

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

C12N 15/86

C12N 15/34

C12N 15/52 A61K 48/00

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 95116291.8

[45]授权公告日 2002年1月16日

[11]授权公告号 CN 1077919C

[22]申请日 1995.9.18 [24]颁证日 2002.1.16

[21]申请号 95116291.8

[30]优先权

[32]1994.9.19 [33]JP [31]251312/1994

[73]专利权人 住友制药株式会社

地址 日本大阪

[72]发明人 斋藤泉 锺江裕美

[56]参考文献

EP542466 1993.1.1 C12N15/86

审查员 孙广秀

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所

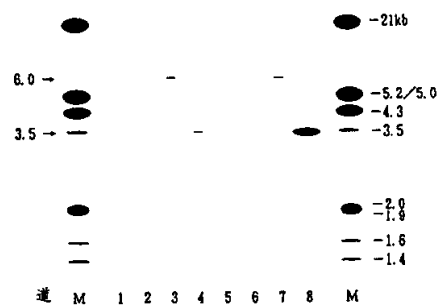
代理人 杜京英

权利要求书 2 页 说明书 31 页 附图页数 1 页

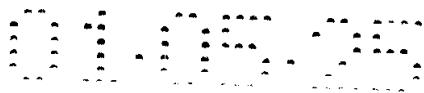
[54]发明名称 转染动物细胞的重组 DNA 病毒载体

[57]摘要

用两种重组 DNA 病毒载体共同转染动物细胞,一种带有启动子、重组酶基因和 poly(A) 序列,另一种含有两个重组酶识别序列和位于它们之间的复制起点、启动子、外源基因和 poly(A) 序列。然后一个载体中表达的重组酶作用下切下另一载体中的含复制起点、启动子、外源基因和 poly(A) 序列的 DNA 片段,形成一环状 DNA 分子,并在共转染细胞中自主复制,从而连续表达外源基因。这两个 DNA 病毒载体对治疗遗传性疾病特别有用。



ISSN 1008-4274



权 利 要 求 书

1. 一种转染动物细胞的重组腺病毒载体，它包括启动子、重组酶基因和 poly(A) 序列，其中所述载体包含 E1A 基因区缺失。

2. 按照权利要求 1 的重组腺病毒载体，其中所述重组酶基因是得自 E. Coli P1 噬菌体的重组酶 Cre 基因。

3. 一种转染动物细胞的重组腺病毒载体，它包括两个重组酶识别序列、在所述动物细胞中可操作的复制起点、启动子、外源基因和 poly(A) 序列，所述复制起点、启动子、外源基因和 poly(A) 序列都位于两个重组酶识别序列之间，其中所述载体包含 E1A 基因区缺失。

4. 按照权利要求 3 的重组腺病毒载体，其中所述复制起点、启动子、外源基因和 poly(A) 序列依此顺序位于两个重组酶识别序列之一的上游。

5. 按照权利要求 3 的重组腺病毒载体，其中所述外源基因、poly(A) 序列、复制起点、和启动子依此顺序位于两个重组酶识别序列之一的上游。

6. 按照权利要求 3-5 之任一的重组腺病毒载体，其中所述重组酶识别序列是编码 loxP 的 DNA 序列，它是重组酶 Cre 的底物。

7. 按照权利要求 3-6 之任一的重组腺病毒载体，其中所述复制起点来自病毒或动物细胞。

8. 按照权利要求 7 的重组腺病毒载体，其中所述复制起点选自乳多空病毒、疱疹病毒、腺病毒、痘病毒和细小病毒的复制起点。

9. 按照权利要求 1-8 之任一的重组腺病毒载体，其中所述启动子和 poly(A) 包含在一杂合启动子 CAG 中，后者包括巨细胞病毒增强子、鸡 β -肌动蛋白启动子、和兔 β -珠蛋白缝接受体和 poly(A) 序列。

10. 一种体外向动物细胞包括人细胞中转导外源基因的方法，其包括下列步骤：

用含启动子、重组酶基因和 poly(A) 序列的具有 E1A 基因区缺失的重组腺病毒载体，和含有两个重组酶识别序列、在所述动物细胞中可操作

的复制起点、启动子、外源基因和 poly(A) 序列的具有 E1A 基因区缺失的重组腺病毒载体共转染动物细胞，所述复制起点、启动子、外源基因和 poly(A) 序列位于两个重组酶识别序列之间；

切下含有所述复制起点、启动子、外源基因和 poly(A) 序列的 DNA 片段，形成环形 DNA 分子；及

所述环形 DNA 分子在共转染的动物细胞中自主复制。

11. 一种体外向细胞中转导人基因的方法，其包括在基因治疗中使用权利要求 10 的转染方法。

说 明 书

转染动物细胞的重组 DNA 病毒载体

本发明涉及转染动物细胞的重组 DNA 病毒载体。更具体地讲,本发明涉及含重组酶基因或编码重组酶识别序列之 DNA 序列的重组 DNA 病毒载体,用所述载体向动物细胞中转导外源基因的方法,及其在基因治疗中的用途。

经常使用逆转录病毒作为基因转导的病毒载体。但是逆转录病毒只转染有丝分裂细胞,并整合在宿主细胞的染色体中,因此,逆转录病毒作为病毒载体遇到了安全性问题,特别是在基因治疗中。因此人们认为应限制使用逆转录病毒作为病毒载体。

腺病毒有许多优势,如在许多种动物培养细胞中转导效率几乎为 100%,不像逆转录病毒,它没有整合入染色体中的阳性机制,甚至可以向静止细胞转导基因。由于这些优点,腺病毒被认为可应用于进行外源基因转导的极广泛的领域中。在不久的将来将确立腺病毒载体用作基因治疗的主要技术之一。

腺病毒载体已广泛用作一种基因治疗技术或用于对高度分化细胞如神经系统细胞中表达的研究。对于基因治疗技术,已广泛研究了体内基因治疗,其中通过向细胞所存在的组织中直接注射基因,将在活细胞中有缺陷的基因转入细胞中。在美国,已允许五个研

究机构进行用基因治疗方法治疗囊性纤维变性病人的临床试验。而且,基因治疗的研究已扩展到了肌肉营养不良、高脂蛋白血(Ⅱ型)、和脑瘤。另一方面,腺病毒载体使得甚至能向静止细胞中转导基因。因此,在进行向初级培养细胞或动物体转导基因的试验时,已应用了腺病毒载体向分化细胞,特别是向神经系统细胞中转导基因。

鉴于上述原因,人们特别希望腺病毒载体能实际应用于特别是基因治疗中,因为此载体能使基因在直接注射或施于动物体内时表达,并能向各种分化和未分化细胞(包括神经系统细胞)中转导基因。

但不像逆转录病毒,腺病毒载体缺少向染色体中整合的阳性机制,结果在此载体中基因的表达只是暂时的。即,表达仅持续少数几周,至多约2个月。因此,当要保持治疗效果时,为了持续表达应重复注射或施用此载体。但重复注射或施用可能会诱导产生减低疗效的抗体。

因此,本发明的目的是提供一种重组腺病毒载体系统,其中通过腺病毒载体将外源基因转入动物细胞,然后转化成一种能够在此细胞中自主复制的形式。本发明的另一目的是提供用于基因治疗的这种系统。

为了达到上述目的,本发明者进行了广泛的研究,并成功地得到了一种重组腺病毒载体系统:

其中用腺病毒载体将带有外源基因的表达单元转入细胞中,然后利用重组酶基因和重组酶识别序列将其转化成环形DNA分子,和

其中已向这样形成的环形DNA分子中引入了复制起点,从而

带有外源基因的表达单元能够自主复制以在此细胞中连续表达外源基因。

本文中，“重组酶”指特异的重组 *DNA* 酶，它能够识别由几十个碱基对组成的特异 *DNA* 序列并裂解该序列，能够改变由这种裂解形成的 *DNA* 片段并将这种片断连接形成新的 *DNA* 序列。因此，同时构建了一个表达重组酶的重组腺病毒载体和一个在相同方向具有两个拷贝重组酶识别序列的重组腺病毒载体，这两个载体共转染到细胞中，其中重组酶在载体中表达以裂解另一载体中的两个重组酶识别序列，然后从存在于两个重组酶识别序列之间并已被重组酶从载体中切下的 *DNA* 片断重建，形成环形 *DNA* 分子。因此，这样的 *DNA* 片段具有外源基因的表达单元和复制起点，当它转化成环形 *DNA* 分子后就可自主复制并永恒保持在转导的细胞中连续表达外源基因。这样，如果将这种重组腺病毒载体系统应用于基因治疗中，一次注射或施用这种载体能够在长时间内保持疗效。

基于这些新发现，进行了进一步研究完成了本发明。

因此，本发明的目的是提供一种转染动物细胞的重组 *DNA* 病毒载体(1)，它包括启动子、重组酶基因和 *poly (A)* 序列。

本发明的另一目的是提供一种按照上述载体(1)的重组 *DNA* 病毒载体(2)，其中所述 *DNA* 病毒载体为腺病毒载体。

再者，本发明的另一目的是提供一种按照上述载体(2)的重组 *DNA* 病毒载体(3)，其中所述重组酶基因是得自 *E. Coli P1* 噬菌体的重组酶 *Cre* 基因。

再者，本发明的另一目的是提供一种转染动物细胞的重组 *DNA* 病毒载体(4)，它包括两个重组酶识别序列、在动物细胞中可

操作的复制起点、启动子、外源基因和 *poly (A)* 序列,所述复制起点、启动子、外源基因和 *poly (A)* 序列都位于两个重组酶识别序列之间。

再者,本发明的另一目的是提供一种按照上述载体(4)的重组 DNA 病毒载体(5),其中所述 DNA 病毒载体为腺病毒载体。

再者,本发明的另一目的是提供一种按照载体(5)的重组 DNA 病毒载体(6),其中所述复制起点、启动子、外源基因和 *poly (A)* 序列依此顺序位于两个重组酶识别序列之一的上游。

再者,本发明的另一目的是提供一种按照上述载体(5)的重组 DNA 病毒载体(7),其中所述外源基因、*poly (A)* 序列、复制起点、和启动子依此顺序位于两个重组酶识别序列之一的上游。

再者,本发明的另一目的是提供一种按照上述载体(4)–(7)之任一的重组 DNA 病毒载体(8),其中所述重组酶识别序列是编码 *loxP* 的 DNA 序列,它是重组酶 *Cre* 的底物。

再者,本发明的另一目的是提供一种按照上述载体(4)–(8)之任一的重组 DNA 病毒载体(9),其中所述复制起点来自病毒或动物细胞。

再者,本发明的另一目的是提供一种按照上述载体(9)的重组 DNA 病毒载体(10),其中所述复制起点选自乳多空病毒、疱疹病毒、腺病毒、痘病毒和细小病毒的复制起点。

再者,本发明的另一目的是提供一种按照上述载体(1)–(10)之任一的重组 DNA 病毒载体(11),其中所述启动子和 *poly (A)* 序列包含在一杂合启动子(CAG 启动子)中,后者包括巨细胞病毒增强子、鸡 β -肌动蛋白启动子、和兔 β -珠蛋白缝接受体和 *poly (A)*

序列。

再者,本发明的另一目的是提供一种向动物细胞中转导外源基因的方法(12),其包括下列步骤:

用含启动子、重组酶基因和 *poly* (A) 序列的重组 DNA 病毒载体,和含有两个重组酶识别序列、在所述动物细胞中可操作的复制起点、启动子、外源基因和 *poly* (A) 序列的重组 DNA 病毒载体共转染动物细胞,所述复制起点、启动子、外源基因和 *poly* (A) 序列位于两个重组酶识别序列之间;

切下含有所述复制起点、启动子、外源基因和 *poly* (A) 序列的 DNA 片段,形成环形 DNA 分子;及

所述环形 DNA 分子在共转染的动物细胞中自主复制。

再者,本发明的另一目的是提供一种按照上述方法(12)的向动物细胞中转导外源基因的方法(13),其中两个 DNA 病毒载体均为腺病毒载体。

再者,本发明的另一目的是提供一种向细胞中转导人基因的方法,其包括在基因治疗中使用上述方法(12)或(13)。

图 1 表示用各种重组腺病毒载体结合转染 COS-1 细胞或 CV-1 细胞,从转染细胞中回收 DNA,用 *Hind* III 消化所回收的 DNA,处理后的 DNA 进行电泳,分离 DNA 片段,并进行 Southern 印迹分析所得到的结果。图中符号的意义如下:

M 道:分子标识

1 道:仅加培养基的 CV-1 细胞;

2 道:用缺失 E3、E1A 和 E1B 区且无外源基因的腺病毒载体和实施例 1 中构建的其中已插入了重组酶 Cre 基因和 CAG 启动子的

重组腺病毒载体共同转染的 CV—1 细胞；

3 道：用实施例 2 中构建的腺病毒载体 *Adex1LCAHBsSL* 和缺失 *E3*、*E1A* 和 *E1B* 区且无外源基因的腺病毒载体共同转染的 CV—1 细胞；

4 道：用载体 *Adex1LCABsSL* 和实施例 1 中构建的其中已插入了重组酶 *Cre* 基因和 *CAG* 启动子的重组腺病毒载体一起转染的 CV—1 细胞；

5 道：同 1 道方法转染的 COS—1 细胞；

6 道：同 2 道方法转染的 COS—1 细胞；

7 道：同 3 道方法转染的 COS—1 细胞；

8 道：同 4 道方法转染的 COS—1 细胞。

下面将更详细地描述本发明。

本发明中所用的 DNA 病毒载体可以是来自诸如腺病毒的 DNA 病毒，感染后可仅在染色体外生存的任何载体。可以不加任何限制地使用这种 DNA 病毒衍生的载体。这种载体的实例包括腺病毒载体、牛痘苗病毒载体和乳多空病毒载体。

以下将用腺病毒载体来说明本发明，它是转染动物细胞的 DNA 病毒载体的优选实例，而且它带有重组酶基因或重组酶识别序列。

用于本发明的腺病毒是利用动物作为天然宿主的腺病毒，特别优选的腺病毒是以人为宿主的人腺病毒。人腺病毒基因组是一约 36kbp 的双链线性 DNA，它具有独特的结构，在两端都有一约 100bp 的反向重复序列，此 DNA 链还有两个由 *E2B* 基因产物加工而成的 55K 蛋白，它们共价连结在 DNA 链的两个 5' 末端。

用于本发明的腺病毒基因组缺失 *E1* 区,特别是 *E1A* 区。这是因为 *E1A* 区与腺病毒的肿瘤转形变异 (*transformation*) 活性有关,通过缺失 *E1A* 区,使得腺病毒成为非毒性的,仅选择性地表达整合在基因组中的外源基因。不必要缺失整个 *E1A* 区,仅缺失部分 *E1A* 区,特别是仅缺失 *E1A* 区中 1.3% 到 9.3% 的片段就可以达到上述所需目的。

而且,用于本发明的腺病毒基因组还可缺失 *E3* 区。特别是,优选缺失 *E3* 区的 79.6% 到 84.8% 的片段,因为这些片段对腺病毒的复制不是必需的。

因此,本发明所用腺病毒的特征在于该腺病毒在一般宿主细胞中不能繁殖,但来自人胎儿肾的细胞系 (293 细胞系) 除外,在此细胞系中持续表达 *E1A* 和 *E1B* 基因。

本发明所用的重组腺病毒载体颗粒可以高达 $10^8 - 10^9$ pfu [(空斑形成单位)/ml] 的滴度水平在 293 细胞系中繁殖,如同在野生细胞株中一样。当在其它细胞或动物组织上转染时,此病毒颗粒高效侵袭到细胞中,病毒基因组转移到细胞核中。但是此腺病毒载体缺少 *E1* 基因,要由 *E1A* 基因产物激活的腺病毒自身启动子因而无法操作。另一方面,整合在腺病毒基因组中的外源基因可由同样整合在腺病毒基因组中的外源启动子转录。因此,本发明所用的重组腺病毒颗粒可将天然腺病毒基因组引起的不利影响减至最小,而重组腺病毒载体中的外源基因可在各种动物细胞中有效地表达。

虽然人腺病毒野生株感染后仅在人细胞中繁殖,但本发明的重组腺病毒中的外源基因可在宽范围的细胞和组织中表达。这是因为本发明的重组腺病毒可有效地作为表达载体,甚至在一般腺病毒无

法繁殖的细胞中也是如此,只要此重组腺病毒颗粒能感染并侵入此细胞。

本发明的重组腺病毒的基因组不能在染色体外复制,仅在细胞核中保持两周到两个月。因此,为了在长时间内表达外源基因,要求重复施用重组腺病毒。但这样就可能引起诱导形成抗体的问题。

根据本发明,构建了一种含重组酶基因的新重组腺病毒,另一方面,还构建了另一种新重组腺病毒,它含有两个作为重组酶底物的重组酶识别序列,还含有目标外源基因和复制起点,两者均位于两个重组酶识别序列之间。

两种重组腺病毒共转染到动物细胞中,在其中将表达重组酶。然后,重组酶作用到两个重组酶识别序列上。将其裂解,再形成环状DNA分子。这样,所形成的环状DNA分子含有复制起点和外源基因,可以在共转染的细胞中自主复制,连续表达外源基因。

用于本发明的启动子有动物病毒基因启动子和动物细胞基因启动子。动物病毒基因启动子的实例包括SV40基因启动子和腺病毒主要晚期基因启动子。动物细胞基因启动子的实例包括胸苷激酶基因启动子、金属硫蛋白(*metallothionein*)基因启动子和免疫球蛋白基因启动子。本发明中特别有利的启动子是CAG启动子。CAG启动子是一种杂合启动子,它含有巨细胞病毒增强子、鸡 β -肌动蛋白启动子、和兔 β -珠蛋白缝接受体和poly(A)序列。日本专利申请公开No. 3(1991)-168087中报导CAG启动子是一种高度表达载体。可通过从以上公开说明书第13页22行到第20页14行及第22页第1行到第25页第6行中描述的质粒pCAGGS,用限制酶Sal I和Hind III将其切下,来构建CAG启动子。如此构建的CAG启

动子可用于本发明。

用于本发明的重组酶是一种特异性 DNA 重组酶,能够识别并裂解特异 DNA 序列,交换所形成的 DNA 片段并将它们重新连结。这种酶例如有 *E. Coli* 的噬菌体 P1 编码的重组酶 *Cre*。此酶的底物是噬菌体 P1 中 *LoxP* 的 DNA 序列[Abremski 等, *J. Biol. Chem.*, 1984, 1509—1514 和 Hoess 等, *P. N. A. S.*, 1984, 81, 1026—1029]。即, *LoxP* DNA 序列是重组酶 *Cre* 的识别序列。重组酶的另一实例是由来自酵母 2 μ -质粒的 *FLP* 基因编码的重组酶[James R. Broarch 等, *Cell*, 29, 227—234]。另外,还可以使用来自 *Luxii* 裂殖酵母的 *pSR1* 质粒的重组酶。该重组酶是由 *R* 基因编码的[Matsuzaki 等, *Molecular and Cellular Biology*, 8, 955—962 (1988)]。本发明特别优选来自噬菌体 P1 的重组酶,即重组酶 *Cre*。

用聚合酶链反应(PCR)扩增噬菌体 P1 DNA 中编码重组酶基因的序列,可制备重组酶 *Cre* 基因。以相似方式,用 PCR 方法可制备其它重组酶基因。选择用于 PCR 方法中的引物,使得能够扩增编码整个重组酶基因序列的序列。为了方便地构建重组腺病毒载体,优选在每个引物末端提供一个适当的限制性位点。

重组酶的识别序列一般是几十个 bp 的序列。例如, *LoxP* 序列由 34bp 组成,由 Abremski 等(*J. Biol. Chem.*, 1984, 1509—1514)和 Hoess 等(*P. N. A. S.*, 1984, 81, 1026—1029)鉴别了其核苷酸序列。因此,可以按常规方法化学合成此重组酶基因供本发明使用。

对本发明中所用的 poly(A)序列没有特别限制,但特别优选兔 β -珠蛋白衍生的序列。

在本发明中,将一核转移信号序列与重组酶基因一起引入腺病

毒载体是有利的。腺病毒载体转染到细胞中后,在细胞核中转录重组酶,然后分泌到核外。因此,为了使表达后的重组酶作用于另一腺病毒载体中的重组酶识别序列,必须将重组酶再转移回细胞核中。核转移信号序列加速重组酶向细胞核中的转移[*Daniel Kalderson*等,*Cell*, 39, 499—509 (1984)]。

用于本发明的可在动物细胞中操作的复制起点可以来自病毒和动物细胞。病毒来源的复制起点的实例包括来自乳多空病毒、疱疹病毒、腺病毒、痘病毒和细小病毒的那些。作为来自乳多空病毒的复制起点,有来自 SV40 的复制起点。

将这些复制起点引入本发明的重组腺病毒载体中,从而用重组酶切下的环状 DNA 分子可以在转染细胞中自主复制。

对用于本发明的外源基因没有特别限制,只要此基因在上述杂合启动子(CAG 启动子)或其它启动子控制下可表达即可。鉴于实用性,优选实例包括在患者体内有缺陷的正常基因,如腺苷脱氨酶、*dystrophin*、低密度脂蛋白受体、 α -1 抗胰蛋白酶、凝血因子 VIII 或凝血因子 IX 和 α 或 β -半乳糖苷酶;细胞因子如白细胞介素 1 到 12,干扰素 α 、 β 或 γ ,肿瘤坏死因子 α 或 β ,粒细胞集落刺激因子,粒巨细胞集落刺激因子,红细胞生成素,生长激素,胰岛素和类胰岛素生长激素;神经营养因子;非自身抗原基因如 *allo-HLA* (*HLA-B7*);编码病毒抗原的核苷酸序列;抗癌基因如 *p53*、*RB*、*WT-1*、*NM23* 和 *NF-1*;反义癌基因如 *Ras* 序列;和自杀基因如胸苷激酶和胞苷脱氨酶。

复制起点、启动子、外源基因和 *poly (A)* 序列都插入在腺病毒载体中两个重组酶识别序列之间,一般按此顺序位于两个重组酶识

别序列之一的上游。

但也可以按外源基因、*poly* (A) 序列、复制起点和启动子的顺序位于两个重组酶识别序列之一的上游。一旦用重组酶形成环状 DNA 分子将它们包含于其中时,以上两种顺序相互没有区别。

当将本发明应用于基因治疗时,动物细胞被两种重组腺病毒载体共转染,一种表达重组酶,另一种带有两个重组酶识别序列,还带有位于两个重组酶识别序列之间的启动子、外源基因和 *poly* (A) 序列。两种载体的转染可以同时进行或相继进行,因为转移到动物细胞中的 DNA 载体保持稳定一个月以上。

共同转染到细胞中以后,表达重组酶的重组腺病毒载体持续表达重组酶一段时间,从而持续产生重组酶。所产生的重组酶作用于另一共转染的带有两个重组酶识别序列的重组腺病毒载体,切下位于两个重组酶识别序列之间的 DNA 片段,形成环状 DNA 分子。此环状 DNA 分子具有在动物细胞中可操作的复制起点,因此在共转染的细胞中自主复制,连续表达外源基因。因此,这两种腺病毒载体的仅一次共转染可以几乎永恒地持续显示预期的治疗效果。因而相信本发明的重组腺病毒载体在基因治疗中极其有效。

本发明的基因治疗可应用于广泛的人和动物细胞,如高度分化的人和哺乳动物神经系统细胞、肌肉系统细胞、肝细胞、未分化的上皮细胞和成纤维细胞。

以下解释构建本发明腺病毒的方法:

1. 首先解释带有启动子、重组酶基因和 *poly* (A) 序列的重组腺病毒载体的构建方法。

构建本发明的重组腺病毒载体特别困难,因为如上所述,腺病

毒基因组在其两端带有共价连结的蛋白质。

因此,本发明中优选使用下列步骤,其中就重组酶 *Cre* 基因作为重组酶基因而论。这些步骤也可以相似方式用于其它重组酶基因。

(1)用 *PCR* 方法扩增后的重组酶 *Cre* 基因和质粒 *pUC19* (*Takara Shuzo Co. Ltd., Japan*)同时用限制酶 *PstI* 和 *XbaI* (*Takara Shuzo Co. Ltd, Japan*)消化。将形成的产物混合并连接,得到其中引入了重组酶 *Cre* 基因的质粒 *pUCCre*。

(2)按照 *SAIBO KOGAKU (Cell Engineering, 13, 760—763 (1994))*描述的方法制备的,带有 *CAG* 启动子的盒式粘性质粒 *pAdexl CAwt* 用限制酶 *Swa I (Boehringer, Germany)*消化。将消化产物与质粒 *pUCCre* 用限制酶 *Pst I* 和 *Xb I (Takara Shuzo Co. Ltd., Japan)*消化的产物混合,然后用 *Klenow* 酶(*Takara shuzo Co. Ltd., Japan*)补平。然后,沉淀 *DNA* 片段,用 *T4 DNA* 连接酶连接,得到其中引入了重组酶 *Cre* 基因的盒式粘性质粒。

当使用 *CAG* 启动子以外的启动子时,首先从全长腺病毒基因组(36kb)制备带有缺失 *E3* 区(1.9kb)(对复制不是必需的)和 *E1A* · *E1B* 区(2.9kb)的约 31kb 的基因组 *DNA*。另一方面,制备含启动子、重组酶 *Cre* 基因和 *poly (A)* 序列的质粒,用适当的限制酶消化此质粒,得到重组酶 *Cre* 基因表达单元。将此单元插入在腺病毒基因组的 *E1A* · *E1B* 缺失位点,得到盒式粘性质粒。

(3)这样得到的盒式粘性质粒用 λ 体外装试剂盒 *Gigapack XL (Stratagene Co. Ltd., USA)*进行体外包装。

(4)另外,制备腺病毒 *DNA*—蛋白质复合物(*Ad5dlX DNA*—

TPC)。使用载体 *Ad5dlX* (*I. Saito* 等, *J. Virology*, vol. 54, 711—719 (1985)) 作为腺病毒 DNA。以 10Roux 管的量用载体 *Ad5dlX* 感染 *HeLa* 细胞, 然后培养。回收病毒颗粒, 用盐酸胍处理, 进行超速离心, 分离回收 DNA—TPC 复合物。

这样得到的 *Ad5dlX* DNA—TPC 复合物用足量的 *EcoT22I* 处理, 按以下步骤制备重组腺病毒。

(5) 最后一步, 将其中引入了重组酶 *Cre* 基因的盒式粘性质粒与事先用 *EcoT22I* 处理过的 *Ad5dlX* DNA—TPC 复合物混合, 形成的混合物按磷酸钙法用 *Celfect Kit* (*Pharmacia*) 转染到 293 细胞中。从因所转染的病毒繁殖而死之的细胞中回收病毒溶液, 得到带有启动子、重组酶基因和 *poly* (A) 序列的重组腺病毒载体。

2. 下面描述另一重组腺病毒载体的构建方法, 它带有两个重组酶识别序列, 以及位于两个重组酶识别序列之间的复制起点、启动子、外源基因和 *poly* (A) 序列。为方便起见, 下面描述使用 SV40 的复制起点的情况。

(a) 首先构建表达目标外源基因的盒式粘性质粒。

(1) 在克隆位点向带有 CAG 启动子的质粒 *pCAGGS* (*Niwa* 等, *Gene*, 108, 193—200, 1990) 中插入 *SwaI* 接头, 制备质粒 *pCAWG*。该质粒用 *SwaI* 消化, 然后用碱性磷酸酯酶处理。然后将目标外源基因与生成的 *pCAWG* 混合, 用连接酶处理。用此产物转化 *E. Coli* *DHI* 菌株 (ATCC 33849), 得到一质粒, 其中外源基因在 CAG 启动子控制下表达。

(2) 制备带有外源基因表达单元 (其中外源基因在 CAG 启动子控制下表达) 以及 SV40 复制起点的 DNA 片段。上述 (1) 中得到的

质粒用限制酶 *SapI* 和 *SalI* 消化,用 *Klenow* 酶补平,然后进行电泳得到目标 *DNA* 片段。将回收的 *DNA* 片段与预先用限制酶 *SmaI* 消化的质粒 *pUC18* (*Takara Shuzo Co. Ltd. , Japan*)混合,然后用碱性磷酸酯酶处理。形成的产物用连接酶处理,得到具有外源基因表达单元和 *SV40* 的复制起点的质粒。

(3)为了向含有表达单位和 *SV40* 的复制起点的 *DNA* 片段的两端增加 *loxP* 序列,进行下列步骤。

质粒 *pUC119* (*Takara Shuzo Co. Ltd. , Japan*)用限制酶 *Ec1136 II* 消化。用碱性磷酸酯酶处理后,消化的质粒与带有 *lox P* 序列的合成 *DNA* 片段(*SEQ ID No: 3*)连接,后者在末端具有 *MluI* 位点和 *XhoI* 位点,设计这些位点是为了连接后从每个 *MluI* 和 *XhoI* 位点形成 *NruI* 位点。这样,得到了含有插入的两个合成 *DNA* 片段的质粒。

此质粒用限制酶 *Nru I* 消化并用碱性磷酸酯酶处理后,处理过的质粒与以上(2)中构建的质粒用限制酶 *SalI* 和 *Ec1136 II* 消化所得 *DNA* 片段连接,然后补平。这样,得到了一质粒,它带有含外源基因表达单元和 *SV40* 的复制起点还在两端含有 *loxP* 位点的 *DNA* 片段。

(4)然后进行下列步骤,以得到含下述 *DNA* 片段的重组粘性质粒,该 *DNA* 片段含有外源基因表达单元和 *SV40* 的复制起点及在两端还含有 *loxP* 位点。

首先,用限制酶 *SmaI* 和 *EcoRI* 消化上述(3)中所得质粒,并用 *Klenow* 酶补平。产物在电泳上纯化,以制备含外源基因表达单元和 *SV40* 的复制起点且在两末端含有 *loxP* 位点的 *DNA* 片段。另一方

面,载体 *pAdex1cw* [SAIBO KOGAKU (*Cedl Engineering*), 13,760-763, 1994] 用限制酶 *SwaI* 消化。将上述制备的片段和盒式粘性质粒混合并沉淀。此 DNA 混合物用 *T4 DNA* 连接酶的连接,得到含有下述 DNA 片段的盒式粘性质粒,此 DNA 片段含有外源基因表达单元和 *SV40* 的复制起点,在两端还含有 *loxP* 位点。

(b) 构建具有下述片段的重组腺病毒载体,所述片段含有两个 *loxP* 序列,还含有位于两个 *loxP* 序列之间的复制起点、*CAG* 启动子和外源基因。

本发明的重组腺病毒载体可用上述 1.(3) 到(5) 中的相同方法制备。

带有启动子、重组酶基因和 *poly (A)* 序列的重组腺病毒载体和带有 *SV40* 的复制起点、外源基因表达单元和两个末端的 *loxP* 序列的另一重组腺病毒载体可有效地用于治疗各种疾病,包括遗传疾病。更详细地讲,将含有本发明的两种重组腺病毒载体的高滴度病毒溶液适当地稀释,稀释溶液经适当途径给药,例如,局部(中枢神经系统、门静脉)、口服(用肠衣)、吸入、皮下等。

下列将参照实施例和参考实施例更详细地描述本发明,但无意去限制它。

除非另有说明,实施例中进行的操作噬菌体、质粒、DNA、各种酶、*E. Coli*、培养细胞等等的各种步骤都是根据 *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (T. Maniatis 等编,第二版(1989), Cold Spring Harbor Laboratory) 中描述的方法的改进。DNA 限制酶和修饰酶购自 *Takara Shuzo Co. Ltd.*, *New England Biolabs (NEB)*, *Stratagene* 或 *Boehringer*, 并按照它们的说明使用。

实施例 1

构建带有重组酶 *Cre* 基因和 *CAG* 启动子的重组腺病毒载体

(1) 构建表达重组酶 *Cre* 基因的盒式粘性质粒:

1) 用含重组酶 *Cre* 基因的 *E. Coli* 噬菌体 *P1 DNA* (ATCC 11303—B23) 作为模板, 下述寡核苷酸 (SEQ ID No:1) 作为 5'—引物, 下述寡核苷酸 (SEQ ID No:2) 作为 3'—引物, *Vent*^R (*NEB*) 作为聚合酶进行 *PCR* 反应。*PCR* 反应的详细条件将在下文描述。将产物在琼脂糖凝胶上进行电泳, 从琼脂糖凝胶上切下显示约 1kb 的带, 得到含重组酶 *Cre* 基因的约 1kb 的 *DNA* 片段。

5'—引物

5'-CGT CTGCAG TGCA TCATGA GTAATTTACTGACCGTACACCAAAATTTGCCTGC-3'

PstI

BspHI

3'—引物

3'-GACCTTCTACCGCTAATCGGTAAT TCGCGAGATCT CGG-5'

Aor51HI; XbaI

划线部分指限制酶的识别位点。

PCR 的条件:

缓冲液: 10mM *KCl*, 20mM *Tris-HCl* (pH8.8),

10mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2mM *MgSO*₄, 0.1% *Triton*. X-100

(使用 *NEB* 提供的缓冲液)

聚合酶:2 单位

dNTP:400 μ M

引物:1 μ M

P1 噬菌体 *DNA*:1ng

双链解旋温度:1.5 分钟

退火温度:1.5 分钟

链延伸反应温度:2.0 分钟

反应循环:20 次

这样得到的 *DNA* 片段和 *pUC19* (*Takara Shuzo Co. Ltd.*, *Japan*) 分别都用限制酶 *RstI* (*Takara Shuzo Co. Ltd.*, *Japan*) 和 *XbaI* (*Takara Shuzo Co. Ltd.*, *Japan*) 消化, 回收消化产物, 将 *DNA* 片段产物与 *pUC19* 产物以摩尔比约 3:1 相互混合。然后混合物用 *T4 DNA* 连接酶(*Takara Shuzo Co. Ltd.*, *Japan*) 连接。反应混合物用于转化 *E. Coli JM109* 株(*ATCC 53323*)。处理后的 *E. Coli* 细胞接种在用 100 μ g/ml 氨苄青霉素补充的 *LB* 琼脂板上, 选择在此琼脂上生长的转化子, 得到带有重组酶 *Cre* 基因的质粒 *pUCCre*。

然后, 已按 *SAIBO KOGAKU (Cell Engineering)*, 13,760—763 (1994) 描述的方法制备的含 *CAG* 启动子的盒式粘性质粒 *pAdexl-cAwt* 用 *SwaI* 消化。再将 1 μ g 消化产物与 0.1 μ g 的约 1kb *DNA* 片段混合, 此 *DNA* 片段是通过质粒 *pUCCre* 用 *PstI* 和 *XbaI* 消化并用 *Klenow* 酶(*Takara Shuzo Co. Ltd.*, *Japan*) 补平后得到。

这里所用的 *CAG* 启动子是日本专利申请公开 *No. 3(1991)*—

168087 中公开的一种高度表达载体。从上述公开说明书第 13 页 20 行到 20 页 14 行及第 22 页 1 行到 25 页 16 行中描述的质粒 *pCAGGS* 用限制酶 *SalI* 和 *Hind* III 酶切,可制备 *CAG* 启动子。这样制得的 *CAG* 启动子可用于本发明。

2) 向上步得到的混合物中加入乙醇沉淀粘性质粒。离心回收沉淀,溶于 5 倍稀释的 *TE* 溶液 (10mM *Tris-HCl* (pH7.5), 1mM *EDTA*)。

3) 所得含粘性质粒的溶液用缓冲溶液中的 *ATP* 和 *T4 DNA* 连接酶在终体积 7 μ l 内进行连接反应过夜。向其中加入无菌水和 *Swal* 反应的缓冲液,使体积达 48 μ l。然后于 70 $^{\circ}$ C 加热 10 分钟使连接酶失活。

不像质粒,粘性质粒可以有效地包装相互以线性衔接形式而不是环形连接而成的大分子 *DNA*。

4) 加入 2 μ l *Swal* (*Boehringer, Germany*) 后,于 25 $^{\circ}$ C 将粘性质粒消化 1 小时。下面给出用 *Swal* 消化粘性质粒的原因。

如果其中不包含表达单元的盒式粘性质粒再连接,将再生 *Swal* 识别位点。因此,用 *Swal* 消化可以再裂解不包括表达单元的粘性质粒,结果没有菌落形成。这是仅选择含有插入序列的盒式粘性质粒的有效方法。

5) 按照 *Molecular Cloning*, vol, 3, E. 34 中描述的常规方法,将盒式粘性质粒进行苯酚萃取、离心和凝胶过滤。

6) 再用 *Swal* 消化。即向缓冲液中加入 5 μ l *Swal*,进行 *Swal* 反应,于 25 $^{\circ}$ C 裂解粘性质粒 2 小时。进行裂解的原因如上所述。

7) 将形成的粘粒 (1 μ l) 进行体外包装。

即使用 1/4 量的 λ 体外包装试剂盒 *Gigapack XL* (*Stratagene Co. Ltd., USA*), 平衡盐溶液于 -80°C 冷冻。因为 *Gigapack XL* 对 42kb 或及小的粘性质粒提供的包装效率低, 该试剂盒在一定程度上选择因包含插入序列而变大的粘性质粒。在此实验中, 当挑出 10 个菌落时, 其中大部分含有插入序列。因此, 可以方便地得到具有预期定向(即, 左侧方向, 指从 *E3* 基因区到 *E1* 基因区的方向)的克隆。

按照 *Izumu Saito* 等在 *JIKKEN IGAKU (Experimental Medicinc)*, vol. 7, 183-187(1989)中描述的常规方法操作粘性质粒。

8) 将包装的粘性质粒感染到 *E. Coli DH1* 菌株(ATCC 33849)中。

即, 将粘性质粒以 1/200, 1/20, 1/2 的量及平衡盐溶液接种到三个(*Ap*⁺)补以氨苄青霉素琼脂板上和 5ml *Ap*⁺LB(管)中, 然后培养过夜。

由试管 LB 培养中, 用 *miniprep* 试剂盒中提取并制备了少量纯化的(*miniprep*) DNA。用全酶消化法测定含插入序列的粘性质粒。结合琼脂板挑出菌落, 在 1.5ml *Ap*⁺LB 中培养过夜, 用 *miniprep* 试剂盒制备少量纯化的 DNA。

9) 用限制酶消化证实了包含在粘性质粒中的表达单元的定向和结构。

即, 用 *NruI* 和连接酶制备了含表达单元但缺失大部分腺病毒 DNA 的质粒, 从该质粒制备了 DNA 片段, 以最终用 *cDNA* 克隆证实。

(2) 制备腺病毒 DNA—蛋白质复合物 (*Ad5 dlX DNA—TPC*)

1) 作为腺病毒 DNA, 使用载体 *Ad5 dlX* (I, Saito 等, *J. Virology*, vol. 54, 711—719 (1985)). 将载体 *Ad5 dlX DNA* 以 10 Roux 管的量感染到 *HeLa* 细胞中, 然后孵育。

即, *Ad5—dlX* 的病毒溶液 ($\sim 10^9$ PFU/ml) 以 0.2 ml/Roux 管的量感染。三天后, 于 1500 rpm 离心 5 分钟收集脱膜细胞。大部分腺病毒颗粒不存在于培养基中, 而在细胞核中, 因此可有利地从感染细胞中纯化病毒。

无菌条件下进行下列步骤。

2) 将这样得到的细胞悬浮在 20 ml 10 mM *Tris—HCl* (pH 8.0) 中, 用密封型超声仪于 200 W 超声处理 2 分钟 (30 秒 \times 4), 以破坏细胞从而释放病毒。

为了从细胞中释放病毒, 当细胞悬液体积为 5 ml 或更少时, 5 次冷冻—融化即可。但是当体积较大时, 用超声仪释放病毒是有利的。此时必须使用带有专用杯的密封型超声仪。普通的投入型是危险的, 既使在安全箱中进行操作也是如此。

3) 10 K rpm 离心 10 分钟除去细胞碎片以后, 将上清液置于装在离心机 (SW28 管) 中的 15 ml 氯化铯溶液 (比重为 1.43) 上, 然后离心浓缩 (25 K rpm, 1 小时, 4°C)。

4) 将界面上的病毒带转入 SW50.1 管中。肉眼观察紧在界面下的病毒层, 收集了 5 ml 病毒带。同时, 另一管中充满氯化铯溶液 (比重 1.34)。

将这些管于 4°C 35 K rpm 离心过夜。然后, 收集形成的病毒带, 转移到预先形成梯度的管中。再将此管进行 4°C 35 K rpm 超速离心

4 小时。

5) 收集病毒带, 与等量的 8M 盐酸胍混合。再向混合物中加入 4M 盐酸胍饱和的氯化铯。将形成的混合物装入 VTi65 管中。颗粒蛋白用 4M 盐酸胍变性使解离, 从而释放 DNA-TPC 复合物。在此实验中不能用溴化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶翁, 因为还没有建立起除去该物质的方法。

6) 上述管于 15°C 55Krpm 进行超速离心过夜, 然后每 0.2ml 分部分离。从每场中吸出 1 μ l, 与 1 μ g/ml 溴化 3,8-二氨基-5-乙基-6-苯基菲啶翁水溶液混合, 以用荧光染色证实 DNA 存在与否。收集含 DNA 的 2/3 流份。

7) 将这些流份对 500ml TE 透析过夜两次, 然后于 -80°C 贮存。用常规方法以 OD₂₆₀ 值为基础测定所得 Ad5 dlX DNA-TPC 的量。

8) 形成的 Ad5 dlX DNA-TPC 复合物用足量的 EcoT22I 消化 2 小时, 然后于 -80°C 保存用于下面第 (3) 步中构建重组腺病毒载体。

同时, DNA-TPC 复合物可进行限制酶消化、透析和凝胶过滤, 但未能进行电泳、苯酚处理和乙醇沉淀。氯化铯平衡离心仅作为一种浓缩方法。因此, DNA-TPC 复合物系统保持在尽可能高的浓度。从 10Roux 管的染感细胞中得到的 300 μ g DNA-TPC 复合物。

9) 收集 1 份 DNA-TPC 复合物溶液, 加入 10ml 电泳 BPB 缓冲液。然后, 向此混合物中加入 1 μ l 蛋白酶 K (10mg/ml)。形成的混合物于 37°C 孵育 10 分钟, 将 DNA-TPC 复合物中的末端蛋白消化。苯酚萃取后, 在琼脂糖凝胶上电泳分离上清液, 以证实完全消

化。

离心凝胶过滤除去 *EcoT22I* 消化的 *DNA-TPC* 中的限制酶缓冲液,形成的产物分开放入几个管中,于 -80°C 贮存。

(3)分离重组病毒,制备高滴度病毒溶液

1)向直径 6cm 和 10cm 的 *Petri* 皿中加入在补以 10%*FCS* 的 *DME* 中培养的 293 细胞系。

2)将 $8\mu\text{g}$ (3—9 μg 为宜)其中引入了表达单元的 *pAdexlw DNA* 与 $1\mu\text{g}$ 先用 *EcoT22I* 消化过的 *Ad5dlx DNA-TPC* 复合物混合,按常规磷酸钙法用 *Celfect Kit (Phamacia)* 将形成的混合物转染到 6cm *Petri* 皿中的 293 细胞系。即,将混合物滴入 6cm *Petri* 皿中的培养基上,并继续培养。

培养过夜(约 16 小时)后,第二天早上更换培养基。然后在晚上将含细胞的培养基以 0.1ml/孔的量与含 5%*FCS* 的 *DME* 一起注入三个 96 孔胶原包被的板的孔中(不稀释,稀释 10 倍,稀释 100 倍)。为了避免每个板之间细胞计数的明显差异,将从 10cm *Petri* 皿收获的 293 细胞的三分之一加入到两个稀释溶液的板上。

3)3—4 天后及 8—10 天后,再向每个孔中加入 $50\mu\text{l}$ 含 10% *FCS* 的 *DME*。当 293 细胞系变稀时,尽早向孔中加入含 10%*FCS* 的 *DME*。

在 7—15 天观察其中病毒繁殖细胞死亡的孔。从每个其中细胞完全死亡的孔中,用无菌巴斯德移液管将含死细胞的培养基转移到 1.5ml 无菌管中。迅速冷冻此管,于 -80°C 保存。

4)在 15—18 天内观察结束。从装有含有较晚期死亡之细胞的培养基的管中选出约 10 个管。重复 6 次冷冻—融化后,于 5Krpm

进行离心 10 分钟。形成的上清液作为第一批种子于 -80°C 保存。

其中病毒在早期开始繁殖的孔表示多个病毒株混合感染的可能性大。

5) 将 293 细胞系置于 24 孔板中, 向孔中加入双份的 5% FCS—DME(0.4ml/孔) 和 $10\mu\text{l}$ 第一批病毒种子。

6) 当在约 3 天内细胞完全死亡时, 从双孔之一得到上清液, 即按照与上述制备第一批病毒种子的方法相似的方法, 经 6 次冷冻—融化并离心而得。将如此得到的上清液用作第二批种子于 -80°C 保存。第二病毒溶液的滴度为约 10^7-10^8 PFU/ml。将双孔的另一孔中之死细胞 5Krpm 离心 5 分钟, 弃去上清液。将细胞单独于 -80°C 保存(细胞团块)。收集了 10 个病毒株的细胞团块, 按以下步骤从感染细胞中提取总 DNA。向每个细胞团中加入 $400\mu\text{l}$ TNE(50mM Tris—HCl, pH7.5, 100mM NaCl, 10mM EDTA), $4\mu\text{l}$ 蛋白酶 K (10mg/ml) 和 $4\mu\text{l}$ 10% SDS。

7) 在 50°C 处理一小时后, 用苯酚—氯仿萃取 2 次, 然后进行乙醇沉淀。将乙醇沉淀回收的核酸溶于 $50\mu\text{l}$ 含 $20\mu\text{g/ml}$ 核糖核酸酶的 TE 中。

$15\mu\text{l}$ 溶液用 *XhoI* (它识别含 CG 的位点) 消化, 消化产物与表达粘粒盒的 *XhoI* 消化产物一起在长约 15cm 的琼脂糖凝胶上电泳过夜。比较所得图谱。选择这样的克隆, 它具有精确指示从表达单元中的酶切位点到腺病毒基因组中左侧末端的 DNA 序列的谱带。弃去产生许多指示未确定 DNA 序列之谱带的克隆, 因为存在此克隆被有缺失的病毒污染的可能性。

腺病毒 DNA 的繁殖水平一般为 10,000 拷贝/细胞。因此, 甚

至提取的总 DNA 包含细胞本身 DNA 和腺病毒 DNA, 用限制酶消化然后进行电泳, 也从而观察到指示来自腺病毒 DNA 的 DNA 片段的谱带。诸如在识别位点含 CG 的限制酶 *XhoI* 不消化细胞 DNA。结果, 当进行电泳时易于观察和区别图谱。当使用其它酶时, 要求以未感染的 293 细胞系 DNA 作为对照, 因为会产生人细胞重复序列。将消化的未感染 293 细胞系 DNA 进行电泳观察谱带, 它们将指示人细胞重复序列。

8) 通过 *XhoI* 消化证实的第二种子溶液以 0.1ml 的量转染到 293 细胞系中, 该细胞系已被放入含 25ml 培养基的 150cm² 胶原包被的瓶中。

当在三天内细胞死亡后, 含死细胞的培养基用密封型超声仪于最大输出功率 200W 无菌处理 2 分钟 (30 秒 × 4) 以释放病毒。

以 3Krpm 于 4℃ 离心 10 分钟除去沉淀, 将所得上清液以 2ml/管的量装在 13 个 5ml 冷冻管中。这些管用干冰迅速冷却, 于 -80℃ 保存, 制得第三批种子溶液。含本发明的重组腺病毒载体的第三种子溶液显示滴度高达 10⁹PFU/ml。

将 5μl 第三种子溶液转染到 24—孔板中含 293 细胞系的一个孔中后, 繁殖后的病毒 DNA 用限制酶消化, 然后进行电泳。通过上文描述的步骤证实了形成的图谱。当存在此病毒可能与缺失病毒或亲本病毒混合的任何怀疑时, 弃去所有的第三种子。因为有已在第二病毒溶液中已存在的缺失病毒在可测水平迅速繁殖的可能性。所以用另一第二种子溶液再进行以上步骤。或者, 将第一种子溶液进行限制稀释方法纯化病毒溶液。

参考实例

对本发明的重组腺病毒载体滴度的简单测定

根据下列步骤可以简单测定本发明重组腺病毒载体的滴度。

(1)准备一个直径10cm的 *Petri* 皿装入 293 细胞。

用补有 5% *FCS* 的 *DME* 连续稀释重组腺病毒载体溶液(即第三种子溶液)至 10^{-1} 到 10^{-4} 。例如,用 0.9ml *DME* 和 0.1ml 病毒溶液制备此溶液。更换所有微量吸移管头。

(2)在一胶原包被的 96—孔板的每一孔中加入 50 μ l *DME*。

在第一排的 8 个孔中,每个加入 25 μ l 稀释至 10^{-4} 的重组腺病毒载体溶液。

用 8—孔板的多道吸液管将 25 μ l 载体溶液转移到第二排的孔中。然后重复相同操作,直到第 11 排,将最后的 25 μ l 载体溶液弃去。结果制备了 3^n 系列稀释溶液直到 $3^{11} \times 10^{-4}$ 。第 12 排中的溶液是作为对照的未感染细胞。

在此实验中每次使用都更换吸头。

实施例 2

带有两个 *loxP* 序列还在两个 *loxP* 序列之间含有 *SV40* 的复制起点、*CAG* 启动子和乙型肝炎病毒表面抗原(*HBs*)的重组腺病毒载体的构建。

(1)构建表达乙型肝炎病毒表面抗原(*HBs*)的盒式粘性质粒

1)具有 *HBs cDNA* 的质粒 *pHBVadr4* (*Fujiyama* 等, *Nucleic Acids Res.*, 11, 4601—4610, 1983)用限制酶 *PspI* 406I 和 *XhoI* 消

化,然后用 *Klenow* 酶补平。形成的消化质粒在琼脂糖凝胶上进行电泳,回收 710bp 的 DNA 片段。

2) 进行下列步骤以得到在 CAG 启动子控制下表达 *HBs cDNA* 的表达单元

将 *SwaI* 接头插入在含有 CAG 启动子的质粒 *pCAGGS* (*Niwa* 等, *Gene*, 108, 193 – 200, 1990) 的克隆位点中,形成质粒 *pCAWG*。质粒 *pCAWG* 用 *SwaI* 消化,然后用碱性磷酸酯酶处理。然后,形成的产物与以上 1) 中得到的 710bp DNA 片段以约 1 : 3 的摩尔比混合。混合物用 *T4 DNA* 连接酶连接。用此反应混合物的染 *E. Coli DHI* 株 (*ATCC* 33849)。从补有氨苄青霉素的 *LB* 琼脂板上挑出转化子。得到质粒 *pCAG · HBs*, 其中已正确插入了 710bp DNA 片段,使 *HBs cDNA* 在 CAG 启动子控制下表达。

3) 进行下列步骤以得到含 *HBs* 表达单元和 *SV40* 的复制起点的 DNA 片段。

质粒 *pCAG · HBs* 用 *SspI* 和 *Sall* 消化,然后用 *Klenow* 酶补平。然后,生成的产物在琼脂糖凝胶上进行电泳回收 3.6kb DNA 片段。质粒 *pUC18* (*Takara Shuzo Co. Ltd., Japan*) 用限制酶 *SmaI* 消化,用碱性磷酸酯酶处理,并与 3.6kb DNA 片段以约 1 : 3 的摩尔比混合。连接此混合物得到目标质粒 *pUC18CAHBsS*。

4) 然后进行下列步骤以向含 *HBs* 表达单元和 *SV40* 的复制起点的 DNA 片段的两端加入 *loxP* 位点。

质粒 *pUC119* (*Takara Shuzo Co. Ltd., Japan*) 用限制酶 *Ecl136 II* 消化,用碱性磷酸酯酶处理。生成的产物与下述合成 DNA 片段 (*SEQ ID No:3*) 连接,后者带有 *loxP* 序列,在末端具有 *MluI*

位点和 *XhoI* 位点,设计此片段使得连接后从每个 *MluI* 和 *XhoI* 位点形成 *NruI* 位点。这样得到其中插入了两个合成 DNA 片段的质粒 *pULL2r*。

合成 DNA 片段

5'-CGAACGCGTATAACTTCGTATAGCATAACATTATACGAAGTTATCTCGAGTCG-3'
3'-GCTTGCGCATATTGAAGCATATCGTATGTAATATGCTTCAATAGAGCTCAGC-5'

划线的序列指 *loxP* 位点。

上述 3) 中得到的 *pUC18CAHBsS* 用限制酶 *SalI* 和 *Ecl136 II* 消化。消化产物用 *Klenow* 酶补平后,形成的产物在琼脂糖凝胶上进行电泳,回收 3.6kb 的 DNA 片段。质粒 *pULL2r* 用限制酶 *NruI* 消化,用碱性磷酸酯酶处理。处理后的质粒与 3.6kb DNA 片段连接,得到目标质粒 *pULCA · HBsS*。

5) 制备以下两个 DNA,以得到带有两端含 *loxP* 位点的 DNA 片段的重组粘性质粒,该片段含有 *HBs* 表达单元和 *SV40* 的复制起点。

(a) 质粒 *pULCA · HBsS* 用限制酶 *SmaI* 和 *EcoRI* 消化,然后用 *Klanow* 酶将两端补平。然后,产物在琼脂糖凝胶上进行电泳,回收 0.3 μ g 的 3.7kb DNA 片段。

(b) 质粒 *pAdexlcw* [SAIBO KOGAKU (*Cell Engineering*), 13, 760—763, 1994] 用限制酶 *SwaI* 消化,得到 1 μ g 消化产物。

将上述 (a) 和 (b) 中所得两个 DNA 产物混合,混合物用与实施例 1, (1), (2) 到 9) 的步骤相同的方法处理,得到目标重组粘粒。

按与实施例 1, (2) 和 (3) 相似的步骤, 得到了带有两个 *loxP* 序列, 在两个 *loxP* 序列之间还含有 SV40 复制起点、CAG 启动子和乙型肝炎病毒表面抗原 (HBs) 的目标重组腺病毒载体 *AdexLLCAHBsSL*。

实施例 3

感染实验

COS—1 细胞或 CV—1 细胞在一直径 6cm 的 *Petri* 皿中培养, 直到此皿的整个底表面布满细胞。

按下列实验步骤将实施例 1 和 2 中制得的腺病毒载体以 *m. o. i*=5 吸收 1 小时。三天后, 收获细胞, 以进行 *Southern* 印迹分析。

即, 重组腺病毒载体 *AdexLLCAHBsSL* 带有 *Hind* III 位点, 约 6.0kb, 在 *loxP* 位点用重组酶 *Cre* 裂解后形成 3.5kb 的环状 DNA 分子。因为该环形 DNA 分子有一个 *Hind* III 位点, 用 *Hind* III 处理后回收的 DNA 用 *Southern* 印迹分析。710bp 的 HBs 片段用作探针。

结果示于图 1 中。

从图 1 中可以清楚地看出, 在第 4 和 8 道观察到了环形 DNA 分子用 *Hind* III 消化产生的 3.5kb 线性 DNA, 即只有实施例 1 和 2 中得到的两种腺病毒载体共同转染时才如此。

当用实施例 2 中所得腺病毒载体和不含重组酶 *Cre* 基因的腺病毒载体转染时, 没有观察到 3.5kb 的带, 而只在第 3 和 7 道观察到 6.0kb 的带, 它是从 *AdexLLCAHBsSL* 用 *Hind* III 酶切而产生的。

再者, 比较第 7 和 8 道间的带密度表明, 环状 DNA 分子在转染

的 *COS*-1 细胞内自主复制 40 倍。另一方面,第 3 道与第 4 道的密度几乎相同,这一事实表明环形 *DNA* 分子在 *CV*-1 细胞中不复制。这与来自 *SV40* 的复制起点在 *CV*-1 细胞中不起作用这一事实相符。

上述结果明显表明,当动物细胞用实施例 1 和 2 中所得本发明的两种腺病毒载体共同转染时,位于载体中两个重组酶识序列之间的 *DNA* 片段被切下并形成一环形 *DNA* 分子,此环形 *DNA* 分子在被转染细胞中自主复制。

上述感染实验如下方便地进行。

当培养基中血清不是 *FCS*(如为 *CS* 时),培养的细胞用无血清培养基洗两次。

在此步骤中以一定量加入病毒溶液(用无血清或 *FCS* 补充的培养基稀释),使细胞表面不干。对 96-孔板的量约为 30—40 μ l,对 24-孔板为 50—70 μ l,对直径为 10cm 的 *Petri* 皿为 100—200 μ l。在与病毒溶液补充前有意保留少量的培养基是切实有利的,然后再向保留的培养基中加入病毒溶液达到上述体积。象跷跷板一样以几秒的间隔摇动培养板几次,病毒溶液均匀分布在细胞上。此操作每 20 分钟进行 3 次,在此操作过程中细胞应放在 CO_2 孵箱中。

完成第三次操作后(转染后一小时),加入常规量的培养液进行常规培养。转染时间一般为 1 小时,(最多)2 小时对此是足够的。

本发明提供了可以转染各种动物细胞的重组 *DNA* 病毒载体,并且外源基因能够在被转染的动物细胞中自主复制。本发明还提供一种产生重组 *DNA* 病毒载体的简单方法。本发明的重组 *DNA* 病毒载体对治疗遗传性疾病特别有用。

序列表

SEQ ID No:1

长度:53 个碱基对

类型:核酸

链型:单链

拓扑学:线性

分子类型:其它核酸(含部分基因组 DNA 的任选 DNA)

假设:是

反义:否

来源:*E. Coli* 噬菌体 P1 DNA

特性鉴定方法:S

序列描述:*SEQ ID No:1*

CGTCTGCAGT GCATCATGAG TAATTTACTG ACCGTACACC AAAATTTGCC TGC 53

SEQ ID No:2

长度:38 个碱基对

类型:核酸

链型:单链

拓扑学:线性

分子类型:其它核酸(含部分基因组 DNA 的任选 DNA)

假设:是

反义:否

来源:*E. Coli* 噬菌体 P1 DNA

特性鉴定方法:S

序列描述:*SEQ ID No:2*

GGCTCTAGAG CGCTTAATGG CTAATCGCCA TCTTCCAG 38

SEQ ID No:3

长度:52个碱基对

类型:核酸

链型:双链

拓扑学:线性

分子类型:其它核酸(含部分基因组 *DNA* 的任选 *DNA*)

假设:是

反义:否

来源:*E. Coli* 噬菌体 *P1 DNA*

特性鉴定方法:*S*

序列描述:*SEQ ID No:3*

CGAACGCGTA TAACTTCGTA TAGCATACAT TATACGAAGT TATCTCGAGT CG 52

说明书附图

图 1

