[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 02807418.1

[51] Int. Cl.
C12N 5/00 (2006.01)
C12N 7/00 (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)
C12N 15/86 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 1 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100362095C

[22] 申请日 2002.3.27 [21] 申请号 02807418.1

[30] 优先权

[32] 2001. 3.27 [33] US [31] 60/279，174

[86] 国际申请 PCT/US2002/009685 2002.3.27

[87] 国际公布 WO2002/077206 英 2002.10.3

[85] 进入国家阶段日期 2003.9.26

[73] 专利权人 沃泰克斯药物股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

[72] 发明人 A·翁 R·伯恩 L·M·雷德

[56] 参考文献

WO9822588 1998.5.28

WO9704803 1997.2.13

CN1301297 2001.6.27

审查员 曹克浩

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

代理人 刘晓东

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 5 页

[54] 发明名称

用于 HCV 感染的组合物和方法

[57] 摘要

本发明提供包含在 HCV 感染之后可有效产生 HCV 的细胞的组合物、用于培养该细胞的组合物、制备该组合物的方法以及在该组合物的细胞中注射 HCV 的方法。 本发明也提供了分析 HCV 产生的方法以及评价影响 HCV 产生的化合物的方法。

1. 一种用于培养生产 HCV 的细胞混合物之组合物，所述组合物包含无血清培养基、约 0.1mM 至约 0.6mM 钙、约 7.6μEq/L FFAs、约 5μg/ml HDL、约 5mM 烟酰胺、约 1x 微量元素、约 100ng/mL EGF、约 10ng/mL 胰岛素、约 5μg/mL 转铁蛋白和约 10^{-6}M 氢化可的松。

2. 权利要求 1 的组合物，其中组合物含有约 0.5mM 钙。

3. 权利要求 1 或 2 的组合物，其还包含约 500μg/mL BSA。

4. 权利要求 1-3 中任一项的组合物，还包含选自如下组分的一个或多个：约 2μg/mL 胰高血糖素，约 20μg/mL 肝生长因子，约 10^{-6}M 乙醇胺和约 10^{-6}M 甲状腺素释放因子。

5. 权利要求 1-4 中任一项的组合物，其中 FFAs 包含约 2.36μM 棕榈酸(16:0)，约 0.21μM 棕榈油酸（顺-16:1 n-7）、约 0.88μM 硬脂酸（18:0）、约 1.02μM 油酸（顺-18:1 n-9）、约 2.71μM 亚油酸（顺-18:2 n-6）以及约 0.43μM 亚麻酸（顺 18:3 n-3）。

6. 权利要求 1-5 中任一项的组合物，其中 1x 微量元素包含约 $1x10^{-7}$M 铜、$5x10^{-11}$M 锌和约 $3x10^{-10}$M 硒。

7. 权利要求 1 的组合物，其还含有饲养细胞。

8. 权利要求 7 的组合物，其中所述饲养细胞为 STO（Reid-99）细胞，于 2001 年 3 月 27 日保藏于美国典型培养物中心，10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209，ATCC 保藏号 PTA 3236。

9. 权利要求 1-8 中任一项的组合物，其中培养基中不含有低密度脂蛋白。

10. 权利要求 1-9 中任一项的组合物，其还含有胞外基质。

11. 权利要求 1-10 中任一项的组合物，其还含有丙型肝炎病毒。

12. 权利要求 11 的组合物，其中丙型肝炎病毒为 RNA898。

用于 HCV 感染的组合物和方法

本申请要求 2001 年 3 月 27 日提交的美国临时申请 60/279,174 的利益。

发明背景

虽然丙型肝炎病毒(HCV)在受感染的人体中强力复制，但是在培养细胞中生长病毒的有力方法尚不理想。使用感染性血清体内感染培养的人肝细胞时，只有少量 HCV 复制，只能由逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)检测到。

对于外周血单核细胞、人 B 和 T 细胞系、人肝细胞系以及原发的人胎和成人细胞，利用 HCV 感染培养细胞的努力已有报道。然而，迄今报道的结果令人失望。病毒复制常常很少，以致于感染的细胞群体所产生的 HCV 即使存在，也只能通过 RT-PCR 检测到，因而只能观察到 HCV RNA 的少量拷贝。另外，相同的病毒和细胞在相同或不同时期的病毒产生具有偶发性，并且孔与孔之间不可重复。再有，给予病毒几天甚至一个月以后，才能观察到感染高峰，例如 Iacovacci 等人，Hepatology 26(5):1328-1337 (1997)。这些问题阻碍了可用于 HCV 患者治疗和/或 HCV 感染相关研究的化合物的鉴定和快速筛选。

因此，需要在细胞培养物中感染和复制 HCV 的方法。也需要快速有效的方法，用于确定在培养中抑制 HCV 产生的化合物。本申请提供包含可以有效复制 HCV 的细胞的组合物、制备细胞组合物、培养细胞所用培养基的方法、利用 HCV 感染细胞的方法、分析 HCV 感染的方法、以及利用本发明组合物和方法评价化合物影响 HCV 产生能力的方法，从而解决了这些问题。

发明概述

本发明提供制备包含大量产生 HCV 的培养细胞的组合物的方法。本发明提供可以被 HCV 有效感染的组合物，其包含细胞混合物，其中含有来自妊娠之后三月龄或以上的人肝的细胞。本发明也提供包含利用本发明方法制备的细胞的组合物。在一个实施方案中，本发明的

组合物包含含有表达甲胎蛋白的细胞、表达白蛋白的细胞、表达血型糖蛋白的细胞、但基本上不含表达 CD34 蛋白质的细胞的细胞混合物。在本发明另一实施方案中，细胞混合物中的细胞可以穿过约 40 微米大小的滤器。在本发明另一实施方案中，所述组合物与饲养细胞联用、或另外包含饲养细胞。 在本发明又一实施方案中，所述饲养细胞是 STO (Reid-99)细胞。

本发明提供用于培养细胞的组合物。在本发明的一个实施方案中，该用于培养细胞的组合物包含：含钙的无血清培养基、游离脂肪酸(FFA)、高密度脂蛋白(HDL)、烟酰胺、微量元素、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转铁蛋白和氢化可的松。根据本发明另一实施方案，上述组合物不包含低密度脂蛋白。 根据本发明另一实施方案，所述组合物另外包含下列成分的任何一种、组合、或全部：胰高血糖素、肝生长因子、乙醇胺和促甲状腺素释放因子。

本发明提供通过将 HCV 给予本发明的组合物从而感染细胞混合物的方法。根据本发明的一个实施方案，该 HCV 是 RNA898。 在本发明的另一实施方案中，首先将 HCV 病毒与组合物(接种物)在约 0.52 ml/cm^2 的体积中约 37°C 温育约 24 小时，然后洗涤组合物中的细胞或利用细胞培养基替换接种物。

本发明提供分析 HCV 感染的方法：将本发明的组合物与饲养细胞温育、将组合物中的细胞与 HCV 接触；并测定细胞和/或培养细胞的培养基相关联的 HCV。

另外，本发明提供评价化合物影响 HCV 产生能力(即影响细胞组合物产生更多 HCV 的能力)的方法，其包含将本发明的组合物与饲养细胞温育、将组合物中的细胞与 HCV 病毒接触、以及在接触 HCV 前后给予该化合物的步骤。在一个实施方案中，该方法用于筛选抑制 HCV 产生的细胞。 在另一实施方案中，该方法用于同时筛选多种化合物抑制 HCV 产生的能力。

在另一实施方案中，通过逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)测定 HCV RNA 的数量，从而确定 HCV 的存在。在一个实施方案中，将样

品中的 HCV RNA 与用作内部对照的另一种病毒的 RNA 的量相比较。在另一实施方案中，所述另一种病毒是牛病毒性腹泻病毒("BVDV")。

附图简述

图 1 描述了利用 RNA898 (-□-)或无血清对照(-●-)感染以后，通过测定培养上清中存在的 HCV RNA 水平，对人胎肝细胞感染的时间过程分析。上清样品 RT-PCR 分析的定量极限值(----LOQ)是 600 个 HCV RNA 拷贝/样品。 给出了三次重复培养物的平均 HCV RNA/ml 值及其标准差。

图 2 描述了利用 RNA898 (-□-)或阴性对照血清(-X-)感染以后，通过测定培养上清中存在的 HCV RNA 水平，对人胎肝细胞感染的时间过程分析。阴性对照血清得自未患 HCV 感染的患者。上清样品 RT-PCR 分析的定量极限值(----LOQ)是 600 个 HCV RNA 拷贝/样品。给出了三次重复培养物的平均 HCV RNA/ml 值及其标准差。

图 3 描述了利用 RNA898 (-□-)或阴性对照血清(-X-)感染以后，通过测定培养上清中存在的 HCV RNA 水平，对人胎肝细胞感染的时间过程分析。阴性对照血清来自未患 HCV 感染的患者。上清样品 RT-PCR 分析的定量极限值(----LOQ)是 600 个 HCV RNA 拷贝/样品。给出了三次重复培养物的平均 HCV RNA/ml 值及其标准差。

图 4 描述了利用 RNA898 感染以后，通过测定细胞关联的 HCV RNA 水平，对人胎肝细胞感染的时间过程分析。阴性对照血清数据未显示。 接种之后，在给予病毒 1、2、3、6 和 8 天后洗涤并收集培养物中的细胞。细胞关联的(cell-associated) RNA 样品 RT-PCR 分析的定量极限值(----LOQ)是 100 个 HCV RNA 拷贝/样品。 给出了三次重复培养物的平均 HCV RNA/孔值及其标准差。

图 5 描述了利用一定浓度范围内的抗病毒剂 VRT-106866 抑制人胎肝细胞的 HCV 感染。利用多重 HCV 特异性 RT-PCR 定量分析，测定样品中的 HCV RNA。细胞关联的 RNA 样品 RT-PCR 分析的定量极限值是 100 个 HCV RNA 拷贝/样品。 结果表示为三次重复培养物的"对照 HCV RNA %" (样品值/阳性对照平均值)的平均值和标准差。

发明详述

本发明的组合物包含细胞混合物，其中包含从妊娠后三月龄或以上的人肝中释放的细胞。根据一个实施方案，所述人的年龄介于并包括妊娠后三个月直至出生后一年。在本发明另一实施方案中，所述人年龄为妊娠后三至六个月。在另一实施方案中，所述人年龄介于妊娠后 18 至 22 周。在本发明的一个实施方案中，所述细胞包含胎肝细胞和造血细胞。根据本发明的一个实施方案，所述肝细胞和造血细胞可以表达甲胎蛋白、白蛋白和/或血型糖蛋白。根据优选实施方案，如果所述人是成年人，则人的肝是健康的。

根据另一实施方案，本发明的组合物包含表达甲胎蛋白的细胞、表达白蛋白的细胞、以及表达血型糖蛋白的细胞，但基本上不含表达 CD34 蛋白质的细胞。细胞混合物的细胞可用特异性针对甲胎蛋白、白蛋白或血型糖蛋白的抗体进行免疫染色，但是该细胞混合物基本上不含可用特异性针对 CD34 蛋白质的抗体进行免疫染色的细胞。根据本发明，术语"基本上不含表达 CD34 蛋白质的细胞"是指利用碱性磷酸酶染料检测系统(例如 Harlow 等人, Antibodies: A Laboratory Manual (1988) Cold Spring Harbor Laboratory, 349, 406-407 页; DAKO Corporation 的 LSAB2 试剂盒)检测免疫结合时，细胞混合物中的细胞显示很少或没有可观测的 CD34 抗体免疫染色。根据本发明组合物的一个实施方案，细胞混合物中少于 2%的细胞群体可以利用抗 CD34 特异性抗体染色。 根据本发明的另一实施方案，细胞混合物中少于 1%的细胞群体可以利用抗 CD34 特异性抗体染色。

本发明包括包含细胞的组合物，该细胞是非常适合 HCV 病毒 RNA898 (下文"RNA898")感染和复制的宿主细胞。RNA898 根据布达佩斯条约，于 2001 年 3 月 27 日保藏于美国典型培养物中心("ATCC", 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209) (ATCC 保藏号 PTA-3237)。 根据一个实施方案，本发明的组合物中存在 4×10^5 个细胞时，在给予病毒 72 小时之后，能够在培养基中产生多于约 5,000 个拷贝; 多于约 10,000 个拷贝; 或多于约 50,000 个拷贝的丙型肝炎病

毒 RNA。例如，根据本发明方法制备并根据实施例 2 和 4 所述方法分析的组合物，在给予病毒 72 小时之后，应能够在培养基中产生多于约 5,000 个拷贝、多于约 10,000 个拷贝、或多于约 50,000 个拷贝的丙型肝炎病毒 RNA。

本领域技术人员应当容易理解，如果组合物中的细胞数目多于 4 x 10^5 细胞，那么所产生的病毒 RNA 总拷贝数将与组合物中增加的细胞数目同比增加。同样，本领域技术人员应当容易理解，如果组合物中的细胞数目少于 4 x 10^5 细胞，那么所产生的病毒 RNA 总拷贝数将与组合物中减少的细胞数目同比减少。 因此，本发明涵盖包含少于或多于 4 x 10^5 细胞、将按比例产生相同拷贝数 HCV RNA 的组合物。本发明的组合物在给予病毒 72 小时以后，能够产生 5,000-55,000 拷贝的 HCV RNA； 10,000-55,000 拷贝的 HCV RNA 以及 25,000-55,000 拷贝的 HCV RNA。

根据本发明可用于免疫染色的抗体的例子为本领域已知。例如，可以使用 DAKO Corporation, Carpinteria, CA 的抗甲胎蛋白抗体、PharMingen, San Diego, CA 的抗血型糖蛋白抗体(32591)、PharMingen, San Diego, CA 的抗人 CD34 抗体(34371A)以及 Accurate Chemical Corp., Westbury, NY 的抗白蛋白抗体(YM5024)

在本发明另一实施方案中，本发明组合物中的细胞混合物可以穿过约 40 微米大小的滤器。

在本发明另一实施方案中，本发明组合物与饲养细胞联用、或另外包含饲养细胞。饲养细胞提供细胞外基质以及可扩散因子，例如生长因子。 在一个实施方案中，所述的饲养细胞几乎没有被 HCV 感染的能力。在另一实施方案中，所述的饲养细胞是成纤维细胞。 在另一实施方案中，所述的饲养细胞是胚胎间充质成纤维细胞。

本发明饲养细胞的例子有小鼠胚胎成纤维细胞(MEF)，例如 STO 细胞，以及大鼠胚胎成纤维细胞(REF)，例如 Brigid Hogan 等人，Manipulating The Mouse Embryo: A Laboratory Manual, 第二版，Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1994;

Robertson, E.J. (1987) Teratocarcinomas and Embryonic Stem Cells: A Practical Approach, Robertson, E.J.编 (IRS, Oxford), 71-112 页. STO (Reid-99)细胞是一种有用的饲养细胞. STO (Reid-99)细胞按照布达佩斯条约，于 2001 年 3 月 27 日保藏于美国典型培养物中心，10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209 (ATCC 保藏号 PTA-3236). 培养和维持饲养细胞的方法为本领域已知. 例如参见 Methods for Tissue Engineering, Robert Lanza 编, Academic Press, NY (2002), 151-202 页.

根据本领域已知方法，饲养细胞可以生长停滞. 例如，可使 STO 细胞在细胞培养板上附着 2-48 小时. 接下来去除培养 STO 细胞的培养基，替换为包含 2 μg/ml 丝裂霉素 C 的培养基. 然后将 STO 细胞在约 37°C 温育约 2 小时. 温育以后去除包含丝裂霉素 C 的培养基. 洗涤细胞两次，然后维持 STO 细胞培养物 0-48 小时，再加入本发明的细胞混合物.

本发明组合物的细胞混合物可以按照以下方法制备，其中包含:

a. 在包含 EGTA 的缓冲液中切碎妊娠后三月龄或以上的人肝;

b. 将切碎的肝在包含胶原酶的缓冲液中温育，从肝中分离细胞;

c. 从分离的细胞中去除约 40 微米或更大的物质;

d. 从分离的细胞中去除血红细胞;

e. 将步骤(d)的细胞重悬于包含 0.1mM - 0.6mM 钙、牛血清白蛋白、游离脂肪酸(FFA)、高密度脂蛋白(HDL)、烟酰胺、微量元素、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转铁蛋白和氢化可的松的无血清培养基中; 以及

f. 在步骤(e)的无血清培养基中培养所述细胞.

步骤(e)或(f)的培养基可以任选另外包含胰高血糖素、肝生长因子、乙醇胺和促甲状腺素释放因子中的任何一个、组合或全部. 在一个实施方案中，该培养基另外包含胰高血糖素、肝生长因子、乙醇胺和促甲状腺素释放因子. 在另一实施方案中，该培养基不包含低密度脂蛋白(LDL).

在一个实施方案中，所述的 EGTA 缓冲液包含 0.1mM - 1.0mM 乙二醇双(β-氨基乙醚)-N,N,N′,N′-四乙酸(EGTA)。在本发明另一实施方案中，所述 EGTA 浓度为 0.5mM。

在一个实施方案中，所述的胶原酶缓冲液包含 0.1 - 5.0 mg/ml 的胶原酶。在本发明另一实施方案中，所述胶原酶浓度为 2 mg/mL。

本发明的大小排阻步骤是指去除不能通过约 40 微米大小滤器的物质，例如组织、碎片和细胞聚集物。因此，本发明涵盖例如使用约 40 - 100 微米大小的滤器以及其它方法去除大于 40 微米大小的碎片。在一个实施方案中，过滤步骤去除不能通过大于约 40 微米大小的滤器的物质。本发明滤器的例子包括尼龙滤器(例如 Falcon 的"Cell strainer" (目录号 2034、2350 或 2360))。

制备本发明组合物的方法包括从细胞混合物中去除血红细胞的步骤。应当理解，从肝中分离细胞之后，可以在制备过程的任何阶段去除血红细胞。 去除血红细胞的方法为本领域已知。根据本发明的一个实施方案，在离心机中通过连续低速离心去除血红细胞。 例如，通过滤器分离的细胞在 50xg (450rpm)离心 4 分钟，重悬细胞沉淀，相同过程重复数次。

可以利用本发明的培养基培养动物或人的原发细胞、细胞系和组织。在一个实施方案中，所述培养基包含无血清培养基、钙、FFA、HDL、烟酰胺、微量元素、EGF、胰岛素、转铁蛋白和氢化可的松。 根据另一实施方案，所述培养基另外包含下列成分的任何一种、组合、或全部：胰高血糖素、肝生长因子、乙醇胺和促甲状腺素释放因子。在另一实施方案中，所述培养基不包含低密度脂蛋白(LDL)。

按照上述过程制备细胞混合物之后，将细胞在适于维持细胞的培养基以及(如有必要)饲养细胞中培养。根据本发明的一个实施方案，为用于 HCV 感染的细胞混合物优化培养基。用于此目的的一种培养基包含无血清培养基(例如(Dulbecco′s modified Eagle′s medium (DMEM))，其含钙、牛血清白蛋白(BSA)、游离脂肪酸(FAA)、高密度脂蛋白(HDL)、烟酰胺、微量元素、表皮生长因子(EGF)、胰岛素、转

铁蛋白、氢化可的松，并任选下列成分中的任何一种、组合或全部：胰高血糖素、肝生长因子、乙醇胺和促甲状腺素释放因子。 根据本发明的一个实施方案中，所述培养基不包含低密度脂蛋白(LDL)。

在一个实施方案中，培养基中钙的浓度为 0.1mM - 0.6mM。在另一实施方案中，钙浓度约为 0.5mM。在一个实施方案中，BSA 的浓度为 500 μg/ml。在另一实施方案中，烟酰胺的浓度为 5mM。在一个实施方案中，胰岛素的浓度为 10 ng/ml。在一个实施方案中，游离脂肪酸的浓度为 7.6uEq/L。在一个实施方案中，EGF 的浓度为 100 ng/ml。在一个实施方案中，肝生长因子的浓度为 20 μg/ml。在一个实施方案中，乙醇胺的浓度为 10^{-6}M。在一个实施方案中，促甲状腺素释放因子的浓度为 10^{-6}M。在一个实施方案中，HDL 的浓度为 5 μg/ml。 在一个实施方案中，氢化可的松的浓度为 10^{-6}M。

在一个实施方案中，所述培养基为 IM-HDM 培养基，其中包含 DMEM (高葡萄糖)、500 μg/ml BSA、7.6uEq/L 游离脂肪酸(FAA)、5 μg/ml HDL、5mM 烟酰胺、1x 微量元素[1x10^{-7}M 铜、5x10^{-11}M 锌、3x10^{-10}M 硒]、100ng/ml EGF、10 ng/ml 胰岛素、5 μg/ml 转铁蛋白、10^{-6}M 氢化可的松、2 μg/ml 胰高血糖素、20 μg/ml 肝生长因子、10^{-6}M 乙醇胺、10^{-6}M 促甲状腺素释放因子]。在一个实施方案中，7.6uEq/L 的总 FFAs 包含 2.36μM 棕榈酸(16:0)、0.21μM 棕榈油酸(顺-16:1 n-7)、0.88μM 硬脂酸 (18:0)、1.02μM 油酸(顺-18:1 n-9)、2.71μM 亚油酸(顺-18:2 n-6)以及 0.43μM 亚麻酸(顺-18:3 n-3)的混合物。 该培养基还可以包含抗生素，以阻止细菌生长，例如 1x 青霉素/链霉素。

本发明组合物的细胞混合物可以铺于包被细胞外基质的塑料基层(substrate)上。细胞外基质成分的例子包括但不限于胶原，例如 IV 型胶原，或粘附蛋白质，纤粘连蛋白和层粘连蛋白，或 Matrigel (ICN Biochemicals Inc.)。使用胶原时，可以单独使用或与层粘连蛋白或纤粘连蛋白联用、或与蛋白聚糖联用、或与富含细胞外基质物质的组织提取物联用。细胞外基质还可以由下述饲养细胞提供。该细胞混合物和细胞外基质的组合物可用于本发明的 HCV 分析方法。

本发明的组合物可以与 RNA898 或其 HCV 感染性等价物接触。RNA898 感染性等价物是 RNA898 以外的 HCV 菌株，所述 HCV 病毒与根据本发明方法制备的组合物的 $4x10^5$ 细胞接触 72 小时以后，能够产生多于约 5,000 拷贝、多于约 10,000 拷贝或多于约 50,000 拷贝的 HCV RNA。根据一个实施方案，通过 RNA898 或其感染性等价物在约 0.52ml/cm^2 的体积中，与本发明的组合物 37 °C 接触约 24 小时，进行细胞感染。根据本发明的一个实施方案，利用细胞外基质培养感染 HCV 的细胞。在本发明另一实施方案中，所述细胞外基质由饲养细胞(例如 STO (Reid-99)细胞)提供。

可以通过测定例如 HCV 蛋白质或核酸产生，来确定本发明组合物中的细胞所产生的 HCV 数量。例如，可以定量细胞关联的(即在其中或附着其上)和/或在培养细胞的培养基中的 HCV RNA 的拷贝数。可用于观察是否产生 HCV 蛋白质或核酸分子的技术为本领域已知。例如，利用针对 HCV 蛋白质的抗体进行探测的蛋白质 Western 印迹，或利用标记的与 HCV 核酸序列互补的核酸分子进行探测的凝胶印迹。从细胞和细胞培养基中提取蛋白质和核酸分子的方法为本领域公知，可以获得用于该目的的商品化试剂盒。

为了更精确定量本发明产生的 HCV 颗粒的拷贝数，可使用逆转录酶聚合酶链式反应(RT-PCR)。根据本发明的一个实施方案，改进了 RT-PCR 方法，通过将其值与以另一种病毒或另一种核酸分子的形式加入待分析的细胞、细胞抽提物和/或培养基样品中的已知数量的另一种核酸分子比较，确定 HCV RNA 的拷贝数。最好是所述另一种病毒与 HCV 密切相关，或所述另一种核酸分子与 HCV RNA 密切相关(即，长度、核酸组成以及病毒衣壳结构相似)。在一个实施方案中，所述另一种核酸分子处于黄病毒衣壳中。在一个实施方案中，所述另一种 RNA 分子是牛病毒性腹泻病毒("BVDV")例如 BVDV NADL 菌株(ATCC 保藏号：VR-534)的 RNA。

所述另一种病毒或核酸分子作为用于量化第一种核酸分子的内部对照，其存在是有益的。该内部对照用于监控和校正随机波动以及分

析的变动性。

例如，本发明提供的方法包含以下步骤:

(a) 将所述 HCV 与已知数量的牛病毒性腹泻病毒("BVDV")混合，其中所述 BVDV 包含本发明的组合物的另一种核酸分子;

(b) 从组合物的细胞或培养细胞的培养基中提取来源于 HCV 的第一种核酸分子以及来源于 BVDV 的所述另一种核酸分子，以形成混合的核酸提取物;

(c) 在所述混合核酸提取物中加入对所述第一种核酸特异性的第一种可检测的探针，以及对所述另一种核酸特异性的另一种可检测的探针;

(d) 利用 PCR 方法扩增所述混合的核酸提取物;

(e) 在扩增的各个循环中，定量分别从所述第一种和另一种可检测的探针释放的可检测信号;

(f) 外推步骤(e)的结果，计算 HCV 中第一种核酸分子以及 BVDV 中所述另一种核酸分子的数量; 以及

(g) 将步骤(f)中所述另一种核酸分子的计算量与步骤(a)使用的所述另一种核酸的已知数量作比较，评价步骤(f)中确定的所述第一种核酸分子的计算量的准确性。

根据另一实施方案，上述方法包含利用系数校正步骤(f)确定的第一种核酸分子的计算量的另外步骤，通过比较步骤(f)中所述另一种核酸的计算量与步骤(a)使用的所述另一种核酸的已知数量，确定该系数。

根据另一实施方案，本发明提供了确定化合物影响 HCV 产生的方法，其包含下述步骤，在给予本发明组合物 HCV 的前后加入化合物，然后测定与组合物中细胞和/或培养受感染细胞的培养基关联的 HCV。如果期望在 HCV 接触组合物之后给予该化合物，则优选在在 HCV 接触组合物后 10 天以内给予该化合物。本发明待测的化合物可以抑制或活化 HCV 的产生。因此，为了实现其影响，化合物可以抑制 HCV 生活周期的任何阶段。该化合物的例子包括但不限于合成或

纯化的化合物、蛋白质以及核酸分子。 加入化合物的样品可以与经相同条件下处理但没有暴露于该化合物、或暴露于已知对 HCV 几乎没有影响的另一化合物的其它样品相比较。

根据一个实施方案，上述方法用于同时筛选多个化合物对 HCV 产生的影响。例如，96 孔板的每个孔可以包含将要根据本发明方法筛选的不同化合物。 在另一实施方案中，本发明方法用于鉴别可抑制 HCV 产生的化合物。

在一个实施方案中，以 HCV 菌株的最保存区为基础，设计用于本发明方法的引物和探针。探针还可以基于以下附加的原则进行构建: a) 探针的解链温度比引物高 8-10°C; b) 5′端不出现 G; c) 没有多于 4 个 G 的片段; 和/或 d)探针不形成解链温度较高的内部结构、或自身或与任何引物形成双链。 在一个实施方案中，整个 PCR 区长度约为 150bp。

根据相同原则设计用于 BVDV 5′ UTR 的引物和探针。此外，应注意保证 HCV 的引物或探针与 BVDV 的引物和探针具有最小量的同源性。可以从合成和制备改变的核酸分子的商业来源获得引物和探针(例如 Oligo and PE Applied Biosystems)。BVDV 可以通过感染 MDBK 细胞而维持。

在本发明的一个实施方案中，使用两种不同的双标记的荧光探针，各自特异性针对 HCV 核酸分子和另一种核酸分子其中之一，而非针对另一个。在另一实施方案中，每种荧光探针一般在 5′端具有报告染料，而在 3′端具有淬火染料。选择两种不同的荧光探针，使其产生可以检测的不同荧光峰，在两个峰之间没有交叉干扰。例如，如上所述，第一种可检测探针的 5′端可标记报告染料，例如 6-羧基-荧光素("6-FAM")，第二种可检测探针的 5′端可标记报告染料例如 VIC。两种可检测探针的 3′端可以标记淬火染料，例如 6-羧甲基-罗丹明("6-TAMRA")。因此，与第一种核酸和第二种核酸结合时，探针 5′端的报告染料与 3′端的淬火染料接近，引起荧光抑制。在扩增过程中，当 Tth 聚合酶沿着核酸序列移动时，通过 5′-3′外切作用去除探针的淬

火染料，而降解荧光探针。由此引起荧光发射，其与扩增循环有关。因此，监控荧光发射为测定实时扩增动力学提供了基础。

用于 HCV 基因型 1 的引物和探针的例子有：(SEQ ID NO: 1) 5′-CCATGAATCACTCCCCTGTG-3′ (正向引物), (SEQ ID NO:2) 5′-CCGGTCGTCCTGGCAATTC-3′ (反向引物), 以及 HCV 探针, (SEQ ID NO:5) 5′-6-FAM CCTGGAGGCTGCACGACACTCA-TAMRA-3′。用于 BVDV 的引物和探针包含正向引物，(SEQ ID NO:3) 5′-CAGGGTAGTCGTCAGTGGTTCG-3′, 反向引物，(SEQ ID NO:4) 5′-GGCCTCTGCAGCACCCTATC-3′, 以及探针，5′-VIC (SEQ ID NO: 6) CCCTCGTCCACGTGGCATCTCGA-TAMRA-3′。

可以在带盖的 96 孔板光盘的同一孔中进行 RT 和 PCR 反应(PE Applied Biosystems, Foster City, CA)。在本发明的一个实施方案中，使用多重 RT-PCR 反应(即，在同一管中的一个 RT-PCR 反应同时扩增和测定两种不同的 RNA，例如 HCV RNA 和 BVDV RNA)。多重反应的好处在于，可使操作者确定 HCV 的阴性结果是由于培养物确实是阴性，还是由于在提取或 RT-PCR 步骤中的某些技术失误。利用 1xTaqman EZ 缓冲液(PE Applied Biosystems)、3mM 乙酸锰、300 mM 各种 dATP、dCTP、dGTP 和 dUTP、5 单位 Tth 聚合酶(Epicentre)、4.0%增强剂(Epicenter)、一定浓度的探针和引物，可以在 50 μl RT-PCR 反应中扩增 10 或 20 μl 病毒 RNA 或 RNA 标准物。Taqman RT-PCR 分析可以运行 60°C 25 分钟 (RT)、95°C 5 分钟、继之以 45 个循环的两步 PCR 反应(60°C 1 分钟及 95°C 15 秒)。为了分析 HCV 和另一种核酸(多重 Taqman 分析)，可以利用两套引物各种浓度的基质混合物优化 HCV 和 BVDV 引物的数量。最后的分析条件包括 6-FAM 标记的 HCV 探针和 VIC 标记的 BVDV 探针各 200 nM 、HCV 引物各 400 nM 以及 BVDV 引物各 45 nM.

贯穿本说明书和权利要求书，单词"包含(comprise)"或其变体(例如"comprises"或"comprising")应当理解为，是指包含所述整体、或

整体组，但不排除任何其它的整体、或整体组。

2001 年 3 月 27 日申请的美国临时申请 60/279,174 以及引用的文章此处引入以供参考。

虽然已经提供了本发明的许多实施方案，但显然可以改变其基本结构，以提供利用本发明的组合物和方法其它的实施方案。因此，应当理解，由权利要求书和说明书、而非此处例示的特定实施方案定义本发明的范围。

实施例 1

分离和培养人胎肝细胞和造血细胞。

妊娠后 18-22 周龄的人胎肝脏组织在切碎之前冰上保存于 RPMI 中。利用 PBS 溶液清洗该组织。 在 50 ml 切碎缓冲液[HBSS (Cellgro 目录号 21-022-cv)、0.5mM EGTA、0.2mM $MgSO_4$、10mM HEPES]中，利用解剖刀切碎组织。组织糜在 37°C 水浴中温育 10 分钟。去除从组织糜中脱离和悬浮的细胞。 组织糜在胶原酶溶液(在胶原酶缓冲液[HBSS、1mM $CaC1_2$、10mM HEPES]中的 2mg/ml 胶原酶(Sigma C-5138))中 37°C 温育 30 分钟。收集悬浮于组织糜之上的脱离细胞，通过 40 微米尼龙滤器(Falcon 号 2034、2350 或 2360)。利用 IM 清洗液[DMEM (高葡萄糖 JRH-51444)、500 μg/ml BSA (Sigma A8806)、7.6uEq/L 总的游离脂肪酸(FAA)、1x Penn/Strep、10 ng/ml 胰岛素、5 μg/ml 转铁蛋白]洗涤组织糜。

将穿过滤器的含细胞溶液混合，1000 rpm 旋转 8 分钟。弃上清。沉淀重悬于 50 ml IM 清洗液，50xg (450rpm)旋转 4 分钟。弃上清。 沉淀重悬于 IM 清洗液、重悬液 50xg 旋转 4 分钟以及弃上清的过程重复 2-3 次。然后将沉淀悬浮于 20 ml IM-HDM 培养基[DMEM (高葡萄糖 JRH-51444), 500ug/ml BSA (Sigma A8806), 7.6uEq/L 游离脂肪酸 (FFAs) [2.36uM 棕榈酸(16:0, Sigma, P0500), 0.21uM 棕榈油酸(顺-16:1 n-7, Sigma, P9417), 0.88uM 硬脂酸(18:0, Sigma, S4751), 1.02uM 油酸 (顺-18:1 n-9, Sigma, O1008), 2.71uM 亚油酸(顺-18:2 n-6, Sigma, L1376)以及 0.43uM 亚麻酸(顺 18:3 n-3, Sigma, L2376)], 5ug/ml HDL

(Sigma L2014), 5mM 烟酰胺(Sigma N0636), 1x Penn/Strep (Gibco 1x), 1x 微量元素[1x10^{-7}M 铜(C8027), 5x10^{-11}M 锌(Sigma 4750), 3x10^{-10}M 硒(Sigma S6663)], 100ng/ml EGF (Peprotech 100-15), 10 ng/ml 胰岛素(Sigma I5500), 5ug/ml 转铁蛋白(Sigma T0665), 10^{-6}M 氢化可的松(Sigma I5500), 2ug/ml 胰高血糖素(Sigma G3157), 20ug/ml 肝生长因子(Sigma G1887), 10^{-6}M 乙醇胺(Sigma E0135), 10^{-6}M 促甲状腺素释放因子(Sigma T9146)].

将沉淀的细胞按 3x10^5 个细胞/cm^2 的密度铺于 IM-HDM 培养基中. 沉淀的细胞在细胞外基质上生长良好. 沉淀的细胞可以在包被胶原的平板上生长.利用 Salas-Prato, Invitro Cell. Dev. Biol 24:230, 1988 的方法包被平板.通常,平板与胶原 I 型储液(30ug/ml 的 DMEM 溶液) 37°C 温育 30 分钟 - 1 小时, 用 PBS 漂洗两次, 用 PBS 覆盖, 在 PBS 中保存直至需要.

此外, 可以用饲养细胞包被平板, 然后加入沉淀的细胞. 例如, 将丝裂霉素 C 处理的 STO (Reid-99)细胞用作饲养细胞. 丝裂霉素 C 使 STO 细胞生长停滞, 但细胞仍存活, 提供了供肝细胞附着的表面.

如果使用 STO 细胞, 将其铺于 1.9cm^2 孔(24 孔板为 1.2x10^5/孔, 96 孔板为 2.2x10^4/孔)的普通 STO 培养基中(RPMI-1640, 10% FCS), 使其附着 2 - 48 小时. 去除培养基, 替换为包含 2ug/ml 丝裂霉素 C 的培养基, 然后 37°C 培养 2 小时. 去除培养基, 将 STO 细胞用普通 STO 培养基洗涤两次, 维持培养 0-48 小时, 然后加入胎细胞.

24-48 小时以后, 通过轻柔吸取, 去除未附着的胎细胞. 一般每 2-7 天更换培养基. 细胞已维持至少 28 天, 细胞附着紧密, 细胞形态良好.

在 HCV 感染后第 11 天, 于 24 孔板或 96 孔板的孔中进行细胞混合物的免疫染色. 甲胎蛋白-1 抗体和阴性对照抗体得自 DAKO Corporation (DAKO), Carpinteria, CA. 抗人 CD34 (34371A)和抗血型糖蛋白(32591A)小鼠单克隆抗体得自 PharMingen, San Diego CA, 与 DAKO 的小鼠阴性对照(N1537)抗体一起使用. 利用 DAKO 的

LSAB2 或 K0676 (碱性磷酸酶)试剂盒，按照厂家说明书进行染色。免疫染色表明，该细胞混合物具有表达甲胎蛋白的细胞、表达血型糖蛋白的细胞、表达白蛋白的细胞，但没有表达 CD34 的细胞。

实施例 2

HCV 感染。

利用实施例 1 的 STO (Reid-99)饲养细胞包被 96 或 24 孔板。如实施例 1 所述制备的细胞铺于 24 孔板中的 STO (Reid-99)细胞上。每孔利用购自 ProMed Dx 的滴度为 $9.3x\ 10^6$ Chiron bDNA Eq/ml 的丙型肝炎病毒 RNA898 感染细胞。选择接种物，使孔中终浓度为 20%-30%添加的血清、或 $1.2\ x\ 10^6$ - $2.8\ x\ 10^6$ Chiron bDNA Eq/ml。一般在 20 天内观察 HCV 感染和复制。在分析 HCV 产生以前的温育期间，每 2-3 天更换培养基。利用 RT-PCR 测定细胞和培养基中 HCV RNA 的拷贝数，对 HCV 感染和复制进行定量。

RT-PCR 分析

从细胞中利用 Rneasy-96 方法、或从细胞培养上清中利用 QIAamp 96 提取方法(试剂来自 Qiagen, Valencia CA)提取 HCV RNA。两种方法均使用离液剂连同能够在离液盐存在下结合核酸的石英玻璃，小规模分离和浓缩病毒 RNA。在加入离液溶液之前，在细胞裂解物中加入牛病毒性腹泻病毒(BVDV) (约 10^6 BVDV 拷贝/样品)。将玻璃纤维柱排成 96 孔形式。利用无 RNase 水将核酸分子洗脱到各孔中(约 70-100ul)。BVDV 最初得自 ATCC (ATCC 保藏号: VR-534)。在使用本方法的测试之间，BVDV 对照是不变的。

这些实验采用多重 RT-PCR 反应，即在同一管中同时扩增和测定两种或多种不同种类 RNA。此处所用 HCV RT-PCR 分析对每反应低于 10 个拷贝敏感，线性范围 100-10^7 个拷贝。每个 RT-PCR 分析可测试 10－20ul 提取的 HCV RNA 样品。

利用下列试剂进行 RT-PCR，EZ RT-PCR 核心试剂盒(Applied Biosystems); 3mM 乙酸锰; 300 uM 各种 dATP, dCTP, dGTP, dUTP; 400nM HCV 正向引物(SEQ ID NO: 1) 5′-ccatgaatcactcccctgtg -3′;

400nM HCV 反向引物(SEQ ID NO:2) 5′ - ccggtcgtcctggcaattc -3′; 45uM BVDV 正向引物(SEQ ID NO: 3) 5′-cagggtagtcgtcagtggttcg - 3′; 和 45uM BVDV 反向引物(SEQ ID NO:4) 5′ - ggcctctgcagcaccctatc - 3′, 以及 0.1U/ul Tth 聚合酶(Epicentre)。以标有染料并包含来源于 HCV RNA 和 BVDV RNA 的核酸序列的 DNA 寡聚物为探针，用于探测 RT-PCR 产生的核酸产物(即 200uM FAM HCV 探针(SEQ ID NO:5) 5′- FAM cctggaggctgcacgacactca - TAMRA - 3′ 和 200uM VIC BVDV 探针(SEQ ID NO: 6) 5′- VIC - ccctcgtccacgtggcatctcga - TAMRA - 3′)。利用 ABI 7700 热循环仪(Applied Biosystems)，在同一孔中进行逆转录酶和聚合酶链式反应。 将一组已知数量的 HCV RNA 与待 RT-PCR 分析的样品同时进行 RT-PCR 分析，由其结果产生标准曲线。

对每次实验确定定量的极限值。在提取并进行 RT-PCR 方法分析以后，通过测定在标准曲线线性部分内产生输出值的最低的 RNA 浓度，确定定量的极限值。所有阴性对照(即表明几乎没有 HCV 产生)一般应低于 LOQ。

利用 ABI 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems)测量荧光。在所有样品中均存在对照 RNA BVDV，证实该分析的 RNA 提取和 RT-PCR 步骤是成功的。BVDV 结果是阳性。 因此，有可能可信地解释阴性 HCV 结果。

实施例 3

感染之后培养基中 HCV 的时间过程分析

如实施例 1 所述制备人胎细胞培养物，铺于经丝裂霉素 C 处理的 STO (Reid-99)细胞饲养层。种植细胞的数目是 $2x10^5$/孔。感染 HCV (RNA898)的病人血清购自 ProMed Dx。在待测的另一细胞样品中不加血清，作为对照。将 300 ul HCV 患者血清的等分样品加入单独的 0.7 ml 培养基中。培养物与病毒 37°C 温育 24 小时。去除接种物，用 1ml 培养基洗涤培养物，然后在新鲜培养基中培养。培养上清在每次更换培养基(每 2-3 天)之前取样，利用如实施例 2 所述的定量多重 HCV 特异性 RT-PCR 分析，测定 HCV RNA。上清样品 RT-PCR 分析的定量极

限值(----LOQ)是 600 个 HCV RNA 拷贝/样品。

图 1 描述了细胞培养上清的 RT-PCR 分析结果。图 1 表明，RNA898 显示高度感染的迹象。阴性对照血清无 HCV RNA 产生。 所有阴性对照均低于 LOQ。

实施例 4

感染之后培养基中 HCV 的时间过程分析

如实施例 1 所述制备人胎细胞培养物，铺于经丝裂霉素 C 处理的 STO (Reid-99)细胞饲养层。种植细胞的数目为 $4x10^5$/孔。感染以及未感染 HCV (RNA898)的病人血清购自 ProMed Dx (阴性对照血清)。将 200 ul HCV 患者血清的等分样品加入单独的 0.8 ml 培养基中。这代表大约 1.9×10^6 Chiron bDNA Eq/孔。该细胞培养物与病毒 37°C 温育 24 小时。去除接种物，用 1ml 培养基洗涤该培养物，然后在新鲜培养基中培养。培养上清在每次更换培养基(每 2-3 天)之前取样，利用如实施例 2 所述的定量多重 HCV 特异性 RT-PCR 分析测定 HCV RNA。上清样品 RT-PCR 分析的定量极限值(----LOQ)是 600 个 HCV RNA 拷贝/样品。

图 2 和图 3 描述了细胞培养上清的 RT-PCR 分析结果。RNA898 显示高度感染的迹象。阴性对照培养物显示无 HCV RNA 产生。图 2 和 3 例证了该 HCV 分析的高度可重复性，类似的 HCV 分析无法得到。

实施例 5

HCV 感染之后细胞关联的 HCV RNA 的时间过程分析

如实施例 1 所述制备人胎细胞培养物，铺于经丝裂霉素 C 处理的 STO (Reid-99)细胞饲养层。种植细胞的数目为 $4x10^5$/孔。这代表大约 1.9×10^6 Chiron bDNA Eq/孔。将 200ul RNA898 血清 (或阴性对照血清，未显示)的等分样品加入 0.8 ml 培养基中。将培养物与病毒 37°C 温育 24 小时。去除接种物，用 1ml IM-洗涤培养基洗涤培养物两次，然后培养物或添加新鲜的 IM-HDM 培养基，或利用裂解缓冲液破坏收集。在感染后第 2、3、6 和 8 天，将培养物同样洗涤、然后添加或收集。利用 Rneasy 方法(Qiagen)，从保存的裂解物中提取总 RNA。利

用多重 HCV 特异性 RT-PCR 定量分析，测定样品中的 HCV RNA。RT-PCR 分析细胞关联的 RNA 样品的定量极限值(----LOQ)是 100 个 HCV RNA 拷贝/样品。所有阴性对照培养物均显示无 HCV RNA (数据未显示)。

图 4 描述了细胞关联的 RNA 的 RT-PCR 分析结果。在感染后第 2 和 3 天观察到最高水平的细胞关联的 HCV RNA，感染后第 6 天仍然存在显著的 HCV RNA。去除外部接种物以后，HCV RNA 在第 1-3 天增加，因而表明 HCV 在细胞内复制。

实施例 6

通过抗病毒剂 VRT-106866 抑制 HCV 感染人胎肝细胞

如实施例 1 所述制备人胎细胞培养物，铺于经丝裂霉素 C 处理的 STO (Reid-99)细胞饲养层。种植细胞的数目为 $4x10^5$/孔。将 200ul RNA898 血清 (或阴性对照血清，未显示)的等分样品加入 0.8 ml 培养基中，37°C 温育 24 小时。24 小时以后，去除培养基，洗涤培养物，将培养基替换为包含不同浓度化合物 VRT-106866 (0-10uM) 的 IM-HDM。每个抑制剂浓度按一式三份进行测试，阳性对照(无抑制剂)按一式六份进行。在抑制剂存在下温育 48 小时以后，去除上清，替换为包含相同浓度抑制剂的新鲜培养基。在另外三天之后，去除培养基，洗涤培养物，利用裂解缓冲液破坏细胞单层，使用 Rneasy 方法(Qiagen)如实施例 2 所述提取总 RNA。利用多重 HCV 特异性 RT-PCR 定量分析，测定样品中的 HCV RNA。RT-PCR 分析细胞关联的 RNA 样品的定量极限值是 100 个 HCV RNA 拷贝/样品。

图 5 图解描述了结果，表示为三次重复培养物的"对照 HCV RNA %" (样品值/阳性对照平均值)的平均值和标准差。图 5 表明，VRT-106866 是 HCV 感染的有效抑制剂。

序列表

<110> VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED

<120> 用于 HCV 感染的组合物和方法

<130> VPI/01-05 PCT

<140> PCT/US02/09685
<141> 2002-03-27

<150> 60/279,174
<151> 2001-03-27

<160> 6

<170> PatentIn Ver. 3.2

<210> 1
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 1
ccatgaatca ctcccctgtg 20

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 2
ccggtcgtcc tggcaattc 19

<210> 3
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成引物

2/2

<400> 3
cagggtagtc gtcagtggtt cg 22

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成引物

<400> 4
ggcctctgca gcaccctatc 20

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成探针

<400> 5
cctggaggct gcacgacact ca 22

<210> 6
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列描述：合成探针

<400> 6
ccctcgtcca cgtggcatct cga 23

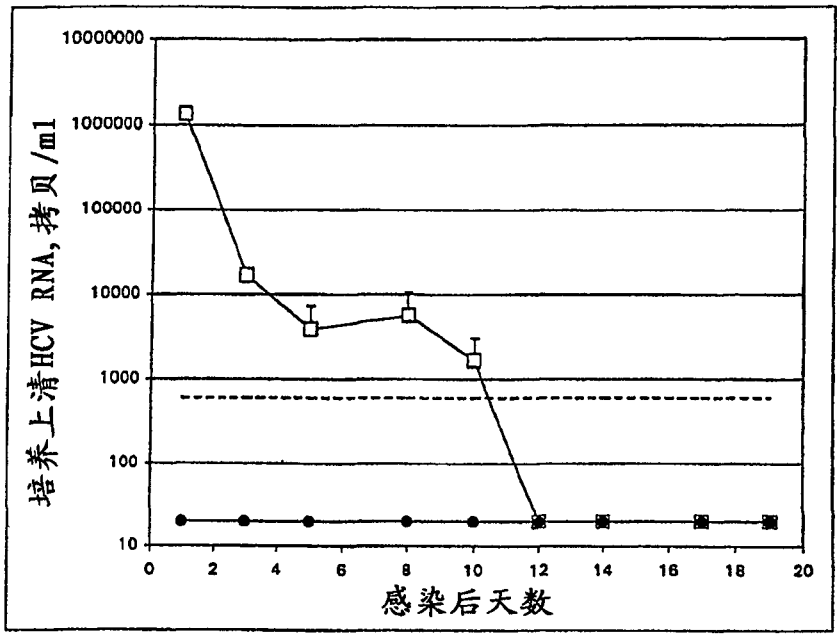

10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
培养上清HCV RNA,拷贝/ml
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
感染后天数

图1

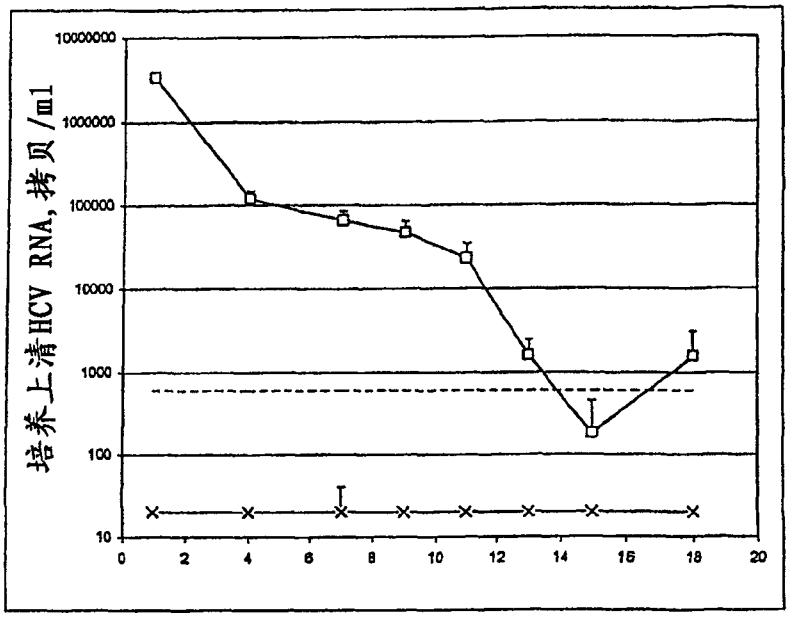

培养上清HCV RNA,拷贝/ml
10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
感染后天数

图2

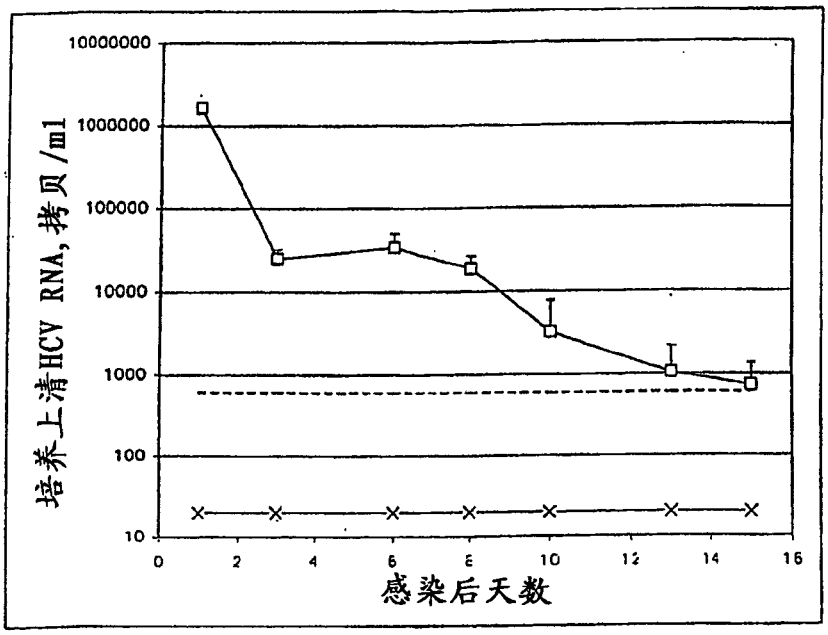

10000000
1000000
100000
10000
1000
100
10
培养上清HCV RNA,拷贝/ml
0
2
4
6
8
10
12
14
16
感染后天数

图3

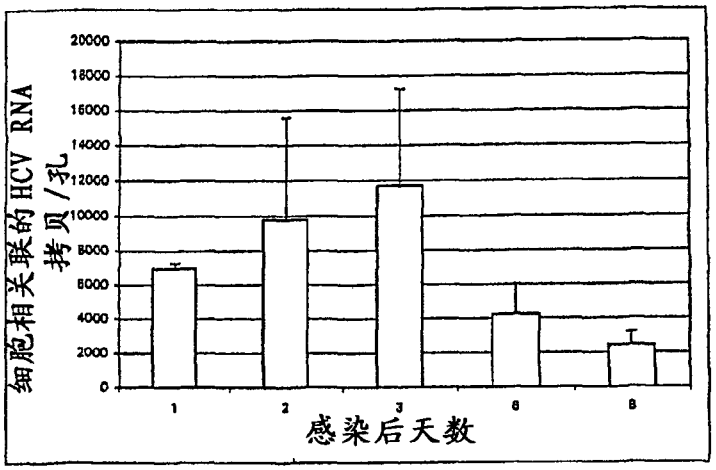

细胞相关联的HCV RNA
拷贝/孔
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
1
2
3
6
8
感染后天数

图4

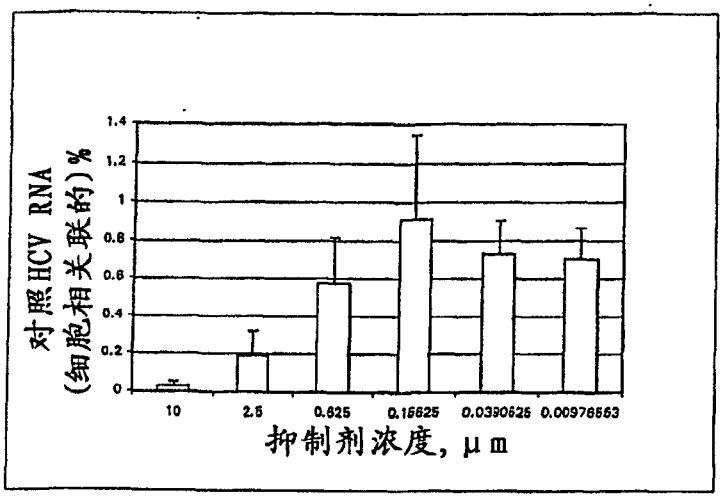

对照HCV RNA
(细胞相关联的)%
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
10
2.5
0.625
0.15625
0.0390625
0.00976563
抑制剂浓度, μm

图5