[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01811802.X

[51] Int. Cl.
C12N 5/06 (2006.01)
C12N 5/08 (2006.01)
A01N 1/02 (2006.01)
A61L 2/00 (2006.01)
A61K 35/12 (2006.01)
A61K 39/42 (2006.01)

[45] 授权公告日 2006 年 4 月 12 日

[11] 授权公告号 CN 1250711C

[51] Int. Cl. (续)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 37/06 (2006.01)

[22] 申请日 2001.6.26 [21] 申请号 01811802.X

[30] 优先权

[32] 2000.6.26 [33] US [31] 60/214,014

[86] 国际申请 PCT/US2001/041121 2001.6.26

[87] 国际公布 WO2002/000233 英 2002.1.3

[85] 进入国家阶段日期 2002.12.26

[71] 专利权人 威尔斯达特生物制剂公司

地址 美国马里兰州

共同专利权人 渥太华大学

[72] 发明人 哈罗德·L·阿特金斯

约翰·C·贝尔

小康拉德·J·海尔曼

布赖恩·D·利克蒂

罗伯特·M·洛朗斯

迈克尔·S·罗伯茨

大卫·F·什托伊德尔

审查员 徐益君

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司

代理人 丁香兰

权利要求书 1 页 说明书 14 页

[54] 发明名称

用病毒清除细胞

[57] 摘要

本发明涉及病毒，这些病毒能清除（减少或去除）细胞混合体中的不良细胞。不良细胞包括瘤细胞、介导移植物抗宿主疾病的细胞和自身免疫细胞。本发明还涉及在对哺乳动物治疗中清除离体的骨髓或外周血细胞中的不良细胞，所述哺乳动物包括癌症患者、移植物接受者和自身免疫性疾病患者。

1．在体外减少或去除正常骨髓细胞和白血病细胞的混合体中的瘤细胞的方法，该方法包括使混合体与小囊状的口腔炎病毒接触。

2．如权利要求1所述的方法，所述方法进一步包括在与所述小囊状的口腔炎病毒接触之前，施用干扰素。

用病毒清除细胞

发明领域

本发明涉及病毒，这些病毒能清除（减少或去除）细胞混合体中的不良细胞。不良细胞包括瘤细胞、介导移植物抗宿主疾病的细胞和自身免疫细胞。本发明还涉及在对哺乳动物治疗中清除离体的骨髓或外周血细胞中的不良细胞，所述哺乳动物包括癌症患者、移植物接受者和自身免疫性疾病患者。

背景技术

体外清除技术在白血病患者或其他恶性肿瘤患者的自体同源骨髓或干细胞移植中取得了部分成功。净化骨髓或外周血中祖细胞（PBPC）的一个目的是去除瘤细胞，而几乎不影响正常干细胞和造血祖细胞。在成髓细胞（myeloablative）治疗如大剂量的化疗或放疗之后，需要进行这种净化骨髓的移植[参见例如，Stuart R.K., 1993, Semin. Oncol 20(5 Suppl 6):40-54), Hammert L.C.和 Ball, E.D., 1997, Curr Opin Hematol 4:423-428; Schneidkraut M.J.等, 1996, J Hematother 5:631-646]。移植任何带有瘤细胞的骨髓都会给患者带来该恶性肿瘤复发的危险[参见例如，Rummel SA 和 Van Zant G, 1994, J. Hematother 3:213-218; Kvalheim G.等, 1996, J Hematother 5:427-436]。当前的研究中选择性地杀死瘤细胞的方法包括使用化疗制剂（如 4-过氧化氢环磷酰胺；参见例如，Bird J.M., 1996, 《骨髓移植》(Bone Marrow Transplant), 18:309-313)、单克隆抗体(参见例如,Hammert L.C.和 Ball, E.D., 1997, 《血液专刊》(Blood Rev.), 11:80-90)、光力学疗法（参见例如，Villeneuve L., 1999, 《生物技术应用生物化学》(Biotechnol Appl Biochem.) 30:1-17)和病毒载体如腺病毒(参见例如,Hirai M,等, 1999, Acta Haematol., 101:97-105; Marini F.C.,等, 1999, 《临床癌症研

究》(Clin.Cancer Res.), 5:1557-1568)。然而，最近的实验显示，治疗性清除后，仍残存在骨髓或PBPC中的活的癌细胞可导致恶性肿瘤复发。当前体外清除方法的另一个主要的局限性是移植物移入的延迟，因为清除会损害正常干细胞或初级造血细胞（Rummel SA 和 Van Zant G, 1994, J.Hematother 3:213-218; Damon 等, 1996, 《骨髓移植》(Bone Marrow Transplant), 17:93-99)。增殖活跃的祖细胞对大多数的化疗制剂如 4-过氧化氢环磷酰胺的杀伤作用通常非常敏感。初级造血细胞损失的结果导致中性粒细胞减少症和/或血小板减少症，这些病症会使患者发生危及生命的感染和/或出血而更加危险。癌症治疗中不干扰正常造血细胞的瘤细胞毒素或溶细胞性制剂是一个重要的进步。

除瘤细胞外，离体的骨髓或外周血祖细胞会含有其他不良细胞，如患有关节炎或硬化症的患者体内的自身免疫细胞。其他不良细胞包括在同种异体移植中介导移植物抗宿主疾病的细胞（例如，某种 T-淋巴细胞)。在癌症和自身免疫性疾病的治疗中，减少或去除这些不良细胞将是重要的。

Roberts 等的 PCT 申请（WO/9918799 和 PCTUS98/21230）涉及用病毒治疗肿瘤。

发明内容

本发明的一个目的是提供病毒，用以减少或去除良性细胞和不良细胞的混合体中的不良细胞。

本发明进一步的目的是提供病毒，用以减少或去除正常细胞和瘤细胞的混合体中的瘤细胞。

本发明进一步的目的是提供病毒，用于从正常造血细胞如骨髓或外周血祖细胞中体外清除瘤细胞。

本发明进一步的目的是提供病毒，用于从正常造血细胞如骨髓或外周血祖细胞中体外清除自身免疫细胞。

本发明的进一步的目的是提供病毒，用于从正常造血细胞如骨髓或外周血祖细胞中体外清除介导移植物抗宿主疾病的细胞。

本发明进一步的目的是提供治疗哺乳动物疾病的方法，该方法通过使良性细胞和不良细胞的混合体与病毒接触，从而将这些细胞移植到哺乳动物体内。

本发明进一步的目的是提供治疗哺乳动物癌症的方法，该方法通过使离体细胞与病毒接触，将这些被净化的造血细胞移植到经过成髓细胞治疗的哺乳动物体内。

本发明进一步的目的是提供防止哺乳动物发生移植物抗宿主疾病的方法，该方法通过使离体细胞与病毒接触，将这些被净化的造血细胞移植到经过成髓细胞治疗的哺乳动物体内。

本发明进一步的目的是提供治疗哺乳动物自身免疫疾病的方法，该方法通过使离体细胞与病毒接触，将这些被净化的造血细胞移植到经过成髓细胞治疗的哺乳动物体内。

本发明进一步的目的是提供为接受骨髓或外周血干细胞移植的哺乳动物治疗癌症的方法，该方法包括病毒的移植疗法。

因此，本发明涉及一种方法，该方法通过使良性细胞和不良细胞的混合体与病毒接触，从而减少或去除其中的不良细胞。

本发明还涉及一种方法，该方法通过使良性细胞和不良细胞的混合体与 RNA 病毒接触，从而减少或去除其中的不良细胞。

本发明还涉及一种方法，该方法通过使离体的正常造血细胞和瘤细胞混合体与病毒如 RNA 病毒接触，从而减少或去除其中的瘤细胞。

本发明还涉及一种方法，该方法通过使离体的骨髓或外周血干细胞与病毒如 RNA 病毒接触，从而体外清除其中的瘤细胞。

本发明还涉及一种方法，该方法通过使离体的骨髓或外周血干细胞与病毒如 RNA 病毒接触，从而体外清除其中的自身免疫细胞。

本发明还涉及一种方法，该方法通过使骨髓或外周血干细胞的细胞群与病毒如 RNA 病毒接触，从而体外清除其中的介导移植物抗宿主疾病的细胞。

本发明还涉及治疗或预防哺乳动物疾病如癌症的方法，该方法包括：

a）取出所述哺乳动物的骨髓或外周血细胞，

b）在体外将所述骨髓或外周血细胞与病毒如 RNA 病毒接触，

c）对所述哺乳动物进行成髓细胞治疗，和

d）将步骤 b 中净化的造血细胞移植到所述哺乳动物体内。

本发明还涉及为接受了骨髓或外周血祖细胞移植的哺乳动物治疗癌症的方法，该方法包括将移植物的离体细胞与病毒如 RNA 病毒接触，然后给所述哺乳动物施用经过净化的细胞。

本发明还涉及为接受了骨髓或外周血祖细胞移植的哺乳动物治疗自身免疫疾病的方法，该方法包括将移植物的离体细胞与病毒如 RNA 病毒接触，然后给所述哺乳动物施用经过净化的细胞。

本发明还涉及为接受了骨髓或外周血祖细胞移植的哺乳动物预防移植物抗宿主疾病的方法，该方法包括将移植物的离体细胞与病毒如 RNA 病毒接触，然后给所述哺乳动物施用经过净化的细胞。

具体实施方式

本发明涉及病毒的发现和病毒的应用，所述病毒能减少或去除良性细胞和不良细胞的混合体中的不良细胞如瘤细胞。本发明提供了病毒和用病毒清除（减少或去除）正常细胞中的不良细胞的方法。本发明的可被病毒清除的造血细胞移植物中的不良细胞包括瘤细胞、自身免疫细胞（例如类风湿性关节炎或多发性硬化症中的自身免疫细胞）和介导移植物抗宿主疾病的细胞。哺乳动物的治疗由以下步骤组成：

a）取出所述哺乳动物的骨髓或外周血细胞，

b）在体外将所述骨髓或外周血细胞与病毒如 RNA 病毒接触，

c）对所述哺乳动物进行成髓细胞治疗，和

d）将步骤 b 中净化的造血细胞移植到所述哺乳动物体内。

本发明的方法

瘤细胞的清除

正常细胞和瘤细胞的混合体与病毒一起孵育，结果选择性地杀死了瘤

细胞而不杀死正常细胞。从造血细胞中清除瘤细胞的有效方法可用于接受了同种异体骨髓或外周血干细胞移植的哺乳动物的癌症治疗。例如，在移植前将取自患肿瘤的哺乳动物的骨髓或外周血干细胞与病毒接触，以防止该肿瘤的复发。能用本发明的方法清除的肿瘤细胞包括但不局限于（1）白血病，（2）淋巴瘤，（3）癌症如乳腺癌、肺癌、肠癌、前列腺癌和胰腺癌，（4）恶性毒瘤，和（5）神经上皮来源的癌例如黑色素瘤和神经母细胞瘤。

各种病毒如 RNA 病毒[例如但不限于，小囊状的口腔炎病毒（VSV）、新城疫病毒（NDV）和呼肠孤病毒]可用于从正常造血细胞中清除瘤细胞。正常造血细胞对很多病毒包括 RNA 病毒的感染具有抵抗力。例如，正常人骨髓细胞对弹状病毒属的 VSV 的感染具有抵抗力，这种抵抗力取决于感染性病毒的增殖力和存活力。来自两个捐献者的正常骨髓细胞即使被高度多重感染（例如 10 个噬菌斑形成单位（pfu）/细胞；见实施例 1）也不产生感染的病毒。被感染的骨髓细胞用甲基纤维素体外培养后，被感染的骨髓细胞培养物与假性感染的培养物在形成正常的造血细胞类型谱方面的能力没有差别。又例如，富含 CD34+的正常人骨髓对来自另一种属（副粘病毒属）的病毒 NDV 的感染具有抵抗力，见 Robbert 等的 WO/9918799。

很多类型的瘤细胞对很多病毒包括 RNA 病毒的细胞杀伤作用有高度的敏感性。使用 VSV 的一个例子是，急性骨髓性白血病细胞系 OCI/AML3、OCI/AML4H 和 OCI/AML5 对 VSV 的感染高度敏感，0.05 pfu/细胞在 24 小时内可杀死 50%的细胞，少至 0.0003 pfu/细胞在 48 小时内也可杀死 50%的细胞（实施例 1）。本实验中所用的印第安纳血清型的 VSV 是从鼠 L929 细胞增殖并获得的。在另一实施例中，不同类型的肿瘤细胞对 VSV 表现出敏感性，这些肿瘤细胞包括卵巢癌细胞、纤维肉瘤细胞、肺癌细胞、黑色素瘤细胞、前列腺癌细胞和白血病细胞（见实施例 3）。NDV 还可杀死大多数的人肿瘤细胞（见 Robbert 等的 WO/9918799）。3 型呼肠孤病毒可杀死人的纤维肉瘤细胞，而不杀死正常的纤维母细胞（见实施例 4）。

多种病毒可用于选择性地去除正常造血细胞和瘤细胞的联合培养物

中的瘤细胞。例如，在含白血病 OCI/AML3 型细胞和正常骨髓细胞的联合培养物中（比例为 1:9 和 1:3），VSV 杀死了所有的白血病细胞，而对正常的造血细胞如果说有影响的话，其影响也是很小的（实施例 2）。本实验中所用的印第安纳血清型的 VSV 是从鼠 L929 细胞增殖并获得的。这些数据显示了在骨髓净化中，采用病毒如 VSV 选择性地破坏了正常骨髓和白血病细胞的混合体中的白血病细胞。在另一个实施例中，采用 NDV 选择性地去除了正常造血细胞和瘤细胞的联合培养物中的瘤细胞。NDV 的 PPMK107 毒株是中等 NDV 毒株的 MK107 毒株经净化的具有三个菌斑的纯品种，该 NDV 的 PPMK107 毒株可选择性地杀死人的口腔癌细胞与纤维母细胞的混合培养物中的人的口腔癌细胞（见 Robbert 等的 WO/9918799）。

介导移植物抗宿主疾病的细胞的清除

不良细胞例如能引起移植物抗宿主疾病 T 淋巴细胞和良性细胞的混合体与病毒一起孵育，结果选择性地杀死了不良细胞。这种净化骨髓或外周血细胞的有效方法可用于预防哺乳动物的移植物抗宿主疾病。

介导自身免疫疾病的细胞的清除

能引起自身免疫疾病的自身免疫细胞和良性细胞的混合体与病毒一起孵育，结果选择性地杀死了自身免疫细胞。这种净化不良细胞的有效方法可用于治疗自身免疫疾病，如类风湿性关节炎或多发性硬化症。

不良细胞的筛选

本发明中的不良细胞包括瘤细胞，所述瘤细胞发生了染色体缺失或基因重组，或含有编码蛋白质或细胞干扰素反应的调制物，或具有其他有缺陷的干扰素反应（Colamonici OR 等，1992，《血液》（Blood），80:744-749; Heyman M 等，1994，《白血病》（Leukemia），8:425-434; Billard C 等，1986，《血液》（Blood），67:821-826）。骨髓或 PBPC 细胞群体具有暂时中止的性质，这使得其便于用荧光激活细胞分类术（FACS）进行分析，以确定细胞的干扰素反应状态。干扰素反应性探针

包括用于基因消除或重组的染色体杂交探针，或用于细胞受体分析以及在细胞对干扰素的反应中的信号转导途径的成分分析的探针，如抗体。

本发明的组合物

本发明的病毒能区分不良细胞如瘤细胞与良性细胞如正常的造血细胞。本发明的 RNA 病毒包括但不局限于（1）单链病毒，包括反义 RNA 病毒和正义 RNA 病毒，和（2）双链 RNA 病毒。本发明的单链反义 RNA 病毒包括但不局限于不分段的病毒属，如弹状病毒属[例如，小囊状的口腔炎病毒（VSV）]和副粘病毒属[例如，新城疫病毒（NDV）和人的 3 型副流感病毒]。本发明的单链正义 RNA 病毒包括但不局限于微小核糖核酸病毒[例如，鼻病毒]和披膜病毒类[例如，新培斯病毒]。本发明的双链 RNA 病毒类包括呼肠孤病毒。本发明包括能复制的 RNA 病毒和不能复制的 RNA 病毒。

本发明包括 Robbert 等在 WO/9918799 中描述的“干扰素敏感性病毒”，本文对其作了完整引用供参考。由于瘤细胞缺乏对干扰素介导抗病毒反应的选择性，所以干扰素敏感病毒经过选择性复制并杀死瘤细胞。除 RNA 病毒外，“干扰素敏感病毒”还包括腺病毒的 VAI 突变异种，这是一种 DNA 病毒。

弹状病毒属由具有紧密相关的被膜的、不分段的反义 RNA 病毒组成，该类病毒包括以下能感染动物的种类：（1）水泡性病毒属（例如，小囊状的口腔炎病毒，VSV）；（2）狂犬病病毒属（例如，狂犬病病毒）；（3）短生病毒属（ephemervirus）[Dietzschold B et al., 1996. 弹状病毒（Rhabdoviruses）. In:《病毒学领域》(Fields Virology) 第 3 版,(编辑 Fields B.N.等), pp1137-1159]。

在本发明的一个特别有益的实施方式中，所用的弹状病毒是小囊状的口腔炎病毒（VSV）。人们已经识别出了几种血清学性质显著的 VSV 毒株和很多被表征的突变异种。VSV 的自然宿主包括昆虫、啮齿动物和家养动物。一般来讲，北美人几乎没有与这类病毒接触过，人的感染大多发生在实验室人员和农民身上。人类感染或者无症状或表现为流感样症状。

VSV 毒株包括但不局限于印地安那(Indiana)、新泽西(New Jersy)、Priy、球菌的(Coccal)和 Chandipura。而本文所公开的实施例涉及印地安那 VSV 毒株。应当理解，采用本文所述的方法，本领域的技术人员可以容易地筛选出其他的 VSV 毒株及其衍生物，所述衍生物包括可选择性地杀死瘤细胞的 VSV 的突变异种。

不分段的反义 RNA 病毒类的副粘病毒属包括三种：(1)副粘病毒，包括新城疫病毒（NDV)；(2）麻疹样病毒（麻疹病毒)；和（3）呼吸道多核体病毒（肺炎病毒)。本发明的 NDV 是一种有利的病毒。按照对小鸡和鸡胚的影响，可将 NDV 分为 3 个明显不同的类别。“低毒株”被称为轻型毒株，它在最小致死量（MLD）下用 90-150 个小时杀死鸡胚；“中毒株”被称为中等毒株，它在最小致死量下用 60-90 个小时杀死鸡胚；“高毒株”被称为强毒株，在最小致死量下用 40-60 个小时杀死鸡胚。参见例如，Hanson 和 Bradley，1955（Science, 122:156-157）和 Diardiri 等，1961（Am J Vet Res 9:918-920)。所有这三类都有用，包括有益的 NDV 的中等毒株如 MK107。

在本发明的一个特别有益的实施方式中，双链 RNA 病毒是呼肠孤病毒。在本发明的另一个有益的实施方式中，呼肠孤病毒是 3 型呼肠孤病毒。

在本发明另一个有益的实施方式中，采用了能在与枯草杆菌蛋白酶相关的蛋白酶表达有缺陷的肿瘤中复制的 RNA 病毒。人类 3 型副流感病毒就是这种类型的病毒。

为了特定的目的，期望获得无性系病毒以确保或增加特种毒株的遗传同质性，并能去除有缺陷的干扰性病毒颗粒。有缺陷的干扰性病毒颗粒的去除可增加成品的纯度，因为纯度是用每个感染颗粒中病毒颗粒的总数来估计的。可采用噬斑纯化或采用 Robbert 等在 WO/9918799 中所描述的其他方法增殖无性系病毒。

在本发明的另一个的实施方式中对病毒进行了遗传修饰，例如为增加病毒对瘤细胞的选择性。弹状病毒如 VSV 的遗传控制技术（Robberts A. 和 J.K. Rose，《病毒学》(Virology)，1998，247:1-6）已经成熟，这

使得改变病毒的遗传特性成为可能。此外，可以采用本领域技术人员所熟知的标准技术来对 VSV 进行遗传修饰，并给 VSV 的基因组中导入良性基因以产生 VSV 的重组体（例如，Sambrook 等，1989，《实验手册》(A Laboratory Manual)，New York, Cold Spring Harboor Press)。在本发明的一个的实施方式中，VSV 的 G 蛋白可经修饰产生融合物，该融合物以肿瘤细胞的特定位点为靶点。在本发明的另一个的实施方式中，VSV 被遗传性改变来表达一种或多种自杀基因，所述自杀基因能使前体药物代谢生成有毒的代谢物，这样通过施用前体药物即可将被 VSV 感染的肿瘤细胞杀死。经修饰可表达疱疹病毒胸苷激酶基因或胞嘧啶脱氨酶基因的 VSV，可被用来分别将 9-1,3-二羟-2-丙氧甲基鸟嘌呤或 5-氟胞嘧啶转变为有毒的化合物。然而，应当理解也可采用其他的自杀基因。

配方与施药

本发明的一个有益的实施方式涉及试剂盒，该试剂盒用于良性细胞和不良细胞的混合体中不良细胞的体外清除。所述试剂盒包括预先测定数量的配制的病毒，该试剂盒适用于处理含一定数量的良性细胞和不良细胞的混合体。有益的配方包括赋形剂，该赋形剂用以稳定病毒以免失去感染性，或用以提高良性细胞的生存力或存活性。一个更有益的试剂盒不需生物密封装置即可在无菌步骤中将病毒配方和靶细胞混合体相接触。这种装置的一个例子是一个隔离成多个空间的靶细胞混合体的收集容器，在其中一个独立的隔间中装有预先测定的病毒。在隔间之间设有开放的通道，使得病毒、靶细胞群以及一种或多种赋形剂可以相互接触。如果病毒和赋形剂是分开的，则病毒和赋形剂可同时或先后接触。在本发明另一个有益的实施方式中，提供了一种隔离成多个空间的容器，在病毒与良性和不良的靶细胞的混合体接触期间，该容器的温度保持在病毒细胞反应最适宜的温度。本发明另一个有益的实施方式涉及一种试剂盒，该试剂盒可使结合在一起的细胞混合体与病毒、赋形剂或前述二者经过适当的时间分离开来。本领域的技术人员可以知道或确定这一适当的接触时间。

本发明中病毒的适当配方包括为那些用于治疗肿瘤的病毒所列出的配方（Robbert 等，1999，PCT WO9918799）。此外，有益的配方包括化合物或生物制品，所述化合物或生物制品对良性细胞和不良细胞的混合体中的良性细胞有以下一种或多种活性：区分、增殖、不干扰、刺激、保护包括休眠。例如，这些化合物或生物制品包括细胞因子、细胞周期中的肽类调制物、白细胞介素、生长因子、能量源、维生素和电解质。附加的适当赋形剂包括冷冻保护组合物。

发明将相当数量的病毒用于减少或去除不良细胞，而保留了良性细胞。本领域的技术人员应当理解，根据所选病毒、不良细胞的种类和数量以及需保留的良性细胞的种类和数量的不同，用来减少或去除不良细胞所需病毒的数量也不同。例如，可采用 0.00001 到 10 pfu/细胞的 VSV，更优选 0.0003 到 10 pfu/细胞。

在本发明的另一个有益的实施方式中，采用病毒与瘤细胞和正常细胞的混合体相接触，这些细胞在与病毒接触之前、之中或之后用干扰素处理。干扰素能增强对正常细胞的保护（参见实施例 3，和 Robbert 等的 WO/9918799）。干扰素（INF）选自Ⅰ级（α、β、ω）组和Ⅱ级（γ）组、重组体变体及其类似物，如 Sreevalsoun T 所描述的（《癌症的生物疗法》（Biologic Therapy of cancer）第二版，1995，V.T. Devita. Jr 等编，J.B. Lippincott Company, Philadephia. pp347-364）。

在本发明的另一个有益的实施方式中，病毒与瘤细胞和正常细胞的混合体相接触，这些细胞在与病毒接触之前、之中或之后用化疗制剂处理。该化疗制剂用以进一步降低瘤细胞的存活力。

以下实施例的目的在于说明，而非限制本发明的方法和组合物。对于在临床治疗经常遇到的各种条件和参数所做的适当的修改和调整，只要这种修改和调整对于本领域的技术人员来说是显而易见的，均在本发明的精神和范围之内。

实施例 1：由独立的细胞培养所确定的小囊状的口腔炎病毒（VSV）

选择性地杀死白血病细胞而不杀死正常的骨髓细胞

将印第安纳血清型 VSV 在鼠 L929 的细胞对噬斑进行纯化。用单个噬斑感染 L929 细胞的单层，18 小时后获取上清液并以 6,000 x g 离心 10 分钟。澄清的上清液经 0.2 的微孔过滤器（Millipore）过滤，然后滴定 L 细胞，等分后在-80℃下保存。每一等分的病毒只用一次。

取自两个不同的健康的捐赠者的正常骨髓培养物对印第安纳血清型的小囊状的口腔炎病毒（VSV）的感染具有抵抗力。即使在 10 pfu/细胞的高浓度感染下，正常骨髓细胞也不产生感染性的 VSV 颗粒。其次，被感染的骨髓细胞用甲基纤维素体外培养后，被感染的骨髓细胞培养物与假性感染的培养物在形成正常的造血细胞类型谱方面的能力没有差别。相反，AML 细胞系 OCI/AML3、OCI/AML4 和 OCI/AML5 对 VSV 感染有高度的敏感性，0.05 pfu/细胞的 VSV 24 小时杀死 50%的细胞，少至 0.0003 pfu/细胞的 VSV 48 小时也杀死 50%的细胞。

实施例 2：用小囊状的口腔炎病毒（VSV）选择性地杀死白血病细胞和正常骨髓细胞的混合培养物中的白血病细胞

按实施例 1 中所述的方法制备印第安纳血清型的 VSV。在白血病 OCI/AML3 细胞和正常骨髓细胞相混合（比例为 1:9）的联合培养物中，VSV 有选择性的肿瘤消解特性。在这个试验中（表 1），用 1 pfu/细胞或 5 pfu/细胞的 VSV 大量地感染联合培养物达 24 小时，然后将该培养物种植在含有或不含生长因子的甲基纤维素中。存在生长因子时，正常骨髓细胞和肿瘤细胞都生长，而没有生长因子存在时，只有 OCI/AML3 形成菌落。14 天后进行菌落计数（表 1），结果显示，不依赖生长因子的白血病细胞全部被清除，且不干扰正常骨髓祖细胞。采用白血病 OCI/AML3 细胞和正常骨髓细胞的 1:3 的混合物时，观察到了相同的结果。这些数据显示，正常骨髓的混合群体中白血病细胞被选择性地破坏了，VSV 在骨髓体外净化中具有实用性。

表 1.选择性地杀死正常骨髓和急性骨髓性白血病细胞（AML）的联合培养物中的急性骨髓性白血病细胞

被 VSV 感染两周后观察到的每皿（装有 10^4 个细胞）中的菌落列于下表，这些菌落有瘤细胞（白血病）和正常造血细胞（中性粒细胞、细胞混合体和单核细胞）。

	感染多重性		
菌落类型	0.0	1.0	5.0
白血病	172	0	0*
中性粒细胞	12	7	5
细胞混合体	6	3	4
单核细胞	10	7	5

*-没有生长因子的皿中，即使每皿装有 10^5 个细胞，也未观察到白血病细胞菌落。

实施例 3. 与单独的细胞培养物中的正常细胞相比，VSV 选择性地在瘤细胞中生长并杀死瘤细胞。

将多种正常细胞系和转化细胞系不做处理或用 100 单位 IFN-α 预处理，用 MOI 为 0.1 pfu/ml 的印第安那型 VSV 感染，然后在 37℃下孵育 18 小时（表 2）。滴定每个样本的培养基以确定 VSV 的繁殖数。用干扰素预处理的正常细胞培养物使感染性病毒颗粒的繁殖数减少到<1000/ml，而肿瘤细胞系能继续产生大量的病毒颗粒（10^5-10^8 pfu/ml）。发现 VSV 在肿瘤细胞中的生长比在来自纤维母细胞或上皮的正常细胞的培养物中的生长更为迅猛。各种细胞类型的差异不仅表现在病毒颗粒的增殖上，还表现在显微水平观察到细胞病变的作用（cpe）。

表 2，或未经处理或用 IFN 处理的各种细胞系过夜感染后，VSV 的病毒产量

细胞系	病毒滴定量（pfu/ml）	
	未处理	IFN-α
OSF7（初级正常的繁殖数）	1×10^{6}	<10
OSF12（初级正常的人纤维细胞）	2×10^{5}	<10
OSF16（初级正常的人纤维细胞）	1×10^{5}	<10
PrEC（初级正常的人前列腺上皮）	8×10^{6}	<10
HOSE（初级正常的人卵巢表皮）	1×10^{7}	<1000
A2780（人的卵巢癌）	2×10^{8}	1×10^{7}
OVCA 420（人的卵巢癌）	1×10^{8}	3×10^{6}
C13（人的卵巢癌）	1×10^{8}	1×10^{5}
LC80（人的肺癌）	2×10^{9}	6×10^{7}
SK-MEL3（人的黑素瘤）	1×10^{9}	1×10^{9}
LNCAP（人的前列腺癌）	4×10^{9}	5×10^{9}
HCT116（人的结肠癌）	1×10^{9}	2×10^{9}
293T(用 T 抗原和 Ad 病毒 E1A 转化的 HEK 细胞）	1×10^{8}	8×10^{7}

实施例 4. 3 型呼肠孤病毒在各个细胞培养物中选择性地杀死瘤细胞而不杀死正常纤维母细胞

在 24 孔的组织培养皿中，使人的肿瘤细胞（HT1080 纤维肉瘤）和正常细胞（CCD922sk，正常的人的皮肤纤维母细胞）生长达到约 80%融合。除去生长介质，并以从 1E+6 pfu/孔到 10 倍的稀释液 10pfu/孔加入 PPVR-824（实验组Ⅰ）或以 7.2E+7 pfu/孔 10 倍的稀释液从 10^{7}稀释到 100 pfu/孔加入 PPVR-824（实验组Ⅱ），所述 PPVR-824 为人的 3 型呼肠孤病毒的纯化噬斑菌落，即 Dearing 毒株。每个孔板上都有未加病毒的对照孔。37℃下在摇床上将病毒吸收 90 分钟。孵育周期结束后，弃去病毒稀释液，用 1ml 生长介质置换。然后将孔板在 37℃、5%CO_2中孵育 5 天。采用比色计 MTT（2-[4,5-二甲基噻唑-2-基]-2,5-二苯基四唑溴）测定仪（细胞滴定量 96，#G4000 类，Promega Corporation, Madison WI 53711）在 570nm 下监测，定量测定细胞毒性，该法测定了线粒体的酶活性(Mosman, T., 1983, 《免疫方法杂志》(J. Immunol. Methods) 65:55)。用对照孔中未处理的细胞活性的百分数来表示经过病毒处理的细胞的生存能

力。用该数据作 pfu/孔随对照细胞活性变化的曲线图。计算 IC50，这就是细胞存活量减少 50%的病毒的数量，单位为 pfu/孔。瘤细胞对 PPVR-824 的杀死作用具有数个数量级的敏感度（表 3）。

表 3 在单独的细胞培养物中 3 型呼肠孤病毒选择性地杀死瘤细胞而不杀死正常的纤维母细胞

	正常纤维母细胞（CCD922sk）IC50	瘤细胞（HT1080），IC50
实验组 I	>1.0E+06	125
实验组 II	>7.2E+07	417

上述实施例意在说明而非限制本发明。在本发明的精神和范围之内可做很多变化和修改。