



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107614008 A

(43)申请公布日 2018.01.19

(21)申请号 201680025272.4

(22)申请日 2016.03.18

(30)优先权数据

62/136,309 2015.03.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.10.31

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/023271 2016.03.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/154055 EN 2016.09.29

(71)申请人 蓝鸟生物公司

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 罗伯特·H·库特纳

韦斯利·戈尔曼

小弗朗西斯·J·皮尔西

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

A61K 39/12(2006.01)

A61K 39/21(2006.01)

权利要求书6页 说明书27页

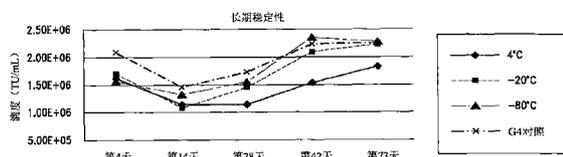
序列表3页 附图6页

(54)发明名称

载体制剂

(57)摘要

本发明提供组合物和制剂以及这些组合物和制剂用于保存病毒载体的用途。特别地,具体实施方案涉及海藻糖或其衍生物的组合物和制剂作为长期储存病毒载体以及体外和体内施用的合适的保护剂。



1. 一种水性组合物,其包括:

(a) 病毒载体;

(b) 按重量计约3%至约15%的海藻糖或其衍生物;和

(c) 药学上可接受的稀释剂。

2. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述载体是腺病毒载体、腺相关病毒载体或逆转录病毒载体。

3. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体。

4. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体是慢病毒载体。

5. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述慢病毒载体选自基本由人免疫缺陷病毒(HIV)、维斯纳梅迪病毒(visna-maedi virus;VMV)、山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)和猴免疫缺陷病毒(SIV)所组成的群组。

6. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述慢病毒载体是HIV-1。

7. 根据权利要求4所述的组合物,其中所述慢病毒载体是HIV-2。

8. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体包括病毒的包膜多肽,所述病毒选自自由禽白血病病毒(ALV)、FIV、HIV、水疱性口炎病毒(VSV)、莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、绵羊肺腺瘤反转录病毒(JSRV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、人类嗜T淋巴球病毒1(HTLV-1)、维斯纳梅迪病毒(VMV)、SARS-CoV、金迪普拉病毒(Chandipura virus)、马尔堡病毒(Marburg virus)、莫科拉病毒(Mokola virus)、猫内源性逆转录病毒(RD114)、埃博拉病毒、狂犬病病毒、罗斯河病毒(RRV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、人副流感病毒3型、丙型肝炎病毒(HCV)、仙台病毒、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、塞姆利基森林病毒(Semliki Forest virus;SFV)、鸡瘟病毒(FPV)、流感病毒、委内瑞拉马脑炎病毒和拉各斯蝙蝠病毒(Lagos-bat virus)所组成的群组。

9. 根据权利要求8所述的组合物,其中所述病毒载体包括源自VSV或RD114的包膜多肽。

10. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体包括编码嵌合抗原受体(CAR)多肽、工程T细胞受体多肽或双特异性T细胞接合子多肽的多核苷酸序列。

11. 根据权利要求10所述的组合物,其中所述CAR包括:

a) 结合抗原的胞外域,所述抗原选自自由 α 叶酸受体、5T4、 α v β 6整合蛋白、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2(HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿AchR、FR α 、GD2、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(Glypican-3;GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、存活素(Survivin)、TAG72、TEM、VEGFR2和WT-1所组成的群组;

b) 来源于选自由CD8 α 、CD4、CD28、CD45、PD1、CTLA-4和CD152所组成的群组中的多肽的跨膜结构域;

c) 一种或多种细胞内共刺激信号结构域,其选自由TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134

(OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70所组成的群组;和

d) CD3 ζ 主信号结构域。

12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述胞外域包括结合所述抗原的抗体或抗原结合片段。

13. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述结合BCMA多肽的抗体或抗原结合片段选自自由骆驼Ig、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、F(ab)'₃片段、Fv、单链Fv抗体("scFv")、bis-scFv、(scFv)₂、微抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、二硫键稳定性Fv蛋白("dsFv")和单域抗体(sdAb、纳米抗体)所组成的群组。

14. 根据权利要求13所述的组合物,其中所述结合BCMA多肽的抗体或抗原结合片段是scFv。

15. 根据权利要求11至13中任一项所述的组合物,其中所述抗体是人源抗体、鼠源抗体或人源化抗体。

16. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述跨膜结构域来源于CD8 α 。

17. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述一种或多种细胞内共刺激信号结构域选自自由CD28、CD134和CD137所组成的群组。

18. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述CAR包括两种或更多种的选自自由CD28、CD134和CD137所组成的群组中的细胞内共刺激信号结构域。

19. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述一种或多种细胞内共刺激信号结构域是CD28。

20. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述一种或多种细胞内共刺激信号结构域是CD134。

21. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述一种或多种细胞内共刺激信号结构域是CD137。

22. 根据权利要求11所述的组合物,进一步包括较链区多肽。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述较链区多肽包括CD8 α 的较链区。

24. 根据权利要求11至23中任一项所述的组合物,进一步包括间隔区多肽。

25. 根据权利要求24所述的组合物,其中所述间隔区多肽包括IgG1的CH2和CH3。

26. 根据权利要求11至25中任一项所述的组合物,进一步包括信号肽。

27. 根据权利要求26所述的组合物,其中所述信号肽包括IgG1重链信号多肽或CD8 α 信号多肽。

28. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体包括编码归巢内切酶、类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)、II型规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)相关的(Cas9)核酸酶,或megaTAL核酸酶的多核苷酸序列。

29. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体包括编码 β -球蛋白多肽的多核苷酸序列。

30. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述病毒载体包括编码ABCD1多肽的多核苷酸序列。

31. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约3%的海藻糖或其

衍生物。

32. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约4%的海藻糖或其衍生物。

33. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约5%的海藻糖或其衍生物。

34. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约6%的海藻糖或其衍生物。

35. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约7%的海藻糖或其衍生物。

36. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约8%的海藻糖或其衍生物。

37. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约9%的海藻糖或其衍生物。

38. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约10%的海藻糖或其衍生物。

39. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约11%的海藻糖或其衍生物。

40. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约12%的海藻糖或其衍生物。

41. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约13%的海藻糖或其衍生物。

42. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约14%的海藻糖或其衍生物。

43. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约15%的海藻糖或其衍生物。

44. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约5%至约15%的海藻糖或其衍生物。

45. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约4%至约12%的海藻糖或其衍生物。

46. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约5%至约10%的海藻糖或其衍生物。

47. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约5%至约9%的海藻糖或其衍生物。

48. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约5%至约8%的海藻糖或其衍生物。

49. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约5%至约7%的海藻糖或其衍生物。

50. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述组合物包含按重量计约4%至约6%的海藻糖或其衍生物。

51. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述药学上可接受的稀释剂包括生理学上可接受的缓冲液。

52. 根据权利要求51所述的组合物,其中所述生理学上可接受的缓冲液选自由汉克缓冲盐水溶液(Hanks buffered saline solution; HBSS)、林格溶液、杜氏磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's phosphate buffered saline; PBS)、5%葡萄糖水溶液(D5W)和生理盐水(0.9%NaCl)所组成的群组。

53. 根据权利要求1所述的组合物,其中所述药学上可接受的稀释剂包括生理学上可接受的细胞培养基。

54. 根据权利要求53所述的组合物,其中所述药学上可接受的细胞培养基选自由StemSpan-ACF、StemSpan-H3000、StemSpan-SFEM、Stemline II、StemPro 34、StemXVivo、伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基(Iscove's modified Dulbecco's medium; IMDM)、达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium; DMEM)、罗斯维尔公园纪念研究所培养基(RPMI) 1640培养基、McCoy's 5A培养基、 α 最小必需培养基(α -MEM)、伊格尔基础培养基(basal medium Eagle; BME)、费舍尔培养基(Fischer's medium)、培养基199、F-12K营养混合物培养基(Kaighn改良, F-12K)和X-vivo 20所组成的群组。

55. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约20°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一个月以上的滴度。

56. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约20°C下储存时,所述病毒载体具有稳定6个月以上的滴度。

57. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约20°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

58. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约10°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一个月以上的滴度。

59. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约10°C下储存时,所述病毒载体具有稳定6个月以上的滴度。

60. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约10°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

61. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约4°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一个月以上的滴度。

62. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约4°C下储存时,所述病毒载体具有稳定6个月以上的滴度。

63. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约4°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

64. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约0°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

65. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约-20°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

66. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约-60°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

67. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约-70℃下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

68. 根据权利要求1至54中任一项所述的组合物,其中,当所述组合物在约-80℃下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

69. 根据权利要求1至68中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体的所述滴度在一个或多个冻融周期保持稳定。

70. 根据权利要求1至68中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体的所述滴度在两个或更多个的冻融周期保持稳定。

71. 根据权利要求1至68中任一项所述的组合物,其中所述病毒载体的所述滴度在三个或更多个的冻融周期保持稳定。

72. 根据权利要求1至71中任一项所述的组合物,其中所述组合物适合于体内直接注射。

73. 根据权利要求1至71中任一项所述的组合物,其中所述组合物适合于体外直接使用。

74. 根据权利要求72或权利要求73所述的组合物,其中所述组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释10倍。

75. 根据权利要求72或权利要求73所述的组合物,其中所述组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释50倍。

76. 根据权利要求72或权利要求73所述的组合物,其中所述组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释100倍。

77. 根据权利要求72或权利要求73所述的组合物,其中所述组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释200倍。

78. 根据权利要求72或权利要求73所述的组合物,其中所述组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释250倍。

79. 一种治疗有治疗需要的受试者的疾病的方法,包括向所述受试者施用经权利要求1所述的组合物转导的细胞群。

80. 一种用权利要求1所述的组合物转导细胞的方法,包括将权利要求1至79中任一项所述的组合物引入细胞群。

81. 根据权利要求80所述的方法,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

82. 根据权利要求80所述的方法,其中所述细胞是人源细胞。

83. 根据权利要求80所述的方法,其中所述细胞是干细胞或祖细胞。

84. 根据权利要求80所述的方法,其中所述细胞是造血细胞。

85. 根据权利要求84所述的方法,其中所述造血细胞是造血干细胞或祖细胞或表达CD34的细胞。

86. 根据权利要求84所述的方法,其中所述造血细胞是淋巴细胞。

87. 根据权利要求86所述的方法,其中所述淋巴细胞是T淋巴细胞。

88. 一种稳定病毒载体的方法,其包括:

(a) 制备包含海藻糖或其衍生物的组合物;以及

(b) 将病毒载体添加至所述组合物。

89. 根据权利要求81所述的方法,其中,当在约-80℃至约25℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。

90. 根据权利要求81所述的方法,其中,当在约-20℃至约18℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。

91. 根据权利要求81所述的方法,其中,当在约-20℃至约4℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。

92. 根据权利要求81所述的方法,其中,当在约4℃至约25℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。

93. 根据权利要求81所述的方法,其中,当在约4℃至约18℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。

载体制剂

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35 U.S.C. §119 (e) 要求2015年3月20日提交的美国临时专利申请第62/136,309号的优先权,所述临时专利申请的全部内容通过引用整体并入本文。

[0003] 序列表说明

[0004] 本申请相关的序列表以文本格式提供以代替纸质副本,并以引用方式将其并入说明书中。包含序列表的文本发明件的名称为BLBD_025_01WO_ST25.txt。文本发明件的大小是3KB,于2016年3月18日创建,并以EFS-Web电子版与说明书一起提交。

技术领域

[0005] 本发明一般涉及用于稳定病毒载体的组合物和制剂。特别地,本发明涉及用于长期储存和稳定病毒载体以在体外和体内施用的包含海藻糖或其衍生物的组合物。

背景技术

[0006] 针对一些疾病的基因疗法最近取得了成功。由于逆转录病毒能稳定地整合到宿主细胞基因组中,所以使用逆转录病毒将基因递送到哺乳动物细胞得到推广。在基因疗法中已经使用了许多逆转录病毒载体,包括 γ 逆转录病毒和慢病毒。

[0007] 慢病毒是复杂的逆转录病毒,其基于更高的复杂性,在潜伏感染的过程中可以整合到非增殖细胞的基因组中并调节其生命周期。这些病毒包括HIV-1、HIV-2和SIV等。像其他逆转录病毒一样,慢病毒具有侧面与两个长末端重复(LTR)序列相接的gag、pol和env基因。这些基因中的每一个基因编码多种蛋白质,最初表达为一种前体多蛋白。这些蛋白对于病毒的结构及其RNA基因组的复制十分重要。5'和3'LTR用于促进病毒粒子RNA的转录和多聚腺苷酸化。

[0008] 慢病毒的转导可能性和潜力受到载体生产和储存过程中生长培养基和血清成分中的各种因素的影响,包括温度、pH、冻融频率和培养条件。在较高的温度下储存时,可以观察到慢病毒滴度随着冻融周期的增加而呈双相性降低(见Kigashikawa和Chang,《病毒学(Virology)》,第280期,第124-131页;2001)。为了使基因疗法的效果最大化,需要具有维持其效力的逆转录病毒载体。

发明内容

[0009] 本领域需要一种稳定的水性组合物,其包含在较宽的温度范围下储存不同时间段时保持异源序列的感染滴度和/或表达并进一步适用于体外或体内施用的病毒载体,例如慢病毒载体。

[0010] 本发明一般提供用于保存病毒载体的组合物和制剂。实施方案提供海藻糖或其衍生物的水性组合物作为长期储存病毒载体的合适的保护剂。与未储存于海藻糖或其衍生物中的病毒载体相比,储存于含有特定浓度海藻糖的溶液中的病毒载体在从约-80°C至约20°C的较宽温度范围内经过多个冻融周期和大范围时间段仍能保持异源序列的感染滴度和/

或表达。

[0011] 因此,在某些实施方案中,提供包含:(a)病毒载体;(b)按重量计约3%-15%的海藻糖或其衍生物;和(c)药学上可接受的稀释剂的水性组合物。在一个实施方案中,病毒载体是腺病毒载体。在另一个实施方案中,病毒载体是腺相关病毒载体。在另一个实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体。

[0012] 在一个实施方案中,病毒载体是慢病毒载体。在另一个实施方案中,慢病毒载体选自基本上由人免疫缺陷病毒(HIV)、维斯纳梅迪病毒(VMV)、山羊关节炎脑炎病毒(CAEV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、猫免疫缺陷病毒(FIV)、牛免疫缺陷病毒(BIV)和猴免疫缺陷病毒(SIV)所组成的群组。在另一个实施方案中,慢病毒载体是HIV-2。

[0013] 在一个实施方案中,病毒载体包括病毒的包膜多肽,所述病毒选自自由禽白血病病毒(ALV)、FIV、HIV、水疱性口炎病毒(VSV)、莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、长臂猿白血病病毒(GaLV)、绵羊肺腺瘤反转录病毒(JSRV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、人类嗜T淋巴病毒1(HTLV-1)、维斯纳梅迪病毒(VMV)、SARS-CoV、金迪普拉病毒、马尔堡病毒、莫科拉病毒、猫内源性逆转录病毒(RD114)、埃博拉病毒、狂犬病病毒、罗斯河病毒(RRV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、人副流感病毒3型、丙型肝炎病毒(HCV)、仙台病毒、辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒(SFV)、鸡瘟病毒(FPV)、流感病毒、委内瑞拉马脑炎病毒和拉各斯蝙蝠病毒所组成的群组。在具体的实施方案中,病毒载体包括源自VSV或RD114的包膜多肽。

[0014] 在一个实施方案中,病毒载体包括编码嵌合抗原受体(CAR)多肽、工程T细胞受体多肽或双特异性T细胞接合子多肽的多核苷酸序列。

[0015] 在一个实施方案中,CAR包括:a)结合抗原的胞外域,所述抗原选自自由 α 叶酸受体、5T4、 α v β 6整合蛋白、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2(HER2)的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿AchR、FR α 、GD2、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、存活素、TAG72、TEM、VEGFR2和WT-1所组成的群组;b)来源于选自由CD8 α 、CD4、CD28、CD45、PD1、CTLA-4和CD152所组成的群组中的多肽的跨膜结构域;c)一种或多种细胞内共刺激信号结构域,其选自自由TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70所组成的群组;和d)CD3 ζ 主信号结构域。

[0016] 在一个实施方案中,CAR的胞外域包括结合抗原的抗体或抗原结合片段。在另一个实施方案中,结合BCMA多肽的抗体或抗原结合片段选自自由骆驼Ig、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、F(ab)'₃片段、Fv、单链Fv抗体("scFv")、bis-scFv、(scFv)₂、微抗体、双链抗体、三链抗体、四链抗体、二硫键稳定性Fv蛋白("dsFv")和单域抗体(sdAb、纳米抗体)所组成的群组。在另一个实施方案中,抗体是人源抗体、鼠源抗体或人源化抗体。

[0017] 在一个实施方案中,CAR的跨膜结构域来源于CD8 α 。

[0018] 在一个实施方案中,CAR的一种或多种细胞内共刺激信号结构域选自自由CD28、CD134和CD137所组成的群组。在另一个实施方案中,CAR包括两种或更多种的选自自由CD28、

CD134和CD137所组成的群组中的细胞内共刺激信号结构域。在具体的实施方案中,CAR的一种或多种细胞内共刺激信号结构域是CD28。在具体的实施方案中,CAR的一种或多种细胞内共刺激信号结构域是CD134。在具体的实施方案中,CAR的一种或多种细胞内共刺激信号结构域是CD137。

[0019] 在一个实施方案中,CAR进一步包括铰链区多肽。在另一个实施方案中,铰链区多肽包括CD8 α 的铰链区。

[0020] 在一个实施方案中,CAR进一步包括间隔区多肽。在另一个实施方案中,间隔区多肽包括的IgG1的CH2和CH3区。

[0021] 在一个实施方案中,CAR进一步包括信号多肽。在另一个实施方案中,信号肽包括IgG1重链信号多肽或CD8 α 信号多肽。

[0022] 在一个实施方案中,病毒载体包括编码归巢内切酶、类转录激活因子效应物核酸酶 (TALEN)、锌指核酸酶 (ZFN)、II型规律成簇的间隔短回文重复 (CRISPR) 相关的 (Cas9) 核酸酶,或megaTAL核酸酶的多核苷酸序列。

[0023] 在一个实施方案中,病毒载体包括编码 β -球蛋白多肽的多核苷酸序列。

[0024] 在一个实施方案中,病毒载体包括编码ABCD1多肽的多核苷酸序列。

[0025] 在另一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%或15%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约3%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约4%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约5%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约6%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约7%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约8%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约9%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约10%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约11%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约12%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,组合物包含按重量计约13%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约14%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,水性组合物包含按重量计约15%的海藻糖或其衍生物。在一个实施方案中,组合物包含按重量计约5%至约15%的海藻糖或其衍生物。在另一个实施方案中,组合物包含按重量计约4%至约12%的海藻糖或其衍生物。在另一个实施方案中,组合物包含按重量计约5%至约10%的海藻糖或其衍生物。在另一个实施方案中,组合物包含按重量计约5%至约9%的海藻糖或其衍生物。在另一个实施方案中,组合物包含按重量计约5%至约8%的海藻糖或其衍生物。在另一个实施方案中,组合物包含按重量计约5%至约7%的海藻糖或其衍生物。在另一个实施方案中,组合物包含按重量计约4%至约6%的海藻糖或其衍生物。

[0026] 在一个实施方案中,药学上可接受的稀释剂包括生理学上可接受的缓冲液。在另一个实施方案中,生理学上可接受的缓冲液选自由汉克缓冲盐水溶液 (HBSS)、林格溶液、杜氏磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、5%葡萄糖水溶液 (D5W) 和生理盐水 (0.9%NaCl) 所组成的群组。在一个实施方案中,药学上可接受的稀释剂包括生理学上可接受的细胞培养基。在另一个实施方案中,药学上可接受的细胞培养基选自由StemSpan-ACF、StemSpan-H3000、

StemSpan-SFEM、Stemline II、StemPro 34、StemXVivo、伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基 (IMDM)、达尔伯克氏改良伊格尔培养基 (DMEM)、罗斯维尔公园纪念研究所培养基 (RPMI) 1640培养基、McCoy's 5A培养基、 α 最小必需培养基 (α -MEM)、伊格尔基础培养基 (BME)、费舍尔培养基、培养基199、F-12K营养混合物培养基 (Kaighn改良, F-12K) 和X-vivo 20所组成的群组。

[0027] 在另一个实施方案中,当所述组合物在约20°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一个月以上的滴度。在一个实施方案中,当所述组合物在约20°C下储存时,所述病毒载体具有稳定6个月以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约20°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

[0028] 在一个实施方案中,当所述组合物在约10°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一个月以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约10°C下储存时,所述病毒载体具有稳定6个月以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约10°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

[0029] 在一个实施方案中,当所述组合物在约4°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一个月以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约4°C下储存时,所述病毒载体具有稳定6个月以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约4°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

[0030] 在一个实施方案中,当所述组合物在约0°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约-20°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约-60°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约-70°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。在另一个实施方案中,当所述组合物在约-80°C下储存时,所述病毒载体具有稳定一年以上的滴度。

[0031] 在另一个实施方案中,病毒载体的所述滴度在一个或多个冻融周期保持稳定。在另一个实施方案中,病毒载体的所述滴度在两个或更多个的冻融周期保持稳定。在另一个实施方案中,病毒载体的所述滴度在三个或更多个的冻融周期保持稳定。

[0032] 在一个实施方案中,组合物适合于体内直接注射。在另一个实施方案中,组合物适合于体外直接使用。

[0033] 在一个实施方案中,组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释10倍。在另一个实施方案中,组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释50倍。在另一个实施方案中,组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释100倍。在另一个实施方案中,组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释200倍。在另一个实施方案中,组合物在体内直接注射或体外直接使用之前至少稀释250倍。

[0034] 在各种实施方案中,考虑了治疗有需要的受试者的疾病的方法,其包括向所述受试者施用经此处所述的水性组合物转导的细胞群。

[0035] 在一个实施方案中,考虑了使用此处所述的水性组合物转导细胞的方法,其包括将所述组合物引入细胞群。在一个实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在另一个实施方案中,所述细胞是人源细胞。在另一个实施方案中,所述细胞是干细胞或祖细胞。在又一个实施方案中,所述细胞是造血细胞。

[0036] 在一个实施方案中,所述造血细胞是造血干细胞或祖细胞或表达CD34的细胞。在另一个实施方案中,所述造血细胞是淋巴细胞。在又一个实施方案中,所述淋巴细胞是T淋巴细胞。

[0037] 在另一个实施方案中,考虑了一种稳定病毒载体的方法,其包括:(a) 制备一种包含海藻糖或其衍生物的组合物;以及(b) 将病毒载体添加至所述组合物。在一个实施方案中,当在约-80℃至约25℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。在另一个实施方案中,当在约-20℃至约18℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。在另一个实施方案中,当在约-20℃至约4℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。在又一个实施方案中,当在约4℃至约25℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。在另一个实施方案中,当在约4℃至约18℃的温度范围内储存时,所述病毒载体具有稳定至少一年的滴度。

附图说明

[0038] 图1示出了解冻对在4℃下储存24小时以及在-80℃下储存24小时后单次融化后的未稀释的慢病毒载体组合物中检测的慢病毒载体滴度的影响。图1示出了与在4℃下储存的未稀释的慢病毒载体相比,在-80℃下储存的未稀释的慢病毒载体组合物的平均滴度(TU/mL)下降。

[0039] 图2示出了在各种温度下检测储存在PBS中未稀释或5%海藻糖/PBS中稀释的慢病毒载体的长期稳定性以延长其储存期。测量在4℃下、-20℃和-80℃下单次解冻后分别储存4、14、28、42和73天的慢病毒载体的滴度。图2示出了由5%海藻糖配制的慢病毒载体在测试温度下至少73天内表现出稳定的慢病毒滴度。

[0040] 图3示出了在用不同浓度的海藻糖配制的 $1.0E+08$ TU/mL转导的细胞中,通过流式细胞术检测的慢病毒载体的表达(RFP表达)。与含有储存在PBS中未稀释的慢病毒载体的细胞相比,在海藻糖/PBS中在4℃下储存24小时以及在-80℃下储存24小时单次解冻后含有表达RFP的慢病毒载体的细胞所占百分比比较高。

[0041] 图4示出了图3中检测到的细胞样品的平均滴度(TU/mL)的变化,以确定在4℃下储存与在-80℃的较低温度下储存时,哪些储存条件能为慢病毒载体提供最大保护。含有储存在PBS中未稀释的慢病毒载体的细胞具有大的负 Δ TU/mL值,这表明与在4℃下储存相比,一旦在-80℃下储存24小时后再解冻,慢病毒载体未能保持稳定性。储存在约15%海藻糖/PBS中的含有慢病毒载体的细胞显示出最大的正 Δ TU/mL值,这表明与在4℃下储存相比,在-80℃下储存24小时后再解冻的慢病毒载体的平均滴度实际上增加了。

[0042] 图5示出了相对于储存组合物的海藻糖浓度(重量%, X轴)绘制的慢病毒载体的滴度(Y轴)。在4℃和-80℃下,最低稀释度的慢病毒载体保存率最高的海藻糖百分比均约为15%。

[0043] 图6示出了在-80℃下储存于各种浓度的海藻糖/PBS的样品中的慢病毒载体的滴度。对于PBS中未稀释或按1:2稀释的浓缩产物,海藻糖的保存效果在所测较低海藻糖浓度下呈线性。

具体实施方式

[0044] A. 综述

[0045] 基因疗法是将经过校正的目标基因导入靶细胞群,通常使用病毒载体。病毒载体,诸如慢病毒受储存条件的不利影响,诸如在4℃下长时间储存或在较低温度,诸如-80℃储存后经历多个冻融周期。观察到慢病毒滴度随着冻融周期的增加和温度的上升而降低。相比于未储存于这些水性组合物中的病毒载体,本发明人发现了在各种温度和时间段内维持病毒载体的效力的水性组合物。

[0046] 除非有相反的规定,否则具体实施方案的实践采用本领域技术范围内惯用的化学法、生化法、有机化学法、分子生物学法、微生物学法、重组DNA技术、遗传学、免疫学和细胞生物学,下文描述了其中的多数方法以作说明。这些技术在文献中进行了充分解释。参见,例如:Sambrook等人,《分子克隆试验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(2001第三版);Sambrook等人,《分子克隆试验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(1989第二版);Maniatis等人,《分子克隆试验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(1982);Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley和Sons,2008年更新);《精编分子生物学实验指南:新编分子生物学实验指南方法纲要(Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology)》,Greene Pub.Associates and Wiley-Interscience;Glover,《DNA克隆:一种实用方法(DNA Cloning:A Practical Approach)》卷I和II(IRL出版社,牛津大学,1985);Anand,《复杂基因组分析技术(Techniques for the Analysis of Complex Genomes)》,(学术出版社,纽约,1992);《转录和翻译(Transcription and Translation)》(B.Hames&S.Higgins,版本,1984);Perbal,《分子克隆实践指南(A Practical Guide to Molecular Cloning)》(1984);以及Harlow和Lane,《抗体(Antibodies)》,(冷泉港实验室出版社,冷泉港,纽约,1998)。

[0047] 本发明引用的所有出版物、专利和专利申请均以引用方式全文并入于此。

[0048] B. 定义

[0049] 除非另有定义,否则本发明使用的所有技术术语和科学术语都具有本发明所属领域技术人员通常所理解的含义。尽管与本发明所述方法和材料类似或相当的任何方法和材料都可用于具体实施方案的实施或检验,但本发明仍描述了组合物、方法和材料的优选实施方案。出于本公开的目的,下列术语定义如下。

[0050] 冠词“a”、“an”和“the”在本发明中用于指代冠词宾语中的一个或多个(即至少一个)。例如,“要素”是指一个要素或多个要素。

[0051] 如本发明所用,术语“约”或“近似”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、用量、重量或长度相对于基准数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、用量、重量或长度的变化多达30%、25%、20%、25%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%。在具体实施方案中,出现在数值之前的术语“约”或“近似”表示所述值增加或减少15%、10%、5%或1%的范围。

[0052] 术语“大体上”或“基本上”是指数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、用量、重量、长度或滴度或其他度量约为基准数量、水平、数值、数目、频率、百分比、尺寸、大小、用量、重量、长度或滴度或其他度量的90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更高。

[0053] 在本说明书中,除非上下文另有要求,否则词语“包括”、“包含”和“含有”暗示包含所述步骤或要素或一组步骤或要素,但不排除任何其他步骤或要素或一组步骤或要素。术语“由...组成”是指包括且限于“由...组成”一词之后的任何成分。因此,短语“由...组成”表示所列要素是必需的或强制性的,并且不存在其他要素。“基本上由...组成”意味着包括在该短语之后列出的任何要素并且限于不干扰或有助于本公开中规定的所列要素的活性或行为的其他要素。因此,“基本上由.....组成”表示所列要素是必需的或强制性的,但是也表示根据是否影响所列要素的活性或行为,没有其他要素是可选的、可能存在或可能不存在。

[0054] 在本说明书中,“一个实施方案”、“实施方案”、“另一实施方案”、“具体的实施方案”、“相关实施方案”、“某个实施方案”、“额外的实施方案”或“另一实施方案”或其组合意味着结合实施方案描述的特定特征、结构或特性包含在至少一个实施方案中。因此,在本说明书的各个部分出现的上述短语并不一定都是指同一个实施方案。此外,特定特征、结构或特性可以以任何合适的方式组合在一个或多个实施方案中。

[0055] 此处所用的术语“剂”或“化合物”包含多核苷酸、多肽和其它有机和无机化学品,包括但不限于所有类似物及其衍生物。

[0056] 关于化学品,诸如有机化学品,“类似物”或“衍生物”涉及在结构和功能上与另一种化学物质相似的化学分子,其通常在结构上相差一个元素或基团,但如果其与亲本化学品具有相同的功能,可能因为一个以上的基团(例如2、3或4个基团)的修饰而不同。这样的修饰对于本领域技术人员而言是常规的,并且包括,例如加成的或取代的化学基团,诸如酸的酯或酰胺、保护基团,例如醇或硫醇的苄基和胺的叔丁氧基羰基。还包括对烷基侧链的修饰,诸如烷基取代基(例如甲基、二甲基、乙基等),对侧链饱和度或不饱和度的修饰,以及改性基团,诸如取代的苯基和苯氧基。衍生物还可以包括轭合物,诸如生物素或抗生物素蛋白基团、酶,诸如辣根过氧化物等,并且包括放射性标记的、生物发光的、化学发光的或荧光基团。此外,可以将基团加入到本发明所述的剂中以改变其药代动力学性质,诸如增加体内或离体的半衰期,或增加其细胞穿透性等。还包括已知增强药物的众多理想品质(例如溶解度、生物利用度、制造等)的前药(参见例如WO/2006/047476,用于示例性EP激动剂前药,通过引用其公开的所述激动剂并入本发明)。

[0057] “保存”是指可以包含在组合物或制剂中的“保护剂”或化合物的使用以基本上维持生物材料的生物活性或完整性。例如,病毒载体中异源序列的感染滴度和/或表达可用海藻糖来保存。用于保存生物材料的化合物的实例包括海藻糖、海藻糖衍生物、甘油、二甲基亚砜、乙二醇、葡萄糖、蔗糖和麦芽糖。此外,“维持”或“保存”或“维护”或“无变化”或“无实质性变化”或“无实质性减少”一般是指生理反应,犹如载体或对照分子/组合物引起的反应或特定细胞谱系中的反应的。类似的反应是与参考反应差别不大或差别可测的反应。在具体实施方案中,当病毒载体的滴度在一个温度下维持一段时间或其滴度降低小于约1%、小于约2%、小于约3%、低于约4%、小于约5%、小于约10%、小于约12%、小于约15%、小于约18%、小于约20%、小于约22%或小于约25%、或任何介于中间的数值时,则在该温度下保存病毒载体。

[0058] “稳定的”组合物是其中的病毒载体一旦在某个温度下储存一段时间后基本上保持其感染滴度、载体颗粒与感染性比例和/或异源序列表达的组合物。实施例中描述了本领域

域中已知的测量病毒载体稳定性的方法。稳定性可以在给定温度和给定时间段进行测量。稳定性也可以紧接着分析可变性进行测量,在具体实施方案中为约20%、约25%、约30%或约35%。优选地,组合物在约20℃、约10℃、约4℃、约0℃、约-5℃、约-10℃、约-20℃、约-30℃、约-40℃、约-50℃、约-60℃、约-70℃、约-80℃或任意中间温度下在指定时间段内是稳定的。优选地,组合物在指定温度下至少约24小时、至少约1个月、至少约6个月、至少约1年、至少约2年或任意中间时间段内是稳定的。

[0059] 在具体实施方案中,病毒载体的感染滴度在某个温度下维持一段时间(例如,小时、天、周、月、年)或与原始测量的滴度相比,或者其滴度降低小于约1%、小于约2%、小于约3%、小于约4%、小于约5%、小于约10%、小于约12%、小于约13%、小于约14%、约15%、小于约16%、小于约17%、小于约18%、小于约19%、小于约20%、小于约21%、小于约22%、小于约23%、小于约24%、小于约25%、小于约26%、小于约27%、小于约28%、小于约29%、小于约30%、小于约31%、小于约32%、小于约33%、小于约34%或小于约35%或任意中间值,则病毒载体在该温度下是稳定的。在一个实施方案中,与最初测量的滴度相比,病毒载体的感染滴度降低小于约15%至小于约25%或任意中间值时,病毒载体在该温度下是稳定的。

[0060] 在具体实施方案中,在某个温度下测量一段时间后(如小时、天、周、月、年),病毒载体的感染滴度为原始滴度的约95%、约94%、约93%、约92%、约92%、约90%、约89%、约88%、约87%、约86%、约85%、约84%、约83%、约82%、约81%、约80%、约79%、约78%、约77%、约76%、约75%、约74%、约73%、约72%、约71%、约70%、约69%、约68%、约67%、约66%或约65%时,病毒载体在该温度下是稳定的。在一个实施方案中,在某个温度下测量一段时间后,病毒载体的感染滴度为原始滴度的约85%至约75%或任意中间值时,病毒载体的滴度在该温度下是稳定的。

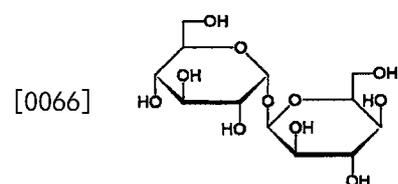
[0061] 在具体实施方案中,病毒的载体颗粒与感染性比例(P:I)为病毒的原始比例或第一次测定的比例(P:I)的约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或任意中间值时,病毒载体在某个温度下是稳定的。在一个实施方案中,当病毒的载体颗粒与感染性比例(P:I)为病毒的原始比例或第一次测定的比例(P:I)的约50%或以上时,病毒载体在某个温度下是稳定的。

[0062] 本领域技术人员知道,测量组合物的稳定性时可以使用高于和低于所列温度的温度以及比所列时间段更短和更长的时间段。此外,组合物优选在组合物冷冻(例如,至-80℃)和解冻之后是稳定的,例如1、2、3、4、5或更多个冻融周期。

[0063] C. 海藻糖及其衍生物

[0064] 在各种实施方案中,本发明所述组合物和制剂包含病毒载体和海藻糖或其衍生物。

[0065] 海藻糖(也称为 α, α -海藻糖、 α -D-吡喃葡萄糖、 α -D-吡喃葡萄糖苷、蘑菇糖、茧糖)是一种在 α, α -1,1键中含有两个D-葡萄糖单元的天然存在的二糖:



[0067] 海藻糖存在于植物、藻类、真菌、酵母、细菌、昆虫和其他无脊椎动物中。它被海藻糖酶(一种高度特异性酶)裂解,海藻糖酶以多种形式存在于含有海藻糖的生物体中。它不易被酸水解且糖苷键不会被 α -葡萄糖苷酶裂解。这种非还原性糖的特征在于其高旋光度和熔化行为,其被认为是非常稳定的二糖。海藻糖的异构体包括 α, β (新海藻糖)和 β, β (异海藻糖),尽管这些异构体很少在自然界中发现。

[0068] 包含海藻糖的现代食物来源包括蜂蜜、味醌、雪利酒、使用酵母制成的许多物品、商业用途种植的蘑菇和无脊椎动物,诸如龙虾、蟹和虾。海藻糖可以从诸如向日葵的种子植物中分离出来。

[0069] 海藻糖本质上可能具有多种作用,包括作为发育过程中的能源、作为结构成分或代谢中间体。它似乎为昆虫的飞行提供了能源。

[0070] “海藻糖衍生物”或“海藻糖的衍生物”包括通过化学或物理的方法从海藻糖中衍生的化合物,其中所述化合物不含游离羰基或异头碳,来自醛或酮基的羰基碳包含于糖苷键。海藻糖衍生物的一些实例包括2,3,2',3'-四-邻-苄基-6,6'-二-邻-癸酰基-4,4'-双-邻(二苯基膦酰基)- α, α -海藻糖、6,6'-二-邻-癸酰基-4,4'-二-邻-膦酰基 α, α -海藻糖、2,3,2',3'-四-邻-苄基-4,4'-双-邻(二苯基膦酰基) α, α 海藻糖6,6'-脂肪酸酯。

[0071] D. 组合物和制剂

[0072] 本发明所述组合物可包含海藻糖或其衍生物以及本发明提及的病毒载体。在具体实施方案中,可以如下制备用于储存和/或稳定病毒载体的组合物:将适量的海藻糖脱水物溶解在生理上可接受的缓冲液中来制备海藻糖或其衍生物的原液,制备海藻糖的原液,例如,约1M至约2M海藻糖的原液;然后,可以在相同或不同的生理学上可接受的,经海藻糖的原液以各种比例稀释的缓冲液中配制病毒载体从而生成组合物,例如水溶液,其包含具有特定的最终重量百分比的海藻糖的病毒载体。

[0073] 组合物包括但不限于药物组合物。“药物组合物”是指在药学上可接受的或生理学上可接受的溶液或缓冲液中配制的、可单独或与一种或多种其它治疗方式组合施用于细胞或动物的组合物。若需要,还可以理解为组合物也可以与其它试剂,诸如,例如细胞因子、生长因子、激素、小分子、化学治疗剂、前药、药物、抗体或其它各种药物活性剂组合施用。对于组合物中可能包含的其它组分实际上没有限制,只要其他试剂不会对组合物实现目的疗法的能力产生不良影响即可。

[0074] 此处所用的术语“药学上可接受的”是指在合理的医学判断范围内适合用于与人类和动物的组织接触而不产生过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症的且与合理的利益/风险比相称的化合物、材料、组合物和/或剂型。

[0075] 此处所用的“药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂”包括但不限于任何,美国食品和药物管理局已批准可用于人或家畜的佐剂、载体、赋形剂、助流剂、甜味剂、稀释剂、防腐剂、染色/着色剂、风味增强剂、表面活性剂、润湿剂、分散剂、悬浮剂、稳定剂、等渗剂、溶剂、表面活性剂或乳化剂。示例性的药学上可接受的载体的例子包括但不限于糖,诸如乳糖、葡萄糖和蔗糖;淀粉,诸如玉米粉和马铃薯淀粉;纤维素及其衍生物,诸如羧甲基纤维素钠,乙基纤维素和乙酸纤维素;黄芪胶;麦芽;明胶;滑石;可可脂、蜡、动植物脂肪、石蜡、硅酮、膨润土、硅酸、氧化锌;油,诸如花生油、棉籽油、红花油、芝麻油、橄榄油、玉米油和大豆油;二醇,诸如丙二醇;多元醇,诸如甘油、山梨糖醇、甘露醇和聚乙二醇;酯类,诸如油酸乙

酯和月桂酸乙酯;琼脂;缓冲剂,诸如氢氧化镁和氢氧化铝;海藻酸;无热原水;等渗盐水;林格溶液;乙醇;磷酸盐缓冲溶液;和药物制剂中使用的任何其他相容物质。

[0076] “生理学上可接受的溶液”或“生理学上可接受的缓冲液”是指可用于人或家畜的水溶液。示例性的生理学上可接受的缓冲液,包括但不限于无热原水;等渗盐水(0.9% NaCl);汉克缓冲盐水溶液(HBSS);林格溶液;5%葡萄糖水溶液(D5W);和生理缓冲盐,例如杜氏磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0077] 在具体实施方案中,本发明所述组合物包含缓冲液以使培养基的pH保持在最适宜病毒载体的值。例如,缓冲液可以是磷酸盐缓冲液或使生理pH为约7的另一缓冲液。在具体实施方案中,组合物的pH为约7、约7.1、约7.2、约7.3或约7.4。在一个实施方案中,组合物的pH为约7.4。

[0078] 在具体实施方案中,用于储存和/或稳定病毒载体的水性组合物可以如下制备:将适量的海藻糖脱水物溶解在磷酸盐缓冲盐水(PBS,pH7.4)中以制备海藻糖或其衍生物的原液,制备例如约1M至约2M海藻糖/PBS的原液;然后,在用海藻糖/PBS的原液以不同的比例稀释的PBS中配制病毒载体从而产生包含具有特定的最终重量百分比的海藻糖的病毒载体的水性组合物。

[0079] 在一个实施方案中,病毒载体是在包含约3%海藻糖、约4%海藻糖、约5%海藻糖、约6%海藻糖、约7%海藻糖、约8%海藻糖、约9%海藻糖、约10%海藻糖、约11%海藻糖、约12%海藻糖、约13%海藻糖、约14%海藻糖、约15%海藻糖、约16%海藻糖、约17%海藻糖、约18%海藻糖、约19%海藻糖或约20%海藻糖或任意中间浓度的海藻糖的水性组合物中配制。在具体实施方案中,本领域技术人员可以根据所需的总体积来调整病毒载体、储备海藻糖和生理学上可接受的缓冲液的体积。

[0080] 本发明所述组合物可以在较宽温度范围下长时间稳定病毒载体。在具体实施方案中,组合物包含病毒载体和有效量的海藻糖以在约20°C、约10°C、约4°C、约0°C、约-5°C、约-10°C、约-20°C、约-30°C、约-40°C、约-50°C、约-60°C、约-70°C、约-80°C,或任意中间温度下长时间稳定病毒载体。在某些实施方案中,病毒载体稳定长达至少约24小时、至少约48小时、至少约72小时、至少约96小时、至少约1周、至少约2周、至少约3周、至少约1个月、至少约2个月、至少约3个月、至少约4个月、至少约5个月、至少约6个月、至少约1年、至少约2年或更久或任意时间段。本领域技术人员明白在具体实施方案中测定组合物的稳定性时可以采用高于和低于所列温度的温度以及比所列时间段更短和更长的时间段。

[0081] 本发明所述组合物在冷冻和解冻载体之后稳定病毒载体。在一个实施方案中,组合物在本发明公开的各种温度下(例如,-20°C、-60°C、-70°C、-80°C等)稳定病毒载体长达1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个冻融周期。在另一个实施方案中,组合物使病毒载体稳定时间超过11个冻融周期。在另一个实施方案中,组合物使病毒载体稳定时间超过20个冻融周期。

[0082] 在各种实施方案中,组合物包含一种或多种抗氧化剂,诸如硫代硫酸钠、抗坏血酸、柠檬酸和柠檬酸钠。如果使用抗氧化剂,其可以本领域公知的有用量存在。

[0083] 在一些实施方案中,组合物包含其他可用作干燥剂和/或渗透调节剂(诸如甲醇、乙醇、甘油和DMSO)的组分。这些组分易于减少保存的病毒载体组合物中的残留水分或平衡渗透应力,从而在某些情况下可实现更好的储存能力。在某些实施方案中,组合物包含蛋白

质,诸如人血清白蛋白或牛血清白蛋白。

[0084] 在具体实施方案中,组合物包含有效稳定病毒载体量的海藻糖。此处所用术语“量”是指为实现目的所用的海藻糖或其衍生物的“有效的量”或“有效量”。

[0085] 在某些实施方案中,药物组合物可以包含缓冲液,诸如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等;碳水化合物,诸如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或葡聚糖、甘露醇;蛋白质;多肽或氨基酸,诸如甘氨酸;抗氧化剂;螯合剂,诸如EDTA或谷胱甘肽;佐剂(例如,氢氧化铝);和防腐剂。本发明所述组合物还可以配制以用于肠胃外给药,例如血管内(静脉内或动脉内)、腹膜内或肌肉内给药。可注射的药物组合物优选为无菌的。

[0086] 包含病毒载体的水性组合物可以通过在体内直接注射到需要基因疗法的受试者的细胞、组织或器官中的方式给药。在各种其它实施方案中,细胞经包含稳定病毒载体的本发明所述组合物在体外或离体转导,并任选地离体扩增。然后将转导的细胞施用于需要基因疗法的受试者。

[0087] E. 病毒载体

[0088] 在各种实施方案中,本发明所述组合物包含有效量的海藻糖或其衍生物以储存或稳定病毒载体。可由本发明所述组合物稳定的载体的示例性类型包括但不限于腺病毒、腺相关病毒、逆转录病毒等。

[0089] 1. 腺病毒

[0090] “腺病毒载体”是指含有足以(a)支持构建体的包装和(b)表达以有义或反义方向克隆到其中的多核苷酸的腺病毒序列的构建体。重组腺病毒载体包含基因工程形式的腺病毒。对36kb的线性双链DNA病毒的腺病毒的遗传组织的了解允许用高达7kb的外源序列取代大片腺病毒DNA(Grunhaus&Horwitz,1992)。与逆转录病毒相反,宿主细胞的腺病毒感染不会导致染色体整合,这是因为腺病毒DNA可以以游离基因的方式复制而没有潜在的遗传毒性。此外,腺病毒具有结构稳定性,并且在广泛扩增后没有检测到基因组重组的情况。无论其细胞周期阶段如何,腺病毒可以感染几乎所有的上皮细胞。到目前为止,腺病毒感染似乎仅与轻度疾病(诸如人类急性呼吸道疾病)有关。

[0091] 腺病毒因其中等大小的基因组、易于处理、高滴度、宽靶向细胞范围和高感染性的特点,尤其适合用作基因转移载体。病毒基因组的两端均含有100至200个碱基对反向重复序列(ITRs),它们是病毒DNA复制和包装所必需的顺式要素。基因组的早期(E)和晚期(L)区含有不同的转录单位,所述转录单位是以病毒DNA开始复制为分界线。E1区(E1A和E1B)编码负责调控病毒基因组转录和少数细胞基因的蛋白质。E2区(E2A和E2B)的表达导致用于病毒DNA复制的蛋白质的合成。这些蛋白质参与DNA复制、晚期基因表达和宿主细胞关闭(Renan,1990)。晚期基因的产物(包括大多数病毒衣壳蛋白)仅在主要晚期启动子(MLP)发出的单个初级转录物大量处理之后才被表达。MLP(位于16.8m.u.)在感染后期特别有效,并且从该启动子发出的所有mRNA都具有使其成为优选翻译的mRNA的5'-三联体前导序列(TPL)。

[0092] 在当前系统中,重组腺病毒产自穿梭载体和前病毒载体之间的同源重组。由于两个前病毒载体之间可能发生重组,因此野生型腺病毒可能在此过程中产生。因此,从个体斑块中分离出单个病毒克隆并检查其基因结构至关重要。

[0093] 有复制缺陷的当前腺病毒载体的产生和增殖取决于命名为293的唯一的辅助细胞系,其通过Ad5 DNA片段由人胚胎肾细胞转化并结构性地表达E1蛋白(Graham等,1977)。由

于E3区对于腺病毒基因组是非必需的 (Jones&Shenk,1978),所以当前的腺病毒载体在293细胞的帮助下将外源DNA携带到E1,D3或这两个区域 (Graham&Prevec,1991)。实质上,腺病毒可以包装大约105%的野生型基因组 (Ghosh-Choudhury等,1987),提供约2个额外kB的DNA。与在E1和E3区可替代的约5.5kB的DNA相结合,当前腺病毒载体的最大容量小于7.5kB,或约为载体总长度的15%。超过80%的腺病毒基因组留在载体骨架中,并且是载体传播细胞毒性的来源。此外,E1缺失病毒的复制缺陷是不完整的。例如,目前可用的载体已经观察到病毒基因表达以高感染复数(MOI)泄漏 (Mulligan,1993)。

[0094] 辅助细胞系可来源于人类细胞,诸如人类胚胎肾细胞、肌肉细胞、造血细胞或其他人胚胎间充质或上皮细胞。或者,辅助细胞可来源于受纳人腺病毒的其它哺乳动物物种的细胞。这类细胞包括,例如,Vero细胞或其他猴胚胎间充质或上皮细胞。如上所述,目前优选的辅助细胞系是293。

[0095] 最近,Racher等人(1995)公开了用于培养293细胞和增殖腺病毒的改良方法。在一种形式中,天然细胞聚集体通过将个体细胞接种到含有100至200mL培养基的1升硅化旋转瓶中而生长 (Techne,英国剑桥)。接着在40rpm转速下搅拌,然后用台盼蓝估计细胞活力。在另一种形式中,Fibra-Cel微载体 (Bibby Sterlin,英国斯通) (5g/1)的用法如下。将重悬于5mL培养基中的细胞接种物加入到250mL厄伦美式锥形瓶中的载体(50mL)中并静置(偶尔搅拌)1至4小时。然后用50mL新鲜培养基代替原来的培养基并摇晃。对于病毒生产,允许细胞生长至约80%融合,然后置换培养基(至最终体积的25%),在MOI为0.05时加入腺病毒。将培养物静置过夜,然后体积增加至100%,再摇晃72小时。

[0096] 除了腺病毒载体有复制缺陷或至少有条件缺陷的要求之外,腺病毒载体的性质对于具体实施方案的成功实践不是至关重要的。腺病毒可以是42种不同的已知血清型或亚组A-F中的任一种。由于5型腺病毒是大量生物化学和遗传信息已知的人腺病毒并且历来被用于大多数使用腺病毒作为载体的构建体,因此,为了获得用于具体实施方案中使用的条件复制缺陷型腺病毒载体,亚组C的5型腺病毒是优选的原料。

[0097] 如上所述,典型的载体是复制缺陷型的且不具有腺病毒E1区。因此,在除去E1编码序列的位置引入编码目标基因的多核苷酸是最方便的。然而,在腺病毒序列内插入构建体的位置并不重要。编码目标基因的多核苷酸也可以插入E3置换型载体中以取代缺失的E3区,如Karlsson等人(1986)所述,或插入辅助细胞系或辅助病毒补充E4缺陷的E4区。

[0098] 腺病毒易于生长和处理,并在体外和体内表现出广谱宿主性。这组病毒可以高滴度获得,例如每毫升 10^9 - 10^{11} 噬菌斑形成单位,并且它们具有高度传染性。腺病毒的生命周期不需要整合到宿主细胞基因组中。腺病毒载体递送的外源基因是游离基因,因此对宿主细胞的遗传毒性低。在野生型腺病毒接种疫苗的研究中并没有报道副作用 (Couch等人,1963;Top等人,1971),这证明了它们作为体内基因转移载体的安全性和治疗潜力。

[0099] 腺病毒载体已用于真核基因表达 (Levrero等,1991;Gomez-Foix等人,1992)和疫苗开发 (Grunhaus&Horwitz,1992;Graham&Prevec,1992)。最近,动物研究表明,重组腺病毒可用于基因疗法 (Stratford-Perricaudet&Perricaudet,1991;Stratford-Perricaudet等人,1990;Rich等人,1993)。对不同组织施用重组腺病毒的研究包括气管滴注法 (Rosenfeld等人,1991;Rosenfeld等人,1992)、肌肉注射 (Ragot等人,1993)、外周静脉注射 (Herz&Gerard,1993)和立体定向接种到大脑 (Le Gal La Salle等人,1993)。

[0100] 2. 腺相关病毒

[0101] AAV (Ridgeway, 1988; Hermonat & Muzyczka, 1984) 是一种细小病毒, 它是作为腺病毒群的污染物被发现的。它是一种普遍存在的病毒 (抗体存在于85%的美国人口), 并没有与任何疾病相关联。它也被归类为依赖病毒, 因为其复制依赖于辅助病毒, 诸如腺病毒的存在。已经分离出各种血清型, 其中AAV-2是最好的表征。AAV具有被包裹在衣壳蛋白VP1、VP2和VP3中的单链线性DNA, 以形成直径为20至24nm的二十面体病毒粒子 (Muzyczka & McLaughlin, 1988)。

[0102] AAV DNA的长度约为4.7千碱基, 其包含两个开放阅读框, 两侧有两个ITR。AAV基因组中有两个主要基因: rep和cap。rep基因编码负责病毒复制的蛋白质, 而cap编码衣壳蛋白VP1-3。每个ITR形成一个T形发夹结构。这些末端重复序列是染色体整合的AAV唯一必需的顺式组分。因此, AAV可作为载体且所有病毒编码序列被递送基因盒除去且替代。已经鉴定出三种病毒启动子, 并根据其图谱位置命名为p5、p19和p40。来自p5和p19的转录导致rep蛋白的产生, 而p40的转录产生衣壳蛋白 (Hermonat和Muzyczka, 1984)。

[0103] 有几个因素促使研究人员研究使用rAAV作为表达载体的可能性。一个是递送基因以整合到宿主染色体中的要求令人惊讶的少。必须具有145-bp的ITR, 其仅占AAV基因组的6%。这在载体中留下了空间以装配4.5-kb的DNA插入物。虽然这种携带能力可以防止AAV递送大基因, 但其非常适合递送反义构建体。

[0104] 由于其安全性, AAV也是递送载体的良好选择, 即基因工程 (重组) 不整合到宿主基因组中。有一个相对复杂的救援机制: 不仅需要野生型腺病毒, 还需要AAV基因来集合rAAV。同样, AAV是非致病性的, 与任何疾病无关。病毒编码序列的去除使得对病毒基因表达的免疫反应最小化, 因此, rAAV不引起炎症反应。

[0105] 其他病毒载体可用作将寡核苷酸或多核苷酸序列递送至宿主细胞的表达构建体。可以使用来自诸如痘苗病毒 (Ridgeway, 1988; Coupar等人, 1988) 脊髓灰质炎病毒和疱疹病毒等病毒的载体。它们为各种哺乳动物细胞提供了几个有吸引力的特征 (Friedmann, 1989; Ridgeway, 1988; Coupar等人, 1988; Horwich等人, 1990)。

[0106] 随着对缺陷型乙型肝炎病毒的认识不断加深, 对不同病毒序列的结构-功能关系有了新的见解。体外研究表明, 尽管其基因组缺失高达80%, 但病毒仍然可以保留辅助依赖性包装和逆转录的能力 (Horwich等人, 1990)。这表明大部分基因组可以用外源遗传物质代替。嗜肝性和持久性 (整合) 是肝定向基因转移特别有吸引力的性质。Chang等人 (1991) 将氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 基因引入鸭乙型肝炎病毒基因组中以代替聚合酶、表面和前表面编码序列。其与野生型病毒共转染到禽肝细胞系中。使用含有高滴度重组病毒的培养基感染原代鸭肝细胞。在转染至少24天后可以检测到稳定的CAT基因表达 (Chang等人, 1991)。

[0107] 3. 逆转录病毒

[0108] 逆转录病毒是基因递送的常用工具 (Miller.《自然 (Nature)》第357期: 第455-460页, 2000)。在具体实施方案中, 逆转录病毒用于将编码嵌合抗原受体 (CAR) 的多核苷酸递送至细胞。此处所用术语“逆转录病毒”是指将其基因组RNA逆转录为线性双链DNA拷贝并随后将其基因组DNA共价整合到宿主基因组中的RNA病毒。一旦被整合到宿主基因组中, 病毒就被称为“前病毒”。前病毒用作RNA聚合酶II的模板并引导编码产生新的病毒颗粒所需的结构蛋白和酶的RNA分子的表达。

[0109] 适用于具体实施方案的示例性逆转录病毒包括但不限于：莫洛尼鼠白血病毒(M-MuLV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒(MoMSV)、哈维鼠肉瘤病毒(HaMuSV)、鼠乳腺肿瘤病毒(MuMTV)、长臂猿白血病毒(GaLV)、猫白血病毒(FLV)、泡沫病毒、弗云德鼠白血病毒、鼠干细胞病毒(MSCV)和劳斯氏肉瘤病毒(RSV)以及慢病毒。

[0110] 此处所用术语“慢病毒”是指一组(种)复合逆转录病毒。示例性慢病毒包括但不限于：HIV(人免疫缺陷病毒,包括1型HIV和2型HIV);维斯纳梅迪病毒(VMV);山羊关节炎脑炎病毒(CAEV);马传染性贫血病毒(EIAV);猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);和猴免疫缺陷病毒(SIV)。在一个实施方案中,优选基于HIV的载体骨架(即,HIV顺式作用序列元件)。在具体实施方案中,慢病毒用于将包含MND启动子并编码CAR的多核苷酸递送至细胞。

[0111] 逆转录病毒载体,尤其是慢病毒载体可用于实践具体实施方案。因此,此处所用术语“逆转录病毒”或“逆转录病毒载体”意味着分别包括“慢病毒”和“慢病毒载体”。

[0112] 此处所用术语“载体”指能够转移或转运另一种核酸分子的核酸分子。转移的核酸通常与载体核酸分子相连,例如插入。载体可以包括在细胞中引导自主复制的序列,或者可以包括足以整合入宿主细胞DNA的序列。有用的载体包括,例如,质粒(如DNA质粒或RNA质粒)、转座子、粘粒、细菌人造染色体和病毒载体。有用的病毒载体包括,例如,复制缺陷型逆转录病毒和慢病毒。

[0113] 本领域技术人员明白,术语“病毒载体”广泛用于指包括病毒源核酸元件(通常促进核酸分子的转移或整合到细胞的基因组)的核酸分子(例如,转移质粒),或着指指导核酸转移的病毒颗粒。病毒颗粒一般包括各种病毒组分,并且有时还包括除核酸外的宿主细胞组分。

[0114] 术语病毒载体可以指能够将核酸转移到细胞中的病毒或病毒颗粒,或者指转移的核酸本身。病毒载体和转移质粒含有主要来源于病毒的结构和/或功能遗传因子。术语“逆转录病毒载体”是指含有主要来源于逆转录病毒的结构和功能遗传因子或其一部分的病毒载体或质粒。术语“慢病毒载体”是指含有主要来源于慢病毒的结构和功能遗传因子或其一部分(包括LTR)的病毒载体或质粒。术语“嵌合型载体”是指含有逆转录病毒(如慢病毒)序列和非慢病毒序列的载体、LTR或其他核酸。在一个实施方案中,嵌合型载体是指包含逆转录、复制、整合和/或包装的逆转录病毒(如慢病毒)序列的载体或转移质粒。

[0115] 在具体实施方案中,术语“慢病毒载体”和“慢病毒表达载体”可用于指慢病毒转移质粒和/或感染性慢病毒颗粒。此处提及了元件,诸如克隆位点、启动子、调控元件、异源核酸等,应当理解,这些元件的序列以RNA形式存在于慢病毒颗粒中并以DNA形式存在于DNA质粒中。

[0116] 前病毒的每一端都是称为“长末端重复序列”或“LTR”的结构。术语“长末端重复序列(LTR)”是指位于逆转录病毒DNA末端的碱基对的结构域,其在自然序列的情况下直接重复并包含U3、R和U5区。LTR通常提供对逆转录病毒基因的表达(例如,基因转录的促进、启动和多聚腺苷酸化)和对病毒复制很重要的功能。LTR含有许多调控信号,包括转录控制元件、多聚腺苷酸化信号和病毒基因组复制和整合所需的序列。病毒LTR分为三个区,即U3、R和U5。U3区包含增强子和启动子元件。U5区是引物结合位点和R区之间的序列,并含有多聚腺苷酸化序列。R(重复序列)区的两侧是U3和U5区。LTR由U3、R和U5区组成,并出现在病毒基因

组的5'和3'两端。与5'LTR相邻的是基因组的逆转录(tRNA引物结合位点)和将病毒RNA有效地包装成颗粒(Psi位点)所必需的序列。

[0117] 此处所用术语“包装信号”或“包装序列”是指位于病毒RNA插入病毒衣壳或颗粒所需的逆转录病毒基因组内的序列(参见,例如Clever等人,1995《病毒学杂志(Journal of Virology)》,第69卷第4期;第2101-2109页)。几种逆转录病毒载体使用病毒基因组的壳化所需的最小包装信号(也称为psi[Ψ]序列)。因此,此处所用术语“包装序列”、“包装信号”、“psi”和符号“Ψ”用于指代在病毒颗粒形成期间对逆转录病毒RNA链进行壳化所需的非编码序列。

[0118] 在各种实施方案中,载体包含改性的5'LTR和/或3'LTR。任何一个LTR或两个LTR可以包括一个或多个修饰,所述修饰包括但不限于一个或多个缺失、插入或替换。3'LTR的修饰通常是通过使病毒具有复制缺陷来改善慢病毒或逆转录病毒系统的安全性。此处所用术语“复制缺陷”是指不能完全、有效地复制以致于不能产生感染性病毒粒子的病毒(例如,复制缺陷型慢病毒后代)。术语“复制能力”是指能够复制以便病毒的病毒复制能够产生感染性病毒粒子的野生型病毒或突变型病毒(例如,复制型慢病毒后代)。

[0119] “自失活”(SIN)载体是指复制缺陷型载体,例如逆转录病毒或慢病毒载体,其中右(3')LTR增强子-启动子区(称为U3区)已被修饰(例如,缺失或替代)以防止第一轮病毒复制以外的病毒转录。这是因为在病毒复制期间,右(3')LTR U3区用作左(5')LTR U3区的模板,因此,不能在缺少U3增强子-启动子的情况下制备病毒转录物。在另一个实施方案中,3'LTR被修饰,使得U5区被替换,例如以理想的poly(A)序列。应当注意,具体实施方案中还包括对LTR的修改,诸如对3'LTR、5'LTR或3'LTR和5'LTR两者的修改。

[0120] 病毒颗粒生产期间,用异源启动子取代5'LTR的U3区来推动病毒基因组的转录提供了额外的安全强化。可以使用的异源启动子的实例包括,例如,病毒性猴病毒40(SV40)(例如早期或晚期)、巨细胞病毒(CMV)(例如即刻早期)、莫洛尼鼠白血病毒(MoMLV)、劳斯氏肉瘤病毒(RSV)和单纯疱疹病毒(HSV)(胸苷激酶)启动子。典型的启动子能够以Tat非依赖性的方式促进高水平的转录。由于在病毒生产系统中没有完整的U3序列,所以这种置换降低重组产生复制型病毒的可能性。在某些实施方案中,异源启动子在控制病毒基因组转录方式方面具有额外的优点。例如,异源启动子可以是可诱导的,使得只有当诱导因子存在时才会发生全部或部分病毒基因组的转录。诱导因子包括但不限于培养宿主细胞的一种或多种化合物或生理条件,诸如温度或pH。

[0121] 在一些实施方案中,病毒载体包含TAR因子。术语“TAR”是指位于慢病毒(例如HIV)LTR的R区的“反式激活反应”遗传因子。该因子与慢病毒反式激活剂(tat)遗传因子相互作用以增强病毒复制。然而,在5'LTR的U3区被异源启动子替代的实施方案中不需要该因子。

[0122] “R区”是指始于封端基团开始(即开始转录)且止于poly(A)片段一开始之前的逆转录病毒LTR内的区域。R区也被定义为侧面与U3和U5区相连。R区在逆转录过程中起到将新生DNA从基因组的一端转移到另一端的作用。

[0123] 此处所用术语“FLAP因子”是指其序列包括逆转录病毒例如HIV-1或HIV-2的中枢多巴胺序列和中枢终止序列(cPPT和CTS)的核酸。美国专利第6,682,907号和Zennou等人在《细胞(Ce11)》,第101期(2000)第173页描述了合适的FLAP因子。在HIV-1逆转录过程中,中枢多巴胺序列(cPPT)的正链DNA的中心起点和中枢终止序列(CTS)的中心终点形成三链DNA

结构:HIV-1中枢DNA活瓣。尽管不愿意受制于任何理论,但DNA活瓣可以作为慢病毒基因组核输入的顺式活性决定因子和/或可以增加病毒滴度。在具体实施方案中,逆转录病毒载体或慢病毒载体骨架包含在载体中目标异源基因的上游或下游的一个或多个FLAP因子。例如,在具体实施方案中,转移质粒包含FLAP因子。在一个实施方案中,载体包含与HIV-1分离的FLAP因子。

[0124] 在一个实施方案中,逆转录病毒或慢病毒转移载体包含一个或多个输出元件。术语“输出元件”是指顺式活性的转录后调控因子,其调节RNA转录物从细胞核到细胞的细胞质的转运。RNA输出元件的实例包括但不限于人免疫缺陷病毒(HIV)转录反应因子(RRE)(参见,例如,Cullen等人,《病毒学杂志(Journal of Virology)》1991,第65期:第1053页;和Cullen等人,1991《细胞》,第58期:第423页)和乙型肝炎病毒转录后调控因子(HPRE)。通常, RNA输出元件位于基因的3'UTR内,并且可以作为一个或多个拷贝插入。

[0125] 在具体实施方案中,通过将转录后调控元件、有效的多腺苷酸化位点和任选的转录终止信号并入载体来增加病毒载体中异源序列的表达。各种转录后调控元件可以增加蛋白质上的异源核酸的表达,例如转基因调控因子(WPRE;Zufferey等人,1999,《病毒学杂志(Journal of Virology)》,第73期:第2886页);乙型肝炎病毒(HPRE)中的转录后调控元件(Huang等人,《分子与细胞生物学(Molecular And Cellular Biology)》,第5期:第3864页);(Liu等人,1995,《基因与发育(Genes&Development)》,第9期:第1766页)。在具体实施方案中,载体包含转录后调控元件,例如WPRE或HPRE。

[0126] 在具体实施方案中,载体缺乏或不包含转录后调控元件,例如WPRE或HPRE,因为在一些情况下,这些元件增加细胞转化的风险和/或不会显著增加mRNA转录物的量或增加mRNA稳定性。因此,在一些实施方案中,载体缺乏或不包含作为附加安全措施的WPRE或HPRE。

[0127] 引导异源核酸转录物的有效终止和多聚腺苷酸化的元件增加异源基因的表达。转录终止信号通常发现于聚腺苷酸化信号的下游。在具体实施方案中,载体包含编码待表达的多肽的多核苷酸的多聚腺苷酸化序列3'。此处所用术语“poly(A)位点”或“poly(A)序列”表示通过RNA聚合酶II引导新生RNA转录物的终止和多聚腺苷酸化的DNA序列。多聚腺苷酸化序列可以通过在编码序列的3'端加入poly(A)尾促进mRNA的稳定性,从而有助于提高翻译效率。重组转录物的高效多聚腺苷酸化是令人满意的,因为缺少poly(A)尾的转录物不稳定并且降解迅速。可以在载体中使用的poly(A)信号的示例包括理想的poly(A)序列(例如AATAAA、ATTA AAA、AGTAAA)、牛生长激素poly(A)序列(BGHpA)、兔 β -球蛋白poly(A)序列(r β gpA)或本领域已知的另一种合适的异源或内源poly(A)序列。

[0128] 在某些实施方案中,逆转录病毒或慢病毒载体进一步包括一个或多个绝缘子元件。绝缘子元件可能有助于从整合位点效应保护表达慢病毒的序列,例如治疗性多肽,整合位点效应可以由存在于基因组DNA中的顺式作用元件介导并导致转移序列的失调表达(即位置效应;参见,例如,Burgess-Beusse等人,2002,《美国国家科学院研究期刊(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》,第99期:第16433页;和Zhan等人,2001,《人类遗传学(Human Genetics)》,第109期:第471页)。在一些实施方案中,转移载体在3'LTR位点包含一个或多个绝缘子元件,并且在将前病毒整合到宿主基因组中之后,前病毒包括通过复制3'LTR在5'LTR和3'LTR两个位

点的一个或多个绝缘子元件。用于具体实施方案的合适的绝缘子包括但不限于鸡 β -球蛋白绝缘子(参见Chung等人,1993,《细胞(Cell)》第74期:第505页;Chung等人,1997,《美国国家科学院研究期刊(Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》第94期:第575页;和Bell等人,1999,《细胞(Cell)》第98期:第387页,通过引用并入本文)。绝缘子元件的实例包括但不限于来自 β 球蛋白基因座的绝缘子,例如鸡HS4。

[0129] 根据某些具体实施方案,大多数或全部病毒载体骨架序列衍生自慢病毒,例如HIV-1。然而,应当理解,可以使用或组合使用许多不同来源的逆转录病毒和/或慢病毒序列,并且可以适应某些慢病毒序列的多个取代和改变而不损削弱转移载体执行本文所述功能的能力。此外,本领域已知的各种慢病毒载体可参见Naldini等人(1996a,1996b和1998);Zufferey等人,(1997);Dull等人,1998,美国专利第6,013,516号和第5,994,136号,其中许多适于产生病毒载体或转移质粒。

[0130] 在一个实施方案中,载体包括至少一种经修饰或未经修饰的逆转录病毒LTR,例如慢病毒LTR、 β -珠蛋白启动子和可操作地连接目标多核苷酸的 β -珠蛋白基因座控制区(LCR),例如编码珠蛋白多肽。LTR的合适修饰包括但不限于:用异源启动子替换5'LTR,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、劳斯氏肉瘤病毒(RSV)启动子、胸苷激酶启动子或猴病毒40(SV40)启动子;以及如本文其他部分所述的3'LTR的一个或多个修饰、添加和/或删除。

[0131] 在一个具体实施方案中,使用人 β 珠蛋白启动子、包含人源 β 珠蛋白LCR的DNA酶I过敏位点2、3和4中的一种或多种的 β -珠蛋白LCR和/或人 β -珠蛋白3'增强子元件来实现多核苷酸的红细胞特异性表达。

[0132] 在各种实施方案中,载体包含一种或多种选自由以下因子所组成的群组:Psi包装序列(Ψ +)、中枢多巴胺/DNA活瓣(cPPT/FLAP)、逆转录病毒输出元件、转录后调控元件、一个或多个绝缘子元件、多聚腺苷酸化序列、可选标记,以及如本文其他部分所述的细胞自杀基因。

[0133] 在各种实施方案中,载体包含可操作地连接编码治疗血红蛋白病的多肽的基因的造血细胞中的启动子。载体可以具有一个或多个LTR,其中每个LTR包含一个或多个修饰,诸如一个或多个核苷酸替代、添加或缺失。载体可以进一步包括一个或多个附加元件以增加转导效率(例如,cPPT/FLAP)、病毒包装(例如,Psi(Ψ)包装信号、RRE),和/或增加治疗基因表达的其他元件(例如poly(A)序列)。

[0134] 在一个实施方案中,载体包含左(5')逆转录病毒LTR、Psi包装序列(Ψ +)、中枢多巴胺/DNA活瓣(cPPT/FLAP)、逆转录病毒输出元件、 β -珠蛋白启动子、 β -球蛋白基因座控制区(LCR)和任选地可操作连接目标多核苷酸的3' β -珠蛋白增强子元件和包含一个或多个绝缘子元件或多聚腺苷酸化序列的右(3')逆转录病毒LTR。

[0135] 在具体实施方案中,载体是慢病毒载体,其包括左(5')HIV-1LTR、Psi包装序列(Ψ +)、HIV-1中枢多巴胺片段/DNA活瓣(cPPT/FLAP)、转录反应因子(RRE)、 β -球蛋白启动子、 β -珠蛋白基因座控制区(LCR)和任选的可操作连接目标多核苷酸的3' β -珠蛋白增强子元件和包含一个或多个绝缘子元件的右(3')逆转录病毒LTR以及兔 β -球蛋白poly(A)序列(r β gpA)。

[0136] 在各种实施方案中,载体包含可操作地连接编码治疗肾上腺脑白质营养不良和/

或肾上腺皮质神经病的多肽的基因的小胶质细胞中的启动子。载体可以具有一个或多个LTR,其中每个LTR包含一个或多个修饰,诸如一个或多个核苷酸替代、添加或缺失。载体可以进一步包括一个或多个附加元件以增加转导效率(例如,cPPT/FLAP)、病毒包装(例如,Psi(Ψ)包装信号、RRE)和/或增加治疗基因表达的其它元件(如poly(A)序列)。

[0137] 在具体实施方案中,载体包括左(5′)逆转录病毒LTR;中枢多巴胺片段/DNA活瓣(cPPT/FLAP);逆转录病毒输出元件;可操作地连接编码ATP结合盒、亚族D、成员1(ABCD1)多肽的多核苷酸且在小胶质细胞中活化的启动子;和右(3′)逆转录病毒LTR。

[0138] 在某一实施方案中,载体是慢病毒载体,其包含:左(5′)HIV-1LTR;Psi(Ψ)包装信号;cPPT/FLAP;RRE;可操作地连接编码人源ABCD1多肽的多核苷酸的MND启动子;右(3′)自灭活(SIN)HIV-1LTR;和兔 β -珠蛋白聚腺苷酸化序列。

[0139] 在各种实施方案中,载体包括可操作地连接编码CAR多肽的多核苷酸的启动因子。载体可以具有一个或多个LTR,其中每个LTR包含一个或多个修饰,诸如一个或多个核苷酸替代、添加或缺失。载体可以进一步包括一个或多个附加元件以增加转导效率(例如,cPPT/FLAP)、病毒包装(例如,Psi(Ψ)包装信号、RRE)和/或增加治疗基因表达的其它元件(如poly(A)序列),并且可以任选地包含WPRE或HPRE。

[0140] 在具体实施方案中,转移载体包含左(5′)逆转录病毒LTR;中枢多巴胺片段/DNA活瓣(cPPT/FLAP);逆转录病毒输出元件;可操作地连接本文所述编码CAR多肽的多核苷酸可的MND启动子;和右(3′)逆转录病毒LTR;以及任选的WPRE或HPRE。

[0141] 在具体实施方案中,转移载体包含左(5′)逆转录病毒LTR;逆转录病毒输出元件;可操作地连接本文所述编码CAR多肽的多核苷酸的MND启动子;右(3′)逆转录病毒LTR;和poly(A)序列;以及任选的WPRE或HPRE。在另一个具体实施方案中,慢病毒载体包括:左(5′)LTR;cPPT/FLAP;RRE;可操作地连接本文所述编码CAR多肽的多核苷酸的MND启动子;右(3′)LTR;和多聚腺苷酸化序列;以及任选的WPRE或HPRE。

[0142] 在某一实施方案中,慢病毒载体包含:左(5′)HIV-1 LTR;Psi(Ψ)包装信号;cPPT/FLAP;RRE;可操作地连接本文所述编码CAR多肽的多核苷酸的MND启动子;右(3′)自灭活(SIN)HIV-1LTR;和兔 β -珠蛋白聚腺苷酸化序列;以及任选的WPRE或HPRE。

[0143] 在另一个实施方案中,载体包含:至少一个LTR;中枢多巴胺/DNA瓣(cPPT/FLAP);逆转录病毒输出元件;和可操作地连接本文所述编码CAR多肽的多核苷酸的MND启动子;以及任选的WPRE或HPRE。

[0144] 在具体实施方案中,载体包含至少一个LTR;cPPT/FLAP;RRE;可操作地连接本文所述编码CAR多肽的多核苷酸的MND启动子;和多聚腺苷酸化序列;以及任选的WPRE或HPRE。

[0145] 在某一实施方案中,载体包含至少一种SIN HIV-1LTR;Psi(Ψ)包装信号;cPPT/FLAP;RRE;可操作地连接本文所述编码CAR多肽的多核苷酸的MND启动子;和兔 β -珠蛋白聚腺苷酸化序列;以及任选的WPRE或HPRE。

[0146] 在一个具体实施方案中,载体包括编码归巢内切酶、类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)、锌指核酸酶(ZFN)、II型规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)相关的(Cas9)核酸酶,或megaTAL核酸酶的多核苷酸序列。

[0147] 本领域技术人员将理解,可以从现有实施方案形成许多其它不同的实施方案。

[0148] 可以通过本领域已知的技术产生具有数百万转导单位/毫升(TU/mL)的滴度的重

组病毒。超离心后,可以获得约108TU/mL、109TU/mL、1010TU/mL、1011TU/mL、1012TU/mL或约1013TU/mL的浓缩原液。

[0149] 病毒可用于在体内、离体或体外使用本领域熟知的技术感染细胞。例如,当细胞(如CD34+细胞、树突状细胞、外周血细胞或干细胞)离体转导时,载体颗粒可以与细胞一起培养,使用剂量通常为1至50倍感染复数(MOI),其也对应于每105个细胞的病毒载体的 1×10^5 至 50×10^5 个转导单位。这当然包括对应于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45和50MOI的载体量。

[0150] 病毒也可以通过直接注射到需要治疗的细胞、组织或器官中而在体内给予受试者。直接注射需要约1至50倍的感染复数(MOI),其也对应于每105个细胞的病毒载体的 1×10^5 至 50×10^5 转导单位。

[0151] 也可以根据病毒滴度(TU/mL)递送病毒,病毒滴度可以通过,例如,市售的p24滴度试验进行测定,其是针对p24病毒外壳蛋白的ELISA。以下公式可用于计算p24的pg/mL:每颗慢病毒的物理粒子(PP)大约有2000个p24分子: $(2 \times 10^3) \times (\text{每PP的p24的} 24 \times 10^3 \text{Da})$, $48 \times 10^6 / \text{Avogadro} = (48 \times 10^6) / (6 \times 10^{23}) = 8 \times 10^{-17} \text{g p24/PP}$, 每 $1 \times 10^{-16} \text{g p24}$ 约1PP, 每pg p24为 1×10^4 PP。包装相当好的VSV-G假型慢病毒载体的感染指数在1TU/1000物理颗粒(PP)至1TU/100PP(或更少)范围内。因此,该范围约为p24的10至100TU/pg。正是通过这种转化才获得TU/mL。

[0152] 根据以前的经验,直接注射的病毒量取决于总TU,并随着可以注射到位点的体积和待注射组织的类型而变化。例如,大脑注射位点可能仅允许注射非常小体积的病毒,因此优选高滴度制剂,每次注射可使用约 1×10^6 至 1×10^7 、约 1×10^6 至 1×10^8 、 1×10^6 至 1×10^9 、约 1×10^7 至 1×10^{10} 、 1×10^8 至 1×10^{11} 、约 1×10^8 至 1×10^{12} 或约 1×10^{10} 至 1×10^{12} 或更高TU。然而,全身给药法可以容纳更大的TU,可以递送 1×10^8 、 1×10^9 、 1×10^{10} 、 1×10^{11} 、 1×10^{12} 、 1×10^{13} 、 1×10^{14} 或 1×10^{15} 的量。

[0153] F. 工程T细胞受体

[0154] 在各种实施方案中,本发明所述组合物包括有效量的海藻糖或其衍生物以储存或稳定编码工程TCR的病毒载体。

[0155] 天然存在的T细胞受体包含两个亚单位,即一个 α -亚单位和一个 β -亚单位,每个亚单位是每个T细胞基因组中由重组事件产生的唯一的蛋白质。TCR的文库经筛选的其对特定靶抗原的活性。以这种方式,对靶抗原具有高亲合力和反应性的天然TCR式被选择、克隆,随后引入到用于过继性免疫疗法的T细胞群中。

[0156] 编码工程TCR的核酸优选与T细胞的(天然存在的)染色体中的天然环境隔离,并且可以并入本文其他部分所述的合适载体中。核酸和包含核酸的载体都可以转移到细胞中,所述细胞优选T细胞。工程TCR的必要实施方案是其对由主要组织相容性复合体(MHC)或类似的免疫成分呈递的肿瘤抗原具有高亲合力。与工程TCR相比,CAR被工程化以MHC非依赖性的方式结合靶抗原。

[0157] 只要连接的附加多肽不干扰 α 链或 β 链形成功能性T细胞受体和MHC依赖性抗原识别的能力,由本发明的核酸编码的蛋白质就可以用连接到本发明的TCR的 α -链或 β -链的氨基末端或羧基末端部分的附加多肽来表达。

[0158] 本发明所述的工程TCR识别的抗原包括但不限于癌抗原(包括在血液瘤和实体瘤

两者上的抗原)。示例性抗原包括但不限于 α -叶酸受体、5T4、 α v β 6整合蛋白、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿AChR、FR α 、GD2、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、存活素、TAG72、TEM、VEGFR2和WT-1。

[0159] G. 嵌合抗原受体

[0160] 在各种实施方案中,本发明所述的组合物包括有效量的海藻糖或其衍生物以储存或稳定编码嵌合抗原受体(CAR)的病毒载体。CAR是将靶抗原(例如肿瘤抗原)的抗体特异性与T细胞受体激活细胞内结构域结合的分子,以产生显示特异性抗肿瘤细胞免疫活性的嵌合蛋白。此处所用术语“嵌合的”描述由部分不同的蛋白质或不同来源的DNA组成。

[0161] 本发明所述的载体包括启动子和编码CAR的多核苷酸。本发明所述的CAR包括结合特异性靶抗原(也称为结合域或抗原特异性结合域)的胞外域、跨膜结构域和细胞内信号结构域。将CAR抗原结合域与其靶抗原在靶细胞的表面上结合从而导致CAR聚集,并向含CAR细胞递送激活刺激。CAR的主要特征是其能够重定向免疫效应细胞特异性,由此引发增殖、细胞因子产生、吞噬作用或分子生成,所述分子可以主要组织相容性(MHC)非依赖性的方式介导表达细胞的靶抗原的细胞死亡,开发单克隆抗体、可溶性配体或细胞特异性共受体的细胞特异性靶向能力。

[0162] 在具体实施方案中,CAR包括结合抗原的胞外域,其包括但不限于抗体或其抗原结合片段、束缚配体,或共受体的胞外域,所述胞外域特异性结合由以下靶抗原所组成的群组: α 叶酸受体、5T4、 α v β 6整合蛋白、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿AChR、FR α 、GD2、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、存活素、TAG72、TEM、VEGFR2和WT-1;一种或多种铰链区或间隔区;跨膜结构域,其包括但不限于来自T细胞受体的 α 或 β 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154和PD-1的跨膜结构域;一种或多种细胞内共刺激信号结构域,其包括但不限于来自TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54 (ICAM)、CD83、CD134 (OX40)、CD137 (4-1BB)、CD278 (ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70的细胞内共刺激信号结构域;以及来自CD3 ζ 或FcR γ 的主信号结构域。

[0163] 示例性的结合域包括但不限于特异性结合靶抗原的抗体或其抗原结合片段。“抗体”是指结合剂,所述结合剂是一种包含至少一个轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽,其特异性识别并结合抗原(诸如肽、脂质、多糖或含有抗原决定簇)的表位,例如免疫细胞识别的这些抗原表位。抗体包括其抗原结合片段,诸如骆驼Ig、Ig NAR、Fab片段、Fab'片段、F(ab)'₂片段、F(ab)'₃片段、Fv、单链Fv抗体(“scFv”)、bis-scFv、(scFv)₂、微抗体、双链抗体、

三链抗体、四链抗体、二硫键稳定性Fv蛋白 (“dsFv”) 和单域抗体 (sdAb、纳米抗体) 以及部分负责抗原结合的全长抗体。所述术语还包括基因工程形式, 例如嵌合抗体 (例如, 人源化鼠抗体)、杂合抗体 (诸如, 双特异性抗体) 及其抗原结合片段。另见皮尔斯目录和手册, 1994-1995 (美国伊利诺斯州罗克福德市Pierce化学品有限公司); Kuby.《免疫学期刊 (Journal of Immunology)》, 第三版, 美国纽约W.H.Freeman&Co., 1997。

[0164] “靶抗原”或“目标靶标抗原”是本发明所述的CAR的结合域所要结合的抗原。在具体实施方案中, 靶抗原是结合域特异性结合的肽、脂质、多糖或核酸的表位。在优选的实施方案中, 抗原是 α 叶酸受体、5T4、 α v β 6整合蛋白、BCMA、B7-H3、B7-H6、CAIX、CD16、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD44、CD44v6、CD44v7/8、CD70、CD79a、CD79b、CD123、CD138、CD171、CEA、CSPG4、EGFR、包括ErbB2 (HER2) 的EGFR家族、EGFRvIII、EGP2、EGP40、EPCAM、EphA2、EpCAM、FAP、胎儿AchR、FR α 、GD2、GD3、磷脂酰肌醇蛋白聚糖3 (GPC3)、HLA-A1+MAGE1、HLA-A2+MAGE1、HLA-A3+MAGE1、HLA-A1+NY-ESO-1、HLA-A2+NY-ESO-1、HLA-A3+NY-ESO-1、IL-11R α 、IL-13R α 2、 λ 、Lewis-Y、 κ 、间皮素、Muc1、Muc16、NCAM、NKG2D配体、NY-ESO-1、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、SSX、存活素、TAG72、TEM、VEGFR2和WT-1多肽。

[0165] 在某些优选的实施方案中, 抗体或片段是人源化的 (诸如人源化单克隆抗体), 其特异性结合肿瘤细胞上的表面蛋白质。“人源化”抗体是包含人骨架区的免疫球蛋白和非人源 (例如小鼠、大鼠或合成物) 免疫球蛋白的一个或多个CDR。

[0166] 在某些实施方案中, 本发明所述的CAR可包括各种结构域之间 (如VH和VL结构域之间) 的连接子残基, 因分子的适当间隔和构造而加入。本发明所述的CAR可以包含一个、两个、三个、四个或五个或多个连接子。在具体实施方案中, 连接子的长度为约1至约25个氨基酸、约5至约20个氨基酸或约10至约20个氨基酸或任意中间长度的氨基酸。在一些实施方案中, 连接子为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个氨基酸长度。

[0167] 示例性的连接子包括甘氨酸聚合物 (G) $_n$; 甘氨酸-丝氨酸聚合物 (G1-5S1-5) $_n$, 其中 n 是至少1、2、3、4或5的整数; 甘氨酸-丙氨酸聚合物; 丙氨酸-丝氨酸聚合物; 和本领域已知的其它柔性连接子。甘氨酸和甘氨酸-丝氨酸聚合物是相对非结构化的, 因此可以用作融合蛋白的结构域之间的中性系链, 诸如本发明所述的CAR。甘氨酸甚至比丙氨酸具有更多的phi-psi空间, 并且比具有较长侧链的残基受到的限制要少得多 (参见Scheraga,《计算化学综述 (Reviews in Computational Chemistry)》111173-142 (1992))。本领域技术人员会认识到, 在具体实施方案中CAR的设计可以包括全部或部分柔性连接子, 以便连接子能包含柔性连接子以及一个或多个赋予较少柔性结构的部分, 以提供期望的CAR结构。

[0168] 其他示例性连接子包括但不限于以下氨基酸序列: GGG; DGGGS (SEQ ID NO:1); TGEKP (SEQ ID NO:2) (参见例如Liu等人,《美国国家科学院研究期刊 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》, 第5525-5530页 (1997)); GGRR (SEQ ID NO:3) (Pomerantz等人, 1995, 同上); (GGGGS) $_n$, 其中 $n=1, 2, 3, 4$ 或5 (SEQ ID NO:4) (Kim等人,《美国国家科学院研究期刊 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, PNAS)》第93期, 第1156-1160页 (1996)); EGKSSGSGSESKVD (SEQ ID NO:5) (Chaudhary等人, 1990,《美国国家科学院院刊 (Proceedings of the National Academy of Sciences)》第87期: 第1066-1070页);

KESGSVSSEQLAQFRSLD (SEQ ID NO:6) (Bird等人,1988,《科学 (Science)》第242期:第423-426页)、GGRRGGGS (SEQ ID NO:7);LRQRDGERP (SEQ ID NO:8);LRQKDGGGSERP (SEQ ID NO:9);LRQKd (GGGS) 2 ERP (SEQ ID NO:10);或者,柔性连接子可以使用能够建模DNA结合位点和肽本身的计算机程序 (Desjarlais&Berg,《美国国家科学院研究期刊 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》第90期:第2256-2260页 (1993),《美国国家科学院研究期刊 (Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America)》第91期:第11099-11103页 (1994)) 或通过噬菌体展示法合理地设计。

[0169] 在具体实施方案中,CAR包括进一步含有可变区连接序列的scFV。“可变区连接序列”是将重链可变区连接到轻链可变区并提供与两个亚结合域的相互作用相容的间隔功能的氨基酸序列,使得得到的多肽保留对作为包含相同轻链和重链可变区的抗体相同的靶分子的特异性亲和力。在一个实施方案中,可变区连接序列是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25或更多个氨基酸长度。在一个具体实施方案中,可变区连接序列包含甘氨酸-丝氨酸聚合物(G1-5S1-5)_n,其中n是至少1、2、3、4或5的整数。在另一个实施方案中,可变区连接序列包含(G4S)₃氨基酸连接子。

[0170] 在具体实施方案中,CAR的结合域紧挨着一个或多个“间隔区”,间隔区指将抗原结合域移出效应细胞表面的区域,以使适当的细胞/细胞接触、抗原结合和激活 (Patel等人,《基因疗法 (Gene Therapy)》,第6期:第412-419页;1999)。间隔区可以是天然的、合成的、半合成的或重组的。在某些实施方案中,间隔区是免疫球蛋白的一部分,其包括但不限于一个或多个重链稳定区,例如CH2和CH3。间隔区可包括天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0171] 在一个实施方案中,间隔区包括IgG1的CH2和CH3。

[0172] CAR的结合域通常紧挨着一个或多个“铰链区”,起到使抗原结合域远离效应细胞表面的作用,以实现适当的细胞/细胞接触、抗原结合和活化。CAR一般包括结合域和跨膜结构域(TM)之间的一个或多个铰链区。铰链区可以是天然的、合成的、半合成的或重组的。铰链区可以包括天然存在的免疫球蛋白铰链区或改变的免疫球蛋白铰链区的氨基酸序列。

[0173] “改变的铰链区”是指(a)具有高达30%氨基酸变化(例如,高达25%、20%、15%、10%或5%氨基酸替代或缺失)的天然存在的铰链区,(b)长度为至少10个氨基酸(例如,至少12、13、14或15个氨基酸)且具有高达30%氨基酸变化(例如,高达25%、20%、15%、10%或5%氨基酸替代或缺失)的天然存在的铰链区的一部分,或(c)包含核心铰链区(可以是4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个,或至少4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个或15个氨基酸长度)的天然存在的铰链区的一部分。在某些实施方案中,天然存在的免疫球蛋白铰链区中的一个或多个半胱氨酸残基可以被一个或多个其它的氨基酸残基(例如一个或多个丝氨酸残基)取替。改变的免疫球蛋白铰链区可选地或另外地具有由另一个氨基酸残基(例如,丝氨酸残基)取替的野生型免疫球蛋白铰链区的脯氨酸残基。

[0174] 适用于此处所述的CAR的其它示例性铰链区包括源自I型膜蛋白,诸如CD8 α 、CD4、CD28和CD7的胞外域的铰链区,其可以是来自这些分子的野生型铰链区,或者可以被更改。在另一个实施方案中,铰链区包含CD8 α 铰链区。

[0175] “跨膜结构域”是CAR融合胞外结合部位和胞内信号结构域并将CAR锚定到免疫效

应细胞的质膜的部位。TM结构域可以是天然的、合成的、半合成的或重组的。TM结构域可以源自,即,包含至少T细胞受体的 α 或 β 链、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 ζ 、CD4、CD5、CD8 α 、CD9、CD16、CD22、CD27、CD28、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD152、CD154和PD-1的跨膜结构域。在一个具体实施方案中, TM结构域是合成的并且主要包括疏水性残基, 诸如亮氨酸和缬氨酸。

[0176] 在一个实施方案中, 此处所述的CAR包括来源于CD8 α 的TM结构域。在另一个实施方案中, 此处所述的CAR包括来源于CD8 α 的TM结构域和短的寡聚或多肽连接子(优选长度在1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸长度之间), 其连接到TM结构域和CAR的细胞内信号域。甘氨酸-丝氨酸连接子提供特别合适的连接子。

[0177] 在具体实施方案中, 此处所述的CAR包含细胞内信号结构域。“细胞内信号结构域”是指参与将有效CAR结合到靶抗原的消息传递到免疫效应细胞内部以引发效应细胞功能(例如活化、细胞因子产生、增殖, 和细胞毒性活性, 包括向CAR结合的靶细胞释放细胞毒性因子, 或者与结合胞外CAR结构域的抗原引起的其它细胞反应)的CAR部分。

[0178] 术语“效应子功能”是指细胞的特有功能。T细胞的效应子功能, 例如, 可以是溶细胞活性或辅助细胞活性, 包括细胞因子分泌。因此, 术语“细胞内信号结构域”是指转导效应子功能信号并引导细胞执行特有功能的蛋白质部位。虽然通常可以使用整个细胞内信号结构域, 但在许多情况下, 不必使用整个结构域。在使用细胞内信号结构域的截短部分的程度上, 只要是转导效应子功能信号, 就可以使用这种截短部分代替整个结构域。术语细胞内信号结构域意在包括足以转导效应子功能信号的细胞内信号结构域的任何截短部分。

[0179] 已知TCR单独生成的信号不足以完全激活T细胞, 还需要辅助或共刺激信号。因此, T细胞活化可以说是由两个不同类型的细胞内信号结构域介导的, 即通过TCR(例如, TCR/CD3复合物)启动抗原依赖性主要活化的主信号结构域和以抗原非依赖性的方式提供辅助或共刺激信号的共同刺激信号结构域。在优选实施方案中, 此处所述的CAR包含细胞内信号结构域, 其包含一个或多个“共刺激信号结构域”和“主信号结构域”。

[0180] 主信号结构域以刺激或抑制的方式调节TCR复合物的主要活化。以刺激方式起作用的主信号结构域包括称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM的信号基序。

[0181] 在具体实施方案中特别使用的含主信号结构域的示例性的ITAM包括来源于FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD3 ζ 、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的ITAM。在特别优选的实施方案中, CAR包含CD3 ζ 主信号结构域和一个或多个共刺激信号结构域。细胞内主信号和共刺激信号结构域可以以任何顺序串联连接到跨膜结构域的羧基末端。

[0182] 此处所述的CAR包含一个或多个共刺激信号结构域, 以增强表达CAR受体的T细胞的功效和增殖。此处所用的术语“共刺激信号结构域”或“共刺激结构域”是指共刺激分子的细胞内信号结构域。共刺激分子是除了抗原受体或Fc受体之外的细胞表面分子, 一旦与抗原结合, 其提供有效活性和T淋巴细胞功能所需的第二信号。这些共刺激结构域的示例包括TLR1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、CARD11、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CD54(ICAM)、CD83、CD134(OX40)、CD137(4-1BB)、CD278(ICOS)、DAP10、LAT、NKD2C、SLP76、TRIM和ZAP70。在一个实施方案中, CAR包含选自由CD28、CD137和CD134所组成的群组中的一种或多种共刺激信号结构域, 和CD3 ζ 主信号结构域。

[0183] 在另一个实施方案中, CAR包括CD28和CD137共刺激信号结构域和CD3 ζ 主信号结构

域。

[0184] 在又一个实施方案中, CAR包括CD28和CD134共刺激信号结构域和CD3 ζ 主信号结构域。

[0185] 在一个实施方案中, CAR包括CD137和CD134共刺激信号结构域和CD3 ζ 主信号结构域。

[0186] 在另一个实施方案中, CAR包括CD28共刺激信号结构域和CD3 ζ 主信号结构域。

[0187] 在又一个实施方案中, CAR包括CD134共刺激信号结构域和CD3 ζ 主信号结构域。

[0188] 在一个实施方案中, CAR包括CD137共刺激信号结构域和CD3 ζ 主信号结构域。

[0189] H. 使用方法

[0190] 本发明所述的包含海藻糖和稳定的病毒载体的组合物可用于提供基因疗法。此处所用的术语“基因疗法”是指将基因导入细胞的基因组。在各种实施方案中, 含稳定的病毒载体的组合物可用于将异源DNA (例如, 治疗转基因) 转移 (和有效整合) 到真核细胞中。也就是说, 稳定在本发明所述含海藻糖的组合物中的重组病毒载体可用作病毒原液以感染培养基或体内的受体细胞。在分泌蛋白质或造血细胞中表达的蛋白质的情况下, 可以使用敏感测定法 (诸如ELISA或免疫印迹法) 来评估基因转移效率。

[0191] 具体地, 含海藻糖稳定病毒载体的组合物不仅可以安全地用于转化各种分裂细胞类型, 而且可以转化非分裂细胞类型, 从而增大基因疗法可治疗疾病的范围。

[0192] 在某些实施方案中, 术语“靶细胞”与宿主细胞可互换, 指所需细胞类型的转染的、感染的或转导的细胞。

[0193] 适合在具体实施方案中使用的初始细胞群可以源自基本上任何合适的来源, 其细胞类型可以是异质的, 也可以是同质的。本发明所述的“自体”是指来自相同受试者的细胞。本发明所述的“同种异体”是指在遗传学上不同于对照细胞的相同种类的细胞。本发明所述的“同源”是指在遗传学上与对照细胞相同的不同受试者的细胞。本发明所述的“异种异体”是指不同于对照细胞的不同种类的细胞。在优选的实施方案中, 细胞是同种异体的或自体的。合适的细胞包括胎儿细胞和成体细胞。此外, 合适的细胞可以来源于哺乳动物, 例如来自啮齿动物、猫、狗、猪、山羊、绵羊、马、牛或灵长类动物。在一个实施方案中, 细胞是人源细胞。

[0194] 示例性的宿主细胞或靶细胞包括但不限于干细胞、祖细胞和分化的细胞。其他合适的细胞包括但不限于干细胞、祖细胞和分化的细胞。在某些实施方案中, 转导的细胞是胚胎干细胞、诱导多能干细胞、骨髓干细胞、脐带干细胞、胎盘干细胞、间充质干细胞、神经干细胞、肝干细胞、胰腺干细胞、胰内胚层、心脏干细胞、肾脏干细胞和造血干细胞。

[0195] 其他示例性的宿主细胞或靶细胞包括但不限于选自由以下异质或同质细胞群所组成的群组中的细胞: 胰岛细胞、CNS细胞、PNS细胞、心肌细胞、骨骼肌细胞、平滑肌细胞、造血细胞、骨细胞、肝细胞、脂肪细胞、肾细胞、肺细胞、软骨细胞、皮肤细胞、滤泡细胞、血管细胞、上皮细胞、免疫细胞、内皮细胞等。

[0196] 在具体实施方案中, 细胞是造血细胞, 包括但不限于造血干细胞、CD34表达细胞、造血祖细胞、骨髓细胞、淋巴细胞、B和T淋巴细胞等。

[0197] 本发明所述的病毒载体可用于基因疗法, 包括用于治疗血红蛋白病。在具体实施方案中, 提供了使用上述载体在红细胞中获得稳定、高水平的基因表达的方法, 例如用于治

疗红细胞系特异性疾病。在一个具体实施方案中,基因疗法载体用于治疗血红蛋白病,包括例如镰状细胞病(SCD)。在另一个优选的实施方案中,基因疗法载体用于治疗地中海贫血,包括但不限于 β -地中海贫血。

[0198] 在另一个实施方案中,造血干细胞通过本发明所述的载体转导,所述载体包含用于治疗肾上腺素能营养不良和/或肾上腺髓质神经病的ABCD1基因。

[0199] 在其它实施方案中,本发明所述的病毒载体也可用于治疗癌症,包括但不限于威尔姆氏瘤、尤文肉瘤、神经内分泌肿瘤、胶质母细胞瘤、成神经细胞瘤、黑素瘤、皮肤癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、前列腺癌、肝癌、肾癌、胰腺癌、肺癌、胆道癌、宫颈癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、头颈癌、甲状腺髓样癌、卵巢癌、神经胶质瘤、淋巴瘤、白血病、骨髓瘤、急性淋巴细胞白血病、急性骨髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤和膀胱癌。

[0200] 在各种实施方案中,含稳定病毒载体的水性组合物通过在体内(例如,骨内施用转基因HSC)直接注射到需要基因治疗的受试者的细胞、组织或器官中来给药。在各种其他实施方案中,细胞通过含稳定的病毒载体的组合物进行体外或离体转导,并且任选地在体外增殖。然后将转导的细胞施用于需要基因治疗的受试者。

[0201] 此外,含稳定的病毒载体的水性组合物也可用于将DNA或目标基因引入哺乳动物细胞(诸如人源细胞),然后再施用于身体的局部部位(例如,将蛋白质递送到身体的局部部位的自体白血细胞的离体感染,参见例如美国专利第5,399,346号)。

[0202] 本说明书中引用的所有出版物、专利申请和授权专利以引用的方式并入本文,就如同具体且单独地指出每个单独的出版物、专利申请或授权专利以引用的方式并入本文。

[0203] 尽管已说明和描述了某些实施方案,但对本领域技术人员显而易见的是在不偏离如下权利要求书的精神和范围的情况下,本领域技术人员可对所述实施方案进行多种改变和修改。仅通过说明而非限制的方式提供以下实施例。本领域技术人员容易认识到可以改变或修改各种非临界参数以产生基本相似的结果。

[0204] 实施例

[0205] 以下实施例表明海藻糖及其衍生物是病毒载体的合适防腐剂。与不储存在海藻糖或其衍生物中的病毒载体相比,储存在含有特定浓度的海藻糖或其衍生物的溶液中的病毒载体在较宽温度范围和多个冻融周期中保持感染滴度。

[0206] 实施例1

[0207] 材料和方法

[0208] 材料和设备

[0209] ●人骨肉瘤(HOS)细胞系(ATCC,产品目录编号:CRL-1543)

[0210] ●DMEM高糖(GIBCO,产品目录编号:11995)

[0211] ●FBS,热灭活(GIBCO,产品目录编号:26140-079)

[0212] ●谷氨酰胺(GIBCO,产品目录编号:35050)

[0213] ●6孔细胞培养板

[0214] ●聚苯乙烯圆底试管(5mL,12mm x 75mm)(Becton Dickinson,目录编号:352005)

[0215] ●流式细胞术所用的汉克缓冲盐水溶液。将20mL十倍的汉克缓冲盐水溶液与4mL FBS和176mL蒸馏水混合,所得溶液可以在4°C下储存至少2个月。

[0216] ●组织培养罩

[0217] ●组织培养箱

[0218] ●FACS机器

[0219] 方法

[0220] 在转导前1天,将HOS细胞以 5×10^4 个细胞/孔的密度装在6孔板中。

[0221] 播种24小时后,用血细胞计数器计算其中两个孔中的细胞数。取出其他孔中的培养基并用0.5mL含有8mg/mL聚凝胺的新鲜培养基替换。通过在细胞培养基中加入0.5-、5-和50-mL等份的稀释100倍的浓缩载体原液来转导细胞(即1 μ L浓缩载体原液分别与每孔99 μ L培养基混合)。HOS细胞分别通过每孔加入0.5-、5-和50-mL等份的稀释的载体悬浮液进行转导。

[0222] 开始转导20小时后,用2mL新鲜培养基替换所述培养基,继续培养细胞。

[0223] 2天后,取出培养基,用1mL PBS洗涤细胞。每孔加入0.5mL胰蛋白酶-EDTA,在37°C下孵育2分钟。

[0224] 将1mL培养基加入到每个孔中并将内容物混合。将各孔中的细胞悬浮液转移到5-mL圆底试管中并以1,500r.p.m(500g)的转速在20°C下离心5分钟以沉淀细胞。

[0225] 通过抽吸除去培养基,将细胞团块重悬于2mL汉克平衡盐溶液中并以1,500r.p.m(500g)的转速在20°C下离心5分钟以沉淀细胞。

[0226] 通过抽吸除去汉克平衡盐溶液,将细胞团块重悬于300mL汉克平衡盐溶液中。

[0227] 然后用FACS分析细胞。

[0228] 根据以下公式计算滴度(转导单位(TU)/mL): $TU/mL = (F \times N \times D \times 1,000) / V$,其中F=荧光细胞百分比(EGFP),N=转导时的细胞数(相当于每孔约 $1E+05$ HOS细胞),D=用于转导的载体样品的稀释倍数,V=添加到各孔转导的稀释的载体样品的体积(mL)。将从经不同量的载体转导的HOS细胞中获得的载体滴度合并,计算平均滴度。为了精确的滴度测定,所用载体量应落在EGFP-阳性细胞百分比与添加的载体量之间的线性关系的范围内。如果荧光细胞的百分比超过40%,则使用其他的载体稀释度重复滴定。

[0229] 实施例2

[0230] 储存于海藻糖的病毒载体的长期稳定性

[0231] 使用标准方法制备和纯化慢病毒载体。通过体积排阻色谱法纯化最终载体产物,并且未稀释储存在磷酸盐缓冲盐水pH7.4(PBS)中或稀释后储存在5%海藻糖/PBS(Sigma-Aldrich,目录编号90210)中。

[0232] 未经稀释的慢病毒载体组合物在4°C下储存24小时,并在-80°C下储存24小时单次解冻后,测定解冻对慢病毒载体滴度的影响。图1显示,与在4°C下储存的未稀释的慢病毒载体相比,在-80°C下储存的未稀释的慢病毒载体组合物的平均滴度(TU/mL)下降。

[0233] 接着,在各种温度下检测储存在PBS中未稀释或5%海藻糖/PBS中稀释的慢病毒载体的长期稳定性以延长其储存期。测量在4°C下以及在-20°C和-80°C下单次解冻后分别储存4、14、28、42和73天的慢病毒载体的滴度。图2示出了由5%海藻糖配制的慢病毒载体在测试温度下至少73天内表现出稳定的慢病毒滴度。

[0234] 实施例3

[0235] 海藻糖中病毒载体的稳定性

[0236] 使用标准方法制备和纯化表达红色荧光蛋白 (RFP) 的慢病毒载体。通过体积排阻色谱法纯化最终载体产物, 并且未稀释储存在 PBS 中或稀释后储存在约 7.5% 的海藻糖/PBS、约 15% 的海藻糖/PBS、约 18.75% 的海藻糖/PBS 和约 22.7% 的海藻糖/PBS 中。

[0237] 在用不同浓度的海藻糖配制的 $1.0E+08$ TU/mL 转导的细胞中, 通过流式细胞术检测慢病毒载体的表达 (RFP 表达)。图 3 示出了与含有在 PBS 中未稀释的慢病毒载体的细胞相比, 在海藻糖/PBS 中在 4°C 下储存 24 小时以及在 -80°C 下储存 24 小时单次解冻后含有表达 RFP 的慢病毒载体的细胞所占百分比比较高。当细胞储存在约 15% 海藻糖/PBS 中时, 表达 RFP 的细胞出现最大百分比, 在 4°C 和 -80°C 下均达到约 98% 至约 99% 的表达 RFP 的细胞。

[0238] 检测这些相同细胞样品的平均滴度 (TU/mL) 的变化, 以确定在 4°C 下储存与在 -80°C 的较低温度下储存时, 哪些储存条件能为慢病毒载体提供最大保护。由图 4 可知, 含有在 PBS 中未稀释的慢病毒载体的细胞具有较大的负 Δ TU/mL 值, 这表明与在 4°C 下储存相比, 一旦在 -80°C 下储存 24 小时后再解冻的慢病毒载体未能保持稳定。储存在约 15% 海藻糖/PBS 中的含有慢病毒载体的细胞显示出最大的正 Δ TU/mL 值, 这表明与在 4°C 下储存相比, 在 -80°C 下储存 24 小时后再解冻的慢病毒载体的平均滴度实际上增加了。

[0239] 当相对于储存组合物 (见图 5) 的海藻糖浓度 (重量%) 绘制慢病毒载体的滴度时, 在 4°C 和 -80°C 下, 最低稀释度的慢病毒载体保存率最高的海藻糖百分比均约为 15%, 与流式细胞术实验中得到的载体的结果和计算出的 4°C 至 -80°C 储存时的 Δ TU/mL 值一致。

[0240] 实施例 4

[0241] 少量海藻糖中病毒载体的稳定性

[0242] 使用标准方法制备和纯化表达绿色荧光蛋白 (GFP) 的慢病毒载体。通过体积排阻色谱法纯化最终载体产物, 并且未稀释储存在 PBS 中或稀释 50% 后储存在 dPBS 中或稀释后储存在约 5.67% 的海藻糖/PBS、约 6.615% 的海藻糖/PBS 和约 7.56% 的海藻糖/PBS 中。

[0243] 检测在 -80°C 下储存于各种浓度的海藻糖/PBS 中的样品中的慢病毒载体的滴度。对于未稀释或在 PBS 中按 1:2 稀释的浓缩产物, 海藻糖的保存效果在所测较低海藻糖浓度下呈线性 (见图 6)。这表明, 即使少量的海藻糖也可能呈现线性保存效果。

[0244] 通常, 下列权利要求中所用的术语不应当理解为将权利要求限制于本说明书公开的具体实施方式和权利要求书, 而应当理解为包括权利要求书授权的任何等同形式整个范围内所有可能的实施方式。因此, 权利要求不受本公开的限制。

序列表

- <110> 蓝鸟生物公司 (Blubird bio, Inc.)
 罗伯特·H·库特纳 (Kutner, Robert H.)
 韦斯利·戈尔曼 (Gorman, Wesley)
 小弗朗西斯·J·皮尔西 (Pierciey, Francis J.)
- <120> 载体制剂
- <130> BLBD-025/01W0
- <150> US 62/136,309
 <151> 2015-03-20
- <160> 10
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> CAR连接子序列
- <400> 1
- [0001] Asp Gly Gly Gly Ser
 1 5
- <210> 2
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> CAR连接子序列
- <400> 2
- Thr Gly Glu Lys Pro
 1 5
- <210> 3
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> CAR连接子序列
- <400> 3
- Gly Gly Arg Arg

1

<210> 4
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CAR连接子序列

<400> 4

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CAR连接子序列

<400> 5

[0002] Glu Gly Lys Ser Ser Gly Ser Gly Ser Glu Ser Lys Val Asp
 1 5 10

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CAR连接子序列

<400> 6

Lys Glu Ser Gly Ser Val Ser Ser Glu Gln Leu Ala Gln Phe Arg Ser
 1 5 10 15

Leu Asp

<210> 7
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> CAR连接子序列

<400> 7

Gly Gly Arg Arg Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 8

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CAR连接子序列

<400> 8

Leu Arg Gln Arg Asp Gly Glu Arg Pro
1 5

<210> 9

<211> 12

<212> PRT

[0003]

<213> 人工序列

<220>

<223> CAR连接子序列

<400> 9

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CAR连接子序列

<400> 10

Leu Arg Gln Lys Asp Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Glu Arg Pro
1 5 10 15

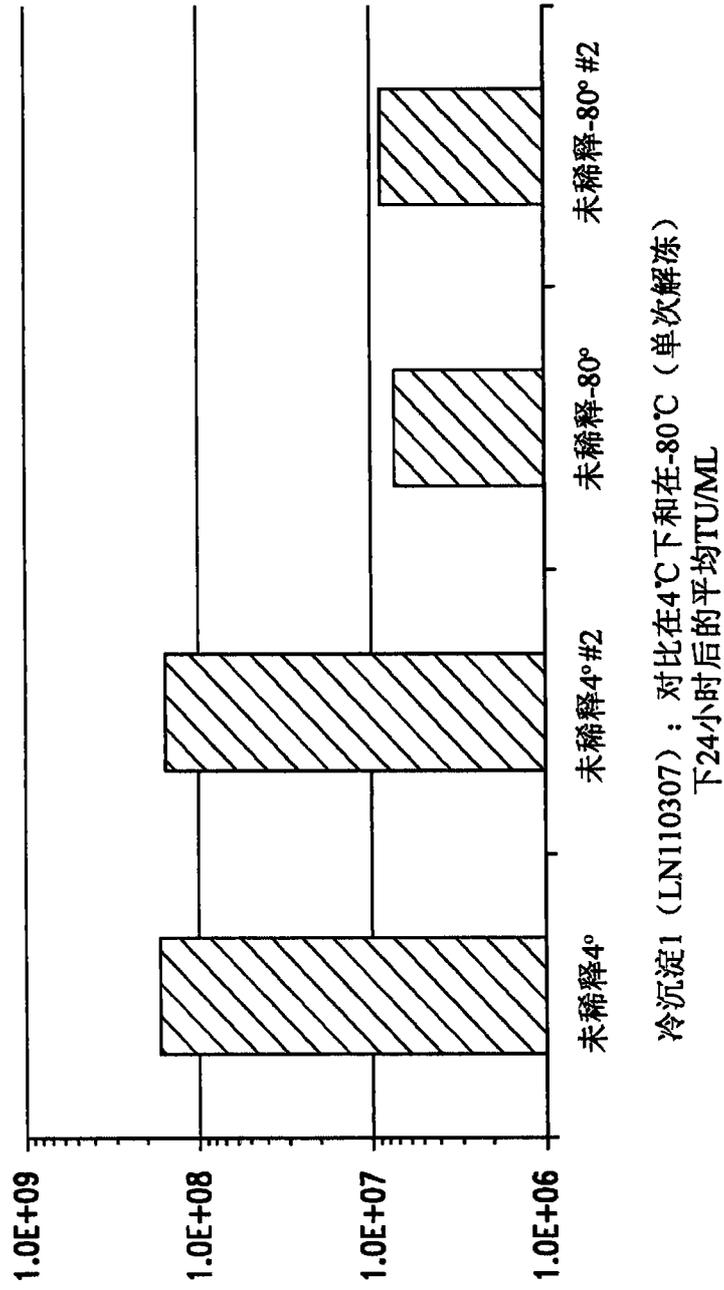


图1

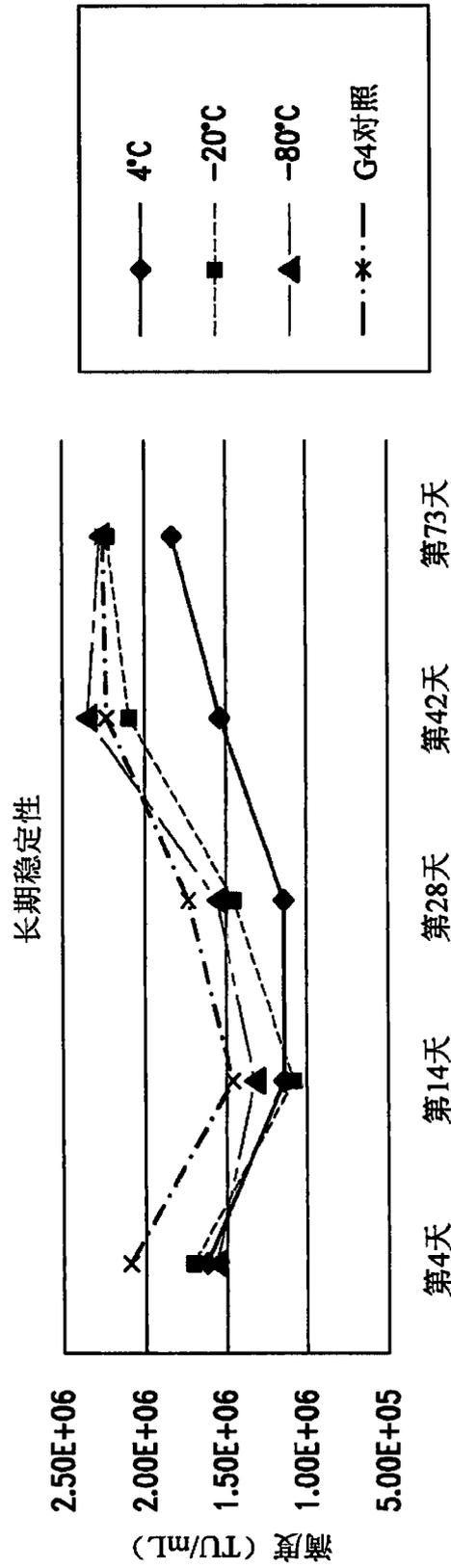


图2

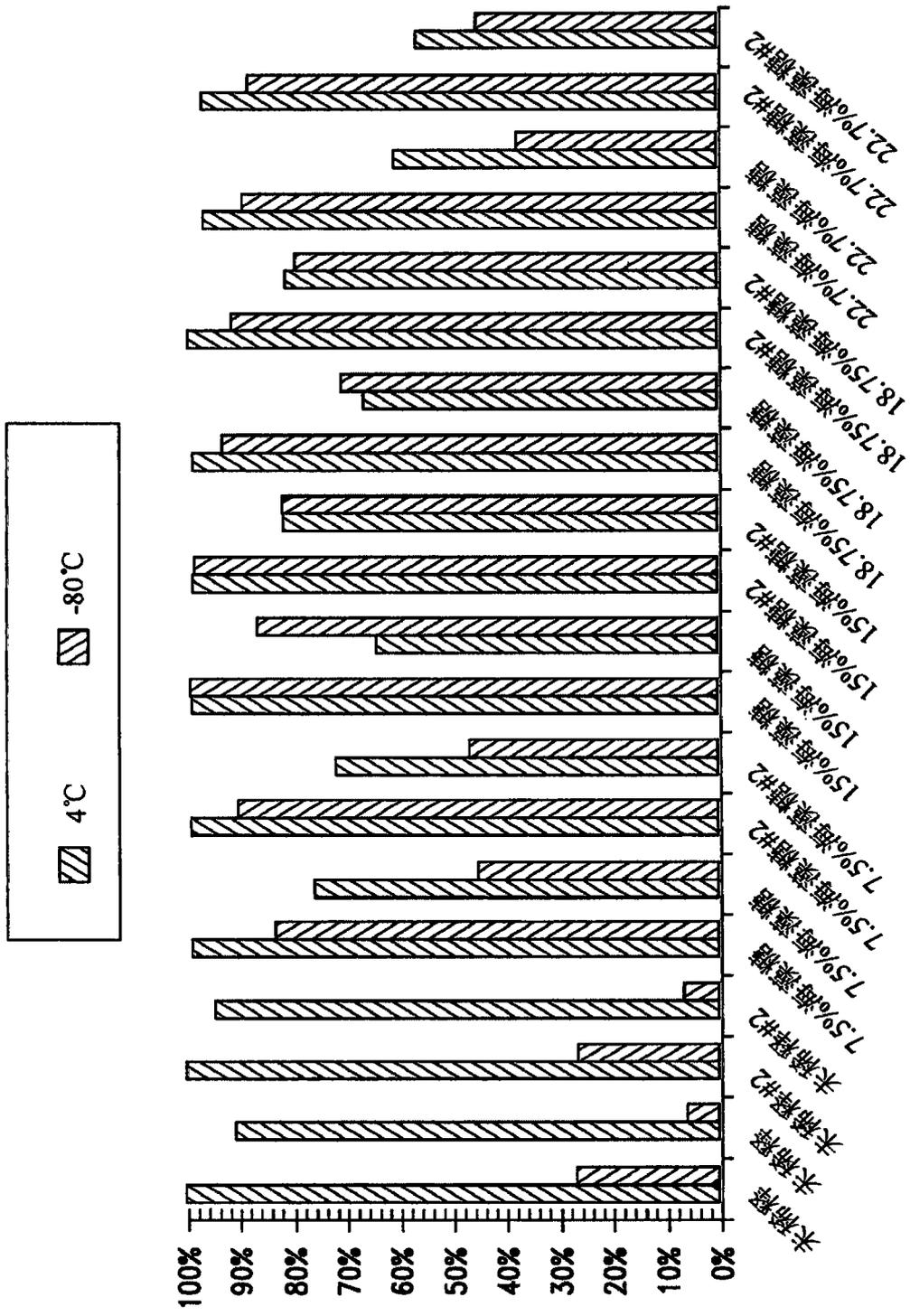


图3

4°C和-80°C样品之间的tu/ml变化

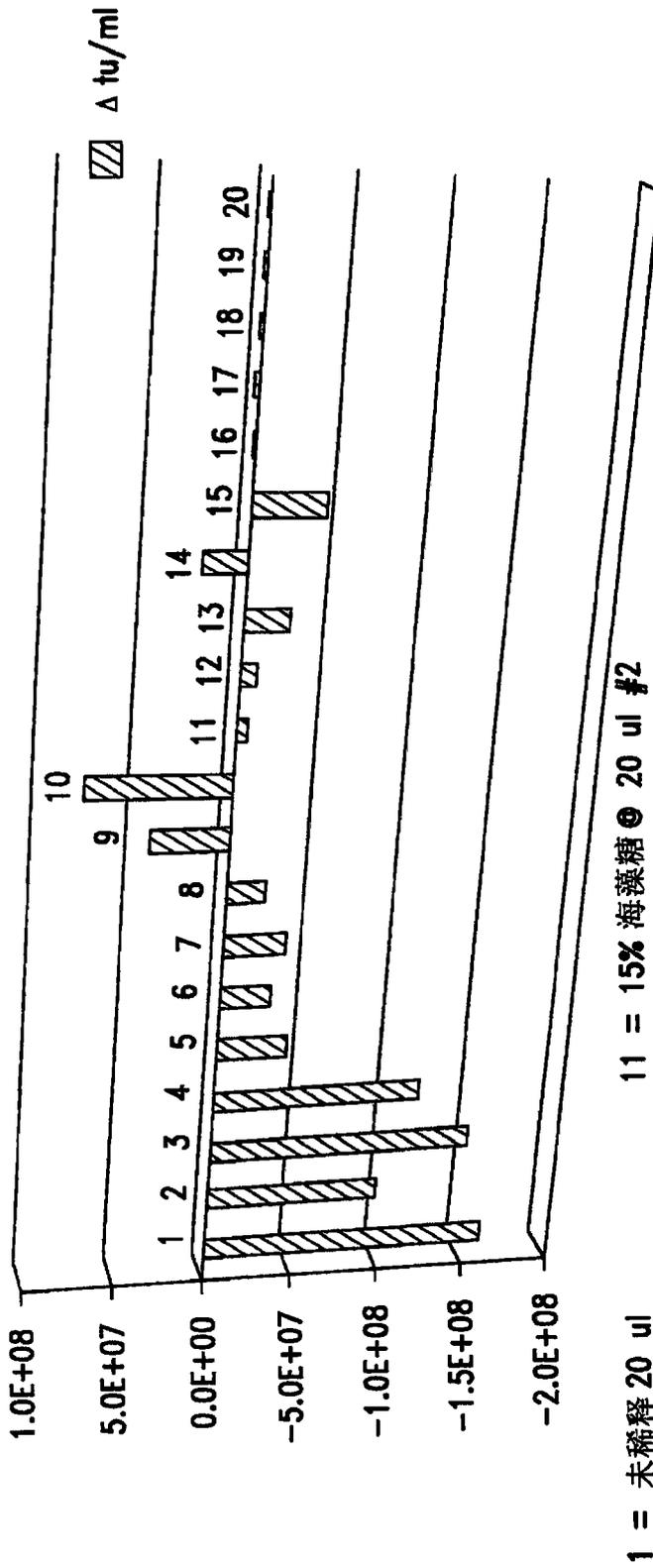


图4

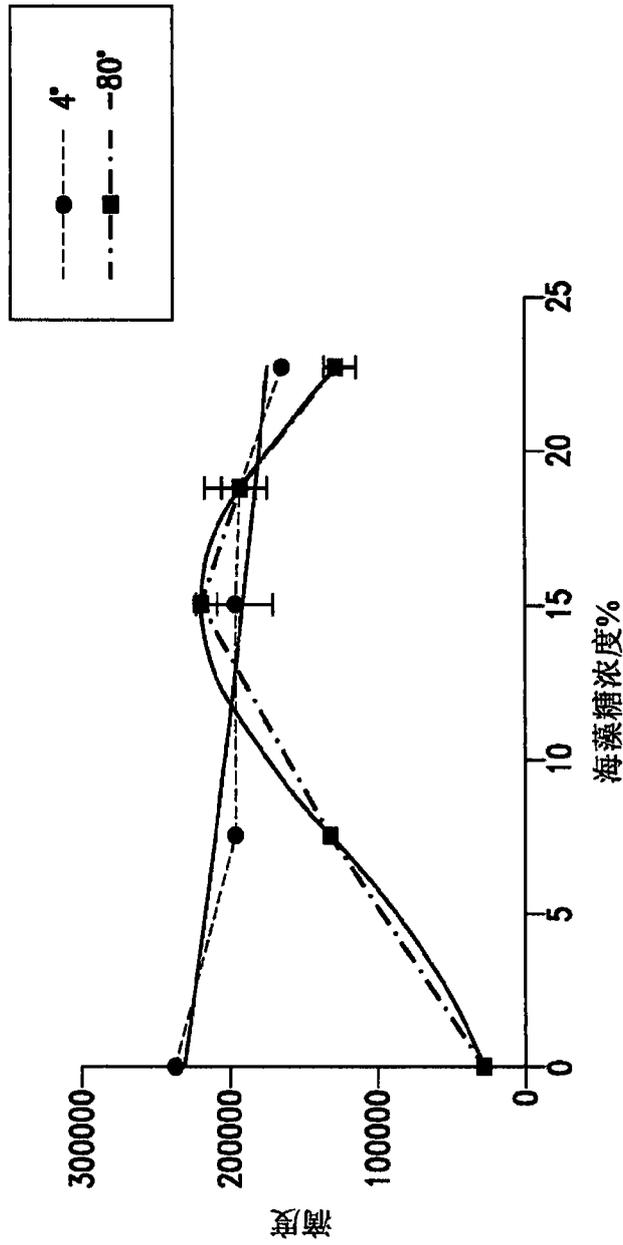


图5

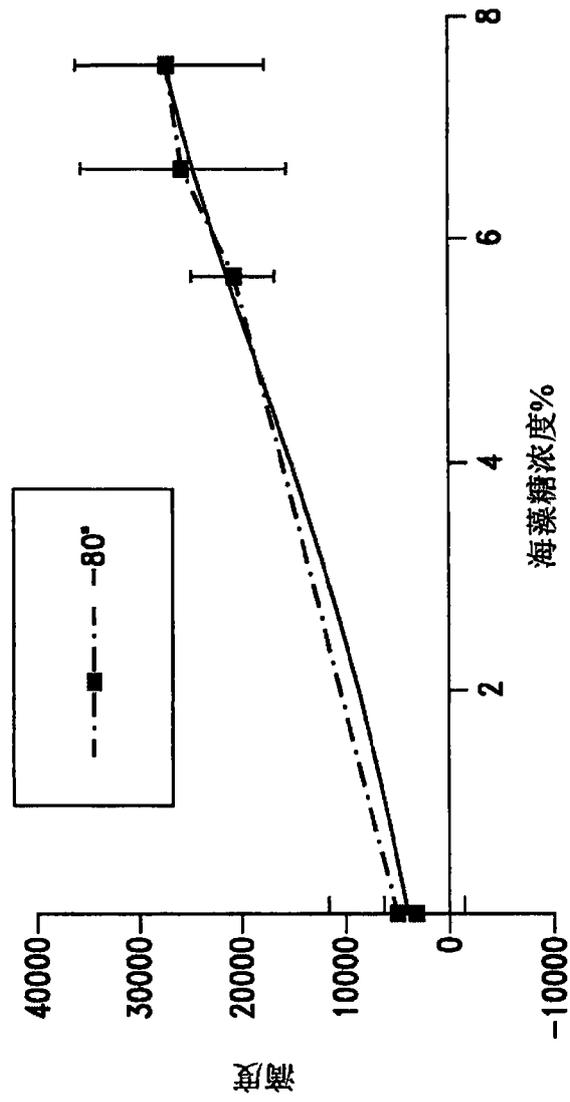


图6