



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118813559 A

(43) 申请公布日 2024.10.22

(21) 申请号 202411197493.2

A61P 31/20 (2006.01)

(22) 申请日 2018.03.26

A61K 48/00 (2006.01)

(66) 本国优先权数据

A61P 1/16 (2006.01)

201710210863.5 2017.03.31 CN

C12R 1/93 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201880034603.X 2018.03.26

(71) 申请人 北京三诺佳邑生物技术有限
公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术
开发区经海二路36号5幢401室

(72) 发明人 王超 张婷婷 蒋立新

(51) Int. Cl.

C12N 7/01 (2006.01)

C12N 15/113 (2010.01)

A61K 31/713 (2006.01)

权利要求书2页 说明书20页
序列表(电子公布) 附图19页

(54) 发明名称

shRNA表达框、携带其的多核苷酸序列及其
应用

(57) 摘要

一种shRNA表达框、携带所述表达框的多核
苷酸序列及其应用。按照5' - 3' 的顺序,所述
shRNA表达框依次含表达shRNA的DNA序列及填充
序列,所述shRNA表达框序列长度接近野生型AAV
5基因组长度。

1. 一种重组腺相关病毒,其包含:shRNA表达框,其中,按照5' -3' 的顺序,所述shRNA表达框依次含启动子,编码shRNA的DNA序列,和填充序列;所述填充序列为HPRT-intron序列的一段序列,所述填充序列全部位于编码shRNA的DNA序列的3' 端;所述编码shRNA的DNA序列为编码用于治疗HBV疾病的shRNA的DNA序列。

2. 根据权利要求1所述的重组腺相关病毒,其中,所述shRNA表达框在使用单链AAV病毒载体进行携带时,所述shRNA表达框序列长度为3.2kb-5.2kb,优选为3.8kb-5.1kb。

3. 根据权利要求1或2所述的重组腺相关病毒,其中,所述shRNA表达框在使用双链AAV病毒载体进行携带时,所述shRNA表达框序列长度为使用单链AAV病毒载体进行携带时所述shRNA表达框序列长度的一半。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的重组腺相关病毒,其中,所述shRNA表达框中,编码shRNA的DNA序列5' 端含有启动子;优选地,所述启动子包含选自RNA聚合酶II启动子和RNA聚合酶III启动子中的一种或多种。

5. 根据权利要求4所述的重组腺相关病毒,其中,所述RNA聚合酶II启动子为组织特异性启动子;优选地,所述RNA聚合酶II启动子为肝脏特异性启动子;更优选地,所述肝脏特异性启动子为LP1、ApoE/hAAT、DC172、DC190、ApoA-I、TBG、LSP1或HD-IFN。

6. 根据权利要求4所述的重组腺相关病毒,其中,所述RNA聚合酶III启动子为U6启动子、H1启动子、7SK启动子;优选地,所述RNA聚合酶III启动子为H1启动子,所述H1启动子的序列如GenBank:X16612所示。

7. 根据权利要求1-6任一项所述的重组腺相关病毒,其中,所述编码shRNA的DNA序列为序列表SEQ ID No:1至序列表SEQ ID No:3中的任一个或多个;优选地,所述编码shRNA的DNA序列为如序列表SEQ ID No:2所示。

8. 根据权利要求1-7任一项所述的重组腺相关病毒,其中,所述shRNA表达框在使用单链AAV病毒载体进行携带时,填充序列HPRT-intron的序列如GenBank:M26434.1的2161-6160位所示;所述shRNA表达框在使用双链AAV病毒载体进行携带时,填充序列HPRT-intron的序列如GenBank:M26434.1的2161-3860位所示。

9. 根据权利要求1-8任一项所述的重组腺相关病毒,其中,所述shRNA表达框的两端还分别具有AAV末端反向重复序列。

10. 根据权利要求9所述的重组腺相关病毒,其中,所述AAV末端反向重复序列选自不同血清型的AAV;优选地,所述AAV末端反向重复序列选自进化支A-F中的任意血清型的AAV或AAV1型、AAV2型、AAV3型、AAV4型、AAV5型、AAV6型、AAV7型、AAV8型、AAV9型或其杂交/嵌合型中的任意一个;更优选地,所述AAV末端反向重复序列来源于AAV2血清型的末端反向重复序列。

11. 根据权利要求9或10所述的重组腺相关病毒,其中,所述两个末端反向重复序列间的序列长度为3.2kb-5.2kb;当其中一个末端反向重复序列中的trs被改造,通过插入、缺失、或替代等方式导致Rep蛋白切割位点突变不能进行有效切割时,两个末端反向重复序列间的序列长度为3.2kb-5.2kb的一半。

12. 根据权利要求11所述的重组腺相关病毒,其中,所述5' 末端反向重复序列缺失D序列,所述两个末端反向重复序列间的序列长度为4.6kb-5.1kb的一半。

13. 根据权利要求1-12任一项所述的重组腺相关病毒,其中,所述腺相关病毒的衣壳蛋

白为血清型VIII型。

14. 一种药物组合物,其包括权利要求1-13任一项所述的重组腺相关病毒和药学上可接受的赋形剂。

15. 根据权利要求14所述的药物组合物,其中,所述药物组合物为注射液,所述注射液包括药学上可接受的赋形剂以及所述活性成分。

16. 权利要求1-13任一项所述的重组腺相关病毒或权利要求14或15所述的药物组合物在制备预防和治疗乙型肝炎的药物中的应用。

shRNA表达框、携带其的多核苷酸序列及其应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请主张在2017年3月31日在中国提交的中国专利申请号No.201710210863.5的优先权,其全部内容通过引用包含于此。

技术领域

[0003] 本公开涉及shRNA表达框、携带其的多核苷酸序列及其应用,属于生物技术和基因治疗领域。

背景技术

[0004] 小干扰RNA (Small interfering RNA; siRNA) 有时称为短干扰RNA (short interfering RNA) 或沉默RNA (silencing RNA), 是一个长20到25个核苷酸的双股RNA, 在生物学上有许多不同的用途。将针对靶基因的siRNA设计成发夹结构送入体内时, 该发夹结构表达形成shRNA, shRNA是short hairpin RNA的缩写, 翻译为“短发夹RNA”, shRNA包括两个短反向重复序列。目前已知shRNA主要参与RNA干扰 (RNAi) 现象, 以带有专一性的方式调节基因的表达。此外, 也参与一些与RNAi相关的反应途径, 例如抗病毒机制或是染色质结构的改变。shRNA进入细胞后, 被宿主细胞内RNA解旋酶解旋为正义RNA链与反义RNA链, 反义RNA链与体内的一些酶结合成沉默复合物RISC, 识别含有其互补序列的mRNA, 并与之结合。此时的RISC具有核酸酶的功能, 能够切割降解mRNA, 从而抑制相应基因表达的现象称为RNA干扰 (RNA interference, RNAi)。

[0005] shRNA特点包括基因序列特异性、高效性和可遗传性。体外合成shRNA进入细胞后容易降解, 半衰期短。很难穿透细胞膜及血管内皮, 转染效率有限。且进入细胞shRNA的量不受控制, 容易在脾脏堆积。需要有效的媒介或递送途径将外源shRNA递送到生物体内。一种方法是利用化学修饰的方法直接递送, 如脂质体转染、PEG修饰, 无需克隆到载体即可将shRNA直接导入细胞抑制特定基因的表达。与直接使用shRNA表达框相比, 质粒或病毒类载体介导的shRNA体内表达的方法显示了其优势。将shRNA对应的dsRNA序列克隆到含有适合启动子的质粒载体或病毒载体中, 再用质粒转染细胞或用病毒感染细胞, 在启动子的操纵下转录生成所需的shRNA, 在体内法可持续产生siRNA作用。

[0006] 腺相关病毒 (AAV) 属微小病毒 (parvovirus) 家族的成员, 为无包膜的单链线状DNA病毒, 作为基因治疗载体, 具有非常多的优势。如感染效率高, 感染范围广, 长期表达的高安全性等。临床中用于治疗肿瘤、视网膜疾病、关节炎、艾滋病、心力衰竭、肌营养不良症、神经系统疾病及其它一系列基因缺陷疾病。但因本公开中涉及的shRNA长度很短, 只有几十个bp, 当使用AAV病毒载体表达时, 包装效率和表达量均为难题之一。

发明内容

[0007] 本公开的部分实施例是提供一种shRNA表达框、携带该shRNA表达框的多核苷酸序列、携带该多核苷酸序列的重组载体质粒、shRNA、宿主、病毒颗粒、分离的改造的细胞、药物

组合物、它们在制备预防和治疗乙型肝炎、获得性免疫缺陷综合征、治疗Duchenne型肌营养不良症(DMD)、治疗高胆固醇血症等的药物中的应用、以及重组载体质粒的载体制备系统。

[0008] 本公开的表达框采用填充序列进行扩充且使得表达框序列长度接近野生型AAV基因组长度,该表达框或携带其的多核苷酸序列在使用AAV病毒载体进行表达时,能保证病毒包装产量,并且经过大量实验摸索发现,当填充序列位于shRNA序列3'端时,该表达框或携带其的多核苷酸序列在使用AAV病毒载体进行表达时,不仅病毒包装产量能得到保证,还能大大提高目的基因shRNA的表达量,提高药物治疗效果。

[0009] 根据本公开的一个方面,本公开提供一种shRNA表达框,按照5'-3'的顺序,所述shRNA表达框依次含表达shRNA的DNA序列及填充序列,所述shRNA表达框序列长度接近野生型AAV基因组长度。所述填充序列可选为人非编码序列。

[0010] 可选地,所述人非编码序列是惰性或无害的,没有功能和活性。在各种特别的方面,人非编码序列不是编码蛋白或多肽的序列,不同于任何以下物质:shRNA、AAV末端反向重复(ITR)序列、启动子、复制点、多腺苷酸序列等。

[0011] 所述人非编码序列为人因子IX的内含子(intron)序列(GenBank:K02402.1)、人因子IX的内含子I片段、人粘粒C346的序列或HPRT-intron序列1704-14779(GenBank:M26434.1)的一段序列或多段序列组合形式;甚至可选为HPRT-intron序列1704-14779(GenBank:M26434.1)的一段序列。人非编码序列长度可根据不同血清型AAV包装容量或其他需求进行调整,不局限于固定长度。

[0012] 可选地,该表达框在使用单链AAV病毒载体进行表达或直接使用时,所述序列长度为3.2kb-5.2kb,可选为3.8kb-5.1kb,甚至可选为3.8kb-4.6kb、4.6kb-5.1kb,尤其可选为4.6kb。

[0013] 甚至可选地,该表达框在使用双链AAV病毒载体进行表达时,所述shRNA表达框序列长度为使用单链AAV病毒载体进行表达或直接使用时所述shRNA表达框序列长度的一半。可选为3.2kb-5.2kb的一半,可选为3.8kb-5.1kb的一半,甚至可选为3.8kb-4.6kb或4.6kb-5.1kb的一半,尤其可选为4.6kb的一半,即2.3kb。

[0014] 本公开所述的shRNA表达框中,表达shRNA的DNA序列5'端含有启动子,所述启动子可为任意来源启动子,所述启动子包含选自RNA聚合酶II启动子和RNA聚合酶III启动子中的一种或多种。RNA聚合酶II启动子为通常所采用的启动子,例如CAG、CMV、SV40、EF1、Ub。针对不同发病组织或细胞,可根据具体病理特征选择组织或细胞特异性启动子,如LP1、CK1、DC172、DC190、ApoE/hAAT、ApoA-I、TBG、LSP1、HD-IFN等,为了保证目的基因shRNA高效表达,启动子可为一个或多个的组合;启动子可为根据实际情况改造的突变体或嵌合体。进一步地,所述启动子选自RNA聚合酶III启动子中的至少一个,所述RNA聚合酶III启动子是U6启动子、H1启动子、7SK启动子,尤其可选的启动子为H1。

[0015] 表达shRNA的DNA序列为表达任意可用于治疗疾病的shRNA的DNA序列。可选地,所述表达任意可用于治疗疾病的shRNA的DNA序列为序列表SEQ ID No:1至序列表SEQ ID No:3中的任一个或多个。例如表达治疗HBV疾病的shRNA的DNA序列、表达治疗HIV疾病的shRNA的DNA序列,可选地表达治疗Duchenne型肌营养不良症(DMD)的DNA序列、用于表达治疗高胆固醇血症的DNA序列等。

[0016] 如1)用于表达治疗HBV疾病的任意shRNA的DNA序列,其中所述shRNA的靶序列可由

下述DNA序列中的19-23nt的片段组成,如:

[0017] (1) catcctgctgctatgcctcat (SEQ ID No:7)

[0018] (2) aaggtatgttgcccgtttgtcc (SEQ ID No:8)

[0019] (3) cctattgattggaaagtatgtcaaa (SEQ ID No:9)

[0020] (4) tcgccaacttacaaggcctttct (SEQ ID No:10)

[0021] (5) tgtgctgccaactggatcct (SEQ ID No:11)

[0022] (6) ccgtgtgcacttcgcttcacct (SEQ ID No:12)

[0023] (7) ggaggctgtaggcataaattggtctgt (SEQ ID No:13)

[0024] (8) ggagtgtggattcgactcct (SEQ ID No:14)

[0025] 2) 用于表达治疗HIV疾病的DNA序列,所述shRNA的靶序列可由下述RNA序列中的19-23nt的片段组成,如:

[0026] (1) aucaaugaggaagcugcagaaugg (SEQ ID No:15)

[0027] (2) ggggaugagacauagcaggaacuacuag (SEQ ID No:16)

[0028] (3) uaaaauaaaauaguaagaauauagcccu (SEQ ID No:17)

[0029] (4) uaugggguaccugugugga (SEQ ID No:18)

[0030] (5) gccaaaucccacauuuauugugc (SEQ ID No:19)

[0031] (6) uaaaauaggcagucucagcagaa (SEQ ID No:20)

[0032] (7) accacacacaaggcuacuuccugau (SEQ ID No:21)

[0033] (8) acagccgccuagcauuucaucac (SEQ ID No:22)

[0034] (9) ggauggugcuucaagcuaguaccaguu (SEQ ID No:23)

[0035] 3) 用于表达治疗Duchenne型肌营养不良症 (DMD) 的DNA序列,其中所述shRNA的靶序列可由下述RNA序列中的19-23nt的片段组成,如:

[0036] (1) ugaguaucaucgugugaaag (SEQ ID No:24)

[0037] (2) uccuucaucucugggcuc (SEQ ID No:25)

[0038] (3) aacuuccucuuuaacagaaaagcauac (SEQ ID No:26)

[0039] (4) aacuuccucuuuaacagaaaagcauac (SEQ ID No:27)

[0040] (5) caaggaaguuggcauuucaa (SEQ ID No:28)

[0041] 4) 用于表达治疗高胆固醇血症的DNA序列,其中所述shRNA的靶序列可由下述RNA序列中的19-23nt的片段组成,如:

[0042] (1) uuccgaauaaacuccaggc (SEQ ID No:29)

[0043] (2) aaccgcaguucuuuguagg (SEQ ID No:30)

[0044] (3) uugguauucagugugauga (SEQ ID No:31)

[0045] (4) ucaucacacugaauaccaa (SEQ ID No:32)

[0046] 所述表达shRNA的DNA序列可以是同时表达两个或两个以上shRNA的DNA序列的组合形式,组合形式可以是2条表达shRNA的DNA序列的组合,也可以是3条表达shRNA的DNA序列的组合,但不仅限于2条或3条;2条相邻表达shRNA的DNA序列可以直接相连或通过接头相连;所述表达的shRNA针对治疗靶点可以是单靶点,也可以是多靶点。

[0047] 本公开提供了一种携带shRNA表达框的多核苷酸序列,其中在所述shRNA表达框的两端分别为AAV末端反向重复序列。

[0048] 所述AAV末端反向重复序列选自不同血清型的AAV,可选地所述AAV末端反向重复序列选自进化支A-F中的任意血清型的AAV或AAV1型、AAV2型、AAV3型、AAV4型、AAV5型、AAV6型、AAV7型、AAV8型、AAV9型或其杂交/嵌合型中的任意一个,可选地所述AAV末端反向重复序列来源于AAV2血清型的末端反向重复序列。其中末端反向重复序列可在相应位点进行改造、或缺失、或截短,以上方法可合并使用。

[0049] 本公开所述的多核苷酸序列中,两个末端反向重复序列间的序列长度为3.2kb-5.2kb,可选为3.8kb-5.1kb,甚至可选为3.8kb-4.6kb、4.6kb-5.1kb,尤其可选为4.6kb;当其中一个末端反向重复序列中的trs被改造,通过插入、缺失、或替代等方式导致Rep蛋白切割位点突变不能进行有效切割时,两个末端反向重复序列间的序列长度可选为3.2kb-5.2kb的一半,可选为3.8kb-5.1kb的一半,甚至可选为3.8kb-4.6kb或4.6kb-5.1kb的一半,尤其可选为4.6kb的一半,即2.3kb。

[0050] 可选地,所述多核苷酸序列中5'末端反向重复序列缺失D序列,所述多核苷酸序列两个ITR间的序列长度可选为4.6kb-5.1kb的一半,甚至可选为4.6kb的一半。

[0051] 本公开提供了一种携带上述shRNA表达框或多核苷酸序列的重组载体质粒。

[0052] 本公开所述的多核苷酸序列可以是商品化合成,可采用分子克隆的方法构建到重组载体质粒中。

[0053] 所述重组载体质粒选自腺相关病毒载体。

[0054] 可选地,所述腺相关病毒载体为各种血清型,如AAV进化支A-F中的任一型(参见公开号W0200533321的专利),具体地为AAV1型(GenBank:AF063497.1)、AAV2型(GenBank:AF043303.1)、AAV3型(GenBank:U48704.1)、AAV4型(GenBank:NC_001829)、AAV5型(GenBank:NC_006152)、AAV6型(GenBank:AF028704)、AAV7型(GenBank:AF513851)、AAV8型(GenBank:AF513852)、AAV9型(GenBank:AY530579)或其杂交/嵌合型。

[0055] 甚至可选地,所述腺相关病毒载体为AAV2/8型,即所述腺相关病毒载体外壳蛋白为血清型VIII型、所述腺相关病毒载体基因组末端反向重复序列为血清型II型的AAV2/8载体。所述两端末端反向重复序列间插入与HBV基因组靶点碱基序列完全匹配的本公开的核苷酸序列形成的靶向肝脏细胞分布、表达产物高效特异抑制HBV复制的基因治疗药物。

[0056] 所述腺相关病毒载体最后包装为病毒,在所述多核苷酸序列两侧的ITR选自正常AAV血清型ITR时,包装入病毒的序列为单链,所述病毒称为单链AAV;当其中任意一个ITR通过插入、缺失、或替代等方式导致Rep蛋白切割位点突变不能进行有效切割时,包装入病毒的序列为双链,所述病毒称为双链AAV。

[0057] 本公开还提供了一种shRNA,其中,所述shRNA是由上述的shRNA表达框或多核苷酸序列或重组载体质粒表达得到的。

[0058] 本公开还提供了一种宿主,其中,所述宿主含有本公开所述的重组载体质粒。所述宿主为选自大肠杆菌、HEK293细胞系、HEK293T细胞系、HEK293A细胞系、HEK293S细胞系、HEK293FT细胞系、HEK293F细胞系、HEK293H细胞系、HeLa细胞系、SF9细胞系、SF21细胞系、SF900细胞系、BHK细胞系的一种或几种。

[0059] 本公开还提供了一种病毒颗粒,其包括上述的重组载体质粒或宿主中的重组载体质粒的载体基因组。所述病毒颗粒非选择性或选择性地肝组织或肝癌细胞中表达。

[0060] 本公开还涉及一种分离的改造的细胞,所述细胞表达或包含上述shRNA表达框、多

核苷酸序列、重组载体质粒、病毒颗粒。该细胞为导入了本公开提供的重组载体质粒或宿主中的重组载体质粒的载体基因组的改造的细胞,包括原核细胞和真核细胞(如真菌细胞,昆虫细胞,植物细胞,动物细胞),可选为哺乳动物细胞,可选为人的细胞,可选为人肝细胞和干细胞。

[0061] 本公开还涉及包含上述细胞的组织和生物,如动物。

[0062] 本公开还涉及包含上述细胞的药物组合物。

[0063] 本公开还提供了一种药物组合物,其中,所述药物组合物含有活性成分和药学上可接受的赋形剂,其中活性成分为选自本公开所述的shRNA表达框、携带shRNA表达框的多核苷酸序列、shRNA、重组载体质粒、病毒颗粒或分离的改造的细胞中的一种或几种。

[0064] 所述药物组合物为注射液,所述注射液包括药学上可接受的赋形剂以及上述的活性成分。

[0065] 本公开还提供了上述shRNA表达框、携带shRNA表达框的多核苷酸序列或重组载体质粒或shRNA、宿主、病毒颗粒或分离的改造的细胞在制备预防和治疗乙型肝炎、获得性免疫缺陷综合征、治疗Duchenne型肌营养不良症(DMD)、治疗高胆固醇血症等的药物中的应用。

[0066] 常规AAV载体制备系统均可用于本公开重组载体质粒的包装。如两质粒包装系统、三质粒包装系统、杆状病毒包装系统和以Ad或HSV为辅助病毒的AAV包装系统等。其中所述三质粒包装系统包括质粒pscAAV-H1-shRNA-Stuffer、质粒pHelper和质粒pAAV-R2CX,其中:

[0067] 所述质粒pHelper提供腺病毒的E2A、E4和VA区域;

[0068] 所述质粒pAAV-R2CX提供含rep和cap基因序列;

[0069] 所述质粒pscAAV-H1-shRNA-Stuffer含上述多核苷酸序列。

[0070] 其中,X指代构成pAAV-R2CX重组载体质粒的Cap基因来源所对应的AAV血清型名称。

[0071] 本公开还提供了一种使用上述制备系统制备本公开所述病毒载体的方法。

[0072] 本公开具有如下有益效果:

[0073] 1、本公开的shRNA表达框采用AAV病毒为载体进行递送的方式,使shRNA能够发挥长效性;相比裸shRNA或其他化学修饰的shRNA,选择AAV作为运载体具有更低的免疫反应原性,安全无致病性;裸shRNA在生物体内无明显组织细胞偏好,但是AAV不同血清型具有明显的组织靶向性,可大大提高shRNA药物疗效。

[0074] 2、本公开提供的shRNA表达框,选择合适的填充序列进行使得其长度接近AAV野生型基因组长度,使得选择AAV病毒载体携带时,保证了包装效率最高;当填充序列位于shRNA序列3'端时,该表达框或携带其的多核苷酸序列在使用AAV病毒载体进行表达时,不仅病毒包装产量能得到保证,还能大大提高目的基因shRNA的表达量,提高药物治疗效果。

[0075] 下面结合附图和具体实施方式对本公开做进一步说明,并非对本公开的限制。凡是依照本专利申请公开内容所进行的任何本领域等同替换,均属于本专利的保护范围。

附图说明

[0076] 图1为pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒图谱。

- [0077] 图2为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron质粒图谱。
- [0078] 图3为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron1质粒图谱。
- [0079] 图4为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron2质粒图谱。
- [0080] 图5为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron3质粒图谱。
- [0081] 图6为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron4质粒图谱。
- [0082] 图7为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron5质粒图谱。
- [0083] 图8为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron6质粒图谱。
- [0084] 图9为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron7质粒图谱。
- [0085] 图10为pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron8质粒图谱。
- [0086] 图11为pSC-H1-shRNA2质粒图谱。
- [0087] 图12为pSC-H1-shRNA2-intron' 质粒图谱。
- [0088] 图13为pSC-H1-shRNA2-intron1' 质粒图谱。
- [0089] 图14为pSC-H1-shRNA2-intron2' 质粒图谱。
- [0090] 图15为pSC-H1-shRNA2-intron3' 质粒图谱。
- [0091] 图16为pSC-H1-shRNA2-intron4' 质粒图谱。
- [0092] 图17为pSC-H1-shRNA2-intron5' 质粒图谱。
- [0093] 图18为pSC-H1-shRNA2-intron6' 质粒图谱。
- [0094] 图19为pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3质粒图谱。
- [0095] 图20为pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron1" 质粒图谱。
- [0096] 图21为pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron2" 质粒图谱。
- [0097] 图22为pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron3" 质粒图谱。
- [0098] 图23为实施例2中HBV的荧光PCR检测结果1。
- [0099] 图24为实施例2中HBV的荧光PCR检测结果2。
- [0100] 图25为实施例2中HBV的荧光PCR检测结果3。
- [0101] 图26为实施例4中HBV的荧光PCR检测结果1。
- [0102] 图27为实施例4中HBV的荧光PCR检测结果2。
- [0103] 图28为实施例4中HBV的荧光PCR检测结果3。
- [0104] 图29为实施例5中HBV的荧光PCR检测结果1。
- [0105] 图30为实施例5中HBV的荧光PCR检测结果2。
- [0106] 图31为实施例5中HBV的荧光PCR检测结果3。
- [0107] 图32为实施例6中检测结果1。
- [0108] 图33为实施例6中检测结果2。
- [0109] 图34为实施例6中检测结果3。
- [0110] 图35为实施例6中检测结果4。
- [0111] 图36为实施例6中检测结果5。
- [0112] 图37为实施例6中检测结果6。
- [0113] 图38为实施例6中检测结果7。
- [0114] 图39为实施例6中检测结果8。
- [0115] 图40为实施例8中HBsAg检测结果。

[0116] 图41为实施例8中HBV DNA检测结果。

具体实施方式

[0117] 实施例一:单链AAV包装容量对产量的影响

[0118] 1、包装质粒构建:

[0119] 参照《分子克隆》进行质粒载体构建,pSNAV2.0-CMV-EGFP(购自本元正阳基因技术有限公司,北京)为单链AAV包装所使用穿梭质粒,该质粒只保留来源于AAV2的ITR。利用XhoI和SalI为酶切位点,合成H1启动子(GenBank:X16612)及表达shRNA1的DNA序列(SEQ ID No:1,后续在描述质粒时简称为shRNA1),替换pSNAV2.0-CMV-EGFP的CMV-EGFP序列。通过定点突变,引入EcoRV酶切位点,形成质粒pSNAV2.0-H1-shRNA1,质粒图谱见图1。质粒构建方法为本领域常规方法(Xiao Xiao,Juan Li,and Richard Jude Samulski.Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus.J.Virol.1998,72(3):2224.)。

[0120] 以pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒为骨架质粒,合成填充序列intron,利用酶切位点BglIII和SalI为插入位点,构建到表达shRNA1的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron质粒,intron来源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)2161-3860位(1.7kb),质粒图谱见图2;

[0121] 以pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒为骨架质粒,合成填充序列intron1,利用酶切位点BglIII和SalI为插入位点,构建到表达shRNA1的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron1质粒,intron1来源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)2161-5360位(3.2kb),质粒图谱见图3;

[0122] 以pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒为骨架质粒,合成填充序列intron2,利用酶切位点BglIII和SalI为插入位点,构建到表达shRNA1的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron2质粒,intron2来源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)2161-6160位(4.0kb),质粒图谱见图4;

[0123] 以pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒为骨架质粒,合成填充序列intron3,利用酶切位点BglIII和SalI为插入位点,构建到表达shRNA1的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron3质粒,intron3来源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)2161-6660位(4.5kb),质粒图谱见图5;

[0124] 以pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒为骨架质粒,合成填充序列intron4,利用酶切位点BglIII和SalI为插入位点,构建到表达shRNA1的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron4质粒,intron4来源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)2161-7560位(5.4kb),质粒图谱见图6;

[0125] 其它包装质粒还包括pR2C8及AAV helper,编码来源于AAV2的Rep蛋白和来源于AAV8的Cap蛋白;Ad Helper提供AAV复制所需的最小化的Ad部分元件。质粒构建方法为本领域常规方法。(参见Gao GP,Alvira MR,Wang L,Calcedo R,Johnston J,Wilson JM.Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene theraph.Proc Natl Acad Sci USA,2002Sep 3;99(18):11854-9)。

[0126] 2、病毒包装及纯化

[0127] 本公开采用HEK293细胞(购于ATCC)作为生产细胞系,常规三质粒包装系统生产AAV病毒载体。所使用实验方法均为本领域常规方法。(参见Xiao Xiao, Juan Li, and Richard Jude Samulski. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J. Virol. 1998, 72(3):2224;)

[0128] 3、基因组滴度检测

[0129] 取适量纯化AAV样品,按下表(表1-1)配制DNase I消化反应混合液,37℃孵育30min,75℃孵育10min,失活DNase I。

[0130] 表1-1

[0131] AAV样品	5ul
10×DnaseI缓冲液	5ul
DnaseI	1ul
无RNA酶水(Rnase-free water)	39ul
合计	50ul

[0132] 处理后的AAV纯化样品稀释适当的倍数后,参照下表(表1-2)配置Q-PCR反应体系,并按照下列程序进行检测。

[0133] 表1-2

反应体系		反应程序	
标准品/样品	5ul	50℃ 2min	1个循环
上游引物(10uM)	0.5ul	95℃ 10min	
[0134] 下游引物(10uM)	0.5ul	95℃ 15sec	40个循环
探针(10uM)	0.5ul	60℃ 30sec	
Taqman PCR Mix(2×)	10ul	37℃ 1sec	1个循环
ddH ₂ O	3.5ul		

[0135] 其中使用的启动子H1引物探针列表如下:

[0136] 表1-3

[0137] 上游引物	ATCAACCCGCTCCAAGGAAT	序列表SEQ ID No:4
下游引物	AACACATAGCGACATGCAAAATATTG	序列表SEQ ID No:5
Taqman探针	CCCAGTGTCAGTAGGCGGAACACC	序列表SEQ ID No:6

[0138] 包装产量结果见下表2-1:

[0139] 表2-1

质粒名称	病毒载体名称	包装长度 (kb)	基因组滴度(vg/ml)
pSNAV2.0-H1-shRNA1	ssAAV2/8-H1-shRNA1	0.6	6.90E+10
[0140] pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron	2.3	7.20E+11
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron1	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1	3.8	5.05E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron2	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	4.6	7.13E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron3	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3	5.1	7.02E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron4	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4	6.0	9.41E+9

[0141] 由上述表2-1显示,在相同包装条件、同等包装规模以及相同终产品体积条件下,当包装长度为3.2~5.2kb范围时,包装产量能满足需求,具体地说,当包装序列长度越接近野生型AAV长度(4.6kb)时,即包装长度为4.6kb、5.1kb时,包装产量最高;当包装序列长度逐渐低于3.8kb时,包装产量开始下降但基本能满足需求;当包装序列长度为野生型长度的1.5倍时,包装产量明显降低。

[0142] 实施例二:填充序列插入位置对目的基因表达影响,以单链AAV载体为例

[0143] 1、包装质粒构建

[0144] 实施例一结果说明单链AAV病毒载体包装长度接近野生型时,可保证病毒载体产量。所以在保证有填充序列插入时,AAV包装长度始终为4.6kb。调整填充序列长度及位置,并与无填充序列的药物结构进行药效比较。ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2对应质粒载体构建参见实施例一。

[0145] 以pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒为骨架质粒,合成填充序列,源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1)第2161-6160位(4.0kb),利用酶切位点EcoRV和XhoI为插入位点,构建到H1启动子序列5'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron5质粒,质粒图谱见图7;

[0146] 以pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒为骨架质粒,分段合成填充序列,源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1)第2161-4160(2.0kb)段序列利用酶切位点EcoRV和XhoI为插入位点,构建到H1启动子序列5'端。源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1)第4161-6160(2.0kb)段序列利用酶切位点BglII和SalI为插入位点,构建到表达shRNA1的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron6质粒,质粒图谱见图8;

[0147] 以pSNAV2.0-H1-shRNA1质粒为骨架质粒,分段合成填充序列,源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1)第2161-2660(0.5kb)段序列利用酶切位点EcoRV和XhoI为插入位点,构建到H1启动子序列5'端。源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1)第2961-5960(3.5kb)段序列利用酶切位点BglII和SalI为插入位点,构建到表达shRNA1的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron7质粒,质粒图谱见图9;

[0148] 以pSNAV2.0-H1-shRNA质粒为骨架质粒,分段合成填充序列,源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1)第2161-5660(3.5kb)段序列利用酶切位点EcoRV和XhoI为插入位点,构建到H1启动子序列5'端。源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1)第5661-6160(0.5kb)段序列利用酶切位点BglII和SalI为插入位点,构建到表达shRNA1的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron8质粒,质粒图谱见图10。其它包装质粒还包括pR2C8和Helper

构建方法参见实施例一。

[0149] 2、病毒包装及纯化

[0150] 参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

[0151] 3、基因组滴度检测

[0152] 参见实施例一“3、基因组滴度检测”，实验结果参见表2-2。

[0153] 表2-2

质粒名称	病毒载体名称	包装长度 (kb)	基因组滴度(vg/ml)
pSNAV2.0-H1-shRNA1	ssAAV2/8-H1-shRNA1	0.6	3.23E+11
[0154] pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron2	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	4.6	7.50E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron5	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron5	4.6	7.85E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron6	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron6	4.6	7.64E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron7	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron7	4.6	7.90E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron8	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron8	4.6	7.12E+12

[0155] 实验结果显示,5组AAV病毒载体产量相当,只要保证包装序列长度接近野生型AAV基因组全长时,填充序列插入位置对包装效率没有影响。

[0156] 4、目的基因shRNA表达及检测

[0157] 用以上5组病毒样品以相同MOI进行HepG2.2.15细胞感染实验,病毒感染为本领域常规方法。(具体实验方法参见;Grieger JC,Choi VW,Samulski RJ.Production and characterization of adeno-associated viral vectors.Nat Protoc.2006;1(3):1412-28.)感染24h后开始,每24h收获一次细胞培养上清液。连续取样4次后,进行药效相关指标检测。本实施例检测指标为感染后细胞培养上清液中HbsAg、HbeAg、HBV DNA,依据三项指标表达情况与未经感染的HepG2.2.15细胞培养上清液三项指标进行对比分析。抗体检测方法为双抗体夹心法(具体参见北京万泰生物药业试剂盒说明书)。HBV DNA检测方法为荧光实时定量PCR法,为常规操作方法(具体参见QIAGEN检测试剂盒说明书)。结果如图23至图25和表2-3所示。

[0158] 结果显示当填充序列全部位于表达shRNA1的DNA序列的3'端时,其药物结构对HBV抑制效果最强。从表中数据结果来看,ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2相对于其他实施例具有统计学意义, $P < 0.01$ 。

[0159] 表2-3

HBsAg-ELISA检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC(空白细胞)	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-H1-shRNA1	1	0.786521	0.652158	0.56321	0.42153
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	1	0.48058	0.102326	0.037761	0.017355
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron5	1	0.752658	0.58173	0.409618	0.3049
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron6	1	0.553575	0.299765	0.106104	0.072074
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron7	1	0.437662	0.285195	0.142352	0.074649

[0160]

ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron8	1	0.496668	0.39661	0.239312	0.124853
HBeAg-ELISA检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC(空白细胞)	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-H1-shRNA1	1	0.919418	0.88009	0.831681	0.769969
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	1	0.744395	0.609283	0.316461	0.211221
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron5	1	0.919418	0.86009	0.731681	0.729969
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron6	1	0.889595	0.803174	0.524138	0.487348
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron7	1	0.892424	0.823163	0.45785	0.361416
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron8	1	0.857871	0.766679	0.431736	0.249484
HBV DNA检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC(空白细胞)	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-H1-shRNA1	1	1.024779	0.89806	0.816933	0.434332
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	1	0.601239	0.533708	0.290499	0.054281
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron5	1	0.924779	0.709806	0.616933	0.334332
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron6	1	0.819469	0.631767	0.337065	0.158961
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron7	1	0.794513	0.663432	0.368956	0.1379
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron8	1	0.904425	0.556691	0.406397	0.282021

[0161] 实施例三:双链AAV包装容量对产量的影响

[0162] 1、包装质粒构建:

[0163] 参照《分子克隆》进行质粒载体构建,pSC-CMV-EGFP为双链AAV包装所使用穿梭质粒,该质粒只保留来源于AAV2的ITR。利用BglIII和XhoI为酶切位点,合成H1启动子及表达shRNA2的DNA序列(SEQ ID No:2,后续在描述质粒时简称为shRNA2),替换pSC-CMV-EGFP的CMV-EGFP序列。通过定点突变,引入EcoRV酶切位点,形成质粒pSC-H1-shRNA,质粒图谱见图11。pSC-CMV-EGFP质粒构建方法为本领域常规方法(参见Wu,J,Zhao,W,Zhong,L,Han,Z,Li,B,Ma,W et al. (2007).Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors:packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity.Hum Gene Ther.2007,18:171-182.中对应pAAV-hrGFP载体构建)。

[0164] 以pSC-H1-shRNA2质粒为骨架质粒,合成填充序列intron',利用酶切位点BglIII和HindIII为插入位点,构建到表达shRNA2的DNA序列的3'端,形成pSC-H1-shRNA2-intron'质粒,intron'来源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)2161-3060(0.9kb),质粒图谱见图12;

[0165] 以pSC-H1-shRNA2质粒为骨架质粒,合成填充序列intron1',利用酶切位点BglIII和HindIII为插入位点,构建到表达shRNA2的DNA序列的3'端,形成pSC-H1-shRNA2-intron1'质粒,intron1'来源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)2161-3460(1.3kb),质粒图谱见图13;

[0166] 以pSC-H1-shRNA2质粒为骨架质粒,合成填充序列intron2',利用酶切位点BglIII和HindIII为插入位点,构建到表达shRNA2的DNA序列的3'端,形成pSC-H1-shRNA2-intron2'质粒,intron2'来源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)2161-3860(1.7kb),质粒图谱见图14;

[0167] 以pSC-H1-shRNA2质粒为骨架质粒,合成填充序列intron6',利用酶切位点BglIII和HindIII为插入位点,构建到shRNA2表达框的3'端,形成pSC-H1-shRNA2-intron3'质粒,

intron6' 来源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1) 2161-4160 (2.0kb), 质粒图谱见图15;

[0168] 以pSC-H1-shRNA2质粒为骨架质粒, 合成填充序列intron3', 利用酶切位点BglII和HindIII为插入位点, 构建到表达shRNA2的DNA序列的3'端, 形成pSC-H1-shRNA2-intron4' 质粒, intron4' 来源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1) 2161-4860 (2.7kb), 质粒图谱见图16;

[0169] 其它包装质粒还包括pR2C8和Helper构建方法参见实施例一。

[0170] 2、参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

[0171] 3、基因组滴度检测

[0172] 实验方法具体参见实施例一“3、基因组滴度检测”。包装产量结果见表2-4。

[0173] 表2-4

质粒名称	病毒载体名称	包装长度 (kb)	基因组滴度 (vg/ml)
pSC-H1-shRNA2	scAAV2/8-H1-shRNA2	0.6	5.20E+10
[0174] pSC-H1-shRNA2-intron3'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron3'	1.5	5.62E+11
pSC-H1-shRNA2-intron1'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron1'	1.9	4.56E+12
pSC-H1-shRNA2-intron2'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	2.3	4.32E+12
pSC-H1-shRNA2-intron3'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron3'	2.6	4.66E+12
pSC-H1-shRNA2-intron4'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron4'	3.3	3.82E+10

[0175] 结果显示, 当包装序列长度接近野生型AAV基因组长度一半时, 即包装长度为1.9kb、2.3kb和2.6kb时, 包装产量最高; 包装序列长度接近野生型长度四分之一或更短时, 包装产量开始明显下降; 当包装序列长度接近野生型长度一半的1.5倍时, 包装产量也非常低。

[0176] 实施例四: 填充序列插入位置对目的基因表达影响, 以双链AAV载体为例

[0177] 1、包装质粒构建:

[0178] 实施例三结果说明双链AAV病毒载体包装长度接近野生型AAV基因组长度一半时, 可保证病毒载体产量。所以在保证有填充序列插入时, AAV包装长度始终为2.3kb。调整填充序列长度及位置, 并与无填充的药物结构进行药效比较。scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2' 对应质粒载体构建参见实施例三。

[0179] 以pSC-H1-shRNA2质粒为骨架质粒, 合成填充序列, 源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1) 第2161-3860 (1.7kb) 位, 利用酶切位点EcoRV和XhoI为插入位点, 构建到H1启动子序列5'端, 形成pSC-H1-shRNA2-intron5' 质粒, 质粒图谱见图17;

[0180] 以pSC-H1-shRNA2质粒为骨架质粒, 分段合成填充序列, 源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1) 第2161-3010 (0.85kb) 段序列利用酶切位点EcoRV和XhoI为插入位点, 构建到H1启动子序列5'端。源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1) 第3011-3860 (0.85kb) 段序列利用酶切位点BglII和SalI为插入位点, 构建到表达shRNA2的DNA序列的3'端, 形成pSC-H1-shRNA2-intron6' 质粒, 质粒图谱见图18;

[0181] 其它包装质粒还包括pR2C8和Helper构建方法参见实施例一。

[0182] 2、参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

[0183] 3、基因组滴度检测

[0184] 实验方法具体参见实施例一“3、基因组滴度检测”。实验结果参见表2-5。

[0185] 表2-5

	质粒名称	病毒载体名称	包装长度 (kb)	基因组滴度 (vg/ml)
[0186]	pSC-H1-shRNA2	scAAV2/8-H1-shRNA2	0.6	5.61E+12
	pSC-H1-shRNA2-intron2'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	2.3	5.50E+12
	pSC-H1-shRNA2-intron5'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5'	2.3	5.85E+12
	pSC-H1-shRNA2-intron6'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron6'	2.3	5.64E+12

[0187] 实验结果显示,3组AAV病毒载体产量相当,只要保证包装序列长度接近野生型AAV基因组全长时,填充序列插入位置对包装效率没有影响。

[0188] 4、目的基因表达及检测

[0189] 实验方法参见实施例二“4、目的基因表达及检测”。

[0190] 检测结果见图26至图28和表2-6所示。

[0191] 表2-6

	HbsAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
[0192]	NC (空白细胞)	1	1	1	1	1

	scAAV2/8-H1-shRNA2	1	0.616521	0.542158	0.50321	0.42243
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	1	0.32058	0.122326	0.037761	0.0163
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5'	1	0.552658	0.45173	0.409618	0.304
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron6'	1	0.453575	0.299765	0.106104	0.06134
	HbeAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
	NC (空白细胞)	1	1	1	1	1
[0193]	scAAV2/8-H1-shRNA2	1	0.719418	0.68019	0.631681	0.6009
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	1	0.604395	0.5192	0.32046	0.198625
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5'	1	0.709418	0.66029	0.631681	0.529969
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron6'	1	0.689595	0.54031	0.524128	0.48704
	HBV DNA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
	NC (空白细胞)	1	1	1	1	1
	scAAV2/8-H1-shRNA2	1	0.824634	0.70801	0.516223	0.434332
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	1	0.501239	0.4387	0.240419	0.054281
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5'	1	0.724701	0.58982	0.51671	0.334332
	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron6'	1	0.61941	0.591701	0.327015	0.158961

[0194] 结果显示当填充序列全部位于表达shRNA2的DNA序列的3'端时,其药物结构对HBV抑制效果最强。从表中数据结果来看,ssAAV2/8-H1-shRNA2-intron2相对于其他实施例具有统计学意义, $P < 0.01$ 。

[0195] 实施例五:填充序列插入位置对双表达盒的目的基因表达影响,以单链AAV载体为例

[0196] 1、包装质粒构建:

[0197] 本实施例以pSNAV2.0-H1-shRNA1为骨架质粒,合成U6启动子及表达shRNA3的DNA序列(SEQ ID No:3,后续在描述质粒时简称为shRNA3)序列,插入表达shRNA3的DNA序列的3'端,形成pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3质粒,质粒图谱见图19。填充序列来源HPRT-intron序列2161-5880(GenBank:M26434.1),调整填充序列长度及位置,并保证AAV包装长度始终为4.6kb。

[0198] 以pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3质粒为骨架质粒,合成填充序列,源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)第2161-5880位(3.8kb),利用酶切位点EcoRV和XhoI为插入位点,构建到H1启动子序列5'端,形成pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron1"质粒,质粒图谱见图20;

[0199] 以pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3质粒为骨架质粒,合成填充序列,源于HPRT-intron(GenBank:M26434.1)第2161-5880(3.8kb)位,利用酶切位点BglIII和SalI为酶切位点,构建到表达shRNA3的DNA序列3'端,形成pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron2"质粒,质粒图谱见图21;

[0200] 以pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3质粒为骨架质粒,分段合成填充序列,,源于HPRT-

intron (GenBank:M26434.1) 第2161-4020 (1.9kb) 段序列利用酶切位点EcoRV和XhoI为插入位点, 构建到H1启动子序列5'端。源于HPRT-intron (GenBank:M26434.1) 第4021-5880 (1.9kb) 段序列利用酶切位点BglIII和SalI为插入位点, 构建到表达shRNA3的DNA序列的3'端, 形成pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron3"质粒, 质粒图谱见图22;

[0201] 其它包装质粒还包括pR2C8和Helper构建方法参见实施例一。

[0202] 2、参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

[0203] 3、基因组滴度检测

[0204] 实验方法具体参见实施例一“3、基因组滴度检测”。实验结果参见表2-7。

[0205] 表2-7

质粒名称	病毒载体名称	包装长度 (kb)	基因组滴度(vg/ml)
pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron1"	ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron1"	4.6	6.53E+12
pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron2"	ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2"	4.6	6.82E+12
pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron3"	ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron3"	4.6	6.64E+12

[0207] 实验结果显示, 3组AAV病毒载体产量相当, 只要保证包装序列长度接近野生型AAV基因组全长时, 填充序列插入位置对包装效率没有影响。

[0208] 4、目的基因表达及检测

[0209] 参见实施例二“4、目的基因表达及检测”。

[0210] 检测结果见图29至图31和表2-8所示。

[0211] 表2-8

[0212]

HbsAg-ELISA检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC (空白细胞)	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron1"	1	0.730654	0.51113	0.302461	0.211049
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2"	1	0.45057	0.10112	0.027862	0.015342
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron3"	1	0.503505	0.227565	0.102107	0.062175
HbeAg-ELISA检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC (空白细胞)	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron1"	1	0.81041	0.76119	0.630601	0.529762
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2"	1	0.64039	0.53528	0.30606	0.111025
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron3"	1	0.709091	0.623104	0.42453	0.384341
HBV DNA检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC (空白细胞)	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron1"	1	0.724712	0.6097	0.51153	0.300382
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2"	1	0.501215	0.433711	0.270494	0.043271
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron3"	1	0.709407	0.581564	0.307165	0.152945

[0213] 结果显示当填充序列全部位于表达shRNA3的DNA序列的3'端时, 其药物结构对HBV抑制效果最强。从表中数据结果来看, ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2"相对于其他实施例具有统计学意义, $P < 0.01$ 。

[0214] 实施例六:多血清型AAV载体中,填充序列插入位置对目的基因表达影响

[0215] 1、包装质粒构建:

[0216] 穿梭质粒pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron5(对应ssAAV-H1-shRNA1-intron5病毒包装)、pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron2(对应ssAAV-H1-shRNA1-intron2病毒包装)、pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron6(对应ssAAV-H1-shRNA1-intron6病毒包装)已构建,具体参见实施例二“包装质粒构建”。结构质粒为pR2C2,或为pR2C3,或为pR2C5,或为pR2C7,或为pR2MH31,或为pR2MH39,或为pR2MH43,或为pR2MH47,或为pR2MH31,不同血清型来源cap基因为合成产品,替换掉pR2C8质粒cap基因(其中MH31、MH39、MH43、MH47来自US9186419)。其它包装质粒还包括Helper构建方法参见实施例一。

[0217] 2、参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

[0218] 3、基因组滴度检测

[0219] 实验方法具体参见实施例一“3、基因组滴度检测”。实验结果参见表2-9。

[0220] 表2-9

[0221]

病毒载体名称	包装长度 (kb)	基因组滴度(vg/ml)
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.50E+12
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.85E+12
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.64E+12
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.95E+12
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.10E+12
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.94E+12
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.40E+12
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.30E+12
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.60E+12
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.43E+12
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.11E+12
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.17E+12
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.51E+12
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.75E+12
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.44E+12
ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.55E+12
ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.18E+12
ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.24E+12

[0222]	ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.43E+12
	ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.39E+12
	ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.67E+12
	ssAAV2/MH47-H1-shRNA-intron5	4.6	6.34E+12
	ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.81E+12
	ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.67E+12

[0223] 实验结果显示,同血清型3组AAV病毒载体产量相当,只要保证包装序列长度接近野生型AAV基因组全长时,填充序列插入位置对包装效率没有影响。

[0224] 4、目的基因表达及检测

[0225] 参见实施例二“4、目的基因表达及检测”。

[0226] 检测结果见图31至图38和表2-10所示。

[0227] 表2-10

HbsAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC (空白细胞)	1	1	1	1	1
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron5	1	0.930675	0.610601	0.333202	0.203432
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron2	1	0.730533	0.259904	0.178197	0.084962
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron6	1	0.862387	0.380989	0.20192	0.15791
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron5	1	0.88453	0.535058	0.442984	0.188561
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron2	1	0.852413	0.345115	0.116186	0.033372
ssAAV2/3-H1-shRNA-intron6	1	0.817118	0.43886	0.207146	0.124495
ssAAV2/5-H1-shRNA-intron5	1	0.909219	0.75665	0.468068	0.434745
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron2	1	0.893479	0.499484	0.332277	0.211844
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron6	1	0.829574	0.676569	0.311333	0.272052
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron5	1	0.88453	0.735058	0.542984	0.338561
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron2	1	0.700769	0.57327	0.411992	0.212092
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron6	1	0.742381	0.680966	0.50184	0.482693
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron5	1	0.83067	0.412621	0.233202	0.213435
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron2	1	0.730531	0.25152	0.078197	0.054962

[0229]	ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron6	1	0.722307	0.36095	0.10195	0.082791
	ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron5	1	0.78453	0.235058	0.142984	0.108561
	ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron2	1	0.752401	0.145115	0.017156	0.030071
	ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron6	1	0.81711	0.33886	0.247142	0.12175
	ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron5	1	0.699219	0.55665	0.268068	0.189474
	ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron2	1	0.693479	0.299484	0.132277	0.011844
	ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron6	1	0.729574	0.376569	0.171333	0.053205
	ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron5	1	0.88453	0.53515	0.442984	0.238501
	ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron2	1	0.740769	0.37121	0.111992	0.012152
	ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron6	1	0.742381	0.58191	0.30184	0.182623

[0230] 结果显示同血清型3种结构AAV病毒载体比较时,当填充序列全部位于表达shRNA1的DNA序列的3'端时,其药物结构对HBV抑制效果最强。从数据结果来看,填充序列全部位于shRNA的3'端的药物结构相对于其他实施例具有统计学意义, $P < 0.01$ 。

[0231] 实施例七:两种病毒载体制备方法

[0232] 本公开还提供了另外两种病毒包装方法,AAV病毒载体包装时不局限于上述包装方法。

[0233] 1、Ad辅助包装方法:所述包装体系须包括pSNAV2.0-H1-shRNA1、pAAV2/8,及Ad5病毒液。所述包装方法所使用的细胞系为HeLa细胞。细胞经过两质粒转染后24h,用Ad5进行辅助感染,获得ssAAV2/8-H1-shRNA1。(具体参见JY Dong,PD Fan,Raymond A, Frizzell.Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus.Human Gene Therapy,1996,7:2101-2112.及实施例一)。依照同样的方法依次合成ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4、ssAAV2/8-H1-shRNA1。后续病毒纯化及检测方法参见实施例一。

[0234] 2、杆状病毒包装系统:本方法需分别构建pFBD-cap8、pFBD-rep2、pFB-shRNA1(pFB-shRNA1原始载体pFB-EGFP,根据《分子克隆》改造而成)三质粒,转化DH10Bac感受态细胞,形成Bac-cap8、Bac-rep2、Bac-GFP三杆粒,分别感染SF9细胞后,获得含有三种基因表达盒的杆状病毒。再用三种杆状病毒同时感染SF9细胞,生产ssAAV2/8-H1-shRNA1。(具体方法参见Haifeng Chen.Intron splicing-mediated expression of AAV rep and cap genes and production of AAV vectors in insect cells.Mol Ther.2008May;16(5):924-30.及实施例一)。依照同样的方法依次合成ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4、ssAAV2/8-H1-shRNA1。后续病毒纯化及检测方法参见实施例一。

[0235] 此方法也可通过改造,将cap及rep构建到同一个杆状病毒中,最终形成两种杆状病毒共感染,来达到生产AAV的目的。

[0236] 表2-11

[0237]

病毒载体名称	包装方法	包装长度kb	基因组滴度vg/ml
ssAAV2/8-H1-shRNA1	Ad辅助两质粒包装	0.6	6.6E+9
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron	Ad辅助两质粒包装	2.3	6.03E+10
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1	Ad辅助两质粒包装	3.8	6.25E+11
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	Ad辅助两质粒包装	4.6	6.78E+11
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3	Ad辅助两质粒包装	5.1	6.62E+11
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4	Ad辅助两质粒包装	6.0	5.99E+8
ssAAV2/8-H1-shRNA1	杆状病毒包装	0.6	7.12E+11
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron	杆状病毒包装	2.3	7.65E+12
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1	杆状病毒包装	3.8	7.44E+13
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	杆状病毒包装	4.6	7.32E+13
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3	杆状病毒包装	5.1	7.58E+13
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4	杆状病毒包装	6.0	6.95E+10

[0238] 上述实验结果说明,无论选用何种病毒包装系统,选择合适长度的填充序列使得包装序列长度接近AAV野生型基因组长度,即3.8kb-5.1kb时,均可以保证较高的包装效率。

[0239] 实施例八:体内药效实验

[0240] 利用scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2和scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5两种结构药物与商品化药物拉米夫定及恩替卡韦进行体内药效比较。给药方式为静脉注射,14天为一个采血周期,分离血清样品后,进行HBsAg及HBV DNA检测。动物实验分组情况如下:

组别	给予药物	剂量 (vg/只)	HBV 转基因 BALB/c 动物数 (n)
1	DPBS	0.2ml/只	6
2	拉米夫定 (LAM)	150mg/kg	6
3	恩替卡韦 (ETV)	3.2mg/kg	6
4	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2	3×10^{10}	6
5	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5	1.5×10^{11}	6

[0242] 本实验共进行266天(38周)。实验方法参见实施例二“4、目的基因表达及检测”。检测结果见图40和表2-12(HBsAg检测)、及图41和表2-13(HBV DNA检测)。

[0243] 表2-12

样品分组	采血时间												
	D0	D14	D28	D35	D49	D70	D98	D126	D154	D182	D210	D238	D266
DPBS	1	0.87	0.84	1.09	0.89	1.07	0.97	1.02	0.36	0.5	0.61	0.27	0.44
LAM	1	0.98	0.96	1.23	1.21	1.01	1.19	1.46	0.66	0.76	1.16	0.5	0.54
ETV	1	1.51	1.55	1.8	1.4	1.33	1.34	1.48	0.75	0.81	1.57	0.83	0.94
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2	1	0.04	0.07	0.09	0.1	0.07	0.11	0.14	0.11	0.14	0.13	0.07	0.05
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5	1	0.07	0.03	0.04	0.04	0.17	0.12	0.17	0.15	0.18	0.09	0.03	0.05

[0245] 表2-13

	D0	D14	D28	D35	D49	D70	D98	D126	D154	D182	D210	D238	D266
[0246] DPBS	1	1.13	2.85	2	2.18	2.1	2.72	1.02	1.68	3.23	3.27	4.77	4.02
LAM	1	0.69	0.87	0.72	0.68	1.26	0.41	0.24	0.56	0.8	0.28	0.26	0.07
ETV	1	8.68	1.24	1.08	1.25	3.93	1.05	0.72	1.06	3.33	5.5	2.96	1.55
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2	1	1.17	1.58	0.8	0.57	1.71	0.51	0.32	0.42	0.8	1.11	0.88	1.04
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5	1	0.7	1.02	0.96	1.21	2.9	0.63	0.56	0.55	1.63	2.87	2.36	1.2

[0247] 由上可知,当scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5的使用剂量是scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2使用剂量的5倍时,两种药物对模型动物血清中HBsAg抑制水平相当,在给药后D14时抑制效果达到最强,且抑制作用持续到D266天,两种结构药物药效均强于商品化药物所使用剂量药效;其中scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2结构药物对模型动物血清中HBV DNA抑制水平与拉米夫定所使用剂量药效相当,scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5结构药物对模型动物血清中HBV DNA抑制水平略差。

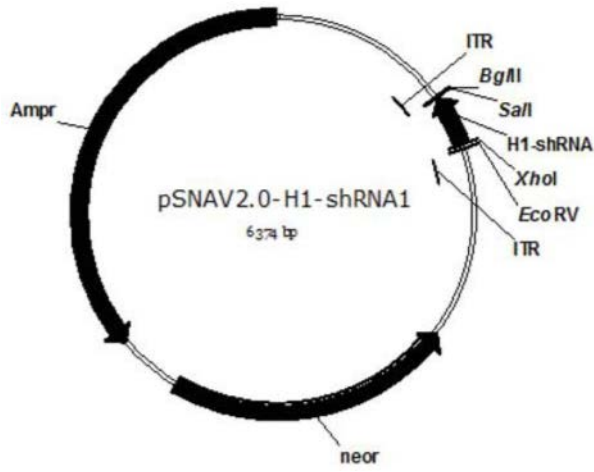


图1

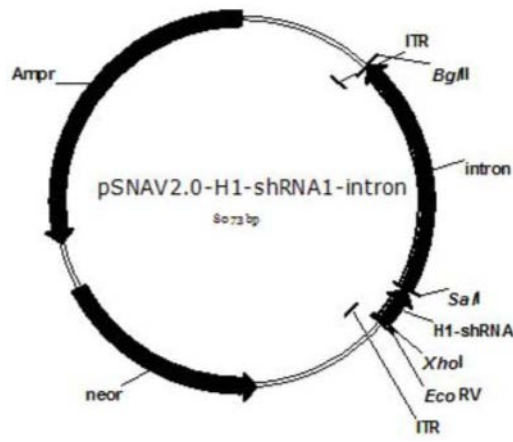


图2

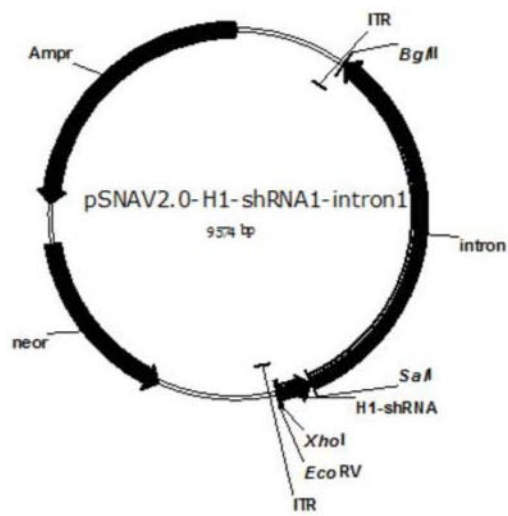


图3

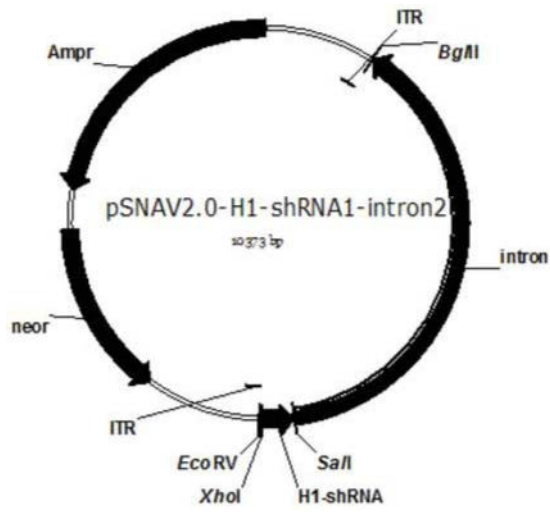


图4

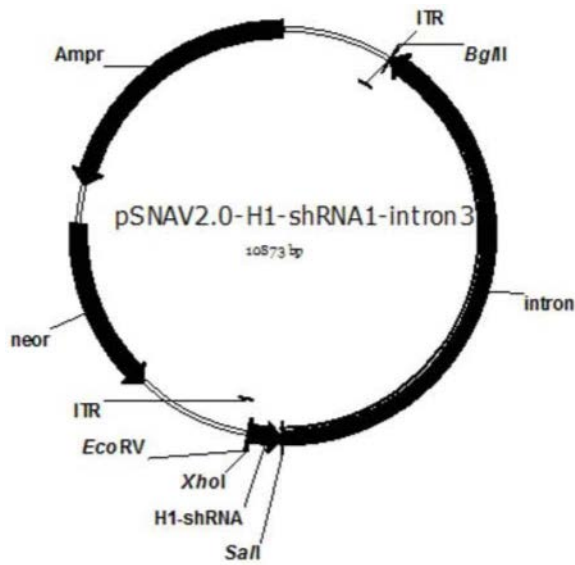


图5

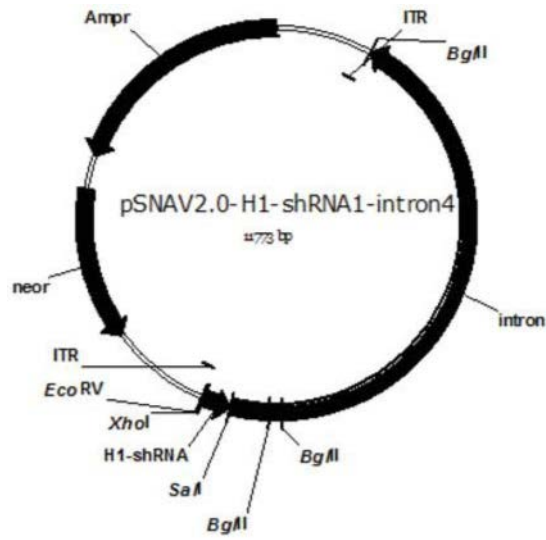


图6

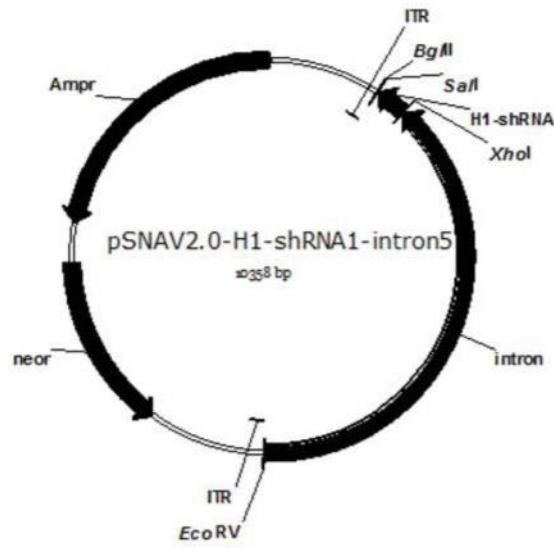


图7

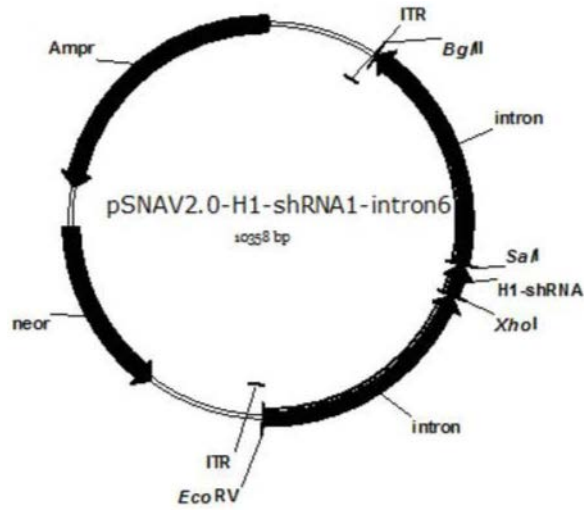


图8

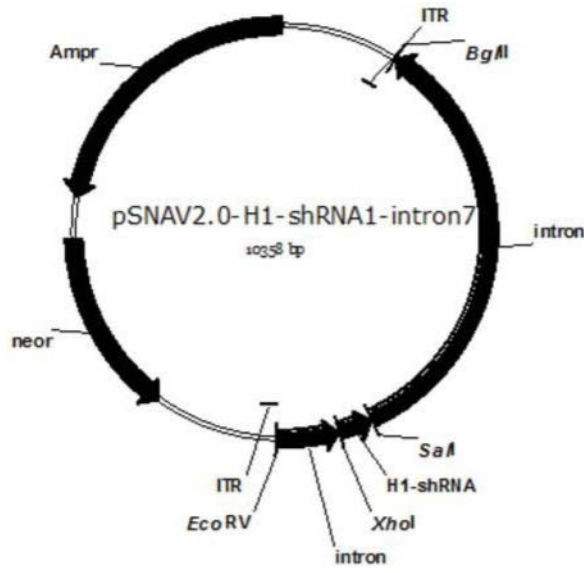


图9

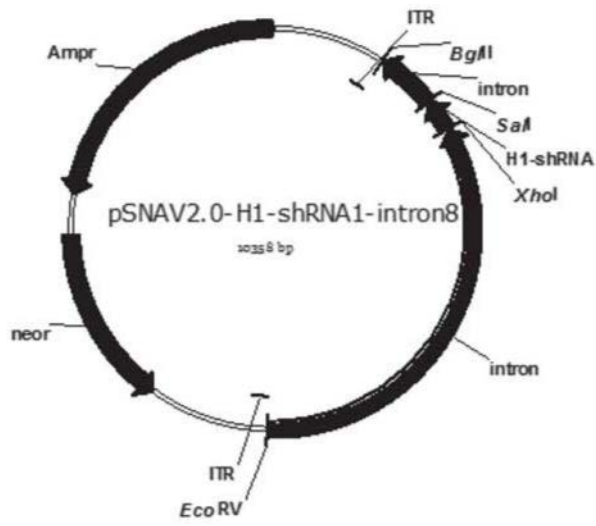


图10

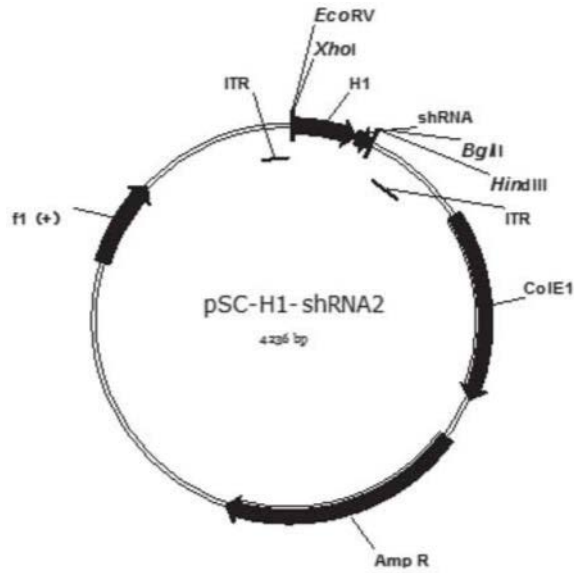


图11

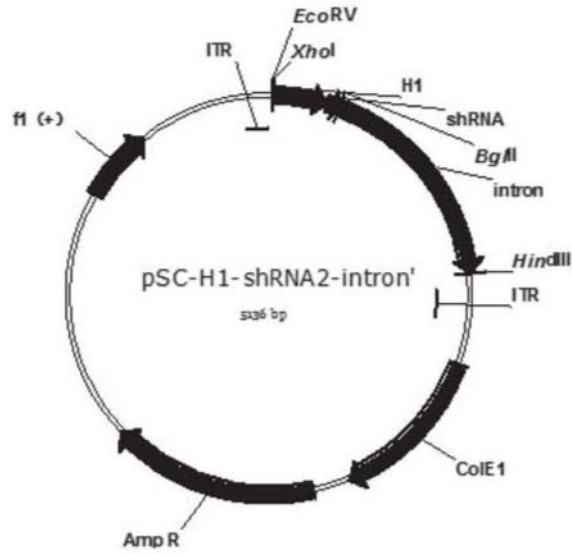


图12

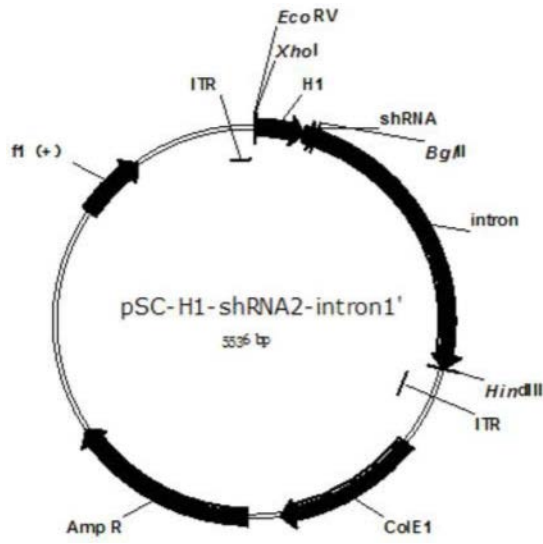


图13

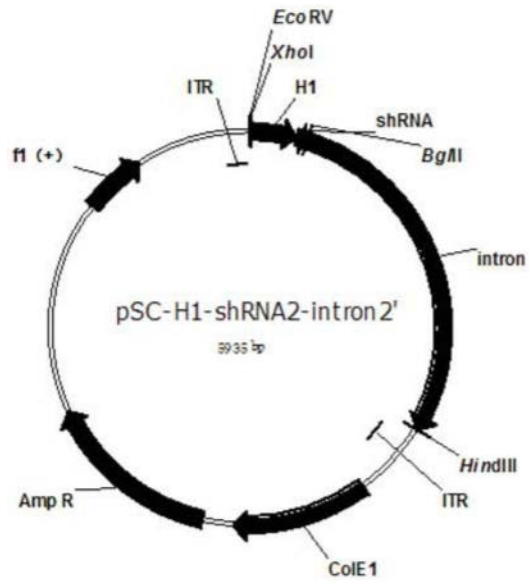


图14

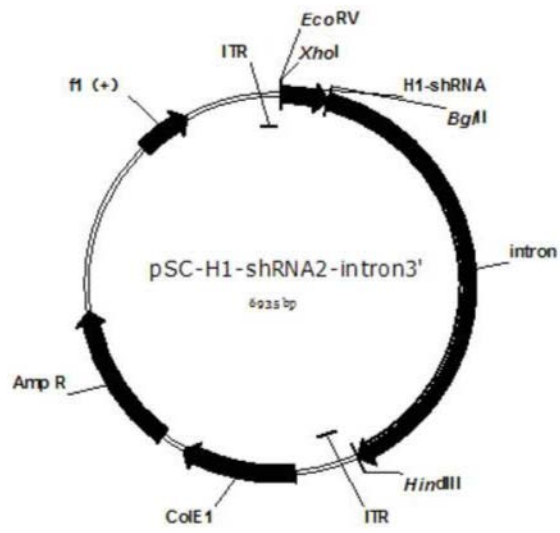


图15

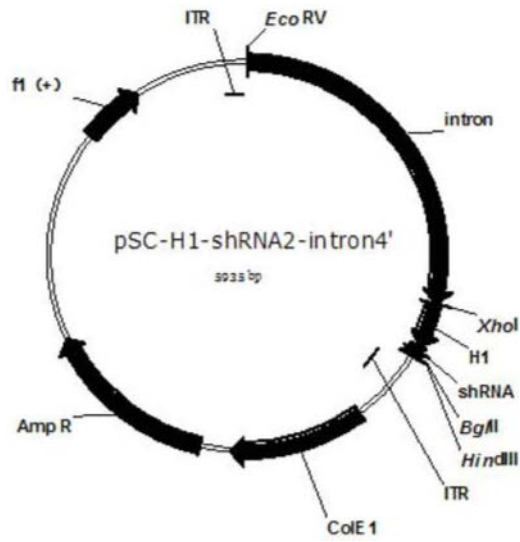


图16

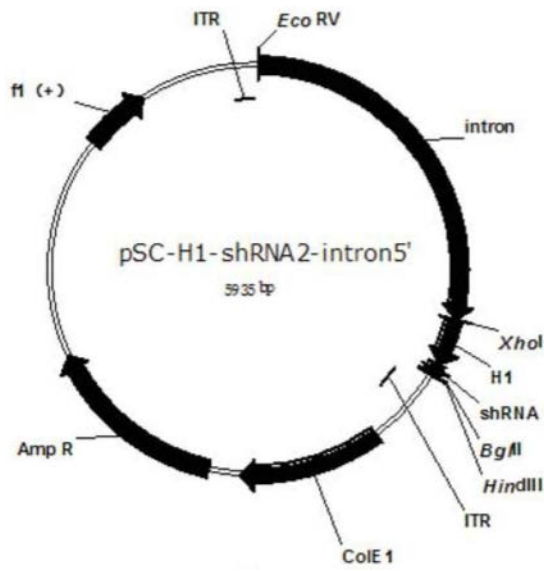


图17

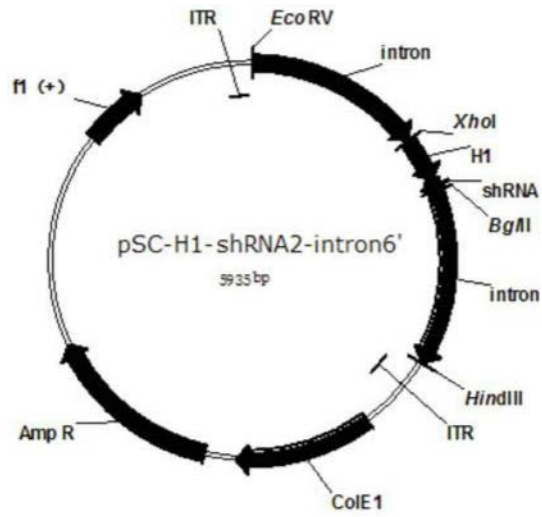


图18

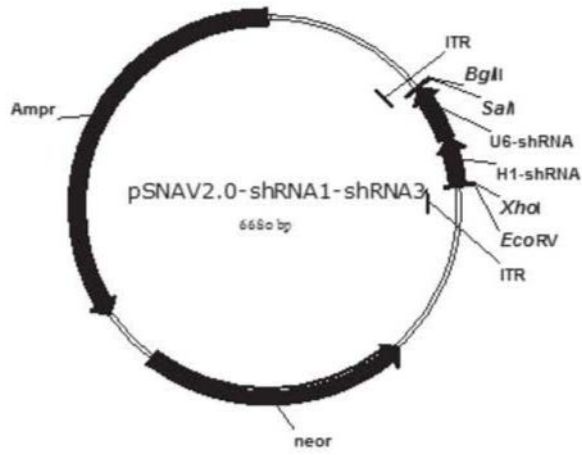


图19

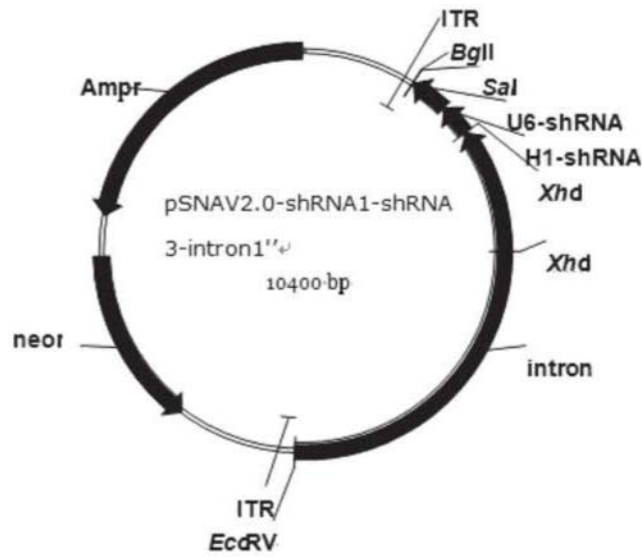


图20

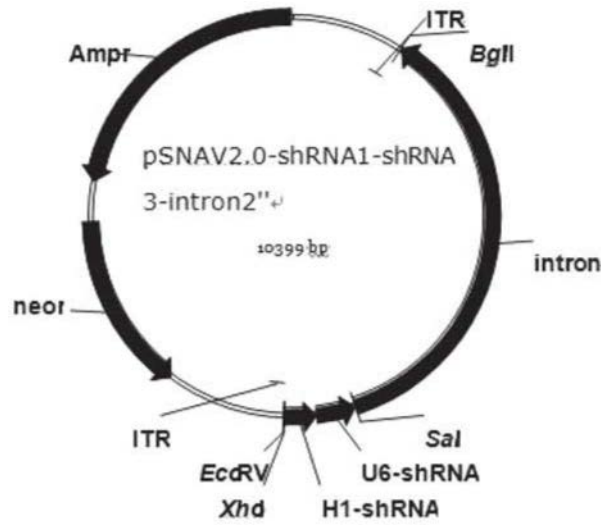


图21

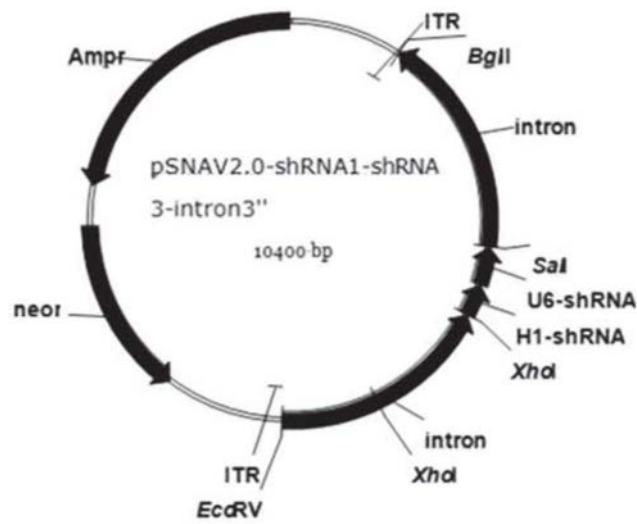


图22

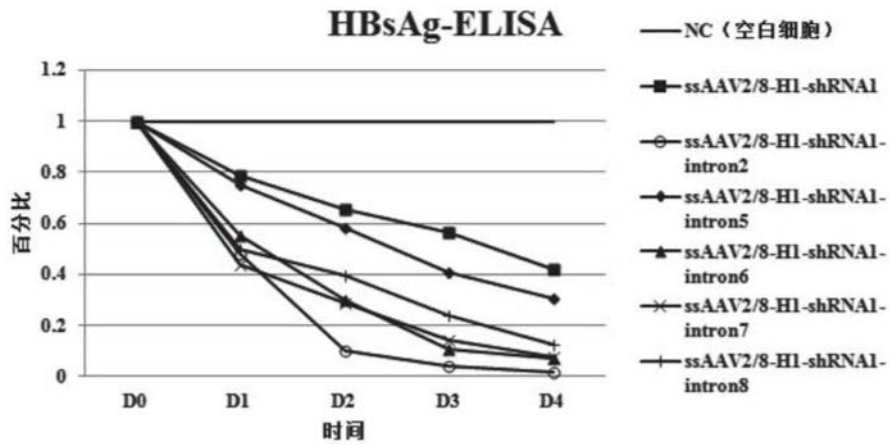


图23

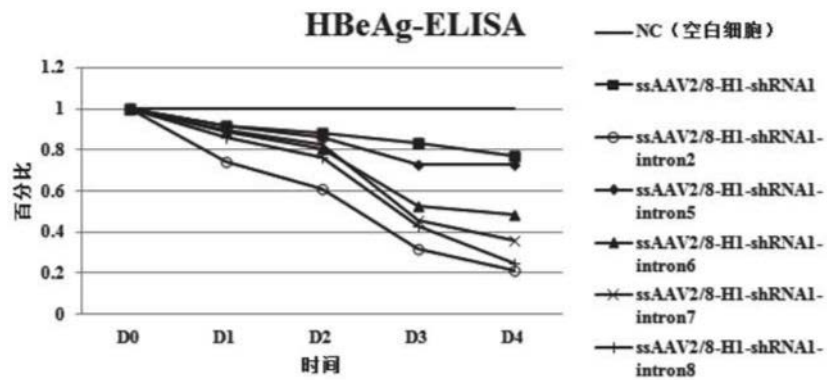


图24

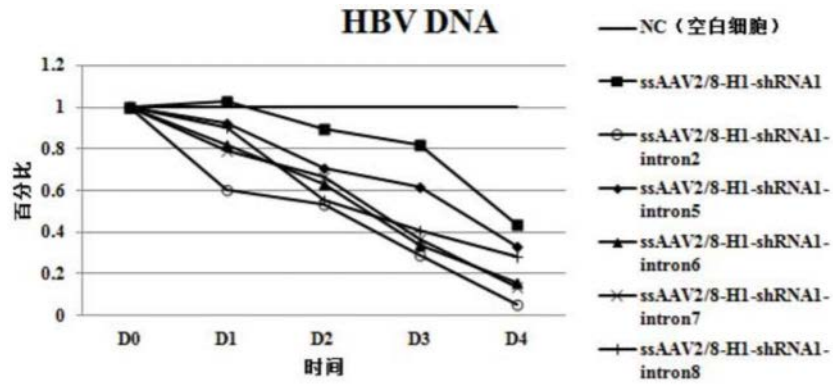


图25

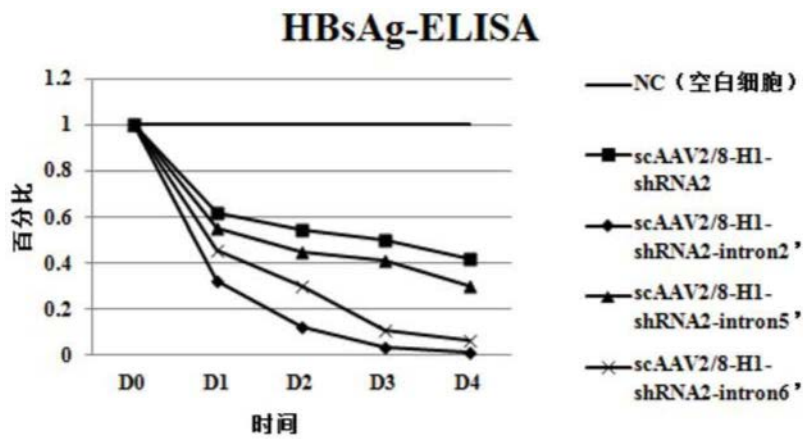


图26

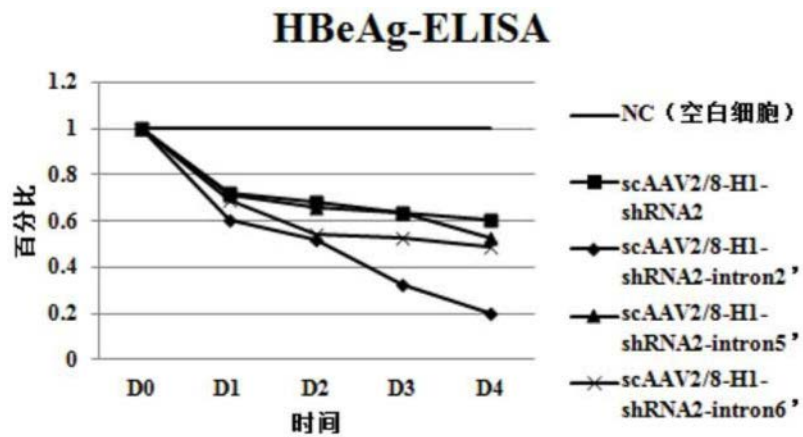


图27

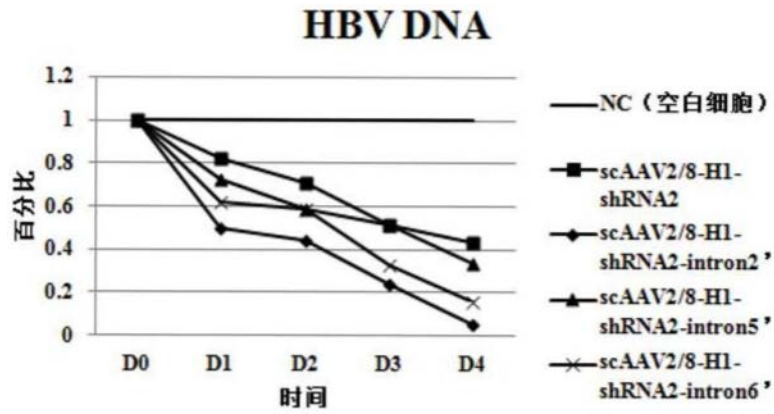


图28

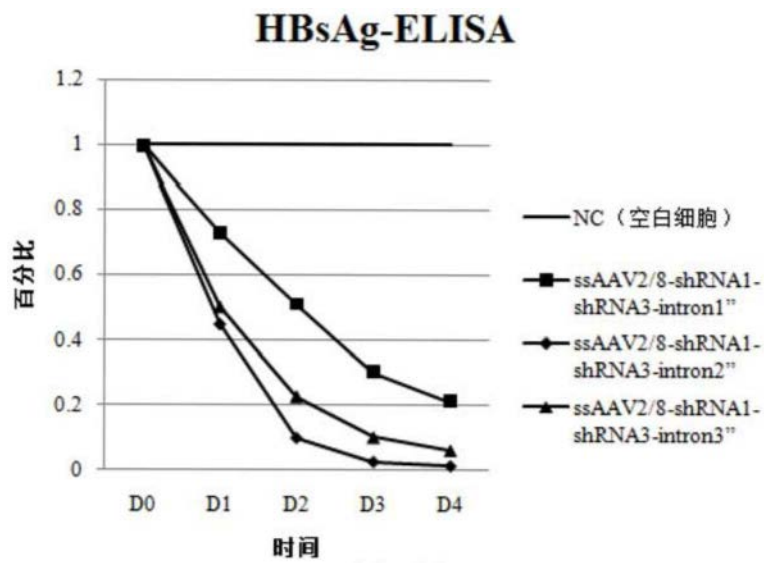


图29

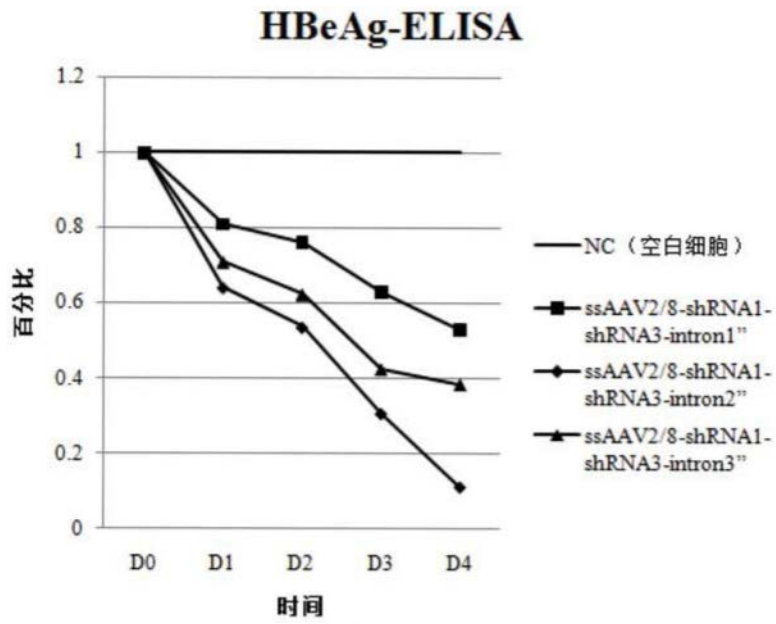


图30

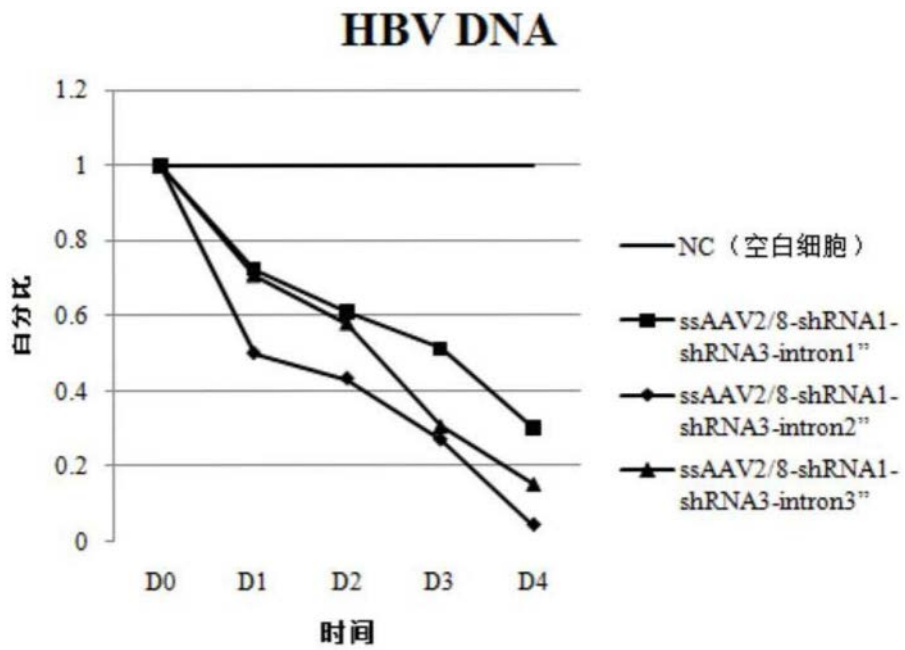


图31

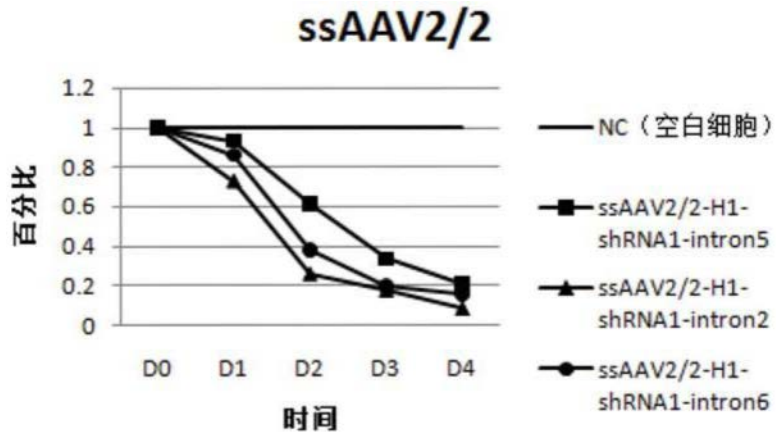


图32

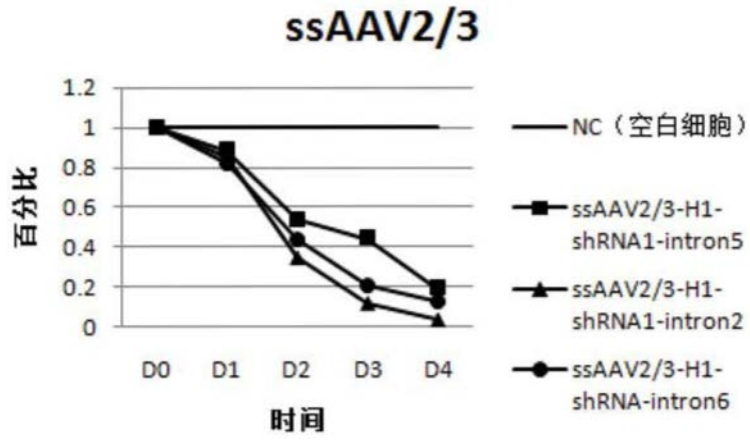


图33

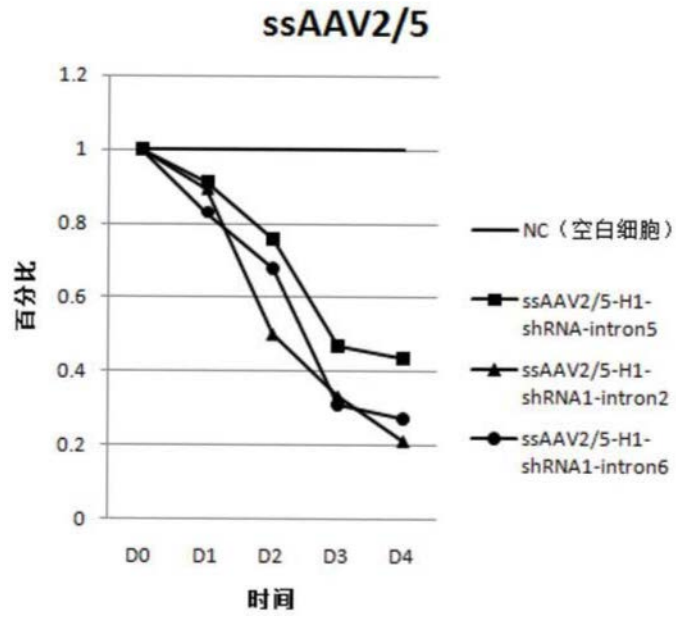


图34

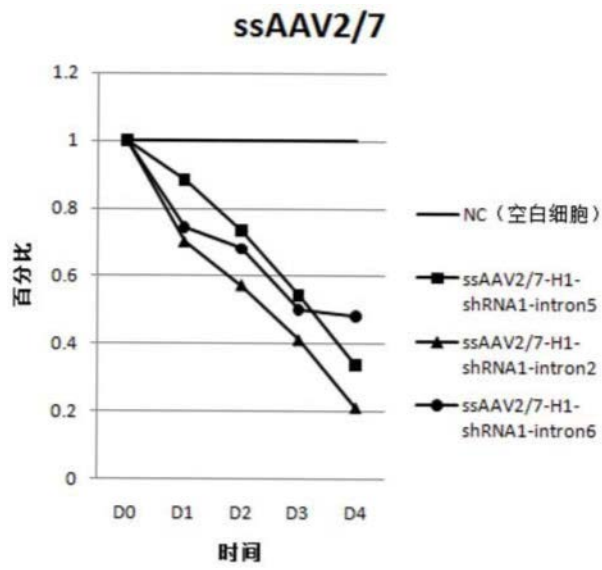


图35

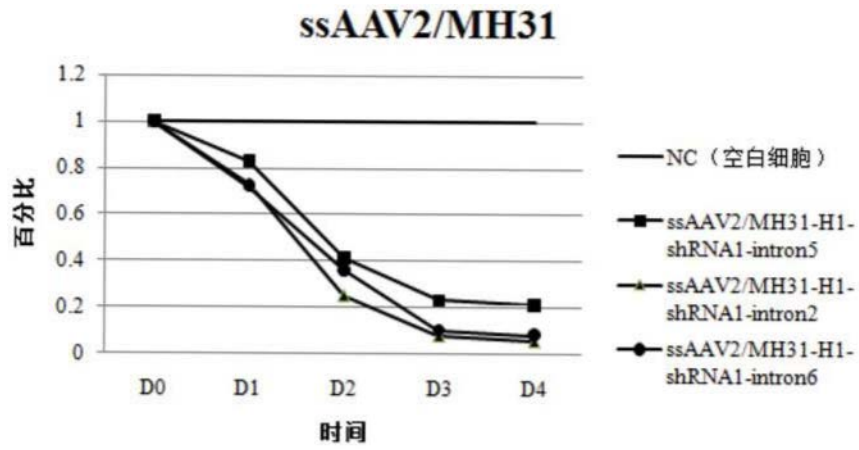


图36

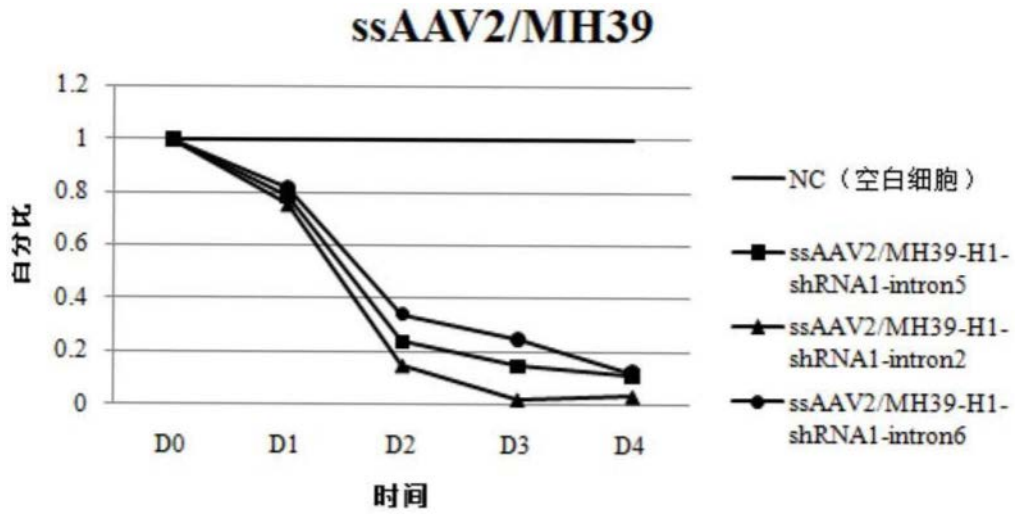


图37

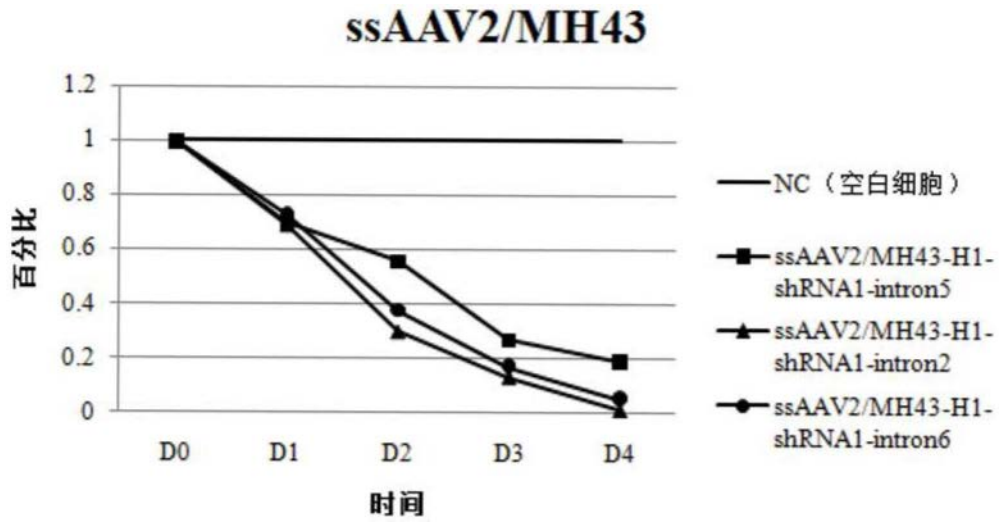


图38

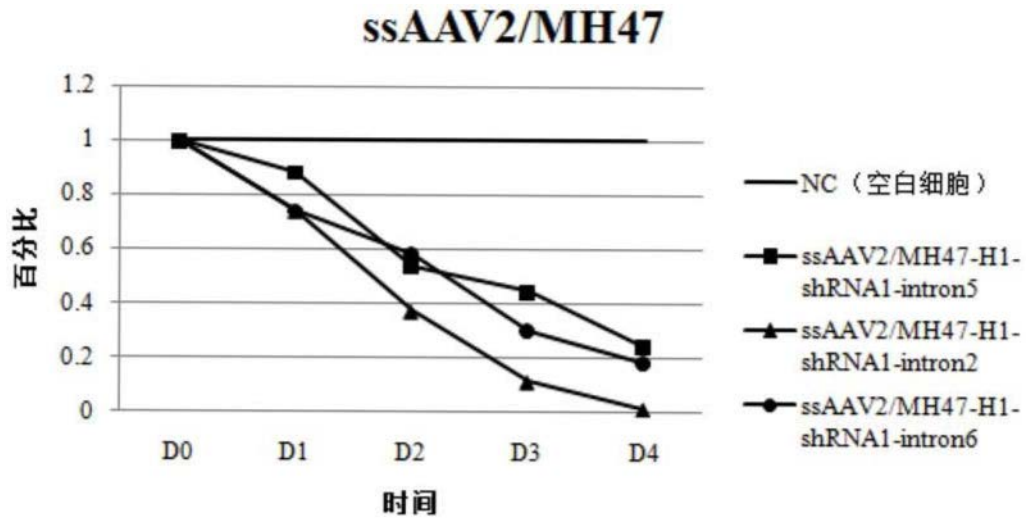


图39

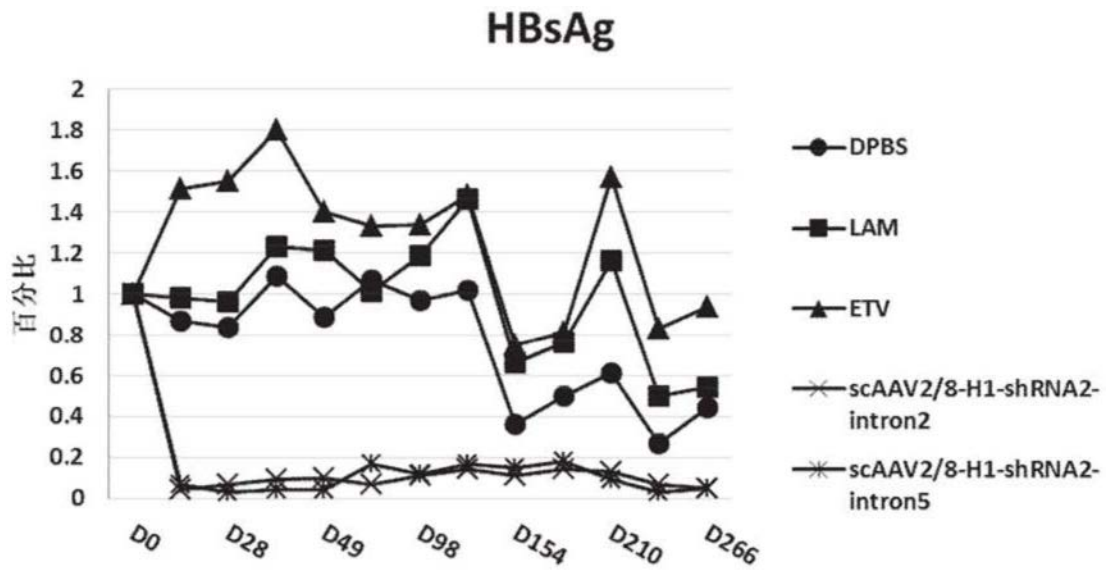


图40

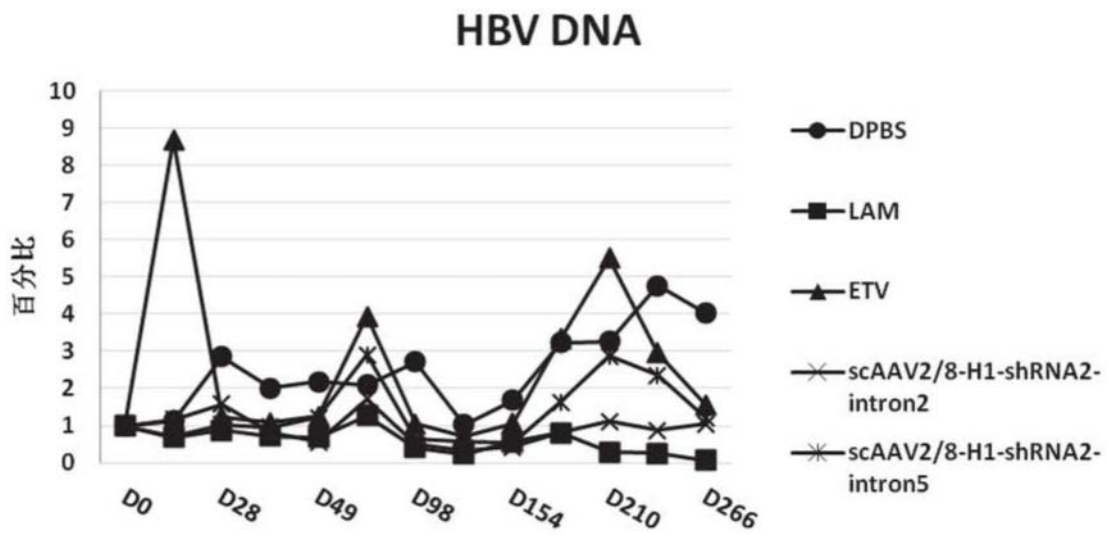


图41