

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

(51) Int. Cl. *C12N 15/86* (2006.01)

2023.01.11

(21) Номер заявки

201892369

(22) Дата подачи заявки

2017.04.20

СПОСОБЫ СЕЛЕКТИВНОЙ МОДУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ ОТДЕЛЬНЫХ ПОДТИПОВ КЛЕТОК

- (31) 16305468.7
- (32) 2016.04.21
- (33) EP
- (43) 2019.05.31
- (86) PCT/EP2017/059435
- (87)WO 2017/182585 2017.10.26
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:

ЭКОЛЬ НОРМАЛЬ СЮПЕРИЁР ДЕ ЛИОН; СЕНТР НАСЬОНАЛЬ **ЛЕ ЛЯ РЕШЕРШ СЬЕНТИФИК:** ЮНИВЕРСИТЕ КЛОД БЕРНАР ЛИОН І; ИНСТИТУТ НАСЬОНАЛЬ ДЕ ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ МЕДИКАЛЬ (ИНСЕРМ) (FR)

(72) Изобретатель:

Коста Фехос Каролин, Верхёйен Эльс, Коссе Франсуа-Лоик (FR), Бендер Рубен, Бухгольц Кристиан (DE), Чжоу Ци (GB)

Представитель:

Липатова И.И., Хмара М.В., Осипов К.В., Новоселова С.В., Дощечкина В.В., Пантелеев А.С., Ильмер Е.Г. (RU)

(56)SABRINA FUNKE ET AL.: "Targeted cell entry of lentiviral vectors", MOLECULAR THERAPY, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 16, № 8, 1 August 2008 (2008-08-01), pages 1427-1436, XP008155467, ISSN: 1525-0016, DOI: 10.1038/MT.2008.128, retrieved from the Internet: URL: http://www.nature.com/mt/journal/v16/n8/in dex.html [retrieved on 2008-06-24], page 1428, right-hand column, last paragraph - page 1429, left-hand column, paragraph 1; figure 3a BRIGITTE ANLIKER ET AL.: "Specific gene

transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors", NATURE METHODS,

№ 11, 1 November 2010 (2010-11-01), pages 929-935, XP055033622, ISSN: 1548-7091, DOI: 10.1038/nmeth.1514, page 930, left-hand column, last paragraph - right-hand column, line 7; figure 1a

SABRINA KNEISSL ET AL.: "Measles Virus Glycoprotein-Based Lentiviral Targeting Vectors That Avoid Neutralizing Antibodies", PLOS ONE, vol. 7, № 10, 10 October 2012 (2012-10-10), page e46667, XP055309089, DOI: 10.1371/journal.pone.0046667, see the first 3 fusion

protein constructs of figure 1

ROBERT C. MÜNCH ET AL.: "DARPins:
An Efficient Targeting Domain for Lentiviral Vectors", MOLECULAR THERAPY, vol. 19, № 4, 1 April 2011 (2011-04-01), pages 686-693, XP055092878, ISSN: 1 April 1525-0016, DOI: 10.1038/mt.2010.298, figure 1a

T. ENKIRCH ET AL.: "Targeted lentiviral vectors pseudotyped with the Tupaia paramyxovirus glycoproteins" GENE THERAPY, vol. 20, № 1, 1 January 2013 (2013-01-01), pages 16-23, XP055309550, GB, ISSN: 0969-7128, DOI: 10.1038/gt.2011.209, figure 1a

M. IMAMURA ET AL.: "Autonomous growth and increased cytotoxicity of natural killer cells expressing membrane-bound interleukin-15", BLOOD, vol. 124, № 7, 14 August 2014 (2014-08-14), pages 1081-1088, XP055309476, US, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/ blood-2014-02-556837, see the abstract, construct mbIL15 and the section "Plasmids, gene transduction, and functional

analysis of NK cells"; figure 1A E. VERHOEYEN ET AL.: "IL-7 surface-engineered lentiviral vectors promote survival and efficient gene transfer in resting primary T lymphocytes", BLOOD, vol. 101, № 6, 15 March 2003 (2003-03-15), pages 2167-2174, XP055272100, US, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2002-07-2224, cited in the application see section "Envelope construction"; page 2169, left-hand column, last

paragraph - right-hand column, paragraph 1

C. FRECHA ET AL.: "Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins", BLOOD, vol. 112, № 13, 15 December 2008 (2008-12-15), pages 4843-4852, XP055309112, US, ISSN: 0006-4971, DOI: 10.1182/blood-2008-05-155945, page 4848, left-hand column, paragraph 2 - page 4850, righthand column, paragraph 2

WO-A2-2008037458

Настоящее изобретение относится к псевдотипированным ретровирусоподобным частицам или ретровирусным векторам, содержащим сконструированные гликопротеины оболочки, происходящие из вируса семейства Paramyxoviridae, слитые с доменом, нацеливающим на клетку, и слитые с функциональным доменом. Настоящее изобретение также относится к применению указанных псевдотипированных ретровирусоподобных частиц или ретровирусных векторов для селективной модуляции активности специфических поднаборов клеток, в частности специфических иммунных клеток. Данные псевдотипированные ретровирусоподобные частицы или ретровирусные векторы являются особенно полезными для генотерапии, иммунотерапии и/или

вакцинации.

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к способам селективной модуляции активности отдельных подтипов клеток.

Предшествующий уровень техники

Клетки иммунной системы участвуют во многих типах патологий. Увеличение или уменьшение их активности, следовательно, является целью многих терапевтических стратегий. Многие типы иммунных клеток с очень отличающимися функциями могут быть различены по экспрессии определенных белков клеточной поверхности. До сих пор нет доступной технологии, которая обеспечивает селективную активацию или дезактивацию только отдельного подтипа клеток, особенно in vivo.

Применение цитокинов для индукции или стимуляции образования желательного иммунного ответа является привлекательным подходом в иммунотерапии против рака. Цитокины типично используются в качестве неспецифичных вспомогательных веществ для поддержки других иммунотерапий или вводятся дополнительно к химиотерапии. Однако вплоть до настоящего времени лечения на основе цитокинов редко используются из-за нерешенной проблемы системной токсичности. Кроме того, цитокины обычно применяются системно, посредством этого затрагивая все типы клеток, экспрессирующих релевантный цитокиновый рецептор. Следовательно, тонко настроенная модуляция в месте, релевантном для заболевания, является невозможной.

Для преодоления данного недостатка цитокины можно сливать с противоопухолевым антителом или соединять с микро- или наночастицами с противоопухолевым антителом, посредством этого нацеливая цитокины на опухоль и уменьшая системные побочные эффекты. Однако данные слитые белки или частицы, загруженные цитокином-антителом, являются менее стабильными и подвергаются быстрому клиренсу in vivo, приводя к относительно низкой концентрации цитокина в местах заболевания. Кроме того, высвобождение цитокинов частицами, загруженными цитокином-антителом, зависит от рН. Кроме того, цитокины (такие как IL-2 (интерлейкин-2)), доставленные в опухоль этими предыдущими подходами, неселективно стимулируют разные типы разных иммунных клеток в сложном микроокружении опухоли, включая и иммуноэффективные и подавляющие клетки, таким образом, ограничивая их применения для лечения рака.

В том что касается генотерапии, важные клетки-мишени, такие как покоящиеся человеческие Т-клетки, В-клетки и HSC (гематопоэтические стволовые клетки) являются невосприимчивыми к трансдукции лентивирусными векторами. Трансдукция, опосредованная традиционным VSV-LV (вирус везикулярного стоматита-лентивирус), происходит только когда Т-клетки были активированы. В генотерапевтических испытаниях, проведенных до настоящего времени, Т-клетки были активированы посредством рецепторов когнатного антигена, что обычно индуцирует фенотипические и функциональные изменения в Т-клетках и в конечном счете приводит к пониженным выживаемости Т-клеток и противоопухолевому эффекту in vivo.

Для стимуляции переноса генов в покоящихся Т-клетках было получено несколько химерных лентивирусных векторов. Например, Verhoeyen et al. (Blood, 2003, vol. 101, n°6) раскрывают полученные из ВИЧ (вирус иммунодефицита человека) векторы, псевдотипированные двумя типами гликопротеинов оболочки: химерным гликопротеином (gp) оболочки MLV (вирус лейкоза мышей), N-терминально слитым с IL-7 (интерлейкин-7), и VSV-G (гликопротеин вируса везикулярного стоматита). Данные векторные частицы с IL-7 могут эффективно трансдуцировать покоящиеся Т-клетки и индуцировать активацию Т-клеток, но равным образом трансдуцируют Т-клетки CD4⁺ и CD8⁺. Таким образом, они не могут различать разные поднаборы Т-клеток. Кроме того, тот факт, что необходим ненацеленный gp оболочки, такой как gp VSV-G, возможно будет обеспечивать трансдукцию нежелательных гематопоэтических или эндотелиальных клеток. Одним исключением являются псевдотипированные гликопротеином вируса кори (MeV) лентивирусные векторы (MV-LV). MV-LV может опосредовать трансдукцию покоящихся Т-лимфоцитов без изменения статуса клеточного цикла G0/G1a. Zhou et al. (J. Immunol., 2015, vol. 195, n°5) также раскрывают нацеленный на CD4 LV, который может трансдуцировать свежевыделенные покоящиеся Т-клетки, но с очень низкой эффективностью (меньше чем 10%) при высокой дозе частиц.

Наконец, современные стратегии получения менее дифференцированных опухолеспецифичных Т-клеток для адоптивной Т-клеточной терапии полагаются на оптимизацию протокола стимуляции и культивирования Т-клеток. Например, для продукции большего числа клеток $T_{\rm SCM}$ (стволовые Т-клетки памяти) или клеток $T_{\rm CM}$ (центральные Т-клетки памяти) используются комбинации IL-15 и IL-7 или IL-21 и IL-7 для стимуляции и размножения Т-клеток. Данная система культивирования является очень дорогой, так как требуется рутинное повторное пополнение цитокинами (каждые двое суток). Затем обычно применяют несколько стадий сортировки клеток с получением желательных типов клеток.

Следовательно, все еще имеется потребность в предложении способов селективного и эффективного модулирования активности отдельных подтипов иммунных клеток.

Описание изобретения

Авторы изобретения неожиданно обнаружили то, что возможно селективно модулировать активность отдельных подтипов иммунных клеток посредством применения псевдотипированных ретровирусоподобных частиц или ретровирусных векторов (например, лентивирусоподобных частиц (VLP) или

лентивирусных векторов (LV)), несущих и специфичный в отношении клетки нацеливающий домен (например, специфичный в отношении Т-клеток CD4⁺ или в отношении Т-клеток CD8⁺), и функциональный домен, например цитокин, каждый из которых слит с гликопротеином вируса семейства Paramyxoviridae. Указанные ретровирусные векторы также специфично и эффективно доставляют упакованный ген в клетки-мишени.

Фактически неожиданно обнаружили то, что объединение функционального домена со специфичным в отношении клетки нацеливающим доменом на псевдотипированных ретровирусоподобных частицах или ретровирусных векторах значительно улучшало селективную модуляцию активности целевых подтипов иммунных клеток по сравнению с соответствующими частицами или векторами, содержащими только специфичный в отношении клетки нацеливающий домен.

Например, авторы изобретения показали то, что частицы, нацеленные на Т-клетки, экспонирующие стимулирующий цитокин, селективно активируют целевые поднаборы Т-клеток смешанных типов клеток и in vivo в мышиной модели человеческой кровеносной системы, а также доставляют упакованный ген в целевой подтип Т-клеток без какой-либо необходимости в стимулирующих культуральных условиях. Экспонирующие IL-7 (интерлейкин-7), нацеленные на CD4 частицы на основе гликопротеинов MeV (вирус кори) (4^H/IL7^H-VLP) в самом деле специфично активируют и стимулируют выживание культивируемых первичных клеток CD4⁺, тогда как экспонирующие IL-7, нацеленные на CD8 частицы на основе гликопротеинов NiV (вирус Нипах) (8^G/IL7^G-VLP) селективно активируют и стимулируют выживание Т-клеток $CD8^+$. Кроме того, $4^H/IL7^H$ -LV эффективно и специфично дозозависимо доставляет трансгены GFP (зеленый флуоресцентный белок) в Т-клетки CD4⁺ в смеси клеток. По сравнению с родительским нацеленым на CD4 LV (не осуществляющим совместное экспонирование IL-7) 4^H/IL7^H-LV является более эффективным в доставке терапевтического трансгена ErbB2CAR селективно в покоящиеся Т-клетки CD4⁺. Аналогичный эксклюзивный перенос генов и стимуляцию Т-клеток CD8⁺ также наблюдали с лентивирусными векторами, псевдотипированными гликопротеином NiV, совместно экспонирующими CD8/IL-7 ($8^G/IL7^G-LV$). В самом деле $8^G/IL7^G-LV$ является более эффективным в селективной активации T-клеток $CD8^+$ и направленной доставке генов, чем 8^G -LV (см. примеры).

Ретровирусоподобная частица и ретровирусный вектор согласно изобретению демонстрируют много преимуществ, таких как

предоставление высокой местной концентрации цитокинов в местах клеток-мишеней, посредством этого улучшая эффективность и предупреждая тяжелые побочные эффекты цитокиновой терапии,

обеспечение более стабильной и постоянной стимуляции клеток-мишеней по сравнению с растворимыми цитокинами, посредством этого улучшая эффективность цитокиновой терапии,

предоставление очень гибкой системы, обеспечивающей объединение разных типов цитокинов и разных типов нацеливающих доменов на одной частице или ретровирусном векторе,

обеспечение связывания стимуляции клетки со специфичным в отношении клетки переносом генов in vitro или in vitro, что приводит к более эффективной трансдукции специфических поднаборов покоящихся Т-клеток,

обеспечение связывания индукции фенотипа Т-клеток с переносом генов in vitro или in vivo из-за взаимодействия с экспонируемыми на частице или поверхности вектора цитокинами, причем дифференциация трансдуцированных клеток контролируется, и как более общее

обеспечение доставки биологического материала и/или терапевтического(их) лекарственного(ых) средства(средств), включающих ген, мРНК, кшРНК (короткая шпилечная РНК), микроРНК, пептид, белок, фрагмент белка и их комбинации, но не ограничивающихся ими, в конкретные клетки или подтипы клеток in vitro или in vivo,

обеспечение более легкого способа изготовления клеток (например, способ изготовления Т-клеток или гематопоэтических клеток) для адоптивной терапии,

предупреждение проблем устойчивости in vivo при применении ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, псевдотипированного гликопротеинами из вируса Нипах, благодаря низкому уровню предсуществующих антител у людей.

Настоящее изобретение, таким образом, относится к псевдотипированной ретровирусоподобной частице или ретровирусному вектору, содержащему

- а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G или H оболочки, и он предпочтительно по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
 - б) по меньшей мере один модулирующий слитый белок, содержащий
- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G или H оболочки, и он предпочтительно по меньшей мере час-

тично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки, или трансмембранный домен, и

- (ii) по меньшей мере один функциональный домен; и
- в) по меньшей мере один гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, и предпочтительно с отсутствием по меньшей мере одной части цитоплазматической области указанного гликопротеина F оболочки,

где указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или указанный модулирущий слитый белок содержит белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Указанный вирус семейства Paramyxoviridae может представлять собой вирус рода Morbillivirus, например, выбранный в группе, состоящей из вируса кори (MeV), вируса собачьей чумы, морбилливируса китовых, вируса чумы мелких жвачных животных, вируса чумы тюленей и вируса чумы, или вируса рода Henipavirus, например, выбранного в группе, состоящей из вируса Нипах (NiV), вируса Цедар и вируса Хендра.

Белок а) и/или б) предпочтительно содержит по меньшей мере две мутации по сравнению с последовательностью указанного гликопротеина G или H оболочки, причем указанные по меньшей мере две мутации приводят к по меньшей мере частичной неспособности связываться с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки.

Указанный домен, нацеливающий на клетку, может быть выбран в группе, состоящей из DARPin, scFv, нацеливающего пептида и их комбинаций, и/или указанный функциональный домен может быть выбран в группе, состоящей из цитокина, фактора роста, гормона, нейромедиатора, лиганда апоптоза и их комбинаций.

Клетки-мишени могут быть выбраны в группе, состоящей из клеток гематопоэтической системы (включая Т-клетки, В-клетки, моноциты, клетки Th1, клетки Th2, клетки Treg, тучные клетки, дендритные клетки (DC), клетки природные киллеры (NK), Т-клетки природные киллеры (NKT), макрофаги, гематопоэтические стволовые клетки, предшественники Т- и/или В-клеток, эритробласты, тромбоциты и/или нейтрофилы), клеток стромы, эндотелиальных клеток, клеток печени, мышечных клеток, клеток нервной системы, больных клеток и их комбинаций.

Настоящее изобретение также относится к применению псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, для селективной модуляции активности клеток-мишеней и/или селективной трансдукции клеток-мишеней, причем клетки-мишени являются, например, такими, как определено выше.

Настоящее изобретение также относится к способу селективной модуляции активности клеток-мишеней и/или селективной трансдукции клеток-мишеней, где указанный способ включает приведение в контакт псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, с клетками, включающими указанные клетки-мишени, причем клетки-мишени являются, например, такими, как определено выше.

Настоящее изобретение также относится к псевдотипированной ретровирусоподобной частице или ретровирусному вектору, как определено выше, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в иммунотерапии, генотерапии и/или вакцинации, например, в предупреждении и/или лечении иммунного заболевания (например, аутоиммунного заболевания), рака, генетического заболевания, аллергического заболевания, воспалительного заболевания, инфекционного заболевания, метаболического заболевания, неврологического заболевания (например, нейродистрофии, болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, болезни Альцгеймера), мышечного заболевания и их комбинаций.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или последовательность, кодирующую модулирующий слитый белок, где

указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, содержит

- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку; и

указанный модулирующий слитый белок содержит

- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один функциональный домен.

Настоящее изобретение также относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, как определено выше.

Настоящее изобретение также относится к способу получения псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, где указанный способ включает сотрансфекцию линии упаковывающих клеток

- (i) по меньшей мере одной нуклеиновой кислотой, кодирующей слитый белок, нацеливающий на клетку, причем указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, содержит
 - (а) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae,

или трансмембранный домен, и

- (b) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
- (ii) по меньшей мере одной нуклеиновой кислотой, кодирующей модулирующий слитый белок, причем указанный модулирующий слитый белок содержит
- (a) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, или трансмембранный домен, и
 - (b) по меньшей мере один функциональный домен;
- (iii) по меньшей мере одной нуклеиновой кислотой, кодирующей гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae;
- (iv) по меньшей мере одним вектором, содержащим нуклеиновую кислоту, кодирующую коровые белки из указанного ретровируса; и
- (v) возможно по меньшей мере одним вектором, содержащим геном, происходящий от ретровирусного, компетентный в отношении упаковывания,

где указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или указанный модулирующий слитый белок содержит белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор.

Термин "ретровирусоподобная частица" в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к частице, содержащей ретровирусные белки Gag, Pol и Env (оболочка), но не содержащей какой-либо генетической информации, происходящей из ретровируса.

Белки Gag, Pol и Env происходят из ретровируса и предоставляются в транслированном виде посредством линии упаковывающих клеток.

"Ретровирусный вектор" в том виде, в котором он используется в данном документе, содержит белки Gag, Pol и Env (оболочка) и молекулу PHK. Указанная молекула PHK не содержит какого-либо гена gag, env или pol, но содержит элемент psi и LTR (длинные концевые повторы), которые требуются для эффективной упаковки молекулы PHK в образующиеся частицы. Указанная молекула PHK может дополнительно содержать интересующий ген, который находится под контролем подходящего промотора и таким образом экспрессируется при встраивании указанного гена в геном хозяина или клетки-мишени.

Ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор представляют собой вирусоподобную частицу или вирусный вектор соответственно, коровые белки которых, т.е. белки, кодируемые генами Gag и Pol, происходят из ретровируса.

Под термином "ретровирус" в данном документе подразумевается вирус, геном которого состоит из молекулы РНК и который содержит обратную транскриптазу.

Ретровирус является членом семейства Retroviridae. Ретровирус может представлять собой онковирус, лентивирус или спумавирус.

Онковирус может представлять собой альфаретровирус, бетаретровирус, дельтаретровирус, эпсилонретровирус или гаммаретровирус.

Когда ретровирус представляет собой онковирус, указанный ретровирус может представлять собой MLV (вирус мышиного лейкоза), ASV (вирус саркомы птиц), вирус лейкоза кошек, вирус коровьего лейкоза, RSV (вирус саркомы Рауса), MPMV (вирус обезьян Мэйсона-Пфайзера), HTLV I (вирус-I человеческого Т-клеточного лейкоза) или HTLV II (вирус-II человеческого Т-клеточного лейкоза).

Когда ретровирус представляет собой лентивирус, указанный ретровирус может представлять собой ВИЧ (вирус иммунодефицита человека), предпочтительно ВИЧ-1 или ВИЧ-2, ВИО (вирус иммунодефицита обезьян), EIAV (вирус инфекционной анемии лошадей), FIV (вирус иммунодефицита кошек) или CAEV (вирус артрита-энцефалита коз).

Когда ретровирус представляет собой спумавирус, указанный ретровирус может представлять собой HFV (человеческий пенящий вирус).

Например, ретровирусный вектор может представлять собой лентивирусный вектор, альфаретровирусный вектор, мышиный ретровирусный вектор или вектор на основе FIV.

Геномы таких ретровирусов легко доступны в базах данных генов.

В предпочтительном воплощении указанный ретровирус представляет собой лентивирус, более предпочтительно ВИЧ, как, например, ВИЧ-1 или ВИЧ-2.

Настоящее изобретение, таким образом, предпочтительно относится к лентивирусоподобной частице (LVP) или к лентивирусному вектору (LV), предпочтительно к LVP или LV, полученным из ВИЧ.

Термин "псевдотипированный" в выражении "псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор" означает в данном документе то, что ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор несет гликопротеины оболочки, которые происходят по меньшей мере из другого вируса, чем указанный ретровирус, и/или которые представляют собой сконструированные гликопротеины оболочки, например химерные и/или мутировавшие гликопротеины оболочки.

Ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор согласно изобретению, например, псевдотипированы с использованием сконструированных гликопротеинов, происходящих из вируса семейства Paramyxoviridae, предпочтительно из вируса рода Morbillivirus или гликопротеинов рода Henipavirus, как

подробно описано ниже.

Гликопротеины оболочки семейства Paramyxoviridae.

Модифицированные гликопротеины оболочки, используемые для псевдотипирования ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора согласно изобретению, происходят из гликопротеинов оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Вирус семейства Paramyxoviridae предпочтительно представляет собой вирус рода Morbillivirus или рода Henipavirus.

Вирусы рода Morbillivirus и рода Henipavirus используют два типа гликопротеинов для поступления к клетку-мишень: белок прикрепления (именуемый гликопротеин G у вируса рода Henipavirus или гликопротеин H у вируса рода Morbillivirus) и гликопротеин F (также именуемый белок слияния или белок F). Белок F опосредует слияние вирусных мембран с клеточными мембранами клетки-хозяина. Гликопротеин G/H распознает рецептор на мембране-мишени и поддерживает белок F в его функции слияния с мембраной. И гликопротеин G/H, и гликопротеин F используются для псевдотипирования ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора согласно изобретению в модифицированной форме.

Вирус рода Morbillivirus, например, выбран в группе, состоящей из вируса кори, вируса собачьей чумы, морбилливируса китовых, вируса чумы мелких жвачных животных, вируса чумы тюленей и вируса чумы.

Предпочтительным вирусом рода Morbillivirus является вирус кори (MeV).

Вирус рода Henipavirus, например, выбран в группе, состоящей из вируса Нипах, вируса Цедар и вируса Хендра.

Предпочтительным вирусом рода Henipavirus является вирус Нипах (NiV).

В предпочтительном воплощении модифицированные гликопротеины оболочки происходят из гликопротеина Н оболочки и гликопротеина F вируса кори или из гликопротеина G оболочки и гликопротеина F вируса Нипах.

Примером последовательности гликопротеина G оболочки вируса Нипах является последовательность SEQ ID NO: 9.

Примером последовательности гликопротеина F оболочки вируса Нипах является последовательность SEQ ID NO: 11.

Примером последовательности гликопротеина H оболочки вируса кори (именуемого гликопротеин H) является последовательность SEQ ID NO: 10.

Примером последовательности гликопротеина F оболочки вируса кори является последовательность SEQ ID NO: 12.

Белок, происходящий из гликопротеина G/H оболочки.

Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор согласно изобретению содержит по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, и по меньшей мере один модулирующий слитый белок. Слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или модулирующий слитый белок содержат первый белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Гликопротеин G или H оболочки является таким, как определено выше в разделе "Гликопротеины оболочки семейства Paramyxoviridae".

Вирус семейства Paramyxoviridae является таким, как определено выше в разделе "Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор".

Под выражением "белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки" в данном документе подразумевается то, что белок содержит по меньшей мере одну модификацию по сравнению с последовательностью гликопротеина G или H оболочки.

Предпочтительный гликопротеин G оболочки представляет собой гликопротеин G оболочки вируса Нипах, также именуемый гликопротеин G оболочки NiV, гликопротеин G NiV или NiV-G.

Предпочтительный гликопротеин H оболочки представляет собой гликопротеин H оболочки вируса кори, также именуемый гликопротеин H MeV, гемагглютинин MeV или MV-H.

Гликопротеин G или H оболочки представляет собой гликопротеин оболочки вируса дикого типа или вакцинного штамма вируса или его вариант при условии, что указанный вариант сохраняет способность указанного гликопротеина дикого типа или вакцинного штамма распознавать рецептор на мембране-мишени и поддерживать белок F в его функции слияния с мембраной.

Эталонной последовательностью для гликопротеина G оболочки NiV является последовательность SEO ID NO: 9.

Гликопротеин G оболочки NiV может иметь последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 9. Например, гликопротеин оболочки NiV может иметь последовательность SEQ ID NO: 9.

Эталонной последовательностью гемагглютинина MeV является последовательность SEQ ID NO: 10.

Гемагглютинин MeV может иметь последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 10. Например, гемагглютинин MeV может иметь последовательность SEQ ID NO: 10.

В предпочтительном воплощении у белка, полученного из гликопротеина G оболочки, отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки.

Белок, у которого отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки, также называется белок, усеченный в его цитоплазматической области.

Выражения "белок, у которого отсутствует х аминокислот цитоплазматической области", "белок, усеченный на х аминокислот в его цитоплазматической области" и "белок Δ cx" являются в данном документе синонимичными и могут использоваться взаимозаменяемо.

Применение гликопротеина G оболочки, усеченного в его цитоплазматической области, значительно улучшает его включение в ретровирусоподобные частицы и ретровирусные векторы, обеспечивая посредством этого получение псевдотипированных ретровирусоподобных частиц или ретровирусных векторов с более высокими титрами и выходом продукции.

Цитоплазматическая область гликопротеина G оболочки расположена на N-конце.

Таким образом, при установлении расположения усеченной части гликопротеина Δ сх относительно неусеченного гликопротеина G, отсчет начинается на втором аминокислотном остатке N-конца гликопротеина G оболочки, т.е. опуская первый остаток метионина.

В качестве примера белок, у которого отсутствует X аминокислот в цитоплазматической области гликопротеина G последовательности SEQ ID NO: Z, отличается от указанного гликопротеина G тем, что у него отсутствуют аминокислоты от Z до Z плюс Z последовательности SEQ ID NO: Z.

Расположение цитоплазматической области в последовательности гликопротеина G оболочки может быть легко определено специалистом.

Цитоплазматическая область гликопротеина H MeV, например, состоит из аминокислот 1-34 последовательности SEQ ID NO: 10.

Цитоплазматическая область гликопротеина G NiV, например, состоит из аминокислот 1-45 последовательности SEQ ID NO: 9.

Например, у белка, происходящего из гликопротеина G или H оболочки могут отсутствовать по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот в цитоплазматической области.

Например, у белка, происходящего из гликопротеина Н оболочки вируса кори может отсутствовать по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 24 аминокислоты в цитоплазматической области. В предпочтительном воплощении у белка, происходящего из гликопротеина Н оболочки вируса кори отсутствуют 15, 18, 20 или 24 аминокислоты.

Например, у белка, происходящего из гликопротеина G оболочки вируса Нипах может отсутствовать по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот в цитоплазматической области. В предпочтительном воплощении у белка, происходящего из гликопротеина G оболочки вируса Нипах отсутствуют 34 аминокислоты.

В предпочтительном воплощении белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки, по меньшей мере частично не способен связываться с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки.

Данная по меньшей мере частичная неспособность связываться с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки может быть получена по меньшей мере одной мутацией, введенной в последовательность указанного гликопротеина G или H оболочки.

Например, белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки, может содержать по меньшей мере одну точечную мутацию, предпочтительно по меньшей мере две точечные мутации, по сравнению с последовательностью указанного гликопротеина оболочки.

Данная точечная мутация может представлять собой делецию, присоединение или замену аминокислоты.

В предпочтительном воплощении точечная мутация является заменой.

В предпочтительном воплощении белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки, не способен к связыванию, т.е. полностью не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки.

Неспособность белка, происходящего из гликопротеина G или H оболочки, связываться с его природным рецептором значительно увеличивает эффективность нацеливания на клетку.

Оценка способности к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором гликопротеина G оболочки может осуществляться любым способом, хорошо известным специалисту.

Природными рецепторами NiV являются рецепторы NiV Ephrin-B2 и -B3.

Белок, происходящий из гликопротеина G оболочки NiV, таким образом, предпочтительно по меньшей мере частично не способен к связыванию с рецептором Ephrin-B2 и/или рецептором NiV Ephrin-B3, предпочтительно с обоими: рецептором Ephrin-B2 и рецептором NiV Ephrin-B3.

Например, гликопротеин оболочки NiV-G может содержать по меньшей мере две или по меньшей

мере три точечные мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 9, где указанные точечные мутации выбраны в группе, состоящей из E501A, W504A, Q530A и E533A.

В предпочтительном воплощении гликопротеин NiV-G содержит или состоит из точечных мутаций E501A, W504A, Q530A и E533A, таким образом приводящих к неспособности к связыванию с рецептором Ephrin-B2 и рецептором NiV Ephrin-B3.

Природными рецепторами MeV являются SLAM, нектин-4 и CD46.

Белок, происходящий из гликопротеина H оболочки MeV, таким образом, предпочтительно по меньшей мере частично не способен к связыванию со SLAM, нектином-4 и/или CD46, предпочтительно по меньшей мере с обоими - SLAM и CD46.

Например, гликопротеин оболочки MV-H может содержать по меньшей мере две или по меньшей мере три точечные мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 10, где указанные точечные мутации выбраны в группе, состоящей из Y481A, R533A, S548L и F549S.

В одном предпочтительном воплощении гликопротеин оболочки MV-H содержит или состоит из двух точечных мутаций Y481A, R533A, S548L и F549S, таким образом приводя к неспособности к связыванию со SLAM и CD46.

Таким образом, у белка, происходящего из гликопротеина G или H оболочки, предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G или H оболочки, и/или он по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки.

В более предпочтительном воплощении у белка, происходящего из гликопротеина G или H оболочки, и отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G или H оболочки, и он по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки.

Под "последовательностью, по меньшей мере на х% идентичной контрольной последовательности" в данном документе подразумевается то, что данная последовательность является идентичной контрольной последовательности или отличается от данной контрольной последовательности на вплоть до 100-х аминокислотных замен на каждые 100 аминокислот контрольной последовательности.

Выравнивание и определение процентной доли идентичности может проводиться вручную или автоматически с использованием, например, программы Needle, которая основана на алгоритме Needleman и Wunsch, описанном у Needleman and Wunsch (1970), J. Mol. Biol., 48:443-453, например,

со следующими параметрами для сравнения полипептидных последовательностей:

матрица сравнений: BLOSUM62;

штраф за открытие пробела: 10;

штраф за удлинение пробела: 0,5;

штраф за концевой пробел: не правильно;

штраф за открытие концевого пробела: 10;

штраф за удлинение концевого пробела: 0,5; и

следующими параметрами для сравнения полинуклеотидных последовательностей:

матрица сравнений: DNAFULL;

штраф за открытие пробела: 10;

штраф за удлинение пробела: 0,5;

штраф за концевой пробел: не правильно;

штраф за открытие концевого пробела: 10;

штраф за удлинение концевого пробела: 0,5.

Как определено в данном документе, аминокислотная последовательность, "по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная" контрольной последовательности, может содержать мутации, такие как делеции, вставки и/или замены по сравнению с контрольной последовательностью.

В случае замен замена предпочтительно соответствует консервативной замене, как указано в табл. 1 ниже. В предпочтительном воплощении последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная контрольной последовательности, отличается от контрольной последовательности только консервативными заменами.

Таблица 1

Консервативные замены	Тип аминокислоты		
Ala, Val, Leu, Ile, Met, Pro, Phe,	Аминокислоты с алифатическими гидрофобными		
Тгр	боковыми цепями		
Ser, Tyr, Asn, Gln, Cys	Аминокислоты с незаряженными, но полярными		
	боковыми цепями		
Asp, Glu	Аминокислоты с кислотными боковыми цепями		
Lys, Arg, His	Аминокислоты с основными боковыми цепями		
Gly	Нейтральная боковая цепь		

В другом предпочтительном воплощении аминокислотная последовательность, по меньшей мере на

80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная контрольной последовательности, соответствует встречающемуся в природе аллельному варианту контрольной последовательности.

Гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки.

Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор согласно изобретению также содержит по меньшей мере один гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, где у указанного гликопротеина предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина F оболочки.

Гликопротеин F оболочки является таким, как определено выше в разделе "Гликопротеины оболочки семейства Paramyxoviridae".

Вирус семейства Paramyxoviridae является таким, как определено выше в разделе "Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор".

Под выражением "белок, происходящий из гликопротеина F оболочки" в данном документе подразумевается то, что данный белок содержит по меньшей мере одну модификацию по сравнению с последовательностью гликопротеина F оболочки.

Предпочтительный гликопротеин F оболочки представляет собой гликопротеин F оболочки вируса Нипах, также именуемый гликопротеин F оболочки NiV, гликопротеин F NiV или NiV-F.

Другим предпочтительный гликопротеином F оболочки является гликопротеин F оболочки вируса кори, также именуемый гликопротеином F MeV или MeV-F.

Гликопротеин F оболочки представляет собой гликопротеин оболочки вируса дикого типа или вакцинного штамма или их вариант при условии, что у указанного варианта сохраняется способность гликопротеина F дикого типа или вакцинного штамма опосредовать слияние вирусных мембран с клеточной мембраной клетки-мишени или клетки-хозяина.

Эталонной последовательностью для гликопротеина F оболочки NiV является последовательность SEQ ID NO: 11. Гликопротеин F оболочки NiV может иметь последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 11. Например, гликопротеин F оболочки NiV может иметь последовательность SEQ ID NO: 11.

Эталонной последовательностью для гликопротеина F оболочки MeV является последовательность SEQ ID NO: 12.

Гликопротеин F оболочки MeV может иметь последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 12. Например, гликопротеин F оболочки MeV может иметь последовательность SEQ ID NO: 12.

В предпочтительном воплощении у белка, происходящего из гликопротеина F оболочки, отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина F оболочки.

Белок, у которого отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина F оболочки, также называется белок, усеченный в его цитоплазматической области.

Выражения "белок, у которого отсутствуют х аминокислот цитоплазматической области", "белок, усеченный на х аминокислот в его цитоплазматической области" и "белок Δ сх" являются в данном документе синонимичными и могут быть использованы взаимозаменяемо.

Применение гликопротеина F оболочки, усеченного в его цитоплазматической области, значительно улучшает его включение в ретровирусоподобные частицы и ретровирусные векторы, обеспечивая посредством этого получение псевдотипированных ретровирусоподобных частиц или ретровирусных векторов с более высокими титрами и выходом продукции.

Цитоплазматическая область гликопротеина F оболочки расположена на C-конце.

Таким образом, при установлении расположения усеченной части гликопротеина Δ сх относительно неусеченного гликопротеина F отсчет начинается с C-конца гликопротеина F.

В качестве примера гликопротеин, у которого отсутствует X аминокислот в его цитоплазматической области по сравнению с гликопротеином F последовательности SEQ ID NO: Z, состоящим из n аминокислот, отличается от указанного гликопротеина F тем, что у него отсутствуют аминокислоты от n-x+1 до n последовательности SEQ ID NO: Z.

Расположение цитоплазматической области в последовательности гликопротеина F оболочки может быть легко определено специалистом.

Цитоплазматическая область гликопротеина F MeV, например, состоит из аминокислот 518-550 последовательности SEQ ID NO: 12 (33 аминокислоты).

Цитоплазматическая область гликопротеина F NiV, например, состоит из аминокислот 519-546 последовательности SEQ ID NO: 11 (28 аминокислот).

Например, у белка, происходящего из гликопротеина F оболочки, могут отсутствовать по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот в цитоплазматической области.

Например, у белка, происходящего из гликопротеина F оболочки вируса кори, могут отсутствовать 30 аминокислот в цитоплазматической области по сравнению с указанным гликопротеином F оболочки вируса кори. Например, указанный белок, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса кори и у

которого отсутствуют 30 аминокислот в цитоплазматической области, содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 15.

Например, у белка, происходящего из гликопротеина F оболочки вируса Нипах, могут отсутствовать 22 аминокислоты в цитоплазматической области по сравнению с указанным гликопротеином F оболочки вируса Нипах. Например, указанный белок, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса Нипах и у которого отсутствуют 22 аминокислоты в цитоплазматической области, содержит или состоит из последовательности SEQ ID NO: 16.

Клетки-мишени.

Клетки-мишени представляют собой интересующие клетки, активность которых подлежит модуляции и/или которые подлежат трансдукции по меньшей мере одним интересующим геном.

Клетки-мишени экспрессируют на их поверхности специфический рецептор клеточной поверхности, обеспечивая посредством этого специфичное нацеливание на данные клетки, а не на клетки, которые не экспрессируют указанный рецептор клеточной поверхности.

Выражения "клетки-мишени" и "целевой поднабор клеток" являются в данном документе синонимичными и могут использоваться взаимозаменяемо.

Клетки-мишени могут быть выбраны в группе, состоящей из гематопоэтических клеток, клеток стромы, эндотелиальных клеток, клеток печени, мышечных клеток (например, сердечных клеток), клеток нервной системы и/или больных клеток.

Клетками нервной системы являются, например, нейроны и/или глиальные клетки.

Под "гематопоэтическими клетками" в данном документе подразумеваются клетки гематопоэтической системы.

Предпочтительные клетки-мишени представляют собой гематопоэтические клетки.

Гематопоэтические клетки могут быть выбраны в группе, состоящей из следующих: Т-клетки, В-клетки, моноциты, клетки Th1, клетки Th2, клетки Treg, тучные клетки, дендритные клетки (DC), природные клетки-киллеры (NK), природные Т-клетки киллеры (NKT), макрофаги, гематопоэтические стволовые клетки, предшественники Т- и/или В-клеток, эритробласты, тромбоциты, нейтрофилы и их комбинации.

Более предпочтительными гематопоэтическими клетками-мишенями являются T-клетки, более предпочтительно T-клетки $CD8^+$ или T-клетки $CD4^+$.

Больными клетками могут быть опухолевые клетки, опухолевые стволовые клетки, клетки, не имеющие специфического функционального гена, сверхэкспрессирующие специфический ген и/или экспрессирующие усеченную или мутировавшую форму специфического гена, инфицированные клетки и/или функционально ослабленные клетки.

Специфичный в отношении клетки нацеливающий домен.

Специфичный в отношении клетки нацеливающий домен (также именуемый "домен, нацеливающий на клетку") обеспечивает специфичное связывание псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора согласно изобретению с рецептором поверхности, селективно экспрессируемым клетками-мишенями.

Клетки-мишени могут быть такими, как определено выше в разделе с таким же названием.

Домен, нацеливающий на клетку, нацеливающего слитого белка предпочтительно выбран в группе, состоящей из DARPin, scFv, нацеливающего пептида и их комбинаций.

Термин "DARPin" относится к разработанным белкам с анкириновыми повторами.

Термин "scFv" относится к одноцепочечному вариабельному фрагменту антитела.

Например, домен, нацеливающий на клетку, является специфичным в отношении CD3, CD8, CD4, маркера раковой клетки, CD11b, CD19, CD62L, CD56, Glut-1 (глюкозный транспортер), CD19, CD22, CD20, CCR5 или CXCR4.

Предпочтительным доменом, нацеливающим на клетку, является DARPin, специфичный в отношении CD4, или scFv, специфичный в отношении CD8.

Функциональный домен.

Функциональный домен обеспечивает модуляцию активности клеток-мишеней.

Под "модуляцией активности клетки-мишени" в данном документе подразумевается активация или ингибирование, индукция фенотипического изменения (например, созревание и/или дифференциация), индукция пролиферации и/или индукция апоптоза указанной клетки-мишени. Модуляция активности клетки-мишени, например, включает усиление или подавление иммунитета, стимуляцию иммунного(ых) ответа(ов), специфичного(ых) для типа клетки.

Функциональный домен модулирующего слитого белка предпочтительно представляет собой лиганд рецептора.

Под "лигандом рецептора" в данном документе подразумевается молекула, предпочтительно белок, предпочтительно нормально высвобождаемая клетками, которая изменяет физиологическое состояние клеток, экспрессирующих когнатный рецептор на их клеточной поверхности. Лиганд рецептора, например, выбран в группе, состоящей из цитокина, фактора роста, гормона, нейромедиатора, лиганда апоптоза, хемокина, транспортера глюкозы и их комбинаций.

Например, цитокин может быть выбран в группе, состоящей из интерлейкина (IL), TNF (фактор некроза опухоли) или интерферона.

Интерлейкин может представлять собой, например, IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL15, IL21, IL-17 или IL-12.

Например, лиганд апоптоза может представлять собой лиганд FAS, лиганд CD40 или TNF-альфа.

Например, хемокин может представлять собой CXCL4, CCL5 или CXCL10.

Например, фактор роста может представлять собой GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор), фактор стволовых клеток (SCF), тромбопоэтин (TPO) или лиганд Flt-3.

Например, гормон может представлять собой инсулин, гормон роста или гормональный пептид, например вазопрессин. Например, нейромедиатор может представлять собой нейропептид, например, выбранный среди инсулина, глюкагона, кальцитонина, нейротензина или брадикинина.

Предпочтительный функциональный домен представляет собой цитокин, предпочтительно интерлейкин, более предпочтительно IL-7.

Нацеливающие на клетку и модулирующие слитые белки.

Ретровирусоподобная частица и ретровирусный вектор согласно данному изобретению содержат два типа слитых белков: один слитый белок, нацеливающий на клетку, и один модулирующий слитый белок.

Слитый белок, нацеливающий на клетку, содержит

- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку.

Модулирующий слитый белок содержит

- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один функциональный домен.

Специалисту будет совершенно понятно то, что, поскольку слитый белок, нацеливающий на клетку, и модулирующий слитый белок представляют собой два разных типа слитых белков, домен, нацеливающий на клетку, и функциональный домен являются разными.

Трансмембранный домен может представлять собой любой встречающийся в природе или не встречающийся в природе трансмембранный домен.

Трансмембранный домен может представлять собой трансмембранный домен рецептора, трансмембранный белок, предпочтительно вирусный трансмембранный белок, фрагмент трансмембранного белка, трансмембранный пептид или его вариант, такой как генетически модифицированный трансмембранный домен рецептора, генетически модифицированный трансмембранный белок, генетически модифицированный фрагмент трансмембранного белка или генетически модифицированный трансмембранный пептил

Примерами трансмембранного домена являются трансмембранный домен (TMD) рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), трансмембранный домен CD34 или трансмембранный домен гликопротеина VSVG.

С-конец белка, происходящего из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, предпочтительно слит прямо или опосредованно (например, через линкер) с N-концом нацеливающего на клетку или функционального домена.

С-конец трансмембранного белка предпочтительно слит прямо или опосредованно (например, через линкер) с N-концом нацеливающего на клетку или функционального домена.

Белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки, домен, нацеливающий на клетку, и функциональный домен являются такими, как определено выше.

При наличии обоих в псевдотипированной ретровирусоподобной частице или ретровирусном векторе белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, в слитом белке, нацеливающем на клетку, и белки в модулирующем слитом белке могут происходить из того же самого вируса семейства Paramyxoviridae или из разных вирусов семейства Paramyxoviridae.

Когда белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, в слитом белке, нацеливающем на клетку, и белки в модулирующем слитом белке происходят из разных вирусов семейства Paramyxoviridae, они предпочтительно происходят из вируса того же самого рода, более предпочтительно из вируса того же самого вида.

Белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, в слитом белке, нацеливающем на клетку, и белки в модулирующем слитом белке предпочтительно являются идентичными. В предпочтительном воплощении слитый белок, нацеливающий на клетку, таким образом, отличается от модулирующего слитого белка его нацеливающим доменом вместо функционального домена и, возможно, при его наличии по меньшей мере одним линкером и/или по меньшей мере одной меткой.

Два белка слитого белка могут быть связаны друг с другом линкером. Можно использовать любой подходящий линкер, хорошо известный специалисту.

Например, линкер может представлять собой $(G_4S)_3$, G_4S , сайт разрезания фактора Xа или спиральный линкер (например, HL3, HL7, ...).

Слитые белки могут быть мечеными, например, для облегчения их очистки и/или выявления.

Метка при ее наличии предпочтительно расположена на С-конце слитого белка, т.е. слита с N-концом домена, нацеливающего на клетку, и/или функционального домена. Можно использовать любую подходящую метку, хорошо известную специалисту.

Например, метка может представлять собой His метку, метку RGS-His, такую как RGSH₆, метку HA (гемагглютинин) или метку с-myc.

Специфическая псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор.

Настоящее изобретение, в частности, относится к псевдотипированной ретровирусоподобной частице или ретровирусному вектору, содержащим

- а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
 - б) по меньшей мере один модулирующий слитый белок, содержащий
- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один функциональный домен; и
- в) по меньшей мере один гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae,

где указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или указанный модулирущий слитый белок содержит белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор, таким образом, содержит по меньшей мере один слитый белок, содержащий белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем указанный слитый белок представляет собой слитый белок, нацеливающий на клетку, или модулирующий слитый белок. В одном воплощении псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор содержит два слитых белка, каждый из которых содержит белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, где один слитый белок представляет собой слитый белок, нацеливающий на клетку, и второй слитый белок представляет собой модулирующий слитый белок.

В одном воплощении псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор содержит

- а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, и
- (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
- б) по меньшей мере один модулирующий слитый белок, содержащий
- (і) трансмембранный домен, и
- (ii) по меньшей мере один функциональный домен; и
- в) по меньшей мере один гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.
- В одном воплощении псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор содержит
 - а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
 - (і) трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
 - б) по меньшей мере один модулирующий слитый белок, содержащий
 - (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, и
 - (ii) по меньшей мере один функциональный домен; и
- в) по меньшей мере один гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.
- В одном воплощении псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор содержит
 - а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
 - (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
 - б) по меньшей мере один модулирующий слитый белок, содержащий
 - (i) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, и
 - (ii) по меньшей мере один функциональный домен; и
- в) по меньшей мере один гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, в слитом

белке, нацеливающем на клетку, белки в модулирующем слитом белке и гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки, могут происходить из того же самого вируса семейства Paramyxoviridae или из разных вирусов семейства Paramyxoviridae.

Когда белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, в слитом белке, нацеливающем на клетку, белки в модулирующем слитом белке и/или гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки, происходят из разных вирусов семейства Paramyxoviridae, они предпочтительно происходят из вируса того же самого рода, более предпочтительно из вируса того же самого вида.

В одном воплощении белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, в слитом белке, нацеливающем на клетку, белки в модулирующем слитом белке и гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки, происходят из того же самого вируса семейства Paramyxoviridae.

В другом воплощении белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, в слитом белке, нацеливающем на клетку, и гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, происходят из того же самого вируса семейства Paramyxoviridae, тогда как модулирующий слитый белок содержит

- (i) трансмембранный домен, например трансмембранный домен (TMD) рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), и
 - (ii) по меньшей мере один функциональный домен.
- В другом воплощении белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, в модулирующем слитом белке и гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, происходят из того же самого вируса семейства Paramyxoviridae, тогда как слитый белок, нацеливающий на клетку, содержит
- (i) трансмембранный домен, например, трансмембранный домен (TMD) рецептора фактора роста тромбоцитов (PDGFR), и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку.

Разные компоненты псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, в частности слитый белок, нацеливающий на клетку, модулирующий слитый белок, гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, и трансмембранный домен являются такими, как определено выше.

Предпочтительная псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор содержит

- а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки и он по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G оболочки, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
 - б) по меньшей мере один модулирующий слитый белок, содержащий
- (i) белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки и он по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G оболочки, или трансмембранный домен и
 - (ii) по меньшей мере один функциональный домен; и
- в) по меньшей мере один гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae и с отсутствием по меньшей мере одной части цитоплазматической области указанного гликопротеина F оболочки,

где указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или указанный модулирущий слитый белок содержит белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Примеры псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора приводятся ниже в табл. 2.

Таблина 2

Название	Слитый	белок,	, Модулирующий		Таолица 2 Гликопротеин,
	·		слитый белок		поисходящий из
	клетку				гликопротеина F
	белок,	домен, на-	белок,	функцио-	оболочки
	происходя-	целиваю-	происходя-	нальный	
	щий из	щий на	щий из	домен	
	гликопроте-	клетку	гликопроте-		
	ина G или H		ина G или H		
	оболочки		оболочки		
MeV	- Hc∆15,	DARpin,	- H∆15,	IL-7	F∆30
4 ^H /IL7 ^H	Нс∆18 или	специфич-	Н∆18 или		
	Hc∆20	ный в отно-	H∆20		
	- 4 мутации	шении	- 4 мутации		
	Y481A,	человечес-	Y481A,		
	R533A,	кого CD4	R533A,		
	S548L,		S548L,		
	F549S		F549S		
			SEQ ID NO:		
	Например, Ѕ	EQ ID NO: 2,	Например, Ѕ	EQ ID NO:	Например, SEQ ID
	содержащая Нс∆15 и His метку		14, содержащая Нс∆15		SEQ ID NO: 15
			и His метку		
NiV	- Gc∆34	scFv, специ-	- Gc∆34	IL-7	F∆22
8 ^G /IL7 ^G	- 4 мутации:	фичный в	- 4 мутации:		
	E501A,	отношении	E501A,		
	W504A,	человечес-	W504A,		
	Q530A,	кого CD8	Q530A,		
	E533A		E533A		
	Например, S	 EQ ID NO: 4,	Например, Ѕ	EQ ID NO:	Например, SEQ ID
	содержащая His метку и линкер (G_4S) $_3$		6, содержащая His		NO: 16
			метку		

В предпочтительном воплощении псевдотипированную ретровирусоподобную частицу или ретровирусный вектор можно получать или получают способом получения, описанным ниже в данном документе в разделе "Способ получения псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора".

Нуклеиновая кислота и вектор.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или модулирующий слитый белок, используемые для псевдотипирования ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора согласно данному изобретению.

Настоящее изобретение, таким образом, в частности, относится к нуклеиновой кислоте, содержащей последовательность, кодирующую слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или последовательность, кодирующую модулирующий слитый белок, где

указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, содержит

- (i) белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки, и он предпочтительно по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G оболочки, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку; указанный модулирующий слитый белок содержит
- (i) белок, происходящий из гликопротеина G оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки, и он предпочтительно по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G оболочки, или трансмембранный домен, и
 - (ii) по меньшей мере один функциональный домен.

Когда нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую слитый белок, нацеливающий на клетку, и последовательность, кодирующую модулирующий слитый белок, указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или указанный модулирующий слитый белок содержат(ит) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Данная нуклеиновая кислота предпочтительно содержит или состоит из

- (i) последовательности, кодирующей белок, происходящий из гликопротеина оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки и он предпочтительно по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G оболочки,
- (ii) последовательности, кодирующей один домен, нацеливающий на клетку, или один функциональный домен, и
 - (iii) возможно линкерной последовательности между последовательностями (i) и (ii),
- (iv) возможно последовательности, кодирующей метку, предпочтительно на 3'-конце последовательности (ii),

где последовательности (i) и (ii) слиты в рамке считывания.

Последовательность линкера кодирует линкер, как определено выше, например кодирует (G₄S)₃.

Последовательность (i) располагается в 5' нуклеиновой кислоты по сравнению с последовательностью (ii), расположенной в 3' нуклеиновой кислоты.

В одном воплощении нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичной последовательности, выбранной в группе, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 13, и/или содержит или состоит из последовательности, кодирующей последовательность, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную последовательности, выбранной в группе, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 14.

В предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота содержит или состоит из последовательности, выбранной в группе, состоящей из SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 13, и/или содержит или состоит из последовательности, кодирующей последовательность, выбранную в группе, состоящей из последовательностей SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 14.

Определение процентной доли идентичности последовательности приводится выше.

Последовательность нуклеиновой кислоты, "по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная" эталонной последовательности, может содержать мутации, такие как делеции, вставки и/или замены, по сравнению с эталонной последовательностью.

В случае замен замена предпочтительно соответствует молчащей замене или замене, приводящей к консервативной замене в транслированной аминокислотной последовательности по сравнению с эталонной последовательностью, например, как показано в табл. 1 выше.

В предпочтительном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты, по меньшей мере на 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичная эталонной последовательности, отличается от эталонной последовательности только молчащей(ими) заменой(ами) и/или заменой(ами), приводящей(ими) к консервативной аминокислотной замене.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, у которого предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина F оболочки.

Гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, является таким, как определено выше.

Нуклеиновая кислота предпочтительно представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту.

Под выражением "нуклеиновая кислота" в данном документе подразумевается фосфатносложноэфирная полимерная форма рибонуклеозидов (также именуемая "молекула РНК"), дезоксирибонуклеозидов (также именуемая "молекула ДНК") или их любой фосфоэфирный аналог, такой как фосфоротиоаты и тиоэфиры, либо в одноцепочечной форме, либо в двухцепочечной форме.

Термин "выделенная" по отношению к биологическому компоненту (такому как нуклеиновая кислота, вектор или белок) относится к биологическому компоненту, который был по существу отделен или очищен от других биологических компонентов в клетке организма, или от самого организма, в котором данный компонент встречается в природе, таких как другие хромосомные и внехромосомные ДНК и РНК, белки, клетки и органеллы. Термин "выделенные нуклеиновые кислоты" или "выделенные векторы" включает молекулы нуклеиновых кислот, очищенные стандартными способами очистки. Данные термины также охватывают нуклеиновые кислоты и векторы, полученные посредством амплификации и/или клонирования, а также химически синтезированные нуклеиновые кислоты и векторы.

Нуклеиновую кислоту согласно изобретению предпочтительно клонируют в вектор.

Термин "вектор", следовательно, имеет значение, отличное от "ретровирусного вектора".

Под термином "вектор" в данном документе подразумевается вектор на основе нуклеиновой кислоты.

Вектор обычно содержит репликатор, сайт множественного клонирования и селектируемый маркер.

Вектор предпочтительно содержит кассету экспрессии, т.е. нуклеиновую кислоту согласно изобретению, помещенную под контроль по меньшей мере одного сигнала экспрессии, обеспечивающего ее экспрессию.

Сигнал экспрессии, в частности, выбран среди промотора, терминатора, энхансера и их комбинаций.

Подходящие промоторы, терминаторы и энхансеры хорошо известны специалисту.

Примером вектора является, например, плазмида.

Под "плазмидой" в данном документе подразумевается двухцепочечная кольцевая ДНК. Данная плазмида может включать маркерный ген, обеспечивающий селекцию клеток, содержащих указанную плазмиду, репликатор для репликации для обеспечения репликации клеткой плазмиды и/или сайт множественного клонирования, обеспечивающий вставку нуклеиновой кислоты согласно изобретению.

Настоящее изобретение, таким образом, также относится к вектору, содержащему нукленовую кислоту, как определено выше.

Данный вектор предпочтительно представляет собой выделенный вектор.

Вектор может содержать или состоять из следующих:

первая нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из следующих:

- (і) последовательность, кодирующая
- а) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G или H оболочки и он предпочтительно по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки, или
 - б) трансмембранный домен,
 - (ii) последовательность, кодирующая один домен, нацеливающий на клетку,
 - (iii) возможно, последовательность линкера между последовательностями (i) и (ii),
- (iv) возможно, последовательность, кодирующая метку предпочтительно на 3'-конце последовательности (ii),

где последовательности (i) и (ii) слиты в рамке считывания;

вторая нуклеиновая кислота, содержащая или состоящая из следующих:

- (і) последовательность, кодирующая
- а) белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, причем у указанного белка предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G или H оболочки и он предпочтительно по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G или H оболочки, или
 - б) трансмембранный домен,
 - (ii) последовательность, кодирующая один функциональный домен,
 - (iii) возможно, последовательность линкера между последовательностями (i) и (ii),
- (iv) возможно, последовательность, кодирующая метку предпочтительно на 3'-конце последовательности (ii),

где последовательности (i) и (ii) слиты в рамке считывания,

где первая нуклеиновая кислота и/или вторая нуклеиновая кислота содержит последовательность, кодирующую белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

Указанная первая нуклеиновая кислота, таким образом, кодирует слитый белок, нацеливающий на клетку, и указанная вторая нуклеиновая кислота кодирует модулирующий слитый белок.

Интересующий ген.

При использовании псевдотипированного ретровирусного вектора в геноме, происходящем от ретровируса, указанного ретровирусного вектора может присутствовать по меньшей мере один интересующий ген.

Интересующий ген может кодировать терапевтический белок, апоптозный белок, химерный рецептор антигена, рецептор клеточной поверхности, антитело, фрагмент антитела, мшРНК, антиген, цитокин, микроРНК, элемент(ы) CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками)/CAS (например, CAS9 и/или РНК-проводники, в частности, для специфичного разрушения или редактирования гена), другую нуклеазную систему, такую как нуклеазы с цинковыми пальцами, S/MAR (каркас/область присоединения к матриксу)-эписому, лиганд и/или рецептор.

S/MAR-эписома вставляется в ядро клетки ретровирусными векторами, которые затем реплицируются с ДНК клетки-хозяина.

Примеры интересующего гена включают ген глобина, ген гематопоэтического фактора роста (например, ген эритропоэтина (EPO)), ген интерлейкина (особенно интерлейкина-1, интерлейкина-2, интерлейкина-3, интерлейкина-6 или интерлейкина-12), ген колониестимулирующего фактора (как, например, ген гранулоцитарного колониестимулирующего фактора, ген гранулоцитарно-макрофагального колоние-

стимулирующего фактора или ген колониестимулирующего фактора стволовых клеток), ген специфичного для тромбоцитов интегрина α IIb β , ген множественной лекарственной устойчивости, гены gp91 или gp47, которые являются дефектными у пациентов с хроническим гранулематозом (CGD), противовирусный ген, делающий клетки устойчивыми к инфекциям патогенами (таким как вирус иммунодефицита человека), ген, кодирующий факторы свертывания крови VIII или IX, которые мутируют при гемофилии, ген, кодирующий лиганд, участвующий в иммунных ответах, опосредованных Т-клетками (как, например, рецепторы антигенов Т-клеток, химерный рецептор антигена (CAR), рецепторы антигенов В-клеток (иммуноглобулины, нейтрализующие антитела против ВИЧ, гепатита С, гепатита В и/или других инфекционных заболеваний), ген обычной цепи у рецептора интерлейкина, ген TNF, ген интерферона гамма, ген СТLА4, гены, экспрессируемые в опухолевых клетках, такие как Melana, гены MAGE (как, например, MAGE-1, MAGE-3), ген P198, ген P1A, ген gp100.

Способ получения псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора.

Настоящее изобретение также относится к способу получения псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, где указанный способ включает сотрансфицирование линии упаковывающих клеток следующими:

- (i) по меньшей мере одна нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, нацеливающий на клетку,
- (іі) по меньшей мере одна нуклеиновая кислота, кодирующая модулирующий слитый белок,
- (iii) по меньшей мере одна нуклеиновая кислота, кодирующая гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae и у которого предпочтительно отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина F оболочки,
- (iv) по меньшей мере один вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую коровые белки из указанного ретровируса, и
- (v) возможно, по меньшей мере один вектор, содержащий компетентный к упаковке геном, происходящий от ретровируса, с получением посредством этого сотрансфицированные клетки.

Указанный слитый белок, нацеливающий на клетку, и/или указанный модулирующий слитый белок содержит белок, происходящий из гликопротеина G или H оболочки вируса семейства Paramyxoviridae.

По меньшей мере один вектор, содержащий компетентный к упаковке геном, происходящий от ретровируса, требуется только для получения ретровирусного вектора.

Можно использовать любую подходящую линию упаковывающих клеток, хорошо известную специалисту.

Под "линией упаковывающих клеток" в данном документе подразумевается линия клеток, которая способна экспрессировать разные компоненты псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора по изобретению.

Нуклеиновые кислоты и векторы, кодирующие разные компоненты псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора по изобретению, могут быть интегрированы в геном линии упаковывающих клеток, например, в случае векторов на основе вируса мышиного лейкоза.

Линия упаковывающих клеток предпочтительно является совместимой с экспрессией лентивирусных генов Gag и Pol.

Например, линия упаковывающих клеток может быть выбрана в группе, состоящей из клеток 293T, клеток насекомых, клеток TE 671 и клеток HT1080.

Термин "трансфекция" означает введение по меньшей мере одной чужеродной нуклеиновой кислоты или вектора (например, ДНК, кДНК или РНК) в клетку таким образом, что клетка-хозяин будет экспрессировать белок(и), кодируемый(ые) указанной(ыми) нуклеиновой(ыми) кислотой(ами) или вектором(ами). Чужеродная(ые) нуклеиновая(ые) кислота(ы) или вектор(ы) может(могут) включать регуляторные или контрольные последовательности, такие как последовательности начала, конца, промотора, сигнальные, секреции или другие последовательности, используемые генетическим аппаратом клетки.

Вектор, содержащий последовательность psi, необходимую для инкапсулирования, называется psi-позитивным вектором, тогда как вектор, не содержащий последовательность psi, называется psi-негативным вектором.

Только вектор, содержащий происходящий от ретровируса геном, компетентный к упаковке, является psi-позитивным вектором. Другие нуклеиновые кислоты и векторы, используемые для сотрансфекции, является psi-негативными.

Нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, нацеливающий на клетку, кодирующая слитый белок, и нуклеиновая кислота, кодирующая гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, являются такими, как определено выше. Они могут быть предоставлены в виде двух или трех отдельных векторов: например, двух отдельных векторов таким образом, что первый вектор содержит или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, нацеливающий на клетку, и нуклеиновой кислоты, кодирующей модулирующий слитый белок, и второй вектор содержит или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae; или трех отдельных векторов, причем первый вектор содержит или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей слитый белок, нацеливающий на клетку, вто-

рой вектор содержит или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей модулирующий слитый белок, и третий вектор содержит или состоит из нуклеиновой кислоты, кодирующей гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae. В качестве альтернативы нуклеиновая кислота, кодирующая слитый белок, нацеливающий на клетку, нуклеиновая кислота, кодирующая модулирующий слитый белок, и нуклеиновая кислота, кодирующая гликопротеин, происходящий из гликопротеина F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, могут быть предоставлены в одном векторе, содержащем или состоящем из трех нуклеиновых кислот.

Также используется вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую коровые белки из указанного ретровируса.

Под "коровыми белками из ретровируса" в данном документе подразумеваются белки, кодируемые генами gag и pol. Ген gag кодирует полипротеин, который подвергается дальнейшему процессингу ретровирусной протеазой до структурных белков, которые составляют ядро. Ген pol, в частности, кодирует ретровирусную протеазу, обратную транскриптазу и интегразу.

Нуклеиновая кислота, кодирующая коровые белки из ретровируса, таким образом, содержит ген gag и ген pol указанного ретровируса.

По меньшей мере один коровый белок из ретровируса может быть модифицирован, например, по сравнению с соответствующим коровым белком из ретровируса дикого типа.

В одном воплощении по меньшей мере один коровый белок из ретровируса модифицируется по меньшей мере одной аминокислотной мутацией, такой как аминокислотная делеция, вставка или замена.

В предпочтительном воплощении указанный по меньшей мере один модифицированный коровый белок представляет собой дефицитную интегразу. Пример дефицитной интегразы несет мутацию D116A.

Нуклеиновая кислота, кодирующая коровые белки, таким образом, может содержать по меньшей мере одну мутацию в гене pol и/или по меньшей мере одну мутацию в гене gag. Указанная по меньшей мере одна мутация может представлять собой нуклеотидную делецию, вставку или замену.

В одном предпочтительном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая коровые белки, содержит по меньшей мере одну мутацию в гене pol, кодируя посредством этого дефицитную интегразу.

Ретровирусный вектор, кодирующий дефицитную интегразу, называется дефицитный по интеграции ретровирусный вектор. Такой вектор обеспечивает кратковременный перенос инкапсулированной молекулы РНК, кодирующей интересующий ген.

Предпочтительный ретровирусный вектор, дефицитный по интеграции, представляет собой IDLV (дефицитный по интеграции лентивирусный вектор).

Происхождение генов gag и pol дает название ретровирусоподобной частице или ретровирусному вектору. Например, выражение "ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор, происходящий из ВИЧ-1" обычно указывает то, что гены gag и pol представляют собой гены ВИЧ-1 или представляют собой модифицированные гены gag и pol из ВИЧ-1.

Вектор, содержащий геном, происходящий от ретровируса, компетентный к упаковыванию, также может быть использован для сотрансфекции, в частности, для продукции ретровирусного вектора.

Под "вектором, содержащим геном, происходящий от ретровируса, компетентным к упаковке" в данном документе подразумевается вектор, который содержит последовательности ретровирусных нуклеиновых кислот, известные как "цисдействующие" последовательности. Они включают длинные концевые повторы (LTR) или модифицированные LTR, например, у которых отсутствует по меньшей мере одна часть области U3, для контроля транскрипции и интеграции, последовательность рsi, необходимую для инкапсулирования, и последовательности сайта связывания праймеров (PBS) и полиуринового тракта (PPT), необходимые для обратной транскрипции ретровирусного генома.

Ретровирусный вектор, продуцируемый с использованием вектора, содержащего LTR, у которого отсутствует по меньшей мере одна часть области U3, например, представляет собой самоинактивирующийся (SIN-LTR) вектор.

В одном воплощении указанный вектор, содержащий геном, происходящий от ретровируса, компетентный к упаковке, дополнительно содержит интересующий(ие) ген(ы), включающий(ие) элемент(ы) CRISPR/CAS и/или S/MAR-эписому.

При использовании системы CRISPR/CAS вектор, содержащий геном, происходящий от ретровируса, компетентный к упаковке, типично содержит ген, кодирующий эндонуклеазу CAS (например, CAS9), последовательность ДНК, соответствующую РНК-проводнику (пРНК), специфичную к интересующему гену, подлежащему нацеливанию, и, возможно, последовательность для редактирования гена.

Указанный геном, происходящий от ретровируса, предпочтительно является дефектным в отношении репликации в отсутствие какой-либо транскомплементирующей функции. Компетентный в отношении репликации геном дополнительно содержал бы гены gag, pol и env. В дефектном в отношении репликации геноме вирусные гены gag, pol и env подвергаются делеции. Сборка ретровирусоподобных частиц или ретровирусных векторов по изобретению достигается посредством предоставления в транс системе другого вектора, который кодирует gag и pol, но который является дефектным в отношении "цис" последовательностей (такой как вектор (iv)), и по меньшей мере другого вектора или нуклеиновой кислоты, которая кодирует гликопротеины псевдотипированной оболочки (такие как нуклеиновые кислоты

(i), (ii) и (iii) вектора(ов), содержащего(их) указанные нуклеиновые кислоты). Их экспрессия обеспечивает инкапсулирование интересующего гена, исключая гены, необходимые для размножения вирусного генома и для образования полных вирусных частиц.

Способ получения псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, может дополнительно включать стадию

- б) культивирования сотрансфицированных клеток в течение достаточного времени для обеспечения экспрессии белков, кодируемых указанной(ыми) нуклеиновой(ыми) кислотой(ами) и вектором(ами); и
- в) обеспечения образования кодируемыми белками ретровирусоподобных частиц или ретровирусных векторов.

Модулирование активности и/или трансдуцирование специфических клеток или подтипов клеток.

Другой целью данного изобретения является применение, предпочтительно применение in vitro или ex vivo, псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, для селективной модуляции активности клеток-мишеней и, возможно, селективной трансдукции клеток-мишеней.

Кроме того, другой целью данного изобретения является способ, предпочтительно способ in vitro или ех vivo, селективного модулирования активности клеток-мишеней и, возможно, селективного транс-дуцирования клеток-мишеней, где указанный способ включает приведение в контакт псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, с клетками, содержащими указанные клетки-мишени.

Термин "селективно" в выражении "селективное модулирование активности клеток-мишеней" означает то, что по существу только указанные клетки-мишени имеют их активность, модулируемую псевдотипированной ретровирусоподобной частицей или ретровирусным вектором. Например, клетки, активность которых модулируется, составляют меньше чем 10%, например меньше чем 5% или меньше чем 1% клеток, не являющихся мишенями.

Термин "селективно" в выражении "селективное трансдуцирование клеток-мишеней" означает в данном документе то, что по существу трансдуцируются только клетки-мишени. Например, трансдуцированные клетки составляют меньше чем 10%, например меньше чем 5% или меньше чем 1% клеток, не являющихся мишенями, подвергаемых трансдукции.

Выражение "модулирование активности клетки-мишени" определяется также, как и выше в разделе "Функциональный домен".

Термин "осуществление переноса" или "трансдуцирование" в том виде, в котором он используется в данном документе, относится к способности ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора доставлять биологическое вещество в мембрану или цитоплазму клеток-мишеней при связывании с клетками-мишенями. После доставки биологическое вещество может транслоцироваться в другой(ие) компартмент(ы) клетки.

Выражение "биологическое вещество" в том виде, в котором оно используется в данном документе, относится к одному или более чем одному соединению, способному изменять структуру и/или функцию клетки. В пределах контекста настоящего изобретения предпочтительно, чтобы биологическое вещество представляло собой одну или более чем одну нуклеиновую кислоту, содержащую интересующий ген, которая может содержатся в геноме ретровирусного вектора, как объяснено выше.

Условия для проведения трансдукции клеток хорошо известны от специалистов и типично включают инкубирование клеток, подлежащих трансдукции, предпочтительно при культивировании во флаконах или на чашках, покрытых, например, ретронектином и, возможно, предварительно стимулированных смесями цитокинов, с псевдотипированным ретровирусным вектором, предпочтительно при МОИ (множественность инфекции) от 0,5 до 100.

Клетки-мишени, в частности, являются такими, как определено выше в разделе с таким же названием.

Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор могут приводиться в контакт с клетками, содержащими клетки-мишени, в культуральной среде.

Специалисту известна культуральная среда, подходящая для данных клеток.

Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор, таким образом, могут использоваться in vitro или in vivo для изменения определенной функции клетки, предоставляя посредством этого новые средства для фундаментальных исследований.

Фармацевтическая композиция.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере одну псевдотипированную ретровирусоподобную частицу или ретровирусный вектор, как определено выше.

Количество псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, подлежащих применению в фармацевтической композиции, зависит, например, от иммуногенности, состояния субъекта, которому назначено введение (например, масса, возраст, пол, состояние здоровья, сопутствующее лечение, при его наличии, и частота лечения), способа введения, типа препарата и/или числа клеток-мишеней.

Фармацевтическая композиция предпочтительно содержит по меньшей мере одну псевдотипированную ретровирусоподобную частицу или ретровирусный вектор и по меньшей мере один фармацевтически приемлемый носитель.

Подразумевается то, что термин "фармацевтически приемлемый носитель" в том виде, в котором он используется в данном документе, охватывает любой носитель, который не препятствует эффективности биологической активности активного ингредиента и который предпочтительно не является токсичным для хозяина, которому он вводится.

Фармацевтически приемлемые носители, которые можно использовать в фармацевтической композиции по изобретению, хорошо известны специалисту. Например, они включают ионообменники, окись алюминия, стеарат алюминия, лецитин, самоэмульгируемые системы доставки лекарственных средств (SEDDS), такие как d-α-токоферолполиэтиленгликоля 1000 сукцинат, поверхностно-активные вещества, используемые в фармацевтических лекарственных формах, такие как разные виды Tween или другие аналогичные полимерные матрицы для доставки, сывороточные белки, такие как человеческий сывороточный альбумин, буферные вещества, такие как фосфаты, глицин, сорбиновая кислота, сорбат калия, частичные глицеридные смеси насыщенных растительных жирных кислот, вода, соли или электролиты, такие как протамина сульфат, динатрия гидрофосфат, калия гидрофосфат, хлорид натрия, соли цинка, коллоидный диоксид кремния, трисиликат магния, поливинилпирролидон, основанные на целлюлозе вещества, полиэтиленгликоль, натрия карбоксиметилцеллюлоза, полиакрилаты, воска, полиэтиленполиоксипропилен-блоксополимеры, полиэтилегликоль и шерстный жир. Для усиления доставки композиций согласно изобретению преимущественно также можно использовать циклодекстрины, такие как α-, β- и γ-циклодекстрин, или химически модифицированные производные, такие как гидроксиалкилциклодекстрины, включающие 2- и 3-гидроксипропил-β-циклодекстрины, или другие солюбилизированные производные.

Данная фармацевтическая композиция может содержать от 10^6 IU до 10^{12} IU псевдотипированного ретровирусного вектора, предпочтительно от 10^7 IU до 10^9 IU, более предпочтительно от 10^7 IU до 10^8 IU.

Термины "IU" или "инфекционная единица" в данном документе означают количество частиц инфекционного вектора, определенное титрованием на линии клеток и выраженное в виде IU/мл.

Введение может достигаться в одной дозе или нескольких дозах фармацевтической композиции согласно изобретению, причем указанные несколько доз инъецируются в то же самое время или раздельно с течением времени.

В одном воплощении фармацевтические композиции представлены в стандартных лекарственных формах для облегчения точного дозирования. Термин "стандартная лекарственная форма" относится к физически дискретным элементам, подходящим в качестве единичных дозировок для человеческих субъектов и других млекопитающих, причем каждый элемент содержит заданное количество активного вещества, рассчитанное для получения желательного терапевтического эффекта, в ассоциации с подходящим фармацевтическим эксципиентом. Типичные стандартные лекарственные формы включают предварительно заполненные, предварительно отмеренные ампулы или шприцы с жидкими композициями. В таких композициях псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор обычно является минорным компонентом, причем остаток представляют собой разные наполнители или носители и вспомогательные вещества для переработки, полезные для образования желательной лекарственной формы.

Согласно изобретению дополнительно предложены наборы, содержащие фармацевтическую композицию, содержащую псевдотипированную ретровирусоподобную частицу или ретровирусный вектор, как определено выше, и инструкции относительно способа введения. В данных инструкциях могут, например, указываться медицинское показание, путь введения, дозировка и/или группа пациентов, подлежащих лечению.

Субъект, подлежащий лечению.

Субъект, подлежащий лечению, может представлять собой млекопитающее, например человека или млекопитающее, не являющееся человеком.

Человека также называют "индивидом" или "пациентом".

Указанный человек может быть любого возраста, например младенцем, ребенком, подростком, взрослым, пожилым человеком, и любого пола.

Млекопитающее, не являющееся человеком, предпочтительно представляет собой грызуна (например, мышь, крысу или кролика), кошачьего (например, кошку), псового (например, собаку) или примата (например, шимпанзе).

Субъект, подлежащий лечению, предпочтительно представляет собой человека.

Предупреждение и/или лечение заболевания.

Настоящее изобретение является особенно полезным для предупреждения и/или лечения заболевания, которое можно предупреждать и/или излечивать посредством селективного модулирования активности специфических клеток или поднабора клеток и, возможно, посредством осуществления селективной трансдукции указанных специфических клеток или поднабора клеток.

Указанное заболевание предпочтительно включает специфические клетки или поднабор клеток.

Субъект, подлежащий лечению, таким образом, может страдать от или, вероятно, может быть поражен заболеванием, которое можно предупреждать и/или излечивать посредством селективного модулирования активности специфических клеток или поднабора клеток и, возможно, посредством осуществления селективной трансдукции указанных специфических клеток или поднабора клеток.

Указанное заболевание может быть выбрано в группе, состоящей из иммунного заболевания (например, аутоиммунного заболевания), рака, генетического заболевания, аллергического заболевания, воспалительного заболевания, инфекционного заболевания (в частности, бактериальной и/или вирусной инфекции), метаболического заболевания, нейродегенеративного заболевания (например, нейродистрофии, болезни Паркинсона, болезни Гентингтона, болезни Альцгеймера), мышечного заболевания и их комбинаций.

Выражение "аутоиммунное заболевание" в том виде, в котором оно используется в данном документе, относится к заболеванию, обусловленному сверхактивным иммунным ответом организма против веществ и/или тканей, обычно присутствующих в организме. Соответственно посредством специфичного нацеливания на иммунные клетки, участвующие в данном сверхактивном иммунном ответе, псевдотипированная ретровирусоподобная частица и ретровирусный вектор по изобретению являются полезными средствами для предупреждения и/или лечения аутоиммунного заболевания.

Аутоиммунные заболевания включают, в частности, следующие: острый рассеянный энцефаломиелит, острый геморрагический лейкоэнцефалит, болезнь Аддисона, агаммоглобулинемия, круговая алопеция, боковой амиотрофический склероз, анкилозирующий спондилит, антифосфолипидный синдром, антисинтетазный синдром, атопическая аллергия, аутоиммунная апластическая анемия, аутоиммунная кардиомиопатия, аутоиммунная энтеропатия, аутоиммунная гемолитическая анемия, аутоиммунный гепатит, аутоиммунное заболевание внутреннего уха, аутоиммунный липопролиферативный синдром, аутоиммунная периферическая нейропатия, аутоиммунный панкреатит, аутоиммунный полиэндокринный синдром, аутоиммунный прогестероновый дерматит, аутоиммунная тромбоцитопеническая пурпура, аутоиммунная крапивница, аутоиммунный увеит, болезнь Бало, концентрический склероз Бало, синдром Бехчета, болезнь Бергера, энцефалит Бикерстаффа, синдром Блау, буллезный пемфигоид, болезнь Кастелмана, целиакия, хроническая воспалительная демиелинирующая полинейропатия, хронический рецидивирующий множественный остеомиелит, синдром Чарга-Стросса, рубцовый пемфигоид, синдром Когана, синдром холодовой агглютинации, недостаточность компонента 2 комплемента, краниальный артериит, CREST-синдром, болезнь Крона, синдром Кушинга, кожный лейкоцитокластический васкулит. болезнь Дего, болезнь Деркума, герпетиформный дерматит, дерматомиозит, сахарный диабет типа 1, диффузный кожный системный склероз, синдром Дресслера, дискоидная волчанка, экзема, артрит, связанный с энтезитом, эозинофильный фасцит, эозинофильный гастроэнтерит, приобретенный буллезный эпидермолиз, узловатая эритема, первичная криоглобулинемия смешанного типа, синдром Эванса, прогрессирующая оссифицирующая фибродисплазия, фиброзный альвеолит, гастрит, желудочно-кишечный пемфигоид, узелковый периартериит, гломерулонефрит, синдром Гудпасчера, болезнь Грейвса, синдром Гийена-Барре (GBS), энцефалит Хашимото, тиреоидит Хашимото, гемолитическая анемия, пурпура Геноха-Шенлейна, герпес беременных, гипогаммаглобулинемия, идиопатическое воспалительное демиелинизирующее заболевание, идиопатический легочный фиброз, идиопатическая тромбоцитопеническая пурпура, IgA нефропатия, миозит с тельцами включения, воспалительная демиелинизирующая полинейропатия, интерстициальный цистит, юношеский идиопатический артрит, юношеский ревматоидный артрит, болезнь Кавасаки, миастенический синдром Ламберта-Итона, лейкоцитокластический васкулит, лишай Вильсона, склеротический лишай, ІдА-зависимый линейный дерматоз (LAD), болезнь Лу Герига, волчаночный гепатит, красная волчанка, синдром Маджеда, болезнь Менье, микроскопический полиангиит, синдром Миллера-Фишера, смешанное заболевание соединительной ткани, кольцевидная склеродермия, болезнь Мухи-Габерманна, рассеянный склероз, тяжелая миастения, миозит, нейромиелит зрительного нерва, нейромиотония, глазной рубцевой пемфигоид, опсо-миоклональный синдром, обычный тиреоидит, палиндромный ревматизм, паранеопластическая мозжечковая дегенерация, ночная пароксизмальная гемоглобинурия (PNH), синдром Парри Ромберга, синдром Персонейджа-Тернера, воспаление pars plana, пузырчатка, обыкновенная пузырчатка, пернициозная анемия, околовенозный энцефаломиелит, синдром POEMS (полиневропатия (полинейропатия) с органомегалией), узелковый полиартериит, ревматическая полимиалгия, полимиозит, первичный билиарный цирроз печени, первичный склерозирующий холангит, прогрессирующая воспалительная нейропатия, псориаз, псориатический артрит, гангренозная пиодермия, истинная эритроцитарная аплазия, энцефалит Расмуссена, феномен Рейно, рецидивирующий полихондрит, синдром Райтера, синдром усталых ног, ретроперитонеальный фиброз, ревматоидный артрит, ревматоидная лихорадка, саркоидоз, синдром Шмидта, синдром Шнитцлера, склерит, склеродермия, синдром Шегрена, спондилоартропатия, болезнь Стилла, синдром скованного человека, подострый бактериальный эндокардит, синдром Сусака, синдром Свита, болезнь Сиденгама, симпатетическая офтальмия, синдром дуги аорты, темпоральный артериит, синдром Толоса-Ханта, поперечный миелит, язвенный колит, недифференцированное заболевание соединительной ткани, недифференцированная спондилоартропатия, васкулит, витилиго и синдром Вегенера.

Термин "рак" в том виде, в котором он используется в данном документе, охватывает любой тип рака, такой как глиобластома, нейробластома, В-клеточная лимфома, Т-клеточная лимфома, рак молочной железы, печеночно-клеточная карцинома, рак, возникающий из гематопоэтических клеток, включающий лейкоз, в частности B-CLL (В-клеточный хронический лимфоцитарный лейкоз), СМL (хронический миелогенный лейкоз) или лейкоз на основе Т-клеток, такой как ATL (острый Т-клеточный лейкоз), ALL (острый лимфобластный лейкоз), AML (острый миелобластный лейкоз) и/или меланома.

Терапевтические применения.

Настоящее изобретение также относится к псевдотипированной ретровирусоподобной частице или ретровирусному вектору, как определено выше, для применения в качестве лекарственного средства, предпочтительно в иммунотерапии, генотерапии и/или вакцинации.

Генотерапия представляет собой терапию с использованием гена(нов) в качестве лекарственного средства, которое, например, может быть получено посредством доставки в клетку интересующего гена и/или редактирования интересующего(их) гена(ов) в эндогенном сайте. В генотерапии нуклеиновая кислота, содержащая интересующий(ие) ген(ы), доставляется в клетки пациента, а экспрессия белка(ов), кодируемого(ых) интересующим(ими) геном(ами) и/или посредством редактирования интересующего(щих) гена(нов), посредством этого обеспечивает предупреждение и/или лечение заболевания.

Указанный интересующий(ие) ген(ы) может(могут) присутствовать в молекуле РНК, содержащейся в ретровирусном векторе согласно изобретению.

Редактирование гена(ов) может проводиться посредством системы CRISPR/CAS.

Иммунная терапия, также именуемая иммунотерапия, представляет собой терапию на основе модулирования активности иммунной системы (например, стимуляции или ингибирования) для предупреждения и/или лечения заболевания.

В контексте настоящего изобретения иммунотерапия заключается в модулировании активности только специфично нацеленных иммунных клеток посредством применения ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора согласно изобретению и, возможно, селективного трансдуцирования указанных иммунных клеток-мишеней. Например, ретровирусный вектор можно использовать для активации В-клеток, таким образом, чтобы заставить их дифференцироваться в плазматические клетки, и, возможно, трансдуцировать их нуклеиновой кислотой, кодирующей эктопическое антитело против инфекционного агента (например, против ВИЧ, HCV (вирус гепатита C) или НВС).

Иммунотерапия также включает Т-клеточную терапию. При Т-клеточной терапии Т-клетки, кроме того, могут модулироваться в отношении их функции, для того чтобы быть более пермиссивными для переноса генов, например для переноса гена рецептора Т-клетки (CAR).

Адоптивная Т-клеточная терапия представляет собой терапию, при которой Т-клетки трансфундируются субъекту, нуждающемуся в этом. В контексте настоящего изобретения активность указанных Т-клеток возможно модулировалась до трансфузии посредством применения ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора согласно изобретению.

В контексте настоящего изобретения вакцинация заключается в экспонировании на поверхности ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора специфических вирусных эпитопов, которые будут служить мишенью и в то же самое время активировать антигенпрезентирующие клетки (например, макрофаги), которые затем будут презентировать эпитопы иммунной системе (Т- и В-клеткам).

Настоящее изобретение также относится к псевдотипированной ретровирусоподобной частице или ретровирусному вектору, как определено выше, для применения в качестве лекарственного средства, где указанная псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор селективно модулирует активность клеток-мишеней и, возможно, селективно трансдуцирует клетки-мишени.

Настоящее изобретение, в частности, относится к псевдотипированной ретровирусоподобной частице или ретровирусному вектору для применения, как определено выше, в предупреждении и/или лечении заболевания, как определено выше в разделе "Предупреждение и/или лечение заболевания".

Указанное заболевание, например, представляет собой иммунное заболевание (например, аутоиммунное заболевание), рак, генетическое заболевание, аллергическое заболевание, воспалительное заболевание, инфекционное заболевание (в частности, бактериальную и/или вирусную инфекцию), метаболическое заболевание, неврологическое заболевание (такое как нейродистрофия, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, болезнь Гентингтона), мышечное заболевание и их комбинации.

В одном воплощении псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор используются для улучшения вакцины на основе DC (дендритная клетка), например, посредством совместной экспозиции специфического лиганда DC клетки (такого как CD11b) и GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) на поверхности вектора для переноса белка или гена.

В преимущественном воплощении активация Т-клеток связана со специфичным для Т-клеток переносом генов, что значительно усиливало эффективность переноса генов в покоящихся Т-клетках, например в генотерапии на основе Т-клеток. Эффективный перенос генов in vivo в поднабор Т-клеток представляет собой революцию в области генной и клеточной терапии, так как он позволяет опускать процессы культивирования и трансдукции ех vivo, которые приводят к высоким затратам в отношении клини-

ческого применения. Кроме того, оставление клеток в их нормальном микроокружении in vivo позволяет им сохранять их фенотип и долговременно выживать в пациенте (например, опухолеспецифичные CD8 цитотоксические клетки).

В другом воплощении данное изобретение можно использовать для усиления селективной доставки генов в покоящиеся В-лимфоциты, например, в генотерапии на основе В-клеток, такой как иммунотерапия, которая обеспечивает продукцию В-клетками нейтрализующих антител против инфекционного(ых) агента(ов) или обеспечивает секрецию В-клетками рекомбинантных белков, которые переносятся иммунной системой, так как В-клетки могут действовать как толерогенные клетки.

Кроме того, экспонирование одного или более чем одного цитокина на поверхности псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора может индуцировать поднабор Т-клеток, дифференцирующихся в фенотипы, подобные TSCM или TCM, которые могут долговременно выживать in vivo.

В другом воплощении данное изобретение можно использовать для размножения in vivo (аутологичных) противораковых природных клеток-киллеров для противораковой терапии.

В одном воплощении псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор используются для индукции апоптоза определенного поднабора клеток посредством совместного экспонирования лиганда апоптоза и нацеливающего домена, специфичного в отношении опухоли или иммунной клетки.

Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор могут быть предоставлены в виде фармацевтической композиции.

Фармацевтическая композиция предпочтительно является такой, как определено выше в разделе с таким же названием.

Настоящее изобретение также касается способа лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающего введение терапевтически эффективного количества псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, предпочтительно в рамках иммунотерапии, генотерапии и/или вакцинации.

Настоящее изобретение также относится к способу лечения субъекта, нуждающегося в этом, включающему введение терапевтически эффективного количества псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, где указанная псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор селективно модулирует активность клеток-мишеней и, возможно, селективно трансдуцирует клетки-мишени.

Настоящее изобретение также касается способа предупреждения и/или лечения заболевания, включающего введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, как определено выше, где указанное заболевание предпочтительно является таким, как определено выше.

Можно использовать любой подходящий способ введения, известный специалисту в данной области. В частности, псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор согласно изобретению может вводиться пероральным путем, парентеральным путем (предпочтительно внутривенной инъекцией), медуллярным путем, в частности, внутрь бедренной кости (как, например, в полость костного мозга) или инъекцией медуллярным путем в плечевую кость и/или местной внутриопухолевой инъекцией.

При выборе парентерального пути псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор может находиться в виде инъецируемого раствора или суспензии, например, приготовленной в ампуле или во флаконе.

Псевдотипированная ретровирусоподобная частица или ретровирусный вектор предпочтительно используется или вводится в терапевтически эффективном количестве.

"Терапевтически эффективное количество" относится к количеству псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора, которое придает терапевтический эффект субъекту, подвергающемуся лечению. Данный терапевтический эффект может быть объективным (т.е. измеряемым некоторым анализом или маркером) или субъективным (т.е. субъект дает указание или чувствует эффект). Как известно от специалиста, эффективные дозы будут варьировать в зависимости от пути введения, размера и/или массы субъекта, а также от возможности совместного применения с другими агентами.

Термин "содержащий" в том виде, в котором он используется в данном документе, охватывает термин "состоящий из".

Настоящее изобретение будет дополнительно проиллюстрировано, принимая во внимание следующие примеры и графические материалы.

Все ссылки, процитированные в данном документе, включающие журнальные статьи или рефераты, опубликованную или неопубликованную патентную заявку, выданные патенты или любые другие ссылки, являются целиком включенными в данный документ посредством ссылки, включая все данные, таблицы, графические материалы и текст, представленный в процитированных ссылках.

Краткое описание последовательностей

SEQ ID NO: 1 соответствует последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей усеченный и

мутировавший (Y481A, R533A, S548L, F549S) белок H MV ($\text{Hc}\Delta 18$), слитый со сконструированным белком с анкириновыми повторами (DARPin)-29.2, специфичным в отношении человеческого CD4.

SEQ ID NO: 2 соответствует аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью SEO ID NO: 1.

SEQ ID NO: 3 соответствует последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей усеченный и мутировавший (E501A, W504, Q530A, E533A) белок G NiV (Gc Δ 34), слитый с одноцепочечным антителом, направленным на человеческий CD8 (scFvC8-Vh1), связанный с дополнительным линкером (G₄S)₃.

SEQ ID NO: 4 соответствует аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью SEQ ID NO: 3.

SEQ ID NO: 5 соответствует последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей усеченный и мутировавший (E501A, W504, Q530A, E533A) белок G NiV (GcΔ34), слитый с IL-7.

SEQ ID NO: 6 соответствует аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью SEO ID NO: 5.

SEQ ID NO: 7 соответствует последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей усеченный и мутировавший (E501A, W504, Q530A, E533A) белок G NiV (Gc∆34), слитый со сконструированным белком с анкириновыми повторами (DARPin), направленным против человеческого EpCAM.

SEQ ID NO: 8 соответствует аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью SEO ID NO: 7.

SEQ ID NO: 9 соответствует полноразмерной аминокислотной последовательности гликопротеина G оболочки вируса Нипах.

SEQ ID NO: 10 соответствует полноразмерной аминокислотной последовательности гликопротеина Н оболочки вируса кори.

SEQ ID NO: 11 соответствует полноразмерной аминокислотной последовательности гликопротеина F оболочки вируса Нипах.

SEQ ID NO: 12 соответствует полноразмерной аминокислотной последовательности гликопротеина F оболочки вируса кори.

SEQ ID NO: 13 соответствует последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей усеченный и мутировавший белок H MeV ($Hc\Delta15$), слитый с IL-7.

SEQ ID NO: 14 соответствует аминокислотной последовательности, кодируемой последовательностью SEO ID NO: 13.

SEQ ID NO: 15 соответствует аминокислотной последовательности белка F вируса кори, усеченного на 30 аминокислот в цитоплазматическом хвосте ($Fc\Delta 30$).

SEQ ID NO: 16 соответствует аминокислотной последовательности белка F вируса Нипах, усеченного на 22 аминокислоты в цитоплазматическом хвосте ($Fc\Delta 22$).

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показан эффективный и стабильный перенос гена ErbB2-CAR в покоящиеся Т-клетки CD4⁺ посредством 4^H/IL7^H-LV. Для оценки того, может ли 4^H/IL7^H-LV эффективно переносить терапевтические гены (ErbB2-специфичный CAR - ErbB2-CAR) в покоящиеся Т-клетки, свежевыделенные Т-клетки CD3⁺ трансдуцировали 4^H-LV или 4^H/IL7^H-LV. Клетки, трансдуцированные VSV-LV или оставленные нетрансдуцированными (ut), использовали в качестве негативных контролей. Через трое суток половину трансдуцированных клеток анализировали посредством FACS (флуоресцентная сортировка клеток) для определения процентной доли клеток ErbB2-CAR⁺ в клетках, отсортированных на CD4 или CD8. Для подтверждения стабильной экспрессии ErbB2-CAR другую половину трансдуцированных клеток дополнительно культивировали в присутствии стимула антитело против CD3/антитело против CD28/IL-2 после стадии промывки в течение еще трех суток. Затем процентные доли клеток CD4⁺/ErbB2⁺ и клеток CD8⁺/ErbB2⁺ определяли посредством FACS.

На фиг. 2 показана мутация гликопротеина G оболочки NiV для устранения распознавания природным рецептором. Показано связывание Ephrin-B2 (A) и B3 (Б) с мутантами NiV-G. Клетки 293Т трансфицировали либо имитацией - плазмидами, кодирующими $Gc\Delta 34^{His}$, либо разными мутантами $Gc\Delta 34^{EpCAM}$: немутировавшим ($Gc\Delta 34^{EpCAM}$), E533A ($Gc\Delta 34^{EpCAM}$ mut1), Q530A+E533A ($Gc\Delta 34^{EpCAM}$ mut2.1), E501A+W504A ($Gc\Delta 34^{EpCAM}$ mut2.2) или E501A+W504A+Q530A+E533A ($Gc\Delta 34^{EpCAM}$ mut4), и инкубировали с 1 мкг/мл рекомбинантного Fc-Ephrin B2 или B3. Количество связывания данного рецептора разными мутантами показано в виде значений MFI (средняя интенсивность флуоресценции). Статистика по отношению к немутировавшему G $\Delta 34$ -DARPin-Ac1 (п равно 3; показаны среднее плюс/минус стандартные отклонения (SD); * - Р меньше 0,1; *** - Р меньше 0,01; *** - Р меньше 0,001 посредством непарного t-критерия).

На фиг. 3 показана селективная активация Т-клеток CD4⁺ посредством 4^H/IL7^H-VLP. Свежевыделенные Т-клетки CD3⁺ оставляли нетрансдуцированными (ut) или трансдуцировали разными типами VLP, псевдотипированных CD4-DARPin-Hmut (4^H-VLP), CD4-DARPin/IL7-Hmut(4^H/IL7^H-VLP) или IL7-Hnse (Hnse/IL7^H-VLP). Через трое суток данные клетки окрашивали антителами против CD8, CD4 и CD71. Показана экспрессия CD71 в Т-клетках, отсортированных на CD4 или CD8.

На фиг. 4 показан функционально экспонированный IL7 на нацеленных VLP, стимулирующий вы-

живание Т-клеток. Профили прямого/бокового рассеивания взрослых покоящихся Т-клеток ${\rm CD3}^+$, которые инкубировались в течение 6 суток с вирусоподобными частицами (VLP), псевдотипированными нацеленным на CD4 MV-H (${\rm 4^H-VLP}$), нацеленным на CD8 MV-H (${\rm 8^H-VLP}$), экспонирующим IL7 нацеленным на CD4 MV-H (${\rm 4^H/IL7^H-VLP}$) или экспонирующим IL7 нацеленным на CD8 MV-H (${\rm 8^H/IL7^H-VLP}$). Клетки, культивированные в одной среде (нетрансдуцированные, ut) или в присутствии 15 нг/мл IL7, использовали в качестве контролей. На каждом дот-блоте показана процентная доля жизнеспособных клеток.

На фиг. 5 показан функционально экспонированный IL7 на LV, нацеленном на CD4, стимулирующий выживание Т-клеток. Профили прямого/бокового рассеивания взрослых покоящихся Т-клеток CD3 $^+$, которые инкубировались в течение 6 суток с лентивирусными векторами (LV), псевдотипированными VSVG (VSV-LV), MV-Hmut (Hnse-LV), нацеленным на CD4 MV-H (4 $^{\rm H}$ -LV), или экспонирующим IL7, нацеленным на CD4 MV-H (4 $^{\rm H}$ /IL7 $^{\rm H}$ -LV). Клетки, культивированные в одной среде (нетрансдуцированные, ut) или в присутствии 15 нг/мл IL7, использовали в качестве контролей. На каждом дот-блоте показана процентная доля жизнеспособных клеток.

На фиг. 6 показана селективная активация Т-клеток CD4⁺ посредством $4^{\rm H}/{\rm IL7^{\rm H}}$ -LV. Свежевыделенные Т-клетки CD3⁺ оставляли нетрансдуцированными (ut) или трансдуцировали разными типами LV, псевдотипированными CD4-DARPin-Hmut ($4^{\rm H\Delta18}$ -LV), Hnse (Hnse-LV) или VSVG (VSVG-LV). Здесь IL7 экспонировался на двух разных версиях Hmut: либо с 20 аминокислотами, усеченными на C-конце (H Δ 10), либо с 15 аминокислотами, усеченными на C-конце (H Δ 15). Соответственно получали два типа $4^{\rm H}/{\rm IL7^{\rm H}}$ -LV и трансдуцировали ими покоящиеся Т-клетки. Через трое суток данные клетки окрашивали антителами против CD3, CD8, CD69 и CD71. Показаны маркеры активации экспрессии CD69 и CD71 в клетках CD8⁺ и CD8⁻(CD4⁺).

На фиг. 7 показано схематическое представление псевдотипированных лентивирусных векторов (LV). $4^{\rm H}$ -LV представляет собой нацеленный на CD4 LV на основе псевдотипов гликопротеина MeV. $4^{\rm H}$ /IL7 $^{\rm H}$ -LV представляет собой экспонирующий IL7, нацеленный на CD4 LV на основе псевдотипов гликопротеина MV. Гликопротеин H оболочки (MV-H) является усеченным в его цитоплазматическом хвосте, например, на 15, 18 или 20 аминокислот, и вводятся по меньшей мере две из четырех точечных мутаций (Y481A, R533A, S548L и F549S) для ослепления его природного распознавания рецептором - SLAM и CD46, приводя посредством этого к гликопротеину Hmut оболочки. Затем нацеливающий домен (напимер, CD4⁻DARPin) и/или цитокин (например, IL7) сливают с мутантом H (Hmut) с линкером или без него. Гликопротеин F оболочки MV является усеченным в его цитоплазматическом хвосте на 30 аминокислот (MV- $F_{\Delta 30}$).

На фиг. 8 показано схематическое представление псевдотипированных вирусоподобных частиц (VLP). 8^G -VLP представляет собой нацеленную на CD8 VLP на основе псевдотипов гликопротеина NiV. 8^G /IL7^G-VLP представляет собой экспонирующую IL7, нацеленную на CD8 VLP на основе псевдотипов гликопротеина NiV. Гликопротеин оболочки NiV-G является усеченным в его цитоплазматическом хвосте на 34 аминокислоты (Δ 34), и вводятся четыре точечные мутации (E501A, W504A, Q530A и E533A) для ослепления его распознавания природным рецептором Ephrin-B2/B3, приводя посредством этого к гликопротеину NiV-G $_{\Delta$ 34</sub> оболочки. Затем нацеливающий домен (CD8-scFv) и/или цитокин (IL7) сливают с мутантным белком G (NiV-G $_{\Delta$ 34</sub>) с линкером или без него. Гликопротеин F оболочки NiV является усеченным в его цитоплазматическом хвосте на 22 аминокислоты (NiV-F $_{\Delta$ 22).

На фиг. 9 показана эффективная и селективная трансдукция покоящихся Т-клеток CD4 $^+$ посредством 4 H /IL7 H -LV. Свежевыделенные Т-клетки CD3 $^+$ оставляли нетрансдуцированными (ut) или трансдуцировали разными типами LV, псевдотипированных CD4-DARPin-Hmut (4 $^{H\Delta18}$ -LV), Hnse (Hnse-LV) или VSVG (VSVG-LV). Здесь IL7 экспонировался на двух разных версиях Hmut: либо с 20 аминокислотами, усеченными на С-конце (H Δ 20), либо с 15 аминокислотами, усеченными на С-конце (H Δ 15). Соответственно получали два типа 4 H /IL7 H -LV (4 $^{H\Delta18}$ /IL7 $^{H\Delta15}$ -LV и 4 $^{H\Delta18}$ /IL7 $^{H\Delta20}$ -LV) и трансдуцировали ими покоящиеся Т-клетки. Через трое суток данные клетки окрашивали антителами против CD3, CD8 и CD4. Показана экспрессия GFP в Т-клетках, сортированных на CD4 или CD8.

На фиг. 10 показана нейтрализация LV, псевдотипированных гликопротеином NiV. Клетки CHO-EpCAM или CHO-Ephrin-B2 трансдуцировали NivmutEpCAM (круг), MVEpCAM-LV (квадрат), NiVwt-LV (треугольник) или VSVG-LV (ромб) при МОИ 0,4 после инкубации с серийными разведениями объединенной человеческой сыворотки (IVIG) в течение 2 ч при 37°С. Через 72 ч клетки GFP+ определяли проточной цитометрией, и показано число клеток GFP+ относительно необработанного контроля (п равно 3).

На фиг. 11 показана селективная активация Т-клеток CD8 $^+$ посредством $8^G/IL7^G$ -LV. Свежевыделенные Т-клетки CD3 $^+$ оставляли нетрансдуцированными (ut) или трансдуцировали разными типами LV, псевдотипированного CD8-scFv-Gmut (8^G -LV) или CD8-scFv-Gmut /IL7-Gmut (8^G /IL7 G -LV). Через трое суток данные клетки окрашивали антителами против CD8, CD4 и CD71. Показана экспрессия CD71 в Т-клетках, сортированных на CD4 или CD8.

На фиг. 12 показана эффективная и селективная трансдукция покоящихся Т-клеток CD8⁺ посредст-

вом $8^G/IL7^G$ -LV. Свежевыделенные Т-клетки CD3⁺ оставляли нетрансдуцированными (ut) или трансдуцировали разными типами LV, псевдотипированных CD8-scFv-Gmut (8^G -LV) или CD8-scFv-Gmut/IL7-Gmut (8^G /IL7^G-LV). Через трое суток данные клетки окрашивали антителами против CD3, CD8 и CD4. Показана экспрессия GFP в Т-клетках, сортированных на CD4 или CD8.

На фиг. 13 показан эффективный перенос гена CAR19 в покоящиеся Т-клетки CD8 $^+$ посредством 8^G /IL7 G -LV. Свежевыделенные Т-клетки CD3 $^+$ оставляли нетрансдуцированными (ut) или трансдуцировали разными типами LV, псевдотипированного CD8-scFv-Gmut (8^G -LV), CD8-scFv-Gmut /IL7-Gmut (8^G /IL7 G -LV) или VSVG (VSV-LV). Терапевтический ген, кодирующий CD19-специфичный CAR (CAR19), доставляли посредством LV. Через трое суток после трансдукции экспрессию CAR19 выявляли антителом против стус. Показана процентная доля клеток, экспрессирующих CAR19, в Т-клетках CD4 $^+$ или CD8 $^+$.

На фиг. $14 \, 4^H$ /IL 7^H -LV обеспечивает целевую активацию Т-клеток CD 4^+ in vivo у гуманизированных мышей. Мышам NOD/SCID gc-/- инъецировали Т-клетки пуповинной крови, и через 2 месяца после перенесения (20%-ное восстановление Т-клеток) инъецировали 100 микролитров 4^H /IL 7^H -LV (1E6 IU) или 4^H /IL 7^H -LV посредством в/в инъекции. Через две недели после инъекции векторов мышей умерщвляли и спленоциты оценивали на % Т-клеток CD 71^+ CD 4^+ (маркер активации).

Примеры

Материал и методы.

Получение конструкций.

Получали плазмиду pHL3-Ac1, кодирующую усеченный и мутировавший белок $Hc\Delta 18$ mut MV и линкер $(G_4S)_3$ (L3) между H и меченным His DARPin Ac1, посредством вставки $\Pi \coprod P$ -амплифицированной кодирующей последовательности EpCAM-специфичного DARPin Ac1 (Stefan et al., 2011) из PQE30 PQE30

Все плазмиды, кодирующие варианты белка G вируса Нипах, были получены из плазмиды pCAGGS-NiV-codonop-Gn. Кодирующую последовательность домена, нацеленного на Ac1, сливали с С-концом рамки считывания белка G посредством ПЦР-амплификации каждого фрагмента и одновременного введения обычного рестрикционного сайта Agel, который использовали для лигирования, приводящего к плазмиде pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1. Все другие нацеливающие домены заменяли посредством AgeI/NotI. Усечения цитоплазматического хвоста белка G вводили посредством ПЦР-амплификации рамки считывания белка G и вставки ПЦР-фрагментов в pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1, приводя к плазмидам pCAGGS-NiV-GcA33-DARPin-Ac1 и pCAGGS-NiV-GcA34-DARPin-Ac1. Меченные Ніѕ белки G и GcA34 получали посредством ПЦР-амплификации из pCAGGS-NiV-codonop-Gn. Фрагменты клонировали посредством рестрикции PacI/NotI в остов плазмиды pCAGGS-NiV-G-DARPin-Ac1, приводя к pCAGGS-NiV-G-His и pCAGGS-NiV-GcΔ34-His соответственно. В кодирующую последовательность белка NiV-GcA34-DARPin-Ac1 были введены мутации, препятствующие распознаванию природным рецептором, посредством сайт-направленного мутагенеза. Каждая мутация была получена амплификацией двух фрагментов, несущих обозначенную мутацию, с гомологичными областями с месте мутации. Данные фрагменты сливали и амплифицировали посредством фланкирующей пары праймеров. Образующиеся фрагменты клонировали в pCAGGS-NiV-GcA34-DARPin-Ac1 посредством RsrlI/AgeI, получая плазмиды pCAGGS-NiV-Gc∆34EpCAMmut.

Для получения вариантов NiV-F кодирующие последовательности $Fc\Delta 22$ и $Fc\Delta 25$ амплифицировали из pCAGGS-NiV-F и клонировали посредством рестрикции PacI/SacI в остов плазмиды pCAGGS-NiV-codonop-Gn, приводя к плазмидам pCAGGS-NiV-Fc $\Delta 22$ и pCAGGS-NiV-Fc $\Delta 25$. Меченные AU1 варианты NiV-F, использованные для анализа векторных частиц вестерн-блоттингом, получали посредством амплификации вариантов NiV-F из pCAGGS-NiV-F и одновременного N-концевого добавления метки AU1. Образующиеся Π UP-фрагменты клонировали посредством рестрикционного расщепления PacI/SacI в остов pCAGGS-NiV-codonop-Gn, приводя к плазмидам pCAGGS-AU1-NiV-F, pCAGGS-AU1-NiV-Fc $\Delta 22$ и pCAGGS-AU1-NiV-Fc $\Delta 25$.

Получение вектора.

Векторные частицы получали временной трансфекцией клеток HEK-293T с использованием полиэтиленимина (PEI). За 24 ч до трансфекции $2,5\times10^7$ клеток высевали во флакон T175. В сутки трансфекции среду культуры клеток заменяли на 10 мМ DMEM (среда Игла, модифицированная по Дульбекко) с 15% FCS (фетальная телячья сыворотка) и 3 мМ L-глутамином. Смесь ДНК готовили посредством смешивания 35 мкг общей ДНК с 2,3 мл DMEM без добавок.

Например, следуя оптимизации отношений G к F, 0,9 мкг плазмиды, кодирующей варианты $Gc\Delta 34DARPin/scFv$, смешивали с 4,49 мкг плазмиды, кодирующей варианты F. Использовали 14,4 мкг упаковывающей плазмиды на основе BИЧ-1 $pCMV\Delta R8.9$ и 15,1 мкг плазмид для переноса на основе LV. Смесь реактивов для трансфекции готовили смешиванием 140 мкл 18 мМ раствора PEI в H_2O с 2,2 мл DMEM без добавок. Данный раствор смешивали со смесью ДНК, встряхивали на вибромешалке, инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и добавляли к клеткам HEK-293T, приводя к DMEM с общим содержанием 10% FCS, 2 мМ L-глутамина. Через 24 ч данную среду заменяли на DMEM

с 10% FCS, 2 мМ L-глутамином, для того чтобы удалить остающиеся комплексы PEI/ДНК. В сутки два после трансфекции супернатант клеток, содержащий лентивирусные векторы, фильтровали через 0,45 мкм фильтр. При необходимости векторные частицы очищали посредством центрифугирования при 450 g в течение 24 ч через слой 20% сахарозы. Осадок ресуспендировали в фосфатно-солевом буферном растворе (PBS). Для трансдукции 8×10³ клеток CHO-EpCAM и SK-OV-3 или 2×10⁴ клеток Molt4.8 и Raji высевали в одну лунку 96-луночного планшета и трансдуцировали на следующие сутки. При необходимости среду для клеток заменяли на среду, содержащую разные концентрации бафиломицина A1 (Santa Cruz Biotechnology, Inc, Даллас, США), и клетки предынкубировали 30 мин при 37°С перед добавлением вектора. Для титрования использовали по меньшей мере четыре серийных разведения векторных частиц. Через 72 ч определяли процентное содержание клеток, позитивных в отношении зеленого флуоресцентного белка (GFP), посредством проточной цитометрии. Трансдуцирование в единицах/мл (t.u./мл) рассчитывали посредством выбора разведений, показывающих линейную корреляцию между коэффициентом разведения и числом GFP-позитивных клеток (число трансдуцированных клеток/объем вектора в мкл/0,001).

Схематические представления псевдотипированной ретровирусоподобной частицы или ретровирусного вектора согласно изобретению показаны на фиг. 7 и 8.

Пример 1. Селективная активация Т-клеток CD4⁺.

Для того чтобы активировать $CD4^+$, но не $CD8^+$ лимфоциты, получали VLP, которые экспонируют CD4-специфичный DARPin в качестве нацеливающего лиганда и IL-7 в качестве активирующего домена на белке H MV, наряду со слитым белком (F), приводя к 4^H /IL7 H -VLP (содержащей белки, последовательности SEQ ID NO: 2, 14 и 15). Для получения частиц создавали протокол трансфекции. Вкратце для трансфекции клеток HEK293T в одном флаконе T175 использовали 0,45 мкг pCG-Hmut-CD4-DARPin (Zhou et al., J. Immunol., 2015), 0,45 мкг pCG-H Δ 15-IL7 (предоставленной Els Verhoeyen), 4,7 мкг pCG-Fc Δ 30 (Funke et al., Molecular therapy, 2008), 14,4 мкг упаковывающей плазмиды на основе ВИЧ-1 pCMV Δ R8.9 (Funke et al., Molecular therapy, 2008) и 15,1 мкг pCG-1. После сбора векторные частицы дополнительно концентрировали посредством ультрацентрифугирования. Для LV были получены титры порядка 10^7 tu/мл, а для VLP было получено порядка 1,5 мкг p24/мл.

Функция 4^H/IL7^H-VLP была продемонстрирована на свежевыделенных покоящихся Т-клетках. Вкратце Т-клетки CD3⁺ были выделены посредством негативной селекции с использованием набора для выделения Т-клеток Pan (Miltenyi Biotech) из периферической крови взрослого. Затем клетки инкубировали с 4^H/IL7^H-VLP в отсутствие какой-либо стимуляции. Через трое суток Т-клетки CD4⁺, но не Т-клетки CD4⁻ в культуре клеток были активированы, что подтверждается анализом FACS для маркера активации CD71 (фиг. 3). Ненацеленные частицы, экспонирующие IL-7, активировали и Т-клетки CD4⁺, и Т-клетки CD4⁻. Известно то, что IL-7 представляет собой цитокин выживания Т-клеток. Следовательно, было продемонстрировано то, что все VLP, экспонирущие IL7, были такими же эффективными, как и рекомбинантный человеческий IL-7, в предупреждении гибели первичных Т-клеток, тогда как большинство покоящихся Т-клеток, помещенных в культуру, были мертвы через шесть суток в присутствии традиционных IL7-дефицитных частиц VLP (фиг. 4).

Способность стимулировать выживание Т-клеток и селективно активировать Т-клетки СD4⁺ также приобреталась экспонирующими IL7, нацеленными на CD4 LV (4^H/IL7^H-LV). Вирусные частицы получали, как описано выше, за исключением того что рСG-1 была заменена плазмидой для переноса, кодирующей GFP. Кроме того, для того, чтобы протестировать гибкость системы и то, могла ли быть усилена функция частиц посредством применения другой версии Hmut, для получения вектора использовали две другие плазмиды, кодирующие Hmut-IL7. pCG-HΔ15-IL7 представляет собой 15 ак (аминокислотное) цитоплазматическое усечение Hmut-IL7 (для получения $4^{\rm H}/{\rm IL7^{\rm H}}\Delta^{15}$ -LV) и pCG-HA20-IL7 представляет собой 20 ак цитоплазматическое усечение Hmut-IL7 (для получения $4^{\rm H}/{\rm IL7}^{\rm H}\Delta^{20}$ -LV). Без конкретного указания экспонирующие IL7 VLP и LV получали с использованием pCG-HΔ15-IL7. Аналогично тому что достигалось посредством 4^H/IL7^H-VLP при инкубации свежевыделенных человеческих Т-клеток CD3⁺ с указанными LV в отсутствие стимуляции в течение 6 суток, 4^H/IL7^H-LV значимо стимулировал выживание Т-клеток по сравнению с родительским 4^H-LV и ненацеленным Hnse-LV (фиг. 5). Как и ожидалось, наивысшая процентная доля жизнеспособных клеток наблюдалась в позитивной группе обработанных rhIL-7, и наименее жизнеспособные клетки были в группах трансдуцированных VSV-LV или нетрансдуцированных (ut) (фиг. 5). Кроме того, $4^{H}/IL7^{H}$ -LV был таким же мощным, как и $4^{H}/IL7^{H}$ -VLP в селективном стимулировании популяции его клеток-мишеней в смешанной культуре клеток. Как показано на фиг. 6, 4^H/IL7^H-LV осуществляет селективную повышающую регуляцию экспрессии клеток CD4⁺ с маркером активации CD69 и CD71, но не клеток CD4⁻. Не было различий между $4^{\rm H}/{\rm IL7}^{\rm H}\Delta^{15}$ -LV и $4^{\rm H}/{\rm IL7^{\rm H}}\Delta^{20}$ -LV в стимуляции Т-клеток CD4 $^{+}$. Следовательно, успешно генерируются функциональные экспонирующие IL7 нацеленные LV.

Пример 2. Доставка опухолеспецифичных химерных рецепторов антигена в покоящиеся Т-клетки. Поскольку IL7-экспонирующие векторы запускали активацию покоящихся Т-клеток, ожидается то, что данные клетки являются пермиссивными для лентивирусной трансдукции. Для того чтобы доказать

это, были получены две версии $4^H/IL7^H-LV$, доставляющего трансген GFP. Как показано на фиг. 9, и $4^H/IL7^H\Delta^{15}-LV$, и $4^H/IL7^H\Delta^{20}-LV$ могут эффективно и селективно трансдуцировать покоящиеся Т-клетки $CD4^+$ в смеси клеток.

Химерные рецепторы антигена (CAR) представляют собой мощное средство для терапии рака. До сих пор поднаборы Т-клеток должны очищаться и активироваться для генетической доставки CAR. В данном документе демонстрируется то, что CAR могут быть селективно доставлены в покоящиеся клетки $\mathrm{CD4}^+$. Частицы получали, как описано в примере 1, за исключением того что pCG-1 была заменена плазмидой для переноса, кодирующей CAR. При трансдукции покоящихся Т-клеток $\mathrm{4^H/IL7^H}$ -LV, доставляющей ErbB2-специфичные химерные рецепторы антигена (ErbB2-CAR), экспрессия ErbB2-CAR наблюдалась только в популяции Т-клеток $\mathrm{CD4}^+$. По сравнению с $\mathrm{IL7}$ -дефицитным, нацеленным на $\mathrm{CD4}$ LV ($\mathrm{4^H-LV}$), $\mathrm{4^H/IL7^H}$ -LV был более эффективным в доставке гена CAR, при сохранении селективности в отношении Т-клеток $\mathrm{CD4}^+$ (фиг. 1).

Пример 3. Гликопротеины MV могут быть заменены гликопротеинами NiV для селективной активации и трансдукции покоящихся человеческих T-клеток $CD8^+$.

Для того чтобы эффективно псевдотипировать VLP или LV гликопротеинами NiV, NiV-G был усечен в его цитоплазматическом хвосте на 34 аминокислоты ($Gc\Delta34$), а NiV-F был усечен в его цитоплазматическом хвосте на 22 аминокислоты ($F\Delta22$). Затем было нарушено распознавание $Gc\Delta34$ природным рецептором Ephrin-B2/B3 посредством введение в $Gc\Delta34$ четырех точечных мутаций (E501A, W504A, Q530A, E533A). LV, псевдотипированный данным сконструированным белком G, полностью терял связывание с природными рецепторами NiV Ephrin-B2 и -B3 (фиг. 2) и не поступал в клетки, экспрессирующие данные рецепторы.

Кроме того, LV, псевдотипированные NiV, имеют некоторые привлекательные характеристики, подобные высокому выходу продукции и устойчивости ко внутривенным иммуноглобулинам. Поскольку отсутствует вакцинация против NiV и небольшое число вспышек ограничивается несколькими случаями в Малайзии, Бангладеш и Индии (SEARO/Регион Юго-восточной Азии ВОЗ (Всемирная организация здравоохранения)), у людей не должны присутствовать нейтрализующие антитела. Для демонстрации этого внутривенный иммуноглобулин (IVIG; Intratect®), охватывающий самый широкий интервал доноров человеческой сыворотки, инкубировали с NiVwt-LV, NiVmut^{EpCAM}-LV, MV^{EpCAM}-LV и VSV-LV в возрастающих концентрациях до трансдукции клеток-мишеней. Экспрессию GFP затем определяли проточной цитометрией через трое суток после трансдукции. Как и ожидалось, трансдукция, опосредованная VSVG-LV и NiVwt-LV, не подвергалась влиянию посредством обработки IVIG. MV^{EpCAM}-LV, с другой стороны, показал дозозависимое уменьшение показателей трансдукции с полной нейтрализацией при 100 мкг/мл IVIG. В отличие от этого NiVmut Epcam-LV был устойчивым против IVIG при всех использованных концентрациях и, таким образом, должен быть по меньшей мере в 10000 раз менее чувствительным против человеческого иммуноглобулина, чем соответствующий вектор на основе МV (фиг. 10). Данные результаты показывают то, что нацеленные на рецептор векторы на основе гликопротеинов NiV не будут нейтрализованы при инъекции человеку.

Следовательно, из-за вышеописанных характеристик NiV-G псевдотипы NiV использовали далее для получения экспонирующих цитокин, нацеленных на CD8 частиц. Здесь CD8-специфичный scFv, происходящий из OKT8, экспонировался на NiV-G Δ 34mut4 с получением оболочечной плазмиды pCG-Gmut-CD8scFv, а человеческий IL7 экспонировался на NiV-G Δ 34mut4 с получением оболочечной плазмиды pCG-Gmut-IL7. Для того чтобы получить 8^G /IL7 G -LV, для трансфекции клеток HEK293T в одном флаконе T175 использовали 0,45 мкг pCG-Gmut-CD8scFv, 0,45 мкг pCG-Gmut-IL7, 4,7 мкг pCG-Fc Δ 22, 14,4 мкг упаковывающей плазмиды на основе ВИЧ-1 pCMV Δ R8.9 и 15,1 мкг плазмид для переноса на основе LV. Для LV были получены титры порядка 1.5 мкг p24/мл.

Аналогично тому что было достигнуто посредством $4^H/IL7^H-LV$, $8^G/IL7^G-LV$ (содержащий белки последовательности SEQ ID NO: 4, 6 и 16) мог селективно стимулировать и трансдуцировать Т-клетки CD8⁺ в смеси периферической крови. Как показано на фиг. 11, при инкубации свежевыделенных человеческих Т-клеток CD3⁺ с $8^G/IL7^G-LV$ в течение 3 суток не только поднаборы Т-клеток CD8⁺ в культуре демонстрировали повышающую регуляцию экспрессии CD71, но также только эта популяция клеток эффективно экспрессировала репортерный трансген GFP (фиг. 12) или терапевтический трансген CAR19 (фиг. 13). Кроме того, по сравнению с родительским IL7-дефицитным, нацеленным на CD8 LV (8^G-LV), $8^G/IL7^G-LV$ был более эффективным в активации клеток-мишеней и доставке трансгенов без нарушения специфичности трансдукции Т-клеток CD8⁺.

Пример 4. Идентификация оптимального отношения нацеливающих на CD8 NiV-G к экспонирующим IL7 NiV-G.

Для того чтобы задействовать больше клеток-мишеней, улучшить титр и увеличить специфичность частиц в отношении селективной активации и трансдукции отличной популяции клеток при максимальном уменьшении эффекта вне мишени, протокол трансфекции дополнительно оптимизируется в отношении продукции вектора и тщательно определяются количества плазмид, кодирующих $NiV-G^{\text{нацеливающий}}$

^{домен} (или MV-H^{нацеливающий домен}) NiV- $G^{\phi y h \kappa u u o h a h b i b}$ (MV-H^{функциональный домен}), сохраняющихся в упаковывающих клетках.

Для получения G^8/G^{IL7} -LV, как описано в примере 3, для трансфекции клеток HEK293 в одном флаконе T175 использовали общие количества плазмид pCG-Gmut 0,9 мкг, наряду с 4,7 мкг pCG-Fc Δ 22, 14,4 мкг упаковывающей плазмиды на основе ВИЧ-1 pCMV Δ R8.9 и 15,1 мкг pSEW. Тем временем плазмиды pCG-Gmut-CD8scFv и pCG-Gmut-IL7 смешиваются в разных соотношениях: 20:1, 10:1, 5:1, 1:1 или 1:5. Соответствующие супернатанты клеток, содержащие $8^G/IL7^G$ -LV, использовали для трансдукции клеток CD8⁺ Molt или A301, и через 48 ч после трансдукции процентная доля клеток GFP⁺ измеряется посредством FACS для расчета титров. Кроме того, $8^G/IL7^G$ -LV используются для трансдукции свежевыделенных T-клеток CD3⁺, и затем определяется экспрессия CD71 и GFP в клетках CD8⁺ и CD8⁻. Идентифицируется наилучшее соотношение как дающее наивысший титр, наивысшую экспрессию CD71 и GFP в целевой популяции и наименьшую экспрессию в нецелевой популяции.

Пример 5. Характеристика трансдуцированных покоящихся Т-клеток посредством экспонирующих IL7, нацеленных VLP и LV.

Компартменты Т-клеток являются высокогетерогенными, и поднаборы Т-клеток являются фенотипически и функционально отличными. Когда речь идет о Т-клеточной терапии рака, менее дифференцированные клетки обычно коррелируют с лучшим противоопухолевым эффектом in vivo. Следовательно, важно идентифицировать поднаборы Т-клеток, которые активируются или модифицируются векторными частицами согласно изобретению. Например, беря $8^G/IL7^G-LV-CAR$, следует охарактеризовать фенотипы трансдуцированных покоящихся Т-клеток по сравнению с трансдуцированными предстимулированными Т-клетками (с применением шире всего используемого протокола стимуляции CD3/CD28). Вкратце через 3 суток после трансдукции покоящихся или предстимулированных Т-клеток CD3 $^+$ отслеживается экспрессия многочисленных маркеров Т-клеток, включающих CD11a, CD11b, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD62L, CD69, CD71, CD95, CD127 и CCR7. Данные молекулы выбираются, так как их использовали в прошлом для дифференциации следующих Т-клеток: CD45RA $^+$ CD45RO°CD62L $^{\rm Bысокая}$ CD95-CD27 высокая наивные ($T_{\rm N}$), CD45RA $^+$ CD45RO°CD62L $^{\rm Bысокая}$ CD95 $^+$ CD27 центральные памяти ($T_{\rm CM}$), CD45RA $^+$ CD45RO $^{\rm Bысокая}$ CD62L $^+$ CD95 $^+$ CD27 центральные памяти ($T_{\rm CM}$), CD45RA $^+$ CD45RO $^+$ CD62L $^+$ CD95 образование памяти ($T_{\rm CM}$), CD45RA $^+$ CD45RO $^+$ CD62L $^+$ CD95 образовать посредством проточной цитометрии.

Кроме того, поднаборы предсортированных Т-клеток $\mathrm{CD4}^+$ ($\mathrm{T}_{\mathrm{SCM}}$, T_{CM} , T_{EM} и T_{E}) инкубируются, например, с $\mathrm{4^H/IL7^H}$ -VLP для демонстрации преимуществ настоящего изобретения в отношении активации Т-клеток по сравнению с традиционной стимуляцией TCR. Вкратце после 3 суток инкубации с $\mathrm{4^H/IL7^H}$ -VLP или стимуляции антителами против $\mathrm{CD3/CD28}$ вышеуказанные поднаборы Т-клеток анализируются на отклонение фенотипа и уровни активации. Ожидается то, что экспонирующие IL7, нацеленные на Т-клетки векторные частицы активируют и трансдуцируют менее дифференцированные Т-клетки.

Пример 6. Усиление функции полученных ех vivo Т-клеток с CAR и упрощение методики получения Т-клеток с CAR.

Было продемонстрировано то, что адоптивная Т-клеточная иммунотерапия является эффективной клинической схемой для лечения разных типов заболеваний. Однако ее более широкое применение было ограничено несколькими проблемами. С одной стороны, получение Т-клеток со сконструированным САR или со сконструированным ТСR является очень дорогим и трудозатратным из-за стимулирования in vitro, долговременного размножения и выделения, и очистки клеток. С другой стороны, эффекторные Т-клетки, которые были размножены in vitro, часто плохо выживают in vivo и не могут демонстрировать поддерживающийся противоопухолевый эффект. Согласно настоящему изобретению предложены потенциальные решения для данных вызовов посредством объединения стимуляции клеток и переноса генов в одной стадии и обеспечения трансдукции покоящихся Т-клеток. С использованием данного изобретения способ получения Т-клеток может быть значительно упрощен, следовательно, уменьшая затраты на изготовление Т-клеток. Кроме того, по сравнению с традиционно получаемыми клетками, Т-клетки со сконструированными САR/ТСR, полученные посредством настоящего изобретения, могут быть более эффективными in vivo из-за потенциала эффективного конструирования менее дифференцированных клеток, как продемонстрировано в примере 5.

Для демонстрации данных характеристик, свежевыделенные человеческие PBMC или Т-клетки CD8⁺ трансдуцируются, например, 8^G/IL7^G-LV-CAR или VSV-LV-CAR в качестве контроля. Тем временем, параллельно получают традиционные Т-клетки с CAR согласно наиболее широко применяемому протоколу. Вкратце выделенные человеческие PBMC или Т-клетки CD8⁺ от того же самого донора стимулируются антителами против CD3/CD28 и IL2. Затем клетки трансдуцируются 8^G/IL7^G-LV-CAR или VSV-LV-CAR с последующими 10 сутками размножения в присутствии IL2. Через 2-3 суток после трансдукции вектором покоящихся Т-клеток или через 12 суток после трансдукции стимулированных Т-клеток данные клетки сокультивируются с опухолевыми клетками-мишенями in vitro или инфундируются гуманизированной мыши, несущей опухоль. Затем оцениваются лизис опухолевых клеток in vitro и

ремиссия опухоли in vivo, выживание животного, выживаемость и пролиферация реагирующих на опухоль Т-клеток.

Пример 7. Селективная активация и трансдукция экспонирующими IL7, нацеленными частицами в in vivo-подобных условиях.

На следующей стадии исследуется возможность применения вирусных частиц для нацеливания и функциональной модификации отдельных клеток в ситуациях in vivo. Таким образом, проводится трансдукция свежей человеческой периферической крови вирусными частицами, например G^8/G^{IL7} -LV. Это обеспечивает оценку целевой активации и переноса генов в популяцию Т-клеток $CD8^+$ в присутствии активной системы человеческого комплемента - препятствия, с которым вирусные частицы сталкиваются in vivo.

Вкратце свежая периферическая кровь инкубируется с $8^G/IL7^G-LV$ -GFP или другими контрольными векторами (VSV-LV, $8^H/IL7^H-LV$, 8^G-LV или VSV/IL7 ^G-LV) в течение 6-8 ч. Затем общие PBMC выделяют из крови и дополнительно культивируют в культуральной среде для T-клеток без добавления какихлибо стимулирующих реактивов. Через 3-4 суток клетки CD8 $^+$ и CD8 $^-$ в культуре оцениваются на экспрессию CD71 и GFP. Для подтверждения стабильного переноса генов маленькая фракция клеток переносится в культуральную среду, дополненную антителами против CD3/CD28 и IL2 на 3 дополнительных суток перед анализом процентных содержаний клеток GFP $^+$.

Пример 8. Экспонирующие IL7, нацеленные частицы селективно активируют и трансдуцируют циркулирующие покоящиеся Т-клетки в гуманизированных мышиных моделях.

Для того чтобы продемонстрировать то, что частицы согласно изобретению способны к локальному или системному применению in vivo для обеспечения специфичной для типа клеток активации или модификации, их применяли у мышей с пересаженными человеческими CD34⁺ гематопоэтическими стволовыми клетками (HSC) от здоровых доноров. В данной мышиной модели могут быть получены человеческие гематопоэтические клетки многих линий, и данные клетки переносятся мышиным хозяином.

Здесь в качестве примера берется применение G^8/G^{IL7} -псевдотипированных частиц для активации и модификации человеческих Т-клеток CD8⁺. Вкратце, после подтверждения того, что человеческая иммунная система была успешно установлена посредством выявления около 10% человеческих Т-клеток CD3⁺, G^8/G^{IL7} -псевдотипированные частицы системно применяются посредством внутривенной инъекции (в/в) или локально посредством внутриселезеночной или внутритимусной инъекции. G^8/G^{IL7} -VLP инъецируется для оценки возможности селективной активации человеческих Т-клеток CD8⁺ in vivo. В данной экспериментальной постановке уровень/продолжительность активации и пролиферация Т-клеток CD8⁺ анализируются в разные моменты времени после инъекции VLP. G^8/G^{IL7} -LV-GFP инъецируется для оценки функции доставки генов in vivo. В данной постановке эксперимента в разные моменты времени после инъекции LV анализируются экспрессия GFP, фенотипы трансдуцированных клеток, их пролиферация и выживание. G^8/G^{IL7} -LV-CAR инъецируется для оценки возможности доставки терапевтического гена и получения in vivo Т-клеток с CAR. В данной постановке эксперимента в разные моменты времени после инъекции LV анализируются экспрессия CAR, фенотипы трансдуцированных клеток, пролиферация и выживание трансдуцированных клеток в присутствии/отсутствие опухолевых клеток/антигеновмишеней, устранение местной/системной опухоли.

Пример 9. Селективная активация Т-клеток CD4⁺ макака-резуса.

Т-клетки примата, не являющегося человеком (NHP), являются фенотипически сходными с человеческими Т-клетками, делая их наилучшей животной моделью человеческого иммунитета и иммунотерапии. Что касается Т-клеточной терапии, модель NHP могла бы быть более надежной в прогнозировании эффекта, дозировки, путей применения и безопасности потенциальных лекарственных средств. Следовательно, весьма желательным является средство для специфичной модификации или индукции функционального изменения в отдельном типе клеток у NHP.

Здесь в качестве примера подробно описываются вектор 4^H/IL7^H-SIV и его применение для макакарезуса. Во-первых, в качестве нацеливающего домена, экспонируемого на белке Hmut (H-CD4^{D57.2}), используется CD4-специфичный DARPin57.2 (CD4^{D57.2}) макака-резуса, а в качестве функционального домена, экспонируемого на Hmut (H-rmIL7), используется IL7, реактивный у макака-резуса. Затем два вышеописанных белка Н, например, в соотношениях, определенных в примере 4, используются для псевдотипирования LV, полученного из вируса иммунодефицита обезьян mac 251 (SIVmac251). После определения выхода вектора и титров посредством ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ) P27/Nano-sight и трансдукции обезьяньих клеток CD4⁺, свежевыделенные обезьяньи Т-клетки CD3⁺ трансдуцируются 4^{H} /IL 7^{H} -SIV, доставляющим GFP или CAR. Затем определяли маркеры активации и экспрессии трансгенов в Т-клетках CD4⁺ по сравнению с CD4⁻, как описано выше. Затем в моделях NHP оценивается возможность применения in vivo. С этой целью одна доза векторов медленно инъецируется в два подмышечных лимфатических узла каждого из зарегистрированных животных (например, макакарезуса). Через одну неделю после инъекции отбираются образцы крови, и один из двух подвергнутых инъекции лимфатических узлов удаляется посредством хирургии и разъединяется на суспензии одиночных клеток. Проводится подробный анализ для определения фенотипов, специфичной активации, уровней экспрессии трансгена и/или функции (при доставке терапевтического трансгена) Т-клеток, трансдуцированных in vivo. Кроме того, второй лимфатический узел получает вторую дозу того же самого вектора, и зарегистрированные животные отслеживаются в течение шести месяцев для оценки пролиферации, жизнеспособности и/или функции (при доставке терапевтического трансгена) Т-клеток, трансдуцированных in vivo.

Пример 10. Селективно активные и размноженные антигенспецифичные Т-клетки в иммунокомпетентной мышиной модели.

Потенциал нацеливания цитокина для функционирования в месте заболевания при избегании системной токсичности может быть хорошо оценен в модели меланомной опухоли иммунокомпетентных мышей. В качестве примера берется VLP, нацеленная на мышиный CD8, экспонирующая IL12 (m8^G/mIL12^G-VLP). Предыдущие исследования показали то, что применение IL12 может усиливать толерантность и противоопухолевую эффективность перенесенных Т-клеток, реагирующих на опухоль, но является очень токсичным системно. Для преодоления данного недостатка в исследовании авторов изобретения для контроля функции IL12 в местах опухоли используется m8^G/mIL12^G-VLP. Мышам дикого типа C57/BI6 трансплантируют меланомные клетки B16/OVA, после развития опухоли мышей обрабатывают радиацией и переносят Т-клетки, выделенные у трансгенных мышей C57/BI6 OT-I. После трансплантации Т-клеток ОТ-I мышей обрабатывают m8^G/mIL12^G-VLP или мышиным IL12, или PBS (фосфатно-солевой буферный раствор) в качестве контролей посредством в/в инъекции. Анализируются объем опухоли, выживаемость in vivo, функция Т-клеток ОТ-I и выживание мышей.

Пример 11. Целевая активация человеческих Т-клеток CD4⁺ in vivo.

Для того чтобы оценить эффективность in vivo MV-4^H/IL7^H-LVs в отношении активации человеческих Т-клеток CD4⁺, мышам NOD/SCID gc-/- (NSG) пересаживали Т-клетки пупочной крови CD3⁺. Восстановление человеческими Т-клетками определяли в крови еженедельно. При выявлении 20% hT-клеток (человеческих Т-клеток) (% клеток hCD3⁺/общее количество клеток hCD45⁺+mCD45⁺) мышам в/в инъецировали 1E6 IU MV-4^H/IL7^H-LV или MV-4^H-LV. Через две недели после инъекции векторов мышей умерщвляли, и выделяли спленоциты и одноядерные клетки периферической крови. Примечательно то, что была обнаружена более сильная специфичная для IL-7 активация, выявленная посредством позднего маркера активации CD71 человеческих Т-клеток CD4⁺, в случае MV-4^H/IL7^H-LV (25% клеток CD4⁺ CD71⁺) по сравнению с MV-4^H-LV (8% клеток CD4⁺ CD71⁺) (фиг. 14). Кроме того, Т-клетки CD4⁻, которые представляют собой Т-клетки CD8⁺, демонстрируют идентичную экспрессию CD71 для обоих нацеливающих векторов. Последнее подчеркивает то, что сигнализация выживания IL-7 активировала только целевые Т-клетки CD4⁺, а не клетки CD8⁺.

В заключение наряду со специфичной активацией in vitro клеток-мишеней, достигаемой с использованием $MV-4^H/IL7^H-LV$, специфичная активация T-клеток $CD4^+$ посредством $MV-4^H/IL7^H-LV$ была подтверждена in vivo в мышиной модели человеческой кровеносной системы.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

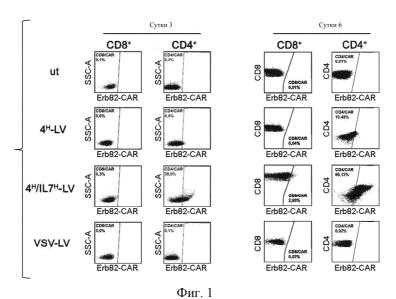
- 1. Псевдотипированный ретровирусный вектор, содержащий
- а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, представляющий собой усеченный гликопротеин G оболочки вируса рода Henipavirus, у которого отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки и который имеет последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 9, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
- б) по меньшей мере один гликопротеин, представляющий собой усеченный гликопротеин F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, у которого отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина F оболочки и который имеет последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 11; и
 - в) ген, кодирующий химерный рецептор антигена.
- 2. Псевдотипированный ретровирусный вектор по п.1, где гликопротеин G Henipavirus представляет собой гликопротеин G оболочки вируса Нипах (NiV).
- 3. Псевдотипированный ретровирусный вектор по п.1 или 2, где у усеченного гликопротеина G оболочки отсутствует по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот в цитоплазматической области.
- 4. Псевдотипированный ретровирусный вектор по любому из пп.1-3, где у усеченного гликопротеина G оболочки отсутствуют аминокислоты 2-34 SEQ ID NO: 9 ($Gc\Delta 34$).
- 5. Псевдотипированный ретровирусный вектор по любому из пп.1-4, где у усеченного гликопротеина F оболочки отсутствует по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот или по меньшей мере 20 аминокислот в цитоплазматической области.
- 6. Псевдотипированный ретровирусный вектор по п.5, где у усеченного гликопротеина F оболочки отсутствуют аминокислоты 525-546 SEQ ID NO: 11 (Fc $\Delta 22$).
 - 7. Псевдотипированный ретровирусный вектор, содержащий

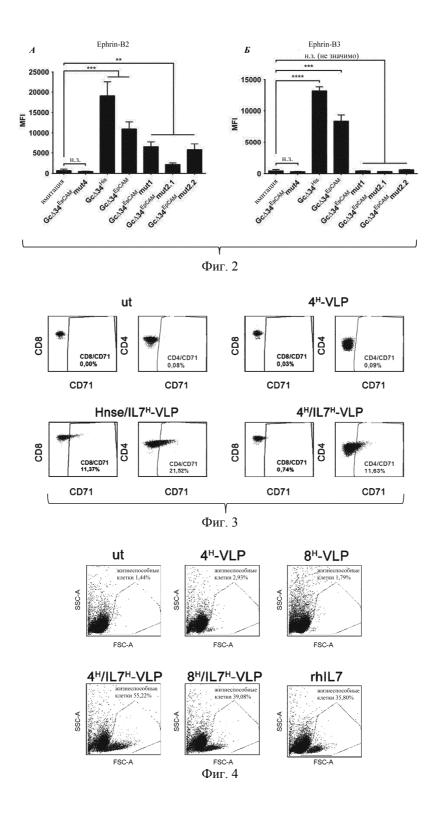
- а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок представляющий собой усеченный гликопротеин G оболочки вируса Нипах, в котором отсутствуют аминокислоты 2-34 SEQ ID NO: 9 ($Gc\Delta 34$), и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку; и
- б) по меньшей мере один усеченный гликопротеин F оболочки вируса Нипах, у которого отсутствуют аминокислоты 525-546 SEQ ID NO: 11 (Fc $\Delta 22$).
- 8. Псевдотипированный ретровирусный вектор по любому из пп.1-7, где усеченный гликопротеин G оболочки по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G оболочки.
- 9. Псевдотипированный ретровирусный вектор по п.8, где усеченный гликопротеин G представляет собой NiV-G и по меньшей мере частично не способен к связыванию с рецептором Ephrin-B2 и/или рецептором Ephrin-B3, предпочтительно с обоими: рецептором Ephrin-B2 и рецептором Ephrin-B3.
- 10. Псевдотипированный ретровирусный вектор по любому из пп.1-9, где усеченный гликопротеин G содержит по меньшей мере две или по меньшей мере три точечных мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 9, причем указанные точечные мутации выбраны в группе, состоящей из E501A, W504A, Q530A и E533A.
- 11. Псевдотипированный ретровирусный вектор по п.10, где точечные мутации представляют собой E501A, W504A, Q530A и E533A и приводят к неспособности связываться с рецептором Ephrin-B2 и рецептором Ephrin-B3.
- 12. Псевдотипированный ретровирусный вектор по любому из пп.7-11, где происходящий от ретровируса геном указанного ретровирусного вектора содержит по меньшей мере один представляющий интерес ген.
- 13. Псевдотипированный ретровирусный вектор по п.12, где представляющий интерес ген кодирует терапевтический белок, апоптозный белок, химерный рецептор антигена, рецептор клеточной поверхности, антитело, фрагмент антитела, малую шпилечную РНК (мшРНК), антиген, цитокин, микроРНК, элемент(ы) CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками)/CAS или другую нуклеазную систему, такую как нуклеазы с цинковыми пальцами, S/MAR (области прикрепления каркаса/матрикса)-эписомы, лиганды и/или рецепторы.
- 14. Псевдотипированный ретровирусный вектор по любому из пп.7-13, который содержит ген, кодирующий химерный рецептор антигена.
- 15. Псевдотипированный ретровирусный вектор по любому из пп.1-6 и 14, где кодируемый химерный рецептор антигена является специфичным в отношении CD19.
 - 16. Псевдотипированный ретровирусный вектор, содержащий
 - а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, представляющий собой усеченный гликопротеин G оболочки вируса Нипах, в котором отсутствуют аминокислоты 2-34 SEQ ID NO: 9 ($Gc\Delta 34$), и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
- б) по меньшей мере один усеченный гликопротеин F оболочки вируса Нипах, у которого отсутствуют аминокислоты 525-546 SEO ID NO: 11 (Fc $\Delta 22$); и
 - в) ген, кодирующий химерный рецептор антигена.
- 17. Ретровирусный вектор по любому из пп.1-16, где указанный домен, нацеливающий на клетку, выбран в группе, состоящей из DARPin, scFv, нацеливающего пептида и их комбинаций.
- 18. Ретровирусный вектор по любому из пп.1-17, где по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку, связывается с клеткой-мишенью, выбранной из гематопоэтических клеток, клеток стромы, клеток печени, мышечных клеток и клеток нервной системы.
- 19. Ретровирусный вектор по любому из пп.1-18, где по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку, является специфичным в отношении CD3, CD8, CD4, маркера раковой клетки, CD11b, CD19, CD62L, CD56, Glut-1 (глюкозный транспортер), CD22, CD20, CCR5 или CXCR4.
- 20. Ретровирусный вектор по п.19, где указанный домен, нацеливающий на клетку, специфичен в отношении CD3.
- 21. Ретровирусный вектор по п.19, где указанный домен, нацеливающий на клетку, специфичен в отношении CD4.
- 22. Ретровирусный вектор по п.19, где указанный домен, нацеливающий на клетку, специфичен в отношении CD8.
 - 23. Псевдотипированный ретровирусный вектор, содержащий
- а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий гликопротеин G оболочки вируса Нипах, в котором отсутствуют аминокислоты 2-34 SEQ ID NO: 9 ($Gc\Delta 34$) и который содержит точечные мутации E501A, W504A, Q530A и E533A, по сравнению с SEQ ID NO: 9; и
- б) по меньшей мере один гликопротеин, представляющий собой гликопротеин F оболочки вируса Hunax, у которого отсутствуют аминокислоты 525-546 SEQ ID NO: 11 ($Fc\Delta 22$).
 - 24. Псевдотипированный ретровирусный вектор по любому из пп.1-23, где ретровирусный вектор

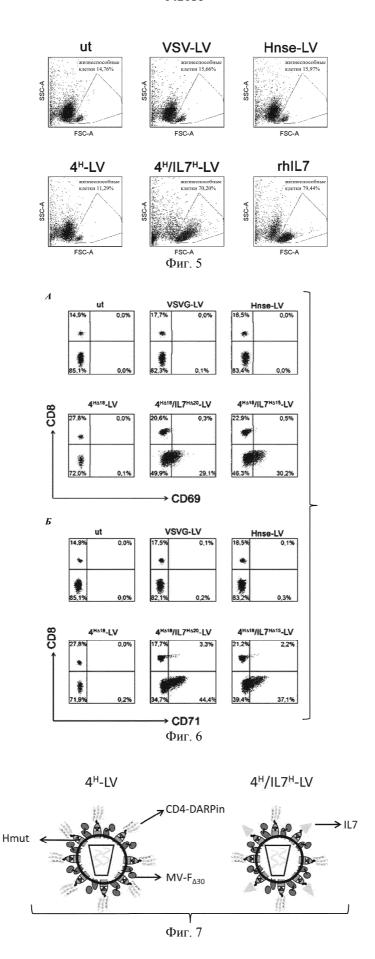
является лентивирусным вектором.

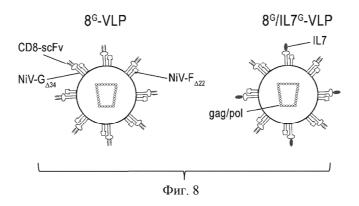
- 25. Применение псевдотипированного ретровирусного вектора по любому из пп.1-24 в качестве лекарственного средства.
- 26. Способ селективного трансдуцирования клеток-мишеней in vitro или ex vivo, включающий приведение в контакт псевдотипированного ретровирусного вектора по любому из пп.1-24 с клетками, содержащими указанные клетки-мишени.
 - 27. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица, содержащая
 - а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, представляющий собой усеченный гликопротеин G оболочки вируса рода Henipavirus, у которого отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина G оболочки и который имеет последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 9, и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
- б) по меньшей мере один гликопротеин, представляющий собой усеченный гликопротеин F оболочки вируса семейства Paramyxoviridae, у которого отсутствует по меньшей мере одна часть цитоплазматической области указанного гликопротеина F и который имеет последовательность, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 11; и
 - в) ген, кодирующий химерный рецептор антигена.
- 28. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по п.27, где гликопротеин G Henipavirus представляет собой гликопротеин G оболочки вируса Нипах (NiV).
- 29. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по п.27 или 28, где у усеченного гликопротеина G оболочки отсутствует по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот, по меньшей мере 18 аминокислот, по меньшей мере 20 аминокислот, по меньшей мере 25 аминокислот или по меньшей мере 30 аминокислот в цитоплазматической области.
- 30. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-29, где у усеченного гликопротеина G оболочки отсутствуют аминокислоты 2-34 SEQ ID NO: 9 (Gc∆34).
- 31. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-30, где у усеченного гликопротеина F оболочки отсутствует по меньшей мере 10 аминокислот, по меньшей мере 15 аминокислот или по меньшей мере 20 аминокислот в цитоплазматической области.
- 32. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по п.31, где у усеченного гликопротеина F оболочки отсутствуют аминокислоты 525-546 SEO ID NO: 11 ($Fc\Delta 22$).
 - 33. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица, содержащая
 - а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, представляющий собой усеченный гликопротеин G оболочки вируса Нипах, в котором отсутствуют аминокислоты 2-34 SEQ ID NO: 9 (Gc $\Delta 34$), и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку; и
- б) по меньшей мере один усеченный гликопротеин F оболочки вируса Нипах, у которого отсутствуют аминокислоты 525-546 SEQ ID NO: 11 (Fc $\Delta 22$).
- 34. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-33, где усеченный гликопротеин G оболочки по меньшей мере частично не способен к связыванию с по меньшей мере одним природным рецептором указанного гликопротеина G оболочки.
- 35. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по п.34, где усеченный гликопротеин G представляет собой NiV-G и по меньшей мере частично не способен к связыванию с рецептором Ephrin-B2 и/или рецептором Ephrin-B3, предпочтительно с обоими: рецептором Ephrin-B2 и рецептором Ephrin-B3.
- 36. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-35, где усеченный гликопротеин G содержит по меньшей мере две или по меньшей мере три точечных мутации по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 9, причем указанные точечные мутации выбраны в группе, состоящей из E501A, W504A, Q530A и E533A.
- 37. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по п.36, где точечные мутации представляют собой E501A, W504A, Q530A и E533A и приводят к неспособности связываться с рецептором Ephrin-B2 и рецептором Ephrin-B3.
- 38. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.33-37, где происходящий от ретровируса геном указанного ретровирусного вектора содержит по меньшей мере один представляющий интерес ген.
- 39. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по п.38, где представляющий интерес ген кодирует терапевтический белок, апоптозный белок, химерный рецептор антигена, рецептор клеточной поверхности, антитело, фрагмент антитела, мшРНК, антиген, цитокин, микроРНК, элемент(ы) CRISPR (кластерные короткие палиндромные повторы, разделенные регулярными промежутками)/CAS или другую нуклеазную систему, такую как нуклеазы с цинковыми пальцами, S/MAR (области прикрепления каркаса/матрикса)-эписомы, лиганды и/или рецепторы.
- 40. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.33-39, которая содержит ген, кодирующий химерный рецептор антигена.

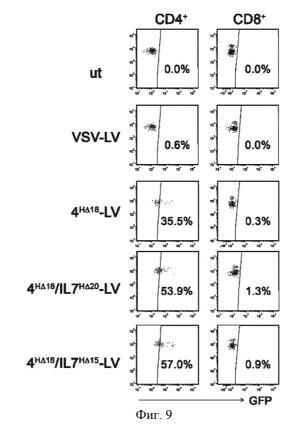
- 41. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-32 и 40, где кодируемый химерный рецептор антигена является специфичным в отношении CD19.
 - 42. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица, содержащая
 - а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий
- (i) белок, представляющий собой усеченный гликопротеин G оболочки вируса Нипах, в котором отсутствуют аминокислоты 2-34 SEQ ID NO: 9 ($Gc\Delta 34$), и
 - (ii) по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку;
- б) по меньшей мере один усеченный гликопротеин F оболочки вируса Нипах, у которого отсутствуют аминокислоты 525-546 SEQ ID NO: 11 ($Fc\Delta 22$); и
 - в) ген, кодирующий химерный рецептор антигена.
- 43. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-41, где указанный домен, нацеливающий на клетку, выбран в группе, состоящей из DARPin, scFv, нацеливающего пептида и их комбинаций.
- 44. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-43, где по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку, связывается с клеткой-мишенью, выбранной из гематопоэтических клеток, клеток стромы, клеток печени, мышечных клеток и клеток нервной системы.
- 45. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-44, где по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку, является специфичным в отношении CD3, CD8, CD4, маркера раковой клетки, CD11b, CD19, CD62L, CD56, Glut-1 (глюкозный транспортер), CD22, CD20, CCR5 или CXCR4.
- 46. Ретровирусоподобная частица по п.45, где по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку, специфичен в отношении CD3.
- 47. Ретровирусоподобная частица по п.45, где по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку, специфичен в отношении CD4.
- 48. Ретровирусоподобная частица по п.45, где по меньшей мере один домен, нацеливающий на клетку, специфичен в отношении CD8.
 - 49. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица, содержащая
- а) по меньшей мере один слитый белок, нацеливающий на клетку, содержащий гликопротеин G оболочки вируса Нипах, в котором отсутствуют аминокислоты 2-34 SEQ ID NO: 9 ($Gc\Delta 34$) и который содержит точечные мутации E501A, W504A, Q530A и E533A, по сравнению с SEQ ID NO: 9; и
- б) по меньшей мере один гликопротеин, представляющий собой гликопротеин F оболочки вируса Нипах, у которого отсутствуют аминокислоты 525-546 SEQ ID NO: 11 ($Fc\Delta 22$).
- 50. Псевдотипированная ретровирусоподобная частица по любому из пп.27-49, где ретровирусоподобная частица является лентивирусоподобной частицей.
- 51. Применение псевдотипированной ретровирусоподобной частицы по любому из пп.27-50 в качестве лекарственного средства.
- 52. Способ селективного трансдуцирования клеток-мишеней in vitro или ex vivo, включающий приведение в контакт псевдотипированной ретровирусоподобной частицы по любому из пп.27-50 с клетками, содержащими указанные клетки-мишени.











● NiVmut^{EpCAM}-LV⊟ MV^{EpCAM}-LV ★ NiVwt-LV ♦ VSV-LV

