кількості клітин, поміщали в чисту 15-мл пробірку, після чого повторно центрифугували при 1500 об/хв 5 хвилин. Клітини зважили до досягнення бажаної концентрації в SCGM+1x цитокінів (100 нг/мл SCF, 100 нг/мл TPO, 100 нг/мл FltL і 30 нг/мл IL-3) і поміщали на стерильну неадгезивну поверхню, після чого витримували при 37 °C і підтримці вологості в стандартному інкубаторі тканинних культур (5 % CO₂).

Скринінг сполук, що підвищують ефективність трансдукції CD34⁺ клітин вірусом здійснювали, використовуючи різні концентрації розчинних сполук різних класів (Таблиця 1). Результати скринінга ілюстровано на Фігурі 1.

Таблиця 1

Концентрація	Wnt3	FGF1	IGF-II	SHH	Stemregenin-1	dmPGE2
Висока	100 нг/мл	100 нг/мл	200 нг/мл	100 нг/мл	1000 нМ	100 мкМ
Середня	10 нг/мл	10 нг/мл	20 нг/мл	10 нг/мл	100 нМ	10 мкМ
Низька	1 нг/мл	1 нг/мл	2 нг/мл	1 нг/мл	10 нМ	1 мкМ

Продовження Таблиці 1

Концентрація	SC514	Omuralide	Epothomycin	AMD3100	B18R	TrichostatinA
Висока	10 мкМ	1000 нМ	10 мкМ	100 нг/мл	200 нг/мл	3000 нМ
Середня	1 мкМ	100 нМ	1 мкМ	10 нг/мл	20 нг/мл	300 нМ
Низька	0.1 мкМ	10 нМ	0.1 мкМ	1 нг/мл	2 нг/мл	30 нМ

ПРИКЛАД 2

ТРАНСДУКЦІЯ

Попередньо стимульовані клітини (Приклад 1) підраховували після 18-24 годин культивування. Потім клітини центрифугували при 1500 об/хв 5 хвилин. $1,2 \times 10^6$ попередньо стимульованих CD34⁺ клітин зважували в 60 мкл 10x цитокінів (1000 нг/мл SCF, 1000 нг/мл TPO, 1000 нг/мл FltL і 300 нг/мл IL-3), 7.8 мкл сульфату протаміну, 111 мкл надосадової рідини, що містить віруси, і 361,2 мкл SCGM. 90 мкл кл.вір. сусп. (приблизно 200,000 клітин) додавали в кожне гніздо стандартної неадгезивної 96-луночної касети. У процесі вірусної трансдукції додавали dmPGE2, з кінцевою концентрацією 100 мкМ, 50 мкМ, 25 мкМ, 12,5 мкМ, 1 мкМ або 0

мкМ. Вихідний розчин вірусів характеризувався значенням $2,7 \times 10^8$ ТУ/мл, з множинністю зараження (MOI), рівною приблизно 25.

Клітини витримували при 37 °C і підтримці вологості в стандартному інкубаторі тканинних культур (5 % CO₂).

5 ПРИКЛАД 3 СТИМУЛЯЦІЯ КЛІТИН dmPGE2

3 1 мг попередньо обробленого dmPGE2 (Cayman Chemicals) приготувляли 10 мМ аліквоти dmPGE2 в DMSO. Протягом короткого часу в контейнер з dmPGE2 вводили пухирці повітря до повного випаровування метилацетату. 263 мкл DMSO додавали до PGE2, що залишився в контейнері, після чого 25 мкл аліквоти поміщали в 1, % мл пробірки Еппендорфа і зберігали при -80 °C. 10х робочі вихідні розчини одержували шляхом серійного розведення dmPGE2 в SCGM, після чого їх додавали до клітин у відповідних робочих концентраціях, як зазначено в Таблиці 2. Потім клітини витримували при 37 °C і підтримці вологості в стандартному інкубаторі тканинних культур (5 % CO₂).

Таблиця 2

Серійні розведення dmPGE2 і додавання dmPGE2 до клітин

	Вих. р-н А	Вих. р-н В	Вих. р-н С	Вих. р-н D	Вих. р-н Е
Заморожений вих. р-н dmPGE2	20	0	0	0	0
Об'єм SCGM	180	100	100	100	92.5
Об'єм вих. р-нуА	0	100	0	0	0
Об'єм вих. р-нуВ	0	0	100	0	0
Об'єм вих. р-нуС	0	0	0	100	0
Об'єм вих. р-нуD	0	0	0	0	8
Концентрація dmPGE2	1 мМ	500 мкМ	250 мкМ	125 мкМ	10 мкМ
До фінальної концентрації:	100 мкМ	50 мкМ	25 мкМ	12.5 мкМ	1 мкМ
Додав. 10 мкл:	Вих. р-ну А	Вих. р-ну В	Вих. р-ну С	Вих. р-ну D	Вих. р-ну Е

ПРИКЛАД 4 СПОСОБИ ОЦІНКИ

Підготовка клітин для процедур оцінки

20 Після 24 годин культивування з вірусом і dmPGE2 клітини промивали перед подальшими процедурами функціональної оцінки. Промивання здійснювали, помістивши клітини в 96-луночну касету з U-подібним дном і центрифугуючи при 1500 об/хв 5 хвилин у стандартній настільній центрифугі. Середовища випарювали, після чого клітини зважували в 200 мкл SCGM. Потім клітини повторно центрифугували при 1500 об/хв 5 хвилин, середовище випарювали.

25 Клітини повторно зважували в 200 мкл SCGM. Потім клітини повторно центрифугували при 1500 об/хв 5 хвилин, середовище випарювали. Окремі процедури функціональної оцінки описані нижче.

7-денна рідка культура

30 Промиті клітини зважували в 200 мкл SCGM+1х цитокінів (як описано в Прикладі 1) і поміщали в стандартну 12-луночну неадгезивну касету для тканинних культур, що містить ще 800 мкл SCGM+1х цитокінів. Клітини витримували ще 6 днів при підтримці вологості в стандартному інкубаторі тканинних культур (5 % CO₂), після чого піддавали аналізу Кількості копій вектора (Приклад 5) і сортуванню флуоресцентно-активованих клітин (FACS). Клітини аналізували на наявність трансгену, що кодується вірусом, зеленого флуоресцентного білка (GFP). Кількість клітин, мічених вірусом у пулі культивованих клітин оцінювали за кількістю GFP+ клітин у популяції. Кількісно оцінювали інтенсивність флуоресценції мічених клітин. Результати аналізу 7-денної рідкої культури при різній концентрації dmPGE2 проілюстровано в Таблиці 3.

Оцінка активності колонієутворюючих одиниць у метилцелюлозі

40 Промиті клітини зважували в 200 мкл SCGM і поміщали в 3 мл аліквоти метилцелюлози, збагаченої цитокінами (наприклад, Methocult M4434 Classic). 1,5 мл потім поміщали на 35-мм чашки для культивування за допомогою тупокінцевої голки 16-го калібру. Чашки витримували 14-16 днів при підтримці вологості в стандартному інкубаторі тканинних культур, після чого оцінювали розмір, морфологію і клітинний склад колоній. Для наступного аналізу кількості копій

вектора (Приклад 5) вибирали окремі колонії, або, зібравши разом, використовували всі колонії, культивовані на 35-мм чашках (Приклад 5).

Стовбурові клітини, що підтримують кровотворення в тривалій культурі кісткового мозку (LTC-IC)

Клітини зважували в 200 мкл SCGM, підраховували, після чого поміщали на заздалегідь підготовлений стромальний шар MS-5 у різних розведеннях (2000; 1000; 500; 250; 125; 62; 31; 16 кл./гн. 200 мкл StemSpan SFEM (StemCell Technologies, cat#09650), збагачений Pen-Strep 100-од/мл-100 мкг/мл), по 24 копії на кожне розведення. Щотижня 100 мкл заміщали 100 мкл свіжого середовища. Через 5 тижнів культури збирали. 100 мкл злили, промивали клітини 100 мкл, що залишилися, а гнізда промивали 50 мкл свіжого середовища, після чого всі зібрані зразки посівали в Methocult™ H4434; 150 мкл клітинної суспензії гомогенізували в 600мкл Methocult H4434 і поміщали в одне гніздо 12-ямкової касети на 14 днів. Потім підраховували колонії. Кількість лунок, що містять щонайменше одну колонію (>40 клітин) і загальну кількість лунок аналізували для кожного розведення для підрахунку кількості LTC-IC і 95 % довірчого інтервалу, використовуючи програмне забезпечення L-calc (Stem Cell Technologies). 100 колоній з кожної обробленої групи поміщали в 100 різних лунок, після чого кожну аналізували на предмет наявності вектора. 100 колоній з кожної обробленої групи змішували разом, виділяли геномну ДНК і підраховували середню кількість копій вектора за допомогою кількісної ПЦР (Приклад 5).

Трансплантація в організм NOD/SCID Gamma (NSG) мишей

Для визначення того, чи підсилює dmPGE2 вірусну трансдукцію довготривалих стовбурових кровотворних клітин людини з мінімальною токсичністю, трансдуційовані клітини промивали і зважували в фосфатно-сольовому буфері (PBS), після чого вводили у хвостову вену опроміненим дорослим NSG мишам. Мишей утримували в стерильному середовищі у відповідності зі стандартними параметрами IACUC захисту тварин. Через певні інтервали часу за допомогою стандартних протоколів проводилася кількісна оцінка людських біологічних агентів у периферійній крові мишей. Коротенько, еритроцити осаджували в 2 % декстрані, після чого надосадова рідина піддавалася подальшому очищенню буфером для лізису еритроцитів. Потім мононуклеарні клітини мітили антитілами, пов'язаними із флуорофором, як описано в Majeti, et al., Cell Stem Cell 2007, і аналізували за допомогою потокової цитометрії на LSR-II (Becton Dickinson).

Аналіз сайтів інтеграції

Для визначення того, чи міняє dmPGE2 кращі сайти інтеграції лентивірусного вектора, зразки кісткового мозку мишей, яким трансплантували трансдуційовані стовбурові кровотворні клітини і кровотворні клітини-попередники людини, оброблені dmPGE2 і неправильними агентами, аналізували "лінійно-ампліфікованої ПЦР" (linear amplification-mediated PCR, LAM-PCR) (Cartier, (2009) Science 326(5954):818-23). Коротенько, 1-1000 нг ДНК використовували як матрицю для лінійної ПЦР з біотинільованими праймерами, специфічними до ретровірусних LTR-последовностей. Продукти лінійної ПЦР виділяли за допомогою парамагнітних зерен. Далі здійснювали синтез другого ланцюга ДНК, обробку рестриктазами (Tsp509I, NlaIII або HpyCH4IV) і лігування лінкерних касет на напівтвердій фазі, після чого проводили 2 цикли експонентної ПЦР. Отримані амплікони LAM-PCR підготовлювали для піросеквенування 454 (GS Flx; Roche Diagnostics), провівши додаткові цикли ПЦР для приєднання GS Flx-специфічних ампліфікуючих і секвенуючих праймерів А і В до обох кінців ампліконів LAM-PCR. Структура і одержання праймерів здійснювалися за інструкціями виробника. Розпізнавану последовність довжиною 6 основ приєднували до праймеру А для одночасного аналізу різних последовностей за один цикл секвенування. Використовували 40 нг очищеного продукту LAM-PCR. Параметри ПЦР: первинна денатурація 120 сек при 95 °C; 12 циклів по 45 сек при 95 °C, 45 сек при 60 °C і 60 сек при 72 °C; фінальна елонгація 300 сек при 72 °C. Відщеплення кінців последовностей ампліконів LAM-PCR і вирівнювання ланцюжків здійснювали за допомогою BLAST.

ПРИКЛАД 5

АНАЛІЗ КІЛЬКОСТІ КОПІЙ ВЕКТОРА

Геномну ДНК виділяли з клітин за допомогою стандартних протоколів (наприклад, колонок DNEasy Qiagen). Геномну ДНК піддавали кількісній ПЦР у масштабі реального часу (qRT-PCR) із зондами TaqMan, специфічними до вірусних LTR-последовностей і β-актину людини. Значення Ct для вірусного сигналу і сигналу β-актину стандартизували відповідно до контрольних значень, після чого підраховували співвідношення копій вірусу і копій β-актину. При використанні вірусної конструкції, що кодує зелений флуоресцентний білок, між кількістю копій вектора і середньою інтенсивністю флуоресценції виявляли лінійну залежність (Приклад 4). Результати аналізу кількості копій вектора Number (VCN) при різних концентраціях dmPGE2

ілюстровані в Таблицях 3А-С.

Таблиці 3А-С показують залежність стимуляції вірусної трансдукції CD34+ клітин від дози dmPGE2 у трьох різних експериментах. CD34+ клітини розморожували і попередньо стимулювали SCF, TPO, FltL і IL3, потім трансдуціювали: (А) GFP+ лентівірусом при множинності зараження 25, (В) GFP+ лентівірусом при множинності зараження 5 і (С) ALD (ABCD1)-експресуючим лентівірусом при множинності зараження 25. У процесі трансдукції вірусом (24-48 годин культивування) клітини обробляли dmPGE2. Потім клітини промивали і аналізували потоковою цитометрією і ПЦР після приблизно одного тижня культивування. За допомогою фарбування FACS визначали процентне співвідношення клітин, що виробляють GFP (А, В) і ALD (С), а також середню інтенсивність флуоресценції (MFI) і кількість копій вектора (VCN) (А, В).

Таблиця 3А

Зелений флуоресцентний білок, множинність зараження 25

Конц. dmPGE2	% позитивн. (GFP)	MFI	VCN
100 мкМ	81,53	1,513,504,00	3,55
50 мкМ	67,62	977,806,75	2,2
25 мкМ	59,99	845,691,00	1,7
12.5 мкМ	54,71	759,442,75	1,5
0 мкМ	30,07	583,079,25	0,535
У відсутності вірусу	0,02	290,577,50	Не виявлено

Таблиця 3В

Зелений флуоресцентний білок, множинність зараження 5

Конц. dmPGE2	% позитивн. (GFP)	MFI	VCN
100 мкМ	42,97	732,716,25	0,83
50 мкМ	36,80	656,703,50	0,715
25 мкМ	18,69	562,428,00	0,21
12.5 мкМ	17,84	530,218,50	0,18
0 мкМ	9,05	477,691,00	0,025
У відсутності вірусу	0,02	290,577,50	Не виявлено

Таблиця 3С

ABCD1 множинність зараження 25

Конц. dmPGE2	% позитивн.
100 мкМ	72,26
50 мкМ	56,10
25 мкМ	43,76
12.5 мкМ	45,36
1 мкМ	34,13
0 мкМ	21,44

ПРИКЛАД 6

ЗАЛЕЖНІСТЬ СТИМУЛЯЦІЇ ВІРУСНОЇ ТРАНСДУКЦІЇ CD34+ КЛІТИН ВІД ТРИВАЛОСТІ ВПЛИВУ І ДОЗИ dmPGE2

MCD-34+ клітини розморожували і попередньо стимулювали SCF, TPO, FltL і IL3, потім трансдуціювали GFP+ лентівірусом при множинності зараження 25. У процесі трансдукції вірусом (24-25 годин, 24-26 годин, 24-28 годин, 24-48 годин культивування) клітини обробляли dmPGE2, промивали і аналізували потоковою цитометрією приблизно після одного тижня культивування. Як альтернативу, клітини обробляли dmPGE2 у процесі попередньої стимуляції (22-24 години; 23-24 години культивування). Процентна частка GFP позитивних клітин проілюстрована в Таблиці 4.

Таблиця 4

Конц. dmPGE2	Вірус і PGE2				Попередня стимуляція PGE2	
	Плюс 1 година	Плюс 2 години	Плюс 4 години	24 години	Мінус 2 години	Мінус 1 година
100 мкМ	2,48	4,02	21,57	76,44	34,85	25,14
50 мкМ	1,85	4,23	27,45	54,63	31,85	22,98
25 мкМ	1,76	4,76	27,46	50,69	31,90	24,05
12,5 мкМ	1,97	5,32	28,08	47,42	30,64	22,13
1 мкМ	2,94	7,17	21,10	32,03	25,74	22,29
0 мкМ	3,14	7,05	13,61	20,79	20,69	21,31

ПРИКЛАД 7

ЛІКУВАННЯ В-ТАЛАСЕМІЇ АБО СЕРПОПОДІБНОКЛІТИННОЇ АНЕМІЇ ПІСЛЯ ТРАНСДУКЦІЇ СТОВБУРОВИХ КРОВОТВОРНИХ КЛІТИН ЛЕНТИВІРУСНИМ ВЕКТОРОМ У ПРИСУТНОСТІ dmPGE2

За згодою пацієнтів, відповідно до протоколу Експертної Ради Організації (IRB) периферичну кров одержували за допомогою аферезу. Для видалення еритроцитів застосовували градієнт щільності Фіколла, після чого виділяли залишок, збагачений CD34+ клітинами за допомогою Miltenyi CliniMACS system (Miltenyi Biotec). Клітини попередньо стимулювали SCF, FltL, TPO і IL3 людини в концентрації, приблизно рівній 4×10^6 cells/мл протягом 18-24 годин. Потім клітини трансдуціювали Лентиглобіном (Lentiglobin GTP), для виділення гена β -globinA-T87Q людини, при множинності зараження 25 протягом 18-24 годин у присутності SCF, FltL, TPO, IL3, сульфату протаміну і dmPGE2.

Після трансдукції, частину клітин відбирали для атестаційного випробування клітини, що залишилися, кріоконсервують і зберігають при -80°C . Як один з етапів атестаційного випробування трансдуційовані клітини суб'єкта потім культивували протягом 7 днів і піддавали аналізу кількості копій вектора (VCN, Приклад 1). Результат повинен становити в середньому 0,5-3 копії на клітину, при ефективності трансдукції, що перевищує 50 %. Після успішних атестаційних випробувань пацієнтам призначали терапію бусульфаном і циклофосфамідом.

Потім пацієнтам одноразово вводили аутологічні CD34+клітини внутрішньовенно, дозою, що перевищує $>3 \times 10^6$ CD34+ клітин/кг. Пацієнти перебувають під щоденним наглядом у відділенні трансплантації для виявлення побічних ефектів і відслідковування лабораторних показників при приживленні трансплантата в кістковому мозку.

Після приживлення трансплантата, за умови стабільного стану пацієнтів, їх виписували зі стаціонару. Протягом 6 перших місяців пацієнти проходили щомісячне обстеження, потім обстеження проводили кожні 3 місяця протягом, у цілому, 24 місяців. Обстеження включало стандартні гематологічні і хімічні лабораторні аналізи, а також особливі гематологічні аналізи, аналізи кісткового мозку, виявлення побічних ефектів і взаємодії з супутніми препаратами, а також оцінку особливих гематологічних і клінічних параметрів, пов'язаних з конкретним захворюванням.

Основними характеристиками були безпека і стерпність введення клітин, трансдуційованих лентиглобіном, і час приживлення аутологічних модифікованих CD34+ клітин. Додаткові характеристики включали біологічні і біохімічні наслідки присутності трансдуційованого гену і його продукту в кровотворних і кров'яних клітинах, необхідність у переливанні крові і частота шпиталізацій і клінічних випадків протягом 2-річного періоду спостереження після трансплантації. Усі пацієнти повинні були проходити щорічне обстеження протягом 15-літнього пост-трансплантаційного періоду для виявлення серйозних побічних ефектів, аналіз на реплікативно-компетентний лентівірус і збір кров'яних клітин для аналізу мутагенезу після впровадження вектора в геном, при наявності ознак розвитку злоякісних пухлин.

ПРИКЛАД 8

ЛІКУВАННЯ АДРЕНОЛЕЙКОДИСТРОФІЇ ПІСЛЯ ТРАНСДУКЦІЇ СТОВБУРОВИХ КРОВОТВОРНИХ КЛІТИН ЛЕНТИВІРУСНИМ ВЕКТОРОМ У ПРИСУТНОСТІ dmPGE2

За згодою пацієнтів, відповідно до протоколу Експертної Ради Організації (IRB) периферичну кров одержували за допомогою аферезу. Для видалення еритроцитів застосовували градієнт щільності Фіколла, після чого виділяли залишок, збагачений CD34+ клітинами за допомогою Miltenyi CliniMACS system (Miltenyi Biotec). Клітини попередньо стимулювали SCF, FltL, TPO і IL3 людини в концентрації, приблизно рівній 4×10^6 cells/мл протягом 18-24 годин. Потім клітини трансдуціювали Lenti-D GTP, що несе ген ABCD1 людини,

при множинності зараження 25 протягом 18-24 годин у присутності SCF, FltL, TPO, IL3, сульфату протаміну і dmPGE2.

Після трансдукції, частину клітин відбирали для атестаційного випробування, клітини, що залишилися, кріоконсервували і зберігали при -80 °C. Як один з етапів атестаційного випробування трансдуційовані клітини суб'єкта потім культивували протягом 7 днів і піддавали аналізу кількості копій вектора (VCN, Приклад 1). Результат повинен становити в середньому 0,5-3 копії на клітину, при ефективності трансдукції, що перевищує 50 %. Після успішних атестаційних випробувань пацієнтам призначали терапію бусульфаном і циклофосфамідом.

Потім пацієнтам одноразово вводили аутологічні CD34+клітини внутрішньовенно, дозою, що перевищує $>3 \times 10^6$ CD34+ клітин/кг. Пацієнти перебували під щоденним наглядом у відділенні трансплантації для виявлення побічних ефектів і відслідковування лабораторних показників при приживленні трансплантата в кістковому мозку.

Після приживлення трансплантата, за умови стабільного стану пацієнтів, їх виписували зі стаціонару. Протягом 6 перших місяців пацієнти проходили щомісячне обстеження, потім обстеження проводили кожні 3 місяці протягом, у цілому, 24 місяців. Обстеження включало стандартні гематологічні і хімічні лабораторні аналізи, а також особливі гематологічні аналізи, аналізи кісткового мозку, виявлення побічних ефектів і взаємодії з супутніми препаратами, а також оцінку особливих гематологічних і клінічних параметрів, пов'язаних з конкретним захворюванням.

Основними характеристиками були безпека і стерпність введення клітин, трансдуційованих Lenti-D, і час приживлення аутологічних модифікованих CD34+ клітин. Додаткові характеристики включали біологічні і біохімічні наслідки присутності трансдуційованого гена і його продукту в кровотворних і кров'яних клітинах, необхідність у переливанні крові і частота шпиталізацій і клінічних випадків протягом 2-річного періоду спостереження після трансплантації. Усі пацієнти повинні були проходити щорічне обстеження протягом 15-літнього пост-трансплантаційного періоду для виявлення серйозних побічних ефектів, аналіз на реплікативно-компетентний лентівірус і збір кров'яних клітин для аналізу мутагенезу після впровадження вектора в геном, при наявності ознак розвитку злоякісних пухлин.

Як стане очевидно фахівцям в даній галузі техніки, що ознайомився з цим описом, варіанти реалізації цього винаходу можуть бути модифіковані відповідним чином, враховуючи описані в заявці деталі і подробиці. У цілому, зазначені у формулі винаходу поняття і терміни не обмежуються конкретними варіантами реалізації, описаними в цій заявці, але мають на увазі всі можливі варіанти реалізації в рамках обсягу винаходу.

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> БЛУБЬОД БАЙО, ІНК.

Гарретт Коллінз ХЕФФНЕР

Абрахам Айзек БЕЙССЕН

<120> СПОЛУКИ ДЛЯ ПОЛІПШЕНОЇ ВІРУСНОЇ ТРАНСДУКЦІЇ

<130> BLBD-006/01WO

<150> US 61/541,736

<151> 2011-09-30

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 576

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 1

```
actcttctgg tccccacaga ctacagagaga acccaccatg gtgctgtctc ctgccgacaa    60
gaccaacgtc aaggccgcct ggggtaaggt cggcgcgcac gctggcgagt atggtgcgga    120
ggccctggag aggatgttcc tgtccttccc caccaccaag acctacttcc cgcacttcga    180
cctgagccac ggctctgccc aggttaaggg ccacggcaag aaggtggccg acgcgtgac    240
caacgccgtg gcgcacgtgg acgacatgcc caacgcgctg tccgccctga gcgacctgca    300
cgcgcacaag cttcgggtgg acccgtcaa cttcaagctc ctaagccact gcctgctggt    360
gaccctggcc gcccacctcc ccgccgagtt caccctgcg gtgcacgcct ccctggacaa    420
gttcctggct tctgtgagca ccgtgctgac ctcaaatac cgttaagctg gacccctggt    480
ggccatgctt cttgcccctt gggcctcccc ccagcccctc ctccccttcc tgcacccgta    540
ccccctggt cttgaataa agtctgagtg ggcggc                                576
```

<210> 2

<211> 142

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Met Val Leu Ser Pro Ala Asp Lys Thr Asn Val Lys Ala Ala Trp Gly

1 5 10 15

Lys Val Gly Ala His Ala Gly Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg

20 25 30

Met Phe Leu Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp

35 40 45

Leu Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala

50 55 60

Asp Ala Leu Thr Asn Ala Val Ala His Val Asp Asp Met Pro Asn Ala

65 70 75 80

Leu Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro

85 90 95

Val Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ala

100 105 110

His Leu Pro Ala Glu Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys

115 120 125

Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg

130 135 140

<210> 3

<211> 142

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 3

Met Val Leu Ser Gly Glu Asp Lys Ser Asn Ile Lys Ala Ala Trp Gly

1 5 10 15
 Lys Ile Gly Gly His Gly Ala Glu Tyr Gly Ala Glu Ala Leu Glu Arg
 20 25 30
 Met Phe Ala Ser Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Pro His Phe Asp
 35 40 45
 Val Ser His Gly Ser Ala Gln Val Lys Gly His Gly Lys Lys Val Ala
 50 55 60
 Asp Ala Leu Ala Asn Ala Ala Gly His Leu Asp Asp Leu Pro Gly Ala
 65 70 75 80
 Leu Ser Ala Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro
 85 90 95
 Val Asn Phe Lys Leu Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Ser
 100 105 110
 His His Pro Ala Asp Phe Thr Pro Ala Val His Ala Ser Leu Asp Lys
 115 120 125
 Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg
 130 135 140

<210> 4

<211> 142

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 4

Met Val Leu Ser Ala Asp Asp Lys Thr Asn Ile Lys Asn Cys Trp Gly

1 5 10 15
 Lys Ile Gly Gly His Gly Gly Glu Tyr Gly Glu Glu Ala Leu Gln Arg
 20 25 30

Met Phe Ala Ala Phe Pro Thr Thr Lys Thr Tyr Phe Ser His Ile Asp

35 40 45

Val Ser Pro Gly Ser Ala Gln Val Lys Ala His Gly Lys Lys Val Ala

50 55 60

Asp Ala Leu Ala Lys Ala Ala Asp His Val Glu Asp Leu Pro Gly Ala

65 70 75 80

Leu Ser Thr Leu Ser Asp Leu His Ala His Lys Leu Arg Val Asp Pro

85 90 95

Val Asn Phe Lys Phe Leu Ser His Cys Leu Leu Val Thr Leu Ala Cys

100 105 110

His His Pro Gly Asp Phe Thr Pro Ala Met His Ala Ser Leu Asp Lys

115 120 125

Phe Leu Ala Ser Val Ser Thr Val Leu Thr Ser Lys Tyr Arg

130 135 140

<210> 5

<211> 626

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 5

```
acatttgctt ctgacacaac tgtgttcaact agcaacctca aacagacacc atggtgcatc 60
tgactcctga ggagaagtct gccgttactg ccctgtgggg caaggtgaac gtggatgaag 120
ttggtggtga ggccctgggc aggctgctgg tggctaccc ttggaccag aggttctttg 180
agtcctttgg ggatctgtcc actcctgatg ctgttatggg caaccctaag gtgaaggctc 240
atggcaagaa agtgctcggg gccttagtg atggcctggc tcacctggac aacctcaagg 300
gcacctttgc cacactgagt gagctgcact gtgacaagct gcacgtggat cctgagaact 360
tcaggctcct gggcaacgtg ctggtctgtg tgctggccca tcactttggc aaagaattca 420
ccccaccagt gcaggctgcc tatcagaaag tgggtggctgg tgtggctaata gccctggccc 480
acaagtatca ctaagctcgc tttcttgctg tccaatttct attaaaggtt cctttgttcc 540
```

ctaagtccaa ctactaaact gggggatatt atgaagggcc ttgagcatct ggattctgcc 600

taataaaaaa catttatatt cattgc 626

<210> 6

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp

1 5 10 15

Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp

35 40 45

Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp

65 70 75 80

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Thr Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val

100 105 110

Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln

115 120 125

Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His

130 135 140

Lys Tyr His

145

<210> 7

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Ser Ala Val Thr Ala Leu Trp

1 5 10 15

Gly Lys Val Asn Val Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp

35 40 45

Leu Ser Thr Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp

65 70 75 80

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val

100 105 110

Cys Val Leu Ala His His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Pro Val Gln

115 120 125

Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His

130 135 140

Lys Tyr His

145

<210> 8

<211> 147

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 8

Met Val His Leu Thr Asp Ala Glu Lys Ala Ala Val Ser Gly Leu Trp

1 5 10 15

Gly Lys Val Asn Ala Asp Glu Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Tyr Phe Asp Ser Phe Gly Asp

35 40 45

Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Ala Lys Val Lys Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Ile Thr Ala Phe Asn Asp Gly Leu Asn His Leu Asp

65 70 75 80

Ser Leu Lys Gly Thr Phe Ala Ser Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Met Ile Val

100 105 110

Ile Val Leu Gly His His Leu Gly Lys Asp Phe Thr Pro Ala Ala Gln

115 120 125

Ala Ala Phe Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Ala Ala Leu Ala His

130 135 140

Lys Tyr His

145

<210> 9

<211> 147

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 9

Met Val His Leu Thr Asp Ala Glu Lys Ala Ala Val Asn Gly Leu Trp

1 5 10 15

Gly Lys Val Asn Pro Asp Asp Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Tyr Phe Asp Ser Phe Gly Asp

35 40 45

Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Ile Asn Ala Phe Asn Asp Gly Leu Lys His Leu Asp

65 70 75 80

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ala His Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Met Ile Val

100 105 110

Ile Val Leu Gly His His Leu Gly Lys Glu Phe Thr Pro Cys Ala Gln

115 120 125

Ala Ala Phe Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Ser Ala Leu Ala His

130 135 140

Lys Tyr His

145

<210> 10

<211> 583

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 10

```

acactcgctt ctggaacgtc tgaggttatc aataagctcc tagtccagac gccatgggtc   60
atttcacaga ggaggacaag gctactatca caagcctgtg gggcaagggtg aatgtggaag  120
atgctggagg agaaaccctg ggaaggctcc tggttgtcta cccatggacc cagaggttct  180

ttgacagctt tggcaacctg tcctctgcct ctgccatcat gggcaacccc aaagtcaagg  240
cacatggcaa gaaggtgctg acttccttgg gagatgcat aaagcacctg gatgatctca  300
agggcacctt tgcccagctg agtgaactgc actgtgacaa gctgcatgtg gatcctgaga  360
acttcaagct cctgggaaat gtgctggtga ccgttttggc aatccatttc ggcaaagaat  420
tcaccctga ggtgcaggct tcctggcaga agatgggtgac tggagtggcc agtgcctgt  480
cctccagata cactgagct cactgcccac gatgcagagc tttcaaggat aggctttatt  540
ctgcaagcaa tcaaataata aatctattct gctaagagat cac                    583

```

<210> 11

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Met Gly His Phe Thr Glu Glu Asp Lys Ala Thr Ile Thr Ser Leu Trp

1 5 10 15

Gly Lys Val Asn Val Glu Asp Ala Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Ser Phe Gly Asn

35 40 45

Leu Ser Ser Ala Ser Ala Ile Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Asp Ala Ile Lys His Leu Asp

65 70 75 80

Asp Leu Lys Gly Thr Phe Ala Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Val Leu Val

100 105 110

Thr Val Leu Ala Ile His Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln

115 120 125

Ala Ser Trp Gln Lys Met Val Thr Gly Val Ala Ser Ala Leu Ser Ser

130 135 140

Arg Tyr His

145

<210> 12

<211> 147

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 12

Met Val His Phe Thr Ala Glu Glu Lys Ala Ala Ile Thr Ser Ile Trp

1 5 10 15

Asp Lys Val Asp Leu Glu Lys Val Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Ile Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Lys Phe Gly Asn

35 40 45

Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ile Met Gly Asn Pro Arg Ile Arg Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Leu Gly Val Lys Asn Met Asp

65 70 75 80

Asn Leu Lys Glu Thr Phe Ala His Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95
 Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Met Leu Val
 100 105 110
 Ile Val Leu Ser Thr His Phe Ala Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln
 115 120 125

Ala Ala Trp Gln Lys Leu Val Ile Gly Val Ala Asn Ala Leu Ser His
 130 135 140

Lys Tyr His

145

<210> 13

<211> 147

<212> PRT

<213> Rattus norvegicus

<400> 13

Met Val His Phe Thr Ala Glu Glu Lys Ala Ala Ile Ile Ser Ile Trp

1 5 10 15

Glu Lys Val Asp Leu Glu Lys Ile Gly Gly Glu Thr Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Ile Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Asp Lys Phe Gly Asn

35 40 45

Leu Ser Ser Ala Leu Ala Ile Met Gly Asn Pro Arg Ile Arg Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Leu Thr Ser Leu Gly Ser Ala Val Glu Asn Met Asp

65 70 75 80

Asn Leu Lys Glu Thr Phe Ala His Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95

Leu His Val Asp Pro Gln Asn Phe Lys Leu Leu Gly Asn Met Leu Val

100 105 110

Ile Val Leu Ser Thr His Phe Ala Lys Glu Phe Thr Pro Glu Val Gln

115 120 125

Ala Ala Trp Gln Lys Leu Val Met Gly Val Ala Asn Ala Leu Ser His

130 135 140

Lys Tyr His

145

<210> 14

<211> 774

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 14

```

agggcaagtt aagggaatag tggaatgaag gttcattttt catttcaca aactaatgaa 60
acctgtctta tcttaaacca acctgtctac tggagcaggg aggacaggac cagcataaaa 120
ggcagggcag agtcgactgt tgcttacact ttcttctgac ataacagtgt tcactagcaa 180
cctcaaacag acaccatggt gcatctgact cctgaggaga agactgtctgt caatgcctg 240
tggggcaaag tgaacgtgga tgcagttggt ggtgaggccc tgggcagatt actggtggtc 300
tacccttga cccagaggtt cttgagtc tttggggatc tgcctctcc tgatgctgtt 360
atgggcaacc ctaagtgaa ggctcatggc aagaagggtc taggtgcctt tagtgatggc 420
ctggctcacc tggacaacct caagggcact ttttctcagc tgagtgagct gcactgtgac 480
aagctgcacg tggatcctga gaacttcagg ctcttgggca atgtgctggt gtgtgtgctg 540
gcccgaact ttggcaagga attcacccca caaatgcagg ctgcctatca gaagggtgtg 600
gtgtgtgtgg ctaatgcctt ggctcacaag taccattgag atcctggact gtttctgat 660
aaccataaga agacctatt tccctagatt ctattttctg aacttgggaa cacaatgcct 720
actcaaggg tatggcttct gcctaataaa gaatgttcag ctcaactcc tgat 774

```

<210> 15

<211> 147

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Val His Leu Thr Pro Glu Glu Lys Thr Ala Val Asn Ala Leu Trp

1 5 10 15

Gly Lys Val Asn Val Asp Ala Val Gly Gly Glu Ala Leu Gly Arg Leu

20 25 30

Leu Val Val Tyr Pro Trp Thr Gln Arg Phe Phe Glu Ser Phe Gly Asp

35 40 45

Leu Ser Ser Pro Asp Ala Val Met Gly Asn Pro Lys Val Lys Ala His

50 55 60

Gly Lys Lys Val Leu Gly Ala Phe Ser Asp Gly Leu Ala His Leu Asp

65 70 75 80

Asn Leu Lys Gly Thr Phe Ser Gln Leu Ser Glu Leu His Cys Asp Lys

85 90 95

Leu His Val Asp Pro Glu Asn Phe Arg Leu Leu Gly Asn Val Leu Val

100 105 110

Cys Val Leu Ala Arg Asn Phe Gly Lys Glu Phe Thr Pro Gln Met Gln

115 120 125

Ala Ala Tyr Gln Lys Val Val Ala Gly Val Ala Asn Ala Leu Ala His

130 135 140

Lys Tyr His

145

<210> 16

<211> 2297

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 16

ccagccccag tccctacgcg gcagccagcc caggtgacat gccgggtgctc tccaggcccc 60
ggccctggcg ggggaacacg ctgaagcgca cggccgtgct cctggccctc gcggcctatg 120
gagcccacaa agtctacccc ttggtgcgcc agtgccctggc cccggccagg ggtcttcagg 180
cgccccccgg ggagcccacg caggaggcct ccgggggtcg gcgggcca aa gctggcatga 240
accgggtatt cctgcagcgg ctctgtggc tctgcggct gctgttccc cgggtcctgt 300
gccgggagac ggggctgctg gcctgcact cggccgcctt ggtgagccgc accttctgt 360
cgggtgatgt ggccgcctg gacggaaggc tggcccgtg catcgtccgc aaggaccgc 420

gggcttttgg ctggcagctg ctgcagtggc tctcatcg cctccctgct accttcgtca 480
acagtccat ccgttacctg gagggccaac tggccctgct gttccgcagc cgtctggtgg 540
cccacgccta ccgcctctac ttctccagc agacctacta ccgggtcagc aacatggacg 600
ggcggcttcg caaccctgac cagtctctga cggaggacgt ggtggccttt gcggcctctg 660
tggccacct ctactcaac ctgaccaagc cactcctgga cgtggctgtg acttctaca 720
ccctgcttcg ggccggccgc tccgtggag ccggcacagc ctggccctcg gccatgcgcg 780
gcctcgtggt gttcctcacg gccaacgtgc tgcgggcctt ctgcccaag ttcggggagc 840
tggtggcaga ggaggcgcg cggaaggggg agctgcgcta catgcactcg cgtgtggtgg 900
ccaactcgga ggagatcgcc ttctatgggg gccatgaggt ggagctggcc ctgctacagc 960
gctctacca ggacctggcc tcgcagatca acctcatcct tctggaacgc ctgtggtatg 1020
ttatgctgga gcagttcctc atgaagtatg tgtggagcgc ctgggcctg ctcatggtgg 1080
ctgtcccat catcactgcc actggctact cagagtcaga tgcagaggcc gtgaagaagg 1140
cagccttgga aaagaaggag gaggagctgg tgagcgagcg cacagaagcc ttactattg 1200
cccgaacct cctgacagcg gctgcagatg ccattgagcg gatcatgtcg tcgtacaagg 1260
agggtacgga gctggctggc tacacagccc ggggtgcacga gatgttccag gtatttgaag 1320
atgttcagcg ctgtcacttc aagaggccca gggagctaga ggacgctcag gcggggtctg 1380
ggacatagg ccggtctggt gtccgtgtgg agggccccct gaagatccga ggccaggtgg 1440
tggtgtgga acaggggatc atctgcgaga acatcccat cgtcacgccc tcaggagagg 1500

tgggtgtggc cagcctcaac atcagggtgg aggaaggcat gcatctgctc atcacaggcc 1560
 ccaatggctg cggcaagagc tccctgttcc ggatcctggg tgggctctgg cccacgtacg 1620
 gtggtgtgct ctacaagccc ccacccagc gcatgttcta catcccgag aggcctaca 1680
 tgtctgtggg ctccctgcgt gaccaggtga tctaccgga ctacgtggag gacatgaaa 1740
 ggaagggcta ctggagcag gacctggaag ccacctgga cgtcgtgcac ctgcaccaca 1800
 tcctgcagcg ggaggaggt tgggaggcta tgtgtgactg gaaggacgtc ctgtcgggtg 1860
 gcgagaagca gagaatcggc atggcccga tgttctacca caggcccaag tacgcctcc 1920
 tggatgaatg caccagcgcc gtgagcatcg acgtggaagg caagatcttc caggcggcca 1980
 aggacgctgg cattgcctg ctctcatca ccacccggcc ctccctgtgg aaataccaca 2040
 cacacttgct acagttgat ggggagggcg gctggaagt cgagaagctg gactcagctg 2100

cccgcctgag cctgacggag gagaagcagc ggctggagca gcagctggcg ggcattccca 2160
 agatgcagcg gcgcctccag gagctctgcc agatcctggg cgaggccgtg gcccagcgc 2220
 atgtgccggc acctagccc caaggccctg gtggcctcca ggggtgcctcc acctgactcg 2280
 agggggggcc cggtacc 2297

<210> 17

<211> 2238

<212> ДНК

<213> Homo sapiens

<400> 17

atgccggtgc tctccaggcc ccggccctgg cgggggaaca cgctgaagcg cacggccgtg 60
 ctcttgcccc tcgcgcccta tggagccac aaagtctacc ccttggtgcg ccagtgcctg 120
 gccccggcca ggggtcttca ggcgcccgc ggggagccca cgcaggaggc ctccggggtc 180
 gcggcgccca aagctggcat gaaccgggta ttctgcagc ggctcctgtg gctcctgcgg 240
 ctgctgttcc cccgggtcct gtgccgggag acggggctgc tggccctgca ctggccgcc 300
 ttggtgagcc gcaccttct gtcggtgat gtggccgcc tggacggaag gctggccgc 360
 tgcatcgtcc gcaaggacc gcgggctttt ggctggcagc tgctgcagt gctcctcatc 420
 gccctccctg ctaccttct caacagtgc atccgttacc tggaggcca actggccctg 480

tcgttccgca gccgtctggt ggcccacgcc taccgcctct acttctcca gcagacctac 540
 taccgggtca gcaacatgga cgggcggctt cgcaaccctg accagtctct gacggaggac 600
 gtggtggcct ttgggcctc tgtggccac ctctactcca acctgaccaa gccactcctg 660
 gacgtggctg tgacttccta caccctgctt cgggcggccc gctcccgtgg agccggcaca 720
 gcctggcctt cgcccatgc cggcctcgtg gtgttcctca cggccaacgt gctgcgggcc 780
 ttctgcccc agttcgggga gctggtggca gaggaggcgc ggcggaaggg ggagctgcgc 840
 tacatgcact cgcgtgtggt ggccaactcg gaggagatcg ctttctatgg gggccatgag 900
 gtggagctgg ccctgctaca gcgtcctac caggacctgg cctcgagat caacctcatc 960
 cttctggaac gcctgtgga tgatatgctg gagcagttcc tcatgaagta tgtgtggagc 1020
 gcctgggcc tgctcatggt ggctgtccc atcatcactg ccactggcta ctcagagtca 1080
 gatgcagagg ccgtgaagaa ggagccttg gaaaagaagg aggaggagct ggtgagcgag 1140

 cgcacagaag ctttactat tgcccgaac ctctgacag cggctgcaga tgccattgag 1200
 cggatcatgt cgtcgtacaa ggaggtgacg gagctggctg gctacacagc ccgggtgcac 1260
 gagatgttcc aggtatttga agatgttcag cgctgtcact tcaagaggcc caggagcta 1320
 gaggacgtc aggcggggtc tgggaccata ggccggtctg gtgtccgtgt ggaggggccc 1380
 ctgaagatcc gaggccaggt ggtggatgtg gaacagggga tcatctgcga gaacatccc 1440
 atcgtcacgc ctcaggaga ggtgggtgtg gccagcctca acatcagggt ggaggaaggc 1500
 atgcatctgc tcatcacagg cccaatggc tgcggcaaga gctccctgtt ccgcatcctg 1560
 ggtgggtctt ggcccacgta cgggtgtgtg ctctacaagc cccacccca gcgcatgttc 1620
 tacatccgc agaggcccta catgtctgtg ggctccctgc gtgaccaggt gatctacccg 1680
 gactcagtg aggacatgca aaggaagggc tactcggagc aggacctgga agccatcctg 1740
 gacgtcgtgc acctgcacca catcctgcag cgggaggag gttggaggc tatgtgtgac 1800
 tggaaggacg tcctgtcggg tggcgagaag cagagaatcg gcatggccc catgtttac 1860
 cacaggccca agtacccct cctggatgaa tgcaccagcg ccgtgagcat cgacgtggaa 1920
 ggcaagatct tccaggcggc caaggacgc ggcatggccc tgcttccat caccaccgg 1980
 ccctccctgt ggaaatacca cacacattg ctacagttcg atggggaggg cggctggaag 2040
 ttcgagaagc tggactcagc tgccgcctg agcctgacgg aggagaagca gcggctggag 2100

cagcagctgg cgggcattcc caagatgcag cggcgctcc aggagctctg ccagatcctg 2160
 ggcgaggccg tggccccagc gcatgtgccg gcacctagcc cgcaaggccc tgggtggcctc 2220
 cagggtgcct ccacctga 2238

<210> 18

<211> 745

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 18

Met Pro Val Leu Ser Arg Pro Arg Pro Trp Arg Gly Asn Thr Leu Lys

1 5 10 15

Arg Thr Ala Val Leu Leu Ala Leu Ala Ala Tyr Gly Ala His Lys Val

20 25 30

Tyr Pro Leu Val Arg Gln Cys Leu Ala Pro Ala Arg Gly Leu Gln Ala

35 40 45

Pro Ala Gly Glu Pro Thr Gln Glu Ala Ser Gly Val Ala Ala Ala Lys

50 55 60

Ala Gly Met Asn Arg Val Phe Leu Gln Arg Leu Leu Trp Leu Leu Arg

65 70 75 80

Leu Leu Phe Pro Arg Val Leu Cys Arg Glu Thr Gly Leu Leu Ala Leu

85 90 95

His Ser Ala Ala Leu Val Ser Arg Thr Phe Leu Ser Val Tyr Val Ala

100 105 110

Arg Leu Asp Gly Arg Leu Ala Arg Cys Ile Val Arg Lys Asp Pro Arg

115 120 125

Ala Phe Gly Trp Gln Leu Leu Gln Trp Leu Leu Ile Ala Leu Pro Ala

130 135 140

Thr Phe Val Asn Ser Ala Ile Arg Tyr Leu Glu Gly Gln Leu Ala Leu
145 150 155 160
Ser Phe Arg Ser Arg Leu Val Ala His Ala Tyr Arg Leu Tyr Phe Ser
165 170 175
Gln Gln Thr Tyr Tyr Arg Val Ser Asn Met Asp Gly Arg Leu Arg Asn
180 185 190
Pro Asp Gln Ser Leu Thr Glu Asp Val Val Ala Phe Ala Ala Ser Val
195 200 205
Ala His Leu Tyr Ser Asn Leu Thr Lys Pro Leu Leu Asp Val Ala Val
210 215 220
Thr Ser Tyr Thr Leu Leu Arg Ala Ala Arg Ser Arg Gly Ala Gly Thr
225 230 235 240
Ala Trp Pro Ser Ala Ile Ala Gly Leu Val Val Phe Leu Thr Ala Asn
245 250 255
Val Leu Arg Ala Phe Ser Pro Lys Phe Gly Glu Leu Val Ala Glu Glu
260 265 270
Ala Arg Arg Lys Gly Glu Leu Arg Tyr Met His Ser Arg Val Val Ala
275 280 285
Asn Ser Glu Glu Ile Ala Phe Tyr Gly Gly His Glu Val Glu Leu Ala
290 295 300
Leu Leu Gln Arg Ser Tyr Gln Asp Leu Ala Ser Gln Ile Asn Leu Ile
305 310 315 320
Leu Leu Glu Arg Leu Trp Tyr Val Met Leu Glu Gln Phe Leu Met Lys
325 330 335
Tyr Val Trp Ser Ala Ser Gly Leu Leu Met Val Ala Val Pro Ile Ile
340 345 350
Thr Ala Thr Gly Tyr Ser Glu Ser Asp Ala Glu Ala Val Lys Lys Ala
355 360 365

Ala Leu Glu Lys Lys Glu Glu Glu Leu Val Ser Glu Arg Thr Glu Ala

370 375 380

Phe Thr Ile Ala Arg Asn Leu Leu Thr Ala Ala Ala Asp Ala Ile Glu

385 390 395 400

Arg Ile Met Ser Ser Tyr Lys Glu Val Thr Glu Leu Ala Gly Tyr Thr

405 410 415

Ala Arg Val His Glu Met Phe Gln Val Phe Glu Asp Val Gln Arg Cys

420 425 430

His Phe Lys Arg Pro Arg Glu Leu Glu Asp Ala Gln Ala Gly Ser Gly

435 440 445

Thr Ile Gly Arg Ser Gly Val Arg Val Glu Gly Pro Leu Lys Ile Arg

450 455 460

Gly Gln Val Val Asp Val Glu Gln Gly Ile Ile Cys Glu Asn Ile Pro

465 470 475 480

Ile Val Thr Pro Ser Gly Glu Val Val Val Ala Ser Leu Asn Ile Arg

485 490 495

Val Glu Glu Gly Met His Leu Leu Ile Thr Gly Pro Asn Gly Cys Gly

500 505 510

Lys Ser Ser Leu Phe Arg Ile Leu Gly Gly Leu Trp Pro Thr Tyr Gly

515 520 525

Gly Val Leu Tyr Lys Pro Pro Pro Gln Arg Met Phe Tyr Ile Pro Gln

530 535 540

Arg Pro Tyr Met Ser Val Gly Ser Leu Arg Asp Gln Val Ile Tyr Pro

545 550 555 560

Asp Ser Val Glu Asp Met Gln Arg Lys Gly Tyr Ser Glu Gln Asp Leu

565 570 575

Glu Ala Ile Leu Asp Val Val His Leu His His Ile Leu Gln Arg Glu

580 585 590
 Gly Gly Trp Glu Ala Met Cys Asp Trp Lys Asp Val Leu Ser Gly Gly
 595 600 605
 Glu Lys Gln Arg Ile Gly Met Ala Arg Met Phe Tyr His Arg Pro Lys
 610 615 620
 Tyr Ala Leu Leu Asp Glu Cys Thr Ser Ala Val Ser Ile Asp Val Glu
 625 630 635 640
 Gly Lys Ile Phe Gln Ala Ala Lys Asp Ala Gly Ile Ala Leu Leu Ser
 645 650 655
 Ile Thr His Arg Pro Ser Leu Trp Lys Tyr His Thr His Leu Leu Gln
 660 665 670
 Phe Asp Gly Glu Gly Gly Trp Lys Phe Glu Lys Leu Asp Ser Ala Ala
 675 680 685
 Arg Leu Ser Leu Thr Glu Glu Lys Gln Arg Leu Glu Gln Gln Leu Ala
 690 695 700

 Gly Ile Pro Lys Met Gln Arg Arg Leu Gln Glu Leu Cys Gln Ile Leu
 705 710 715 720
 Gly Glu Ala Val Ala Pro Ala His Val Pro Ala Pro Ser Pro Gln Gly
 725 730 735
 Pro Gly Gly Leu Gln Gly Ala Ser Thr
 740 745

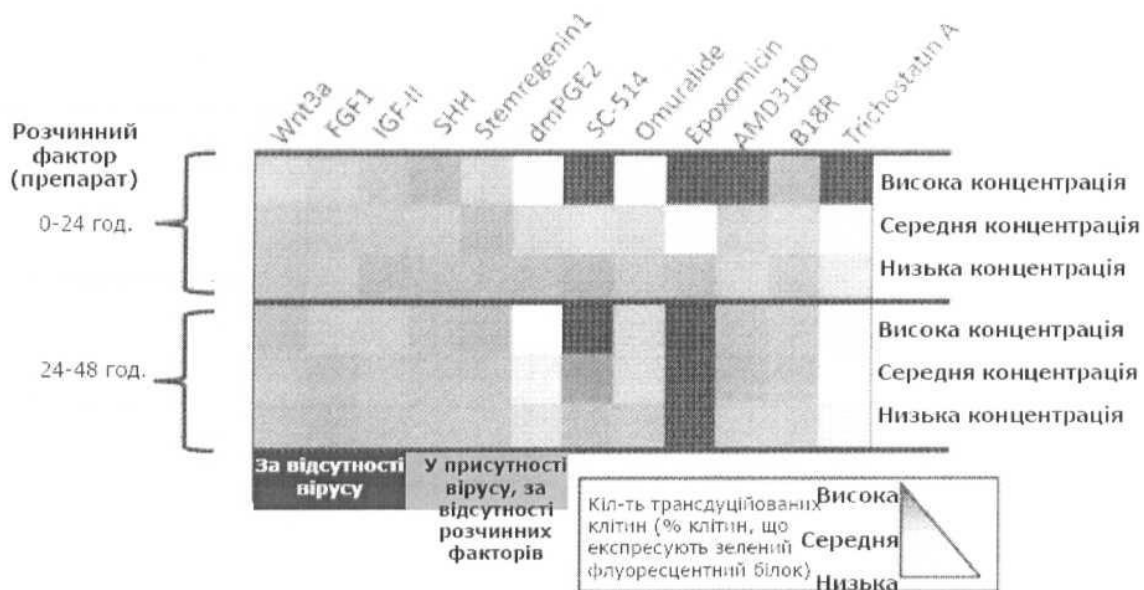
ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

1. Спосіб підвищення ефективності трансдукції кровотворних стовбурових клітин або клітин-попередників, культивованих з лентивірусом, який включає: культивування стовбурових клітин або клітин-попередників і лентивірусу в культуральному середовищі, що містить сполуку, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP,
де кровотворні стовбурові клітини або клітини-попередники культивують з лентивірусом під час або до культивування зі сполукою, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, та
де сполуку, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, вибирають з групи, яка складається з: PGA_2 , PGB_2 , PGD_2 , PGE_1 , PGE_2 , PGF_2 , PGI_2 , PGH_2 , PGJ_2 та їх аналогів, або
де сполуку, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, вибирають з групи, яка складається з: $15d-PGJ_2$; дельта- $12-PGJ_2$; 2-гідроксигептадекатрієнової кислоти (ГГТ); тромбоксану A_2 ; тромбоксану B_2 ; ілопросту; трепростинілу; травопросту; карбопросту трометаміну; тафлупросту; латанопросту; біматопросту; унопростона ізопропілу; клопростенолу; естрофану; суперфану; мізопростолу; бутапросту; лінолевої кислоти; $13(s)$ -HODE; LY171883; мідової кислоти; ейкозатрієнової кислоти; епоксиейкозатрієнової кислоти; ONO-259; Cay1039; агоніста рецептора PGE_2 ; 16,16-диметил- PGE_2 ; 19(R)-гідрокси- PGE_2 ; 16,16-диметил- PGE_2 п-(п-ацетамідобензамідо)фенілового естеру; 11-дезоксид-16,16-диметил- PGE_2 ; 9-дезоксид-9-метил-16,16-диметил- PGE_2 ; 9-дезоксид-9-метил- PGE_2 ; сульпростону; сериноламиду- PGE_2 ; метилового естеру PGE_2 ; 16-феніл-тетранор PGE_2 ; 15(S)-15-метил- PGE_2 ; 15(R)-15-метил- PGE_2 ; BIO; 8-бром-цАМФ; форсколіну; ацетоксиметилового ефіру 1,2-бісетан-N,N,N,N-тетраоцтової кислоти (BAPTA-AM); фендиліну; нікардипіну; ніфедипіну; пімозиду; строфантиніду; ланатозиду; L-аргініну; нітропрусиду натрію; ванадату натрію; брадикініну; мебеверину; флурандренолідіду; атенололу; піндололу; габоксадолу; кінуренової кислоти; гідралазину; тіабендазолу; бікукуліну; везаміколу; перувозиду; іміпраміну; хлорпропаміду; 1,5-пентаметилентетразолу; 4-амінопіридину; діазоксиду; бенфотіаміну; 12-метоксидодеценної кислоти; N-форміл-метіонін-лейцин-фенілаланіну; галаміну; IAA 94; і хлортрианізену, або
де сполуку, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, вибирають з групи, яка складається з: простагландину $E_2(PGE_2)$ або 16,16-диметил- PGE_2 .
2. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що стовбурові клітини або клітини-попередники вибирають з групи, яка складається з: ембріональних стовбурових клітин і індукованих плюрипотентних стовбурових клітин.
3. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що стовбурові клітини або клітини-попередники вибирають з групи, яка складається з: мезенхімальних стовбурових клітин, кровотворних стовбурових клітин, стовбурових клітин нервової тканини, стовбурових клітин сітківки, стовбурових клітин міокарда, стовбурових клітин кістякових м'язів, стовбурових клітин, отриманих з жирової тканини, стовбурових клітин хрящової тканини, стовбурових клітин печінки, стовбурових клітин нирок і стовбурових клітин підшлункової залози.
4. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що клітини вибирають з групи, яка складається з: остеобластів, хондроцитів, адипоцитів, клітин кістякових м'язів, кардіоміоцитів, нейронів, астроцитів, олігодендроцитів, шванівських клітин, клітин сітківки, клітин рогівки, клітин шкіри, моноцитів, макрофагів, нейтрофілів, базофілів, еозинофілів, еритроцитів, мегакаріоцитів, дендритних клітин, Т-лімфоцитів, В-лімфоцитів, NK-клітин, клітин шлунку, клітин кишечника, гладком'язових клітин, клітин судин, клітин сечового міхура, α -клітин підшлункової залози, β -клітин підшлункової залози, дельта-клітин підшлункової залози, гепатоцитів, клітин нирок, клітин надниркової залози і клітин легенів.
5. Спосіб за п. 1, який **відрізняється** тим, що клітини являють собою кровотворні стовбурові клітини або кровотворні клітини-попередники.
6. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що трансдукується щонайменше 50 % кровотворних стовбурових клітин або кровотворних клітин-попередників.
7. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що трансдукується щонайменше 75 % кровотворних стовбурових клітин або кровотворних клітин-попередників.
8. Спосіб за п. 5, який **відрізняється** тим, що трансдукується щонайменше 90 % кровотворних стовбурових клітин або кровотворних клітин-попередників.
9. Спосіб за будь-яким з пп. 1-8, який додатково включає культивування клітин і лентивірусу в присутності інгібітору гістондеацетилази (ГДАЦ).
10. Спосіб за п. 9, який **відрізняється** тим, що інгібітор гістондеацетилази (ГДАЦ) вибирають з групи, яка складається з: трихостатину А (ТСА), вальпроєвої кислоти (ВПК), бутирату натрію,

субероїланіліду гідроксамової кислоти (САГК), фенілбутирату натрію, депсипептидів, трапоксину (ТПК), пептиду 1, що містить циклічну гідроксамову кислоту (ЦГКП1), MS-275, LBH589 і PXD-101.

11. Спосіб за будь-яким з пп. 1-10, який **відрізняється** тим, що лентивірус являє собою вірус імунodefіциту людини (ВІЛ).
12. Спосіб за будь-яким з пп. 1-11, який **відрізняється** тим, що лентивірус псевдотипований білком G оболонки вірусу везикулярного стоматиту (VSV-G).
13. Спосіб за будь-яким з пп. 1-12, який **відрізняється** тим, що клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, до процесу трансдукції.
14. Спосіб за п. 13, який **відрізняється** тим, що клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом щонайменше приблизно 2 годин.
15. Спосіб за п. 13, який **відрізняється** тим, що клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом щонайменше приблизно 4 годин.
16. Спосіб за будь-яким з пп. 1-13, який **відрізняється** тим, що клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, під час трансдукції.
17. Спосіб за п. 16, який **відрізняється** тим, що клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом щонайменше приблизно 24 годин.
18. Спосіб за будь-яким з пп. 15 -17, який **відрізняється** тим, що клітини культивують в присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, протягом перших 24 годин процесу трансдукції.
19. Спосіб за будь-яким з пп. 15 -18, який **відрізняється** тим, що клітини культивують у присутності сполуки, яка забезпечує посилення сигнального шляху рецептора простагландину EP, впродовж перших 48 годин процесу трансдукції.
20. Спосіб за будь-яким з пп. 1-19, який **відрізняється** тим, що лентивірус містить вектор, який включає:
 - а) лівий (5') довгий кінцевий повтор (ДКП) лентивірусу;
 - б) послідовність контролю експресії, функціонально пов'язану з геном, що представляє інтерес; і
 - с) правий (3') довгий кінцевий повтор (ДКП) лентивірусу.
21. Спосіб за будь-яким з пп. 6-20, який **відрізняється** тим, що лентивірус містить вектор, який включає:
 - а) лівий (5') довгий кінцевий повтор (ДКП) ВІЛ-1;
 - б) псі-послідовність для упаковки (Ψ+);
 - с) центральний поліпуриновий тракт ВІЛ-1/ДНК-flap елемент (сPPT/FLAP);
 - д) елемент, що зв'язується з білком rev (RRE-структура);
 - е) промотор β-глобіну і контролюючу локус область (LCR) β-глобіну, функціонально пов'язані з геном, що представляє інтерес, і
 - ф) правий (3') довгий кінцевий повтор (ДКП) лентивірусу, що містить:
 - i) один або декілька інсуляторів або
 - ii) поліаденінову послідовність β-глобіну кролика (gβgrA).
22. Спосіб за будь-яким з пп. 6-20, який **відрізняється** тим, що кровотворні стовбурові клітини або кровотворні клітини-попередники вводять пацієнтові, що страждає на гемоглобінопатію.
23. Спосіб за п. 22, який **відрізняється** тим, що гемоглобінопатія являє собою β-таласемію або серповидноклітинну анемію.
24. Спосіб за будь-яким з пп. 6-20, який **відрізняється** тим, що лентивірус містить вектор, що включає:
 - а) лівий (5') довгий кінцевий повтор (ДКП) ВІЛ-1;
 - б) псі-послідовність для упаковки (Ψ+);
 - с) центральний поліпуриновий тракт ВІЛ-1/ДНК-flap елемент (сPPT/FLAP);
 - д) елемент, що зв'язується з білком rev (RRE-структура);
 - е) промотор MND, функціонально зв'язаний з полінуклеотидом, що кодує поліпептид ABCD1 людини;
 - ф) правий (3') довгий кінцевий повтор (ДКП) ВІЛ-1 і
 - г) поліаденінову послідовність β-глобіну кролика (gβgrA).
25. Спосіб за будь-яким з пп. 1-24, який **відрізняється** тим, що лентивірус являє собою реплікативно-дефектний вірус.

26. Спосіб за п. 24, який **відрізняється** тим, що кровотворні стовбурові клітини або кровотворні клітини-попередники вводять пацієнтові, що страждає на аденолейкодистрофію або адреномієлонеуропатію.



ФІГ. 1