



(12)

CERERE DE BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. cerere: **a 2022 00688**

(22) Data de depozit: **27/10/2022**

(41) Data publicării cererii:
30/04/2024 BOPI nr. **4/2024**

(71) Solicitant:
• **INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI
PATOLOGIE CELULARĂ "NICOLAE
SIMIONESCU" BUCUREȘTI,
STR. B.P. HAȘDEU NR. 8, SECTOR 5,
BUCUREȘTI, B, RO**

(72) Inventatori:
• **GAFENCU VIOLETA ANCA,
STR.ANTON PANN, NR.48A, ET.1, AP.1,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **DUMITRESCU MĂDĂLINA, BULEVARDUL
CAMIL RESSU, NR.8, BL.1, SC.B, AP.44,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO;**
• **TUDORACHE IRINA, STR.LUCIENI, NR.41,
SECTOR 3, BUCUREȘTI, B, RO**

(54) **O METODĂ EFICIENTĂ DE PURIFICARE A
LENTIVIRUSURILOR UTILIZATE CA VECTORI DE LIVRARE
A GENELOR SAU A ALTOR FRAGMENTE DE ACIZI
NUCLEICI**

(57) Rezumat:

Invenția se referă la un procedeu de purificare a preparatelor lentivirale non-replicative, pentru utilizare în terapia genică în modele *in vitro* sau pentru experimente pre-clinice. Procedeu, conform invenției, constă în etapele:

(I) precipitarea particulelor lentivirale cu sulfat de amoniu urmată de solubilizarea lor și

(II) sedimentarea particulelor lentivirale prin ultracentrifugare pe strat de sucroză, rezultând un preparat lentiviral care este capabil să infecteze celule în cultură și să producă proteina care a fost inserată în vectorul viral.

Revendicări: 3



REZUMATUL INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la un procedeu de purificare a preparatelor lentivirale non-replicative înalt purificate, pentru utilizarea acestora în terapia genică în modele *in vitro* sau modele preclinice. Procedeu de purificare a lentivirusului din mediul de cultură în care a fost secretat de către celulele de împachetare constă în 2 etape: (i) precipitarea particulelor lentivirale cu sulfat de amoniu urmată de solubilizarea lor și (ii) sedimentarea particulelor lentivirale prin ultracentrifugare pe strat de sucroză. După purificare, lentivirusul este capabil să infecteze celule în cultură și să producă proteina care a fost inserată în vectorul viral.

DESCRIEREA INVENȚIEI

Prezenta invenție se referă la un procedeu de preparare și purificare a lentivirusurilor non-replicative, obținându-se un preparat lentiviral cu o puritate mare, care se poate folosi în experimentele preclinice, *in vivo* și *in vitro*.

Domeniul tehnic în care poate fi folosită invenția

Invenția care constă în metoda de purificare a lentivirusurilor are aplicații în domeniul biomedical pentru a transfera:

- gene de interes sub promotori puternici (de ex. CMV) pentru supraexpresia unor proteine
- gene de interes sub anumiți promotori pentru expresia condiționată a unor proteine
- fragmente de RNA precum RNA de interferență, pentru silențierea unor gene
- gene de interes pentru obținerea celulelor CAR-T

Lentivirusurile astfel purificate pot fi folosite: *in vitro* și *in vivo*.

Transferul de gene sau RNA se poate face în celule care se divid cât și în celule care nu se divid.

Descrierea stadiului actual al tehnicii

Vectorii lentivirali (LV) au un diametru de aproximativ 80–100 nm iar genomul lor constă din două copii monocatenare de ARN (în sens pozitiv) în interiorul unei capsidă conice, înconjurată de un dublu strat lipidic [1]. Vectorii lentivirali conferă posibilitatea de modificare a celulelor eucariote, prin inserarea unei gene în genomul celulei gazdă. În prezent există și lentivirusuri defective pentru integrare, care pot induce expresia genei de interes fără integrare în genomul celulei gazdă [2] [3].

În scopul cercetării sau în scop terapeutic, lentivirusurile pot transduce o gamă largă de celule, de exemplu neuroni [8], celule hematopoietice stem și celule progenitoare [6], celule dendritice [9] cardiomiocite adulte și neonatale [7].

În prezent, lentivirusurile non-replicative și auto-inactivante sunt folosite în cercetare pentru studiul diferitelor procese celulare și moleculare, cât și pentru aplicațiile biomedicale. Aplicațiile biomedicale includ transferul de gene în terapia genică [10,11], tratamente bazate

introducerea unor gene în celulele T pentru tehnologia CAR-T [12], cât și vaccinuri realizate prin modificarea celulelor dendritice [13]. Au fost înregistrate succese la infectarea cu lentivirusuri a celulelor stem hematopoietice pentru a corecta imunodeficiențe primare [14] și hemoglobinopatii [15] [16]. Terapiile cu celule T CAR concepute folosind vectori lentivirali au demonstrat un succes clinic remarcabil la pacienții cu tumori maligne cu celule B, ducând la aprobarea de reglementare a primei terapii celulare modificate genetic folosind vectori lentivirali.

Cei mai utilizați vectorii lentivirali folosiți până în prezent sunt cei derivați din virusul imunodeficienței umane (HIV). Asamblarea structurii acestora a fost investigată pe larg și optimizată în ultimele două decenii. Astfel s-au realizat vectorii lentivirali de a treia generație, non-replicativi, auto-inactivați.

Deși sunt utilizați în diferite scopuri, prepararea acestor lentivirusuri non-replicative pe scară largă este limitativă [17]. Producția de lentivirus în cantități și concentrații necesare pentru livrarea *in vivo* este laborioasă și necesită concentrarea virusului din cantități mari de medii lichide în care acesta este secretat.

Producția de vectori lentivirali se realizează prin cotransfecția unor celule imortalizate din linia celulară HEK293T, utilizate ca celule de împachetare. Plasmidele folosite pentru transfecție codifică proteinele necesare pentru producerea vectorului lentiviral dar și ADN care conține gena de interes. Separarea genelor care assemblează componentele virale în plasmide diferite crește gradul de securitate biologică. Plasmide de împachetare codifică o proteină prin care virusul să intre în celulele eucariote, (cel mai frecvent VSV-G), gena pentru gag și gena pol dar și gene pentru proteine accesorii HIV, cum ar fi Rev. Cotransfecția acestor plasmide cu vectorul lentiviral (care conține gena de interes) oferă toate componentele necesare pentru ca linia celulară să producă particule virale funcționale. După cotransfecție, celulele de împachetare produc particule de lentivirus non-replicativ, care sunt secretate în mediul de cultură. Până în prezent, pentru purificarea lentivirusurilor non-replicative s-au folosit diverse metode precum ultracentrifugarea mediului, concentrarea prin filtrare, cromatografie, precipitare cu PEG [18].

Brevetele identificate în prezent cu privire la purificarea și concentrarea lentivirusurilor:

- Brevetul US9169491B2 „*Virus purification*” descrie metoda de concentrare a vectorului retroviral printr-o etapă de ultrafiltrare;

- Brevetul US20210009966A1 „*Method for large-scale preparation of purified preparation of recombinant lentiviral vector at gmp grade*” propune cromatografia ca metoda de purificare

- CN107384877B „*Method for purifying lentivirus*” – propune o metoda combinată de filtrare, ultracentrifugare și cromatografie

- WO2022036048A1 „*Methods for producing clinical-grade lentiviral vector*” propune o metoda de concentrare utilizând PEG or LENTI-X CONCENTRATOR

Puritatea produsului lentiviral este critică, mai ales pentru utilizarea acestuia *in vivo*. Resturi de la celulele de împachetare colectate împreună cu lentivirusul produs pot provoca

răspunsuri inflamatorii *in vitro* și mai ales *in vivo* [19]. Odată purificate, stocurile lentivirale sunt stabile până la 9 ani dacă sunt crioconservate la $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ [20].

Problema tehnică

Metode consacrate pentru purificarea lentivirusului:

1. Ultracentrifugarea – la viteze de peste $38000 \times g$, pentru durate diferite (de la 2 la 18 ore).

O problema tehnica este ca volumul mare de mediu in care a fost secretat virusul este dificil de centrifugat: cu cat mai mari sunt cupele rotorului de ultracentrifuga, cu atat viteza de ultracentrifugare este mai mica si timpul de centrifugare este mai mare.

2. Concentrarea prin filtrare si cromatografie

O problema tehnica este ca volumul mare de mediu care conține virusul produs de celule este dificil de filtrat sau de trecut pe coloana cromatografica.

3. Precipitarea cu o soluție de PEG.

O problema tehnica este ca precipitarea cu PEG nu are un randament foarte mare si, in plus pentru unele aplicații (de exemplu pentru transducția *in vivo*) nu este convenabil ca PEG sa rămână in preparatul viral.

Soluția tehnică propusa de noi pentru aceasta problema este ca precipitarea sa se realizeze cu ajutorul unor substanțe care:

1. Sa nu afecteze structura moleculara a virusului, si acesta sa rămână capabil de transducție.

2. Sa poată fi ușor îndepărtata după precipitare.

Soluția tehnică

Soluția tehnica identificata aici se refera la precipitarea particulelor lentivirale din mediu de cultura, cu sulfat de amoniu.

Adăugarea unor concentrații mari de ioni ai sulfatului de amoniu in mediul in care se găsesc particulele lentivirale concurează cu proteinele lentivirale pentru a se lega de moleculele de apă. Acest lucru elimină moleculele de apă din proteinele virale și scade solubilitatea acestora, rezultând precipitarea particulelor virale. Avantajul metodei propuse este că proteinele virale se pot rehidrata prin diluarea sau îndepărtarea ionilor de sulfat de amoniu prin dializa, iar particulele virale își recapătă proprietățile inițiale.

După rehidratarea lentivirusului într-o cantitate mica de tampon fosfat, urmează a doua etapa a purificării, prin ultracentrifugare pe strat de sucroză, la $100.000 \times g$, 3h, 4°C . Sedimentul format este solubilizat într-o soluție de tampon fosfat salin la care se adaugă 4% sucroză pentru crioprotecție.

Particulele lentivirale astfel obținute pot fi folosite pentru transducție *in vitro* sau *in vivo*.

Descrierea detaliata a invenției

1. Obținerea lentivirusului : optimizarea transfecției și a timpului de colectare a lentivirusului.

Celule 293T au fost însămânțate în plăci de 6 godeuri (10^6 celule/godeu) și transfectate de două ori în zile succesive cu diferite cantități de ADN (mix pGreenPuro, pMDL/pRRE, pRSV-Rev, pMD2.G în raport 4:2:1:1. Mediul lentiviral a fost colectat la 24, 48 și 96h de la schimbarea amestecului de transfecție. Celule HEK 293T însămânțate în 3 plăci de 12 godeuri au fost transduse cu 1 mL mediu LV/godeu în prezența de polybrene ($8 \mu\text{g/mL}$). După 48h de la transducție celulele au fost analizate prin microscopie de fluorescență și citometrie în flux.

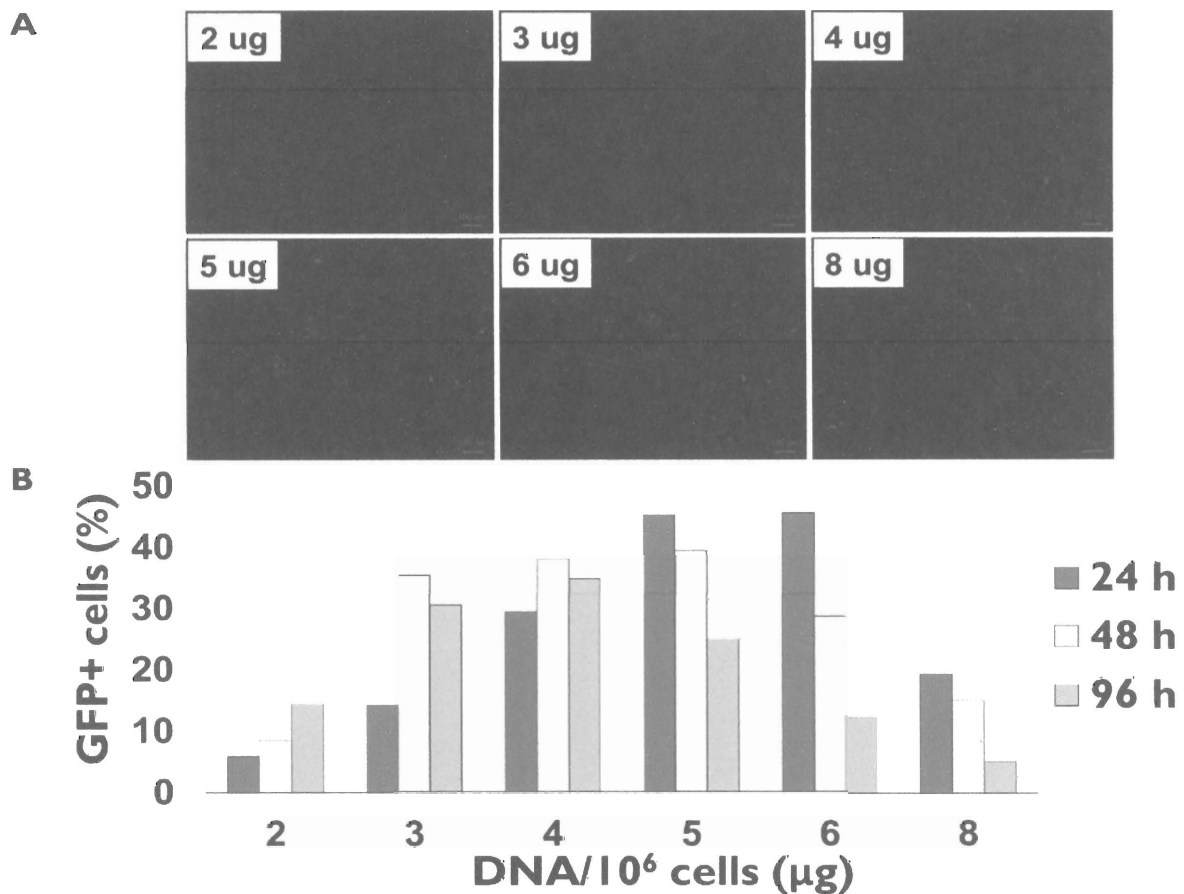


Fig.1. Optimizarea cantitatii de ADN folosita pentru producerea lentivirusului și secreția lentivirusului în timp. Celulele au fost transfectate cu cantități diferite de ADN iar virusul produs a infectat celule HEK293. Procentul de celule infectate a fost determinat prin citometrie de flux.

Datele arata ca $4\mu\text{gADN} / 10^6$ celule este cantitatea minima pentru producerea cantității maxime de lentivirus, fără sa altereze starea celulelor de împachetare, care pot produce virus in cantități substanțiale pana la 96h.

Dat fiind faptul ca lentivirusul împachetat poate induce expresia unei proteine fluorescente (green fluorescent protein, GFP), titrarea lentivirusului a fost realizata prin citometrie de flux, determinându-se procentul de celule pozitive pentru diferite diluții cu care s-a realizat infectarea cu lentivirus (Fig 2). Astfel s-a determinat numărul de unități de transducție /ml (TU/ml). In figura 6 este redat un exemplu de titrare prin citometria de flux. Pentru calculul titrului a fost utilizata valoarea % a celulelor pozitiva între 5-20%. Formula dupa care a fost calculat titrul este:

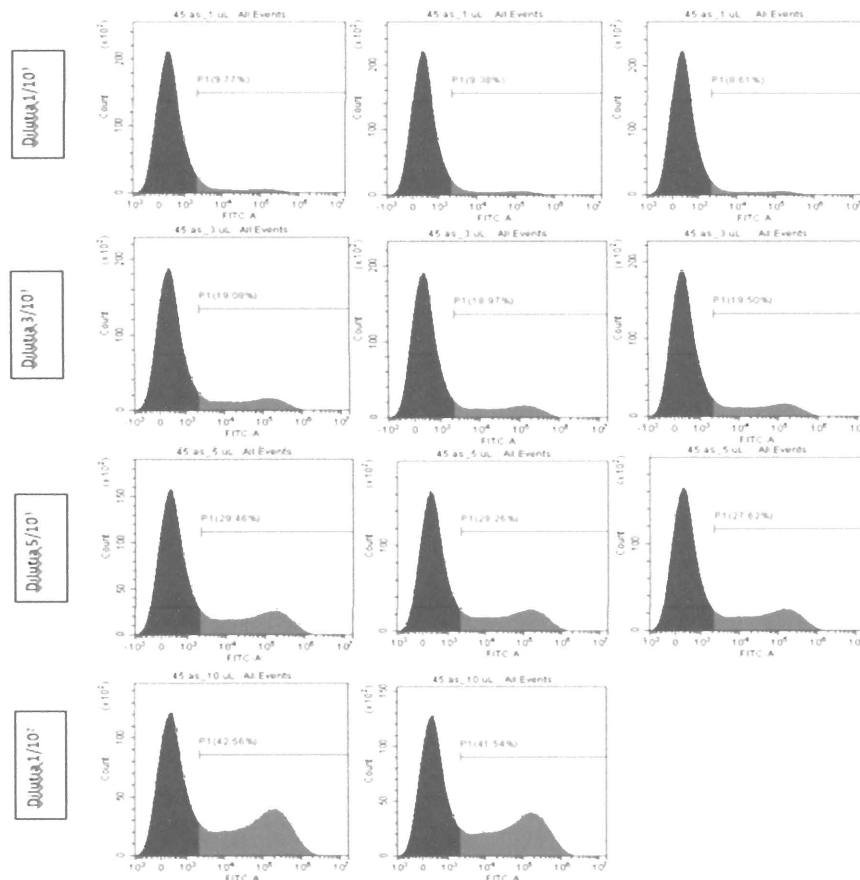
$$\text{Titrul (TU/mL)} = D \times F / 100 \times C / V$$

D – factorul de diluție

F – media procentelor de celule GFP+

C- numarul de celule din godeu la momentul transductiei

V- volumul de inocul



ul LV	F1	F2	F3	media F1F2F3	D (factor dil)	C (nr cel)	V (mL)	TU/mL*10 ⁻⁷
1	0.0977	0.0938	0.0861	0.092533333	1000	540000	1	4.9968

Fig.2. Titrarea lentivirusului prin citometrie de flux. Diferite diluții de virus induc procente diferite de celule care exprima gena proteinei fluorescente. In tabel este un exemplu de calcul al unui titru viral.

2. Purificarea lentivirusului prin metoda propusa de noi – precipitare cu sulfat de amoniu.

Având in vedere experiența anterioara, in care am purificat adenovirus prin precipitare cu sulfat de amoniu (21-23) am optimizat si pentru lentivirus același tip de purificare. Mai jos este redată schema de producere si purificare prin metoda propusa de noi, cu sulfat de amoniu.

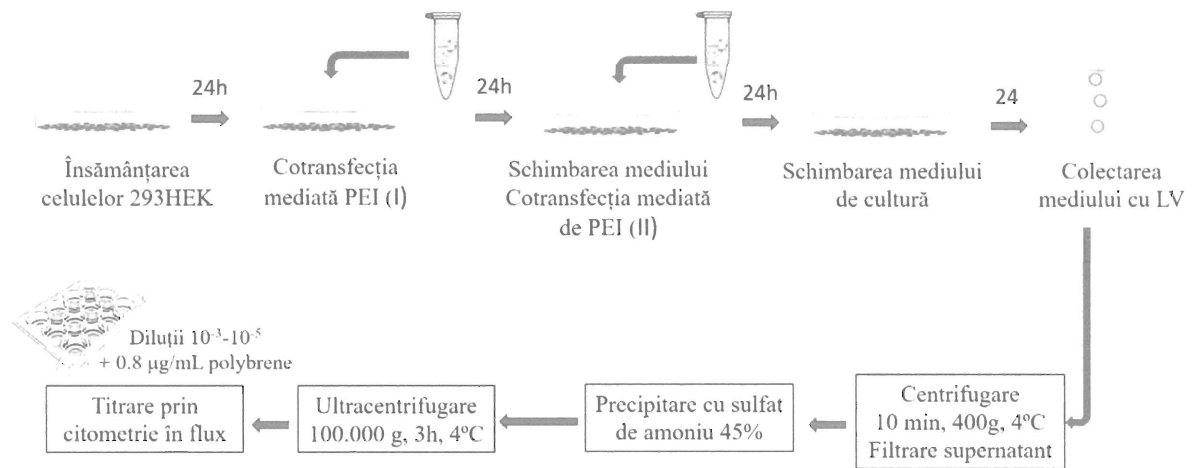


Fig.3. Împachetarea si purificarea lentivirusului prin precipitare cu sulfat de amoniu urmata de ultracentrifugare.

Preparatul lentiviral brut a fost obținut prin transfecției HEK 293T cultivate pe placi cu diametru de 10 cm de transfectate cu 26 μ g ADN/ placa in doua transfectie cu o durata de 18h si respectiv 6h.

Pentru a determina procentul de sulfat de amoniu la care lentivirusul precipita, 200 mL mediu lentiviral a fost centrifugat 10min la 400xg la 4°C, filtrat prin filtru de 0.22 μ m si apoi incubat secvențial timp de 30 de minute cu cantități din ce in ce mai mari de sulfat de amoniu, crescând saturația acestuia. Particulele virale precipitate au fost centrifugate la 4000 g, 15 min la 4°C, iar sedimentul a fost resuspendat in tampon fosfat salin (PBS) pentru resolubilizarea virusului. Preparatul viral obținut după precipitarea cu sulfat de amoniu au fost ulterior purificate prin ultracentrifugare (100.000 x g, 3h, 4°C) pe pat de sucroză 20%, iar sedimentul reprezentat de virusul pur, a fost resuspendat in 200 μ L PBS.

Asa cum se observa din figura 4, la 45% concentrație de sulfat de amoniu a fost obținuta cantitatea maxima de lentivirus.

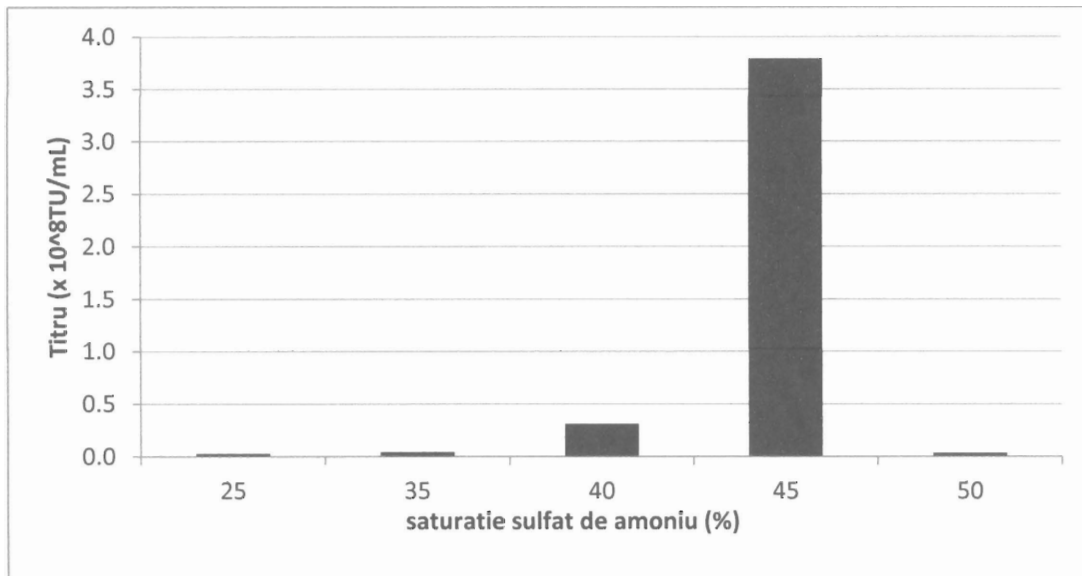


Fig.4. Optimizarea metodei de purificare a lentivirusului cu sulfat de amoniu. Precipitarea succesiva cu concentrații diferite de sulfat de amoniu a arata ca o concentrație de 45% este optima pentru precipitarea lentivirusului.

Exemplul 1.

Comparația purificării prin precipitare cu sulfat de amoniu cu alte doua metode consacrate in literatura: precipitare cu PEG si ultracentrifugare.

Pornind de la 336 ml mediu de cultura conținând lentivirus obținut de la 12 placi de 10 cm HEK 293T transfectate cu 26 μg ADN/ placa in doua transfectiei cu durata de 18h si respectiv 6h, am testat eficienta purificării prin metoda propusa de noi prin precipitare cu sulfat de amoniu 45% si prin alte doua metode consacrate: (i) ultracentrifugare si (ii) precipitare cu PEG.

Volumul de mediu de 336 ml conținând lentivirus a fost împărțit in 3 volume egale si prelucrat prin cele 3 metode de purificare:

- I. Un volum de 112 ml mediu lentiviral a fost ultracentrifugat (100.000 g, 3h, 4° C) pe pat de sucroză 20%, iar sedimentul a fost resuspendat in 1 mL PBS.
- II. Un volum de 112 ml mediu lentiviral a fost precipitat cu 1/3 volum soluție PEG (40% PEG, 1.2 M NaCl) prin incubarea amestecului 4h cu agitare la 4°C, urmata de centrifugare (1600 g, 1h, 4°C). Sedimentul resuspendat in PBS a fost ultracentrifugat (100.000 g, 3h, 4° C) pe pat de sucroză 20%, sedimentul obținut fiind apoi resuspendat in 1 mL PBS.

- III. Un volum de 112 ml mediu lentiviral a fost precipitat cu sulfat de amoniu la 45% saturație. Amestecul a fost incubat timp de 1h la 4° C cu agitare și centrifugat la 4000g, 15 min, 4° C. Sedimentul resuspendat în PBS a fost ultracentrifugat (100.000 g, 3h, 4° C) pe pat de sucroză 20%, sedimentul obținut fiind apoi resuspendat în 1 mL PBS.

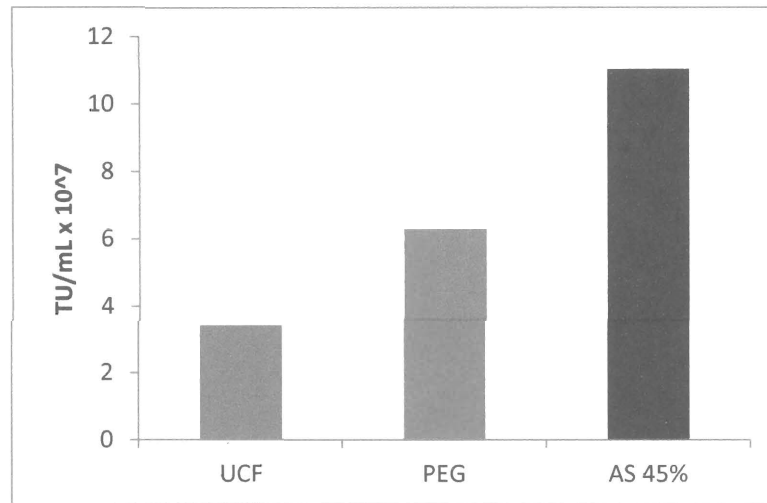


Fig.5. Comparația metodei propuse – precipitare cu sulfat de amoniu (AS45%) cu alte două metode consacrate: UCF (ultracentrifugarea) și PEG (precipitarea cu polietilenglicol). Datele arată că precipitarea cu sulfat de amoniu are un randament mai mare decât precipitarea cu PEG sau ultracentrifugarea.

Concluzie: Se observă că cea mai eficientă metodă de purificare este cea prin precipitare cu 45% sulfat de amoniu (Fig. 5).

Exemplu 2.

Lentivirusul conținând vectorul viral pGreenPuro a fost împachetat cu plasmide de împachetare de generația a 2-a și de generația a 3-a, după schema din figura 3.

Pentru obținerea lentivirusului pGreenPuro cu plasmide de generația a 2-a transfecțiile au fost realizate cu pGreenPuro, pCPRDEnv, pCI-VSVG în raport 4:3:1

Pentru obținerea lentivirusului pGreenPuro cu plasmide de generația a 3-a transfecțiile au fost realizate cu pGreenPuro, pMDL/pRRE, pRSV/Rev, pMD2G în raport 4:2:1:1

Mediul a fost colectat, centrifugat 10min la 400xg la 4°C, filtrat prin filtru de 0.22μm și apoi incubat cu sulfat de amoniu 45%. Particulele virale precipitate au fost centrifugate la 4000 g, 15 min la 4°C, iar sedimentul a fost resuspendat în tampon fosfat salin (PBS) pentru resolubilizarea virusului. Preparatul viral obținut după precipitarea cu sulfat de amoniu a fost ulterior purificat prin ultracentrifugare (100.000 x g, 3h, 4°C) pe pat de sucroză 20%, iar sedimentul reprezentat de virusul pur, a fost resuspendat în 200 μL PBS.

Eficiența preparatului lentiviral de a induce gena pe care o poartă, în cazul de față gena pentru GFP a fost testată prin transducția celulelor HEK93 cu 1 unitate de transducție / celulă. Rezultatele arată că preparatul lentiviral obținut transduce eficient celulele, fără a induce și moartea celulelor transduse (Figura 6). Microscopia de fluorescență arată o bună rată de transducție a celulelor.

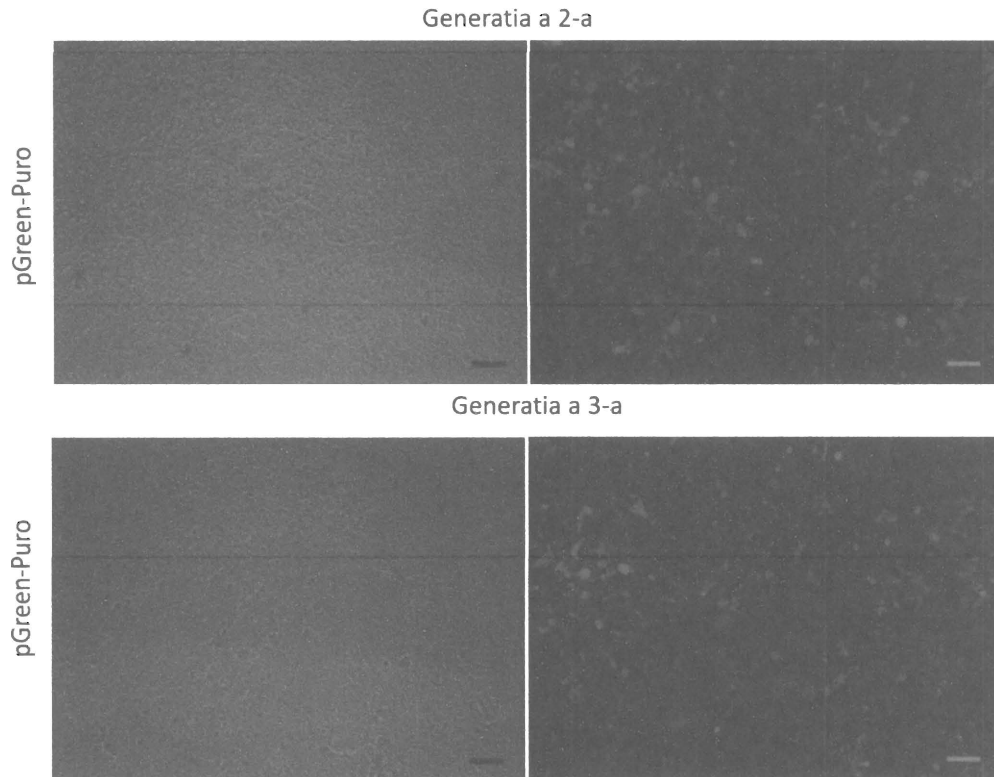


Fig.6. Metodologia de purificare se poate aplica lentivirusurilor de generația 2 sau 3. Datele arată că precipitarea cu sulfat de amoniu este eficientă atât pentru lentivirusurile impachetate cu plasmide de generația a 2-a cât și cu plasmide de generația a 3-a. Microscopie în contrast de fază (Stanga), microscopie de fluorescență (Dreapta) – pentru determinarea expresiei genei de interes- green fluorescent protein (GFP) Bara: 100μm.

REVENDICARI

1. Tehnologia de purificare a lentivirusurilor non-replicative prin precipitare cu sulfat de amoniu, cu păstrarea capacității de transducție *in vitro* și *in vivo*.
2. Precipitarea particulelor lentivirale de generația a2a și a3a cu ajutorul unei soluții de sulfat de amoniu.
3. Utilizarea preparatului lentiviral purificat prin tehnica precipitării cu sulfat de amoniu pentru experimente preclinice *in vitro* sau *in vivo*, pentru inducerea supraexpresiei sau pentru silențierea unor gene.

Referinte:

1. Chen, Y.H.; Keiser, M.S.; Davidson, B.L. Viral Vectors for Gene Transfer. *Curr Protoc Mouse Biol* 2018, 8, e58, doi:10.1002/cpmo.58.
2. Gurumoorthy, N.; Nordin, F.; Tye, G.J.; Wan Kamarul Zaman, W.S.; Ng, M.H. Non-Integrating Lentiviral Vectors in Clinical Applications: A Glance Through. *Biomedicines* 2022, 10, doi:10.3390/biomedicines10010107.
3. Sengupta, R.; Mukherjee, C.; Sarkar, N.; Sun, Z.; Lesnik, J.; Huang, J.; Lu, B. An Optimized Protocol for Packaging Pseudotyped Integrase Defective Lentivirus. *Biol Proced Online* 2016, 18, 14, doi:10.1186/s12575-016-0044-z.
4. Cockrell, A.S.; Kafri, T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol* 2007, 36, 184-204, doi:10.1007/s12033-007-0010-8.
5. Li, M.; Rossi, J.J. Lentiviral vector delivery of siRNA and shRNA encoding genes into cultured and primary hematopoietic cells. *Methods Mol Biol* 2008, 433, 287-299, doi:10.1007/978-1-59745-237-3_18.
6. Christopher, A.C.; Venkatesan, V.; Karuppusamy, K.V.; Srinivasan, S.; Babu, P.; Azhagiri, M.K.K.; Chambayil, K.; Bagchi, A.; Rajendiran, V.; Ravi, N.S., et al. Preferential Expansion of Human CD34(+)CD133(+)CD90(+) Hematopoietic Stem Cells Enhances Gene-Modified Cell Frequency for Gene Therapy. *Hum Gene Ther* 2022, 33, 188-201, doi:10.1089/hum.2021.089.
7. Zhao, J.; Pettigrew, G.J.; Thomas, J.; Vandenberg, J.I.; Delriviere, L.; Bolton, E.M.; Carmichael, A.; Martin, J.L.; Marber, M.S.; Lever, A.M. Lentiviral vectors for delivery of genes into neonatal and adult ventricular cardiac myocytes in vitro and in vivo. *Basic Res Cardiol* 2002, 97, 348-358, doi:10.1007/s00395-002-0360-0.
8. Bellizzi, A.; Ahye, N.; Wollebo, H.S. Lentiviral Transduction of Neuronal Cells. *Methods Mol Biol* 2021, 2311, 155-160, doi:10.1007/978-1-0716-1437-2_11.
9. Sadat Larijani, M.; Ramezani, A.; Mashhadi Abolghasem Shirazi, M.; Bolhassani, A.; Pouriayevali, M.H.; Shahbazi, S.; Sadat, S.M. Evaluation of transduced dendritic cells expressing HIV-1 p24-Nef antigens in HIV-specific cytotoxic T cells induction as a therapeutic candidate vaccine. *Virus Res* 2021, 298, 198403, doi:10.1016/j.virusres.2021.198403.
10. Privolizzi, R.; Chu, W.S.; Tijani, M.; Ng, J. Viral gene therapy for paediatric neurological diseases: progress to clinical reality. *Dev Med Child Neurol* 2021, 63, 1019-1029, doi:10.1111/dmcn.14885.
11. Page, A.; Fusil, F.; Cosset, F.L. Toward Tightly Tuned Gene Expression Following Lentiviral Vector Transduction. *Viruses* 2020, 12, doi:10.3390/v12121427.
12. Okuma, A. Generation of CAR-T Cells by Lentiviral Transduction. *Methods Mol Biol* 2021, 2312, 3-14, doi:10.1007/978-1-0716-1441-9_1.

13. Ku, M.W.; Charneau, P.; Majlessi, L. Use of lentiviral vectors in vaccination. *Expert Rev Vaccines* 2021, 20, 1571-1586, doi:10.1080/14760584.2021.1988854.
14. Houghton, B.C.; Booth, C. Gene Therapy for Primary Immunodeficiency. *Hemasphere* 2021, 5, e509, doi:10.1097/hs9.0000000000000509.
15. Ouyang, W.; Dong, G.; Zhao, W.; Li, J.; Zhou, Z.; Yang, G.; Liu, R.; Li, Y.; Zhang, Q.; Du, X., et al. Restoration of β -Globin Expression with Optimally Designed Lentiviral Vector for β -Thalassemia Treatment in Chinese Patients. *Hum Gene Ther* 2021, 32, 481-494, doi:10.1089/hum.2020.204.
16. Drysdale, C.M.; Nassehi, T.; Gamer, J.; Yapundich, M.; Tisdale, J.F.; Uchida, N. Hematopoietic-Stem-Cell-Targeted Gene-Addition and Gene-Editing Strategies for β -hemoglobinopathies. *Cell Stem Cell* 2021, 28, 191-208, doi:10.1016/j.stem.2021.01.001.
17. Milone, M.C.; O'Doherty, U. Clinical use of lentiviral vectors. *Leukemia* 2018, 32, 1529-1541, doi:10.1038/s41375-018-0106-0.
18. Gouvarchin Ghaleh, H.E.; Bolandian, M.; Dorostkar, R.; Jafari, A.; Pour, M.F. Concise review on optimized methods in production and transduction of lentiviral vectors in order to facilitate immunotherapy and gene therapy. *Biomed Pharmacother* 2020, 128, 110276, doi:10.1016/j.biopha.2020.110276.
19. Baekelandt, V.; Eggermont, K.; Michiels, M.; Nuttin, B.; Debyser, Z. Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther* 2003, 10, 1933-1940, doi:10.1038/sj.gt.3302094.
20. Wang, X.; Olszewska, M.; Qu, J.; Wasielewska, T.; Bartido, S.; Hermetet, G.; Sadelain, M.; Riviere, I. Large-scale clinical-grade retroviral vector production in a fixed-bed bioreactor. *J Immunother* 2015, 38, 127-135, doi:10.1097/CJI.0000000000000072.
21. Adenovirus containing murine FasL mini-gene for induction of the functional FasL expression in transduced cells – M.Dumitrescu, V.G.Truscă, A. Burlacu, M.Simionescu, N. Askenasy, A.V. Gafencu – brevet OSIM A/00512/26.08.2019
22. Dumitrescu M, Trusca VG, Savu L, Stancu IG, Ratiu AC, Simionescu M, Gafencu AV. Adenovirus-Mediated FasL Minigene Transfer Endows Transduced Cells with Killer Potential. *Int J Mol Sci.* 2020 Aug 20;21(17):6011. doi: 10.3390/ijms21176011.
23. Dumitrescu M, Trusca VG, Fenyó IM, Gafencu AV. An Efficient Method for Adenovirus Production. *J Vis Exp.* 2021 Jun 10;(172). doi: 10.3791/61691.

REVENDICARI

1. Tehnologia de purificare a lentivirusurilor non-replicative prin precipitare cu sulfat de amoniu, cu păstrarea capacității de transducție in vitro și in vivo.
2. Precipitarea particulelor lentivirale de generația a2a și a3a cu ajutorul unei soluții de sulfat de amoniu.
3. Utilizarea preparatului lentiviral purificat prin tehnica precipitării cu sulfat de amoniu pentru experimente preclinice in vitro sau in vivo, pentru inducerea supraexpresiei sau pentru silențierea unor gene.