



(19)  
Bundesrepublik Deutschland  
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) DE 698 37 537 T2 2007.12.20

(12)

## Übersetzung der europäischen Patentschrift

(97) EP 0 980 441 B1

(21) Deutsches Aktenzeichen: 698 37 537.8

(86) PCT-Aktenzeichen: PCT/US98/09479

(96) Europäisches Aktenzeichen: 98 921 082.8

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: WO 1998/051820

(86) PCT-Anmeldetag: 08.05.1998

(87) Veröffentlichungstag

der PCT-Anmeldung: 19.11.1998

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: 23.02.2000

(97) Veröffentlichungstag

der Patenterteilung beim EPA: 11.04.2007

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: 20.12.2007

(51) Int Cl.<sup>8</sup>: C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

857007 15.05.1997 US

(84) Benannte Vertragsstaaten:

AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE

(73) Patentinhaber:

The Regents of the University of California,  
Oakland, Calif., US

(72) Erfinder:

HELLERSTEIN, Marc, Kensington, CA 94612, US

(74) Vertreter:

Viering, Jentschura & Partner, 81675 München

(54) Bezeichnung: **METHODEN ZUR MESSUNG ZELLULÄRER VERMEHRUNGS- UND ABBAURÄTEN IN VITRO UND IN VIVO**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelebt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

## Beschreibung

### 1. Einleitung

**[0001]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Messen der Proliferations- und Abbauraten von Zellen durch das Messen der Desoxyribonukleinsäure (DNA) Synthese. Insbesondere verwenden die Verfahren nicht-radioaktive, stabile Isotopenmarker, um DNA, die durch den de novo Nukleotidsyntheseweg in einer Zelle synthetisiert wurde, endogen zu markieren. Die Menge an Marker, die in die DNA eingebaut wurde, wird als ein Hinweis auf die zelluläre Proliferation gemessen. Solche Verfahren erfordern keine Radioaktivität oder potentiell toxische Metaboliten und sind sowohl für die Verwendung *in vitro* als auch *in vivo* geeignet. Daher ist die Erfindung nützlich, um für die Diagnose einer Reihe von Krankheiten oder Leiden, an denen zelluläre Proliferation oder zellulärer Abbau beteiligt ist, die Raten der zellulären Proliferation und/oder des zellulären Abbaus in Menschen zu messen. Die Erfindung bietet ebenfalls Verfahren zum Untersuchen eines Agens auf seine Fähigkeit die zelluläre Proliferation oder den zellulären Abbau zu induzieren oder zu hemmen und Verfahren zum Messen der Proliferation oder des Abbaus von T-Zellen in einem Subjekt, das mit dem menschlichen Immunschwächevirus (HIV) infiziert ist.

### 2. Hintergrund der Erfindung

**[0002]** Die Kontrolle der Zellproliferation ist in allen multizellulären Organismen von Bedeutung. Eine Reihe von pathologischen Prozessen, einschließlich Krebs und dem erworbenen Immunschwächesyndrom (AIDS) (Ho et al., 1995, *Nature* 373: 123–126; Wei et al., 1995, *Nature* 373: 117–122; Adami et al., 1995, *Mutat. Res.* 333: 29–35), zeichnet sich durch das Fehlen der normalen Regulation des Zellumsatzes aus. Eine Messung des *in vivo* Umsatzes von Zellen hätte daher weitreichende Anwendungsmöglichkeiten, wenn geeignete Verfahren verfügbar wären. Vor der vorliegenden Erfindung gab es direkte und indirekte Techniken zum Messen der Zellproliferation oder des Zellabbaus, aber beide Arten wiesen Mängel auf.

**[0003]** Die direkte Messung der Zellproliferation beinhaltete im Allgemeinen den Einbau von markierten Nukleosiden in die genomische DNA. Beispiele schließen Verfahren mit Tritiummarkiertem Thymidin ( $^3\text{H-dT}$ ) und Bromdesoxyuridin (BrdU) ein (Waldman et al., 1991, *Modern Pathol.* 4: 718–722; Gratzner, 1982, *Science* 218: 474–475). Die Techniken sind aufgrund von strahleninduzierten DNA-Schäden bei ersterem (Asher et al., 1995, *Leukemia and Lymphoma* 19: 107–119) und den Toxizitäten der Nukleosidanaloge (Rocha et al., 1990, *Eur. J. Immunol.* 20: 1697–1708) bei letzterem, in Menschen jedoch von begrenztem Nutzen.

**[0004]** In speziellen Fällen wurden ebenfalls indirekte Verfahren verwandt. Das kürzliche Interesse an der Umwandlung von CD4+ T Lymphozyten in AIDS wurde zum Beispiel durch indirekte Schätzungen der T-Zell Proliferation basierend auf ihrer Akkumulationsrate im Kreislauf nach Beginn einer effektiven anti-retroviralen Therapie angeregt (Ho et al., 1995, *Nature* 373: 123–126; Wei et al., 1995, *Nature* 373: 117–122). Ungleicherweise sind solche indirekten Techniken, die sich auf Veränderungen in der Poolgröße stützen, nicht definitiv. Der Anstieg in der Poolgröße von T-Zellen im Blut kann eher die Umverteilung aus anderen Pools in das Blut als tatsächliche Proliferation wiederspiegeln (Sprent und Tough, 1995, *Nature* 375: 194; Mosier, 1995, *Nature* 375: 193–194). Beim Fehlen direkter Messungen der Zellproliferation ist es nicht möglich zwischen diesen und anderen Alternativen (Wolthers et al., 1996, *Science* 274: 1543–1547) zu unterscheiden.

**[0005]** Park et al. (1997), *Berkeley Sci.* 1, 41–43, offenbaren ein Verfahren zum Messen der Umwandlung von Darmzellen in Ratten, basierend auf der massenspektroskopischen Messung eines stabilen Isotopenmarkers, der in die zelluläre DNA eingebaut wurde.

**[0006]** Macallan et al., (1998), *PNAS*, 95, 2, 708–713, offenbaren eine Zellproliferationsstudie unter Verwendung von isotopenmarkierter Glukose.

**[0007]** Die Messung der Zellproliferation ist bei Krankheiten wie Krebs von großem diagnostischem Wert. Das Ziel von Anti-Krebs-Therapien ist es, das Wachstum der Tumorzellen, das darüber bestimmt werden kann, ob Tumor DNA synthetisiert oder abgebaut wird, zu verringern. Gegenwärtig wird die Wirksamkeit einer Therapie, ob Chemotherapie, immunologische Therapie oder Strahlentherapie, über indirekte und ungenaue Verfahren, wie zum Beispiel die sichtbare Größe beim Röntgen des Tumors, bestimmt. Die Wirksamkeit einer Therapie und die rationale Auswahl von Kombinationstherapien könnte am direktesten auf Basis des biosynthetischen und katabolischen Ansprechens eines individuellen Tumors auf verschiedene Eingriffe bestimmt werden. Das Modell, das in der klinischen Medizin für bakterielle Infektionen verwendet wird – das Kultivieren des Organismus und das Bestimmen seiner Sensitivität gegenüber Antibiotika und dann das Auswählen eines Antibioti-

kums gegenüber dem er sensitiv ist – könnte dann auch für die Krebstherapie verwendet werden. Gegenwärtige Handhabungspraktiken erfolgen ohne die Möglichkeit direkt bestimmen zu können, wie gut die therapeutischen Agenzen wirken.

**[0008]** Eine lange bestehende Vision von Onkologen ist es, in der Lage zu sein, chemotherapeutische Mittel auf dieselbe Weise auswählen zu können wie Antibiotika – auf Basis der gemessenen Sensitivität des Tumors des fraglichen Patienten gegenüber jedem Medikament. Die Möglichkeit die Krebszellreplikation zu messen, würde die Wahl einer Chemotherapie und die Forschung auf die gleiche Basis wie die Auswahl von Antibiotika stellen, mit großem Potential für verbesserte Ergebnisse.

**[0009]** Dementsprechend besteht großer Bedarf für ein allgemein anwendbares Verfahren zum Messen der Zellproliferation das ohne Risiko ist und auf klinischem Gebiet angewandt werden kann.

### 3. Zusammenfassung der Erfindung

**[0010]** Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren zum Messen der Raten der zellulären Proliferation und/oder des zellulären Abbaus durch das Messen der DNA Synthese. Insbesondere bezieht sie sich auf die Verwendung eines nicht radioaktiven, stabilen Isotopenmarkers, um endogen DNA zu markieren, die über den de novo Nukleotidsyntheseweg der Zelle synthetisiert worden ist. Der Marker, der während der DNA-Synthese in die DNA eingebaut worden ist, ist über Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, einfach nachzuweisen. Die Menge des eingebauten Markers kann als ein Hinweis auf die Raten der zellulären Proliferation oder des zellulären Abbaus gemessen und berechnet werden.

**[0011]** Die Erfindung basiert zum Teil auf der Entdeckung der Anmelder, dass die DNA Synthese über das Markieren des Desoxyribose-Rings mit einem stabilen Isotopenmarker über den de novo Nukleotidsyntheseweg gemessen werden kann. Die zelluläre Proliferation wurde *in vitro*, in einem Tiermodell und in Menschen gemessen. *In vitro* wurde die Proliferation von zwei Zelllinien in der logarithmischen Wachstumsphase mittels der Verfahren der Erfindung gemessen und es wurde gezeigt, dass es in guter quantitativer Übereinstimmung mit der erhöhten Anzahl von Zellen steht, die durch direkte Zellzählung bestimmt wurde, was als das am wenigsten ungenaue Maß der Zellproliferation angesehen wird. In Tieren wurde gezeigt, dass die Messungen der Erfindung in Übereinstimmung mit den Werten stehen, die zuvor durch unabhängige Techniken geschätzt wurden. Zum Beispiel wurde gezeigt, dass Thymus und Darmepithel Gewebe mit einem hohen Umsatz sind, während der Umsatz von Leberzellen deutlich langsamer war. In Menschen ist das beobachtete Muster einer Verzögerungsphase gefolgt von dem schnellen Auftreten einer Schar markierter Granulozyten ebenfalls konsistent mit der vorherigen Beobachtung.

**[0012]** Die Verfahren unterscheiden sich von konventionellen Markierungstechniken in drei Hauptaspekten. Erstens, konventionelle Isotopen-Verfahren markieren die DNA über den bekannten Nukleosid-Wiedergewinnungsweg, während die Verfahren der Erfindung Desoxyribonukleotide in der DNA über den bekannten de novo Nukleotidsyntheseweg markieren ([Fig. 1](#)), über den Purin- und Pyrimidin-Nukleotide gebildet werden. Kurz gefasst, werden in dem de novo Nukleotidsyntheseweg Ribonukleotide zuerst aus kleinen Vorläufermolekülen (z.B. Glukose, Glukose-6-Phosphat, Ribose-5-Phosphat, Purin- und Pyrimidin-Basen, etc.) gebildet und werden in der Folge durch Ribonukleotidreduktase zu Desoxyribonukleotiden reduziert. Siehe z.B. [Fig. 1](#); Reichard, 1988, Ann. Rev. Biochem. 57: 349–374 (z.B. [Fig. 1](#) und [Fig. 2](#)); Thomas Scott und Mary Eagleson, Concise Encyclopedia Biochemistry 406–409, 501–507 (2. Auflage 1988); und Textbook of Biochemistry with clinical correlations (Thomas M. Devlin, 3. Auflage 1992)), von denen jede hierin in ihrer Gesamtheit durch Bezugnahme für jeden Zweck eingeschlossen ist. Durch die Wirkung der Ribonukleotidreduktase werden direkt drei Desoxyribonukleotide gebildet, dADP, dCDP und dGDP. Diese Desoxyribonukleotide werden dann durch Nukleosiddiphosphat-Kinase phosphoryliert, um die entsprechenden Nukleotidtriphosphate, dATP, dCTP und dGTP zu bilden. Ein vierter Desoxyribonukleotid, dTTP, wird ebenfalls, nach zusätzlicher Umformung, durch Ribonukleotidreduktase gebildet. Die vier Desoxyribonukleotidtriphosphate – dATP, dCTP, dGTP und dTTP – werden verwendet, um die DNA zu synthetisieren. [Fig. 1](#), die den de novo Nukleotidsyntheseweg zeigt, zeigt ebenfalls einen Weg DNA ausgehend von mit stabilen Isotopen markierter Glukose endogen zu markieren.

**[0013]** Das Markieren über den de novo Nukleotidsyntheseweg ist vorteilhaft, da in den meisten Zellen, die in die S-Phase des Zellzyklus eintreten, die Schlüsselenzyme, die die de novo Synthese von Desoxyribonukleotid-Triphosphaten (dNTPs) kontrollieren, insbesondere Ribonukleotidreduktase (RR), hochreguliert sind, wohingegen die Enzyme des Nukleosidwiedergewinnungsweges (der einen alternativen weg zur Bildung von Purin- und Pyrimidinnukleotiden darstellt) unterdrückt werden (Reichard, 1978, Fed. Proc. 37: 9–14; Reichard, 1988, Ann. Rev. Biochem. 57: 349–374; Cohen et al., 1983, J. Biol. Chem. 258: 12334–12340; Thomas Scott

& Mary Eagleson, Concise Encyclopedia Biochemistry 543–544 (2. Auflage, 1988).

**[0014]** Zweitens, kann der Marker gemäß den Verfahren der Erfindung in Purin-Desoxyribonukleotiden anstelle von Pyrimidinen (z.B. aus <sup>3</sup>H-dT oder BrdU) nachgewiesen werden. Das ist vorteilhaft, da der de novo Syntheseweg dazu neigt, für Purin-dNTPs aktiver zu sein als für Pyrimidin-dNTPs (Reichard, 1978, Fed. Proc. 37: 9–14; Reichard, 1988, Ann. Rev. Biochem. 57: 349–374; Cohen et al., 1983, J. Biol. Chem. 258: 12334–12340). Tatsächlich wurde in Lymphozyten gezeigt, dass regulatorische Desoxyribonukleotide eine negative Rückkopplung mit RR für die Pyrimidin dNTP Synthese besitzen, aber eine positive Rückkopplung für Purin dNTP Synthese, was sicherstellt, dass der de novo Syntheseweg für Purine immer aktiv, aber für Pyrimidine variabel ist.

**[0015]** Zusätzlich sind die Verfahren gemäß der Erfindung, die stabile Isotopenmarker anstelle von nicht stabilen Radioisotopen verwenden, sicher für die Verwendung im Menschen. Daher werden eine große Auswahl von Verwendungen durch die Erfindung erfasst, einschließlich, aber nicht beschränkt auf das Messen der Rate der zellulären Proliferation und/oder des zellulären Abbaus unter Bedingungen, bei denen eine solche Information von diagnostischem Wert ist, wie zum Beispiel Krebs, AIDS, hämatologische Erkrankungen, endokrine Erkrankungen, Knochenerkrankungen und Organversagen. Wo nicht toxische, stabile Isotope verwendet werden, können solche zellulären Proliferations- und Abbauraten in vivo in einem Subjekt gemessen werden.

**[0016]** In einem Aspekt liefert die Erfindung Verfahren zum Messen der zellulären Proliferations- oder zellulären Abbauraten, die das in Kontakt bringen einer Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, und den Nachweis des Markers in der DNA umfassen.

**[0017]** Die Erfindung liefert ebenfalls Verfahren zum Messen der Raten der zellulären Proliferation und/oder des zellulären Abbaus in einem Subjekt. Solche Verfahren umfassen das in Kontakt bringen einer Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, und den Nachweis des Markers in der DNA des Subjekts.

**[0018]** In einem anderen Aspekt der Erfindung werden Verfahren zum Messen der Raten der Proliferation und/oder des Abbaus von T-Zellen in einem Subjekt, das mit dem humanen Immunschwächevirus (HIV) infiziert ist, bereitgestellt. Solche Verfahren umfassen das Verabreichen einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers an das Subjekt, wobei der Marker über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA der T-Zellen des Subjekts eingebaut wird. Der Marker in der DNA der T-Zellen des Subjekts wird nachgewiesen, um die Raten der Proliferation und/oder des Abbaus von T-Zellen in dem Subjekt zu messen.

**[0019]** Die Erfindung liefert ebenfalls Verfahren zum Untersuchen eines Agens auf seine Fähigkeit die zelluläre Proliferation zu induzieren oder zu inhibieren. Solche Verfahren umfassen das in Kontakt bringen einer Zelle mit dem Agens, das in Kontakt bringen der Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA der Zelle eingebaut wird und den Nachweis des Markers in der DNA. Die Menge des Markers, verglichen mit einer Kontrollanwendung, in der die Zelle dem Agens nicht ausgesetzt wird, zeigt das Ausmaß der zellulären Proliferation an und dadurch, ob das Agens die zelluläre Proliferation induziert oder infiziert.

**[0020]** In einem anderen Aspekt liefert die Erfindung Verfahren zum Untersuchen eines Agens auf seine Fähigkeit die zelluläre Proliferation in einem Subjekt, das dem Agens ausgesetzt wird, zu induzieren oder zu inhibieren. Solche Verfahren umfassen das Aussetzen des Subjektes gegenüber dem Agens; das Verabreichen einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers an das Subjekt, wobei der Marker über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA des Subjekts eingebaut wird; und den Nachweis des Markers in der DNA einer Zelle von Interesse in dem Subjekt, was auf die zelluläre Proliferation in dem Subjekt hindeutet. Die Menge des Markers relativ zu einer Kontrollanwendung, in der das Subjekt dem Agens nicht ausgesetzt wird, zeigt das Ausmaß der zellulären Proliferation an und dadurch, ob das Agens die zelluläre Proliferation in dem Subjekt induziert oder inhibiert.

**[0021]** In noch einem anderen Aspekt der Erfindung werden Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation in einer proliferierenden oder sich teilenden Population von Zellen bereitgestellt. Diese Verfahren umfassen: (a) Das in Kontakt bringen der proliferierenden Zellpopulation mit einer nachweisbaren Menge eines ersten Markers, wobei der erste Marker einen stabilen Isotopenmarker umfasst, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird; (b) das Nachweisen des ersten Markers, der in die DNA eingebaut wurde, um die zelluläre Proliferation in der proliferierenden Zellpopulation zu messen; (c) das in Kontakt brin-

gen der proliferierenden Zellpopulation mit einer nachweisbaren Menge eines zweiten Markers, wobei der zweite Marker einen radioaktiven Isotopenmarker umfasst, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird; und (d) Nachweis des zweiten Markers, der in die DNA eingebaut wurde, um die zelluläre Proliferation in der proliferierenden Zellpopulation zu messen. In einigen solchen Verfahren, die sowohl radioaktive als auch nicht radioaktive Isotopenmarker verwenden, werden die Schritte (a) und (b) vor den Schritten (c) und (d) durchgeführt. In anderen solchen Verfahren, die sowohl radioaktive als auch nicht radioaktive Isotopenmarker verwenden, werden die Schritte (c) und (d) vor den Schritten (a) und (b) durchgeführt. Alternativ können in einigen solchen Verfahren die Schritte (a) und (c) gleichzeitig und die Schritte (b) und (d) ebenfalls gleichzeitig durchgeführt werden.

**[0022]** Die vorliegende Erfindung schließt ebenfalls Verfahren zum Bestimmen der Anfälligkeit eines Subjekts gegenüber einer Krankheit oder Störung (einschließlich Störungen, die nicht selber Krankheiten sind, aber die das Subjekt gegenüber einer Krankheit prädisponieren) ein, die in dem Subjekt eine Änderung in einer Rate der zellulären Proliferation induziert. Solche Verfahren umfassen das Aussetzen des Subjekts gegenüber einem Umstand oder einem Agens, der/das die Krankheit oder Störung hervorrufen oder induzieren kann, und das Verabreichen einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers an das Subjekt. Der Marker wird über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA des Subjekts eingebaut. Der Marker in der DNA des Subjekts wird nachgewiesen. Ein Anstieg des Markers in der DNA des Subjekts, verglichen mit einer Kontrollanwendung, in der das Subjekt dem Umstand oder dem Agens nicht ausgesetzt wird, zeigt einen Anstieg in Rate der zellulären Proliferation und die Anfälligkeit des Subjekts gegenüber der Krankheit oder Störung an.

**[0023]** Die Erfindung schließt ebenfalls Verfahren zum Bestimmen der Anfälligkeit eines Subjekts gegenüber einer Krankheit ein, die eine Veränderung in einer Rate des zellulären Abbaus in einem Subjekt induziert (einschließlich Störungen, die nicht selber Erkrankungen sind, aber die ein Subjekt gegenüber einer Krankheit prädisponieren). Diese Verfahren umfassen das Aussetzen des Subjekts gegenüber einem Umstand oder einem Agens, welche die Krankheit hervorrufen können, das Verabreichen einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers an das Subjekt, wobei der Marker über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA des Subjektes eingebaut wird, und den Nachweis des Markers in der DNA des Subjekts. Eine Verringerung des Markers in der DNA des Subjekts verglichen mit einer Kontrollanwendung, in der das Subjekt dem Umstand oder dem Agens nicht ausgesetzt wird, zeigt einen Anstieg in der Rate des zellulären Abbaus und die Anfälligkeit des Subjekts gegenüber der Krankheit an.

**[0024]** In einem anderen Aspekt bietet die Erfindung Verfahren zum Markieren der DNA in einer Zelle, die das in Kontakt bringen der Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der dann über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, einschließen.

#### 4. Kurze Beschreibung der Zeichnungen

**[0025]** [Fig. 1](#): Biochemie der DNA-Synthese und Wege des Markereintritts. Es sind nicht alle Zwischenstufen gezeigt. G6P, Glukose-6-Phosphat; R5P, Ribose-5-Phosphat; PRPP, Phosphoribosepyrophosphat; DNNS, de novo Nukleotidsyntheseweg; NDP, Ribonukleosiddiphosphate; RR, Ribonukleosidreduktase; DN, Desoxyribonukleosid; dNTP, Desoxyribonukleosidtriphosphat;  $^3\text{H}$ -dT, Tritium-markiertes Tymidin; BrdU, Bromdesoxyuridin.

**[0026]** [Fig. 2](#): Überblick über ein spezifisches Beispielverfahren zum Messen der DNA Synthese über den Einbau von  $(6,6\text{-}^2\text{H}_2)$  Glukose.

**[0027]** [Fig. 3](#): GC-MS eines DNA Verdaus (Gesamt-Ionenstrom). Die Massenspektren der Purindesoxyribonukleosid dA und dG Signale sind als Einfügungen gezeigt.

**[0028]** [Fig. 4a–Fig. 4d](#): Markieren der Gewebekulturzellen während der logarithmischen Wachstumsphase in vitro. Anreicherung von dA aus zellulärer DNA in Hepatozyten (HepG2)- (4A) und Lymphozyten (H9)- (4B) Zelllinien, die in Medium, das mit  $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$  Glukose angereichert war, wachsen gelassen wurden. Die Lymphozytendaten schließen Ergebnisse aus Experimenten bei zwei verschiedenen Glukoseanreicherungen ein. Die [Fig. 4C](#) und [Fig. 4D](#) sind Vergleiche der Anteile der DNA-Synthese durch HepG2-Zellen (4C) und H9-Zellen (4D), berechnet aus  $M_2$  Anreicherungen von dA/Mediumglukose, mit einem Anstieg der durch Zählen bestimmten Zellzahlen.

**[0029]** [Fig. 5A–Fig. 5B](#): Anreicherung von dA in DNA aus [\(Fig. 5A\)](#) Hepatozyten (Hepg2) und [\(Fig. 5B\)](#) Lymphozyten (H9) Zelllinien, die in einem Medium, das 100  $(6,6\text{-}^2\text{H}_2)$  Glukose enthielt, für einen längeren Zeitraum

mit wiederholten Subkulturen wachsen gelassen wurden.

**[0030]** [Fig. 6A](#)–[Fig. 6B](#): [Fig. 6A](#) zeigt die Anreicherung des M<sub>5</sub>-Ions von Desoxyadenosin in DNA aus Zellen einer Hepatozyten Zelllinie (HepG2), die in ungefähr 20% (U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>) Glukose wachsen gelassen wurden. [Fig. 6B](#) ist ein Vergleich der Anteile an synthetisierter DNA mit M<sub>5</sub>-Markierung mit dem, durch direktes Zählen bestimmten Anteil neuer Zellen.

**[0031]** [Fig. 7](#): Anteil der Synthese von Granulozyten in peripherem Blut aus vier Subjekten nach zweitägiger Infusion von (6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>) Glukose, beginnend zum Zeitpunkt 0. Offene Symbole, Kontrollsubjekt; gefüllte Symbole, HIV-infizierte Subjekte. Der Anteil neuer Zellen wurde durch Vergleich der dA-Anreicherung zu der durchschnittlichen Anreicherung von Glukose im Plasma, nach dem Berichtigten aufgrund der geschätzten 35%-igen intrazellulären Verdünnung, berechnet.

**[0032]** [Fig. 8](#): Anteil der Synthese von gemischten Lymphozyten (einschließlich B- und T-Zellen), die nach zweitägiger Infusion von [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose aus peripherem Blut eines HIV-infizierten Patienten erhalten wurden.

**[0033]** [Fig. 9A](#)–[Fig. 9C](#): [Fig. 9A](#) zeigt eine fluoreszenz-aktivierte Zellsortierungs(FACS)-Isolation von gereinigten, peripheren Blut CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten. Für die Trennung durch FACS wurden 50–70 Milliliter (mls) peripheres Blut durch Ficoll-Hypaque-Gradienten-Sedimentation fraktioniert, um ungefähr 50 – 100 × 10<sup>6</sup> periphere mononukleäre Blutzellen (PBMCs) zu erhalten. Diese Zellen wurden in 4 Stunden mit Phycoerythrin-Cychrome 5 (PE-Cy5) konjugierten anti-CD4 und Allophycocyanin (APC)-konjugierten anti-CD8 Antikörpern gefärbt und einer Sortenreinigung auf einem dualen Laser (Argon 310 nm, Argon 488 nm) FACS Vantage(Becton Dickinson Immunocytometry Systems, San Jose, CA), das für biokontaminierte Verfahren mit lebensfähigen, HIV-1-infizierten Zellen ausgestattet war, unterzogen (obere Reihe). Für die kinetische Analyse mittels GC-MS war es optimal mindestens jeweils eine Million Zellen von den gereinigten CD4<sup>+</sup>- und CD8<sup>+</sup>-T-Zellsubpopulation zu erhalten. Die Nachanalyse zeigte Sortenreinheiten von >98% (mittlere Reihe und untere Reihe für CD4<sup>+</sup> bzw. CD8<sup>+</sup> T-Zellen). Die [Fig. 9B](#) zeigt die GC-MS von derivatisiertem dA, das aus T-Zell DNA hergestellt wurde. Die DNA wurde mit einem QUILamp Blutkit (Qiagen, Valencia, CA) aus den Zellen extrahiert. Die DNA wurde unter Verwendung von Nuklease PI gefolgt von Schlangengift-Phosphodiesterase I und alkalischer Phosphatase einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen (Macallan et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 708). Die verdaute DNA wurde über HPLC getrennt (Umkehrphasen C-18 Vydac-Säule; Puffer A, 2,5% Methanol; Puffer B 50% Methanol; 1 ml/min (Milliliter/Minute) Flussrate mit dem Gradienten 0% B bis 8% B über 10 Minuten, dann 8% B bis 100% B über 10 Minuten und schließlich Aufrechterhalten von 10% B für 10 Minuten; Überwachen der OD (optische Dichte) bei 260 nm) und der dA-Peak (bei ungefähr 20 Minuten) gesammelt. Nach dem Verdampfen des Methanols unter N<sub>2</sub>, wurde das dA durch Acetylierung mit Acetonitril: Essigsäureanhydrid: N-Methylimidazol (100:10:1) für 60 Minuten bei Raumtemperatur, Eindampfen bis zur Trockenheit und Methylierung mit CH<sub>3</sub>Cl derivatisiert. Für die GC-MS von dA wurde ein HP-Modell 5971 MS mit 5890 GC und Autosampler (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) mit einer DB-5MS oder Restek Rtx-5 Aminsäule verwendet. Die Injektortemperatur betrug 320°C, die anfängliche Ofentemperatur 140°C für 2 Minuten, dann mit 40°/min ansteigend auf 300°C und Aufrechterhalten von 300°C für 10 Minuten. Es wurden die Elektronenstoßionisation und der Selected Ion Monitoring-Modus verwendet. Die ausgewählten Ionen waren m/z 276 und 278, welche das molekulare Ion von acetyliertem dA minus einem Acetat darstellen. [Fig. 9C](#) zeigt die Standardkurve von <sup>2</sup>H-dA. Die Probenanreicherungen wurden durch Vergleiche mit mengenkorrigierten Standardkurven unter Verwendung von [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]dA berechnet. Abgewogene Mischungen von Standard [<sup>2</sup>H<sub>2</sub>]dA (Isotec, Miamisburg, OH) und natürlich auftretendem dA wurden mit verschiedenen Volumina injiziert um die Menge an dA, das möglicherweise in Proben vorhanden ist, abzudecken. Eine Standardkurve wurde dann mit der gemessenen Menge jeder Probe abgeglichen.

**[0034]** [Fig. 10](#): Der Zeitverlauf der CD4<sup>+</sup> T-Zellenmarkierung nach 48 Stunden iv-Infusion von <sup>2</sup>H-Glukose (es sind Ergebnisse von Subjekten aus Gruppe III gezeigt, in denen die meisten Wiederholungsmessungen durchgeführt wurden). Der höchste beobachtete Wert wurde verwendet, um den Anteil der Ersetzung (vorhandene neue Zellen) zu berechnen. [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose (60–100 Gramm (g), Isotec Inc, Miamisburg, OH) wurde iv in einem Liter 0,45% Salzlösung verabreicht und über 48h mit einer Rate von 1,25 bis 2,0 Gramm/Stunde (g/hr) infundiert. Die Subjekte erhielten während dem 48-stündigen Infusionszeitraum eukalorische Diäten mit eingeschränkten Kohlenhydraten(<50 g Kohlenhydraten pro Tag), um maximale Plasmaanreicherungen der Glukose zu ermöglichen.

**[0035]** [Fig. 11A](#)–[Fig. 11B](#): [Fig. 11A](#) zeigt absolute Proliferationsraten (Zellen/μL/Tag) von Blut CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in unterschiedlichen Gruppen. Die Zahlen stehen für die Anzahl von Subjekten pro Gruppe. Die

**Fig. 11B** zeigt  $k(d^{-1})$  Werte (Ratenkonstante) für Blut CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in unterschiedlichen Gruppen. Die Zahlen geben die Anzahl von Subjekten pro Gruppe an. Symbole: a, p < 0,05 gegenüber normal; b, p < 0,05 gegenüber HIV + (HIV positiv); c, p < 0,05 gegenüber kurzzeitiger hochaktiver anti-retroviraler Therapie (HAART), d, p < 0,05 gegenüber kurzzeitiger HAART und viralem Ansprechen. Beim Vergleich von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen bestanden die einzigen signifikanten Unterschiede in den absoluten Proliferationsraten bei kurzzeitiger HAART und kurzzeitiger HAART mit viralem Ansprechen (p < 0,05).

**[0036]** **Fig. 12:** Vergleich der Nettoanreicherungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen über die ersten 6 Wochen nach Beginn einer HAART-Kur (Zugabe von Ritonavir/Saquinavir) mit der absoluten Steady-State Rate der Ersetzung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Woche 12 der HAART. Die Nettoanreicherungsrate wurde aus der Differenz zwischen der Zählung des CD4 Basiswerts (Mittelwert von 2–3 Werten) und der CD4-Zählung in Woche 6 berechnet. Das stellt die durchschnittliche Anreicherungsrate über 6 Woche dar, die immer noch niedriger als die gemessene Steady-State Rate der Ersetzung ( $19,2 \pm 15,4$  Zellen/ $\mu\text{L}/\text{Tag}$ ) ist. Ein anderes Symbol (z. B. gefüllte Quadrate, offene Raute, offenes Dreieck, offener Kreis, "X"-Symbol) zeigt ein individuelles Subjekt an. Werte, die über die zwei Verfahren für jedes individuelle Subjekt erhalten wurden, sind mit einer Linie verbunden. Die beiden gefüllten waagerechten Balken stellen Durchschnittswerte für jedes der beiden Verfahren dar.

**[0037]** **Fig. 13A–Fig. 13G:** **Fig. 13A** zeigt die Korrelation zwischen den absoluten Proliferationsraten von Blut CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in HIV +, Kurzzeit-HAART und Langzeit-HAART-Subjekten ( $r^2 = 0,69$ , p < 0,001). HIV+ Subjekte (Gruppe II), gefüllte Rautensymbole; Kurzzeit-HAART-Subjekte (Gruppe III), offene Quadratsymbole; Langzeit-HAART-Subjekte (Gruppe IV), gefüllte Quadratsymbole. Die **Fig. 13B** zeigt die Korrelation zwischen  $k(d^{-1})$  für Blut CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in HIV +, Kurzzeit-HAART- und Langzeit-HAART-Subjekten ( $r^2 = 0,66$ , p < 0,001). Die Symbole sind dieselben wie in **Fig. 13A**. Die **Fig. 13C** zeigt die Korrelation zwischen absoluten Proliferationsraten und der Zählung von Blut CD4<sup>+</sup> T-Zellen in HIV + Subjekten (Gruppe II,  $r^2 = 0,96$ , p < 0,001). **Fig. 13D** zeigt die Korrelation zwischen absoluten Proliferationsraten und der Zählung von Blut CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Kurzzeit-HAART-Subjekten (Gruppe III,  $r^2 = 0,55$ , p < 0,01). Die **Fig. 13E** zeigt die Korrelation zwischen  $k$  (Ratenkonstante (Zeit<sup>-1</sup>)) und der Zählung von Blut CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der HIV + (gefüllte Quadrate) und Kurzzeit-HAART-Gruppe (gefüllte Raute); es ist keine signifikante Korrelation vorhanden.

**[0038]** **Fig. 13F** zeigt das Verhältnis zwischen der Virenmenge im Plasma und der absoluten Proliferationsrate von Blut CD4<sup>+</sup> T-Zellen in HIV +, Kurzzeit-HAART- und Langzeit-HAART-Subjekten (Gruppen II, III und IV, Tabelle 4). Die Subjekte wurden in drei Untergruppen aufgeteilt: virale Menge < 500, zwischen 500 bis 30.000 und > 30.000 Kopien/mL. Es sind keine Unterschiede zwischen den Subgruppen vorhanden. **Fig. 13G** zeigt das Verhältnis zwischen der Virenmenge im Plasma und  $k$  (Ratenkonstante (Zeit<sup>-1</sup>)) von CD4<sup>+</sup> T-Zellen in den Gruppen II, III und IV. Die Subjekte wurden wie in **Fig. 13F** oben in drei Untergruppen aufgeteilt. Zwischen den Untergruppen sind keine Unterschiede vorhanden.

**[0039]** **Fig. 14:** Kinetische Vorhersagen von "hohen Umsatz"- (beschleunigter Abbau) und "niedrigen Umsatz"- (regeneratives Versagen) Modellen der CD4<sup>+</sup> T-Zellabnahme bei der HIV-1 Infektion. Die vorhergesagten Beziehungen zwischen der Ersetzungsrate (Umsatz) und der Zählung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie die Wirkungen von HAART sind schematisch gezeigt (für die Diskussion siehe den Text).

##### 5. Detaillierte Beschreibung der Erfindung

**[0040]** Die biochemische Entsprechung der Produktion neuer Zellen ist die DNA-Synthese. Die DNA-Synthese ist ebenfalls relativ spezifisch für die Zellteilung, da "ungeplante" DNA-Synthese quantitativ gering vorhanden ist (Sawada et al., 1995, Mutat. Res. 344: 109–116). Daher entspricht die Messung der Synthese neuer DNA im Wesentlichen der Messung der Zellproliferation.

**[0041]** In einem Aspekt der Erfindung werden Verfahren zum Messen der Raten der zellulären Proliferation und/oder des zellulären Abbaus bereitgestellt. Solche Verfahren umfassen das in Kontakt bringen einer Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, und den Nachweis des Markers, der in die DNA eingebaut wurde. Es ist selbstverständlich für den Durchschnittsfachmann, dass ein stabiler Isotopenmarker ein nicht-radioaktiver Isotopenmarker ist. Ein radioaktiver Isotopenmarker ist ein Marker, der ein Radioisotop umfasst. Ein Radioisotop ist eine Isotopenform eines Elements (entweder natürlich oder künstlich), die Radioaktivität zeigt – die Eigenschaft von einigen Kernen spontan Gammastrahlen oder subatomare Partikel (zum Beispiel Alpha- und Betastrahlen) zu emittieren.

**[0042]** Mit einigen solchen Verfahren kann die zelluläre Proliferationsrate einer proliferierenden Zellpopulation

gemessen werden. Eine proliferierende Zellpopulation ist eine Gruppe von Zellen, die sich teilen und Nachwuchs erzeugen. Die Menge des Markers, der in die DNA eingebaut ist, wird als ein Hinweis auf die zelluläre Proliferation gemessen. Die Messung der Abnahme von markierter DNA über einen Zeitraum (d.h. die Messung der Abnahme des Signals des Markers, der in die DNA eingebaut wurde) dient als ein Hinweis auf den Abbau von Zellen.

**[0043]** Die Verfahren zum Messen der DNA-Synthese und/oder -Abbaus und somit der Zellproliferations- und/oder -abbauraten, die hierin beschrieben werden, haben mehrere Vorteile über zuvor verfügbare Verfahren. <sup>3</sup>H-Tymidin ist ein wirksamer Antimetabolit, der verwendet wurde, um sich teilende Zellen zu töten (Asher et al., 1995, Leukemia and Lymphoma 19: 107–119); die Toxizität der Einführung von Radioisotopen in die DNA wird durch die Verfahren der Erfindung, die nicht radioaktive stabile Isotopen verwenden, vermieden. Somit sind die Verfahren der Erfindung, die nicht radioaktive stabile Isotopen verwenden, sicher und insbesondere zum Messen der zellulären Proliferation- und/oder zellulären Abbauraten für die Diagnose, Prävention oder die Handhabung von Krankheiten oder Störungen, die die zelluläre Proliferation oder den zellulären Abbau induzieren oder inhibieren, im Menschen nützlich.

**[0044]** Die Toxizitäten von Nukleosidanalogien, zum Beispiel BrdU, werden ebenfalls durch das Verwenden der Verfahren der Erfindung, die das Markieren mit einem nicht-toxischen physiologischen Substrat (zum Beispiel einem stabilen Marker) über endogene Synthesewege ermöglichen, vermieden.

**[0045]** Die Isotopenkontamination durch DNA-Synthese außerhalb der S-Phase wird ebenfalls durch das Markieren über den de novo Nukleotidsyntheseweg, der hauptsächlich während der S-Phase aktiv ist, minimiert. Die Variabilität der Aufnahme von wiedergewonnenen markierten Pyrimidin-Nukleosiden wird durch das Markieren von Purin-dNTP's über den de novo Nukleotidsyntheseweg gelöst, wobei der Weg zur Wiedergewinnung von Pyrimidin-Nukleosiden der Weg ist, den zuvor verwendete Marker, wie zum Beispiel <sup>3</sup>H-Deoxytymidin oder BrdU, durchlaufen müssen, um in die DNA zu gelangen ([Fig. 1](#)), was das, was zuvor ein Nachteil war (niedrige Purin-dNTP Markierung in dem Nukleosid-Wiedergewinnungsweg) in einen Vorteil (hohe und konstante Purin-dNTP Markierung in dem de novo Weg) umwandelt. Das wird durch die Konstanz des [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose Einbaus in die DNA, selbst in Gegenwart von supraphysiologischen extrazellulären Konzentrationen von Desoxyribonukleosiden (Tabelle 1), gezeigt. Die mögliche Zufuhr von freien Purin- oder Pyrimidinbasen, die wiedergewonnen wurden, verdünnt nicht den Riboserest von NTPs, da der Wiedergewinnungsweg für freie Basen, wie die de novo Synthese von Basen, die Kombination mit PRPP, das aus Glukose synthetisiert wird, einschließt ([Fig. 1](#)).

**[0046]** Außerdem wird die Wiederverwendung von Markern aus katabolisierte DNA durch das Analysieren der Purindesoxyribonukleotide vermieden, da der Desoxyribonukleosid-Wiedergewinnungsweg für Purine gering ist. Die absinkenden Kurven von markiertem dA oder dG in DNA nach dem Beenden der Markierung sind daher relativ wenig durch Isotopenwiederverwendung verunreinigt, und der Zellenumsetz sollte aus abfallenden Kurven sowie Einbaukurven messbar sein (Hellerstein and Neese, 1992, Am. J. Physiol. 263: E988–E1001) Zusätzlich bieten die Verfahren der Erfindung eine präzise quantitative Messung zum Zählen der Anzahl neuer Zellen gegenüber konventionellen Verfahren, die nur den relativen Anstieg oder die Abnahme von Zellzahlen verglichen mit Kontrollen nachweisen.

**[0047]** Die vorliegende Erfindung liefert ebenfalls in vivo Verfahren zum Messen der Proliferation oder der Abnahme von T-Zellen in Subjekten, die mit HIV infiziert sind. Diese Verfahren sind beim Bestimmen der Rate der Proliferation oder des Abbaus von T-Zellen, einschließlich CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen, in verschiedenen Subjekten, einschließlich Menschen, die mit dem HI-Virus infiziert sind und/oder an AIDS leiden, von Nutzen. Solche Verfahren umfassen endogene Markierungsverfahren zum Messen der DNA-Synthese mittels massenspektrometrischer Techniken unter Verwendung von nicht radioaktiven (stabilen) Isotopen, wie hierin und in den unten stehenden Beispielen im Detail beschrieben. Insbesondere umfassen solche Verfahren das Verabreichen einer nachweisbaren Menge eines stabilen, nicht radioaktiven Isotopenmarkers an das Subjekt, wobei der Marker über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA des Subjekts eingebaut wird. Der Marker in der DNA wird nachgewiesen, um die Proliferation oder den Abbau von T-Zellen zu messen. Solche Verfahren können vor oder nach der anti-retroviralen Behandlung der HIV-Infektion des Subjekts durchgeführt werden. Auf diesem Weg können die Wirkungen von solchen Behandlungen auf die T-Zellproliferations- oder -abbauraten analysiert werden.

**[0048]** Die Erfindung liefert ebenfalls in vitro und in vivo Verfahren zum Untersuchen eines Agens oder einer Verbindung auf die Eigenschaft oder Fähigkeit die zelluläre Proliferation zu induzieren oder zu inhibieren. Solche Untersuchungsverfahren sind nützlich, um bestimmte Agenzien oder Verbindungen zu identifizieren, die

die zelluläre Proliferation stimulieren oder inhibieren. Diese Verfahren sind ebenfalls beim Identifizieren von "Proliferogenen" – Agenzien oder Verbindungen, die die zelluläre Proliferation oder die Produktion neuer Zellen stimulieren oder fördern – nützlich. Zusätzlich sind solche Untersuchungsverfahren beim Bestimmen ob ein bestimmtes Agens, eine Substanz oder eine Verbindung ein potentielles Karzinogen ist, eine Hilfe, da die Fähigkeit eines Agens, einer Substanz oder einer Verbindung die Zellproliferation zu induzieren ein wichtiges Kriterium ist, das darauf hindeutet, dass es, getrennt von oder unabhängig von seiner Fähigkeit DNA zu schädigen, ein Karzinogen sein könnte (z.B. Ames et al., 1973, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70: 2281). Somit dienen diese Untersuchungsverfahren als ein bequemer Indikator der Karzinogenität eines Agens oder einer Verbindung.

**[0049]** Die Untersuchungsverfahren der Erfindung sind gegenüber zuvor verfügbaren Verfahren aufgrund einer Reihe von Gründen vorteilhaft, einschließlich denen, die oben mit Bezug auf andere Verfahren der Erfindung behandelt wurden. Insbesondere sind solche Untersuchungsverfahren von Nutzen, da sie nicht die Verwendung toxischer, nicht stabiler Radioisotope erfordern; im Gegenteil, es können nicht toxische, stabile Isotope zusammen mit den Untersuchungsverfahren der Erfindung verwendet werden.

**[0050]** Zusätzlich liefert die Erfindung Verfahren zum Markieren der DNA in einer Zelle. Solche Verfahren umfassen das in Kontakt bringen einer Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird. Solche Verfahren zum Markieren der DNA sind aus den hier beschriebenen Gründen für andere Verfahren der Erfindung nützlich; insbesondere sind solche Verfahren für in vivo Anwendungen, die den Nachweis von DNA in Subjekten, einschließlich Menschen, erfordern, nützlich, da sie nicht die Verwendung von toxischen, nicht stabilen Radioisotopenmarkern erfordern. Solche DNA-Markierungsverfahren werden unter Verwendung der Techniken und Verfahren, die supra und infra in dieser Offenbarung mit Bezug auf Verfahren zum Messen der zellulären Proliferations- und zellulären Abbauraten in vitro und in vivo beschrieben werden (zum Beispiel in Kontakt bringen einer Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, Einbau besagten Markers in die DNA über den de novo Syntheseweg und Nachweis des Markers in der DNA der Zelle), nützlich. In solchen Verfahren sind die Art der Verabreichung, die Art des stabilen Isotopenmarkers (zum Beispiel [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose) und die Techniken zum Nachweis solcher Marker (zum Beispiel Massenspektroskopie) analog zu denen, die für andere Verfahren der Erfindung mit Bezug auf die Messung von zellulären Proliferations- und Abbauraten beschrieben wurden.

**[0051]** Obwohl die hierin beschriebenen spezifischen Verfahren und Vorgehensweisen unter Verwendung von markierter Glukose als Vorläufer und dem Nachweis des Markers durch das Analysieren von Purin-Desoxyribonukleosiden beispielhaft beschrieben werden, sind sie für die Anwendung der Erfindung veranschaulichend. Analoge Vorgehensweisen und Techniken sowie funktionell äquivalente Marker, die basierend auf der hierin bereitgestellt detaillierten Offenbarung für den Durchschnittsfachmann offensichtlich sind, werden ebenfalls durch die Erfindung erfasst.

### 5.1. Stabile Isotopenmarker für die Verwendung bei der Markierung von DNA während der de novo Biosynthese von Nukleotiden

**[0052]** Die vorliegende Erfindung bezieht sich auf Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation durch das in Kontakt bringen einer Zelle mit einem stabilen Isotopenmarker für dessen Einbau in die DNA über den de novo Nukleotidsyntheseweg. Der Nachweis des eingebauten Markers wird als ein Maß für die DNA-Synthese verwendet. Das Markieren der DNA über den de novo Nukleotidsyntheseweg (endogen) hat mehrere Vorteile gegenüber konventionellen Markierungsverfahren über den Nukleosidwiedergewinnungsweg (exogen). Diese schließen die fehlende Toxizität, Spezifität für die S-Phase des Zellzyklus und das Fehlen des Wiedereinbaus des Markers aus katabolisierte DNA ein. Die Verwendung eines nicht radioaktiven Markers vermeidet ferner das Mutationsrisiko.

**[0053]** In einer spezifischen Ausführungsform, die beispielhaft in Teil 6 infra dargestellt wird, wurden [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose, [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] Glukose und [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] Glycerin verwendet, um den Desoxyribose-Ring der DNA zu markieren. Das Markieren der Desoxyribose ist der Markierung der informationstragenden Stickstoffbasen in der DNA überlegen, da es verschiedene Fehlerquellen vermeidet. Die stabilen Isotopenmarker sind einfach durch massenspektrometrische Techniken nachweisbar.

**[0054]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird ein stabiler Isotopenmarker verwendet um den Desoxyribose-Ring der DNA ausgehend von Glukose, Vorläufern von Glukose-6-Phosphat oder Vorläufern von Ribose-5-Phosphat zu markieren. In Ausführungsformen, in denen Glukose als Startmaterial verwendet wird, schließen geeignete Marker ein, aber sind nicht beschränkt auf Deuterium-markierte Glukose wie zum Beispiel [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose, [1-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>] Glukose, [3-<sup>2</sup>H<sub>1</sub>] Glukose, [<sup>2</sup>H<sub>7</sub>] Glukose und ähnliche; <sup>13</sup>C-1 markierte Glu-

kose, wie zum Beispiel [ $1-^{13}\text{C}_1$ ] Glukose, [ $\text{U}-^{13}\text{C}_6$ ] Glukose und ähnliche; und  $^{18}\text{O}$ -markierte Glukose, wie zum Beispiel [ $1-^{18}\text{O}_2$ ] Glukose und ähnliche.

**[0055]** In Ausführungsformen, in denen ein Glukose-6-Phosphat Vorläufer oder ein Ribose-5-Phosphat Vorläufer wünschenswert ist, kann ein Vorläufer oder ein Metabolit aus der Glukoneogenese, der in der Lage ist in Glukose-6-Phosphat oder Ribose-5-Phosphat umgewandelt zu werden, verwendet werden. Vorläufer aus der Glukoneogenese schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf  $^{13}\text{C}$ -markiertes Glycerin, wie zum Beispiel [ $2-^{13}\text{C}_1$ ] Glycerin und ähnliche, eine  $^{13}\text{C}$ -markierte Aminosäure, deuteriertes Wasser ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ) und  $^{13}\text{C}$ -markiertes Laktat, Alanin, Pyruvat, Propionat oder andere nicht-Aminosäurevorläufer der Glukoneogenese. Metaboliten, die zu Glukose-6-Phosphat oder Ribose-5-Phosphat umgewandelt werden, schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf markierte ( $^2\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ ) Hexosen, wie zum Beispiel [ $1-^2\text{H}_1$ ] Galaktose, [ $\text{U}-^{13}\text{C}$ ] Fruktose und ähnliche; markierte ( $^2\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ ) Pentosen, wie zum Beispiel [ $1-^{13}\text{C}_1$ ] Ribose, [ $1-^2\text{H}_1$ ] Xylitol und ähnliche, markierte ( $^2\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ ) Metaboliten des Pentosephosphatwegs, wie zum Beispiel [ $1-^2\text{H}_1$ ] Seduheptalose und ähnliche und markierte ( $^2\text{H}$  oder  $^{13}\text{C}$ ) Aminozucker wie zum Beispiel [ $\text{U}-^{13}\text{C}$ ] Glukosamin, [ $1-^2\text{H}_1$ ] n-Acetylglukosamin und ähnliche.

**[0056]** Die vorliegende Erfindung umfasst ebenfalls stabile Isotopenmarker, die Purin- und Pyrimidinbasen der DNA über den de novo Nukleotidsyntheseweg markieren. Verschiedene Bausteine der endogenen Purin-synthese können verwendet werden um Purine zu markieren und diese schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf  $^{15}\text{N}$ -markierte Aminosäuren, wie zum Beispiel [ $^{15}\text{N}$ ] Glycin, [ $^{15}\text{N}$ ] Glutamin, [ $^{15}\text{N}$ ] Aspartat und ähnliche,  $^{13}\text{C}$ -markierte Vorläufer, wie zum Beispiel [ $1-^{13}\text{C}_1$ ] Glykon, [ $3-^{13}\text{C}_1$ ] Laktat, [ $^{13}\text{C}$ ]  $\text{HCO}_3$ , [ $^{13}\text{C}$ ] Methionin und ähnliche und  $^2\text{H}$ -markierte Vorläufer wie zum Beispiel  $^2\text{H}_2\text{O}$ . Verschiedene Bausteine für die endogene Pyrimidinsynthese können verwendet werden um Pyrimidine zu markieren und diese schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf  $^{15}\text{N}$ -markierte Aminosäuren wie zum Beispiel [ $^{15}\text{N}$ ] Glutamin und ähnliche,  $^{13}\text{C}$ -markierte Vorläufer wie zum Beispiel [ $^{13}\text{C}$ ]  $\text{HCO}^3$ , [ $\text{U}-^{13}\text{C}_4$ ] Aspartate und ähnliche und  $^2\text{H}$ -markierte Vorläufer ( $^2\text{H}_2\text{O}$ ).

**[0057]** Es ist für den Durchschnittsfachmann selbstverständlich, dass zusätzlich zu der obigen Liste andere stabile Isotopenmarker, die Substrate oder Vorläufer für jeden Weg, der zu der endogenen Markierung von DNA führt, ebenfalls durch den Umfang der Erfindung erfasst werden. Die Marker, die für die Verwendung gemäß der vorliegenden Erfindung von Nutzen sind, sind im Allgemeinen kommerziell erhältlich oder können über Verfahren, die im Stand der Technik gut bekannt sind, synthetisiert werden.

## 5.2. Nachweis des eingebauten Markers in der DNA

**[0058]** Der Grad des Einbaus eines stabilen Isotopenmarkers in die DNA von Zellen wird durch das Isolieren der DNA aus einer Zellpopulation von Interesse und das Analysieren eines chemischen Teils des DNA-Moleküls, der in der Lage ist den Marker durch einen endogenen Markierungsweg einzubauen, unter Verwendung von Standardanalyseverfahren, wie zum Beispiel Massenspektroskopie, Kernspinresonanz und ähnlichen, bestimmt. Die Verfahren der Probenvorbereitung hängen von den bestimmten Analyseverfahren ab, die verwendet werden, um die Gegenwart des Isotopenmarkers zu bestimmen, und sind für den Durchschnittsfachmann offensichtlich.

**[0059]** In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung wird die Gegenwart des Markers über Massenspektroskopie bestimmt. Für diese Nachweisverfahren werden Gewebe oder Zellen von Interesse gesammelt (zum Beispiel über Gewebsbiopsie, Blutentnahmen, das Sammeln von Sekreten oder Ausscheidungen des Körpers, etc.) und die DNA unter Verwendung von Standardtechniken, wie sie im Stand der Technik gut bekannt sind, extrahiert. Natürlich hängt das tatsächliche Verfahren der DNA-Isolation von dem jeweiligen Zelltyp ab und ist für den Durchschnittsfachmann offensichtlich. Die Zellen können vor der Extraktion der DNA optional unter Verwendung von Standardtechniken, wie zum Beispiel Immuno-Affinitäts-Chromatographie, fluoreszenzaktiviertem Zellsortieren, Elutration, Magnetpartikelabtrennung, Dichtegradientenzentrifugation, etc. weiter gereinigt werden.

**[0060]** Wenn gewünscht kann die DNA dann unter Verwendung von Standardhydrolyseverfahren, wie sie im Stand der Technik gut bekannt sind, weiter zu Desoxyribonukleosiden hydrolysiert werden. Zum Beispiel kann die DNA enzymatisch, wie zum Beispiel mit Nukleasen oder Phosphatasen, oder nichtenzymatisch mit Säuren, Basen oder anderen Verfahren der chemischen Hydrolyse hydrolysiert werden. Alternativ kann vor dem Nachweis der DNA die DNA, die den stabilen Isotopenmarker enthält, in Form intakter DNA Polymere bestimmt und gemessen werden ohne zu Desoxyribonukleosiden hydrolysiert zu werden.

**[0061]** Die Desoxyribonukleoside werden dann für die massenspektroskopische Analyse unter Verwendung

von Standardtechniken (zum Beispiel Synthese von Trimethylsilyl-, Methyl-, Acetyl-, etc. Derivaten; die direkte Injektion bei der Flüssigkeitschromatographie; die direkte Probeneinführung, etc.) vorbereitet und der Grad des Einbaus des Markers in die Desoxyribonukleoside bestimmt.

**[0062]** Die massenspektroskopische Analyse kann Fragmente, die potentiell stabile Isotopenmarker enthalten, die auf dem endogenen Markierungsweg eingeführt wurden, erfassen. Zum Beispiel können das m/z 467–469 Fragment des Desoxyadenosins oder das m/z 557 und 559 Fragment des Desoxyguanosinmassenspektrums, das den intakten Desoxyribosering enthält, nach [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukoseverabreichung unter Verwendung eines Gaschromatographen/Massenspektrometers unter Elektronenstoßionisation und dem „selected ion“-Aufnahmemodus analysiert werden. Oder das m/z 103 und 104 Fragment des Desoxyadenosinmassenspektrums, das die Position C-5 der Desoxyribose enthält, könnte nach Verabreichung von [6,6-<sup>2</sup>H] Glukose oder [6-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] Glukose analysiert werden. In einer bevorzugten Ausführungsform stammt das analysierte massenspektroskopische Fragment von einem Purindesoxyribonukleosid anstelle eines Pyrimidindesoxyribonukleosids.

**[0063]** Die Anteil der neu synthetisierten DNA und daher der neu geteilten Zellen (Zellproliferations- oder Input-Rate) oder neu entfernte Zellen (Zelltod- oder Exit-Rate) wird dann berechnet (Tabelle 1).

Tabelle 1

Tag #	Häufigkeiten m/z	Häufigkeiten m/z	dA* Anreicherung	f (unkorri- giert) (% neue Zellen)	f (korri- giert) (% neue Zellen)
1	2844049	518152	0.00000	0.00	0.00

(Basis- linie)					
2	1504711	260907	0.00000	0.00	0.00
3	2479618	453609	0.00298	2.50	3.84
4	3292974	624718	0.00586	4.91	7.55
5	2503144	461905	0.00451	3.77	5.81
6	1055618	186087	0.00318	2.66	4.09
7	2186009	394058	0.00193	1.61	2.48

**[0064]** Die Häufigkeiten repräsentieren den Durchschnitt von drei Entnahmen. [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose wurde einem gesunden menschlichen Subjekt mit 550 CD4<sup>+</sup> T-Zellen pro mm<sup>3</sup> Blut intravenös für 48 Stunden mit 1,25 g/hr infundiert.

**[0065]** Plasmaglukoseanreicherung = 11,9; dA\* = Desoxyadenosinanreicherung basierend auf dem Vergleich mit einer mengen-korrigierten Standardkurve von [5,5-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Desoxyadenosin; f unkorrigiert, berechnet als die dA-Anreicherung geteilt durch die Plasmaglukoseanreicherung; f korrigiert, berechnet als die dA-Anreicherung geteilt durch 0,65 mal die Plasmaglukoseanreicherung (Macallan et al., 1998 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 708–713). Die berechnete Zellproliferationsrate in der Gesamtpopulation: 3,93 pro Tag (21,6 Zellen/mm<sup>3</sup> Blut pro Tag). Die berechnete Abbau(Zerstörungs)-Rate von sich kürzlich teilenden Zellen: 31,3 pro Tag (Halbwertszeit = 2,2 Tage).

## 5.3. Verwendungen

## 5.3.1. In vitro Verwendungen

**[0066]** In einer spezifischen Ausführungsform, die beispielhaft in Teil 6, infra, dargestellt wird, wurde eine Anreicherung von Desoxyadenosin (dA) in zwei Zelltypen, die mit einem stabilen Isotopenmarker inkubiert und als Monoschichten und in Suspension wachsen gelassen wurden, beobachtet. Die dA-Anreicherung korrelierte stark mit dem Anstieg der Zellzahlen, die durch direkte Zählung bestimmt wurden. Daher können die Verfahren der Erfindung verwendet werden, um die zelluläre Proliferation in einer Reihe von proliferativen Assays zu messen. Zum Beispiel können Bioassays, die die zelluläre Proliferation als ein read-out der Antwort auf Wachstumsfaktoren, Hormone, Cytokine oder inhibitorische Faktoren verwenden, unter Verwendung eines stabilen Isotopenmarkers, der sich auf den de novo Nukleotidsyntheseweg richtet, entwickelt werden. Beispiele von solchen Assays schließen Lymphozytenaktivierung durch Antigene und antigenpräsentierende Zellen, Apoptose von Zielzellen, die durch Tumornekrosefaktor induziert wird, und die Cytotoxizität von Tumorzellen durch zytolytische Lymphozyten ein.

## 5.3.2. In vivo Verwendungen

**[0067]** Da die Verfahren der Erfindung, die stabile Isotopenmarker verwenden, keine Radioaktivität und potentiell toxische Metaboliten einschließen, sind solche Verfahren insbesondere als ein diagnostisches Werkzeug beim Messen der zellulären Proliferations- und Abbauraten in vivo in Subjekten, einschließlich Menschen, von Nutzen. Im Vergleich zu konventionellen Verfahren im Menschen, sind die Verfahren der Erfindung sicher, breiter anwendbar, einfacher durchführbar, sensitiver, erfordern nicht die Konservierung der Zell- oder Gewebsanatomie, schließen keine Radioaktivität ein und erzeugen genauere Ergebnisse, da der de novo Nukleotidsyntheseweg konstant und dominierend ist, nicht verdünnt wird und die DNA über physiologische Substrate anstelle von potentiell toxischen, nicht-physiologischen Metaboliten markiert wird.

**[0068]** Eine große Auswahl von medizinischen Anwendungen, in denen zelluläre Proliferation und zellulärer Abbau eine wichtige Rolle spielen, werden durch die vorliegende Erfindung erfasst. Insbesondere können die Verfahren der Erfindung verwendet werden, um die Proliferations- und Abbauraten in Krebs, Infektionskrankheiten, Immun- und hämatologischen Erkrankungen, Organversagen und Erkrankungen der Knochen, der Muskeln und endokriner Organe zu bestimmen.

## 5.3.2.1. Krebsbehandlungen

**[0069]** Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung könnte ein Patient eine systemische oder lokale Verabreichung eines stabilen Isotopen-markierten Vorläufers für den de novo Nukleotidsyntheseweg (zum Beispiel intravenös [6,6-<sup>2</sup>H]<sub>2</sub> Glukose mit 1,25 g/hr über 24–48 Stunden) vor dem Beginn der Chemotherapie und wiederum 1–2 Wochen nach dem Start der Chemotherapie erhalten. Nach jedem Zeitraum der Verabreichung des stabilen Isotops wird eine kleine Probe des Umsatzes (zum Beispiel durch Aspiration mit einer dünnen Nadel) in der Syntheserate der DNA, was die Inhibition der Tumorzellteilung widerspiegelt, durchgeführt und könnte als ein Behandlungsendpunkt für die Auswahl der optimalen Therapie verwendet werden. Typischerweise ist die Dosis des gegebenen Isotopenvorläufers ausreichend, um den Einbau in Desoxyribonukleoside über den massenspektroskopischen Nachweisgrenzen zu erlauben. Proben werden abhängig von der Verdünnung eines Tracers und den Zellumsatzraten entnommen.

## 5.3.2.2. Krebsprävention

**[0070]** Das Risiko für Brust- und Darmkrebs und andere Krebsformen korreliert stark mit dem proliferativen Stress in dem Gewebe, das heißt Hormonen, Entzündungen oder Ernährungsfaktoren, die die Zellproliferation verändern, und die Krebsraten grundlegend beeinflussen. Die Fähigkeit den proliferativen Stress der Brustzellen einer Frau und deren Antwort auf eine präventive Intervention (wie zum Beispiel Tamoxifen) im frühen Erwachsenenleben zu bestimmen, würde zum Beispiel die Brustkrebsprävention radikal verändern. Dasselbe trifft auf Darmkrebs, Lungenkrebs und andere Krebsformen zu.

## 5.3.2.3. AIDS

**[0071]** Anti-retrovirale Mittel sollen bei AIDS die virale Replikation (einen biosynthetischen Prozess) blockieren, um den CD4<sup>+</sup> T-Zelltod und -umsatz zu verringern. Kürzliche Fortschritte bei der AIDS Behandlung haben sich genau auf diese kinetischen Prozesse konzentriert, obwohl direkte kinetische Messungen nicht verfügbar

waren. Die Fähigkeit direkt diese Behandlungsendpunkte zu messen kann die Art der HIV-Therapeutika radikal verändern. Die Ärzte können für jeden einzelnen Patienten schnell bestimmen, ob früh in der Krankheit mit einer aggressiven anti-retroviralen Behandlung begonnen werden soll. In einer spezifischen Ausführungsform, die beispielhaft in Teil 6, infra, gezeigt wird, werden die Verfahren der Erfindung verwendet, um die Proliferations- und/oder Abbauraten von CD4<sup>+</sup> Zellen in, mit menschlichem Immunschwächerivirus (HIV)-infizierten Patienten genau zu bestimmen.

**[0072]** In einer anderen spezifischen Ausführungsform, die beispielhaft in Teil 6, infra, gezeigt wird, werden die Verfahren der Erfindung verwendet, um die Proliferations- oder Abbauraten von T-Zellen, einschließlich CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Zellen, in vivo in Subjekten, die mit dem humanen Immunschwächerivirus (HIV) infiziert sind, genau und direkt zu messen. Solche Verfahren können vor, während oder nach der anti-retroviralen Behandlung der HIV-Infektion des Subjektes durchgeführt werden.

#### 5.3.2.4. Erkrankungen, an denen die zelluläre Proliferation beteiligt ist

**[0073]** Es ist für eine große Anzahl von Erkrankungen bekannt, dass sie sich durch veränderte zelluläre Proliferationsraten auszeichnen, und damit durch Verfahren gemäß der Erfindung überwacht werden können:

##### Krebs:

**[0074]** Bösartige Tumore jeder Art (zum Beispiel Brust, Lungen, Haut, Lymphom, Leukämie etc.); Vor-Krebszustände (Adenome, Polypen, Prostatahypertrophie, Ulcerative Colitis, etc.); Faktoren, die das Risiko für häufige Krebsformen modulieren (zum Beispiel Östrogene und Brustepithelzellen; Fett in der Ernährung und Colonzyten; Zigarettenrauchen oder Anti-Oxidantien und bronchiale Epithelzellen; Hormone und Prostatazellen, etc.). Die oben identifizierten Zellen und die Zellen von Geweben und Organen, die oben genannt werden, sind unter den Zellen, für die ein Krebsrisiko besteht.

##### Immunerkrankungen:

**[0075]** CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten in AIDS; T- und B-Lymphozyten in dem fehlenden Ansprechen auf Vakzine; T-Zellen in Autoimmunerkrankungen; B-Zellen in Hypogammaglobulinämien; primäre Immunschwächen (Thymozyten); stressabhängige Immunschwächen (Lymphozyten); und ähnliche.

##### Hämatologische Erkrankungen:

**[0076]** Mangel an weißen Blutzellen (zum Beispiel Granulocytopenie); Anämien jeder Art; myeloproliferative Erkrankungen (zum Beispiel Polycythaemia vera); Geweberkrankungen mit weißer Blutzellinfiltration (zum Beispiel pulmonäre interstitielle Eosinophilie, lymphozytische Thyroiditis, etc.); lymphoproliferative Erkrankungen; monoklonale Gammopathien; und ähnliche.

##### Organversagen:

**[0077]** Alkoholische und virale Hepatitis (Leberzellen); diabetische Nephropathie (glomeruläre oder mesangiale Zellen); myotrophische Erkrankungen (Myozyten); verfrühtes Keimzellversagen (Oocyten, Stromazellen der Eierstöcke, Spermatozyten, Leydig-Zellen, etc.); und ähnliche.

##### Erkrankungen der Knochen und Muskeln:

**[0078]** Als Antwort auf körperliches Training oder physikalische Therapie (Myozyten oder Mitochondrien in Myozyten); Osteoporose (Osteoclasten, Osteoblasten, parathyroide Zellen) Myositis; und ähnliche.

##### Endokrine Erkrankungen:

**[0079]** Diabetes (β-Insel-Zellen); Hypothyroidismus und Hyperthyroidismus (Schilddrüsenzellen); Hyperparathyroidismus (Parathyroidzellen); polycystische Ovarien (Stromazellen des Eierstocks); und ähnliche.

##### Infektiöse Erkrankungen:

**[0080]** Tuberkulose (Monozyten/Makrophagen); bakterielle Infektionen (Granulozyten); Abszesse und andere lokalisierte Gewebsinfektion (Granulozyten); virale Infektionen (Lymphozyten); Diabetesfußerkrankung und

Gangrän (weiße Blutzellen); und ähnliche.

Vaskuläre Erkrankungen:

**[0081]** Atherogenese (Proliferation der glatten Muskelzellen in der arteriellen Wand); Kardiomyopathien (kardiale Myozytenproliferation) und ähnliche.

Berufserkrankungen und Expositionen:

**[0082]** Anfälligkeit gegenüber Kohlenstaub für die Staublungenkrankung (Pneumokoniose der Kohlenarbeiter) und Byssinose (proliferative Antwort der Fibroblasten); Anfälligkeit gegenüber Hauterkrankungen, die im Zusammenhang mit der Sonne oder chemischen Expositionen stehen (Hautzellen); und ähnliche.

**[0083]** Der Isotopenmarker, der für die Verwendung in vivo geeignet ist, wird gemäß konventioneller Verfahren aus dem Stand der Technik unter Verwendung einer physiologisch und klinisch annehmbaren Lösung hergestellt. Die geeignete Lösung ist abhängig von dem gewählten Verabreichungsweg. Geeignete Verabreichungswege können zum Beispiel die orale, rektale, transmukosale, transkutane oder intestinale Verabreichung; die parenterale Abgabe, einschließlich intramuskulärer, subkutaner, intramedullärer Injektionen sowie intrathekaler, direkter intraventrikularer, intravenöser, intraperitonealer, intranasaler oder intraokularer Injektionen, einschließen.

**[0084]** Alternativ kann man den Marker in einer lokalen anstelle einer systemischen Art und Weise zum Beispiel über Injektion des Markers direkt in ein spezifisches Gewebe, oftmals in einer Depotzusammensetzung oder einer Zusammensetzung zu verzögerten Freisetzung, verabreichen.

**[0085]** Das Festlegen einer nachweisbaren Menge des Markers liegt innerhalb der Fähigkeiten des Durchschnittsfachmanns.

5.4 Verfahren zum Untersuchen eines Agens auf die Fähigkeit die zelluläre Proliferation zu induzieren oder zu inhibieren

**[0086]** Die Erfindung liefert ebenfalls Verfahren zum Untersuchen eines Agens oder einer Verbindung auf die Fähigkeit oder Eignung die zelluläre Proliferation zu induzieren oder zu inhibieren. Solche Verfahren umfassen das in Kontakt bringen einer Zelle mit oder das Exponieren einer Zelle gegenüber einem vermutlich toxischen Agens oder einer vermutlich toxischen Verbindung. Die Zelle wird mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg, wie hierin für andere Verfahren der Erfindung beschrieben, in die DNA der Zelle eingebaut wird, in Kontakt gebracht, um die zellulären Proliferations- und Abbauraten zu messen. In einigen solchen Verfahren wird die Zelle mit dem Agens oder der Verbindung von Interesse vor dem in Kontakt bringen mit dem Isotopenmarker in Kontakt gebracht oder diesem ausgesetzt. Alternativ kann die Zelle mit solch einem Agens oder solch einer Verbindung in Kontakt gebracht werden, nachdem sie mit dem Isotopenmarker in Kontakt gebracht worden ist. Die Menge des Markers, der in die DNA eingebaut worden ist, verglichen mit einer Kontrollanwendung, in der Zelle dem Agens nicht ausgesetzt wurde, zeigt das Ausmaß der zellulären Proliferation an und dadurch, ob das Agens die zelluläre Proliferation induziert oder inhibiert. Wie in den anderen Verfahren gemäß der Erfindung, die supra und infra beschrieben werden, ist der Marker typischerweise an einen Vorläufer von Desoxyribose in dem de novo Nukleotidsyntheseweg gebunden, wobei der Vorläufer in die Desoxyribose eingebaut wird. In einigen solchen Verfahren, wie in anderen Verfahren der Erfindung, ist der Vorläufer Glukose und der Marker an die Glukose gebunden. Die Arten von stabilen Isotopenmarker die in solchen Verfahren verwendet werden können, sind analog zu denen, die für andere Verfahren gemäß der Erfindung, die sich auf das Messen der zellulären Proliferations- und Abbauraten beziehen, beschrieben wurden.

**[0087]** Die Nachweisverfahren schließen solche ein, die im Stand der Technik gut bekannt sind, und solche, die in dieser Offenbarung mit Bezug auf Verfahren zum Messen der zellulären Proliferations- und Abbauraten, einschließlich Massenspektroskopie, beschrieben werden. Wie in anderen Verfahren der Erfindung, wird die DNA typischerweise – obwohl nicht notwendigerweise – vor dem Nachweis des Markers in der DNA zu Desoxyribonukleosiden hydrolysiert. Der Marker kann in intakten DNA-Polymeren nachgewiesen werden.

**[0088]** Die vorliegende Erfindung liefert ebenfalls in vivo Verfahren zum Untersuchen eines Agens auf seine Fähigkeit oder Eignung die zelluläre Proliferation in einem Subjekt, das dem Agens ausgesetzt wird, zu induzieren oder zu hemmen. Solche Verfahren umfassen das Aussetzen des Subjekts (oder einer Zelle des Sub-

jets) gegenüber dem Agens und das Verabreichen einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers an das Subjekt. Der Marker wird über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA des Subjekts eingebaut. Der Marker, der in die DNA einer Zelle von Interesse in dem Subjekt eingebaut worden ist, wird bestimmt, um das Ausmaß der zellulären Proliferation der Zelle von Interesse in dem Subjekt zu bestimmen. Die Menge des Markers, der in der DNA nachgewiesen wird – relativ zu einer Kontrollanwendung, in der dasselbe Subjekt dem Agens nicht ausgesetzt wird oder verglichen mit einer Kontrollgruppe von vergleichbaren Subjekten, die dem Agens nicht ausgesetzt werden – zeigt das Ausmaß der zellulären Proliferation an und somit, ob das Agens die zelluläre Proliferation in dem Subjekt induziert oder inhibiert. Die Art der Verabreichung, die Art des stabilen Isotopenmarkers und das Nachweisverfahren sind analog zu denen, die für andere Verfahren gemäß der Erfindung mit Bezug auf das Messen der zellulären Proliferations- und Abbauraten beschrieben wurden.

**[0089]** Mit diesem Untersuchungs-Verfahren kann die Fähigkeit eines Agens die zelluläre Proliferation einer Zelle direkt zu induzieren oder zu inhibieren durch das direkte Aussetzen der Zelle von Interesse gegenüber dem Agens und dann das Messen der Proliferation der Zelle bestimmt werden.

**[0090]** Die Erfindung liefert ebenfalls Verfahren zum Untersuchen eines Agens auf die Fähigkeit die zelluläre Proliferation indirekt zu induzieren oder zu inhibieren; solche Verfahren umfassen das Aussetzen einer Zelle oder einer Population sich teilender Zellen des Subjektes gegenüber dem Agens und das Messen der Rate der zellulären Proliferation einer zweiten Zelle oder einer zweiten Population von Zellen, die von der ersten Zelle unterschiedlich sind. Zum Beispiel kann die Zelle, die direkt dem Agens ausgesetzt wird, von einem Gewebe des Subjektes stammen, während die Zelle von Interesse von einem zweiten Gewebe stammt. Alternativ kann die Zelle, die direkt dem Agens ausgesetzt wird, einen ersten Typ von Zelllinie umfassen, während die Zelle von Interesse eine zweite Art von Zelllinie umfasst, die von der ersten Zelllinie unterschiedlich ist. Die Fähigkeit des Agens die zelluläre Proliferation indirekt in einer zweiten Zelle von Interesse zu induzieren oder zu inhibieren, wird durch den Nachweis des Einbaus des Markers in die DNA der zweiten Zelle bestimmt. In solchen Verfahren wird die zelluläre Proliferation der zweiten Zelle typischerweise durch den Kontakt oder die Assozierung der zweiten Zelle mit der ersten Zelle – oder dem Produkt der ersten Zelle – die dem Agens ausgesetzt worden ist, vermittelt.

**[0091]** Mit dem Untersuchungsverfahren gemäß der Erfindung kann die zelluläre Proliferation in vitro und in vivo in Tieren und Menschen, wie hierin im Detail für Verfahren gemäß der Erfindung zum Messen der zellulären Proliferation beschrieben, gemessen werden. Die Verbindung oder das Agens können zum Beispiel in vitro an eine Zelle oder ein Gewebe oder in vivo an einen Organismus verabreicht werden, gefolgt von der Messung der zellulären Proliferation.

**[0092]** In einigen Untersuchungsverfahren der Erfindung kann der Marker in einen Vorläufer von Desoxyribose eingebaut werden und der Marker kann eine markierte Glukose umfassen, wie für andere Verfahren gemäß der Erfindung zum Messen der zellulären Proliferation in dieser Anmeldung beschrieben. Zusätzlich wird in einigen solchen Untersuchungsverfahren die DNA zu Desoxyribonukleosiden hydrolysiert und der Marker über Massenspektroskopie nachgewiesen. Ferner kann die DNA, wie in anderen Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation, die supra und infra beschrieben werden, aus einer Reihe von Zellen, einschließlich Zellen, die ein besonders hohes Risiko für Krebs aufweisen (zum Beispiel Brust-, Darm- oder bronchiale Epithelzellen), Lymphozyten, CD4<sup>+</sup> T-Zellen oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen, extrahiert werden.

**[0093]** Untersuchungsverfahren gemäß der Erfindung können entweder einen stabilen, nicht radioaktiven Isotopenmarker oder einen radioaktiven Marker, einschließlich der hierin beschriebenen, die mit den Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation eingesetzt werden, verwenden. Nicht radioaktive, stabile Isotopenmarker sind insbesondere deswegen vorteilhaft, weil sie nicht toxisch sind und daher sicher für die Verwendung in Tieren und Menschen sind, wie in dieser Offenbarung im Detail supra und infra beschrieben.

**[0094]** Die Untersuchungsverfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können verwendet werden, um eine große Auswahl von Verbindungen und Agenzien auf ihre entsprechenden Fähigkeiten die zelluläre Proliferation zu induzieren zu untersuchen. Solche Verbindungen und Agenzien schließen ein, aber sind nicht beschränkt auf zum Beispiel Karzinogene, vermutlich toxische Agenzien, chemische Verbindungen, mutagene Agenzien, Pharmazeutika, Nahrungsmittel, inhalierte Partikel, Lösungsmittel, Partikelstoffe, Gase und giftige Verbindungen im Rauch (einschließlich Zigaretten- und Zigarrenrauch, sowie Rauch der durch industrielle Verfahren erzeugt wird), Nahrungszusatzstoffe, Lösungsmittel, biochemische Materialien, Hormone, Medikamente, Pestizide, Grundwassertoxine, Umweltgifte, Proliferogene, die die zelluläre Proliferation stimulieren, und alle anderen Verbindungen oder Agenzien für die bekannt ist, oder für die vermutet wird, dass sie das Risiko

von Krebs erhöhen. Agenzien, die auf ihre Fähigkeit oder Eignung die zelluläre Proliferation zu verursachen untersucht werden können, schließen ebenfalls ein, aber sind nicht beschränkt auf zum Beispiel Radon, Mikrowellenstrahlung, elektromagnetische Strahlung, elektromagnetische Felder, Strahlung, die durch Mobiltelefone erzeugt wird, Hitze und schädliche Materialien und Bedingungen, die in industriellen oder beruflichen Umgebungen erzeugt werden oder vorhanden sind.

**[0095]** Mit den Untersuchungsverfahren gemäß der Erfindung können die Proliferationsraten von Zellen, die den Agenzien oder Verbindungen von Interesse nicht ausgesetzt wurden, mit den Proliferationsraten von Zellen, die den Agenzien oder den Verbindungen von Interesse ausgesetzt wurden, verglichen werden. Zusätzlich können solche Untersuchungsverfahren verwendet werden, um die Rate der zelluläre Proliferation in einer bestimmten Zelle von Interesse vor und nach Exposition gegenüber einem spezifischen Agens oder einer Verbindung von Interesse, einschließlich den hierin beschriebenen, zu vergleichen.

**[0096]** Wie supra beschrieben, wird der Isotopenmarker, der für die *in vivo* Verwendung geeignet ist, gemäß konventioneller Verfahren aus dem Stand der Technik unter Verwendung einer physiologisch und klinisch annehmbaren Lösung hergestellt. Die richtige Lösung ist abhängig von dem gewählten Verabreichungsweg.

**[0097]** Geeignete Verabreichungswege können zum Beispiel orale, rektale, transmukosale, transkutane oder intestinale Verabreichung; parenterale Abgabe, einschließlich intramuskulärer, subkutaner, intramedullärer Injektionen sowie intrathekaler, direkter intraventrikularer, intravenöser, intraperitonealer, intranasaler oder intrakutaner Injektionen, einschließen.

**[0098]** Alternativ kann man den Marker in einer lokalen anstelle einer systemischen Art und Weise verabreichen, zum Beispiel über die Injektion des Markers direkt in ein spezifisches Gewebe, oftmals in einer Depotformulierung oder einer Formulierung zur verzögerten Freisetzung.

**[0099]** Die Bestimmung einer nachweisbaren Menge des Markers liegt innerhalb der Fähigkeiten des Durchschnittsfachmanns.

#### 5.5 Verfahren zum Bestimmen der Anfälligkeit und Risiken eines Subjektes gegenüber Krankheiten, die die zelluläre Proliferation induzieren oder inhibieren

**[0100]** Die vorliegende Erfindung liefert ebenfalls Verfahren zum Bestimmen oder Messen der Anfälligkeit eines Subjektes, einschließlich Tieren und Menschen, gegenüber einer Krankheit, die die zelluläre Proliferation induziert oder inhibiert. Solche Verfahren umfassen das Aussetzen des Subjektes gegenüber einem Umstand oder einem Agens, der/das die Krankheit verursacht oder stimuliert, und das Messen der Rate der zellulären Proliferation in dem Subjekt über *in vivo* Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation in einer Zelle von Interesse in dem Subjekt, wie hierin und in dieser Anmeldung beschrieben. Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation in einem Subjekt umfassen zum Beispiel das Verabreichen einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers an das Subjekt. Der Marker wird über den *de novo* Nukleotidsyntheseweg in die DNA des Subjekts eingebaut. Der Marker in der DNA einer Zelle von Interesse in dem Subjekt wird nachgewiesen, um die zelluläre Proliferation in der Zelle von Interesse zu bestimmen. Siehe Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation, die im Detail in dieser Anmeldung beschrieben werden.

#### 5.6. Individualisierung einer medizinischen Risikoeinschätzung für eine Krankheit: Personalisierte Risikoabschätzung

**[0101]** In einem anderen Aspekt liefert die vorliegende Erfindung Verfahren zum Bestimmen des Risikos einer einzelnen Testperson für den Erwerb einer bestimmten Krankheit oder eines medizinischen Leidens, das zelluläre Proliferation oder zellulären Abbau einschließt oder induziert. Es ist gut bekannt, dass Individuen sich nicht nur in ihrer Exposition gegenüber Krankheitsrisikofaktoren unterscheiden, sondern ebenfalls auch in ihrer Anfälligkeit gegenüber Risikofaktoren. Gegenwärtige öffentliche Gesundheitsempfehlungen, die die Risikoverringerung betreffen, sind im Allgemeinen eher kollektiv als tatsächlich personalisiert; das heißt, ein Individuum wird gemäß bekannten epidemiologischen Variablen (wie zum Beispiel: kaukasische Frau mit nordeuropäischem ethnischen Hintergrund nach der Menopause mit niedrigem Körpergewicht und zwei Schwangerschaften) klassifiziert und ein statistisches Risiko für eine bestimmte Erkrankung (wie zum Beispiel Brustkrebs, Endometrialkrebs, Osteoporose etc.) wird abgeschätzt. Entscheidungen, die das Krankheitsrisiko und potentielle Vorteile von Präventivmaßnahmen betreffen (wie zum Beispiel die Verwendung von Tamoxifen, um das Brustkrebsrisiko zu senken), sollten idealerweise eher personalisiert als auf statistischen Risiken basiert sein.

**[0102]** In einer Ausführungsform liefert die vorliegende Erfindung Verfahren zum Bestimmen der Anfälligkeit eines Subjektes gegenüber einer Krankheit oder Störung, die die Rate der zellulären Proliferation und/oder des zellulären Abbaus in dem Subjekt verändert oder abwandelt (zum Beispiel die Rate der zellulären Proliferation und/oder des zellulären Abbaus induziert oder inhibiert). Solche Verfahren umfassen das Aussetzen des Subjektes gegenüber einem Umstand oder einem Agens, das die Krankheit oder Störung auslösen kann, das Verabreichen einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers an das Subjekt, wobei der Marker über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA des Subjekts eingebaut wird, und den Nachweis des Markers in der DNA des Subjekts. Das Subjekt kann gegenüber dem Agens oder gegenüber dem Umstand, der die Krankheit oder die Störung hervorruft, in einer solchen Art und Weise ausgesetzt werden, dass das Subjekt nur eine vorübergehende oder milde Form der Krankheit erwirbt, wenn die Krankheit oder Störung die zelluläre Proliferation induziert, deutet ein Anstieg des Markers in der DNA des Subjekts – verglichen zu einer Kontrollanwendung, in der das Subjekt nicht dem Umstand oder dem Agens ausgesetzt wird oder verglichen zu einer Kontrollgruppe von vergleichbaren Subjekten, die dem Umstand oder dem Agens nicht ausgesetzt werden – auf einen Anstieg in der Rate der zellulären Proliferation hin und ist ein Beweis für die Anfälligkeit des Subjekts gegenüber der Krankheit oder Störung. Solche Informationen liefern eine Vorhersage der Anfälligkeit des Subjekts gegenüber dieser Krankheit oder Störung. Entsprechend zeigt die Verlustrate oder die Abnahme des Markers in der DNA des Subjekts eine Veränderung in der Rate des zellulären Abbaus an. Wenn die Krankheit oder Störung den zellulären Abbau induziert, zeigt ein Verlust des Markers in der DNA des Subjekts (zum Beispiel ein schneller Verlust) – verglichen zu einer Kontrollanwendung, in der das Subjekt dem Umstand oder dem Agens nicht ausgesetzt wird oder verglichen mit einer Kontrollgruppe von anderen vergleichbaren Subjekten, die dem Umstand oder dem Agens nicht ausgesetzt werden – einen Anstiegs in der Rate der zellulären Zerstörung und Anfälligkeit des Subjekts gegenüber dieser Krankheit an. Solche Informationen liefern eine Vorhersage des Risikos des Subjekts für solch eine Krankheit oder Störung, die die Rate des zellulären Abbaus erhöht.

**[0103]** Solche Verfahren erlauben die Personalisierung der Risikoeinschätzung des Erwerbs einer Krankheit oder Erkrankung, die veränderte Raten der zellulären Proliferation oder des zellulären Abbaus einschließt, durch das Messen der gegenwärtigen Raten der Zellproliferation und/oder des Zellabbaus in einem einzelnen Subjekt. Diese Verfahren sind nützlich, da sie einem Individuum erlauben wichtige Entscheidungen bezüglich seinem oder ihrem Lebensstil (zum Beispiel Ernährung, Beruf, Gewohnheiten, Medikationen etc.) und/oder medizinischer Interventionen (zum Beispiel Pharmazeutika Hormone, Vitamine etc.) zu treffen. Durch das Messen der spezifischen Anfälligkeit eines Individuums gegenüber einer Krankheit, die veränderten Raten der zellulären Proliferation oder des zellulären Abbaus einschließt, können Entscheidungen die den Lebensstil oder medizinische Behandlungen betreffen auf dem tatsächlichen Risiko eines individuellen Subjekts für den Erwerb einer bestimmten Krankheit basieren – anstelle auf auf kollektiven Risiko-Statistiken für eine allgemeine Population von Individuen zu basieren. Mit solchen Verfahren kann die Wirksamkeit eines medizinischen Eingriffs, eines Eingriffs in den Lebensstil oder ein anderer Eingriff in ein Individuum ebenfalls direkt gemessen anstelle von angenommen werden (zum Beispiel um sicherzustellen, ob eine Intervention, wie zum Beispiel eine Tamoxifentherapie tatsächlich erfolgreich beim Verringern der Proliferation von Brustepithelzellen in einem bestimmten weiblich Subjekt mit einem hohen Risiko für Brustkrebs ist).

**[0104]** Für eine große Auswahl von Krankheiten und Erkrankungen einschließlich denen, die in Teil fünf, supra, und Teil sechs, infra, beschrieben werden, können medizinische Risikoabschätzungen erfolgen. Zum Beispiel sind solche Verfahren gemäß der Erfindung beim Abschätzen des Risikos eines bestimmten Individuums die Staublungen-Krankheit oder Byssinose – eine Berufserkrankung von Arbeitern in Kohleminen – zu erwerben, von Nutzen. Eine der klassischen Beobachtungen hinsichtlich der Pneumokoniose (Staublungenerkrankung) von Kohlenarbeitern ist, dass unter Kohlenarbeitern eine interindividuelle Variabilität in der Anfälligkeit besteht (Balaan et al., 1993, Occup. Med. 8(1): 19–34; Borm et al., 1992, Toxicol. Lett. 64/65: 767–772; Liddell and Miller, 1983, Scand. J. Work Environ. Health. 9: 1–8; Katsnelson et al., 1986, Environ. Health Perspect. 68: 175–185). Die Rate, mit der pulmonäre Veränderungen in Individuen, die Bedingungen ausgesetzt sind, die diese Krankheit verursachen, auftreten, variiert erheblich – einige Leute entwickeln nur mäßigen Husten und Sputumproduktion nach zehn Jahren Staubexposition, während andere Leute schnell fibrotische Lungen, schwere Kurzatmigkeit und niedrigen Blutsauerstoffgehalt entwickeln.

**[0105]** Einige Faktoren, die die Rate des Fortschreitens der Staublungenkrankheit beeinflussen, sind bekannt (zum Beispiel das Rauchen von Zigaretten (Balaan et al., 1993 Occup. Med. 8(1): 19–34)). Aber es ist gegenwärtig nicht möglich hoch anfällige Individuen zu identifizieren. Einige Forscher haben die Wichtigkeit der frühen Identifikation dieser Arbeiter, die beschleunigte Verringerungen der Lungenfunktion besitzen, und die Versetzung von solchen Arbeitern von ihrem Arbeitsplatz betont (Balaan et al., 1993 Occup. Med. 8(1): 19–34). Die Identifikation von anfälligen Individuen ist die ideale Präventivstrategie für jedes öffentliche Gesundheits-

problem, abgesehen von dem Entfernen des verursachenden Agens selbst. Es wird angenommen, dass die Umweltexposition gegenüber dem Agens, das die Staublungenenerkrankung oder verwandte Erkrankungen verursacht, und die individuelle Anfälligkeit (basierend auf genetischen Faktoren, dem Ernährungszustand, Co-Faktoren etc.) gegenüber der Staublungenkrankheit beide erforderlich sind, um die Krankheit hervorzurufen. Die Staublungenkrankheit oder verwandte Erkrankungen verursachen Fibrosen (Lungenvernarbung).

**[0106]** Der übliche finale Weg, der in allen Individuen zu fibrotischen Lungen führt, ist die Aktivierung von Zellen, die für die Vernarbung (Fibroblasten) verantwortlich sind, sich zu teilen und das Protein, das in den Narben enthalten ist (Kollagen), zu produzieren. Solche Lungenschäden können in Menschen mit Risiko direkt unter Verwendung der Verfahren gemäß der Erfindung gemessen werden. Da die Proliferation von Fibroblasten einen zellulären Proliferationsprozess darstellt, ist diese Pathogenese ideal für die Beobachtung oder Verwendung der in vivo Verfahren der vorliegenden Erfindung zum Messen der zellulären Proliferation geeignet. Die Verfahren der vorliegenden Erfindung sind insbesondere in dieser Hinsicht nützlich, da sie einem Arzt oder Forsscher ermöglichen, die zelluläre Proliferationsprozesse in einem Individuum (zum Beispiel einem Kohlenarbeiter) präzise und direkt zu messen – anstelle nach indirekten Anzeichen für die Entwicklung einer Fibrose und der Vernarbung suchen zu müssen und/oder darauf warten zu müssen, dass sich die irreversible Vernarbung über Röntgen oder funktionelle Veränderungen manifestiert.

**[0107]** Die Verfahren zum Bestimmen des Risikos oder der Anfälligkeit eines Subjekts gegenüber einer bestimmten Krankheit oder Erkrankung, die die zelluläre Proliferation einschließt, umfasst typischerweise die Exposition des Subjekts gegenüber einem Agens oder einem Umstand, das/der die Krankheit hervorruft, induziert oder stimuliert, und das Messen der Rate der zellulären Proliferation in dem Subjekt mittels der in vivo Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation, die in dieser Anmeldung beschrieben werden. Eine Einschätzung der Anfälligkeit oder des Risikos des Subjekts eine Staublungenkrankheit zu erwerben, kann zum Beispiel durch das orale Verabreichen einer Markernährösung (das heißtt, einer Lösung, die eine markierte Verbindung enthält, die letztlich in die DNA des Individuums eingebaut wird, wie für andere hierin beschriebene Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation) und dann das Sammeln des Sputums (oder der Lungenwaschungen) bestimmt werden. Der Marker, der in die DNA eingebaut wurde, wird dann nachgewiesen. Dieses Verfahren kann an einem Subjekt sowohl vor der berufsbedingten Exposition (das heißtt, bevor dem Beginn der Arbeit in einer Kohlemine) und nach einer solchen Exposition für einen geeigneten Zeitraum (zum Beispiel sechs Monate) durchgeführt werden. Die Gegenwart von schnell proliferierenden Fibroblasten (Hellerstein and Neese, 1992, Am. J. Physiol. 263: E988–E1001) oder neu synthetisiertem Kollagen (Hellerstein and Neese, 1992, Am. J. Physiol. 263: E988–E1001; Papageorgopoulos et al., 1993, FASEB J. 7(3): A177; Caldwell et al., 1993, Rm.Soc. Mass Spectrom. Conf. p.7) zeigt an, ob Fibrogenese und Gewebsvernarbung aktiv auftraten, bevor sich ein anhaltender und irreversibler Schaden entwickelte.

**[0108]** Die Fähigkeit die Fibroblastenproliferation in den Lungen eines Individuums direkt zu messen ist beim Bestimmen der Anfälligkeit des Individuums gegenüber der Staublungenenerkrankung nützlich. Solche Messungen sind ebenfalls extrem nützlich beim Überwachen oder Sicherstellen der Wirksamkeit von Standardbehandlungstherapien bei Patienten, die an Erkrankungen, wie zum Beispiel der Staublungenkrankheit leiden, oder beim Bewerten der Wirksamkeit neuer Behandlungstherapien (zum Beispiel Antioxidantien, anti-fibrogene Faktoren, Cytokinblocker, etc. (Lapp und Castranova, 1993, Occup. Med. 8(1): 35–56)) für solche Krankheiten. Solche Verfahren der Erfindung bieten verschiedene Vorteile über gegenwärtig verwendete Verfahren; zum Beispiel ist es mit solchen nicht notwendig, auf die Entwicklung von irreversiblen Veränderungen, die über Röntgen nachgewiesen werden können, oder den Verlust an Lungenfunktion zu warten, bevor Anpassungen bei der Behandlungstherapie eines Individuums gemacht werden. Es können daher eher frühe Präventivmaßnahmen anstelle von nachträglichen Antworten bestimmt und eingesetzt werden.

**[0109]** Die Information, die aus solchen Verfahren stammt, würde medizinischen Fachleuten erlauben, Individuen, die gegenüber der Krankheit oder der Erkrankung resistent sind, sowie Individuen, die gegenüber der Krankheit anfällig sind, Hilfe zu bieten. Individuen, die gegenüber der Krankheit oder Erkrankung nicht anfällig sind, könnten angewiesen werden, in der Umgebung weiter zu arbeiten ohne Angst haben zu müssen die Krankheit zu entwickeln, während krankheitsanfälligen Individuen geraten werden könnte, die Arbeitsumstände zu ändern oder einen medizinische Eingriff zu versuchen, der den Lungenschaden verringern oder verhindern könnte (siehe obigen Text).

## 5.7 Radioaktive Isotopenmarker für die Verwendung in Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation

**[0110]** Die vorliegende Erfindung liefert ebenfalls Verfahren zum Messen der zellulären Proliferations- und Abbauraten, die nicht stabile radioaktive Isotopenmarker verwenden, um über den de novo Nukleotidsynthe-

seweg einer Zelle endogen DNA zu markieren. Solche Verfahren umfassen das in Kontakt bringen einer Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines radioaktiven Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, wie zuvor für die Verfahren, die nicht radioaktive, stabile Isotopen verwenden, beschrieben wurde. Der radioaktive Isotopenmarker wird dann in der DNA nachgewiesen, um die Rate der zellulären Proliferation oder des zellulären Abbaus zu bestimmen.

**[0111]** Verfahren, die radioaktive Isotopenmarker verwenden, bieten besondere Vorteile und Verwendungsmöglichkeiten, da solche Marker und die Techniken zum Nachweis solcher Marker oftmals weniger Kosten verursachen als nicht radioaktive, stabile Isotopenmarker und die entsprechenden Techniken zum Nachweis stabiler Isotopenmarker. Zum Beispiel sind Radioaktivitätsmesstechniken zum Nachweis von radioaktiven Markern typischerweise mit weniger Kosten durchzuführen, als die massenspektroskopischen Standardtechniken, die zum Nachweis stabiler Isotopenmarker verwendet werden. Die Erfindung liefert ebenfalls Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation in einer proliferierenden oder einer Zellpopulation, die sich teilt und Nachwuchs erzeugt, die sowohl Radioisotopenmarker und stabile Isotopen verwenden, um über den de novo Nukleotidsyntheseweg endogen DNA zu markieren. Solche Verfahren umfassen das in Kontakt bringen der proliferierenden Zellpopulation mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird. Der stabile Isotopenmarker, der in die DNA eingebaut wurde, wird bestimmt, um die Rate der zellulären Proliferation in der Zellpopulation über die hierin beschriebenen Techniken, einschließlich massenspektroskopischer Techniken, zu bestimmen. Die proliferierende Zellpopulation wird ebenfalls mit einer nachweisbaren Menge eines radioaktiven Isotopenmarkers in Kontakt gebracht, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird. Der radioaktive Isotopenmarker, der in die DNA eingebaut wurde, wird über radioaktive Standardzähltechniken nachgewiesen, um die zelluläre Proliferation in der proliferierenden Zellpopulation zu messen. Die proliferierende Zellpopulation kann zuerst mit entweder dem stabilen Isotopenmarker oder dem radioaktiven Isotopenmarker in Kontakt gebracht werden und, nach dem Einbau eines solchen Markers in die DNA, wird die Menge eines solchen Markers in der DNA gemessen und durch die Nachweisverfahren, die hierin beschrieben werden, bestimmt. Alternativ kann die Zellpopulation in einigen solchen Verfahren gleichzeitig mit dem stabilen und radioaktiven Isotopenmarker in Kontakt gebracht werden und der Nachweis von beiden Isotopen kann gleichzeitig durchgeführt werden.

**[0112]** Verfahren gemäß der Erfindung, die sowohl nicht radioaktive, stabile Isotopenmarker als auch radioaktive Isotopenmarker verwenden, sind nützlich zum Durchführen von Doppelmarkierungsstudien und zum Messen der zellulären Proliferationsraten über einen gewissen Zeitraum – selbst einen kurzen Zeitraum (wie zum Beispiel mehrere Minuten oder Stunden). Bemerkenswerterweise können, weil typischerweise verschiedene Techniken verwendet werden, um radioaktive Isotopenmarker und nicht radioaktive, stabile Isotopenmarker nachzuweisen, die Menge jeder Art von Marker, die in die DNA eingebaut wurde, unabhängig gemessen werden – ohne Risiko, dass die Messung einer Markerart mit der Messung der anderen Art von Marker interferieren könnte.

**[0113]** In einigen Verfahren zum Messen der zellulären Proliferationsraten in einer sich teilenden Zellpopulation unter Verwendung von sowohl stabilen als auch radioaktiven Isotopenmarkern, sind die stabilen und radioaktiven Isotopenmarker jeweils an einen Vorläufer von Desoxyribose in dem de novo Nukleotidsyntheseweg gebunden. Jeder Vorläufer wird dann in die Desoxyribose der DNA eingebaut. In einer bevorzugten Ausführungsform umfassen der stabile Isotopenmarker und der radioaktive Isotopenmarker jeweils markierte Glukose.

**[0114]** Zum Beispiel wird in einer Ausführungsform eine Messung der Basislinie der zellulären Proliferation erst nach dem in Kontakt bringen einer Zelle mit einer nachweisbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, durchgeführt. Die Messung der zellulären Proliferation wird dann nach dem in Kontakt bringen der Zelle mit einem radioaktiven Isotopenmarker, der ebenfalls über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, wiederholt. Auf diese Weise wird eine Veränderung in der Rate der zellulären Proliferation über die Zeit bestimmt, ohne Interferenz oder Verunreinigung mit dem anfänglichen, mit einem stabilen Isotop markierten Material. Ferner kann die zweite zelluläre Proliferationsmessung, die radioaktive Isotopenmarker verwendet, kurz nach der ersten zellulären Proliferationsmessung durchgeführt werden, ohne darauf zu warten, dass der stabile Isotopenmarker aus dem System entfernt oder herausgewaschen wird, weil kein Risiko besteht, dass der stabile Isotopenmarker mit einer genauen Messung des radioaktiven Markers interferiert. Die DNA, in die der stabile Isotopenmarker eingebaut wurde, und/oder die DNA, in die der radioaktive Isotopenmarker eingebaut wurde, können vor dem Nachweis des Markers in der DNA zu Desoxyribonukleosiden hydrolysiert werden oder sie können in intakten DNA-Polymeren nachgewiesen und gemessen werden.

**[0115]** Die zellulären Proliferationsraten einer Reihe von proliferierenden Zellpopulationen, einschließlich Krebszellen und Lymphozyten (zum Beispiel CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup>-Zellen) etc., können mittels dieser Verfahren gemessen werden.

**[0116]** In den Verfahren gemäß der Erfindung, die radioaktive Isotopenmarker verwenden, kann der Einbau des radioaktiven Markers in die DNA einer Zelle mit einer Reihe von gut bekannten Techniken, einschließlich Radioaktivitätsmesstechniken, wie zum Beispiel Szintillationszählung in einer Flüssigkeit oder Gammazählung und Beschleunigungsmassenspektroskopie, gemessen werden. Beschleunigungsmassenspektroskopie ist insbesondere beim Messen des Einbaus von bestimmten radioaktiven Markern (wie zum Beispiel <sup>14</sup>C) in zelluläre DNA nützlich. Bemerkenswerterweise kann die Beschleunigungsmassenspektroskopie nicht verwendet werden, um den Einbau von stabilen Isotopenmarkern (zum Beispiel <sup>13</sup>C-Einbau) in die zelluläre DNA zu messen. Obwohl die Beschleunigungsmassenspektroskopie typischerweise teuer ist, erlaubt sie den Nachweis von extrem geringen Mengen des Einbaus von Radioisotopen (z. B. insbesondere <sup>14</sup>C-Einbau) in die zelluläre DNA. Angesichts der Tatsache, dass mittels dieser Art von Technik extrem geringe Mengen eines radioaktiven Markers (z.B. <sup>14</sup>C) in der DNA nachgewiesen werden können, müssen nur kleine Mengen an radioaktiven Marker verwendet werden, was die potentiellen Toxizitäten, die mit einem solchen Marker verbunden sind, verringert oder beseitigt. In Verfahren, die sowohl radioaktive als auch stabile Isotopenmarker verwenden, kann der stabile Isotopenmarker über gut bekannte Standardtechniken, einschließlich Massenspektroskopie, wie für die anderen Verfahren gemäß der Erfindung beschrieben, nachgewiesen werden.

**[0117]** Radioaktive Isotopenmarker, die für die Verwendung in den Verfahren gemäß der Erfindung geeignet sind, sind dem Durchschnittsfachmann bekannt. Beispiele schließen Tritiummarkiertes Thymidin (<sup>3</sup>H-dT) und Bromdesoxyuridin (BrdU) (Waldman et al., 1991, Modem Pathol. 4: 718–722; Gratzner, 1982, Science 218: 474–475) ein. Solche radioaktiven Isotopenmarker können, wie supra für die stabilen Isotopenmarker beschrieben, gemäß konventionellen Verfahren aus dem Stand der Technik und die Verwendung einer physiologisch und klinisch annehmbaren Lösung hergestellt werden. Die richtige Lösung ist abhängig von dem gewählten Verabreichungsweg.

**[0118]** Verfahren zum Markieren eines Vorläufers der DNA, wie zum Beispiel Desoxyribose, mit einem radioaktiven Isotopenmarker und der Einbau eines solchen radioaktiven Isotopenmarkers in die DNA über den de novo Nukleotidweg sind analog zu denen, die hierin mit Bezug auf Verfahren zum Messen der zellulären Proliferation und des zellulären Abbaus beschrieben werden, und wie sie für den Durchschnittsfachmann basierend auf der hierin bereit gestellten detaillierten Offenbarung offensichtlich sind.

**[0119]** Die Bestimmung einer nachweisbaren Menge von entweder dem radioaktiven Isotopenmarker oder dem stabilen Isotopenmarker liegt innerhalb der Fähigkeiten des Durchschnittsfachmanns.

**[0120]** Die vorliegende Erfindung wird ferner durch die folgenden Beispiele veranschaulicht. Es ist beabsichtigt, dass diese Beispiele Aspekte der vorliegenden Erfindung illustrieren und nicht Beschränkungen dieser Erfindung darstellen.

## 6. BEISPIELE: MESSUNG DER ZELLPROLIFERATION DURCH DAS MARKIEREN DER DNA MIT GLUKOSE, DIE MIT STABILEN ISOTOPEN MARKIERT IST

### 6.1. Materialien und Methoden

#### 6.1.1. Isolation von Desoxyribonukleosiden aus der DNA

**[0121]** Die DNA wurde aus Zellen oder Geweben durch Phenol-Chloroform-Isoamyl Alkoholextraktion aus Zellsuspensionen oder Gewebshomogenaten hergestellt. Die Ausbeute und Reinheit wurden über die optische Dichte bestätigt. Nach der Hitzedenaturierung wurde DNA durch sequentiellen Verbau mit Nuklease PI, Phosphodiesterase und alkalischer Phosphatase, wie von Crain et al. (Crain, 1990, Methods Enzymol. 193: 782–790) beschrieben, enzymatisch zu Desoxyribonukleosiden hydrolysiert. Die Nukleosidausbeute und -reinheit wurden über HPLC unter Verwendung einer C-18 Säule und einem Wasser-Methanolgradienten bestätigt (Shigenaga et al., 1994, Methods Enzymol. 234: 16–33).

#### 6.1.2. Derivatisierung von Desoxyribonukleosiden und Analyse mittels Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC-MS)

**[0122]** Trimethylsilylderivate von Nukleosiden wurden durch Inkubation von lyophilisierten Hydrolysaten mit

BSTFA: Pyridin (4:1) bei 100°C für 1 Stunde synthetisiert. Die Proben wurden mittels GC-MS (DB-17 HT-Säule, J&W Scientific, Folsom CA; HP 5890 GC und 5971MS, Hewlett Packard, Palo Alto, CA) analysiert. Die Häufigkeiten von Ionen bei dem Masse zu Ladungs-Verhältnis (m/z) 467 und 469 wurden mittels des „selected ion recording“-Modus für Desoxyadenosin (dA) quantifiziert; und m/z 555 und 557 wurden für Desoxyguanosin (dG) gemessen. Unter den verwendeten Derivatisierungs- und GC-MS-Bedingungen ergaben die Purine (dA und dG) größere Signale (Fig. 3) als die Pyrimidine, was zu einer größeren Sensitivität und einem höheren Signal-Rausch-Verhältnis führte. Um die Anreicherung von Glukose zu messen, wurden Plasma oder Kulturmedium mit Perchlorsäure deproteinisiert und über Anionen- und Kationenaustauschersäulen gegeben (Neese et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 14452–14463). Das Glukosepentaacetatderivat wurde durch Inkubation mit Essigsäureanhydrid in Pyridin gebildet. Die GC-MS-Analyse wurde wie zuvor beschrieben (Neese et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 14552–14663), mittels des Überwachens von m/z 331 und 333 bei „selected ion recording“ durchgeführt.

#### 6.1.3. In vitro Studien

**[0123]** Anfängliche Studien des Markereinbaus aus [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose in die zelluläre DNA wurden in Gewebekulturzelllinien durchgeführt. Zwei Zelllinien wurden verwendet: eine Hepatozytenzelllinie, HepG2, und eine lymphozytische Zelllinie, H9, bei der es sich um eine CD4<sup>+</sup> T-Zelllinie handelt. Die HepG2-Zellen wurden in 10 ml Schälchen mit alphamodifizierten Dulbecco's Minimum Essential Medium (MEM) wachsen gelassen. Die H9 Zellen wurden in Suspension in RPMI 1640 wachsen gelassen. Beide wurden in Gegenwart von 10% dialysiertem fötalem Kälberserum und Antibiotika wachsen gelassen (alle Reagenzien wurden von Gibco-BRL, Gaithersburg, MD, erhalten, außer wo anders angegeben). In beiden Fällen wurde die Anzahl an vorhandenen Zellen über das Zählen eines Aliquots auf einem Coulter ZM0901 Zellzähler gemessen. Für HepG2 Zellen wurde die Ausplattierungseffizienz durch das Zählen einer identischen Platte zu Beginn jeder Markierungsphase korrigiert. Die Zellen wurde durch Zugabe von [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose (Cambridge Isotopen Laboratorien, Andover, MA) markiert, so dass die markierte Glukose 10 bis 20 Gewichtsprozent der gesamten vorhandenen Glukose (100 mg/L für MEM-a und 200 mg/L für RPMI 1640) ausmachte. In einigen Experimenten wurde glukosefreies Medium verwendet und es waren nur 100 markierte Glukose in dem Medium vorhanden. Zusätzliche Experimente wurden in Gegenwart von [U-<sup>13</sup>C<sub>6</sub>] Glukose und [2-<sup>13</sup>C<sub>1</sub>] Glycerin (Cambridge Isotopen Laboratorien, Andover, MA) durchgeführt.

#### 6.1.4. Tierstudien

**[0124]** Vier Ratten (ungefähr 2508) wurden mit markierter Glukose infundiert. Intravenöse Kanülen wurden unter Betäubung platziert (Hellerstein et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 7044–7048). Nach einer 24–48-stündigen Erholungsphase, wurde [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose als eine sterile 46 mg/ml Lösung mit 0,5 ml/h für ungefähr 24 Stunden infundiert. Zu Beginn der Isotopeninfusion wurde das Futter entfernt. Es wurde, basierend auf früheren Studien in hungernden Ratten (Neese et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 14452–14463), erwartet, dass diese Dosis durchschnittliche Plasmaglukoseanreicherungen von ungefähr 10% erzielt. Am Ende der Infusionsperiode, wurden die Tiere getötet. Vor der Analyse wurde Blut für die Plasmaglukoseanreicherung und Gewebe für die DNA-Extraktion gesammelt und eingefroren. Ein ungefähr 30 cm langer Teil des Darms wurde der Ratte direkt unter dem Duodenum entnommen. Die Darmsegmente wurden umgestülpt und gewaschen. Die Epithelzellen wurden aus der Submucosa durch Inkubation in Puffer, der 5 mM EDTA enthielt, unter Schütteln bei 37°C für 10 Minuten freigesetzt, wie von Traber et al. beschrieben (Traber et al., 1991, Am. J. Physiol. 260: G895–G903). Die DNA wurde aus den Zellpräparaten extrahiert, dann zu den Nukleosiden hydrolysiert und mittels GC-MS analysiert (Fig. 2).

#### 6.1.5. Studien der Granulozyten-Kinetiken in menschlichen Subjekten

**[0125]** Um die Anwendung der Verfahren gemäß der Erfindung unter klinischen Bedingungen zu untersuchen, erhielten vier Freiwillige im General Clinical Research Center in San Francisco General Hospital intravenöse Infusionen von [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose (60 g über 48 Stunden). Ein Subjekt war ein gesunder normaler Freiwilliger, die anderen drei waren HIV seropositive Männer, die an einer kinetischen Studie von Lymphozyten (Blut CD4 T-Zellzählungen im Bereich 215–377/mm<sup>3</sup>) teilnahmen. Keiner hatte zum Zeitpunkt der intravenösen Infusion eine klinisch sichtbare Infektion. Um hohe und relative konstante Anreicherungen von Plasmaglukose zu ermöglichen und die Markierung der zellulären DNA zu maximieren, wurden die Kohlenhydrate in der Ernährung während der zweitägigen Infusionsperiode beschränkt (mittlere Aufnahme 46 g/Tag). Eine heparinierte Probe wurde zur Abschätzung der Plasmaglukoseanreicherung zu Beginn und während der Infusion alle zwölf Stunden entnommen. Nach 48-stündiger Infusion wurde täglich über 10 Tage Blut entnommen und Granulozyten und mononukleäre Zellen durch Gradientenzentrifugation getrennt (Vacutainer CPT, Becton Dickin-

son, Franklin Lakes, NJ). Die Granulozyten-DNA wurde extrahiert, zu Nukleosiden hydrolysiert und mittels GC-MS analysiert, wie in Teil 6.1.2., supra, beschrieben. Alle Verfahren wurden zuvor von dem Komitee für humane Forschung der Universität von Kalifornien in San Francisco und dem Komitee für den Schutz von menschlichen Subjekten der Universität von Kalifornien in Berkeley erlaubt, und für alle durchgeführten Verfahren die schriftliche Einwilligungserklärung des Subjekts erhalten.

## 6.2. Ergebnisse

### 6.2.1. Entwicklung eines analytischen Verfahrens

**[0126]** Die Derivatisierung ist erforderlich, um Desoxyribonukleoside für die GC-MS Analyse zu verdampfen (Blau and Halket, 1993, Handbook of Derivates for Chromatography 2nd ed.). Verglichen mit der Methylierung oder Acetylierung wurden die höchsten Mengen mit TMS-Derivatisierung beobachtet. Es sind die GC-MS Aufnahmen einer typischen TMS-derivatisierten Probe, die mittels Elektronenstoßionisation analysiert wurde, gezeigt ([Fig. 3](#)). dA und dG, die von der GC-Säule eluiert wurden, zeigen gut definierte Signale. Wie zuvor beschrieben (McCloskey, 1990, Methods Enzymol. 193: 825–841), sind die dominanten Ionen in den Spektren die von dem Basenrest, der nicht mit  $[6,6-^2\text{H}_2]$  Glukose markiert wurde. Die Vorgängerionen, m/z 467 und 557 für dA-TMS<sub>3</sub> und dG-TMS<sub>4</sub>, waren gut vorhanden und lagen in einer Region des Massenspektrums mit wenig Hintergrund. Markierte Proben enthielten einen Überschuss der M + 2 Ionen 469 und 557; für die Quantifizierung wurden die Verhältnisse von 469 zu 467 und 557 zu 559 verwendet.

**[0127]** Die Mengensensitivität von Isotopenverhältnissen (Konzentrationsabhängigkeit) wurde für dA und dG, wie für GC-MS beschrieben (Neese et al., 1995, J. Biol. Chem. 270: 14452–14463; Patterson and Wolfe, 1993, Biol. Mass Spectrom. 22: 481–486) beobachtet. Wenn die Isotopenanreicherungen berechnet wurden, wurden die Proben daher immer bei Mengen analysiert, die den in den Standards entsprachen, die für die Grundliniensustraktion (natürliche Häufigkeit) verwendet wurden. In angereicherten Proben waren wie erwartet die gemessenen Anreicherungen von dA nicht signifikant unterschiedlich zu dG. Unten sind nur Daten von dA gezeigt.

### 6.2.2. In vitro Zellproliferationsstudien

**[0128]** Die Anreicherung von dA aus Zellen, die aus Medium, das 10–15%  $[6,6-^2\text{H}_2]$  Glukose enthielt, stammten, stieg mit der Zeit progressiv an ([Fig. 4A](#) und [Fig. 4B](#)). Das wurde sowohl für eine Hepatozyten-Zelllinie (HepG2), die als Monoschicht auf Platten wachsen gelassen wurden, als auch für eine lymphozytische T-Zelllinie (H9), die in Suspension wachsen gelassen wurde, gezeigt. Verglichen mit der Anzahl von Zellen, die durch direkte Zählung gemessen wurden, korrelierte die dA Anreicherung stark mit dem Anstieg der Zellen, der durch direkte Zählung bestimmt wurde ([Fig. 4C](#) und [Fig. 4D](#)). Der Korrelationskoeffizient zwischen dem Anteil neuer DNA (berechnet aus dem Verhältnis der Anreicherung von M2 in dA zu Mediumglukose) und dem Prozentsatz an neuen Zellen, der durch direkte Zählung bestimmt wurde, betrug 0,984 für HepG2-Zellen und 0,972 für H9-Zellen.

**[0129]** Die Anreicherung des tatsächlichen intrazellulären dATP Vorläuferpools für die DNA-Synthese unter der Verwendung wachsender Zellen, war in der Theorie gleich zu der dA Anreicherung in der DNA bei 100% neuen Zellen (d.h. wenn nur markierte DNA vorhanden war). Extrapolation der Zeitverlaufsexperimente der Markierung auf 100 neue Zellen ergab geschätzte Plateau-dA Anreicherungen von 0,725 der Mediumglukose-Anreicherung für HepG2 Zellen und 0,525 für H9-Zellen ([Fig. 4A–Fig. 4D](#)).

**[0130]** Um direkt das Verhältnis zwischen der Anreicherung von extrazellulärer Glukose und intrazellulären DNA-Vorläufern zu testen, wurden die Zellen für längere Zeiträume in Medium, das 100  $[6,6-^2\text{H}_2]$  Glukose enthielt, mit wiederholtem Umplattieren oder Subkultivieren von Zellen, für insgesamt 53 Tage im Fall von HepG2-Zellen und 25 Tage im Fall von H9-Zellen wachsen gelassen. Am Ende des Experiments konnten weniger als 0,1% der vorhandenen DNA als in den anfänglich unmarkierten Zellen enthalten ausgewiesen werden. Die maximale Anreicherung von dA betrug für sowohl HepG2 als auch H9-Zellen ungefähr 65% ([Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#)). Eine mögliche Erklärung für diese Verdünnung der extrazellulären markierten Glukose könnte die Synthese von Glukose innerhalb der Zelle, zum Beispiel durch Glukoneogenese (GNG), sein, da unmarkierte Aminosäure-Vorläufer für GNG im Kulturmedium vorhanden waren. Alternativ könnte etwas Austausch des Markers während des intrazellulären Metabolismus der Glukose, entweder während der Glykolyse oder der Passage durch den Tricarbonsäurezyklus oder während der dem nicht-oxidativen Teil des Pentosephosphatwegs, stattgefunden haben (Wood et al., 1963, Biochemische Zeitschrift 338: 809–847).

**[0131]** Wenn die intrazelluläre unmarkierte Glukose aus GNG der Hauptursprung der Verdünnung war, könnte sich dA aus H9-Zellen den 100% der Mediumglukoseanreicherung eher annähern als dA aus HepG2-Zellen. Es wurde jedoch gefunden, dass das nicht der Fall ist ([Fig. 4A](#)–[Fig. 4D](#), [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#)). Ein direkter Test wäre der Einbau von GNG-Vorläufern in dA der DNA durch HepG2-Zellen. Um diese Hypothese zu testen, wurden sowohl HepG2 als auch H9 in Gegenwart von [ $2\text{-}^{13}\text{C}_1$ ] Glycerin kultiviert. Durch das Anwenden der Theorie kombinatorischer Möglichkeiten oder der Verteilungsanalysentechnik von Massenisotopen (MIDA) (Neese et al., 1995, *J. Biol. Chem.* 270: 14452–14463; Hellerstein et al., 1992, *Am. J. Physiol.* 263: E988–E1001) konnte der Teil von Desoxyribose in dA, der aus der GNG stammte, dann berechnet werden. Wenn HepG2-Zellen in Medium wachsen gelassen wurden, zu dem [ $2\text{-}^{13}\text{C}_1$ ] Glycerin mit einer Konzentration von 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$  zugegeben wurde, wurde ein vernachlässigbarer Einbau von  $^{13}\text{C}$  in dA gefunden. In Gegenwart von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  [ $2\text{-}^{13}\text{C}_1$ ] Glycerin (ungefähr 2–3 Mal Plasmaglycerinkonzentration) wurde die Anreicherung von sowohl  $M_{+1}$  als auch  $M_{+2}$  Ionen in dA beobachtet. Die Anwendung von MIDA zeigte, dass 17,8 der dA Pentoseringsynthese von GNG anstelle aus der Verwendung extrazellulärer Glukose zu stammen schienen. H9-Zellen, die in Gegenwart von 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$  [ $2\text{-}^{13}\text{C}_1$ ] Glycerin wachsen gelassen wurden, zeigten wie erwartet keine messbare GNG.

**[0132]** Doppelte Paare von Zellkulturen wurden ebenfalls in Gegenwart von 10% [ $6,6\text{-}^2\text{H}_2$ ] Glukose mit und ohne die Zugabe von unmarkiertem Glycerin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) wachsen gelassen. So ein unmarkiertes Glycerin beeinflusste die Markierung in H9-Zellen nicht; in HepG2-Zellen war der Einbau in dA um 7% reduziert. Es scheint somit, dass die Verfügbarkeit von GNG-Vorläufern nur eine geringe Auswirkung auf die Markierung von DNA in Zellen hat, die zu GNG in der Lage sind, und dass GNG die intrazelluläre Verdünnung von dA nicht vollständig erklärt.

**[0133]** Wenn die ungefähr 35% Verdünnung zwischen extrazellulärer Glukose und dA in DNA auf den Austausch von  $^2\text{H}$  gegen  $^1\text{H}$  in intrazellulären Glukosezyklen zurückzuführen waren, sollte der Kohlenstoffmarker in [ $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ ] Glukose eine Umordnung durchlaufen. Dementsprechend wurden HepG2 und H9-Zellen in Gegenwart von 10% [ $\text{U-}^{13}\text{C}_6$ ] Glukose wachsen gelassen. Wenn es keinen Metabolismus über Wege, wie zum Beispiel den nicht oxidativen Teil des Pentosephosphatweges gibt, sollten die dNTP's aus diesem Vorläufer alle fünf markierten Kohlenstoffatome beibehalten und die Masse von  $M_5$  besitzen. Die  $M_5$ -Anreicherung erhöhte sich in einer ähnlichen Art und Weise wie die, die mit dem  $M_2$ -Ion aus [ $6,6\text{-}^2\text{H}_2$ ] Glukose beobachtet wurde. In HepG2-Zellen wurde eine Asymptote von ungefähr 80% der extrazellulären Anreicherung erreicht ([Fig. 6A](#) und [Fig. 6B](#)), während in H9-Zellen die Asymptote ungefähr 60% der extrazellulären Glukoseanreicherung betrug. Wenn das  $M_0$  bis  $M_5$ -Spektrum analysiert wurde, wurden Anreicherungen von  $M_2$ ,  $M_3$ , und  $M_4$  Ionen zusätzlich zu der erwarteten Anreicherung von  $M_5$  gefunden. Dieses Phänomen wurde sowohl in H9 als auch HepG2-Zellen beobachtet, obwohl die relativen Mengen dieser Ionen in H9-Zellen größer waren.

**[0134]** Die obigen Zellkultur-Experimente wurden in Abwesenheit von Desoxyribonukleosiden im Medium durchgeführt. Frühere Studien mit Lymphozyten-Zelllinien (Reichard, 1978, *Fed. Proc.* 37: 9–14; Reichard, 1988, *Ann. Rev. Biochem.* 57: 349–374) haben vermuten lassen, dass das Erhöhen der Verfügbarkeit von extrazellulären Desoxyribonukleosiden die Aktivität von Ribonukleosidreduktase und den endogenen Syntheseweg für Purin dNTP's nicht verringert, sondern sogar erhöhen kann ([Fig. 1](#)). Um direkt die Wirkungen der erhöhten Verfügbarkeit von extrazellulären Desoxyribonukleosiden zu testen, wurden HepG2 und H9-Zellen in Gegenwart einer äquimolaren Mischung der vier Desoxyribonukleoside wachsen gelassen. Zwei Konzentrationen, 20 und 100  $\mu\text{M}$ , wurden ausgewählt, um die im Gewebe vorhandenen Konzentrationen wiederzugeben oder zu übertreffen; Plasmakonzentrationen liegen normalerweise im Bereich von 1  $\mu\text{M}$  und Gewebskonzentrationen können von 1 bis 100  $\mu\text{M}$  reichen (Cohen et al., 1983, *J. Biol. Chem.* 258: 12334–12340). Sechs Flaschen H9-Zellen wurden parallel in Medium, das mit circa 10% [ $6,6\text{-}^2\text{H}_2$ ] Glukose markiert war, wachsen gelassen (Tabelle 2).

Tabelle 2

Wirkung von extrazellulären Desoxyribonukleosiden auf den Einbau von [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose in dA in DNA

	Extrazelluläre					
	Desoxyribonukleosidkonzentration (μM)					
Lymphozyten (H9)	0	0	20	20	100	100
dA/Glukose Verhältnis	0,527	0,522	0,535	0,528	0,534	0,514
Anteil neuer Zellen (durch Zählen)	0,849	0,851	0,867	0,856	0,839	0,822
Extrapoliert dA/Glukose (100% neue Zellen)	0,620	0,613	0,617	0,617	0,637	0,626
Hepatozyten (Hep2G)						
dA/Glukose Verhältnis	0,386	0,385	0,381	0,370	0,339	0,344
Anteil neuer Zellen (durch Zählen)	0,568	0,589	0,536	0,565	0,626	0,570
Extrapoliert dA/Glukose (100% neue Zellen)	0,680	0,653	0,711	0,655	0,541	0,603

**[0135]** Zwei wurden ohne zugegebene Desoxyribonukleotide wachsen gelassen, zwei wurden bei der niedrigeren und zwei wurden bei der höheren Desoxyribonukleosid-Konzentration wachsen gelassen. Nach 90 Stunden, waren gemäß Zählung 85% der Zellen neu. Das Experiment wurde ebenfalls mit HepG2-Zellen durchgeführt, und ergab einen durchschnittlichen Anstieg in der Zellzahl, was ungefähr 58% neuen Zellen entspricht. In H9-Zellen verringerte die Gegenwart von extrazellulären Desoxyribonukleosiden bei entweder 20 oder 100 μM nicht den Einbau des Markers aus der Glukose in dA und schien somit die Aktivität des de novo Nukleotidsynthesewegs nicht zu unterdrücken. In HepG2-Zellen gab es keine merkbare Verringerung beim Einbau bei 20 μM, obwohl es eine kleine (ca. 12%) Verringerung bei 100 μM gab. In H9-Zellen war das extrapolierte Verhältnis von dA/Glukose bei 100% neuen Zellen (basiert auf der Zählung der Zellen) reproduzierbar zwischen 62 und 64%. Für HepG2-Zellen lag das Verhältnis zwischen 54 und 71%.

#### 6.2.3. In vivo Markierung der DNA: Tierstudien

**[0136]** In Ratten (n = 4), die eine intravenöse Infusion von [6,6-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>] Glukose erhielten, betrug die Plasmaglukoseanreicherung beim Töten der Tiere 13,2 ± 0,9%. Die mittlere Plasmaglukose-Anreicherung über die gesamte 24-stündige Infusionsperiode war geringer als dieser Wert, da die Plasmaglukoseanreicherung während dem Fasten progressiv anstieg, während die Ra Glukose progressiv fiel (Rocha et al., 1990, Eur. J. Immunol. 20: 1697–1708). Die mittlere Plasmaglukoseanreicherung wurde von zwei Ratten, die eine Infusion mit markierter Glukose erhielten, und denen wiederholt über einen arteriellen Zugang zur Blutentnahme Blutproben entnommen wurden, geschätzt. Die mittlere Anreicherung für die 24-stündige Fastenperiode betrug 0,70 der Gesamtanreicherung; daher wurde dieser Wert zum Berechnen der mittleren Glukoseanreicherung für die vier experimentellen Ratten verwendet (9,2 ± 0,6%).

**[0137]** In den drei studierten Geweben wurden unterschiedliche Anreicherungen von dA gefunden (Tabelle 3).

**Tabelle 3**  
**In vivo Einbau von [ $6,6\text{-}^2\text{H}_2$ ] Glukose in dA in DNA in verschiedenen Geweben in Ratten**

Gewebe	dA-Anreicherung (%)	Prozent neue Zellen		Umwandlungszeit (s)		Ratenkonstante K( $\text{d}^{-1}$ )		$t_{1/2}$ (d)
		Unkorrigiert	Korrigiert	Unkorrigiert	Korrigiert	Unkorrigiert	Korrigiert	
Darmepithel	3.18 $\pm$ 0.24	34.6 $\pm$ 4.2	53.2 $\pm$ 6.5	2.83 $\pm$ 0.37	1.84 $\pm$ 0.24	--	--	--
Thymus	2.33 $\pm$ 0.08	25.3 $\pm$ 2.2	38.9 $\pm$ 3.1	--	--	0.302 $\pm$ 0.030	0.51 $\pm$ 0.058	2.31 $\pm$ 0.23
Leber	0.25 $\pm$ 0.06	2.7 $\pm$ 0.5	4.2 $\pm$ 0.9	--	--	0.028 $\pm$ 0.005	0.044 $\pm$ 0.008	25.4 $\pm$ 4.9

Die mittlere Plasmaglukoseanreicherung betrug 9.2  $\pm$  0.6% und die mittlere Dauer der Infusion betrug 23.2  $\pm$  0.1 Stunden. Nichtkorrigierte Berechnungen verwenden Plasmaglukoseanreicherungen als Vorläufer für die DNA Synthese; korrigierte Berechnungen verwenden einen Korrekturfaktor 0,65 \* Plasmaglukoseanreicherung, um die Verdünnung in dem intrazellulären Vorläufer (siehe Text) zu berücksichtigen. Ein lineares kinetisches Modell wurde für Darmepithel verwendet; ein exponentielles Modell wurde für Thymus und Leber verwendet.

**[0138]** Für Darmepithelzellen wurde basierend auf der Annahme, dass neue Zellen sich teilen, für einen bestimmten Zeitraum leben und dann in der Reihenfolge absterben, in der sie gebildet wurden, was das Fortschreiten der Darmepithelzellen von der Krypte zur Zottenspitze repräsentiert, ein (lineares) kinetisches Modell der Lebensdauer verwendet (Lipkin, 1987, Physiol. Gastrointest. Tract, pp. 255–284, Ed. Johnson, L.R.). Es wurde eine Umsatzzeit von 2,8  $\pm$  0,4 d berechnet (unkorrigiert, unter Verwendung der Plasmaglukoseanreicherung um intrazelluläres dATP darzustellen) oder 1,8  $\pm$  0,2 d (korrigiert unter Verwendung der Plasmaglukose mit einem 35%igen intrazellulären Verdünnungsfaktor). Für Thymus und Leber wurde ein „random replacement“

Modell (exponentiell) angewandt. Der Thymus hatte einen 10-fach schnelleren Umsatz als die Leber (Tabelle 3).

#### 6.2.4. Klinische Studien der Granulozyten-Kinetiken in menschlichen Subjekten

**[0139]** Als Teil einer Studie der Kinetiken von T-Lymphozyten in AIDS, erhielten drei HIV seropositive Männer und ein HIV seronegativer Mann eine Infusion von  $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$  Glukose (1,25 g/hr für 48 Stunden). Alle waren zum Zeitpunkt der Untersuchung klinisch stabil. Die absoluten Granulozytenzählungen betrugen 1,5, 0,9 und  $2,4 \cdot 10^9/\text{Liter}$  in den HIV positiven Subjekten und  $2,4 \cdot 10^9/\text{Liter}$  im Kontrollsubjekt. Die Infusionen wurden gut vertragen. Die mittleren Plasmaglukoseanreicherungen von  $15,3 \pm 2,4$  Molprozent Überschuss wurden erzielt (Auftauchrate der Glukose von 2 mg/kg/min). Die Granulozyten wurden isoliert und die dA-Anreicherung in der DNA gemessen. Für die ersten sechs Tage nach der Infusion wurden sehr niedrige Anteile an markierten Zellen im Kreislauf gefunden (Fig. 7), gefolgt von dem Auftauchen von markierten Zellen beginnend an den Tagen 6–8.

**[0140]** Die Anreicherungen an Tag 8 zeigten, dass ungefähr 25% neue Zellen vorhanden waren (korrigiert).

#### 6.2.5. Messung der T-Zellproliferation bei der HIV-Infektion

**[0141]** Die T-Zellproliferationsraten in Individuen, die mit dem Humanimmunschwächevirus (HIV) infiziert waren, wurden gemäß dem Verfahren der Erfindung gemessen. Eine intravenöse Infusion mit  $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$  Glukose wurde in Männern mit gut aufrecht erhaltenen CD4<sup>+</sup> T-Zellzahlen ( $> 500/\text{mm}^3$ ) oder niedrigen CD4<sup>+</sup> Zahlen ( $< 200/\text{mm}^3$ ) durchgeführt. Die Infusion erfolgte über 48 Stunden mit 1,25 g  $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$  Glukose/hr, um 10–15% Anteil an markierten Glukosemolekülen im Blutplasma (10–15% Anreicherung) zu erzielen. Während der Infusion und über die folgenden 10 Tage wurde täglich Blut (20–30 cc) entnommen.

**[0142]** Mononukleare Zellen wurden unter Verwendung von PT®-Röhrchen isoliert; und die CD4<sup>+</sup> Zellen wurden dann entweder unter Verwendung von Immuntrennung über magnetische Kugelchen (Dynabeads®) oder fluoreszenzaktiviertes Zellsortieren isoliert, um  $10^6$  Zellen zu isolieren. Die DNA aus isolierten Zellen wurde unter Verwendung eines kommerziellen Kits (Quiagen®) gewonnen. Die DNA wurde enzymatisch mit Nukleare P<sub>1</sub>, Phosphodiesterase und alkalischer Phosphotase zu den freien Desoxyribonukleosiden hydrolysiert; das Hydrolysat wurde mit FSTFA zu den Trimethylsilylderivaten der Desoxyribonukleoside derivatisiert, die in ein Tisch GC-MS Instrument injiziert wurden. Die dA und dG Signale aus dem GC-Abfluss wurden mittels „selected ion recording“-Massenspektroskopie überwacht und m/z 467 und 469 (für dA) und m/z 555 und 557 (für dG) durch den Vergleich mit Standardkurven von kommerziell markiertem Material, das gleichzeitig analysiert wurde (zum Beispiel  $[5,5\text{-}^2\text{H}_2]$  dA erworben von CIL, Cambridge, MA), quantifiziert. Standardkurven wurden bezüglich der Mengen zwischen Standards und Proben angepasst, um die Konzentrationssensitivität der Isotopenverhältnisse zu korrigieren. Die Anreicherungen von dA und dG aus CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen lagen im Bereich von 0,00 bis 1,50% markierter Spezies. Durch den Vergleich mit der Plasmaglukoseisotopenanreicherung (10–15% markierte Spezies) mit einer 35% Verdünnungskorrektur und Anwendung des Vorläufer-Produktverhältnisses (Hellerstein and Neese, 1992, Am. J. Physiol. 263: E988–1001), wurde die Herstellung von neu synthetisierten DNA-Strängen quantifiziert. Gipfelwerte traten waren zwei bis drei Tage nach dem Start der  $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$  Glukoseinfusion auf und erreichten 15–20% neu synthetisierte DNA-Stränge und somit 15–20% neu proliferierende Zellen (Fig. 8). Die abfallenden Kurven der dA oder dG Markierungen zwischen den Tagen vier und zehn zeigten die Abbauraten des Markers und daher Zellpopulationen, die sich kürzlich geteilt hatten (Hellerstein and Neese, 1992, Am. J. Physiol. 263: E988–1001). Die Abbauraten von markierten Zellen waren im Allgemeinen höher als für die allgemeine Zellpopulation, was den selektiven Tod von Zellen, die sich kürzlich geteilt haben und aktiviert wurden, vermuten lässt. Die Wirkung von antiretroviroalen Therapien auf die CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferation und den CD4<sup>+</sup> T-Zellabbau wurde dann durch das Wiederholen der  $[6,6\text{-}^2\text{H}_2]$  Glukoseinfusion nach acht bis zwölf Wochen der Therapie bestimmt.

**[0143]** Zusammenfassend wurde ein Verfahren zum Messen der DNA-Synthese unter Verwendung von stabilen Isotopenmarkern und Massenspektroskopie zum Messen der Zellproliferationen entwickelt. Dieses Verfahren beinhaltet keine Radioaktivität und potentiell toxische Metaboliten und ist somit für die Verwendung im Menschen geeignet.

#### 6.3. Messung von T-Lymphozyten Kinetiken in Menschen: Wirkungen der HIV-1 Infektion und der anti-retroviralen Therapie

**[0144]** Der T-Lymphozytenpool existiert, wie alle biochemischen und zellulären Systeme, in einem dynami-

schen Zustand: Zellen sterben und werden durch Zellen, die sich neu geteilt haben, ersetzt. Eine Abnahme des CD4<sup>+</sup> T-Zellpools tritt in der HIV-1 Infektion auf, aber die dynamische Basis dieser Veränderung bleibt umstritten.

**[0145]** Es wurde ein kinetisches Modell der CD4 Abnahme in AIDS mit hohem Umsatz vorgeschlagen (Ho et al., 1995, *Nature* 373: 123–126; Wei et al., 1995, *Nature* 373: 117–122). Die zentralen Annahmen dieses Modells sind, dass HIV-1 hohe Raten des CD4<sup>+</sup> T-Zellabbaus ( $1 - 2 \cdot 10^9$  Zellen/Tag) verursacht und dass die hohen Anforderungen an die CD4<sup>+</sup> regenerierenden Systeme nach vielen Jahren zu einer Erschöpfung der lymphopoietischen Reserven und zum Kollaps des CD4<sup>+</sup> T-Zellpools führen. Diese Modell hat als ein starker Anreiz für nachfolgende Forschung gedient, aber basiert auf indirekten Beweisen: nach Beginn einer hochaktiven anti-retroviralen Therapie (HAART) bei fortgeschrittener HIV-1 Erkrankung reichern sich CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut mit einer Rate von 4–8 Zellen/ $\mu\text{L}/\text{Tag}$  an. Das Extrapolieren dieses Werts auf eine Gesamtkörperanreicherungsrate von  $1 - 2 \cdot 10^9$  Zellen/Tag und unter der Annahme, dass die Rate der T-Zellanreicherung nach der Behandlung die Rate des T-Zellabbaus vor der Behandlung widerspiegelt (das heißt die anti-retrovirale Therapie inhibiert vollständig den T-Zellabbau und hat keinen Effekt auf die Proliferation) schlossen die Autoren dieses Modells, dass die Krankheit im späten Stadium mit einer sehr hohen Rate an T-Zellumsatz verbunden ist.

**[0146]** Seitdem haben verschiedene Forscher darauf hingewiesen, dass Veränderungen in den Zahlen zirkulierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen Veränderungen in der Verteilung zwischen Geweben und Blut aufgrund von "viral trapping", Cytokinen, Stresshormonen oder anderen Faktoren darstellen könnten, anstelle von Veränderungen in dem Umsatz (Proliferation und Abbau) von T-Zellen (Dimitrov and Martin, 1995, *Nature*, 375: 194; Mosier, 1995, *Nature*, 375: 193; Sprent and Tough, 1995, *Nature*, 375: 193). Wenn dem so ist, wären ausgehend von Messungen der zirkulierenden Zellzahlen allein Schlussfolgerungen über die Proliferation und den Abbau nicht gerechtfertigt. Spätere Studien des CD4<sup>+</sup> T-Zellgehalts von lymphoiden Geweben nach HAART haben bestätigt, dass die T-Zellverteilung durch die anti-retrovirale Therapie tatsächlich verändert werden könnte, und dass der anfängliche Anstieg bei der Blut CD4 Zählung hauptsächlich eine Umverteilung anstelle einer Gesamtkörper T-Zellanreicherung darstellen könnte (Zhang et al., 1998, *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 95: 1154; Gorchov et al., 1998, *Nature Med.* 4: 215; Bucy et al., 1998, 5th Conference on Retroviral and Opportunistic Infections, Abstr. 519: 177). Außerdem haben einige Forscher, unter Verwendung von anderen indirekten Verfahren zum Abschätzen der T-Zellkinetiken (das heißt die terminale Restriktionsfragmentslänge (TRF) von T-Zellchromosomen), gefolgt, dass bei der HIV-1 Infektion ein Stadium mit hohem Umsatz nicht existiert (Wolthers et al., 1996, *Science* 274: 1543; Palmer et al., 1996, *J. Exp. Med.* 185: 1381). Die Verwendung von TRF-Verkürzungsgraten als Index der replikativen Geschichte kann jedoch, insbesondere für die Verwendung bei der HIV-Infektion, ebenfalls kritisiert werden (Hellerstein and McCune, 1997, *Immunity* 7: 583).

**[0147]** Das Fehlen von qualitativen Daten betreffend die T-Zelldynamiken in normalen Menschen hat ferner zu der Unsicherheit bezüglich der dynamischen Konsequenzen der HIV-1 Infektion auf T-Zellen beigetragen. Es ist zum Beispiel nicht klar, ob eine Proliferationsrate von  $1 - 2 \cdot 10^9$  Zellen/Tag (4–8 Zellen/ $\mu\text{L}$  Blut/Tag) für CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Ho et al., 1995, *Nature* 373: 123–126; Wei et al., 1995, *Nature* 373: 117–122; Perelson et al., 1996, *Science* 271: 1582; Perelson et al., 1997, *Nature* 387: 188; Wain-Hobson, 1995, *Nature* 373: 102), selbst wenn sie korrekt wäre, einen höheren als normalen Wert darstellen und damit eine ungewöhnliche proliferative Belastung des T-lymphopoietischen Systems darstellen würde.

**[0148]** Diese Unsicherheiten hinsichtlich der T-Zelldynamiken sind größtenteils auf Beschränkungen früherer Verfahren zurückzuführen. Bis kürzlich gab es keine Technik für die direkte und genaue Messung von T-Zell-Kinetiken für die Verwendung in Menschen. Mit dem Verfahren gemäß der vorliegenden Erfindung können die Proliferations- und Ersetzungsgraten von Zellen in den Subjekten, einschließlich Menschen, gemessen werden. Die Verfahren gemäß der Erfindung erlauben die Messung der DNA Replikation und Zellproliferation durch endogene Markierung mit stabilen Isotopen ([Fig. 1](#)), gefolgt von der Isolation der zellulären DNA, der enzymatischen Hydrolyse zu Desoxyribonukleosiden und Analyse der Isotopenanreicherung durch Gaschromatographie/Massenspektroskopie (GC-MS), ohne die Verwendung von Radioaktivität oder potentiell toxischer Metaboliten. Durch das Kombinieren dieser Techniken mit fluoreszenzaktiviertem Zellsortieren (FACS), um ausgewählte Zellsubpopulationen zu reinigen ([Fig. 9a](#)), können die Proliferationsrate und Überlebenszeit von T-Zellen in Menschen gemessen werden.

**[0149]** In diesem Beispiel haben wir die Kinetiken (Proliferations- und Ersetzungsgraten) von zirkulierenden T-Zellen in Menschen mit und ohne HIV-1 Infektion unter Verwendung dieser stabilen Isotopen/FACS/GC-MS Verfahren der vorliegenden Erfindung gemessen. Wir haben uns auf bestimmte fundamentale Fragen bezüglich der T-Zelldynamiken konzentriert: Was sind normale Proliferationsraten und Ratenkonstanten für den Teilersatz zirkulierender CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in HIV-1 seronegativen Menschen? Sind diese Werte in HIV-1

infizierten Patienten mit messbarer Plasmavirenbeladung verändert? Was sind die Wirkungen einer hochaktiven anti-retroviralen Therapie (HAART) nach entweder Kurzzeit- (zum Beispiel 3 Monate) oder Langzeit(zum Beispiel > 12 Monate) Therapie? Wie ist unter diesen Bedingungen die Beziehung zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellkinetiken?

### 6.3.1. VERFAHREN

#### 6.3.1.1 Menschliche Subjekte

**[0150]** Kinetische Messungen wurden in vier Gruppen von Subjekten durchgeführt (Tabelle 4). Alle Subjekte waren Freiwillige, die durch Werbung oder mündlich angeworben wurden:

- (I) Normale, HIV-1 seronegative Subjekte (n = 9; 6 Männer, 3 Frauen). Die Subjekte waren gesund, gewichtsstabil, hatten kein Fieber und bekamen keine Medikamente.
- (II) HIV-1 infizierte Subjekte, die keine Proteaseinhibitor-Therapie erhielten und messbare Plasmavirenbeladungen zeigten (HIV+ Gruppe, n = 6; 5 Männer, 1 Frau). Die Subjekte hatten zuvor keine Proteaseinhibitoren genommen, waren klinischen stabil und fieberfrei. Es sind die CD4 Zählungen zum Zeitpunkt der Studie gezeigt (Tabelle 4).
- (III) Subjekte, die nach 12 Wochen einer Ritonavir/Saquinavir Kombinationstherapie mit Nukleosiden (Kurzzeit HAART-Gruppe, n = 8 Männer) studiert wurden. Die Auswahlkriterien für die Teilnahme waren messbare Virenbeladung bei Nukleosid oder Nicht-Nukleosidtherapien (n = 6) oder einem Proteaseinhibitor mit Nukleosiden (n = 2); klinische Stabilität; keine anderen medizinischen Erkrankungen; und Einverständnis für 12 Wochen nach dem Start der Ritonavir/Saquinavir Therapie überwacht zu werden. Neun Subjekte nahmen teil; acht vollendeten die 12-wöchige Studie. Die Grundlinien und die 12-Wochen T-Zell-Zählungen sind gezeigt (Tabelle 4).
- (IV) Subjekte die für 12–24 Monate eine HAART-Kur erhielten, mit einer Virenbeladung, die dauerhaft unter dem Nachweislimit lag (Langzeit-HAART-Gruppe, n = 5 Männer). Diese Subjekte waren klinisch stabil und hatten eine dokumentierte Unterdrückung der Virenbeladung für 12–24 Monate. Die CD4 Zählungen bei dem Tiefpunkt jedes Patienten und zum Zeitpunkt der Studie sind gezeigt (Tabelle 4).

**[0151]** Von allen Subjekten wurde vor jedem Verfahren eine schriftliche Einverständniserklärung erhalten. Das Protokoll wurde von dem UC San Francisco Komitee für humane Forschung zugelassen.

Tabelle 4

Gruppe/ Subject	CD4	VL (x10 <sup>3</sup> )	CD4	ΔCD4	CD8	k (d <sup>-1</sup> )	CD4			CD8		
							Zählung 2/Mil lung	Zellen/µL/d/Zelltyp	Abs Prolif	Abs Prolif	k (d <sup>-1</sup> )	Zellen/µL/d/Zelltyp
<b>I) Normalkontrollen</b>												
#1	--	--	1,792	--	403	0.0120	21.5	5.4	0.0080	3.2	0.0011	0.4
#2.	--	--	875	--	375	0.0084	7.4	1.8	0.0039	2.2	0.0036	0.4
#3.	--	--	1,509	--	574	0.0046	6.9	1.7	0.0110	10.9	0.0422	25.1
#4.	--	--	1,576	--	989	0.0140	22.1	5.5	0.0034	3.1	0.0034	0.8
#5.	--	--	1,317	--	594	0.0046	6.1	1.5	0.0035	0.8	0.0035	0.2
#6.	--	--	891	--	226	0.0035	3.1	0.8	0.0080	5.3	0.0034	1.3
#7.	--	--	1,142	--	664	0.0059	6.7	1.7	0.0034	3.1	0.0034	0.8
#8.	--	--	1,971	--	902	0.0083	16.4	4.1	--	--	--	--
#9.	--	--	629	--	833	0.0190	12.0	3.0	0.0100	6.4	0.0130	1.6
Mittelwert ± Standardabweichung	--	--	1300	--	618	0.0089	11.4	2.8	0.0034	3.1	0.0034	±2.1
<b>II) HIV+</b>												
#1.	--	2.0	183	--	361	0.032	5.9	1.5	0.023	8.3	0.023	2.1
#2.	--	21.5	740	--	1173	0.026	19.2	4.8	0.031	36.4	0.031	9.1
#3.	--	107.4	168	--	838	0.040	6.7	1.7	0.048	40.2	0.048	10.1
#4.	--	43.0	236	--	1859	0.034	8.0	2.0	--	--	--	--
#5.	--	10.0	636	--	1145	0.022	14.6	3.7	--	--	--	--
#6.	--	440	172	--	702	0.031	5.3	1.3	--	--	--	--
Mittelwert ± Standardabweichung	--	102.4	356	--	1,031	0.030	9.9	2.5	0.034	28.3	0.034	7.11
<b>III) Kurzzeit HAART</b>												
A) Virale Ansprachen	--	170.7	±261	--	±512	±.006	±5.7	±1.4	±.013	±17.4	±.013	±4.4
#1.	135	< 500	296	3.1	920	0.078	23.1	5.8	0.084	76.8	0.062	19.0
#2.	335	< 500	629	4.6	1,058	0.044	27.6	6.9	0.036	65.6	0.042	16.4
#3.	77	< 500	363	5.6	987	0.036	11.0	2.8	0.042	35.2	0.036	8.8
#4.	83	< 500	135	0.6	776	0.032	4.4	1.1	0.042	32.7	0.036	8.2
#5.	289	< 500	365	2.0	2,277	0.082	29.9	7.5	0.036	81.4	0.036	20.0

(Fortsetzung)  
T-Zellkinetiken in individuellen Subjekten

Gruppe/ Subjekt	CD4	VL (x10 <sup>3</sup> )	CD4	ΔCD4	CD8	k	CD4			CD8		
							Zählung	Zählung (d <sup>-1</sup> )	(Zellen/µL/d)/Zellen/d x 10 <sup>-9</sup> )	Abs Prolif	Abs Prolif	k
Mittelwert 184	<500	358	3.2	1.204	0.053	19.2	4.8	0.052	58.3	14.5	±23.0	±56
±Standardabweichung ±120		±178	±2.0	±609	±0.025	±11.0	±2.8	±.021				
B) Virologisches Versagen												
#6.	320	47.6	450	0	1.031	0.105	47.1	12.0	0.068	70.2	17.6	
#7.	76	26.0	65	0	563	0.060	4.2	1.1	0.057	32.1	8.0	
#8.	164	65.0	178	0	1.037	0.036	6.3	1.6	0.026	26.6	6.6	
Mittelwert ±	187	46.2	231	0	877	0.067	19.2	4.9	0.050	43.0	10.7	
Standardabweichung ±124		±19.5	±198	10	±272	±.035	±24.2	±6.2	±.022	±23.7	±6.0	
Gesamtgruppe,												
Mittelwert	185	—	310	2.0	1.081	0.058	19.2	4.9	0.051	52.6	13.1	
±Standardabweichung	+112		±183	±2.2	±512	±.028	±15.4	±3.9	±.020	±23.0	±5.7	
IV) Langzeit HAART												
#1.	13	<500	608	—	1.976	0.0091	5.5	1.4	0.0134	26.4	6.6	
#2.	603	<500	1261	—	880	0.0018	2.3	0.6	0.0027	2.4	0.6	
#3.	7	<500	364	—	499	0.0103	3.7	0.9	0.0144	7.2	1.8	
#4.	87	<500	330	—	898	0.0160	5.3	1.3	0.0048	4.3	1.1	
#5.	381	1	<500	9177	—	943	0.0078	7.22	1.88	—	—	
Mittelwert	218	<500	696	—	1039	0.0090	4.8	1.2	0.0088	10.1	2.5	
±264		±394			±553	±.00511	±1.9	±0.5	±.0059	±11.1	±2.8	

Legende: Abs Prolif, absolute Proliferationsrate; VL, Virenbeladung. Plasma HIV-1 Virenbeladung wurde mittels der Chiron bDNA Methode gemessen. CD4+ und CD8+ T-Zellzählungen wurden mittels FACS in Woche 12 bestimmt. CD4 Nadir, niedrigste Blut CD4 Zählung, die in der Krankenakte des Subjekts dokumentiert war. Δ CD4, Veränderungen im Blut CD4 Zählung von dem Vorbehandlungswert während der ersten sechs Wochen von Kurzzeit HAART (nur Gruppe III); —, nicht gemessen oder nicht angebracht; "d" bedeutet "Tag".

## 6.3.1.2. Messungen von T-Zellkinetiken

**[0152]** Für diese Studien wurden Verfahren der vorliegenden Erfindung verwendet, die sich auf stabile Isotopen/MS-Verfahren zum Messen der Zellproliferation und des Umsatzes richten, wie oben und hierin beschrieben. Kurz gefasst, schlossen diese Verfahren die folgenden vier Schritte ein:

(1) Verabreichung von [ $6,6\text{-}^2\text{H}_2$ ] Glukose in vivo.

**[0153]** Es wurde eine 48-stündige konstante intravenöse Infusion von markierter Glukose durchgeführt, um eine repräsentative Zeitprobe von T-Zell-Kinetiken sicher zu stellen. Die Anreicherungen von Plasmaglukose wurden während der Infusion alle 12 Stunden gemessen. Infusionen wurden an dem General Clinical Research Center des San Francisco General Hospital durchgeführt. Plasma [ $^2\text{H}_2$ ] Glukoseanreicherungen fielen innerhalb von 1–2 Stunden nach dem Beenden der intravenösen Infusion auf < 10% der steady-state Werte.

(2) Isolation von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellpopulationen aus dem Blut.

**[0154]** Blutentnahmen wurden im Allgemeinen zweimal durchgeführt (jeweils 50–70 ml) – einmal zwischen den Tagen 5–8 und einmal zwischen den Tagen 10–14 nach dem Beginn der [ $^2\text{H}$ ] Glukoseinfusion. Die peripheren mononukleären Blutzellen wurden anfänglich unter Verwendung von Immunaffinitätskügelchen [Dynabeads (Dynal; Oslo, Norwegen) oder MACS Separationssäulen (Miltenyi Biotec, Auburn, CA)] in CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulation getrennt. Bei der erneuten Analyse wurde gefunden, dass diese Zellpräparate durchschnittlich nur 70–90% rein waren und mit GC-MS inkonsistente kinetische Messungen ergaben. Dementsprechend war es notwendig unter Verwendung von Multiparameter-Durchflusszytometrie die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellsubpopulationen bis zu > 98% Reinheit zu isolieren ([Fig. 9A](#)).

## (3) Präparation von dA aus T-Zell DNA.

**[0155]** Die Purindesoxyribonukleoside (dA und dG) wurden für die folgende GC-MS Analyse ([Fig. 9B](#)) aus T-Zell DNA isoliert. Im Allgemeinen waren  $\geq 5\mu\text{g}$  DNA, was ungefähr  $10^6$  Zellen entspricht, erforderlich um ausreichend dA für GC-MS Messungen zu gewinnen.

(4) Massenspektrometrische Messungen der  $^2\text{H}$ -Anreicherungen in dA.

**[0156]** Eine GC-MS Analyse der Isotopenanreicherungen von dA wurde durch Vergleich mit Standardkurven von [ $^2\text{H}_2$ ] dA ([Fig. 9C](#)) durchgeführt.

## 6.3.1.3. Berechnungen der kinetischen Parameter von T-Zellen

**[0157]** Kinetische Berechnungen basieren auf den Mathematiken des Vorläufer-Produktverhältnisses, oder Newton's Abkühlungsgesetz, und repräsentieren den Austausch oder das Ersetzen von nicht markiertem durch markiertes Material wie hierin beschrieben (Macallan et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 708–713; Zilversmit et al., 1974, J. Gen. Physiol. 60: 325; Hellerstein and Neese, 1992, Am. J. Physiol. 263: E988–E1001; Waterlow et al., PROTEIN TURNOVER IN MAMMALIAN TISSUES AND IN THE WHOLE BODY 216–219 (North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1978)). Die fraktionelle Ersatzrate ( $k$ ,  $\text{d}^{-1}$ ) oder die Ratenkonstante des Einstroms und der Entfernung unter steady-state oder pseudo-steady-state Bedingungen wird aus dem Verhältnis des Markereinbaus in das Produkt (T-Zell dA) verglichen zu dem Vorläufer (Blutglukose, korrigiert für die intrazelluläre Verdünnung in dem Desoxyribonukleosidpool) berechnet:

$$\frac{dA}{dt} = k (A - B), \quad \text{Gleichung (1)}$$

wobei A die Isotopenanreicherung des Vorläufers und B die Isotopenanreicherung des Produktes ist.

**[0158]** Wenn A konstant ist, ergibt die Integration:

Gleichung (2):

$$\frac{B/A}{1 - e^{-kt}} = \frac{[\text{Glukose Anreicherung}]}{[\text{dA Anreicherung}]} = 0,65$$

durch Umformen

$$k = \frac{-\ln(1 - [B/A])}{t} \quad \text{Gleichung (3)}$$

wobei t 2 Tage ist (der Isotopenmarkierungszeitraum) und die Anreicherung den Teil von vorhandenen [ $^2\text{H}_2$ ] markierten Molekülen darstellt. Absolute T-Zellproliferationsraten werden dann als ( $k \cdot \text{Poolgröße}$ ) berechnet, wobei die Poolgröße der gemessenen Zählung im Blut (T-Zellen/ $\mu\text{L}$ ) entspricht. Extrapolation auf die absoluten

Gesamtkörper T-Zell Proliferationsraten kann dann wie woanders beschrieben (Ho et al., 1995, Nature 373: 123–126; Wie et al., 1995, Nature 373: 117–122) durch das Multiplizieren mit  $10^6 \mu\text{L}/\text{Liter} \cdot (5 \text{ Liter Blutvolumen}) \cdot (50)$  durchgeführt werden.

**[0159]** Diese Berechnungen basieren auf dem Folgenden: zirkulierende T-Zellzählungen während der Markierungsphase sind stabil, so dass der Eintritt von Zellen, die sich neu geteilt haben, in den Kreislauf durch das Ausscheiden von anderen Zellen ausgeglichen werden muss (steady-state Annahme); proliferierende T-Zellen und nicht-proliferierende T-Zellen wandern gleichmäßig zwischen Gewebe und Blut, so dass der Anteil von Zellen, die sich neu geteilt haben, im Blut den in Geweben entspricht; und der metabolische Beitrag der extrazellulären Glukose zu dem Desoxyribosederivat von dATP in T-Zellen ([Fig. 1](#)) in allen lymphoproliferativen Geweben gleich ist und bei dem zuvor berechneten in vitro Wert liegt (Tabelle 2; siehe ebenfalls Macallan et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 708–713). Die Interpretation der Ersatzraten von zirkulierenden T-Zellen als Maß des T-Zellabbaus nimmt an, dass die Größe des Pools der Gewebs-T-Zellen während der Markierungsphase konstant ist, so dass die Produktion von Zellen, die sich neu geteilt haben, durch den Abbau von anderen Zellen ausgeglichen werden muss. Die Extrapolation von absoluten Proliferationsraten von zirkulierenden T-Zellen auf den gesamten Körper beruht auf der Annahme, dass die Verteilungsrate zwischen Geweben und Blut konstant ist und bei dem Wert (50:1) liegt, der woanders geschätzt wurde (Ho et al., 1995, Nature 373: 123–126; Wie et al., 1995, Nature 373: 117–122).

#### 6.3.1.4. Statistische Analysen

**[0160]** Die Gruppen wurden mit Einweg ANOVA mit Dunn/Bonferroni Folge mit einer verfahrensweisen Fehlerrate von 5% verglichen. CD4<sup>+</sup> wurden innerhalb der Gruppen durch den gepaarten T-Test mit CD8<sup>+</sup> Zellen verglichen.

#### 6.3.2. ERGEBNISSE

**[0161]** Die Messung der Dynamiken von zirkulierenden Lymphozyten besitzt ein etwas atypisches Merkmal, das darin liegt, dass der untersuchte Bestandteil (Blut) nicht der Bestandteil ist, von dem angenommen wird, dass dort die Zellproliferation stattfindet. Die Interpretation des Einbaus des Markers in zirkulierende T-Zellen muss diese Kompartimentalisierung berücksichtigen. Die Ergebnisse in [Fig. 10](#) liefern Einsicht in den Zeitverlauf des Markereinbaus, wie er in zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen gemessen wurde. In dieser Gruppe von 8 Subjekten auf Kurzzeit HAART (Gruppe III) zeigten die meisten (6) äquivalente Grade des Markereinbaus an Tag 5 und Tag 14; drei Subjekte mit Proben ebenfalls an den Tagen 6 und 7 zeigten Stabilität des Markereinbaus während dieses Intervalls. Diese Beobachtungen sind konsistent mit einem Modell der T-Zellproliferation in einem zentralen, nicht getesteten Kompartiment gefolgt von einem schnellen Austausch (Mischung) in den zirkulierenden Pool über die folgenden 5 bis 14 Tage. Da der Blut CD4 Pool mehrere Male pro Tag zirkuliert (Gowans et al., 1998, Blut 91: 1653), zeigt die anscheinende Stabilität der Anreicherung in zirkulierenden T-Zellen ([Fig. 10](#)) an, dass die sich austauschenden Pools gut gemischt sind. Das Fehlen eines Abfalls in der CD4<sup>+</sup> T-Zellanreicherung über die zwei Wochen nach Absetzen der Markierung spiegelt wahrscheinlich den restlichen langsamem Eintritt von markierten Zellen aus Gewebe wieder, der dem Abbau von markierten Zellen im Kreislauf gegensteuert. Wenn Blut und Gewebe weniger als 100% gemischt sind oder wenn einige markierte Zellen zerstört werden, bevor sie in dem Blutstrom auftauchen, wird die im Blut gemessene Ersatzrate die wahren Raten der T-Zellproliferation im Gewebe daher zu niedrig einschätzen, obwohl sie immer noch genau den Ersatz und die Proliferation von Zellen, die im Blutstrom vorhanden sind, widerspiegelt. Die gemessenen Umwandlungsblutraten sollten daher, wenn sie auf die Gewebe extrapoliert werden, als Minimumswerte angesehen werden.

**[0162]** In zwei Subjekten, die in Gruppe III untersucht wurden, stieg der gemessene Einbau zwischen den ersten und den letzten Zeitpunkten, obwohl die Markerverabreichung lange vorbei war.

**[0163]** In diesen Fällen müssen die proliferierenden Zellen (die während der ersten zwei Tage markiert wurden) mit einer langsameren Rate in den peripheren Kreislauf übergehen als die, die in den anderen sechs Subjekten beobachtet wurde. Zum Zweck der Datenpräsentation unten, wurde angenommen, dass die gemessenen Einbauwerte solcher Individuen von dem Tag mit dem höchsten Wert stammen. Wie oben müssen diese Ergebnisse geschätzte Minimumswerte der Gewebsraten der T-Zellproliferation widerspiegeln. Ähnliche Zeitverläufe des Markereinbaus in zirkulierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden in Subjekten der Gruppen I, II und IV beobachtet (Tabelle 4).

6.3.2.1. CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zelldynamiken

**[0164]** Die fraktionelle Ersatzrate (k) für CD4<sup>+</sup> T-Zellen in normalen, HIV-1 seronegativen Subjekten betrug  $0,0089 \pm 0,0052 \text{ d}^{-1}$  (Tabelle 4, Gruppe I). Der k-Wert für CD8<sup>+</sup> T-Zellen betrug  $0,0100 \pm 0,0130 \text{ d}^{-1}$ . Die absoluten Proliferationsraten von zirkulierenden T-Zellen betrugen  $11,4 \pm 7,0$  bzw.  $6,4 \pm 8,3 \text{ Zellen}/\mu\text{L}/\text{Tag}$  für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Wenn Standardschätzungen für die Gewebe:Blut T-Zellverteilung (50:1) angewandt werden (Ho et al., 1995, Nature 373: 123–126; Wie et al., 1995, Nature 373: 117–122; Perelson et al., 1996, Science 271: 1582; Perelson et al., 1997, Nature 387: 188; Wain-Hobson 1995 Nature 373: 102) können diese Raten im Blut auf  $2,8 \pm 1,8 \cdot 10^9$  bzw.  $1,6 \pm 2,1 \cdot 10^9 \text{ Zellen}/\text{Tag}$  im gesamten Körper extrapoliert werden. In diesen HIV-1 seronegativen Subjekten ist die Proliferationsrate für CD4<sup>+</sup> T-Zellen somit um einen Faktor von nahezu zwei höher als die, die für CD8<sup>+</sup> T-Zellen gefunden wurde. Bemerkenswerterweise ist die CD4<sup>+</sup> Umsatzrate in diesen HIV-1-seronegativen Subjekten ebenfalls höher als die, die zuvor während der Spätphase der HIV-1 Erkrankung unter Verwendung indirekter Mittel geschätzt wurde (Ho et al., 1995, Nature 373: 123–126; Wie et al., 1995, Nature 373: 117–122).

**[0165]** Es sind kinetische Ergebnisse in HIV-1 seropositiven Männern (n = 6) mit messbaren Plasmavirenbeladungen (Mittelwert  $10^{5,0 \pm 5,2}$ ; CD4 Zählung  $360 \pm 267$ ) gezeigt (Tabelle 4, Gruppe II). Verglichen mit normalen Kontrollen war der k-Wert für CD4<sup>+</sup> T-Zellen in HIV-1 infizierten Subjekten ungefähr 3-fach höher ( $0,031 \pm 0,006 \text{ d}^{-1}$ ) ([Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)). Die absolute Proliferationsrate von zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen,  $9,9 \pm 5,7 \text{ Zellen}/\mu\text{L}/\text{Tag}$ , die den Eintritt von Zellen, die sich neu geteilt haben, in den zirkulierenden Pool repräsentiert (oder eine Gesamtkörperrate von  $2,5 \pm 1,4 \cdot 10^9 \text{ Zellen}/\text{Tag}$ ) waren in einer unkontrollierten HIV-1 Infektion nicht über die Normalwerte erhöht ([Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)). Im Gegensatz dazu war, verglichen mit normalen Kontrollen, die absolute Rate der zirkulierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellproliferation in der HIV-1 Infektion erhöht ( $28,3 \pm 17,4 \text{ Zellen}/\mu\text{L}/\text{Tag}$  oder  $7,1 \pm 4,4 \cdot 10^9 \text{ Zellen}/\text{Tag}$  im gesamten Körper, [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)) und war eher größer als kleiner als die, die für CD4<sup>+</sup> T-Zellen gefunden wurde.

**[0166]** Acht Subjekte wurden untersucht, nachdem sie für 12 Wochen eine kombinierte Proteaseinhibitor-enthaltende HAART-Kur (Ritonavir/Saquinavir, zusätzlich zu den vorigen Nukleosid oder Nicht-Nukleosid-Agenzien) erhielten, wonach die Blut CD4<sup>+</sup>-Zellzahlen relativ stabil waren (Tabelle 4; Ho et al., 1995, Nature 373: 123–126; Wei et al., 1995, Nature 373: 117–122; Perelson et al., 1996, Science 271: 1582; Perelson et al., 1997, Nature 387: 188; Wain-Hobson, 1995, Nature 373: 102; Zhang et al., 1998, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95: 1154). Die zu diesem Zeitpunkt im Blutstrom gemessenen T-Zell-Ersatzraten wurden mit der durchschnittlichen Anreicherungsrate von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut während der ersten 6 Wochen der nicht steady-state-Phase (d.h. abgeleitet von der Differenz zwischen der Basislinie und den Zählungen der Blut CD4 Zellen in Woche 6; siehe Legende der [Fig. 12](#)) verglichen. Die durchschnittliche Anreicherungsrate während des anfänglichen nicht steady-state-Zeitraums schätzte die wahren Ersatzraten beim steady-state zu niedrig ein und korrelierte selbst qualitativ nicht mit den gemessenen Werten ([Fig. 12](#)). Einige Subjekte zeigten zum Beispiel keinen Anstieg in den CD4 Zahlen im Blut bei HAART, so dass der Umsatz nicht über das Anreicherungsverfahren geschätzt werden konnte. Nichtsdestotrotz zeigten diese Subjekte aktiven Umsatz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 12 Wochen Therapie ([Fig. 12](#)).

**[0167]** Verglichen mit sowohl HIV-1 seronegativen Kontrollen und HIV-1 infizierten Subjekten, die keine Proteaseinhibitorenenthaltenden Medikamentenkuren erhielten, wurden in Patienten nach einer Kurzzeit-HAART-Kur eine Reihe von signifikanten Unterschieden in den T-Zell-Kinetiken dokumentiert ([Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)). Ob die Virenbeladung sank oder nicht, die Werte für k und die absoluten Proliferationsraten der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren im Allgemeinen höher. Die T-Zell-Kinetiken in Gruppe III waren für Personen, die auf die Behandlung virologisch ansprachen (virale Beladung < 500 Kopien/mL) und virologische Fehlschläge (virale Beladung > 500 Kopien/mL, Tabelle 4, [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)) nicht merklich unterschiedlich. Subjekte mit Langzeit-HAART (Gruppe IV mit anhaltender Subpression der Virenbeladung für 12–24 Monate) zeigten noch andere Kinetiken ([Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)): In dieser Gruppe von 5 Individuen waren die Werte für k und die absoluten Proliferationsraten für CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Wesentlichen auf Normalwerte, die in HIV-1-seronegativen Subjekten beobachtet wurden, zurückgegangen.

**[0168]** Es wurde eine starke Korrelation zwischen den absoluten Proliferationsraten von CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen ([Fig. 13A](#),  $r^2 = 0,69$ ,  $p < 0,001$ ) und k ([Fig. 13B](#),  $r^2 = 0,66$ ,  $p < 0,001$ ) beobachtet. Es wurde ebenfalls eine starke Korrelation zwischen den absoluten Proliferationsraten und der Anzahl von CD4<sup>+</sup> T-Zellen im Blut in sowohl HIV-1 seropositiven ([Fig. 13C](#),  $r^2 = 0,96$ ,  $p < 0,0001$ ) als auch Kurzzeit-HAART-Gruppen ([Fig. 13D](#),  $r^2 = 0,55$ ,  $p < 0,001$ ) beobachtet, wobei keine Korrelation zwischen k und der CD4-Zählung ([Fig. 13E](#)) bestand. Es gab keine Korrelation zwischen der Plasmavirenbeladung und entweder der absoluten Proliferationsrate ([Fig. 13F](#)) oder k ([Fig. 13G](#)) der zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen in der HIV-1 infizierten Gruppe, d. h. eine hohe

Plasmavirenbeladung war nicht mit hohen Raten an CD4<sup>+</sup> T-Zellumsatz, sowohl anteilig als auch absolut, im Blutstrom verbunden.

### 6.3.3 ANALYSE

**[0169]** Die Kinetiken von T-Lymphozyten können direkt in menschlichen Subjekten unter Verwendung der stabilen Isotopen/FACS/GC-MS Verfahren der vorliegenden Erfindung gemessen werden, die hierin und oben beschrieben werden. Eine Reihe von Fragen, die die Immunpathogenese von HIV-1 betreffen können, können dadurch behandelt werden.

Frage(1):

**[0170]** Was sind die Kinetiken des Umsatzes (Ratenkonstanten des Ersatzes und der absolute Proliferationsrate) von zirkulierenden T-Zellen in normalen Menschen?

**[0171]** Ohne Informationen über zirkulierende T-Zellumsatzraten in nicht HIV-1 infizierten normalen Kontrollen, ist es nicht möglich zu folgern, dass solche Raten während des Verlaufs der HIV-1 Erkrankung verändert sind. Zuvor wurden indirekte Verfahren verwendet, um die normalen Umsatzraten einzuschätzen, einschließlich der Messung des Bestehens eines instabilen Chromosomenschadens in T-Zellen als Folge der Radiotherapie (McLean and Michie, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3707; Michi et al., 1992, Nature 360: 264). Schätzungen, die durch diesen Ansatz erhalten wurden ( $k = 0,01 \text{ d}^{-1}$  für Gedächtnis T-Zellen und  $0,001 \text{ d}^{-1}$  für naive T-Zellen) sind nah an, aber etwas niedriger als die hierin beschriebenen gemessenen Werte von ca.  $0,009 \text{ d}^{-1}$  für den gemischten T-Zellpool. Diese etwas niedrigeren täglichen Umsatzschätzungen (4–8 Zellen/ $\mu\text{L}/\text{Tag}$  gegenüber 11 Zellen/ $\mu\text{L}/\text{Tag}$ , was über unseren Ansatz gemessen wurde) können das verlängerte Überleben von T-Zellen in den lymphopenisch "normalen" Subjekten nach der Radiotherapie widerspiegeln (McLean and Michie, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3707; Michi et al., 1992, Nature 360: 264).

**[0172]** Im Kontext der HIV-1 Infektion unterstützen weder die hierin beschriebenen Ergebnisse noch frühere Ergebnisse (McLean and Michie, 1995, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 3707; Michi et al., 1992, Nature 360: 264) die Ansicht, dass eine CD4<sup>+</sup> T-Zell Regenerationsrate von 4–8 Zellen/ $\mu\text{L}/\text{Tag}$  ( $1 - 2 \times 10^9 \text{ Zellen}/\text{Tag}$ ) in AIDS ungewöhnlich hoch ist. Modelle, die annehmen, dass Proliferationsraten des zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zell-pools in diesem Bereich eine chronische Belastung der lymphopoetischen Reserven darstellen (Ho et al., 1995, Nature 373: 123–126; Wei et al., 1995, Nature 373: 117–122; Perelson et al., 1996, Science 271: 1582; Perelson et al., 1997, Nature 387: 188; Wain-Hobson, 1995, Nature 373: 102) sind daher mit verfügbaren Referenzdaten für normale Menschen nicht konsistent.

Frage (2):

**[0173]** Ist die CD4<sup>+</sup> T-Zellabnahme in der fortgeschrittenen HIV-1 Erkrankung auf beschleunigten Zellenabbau (Hoch-Umsatzmodell), regeneratives Versagen (niedriges Umsatzmodell) oder beides zurückzuführen?

**[0174]** Es ist wichtig, expliziert zu definieren, wie der Ausdruck "Umsatz" verwendet wird, da dieser Ausdruck oftmals verwendet wird, um zwei verschiedene Aspekte des Prozesses des Zellersatz zu bezeichnen. "Umsatz" kann entweder: (i) die absolute Rate mit der Zellen gebildet werden und absterben (absolute Proliferationsrate, Zellen/Tag) oder (ii) den Anteil an dem Zellpool, der pro Tag ersetzt wird ( $k, \text{ d}^{-1}$ ) wiedergeben. In biochemischen Systemen wird die Poolgröße typischerweise durch die absolute Produktionsrate (im Allgemeinen nullter Ordnung mit Bezug auf das Endprodukt) und die Ratenkonstante für die Entfernung (die im Allgemeinen mit Bezug auf das Endprodukt erster Ordnung ist) bestimmt (Waterlow et al., PROTEIN TURNOVER IN MAMMALIAN TISSUES AND IN THE WHOLE BODY 198–211 (North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1978); Schimke, in MAMMALIAN PROTEIN METABOLISM 178–228 (H.N. Munroe ed., Acad. Press, New York, 1970)). Die relevante Frage bei der HIV-1-Infektion ist, ob der beschleunigte Abbau und/oder die gestörte Produktion von T-Zellen die Abnahme an CD4<sup>+</sup> T-Zellen antreibt. Die beiden Modelle haben gegensätzliche kinetische Vorhersagen: Das Modell eines beschleunigten Abbaus (Ho et al., 1995, Nature 373: 123–126; Wei et al., 1995, Nature 373: 117–122; Perelson et al., 1996, Science 271: 1582; Perelson et al., 1997, Nature 387: 188; Wain-Hobson, 1995, Nature 373: 102) sagt für eine unbehandelte HIV-1 Erkrankung einen hohen Umsatz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, eine inverse Korrelation zwischen dem Umsatz und der CD4 Zahl und eine Reduktion in der Umsatzrate nach HAART voraus (siehe [Fig. 14](#), links). Im Gegensatz dazu sagt das Modell des regenerativen Versagens (Wolthers et al., 1996, Science 274: 1543; Palmer et al., 1996, J. Exp. Med. 185: 1381; Hellerstein and McCune, 1997, Immunity 7: 583) für eine unbehandelte HIV-1 Erkrankung eine niedrige CD4<sup>+</sup> T-Zellumsatzrate, eine direkte Korrelation zwischen Umsatz und CD4-Zahl und einen Anstieg in der Umsatz-

rate nach Beginn einer HAART (siehe [Fig. 14](#), rechts) voraus.

**[0175]** Obwohl  $k$  für CD4<sup>+</sup> T-Zellen in HIV-1 positiven Subjekten 3mal höher als in HIV-1 negativen Subjekten war, lassen die Beobachtungen vermuten, dass die T-Zellproduktionsrate oder die regenerative Kapazität beim Bestimmen der Anzahl zirkulierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen, zumindest in den Populationen mit fortgeschrittener HIV-1 Erkrankung, die hierin untersucht wurden, die quantitativ wichtigere Rolle spielt:

- (i) Kurzzeit-HAART war mit höheren, nicht niedrigeren Werten von sowohl anteiligen, als auch absoluten Ersatzraten für zirkulierende CD4<sup>+</sup> T-Zellen ([Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)) verbunden. Diese Daten zeigen, dass der steady-state-Anstieg in CD4 Zahlen, der nach Kurzzeit-HAART beobachtet wird, nicht auf ein verlängertes Überleben von zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen zurückzuführen ist (tatsächlich ist die Überlebenszeit oder die Halbwertszeit kürzer), sondern anstelle dessen eine erhöhte Rate des Eintritts von neu produzierten T-Zellen in den zirkulierenden Pool widerspiegelt.
- (ii) Die absoluten Proliferationsraten von zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen waren in HIV-1 infizierten Subjekten mit hohen Virenbeladungen nicht höher ([Fig. 13F](#)) und waren, verglichen mit normalen, seronegativen Kontrollen, in unbehandelten HIV-1 seropositiven Subjekten nicht höher (Tabelle 4, [Fig. 11B](#)). Diese Beobachtungen unterstützen das Modell einer viral angetriebenen lymphopoetischen Belastung – zumindest in einer fortgeschrittenen HIV-1-Erkrankung – nicht.
- (iii) Je höher die absolute Umsatzrate der Blut CD4<sup>+</sup> T-Zellen war, desto höher war die CD4 Zahl, aber es gab keine Korrelation mit  $k$  ([Fig. 13C](#)–[Fig. 13E](#)). Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu den Kinetiken, die durch das Modell des beschleunigten Abbaus vorhergesagt werden ([Fig. 14](#)), gemäß welchem das HIV-1 seropositive Individuum mit dem schnellsten CD4<sup>+</sup> T-Zellumsatz die niedrigsten CD4 Zahlen haben sollten (vergleiche [Fig. 13C](#) und [Fig. 13D](#) mit [Fig. 14](#)).
- (iv) Kurzzeit-HAART erhöhte die Proliferation von CD8<sup>+</sup> T-Zellen in demselben Ausmaß wie von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ([Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)) und HIV-1 infizierte Subjekte mit niedrigen CD4<sup>+</sup> Proliferationsraten besaßen ebenfalls niedrige CD8<sup>+</sup> Proliferationsraten ([Fig. 13A](#)). Somit teilen in einer fortgeschrittenen HIV-1 Erkrankung die CD8<sup>+</sup> T-Zellen augenscheinlich die regenerative Beschränkung mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen.

**[0176]** Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass die Regeneration von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen in einer HIV-1 Erkrankung beschränkt ist, und dass eine solche Beschränkung durch eine anti-retrovirale Therapie aufgehoben wird. Kürzliche Beobachtungen (Zhang et al., 1998, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95: 1154) an peripheren Lymphgeweben sind mit der Ansicht, dass die regenerativen Systeme von T-Zellen nach HAART verbessert werden, konsistent. Die teilweise Wiederherstellung von follikulären dendritischen Netzwerken tritt in lymphoiden Geweben schnell auf, mit dem Auftauchen von entstehenden Lymphfollikeln und zellulären Infiltraten (Zhang et al., 1998, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95: 1154). Je niedriger die anfängliche CD4-Zahl, desto dramatischer waren die Veränderungen im Lymphaufbau. Die kinetischen Daten, die hierin präsentiert werden, unterstützen die Ansicht, dass durch eine anti-retrovirale Therapie die Mikroumgebung für die T-Zellproliferation in peripheren Lymphgeweben, und vielleicht im Thymus, verbessert werden kann.

Frage (3):

**[0177]** Gibt es Beweise für eine "blinde Homeostase" von T-Zellen in einer HIV-1 Infektion?

**[0178]** Ein Modell einer "blinden Homeostase" wurde vorgeschlagen (Roederer, 1995, Nature Med. 1(7): 621; Margolick et al., 1995, Nature Med. 1(7): 674–680), um reziproke Veränderungen in zirkulierenden CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellzahlen während dem Verlauf einer HIV-1 Erkrankung zu erklären. Dieses Modell postuliert eine T-Zellzahl, die nicht zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen unterscheidet: Wenn CD4<sup>+</sup> T-Zellen zerstört werden, dann werden CD8<sup>+</sup> T-Zellen in größeren Mengen erzeugt, um den verfügbaren T-Zellraum auszufüllen. In ökologischer Terminologie, es wird vorgeschlagen, dass die CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellregeneration im Wettbewerb um gemeinsame und beschränkte Ressourcen (z.B. antigen-präsentierende Zellen, co-stimulierende Moleküle, etc.) stehen.

**[0179]** Die hierin präsentierten Daten sind mit diesem Modell teilweise konsistent. Für dieses Modell spricht die Beobachtung, dass das Verhältnis der absoluten Proliferationsraten von CD8:CD4 nach der Infektion mit HIV-1 umgekehrt wird (Tabelle 4, [Fig. 11B](#)). In normalen Subjekten war die absolute Proliferationsrate oder die Zahl zirkulierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen zweimal so hoch wie die absolute Proliferationsrate von zirkulierenden CD8<sup>+</sup> T-Zellen, während in HIV-1 infizierten Gruppen die CD8-Rate mindestens zweimal so hoch wie die CD4-Rate war, was den Veränderungen der CD8<sup>+</sup> T-Zellpoolgröße im Blut entspricht (Tabelle 4).

**[0180]** Auf der anderen Seite war die Behandlung mit HAART mit koordinierten Anstiegen in sowohl den absoluten Proliferationsraten von CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen verbunden ([Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)). Außerdem

gab es innerhalb der HIV+ Gruppen eine starke direkte Korrelation zwischen CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> Proliferationsraten ([Fig. 13A](#)). Diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass zumindest unter den Umständen einer HIV-1 Erkrankung im Spätstadium, die Produktion von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen durch die Abwesenheit von gemeinsamen Faktoren beschränkt wird.

**[0181]** Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Element des Wettbewerbs um Ressourcen in einer fortgeschrittenen HIV-1 Erkrankung vorhanden ist, aber von üblichen regenerativen Defekten überlagert werden. Es sind Langzeit-Studien der CD4- und CD8-Kinetiken über den natürlichen Verlauf der HIV-1 Infektion hinweg erforderlich, um diese Fragestellung zu lösen.

Frage (4):

**[0182]** Ist der meiste CD4-Umsatz auf direktes HIV-1 vermitteltes Abtöten zurückzuführen?

**[0183]** Obwohl klar ist, dass HIV-1 in vivo direkt CD4<sup>+</sup> (und möglicherweise CD8<sup>+</sup> T-Zellen, Flamand et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 3111) infizieren und zerstören kann, zeigen kinetische Analysen, dass der größte Anteil des Absterbens zirkulierender CD4<sup>+</sup> T-Zellen auf eine Art und Weise auftritt, die nicht direkt mit zirkulierendem HIV-1 korreliert:

- i) In den fünf Subjekten, die auf Kurzzeit-HAART "viral ansprachen" (Tabelle 4, Gruppe IIIA), war  $k$  für CD4<sup>+</sup> T-Zellen höher, nicht niedriger, als der Wert, der in HIV-1 infizierten Subjekten mit messbarer Virenbeladung (Gruppe II) gefunden wurde – d.h. bei einer niedrigeren zirkulierenden Virenbeladung starb ein höherer Anteil von CD4<sup>+</sup> T-Zellen ab ([Fig. 11B](#)). Dieses Ergebnis kann die Enthemmung der T-Zellregeneration widerspiegeln, was über einen kurzen Zeitraum zu einem erhöhten Grad der CD4<sup>+</sup> T-Zell Proliferation und somit zu einem erhöhten Grad an aktivierungs-induziertem Zelltod führt (AICD) (Murali-Krishna et al., 1998, Immunity 8: 177). Niedrigere virale Beladungen können anfänglich die Gesamtrate des CD4<sup>+</sup> T-Zelltods erhöhen, da mehr CD4<sup>+</sup> T-Zellen produziert werden.
- ii) Eine ähnliche Beobachtung trifft für den Umsatz von CD8<sup>+</sup>-Zellen zu: Diese Zellen haben einen höheren  $k$  Wert, oder eine kürzere Überlebensdauer, in Subjekten mit "viralem Ansprechen" (Gruppe III) als in HIV-1 infizierten Subjekten mit aktiver viraler Replikation (Gruppe II). Die Halbwertszeiten ( $1/k$ ) für CD8<sup>+</sup> T-Zellen waren in den unterschiedlichen HIV-1 infizierten Gruppen identisch zu denen für CD4<sup>+</sup> T-Zellen ([Fig. 11A](#)) und korrelierten innerhalb der Gruppen stark miteinander ([Fig. 13B](#)). Da CD8<sup>+</sup> T-Zellen in vivo nicht infiziert und zerstört werden, ist es schwierig, ihre erhöhten Werte für  $k$  und die absolute Proliferationsrate auf eine direkte Wirkung von HIV-1 zurückzuführen.
- iii) Schließlich wurde keine Korrelation zwischen der zirkulierenden Virenbeladung und den CD4<sup>+</sup> T-Zellproliferationsraten oder  $k$  ([Fig. 13F](#) und [Fig. 13G](#)) gefunden. Die Plasmavirenbeladung wurde zuvor als ein Index der Rate der CD4<sup>+</sup> T-Zellzerstörung im Körper interpretiert (Perelson et al., 1996, Science 271: 1582; Perelson et al., 1997, Nature 387: 188; Wain-Hobson, 1995, Nature 373: 102; Mellors et al., 1996, Science 272: 1167; Mellors et al., 1995, Ann. Int. Med. 122: 573). Obwohl wir die Möglichkeit, dass die T-Zellzerstörung in lymphoiden Geweben auftrat, nicht ausschließen können, unterstützen unsere Daten die Auffassung, dass Plasmavirenbeladungen die Abbauraten von zirkulierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen widerspiegeln, nicht.

**[0184]** Diese kinetischen Ergebnisse sprechen nicht gegen das Auftreten von viral vermitteltem Abtöten von CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> T-Zellen. Vielmehr zeigen sie, dass die meisten sterbenden CD4<sup>+</sup> (und CD8<sup>+</sup>) T-Zellen im zirkulierenden Pool nicht infiziert sind (Oyaizu and Pahwa, 1995, J. Clin. Immunol. 15: 217; Casella and Finkel, 1997, Curr. Op. Hematol. 4: 24; Anderson et al., 1998, J. AIDS Hum. Retrovirol. 17: 245).

Frage (5):

**[0185]** Was treibt die T-Zellproliferation bei einer fortgeschrittenen HIV-1 Erkrankung an?

**[0186]** Der Vergleich von T-Zellproliferationsraten in den drei HIV-1 infizierten Gruppen ([Fig. 11B](#)) zeigt, dass die T-Zellregeneration unter diesen Bedingungen größtenteils antigen-getrieben ist. Die extrem hohe Proliferation von sowohl CD4<sup>+</sup> als auch CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Kurzzeit-HAART (verglichen zu HIV-1 infizierten Subjekten, die keine HAART erhielten, sowie zu HIV-1 seronegativen Kontrollen) stehen im Gegensatz zu dem bemerkenswert niedrigeren Umsatz – sowohl anteilig als auch absolut – nach 12 bis 24 Monaten HAART. Die letzteren Umstände können die Normalisierung der antigenen Belastung widerspiegeln, wohingegen die frühere Situation mit antigenen Stimuli, einschließlich HIV-1 selbst sowie pathogenen Organismen, übersättigt ist. Diese Interpretation sagt vorher, dass der frühere Anstieg in der T-Zellproliferation hauptsächlich Gedächtnis-T-Zellen widerspiegelt – das heißt antigen-angetriebene Zellproliferation – und nicht mit einem variableren T-Zellrezeptor (TCR) Repertoire in Verbindung gebracht werden sollte (Connors et al., 1997, Nature Med. 3:

533). Im Gegensatz dazu, kann die Proliferation nach einer viralen Suppression über einen langen Zeitraum, wenn sie nicht antigen-getrieben ist, und insbesondere wenn sie die Maturierung im Thymus einschließt (McCune, 1997, Sem. Immunol. 9: 397), die Erzeugung von naiven T-Zellen mit der begleitenden Verbreiterung der Diversität des TCR-Repertoires einschließen.

**[0187]** Eine der rätselhaften Fragen über die Dynamiken von Immunzellen in AIDS war, warum die CD4<sup>+</sup> Zahlen nach HAART so schnell ansteigen, aber sich nach einer durch Knochenmarktransplantation oder Strahlungstherapie induzierten Lymphopenie viel langsamer erholen (Mackall et al., 1994, Blood 84: 2221; Mackall et al., 1997, Immunol Today 18: 245; Makall et al., 1997, Blood 89: 3700). Die Vermutung, dass die HIV-1 Infektion irgendwie die T-Lymphopoiese stimuliert, war biologisch schwierig zu begründen. Ein antigen-getriebenes Modell – in Kombination mit einer weniger oder eher reversibel geschädigten Mikroumgebung in AIDS – könnte die Unterschiede zwischen diesen Umständen erklären. Die Ersatzraten von ungefähr 5 bis 47 CD4<sup>+</sup> Zellen/µL/Tag und 27 bis 81 CD8<sup>+</sup> Zellen/µL/Tag im Patienten nach 12 Wochen kombinierter Proteaseinhibitorbehandlung (Tabelle 4) sind mehr als ausreichend, um unter diesen Umständen relativ schnelle Veränderungen in der Poolgröße von zirkulierenden T-Zellen zu begründen – selbst wenn die anteiligen Abbauraten ebenfalls erhöht sind. Die auffallend niedrigeren Ersatzraten in Patienten nach 12 bis 24 Monaten HAART (2 bis 7 CD4 Zellen/µL/Tag und 4 bis 26 CD8 Zellen/µL/Tag) können eher die Kinetiken unter den Bedingungen nach einer Knochenmarktransplantation oder Strahlentherapie widerspiegeln. Die Messung der Lymphozytentodynamiken in diesen nicht mit HIV in Verbindung stehenden lymphopenischen Zuständen ist von Interesse.

Frage (6):

**[0188]** Hat eine anti-retrovirale Langzeit-Therapie andere Auswirkungen auf T-Zellen als eine Kurzzeit-Therapie?

**[0189]** Kürzliche Studien haben vorgeschlagen, dass die Phänotypen der T-Zell-Populationen nach 12 bis 18 Monaten Proteaseinhibitorenthaltender Medikamentenkuren anders beeinflusst werden, als während der anfänglichen 3–6 Monate der Behandlung (Autran et al., 1997, Science 277: 112; Connick et al., 1998, 5th Conference on Retroviral and Opportunistic Infections, Abstr. LB14: 225). Von besonderem Interesse ist, dass spätere Anstiege von T-Zellen des naiven Phänotyps (CD45Ra<sup>+</sup> CD62L<sup>+</sup>) berichtet wurden. Unsere Ergebnisse (Tabelle 4, [Fig. 11A](#) und [Fig. 11B](#)) zeigen nach einer Langzeit-, verglichen mit einer Kurzzeit-Therapie, sehr verschiedene T-Zell-Kinetiken. Nach 12–24 Monaten waren die anteiligen und absoluten Umsatzraten von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, verglichen mit den deutlich höheren Werten, die nach 3 Monaten HAART vorhanden waren, auf die normaler Kontrollen reduziert. In Verbindung mit Berichten, dass die Kinetiken während der anfänglichen 4–6 Wochen nach HAART hauptsächlich die Umverteilung zwischen Gewebe und Blut widerspiegeln (Zhang et al., 1998, Proc Natl. Acad. Sci. USA 95: 1154; Gorochov et al., 1998, Nature Med. 4: 215; Bucy et al., 1998, 5<sup>th</sup> Conference on Retroviral and Opportunistic Infections, Abstr. 519: 177) zeigen diese Daten, dass der Zeitraum nach HAART in mindestens drei unterschiedliche kinetische Phasen unterteilbar ist: eine anfängliche nicht steady-state (oder Umverteilungs-) Phase während der ersten 0–2 Monate, eine Phase der beschleunigten Proliferation und des Abbaus während der 2–6 Monatsphase und eine niedrige Umsatzphase danach, die sich möglicherweise durch naive T-Zellen-Regeneration und Immunrekonstitution auszeichnet. Dieses Modell der T-Zellen-Dynamiken ist zukünftig unter der Verwendung der Verfahren der vorliegenden Erfindung, die hierin beschrieben werden, testbar.

Frage (7):

**[0190]** Was sind die Schlussfolgerungen für andere Techniken zum Abschätzen der T-Zell-Kinetiken?

**[0191]** Die hierin präsentierten Ergebnisse – die direkte Messungen des T-Zell-Umsatzes mit der Anreicherungsrate von zirkulierenden T-Zellen im anfänglichen nicht steady-state Zustand ([Fig. 12](#)) vergleichen – deuten darauf hin, dass letzterer Ansatz bezüglich des wahren Umsatzes, selbst des zirkulierenden T-Zell-Pools, nicht informativ ist. Neben dem Unterschätzen des steady-state Umsatzes gab es keine verlässliche Korrelation mit den tatsächlichen Ersatzraten und Auswirkungen der Umverteilung auf die frühe Anreicherungsrate können nicht ausgeschlossen werden. Zusätzlich kann das Anreicherungsverfahren nicht angewendet werden, wenn die T-Zellzahlen stabil sind, und einige der interessanteren Subjekte in Gruppe III befanden sich in dieser Kategorie (Tabelle 4). Die Annahme, dass die CD4<sup>+</sup> T-Zellzerstörung als Folge der akuten Suppression der viralen Replikation auf Null verringert wird (Ho et al., 1995, Nature 373: 123–126; Wei et al., 1995, Nature 373: 117–122; Perelson et al., 1996, Science 271: 1582; Perelson et al., 1997, Nature 387: 188; Wain-Hobson, 1995, Nature 373: 102), ist nicht mit den hierin präsentierten Daten konsistent, da normale HIV-1 negative Subjekte einen CD4<sup>+</sup> T-Zellumsatz von ungefähr 11.4 Zellen/µL/Tag (oder  $2,8 \times 10^9$  Zellen/d im gesamten Körper)

besaßen. Somit spiegeln CD4 Anreicherungsraten im Blutstrom nach HAART weder die Proliferations- oder Abbauraten von Blut CD4<sup>+</sup> T-Zellen vor HAART noch nach HAART wieder.

**[0192]** Die Rate der telomeren TRF-Verkürzung wurde ebenfalls als ein Index der replikativen T-Zell Geschichte bei der HIV-1 Infektion verwendet (Wolthers et al., 1996, Science 274: 1543; Palmer et al., 1996, J. Exp. Med. 185: 1381). Dieses Verfahren ist aufgrund einer potentiellen Auswahlneigung gegen proliferierende Zellpopulation insbesondere bei der HIV-1 Infektion problematisch (siehe ebenfalls Hellerstein and McCune, 1997, Immunity 7: 583). Das Problem ist, dass, wenn HIV-1 vorzugsweise in aktivierte Zellen eindringt und diese tötet, die TRF Längen überlebender Zellen nicht die replikative Geschichte der Gesamtpopulation wider-spiegeln. Weder Wolthers et al. noch Palmer et al. fanden eine höhere Rate der TRF-Verkürzung für CD4<sup>+</sup> T-Zellen in HIV-1 infizierten Patienten verglichen mit HIV-1 seronegativen Kontrollen (Siehe Wolthers et al., 1996, Science 274: 1543; Palmer et al., 1996, J. Exp. Med. 185: 1381), aber Wolthers et al. haben seitdem festgestellt, dass ein Anstieg in dem anteiligen Umsatz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen bis zu 3-fach über Normalwerten immer noch mit ihren TRF-Daten kompatibel sein würde, wenn HIV-1 eine 30%-ige Effizienz für die Infektion und Zerstörung von proliferierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen besitzen würde (siehe Wolthers et al., 1998, Immunol. Today 19: 44). Gemäß dieser Formulierung ist unser Ergebnis eines ca. 3-fach höheren k-Werts in HIV+ Subjekten konsistent mit den TRF-Daten. Der Bericht (Wolthers et al., 1996, Science 274: 1543; Palmer et al., 1996, J. Exp. Med. 185: 1381) eines höheren CD8<sup>+</sup> T-Zellumsatzes in HIV-1 infizierten Subjekten verglichen mit HIV-1 seronegativen Kontrollen, ist ebenfalls mit den hierin präsentierten Ergebnissen konsistent, wenn proliferierende CD8<sup>+</sup> T-Zellen präferenziell nicht von HIV-1 infiziert und zerstört werden.

Frage (8):

**[0193]** Haben diese Ergebnisse irgendeine Bedeutung auf die klinische Behandlung von HIV-1 infizierten Patienten?

**[0194]** Ein wichtiges Merkmal dieser kinetischen Ergebnisse war die bemerkenswerte Heterogenität unter den Individuen jeder Gruppe, insbesondere in Form der dynamischen Antwort auf HAART (Tabelle 4). Wahrscheinlich beeinflussen viele Faktoren, einschließlich das Stadium der Erkrankung, die Kontrolle der viralen Replikation, das Alter des Patienten, die antigene Belastung, die Thymusfunktion und die Fähigkeit des lymphoiden Gewebes die antigen-abhängige T-Zellregeneration zu unterstützen, die T-Zell-Kinetiken. Heterogenität innerhalb einer Krankheitspopulation wirft die Möglichkeit auf, pathogen unterschiedliche, klinische Subgruppen zu identifizieren.

**[0195]** Bestimmte hierin untersuchte Individuen lassen vermuten, dass klinische Subgruppen existieren und identifizierbar sind. Zwei Beispiele stammen aus der Kurzzeit HAART Gruppe (Gruppe III, Tabelle 4): Patient #4 (43 Jahre alter Mann mit AIDS). Obwohl die Plasmavirenbeladung bei HAART von 157000 auf < 500 fiel, gab es nur einen kleinen Anstieg in der CD4 Zahl (von 83 auf 135 CD4/ $\mu$ L). Die absolute Proliferationsrate in diesem Subjekt betrug nur 4,4 Zellen/ $\mu$ L/Tag ( $1,1 \times 10^9$  Zellen/d), verglichen mit einem Mittelwert von 90,2 Zellen/ $\mu$ L/Tag für die Gruppe III insgesamt. Patienten dieser Art können einen weiter fortgeschrittenen Schaden des T-lymphopoietischen Systems widerspiegeln und können Kandidaten für immunstimulatorische Adjuvans-Therapien (zum Beispiel Interleukin-2, Transplantation von Thymusgewebe oder Vorläuferzellen) sein.

**[0196]** Patient #6 (48 Jahre alter Mann mit AIDS). Dieser Patient hatte zuvor bei einem anderen Proteaseinhibitor versagt (Indinavir, virale Beladung = 28000) und dann eine vorübergehende Antwort auf Ritonavir/Saquinavir vor einem weiteren Versagen (virale Beladung = 47000). Nichtsdestotrotz behielt er eine CD4 Zahl um 450 Zellen/ $\mu$ L und hatte eine absolute Proliferationsrate von 47,1 Zellen/ $\mu$ L/d ( $12,5 \times 10^9$  Zellen/d). Somit wurde trotz der Halbwertszeit seiner Blut-CD4-Zellen von nur 6,5 Tagen ( $k = 0,105 \text{ d}^{-1}$ ) der zirkulierende CD4-Pool durch eine sehr hohe T-Zell-Regenerationsrate aufrechterhalten. Diese Ergebnisse zeigen eine Fähigkeit der T-Zell-Regenerationssysteme, die nicht ausgehend von der Messung der Plasmavirenbeladung ersichtlich ist, und die sogar auf einen günstigen Effekt der anti-retroviralen Therapie bei "virologischem Versagen" (zum Beispiel vielleicht sekundär zu lokalen Wirkungen auf die T-Lymphozyten-Regeneration, veränderte Pathogenität des Virus, etc.) hindeuten kann.

**[0197]** Die Kinetiken bieten ebenfalls klinisch nützliche Informationen bezüglich des Zeitraums bis zum Beginn einer anti-retroviralen Therapie. Wenn Veränderungen in den T-Zell-Dynamiken ("Stress") Veränderungen in der T-Zell-Poolgröße ("Belastung") vorausgehen, können Messungen der erstenen die Prävention der letzteren ermöglichen.

**[0198]** Zusammenfassend liefert die vorliegende Erfindung Messungen zum direkten Messen der T-Zellen-Kinetiken in Menschen. Mit solchen Verfahren können fundamentale Fragen der Immunpathogenese von HIV-1 behandelt werden. Die hierin präsentierten Ergebnisse konzentrieren sich auf die T-Zell-Regenerationssysteme in der Pathogenese der HIV-1-Erkrankung und bei der Antwort auf eine anti-retrovirale Therapie. Die Ergebnisse zeigen ebenfalls, dass Mechanismen neben der direkten HIV-1 vermittelten CD4<sup>+</sup> T-Zell-Abtötung der Grund für den meisten T-Zell-Umsatz in einer fortgeschrittenen HIV-1-Erkrankung sind, und dass der T-Zell-Umsatz unter den Bedingungen nach einer HAART antigen-getrieben ist. Wie für den Durchschnittsfachmann basierend auf der hierin gelieferten detaillierten Offenbarung offensichtlich ist, sind die Verfahren der vorliegenden Erfindung breit auf andere Aspekte der HIV-1-Immunopathogenese und in vivo Therapie anwendbar.

**[0199]** Von dem Vorausgegangenen sollte es offensichtlich sein, dass viele der beschriebenen Verfahren verschiedene allgemeine Merkmale besitzen, die knapp wie folgt ausgedrückt werden können: in vitro und in vivo Verwendung eines stabilen Isotopenmarkers, um die DNA einer Zelle über den de novo Nukleotidsyntheseweg zu markieren. In vitro und in vivo Verwendung eines stabilen Isotopenmarkers, um die DNA einer Zelle über den de novo Nukleotidsyntheseweg zu markieren und um die zellulären Proliferations- und/oder zellulären Abbauraten zu messen. Verwendung eines stabilen Isotopenmarkers und eines nicht stabilen radioaktiven Isotopenmarkers, um die DNA einer Zelle zu markieren, einschließlich der Markierung einer solchen Zelle über den de novo Nukleotidsyntheseweg. Verwendung eines stabilen Isotopenmarkers und eines radioaktiven Isotopenmarkers, um die DNA einer Zelle über den de novo Nukleotidsyntheseweg zu markieren, um die zellulären Proliferations- und/oder zellulären Abbauraten zu messen. Verwendung eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut worden ist, um ein Agens auf seine Fähigkeit zu untersuchen, die zelluläre Proliferation zu induzieren oder zu inhibieren. Verwendung eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wurde, um die Anfälligkeit eines Subjektes gegenüber einer Krankheit, die die zelluläre Proliferation oder den zellulären Abbau oder eine Veränderung in einer Rate der zellulären Proliferation oder des zellulären Abbaus induziert, zu bestimmen.

### Patentansprüche

1. Ein in vitro Verfahren zum Markieren von DNA in einer Zelle, wobei humane Embryonen ausgeschlossen sind, das das in Kontakt bringen der Zelle mit einer detektierbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, umfasst.

2. Ein in vitro Verfahren zum Messen der Rate der zellulären Proliferation oder der zellulären Destruktion, das das in Kontakt bringen einer Zelle, wobei humane Embryonen ausgeschlossen sind, mit einer detektierbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, das Markieren der DNA in einer Zelle nach dem Verfahren gemäß Anspruch 1, das Detektieren des Markers in der DNA und das Bestimmen einer Menge der Markierung, die in die DNA eingebaut ist, um die zelluläre Proliferation oder zelluläre Destruktion zu messen, umfasst.

3. Das Verfahren gemäß Anspruch 2, zur Verwendung beim Auswählen eines Agens mit der Kapazität die zelluläre Proliferation zu induzieren oder zu inhibieren, das weiter den Schritt umfasst:  
– in Kontakt bringen der Zelle mit dem Agens.

4. Das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei der Marker einem Vorläufer der Desoxyribose im de novo Nukleotidsyntheseweg angeheftet wird, wobei der Vorläufer in die Desoxyribose eingebaut wird.

5. Das Verfahren gemäß Anspruch 4, wobei der Vorläufer markierte Glucose ist.

6. Das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die DNA vor dem Detektieren des Markers in der DNA zu Desoxyribonukleosiden hydrolysiert wird.

7. Das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, wobei der Marker durch Massenspektrometrie detektiert wird.

8. Das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei die Zellen humane Zellen sind.

9. Das Verfahren gemäß Anspruch 8, wobei die humanen Zellen eine durch das Humane Immunodefizienz Virus (HIV) infizierte T-Zelle ist.

10. Das Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die T-Zelle eine CD4<sup>+</sup> oder CD8<sup>+</sup> Zelle umfasst.
11. Das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Zelle eine Krebszelle oder eine Lymphozytenzelle ist.
12. Das Verfahren gemäß Anspruch 11, wobei der Lymphozyt eine CD4<sup>+</sup> Zelle umfasst.
13. Das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Zelle eine Zelle ist, die ein Krebsrisiko aufweist.
14. Das Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei das Agens ein antiretrovirales Agens ist.
15. Ein in vitro Verfahren zum Markieren von DNA in einer Probe, die einer proliferierenden Zellpopulation entnommen wurde, wobei humane Embryonen ausgeschlossen sind, wobei das Verfahren umfasst:
  - Markieren der DNA in der Probe mit einem ersten Marker, wobei das Markieren das in Kontakt bringen der Zelle mit einer detektierbaren Menge eines stabilen Isotopenmarkers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird;
  - in Kontakt bringen der Probe mit einer detektierbaren Menge eines zweiten Markers, der über den de novo Nukleotidsyntheseweg in die DNA eingebaut wird, wobei die zweite Markierung einen radioaktiven Isotopenmarker oder einen anderen stabilen Isotopenmarker umfasst als der erste Marker.
16. Das Verfahren gemäß Anspruch 15, wobei der erste Marker und der zweite Marker in dem de novo Nukleotidsyntheseweg jeweils in einen Vorläufer der Desoxyribose eingebaut werden, wobei jeder der Vorläufer in Desoxyribose eingebaut wird.
17. Das Verfahren gemäß Anspruch 16, wobei der erste Marker und der zweite Marker jeweils markierte Glukose umfassen.
18. Das Verfahren gemäß einem der Ansprüche 15 bis 17, das weiter umfasst:
  - Detektieren des ersten Markers, der in die DNA eingebaut ist, zum Messen der zellulärer Proliferation in der proliferierenden Zellpopulation; und
  - Detektieren des zweiten Markers, der in die DNA eingebaut ist, zum Messen der zellulären Proliferation in der proliferierenden Zellpopulation.
19. Das Verfahren gemäß Anspruch 18, wobei eine oder beide der DNA, in die der erste Marker eingebaut ist, und die DNA, in die der zweite Marker eingebaut ist, vor dem Detektieren der Marker in der DNA zu Desoxyribonukleosiden hydrolysiert wird/werden, um die zelluläre Proliferation in der proliferierenden Zellpopulation zu messen.
20. Das Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 19, wobei der erste Marker durch Massenspektrometrie detektiert wird.
21. Das Verfahren gemäß Anspruch 18 oder 19, wobei der zweite Marker durch Massenspektrometrie, Flüssig-Szintillationszählung, oder Gammastrahlenzählung detektiert wird.

Es folgen 17 Blatt Zeichnungen

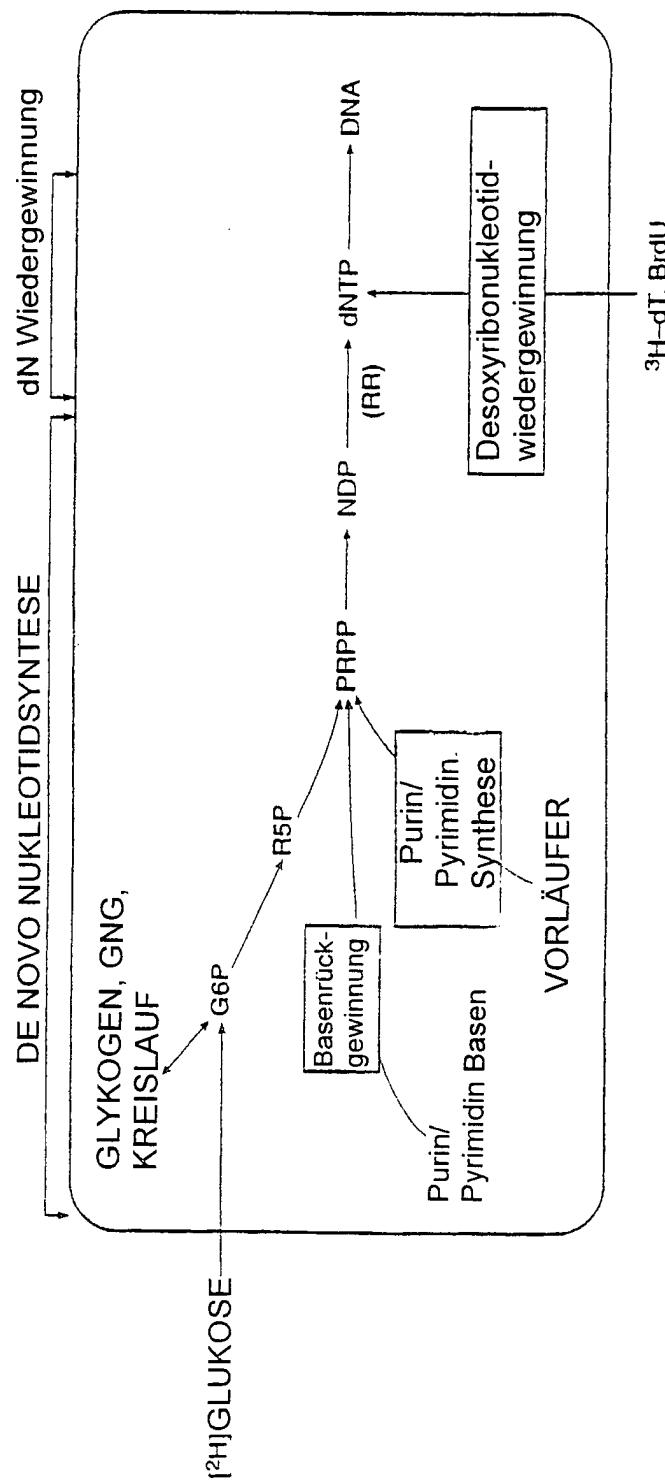


FIG. 1

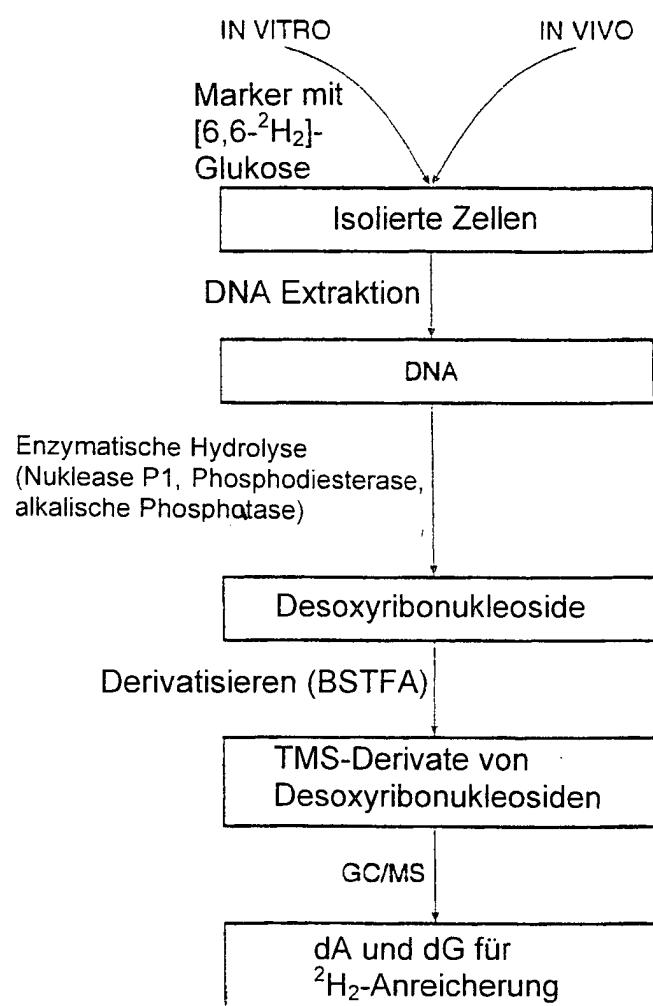


FIG. 2

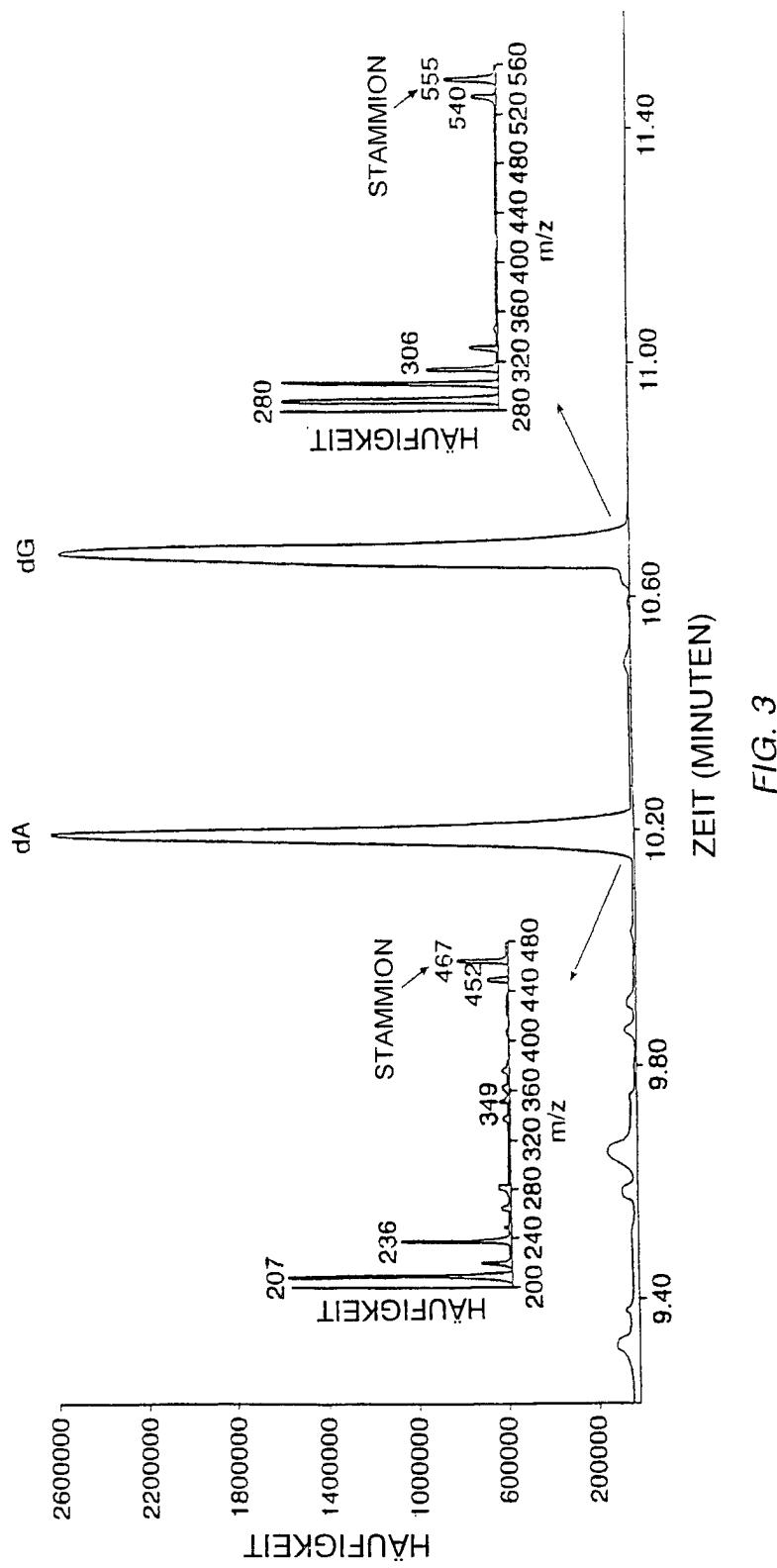


FIG. 3

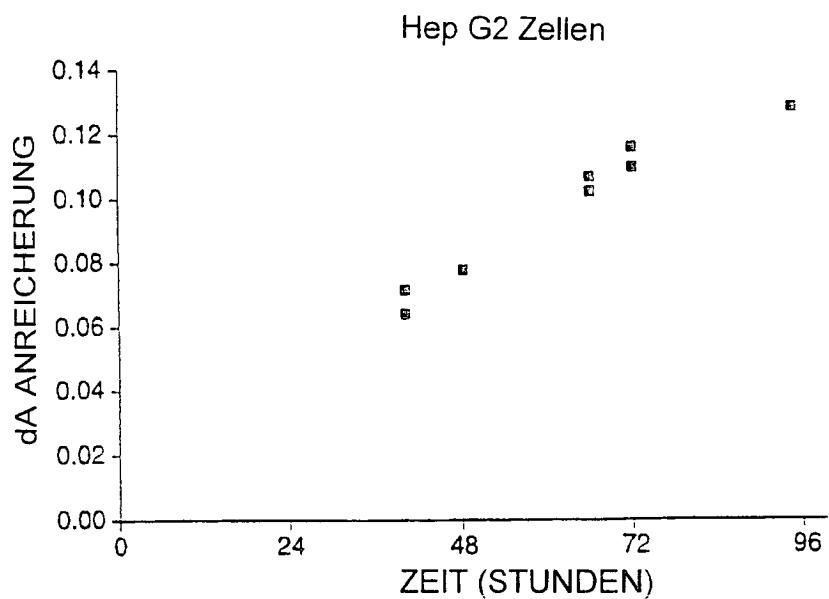


FIG. 4A

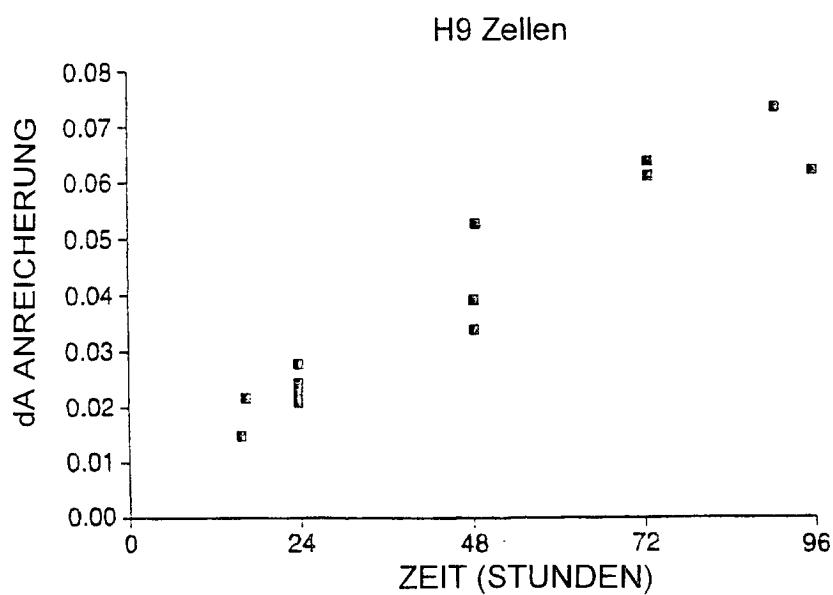


FIG. 4B

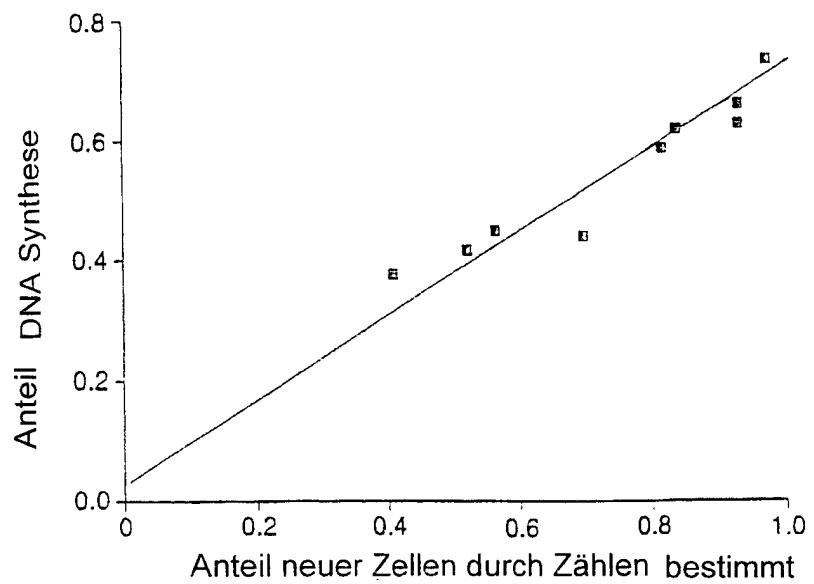


FIG. 4C

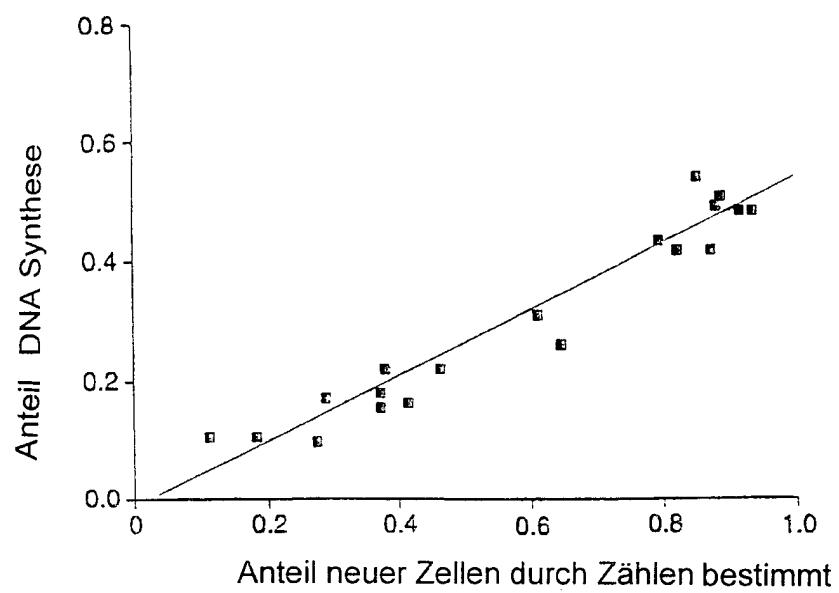


FIG. 4D

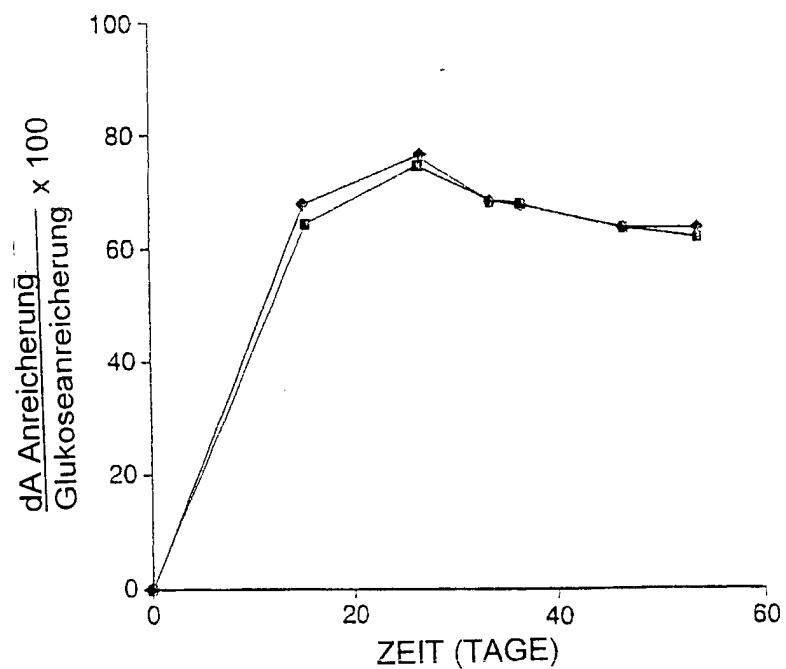


FIG. 5A

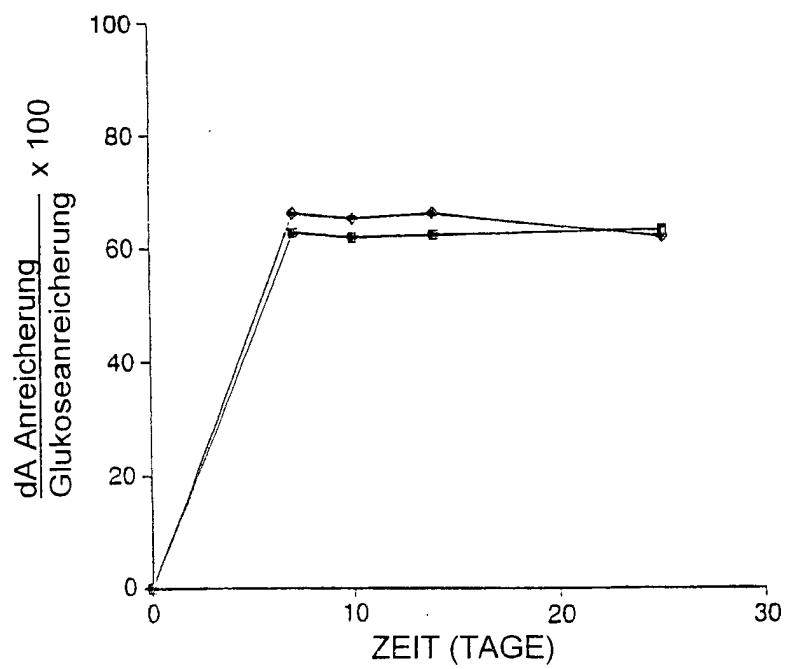


FIG. 5B

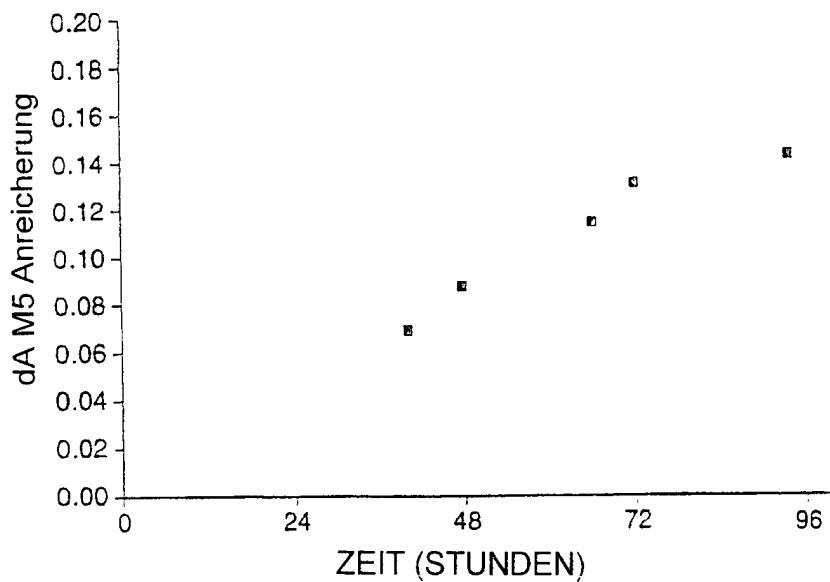


FIG. 6A

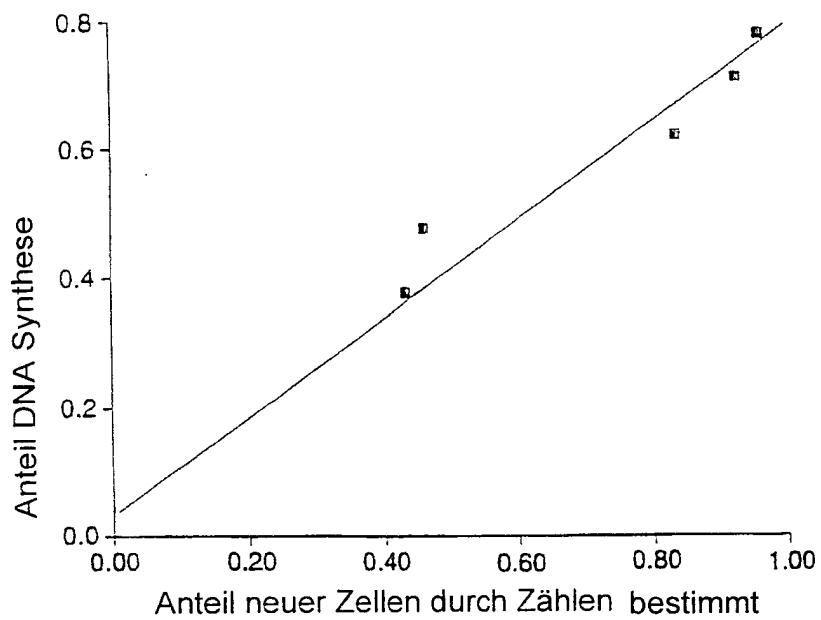


FIG. 6B

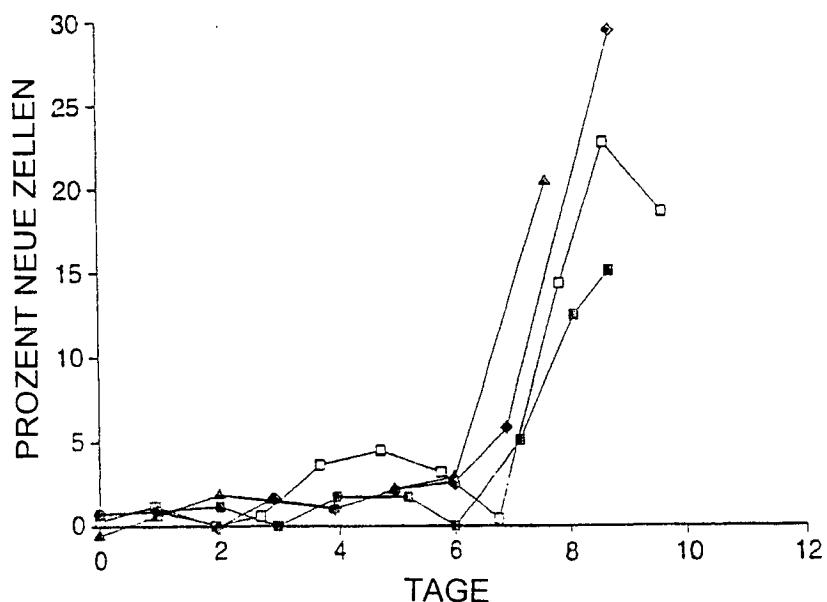


FIG. 7

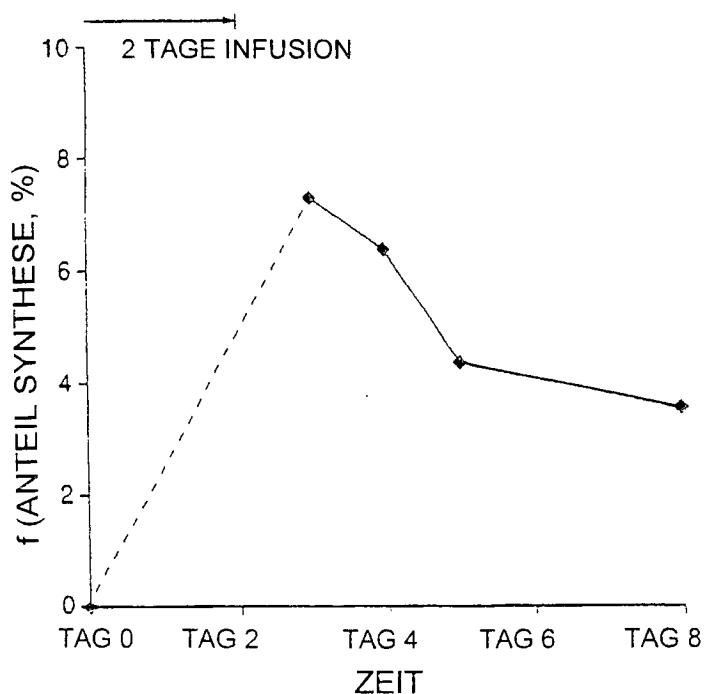


FIG. 8

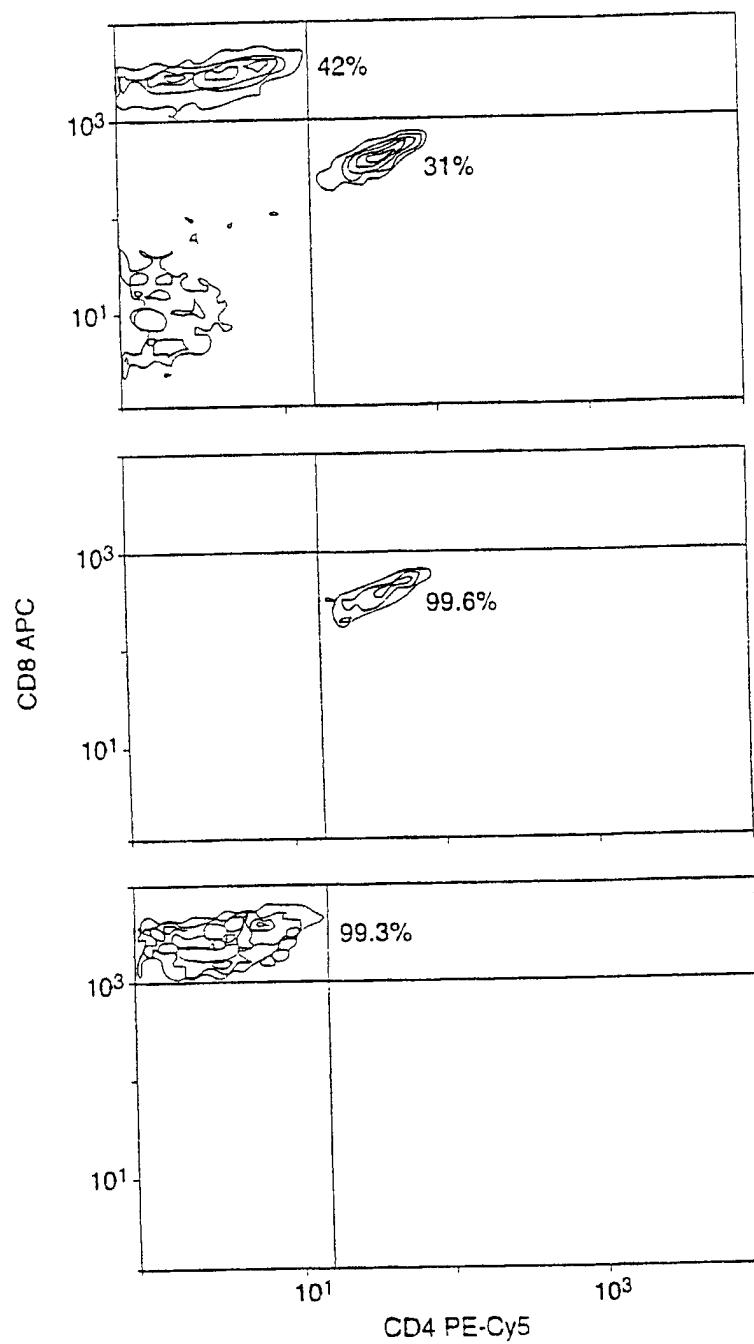


FIG. 9A

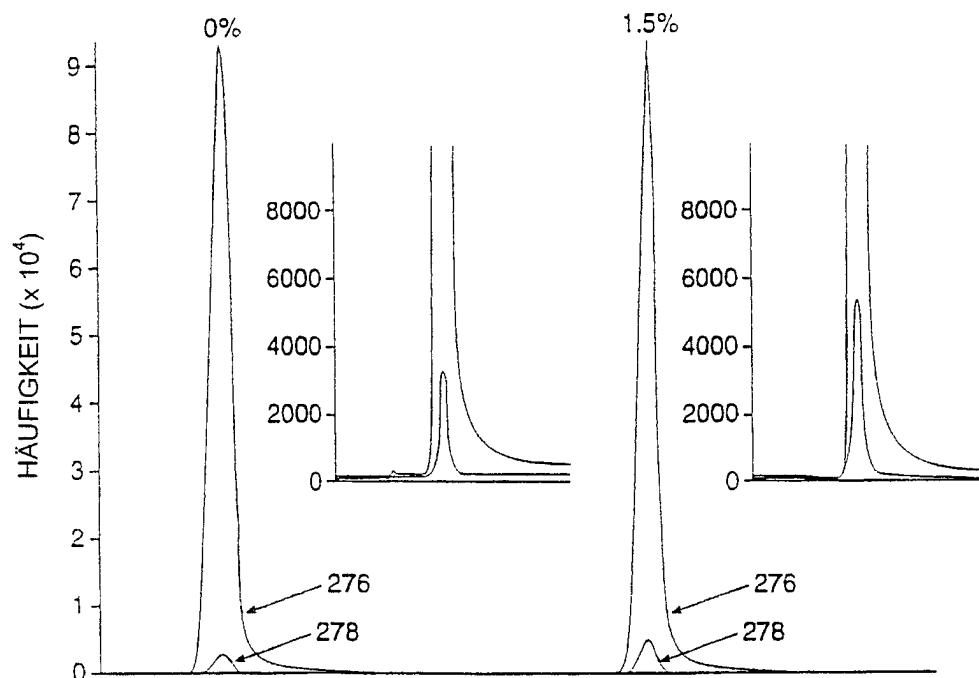


FIG. 9B

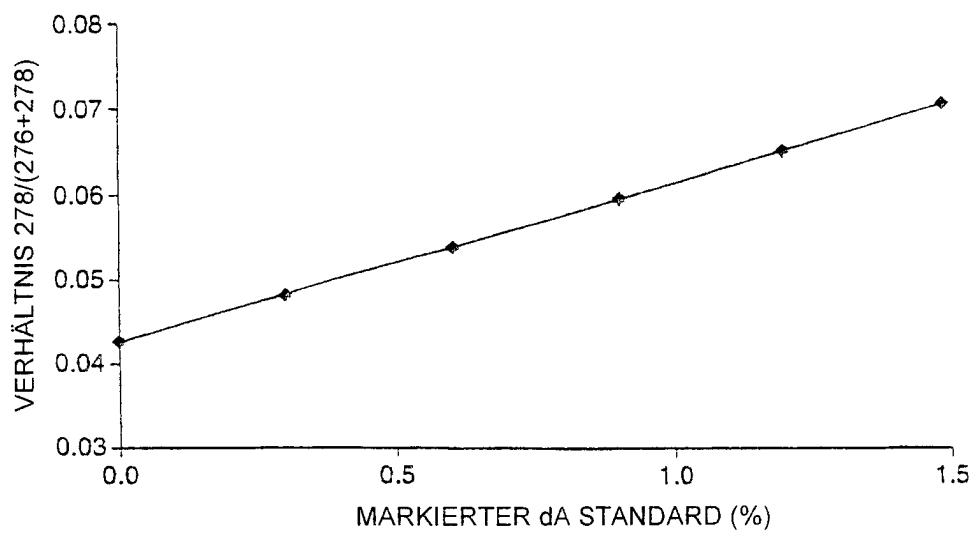


FIG. 9C

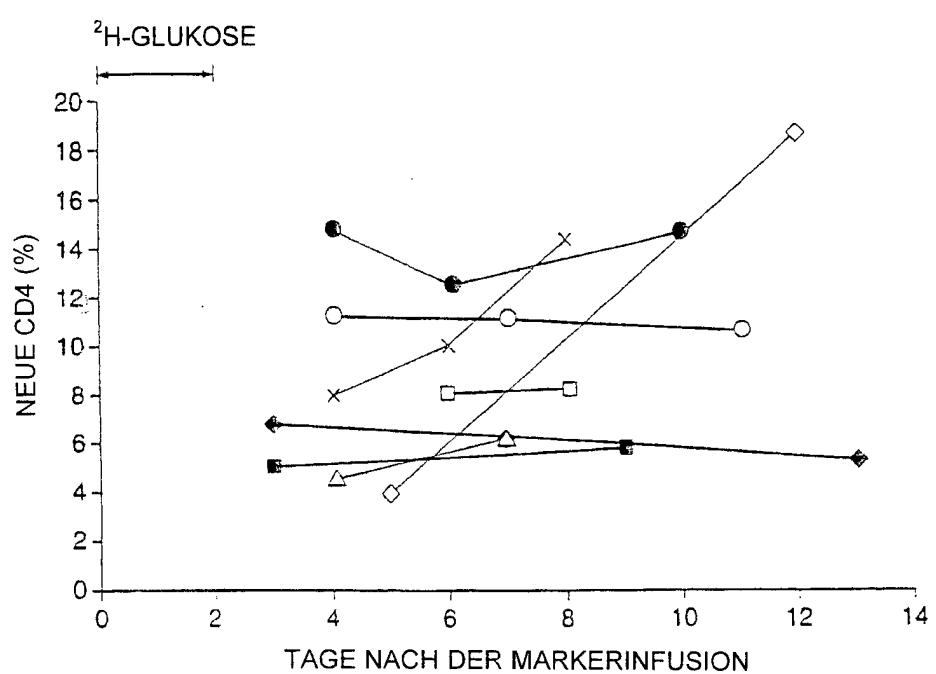


FIG. 10

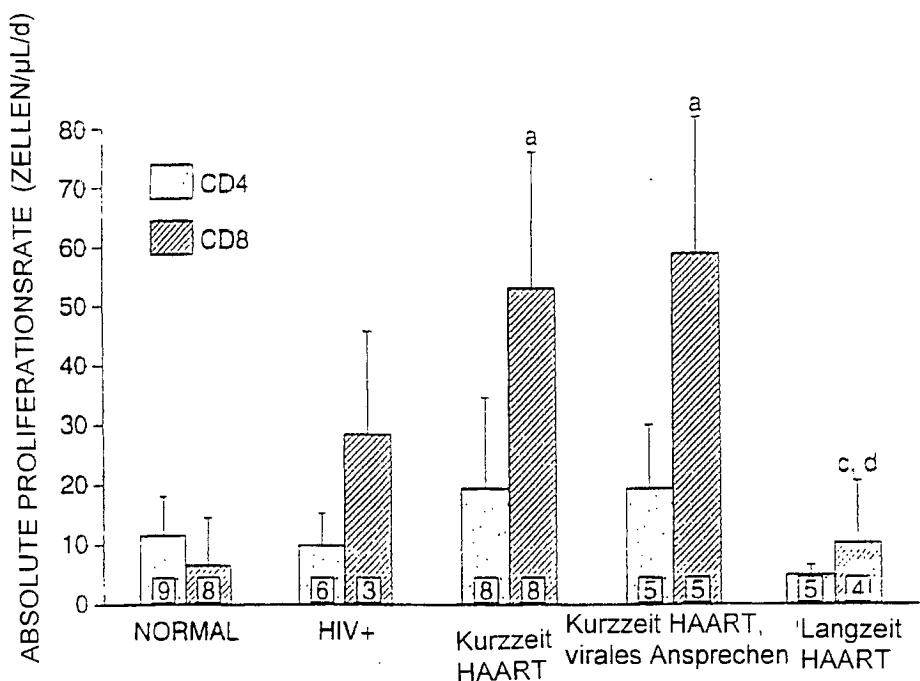


FIG. 11A

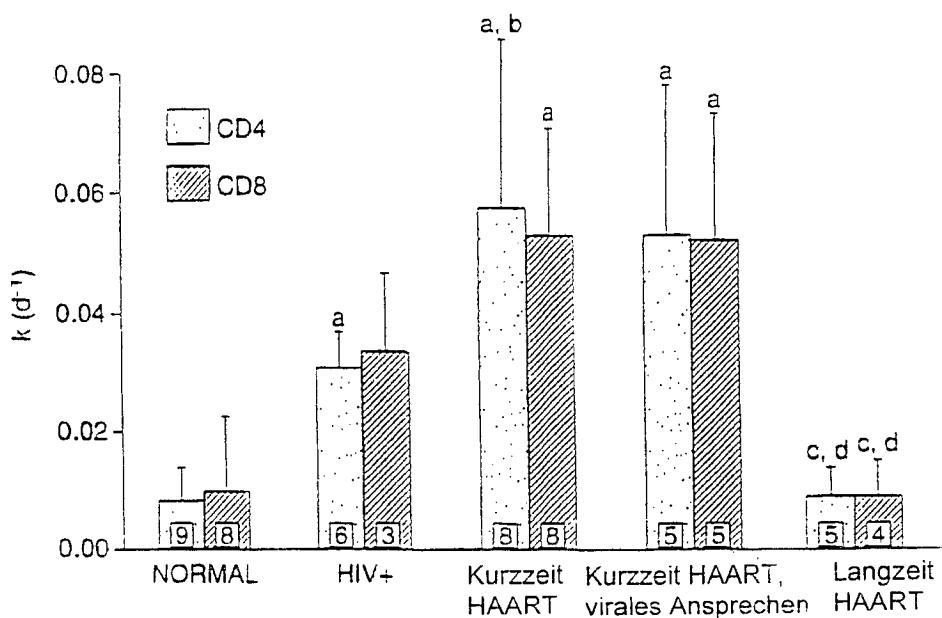


FIG. 11B

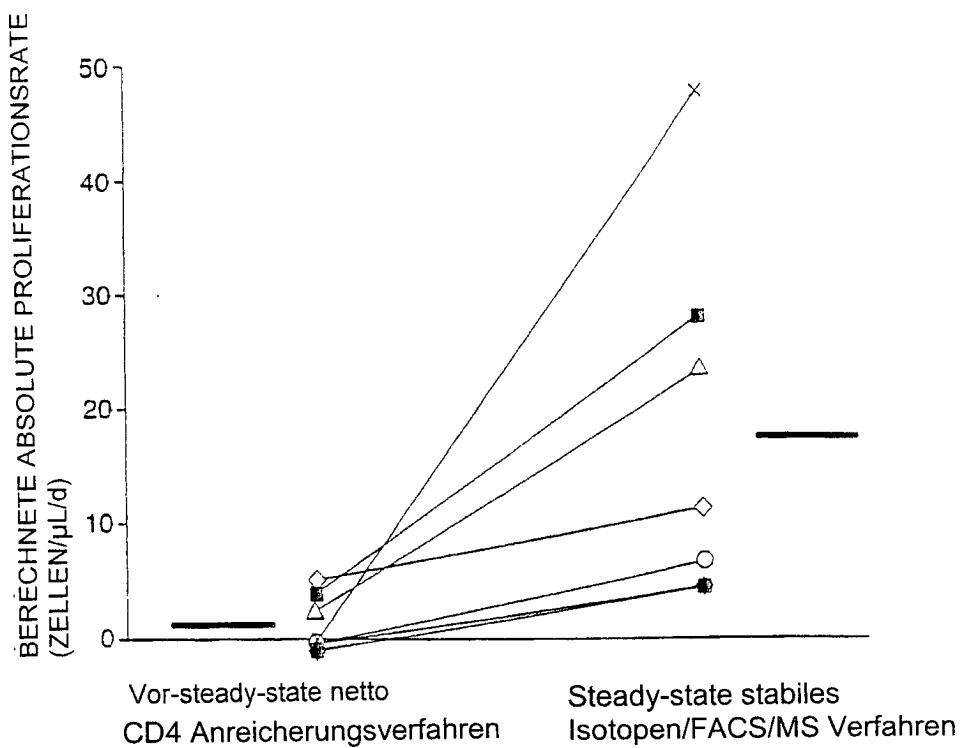


FIG. 12

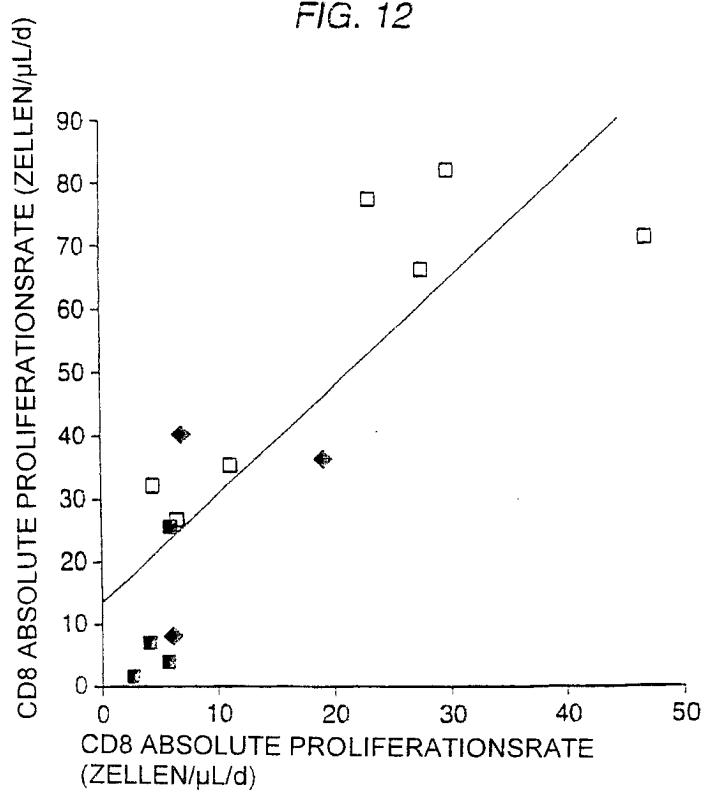


FIG. 13A

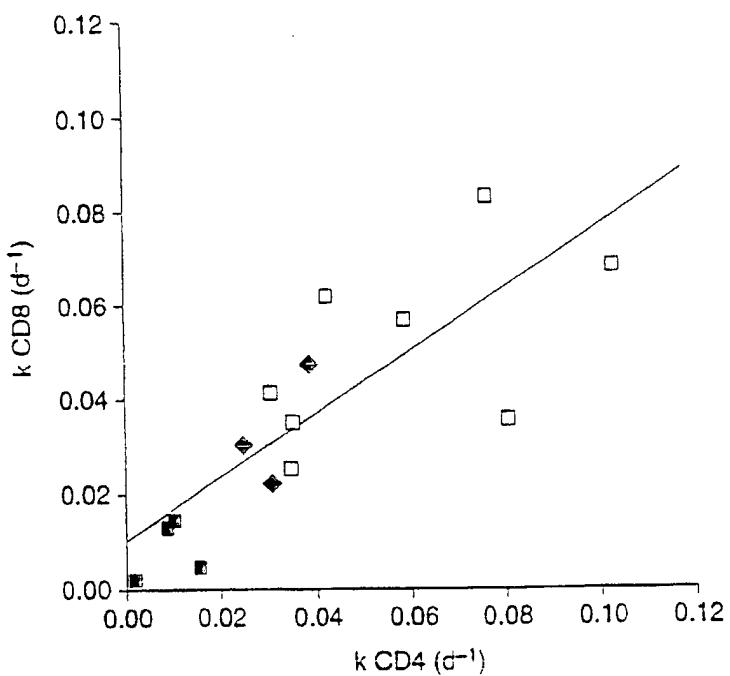


FIG. 13B

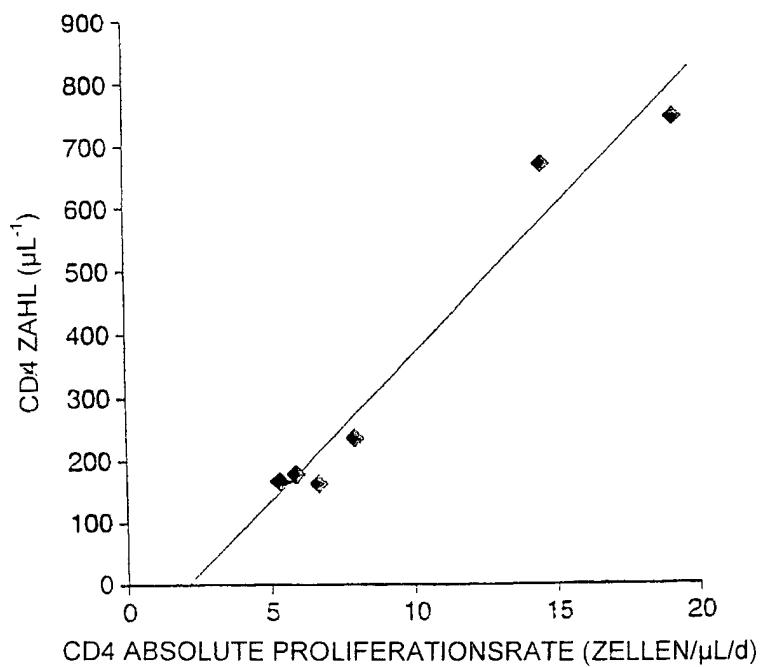


FIG. 13C

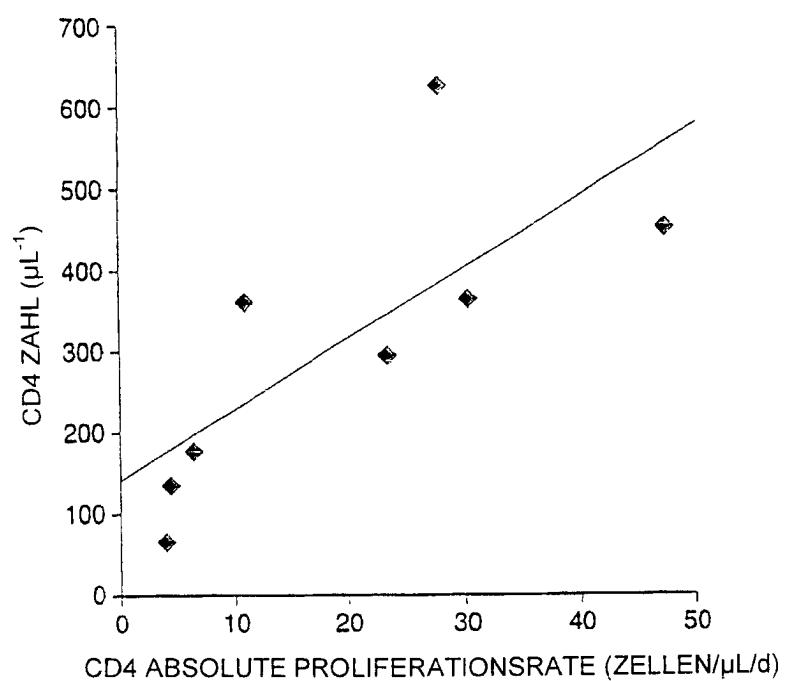


FIG. 13D

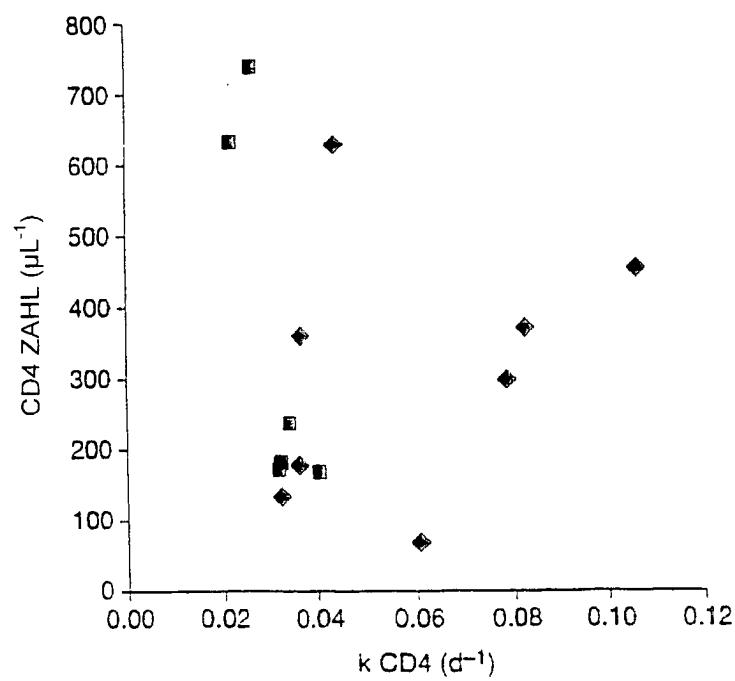


FIG. 13E

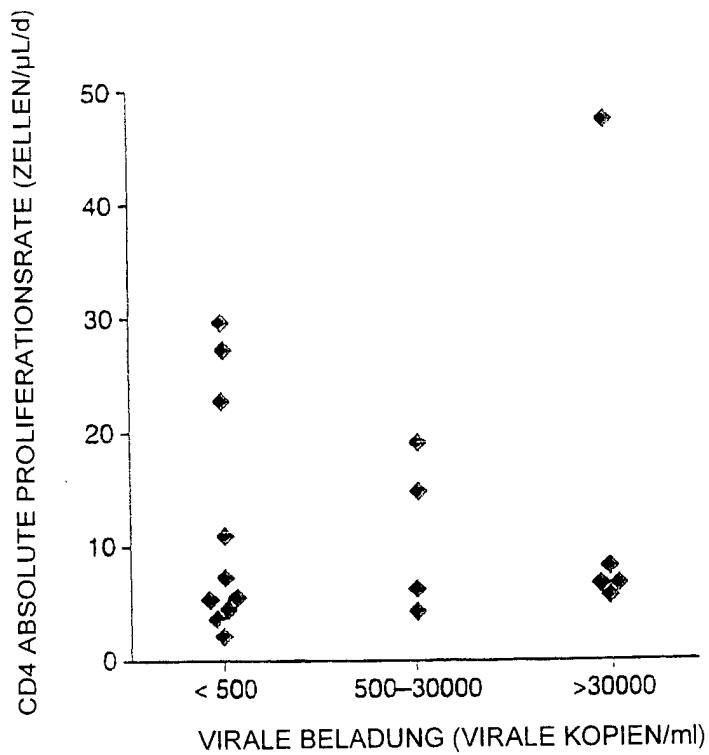


FIG. 13F

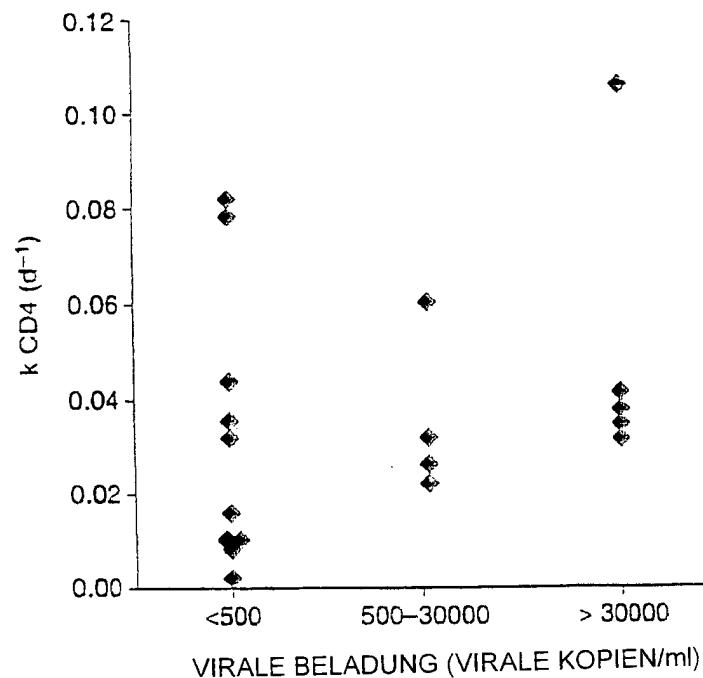


FIG. 13G

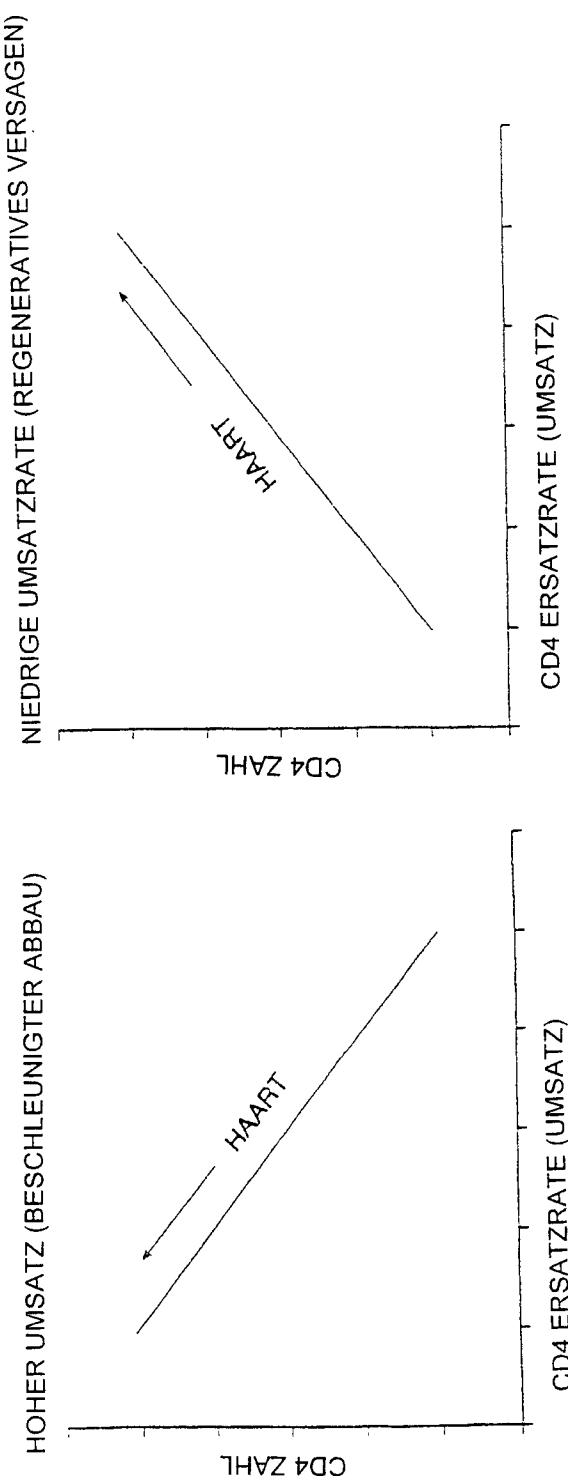


FIG. 14