

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/11

C12N 5/10

A61K 48/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03813501.9

[43] 公开日 2005 年 8 月 24 日

[11] 公开号 CN 1659281A

[22] 申请日 2003.4.11 [21] 申请号 03813501.9

[30] 优先权

[32] 2002.4.12 [33] EP [31] 02076434.6

[86] 国际申请 PCT/NL2003/000279 2003.4.11

[87] 国际公布 WO2003/087371 英 2003.10.23

[85] 进入国家阶段日期 2004.12.10

[71] 申请人 维如维申股份有限公司

地址 荷兰莱顿

[72] 发明人 彼得鲁斯·特奥多鲁斯·德哈恩

[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

代理人 林晓红

权利要求书 3 页 说明书 30 页

[54] 发明名称 基于 RNA 干扰的抗病毒疗法

[57] 摘要

本发明涉及一种新的治疗患有慢性病毒如 HIV 或 HCV 感染的动物和人的基因疗法。这种方法也可以预防性用于预防慢性感染。所述疗法利用稳定整合进病毒靶细胞的基因组中的核苷酸构建体，其能产生能形成抑制病毒原位复制的双链 RNA 的单个转录物或多个转录物。

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

1、一种抑制慢性病毒在动物或人体细胞中复制的方法，其通过将一种核苷酸构建体稳定整合进病毒的靶细胞或者其能产生所述病毒靶细胞的祖细胞的基因组中而进行，该核苷酸构建体能产生一或多种能形成双链 RNA 的转录物，所述双链 RNA 具有与所述病毒的病毒复制所必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列。

2、权利要求 1 的方法，其中所述稳定整合通过用一种病毒载体转导所述靶细胞或所述祖细胞而实现，所述病毒载体衍生自选自反转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒或单纯疱疹病毒组成的组中的一种病毒。

3、权利要求 1 或 2 的方法，其中所述稳定整合通过用一种病毒载体转导所述靶细胞或所述祖细胞而实现，所述病毒载体衍生自慢病毒或腺伴随病毒。

4、前述权利要求任一项的方法，其中所述祖细胞是干细胞。

5、一种抑制人免疫缺陷病毒复制的方法，包括如下步骤：

a) 分离选自造血干细胞、淋巴干细胞和辅助 T 淋巴细胞的人细胞；

b) 将一种核苷酸构建体稳定整合进所述细胞的基因组中，所述构建体能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物，所述双链 RNA 具有与人免疫缺陷病毒的复制所必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列；

c) 将所述细胞再导入从中分离所述细胞的人体中。

6、一种抑制丙型肝炎病毒复制的方法，包括

a) 从人体分离肝细胞、肝干细胞、间充质成熟祖细胞、间充质干细胞或造血干细胞；

b) 将一种核苷酸构建体导入所述细胞中，所述核苷酸构建体能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物，所述双链 RNA 具有

与丙型肝炎病毒的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列；以及

c) 将所述细胞再导入从中分离所述细胞的人体的肝脏中。

7. 一种是慢性病毒靶细胞的动物或人体细胞，其特征在于其中导入能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物的一种核苷酸构建体，所述双链 RNA 具有与所述慢性病毒的复制所必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列，所述核苷酸构建体稳定整合进所述动物或人体细胞的基因组中。

8. 一种能产生慢性病毒靶细胞的动物或人祖细胞，其特征在于其中导入能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物的一种核苷酸构建体，所述双链 RNA 具有与所述病毒的复制所必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列，所述核苷酸构建体稳定整合进所述动物或人祖细胞的基因组中。

9. 一种人造血干细胞或淋巴干细胞或辅助 T 淋巴细胞，其特征在于其中导入能产生一种双链 RNA 的一种核苷酸构建体，所述双链 RNA 与人免疫缺陷病毒的复制所必需的一或多个核苷酸序列同源，所述核苷酸构建体稳定整合进所述动物或人细胞的基因组中。

10. 一种包含一种核苷酸构建体的病毒载体，所述核苷酸构建体携带具有至少 40 个核苷酸的一个核苷酸序列，其与能感染动物或人体细胞的一种慢性病毒的基因或基因的一部分同源，其中所述核苷酸序列还以一种反向重复序列存在或者其中所述核苷酸序列两侧有一个启动子，当核苷酸构建体被转录时能从所述序列及其反向重复序列中，或者从两侧各有一个启动子的所述序列中产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物，所述病毒载体还能将所述核苷酸构建体稳定整合进所述动物或人体细胞的基因组中。

11. 权利要求 10 的病毒载体，其中所述核苷酸序列及其反向重复序列由一个内含子分开。

12. 权利要求 10 或 11 的病毒载体，其特征在于其包含长度为至

少 40 个核苷酸的多个核苷酸序列，所述核苷酸序列与所述病毒的相同基因的不同部分或者与不同基因或其部分具有核苷酸序列同源性，其中所述核苷酸构建体还以反向重复序列存在，或者其中所述核苷酸构建体两侧各有一个启动子。

13. 权利要求 10—12 任一项的病毒载体，其中所述载体衍生自反转录病毒或慢病毒或腺伴随病毒。

14. 权利要求 10—13 任一项的载体在抑制动物或人细胞中一种慢性病毒复制中的应用。

15. 一种治疗患者细胞中慢性病毒感染的方法，所述方法包括将患有所述感染的患者的所述细胞或能产生所述细胞的祖细胞与一种治疗有效量的试剂接触，所述试剂将一种核苷酸构建体稳定整合进所述细胞或所述祖细胞的基因组中，该核苷酸构建体能产生一或多种能形成双链 RNA 的转录物，所述双链 RNA 具有与所述病毒的病毒复制必需的一或多个序列同源的核苷酸序列。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述慢性病毒是人免疫缺陷病毒，及其中所述细胞是造血干细胞、淋巴干细胞或者辅助 T 淋巴细胞。

17. 权利要求 15 的方法，其中所述慢性病毒是丙型肝炎病毒，及其中所述细胞是肝细胞、肝干细胞、间充质成熟祖细胞、间充质干细胞或者造血干细胞。

18. 权利要求 15—17 任一项的方法，其中所述试剂包含权利要求 10—13 任一项的病毒载体。

19. 权利要求 15—18 任一项的方法，其中在与所述试剂接触之前，将所述细胞或祖细胞从所述患者中分离，及其中所述细胞或祖细胞随后再导入所述患者体内。

基于 RNA 干扰的抗病毒疗法

发明领域

本发明涉及一种抗慢性病毒（chronic virus）如 HIV 和肝炎病毒的疗法。本发明特别涉及一种新的基于基因技术的疗法以抑制病毒复制及预防新的病毒粒的形成。

发明背景

慢性病毒是在感染的个体出现疾病症状之前长期潜伏的病毒。慢性病毒包括人免疫缺陷病毒(HIV)，Kaposi's 肉瘤相关疱疹病毒(KSHV)，Epstein-barr 病毒(EBV)，乙型肝炎病毒(HBV)和丙型肝炎病毒(HCV)。尤其 HIV 和 HCV 是影响全球人类健康的一个主要问题。感染 HIV 的患者在一定时期内丧失免疫应答并且可见致死性的获得性免疫缺陷综合征(AIDS)的典型症状。HCV 是导致慢性肝脏感染的因素，在受感染的个体中相当部分发展为致死性硬化或肝癌。迄今为止携带这些慢性病毒的患者还不能治愈。现有的抗 HIV 疗法是通过所谓的高活性抗反录病毒疗法 (Highly Active Anti-Retroviral Therapy, HAART)使用蛋白酶及反转录酶抑制剂以防止新的病毒粒形成。然而，HAART 很昂贵并因此最受影响的那些国家承担不起这笔花费。所述抑制剂有许多对健康不利的副作用而且患者不得不终生使用该药物。HCV 感染目前用 α -干扰素单独治疗或者与三氮唑核苷组合治疗，但成功率较低。另外，这两种药物的费用均很高。

因此大部分研究专注于疫苗的开发。然而，由于 HIV 和 HCV 基因组的高度突变率及因此逃脱上述治疗的病毒变体的快速出现迫切需要新的治疗方法。

HIV 属于反转录病毒科的慢病毒亚科。病毒粒由两个基因组单链 RNA 分子组成，所述 RNA 分子用蛋白质包裹成为核壳 (nucleocapsid)。附有糖蛋白突起的脂质包膜围绕在核壳周围。毒粒 (virion) 通过 gp120 与 CD4 受体的结合而进入特异的淋巴细胞中。所有造血细胞的成熟阶段均通过其表达由特异性单克隆抗体识别的膜分子 (分化簇 (clusters of differentiation), CD) 而区别。因此，用 CD4 受体装饰的辅助 T 细胞是主要靶位。然而，许多其它细胞类型如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、某些 B 细胞及造血干细胞(HSC) 也表达一些 CD4 并因此也可被 HIV 感染。在进入细胞后，核壳被释放在细胞质中，在此反转录酶 (包括在核壳中) 产生基因组 RNA 的一个 cDNA 拷贝。也包含在核壳中的反转录酶和 RNaseH 产生基因组 RNA 的线性双链 DNA 拷贝，其定向于核，在那里其作为前病毒 DNA (proviral DNA) 通过病毒整合酶整合进核 DNA 中，所述病毒整合酶也包含于核壳中。

前病毒基因组两侧有长末端重复(LTR)。5'LTR 含有病毒基因转录必需的增强子和启动子序列。3'LTR 含有病毒转录物聚腺苷酸化所需的聚腺苷酸化信号。前病毒含有三个结构基因：gag，编码核壳蛋白；pol，编码病毒酶；及 env，编码膜糖蛋白。成熟蛋白是在初级翻译产物的蛋白酶剪切之后形成。另外，前病毒具有编码涉及毒粒感染性、病毒装配及释放、病毒 mRNA 易位及基因组激活的调节蛋白的另外 5 个基因。rev, tat 和 nef 调节蛋白由早期多剪接 (multiple-spliced) 的 mRNA 分子编码，而结构蛋白和其它非结构蛋白由晚期单剪接 (single-spliced) 的 (env, vif, vpr 和 vpu) 和未剪接的 (pol 和 gag) mRNA 分子编码。

前病毒通过抗原结合或者通过用其它病毒感染而激活。前病毒激活引起编码调节蛋白包括 tat 和 rev 蛋白的基因表达。tat 进一步加强 5'LTR 启动子，而 rev 促进结构蛋白和病毒酶的表达。病毒核壳在细

胞质中形成，最后病毒粒从病毒感染的 CD4 细胞中出芽。在这个过程中，病毒杀死具有高于阈值 CD4 受体水平的辅助 T 细胞。其它感染的细胞类型完整保留。

HIV 感染因此在某一时间点引起 CD4+T 淋巴细胞的耗竭及可见典型的 AIDS 症状。未感染的 CD4 T 淋巴细胞丧失其应答新抗原的能力。总体抗体水平下降。胸腺中 T 淋巴细胞成熟受到抑制。出现细胞因子失衡，引起许多免疫异常。AIDS 患者最终死于进行性病原体感染及衰竭。

HCV 属于黄病毒科 (Flaviviridae)。病毒粒由一个正链基因组 RNA 分子组成，其用 C 蛋白包被成核壳。具有糖蛋白突起的脂质包膜围绕在核壳周围。所述 RNA 分子编码一个单一的大的多蛋白 (polyprotein)，其通过病毒和细胞蛋白酶在翻译时或之后切割为 10 种不同的成熟病毒蛋白，结构蛋白(C, E1, E2 和 p7)位于氨基末端部分，非结构蛋白(NS2, NS3, NS4a, NS4b, NS5a 和 NS5b)位于羧基末端。从与 C 编码区重叠的多蛋白不同的一个读框中，另一个非结构蛋白(p16)被编码。病毒粒具有肝细胞和淋巴细胞向性。在进入细胞后，核壳被释放在细胞质中，基因组 RNA 分子被直接翻译。病毒复制发生在感染的细胞的胞质中。大多数感染的个体成为慢性感染，通常表现为慢性肝炎。慢性 HCV 感染的病史在个体之间变化非常明显。一些个体具有最小限度的肝脏疾病而且从不产生并发症。其它个体产生严重的病变并通常在感染许多年后产生致死性肝硬化和/或肝细胞癌。肝硬化是肝脏移植的首要指征。HCV 特征在于其在慢性阶段期间在感染的细胞中以非常低的效价 (titre) 存在及其非常高的基因组可变性。这些特征显然不利于成功进行抗 HCV 治疗。

基因治疗已经被认为是引人注目的一种新的抗 AIDS 治疗方法 (Romano et al., Stem Cells 17: 191-202, 1999; Engel 和 Kohn, Front. Biosci. 4: 26-33, 1999; Buchsacher 和 Wong- Staal, Human Gene Therapy

12: 1013-1019, 2001)。迄今为止, 还未提出针对其它慢性病毒所致疾病的基因疗法。

就 HIV 感染的基因疗法有两个一般方案: 消除感染的细胞或者干扰病毒复制。第一个方案包括尝试提高患者抗 HIV 的免疫应答及尝试在 HIV 感染的细胞中表达毒素。到目前为止所报道的第二个方案包括显性阴性病毒蛋白的转基因表达(美国 5,908,923)、定向核酸酶和核糖核酸酶(Singwi 和 Joshi, *Front. Biosci.* 5: 556-579, 2001; Singwi et al., *Gene Therapy* 6: 913-921, 1999)、胞内抗体(Marasco et al., *Human Gene Therapy* 9: 1627-1642, 1998; Mhasshikar et al., *Human Gene Therapy* 10: 1453-1467, 1999)、干扰 RNA 分子(Lamothe and Joshi, *Front. Biosci.* 5 : 527-555, 2000)如有义诱骗 (decoy) RNA 分子(Rosenzweig et al., *J. of Virol.* 71 : 2740-2746, 1997; Kohn et al., *Blood* 94: 368-371, 1999)、反义 RNA 分子(WO 94/16066; DE 4225094; EP 0386563; Veres et al., *J. of Virology* 72: 1894-1901, 1998)和 HIV-特异性核酶(WO94/26877; Rigden et al., *Curr. Issues Mol. Biol.* 2: 61-69, 2000)。迄今为止使用 (HIV 感染的) 人细胞系或者分离自患者血样的 CD34+38-细胞仅进行了体外实验。现在充分确定细胞中的基因表达可以通过将一个 RNA 双链体 (如短 RNAi) 导入细胞中而被抑制, 所述 RNA 双链体具有与表达被抑制的基因的一部分相同的核苷酸序列(例如 WO 99/32619 和 WO 99/53050 所述)。这种双链 RNA 分子可以通过将一个双链 RNA(dsDNA)导入细胞中而在体内 (即在细胞中) 产生(WO 00/63364), 或者可以衍生自内源模板(WO 01/36646)。

已经使用相似的方案在其它活系统如植物中赋予病毒抗性。在植物中, 核酶、反义和有义诱骗 RNA 赋予相对低水平的和/或无效的病毒抗性, 例如仅有少量转化的细胞 (植物) 示出希望的表型。从这些实验中可以推断由这些分子赋予的抑制 HIV 复制的水平太低以至于在潜伏期不能完全保持 HIV 前病毒 DNA 分子。另外, 尽管出现将抑

制性双链 RNA 产物转移至子代细胞，但通过上述方法对特异基因表达的抑制仅短暂保持。因此在慢性病毒感染的情况中，现有技术中的方法未产生有效的治疗效果。一旦由于子代细胞未被有效保护而使得抑制变小，则毒粒最终再次出现或者再次激活。

因此仍需要更强有效的基因疗法以抑制 HIV 及其它慢性病毒包括 HCV 的复制。

发明概述

本发明提供了一种抑制慢性病毒在动物或人体细胞中复制的方法，通过将一种核苷酸构建体稳定整合进病毒的靶细胞或者其能产生所述病毒的靶细胞的祖细胞的基因组中而进行，所述核苷酸构建体能产生能形成双链 RNA 的一或多种转录物，所述双链 RNA 具有与病毒复制必需的病毒的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列。因此，本发明的一个实施方案还包括这样一种方法，其中祖细胞(即造血干细胞或淋巴干细胞或辅助 T 细胞(包括原初细胞和记忆细胞))具有所述核苷酸构建体及其中所述祖细胞能产生所述病毒的靶细胞。优选所述祖细胞是干细胞。

在 HIV 的具体情况中，本发明提供了抑制人免疫缺陷病毒复制的方法，包括如下步骤：

- a) 从人体细胞中分离造血干细胞、淋巴干细胞和辅助 T 淋巴细胞；
- b) 将一种核苷酸构建体稳定整合进所述细胞的基因组中，所述核苷酸构建体能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物，所述双链 RNA 具有与复制所必需的人免疫缺陷病毒的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列；及
- c) 将所述细胞再导入从中分离所述细胞的人体中。

或者，将一种核苷酸构建体通过原位导入而稳定整合进祖细胞

中,不用从人体分离所述细胞及再导入,所述核苷酸构建体能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物,所述双链 RNA 具有与人免疫缺陷病毒复制所必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列。

在 HCV 的具体情况中,本发明提供了抑制 HCV 复制的方法,包括如下步骤:

- a) 从一个人中分离肝细胞、肝干细胞、间充质成熟祖细胞、间充质干细胞或造血干细胞;
- b) 将一种核苷酸构建体导入所述细胞中,其能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物,所述双链 RNA 具有与丙型肝炎病毒的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列;及
- c) 将所述细胞再次导入从中分离所述细胞的人的肝脏中。

另外,本发明提供了是慢性病毒的靶细胞的动物或人体细胞,其特征在于细胞中导入了一种核苷酸构建体,所述核苷酸构建体稳定整合进所述细胞的基因组中而且能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物,所述双链 RNA 具有与所述病毒复制必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列。

另外本发明提供了能产生慢性病毒的靶细胞的动物或人体祖细胞,其特征在于所述祖细胞中导入了一种核苷酸构建体,所述核苷酸构建体稳定整合进所述祖细胞的基因组中而且其能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物,所述双链 RNA 具有与所述慢性病毒复制必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列。

更具体地,这种靶细胞是人造血干细胞或淋巴干细胞或辅助 T 淋巴细胞(包括原初细胞或记忆细胞),或者这种靶细胞可以是肝细胞或肝干细胞、间充质成熟祖细胞或间充质干细胞,所述细胞特征在于其中导入了一种核苷酸构建体,所述核苷酸构建体稳定整合进所述细胞的基因组中而且能产生一或多种能形成一种 dsRNA 的转录物,所述 dsRNA 具有与人免疫缺陷病毒复制所必需的一或多个核苷酸序列

同源的核苷酸序列。

本发明的另一部分是一种核苷酸构建体，其携带与能感染动物或人体细胞的慢性病毒的基因或基因的一部分同源的具有至少 40 个核苷酸的核苷酸序列，其中所述核苷酸序列也以一个反向重复序列存在或者其中所述核苷酸序列的两侧各有一个启动子 (said nucleotide sequence is flanked by two promoters)，而且该构建体可以稳定整合进所述细胞的基因组中，当其转录时从所述序列及其反向重复序列或者从由两侧各有一个启动子的序列中产生能形成 dsRNA 的一或多种转录物。优选在这种核苷酸构建体中，所述核苷酸序列与其反向重复序列由一个内含子分隔。本发明的另一个实施方案是如下这种核苷酸构建体，其包含长度为至少 40 个核苷酸的多个核苷酸序列，所述序列与所述病毒的相同基因的不同部分或者不同基因或其部分同源，其中所述核苷酸构建体也以一种反向重复序列存在，或者其中所述核苷酸构建体的两侧各有一个启动子。

另一方面，本发明提供了生产是一种慢性病毒的靶细胞的动物或人体细胞或者其祖细胞的一种方法，所述方法包括提供一种动物或人体细胞或者其祖细胞并将一种核苷酸构建体稳定整合进所提供的细胞的基因组中，所述核苷酸构建体能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物，所述双链 RNA 具有与所述病毒复制必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列。

另一方面，本发明提供了一种治疗患者细胞中慢性病毒感染的方法，所述方法包括将患有所述感染的患者的所述细胞或其能产生所述细胞的祖细胞与治疗有效量的试剂接触，所述试剂将一种核苷酸构建体稳定整合进所述细胞或所述祖细胞的基因组中，所述核苷酸构建体能产生一或多种能形成一种双链 RNA 的转录物，所述双链 RNA 具有与所述病毒复制所必需的一或多个核苷酸序列同源的核苷酸序列。

在这个方面的一个实施方案中，本发明提供了这样的一种方法，

其中所述慢性病毒是人免疫缺陷病毒，其中所述细胞是造血干细胞、淋巴干细胞或辅助 T 淋巴细胞。

在这个方面的另一个实施方案中，本发明提供这样的一种方法，其中所述慢性病毒是丙型肝炎病毒，其中所述细胞是肝细胞、肝干细胞、间充质成熟祖细胞，间充质干细胞或造血干细胞。

在治疗患者细胞中一种慢性病毒感染的方法的一个实施方案中，本发明提供了这样的一种方法，其中所述试剂包括本发明的一种病毒载体。

本发明的治疗慢性病毒感染的方法可以以多种方式进行。例如，在将感染的细胞或其祖细胞与所述试剂接触之前，将细胞或祖细胞从所述患者体内分离，之后将如此转导的细胞或祖细胞再导入所述患者体内。

发明详述

本文所用术语“干细胞”是机体内所有特化细胞的祖细胞，并包括位于骨髓内且不断产生多种血液和免疫系统细胞的血液干细胞(造血细胞)，作为新的骨、软骨和结缔组织细胞的来源的间充质干细胞、和产生多种神经系统组织的神经元干细胞。所有这些更特化的干细胞的前体是“多能干细胞(pluripotential stem cell)”(PSC)，其通过不对称分裂(即分裂产生一个分化的子细胞和一个未分化的干细胞)而分裂。所述更特化的干细胞包括“多能干细胞(multipotential stem cell)”淋巴祖细胞和髓样祖细胞。淋巴祖细胞(干细胞)包括前 B 细胞(产生 B-淋巴细胞，如浆细胞和记忆细胞)和前 T 细胞(产生 T-淋巴细胞(包括辅助 T 细胞，胞毒性 T 细胞，抑制性 T 细胞及或许还有 NK 细胞))。髓样祖细胞(干细胞)包括 GM 干细胞(产生粒细胞、单核细胞和巨噬细胞)，嗜酸性干细胞(产生非嗜酸性粒细胞)，巨核细胞干细胞(megakaryo-stem cell)(血小板)，及红细胞干细胞(erythro-stem cell)

(网织红细胞和红细胞)。其它更特化的干细胞是产生分化的子细胞如内皮祖细胞、神经祖细胞、少突胶质细胞祖细胞、胰腺祖细胞、造血祖细胞、胶质祖细胞或肝细胞祖细胞的那些细胞。

本文所用术语“祖细胞”是指作为得自细胞分裂的直系子细胞的祖先的那些细胞并包括多能及其它干细胞及一些特化的细胞。因此 T 淋巴细胞的祖细胞除了是干细胞之外,还可以是原初 T 淋巴细胞或记忆 T 淋巴细胞或任何 T 淋巴细胞或者产生子代 T 淋巴细胞的任何细胞。

本文所用术语“稳定整合”是指将一种核酸构建体长期或持久地掺入宿主细胞的基因组中,例如通过使用下文所述的载体或其它输送系统在进行接触后这种构建体被导入。这种掺入可以是同源重组的结果并使得细胞将此掺入染色体的构建体传播至来自细胞分裂的所有子细胞。

本文所用术语“核苷酸序列同源性”是指两个多核苷酸之间存在同源性。当进行最大程度相应性 (maximum correspondence) 对比时,如果两个序列中的核苷酸序列是相同的,则多核苷酸具有“同源”序列。两或多个多核苷酸之间的序列对比一般通过对比窗对比两个序列的一部分而进行,以鉴别及对比具有序列相似性的局部区域。所述对比窗一般是大约 20—200 个连续核苷酸。多核苷酸的“序列同源性百分比”,如 50, 60, 70, 80, 90, 95, 98, 99 或 100% 序列同源性可以通过对比窗对比两个最佳排列的序列而确定,其中对比窗中多核苷酸序列的一部分与参比序列(其不包含添加或缺失)相比可以包含添加或缺失(即缺口)以进行序列的最佳排列。所述百分比如下计算:
(a)确定两个序列中相同的核酸碱基的位置数以产生匹配的位置数;(b)将匹配的位置数除以对比窗中位置总数;及(c)将此结果乘以 100 以产生序列同源性百分比。进行对比的序列最佳排列可以通过已知算法的计算机进行或者通过目测而进行。易于获得的序列对比和多序列比对

算法分别为在互联网上可获得的 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Altschul, S.F. et al. 1990., J. Mol. Biol. 215:403; Altschul, S. F. et al. 1997., Nucleic Acid Res. 25: 3389-3402)和 ClustalW 程序。其它合适的程序包括 Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group (GCG), Madison, WI, USA)中的 GAP, BESTFIT 和 FASTA。

慢性病毒复制的抑制通过一种产生基因表达的序列特异性抑制的方法而获得, 通过导入在转录时能形成一或多种转录物的一种核苷酸构建体而进行, 所述转录物能形成 dsRNA。本发明提供了一种在人体或动物细胞中抑制同源病毒基因表达的方法, 所述细胞是病毒的靶细胞或者是能产生病毒靶细胞的细胞。所述方法包括导入核苷酸构建体, 所述构建体包含与病毒的复制必需序列同源的核苷酸序列, 其可以形成部分或完全双链的 RNA 分子。当在靶细胞中存在时, 这种核苷酸构建体以一种称为 RNA 沉默 (RNA silencing) 的方法以序列特异性方式抑制同源病毒基因的表达(Ding S. W. 2000, Curr. Opin. Biotechnol. 11: 152-156)。基因表达的抑制是指同源病毒基因的蛋白质和/或 mRNA 产物的水平不存在 (或者可见的降低)。特异性是指只抑制靶基因而对细胞的其它基因无明显作用的能力。

一般而言, 一个病毒的所有基因对其都是必需的。然而通过 RNA 沉默对病毒靶基因的 dsRNA 的抑制通常不足以抑制病毒复制。如果该病毒在其需要靶基因之前能克服、避开或过载 (overload) 宿主 RNA 沉默, 则该病毒的复制不被抑制。因此只有在病毒能克服、避开或过载宿主 RNA 沉默之前所需要的病毒靶基因才认为是病毒复制所必需的。优选定向于早期病毒基因以防止病毒复制。

优选用于抑制的是这样的一种核苷酸构建体, 其能形成含有与所述病毒基因的一部分相同的核苷酸序列的 RNA。还发现相对于靶病毒序列具有插入、缺失和单点突变的 RNA 序列 (即与所述病毒序列

不相同但同源)对于抑制也有效。这在病毒倾向于基因组变化的情况中尤为重要。即使病毒的基因组序列示出变化,而核苷酸构建体的抑制作用仍存在。序列相同性可以通过本领域已知的序列较比及比对算法而优化(见 Gribskov, M. and J. Devereux (Eds.), *Sequence Analysis Primer*, Stockton Press, New York, 1991, 在此引用参考),并计算核苷酸序列之间的差别百分比,例如使用 BESTFIT 软件程序中执行的 Smith-Waterman 算法使用默认参数进行(例如 University of Wisconsin Computing Group)。优选抑制性核苷酸序列与靶病毒基因的一部分之间具有 90%以上或者甚至 100%的序列相同性。或者,由所述核苷酸构建体编码的 RNA 转录物的双链区域可以在功能上限定为一种(双链)核苷酸序列,在变性时其能与靶基因转录物的一部分杂交(例如在 400 mM NaCl, 40 mM PIPES pH 6.4, 1 mM EDTA, 温度为 50°C—65°C 条件下杂交 12—16 小时,随后洗涤)。相同的核苷酸序列的长度应为至少 40 个核苷酸,但优选更长,如 50、100、200、300 或 400 个核苷酸。如本文所揭示的,抑制性核苷酸构建体与靶内源基因之间具有 100%序列相同性不是本发明所必需的,而且这在靶病毒基因由于病毒基因组的变化而改变的情况中难以获得。因此本发明具有能耐受预期由于遗传突变、菌株多态性或者进化趋异而发生的序列变化的优势。本发明中使用的 dsRNA 与病毒复制所必需的及被抑制的一或多个核苷酸序列之间的序列同源性适当地高于 80%,优选高于 90%,更优选高于 95%,更优选高于 98%,最优选高于 99%。

为从一个(用于转基因体内转录的)表达 DNA 构建体中转录,可以使用一个调节区域如启动子、增强子、剪接供体和受体或聚腺苷酸化以转录该 DNA。所述 RNA 链可以是或不是聚腺苷酸化的;所述 RNA 链能或不能通过细胞翻译机构(translational apparatus)而被翻译成多肽。优选地,所述构建体不被翻译成多肽。本领域已知一个表达构建体的应用和生产(参见 WO 97/32016; US 5,593,874, US

5,698,425, US 5,712,135, US 5,789,214 和 US5,804,693)。

本发明的一种核苷酸构建体被稳定整合进靶细胞或其祖细胞的染色体 DNA 中。这样稳定的整合可以通过许多方法之一而获得。例如使用将核酸导入细胞的物理方法。这种方法称作裸 DNA 转移 (naked DNA transfer), 包括注射一种含有所述核苷酸构建体的溶液, 将细胞在含有所述核苷酸构建体的溶液中浸透, 或者在存在所述核苷酸构建体的情况下对细胞膜进行电穿孔。可以使用本领域已知的其它裸 DNA 转移方法, 如脂质介导的载体转运、化学物如磷酸钙等介导的转运。通过裸 DNA 转移, 可以将所述核苷酸构建体插入在靶细胞或其祖细胞的基因组中的特异位置。这通过在与人体序列优选非编码序列同源的部分之间工程化所述核苷酸构建体而进行。然后将这个核苷酸序列通过同源重组插入在基因组的特异位置上。使用这种机制, 可以将所述核苷酸序列插入在高度转录的部位而且不扰乱正常的细胞功能。两侧序列的长度和同源性越大, 则定点同源重组 (site directed homologous recombination) 的效力越高。

另一种输送系统可包括应用其中捕获或包有所述核苷酸构建体的脂质体, 或者所述核苷酸构建体与其复合的阳离子两亲性化合物。

将所述核苷酸构建体导入靶细胞或其祖细胞中的一种优选的方法包括使用一种病毒载体系统。为此, 将所述核苷酸构建体工程化进一种病毒载体 DNA 分子中并包装成病毒颗粒。然后该病毒颗粒将所述核苷酸构建体有效导入靶细胞或其祖细胞中。合适的病毒载体包括的病毒如反转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒 (adeno-associated virus) 或单纯疱疹病毒, 其通过除去复制必需的病毒基因而成为复制缺陷的。

稳定整合进宿主细胞 DNA 中是反转录病毒的一个天然特性, 由此通过这些载体导入的基因可以在细胞的生命中始终保持。另外, 所述载体将存在于得自细胞分裂的所有子细胞中。合适的反转录病毒包

括鼠白血病病毒(MLV)和莫洛尼鼠白血病病毒(Mo-MuLV)。使用如 MLV 这样的病毒的优势是对这种病毒预先不存在免疫原性,对病毒基因产物无免疫应答及毒粒相对易于生产。然而,病毒需要分裂细胞以感染及可以随机整合进宿主细胞基因组中,通过插入突变而导致潜在的肿瘤发生。另外,已知 LTR 可以干扰基因表达。

合适的慢病毒包括牛慢病毒,如牛免疫缺陷病毒和 Jembrana 病病毒,马慢病毒如马传染性贫血病毒,猫慢病毒如猫免疫缺陷病毒(FIV),豹慢病毒和狮慢病毒,绵羊/山羊慢病毒如 Brazilian 山羊慢病毒,山羊关节炎-脑炎病毒,山羊慢病毒, Maedi-Visna 病毒,绵羊慢病毒和 Visna 慢病毒及灵长类动物慢病毒类包括如人免疫缺陷病毒(HIV)和猿免疫缺陷病毒(SIV)。使用慢病毒的一个优势是不需要细胞分裂及其因此可用于在体内转导非分裂细胞(例如记忆 T-淋巴细胞、造血干细胞、神经元)。

优选腺伴随病毒(AAV)载体,因为其既可迅速感染非分裂细胞而且还经历位点特异性整合进宿主细胞基因组中,引起长期转导。腺伴随病毒(AAV)是一种具有广泛宿主的非病原性依赖性细小病毒,其能高水平转导及稳定整合进宿主细胞基因组中。

所有上述输送系统均可以用于本发明的方法中,条件是稳定整合进宿主细胞基因组中。

最优选的是使用衍生自慢病毒、腺伴随病毒(AAV)或者如腺病毒-AAV 杂合载体组合的病毒载体。本领域技术人员已知构建病毒载体及其包装成病毒颗粒的方法。

被转导的或转染的靶细胞优选是病毒感染的患者的那些细胞。当然,用于转导这些细胞的病毒必须能感染这些细胞。慢病毒已知感染携带 CD4 受体的细胞,包括 T 淋巴细胞,并适于原位 (*in situ*) 转导 HIV 靶细胞。2 型 AAV 已知感染肝细胞并因此适于原位转导肝细胞。

或者,本发明的方法中使用产生病毒攻击靶位的细胞的干细胞或

者祖细胞。在 HIV 的情况中，造血干细胞或淋巴干细胞或者记忆或原初辅助 T 淋巴细胞均是合适的。在 HCV 的情况中，肝干细胞或造血干细胞或间充质干细胞或间充质成熟祖细胞是合适的。

多能造血干细胞存在于婴幼儿和成人骨髓内的造血组织中。大约 2000 个细胞中就有一个干细胞。干细胞分裂并分化为髓样干细胞或淋巴干细胞并从此成为成熟血液细胞和免疫系统细胞。

髓样干细胞是粒细胞、肥大细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞、红细胞和巨核细胞的前体。红细胞成为血红细胞，而巨核细胞成为血小板。髓样干细胞一起形成血液组织，一些类型的细胞在免疫性中起作用。例如，单核细胞和巨噬细胞在吞噬和抗原呈递给淋巴细胞中起关键作用。粒细胞也示出吞噬作用（中性粒细胞、嗜酸性粒细胞）或者它们释放抗微生物化合物（嗜碱性粒细胞）。肥大细胞在感染部位也释放具有药理学活性的化合物。树突细胞在抗原呈递给 T 淋巴细胞中起关键作用。

淋巴干细胞在骨髓中分化为 B 淋巴细胞。B 淋巴细胞是产生抗体的细胞并可引起体液防御应答。在骨髓中，B 细胞经历一种有序的免疫球蛋白基因排列，其是抗原非依赖性的。表达膜结合 IgM 和 IgD 分子的成熟原初 B 细胞离开骨髓并迁移至二级淋巴器官中。直接或通过抗原呈递细胞与抗原的相互作用在特异的细胞因子介导的程序中诱导受影响的 B 细胞的克隆选择，所述特异的细胞因子是由激活的 T 淋巴细胞（效应细胞）分泌的。B 细胞分裂及分化，产生短期存活的浆细胞（plasma cells），或者长期存活的记忆细胞群，其分泌特异性免疫球蛋白。

淋巴干细胞也从骨髓中迁移至胸腺，在此其分化为 T 淋巴细胞和（天然杀伤细胞）NK-淋巴细胞。从胸腺中，成熟的 T 淋巴细胞和 NK 细胞活性地分布于周围组织。T 淋巴细胞和 NK 淋巴细胞负责细胞防御应答。T 淋巴细胞识别抗原，所述抗原必须与 MHC 分子一起呈递

于抗原呈递细胞、癌细胞、病毒感染的细胞或移植体的表面上。

携带 CD4 的一种 T 淋巴细胞亚群识别与 II 型 MHC 分子相关的抗原，而且一般具有辅助 T 细胞的功能。原初辅助 T 淋巴细胞是通过抗原识别激活的并形成记忆和效应辅助 T 淋巴细胞。辅助 T 淋巴细胞的激活导致细胞分裂并产生效应细胞克隆。所述效应细胞分泌特异的细胞因子，在参与特异性应答的细胞激活中起关键作用，产生记忆，如成熟的 B 淋巴细胞或 T 胞毒性淋巴细胞及参与非特异性应答的其它细胞如 NK 淋巴细胞、单核细胞和巨噬细胞。

携带 CD8 的 T 淋巴细胞识别与 I 型 MHC 分子相关的抗原并具有 T 胞毒性细胞的功能。在 T 胞毒性淋巴细胞结合抗原之后，细胞因子如辅助 T 淋巴细胞产生的 IL-2 诱导 T 胞毒性淋巴细胞增殖和分化为携带各自抗原的胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)和记忆 T 胞毒性淋巴细胞，引起细胞降解。

除了造血干细胞之外，间充质干细胞和间充质成熟祖细胞也存在于骨髓中。所有这些干细胞均呈现能转分化(trans-differentiating)为肝细胞。

因此，当使用造血干细胞以导入本发明的核苷酸构建体时，衍生自所述干细胞的所有细胞在其基因组中均携带所述核苷酸构建体，而且这些细胞将引起 HIV 复制及 HIV 颗粒的进一步扩散的阻断。另外它们不会被激增的病毒颗粒杀死并因此不出现 AIDS 症状。由于成熟白细胞的平均寿命为 100 天，因此易于见到在相对短的时期内所有感染的和未保护的细胞均从血液中消失，而代之为已经从转基因的干细胞中形成的细胞。如果在这些转基因细胞中一种前病毒成为活性的并开始从前病毒 DNA 的转录中产生基因产物，则能产生能折叠为 dsRNA 的一或多种转录物的本发明的核苷酸构建体将诱导一种胞内和胞质机制，其中同源的病毒 RNA 分子在称为 RNA 沉默的程序中被特异性降解。结果，病毒复制所必需的一或多种病毒基因的表达被

抑制，病毒颗粒不再生及不再出现颗粒的最终激增。另外，这些细胞中存在本发明的核苷酸构建体不削弱细胞的正常功能。

为治疗在 B 淋巴细胞中均以其潜伏形式出现的 KSHV 和 EBV，将表达能抑制所述病毒复制的 dsRNA 的一种核苷酸构建体导入多能造血干细胞中。

丙型肝炎病毒感染肝细胞并居于其中。另外，HCV 呈现也以潜伏状态居于特异的血细胞中。就 HCV 而言，靶细胞是肝细胞。这些肝细胞的祖细胞是多能肝干细胞，或者间充质干细胞、间充质成熟祖细胞或造血干细胞。当然在这些祖细胞中可以如造血干细胞的相似方式导入一种核苷酸构建体。当使用祖细胞导入本发明的核苷酸构建体时及在将所述细胞导入人体肝脏中之后，衍生自所述祖细胞的所有肝细胞将在其基因组中携带所述核苷酸构建体，而且这些细胞将引起 HCV 复制和 HCV 颗粒进一步扩散的阻断。

本领域已知人造血干细胞的转导。Chatterjee et al. (*Blood*, 93:1882-1894, 1999)描述了一种使用 AAV 转导人骨髓祖细胞的系统。AAV 是一种单链的复制缺陷的非病原性人细小病毒，具有回文反向重复序列的 4.7kb DNA 基因组。野生型 AAV 需要与一种辅助病毒如腺病毒或单纯疱疹病毒共感染以成功感染。在没有辅助病毒共感染的情况中，AAV 通过反向重复序列整合进入第 19 号染色体的 AAVS1 位点。缺少 P5 启动子区域的 AAV 载体整合进 AAVS1 之外的其它染色体位点。AAV 载体使得可以从 RNA 聚合酶 II 和 III 依赖性启动子中有效进行转基因表达。来自 Chatterjee 等的结果示出原始的骨髓类红细胞祖细胞 (primitive myelo-erythroid progenitor cells) 可通过 AAV 载体进行遗传修饰。

除了 AAV 之外，慢病毒载体及反转录病毒载体在转导造血干细胞中也是有效的(Logan et al., *Current Opinion in Biotechnology* 2002, 13:429-436)，反转录病毒载体有效程度稍低。

被本发明的核苷酸构建体进行抑制的病毒的靶基因优选是病毒复制必需的基因。在 HIV 的情况中, 这种基因是 tat、rev 和 nef 基因。tat 和 rev 具有重叠编码结构域中的 tat、rev 和 nef 调节基因是前病毒激活及病毒结构蛋白和基因组 RNA 的积聚所必需的。Tat、rev 和 nef 基因是由早期多重剪接的 mRNA 分子编码的。所述核苷酸构建体中的序列可以衍生自单个 HIV 基因或者衍生自多个 HIV 基因。在仅具有单个基因的 HCV 的情况中, 所述靶序列可以是病毒基因组的任何部分。

为生产能形成 dsRNA 的单个或多种转录物, 制备一种核苷酸 DNA 构建体, 其也称作转基因盒, 其包含相反极性的一个有义和一个反义核苷酸序列(即由此所述反义序列与所述有义序列反向互补), 其中有义和反义序列的长度均具有至少 40 个核苷酸。另外, 为提供有效抑制靶细胞中基因表达的转录物, 所述转基因盒的有义或反义链与所述靶细胞的所述基因优选靶病毒基因互补或者呈现核苷酸序列同源性。已经描述了 40 个核苷酸的长度是 dsRNA 有效阻断靶基因表达所需要的最低限度。稳定整合进靶细胞基因组中及从中转录所述沉默 dsRNA 的基因的 DNA 构建体因此应包含至少大约 80 个核苷酸。优选所述转基因盒中应使用较大的 DNA 序列, 长度为 100、150、200、250、300、350、400、450 或 500 个核苷酸。

从稳定整合进宿主细胞基因组中的核苷酸构建体转录的 RNA 应形成 dsRNA 或 RNA 双链体。因此, 所述 RNA 应包含反向重复序列或者是回文结构, 但优选包含反义和有义序列。所述 dsRNA 可以是发夹结构或者锅柄 (panhandle) 折叠形式, 从而所述有义和反义区被内含子或套索 (lariat) 结构分隔(Moore et al.1993 The RNA World, eds. Gesteland, R. F. & Atkins, J. F. Cold Spring Harbor Lab.Press, Plainview, NY, pp.303-357)。优选地, 形成 RNA 双链体的两个 RNA 链通过一个形成环的间隔区 (spacer region) 结合在一起。更优选地,

形成 RNA 双链体的两个 RNA 链通过当内含子被剪接掉时剩下的一个间隔区结合在一起。所述有义和反义核苷酸序列可以通过一个任何长度的间隔核苷酸序列（如内含子序列）连接。如果一个完整的内含子序列用作间隔，则该内含子在 mRNA 形成期间可以通过细胞核中的内源程序而除去。所述有义和反义序列的顺序不重要，尽管由于这种转录物不可能编码一种蛋白质的原因而优选反义方向。在一个及同样的构建体中也可以组合一个以上的有义-反义组合。所述构建体的简式可以描述为：prom-AS-spac-S-term，其中 prom 表示启动子，S 表示靶病毒 DNA 序列，AS 表示与 S 相反极性的靶病毒 DNA 序列，spac 表示一个间隔序列，term 表示转录终止子 DNA 序列。也可以应用如下构建体：prom-AS1-spac-S1-spac-AS2-spac-S2-term，或 prom-AS2-spac-AS1-spac-S1-spac-S2-term。所述构建体的组分可以变化，只要所述构建体的转录物可以部分或完全折叠为 dsRNA 即可。

或者，所述核苷酸构建体可以由两个独立的转基因盒组成，其中所述靶病毒 DNA 序列以与启动子相反的极性存在。将这些构建体以简短的符号表示为：prom1-S-term1 和 prom2-AS-term2。Prom1 和 prom2 可以是相同或不同的启动子，term1 和 term2 可以是相同或不同的终止子。这两个构建体均可以在相同载体上导入细胞中，但也可以使用两种不同的载体导入。

或者，所述核苷酸构建体可以由在两侧存在转录方向相反的启动子的单个靶病毒 DNA 序列组成。这种构建体以简短符号表示为：prom1-S-prom2。Prom1 和 prom2 可以是相同或不同的启动子。

转录启动子优选衍生自 DNA 病毒，包括来自反转录病毒和慢病毒的 5'-长末端重复、SV40 大 T 抗原启动子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子等。本领域技术人员易于获得这些启动子和多种其它启动子。作为终止子，可以使用适用于人和动物细胞中的任何终止子。

就有效抗 HIV 的治疗而言，应基本进行如下步骤：

1. 干细胞的分离

在从 HIV 感染的人体中分离人造血干细胞的情况中，从 HIV 血清反应阳性的患者中取骨髓穿刺液。这些穿刺液一般每毫升具有 10^8 个细胞，其中 50,000 个是造血干细胞。使用标准富集技术分离 5×10^5 个 $CD34^+38^-$ 细胞/ml，这些细胞的十分之一是 HSC。

2a. 转基因盒的构建

根据通常使用的遗传工程技术制备一种核苷酸构建体，其包含一或多个启动子和终止子以使得能够进行上述的 dsRNA 转录和形成。

2b. 干细胞的转导

优选将富集造血干细胞和淋巴干细胞的细胞组分使用重组进行转导。为此，优选将如上述制备的核苷酸构建体插入一个病毒载体中以稳定整合进靶细胞染色体中。干细胞的转染或转导使用本领域已知的方法进行(例如 Halene & Kohn, Human Gene Therapy 11: 1259-1267, 2000; Buchsacher & Wong-Stall, Blood 95: 2499-2504, 2000; Buchsacher & Wong-Staal, Human Gene Therapy 12: 1013-1019, 2001)。

3. 再导入

随后将转导的 HIV 抗性造血干细胞和淋巴干细胞再导入患者的骨髓中，并建立一种新的 HIV 抗性 T 辅助细胞群保护患者不发生 AIDS 症状及使患者不再感染。

本领域技术人员能使用本发明以相似方式治疗其它慢性病毒感染。

本发明不仅适于治疗已经感染慢性病毒动物或人体，而且还可以预防性应用以抑制这种病毒感染的感染。这尤其值得推荐给慢性病毒感染高危人群。

实施例

实施例 1: HIV-1 Rev、Tat 和 Nef 基因的分子克隆

将以 pLai 表示的 HIV-1 感染性 cDNA 克隆的纯化的 DNA (Peden K. et al., 1991. Virology 185: 661-672) 用作模板, 使用基于 DNA 的 PCR 克隆 HIV-1 Rev、Tat 和 Nef 基因。设计 4 个寡核苷酸, 它们是在第一个 Rev 外显子两侧的 WdV001:

GCGGCCGCATGGCAGGAAGAAGCGGAG 和 WdV002:

GAGGTGGGTTGCTTTGATAGAGAACTTGATG 及在第二个 Rev 外显子两侧的 WdV003: CAAAGCAACCCACCTCCCAACCCCGAG 和 WdV004: GCGGCCGCTATTCTTTAGTTCCTGACTCC。寡核苷酸 WdV001 和 WdV004 含有一个 NotI 识别位点, 其在 Lai Rev DNA 序列中不存在。将纯化的 Lai DNA 使用寡核苷酸 WdV001 和 WdV002 及使用寡核苷酸 WdV003 和 WdV004 进行 PCR, 分别产生 Rev 外显子 1 和外显子 2 的 cDNA 分子。将这两个 DNA 片段经琼脂糖凝胶纯化, 混和并使用寡核苷酸 WdV001 和 WdV004 进行第二次 PCR 扩增。将长度为 366 碱基对的 DNA 片段直接连接入 pGEM-T 载体(Promega) 中, 产生重组质粒 pGEM-T-Rev。

相似地, 设计 4 个寡核苷酸, 它们是在第一个 Tat 外显子两侧的 WdV005 : GCGGCCGCATGGCAGCCAGTAGATCCTAGAC 和 WdV006: GAGGTGGGTTGCTTTGATAGAGAACTTGATG, 及在第二个 Tat 外显子两侧的 WdV007:

CTATCAAAGCAACCCACCTCCCAACCCCGAGG 和 WdV008 :

GCGGCCGCTATTCTTTAGTTCCTGACTCC。寡核苷酸 WdV005 和 WdV008 含有一个 NotI 识别位点, 其在 Lai Tat DNA 序列中不存在。将纯化的 Lai DNA 使用寡核苷酸 WdV005 和 WdV006 及寡核苷酸 WdV007 和 WdV008 进行 PCR, 分别产生 Tat 外显子 1 和外显子 2 cDNA 分子。将这两个 DNA 片段经琼脂糖凝胶纯化, 混和并使用寡核苷酸 WdV005 和 WdV008 进行第二次 PCR 扩增。将长度为 276 碱

基对的 DNA 片段直接连接入 pGEM-T 载体(Promega)中, 产生重组质粒 pGEM-T-Tat。

设计两个寡核苷酸 WdV011:

ATAAGAATGCGGCCGCCATGGGTGGCAAGTGGTCAAAAAGTAG

和 WdV012:

ATAGTTTAGGCGGCCGCTCAGCAGTTCTTGAAGTACTCCGGATG,

其在 Nef 编码序列的两侧。这两个寡核苷酸均含有一个 NotI 识别位点, 其在 Lai Nef DNA 序列中不存在。将纯化的 Lai DNA 使用寡核苷酸 WdV011 和 WdV012 进行 PCR, 产生 Nef cDNA 分子。将长度为 653 碱基对的 DNA 片段直接连接入 pGEM-T 载体(Promega)中, 产生重组质粒 pGEM-T-Nef。

实施例 2: GFP 报道 DNA 构建体的构建

hrGFP 编码序列通过 PCR 产生, 使用质粒 pFB-hrGFP (Stratagene) 的纯化的 DNA 作为模板, 使用在 hrGFP 编码序列两侧的寡核苷酸 WdV020: TCACCATGGTGAGCAAGCAGATCCTG 和 WdV021: ATTACACCCACTCGTGCAGGCTGC 进行这一反应。将扩增的 DNA 片段使用 “ gateway ” (Invitrogen) 根据厂商建议克隆入 pEF5/FRT/V5-DEST 中, 产生 pWdV08 (有义, s-GFP)。

通过 PCR 产生包含人 EF1a 启动子的一个 DNA 片段, 使用质粒 pEF5/FRT/V5-DEST 的 DNA 作为模板, 使用寡核苷酸 WdV034: ACATGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGATGTCGCGTGA GGCTCCGGTGCCCGTCAG (具有一个 SphI 限制位点)和 WdV035: CTCCATGGTGAATCACGACACCTGAAATGGAAGAAAAAACTT TG 进行这一反应。通过 PCR 产生一个 300 碱基对的反义 hrGFP DNA 片段, 使用质粒 pWdV08 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV036: GGTGTCGTGATTCACCATGGAGGGCTGCGGCAAGGGCAACATC

CTG 和 WdV037:

CGGGATCCCGAGGCCGGTGATGGTCTTCTTCATCACGGGGCCGT
CG (具有一个 BamHI 限制位点)进行这一反应。将这两个 DNA 片段以等摩尔比率混和及使用寡核苷酸 WdV034 和 WdV037 通过 PCR 再次扩增。将该 DNA 片段用 SphI 和 BamHI 消化，从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pUC19 (Stratagene)中，产生 pWdV09。

通过 PCR 产生一个包含 SV40 的聚腺苷酸化信号的 DNA 片段，使用 pPUR (Clontech)的 DNA 作为模板，使用寡核苷酸 WdV040:
CCCTCCATGGTGAATTTACTTGCTTTAAAAAACCTCCCAC 和
WdV041:

GGAATTCACATGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGTGCA
GACATGATAAGATACATTGATGAGTTTGGAC (含有 EcoRI 和 SphI
限制位点)进行这一反应。通过 PCR 产生一个 300 碱基对的有义 hrGFP
DNA 片段，使用质粒 pWdV08 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸
WdV038:

CGGGATCCGCCCTTGTACTCCACGCGGTACACGAACATCTC(具
有一个 BamHI 限制位点)和 WdV039:

GCAAGTAAATTCACCATGGAGGGCTGCGGCAAGGGCA 进行这一
反应。将这两个 DNA 片段以等摩尔比率混和并使用寡核苷酸
WdV038 和 WdV040 通过 PCR 再次扩增。将该 DNA 片段用 BamHI
和 EcoRI 消化，从琼脂糖凝胶分离并克隆入同样消化的 pWdV09 中，
产生 pWdV10 (反义-填充片段 (stuffer) -有义, ass-GFP)。

实施例 3: 包含 HIV-1 Tat、Rev 和 Nef 基因序列的有义加反义 DNA
构建体的构建

反义-填充片段-有义(ass)载体的构建

1) ass-Tat 构建体的构建

将质粒 pEF5/FRT/V5-DEST(Invitrogen) 的 EF1a 启动子、GATEWAY 盒及 BGH 聚腺苷酸化信号通过用 HindIII 和 SphI 消化该质粒而除去。通过 PCR 产生含有 HindIII、NotI、SacI、AvrII、XhoI、SgrAI、PacI 和 SphI 限制位点的一个多接头的 DNA 片段，使用寡核苷酸 WdV022:

CCCAAGCTTGCGTAGAACCTGCGGCCGCTAATCTCGTGCGAG ,

WdV023:

GCAAGGCCTAGGCGATGATAGTTATGAGAGCTCGCACGAGATTA
GCGGCC, WdV024:

CGCCTAGGCCTTGCTTCGCTCGAGCATCTGATTCGCCGGTGATC
CG 和 WdV025:

AGCTACAAGCATGCACGATACAGTTAATTAAAAACGGATCACCGG
CGAATC 进行这一反应。

将所得 DNA 片段用 HindIII 和 SphI 消化，从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pEF5/FRT/V5-DEST 中，产生 pWdV06.3 (空表达载体 (empty expression vector))。

通过 PCR 产生包含人 EF1a 启动子的一个 DNA 片段，使用质粒 pEF5/FRT/V5-DEST 的 DNA 作为模板，使用寡核苷酸 WdV047:
CCCAAGCTTGGGCGTGAGGCTCCGGTGC(具有一个 HindIII 限制位点)和 WdV048:

AGGCCCGAAGGAATATCACGACACCTGAAATG 进行这一反应。

通过 PCR 产生一个 300 碱基对的反义 Tat DNA 片段，使用质粒 pGEM-T-Tat 的 DNA 作为模板，使用寡核苷酸 WdV049:
AGGTGTCGTGATATTCCTTCGGGCCTGTGCG 和 WdV050 :
AATAGTTTAGCGGCCGCAGATCCTAGACTAGAGC(具有一个 NotI 限制位点)进行这一反应。将这两个 DNA 片段以等摩尔比率混和，使用寡核苷酸 WdV047 和 WdV050 通过 PCR 再次扩增。将该 DNA 片

段用 HindIII 和 NotI 消化，从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pWdV06.3 中，产生 pWdV16。

通过 PCR 产生包含牛生长激素基因的聚腺苷酸化信号的一个 DNA 片段，使用 pEF5/FRT/V5-DEST 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV053：

CCGCGGCCGCGAAGGAATACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC(含有一个 NotI 限制位点)和 WdV054：

CCCCTAGGCCATAGAGCCCACCGCATC(含有一个 AvrII 限制位点)进行这一反应。将该 DNA 片段用 AvrII 和 NotI 消化，从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pWdV16 中，产生 pWdV17 (as-Tat)。

通过 PCR 产生包含牛生长激素基因的聚腺苷酸化信号的一个 DNA 片段，使用 pEF5/FRT/V5-DEST 作为模板，使用寡核苷酸 WdV053 : CGAAGGAATACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC 和 WdV054: CCTTAATTAACCATAGAGCCCACCGCATC(含有一个 PacI 限制位点)进行这一反应。

通过 PCR 产生一个 300 碱基对的有义 Tat DNA 片段，使用质粒 pGEM-T-Tat 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV051 : GTCCTAGGAGATCCTAGACTAGAGCCCTG(含有一个 AvrII 限制位点)和 WdV52: AACTAGAAGGCACAGTATTCCTTCGGGCCTG 进行这一反应。将这两个 DNA 片段混和并使用寡核苷酸 WdV051 和 WdV054 通过 PCR 再次扩增。将该 DNA 片段用 AvrII 和 PacI 消化，从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pWdV16 中，产生 pWdV18 (ass-Tat) 。

2) ass-Rev 构建体的构建

通过 PCR 产生包含人 eF1 α 启动子的一个 DNA 片段，使用质粒 pEF5/FRT/V5-DEST 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV047: CCCAAGCTTGGGCGTGAGGCTCCGGTGC(含有一个 HindIII 限制

位点)和 WdV055: TCAAATATTGGTGTACGACACCTGAAATG 进行这一反应。

通过 PCR 产生一个 300 碱基对的反义 Rev DNA 片段, 使用质粒 pGEM-T-Rev 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV056: AGGTGTCGTGACACCAATATTTGAGGGCTTC 和 WdV057: ATAGTTTAGCGGCCGCAGCGGAGACAGCGACGAAGACCTC(含有一个 NotI 限制位点)进行这一反应。将这两个 DNA 片段以等摩尔比率混和并使用寡核苷酸 WdV047 和 WdV057 通过 PCR 再次扩增。将该 DNA 片段用 HindIII 和 NotI 消化, 从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pWdV06.3 中, 产生 pWdV19。

使用 pEF5/FRT/V5-DEST 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV054: CCTTAATTAACCATAGAGCCCACCGCATC(含有一个 NotI 限制位点)和 WdV60: CTCAAATATTGGTGTCTGTGCCTTCTAG 通过 PCR 产生包含牛生长激素基因的聚腺苷酸化信号的一个 DNA 片段。通过 PCR 产生一个 300 碱基对的有义 Rev DNA 片段, 使用质粒 pGEM-T-Rev 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV058: AGCCTAGGAGCGGAGACAGCGACGAAGAC(含有一个 AvrII 限制位点)和 WdV059: GAAGGCACAGCACCAATATTTGAGGGCTTC 进行这一反应。将这两个 DNA 片段以等摩尔比率混和并使用寡核苷酸 WdV054 和 WdV058 通过 PCR 再次扩增。将该 DNA 片段用 AvrII 和 PacI 消化, 从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pWdV19 中, 产生 pWdV20。

3) ass-Nef 构建体的构建

通过 PCR 产生包含人 eF1a 启动子的一个 DNA 片段, 使用质粒 pEF5/FRT/V5-DEST 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV047: CCCAAGCTTGGGCGTGAGGCTCCGGTGC(含有一个 HindIII 限制位点)和 WdV061: GATGGTGTACTCACGACACCTGAAATGGAAG

进行这一反应。通过 PCR 产生一个 300 碱基对的反义 Nef DNA 片段，使用质粒 pGEM-T-Nef 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV062：
CAGGTGTCGTGAGTAGCACCATCCAAAGG 和 WdV063：
ATAGTTTAGCGGCCGCACAAGTAGCAATACAGCAGCTACC (含有一个 NotI 限制位点)进行这一反应。将这两个 DNA 片段混和并使用寡核苷酸 WdV047 和 WdV063 通过 PCR 再次扩增。将该 DNA 片段用 HindIII 和 NotI 消化，从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pWdV06.3 中，产生 pWdV21。

通过 PCR 产生包含牛生长激素基因的聚腺苷酸化信号的一个 DNA 片段，使用质粒 pEF5/FRT/V5-DEST 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV054：CCTTAATTAACCATAGAGCCCACCGCATC (含有一个 PacI 限制位点)和 WdV066：

GATGGTGCTACCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGC 进行这一反应。

通过 PCR 产生一个 300 碱基对的有义 Nef DNA 片段，使用质粒 pGEM-T-Nef 的 DNA 作为模板及使用寡核苷酸 WdV064：
AGCCTAGGACAAGTAGCAATACAGCAGCTAC (含有一个 AvrII 限制位点)和 WdV065：AGAAGGCACAGGTAGCACCATCCAAAGGTC 进行这一反应。

将这两个 DNA 片段以等摩尔比率混和并使用寡核苷酸 WdV054 和 WdV064 通过 PCR 再次扩增。将该 DNA 片段用 AvrII 和 PacI 消化，从琼脂糖凝胶中分离及克隆入同样消化的 pWdV21 中，产生 pWdV22。

反义-内含子-有义(ais)载体的构建

使用质粒 pRL-null(Promega)的 DNA 作为模板及使用具有 NotI 和 AvrII 限制位点的两种寡核苷酸 WdV077：

CGATCGATCGAGCGGCCCGCCAGGTAAGTATCAAGGTTACAAGA

CAG (含有一个 NotI 位点)和 WdV078 :

AGCATACCTAGGCCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTG (含有一个 AvrII 位点), 通过 PCR 产生一个 168 碱基对的 DNA 片段, 所述 DNA 片段包含由人 β 球蛋白内含子 1 的 5' 供体剪接位点和分枝及衍生自人免疫球蛋白基因的重链可变区的一个内含子的 3' 受体剪接位点组成的一个嵌合内含子片段。将该 DNA 片段用 NotI 和 AvrII 消化, 从琼脂糖凝胶中分离并克隆入同样消化的 pWdV18、pWdV20 或 pWdV22 中, 分别产生 pWdV35 (ais-Tat)、pWdV36 (ais-Rev)和 pWdV37 (ais-Nef)。

实施例 4: HIV-1 衍生的有义加反义 DNA 构建体的瞬时表达在 SupT1 和 C33A 细胞中抑制 HIV-1 复制

将 SupT1 人非 Hodgkin's T 淋巴瘤细胞(Smith S.D., et al., 1984, Cancer Research 44: 5657)在 37°C 在具有 2 mmol/L L-谷氨酰胺(Gibco)及补加 10%胎牛血清(Biochrom KG)和 100 μ g/ml Zeocine (Invitrogen), 100U/ml 青霉素和 100 μ g/ml 链霉素(RPMI 培养基)的 RPMI 1640 培养基中生长。每周两次将含有 2×10^6 个细胞/ml 的细胞培养物在 RPMI 培养基中稀释 10 倍及在 37°C 传代培养。

将含有 10^6 个细胞/ml 的 3ml 的 SupT1 细胞培养物用 1 μ g 的 pLai DNA 电穿孔并在 37°C 温育。在电穿孔 7 天后, 上清中存在的病毒的量使用 p24(capsid)酶联免疫吸附测定 (ELISA) 根据厂商方案 (Beckman-Coulter) 加以定量, 并将等份在 -70°C 贮存以用作接种物 (inoculum) (SupT1-适应 (SupT1-adapted) 的 Lai)。

将含有 10^6 个细胞/ml 的 3ml 的 SupT1 细胞培养物用 4 μ g 的质粒 DNA 电穿孔并在 37°C 温育(Beerens, N. & Berkhout, B.2002, Journal of Virology 76: 2329-2339)。在电穿孔后 1 天, 将细胞培养物接种 0.2 μ l 的 SupT1-适应的 Lai, 并每天监测合胞体 (syncytium) 的形成情况直

至感染后 14 天。在用对照质粒电穿孔的培养物中，在感染后 6 天形成合胞体，所述对照质粒是空表达载体，sGFP，ass-GFP 和 as-Tat。在用抗 HIV 质粒电穿孔的细胞培养物中形成的合胞体的数目与用对照质粒电穿孔的那些相比明显较低，所述抗 HIV 质粒是 ass-Tat, ass-Rev, ass-Nef, ais-Tat, ais-Rev 和 ais-Nef。

将 C33A 宫颈癌细胞(Auersperg N., 1964, J.Natl. Cancer Inst.32: 135-163)在 37°C 在 DMEM 培养基中生长，所述培养基具有 0.11g/L 吡哆醇钠 (sodium pyridoxine)，MEM 非必需氨基酸(Gibco)，补加了 10% 胎牛血清(Biochrom KG)和 100µg/ml Zeocine (Invitrogen)，100 U/ml 青霉素和 100µg/ml 链霉素(DME 培养基)。每周两次将铺满的细胞培养物在 DME 培养基中稀释 10 倍并在 37°C 传代培养。

将 3ml 铺满的 C33A 细胞培养物与 1µg 的 pLai DNA 使用磷酸钙方法共转染(Das, A. T. , Klaver, B., Klasens, B. I. F., van Wamel, L.B.& Berkhout, B., 1997, Journal of Virology 71: 2346-2356)并在 37°C 温育。在转染 7 天后，上清中病毒的量使用 p24 ELISA 定量，并将等份在 -70°C 贮存以用作接种物(C33A 适应的 Lai)。

将 3ml 铺满的 C33A 细胞培养物与 1µg 的质粒 DNA 和 1µg 的 pLai DNA 使用磷酸钙方法共转染并在 37°C 贮存。转染 3 天后，上清中病毒的量使用 p24 ELISA 定量。用抗 HIV 质粒转染的细胞上清中病毒的量与用对照质粒转染的细胞上清中的那些病毒的量相比明显较低，所述抗 HIV 质粒是 ass-Tat, ass-Rev, ass-Nef, ais-Tat, ais-Rev 和 ais-Nef, 所述对照质粒是空表达载体，sGFP，ass-GFP 和 as-Tat。

实施例 5: 稳定表达 HIV-1 衍生的有义加反义基因序列的 293 和 Jurkat 细胞系的产生

将具有一个 FRT 重组位点的 Flp-In 293 人胚胎肾细胞(Graham et al., 1977, J.Gen Virol.36: 59-74; 购自 Invitrogen)在 37°C 在 DME 培

培养基中生长。每周两次将铺满的细胞培养物在 DME 培养基中稀释 10 倍并在 37°C 传代培养。

将具有一个 FRT 重组位点的 Flp-In Jurkat 人 T 细胞白血病细胞 (Weiss et al., 1984, J. Immunol. 133: 123-128; 购自 Invitrogen) 在 37°C 在 RPMI 培养基中生长。每周两次将含有 2×10^6 个细胞/ml 的细胞培养物在 RPMI 培养基中稀释 10 倍并在 37°C 传代培养。

根据厂商 (Invitrogen) 建议将质粒 DNA 重组入这两个细胞系的 FRT 重组位点中。将质粒 DNA 稳定整合进其染色体 DNA 上 FRT 重组位点中的细胞在具有 100 μ g/ml 潮霉素的合适培养基中培养并选择。

实施例 6: 稳定表达 HIV-1 衍生的有义加反义基因序列的 Flp-In 293 细胞对 HIV-1 感染有抗性

将 3ml 铺满的潮霉素抗性的及 Zeocine 敏感的具有整合的质粒的 Flp-In 293 细胞培养物用 1 μ g pLai DNA 使用 lipofectamin 根据厂商 (Invitrogen) 指导进行转染, 并在 37°C 温育。感染 7 天后上清中病毒的量使用 p24 ELISA 定量。具有抗 HIV 质粒的细胞上清中病毒的量与具有对照质粒的细胞上清中那些量相比明显较低, 所述抗 HIV 质粒是 ass-Tat, ass-Rev, ass-Nef, ais-Tat, ais-Rev 和 ais-Nef, 所述对照质粒是空表达载体, sGFP, ass-GFP 和 as-Tat。

实施例 7: 稳定表达 HIV-1 衍生的有义加反义基因序列的 Flp-In Jurkat 细胞对 HIV-1 感染有抗性

将 C33A-适应的 Lai 或 SupT1-适应的 Lai 接种于 Flp-In Jurkat 细胞中并在感染后使用 p24 ELISA 监测感染进程 30 天。

C33A-适应的病毒在感染后 11—14 天在 Flp-In Jurkat 细胞中开始复制。将这些细胞上清中的病毒颗粒再接种于 Flp-In Jurkat 细胞中。感染后 7 天开始病毒复制, 产生 Jurkat-适应的 Lai 株, 其用于进一步

的感染实验中。

将 3ml 的潮霉素抗性的及 Zeocine 敏感的及具有整合的质粒的 Flp-In Jurkat 细胞培养物接种 1 μ l 的 Jurkat-适应的 Lai 并在 37 $^{\circ}$ C 温育。感染后 14 天上清中病毒的量使用 p24 ELISA 定量。具有抗 HIV 质粒的细胞上清中病毒的量与具有对照质粒的细胞上清中的那些量相比明显较低，所述抗 HIV 质粒是 ass-Tat, ass-Rev, ass-Nef, ais-Tat, ais-Rev 和 ais-Nef, 所述对照质粒是空表达载体, sGFP, ass-GFP 和 as-Tat。

感染 14 天后，将 10 μ l 的每种上清接种于含有 10⁶ 个细胞/ml 的 3ml 的 Jurkat 培养物中，在感染后 7 天使用 p24 ELISA 定量上清中病毒的量。与具有对照质粒的细胞培养物相反，具有抗 HIV 构建体的细胞培养物上清不积聚感染性病毒颗粒。