



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 695 30 793 T2 2004.03.18**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 0 800 575 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **695 30 793.2**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/FR95/01691**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **95 942 764.2**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 96/019567**

(86) PCT-Anmeldetag: **18.12.1995**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **27.06.1996**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **15.10.1997**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **14.05.2003**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **18.03.2004**

(51) Int Cl.7: **C12N 5/10**
C12N 5/08, A61K 48/00

(30) Unionspriorität:
9415497 22.12.1994 FR

(73) Patentinhaber:
**Centre National de la Recherche Scientifique
(C.N.R.S.), Paris, FR**

(74) Vertreter:
**Tiedtke, Bühling, Kinne & Partner GbR, 80336
München**

(84) Benannte Vertragsstaaten:
**AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU,
MC, NL, PT, SE**

(72) Erfinder:
**KLEIN, Antoinette, F-92160 Antony, FR;
HATZFELD, Jacques, F-92160 Antony, FR**

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN DES TRANSFERS VON GENEN IN AKTIVIERTEN ZELLEN AUSGEHEND VON EINEM ZUSTAND DES TEILUNGSSTILLSTANDES**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf ein Verfahren zum Transfer von Genen in aktivierte Zellen ausgehend von einem Ruhezustand beziehungsweise Zustand des Teilungsstillstandes, insbesondere auf Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, und auf so erhaltene Zellen.

[0002] Der Fortschritt bei der Identifizierung und der Klonierung von Genen, die für menschliche genetische Krankheiten verantwortlich sind, hat Bemühungen zur Verbesserung der Technik beim Transfer von Genen in Gang gesetzt (Anderson, W. F. (1992) *Science*, 256: 808–813; Miller, A. D. (1992) *Nature*, 357: 455–460; Morgan, R. A., und Anderson, W. F. (1993) *Annu. Rev. Biochem.*, 62: 191–217; Karlsson, S. (1991) *Blood*, 78: 2481–2492). Zum Beispiel sind verschiedene virale Vektoren für die Zellen der hämatopoetischen Zelllinie verwendet worden, wobei jeder eigene Vorteile besitzt (Anderson, W. F. (1992), der nachstehend erwähnt wird). Der Einbau eines retroviralen Vektors in das Genom stellt die Replikation in der Gastzelle sicher. Dieser Einbau erfordert einen aktiven proliferativen Zustand (Anderson, W. F. (1992), der nachstehend erwähnt wird; Varmus, H. E., Padgett, T., Heasley, S., Simon, G., und Bishop, J. M. (1977), *Cell*, 11: 307–319; Nolte, J. A., und Kohn, D. B. (1990) *Hum. Gene Ther.*, 1: 257–268; Miller, D. G., Adam, M. A., und Miller, A. D. (1990) *Mol. Cell. Biol.*, 10: 4239–4242) der in dem Kompartiment der Zelle der hämatopoetischen Zelllinie, die sich im Ruhezustand befindet, nicht existiert (Lajtha, L. G., und Schofield, R. (1974) *Differentiation*, 2: 313–320), oder in andere Typen von Zelllinien und somatischen Zellen, wie etwa Leberzellen. unter Verwendung von Antisense-Oligonucleotiden gegen das Inhibitor-Gen/die Inhibitor-Gene, insbesondere TGF- β -1, hat man gezeigt, dass die frühen Progenitoren des menschlichen Knochenmarks aus ihrem Ruhezustand durch Blockade eines TGF- β -Autokrins befreit werden können (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Brown, E. L., Sookdeo, H., Levesque, J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clark, S. C., und Hatzfeld, A. (1991), *J. Exp. Med.*, 174: 925–929).

[0003] Im Übrigen ist, soweit es sich um Implantate des hämatopoetischen Gewebes handelt, in der Vergangenheit die Möglichkeit zum Implantieren von Knochenmarkproben durch Abschätzung des Gehalts an CFU-GM Zellen (koloniebildende Einheit - Granulozyt/Macrophage: granulo-monozytär Progenitor) analysiert worden. Jedoch können diese Zellen, die eine wichtige Rolle bei der Zellbildung während einer kurzen Zeitspanne spielen, die auf die Transplantation eines Implantats folgt, nicht den Gehalt an primitiveren Zellen reflektieren, und insbesondere an Zellen der hämatopoetischen Zelllinie, die in der Langzeit-Hämatopoese wichtig sind, wiedergeben. Die Zelllinienzellen, die in den Langzeitimplantaten betroffen sind, stellen eine kleine Unterpopulation der Zellen dar, die eventuell den Phänotyp CD34 + CD38-(Kompartiment der Zelle einer hämatopoetischen Zelllinie: Zellen, die reich an Membranantigen CD34 und arm an Reifungs-Membranantigen CD38 sind) haben können.

[0004] Kürzlich hat sich das Blut der menschliche Nabelschnur nach Transplantation bei Kindern als dafür geeignet herausgestellt, die Hämatopoese wieder herzustellen (Gluckman, E., Broxmeyer, H. E., Auerbach, A. D., Friedman, H. S., Douglas, G. W., Devergie, A., Esperou, H., Thierry, D., Socie, G., Lehn, P., Cooper, S., English, D., Kurtzberg, J., Bard, J., Boyse, E. A., (1989) *N. Eng. J. Med.*, 3: 1174–1178; Broxmeyer, H. E., Douglas, G. W., Hango, G., Cooper, S., Bard, J., English, D., Arny, M., Thomas, L., und Boyse, E. A. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86: 3828–3832; Broxmeyer, H. E., Hango, G., und Cooper, S. (1992) *Bone Marrow Transplant.*, 9: 7–10). In vitro legen die Ergebnisse der verschiedenen Laboratorien (Broxmeyer, H. E., Hango, G., Cooper, S., Ribeiro, R. C., Graves, V., Yoder, M., Wagner, J., Vadhan-Raj, S., Benninger, L., Rubinstein, P., und Broun, E. R. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4109–4113; Lu, L., Xiao, M., Shen, R.-N., Grisby, S., und Broxmeyer, H. E. (1993) *Blood*, 81: 41–48; Hows, J. M., Bradley, B. A., Marsh, J. C. W., Luft, T., Coutinho, L., Testa, N. G., und Dexter, T. M. (1992) *Lancet*, 340: 73–76; Cardoso, A. A., Li, M. L., Batard, P., Hatzfeld, A., Brown, E. L., Levesque, J. P., Sookdeo, H., Panterne, B., Sansilvestri, P., Clark, S. C., und Hatzfeld, J., (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 8707–8711) nahe, dass das Blut der Nabelschnur eine überlegene Kapazität zum Erzeugen der Vorläufer bzw. Progenitoren in Kultur gegenüber derjenigen des Knochenmarks besitzt, und folglich, dass das Blut der Nabelschnur geeignet sein könnte, um Implantate von hämatopoetischen Geweben bei erwachsenen Empfängern durchzuführen.

[0005] Jedoch ist bis zum heutigen Tag ein schneller Gentransfer des gesamten Zellkompartiments (Gesamtheit) der hämatopoetischen Zelllinie oder jeder anderer Zelllinie oder somatischen Zelllinien im Ruhezustand, (wobei der Ruhezustand auch als "Ruhe" oder als der G₀-Phase entsprechend bezeichnet wird), nicht in ausreichender Weise erhalten worden.

[0006] Der Transfer von Genen in aktivierte Zellen ausgehend vom Ruhezustand, insbesondere Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die aus einem Ruhezustand befreit worden sind, ist einer der Aspekte der Erfindung.

[0007] Die Erfindung bezieht sich auch auf Zellen im Ruhezustand, insbesondere Zellen der hämatopoetischen Zelllinien im Ruhezustand, die ein heterologes Gen enthalten.

[0008] Die Erfindung bezieht sich auch auf hämatopoetisches Gewebe, das ein heterologes Gen enthält, das dafür geeignet ist, Langzeit-Implantate bzw. -Transplantate zu bilden.

[0009] Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von Hemmstoffen von wenigstens einem Inhibitor des Zell-

zyklus über eine Zeitspanne, die 72 Stunden nicht übersteigt und bevorzugt 36 Stunden nicht übersteigt, und insbesondere geringer als etwa 20 Stunden und bevorzugt etwa 1 bis 15 Stunden und bevorzugt etwa 1 bis 10 ist, in einer Kultur von Zellen einer Zelllinie, um die Zellen einer Zelllinie aus ihrem Ruhezustand zu befreien.

[0010] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung von Hemmstoffen von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus in einem Vergleichstest zwischen, einerseits, einer Kultur von Zellen einer Zelllinie in einem Medium, welches die oben genannten Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus enthält, und, andererseits, einer gleichen Kultur von Zellen einer Zelllinie wie die oben erwähnte, in einem Medium, welches keine der oben genannten Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus enthält, um den Reifegrad der oben genannten Zellen einer Zelllinie zu bestimmen.

[0011] Gemäß einer anderen Ausführungsform bezieht sich die Erfindung auf die Verwendung von Hemmstoffen von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus in einer Kultur von Zelllinie, um die Zelllinien aus ihrem Ruhezustand zu befreien, gefolgt von einem Schritt des Transfers von Genen in die vorstehend genannten Zelllinien.

[0012] Im Fall der Erfindung sind die Zelllinien vorzugsweise hämatopoetische Zellen und die Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus bestehen vorzugsweise aus dem Anti-TGF- β .

[0013] Die Erfindung betrifft Zellen, insbesondere Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens in ihrem Genom enthalten, welche durch das Verfahren erhalten werden können, dass die folgenden Schritte umfasst:

- Vorstimulation von Zellen im Ruhezustand, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie im Ruhezustand in einem Medium, welches enthält:
- direkte oder indirekte Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus der Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, über eine ausreichende Zeitspanne, um die Zellen, insbesondere Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, aus ihrem Ruhezustand zu befreien, und die 72 Stunden nicht übersteigt bevorzugt 36 Stunden nicht übersteigt, und insbesondere geringer als etwa 20 Stunden und bevorzugt etwa 1 Stunde bis 15 Stunden und bevorzugt etwa 1 Stunde bis 10 Stunden beträgt, und
- Substanzen, insbesondere Zytokine, um die Aktivierung in einem Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus zu ermöglichen,
- den Transferschritt durch Vorlegen der im vorherigen Schritt erhaltenen Zellen, insbesondere Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, mit einem vollständigen oder einem Teil eines heterologen Gens in einem Medium, welches den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in das Genom der Zellen, insbesondere Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, ermöglicht, um Zellen, insbesondere Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, zu erhalten, welche vollständig oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten,
- die eventuelle Wiedergewinnung der durch den vorhergehenden Schritt erhaltenen Zellen, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinien.

[0014] Die Erfindung betrifft insbesondere Zellen der hämatopoetischen Zelllinien, die in ihrem Genom ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten und ein Vermehrungspotential in vitro besitzen, das gleich oder höher als 10^6 ist und ein Differenzierungspotential besitzen, welches sich auf die gesamten hämatopoetischen Zelllinien erstreckt.

[0015] Die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie sind als Zellen im Ruhezustand definiert, die alle hämatopoetischen Zellen und davon abstammende Zelllinien entstehen lassen können. Was auch immer der Ursprung der Zelllinien ist (Fötalleber, fötales Mark, Blut der Nabelschnur, adultes Mark, peripheres Blut), deren Proliferationspotential ist immer sehr erhöht: aus einer Zelle entstehen mehr als 1 bis 20×10^6 Zellen in vitro. Diese Zahl kann weiter erhöht sein, wenn man neue Zytokine und Bioreaktoren verwendet.

[0016] Die Zellen der hämatopoetischen Zelllinie können aus einer Probe des Knochenmarks kommen, die einer Punktion des Darmbeinkamms bei den Spendern entstammt.

[0017] Die Zellen der hämatopoetischen Zelllinie können auch aus dem sofort nach der Geburt entnommenen Blut der Nabelschnur, der Leber oder des fötalen Marks des peripheren Bluts oder aus jedem anderen Organ des hämatopoetischen Systems gewonnen werden.

[0018] Ein Vermehrungspotential gleich oder höher als 10^6 gibt an, dass eine Zelle der hämatopoetischen Zelllinie unter geeigneten Bedingungen 10^6 Zellen Blut ergeben kann.

[0019] Das Vermehrungspotential der Zellen der hämatopoetischen Zelllinie der Erfindung kann 1 bis 20×10^6 Zellen in StemGEM*-Milieu und in herkömmlicher Kultur ergeben. Dieser Wert kann erhöht sein, wenn man neue Zytokine und Bioreaktoren verwendet.

[0020] Mit hämatopoetischer Zelllinie bezeichnet man die Gesamtheit von Zellen, die die verschiedenen Zelltypen des Blutes entstehen lassen.

[0021] Mit Zellen im Ruhezustand, die in dem Fall der Erfindung einbezogen werden können, bezeichnet man Zellen, die sich unter gewöhnlichen physiologischen Umständen nicht vermehren und in Kultur aktiviert werden

können. Als Beispiel kann man aufzählen: Zellen der Leber, des Knochengewebes, der Endothelzellen, des Gewebes des Nervensystems, etc. oder Zellen der hämatopoetischen Zelllinie, die beim normalen Individuum größtenteils im Ruhezustand verbleiben.

[0022] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Zellen, insbesondere der hämatopoetischen Zelllinien, die in deren Inneren selbst oder auf deren Oberfläche Hemmstoffe mit einem vollständigen Inhibitor ihres Zellzyklus aufweisen.

[0023] Als Hemmstoffe des Zellzyklus im Inneren der Zelle kann man Antisense-Oligonukleotide, Ribozyme, natürliche oder synthetische chemische Inhibitoren, blockierende Antikörper, Zytokine, wie etwa das TNF, Interferone oder Faktoren, wie etwa das MIP-1 α , den Blutplättchenfaktor IV oder das FGF zitieren. Diese können auf natürliche Weise mit dem geeigneten Kulturmedium oder durch Elektroporation, durch Mikroinjektion oder durch jedes andere Verfahren eindringen, das einen Transport durch die Membran hindurch verwendet, wie etwa Liposome.

[0024] Als Hemmstoffe der Inhibitoren des Zellzyklus auf der Oberfläche der Zelle kann man Antikörper von Rezeptoren oder Membranantigenen, natürliche oder synthetische Liganden des Rezeptors, Kombinationen von Zytokinen, die diverse Interleukine und koloniestimulierende Faktoren umfassen, CSFs (Faktoren, die die Kolonie stimulieren) oder hämatopoetische Wachstumsfaktoren zitieren.

[0025] Die Antikörper und die Liganden binden sich spezifisch an einen Antigen oder einen Rezeptor, der ihnen entspricht.

[0026] In den Zellen der Erfindung, insbesondere in den Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, können die Hemmstoffe aus dem Folgenden zusammengesetzt sein: den Anti-Inhibitoren des Zellzyklus, zum Beispiel Hemmstoffe der Tumorsuppressorgene, Antagonisten des TGF- β , wie TGF- β -Antisense, neutralisierende Antikörper gegen TGF- β , lösliche Rezeptoren des TGF- β oder natürliche oder synthetische Inhibitoren des TGF- β oder Inhibitoren des Syntheseweges von TGF- β .

[0027] Die Abkürzung TGF- β entspricht einem "transformierenden Wachstumsfaktor" (transformierender Wachstumsfaktor) und entspricht einer Familie von Proteinen.

[0028] Als Beispiel für Suppressorantigene von Tumoren kann man pRb, p107 zitieren (Zhu et al., Genes and development, 7: 1111–1125, 1993), p130 (Hannon et al., Genes Dev. 7: 2378–2391, 1993), p300, p53, p15 (Hannon G. J. & Beach D. (1994): "p15^{INK4B} is a potential effector of TGF- β -induced cell cycle arrest", Nature, 371: 257), p16, (Iverson A. J. (1994): "p16 and familial melanoma". Nature Genet. 371: 180, Sanselvestri P. These de Doctorat d'Etat Paris XI, 1994), p21 (Xiong Y., et al., & Beach D. (1993): "p21 is a universal inhibitor of cyclin kinases". Nature, 366: 701), p27 (Polyak et al. (1994a): Cloning of p27^{kip1}, a cyclin-dependent kinase inhibitor and a potential mediator of extracellular antimitogenic signals". Cell, 78: 59–66; Polyak et al. (1994a): p27^{kip1}, a cyclin-cdk inhibitor, links transforming growth factor b and contact inhibitor to cell cycle arrest". Genes Development, 8: 9-22).

[0029] Als Antagonisten des TGF- β bezeichnet man ein Mittel, das in vitro oder in vivo die biologische Aktivität des TGF- β , Typen 1, 2 oder 3 neutralisiert.

[0030] Als neutralisierende Antikörper bezeichnet man einen Antikörper oder eine Kombination von Antikörpern, vorzugsweise einen monoklonalen Antikörper oder eine Kombination von monoklonalen Antikörpern, die in vitro oder in vivo die biologische Aktivität des TGF- β der Typen 1, 2 oder 3 neutralisieren.

[0031] Als einen natürlichen oder synthetischen Inhibitor des TGF- β bezeichnet man eine Substanz, die in vitro oder in vivo die biologische Aktivität des TGF- β inhibiert.

[0032] Als Antisensenukleotid des TGF- β kann man vorzugsweise verwenden: 5'-CCCGGAGGGCGG-CATGGGGGA-3'.

[0033] Als Hemmstoffe kann man auch ein Cytokin oder eine Kombination von Zytokinen verwenden, die die Zelllinien aus einem Ruhezustand während einer Dauer unterhalb von ungefähr 10 Stunden befreien können.

[0034] Als Zytokine kann man aufzählen: alle Zytokine, alle CSF, (stimulierende Faktoren der Kolonie) alle Immunomodulatoren (zum Beispiel die folgenden Interleukine: IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11, IL12, IL13, die TNF (Tumornekrosefaktoren), die Interferone, das LIF (inhibierender Faktor von Leukämie), das MIP-1 α (inflammatorisches Makrophagenprotein: das hergestellte oder auf dem Makrophagen befindliche inflammatorische Protein, Dunlop D. J. et al.: Blood, 1992, 79: 2221–2225), der Steel-Faktor, der Ligand des Rezeptors flt-3 oder FL.

[0035] Als Kombination von Zytokinen, kann man das IL3, das IL6, das GM-CSF (Wachstumsfaktor der granulomonozytären Progenitoren), des SF und des FL zitieren.

[0036] Die Hemmstoffe des gesamten zellulären Zellzyklus können in geeigneten Mengen verwendet werden, um die Aktivität von jedem Inhibitor des Zellzyklus zu neutralisieren. Sie werden im Allgemeinen in Konzentrationen verwendet, die von 0,1 bis 1000 Einheiten/ml, vorzugsweise von 1 bis 10 Einheiten/ml reichen.

[0037] Wenn man ein Antisense-Oligonukleotid des TGF- β verwendet, kann dieses von 0,03 μ M bis 100 μ M verwendet werden, insbesondere von 5 μ M bis 8 μ M, oder von 0,01 μ M bis 0,5 μ M in Gegenwart von bestimmten Mitteln, zum Beispiel lipidartige Mittel, die eine besseres Eindringen der Oligonukleotide in die Zelle als die vorstehend beschriebenen Arten des Eindringens ermöglichen.

[0038] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform betrifft die Erfindung Zellen im Ruhezustand, insbesondere Zellen der hämatopoetischen Zelllinie, die in ihrem Genom integriert ein Vollständiges oder ein Teil eines heterologen Gens enthalten.

[0039] So können nach dem Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in das Erbmaterial, die Zellen im Ruhezustand ausgetauscht werden.

[0040] Das Verfahren, gemäß welchem, nach dem Transfer des vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens, die Zellen im Ruhezustand ausgetauscht werden, wird in der folgenden Beschreibung detailliert erläutert werden.

[0041] Die Erfindung betrifft auch eine Zusammensetzung von hämatopoetischen Zellen oder eines Clusters von hämatopoetischen Zellen oder eines Gewebes von hämatopoetischen Zellen, die eine Hämatopoese während einer Dauer oberhalb oder gleich von ungefähr 6 Monaten beibehalten können, und durch Zellen der hämatopoetischen Zelllinien zusammengesetzt sind und gegebenenfalls von Progenitoren im Lauf der Differenzierung, wobei die vorstehend erwähnten Zelllinien und die vorstehend erwähnten Progenitoren ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten.

[0042] Der Ausdruck "Beibehalten einer fortgesetzten Hämatopoese" entspricht einer physiologischen Produktion von reifen Blutzellen.

[0043] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in das Genom von aktivierten Zellen ausgehend von einem Ruhezustand, insbesondere von Zellen der hämatopoetischen Zelllinie, die ausgehend vom Ruhezustand aktiviert sind, dadurch gekennzeichnet, dass diese die folgenden Schritte umfasst:

- Vorstimulation der Zelle im Ruhezustand, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie im Ruhezustand, in einem Medium, welches enthält:
- direkte oder indirekte Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus der Zellen im Ruhezustand, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, während einer ausreichenden Zeitspanne, um die Zellen, insbesondere die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, aus ihrem Ruhezustand zu befreien, und die 72 Stunden nicht übersteigt bevorzugt 36 Stunden nicht übersteigt, und insbesondere geringer als etwa 20 Stunden und bevorzugt etwa 1 Stunde bis 15 Stunden und bevorzugt etwa 1 Stunde bis 10 Stunden beträgt, und
- Substanzen, insbesondere Zytokine, um die Aktivierung in einem Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus zu ermöglichen,
- den Transferschritt durch Vorlegen der im vorherigen Schritt erhaltenen Zellen, insbesondere Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, mit einem vollständigen oder einem Teil eines heterologen Gens in einem Medium, welches den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in das Genom der Zelle einer hämatopoetischen Zelllinie ermöglicht, um Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie zu erhalten, welche ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten,
- die eventuelle Wiedergewinnung der durch den vorhergehenden Schritt erhaltenen Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie.

[0044] Die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie im Ruhezustand, die im Fall des Transfers des Gens verwendet werden, können ausgehend von fötalen hämatopoetischen Organen, Nabelschnurblut, Knochenmark, peripheren Blut oder jedem anderen hämatopoetischen Organ gemäß dem in den Beispielen beschriebenen Verfahren erhalten werden (Hatzfeld J., Batard P., Cardoso A. A., Li M.-L., und Hatzfeld A.: "Purification and in vitro assay of early human hematopoietic progenitors", 205-221. In Culture of Hematopoietic Cells. Freshney R. I., Pragnell I. B., Freshney M. G., 1994).

[0045] Was die Dauer der Vorstimulation betrifft, überschreitet sie nicht ungefähr 72 Stunden, vorzugsweise 36 Stunden, und beträgt vorzugsweise ungefähr 1 Stunde bis 15 Stunden, und vorzugsweise von ungefähr 1 Stunde bis 10 Stunden.

[0046] Die Einleitung der Vorstimulation kann während einer extrem kurzen Zeit durchgeführt werden, in der Größenordnung von einigen Sekunden, aber die Auslösung der Gesamtheit der zellulären Mechanismen, die ermöglicht, dass die Zelllinie die Go-Phase verlässt, nimmt mindestens 1 Stunde in Anspruch.

[0047] Im Fall der Verwendung als Hemmstoff, von Anti-TGF- β , überschreitet die Vorstimulation nicht ungefähr 72 Stunden, da oberhalb von 72 Stunden, und insbesondere oberhalb von 19 Stunden, man keinen zusätzlichen Effekt der Vorstimulation, der mit den Kombinationen von Zytokinen oder dem Anti-TGF- β oder den Kombinationen von Zytokinen erhalten wurde, erhält.

[0048] Der Ausdruck "Aktivierung eines Zellzyklus" entspricht der Bereitstellung von Funktionen, die das Durchschreiten des Zellzyklus ermöglichen.

[0049] Der Ausdruck "das Durchschreiten von wenigstens einem Zellzyklus" entspricht einer Teilung des Genoms (S-Phase), und einer Mitose, die zwei identische Zellen ergibt.

[0050] Nach Beendigung des Gentransfers, können die Zellen sich vermehren und sich differenzieren, oder in den Ruhezustand zurückversetzt werden, wie in der folgenden Beschreibung erläutert wird.

[0051] Wenn man die transferierten Zellen einer Zelllinie in den Ruhezustand zurückversetzt, ist das Kompartiment der Zelle einer Zelllinie um eine Teilung "gealtert", die wenig ist, im Verhältnis zu ihrem enormen hämatopoetischen Potenzial.

[0052] Im Verfahren der Erfindung umfasst gemäß einer bevorzugten Ausführungsform das Medium der Vorstimulation: IMDM (Iscove Dulbecco Modified Medium), StemGEM*, das einer durch C. N. R. S. kommerzialisierter Produktpalette von Medien entspricht, Zytokine, Antagonisten des TGF- β , wie etwa Antisense-Oligonukleotide von TGF- β , neutralisierende Antikörper des TGF- β , lösliche Rezeptoren des TGF- β oder natürliche oder synthetische Inhibitor des TGF- β , Kombinationen von Zytokinen, die in einem kurzen Zeitraum blockieren können (weniger als 72 Stunden, vorzugsweise weniger als 10 Stunden), Inhibitoren des Zellzyklus der Zellen einer ruhenden Zelllinie, die durch das TGF- β gesteuert werden oder nicht.

[0053] Gemäß einer Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung, werden die Zytokine aus einer Kombination von wenigstens vier Zytokinen ausgewählt, die aus den folgenden Zytokinen ausgewählt sind: IL1 (Interleukin 1), IL2 (Interleukin 2), IL3 (Interleukin 3), IL4 (Interleukin 4), IL5 (Interleukin 5), IL6 (Interleukin 6), IL7 (Interleukin 7), IL11 (Interleukin 11), GM-CSF (Granulozyten-Makrophagen koloniestimulierender Faktor: Wachstumsfaktor der granulo-monozytären Progenitoren), G-CSF (Granulozytenkolonie-stimulierender Faktor: Wachstumsfaktor der granulozytären Progenitoren), Faktor Steel (SF), Ligand des FLT3-Rezeptors (FL), Erythropoetin, TNF, LIF (Leukämieinhibitorfaktor: inhibierender Faktor der Leukämie, Thrombopoetin, Insuline und FGF.

[0054] Der Transfer von dem vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens kann mit einer Kokultur von Zellen, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, durchgeführt werden, die gemäß eines ersten Schritts des Verfahrens der Erfindung vorstimuliert wurden, und von Zellen, die einen Vektor produzieren, wie etwa einen viralen Vektor oder ein Retrovirus, der das vollständige oder einen Teil eines Gens zum Transferieren enthält. (Ferry N., Duplessis O., Houssin D., Danos O., und Heard J.-M. "Retroviralmediierter Gentransfer in Hepatocyten in vivo". Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 88: 8377–8381, 1991).

[0055] Der Transfer kann auch durchgeführt werden, indem in Gegenwart von Zellen, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die vorstimuliert wurden, und eines Überstands von Zellen, die einen Vektor enthalten, wie etwa einen viralen Vektor oder ein Retrovirus, die ein vollständiges oder einen Teil des Gens zum Transferieren umfassen, übertragen wird (Lu, R. L., Xiao, M., Clapp, D.-W., Li, Z.-H., & Broxmeyer H. E. (1993) J. Exp. Med., 178: 2089–2096).

[0056] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in das Genom von aktivierten Zellen ausgehend von einem Ruhezustand, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die ausgehend von einem Ruhezustand aktiviert worden sind, dadurch gekennzeichnet, dass dieses die folgenden Schritte umfasst:

- die Vorstimulation von Zelle im Ruhezustand, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie im Ruhezustand, in einem Medium der Vorstimulation, das enthält:
- direkte oder indirekte Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus der Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, während einer ausreichenden Dauer, um die Zellen, insbesondere die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, aus ihrem Ruhezustand zu befreien, und die 72 Stunden nicht übersteigt bevorzugt 36 Stunden nicht übersteigt, und insbesondere geringer als etwa 20 Stunden und bevorzugt etwa 1 Stunde bis 15 Stunden und bevorzugt etwa 1 Stunde bis 10 Stunden beträgt, und
- Substanzen, insbesondere Zytokine, um die Aktivierung in einem Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus zu ermöglichen,
- den Transferschritt durch Vorlegen der im vorherigen Schritt erhaltenen Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie mit einem vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in einem Medium, welches den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in das Genom der Zelle einer hämatopoetischen Zelllinie ermöglicht, um Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie zu erhalten, welche vollständig oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten,
- die eventuelle Wiedergewinnung der durch den vorhergehenden Schritt erhaltenen Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie.

[0057] Die Kokultur kann durchgeführt werden wie in "Human Cord Blood Cells as Target for Gene Transfer": Potential Use in Genetic Therapies of Severe Combined Immunodeficiency Disease. Moritz T., Keller D. C. und Williams D. A., J. Exp. Med 178: 529–536 (1993).

[0058] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in das Genom von aktivierten Zellen ausgehend von einem Ruhezustand, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die ausgehend von einem Ruhezustand aktiviert worden sind, dadurch gekennzeichnet, dass dieses die folgenden Schritte umfasst:

- die Vorstimulation von Zellen im Ruhezustand, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie im Ruhezustand in einem Milieu der Vorstimulation, das enthält:
- direkte oder indirekte Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus der Zellen, insbesondere

der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, während einer Dauer, die ausreichend ist, um die Zellen, insbesondere die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, aus ihrem Ruhezustand zu befreien, und die 72 Stunden nicht übersteigt, bevorzugt 36 Stunden nicht übersteigt, und insbesondere geringer als etwa 20 Stunden und bevorzugt etwa 1 Stunde bis 15 Stunden und bevorzugt etwa 1 Stunde bis 10 Stunden beträgt, und

- Substanzen, insbesondere Zytokine, um die Aktivierung in einem Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus zu ermöglichen,
- den Transferschritt durch Vorlegen der aktivierten, im vorherigen Schritt erhaltenen Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, mit einem vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in einem Medium, welches den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in das Genom der Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, durch Vorlegen von Zellen, insbesondere von Zellen einer Zelllinie, die wie vorstehend angegeben vorstimuliert wurden und eines Überstands von Zellen, die einen Vektor, wie etwa einen viralen Vektor oder einen Retrovirus, die das vollständige oder einen Teil des Gens zum Transferieren enthalten, ermöglicht, um Zellen, insbesondere Zellen einer Zelllinie, zu erhalten, die das vollständige oder ein Teil eines heterologen Gens tragen,
- eventuelle Wiedergewinnung von im vorhergehenden Schritt erhaltenen Zellen, insbesondere von Zellen einer Zelllinie.

[0059] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in dem Genom von ausgehend von einem Ruhezustand, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die ausgehend von einem Ruhezustand aktiviert worden sind, dadurch gekennzeichnet, dass dieses die folgenden Schritte umfasst:

- die Vorstimulierung von Zelle im Ruhezustand, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie im Ruhezustand, in einem Medium der Vorstimulation, das enthält:
 - Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus der Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, während einer ausreichenden Zeitdauer, um Zellen, insbesondere die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, aus ihrem Ruhezustand zu befreien, und die vorzugsweise ungefähr 72 Stunden nicht überschreitet und insbesondere weniger als 20 Stunden und vorzugsweise ungefähr 1 Stunde bis 15 Stunden beträgt, und vorzugsweise ungefähr 1 Stunde bis 10 Stunden beträgt, und
 - Substanzen, insbesondere Zytokine, um die Aktivierung in einem Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus der Zelle in einer Zelllinie zu durchlaufen,
 - den Transferschritt durch Vorlegen der im vorherigen Schritt erhaltenen, vorstimulierten Zellen einer Zelllinie, insbesondere einer hämatopoetischen Zelllinie, mit einem vollständigen oder einem Teil eines heterologen Gens, in einem Medium, das den Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in das Genom der Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, durch Vorlegen von Zellen, insbesondere von wie vorstehend angegeben vorstimulierten Zellen einer Zelllinie, und des Überstands von Zellen, die einen Vektor, wie etwa einen viralen Vektor oder einen Retrovirus, die ein vollständiges oder einen Teil eines Gens zum Transfer enthalten, ermöglicht, um Zellen, insbesondere Zellen einer Zelllinie, zu erhalten, die ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens tragen,
 - eventuelle Wiedergewinnung von Zellen, insbesondere von Zellen einer Zelllinie, die im vorgehenden Schritt erhalten wurden.

[0060] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren zum Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in das Genom von Zellen, die ausgehend von einem Ruhezustand aktiviert wurden, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die ausgehend von einem Ruhezustand aktiviert wurden, dadurch gekennzeichnet, dass dieses die folgenden Schritte umfasst:

- die Vorstimulation von Zellen im Ruhezustand, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie im Ruhezustand in einem Medium der Vorstimulation, das enthält:
 - Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus der Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, während einer ausreichenden Dauer zum Befreien der Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, aus ihrem Ruhezustand, und die vorzugsweise ungefähr 72 Stunden nicht überschreitet und insbesondere weniger als ungefähr 20 Stunden beträgt und vorzugsweise ungefähr 1 Stunde bis 15 Stunden beträgt und vorzugsweise ungefähr 1 Stunde bis 10 Stunden beträgt, und
 - Substanzen, insbesondere Zytokine, um die Aktivierung in einem Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus der Zellen, insbesondere der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, zu ermöglichen,
 - den Transferschritt durch Vorlegen von im vorherigen Schritt erhaltenen vorstimulierten Zellen, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, mit einem vollständigen oder einem Teil eines heterologen Gens, in einem Medium, das den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in das Genom von Zellen ermöglicht, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, um Zellen zu

erhalten, insbesondere Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens, ein vollständiges oder eine Teil eines heterologen Gens, das insbesondere von einem Vektor, wie etwa einem viralen Vektor oder einem Retrovirus, stammt, die durch eine Produktionskultur hergestellt wurden, zu welcher ei virales Mitten zugegeben wurde, wie etwa ein Anti-TGF- β , ein Anti-Interferon oder jedes Mittel, was die Produktionshöhe und/oder die Stabilität des Vektor ermöglicht,
 – eventuelle Wiedergewinnung von Zellen, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie die in dem vorhergehenden Schritt erhalte wurden.

[0061] Bezugnehmend auf die Zelle in einer Zelllinie, werden diese eventuell in einen Ruhezustand nach dem Transferschritt zurückversetzt.

[0062] Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens der Erfindung, ist das Medium, das den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens ermöglicht zusammengesetzt aus, oder umfasst: DMEM (Eagle-Medium, modifiziert durch Dulbecco), und eventuell IMDM (Iscove-medium, modifiziert durch Dulbecco), Zytokine, und eventuell einen Antagonisten des TGF- β , wie etwa vorstehend definiert, Anti-Interferone, und jedes andere virale Mittel, das den Anstieg der Produktion und/oder die Stabilität des viralen Vektors oder des Retrovirus ermöglicht, die das Gen zum Transfizieren bzw. Übertragen enthalten, wenn der Transfer des Ganzen oder eines Teils des heterologen Gens durch Co-Kultivierung von Zellen einer Zelllinie und eines viralen Vektors, oder eines Retrovirus, durchgeführt wird.

[0063] Wenn der Transfer unter Verwendung eines Überstandes der Kultur, die den Vektor enthält, durchgeführt wird, kann der Gehalt des durch die Produktionskulturen hergestellten Vektors vorzugsweise erhöht werden, indem zu der Produktionskultur des Vektors ein Anti-TGF- β oder ein Anti-Interferon oder jedes andere Mittel zugegeben wird, das die Produktion und/oder die Stabilität des Vektors erhöhen kann.

[0064] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren, das es ermöglicht, den Gehalt des Vektors zu erhöhen, wie etwa eines viralen Vektors, oder eines Retrovirus, welcher Vektor durch eine Produktionskultur hergestellt wird, durch Zugabe eines viralen Mittels, wie etwa eines anti-TGF- β , eines Anti-Interferons, oder jeglichen Stabilisierungsmittels des Vektors, zu der Kultur.

[0065] Am Ende des Transferschrittes von dem vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in die Zellen einer Zelllinie, können die Zellen einer Zelllinie, die in ihrem Genom ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten, in ein geeignetes Medium platziert werden, insbesondere ein flüssiges Medium oder ein halbfestes Medium, um sich zu vermehren und sich in die differenzierten hämatopoetischen Zellen zu differenzieren, insbesondere in differenzierte Zellen des Blutes.

[0066] Als Beispiel von differenzierten Zellen kann man die Granulozyten, die Monozyten, die Megakaryozyten, die Erythrozyten zitieren.

[0067] Am Ende des Transferschrittes des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in die hämatopoetischen Zellen, kann man vorzugsweise einen Schritt des Zurückversetzens in den Ruhezustand der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die ein vollständiges oder einen Teil des heterologen Gens enthalten, durchführen, wobei dieser Schritt mit Hilfe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus, wie etwa dem TGF- β , durchgeführt werden kann.

[0068] Genauer gesagt, kann man, um die Zellen einer Zelllinie nach dem Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in den Ruhezustand (das heißt in die Go-Phase) zurückzusetzen, auf folgende Weise verfahren.

[0069] Der Vorteil des Verfahrens der Erfindung über alle anderen Verfahren beruht darauf, dass die Aktivierung der Zelle im Ruhezustand sich in einer extrem kurzen Zeitdauer (in der Größenordnung von 1 bis 72 Stunden, vorzugsweise von 6 bis 12 Stunden ausgehend von dem Ende des Schrittes der Vorstimulation) dank einer Synchronisation des Ausgangs der Go-Phase für alle Zellen im Ruhezustand bei dem Schritt der Vorstimulation nach dem vorstehend beschriebenen Verfahren der Erfindung vollzieht. Dies ermöglicht, die transfizierten Zellen nach dem Transfer durch Zugabe von TGF- β in die Go-Phase zurückzusetzen. Dies garantiert, dass während dem Transfer des Gens/der Gene die Zellen einer Zelllinie ihr hämatopoetisches Potenzial nicht verloren haben, soweit die Teilungszahl nicht mehr als 1 oder 2 beträgt.

[0070] Das heterologe Gen, welches vollständig oder zum Teil in das Genom der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, eingeführt wird, kann aus den folgenden Genen ausgewählt sein: Marker: Neo (Gen der Neomycinresistenz), CD2 (Leukozytenantigen), nls-Lac-Z, oder Gene, die eine Hämationose oder eine andere Krankheiten heilen können, wie etwa ADA (Gen der Adenosindesaminase), ALDP (Gen, das Adrenoleukodystrophie heilen kann), TK (Suizidgen unter der Kontrolle viraler Promotoren, das es ermöglicht, Zellen in der Anwesenheit von Aciclovir zu töten), wobei die Aufzählung nicht begrenzend ist.

[0071] Die aktuellen Verfahren des Transfers eines Gens, ermöglichen nicht, das Kompartiment der Zelle einer Zelllinie auf eine Weise zu transfizieren, dass lymphoide Stämme auf zufrieden stellende Weise transfiziert werden. Doch ist dies wichtig, wenn man möchte, dass die zelluläre Therapie zur Behandlung von AIDS oder Krankheiten anwendbar ist, die B-Zellen (Lymphome etc ...) betreffen. Das Verfahren des Transfers der Erfindung ermöglicht den Transfer in die B- und T-Linien effektiv, was verifiziert werden kann, indem die zwei nach-

folgenden Modelle verwendet werden, die es ermöglichen die Entwicklung des Kompartiments der Zelle einer Zelllinie zu untersuchen:

- humanisierte SCID Mäuse (McCune J. M., Namikawa R., Weilbaecher K. N., Kaneshima H., Schultz L. D., Lieberman M., und Weissuran IL.: "The SCID-hu mouse: Murine model for the analysis of human hematolymphoid differentiation and function". Science, 241: 1632, 1988).
- Thymus-Epithelkulturen (Plum J., De Smedt M., Defrense M.-P., Leclercq G., und Vandekerckhove B.: "Human CD34+ fetal liver stem cells differentiate Tumorsuppressorgene T cells in a mouse thymic microenvironment". Blood 84: 1587–1593, 1994).

[0072] Diese Verfahren ermöglichen es, in dem ersten Fall alle Linien darunter umfasst B- und T-Linien, in dem zweiten Fall, die T-Linie, zu erhalten.

[0073] Die verwendeten Medien, um die Teilung des Kompartiments der Zelle einer Zelllinie zu ermöglichen, die einmal aktiviert wurde, um die Go-Phase zu verlassen, muss die Expression von Rezeptoren der Zelle einer Zelllinie gemäß dem Empfehlungen respektieren, die in Hatzfeld A. et al., Hematol., 1993, 35: 281–283, und in Panterne et al., J. Cell. Physiol. 91: 1481:1489 produziert wurden.

[0074] Das Verfahren der Erfindung ermöglicht insbesondere:

- den Gehalt eines Vektors zu erhöhen, der ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens zum Transfizieren enthält, insbesondere in den Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie,
- ein vollständiges oder einen Teil eines Gens in die Zellen im Ruhezustand zu transferieren, insbesondere die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, in welchen, bis zur Gegenwart ein derartiger Transfer zufällig war;
- die Effektivität des Transfers in die frühen hämatopoetischen Progenitoren zu verbessern, wie etwa CFU-GEMM, LTC-IC (long term culture-initiating cell= Langzeit-kulturinitiiierende Zelle), HPP-Q (High Proliferative Potential Quiescent cells= Zellen im Ruhezustand mit hohem Proliferationspotential) und lymphoide Progenitoren mit starken Proliferationspotential, die als "Kompartiment der Zelle einer Zelllinie" im Verhältnis zum bereits realisierten Transfer betrachtet werden, wobei die Verfahren des Stands der Technik eingesetzt werden; zum Beispiel wird das Verfahren einen Transfer in mehr als 95% der CFU-GEMM, die sich in Kolonien entwickeln, ermöglichen, die mehr als 10^5 Zellen enthalten, wobei die durch das CNRS ausgegebenen StemGEM*-Medien, es ermöglichen, derartige Zellen des Kompartiments der Zelle einer Zelllinie zu bewerten, die humanisierten SCID-Mäuse (immunodefiziente Mäuse: schwere kombinierte Immundefizienz) und Systeme aus stromalen Kulturen oder Epithelthymen (die nachstehend angegeben werden) es ermöglichen, den Transfer in jedes Kompartiments der Zelle einer Zelllinie zu bewerten;
- die Stabilität der Expression im Laufe der Entwicklung der Zelle einer Zelllinie und der Progenitoren zu bewerten (Amplifikation und Differentiation), wobei Markergene verwendet werden können, um diese Expression zu verfolgen und zu bewerten (Beispiel: nls-Lac-Z).

[0075] Die Erfindung betrifft auch ein Verfahren, das es ermöglicht, die Reife oder die Unreife von Zellen einer Zelllinie vor und/oder nach dem Transfer von Genen zu bewerten.

[0076] Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zur Bestimmung des Grads der Reife von Zellen einer Zelllinie, insbesondere von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, das dadurch gekennzeichnet ist, dass es folgende Schritte umfasst:

- Kultivierung eines ersten Ansatzes von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie in einem zu ihrer Kultivierung geeigneten Medium, welches aber keine Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus enthält, für etwa 14 bis 28 Tage, bevorzugt 18 Tage,
- Kultivierung eines zweiten Ansatzes von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie von gleicher Herkunft und mit gleichem Reifegrad wie die vorher erwähnten Zellen, in einem geeigneten Medium, welches einen Hemmstoff von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus enthält, wobei diese Hemmstoffe in dem Kulturmedium in einer wirkungsvollen Konzentration vorliegen, über eine Zeitspanne, die 72 nicht übersteigt, bevorzugt etwa 1 bis 15 Stunden und bevorzugter etwa 1 bis 10 Stunden, wobei diese Kultur die gleiche Dauer hat, wie die der Zellen des ersten Ansatzes der Zelllinie,
- Vergleich, 18 Tage nach Beginn der Kultivierung jedes der beiden Ansätze von Zellen einer Zelllinie, hinsichtlich der Anzahl und der Natur der Kolonien und des Unterschieds in der Menge der Kolonien mit hohem Proliferationspotential (HPP-CFC= Zelle, die eine Kolonie mit hohem Proliferationspotential bildet, HPP-MEG= Megakaryozyt mit hohem Proliferationspotential, HPP-GEMM= Granulozyt Erythrozyt Monozyt mit hohem Proliferationspotential), jeweils zwischen dem ersten Ansatz und dem zweiten Ansatz, welches den HPP-Q-Kolonien entspricht.

[0077] Die optimale Konzentration von Anti-Sens-Oligonukleotiden kann von ungefähr 0,001 μM bis ungefähr 100 μM , vorzugsweise weniger als ungefähr 10 μM , betragen.

[0078] Die optimale Konzentration an blockierenden Antikörpern kann von ungefähr 0,01 $\mu\text{g/ml}$ bis 100 $\mu\text{g/ml}$,

vorzugsweise 1 µg/ml betragen.

[0079] Betreffend der Kultur in Gegenwart von Mitteln der Blockierung eines Inhibitors des Zellzyklus, am Ende der Periode, die 72 Stunden nicht übersteigt, und die vorzugsweise ungefähr 26 Stunden nicht übersteigt, und die vorzugsweise 1 bis 15 Stunden und weiter bevorzugt 1 bis 10 Stunden beträgt:

- kann man entweder die Zellen waschen, um die vorstehenden Mittel der Blockierung zu eliminieren,
- oder man kann die vorstehenden Mittel der Blockierung auf eine Konzentration verdünnen, so dass diese ohne proliferativen Effekt auf die reiferen Zellen sind (das heißt bereits aktivierten Progenitoren).

[0080] "Die Bewertung des Reifegrades oder der Unreife der Zelle einer Zelllinie" entspricht einer folgenden Untersuchung.

[0081] Nach 18 Stunden beobachtet man im Mikroskop die Zahl und die Natur der Kolonie: man zählt die Zahl der gemischten Kolonien, die aus Zellen der roten Linie zusammengesetzt sind und eines oder mehrere Typen von Zellen der weißen Linie. Die Zahl der gemischten Kolonien ist weiter erhöht, wenn die zelluläre Population, unreifer ist, das heißt aus gelberen Zellen zusammengesetzt ist, von denen bestimmte im Ruhezustand sind. Andererseits umso mehr die Zelle, die eine Kolonie hat entstehen lassen, unreif ist, das heißt im Ruhezustand ist, umso mehr ist sein Proliferationspotential groß, folglich wird die Kolonie, die von dieser Zelle abstammt, wenn sie einmal aktiviert ist, in der Größe bedeutender sein.

[0082] Dieser Test wird auch in der Folge als HPP-Q Test bezeichnet.

[0083] Um dies durchzuführen vergleicht man eine Kultur von Zellen einer Zelllinie in einem halbfesten oder flüssigen Medium, es kann ein Anti-Inhibitor des Zellzyklus enthält, mit der gleichen Kultur von Zellen einer Zelllinie in einen halbfesten oder flüssigen Medium, das einen Anti-Inhibitor des Zellzyklus enthält, zum Beispiel Anti-TGF-β.

[0084] Die Bedingungen der Kultur in dem Medium, das keinen Anti-Inhibitor des Zellzyklus enthält, können das IL1, das IL2, das IL3, das IL4, das IL5, das IL6, das IL7, das IL11 und das G-CSF, das GM-CSF, das SF, das FL, das FGF, das Insulin, das Erythropoetin, das Thrombopoetin oder andere Zytokine, die kooperieren oder mit den vorhergehenden synergetisch sind, verwenden.

[0085] Die Kulturbedingungen in dem Medium, das einen Anti-Inhibitor des Zellzyklus enthält, zum Beispiel Anti-TGF-β sind die Folgenden: das Anti-TGF-β wird nur zur Vorstimulation während 10 Stunden in einem schwachen Volumen der flüssigen Kultur, die die Zellen im Ruhezustand enthält, wie etwa die Zellen CD24+CD38-(1 bis 10% der am meisten unreifen D34+), enthält. Das Volumen dieser Vorkultur beträgt ungefähr 1/6 des Endvolumens. Diese Vorkultur wird anschließend zu der Methylzellulose mit den Zytokinen, denen kein Anti-TGF-β zugegeben wurde, zugegeben, um das Endvolumen zu ergeben.

[0086] Eine Vereinfachung dieses Verfahrens besteht aus dem Vorlegen von Anti-TGF-β sofort in die Endkultur mit Konzentrationen, die es nur dieser ermöglicht, während den ersten Stunden der Kultur vorzugsweise während den 10 ersten Stunden aktiv zu sein.

[0087] Unter diesen Bedingungen beobachtet man neue größere Kulturen als die vorhergehenden, die von Zellen abgeleitet sind, die High Proliferative Potential Quiescent Cells oder HPP-Q genannt werden, die sich in 18 Tagen und nicht nur in 8, 10, 12 oder 14 Tagen entwickeln, wie man ohne Vorstimulation durch Anti-TGF-β beobachtet. Das Anti-TGF-β muss folglich während der ganzen Dauer der Kultur nicht anwesend sein. Betreffend der Größe der Kolonie kann diese durch Zählung im Mikroskop auf einen Schirm von Mallasez bestimmt werden, nach Aufnahme und Dispersion der Kolonie in einem bekannten Volumen von flüssigem Medium; dieses Verfahren ermöglicht es, die Zahl der Zellen, die die Kolonie zusammensetzen, zu bewerten.

[0088] Ob der Test im flüssigen Medium, klonal oder nicht klonal, durchgeführt wird, man vergleicht die Klone oder die Populationen in den zwei Typen der Kultur.

[0089] Wenn es sich um die HPP-Q handelt, setzen diese ein Element des Kompartiments der Zelle einer Zelllinie zusammen und, Dank ihres Phänotyps, handelt es sich um CD34+ Kit Low IL6-R low.

[0090] Betreffend der Kulturmedien, kann man das Medium verwenden, das für CFU-GEMM Zellen geeignet ist und auch die Entwicklung von lymphoiden Zellen ermöglicht.

[0091] Die Zusammensetzung der Medien der halbfesten Kultur kann so sein, wie diese in dem Kapitel 12 beschrieben wird, das in dem Buch mit dem Titel "Culture of Hematopoietic cells, R. I. Freshney, I. B. Pragnell, M. G. Freshney ed, Wiley-Liss" Seiten 205–221 beschrieben wird. Der Titel des Kapitels heißt "Reinigung und in vivo Assay der frühen menschlichen hämatopoetischen Progenitoren", J. Hatzfeld, P. Batard, A. A. Cardoso, M. L. Li, A. Hatzfeld.

[0092] Als Bestätigung der Erfindung, kann man den Reifegrad oder die Unreife von Zellen einer Zelllinie nach den Transfer von Genen bewerten. Die Bewertung wird wie nachstehend angegeben durchgeführt, ausgehend von den größten Kolonien, für welche man gleichzeitig die vorstehend angegebene Bewertung der Unreife verifiziert, die einen Transfer von Genen besaßen, wie nachstehend in Beispiel 1 angegeben.

[0093] Die Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zum Transfer von Genen in die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, in welcher man die Unreife von Zellen einer Zelllinie vor dem Transfer eines Gens bewertet, vorzugsweise nach dem Transfer von Genen.

[0094] Dieses Verfahren kann die folgenden Schritte umfassen:

- 1- Bewertung von hämatopoetischen Zellen zum Implantieren bzw. Transplantieren, um sicherzustellen, dass diese unreife Zellen enthalten, die nachstehend mit HPP-Q bezeichnet werden, Element des Kompartiments der Zelle einer Zelllinie. Es ist so nicht nützlich, zu einem Transfer von Genen voranzuschreiten, wenn die verwendeten Zellen nicht gut sind. Durch das Verfahren der Bewertung der Unreife der Zellen einer Zelllinie, kann man eine Kultur in einem halbfesten oder flüssigen Medium vergleichen, ohne Anti-Inhibitor des zellulären Zyklus und der gleichen Kultur in Gegenwart eines Anti-Inhibitors. Die Differenz der Zahl der Kolonien muss das Erscheinen neuen größeren als die vorgehenden Kolonien unter Beweis stellen, die von Zellen des HPP-Q abgeleitet sind.
- 2- Vorstimulation von hämatopoetischen Zellen mit einem Medium, das einen Aktivator des Zellzyklus enthält (10 Stunden für ein Anti-TGF- β), damit die hämatopoetischen Zellen die Ruhephase verlassen, das heißt, um diese zu aktivieren.
- 3- Transfer von Genen mit einem viralen Überstand oder eine Cokultivierung mit Virus produzierenden Zellen in einem Medium, das ein Anti-Interferon und/oder ein Anti-TGF- β enthält.
- 4- Nach dem Transfer von Genen, müssen die hämatopoetischen aktivierten Zellen wieder in die Ruhephase (Go-Phase) in einem Medium der Deaktivierung, das einen Inhibitor dieser Zelle enthält (TGF- β im Fall der Zelle einer hämatopoetischen Zelllinie) zurückversetzt werden.
- 5- Alternativ können die aktivierten Zellen, die einen Transfer von Genen unterworfen wurden oder nicht, amplifiziert werden, um in vivo zurückinjiziert zu werden. Dies kann mit einer Unterpopulation der Zellen zur Reinjektion realisiert werden, um eine Aplasie zu verhindern, die im Allgemeinen der Aufnahme eines Implantats vorausgeht.
- 6- Vor oder nach der Reinfusion der Zellen ist es notwendig, einen HPP-Q Test durchzuführen, gefolgt von einer Einfärbung in situ oder eines RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction= reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion) von erhaltenen Kolonien, um den Transfer von Genen zu bewerten.

[0095] Als Medium der Vorstimulation und vor dem Transfer von Genen, kann man die Medien der flüssigen Kultur verwenden, wie etwa diejenigen wie in dem Artikel von Cardoso et al. beschrieben wurden (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 90, Seiten 8707–8711, September 1993).

[0096] Das Verfahren der Erfindung erlaubt es, die Zahl der primitiven Zellen im Ruhezustand (HPP-Q) vor dem Transfer der Gene abzuschätzen, um die Menge beziehungsweise Reichhaltigkeit von Zellen einer Zelllinie zu bestimmen, oder nach dem Transfer der Gene, um die Effizienz des Gentransfers in das Kompartiment der Zelle einer Zelllinie zu bestimmen.

Beschreibung der Figuren

[0097] Die **Fig. 1** stellt eine Kolonie CFU-GEMM dar, die das Gen nls-Lac-Z stabil exprimiert, was durch die X Gal-Verfärbung unter Beweis gestellt wird.

[0098] Die **Fig. 2** stellt bei stärkerem Wachstum eine Gruppe von eErythroide Zellen der CFU-GEMM Kolonie mit einer Expression des homogenen Gens nls-Lac-Z in allen Zellen dar.

[0099] Die **Fig. 3** zeigt die Kernlokalisierung der β -Galactosidase der Macrophagen und die Abwesenheit von unspezifischer Verfärbung in dem Cytoplasma.

Beispiel 1: Transfer des nls-Lac-Z Gens in die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie.

Material und Verfahren

Hämatopoetischer Wachstumsfaktor und Antiserum

[0100] Das menschliche rekombinante Interleukin 3 (IL3), das menschliche rekombinante Interleukin 6 (IL6), das menschliche rekombinante GM-CSF (Granulozyten-Macrophagen koloniestimulierender Faktor) und das menschliche rekombinante G-CSF (Granulozyten koloniestimulierender Faktor) werden durch das Genetics Institute (Cambridge, MA) geliefert. Das menschliche rekombinante Erythropoetin wird durch AMGEN (Thousand Oaks, CA) geliefert und das menschlich rekombinante SF (Steel-Faktor) stammt von IMMUNEX (Seattle, WA). Die spezifischen Aktivitäten dieser Zytokine sind jeweils: $2,3 \times 10^6$ U/mg, 4×10^6 U/mg, $9,3 \times 10^6$ U/mg, 7×10^9 U/mg, $4,98 \times 10^5$ U/mg und 10^6 U/mg. Das blockierende Puten-Antiserum, Anti-TGF- β , ist eine Gabe von Dr. A. B. Roberts und von MB Sporn (Danielpour, D., Dart, L. L. Flanders, K. C., Roberts, A. B., & Sporn, M. B. (1998) J. Cell. Physiol. 138, 79–86): $1 \mu\text{l}$ kann 4 ng TGF- β neutralisieren. Es wird bei der Konzentration von 4,2 $\mu\text{l/ml}$ verwendet.

Reinigung von CD34+Zellen

[0101] Mit CD34+Zellen bezeichnet man Zellen, die das Membranantigen CD34 tragen und eine Unterpopulation umfassen, die das Kompartiment der Zelle einer Zelllinie darstellt.

Wiedergewinnung von Nabelschnurblut

[0102] Menschliche von Nabelschnurproben werden ausgehend von Nabelschnur/Plazenta sofort nach der Geburt geschnitten, so dass die Plazenta in situ zurückbleibt (Broxmeyer H. E., Douglas G. W., Hangoe, G., Cooper, S., Bard J., English, D., Army, M., Thomas, L., & Boyse E. A. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 3828–3832; Gluckman, E., Devergie, A., Thierry, D., Eperou-Bourdeau, H., Traineau, R., Gerrota, J., Brossard, Y., Van Nifferik, J., & Benbunan, M. (1992) Bone Marrow Transplant. 9, 114–117).

Reinigung von SBA-CD34+Zellen

[0103] Die mononukleären Zellen werden wie vorhergehend beschrieben erhalten (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Brown, E. L., Sookdeo, H., Levesque, J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clarck, S. C., & Hatzfeld, A. (1991) J. Exp. Med. 174, 925–929). Sehr kurz nach der Isolierung der mononukleären Zellen aus der Ficoll Hypaque, werden die SBA- Zellen (Zellen die sich nicht an Sojaagglutin fixieren) gereinigt, indem die zurückgebliebenen Zellen, die an Sojaagglutin angehaftet sind, das auf kovalente Weise unter Verwendung des AIS Verfahrens immobilisiert wurde, eliminiert werden (Verfahren, das durch die Firma Applied Immune Sciences eingeführt wurde). (BSA CELLector Flasks, Applied Immune Sciences Inc. Santa Clara, CA). Die positive Selektion von CD34+ wird mit Kulturkolben erhalten, die mit monoklonalen Antikörpern CD34 ICBS bedeckt sind (CD34 CELLector Flasks, AIS), eine ausreichende Anzahl von Malen gewaschen (bis zu 10 Mal) mit einer Salzlösung, die mit Dulbecco-Phosphat gepuffert ist (das 1 EDTA-Medium enthält, um die Eliminierung von Zellen sicherzustellen, die nicht angehaftet sind und schwach angehaftet sind (CD34^{schwach}), wie unter einem Umkehrmikroskop beobachtet (Hatzfeld J., Batard P., Cardoso A. A., Li M.-L., und Hatzfeld A. Purification an in vitro assay of early human hematopoietic progenitors. 205–221. In Culture of Hematopoietic Cells. Freshney R. I., Pragnell I. B., Freshney M. G., 1994).

[0104] Dieses Verfahren ergibt routinemäßig eine Reinheit von 95 (± 3%) von CD34 Zellen. Die isolierten CD34+SBA- Zellen werden anschließend durch Inkubation von 2 Stunden bei 37°C in einem Iscove-Medium, das durch Dulbecco modifiziert wurde (IMDM), lösgelöst, dem 10 prozentiges fötales Kalbsserum (FCS) zugegeben wurde oder im StemGEM* Medium des CNRS (Medium ohne Serum). Die Ablösung der Zellen muss vollständig sein, in Anbetracht der Tatsache, dass die Zellen, die eine erhöhte Menge an CD34 Genen exprimieren, die am meisten unreifen Progenitoren darstellen und am leichtesten abzulösen sind.

Zusammensetzung der Medien

[0105] Die Medien der Vorstimulation und des Transfers sind StemGEM* Medien mit oder ohne Serum (CNRS Centre National de 1a Recherche Scientifique UPR 9044 Villejuif France).

Transduktionsverfahren

[0106] Die Linie der NB16 Zellen, eine Linie von Zellen (Danos O., und Mulligan R. C.: Safe and efficient generation of recombinant retroviruses with amphotropic and ecotropic host ranges". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 6460–6464, 1988), die die β -Galaktosidase von E. coli exprimieren (Strair, R. K., Towle, M., & Smith, B. R. (1990) Nucleic Acids Res. 18, 47-4762) wird von J. M. Heard und O. Danos geliefert. Diese Zellen werden in Kultur im DMEM-Medium gehalten, eisenangereichertes Serum vom neugeborenen Kalb (Hyclone) zugegeben wurde. Diese zelluläre Linie produziert gewöhnlich einen Überstand mit einem Virusgehalt von 1 bis 5 × 10⁵ Einheiten/ml. Die CD34+ Zellen werden während variierender Zeiten (50 000 CD34+ Zellen in 0,5 ml) vorstimuliert. Sie werden anschließend während 40 Stunden auf NB16 Zellen mit 40% Konfluenz im StemGEM* Medium (CNRS) co-kultiviert, dem 8 µl/ml Polybren bei 37°C mit 5% CO₂ in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre zugegeben wurde. Die CD34+ Zellen werden anschließend vorsichtig abgelöst, konzentriert und für klonogene Assays getestet.

Klonogene Assays in Methylzellulose

[0107] Die CD34+ Zellen werden in einer Menge von 300–400 Zellen/ml gemäß einer Modifikation eines Mischkolonietests von Fauser und Messner kultiviert (Hatzfeld, J., Li, M.-L., Sookdeo, H., Levesque J.-P., O'Toole, T., Gurney, C., Clarck, S. C., & Hatzfeld, A. (1991) J. Exp. Med. 174, 925–929; Fauser, A. A., & Mess-

ner, H. A. (1979) Blood 53, 1023). Alle Kulturen werden wenigstens zweifach hergestellt.

Einfärbung von Kolonien, bei denen ein Transfer durchgeführt wurde

[0108] Nach einer Inkubation von 14 bis 21 Tagen bei 37°C in einer feuchtigkeitsgesättigten Atmosphäre, werden die Kolonien gezählt und wie zuvor beschrieben eingeteilt (Zhou, Y.-Q., Stanley, E. R., Clarck, S. C., Hatzfeld, J., Levesque, J.-P., Federici, C., Watt, S. M., & Hatzfeld, A. (1988) Blood 72, 1870–1874). Sie werden anschließend durch das gleiche histochemische Verfahren eingefärbt, wie dasjenige, das zum Bewerten des Gehalts eines Überstands verwendet wird, mit X-Gal als Substrat (MacGregor, G. R., Nolan, G. P., Fiering, S., Roederer, M., & Herzenberg, L. A. (1991) Methods Mol. Biol. 7, 217–235) mit Ausnahme der Tatsache, dass die Färbelösung (1 ml/Petrischale) zweifach konzentrierter als die anhaftenden Zellen ist. Die Verfärbungsreaktion wird die ganze Nacht durchgeführt.

Statistische Analyse

[0109] Die Bedeutung der Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen wird unter Verwendung des T Testes von Student ermittelt.

Ergebnisse

[0110] Die Effizienz der Infektion von nls-Lac-Z hängt von einer Periode der Vorstimulation von 10 Stunden mit dem Anti-TGF-β ab.

[0111] Die SBA-CD34⁺⁺⁺ Zellen (die unreifsten CD34 Zellen) werden mit einer erhöhten Wiedergewinnung von Zellen des Kompartiments der Zelle einer Zelllinie gereinigt, von denen CFU-GEMM (koloniebildende Einheit-Granulozyt/Erythrozyt/Makrophage/Megakaryozyt) ein Teil bildet, die ein erhöhtes Proliferationspotential (oberhalb von 10⁵ Zellen) besitzen, wie in Material and Methods beschrieben. Die Zellen werden während variierender Zeiten mit oder ohne Anti-TGF-β, wie in der Tafel 1 beschrieben, vor der Cokultur mit den NB16 Zellen zur Infektion mit den retroviralen Vektoren vorinkubiert. Wenn diese Zellen während 10 Stunden nur mit den Zytokinen und ohne Anti-TGF-β vor der Transduktion vorstimuliert werden, steigt die Effizienz des Transfers von 1,1 auf 23,8%. Diese Erhöhung verdoppelt sich auf signifikante Weise in Gegenwart des Anti-TGF-β Serums, wobei sie sich von 23,8 auf 47,3% erhöht. Die Effizienz der Aktivierung des Anti-TGF-β verschwindet während der Zeit längerer Präinkubation. Die Perioden der Vorstimulation von 20 oder 48 Stunden, oder länger (nicht dargestellt) mit oder ohne Anti-TGF-β Serum liefern ähnliche Ergebnisse wie diejenigen, die nach 10 Stunden ohne Anti-TGF-β Serum beobachtet wurden.

[0112] Effekt des Anti-TGF-β auf die Effizienz des Transfers von nls-Lac-Z in verschiedenen Typen von Progenitoren

[0113] Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass eine Stimulation von 10 Stunden in Gegenwart des Anti-TGF-β Serums zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamtzahl der Kolonien mit Transduktion führt, hat man diese Bedingung der Vorstimulation in den folgenden Experimenten verwendet. Die Tabelle 2 gibt detailliert verschiedene Typen von Progenitoren wieder, bei denen nach diesem Verfahren eine Transduktion durchgeführt wurde und die relative Effizienz der Expression für jede von ihnen. Die am meisten erhöhte Effizienz der Expression wird mit den Progenitoren erhalten, die am unreifsten sind, welche gemischte Kolonien sind, die von CFU-GEMM abstammen. Diese Progenitoren ergeben Kolonien, die 1 bis 2 × 10⁵ Zellen enthalten. Die **Fig. 1** zeigt eine derartige Kolonie. Die **Fig. 2** zeigt erythroide Zellen mit einer Expression des homogenen nls-Lac-Z Gens in allen Zellen. Die **Fig. 3** gibt auf genauere Weise die nukleare Lokalisation von β-Galactosidase in den Makrophagen wieder und beweist die Abwesenheit einer nicht spezifischen Verfärbung in dem Cytoplasma. Die Vorstimulation durch Anti-TGF-β erhöht die Effizienz des Transfers von 54,5 auf 95% in dem CFU-GEMM (koloniebildende Einheit-Granulozyt/Erythrozyt/Makrophage/Megacyrozyt), von 43,8 auf 66,2% in dem BFU-E (Ausbruch bildende Einheit-Erythroid [burst forming unit- erythroid]), von 3,5 auf 13,5% in dem CFU-GE (koloniebildende Einheit-Granulozyt/Makrophage) von 0 auf 9,3% in CFU-G (koloniebildende Einheit-Granulozyt) und 8,3 auf 22,2 in den CFU-M (koloniebildenden Einheit- Makrophage). (Die Effizienz des Transfers wird im Verhältnis zu den Bedingungen der Transfektion von CFU-GEMM in TGF-β erhöht).

[0114] Die Vorstimulation durch Anti-TGF-β erhöht die Stabilität der Genexpression während der Entwicklung des CFU-GEMM.

[0115] Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die CFU-GEMM eine Unterpulation des Kompartiments der Zelle einer Zelllinie darstellen, welche einen Teil der hämatopoetischen Langzeitwiederherstellung bilden (Lu, L., Xiaou, M., Shen, R.-N., Grisby, S., & Broxmeyer H. E. (1993) Blood 81, 41–48), hat man die Stabilität der Genexpression während der Entwicklung der CFU-GEMM in gemischten Kolonien analysiert. In der Tabelle 3 sind die CFU-GEMM gemäß dem Prozentsatz der Zellen, die nls-Lac-Z exprimieren im Inneren von jeder Kolonie eingeteilt. Die Vorstimulation durch das Anti-TGF-β Serum erhöht die Zahl der Kolonien, die von

90-100% Zellen enthalten, die das nls-Lac-Z gen exprimieren. Der CFU-GEMM entwickelt sich nicht in den Kulturen von Zellen, die nicht durch ein Anti-TGF- β Serum vorstimuliert werden. Im Gegenteil stellt diese Unterpopulation 41,2% der ganzen CFU-GEMM dar, bei denen die Vorstimulation durch das Anti-TGF- β Serum durchgeführt wurde.

[0116] Man hat bestimmt, ob die Größe der Kolonien durch den Transfer modifiziert wird. Man hat beobachtet, dass die Zahl der Zellen sich nicht signifikant in den Kolonien unterscheidet, bei denen eine Transduktion durch nls-Lac-Z durchgeführt wurde, im Verhältnis zu denjenigen, bei denen diese nicht durchgeführt wurde.

Tabelle 1

Das während der Vorstimulation von 10 Stunden zugegebene Anti-TGF- β -Serum erhöht die Effizienz des Gentransfers				
Std.	Anti-TGF- β -Antiserum	Gesamtzahl der Kolonien	transfizierte Kolonien	% Transfer
0	-	103 (\pm 16)	1 (\pm 0)	1,1 (\pm 0,05)
	+	94 (\pm 18) df=2; p=0,330	2 (\pm 2) df=2; p=0,028	1,54 (\pm 4) df=2; p=0,128
10	-	74 (\pm 19)	15 (\pm 5)	23,8 (\pm 9,0)
	+	125 (+0+ 15) df=3; p=0,001	51 (\pm 10) df=3; p=0,0004	24,8 (\pm 2,09) df=3; p=0,034
20	-	110 (\pm 7)	24 (\pm 5)	23,5 (\pm 1,66)
	+	140 (\pm 4) df=2; p=0,015	35 (\pm 4) df=2; p=0,085	24,8 (\pm 2,2) df=2; p=0,394
48	-	91 (\pm 15)	20 (\pm 6)	21,9 (\pm 3,7)
	+	113 (\pm 10) df=2; p=0,138	21 (\pm 4) df=2; p=0,440	18,7 (\pm 2,2) df=2; p=0,394

[0117] Die Zahl der Kolonien wird mit 10^3 Zellen/Medium, die in der Methylzellulose kultiviert wurden, wie in Material und Verfahren beschrieben, erhalten.

Tabelle 2

Effekt des Anti-TGF- β Serums auf die Effizienz des Transfers in verschiedenen Typen von hämatopoetischen Progenitoren			
Progenitoren		% Transfer ohne Vorstimulation durch Anti-TGF- β	% Transfer mit Vorstimulation mit Anti-TGF- β
CFU-GEMM	Gesamtzahl von Kolonien	11	21
	Transfizierte Kolonien	6	20
	% Transfer	54,5	95
BFU-E	Gesamtzahl von Kolonien	67	83
	Transfizierte Kolonien	19	55
	% Transfer	43,8	66,2
CFU-GM	Gesamtzahl von Kolonien	28	38
	Transfizierte Kolonien	1	5
	% Transfer	2,5	13,5
CFU-G	Gesamtzahl von Kolonien	21	43
	Transfizierte Kolonien	0	4
	% Transfer	0	9,3
CFU-M	Gesamtzahl von Kolonien	12	18
	Transfizierte Kolonien	1	4
	% Transfer	8,3	22,2
CFU-GEMM: koloniebildende Einheit - Granulozyt/ Erythrozyt/ Makrophage/ Megakaryozyt; BFU-E: Ausbruch bildende Einheit - Erythroid; CFU-GM: koloniebildende Einheit - Granulozyt/Makrophage CFU-G: koloniebildende Einheit - Granulozyt CFU-M: koloniebildende Einheit - Makrophage			

[0118] Dies ist das Ergebnis eines Experiments von drei ähnlichen Experimenten.

Tabelle 3

Verteilung der transfizierten CFÜ-GEMM nach der Stabilität der Expression des nls-Lac-Z-Gens während der Entwicklung der Kolonie				
	Ohne Anti-TGF- β -Serum		Mit Anti-TGF- β -Serum	
% von Zellen, die das nls-Lac-Z in jeder gemischten Kolonie exprimieren	% gemischter Kolonien	Zahl von Zellen pro gemischter Kolonie	% gemischter Kolonien	Zahl von Zellen pro gemischter Kolonie
90-100	0	118 706 (\pm 16 300)	41,2	152 776 (\pm 18 336)
40-90	66,6	121 766 (\pm 10 821)	25,3	156 456 (\pm 19 069)
0-40	33,3	122 313 (\pm 590)	23,5	169 963 (\pm 16 919)

[0119] Die Ergebnisse stellen den Durchschnitt (\pm SD) von 3 unabhängigen Experimenten dar.

Tabelle 4

Effekt des Anti-TGF- β Antiserum und/oder des Anti-Interferon (JFN) auf den Gehalt an von NB16 Zellen produzierten Überstand			
Überstand	Kontrolle	Antiserum Anti-IFN	Antiserum Anti-TGF- β
CFU/10 ⁻⁵ Zahl von Experimenten	5 (\pm 4,4) (n=6)	65,8 (\pm 68,7) (n=6)	38,2 (\pm 42,02) (n=4)

[0120] Die NB16 Zellen sind Abwesenheit oder in Anwesenheit von Anti-TGF- β oder Anti-Interferon kultiviert worden.

[0121] Die Überstände werden anschließend zu den nicht konfluenten Kulturen von 3T3 Zellen hinzugegeben. Wenn die Zellen konfluent sind, werden diese durch das X-Gal eingefärbt und die viralen Mittelpunkte werden gezählt und die Menge wird durch die Zahl der viralen Mittelpunkte multipliziert mit dem Kehrwert der Verdünnung des Anfangsüberstands ausgedrückt (CFU: Colony Forming Unit).

[0122] Die Zugabe von Anti-TGF- β oder Anti-Interferon während der Cokultur kann den Prozentsatz des Transfers (nicht gezeigt Ergebnis) in den hämatopoetischen Zellen durch einen Effekt direkt auf die Produktionslinie erhöhen. Die Tabelle 4 zeigt so, dass wenn man NB16 Zellen von Anti-TGF- β oder ein virales Mittel, wie ein Anti-Interferon, zugibt, man die Menge des Überstands erhöht. So erhöht sich der Überstand, der nach Behandeln mit Anti-Interferon erhalten wird, um das 11-fache der Zahl der Infektionsherde und mit Anti-TGF- β nimmt dieser um das 6-fache zu.

Beispiel 2

[0123] Nachstehend werden die erhaltenen Ergebnisse in den Vergleichsversuchen der Vorstimulation mit oder ohne Anti-Inhibitor des Zellzyklus angegeben.

Ziel des Experiments:

[0124] Man versucht, aus der Phase des Ruhezustands der primitiven Progenitoren auszutreten, welche unter der Steuerung eines TGF- β Autokrins stehen. Dieses Austreten wird nach einer Zeit kurzer Stimulation (10 Stunden) erhalten, dann wird das Phänomen durch Kultivierung halbfester aktivierter Progenitoren und Ableitung der Zahl der gemischten Kulturen nach 21 Tagen der Kultur unter Beweis gestellt. (Fauser A. A. und Messner H. A. (1979), Identifizierung von Megakaryozyten, Makrophagen und Eosinophilen in Kolonien von menschlichen Knochenmark, das neutrophile Granulozyten und Erythroblasten enthält. Blood, 53: 1023–1027).

Experimentelle Vorgehensweise:

[0125] Reinigung von CD34+ Zellen des Nabelschnurbluts.

[0126] Die Zellen werden in zwei verschiedenen Basismedien inkubiert.

A: GTL-Medium

B: flüssiges Standardmedium mit 10% fötalem Kalbsserum.

[0127] Die Zusammensetzung des GTL-Mediums wird in dem folgenden Artikel "Specific role of lipids, transferrin and insulin in defined media for cells of the human hematopoietic and immune systems" J. Hatzfeld, A. Hatzfeld, J. Maigne, M. Sasportes, R. Willis and D. B. Mc Clure in Cold Spring Harbor Conferences on Cell proliferation Band 9, Growth of Cells in hormonally defined media, 1982, Seiten 703-710 beschrieben.

[0128] Die Zusammensetzung des GTL-Milieus ist wie folgt:

[0129] IMDM: Basismedium

+1 mg/ml albumines Rinderserum, entfettet mit 5 μ g/ml Ölsäure, 5 μ g/ml Linolsäure, 1 μ g/ml Palmitinsäure wieder hergestellt,

+ Transferrin 5 μ g/ml ("Specific role of lipids, transferrin and insulin in defined media for cells of the human hematopoietic and immune systems" J. Hatzfeld, A. Hatzfeld, J. Maigne, M. Sasportes, R. Willis and D. B. Mc Clure in Cold Spring Harbor Conferences on Cell proliferation Band 9, Growth of Cells in hormonally defined media, 1982, Seiten 703–710).

[0130] Zusammensetzung des Standardmilieus ist wie folgt:

IMDM+ 10% fötales Kalbsserum

1 mg/ml albumines Rinderserum

2 mM Glutamin

10 μ m/ml Transferrin 4×10^{-5} M β - Mercaptoethanol.

[0131] Zu diesen zwei Basismilieus werden sechs wenigstens der folgenden Zytokine gegeben: IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6 IL7, IL11, GCSF, SF, EPO, GM-CSF, FL, TPO, FGF, Insulin oder Synthokine, die die den Zytokine entsprechenden Rezeptoren aktivieren.

[0132] In jeder Gruppe der Medien A und B testet man die folgenden Bedingungen:

1) Kontrolle: Es wird nichts anderes zugegeben,

2) Zugabe eines Anti-TGF- β Antikörpers, der von StemGEM*CNRS, 7 rue Guy Môquet, 94801 Villejuif, FRANCE stammt.

[0133] Die Zellen werden während 10 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ in einen Inkubator gestellt; 1000 Zellen in 0,4 ml Medium.

[0134] Am Ende der Vorstimulationsperiode, gibt man 2,1 ml festes Medium zu den Zellen. Man überlässt sie der Inkubation während 21 Stunden bei 27°C, 5 CO.

Ergebnisse:

[0135] Jede Ziffer gibt den Durchschnitt von zwei Behältern wieder. Es werden nur die Zählungen der gemischten Kolonien (Kolonien, die aus roten Zellen + einen oder mehrere Typen der Linien von weißen Zellen zusammengesetzt sind) dargestellt, die von den unreiferen Zellen abstammen.

	Exp A	Exp B	Exp C
Kontrolle	8	6	1
In Gegenwart von Anti-TGF- β Antikörpern	15	12	4

Beispiel 3:

[0136] Im Übrigen hat man verifiziert, dass die Kombination von weiter entwickelten Faktoren, als die bereits verwendeten keinen genauso effizienten Effekt besitzen wie das Anti-TGF- β .

[0137] Man hat zahlreiche Kombinationen von Zytokinen, die weiterentwickelt sind als die vorhergehenden, in den Kulturen mit oder ohne Anti-TGF- β untersucht. Man beobachtet, dass bestimmte Kombinationen von Zytokinen einen ähnlichen Effekt wie der Effekt des Anti-TGF- β auf die Kolonien haben können, die sich schnell entwickeln und folglich von späten bereits aktivierten Progenitoren abstammen. Im Gegensatz dazu kann der Effekt Anti-TGF- β nicht durch irgendeine Kombination von Zytokinen für die Entwicklung von Kolonien in 18 Tagen ersetzt werden.

[0138] Im Übrigen, wenn es bekannt wäre, dass die Zytokine den Rmphotropenrezeptor der verwendeten Retroviren für einen Gentransfer einführen, hat man dank der Erfindung gezeigt, dass das Anti-TGF- β die Expression der Rezeptoren von Zytokinen folglich ihre Wirkung, folglich die Expression von Amphotropenrezeptoren, folglich den Gentransfer erhöht. Die Erhöhung der Expression der Rezeptoren der Zytokinen für das Anti-TGF- β ist insbesondere gut für die Zellen im Erholungszustand.

Beispiel 4:

[0139] Das Experiment unter der Bedingung von unizellulären Kulturen (schwache Zellen CD34⁺CD38⁻), den Effekt des FL/bFGF (Ligand Flik/Fibraoplastenwachstumsfaktor) und Antikörper Anti-TGF- β , der von StemGEM* abstammt) in dem folgenden Milieu: Milieu B: Serum /IL3/IL6/SF/GCSF) bei J0, und Milieu B + GMCSF + EPO bei J12.

[0140] Man hat vier Bedingungen des Kulturmediums verwendet:

1. Standardmedium mit 24% fötalem Kalbsserum und 4 Zytokinen (IL3, IL6, SF, GCSF),
2. Standardmedium mit 10% fötalem Kalbsserum und 4 Zytokinen (IL3, IL6, SF, GCSF) + FL/bFGF,
3. Standardmedium + Anti-TGF- β Antikörper (stammt von StemGEM*).
4. Standardmedium + FL/bFGF + Anti-TGF- β Antikörper (stammt von StemGEM*).

Ergebnisse:

[0141] Die vier Bedingungen ergebend die folgenden Resultate: Für das Einsetzen des Zyklus der Zellen:

1. 50% der Zellen ergeben Klone von mehr als 100 Zellen,
2. 75% der Zellen ergeben Klone von mehr als 100 Zellen,
3. 75% der Zellen ergeben Klone von mehr als 100 Zellen,
4. 75% der Zellen ergeben Klone von mehr als 100 Zellen.

[0142] Es ergibt sich somit kein Additionseffekt in dem Vergleich 4).

1. Es scheint sich um die gleiche Population zu handeln.
– Für die Proliferation ergeben die Bedingungen 2 und 3 die folgenden Ergebnisse:
 2. 15–20% der Klone enthalten mehr als 10⁴ Zellen,
 3. 50% der Klone enthalten mehr als 10⁴ Zellen.
- Folglich ist der Anti-TGF- β Antikörper effizienter als das FL/bFGF.

- Auf die Natur der erhaltenen Zellen:
- Mit der Kombination erhält man vor allem G und M (reifere Zellen), das heißt, Granulozyten und Monozyten,
- Mit den Kombinationen 3 und 4 erhält man vor allem rote Zellen und gemischte (das heißt eine Mischung von roten Zellen und weißen Zellen).

[0143] Folglich induziert der Antikörper das Einsetzen eines Zyklus von früheren Zellen, als dies nur mit dem Anti-TGF- β Antikörper der Fall ist, wobei man die erythroiden oder gemischten Wege stimuliert.

[0144] Die Gesamtheit dieser Ergebnisse ermöglicht es die Vorteile der kurzen Behandlung durch Anti-TGF- β gemäß der Erfindung auszuüben.

[0145] Alle Veröffentlichungen, die den Transfer von Genen betreffen, bestehen auf den beiden wichtigen Parametern eines effizienten Transfers: ein Überstand mit einem erhöhten viralen Gehalt das Einsetzen eines Zyklus der Zelle zum Infizieren. Das ist der Grund aus welchem man die Zellen einer Zelllinie mit Zytokinen stimuliert. In den Veröffentlichungen wird die Stimulation während mehr als 72 Stunden durchgeführt und betrifft die bereits im Zyklus befindlichen Zellen. Am Ende von 72 Stunden haben viele von diesen Zellen bereits damit begonnen, sich zu differenzieren. Die Zellen, welche infiziert sind, sind viel weniger unreif als am Anfang. Mit dem Anti-TGF- β , und unter Bestätigung des Verfahrens der Erfindung werden Zellen in einer so kurzen Zeit stimuliert und sind Zellen, am Anfang im Ruhezustand. Sie haben nur die Zeit in den Zyklus einzutreten ohne sich zu differenzieren oder wenig. Das Verfahren der Erfindung ermöglicht es, in die Phase des Ruhezustands sofort nach dem Transfer von Genen wieder einzutreten, dank einer kurzen Behandlung durch das TGF- β . Folglich sind die Zellen, die transfiziert sind, viel unreifer, was das Ziel ist, das in der genetischen Therapie erreicht werden sollte, die die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie verwendet. Dieses Verfahren auf andere Typen von Zellen anwendbar, indem man eventuell andere Anti-Inhibitoren des Zellzyklus verwendet (Anti RB: Anti-Gen der Suszeptibilität gegenüber Retinoblastom, Anti INK: Anti-Inhibitor von Kinase, etc.).

[0146] Diese Anti-Inhibitoren können Anti-Sens-Oligonukleotide, blockierende Antikörper, natürliche oder synthetische Inhibitoren sein.

Patentansprüche

1. Verwendung von Hemmstoffen von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus über eine Zeitspanne, die 72 h nicht übersteigt und bevorzugt 36 h nicht übersteigt, und insbesondere geringer als etwa 20 h und bevorzugt etwa 1 bis 15 h und bevorzugt etwa 1 bis 10 h ist, in einer Kultur von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, um die Zellen der hämatopoetischen Zelllinie aus ihrem Ruhezustand zu befreien.

2. Verwendung der Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus nach Anspruch 1, in einer Vergleichsuntersuchung zwischen einerseits einer Kultur von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie in einem Medium, welches die oben genannten Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus enthält, und andererseits einer gleichen Kultur von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie wie die oben erwähnte, in einem Medium, welches keine der oben genannten Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus enthält, um den Reifegrad der oben genannten Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie zu bestimmen.

3. Verwendung der Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus nach Anspruch 1 in einer Kultur von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, um die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie aus ihrem Ruhezustand zu befreien, gefolgt von einem Gentransferschritt in die oben genannten Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie.

4. Verwendung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die Zellen der Zelllinie hämatopoetische Zellen sind, und wobei die Hemmstoffe mit wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus aus dem anti-TGF- β bestehen.

5. Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, welche ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens in ihrem Genom enthalten, welche durch das Verfahren erhalten werden können, das die folgenden Schritte umfasst:

- Vorstimulation der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie in den Ruhezustand in einem Medium, welches enthält:
- direkte oder indirekte Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus der besagten Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie über eine ausreichende Zeitspanne, um die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie aus ihrem Ruhezustand zu befreien, und die 72 h nicht übersteigt und bevorzugt 36 h nicht übersteigt, und insbesondere geringer als etwa 20 h und bevorzugt etwa 1 h bis 15 h und bevorzugt etwa 1 h bis 10 h beträgt, und
- Substanzen, insbesondere Zytokine, um die Aktivierung in einen Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus zu ermöglichen,

– den Transferschritt durch Vorlegen der im vorherigen Schritt erhaltenen Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie mit einem vollständigen oder einen Teil eines heterologen Gens in einem Medium, welches den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in das Genom der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie ermöglicht, um Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie zu erhalten, welche vollständig oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten,
– die eventuelle Rückgewinnung der durch den vorhergehenden Schritt erhaltenen Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie.

6. Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie nach Anspruch 5, welche in ihrem Genom ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten, und ein Multiplikationspotential von gleich oder mehr als 10^6 , und ein Differenzierungspotential haben, welches sich über die gesamten hämatopoetischen Zelllinien erstreckt.

7. Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie nach Anspruch 5 oder 6, welche in ihrem Innern oder auf ihrer Oberfläche Hemmstoffe mit einem vollständigen Inhibitor ihres Zellzyklus aufweisen.

8. Zellen nach einem der Ansprüche 5 bis 7, welche sich im Ruhezustand befinden.

9. Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie nach einem der Ansprüche 5 bis 8, in denen die Hemmstoffe ausgewählt sind aus: Den anti-Inhibitoren des Zellzyklus, zum Beispiel Hemmstoffe der Tumorsuppressorgene, Antagonisten des TGF- β , wie TGF- β -Antisense, neutralisierende Antikörper gegen TGF- β , lösliche Rezeptoren des TGF- β oder natürliche oder synthetische Inhibitoren des TGF- β oder Inhibitoren des Syntheseweges von TGF- β .

10. Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie nach einem der Ansprüche 5 bis 9, wobei das vollständige oder ein Teil des heterologen Gens aus den folgenden Genen ausgewählt werden kann: Marker: Neo (Gen der Neomycinresistenz), CD2 (Leukozytenantigen), nls-Lac-Z, oder Gene, die eine Hämationose oder eine andere Krankheiten heilen können, wie etwa ADA (Gen der Adenosindesaminase), ALDP (Gen, das Adrenoleukodystrophie heilen kann), TK (Suizidgen unter der Kontrolle viraler Promotoren, das es ermöglicht, Zellen in der Anwesenheit von Aciclovir zu töten).

11. Verfahren zum Transfer eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in das Genom von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, welche aus dem Ruhezustand aktiviert wurden, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

– Vorstimulation der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie im Ruhezustand in einem Medium, welches enthält:

– direkte oder indirekte Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus der besagten Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie über eine ausreichende Zeitspanne, um die Zellen, insbesondere die Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, aus ihrem Ruhezustand zu befreien, und die 72 h nicht übersteigt und bevorzugt 36 h nicht übersteigt, und insbesondere geringer als etwa 20 h und bevorzugt etwa 1 h bis 15 h und bevorzugt etwa 1 h bis 10 h beträgt, und

– Substanzen, insbesondere Zytokine, um die Aktivierung in einen Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus zu ermöglichen,

– den Transferschritt durch Vorlegen der im vorherigen Schritt erhaltenen Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie mit einem vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens in einem Medium, welches den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens in das Genom der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie ermöglicht, um Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie zu erhalten, welche vollständig oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten,

– die eventuelle Rückgewinnung der durch den vorhergehenden Schritt erhaltenen Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie.

12. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Transferschritt eines vollständigen oder eines Teils eines heterologen Gens durch eine Kokultivierung von gemäß dem ersten Schritt des Anspruchs 11 vorstimulierten Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie und von Zellen, welche einen Vektor produzieren, wie einen ein vollständiges oder einen Teil eines zu transferierenden Gens umfassender viraler Vektor oder Retrovirus, erfolgt.

13. Verfahren nach Anspruch 11, wobei der Transferschritt des vollständigen oder eines Teils des teilweisen heterologen Gens durch Vorlegen von gemäß dem ersten Schritt des Anspruchs 11 vorstimulierten Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie und durch Überschichten mit Zellen, welche einen Vektor produzieren, wie einen ein vollständiges oder einen Teil eines zu transferierenden Gens umfassender viraler Vektor oder Retrovirus, erfolgt.

14. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 13, wobei das vollständige oder ein Teil eines zu transferierenden Gens aus einem Vektor wie einem viralen Vektor oder einem Retrovirus stammt, welcher durch eine produktive Kultur produziert wird, zu der ein virales Mittel, wie ein anti-TGF- β , ein anti-Interferon oder alle vektorstabilisierenden Mittel, hinzugegeben wird.

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 14, wobei das vorstimulierende Medium umfasst: IMDM (Iscove Dulbecco Modified Medium), (Stern GEM*, welches einem vom C. N. R. S. vertriebenen Medium entspricht), Zytokine, Antagonisten des TGF- β , wie TGF- β -Antisense-Oligonukleotide, neutralisierende Antikörper gegen das TGF- β , lösliche Rezeptoren des TGF- β oder natürliche oder synthetische Inhibitoren des TGF- β , neutralisierende Antikörper gegen das TGF- β , lösliche Rezeptoren des TGF- β oder natürliche Inhibitoren oder Syntheseinhibitoren des TGF- β , Mischungen von Zytokinen, welche geeignet sind, über einen kurzen Zeitraum (weniger als 72 h, bevorzugt weniger als 10 h) zu hemmen, die Inhibitoren des Zellzyklus der ruhenden Zellen der Zelllinie.

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 15, wobei die Substanzen, welche die Aktivierung in einen Zellzyklus und/oder das spätere Durchlaufen wenigstens eines Zellzyklus erlauben, ausgewählt sind aus einer Mischung von wenigstens 4 Substanzen, ausgewählt aus den Folgenden: IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL11, GM-CSF (Granulozyten-Monozyten Kolonien stimulierender Faktor), G-CSF, Steel-Faktor (SF), ein Ligand von FLT3 (FL), Erythropoetin, TNF, LIF, Thrombopoetin und Insulin oder Synthokine der Synthese.

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 16, wobei das Medium, welches den Transfer des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens erlaubt, besteht aus oder umfasst: DMEM und eventuell IMDM, Zytokine und eventuell einen Antagonisten des TGF- β , anti-Interferone, oder alle anderen viralen Mittel, welche die Produktion und/oder die Stabilität des das zu transfizierende Gen enthaltenden viralen Vektors oder Retrovirus erhöhen.

18. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 17, welches am Ende des Transferschritts des vollständigen oder eines Teils des heterologen Gens, die Kultur der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, die in ihrem Genom ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten, in einem geeigneten Medium umfasst, insbesondere einem flüssigen Medium oder einem halbfesten Medium, um differenzierte hämatopoetische Zellen zu erhalten, insbesondere differenzierte Blutzellen.

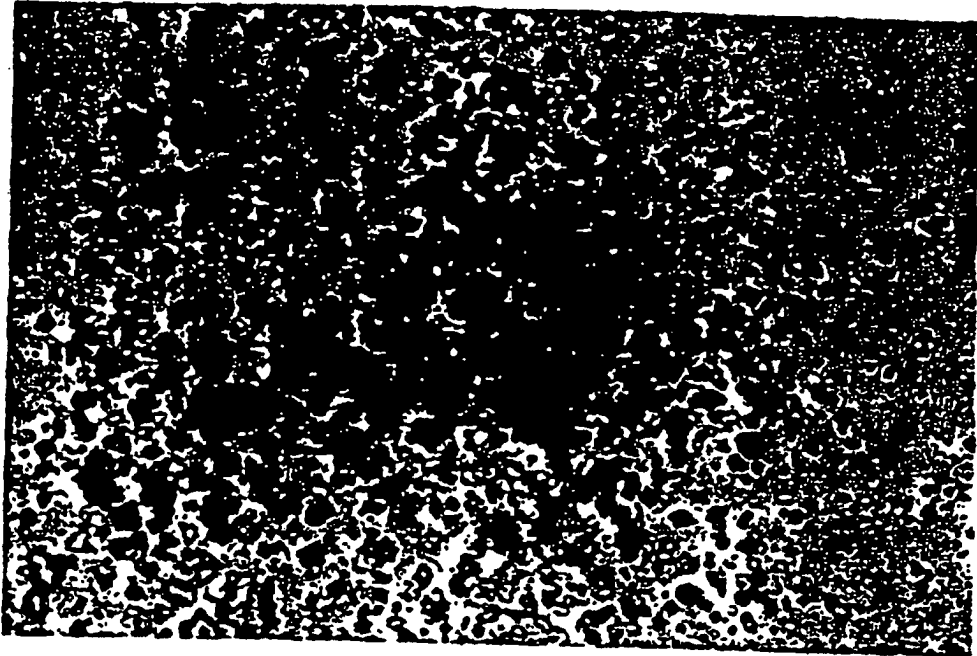
19. Verfahren nach einem der Ansprüche 11 bis 17, welches am Ende des Transferschritts des vollständigen oder eines Teils des Gens einen Schritt des Versetzen der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, welche ein vollständiges oder einen Teil eines heterologen Gens enthalten, in den Ruhezustand umfasst, wobei dieser Schritt durch die Hilfe wenigstens eines Inhibitors des Zellzyklus, wie das TGF- β , erfolgen kann.

20. Verfahren zur Bestimmung des Reifegrades der Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie, dadurch gekennzeichnet, dass es die folgenden Schritte umfasst:

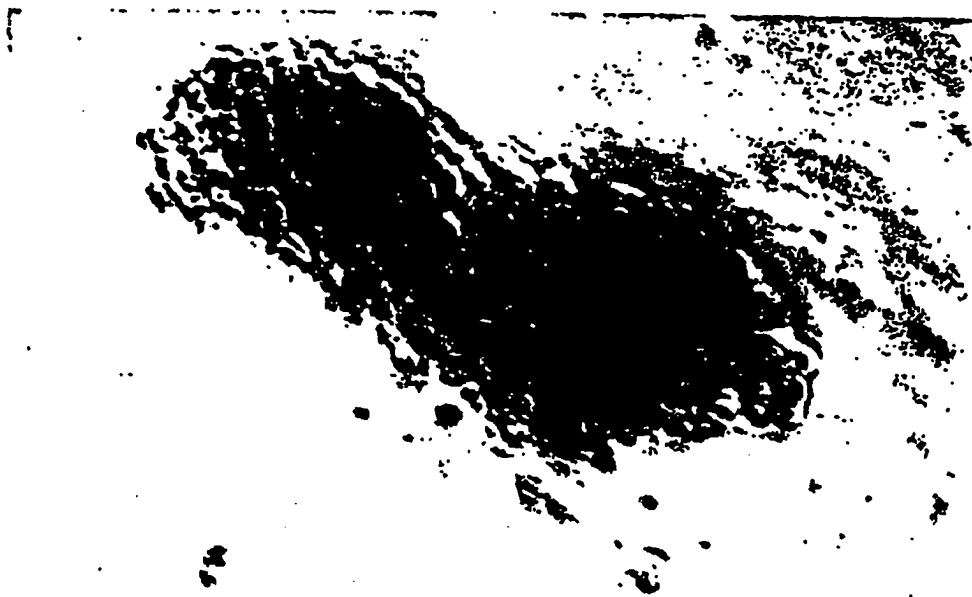
- Kultivierung eines ersten Ansatzes von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie in einem zu ihrer Kultivierung geeigneten Medium, welches aber keine Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus enthält, für etwa 14 bis 28 Tage, bevorzugt 18 Tage,
- Kultivierung eines zweiten Ansatzes von Zellen einer hämatopoetischen Zelllinie von gleicher Herkunft und mit gleichem Reifegrad wie die vorher erwähnten Zellen, in einem geeigneten Medium, welches einen Hemmstoffe von wenigstens einem Inhibitor des Zellzyklus enthält, wobei diese Hemmstoffe in dem Kulturmedium in einer wirkungsvollen Konzentration vorliegen, über eine Zeitspanne, die 72 h nicht übersteigt, bevorzugt etwa 1 bis 15 h und bevorzugter etwa 1 bis 10 h, wobei diese Kultur die gleiche Dauer hat wie die der Zellen des ersten Ansatzes der Zelllinie,
- 18 Tage nach Beginn der Kultivierung jedes der beiden Zellansätze Vergleich zwischen den Zellen des zweiten Zellansatzes bzw. des ersten Zellansatzes hinsichtlich der Anzahl und des Zustands der Kolonien und des Unterschieds in der Menge der Kolonien mit hohem Proliferationspotential (HPP-CFCH, HPP-MEG, HPP-GEMM), welche den HPP-Q-Kolonien entsprechen.

Es folgen 2 Blatt Zeichnungen

FIGUR 1



FIGUR 2



FIGUR 3

