

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[ 51 ] Int. Cl<sup>7</sup>

A01N 63/00

A61K 48/00 C12N 15/63

C12N 5/06 C12N 5/08



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02817487.9

[43] 公开日 2004 年 12 月 1 日

[11] 公开号 CN 1551728A

[22] 申请日 2002.7.10 [21] 申请号 02817487.9

[30] 优先权

[32] 2001.7.10 [33] US [31] 60/304,283

[32] 2001.10.22 [33] US [31] 60/343,392

[86] 国际申请 PCT/US2002/021713 2002.7.10

[87] 国际公布 WO2003/006612 英 2003.1.23

[85] 进入国家阶段日期 2004.3.8

[71] 申请人 J&J 研究控股有限公司

地址 澳大利亚新南威尔士

[72] 发明人 G·西蒙子 J·莫里 G·凡宁

J·麦克弗森 S·庞德

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 周承泽

权利要求书 3 页 说明书 22 页 序列表 3 页  
附图 5 页

[54] 发明名称 转导造血祖细胞的生成

[57] 摘要

本发明涉及将含外源核酸的造血祖细胞导入患者的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种将含外源核酸的造血祖 (HP) 细胞导入受试者的方法, 其特征在于, 所述方法包括步骤:

- 5       a) 从受试者获得含 CD34+HP 细胞的细胞样品;
- b) 浓缩 HP 细胞以提供含至少 40% HP 细胞的细胞群;
- c) 将含外源核酸产物的载体导入细胞群, 其中, 外源核酸产物能在所述 HP 细胞中表达且细胞进一步在体外培养;
- d) 确定这种含源核酸产物的 HP 细胞数量, 从而在传递给第二个或相同受试者
- 10   时, 第二个或相同受试者接受的剂量为, 每千克体重的总细胞群为  $1.63 \times 10^6$  个 CD34+HP 细胞, 其中每千克体重至少有  $0.52 \times 10^6$  个包含基因的 CD34+HP 细胞。
- e) 将上述剂量导入受试者。

2. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 骨髓移植后, 在受试者的骨髓中有至少 10% 含外源核酸的 HP 细胞

- 15       3. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 含外源核酸的细胞数小于每千克体重  $0.52 \times 10^6$  个包含基因的 CD34+HP, 随后冷冻细胞并重复权利要求 1 所述的方法, 或加入一次或更多转移和/或单采血液成分 (aphereses) 步骤直到 HP 细胞数为每千克体重至少  $0.52 \times 10^6$  个包含基因的 CD34+HP 细胞。

4. 一种用权利要求 1 所述方法制造的遗传修饰的 CD34+HP 细胞群。

- 20       5. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 传递给第二个或相同受试者的含外源核酸的 CD34+HP 数至少为每千克体重  $1 \times 10^7$  个细胞。

6. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 传递给第二个或相同受试者的含外源核酸的 CD34+HP 数至少为每千克体重  $2 \times 10^7$  个细胞。

- 25       7. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 传递给第二个或相同受试者的含外源核酸的 CD34+HP 数至少为每千克体重  $4 \times 10^7$  个细胞。

8. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 传递给第二个或相同受试者的含外源核酸的 CD34+HP 数至少为每千克体重  $8 \times 10^7$  个细胞。

9. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 传递给第二个或相同受试者的含外源核酸的 CD34+HP 数至少为每千克体重  $10 \times 10^7$  个细胞。

- 30       10. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 含外源核酸的 CD34+HP 细胞产生含外源核酸的后代淋巴和骨髓细胞, 所述后代细胞在导入步骤后至少 1 年在个人体

内可测。

11. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 权利要求 1 所述方法产生的嵌合造血系统包括导入步骤 4 年内任何外周血细胞类型中至少有 0.01% 含外源核酸的细胞。

5        12. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内任何外周血细胞类型中至少有 0.1% 含外源核酸的细胞。

13. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内任何外周血细胞类型中至少有 1% 含外源核酸的细胞。

10       14. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内任何外周血细胞类型中至少有 10% 含外源核酸的细胞。

15. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内任何外周血细胞类型中至少有 20% 含外源核酸的细胞。

16. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内任何外周血细胞类型中至少有 50% 含外源核酸的细胞。

15       17. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内在骨髓活组织切片中至少有 0.01% 含外源核酸的细胞。

18. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内在取出的骨髓活组织切片中至少有 0.1% 含外源核酸的细胞。

20       19. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内在取出的骨髓活组织切片中至少有 1% 含外源核酸的细胞。

20. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内在取出的骨髓活组织切片中至少有 10% 含外源核酸的细胞。

21. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内在取出的骨髓活组织切片中至少有 20% 含外源核酸的细胞。

25       22. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法产生嵌合造血系统, 该系统在处理 4 年内在取出的骨髓活组织切片中至少有 50% 含外源核酸的细胞。

23. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 骨髓切除步骤不在患者上进行。

24. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述方法用于将抗病毒治疗导入患者。

30       25. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述抗病毒治疗是抗 HIV 治疗。

26. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述抗 HIV 治疗是核酶治疗。

27. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于, 所述核酶治疗包括使用 RRz2 核酶。

28. 如权利要求 1-11 所述的核酶 RRz2 作为抗 HIV 基因治疗的应用。

29. 其它抗 HIV 核酶本身或与 RRz2 的组合物在权利要求 1-11 所述方法中的应用。

5       30. 如权利要求 25 所述的方法, 其特征在于, 所述抗 HIV 治疗是反义治疗, 使用 RNA 诱杀、胞内抗体或干扰性 RNA。

31. 使用定量实时 PCR 来确定含外源核酸片断或外源核酸片断转录产物的 CD34+HP 细胞的百分比。

32. 使用 DzyNA PCR 来确定外周血、淋巴和骨髓细胞的百分比, 所述细胞含有  
10       权利要求 1-11 所述方法中任一项所述的抗病毒构建物。

33. 使用 DzyNA PCR 来确定外周血、淋巴和骨髓细胞的百分比, 所述细胞表达  
      权利要求 1-11 所述方法中任一项所述的 RRz2 基因构建物。

34. 如权利要求 1-11 所述的方法, 其特征在于, 所述方法被重复直到至少一种  
      取自受试者的骨髓样品含有至少 10% CD34+HP 细胞。

15       35. HIV 感染受试者的治疗方法, 其特征在于, 所述方法包括将权利要求 1 所述  
      的方法与至少一种其它抗 HIV 疗法联合进行。

## 转导造血祖细胞的生成

5      发明领域

本发明涉及基因治疗，具体应用于造血祖(HP)细胞。更具体的是，本发明涉及生成富含转导 HP 细胞的集合以传递给人类受试者来获得所需治疗效果，发明还涉及产生和使用丰富的转导 HP 细胞集合的方法。

10      发明背景

出于本发明的目的，基因治疗指将重组 DNA 序列仔细地导入具体细胞类型用于治疗。基因治疗可包括所需基因的导入或使用其它核酸构建物使异常表达的基因失活。例如基因治疗可针对多种有遗传缺陷的疾病。

一些研究者建议和试验了多种基因治疗方法，在组织培养中用新的抗人免疫缺陷病毒剂。这些方法包括胞内表达反式显性蛋白质(Smythe 等，1994)、胞内抗体(Marasco 等，1998)、反义核糖核酸(RNA)(Sczakiel 等，1991)、病毒诱杀(Kohn 等，1999)和催化核酶(Sarver 等，1990; Sun 等，1994, Sun 等 1996)。

核酶是小的催化 RNA 部分，能裂解具体 RNA 靶分子，包括例如 HIV-1 和其它 HIV 株。例如针对 HIV-1 的核酶可干扰 HIV-1 复制，这是通过干扰 HIV-1 生活周期的一些步骤包括(i)最近被感染细胞中的基因组病毒 RNA 生成(反转录前)和(ii)翻译前或基因组 DNA 包装前从前病毒转录的病毒 RNA 的生成(Sarver 等，1990; Sun 等，1994; Sun 等，1996; Sun 等，1998)。一般认为核酶比以反义为基础的治疗更有效，因为核酶是催化分子，其中单个催化核酶能结合和裂解细胞中多种 RNA 底物分子(Sarver 等，1990; Sun 等，1994; Sun 等 1996)。

25      核酶裂解的要求是 RNA 的可到达区域，在锤头状核酶的情况中需要 GUX 靶基序(其中 G 是鸟苷且 X 是 A、C 或 U 核糖核苷酸；在某些情况中 NUX 可能足够(其中 N 是任何核糖核苷酸且 X 是 A、C 或 U 核糖核苷酸)。不象一些其它抗病毒治疗，催化 RNAs 不能引起免疫应答。表达催化 RNAs 的不需要免疫应答可导致含外源基因的细胞的去除。

30      一些研究证明试管反应中的核酶裂解活性以及组织培养系统中抗实验室和临床 HIV-1 分离物的保护性效果(Sarver 等，1990; Sun 等，1994; Sun 等 1996; Sun

等 1998; Wanger 等, 1998)。这些研究使用锤头或发夹状核酶; 例如表示为 Rz2 的锤头状核酶针对 *tat* 基因的高度保守区域(图 1)。*tat* 基因对 HIV-1 复制是必需的; 它编码和生成 Tat 蛋白, Tat 蛋白是整合 HIV 前病毒的转录活化剂。Rz2 核酶包含互补杂合和靶序列, 包括参考株 HIV-HXB2(Genbank 登录号 K03455)的核苷酸  
5 5833-5849(GGAGCCAGUAGA UCCUA, SEQ ID NO:1)并可类似地靶向 HIV IIIB(Genbank 登录号 X01762)的核苷酸 5865 到 5881(GGAGCCAGUAGA UCCUA, SEQ ID NO:1)。在这些研究中 Rz2 核酶序列 5'-TTA GGA TCC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACT GGC TC-3', SEQ ID NO:2 作为 DNA 插入质粒 pLNL6 的 *neo<sup>R</sup>* 基因的 3' 未翻译区, pLNL6 含不能复制的逆转录病毒载体 LNL6(Bender 等, 1987; Genbank 登录号 M63653 并见下文的定义)  
10 以产生新的病毒 RRz2。核酶序列在 RRz2 中从莫洛尼氏白血病毒(MoMLV)长末端重复序列(LTR)表达为 *neo<sup>R</sup>*-核酶融合转录本。使用此病毒在体外成功地裂解 HIV 感染细胞。

将治疗基因活体外导入 CD34+多能造血祖细胞对于治疗 HIV-1 感染是一种具有吸引力的可能性, 因为这些祖细胞可从更成熟的造血细胞中分离(CD34+抗原是膜-  
15 结合 115Kd 分子, 存在于能产生多谱系集落形成细胞的细胞上, 但在更成熟的造血细胞上缺乏(Baum 等, 1992))且能相对迅速地重新构成淋巴(CD4+和 CD8+T 淋巴细胞)和骨髓(单核细胞/巨噬细胞)造血(Levinsky 1989; Schwartzberg 等, 1992)。造血祖(HP)细胞分化并成熟产生通过中间祖细胞提高多种谱系成熟的细胞。HIV/AIDS 感染中的关键细胞是 CD4+ T 淋巴细胞和单核细胞/巨噬细胞。尽管需要  
20 时间重新构成, 单个 CD34+HP 细胞理论上能重新构成完整的造血系统, 系统由多种谱系中不同成熟阶段的细胞组成。从实践上看, 不知道转导 HP 细胞的最佳数量, 这些细胞能有效重形成有基因修饰细胞群的造血系统并能对疾病产生作用。

用 RRz2 通过将构建物导入 CD4+(Cooper 等, 1999)或 CD34+(Amado 等, 1999)细胞来进行两阶段 I 临床试验。在各个这些试验中, 约一半的各相关细胞群(CD4+或  
25 CD34+)用 LNL6 转导且另外约一半用 RRz2 转导, 接着混合细胞并用与本文所述不同的方法重灌注。在 CD4+试验中, 含淋巴细胞的 RRz2 从 HIV 阴性供体中取出, 活体外转导并导入遗传相同的双胞胎(Cooper 等, 1999)。

在 CD34+试验中, 将 RRz2 活体外导入 CD34+细胞且将这些细胞灌注到相同患者中, 显示这是技术上可行和安全的且导致核酶构建物在外周血淋巴和骨髓细胞中存在和表达。研究的目的是至少部分在 HIV 感染个体中提供细胞, 至少部分保护个体  
30 不受 HIV 感染和 HIV-1 胞内复制。研究证明 CD34+试验中含 RRz2 的淋巴细胞相对

含 LNL6 的淋巴细胞优先存活。与本发明不同, 用较低的各患者平均返回细胞数进行阶段 I HP 试验且使用低于本发明的转导效率。改为建立阶段 I 试验以评估活体外方法的能力和安全性且确定这些转导细胞的造血细胞后裔在患者中存在(持续)长度。已知 CD34+细胞有大的重新构成和重进入的潜力, 有证据表明 CD34+细胞不直接被 HIV 感染。本发明部分涉及鉴定治疗相关水平的转导 CD34+细胞以提供目前患者中被保护细胞来源, 从而对疾病发展产生作用。

为对疾病发展产生作用, 不仅用于 HIV 感染也用于涉及造血系统细胞的其它疾病, 需要确定和尽可能最大化转导 HP 细胞的数量以产生足够数量的遗传修饰淋巴和骨髓细胞前体, 这些细胞在合理时间内生成遗传修饰的成熟淋巴和骨髓细胞。

本发明者认为为对有活体外转导遗传修饰 HP 细胞的患者产生益处, 必须使受体患者接受足够数量的转导 HP 细胞以产生嵌合造血系统, 此系统生成充分的核酶-包含成熟淋巴(CD4+和 CD8+T 淋巴细胞)和骨髓(单核细胞/巨噬细胞)细胞以对病毒感染和/或疾病发展产生作用。对于任何病毒或非病毒疾病也是如此, 其中需要遗传修饰的 HP 细胞或更多造血谱系的成熟祖细胞。在这些疾病中, HP 细胞被相同的分离、加工并转导以产生含基因的后代, 后代可重导入患者并可随后被建立或移植到该患者骨髓中。因此本发明针对确定、获得和制备所需治疗剂量的丰富 HP 细胞集合, 细胞用治疗基因转导以传递给患者, 此丰富的集合获得自 HP 细胞包括 CD34+细胞。基本原理是这些转导 HP 细胞会产生含治疗基因的成熟淋巴和骨髓细胞。

## 附图简述

图 1 提供了 HIV-1 基因组内核酶靶位点的位置。图 1A 提供了 HIV-1 基因组的示意图, 显示复制、调节和辅助基因的位置; 图 1B 提供了与 *tat* 基因内互补靶和杂合序列一起的优选核酶序列。靶 GUA 切割位点为环状; 图 1C 提供了编码 Tat 和 Vpr 蛋白的基因中 GUA 靶序列的位置。

图 2 是本发明示范步骤的流程图。优选的是, 此例子中的步骤以所示连续的方式完成。

图 3 阐明了实时定量 PCR 的原理, 在此情况中 DzyNA PCR 用于确定含基因和表达基因的细胞的百分比。图 3A 是 DzyNA PCR 检测方法示意图且图 3B 显示定量的方法。

图 4 阐明了从 CD34+HP 细胞中生成 CD4+ T 淋巴细胞的数学模型。考虑的参数是 T 淋巴细胞前体离开骨髓、在胸腺内通过选择机制穿过、并作为幼稚细胞(N)输

出进入外周血的速度。这需要估计不同年龄个体的胸腺输出，因为已知胸腺随着年龄和其相应 CD4+ T 淋巴细胞输出减少而退化 (Sempowski 等, 2000)。一旦在周围建立幼稚细胞，含 T 淋巴细胞的基因的存活和扩增取决于天然稳态机制。调节 T 细胞数量的天然机制描述于图中，它们包括过程 (1)–(4)，这些过程是下列 CD4+ T 淋巴细胞发展的方面：从胸腺输出新幼稚细胞 (1)；活化幼稚细胞 (2) 和记忆细胞以产生活化细胞，一些回复记忆表型 (3)；记忆细胞回复成幼稚表型 (4)。

图 5 阐明了骨髓中从 CD34+HP 细胞生成巨噬细胞的数学模型。

图 6 阐明了在存在 HIV-1 感染时从 CD34+HP 细胞中生成 CD4+ T 淋巴细胞的数学模型。考虑的参数是含 RRz2 (或其它抗 HIV 基因) 的 T 淋巴细胞前体离开骨髓、在胸腺内通过选择机制穿过、并作为幼稚细胞 (N) 输出进入外周血的速度。这需要估计不同年龄个体的胸腺输出，因为已知胸腺随着年龄和其相应 CD4+ T 淋巴细胞输出减少而退化 (Sempowski 等, 2000)。一旦在周围建立幼稚细胞，含 RRz2 的 T 淋巴细胞的存活和扩增取决于天然稳态机制和 HIV 改变这些机制时此类细胞对 RRz2-CD4+ T 淋巴细胞的潜在选择优势。调节 T 细胞数量的天然机制描述于图左侧，它们包括过程 (1)–(4)，这些过程是 CD4+ T 淋巴细胞发展的方面，详述于图 3 涉及的内容。

除了胸腺输出，通过抗原活化和扩增到记忆 T 淋巴细胞中使含 RRz2 的 CD4+ T 淋巴细胞数量增加。本发明的模型结合此记忆 T 淋巴细胞扩增程度的估计。HIV 感染时，开始发生图右侧部分 (过程 (5) 到 (7))。活化细胞为病毒感染 (5, 7)；这些依次产生完成感染周期的新病毒 (6)。这些机制包括在模型中。此外，模型可改变一些天然过程如由于 HIV 存在使幼稚和记忆细胞 (2, 3) 活化增加。

图 7 阐明了在存在 HIV-1 感染时从 CD34+HP 细胞中生成巨噬细胞的数学模型。模型的基础是被感染的单核细胞和巨噬细胞在使用抗逆转录病毒治疗中对维持感染发挥重要作用且不使用抗逆转录病毒治疗时这些细胞对正发生的感染起显著作用。评估此感染成分作用的模型在这里被发展并结合一些 Zack 等, 1990 和 Murray 等, 2001 的假设。本模型在未处理和处理的血清诊断中检测 HIV-1 RNA 和 HIV-1 DNA。考虑未整合 HIV-1 DNA 的不稳定性质并包括潜伏感染的 CD4+ T 淋巴细胞和感染的巨噬细胞。通过与长时间存活的被感染巨噬细胞  $M$  相互作用，模型包括未整合形式的感染，有缺陷的  $L_d$  和活性  $L_a$ 。有整合 HIV-1 DNA  $L_i$  的潜伏感染细胞来自活性未整合 HIV-1 DNA  $L_a$ ，HIV-1 DNA 分子被整合。产生的感染细胞  $P$  来自被游离病毒  $V$  感染的活化细胞，有整合 HIV-1 DNA 的潜伏感染细胞被活化，穿过在与被感染巨噬细胞



胞相互作用过程中活化的细胞。巨噬细胞通过与被感染巨噬细胞接触而受感染。

### 发明概述

在本发明的一方面，发明通过数学模型涉及遗传工程 HP 细胞最小起始数的鉴定，在转导和重灌注后有助于确保大部分如果不是全部造血系统，重新有多种血细胞谱系的遗传修饰细胞，使基因修饰细胞有治疗效果。

此外，发明涉及获得治疗性的包含基因的造血祖 (HP) 细胞最小起始数的方法。除了洗涤细胞步骤，方法包括：使 HP 细胞从骨髓转移到患者的外周血区室；单采血液成分术血液以获得单核细胞部分；用 CD34 抗原或造血除尽的抗原来纯化 HP 细胞群；将 HP 细胞转移到组织培养；细胞因子/生长因子的活化和培养；逆转录病毒转导；随后的细胞培养；收集；重灌注入患者。发明进一步使用模型以定量测量转导 HP 细胞和定量测量个体中含基因的后代细胞。后者提供了监控造血系统中基因-修饰嵌合性程度的方法，它指示可能的治疗效果。

### 发明详述

术语“造血祖 (HP) 细胞”指多能和体内连续产生造血系统多种谱系的造血细胞。

术语“CD34+细胞”指表面有 CD34+抗原的细胞。它们是造血祖细胞的亚类。

短语“CD34+细胞的纯度”指任何 CD34+抗原阳性的群体中细胞的百分比。

术语“外源核酸产物”指导入细胞的可表达核酸片断，优选的是导入细胞时有治疗效果的片断，抗病毒效果优选。同样优选的是非细胞天然的片断。此产物可包括但不限于编码蛋白质的基因，包括抗体、反义分子、核酶，或其它能通过细胞介质内转录或转录和翻译产生的产物。

术语“LNL6”指获得自莫洛尼氏白血病毒的鼠逆转录病毒载体，它的复制基因被删去且插入新霉素磷酸转移酶(*neo<sup>r</sup>*)基因(Bender 等, 1987)。载体以逆转录病毒质粒 pLNL6 为基础，质粒包含不能复制的逆转录病毒载体 LNL6 (Genbank 登录号 M63653)。

术语“Rz2”指靶向 *tat* 基因高度保守区域的抗 HIV 锤头状核酶。Rz2 核酶序列的 DNA 形式是 5' -TTA GGA TCC TGA TGA GTC CGT GAG GAC GAA ACT GGC TC-3'，SEQ ID NO:3 且 RNA 形式是 5' -UUA GGA UCC UGA UGA GUC CGU GAG GAC GAA ACU GGC UC-3'，SEQ ID NO:4。

术语“RRz2”指由 LNL6 组成的逆转录病毒载体，LNL6 有 Rz2 插入 *neo<sup>r</sup>* 的 3' 末

翻译区域。

术语“DzyNA”指实时定量 PCR 检测和 DNA 或 RNA 定量的方法，如描述于美国专利 6,140,055 和美国专利 6,201,113。

术语“转导”指将基因导入细胞和随后在该细胞表达此基因。

- 5 在第一个方面，本发明提供剂量确定和制备细胞的方法，细胞含传递给受试者的外源治疗基因。为确定提高给予患者的 HP 细胞剂量的效果，建立了独特的数学模拟。这些模拟用于预测基因-转导的 HP 细胞方法是否能对成熟 T 淋巴和单核细胞/巨噬细胞后代细胞群产生临床相关的效果。

- 10 数学模型用于确定两个细胞群的动力学；i) CD4+T 淋巴细胞和 ii) 与后代组织巨噬细胞一起的单核细胞。由于细胞特征由不同的细胞生长、成熟和死亡参数表现，分别建立各细胞类型的模型。例如，确定含 Rz2 的群体引起的病毒量减少，在 CD4+T 淋巴细胞的情况下，评估 HIV 存在时 CD4+T 淋巴细胞群被维持/增加的程度。

- 数学模拟至少部分以公布的微分方程为基础 (Murray 等, 1988, Haase, 1996)，方程描述了：(i) T 淋巴细胞群随着时间的生长，作为个体年龄和胸腺质量的函数；  
15 (ii) 响应抗原的幼稚 T 淋巴细胞的活化和增殖；(iii) 单核细胞/巨噬细胞的生成。

- 这些模拟表明将 HP 细胞剂量增加到最小起始水平可使含基因的 CD4+T 淋巴细胞和单核细胞/巨噬细胞数量增加。结果表明当转导的 CD34+细胞的百分比超过剩余 HP 细胞 10%，更优选是超过剩余 HP 细胞 20%时，这会对病毒负荷和 CD4+细胞数起作用。此外，只有分开建立淋巴细胞和巨噬细胞的模型，模型可预测能观察到巨  
20 噬细胞中抗病毒效果的条件。巨噬细胞中的抗病毒效果对于使受试者中的 HIV 病毒储存减少是重要的。

在第二个方面，本发明提供了生成和传递相同百分比细胞的方法，细胞含治疗基因。此方法包括：

- (a) 从受试者获得含 CD34+HP 细胞的细胞样品；  
25 (b) 浓缩 HP 细胞以提供含至少 40% HP 细胞的细胞群；  
(c) 将含外源核酸产物的载体导入细胞群，其中，外源核酸产物能在所述 HP 细胞中表达且细胞进一步在体外培养；  
(d) 确定这种含源核酸产物的 HP 细胞数量，从而在传递给同一个或另一个受试者时，同一个或另一个受试者接受的剂量为，每千克体重的总细胞群为  $1.63 \times 10^6$   
30 个 CD34+HP 细胞，其中每千克体重至少有  $0.52 \times 10^6$  个包含基因的 CD34+HP 细胞。

优选的是，含基因的 HP 细胞数量能在此方法后约 1-3 个月间观察到受试者骨

髓中至少 10%含基因的 HP 细胞。模型预测如果此含基因的 HP 细胞量存在于骨髓中，可观察到治疗效果如抗病毒效果。更优选的是，含基因的 CD34+HP 细胞生成含基因的后代淋巴和骨髓细胞，导入步骤后至少 1 年可在个体体内检测到后代细胞。而更优选的是，由此方法产生的嵌合造血系统包括导入步骤后 4 年内任何外周血细胞类型中至少 0.01%、0.1%、1.0%、10%和更优选的 20%及更加优选的 50%含基因的细胞。此外，由此方法产生的嵌合造血系统包括导入步骤后 4 年内所获骨髓样品中至少 0.01%、0.1%、1.0%、10%和更优选的 20%及更加优选的 50%含基因的细胞。

因此发明也涉及方法预测是否能观察到受试者中病毒负荷减少，包括上述方法步骤和下列的移植(即细胞在骨髓中建立的时间)，骨髓中有至少 10%含基因的 HP 细胞。此外，在本发明另一个较佳实施方案中，如果含基因和/或不含基因的 HP 细胞数量少于导入受试者的优选数量，随后细胞被冷冻并进行一次或更多另外的转移和单采血液成分(aphereses)直到收集的 HP 细胞数量(含和不含基因)至少是上面步骤(d)中提供的量。

优选的是，所得细胞集合包括足够的包含基因的 CD34+HP 细胞，从而传递给所述受试者时，受试者接受每千克受试者体重至少  $5 \times 10^6$  个，优选超过  $1 \times 10^7$  或  $2 \times 10^7$  个 CD34+HP 细胞，更优选超过  $4 \times 10^7$  或  $5 \times 10^7$  个包含基因的 CD34+HP 细胞，再优选的是每千克受试者体重超过  $8 \times 10^7$  或至少  $10 \times 10^7$  个包含基因的 CD34+HP 细胞。

优选的是，所得细胞集合传递给所述受试者时，受试者接受的细胞总量(即包含治疗基因的 HP 细胞和所得细胞集合中存在的所有其它细胞)为至少每千克受试者体重  $1 \times 10^7$  到  $4 \times 10^7$  个，或更优选的是高至每千克  $10 \times 10^7$  个细胞或更多。

从受试者中“收集”的细胞群可通过任何本领域熟知的方法获得。例如，可治疗患者使 HP 细胞从骨髓转移到外周血，如通过施用适当量的细胞因子，包括但不限于加入聚乙二醇的粒细胞-集落刺激因子、pegG-CSF、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和更优选的 G-CSF，接着单采血液成分术过滤。另外，HP 细胞可根据熟知的技术从骨髓或脐带血中吸出。

处理收集的细胞群优选包括一个或更多洗涤步骤(如用离心或自动化细胞洗涤机和/或去体积步骤(即去除过多的红血细胞、粒细胞、血小板、T 淋巴细胞)。优选的是，去体积步骤用装置进行入 Dendreon DACS 系统(Charter Medical, Winston Salem, NC)，更优选的是包括 HP 细胞选择步骤。HP 细胞选择可通过免疫亲和或流式细胞仪技术完成。优选的是，HP 细胞选择步骤选择 CD34+细胞或在另一个实施方案中可包括成熟/定型造血细胞的抗原消耗，从而富集细胞群用于 HP 细胞。HP 细

胞选择步骤可用多种选择装置进行, 例如但不限于 Nexell/Baxter Isolex 300I(Irvine, CA)、Miltenyi CliniMACS(Miltenyi; Biotech GmbH, Bergisch Gladbach, 德国)、干细胞技术(Vancouver, BC, 加拿大)StemSep 装置。

5 处理收集的细胞群也包括细胞培养步骤以增加细胞数量并具体增加所选 HP 细胞的数量。也需要细胞培养以将治疗基因导入细胞且细胞培养可在导入治疗基因后使用以促进基因整合和基因构建物的表达并优选扩增这种含基因的 HP 细胞数量。

初始的处理步骤(转移、单采血液成分术、HP 选择)导致获得和富集 HP 细胞。确定 HP 细胞的百分比需要这些细胞的可测量方面如 CD34 抗原阳性。要理解的是活体外处理细胞集合优选包括至少 20%、更优选的至少 40%、更加优选的至少 60%和最优选的至少 80%HP 细胞。

10 将治疗基因或核酸导入至少一部分 HP 细胞可用本领域多种熟知的方法或其它方法完成。在一个较佳实施方案中, 导入步骤采用转导, 使用逆转录病毒载体或其它病毒或非病毒(DNA 或 RNA)载体, 载体携带治疗基因或核酸序列。使用转导时, 转导促进剂(如用于逆转录病毒载体, 称为 RetroNectin 的纤连蛋白 CH296 片断或其它试剂如聚凝胺或硫酸鱼精蛋白)优先使用。含治疗基因或核酸序列的 HP 细胞和由此获得的细胞(即来自随后的淋巴和骨髓造血)包含且能优先表达治疗基因或核酸序列, 其中治疗基因用于细胞表达。

20 导入 HP 细胞的治疗核酸可编码产物, 例如但不限于蛋白质(如反式显性蛋白质和胞内抗体)、反义 RNA、适体、干扰性 RNA 和 HIV/AIDS 中的催化核酶以及这些或其它基因如其它疾病中的肿瘤抑制基因。

25 细胞可根据常规方法如细胞灌注传递给受试者。细胞可用药理学上可接受缓冲液、盐类等与药理学上可接受载体一起传递(如 5%的人血清白蛋白)。受试者可或可不先(即重灌注细胞前)接受定义为骨髓切除或其它造血调节安排。然而, 在一种用于移植本发明转导 HP 细胞群的优选方法中, 本发明的重要益处是受试者不接受骨髓切除手术(即完全或几乎完全破坏骨髓)或其它造血调节安排。这些不用骨髓切除而产生转导和移植 HP 细胞群方法的益处是包括但不限于化疗或放射治疗的骨髓切除过程对接受过程的受试者有毒、使其能量耗尽且虚弱。

30 本发明方法可结合其它治疗, 包括例如其它抗病毒治疗。其它抗病毒治疗包括如使用 RNA 诱杀、胞内抗体、干扰性 RNA(Sharp, P. A. (2001), RNA 干扰(RNA interference), 2001, Gene&Dev 15:485-490)等。例如, 该方法针对抗 HIV 治疗的使用如核酶-类型治疗, 可使用其它抗病毒或具体抗 HIV 治疗。使用核酶-类型治疗

时,可传递大于一种的催化核酶给细胞或者不同核酶可传递给最初取自患者的样品中的不同细胞。类似的,此方法可结合其它不需要 HP 细胞转导的基因治疗,如本领域已知的标准化疗和蛋白质技术。关于治疗感染 HIV 患者的一个例子是结合本发明方法和标准药物用于 HIV,具体是检测到 HIV 抗性或证明其它抗 HIV 治疗难控制受试者中的 HIV 感染。

预期本发明是导入含外源基因的造血系统细胞的一般方法,发明仅针对例如 HIV 的抗病毒基因治疗。在此方法中,富集从 HIV 阳性受试者中收集的细胞用于 HP 细胞且治疗基因编码抗 HIV 产物。

因此,在第三个方面,本发明确定剂量和制备 HP 细胞,优选是 CD34<sup>+</sup>细胞,包含编码抗 HIV 产物的基因传递给 HIV 阳性受试者以持续获得抗病毒治疗效果。预期核酶是本发明的较佳实施方案,可使用其它编码基因的抗病毒产物,例如但不限于反义 RNA、干扰性 RNA 等。

如上所示,考虑以公布的微分方程为基础的确定的数学模拟(Murray 等, 1988, Haase, 1996)和本发明所用数学模拟用于 HIV 感染:

- i) T 淋巴细胞随着时间的生长,作为个体年龄和胸腺质量的函数;
- ii) 响应抗原的幼稚 T 淋巴细胞的活化和增殖;
- iii) CD4<sup>+</sup>细胞随着 HIV 感染进程减少;
- iv) 单核细胞/巨噬细胞的生成。

用数学模拟研究确定 CD34<sup>+</sup>细胞剂量增加的效果,数学模拟提供理论方法评估转导 RRz2 的 CD34<sup>+</sup>细胞方法是否会对 HIV 患者中 CD4<sup>+</sup>细胞数和病毒负荷产生临床相关的效果。这些模拟预测 CD34<sup>+</sup>细胞剂量增加会产生含 RRz2 的 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞和单核细胞/巨噬细胞,这些细胞对 CD4<sup>+</sup>T 淋巴细胞数和 HIV 病毒负荷产生作用。以这些模拟为基础,我们阐述了确定和最大化导入的转导 HP 细胞数量的方法。转导的 CD34<sup>+</sup>细胞剂量对前面阶段 I 试验中所用最高剂量增加至少 2-10 倍。此剂量通过所述方法达到。

因此传递抗 HIV 产物的方法包括:

- (i) 从所述受试者中获得可存活细胞群,包括 HP 细胞,优选 CD34<sup>+</sup>细胞;
- (ii) 治疗和/或培养所述细胞群以提供细胞集合,细胞集合包括至少 20%CD34<sup>+</sup>细胞;
- (iii) 将至少一个治疗基因导入所述细胞集合中的 CD34<sup>+</sup>细胞群,从而所述治疗基因能在所述 CD34<sup>+</sup>细胞中表达;其中制备了所得细胞的集合,细胞集合包括含治

疗基因的 CD34+细胞, 传递给所述受试者后, 受试者接受的剂量为每千克体重至少  $0.52 \times 10^6$  个含治疗基因的 HP 细胞。

优选的是, 制备所得可存活细胞集合, 细胞集合包括含治疗基因的 CD34+HP 细胞, 传递给所述受试者后, 受试者接受的剂量为每千克体重至少  $5 \times 10^6$  个, 优选  
5 超过  $2 \times 10^7$ , 更优选超过  $5 \times 10^7$  个含治疗基因的 HP 细胞。

优选的是, 所得细胞集合传递给患者时, 患者接受的细胞总量(即含治疗基因的 HP 细胞和所得细胞集合中存在的所有其它细胞)为每千克体重至少  $1 \times 10^7$  到每千克体重  $4 \times 10^7$  个, 更优选的是到每千克体重  $10 \times 10^7$  个细胞或更多。

细胞群的收集和随后的治疗可按上述关于发明的第一个方面所述完成。优选的是, 治疗包括第一个洗涤细胞群的步骤(如用标准细胞洗涤机), 接着任选是去体积  
10 步骤(如用标准设备去除过多的红血细胞、粒细胞、血小板、T 淋巴细胞)产生细胞群, 富集细胞群用于 HP 细胞, 洗涤的第二个步骤(如用自动化细胞洗涤机), 培养 HP 富集的细胞群。

初始的处理步骤(转移、单采血液成分术、HP 选择)导致富集 HP 细胞部分。确定 HP 细胞的百分比需要这些细胞的可测量方面如 CD34 抗原阳性。要理解的是处理的细胞集合优选包括至少 20%、更优选至少 40%、更加优选至少 60%和最优选的至少 80%HP 细胞。  
15

存在转导促进剂(如 RetroNectin)时, 将基因导入至少一部分 CD34+细胞优先通过用逆转录病毒载体转导这些细胞来完成, 载体携带治疗基因。然而, 基因治疗  
20 领域的普通技术人员意识到其它公布的将基因导入细胞的方法可产生相同结果。基因可编码任何抗 HIV 产物, 但优选编码抗 HIV 催化核酶。具体优选的抗 HIV 催化核酶裂解 *tat* 基因内的 HIV RNA, 具体是该基因的高度保守区域(即参考株 HIV-HXB2 (Genbank 登录号 K03455)的核苷酸 5833-5849(GGAGCCAGUAGA UCCUA, SEQ ID NO:3)和 HIV-IIIIB 菌株 (Genbank 登录号 X01762)的核苷酸 5865 到 5881  
25 (GGAGCCAGUAGA UCCUA))。

在一个较佳实施方案中, 受试者不需要骨髓切除或其它造血调节安排, 传递细胞的步骤导致受试者接受的剂量为每千克体重至少  $1.63 \times 10^6$  个 CD34+细胞, 该群体中每千克体重至少有  $0.52 \times 10^6$  个含治疗基因的 CD34+细胞。

本发明进一步涉及监控基因构建物存在和表达的方法。我们发展了一种定量实时 PCR 方法用于此检测。这类名为 DzyNA-PCR 的定量实时 PCR 方法公布和描述于  
30 Todd 等, 2000 和美国专利号 6,140,055 和 6,201,113, 其中提供策略检测疾病相

关的具体遗传序列和外源试剂的存在。此方法提供了一种系统，使同源核酸扩增在单个密封容器中与实时荧光检测偶联。策略包括用 DzyNA 引物体外扩增遗传序列，引物有 10:23 DNA 酶的互补(反义)序列(Santoro 等, 1997)。在扩增中，生成含 DNA 酶活性(正义)拷贝的扩增子，DNA 酶裂解反应混合物中包括的报道基因底物。PCR 中扩增子的积聚通过荧光变化来监控，荧光通过分离荧光/淬灭剂染料分子来生成，染料分子结合到报道基因底物中 DNA 酶切割位点的相反侧。裂解此报道基因底物指示成功的靶核酸序列扩增。可在 ABI PRISM®7700 序列检测系统(Applied Biosystems)或其它能实时监控荧光的热循环仪上实时测量。

此说明书中单词“包含”或变化如“包括”或“含有”理解为包括规定成分、一次性或逐步(step)、或成分的组合、一次性或逐步，但不排除任何其它成分、一次性或逐步、或成分的组合、一次性或逐步。

本说明书中包括的任何文献、法案、材料、装置、文章等的讨论仅用于提供本发明内容。这不是允许在本申请各权利要求的优先权日期前，任何或所有这些内容形成部分现有领域或是本发明相关领域的一般常识，下文会参考下列非限制例子和附图来描述发明。

## 实施例

### 实施例 1:

#### 收集、转导和重灌注 HP 细胞

在一个优选方法中，本发明包括下列步骤：

1. HP 细胞转移从个体骨髓中进入外周血；
2. 单采血液成分术个体的外周血以获得转移的 HP 细胞；
3. 洗涤步骤#1；在制备中用细胞洗涤机洗涤未纯化的外周血单核细胞用于可能的去体积；
4. 去体积(de-bulking)步骤；去除过多的红细胞、粒细胞、血小板和 T 淋巴细胞；
5. 洗涤步骤#2；用细胞洗涤机洗涤富集的 HP 细胞
6. CD34+细胞选择或消耗来自 HP 细胞群的抗原阳性细胞；
7. 洗涤步骤#3；用细胞洗涤机洗涤纯化的 HP 细胞；
8. 细胞培养通过将纯化的 HP 细胞置于细胞因子/生长因子培养物中；
9. 转导过程转导 HP 细胞，通过在存在转导促进剂时使用含基因构建物的

逆转录病毒载体；导入病毒载体；

10. 收集细胞产物并洗涤 HP 细胞，包括转导的 HP 细胞；
11. 制备灌注产物：将 HP 细胞置于灌注袋中并进行产物脱开安全器试验；
12. 灌注患者细胞回到相同的个体中。

5 如下描述这些步骤，用下面提供的例子和本发明的其它修改：

步骤 1—HP 细胞转移

此过程的第一个步骤使用试剂使 HP 细胞从骨髓转移到外周血。这里的例子使用的细胞因子优选选自加入聚乙二醇的粒细胞-集落刺激因子、(pegG-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、GM-CSF，更优选的是 G-CSF，接着进行单采血液成分

10 术过滤。另外，HP 细胞可根据熟知的技术从骨髓或脐带血中吸出。

集落刺激因子(G-CSF) (Amgen, Thousand Oaks, 加利福尼亚, Neupogen™) 皮下施用给患者，至少 10 $\mu$ g/ml/kg/天且优选约 30  $\mu$ g/ml/kg/天，每天一次，直到连续五天。G-CSF 施用中每天进行完全血液计数(CBCs)、分类和血小板计数以评估白细胞增多程度。用于确定 CD34+细胞数的血液样品优选在 G-CSF 施用第 3 天吸出以确保

15 单采血液成分术开始前外周血 CD34+数超过 20 个细胞/mm<sup>3</sup>。然而不能达到此 CD34+细胞数不会防止过滤，过滤一般在 G-CSF 施用第 4 和 5 天进行。

步骤 2—过滤(实施例 1：优选在第 4&5 天)

单采血液成分术是一种“血液过滤”的方法，用于获得外周血的单核细胞部分。这里，Cobe Spectra (Gambro BCT, Lakewood, Colorado)、Haemonetics (Haemonetics

20 公司, Braintree, MA) 或 Amicus (Baxter Fenwal, Deerfield, IL) 机器优选在至少两个不同时间使用(优选在转移后 4 和 5 天，其中第 1 天是诱导转移的第 1 天)，尽管在其它例子中单采血液成分术可在较早和较晚时间进行，这是通过确定外周血 CD34+细胞数超过：5 个细胞/mm<sup>3</sup> 或优选的 10 个细胞/mm<sup>3</sup> 和最优选的 20 个细胞/mm<sup>3</sup> 的时间。在一个较佳实施方案中，单采血液成分术从约 5 升(L)通过血流中产生细

25 胞产物，优选 5-10L，但更优选 10-20L，更加优选 20L 或更多。在一个较佳实施方案中，来自各单采血液成分术的产物可单独处理或在第二次单采血液成分术后收集。记录总细胞数和绝对的 CD34+细胞数。用步骤 1&2 生成直到 5x10<sup>6</sup> 个 HP(通过 CD34 阳性测量)细胞/kg 或更多，优选超过 2 x10<sup>7</sup>，更优选超过 4 x10<sup>7</sup>。

步骤 3—洗涤步骤#1(实施例 1：优选在第 4&5 天)

30 洗涤收集的细胞。这通过细胞离心(1,500rpm 或 300g, 15 分钟或类似)或更优选使用自动化细胞洗涤机，在一个例子中此细胞洗涤用 Nexell CytoMate 洗涤机



(Nexell Therapeutics, Irvine, CA) 进行, 使用程序洗涤细胞, 从袋 4 通过纺纱膜到洗涤袋 1, 用下列参数(剩余倍数减少(Residual Fold Reduction)=1; 最大末端重量(Maximum End Weight)=190mL; 源袋漂洗(Source Bag Rinse)=50mL 或类似的参数)。接着将细胞从洗涤袋 1 转移到洗涤袋 3 最终产物, 用下列参数(管漂洗涤体积=90mL; 最大泵速度=50mL 每分钟; 或类似参数)。

步骤 4—去体积步骤(实施例 1: 优选在第 4 和第 5 天)

在一个实施方案中, 来自单采血液成分术过程的细胞在各单采血液成分术天被“去体积”—使用 Charter Medical DACS-SC™ 系统(Charter Medical, Winston-Salem, NC)之类的系统。在一个实施方案中, 产物从第 1(或随后)天过夜保存用于之后收集最后 1 天的产物, 两个或更多单采血液成分术产物在收集天去体积且保存第 1 个产物直到第 2 个产物被去体积。去体积包括将洗涤的单采血液成分术细胞产物在 DACS-SC™ 装置中加入 BDS60 溶液并在 20-25 摄氏度以 850g 离心 30 分钟没有刹车。通过倒置回收产物并在无菌条件下收集到转移包中。

步骤 5—洗涤步骤#2(实施例 1: 第 4 天)

在收集天(收集物在集合前保存), 所得产物用添加 0.5%人血清白蛋白的 Dulbecco 磷酸盐缓冲盐水(DPBS)进行洗涤步骤。这是用 Nexell CytoMate 洗涤机进行, 使用程序洗涤细胞, 从袋 4 通过纺纱膜到洗涤袋 1, 用下列参数(剩余倍数减少=1,000; 最大末端重量=20mL; 源袋漂洗=50mL; 或类似参数)。接着将自身血浆中的细胞从洗涤袋 1 转移到洗涤袋 3 最终产物, 用下列参数(管漂洗涤体积=195mL; 最大泵速度=50mL 每分钟; 或类似参数)。随后用另外的 50mLDPBS 加 0.5%人血清白蛋白洗涤流体通道。然后细胞产物以不超过  $200 \times 10^6$  个细胞每 mL 的细胞密度在 2-8 摄氏度过夜保存。没有过夜保存的产物不进行单独的洗涤步骤, 洗涤步骤在 CD34+选择步骤中进行(下面的步骤 6)。

步骤 6—CD34+细胞选择(实施例 1: 第 5 天)

取、计数、收集细胞(在有两种或更多产物的实施方案中)并将细胞从 Isolex 300i(Nexell Therapeutics, Irvine, CA) 一次性装置放入 LifeCell 袋(Nexell Therapeutics, Irvine, CA)。(如果在最近的时间点有超过两种产物都要收集)。CD34+细胞选自洗涤后的产物, 选择通过用 Isolex 300i; Miltenyi 或细胞表达标记(如 CD2、CD3、CD14、CD16、CD19、CD24、CD56、CD66 糖蛋白、Stemsep)的谱系除尽策略。丰富的 CD34+集合或谱系除尽细胞优选包括至少 40%此类型细胞, 更优选至少 60%, 最优选至少 80%。在 Isolex 300i 情况中, 它包括下列自动化过程步

- 骤(按照厂商操作过程和软件版本 2.5): 1. 细胞在添加 0.41%柠檬酸钠和 1%人血清白蛋白的 DPBS 中洗涤以去除血小板; 2. 细胞用抗 CD34+抗体(如所供应的)室温孵育 15 分钟且未结合抗体通过洗涤去除; 3. 细胞转移到磁室用于形成花结(室温 30 分钟); 4. 磁体用于捕获 CD34+细胞/磁珠复合体且未结合抗体通过洗涤去除; 5. 结合细胞通过用试剂 PR34+孵育来释放; 6. 洗涤细胞并转移到最终产物袋用于随后的加工。

#### 步骤 7—洗涤步骤#3(实施例 1: 第 5 天)

- 细胞通过离心或用 Nexell CytoMate 或类似来计数和洗涤并转移到细胞培养基中, 培养基包括添加 10%热灭活胎牛血清的 Iscove 改进的 Dulbecco 培养基(IMDM), 在一个较佳实施方案中添加 50ng/ml 干细胞因子(SCF)及 100ng/ml 巨型核细胞生长和发展因子(MGDF)。这在添加 10%热灭活胎牛血清的 IMDM 中进行, 用 Nexell CytoMate 洗涤机程序洗涤细胞, 从袋 4 通过纺纱膜到洗涤袋 1, 用下列参数(剩余倍数减少=10; 最大末端重量=20mL; 源袋漂洗=50mL; 或类似参数)。接着将细胞从洗涤袋 1 转移到洗涤袋 3 最终产物 LifeCell 袋, 用下列参数(管漂洗体积=500mL; 最大泵速度=50mL 每分钟; 或类似参数)。

#### 步骤 8—细胞培养(实施例 1: 第 5-8 天)

- 细胞优选以  $1 \times 10^5$  到  $5 \times 10^6$  个细胞/ml 置于细胞培养烧瓶、细胞培养袋中或在一个较佳实施方案中置于 1,000ml (390cm<sup>2</sup>) Nexell LifeCell X-Fold 培养袋(Nexell Therapeutics)或类似, 有 Iscove 改进的 Dulbecco 培养基加 10%含细胞因子/生长因子的胎牛血清(FBS)。在一个较佳实施方案中, 此细胞因子/生长因子混合物由干细胞因子(50ng/ml)及巨型核细胞生长和发展因子(100ng/ml)组成。步骤 3-9 产生多至每千克  $12 \times 10^7$  个 HP 细胞或更多(通过 CD34 阳性评估)。细胞培养在有 5%CO<sub>2</sub> 的潮湿培养箱中 37 摄氏度进行 30-60 小时。

#### 步骤 9—转导过程(实施例 1: 第 7 天)

- 细胞从第一个烧瓶或组织培养袋中收集, 包括一个较佳实施方案中的 LifeCell 培养袋或类似, 用 Cytomate 装置或类似, 重悬于逆转录病毒上清如 200 微升等分的逆转录病毒-包含培养基, 此培养基在一个较佳实施方案中用 AM-12 包装细胞系生成(Genetix Pharmaceuticals 或参考 Markowitz, D., Goff, S. & Bank, A. (1988).

- 《构建和使用安全有效的兼嗜性包装细胞系》(Construction and use of a safe and efficient amphotropic packaging cell line). *Virology*, 167, 400-406)。

在此例子中, GMP 级逆转录病毒上清由 BioReliance 公司, Rockvill, MD 在特别

设备中在 GMP 条件下生产。含载体 RRz2 的核酶和产生含核酶的病毒颗粒的方法被详细描述(L-Q Sun 等(1998)《设计、生成和确认抗 HIV 1 型核酶》(The design, production and validation of an anti-HIV type 1 ribozyme),分子医学方法(Methods in Molecular Medicine), 第 11 卷, 核酶的治疗用途(Therapeutic Applications of Ribozymes); 51-64 页, Human 出版社)。生成细胞系的载体以 3-4x10<sup>4</sup> 个细胞每 cm<sup>2</sup> 平板培养于 850 cm<sup>2</sup> 滚瓶中, 瓶中有添加 10% 热灭活胎牛血清的 IMDM, 在存在 5%CO<sub>2</sub> 的潮湿空气中以 0.5-1.0rpm 培养。当细胞密度达到 9 x10<sup>4</sup> 个细胞每 cm<sup>2</sup> 时, 培养基用添加 10% 热灭活胎牛血清的 IMDM 替换并培养 4 小时。在时间=4 小时时, 收集培养物上清并在 2-8 摄氏度保存, 直到准备完所有收集。培养在添加 10% 热灭活胎牛血清的 IMDM 中重复额外的 5 小时, 随后再进行 15 小时。在此方法中, 3 种含培养基的病毒收集物被收集、集合并是在无菌装入 200ml 到 1L Cryocyte 袋(Nexell Therapeutics, Irvine, CA) 前进行 0.2 微米过滤, 70℃ 保存。

分析 GMP 级病毒上清以证实没有污染, 这是通过下列测试: 支原体(1993 PTC)、能复制的逆转录病毒共培养试验、同工酶分析、体外外来病毒试验、体内外来病毒试验、无菌(膜过滤)试验、细菌抑制和真菌抑制(膜过滤)试验、综合安全性试验、能复制的逆转录病毒扩增试验、剩余 DNA 的 PCR 试验和细菌内毒素试验(鲎阿米巴细胞裂解物显色试验)。此外, 用 3T3 传染性试验测试 GMP 物质的效力。在一个较佳实施方案中, 逆转录病毒上清的滴度是 1×10<sup>6</sup> 集落形成单位每 ml。

200 微升等分样品转移到第二个组织培养容器中, 一种是有逆转录病毒转到促进剂的 LifeCell X-Fold 培养袋。这种试剂包括聚凝胺、硫酸鱼精蛋白、阳离子脂类或在一个较佳实施方案中, 组织培养容器预覆盖 1-4mcg/cm<sup>2</sup> 的 RetroNectin (Takara Shuzo 公司, Shiga, 日本)。进行 RetroNectin 覆盖, 例如通过加入 0.8mL 的 1mg/mL RetroNectin 溶液到 390cm<sup>2</sup> LifeCell X-Fold 袋并在 2-8 摄氏度培养 16-48 小时。任何未结合 RetroNectin 通过用 60mL DPBS 洗涤两次来去除。进行 Cytomate 细胞洗涤步骤的程序用 IMDM 加 10% 热灭活胎牛血清洗涤细胞, 从袋 4 通过纺纱膜到洗涤袋 1, 用下列参数(剩余倍数减少=10; 最大末端重量=20mL; 源袋漂洗=50mL; 或类似参数)。接着转移自身逆转录病毒上清(在一个较佳实施方案中是 200mL)中的细胞, 在一个较佳实施方案中上清被解冻并添加如上浓度的细胞因子 SCF 和 MGDF。转移是从洗涤袋 1 到袋 3 最终产物, 袋 3 是 RetroNectin 覆盖的 LifeCell X-Fold 袋, 用下列参数(管漂洗涤体积=195mL; 最大泵速度=50mL 每分钟; 或类似参数)。随后用另外的 50mL IMDM 加 10% 热灭活胎牛血清洗涤流体通道。含

细胞的 RetroNectin 覆盖的袋置于有 5%CO<sub>2</sub> 的 37 摄氏度潮湿培养箱中。5-7 小时后用 CytoMate 或类似重复转移过程；对于第二次转导，细胞转移到新的组织培养容器(聚凝胺、硫酸鱼精蛋白)或回到与它们来自的容器相同或类似的 RetroNectin 覆盖容器。用 CytoMate 转移与第一次转导所述过程相同。在一个较佳实施方案中，这在新的上述 200mL 等分逆转录病毒上清中进行并培养过夜。在另一个实施方案中，此重复转导不进行或在类似的时间段中反复一些次数。收集等分逆转录病毒上清用于无菌试验。此生长/转导过程产生多至每千克体重  $5 \times 10^7$  个含基因的 HP 细胞或更多(通过 CD34 阳性评估)。这个数字通过定量试验如 DzyNA PCR 确定。转导效率至少为 10%或更多，优选在 30-50%的范围中，更优选超过 50%。

#### 10 步骤 10—收集细胞产物(实施例 1：优选在第 8 天)

在第 8 天早上(在较佳实施方案中是细胞培养的第 3 天)，细胞收集和洗涤用标准细胞离心(1,500rpm 或 300g, 15 分钟或类似)或自动化系统如 CytoMate 细胞培养样品。进行 Cytomate 细胞洗涤步骤的程序用没有酚红的 RPMI 加 0.3%人血清白蛋白洗涤细胞，从袋 4 通过纺纱膜到洗涤袋 1，用下列参数(剩余倍数减少=1,000；最大末端重量=20mL；源袋漂洗=50mL；或类似参数)。接着转移 RPMI 加 5%人血清白蛋白中的细胞。转移是从洗涤袋 1 到袋 3 最终产物，袋 3 是用于最终灌注产物的转移包，用下列参数(管漂洗涤体积=100mL；最大泵速度=50mL 每分钟；或类似参数)。这会在 100mL RPMI 加 5%人血清白蛋白或类似载体中产生多至每千克体重  $5 \times 10^7$  个含基因的 HP 细胞或更多(通过 CD34 阳性评估)。

#### 20 步骤 11—灌注产物(实施例 1：第 8 天)

因此细胞重悬于含 5%人血清白蛋白或类似载体的生理灌注缓冲液中。取出等分样品用于无菌培养(需氧细菌、厌氧细菌、真菌、支原体)。不释放灌注产物直到有内毒素(LAL)、支原体杂交试验、bacterialgram 菌株试验、灌注细胞存活性和 CD34+纯度的结果。总 CD34+细胞的剂量以 CD34+细胞数每千克体重为基础计算。一旦知道 DzyNA 或类似以 PCR 的试验结果，转导的细胞数在灌注后确定。

#### 25 步骤 12—灌注患者(实施例 1：第 8 天)

CD34+细胞制备适当施用给患者。在一个较佳实施方案中，患者接受的单次灌注为  $0.5-5 \times 10^7$  个转导的 CD34+细胞或更多每千克体重(细胞/kg)，这是在含 5%人血清白蛋白或类似载体的生理灌注缓冲液中。每个患者的转导 CD34+细胞剂量取决于转移、单采血液成分术、分离、培养和转导过程各步骤的效率。CD34+细胞的总数(转导和非转导的)通过细胞计数和流式细胞仪确定。含导入基因的 HP 细胞产生

嵌合造血系统, 其中在骨髓中有含基因的 HP 细胞的百分比。为治疗 HIV/AIDS 阳性个体, 此含基因的 HP 细胞的百分比至少为 5%, 优选超过 10%, 更优选超过 20%。

实施例 2: 使用 DzyNA 技术检测和定量 HP 细胞的转导百分比及含基因的后代细胞数

- 5 步骤 1 用实时定量 PCR (DzyNA, 见上文引证) 确定灌注产物中含基因的细胞比例  
步骤 2 用 DzyNA 实时定量 PCR 随着时间定量个体内含基因的后代细胞数(见上文引证的方法)

DzyNA-PCR 是检测与疾病或外来试剂相关的具体遗传序列的一般策略。此方法提供了一种系统, 使同源核酸扩增在单个密封容器中与实时荧光检测偶联。策略包  
10 括用 DzyNA 引物体外扩增遗传序列, 引物有 10:23 DNA 酶的互补(反义)序列。在扩增中, 生成含 DNA 酶活性(正义)拷贝的扩增子, DNA 酶裂解反应混合物中包括的报道基因底物。PCR 中扩增子的积聚通过荧光变化来监控, 荧光通过分离荧光/淬灭剂染料分子来生成, 染料分子结合到报道基因底物中 DNA 酶切割位点的相反侧。裂解此报道基因底物指示成功的靶核酸序列扩增。可在 ABI PRISM®7700 序列检测系  
15 统或其它能实时监控荧光的热循环仪上实时测量(如 Corbett Rotor-Gene (Corbett Research, Sydney Australia), Stratagene Mx4000 (Stratagene, LaJolla, CA) 或 Roche LightCycler (Roche, 德国)。

发展 DzyNA-PCR 操作以分析含新霉素抗性基因的载体和治疗剂。此试验有多种用途, 包括估计细胞的转导百分比和监控基因治疗下的患者中转导细胞或它们后代  
20 细胞的存在和定量。

报道基因底物 Sub G5-FD 由 Trilink Biotechnologies (加利福尼亚, USA) 合成。Sub G5-FD (下面阐述) 是含 RNA (以小写字母示于下面) 和 DNA 核苷酸的嵌合分子。它有 3' 磷酸基团, 在 PCR 中防止其被 DNA 聚合酶延伸。Sub G5-FD 用附于所示“T”脱氧核糖核酸的 FAM (F) 和 DABCYL (D) 部分合成。裂解报道基因底物可在 530nm (FAM  
25 发射波长) 监控, 在 485 nm 激发 (FAM 激发波长)。

Sub G5-FD 如下所示:

5'CACCAAAAGAGAAC (T-F) GCAATguT (T-D) CAGGACCCACAGGAGCG-p3' (SEQ ID NO:5)

两种 PCR 引物由 Sigma Genosys (NEW, Australia) 合成。5'PCR 引物 (5L1A) 与新霉素抗性基因杂合。3'引物 (3L1Dz5) 是 DzyNA PCR 引物, 包括 (a) 含活性 DNA 酶的催化失活反义序列的 5'区域和 (b) 与新霉素抗性基因互补的 3'区域。PCR 扩增中用  
30 5L1A 和 3L1Dz5, 5L1A 延伸产生的扩增子包含新霉素抗性序列和结合在其 3'区域的

DNA 酶的催化活性正义拷贝。设计活性 DNA 酶裂解 RNA/DNA 报道基因底物 Sub G5-FD。

PCR 引物的序列如下所示：

5L1A(5'引物)

5 5' GAG TTC TAC CGG CAG TGC AAA 3' (SEQ ID NO:6)

3L1Dz5(3'DzyNA 引物)

5'CAC CAA AAG AGA ACT GCA ATT CGT TGT AGC TAG CCT

TTC AGG ACC CAC AGG AGC GGC AAG CAA TTC GTT CTG

TAT C 3' (SEQ ID NO:7)

10

人细胞系 CEMT4 获得自美国模式培养物保藏所(Rockville, MD)。CEMT4 细胞用含新霉素抗性基因的逆转录病毒转导。基因组 DNA 分离自 CEMT4 细胞，CEMT4 细胞用有新霉素抗性基因的逆转录病毒转导，使用 QIAGEN DNeasy Tissue 试剂盒(QIAGEN 控股有限公司, 维多利亚州, 澳大利亚, 产品编号 69504)。提取自转导细胞  
15 的 DNA 与来自未转导细胞的 DNA 混合(重量)以获得下列转导 DNA 百分比-100%、11%、1.2%、0.1%、0.02%和 0%(即 100%未转导的 CEMT4)。

分离自 CEMT4 细胞的基因组 DNA 通过 DzyNA PCR 扩增，CEMT4 细胞用有新霉素抗性基因的逆转录病毒转导。反应在 40μl 总反应体积中包含 20 或 30 皮摩尔 5L1A、1 或 2 皮摩尔 3L1Dz5、10 皮摩尔 Sub G5-FD、20U RNA 酶抑制剂(Promega, 产品编号 2515, 麦迪逊, 威斯康星州)、20 皮摩尔 ROX 被动参考染料和 1x QIAGEN HotStar Taq Master 混合物(QIAGEN 控股有限公司, 维多利亚州, 澳大利亚, 产品编号 203445)加另外的 2.5mM MgCl<sub>2</sub>。对照反应包含所有反应成分，除了基因组 DNA。反应置于  
20 ABI Prism 7700 序列检测系统中，95℃变性 10 分钟，10 个循环的 70℃ 1 分钟，每个循环温度下降 1℃，94℃ 1 分钟。接着另外进行 60 个循环的 60℃ 1 分钟，94  
25 ℃ 30 秒。在 PCR 退火/延伸阶段中，荧光通过 ABI Prism 7700 序列检测系统检测。

含新霉素抗性基因的基因组 DNA 的反应显示 530nm 的 FAM 荧光相对对照反应中观察到的荧光增加。当 1μg 含来自转导 CEMT4 细胞 DNA 的基因组 DNA 被分析时，校准曲线为线性，范围从 100 到 0.2%转导细胞(R<sup>2</sup> 始终>0.99)。反应含来自未转导细胞的 DNA 或缺乏 DNA，在 70 个热循环的 PCR 中不比起始水平增加。用标准量产生的  
30 的校准曲线可用于估计未知样品中含新霉素抗性基因的细胞或 DNA 的比例。此例子中所述实验阐明了一套反应条件，可用于检测和定量新霉素抗性基因。此操作可由

本领域普通技术人员修改并用于在修改操作和将逆转录本纳入反应混合物后检测来自新霉素抗性基因的 RNA 转录本。

本领域技术人员理解可对具体实施方案中所示发明作出许多变化和/或修改，而没有离开广泛描述的发明精神或范围。因此本实施方案在所有方面认为是说明性  
5 而不是限制性的。

#### 参考文献：

Agulia, H. L. , K. Akashi, J. Domen, K. L. Gandy, E. Lagasse, R. E. Mebius, S. J. Morrison, J. Shizuru, S. Strober, N. Uchida 等, (1997), 《从干细胞到淋巴细胞：生物  
10 和移植》(From stem cells to lymphocytes:biology and transplantation) Immunol Rev 157:13-40。

Amado, R. G. , R. T. Mitsuyasu, G Symonds, J. D. Rosenblatt, J. Zack, L. -Q. Sun, M. Miller, J. Ely 和 W. Gerlach(1999) 《用抗 HIV 核酶转导的自身 CD34+造血祖细胞的阶段 I 试验》(A phase I trial of autologous CD34 hematopoietic progenitor  
15 cells transduced with an anti-HIV ribozyme). Human Gene Ther 10:2255-2270。

Baum C, I. L, Weissman, A. S. Tsukamoto, A. -M. Buckle 和 B. Peault(1992) 《候选人造血干细胞群的分离》(Isolation of candidate human hematopoietic stem-cell population). Proc Natl Acad Sci USA 89:2804-2808。

Bender, M. A. , Palmer, T. D. , Gelinas, R. E. & Miller, A. D. (1987). 《莫洛尼氏白血病毒包装信号延伸到 *gag* 区域的证据》(Evidence that the packaging signal of Moloney murine leukemia virus extends into the *gag* region. *J Virol*, 61,  
20 1639-1646。

Cooper, D. , R. Penny, G. Symonds, A. Carr, W. Gerlach, L. Q. Sun 和 J. Ely(1999). 《HIV 相异同卵双生中治疗性的转导 CD4+外周血淋巴细胞的标记研究》(A marker  
25 study of therapeutically transduced CD4+ peripheral blood lymphocytes in HIV discordant identical twins). Hum Gene Ther 10(8):1401-1421。

Haase, A. T. , Henry, K. , Zupancic, M. , Sedgewick, G. , Faust, R. A. , Melroe, H. , C avert, W. , Gebhard, K. , Staskus, K. , Zhang, Z. Q. , Dailey, P. J. , 小 Balfour, H. H. , Erice, A. & Perelson, A. S. (1996). 《淋巴组织中 HIV-1 感染的定量图象分析》  
30 (Quantitative image analysis of HIV-1 infection in lymphoid tissue. *Science*, 274, 985-989。

- Knop, A. E. , A. J. Arndt, M. Raponi, M. P. Boyd, J. A. Ely 和 G. Symonds(1999). 《人造毛细管培养:扩增和逆转录病毒转导 CD4+T 淋巴细胞用于临床应用》(Artificial capillary culture:Expansion and retroviral transduction of CD4+T lymphocytes for clinical application)Gene Ther6:373-384。
- 5 Kohn, D. B. , G. Bauer, C. R. Rice, J. C. Rothschild, D. A. Carbonaro, P. Valdez, Q. Hao, C. Zhou, I. Bahner, K. Kearns 等, (1999). 《逆转录病毒-调节的将 rev-反应元件诱杀基因转移到 CD34(+)细胞的临床试验, CD34(+)细胞来自人免疫缺陷病毒-1-感染儿童的骨髓》(A clinical trial of retroviral-mediated transfer of a rev-responsive element decoy gene into CD34(+) cells from the bone marrow  
10 of human immunodeficiency virus-1-infected children)Blood94(1):368-371。
- Levinsky, R. J. (1989). 《骨髓移植的最近进展》(Recent advances in bone marrow transplantation)Immunol Immunopathol50(1Pt2):S124-132。
- Marasco, W. A. , S. Chen, J. H. Richardson, U. Ramstedt 和 S. D. Jones(1998). 《抗 HIV-1 包膜抗原的胞内抗体用于 AIDS 基因治疗》(Intracellular antibodies  
15 against HIV-1 envelope proteins for AIDS gene therapy)Hum Gene Ther9(11):1627-1642。
- McFarland, R. D. , D. C. Douek, R. A. Koup 和 L. J. Picker(2000). 《人最新胸腺迁出表型的鉴定》(Identification of a human recent thymic emigrant phenotype)Proc Natl Acad Sci USA 97(8):4215-4220。
- 20 Murray, JM. Kaufmann, G, Kelleher, AD, Cooper, DA(1998). 《初次 HIV-1 感染的模型》(A model of primary HIV-1 infection)Mathematical Biosciences 154:57-85。
- Murray, J(2001). 《治疗或未治疗初次 HIV-1 感染中 HIV-1 RNA 和 DNA 动力学》(HIV-1 RNA and DNA dynamics during treated and untreated primary HIV-1  
25 infection) 第 8 次逆转录病毒和机会感染会议 Eighth Conference on Retroviruses on Opportunistic Infections, Chicago。
- Rossi, J. J. , E. M. Cantin, N. Sarver 和 P. F. Chang(1991). 《催化 RNAs 在 HIV 感染和其它疾病中的潜在用途》(The potential use of catalytic RNAs in therapy of HIV infection and other diseases)Pharmacol Ther 50(2):245-254。
- 30 Santoro, S. W. 和 G. F. Joyce(1997). 《RNA-裂解 DNA 酶的一般用途》(A general purpose RNA-cleaving DNA enzyme)Proc Natl Acad Sci USA 94(9):4262-4266。



Sarver, N. , E. M. Cantin, P. S. Chang, J. A. Zaia, P. A. Ladne, D. A. Stephens 和 J. J. Rossi (1990). 《作为潜在抗 HIV-1 治疗剂的核酶》(Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents) Science 247:1222-1225。

Schwartzberg, L. S. , R. Birch, B. Hazelton, K. W. Tauer, P. Lee, Jr. , R. Altemose, C. George, R. Balnco, F. Wittlin, J. Cohen 等, (1992). 《通过有或没有重组人粒细胞-集落刺激因子的化疗进行外周血干细胞转移》(Peripheral blood stem cell mobilization by chemotherapy with and without recombinant human granulocyte colony-stimulating factor) J Hematother 1(4):317-327。

Sczakiel, G. 和 M. Pawlita (1991). 《抑制人 T 细胞中稳定表达反义 RNA 的人免疫缺陷病毒 1 型复制》(Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in human T cells stably expressing antisense RNA). J Virol 65(1): 468-472。

Sempowski, G. D. , Hale, L. P. , Sundry, J. S. , Massey, J. M. , Koup, R. A. , Douek, D. C. , Patel, D. D. & Haynes, B. F. (2000). 《人胸腺中白血病抑制因子制瘤素 M、IL-6 和干细胞因子 mRNA 的表达随着年龄增加且与胸腺萎缩相关》(Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy) J Immunol, 164, 2180-7。

Smythe, J. A. , D. Sun, M. Thomson, P. D. Markham, M. S. Reitz, R. C. Gallo 和 J. Lisziewicz (1994). 《稳定转移到 T 淋巴细胞中的 Rev-可诱导的突变 *gag* 基因:一种抗人免疫缺陷病毒 1 型感染的基因治疗方法》(A Rev-inducible mutant *gag* gene stably transferred into T lymphocytes: An approach to gene therapy against human immunodeficiency virus type 1 infection) Proc Natl Acad Sci USA 91(9):3657-3661。

Sullenger, B. A. , H. F. Gallardo, G. E. Ungers 和 E. Gilboa (1990). 《过渡表达 TAR 序列使细胞抗人免疫缺陷病毒复制》(Overexpression of TAR sequences render cells resistant to human immunodeficiency virus replication) Cell 63(3): 601-608。

Sun, LQ, D Warrilow, L Wang, C Witherington, J Macpherson 和 G Symonds (1994) 《允许细胞系中莫洛尼氏白血病毒和人免疫缺陷病毒 I 型复制的核酶-调节抑制》(Ribozyme-mediated suppression of Moloney murine leukemia virus and human

immunodeficiency virus type I replication in permissive cell lines) *Proc Natl Acad Sci USA* 91:9715-9719.

Sun, L. Q., W. L. Gerlach 和 G. Symonds (1996). 《使用核酶抑制 HIV 复制》(The use of a ribozyme to inhibit HIV replication) *Catalytic RNA*. F. Eckstein 和 D. Lilley. 10:329-342.

Sun, L. Q., W. L. Gerlach 和 G. Symonds (1998). 《设计、生成和确认抗 HIV 1 型核酶》(The design, production and validation of an anti-HIV type 1 ribozyme) K. J. Scanlon. Totowa, NJ, Human 出版社 Inc. 11:51-64.

Sun, L. Q., J. Pyati, J. Smythe, L. Wang, J. Macpherson, W. Gerlach 和 G. Symonds (1995a). 《用核酶、反义或聚合顺式-活化反应元件构建物转导人外周血淋巴细胞赋予人对免疫缺陷病毒 1 型感染的抗性》(Resistance to human immunodeficiency virus type 1 infection conferred by transduction of human peripheral blood lymphocytes with ribozymes, antisense or polymeric trans-activation response element constructs) *Proc Natl Acad Sci USA* 92(16):7272-7276.

Todd, A. V., C. J. Fuery, H. L. Impey, T. L. Applegate 和 M. A. Haughton (2000). 《DzyNA-PCR: 使用 DNA 酶检测和定量实时荧光模式中的核酸序列》(DzyNA-PCR: use of DNazymes to detect and quantify nucleic acid sequence in a real-time fluorescent format) *Clin Chem* 46(5):625-630.

Tough, D. F. 和 J. Sprent (1995). 《幼稚和记忆 T 细胞的寿命》(Life span of naïve and memory T cells) *Stem Cells* 13(3):242-249.

Wang, L. m, C. Witherington, A. King, W. L. Gerlach, A. Carr, R. Penny, D. Cooper, G. Symonds 和 L. Q. Sun (1998). 《用于治疗应用的抗 tat 核酶的潜伏期特征》(Preclinical characterization of an anti-tat ribozyme for therapeutic application) *Hum Gene Ther* 9(9):1283-1291.

Zack, J. A., Arrigo, S. J., Weitsman, S. R., Go, A. S., Haislip, A. & Chen, I. S. (1990). 《HIV-1 进入休眠的初级淋巴细胞: 分子分析揭示了不稳定、潜伏性病毒结构》(HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure) *Cell*, 61, 213-22.

<110> J&J 研究控股有限公司 (J&J RESEARCH PTY LTD)

<120> 转导造血祖细胞的生成

<130> J&J2119

<150> 60/304,283

<151> 2001-07-10

<150> 60/343,392

<151> 2001-10-22

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 17

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 催化核酶 RRz2 的靶位点

<400> 1

ggagccagua gauccua

17

<210> 2

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Rz2 核酶序列

<400> 2

ttaggatcct gatgagtccg tgaggacgaa actggc

36

<210> 3

<211> 38

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 载体中的 Rz2 核酶序列

<400> 3

ttaggatcct gatgagtccg tgaggacgaa actggctc

38

<210> 4

<211> 38

<212> RNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Rz2 核酶序列

<400> 4

uuaggaucuu gaugaguccg ugaggacgaa acuggcuc

38

<210> 5

<211> 41

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 核酶的报道物底物

<220>

<221> misc\_feature

<222> (15)..()

<223> 残基 15 通过 FAM 连接到寡核苷酸

<220>

<221> misc\_RNA

<222> (20)..(21)

<223> 残基 20 和 21 是核糖核酸

<220>

<221> misc\_feature

<222> (23)..()

<223> 残基 23 由附在 T 上的 DABCYL 合成

<400> 5

caccaaaaaga gaactgcaat gtttcaggac ccacaggagc g

41

<210> 6

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> PCR 引物

<400> 6

gagttctacc ggcagtgcaa a

21

<210> 7

<211> 76

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> DzyNA 引物

<400> 7

caccaaaaaga gaactgcaat tcgttgtagc tagcctttca ggaccacag gagcggcaag

60

caattcgttc tgtatc

76

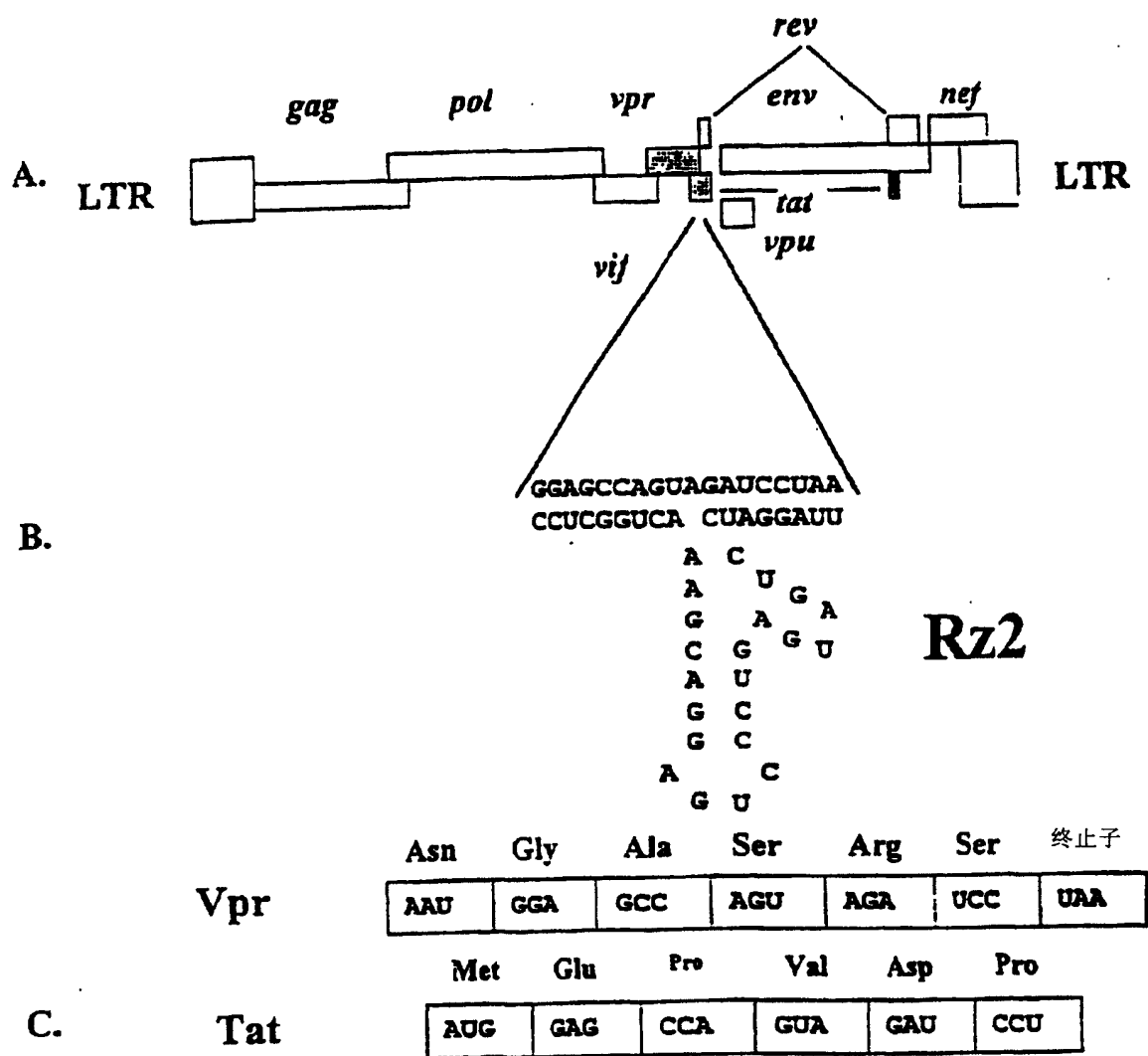
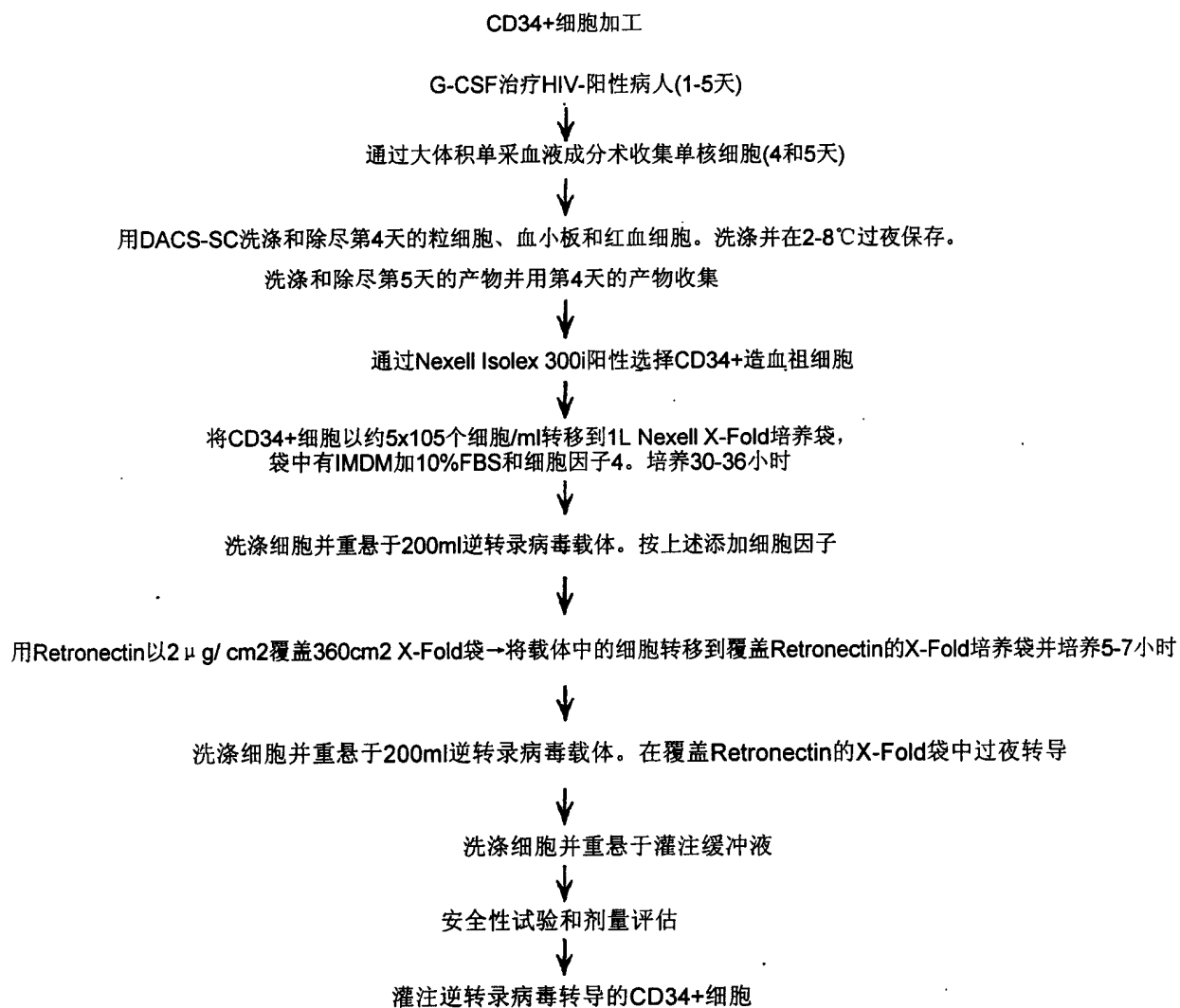
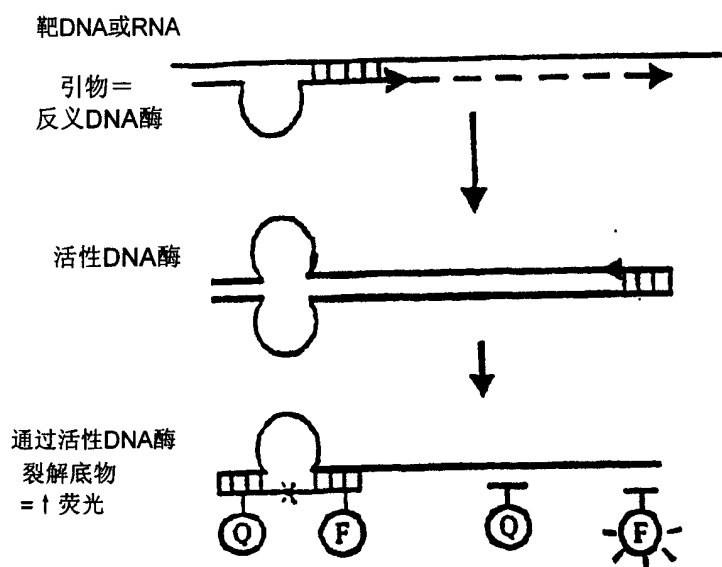


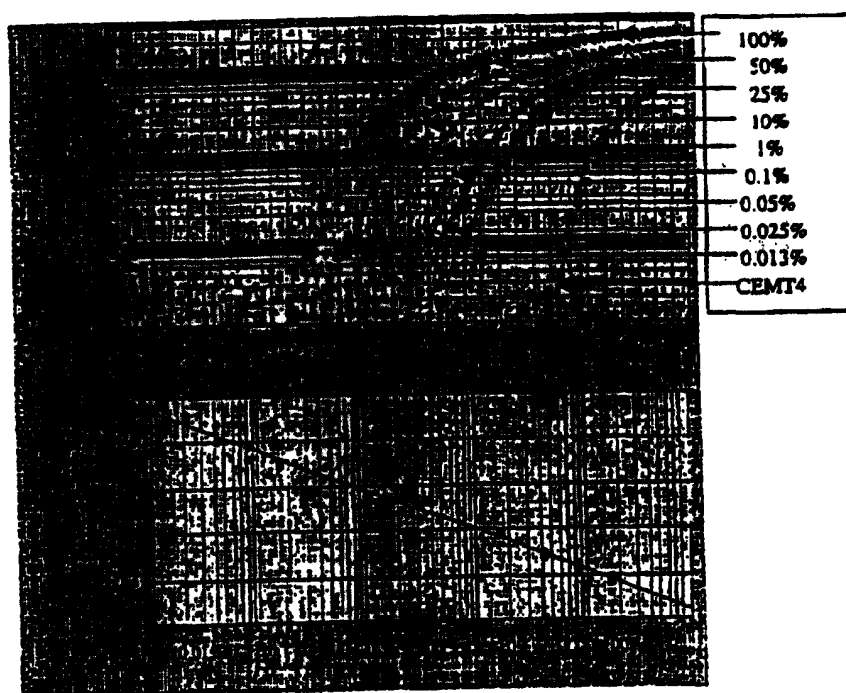
图 1



A



B

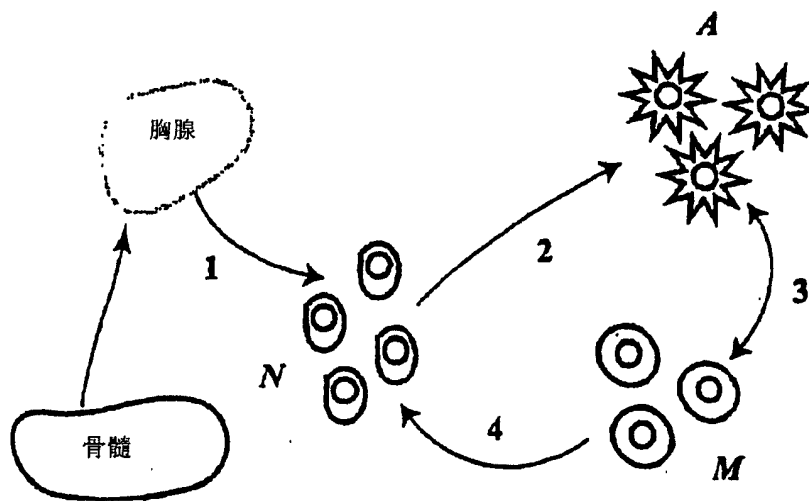


(A) DzyNA PCR检测方法的示意图

(B) 通过DzyNA PCR定量 $\text{neo}^R$  基因产生标准曲线, 该曲线可用来估计"未知"样品中标记的百分比。

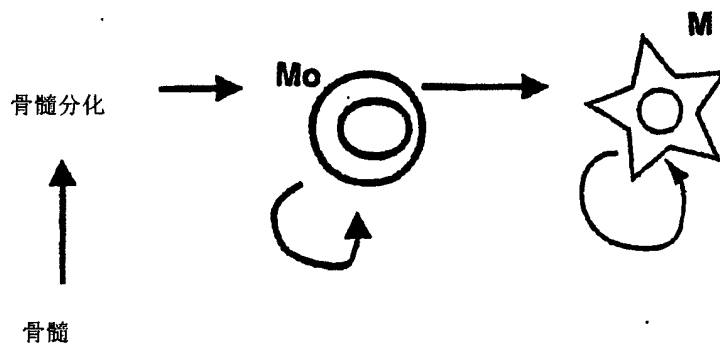
图 3





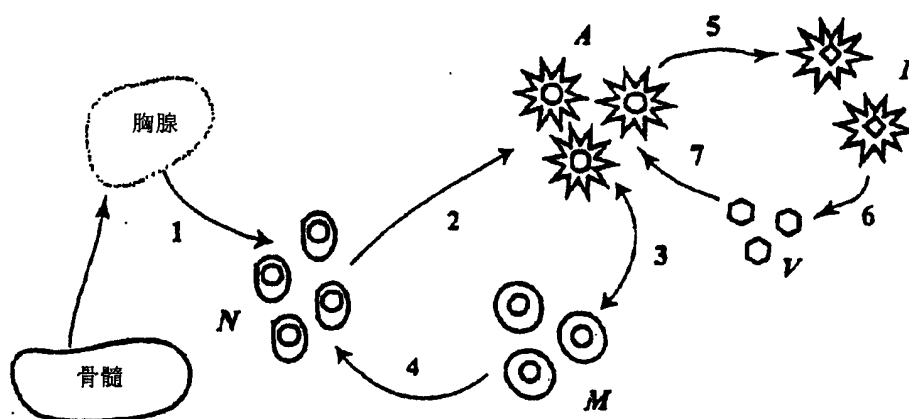
CD4+T淋巴细胞模型的图表:原初细胞N,活化细胞A,记忆细胞M。

图 4



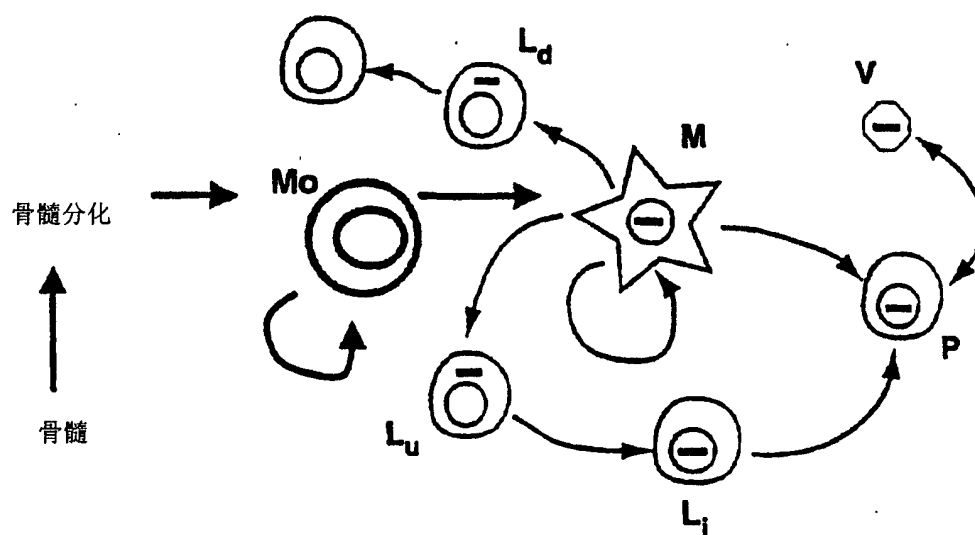
巨噬细胞模型的图表:单核细胞Mo,巨噬细胞M。

图 5



CD4+T淋巴细胞模型的图表：原初细胞N,活化细胞A, 记忆细胞M, 游离HIV病毒V

图 6



巨噬细胞模型的图表：游离病毒V, 产生的感染细胞, 感染的巨噬细胞M, 有缺陷未整合HIV DNA Ld的休眠CD4+T细胞, 有活性未整合HIV DNA Lu的休眠CD4+T细胞, 有整合HIV DNA的休眠CD4+T细胞

图 7