(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 1775946 B
(45)授权公告日 2010.11.10

(21)申请号 200410082654.X

(22)申请日 1995.03.27

(30)优先权数据
218355 1994.03.25 US

(62)分案原申请数据
95193268.3 1995.03.27

(73)专利权人 印第安纳大学研究及科技有限公司
地址 美国印第安纳州
专利权人 西北大学

(72)发明人 D·A·威廉斯 V·P·帕特尔

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 徐雁漪

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C12N 7/01(2006.01)
C12N 1/38(2006.01)
C07K 14/78(2006.01)
C12N 15/48(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)
A61K 38/16(2006.01)
A61K 38/39(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

(56)对比文件
CN 1084216 A,1994.03.23, 全文.
WILLIAMS D.A. 和 MORITZ T..Umbilical cord blood stem cells as targetsforgeneticmodification: new therapeutic approaches tosomaticgenepy.. BLOOD CELLS20 2/3.1994,20(2006-2-3),504-516.
TORRE D. 等人.Interaction of human plasma fibronectin with viral proteinsofhuman immunodeficeincy virus.FEMS IMMUNOL. MED. MICROBIOL8 2.1994,8(2),127-131.

审查员 王启扬

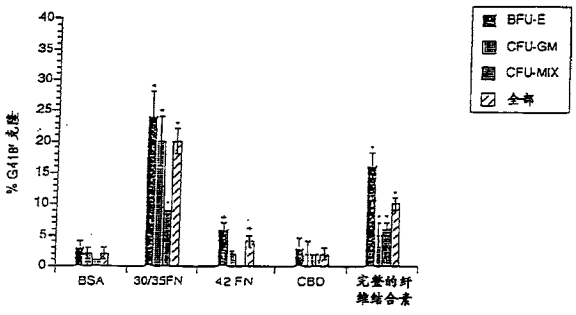
权利要求书 1 页 说明书 19 页 附图 10 页

(54)发明名称

增强的病毒介导的DNA转移

(57)摘要

一种通过逆病毒提高造血细胞和其它细胞转导效率的方法,其包括在纤维结合素或纤维结合素片段存在的条件下感染细胞。如图所示,纤维结合素或纤维结合素片段显著地增强了逆病毒介导的向细胞(特别是造血细胞,包括定型祖细胞和初级造血干细胞)中进行的基因转移。本发明还提供了利用增强的基因转移法、造血细胞类群和新的用于增强向细胞中进行逆病毒介导的DNA转移的构建体而进行的改进的体基因疗法及其应用。



CN 1775946 B

1. 一种体外定位逆病毒的方法，其包括：

温育一种包含有与有效固定化量的多肽相接触的逆病毒的培养物，所述多肽包含纤维结合素的肝素 II 区中具有逆病毒结合活性的氨基酸序列，所述多肽由下式所示的氨基酸序列组成：

Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr
Ser Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr
Arg Val Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile
Asn Leu Ala Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val
Ala Thr Lys Tyr Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr
Ser Arg Pro Ala Gln Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro
Pro Arg Arg Ala Arg Val Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile
Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala
Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro Ile Gln Arg Thr Ile Sys Pro Asp
Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln Pro Gly Thr Asp Tyr Lys
Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg Ser Ser Pro Val Val
Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn Leu Arg Phe Leu
Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro Pro Arg Ala
Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Sys Pro Gly Sev Pro Pro
Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile
Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu
Lys Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr。

增强的病毒介导的 DNA 转移

[0001] 本发明是申请日为 1995 年 3 月 27 日，申请号为 95193268.3，发明名称与本案相同的申请的分案申请。

[0002] 发明领域

[0003] 本发明涉及通过病毒提高细胞转导效率的方法，具体地说，涉及用纤维结合素和 / 或纤维结合素片段来增强病毒介导的基因向细胞转移的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 近来，随着人们对许多人类疾病分子基础的了解以及基因转移技术的发展，人们开始尝试建立对一些遗传病的体基因疗法 (somatic genetherapy) 方案。目前用基因疗法有希望治愈的疾病有这样一些 :在这些疾病中，一种酶或其他蛋白有缺陷或者丢失，而这些酶或蛋白的水平不需精确调节，尤其不需内在的精确调节，而且那些酶或蛋白的缺陷是在患者骨髓中可发现的。

[0006] 例如，一种可用基因疗法来治疗的疾病是腺苷脱氨酶 (ADA) 缺乏症。这种病会导致严重的并发免疫缺乏症 (SCID)。ADA 缺乏的患者骨髓中有很少或没有这种酶。然而，ADA 缺乏已通过相配的骨髓移植得到治疗。ADA 正常的细胞对 ADA 缺乏的细胞有一种选择优势，并且会再生出病人的骨髓。

[0007] 骨髓细胞之所以是体基因疗法的好的目标，是因为骨髓组织易于体外操作并且包含可再生细胞。另外，人脐带血中也包含大量的始祖细胞。把基因成功地转入可长期再生的造血干细胞中，这些细胞的后代的存在使得多种疾病得以终身治愈。

[0008] 一些研究者已在鼠中将基因转移至可再生干细胞中并在可再生干细胞中长期表达。然而对于大型动物，如狗和灵长类，体内实验还仅有极少的成功记录。这很可能是由于初级造血干细胞的感染效率较低的缘故。当应用于人类时，现有的基因转移技术的局限性就更加复杂了，这是由于以下因素的存在造成的 :成人骨髓 (ABM) 中干细胞较少 ;缺乏纯化这些细胞的方法 ;并且这种原始细胞在细胞周期中所占的时间相对较少。

[0009] 在鼠和大型动物的骨髓细胞实验中，人们注意到，最成功的方案是把靶细胞与产生逆病毒的细胞系共同培养。另外，多数的 FDA 支持的基因转移试验依赖于重组的逆病毒载体来进行基因转导。由于重组逆病毒载体转移效率高并且可以精确而稳定地把外源 DNA 整合到细胞 DNA 中，所以它成为基因疗法很合适的载体。这些载体中包含所要转移的外源 DNA，并经过进一步的修饰除去了病毒的病原性。由于这些修饰，病毒的产生就通过逆病毒包装细胞而基本上完成了。然而，对于临床基因疗法，由于考虑到生物安全性和质量控制，不依赖细胞的转导更为合适。不幸的是，如果不与产生病毒的细胞共同培养，一般很难把基因有效地转移到造血细胞比如干细胞中。

[0010] 最近，有人指出，在感染过程中，把靶细胞暴露于基质细胞中，基因转移效率会被提高。基质细胞是造血微环境 (HM) 的一种主要成分。HM 由一种有组织的网络组成，主要包括 :巨噬细胞、基质细胞、内皮细胞、脂肪细胞和一类由多种特定粘附分子组成的复合胞外基质 (ECM)。一些 ECM 分子，如 laminin，胶原，thrombospondin，蛋白多糖，葡糖胺多糖和纤维结合素，为造血细胞和生长因子提供了锚定位点。基质使逆病毒感染效率提高的机制还

不清楚，但一段时间以来，人们已经知道，当造血细胞与 HM 的细胞直接接触时，会对这些造血细胞增殖和分化有生理调节作用。

[0011] 要把基因有效地转入可长期再生的造血干细胞及其他细胞之中还存在一些疑问，这就使基因转移法在对造血病或其他病的治疗方面受到了限制。人们需要一种方法，它可以有效地把遗传物质转入哺乳动物体内，并且不带有过去方法所具有的危险性和局限性。本发明中的方法满足了这些需求。

[0012] 发明概述

[0013] 简单地说，本发明的一个优选实施方案提供了一种通过逆病毒载体来提高造血细胞转导频率的方法。这种方法包括在可通过逆病毒来有效地提高细胞转导频率的纯的纤维结合素和 / 或纤维结合素片段存在的条件下，用一种缺乏复制能力的重组逆病毒载体来感染活的造血细胞。这些纤维结合素和 / 或纤维结合素片段可以从天然材料中获得，或通过合成而得到（例如，用重组或化学合成基因工程技术进行），也可以通过天然与合成材料相结合而获得。另外，应该明白，本发明中所用的纤维结合素多肽可能包括对天然纤维结合素氨基酸序列的一些突变，从而为本发明提供了对提高转导效率有促进作用的具有粘附的功能多肽。

[0014] 本发明的另一个优选实施方案提供了一种制备被转导的造血细胞的方法。此方法包括用一种复制缺损型带有外源 DNA 的重组逆病毒来感染活的造血细胞。此方法中要有足够的固定化的纤维结合素或其片段或者它们的固定化混合物，从而能够有效地通过逆病毒来提高细胞转导频率。

[0015] 本发明的另一个优选实施方案提供了一种细胞移植的改进方法。这一方法包括：从动物供体中获得活的造血细胞；在固定化的纤维结合素和 / 或它的片段存在并可有效地提高转导频率的条件下，用重组的逆病毒载体感染造血细胞来制备被转导的活的造血细胞；并且把这种被转导的活的造血细胞作为细胞移植体导入到动物受试者体内。在一个优选方式中，这些被感染的细胞能被导入到自身供体中。

[0016] 本发明的另一个优选实施方案提供了一种可获得适合于细胞移植过程的被转导的脐带血细胞的方法。这种方法包括在存在可通过逆病毒提高造血细胞转导频率的有效固定化量的纤维结合素和 / 或纤维结合素片段的情况下，用复制缺损型重组逆病毒载体来感染脐带血中的造血细胞。本发明还包括用这种方法获得的从脐带血中得到的活的被转导细胞类群；以及把被转导的细胞类群作为移植体导入动物体内的移植方法。

[0017] 根据上述各实施方案中更特殊的方面，所用的纤维结合素或纤维结合素片段将包括提供了纤维结合素的肝素 -II 结合区逆病毒结合活性的第一氨基酸序列，也包括提供了纤维结合素的 CS-1 区细胞结合活性的第二氨基酸序列。把纤维结合素的这两个结合区同时使用被证明可以非常明显地通过逆病毒提高靶细胞的转导效率。

[0018] 本发明的另一个优选实施方案提供了一种制备通过逆病毒载体来提高指定靶细胞转导效率的构建体的方法。本方法包括把靶细胞上结合的配体，与纤维结合素上提供了逆病毒结合活性的肝素 II 结合区序列的多肽共价偶联的步骤。本发明还包括利用这些构建体通过逆病毒来增加指定靶细胞转导效率的方法，以及用这些被转导的细胞进行移植的过程。

[0019] 本发明的另一个优选实施方案提供了一种定位多种病毒的方法。此方法包括，在

足够的固定化的纤维结合素或纤维结合素片段存在下，温育含有该病毒的培养基，其中纤维结合素或纤维结合素片段中具有肝素 II 结合区域的病毒结合活性，可用来定位多种病毒。

[0020] 本发明还有一个优选的实施方案，它提供了被转导的活的造血细胞及含有基本上纯的和 / 或固定化的纤维结合素或其片段的细胞培养物。同时还提供了逆病毒介导的 DNA 向细胞转移的试剂盒。这将在后面进一步说明。

[0021] 本发明的一个目的是提供利用逆病毒有效地感染哺乳动物细胞的方法。

[0022] 本发明的另一个目的是提供利用逆病毒载体进行基因转移的方法。

[0023] 本发明的另一个目的是提供一些用于自体和 / 或异体细胞移植的改进的移植方法和细胞培养物。

[0024] 本发明的这些及其他目的、优点、特性经过阅读下面的说明书之后，对那些熟悉本领域的人来说将是非常明显的。

附图说明

[0025] 图 1. 给出了包括胰凝乳蛋白酶片段的纤维结合素分子的简图。

[0026] 图 2. 显示了存在纤维结合素片段时 TKNEO 载体使人的始祖细胞被感染的效率。在以后的实施例 1 中将进一步描述。

[0027] 图 3. 比较了在纤维结合素片段存在时用 TKNEO 载体使各种人的造血始祖细胞被感染的效率。在以后的实施例 1 中将进一步描述。

[0028] 图 4. 比较了用不同方法转导的骨髓细胞移植到小鼠体内之后，hADA 的存在情况。(i) 泳道 2-4 用的是共同培养法，(ii) 泳道 5-7 是在固定化的纤维结合素片段存在时的上清感染，(iii) 泳道 8 ～ 10 是用 BSA 进行的上清感染。这些将在以后的实施例 7 中详细描述。hADA 的对照实验分别为泳道 1 和 12，鼠类 ADA 的对照为泳道 8。

[0029] 图 5. 表明结合在纤维结合素片段上的逆病毒，在以后的实施例 8 中将进一步描述。

[0030] 图 6. 表明结合在纤维结合素片段上的逆病毒的剂量依赖性，在以后的实施例 8 中将进一步描述。

[0031] 图 7. 给出了实施例 9-11 中所用的各种重组纤维结合素片段的简图。

[0032] 图 8. 显示了逆病毒与各种纤维结合素片段包括一些重组片段结合的情况。在以后的实施例 9 中将进一步描述。

[0033] 图 9. 说明了肝素阻碍逆病毒与纤维结合素片段结合的情况。在以后的实施例 9 中将进一步描述。

[0034] 图 10. 显示了鼠造血细胞在各种纤维结合素片段存在的条件下被逆病毒感染的效率。在后面的实施例 10 中进一步说明。

[0035] 图 11. 比较了用不同方法转导的骨髓细胞移植到小鼠体内之后 hADA 的存在情况：(i) 共培养方法；(ii) 用不同纤维结合素片段进行上清感染；(iii) 用 BSA 进行上清感染。在以后的实施例 11 中将进一步描述。

[0036] 优选实施方案的说明

[0037] 为了进一步加深对本发明原理的理解，这里对它的一些特定的实施方案作一定的

解释，并且用特定的语言来描述同一实施方案。不过还应理解，此发明的范围是没有限制的。如把这里所述原理的应用进行进一步的替换修饰，对于熟悉相关领域的人来说是很容易的。

[0038] 正如前面所指出的，本发明提供了用病毒，如逆病毒，来提高活细胞转导效率的方法。本发明还提供了用重组逆病毒载体把基因有效地转移到活细胞中的方法，获得被转导的细胞的方法，以及得到的自体及其他细胞移植的方法和材料。

[0039] 本发明的一个特征是发现了纤维结合素 (FN) 及包含 FN CS-1 细胞粘合区的纤维结合素片段可以明显地提高逆病毒介导的基因向细胞转移的效率。例如，特定的前体及初级造血干细胞或长期培养起始细胞 (LIC-IC)，带有一个纤维结合素受治疗者，因而表现出与纤维结合素及其片段相结合的能力。有利的是，这种效率提高使得不再需要与产生病毒的细胞共同培养。本发明的另外一些特征强调的是，位于肝素 II 结合区中的纤维结合素的病毒结合区的发现。这种病毒结合区可在多种应用中用于定位病毒粒子。包括例如，用于把病毒释放到靶细胞中的范围很广的构建体。

[0040] 与本发明的一些优选实施方案相一致的重组病毒载体包含有外源 DNA，并且是没有病原性的，也就是复制缺陷型的。这些载体有效地转移外源 DNA，并且精确而稳定地把外源 DNA 整合到宿主细胞，如动物细胞，尤其是哺乳动物细胞的 DNA 中。例如，在本发明中，包含我们感兴趣序列的基因中一段碱基的核苷酸序列，可以在适当的启动子作用下被整合到重组的逆病毒载体中，这种启动子通常是外源的、可以启动该基因的启动子。考虑到这一点，外源 DNA 可能包含天然或人工制备的 DNA，也可能是从异源部分得到的异源 DNA。这些 DNA 可能是天然的，也可能是化学合成的分子，它们已通过连接或本领域其他技术手段被连接起来。正象前面指出的，导入的核苷酸序列将处于启动子的控制之下，并一般位于启动子的下游。换一种说法，就是启动子一般位于编码序列的上游（即 5，端）。由此可知，除了启动子和转录起始密码子之外，可能还有，也可能没有其他调节因子（如增强子）来与它们配合，共同完成外源编码序列的转录。另外，重组 DNA 中在引进编码序列的下游还应优先地包括一个终止序列。

[0041] 包含外源 DNA 的逆病毒载体提供了一个选择性标记或其它可以利用的选择优势。例如，这些载体可以包含一个或多个可抗多种选择试剂的基因。选择试剂包括一些抗生素，如新霉素。本发明使用的代表性载体包括 :N2/ZipTKNEO 载体 (TKNEO)（效价 :在 NIH3T3 细胞上为 1×10^{5}G418^{r}cfu/ml)，ZipPGK-hADA 载体，和 ZipPGK-mADA 载体。这些载体 Moritz 等人以前已经报告过 (1993)，医学专家杂志 178 :529。在 TKNEO 载体中，neo 磷酸转移酶序列通过疱疹单纯胸腺嘧啶激酶启动子而进行正向表达（相对于 5’的长末端重复 LTR)。这一载体包含具有新霉素抗性的选择性标记基因，从而易于确定被转导的细胞。在 ZipPGK-hADA 载体中，人的 ADA(hADA)cDNA 经过人磷酸甘油酸激酶 (PGK) 启动子作用而在相对于 5’LTR 的正方向上被表达。它只包含一个可表达的基因序列，而没有明显的选择性标记。ZipPGK-mADA(PGK-mADA) 载体与 ZipPGK-hADA 载体基本相同，只是由鼠的 ADA 取代了人的 ADA cDNA。对于熟悉本发明领域的人来说，这些和其他一些病毒载体及其制备技术将是很清楚的，并且本发明的应用也是容易被掌握的。

[0042] 本发明中使用的病毒载体表现出与纤维结合素，包括人的纤维结合素上的肝素 II 结合区中一个氨基酸序列相结合的能力。下面将会讲到，虽然本发明不受任何理论的限制，

但是人们相信，通过病毒与细胞上相应的功能区相结合而同时定位病毒和靶细胞，会使由病毒介导的细胞转导效率有所提高。考虑到这一点，病毒与肝素 II 结合区中氨基酸序列相结合的能力会使本发明得以有效地进行，这些可用实施例 8 和实施例 9 中描述的常规方法进行表征。一般地讲，这些方法决定了病毒粒子与包含肝素 II 结合区的固定化多肽结合的程度，因此不会被从固定化的多肽基质中洗掉。简单地，在一定程度上，包含病毒的上清可以培养在一个包含带有纤维结合素的肝素结合区的固定化多肽的小孔中。然后用生理盐水冲洗小孔，之后把此病毒的靶细胞培养在此小孔中，用来确定小孔中保留下来的感染活性。相对于初始病毒上清，感染活性或效价的减低得到评价并且与类似的对照实验相比较（例如：用 BSA 涂覆的小孔），与对照孔相比，包含肝素 II 结合区的小孔保留了相当高的效价，证明了病毒很适合于本发明的要求，为了简化这一筛选过程，病毒载体可以带有一个选择性的标记，这在前面已提到过。

[0043] 本发明中使用的纤维结合素的片段可以是天然的或合成的，并且可以从天然材料中制备到较纯的样品，例如 Ruoslahti 等人 (1981) 已经描述过，生物化学杂志 256 :7277 ; Patel 和 Lodish(1986) 细胞生物学杂志 102 :449 ;Bernardi 等人 (1987) 细胞生物学杂志 105 :489。考虑到这一点，相当纯的纤维结合素或纤维结合素片段的存在可能意味着它们基本上不受与天然纤维结合素同时产生的其他蛋白的影响。本发明中所使用的基本上纯的纤维结合素或纤维结合素片段也可以通过重组细胞产生。例如 Taguchi 等人在 1993 年 3 月 30 日发表的美国专利 No.5,198,423 号上就描述了这样的方法，此专利已转让给日本东京的 Takara Shuzo 有限公司。值得注意的是，在这个'423 号专利中描述了与下面实施例子中 H-271，H-296，CH-271，CH-296 和 C-CS1 相一致的重组片段，这个专利中还描述了得到这些片段的方法。下面实施例子中使用的 C274 片段可用美国专利 No.5,102,988 中描述的方法来获得。这些片段或那些可以通过常规方法而得到的片段可以在日本工业科学技术发酵研究院中通过培养大肠杆菌获得，如FERM P-10721(H-295)，FERM BP-2799(C-277 通过蛋氨酸连接到 H-296) 和 FERM BP-2264(H-271)，在美国专利 No.5,198,423 中也有所描述。另外，关于在这里使用的纤维结合素片段和这种片段起始材料的一些信息可以在 Kimizuka 等人的论文中找到 J.Biochem.110,25,4936-4961(1986)，他们的论文报告了人的纤维结合素的肝素 II 结合区域的情况。同时，具有 CS-1 细胞粘附区和肝素 II 结合区的纤维结合素片段，被发现能有效地提高本工作中基因向造血细胞中的转移效率，因此在本发明中被优选地使用。这类片段包括大约一种 30kd 或 35kd 的片段 (30/35FN) 和下面的实施例子中将要介绍的多种重组片段。这样就可以明白，广义地说，与纤维结合素相关的多肽或本发明中所用的多肽将提供一个具有 FN 的 CS-1 细胞结合区细胞结合活性的氨基酸序列，同时也能提供一个能与病毒结合的 FN 上肝素 II 结合区氨基酸序列。熟悉本领域的人将会认识到，这里所需的细胞和病毒的结合活性一方面可以由天然的这些 FN 区域的氨基酸序列提供，另一方面也可以由那些在序列上与天然序列有所不同，但很相似的，可以表现出细胞结合及病毒结合活性的片段来提供。这些相似的氨基酸序列与天然序列基本同源，并且可能包括那些被删除、被取代、被修饰了部分氨基酸，但仍提供了细胞结合或病毒结合特性所需的氨基酸序列的序列。

[0044] 考虑到这一点，有关的生物技术人员已进一步阐述了可用常规方法对主要功能区氨基酸的删除、取代、增加或其他修饰。这样，所得到的氨基酸序列可以通过常规筛选得到

所需的细胞结合或病毒结合活性。例如，纤维结合素肝素 II 结合区的突变或修饰形式，就可以用上面一般性讨论中所提到的方法筛选，更详细的方法将在后面的实施例 8 和实施例 9 中讨论，用病毒培养、洗涤、病毒效价分析来确定与对照相比保留下来的感染情况。按本文提供的精神，对工作于本领域的人来说，这些结合仅代表的是一些常规实验。

[0045] 细胞结合修饰或突变了的纤维结合素 CS-1 细胞结合区，或者结合其他细胞结合多肽，可能可以通过传统的步骤进行分析。例如，自然 352 :438-441 页中所描述的步骤即可用于此分析。简单地说，把细胞结合多肽涂在塑料小碟上，把要分析的细胞类群涂布于其上，放置 30 分钟至 2 小时，之后，把没有与蛋白结合的细胞取出，计数，并且测试活性。与多肽结合的细胞通过胰蛋白酶或细胞解离缓冲液（如 Gibco）作用而回收，计数并测试活性。在某些情况下，如对于造血集落形成细胞，这些细胞继续培养 12 到 14 天直至证明这些细胞确实具有形成集落的特性。然后计算粘附细胞的比例并且与标准对照进行比较。标准对照可用涂于塑料碟上的牛血清白蛋白 (BSA)。靶细胞基本上与所分析的多肽能够结合，这说明这种多肽与细胞的结合是适合于本发明的，而且这种多肽还可以被结合于纤维结合素的逆病毒结合片段之上，以生成本发明的构建体来通过病毒载体有效地提高靶细胞的感染率。

[0046] 依照本发明更特殊的一些方面，用于通过逆病毒来提高转导效率这一过程中的病毒结合多肽将包括 (i) 与人纤维结合素肝素 II 结合区的 Ala^{1690}-Thr^{1960} 相对应的第一氨基酸序列，此序列如下 (Seq. I. D. #1)：

[0047] Ala Ile Pro Ala Pro Thr Asp Leu Lys Phe Thr Gln Val Thr Pro Thr Ser

[0048] Leu Ser Ala Gln Trp Thr Pro Pro Asn Val Gln Leu Thr Gly Tyr Arg Val

[0049] Arg Val Thr Pro Lys Glu Lys Thr Gly Pro Met Lys Glu Ile Asn Leu Ala

[0050] Pro Asp Ser Ser Ser Val Val Val Ser Gly Leu Met Val Ala Thr Lys Tyr

[0051] Glu Val Ser Val Tyr Ala Leu Lys Asp Thr Leu Thr Ser Arg Pro Ala Gln

[0052] Gly Val Val Thr Thr Leu Glu Asn Val Ser Pro Pro Arg Arg Ala Arg Val

[0053] Thr Asp Ala Thr Glu Thr Thr Ile Thr Ile Ser Trp Arg Thr Lys Thr Glu

[0054] Thr Ile Thr Gly Phe Gln Val Asp Ala Val Pro Ala Asn Gly Gln Thr Pro

[0055] Ile Gln Arg Thr Ile Sys Pro Asp Val Arg Ser Tyr Thr Ile Thr Gly Leu Gln

[0056] Pro Gly Thr Asp Tyr Lys Ile Tyr Leu Tyr Thr Leu Asn Asp Asn Ala Arg

[0057] Ser Ser Pro Val Val Ile Asp Ala Ser Thr Ala Ile Asp Ala Pro Ser Asn

[0058] Leu Arg Phe Leu Ala Thr Thr Pro Asn Ser Leu Leu Val Ser Trp Gln Pro

[0059] Pro Arg Ala Arg Ile Thr Gly Tyr Ile Ile Lys Tyr Glu Sys Pro Gly Sev Pro

[0060] Pro Arg Glu Val Val Pro Arg Pro Arg Pro Gly Val Thr Glu Ala Thr Ile

[0061] Thr Gly Leu Glu Pro Gly Thr Glu Tyr Thr Ile Tyr Val Ile Ala Leu Lys

[0062] Asn Asn Gln Lys Ser Glu Pro Leu Ile Gly Arg Lys Lys Thr；

[0063] 或者与上述序列充分相似而且具有与逆病毒结合能力的氨基酸序列；(ii) 与人纤维结合素 III CS 结合区的一部分 (CS-1 细胞结合区）相对应的第二氨基酸序列，此序列如下 (Seq. I. D. #2)：

[0064] Asp Glu Leu Pro Gln Leu Val Thr Leu Pro His Pro Asn Leu His Gly

[0065] Pro Glu Ile Leu Asp Val Pro Ser Thr；

[0066] 或者与上述序列充分相似而且具有造血细胞结合能力的氨基酸序列。造血细胞可

以是始祖细胞和/或长期再生（干）细胞。

[0067] 正如前面提到的，可以理解，所得氨基酸序列与天然序列充分相似而且表现出与病毒结合的能力（在肝素 II 结合区的情况）和与靶细胞结合能力（在 CS-1 区的情况）。在此情况下本发明应用中对天然序列进行修饰和诱变是完全可能的。

[0068] 本发明的一个方面是提供了一种体基因疗法，此疗法包括体外细胞疗法和随后的靶细胞向宿主的移植，也就是把被转导的靶细胞“移植”到宿主中。造血细胞或其他细胞可以从人体或其他哺乳动物中通过标准方法而获得。例如，造血细胞可以从人的骨髓或外周血中或者胎儿的脐带血中获得。一旦得到，造血细胞就可以在干细胞和/或始祖细胞中用标准技术来处理，扩增。这样造血细胞就可以培养了，例如可在组织培养皿上进行培养。可选地，在这一阶段中非粘附性、低密度、单核的细胞可以在逆病毒感染之前被预刺激。这里使用的和本领域中所用的“预刺激”指的是在暴露于逆病毒之前把细胞暴露在生长刺激因子之中的过程。这种预刺激被证明对逆病毒介导的造血细胞转导有促进作用。

[0069] 在预刺激之后，收集细胞并把它们与纤维结合素或纤维结合素片段一起培养，这里的 FN 片段是可以提高逆病毒介导的细胞转导效率的片段。优选地，细胞是与纯的和/或不溶的如被固定化的纤维结合素或纤维结合素片段一起培养的。然后，可以用重组病毒感染这些细胞，此重组病毒包含有例如修复细胞中酶或其他蛋白缺乏或异常的基因。感染时存在足够的纤维结合素或纤维结合素片段使得逆病毒介导的细胞转移效率被有效地提高。之后产生的转导造血细胞可内源地引入到动物细胞移植受治疗者中。移植时优选受治疗者是自体供体，当然也包括异体移植。后者，尤其是使用脐带血细胞作移植体的情况将在后面讨论。

[0070] 本发明的方法可以用于基因标记或多种疾病的基因疗法。这些疾病包括骨髓病，如癌症，白血病，蛋白缺失或异常。还可用于修饰细胞的疗法，从而提高对其他疗法，如化学疗法的耐受性，用本发明治疗的代表性疾病包括 ADA 缺乏症，如 ADA 缺乏 SCID，幼儿急性骨髓白血病 (AML)、神经分裂症，和成人 AML 及淋巴白血症。

[0071] 本发明的一个特定的优选实施方案中，用于细胞移植的细胞是从人脐带血中得到的。这样，人脐带血就可以被获得并在活的造血祖细胞和/或干细胞中扩增富集，例如，通过获得一种非粘附性、低密度、单核的细胞类群而达到富集的目的。这一类群紧接着被选择预刺激，并在存在逆病毒和固定化或纯的纤维结合素或其片段的条件下培养，从而提高载体介导的细胞转导效率。考虑到这一点，人们发现，在纤维结合素或其片段存在时，即使纤维结合素并不构成脐带因 ECM 的一部分，即使所用的脐带血原始祖细胞和干细胞与骨髓中的并不相同，脐带血中原始祖细胞和/或干细胞的转导效率仍然被大幅度提高了。特别指出的是，脐带血中的干细胞被表征为 $CD34^+$，$HLA\text{-}DR^+$；而骨髓中的干细胞被表征为 $CD34^+$，$HLA\text{-}DR^-$。申请者这一发现，即在纤维结合素或纤维结合素片段存在下脐带血中的原始祖细胞可被高效地转导的现象，使得人们能够使用一种方便并且富含干细胞的造血细胞源。另外，用于富集原始祖细胞和干细胞的脐带血通过异体移植而成功移植到无数病人体内的事实，使得脐带血成为造血细胞的一个优选的源泉。请参考：科利 - 库玛尔等，Brit. Heaematol. 85：419-422(1993)；布鲁科思梅尔等，血细胞 17：313-329(1991)；格鲁克曼等，Br. J. Heaematol. 45：557(1980)；海德尔堡：Springer-Verlag pp. 60-68(1989)；瓦格纳等，血液 79：1874-1881(1992)；瓦格纳等，血液 82-86a（摘要）

[0072] 如果需要，收获的被转导细胞或其他细胞可以再测定转导效率和基因表达。例如，本发明提供的方法使逆病毒介导的基因转移效率明显提高，将在下面的特定实施例子中进行阐述。其中就描述了一些测定方法，用于说明在纤维结合素或纤维结合素片段存在下，逆病毒介导的感染和基因转移的高效率。尤其指出，用 PGK-hADA 逆病毒感染的鼠造血细胞表达了很高水平的转移来的 ADA cDNA。类似地，用单个 PGK-mADA 病毒感染的人前体克隆比内源人 ADA 蛋白多表达了 10 倍以上。因此，为了严格地分析转移效率，只有当转移的 mADA 表达量等于或高于内源人的 ADA 水平时，才认为前体克隆被转导了。TKNEO 载体的新霉素的高效表达可通过对 G418 药物的抗性来检测的，这可用来分析 neo 磷转移酶（新霉素基因的产物）活性。

[0073] 正如前面指出的那样，本发明中的方法的优点是不需要与产生逆病毒的细胞共同培养。这样，根据本发明的这个方面，逆病毒介导的基因转移可以在没有其他细胞而只有靶细胞的情况下完成，靶细胞可以是造血细胞或其他类型细胞。例如，包含逆病毒载体质粒的生产者细胞可以被培养并且从上清中收集到这种载体质粒。然后包含逆病毒的上清可用来感染造血细胞。感染过程中有纤维结合素和 / 或纤维结合素片段存在，并且它们是优选地处于固定化状态的，例如涂在要进行感染的基物之上或与感染用的介质相接触。这样，任何制备高效价游离逆病毒的细胞都被认为适用于本发明。这些细胞包括包装细胞，如 Psi-2，C2，PA 12，PA317 和 GptenvAM12，和许多本领域中的其它包装细胞系。

[0074] 根据本发明的其他一些性质，与纤维结合素肝素 II 结合区上氨基酸相结合的病毒可以用于构建多种类型细胞病毒疗法的构建体。至此，一种带有纤维结合素逆病毒结合区的多肽，可以与具有这种靶细胞构建专一性的任何配体进行共价偶联。这种方法将不再象以前那样，需要对每一种靶细胞构建一个特定的逆病毒生产者细胞系 (Kasahara，N.A.MDozy，和 Y.W.Kan.，科 学，266 卷，1373-1376 页 (1994)，Valsesia-Wittmann，S.，A.Drynda，G.Deleage，M.Aumailley，J.M.Heard，O.Danos，G.Verdier，和 F.L.Cosset，病毒学杂志，68 卷，4609-4619 页 (1994))。靶向构建体的专一性可以通过使用不同的配基来实现，这些配基包括 :1) 细胞粘连蛋白，2) 激素或细胞因子，3) 靶细胞的单抗隆抗体，4) 与靶细胞结合的碳水化合物 (G.Ashwell 等，生物化学研究年鉴，51 卷，531-554 页 (1982))，5) 靶细胞产生的代谢物，或者 6) 与靶细胞结合的功能多肽。这种基因传递构建体的效率可以通过加入一些肝素 II 病毒结合区来改善，从而可以增加传递到靶细胞上病毒粒子的数目。例如，美国专利第 5,198,423 号中描述的与 Pro^{1239}-Ser^{1515} 片段相对应的人类纤维结合素细胞结合区，已被证明可以与包括 BHK 和 B_{16}-F_{10} 细胞在内的几种细胞相结合 (Kimizuka 等人，生物化学杂志 110 卷，285-291 页 (1991))。另外，肝素 II 区本身也具有与纤维结合素，内皮细胞及癌细胞结合的能力。这些多肽序列可以被偶联到纤维结合素的逆病毒结合区上，从而用来定靶于将要用逆病毒感染的靶细胞。

[0075] 造血系统的典型应用还包括促红细胞生成素构建体或 G-CSF 与纤维结合素的逆病毒结合区偶联，从而高度特异地分辨并分别定靶于类红细胞或粒状前体细胞。本发明的另外一个常见的应用将使逆病毒的一个或多个结合区与专一或主要结合在恶性细胞上的配体相联系。例如，已有人报道，在体外，甚至体内，乳腺癌细胞的生长会因为使用了一些结合在靶细胞受治疗者上的物质而受到影响。这些物质包括 :促黄体生成素释放的衍生物，(Emons，G. 等人，人类繁殖 9 :1364-1379，(1994))，雌激素 (Tolcher，A.W.，Oncol，

8:39-43(1994)),或抗雌激素 (Howell, A. 等, Lancet 345:29-30(1995)),孕激素或抗孕激素 (Klijn, F.G. 等,人类繁殖,9 Suppl.1:181-189(1994);Griffiths, K. 等人, Semin. Oncol.21:672-687(1994))。这些物质在本发明中充当了包含一个或多个纤维结合素病毒结合区的构建体中的配体。进一步举例说明,甲状腺(癌)细胞可以用带有基质的构建物来高度特异地定靶,肝(癌)细胞可以用含有 HDL 或 HDL 的一部分的构建物来定靶。最后,单克隆抗体的构建物和纤维结合素逆病毒结合区将可以定靶单克隆抗体所适合的任何细胞和器官。这样,通过利用纤维结合素逆病毒结合区结合并定位病毒载体的能力,很大范围类型的哺乳动物细胞都可以成为靶细胞。

[0076] 相应地,本发明的另一个优选实施方案包含了制备可用来制备靶细胞的病毒转导的构建体。纤维结合素肝素 II 结合区上的病毒结合氨基酸序列是被偶联在与靶细胞相连的配体上的。正象上面讨论的,配体可以包括:纤维结合素或其他蛋白上的一段多肽(包括细胞粘连蛋白,如层蛋白,胶原蛋白,vitronectin,osteopontin 或 thrombospondin),一种激素,一种代谢物,一种抗体(包括单克隆抗体),或任何一种具有专一地与靶细胞相结合能力的其他配体。所得到的总的构建物可以象纤维结合素那样,以被固定化的形式来应用,这将在以后的实施例中专门描述。

[0077] 正象前面所述,这样的构建体和细胞定靶方法可以应用在体外,考虑到构建体的稳定性和专一性及在生理条件下逆病毒构建物的相互作用等因素,这种构建体也可用于逆病毒的体内定靶。通过修饰传递系统来定位构建体向靶细胞的传递还可以进一步提高特异性。例如,通过疏张门静脉来定靶肝细胞。

[0078] 使用为本发明的实用方法专门设计的试剂盒会使进行逆病毒介导的 DNA 转移变得更为方便。相应地,本发明的另一个方面提供了一些试剂盒,其中包括:大量基本上纯的多肽或可增强靶细胞的转导的构建体,和作为逆病毒感染基质的人造基质。多肽或其他构建物可以分别提供或涂在人造基质上。在人造血细胞的感染时,试剂盒中还包括用于细胞预刺激的造血细胞生长因子。另外,试剂盒中可包括上面讨论过的用于转导的重组逆病毒载体。一般地说,试剂盒应包括无菌包装,从而保证试剂盒中各种成分在空间上分离,防止在使用试剂盒时成分被破坏。例如,在实践中,常用带多个分室或分区的密封塑料盒来分离试剂盒中的各种成分。

[0079] 为了进一步加深对本发明的理解和认同,我们给出了以下实施例。应该明白,这些实施例仅仅是本发明的例证,实际上,本发明并不局限于此。

[0080] 实施例 1

[0081] 用 TKNEO 把基因转移到骨髓细胞中

[0082] 1.1 病毒上清的制备

[0083] 包含逆病毒质粒 TKNEO 载体的 GP+EnvAM12 生产者细胞(参阅 Markowitz 等人(1988) 病毒学 167:400) 培养在 Iscove 的改进的 Dulbeccos 培养基 (IMDM,Gibco 公司,盖斯伯里,MD) 中。这种培养基中含有 10%的胎牛血清 (FCS,Hyclone 公司,罗甘,UT) 和 100 单位/毫升的青霉素及 100 毫克/毫升的链霉素 (P/S,Gibco 公司) 包含病毒的上清通过加入 10 毫升含 20% FCS 的 IMDM 浓缩过夜而获得。收集到的介质通过 0.45 微米滤膜 (Gelman 科学,Ann Arbor,MI) 过滤之后保存在 -80℃冰箱中待用。

[0084] 1.2 纤维结合素片段的制备

[0085] FN 是利用 Ruoslahti 等人在酶学方法,82 :803-831(1982) 中所描述的方法从人血浆 (生命源, Glenview, IL) 中纯化的,只是在用 4N 脲洗脱之前,用 1M 脲来洗这个明胶琼脂糖柱。纯化了的 FN 在 4℃,10mM3-(环己胺)-1- 丙基 - 磺酸 (CAPS),150mM NaCl,2mM $CaCl_2$pH11.0 的溶液中进一步水解,并分装保存在 -80℃冰箱中。FN 的胰凝蛋白酶细胞结合区 (CBD)(CS-1) 和肝素 II 结合片段用前面的方法进行纯化 (Ruoslahti 等人, (1982),如上,Patel 和 Lodish,细胞生物学杂志 102,449-456 页 (1986),以及 Bernardi 等人.,细胞生物学杂志 105,489-498 页 (1987)。三个主要的肝素结合片段 (30kD,35kD 和 42kD) 从肝素琼脂糖层析柱的 1M NaCl 洗脱成分中得到。为进一步纯化这些肝素结合片段,这些 1M NaCl 洗脱成分在 4℃ 10mM Tris-HCl pH7.0 溶液中水解过夜,并通过预先用 10mM Tris-HCl pH7.0 平衡了的阳离子交换柱 (2ml DEAE Sepharose 快流 (Pharmacia 精细化学,Uppsala,瑞典)/ 毫克蛋白),30/35kD 片段在没结合的流份中被收集,而 42kD 片段则用 10mM NaCl 洗脱下来。从 500mg FN 中,大约可得到 26mg 的 30/35kD 片段和 4mg 42kD 片段。通过 Wester 印迹技术测定可知是 42kD 片段,而不 30/35kD 片段可被抗 fibrin 结合区的抗体所识别。同样,42kD 片段可以结合在 fibrin-sepharose 亲和层析柱上。

[0086] 为了用于感染方案中,纤维结合素片段被固定于 35 或 100mm 的培养皿中 (Falcon 公司,林肯公园,NJ),浓度和 Patel,Lodish 所述一样为 75pmol/cm^2,(1986),如上。对照皿中以相似的方式涂上 2% (不含 FN) 的牛血清清蛋白 (BSA,伯宁汉姆,Mannheim,德国)。

[0087] 1.3 逆病毒感染方法

[0088] 从健康成人中取来的骨髓样品被收集在含无菌,无防腐剂的硫酸钠肝素的试管中。这一方法是依据印第安那大学医学院学术委员会认可的方法来进行的。在 Ficoll-Hypaque(密度 1.077g/ml, Pharmacia, Piscataway, NJ) 离心机上,25℃离心 45 分钟,制备出低密度的单核的细胞。通过在含 2% FCS 的 IMDM 组织培养皿上进一步培养 4-16 小时除去低密度骨髓细胞中的塑料粘连细胞。培养温度为 37℃,在 5% CO_2 环境中。

[0089] 正象以前 Luskey 等人描述的那样,非粘附性、低密度、单核的细胞在 37℃下含 5% CO_2 的 IMDM 的培养皿中,在用逆病毒感染之前,首先预刺激 48 小时。这种 IMDM 培养基含有 20% FCS,100U/ml rhIL-6,100ng/ml rhSCF(Amgen, Thousomdoaks, CA),和细胞密度为 1×10 细胞 /ml 的 P/S。被预刺激了的细胞通过充分的吹洗除去与塑料结合不紧密的细胞。

[0090] 预刺激了的细胞 (5×10^5 个细胞 /ml) 在涂有 BSA(对照) 或纤维结合素或其片段的平板上培养 6 小时 (这些蛋白或多肽经 UV 放射性检测,已很好地粘附在塑料平板上),然后,在生长因子 (如上) 和 7.5 毫克 /ml 多 (Aldrich 化学公司,Milwankee,WI) 存在下,用病毒上清进行感染。两小时后,除去病毒上清 (包括生长因子和 5.0 毫克 /ml 溴化己二甲铵),并继续培养 12 到 24 小时。每次交换介质时都重新加入非粘的细胞。

[0091] 感染步骤之后,非粘附细胞被弃掉,而粘附的造血细胞按照厂家的说明用细胞裂解液 (CDB)(以无酶 /PBS 为基础,Gibco) 从培养物中收集得到。粘附细胞中加入非粘附部分,洗两次然后计数。收集到的细胞或接种在克隆化甲基纤维素前体化验平板上,或接种在长期骨髓培养物的平板上。

[0092] 1.4 长期骨髓培养

[0093] LTC-IC(人干细胞) 分析是按前面描述的方法进行的,仅做了轻微的改动,Sutherland 等人,血液 74 :1563(1989)。简要地说,$0.5\text{-}1\times10^6$ 被感染了的细胞被接种在含

浓缩的被预照射的（如上）异源人骨髓成纤维细胞的5ml IMDM六个组织培养平板上的长期骨髓培养物(LTMC)中。IMDM含有10％FCS,10％马血清(Sigma)和P/S,1×10^{-5}M的氢化可的松(Upjohn,Kalamazoo,MI)和320毫mol NaCl(Costar,剑桥,MA)。LTMC被培养在33℃,5％ CO_2的条件下,并且每星期除去50％的介质和非粘附细胞。五周后,LTC-IC培养物用CDB除去以从BMF中除去粘附细胞。非粘附和粘附细胞都结合并铺在甲基纤维素平板上,从而从LTC-IC中获得克隆。

[0094] 1.5克隆化甲基纤维素分析

[0095] 甲基纤维素分析基本上按Toksoz等人在美国国家科学院院刊,Vol.89,p7350(1992)中描述的方法进行,只是做了轻微的改动。简单地说,$2\text{-}5\times10^{4}$个被感染的成骨髓细胞与5单位/ml促红细胞生成素(Epo,Amgen),100ng/ml rhSCF,10ng/ml rhIL-3(Genzyme,剑桥,MA)一起铺在1ml 2.4％IMDM甲基纤维素平板上(Fluka,Ronkonkoma,NY)。这种平板含25％FCS,10％人血浆,10^{-5}Mβ-巯基乙醇(Sigma)和P/S,培养物在37℃含5％ CO_2,95％空气中培养,并用反相显微镜在第13天时观察记录克隆的情况,如CFU-GM(包含粒细胞和巨噬细胞)CFU(包含类骨髓细胞和类红细胞成分),或BFU-E(只包含类红细胞成分)。

[0096] 1.6逆病毒感染的分析

[0097] 用TKNEO病毒进行感染的效率可通过测定在13天时甲基纤维素克隆在1.5mg/ml(干粉,Gibco)G418存在下的存活百分比来分析。模拟感染在每个实验中都通过不生产重组病毒的GP+EnvAM12包装系培养骨髓来进行,这些模拟感染细胞培养物在用G418存在时显示出低于1％的本底克隆。

[0098] 1.7定型祖细胞的基因转移效率

[0099] 通过以感染铺在30/35FN-或涂有BSA平板上的骨髓细胞为对照来分析转导效率,在感染后,未经选择前,在这些条件下没有发现克隆数目有什么区别。图2说明了感染后$G418^{r}$克隆的百分比。在所有类型的祖细胞中,30/35FN上得到了更高比例的$G418^{r}$克隆。其中包括那些从单谱系(BFU-E和CFU-GM)和多谱系(CFU-Mix)祖细胞中得到的克隆。对BSA相比,在30/35FN上,所有定型祖细胞被感染数提高了九倍。

[0100] 1.8长期培养起始细胞的基因转移效率

[0101] 基因向LTC-IC的转移用TKNEO载体来估计,向LTC-IC进行基因转移得到的克隆仅在30/35FN上的感染之后才进行检测(30/35FN与BSA相比,分别为16％$G418^{r}$和0％$G418^{r}$克隆)。

[0102] 1.930/35FN的专一性对造血细胞感染效率的影响

[0103] 为了确定在30/35FN上,提高基因转移效率的专一性,在分别涂有BSA、30/35FN、天然纤维结合素、一种包含带有RGDS四肽序列的中央细胞结合区(CBD)的115kD FN片段,一个42kd带有肝素II结合区而无CS-1序列(图1)的FN片段(42FN),的平板上,用TKNEO进行感染。在BSA上的感染产生3±1％的$G418^{r}$BFU-E,1±1％的$G418^{r}$CFU-GM和0±0％$G418^{r}$CFU-MIX。在CBD上没有发现$G418^{r}$克隆比例有明显提高,而在42FN上BFU-E的感染有少量增加(6.0±-1％)。然而,天然的FN可以提高所有定型祖细胞的基因转移。在所有谱系中,天然FN上感染后的$G418^{r}$克隆比例都低于在30/35FN上的感染。包括BFU-E(16±-2对24±4％),CFU-GM(5±2对20±4％)和CFU-MIX(6±1对9±1％),以上是天然FN和

30/35FN 的比较，前者为天然 FN，后者为 30/35FN。

[0104] 实施例 2

[0105] 用 PGK-mADA 对骨髓细胞进行基因转移

[0106] 2.1 一般步骤

[0107] 用实施例 1 中制备 TKNEO 的方法来制备 PGK-mADA 病毒上清。纤维结合素的胰凝乳蛋白酶原片段（图 1）用实施例 1 中介绍的方法进行制备，之后按实施例 1 中的方法进行逆病毒感染。LTC-IC（人类干细胞）分析和甲基纤维素分析也按照实施例 1 进行。

[0108] 2.2 逆病毒感染的分析

[0109] 用 PGK-mADA 进行感染的效率可通过使用 ADA 同功酶电泳的蛋白分析来测定。对各种单个祖细胞克隆的分析可按以前 Moritz(1993) 和 Lim 等人 (1989) 在美国国家科学院院刊，Vol.86，p8892 中描述的方法进行。为了精确分析转移效率，只有当克隆所表达的 mADA 与内源人类 ADA 水平相同或更高时，才认为进行了转导。为了分析收集到的克隆，把从甲基纤维素培养物中挑出的克隆放入 1.5ml 微量试管中，用温的介质和磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗，离心后保存在 -20℃冰箱中。为进行 ADA 分析，在 5μl 裂解缓冲液中反复冻融裂解细胞，同功酶电泳用前面介绍的方法进行。

[0110] 2.3 定型祖细胞的基因转移效率

[0111] 把骨髓细胞接种在分别涂有 30/35FN 和 BSA 的平皿上进行感染，来比较转导效率，在未选择时感染后得到的克隆数在这些条件之间没什么区别。如表 1 所示，与在 BSA 上相比，在 30/35FN 上的所有定型祖细胞的转导效率明显地提高。正如用高效价（～ 1×10^7 病毒 /ml）载体来预测的那样，定型祖细胞的转导效率非常高。根据表 1，在两个不同实验中，用 PGK-mADA 在 30/35FN 上对骨髓进行感染，几乎 100％的定型祖细胞被转导。

[0112] 表 1

[0113] 在纤维结合素 30/35 片段上用 PGK-mADA 载体对定型祖细胞转导的效率。

[0114]

实验	牛血清白蛋白 (BSA)	30/35FN
实验 1	1/18*	13/14
实验 2	2/13	12/13

[0115] *mADA 表达克隆的数目 / 所分析的总克隆数

[0116] 2.4 基因向长期培养起始细胞的转移效率

[0117] 在用 PGK-mADA 进行的四个独立的实验中，5 周龄的 LTMC（即 TLC-IC 产生的克隆）中得到的祖细胞克隆中有很大比例都表达了转移来的鼠 ADA 基因。所分析克隆的表达范围为 2/12(17％）到 6/6(100％）（表 2）在所有考虑到的阳性克隆中，引入 mADA 基因的表达超过了或至少等于人内源 ADA 的活性。PGK-mADA 的感染效率高于 TKNEO 的效率。如表 2 所示，在两个不同实验中，用 PGK-mADA 在 30/35FN 对骨髓进行感染几乎 100％的定型祖细胞被转导。

[0118] 表 2

[0119] PGK-mADA 载体对人长期培养起始细胞 (LTC-IC) 的感染效率

[0120]

实验	BSA	30/35FN
实验 1	0/14*	10/19
实验 2	N/A	2/12
实验 3	0/4	3/5
实验 4	0/4	6/6
总计	0/22	21/42

[0121] *mADA 阳性克隆数 / 所分析的总克隆数

[0122] N/A :未分析。

[0123] 2.530/35FN 对造血细胞感染效率影响的专一性

[0124] 在 30/35FN 上基因向 LTC-IC 转移的效率被提高了。由于再次得到的 LTC-IC 克隆相对较小，所以，用单个克隆进行蛋白分析受到限制。在 BSA，天然 FN 和 42FN 上感染后，分别得到了 0/6，0/4，和 0/3 的 LTC-IC 获得克隆，而用 30/35FN 感染时得到的 LTC-IC 获得克隆 3/5 表达了 mADA，说明了鼠 ADA 的表达。另外，多种 LTC-IC 获得克隆在分析前被均分后，进行另外两个实验。结果，感染之后在 30/35FN 上发现 mADA 表达，在天然 FN 上表达量要少一些，而在 42FN 或 BSA 上，没有 mADA 被表达。

[0125] 实施例 3

[0126] 用 PGK-hADA 对骨髓细胞进行基因转移

[0127] 3.1 一般步骤

[0128] 用实施例 1 中制备 TKNEO 的方法来制备 PGK-hADA 病毒上清。纤维结合素的胰凝乳蛋白酶原片段（图 1）用实施例 1 中介绍的方法进行制备。之后按实施例 1 中的方法进行逆病毒感染。LTC-IC 分析和甲基纤维素分析也按照实施例 1 进行。

[0129] 3.2 逆病毒感染的分析

[0130] 为了分析收集到的克隆，把从甲基纤维素培养物中挑出的克隆放入 1.5ml 微量试管中，用温暖的介质和 PBS 冲洗，离心后保存在 -20℃冰箱中。为了进行 ADA 分析，在 5ml 裂解缓冲液中反复冻融，裂解细胞，用前面介绍的方法进行同功酶电泳。

[0131] 实施例 4

[0132] 用 TKNEO 对脐带血细胞进行基因转移

[0133] 4.1 一般步骤

[0134] 用前面实施例 1 中介绍的方法制备 TKNEO 病毒上清和胰凝乳蛋白酶原片段。实施例 1 中逆病毒感染过程基本上原样进行，只是不再用骨髓细胞，而代之以收集在试管中的，含有肝素的，正常足月新生儿的脐带血。这种脐带血是根据印第安纳大学医学院学术委员会认可的方法制备的 LTC-IC（人干细胞）分析，甲基纤维素分析也按照实施例 1 进行。

[0135] 4.2 向定型祖细胞进行基因转移的效率

[0136] 在三个不同实验中，与 BSA 相比，FN30/35 上的感染要高四倍以上。

[0137] （表 3）

[0138] 表 3

[0139] 用 30/35FN 片段和 TKNEO 载体对脐带血祖细胞进行感染的效率

[0140]

BSA	12±17
30/35FN	55±16

[0141] 实施例 5

[0142] 用 PGK-mADA 对脐带血细胞进行基因转移

[0143] 5.1 一般步骤

[0144] 用前面实施例 1 中描述的方法制备 PGK-mADA 和胰凝乳蛋白酶原片段。实施例 1 中逆病毒感染过程基本上原样进行，只是不再用骨髓细胞，而代之以收集在试管中的正常足月新生儿的脐带血。这种脐带血是根据印第安纳大学医学院学术委员会认可的方法制备的。LTC-IC 分析和甲基纤维素分析按实施例 1 进行。

[0145] 5.2 基因向长期培养起始细胞的转移效率

[0146] 利用高效价的 PGK-mADA 载体，分析 LTC-IC 获得克隆，表明仅在 FN30/35 上用上清感染的脐带血培养物高水平表达了引入的 mADAcDNA，而在 BSA 对照平板上，LTC-IC 获得克隆中几乎没有检测到 mADA 的表达。

[0147] 实施例 4 和实施例 5 的结果表明当使用脐带血祖细胞和干细胞时，用 FN30/35 也可以提高它们的感染效率。

[0148] 实施例 6

[0149] 用 PGK-hADA 向脐带血细胞中进行基因转移

[0150] 用实施例 1 中的方法制备 PGK-hADA 病毒和胰凝乳蛋白酶原片段（图 1）。实施例 1 中逆病毒感染过程基本上原样进行，只是不再用骨髓细胞，而代之以收集在试管中的正常足月新生儿的脐带血。这种脐带血是根据印第安纳大学医学院学术委员会认可的方法制备的。LTC-IC 分析和甲基纤维素分析按实施例 1 进行。

[0151] 实施例 7-11

[0152] 逆病毒载体和生产者细胞系

[0153] 关于实施例 7-11

[0154] 在实施例 7-11 中使用了两种逆病毒制备包装细胞系：分别是 ecotropic GP+E86(Markowitz，D.，S.Goff，和 A.Bank，病毒学杂志，62 卷，1120-1124 页 (1988)) 和 amphotropic GP+envAM12 细胞系 (Markowitz，D.，S.Goff，和 A.Bank，病毒学，卷 167，400-406 页 (1988))。研究中所用的逆病毒载体和生产者克隆列于下列表 4 中：

[0155] 表 4

[0156]

载体	产物 / 克隆	表达的 cDNA
PGK-hADA	GP+E86/EPHA-5	人 ADA

载体	产物 / 克隆	表达的 cDNA
PM5neo	GP+E86/EAL2a	neo 磷酸转移酶 LAC-Z
TKNeo	GP+E86/TKNeo	neo 磷酸转移酶
PGK-mADA	GP+EnvAM12/55/6	鼠 ADA

[0157] 所有细胞系都在杜氏改进的Eagles培养基(DME,Gibco公司,GrandIsland,纽约)中培养,除了EAL2a细胞是在含有10%FCS和P/S的DME-F12(Gibco)中生长。DME培养基中包含10%的胎牛血清(FCS,Hyclone,Logan,UT)和100单位/ml的青霉素和100μg/ml的链霉素。通过加入10ml鼠细胞α最低量基本培养基(αMEM,Gibco)或人细胞的Iscove's Dulbecco培养基(IMDM,Gibco)在10cm平板上浓缩过夜来收集包含病毒的上清。这两种培养基中都含有10%的FCS和P/S。收集到的培养基质通过0.45微米滤膜(Gelman科学,Ann Arbor,MI)来过滤。

[0158] 实施例7

[0159] 初级鼠造血细胞的转导

[0160] 7.1实验

[0161] 为了用鼠细胞来研究,在注射了150mg/kg 5-氟尿嘧啶两天后,从6至8周龄C3H/HeJ小鼠股骨或胫骨中提取骨髓(Solopack实验室,福兰克林公园,IL)(Lim,B.,J.F.Apperley,S.H.Orkin,和D.A.Williams,美国国家科学院院刊86卷,8892-8896页(1989))。在含有20%FCS和P/S及100ng/ml的重组干细胞因子,100单位/ml重组人白介素-6(rhIL-6;Pepro技术公司,洛克西尔,NJ)的IMDM培养基中,把浓度为5×10^5个细胞/ml的细胞预刺激48小时(Luskey,B.D.,M.Rosenblant,K.Zsebo和D.A.Williams,血液,80卷,396-402页(1992))。然后,用三种不同的方法比较EPHA-5细胞制备的PGK-hADA载体的基因转移效率。这三种方法是:1)上清感;2)用上清在FN30/35上感染;3)与EPHA-5生产者细胞共同培养。这样,在室温下,把溶于磷酸盐缓冲液中的FN30/35以2.5μg/cm^2(相当于75pmol)的密度涂在10mm的细菌平皿中,开盖在紫外灯下照射1小时,盖上盖再照射1小时,用2%的小牛血清清蛋白在室温下封闭30分钟之后,用补充了25%(v/v)1MHepes的Hank's平衡盐溶液(HBSS)(Gibco)洗涤一次。对于上清感染,平皿只涂上BSA。5×10^6个预刺激了的供体细胞与10ml从EPHA-5细胞中用上述方法得到的病毒上清一起培养,其中加入100U/ml的rhIL-6,100ng/ml的hrSCF和7.5μg/ml的溴化己二甲铵。非粘附细胞被收集起来并与新鲜的病毒上清一起加入。对于共同培养,4ml培养基中的EPHA-5细胞与10μg/ml的丝裂霉素C一起培养2小时,冲洗,用胰蛋白酶消化并接种在100mm的含10mlαMEM/20%FCS和P/S的组织培养基上,接种浓度为3×10^6个细胞。第二天,5×10^6个预刺激了的骨髓细胞和100U/ml rhIL-6,100ng/ml rrSCF及4μg/ml的溴化己二甲铵一起加入到培养基中,继续培养48小时。在感染之后,扔掉非粘附细胞并用细胞解离缓冲液按厂家的指导从培养物中收集粘附造血细胞。这些粘附细胞加入到非粘附组分中,冲洗两次,并悬浮在大约1ml的HBSS/Hepes溶液中。把从5×10^6预刺激了的细胞获得了全部细胞从尾静脉注射到三只被全身致死性照射过的小鼠体内(用700+400cGy,^{137}Cs-放射源照射)

(Luskey,B.D.,M.Rosenblatt,K.Zsebo,和D.A.Williams,血液,80卷,396-402页(1992))。造血干细胞的转导情况通过测定恢复健康的小鼠体内引入的人ADA cDNA的表达来分析。这种ADA同功酶分析是在移植小鼠体内通过用乙酸纤维素原位酶分析法检测外周血细胞中hADA蛋白的存在来完成的(Lim,B.,D.A.Williams,和S.H.Orkin,分子细胞生物学,7卷,3459-3465页(1987))。检测从移植四个月后开始,以后每月重复一次。

[0162] 7.2结果

[0163] 用基因操作造血干细胞来完成的小鼠长期骨髓的重新恢复已被广泛接受,并被认为可以充分确定移植四个月后干细胞转导的效率。在7个月后,用同功酶分析法对受治疗者转入的骨髓进行分析表明:1)无论是用共同培养还是在FN30/35上培养,人ADA cDNA都进行了表达,而在无FN30/35的感染之后,被移植的小鼠体内没有人ADA cDNA表达。2)在共同培养和FN30/35培养后的移植小鼠体内,ADA表达水平是可以进行比较的。如图4中泳道2-4所示,移植了用与EPHA-5共培养而转导的骨髓的三只小鼠显示出很明显的人的ADA带,在三只移植了用FN30/35上清感染而产生的造血细胞的小鼠体内,也有类似水平的人ADA的表达(图4,泳道5-7)。相反地,在移植了在BSA上转导的细胞的三只小鼠体内,没有发现人的ADA(图4,泳道8-10)。图4中泳道1和12作为对照定位了人的ADA,泳道11定位了鼠ADA。在泳道2-10中的鼠ADA带表明上样量是相同的。这些数据说明用FN30/35上的上清感染来对长期重建造血干细胞进行转导是与共同培养法等效的,并且远远地优用没有FN30/35的上清感染。

[0164] 实施例8

[0165] 用逆病毒载体结合到FN30/35上来增强转导的机制

[0166] 8.1实验

[0167] 为了测定增加转导是否是同时定位病毒和造血细胞的结果,我们分析了重组逆病毒粒子是否是结合在FN30/35上。这样,把涂有FN30/35的平板用含有TKNEO病毒的上清预先培养30分钟,然后,分别冲洗。根据标准方法用NIH/3T3细胞测定上清的病毒效价(Markowitz,D.,S.Goff和A.Bank,病毒学杂志,62,pp1120-1124(1988))。简单地说,3T3细胞以1000个细胞/孔的浓度被接种在6孔组织培养平板上并生长过夜。一系列病毒上清稀释液与7.5μg/ml溴化己二甲铵一起加入到每个孔之中,37℃下培养2.5小时之后再加入2ml培养基。24小时之后用含有G418(0.75mg/ml干粉,Gibco)的培养基取代原培养基。把这些平板培育10-12天。10-12天之后,把具有G418抗性的克隆($G418^r$)染色并计数。每孔中的克隆数与病毒上清稀释倍数的乘积即作为每毫升上清的感染数(cfu)。我们估计(“定效价”)了用病毒上清预培养之后留在涂有FN30/35或BSA的35mm平板上的逆病毒粒子数,并在每个平皿中加入1000个NIH/3T3细胞和溴化己二甲铵。24小时后,向培养物中加入含0.75mg/mlG418(干粉)的培养基,并继续培养10-12天。在此之后,通过测出具G418抗性的克隆数来定量存在的粘附病毒。

[0168] 为了了解病毒与FN30/35的结合是否与剂量有关,增加涂在平皿上的FN30/35的浓度,重复上述实验。因此,在35mm细菌培养皿上分别涂上1、4、10和20μg/cm^2的FN30/35,如上所述。把一种预先测了效价的TKNEO病毒样品以1∶50的稀释倍数加到涂有FN30/35的平板上,培养30分钟。其中稀释后病毒样品效价为1×10^4感染粒子/mL。在充分冲洗之后,向每个孔中加入2000个NIH/3T3细胞。象上面介绍的那样进行挑选,挑选后培养10天,

对具有 G418 抗性的克隆进行计数。

[0169] 8.2 结果

[0170] 图5给出了三个代表性实验之一的结果。利用TKNEO上清，用NIH/3T3细胞的$G418^r$克隆数测出的逆病毒效价，在涂有 BSA 的平板上降低了三个量级以上（从 4×10^3 到 0），而在涂有 30/35FN 的平板上效价的减少仅为 1 个量级。这些结果表明逆病毒与 FN30/35 定量地结合而不与涂有 BSA 的平板（对照平板）结合。图 6 显示了，当含有病毒的上清培养在涂有浓度不断增加的 FN30/35 的平板上时，检测到具有 G418 抗性的克隆数也增加的情况。因此病毒与 FN30/35 结合是依赖于剂量的。

[0171] 实施例 9

[0172] 病毒与重组纤维结合素片段的结合

[0173] 9.1 实验

[0174] Kimizuka 等人曾经报告了克隆的 FN DNA 序列在大肠杆菌中的表达 (Kimizuka, F., Y.Taguchi, Y.Odate.Y.Kawase, T.Shimojo, D.Hashino.I.Kato, K.Sekiguchi, 和 K.Titani,生物化学杂志,110 卷,284-291 页 (1991))。克隆的和嵌合的多肽中含有纤维结合素中参与细胞粘连的一个或多个重要的序列，（包括 RGDS，CS-1 和肝素结合位点），参阅图 7。为了分析逆病毒是否能和这些重组 FN 片段相结合，在涂有各种重组片段的平板上反复进行 3T3 细胞克隆形成测试，测试中使用了冰冻的，效价为 1×10^4cfu/ml 逆病毒样品的两种不同稀释液（稀释倍数分别为 1 ： 10 和 1 ： 100)。而所测试的重组片段包括 :C-274，H-271，H-296，CH-271，CH-296 和 C-CS1 以及做为阳性对照的 FN30/35。FN 片段的浓度为 120-130pmol/ml（相当于 4 μ g/cm^2 的 C-274，H-271，H-296，C-CS1，FN30/35 和 8 μ g/cm^2 的 CH-271 和 CH-296)。简单地说，涂平板，加入病毒，充分冲洗平板，加入 NIH/3T3 细胞培养 24 小时，然后在选择培养基中培养 10 天，最后把产生的克隆进行染色和计数。

[0175] 9.2 结果

[0176] 图 8 指出在片段 H-271，H-296，CH-271 和 CH-296 中，G418 抗性克隆的数目有所增加（因此有病毒被粘连）。另外，虽然在本实验中 CH-271 显示出与病毒结合的最高水平，但总的来说，这几种片段与病毒结合的数目是与 FN30/35 基本相同的。这 5 种 FN 片段的共同点是具有包含高亲和性肝素结合位点的第 III 类型重复序列 12-14(Ruoslahti,E.,生物化学研究年鉴,57 卷,375-413 页 (1988)，Kimizuka，F.，Y.Taguchi，T.Ohdate，Y.Kawase，T.Shimojo,K.Hashino,I.Kato,K.Sekiguchi 和 K.Titam,生物化学杂志,110 卷,284-291 页 (1991))，可能位于重复序列 13(Kimizuka,F.,Y.Taguchi,Y.Ohdat,Y.Kawase,T.Shimojo,K.Hashino,I.Kato,K.Sekiguchi 和 K.Titani,生物化学杂志,110 卷,284-291 页 (1991))。这指出病毒的结合是通过这些已知的位点进行的。通过下列实验证明了这一点。在涂有 4 μ g/cm^2 的 CH-271 的平板上，用不同浓度 (10-1000 μ g/ml) 的肝素硫酸盐来预培养。肝素硫酸盐是可以抑制细胞与肝素结合位点相结合的一种带有强电荷的分子。如在图 9 中所看到的那样，在用不断上升浓度的肝素硫酸盐预培养以后，具有 G418 抗性的克隆减少了。这些数据表明，病毒与 FN 相结合是通过位于与 FN 的 C- 末端区 CS-1 位点相邻的高亲和性肝素结合位点参与而完成的。

[0177] 实施例 10

[0178] 在重组纤维结合素片段上转导造血细胞

[0179] 10.1 实验

[0180] 为了分析前面介绍的 FN30/35 对造血细胞转导效率的增强效应是否会在重组 FN 片段上发生，我们利用高繁殖力潜在克隆形成细胞 (HPP-CFC) 法在体外测定了上清感染的转导效率。通过使用 EAL2a 载体，我们以 G418 抗性克隆生长状况作为基因转移的指示剂，比较了在 BSA 上，各种重组 FN 片段和 FN30/35 上清感染对造血细胞转导的影响。另外，我们比较了与粘连在 FN 片段上的病毒粒子（与上清病毒）转导造血细胞的能力。在 35mm 涂有 FN 片段的培养皿上 1-2ml EAL2a 包含病毒的上清中，用生长因子和 5μg/ml 的溴化己二甲铵培养 $0.5\text{-}1\times10^6$ 预刺激了的骨髓细胞。为了用病毒与 FN 的结合来测定造血细胞的转导，用含病毒上清培育的涂有 FN 的 35mm 培养皿被冲洗三次，每次用 2ml PBS。然后，向 $0.5\text{-}1\times10^6$ 被预刺激了的骨髓细胞中加入补充了生长因子和溴化己二甲铵的 2ml 培养基。22 小时以后，收获细胞然后在有和没有 1.5mg/ml G418 的条件下，进行 HPP-CFC 分析 (Bradley,T.R. 和 D.Metcalf，澳大利亚实验生物医学杂志，44 卷，287-293 页 (1966))。培养物在 33℃，7% CO_2 中培养 14 天，然后用 G418 抗性克隆的比例来计算基因的转移效率。

[0181] 10.2 结果

[0182] 对于所有片段，通过上清感染的初级造血细胞的转导（图 10）明显地高于在 BSA 上进行的上清感染。这里所述片段都包含肝素结合位点 (HBS) 和至少一个更活跃的细胞结合位点（粗条）。重组片段 CH-271，H-296，CH-296 和 C-CS1 的转导效率与 FN30/35 的作用相似。所有这三个片段都同时具有肝素结合位点和 CS-1 位点。在所有的其他情况下，转导都明显地减弱。这些数据说明，前面提到的在 FN30/35 上初级造血细胞转导被增强的现象，在重组 FN 片段上也可以再现。这还进一步说明，病毒直接与 FN 相结合能够造成造血细胞的基因转导。最后，还证明了 CS-1 和肝素结合位点同时存在对初级造血前体（干）细胞转导的应用。

[0183] 实施例 11

[0184] 用在重组 FN 片段上鼠供体细胞的

[0185] 转导进行的小鼠长期骨髓重建

[0186] 11.1 实验

[0187] 我们重复一下上述在体外对初级造血祖细胞的研究（实施例 10)，如比较用骨髓移植比较在 BSA、FN30/35、重组 FN 片段以及共培养时上清感染，来分析对造血干细胞恢复的影响。简单地说，被致命照射了的小鼠被注入供体细胞，这种供体细胞已被含有人 ADA cDNA 的 EPHA-5 载体所转导。一个月后，通过外周血 ADA 同功酶分析来分析基因转移的效率。

[0188] 11.2 结果

[0189] 图 11 清楚地显示了同时含有肝素结合位点和 CS-1 位点的纤维结合素片段 H-296 产生了与 FN30/35 及共培养相似的结果。不同时含有这些位点的片段在转导可转导细胞时表现出较低的效率。这些数据说明，结合在重组 FN 片段上的初级造血 / 干细胞和逆病毒的同时定位使可转导细胞有效地被转导，其中重组 FN 片段中同时含有 CS-1 和肝素结合位点。

[0190] 虽然在前面的描述中，本发明已被详细地说明和描述，但同样应认为这些仅是作为例证或说明，而不是严格的限定。应该明白，这里仅描述了优选的实施方案。因而，根据本发明的精神而进行的所有改变和修饰都要求受到保护。

[0191] 这里引用的所有文献都被作为整体引入本文，就象它们是单独地被引入和完整地列出一样。

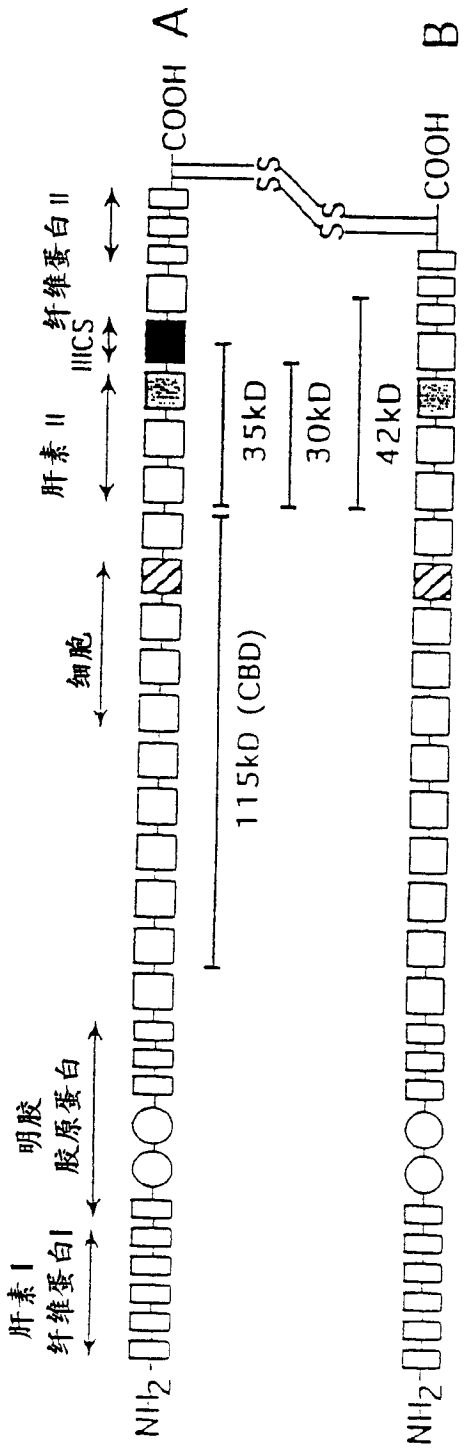

肝素 I
纤维蛋白 I
明胶
胶原蛋白
细胞
肝素 II
IIICS
纤维蛋白 II
NH2-
COOH
A
115kD (CBD)
35kD
30kD
42kD
SS
SS
NH2-
COOH
B

图 1

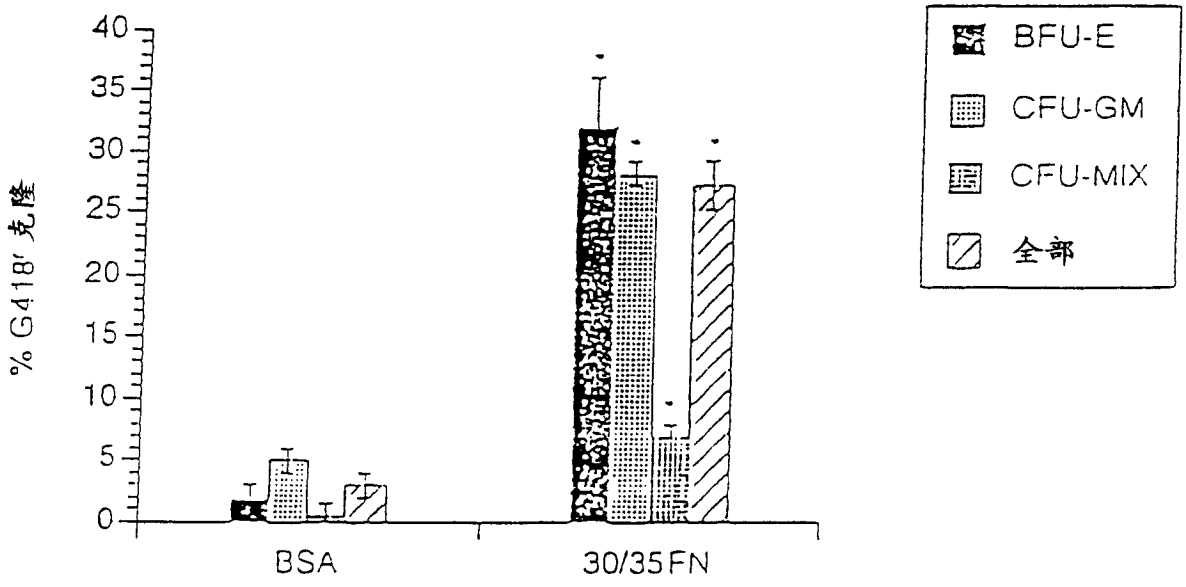

40
35
30
25
20
15
10
5
0
% G418' 克隆
BSA
30/35FN
BFU-E
CFU-GM
CFU-MIX
全部

图 2

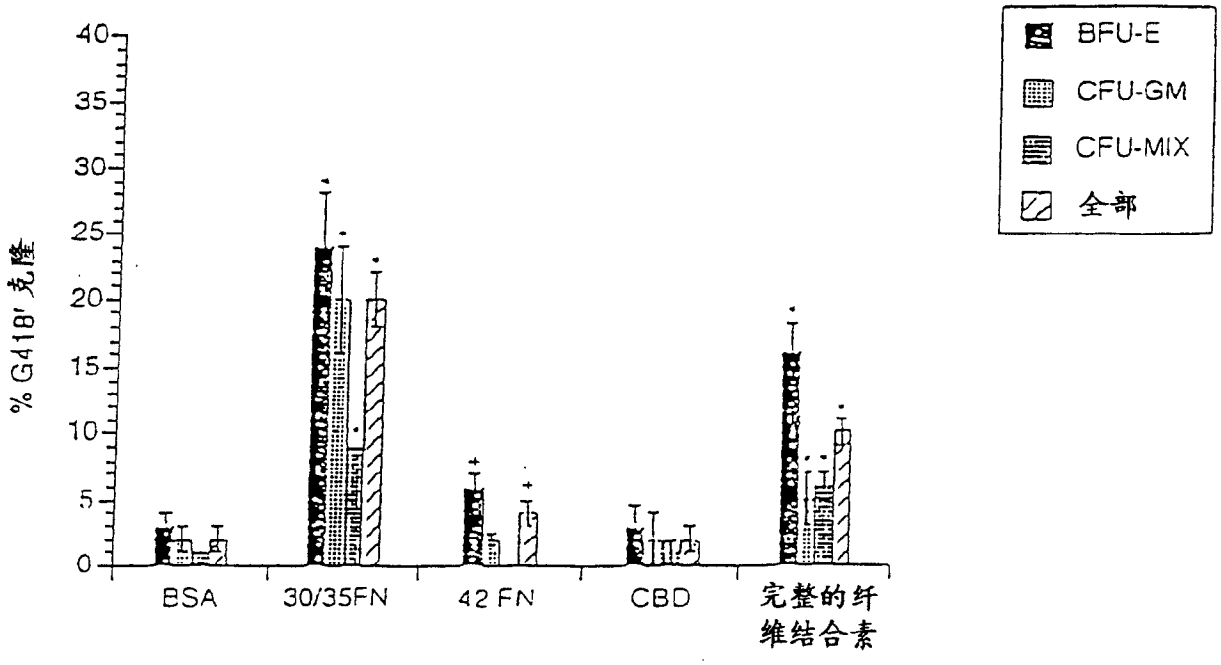

40
35
30
25
20
15
10
5
0
% G418' 克隆
BSA
30/35FN
42 FN
CBD
完整的纤维结合素
BFU-E
CFU-GM
CFU-MIX
全部

图 3

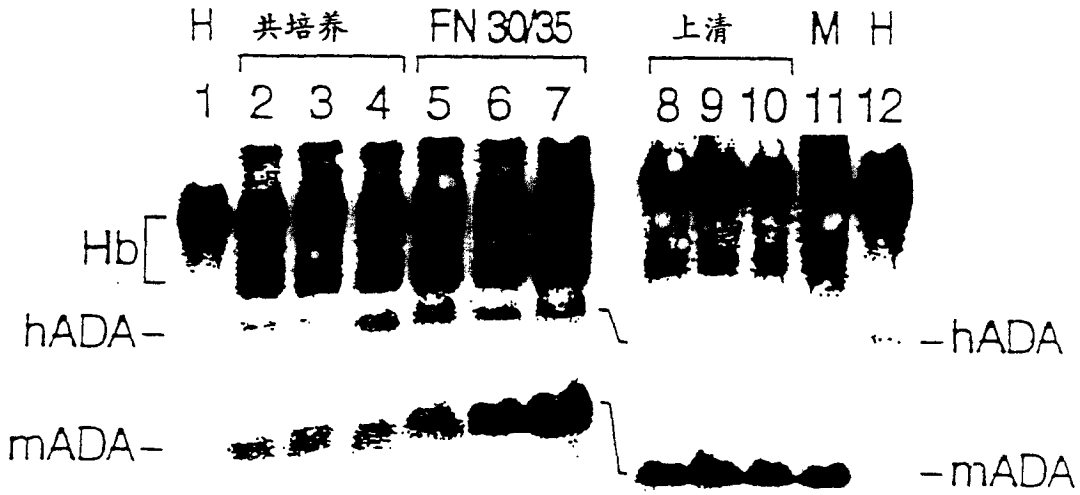


图 4

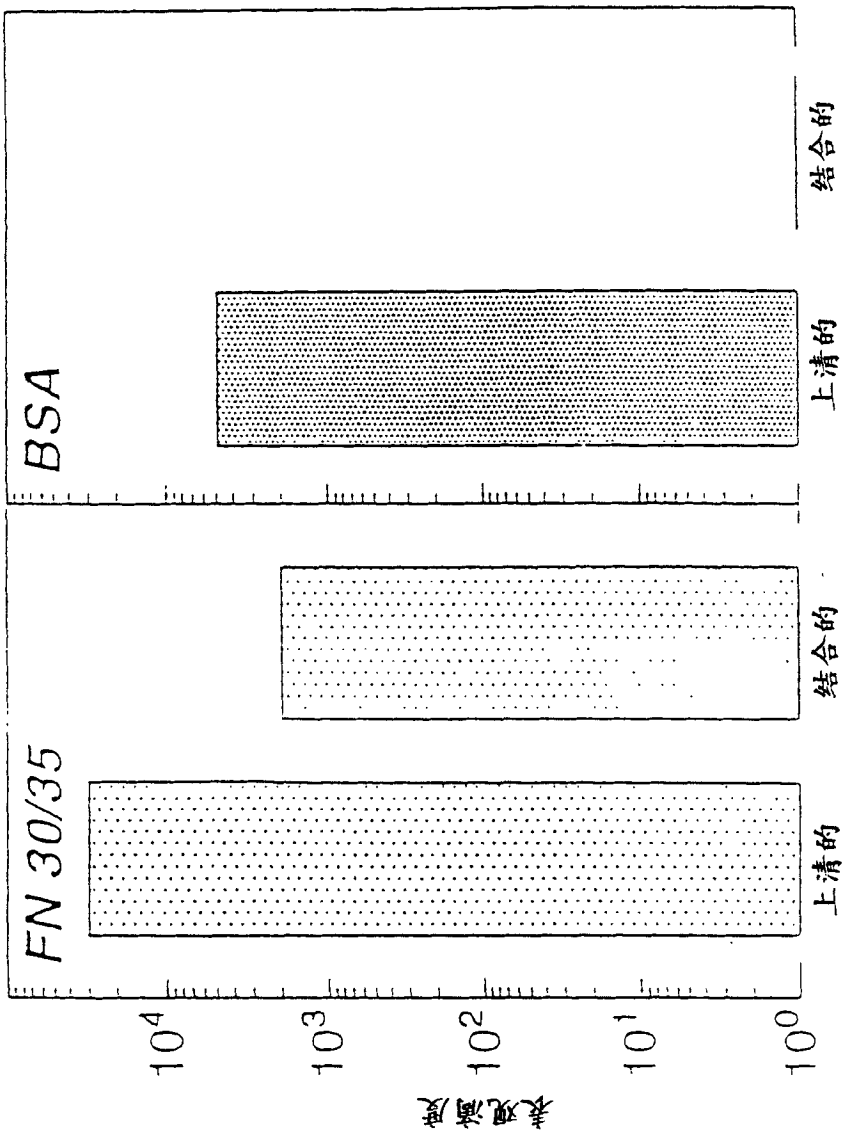


图 5

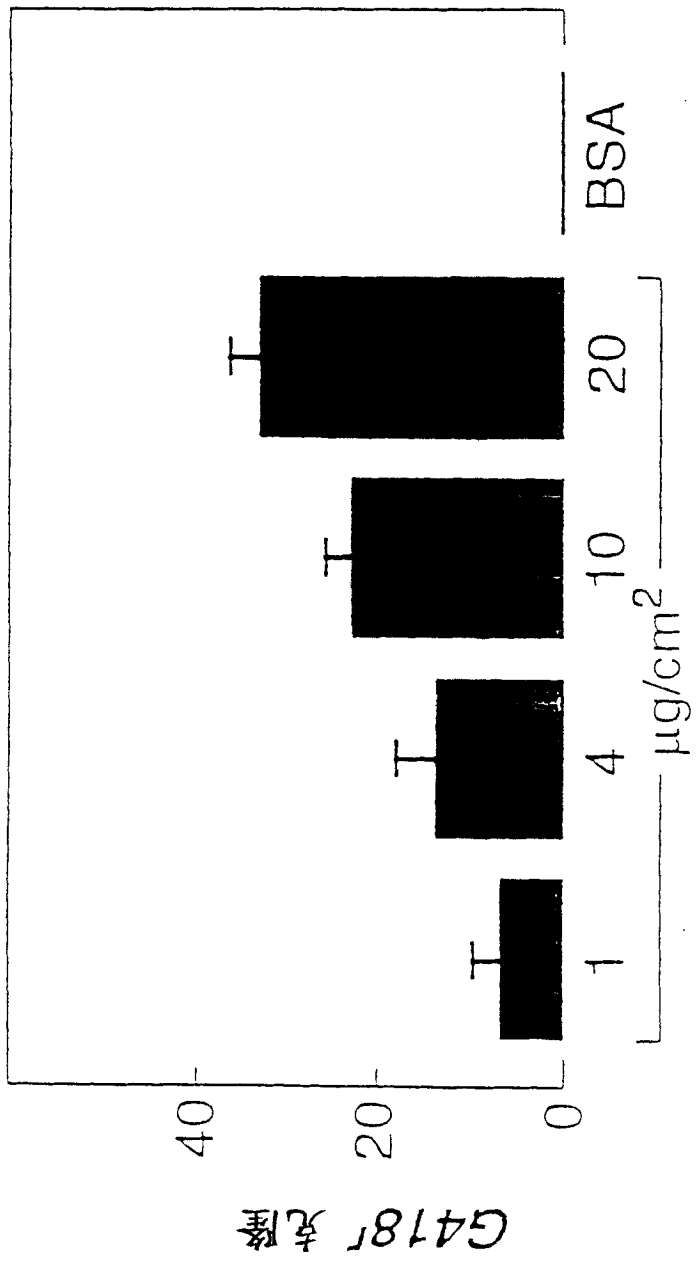


图 6


NH2
COOH
SS
SH
SH
ED-B
RGDS
ED-A
IIICS
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
纤维蛋白
肝素
胶原蛋白
(DNA)
细胞
肝素
纤维蛋白
I型
II型
III型
C-274
H-271
CH-271
H-296
CH-296
C-CS1

图 7

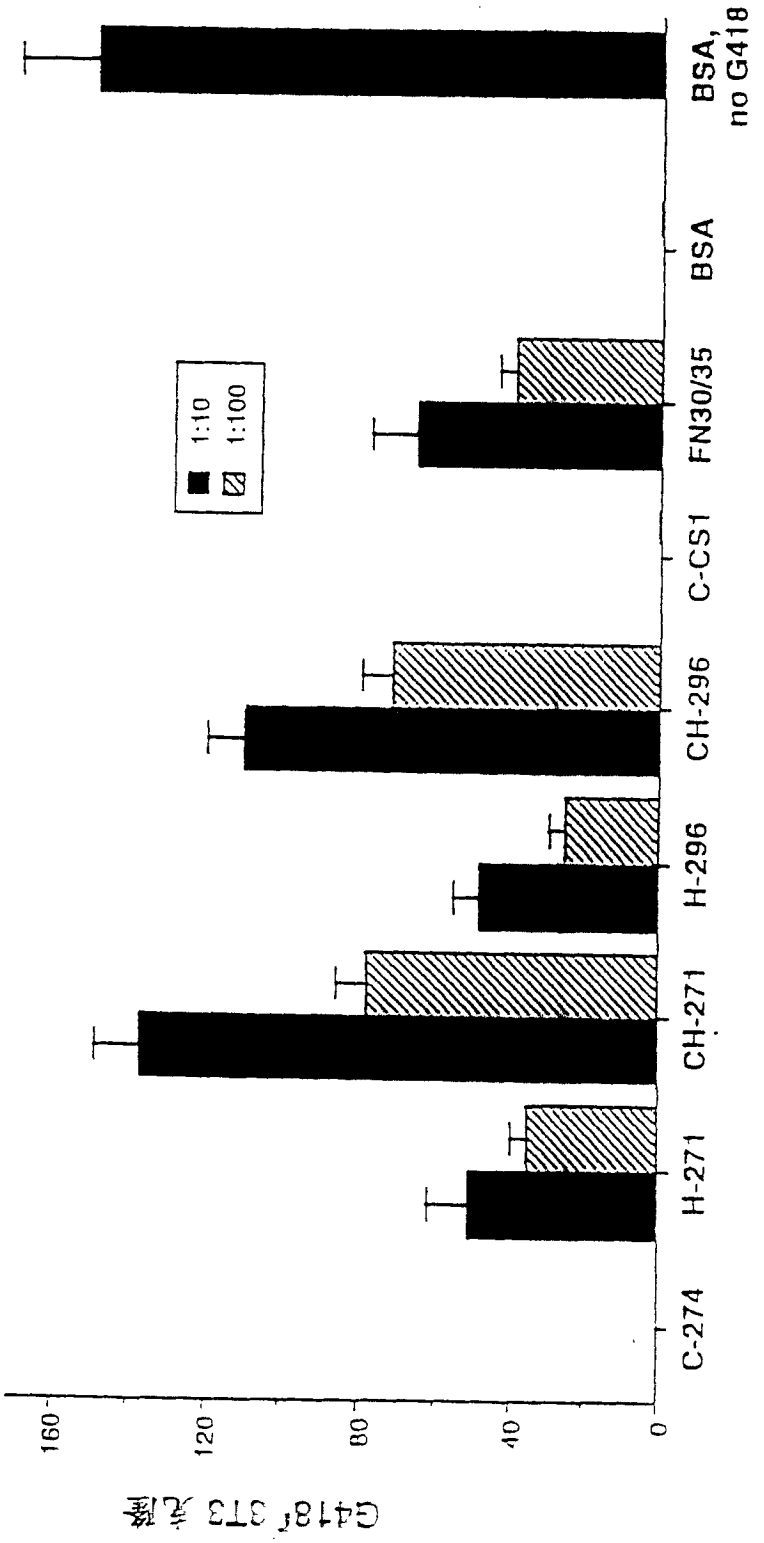

G418r 3T3 克隆
160
120
80
40
0
C-274
H-271
CH-271
H-296
CH-296
C-CS1
FN30/35
BSA
BSA, no G418
1:10
1:100

图 8

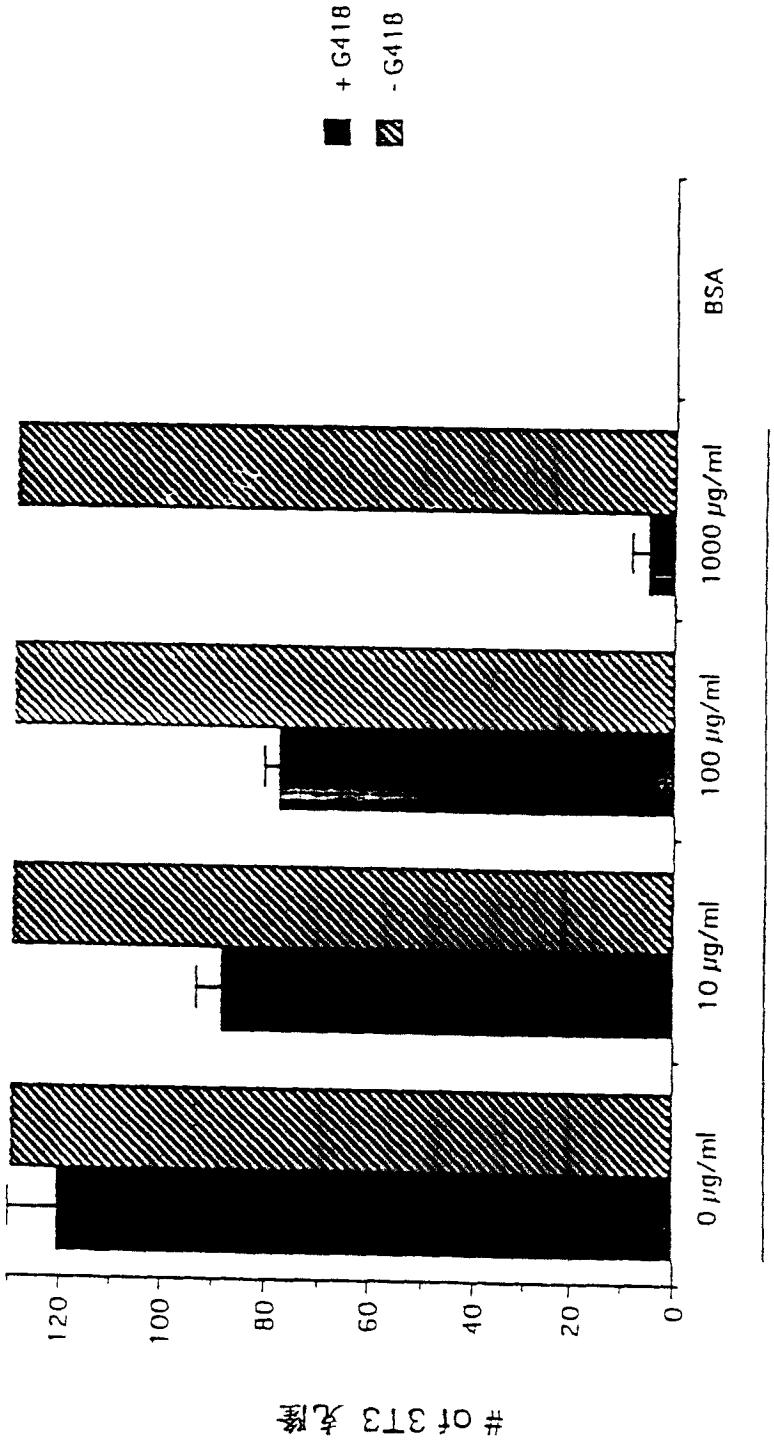

+ G418
- G418
# of 3T3 克隆
120
100
80
60
40
20
0
0 μg/ml
10 μg/ml
100 μg/ml
1000 μg/ml
BSA
用肝素预培养

图 9

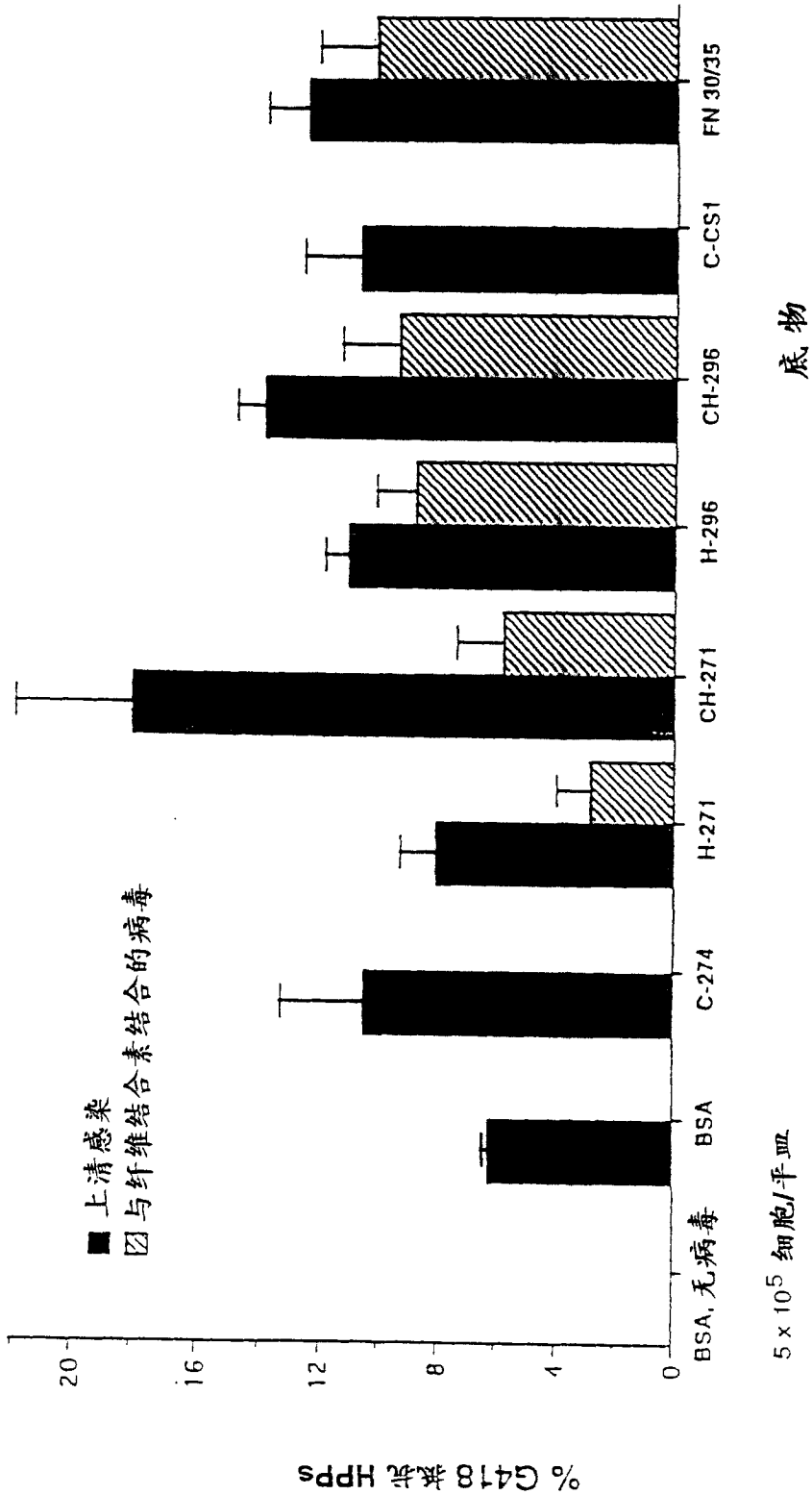

% G418 抗性 HPPs
20
16
12
8
4
0
■ 上清感染
囚 与纤维结合素结合的病毒
BSA, 无病毒
BSA
C-274
H-271
CH-271
H-296
CH-296
C-CS1
FN 30/35
5 x 10^5 细胞/平皿
底物

图 10

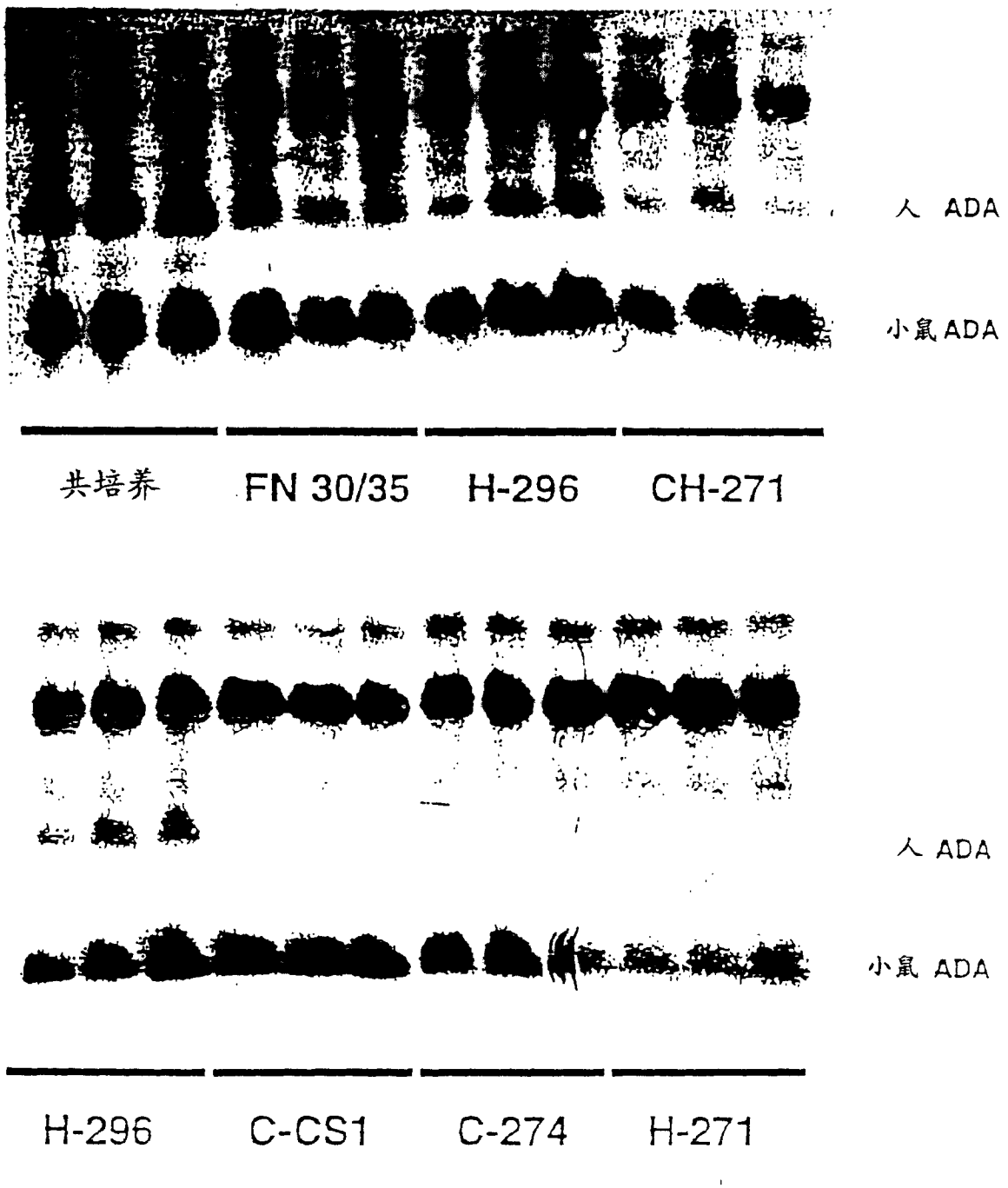

人 ADA
小鼠 ADA
共培养
FN 30/35
H-296
CH-271
人 ADA
小鼠 ADA
H-296
C-CS1
C-274
H-271

图 11