

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 7/02

C12N 15/867 A61K 38/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01809108.3

[43] 公开日 2004年7月28日

[11] 公开号 CN 1516733A

[22] 申请日 2001.3.22 [21] 申请号 01809108.3

[30] 优先权

[32] 2000.4.18 [33] GB [31] 0009619.8

[32] 2001.2.14 [33] GB [31] 0103731.6

[86] 国际申请 PCT/GB2001/001261 2001.3.22

[87] 国际公布 WO2001/079456 英 2001.10.25

[85] 进入国家阶段日期 2002.11.6

[71] 申请人 癌症研究技术有限公司

地址 英国伦敦

[72] 发明人 D·达灵 F·法赞尼

C·P·休吉斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 程泳

权利要求书3页 说明书41页 附图9页

[54] 发明名称 关于提高病毒滴度的材料与方法

[57] 摘要

本发明提供提高样品中病毒滴度的方法。该方法使用特异结合成员(如凝集素和抗体)结合病毒颗粒,使它们能够浓缩。本发明还提供从样品(例如血液)中分离病毒颗粒的方法。也提供利用抗体或顺磁颗粒将病毒颗粒导向特定组织的材料与方法。

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

1. 一种提高含病毒颗粒样品的病毒滴度的方法，该方法包括使样品接触能与病毒颗粒结合形成复合物的结合成员；并浓缩该复合物。
2. 根据权利要求1的方法，其中通过离心浓缩所述复合物。
3. 根据权利要求1或权利要求2的方法，其进一步包括测定病毒滴度的步骤。
4. 根据前述任一权利要求的方法，其中所述病毒颗粒是逆转录病毒颗粒。
5. 根据前述任一权利要求的方法，其中所述结合成员是一种颗粒性稠密底物。
6. 根据权利要求3的方法，其中这种颗粒性稠密底物是 pansorbin。
7. 根据权利要求1-4任一项的方法，其中该方法还包括加入能捕获该复合物的捕获剂。
8. 根据权利要求7的方法，其中所述捕获剂是顺磁颗粒。
9. 根据权利要求7或权利要求8的方法，其中结合成员是一种针对可与病毒颗粒结合的蛋白质的抗体，该抗体可与第一种偶联配偶体结合，该配偶体能偶联可与捕获剂结合的第二种偶联配偶体。
10. 根据权利要求7或权利要求8的方法，其中结合成员是能与病毒颗粒表面上的糖基化蛋白质结合的凝集素，该凝集素可与第一种偶联配偶体结合，该配偶体能偶联可与捕获剂结合的第二种偶联配偶体。
11. 根据权利要求10的方法，其中凝集素是同工凝集素 B₄ 或琥珀酰-伴刀豆球蛋白 A。
12. 根据权利要求9-11任一项的方法，其中偶联配偶体选自生物素/生物胞素-亲和素/链霉亲和素、受体-配体和抗体-抗原。
13. 一种修饰病毒颗粒，以便于从含有这种修饰病毒颗粒的样品中捕获，以提高其滴度的方法，该方法包括在病毒包装细胞表面上添加偶联配偶体的步骤，使包装细胞产生的病毒颗粒在其表面上展示这

种偶联配偶体。

14. 根据权利要求 13 的方法，其中所述偶联配偶体是与包装细胞表面上的蛋白质共价偶联的生物素。

15. 根据权利要求 14 的方法，其中利用琥珀酰亚胺酯将所述生物素与蛋白质共价偶联。

16. 根据权利要求 13-15 任一项的方法，其进一步包括下列步骤：使用捕获剂浓缩修饰的病毒颗粒，该捕获剂包含能与添加到病毒颗粒表面上的偶联配偶体偶联形成复合物的第二种偶联配偶体；和浓缩该复合物。

17. 根据权利要求 1-12 和权利要求 16 任一项的方法，其中分离该复合物，用于制备医学治疗用药物。

18. 一种复合物，其含有病毒颗粒和通过第一种和第二种偶联配偶体偶联在一起的顺磁颗粒，用于体内导向。

19. 根据权利要求 18 的复合物在制备用于体内导向的药物中的应用。

20. 一种将根据权利要求 18 的复合物导向人体或动物体内组织的方法，该方法包括对人体或动物体施用该复合物，和利用磁场将复合物吸引到组织的步骤。

21. 根据权利要求 20 的方法，其中所述病毒是一种逆转录病毒。

22. 根据权利要求 20 或权利要求 21 的方法，其中所述病毒含有用于在靶向组织中表达的外源核酸序列。

23. 一种利用根据权利要求 13-15 任一项的方法生产的修饰病毒颗粒，用于导向组织，该修饰病毒颗粒还包含对该组织特异的抗体或抗体结合域，该抗体或抗体结合域通过病毒颗粒表面的偶联配偶体与颗粒偶联。

24. 根据权利要求 23 的修饰的病毒颗粒，它是一种逆转录病毒颗粒。

25. 一种从样品中分离病毒的方法，该方法包括：

使样品接触一种能特异结合该病毒的结合成员，使该病毒和结合

成员形成复合物;

使该复合物接触一种能捕获该复合物的捕获剂; 和
从样品中分离该复合物和捕获剂。

26. 根据权利要求 25 的方法, 其中该结合成员与第一种偶联配偶体结合, 该配偶体能偶联与捕获剂结合的第二种偶联配偶体。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其中偶联配偶体是生物素和链霉亲和素。

28. 根据权利要求 26 或权利要求 27 的方法, 其中结合成员是一种抗体, 捕获剂是一种顺磁颗粒。

29. 根据权利要求 28 的方法, 其中利用磁场从样品中分离复合物和捕获剂。

30. 根据权利要求 26 或权利要求 27 的方法, 其中捕获剂位于一种固体载体上, 样品在该载体上通过, 使复合物和捕获剂在该固体载体上分离。

31. 根据权利要求 25-27 任一项的方法, 其中结合成员是一种凝集素。

32. 根据权利要求 25-31 任一项的方法, 其中样品是血液、尿、血清或精液。

33. 根据权利要求 25-32 任一项的方法, 其中病毒是 HIV。

34. 一种用于实施根据权利要求 1-12 任一项方法的试剂盒, 包含:

- (i) 能与病毒结合形成复合物的结合成员; 和任选地
- (ii) 能通过偶联配偶体捕获该复合物的捕获剂。

关于提高病毒滴度的材料与方法

发明领域

本发明涉及与提高病毒滴度有关的材料与方法。特别是，但不是唯一地，本发明涉及从包装细胞上清液中纯化和浓缩逆转录病毒的新方法。本发明也涉及这些方法在导向特定组织、疾病治疗领域和筛查与诊断中的应用。

发明背景

逆转录病毒介导的基因治疗需要可释放大量传染性逆转录病毒颗粒的逆转录病毒包装细胞，和/或提高逆转录病毒/靶细胞相互作用效率的方法（优选地同时采用这两种方法）。优化逆转录病毒载体有效滴度的努力集中于以下三种策略。

1) 设计新的载体构建体，它们将用于逆转录病毒载体 RNA 的更有效的表达和包装^{1, 2}。通过离心⁶或人补体^{5, 6}，它们与能产生更多逆转录病毒颗粒的新一代包装细胞系偶联³⁻⁵，也可能具有更广的靶细胞趋向性（trophism）^{3, 5, 6}，并且对灭活有更强的抗性。

2) 改进最佳逆转录病毒载体颗粒生产的培养条件和逆转录病毒/靶细胞相互作用的效率。提高逆转录病毒产量的方法包括：可相互感染的包装细胞的“乒乓”机制⁷、超感染⁸、靶细胞⁹或包装细胞在 32℃ 时的培养¹⁰，有时加入组蛋白脱乙酰酶抑制剂丁酸钠¹¹。分泌到上清液中后，通过与聚阳离子（如 polybrene 和鱼精蛋白硫酸酯）温育^{12, 13}，逆转录病毒颗粒与脂质体或脂质体脂类复合¹⁴，培养上清液的流通¹⁵和低速离心逆转录病毒颗粒与其靶细胞^{9, 10}，能提高逆转录病毒颗粒感染靶细胞的可能性。通过在排除磷酸盐的培养基中培养¹⁰，或加入纤连蛋白及其截短衍生物¹⁶，也能使靶细胞更易感染。

3) 上述多种方法能与浓缩或纯化的逆转录病毒结合。曾经报道，

使逆转录病毒上清液通过分子量截止滤器^{9, 17-20}, 冻干, 与磷酸钙共沉淀²¹, 能减少上清液体积而保持逆转录病毒的传染性。然而, 也能通过浓缩可抑制感染²²或对靶细胞有毒性²¹的其它成分, 实现这种减少。这种发展是由于离心作为完整传染性逆转录病毒的一种纯化方法的限制。“经典方法”的不同形式包括以 18000g 超离心可达 16 小时²³, 似乎效果极好。然而, 能够纯化的上清液体积相对较少, 传染性逆转录病毒的回收率较低, 使用低滴度逆转录病毒时该方法效果最好²³。文献中提到的其它变型使用速度降低的离心²⁴⁻²⁶ (可低至 3000g), 而保持时间长度, 或者提高 g 值并减少时间¹⁹。然而离心有许多优点, 它易于进行, 在不与感染抑制剂共纯化的情况下能减少上清液体积。离心浓缩有许多潜在的优点, 因此已经设计了用于生产假型逆转录病毒载体的包装细胞, 主要考虑对离心应力灭活的抗性^{4, 6}。这种 VSV-G (水泡性口炎病毒 G) 假型载体能 50000g 离心 90 分钟^{6, 27}, 使体积减少可达 2000 倍, 而传染性病毒的回收率高于 70%⁶。

如果没有用于 VSV-G 假型之外的载体的最佳逆转录病毒浓缩方案, 人们不能简单地通过使用较多的上清液来提高用于靶细胞的逆转录病毒颗粒的数量。这是由于 37℃ 下 5-7 小时的逆转录病毒载体半衰期与在此期间它接触靶细胞的可能性之间的平衡。仅仅通过布朗运动移动的逆转录病毒颗粒在一个半衰期内不可能移动 600μm 以上²⁸。因此, 在 1ml 的静置培养物中, 多达 90% 的逆转录病毒可能不能用于感染。由于靶细胞利用性有限, 人们不能使用足够数量的细胞与所有可用的逆转录病毒有效地相互作用。

发明概述

本发明者认为, 需要有提高病毒滴度, 从而增加可用于感染的病毒数量的方法。因此, 在上述逆转录病毒的实例中, 为了充分利用不可能接触细胞的 90% 的逆转录病毒, 发明者设计了使用能与逆转录病毒结合形成复合物的结合成员的方法。然后能从包装细胞上清液中有效收集该复合物。发明者意外地发现, 短时低速离心能实现这种收集,

使得在体积只减少 200 倍后，滴度至少提高 1000-2000 倍。

因此，本发明提供一种提高含病毒颗粒样品的病毒滴度的方法，该方法包括使样品接触能与病毒颗粒结合形成复合物的结合成员；浓缩该复合物，例如通过离心样品；必要时测定病毒滴度。

病毒滴度的提高不会引起样品中病毒数量的增加。实际上，不必知道样品中病毒的准确数量，对于本发明，病毒滴度的提高肯定是病毒感染靶细胞的数量和可能性的函数。因此，浓缩后病毒滴度的提高可根据靶细胞的传染性确定。

为方便起见，下文参照逆转录病毒说明了本发明及其各方面。然而，本领域技术人员应当明白，本发明适用于所有病毒，包括逆转录病毒假型包装细胞系，例如具有 vsvg 假型包膜的 MoMulv 载体。例如，发明者特别关注逆转录病毒科，它在复制病毒中包含 ssRNA、阳性有义、非节段基因组、包膜和 DNA 步骤。逆转录病毒科的亚科包括肿瘤病毒亚科（即莫洛尼鼠白血病毒）、慢病毒亚科（即 HIV 和其它慢病毒载体）和泡沫病毒亚科。

然而，本发明也适用于其它病毒科，如疱疹病毒科（dsDNA 和包膜病毒），例子包括单纯疱疹病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒。

其它科包括：腺病毒科（ds 和非包膜病毒），例子包括腺病毒和腺病毒载体，如基于 Ad.5 的；乳头多瘤空泡病毒科（ds 和非包膜病毒），例如猿空泡病毒 40 和多瘤病毒；小 RNA 病毒科（ssRNA+有义，非包膜，非节段病毒），例如肠道病毒、脊髓灰质炎病毒；弹状病毒科（ssRNA，-ve 有义，非节段，包膜病毒），例如水泡性口炎病毒；痘病毒科（dsDNA，非包膜病毒），例如痘病毒（天花）和牛痘。本发明适用的其它科包括：沙粒病毒科、双 RNA 病毒科、布尼亚病毒科、杯状病毒科、冠状病毒科、丝状病毒科、黄病毒科、嗜肝 DNA 病毒科、虹色病毒科、正粘病毒科、副粘病毒科、细小病毒科、呼肠病毒科、披膜病毒科。此清单并非全部。如上所述，为方便起见，下文涉及逆转录病毒，包括慢病毒。

按照上述方法，希望将逆转录病毒与结合成员分离。然而，本发明者已经确定了大量结合成员，它们可用于上述方法，不需与逆转录病毒分离，逆转录病毒即可保持有效的传染性。以下作为本发明的一个方面描述。

例如，在本发明的第一方面，发明者设计了一种使用便宜、易于获得、颗粒性、稠密底物的方法。当包装细胞上清液中的逆转录病毒与过量底物混合时，形成逆转录病毒/底物复合物，其足够稠密，在病毒半衰期内在静置培养中因重力而沉淀。必要时这种复合物也能进行短时低速离心，以进行逆转录病毒浓缩。使用这种颗粒性稠密底物，发明者发现病毒意外地保持传染性，促进其释放不需要特殊处理，这种无毒底物能在培养物中长时间保留，足以引起最佳逆转录病毒/靶细胞的相互作用^{14, 29}。

因此，本发明提供一种提高样品中逆转录病毒滴度的方法，包括向样品中加入一种能与逆转录病毒形成复合物的稠密、颗粒性底物；离心样品以浓缩该复合物；根据靶细胞的传染性，确定逆转录病毒的浓度。

优选地，这种稠密、颗粒性底物是 Pansorbin，一种加热杀死的福尔马林固定的金黄色葡萄球菌，尽管也可使用其它底物，如 Sansorbin。情况可能是，其它细菌具有与 Pansorbin 和 Sansorbin 相同的能力。这可能是基于细菌表面存在的纤连蛋白结合蛋白（fnb），fnb 型蛋白质可以在不同细菌中表达。因此，根据此处所述，技术人员能确定其它合适的稠密、颗粒性底物。

如下文“发明详述”部分所述，发明者证实，从鼠成纤维细胞衍生的 PG13 包装细胞（Gibbon Apc 白血病毒[Galv]包膜蛋白假型）释放的逆转录病毒颗粒能有效浓缩为传染性逆转录病毒。PG13 衍生的逆转录病毒颗粒自发地与加热杀死的福尔马林固定的金黄色葡萄球菌（Pansorbin）复合。这种复合物能够离心浓缩，结合的逆转录病毒颗粒保留感染靶细胞的能力，而不需要促进其释放的预先措施。

Kayman S.C.等人（J. Virology. 99 年 3 月，第 1802-1808 页）描

述了使用 Pansorbin 排除（或负富集）野生型病毒的上清液，尽管他们没有涉及提高逆转录病毒滴度。然而，与本发明不同，该作者使用针对以前插入病毒（SC258）env 基因中的表位的抗体，将其与病毒和 Pansorbin 混合，这是根据抗体的 Fc 将与 Pansorbin 上的蛋白 A 结合。作者认为，正富集需要从结合态回收传染性病毒，而且用来破坏抗体-抗原复合物的标准条件对逆转录病毒是致死的。与之相反，本发明者惊奇地确定，对于逆转录病毒保持传染性，逆转录病毒和 Pansorbin 的复合物不需要破坏。因此，Pansorbin 或其它类似的颗粒性、稠密底物，例如 Sansorbin，可用于帮助提高病毒滴度，而浓度乃至传染性不丢失，因为能够避免与逆转录病毒形成的复合物的破坏。

本发明者认为，在 Pansorbin 中使用的、最近克隆的存在于金黄色葡萄球菌 Cowan I 株表面的纤连蛋白结合蛋白（fnbA³² 和 fnbB³³）能解释观察到的这种结合，以及感染能力的保持。这些蛋白质可与 PG13 包装细胞基于的 NIH 3T3 细胞分泌的鼠纤连蛋白相互作用。上清液中的纤连蛋白然后可与 PG13 产生的逆转录病毒颗粒结合。因此，逆转录病毒似乎不直接与 Pansorbin 相互作用，而是通过纤连蛋白中间物结合。已知这种纤连蛋白相互作用加强而不是抑制逆转录病毒传染性，并且可以解释当与 Pansorbin 复合时逆转录病毒为何保持传染性。

尽管该方法对于 PG13、PA317 和 GP+envAM12 产生的逆转录病毒十分有效，但是使用其它逆转录病毒（如基于 NIH 3T3 的 GP+E-86 和基于人 HT1080 的 FLYRD18 和 A13 包装细胞）的结果并不令人满意。

因此，本发明者设计了另一种方法作为本发明的第二方面，前提是能利用抗纤连蛋白抗体从上清液中捕获逆转录病毒。因此，根据本发明的第二方面，结合成员是一种针对可与病毒结合的蛋白质的抗体或抗体结合域。该抗体可以针对实际存在于病毒表面上的蛋白质，或者可以针对可与病毒结合的蛋白质，即具有逆转录病毒自然结合亲和力的蛋白质。

当抗体结合成员不是稠密底物时，能通过静置培养利用重力或通过短时低速离心浓缩形成的复合物。因此，本发明的第二方面也提供捕获剂捕获复合物使其浓缩的用途。这类捕获剂的例子包括可利用磁体浓缩的顺磁颗粒(PMP)(Promega; 其它供应商包括: Dynal, Miltenyi Biotec)。也能使用非磁珠，只要它们较小，例如为 1 μ m 数量级，并且对低速离心敏感。在此处所述实施例中，所述抗体针对鼠纤连蛋白，发明者使用与多克隆兔抗小鼠纤连蛋白抗体偶联的链霉亲和素包被的顺磁颗粒，根据与鼠纤连蛋白的结合，磁性纯化 PG13 产生的颗粒。发明者表示，抗体可通过其 Fc 域结合蛋白 A。蛋白 A 可通过生物素结合 PMP 形成复合物。此外也可使用生物素化的多克隆抗体。

因此，本发明的第二方面需要使用可与捕获剂结合的第一种偶联配偶体，例如链霉亲和素；和可与抗体结合域结合的第二种偶联配偶体，例如生物素。技术人员能够设计可与本发明联合使用的其它偶联配偶体。

然而，根据本发明第二方面的方法只适用于分泌纤连蛋白并产生具有纤连蛋白结合活性的病毒(如逆转录病毒)的鼠包装细胞。因此，为了提供更加通用的策略，发明者改进了这一方法，使用基于凝集素的亲和捕获方法，这将亲和捕获策略的适用范围扩展到其它病毒包装细胞，例如逆转录病毒包装细胞，如人 HT1080 衍生的包装细胞。这基于以下发现：逆转录病毒包膜蛋白被包装细胞特异地糖基化，这些细胞释放的逆转录病毒的表面修饰反映了这一事实。

因此，根据本发明的第三方面，结合成员是一种能结合病毒(例如逆转录病毒)表面上糖基化蛋白质的凝集素。发明者第一次认识到，该方法可应用逆转录病毒的表面蛋白质(例如包膜蛋白)的翻译后糖基化修饰，而不需要为了保持传染性从结合成员释放。在下文关于本发明该方面的实施例中，使用的凝集素是从 *Bandeiraea Simplicifolia* 分离的同工凝集素 B₄(BS-IB₄)(结合人类中不存在的 α -半乳糖基)或主要结合 α -甘露糖修饰的琥珀酰-伴刀豆球蛋白 A。也可以使用技术人员所知的可与糖基化位点结合的其它凝集素，例如 PHA。

对于本发明的第二方面，可能需要捕获剂捕获凝集素/逆转录病毒复合物，以便在静置培养中通过重力或通过短时低速离心浓缩。捕获剂优选地是顺磁颗粒。

关于本发明的第二和第三方面，捕获剂需要一种能捕获复合物(例如偶联配偶体，如抗体/逆转录病毒或凝集素/逆转录病毒)的机制。该机制可由偶联配偶体引起，如生物素/生物胞素-亲和素/链霉亲和素、受体-配体、抗体-抗原等。于是可以设计复合物，使它进一步含有偶联配偶体的一个成员，例如生物素，并且可以设计捕获剂，使其含有偶联配偶体的另一个成员，例如链霉亲和素。这样，当复合物与捕获剂接触时，偶联配偶体结合(生物素结合链霉亲和素)，从而连接复合物与捕获剂。

还存在其它实例。例如，本发明者使用可与抗体 Fc 区结合的蛋白 A。因此可以使用一种可结合逆转录病毒的抗体，它对逆转录病毒表面存在的蛋白质是特异性的。蛋白 A 可以生物素化，使其被捕获剂(例如链霉亲和素包被的 PMP)捕获，并与抗体/逆转录病毒接触。抗体的 Fc 区和蛋白 A 用作偶联配偶体，并用于使抗体/逆转录病毒复合物与捕获剂(PMP)接触。技术人员应当理解，蛋白 G 和蛋白 L 同样可以代替蛋白 A 使用。

利用偶联配偶体，例如配体，优选地将其与捕获剂(如 PMP)结合，之后导入病毒上清液中。这样能优化捕获剂/偶联配偶体与上清液中的逆转录病毒复合物之比。

最后，发明者研究了第四种策略，它适用于所有病毒，优选地是当前可以获得的(和尚未发展的)逆转录病毒包装细胞型。除了包装细胞特异的逆转录病毒翻译后修饰外，发明者还研究了包括向逆转录病毒表面引入修饰的对蛋白质更有效(proactive)的方法。该方法使用琥珀酰酯(例如，生物素琥珀酰酯)的蛋白质特异的共价偶联活性。生物素修饰包装细胞的表面蛋白产生可被例如链霉亲和素 PMP 有效捕获的传染性逆转录病毒。

发明者惊奇地发现，偶联配偶体可用来向逆转录病毒表面表添加

结合成员。这优选地利用琥珀酰酯衍生物实现，它能将生物素与包装细胞表面的蛋白质共价偶联。这些生物素化细胞产生的逆转录病毒例如与捕获剂上的链霉亲和素亲和偶联。

因此，本发明的第五方面提供了一种修饰病毒颗粒，以便于从含有这种修饰病毒颗粒的样品中捕获，以提高其滴度的方法，该方法包括在病毒包装细胞表面添加偶联配偶体的步骤，使包装细胞产生的病毒颗粒在其表面上展示这种偶联配偶体。

根据本发明的方法不仅可使病毒从包装细胞上清液中浓缩为升高的滴度，而且具有使用此处所述结合配偶体带来的其它优点。

例如，发明者发现，逆转录病毒不需要从结合表面分离才具有传染性。进而，发明者还发现，捕获剂/结合成员/病毒复合物能够冷冻。尽管融化过程将丢失可达50%的逆转录病毒活性，但这大大优于已知的其它方法。另外，由于根据本发明的方法逆转录病毒的初始浓度较高但体积较小，与未浓缩的病毒相比，只使用极少量的冷冻溶液，例如DMSO。这在治疗因DMSO毒性的患者中极有价值。

发明者进一步认为，根据本发明形成的复合物可用于疾病的治疗。例如，PMP/逆转录病毒复合物可用于体内导向。使用适当的PMP将允许利用NMR聚焦所需的磁场将其分离到特定区域。

因此，本发明也提供根据上述方法形成的复合物在制备用于向组织体内导向病毒（例如逆转录病毒）的药物中的用途。此处，本发明提供一种向人体或动物（哺乳动物）体内组织导向逆转录病毒复合物的方法，该复合物含有逆转录病毒和磁性颗粒，该方法包括对人体或动物体施用该复合物，并利用磁场将复合物吸引到组织。

也提供另一种导向组织的方法，它使用对结合成员或捕获剂的任何空余的结合能力。例如，如果根据本发明的第四方面修饰逆转录病毒表面使其携带生物素，它可被链霉亲和素PMP捕获。然而，发明者发现，不是所有的链霉亲和素都结合。因此，生物素化的抗特定组织抗原的抗体也可以通过链霉亲和素-生物素偶联配偶体与PMP结合。这样，抗体将与特定组织抗原结合，从而使结合的逆转录病毒与该组

织接触。此外，蛋白 A 也可用来结合抗体的 Fc 域。组织抗原可以是对选择用于导向的组织类型特异的任何已知抗原。在一个实施方案中，组织抗原可以是一种肿瘤抗原，它可使逆转录病毒与特定肿瘤接触。逆转录病毒可进一步修饰，以携带外源核酸用于基因治疗。该方法具有逆转录病毒不需要根据导向的组织类型修饰的优点。

发明者也认为，根据本发明的方法可用于病毒的标记或鉴定。例如，上述捕获剂和/或偶联配偶体可用来从生物样品（如血液、血清、尿、精液等）中鉴定或分离病毒。可以从血样中有效提取 HIV 病毒。这可提供敏感性提高（提高约 100 倍）的 HIV 检测。此外，该方法也可与用来处理生物样品的其它技术结合使用。例如，在透析过程中可以利用捕获剂和/或偶联配偶体从血清中去除病毒。

因此，另一方面，本发明提供一种从样品（例如血液）中分离或去除病毒的方法，该方法包括下列步骤：

- (a) 使样品接触能特异结合该病毒的结合成员，使该病毒和结合成员形成复合物；
- (b) 使该复合物接触一种能捕获该复合物的捕获剂；和
- (c) 从样品中分离或去除该复合物和捕获剂。

如上所述，捕获剂可以通过偶联配偶体（如生物素和链霉亲和素）捕获复合物。如果捕获剂是 PMP，可以利用磁场将它与它捕获的复合物一起去除。捕获剂也可以是偶联配偶体（如链霉亲和素）包被的固体载体，样品在其上流过。如果结合成员是可与偶联配偶体（如生物素）结合的抗体或凝集素，它将与固体载体偶联，从而从样品（如血液、尿或血清）中去除或分离复合物。

此处描述了适用于鼠源和人源包装细胞上清液的本发明每一方面的详细方法。

本发明的另一方面是，提供了一种试剂盒，或一种试剂盒在实施根据上述方法提高包装细胞上清液逆转录病毒滴度的方法中的用途；该试剂盒含有一种能与病毒结合的结合成员，和任选地如上所述的一种捕获剂和/或偶联配偶体。该试剂盒也可含有实施本发明的方法的说

说明书。根据本发明的试剂盒的组件的实例有顺磁珠、磁体、蛋白 A-生物素复合物、抗鼠纤连蛋白抗体、抗人纤连蛋白抗体、伴刀豆球蛋白 A-生物素复合物、BSI-B₄-生物素复合物、生物素琥珀酰亚胺酯和洗涤缓冲液。

现在将通过实施例，参照附图说明本发明的各方面和实施方案。本领域技术人员将明白其它方面和实施方案。本文提到的所有文件均在此引用作为参考。

附图简述

图 1. 逆转录病毒上清液与浓度逐渐升高的 Pansorbin 预温育提高了有效滴度。在与福尔马林固定的金黄色葡萄球菌温育后测定 PG13 产生的逆转录病毒 (IL-2/B7) 上清液的 cfu/ml。5ml 等份的逆转录病毒上清液立即滴定 (T=0, 对照) 或在不含 Pansorbin (T=0, 对照) 或含指定体积的 Pansorbin 时 4℃ 温育 2 小时, 之后用连续稀释的混合物感染 K562 细胞。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 2. Pansorbin/逆转录病毒预温育的持续使有效滴度成比例升高。5ml 等份 PG13 产生的逆转录病毒 (IL-2/B7) 上清液在不含 Pansorbin 下或与 25μl Pansorbin 温育, 在指定时间用连续稀释的混合物感染 K562 细胞。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 3. PG13 产生的逆转录病毒载体 (IL-2/B7) 上清液/Pansorbin 复合物的离心浓缩。收集逆转录病毒上清液, 采样, 连续稀释, 立即感染 K562 细胞 (T=0)。然后将上清液分为 50ml 等份, 在 4℃ 下不加其它 (T=3)、只与 250μl Pansorbin (P) 或 250μl Sansorbin (S) 温育 3 小时。然后用连续稀释的 T=3、P 和 S 样品感染 K562 细胞。另外, 对 5ml 等份的 T=3 和 P 样品进行 0.45μm 过滤, 用于感染 (第二次过滤和 P 过滤)。然后离心浓缩所有样品, 并从 T=3 和 P 中吸出上清液进行滴定 (Cont Dep 和 Pdep)。T=3 的剩余上清液充分混合 (如同悬浮沉淀), 用于滴定 (Cont conc)。剩余的 Pansorbin 和 Sansorbin 样品沉淀重悬浮于 10ml 新鲜培养基中, 再次离心, 重悬浮于最小体积

的培养基中(比初始体积减少 180 倍),进行感染(P conc 和 S conc)。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 4. Pansorbin 介导的逆转录病毒滴度的提高不只是对 K562 有效。收集 PG13 IL-2/B7 产生的逆转录病毒上清液,分为 50ml 等份,在 4℃ 下不加其它(T=3)、与 250 μ l Pansorbin(P)温育。3 小时后,用所有条件的样品感染 NB4、U937 和 HeLa 细胞(T=3)。如上所述离心浓缩所有 Pansorbin/逆转录病毒样品的剩余体积,再次用来感染 NB4、U937 和 HeLa 细胞(P conc)。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 5. Pansorbin 与逆转录病毒复合不依赖于载体插入片段。收集 PG13 RaRT 产生的逆转录病毒上清液,立即用来感染 K562、NB4、U937 和 HeLa 细胞(T=0)。剩余的 50ml 上清液在 Pansorbin 存在下 4℃ 温育 3 小时(P)。温育后,离心浓缩样品,用于感染(P conc)。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 6. Pansorbin 介导的浓缩效率随包装细胞型不同而不同。收集 GP+envAM12IL-2/B7、PA317IL-2/B7、FLYRD18pBabe.puro、FLYA13pBabe.puro 和 GP+E-86pBabe.puro 产生的逆转录病毒上清液,立即对人 K562 或鼠 32Dp210 骨髓细胞滴定(对照)。剩余的样品分为 50ml(FLYRD18、FLYA13 和 GP+E-86)或 10ml(GP+envAM12 和 PA317)等份,并在 4℃ 下与 250 μ l 或 50 μ l Pansorbin 温育。3 小时后,如上所述离心浓缩样品,再次感染靶细胞(Pansorbin 浓缩物)。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 7. 纤连蛋白结合的 PG13 产生的逆转录病毒的顺磁颗粒介导的浓缩。在与顺磁颗粒(PMP)温育之前和之后测定 PG13 产生的逆转录病毒(pBabe.puro)上清液的 cfu/ml。5ml 等份的逆转录病毒上清液立即滴定(对照),或在 4℃ 下与 2.5×10^9 链霉亲和素磁球(预先单独与蛋白 A-生物素偶联,或与蛋白 A-生物素和多克隆 Ig 兔抗小鼠纤连蛋白偶联)温育 2 小时。在如上所述磁性浓缩并洗涤后,用连续稀释的混合物感染 K562 细胞。每个值代表一式三份集落计数的平均值

和标准差。

图 8. 凝集素/PMP 介导的 PG13 产生的逆转录病毒颗粒的捕获和浓缩。在与顺磁颗粒 (PMP) 温育之前和之后测定 PG13 产生的逆转录病毒 (pBabe.puro) 上清液的 cfu/ml。5ml 等份的逆转录病毒上清液立即滴定 (对照), 或在 4℃ 下与 2.5×10^9 链霉亲和素磁球 (预先与生物素化的凝集素同工凝集素₄ (BSI-B₄)、生物素化的凝集素伴刀豆球蛋白 A (ConA) 偶联) 温育 2 小时。在如上所述磁性浓缩并洗涤后, 用连续稀释的混合物感染 K562 细胞。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 9. 凝集素/PMP 介导的 FLYRD18 和 A13 逆转录病毒颗粒的捕获和浓缩。在与顺磁颗粒 (PMP) 温育之前和之后测定 FLYRD18 和 A13 产生的逆转录病毒 (pBabe.puro) 上清液的 cfu/ml。5ml 等份的逆转录病毒上清液立即滴定 (对照), 或在 4℃ 下与 2.5×10^9 链霉亲和素磁球 (预先与生物素化的凝集素同工凝集素₄ (BSI-B₄)、生物素化的凝集素伴刀豆球蛋白 A (ConA) 偶联) 温育 2 小时。在如上所述磁性浓缩并洗涤后, 用连续稀释的混合物感染 K562 细胞。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 10a. 生物素琥珀酰亚胺酯/PMP 介导的 PG13 逆转录病毒颗粒的捕获和浓缩。在与顺磁颗粒 (PMP) 温育之前和之后测定 PG13 产生的逆转录病毒 (pBabe.puro) 上清液的 cfu/ml。未处理、DMSO 温育或生物素琥珀酰亚胺酯标记的包装细胞的 5ml 等份逆转录病毒上清液立即滴定 (对照, DMSO, 生物素 SE), 或者 DMSO 温育或生物素标记的包装细胞的上清液在 4℃ 下与 2.5×10^9 链霉亲和素磁球温育 2 小时。在如上所述磁性浓缩并洗涤后, 用连续稀释的混合物 (DMSO conc, 生物素 SE conc) 感染 K562 细胞。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 10b. 生物素标记的包装细胞的流式细胞分析。PG13 细胞如上所述生物素化, 并在 37℃ 下温育过夜。在收集上清液进行逆转录病毒加工后, 如上所述从底层取出细胞, 1×10^6 个细胞用亲和素 FITC 标记。

两张分布图代表单独与载体（DMSO，实线）温育的细胞或在亲和素-FITC 标记 24 小时前生物素化的细胞（生物素 SE，虚线）。载体对照的平均荧光指数（MFI）为 6.5，生物素化细胞的 MFI 为 2000。

图 11. 生物素琥珀酰亚胺酯/PMP 介导的 FLYRD18 和 A13 逆转录病毒颗粒的捕获和浓缩。在与顺磁颗粒（PMP）温育之前和之后测定 FLYRD18 和 A13 产生的逆转录病毒（pBabe.puro）上清液的 cfu/ml。未处理、DMSO 温育或生物素琥珀酰亚胺酯标记的包装细胞的 5ml 等份逆转录病毒上清液立即滴定（对照，DMSO，生物素 SE），或者 DMSO 温育或生物素标记的包装细胞的上清液在 4℃ 下与 2.5×10^9 链霉亲和素磁球温育 2 小时。在如上所述磁性浓缩并洗涤后，用连续稀释的混合物（DMSO conc，生物素 SE conc）感染 K562 细胞。每个值代表一式三份集落计数的平均值和标准差。

图 12 显示制品的冻融。未浓缩的对照逆转录病毒以 2-5ml 等份置于 -20℃ 下冷冻。PMP 捕获的浓缩逆转录病毒通过加入三倍体积的标准冷冻混合液（10% DMSO，20% FCS，终 DMSO 浓度为 7.5%）并置于 -20℃ 下冷冻。逆转录病毒制品尽可能快地融化，取出一等份进行检测，其余的放回 -20℃。

图 13. 磁场介导的逆转录病毒感染 HeLa 细胞的定位。平板 a) 显示未感染培养物的嘌呤霉素选择的毒性作用，平板 b) 证实在没有磁性导向的情况下感染均匀扩散，c) 显示靶细胞向培养物特定区域的有效定向感染，由逆转录病毒感染后存活的抗药性细胞的模型证实。平板 d) 显示用来引导局部感染的最初磁性模板，并证实定向感染非常接近地反映最初模板的形状。

关于本发明第一方面的详述

PG13 上清液与福尔马林固定的金黄色葡萄球菌（Pansorbin）的温育

为了基因治疗的目的，我们使用含 GaLv（Gibbon Ape 白血病病毒）包膜蛋白的鼠成纤维细胞衍生的假型 PG13 包装细胞³。利用软琼

脂集落计数试验对 K562 细胞滴定产生基于 MoMuLv 的载体 (pWZLIL2/B7M Fusagene³⁰, 赋予盐酸杀稻瘟菌素 S 抗性, 以后称为 IL-2/B7) 的混合细胞群体。图 1 中可见由这种混合群体获得的滴度 (1.95×10^4 cfu/ml) 的代表性实例 (T=0, 对照)。尽管这种滴度比以前的包装细胞大大提高, 但仍不足以用于我们的目的。

发明者于是决定检验这样一种假说: 由于已知 Galv 假型³¹ 逆转录病毒和金黄色葡萄球菌^{32, 33} 附着于纤连蛋白, 那么与相对较大和稠密的细菌结合的逆转录病毒能在培养中在重力下沉淀, 从而提高能感染靶 K562 细胞的逆转录病毒的局部浓度。与细胞培养物相容的金黄色葡萄球菌的易于获得的来源经加热杀死, 甲醛固定, 但在表面上仍保留功能性蛋白 A³⁴, 因而可能保留其它表面表达的蛋白质活性。

图 1 显示一个实验, 它使用与 Pansorbin 预温育的 PG13 产生的 IL-2/B7 逆转录病毒上清液。不含 Pansorbin 时, 新鲜收获的上清液对 K562 细胞的 cfu/ml 滴度为 $1.95 \times 10^4 \pm 4 \times 10^3$ /ml (T=0, 对照)。在不含 Pansorbin 时 4℃ 温育 2 小时后 (T=2, 对照), cfu/ml 不变, 为 $1.75 \times 10^4 \pm 4 \times 10^3$ /ml。然而, 预温育中存在 Pansorbin 对逆转录病毒的 cfu/ml 滴度具有剂量依赖的影响。可达 25μl 的 Pansorbin 与 PG13 产生的逆转录病毒载体预温育 2 小时使得对 K562 细胞的有效 cfu/ml 滴度提高多达 3 倍。

Pansorbin/逆转录病毒预温育时间对传染性的影响

使用 25μl Pansorbin/5ml 逆转录病毒上清液, 研究了最佳预温育时间 (图 2)。温育 2 小时后, Pansorbin 介导的滴度增加达到稳定期 ($5.3 \times 10^4 \pm 9.5 \times 10^3$ cfu/ml), 而不含 Pansorbin 的对照 cfu/ml 滴度保持稳定 (T=0, $9 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$ cfu/ml; 2 小时, $8.33 \times 10^3 \pm 1.7 \times 10^3$ cfu/ml), 但在 4 小时后降低为 $5.4 \times 10^3 \pm 1.1 \times 10^3$ cfu/ml。在随后的实验中, 常规使用 3 小时的温育时间和 25μl Pansorbin/5ml 上清液。值得注意的是, 在使用 25μl Pansorbin 的图 1 中, 2 小时后 cfu/ml 滴度提高 3 倍, 而在图 2 中在相同条件下超过 7 倍。这与其它实验 (数据

未显示)一致,这类实验平均约有5倍 cfu/ml 提高。

与 Pansorbin 复合后逆转录病毒的低速离心浓缩

图 1 和图 2 所述的实验以小体积上清液进行,但为了成为实用方法需要放大。逆转录病毒只在重力下的 Pansorbin 特异的沉淀提示,低速离心可从包装细胞上清液中浓缩并纯化逆转录病毒。本发明者于是将 50ml 逆转录病毒上清液样品与 250 μ l Pansorbin 温育,并试图浓缩逆转录病毒;图 3 显示一个典型实验的结果。

温育前的对照滴度约等于图 1 和图 2 中的类似滴度 ($1.4 \times 10^4 \pm 7.5 \times 10^2$ cfu/ml), 4 $^{\circ}$ C 预温育 3 小时后减半为 $7.2 \times 10^3 \pm 7.3 \times 10^2$ cfu/ml, 表明这可能是温育时间的上限。与 Pansorbin 温育 3 小时再次将有效 cfu/ml 由 1.4×10^4 提高到 2.3×10^5 (即 16 倍)。这部分过程的效率是最佳结合时间、逆转录病毒传染性降低和逆转录病毒或 Pansorbin 与容器非特异性结合之间的平衡。这可以解释单独预温育在只温育 3 小时后在放大形式中为何更加有效。为了证实病毒与 Pansorbin 物理复合,从温育混合物中取出 5ml 等份,通过 0.45 μ m 滤器过滤一次,立即滴定。在不含 Pansorbin 情况下温育 3 小时后,第二次过滤逆转录病毒使滴度降低 38% (由 7.2×10^3 cfu/ml [T=3] 降为 4.4×10^3 cfu/ml [第二次过滤])。对 Pansorbin 温育样品 (P) 进行的相同处理使滴度降低 97% 以上 (P:P 过滤, 2.3×10^5 cfu/ml : 5.4×10^3 cfu/ml)。因此只通过过滤就能从共温育中除去 97% 以上的逆转录病毒滴度。

在滴定之前低速离心剩余的 45ml Pansorbin 逆转录病毒混合物,洗涤一次,重悬浮于 250 μ l 新鲜培养基中(体积减少 180 倍),使 cfu/ml 为 1.1×10^8 cfu/ml (Pconc), 代表 cfu/ml 提高 7.8×10^3 倍。当单独与对照上清液比较时,浓缩物中检测到的有效滴度大大高于预期。当浓缩物和与 Pansorbin 温育并不经离心滴定的上清液相比较时,这种异常并不显著 (P conc, 1.1×10^8 cfu/ml : P, 2.3×10^5 cfu/ml), 尽管在体积只减少 180 倍的情况下仍达到滴度提高 473 倍。用离心样品 (Pdep) 的上面 25ml 上清液进行感染滴定证实,不是所有逆转录病毒传染性都

与 Pansorbin 一起沉淀，在上清液中仍保留了 2.7×10^4 cfu/ml 的滴度。这可能代表不与 Pansorbin 结合的逆转录病毒，或者与低速离心下不沉淀的 Pansorbin 结合的逆转录病毒。

作为对照，也在不含 Pansorbin 下温育 3 小时后，进行逆转录病毒上清液的离心。将不可见的沉淀重悬浮于 250 μ l 浆液中，不需要洗涤步骤 (cont conc)，显示 1.6×10^6 cfu/ml 的惊人的高滴度；与对照相比提高 115 倍，尽管比单独 Pansorbin 达到的低 >60 倍。理论上，在这种条件下不可能达到 68-123% 的逆转录病毒回收率（根据与作为对照的 T=0 或 T=3 比较），因为 2600g 10 分钟在时间和 g 值上都大大低于其它任何离心方案。

为了排除 B7-1³⁵ 的胞外 Ig 样域可显示于逆转录病毒表面^{36,37} 并与 Pansorbin 蛋白 A 结合的可能性，利用 Sansorbin（蛋白 A 阴性的金黄色葡萄球菌，Wood 46）平行进行浓缩。利用 Sansorbin 仍能将逆转录病毒浓缩为 1.15×10^7 cfu/ml，尽管效率比 Pansorbin 低 10 倍（也在未离心的 Sansorbin 中见到），但仍好于单独的离心。这表明，Pansorbin 浓缩的蛋白 A 成分可能主要贡献于浓缩作用。然而，也可能是 Sansorbin（Wood 46）以通常不可检测的水平表达蛋白 A，或者 Wood 46 对纤连蛋白有较低的亲和力。

逆转录病毒浓缩不是靶细胞特异的

为证明该作用不是只对 K562 细胞特异，平行使用相同的逆转录病毒制品感染其它两种人骨髓细胞系，NB4 和 U937，它们示于图 4，同时用分别的逆转录病毒制品感染人粘附上皮 HeLa 细胞。逆转录病毒上清液温育 3 小时后，对照物对 NB4 细胞的滴度极低 (46 ± 40.4)，标准差极大，这是用稀释于 1ml 细胞悬液中的 100 μ l 纯上清液测定的。体积减少 180 倍后，有效滴度升高到 1.3×10^4 cfu/ml，表示滴度只升高了 282 倍。

利用稀释于 1ml 细胞悬液中的 100 μ l 纯上清液，U937 细胞根本不感染，因此对 K562 细胞的滴度为 7.2×10^3 cfu/ml 的 PG13 产生的相同

上清液（图 3）对 NB4 细胞的滴度减少 150 倍，对 U937 细胞的滴度为 0。U937 细胞的可靠感染只在浓缩后实现（P conc, 1.3×10^3 cfu/ml），并且由于初始滴度为 0，无法估计浓缩效率。最后，对于 HeLa 细胞，在 160 倍浓缩后，逆转录病毒上清液的初始滴度由 410 ± 46 提高了超过 4×10^3 倍（P conc, 1.65×10^6 cfu/ml）。虽然病毒（对于 K562、NB4 和 U937，同一天，相同的病毒制品）的初始滴度有很大差异，但在任何情况下通过与 Pansorbin 温育和离心，滴度都会增加，尽管对于 NB4 不是特别有效。

逆转录病毒浓缩不是载体插入片段特异的

已经表明逆转录病毒的浓缩对于其它靶细胞是有效的（尽管易变），我们设法确定逆转录病毒与 Pansorbin 偶联是只限于逆转录病毒载体中特异插入片段（即 B7-1）的作用，还是适用于 PG13 释放的其它逆转录病毒载体。发明者扩展到研究与 pWZLIL2/B7M Fusagene³⁰ 相同但含有另一个插入片段的逆转录病毒载体 spine（pWZLblast³⁸）。该载体编码一种不含信号肽的截短基因，被称为 RaRT（截短的视黄酸受体 α ）。图 5 显示，这种 PG13 生产细胞混合群体释放能以相同方式浓缩的逆转录病毒。过滤后立即对 K562 细胞滴定显示滴度为 1.25×10^5 cfu/ml（比 IL-2/B7 约高 10 倍）。Pansorbin 介导的离心浓缩在体积减少 200 倍后使滴度提高到 7.7×10^8 cfu/ml（P conc, 提高 6333 倍）。通过离心（和洗涤）浓缩对照逆转录病毒证实，在体积减少 200 倍的情况下，滴度提高 50 倍（ $6.6 \times 10^6 \pm 8.6 \times 10^5$ cfu/ml）（数据未作图）。

同样浓缩的逆转录病毒制品当用来感染 NB4 细胞时，也显示有限的滴度升高（875 倍）（T=0: 5.6×10^3 cfu/ml, P conc: 4.9×10^6 cfu/ml）。在这种情况下，该病毒上清液对 U937 的初始滴度为 9.4×10^3 cfu/ml，在 P conc 中升高到 4.65×10^7 cfu/ml（4900 倍）。初始滴度为 3.35×10^4 cfu/ml 的 HeLa 细胞显示滴度并不显著地提高约 2500 倍。

逆转录病毒浓缩不是 PG13 特异的

Pansorbin 介导的浓缩用 PG13 释放的不同载体进行, 对 K562 靶细胞不是特异性的。表 1 显示了对当前其它包装细胞系和不同插入片段的有限调查。PG13 包装细胞似乎最有效地浓缩 (3500 倍, 体积减少 200 倍)。然而, 仅次于它的是 GP+envAM12³⁹ (当对 200 倍浓缩标准化时, 滴度提高 3500 倍) 和 PA317⁴⁰ (当对 200 倍浓缩标准化时, 滴度提高 1500 倍)。鼠成纤维细胞衍生的包装细胞似乎以完全不同的方式对肉瘤细胞衍生的 FLY⁵ 包装细胞反应, 对于后者 Pansorbin 介导的浓缩基本无效。亲嗜性 GP+E-86⁴¹ 细胞不能只对鼠靶细胞检测, 因此与感染人细胞的比较是不恰当的, 但是来自这些细胞的逆转录病毒不能十分有效地浓缩。

讨论

Pansorbin 用作不溶性稠密底物证明了这些高密度颗粒在传染性逆转录病毒寿命内能与相对较低滴度的逆转录病毒上清液相互作用的原理。在图 1 中, 显示逆转录病毒上清液与 Pansorbin 共温育能提高转录病毒的有效滴度 (cfu/ml)。这种相互作用时程的确定 (图 2) 显示, 尽管最初的相互作用极快, 但是在超过 60 分钟的温育后获得最佳结果。发明者将这种结果解释为, 逆转录病毒与 Pansorbin 复合, 在静置培养中一定比例的复合物在重力作用下沉淀, 从而提高了可与靶细胞结合的逆转录病毒的局部浓度。显然, K562 细胞暴露于 Pansorbin 即便过夜温育也没有毒性。可以认为, Pansorbin 不是促进感染而是整合上清液中可能存在的某些抑制因子^{8, 22}。然而, 发明者认为这一解释是不可能的, 因为在标准感染方案中加入未感染的 PG13 生产细胞的上清液不能抑制逆转录病毒的有效滴度 (数据未显示), 过滤逆转录病毒/Pansorbin 共温育物表明 cfu/ml 活性与 Pansorbin 分离。也清楚逆转录病毒不需要与 Pansorbin 分离也具有传染性, 或者仅仅 37°C 温育过夜就足以促使其释放。然而, 在使用 Pansorbin 和抗逆转录病毒包膜抗体介导复合物形成的其它方法中可能不是这样, 此时逆转录

病毒的传染性似乎受到损害⁴²。

使用图 1 和图 2 所示的数据，合理选择 Pansorbin 体积和共温育时间，并在放大实验和离心浓缩中使用。在我们的方案中 Pansorbin/逆转录病毒相互作用十分强，允许在 2600g 下进行两轮离心，相对剧烈地重悬浮于新鲜培养基中，之后滴定。静置培养中重力引起的体积减少和传染性提高可能是对 K562 测定的滴度升高远高于单独体积减少所预期的这一事实的一种解释。某些靶细胞对 Pansorbin 也可能有亲和力，它能在靶细胞附近保留逆转录病毒。图 3 显示，无论机制如何，在体积只减少 180 倍的情况下，有效滴度能提高可达 7500 倍。另一个意外是，在不含 Pansorbin 的情况下离心上清液也能提高滴度，尽管有效性很低。这可能表明，PG13 产生的逆转录病毒能与培养物中的未知因子复合，使可离心的沉淀物交联并浓缩。

图 3 的排除研究 (Pdep) 不很清楚；发明者将上清液的活性解释为，在这种速度下 Pansorbin 不会完全沉淀。在复合的逆转录病毒通过 0.45 μ m 滤器时，样品形成更清楚的图片，预过滤物的滴度降低多达 90% (P:P 过滤)。但是滴度不会降为零，可能表明多数可利用的逆转录病毒仍未结合 Pansorbin (甚至是优化的方案)，或者过滤足以将结合的逆转录病毒与 Pansorbin 分离。

在没有阴性对照的情况下，对于浓缩方案 (理解地没有逆转录病毒结合活性的 Pansorbin)，Pansorbin 上蛋白质 A 的活性不能完全降低。应用 Sansorbin 的平行实验显示，作用可能相当复杂，尽管 Sansorbin 远不如蛋白 A 阳性相应物有效，但它仍产生非常令人鼓舞的结果。Sansorbin (Wood 46 株) 不是只缺乏蛋白 A 的 Cowan I (Pansorbin) 的遗传工程亚株，而是一种完全不同的菌株，因此这些细胞中也可能缺乏完全不同的细胞表面蛋白。用链霉亲和素偶联的顺磁珠 (与从分泌型变异金黄色葡萄球菌株中纯化的生物素化蛋白 A 复合) 再次浓缩的努力只显示较低的逆转录病毒结合活性 (数据未显示)，这可有助于将 (discount) 蛋白 A 作为配体。

为了确定该浓缩方法的用途如何广泛，发明者希望确定 K562 是

否是这类方法的唯一靶细胞。图 4 相当清楚地显示，附着 HeLa 细胞以与 K562 细胞相同但程度较低的方式反应。IL-2/B7 逆转录病毒对 U937 细胞的传染性的低滴度也意味着对这些细胞不能估计浓缩比。

尽管浓缩病毒感染细胞系的能力不是细胞特异的，但对于确定逆转录病毒对 Pansorbin 的向性是否是 IL-2/B7 插入片段独有的至关重要。因此，发明者用其它载体（如 pWZLblast 中的 RaRT 插入片段）重复了该方案。图 5 中详述的结果显示，浓缩逆转录病毒载体的能力不是对特定插入片段/载体构建体特异的。然而，令人感兴趣的是注意到，在这种情况下，U937 靶细胞比 NB4 细胞更易于感染。这可能是由于插入片段的作用，如对 U937 细胞具有毒性的 IL-2 表达，尽管发明者不能证明在只加入浓度高达 50000U/ml 的人 IL-2 的三种悬浮细胞中软琼脂克隆效率有任何抑制。在 IL-2 存在或不存在下，U937、K562 和 NB4 的克隆效率分别为 78%、43%和 10%（细胞以 200 个细胞/平皿接种；数据未显示）。因此，外源 IL-2 对这些细胞无毒，但是为了确定从头合成的胞内 IL-2 的存在对这些细胞是否具有不同的毒性，需要调节型表达载体。

通常对 50ml 上清液样品进行 Pansorbin 离心浓缩，并且放大，该方法主要依赖于能输入系统中的上清液的量。利用 50ml 离心管每 10 分钟能离心 400ml 上清液，使得从成升的上清液中生产病毒变得相对容易。最初是由于病毒滴度较低的问题进行该研究，并推测用高滴度原料能达到什么程度。Pansorbin 购买时为 10% (w/v) 悬液，但用血细胞计数器能获得估计的颗粒数，表明浓度为 1×10^{10} - 1×10^{11} /ml。因此，浓缩 50ml 上清液的标准方案（250 μ l Pansorbin）使用约 1.25×10^{10} 个颗粒，甚至假定每个颗粒只能结合一个传染性逆转录病毒颗粒，这使 Pansorbin 具有携带 50ml 上清液中 1.25×10^{10} 个逆转录病毒颗粒的能力。该方法利用高滴度生产细胞可能与利用发明者研究的细胞同样（或更加）有效。假定上清液含有 1×10^6 cfu/ml 逆转录病毒，当与正常浓度的 Pansorbin (2.5×10^8 /ml) 混合时，每个逆转录病毒距其邻近病毒平均 100 μ m，而 Pansorbin 颗粒平均相距只有 16 μ m。因此，逆转录病

毒在到达 Pansorbin 颗粒附近之前只需要运动 10-20 μm , 因此提高或降低上清液中的逆转录病毒含量(假如它低于 Pansorbin 的携带能力)使逆转录病毒接触 Pansorbin 颗粒的可能性差异极小。人们可能预期逆转录病毒当与 Pansorbin 结合时将不能感染靶细胞, 事实上当在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下用靶细胞稀释时确实如此, 此时存在向培养基中逐渐释放逆转录病毒的逆反应。然而, 发明者认为逆转录病毒在感染靶细胞时仍与 Pansorbin 复合。

尽管没有关于结合机制的权威性数据, 但发明者确信病毒与 Pansorbin 结合, 如图 3 所见(P 和 P 过滤), 过滤共温育的上清液将不会降低滴度。

此处显示本发明的第一方面对 PG13 细胞有效, 浓缩方法对 PG13 优化。然而, 利用相同方案导向 K562 细胞, 发明者也发现单独的 Pansorbin 对 GP+envAM12³⁹ 和 PA317⁴⁰ (小鼠包装细胞, 兼嗜性鼠白血病毒包膜) 很有效, 当对 200 倍体积减少标准化后, 滴度分别增加 1500 倍和 600 倍。此外, 也对其它包装细胞系实施该方法, 如 FLYA13⁵ (人 HT1080 纤维肉瘤细胞, 兼嗜性鼠白血病毒包膜)、FLYRD18⁵ (具有 RD114 猫内源病毒包膜的 HT1080)。另外, 发明者还发现, 对鼠 32Dp210⁴³ 骨髓细胞滴定的亲嗜性包装细胞 GP+E-86⁴¹ (Mo-LULV env) 产生的逆转录病毒在体积减少 200 倍的情况下 Pansorbin 能被浓缩 150 倍, 这符合 FLYA13 对 K562 细胞的效率。

发明者认为, 纤连蛋白中间物可介导逆转录病毒与 Pansorbin 的结合。至少两种细菌基因的蛋白质产物似乎是特化的膜结合纤连蛋白结合蛋白 (fnbA³² 和 fnbB³³), 它们均从金黄色葡萄球菌 (不是 Cowan I 株) 中克隆。然而, 外源应用重组 fnbB 短肽³³ 能阻断 Cowan I 的纤连蛋白结合能力 (fnbA 未检测)。尽管没有这样直接检测 Wood 46 株, 但已经证实, Cowan I 在纤连蛋白或层粘连蛋白存在下凝集的能力在 Wood 46 中基本不存在⁴⁴。也注意到这两种菌株同样地附着于纤连蛋白包被的塑料组织培养器皿⁴⁴, 表明 Wood 46 可能 fnbA 或 fnbB 缺陷, 但或许不会两者都缺陷。也曾经报道, 包装细胞系 GP+E-86、

GP+envAM12、PA317 和 PG13 产生的逆转录病毒都可结合重组人纤连蛋白片段 (CH-296^{16, 31}, 也称作 RetroNectinTM)。因此, NIH3T3 衍生的包装细胞⁴⁵产生的逆转录病毒和纤连蛋白在培养过程中能与纤连蛋白结合是合理的, 这种纤连蛋白/逆转录病毒复合物然后可通过 fnbA 或 fnbB 与 Pansorbin 结合。大多数包装细胞表达纤连蛋白的水平肯定是测定逆转录病毒滴度的限制因素, 在 RetroNectin 处理后未见提高。尽管没有正式检测鼠包装细胞的纤连蛋白分泌, 但 FLYA13 和 FLYRD18 核心处的人 HT1080 纤维肉瘤细胞只表达占总蛋白质 0.004% 的纤连蛋白, 相比而言, 与正常人二倍体成纤维细胞相关的占 0.3%⁴⁶, FLYRD18 包膜甚至不能结合纤连蛋白⁴⁷。FLYA13 细胞尽管应用与 GP+envAM12 和 PA317 相同的 env 蛋白, 在浓缩试验中也表现极差。

Pansorbin/纤连蛋白/逆转录病毒复合物也可能以类似于 RetroNectin 的方式促进感染, 因为纤连蛋白中的细胞结合域可与靶细胞交联¹⁶, 这在 NB4 细胞中效率较低, 因为它们表达的许多 VLA-4 和 VLA-5 可能无活性⁴⁸。

发明者曾经使用不同的 4 批 Pansorbin、两批 Sansorbin 和一批来自 Sigma Aldrich 的 Pansorbin 相当物。他们发现 Pansorbin 的浓缩能力有 2-4 倍的批间差异 (浓缩后滴度升高 2000-7500 倍), 他们发现 Pansorbin 总比 Sansorbin 更有效, 而且总是优于 Sigma Aldrich 的产品。初看起来, 可能担心这种批间差异。然而, Cowan I 的制备方法已经优化, 并且对蛋白 A 但未对 fnb 进行质量控制。Sigma Aldrich 产品的较差活性似乎与它在 2600g 下沉淀的程度相关, 因此优化更好的离心条件可提高其活性。

尽管本发明明显适用于体外研究, 但对治疗的适用性则有争议, 因为在高浓度 Pansorbin 存在下甚至体外转导的细胞也必须花费时间。可以认为, 在感染过程中毒性因子可以滤除 Pansorbin, 如果它们附着于细胞疫苗则可能具有体内毒性。但是, 本领域的其他作者不考虑这种可能性。然而, 尽管这样, 只有 Pansorbin 的蛋白 A 成分获准用于

人体（自身免疫性血小板减少性紫癜，ITPP）⁵⁰。此外，只用蛋白 A 离体吸收患者血浆在病毒诱导的大鼠恶性肿瘤⁵¹中获得的下列有希望的结果对转移性乳腺癌^{52, 53}、卡波氏肉瘤⁵³和结肠癌⁵³已经到达临床试验阶段，这基于去除认为抑制抗肿瘤免疫应答的抗体复合物^{52, 53}。然而试图推测蛋白 A 和 fnb 在治疗其它恶性肿瘤中对 Cowan I 的相对贡献，逆转录病毒作用的证据十分引人注目，病毒败血症的减少将取决于循环逆转录病毒/抗体复合物^{54, 55}。

Pansorbin 的作用证明，在逆转录病毒的半衰期内能发生逆转录病毒与颗粒性底物的相互作用。这允许我们发展一种简单的浓缩逆转录病毒载体的方法。但是，本发明的其它方面是使用可能更加有助于临床实践并适用于多种包装细胞系的试剂的改进。

关于本发明第一方面的材料与方法

细胞系

人（NB4、U937、K562）和小鼠（32Dp210⁴³）骨髓细胞系和 HeLa 上皮细胞在 RPMI+10% FCS、2mM L-谷氨酰胺、100 μ g/ml 链霉素和 100U/ml 青霉素（均为 Sigma, Poole, UK）中常规生长。悬浮细胞保持于 1×10^5 - 1×10^6 /ml，而 HeLa 细胞通过胰蛋白酶消化传代，并保持低于 7×10^6 /90mm 组织培养皿。

小鼠胚胎成纤维细胞衍生的 GP+envE-86⁴¹、PG13 GaLv 假型³（CRL-10686，从 ATCC 获得）、GP+envAM12、GP+E-86、PA317 和人肉瘤衍生的 FLYA13 和 FLYRD18 包装细胞在 DMEM+10% FCS、2mM L-谷氨酰胺、100 μ g/ml 链霉素和 100U/ml 青霉素中常规生长。细胞保持于 90mm 组织培养皿中，通过胰蛋白酶消化传代，保持于 5×10^5 - 7×10^6 /90mm 组织培养皿。

试剂

Pansorbin（Calbiochem-Novabiochem, Nottingham, 507858）是加热杀死的、福尔马林固定的金黄色葡萄球菌（Cowan I）的 10%（w/v）悬液，携带高细胞表面密度蛋白 A 的 1 μ m 颗粒，在 4 $^{\circ}$ C 下贮存，4-6

周后更换。Sansorbin (Calbiochem-Novabiochem, Nottingham, 557601) 是加热杀死的、福尔马林固定的金黄色葡萄球菌 (Wood 46) 的 10% (w/v) 悬液, 不含蛋白 A 的 1 μ m 颗粒, 在 4 $^{\circ}$ C 下贮存, 4-6 周后更换。不溶性蛋白 A (Sigma, Poole, UK, P-7155) 细胞悬液, 约 10% (湿重/体积) 不能存活的金黄色葡萄球菌 Cowan 株, 在 4 $^{\circ}$ C 下贮存, 4-6 周后更换。标记的蛋白 A-生物素 (Sigma, Poole, UK, P-2165) 从分泌蛋白 A 的金黄色葡萄球菌株的培养基中纯化 (2mg/ml, 于 pH 8.0 的 PBS 中, -20 $^{\circ}$ C 贮存)。盐酸杀稻瘟菌素 S (ICN Pharmaceuticals, Basingstoke, UK, 150477) 过滤除菌, 以 5mg/ml-20 $^{\circ}$ C 贮存于水中。纯净琼脂 (Difco Laboratories, Detroit, USA, 0142-17-0)。polybrene (Sigma, Poole, UK, H-9268) 在水中制成 8mg/ml, 过滤除菌贮存于 -20 $^{\circ}$ C。链霉亲和素磁球顺磁颗粒 (Promega, Madison, USA, Z5482) 为 1mg/ml (5 \times 10⁸ 颗粒/ml) 1 μ m 直径顺磁颗粒, 在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 贮存。

生产细胞的产生和培养

FG13、GP+envAM12 和 PA317 包装细胞用胰蛋白酶消化, 以 1 \times 10⁶/90mm 平皿的密度接种; 4 小时后, 吸出培养基, 更换为 10ml 过滤 (0.45 μ M) 的含 4 μ g/ml polybrene 的 GP+E-86 上清液。这些磷酸钙转染的 GP+E-86 混合细胞群体产生 pWZLIL-2/B7³⁰ 或 pWZLRaRT 逆转录病毒载体 (赋予杀稻瘟菌素 S 抗性) 或 pBabe.puro 载体 (赋予嘌呤霉素抗性)。24 小时后重复感染, 细胞再培养 48 小时, 在含 10 μ g/ml 杀稻瘟菌素 S 或 5 μ g/ml 嘌呤霉素的 DMEM+10% FCS 中筛选 4 周, 冻存抗性细胞的混合群体。

FLYRD18 和 FLYA13 包装细胞以 7.5 \times 10⁵/90mm 平皿的密度开始, 过夜培养后吸出培养基, 更换为 10ml 过滤 (0.45 μ m) 的含 8 μ g/ml polybrene 的 PG13.pBabe.puro。72 小时后吸出培养基, 更换为含 5 μ g/ml 嘌呤霉素的新鲜培养基。细胞再培养 7 天, 此时所有对照培养物均死亡, 冻存存活细胞的混合群体。

逆转录病毒的产生

PG13、GP+envAM12、PA317 和 GP+E-86 生产细胞用胰蛋白酶

消化，以 $1 \times 10^6/90\text{mm}$ 平皿的密度接种；72 小时后更换培养基；24 小时后吸出培养基，通过 $0.45\mu\text{m}$ 滤器过滤，进一步处理。FLYA13 和 FLYRD18 细胞以 $2 \times 10^6/90\text{mm}$ 平皿的密度接种，48 小时和 72 小时后更换培养基，总共 96 小时后吸出培养基，通过 $0.45\mu\text{m}$ 滤器过滤，进一步处理。

金黄色葡萄球菌的制备

Pansorbin、sansorbin 或不溶性蛋白 A 用 RPMI+10% FCS 1:20 稀释， 4°C 贮存 18 小时。离心（ 2600g ，20 分钟， 4°C ）所需的量，在 RPMI+10% FCS 中重悬浮为希望的浓度。

Pansorbin/Sansorbin 的制备和浓缩：逆转录病毒复合物

将指定体积的 Pansorbin/Sansorbin 加入到无菌聚丙烯管中希望体积的逆转录病毒上清液中，混合物在 4°C 和恒定摇动下温育（Stuart Scientific SRT1 倾斜旋转混合器）。在指定时间时，直接取出混合物测定 cfu/ml 滴度或离心浓缩。对于浓缩：离心 45 或 50ml 混合物（ 2600g ，10 分钟， 4°C ），弃去上清液，沉淀重悬浮于 10ml 冷 DMEM+10% FCS 中，如上所述再离心一次。倾出上清液，试管倒置贮存 60 秒排净，沉淀重悬浮于约 $250\mu\text{l}$ 冷 RPMI+10% FCS 中。重悬浮沉淀可能较困难，因为它倾向于凝块（特别是 Pansorbin）， $250\mu\text{l}$ 终体积倾向于由 50% 堆积体积和浆液和 50% 的新鲜培养基组成。必要时能以 150g 脉冲混合物（使之有效恢复），移到聚丙烯冻存瓶中在冰上贮存并测定 cfu/ml 滴度。

cfu/ml 滴度的测定

计数 K562、U937、NB4 和 32Dp210 细胞的悬液，用含有 $4.4\mu\text{g/ml}$ polybrene 的 RPMI+10% FCS 调节为 $4 \times 10^5/\text{ml}$ 。然后将细胞以 1ml 等份接种于 24 孔细胞培养板中，在 $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ 下温育 1-3 小时。逆转录病毒制品用 RPMI+10% FCS 1:10 连续稀释，将 $100\mu\text{l}$ 加到一式三份孔中充分混合。18-24 小时后， 0.9ml 细胞与 3.8ml RPMI+24% FCS+ 1.3mM 丙酮酸钠混合，保持于 37°C 下，随后加入 0.3ml 高压灭菌的 5% v/v 纯净琼脂水溶液（终浓度为 0.3%），保持

于 60℃。细胞然后接种于 60mm 组织培养皿中，使琼脂凝固后，置于 37℃/5% 下。再过 18-24 小时后，小心加入含有 20μg/ml 杀稻瘟菌素 S 或 10 μg/ml 嘌呤霉素的 5ml RPMI+20% FCS+1mM 丙酮酸钠，分别使软琼脂选择浓度为 10 μg/ml 和 5 μg/ml。平皿再放回培养 2-3 周，之后测量软琼脂集落数。cfu/ml 浓度计算为每个平皿的集落数/孔乘以稀释倍数。在所有 cfu/ml 测定中进行倍数稀释，尽管大多数没有价值，含有太少或太多的集落而无法精确计数（即多于 300/60mm 平皿）。

附着的 HeLa 细胞用胰蛋白酶消化，计数，并用 RPMI+10% FCS 调节为 1×10^5 /ml，然后以 0.5ml 等份接种于 24 孔细胞培养板中。温育 18 小时后（37℃/5%），感染 1-3 小时前，加入另外 0.5ml 含 polybrene 的培养基，使终浓度为 4.4 μg/ml。

逆转录病毒在 RPMI+10% FCS 中进行 1:10 连续稀释，向靶细胞中一式三份加入 100 μl 等份的适当稀释液，并混合。感染 48 小时后，培养基更换为含有 10 μg/ml 杀稻瘟菌素 S 的新鲜培养基。每 3-4 天更换一次培养基，持续 2 周，之后吸出培养基，培养板用 2ml 考马斯蓝染液染色（5.35% wt/vol 溶于 45% 甲醇:10% 乙酸），用自来水洗涤，计数集落，测定滴度。

关于本发明第二、第三和第四方面的详述

纤连蛋白结合的 PG13 产生的逆转录病毒的顺磁颗粒介导的浓缩

为了确定 PG13 产生的逆转录病毒实际上是否与包装细胞上清液中的纤连蛋白结合，发明者使用与 PMP 偶联的抗鼠纤连蛋白多克隆抗体。图 7 详述了使用以前描述软琼脂集落形成试验⁵⁶测定这些颗粒捕获传染性 PG13 逆转录病毒的能力。在未浓缩情况下，对人骨髓 K562 细胞的初始滴度（cfu/ml）为 $1.4 \times 10^5 \pm 9 \times 10^3$ cfu/ml（对照），用蛋白 A-生物素偶联的 PMP（PAB）将上清液体积浓缩 125 倍使其滴度提高 100 倍以上，至 $1.6 \times 10^7 \pm 3.4 \times 10^6$ cfu/ml。然而，多克隆兔抗小鼠纤连蛋白、通过蛋白 A-生物素与 PMP 偶联的抗体（蛋白 A 抗体生物素:PAAB）在体积同样减少 125 倍的情况下，使滴度提高到 $4 \times 10^8 \pm$

9.5×10^7 cfu/ml, 增加 2800 倍。导致定向特异性抗体锚定的抗体蛋白 A-生物素组合比单独的蛋白 A-生物素效率高 25 倍。然而, 单独的蛋白 A-生物素的效率不能提示蛋白 A 对纤连蛋白或逆转录病毒的有限亲和力。

小鼠纤连蛋白抗体允许从逆转录病毒上清液中捕获鼠纤连蛋白衍生的包装细胞产生的传染性逆转录病毒。体积只降低 125 倍导致逆转录病毒滴度提高 2000-3000 倍。捕获的逆转录病毒群体的总传染性 (cfu/ml) 约 20 倍于对照上清液。这可反映病毒向细胞的输送增强, 这是由于重力介导的 PMP 沉积, 而不是单独的布朗运动¹⁵, 或在 PMP 捕获后逆转录病毒的传染性提高。在磁性浓缩后使用逆转录病毒/PMP 混合物的上清液的排除 (depletion) 研究也表明, 上清液的逆转录病毒滴度降低约 90%。该数据证实 PG13 包装细胞向上清液中分泌鼠纤连蛋白, 大多数逆转录病毒颗粒与之结合, 或者在不含纤连蛋白时逆转录病毒没有传染性。

该方法的效率显示, 在这些条件下, 负责逆转录病毒与纤连蛋白、纤连蛋白与靶细胞结合的表位不被抗体空间阻碍。该方法使用总共 1.25×10^9 PMP 浓缩 5ml 逆转录病毒上清液, 而 PMP 数量减少的其它实验导致广泛的交联, 这由 PMP 的凝集证实。使用较低浓度蛋白 A-生物素和抗体的其它试验也使逆转录病毒浓缩效率降低。

凝集素/PMP 介导的逆转录病毒颗粒的捕获

鼠包装细胞释放的逆转录病毒颗粒对人血清灭活极敏感, 这似乎依赖于使用的包装细胞和包膜蛋白⁵⁷。这种敏感性主要由鼠包装细胞释放的逆转录病毒颗粒的包膜蛋白的末端 Gal(α 1-3)Gal 修饰引起。这种鼠酶的人同源物具有遗传获得的突变, 导致人细胞中(α 1-3)半乳糖基转移酶活性不明显。针对人血清中可见的 Gal(α 1-3)Gal 修饰的高水平抗体确保鼠包装细胞产生的逆转录病毒载体在体内快速灭活⁵⁷。PG13 产生的逆转录病毒上存在 Gal(α 1-3)Gal 修饰提供了捕获 PG13 逆转录病毒的第二种策略。图 8 显示使用与 Gal(α 1-3)Gal 结合同工凝集素 B4 (BSI-B4)⁶¹ 或伴刀豆球蛋白 A (ConA)⁶² 偶联的 PMP 的浓缩效

率, ConA 主要结合更多普遍存在的 α -甘露糖修饰。使用与 PMP 偶联的这两种凝集素的任一种, 在上清液体积减少 125 倍后, $4 \times 10^5 \pm 5.5 \times 10^4$ cfu/ml 的对照滴度能升高到 $7 \times 10^8 \pm 6.4 \times 10^7$ cfu/ml (1700 倍) (生物素-BSI-B₄), 或 $5.4 \times 10^8 \pm 5 \times 10^7$ cfu/ml (1300 倍) (生物素-ConA)。单独的 PMP 浓缩导致升高 4 倍 ($1.6 \times 10^6 \pm 4 \times 10^5$ cfu/ml), 证明逆转录病毒浓缩依赖于凝集素而不是链霉亲和素。这一策略可以更广泛地应用, 因为它对于不能结合纤连蛋白的逆转录病毒载体也可能是有效的⁴⁷。在这种情况下意外发现, 由于逆转录病毒与 PMP 紧密结合, 并且不能被大的中间蛋白质(如纤连蛋白)捕获, 它仍有传染性, 这是本发明的第二方面。对于 ConA 尤其如此, ConA 是一种已知可抑制 HIV-1 体外传染的凝集素⁶³, 尽管这可能是反映其独特受体应用的特殊情况⁶⁴。类似的 ConA 捕获策略实际上消除了 HIV-1 的传染滴度(降低 95%以上)⁶⁵也令人感兴趣, 与之明显相反的是应用 PG13 产生的载体可见的提高。然而, 凝集素也能以类似于纤连蛋白的方式结合上清液中作为中间物的蛋白质, 而不直接结合逆转录病毒本身。

应用于人 HT1080 衍生的包装细胞的凝集素/PMP 介导的磁性浓缩也对 FLYA13 和 FLYRD18 产生的逆转录病毒测试了凝集素策略^{5, 66}, 发明者以前不能设计对它们有效的方法。图 9 显示凝集素/PMP 介导的 FLYRD18 和 FLYA13 产生的逆转录病毒的浓缩。FLYRD18 细胞的(对照)滴度为 $3.5 \times 10^4 \pm 1.1 \times 10^4$ cfu/ml, ConA 介导的浓缩(125 倍)将其提高为 $1.2 \times 10^7 \pm 3.6 \times 10^6$ cfu/ml。这种 342 倍的提高远少于用 PG13 能达到的 1300 倍, 表明 ConA/PMP 介导的 FLYRD18 逆转录病毒效率通常比 PG13 产生的低 5 倍。BSI-B₄/PMP 浓缩的滴度只比对照高 6 倍 ($2.2 \times 10^5 \pm 6.4 \times 10^4$ cfu/ml), 证实人细胞上最低程度的存在 α -半乳糖基。FLYA13 细胞的(对照)滴度为 $6.2 \times 10 \pm 5.7 \times 10^2$ cfu/ml, 在 ConA/PMP 介导的体积减少 125 倍后, 滴度升高 369 倍, 为 $2.3 \times 10^6 \pm 2 \times 10^5$ cfu/ml。BSI-B₄ 在捕获人源包装细胞释放的逆转录病毒中无效。尽管对 FLY 的有效性比 PG13 产生的逆转录病毒低, 但凝集素介导的浓缩仍是至今对于 HT1080(FLY)产生的逆转录病毒家族所述中最有

效的。

生物素琥珀酰亚胺酯/PMP 介导的 PG13 逆转录病毒颗粒的捕获

本发明的第二方面（抗体介导）和第三方面（凝集素介导）也许不能广泛适用于或有效用于迄今在基因治疗中使用的所有包膜逆转录病毒包装细胞系。因此，发明者设计了本发明的第四方面，这也许是对 PMP 介导的逆转录病毒浓缩最有效的一方面。使用标记包装细胞的方法^{67, 68}，用琥珀酰亚胺酯衍生物标记 PG13 包装细胞，该衍生物共价偶联生物素与包装细胞表面上的蛋白质。图 10a 显示生物素化包装细胞产生的逆转录病毒的 PMP 介导浓缩的结果。未浓缩时，包装细胞的生物素化（BSE）或单独的载体（DMSO）处理对滴度没有影响（对照： $4.6 \times 10^5 \pm 1.5 \times 10^4$ cfu/ml，DMSO： $4.2 \times 10^5 \pm 2.6 \times 10^4$ cfu/ml，BSE： $4.2 \times 10^5 \pm 3.6 \times 10^4$ cfu/ml）。未生物素化时（单独用 DMSO 载体处理细胞），单独的 PMP 不能捕获逆转录病毒（DMSO 浓缩： $4.6 \times 10^5 \pm 1 \times 10^5$ cfu/ml）。生物素化的包装细胞分泌一种逆转录病毒，它与 PMP 上的链霉亲和素亲和偶联，并在体积只减少 125 倍后使浓度升高为 $1.8 \times 10^9 \pm 1.8 \times 10^8$ cfu/ml 的滴度（升高 4200 倍），这似乎是迄今对 PG13 最有效的策略。此外，排除的上清液的滴度显示降低为 6.4×10^4 /ml \pm 1.4×10^4 /ml，表示与对照滴度相比 80% 以上排除。图 10b 显示 FACS 图，说明标记 24 小时后可用亲和素-FITC 检测的表面修饰程度。关于该图的详述是，与 24 小时前用生物素 N-羟基琥珀酰亚胺酯处理并用亲和素-FITC 染色的（BSE-Av-FITC）细胞相比，单独用 DMSO 处理并用亲和素-FITC 染色的（DMSO+Av-FITC）对照细胞的荧光。甚至在培养 24 小时后，荧光有大于 2 log 的改变。生物素化反应对包装细胞无毒性，被认为是针对赖氨酸侧链的 NH₂ 末端。以前悬浮细胞生物素化的经验提示，由于蛋白质更新（turnover），表面修饰非常快速地内吞。因此，几乎没有生物素化蛋白质分泌到上清液中。包装细胞表面上的包膜蛋白可在芽殖过程中在与逆转录病毒 gag 和 pol 结合前生物素化。这样能从生物素化的包装细胞中分泌生物素标记的逆转录病毒。由于其它细胞的表面蛋白也可以作为逆转录病毒外壳上的生物

素化衍生物，env 蛋白可能不被生物素化。另外，包装细胞产生的蛋白质（后来可与逆转录病毒结合）也可能是生物素化的主要靶标。在逆转录病毒表面上估计有 300 个包膜分子，因而生物素过程的效率对于捕获无关紧要，因为生物素/链霉亲和素相互作用的强度太强，以致只有一个生物素与 PMP 接触即可足以捕获逆转录病毒。

有效的生物素琥珀酰亚胺酯/PMP 介导的 FLYRD18 和 A13 捕获伴刀豆球蛋白 A 介导的 FLYRD18 和 FLYA13 捕获没有获得预期的成功。因此，发明者决定研究生物素 SE 捕获是否有效捕获这些包装细胞产生的逆转录病毒。图 11 显示测定生物素介导的 FLYRD18（图 11）和 FLYA13（图 11）磁性浓缩效率的实验结果。再次检测单独的载体和生物素修饰对起始滴度的影响，对于 FLYRD18（图 11），对照滴度（ $4.6 \times 10^4 \pm 8.7 \times 10^3$ cfu/ml）与 DMSO 载体（ $4.7 \times 10^4 \pm 1.2 \times 10^4$ cfu/ml）或生物素修饰（ $5.4 \times 10^4 \pm 3 \times 10^3$ cfu/ml）没有差异。单独载体（DMSO）处理细胞在体积减少 125 倍后不能引起逆转录病毒浓缩，DMSO 浓缩： $4.3 \times 10^4 \pm 7 \times 10^3$ cfu/ml。FLYRD18 的生物素化导致在体积减少 125 倍后浓缩物的滴度为 $1 \times 10^8 \pm 1.8 \times 10^7$ cfu/ml，比起始物高 2000 倍，这是接近 PG13 的效率。也确定了本发明的第四方面也能有效浓缩 FLYA13 细胞。

对照和浓缩 PG13 产生的逆转录病毒的冻融稳定性

为了独立进行所需的安全性测试，逆转录病毒制品必须预先制备，因此确定浓缩对于冷冻后传染性保持的意义如何至关重要。图 12 显示逆转录病毒浓缩物实际上比冷冻的对照上清液更加稳定。对照在第一次冻融后均丢失 80% 以上的滴度，在第二次冻融后丢失 94% 以上。对于浓缩物，在第一次融化后大多数活性丢失（可达 60%），但随后传染性基本不丢失。因此，PG13 衍生的浓缩物能比纯净的上清液更有效地贮存（对于 ConA 和 BS-IB₄，-20℃ 下 6 周多以后）。如下文所述，浓缩物以加入 3 倍体积的 10% DMSO、20% FCS 所达到的 7.5% DMSO 的终浓度冷冻（因此考虑这一稀释度调节融化的浓缩物的滴度）。由于为了滴定浓缩物需要较大的稀释度，DMSO 的影响不是问

题，也能使用 PMP 磁性浓缩器在融化后进一步洗涤逆转录病毒制品。然而，对照上清液不适于 DMSO 存在下冷冻，因为甚至将融化的逆转录病毒稀释 10 倍仍将含有显著的 DMSO 污染。

PMP/逆转录病毒偶联物能用于感染的体外定位

现在能生产有效的“传染性、顺磁性逆转录病毒载体颗粒”，然后能磁性吸引到希望的感染位置。图 13 显示体外磁性定位的一个例子，是对该方法的原理的证实。从磁片上切下的模型(d)，置于 HeLa 细胞亚铺满培养物之下，能吸引并保留逆转录病毒，主要感染存在磁体的区域。此处使用的特殊设计旨在显示这一导向不是搅动过程中使逆转录病毒载体在平皿中涡旋的流体动力学的结果。另外，该实验表明，在连续存在磁场的情况下能发生感染，逆转录病毒在培养中仍能被顺磁颗粒捕获。这种磁片尽管较弱，但在体外引导逆转录病毒感染中极其有效，然而有效的体内导向是一个三维问题，将需要更强的磁场。对于体内环境，在易接近的部位使用小的永磁体，而体外产生的电磁场能一次集中于一个特定部位。对于所有导向，未导向的部位的感染抑制不是主要问题，因此如上所述的逆转录病毒载体的可逆灭活是令人激动和值得称赞的进展(28)。可逆灭活的逆转录病毒载体局限于特异组织、器官和转移，以及随后感染的局部复活，可使体内导向进一步复杂化。

总之，链霉亲和素 PMP 技术结合正确选择配体能捕获 PG13 和 FLY 包装细胞产生的逆转录病毒。该研究只检测了三种包装细胞型和两种导向细胞系，因此每种靶细胞型的其它优化可能将进一步提高浓缩物的传染性，这可能是依赖于靶细胞型和逆转录病毒受体的优选捕获方法。例如，对于通过 α -甘露糖修饰的受体进入的逆转录病毒，伴刀豆球蛋白 A 不是最佳选择(25-27)。PMP 上多余的生物素结合能力也可用来偶联其它蛋白质，实现迄今只能通过配体(31-34)或者逆转录病毒包膜基因的单链 Fv 修饰(35-38)达到的这种导向。发明者意识到，配体与没有遗传修饰的传染性制剂偶联将使逆转录病毒导向有更大的灵活性，可能不需要假型(pseudotyping)(31, 33, 37)

和靶细胞特异的包装细胞设计 (32, 34, 35, 38)。在不含其它配体的情况下, 顺磁逆转录病毒载体也是向相同细胞背景内的少数细胞体内导向感染的一种有效策略。

优化逆转录病毒/PMP 比, 降低聚阳离子增强剂依赖性 (39), 捕获当前的慢病毒载体构建体 (40) 的改进 PMP/逆转录病毒技术, 提高了体内逆转录病毒感染的可能性, 用于 PMP 浓缩, 并且通过磁场保留于或针对需要的部位。

材料与方法

细胞系

人骨髓悬液 (K562) 和 HeLa 附着上皮细胞在 RPMI+10% FCS、2mM L-谷氨酰胺、100 μ g/ml 链霉素和 100U/ml 青霉素 (均为 Sigma, Poole, UK) 中常规生长。悬浮细胞保持于 1×10^5 - 1×10^6 /ml, 而 HeLa 细胞通过胰蛋白酶消化传代, 并保持低于 7×10^6 /90mm 组织培养皿。

PG13 GaLv 假型包装细胞³ (CRL-10686, 获自 ATCC, Rockville, MD, USA) 在 DMEM+10% FCS、2mM L-谷氨酰胺、100 μ g/ml 链霉素和 100U/ml 青霉素中常规培养。细胞保存于 90mm 组织培养皿中, 通过胰蛋白酶消化传代, 保持于 5×10^5 - 7×10^6 /90mm 组织培养皿。

试剂

链霉亲和素磁球顺磁颗粒, 1mg/ml (5×10^8 颗粒/ml) 1 μ m 直径的顺磁颗粒在 PBS 中 4 $^{\circ}$ C 贮存。多克隆 I 兔抗小鼠纤连蛋白, 10.8mg/ml 于 PBS 中, 4 $^{\circ}$ C 贮存 (Biogenesis, Poole, UK, 4470-4339)。标记的蛋白 A-生物素 (Sigma, Poole, UK, P-2165) 从分泌蛋白 A 的金黄色葡萄球菌株培养基中纯化 (2mg/ml, 于 pH8.0 的 PBS 中, -20 $^{\circ}$ C 贮存)。生物素标记的琥珀酰-伴刀豆球蛋白 A (Sigma, Poole, UK, L0767) 以 1mg/ml 在 pH8.0 的 PBS 中 -20 $^{\circ}$ C 贮存。来自 *Bandeiraea Simplicifolia* 的 BS-I 生物素标记的同工凝集素 B₄ (BS-IB₄) 以 1mg/ml 在 pH8.0 的 PBS (Sigma, Poole, UK, L2140) 中 -20 $^{\circ}$ C 贮存。生物素酰胺基己酸 N-羧基琥珀酰亚胺酯 (Sigma, Poole, UK, B2643) 用 DMSO 重建为 366mM 并贮存于 -20 $^{\circ}$ C, 自此称为 BSE。亲和素-FITC (Sigma, Poole,

UK, A-2901) 贮存于 -20°C , 在 pH8.0 的 PBS 中重建为 1mg/ml。嘌呤霉素 (Sigma, Poole, UK, P-8833) 过滤除菌, 在 -20°C 下以 5mg/ml 贮存于水中。

生产细胞的产生和培养

PG13 包装细胞用胰蛋白酶消化, 以 $1 \times 10^6/90\text{mm}$ 平皿的密度接种; 4 小时后, 吸出培养基, 更换为 10ml 过滤 ($0.45\mu\text{M}$) 的含 $4\mu\text{g/ml}$ polybrene 的 GP+E-86 上清液。这些磷酸钙转染的 GP+E-86 混合细胞群体产生赋予嘌呤霉素抗性的 pBabe.puro 载体。24 小时后重复感染, 细胞再培养 48 小时, 在含 $5\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的 DMEM+10% FCS 中筛选 4 周, 冻存抗性细胞的混合群体。

FLYRD18 和 FLYA13 包装细胞以 $7.5 \times 10^5/90\text{mm}$ 平皿的密度开始, 过夜培养后吸出培养基, 更换为 10ml 过滤 ($0.45\mu\text{m}$) 的含 $8\mu\text{g/ml}$ polybrene 的 PG13.pBabe.puro。72 小时后吸出培养基, 更换为含 $5\mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素的新鲜培养基。细胞再培养 7 天, 此时所有对照培养物均死亡, 冻存存活细胞的混合群体。

逆转录病毒的产生

PG13 生产细胞用胰蛋白酶消化, 以 $1 \times 10^6/90\text{mm}$ 平皿的密度接种; 72 小时后更换培养基; 24 小时后吸出培养基, 通过 $0.45\mu\text{m}$ 滤器过滤, 进一步处理。FLYRD18 和 FLYA13 以 $2 \times 10^6/90\text{mm}$ 平皿的密度接种, 48 小时和 72 小时后吸出培养基, 更换为新鲜培养基。再过 24 小时后, 吸出含有可使逆转录病毒失能的培养基, 通过 $0.45\mu\text{m}$ 滤器过滤, 进一步处理。

生物素标记的逆转录病毒的产生

细胞的生物素化基本如上所述, 具有对附着细胞的改进^{67, 68}。简言之, 培养 72 小时后, 完全吸出培养基, 用含 0.75mM CaCl_2 和 0.48mM MgCl_2 的 PBS (pH 8.0) 洗涤, 更换为 10ml 新鲜稀释的生物素 SE ($500\mu\text{M}$ 于 PBS pH8.0 + Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 中)。细胞在室温下温育 30 分钟, 之后完全吸出试剂, 更换为新鲜的生长培养基, 细胞放回 3°C 下培养。再过 3-4 小时后, 培养基再次更换为新鲜培养基, 并放回继续

培养 18 小时，之后吸出逆转录病毒上清液。在所有情况中，单独用载体（DMSO）标记的对照都平行处理。

免疫荧光

生物素化的包装细胞培养过夜。收获逆转录病毒后，在凡尔生存在下通过轻轻移液从底层取出细胞，置于 DMEM+10% FCS 中。总共 1×10^6 个细胞在含或不含 $10 \mu\text{g/ml}$ 亲和素-FITC 的 $100 \mu\text{l}$ HBSS+1% FCS 中标记。细胞在室温下温育，洗涤，通过流式细胞分析术分析。

顺磁颗粒的制备

对于 5ml 逆转录病毒上清液，将 2.5ml 顺磁颗粒(PMP) ($5 \times 10^8/\text{ml}$) 置于 15ml 聚丙烯试管中，放到 Dynal MPC-6 磁性颗粒浓缩器中，吸出上清液，PMP 重悬浮于 1ml 过滤除菌的 PBS+0.1% BSA 中，并转移到无菌 1.5ml eppendorf 管中。然后将 PMP 加到 Dynal MPC-E 磁性颗粒浓缩器中，吸出上清液，将 PMP 重悬浮于 0.4ml 过滤除菌的 PBS+0.1% BSA 中，加到 MPC-E 中，吸出上清液。

对于抗体偶联：PMP 重悬浮于 $50 \mu\text{l}$ PBS+0.1% BSA 和 $50 \mu\text{l}$ 2mg/ml 蛋白 A-生物素中。在室温下温育 30 分钟后，PMP 利用 MPC-E 在 PBS+0.1% BSA 中洗涤三次，重悬浮于含 5mg/ml 多克隆 Ig 兔抗小鼠纤连蛋白的 $250 \mu\text{l}$ PBS+0.1% BSA 中。

对于凝集素偶联：PMP 重悬浮于 $100 \mu\text{l}$ 1mg/ml 生物素琥珀酰-伴刀豆球蛋白 A 或 $100 \mu\text{l}$ $500 \mu\text{g/ml}$ 生物素标记的同工凝集素 B₄ (BS-IB₄) 中。对于生物素琥珀酰亚胺酯浓缩和对照未偶联的 PMP：PMP 重悬浮于 $100 \mu\text{l}$ PBS+0.1% BSA 中。

在室温下温育 30 分钟后（定期搅拌），利用 MPC-E 在 $500 \mu\text{l}$ PBS+0.1% BSA 中洗涤所有 PMP 偶联物三次。最后一次洗涤后，将 PMP 重悬浮于希望体积的逆转录病毒上清液中。

PMP 的制备和浓缩：逆转录病毒复合物

常规制备的 1.25×10^9 PMP 重悬浮于无菌聚丙烯管中的 5ml 逆转录病毒上清液中，混合物在恒速搅拌下 4°C 温育（Stuart Scientific SRT1 倾斜旋转混合器）。2.5 小时后，将混合物加到 Dynal MPC-6 上，吸

出上清液,将 PMP 重悬浮于 1ml PBS+0.1% BSA 或 RPMI+0.1% FCS 中(凝集素浓缩)。然后用 MPC-E 再洗涤 PMP 三次, PMP 重悬浮于最小体积的 RPMI+10% FCS 中。堆积体积 1.25×10^9 PMP 可重悬浮于 20 μ l RPMI+10% FCS 中,产生 40 μ l 的终体积(5ml:40 μ l, 125 倍体积),然后进一步处理。

cfu/ml 滴度的测定

计数 K562 细胞悬液,用含有 4.4 μ g/ml polybrene 的 RPMI+10% FCS 调节为 4×10^5 /ml。然后将细胞以 1ml 等份接种于 24 孔细胞培养板中,在 37 $^{\circ}$ C/5% CO₂ 下温育 1-3 小时。逆转录病毒制品用 RPMI+10% FCS 1:10 连续稀释,将 100 μ l 加入一式三份孔中充分混合。18-24 小时后,0.9ml 细胞与 3.8ml RPMI + 24% FCS + 1.3mM 丙酮酸钠混合,保持于 37 $^{\circ}$ C 下,随后加入 0.3ml 高压灭菌的 5% 纯净琼脂(终浓度为 0.3%),保持于 60 $^{\circ}$ C。细胞然后接种于 60mm 组织培养皿中,使琼脂凝固后,置于 37 $^{\circ}$ C/5% 下。再过 48 小时后,小心加入 5ml RPMI+20% FCS+1mM 丙酮酸钠(含有 10 μ g/ml 嘌呤霉素),使软琼脂选择浓度为 5 μ g/ml 嘌呤霉素。平皿再放回培养 2-3 周,之后测量软琼脂集落数。cfu/ml 浓度计算为每个平皿的集落数/孔乘以稀释倍数。在所有 cfu/ml 测定中进行倍数稀释,尽管大多数是没有价值,含有太少或太多的集落而无法精确计数(即多于 300/60mm 平皿)。

附着的 HeLa 细胞用胰蛋白酶消化,计数,并调节为 1×10^5 /ml(需要时用 RPMI+10% FCS 或 DMEM+10% FCS),然后以 0.5ml 等份接种于 24 孔细胞培养板中。温育 18 小时后(37 $^{\circ}$ C/5%),感染 1-3 小时前,加入另外 0.5ml 含 polybrene 的培养基,使终浓度为 4.4 μ g/ml。

逆转录病毒在 RPMI+10% FCS 中进行 1:10 连续稀释,向靶细胞中一式三份加入 100 μ l 等份的适当稀释液,并混合。感染 48 小时后,将培养基更换为含有 5 μ g/ml 嘌呤霉素的新鲜培养基。每 3-4 天更换一次培养基,持续 2 周,之后吸出培养基,培养板用 2ml 考马斯蓝染液染色(5.35% wt/vol 溶于 45% 甲醇:10% 乙酸),用自来水洗涤,计数集落,测定滴度。

冻融逆转录病毒制品

未浓缩的对照逆转录病毒以 2-5ml 等份置于 -20°C 下冷冻。通过加入 3 倍体积的标准冷冻混合物（10% DMSO, 20% FCS, 终 DMSO 浓度为 7.5%）并置于 -20°C 下，冷冻浓缩的 PMP 捕获的逆转录病毒。尽可能快地融化逆转录病毒制品，取出一等份进行检测，剩余的放回 -20°C 下。

逆转录病毒感染的磁性增强

HeLa 细胞以 2×10^6 细胞/90mm 平皿的密度接种，并在 37°C 下培养过夜。在感染之前，需要的磁性模型（从 Bisiflex II 片上切下）放置到（tap to）培养皿下面，培养基也调节为 $4 \mu\text{g/ml}$ polybrene, 2-4 小时后在 5ml 新鲜培养基中加入生物素化 PG13 产生的逆转录病毒载有的 7.5×10^6 磁性颗粒。然后在室温下搅拌（40 圈/分钟）培养物 30 分钟（the Belly Dancer, Stovall Life Sciences Inc, Greenboro, NC, USA），之后将培养物置于 37°C 。24 小时后取出磁体，更换培养基，并将培养物放回 37°C 。总共感染 48 小时后，将培养基调节为 $5 \mu\text{g/ml}$ 嘌呤霉素，每日更换培养基后（保持药物筛选），培养物用考马斯蓝染液（5.35% wt/vol 溶于 45% 甲醇:10% 乙酸）染色（开始选择 72 小时后）。

参考文献

- 1 Miller AD, Rosman GJ. *Biotechniques* 1989; 8: 980-990.
- 2 Riviere I, Brose K, Mulligan RC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995 92: 6733-6737.
- 3 Miller AD et al. *J. Virol.* 1991; 65: 2220-2224.
- 4 Ory DS, Neugeboren BA, Mulligan RC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 11400-11406.
- 5 Cosset F-L et al. *J. Virol.* 1995; 69: 7430-7436.
- 6 Burns JC et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 8033-8037.
- 7 Kozak SL, Kabat D. *J. Virol.* 1990; 64: 3500-3508
- 8 Parente MK, Wolfe JH. *Gene Therapy* 1996; 3: 756-760.
- 9 Kotani H et al. *Hum. Gene Ther.* 1994; 5: 19-28
- 10 Bunnell BA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 7739-7743.
- 11 Olsen JC, Sechelski J. *Hum. Gene Ther.* 1995; 6: 1195-1202.
- 12 Manning JS, Hackett AJ, Darby-Jr NB. *Appl. Microbiol.* 1971; 22: 1162-1163.
- 13 Toyoshima K, Vogt PK. *Virology* 1969; 38: 414-426

-
- 14 Porter CD et al. *J. Virol.* 1998; 72: 4832-4840.
 - 15 Chuck AS, Clarke MF, Palson BO. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7: 1527-1534.
 - 16 Hanenberg H et al. *Nature Med.* 1996; 2: 876-882.
 - 17 Paul RW et al. *Hum. Gene Ther.* 1993; 4: 609-615.
 - 18 Miller DL, Meikle PJ, Anson DS. *Nucl. Acids Res.* 1996 24: 1576-1577.
 - 19 Chu T-HT, Dornburg R. *J. Virol.* 1997; 71: 720-725.
 - 20 Olsen JC, Johnson LG, Yankaskas JR. In: Robbins P (ed). *Gene Therapy Protocols*. Humana Press:New Jersey, 1997, pp153-168
 - 21 Morling FJ, Russell SJ. *Gene Therapy* 1995; 2: 504-508.
 - 22 LeDoux JM, Morgan JR, Snow RG, Yarmush ML. *J. Virol.* 1996; 70: 6468-6473.
 - 23 Russell SJ. In: Collins MKL (ed). *Methods in Molecular Biology: Vol 8 Practical Molecular Virology*. Humana Press:New Jersey, 1991, pp29-48
 - 24 Bowles NE et al. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7: 1735-1742.
 - 25 Seppen J, Kimmel RJ, Osborne WRA. *Biotechniques.* 1997; 23: 788-790.
 - 26 McNeish IA et al. *Gene Therapy* 1998; 5: 1061-1069.

-
- 27 Liu M-L, Winther BL, Kay MA. *J. Virol.* 1996; **70** :2497-2502.
- 28 Palson B, Andreadis S. *Exp. Haem.* 1997; **25**: 94-102.
- 29 Morgan JR et al. *J. Virol.* 1995; **69**: 6994-7000.
- 30 Gäken J et al. (submitted for publication)
- 31 Dardalhon V et al. *Hum. Gene Therap.* 1999; **10**: 5-14
- 32 Signas C et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989; **86**: 699-703.
- 33 Jonsson K et al. *Eur. J. Biochem.* 1991; **202**: 1041-1048.
- 34 Shantz EM. PANSORBIN, Calbiochem:1994.
- 35 Freeman GT et al. *J. Immunol.* 1989; **143**: 2714-2722.
- 36 Spear GT et al. *J. Immunol.* 1995; **155**: 4376-4381.
- 37 Balliet JW, Bates P. *J. Virol.* 1998; **72**: 671-676.
- 38 Izumi M et al. *Exp. Cell Res.* 1991; **197**: 229-233
- 39 Markowitz D, Goff S, Bank A. *Virology* 1988; **167**: 400-406.
- 40 Miller AD, Buttimore C. *Mol. Cell Biol.* 1986; **6**: 2895-2902
- 41 Markowitz D, Goff S, Bank A. *J. Virol.* 1988; **62**: 1120-

1124.

42 Kayman SC et al. *J. Virol.* 1999; 73: 1802-1808.

43 Daley GQ, Baltimore D. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85: 9312-9316.

44 Vercellotti GM et al. *Am. J. Path.* 1985; 120: 13-21.

45 Jordan-Sciutto KL et al. *Exp. Cell Res.* 1997; 236: 527-536.

46 Dean DC, Newby RF, Bourgeois S. *J. Cell Biol* 1988; 106: 2159-2170.

47 Gerin PA et al. *Hum. Gene Therap.* 1999 10: 1965-1974

48 Touhami M, Bourge J-F, Legrand C. *Brit. J. Haem.* 1999; 104: 706-714.

49 Bansal SC et al. *Cancer* 1978; 42: 1-18.

50 Cowan FM. *Toxicol. Meth.* 1997; 7: 9-15.

51 Steele G, Ankerst J, Sjogren HO. *Int. J. Cancer* 1974; 14: 83-92.

52 Fennelly DW et al. *Cancer* 1995; 75: 2099-2102.

53 Messerschmidt GL et al. *Semin. Haem.* 1989; 26 (suppl 1): 19-24.

54 Engelman RW, Good RA, Day NK. *Cancer Detect. Prev.* 1987; 10: 435-444.

- 55 Snyder HW, Reed DE, Jones FR. *Semin. Haem.* 1989; 26 (suppl 1): 25-30.
- 56 Darling, D., Hughes, C. Galea-Laun, J. Gäken, J. Trayner, ID., Kuiper, M and Farzaneh F. 2000 *Gene. Therapy* (in press).
- 57 Takeuchi, Y., Porter, C. D., Strahan, K.M. Preece, A. F., Gustafsson, K. Cosset, F-L. et al. *Nature*, 1996, 379:85-88.
- 58 Larsen, R. D., et al 1990, *J. Biol. Chem*, 265: 7055-7061.
- 59 Chuck AS, Clarke MF, Palson BO. *Hum. Gene Ther.* 1996; 7: 1527-1534.
- 60 Galili, U. and Swanson, K. 1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88: 7401-7404.
- 61 Wood, et al *Arch. Biochem. Biophys.* 1979, vol 198 p1
- 62 Reeke G. N. *Ann NY Acad Sci* vol. 234, 369 1974
- 63 Animashshaun, T. et al 1993, *Antivir. Che. Chemotherap.* 4: 145-153
- 64 Gilbert, M. 1993. *J. Virol. Meth* 42: 1-12
- 65 Hayakawa, T. et al 1998. *J. Med. Virol.* 56: 327-331
- 66 Cosset, F. L. et al 1995, *J. Virol.* 69: 7430-7436
- 67 Yu, H. et al 1998 *Virology* 243: 415-422
- 68 Spies C. P. and Compans R.W. 1993 *J. Virol.* 67: 6535-6541

图1

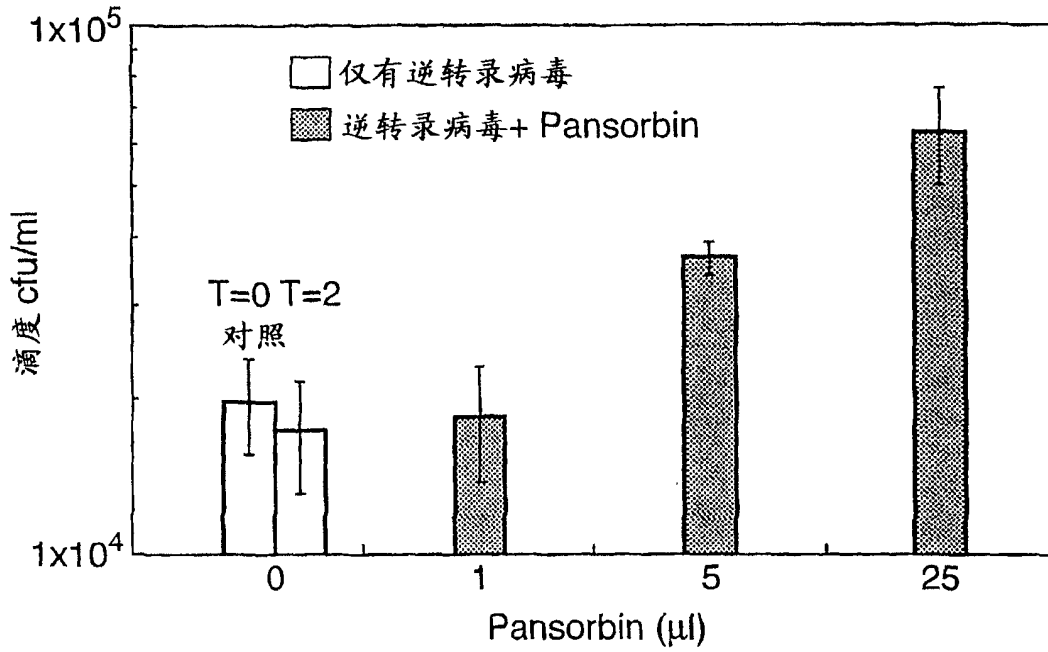


图2

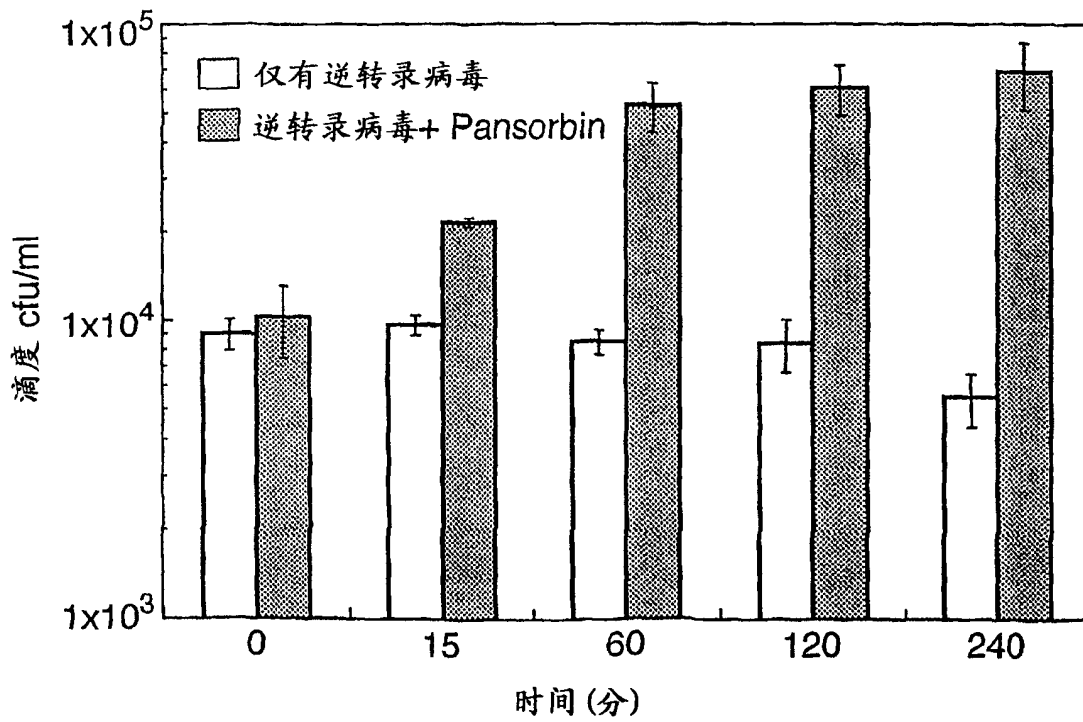


图 3

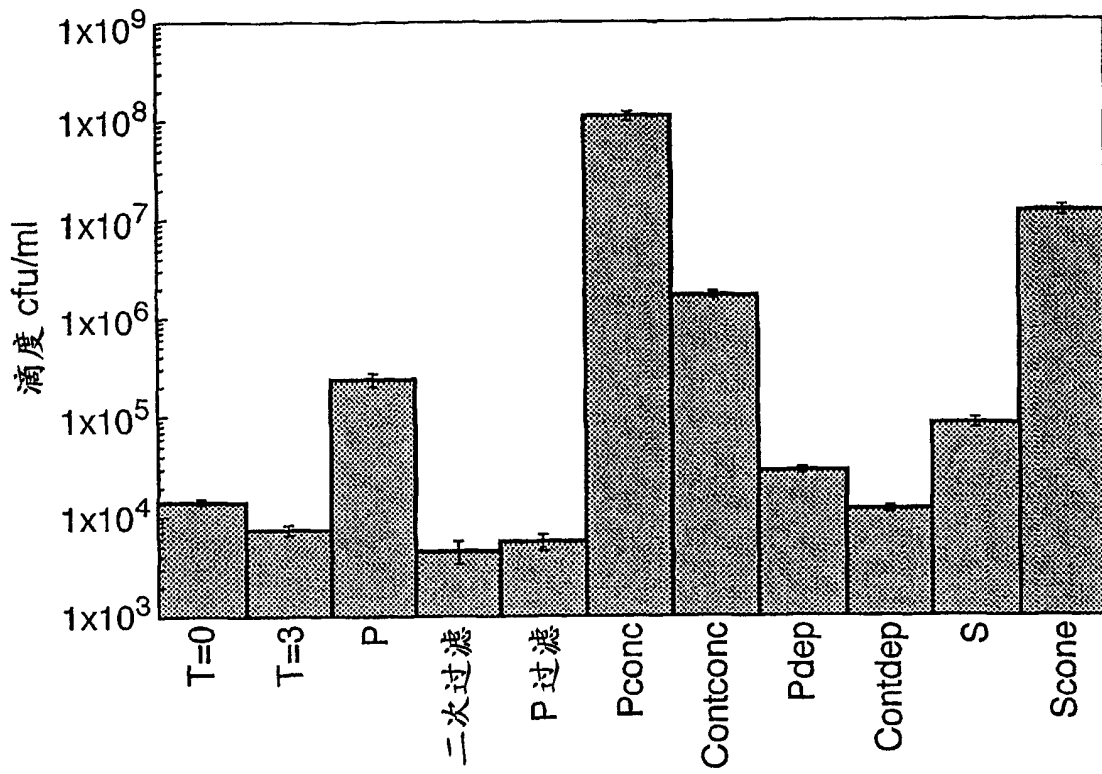


图 4

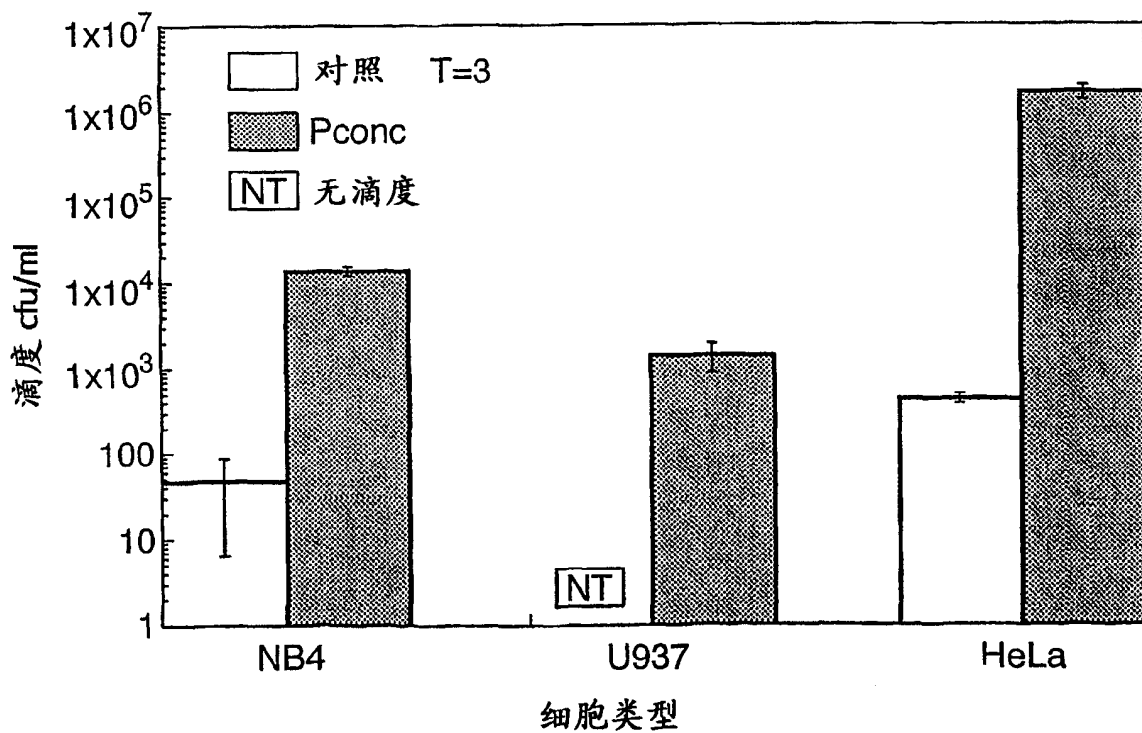


图5

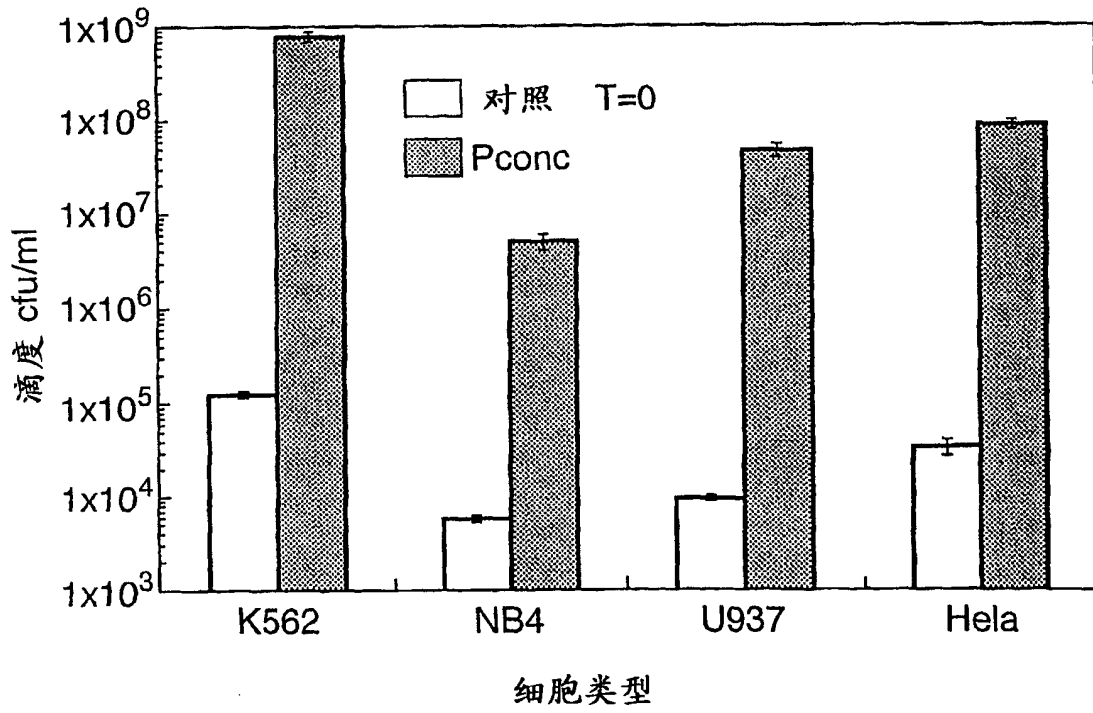


图6

包装细胞	载体	靶细胞	对照滴度 (cfu/ml)	Pansorbin 浓缩物滴度 (cfu/ml)	体积减少	滴度 增加
GP+env AM12	pWZLIL-2/B7M	K562	580±174	$2.3 \times 10^5 \pm 7.5 \times 10^4$	50x	396x
PA317	pWZLIL-2/B7M	K562	7200±1400	$1.16 \times 10^6 \pm 2.4 \times 10^5$	50x	152x
FLYRD18	pBabe.puro	K562	5630±1050	$6.8 \times 10^4 \pm 5 \times 10^3$	250x	12x
FLYA13	pBabe.puro	K562	473±47	$6.4 \times 10^4 \pm 4.3 \times 10^3$	250x	135x
PG13	pBabe.puro	K562	$1.6 \times 10^5 \pm 6.8 \times 10^3$	$5.6 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$	200x	3500x
GP+E-86	pBabe.puro	32Dp210	153±40	$2 \times 10^4 \pm 5.3 \times 10^3$	166x	130x

图7

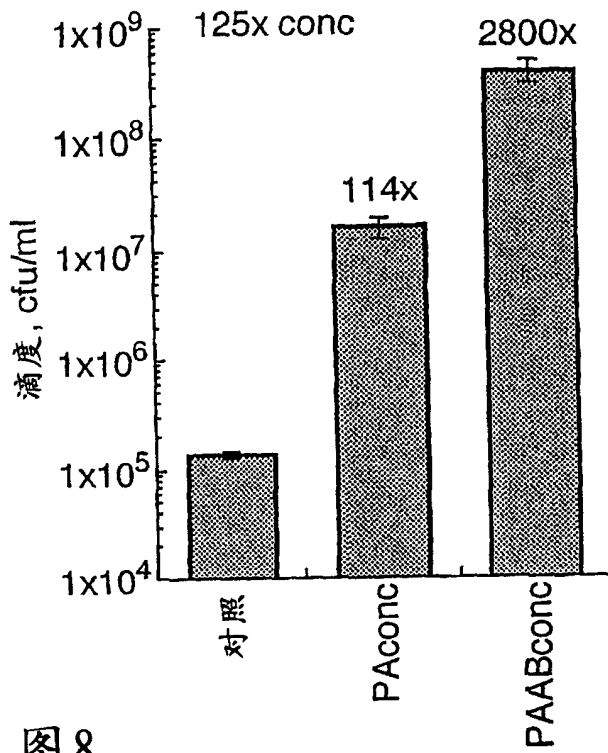


图8

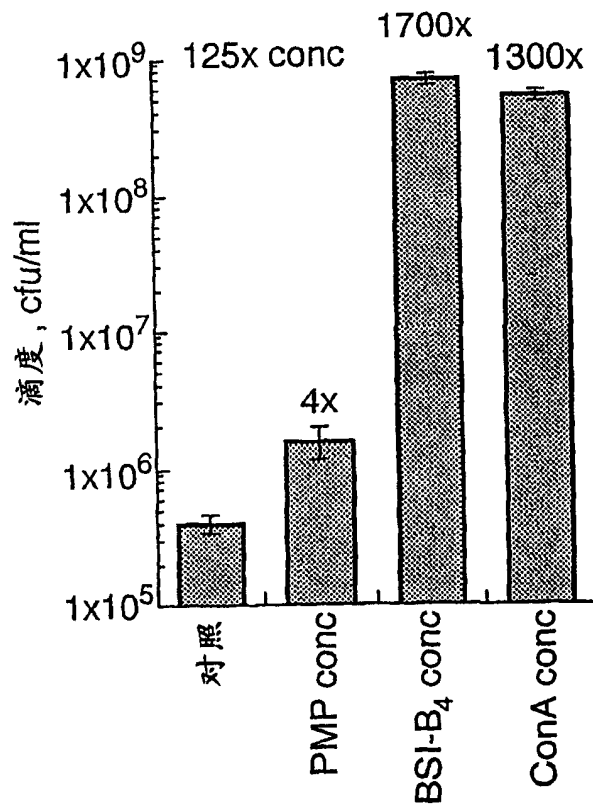


图9

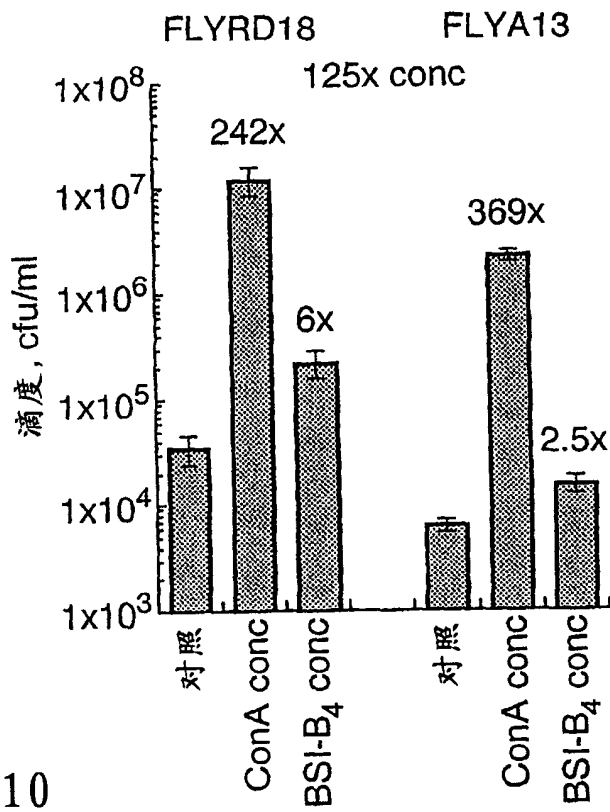


图10

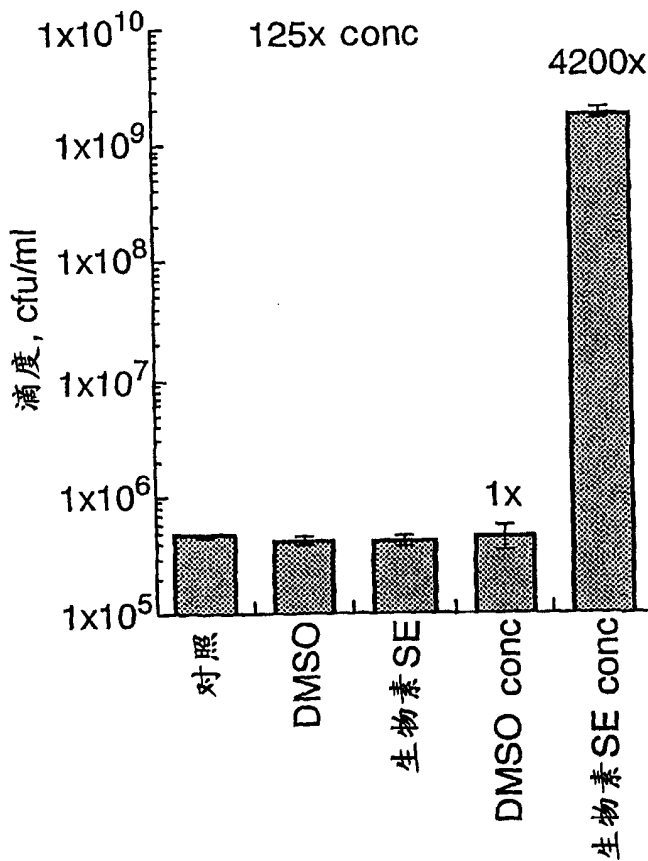


图 10b

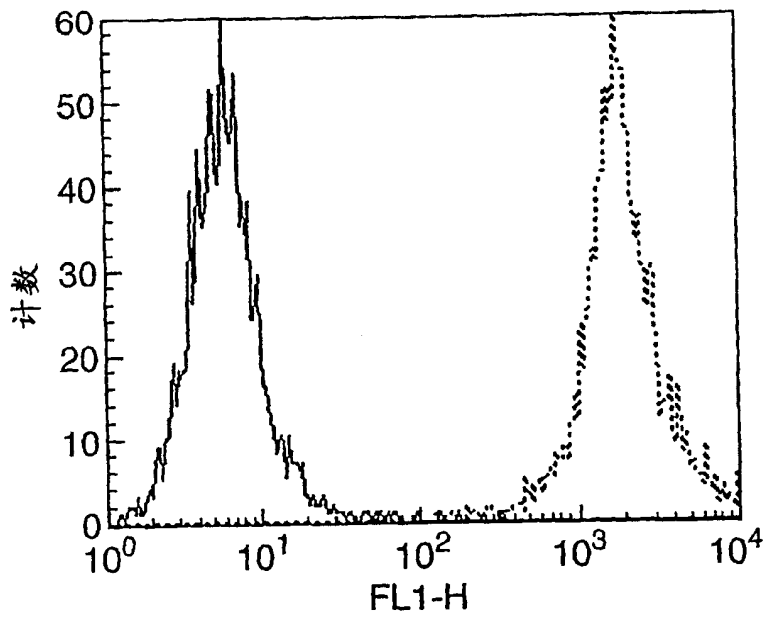


图 11

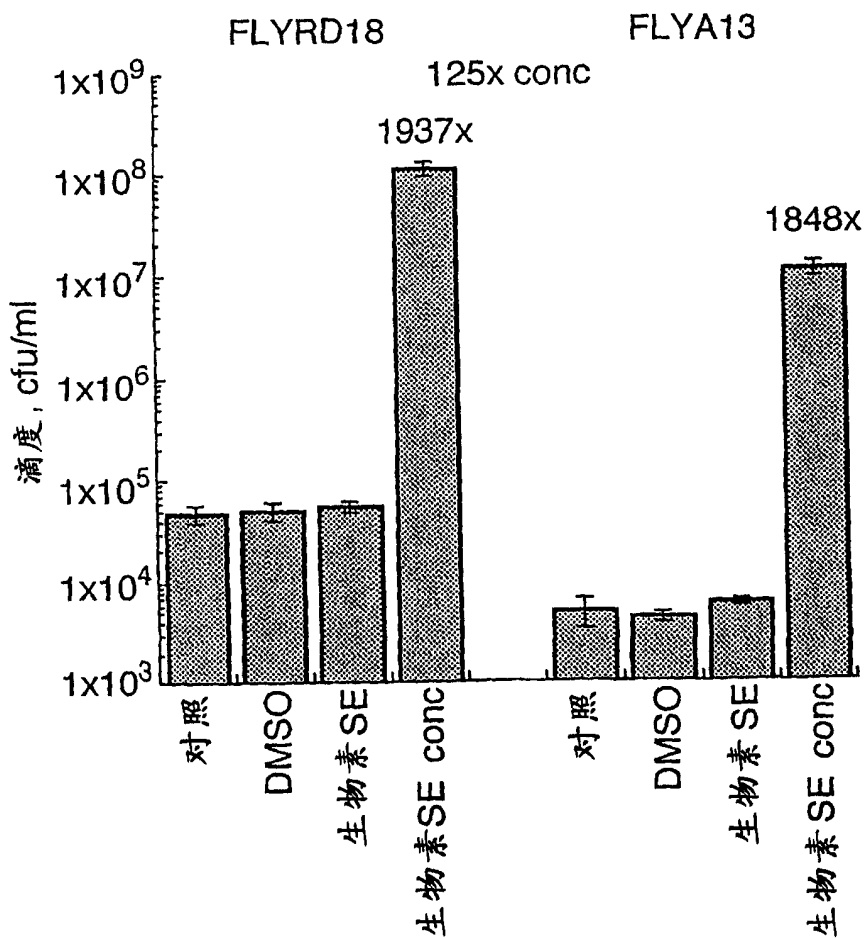


图12

浓缩策略	新鲜滴度	冻融1次 滴度	% 剩余	冻融2次 滴度	% 剩余
未浓缩的 α 纤连蛋白 conc	$1.4 \times 10^5 \pm 9 \times 10^3$ $4 \times 10^8 \pm 9.5 \times 10^7$	$1.6 \times 10^4 \pm 3.5 \times 10^3$ $1.6 \times 10^8 \pm 2.2 \times 10^7$	11.5 40	$8.3 \times 10^3 \pm 1.4 \times 10^3$ $1.4 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7$	5.8 35
未浓缩的 ConA conc BSI-B ₄ conc	$5 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^4$ $9 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^8$ $7.9 \times 10^8 \pm 1 \times 10^8$	$4.2 \times 10^4 \pm 4.9 \times 10^3$ $2.7 \times 10^8 \pm 1.1 \times 10^7$ $4.5 \times 10^8 \pm 5.6 \times 10^7$	8.3 30 56	$7.6 \times 10^3 \pm 7.7 \times 10^2$ $1.95 \times 10^8 \pm 2.9 \times 10^7$ $3.9 \times 10^8 \pm 3.7 \times 10^7$	1.5 21 49
未浓缩的 生物素 SE conc	$2.5 \times 10^5 \pm 3.8 \times 10^4$ $1.6 \times 10^9 \pm 7.2 \times 10^7$	$5.3 \times 10^4 \pm 1.5 \times 10^4$ $9.6 \times 10^8 \pm 2.1 \times 10^8$	21 60	$5.3 \times 10^3 \pm 1.3 \times 10^3$ $1.1 \times 10^9 \pm 6.9 \times 10^7$	2 68

图13

