



(51) МПК
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2011151506/10, 19.12.2011

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 19.12.2011

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 19.12.2011

(45) Опубликовано: 10.04.2013 Бюл. № 10

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: WO 1996033282 A2, 24.10.1996. US
 20030157070 A1, 21.08.2003. WO 2008122434
 A1, 16.10.2008. RU 2280074 C2, 10.02.2005. RU
 2009148877 A, 20.07.2011.

Адрес для переписки:

119607, Москва, Мичуринский пр-т, 25, к.1,
 кв.57, А.А. Исаеву

(72) Автор(ы):

**Ризванов Альберт Анатольевич (RU),
 Соловьева Валерия Владимировна (RU),
 Исаев Артур Александрович (RU),
 Генкин Дмитрий Дмитриевич (RU)**

(73) Патентообладатель(и):

**Открытое акционерное общество "Институт
 стволовых клеток человека" (RU)**

(54) СПОСОБ ПОВЫШЕНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ВИРУСНОЙ ТРАНСДУКЦИИ

(57) Реферат:

Изобретение относится к области биотехнологии. Эукариотические клетки трансдуцируют ретровирусом в присутствии гистонного белка бис-мет-гистона И 1.3. Способ позволяет повысить эффективность ретровирусной трансдукции и избежать

недостатков аналогов. Изобретение может быть использовано в медицине, ветеринарии, биологии для получения лекарственных препаратов для генной терапии и для генетической модификации клеток *in vitro/ex vivo*. 6 ил., 4 пр.

RU 2 478 711 C1

RU 2 478 711 C1



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(19) **RU** (11) **2 478 711** (13) **C1**

(51) Int. Cl.
C12N 15/86 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2011151506/10, 19.12.2011**

(24) Effective date for property rights:
19.12.2011

Priority:

(22) Date of filing: **19.12.2011**

(45) Date of publication: **10.04.2013 Bull. 10**

Mail address:

**119607, Moskva, Michurinskij pr-t, 25, k.1,
kv.57, A.A. Isaevu**

(72) Inventor(s):

**Rizvanov Al'bert Anatol'evich (RU),
Solov'eva Valerija Vladimirovna (RU),
Isaev Artur Aleksandrovich (RU),
Genkin Dmitrij Dmitrievich (RU)**

(73) Proprietor(s):

**Otkrytoe aktsionernoe obshchestvo "Institut
stvolovykh kletok cheloveka" (RU)**

(54) **METHOD FOR PROVIDING HIGHER EFFECTIVENESS OF VIRAL TRANSDUCTION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine, pharmaceuticals.

SUBSTANCE: invention refers to biotechnology.
Eukaryotic cells are transduced by retrovirus in the presence of the primer protein bis-meth-histone I 1.3. The method enables higher effectiveness of retroviral transduction and avoided disadvantages of

the analogues.

EFFECT: invention may be used in medicine, veterinary science, biology for producing drug preparations for in vitro/ex vivo gene therapy and gene modification of cells.

6 dwg, 4 ex

RU 2 478 711 C 1

RU 2 478 711 C 1

Изобретение относится к способу увеличения частоты ретровирусной трансдукции эукариотических клеток и может быть использовано в медицине, ветеринарии, биологии для получения лекарственных препаратов для генной терапии.

Известен способ [1] повышения эффективности ретровирусной трансдукции (инфекции, трансфекции генетического материала) с помощью поликатиона - декстрана. Недостатком способа является высокая токсичность и низкая эффективность декстрана. Кроме того, декстран не разрешен для клинического применения.

Известен способ [2] повышения эффективности ретровирусной трансдукции с помощью поликатиона - полибрена. Недостатком способа (Manning, Hackett et al. 1971) является высокая токсичность и низкая эффективность полибрена. Кроме того, полибрен не разрешен для клинического применения.

Известен способ [3] «Опосредованный вирусом усиленный перенос ДНК». Способ также направлен на повышения эффективности ретровирусной трансдукции. Усиление ретровирусного переноса ДНК достигают инфицированием клеток в присутствии фибронектина или его фрагментов. Недостатком известного способа является высокая себестоимость фибронектина. Кроме того, инфицирование в присутствии фибронектина по указанному способу возможно только *in vitro/ex vivo*, так как фибронектин является одним из основных компонентов плазмы крови (300 мкг/мл). Таким образом, способ теряет смысл при применении *in vivo*, при котором фибронектин присутствует в больших количествах в организме в норме.

Наиболее близким изобретением является известный способ [4] повышения эффективности ретровирусной трансдукции с помощью протамин сульфата-специфического антагониста гепарина. Недостатком способа является низкая эффективность повышения ретровирусной трансдукции и возможные побочные эффекты при клиническом применении протамин сульфата. Например, внутривенное введение может вызвать артериальную гипотензию, брадикардию, чувство жара и покраснение кожи. У больных, принимавших протамин-цинк инсулин для лечения сахарного диабета, возможны анафилактические реакции на протамин сульфат. Противопоказанием к применению протамин сульфата является гиперчувствительность, идиопатическая или врожденная гипергепаринемия. Может взаимодействовать с другими лекарственными веществами, например с растворами цефалоспоринов и пенициллином, что может привести к снижению эффективности лекарственной терапии.

Способ позволяет повысить эффективность ретровирусной трансдукции и избежать недостатков аналогов.

Технический результат достигают тем, что эукариотические клетки трансдуцируют ретровирусом в присутствии гистонного белка - бис-мет-гистона Н 1.3 [5]. Под определением РЕТРОВИРУС подразумевают любой вирус семейства *Retroviridae*. Все представители семейства *Retroviridae* обладают схожим строением и жизненным циклом. Это семейство РНК-содержащих вирусов, представляющих из себя сферические вирионы сферической формы размером 80-100 нм, покрытые внешней липопротеиновой оболочкой, содержащие оболочечные гликопротеины. После инфицирования клетки ретровирусом в цитоплазме начинается синтез вирусного ДНК-генома с использованием вирионной РНК в качестве матрицы. Все ретровирусы используют для репликации своего генома механизм обратной транскрипции: вирусный фермент обратная транскриптаза (или ревертаза) синтезирует одну нить ДНК на матрице вирусной РНК, а затем уже на матрице синтезированной нити ДНК

достраивает вторую, комплементарную ей нить. Образуется двунитевая молекула ДНК, которая, проникнув через ядерную оболочку, интегрируется в хромосомную ДНК клетки и далее служит матрицей для синтеза молекул вирусных РНК. Эти РНК выходят из клеточного ядра и в цитоплазме клетки упаковываются в вирусные частицы, способные инфицировать новые клетки. Наиболее известным представителем семейства Retroviridae является вирус иммунодефицита человека (ВИЧ). В качестве примера метода повышения эффективности вирусной трансдукции, мы используем репликационно дефектный рекомбинантный лентивирус (GFP-RV), сконструированный на основе генома ВИЧ и сохранившего основные свойства ВИЧ дикого типа: способность взаимодействовать с клеточными мембранами посредством поверхностных гликопротеинов, проникать внутрь клетки-хозяина, осуществлять реакцию обратной транскрипции, транспорта в ядро клетки и интеграции в геном клетки-хозяина. Так как подобные стадии жизненного цикла присущи всем представителям семейства Retroviridae, то предложенный метод будет эффективным и для других представителей семейства.

Возможность осуществления изобретения иллюстрируют примеры. Способ производят последовательно, например, в четыре этапа.

Пример 1

Первый этап.

Культивирование клеток.

Все работы с культурой клеток проводят в стерильном ламинарном боксе согласно общепринятым правилам работы в лаборатории 2-го класса био-безопасности.

Эмбриональные клетки почки человека HEK-293T (ATCC, CRL-11268) и HeLa (ATCC, CCL-2) культивируют в среде DMEM с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы (англ. Fetal Bovine Serum, FBS) и пенstrepa (фирма-производитель - Sigma, Великобритания). Клетки инкубируют при плюс 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂. Пересев клеток проводят при плотности клеточного монослоя 90% с применением 0,25% раствора трипсина-ЭДТА (фирма-производитель - Биолот, Санкт Петербург).

Таким путем завершают получение клеточных культур HEK-293T и HeLa и приступают ко второму этапу.

Второй этап. Получение рекомбинантного лентивируса (GFP-RV).

Рекомбинантный лентивирус получают с помощью котрансфекции культуры клеток плазмидами, кодирующими разные компоненты рекомбинантного вируса. Например плазмидами, полученными из некоммерческой организации AddGene (www.addgene.org): pCMV-VSV-G (плазмида №8454), psPAX2 (плазмида №12260) и pWPT-GFP (плазмида №12255). Клетки HEK-293T культивируют в культуральном флаконе T75 до плотности клеточного монослоя 70%. Трансфекцию проводят, например через 2 часа после смены среды трансфекционной смесью: 112,5 мкг векторной плазмиды pWPT-GFP, 39,5 мкг оболочечной плазмиды pCMV-VSV-G, 75 мкг упаковочной плазмиды psPAX2, 3,3 мл TE 0, 1X (10 mM Трис + 1 mM ЭДТА pH 8,0), 1,75 мл дистиллированной воды, 565 мкг 2,5 M раствора CaCl₂, 5,7 мл 2x HBS (0,280 M NaCl, 0,1 M Hepes, 0,0015 M Na₂HPO₄, pH 7,12). Через 17 часов после трансфекции заменяют среду на свежую. Сбор содержащего вирус супернатанта проводят 3 раза, через каждые 12 часов. Супернатанты объединяют и хранят при плюс 4°C. По завершению сбора супернатанты центрифугируют в течение 5 минут, при 1500 об/мин и фильтруют через фильтр 0,22 мкм. Очищенные супернатанты хранят в аликвотах при минус 80°C.

Таким путем завершают получение раствора рекомбинантного лентивируса GFP-RV и приступают к третьему этапу.

Третий этап. Приготовление раствора бис-мет-гистона Н 1.3.

5 Для приготовления препаратов гистона (гистонного белка) делают навеску бис-мет-гистона Н 1.3, растворяют в стерильной воде MilliQ до концентрации 50 мкг/мл. Рабочий раствор бис-мет-гистона Н 1.3 хранят при плюс 4°C.

Четвертый этап. Трансдукция клеток HeLa рекомбинантным лентивирусом GFP-RV.

10 Эксперименты проводят, например - в 24-луночных культуральных планшетах. Клетки HeLa культивируют в 24-луночном планшете до плотности клеточного монослоя 50%. Далее клетки инфицируют рекомбинантным лентивирусом GFP-RV, экспрессирующим GFP. Для этого к клеткам HeLa добавляют рекомбинантный лентивирус с протамин сульфатом в количестве 5 мкг на 500 мкл среды (конечная

15 концентрация 10 мкг/мл). Клетки инкубируют в течение 48 часов при плюс 37°C, во влажной атмосфере, содержащей 5% CO₂, после чего определяют степень инфицирования клеток рекомбинантным лентивирусом.

20 Инфицирование клеток определяют по экспрессии и флуоресценции GFP, например - на проточном цитометре Becton Dickinson FACSCalibur (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA) согласно инструкциям производителя.

Пример 2

25 Отличается от примера 1 тем, что на 4 этапе клетки (вместо протамин сульфата) преобразуют бис-мет-гистона Н 1.3. и затем добавляют рекомбинантный лентивирус.

Пример 3

Отличается от примера 1 тем, что на 4 этапе клетки (вместо протамин сульфата) обрабатывают рекомбинантным лентивирусом и затем бис-мет-гистона Н 1.3.

30 Пример 4

Отличается от примера 1 тем, что на 4 этапе клетки (вместо протамин сульфата) обрабатывают смесью рекомбинантного лентивируса и бис-мет-гистона Н 1.3.

35 Бис-мет-гистон Н 1.3 (в примерах 2-4) добавляют в лунку в количестве 125 мкг на 500 мкл среды (конечная концентрация 250 мкг/мл).

40 Концентрация 250 мкг/мл - максимально нетоксичная концентрация гистона для клеток HeLa (на сроках 24, 48 и 72 часа после добавления бис-мет-гистона Н 1.3), то есть была выбрана максимально безопасная (с точки зрения цитотоксичности) концентрация гистона, которая является эффективной в данном случае. В каждом конкретном случае количество бис-мет-гистона Н 1.3 будет зависеть от клеточной культуры, от используемого ретровируса и возможно других факторов.

45 На Фигурах приведены данные проточной цитофлуориметрии клеток, трансдуцированных рекомбинантным лентивирусом, экспрессирующим зеленый флуоресцентный белок GFP. Культуру клеток или раствор лентивируса обрабатывали рекомбинантным бис-мет-гистона Н 1.3 в различных вариантах. Эффективность вирусной трансдукции по экспрессии репортерного гена, например - GFP. Ген GFP входит в состав генома рекомбинантного лентивируса и, таким образом, ведет себя как типичный вирусный ген. Для экспрессии лентивирусных генов необходимо, чтобы провирус встроился (интегрировался) в геном клетки хозяина. После встраивания в геном клетки хозяина начинается экспрессия вирусных генов - транскрипция мРНК и трансляция белка. Таким образом, наличие зеленой флуоресценции клеток свидетельствует об успешной вирусной трансдукции.

Фиг.1. Не трансдуцированные клетки (контроль фоновой флуоресценции). В связи с тем, что популяция клеток обладает естественной гетерогенностью по уровню автофлуоресценции, пороговое значение флуоресценции было выбрано таким образом, что 99,5% клеток считались не флуоресцирующими, а 0,5% клеток, соответственно, считались ложно-положительными по флуоресценции.

Фиг.2. - Клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом GFP-RV. 9,21% клеток обладали флуоресценцией, что свидетельствует о трансдукции GFP-RV.

Фиг.3. - Клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом GFP-RV с добавлением протамина сульфата. 12,73% клеток обладали флуоресценцией, что свидетельствует о трансдукции GFP-RV. Таким образом, добавление протамина сульфата повысило эффективность вирусной трансдукции на 38,22% по отношению к GFP-RV без дополнительных добавок.

Фиг.4. - Клетки, предобработанные рекомбинантным бис-мет-гистоном H 1.3 и затем трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом GFP-RV. 8,16% клеток обладали флуоресценцией, что свидетельствует о трансдукции GFP-RV. Таким образом, предобработка клеток бис-мет-гистоном H 1.3 не привела к увеличению эффективности лентивирусной трансдукции.

Фиг.5. - Клетки, трансдуцированные рекомбинантным лентивирусом GFP-RV и затем обработанные рекомбинантным бис-мет-гистоном H 1.3. 27,19% клеток обладали флуоресценцией, что свидетельствует о трансдукции GFP-RV. Таким образом, обработка бис-мет-гистоном H 1.3 повысила эффективность вирусной трансдукции на 213,59% по отношению к GFP-RV без дополнительных добавок.

Фиг.6. - Клетки, трансдуцированные смесью рекомбинантного лентивируса GFP-RV и рекомбинантного бис-мет-гистона H 1.3. 23,75% клеток обладали флуоресценцией, что свидетельствует о трансдукции GFP-RV. Таким образом, смесь GFP-RV с бис-мет-гистоном H 1.3 повысила эффективность вирусной трансдукции на 186,57% по отношению к GFP-RV без дополнительных добавок.

Приведенные примеры показывают полезность способа для повышения эффективности ретровирусной трансдукции. Способ повышения эффективности вирусной трансдукции может найти применение в клеточной биологии, биотехнологии и генной терапии для создания препаратов, повышающих эффективность ретровирусной трансдукции, что применимо, в частности, для генетической модификации клеток *in vitro*.

Данное техническое решение также может найти применение для лечения наследственных заболеваний, посредством использования известных стандартных технических устройств и оборудования.

Источники информации

1. Duc-Nguyen, H. (1968). "Enhancing effect of diethylaminoethyl-dextran on the focus-forming titer of a murine sarcoma virus (Harvey strain)." J Virol 2(6): 643-644.

2. Manning, J.S., A.J.Hackett, et al. (1971). "Effect of polycations on sensitivity of BALD-3T3 cells to murine leukemia and sarcoma virus infectivity." Appl Microbiol 22(6): 1162-1163.

3. Патент RU 2174846. Опосредованный вирусом усиленный перенос ДНК.

4. Cornetta, K. and W.F.Anderson (1989). "Protamine sulfate as an effective alternative to polybrene in retroviral-mediated gene-transfer: implications for human gene therapy." J Virol Methods 23(2): 187-194.

5. WO 2008122434, 16.10.2008.

Формула изобретения

Способ увеличения частоты трансдукции эукариотических клеток с помощью ретровируса, отличающийся тем, что эукариотические клетки инфицируют ретровирусом в присутствии бис-мет-гистона Н 1.3 в эффективном количестве.

5

10

15

20

25

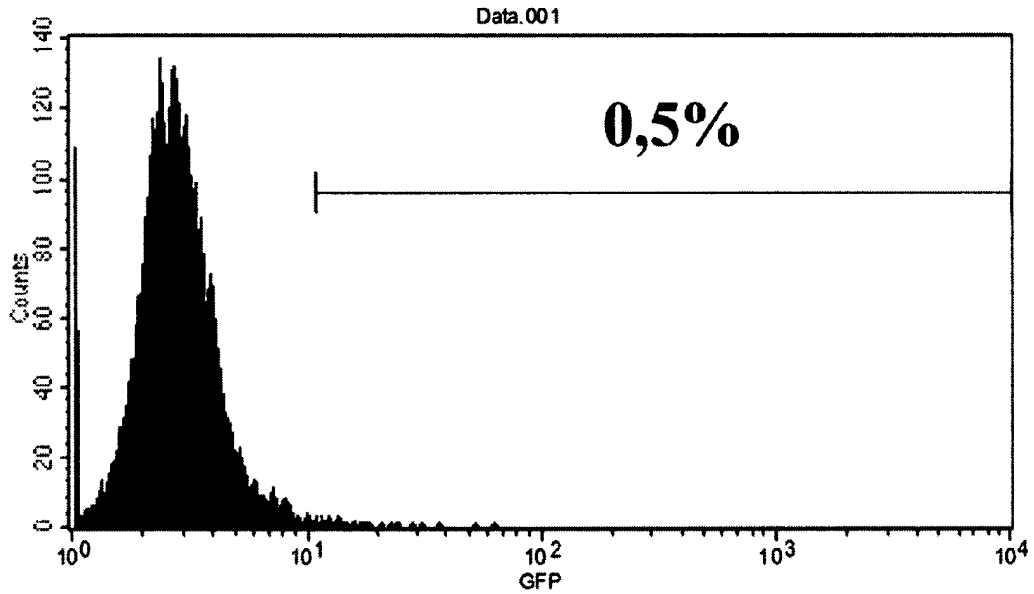
30

35

40

45

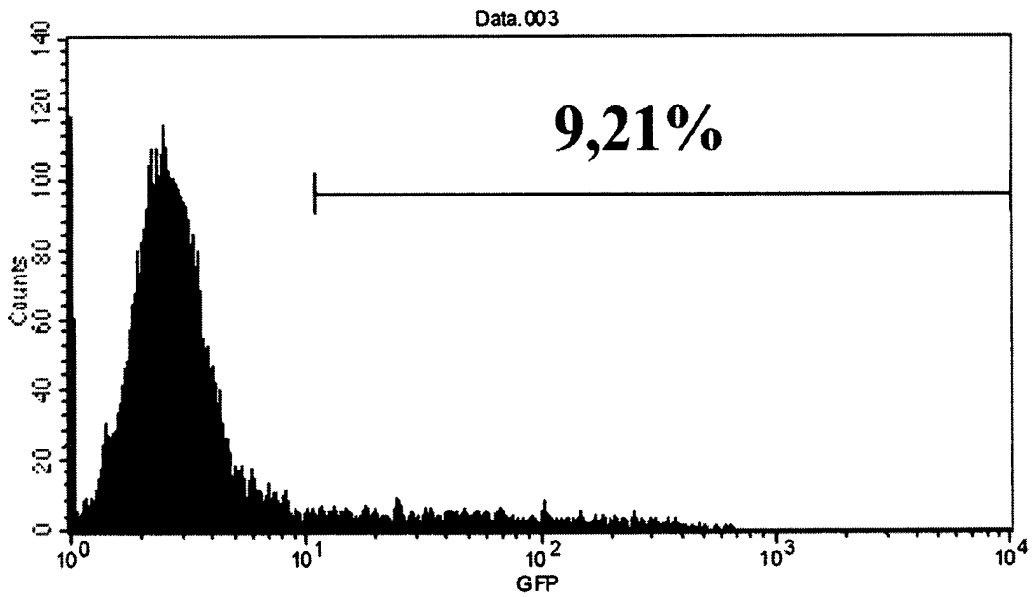
50



Tube: 1 NTC Acquisition Date: 01-Feb-11

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	2.97	2.74	56.04	2.67	2
M1	11, 9910	50	0.50	0.50	17.09	15.62	56.73	13.52	11

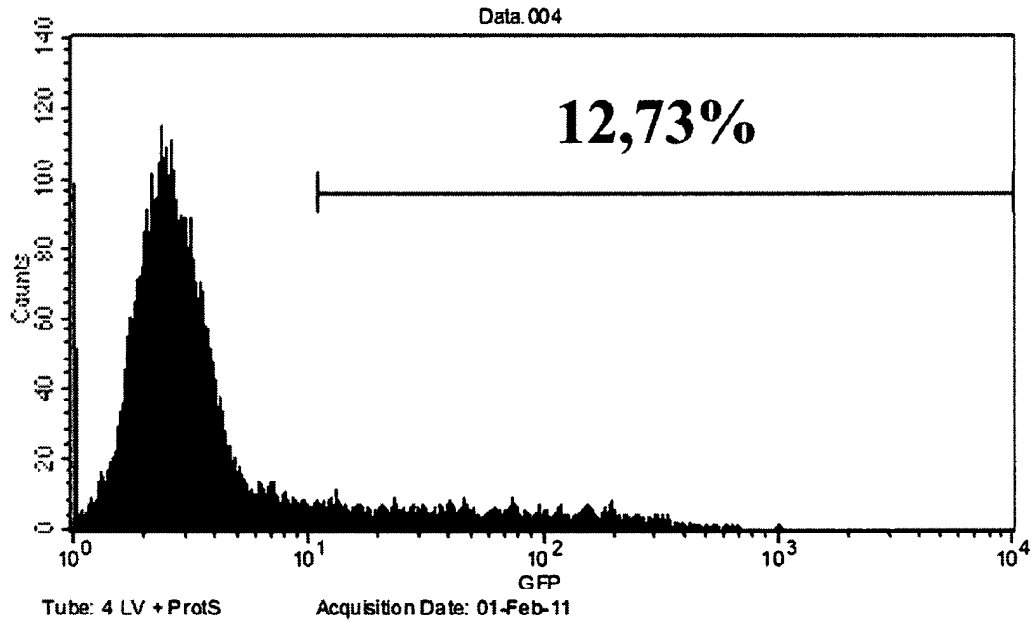
Фиг. 1



Tube: 3 LV Acquisition Date: 01-Feb-11

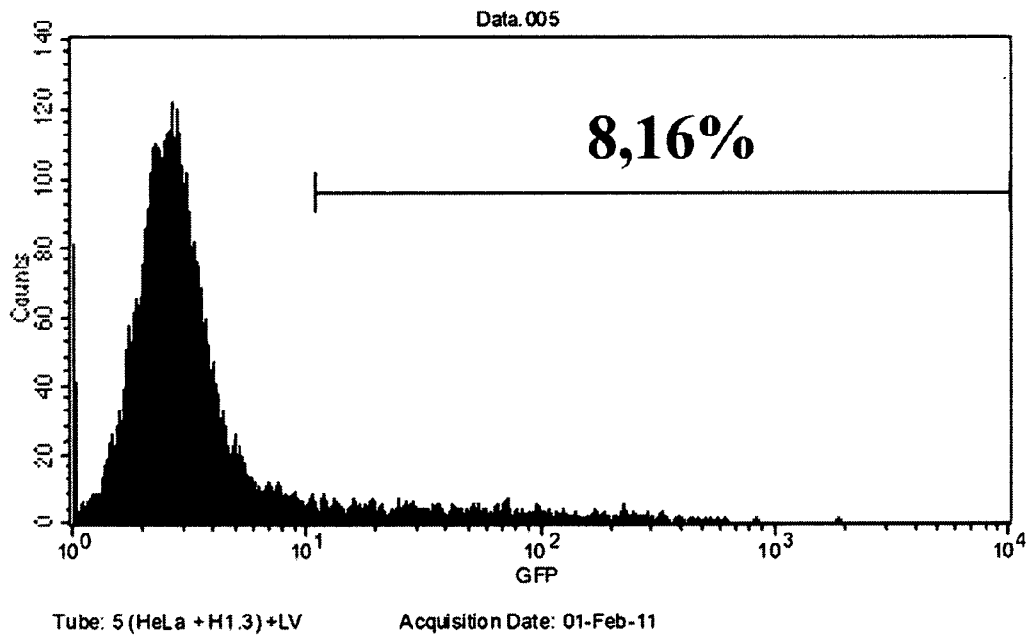
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	9.79	3.47	351.48	2.71	1
M1	11, 9910	921	9.21	9.21	77.78	47.83	113.15	43.32	24

Фиг. 2



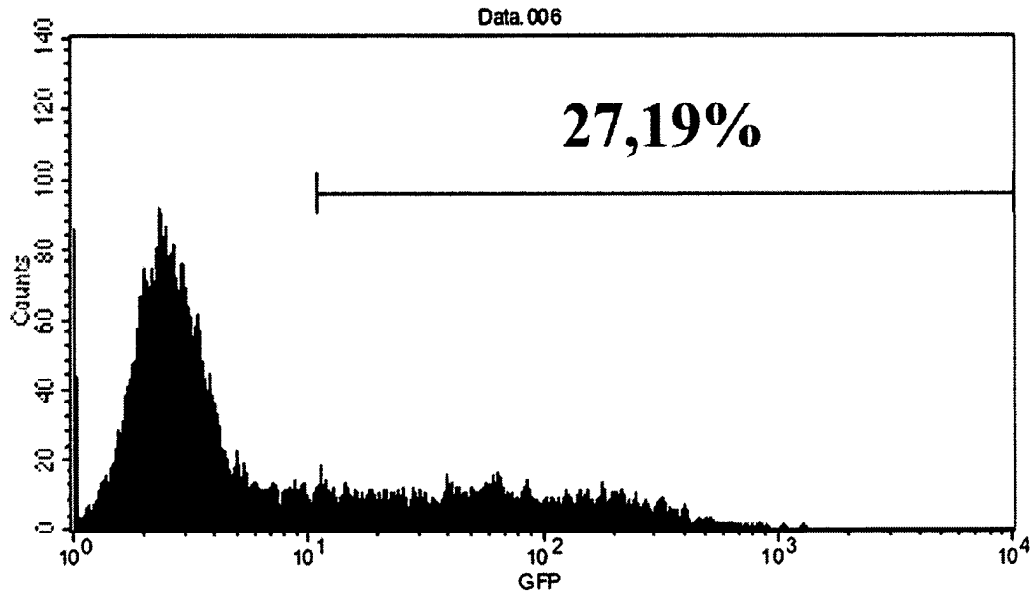
Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	13.85	3.92	326.39	2.74	2
M1	11, 9910	1273	12.73	12.73	88.64	53.03	110.79	48.26	12

Фиг. 3



Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	8.80	3.41	412.09	2.74	2
M1	11, 9910	816	8.16	8.16	74.64	43.84	143.02	37.86	11

Фиг. 4

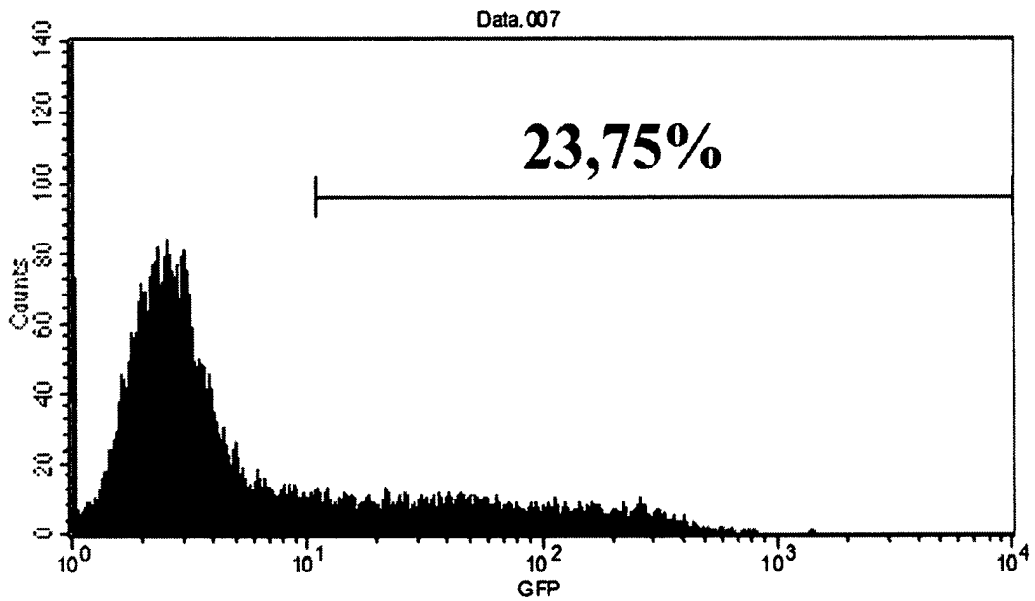


Tube: 6 (HeLa + LV) + H1.3

Acquisition Date: 01-Feb-11

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	31.17	6.47	248.69	3.16	2
M1	11, 9910	2719	27.19	27.19	106.34	62.90	112.60	60.98	11

Фиг. 5



Tube: 7 (LV + H1.3) + HeLa

Acquisition Date: 01-Feb-11

Marker	Left, Right	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean	CV	Median	Peak Ch
All	1, 9910	10000	100.00	100.00	25.12	5.58	262.01	3.05	1
M1	11, 9910	2375	23.75	23.75	95.85	56.88	112.70	52.33	11

Фиг. 6