[19]中华人民共和国专利局

[11] 公开号 CN 1127527A

[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 94192807.1

[51]Int.Cl[6]
C12N 5/10

[43]公开日 1996 年 7 月 24 日

[22]申请日 94.5.17

[30]优先权

[32]93.5.17 [33]US[31]08/062,465

[86]国际申请 PCT/US94/05700 94.5.17

[87]国际公布 WO94/26877 英 94.11.24

[85]进入国家阶段日期 96.1.17

[71]申请人 加利福尼亚大学董事会

地址 美国加利福尼亚州

[72]发明人 黄以静 余 芒 山田长寨
乔舒亚·O·奥杰旺 马克·莱维特
何 翟

[74]专利代理机构 柳沈知识产权律师事务所

代理人 巫肖南

C12N 15/11 C12N 15/86

权利要求书 3 页 说明书 63 页 附图页数 29 页

[54]发明名称 人免疫缺陷型病毒感染和艾滋病的核酶基因治疗方法

[57]摘要

本发明提供了一种感染性反转录病毒，在该反转录病毒的 5′和 3′长末端重复序列之间插入了一个编码抗 HIV 型特异性因子的核酸，该核酸处于 pol III 启动子控制之下。还提供了含有本发明反转录病毒载体的宿主细胞。本发明进一步提供了干扰和阻止受 HIV 感染或可能会受 HIV 感染的细胞中 HIV 病毒的复制的方法。

权 利 要 求 书

1、一种反转录病毒载体，它含有一种感染性反转录病毒，在该反转录病毒的5′和3′长末端重复序列之间插入了一个处于pol III启动子控制下的、为一种抗HIV型特异性因子编码的核酸序列。

2、根据权利要求1的反转录病毒载体，其中，该抗HIV型特异性因子是一种特异于HIV－1型病毒的核酶。

3、根据权利要求1的反转录病毒载体，其中，该核酶具有基本上与被称为Rz－1或Rz－2的核酶相同的序列。

4、根据权利要求1的反转录病毒载体，其中，该抗HIV型特异性因子是一种特异于HIV－2型病毒的核酶。

5、根据权利要求1的反转录病毒载体，其中，该pol III启动子是人$tRNA^{Val}$启动子或腺病毒VA1启动子。

6、根据权利要求2的反转录病毒载体，其中，该HIV－1特异性核酶在HIV－1的前导序列内切割。

7、根据权利要求5的反转录病毒载体，其中，该抗HIV型特异性因子是一种具有结合到HIV核酶上并阻止HIV复制的能力的反义分子。

8、一种pol III启动子转录盒，它存在于pMJT或pMJV载体中。

9、一种用权利要求1的反转录病毒载体稳定转化的宿主细胞。

10、根据权利要求9所说的宿主细胞，其中，该宿主细胞是一种灵长类动物、鼠或人细胞。

11、根据权利要求10所说的宿主细胞，其中，该宿主细胞是成

纤维细胞、$CD4^+$ T细胞、胎盘脐带血细胞、外周血淋巴细胞、外周血单核细胞或造血干细胞。

12、一种干扰或阻止受外源基因或病毒感染的细胞中该外源基因表达或该病毒复制的方法，该方法包括在有利于反转录病毒转导和核酸在细胞中稳定表达的条件下，用权利要求1的反转录病毒载体转导细胞。

13、根据权利要求12的方法，其中，所述细胞是人细胞或灵长类细胞。

14、根据权利要求13的方法，其中的人细胞是人成纤维细胞，人$CD4^+$ T细胞，人外周血淋巴细胞，胎盘脐带血细胞，人外周血单核细胞或人造血干细胞。

15、一种防止易受HIV感染的细胞感染人免疫缺陷病毒（“HIV”）的方法，该方法包括在有利于反转录病毒载体转导以及核酸在细胞中稳定表达的条件下，用权利要求1的反转录病毒载体转导该细胞。

16、根据权利要求15的方法，其中该细胞是人细胞或鼠细胞。

17、根据权利要求16的方法，其中的人细胞是人成纤维细胞，人$CD4^+$ T细胞，人外周血淋巴细胞，胎盘脐带血细胞，人外周血单核细胞或人的造血干细胞。

18、根据权利要求12或15的方法，该方法进一步包括给与获取转导细胞的哺乳动物相同种的动物施用用该反转录病毒载体转导的细胞。

19、根据权利要求18的方法，其中用该反转录病毒载体转导的细胞是从接受该转导细胞的哺乳动物中得到的。

20、一种抗HIV－1型的特异性核酶，该核酶具有与被称为Rz－2的核酶的序列基本上相同的序列。

人免疫缺陷型病毒感染和艾滋病的核酶基因治疗方法

本申请是1993年5月17日申请的美国专利申请No.08/062,465的继续部分，该申请内容引入本文作为参考。

根据美国陆军授予的No.DAMD 17－90－C－0094 合约，政府具有本发明法权。

现今已知由人免疫缺陷病毒(HIV)引起的艾滋病已经在全球范围极大地威胁到公众健康。在美国和在许多其他国家，阻止该疾病的进一步传播是保障健康最需优先考虑的事项。虽然早在1984年就已经证实HIV是引起艾滋病的病因， 但是几乎没有能为公众得到的已证明能治疗或预防艾滋病的任何药物或疫苗。这在很大程度上是由于该致病因素本身的复杂性造成的。

在体内，HIV能感染各种组织和细胞。 另外，该病毒进入细胞之后，能在个体的中枢神经系统细胞中“隐藏”若干年，然后才出现病症。

受HIV感染个体临床症状的发展依赖于对新感染细胞的募集而连续进行的病毒的表达。因此，一些研究者相信病毒繁殖的这种病因学上的表现为开发抗HIV的治序方法提供了理论基础。 的确，能抑制该病毒逆转录酶的核苷类似物已经显示出某些临床效果。但是，由于这些药物固有的毒性以及在治疗过程中会不可避免地出现对药

物具抗性的HIV突变株， 人们已不考虑将这种类型的药物作为艾滋病的治疗剂。因此，研究人员在继续寻找一种新的有效的治疗方法。

本发明提供了一种新的抗HIV以及治疗艾滋病的方法， 该方法克服了在艾滋病预防和治疗中使用的基于核苷酸的治疗法所具有的局限性。

本发明提供了一种具感染性的反转录病毒，在该反转录病毒的5′和3′长末端重复序列之间插入了一段为抗HIV型特异性因子编码并受pol III启动子控制的核酸。还提供了含有本发明所述的反转录病毒载体的宿主细胞。 进一步提供了干扰和阻止被HIV感染的细胞中HIV病毒复制的方法。 该方法包括在有利于载体的转导并且在细胞中该因子稳定表达的条件下， 用含有为抗HIV型特异性因子编码的核酸的反转录病毒载体转导受感染细胞。 还可以在HIV感染之前用该反转录病毒载体转导细胞。这样做可防止HIV感染。

附图简述

图1: 图解描述含有被称为“Rz－1”的HIV－特异性核酶基因的各种质粒和反转录病毒载体(未按比例描绘)。参见“发明详述”部分各个质粒的设计。

图2A－2C: 在瞬间检测中抗HIV－1特异性核酶对HIV表达的影响。将效应质粒(如Ratner, L.等人, AIDS Res.Hum.Retroviruses Vol 3:57-69 (1987)描述的pHXB2gpt, 引入本文作为参考)和报道质粒与pUC19一起或分别与含有抗HIV－1核酶的pβ－HR或pJT－HR或pJV－HR以1:10μg的比例(效应质粒与核酶质粒)一起三联转染到Hela细胞中。各个条带以其质粒名称进行标记。图2A: 转染48小时后收集Hela细胞并将其进行CAT酶检测。 用闪烁计数器对TLC(薄

层层析)薄片进行计数，所得结果为与对照的相对值。 图2B: 将上清进行p24抗原分析，数值表示对照含量的相对百分数。 图2C: 用快速分离方法(参见“发明详述”下文)分离总RNA。 将20微克总RNA点印上样，用内部已进行[α－^{32}p]UTP标记的HIV－1特异性探针与之杂交。点渍1: 从pUC19/pHXB2gpt转染的细胞制备的RNA，点渍2: 从pJV－HR/pHXB2gpt转染的细胞制备的RNA。

图3: HIV－1分离株的靶前导序列的直线排列(分别为SEQ ID NOs.6至12)。

图4A和4B: 抗HIV－1特异性核酶对HIV－1 SF－2表达的影响以及该核酶在反转录病毒载体中的表达。图4A: 将效应质粒(pSF－2)与含有核酶的反转录病毒载体(效应质粒与核酶载体之比为0.5:10μg)pMJF－1，pMJT，pMJV和pMHR(分别为条带1，3，4和5)或与不含核酶基因的反转录病毒载体pLRNL－2(条带2)一起转染至Hela细胞中，每项试验设置1个或2个重复。 48小时之后，收集细胞(参阅下文的“发明详述”部分)并将上清进行p24抗原分析。图4B: 从用pMJF－1，pLRNL－2(仅载体)，pMJT，pMJV和pMHR转染的Hela细胞中分离总RNA，并点样于膜上(见“发明详述”，下文)，然后与5′末端放射性标记的核酶特异性探针杂交。用磷光显像器(phosphoroimager)(Molecular Dynamics，California)的扫描装置对点样印迹强度进行定量分析。

图5A和5B: 在瞬时检测中由反转录病毒载体表达的抗HIV－1特异性核酶对HIV－1 Eli和MN株表达的影响。将效应质粒(pEli或pMN)与含核酶的反转录病毒载体pMJT，pMJV和pMHR(分别为条带2，3和4)或没有核酶基因的反转录病毒载体pLRNL－2(条带1)一起共转染到

Hela细胞中，每项实验设置1个或2个重复。图5A：对于HIV－1 pE-li，以0.25:10μg比例(效应质粒：核酶载体)共转染。图5B：对于HIV－1 pMN，以0.25:10μg(效应质粒：核酶载体)共转染。48小时之后，收集细胞(见“发明详述”部分，下文)并对上清液进行p24抗原分析。

图6A和6B显示在转导之后11周(图6A)和25周(图6B)，HIV－1特异性核酶在稳定细胞系中的表达。采用Chomczynski，P和Sacch，N. Anal.Biochem. 162:156 (1987)的方法(引入本文作为参考)用酸性硫氰酸胍－苯酚/氯仿对从稳定细胞系中获得的总RNA进行萃取。将用不含RNA酶的DNA酶(RQ1 DNase:Promega)处理之后的1μg总RNA用作为逆转录反应的模板。根据Yamada，O.等人，J.Virol.Methods 27:203 (1990) (引入本文作为参考)中的方法，不同之处在于省去使用玻璃粉的提取步骤，用Rib4 (5′－CAC，ACA，ACA，AGA，AGG-3′)(SEQ ID NO.1)和Rib2 (5′－TAC，CAG，GTA，ATA，TAC，CAC－3′)(SEQ ID NO.2)引物对完成与逆转录相结合的PCR反应(在94℃进行1分钟，42℃进行1分钟，72℃进行1分钟：进行30个循环)。在有或没有逆转录的PCR完成之后，取每种扩增产物各10μl在3%低熔点琼脂糖凝胶(Boehringer)和Tris－硼酸盐缓冲液(pH 7.2)中进行电泳。用[^{32}P]－末端标记的Rib3 (5′－CAA，CCA，GAG，AAA，CAC，ACG，TT－3′)(SEQ ID NO.3)完成Southern印迹分析。图中给出了在未受感染的MLNL6(没有核酶)，MMJF－1，MMJT，JLNL6(没有核酶)，JMJF－1和JMJT细胞中核酶的表达。将含有核酶的反转录病毒载体质粒(pMJT)用作核酶DNA的阳性对照，在没有逆转录酶参与的情况下完成－RT:PCR反应。扩增产物的大小是54bp。

图7显示了表达HIV－1特异性核酶的Jurkat细胞的增殖情况。将亲代Jurkat细胞(Jurkat克隆3.8)和待检细胞系均分到一个U形孔底的96孔平板的四个重复设置的孔中，细胞浓度为10^4个细胞/100μl/孔。将补充了10% FBS并含有1μCi的[^{3}H]－(甲基)－胸腺嘧啶(NET－027, NEN)的100μl RPMI 1640加入每个孔。48小时之后，将细胞收集在滤纸上。用闪烁计数计(Beckman)检测该滤纸的放射活性。所给出的数据为平均值±S.D. (n = 4)。

图8: HIV－1特异性核酶对不同的HIV－1株表达p24抗原的抑制作用。将HIV－1毒株HXB2, MN, Eli或J677－2(一种未克隆的临床分离株)用于感染能表达核酶的Jurkat细胞 (JMJF－1和JMJT细胞)以及受没有核酶的反录病毒载体转导的对照Jurkat细胞(JLNL6细胞)，感染时各毒株的输入感染复数(M.O.I.)为0.01(或者对于较慢速生长的J677-2株, M.O.I.为0.1)。在把艾滋病患者的PBMC与正常PBMC共培养，将J677-2分离之后，在MT－4细胞中传代一次。○JLNL6, ●JMJF－1, □JMJT。

图9: HIV－1特异性核酶对HIV－2复制没有抑制作用。以0.01(HXB2)或0.001(对于快速生长的毒株HIV－2 KR)的输入M.O.I.，将HIV－1 HXB2或HIV－2 KR感染到表达核酶的Molt－4/8细胞(MMJF－1和MMJT)以及受没有核酶的反录病毒载体转导的Molt－4/8细胞中(MLNL6)。○MLNL6, ●MMJF－1, □MMJT。根据Yamada, O.等人, AIDS Res.Hum.Retroviruses 4:287 (1988)(引入本文作为参考)的方法，利用MT－2细胞测定这些病毒株制剂的感染效价($TCID_{50}$)。在病毒吸附2小时之后用RPMI 1640培养基将细胞洗涤两次，以10^5个细胞/ml的浓度将细胞重悬于增补了10% FBS的RPMI 1640培养基中。

将这些受感染细胞培养6天。每2天收集该培养液的小量样品，采用HIV－1或SIV/HIV－2抗原捕获ELISA检测法(Coulter)测定p24或p26抗原的量。

图10：感染之后第9天在MLNL6和MMJF－1细胞中合胞体的形成。以0.01的输入M.O.I.，用HIV-1 HXB2或MN毒株感染表达核酶的Molt 4/8细胞(MLNL6和MMJF－1)。在病毒吸收2小时之后，用RPMI 1640培养基将细胞洗涤两次，并以10^5个细胞/ml的浓度将细胞重悬于补充了10% FBS的RPMI 1640培养基中。在感染之后第5天开始每2天将细胞分开，使浓度为3×10^5个细胞/ml。

图11：在长期培养过程中，在受HIV-1/HXB2或HIV-1/MN感染的能表达HIV－1特异性核酶的Jurkat细胞中对RT活性的抑制。将HIV－1 HXB2(A)或MN(B)分别以0.01的输入M.O.I.感染JLNL6，JMJF－1和JMJT细胞。在病毒吸收2小时之后用RPMI 1640将细胞洗涤两次，并以10^5个细胞/ml的浓度将细胞重悬于补充了10% FBS的RPMI 1640中。在第5天或之后，每2天将细胞分开以使浓度维持在3×10^5个细胞/ml。检测培养上清液中是否存在HIV RT活性。简而言之，将0.5 ml 上清液样品与0.24 ml的30%聚乙二醇6000以及20 ml的4 M NaCl混合，设置两份。在以14000 rpm微离心30分钟之后，除去上清液，向每个试管中各加入10 ml的TNE溶液(10 mM Tris－HCl, pH 7.8; 100 mM NaCl; 1 mM EDTA)。混合之后，加入40 ml 含有250 mM Tris－HCl pH 7.8; 250 mM $MgCl_2$; 250 mM KCl; 25 mM二硫苏糖醇; 1.25 mg/40 ml 的聚(rA)聚(dT) 12－18(Pharmacia); 2.5 mCi/0.25 nmol/40 ml的[^{3}H]dTTP(NEN)的混合物，并在37℃培养1小时。加入10 ml的0.2 M EDTA。然后将该混合物的一份样品

(50 ml)点印到DE81纸(Whatman)上，风干，用5%焦磷酸钠洗涤5次，用水洗两次。然后将该纸干燥，用闪烁光度计(Beckman)检测放射活性。当用聚(dA)聚(dT)替代聚(rA)聚(dT)时检测不到放射活性。○JLNL6，●JMJF－1，□JMJT。

图11(插图)：在感染之后，HIV－1特异性核酶在稳定细胞系中的表达。采用图6中描述的RT PCR方法检测用HIV－1/MN感染之后23天时在Jurkat细胞JMJT和JMJF－1中核酶的表达。以未感染的JLNL6细胞作为阴性对照。还进行了没有逆转录发生的PCR反应，未检测到扩增产物。

图12：用“逃逸”病毒攻击能表达HIV－1特异性核酶的Jurkat细胞。将在图11中所示的实验中，分别在第35天或第23天收集HIV－1 HXB2或MN株感染的JMJF－1细胞的培养上清液用于再感染JLNL6，JMJF－1和JMJT细胞。对于HXB2和MN，其输入M.O.I.分别为0.0004和0.01。由于在第35天时收集的HXB2的感染性很低，因而不能将其输入M.O.I.调整至0.01。采用HIV－1抗原捕获ELISA检测法(Coulter)测定p24水平。○JLNL6，●JMJF－1，□JMJT。

图13：在HIV－1感染的早期，HIV－1特异性核酶对原病毒DNA在JMJT细胞中合成的影响。采用嵌套式双重PCR方法半定量地分析在用HXB2感染的早期阶段，JLNL6和JMJT细胞中HIV－1原病毒DNA的含量。在用HIV－1 HXB2感染之后采用蛋白酶K和苯酚/氯仿的方法从JLNL6和JMJT细胞中提取细胞基因组DNA。每种DNA提取物各取1 μg用作第一次PCR反应的模板。第一次和第二次PCR反应的反应混合物组成是：50 mM Tris (pH 8.3)；6 mM $MgCl_2$；40 mM KCl；1 mM二硫苏糖醇；dATP，dGTP，dTTP和dCTP各200 mM；2.5个单位

的Taq聚合酶；以及引物(Promega)各1 mM。用于扩增HIV－1 LTR的引物对用作为扩增HIV－1 DNA的引物（其扩增产物包括对应于核酶的靶序列)。用引物对SK29和GK 2（5′－CGG, CGG, ATC, CCG, GGC, GCT, TCA, GCA, AGC, CGA－3′)(SEQ ID NO.4)进行第一次PCR（在94℃进行1分钟，54℃进行1分钟，72℃进行1分钟：共30个循环)。在第一次PCR进行至第10个循环时向该反应试管中加入用于扩增β－球蛋白的引物对PC03/GH21，用作内部对照。对于第二次PCR，将1/10体积的第一次PCR产物加入，并用SK29/SK30引物对[Ou, C－Y等人，Science 239:295 (1988)引入本文作为参考]以及RS 06 [参见Saiki,R.等人，Science 239:487 (1988)引入本文作为参考]/GH21引物对完成扩增过程(30个循环)。每隔5个循环收集10μl第二次PCR产物，采用凝胶电泳方法以及Southern印迹分析法检测扩增产物。Southern印迹法是用分别对应于HIV－1或β－球蛋白DNA的[^{32}P]－末端标记SK31(参见Ou, C－Y等人，文献同上，引入本文作为参考)或RS 06进行杂交的。特异于HIV－1的扩增产物的大小为105个碱基对，对应于β－球蛋白的大小为204个碱基对。图中显示了在不同循环次数时收集到的扩增产物的检测结果。

图14：用HIV－1攻击被转导/选择的人外周血淋巴细胞。采用Ficoll－Hypaque离心法从血液中分离人PBMC，并以1×10^{6}个细胞/ml的浓度平板培养于RPMI培养基中，该培养基中增补了10%胎牛血清，5μg/ml PHA－P以及20 U/ml IL－2。在37℃培养2天之后，离心细胞，并洗涤，然后用于转导。在4μg/ml polybrene (1,5－二甲基－1,5－二氮十一亚甲基聚甲溴化物)存在下，将PALNL－6或PAMJT包装细胞系的经过滤的上清液与3×10^{6}经刺激的PBMC在37℃

温育4－6小时。 将PBMC洗涤，并以1×10^6/ml的密度在RPMI＋10% FCS, 20 U/ml IL－2中培养过夜。转导步骤每天重复进行一次共三天。 将细胞在添加了400μg/ml G418的RPMI＋10% FCS, 20 U/ml IL－2中培养8天进行选择， 随后在没有G418的相同培养基中培养3天。未与包装细胞系上清液接触的对照细胞系在经过该步骤时不能生存，正如台盼蓝染料排除法测定的那样。将选择到的细胞(2×10^5)感染2小时(M.O.I. = 0.01)，洗涤一次，并以1×10^6/ml的浓度平板培养于RPMI＋10% FCS, 20 U/ml IL－2中。每2天收集一半量的培养基并用新鲜培养基替代。 采用抗原捕获(p24) ELISA (Coulter)法监测病毒的产生。将经转导/选择的LNL－6和MJT细胞系分别命名为TLNL和TMJT。

图15: 图解描述能表达多靶核酶的反转录病毒载体的构建（未按比例绘制）。更详细的描述参见“发明详述”部分。

图16: 在HIV－1 HXB2感染的早期， 核酶对JMJT细胞中原病毒DNA合成的影响。 采用嵌合双重PCR方法对JLNL6和JMJT细胞中用HXB2感染6小时后HIV－1原病毒DNA含量进行半定量测定。图中显示了在第二次PCR的第15, 20, 25和30轮循环时收集到的扩增产物的检测结果。用相同引物和条件(见下文)扩增到了不同量的(0.05－5 fg)pSF-2, 以估测HIV－1 DNA的相对量。

图17: Southern印迹分析法分析经转导/选择的培养物的RT－PCR产物。－和＋表示在RT－PCR反应中是否存在逆转录酶。 RNA是从下列细胞中分离的: MMJT, 用MJT稳定转导的Molt4/克隆8; MJT和LNL, 用MJT或LNL－6转导的并在含G418的培养基中选择了8天，随后在没有G418的培养基中培养1周之后的PBMC。

图18A和18B。所选择到的培养物(供体054)的生长和CD4/CD8特性。A: 在G418选择之后经LNL－6△, MJT□转导的培养物的生长。B: 按FACS测定法测出的选择之后CD4＋□, 和CD8＋■细胞的百分数。

图19A－19D。用HIV－1和HIV－2攻击经转导/选择的培养物。A, C: 表示在经转导/选择的培养物中HIV－1 HXB2病毒产生, B: 表示HIV－2KR的产生; LNL－6△, MJT□。A组和B组(供体054)中的培养物是在平行条件下受HIV－1和HIV－2感染的。C组表示供体029的经转导/选择培养物受HIV－1长期攻击的情况。 D: 在经转导/选择培养物中临床HIV－1分离株的产生。 供体052＋临床分离株F(LNL－6△, 和MJT□); 供体061＋临床分离株G (LNL－6▲, 和MJT■)。

图20A和20B。A: 图解描述反转录病毒载体的构建。核酶受内部pol III启动子控制的载体的构建过程如下: 将含有人$tRNA^{val}$或腺病毒VA1 pol III启动子－核酶表达盒(包括终止信号)的片段(参见Ojwang等人, P.N.A.S.U.S.A., 89:10809 (1992), 引入本文作为参考)插入到反转录病毒载体pLNL6的Hind III位点处, 即所示的neo基因的下游。将得到的反转录病毒载体命名为pMJT(带tRNA启动子的载体)和pMJV(带有VA1启动子的载体)。用标准方法, 利用一种亲嗜性(ecotropic)细胞系psi2以及一种双嗜性(amphotropic)细胞系PA317包装反转录病毒载体。利用208F细胞测出的所有三种载体的效价约为10^5 CFU/ml。B: 采用RNA PCR法进行的核酶表达检测。采用酸性硫氰酸胍－苯酚/氯仿提取方法从每个样品的10个集落中提取总RNA。将0.1μg的总RNA用脱氧核糖核酸酶I (RQ1 DNase; Promega)处理之后, 用作逆转录(RT)反应的模板。用Rib4 (5′－CAC,

ACA, ACA, AGA, AGG－3′)(SEQ ID NO.1)和Rib2 (5′－TAC, CAG, GTA, ATA, TAC, CAC－3′)(SEQ ID NO.2)引物对进行与RT结合的聚合酶链式反应(在94℃反应1分钟, 45℃反应1分钟, 72℃反应1分钟; 共30个循环)。在与或不与RT结合进行的PCR完成之后, 每种扩增产物各取10μl进行点印迹分析。 用[^{32}P]末端标记的第三种寡核苷酸Rib3(5′－CAA, CCA, GAG, AAA, CAC, ACG, TT－3′(SEQ ID NO.3), 源自于核酶内部序列)进行杂交。 a＝MJT, b＝MJV, C＝LNL6, d＝混合对照: d1和d2, 未转导的干细胞/始祖细胞; d3, b1－b5的结合物(没有RT); d4, b6－b10的结合物(没有RT); b5, a1－a5的结合物(没有RT); d6, a6－a10的结合物(没有RT)。d9和d10, 2×10^3 MJT转导的Jurkat T细胞, 作为阳性对照。

图21: 反转录病毒载体转导的干/始祖细胞集落形成率的比较。将形成的集落总数(在表II底部给出的数据)除以平板培养的干细胞数目(5000)计算出集落形成率。误差线表示从三个实验中获得的集落数的偏差, 这三个实验是利用从互不相关的供体的脐带血液中分离得到的干/始祖细胞完成的。

图22A－22C。 A: 在来自于干细胞的巨噬细胞中核酶对HIV－1复制的抑制作用。在含有IMDM IL－3, IL－6, SCF的15 ml培养管(delta培养)中将被转导的干/始祖细胞维持3星期。 然后将培养物置于用人血清包被的平板(Costar 24孔#3524)上2－4小时并除去未粘附的细胞。之后, 将培养物维持于补充了10% FCS, 10%正常人血清以及GM－CSF (1 ng/ml)的RPMI培养基中。再培养3－4周之后, 用嗜巨噬细胞毒株HIV－1/Bal攻击生长条件下衍生于干细胞的巨噬细胞/单核细胞。 在所示时间收集细胞培养上清液, 并进行标准的

HIV p24 ELISA。B: 经转导的干细胞的生长曲线。在本图的附图说明A中描述的条件下培养LNL6、MJT和MJV反转录病毒转导的干细胞。在所示的不同的时间将总细胞计数。用0.4%台盼蓝(GIBCO BRL)排除掉任何死细胞，以避免在显微镜下将其计入细胞总数。 C: 在衍生于转导干细胞的巨噬细胞中核酶的长期表达。采用酸性硫氰酸胍－苯酚/氯仿提取法从每个样品的约10^6个巨噬细胞(干细胞转导之后约2个月)中提取总RNA。在Rib4(LTR转录特异，泳道2和5)或Rib2(pol III转录特异，泳道3和6)存在下以0.1μg的总RNA作为模板，进行逆转录(RT)反应。通过在图1B描述的反应条件下加入第二种引物而完成PCR反应。在有(泳道 1，2，3，5和6)或没有(泳道4和7)RT参与的PCR反应之后，每种扩增产物各取10μl(10%)在3%低熔点琼脂糖凝胶(Boehringer)上以及Tris－硼酸盐缓冲液(PH 7.2)中进行电泳，用[^{32}P]末端标记的第三个探针Rib3(来源于核酶的内部序列)进行Southern印迹分析。点渍2，3，4 = MJT；点渍5，6，7 = MJV，点渍1 = LNL－6，点渍8是以pMJT质粒作为模板时DNA PCR产物的阳性核酶大小的对照。在所有对照点渍(1，4，7和8)中，在逆转录步骤中同时加入Rib2和Rib4引物。

发明详述

基因治疗是一种令人兴奋的新颖的治疗人类疾病的方法。除了采用插入功能性细胞基因而校正遗传缺陷外，基因治疗还可以刺激针对肿瘤或受病毒感染的细胞的免疫应答或用于抑制传染性病原因子的表达/功能。

自从鉴定出人免疫缺陷型病毒(HIV)是获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的致病因子以来，为研制抑制该病毒复制的方案已作出了巨

大努力。从理论上讲，通过干扰病毒生命周期中的各个关键步骤：包括病毒入侵，逆转录，整合，转录，RNA加工，反式激活，转译，包装，以及病毒粒子的释放，应该可以达到对HIV复制的抑制。 的确， HIV的生命周期提供了可用基因治疗方法进行干扰的许多值得注意的环节，包括将干扰HIV病毒入侵的反显性(transdominant)突变gag和包被基因、 抑制HIV－1转录和反式激活的反式激活效应假目标(TAR decoy)、 抑制HIV RNA加工的REV效应元件假目标(RRE decoy)以及反显性的REV突变体导入到受HIV感染的细胞中，等等。

已经用反义(RNA或DNA)核苷酸靶击和抑制在HIV－1生命周期中病毒mRNA的利用。但是反义抑制作用的化学计量学特性使这种对胞内HIV感染和复制的抑制方法具有局限性。

本文揭示的HIV型特异性核酶可以克服用传统反义技术来阻止细胞中HIV感染和复制所受到的限制。 核酶是具有RNA催化活性的RNA分子。一条催化链切割靶RNA上的一个特异性位点； 被切割的RNA的数目大于基于化学计量学预定的数目。

本文中所使用的“核酶”是指含有进行特异性识别的反义序列，并具有切割RNA的酶活性的RNA分子。该催化链以大于化学计量学浓度在靶DNA的特异位点上切割。 本发明中，有两种“类型”的核酶。锤头型核酶(hammerhead ribozyme)(Rossie, J.J.等人, Pharmac. Ther.50:245－254 (1991)，引入本文作参考)以及发夹型核酶(hairpin ribozyme)(Hampel等人, Nucl.Acids Res. 18:299－304 (1990)以及美国专利No.5,254,678，1993年10月19日颁发，两篇文章都引入本文作为参考)。 由于锤头型和发夹型核酶都是具有反义和核糖核苷酸内切酶活性的催化分子，因此核酶技术是作为使基因

失活的反义方法的进一步发展而出现的。如下文中详细描述的，已经证实，抗HIV－1 RNA的锤头型核酶和发夹型核酶在细胞内的表达可使细胞有效地抵抗HIV－1感染。

这种核酶可以是一种锤头型(例如，由Forster和Symons(1987) Cell 48: 211－220; Haseloff和Gerlach (1988) Nature 328: 596－600; Walbot和Bruening (1988) Nature 334:196; Haseloff和Gerlach (1988) Nature 334:585，都引入本文作为参考)也可以是一种发夹型核酶 (例如，由Haseloff等人，美国专利No. 5,254,678，1993年10月19日颁发以及Hempel等人，欧洲专利申请No.0360257，1990年3月26日公开，都引入本文作为参考)，该酶具有特异性地靶击、切割和失活HIV RNA的能力。

发夹型核酶的必需序列是由NNNG/CN˙GUCNNNNNNNN组成的任何RNA序列(SEQ ID NO.15)(其中N˙G是切割位点，并且N是G，U，C或A中任何一种)。对于锤头型核酶，其切割位点处的序列要求是由可被靶击的NUX(其中N是G，U，C或A中任何一种，X代表C，U或A)组成的任何RNA序列。因此，位于发夹型前导序列内的同样的靶GUC，对于锤头型核酶也是有用的。锤头型核酶或发夹型核酶的其他核苷酸是由靶两侧的核苷酸以及锤头型共有序列确定的。

Cech等人(美国专利No.4,987,071，1991年1月22日颁发)已经公开了具有核糖核酸内切酶活性的几种合成核酶的制备和使用。这些核酶是以四膜虫属核糖体RNA的自我拼接反应特性为基础的，并且需要一个八个碱基对的靶位点。据报道，该核糖核酸内切酶活性的最适温度为50℃。切割反应产生的片段含有5′磷酸和3′羟基基团以及加在被切割的RNA的5′末端的一个游离鸟嘌呤核苷酸。相反，

本发明的核酶可在生理温度条件下有效地与靶序列杂交，从而使这些酶适合于在体内使用，而不仅仅是作为研究工具(参见，Cech等人，美国专利No.4,987,071，第15栏，18－42行)。

本发明的核酶以及在下文中将更详细描述的编码该酶的DNA可用本领域内熟知的方法进行化学合成(例如，可根据USA，Wis.，Madison的Promega推荐的方案。引入本文作为参考)。还可以从DNA分子制备该核酶(转录后产生RNA分子)，该DNA分子用基因操作方法与一个RNA聚合酶启动子（例如，T7 RNA聚合酶或SP6 RNA聚合酶的启动子）进行连接。因此，本发明还提供了一种为本发明核酶编码的核酸分子即DNA或cDNA。如果载体还含有与该DNA分子通过基因操作连接的一个RNA聚合酶启动子，则也可以将它与RNA聚合酶和核苷酸一起温育而在体外制备该核酶。在另一个实施方案中，按照Cotten和Birnstiel (1989) EMBO J. 8(12):3861－3866和Hempel等人，Biochemistry 28:4929－4933 (1989)或Yu等人，P.N.A.S. 90:6340－6344 (1993)(引入本文作为参考)描述的方法将该DNA插入到一个表达盒或转录盒内。在Sambrook等人(1989) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (引入本文作为参考)一书中公开了更详细的分子生物学方法。在合成之后，可以将它与一个具有使该核酶稳定并使之对RNA酶具有抗性能力的DNA分子相连接而修饰该RNA分子。或者，将该核酶修饰成为一种适用于脂质体释放系统的磷硫类似物(phosphothio analg)。这种修饰作用也可以给该核酶提供抵抗核酸内切酶活性的能力。

该DNA分子也可以存在于培养的原核宿主或真核宿主细胞或生物体细胞内。可用含有为本发明核酶编码的DNA分子的合适的转移

载体转染合适的原核和真核细胞。当该DNA分子与RNA转录所需的启动子通过基因操作而连接时，将该宿主细胞在有利于该DNA分子转录的条件下生长，就可以生产该RNA。这种载体可以是，但不限于质粒，病毒，反转录转座子(retrotransposon)或粘粒(cosmid)。这种载体的举例描述可参见美国专利No.5,166,320（引入本文作为参考）。适当的腺病毒载体也特别有用，例如腺相关的1型载体（“AAV－1”）或腺相关的2型载体（“AAV－2”）(参见Chatterjee等人，(1992) Science Vol.258:1485－1488，引入本文作为参考)。基因治疗方法是本领域内熟知的，参见，例如Larrick，J.W.和Burck，K.L.Gene Therapy: Application of Molecular Biology，Elsevier Science Publishing Co.，Inc.，New York，New York (1991)和Kreigler，M.Gene Transfer and Expression : A Laboratory Mannual，W.H. Freeman and Company，New York (1990)，所有文献引入本文作为参考。

本发明还提供了一个pol III转录盒，它存在于诸如pMJV和pMJT的载体中。这些转录盒具有下文列出的序列:

5′- AAG CTT TGT AAC CGT TGG TTT CCG TAG TGT AGT GGT TAT CAC GTT CGC CTC ACA CGC GAA CGG TCC CCG GTT CGA AAC CGG GCG GAA ACA GGA TCC ... (插入的外源基因) ... ACG CGT TTT TGC ATT TTT CTG CAG GCA TGC AAG CTT - 3′ (SEQ. ID NO. 17)； 和

pMJV

5′ -ATC GAT AAG CTA ATT CGA GAG CCT GTA AGC GGG

CAC TCT TCC GTG GTC TGG TGG ATA AAT TCG CAA GGG TAT CAT GGC GGA CGA CCG GGG TTC GAA CCC CGG ATC C ... (插入的外源基因) ... ACG CGT TTT TGC ATT TTT CTG CAG GCA TGC AAG CTT -3′ (SEQ. ID NO. 18).

本文还提供了一种载体，该载体含有该pol III转录盒和一个外源基因。本文也提供了用这些转录盒进行表达的宿主细胞以及方法。该表达盒适用于基因或DNA序列的表达，并且不仅限于表达本文公开的HIV核酶。

为了用载体产生核酶，将该编码核酶的核苷酸序列置于一个强启动子(例如lac，SV40晚期，SV40早期或λ启动子)控制之下。然后直接在体内从转移载体中产生核酶。

在另一个实施方案中，病毒载体是一种反转录病毒，例如基于无毒的牛痘苗病毒载体或Moloney鼠白血病病毒。适用于基团治疗的合适的反转录病毒载体是一种能自我复制的反转录病毒，在该反转录病毒的5′和3′长末端重复(LTR)区之间插入了一个外源核酸(DNA或cDNA)序列，该序列处于一个启动子控制下，例如反转录LTR或被插入的pol III启动子（如人$tRNA^{Val}$启动子或腺病毒VA1启动子）。然后该反转录病毒载体在宿主细胞中稳定地表达该核酶。

本发明的一个方面提供了一种反转录病毒载体，利用该载体可在体外从一个患者样本中检测HIV的存在，或者将组织样本输注给患者之前，用该载体净化出组织样本中的HIV。当用作为体外检测系统时，从哺乳动物中取出一个被怀疑含有病毒的细胞样品。“哺乳动物”意指包括，但不限于灵长类，鼠类和人类。将反转录病毒载体转导到这些细胞中，然后繁殖细胞。对从细胞中分离的核酸进行

探测(采用杂交分析)，观察在细胞未与含有核酶的反转录病毒载体接触时，还没有存在的HIV片段。一种核酶特异片段的存在是HIV存在的阳性指征。在该检测分析中可以用诸如放射性同位素或酶标记进行检测。 在体内，基因治疗以阻止HIV感染和复制中可使用该反转录病毒载体。本发明的反转录病毒载体是一种感染性反转录病毒载体， 在该反转录病毒的5′和3′长末端重复(LTR)区之间插入了一个外源核酸(DNA, RNA或cDNA序列)， 该序列处于pol III启动子控制下。然后该反转录病毒载体在宿主细胞中稳定表达该外源基因。本文中所使用的术语“感染性”是指具有感染、整合和表达外源核苷酸序列的能力的反转录病毒载体。为了便于说明，适用于构建本发明反转录病毒载体的合适的反转录病毒包括Moloney 鼠白血病病毒、衍生于HIV－1和HIV－2的反转录病毒载体。外源核酸序列包括，但不限于为一种抗HIV型特异因子 (例如抗HIV反义分子或特异性地切割HIV的核酶) 编码的核酸序列或一种HIV调节序列 (如TAR) 。

在一个实施方案中， 该核酸序列编码一种特异于HIV－1型或HIV－2型病毒的核酶。在一个具体实施方案中，反转录病毒载体可表达特异性地切割HIV－1各种毒株的核酶。一种HIV－1型特异性核酶特异性地切割HIV－1型病毒中存在的保守序列，该保守序列存在于各种HIV－1毒株的前导序列中，但HIV－2中不存在。

另一种HIV－1型特异性核酶靶击HIV基因组的3′末端。 一个3′末端特异的核酶的例子具有下列序列:

5′－ACUGGGUCUCUCUGGUUAG－3′

(SEQ ID NO.5, 命名为“Rz－2”)。

该序列大约是从U3/R边界起始的mRNA的9079至9097位核苷酸。

另一个例子是HIV基因组的Rev/ENV区域。该序列是5′TTGGAGTCAGG-AACTA 3′(SEQ ID NO.16)。该序列是HBX2的8629至8644位核苷酸。另外，本质上与这些序列相似的序列也包括在本发明范围内。“本质上相似”或“本质上相同”包括那些具有靶击和阻止HIV感染的能力(如上文中显示的序列)的核酶序列。本质上相似的序列是那些在严谨条件下能与该序列或其互补序列杂交的序列。杂交方法也是本领域内熟知的，参见Sambrook等人，下文，引入本文作为参考。

换一种方法，用下文中介绍的方案也可以构建能特异性地切割不同的HIV－2毒株中的保守序列的核酶并在体内表达。

本发明进一步提供了反转录病毒载体，在这些载体中其5′和3′LTR之间插入了一个以上的外源基因序列，每个外源基因序列受一个独立的pol III启动子控制，或者受单一的一个pol III启动子控制。这些外源基因序列可以编码相同或不同基因产物，例如，编码抗HIV-1的反义分子的核酸可以插入与编码HIV-1特异性核酶的核酸序列相同的反转录病毒载体中。这样的反转录病毒载体提供了抗HIV感染的多功能治疗方法，各种特异性治疗方法具有协同增效作用。另外，由于使用的载体数少，因而减少了宿主细胞中整合位点数目，从而降低了由于插入反转录病毒载体而激活宿主细胞DNA序列的可能性。

本发明还提供了用上文描述的反转录病毒载体稳定转导的宿主细胞。合适的宿主细胞有哺乳动物细胞(如人或灵长类动物的成纤维细胞，外周血淋巴细胞，外周血单核细胞，$CD4^+$ T细胞或造血干细胞)。在其成熟之前插入了一种上文描述的反转录病毒载体的成熟的、分化完的干细胞或胎盘脐带血细胞也包括在本发明范围内。这时这

种分化的干细胞基本地、稳定地表达外源基因产物。转导反转录病毒载体的方法是本领域内熟知的方法。 参见，例如Larrick, J.W. 和Burck, K.L.Gene Therapy: Application of Molecular Biology, Elsevier Science Publishing Co., Inc. New York, (1991), 引入本文作为参考。

本发明还提供了在受HIV感染的细胞中干扰和阻止HIV病毒复制的方法。该方法需要用一种反转录病毒载体转导该细胞，该反转录病毒的5′和3′ LTR之间插入了一个核酸序列，该核酸序列编码一种抗HIV型特异性因子(例如上文描述的核酶)，并且受一个插入的pol III启动子控制。 在有助于该载体插入到该靶细胞中并且使该编码HIV型特异性核酶的核酸稳定表达的条件下转导该靶细胞。 该靶细胞包括（但不限于）哺乳动物细胞。合适的哺乳动物细胞包括（但不限于）灵长类或人细胞（例如成纤维细胞，$CD4^+$ T细胞，外周血淋巴细胞，胎盘脐带血细胞，外周血单核细胞或造血干细胞）。如果在HIV感染之前转导该细胞，可以阻止该靶细胞或其后代被感染。

可以从正常新生儿、 受HIV感染个体的新生儿或从分娩过程中的母亲采集胎盘脐带血液。利用设计好的冷冻程序将血液冷冻以确保最大的存活率。

本文中使用的术语“干扰或阻止”细胞中HIV病毒复制是指，与未用反转录病毒载体暂时或稳定转导的细胞相比， 降低了该细胞中HIV复制或子代病毒形成所必需的HIV成分的产生。该术语还包括感染性病毒粒子的产生相对降低， 这是通过切割包装好的子代RNA而实现的。一种简单而方便的测定HIV病毒复制是否已经降低的检测方法是针对HIV p24抗原(gag基因产物)的ELISA检测法。 另一

种可使用的方法是，从被转导和受感染“对照”细胞中分离总RNA而用点印渍法进行分析，它是用HIV特异性DNA进行探测以测定HIV复制是否降低。与对照细胞相比，HIV复制降低50%以上即可定量地说明了HIV复制受到抑制。

在本发明中，HIV包括任何变异型HIV，例如HIV－1，HIV－2或未进行分类的临床分离株。本发明所具有的令人意想不到的优点是其抗各种类型的毒株或各种类型的HIV变异株的效率。

在本发明的一个实施方案中，利用本领域内熟知的方法从哺乳动物例如灵长类或人患者中获取靶细胞并用上述方法进行转导。然后将该转导后的靶细胞再导入到同一动物或相同种的不同动物中。

下列实施例是为了描述而不是为了限制本发明。

实验详述

实验1

酶和化学药品：所使用的所有限制性酶来自于Bethesda Research Laboratories (BRL) 或Boehringer Mannheim Biochemicals。对应于限制性酶的缓冲液也由酶的制造商提供。T4 DNA连接酶以及测序试剂盒购于Pharmacia。体外转录试剂盒以及相关的酶购于Promega。小牛血清，抗菌素(青霉素和链霉素)，L－谷氨酰胺，丙酮酸钠，磷酸盐缓冲液(PBS)以及Dulbecco改良的伊格尔氏(Eagle)培养基(DEME)均购于GIBCO。HIV－1 p24抗原检测试剂盒购于Coulter，并根据制造商的说明使用。

pol III启动的核酶质粒的构建：除非另有说明，所有重组DNA技术都是按照Sambrook等人，Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Lab., Cold Spring Harbor, NY

(1989)(引入本文作为参考)的描述进行的。HIV－1 5′前导序列特异性发夹型核酶(5′－ACA, CAA, CAA, GAA, GGC, AAC, CAG, AGA, AAC, ACA, CGT, TGT, GGT, ATA, TTA, CCT, GGT, A－3′(SEQ ID NO.13))按如下方法进行克隆：将用化学方法合成的对应于人$tRNA^{val}$启动子(138bp)和腺病毒VA1(104bp)启动子的双链脱氧核糖核苷酸克隆到pHR和pdHR质粒(Ojwang等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89: 10802－10806 (1992), 引入本文作为参考)(两个质粒分别含有活性的和失活的核酶), 其克隆位点位于该核酶编码序列上游的EcoRI至BamH I位点(图1)。用Mlu I和Pst I将得到的含有pol III启动子的质粒进行消化, 以除去自催化盒, 并按照Geiduschek,E.P.,Ann. Rev. Biochem.,57: 873－914 (1988)描述(引入本文作为参考)的方法用pol III终止序列替代。用DNA测序法确认这些克隆的序列。将含有$tRNA^{Val}$启动子的质粒命名为pJT－HR, 含有VA1启动子构建体的质粒命名为pJV－HR(图1)。

HIV特异性核酶在从5′帽位点处计数时第111/112位点的两个碱基之间切割。

反转录病毒载体的构建：按如下方法构建其核酶受内部pol III启动子控制的载体：通过用Hind III消化从pJT－HR或pJV－HR(具有启动HIV前导序列发夹型核酶的合成tRNA或VA1启动子的质粒(Yu et al., P.N.A.S.(1993), 引入本文作为参考))上除去含有人$tRNA^{Val}$或腺病毒VA1 pol III启动子－核酶(Rz)编码盒(包括pol III终止信号)的片段, 并插入到反转录病毒载体pLNL6(购自California大学的Dr.Fred Levine, San Diego)的Hind III位点。现在该内部启动子转录盒与该载体的LTR处于相反方向定位。 将得到的

反转录病毒载体命名为pMJT(对于$tRNA^{val}$内部启动子)和pMJV(对于VA1内部启动子，图1)。

利用相同载体，以及来自pβ－HR的EcoRI－BamHI插入片段(Ojwang等人，文献同上)构建含有内部β-肌动蛋白启动子的反转录病毒载体。在该插入片段中含有发夹型自催化盒(Ojwang等人，文献同上)。将连接后得到的反转录病毒载体命名为pMHR(图1)。为了将从内部启动子进行的核酶表达与反转录病毒LTR进行的表达进行比较，使用了另一种载体(pLRNL-2，来自于San Diego, California大学的Dr.Jiing－Kuan Yee)。用EcoRI和Hind III消化，从pHR上切下核酶序列，并且在将该插入物和该线性化质粒末端平头化以后，将该序列插入到Hind III克隆位点。并将该核酶序列置于与启动neo基因的RSV启动子上游紧密相连的地方(图1)。

根据国际承认用于专利程序的微生物保存布达佩斯条约，于1993年5月17日将反转录病毒载体pMJV和pMJT样品保存于美国典型培养物保藏中心(ATCC)，12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852，并分别给出登记号ATCC No.75471和75470。

多靶核酶表达载体：为了确保对HIV感染进行核酶基因治疗的效率，构建能表达多靶核酶的载体(图15)。利用一个双顺反子反转录病毒载体pLPONL(得自于San Diego, California大学的Dr.Jiing－Kuan Yee)。从pMJT或MJV(图1)上切除含有$tRNA^{Val}$或VA1启动子的抗前导核酶基因(Rz－1)。将能靶击HIV－1 3′序列的一个片段的一个核酶基因(Rz－2)克隆到脊髓灰质炎病毒的未转译区的内部转译起始位点(po)的前面。瞬间共转染的结果显示，p24的产生量降低，证明这些构建体对HIV－1的表达具有抑制作用。Jurkat细胞系可稳

定地表达这两种核酶。 也可将其他核酶和/或反义序列掺入到这些构建体中。

细胞和转染: 在含有10%胎牛血清(FBS), 100μg/ml青霉素－链霉素, 2 mM L－谷氨酰胺和1 mM丙酮酸钠的DMEM中繁殖Hela细胞。在转染前一天, 在一个12孔的平板上(1×10^5个细胞/孔)将细胞生长至约70%细胞汇合。在转染之前, 用含有相同添加物的2 ml新鲜DMEM替代孔中培养基。 将用磷酸钙沉淀的质粒DNA加入到细胞中。在12－24小时之后, 除去培养基, 用1×PBS将细胞洗2或3次。然后将培养物维持于含有10% FBS, 100μg/ml青霉素－链霉素, 2 mM L－谷氨酰胺和1 mM丙酮酸钠的2 ml DMEM中。

稳定细胞系: 为了产生反转录病毒颗粒, 采用Sambrook等人, (1989)(文献同上)的磷酸钙方法转染双嗜性包装细胞系PA317, 方法如下: 在100－mm组织培养平皿中的增补了1 mM丙酮酸钠, 100单位/ml青霉素, 100μg/ml链霉素, 13μg/ml次黄嘌呤, 3.9μg/ml胸苷, 18 ng/ml氨基喋呤和10%胎牛血清(FBS; Gemini Bioproducts)的Dulbecco改良过的伊格尔氏培养基(GIBCO)中用20μg的磷酸钙沉淀的pLML6, pMJF－1或pMJT转染亚汇合PA317培养物12小时。用磷酸盐缓冲液(pH 7.4, 无Ca^{2+}, 无Mg^{2+})将细胞洗涤两次, 然后在新鲜培养基中再培养24小时。用该培养物上清液转染人$CD4^+$淋巴细胞衍生的Jurkat或Molt－4克隆8细胞(Molt－4/8)(Kikukawa, R.等人, J. Virol. 57:1159－1162 (1986))。将Jurkat和Molt－4/8细胞(1×10^6个细胞)悬浮于5 ml两种上清液中。4小时之后, 除去上清液, 将细胞培养于增补了100单位/ml青霉素, 100μg/ml链霉素, 10% FBS和400μg/ml G418 (GIBCO)的RPMI－1640培养基(GIBCO)中。通

过在含有G418的培养基中生长3－4星期而选择出抗性细胞。 将由pLNL6, pMJF－1和pMJT转导的具G418抗性的Jurkat或Molt－4/8细胞分别命名为JLNL6, JMJF－1和JMJT或MLNL6, MMJF－1和MMJT。

核酶在稳定细胞系中的表达: 按照Chomczynski和Sacchi, Anal.Biochem.162:156－159 (1987)(引入本文作为参考)描述的酸性硫氰酸胍－苯酚/氯仿萃取法从稳定细胞系中提取总RNA。将1μg的总RNA用脱氧核糖核酸酶I(RQ1 DNase; Promega)处理之后, 用作逆转录反应(RT)的模板。根据前述的方法, 不同的是省略了用玻璃粉萃取的步骤, 用Rib4 (5′－CAC, ACA, ACA, AGA, AGG－3′(SEQ.ID. NO.1))和Rib2 (5′－TAC, CAG, GTA, ATA, TAC, CAC－3′(SEQ ID NO.2))引物对进行有RT参与的聚合酶链式反应(PCR)(94℃进行1分钟, 45℃进行1分钟, 72℃进行1分钟; 共30次循环)。参见Yamada, O.等人, J.Virol.Methods 27:203－210 (1990), 引入本文作为参考。在RT参与或未参与的PCR完成之后, 在3%低融点琼脂糖凝胶(Boehringer)以及Tris－硼酸盐缓冲液(PH 7.2)中将各种扩增产物各取10μl进行电泳, 并按前面所述用^{32}P末端标记的Rib3 (5′－CAA, CCA, GAG, AAA, CAC ACG, TT－3′ (SEQ. ID. NO.3)) 进行Southern印迹分析。参见Yamada, O.等人(1990)文献同上, 引入本文作参考。

稳定细胞系的增殖: 根据细胞中掺入的[^{3}H]胸苷的量测定细胞的增殖。 简而言之, 以10^{4}个细胞/100μl/孔的浓度将亲代Jurkat细胞和待测细胞系分配到U形底96孔平板的四个重复的孔中。 向每个孔中加入增补了含1μCi[^{3}H－甲基]胸苷(NEt－027; NEN)的10% FBS的100μl RPMI－1640。48小时之后, 将细胞收集到滤纸上。用

闪烁光度计(Beckman)检测滤纸的放射活性。

HIV感染: HIV－1毒株HXB2, MN和Eli是从克隆的HIV－1 pHXB2(描述于Starcich, B.等人,. Science 227:538－540 (1985)), pMN(Gurgo, C., 等人, Vir.164:531－540 (1988))以及pEli(Alizon, M., Cell 46:63－74(1986))(三篇文献都引入本文作参考)产生的。未克隆的HIV J677－2是先将艾滋病患者的外周血单核细胞(PBMC)与正常PBMC一起共培养而分离的, 随后将它在MT－4(一种寄生了人T－细胞白血病病毒I型(HILV－1)的人$CD4^+$ T－细胞系)中传代一次。利用MT－2, 一种HTLV－1感染的人$CD4^+$ T-细胞系, 根据Yamada, O.等人, AIDS Res.Hum.Retroviruses 4:287－294 (1988) (引入本文作为参考) 描述的方法, 检测这些病毒株的病毒制剂的感染效价($TCID_{50}$)。在短期培养实验中, 以0.01或0.1(对于较慢速生长的J677－2株)的输入感染复数(M.O.I.)将这些病毒株用于感染能表达核酶的Jurkat细胞(JMJF－1和JMJT)以及对照Jurkat细胞(JLNL6)。在长时期培养实验中, 以0.01的输入感染复数, 用HXB2和MN感染JMJF－1, JMJT和JLNL6。从Talbott, R.等人, P.N.A.S., USA 90:4226－4230 (1993) (引入本文作为参考) 描述的感染性分子克隆中制备HIV－2 KR毒株。采用Yamada, O.等人(1988) (文献同上)的方法测定HIV－2 KR制剂感染Molt 4/8细胞的$TCID_{50}$。在短期培养实验中, 分别以0.01和0.001的输入感染复数, 用HXB2和HIV－2 KR感染能表达核酶的Molt－4/8细胞(MMJF－1和MMJT)以及由对照反转录病毒载体转导的Molt－4/8细胞(MLNL6)。在吸收病毒2小时之后, 用RPMI－1640培养基将细胞洗涤两次, 并以10^5个细胞/ml的浓度将细胞悬浮于增补了10% FBS的RPMI－1640中。在短期培养实验中,

将受感染细胞培养6天，每隔一天收集一小份培养液，并且采用HIV－1或SIV/HIV－2抗原捕获ELISA检测法(Coulter)测定HIV－1 p24抗原或HIV－2 p26抗原的量。在长期培养实验中，在第5天或之后，每隔一天将受感染细胞分开，以便维持3×10^5个细胞/ml的浓度。检测培养上清液中存在的HIV逆转录酶(RT)活性。简而言之，向0.5 ml上清液中加入0.24 ml 30%聚乙二醇6000和20μl 4 M NaCl，设置两份。在以14000×g微离心30分钟之后，除去上清液，向每一试管中加入TNE溶液(0.1% Triton x 100, 10 mM Tris－HCl pH 7.8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA)各10μl。混合之后，加入含有62.5 mM Tris－HCl pH 7.8, 25 mM $MgCl_2$, 25 mM KCl, 2.5 mM二硫苏糖醇，31.25μg/ml聚 (rA) p(dt)12－18 (Pharmacia), 62.5μCi/6.25 nmol/ml [^{3}H]dTTP(NEN)的混合物40μl，并在37℃培养1小时。加入0.2 M EDTA 10μl。然后将该混合物样品(50μl)点印到DE81纸(Whatman)上，风干，用5%焦磷酸钠洗涤三次，再用水洗两次。然后将该纸干燥，用闪烁光度计(Beckman)检测放射活性。

用经过长时间培养后回收到的病毒再次攻击：将图12所示试验中分别在第35天或23天收集到的用HIV－1 HXB2或MN株感染的JMJF－1细胞的培养上清液用于再感染JLNL6, JMJF－1和JMJT细胞。对于HXB2和MN，其输入感染复数分别为0.0004和0.01(因在第35天时收集到的HXB2的感染性十分低，因而不能将输入感染复数调整到0.01)。将这些受感染细胞培养6天。每隔一天收集小份培养液样品，并用HIV－1抗原捕获ELISA检测法(Coulter)测出p24抗原的量。

病毒DNA的半定量双重PCR反应：按照上文中描述的Sambrook等人的方法(文献同上)，利用蛋白酶K和酚/氯仿，从用HIV－1 HXB2

感染之后6小时的JLNL6和JMJT细胞中提取细胞基因组DNA。 取各种DNA提取物各1μg用作第一次PCR反应的模板。 第一次和第二次PCR反应混合物的组成是: 50 mM Tris pH 8.3, 6 mM $MgCl_2$, 40 mM KCl, 1 mM二硫苏糖醇, dATP, dGTP, dTTP和dCTP各200 mM, 每种引物各1 mM以及2.5单位的Taq聚合酶(Promega)。 将HIV－1 LTR的引物对用于扩增HIV－1 DNA(扩增产物包括核酶的靶序列)。 用SK29(参见Talbott, R.等人, P.N.A.S. (1993), 文献同上, 和GK2(5′－CGG, CGG, ATC, CCG, GGC, GCT, TCA, GCA, AGC, CGA－3′(SEQ ID NO. 14))引物对完成第一次PCR(94℃进行1分钟, 54℃反应1分钟, 72℃反应1分钟: 共30个循环)。在第一次PCR进行10次循环之后, 向同一反应试管中加入β－球蛋白的引物对PC03/GH21(参见Saiki, R.等人, Science 239:487－491 (1988), 引入本文作为参考)作为内部对照。 对于第二次PCR反应, 加入第一次PCR 1/10体积的产物, 并用两种引物对SK29/SK30 (参见Talbott, R.等人(1993), 文献同上)以及RS06/GH21(参见Saiki, R.等人, (1988), 文献同上) 进行扩增(30个循环)。 每进行5个循环收集10μl第二次PCR产物, 通过凝胶电泳和Southern印迹分析检测扩增产物。Southern印迹分析是分别用针对HIV或β－球蛋白的^{32}P－末端标记的SK31 (Talbott, R.等人, (1993), 文献同上)或RS06进行的。为了估测细胞DNA抽提物中HIV－1 DNA的相对量, 用相同的引物和反应条件扩增不同浓度(0.05－500 fg/ml)的含HIV－1 SF2的质粒DNA(参见Sanchez－Pes-eador, R.等人, Science 227:484－492 (1985), 引入本文作为参考)。

p24抗原定量分析: 按照制造商说明, 用Coulter HIV－1 p24

ELISA试剂盒定量检测核心抗原。用ELISA平板读数器在450 nm处检测光密度值。利用标准曲线由吸收值测定转染40－48小时之后收集到的培养上清液中病毒蛋白质(p24)的浓度。 然后以活性百分数或直接由p24蛋白质浓度表示该数值。 用HIV－1 p24表达的抑制百分率测定核酶作为HIV－1复制和表达抑制剂的效率。利用同样的方法(Coulter)对HIV－2 p26进行定量检测。

点印渍分析: 用前面描述的Ojwang等人 (文献同上) 的方法(引入本文作为参考), 从用不同DNA样品转染的Hela细胞中分离总RNA。简而言之, 用冰冷1×PBS将细胞洗涤两次, 然后加入10 mM EDTA (pH 8.0), 0.5% SDS, 0.1 M乙酸钠(pH 5.2)进行裂解。 通过用水饱和的酚萃取一次并用乙醇沉淀而从细胞裂解液中回收总RNA。为了除去模板DNA, 将分离到的RNA用DNase I处理。通过加入10 mM EDTA和0.2% SDS终止反应, 并用酚: 氯仿处理, 最后用乙醇沉淀而提取RNA。将回收到的总RNA再溶于DEPC处理过的水中, 并且通过用一个吸印多支管(Bethesda Research Laboratory)进行缓慢吸吮而将20μg溶液点印至GeneScreen Plus膜(Dupont)。然后将该膜用5′－末端放射性标记的合成DNA探针进行探测, 该探针与核酶RNA互补, 或者用体外转录的并且其内部进行了放射性标记的RNA探针进行探测, 该探针与HIV－1 RRE RNA互补。 用磷监测仪(Molecular Dynamics, California)对印迹强度进行定量测定。

由pol III启动子启动的核酶对HIV－1表达的影响: 将人$tRNA^{Val}$和VA1启动子插入到HIV－1 5′前导序列特异性核酶基因的上游。利用Ratner等人, AIDS Res.Hum.Retroviruses 3:57－69 (1987)(引入本文作为参考)公开的方法将pol III终止位点插入到该核酶基因

的下游。 采用RNA点印渍分析方法测定用这些质粒转染的Hela细胞中核酶的表达。与前面描述的pol II启动子人β－肌动蛋白(由Chang等人, Clinical Biotech. 2:23－31 (1990)描述, 引入本文作为参考)相比, 由pol III启动子启动的核酶的表达高88%。

为了在瞬间检测中测出核酶介导的对HIV表达的抑制效果, 根据Ojwang等人(文献同上)描述的磷酸钙方法, 将效应质粒(pHX32g-pt)和报道质粒(pC15CAT)(Arya等人, Science 229:69－73 (1985), 引入本文作为参考)与含有核酶的质粒(pJT－HR和pJV－HR)或作为对照的pUC19共转染到Hela细胞中。 为了进行比较, 在同等条件下使用由Ojwang等人(文献同上)报道的β-肌动蛋白启动子启动的相同核酶。 将细胞裂解液进行CAT检测, 并采用酶连免疫吸附检测(ELISA)法分析培养上清液中HIV－1 p24抗原(gag基因产物)的含量。将获得的结果以相对于对照值(作为100%)的百分数作图(图2A和B)。由pol III启动子表达的HIV－1核酶能显著地抑制HIV－1的表达以及病毒的产生 (总的来说为70－95%) 。 在检测Tat蛋白质活性(图2A)的分析中, 由$tRNA^{Val}$启动子引导的核酶产生的抑制率比由β－肌动蛋白启动子所引导的高出10%。对于p24的表达(图2B), pol III启动子引导的核酶产生的抑制率比β－肌动蛋白启动子引导的核酶高出15－25%。此外, 含有pol III启动子核酶的质粒对HIV-1表达的抑制的效果是DNA剂量依赖性的。

核酶的切割及其靶特异性: β－肌动蛋白启动子启动的核酶对HIV的抑制是其催化活性而不是其反义特性提供的。 另外, 它的作用依赖于靶序列的存在。现在也已经发现了pol III启动子启动的核酶具有同样的功能和特异性。为了测定催化特性相对于反义特性对

HIV-1表达抑制的相对大小，在pol III启动子质粒中构建具有三个突变点(由22－AAA－24突变为22－UGC－24)的失活核酶(Ojwang等人，文献同上)。这些突变位点的存在使核酶失活，但并不影响其与靶RNA的结合。野生型和失活核酶以相同水平在转染细胞中表达，但失活核酶对HIV－1表达的抑制率只有约10%。因此，所观察到的对HIV－1复制和表达的抑制主要归因于该核酶的催化活性而不是其反义特性。当用pTAT替代pHXB2gpt反式(in trans)提供Tat蛋白质时，pJT－HR或pJV－HR都不能抑制CAT活性。这一现象证实HIV－1核酶仅抑制含靶序列的信使RNA的表达。

将等量的从pHXB2gpt/pJV－HR (1:10μg)和pHXB2gpt/pUC19转染的Hela细胞得到的总RNA用于进行点印渍分析，并用HIV－1特异性DNA探测，以确定HIV－1蛋白质的表达降低是否HIV－1 mRNA的量降低所产生的直接后果。图2C所示的结果表明，核酶的存在使HIV－1的转录降低71%。体内观察到的病毒蛋白质p24的抑制水平(80－90%，图2C)可归因于这样的事实：病毒mRNA仅被部分降解，仍可用点印迹法检测到，但不能转译为蛋白质。

前导序列核酶抑制不同的HIV－1毒株：任何抗HIV感染和艾滋病的有效治疗剂的必要特征是它能够抑制不同的HIV株。利用不同的含有核酶的反转录病毒载体(图1)与从不同HIV－1毒株得到的DNA构建体一起进行共转染来研究这一重要问题。选择了三个病毒株MN，SF－2和Eli，它们与HXB2之间有不同的遗传距离，对于Eli，一种扎伊尔株，相距最远。有趣的是，在已知的HIV－1株中，所研究的核酶靶击的前导序列是完全保守的，但MN除外，它有一个碱基发生了突变(参见Myers等人，Human Retroviruses and AIDS 1992，

Theoretical Biology and Biophysics, New Mexico, 引入本文作为参考)(图3)。如在图4A中看到的，其核酶基因受内部启动子控制的所有三种反转录病毒载体(图1)都显示有对SF－2的表达有显著的抑制效果(将右边三个条带与左边第二个对照条带相比较)。这些内部启动子包括以前报道的pol II β－肌动蛋白启动子(位于pMHR中)和本文所述的$tRNA^{Val}$和VA1的pol III启动子(位于pMJT和pMJV中)。另一方面，核酶基因直接受MoMLV LTR启动的反转录病毒载体pMJF－1(图1)不能抑制HIV－1的表达(图4A，比较左边的两个条带)。为了确定pMJF－1不能抑制SF－2是否由于该载体中不能表达核酶造成的，进行了RNA点印迹分析(图4B)。在包括pMJF－1的所有携带核酶基因的反转录病毒载体中都检测到了核酶序列的表达。与之相反，单独的载体(条带#2)没有产生核酶。事实上，不能抑制HIV－1表达的pMJF－1是高效率表达载体之一。对该载体不能抑制病毒表达的一种解释是核酶克隆位点离开转录起始点有几百个碱基对。在核酶的5′末端附加的特长臂可能与细胞核酸或蛋白质相互作用，从而影响其与底物接近。

然后研究pMJT，pMJV和pMHR对Eli和MN的影响。如图5A所示，对于SF－2和Eli病毒株，观察到相同的抑制程度(图4A和图5A)。对于MN株观察到的略低但仍很显著的抑制效果(图5B)表明，靶序列中单碱基替代对核酶活性有影响，并且更重要的是，发夹型核酶能忍受底物中发生的突变。

实验2

稳定表达核酶的T细胞系的构建：按如上所述从亲代载体LNL－6和LRNL－2构建反转录病毒载体pMJF－1和pMJT(图1)。将这些质粒

DNA以及pLNL6载体DNA对照转染到双嗜性(amphotropic)包装细胞系PA317中，并用其培养上清液感染人$CD4^+$ T细胞系Jurkat和Molt－4/8。将由LNL6，MJF－1和MJT转导的G418抗性Jurkat或Molt－4/8细胞分别命名为JLNL6，JMJF－1和JMJT或MLNL6，MMJF－1和MMJT。利用包含于核酶序列中的引物(图6)，进行与逆转录反应结合的聚合酶链式反应(RT－PCR)，检测这些细胞系中核酶的表达。仅在JMJF－1，JMJT，MMJF－1和MMJT中检测到扩增产物，而在单独的载体对照(JLNL6和MLNL6)中未检测到。此外，该产物是从RNA而不是从DNA扩增来的，因为在没有逆转录的情况下未观察到扩增反应。虽然所设计的PCR检测方法并不是定量检测法，但JMJT和MMJT中表达的核酶的量始终比JMJF－1和MMJF－1中表达的量要高，表明内部$tRNA^{Val}$启动子能更有效地启动表达。采用胸苷摄取法(图7)或细胞数量检测估计的结果，核酶的稳定表达对细胞增殖没有有害影响。此外，在每隔4天传代一次共径历3个月时就存活率(≥99%)而言，被转导和未被转导(亲代)细胞没有区别。

在稳定T－细胞系中核酶的表达抑制了不同HIV病毒株的感染：开发抗－HIV治疗法的关键问题是确保其能有效地抗广谱的病毒分离株。在北美洲/欧洲和非洲的分离株中，本文使用的发夹型核酶识别的靶序列是高度保守的。只有MN株在该序列中有一个碱基取代(Myers等人，文献同上)。在与该核酶基因瞬时共转染的Hela细胞中，由克隆的HXB2，MN SF2和Eli DNA进行的p24抗原的表达受到抑制。但是，不能用瞬时共转染法评估对与人类更相关的未克隆分离株的抑制作用。为了证实病毒感染的人T细胞系中存在这种作用，将由HXB2，MN，Eli衍生的感染性病毒以及一种未克隆的临床分离

株J677－2用于感染JMJF－1，JMJT和JLNL－6细胞。J677－2是直接从病人的外周血单核细胞(PBMC)通过与正常PBMC共培养，并在MT－4细胞中传代一次进行扩增而得到的。在所有HIV－1株，包括临床分离株感染的细胞的培养上清液中，p24抗原的表达急剧下降(图8)。在6天的培养期间内，在靶序列中含有一个错配碱基的MN株的复制也完全受到抑制。为了测定病毒的抑制是否具靶序列特异性，在同等条件下用一种高度复制性HIV－2 KR和HIV－1 HXB2感染MMJF－1，MMJT和MLNL－6细胞。如图9所示，在表达核酶的细胞中HIV－2 KR的表达完全不受抑制，而HXB2的复制再次被完全抑制。这些结果表明，针对HIV－1的保守的前导序列的发夹型核酶能有效地抑制不同的HIV－1株，包括在实验室中没有为T－细胞系适应的未克隆病毒，但并不影响HIV－2，在该区域，HIV－2的序列与其具有很大差异。在感染之后第9天，该核酶对MLNL6和MMJF－1细胞中由HXB2和MN诱导的合胞体的形成的影响也很明显(参见图10)。在仅用载体转导的对照细胞中两类病毒都能诱导大的合胞体，但在表达核酶的细胞中几乎没有或完全没有观察到合胞体。

表 I

培养物中感染性病毒效价($TCID_{50}$)以及p24抗原水平

病毒株	细胞系	感染后天数	$TCID_{50}$/ml	p24 (pg/ml)
HXB2	JLNL6	17	$10^{4.25}$	813 000
	JMJF-1	0	---	<15
		17	ND	887
		25	$10^{1.25}$	1 462
	JMJT	0	---	<15
		17	ND	163
		35	ND	104
MN	JLNL6	13	$10^{4.00}$	731 000
	JMJF-1	0	---	<15
		13	$10^{1.25}$	1 810
		23	$10^{2.75}$	
	JMJT	0	---	<15
		13	ND	948
		23	---	---

表中数值表示在所指明的天数时在用HIV－1 HXB2或MN株感染的JLNL6，JMJF－1和JMJT细胞培养上清液中检测到的感染效价($TCID_{50}$)和p24抗原。ND，未检测到；---，未进行检测。

核酶的表达对HIV表达的长期抑制：　用HXB2或MN感染JLNL6，JMJF－1和JMJT细胞。在用HXB2或MN感染的JLNL6细胞上清液中RT活性水平分别在感染后第19天或第13天达到最大值(图11)。此后，RT活性下降，由于病毒具有很大的细胞毒性作用，因而结束了这些对照培养。在HXB2感染的JMJT细胞中RT活性被显著地抑制至背景水平，直至感染之后第35天，而HXB2感染的JMJF－1细胞RT活性被降至低于

对照细胞RT活性峰值的1%(图11)。 在第17和35天在JMJT上清液中未检测到感染性, 而在第35天JMJF－1上清液中检测到低感染性($10^{1.25}$ $TCID_{50}$/ml), 而其感染性仍比第17天时JLNL－6细胞上清液的$TCID_{50}$/ml低三个对数值(表I)。 在第17天和35天在JMJT上清液中可检测到低水平的p24抗原(表I)。在MN感染的JMJT和JMJF－1中, 与MN感染的JLNL6的峰值相比较, 直至感染之后第27天其RT活性分别被抑制至低于2%和5%(图11)。 在第13和23天也可从JMJF－1培养物中回收到感染性病毒(表I)。为了确定RT活性的出现是否由于在培养期间核酶没有持续地表达造成的, 采用RT－PCR以及核酶特异性引物对在感染之后第23天收集受MN感染的JMJT和JMJF－1细胞中的RNA进行检测(图11, 插图)。

在JMJT和JMJF－1细胞中检测到显著量的核酶RNA, 与受病毒攻击之前的细胞相一致(图6A和6B)。 由于所设计的RT－PCR不是定量的, 因而无法将感染之后23天时稳定细胞系中表达的核酶水平与感染之前核酶水平进行比较。因此, 仍存在这样的可能性, 即在长期培养过程中, 核酶表达水平降至保护临界值以下。但是, 如图6B所示, 在转导之后直至25周, 在稳定细胞系中未检测到核酶RNA。核酶对MN较小的抑制作用提示, 靶序列中存在的单碱基取代对长期培养中核酶的活性确有影响。

对逃逸突变体的检测试验: 为了确定在HXB2或MN感染的JMJF-1细胞经过长期培养 (示于图11和表I) 之后回收到的感染性病毒是否代表现在对核酶具抗性的逃逸突变体, 将JMJF－1培养物培养第23天(MN)和第35天(HXB2)时的培养上清液用于再攻击JLNL6, JMJF－1和JMJT细胞。 在6天的培养期间监测培养上清液中p24抗原的水

平。如在初次感染中看到的(图8, 9和11), 对于两种回收到的病毒, p24抗原的表达水平大大地受到抑制(图12)。 因此, 在受感染细胞经过长期培养之后病毒的低水平表达并不是由于出现了对核酶不敏感的病毒的特殊突变体造成的。 然而, 病毒RNA量的逐渐增加最终说明核酶抗病毒作用至少部分消失。

核酶还能抑制病毒复制的早期活动: 已经观察到病毒DNA和核酶基因的瞬时共转染导致病毒RNA和蛋白质的产生降低, 从而证实该核酶可能通过切割转录的病毒mRNA抑制病毒基因表达。而且, 由于病毒基因组RNA也含有靶序列, 因而核酶可能切割正在侵入的病毒RNA并阻止整合的进行。

为了检测核酶是否确实干扰了病毒复制的早期活动, 利用下文中描述的半定量分析性, 嵌套的双重PCR(nested double PCR)方法, 在用HIV－1感染之后18和甚至6小时之后在有或没有核酶表达的细胞中检测原病毒DNA合成。用HIV－1 LTR的引物对[SK29 (Ou, C－Y等人, Science 239:295 (1988), 引入本文作为参考) 和GK2]首先对JMJT和JLNL6细胞的细胞基因组DNA中HIV－1 LTR衍生的序列进行扩增30个循环, 其中的JMJT和JLNL6细胞是以0.1输入感染复数用HXB2感染18小时得到的。 作为内部对照, 在第一次PCR反应进行10个循环之后向反应试管中加入相对于β－球蛋白基因的引物对[PC03和GH21(Saiki等人, Science 239:487 (1988), 引入本文作为参考), 以避免β－球蛋白产物可能干扰LTR序列的扩增。因为由于受感染细胞的百分数较低, 所估测到的细胞抽提物中β－球蛋白DNA的量高于HIV－1 DNA的量。

对于第二次PCR反应, 加入1/10体积的第一次PCR产物并且用对

应于HIV的SK29/30引物对(Ou, C－Y等人, 文献同上)以及对应于β－球蛋白的RS06/GH21 (Saiki等人, 文献同上)引物对进行扩增(30个循环)。对于第二次PCR, 每隔5个循环收集10μl扩增产物, 并用凝胶电泳和Southern印迹检测扩增产物。 在第一次PCR之后通过凝胶电泳和用溴化乙锭染色在JMJT和JLNL6的提取物中既未检测到β－球蛋白产物也未检测到含有核酶靶序列的HIV－1 LTR产物。在第二次PCR中, 在扩增10个循环或更多时在JMJT和JLNL6中都可检测到β－球蛋白产物。 由于在JMJT和JLNL6之间其β－球蛋白产物与^{32}P－标记的探针杂交时产生的信号强度没有显著差异, 因而可认为这些样品之间扩增效率是相近的 (图12) 。 对于JLNL6和JMJT分别在第15轮循环和第25轮循环时首先在与得到β－球蛋白产物的相同反应试管中检测到扩增的HIV－1 LTR产物 (图16) 。 为了估测细胞DNA提取物中HIV－1 DNA的相对量, 利用同样的引物和反应条件对不同浓度的(0.05 fg－500 fg/μl)含有HIV－1 SF2质粒DNA进行扩增。在第15和25轮循环时检测到的HIV－1 LTR产物分别对应于50 fg 和0.5 fg质粒DNA。因此, 细胞DNA量相同时, JMJT比JLNL6含有的HIV－1 DNA约低50－100倍。 在用HXB2感染之后18小时对JMJT和JLNL6细胞进行检测时获得相同结果。该结果显示, 核酶可能通过切割正在侵入的病毒RNA而有效地干扰病毒复制的早期活动。

针对HIV的核酶基因治疗: 上文中已经证实, 通过瞬间共转染至Hela细胞中, 靶击HIV－1的5′－前导序列的发夹型核酶能抑制几个HIV原病毒DNA克隆的表达。再者, 由于失活的核酶仅有约10%的效果, 因而证明了抑制作用主要是由核酶的催化特性, 而不是其反义特性产生的。能稳定地表达核酶基因的T细胞系对HIV的感染具有

长期(对于本实验，该期间为35天)的抗性。

核酶治疗方法的一个特征是它可以靶击反转录病毒复制周期的多个步骤：脱壳之后正在侵入的病毒的基因组RNA、病毒mRNA转录物以及将要包装为子代病毒粒子的基因组RNA。其中每一种物质都是核酶切割的底物。本文还证明了核酶基因和原病毒DNA克隆的共转染导致病毒RNA和蛋白质的表达显著降低(可降低95%)，因而核酶可有效地阻止预先存在的原病毒DNA的病毒表达。但是，后来的实验显示，在表达核酶的细胞中，在一轮感染周期中原病毒DNA的合成大约降低100倍。因此，该核酶可有效地阻止病毒感染的进行。

还值得注意的是，用特异于前导序列的核酶转导的Jurkat细胞中检测不到感染性病毒，即使在上清液中发现低水平的p24(表I)。因此，这种现象可以解释为核酶可进一步切割包装好的子代RNA，从而相应地降低了感染性病毒粒子的产生。

将上述方法和构建体与其他艾滋病治疗方法结合使用可以获得更大的抗病毒增效作用。例如，阻止感染的进行的治疗方法可与阻止受感染细胞产生病毒的方法结合使用。因此，核酶作为组合中的单试剂组分具有独一无二的优点。

也已经证明该核酶可有效地抵抗不同的HIV－1株，包括扎伊尔株(ELI)和一种未克隆的临床病毒分离株。在已知的HIV－1序列中该靶序列是完全保守的。一个例外是MN，该病毒株在离CUG切割位点的第6位上含有一个核苷酸替换（参见Myers等人，文献同上）。的确，MN的表达不是完全被抑制，尽管被抑制的程度仍很显著。在MN中存在的这种例外使人们担心，在核酶存在下，通过单位点突变可快速地产生病毒逃逸突变体。但是，至少在实验期间，没有证据

显示会高频率地产生逃逸突变体。在受HXB－2和MN感染的细胞经过长期培养之后回收到的病毒对核酶的抑制作用仍非常敏感。

实验3

用反转录病毒载体转导人外周血淋巴细胞(PBL)： 对用反转录病毒载体转导人外周血淋巴细胞(PBL)的可行性也进行研究。 这不仅对于研究核酶在人初级T细胞中的作用效率有意义， 还有下列重要原因：PBL系统是研究核酶对HIV临床分离株复制的作用的理想工具。另外，该模型是用HU－PBL－SCID鼠模型进行HIV核酶基因治疗的先导。

在受刺激条件下，淋巴细胞发生增殖，并且可以受编码新霉素抗性基因的反转录病毒载体转导(参见，例如， Fauser，A.A.等人，J.of Cell.Biochem. 45:353－358 (1991)，引入本文作为参考)。然后通过在抗生素G418存在下进行培养而将未受转导的PBMC去除。如果将抗性重组体在增补了IL－2的培养基中培养(Culver，K.W.等人，Transplantation Proceedings 23:170－171 (1991)，引入本文作为参考)，可将其扩增1000倍。

在下列条件下用反转录病毒载体pMJT，pMJF－1和pLNL－6转导人PBMC(来自于外周血淋巴细胞，未去除巨噬细胞)。 将经过Fico-ll-hypaque 纯化的PBMC重新悬浮于RPMI＋10％FCS＋PHA－P中2－3天。在活化之后，将淋巴细胞继续维持于增补了IL－2(20 U/ml)的培养基中。 将受刺激的培养物与能产生不同反转录病毒载体的PA317细胞系的上清液一起培养，或与细胞系本身一起培养。在转导经过三天之后，在增补了IL－2 (20 U/ml)的G418培养基(400μg/ml)中培养8－9天而选择重组体。从1×10^{6}个初始PBMC中，大约可产生

2×10^6个具G418抗性的重组体。 将受LNL－6和MJT转导的培养物分别命名为TLNL和TMJT。通过将TLNL和TMJT细胞生长16天进行比较，发现核酶的存在对被转导/选择出的培养物的存活率并没有有害的影响。 用HIV－1 (HXB2)感染存活的PBMC，结果显示，在转导了核酶的细胞中病毒的产生被大大地降低，而用对照质粒(LNL－6)转导的细胞被感染，并能产生新病毒。

实验4

将抗HIV－1核酶基因转移至人初级淋巴细胞中

为了更接近地模拟体内感染过程以便研究抗HIV－1核酶基因治疗，利用鼠反转录病毒载体开发了一个系统，以便将核酶基因转移到刚分离的人外周血淋巴细胞(PBL)中。 经过转导并经过G418选择之后， 来自多个供体的人PBL可表达核酶并对HIV－1病毒克隆以及临床分离株的攻击具抗性，而用对照载体转导的PBL完全容许HIV－1的感染。在表达核酶的PBL中可看到缺乏靶位点的HIV－2克隆没有受抑制。核酶的表达对初级淋巴细胞的存活率或增殖动力学没有影响。该研究首次证明了通过基因转移方法，使人初级T细胞对HIV-1感染具抗性。

载体制备：利用根据上文描述的标准方法制备的产生反转录病毒载体的双嗜性PA317细胞系进行反转录病毒构建体pLNL－6(对照载体)和pMJT(核酶载体)的转导。 从细胞系收集含反转录载体的上清液，过滤之后，贮存于-80℃。用208F细胞测定其效价。

PBL的转导和选择：通过静脉穿刺之后进行Ficoll－hypaque密度离心的方法而从不同供体分离外周血单核细胞(PMC)。 以1－3×10^6个细胞/ml的浓度将淋巴细胞维持于RPMI＋10% FCS, 20－100

U/ml IL－2，100单位/ml青霉素和100μg/ml链霉素。通过在ficoll纯化那天加入抗－CD3抗体，OKT3 (Ortho Diagnostics) (5 ng/ml)而刺激增殖。

在开始OKT3刺激之后2－3天，用含有4μg/ml 硫酸精氨酸的经过滤的包装细胞系上清液(M.O.I. = 0.5－2.0)替代上述培养基。 4－6小时之后，将淋巴细胞放回到原始培养基(含IL－2和OKT3)并培养过夜。将该转导步骤每天重复一次，共进行2－4天。在最后转导完成之后24小时向培养物中加入G418 (400μg/ml活性)。在选择性条件下维持该培养物，直至未转导的对照培养物完全被杀死，约8－11天。在某些情况下，通过ficoll密度离心去除死细胞。采用流式细胞计数法(Cassel等人，Exp.Hematol.，21:585 (1993)，引入本文作为参考)对CD4/CD8表面标记进行检测。

HIV攻击：以0.01 M.O.I.，用HXB2、临床分离株或HIV－2 KR将G418选择出的培养物培养过夜，并洗涤两次。HIV－1临床分离株是通过将来自HIV血清阳性的个体的PBL在含有IL－2的培养基中培养，随后在MT4细胞系中传代一次而得到的。 在攻击期间，将淋巴细胞(1×10^6个细胞/ml，0.2 ml总体积)维持于增补了20 U/ml IL－2的RPMI 1640(没有G418)中，每隔2－3天取样。 采用p24或p26 ELISA (coulter)法监测HIV的产生。

结果

被转导的PBL的选择和鉴定： 用抗-CD3抗体刺激来自几个供体的PBMC，并用2个双嗜性载体在同等条件下进行转导：一个是MJT，它编码由RNA聚合酶III转录的5′前导序列特异性核酶，以及对照载体LNL－6(图16A)。 然后基于其对G418的抗性而选择这些培养物的

转导子。 抗性是由LTR启动的新霉素磷酸转移酶基因(NPT II)提供的，该基因在两种构建体中都存在。 未转导的培养物在8－11天内完全被杀死，而在该条件下被LNL－6或MJT转导的培养物能够存活。在上面描述的条件下， 刚分离的PBL可维持至5－6周仍可存活并可繁殖。

在经过G418选择的PBL中表达抗HIV核酶：将从选择到的培养物分离的总RNA进行逆转录，然后PCR反应而检测5′前导序列核酶的表达(图17)。由于LTR和tRNA启动的转录物是由整合载体DNA的相对的链编码的， 因而通过在PCR方法的RT步骤期间利用一个核酶特异性引物可容易地将pol III起动转录的核酶RNA与LTR新霉素磷酸转移酶转录产物区分开。从该方法中去除逆转录酶之后将导致检测不到产物，表明只有来自于逆转录RNA模板的DNA得到扩增。

经过G418选择的PBL的特性：将LNL－6和MJT转导的淋巴细胞培养物经过选择之后的生长动力学进行比较，结果显示，核酶的表达没有显著地影响这些细胞的生存或增殖(图18A)。 不管转导载体如何，被转导细胞的存活和生长需要外源性IL－2存在。根据CD4/CD8比例而对被转导并且经过选择的培养物的表现型进行比较(图18B)。虽然对于不同的供体，其细胞表面标记存在一些差异，但是对于核酶或对照载体转导的细胞CD4和CD8细胞群体分布并没有差异。

表达核酶的PBL长期免受HIV感染： 用HXB2和HIV－1病毒克隆攻击经过G418选择的培养物， 其中HIV－1病毒克隆含有全部保守的核酶靶序列的HIV 5′前导序列。在感染之后第10天进行比较发现，相对于LNL－6转导的培养物，MJT转导的培养物中HIV的产生被抑制1000倍(图19A)。 为了确证所观察到的抑制作用不是由于所选择培

养物因其他原因(例如细胞表面受体的反向调节， 干扰素的诱导等等)而不再具有被感染的可能性造成的， 还用HIV－2攻击培养物，该HIV－2在靶位点处含有完全不同的序列。如图19所示， 用HIV－2进行感染导致在LNL－6和MJT转导的PBL中产生等效的可产生子代病毒的感染，这表明，病毒抑制是靶序列特异性的。 由于在PBL培养物中没有观察到细胞病理作用，有规律地加入rIL－2 (20 U/ml)可使HIV感染的淋巴细胞维持几个星期。在该期间病毒复制被抑制(图19)。

保护作用延伸至抗临床分离株: 为了临床应用，抗HIV基因必须能够提供对广谱的HIV－1株的抗性，这些HIV－1株天然存在于人群中。 因此，研究人员的研究范围已超出了实验室HIV株，包括使用HIV－1的临床分离株，以攻击来自不同供体的被转导的和被选择出的淋巴细胞。图19D显示来自两个不同供体的核酶转导的PBL有效地抑制两个临床分离株的感染。

实验5

用抗HIV－1的核酶对人造血干/始祖细胞进行细胞内免疫接种

在本研究中， 按照以前的方案进行$CD34^+$细胞的富集和反转录病毒的转导(Lu, M., 等人, Human Gene Therapy 5:203 (1994); Smith, C., J.Hematotherapy 1:155 (1992); Cassel, A., 等人, Exp.Hematol. 21:585 (1993), 均引入本文作为参考)。 但是，基于LNL6的载体含有受内部pol III启动子控制的核酶基因。与pol II启动子相比，pol III启动子能确保更高效率以及更持久的基因表达。这些载体构建体示于图20A中。使用了两种pol III启动子: $tRNA^{val}$, 一种细胞管家基因启动子； 以及腺病毒VA1, 一种强病毒启动子。用人胎盘脐带血作为$CD34^+$细胞的来源有以下几个原因: 脐带血衍

生的始祖细胞有高转导效率。 相对于成人骨髓，脐带血中的干/始祖细胞比例更高。与骨髓细胞相比，脐带血干细胞有更高的扩增潜力和复原能力。此外，从逻辑上说对婴儿进行来自脐带血的干细胞基因治疗困难较小， 并且有可能扩展到可同种异体移植情况下HLA匹配的成人的治疗。

用生长因子，SCF(干细胞因子，25 ng/ml)，IL－3(500 U/ml)，以及IL－6(500 U/ml)对2×10^5个纯化的$CD34^+$干/始祖细胞进行预刺激24小时，并且以1－5(用208F细胞测定病毒效价)的M.O.I.，用无细胞的重组病毒MJT或MJV， 以及从克隆的PA317生产细胞系产生的LNL6载体感染细胞。参见图20A的附图说明。 为了完成这一步骤，将等体积的病毒上清液加到细胞中，并在4μg/ml polybrene 存在下保温16－24小时。在洗涤之后，按照上面所述的浓度将细胞放回到含SCF，IL－3和IL－6的培养基中， 并保温48－72小时。在没有G418情况下完成克隆形成检测。 从每个平板上挑取集落，并用neo基因引物完成嵌套的DNA PCR以测定转导效率。获得了可重复的高转导效率(80－100%)。利用核酶特异性引物进行RNA PCR，估测这些子代细胞中核酶的表达。利用第三个核酶特异性探针进行点印迹分析来证实PCR产物的特异性。 如在图20所示，在所有从转导的干/始祖细胞衍生的集落中， 两种内部pol III启动子都支持核酶表达(MJT和MJV)；在LNL6转导的细胞中或者未转导的干/始祖细胞(d1和d2)中未检测到信号。

此外， 在核酶转导的细胞(d3－d5 MJT; d4－d8 MJV)中从PCR步骤中省略掉RT时就检测不到信号， 证实检测到的信号是RNA而不是DNA。 在阳性样本中存在的核酶不同水平的表达可能是部分由于

挑取的集落的大小(细胞数目)不同造成的。将2×10^3 MJT转导的Jurkat细胞(d9和d10)作为阳性对照，该细胞完全能抵抗HIV－1的感染。相对这些细胞而言，经转导的CD34+细胞集落(每个集落仅含有100－500个细胞)的子代显示出能高水平地表达核酶，尽管该检测方法仅是半定量性的。

由于基于MMLV的反转录病毒载体仅能感染分裂中的细胞，一般需要在转导之前用细胞分裂素组合物对干细胞进行预刺激。在这一过程中，一些CD34+干细胞分化为定型细胞，这些定型细胞仍保持了形成集落的能力。为了确认是否CD34+干细胞群体而不是定型细胞能被高效率地转导，在预刺激和转导之后再用流式细胞计数器分离CD34+细胞。大约有25%的总细胞保持为CD34+。然后将CD34+单个细胞分入96孔平板中并在含有10% FCS的IMDM培养基中培养。除SCF(25 ng/ml)之外，向培养基中再加入IL－3(500 U/ml)，IL－6(500 U/ml)和GM－CSF(500 U/ml)。在2周时间内，在一些孔中由单个细胞在液体培养基中形成了含有300－500个细胞的集落（集落形成效率约为30%）。利用上文描述的neo引物进行嵌合DNA PCR反应的结果显示，对于该细胞群体其转导效率也达到80－100%。因此，没有检测到CD34+细胞群体和总细胞群体的转导效率有差异。

基因治疗方法治疗受HIV感染的自体或同种异体干细胞的最终目的是重建具有遗传特性受到改变的、对HIV具抗性的细胞的免疫系统。但是，最重要的前提是转导和/或转基因的表达不会剥夺干细胞分化为多细胞谱系的能力。为了解决这一重要问题，进行了集落形成检测和子代表现型检测。在相同条件下培养未转导的干细胞，所不同的是在转导期间用培养基替代感染病毒。如表II所示，对于

未转导细胞和那些用对照或核酶载体转导的细胞，获得了等数目的具不同谱系的细胞。因此，反转录病毒转导和核酶表达对干细胞分化都不产生影响。一个同样重要的问题是转导和核酶表达是否会改变总干细胞集落形成效率。如图21所示，在核酶转导的干细胞和对照载体转导的干细胞中其集落形成效率没有显著不同（最后三栏结果比较），提示核酶表达对干细胞的定型能力没有明显的不利影响。总的来说，转导本身几乎不能降低干细胞的集落形成效率（图21）。

表 II

	未转导	LNL6	MJT	MJV
CFU总数	196 + 43	156 + 48	158 + 48	151 + 38
BFU-e	74 + 73	60 + 52	68 + 72	72 + 89
混合(Mix)	1 + 1	2 + 1	1 + 1	2 + 2
总计	271 + 63	218 + 6	227 + 34	225 + 63

反转录病毒载体转导的干细胞的集落形成检测和子代表现型检测。反转录病毒转导之后48小时，将0.5×10^{4}个未转导的或转导的干细胞与含有20% FCS，1.2%甲基纤维素，25 ng/ml SCF，500 U/ml IL－3，500 U/ml IL－6，5 ng/ml GM－CSF，2.5 U/ml促红细胞生长素以及5×10^{-5} M2－巯基乙醇的Iscove改良Dulbecco培养基(IMDM，GIBCO)相混合。将培养物涂布于平板上培养，设置一个重复，并在37℃含5% CO_2的湿润条件下培养14天。每个集落含有50个以上的细胞。在显微镜下根据其形态特征鉴定出粒细胞－巨噬细

胞集落(CFU－GM)以及红细胞样破裂(erythroid bursts)(BFU－E)。各个集落数代表利用从不同的供体的脐带血分离的干/始祖细胞进行的三个同样的实验。

为了估测核酶基因的体外效果，检查从受转导的干/始祖细胞衍生的子代细胞对HIV攻击的抗性。在受HIV感染的个体中，病毒主要的攻击目标是CD4+ T淋巴细胞和巨噬细胞/单核细胞。用不同的细胞分裂素和生长因子组合物促使被转导的干/始祖细胞分化为淋巴细胞的试验没有取得成功。但是，利用图22A附图说明中描述的实验条件成功地获得了附着的单核细胞/巨噬细胞。在细胞培养过程中培养基中没有添加G418，因为根据Lu，M.等人，(1994)(文献同上)报道，LNL6载体进行的neo基因表达是不连续的，并且在我们的系统中已经观察到高效率的转导和核酶的表达。一种嗜淋巴型毒株HIV－1/HXB2不能感染这些细胞，但一种嗜巨噬细胞性毒株HIV－1/Bal可感染这些细胞并可进行病毒繁殖。用HIV－1/Bal攻击这些细胞，以测定从核酶转导的干/始祖细胞衍生的子代巨噬细胞是否可抵抗HIV－1感染。如图22A所示，与对照载体LNL6转导的细胞相比，MJT和MJV转导的细胞显著地降低HIV－1复制，直至第6天(此后细胞培养终止)。在受MJV转导的干细胞中观察到的抑制作用比MJT转导的干细胞的抑制作用更大(图22A)。用来自不同供体的干/始祖细胞可重复得到这些数据。抑制作用不可能是由细胞活性差异造成的，因为在病毒攻击之前，在这些液体培养条件下，LNL6、MJT和MJV显示出相同的生长动力学(参见图22B的生长曲线)。用RT－PCR反应测定在这些子代细胞中是否保持着核酶的表达，从而解释所观察到的病毒复制的抑制现象(图22C)。在转导之后约2个月，在MJT和MJV转

导的细胞中检测到了核酶的表达(泳道3和6)，但在LNL6转导细胞中未检测到(泳道1)。再者，在反应中省略了RT步骤时检测不到信号(泳道1和7)，表明检测到的是特异的RNA而不是DNA。由于MJT和NJV表达的核酶水平没有显著差异，所以在MJV转导的干细胞中产生的较大的抑制作用的原因尚不清楚。因为核酶表达盒是以相对LTR的反义方向构建的(图1)，因此，在逆转录步骤中用两个引物之一时，可从pol III和pol II(MMLV LTR)启动子获得不同的转录物。对于pol III转录物(泳道3和6)检测到的信号比pol II转录物(泳道2和5，详见附图说明)的信号更强。这一结果与在造血干细胞中由LTR进行的neo基因低水平表达结果相一致。由于没有进行G418筛选，因而低水平的病毒表达是由于存在少量未转导细胞造成的。但是，在转导之后可进行短时间的G418选择，以确保更完全地抵抗HIV－1感染。就申请人所知，本文提供的数据是首次对巨噬细胞/单核细胞群体进行胞内免疫接种产生的体外效果的报道。

总而言之，这些结果证明，用抗HIV－1的核酶对造血干/始祖细胞进行胞内免疫接种是一种治疗HIV感染的可行的基因治疗途径。进行干细胞基因治疗的合适的目标群体是HIV－1阳性新生儿。我们可以在体外用核酶基因转导从脐带血分离的干细胞，然后再将遗传特性被改变的干细胞输注到确诊为HIV阳性的患者中。有报道证实，HIV阳性母亲分娩的婴儿中25%感染了HIV。在新生儿刚出生时或者出生之后不久，病毒显著地损害胸腺和淋巴系统的器官之前开始基因治疗是非常有利的，因为用遗传特性被改变的干细胞成功地重建免疫功能，尤其是T细胞，主要依赖于这些器官的正常功能。由于儿童艾滋病比成人患病发展更快(有80%受感染婴儿在第一年就出现

病症)，因而在该群体中可更快地估测体内基因治疗的效果。HIV是否感染CD34+细胞的问题仍在争论之中，但一般认为大多数的CD34+干细胞没有受到感染。这些结果表明，用核酶基因可转导CD34+细胞，该基因可抑制感染的进行和病毒表达；因此，以干细胞作为靶的核酶基因治疗法是治疗HIV感染的一种有希望的、先发制人的策略。

用核酶转导人CD34+干细胞：　在抗艾滋病的基因治疗中使用经过长期重建群体培养的造血干细胞是较为理想的，因为它们不仅能够自我更新，而且能够分化为HIV靶细胞。　最近我们开发了一种方法，其中CD34+细胞的转导效率可达到90%以上。在4μg/ml的polybrene存在下，用无细胞重组病毒MJT，MJV和LNL－6（图1）分别感染纯化的干细胞。对在半固体琼脂上生长的干细胞衍生的集落进行PCR可测定转导效率。

实验6

转导HU－PBL－SCID鼠模型：　hu－SCID小鼠是通过将人外周血白细胞注射到SCID小鼠的腹膜腔中而创造的一种人/鼠嵌合体。　参见Koch，J.A.和Ruprecht，R.M.Antiviral Res. 19:81－109(1992)。从该嵌合体的血液和淋巴组织中分离表现型和功能都正常的人淋巴细胞。这些小鼠可被HIV－1的实验室分离株和实验室适应性毒株感染，并可进行病毒繁殖。

用含有为特异性催化HIV的核酶编码的核酸的反转录病毒载体转导初级PBL。　在转导和选择完成之后，采用腹膜内注射法(IP)将PBL注射到严重地并发了免疫缺陷症(SCID)的小鼠(2×10^7个细胞/小鼠)中，并且在两天之后用HIV攻击，优先使用HIV－1攻击。用病毒攻击之后30天，杀死动物，　并从腹膜和脾脏中分离细胞。　利用

p24 ELISA方法从以不同时间间隔收集的血样本中检测病毒的感染和产生。 换一种方法，可将这些样品与新鲜PBL一起培养以便分离病毒，或者针对HIV gag进行PCR以测定病毒负载量。另外，用FACS测定CD4+ T细胞的损耗。

临床试验：用由反转录病毒载体转导的自体T细胞对HIV血清阳性型个体进行治疗， 该载体含有为HIV特异的催化性核酶编码的核酸。 采用血浆去除法收集外周血淋巴细胞， 并且用负选择法富集CD4细胞。在培养中刺激富集的细胞，随后用反转录病毒载体转导。单独地将部分细胞用一种标记载体进行转导以便进行存活力比较。在用含有核酶的反转录病毒感染之后，在G418上选择细胞。在限制内源性HIV传播的培养条件下将被转导的细胞扩大生产。 将这些遗传特性被改变的细胞混合起来，输回供体中。

为了估测效果，追踪观察受试者的功能性免疫状况、血浆病毒血症、p24抗原含量、受HIV感染的外周血细胞百分数以及反转录病毒转导的细胞相对对照细胞的相对存活率。

选择合适的患者的标准：选择出的用本发明方法治疗的患者最好是ELISA或Western印迹证实为HIV阳性，并显示是血浆病毒血症和具有可检测的p24抗原。其CD4计数最好在200和600个细胞/mm^3之间，并且其预期的存活时间应大于3个月。 其行为表现状况最好是0、1或2(见下文)。可根据其体内存在的HIV是否存在核酶靶位点的核苷酸序列来进一步选择患者。 这一步骤中， 可直接对来自于患者的PBL的合适靶序列进行PCR并对其测序。 含有靶位点明显不同的HIV的患者被排除掉。

患者的行为表现状态

五个等级状态

等级	
0	能够完成所有正常活动，没有限制。
1	对耗费体能的活动有限制，但不需卧床并且能够做轻便工作。
2	不需卧床并且生活自理，但不能做任何工作。非睡眠时间超过或大约为50%。
3	仅能有限地自理，坐卧时间超过50%。
4	完全失去能力。完全不能自理。全部时间处于坐卧状态。

临床评估：最好对所有病人进行评估，如下所述，这些评估包括：整个病历，体格检查，实验研究，心电图以及胸腔X－射线透视。

完整的病历最好包括诊断为HIV感染期间的资料，疾病表现以及并发症的资料；所有已知的变态反应病史；机会性感染和肿瘤病史；性传播疾病病史，包括淋病，梅毒，肝炎，单核细胞增多症，CMV感染，疱疹以及寄生虫病；当前使用的药物，包括从药店购买的药剂；毒品和娱乐药物使用史；抑郁症，忧虑，精神病，情感障碍，精神病药物的使用以及心理治疗史；“性安全”的知识和经验；现用的避孕方法；以及外科手术方案和结果。

完整的体格检查包括患者的行为表现状况(上文)；体重；身高；脉博；肺部检查；心脏检查；腹部检查；神经病学检查；口咽部检查；以及粪便潜血检查。

实验室检查(最好按照下文中所述计划进行筛选，登记，随访)包括：血细胞计数；血小板计数；网状细胞计数；尿液分析；凝血

酶原时间(protime PT)和部分促凝血酶原激酶时间(PTT)； 血清电解质(例如NA^+, K^+, Cl^-, HCO_3^-)； 血糖； 血脲氮(BUN)； 尿酸； 总的胆红素； 碱性磷酸酶(如果测出的值为正常人上限值的2倍，就要测定γ－谷氨酰转肽酶(GTP))； 丙氨酸氨基转移酶(ALT)； 天门冬氨酸转氨酶(AST)； 乳酸脱氢酶(LDH)， 并且，如果该值升高，再测LDH同工酶； 钙，白蛋白，总蛋白，定量的免疫球蛋白； 乙肝和丙肝血清检查，鸟分枝杆菌和胞内分枝杆菌的血液培养检测，血清隐球菌抗原； 淋巴细胞分类； HIV聚合酶链式反应； 由验证性Western印迹法进行HIV ELISA检测，血清p24抗原； 血浆的定量HIV培养； β2巨球蛋白； 用反转录病毒载体和对照载体特异的引物从外周血单核细胞(PBMC)中提取的DNA进行定量DNA PCR反应； 纯化的结核菌素蛋白质衍生物(PPD)和破伤风类毒素对照 (PPD and tetanus toxoid control)；以及破伤风类毒素加强剂量(tetanus toxoid booster) 。

淋巴细胞分类可包括，但不限于： 用FACS分析法测出的外周血细胞表现型， 包括$CD4^+$和$CD8^+$计数及其百分比，体外淋巴细胞增殖检测，包括对分裂原(PHA, PWM, Copn－A)，可溶性抗原(白喉，破伤风，白色假丝酵母)，同种抗原以及抗－CD3+/－IL2的应答； 以及细胞毒性作用的测定。

外周血单核细胞(PBMC)的分离性输血法(apheresis)： 用手工方法或自动细胞分离器进行白细胞分离(leukopheresis)。如果使用手工方法，用合适的抗凝剂(例如ACD－A或肝素)抽取一个单位的全血，并且通过离心而分离开各成分。收集白细胞后将剩下的红细胞和血浆输回患者。按这种方法依次加工1－5个单位的血液。通常只需采用静脉穿刺术并且完成该方法只需约30－45分钟。

也可用自动细胞分离装置完成分离性输血法。 以约50－60ml/分钟的速率从静脉穿刺位点抽取全血，并引入细胞分离器。在该分离器中通过离心将细胞部分和血浆部分分离开。将白细胞收集到组分袋中，再从第二个静脉穿刺位点将红细胞和血浆输回病人体内。用ACD－A或其等效物以全血与抗凝剂13:1的比例进行抗凝。最大体外血体积将依据使用的装置而处于约300 ml与约600 ml之间。处理1－5升血液耗时1－2小时。通常，在一次白细胞分离操作中去除的白细胞数不超过5×10^{9}。在完成该步骤过程中体外血液的体积不超过一个成人血液体积的15%。这些体积数是用标准公式计算得到的。

白细胞分离法的危害和预防：分离性输血法的负作用较少，包括与注射针插入以及瞬间体积损失有关的血管迷走神经发作，和与柠檬酸盐诱导的血钙过少相关的皮肤感觉异常。前一反应可由随后的操作和饮水来处理。后一反应通常可通过放慢抗凝剂输入的速率或临时中断输入来缓解。在某些情况下，由于重新输回了抗凝血液制品，因而患者体内凝块形成参数有小的增长，异致出血倾向稍微增加。但是这一效应是暂时的，通过治疗可以解决。

细胞分离以及CD4 T细胞的富集： 根据已建立的方法， 采用Ficoll－Hypaque密度梯度离心方法从血红细胞和嗜中性粒细胞中分离PBMC。用补充了1%胎牛血清(FBS)的经改良的AIM－V（它由AIM－V (GIBCO)以及2 mM 谷氨酰胺，10μg/ml硫酸庆大霉素，50μg/ml链霉素组成)洗涤细胞。按照标准技术，用结合到磁珠上的抗－CD8单克隆抗体进行负选择而进行CD4细胞的富集。取一份细胞样品，分析其中细胞表面表型(包括CD4，CD8，CD3和CD14)。

CD4富集细胞的转导和扩增： 用上面所述的含有5% FBS 以及

100 U/ml重组IL－2(rIL－2)的改良AIM－V(增补型AIM－V)洗涤细胞，并以5×10^5个细胞/ml的浓度重悬于该培养液中。 在某些情况下，可向培养物中加入25 nM CD4－PE40(一种重组蛋白质，由连接于易位点的HIV－1结合的CD4区域和铜绿假单胞菌内毒素A的ADP-核糖化区　组成)，以便在选择性地从该培养物中去除HIV感染的细胞时便于残留细胞进行细胞扩增。已经证明CD4－PE40可抑制受HIV-1感染的细胞中p24的产生并且可选择性地杀死HIV-1感染的细胞。此外，CD4-PE40和逆转录酶抑制剂在抵抗HIV在人初级T细胞中的传播有强烈的增效作用。

为了刺激增殖，加入OKT3单克隆抗体(ortho Diagnostics)至浓度为10 ng/ml，将细胞以每孔0.5 ml的量培养于24 孔平板上。在含有5% CO_2的湿润培养箱中，于37℃将细胞培养48小时。从细胞培养物中吸出培养基，加入1 ml含载体的上清液(如下文所述)，该上清液中添加了5μg/ml硫酸鱼精蛋白，100 U/ml rIL－2，100 U/ml青霉素，0.25μg/ml两性霉素B以及100μg/ml链霉素(可按上文所述加入25 nM CD4－PE40)。

按照Good Manufacturing Process方法(GMP)完成载体制备和上清液生产。为了完成转导，将80%含有PBMC的孔用反转录病毒载体一起保温，20%孔用对照载体一起保温，所述反转录病毒载体含有为核酶编码的核酸。加入载体上清液。该步骤重复进行4－6次。在最后一次操作完成之后8－16小时，除去载体上清液并将细胞在增补型AIM－V中培养24小时。

将培养基改为添加了高达1000 IU/ml的rIL－2，40μM DDI(为了抑制HIV复制)，以及250－500μg/ml的活性G418的AIM－V

302，从而开始用G418选择去除未转导的细胞。在含有G418的培养基中培养6－8天之后，将细胞转移到加了40μM DDI(+/－25 nM CD4－PE40)的增补型AIM－V中，并扩增到1×10^{8}和4×10^{9}个细胞之间。如果已开发出新的细胞培养技术，可在该方案中改变用于扩增细胞的培养条件。

用于输回的外周血细胞的制备：按照已建立的方法制备细胞。参见Abrahamsen等人，J.Clin.Apheresis 6:48－53 (1991)，Carter等人，J.Clin.Apheresis 4:113－117 (1988)，Aebersold等人，J.Immunol.Methods 112:1－7 (1988)，Muul等人，J.Immunol.Methods 101:171－181 (1987)，以及Carte等人，Transfusion 27:362－365 (1987)，所有这些都引入本文作为参考。在培养大约2个星期之后，细胞数目应在1×10^{8}到4×10^{9}之间。细胞的生长特性在不同的患者之间差别很大。在转导细胞被输回前约72小时，抽取一份样品，分析其表型、含有整合载体的细胞的百分数、含有整合的HIV原病毒的细胞的百分数、HIV的培养以及HIV p24抗原。再获取一份样品进行革兰氏染色，进行好氧和厌氧细菌的微生物学培养以及真菌学培养。在输注进行的当天取一份细胞样品进行同样的检测。如果由于进行G418选择而使大于10%的细胞不能存活，则可采用Ficoll－Hypaque密度离心方法除去这些细胞。

将经扩增和转导后的细胞输回供体中：在输注之前，抽取血液样品并贮存起来用于分析。用静脉注射方法在60分钟时间内将1×10^{8}和4×10^{9}个转导细胞输回人体。按照下文的程序严密地监测生活征和用脉冲血氧定量法检测氧饱和度。在输注之后5分钟和1小时抽取血液样品，贮存起来用于随后的分析。每隔2－3个月重复进行一

次白细胞提取，转导和输回，在一年的时间内共进行4－6次。在第一次处理完成之后，将患者作为门诊病人，由临床医师自行进行输注。 如果输注是对门诊病人进行的，则至少在治疗之后4小时内监测受治疗者的情况。

与输注有关的反应的处理：如果患者发生了发烧、发冷或肌肉疼痛，则他/她需接受合适剂量的阿司匹林、布洛芬或醋氨酚。 如果患者不能忍受阿司匹林或布洛芬，则使用醋氨酚。对出现的皮疹初次用口服苯海拉明进行治疗。对输注曾经有反应（例如发烧，肌肉疼痛，以及寒冷）的患者，在进行再次输注之前30分钟，预先服用阿司匹林、醋氨酚或苯海拉明。对于不能很快地应答解热药和抗组氨药的较严重的发冷和肌肉疼痛可使用度冷丁。根据反应的严重程度放慢细胞输注的速度或中断输注细胞。在有严重反应出现时，应立即采取紧急的生命救助措施。

实验7

骨髓吸出术：在手术室内全身麻醉条件下，从所有适宜的病人的髂骨嵴中多次抽取骨髓。 抽取的骨髓量约为1000 ml，并且是从后髂骨以及嵴中抽取的。 如果收集到的细胞总数< 2×10^8/kg，除使用后嵴外还可使用胸骨和前髂嵴进行第二次抽取。在手术期间，给患者施用两个单位的经照射过的包装的红细胞(irradiated packed red cell)以替代由吸出术抽出的骨髓。

$CD34^+$细胞的纯化： 造血始祖和干细胞的特征在于其具有CD34膜表面抗原。 根据该特性来进行纯化。 在收集了骨髓之后，采用ficol梯度离心将单核细胞与其它成份相分离。 这是采用细胞分离器(Baxter Fenwal CS3000＋或Terumo机器)的半自动化方法进行的。

收集主要是由单核细胞组成的光密度细胞，将细胞于37℃，塑料瓶中培养1.5小时。将由许多单核细胞，巨噬细胞和B细胞组成的粘附的细胞除去。然后收集未粘附的细胞并用鼠单克隆抗－CD34抗体(9C5)于4℃缓慢摇动温育30分钟。抗－CD34抗体的最终浓度是10 μg/ml。在洗涤二次之后，以2个细胞/株的比率向细胞悬液中加入用羊抗鼠IgG(Fc)抗体包裹的顺磁性微球体(Dynal Beads，由California，Santa Ana，Baxter Immunotherapy Group 提供)。在4℃再培养30分钟之后，用一个磁棒收集成星状的细胞及磁珠。加入木瓜凝乳蛋白酶(由California Santa Ana，Baxter Immunotherapy Group提供)至终浓度200 U/ml，以将$CD34^+$细胞与磁珠分离。将由此分离的$CD34^+$细胞培养48小时。之后，按如上描述的方法，用反转录病毒载体构建体进行转导实验。

用遗传工程手段修饰过的$CD34^+$始祖细胞的输回：在转导实验完成之后以及相应的质量检测（微生物学，克隆形成检测，存活性试验）完成之后，按照标准方法，将遗传工程方法修饰过的骨髓始祖细胞输回到患者体内，在此之前给患者施用苯海拉明和氢化可的松（例如参见，Korbling，M.等人，Blood，67:529－532（1986）或者Haas，R.等人，EXP.Hematol.，18:94－98（1990），引入本文作为参考）。

在输注之后，定期检测外周血和骨髓来检测骨髓中遗传工程手段修饰过的干细胞的存在，在开始的四个星期内以每周进行一次。随后，在约六个月的期间内每月检查一次。

表II 实验过程中的检测

	筛选	病历和体验	第1周	第2－12周	第13周	第14－24周	第25周	第26－36周	第37周	第38－48周	第49－60周
输注		X	第1天		第1天		第1天		第1天		
护理随访		X	第1、2天	每周	第1、2天	每周	第1、2天	每周	第1、2天	每周	每4周
未随访		X	第1天		第1天		第1天		第1天		每4周
行为表现	X	X	第1、2天	每周	第1、2天	每周	第1、2天	每周	第1、2天	每周	每4周
血细胞,血小板,分化的网织红细胞计数	X	X	第1天	每周	第1天	每周	第1天	每周	第1天	每周	每4周
凝血相	X	X	第1天	每周	第1天	每周	第1天	每周	第1天	每周	每4周
电解质	X	X	第1天	每周	第1天	每周	第1天	每周	第1天	每周	每4周
肝、肾无机盐	X	X	第1天	每周	第1天	每周	第1天	每周	第1天	每周	每4周
定量检测免疫球蛋白	X	X	第1天		第1天		第1天		第1天		每4周
孕情检测	X	X	第1天**		第1天**		第1天**		第1天**		
乙肝、丙肝检测	X	X									
MAI血液培养		X									
血清隐球菌抗原	X	X									
PPD和破伤风对照	X										
破伤风毒素加强剂量	X										
尿分析	X	X	第1天		第1天		第1天		第1天		每4周

表 II（续）

	筛选	病历和体验	第 1 周	第 2 - 12 周	第 13 周	第 14 - 24 周	第 25 周	第 26 - 36 周	第 37 周	第 38 - 48 周	第 49 - 60 周
胸部 X 照射	X										
心电图	X	X									
HIV DNA - PCR	X	X	第 1 天	每周	第 1 天	每周	第 1 天	每周	第 1 天	每周	每 4 周
β - 2 微球蛋白	X	X	第 1 天		第 1 天		第 1 天		第 1 天		每 4 周
淋巴细胞分类	X	X	每天	每周	每天	每周	每天	每周	每天	每周	每 4 周
ELISA 和 WESTERN 印迹	X										每 4 周
血清 P24 抗原	X	X	每天	每周	每天	每周	每天	每周	每天	每周	每 4 周
血浆病毒血症	X	X	每天	每周	每天	每周	每天	每周	每天	每周	每 4 周
血清中的 CD4 - IgG 蛋白		X	每天	每周	每天	每周	每天	每周	每天	每周	每 4 周
对两种基因载体进行 DNA - PCR			每天**	每周	每天**	每周	每天**	每周	每天	每周	每 4 周
对 HIV DNA 进行 DNA PCR 分析											
血清中抗 CD4 - IgG 抗体			第 1 天	每周	第 1 天	每周	第 1 天	每周	第 1 天	每周	每 4 周
库存血清	X	X	第 1 天	每周	第 1 天	每周	第 1 天	每周	第 1 天	每周	每 4 周

* 随着研究继续进行，可降低表中列举的如“每天”或“每周”的检查频率。

* * 孕情检查是在输注之前进行的并且必须是阴性的。

* * * 还可参见表4

Q和q表示“每”。

表 IV 淋巴细胞输注期间的监测

	输注前	输注期间	输注后
体温	X	每隔 15 分钟	每小时 4 次， 然后每 4 小时一次*
血压	X	每隔 15 分钟	每小时 4 次， 然后每 4 小时一次*
脉博	X	每隔 15 分钟	每小时 4 次， 然后每 4 小时一次*
呼吸速率	X	每隔 15 分钟	每小时 4 次， 然后每 4 小时一次*
意识水平	X	每隔 15 分钟	每小时 4 次， 然后每 4 小时一次*
主诉症状	X	每隔 15 分钟	每小时 4 次， 然后每 4 小时一次*
氧饱和度（根据脉冲血氧定量法）**	X	连续**	连续 4 小时**
尿量	X		每 8 小时一次
P24 抗原	X		
细胞存活性分析（对各个载体都进行 PCR）	时间 0(从 BAG 开始)		5 分钟, 1， 2， 4，6， 24 小时**
对 HIV DNA 进行 PCR	X		
血浆病毒血症	X		24 小时

* 对于第2和第4次输注，除了出现综合症状，这些参数是每1小时监测一次，共4次。

* * 除了出现综合症状，仅在第一次输注时进行监测。

Q和q表示“每”。

尽管已参照优选实施方案描述了本发明，但还应明白很多方法的变化并不脱离本发明精神。因此，本发明仅由下面的权利要求来限定。

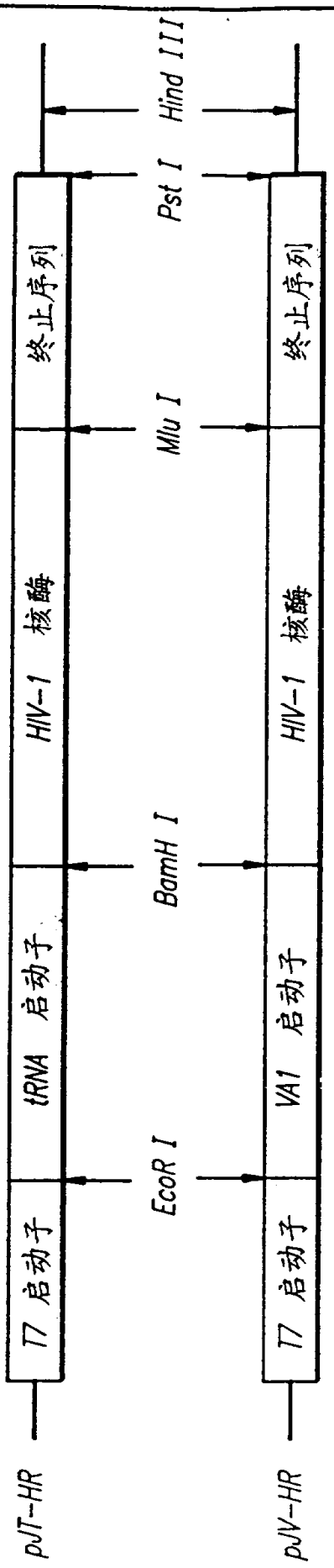

pJT-HR
T7 启动子
tRNA 启动子
HIV-1 核酶
终止序列
EcoR I
BamH I
Mlu I
Pst I
Hind III
pJV-HR
T7 启动子
VA1 启动子
HIV-1 核酶
终止序列

图 1A

图 1B

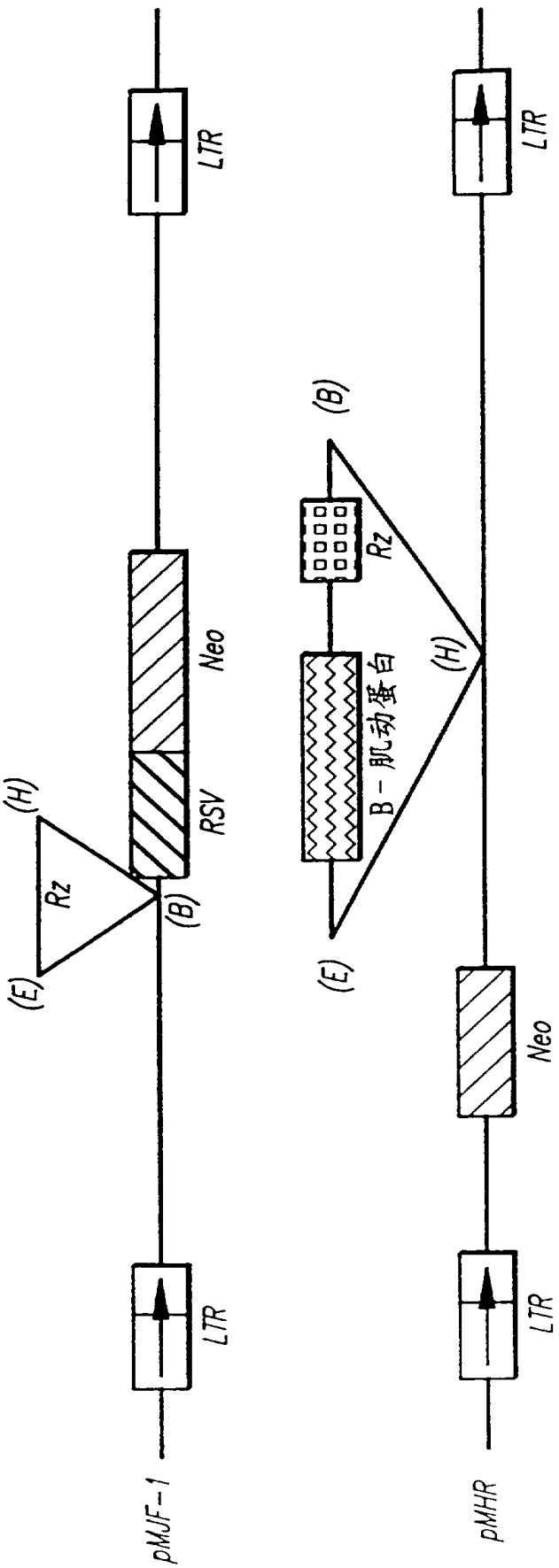


图 1C

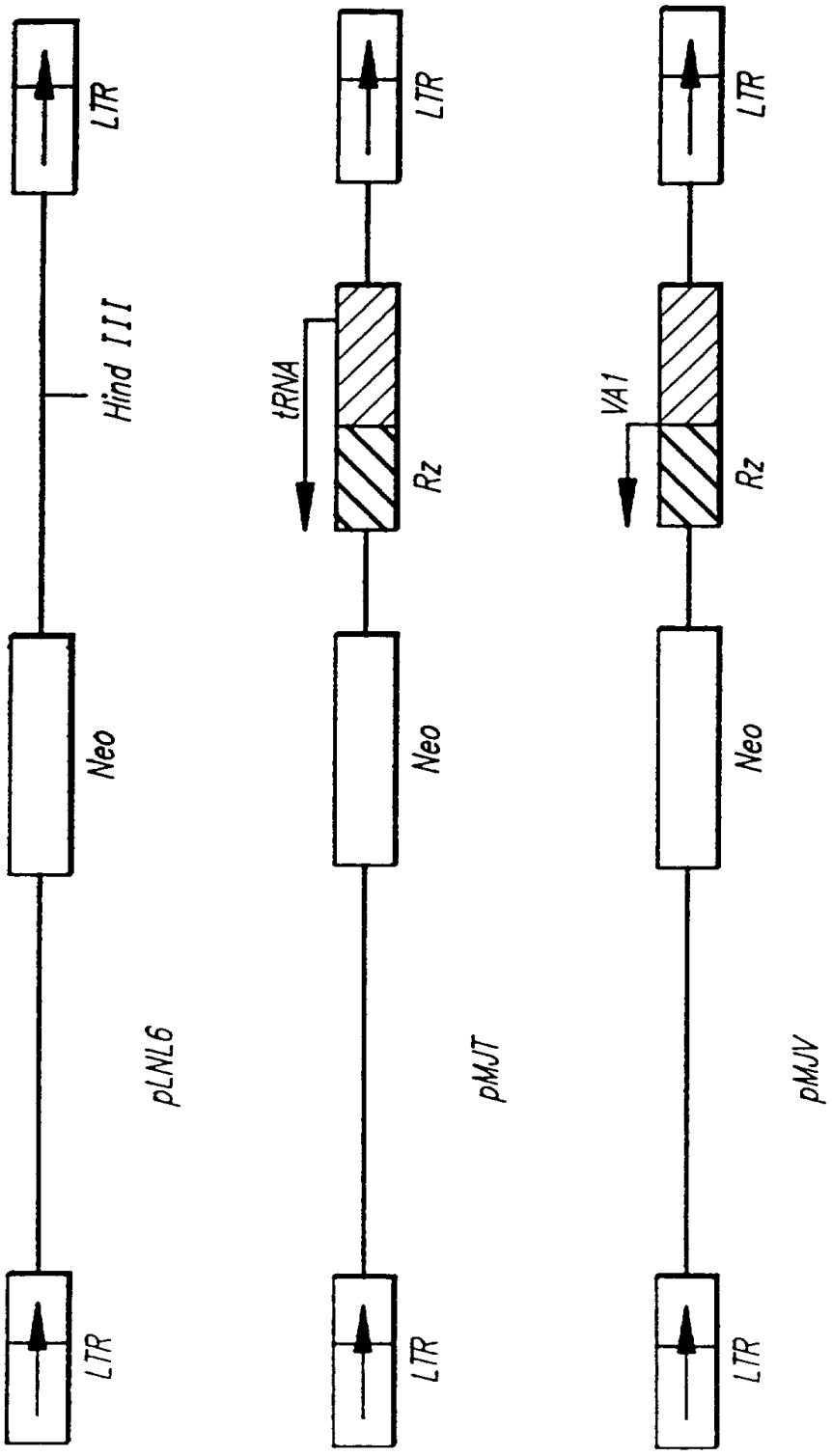

LTR
Hind III
Neo
LTR
pLNL6
LTR
tRNA
Rz
Neo
LTR
pMJT
LTR
VA1
Rz
Neo
LTR
pMJV

图 2A

核酶对TAT活性的影响

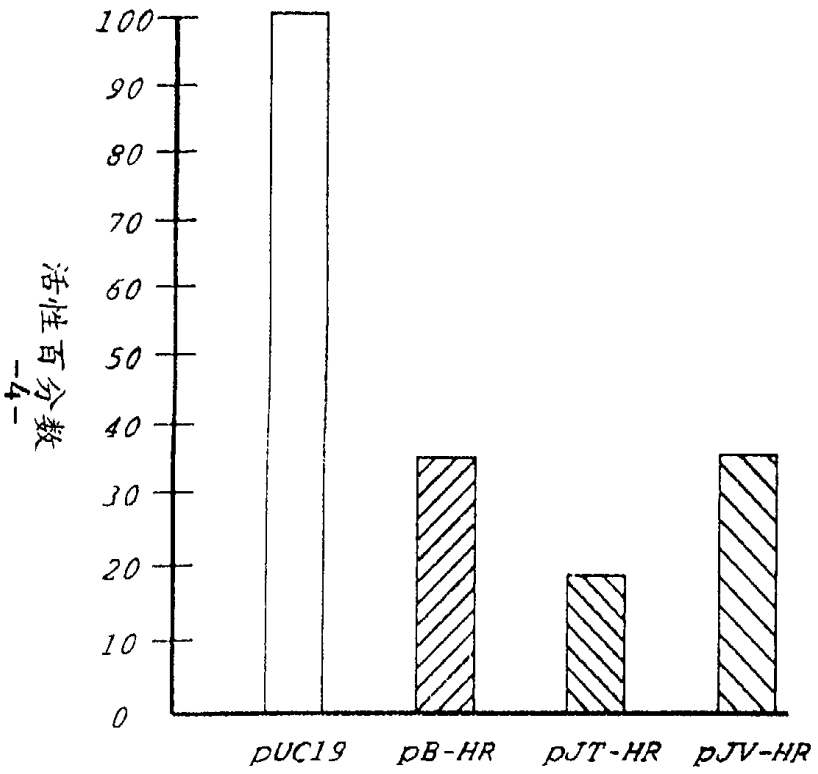


图 2B

核酶对P24表达的影响

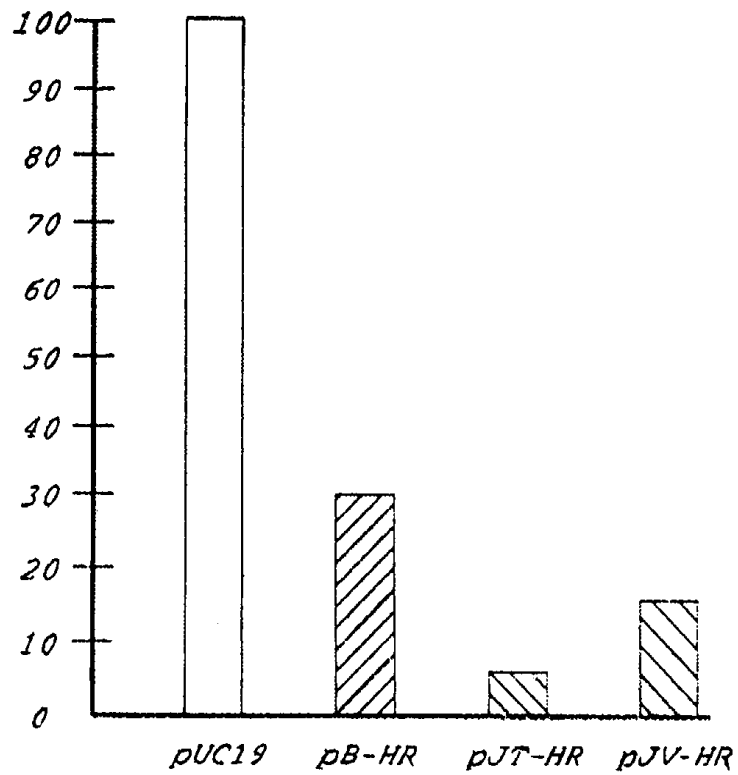


图 2C

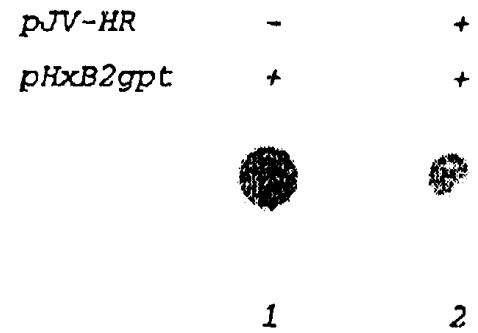


图 3

HIV－1引导序列
（发夹型核酶靶序列）

HXB2	*TG*	*CCC*	*GTC*	*TGT*	*TGT*	*GT*
MN	*TG*	*CCC*	*GTC*	*TGT*	*TaT*	*GT*
SF2	*TG*	*CCC*	*GTC*	*TGT*	*TGT*	*GT*
RF	*TG*	*CCC*	*GTC*	*TGT*	*TGT*	*GT*
HAN	*TG*	*CCC*	*GTC*	*TGT*	*TGT*	*GT*
ELI	*TG*	*CCC*	*GTC*	*TGT*	*TGT*	*GT*
Z2Z6	*TG*	*CCC*	*GTC*	*TGT*	*TGT*	*GT*

核酶对SF－2的抑制

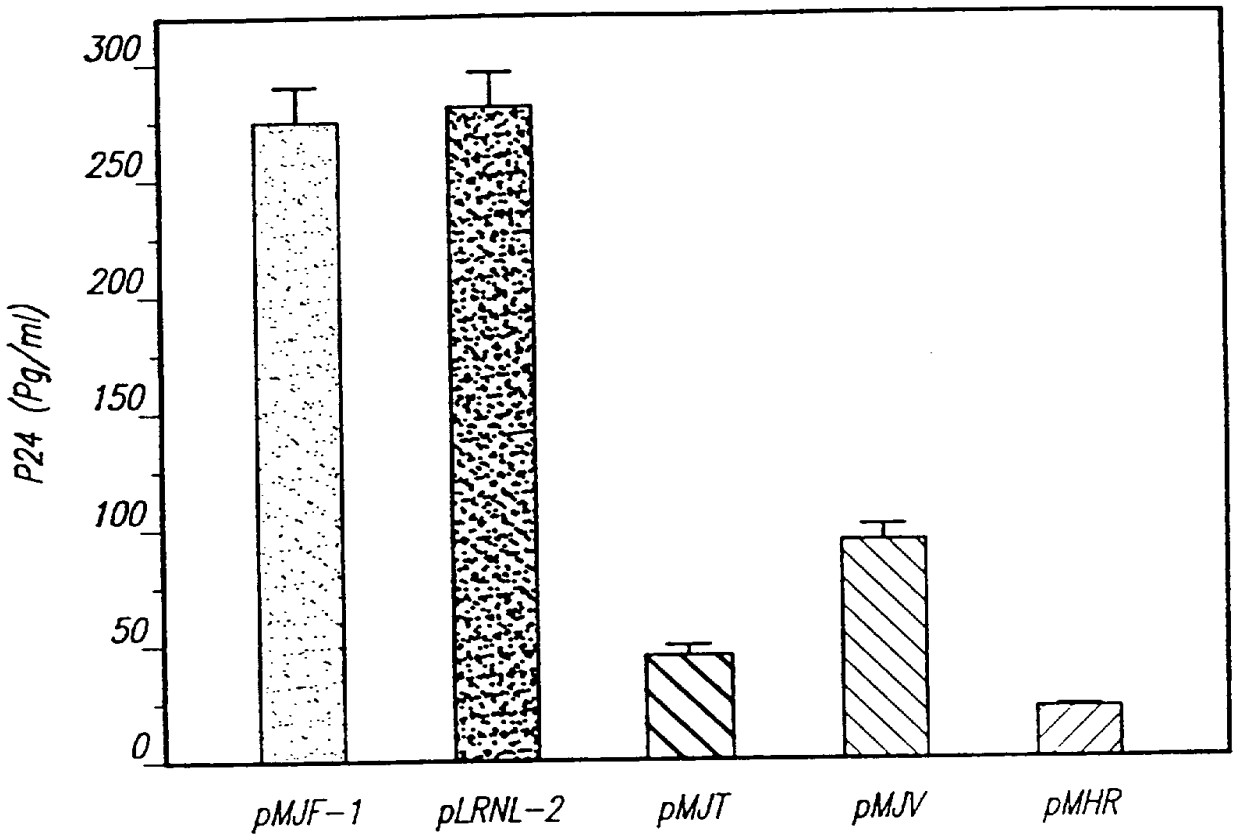


图 4A

图 4B

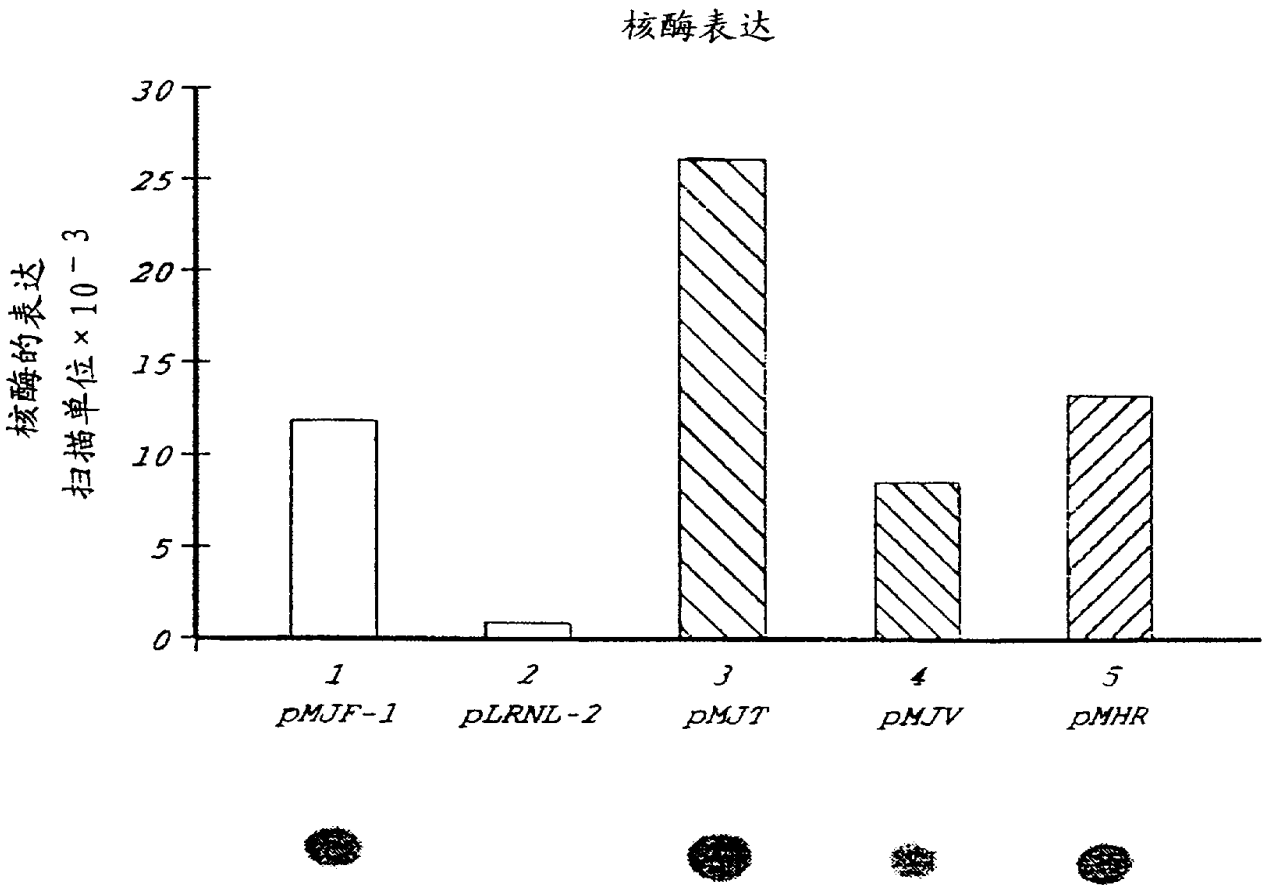

核酶表达
核酶的表达
扫描单位 × 10 - 3
30
25
20
15
10
5
0
1
pMJF-1
2
pLRNL-2
3
pMJT
4
pMJV
5
pMHR

图 5A

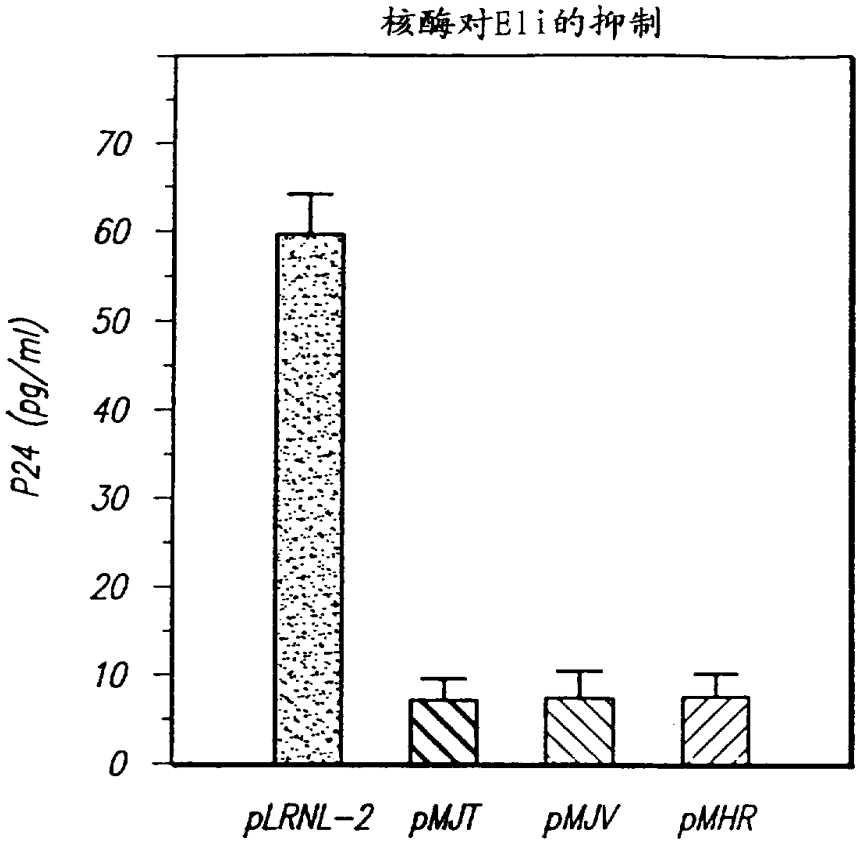

核酶对Eli的抑制
P24 (pg/ml)
70
60
50
40
30
20
10
0
pLRNL-2
pMJT
pMJV
pMHR

图 5B

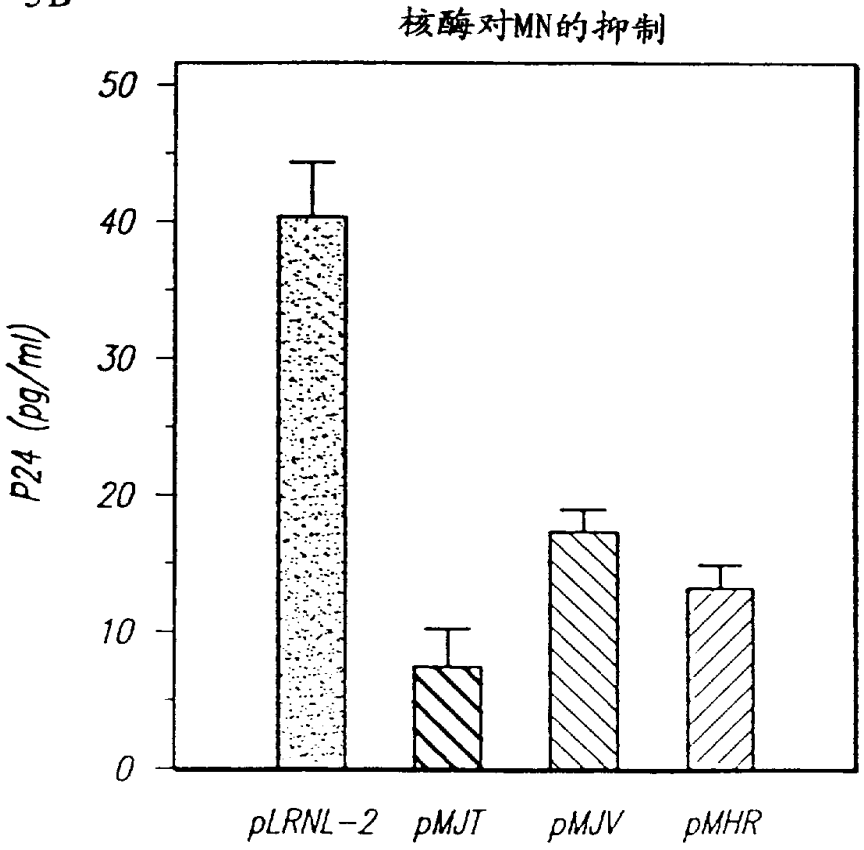

核酶对MN的抑制
P24 (pg/ml)
50
40
30
20
10
0
pLRNL-2
pMJT
pMJV
pMHR

图 6A

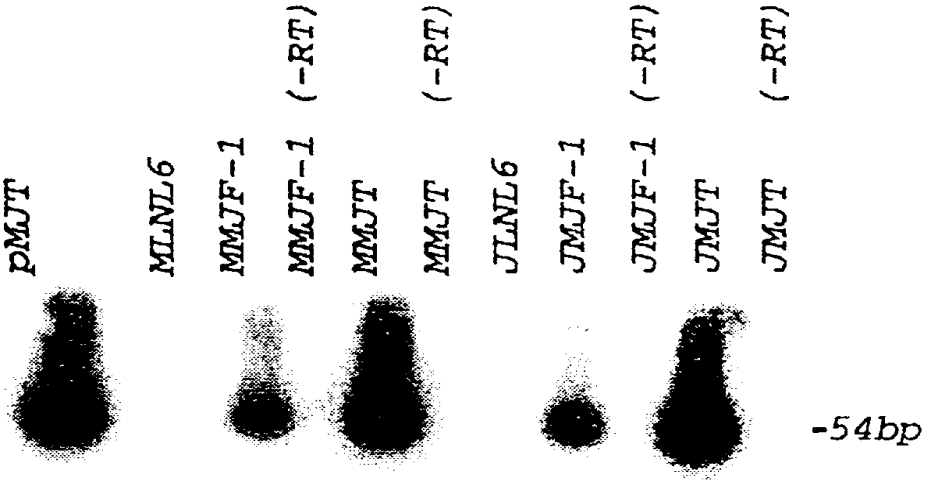
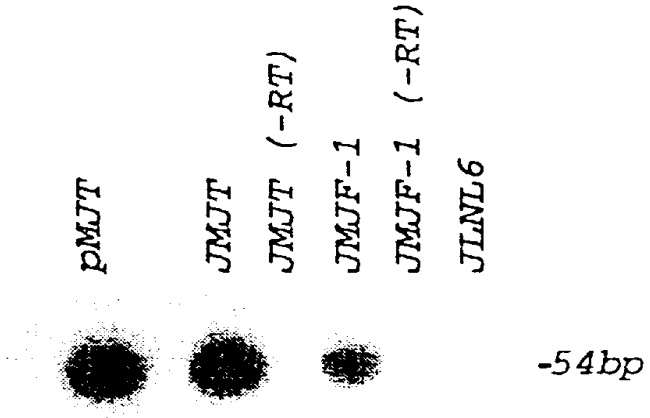

pMJT
MLNL6
MMJF-1
MMJF-1 (-RT)
MMJT
MMJT (-RT)
JLNL6
JMJF-1
JMJF-1 (-RT)
JMJT
JMJT (-RT)
-54bp

图 6B


pMJT
JMJT
JMJT (-RT)
JMJF-1
JMJF-1 (-RT)
JLNL6
-54bp

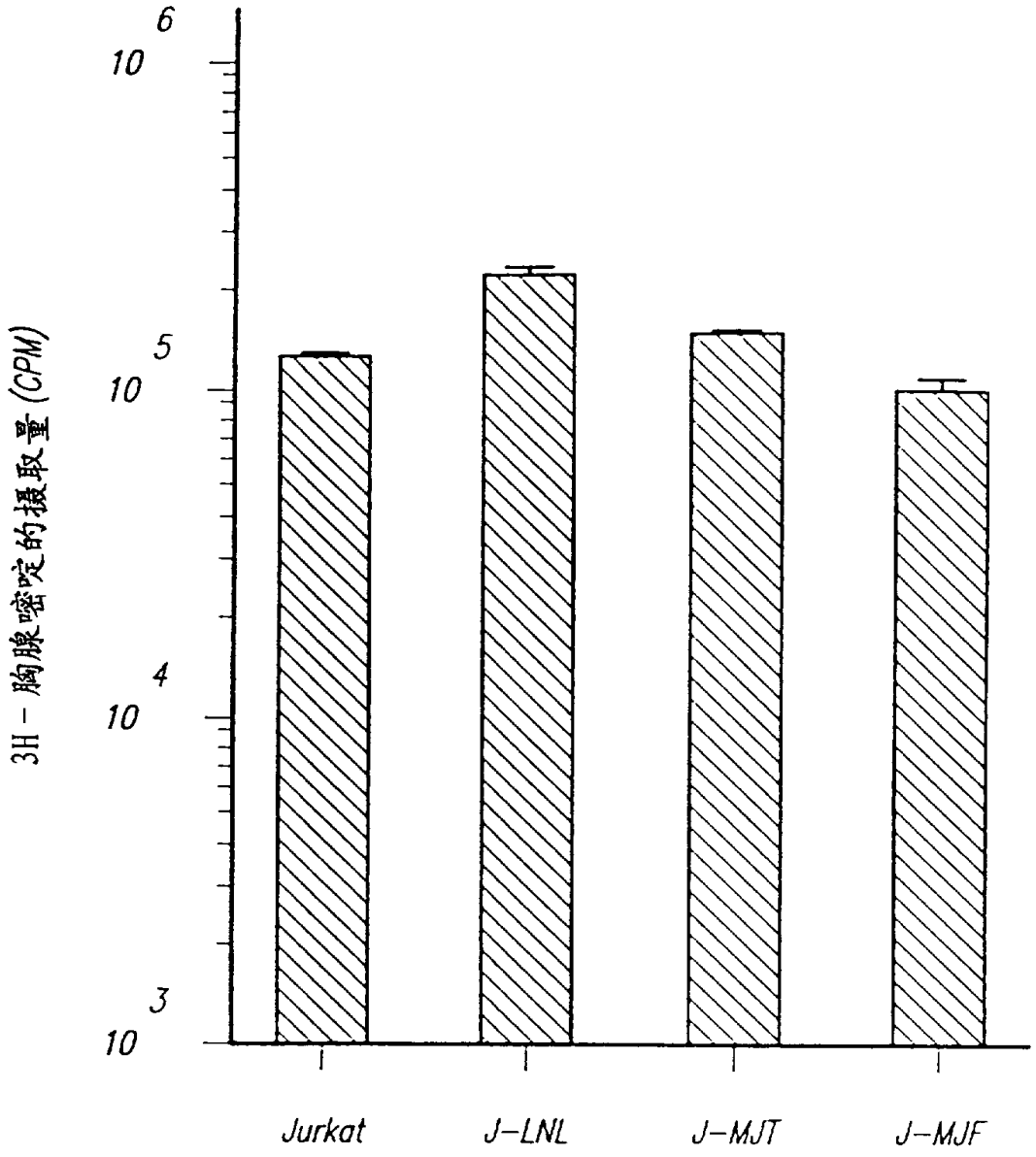
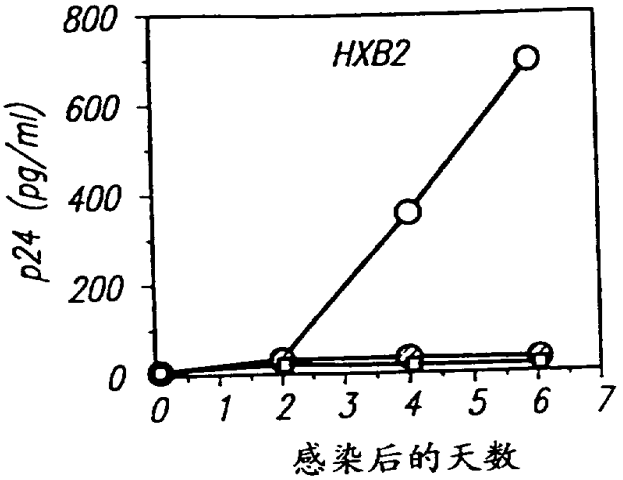


图 7

图 8A


HXB2
800
600
400
200
0
p24 (pg/ml)
0 1 2 3 4 5 6 7
感染后的天数

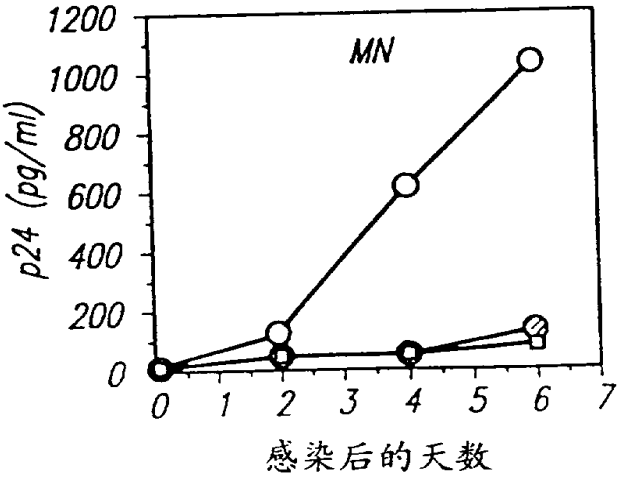
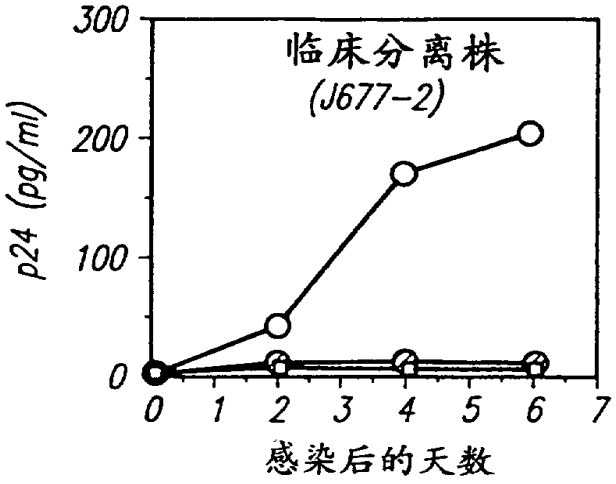

MN
1200
1000
800
600
400
200
0
p24 (pg/ml)
0 1 2 3 4 5 6 7
感染后的天数

图 8B

图 8C


300
200
100
0
p24 (pg/ml)
临床分离株
(J677-2)
0 1 2 3 4 5 6 7
感染后的天数

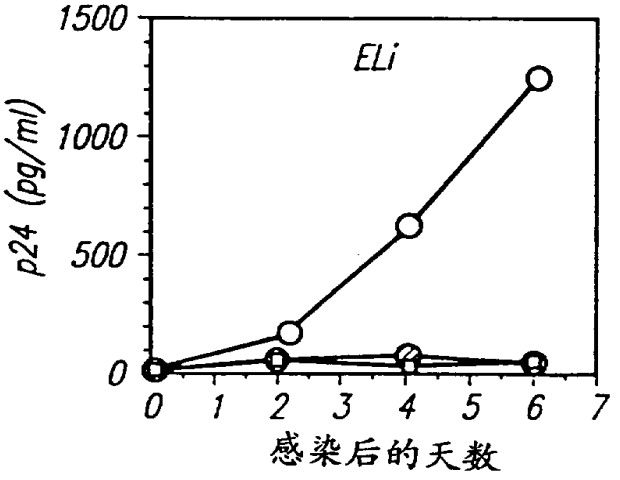
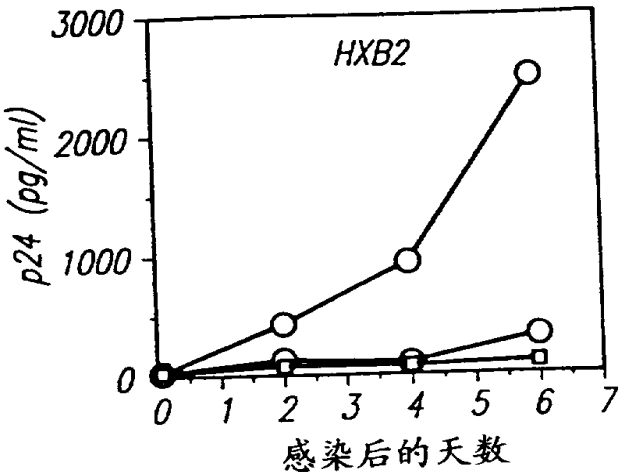

1500
1000
500
0
p24 (pg/ml)
ELi
0 1 2 3 4 5 6 7
感染后的天数

图 8D

图 9A


HXB2
3000
2000
1000
0
p24 (pg/ml)
0 1 2 3 4 5 6 7
感染后的天数

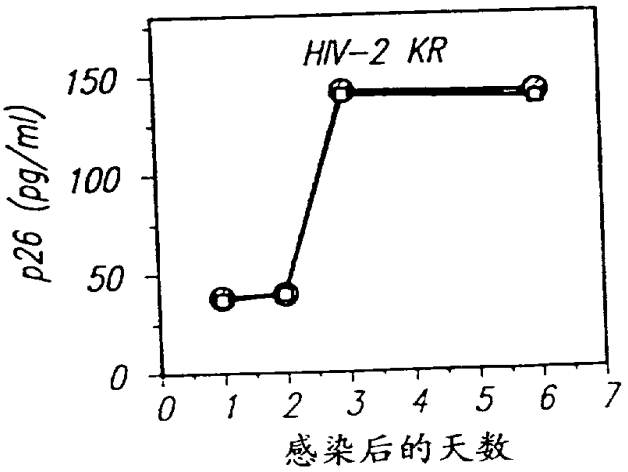

HIV-2 KR
150
100
50
0
p26 (pg/ml)
0 1 2 3 4 5 6 7
感染后的天数

图 9B

图 10

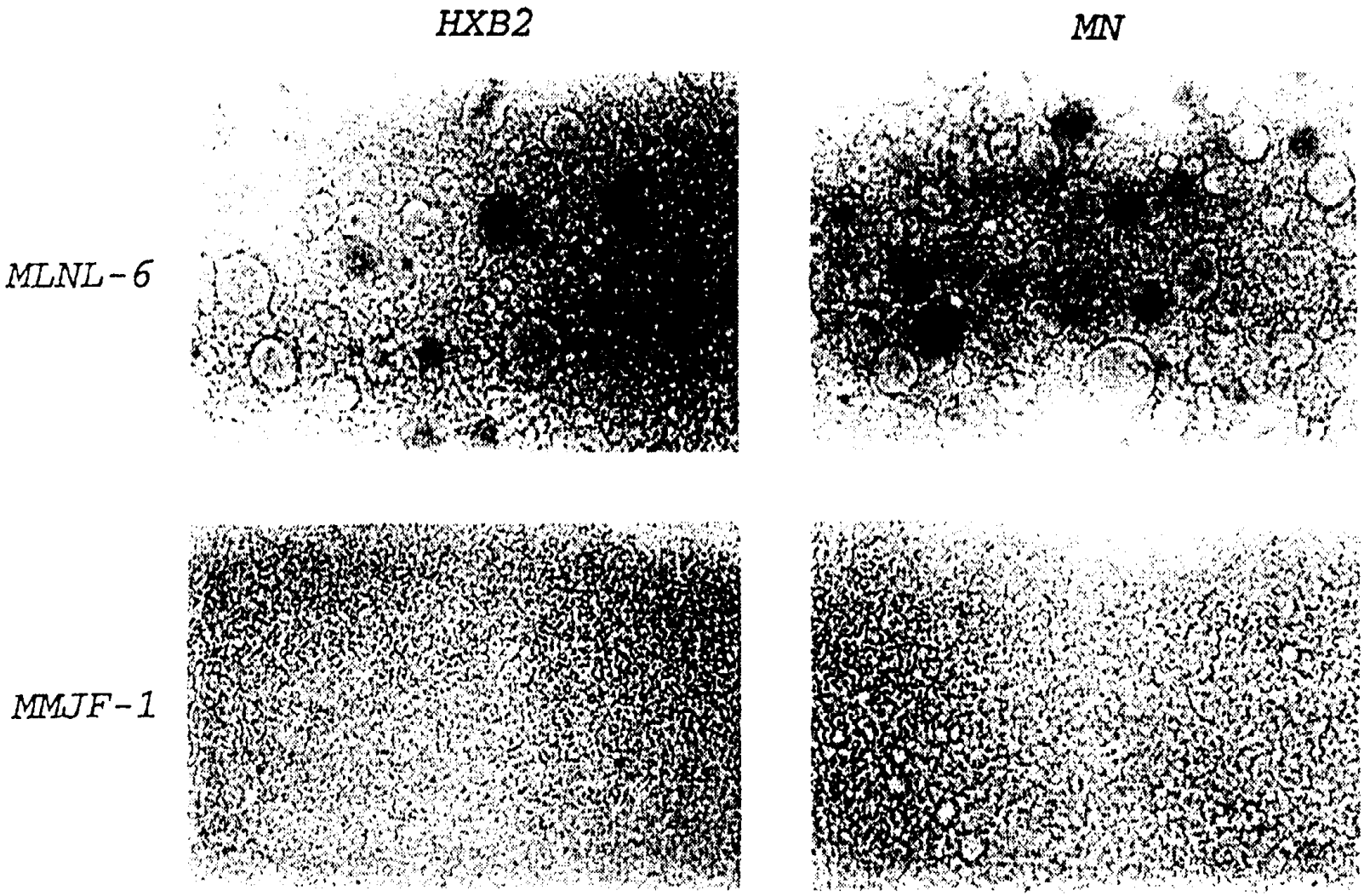


图 11A

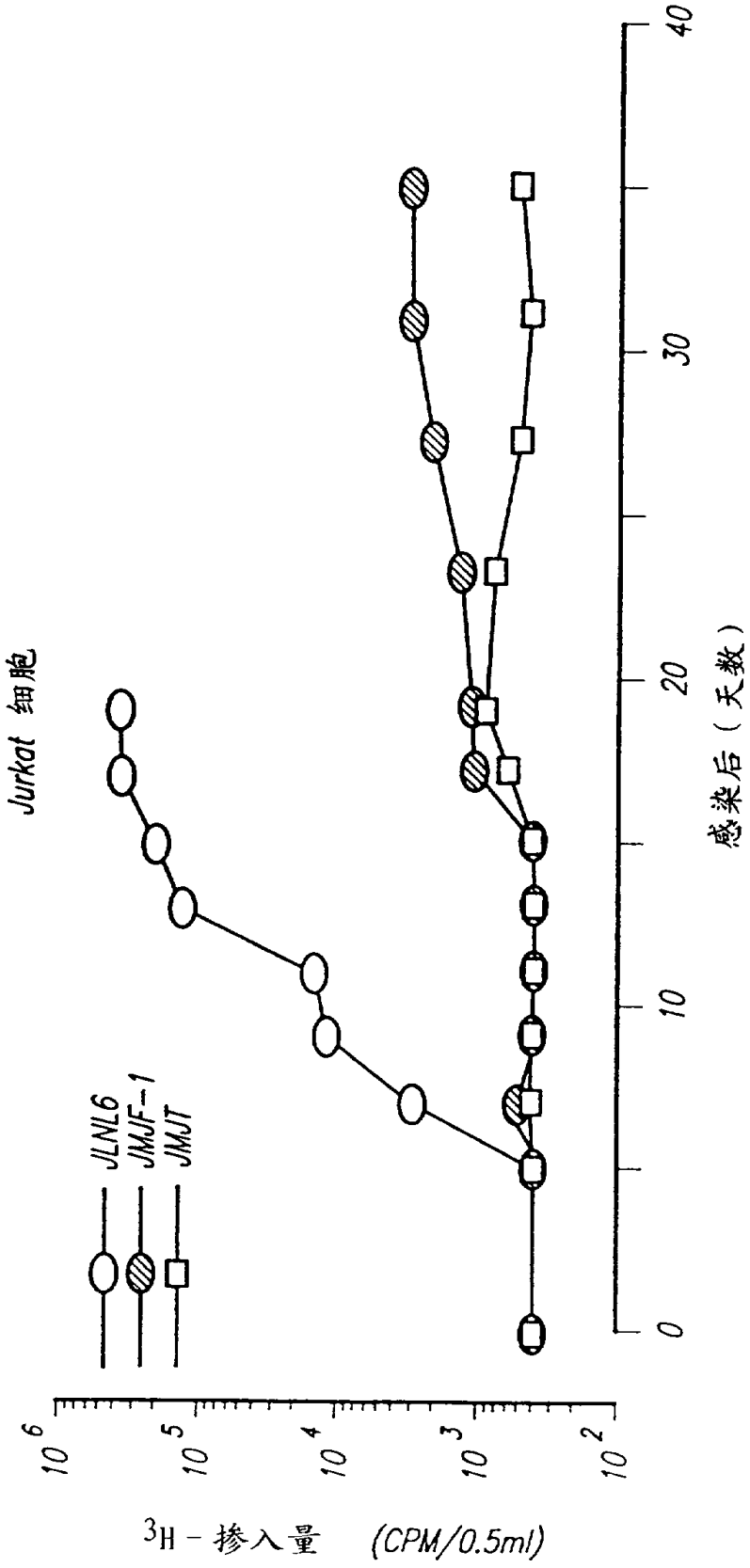

Jurkat 细胞
JLNL6
JMJF-1
JMJT
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
^3H - 掺入量 (CPM/0.5ml)
0
10
20
30
40
感染后（天数）

图 11B

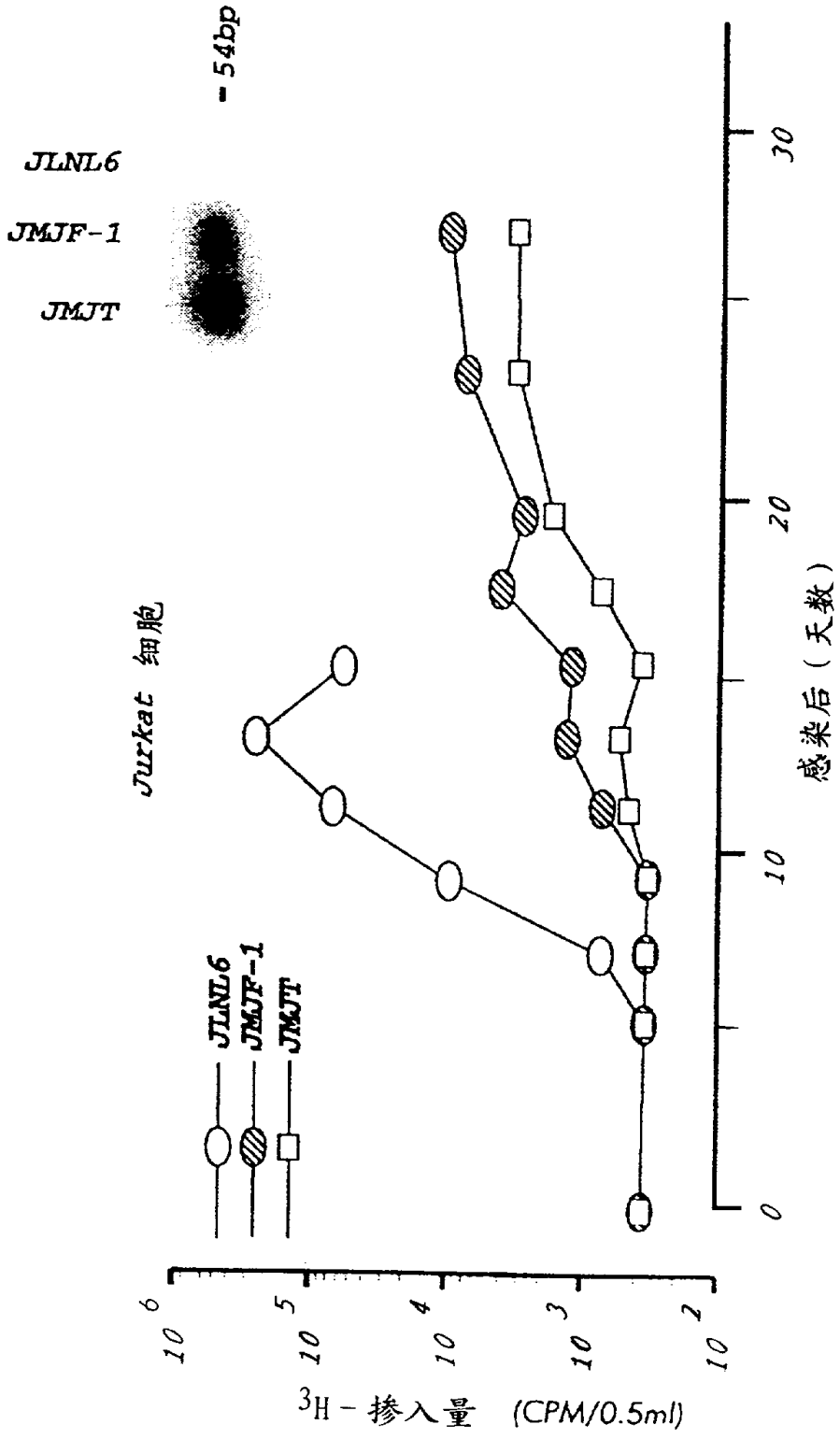
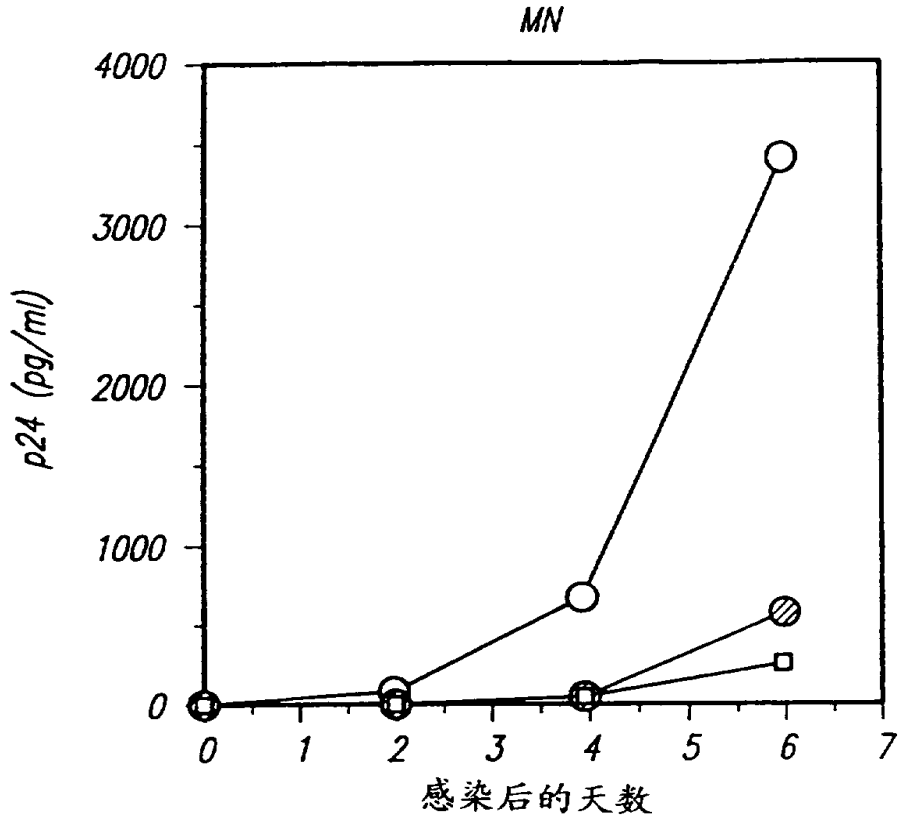

-54bp
JLNL6
JMJF-1
JMJT
Jurkat 细胞
JLNL6
JMJF-1
JMJT
10^6
10^5
10^4
10^3
10^2
0
10
20
30
感染后（天数）
^{3}H－掺入量 (CPM/0.5ml)

图 12A


MN
4000
3000
2000
1000
0
p24 (pg/ml)
0
1
2
3
4
5
6
7
感染后的天数

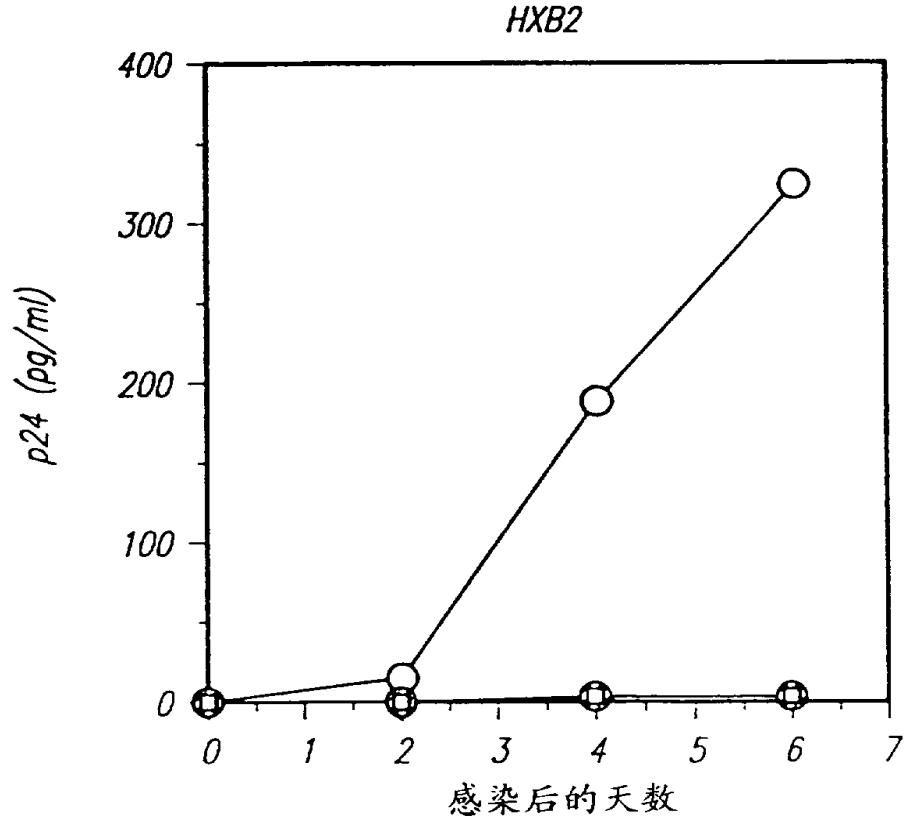

HXB2
400
300
200
100
0
p24 (pg/ml)
0
1
2
3
4
5
6
7
感染后的天数

图 12B

JMJT
10 循环
15 循环
20 循环
25 循环
30 循环
JLNL6
10 循环
15 循环
20 循环
25 循环
30 循环
204bp
105bp

图 13

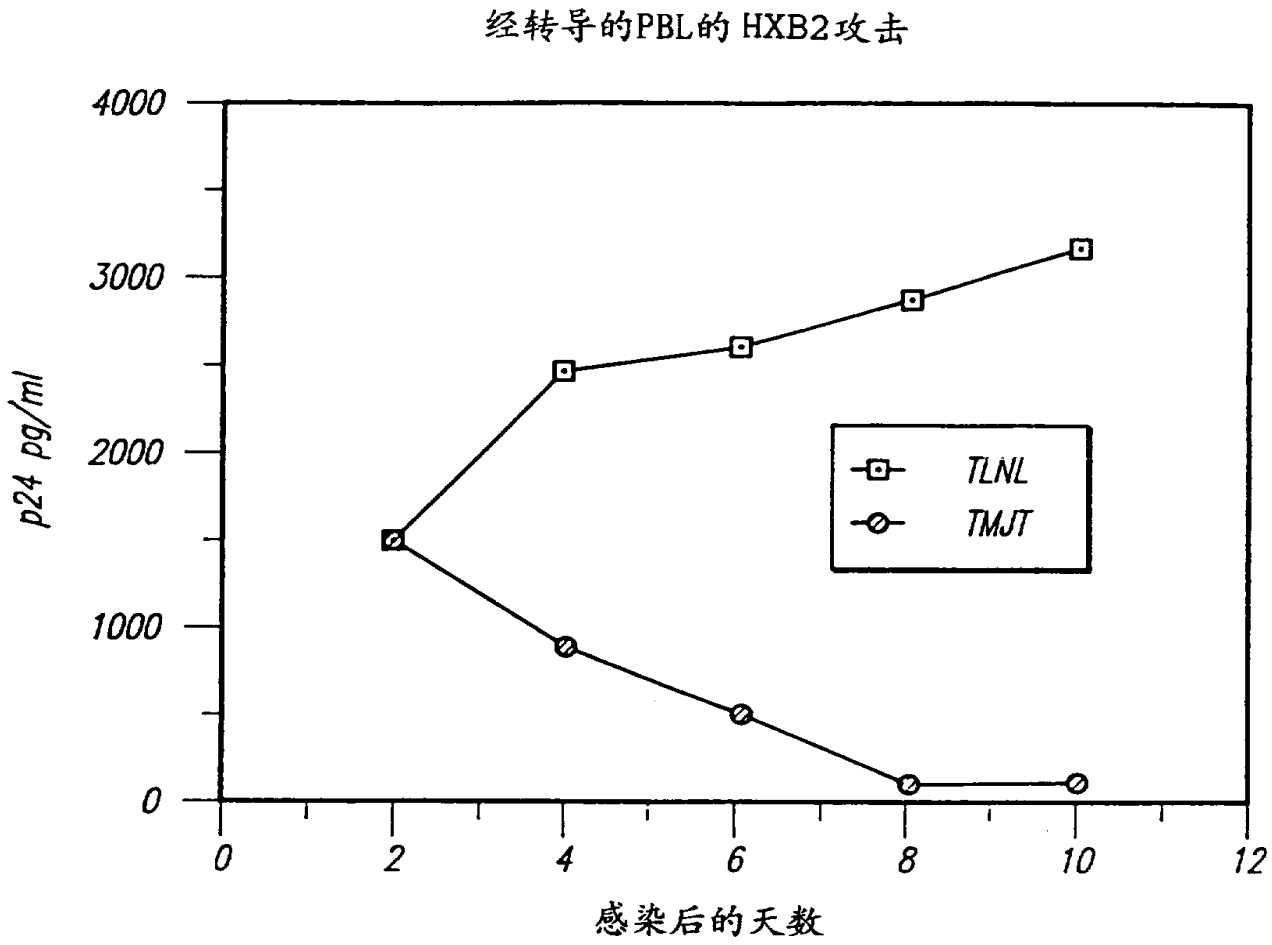
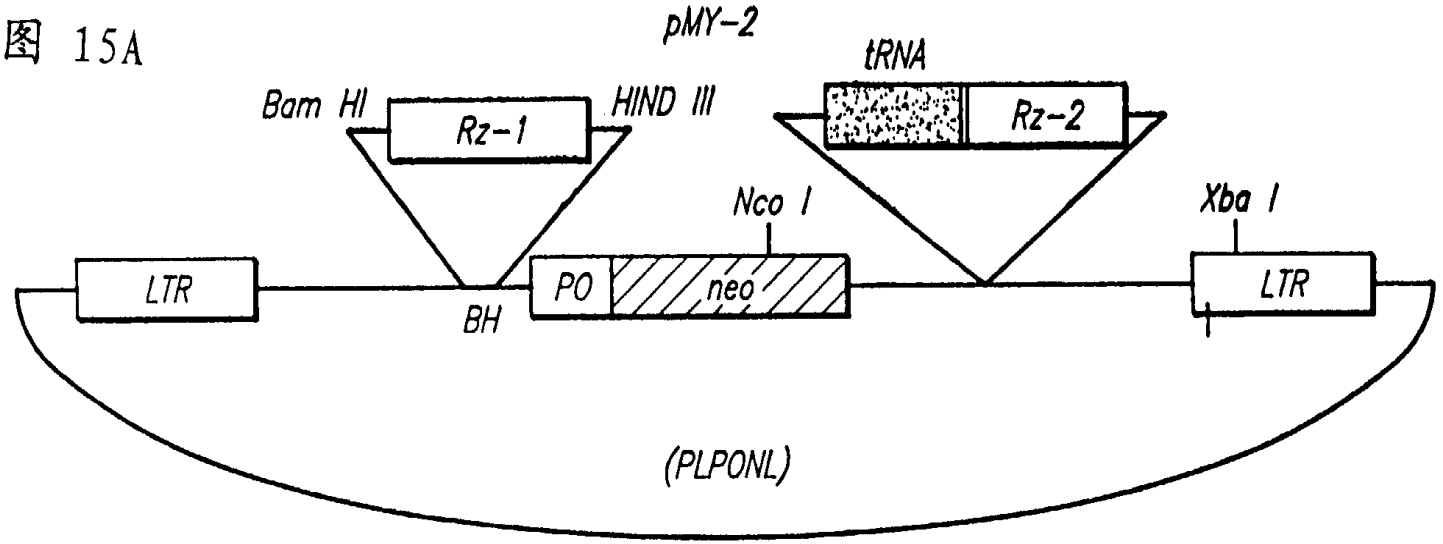

经转导的PBL的 HXB2攻击
4000
3000
2000
1000
0
p24 pg/ml
0
2
4
6
8
10
12
感染后的天数
TLNL
TMJT

图 14

图 15A


pMY-2
tRNA
Bam HI
Rz-1
HIND III
Rz-2
Nco I
Xba I
LTR
PO
neo
LTR
BH
(PLPONL)

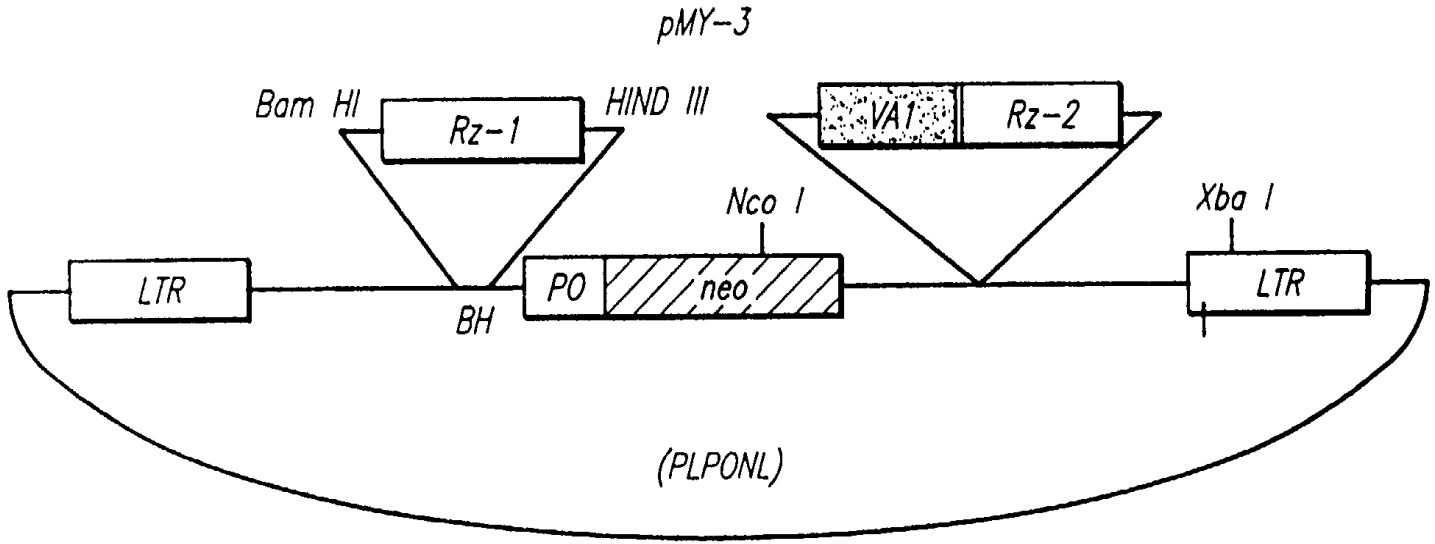

pMY-3
Bam HI
Rz-1
HIND III
VA1
Rz-2
Nco I
Xba I
LTR
PO
neo
LTR
BH
(PLPONL)

图 15B

图 16A

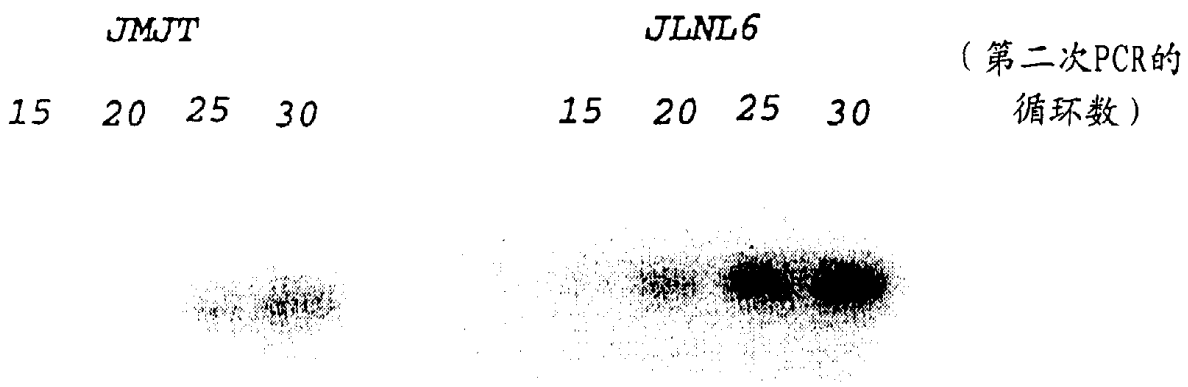


图 16B

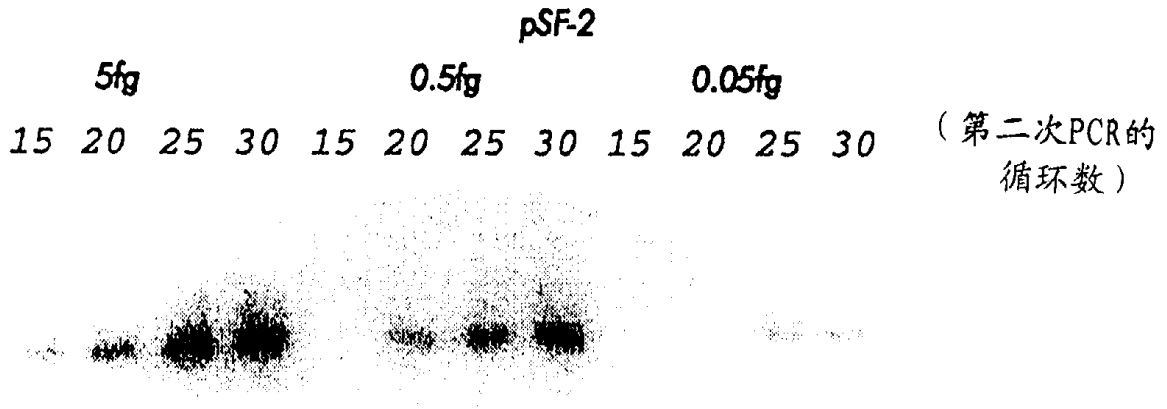
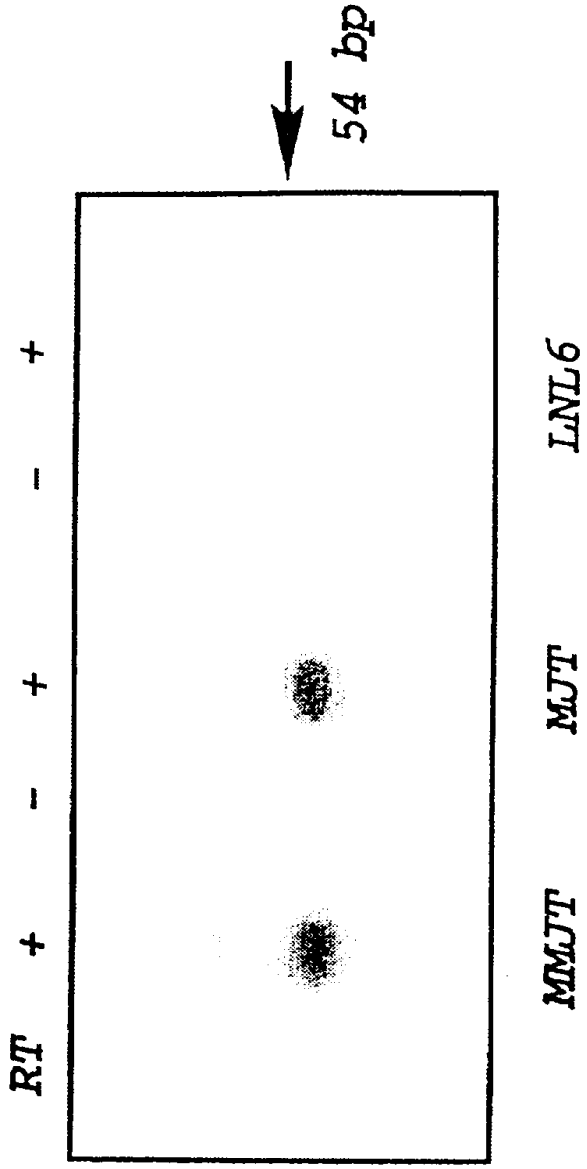

pSF-2
5fg
0.5fg
0.05fg
15 20 25 30 15 20 25 30 15 20 25 30
（第二次PCR的循环数）

图 17



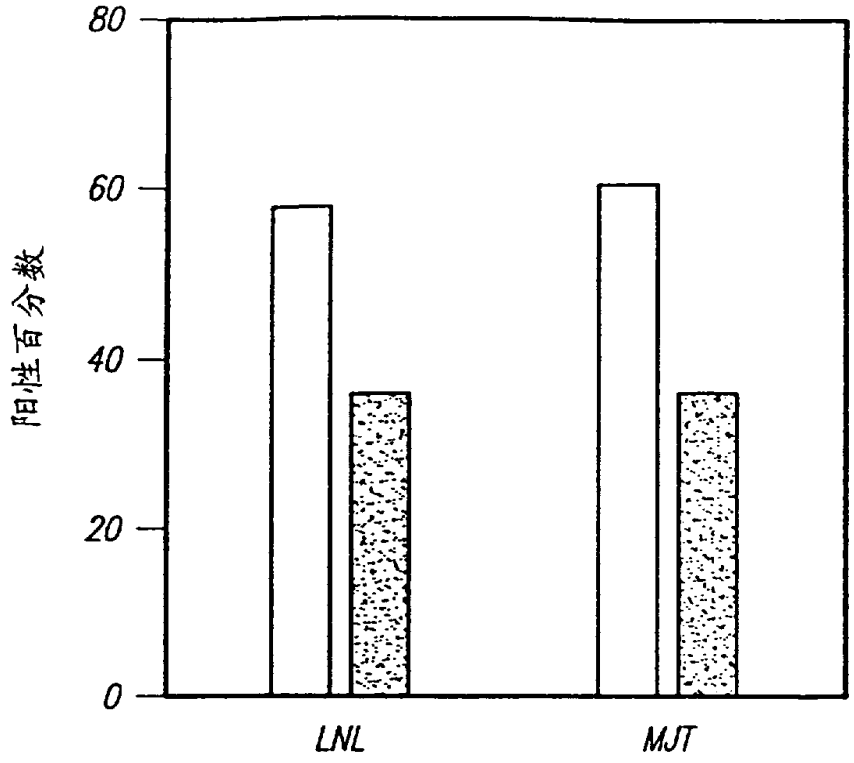


图 18B

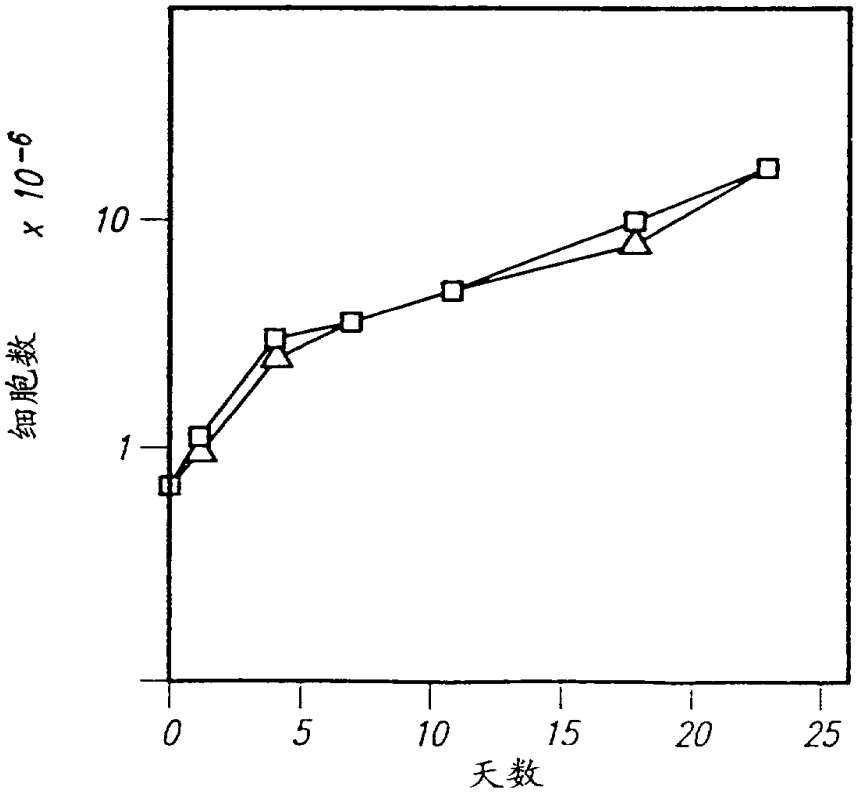


图 18A

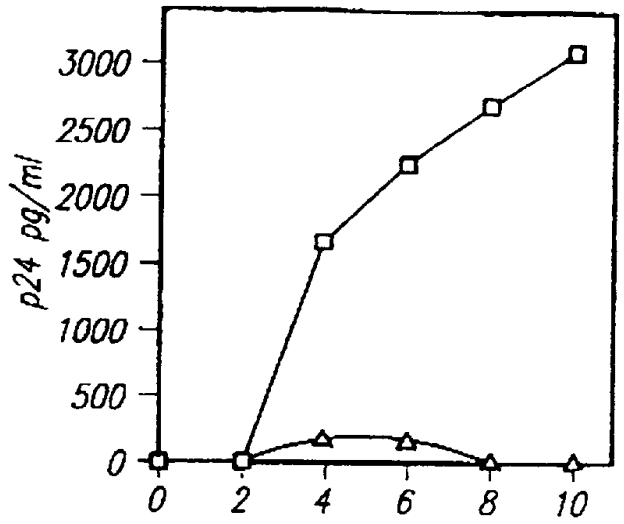

3000
2500
2000
1500
1000
500
0
p24 pg/ml
0
2
4
6
8
10

图 19A

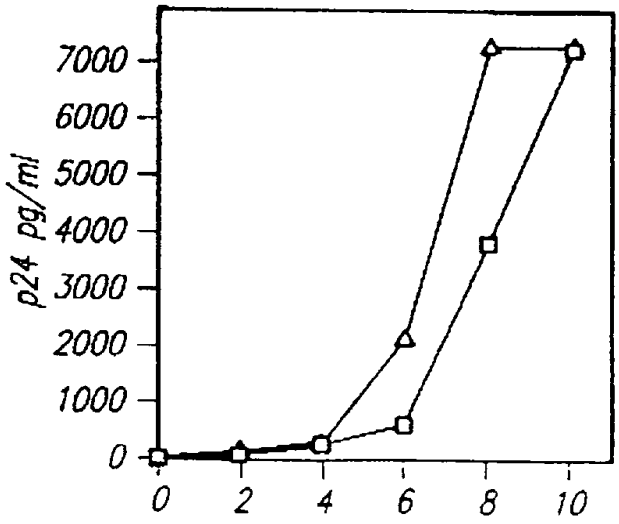

7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
p24 pg/ml
0
2
4
6
8
10

图 19B

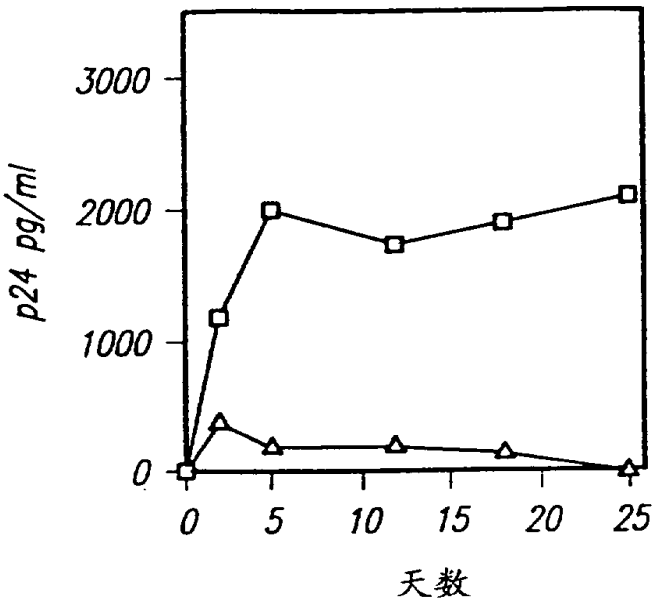

3000
2000
1000
0
p24 pg/ml
0
5
10
15
20
25
天数

图 19C

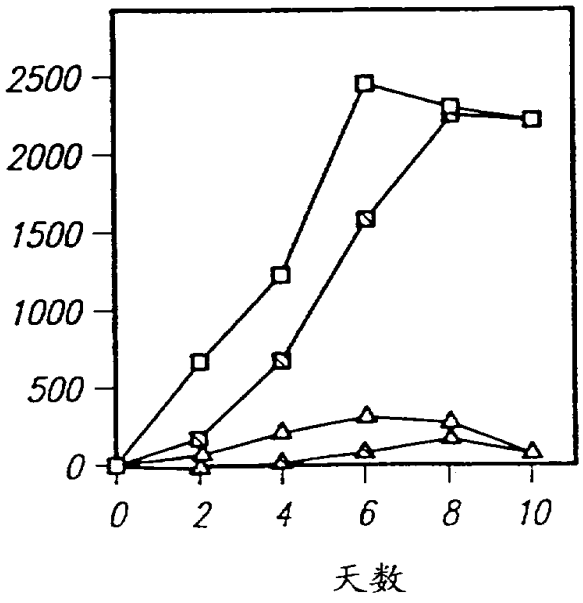

2500
2000
1500
1000
500
0
0
2
4
6
8
10
天数

图 19D

图 20A

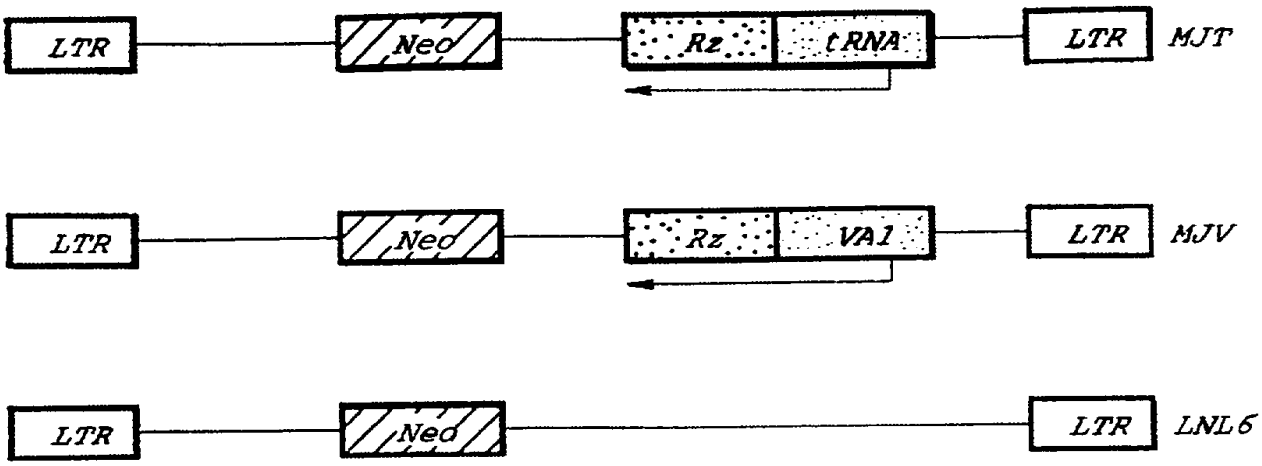
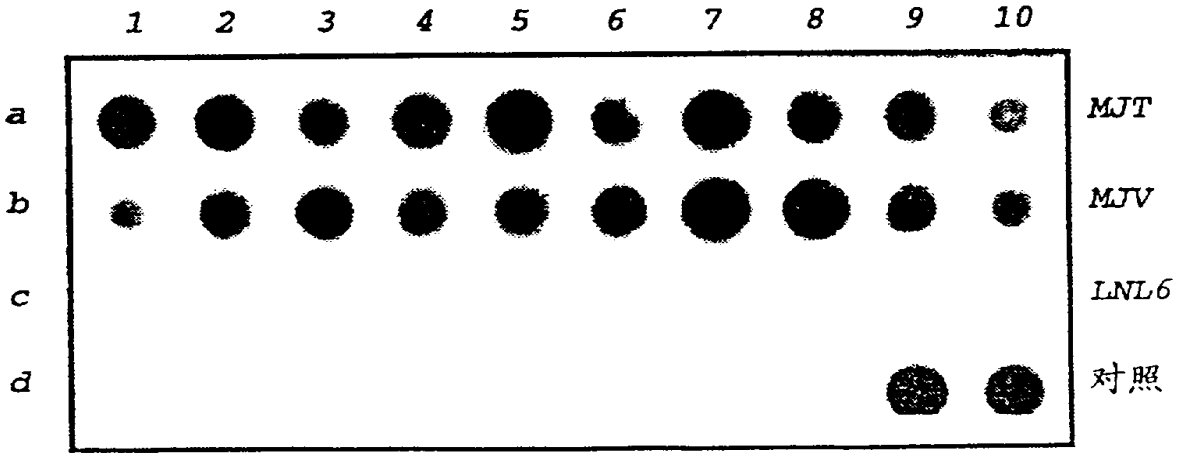

LTR
Neo
Rz
tRNA
LTR
MJT
LTR
Neo
Rz
VA1
LTR
MJV
LTR
Neo
LTR
LNL6

图 20B


1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
a
b
c
d
MJT
MJV
LNL6
对照

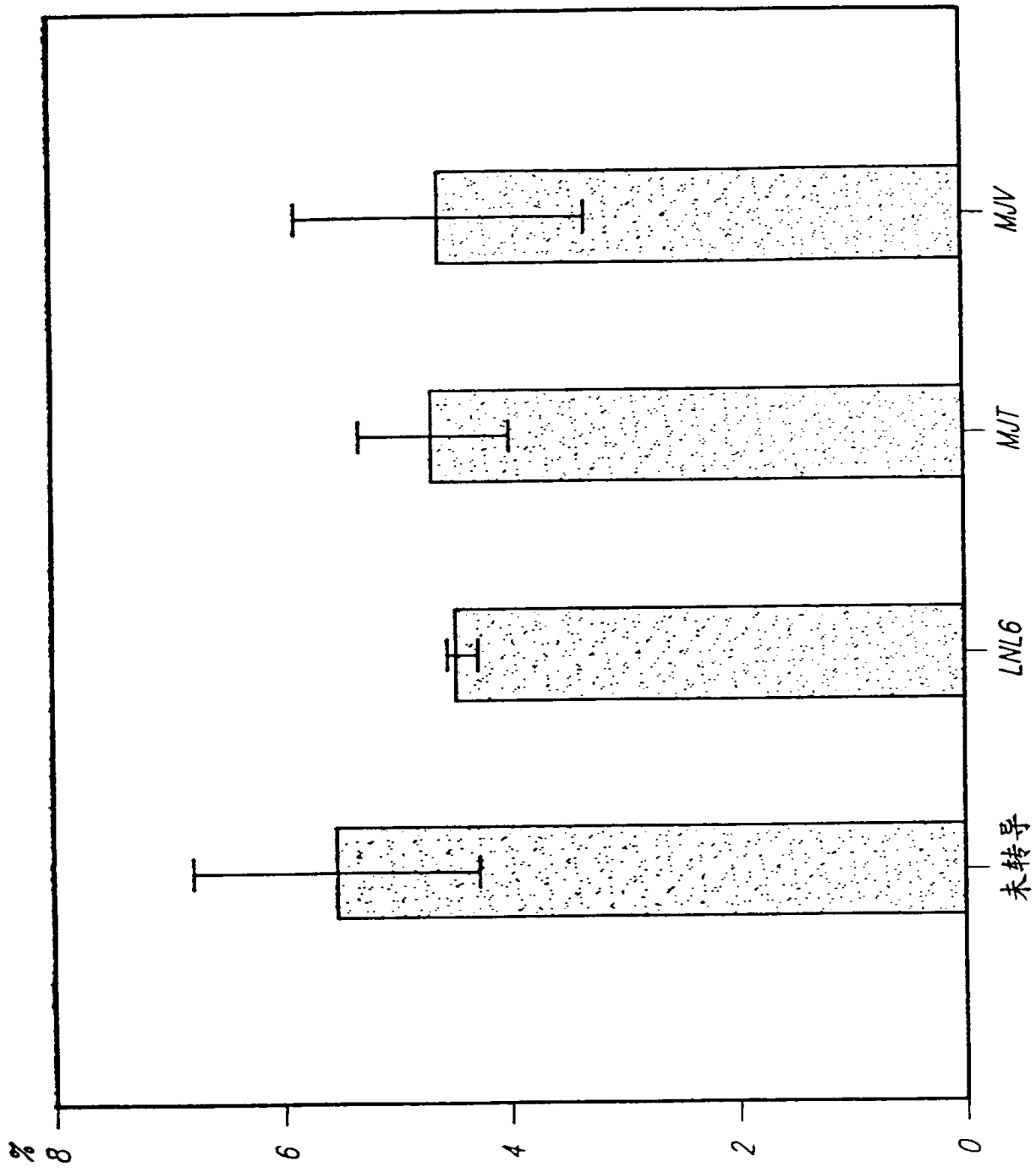


图 21

图 22A

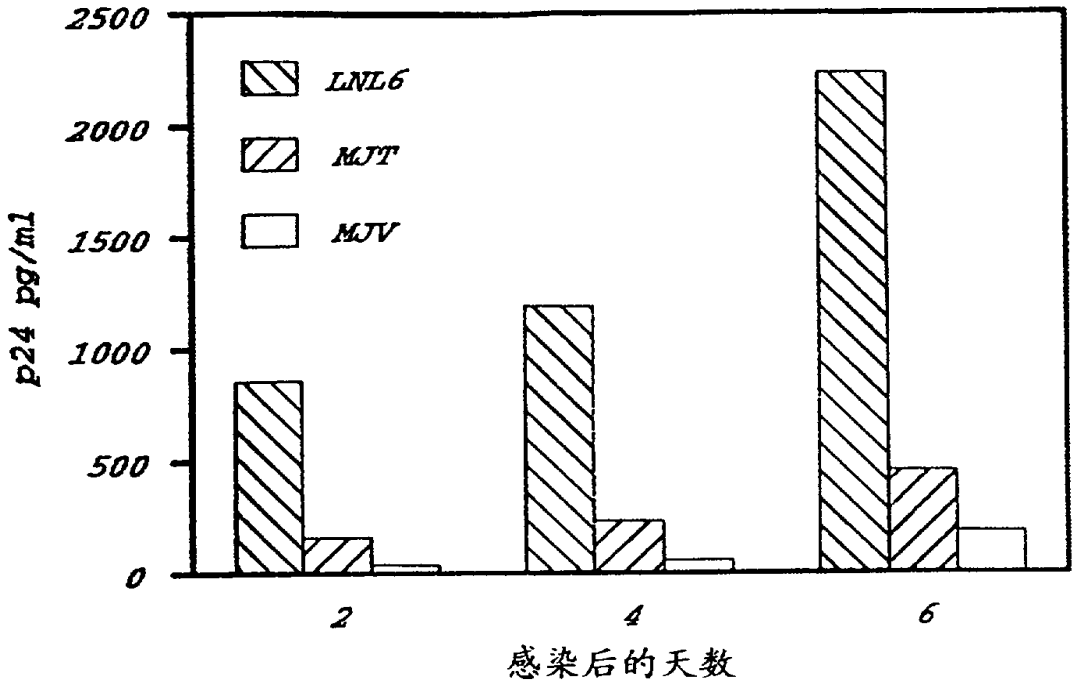


图 22B

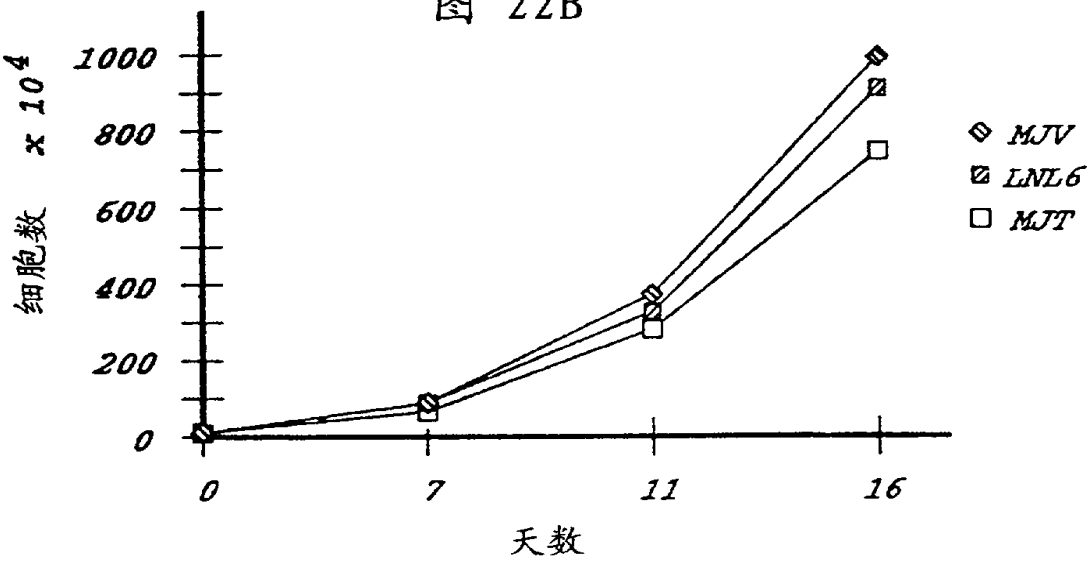


图 22C

