



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108026593 A

(43)申请公布日 2018.05.11

(21)申请号 201680042304.1

(22)申请日 2016.05.16

(30)优先权数据

62/163,327 2015.05.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.18

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/032767 2016.05.16

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/187151 EN 2016.11.24

(71)申请人 卡琳缪恩股份有限公司

地址 美国亚利桑那州

申请人 卡琳缪恩澳大利亚私人有限公司

圣文森特医院悉尼有限公司

新南创新私人有限公司

(72)发明人 K·铃木 A·D·凯莱赫

G·P·西蒙兹

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所

(普通合伙) 44240

代理人 金辉

(51)Int.Cl.

C12Q 1/70(2006.01)

A61K 48/00(2006.01)

权利要求书5页 说明书40页

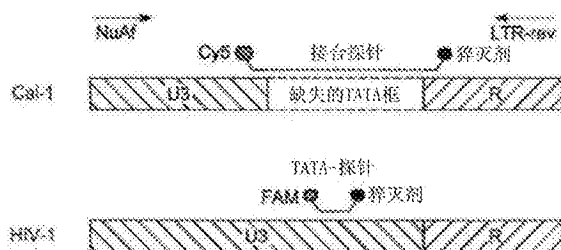
序列表5页 附图38页

(54)发明名称

区分HIV-1与慢病毒载体的方法

(57)摘要

本公开提供了特别用于检测和/或定量样品诸如衍生自HIV或慢病毒载体的那些中的核酸的组合物(即扩增引物和探针)、方法和试剂盒。



1. 一种组合物, 包含: (a) 探针、(b) 正向引物以及 (c) 反向引物, 所述探针包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的核苷酸序列, 所述探针缀合于报道子成分, 所述正向引物包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的核苷酸序列, 所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列; 其中正向和反向引物的每一个能够退火至靶序列以扩增所述靶序列。

2. 根据权利要求1所述的组合物, 其中所述报道子成分选自Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas红-X、Tamara或Yakima黄。

3. 一种组合物, 包含: (a) 探针、(b) 正向引物以及 (c) 反向引物, 所述探针包含与SEQ ID NO:10具有至少80%同一性的核苷酸序列, 所述探针缀合于报道子成分, 所述正向引物包含与SEQ ID NO:2具有至少80%同一性的核苷酸序列, 所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列; 其中正向和反向引物的每一个能够退火至靶序列以扩增所述靶序列。

4. 根据权利要求3所述的组合物, 其中所述报道子成分选自Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas红-X、Tamara或Yakima黄。

5. 一种组合物, 包含: (a) 探针、(b) 正向引物以及 (c) 反向引物, 所述探针包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的核苷酸序列, 所述探针缀合于报道子成分, 所述正向引物包含与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的核苷酸序列, 所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列; 其中正向和反向引物的每一个能够退火至靶序列以扩增所述靶序列。

6. 根据权利要求5所述的组合物, 其中所述报道子成分选自Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas红-X、Tamara或Yakima黄。

7. 一种用于区分样品中的慢病毒核酸和HIV核酸的试剂盒, 所述试剂盒包含权利要求1所述的组合物和权利要求3或5所述的组合物。

8. 一种用于定量第一靶序列的方法, 包括将包含所述第一靶序列的第一样品与权利要求1的组合物中的探针和引物相接触; 使用所述第一靶序列作为模板实施实时聚合酶链式反应; 以及定量所产生的第一扩增子的量。

9. 根据权利要求8所述的方法, 进一步包括定量第二靶序列, 包括将包含所述第二靶序列的第二样品与权利要求2或3的的组合物中的探针和引物相接触; 并使用所述第二靶序列作为模板实施实时聚合酶链式反应; 以及定量所产生的第二扩增子的量。

10. 根据权利要求9所述的方法, 所述第一和第二样品来自于相同的来源, 并且其中所述第一和第二靶序列的定量发生在单个反应室内。

11. 根据权利要求9所述的方法, 所述第一和第二样品来自于相同的来源, 并且其中所述第一和第二靶序列的定量发生在各自的反应室内。

12. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述第一靶序列为慢病毒核酸序列且其中所述第二靶序列为HIV核酸序列。

13. 根据权利要求9所述的方法, 其中定量所产生的第一扩增子的量的步骤包括检测来自第一报道子成分的信号; 并且其中定量所产生的第二扩增子的量的步骤包括检测来自第二报道子成分的信号, 其中所述第一和第二报道子成分不同。

14. 根据权利要求13所述的方法, 进一步包括通过进行以下比较而评估从慢病毒载体

的转基因的效力：(i) 在第一时间点产生的第一扩增子的测定量与产生的第二扩增子的测定量的第一比例；(i i) 在第二时间点产生的第一扩增子的测定量与产生的第二扩增子的测定量的第二比例；其中慢病毒核酸对HIV核酸增加的比例为治疗效力的指征。

15. 根据权利要求8所述的方法，其中所述第一靶序列和所述第二靶序列为独立的DNA或RNA。

16. 一种检测样品中的慢病毒核酸和/或HIV核酸的方法，所述方法包括：(a) 使用以下物质，用样品中的慢病毒核酸模板和HIV核酸模板实施多重实时PCR，(i) 具有与SEQ ID NO: 2具有至少80%同一性的核苷酸序列的第一正向引物，具有与SEQ ID NO: 6具有至少80%同一性的核苷酸序列的第一反向引物，以及具有与SEQ ID NO: 14具有至少80%同一性的核苷酸序列的第一探针，所述第一探针具有第一报道子成分；(i i) 具有与SEQ ID NO: 2具有至少80%同一性的核苷酸序列的第二正向引物，具有与SEQ ID NO: 6具有至少80%同一性的核苷酸序列的第二反向引物，以及具有与SEQ ID NO: 10具有至少80%同一性的核苷酸序列的第二探针，所述第二探针具有第二报道子成分，其中第一和第二报道子成分不同；(b) 检测通过以下产生的扩增子：(i) 第一正向和反向引物，以及(i i) 第二正向和反向引物；并且其中检测包括检测来自第一和第二报道子成分的第一和第二信号。

17. 一种检测样品中的慢病毒核酸和/或HIV核酸的方法，所述方法包括：(a) 使用以下物质，用样品中的慢病毒核酸模板和HIV核酸模板实施多重实时PCR，(i) 具有与SEQ ID NO: 2具有至少80%同一性的核苷酸序列的第一正向引物，具有与SEQ ID NO: 6具有至少80%同一性的核苷酸序列的第一反向引物，以及具有与SEQ ID NO: 14具有至少80%同一性的核苷酸序列的第一探针，所述第一探针具有第一报道子成分；(i i) 具有与SEQ ID NO: 4具有至少80%同一性的核苷酸序列的第二正向引物，具有与SEQ ID NO: 6具有至少80%同一性的核苷酸序列的第二反向引物，以及具有与SEQ ID NO: 8具有至少80%同一性的核苷酸序列的第二探针，所述第二探针具有第二报道子成分，其中第一和第二报道子成分不同；(b) 检测通过以下产生的扩增子：(i) 第一正向和反向引物，以及(i i) 第二正向和反向引物；并且其中检测包括检测来自第一和第二报道子成分的第一和第二信号。

18. 一种检测样品中的慢病毒核酸的量的方法，包括：(a) 将样品与第一正向引物和第一反向引物相接触；(b) 将样品与特异于慢病毒核酸的3' LTR内的接合位点的接合探针相接触，其中所述接合探针包括能够与慢病毒核酸3' LTR的U3区域内的至少一部分序列杂交的第一部分和能够与慢病毒核酸3' LTR的R区域内的至少一部分序列杂交的第二部分，并且其中所述接合探针包括第一可检测成分；以及检测来自第一可检测成分的信号。

19. 根据权利要求18所述的方法，其中接合探针的第一部分同与SEQ ID NO: 12具有至少80%同一性的核苷酸序列杂交。

20. 根据权利要求18所述的方法，其中接合探针的第二部分与SEQ ID NO: 13的核苷酸序列杂交。

21. 根据权利要求18所述的方法，其中接合探针包含与SEQ ID NO: 14具有至少80%同一性的核苷酸序列。

22. 根据权利要求18所述的方法，其中接合探针包含与SEQ ID NO: 14具有至少90%同一性的核苷酸序列。

23. 根据权利要求18所述的方法，进一步包括检测样品中的HIV核酸的量。

24. 根据权利要求23所述的方法,对样品中的慢病毒核酸的量和HIV核酸的量的检测发生在相同的反应管内。

25. 根据权利要求24所述的方法,HIV核酸的量的检测包括将样品与特异于HIV核酸序列的3' LTR内的TATA-框序列的第二探针相接触,第二探针缀合与第二可检测成分;以及检测来自第二可检测成分的信号。

26. 根据权利要求26所述的方法,其中第二探针具有与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的核苷酸序列。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中第一正向引物为NuAf引物且第一反向引物为LTR-rev引物。

28. 根据权利要求27所述的方法,NuAf引物具有SEQ ID NO:2的序列。

29. 根据权利要求27所述的方法,LTR-rev引物具有SEQ ID NO:6的序列。

30. 根据权利要求23所述的方法,其中对样品中的慢病毒核酸的量和HIV核酸的量的检测发生在不同的反应管内。

31. 根据权利要求30所述的方法,其中HIV核酸的量的检测包括将样品与第二正向引物、第二反向引物和第二探针相接触,第二探针具有与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的核苷酸序列,其中第二探针包括第二可检测成分;以及检测来自第二可检测成分的信号。

32. 根据权利要求31所述的方法,其中第二正向引物与SEQ ID NO:3的核苷酸序列杂交。

33. 根据权利要求31所述的方法,其中第二探针包含与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的核苷酸序列。

34. 根据权利要求31所述的方法,其中第二反向引物包含SEQ ID NO:6的序列。

35. 一种检测样品中的慢病毒核酸的方法,包括:(a)将样品与第一正向引物 and 第一反向引物相接触;(b)将样品与特异于慢病毒核酸的3' LTR内的接合位点的接合探针相接触,其中慢病毒核酸3' LTR不包含TATA-框序列,且其中接合位点横跨慢病毒核酸3' LTR的一部分U3区域和慢病毒核酸3' LTR的一部分R区域,且其中所述接合探针的至少一部分与SEQ ID NO:13的核苷酸序列杂交。

36. 根据权利要求35所述的方法,进一步包括将样品与特异于HIV核酸序列的3' LTR内的TATA-框序列的第二探针相接触,第二探针具有第二可检测成分,其中第一和第二可检测成分不同;以及检测来自第二可检测成分的信号。

37. 根据权利要求35所述的方法,进一步包括将样品与第二正向引物、第二反向引物和第二探针相接触,第二探针具有与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的核苷酸序列,其中第二探针包括第二可检测成分,其中第一和第二可检测成分不同;以及检测来自第二可检测成分的信号。

38. 一种定量样品中的慢病毒核酸的量和HIV核酸的量的方法,慢病毒核酸和HIV核酸包含不同的3' LTR,所述方法包括用正向引物和反向引物扩增慢病毒核酸和HIV核酸两者,所述正向引物与慢病毒核酸的3' LTR和HIV核酸的3' LTR两者内的序列杂交,所述反向引物与慢病毒核酸的3' LTR和HIV核酸的3' LTR两者内的序列杂交,且其中慢病毒核酸和HIV核酸两者的扩增发生在单个反应管内。

39. 根据权利要求38所述的方法,其中慢病毒核酸的3' LTR比HIV核酸的3' LTR少包含至

少50个核苷酸。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中慢病毒核酸的3' LTR不包含TATA-框序列。

41. 根据权利要求39所述的方法,其中扩增产生具有第一大小的慢病毒核酸扩增子和具有第二大小的HIV核酸扩增子,其中,慢病毒核酸的扩增子小于HIV核酸的扩增子。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中使用电泳分离慢病毒核酸扩增子和HIV核酸扩增子。

43. 根据权利要求38所述的方法,其中慢病毒核酸3' LTR包含具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列的U3区域。

44. 根据权利要求38所述的方法,其中HIV核酸3' LTR包含具有SEQ ID NO:16的核苷酸序列的U3区域。

45. 通过从包含慢病毒核酸的样品用一对引物扩增而能够获得的扩增子,所述引物具有SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:6,所述扩增子包含3' LTR,所述3' LTR不包含TATA-框序列。

46. 分离的核苷酸序列,包含与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的核苷酸序列。

47. 根据权利要求46所述的分离的核苷酸序列,其中所述序列缀合于可检测的成分。

48. 分离的核苷酸序列,包含与SEQ ID NO:15具有至少90%同一性的核苷酸序列。

49. 分离的核苷酸序列,包含与SEQ ID NO:14具有至少70%同一性且能够与SEQ ID NO:15的核苷酸序列的片段杂交的核苷酸序列。

50. 具有第一部分和第二部分的分离的核酸序列,所述第一部分能够与SEQ ID NO:12具有至少70%同一性的核苷酸序列杂交,所述第二部分能够与SEQ ID NO:13的核苷酸序列杂交。

51. 根据权利要求50所述的分离的核苷酸序列,其中所述序列缀合于可检测的成分。

52. 分离的核苷酸序列,包含与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的核苷酸序列。

53. 根据权利要求52所述的分离的核苷酸序列,其中所述序列缀合于可检测的成分。

54. 分离的核苷酸序列,包含与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的核苷酸序列。

55. 根据权利要求54所述的分离的核苷酸序列,其中所述序列缀合于可检测的成分。

56. 一种治疗HIV阳性患者的方法,包括:

(i) 从患者获取细胞;

(ii) 用Ca1-1慢病毒载体在有利于摄取Ca1-1进入细胞的条件下处理获取的细胞;

(iii) 测定处理的细胞是否存在基因修饰;

(iv) 如果测定细胞基因修饰的存在为阳性,对患者给予处理的细胞。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中评估基因修饰是否存在的步骤包括检测处理的细胞内的结合位点。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中接合位点的检测包括将样品与接合探针相接触,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的核苷酸序列。

59. 根据权利要求56所述的方法,其中基因修饰的检测在DNA或RNA水平上实施。

60. 一种测定基于HIV的重组载体对患者的治疗效力的方法,包括:

(i) 从患者获取细胞;

(ii) 用Ca1-1慢病毒载体在有利于摄取Ca1-1进入获取的细胞的条件下处理获取的细胞;

(iii) 在第一时间点测定存在于获取的细胞中的野生型HIV核酸的水平；  
(iv) 在第二时间点测定存在于获取的细胞中的野生型HIV核酸的水平，  
(v) 在第一时间点测定存在于获取的细胞中的Ca1-1核酸的水平；  
(vi) 在第二时间点测定存在于获取的细胞中的Ca1-1核酸的水平，  
其中如权利要求16和17中任一项实施对Ca1-1核酸和野生型HIV核酸的水平的测定；以及

其中在第二时间点的较低水平的野生型HIV核酸和较高水平的Ca1-1核酸为Ca1-1治疗有效的指征。

61. 根据权利要求6所述的方法，其中在附加的时间点重复进行步骤(iii)至(vi)。

62. 一种检测样品中的慢病毒RNA的量的方法，包括：(a) 将慢病毒RNA转换为cDNA；(b) 将样品与第一正向引物与第一反向引物相接触；(c) 将样品与特异于慢病毒核酸的3' LTR内的接合位点的接合探针相接触；其中所述接合探针包括能够与慢病毒核酸3' LTR的U3区域内的至少一部分序列杂交的第一部分和能够与慢病毒核酸3' LTR的R区域内的至少一部分序列杂交的第二部分，并且其中所述接合探针包括第一可检测成分；以及检测来自第一可检测成分的信号。

63. 根据权利要求61所述的方法，进一步包括检测在其之中的HIV核酸的量，其中HIV核酸为DNA或RNA。

## 区分HIV-1与慢病毒载体的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年5月18日提交的美国临时专利申请No. 62/163,327的权益,在此该申请的全部内容通过引用并入本文。

### 技术领域

[0003] 本公开总体上涉及分子生物学和病毒学领域。具体地,本公开涉及区分HIV-1与慢病毒载体的方法。

[0004] 工业实用性的声明

[0005] 本公开在基因治疗和药物诊断领域具有工业实用性。

### 背景技术

[0006] HIV-1是获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的病原体,其在全球范围内具有三千万量级的感染个体。HIV引起免疫系统失灵并增加了机会性感染导致死亡的可能性。HIV感染是一个主要的全球健康问题,这可以从世界卫生组织已将其归为流行性疾病来证实。很多感染了HIV的人,特别是在发展中国家,最终发展为每年夺走多于一百万人生命的AIDS。

[0007] HIV-1属于病毒的逆转录病毒家族,并且为其基因组是由两条单链RNA分子(ssRNA)组成的包膜病毒。HIV-1的主要靶标是CD4+表达细胞,诸如CD4+ T细胞。HIV-1病毒的糖蛋白与靶细胞的CD4分子和靶细胞表面上的趋化因子共受体、CCR5或CXCR4相互作用。融合并进入靶细胞后,包含病毒基因组的病毒粒子解离,释放包括ssRNA的病毒的内容物进入细胞质中。HIV-1的逆转录(RT)酶从ssRNA基因组合成病毒的双链DNA(dsDNA)。在双链HIV-1 DNA分子合成之后,将HIV-1 DNA整合进宿主基因组。

[0008] 整合的HIV-1 DNA侧翼具有相同的5' 和3' 长的末端重复序列(LTR),HIV-1可以从其启动整合的HIV-1基因组的转录。病毒DNA的转录需要转录因子,如NF- $\kappa$ B,其在活化的T细胞中上调。因此,病毒转录在T细胞活化后的T细胞中是最活跃的,例如在感染期间。随后将整合的HIV-1基因组的转录产生的病毒RNA翻译并包装成病毒颗粒,然后该病毒颗粒离开细胞成为感染性病毒。

[0009] HIV-1感染的治疗包括联合抗逆转录病毒疗法(cART)。包括核苷类似物逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、非核苷逆转录酶抑制剂、整合酶和融合抑制剂的组合的cART可减缓HIV进展。这反过来在世界上有治疗的地区大大降低了HIV/AIDS的发病率和死亡率。然而,cART不能治愈或完全消除HIV/AIDS的所有症状。另外,cART治疗可被耐药突变损害,并且有可能严重并且似乎是累积的一系列副作用。进一步地,cART治疗的中断几乎总是导致可检测的病毒复制的再次出现和进展为AIDS,并且已显示与所有死亡原因和严重的非AIDS事件的发病率增加有关。由于这些原因,以及cART的高成本和严格遵守的需要,这种治疗对于大量若干患者可能相对无效。

[0010] 基于HIV的慢病毒载体正在迅速成为研究和临床基因转移应用所选的逆转录病毒载体系统。慢病毒载体转导静止干细胞和非分裂终末分化细胞的能力增强导致了广泛的治

疗性基因递送载体的发展,以及有希望的研究工具,诸如短发夹RNA(shRNA)基因敲除文库和载体用于终末分化细胞中多能性的诱导。早期 $\gamma$ -逆转录病毒临床基因治疗载体恢复了X连锁严重联合免疫缺陷(SCID-X1)患者的免疫功能,但随后发现它们通过原癌基因的反式激活引起增殖性疾病。较新的慢病毒载体设计可以显著降低这种风险,并且它们在等待临床测试,以最终验证其预期的安全性。该领域处于不断变化中,并且临床测试的结果是不可预测的。

[0011] 当基于抗HIV-1慢病毒的基因治疗(例如双结合抗HIV-1慢病毒载体(Ca1-1, LVsh5/C46))用于抑制HIV-1复制时,有必要定量包含Ca1-1 DNA的细胞和包含野生型HIV DNA的细胞。这对于从感染HIV-1的患者获取的细胞来说是特别正确的。我们面临在DNA水平区分HIV-1和Ca1-1的困难。目前可商业获得的基于PCR的测定法不能区分HIV-1整合的DNA与Ca1-1转基因整合的DNA。有报道基于对pol区域的PCR以确定HIV-1 DNA的测定法(Burke BP, et al: Mol Ther Nucleic Acids 2015, 4:e236),其中引物用于检测不存在于慢病毒载体中的HIV-1序列。也有报道使用C46引物区域以确定不存在于HIV-1中的Ca1-1转基因DNA的可能的测定法(Wolstein O, et al: Mol Ther Methods&Clinical Development 2014, 1, 11)。

## 发明内容

[0012] 在本公开的一个方面是一组合物,包含:(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物;所述探针包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于报道子成分;所述正向引物包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列;所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列;其中正向和反向引物的每一个能够与靶序列退火以扩增所述靶序列。

[0013] 在本公开的另一方面是一组合物,包含:(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物;所述探针包含与SEQ ID NO:10具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于报道子成分;所述正向引物包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列;所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列;其中正向和反向引物的每一个能够与靶序列退火以扩增所述靶序列。

[0014] 在本公开的另一方面是一组合物,包含:(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物;所述探针包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于报道子成分;所述正向引物包含与SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的核苷酸序列;所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列;其中正向和反向引物的每一个能够与靶序列退火以扩增所述靶序列。

[0015] 在本公开的另一个方面是包含第一组合物和第二组合物的试剂盒,其中所述第一组合物包含:(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物,所述探针包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于所述报道子成分,所述正向引物包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列,所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列,其中正向和反向引物的每一个能够与靶序列退火以扩增所述靶序列;并且所述第二组合物包含:(i)包含(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物的组合物,所述探针包含与SEQ ID NO:10具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于报

道子成分,所述正向引物包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列,所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列,其中正向和反向引物的每一个能够与靶序列退火以扩增所述靶序列;或者(ii)包含(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物的组合物,所述探针包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于报道子成分,所述正向引物包含与SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的核苷酸序列,所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列,其中正向和反向引物的每一个能够与靶序列退火以扩增所述靶序列。

[0016] 在本公开的另一个方面是定量第一靶序列的方法,其包括:将包含第一靶序列的第一样品与一组合物相接触,所述组合物包含:(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物,所述探针包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于报道子成分,所述正向引物包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列,所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列;用所述第一靶序列为模板实施实时聚合酶链式反应,并定量所产生的第一扩增子的量。

[0017] 在一些实施例中,所述方法进一步包括定量第二样品中的第二靶序列。在一些实施例中,使用一组合物检测所述第二靶序列,所述组合物包含:(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物,所述探针包含与SEQ ID NO:10具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于报道子成分,所述正向引物包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列,所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列;其中正向和反向引物的每一个能够与靶序列退火以扩增所述靶序列。在其他实施例中,使用一组合物定量所述第二靶序列,所述组合物包含:(a)探针、(b)正向引物以及(c)反向引物,所述探针包含与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的核苷酸序列,所述探针缀合于报道子成分,所述正向引物包含与SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的核苷酸序列,所述反向引物包含与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的核苷酸序列;其中正向和反向引物的每一个能够与靶序列退火以扩增所述靶序列。

[0018] 在一些实施例中,第一和第二样品来自于相同的来源,并且其中第一和第二靶序列的定量发生在单个反应室内。在一些实施例中,第一和第二样品来自于相同的来源,并且其中第一和第二靶序列的定量发生在不同的反应室内。在一些实施例中,第一靶序列为慢病毒核酸序列且其中第二靶序列为HIV核酸序列。在一些实施例中,定量所产生的第一扩增子的量的步骤包括检测来自第一报道子成分的信号,并且其中定量所产生的第二扩增子的量的步骤包括检测来自第二报道子成分的信号,其中所述第一和第二报道子成分不同。在一些实施例中,所述方法进一步包括通过进行以下比较来评估从慢病毒载体的转基因的效力:(i)在第一时间点产生的第一扩增子的测定量与产生的第二扩增子的测定量的第一比例;(ii)在第二时间点产生的第一扩增子的测定量与产生的第二扩增子的测定量的第二比例。在一些实施例中,慢病毒核酸对HIV核酸的增加了的比例为治疗效力的指征。

[0019] 在本公开的另一个方面是检测样品中的慢病毒核酸和/或HIV核酸的方法,所述方法包括:(a)使用以下物质,用样品中的慢病毒核酸模板和HIV核酸模板实施多重实时PCR:(i)具有与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列的第一正向引物,具有与SEQ ID NO:6具有至少90%同一性的核苷酸序列的第一反向引物,以及具有与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的核苷酸序列的第一探针,所述第一探针具有第一报道子成分;(ii)具有与

SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列的第二正向引物,具有与SEQ ID NO:6具有至少90%同一性的核苷酸序列的第二反向引物,以及具有与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的核苷酸序列的第二探针,所述第二探针具有第二报道子成分,所述第一和第二报道子成分不同;(b)检测通过以下产生的扩增子:(i)第一正向和反向引物,以及(ii)第二正向和反向引物;并且其中检测包括检测来自第一和第二报道子成分的第一和第二信号。

[0020] 在本公开的另一个方面是检测样品中的慢病毒核酸和/或HIV核酸的方法,所述方法包括:(a)使用以下物质,用样品中的慢病毒核酸模板和HIV核酸模板实施多重实时PCR:(i)具有与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列的第一正向引物,具有与SEQ ID NO:6具有至少90%同一性的核苷酸序列的第一反向引物,以及具有与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的核苷酸序列的第一探针,所述第一探针具有第一报道子成分;(ii)具有与SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的核苷酸序列的第二正向引物,具有与SEQ ID NO:6具有至少90%同一性的核苷酸序列的第二反向引物,以及具有与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的核苷酸序列的第二探针,所述第二探针具有第二报道子成分,所述第一和第二报道子成分不同;(b)检测通过以下产生的扩增子:(i)第一正向和反向引物,以及(ii)第二正向和反向引物;并且其中检测包括检测来自第一和第二报道子成分的第一和第二信号。

[0021] 在本公开的另一个方面是检测样品中的慢病毒核酸的量的方法,包括:(a)将样品与第一正向引物和第一反向引物相接触;(b)将样品与特异于慢病毒核酸的3' LTR内的接合位点的接合探针相接触,其中所述接合探针包括能够与慢病毒核酸3' LTR的U3区域内的至少一部分序列杂交的第一部分和能够与慢病毒核酸3' LTR的R区域内的至少一部分序列杂交的第二部分,并且其中所述接合探针包括第一可检测成分;以及检测来自第一可检测成分的信号。在一些实施例中,接合探针的第一部分同与SEQ ID NO:12具有至少80%同一性的核苷酸序列杂交。在一些实施例中,接合探针的第二部分与SEQ ID NO:13的核苷酸序列杂交。在一些实施例中,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的核苷酸序列。在一些实施例中,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的核苷酸序列。

[0022] 在一些实施例中,所述方法进一步包括检测样品中的HIV核酸的量。在一些实施例中,对样品中的慢病毒核酸的量和HIV核酸的量的检测发生在相同反应管内。在一些实施例中,HIV核酸的量的检测包括将样品与特异于HIV核酸序列的3' LTR内的TATA-框序列的第二探针相接触,第二探针缀合于第二可检测成分;以及检测来自第二可检测成分的信号。在一些实施例中,第二探针具有与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的核苷酸序列。在一些实施例中,第一正向引物为NuAf引物且第一反向引物为LTR-rev引物。在一些实施例中,NuAf引物具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施例中,LTR-rev引物具有SEQ ID NO:6的序列。

[0023] 在一些实施例中,对样品中的慢病毒核酸的量和HIV核酸的量的检测发生在不同的反应管内。在一些实施例中,HIV核酸的量的检测包括将样品与第二正向引物、第二反向引物和第二探针相接触,第二探针具有与SEQ ID NO:8具有至少90%同一性的核苷酸序列,其中第二探针包含第二可检测成分;以及检测来自第二可检测成分的信号。在一些实施例中,第二正向引物与SEQ ID NO:3的核苷酸序列杂交。在一些实施例中,第二正向引物包含与SEQ ID NO:4具有至少80%同一性的核苷酸序列。在一些实施例中,第二反向引物包含SEQ ID NO:6的序列。

[0024] 在本公开的另一个方面是检测样品中的慢病毒核酸的方法,包括:(a)将样品与第

一正向引物和第一反向引物相接触；(b)将样品与特异于慢病毒核酸的3' LTR内的接合位点的接合探针相接触，其中慢病毒核酸3' LTR不包括TATA-框序列，且其中接合位点横跨慢病毒核酸3' LTR的U3区域和慢病毒核酸3' LTR的R区域，且所述接合探针的至少一部分与SEQ ID NO:13的核苷酸序列杂交。在一些实施例中，所述方法进一步包括将样品与特异于HIV核酸序列的3' LTR内的TATA-框序列的第二探针相接触，第二探针具有第二可检测成分，其中第一和第二可检测成分不同；以及检测来自第二可检测成分的信号。在一些实施例中，所述方法进一步包括将样品与第二正向引物、第二反向引物和第二探针相接触，第二探针具有与SEQ ID NO:8具有至少80%同一性的核苷酸序列，其中第二探针包含第二可检测成分，其中第一和第二可检测成分不同；以及检测来自第二可检测成分的信号。

[0025] 在本公开的另一方面是定量样品中的慢病毒核酸的量和HIV核酸的量的方法，慢病毒核酸和HIV核酸包括不同的3' LTR，所述方法包括用正向引物和反向引物扩增慢病毒核酸和HIV核酸两者，所述正向引物与慢病毒核酸的3' LTR和HIV核酸的3' LTR两者内的序列杂交，所述反向引物与慢病毒核酸的3' LTR和HIV核酸的3' LTR两者内的序列杂交，且其中慢病毒核酸和HIV核酸两者的扩增发生在单个反应管内。在一些实施例中，慢病毒核酸的3' LTR比HIV核酸的3' LTR少包含至少50个核苷酸。在一些实施例中，慢病毒核酸的3' LTR不包含TATA-框序列。在一些实施例中，扩增产生具有第一大小的慢病毒核酸扩增子和具有第二大小的HIV核酸扩增子，其中，慢病毒核酸的扩增子小于HIV核酸的扩增子。在一些实施例中，使用电泳分离慢病毒核酸扩增子和HIV核酸扩增子。在一些实施例中，慢病毒核酸3' LTR包含具有SEQ ID NO:15的核苷酸序列的U3区域。在一些实施例中，HIV核酸3' LTR包含具有SEQ ID NO:16的核苷酸序列的U3区域。

[0026] 在本公开的另一个方面是通过从包含慢病毒核酸的样品用一对引物扩增而能够获得的扩增子，所述引物具有SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:6，所述扩增子包括3' LTR，所述3' LTR不包含TATA-框序列。

[0027] 在本公开的另一个方面是分离的核酸序列，包含与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的核苷酸序列。

[0028] 在本公开的另一个方面是分离的核酸序列，包含与SEQ ID NO:15具有至少90%同一性的核苷酸序列。

[0029] 在本公开的另一个方面是分离的核酸序列，包含与SEQ ID NO:14具有至少70%同一性的核苷酸序列并能够与SEQ ID NO:15的核苷酸序列的片段杂交。

[0030] 在本公开的另一个方面是具有第一部分和第二部分的分离的核酸序列，所述第一部分能够同与SEQ ID NO:12具有至少70%同一性的核苷酸序列杂交，所述第二部分能够与SEQ ID NO:13的核苷酸序列杂交。

[0031] 在本公开的另一个方面是定量样品中的慢病毒核苷酸的量的方法，所述慢病毒核苷酸与野生型3' LTR相比较在3' LTR上具有缺失，包括使用特异于慢病毒核酸的3' LTR中的缺失的探针扩增慢病毒核酸。在一些实施例中，特异于慢病毒核酸的3' LTR中的缺失的探针包括第一部分和第二部分，所述第一部分与慢病毒核酸的3' LTR的U3区域内的序列杂交，所述第二部分与慢病毒核酸的3' LTR的R区域内的序列杂交。在一些实施例中，慢病毒核酸的3' LTR的U3区域内的序列包含(i)与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的序列；以及(ii)SEQ ID NO:12。在一些实施例中，慢病毒载体的3' LTR的R区域内的序列包含SEQ ID NO:13

的序列。在一些实施例中,特异于慢病毒核酸的3' LTR中的缺失的探针包含(i)与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的序列;以及(ii)SEQ ID NO:14。

[0032] 在一些实施例中,慢病毒载体核酸的扩增进一步包括引入特异于慢病毒载体核酸的3' LTR内的序列的正向和反向引物。在一些实施例中,正向引物包含SEQ ID NO:2的序列。在一些实施例中,反向引物包含SEQ ID NO:4的序列。在一些实施例中,所述方法进一步包括定量存在于样品中的野生型HIV核酸的量。在一些实施例中,定量存在于样品中的HIV核酸的量包括扩增野生型HIV核酸,并且其中野生型HIV核酸的扩增发生在与慢病毒核酸的扩增相同的反应管中。在一些实施例中,HIV核酸的扩增使用特异于野生型HIV核酸3' LTR的U3区域内的TATA-框序列的探针。在一些实施例中,HIV核酸的扩增包括在慢病毒载体核酸的扩增中使用的相同的正向和反向引物。在一些实施例中,特异于慢病毒载体核酸的3' LTR的探针和特异于野生型HIV核酸的U3区域内的TATA-框序列的探针每个缀合于不同的可检测成分。

[0033] 在一些实施例中,存在于样品中的野生型HIV核酸的扩增发生在与慢病毒载体核酸的扩增不同的反应管中。在一些实施例中,野生型HIV核酸的扩增使用特异于野生型HIV核酸的3' LTR的R区域内的序列的探针。在一些实施例中,HIV核酸的扩增包括与在慢病毒载体核酸的扩增中使用的相同的反向引物。在一些实施例中,野生型HIV核酸的扩增包括特异于野生型HIV核酸的3' LTR的U3区域内的TATA-框序列的正向探针。在一些实施例中,特异于慢病毒载体核酸的3' LTR的探针和特异于野生型HIV核酸的R区域内的序列的探针每个缀合于不同的可检测成分。

[0034] 在本公开的另一个方面为区分存在于样品中的慢病毒核苷酸与HIV核酸的方法,所述慢病毒核苷酸包含具有U3区域的3' LTR,所述U3区域不含有TATA-框序列,包括用特异于慢病毒核酸的3' LTR中的序列的第一探针扩增慢病毒核酸,并用特异于HIV核酸的3' LTR中的序列的第二探针扩增HIV核酸。

## 附图说明

[0035] 图1A是LVsh5/C46慢病毒载体的示意图,其中CCR5 shRNA(sh5)位于人类H1 RNA聚合酶III启动子之下;且C46位于泛素C启动子(UbC)之下。LVsh5/C46载体的其他成分包括5'和3'修饰的HIV-1长终端重复(LTR)、中央多嘌呤序列(cPPT)和土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。值得注意的是,删除LVsh5/C46中U3区域的TATA框,如本文进一步描述的,将其区别于野生型U3区域。

[0036] 图1B到1I提供了一种特定慢病毒载体(即Ca1-1)的3' LTR的U3区域和野生型3' LTR的U3区域(诸如在HIV-1(HXB2)中发现的)之间的比对。图1B示出了在Ca1-1 U3区域中不存在TATA框,其表示Ca1-1的U3区域与HXB2之间的失配序列。该失配序列由点表示。图1C也示出了Ca1-1的3' LTR的R区域,其中Ca1-1的R区域与HIV具有相同的序列。图1C示出了Ca1-1的“结合位点”,该结合位点桥接可存在于野生型的U3区域的序列。图1C再一次示出了Ca1-1的U3区域和野生型的U3区域(诸如在HIV中)之间的区别。图1D至1I进一步示出了Ca1-1和HIV的U3区的区别。

[0037] 图2示出了根据本文公开的多重“方法-1”的Ca1-1 U3区域和HIV-1(HXB2)的比对以及引物和探针的位置。值得注意的是,Cy5标记的探针设计为Ca1-1构建体的U3和R区域的

独特接合位点,其不存在于HIV-1中;FAM标记的探针如果设计为HIV-1中的TATA框区域,其不存在于Ca1-1中。

[0038] 图3示出了根据本文公开的双管“方法-2”的Ca1-1 U3区域和HIV-1 (HXB2) 的比对以及引物和探针的位置。值得注意的是,正向引物 (NUAf) 和反向引物 (LTR-rev) 能够扩增Ca1-1;并且Cy5标记的探针设计为Ca1-1构建体的U3和R区域的独特接合位点,其不存在于HIV-1中。同样地,正向引物 (TATA) 和LTR-rev引物仅能够仅扩增HIV-1;FAM标记的探针能够扩增HIV序列。

[0039] 图4示出了根据本文公开的多重“方法-3”的Ca1-1 U3区域和HIV-1 (HXB2) 的比对以及引物和探针的位置。值得注意的是,正向引物 (NUAf) 和反向引物 (LTR-rev) 能够扩增Ca1-1和HIV-1两者。来自Ca1-1的PCR扩增条带比来自HIV-1的PCR扩增条带短。量化不同大小的扩增子可以产生在反应中与Ca1-1和HIV-1的拷贝数有关的数据。

[0040] 图5A、5B和5C提供了显示初始体外实验的结果的图,该实验基于以MOI 2.5用lenti-Ca1-1转导的MOLT-4细胞。图5A显示了逆转录酶 (RT) 测定数据。图5B和5C显示了根据本文所描述的多重方法-1使用单管测定法的HIV-1 RNA和Ca1-1 RNA拷贝数的定量结果。

[0041] 图6A、6B和6C提供了显示根据本文描述的方法1的实验结果的图表,该实验使用单管测定法能够确定HIV-1 DNA和Ca1-1 DNA的拷贝数。

[0042] 图7示出了根据本文所述的方法3使用单管测定法的来自Ca1-1和HIV-1的扩增子的比较尺寸。

[0043] 图8A和8B提供了显示根据本文所述的方法2使用两个不同管的测定法而能够确定HIV-1 DNA和Ca1-1 DNA拷贝数的实验结果的图表。

[0044] 图9提供了显示根据本文所述的方法2使用两个不同管的测定法而能够确定HIV-1 DNA拷贝数的实验结果的图表。

[0045] 图10A提供了基于用lenti-ccr5和Ca1-1 (ccr5和C46) 转导的MOLT-4细胞的第二次体外实验的流分析。用lenti-sh5或lenti-Ca1-1以MOI 2.5转导MOLT-4细胞。在48小时温育期后,利用2F5染色然后进行流式细胞分析而测定转导。Lenti-sh5转导的MOLT-4细胞显示CCR5表达降低75%。Lenti-Ca1-1显示了CCR5的60%敲除。在lenti-Ca1-1的转导后72小时,约89%的细胞表达C46,转导的MOLT-4细胞的CCR5表达减少了60%。

[0046] 图10B提供了在HIV-1感染后具有ccr5的MOLT4和具有Ca1-1的MOLT4的逆转录酶测定。转导后48小时用MOI 0.2的BaL感染MOLT4细胞。转导后7天,测试培养上清液中的逆转录酶活性。与lenti-sh5转导的MOLT4细胞和未转导的MOLT4细胞的那些相比,CCR5和C46融合抑制剂 (Ca1-1) 的组合显示了逆转录酶活性受到显著抑制。

[0047] 图10C提供了三种情况的逆转录酶测定法的时程数据:(a) 用Ca1-1转导的MOLT4;(b) 80%未转导的MOLT4与20%Ca1-1转导混合;和(c) MOCK对照。该图说明,在第14天与20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物以及未转导的MOLT4细胞 (MOCK对照) 相比,在第14天在Ca1-1转导的MOLT4细胞中观察到逆转录酶活性减少超过2个对数。

[0048] 图10D提供了这三个体外实验组的逆转录酶实时PCR分析的时程数据。之前的RT数据通过基于TaqMan的逆转录酶实时PCR测定法来证实。该图示出了与来自20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物以及未转导的MOLT4细胞 (MOCK对照) 相比,可以观察到在第14天从Ca1-1转导的MOLT4细胞的培养上清液中提取的HIV-1 RNA减少超过2个对

数。

[0049] 图11A示出了根据本公开的实施例的Ca1-1检测结果,其使用根据本文的方法2使用两个不同管的测定法。基于本文公开的测定方法,通过基于TaqMan的DNA PCR方法扩增Ca1-1整合的DNA。用从三组基于MOLT4的感染实验提取的DNA进行实时DNA PCR。数据显示在整个实验中从第4天至第14天在Ca1-1转导的MOLT4细胞中检测到整合的Ca1-1 DNA水平(通过肌动蛋白标准化)的一致存在。在MOLT4细胞中未检测到Ca1-1 DNA (MOCK对照)。很明显,在第4天和第7天,在20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物中Ca1-1 DNA的整合水平显著降低。直到第10天和第14天,这些水平进一步下降至无法检测的水平。Ca1-1拷贝数用1000个拷贝的Action DNA来标准化。

[0050] 图11B示出了根据本公开的实施例的HIV-1检测结果,其根据本文方法2使用两个不同管的测定法。在HIV-1感染后的第4天至第14天,与未转导的MOLT4细胞相比,在Ca1-1转导的MOLT4细胞中观察到HIV-1 DNA的整合水平降低超过三个对数。该数据证实了在Ca1-1慢病毒载体的转导后保护MOLT4细胞免受HIV-1感染。与第4天和第7天相比,在第10天和第14天在20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物中HIV-1 DNA的水平升高。在第10天和第14天20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物的Ca1-1 DNA数据暗示在那些时间点上的整合的Ca1-1 DNA的丢失。因此,在第10天和第14天观察到在混合培养物中HIV-1 DNA水平有所增加。这些数据也暗示了Ca1-1转基因保护免受HIV-1感染的功能。HIV-1拷贝数用1000个拷贝的Action DNA来标准化。

[0051] 图12A展示了基于用本文方法2的3' LTR测定法在MOLT-4细胞中的HIV-1 RNA的细胞内分析。在HIV-1感染后的第4至14天,与未转导的MOLT4细胞相比,观察到在Ca1-1转导的MOLT4细胞中HIV-1病毒RNA的整合水平降低超过3个对数。

[0052] 图12B展示了在MOLT-4细胞中基于叠接的Tat测定法的HIV-1 RNA的细胞内分析。在基于叠接的Tat测定法的Ca1-1转导的MOLT4细胞观察到RNA类似水平的大量减少。由叠接的Tat mRNA产生的TAT蛋白能够驱动大量未叠接的HIV-1 mRNA。叠接的Tat mRNA的检测是最初HIV-1转录的关键标记物。HIV-1 RNA拷贝数用1,000,000个拷贝的GAPDH mRNA来标准化。图12A和12B两者暗示了,观察到HIV-1细胞内mRNA水平的大量减少,这被Ca1-1转导的MOLT4细胞中观察到的整合DNA水平的大量减少所支持(参见图11A和11B)。

[0053] 图13A示出了基于来自健康供体的PBMC的逆转录酶测定数据。基于来自健康供体的PBMC进行了HIV-1感染实验。以与上述基于MOLT4的实验的相同方式进行lenti-Ca1-1转导。在HIV-1感染后第4天和第7天,与未转导的PBMC相比,在Ca1-1转导的PBMC中观察到逆转录酶活性降低超过5倍。

[0054] 图13B示出了用方法2对在培养的上清液中的RNA进行的逆转录酶实时PCR分析。图13A中的逆转录酶数据通过使用从培养上清液中提取的RNA的、基于TaqMan的逆转录酶实时PCR测定法来证实。与未转导的PBMC (MOCK对照) 相比,在第7天和第10天观察到来自Ca1-1转导的PBMC的培养上清液的HIV-1 RNA减少5倍。

[0055] 图14A示出了根据方法2使用两个不同管的测定法在PBMC中的Ca1-1 DNA检测结果。通过本文所描述的基于TaqMan的DNA PCR方法扩增Ca1-1整合的DNA。从两组PBMC感染实验中提取DNA。数据表明从第4天到第10天在Ca1-1转导的PBMC中整合的Ca1-1 DNA水平(通过肌动蛋白标准化)的一致存在。在未转导的PBMC中未检测到Ca1-1 DNA (MOCK对照)。Ca1-1

拷贝数用1000个拷贝的Action DNA来标准化。

[0056] 图14B示出了PBMC中的HIV-1 DNA检测。通过基于TaqMan的DNA PCR方法,使用根据方法2的两个不同管的测定法来扩增HIV-1整合的DNA。在第4天与未转导的PBMC相比,在Ca1-1转导的PBMC中观察到HIV-1 DNA的整合水平降低五倍。该数据证实了在Ca1-1慢病毒载体的转导后保护PBMC免受HIV-1感染。HIV-1拷贝数用1000个拷贝的Action DNA来标准化。尽管PBMC难以用Ca1-1转导,但是数据积极地支持了Ca1-1保护免遭HIV-1。

[0057] 图14C示出了基于使用方法2的3' LTR测定法而在PBMC中进行HIV-1 RNA的细胞内分析的结果。通过本文描述的基于TaqMan的一步逆转录酶实时PCR方法扩增HIV-1细胞内mRNA。在第4天与未转导的PBMC相比,在Ca1-1转导的PBMC中观察到HIV-1病毒RNA的整合水平降低4倍以上。HIV-1 RNA拷贝数用1,000,000个拷贝的GAPDH mRNA来标准化。

[0058] 图14D示出了基于叠接的Tat测定法在PBMC中进行的HIV-1 RNA的细胞内分析的结果。在基于叠接的Tat测定法的Ca1-1转导的PBMC中观察到类似水平的大量减少。图14A和14B中的数据证实了在Ca1-1转导的PBMC中整合的HIV-1 DNA水平降低的影响。因此,在Ca1-1转导的PBMC中观察到HIV-1细胞内mRNA水平的实质性降低(图14C和图D)。HIV-1 RNA拷贝数用1,000,000个拷贝的GAPDH mRNA来标准化。

[0059] 图15A至15E展示了设于96孔板的不同孔中的不同试剂的实例。

## 具体实施方式

[0060] 一般来说,本公开提供了特别用于检测和/或定量样品诸如衍生自HIV或慢病毒载体的那些中的核酸的化合物(即扩增引物和探针)、方法和试剂盒。

### [0061] 定义

[0062] 如本文所使用的,除非上下文另有明确指示,否则单数术语“一个”,“一种”和“该”包括复数指代物。类似地,词语“或”旨在包括“和”,除非上下文另有明确指示。

[0063] 如本文所使用的,将“扩增子”定义为通过核酸扩增技术产生的任何核酸分子。特别地,扩增子包含在接触引物时与其杂交的序列,并且可以是完整分子或其部分。

[0064] 靶核酸序列的“扩增”应意指体外靶扩增技术,其中将靶序列复制,产生作为模板的用于扩增进一步循环的扩增子。

[0065] 如本文所使用的,“Ca1-1”是指包含短发夹RNA CCR5和C46融合抑制剂的慢病毒载体。关于Ca1-1的进一步细节在共同未决申请中作为美国公开号US2012/0201794公开,其公开在此引入全文作为参考。

[0066] 术语“包含”,“包括”,“具有”等可以互换使用并具有相同的含义。术语“包含”,“包括”,“具有”等可以互换使用并具有相同的含义。具体而言,每个术语被定义为与“包含”的美国专利法定义一致,因此解释为“至少以下”的开放术语,并且也解释为不排除附加的特征、限制、方面等。因此,例如,“具有部件a、b和c的设备”意味着该设备至少包括部件a、b和c。同样,短语:“涉及步骤a、b和c的方法”意味着该方法至少包括步骤a、b和c。而且,虽然这些步骤和过程在本文中可以按照特定的顺序列出,但是本领域技术人员将认识到,按顺序的步骤和过程可以变化。

[0067] 如本文所使用的,术语“人类免疫缺陷病毒”(HIV)是指任何HIV,包括实验室毒株、野生型毒株、突变株和包含至少一种HIV病毒的任何生物样品,例如HIV临床分离株。与本发

明方法相容的HIV毒株是能够感染哺乳动物,特别是人类的任何这种毒株。例子为HIV-1。HIV-2和SIV。

[0068] 如本文所使用的,术语“慢病毒载体”用于表示来源于慢病毒并用于通过转导将遗传物质转移到细胞中的任何形式的核酸。该术语包括慢病毒载体核酸(例如DNA和RNA),这些核酸的封装形式,以及在其中包装有病毒载体核酸的病毒颗粒。

[0069] 如本文所使用的,术语“长终端重复”(LTR)用于指位于逆转录病毒DNA末端的碱基对的结构域。这些LTR在长度上可以是几百个碱基对。LTR经常提供对于大多数真核基因的表达(例如转录的促进,启动和聚腺苷酸化)的功能基础。通常,LTR包含用于基因表达(U3)的增强子和启动子区域,以及RNA起始位点,和非翻译RNA序列(R/U5),如基因组重复和聚腺苷酸化位点。

[0070] 如本文所使用的,术语“引物”是指DNA或含有DNA的核酸分子的短片段,其(i)在扩增条件下与要扩增的DNA或RNA序列的合适部分退火,和(ii)启动,并且通过聚合酶介导的合成而自身物理延伸。

[0071] 如本文所使用的,术语“探针”是指寡核苷酸(即核苷酸的序列),无论天然发生在纯化的限制性消化物中还是合成产生的,其能够与另一种目的寡核苷酸杂交。探针可用于检测、确定和分离特定的基因序列。预期在本公开中使用的任何探针将用“报道分子”或“可检测成分”标记,使得可在任何检测系统中检测到,包括但不限于酶(例如ELISA,以及基于酶的组织化学测定法)、荧光、放射性、量热和发光系统。

[0072] 如本文所使用的,术语“TAR”指位于LTR的R区域中的“反式激活反应”遗传元件。该元件通过与病毒反式激活因子tat物理结合来介导tat的活动。

[0073] 如本文所使用的,短语“靶序列”或“靶核酸”各自指待扩增、检测或以其他方式分析的核酸的区域。

[0074] 如本文所使用的,“Tat”指作为延伸因子而起作用的病毒性编码的反式激活蛋白。Tat作为增加HIV基因表达的关键病毒元件是病毒复制所必需的。

[0075] 如本文所使用的,术语“TATA框”用于指位于RNA聚合酶结合的真核结构基因的从起点向上游约19-27个碱基对的DNA片段。TATA框在长度上约为7个碱基对,通常包含序列“TATAAAA”。TATA盒子有时也指“Hogness框”。

[0076] 如本文所使用的,术语“转导(transduce)”或“转导(transduction)”指使用病毒或逆转录病毒载体通过感染而不是转染来递送基因。例如,可以通过感染和原病毒整合可将逆转录病毒载体(用于将核酸引入细胞的作为载体的修饰的逆转录病毒)携带的抗HIV基因转导入细胞。因此,“转导基因”是已经通过慢病毒或载体感染和原病毒整合而引入细胞中的基因。病毒载体(例如“转导载体”)将基因转导到“靶细胞”或宿主细胞中。

[0077] 如本文所使用的,术语“转基因”是慢病毒载体中的核酸序列,其通常不存在于待用慢病毒载体转导的细胞中。慢病毒载体用于将该序列引入转导的细胞中。

[0078] 如本文所使用的,术语“载体”用于指将核酸(例如DNA)片段从一个细胞转移到另一个细胞的核酸分子。

[0079] 如本文所使用的,术语“野生型”指在群体中最经常观察到的基因或核酸序列,并因此任意地设计基因或核酸序列的“正常”或“野生型”形式。

[0080] 慢病毒载体

[0081] 在一些实施例中,慢病毒载体包括灭活或自灭活3' LTR。“自灭活3' LTR”是包含阻止LTR序列驱动下游基因表达的突变、置换或缺失的3' LTR。可以相信,来自3' LTR的U3区域的拷贝充当用于在整合的原病毒中产生LTR的模板。因此,当具有灭活缺失或突变的3' LTR作为原病毒的5' LTR而整合时,不可能从5' LTR转录。这消除了病毒增强子/启动子和任何内部增强子/启动子之间的竞争。例如,自灭活的3' LTR在Zufferey et al., J. Virol., Vol. 72: 9873-9880, 1998; Miyoshi et al., J. Virol., Vol. 72: 8150-8157, 1998; and Iwakuma et al., Virology, Vol. 261: 120-132, 1999中有所描述。可通过本领域已知的任何方法使3' LTR自灭活。在一个实施例中,3' LTR的U3元件或区域含有其增强子序列的缺失,优选为TATA盒、Sp1和NF- $\kappa$ B位点。由于自灭活的3' LTR,整合到宿主细胞基因组中的原病毒将包含灭活的5' LTR。本公开的病毒表达载体优选不抑制生产细胞中的载体生产。

[0082] 一般而言,本公开的自灭活重组慢病毒载体(SIN)包含3' LTR,其由于U3区域内的序列的缺失而已基本上呈现对转录失活。在一些实施例中,慢病毒载体包含在3' LTR的U3区域中的缺失,包括TATA框序列的去除(例如从慢病毒载体的3' LTR的U3区域缺失SEQ ID NO: 11的序列)。在基于HIV的慢病毒载体的情况下,这种载体耐受显著的U3缺失,包括LTR TATA框的去除,而不明显减少载体滴度。因此,在一些实施例中,与野生型的U3 3' LTR区域相比,慢病毒载体包含从3' LTR的U3区域去除约100至约160个核苷酸。在其他实施例中,与野生型的U3 3' LTR区域相比,慢病毒载体包含从3' LTR的U3区域去除约120至约140个核苷酸。在一些实施例中,与野生型的U3 3' LTR区域相比,慢病毒载体包含从3' LTR的U3区域去除约132个核苷酸。

[0083] 举例来说,SEQ ID NO. 16提供了野生型U3 3' LTR区域(本文中也指为“野生型U3区域”或“野生型HIV”);而SEQ ID NO. 15提供了修饰的U3区域,诸如在慢病毒载体中发现的。当将SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 16相比较,本领域技术人员将会明白,在慢病毒载体3' LTR的U3区域中缺失了132个核苷酸,包括TATA框的去除。在一些实施例中,3' LTR的R区域是不变的,即野生型R区域(例如,参见SEQ ID NO: 17)。

[0084] 具有缺少TATA框的U3区域的慢病毒载体的一个实例是在图1A中描述的“Ca1-1”(LVsh5/C46)慢病毒载体。如图1B和1D至1I所示,Ca1-1包含在3' LTR的U3区域内从核苷酸423至556的缺失,并且这样的缺失延伸通过TATA框(即SEQ ID NO: 11的序列)。与Ca1-1相比,HIV的3' LTR的野生型U3区域包含完整的TATA盒(例如,参见图1B和1D至1I)。事实上,野生型HIV的U3区域含有增强子和启动子元件,其响应于细胞活化而调节HIV基因组在感染细胞中的基础和诱导表达。当然,本领域技术人员将理解,Ca1-1仅仅示出了单个慢病毒载体,且其他载体可以具有不同的3' LTR区域,例如,包括与野生型的U3区域相比具有不同序列或包含不同核苷酸缺失的U3区域,并且可以根据本文公开的方法检测这些不同的慢病毒载体。

#### [0085] 方法概述

[0086] 本文公开的测定法利用了慢病毒载体和野生型HIV的3' LTR的U3区域中的不同,并因此允许特定设计的引物和/或探针域慢病毒载体杂交,但不与野生型HIV杂交,反之亦然,如本文所述。

#### [0087] 引物

[0088] 本领域技术人员将会理解,可以基于慢病毒载体和HIV的3' LTR的结构设计具有合

适的杂交特性的引物序列。例如,本领域技术人员将理解,基于慢病毒载体的3' LTR的序列,可以设计具有合适的杂交特征的引物。特别考虑本文公开的引物作为多重扩增反应的成分,其中可从本文所描述的靶特异性引物产生几种扩增子种类。

[0089] 在一些实施例中,选择正向引物使得其与慢病毒载体和/或HIV的3' LTR的U3区域内的序列杂交。在一些实施例中,并且如本文进一步详细描述,相同的正向引物用于慢病毒载体和HIV两者的扩增(参见图2和4)。在其他实施例中,不同的正向引物用于扩增慢病毒载体和HIV(参见图3)。

[0090] 在一些实施例中,选择正向引物使得其与在3' LTR的U3区域内与SEQ ID NO:1具有至少85%同一性的序列杂交。在其他实施例中,选择正向引物使得其与在3' LTR的U3区域内与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的序列杂交。在另外的实施例中,选择正向引物使得其与在3' LTR的U3区域内与SEQ ID NO:1具有至少95%同一性的序列杂交。

[0091] 在一些实施例中,选择正向引物使得其与在3' LTR的U3区域内与SEQ ID NO:3具有至少85%同一性的序列杂交。在其他实施例中,选择正向引物使得其与在3' LTR的U3区域内与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的序列杂交。在另外的实施例中,选择正向引物使得其与在3' LTR的U3区域内与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的序列杂交。

[0092] 适用于本文所描述的测定法的一个正向引物是NuAf引物。本领域技术人员将理解,根据慢病毒载体和HIV的U3序列,NuAf引物能够与慢病毒载体和HIV杂交。在一些实施例中,NuAf引物包含SEQ ID NO:2的序列或与SEQ ID NO:2的序列具有至少90%同一性的序列(参见图2和4)。

[0093] 适用于本文所公开的测定法的另一个正向引物是TATA引物。TATA引物能够与HIV杂交,但不能与在3' LTR的U3区域中不含或缺少TATA框序列的慢病毒载体杂交。TATA引物包含SEQ ID NO:4的序列或与SEQ ID NO:4的序列具有至少90%同一性的序列(参见图3)。

[0094] 在一些实施例中,选择反向引物以使其与3' LTR的R区域内的序列杂交。在其他实施例中,选择反向引物以使其与3' LTR的R区域的在5'末端的序列杂交。如本文将进一步描述的,在一些实施例中,相同的反向引物用于扩增慢病毒载体和野生型HIV两者,即将反向引物设计为在慢病毒载体和野生型HIV两者的R区域内共有的序列。

[0095] 在一些实施例中,选择反向引物使得其与在3' LTR的R区域内与SEQ ID NO:5具有至少85%同一性的序列杂交。在其他实施例中,选择反向引物使得其与在3' LTR的R区域内与SEQ ID NO:5具有至少90%同一性的序列杂交。在另外的实施例中,选择反向引物使得其与在3' LTR的R区域内与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的序列杂交。

[0096] 适用于所公开的测定法的一个反向引物是LTR-rev引物。LTR-rev引物包含SEQ ID NO:6的序列。LTR-rev引物能够与慢病毒载体和HIV两者杂交。

#### [0097] 探针

[0098] 通常,本文所公开的方法中使用的探针属于称为“FRET探针”(Förster或荧光共振能量转移)的探针类别,即含有荧光报道子和淬灭剂对的探针。在一些实施例中,用于本文所描述的方法的探针是TAQMAN®探针。TAQMAN®探针(Heid et al, 1996)使用Taq聚合酶的荧光5'外切核酸酶活性来测量核酸样品中靶序列的量。TAQMAN®探针是一般在5'碱基处或附近含有荧光染料以及通常在3'碱基处或附近含有淬灭成分的寡核苷酸。淬灭剂成分可以是诸如TAMRA的染料或者可以是非荧光分子诸如4-(4-二甲基氨基苯偶氮基)苯甲

酸(DABCYL)。当照射时,激发的荧光染料将能量转移到附近的淬灭染料分子而不是发荧光(FRET,如上面提到)。因此,报道子和淬灭剂的紧密接近防止任何荧光的发射而探针完整。TAQMAN®探针设计为退火到PCR产物的内部区域。当聚合酶复制结合有TAQMAN®探针的模板时,其5'核酸外切酶活性切割探针。这终止了淬灭剂(无FRET)的活性并且报道子染料开始发出荧光,其在每个循环中与探针切割的速率成比例地增加。通过监测报道子染料的荧光的增加来检测PCR产物的累积(在这个过程中,只有探针是FRET标记的且引物未标记)。TAQMAN®试验使用通用的热循环参数和PCR反应条件。因为只有当探针与靶标杂交时才发生切割,所检测到的荧光来源于特定的扩增。杂交和切割过程不会干扰产品的指数累积。

[0099] 在其他实施例中,所公开的方法中使用的探针是分子信标。分子信标是用于确定细胞内存在的特定核苷酸序列的探针(Tyagi et al, (1998) Nature Biotechnology 16: 49-53)。分子信标可以仅由诸如DNA或RNA的核酸组成,或者其可以由肽核酸(PNA)缀合物组成。分子信标与特定核苷酸序列的结合允许在体外或体内确定这些序列的存在。分子信标包括缀合物(例如,诸如量子点示踪的珠子的结构)、探针、荧光团和淬灭成分。探针是包含茎(stem)和环结构的单链寡核苷酸,其中亲水性连接基团连接到单链寡核苷酸的一端,并且淬灭成分连接到单链寡核苷酸的另一端。荧光团可以是任何荧光有机染料或单个量子点,使得其发射不与量子点示踪的珠子的发射重叠。淬灭成分理想地淬灭荧光团的发光。淬灭荧光团发光的任何合适的淬灭成分可用于上述的缀合物中。

[0100] 在另外的其他实施例中,所公开的方法中使用的探针是双杂交探针。通常,双杂交探针除了两种序列特异性DNA引物外,还使用两种序列特异性寡核苷酸探针。两个探针设计为结合靶标中的相邻序列。双杂交探针用显示FRET的一对染料标记。供体染料连接到第一探针的3'末端,而受体染料连接到第二探针的5'末端。

[0101] 在实时PCR期间,在供体染料特异的波长下实施激发,并且在受体染料的发射波长处监测反应。在退火步骤中,探针以头对尾的排列与其靶序列杂交。该退火使供体和受体染料接近,允许FRET发生,导致由受体发出荧光。受体荧光的增加量与PCR产物存在的量成比例。

[0102] 本领域技术人员将会理解,可以基于慢病毒载体和野生型HIV的结构和序列来设计具有合适杂交特性的探针。例如,本领域技术人员将理解可基于慢病毒载体或HIV特有的3' LTR的U3和R区域的序列来设计探针。例如,可以设计与慢病毒载体U3区域杂交而排除野生型U3 3' LTR区域的探针,反之亦然。如本文所指出的,某些慢病毒载体包含U3区域,与野生型U3区域相比,在U3序列内包含某些缺失,且本领域技术人员将能够设计与这些慢病毒载体U3区域杂交而不与野生型U3区域杂交的探针。

[0103] 在一些实施例中,本文所公开的方法利用与跨越慢病毒载体的3' LTR的U3区域和R区域的序列退火(即“接合位点”)的接合探针。图1C示出了慢病毒载体的接合位点,该接合位点包含与野生型U3区域相比包含某些缺失的U3区域。适当设计的接合探针可以包含与该接合位点或该接合位点的一部分或片段杂交的部分。在一些实施例中,接合探针包含第一部分和第二部分,其中第一部分设计为与慢病毒载体的3' LTR的U3区域内的部分核苷酸序列或核苷酸序列片段杂交;并且其中第二部分设计为与3' LTR的R区域内的核苷酸序列的部分或片段杂交。

[0104] 在一些实施例中,接合探针在其中杂交的3' LTR的U3区域包含与SEQ ID NO:12具有至少80%同一性的序列。在其他实施例中,接合探针在其中杂交的慢病毒载体的3' LTR的U3区域包含与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的序列。在进一步的实施例中,接合探针在其中杂交的慢病毒载体的3' LTR的U3区域包含与SEQ ID NO:12具有至少95%同一性的序列。在更进一步的实施例中,接合探针在其中杂交的慢病毒载体的3' LTR的U3区域包含SEQ ID NO:12的序列。

[0105] 在一些实施例中,接合探针在其中杂交的慢病毒载体的3' LTR的R区域包含与SEQ ID NO:13具有至少90%同一性的序列。在其他实施例中,接合探针在其中杂交的慢病毒载体的3' LTR的R区域包含SEQ ID NO:13的序列。

[0106] 本领域技术人员将理解,可将任何接合探针设计为适应任何慢病毒载体的不同的U3区域和R区域。在一些实施例中,接合探针包含SEQ ID NO:14的序列或与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的序列。在一些实施例中,接合探针缀合于与可检测的成分,诸如荧光报道子。在一些实施例中,荧光报道子选自Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas红-X、Tamara或Yakima黄。在其他实施例中,荧光报道子包括花青染料,诸如吲哚二羧菁(indodicarbocyanine, Cy5TM)。

[0107] 另一个适用于所公开的测定法的探针是TAR-探针,即特异于HIV的3' LTR中的TAR元素的探针。在一些实施例中,TAR-探针是TaqMan®探针,诸如本文所描述的。在一些实施例中,选择探针使得其与在3' LTR内与SEQ ID NO:7具有至少85%同一性的序列杂交。在其他实施例中,选择探针使得其与在3' LTR内与SEQ ID NO:7具有至少90%同一性的序列杂交。在另外的实施例中,选择探针使得其与在3' LTR内与SEQ ID NO:7具有至少95%同一性的序列杂交。在一些实施例中,TAR-探针包含SEQ ID NO:8的序列。在一些实施例中,TAR-探针缀合于可检测的成分,诸如荧光报道子。在一些实施例中,荧光报道子选自Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas红-X、Tamara或Yakima黄。在其他实施例中,TAR-探针包含荧光报道子和猝灭剂。在一些实施例中,荧光报道子是荧光素(CAS2321-07-5)。

[0108] 另一个适用于所公开的测定法的探针是TATA-探针,即特异于野生型3' LTR的U3区域中的TATA框的探针。在一些实施例中,TATA-探针是TaqMan®探针。在一些实施例中,TATA-探针与3' LTR的U3序列杂交(反义链靶向)。在一些实施例中,选择TATA-探针使得其与在3' LTR内与SEQ ID NO:9具有至少85%同一性的序列杂交。在其他实施例中,选择TATA-探针使得其与在3' LTR的U3区域内与SEQ ID NO:9具有至少90%同一性的序列杂交。在另外的实施例中,选择TATA-探针使得其与在3' LTR的U3区域内的与SEQ ID NO:9具有至少95%同一性的序列杂交。在一些实施例中,TATA-探针包含SEQ ID NO:10的序列。在一些实施例中,TATA-探针包含荧光报道子和猝灭剂。在一些实施例中,荧光报道子选自Tex-615、Tye-563、Tye-665、Joe、Cy3、Max、Rox、Tet、Texas红-X、Tamara和Yakima黄。在其他实施例中,TAR-探针包含荧光报道子和猝灭剂。在一些实施例中,荧光报道子是荧光素(CAS 2321-07-5)。

#### [0109] 测定方法

[0110] 可以使用市场上可购得的以及本领域普通技术人员已知的标准DNA提取试剂盒收集样品。在一些实施例中,DNA提取试剂盒是BioLine DNA提取试剂盒(购自BioLine, Taunton, MA)。在一些实施例中,样品的非限制性来源包括血液样品、血浆样品、组织样品、

活检样品或通过流式细胞术分选后产生的样品。

[0111] DNA,例如原病毒DNA或转基因DNA,可以使用本领域技术人员已知的方法从样品中提取,诸如由Maniatis et al,Molecular cloning:A laboratory manual (Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY),1982所描述的过程,其公开内容通过引用整体并入本文。该过程涉及细胞裂解物的制备,随后用蛋白酶K消化、通过多步酚提取、乙醇沉淀和核糖核酸酶消化获得DNA纯化物。

[0112] RNA可用于本文所描述的测定方法中来代替DNA。当使用RNA时,需要通过合适的逆转录酶而逆转录成互补DNA (cDNA)。下面描述DNA的扩增和随后分析的方法因此适合于RNA分析。在一些实施例中,可使用已知方法分离病毒RNA,诸如在Boom,R.et al (J.Clin.Microbiol.28 (3):495-503 (1990);通过引用并入本文)中所描述的,或者通过其他常规方法,诸如酸酚法(例如,酸性胍-酚-氯仿 (AGPC) 方法),异硫氰酸胍过程,因此用到Chomczynski和Sacchi (Anal.Biochem.162,156-159 (1987))的方法。在一些实施例中,cDNA可以用SENSIScript® RT (Qiagen) 来合成。在一些实施例中,使用一步逆转录酶和Taq-聚合酶试剂盒。在其他实施例中,合成cDNA,然后进行实时DNA PCR方法。

#### [0113] 扩增

[0114] 用于核酸序列的扩增技术对本领域普通技术人员是已知的。扩增靶序列的一种方法是使用称为聚合酶链式反应 (PCR) 的聚合酶介导的技术。通常,PCR是一种提高基因组DNA混合物中靶序列的片段浓度的方法,而无需克隆或纯化。该扩增靶序列的过程由将大过量的两种寡核苷酸引物引入含有所期望的靶序列的DNA混合物中,以及接着在DNA聚合酶存在下进行热循环的精确顺序组成。两个引物与双链靶序列的各自链互补。为了产生扩增,将混合物变性,然后将引物与靶分子内的互补序列退火。退火后,用聚合酶(例如DNA聚合酶)延伸引物以形成一对新的互补链。变性,引物退火和聚合酶延伸的步骤可以重复多次(即变性,退火和延伸构成一个“循环”,可以有許多“循环”)以获得高浓度的所期望的靶序列的扩增片段(扩增子)。所期望的靶序列的扩增片段的长度由引物相对于彼此的相对位置决定,并因此该长度是可控的参数。聚合酶链式反应 (“PCR”) 描述于例如美国专利4,683,202、美国专利号4,683,195、美国专利4,000,159、美国专利号4,965,188、美国专利号5,176,995),各自的公开内容在此通过引用整体并入本文。

[0115] PCR可以用于定性或定量。一种已知的定量扩增技术是“实时PCR”。如本文使用的术语“实时PCR”意味着在反应期间监测从PCR测定发射的信号,作为在每个PCR扩增循环期间的扩增子生产的指示,即“实时”,与常规的PCR方法相反,在PCR反应的终点检测测定信号。实时PCR通常基于荧光报道子的检测和定量,如本文所描述的那些。报道子的信号与反应中PCR产物的量成正比增加。因此,通过记录每个循环的荧光发射量,可以在PCR产物的量的第一次显著增加与靶模板的初始量相关的指数阶段监测PCR反应。有关“实时PCR”的一般描述,参见Dehee et al.Virol.Meth.102:37-51 (2002) 和Aldea et al.J.Clin.Microbiol.,40:1060-1062 (2002),其公开内容通过引用整体并入本文。

[0116] 逆转录酶-聚合酶链式反应是指从RNA模板产生互补DNA,并进一步使用互补DNA作为模板实施PCR以复制,如上所述,并扩增DNA。在逆转录酶反应中,将反应混合物在足以合成与全部或部分RNA模板互补的DNA分子的温度下温育。在逆转录反应之后,将反应在足以扩增所合成的DNA分子的温度下温育。

### [0117] 慢病毒核酸的扩增

[0118] 在本公开的一个方面是扩增慢病毒核酸例如慢病毒转基因的方法。在一些实施例中，慢病毒核酸的扩增使用与3' LTR的一部分U3区域杂交的正向引物和与3' LTR的一部分R区域杂交的反向引物。在一些实施例中，慢病毒核酸的扩增使用NuAf正向引物和LTR-rev反向引物。在一些实施例中，产生于扩增的扩增子包括约100至约600个核酸。在一些实施例中，将所产生的扩增子的量进行定量。

[0119] 在一些实施例中，慢病毒核酸的扩增包括使用特异于慢病毒载体的3' LTR内的序列的探针，即只与慢病毒载体的3' LTR杂交且不与诸如HIV的3' LTR的野生型3' LTR杂交。在一些实施例中，与不包含缺失的野生型的3' LTR相比，针对在慢病毒载体的3' LTR的U3区域中存在这样的缺失而对探针进行优化。在一些实施例中，缺失包括缺失TATA框序列（再一次与野生型U3区域相比）。在一些实施例中，优化针对在3' LTR的U3区域中存在缺失而进行优化探针设计为跨越慢病毒载体的3' LTR的部分U3区域和慢病毒载体的3' LTR的部分R区域。在一些实施例中，优化针对在3' LTR的U3区域中存在缺失而优化的探针为接合探针。在一些实施例中，接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的序列。在一些实施例中，慢病毒核酸或慢病毒转基因的扩增包括将扩增的核酸的量进行定量，诸如检测缀合探针的荧光报道子的量。

[0120] 在一些实施例中，慢病毒核酸的扩增包括根据本领域普通技术人员已知的过程将正向引物、反向引物和接合探针引入样品并实施PCR。在一些实施例中，正向引物是NuAf、反向引物是LTR-rev，且接合探针包含SEQ ID NO:14的序列。在一些实施例中，进行45-50个循环的PCR。在一些实施例中，PCR方法是实时PCR或定量实时PCR。在一些实施例中，核酸是RNA且首先将该RNA转化为cDNA。在一些实施例中，核酸是RNA且使用逆转录酶PCR或定量逆转录酶PCR。

### [0121] 一般的多重测定方法论

[0122] 在本公开的另一个方面是检测和/或定量样品中的慢病毒核酸和HIV核酸的多重方法。在一些实施例中，多重方法发生在单个反应系统或腔中（本文后述为“反应管”）。在其他实施例中，多重方法发生在各自的反应管中。在一些实施例中，慢病毒核酸是慢病毒转基因。在一些实施例中，HIV核酸是原病毒DNA。在一些实施例中，慢病毒核酸和/或HIV核酸是RNA，且RNA在扩增前首先转化（例如通过逆转录过程）为cDNA。

[0123] 在一些实施例中，多重方法使用正向引物，其能够与慢病毒载体和/或HIV的3' LTR的U3区域内的序列杂交。在一些实施例中，多重方法使用反向引物，其能够与慢病毒载体和/或HIV的3' LTR的R区域内的序列杂交。在一些实施例中，多重方法使用相同的正向和反向引物用于慢病毒核酸的扩增和HIV核酸的扩增两者。在这些情况下，本领域技术人员将能够选择能够与野生型HIV核酸和慢病毒载体核酸两者的U3区域内的相同序列杂交的正向引物。在其他实施例中，多重方法使用不同的正向引物但相同的反向引物。在一些实施例中，正向引物选自NuAf引物和TATA引物。在一些实施例中，反向引物是LTR-rev引物。

[0124] 在一些实施例中，特异于慢病毒核酸的第一探针用在PCR过程（例如实时PCR过程）中以扩增和/或定量慢病毒核酸的量，且特异于HIV的第二探针用在PCR过程中以扩增和/或定量HIV核酸的量，其中第一和第二探针包括不同的可检测成分。在一些实施例中，第一探针是能够与慢病毒载体的3' LTR内的序列杂交但不与野生型HIV的3' LTR内的序列杂交的探

针。在一些实施例中,与野生型3' LTR序列相比,第一探针针对慢病毒载体核酸的3' LTR中的序列缺失进行了优化。

[0125] 在一些实施例中,第一探针是特异于慢病毒载体的3' LTR(例如3' LTR内的接合位点)的接合探针。在一些实施例中,接合探针是能够与慢病毒载体的U3区内的至少一部分序列杂交并且能够与慢病毒载体的R区内的至少一部分序列杂交的探针。在一些实施例中,接合探针包含能够与第一序列杂交的第一部分和能够与SEQ ID NO:13的序列杂交的第二部分,所述第一序列与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性。

[0126] 在一些实施例中,第二探针选自TATA探针或TAR-探针。

[0127] 在一些实施例中,慢病毒核酸或HIV核酸的扩增包括将扩增的核酸的量进行定量,诸如通过检测对应缀合于所使用的探针的不同荧光报道子的信号。在其他实施例中,在将慢病毒核酸扩增子和HIV核酸扩增子电泳分离之后,定量慢病毒核酸扩增子的量和HIV核酸扩增子的量。

[0128] 在一些实施例中,多重方法包括确定存在于样品中的慢病毒核酸的量与HIV核酸的量的比例。在一些实施例中,确定的比例用于评估疗法或基因治疗例如用慢病毒载体转导的干细胞的效力。在一些实施例中,慢病毒和HIV核酸的量可以在治疗过程中,即在几个不同的时间点上确定,以评估治疗的效力(其中,例如,可将第一评估时间点和第二评估时间点进行比较,其中与从第一评估时间点到第二评估时间点的与HIV核酸相比的慢病毒核酸的增加量是治疗效力的指征)。在一些实施例中,根据所提供的评估给予另外的治疗。

#### [0129] 多重“方法1”

[0130] 参考图2,在本公开的一个方面是检测或定量在样品或相同反应管中的慢病毒核酸和HIV核酸的多重方法(“方法1”)。在一些实施例中,该方法首先包括制备存在于样品中的核酸,即DNA或RNA,用于扩增。如果RNA是样品中的起始物,那么根据本领域技术人员已知的方式将该RNA转换为cDNA。

[0131] 一旦制备了核酸,将正向和反向引物引入该样品。在这个特定方法中,在慢病毒核酸和HIV核酸两者的扩增中使用相同的正向和反向引物(参见图2)。在一些实施例中,正向引物是NuAf引物。在一些实施例中,正向引物具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施例中,反向引物与慢病毒核酸和HIV核酸两者的3' LTR的R区域内的序列杂交。在一些实施例中,反向引物是LTR-rev引物。在一些实施例中,反向引物具有SEQ ID NO:6的序列。不希望受任何特定理论的约束,可以相信,该特定的测定方法的特异性是基于正向引物。再一次地,不希望受任何特定理论的约束,可以相信,由于单个引物组,慢病毒核酸和HIV核酸两者的扩增效率是相同的。

[0132] 在将引物引入样品之后,引入两种不同的探针,其中第一探针包含对慢病毒核酸特异的第一可检测成分,并且其中第二探针包含对HIV核酸特异的第二可检测成分(参见图2)。在一些实施例中,与野生型HIV核酸相比,将对特异于慢病毒核酸的第一探针针对慢病毒载体的3' LTR的U3区域内的缺失进行优化(使得第一探针可与慢病毒核酸而不是HIV核酸杂交)。在一些实施例中,探针是特异于慢病毒核酸的3' LTR内的接合位点的接合探针,例如,跨越3' LTR的U3和R区域的接合位点。在一些实施例中,接合探针能够与3' LTR内的第一区域和3' LTR内的第二区域杂交。在一些实施例中,接合探针能够与3' LTR的U3区域内的核苷酸序列的部分或片段杂交;以及与3' LTR的R区内的核苷酸序列的部分或片段杂交。在一

些实施例中,接合探针包含能够与第一序列杂交的第一部分和能够与SEQ ID NO:13的序列杂交的第二部分,所述第一序列与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性。在一些实施例中,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的序列。在其他实施例中,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的序列。在另外的实施例中,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少95%同一性的序列。

[0133] 在一些实施例中,特异于HIV核酸的第二探针是TATA-探针。在一些实施例中,第二探针具有SEQ ID NO:10的序列或与SEQ ID NO:10具有至少90%同一性的序列。在一些实施例中,第一探针用Cy5标记。在一些实施例中,第二探针用FAM标记。

[0134] 在探针的引入之后,允许发生根据标准方案的扩增。在一些实施例中,允许发生45-50个PCR循环。在一些实施例中,PCR是实时PCR。在RNA是起始物,并作为首先将RNA转换成cDNA的替代的情况下,可以使用逆转录酶PCR或实时逆转录酶。

[0135] 在一些实施例中,例如通过检测来自缀合于不同探针的不同可检测成分的信号来定量慢病毒核酸和HIV核酸的量。在一些实施例中,慢病毒核酸的量与HIV核酸的量的比例。在一些实施例中,所确定的比率用于评估疗法或基因治疗诸如用慢病毒载体转导的干细胞的效力。在一些实施例中,慢病毒和HIV核酸的量可以在治疗过程中,即在几个不同的时间点上确定,以评估疗法的治疗效力(其中,例如,可将第一评估时间点和第二评估时间点进行比较,其中与从第一评估时间点到第二评估时间点的与HIV核酸相比的慢病毒核酸的增加量为指示治疗效力的指征)。在一些实施例中,根据所提供的评估给予另外的治疗。

#### [0136] 多管“方法2”

[0137] 参考图3,本公开的一个方面是检测和/或定量样品中的慢病毒核酸和HIV核酸的多重方法,其中该多重方法发生在两个各自的反应管中(“方法2”)。第一反应管包括扩增慢病毒核酸所必要的所有成分。第二反应管包括扩增HIV核酸所必要的所有成分。与上述的“方法1”类似,该测定法再一次利用了3' LTR慢病毒核酸结构和野生型3' LTR HIV核酸结构之间的不同,并且,特别地,使用TATA-框作为对HIV核酸的扩增起始位点。

[0138] 如同前面的方法,该方法首先包括制备存在于样品中的核酸,即DNA或RNA,用于扩增。如果RNA是样品中的起始物,那么将该RNA转换为cDNA。一旦制备了核酸,引入正向和反向引物。在这个特定方法中,在慢病毒核酸和HIV核酸两者的扩增中使用不同的正向引物(参见图3)。用于扩增慢病毒核酸,正向引物是NuAf引物。在一些实施例中,正向引物具有SEQ ID NO:2的序列。用于扩增HIV核酸,正向引物是TATA引物。在一些实施例中,正向引物具有SEQ ID NO:4的序列。

[0139] 在一些实施例中,在慢病毒核酸和HIV核酸两者的扩增中使用相同的反向引物。在一些实施例中,反向引物与慢病毒核酸和HIV核酸两者的3' LTR的R区域内的序列杂交。在一些实施例中,反向引物是LTR-rev引物。在一些实施例中,反向引物具有SEQ ID NO:6的序列。不希望受任何特定理论的约束,可以相信,该特定的测定方法的特异性是基于正向引物。再一次地,不希望受任何特定理论的约束,可以相信,由于单个引物组,慢病毒核酸和HIV核酸两者的扩增效率是相同的。

[0140] 不希望受任何特定理论的约束,可以相信,在第一反应管(慢病毒载体核酸的扩增)中的反应的特异性基于使用的特异探针。不希望受任何特定理论的约束,可以相信,在第二反应管(HIV核酸的扩增)中的反应的特异性基于使用的正向引物。再一次地,不希望受

任何特定理论的束缚,可以相信,由于这些测定法基于普通的反向引物(例如LTR-rev),并且正向引物的位置在几百个碱基内隔开,因此扩增效率是相对相同的,使得该测定法可以在LV核酸和HIV核酸两者的检测和/或定量中提供可靠的比较数据。

[0141] 在将引物引入样品之后,引入两种不同的探针,其中第一探针包含特异于慢病毒核酸的第一可检测成分,并且其中第二探针包含特异于HIV核酸的第二可检测成分(参见图3)。在一些实施例中,与野生型HIV核酸相比,将特异于慢病毒核酸的第一探针针对慢病毒载体的3' LTR的U3区域内的缺失进行优化(使得第一探针可与慢病毒核酸而不是HIV核酸杂交)。在一些实施例中,探针是特异于慢病毒核酸的3' LTR内的接合位点的接合探针,例如,跨越3' LTR的U3和R区域的结合位点。在一些实施例中,接合探针能够与3' LTR内的第一区域和3' LTR内的第二区域杂交。在一些实施例中,接合探针能够与3' LTR的U3区域内的核苷酸序列的部分或片段杂交;以及3' LTR的R区内的核苷酸序列的部分或片段杂交。在一些实施例中,接合探针包含能够与第一序列杂交的第一部分和能够与SEQ ID NO:13的序列杂交的第二部分,所述第一序列与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性。在一些实施例中,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少80%同一性的序列。在其他实施例中,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的序列。在另外的实施例中,接合探针包含与SEQ ID NO:14具有至少95%同一性的序列。

[0142] 在一些实施例中,特异于HIV核酸的第二探针是TAR-探针。在一些实施例中,第二探针具有SEQ ID NO:8的序列或与SEQ ID NO:8的序列具有至少90%同一性的序列。在一些实施例中,第一探针用Cy5标记。在一些实施例中,第二探针用FAM标记。

[0143] 在探针的引入之后,允许发生根据标准方案的扩增。在一些实施例中,允许发生45-50个PCR循环。在一些实施例中,PCR是实时PCR。在RNA是起始物,并作为首先将RNA转换成cDNA的替代的情况下,可以使用逆转录酶PCR或实时逆转录酶。

[0144] 在一些实施例中,例如通过检测来自缀合于不同探针的不同可检测成分的信号来定量慢病毒核酸和HIV核酸的量。在一些实施例中,慢病毒核酸的量与HIV核酸的量的比例。在一些实施例中,所确定的比例用于评估疗法或基因治疗诸如用慢病毒载体转导的干细胞的效力。在一些实施例中,慢病毒和HIV核酸的量可以在治疗过程中,即在几个不同的时间点上确定,以评估疗法的治疗效力(其中,例如,可将第一评估时间点和第二评估时间点进行比较,其中与从第一评估时间点到第二评估时间点的与HIV核酸相比的慢病毒核酸的增加量为治疗效力的指征)。在一些实施例中,根据所提供的评估给予另外的治疗。

#### [0145] 多重“方法3”

[0146] 参考图4,在本公开的一个方面是检测和/或定量样品中的慢病毒核酸和HIV核酸的多重方法,其中该多重方法发生在单个反应管中(“方法3”)。在一些实施例中,该方法首先包括制备存在于样品中的核酸,即DNA或RNA,用于扩增。如果RNA是样品中的起始物,那么将该RNA转换为cDNA。

[0147] 一旦制备了核酸,引入正向和反向引物。在该特定方法中,在慢病毒核酸和HIV核酸两者的扩增中使用相同的正向和反向引物(参见图4)。在一些实施例中,正向引物是NuA引物。在一些实施例中,正向引物具有SEQ ID NO:2的序列。在一些实施例中,反向引物与慢病毒核酸和HIV核酸两者的3' LTR的R区域内的序列杂交。在一些实施例中,反向引物是LTR-rev引物。在一些实施例中,反向引物具有SEQ ID NO:6的序列。在该特定的方法中,相比较

本文的方法1和方法2,没有用到探针。不希望受任何特定理论的约束,可以相信,由于单个引物组,LV核酸和HIV核酸两者的扩增效率是相同的。

[0148] 在该方法中,扩增产生具有不同大小的慢病毒核酸扩增子和HIV核酸扩增子(参见图7,其显示了来自从本文实例1提取的DNA的扩增子的相对大小)。在一些实施例中,这两个扩增子的大小的不同的范围为约100至约560个碱基对,并且慢病毒载体核酸扩增子短于(即具有相对少的碱基或较低的分子量)HIV扩增子。在其他实施例中,这两个扩增子的大小的不同的范围为约100至约550个碱基对,并且慢病毒载体核酸扩增子短于(即具有相对少的碱基或较低的分子量)HIV扩增子。通过使用任何标准电泳分离方法(例如结合DNA染色步骤使用琼脂糖凝胶的电泳分离,诸如Sybr-green, EvaGreen)可将不同大小的扩增子彼此区别和/或分离。可随后定量分离的扩增子,以能够得到样品中的慢病毒载体核酸和HIV核酸的量。

[0149] 在一些实施例中,可以使用液滴数字PCR(BioRad)以用EvaGreen染料立即分离具有精确的定量检测的条带的大小,以及允许用简单的PCR引物组同时产生LV核酸和HIV核酸的拷贝数的绝对定量。

[0150] 液滴数字PCR技术是利用水-油乳滴系统的数字PCR方法。液滴形成在水-油乳液中以形成分隔模板DNA分子的分区。液滴的功能基本上与PCR反应发生的平板中的单个试管或孔起到相同的作用,尽管格式小得多。不希望受任何特定理论的约束,可以相信,液滴数字PCR系统将核酸样品分配成数千纳升大小的液滴,并且在每个液滴内进行PCR扩增。

[0151] 液滴支持它们包含的模板分子的PCR扩增,并使用与基于EvaGreen染色双链DNA的常规实时PCR方法中使用的那些类似的试剂和 workflows。在PCR之后,以与流式细胞仪相似的思路分析或读取每个液滴,以确定原始样品中PCR阳性液滴的分数。当我们用在图4所描述的方法时,LV扩增子和HIV-1扩增子中的两个扩增子侧是不同的。嵌入染料EvaGreen与双链DNA结合。在HIV-1的情况下,较长的双链DNA扩增子产生高得多的强度,并且在Ca1-1的情况下由较短的双链DNA扩增子产生高得多的强度。然后使用泊松统计分析这些数据以确定原始样品中的靶DNA模板浓度。通过这种方法,我们可以确定原始样本中有多少拷贝的HIV-1和Ca1-1扩增子。

#### [0152] 试剂盒

[0153] 在本公开的另一个方面是用于实施所要求保护的方法的试剂盒。在一些实施例中,本公开的试剂盒提供至少一种正向引物、至少一种反向引物和至少一个探针。在一些实施例中,本公开的试剂盒包括NuAf引物、LTR-rev引物和特异于慢病毒载体的探针。在其他实施例中,本公开的试剂盒包括NuAf引物、LTR-rev引物和具有SEQ ID NO:14的序列的探针。在另一些实施例中,本公开的试剂盒包括NuAf引物、LTR-rev引物、特异于慢病毒载体的探针和TATA-探针。在进一步的实施例中,本公开的试剂盒包括NuAf引物、LTR-rev引物、具有SEQ ID NO:14的序列的探针和TATA-探针。

[0154] 在其他实施例中,本公开的试剂盒包括NuAf引物、TATA-引物、LTR-rev引物、特异于慢病毒载体的探针和TAR-探针。在其他实施例中,本公开的试剂盒包括NuAf引物、TATA-引物、LTR-rev引物、具有SEQ ID NO:14的探针和TAR-探针。

[0155] 本公开的试剂盒可以进一步包含其他成分,包括反应管、说明、缓冲液、试剂和寡核苷酸。

[0156] 实例

[0157] 本文公开的是一系列非限制性实例,其进一步说明了本公开的特定实施例。

[0158] 实例1

[0159] 基于MOLT-4细胞制备三组样品:基于MOLT-4细胞的初始体外实验。

[0160] a) 仅为MOLT-4细胞,没有Ca1-1慢病毒的任何转导;

[0161] b) 80%的MOLT-4细胞和20%用Ca1-1慢病毒转导的MOLT-4细胞。通过C46表达的流式细胞术分析而测定转导的细胞的程度。该实验设置用于测定原始MOLT-4细胞(80%)和Ca1-1转导的MOLT-4细胞(20%)的混合群体的转基因效应;

[0162] c) MOLT4 Ca1-1(100%)。在流式细胞术中通过C46表达确定100%的细胞已用Ca1-1转导。

[0163] 约50万个这些细胞被HIV-1 BaL感染。在CO<sub>2</sub>温育箱中使用10mL含有带1×谷氨酰胺补充物的10%FBS的标准RPMI-1640培养基在25-cm<sup>2</sup>的培养烧瓶中培养这些细胞。在第4、7、10、14天取出培养的上清液样品(1mL)用于RT测定(图5A)和逆转录酶实时(RT)-PCR测定两者(图5B和C)的分析。在第4、7、10、14天也制备培养的细胞样品用于分析DNA(图6AB)和RNA两者(图6C)的细胞内分析。在每个时间点,将0.6mL用于DNA分析的培养细胞悬浮液和0.4mL用于RNA分析的培养细胞悬浮液转移到2.0mL标准Eppendorf管中。将这些管以900g离心3分钟。然后除去上清液。向每个管中加入1mL PBS,然后在900g下离心3分钟。再次除去上清液。细胞沉淀用于RNA和DNA分析。

[0164] 使用逆转录酶测定法(RT测定法)(图5A)来测量在10μL感染的MOLT-4释放的培養的上清液中的慢病毒的量。RT测定法能够检测培养的上清液中的HIV-1和慢病毒载体(参见 Suzuki K, et al: Poly A-linked non-isotopic microtiter plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates. J Virol Methods 1995, 55:347-356, 公开的全部内容通过引用并入本文)。

[0165] MOLT-4(●)在第10天、第14天显示出高度增加的RT水平,表明随着培养,从感染的MOLT-4释放了高产量的HIV-1。这个数据表明这个组感染实验进行良好;

[0166] MOLT4 Ca120%(▲)在第14天显示从感染的MOLT-4释放的HIV-1的大幅减少(10fold);

[0167] MOLT4 Ca1-1(■)显示感染的细胞释放的HIV-1大大减少;

[0168] RT测定法能够检测HIV-1的RT活性,并且RT测定法也能够检测Ca1-1慢病毒,其被认为是来自MOLT-4转染过程的残留。在第4天的分析中,MOLT4 Ca1-1(■)的RT活性高于MOLT4(●)。MOLT4 Ca120%(▲)的RT活性也略高于MOLT4(●)。

[0169] 根据本文所述的多重方法-1,根据使用单管测定法的测定方法,基于单管测定法实施HIV-1特异的RNA检测(图5B)。使用60μL的洗脱体积设置的自动提取系统(EasyMag, bioMerieux)从500μL培养的上清液中提取RNA。

[0170] 注意:在一步逆转录酶实时(RT)-PCR分析中使用LightCycler 480(Roche)和用于LightCycler-480的白色96-孔板。

[0171] 制造每个方案的主混合物用于8个标准品和样品分析。

[0172] 主混合物:用于检测HIV-1 RNA和Ca1-1 RNA的双重检测

[0173] 表1用于HIV-1 RNA和Ca1-1 RNA的双重检测的主混合物,混合物的总体积为34微升。

[0174]

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶            | 10.60 |
| 2x B(来自试剂盒)               | 20.00 |
| NuA <sub>f</sub> (20μM)   | 0.50  |
| Imai-LTR-Rev (20μM)       | 0.50  |
| 用FAM标记的HIV-1 Tata探针 (5μM) | 0.60  |
| 用Cy5标记的Ca1-1探针 (5μM)      | 0.60  |
| RT酶(来自试剂盒)                | 0.40  |
| 核糖核酸酶抑制剂(来自试剂盒)           | 0.80  |

[0175] 将34μL主混合物的等分试样(aliquot)分配到设定位置的96孔板(参见图15A)的每个孔中,如在下面的测定模式中所示。对设定位置的每个孔加入6μL HIV-1和Ca1-1两者的标准品和测试样品后,使用以下条件实施RT-PCR:45°C-20min,95°C-2min(94°C-7秒,60°C-30秒)45个循环。

[0176] 试剂

[0177] SensiFAST探针一步试剂盒(BioLine#BIO-76005)

[0178] 标准品

[0179] HIV-1标准品:0、4、4x10、4x10<sup>2</sup>、4x10<sup>3</sup>、4x10<sup>4</sup>、4x10<sup>5</sup>、4x10<sup>6</sup>拷贝/μL。

[0180] Ca1-1标准品:0、2、2x10、2x10<sup>2</sup>、2x10<sup>3</sup>、2x10<sup>4</sup>、2x10<sup>5</sup>、2x10<sup>6</sup>拷贝/μL。

[0181] HIV-1特异的RNA检测数据(图5B)显示,在第四天,所有三个实验显示了使用根据方法-1的单管测定法在从上清液提出的RNA中的相同水平的HIV-1。MOLT4 Ca1-1(■)中的HIV-1的量显示了在第10天和第14天比从感染的MOLT-4(●)释放的HIV-1减少超过1000倍。MOLT4 Ca120%(▲)显示了在第14天从感染的MOLT-4释放的HIV-1减少10倍,与RT测定法数据一致。

[0182] 使用根据方法-1的单管测定法,Ca1-1特异的RNA检测(图5C)表明在Ca1-1转导的MOLT4细胞(●)中观察到培养中Ca1-1 RNA水平随时间降低。当用Ca1-1在第0天转导MOLT-4细胞时,Ca1-1的量可能是残留的慢病毒的结果。在未转导的MOLT-4细胞中没有检测到Ca1-1 RNA。在第4天仅从MOLT4Ca120%(●)组在天数-4检测到少量的Ca1-1 RNA。

[0183] RT数据显示,在第4天,与单独的MOLT4细胞(●)相比,MOLT4 Ca1-1(■)的RT水平略微升高。这可能是由于慢病毒的残留。与MOLT-4感染相比,在MOLT4 Ca120%(▲)中也观察到很小水平的升高的RT。稍微升高的RT可能是低水平的慢病毒残留所导致的指征。在第14天样品上清液中Ca1-1 RNA的水平是培养上清液中HIV-1 RNA水平的约1/1000,表明了极小水平的Ca1-1 RNA残留。

[0184] 实例2A

[0185] 根据方法-1,基于单管测定法生成了HIV-1整合的DNA(图6A)和Ca1-1整合的DNA(图6B),并在本文中进一步描述。DNA提取自用具有60μL洗脱体积的PurLink Genomic DNA试剂盒(ThermoFisher)在第4、7、10、14天制备的细胞沉淀。

[0186] 注意:在该一步实时PCR分析中使用LightCycler 480(Roche)和用于

LightCycler-480的白色96-孔板。

[0187] 每个方案制造两个主混合物用于8个标准品和样品分析。

[0188] i) 主混合物1用于检测HIV-1 DNA和Ca1-1 DNA的双重检测

[0189] ii) 主混合物2用于肌动蛋白检测

[0190] 表2PCR主1混合物:主混合物用于检测HIV-1 DNA和Ca1-1 DNA的双重检测。

[0191]

|                         |      |
|-------------------------|------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶          | 11.7 |
| 10x B                   | 2.0  |
| MgSO <sub>4</sub> (5mM) | 0.8  |
| NuA <sub>f</sub> (20μM) | 0.25 |
| Imai-LTR-Rev (20μM)     | 0.25 |
| 用FAM标记的Tata探针 (5μM)     | 0.3  |
| 用Cy5标记的Ca1-1探针 (5μM)    | 0.3  |
| ACCUPRIME TAQ           | 0.4  |

[0192] 表3PCR主混合物2用于肌动蛋白检测。

[0193]

|                         |      |
|-------------------------|------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶          | 12.0 |
| 10x B                   | 2.0  |
| MgSO <sub>4</sub> (5mM) | 0.8  |
| 肌动蛋白正向引物 (20μM)         | 0.25 |
| 肌动蛋白正向引物 (20μM)         | 0.25 |
| 用Cy5标记的肌动蛋白Taq探针 (5μM)  | 0.3  |
| ACCUPRIME TAQ           | 0.4  |

[0194] 将34μL主混合物-1的等分试样分配到设定位置的96孔板的每个孔中,如在下面的测定模式中所示,并且将16μL主2混合物(肌动蛋白检测)的等分试样分配到不同的96孔板的每个孔中,如在下面的测定模式中所示(参见图15B)。

[0195] 在对设定位置的每个孔加入6μL HIV-1和Ca1-1两者的标准品以及测试样品以及对设定位置的每个孔加入3μL肌动蛋白的标准品以及测试样品后,启动具有以下条件的RT-PCR:95℃-2min,(94℃-15秒,60℃-30秒)45个循环。

[0196] 试剂

[0197] ACCUPRIME TAQ (Life-Technology#12339016)

[0198] 标准品

[0199] HIV-1标准品:0、4、4x10、4x10<sup>2</sup>、4x10<sup>3</sup>、4x10<sup>4</sup>、4x10<sup>5</sup>、4x10<sup>6</sup>拷贝/μL。

[0200] Ca1-1标准品:0、2、2x10、2x10<sup>2</sup>、2x10<sup>3</sup>、2x10<sup>4</sup>、2x10<sup>5</sup>、2x10<sup>6</sup>拷贝/μL。

[0201] 肌动蛋白标准品:0、2、2x10、2x10<sup>2</sup>、2x10<sup>3</sup>、2x10<sup>4</sup>、2x10<sup>5</sup>、2x10<sup>6</sup>拷贝/μL。

[0202] HIV-1整合的DNA数据用106个拷贝的GAPDH来标准化(图6A)。在培养期间观察到在MOLT4细胞中HIV-1 DNA水平显著增加。这是在MOLT4细胞中高水平的HIV-1整合的指征。

[0203] MOLT4 Ca1-1-20%显示了在第10天和第14天可检测到HIV-1 DNA。但是,观察到HIV-1 DNA的水平相比单独的MOLT4细胞低约10-50倍。在HIV激发的Ca1-1 100%转导的

MOLT4细胞中没有检测到HIV-1 DNA。可以相信,转导的Ca1-1载体保护了MOLT4细胞免受HIV-1感染。

[0204] Ca1-1整合的DNA数据用106个拷贝的GAPDH来标准化(图6B)。在培养期间观察到在Ca1-1 100%转导的MOLT4细胞中Ca1-1 DNA水平显著增加。这是在MOLT4细胞中高水平的HIV-1整合的指征。

[0205] MOLT4 Ca1-1-20%显示了在第4天和第7天检测到HIV-1 DNA。但是,观察到Ca1-1 DNA的水平相比Ca1-1 100%转导的MOLT4细胞低约20-60倍。在第10天和第14天在MOLT4 Ca1-1-20%中观察到Ca1-1 DNA的水平降低。这与HIV-1 DNA数据有关。由于在该实验设置中缺少Ca1-1 DNA,HIV-1 DNA水平在第10天和第14天升高(图6A)。在单独的MOLT4细胞中未检测到Ca1-1 DNA。Ca1-1

#### [0206] 实例2B

[0207] 图6C提供了显示使用方法-1而能够确定HIV-1 RNA拷贝数的实验结果的图表。为了检测HIV-1细胞内RNA水平,分析HIV-1特异的LTR mRNA(图6C)。RNA提取自用具有60μL洗脱体积的ReliaPrep RNA Miniprep系统(Promega)在第4、7、10、14天制备的细胞沉淀。

[0208] 注意:在该一步逆转录酶实时(RT)-PCR分析中使用LightCycler 480 (Roche)和用于LightCycler-480的白色96-孔板。

[0209] 每个方案制造两个主混合物用于8个标准品和样品分析。

[0210] PCR主1混合物:主1混合物用于HIV-1 mRNA检测。

[0211] PCR主2混合物:主混合物用于GAPDH mRNA检测

[0212] 表4PCR主1混合物用于HIV-1 mRNA检测。

[0213]

|                          |       |
|--------------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶           | 11.20 |
| 2x B(来自试剂盒)              | 20.00 |
| Tata正向引物(20μM)           | 0.50  |
| Imai-LTR-Rev(20μM)       | 0.50  |
| 用FAM标记的HIV-1 Tata探针(5μM) | 0.60  |
| RT酶(来自试剂盒)               | 0.40  |
| 核糖核酸酶抑制剂(来自试剂盒)          | 0.80  |

[0214] 表1 PCR主混合物2用于检测GAPDH mRNA的检测。

[0215]

|                         |       |
|-------------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶          | 5.60  |
| 2x B(来自试剂盒)             | 10.00 |
| GAPDH正向引物(20μM)         | 0.25  |
| GAPDH正向引物(20μM)         | 0.25  |
| 用Cy5标记的GAPDH Taq探针(5μM) | 0.30  |
| RT酶(来自试剂盒)              | 0.20  |
| 核糖核酸酶抑制剂(来自试剂盒)         | 0.40  |

[0216] 将34μL主混合物-1(HIV-1检测)的等分试样分配到设定位置的96孔板的每个孔中,如在下面的测定模式所示,并且将16μL主2混合物(GAPDH检测)的等分试样分配到不

同的96孔板的每个孔中,如在下面的测定模式中所示(参见图15C)。

[0217] 然后对设定位置的每个孔加入6 $\mu$ L HIV-1标准品以及测试样品以及对设定位置的每个孔加入3 $\mu$ L GAPDH的标准品以及测试样品。启动具有以下条件的RT-PCR:45 $^{\circ}$ C-20min, 95 $^{\circ}$ C-2min, (94 $^{\circ}$ C-7秒,60 $^{\circ}$ C-30秒) 45个循环

[0218] 试剂

[0219] SensiFAST探针一步试剂盒 (BioLine#BIO-76005)

[0220] 标准品

[0221] HIV-1标准品:0、4、4x10、4x10<sup>2</sup>、4x10<sup>3</sup>、4x10<sup>4</sup>、4x10<sup>5</sup>、4x10<sup>6</sup>拷贝/ $\mu$ L。

[0222] GAPDH标准品:0、2、2x10、2x10<sup>2</sup>、2x10<sup>3</sup>、2x10<sup>4</sup>、2x10<sup>5</sup>、2x10<sup>6</sup>拷贝/ $\mu$ L。

[0223] HIV-1 mRNA分析数据用106个拷贝的GAPDH的mRNA表达来标准化(图6C)。在培养期间在未转导的MOLT4细胞(●)中检测到高水平的HIV-1特异的细胞相关的HIV-1 LTR mRNA。

[0224] 另一方面,在第10天和第14天在Ca1-1 100%转导的MOLT4细胞(■)中观察到显著减少(约1000倍)的HIV-1细胞相关的HIV-1LTR mRNA。HIV-1细胞相关的HIV-1 LTR mRNA(▲)中MOLT4 Ca1-1-20%实验组的减少水平(10-100倍)是在第10天部分保护免受HIV感染的指征。这些观察结果提示,Ca1-1能够诱导MOLT4细胞中HIV感染的减少超过1000倍。

[0225] 尽管在Ca1-1转导的MOLT4细胞中未检测到HIV DNA水平,但如图6C所示,HIV-1细胞相关的LTR-mRNA仍可检测到(■)。这表明极低水平的RNA转录是从MOLT-4细胞中大概很小的群体的HIV-1整合DNA发生的。

[0226] 添加到每个PCR反应中的DNA的量具有大概 $1-2 \times 10^5$ 个细胞的细胞当量。因此,该测定法中的HIV-1检测灵敏度是每 $1-2 \times 10^5$ 细胞2个拷贝。如果HIV-1整合频率低于每 $1-2 \times 10^5$ 细胞2个拷贝,则该测定法不能使用该测定方法检测HIV-1 DNA。

[0227] 观察到的HIV-1 LTR-mRNA水平可能是很小部分的MOLT4细胞的结果,其不能用Ca1-1转导。

[0228] 实例3

[0229] 实例3示出了在图2(方法-1)和图3(方法-2)中示出的两种不同测定方法的结果,其该方法中使用从本文实例1获得的DNA进行比较。表6中的结果利用了单个反应管(方法-1)中发生的多重测定方法;而表7和表8中的结果利用了两个不同的反应管(方法-2)中发生的多重测定方法。基于表6、7和8中的数据,类似地实施两种测定法,即从两种方法获得的定量数据是相似的。因此,如本文所公开的,两种方法都能够扩增慢病毒核酸和HIV核酸以及定量扩增的慢病毒核酸和扩增的HIV核酸的水平。

[0230] 表6在单个PCR管中使用具有Cy5标记的Ca1-1和FAM-标记的HIV-1特异性探针的单个引物组的测定法

[0231]

| Cy5 标记的 Cal-I 数据 |       |              |       |              |                          |
|------------------|-------|--------------|-------|--------------|--------------------------|
| 孔                | Fluor | 内容物          | Cq    | 拷贝数/ $\mu$ L | 标准化的拷贝数/1000<br>拷贝 GAPDH |
| A02              | Cy5   | NTC          | N/A   | N/A          |                          |
| B02              | Cy5   | Cal-1 Std-01 | N/A   | 2            |                          |
| C02              | Cy5   | Std-02       | 38.34 | 20           |                          |
| D02              | Cy5   | Std-03       | 34.2  | 200          |                          |
| E02              | Cy5   | Std-04       | 29.82 | 2000         |                          |
| F02              | Cy5   | Std-05       | 27.25 | 20000        |                          |
| G02              | Cy5   | Std-06       | 25.54 | 200000       |                          |
| H02              | Cy5   | Std-07       | 18.68 | 2000000      |                          |
| A04              | Cy5   | 仅 MOLT4      | N/A   | N/A          |                          |

[0232]

| B04              | Cy5   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A     |       |
|------------------|-------|--------------------|-------|---------|-------|
| C04              | Cy5   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | N/A   | N/A     |       |
| D04              | Cy5   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | N/A   | N/A     |       |
| E04              | Cy5   | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | 22.85 | 308600  | 48575 |
| F04              | Cy5   | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | 23.01 | 279000  | 43916 |
| FAM 标记的 HIV-1 数据 |       |                    |       |         |       |
| 孔                | Fluor | 内容物                | Cq    | SQ      |       |
| A03              | FAM   | NTC                | N/A   | N/A     |       |
| B03              | FAM   | HIV Std-11         | N/A   | 2       |       |
| C03              | FAM   | Std-12             | 38.67 | 20      |       |
| D03              | FAM   | Std-13             | 34.67 | 200     |       |
| E03              | FAM   | Std-14             | 30.64 | 2000    |       |
| F03              | FAM   | Std-15             | 27.27 | 20000   |       |
| G03              | FAM   | Std-16             | 23.3  | 200000  |       |
| H03              | FAM   | Std-17             | 18.17 | 2000000 |       |
| A04              | FAM   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A     |       |
| B04              | FAM   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A     |       |
| C04              | FAM   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | 30.67 | 2134    | 818   |
| D04              | FAM   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | 29.01 | 2003    | 768   |
| E04              | FAM   | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | N/A   | N/A     |       |
| F04              | FAM   | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | N/A   | N/A     |       |

[0233] 表7使用具有Cy5标记的Ca1-1特异性探针的引物组的单管

[0234]

| 孔   | Fluor | 内容物                | Cq    | 拷贝数/ $\mu$ L | 标准化的拷贝数 /1000 拷贝 GAPDH |
|-----|-------|--------------------|-------|--------------|------------------------|
| A05 | Cy5   | NTC                | N/A   | N/A          |                        |
| B05 | Cy5   | Std-21             | N/A   | 2            |                        |
| C05 | Cy5   | Std-22             | 37.75 | 20           |                        |
| D05 | Cy5   | Std-23             | 34.75 | 200          |                        |
| E05 | Cy5   | Std-24             | 30.23 | 2000         |                        |
| F05 | Cy5   | Std-25             | 28.18 | 20000        |                        |
| G05 | Cy5   | Std-26             | 26.06 | 200000       |                        |
| H05 | Cy5   | Std-27             | 19.83 | 2000000      |                        |
| A06 | Cy5   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A          |                        |
| B06 | Cy5   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A          |                        |
| C06 | Cy5   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | N/A   | N/A          |                        |

[0235]

|     |     |                    |       |        |       |
|-----|-----|--------------------|-------|--------|-------|
| D06 | Cy5 | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | N/A   | N/A    |       |
| E06 | Cy5 | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | 23.45 | 388000 | 61074 |
| F06 | Cy5 | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | 23.26 | 441300 | 69463 |

[0236] 表8使用具有FAM标记的探针的HIV-1特异性引物组的另一个单管的反应

[0237]

| 孔   | Fluor | 内容物                | Cq    | 拷贝数/ $\mu$ L | 标准化的拷贝数/1000 拷贝 GAPDH |
|-----|-------|--------------------|-------|--------------|-----------------------|
| A08 | FAM   | NTC                | N/A   | N/A          |                       |
| B08 | FAM   | HIV Std-31         | N/A   | 2            |                       |
| C08 | FAM   | Std-32             | 38.65 | 20           |                       |
| D08 | FAM   | Std-33             | 33.86 | 200          |                       |
| E08 | FAM   | Std-34             | 30.13 | 2000         |                       |
| F08 | FAM   | Std-35             | 25.66 | 20000        |                       |
| G08 | FAM   | Std-36             | 21.74 | 200000       |                       |
| H08 | FAM   | Std-37             | 17.61 | 2000000      |                       |
| A09 | FAM   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A          |                       |
| B09 | FAM   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A          |                       |
| C09 | FAM   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | 31.35 | 966          | 370                   |
| D09 | FAM   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | 31.55 | 862          | 331                   |
| E09 | FAM   | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | N/A   | N/A          |                       |
| F09 | FAM   | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | N/A   | N/A          |                       |
| 孔   | Fluor | 内容物                | Cq    | 拷贝数/ $\mu$ L | 标准化的拷贝数/1000 拷贝 GAPDH |
| A08 | FAM   | NTC                | N/A   | N/A          |                       |
| B08 | FAM   | HIV Std-31         | N/A   | 2            |                       |
| C08 | FAM   | Std-32             | 38.65 | 20           |                       |
| D08 | FAM   | Std-33             | 33.86 | 200          |                       |
| E08 | FAM   | Std-34             | 30.13 | 2000         |                       |
| F08 | FAM   | Std-35             | 25.66 | 20000        |                       |
| G08 | FAM   | Std-36             | 21.74 | 200000       |                       |
| H08 | FAM   | Std-37             | 17.61 | 2000000      |                       |
| A09 | FAM   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A          |                       |
| B09 | FAM   | 仅 MOLT4            | N/A   | N/A          |                       |
| C09 | FAM   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | 31.35 | 966          | 370                   |
| D09 | FAM   | 具有 HIV-1 感染的 MOLT4 | 31.55 | 862          | 331                   |
| E09 | FAM   | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | N/A   | N/A          |                       |
| F09 | FAM   | 具有 Cat1 转导的 MOLT4  | N/A   | N/A          |                       |

[0238] 实例4

[0239] 测试HIV-1临床样品以评估新开发的基于LTR的测定法的HIV-1检测灵敏度。通常，进行该研究以评估开发的HIV-1测定法的检测灵敏度，并确认对HIV-1 DNA的任何交叉反应性，使用临床HIV-1患者样品。对14个HIV-1临床样品进行测试以评估HIV-1检测的灵敏度。用洗脱体积为60 $\mu$ L的QIAamp DNA Blood Mini试剂盒 (Qiagen Cat No.51104) 从1mL患者血液样品中提取DNA。按照实例5中提供的方案进行PCR分析。

[0240] 目标

[0241] 1) 用方法-2的测定法来确定HIV-1测定法对于检测从HIV-1阳性患者中提取的HIV-1DNA是否足够敏感。

[0242] 2) 确定Ca1-1测定法是否不能与从HIV-1阳性患者中提取的DNA发生任何交叉反应。

[0243] 样品的制备

[0244] 使用14个HIV-1阳性样品进行分析。从1mL血液(约 $0.3-0.7 \times 10^6$  CD4<sup>+</sup>细胞)中提取DNA用于HIV-1的分析和Ca1-1检测。

[0245] 结果

[0246] 通过标准品计算HIV-1和Ca1-1拷贝数,并通过1,000,000个拷贝的肌动蛋白DNA进行标准化。两个标准品都产生了线性线,参见图9。HIV-1和Ca1-1两者的测定法都是有效的。如图9所示,HIV-1 DNA测定法能够检测出14个样品(A-N样品)中的14个。在14个样品的任何一个中没有检测到Ca1-1 DNA测定。Ca1-1测定法与从HIV-1阳性患者中提取的DNA没有任何交叉反应性。临床样品中HIV-1 DNA测定的水平与用2和20个U1细胞的加入数据获得的水平相似,表明本文实例4中的实验设置与实际的临床设置在相似水平。

[0247] 实例5

[0248] 基于实例5实施另一个实验,显示了根据方法2能够确定HIV-1和Ca1-1 DNA拷贝数的两个不同管的测定法的实验结果。

[0249] 基于获自单个供体的离体CD4<sup>+</sup> T细胞样品制备三组样品:

[0250] a) 未转导的CD4<sup>+</sup> T细胞

[0251] 用Ca1-1-lenti以MOI-2转导的CD4 (5x10<sup>6</sup>个细胞)

[0252] 用Ca1-1-lenti以MOI-10转导的CD4 (5x10<sup>6</sup>个细胞)

[0253] 组-a)是该实验的阴性对照组。组-b)是MOI-2的Ca1-1转导的CD4<sup>+</sup> T细胞。组-c)是MOI-10的Ca1-1转导的CD4<sup>+</sup> T细胞。

[0254] 在使用标准Ca1-1转导方案用Ca1-1-lenti转导CD4<sup>+</sup> T细胞后第14天获得这些样品。在第14天,将三组未转导的和转导的五百万个细胞的CD<sup>+</sup> T细胞以冷藏保存的方式储存在液氮的蒸气相中。

[0255] 计数U1细胞。将2个、20个、200个、2000个U1细胞的等分试样加入含有 $1 \times 10^6$ 个细胞的CD4细胞中。使用另一等份没有加入对照的 $1 \times 10^6$ 个细胞的CD4细胞(请注意,将转导的CD4的 $5 \times 10^6$ 个细胞分成等量的5等份,每个等份包含 $1 \times 10^6$ 个细胞)。用具有60μL洗脱体积的PurLink Genomic DNA试剂盒(ThermoFisher)提取DNA。基本上我们通过将U1细胞加入上述三组CD4<sup>+</sup> T细胞中来创建模拟的临床样品。选择U1细胞是因为它在单个细胞中携带整合的HIV-1基因的组两个拷贝。实验设置列出如下:

[0256] a) 每 $1 \times 10^6$ 个未转导的CD4<sup>+</sup> T细胞,0个、2个、20个、200个和2000个U1细胞

[0257] b) 每 $1 \times 10^6$ 个在MOI-2用Ca1-1-lenti转导的CD4,0个、2个、20个、200个和2000个U1细胞

[0258] c) 每 $1 \times 10^6$ 个在MOI-10用Ca1-1-lenti转导的CD4,0个、2个、20个、200个和2000个U1细胞

[0259] 根据方法-2,基于两个不同管的测定法获得HIV-1整合的DNA(图8A)和Ca1-1整合的DNA(图8B)数据。

[0260] 每个方案制造三个主混合物用于8个标准品和样品分析。

[0261] i) 主混合物1用于HIV-1 DNA的检测(表9)

[0262] ii) 主混合物2用于Ca1-1 DNA的检测(表10)

[0263] iii) 主混合物3用于肌动蛋白检测的检测(表11)

[0264] 表9 PCR主混合物1用于检测HIV-1 DNA,总量为34微升。

[0265]

|                    |       |
|--------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶     | 12.40 |
| 2x B(来自该试剂盒)       | 20.00 |
| Tata正向引物(20μM)     | 0.50  |
| Imai-LTR-Rev(20μM) | 0.50  |
| 用FAM标记的TAR探针(5μM)  | 0.60  |

[0266] 表10 PCR主混合物2用于检测Ca1-1 DNA,总量为34微升。

[0267]

|                     |       |
|---------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶      | 12.40 |
| 2x B(来自该试剂盒)        | 20.00 |
| NuAf(20μM)          | 0.50  |
| Imai-LTR-Rev(20μM)  | 0.50  |
| 用Cy5标记的Ca1-1探针(5μM) | 0.60  |

[0268] 表11 PCR主混合物3用于检测肌动蛋白,总量为17微升。

[0269]

|                  |       |
|------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶   | 6.20  |
| 2x B(来自该试剂盒)     | 10.00 |
| 肌动蛋白正向引物(20μM)   | 0.25  |
| 肌动蛋白反向引物(20μM)   | 0.25  |
| 用FAM的肌动蛋白探针(5μM) | 0.30  |

[0270] 将34μL主混合物-1(HIV-1检测)和主混合物-2(Ca1-1检测)的等分试样分配到设定位置的96孔板的每个孔中,如在下面的测定模式中所示,并且将16μL主3混合物(肌动蛋白检测)的等分试样分配到不同的96孔板的每个孔中,如在下面的测定模式中所示(参见图15D和15E)。

[0271] 然后对设定位置的每个孔加入6μL HIV-1和Ca1-1标准品以及测试样品并对设定位置的每个孔加入3μL肌动蛋白的标准品以及测试样品。实施使用以下条件的PCR:95℃-2min(94℃-7秒,60℃-30秒)45个循环

[0272] 试剂

[0273] SentiFast探针试剂盒(Line Cat No.BI0-86005)

[0274] 标准品

[0275] HIV-1标准品:0、4、4x10、4x102、4x103、4x104、4x105、4x106拷贝/μL。

[0276] Ca1-1标准品:0、2、2x10、2x102、2x103、2x104、2x105、2x106拷贝/μL。

[0277] 肌动蛋白标准品:0、2、2x10、2x102、2x103、2x104、2x105、2x106拷贝/μL。

[0278] HIV-1整合的DNA数据用106个拷贝的肌动蛋白来标准化(图8A)。

[0279] 分析

[0280] 未转导的CD4细胞的分析显示,通过该测定法检测到加入1x10e6个CD4细胞的两个

U1细胞,以及检测到20、200和2000个U1细胞。检测到线性增加的HIV-1 DNA拷贝数与U1细胞加入量成比例。

[0281] 在Ca1-1转导的CD4细胞(MOI2)的分析中,结果显示可线性地检测到加入的2、20、200、2000个U1细胞。

[0282] 在Ca1-1转导的CD4细胞(MOI10)的分析中,结果显示也可线性地检测到加入的2、20、200、2000个U1细胞。

[0283] 在2、20、200、2000个U1细胞的分析中,HIV-1检测值在三组中显示等同的数据,表明整合的Ca1-1 DNA不干扰HIV-1检测(图8A)。

[0284] Ca1-1整合的DNA数据用106个拷贝的肌动蛋白来标准化(图8B)。

[0285] 尽管将U1细胞加入CD4细胞中,Ca1-1 DNA测定法未检测到未转导的CD4细胞中的Ca1-1 DNA。

[0286] 观察Ca1-1 DNA水平的一致性检测用于分析“Ca1-1转导的CD4细胞(MOI2)”。

[0287] 观察Ca1-1 DNA水平的一致性检测也用于分析“Ca1-1转导的CD4细胞(MOI10)”。MOI=10的Ca1-1检测值比MOI=2的Ca1-1的值高约50倍,表明Ca1-1 DNA更多地整合到CD4+T细胞中。

[0288] 结论

[0289] 1) HIV-1检测方法足够灵敏,能够检测从来自患者的1mL血液中获得HIV-1 DNA(14份HIV-1阳性标本中检测出14份)

[0290] 2) Ca1-1测定法与从HIV-1提取的DNA没有任何交叉反应性。

[0291] 实例6

[0292] 测试三个样品:

[0293] 1. 未转导的CD4细胞

[0294] 2. 用Ca1-1-lenti以MOI2转导的CD4

[0295] 3. 用Ca1-1-lenti以MOI10转导的CD4

[0296] 这些样品是从相同的供体制备的。

[0297] 1号样品是实验的阴性对照。2号样品是Ca1-1以MOI2转导的CD4+细胞,3号样品是Ca1-1以MOI10转导的CD4+细胞。这些样品在用Ca1-1-lenti转导CD4细胞后14天获得。

[0298] 目标

[0299] A) 基于LTR区域的新测定法的评价能够使用实际供体样品检测CAL-1整合的DNA。

[0300] B) 用较高MOI转导的细胞检查CAL-1整合DNA水平中增加的拷贝数。

[0301] C) 检查HIV-1测定法的交叉反应性:由于这些样本没有HIV-1感染,因此HIV-1 LTR测定法在那些只有CAL-1整合DNA的临床样本中不应该检测到任何HIV水平。

[0302] D) 检查内部(in-house)对照性能:内部控制的建立对评估实际样品分析的测定验证非常重要。

[0303] 三个内部对照:

[0304] No.1<MOLT4 w Ca1-1>用Ca1-1转导MOLT4细胞

[0305] No.2<80%MOLT4 20%MOLT4-Ca1-1>用C46表达的流分析确定转导的细胞的程度。该实验设置用于原始MOLT-4细胞(80%)和Ca1-1转导的MOLT-4细胞(20%)的混合群体的转基因效应。

[0306] No.3<MOLT4 (w/o Ca1-1)>仅为MOLT4细胞,没有Ca1-1的任何转导

[0307] 这些三组细胞用BaL HIV-1感染。在MOLT-4感染的14天后制备DNA样品。

[0308] 结果(表12、13和14),显示了使用两个不同管的测定法(方法2)能够确定HIV-1和Ca1-1 DNA拷贝数的实验结果。

[0309] HIV-1测定法

[0310] HIV标准品显示了HIV-1 DNA从4至4,000,000拷贝/ $\mu$ L的良好线性检测

[0311] 用相同供体的三个样品显示没有检测到HIV-1 DNA:(a) No.1对照<MOLT4w Ca1-1>显示没有HIV;(b) No.2对照<80%MOLT4 20%MOLT4-Ca1-1>显示了一定水平的HIV检测;(c) No.3对照<没有Ca1-1的MOLT4>显示了相当高水平的HIV检测。

[0312] Ca1-1测定法

[0313] Ca1-1标准品显示了Ca1-1 DNA从2至2,000,000拷贝/ $\mu$ L的良好线性检测:(a) JE#1-3显示了无Ca1-1整合;(b) JE#1-3以MOI=2的转导显示了Ca1-1整合的70.5个拷贝;(c) JE#1-3以MOI=10的转导显示了Ca1-1整合的160个拷贝,其为MOI2的二倍值;(d) No.1对照<MOLT4w Ca1-1>显示了高水平的CAL-1 DNA 773个拷贝;(d) No.2对照<80%MOLT4 20%MOLT4-Ca1-1>显示了相当低水平的CAL-1 DNA拷贝;(e) No.3对照<没有Ca1-1的MOLT4>显示不出Ca1-1的检测水平。

[0314] 结论

[0315] A) 基于LTR区域的新测定法能够使用具有相同供体的实际临床样品来检测CAL-1整合的DNA。

[0316] B) 新测定法通过比较MOI2和MOI10的数据,能够检测CAL-1整合DNA水平中具有较高MOI转导的细胞的增加的拷贝数。

[0317] C) 基于HIV-1 LTR区域的新测定法没有显示CAL-1整合的DNA进入样品中的任何交叉反应性。

[0318] D) 三个新的内部对照可很好地评价这个新的测定法。这三个控制对于Ca1-1和HIV-1分析的每一次运行都是有用的。

[0319] 对于HIV-1测定法:(a) 样本中的HIV-1拷贝数由HIV-1标准品计算;(b) HIV-1拷贝数由在相同提取的DNA中的肌动蛋白DNA拷贝数标准化,标准化的HIV拷贝数由1000个拷贝的肌动蛋白计算,其在最后一栏用蓝色字母突出显示。

[0320] 对于Ca1-1测定法:(a) 样本中的Ca1-1拷贝数由Ca1-1标准品计算;(b) Ca1-1拷贝数由在相同提取的DNA中的肌动蛋白DNA拷贝数标准化,标准化的Ca1-1拷贝数由1000个拷贝的肌动蛋白计算,其在最后一栏用蓝色字母突出显示。

[0321] 对于肌动蛋白测定法:(a) 样本中的肌动蛋白拷贝数由肌动蛋白标准品计算;(b) 这些拷贝数用于将在样品中的HIV-1和Ca1-1样品标准化。

[0322] 表12提供:由HIV-1标准品计算的样品中的HIV-1拷贝数;HIV-1拷贝数通过在相同提取的DNA中的肌动蛋白DNA拷贝数标准化。标准化的HIV拷贝数通过1000个拷贝的肌动蛋白计算,列在最后一栏中。注意:cp(交叉点PCR循环)值是荧光在其中达到限定的阈值的循环。HIV标准品显示了HIV-1 DNA从4至4,000,000拷贝/ $\mu$ L的良好线性检测。相同供体(未转导、以MOI2转导、以MOI10转导)的三个样品显示没有检测到HIV-1 DNA。用HIV感染的样品的内部对照No.1<具有Ca1-1的MOLT4>显示没有HIV。用HIV感染的样品的内部对照No.2<80%

MOLT4 20%MOLT4-Ca11>显示一定程度的HIV检测。用HIV感染的样品的内部对照No.3<没有Ca1-1的MOLT4>显示相当高程度的HIV检测。

[0323] 表13提供Ca1-1分析数据。样品中的Ca1-1拷贝数由Ca1-1标准品计算；Ca1-1拷贝数通过在相同提取的DNA中的肌动蛋白DNA拷贝数标准化。标准化的Ca1-1拷贝数通过1000个拷贝的肌动蛋白计算，列在最后一栏中。Ca1-1标准品显示了Ca1-1 DNA从2至2,000,000拷贝/ $\mu$ L的良好线性检测。未转导的JE#1-3显示无CAL1整合。以MOI=2转导的JE#1-3显示了CAL1整合的70.5个拷贝。以MOI=10转导的JE#1-3显示了CAL1整合的160个拷贝，其为MOI2的二倍值。用HIV感染的样品的内部对照No.1<MOLT4w Ca11>显示了高水平的CAL1 DNA 773拷贝。用HIV感染的样品的内部对照No.2<80%MOLT4 20%MOLT4-Ca11>显示了相当低水平的CAL1 DNA拷贝。用HIV感染的样品的内部对照No.3<没有Ca1-1的MOLT4>显示不出Ca1-1的检测水平。

[0324] 表14提供肌动蛋白分析数据。样品中的肌动蛋白拷贝数由肌动蛋白标准品计算；这些拷贝数用于将样品中的HIV-1和Ca1-1拷贝数标准化。

[0325] 表12 HIV CAL肌动蛋白测定法

[0326]

| 位置 | 名称                                              | Cp    | HIV-1<br>浓度 | 肌 动 蛋<br>白 | 每 10 (3) 肌动蛋白拷贝的<br>HIV-1 的拷贝 |  |
|----|-------------------------------------------------|-------|-------------|------------|-------------------------------|--|
| A2 | NC                                              |       | 0           |            |                               |  |
| B2 | HIV 标准品                                         | 38.22 | 4           |            |                               |  |
| C2 | HIV 标准品                                         | 33.21 | 40          |            |                               |  |
| D2 | HIV 标准品                                         | 29.88 | 400         |            |                               |  |
| E2 | HIV 标准品                                         | 27.44 | 4000        |            |                               |  |
| F2 | HIV 标准品                                         | 23.41 | 40000       |            |                               |  |
| G2 | HIV 标准品                                         | 20.33 | 400000      |            |                               |  |
| H2 | HIV 标准品                                         | 16.73 | 4000000     |            |                               |  |
| A3 | <未转导的 JE #1-3> 用 $5 \times 10^6$                |       | 0           | 11137166   | 0                             |  |
| B3 | <用 MOI=2 转导的 JE #1-3> $5 \times 10^6$           |       | 0           | 8705100    | 0                             |  |
| C3 | <用 MOI=10 转导的 JE #1-3> $5 \times 10^6$          |       | 0           | 3901724    | 0                             |  |
| D3 | 第 14 天具有 HIV 的对照 NO.1<MOLT4 w Ca11>             |       | 0           | 44498      | 0                             |  |
| E3 | 第 14 天具有 HIV 的对照 NO.2<80% MOLT4 20% MOLT4-Ca11> | 25.57 | 10598       | 67407      | 157                           |  |
| F3 | 第 14 天具有 HIV 的对照 NO.3<MOLT4 ( w/o Ca11) >       | 22.35 | 90697       | 86849      | 1,044                         |  |

[0327] 表13 HIV CAL肌动蛋白测定法

[0328]

| 位置 | 名称      | Cp    | Cal-I<br>浓度 | 肌动蛋白 | 每 10 (3) 肌动蛋白拷贝的<br>Cal-1 的拷贝 |  |
|----|---------|-------|-------------|------|-------------------------------|--|
| A5 | NC      |       | 0           |      |                               |  |
| B5 | Cal 标准品 | 37.7  | 2           |      |                               |  |
| C5 | Cal 标准品 | 36.8  | 20          |      |                               |  |
| D5 | Cal 标准品 | 34.13 | 200         |      |                               |  |
| E5 | Cal 标准品 | 30.76 | 2000        |      |                               |  |

[0329]

|    |                                                       |       |         |          |       |  |
|----|-------------------------------------------------------|-------|---------|----------|-------|--|
| F5 | Cal 标准品                                               | 27.48 | 20000   |          |       |  |
| G5 | Cal 标准品                                               | 23.6  | 200000  |          |       |  |
| H5 | Cal 标准品                                               | 20.45 | 2000000 |          |       |  |
| A6 | <未转导的 JE #1-3> 用 $5 \times 10^6$                      |       |         | 11137166 | 0.0   |  |
| B6 | <用 MOI=10 导的 JE #1-3><br>$5 \times 10^6$              | 22.6  | 613511  | 8705100  | 70.5  |  |
| C6 | <用 MOI=10 导的 JE #1-3><br>$5 \times 10^6$              | 22.58 | 622911  | 3901724  | 159.7 |  |
| D6 | 第 14 天具有 HIV 的对照<br>NO.1<MOLT4 w Cal1>                | 26.39 | 34388   | 44498    | 772.8 |  |
| E6 | 第 14 天具有 HIV 的对照<br>NO.2<80% MOLT4 20%<br>MOLT4-Cal1> | 32.29 | 388     | 67407    | 5.7   |  |
| F6 | 第 14 天具有 HIV 的对照<br>NO.3<MOLT4 (w/o Cal1)>            |       | 0       | 86849    | 0.0   |  |

[0330] 表14 HIV CAL 肌动蛋白测定法

[0331]

| 位置 | 名称                                   | Cp    | 肌动蛋白浓度   |
|----|--------------------------------------|-------|----------|
| A8 | NC                                   |       | 0        |
| B8 | 肌动蛋白标准品                              | 39.56 | 2        |
| C8 | 肌动蛋白标准品                              | 39.56 | 20       |
| D8 | 肌动蛋白标准品                              | 34.78 | 200      |
| E8 | 肌动蛋白标准品                              | 30.85 | 2000     |
| F8 | 肌动蛋白标准品                              | 28.03 | 20000    |
| G8 | 肌动蛋白标准品                              | 24.26 | 200000   |
| H8 | 肌动蛋白标准品                              | 21.48 | 2000000  |
| A9 | <未转导的 JE #1-3>用 $5 \times 10^6$      | 18.97 | 11137166 |
| B9 | <用 MOI=2 导的 JE #1-3> $5 \times 10^6$ | 19.32 | 8705100  |

|    |                                            |       |         |
|----|--------------------------------------------|-------|---------|
| C9 | <用MOI=10导的JE #1-3>5 x 10 <sup>6</sup>      | 20.46 | 3901724 |
| D9 | 第14天具有HIV的对照NO.1<MOLT4 w Cal1>             | 26.81 | 44498   |
| E9 | 第14天具有HIV的对照NO.2<80% MOLT4 20% MOLT4-Cal1> | 26.22 | 67407   |
| F9 | 第14天具有HIV的对照NO.3<MOLT4 (w/o Cal1)>         | 25.86 | 86849   |

### [0332] 实例7

[0333] 基于MOLT-4感染的模型制备三组样品。图10提供了显示MOLT-4细胞中的转导效率(图10A)和培养的上清液分析(图10B、C)以通过RT测定法检测从HIV-1感染的MOLT-4细胞释放的HIV-1病毒量的图表并通过一步逆转录酶实时(RT)-PCR分析(图10D)。

[0334] 基于MOLT-4细胞制备三组样品以观察Cal-1保护免受HIV-1感染的影响。

[0335] A) 仅MOLT-4细胞,没有Cal-1慢病毒载体的任何转导;

[0336] B) 用lenti-ccr5载体转导的MOLT-4细胞;

[0337] C) 用Cal-1lenti载体转导的MOLT-4细胞。

[0338] 将MOLT-4细胞用lenti-sh5或lenti-Cal-1以MOI 2.5进行转导。在48小时温育期后,利用2F5和ccr5在MOLT-4细胞上染色进行流式细胞术分析而测定转导。

[0339] 图10A提供了具有lenti-ccr5和Cal-1(ccr5和C46)的MOLT-4细胞的流分析。仅Lenti-sh5转导的MOLT-4细胞表明CCR5表达降低75%。lenti-Cal-1转导的MOLT-4细胞的数据显示约89%的细胞表达C46,也可以观察到在CCR5表达中减少了约68%。

[0340] 图10B提供了在HIV-1感染后根据方法2使用两个不同管的测定法,具有lenti-ccr5的MOLT4和具有Cal-1的MOLT4的逆转录酶测定法。转导后48小时用MOI 0.2的BaL感染MOLT4细胞。转导后7天,测试培养上清液中的逆转录酶活性。与lenti-ccr5转导的MOLT4细胞和未转导的MOLT4细胞相比,CCR5和C46融合抑制剂(Cal-1)的组合显示逆转录酶活性受到显著抑制。

[0341] 我们基于MOLT-4细胞制备了另外三组样品,其与实例1中描述的实验设置相同,以用这个重复实验确认之前的数据。

[0342] a. 仅为MOLT-4细胞,没有Cal-1慢病毒的任何转导;

[0343] b. 80%的MOLT-4细胞和20%用Cal-1慢病毒转导的MOLT-4细胞。通过C46表达的流式细胞术分析而测定转导的细胞的程度。该实验设置用于原始MOLT-4细胞(80%)和Cal-1转导的MOLT-4细胞(20%)的混合群体的转基因效应。

[0344] c. MOLT4 Cal-1(100%)。在流式细胞术中通过C46表达确定100%的细胞已用Cal-1转导。

[0345] 该实验过程与本文实例1中相同。简略地,约50万个这些细胞被HIV-1 BaL感染。在CO2温育箱中使用10mL含有带1×谷氨酰胺补充物的10%FBS的标准RPMI-1640培养基在25-cm<sup>2</sup>的培养烧瓶中培养这些细胞。在第4、7、10、14天取出培养的上清液样品(1mL)用于RT测定(图10C)和逆转录酶实时(RT)-PCR测定两者(图10D)的分析。在第4、7、10、14天同样制备培养的细胞样品用于分析DNA(图11AB)和RNA(图12AB)两者的细胞内分析。在每个时间点,将0.6mL用于DNA分析的培养细胞悬浮液和0.4mL用于RNA分析的培养细胞悬浮液转移到2.0mL标准Eppendorf管中。将这些管以900g离心3分钟。除去上清液。向每个管中加入1mL PBS,然后在900g下离心3分钟。除去上清液。细胞沉淀用于RNA和DNA分析。

[0346] 图10C提供了这三个条件的逆转录酶测定法的时程数据:(a)用Cal-1转导的MOLT;

(b) 与20%Ca1-1转导混合的80%未转导的MOLT和(c) MOCK对照。该数据显示,在第14天与20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物以及未转导的MOLT4细胞(MOCK对照)相比,在第14天在Ca1-1转导的MOLT4细胞中观察到逆转录酶活性减少超过2个对数。

[0347] 使用逆转录酶测定法(RT测定法)(图10C)测量10 $\mu$ L从感染的MOLT-4释放的培养物上清液中的HIV-1量(Suzuki K,et al:Poly A-linked non-isotopic microtiter plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates.J Virol Methods 1995,55:347-356)。

[0348] 图10D提供了显示使用方法2用500 $\mu$ L培养的上清液而能够确定HIV-1 RNA拷贝数的实验结果的图表。使用60 $\mu$ L的洗脱体积设置的自动提取系统(EasyMag,bioMerieux)从培养的上清液中提取RNA。

[0349] 在一步逆转录酶实时PCR分析中使用LightCycler-480(Roche)和用于LightCycler-480的白色96-孔板。

[0350] 制造每个方案的主混合物用于8个标准品和样品分析(参见表15)。

[0351] 表15用于HIV-1 mRNA的检测的PCR主混合物,混合物的总体积为34微升。

[0352]

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶                 | 11.20 |
| 2x B(来自试剂盒)                    | 20.00 |
| Tata正向引物(20 $\mu$ M)           | 0.50  |
| Imai-LTR-Rev(20 $\mu$ M)       | 0.50  |
| 用FAM标记的HIV-1 Tata探针(5 $\mu$ M) | 0.60  |
| RT酶(来自试剂盒)                     | 0.40  |
| 核糖核酸酶抑制剂(来自试剂盒)                | 0.80  |

[0353] 将34 $\mu$ L主混合物的等分试样分配到96孔板的每个孔中。

[0354] 然后对在设定位置的每个孔加入6 $\mu$ L的标准品及样品。

[0355] 启动具有以下条件的RT-PCR:45 $^{\circ}$ C-20min,95 $^{\circ}$ C-2min(94 $^{\circ}$ C-7秒,60 $^{\circ}$ C-30秒)45个循环

[0356] 试剂

[0357] SensiFAST探针一步试剂盒(BioLine#BIO-76005)

[0358] 标准品

[0359] HIV-1标准品0、4、4x10、4x102、4x103、4x104、4x105、4x106拷贝/ $\mu$ L

[0360] 图10D提供了用于一步逆转录酶实时(RT)-PCR分析的时程数据。之前的RT数据通过该基于TaqMan的实时PCR测定法来证实。该图显示了与来自20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物以及未转导的MOLT4细胞(MOCK对照)的数据相比,可以观察到在第14天从Ca1-1转导的MOLT4细胞的培养上清液中提取的HIV-1 RNA减少超过2个对数。

[0361] 注意:没有对这些样品实施Ca1-1测定。对这些样品仅进行了HIV-1特异性检测。

[0362] 实例8

[0363] 图11A和11B提供了显示根据方法-2的实验结果的图表,该实验使用两个不同管的测定法能够确定HIV-1 DNA和Ca1-1 DNA的拷贝数。

[0364] DNA提取自用具有60 $\mu$ L洗脱体积的PurLink Genomic DNA试剂盒(ThermoFisher)

在第4、7、10、14天制备的细胞沉淀。

[0365] 注意：在该分析一步实时PCR分析中使用LightCycler 480 (Roche) 和用于LightCycler-480的白色96-孔板。

[0366] 每个方案制造三个主混合物用于8个标准品和样品分析(参见表16、17和18)。

[0367] i) 主混合物1用于HIV-1 DNA的检测

[0368] ii) 主混合物2用于Ca1-1 DNA的检测

[0369] iii) 主混合物3用于肌动蛋白检测的检测

[0370] 表16 PCR主1混合物用于检测HIV-1 DNA,混合物的总体积为34微升。

[0371]

|                    |       |
|--------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶     | 12.40 |
| 2x B(来自该试剂盒)       | 20.00 |
| Tata正向引物(20μM)     | 0.50  |
| Imai-LTR-Rev(20μM) | 0.50  |
| 用FAM标记的TAR探针(5μM)  | 0.60  |

[0372] 表17 PCR主混合物2用于检测Ca1-1 DNA,混合物的总体积为34微升。

[0373]

|                     |       |
|---------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶      | 12.40 |
| 2x B(来自该试剂盒)        | 20.00 |
| NuAf(20μM)          | 0.50  |
| Imai-LTR-Rev(20μM)  | 0.50  |
| 用Cy5标记的Ca1-1探针(5μM) | 0.60  |

[0374] 表18 PCR主混合物3用于肌动蛋白的检测,混合物的总体积为17微升。

[0375]

|                  |       |
|------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶   | 6.20  |
| 2x B(来自该试剂盒)     | 10.00 |
| 肌动蛋白正向引物(20μM)   | 0.25  |
| 肌动蛋白反向引物(20μM)   | 0.25  |
| 用FAM的肌动蛋白探针(5μM) | 0.30  |

[0376] 将34μL主1混合物的等分试样分配到96孔板在设定位置的孔的每个孔中。将34μL主2混合物的等分试样分配到96孔板的每个孔中。并且将17μL主3混合物的等分试样分配到96孔板的每个孔中。

[0377] 然后对主1混合物和主2混合物的每个孔加入6μL标准品以及样品并对主3混合物的每个孔加入3μL的标准品以及样品。

[0378] 启动具有以下条件的PCR:95°C-2min(94°C-7秒,60°C-30秒)45个循环

[0379] 试剂

[0380] SentiFast探针试剂盒(Line Cat No.BIO-86005)

[0381] 标准品

[0382] HIV-1标准品:0、4、4x10、4x102、4x103、4x104、4x105、4x106拷贝/μL。

[0383] Ca1-1标准品:0、2、2x10、2x102、2x103、2x104、2x105、2x106拷贝/μL。

[0384] 肌动蛋白标准品:0、2、2x10、2x10<sup>2</sup>、2x10<sup>3</sup>、2x10<sup>4</sup>、2x10<sup>5</sup>、2x10<sup>6</sup>拷贝/μL。

[0385] Ca1-1整合的DNA数据和HIV-1整合的DNA数据用1000个拷贝的肌动蛋白来标准化(图11AB)。

[0386] 图11A示出了根据本公开的实施例的Ca1-1检测的结果。在图3中示出了基于本文公开的测定方法,通过基于TaqMan的DNA PCR方法扩增Ca1-1整合的DNA。用来自三组基于MOLT4的感染实验提取的DNA进行实时DNA PCR。数据显示在整个实验中从第4天至第14天在Ca1-1转导的MOLT4细胞中检测到整合的Ca1-1 DNA水平(通过肌动蛋白标准化)的一致存在。在MOLT4细胞(MOCK对照)中未检测到Ca1-1 DNA。很明显,在第4天和第7天,在20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物中观察到Ca1-1 DNA的整合水平显著降低。直到第10天和第14天,这些水平进一步下降至无法检测的水平。Ca1-1拷贝数用1000个拷贝的Action DNA来标准化。

[0387] 图11B示出了根据本公开的实施例的HIV-1检测的结果。在HIV-1感染后的第4天至第14天,与未转导的MOLT4细胞相比,在Ca1-1转导的MOLT4细胞中观察到HIV-1 DNA的整合水平降低超过三个对数。该数据证实了在Ca1-1慢病毒载体的转导后保护MOLT4细胞免受HIV-1感染。与第4天和第7天相比,在第10天和第14天在20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物中HIV-1 DNA的水平升高。在第10天和第14天在20%Ca1-1转导的和80%未转导的MOLT4细胞的混合培养物中的Ca1-1 DNA数据提示在那些时间点上的整合的Ca1-1 DNA的丢失。因此,在第10天和第14天观察到在混合培养物中HIV-1 DNA水平有所增加。这些数据也提示了Ca1-1转基因起到保护免受HIV-1感染的功能。HIV-1拷贝数用1000个拷贝的Action DNA来标准化。

#### [0388] 实例9

[0389] 图12A提供了显示使用方法-2而能够确定HIV-1 RNA拷贝数的实验结果的图表。为了检测HIV-1细胞内RNA水平,分析HIV-1特异的LTR mRNA(图12A)。RNA提取自用具有60μL洗脱体积的ReliaPrep RNA Miniprep系统(Promega)在第4、7、10、14天制备的细胞沉淀。

[0390] 注意:在该分析一步逆转录酶实时(RT)-PCR分析中使用LightCycler 480(和用于LightCycler-480的白色96-孔板)。

[0391] 每个方案制造两个主混合物用于8个标准品和样品分析(参见表19和20)。

[0392] PCR主1混合物:主混合物用于HIV-1 mRNA检测。

[0393] PCR主2混合物:主混合物用于GAPDH mRNA检测

[0394] 表19 PCR主1混合物用于HIV mRNA检测,混合物具有34微升的总体积。

[0395]

|                           |       |
|---------------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶            | 11.20 |
| 2x B(来自试剂盒)               | 20.00 |
| NuA <sub>f</sub> (20μM)   | 0.50  |
| Imai-LTR-Rev (20μM)       | 0.50  |
| 用FAM标记的HIV-1 Tata探针 (5μM) | 0.60  |
| RT酶(来自试剂盒)                | 0.40  |
| 核糖核酸酶抑制剂(来自试剂盒)           | 0.80  |

[0396] 表20 PCR主2混合物用于GAPDH mRNA检测,混合物具有17微升的总体积。

[0397]

|                                |       |
|--------------------------------|-------|
| 无水脱氧核糖核酸酶核糖核酸酶                 | 5.60  |
| 2x B (来自试剂盒)                   | 10.00 |
| GAPDH正向引物 (20 $\mu$ M)         | 0.25  |
| GAPDH正向引物 (20 $\mu$ M)         | 0.25  |
| 用Cy5标记的GAPDH Taq探针 (5 $\mu$ M) | 0.30  |
| RT酶 (来自试剂盒)                    | 0.20  |
| 核糖核酸酶抑制剂 (来自试剂盒)               | 0.40  |

[0398] 将34 $\mu$ L主1混合物的等分试样分配到96孔板的每个孔中,并将17 $\mu$ L主2混合物的等分试样分配到96孔板在设定位置的孔的每个孔中。

[0399] 然后对主1混合物的每个孔加入6 $\mu$ L标准品以及样品并对主2混合物的每个孔加入3 $\mu$ L的标准品以及样品。用以下条件启动PCR:45 $^{\circ}$ C-20min,95 $^{\circ}$ C-2min (94 $^{\circ}$ C-7秒,60 $^{\circ}$ C-30秒) 45个循环

[0400] 试剂

[0401] SensiFAST探针一步试剂盒 (BioLine#BIO-76005)

[0402] 标准品[0403] HIV-1标准品:0、4、4x10、4x102、4x103、4x104、4x105、4x106拷贝/ $\mu$ L。[0404] GAPDH标准品:0、2、2x10、2x102、2x103、2x104、2x105、2x106拷贝/ $\mu$ L。

[0405] HIV-1 mRNA分析数据用106个拷贝的GAPDH的mRNA表达来标准化 (图12A)。

[0406] 实例10

[0407] 基于PBMC感染的模型制备两组样品。通过RT测定法 (图13A) 和一步逆转录酶实时 (RT)-PCR分析 (图13B) 进行培养的上清液分析以检测从HIV-1感染的PBMC释放的HIV-1病毒量。

[0408] 基于PBMC制备两组样品以观察Ca1-1保护免受HIV-1感染的影响。

[0409] A) 仅PBMC,没有Ca1-1慢病毒载体的任何转导。

[0410] B) 用Ca1-1慢病毒载体转导的PBMC。

[0411] 通过单个的健康供体制备PBMC。使用标准的PHA刺激方法在培养前刺激PNMC三天,随后用MOI 2.5的lenti-Cal-1转导。

[0412] 实验过程如下:用HIV-1 BaL感染三百万的转导的PBMC和无转导的仅PBMC两者。在CO2温育箱中使用4mL含有带1 $\times$ 谷氨酰胺补充物的10%FBS的标准RPMI-1640培养基在6孔的培养板上培养这些细胞。在第4、7、10、14天取出培养的上清液样品 (1mL) 用于RT测定法 (图13A) 和逆转录酶实时 (RT)-PCR测定法两者 (图13B) 的分析。也在第4、7、10、14天制备培养的细胞样品用于分析DNA (图14AB) 和RNA (图14C) 两者的细胞内分析。在每个时间点,将0.6mL用于DNA分析的培养细胞悬浮液和0.4mL用于RNA分析的培养细胞悬浮液转移到2.0mL标准Eppendorf管中。将这些管以900g离心3分钟。除去上清液。向每个管中加入1mL PBS,然后在900g下离心3分钟。除去上清液。细胞沉淀用于RNA和DNA分析。

[0413] 图13B示出了根据方法-2对在培养的上清液中的RNA进行的逆转录酶实时PCR分析。图14a中的逆转录酶数据通过使用从培养上清液中提取的RNA的、基于TaqMan的逆转录酶实时PCR测定法来证实。与未转导的PBMC (MOCK对照) 相比,在第7天和第10天观察到来自

Ca1-1转导的PBMCs的培养上清液的HIV-1 RNA减少5倍。

[0414] 使用逆转录酶测定法(RT测定法)(图13A)测量10 $\mu$ L从感染的PBMC释放的培养物上清液中的HIV-1量(Suzuki K,et al:Poly A-linked non-isotopic micro titer plate reverse transcriptase assay for sensitive detection of clinical human immunodeficiency virus isolates.J Virol Methods 1995,55:347-356)。

[0415] 图13A示出了基于来自健康供体的PBMC的逆转录酶测定数据。在HIV-1感染后第4天和第7天,与未转导的PBMC相比,在Ca1-1转导的PBMC中观察到逆转录酶活性降低超过5倍。

[0416] 本说明书中提及的所有出版物均通过引用整体并入本文。本领域技术人员将会理解,可以对具体实施例中所示的公开进行许多变化和/或修改,而不脱离如广泛描述的本公开的精神或范围。因此,本实施例在所有方面都认为是说明性的而不是限制性的。

[0417] 尽管已经参考特定实施例描述了本公开,但是应该理解,这些实施例仅仅是本公开的原理和应用的说明。因此应该理解,可以对说明性实施例进行许多修改,并且可以设计出其它布置而不脱离由所附权利要求限定的本公开的精神和范围。

## SEQUENCE LISTING

- <110> 圣文森特医院悉尼有限公司(ST. VINCENT'S HOSPITAL SYDNEY LIMITED)  
卡琳缪恩股份有限公司(CALIMMUNE, INC.)  
卡琳缪恩澳大利亚私人有限公司(CALIMMUNE AUSTRALIA PTY LTD)  
新南创新私人有限公司(NEWSOUTH INNOVATIONS PTY LIMITED)  
A·D·凯莱赫(KELLEHER, Anthony Dominic)  
G·P·西蒙兹(SYMONDS, Geoffrey Phillip)  
K·铃木(SUZUKI, Kazuo)
- <120> 区分HIV-1与慢病毒载体的方法(METHODS OF DISCRIMINATING BETWEEN HIV-1 AND LENTIVIRAL VECTORS)
- <130> Cal-004W0
- <150> US 62/163,327
- <151> 2015-05-18
- <160> 17
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 24
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 合成的:在U3区域内与NuAf引物杂交的序列(Synthetic: sequence within the U3 region that the NuAf primer hybridizes to)
- <400> 1  
ggttttcttct gttctatagg aact 24
- <210> 2
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 合成的:NuAf引物(Synthetic: NuAf primer)
- <400> 2  
ccaaagaaga caagatatcc ttgac 25
- <210> 3
- <211> 22
- <212> DNA
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 合成的:在U3区域内与TATA引物杂交的序列(Synthetic: sequence within

the U3 region that the TATA primer hybridizes to)

<400> 3

gacgaatata cgtcgtagac tc 22

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的:TATA引物(Synthetic: TATA primer)

<400> 4

ctcagatgct gcatataagc ag 22

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的:在R区域内与LTR-rev引物杂交的序列(Synthetic: sequence within the R region that the LTR-rev primer hybridizes to )

<400> 5

ccactgctta agcctcaa 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的:LTR-rev引物(Synthetic: LTR-rev primer)

<400> 6

ttgaggctta agcagtgg 18

<210> 7

<211> 29

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的:在3'LTR内与TAR-探针杂交的序列(Synthetic: sequence within the 3'LTR that the TAR-probe hybridizes)

<400> 7

aatctggtct agactcggac cctcgagag 29

<210> 8

<211> 29

<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的:TAR-探针(Synthetic: TAR-probe)  
<400> 8  
ttagaccaga tctgagcctg ggagctctc 29  
<210> 9  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的:在3'LTR内与TATA-探针杂交的序列(Synthetic: sequence within  
the 3'LTR that the TATA-probe hybridizes to)  
<400> 9  
gccctcagat cctgcatata agcag 25  
<210> 10  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的:TATA-探针(Synthetic: TATA-probe)  
<400> 10  
ctgcttatat gcaggatctg agggc 25  
<210> 11  
<211> 5  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的:TATA框序列(Synthetic: TATA box sequence)  
<400> 11  
tataa 5  
<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的:在U3区域内与接合探针杂交的序列(Synthetic: Sequence within U3  
region in which the junction probe hybridizes)  
<400> 12

cgacgtaggc ctgacatgac c 21  
<210> 13  
<211> 6  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的:在R区域内与接合探针杂交的序列(Synthetic: Sequence within R region in which the junction probe hybridizes)  
<400> 13  
cagaga 6  
<210> 14  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的:接合探针序列(Synthetic: Junction probe sequence)  
<400> 14  
gctgcatccg gactgtactg ggtctct 27  
<210> 15  
<211> 322  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 合成的:Ca1-1的U3序列(Synthetic: U3 sequence of Ca1-1)  
<400> 15  
tggaagggt aattcactcc caacgaagac aagatatacct tgatctgtgg atctaccaca 60  
cacaaggcta cttccctgat tggcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120  
tgacctttgg atggtgctac aagctagtac cagttgagca agagaaggta gaagaagcca 180  
atgaaggaga gaacacccgc ttgttacacc ctgtgagcct gcatgggatg gatgacccgg 240  
agagagaagt attagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcacac atggccccgag 300  
agctgcatcc ggactgtact gg 322  
<210> 16  
<211> 454  
<212> DNA  
<213> HIV-1  
<220>  
<221> misc\_feature  
<223> 野生型U3序列(Wildtype U3 sequence)  
<400> 16

tggaagggt aattcactcc caacgaagac aagatatacct tgatctgtgg atctaccaca 60  
cacaaggcta cttccctgat tagcagaact acacaccagg gccagggatc agatatccac 120  
tgacctttgg atggtgctac aagctagtagc cagttgagcc agagaagtta gaagaagcca 180  
acaaaggaga gaacaccagc ttgttacacc ctgtgagcct gcatggaatg gatgaccg 240  
agagagaagt gttagagtgg aggtttgaca gccgcctagc atttcatacac atggccccgag 300  
agctgcatcc ggagtacttc aagaatgctg acatcgagct tgctacaagg gactttccgc 360  
tggggacttt ccagggaggc gtggcctggg cgggactggg gagtggcgag ccctcagatc 420  
ctgcatataa gcagctgctt ttgcctgta ctgg 454

<210> 17

<211> 96

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的:Cal-1的R区域(Synthetic: R region of Cal-1)

<400> 17

gtctctctgg ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaaccact 60  
gettaagcct caataaagct tgccttgagt gcttca 96

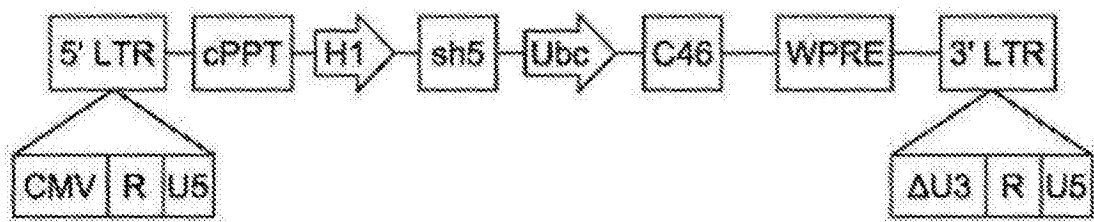


图1A

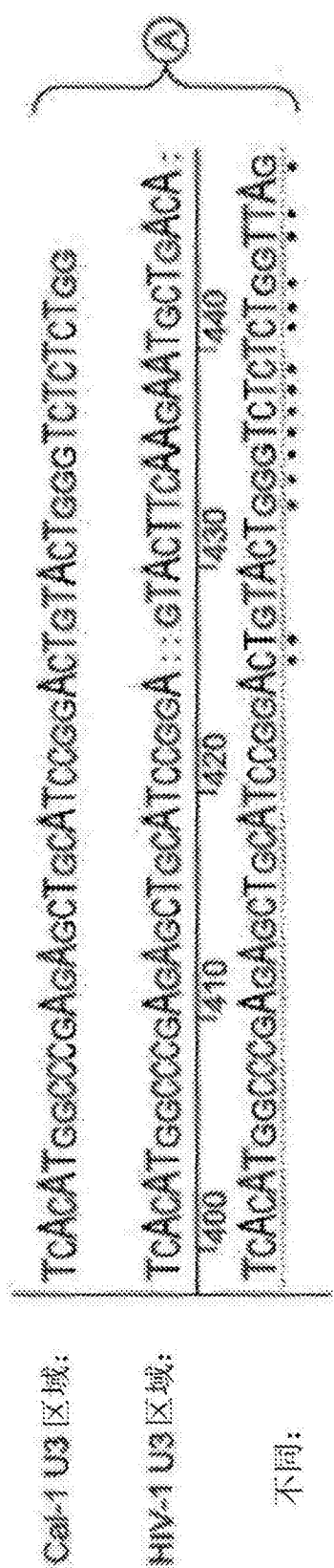


图1B

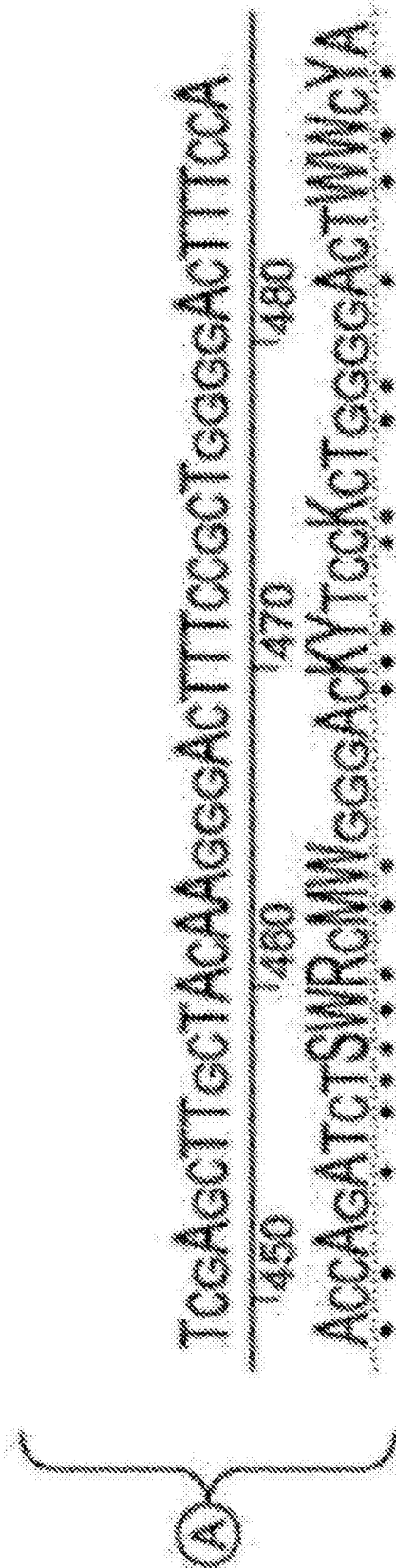


图1C

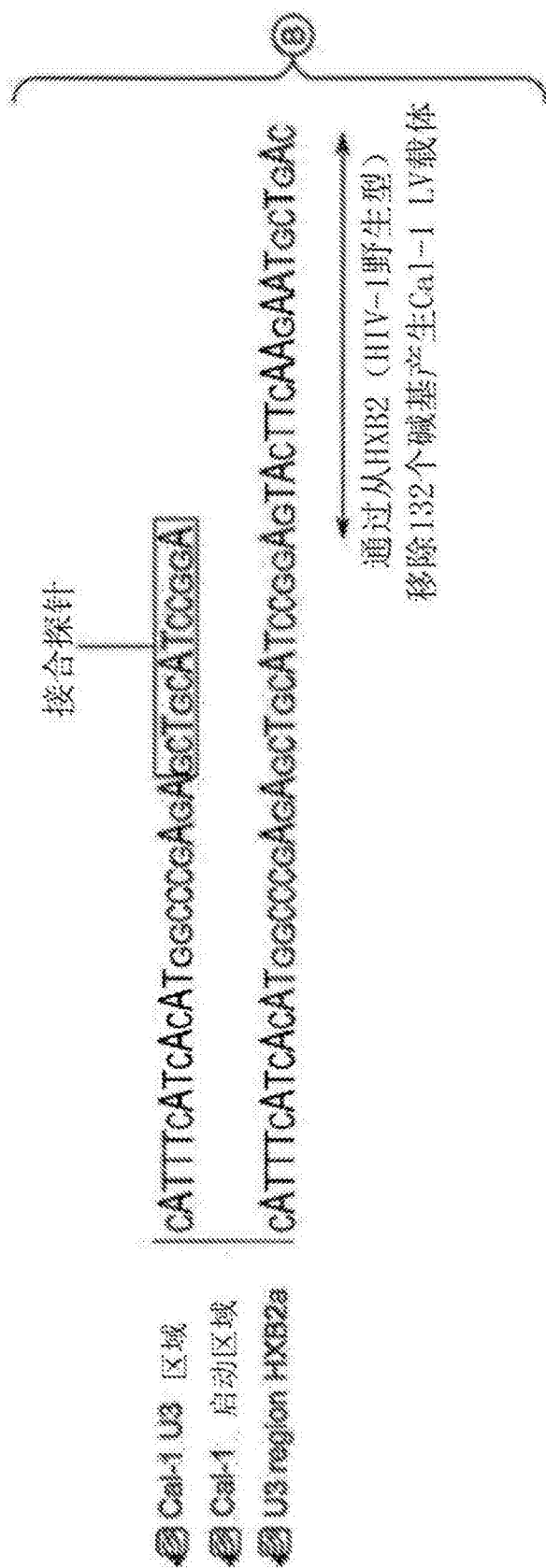


图1D

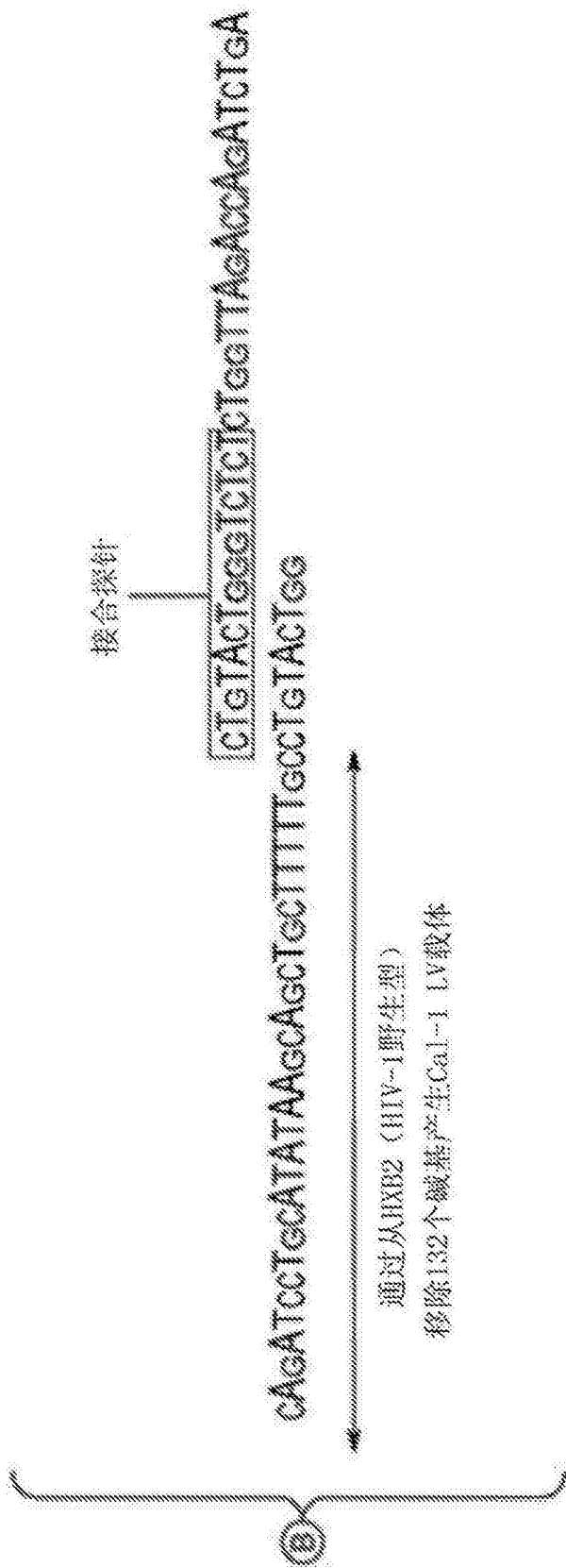


图1E

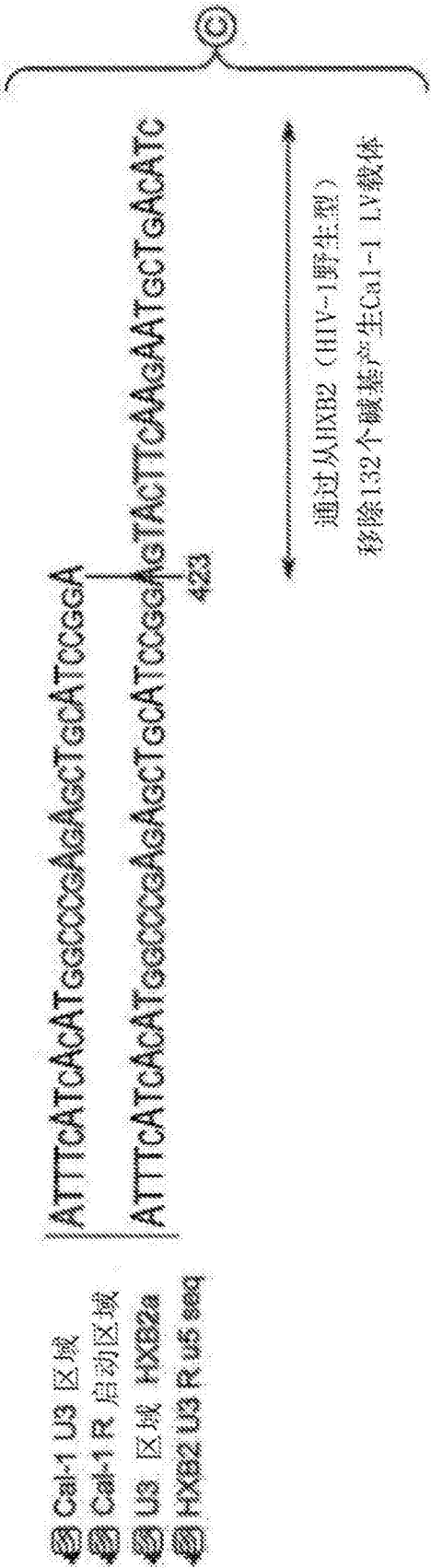


图1F

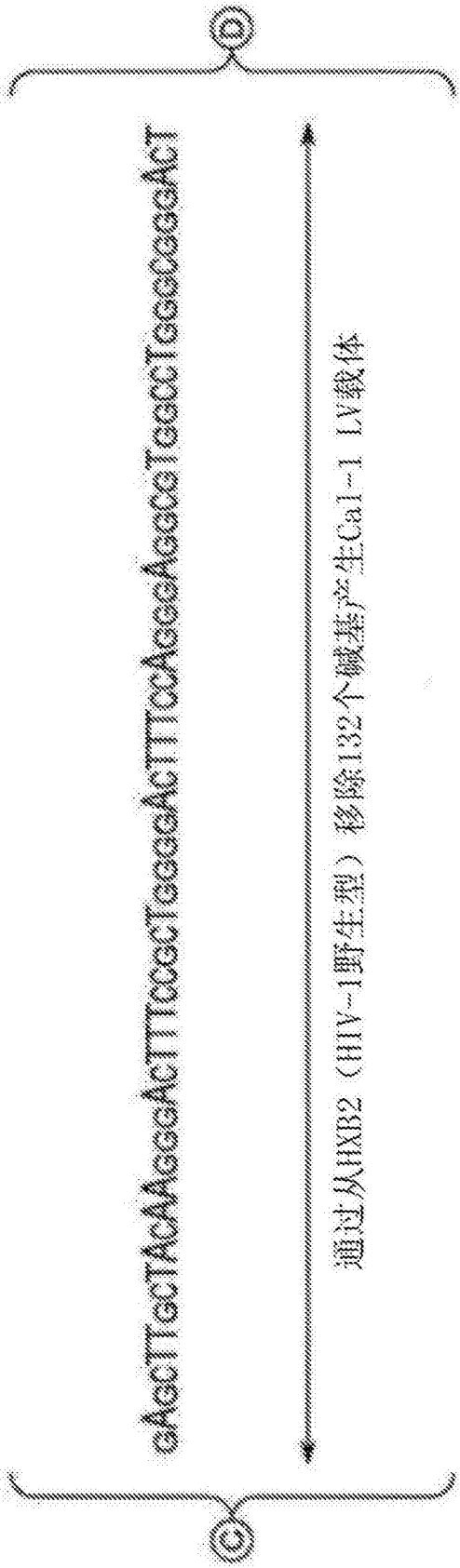


图1G

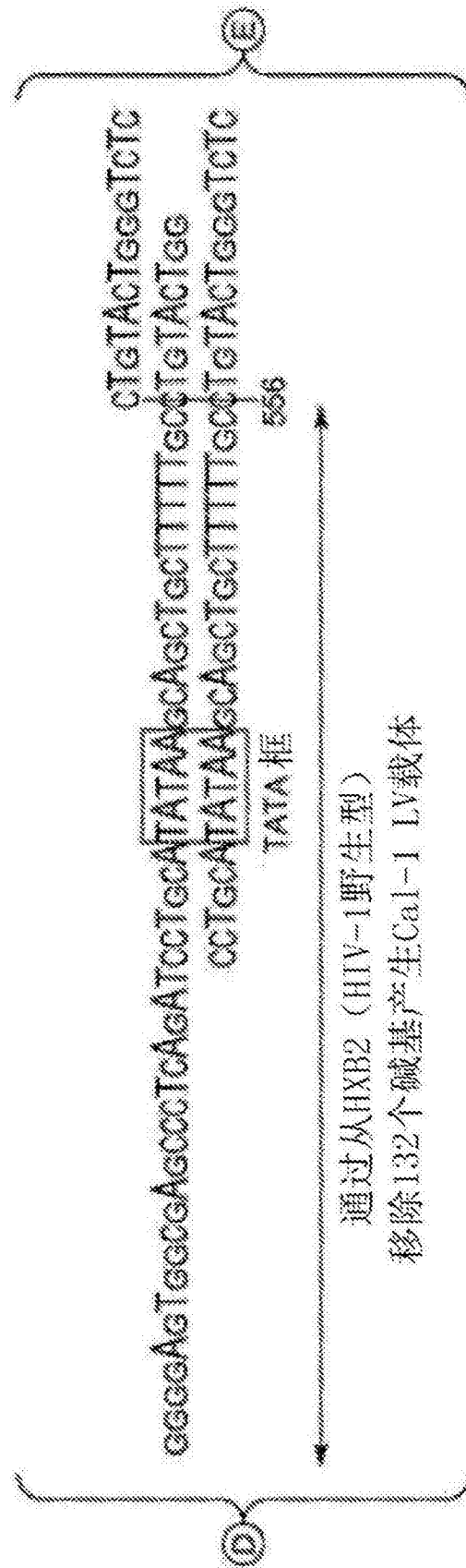


图1H

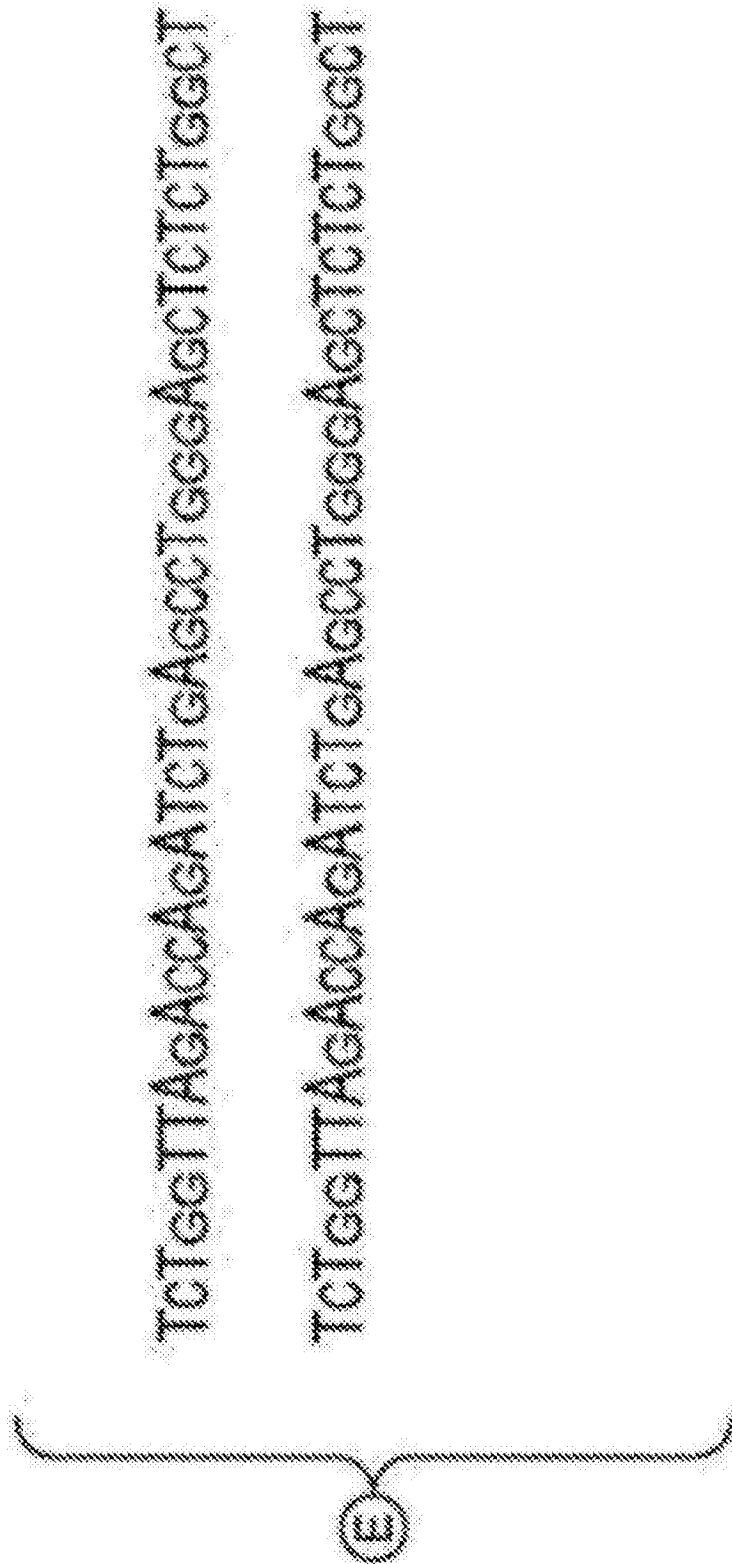


图11

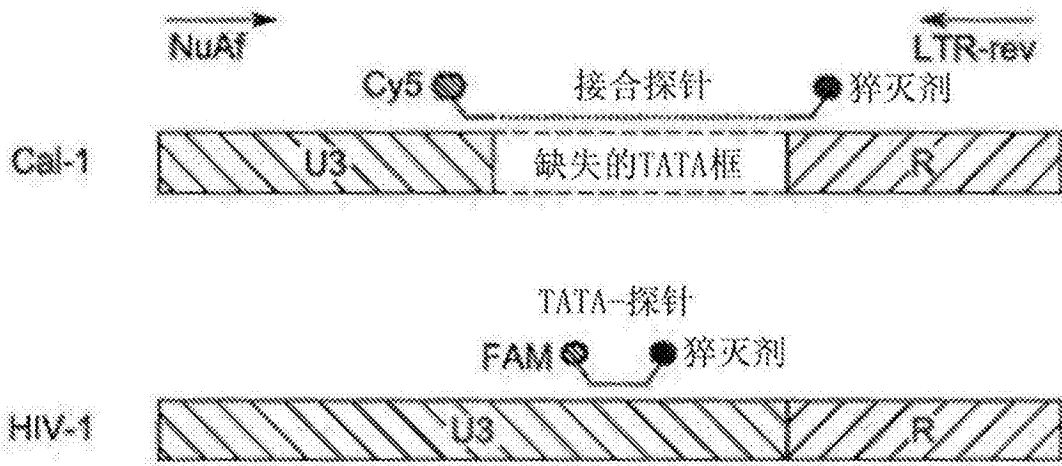


图2

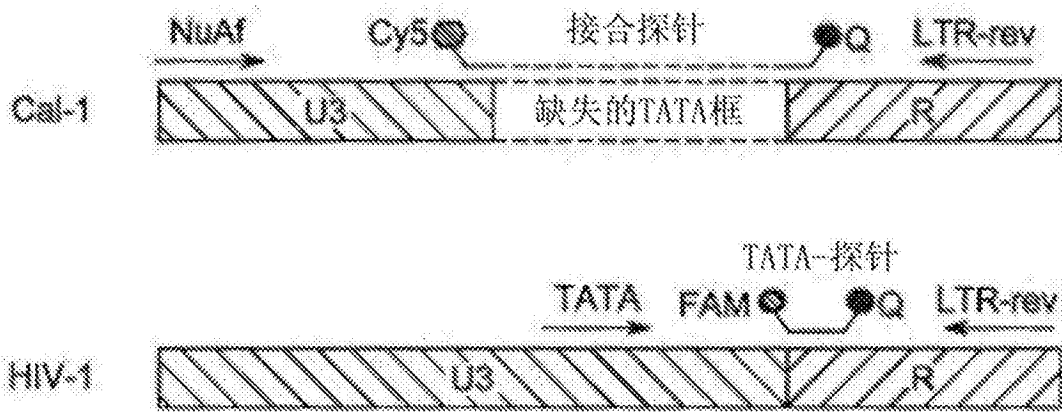


图3



图4

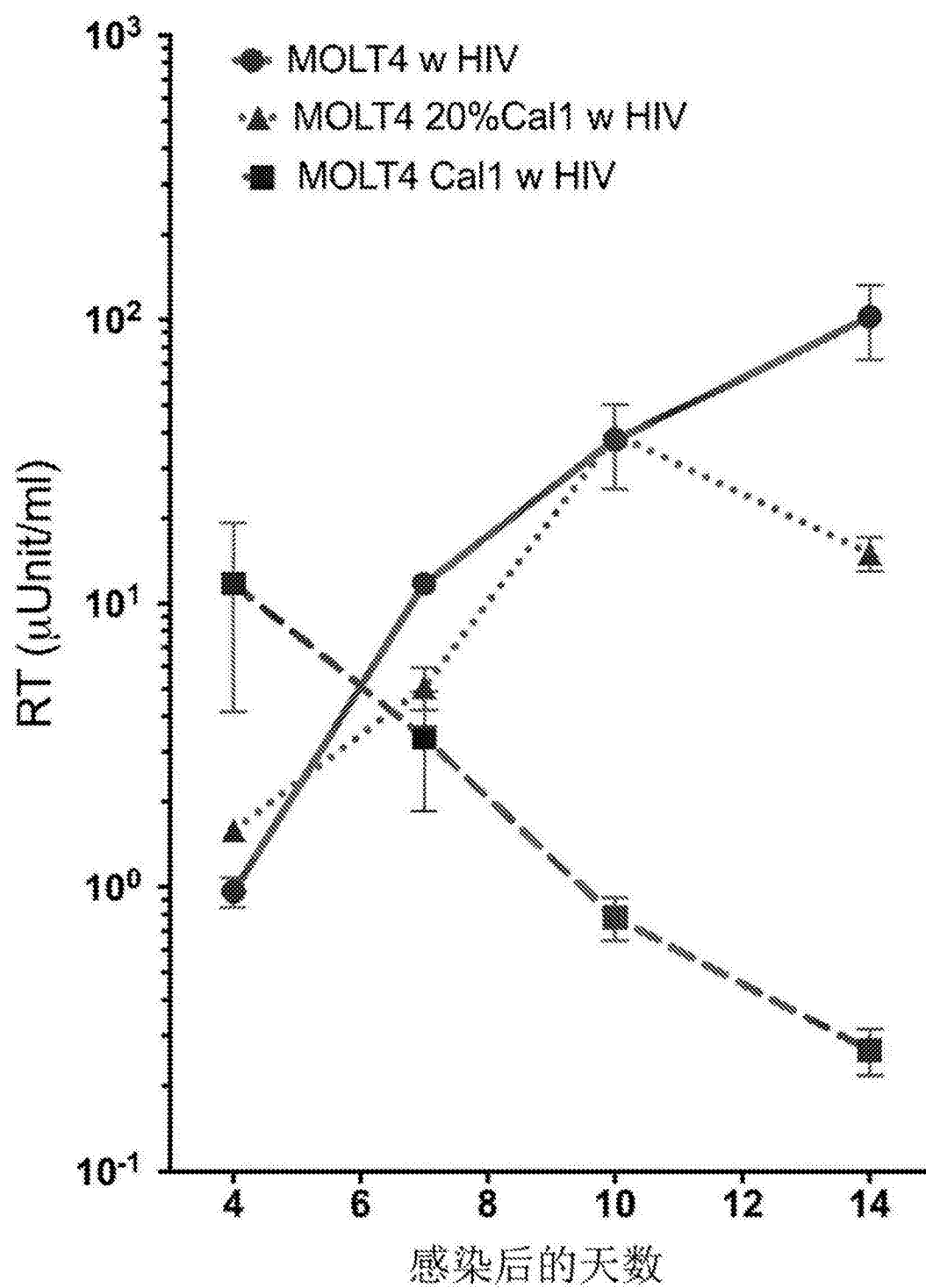


图5A

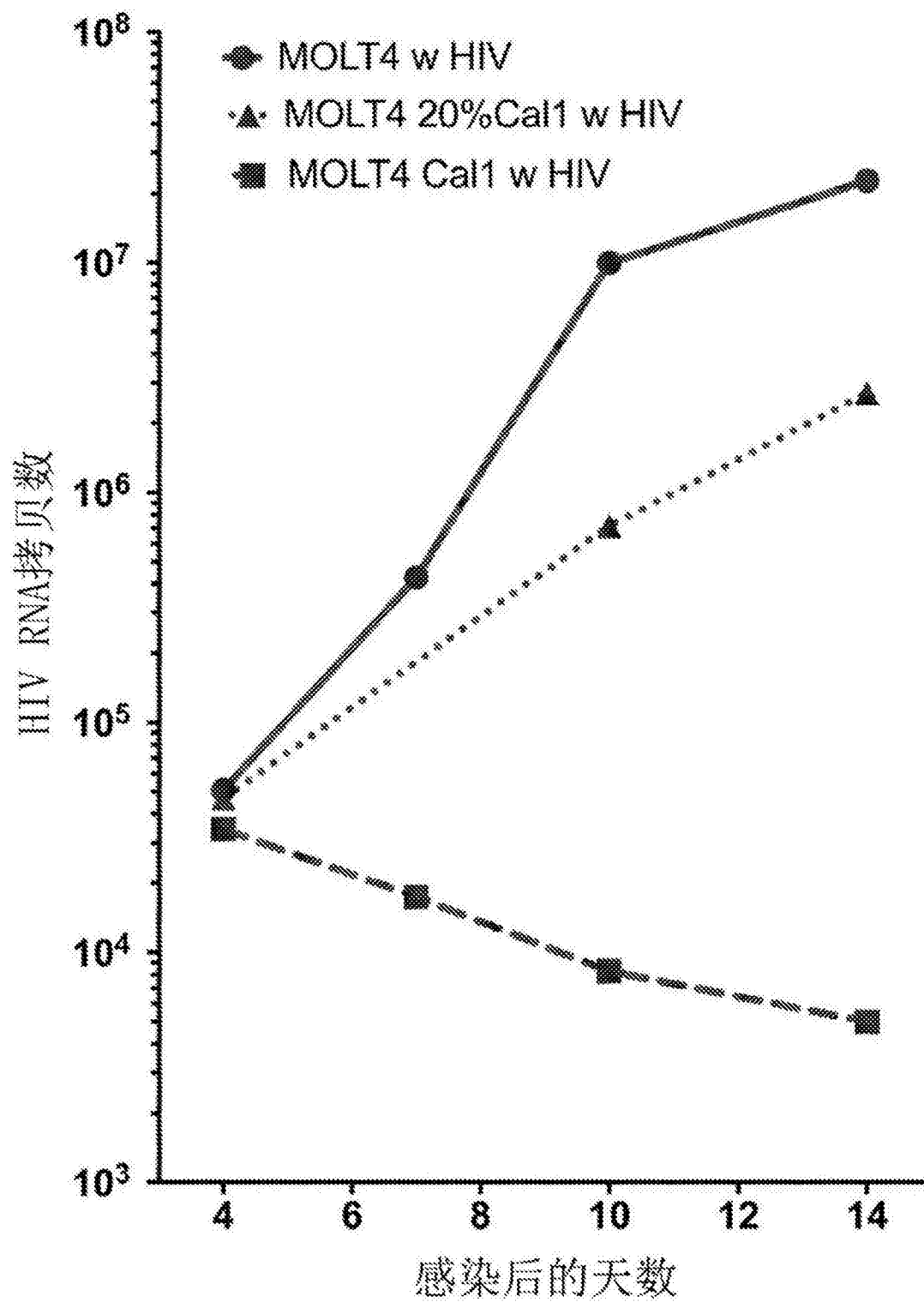


图5B

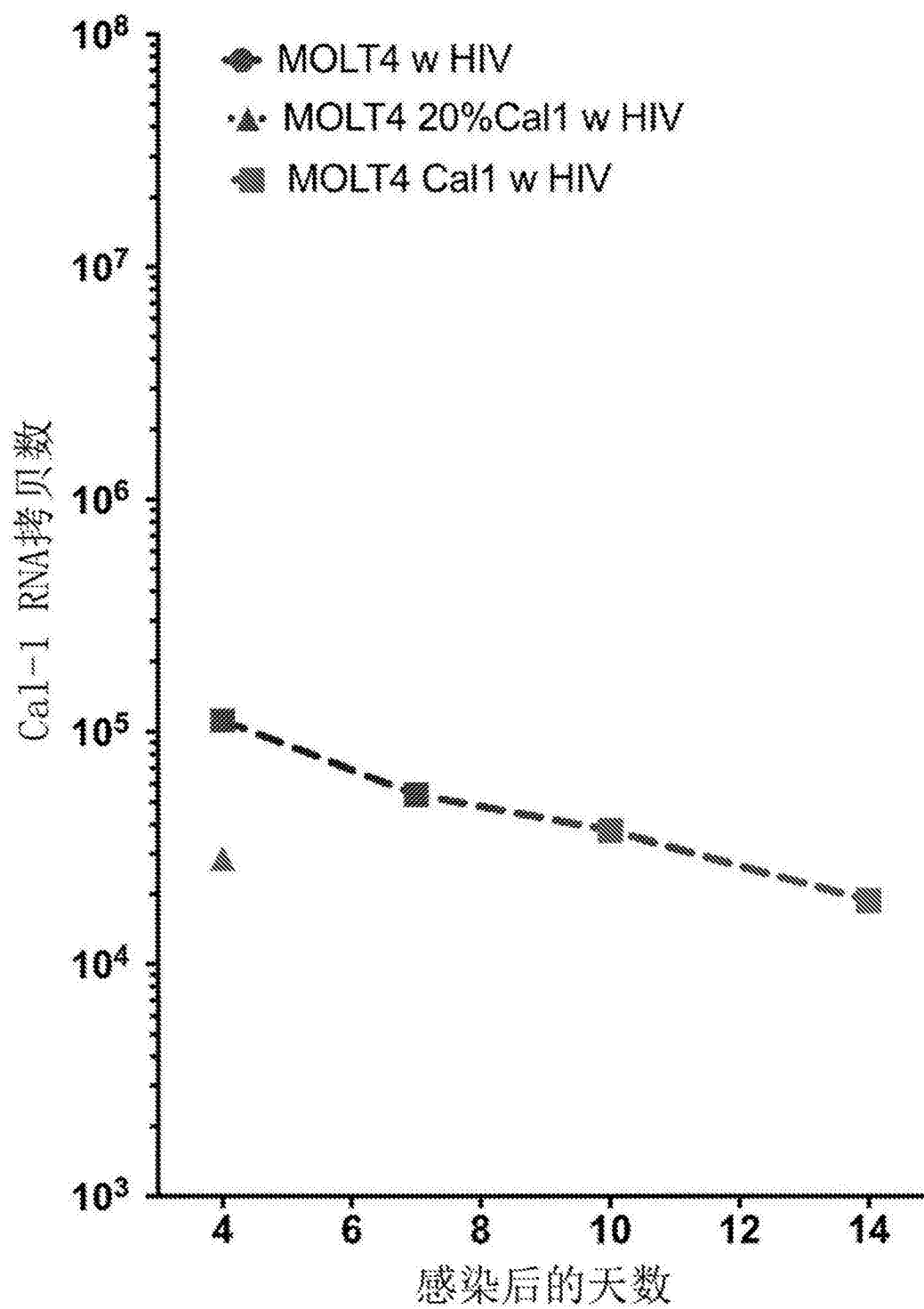


图5C

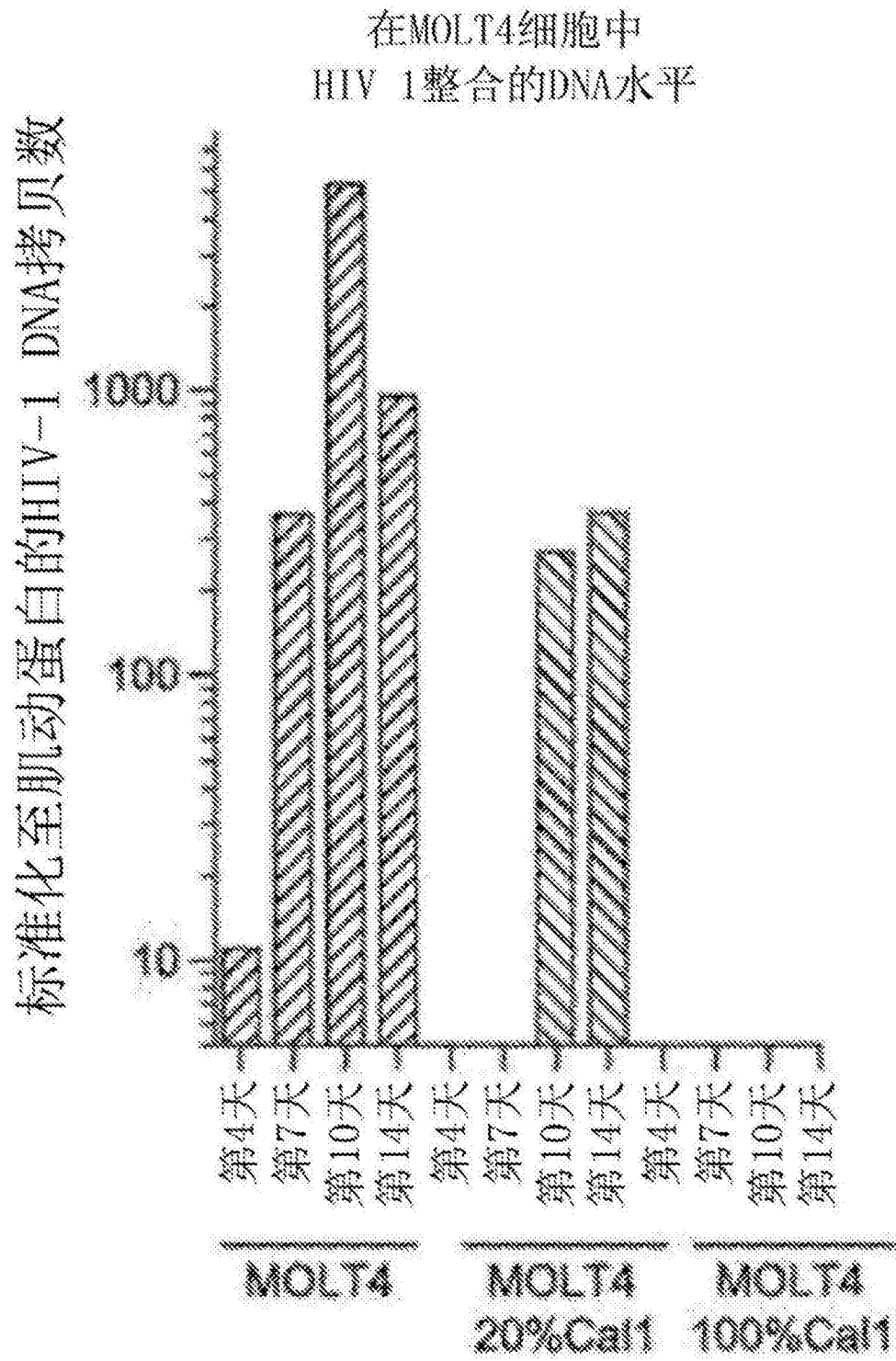


图6A

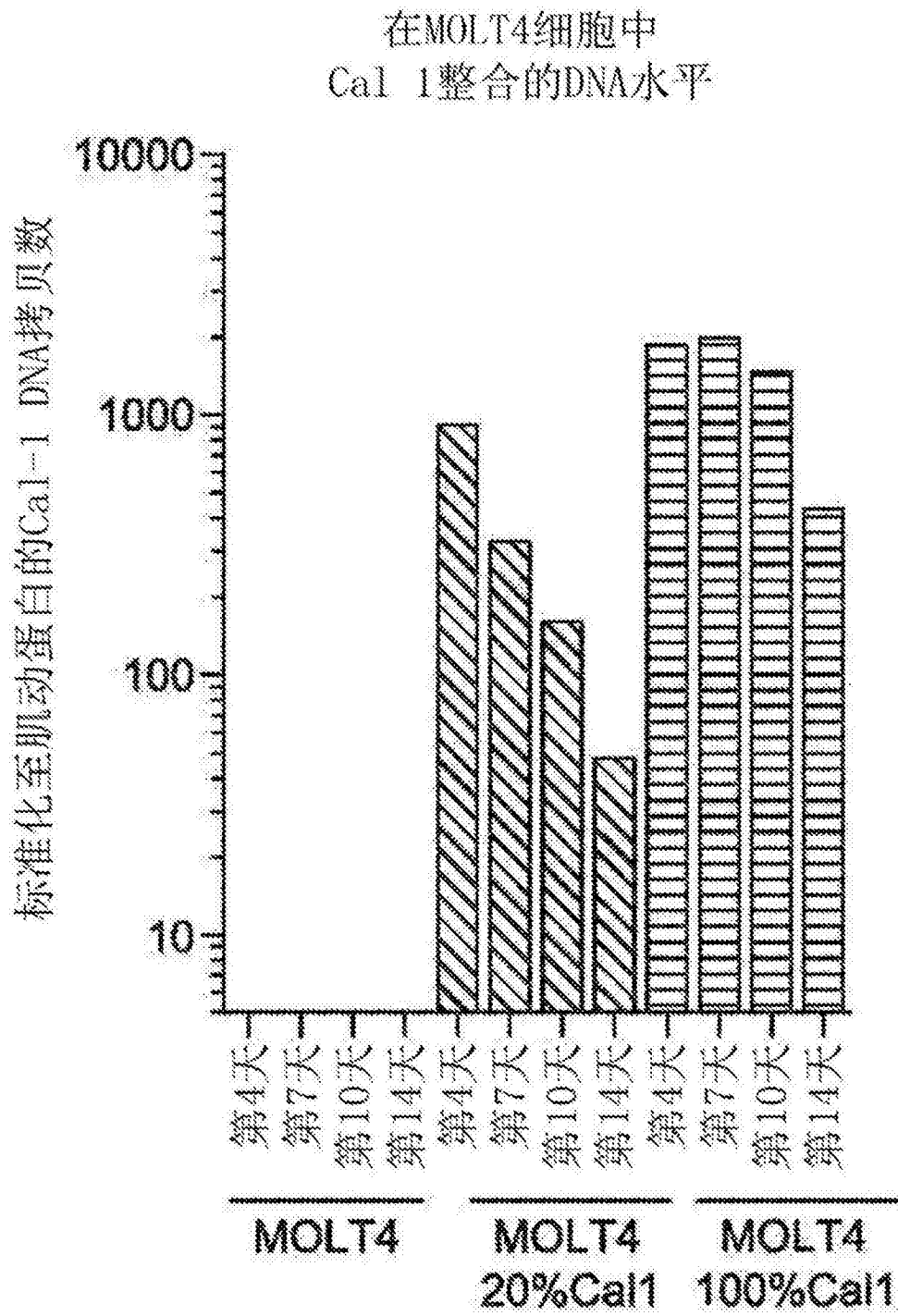


图6B

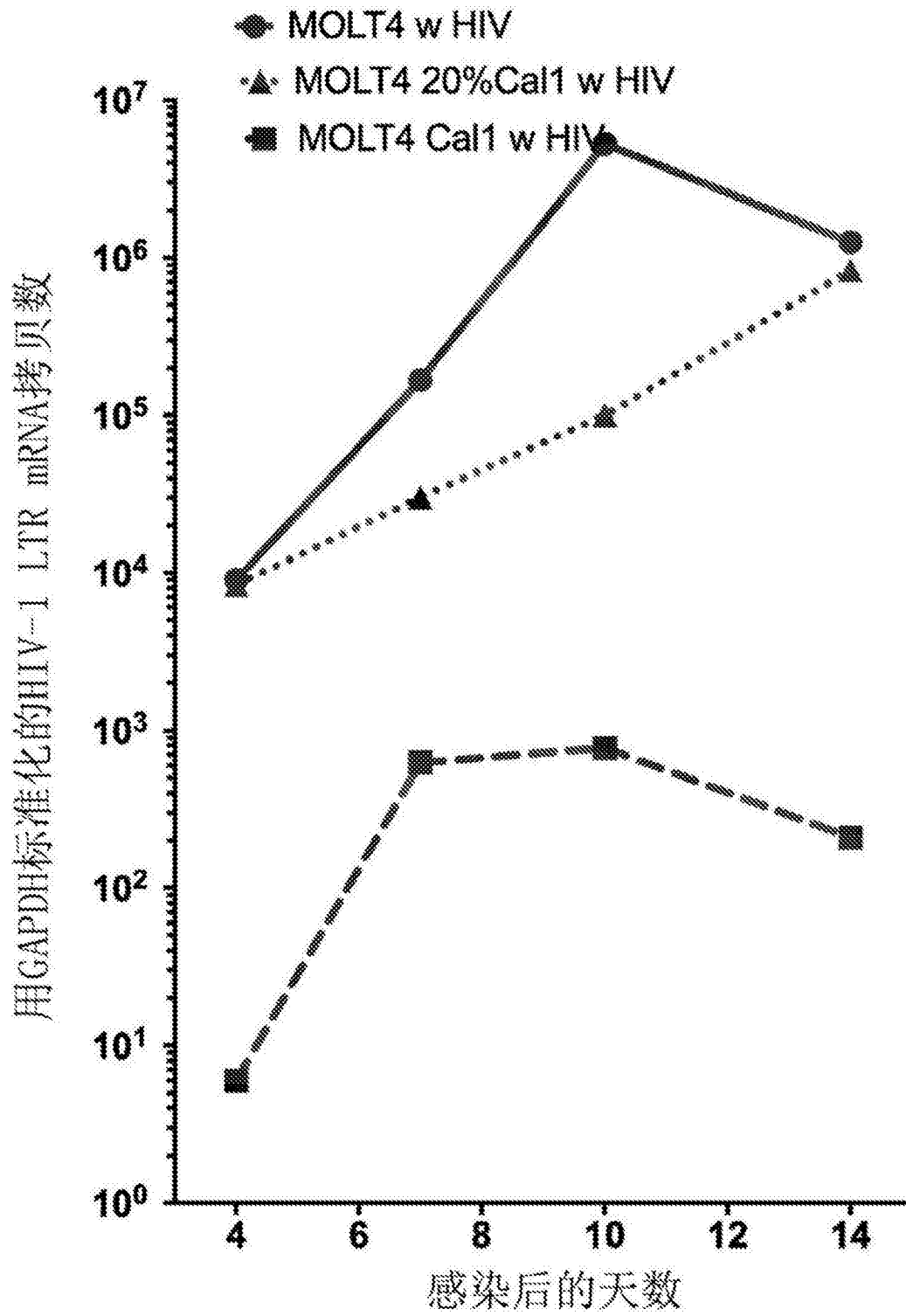


图6C

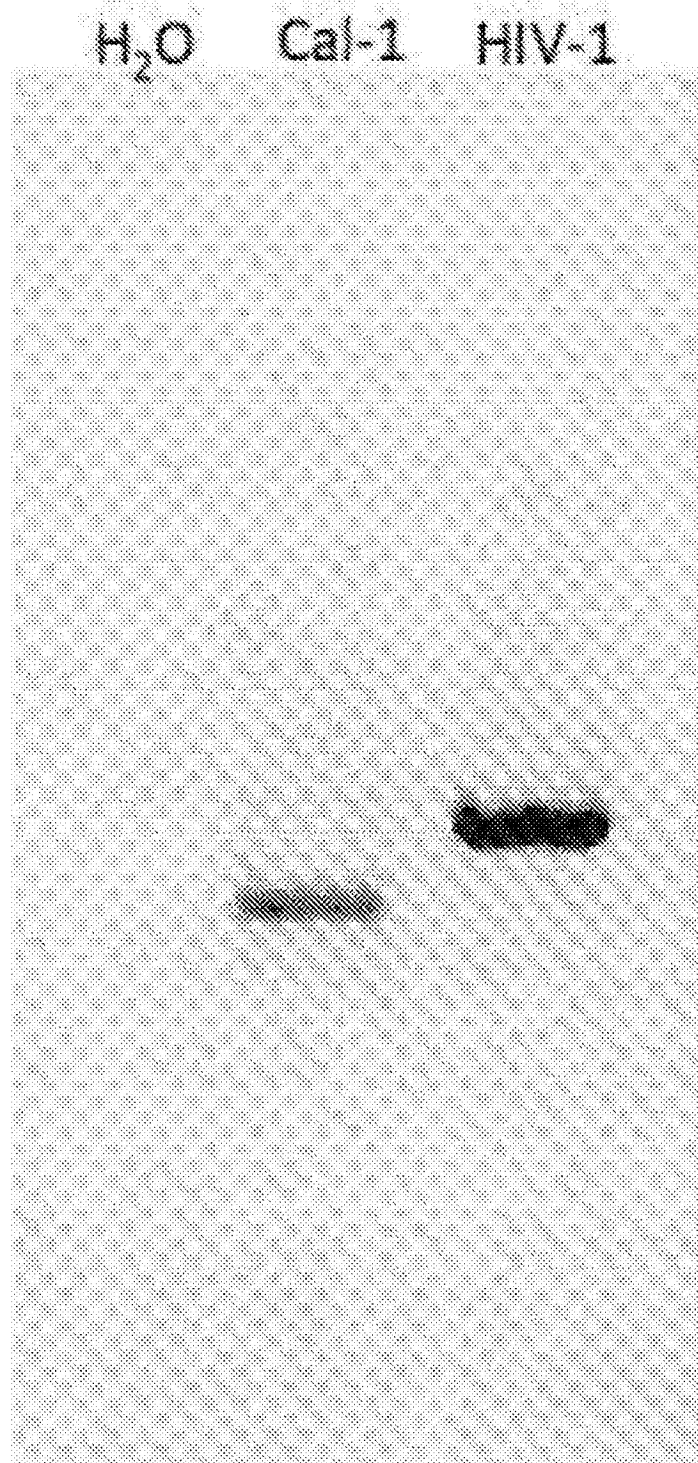


图7

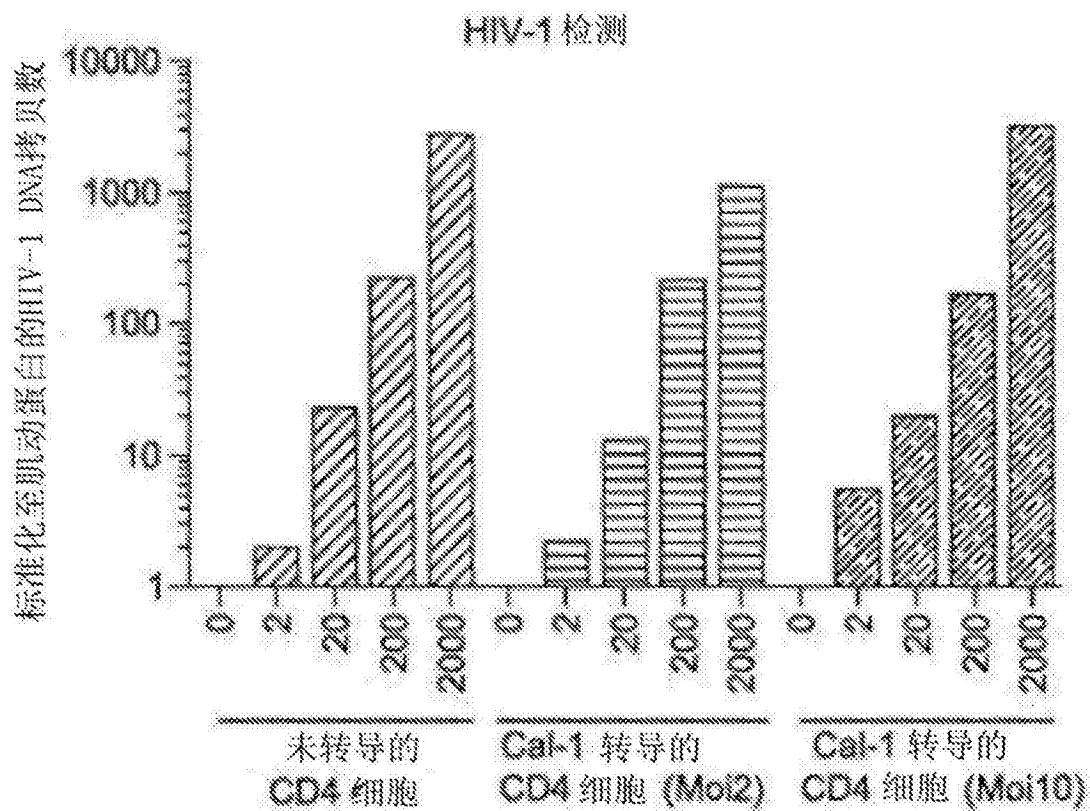


图8A

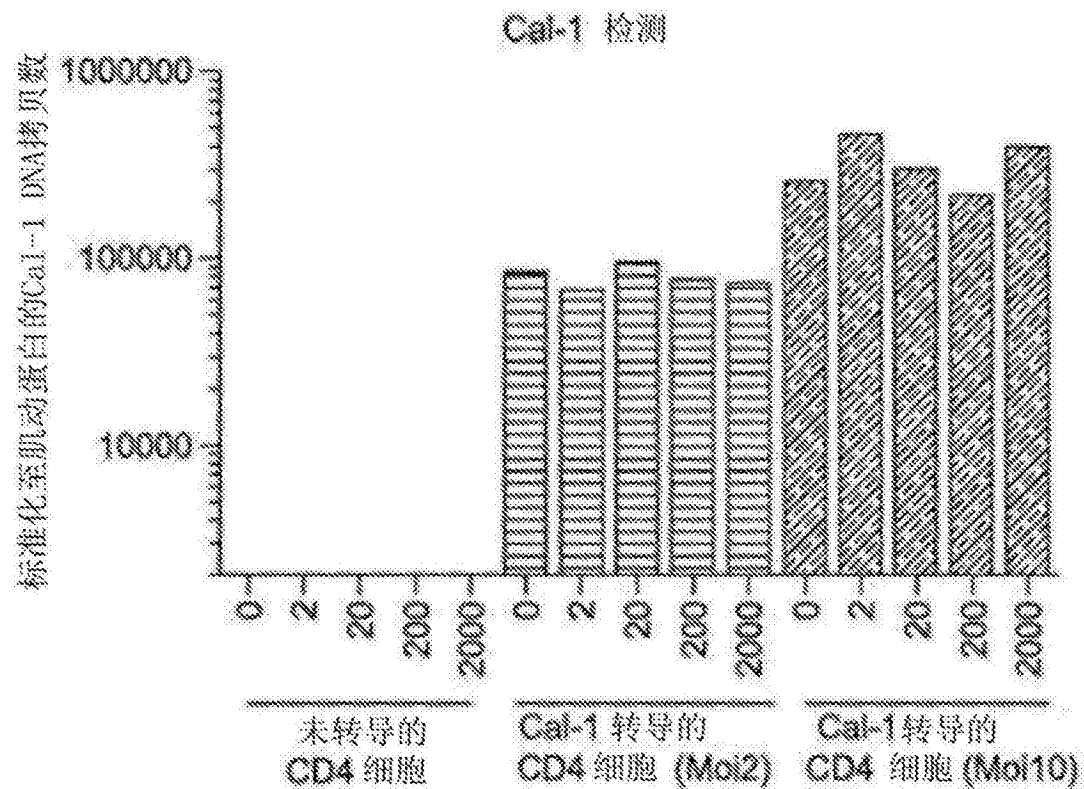


图8B

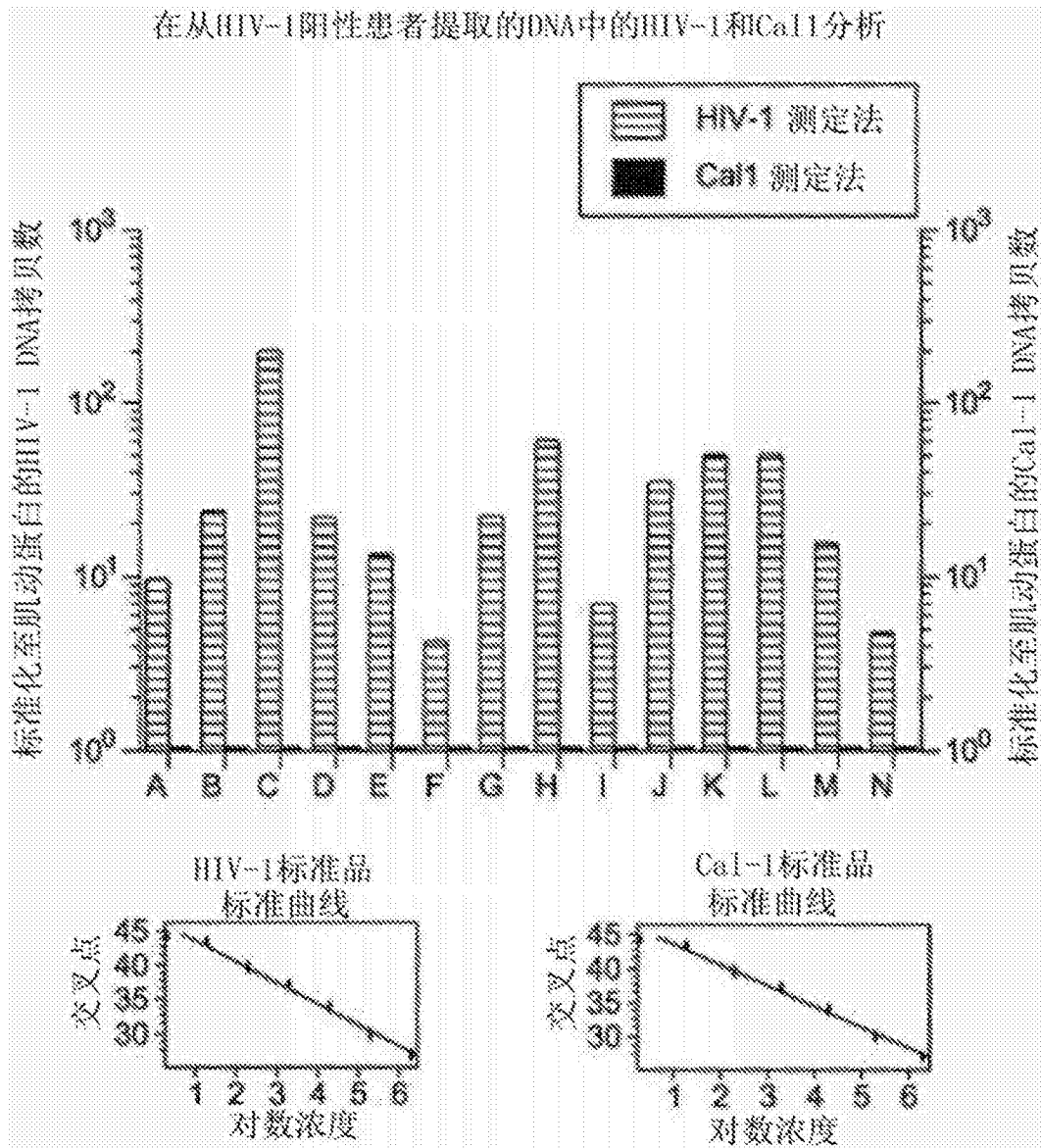


图9

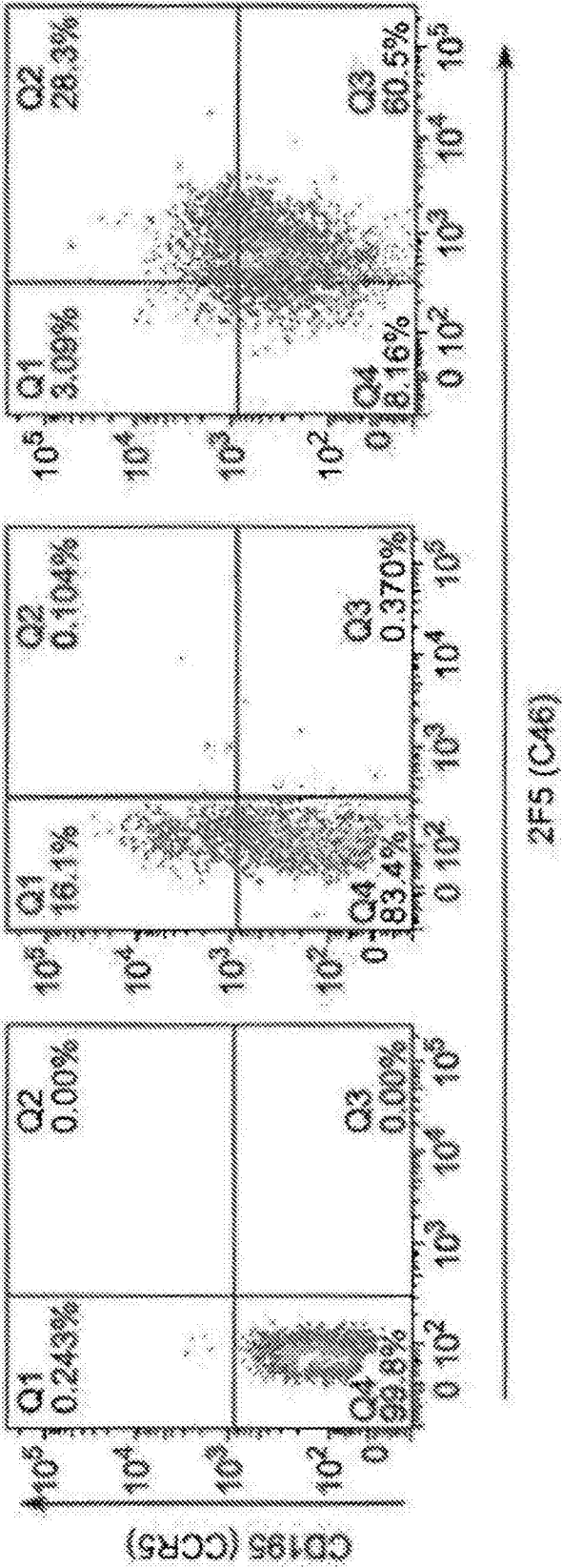


图10A

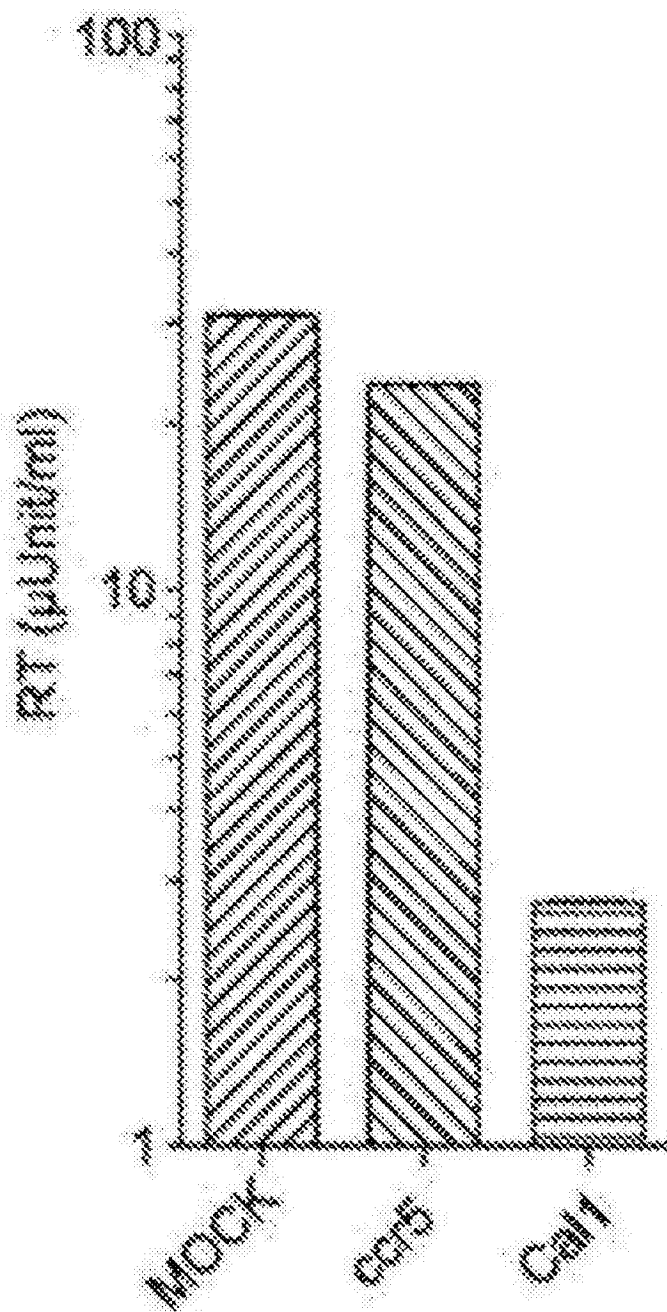


图10B

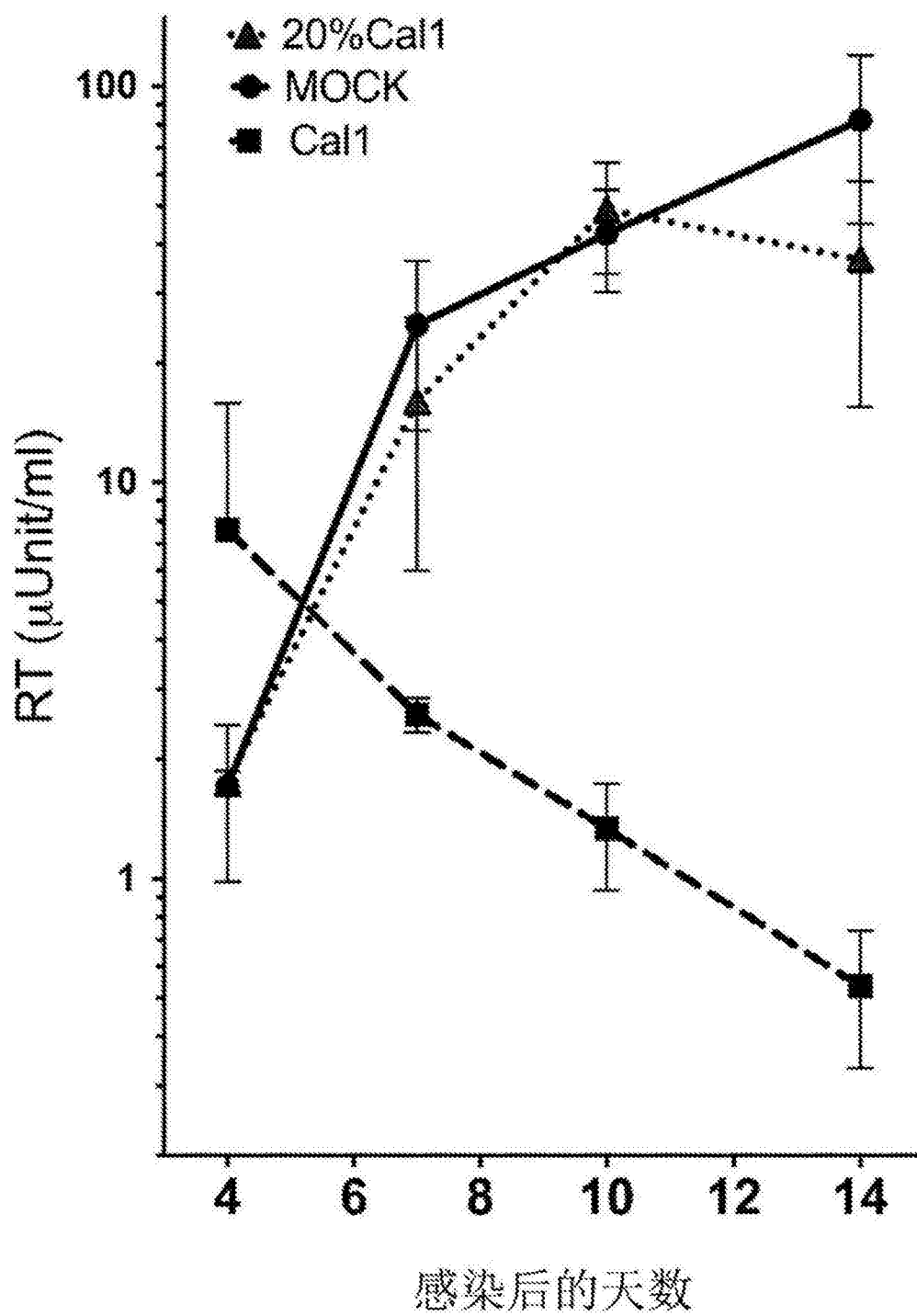


图10C

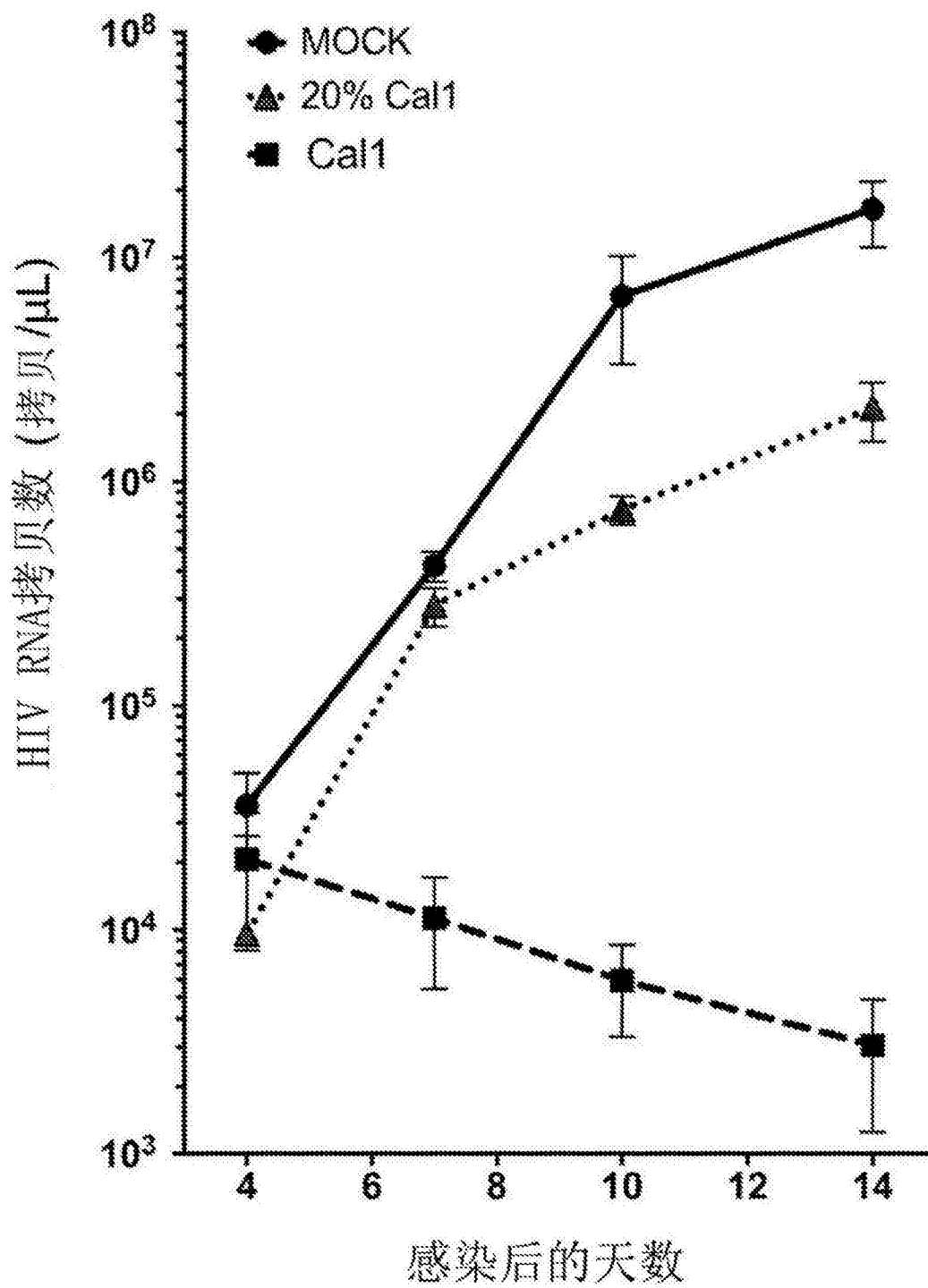


图10D

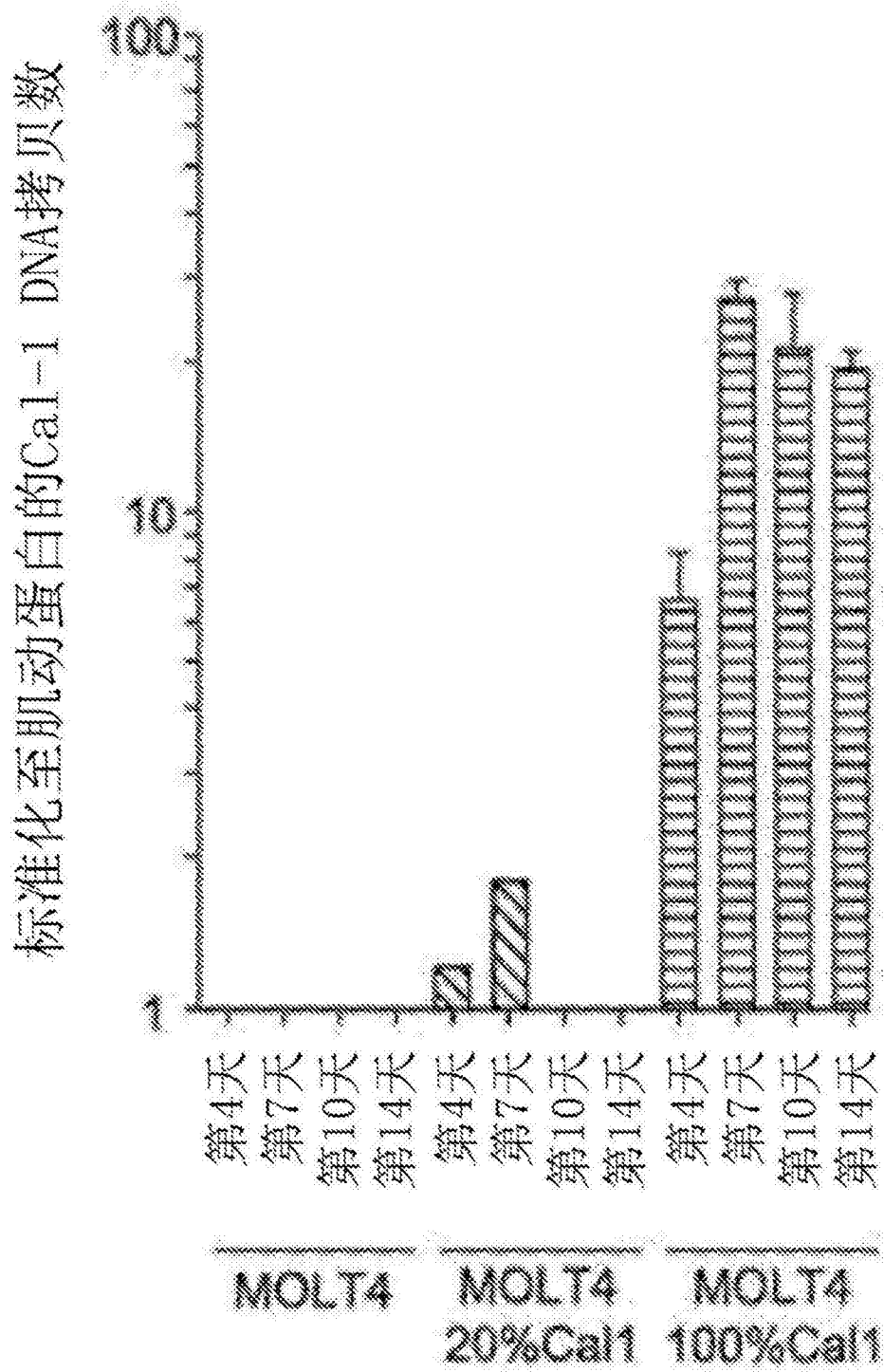


图11A

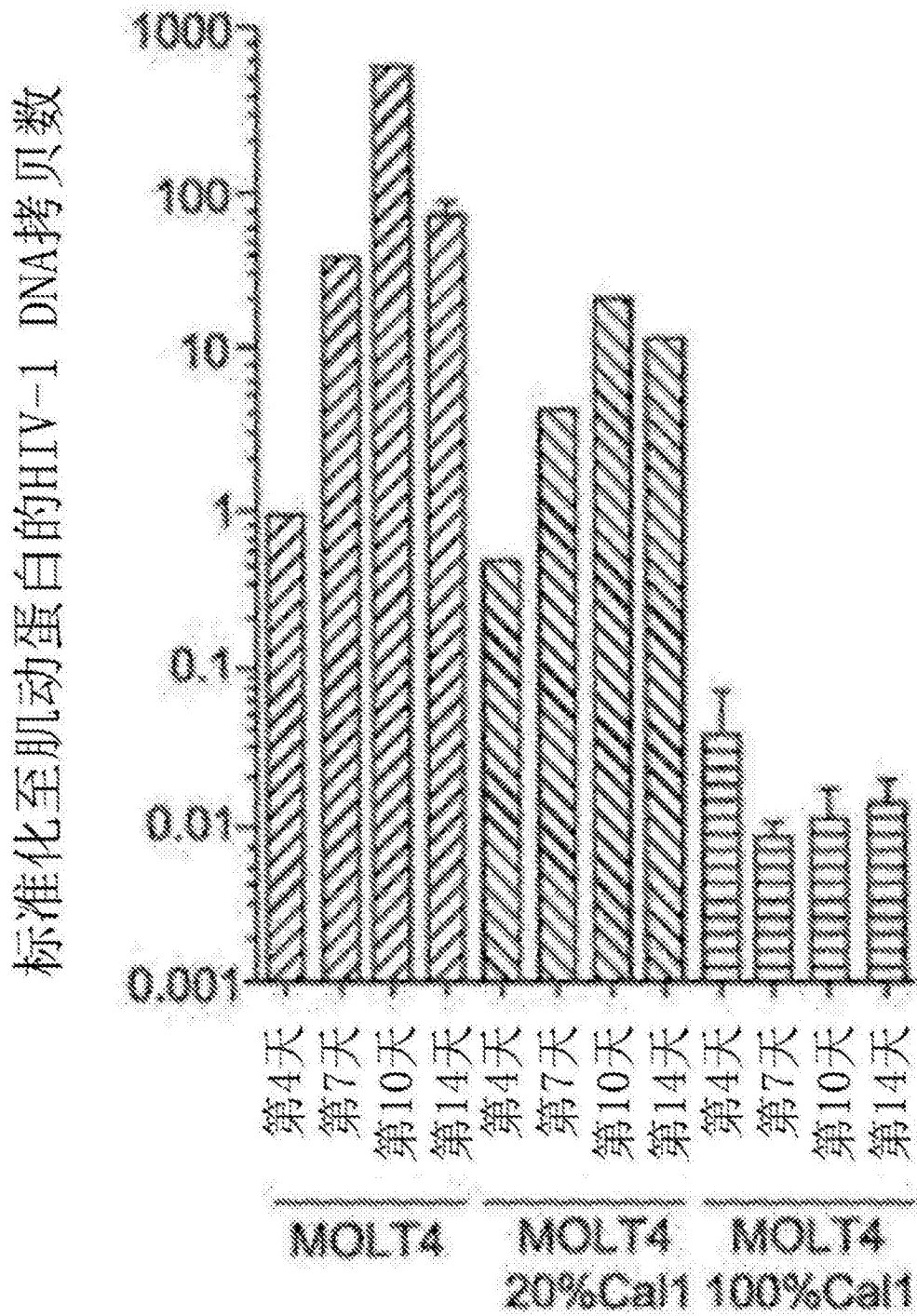


图11B

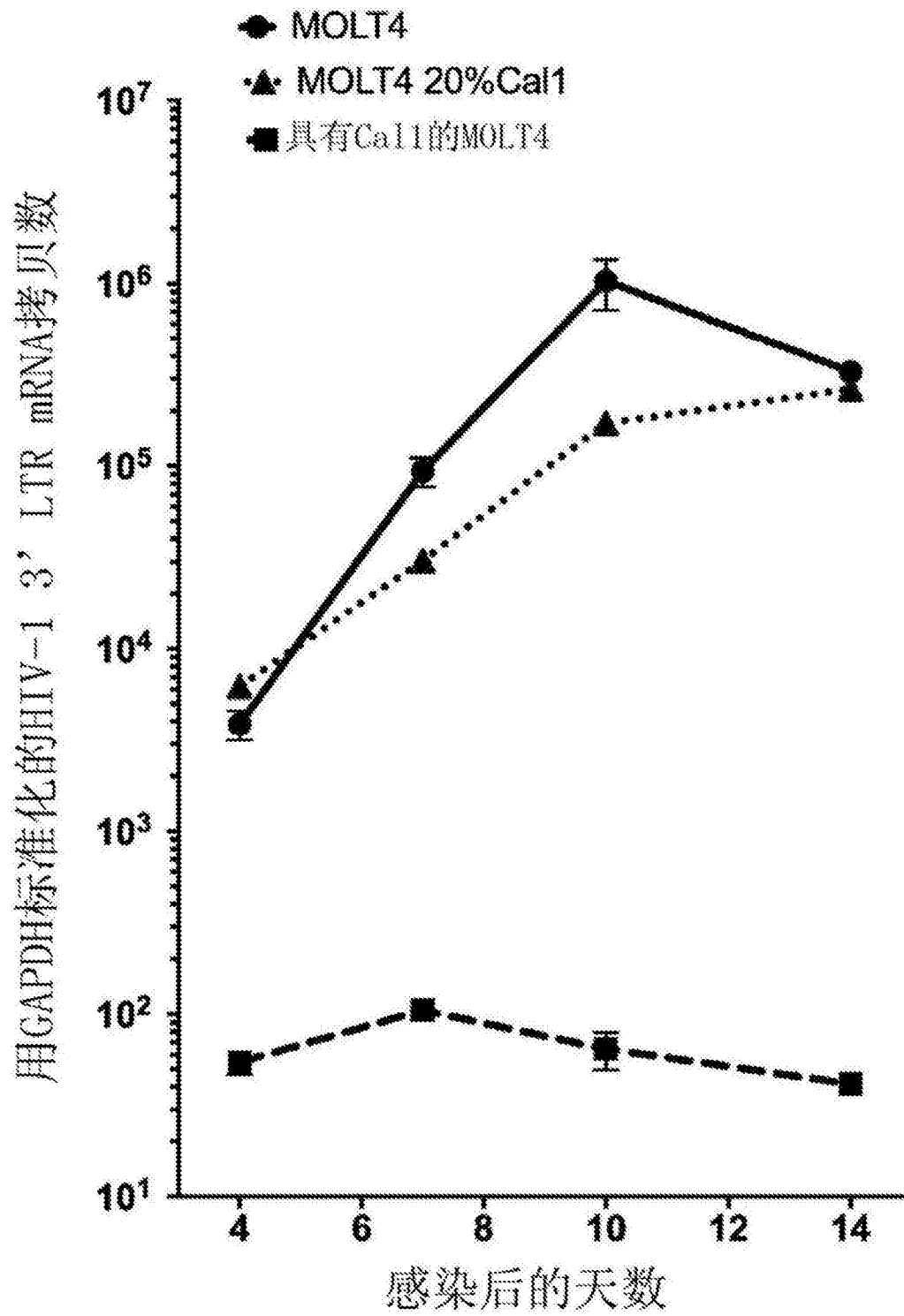


图12A

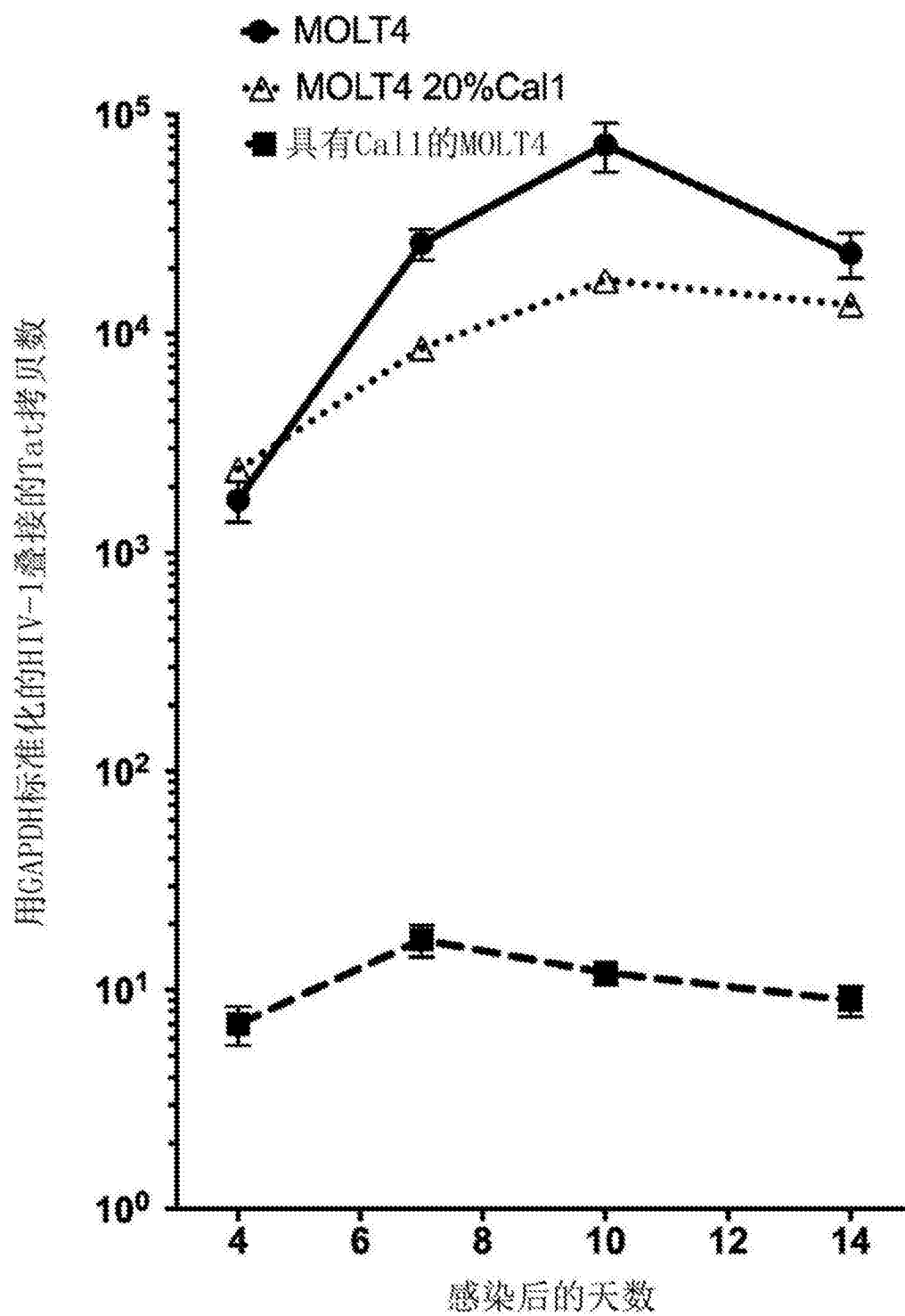


图12B

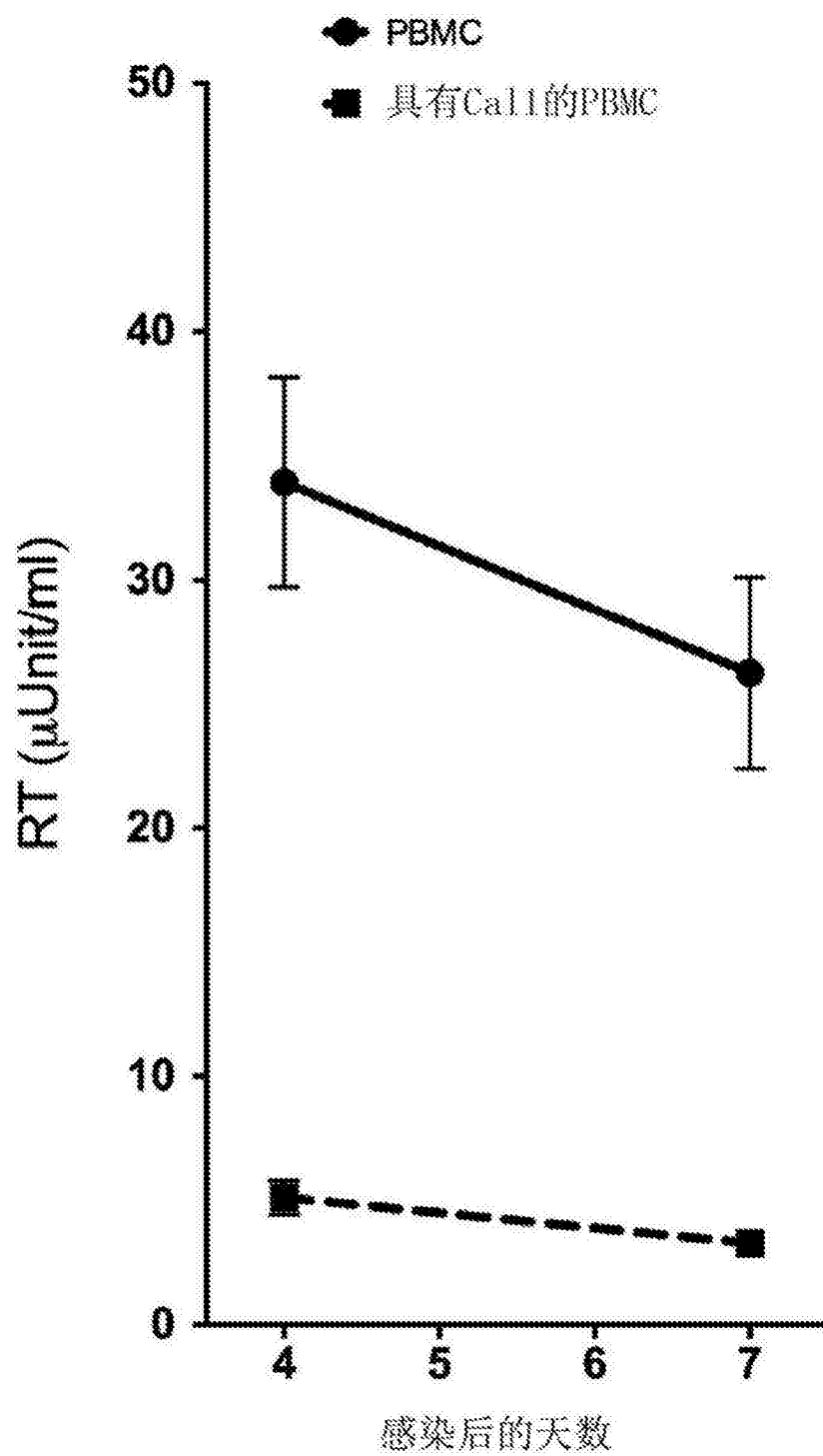


图13A

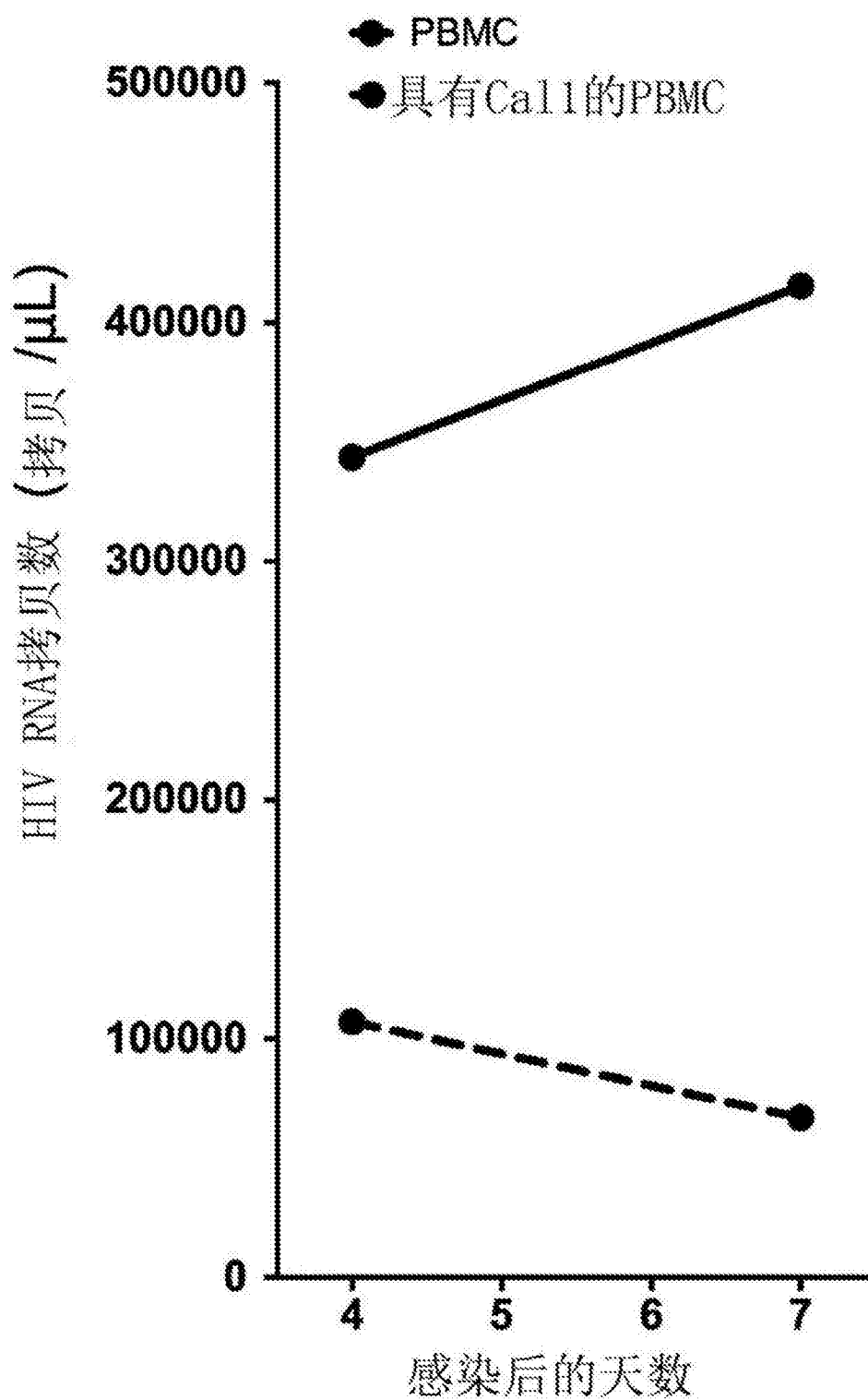


图13B

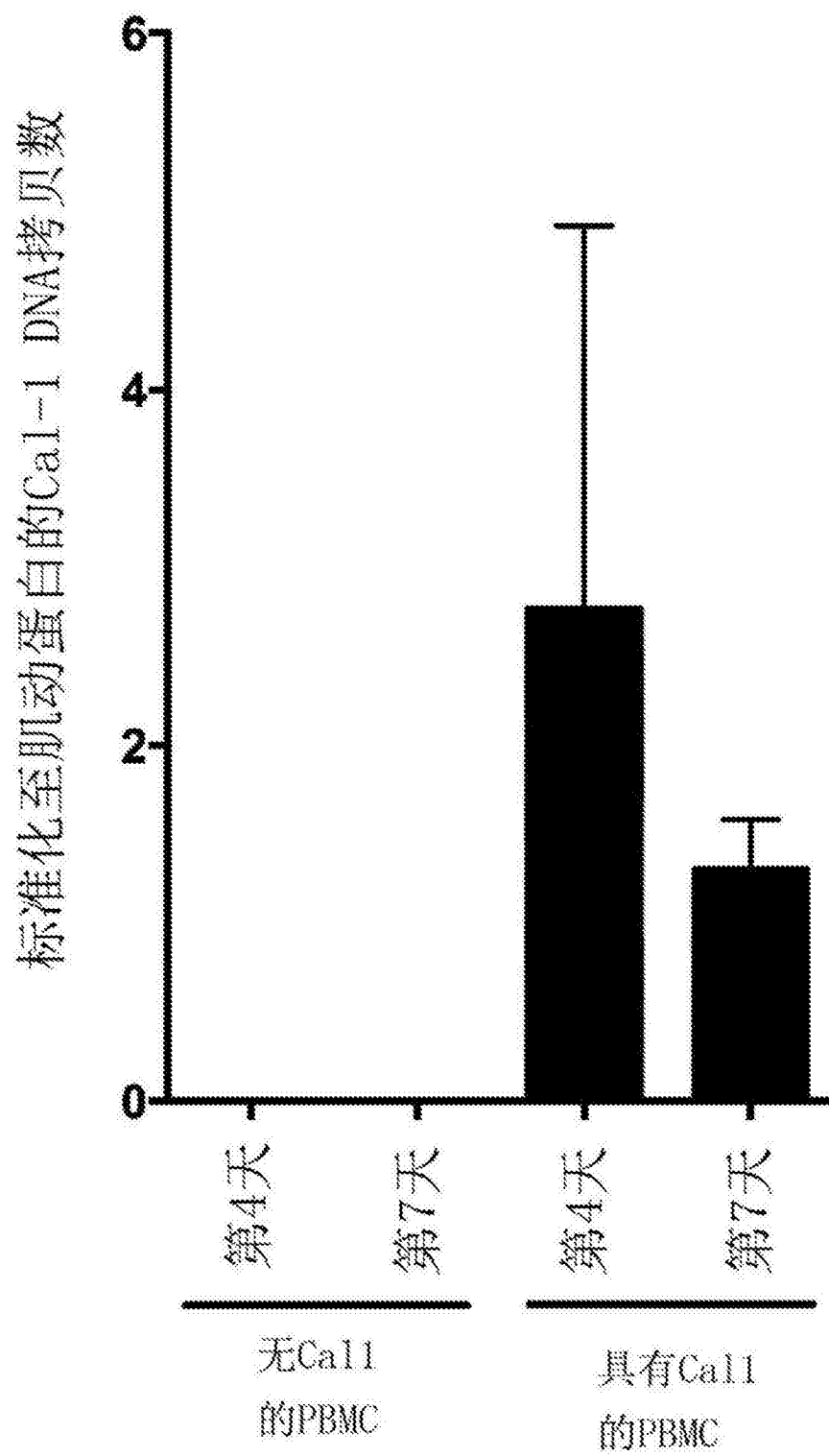


图14A

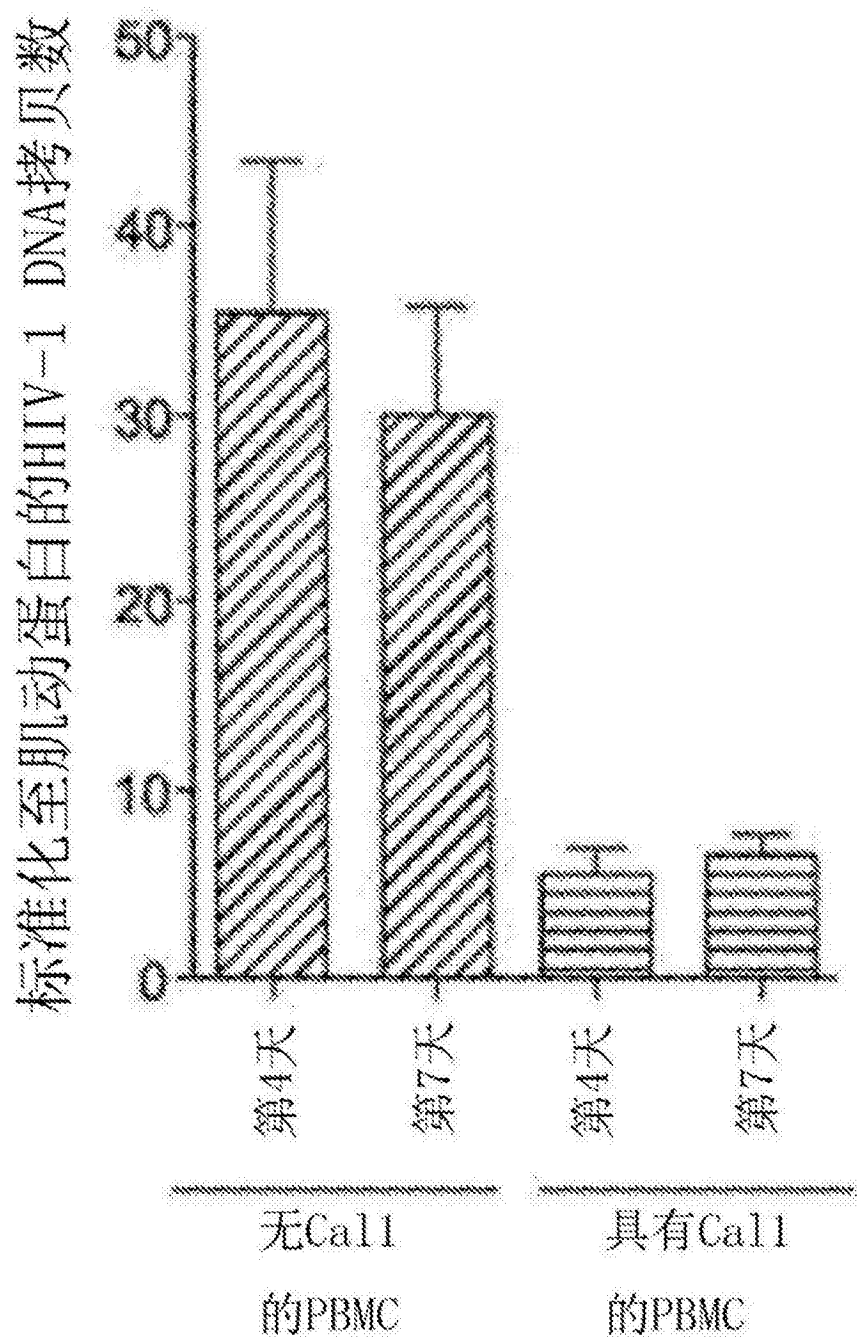


图14B

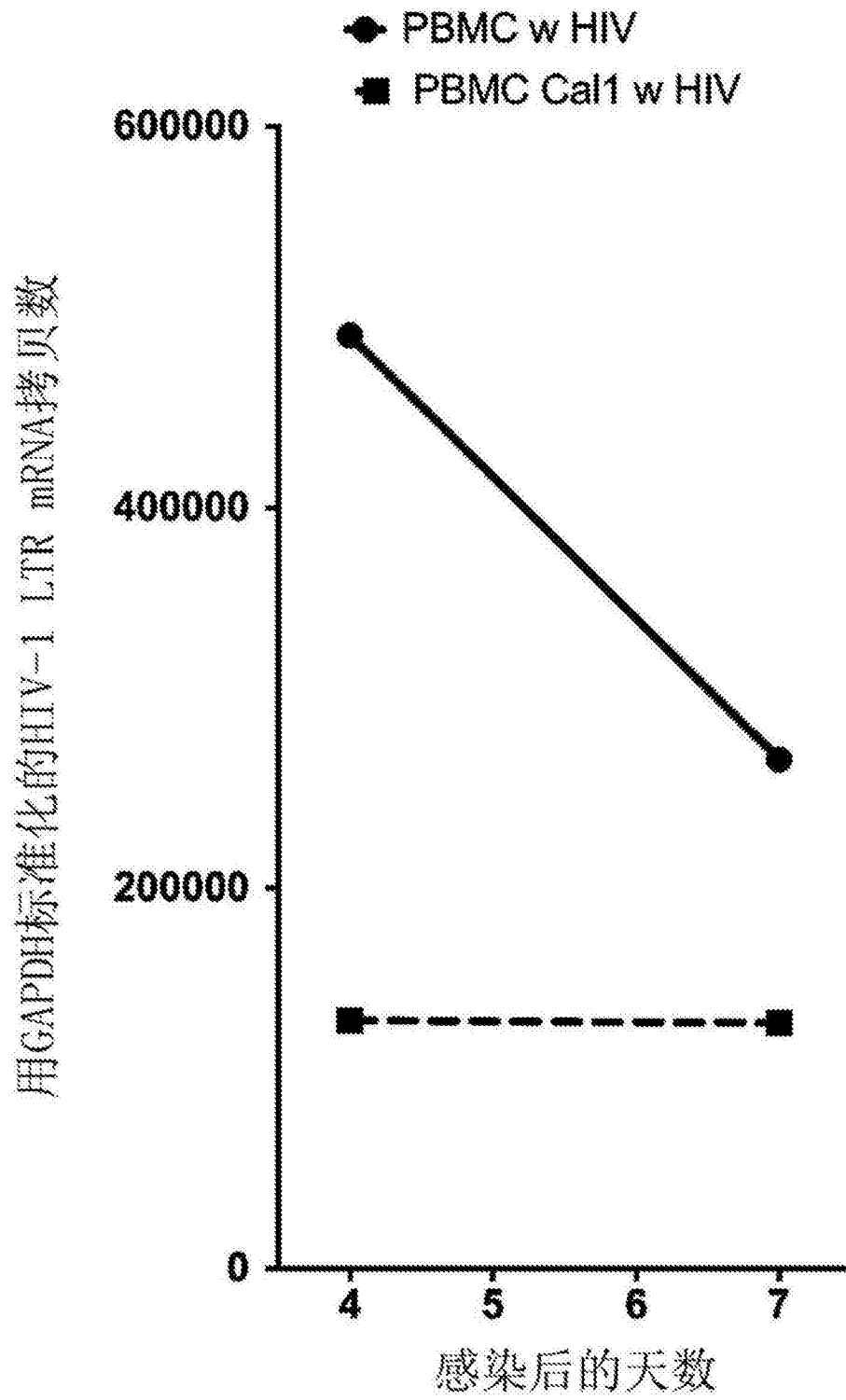


图14C

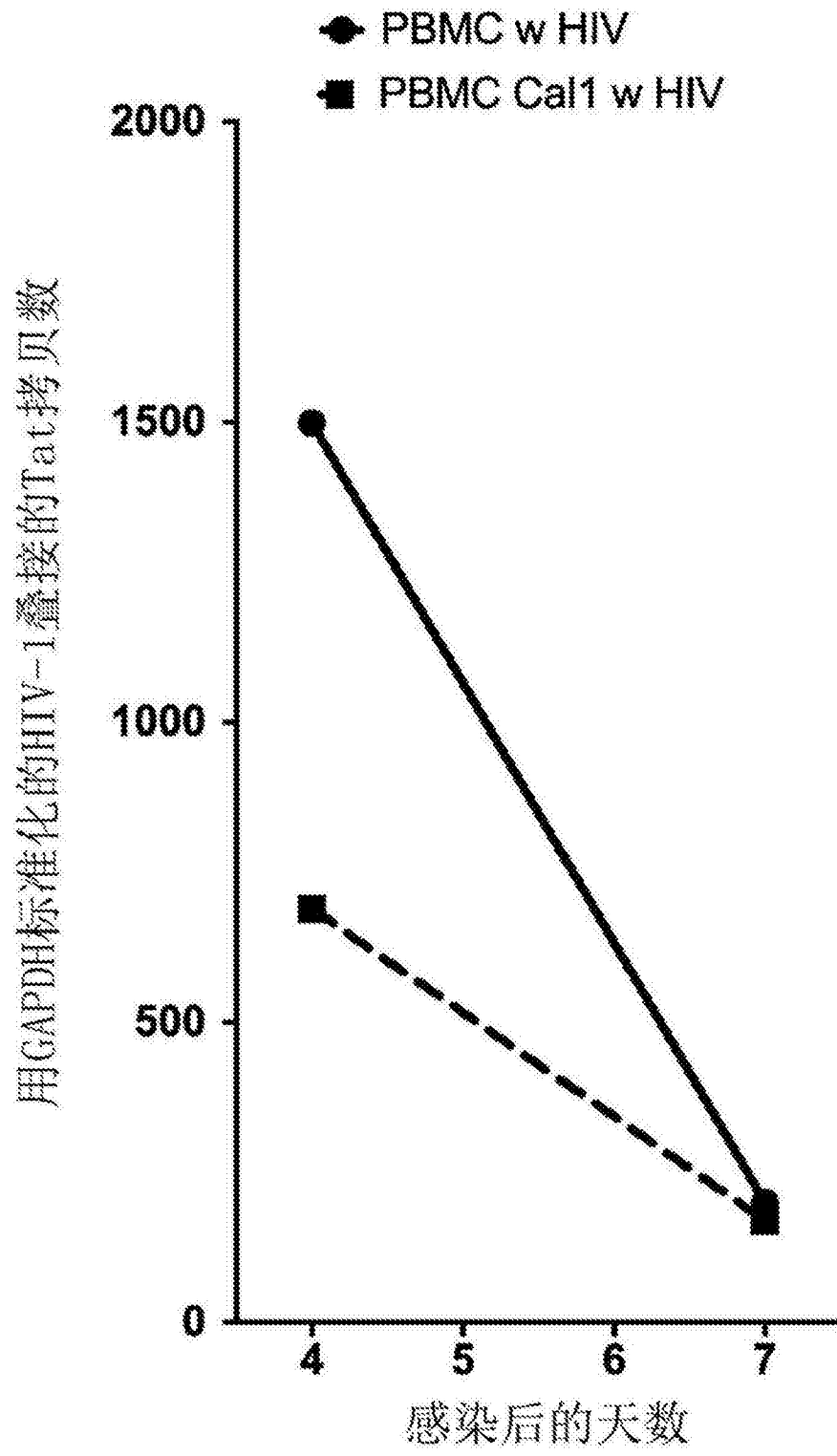


图14D

用于Cal-1和HIV-1的主混合物

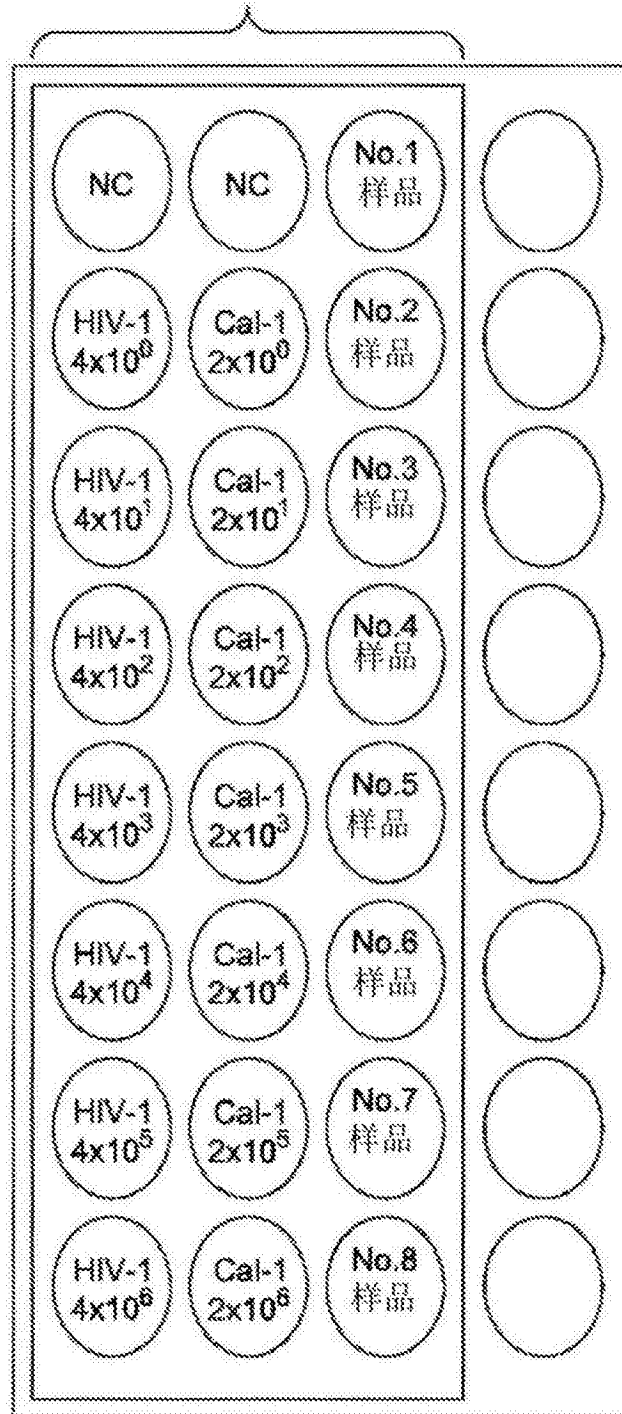


图15A

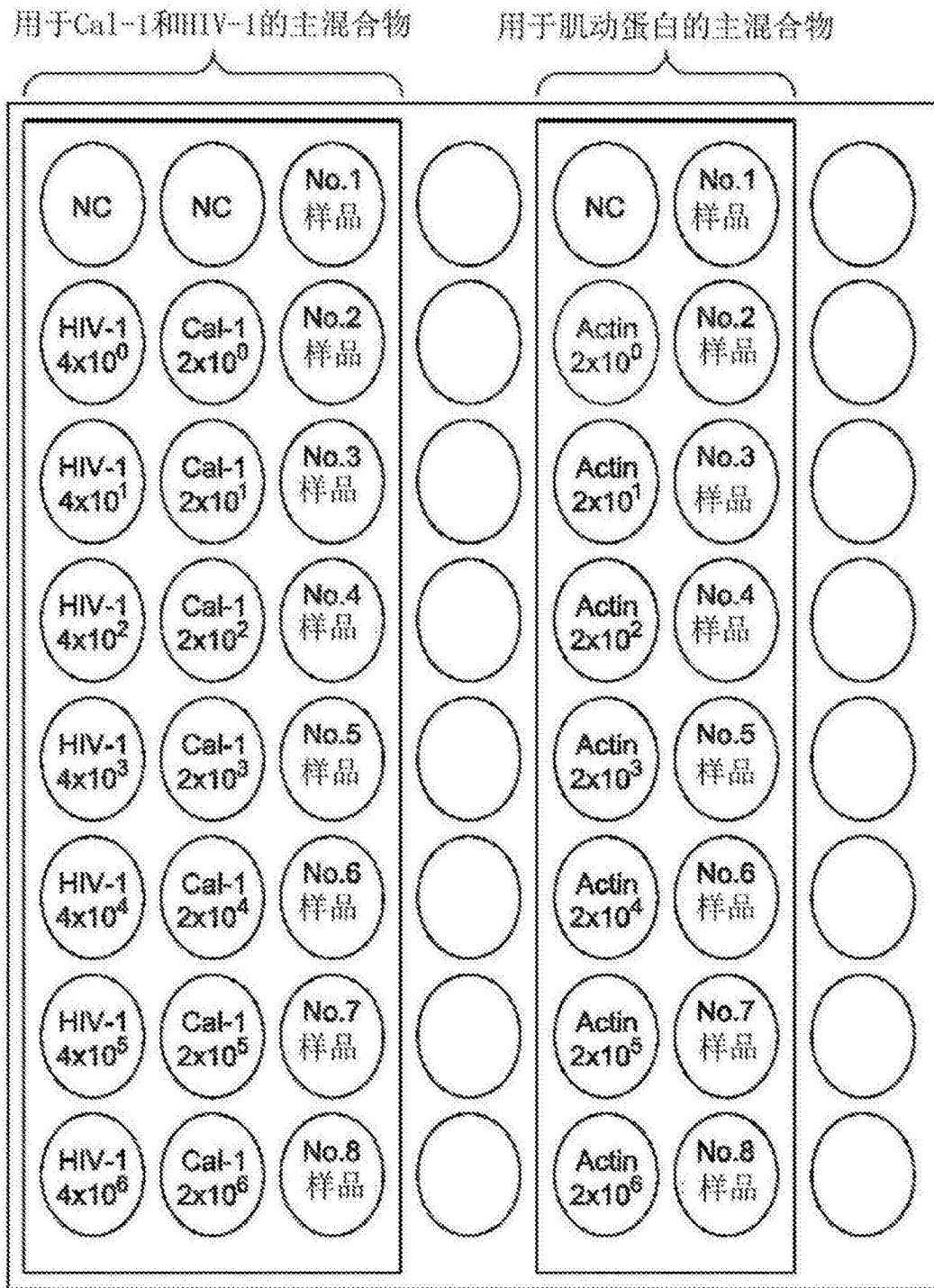


图15B

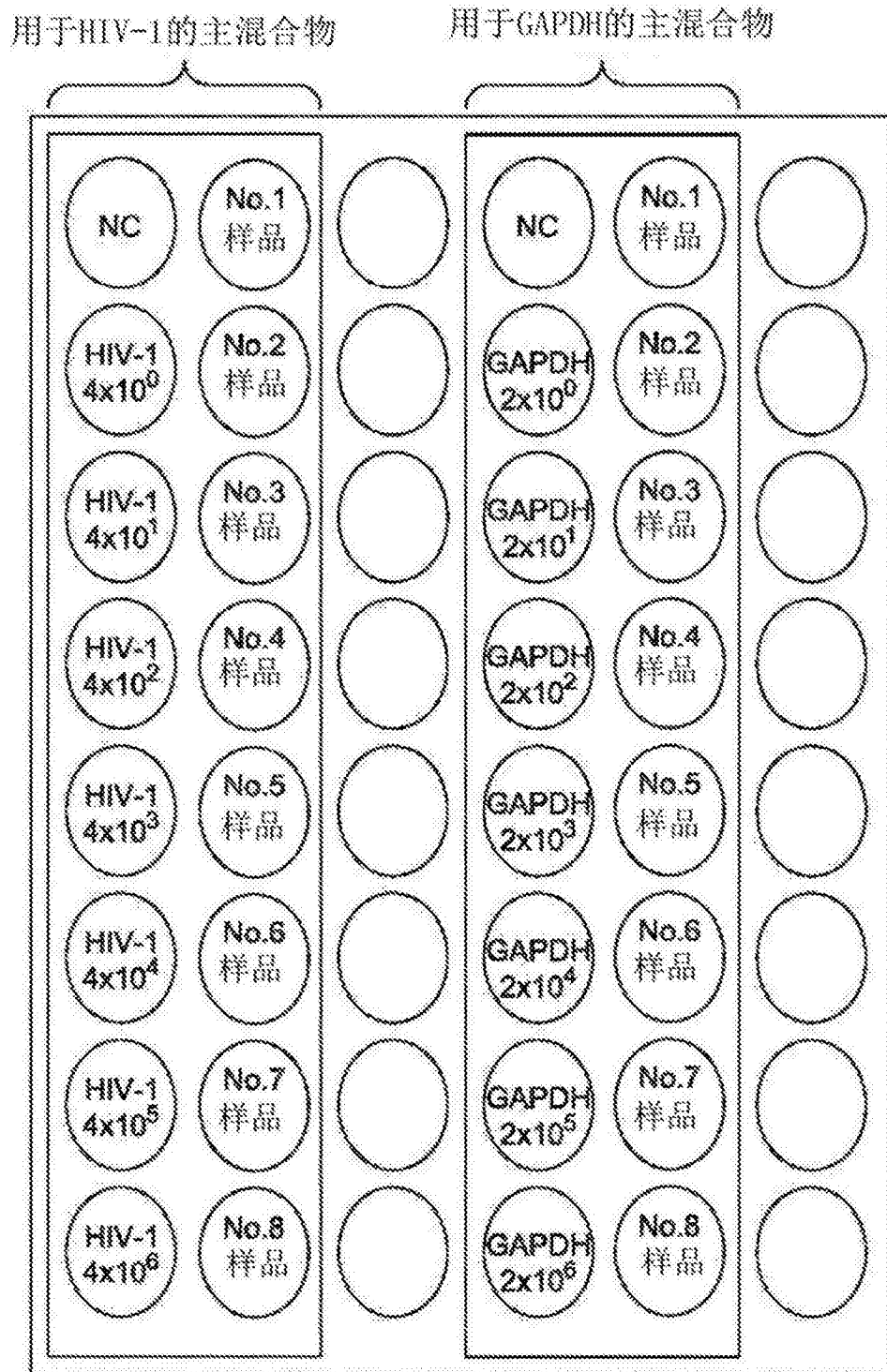


图15C

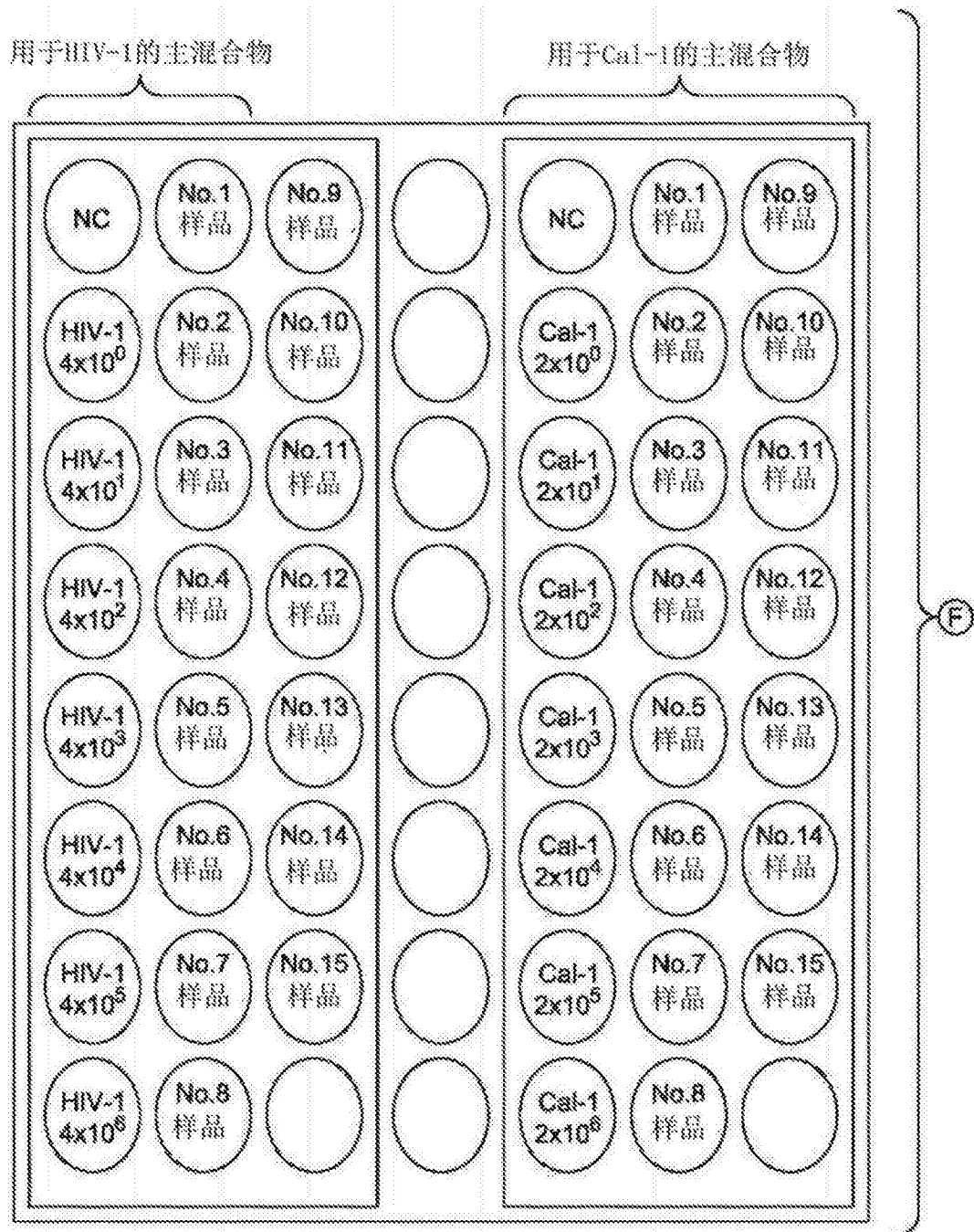


图15D

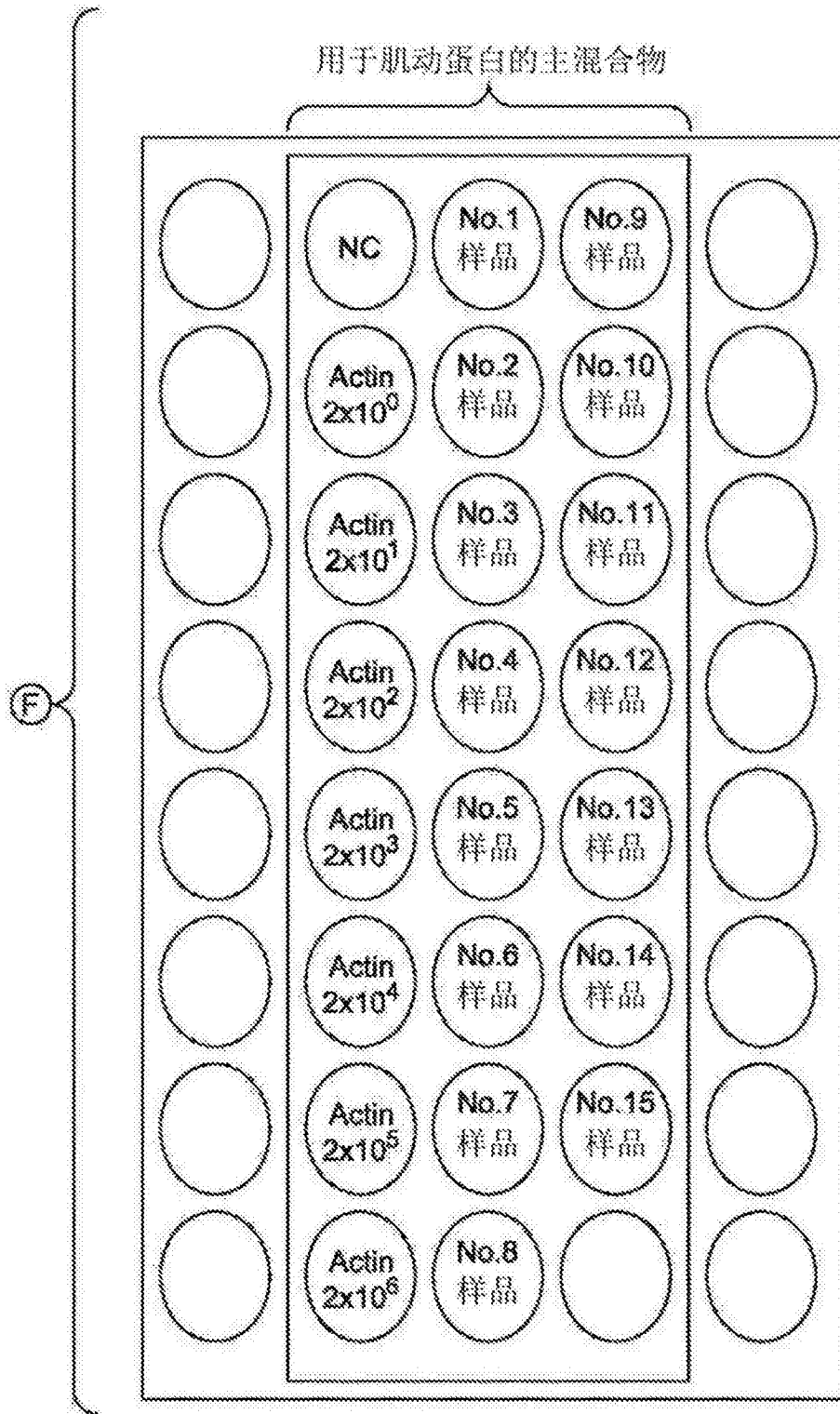


图15E