

A6
B6

美 國(地區) 申請專利, 申請日期: 1996.4.8 案號: 08/629,308, ☐有 ☐無主張優先權

有關微生物已寄存於： _____，寄存日期： _____，寄存號碼： _____

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

五、發明說明(1)

1. 說明

本發明係關於將製造細胞植入哺乳動物腦部之方法。該製造細胞受反轉錄病毒爲主的重組載體控制，編有殺腫瘤細胞或易感染之因子的密碼，使得腫瘤細胞對化學療法或放射療法治劑敏感。植入哺乳動物腦部之前，先將製造細胞於體外培養於支撐基質上，以增加被移植細胞之長期存活率，並有益於其長期機能之運作。

2. 發明背景

腫瘤是35歲以下成人因癌症死亡的主因。中樞神經系統腫瘤的發生率是霍金斯(Hodgkin's)症的二倍以上，超過黑色瘤的一半，而女性因中樞神經系統腫瘤所引起的死亡頻率幾乎等於由卵巢癌所引起的頻率。腦腫瘤是兒童最常見的實體腫瘤，而且是兒童時期癌症的全部原因中僅次於白血病患者(Dale, D.C. 和 Federman, D.D., 1995, Scientific American Medicine, Scientific American Inc., New York, Chapter 7)。大部份的腦腫瘤是無法開刀的，即使該些腦腫瘤細胞是可以開刀的，但手術非常困難，而且常常導致神經上的疾病。

於體內使用以反轉錄病毒載體傳送的基因療法已應用於腦腫瘤的治療上(Oldfield等人，1993，人類基因療法；4:39-69；Culver等人，1992，Science 256:1550-2)。大概最常被廣泛研究應用的基因療法係利用反轉錄病毒以基因控制表現蛋白質，以活化相當不具毒性的前藥形成毒性很強的治劑。例如，爲了殺死腫瘤細胞而將表現易感染因子之

五、發明說明(2)

反轉錄病毒的製造細胞植入病人的腦組織內(Barba, D.等人, WO 93/04167)。該系統有一種特殊用途係利用對病毒藥物, 如甘西克羅弗(ganciclovir)和阿塞克羅弗(acyclovir)敏感之單純疱疹病毒的胸腺核苷激酶基因(Barba等人, WO 93/04167; Moolten F.L.等人, 1986, 癌症研究46:5276-5281)。該HSV-TK基因產物催化一些核苷酸類似物的磷酸化作用, 而該核苷酸類似物是哺乳動胸腺核苷激酶的較差受質。例如抗疱疹藥物阿塞克羅弗對於無HSV-TK活性之細胞毒性最小, 但卻會使細胞活化表現HSV-TK為一種能夠抑制DNA合成的有毒型態, 而且顯示出對表現該HSV-TK基因之細胞會有選擇性的胞毒性。

使用反轉錄病毒載體傳送基因之治療法時需要考慮的是所植入的製造細胞可能不會繼續存活和/或需要達到最大治療效益的期間內表現出該治療基因。一般已知細胞在直接植入腦內2至4週內死亡(見, 例如Itukura, T.等人, 1988, J. Neurosurg, 68:955-959)。有些例子中, 在移植作用前, 將細胞附著於微載體上會加強被植入細胞之長期存活力(Cherskey等人; WO 9206702), 但迄今此方法尚未成功地運用於反轉錄病毒之製造細胞株上。

3. 發明摘要

本發明係關於一種將編有殺腫瘤因子或易感染因子之密碼的基因轉移至腦腫瘤細胞內的方法。該方法包括將由編有殺腫瘤因子或易感染因子反轉錄病毒為主之重組載體所控制的製造細胞植入哺乳動物腦內。被控制的製造細胞會

五、發明說明(3)

製造能使腦部腫瘤細胞附近感染之具傳染性的反轉錄病毒顆粒，因而使得腫瘤細胞會對化學療法或放射療法治劑敏感。由於反轉錄病毒載體基因轉移系統在腦部需要增生的標的細胞來整合及基因表現，因此腦腫瘤應用本系統時，會有正常未增生之腦細胞不受感染，但反轉錄病毒會以腦腫瘤增生細胞為標的物之優點。

實行本發明時，可以使用一些編有殺腫瘤或易感染因子密碼之基因。這些基因編有酵素，可以將相當無毒性的治劑轉製成毒性很強的治劑。藉由遺傳控制細胞使其表現此等基因時，基本上在適當的前藥存在下會產生代謝性自殺。

本發明之具體實施例中，可以控制簡單疱疹病胸腺核苷激酶(HSV-TK)基因，使其進入重組反轉錄病毒轉體內。接著被該重組反轉錄病毒感染病且表現該HSV-TK基因的任何細胞，會變得對化學療法治劑，例如阿塞克羅弗和甘西克羅弗敏感。本發明另一個具體實施例中，可以控制胞嘧啶脫氨基酶(CD)基因，使其進入重組反轉錄病毒載體內。表現該CD基因之細胞會使相當無毒性的製造5-氟胞嘧啶新陳代謝成為毒性很強的5-氟尿嘧啶(Mullen, CA等人，1994，癌症研究54:1503-6)。

本發明之方法進一步包括在植入哺乳動物腦部前，於體外培養製造細胞於支撐基質上。在植入腦部前，先將細胞附著於微載體上係為了加強被移植細胞的長期存活率及提供長期機能運作上的效果。

五、發明說明(4)

本發明部份係以說明在植入哺乳動物腦部前，先將製造細胞附著至微載體上，以加強被移植細胞之存活率為主。於本文所述的特別實施例中，製造細胞係植入老鼠腦部。被植入的製造細胞會製造控制基因表現鹼性磷酸酶基因之傳染性反轉錄病毒顆粒。結果顯示在被移植的動物腦內成功地長期表現出該鹼性磷酸酶基因。

4. 圖之敘述

圖1. 植入附著於微載體珠子上之非轉移感染細胞的老鼠腦部橫切面(放大20倍)。在珠子周圍有很稀少或無染色。

圖2. 植入附著於微載體珠子上之非轉移感染細胞的老鼠腦部橫切面(放大20倍)。橫切面上未見染色。

圖3. 將以鹼性磷酸酶基因質體附著於微載體珠子上轉移感染的細胞植入老鼠腦部30天前之橫切面(放大10倍)。可見到高密度黑色染色物質(細胞)。

5. 本發明之詳細說明

本發明係關於治療腦部腫瘤之方法，包括將受反轉錄病毒為主的重組載體所控制，編有殺腫瘤細胞或易感染因子密碼的製造細胞植入哺乳動物腦內。該製造細胞製造能感染腦部腫瘤細胞之傳染性反轉錄病毒顆粒，因而使得該些腫瘤細胞對化學療法治劑敏感。移植前藉由體外於支撐基質上培養該製造細胞而可以增強製造細胞的長期存活率。

據顯示可以將特別令人感興趣的DNA有效而穩定地傳入「製造細胞」內，接著轉移至支撐基質上，以期被轉移

五、發明說明(5)

移植或移植入哺乳動物腦部內。製造細胞製造可以感染非常靠近該被植入之製造細胞附近的腦組織之感染性的反轉錄病毒顆粒。移植後30天，被感染的腦組織顯示表現出預期的基因。

5.1 反轉錄病毒載體

爲了表現殺腫瘤或易感染因子，將編有此等因子密碼之核苷酸序列嵌入適當的反轉錄病毒表現載體內。該些熟於此藝者廣泛已知之方法可用來建立包含編有與執行適當轉錄/轉譯控制訊號有關密碼之殺腫瘤或易感染的核苷酸序列之重組反轉錄病毒載體。利用本藝中已充份了解的標準絡合物作用和限制技術可以製造出建立含編有殺腫瘤或易感染密碼之序列的重組反轉錄載體。請見，例如 Sambrook 等人於分子複製中所述之技術：實驗手冊，Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 2d ed., 1989 和 Auselbel 等人，1989，分子生物學之最新實驗步驟，Greene Publishing Associates & Wiley Interscience, N.Y.。

該些熟於此藝者也會使用一些以反轉錄病毒爲主而效果相當的重組載體。該重組載體可以含有不同量的反轉錄病毒序列，包括需要整合入宿主基因體內的反轉錄病毒長端重現(LTRS)，以及病毒原的重組RNA轉錄外殼編碼進入成熟的病毒顆粒所需之組合訊號(ψ)。特別合適的反轉錄病毒載體包括但不侷限於以下參考文獻中所述之該些載體，其中每一種皆併入本文參考文獻內：SAX載體(Kantoff P.W.等人，1986，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:6563)；N2

五、發明說明 (6)

載體 (D. Armentano 等人, 1987, 病毒學雜誌, 61:1647); LXSNA 載體 (Miller A.D. 等人, 1989, 生物技術 7:980-990); 和 LASN 載 (血液 72:876-81)。

重組載體也可含有對抗生素如氨苄青黴素和四環黴素有抗性所需之細菌質體序列, 以及細菌複製所需之序列。另外, 該重組載體也包含可用來確認已穩定被轉移感染之細胞的可選擇性標記基因。重組載體中可選擇的標記會對選擇作用有抗性, 並且使得細胞可以穩定地將重組反轉錄病毒表現載體整合入細胞的染色體內。此方法有益於用來確認接著會製造傳染性反轉錄病毒顆粒而成功地被轉移感染的製造細胞株。

可以使用一些選擇系統, 包括但不侷限於能分別使用 HGPRT 或 APRT 細胞之次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶 (Szybalska & Szybalski, 1962, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48:2026), 和腺嘌呤磷酸核糖基轉移酶 (Lowy 等人, 1980, 細胞 22:817) 基因。也可用代謝拮抗物抗性來作為選擇 DHFR 之基礎, 其指的是對氨甲蝶呤的抗性 (Wigler 等人, 1980, Natl. Acad. Sci. USA 77:3567; O'Hare 等人, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:1527); GPT, 指的是對霉酚酸有抗性 (Mulligan & Berg, 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:2072); neo, 指的是對氨基苷類 G-418 有抗性 (Colberre-Garapin 等人, 1981, 分子生物雜誌 150:1); 及 hygro, 指的是對潮霉素有抗性 (Santerre 等人, 1984, 基因 30:147) 的基因。最近, 已另有一種可選擇的基因, 名為 trpB, 使細胞

五、發明說明(7)

可以利用吡啶代替色胺酸；hisD，使細胞可以利用組胺酸醇代替組胺酸(Hartman & Mulligan, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:8047)；及ODC(鳥胺酸脫羧酶)，指的是對鳥胺酸脫羧酶有抗性的抑制劑，2-(二氟甲基)-DL-鳥胺酸，DFMO (McConlogue L., 1987, In: 分子生物學之最新方法，Cold Spring Harbor Laboratory ed.)。

實行本發明時可以使用一些殺腫瘤或易感染的因子。這些因子之定義為該些使細胞對化學療法治劑敏感之因子。在本發明之特別實施例中，HSV-TK基因係嵌入重組反轉錄病毒載體內。該HSV-TK編碼區可以衍生自一些能公然使用的同源細胞株(Wigler等人)，1977，細胞11:223)。以此種反轉錄病毒載體感染的腫瘤細胞會使得該些細胞對如阿塞克羅弗和甘西克羅弗的藥物敏感。

根據本發明，編有殺腫瘤或對易感染因子密碼之核苷酸序列與執行反轉錄病毒LTR促進質-強化質訊號有關。可作用的聯結是該LTR促進質-強化質序列中的一種，而且與以此種方式殺腫瘤或易感染因子之基因使得基因表現有關。此外，該些熟於此藝者也利用效果相當的其它促進質-強化質序列來提供嵌入序列的轉錄。舉例來說，可以使用由哺乳動物的基因組分離出來，隨著病毒在哺乳動物內生長，或由重組DNA或合成技術製造的促進質-強化質元件來提供編有殺腫瘤或易感染因子之密碼的基因轉錄。任何一些適用的促進質-強化質元件，包括構成和可誘發的促進質也可以使用於表現載體中。

五、發明說明(8)

嵌入基因爲足夠轉譯所需之特異起始訊號也包含在反轉錄病毒表現載體內。這些外生性轉譯控制序列包括ATG起始密碼和鄰近的序列能有一些天然或合成的起源。在整個殺腫瘤或易感染基因，包括其本身的起始密碼和鄰近序列，嵌入適當的表現載體內的例子中，不需要額外的轉譯訊號。然而，在只有嵌入部份編有殺腫瘤或易感染密碼序列的例子中，外生性的轉譯控制訊號，包括ATG起始端必須與該殺腫瘤或易感染密碼序列的讀取構造相配合，以確定完成整個嵌入部份的轉譯。藉由包括適當的轉錄促進質元件、轉譯終止密碼等可以加強表現的效力(見Bitter等人，1987，酵素學方法153:516-544)。

於本文所述之特殊具體實施例中，在藉由SV40促進質驅使的載體LTR和G418抗性的控制下，製造細胞係以遺傳控制含有編有鹼性磷酶密碼的基因而轉移感染之反轉錄病毒載體。將被轉移感染的製造細胞附著於塗被膠原葡萄糖微載體上，然後植入老鼠腦部。移植後30天進行組織學研究顯示鹼性磷酸酶基因長期表現於被反轉錄病毒感染的細胞上。

雖然重組的反轉錄病毒載體是本發明方法中所使用之較佳載體，但其它的病毒載體也可以用來表現殺腫瘤或易感染的基因。例如，可以使用腺病毒、與腺體有關的病毒、Epstein-Barr病毒、乳頭狀瘤病毒、類牛痘病毒、疱疹病毒和其它人類及動物病毒來表現欲植入哺乳動物腦內細胞中的殺腫瘤或易感染因子。又例如，在使用腺病毒作爲表現

五、發明說明 (9)

載體的例子中，編有殺腫瘤或易感染因子密碼之序列可以與腺病毒轉錄/轉譯控制複合物，如最近的促進質和分成三部份的前導序列連結。然後在體外或體內重組作用時，將此嵌合型基因嵌入腺病基因組內。嵌入該病毒基因組的非必要區域(如E1和E3區)內會導致重組病毒可以存活，並且能在被感染的宿主細胞內表現殺腫瘤或易感染的基因(如，見Logan & Shenk, 1984, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 81:3655-3659)。

5.2 可組合之細胞株

爲了製造可轉移的反轉錄病毒顆粒，將重組的反轉錄病毒表現載體轉移感染進入穩定的「製造」細胞株內。製造細胞株含有穩定被整合的病毒原，會表現反式組合病毒轉錄作用所需之全部反轉錄病毒功用而成爲成熟病毒顆粒。此等包括群特異性抗原(gag)，胞質鞘(env)和聚合酶(pol)基因。gag基因編有內部結構(殼包核酸)蛋白質密碼；pol基因編有RNA指揮DNA聚合酶(反轉錄酶)密碼；以及env基因編有病毒胞質鞘糖蛋白質密碼。穩定整合過的病毒原基本特徵之一爲缺乏通常在順式病毒轉錄組合作用中會提供所需之訊號的組合序列(psi序列)。因此由病毒原所表現的轉錄並未組合入病毒顆粒內，而是提供反式病毒顆粒所需之基因產物。

因爲反轉錄病毒載體需要細胞分裂和DNA合成以有效傳染，因此製造細胞的整合及基因表現最好是在活動力強的生長細胞內進行。這種製造細胞包括纖維母細胞、神經

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

裝

五、發明說明 (10)

元、神經膠質細胞、角質細胞、肝細胞或使用本發明方法而能被轉移感染及移植之任何其它的哺乳動物細胞。

本發明方法可以應用一些製造細胞株。例如，既存的反轉錄病毒製造細胞株可以應用於實行本發明中。此等細胞株包括 BOSC23 (Pear, W.S. 等人，1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:8392-8396)，Psi2 (Cone, R.D. 等人，1984, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6349-6353)，Psi am (Hartley, J.W. 等人，1976，病毒學雜誌，19:19-25) 細胞株或任何其它機能相當的製造細胞株提供病毒反式組合所需之基因產物。

此外，也可以生成一種新穎的製造細胞株。爲了生成另一種製造細胞株，將合成病毒反式集結所需之全部蛋白質的反轉錄病毒載體，轉移感染至活動力強的生長細胞內。該些熟於此藝者已知許多可以用來將反轉錄病毒表現載體轉移到製造細胞株內之轉移感染的技術。此等技術包括磷酸鈣-DNA 沉澱法，DEAE-葡萄糖聚糖轉移感染電泳法，或脂質體傳送的DNA轉移。

製造細胞接著以含有殺腫瘤和易感染基因並且視需要編有可選擇標記密碼之DNA的重組反轉錄病毒載體轉移感染。在含有可選擇標記之重組載體例子中，可於移植前完成選擇被轉移感染的細胞。

5.3 體外培養組合細胞株

爲了增加被植入之製造細胞的長期存活率，在體外先將製造細胞附著在支撐基質上，該支撐基質可以包含的物質包括在體外培養後細胞會附著，而且可以成長於上，並且

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (12)

而於體內移植後，緩慢地由此釋出。

當用於移植作用的細胞附著於根據本發明之支撐基質上時，通常是位於支撐基質的「外表層」上。該支撐基質是固態或多孔的。然而，即使是多孔的輔助物質，細胞直接與外部表層接觸，不需要干擾膜或其它障礙。因此，根據本發明認為細胞係位於輔助物的「外表面」上，甚至其所附著之多孔輔助物質表面可以是內褶或迴轉形態，而細胞也不會附著於顆粒或珠子本身的外部。

輔助物質的構造最好是球形的，如珠子狀，但也可以是圓柱狀、卵圓形、平板頁狀或條狀、針或大頭針狀及其類似者。支撐基質之較佳形態為玻璃珠子。另一種較佳的珠子是聚乙烯珠子。珠子大小範圍為直徑約10微米至1公分，最好是約90至約150微米。關於各種微載體珠子的敘述，請見，例如 Fisher Biotech Source 87-88，Fisher Scientific Co. 1987, pp. 72-75；Sigma細胞培養種類，Sigma Chemical Co. St. Louis, 1991 pp. 162-163；Ventrex產品種類，Ventrex Laboratories, 1989；這些參考資料皆併入本文參考文獻內。珠子大小的上限以珠子不會對宿主產生不必要的刺激而定；例如膠樣變性會干擾被移植細胞的功能或使附近的腦組織受損。熟於此藝者已充份定出了這些限制。

5.4 轉移組合細胞

表現殺腫瘤或易感染基因之製造細胞於體外生長，並附著於支撐基質上。本發明之方法包括將含有令人感興趣之

五、發明說明 (13)

治療基因的製造細胞進行腦內移植植入受腫瘤影響的腦部區域內。將細胞植入腦內的方法敘述於哺乳動物中樞神經系統的神經移植中，1985, Bjorklund和Stenevi，eds和Gage等人，腦部研究，每一篇皆併入本文參考文獻內。將細胞植入腦內的步驟包括：

- 1) 將製造細胞注射入宿主腦內，或
- 2) 以手術方法準備一個腔室以儲存該製造細胞。

製造細胞可以注射入腦部非常靠近腫瘤部位的選擇性區域內。該製造細胞係以針筒抽出，然後注射病人。可以在腫瘤的部位進行多次注射。另外，也可利用外科手術在受腫瘤影響的腦部附近準備一個腔室，以使製造細胞可以儲存於該腔室內。

為達到本發明目的所需之細胞數目，因病患的身高、年齡、體重及腦腫瘤的大小而異。細胞之數目不必要過度實驗，即可由熟於本藝者定出。本文所述之本發明的具體例中，將經由遺傳改良後附著於支撐基質上的製造細胞植入老鼠腦部。組織學研究顯示反轉錄病毒所傳送的基因表現能在移植後30天測得，意味著反轉錄病毒基因會成功地長期表現。

本發明目前已作了一般敘述，除非特別指定，否則參考以下實施例的說明，但不侷限於本發明，更可以清楚地了解本發明。

五、發明說明(14)

6. 實施例：哺乳動物腦中長期由

反轉錄病毒所傳送的基因

以下部份係敘述將附著於輔助基質上的製造細胞植入老鼠腦部。被移植的製造細胞會製造由遺傳控制表現鹼性磷酸酶基因且具傳染性的反轉錄病毒顆粒。結果顯示在被植入動物腦內會成功地長期表現出鹼性磷酸酶的基因。

6.1 材料和方法

6.1.1 動物和細胞之製備

由 Taconic 農場 (Germantown, -NY) 取得重 120-150 克的 Sprague-Dawley (SD) 公鼠。Bing 細胞株是 BOSC23 細胞株的雙性配對物 (W. Pear 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 90, 8392-8396, 1993), 係由 293T (293tsal609neo) 人類胚胎腎臟細胞株 (R.B. DuBridge 等人, Mol. Cell Biol. 7, 379-387, 1987) 分離出來歐在瞬間轉移感染後會製造出能以 10^6 /毫升以上的力價傳染 NIH3T3 細胞反轉錄病毒上清液。為了組合複製-有缺陷的反轉錄病毒載體, 例如 LXSX 為主的反轉錄病毒載體, 因此將雙性的反轉錄病毒構成物傳物該 Bing 細胞株內。然後將細胞株保存於添加了 10% 胎牛血清 (Hyclone) 和抗生素 (青黴素-鏈黴素溶液, Sigma) 的高葡萄糖 DMEM 培養基中。

鹼性磷酸酶載體係以 LNSX 反轉錄病毒載體構成物為主 (A.D. Miller, 人類基因療法, 1,5-14, 1990)。由 SV40 促進質驅使下對 G418 產生抗性以及在載體 LTR 的控制下, 鹼性磷酸酶載體含有編有鹼性磷酸酶密碼的基因。

五、發明說明 (15)

爲了進行轉移感染，將 10^7 個Bing細胞置於p100小圓盤上，利用標準鈣-磷酸轉移感染步驟(J. Sambrook等人，分子複製，第2版)，以10微克鹼性磷酸酶植體(根據製造廠商指示，在Quiagen Maxi-prep管柱上純化)轉移感染。

轉移感染72小時後，收取細胞，依等份加入添加了10%胎牛血清的DMSO (Sigma)，將該細胞置於 -70°C 下長期表存。將部份被轉移感染的細胞轉置於玻璃玻片上，以2%多聚甲醛固定，然後以酸鹼值爲8.5的氮藍四唑(Sigma)染色1小時。在30%鹼性磷酸酶載體轉移感染的Bing細胞中發現鹼性磷酸酶呈陽性染色；而控制組未被感染的Bing細胞則未發現特異性染色。

6.1.2 細胞附著於微載體上

細胞在附著於微載體前，先在不含血清的培養基PC-1 (Hycor)中洗滌3次後，於PC-1中形成懸浮液。將珠子每1克珠子置於10毫升無菌蒸餾水中加熱至 121°C 15分鐘，使得塗被膠原的葡萄聚糖微載體(Cytodex 3, 100-200微米)達到滅菌的效果。待溶液冷卻至室溫後，將水去除。然後將微載體懸浮於小體積的培養基內，使其靜置30分鐘。去除培養基後，將珠子(大約0.21克)添加至先前敘述的細胞製備液中。搖動所生成的混合物2小時，並另外加入4毫升PC-1。然後以周期性混合培養基燒瓶整夜，以使細胞附著至該微載體上。培養後移植前，等份取出與錐虫藍反應，由顯微鏡檢視決定細胞存活率及附著於該微載體上的細胞數目。此步驟導致約每個微載體上附著5至7個存活

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五、發明說明 (16)

率為95%或以上的細胞。

6.1.3 注射細胞

利用戊巴比妥鈉(40毫克/公斤，腹膜內注射)麻醉動物，在無菌下進行手術。使用驅異物性注射將細胞注射入腦內的尾狀/被殼區域內。在4群3種動物中，每一種植入1)僅有未被轉移感染的細胞，2)附著於微載體上未被轉移感染的細胞，3)僅有被轉移感染的細胞，4)附著於微載體上被轉移感染的細胞。將移植物置於(校正後)距前囟1.5毫米前，硬膜表面下5.0毫米及距側面2.0毫米間。領骨板位於-3.3毫米。利用直接位於前囟上方位置，每隻動物經校正後的驅異物性同等物質做為零值相等物。由硬膜表面測得者為背-腹側值。一旦適當地地下針後，以1微升/分鐘的速度注入細胞，直到注射之最終體積達5微升為止。針孔緊密地嵌入通管針，以推進已附著在針上的殘餘珠子通過。利用Clay-Adam 9毫米傷口夾夾合手術部位。

6.1.4. 組織學研究

利用戊巴比妥鈉60毫克/公斤，腹膜內注射麻醉老鼠，並於400毫升酸鹼值為7.2的1%戊二醛/4%多聚甲醛/0.1M磷酸鈉灌流後，再以400毫升經肝磷脂化以防止血液凝固的磷酸緩衝鹽水灌流動物。取出腦部並置於30%溶有蔗糖之磷酸緩衝鹽水中，並製備28微米或50微米的冷凍切片。將切片轉置於數支含有磷酸緩衝鹽水的試管內，置於塗被膠原的玻片上，並在室溫下與5-溴，4-氯，3-吡啶磷酸鹽/吡啶硝基四唑(BCIP/INT)(Biomedica,

五、發明說明 (17)

Foster City, CA) 反應 30 分鐘進行鹼性磷酸酶的染色，產生棕色反應產物。將 10 微米石蠟切片經蘇木紫和伊紅染色以進行常規組織學研究。

6.2. 結果，

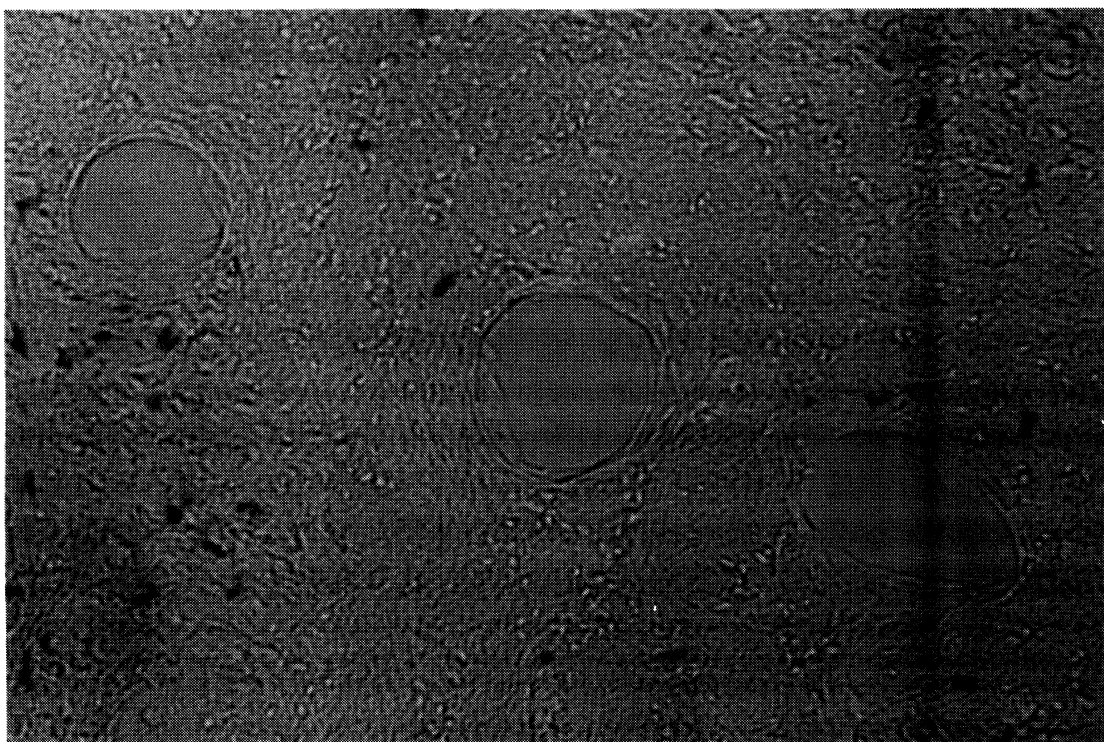
移植 30 天後將動物殺死以進行組織學研究。圖 1-3 說明此等研究所獲得之結果。

以不附著於微載體上未被轉移感染的細胞植入老鼠腦部的切片顯示無 BCIP/INT 陽性物質。取自施以不附著於微載體上被轉移感染的細胞移植入老鼠腦部之移植部位的切片顯示有少許或無 BCIP /INT 陽性物質 (圖 2)。

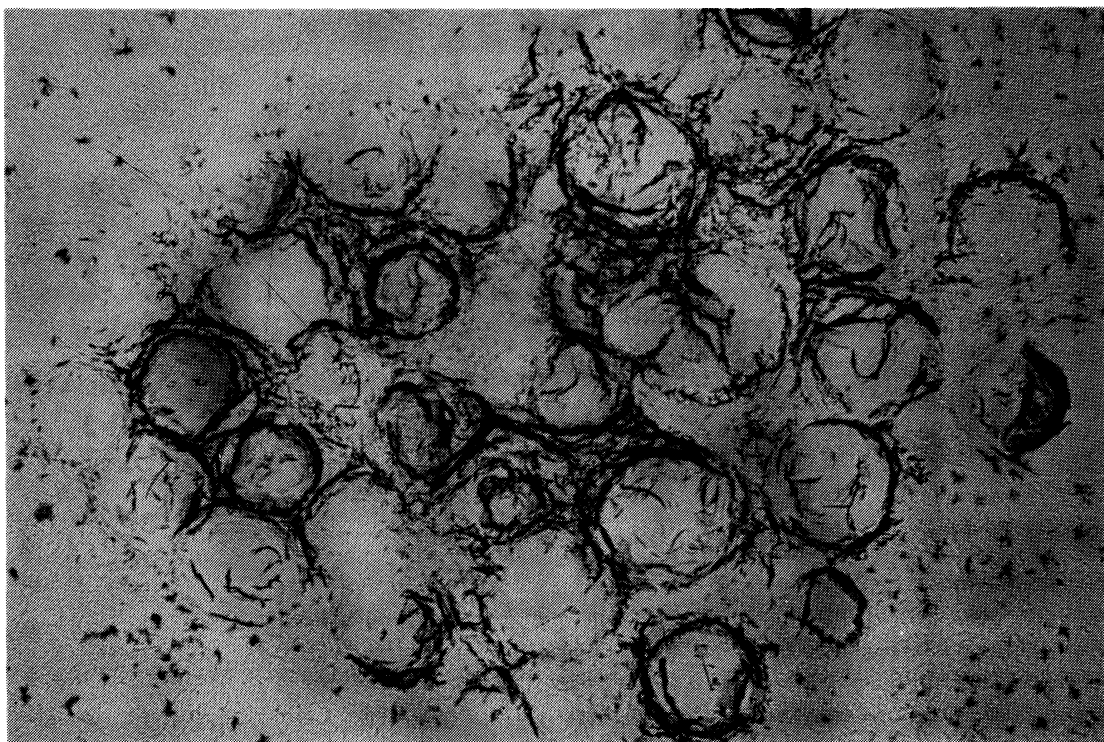
爲了排除微載體本身產生人工構造染色的可能性，也檢驗於微載體上被移植之未被轉移感染的細胞。圖 1 顯示取自移植部位的典型切片。由於色原質 BCIP/INT 不會染上色，因此 Cytodex 微載體不會造成圖 3 所見之染色型態。

當植入附著於 Cytodex 微載體之細胞時，在 30 天後進組織學研究會出現不同型態。圖 3 顯示取自以鹼性磷酸酶基因質體轉移感染的 CaK8p7 細胞植入老鼠腦部 30 天前放大 20 倍後的切片。以 BCIP/INT 染色出現許多細胞在或靠近珠子表面有陽性鹼性磷酸酶反應。此結果與不附著於微載體上被植入細胞之結果呈強烈對比 (圖 2)。

在這些研究中所獲得的結果說明了在移植前先將細胞附著於微載體上會促進被植入細胞的存活率，而且延長基因治療的治療窗期。在應用製造細胞方法時，藉由增加基因傳送至中樞神經系統的速度應該可以使此延長反達到最大療效。







公告本

申請日期	86. 4. 09.
案 號	86104516
類 別	A61k 48/60

A4
C4

(以上各欄由本局填註)

中文說明書替換頁(93年5月)

發 明 專 利 說 明 書 I222870		
一、發明 新 型 名 稱	中 文	將基因轉移至腦部腫瘤細胞以殺死腫瘤細胞之套組
	英 文	" A KIT FOR TRANSFERRING GENE TO TUMOR CELLS IN BRAIN IN ORDER TO KILL THE TUMOR CELLS "
二、發明 創 作 人	姓 名	1.布魯斯 卻斯基 2.路易斯 R. 布卡洛
	國 籍	均美國
三、申請人	住、居所	1.美國紐澤西州郝伯肯市威洛特瑞斯59號 2.美國加州舊金山市迪維山德洛街3418號
	姓 名 (名 稱)	1.美國紐約大學醫學中心 2.美商替坦製藥公司
	國 籍	均美國
	住、居所 (事務所)	1.美國紐約州紐約市第一街550號 2.美國紐澤西州桑孟維爾市區間街50號
	代 表 人 姓 名	1.艾塞克 T. 克伯格 2.李察 C. 阿倫

五、發明說明 (11)

可以移植到哺乳動物腦內而不會產生有毒反應，或者會破壞被移植細胞或其它會干擾其生物或治療活性之發炎反應的該些物質。此等物質可以是人工合成或天然的化學物質或有生物起源的物質。基質物質包括但不侷限於玻璃和其它的矽氧化物、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚偏二氟乙烯、聚胺基甲酸乙酯、聚藻酸鹽、聚砒類、聚乙烯醇、丙烯腈聚合物、聚丙烯醯胺、聚碳酸酯、聚戊烯尼龍、直鏈澱粉、明膠、膠原、天然和改良的多醣，包括葡萄糖聚醣和纖維素(如硝基纖維素)、瓊脂和磁鐵礦。也可以使用可再吸收或不可再吸收的物質。本藝中廣為人知的細胞外基質物質也值得注意。細胞外的基質物質可以由市售商品或由會分泌此等基質之生長細胞獲得，去除該分泌細胞後，會使得被移植細胞與其基質互相反應並附著於上。被移植細胞會附著生長於上，或與該細胞混合的基質物質，可以是被移植之製造細胞本身的天然產物。因此，例如，該基質物質可以是細胞外的基質或由被移質之製造細胞所製造和分泌的基底膜物質。

為了改良細胞分裂、存活和作用，可視需要在固態基質外表面上塗被本藝已知的因子以促進細胞附著、生長或存活。此等因子包括細胞附著分子、細胞外基質，像是例如 fibronectin、昆布胺酸、膠原、彈性蛋白、葡糖胺聚糖或蛋白多醣，或是生長因子，像是例如神經生長因子 (NGF)。另外，若被移植細胞附著之固態基質是由多孔物質所組成，促進生長或生存的因子可以與基質物質混合，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

四、中文發明摘要(發明之名稱:將基因轉移至腦部腫瘤細胞以殺死腫瘤細胞之套組)

本發明係關於一種製造細胞植入哺乳動物腦部之方法。該製造細胞受反轉錄病毒為主的重組載體操控，該載體編碼殺腫瘤細胞或易感染之因子的密碼，使得腫瘤細胞對化學療劑或放射療劑敏感。植入哺乳動物腦部之前，先將製造細胞於輔功基質上體外培養，以增加被移植細胞之長期存活率，並提供長期機能之益處。

英文發明摘要(發明之名稱:"A KIT FOR TRANSFERRING GENE TO TUMOR CELLS IN BRAIN IN ORDER TO KILL THE TUMOR CELLS")

The present invention relates to a method for implanting producer cells into the mammalian brain. The producer cells are engineered with a retroviral based recombinant vector encoding a tumorcidal factor or susceptibility factor that confers on tumor cells sensitivity to chemotherapeutic or radiotherapeutic agents. Prior to transplantation into the mammalian brain, the producer cells are first cultured in vitro on a support matrix to increase the long-term viability of the transplanted cells and to provide long-term functional benefit.

六、申請專利範圍

1. 一種用於傳送殺腫瘤或易感染的基因進入哺乳動物腦部腫瘤細胞內以殺死該腫瘤細胞之套組，其包含：
 - a) 支撐基質其中該支撐基質可促進細胞附著、細胞存活及移植至哺乳動物腦部，且該支撐基質是由選自矽氧化物、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、聚碳酸酯、聚戊烯、丙烯腈聚合物、尼龍、天然的多醣、改良後的多醣、明膠、直鏈澱粉膠原、天然纖維素、改良後的纖維素、瓊脂、磁鐵礦、透明質酸和細胞外的基質所組成之群之材料所製成；及
 - b) 製造細胞，其包含具有殺腫瘤或易感染基因之反轉錄病毒表現載體，且其然後被允許於體外附著在該支撐基質之表面，其中該製造細胞含病毒原，該病毒原會表現反式包裝病毒轉錄物成為成熟病毒顆粒所需之全部反轉錄病毒功能，且其缺乏用於包覆病毒原 RNA 轉錄物成為成熟病毒顆粒所需之包裝訊號序列。
2. 根據申請專利範圍第 1 項之套組，其係將附著有製造細胞之支撐基質植入腫瘤細胞附近而使用，其中於植入 30 天後，該殺腫瘤或易感染基因仍會表現。
3. 根據申請專利範圍第 1 項之套組，其中腫瘤細胞是腦腫瘤細胞。
4. 根據申請專利範圍第 1 項之套組，其中殺腫瘤或易感染基因編碼簡單疱疹病毒胸腺核苷激酶。
5. 根據申請專利範圍第 1 項之套組，其中殺腫瘤或易感染

六、申請專利範圍

基因編碼胞嘧啶脫氨激酶基因。

6. 根據申請專利範圍第1項之套組，其中該支撐基質是多孔或無孔的微珠。
7. 根據申請專利範圍第6項之套組，其中該微珠的直徑是約90微米至約150微米。
8. 根據申請專利範圍第1項之套組，其中該製造細胞是由缺乏用於包覆病毒原RNA轉錄物成為成熟病毒顆粒所需之包裝訊號序列的反轉錄病毒載體穩定引入哺乳動物宿主細胞內所生成的細胞株。
9. 根據申請專利範圍第1項之套組，其中該製造細胞係附著在該支撐基質之表面。
10. 根據申請專利範圍第1項之套組，其中反轉錄病毒載體包含完整的包裝訊號(packaging signals)。
11. 根據申請專利範圍第1項之套組，其中反轉錄病毒載體包含可選擇的標記基因。
12. 根據申請專利範圍第1項之套組，其中製造細胞是BOSC23。
13. 根據申請專利範圍第1項之套組，其中製造細胞是Psi2。
14. 根據申請專利範圍第1項之套組，其中製造細胞是PsiAm。