



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105722984 B

(45) 授权公告日 2021.08.13

(21) 申请号 201480050980.4

(22) 申请日 2014.09.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105722984 A

(43) 申请公布日 2016.06.29

(30) 优先权数据
1358909 2013.09.16 FR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2016.03.16

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/FR2014/052279 2014.09.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02015/036713 FR 2015.03.19

(73) 专利权人 吉尼松公司
地址 法国埃维里

(72) 发明人 大卫·弗纳尔

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

代理人 杨青 缙正煜

(51) Int.Cl.
C12N 15/86 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2013076309 A1, 2013.05.30
Sally McTaggart et al. Effects of
Culture Parameters on the Production of
Retroviral Vectors by a Human Packaging
Cell Line.《Biotechnol. Prog.》.2000,第16卷
(第5期),
Kouki Morizono et al. Transient low pH
treatment enhances infection of
lentiviral vector pseudotypes with a
targeting Sindbis envelope.《Virology》
.2006,

审查员 王溯铭

权利要求书1页 说明书10页 附图6页

(54) 发明名称
生产包膜病毒的方法

(57) 摘要
本发明涉及一种在弱酸性培养基中生产包膜病毒的方法。本发明的方法可用于在符合良好操作规范(或GMP)的条件下大规模生产和回收包膜病毒。

1. 一种生产慢病毒的方法,其特征在于将生产所述慢病毒的宿主细胞在弱酸性培养基中培养,所述培养基的pH在5.8至6.2之间,其中所述慢病毒是假型的,并具有选自VSV-G包膜蛋白或GALVTR包膜蛋白的包膜糖蛋白。

2. 权利要求1的方法,所述培养基的pH为6。

3. 前述权利要求任一项的方法,所述宿主细胞选自HEK293、HEK293T、HEK293FT、Te671、CEM、NIH-3T3、Mpf或D17细胞。

4. 权利要求1-2任一项的方法,所述宿主细胞用编码生产所述慢病毒所需的元件的一种或几种质粒稳定或瞬时转染。

5. 权利要求1-2任一项的方法,所述慢病毒还含有导入到其基因组中的目标转基因。

6. 权利要求1-2任一项的方法,所述方法包括下列步骤:

- 利用编码生产所述慢病毒所需的元件的一种或几种质粒瞬时转染HEK293T细胞;
- 将所述细胞在适合的培养基中培养,所述培养基的pH为6;
- 收获培养物上清液中的慢病毒。

7. 权利要求6的方法,利用4种质粒转染所述细胞:一种质粒带有包含慢病毒的gagpol基因的表达盒,一种质粒带有包含慢病毒的rev基因的表达盒,一种转移质粒带有包含在慢病毒的LTR-5'与LTR-3'之间的目标转基因的表达盒,一种质粒带有包膜糖蛋白的表达盒。

8. 一种用于实施权利要求1至7任一项的方法的试剂盒,所述试剂盒包含弱酸性培养基,或者伴有一种或几种溶液的培养基,所述一种或几种溶液用于将所述培养基的pH调整到弱酸性值,所述培养基的pH在5.8至6.2之间,所述试剂盒还包含:

(a) 用于生产慢病毒的一种或几种适合的质粒,所述慢病毒是假型的,并具有选自VSV-G包膜蛋白或GALVTR包膜蛋白的包膜糖蛋白;和/或

(b) 用于生产所述慢病毒的适合的细胞。

9. 权利要求8的试剂盒,其还包含用于实施权利要求1至7任一项的生产慢病毒的方法的说明书。

生产包膜病毒的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种生产包膜病毒的方法,所述包膜病毒在弱酸性培养基中通过细胞培养来生产。本发明的方法可用于生产这些病毒粒子以应用于生物医学或生物技术研究,以便当生产在观察到良好操作规范(GMP)的条件下大规模进行时,显著提高产品收得率。

背景技术

[0002] 包膜病毒载体以及尤其是慢病毒载体例如源自于人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1) 的病毒载体,在基因治疗方法领域中是有希望的工具。然而,临床等级的这些载体的大量生产目前仍是一种挑战。为了改进它们的生产已提出了几种方法:优化生产所述载体所需的质粒在宿主细胞中的转染(例如转染试剂、细胞密度、质粒比率等的优化),或聚焦于特定细胞代谢途径的细胞培养条件的优化(例如添加脂类、胆甾醇、氯喹、丁酸钠等)(Ansorge等, 2010;Schweizer和Merten,2010)。

[0003] 本发明人具有扩展这一领域和优化物理化学参数的想法,更具体来说对pH条件感兴趣。培养基pH的中性被认为是培养哺乳动物细胞的关键参数。此外,一项研究报道了具有水泡性口炎病毒的包膜糖蛋白(VSV-G)的假型慢病毒在磷酸盐缓冲液中在pH 6下不稳定(Higashikawa和Chang 2001)。考虑到这些因素,本领域技术人员认为降低培养基的pH将对包膜病毒的生产具有负面影响。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明源自于下述观察,即当将生产包膜病毒的细胞在弱酸性培养基中培养时,所述病毒的生产得到提高。所述弱酸性条件以相当令人吃惊的方式提供了生产具有比在常规使用的中性培养基中获得的高2至3倍的感染滴度的病毒的可能性。

[0006] 因此,本发明的目的是将弱酸性条件用于生产包膜病毒。更具体来说,本发明涉及一种生产包膜慢病毒载体的方法,其特征在于用于培养生产所述载体的宿主细胞的培养基是弱酸性培养基。

[0007] 发明详述

[0008] 因此,本发明涉及一种生产包膜载体的方法,其特征在于所述载体在弱酸性条件下生产。

[0009] 表述“弱酸性条件”是指水性溶液的pH在5至6.6之间,特别是5.5至6.6之间或5至6.2之间,更特别是在5.8至6.2之间。尤其是pH等于5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6、6.1或6.2。根据特定实施方式,pH为约6。所选的pH也取决于所使用的培养基的缓冲能力,本领域技术人员能够根据他/她的常识容易地确定所述缓冲能力。

[0010] 本领域技术人员可以改变溶液的pH,尤其是细胞培养基的pH。尤其是,他/她可以在所述溶液中引入酸、尤其是强酸例如盐酸溶液。如果需要,可以使用碱、尤其是强碱例如氢氧化钠溶液重新调整pH,以将它带到所需值。

[0011] 除了作为本发明的目的的弱酸性条件之外,用于生产包膜病毒的方法还应用本领域中公知的方法和材料。在领域技术人员可以参考他/她的在生产包膜病毒方面的常识,尤

其是由文献所说明的常识 (Ansorge等, 2010; Schweizer和Merten, 2010; Rodrigues等, 2011)。

[0012] 在本发明的范围内, 术语“病毒”是指在自然界中存在的天然病毒和基因组相对于它所源自的亲本病毒的基因组来说包含修饰的修饰病毒两者。这可以是减毒病毒, 与它所源自的天然病毒相比已失去其全部或部分致病力。它的基因组在细胞培养物中或在活生物体内连续传代期间被体内修饰。术语“病毒”也可以是指重组病毒, 其基因组通过遗传工程技术在体外修饰。所述修饰可以例如允许失活至少一个对病毒复制来说必需的基因 (使病毒对复制缺陷) 和/或插入编码蛋白质或异源RNA (其通常不被天然病毒编码) 的DNA片段。在后一种情况下, 这被称为“病毒载体”。插入发生在病毒基因组的适合区域中, 以便允许在靶细胞中表达所述异源DNA片段。术语“病毒”还指假病毒粒子, 即在其表面没有任何包膜糖蛋白或没有基因组并且通过病毒的结构和/或酶蛋白的自发装配获得的病毒粒子。

[0013] 根据特定实施方式, 所述包膜病毒是病毒载体。所述病毒载体尤其源自于反转录病毒, 例如慢病毒。按照本发明生产的反转录病毒载体尤其源自于 α -反转录病毒 (例如禽白血病病毒ALV)、 β -反转录病毒 (例如小鼠乳腺肿瘤病毒MMTV)、 γ -反转录病毒 (例如不同类型的鼠白血病病毒MLV)、 δ -反转录病毒 (例如不同类型的人T淋巴细胞病毒HTLV)、 ϵ -反转录病毒 (例如大眼梭鲈皮肤肉瘤病毒WDSV)、泡沫病毒 (例如人泡沫病毒HFV和猴泡沫病毒SFV)、灵长类慢病毒例如不同类型的人免疫缺陷病毒 (人免疫缺陷病毒HIV)、不同类型的猴免疫缺陷病毒 (猴免疫缺陷病毒SIV) 或非灵长类哺乳动物的慢病毒例如马传染性贫血的病毒 (马传染性贫血症病毒EIAV)、猫免疫缺陷病毒 (猫免疫缺陷病毒FIV)、山羊关节炎-脑炎的病毒 (山羊关节炎-脑炎病毒) 或绵羊维斯纳-梅迪病毒 (维斯纳梅迪病毒VMV)。

[0014] 根据特定实施方式, 所述反转录病毒载体特别是慢病毒载体是假型的, 即它包含源自于与所述反转录病毒粒子所源自的病毒不同的病毒的包膜糖蛋白、修饰的包膜糖蛋白或嵌合的包膜糖蛋白。根据特定实施方式, 所述反转录病毒载体是假型的, 并具有源自于水泡性口炎病毒 (VSV-G) 或长臂猿白血病病毒 (长臂猿白血病病毒GALV) 的包膜蛋白, 尽管本领域技术人员可以设想使用其他病毒的包膜糖蛋白 (Frecha等, 2008)。根据特定实施方式, 所述反转录病毒载体、更具体为慢病毒载体是假型的, 并具有修饰的包膜糖蛋白例如GALVTR (GALV的包膜糖蛋白, 其中病毒子内的C-末端已被双嗜性人致白血病病毒A-MLV的包膜糖蛋白的C-末端代替, 因此允许将包膜糖蛋白高效并入慢病毒粒子中) (Christodoulopoulos和Cannon, 2001)。根据特定实施方式, 所述反转录病毒载体、更具体为慢病毒载体是假型的, 并具有嵌合的包膜糖蛋白例如麻疹病毒的包膜糖蛋白, 其中已插入有编码免疫球蛋白的重链和轻链的可变区 (单链可变片段scFv) 的融合蛋白或具有重复的锚蛋白结构域的蛋白 (设计的锚蛋白重复序列蛋白DARPin), 以便允许特异性靶向靶细胞表面处的给定受体 (Anliker等, 2010; Munch等, 2011)。

[0015] 根据特定实施方式, 用于为反转录病毒载体、更具体为慢病毒载体形成假型的病毒包膜糖蛋白, 源自于属于下述科的病毒的包膜糖蛋白: 弹状病毒科, 尤其是水泡病毒属 (例如VSV-G) 或狂犬病毒属 (例如狂犬病毒、莫科拉病毒); 砂粒病毒科 (例如淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)); 披膜病毒科, 更具体为甲病毒属 (例如罗斯河病毒 (RRV)、辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒 (SFV)、委内瑞拉马脑炎病毒、西部马脑炎病毒); 丝状病毒科, 更具体为丝状病毒属 (埃博拉病毒、拉沙病毒); 反转录病毒科, 更具体为 α 反转录病毒属 (例如禽

白血病毒 (ALV)、劳氏肉瘤病毒 (RSV)、 β 反转录病毒属 (例如绵羊肺腺瘤反转录病毒)、 γ 反转录病毒属 (例如不同的鼠白血病毒 (MLV)、野生狒狒猿内源病毒 (BAEV) 或修饰体 (BAEVTR)、野生长臂猿白血病毒 (GALV) 或修饰体 (GALVTR))、 δ 反转录病毒属 (例如人T淋巴细胞病毒 (HTLV-1))、泡沫病毒属 (例如人泡沫病毒)、慢病毒属 (例如梅迪-维斯纳病毒 (MMV))；冠状病毒科,更具体为冠状病毒属 (例如SaRS-CoV)；副粘液病毒科,更具体为呼吸道病毒属 (例如仙台病毒、人3型副流感病毒)、亨尼帕病毒属 (例如尼帕病毒)、麻疹病毒属 (例如麻疹病毒)；黄病毒科,更具体为肝炎病毒属 (例如丙肝病毒 (HCV))；正粘病毒科,更具体为甲型流感病毒属 (例如流感病毒)；杆状病毒科,更具体为核型多角体病毒属 (例如自显影加利福尼亚多粒核多角体病毒)。用于形成假型的包膜糖蛋白更具体来说是修饰的包膜糖蛋白,例如与具有单链可变区ScFV的抗体片段融合的包膜蛋白如麻疹-ScFV、Tupaia-ScFV、辛德毕斯-ScFV包膜糖蛋白,与锚蛋白重复结构域融合的包膜蛋白如麻疹/DARPin包膜蛋白,或展示有缺陷的结合蛋白的VSV-G+纳米抗体。

[0016] 根据特定实施方式,按照本发明生产的反转录病毒、更具体为慢病毒是假型的,并具有VSV-G、麻疹、GALV或BAEV (如果所述病毒是反转录病毒)、GALVTR或BAEVTR (如果所述病毒是慢病毒) 或杆状病毒gp64糖蛋白。

[0017] 此外,所述包膜病毒可以含有导入到其基因组中的目标转基因。当然,目标转基因取决于所述包膜病毒载体所打算的具体用途。作为示例,我们可以提到的是编码治疗性RNA的目标转基因 (例如编码靶RNA或DNA序列的互补反义RNA的目标转基因),编码在患病对象中缺陷或不存在的蛋白质的基因疗法转基因,或用于DNA疫苗接种的转基因,即编码一种蛋白的转基因,所述蛋白的表达将引起接受的生物体的针对所述蛋白的疫苗接种。因此,本发明的方法允许生产可用于基因治疗的包膜病毒载体。有利的是,本发明的方法与良好实验室规范相容,并为设想大规模生产包膜病毒载体、尤其是慢病毒载体、特别是假型慢病毒载体 (特别是具有VSV-G或GALVTR包膜蛋白) 提供了可能性。

[0018] 根据用于生产慢病毒载体的优选实施方式,在宿主细胞中引入下列4个元件:包含慢病毒gagpol基因的表达式,包含慢病毒rev基因的表达式,包含在慢病毒的LTR-5' 与LTR-3' 之间的目标转基因的表达式,以及包膜糖蛋白的表达式。

[0019] 在特定实施方式中,所述包膜病毒、尤其是反转录病毒载体、更具体为慢病毒载体,从表达生产包膜病毒所需的一个或几个元件的稳定株系生产 (Miller 2001;Rodrigues 等,2011),例如人类生产株系GPRG-EF1 α -hx₀OPT,其组成性生产源自于HIV-1的用VSV-G包膜糖蛋白进行假型的慢病毒载体 (Greene等,2012),或例如鼠类生产株系PG13-MFG-GFP,其组成性生产用GALV包膜糖蛋白进行假型的 γ -反转录病毒载体MLV (Merten 2004)。在特定实施方式中,所述包膜病毒从用编码生产所述病毒所需的元件的一种或几种质粒瞬时转染的哺乳动物宿主细胞生产。根据允许生产慢病毒载体的可选实施方式,利用4种质粒将所述元件导入到细胞中:带有包含慢病毒的gagpol基因的表达式盒的质粒,带有包含慢病毒的rev基因的表达式盒的质粒,带有包含在慢病毒的LTR-5' 与LTR-3' 之间的目标转基因的表达式盒的转移质粒,以及带有包膜糖蛋白的表达式盒的质粒。

[0020] 本领域技术人员将从本公开了解到,按照本发明,病毒的生产一开始,就进行在弱酸性培养基中的培养。也就是说,将生产细胞在培养基中培养,所述培养基在与生产细胞接触之前其pH是弱酸性的。根据特定实施方式,将细胞在转染后在弱酸性培养基中培养5至24

小时,更特别地在转染后培养10至20小时,甚至更特别地在转染后培养16至20小时。

[0021] 宿主细胞可以选自允许生产包膜蛋白的任何细胞。根据特定实施方式,所述细胞选自人类细胞(HEK293、HEK293T、HEK293FT、Te671、HT1080、CEM)、鼠科动物细胞(NIH-3T3)、鼯科动物细胞(Mpf)、犬科动物细胞(D17)(Miller 2001;Miller和Chen 1996;Merten 2004;Rodrigues等,2011;Stacey和Merten,2011)。

[0022] 将细胞在适合于培养哺乳动物细胞并生产包膜病毒的培养基中培养。此外,所述培养基可以增补有本领域中公知的添加剂,例如以适合的浓度添加的抗生素、血清(尤其是胎牛血清等)。尤其是,所使用的培养基可以包含血清或者不含任何血清。用于培养哺乳动物细胞的培养基在本领域中是公知的。就此而言,可以提到的是DMEM(Dulbecco改良的Eagle培养基)培养基、RPMI1640或不同培养基的混合物例如包括DMEM/F12,或不含任何血清的培养基如optiMEM®、optiPRO®、optiPRO-SFM®、CD293®、Freestyle F17®(LifeTechnologies)或Ex-Cell®293(Sigma-Aldrich)。

[0023] 在使用瞬时转染的细胞的方法中,可以使用允许质粒转染的任何试剂。尤其是可以使用磷酸钙或聚乙烯亚胺,尽管本领域技术人员可以设想其他的试剂(Ansorge等,2010)。本领域技术人员可以根据所生产的病毒和/或引入到转移质粒中的转基因的特征来改变条件(尤其是质粒的量、质粒之间的比率、质粒与转染试剂之间的比率、培养基的类型等)和转染时间长度。

[0024] 然后按照本领域中公知的方法从培养上清液收获包膜病毒。

[0025] 根据特定实施方式,本发明的方法包括下列步骤:

[0026] -利用编码生产所述包膜载体所需的元件的一种或几种质粒瞬时转染HEK293T细胞;

[0027] -将所述细胞在适合的培养基中培养,所述培养基的pH为约6;

[0028] -收获培养上清液中的包膜病毒。

[0029] 根据这种实施方式的可选替形式,生产的包膜病毒是在利用4种质粒转染细胞后产生的慢病毒:一种质粒带有包含慢病毒的gagpol基因的表达盒,一种质粒带有包含慢病毒的rev基因的表达盒,一种转移质粒带有包含在慢病毒的LTR-5'与LTR-3'之间的目标转基因的表达盒,一种质粒带有包膜糖蛋白的表达盒。根据一种可选替形式,所述包膜蛋白源自于VSV病毒(尤其是VSV-G包膜)或GALV病毒(尤其是用于慢病毒载体的GALVTR修饰糖蛋白)。

[0030] 然后可以按照本领域技术人员公知的方法纯化产生的病毒或病毒载体(Segura等,2011)。

[0031] 此外,本发明涉及一种用于培养哺乳动物细胞的培养基,所述培养基是弱酸性的。具体来说,所述培养基具有5.5至6.6之间、更特别的5.8至6.2之间的pH。更具体来说,本发明的培养基的pH为约6。根据另一个特定实施方式,所述培养基是弱酸性DMEM,尤其是具有本文中前面所定义的pH。具体来说,本发明的培养基是具有5.8至6.2之间的pH的DMEM培养基,特别是pH 6的DMEM培养基。应该理解,本发明的培养基以在培养细胞之前具有弱酸性pH为特征。

[0032] 此外,本发明涉及一种用于执行如上所定义的生产包膜病毒的方法的试剂盒,所述试剂盒包含弱酸性培养基,或者伴有的一种或几种溶液的培养基,所述一种或几种溶液用

于将所述培养基的pH调整到弱酸性值,所述试剂盒还包含:

[0033] (a) 用于生产包膜病毒的一种或几种适合的质粒;和/或

[0034] (b) 用于生产所述病毒的适合的细胞。

[0035] 本发明的试剂盒旨在用于生产本发明的包膜病毒。因此,它还可以包含所述试剂盒的不同组分的使用说明书,以允许生产本发明的包膜病毒。具体来说,这些说明书可以指示如何将旨在用于生产的细胞用适合的质粒转染并在培养基中培养。具体来说,所述说明书指示了生产包膜病毒的细胞必须在具有如上所定义的弱酸性pH的培养基中培养。

[0036] 本发明还涉及一种用于实施如上所定义的生产包膜病毒的方法的试剂盒,所述试剂盒包含:(i) 用于实施所述方法的工具,以及(ii) 实施所述方法所需遵循的说明书。根据特定实施方式,所述试剂盒中包含的工具选自下列一种或几种工具:

[0037] (a) 用于生产包膜病毒的一种或几种适合的质粒;

[0038] (b) 用于生产所述病毒的适合的细胞;以及

[0039] (c) 弱酸性培养基,或者伴有一种或几种溶液的培养基,所述一种或几种溶液用于将所述培养基的pH调整到弱酸性值。

[0040] 因此,本发明的试剂盒尤其可以包含工具(a)和(b)、(a)和(c)、(b)和(c)、或(a)和(b)和(c)。

[0041] 本发明还涉及一种用于实施如上所定义的生产包膜病毒的方法的试剂盒,所述试剂盒包含培养基并伴有用于将所述培养基的pH调整到弱酸性值的一种或几种溶液。

附图说明

[0042] 图1.在多种不同pH条件下具有GALVTR包膜的假型慢病毒载体(GALVTR-LV)的生产。(a)使用盐酸或氢氧化钠将培养基(DMEM/FCS)缓冲到指示的pH。培养基中包含的pH指示剂(酚红)具有从黄色(pH 6)到紫色(pH 8)的颜色范围。(b)从在处于所指示的pH值下的DMEM/SVF培养基中培养HEK293T的细胞生产GALVTR-LV粒子。在HCT116细胞转导并通过流式细胞术定量GFP转基因的表达水平后,确定感染滴度(TU/ml)。上清液的物理粒子GALVTR-LV含量,通过利用商品化ELISA试剂盒定量测量HIV-1的衣壳p24来定量。对应于感染滴度与物理粒子的量之间的比率的比活性(TU/ng p24)在柱状图下图示说明。结果代表了两次独立实验的平均值±标准偏差。在pH 7.2或pH 6的培养基中生产7批GALVTR-LV载体并滴定,以得到它们的感染粒子(c)或物理粒子(d)的含量。(e)图示说明了每种GALVTR-LV上清液的比活性。条指示分布的平均值。

[0043] 图2.在中性或微酸性pH条件下VSV-G-LV慢病毒载体的生产。(a)从在处于所指示的pH下的DMEM/SVF培养基中培养的HEK293T细胞生产6批VSV-G-LV载体。如图1b中所示确定感染滴度。(b)物理粒子的量通过利用商品化ELISA试剂盒定量测量HIV-1的p24衣壳来确定。(c)图示说明了每种VSV-G-LV上清液的比活性。条指示分布的平均值。

[0044] 图3.在中性或微酸性pH条件下GALV-MLV γ -反转录病毒载体的生产。从在处于所指示的pH下的DMEM/SVF培养基中培养的HEK293T细胞生产6批GALV-MLV载体。如图1b中所示确定感染滴度。条指示分布的平均值。

[0045] 图4.GALVTR-LV慢病毒粒子在几个冷冻/融化循环后的稳定性研究。(a)载体的冷冻/融化程序的示意图。(b)将在pH 7.2(黑色)或pH 6(灰色)下生产的几批GALVTR-LV载体

暴露于1个或2个冷冻/融化循环。如图1b中所示确定感染滴度。数据代表了获得的各种不同感染滴度(左图),或相对于与1个冷冻/融化循环相对应的条件归一化至100%(右图)。室温(R.T.),冷冻(Freez.),融化(Thaw.)。

[0046] 图5.GALVTR-LV慢病毒粒子在暴露于37℃的温度后的稳定性研究。将含有1毫升在pH 7.2或pH 6下生产的GALVTR-LV粒子的冷冻管在37℃下温育0至4天。接下来,如图1b中所示确定感染滴度。(a)数据被表示成从3个独立实验获得感染滴度,或(b)感染滴度的平均值±标准偏差,并相对于对照条件(对应于未在37℃下暴露的GALVTR-LV载体的条件)归一化至100%。

[0047] 图6.在处于中性或微酸性pH下的培养基中培养的生产性HEK293T细胞中细胞内p55gag的表达水平的研究。(a)在pH 7.2或pH 6下生产GALVTR-LV载体的HEK293T细胞的裂解液中p55gag表达的蛋白质印迹。将p55gag的表达水平相对于肌动蛋白的表达水平进行归一化。(b)柱状图代表了在4个独立实验中相对于肌动蛋白的表达水平归一化的p55gag的平均表达水平±标准偏差。

实施例

[0048] 设备和方法

[0049] 细胞培养

[0050] 将源自于人类结肠直肠癌的HCT116细胞(CCL-247;ATCC,Manassas,VA)、HEK293T人胚胎肾细胞(Merten等,2011)和生产 γ -反转录病毒GALV-MLV的细胞(PG13-MFG-GFP株系)(Fenard等,2013)在37℃和5%CO₂下,在增补有2至10%的热失活胎牛血清(FCS)(Life Technologies,St-Aubin,France)的Dulbecco改良的Eagle培养基(DMEM+Glutamax)中培养。使用盐酸或氢氧化钠将DMEM/FCS培养基缓冲到所指示的pH值,然后在滤器(0.22 μ)上除菌。

[0051] 病毒载体的生产和滴定

[0052] 源自于HIV-1的慢病毒载体通过用磷酸钙将4种质粒在HEK293T细胞中瞬时转染来产生(Fenard等,2013):gagpol(pKlgagpol)和rev(pBArev)的表达质粒,编码绿色荧光蛋白GFP的转移质粒(pCCL-eGFP)和编码GALVTR包膜糖蛋白(pBA.GALV/Ampho-Kana)或VSV-G(pMDG)的质粒。在转染后16至20hrs,将HEK293T细胞清洗并在缓冲到所指示的6至8之间的pH值的DMEM/SVF培养基中温育。在生产24h后,收集病毒上清液,过滤(0.45 μ)并在-80℃冷冻。物理粒子的滴度通过利用商品化ELISA试剂盒(Perkin Elmer,Courtaboeuf,France)定量测量HIV-1的p24衣壳而确定。感染滴度在HCT116细胞上通过用流式细胞术(FACSCalibur,BD Biosciences,Le Pont de Claix,France)检测GFP来确定,滴度被表示成每毫升的转导单位(TU/ml)(Fenard等,2013)。

[0053] 病毒载体暴露于37℃的温度和多个冷冻/融化循环

[0054] 将用于冷冻在pH 7.2或6下生产的1ml含有GALVTR-LV(具有包膜糖蛋白GALVTR的假型慢病毒载体)的上清液的管,在37℃下温育所指示的时间(所述管具有保持关闭的螺旋盖)。接下来,将管再次在-80℃冷冻,并对所有条件同时进行在HCT116细胞上的滴定,以便防止实验间变差。

[0055] 对于冷冻/融化的稳定性实验来说,第一和第二个冷冻/融化循环使用来自于相同

GALVTR-LV生产的两个不同样品平行地进行。这一程序允许同时评估所有GALVTR-LV的感染滴度,以便避免任何实验间变差。

[0056] 蛋白质印迹和分析

[0057] 将生产细胞清洗并在含有50mM Tris-HCl pH 7.5、200mM NaCl、1%Triton X-100、0.1%SDS、0.5%脱氧胆酸钠、10%甘油、1mM EDTA、1mM PMSF并增补有蛋白酶抑制剂混合物(完全蛋白酶抑制剂混合物,Roche Diagnostics,Meylan,France)的缓冲液中裂解。利用Bio-Rad DC蛋白质测定试剂盒I(Bio-Rad,Marnes-la-Coquette,France)确定蛋白质浓度。将蛋白质(30μg/道)在10%SDS-聚丙烯酰胺电泳凝胶(PAGE)上分离,转移到硝酸纤维素膜Hybond ECL(GE Healthcare Life Sciences,Velizy-Villacoublay,France)上,并通过将山羊抗p24抗体(AbdSerotec,Oxford,UK)与小鼠抗肌动蛋白抗体(AC-15克隆)(Sigma-Aldrich,St-Quentin-Fallavier,France)组合来产生免疫印迹。使用与IRDye 800偶联的驴抗山羊抗体和与IRDye 680偶联的驴抗小鼠抗体作为第二抗体(Eurobio,Courtaboeuf,France)。使用红外Odyssey扫描仪检测免疫反应性条带,并使用分析软件Odyssey 3.0(LICOR Biosciences,Lincoln,NE)定量。

[0058] 统计分析

[0059] 利用GraphPad Prism 5软件,使用非参数Wilcoxon检验确定P值。

[0060] 结果

[0061] 在弱酸性培养基中生产GALVTR-LV慢病毒载体

[0062] 利用GALVTR包膜糖蛋白形成假型的慢病毒载体(LV)(GALVTR-LV)以高度有效的方式转导造血干细胞(Sandrin等,2002;Jacome等,2009)。然而,这种类型的载体的大规模生产仍然是巨大的挑战。评估了GALVTR-LV载体在pH 6至8的各种不同培养基中的生产效率(图1a)。图1b显示,在pH 8下获得的感染滴度相对于在典型的7.2的pH下的感染滴度强烈降低。相反,并且以相当令人吃惊的方式,在pH 6的培养基中产生的GALVTR-LV的感染滴度明显高于(2.3x)在pH 7.2下获得的感染滴度(图1b和1c)。重要的是注意到,我们在pH 6下生产的GALVTR-LV上清液中平行地观察到p24抗原的量的增加(图1b和1d)。这种正相关性导致在中性或弱酸性pH下生产的载体之间比活性稳定(图1b和1e),而在pH 8下该比活性强烈降低(图1b)。因此,弱酸性条件的使用代表了生产大量GALVTR-LV载体的最适条件。

[0063] 弱酸性pH条件对具有VSV-G蛋白的假型慢病毒载体和具有GALV蛋白的假型MLV γ-反转录病毒载体的生产的影响

[0064] 使用GALVTR-LV载体获得的令人鼓舞的结果促使我们试验将这些相同的条件用于生产具有在本领域中广泛使用的包膜糖蛋白VSV-G蛋白的假型慢病毒载体(VSV-G-LV载体)。图3显示,pH 6的培养基允许VSV-G-LV感染粒子(图2a)和VSV-G-LV物理粒子(图2b)生产的显著增加,平均为1.5倍,并具有稳定的比活性(图2c)。由Higashikawa团队(前面引用的文献)报道的等于6的pH的有害效应可能是被这些作者使用的程序的结果,所述作者在中性pH下生产反转录病毒粒子,浓缩它们然后在缓冲到pH 6的非离子性溶液中稀释它们,导致病毒上清液的感染性丧失90%。出人意料的是,直接在增补有FCS的pH 6的培养基中生产的VSV-G-LV粒子不仅稳定,而且出人意料地以比它们从通常被认为对这种类型的生产来说最适的pH 7.2的培养基生产时更高的水平生产。

[0065] 为了确保观察到的改进不依赖于所使用的HEK293T细胞或仅仅生产慢病毒载体,

评估了弱酸性pH对生产GALV-MLV的细胞系PG13-MFG-GFP (具有包膜糖蛋白GALV的假型MLV γ -反转录病毒)的影响(Merten 2004)。原始的PG13细胞系是以稳定的方式用MLV病毒的包装系统(pLGPS)和编码GALV包膜糖蛋白的构建物(pMOV-GALV)转染的鼠类成纤维细胞(NIH-3T3)的细胞系(Miller等,1991)。为了以组成性方式生产反转录病毒GALV-MLV假型,将编码置于MLV的LTR启动子控制之下的GFP蛋白的转移质粒(pMFG-GFP)以稳定的方式导入到PG13细胞系中。在平行产生的细胞培养物中,将PG13-MFG-GFP细胞在缓冲到pH 7.2或pH 6的DMEM中温育,并且在24至48小时后,评估收获的上清液中感染粒子的含量。图3显示在弱酸性pH下,GALV-MLV粒子的生产显著增加。这个结果是特别有趣的,因为它显示所提出的生产方法不限于人类细胞系例如HEK293T细胞系,并且除了特别适应于生产慢病毒载体之外,它不限于生产慢病毒属的载体,因为利用本发明的程序可以更高效地生产其他包膜病毒。

[0066] 暴露于几个冷冻/融化循环的GALVTR-LV粒子的稳定性

[0067] 收获到的慢病毒载体的上清液在纯化之前一般被储存在-80℃。以前可能推测,弱酸性pH条件将会具有在冷冻或融化程序期间增加病毒粒子失活的不利影响。因此,使GALVTR-LV粒子的上清液经历1个或2个冷冻/融化循环,并在每个融化步骤时确定感染滴度(图4a)。图4b显示,弱酸性条件不影响粒子的感染性。与单个循环相比,在两个冷冻/融化循环后感染滴度的平均降低在pH 7.2和pH 6两种条件下仅为5%。因此,当将慢病毒载体在弱酸性条件下冷冻时,感染性不改变。

[0068] GALVTR-LV粒子长期暴露于37℃的温度的影响

[0069] 在慢病毒转导期间,将在我们的情形中为哺乳动物细胞的靶细胞在37℃的温度下培养。因此,我们试图确定在弱酸性pH下生产慢病毒载体对它们在更多或更少的长期暴露于37℃的温度后的稳定性是否具有不利影响。为此,将含有在pH 7.2或pH 6下生产的GALVTR-LV载体上清液的冷冻用管在37℃下温育0至4天,并追踪感染性降低的动力学。如图5a中所示,尽管对于在pH 7.2下生产的GALVTR-LV载体和在pH 6下生产的载体两者来说感染滴度在长期暴露于37℃后都强烈降低,但对于在pH 6下生产的GALVTR-LV载体来说这种降低的斜率较不显著。对pH 6下生产的GALVTR-LV载体得到的半衰期为对pH7下生产的GALVTR-LV载体所观察到的半衰期的两倍(约2天相比于1天,参见图5b)。有趣的是,这个实验显示,在封闭环境(具有封闭的螺旋盖的管)中,GALVTR-LV载体的粗上清液在37℃的温度下相当具有抗性(半衰期为1至2天)。这与在细胞培养物中显示出仅仅6h的半衰期(Strang等,2004)的稳定性相反,表明当在细胞培养物中在37℃下评估慢病毒载体的稳定性时,还必须考虑到温度之外的参数例如氧化胁迫。

[0070] 在弱酸性pH下培养的HEK293T生产细胞中p55gag的细胞内表达水平的调节

[0071] 在GALVTR-LV上清液中收获的HIV-1的p24蛋白的量在弱酸性条件下得到提高(图1b和1d)。因此,我们试图确定这种提高是否可能是生产细胞中HIV-1的p55gag前体蛋白的细胞内表达水平提高的结果。在图6a中,免疫印迹实验显示相对于pH 7.2,在pH 6下p55gag的细胞内表达提高,平均过表达为160%(图6b)。p55gag的细胞内过表达与慢病毒上清液中p24蛋白量的增加之间的这种正相关性,表明弱酸性条件产生对病毒组分的最适表达更加有利的环境。

[0072] 参考文献

[0073] Anliker,B.,T.Abel,S.Kneissl,J.Hlavaty,A.Caputi,J.Brynza等,(2010)，“使

用慢病毒载体向神经元、内皮细胞和造血祖细胞的特异性基因转移”(Specific gene transfer to neurons, endothelial cells and hematopoietic progenitors with lentiviral vectors), Nat. Methods 7(11):929-935。

[0074] Ansorge, S., O. Henry 和 A. Kamen (2010), “慢病毒载体大规模生产的最新进展”(Recent progress in lentiviral vector mass production), Biochem. Eng. J. 48(3):362-377。

[0075] Christodoulouopoulos, I. 和 P. M. Cannon (2001), “长臂猿白血病病毒包膜蛋白的细胞质尾部中防止它并入到慢病毒载体中的序列”(Sequences in the cytoplasmic tail of the gibbon ape leukemia virus envelope protein that prevent its incorporation into lentivirus vectors), J. Virol. 75(9):4129-4138。

[0076] Fenard, D., D. Ingraio, A. Seye, J. Buisset, S. Genries, S. Martin 等, (2013), “Vectofusin-1 这种新的病毒侵入增强剂强烈促进人造血干细胞的慢病毒转导”(Vectofusin-1, a new viral entry enhancer, strongly promotes lentiviral transduction of human hematopoietic stem cells), Mol Ther Nucleic Acids 2:e90。

[0077] Frecha, C., J. Szecsi, F. L. Cosset 和 E. Verhoeyen (2008), “慢病毒载体的定向策略”(Strategies for targeting lentiviral vectors), Curr. Gene Ther. 8(6):449-460。

[0078] Greene, M. R., T. Lockey, P. K. Mehta, Y. S. Kim, P. W. Eldridge, J. T. Gray 等, (2012), “用自失活慢病毒载体转导人 CD34⁺ 再植细胞以通过稳定细胞系以临床规模生产 SCID-X1”(Transduction of human CD34⁺ repopulating cells with a self-inactivating lentiviral vector for SCID-X1 produced at clinical scale by a stable cell line), Hum Gene Ther Methods 23(5):297-308。

[0079] Higashikawa, F. 和 L. Chang (2001), “简单和复杂反转录病毒载体的稳定性的动力学分析”(Kinetic analyses of stability of simple and complex retroviral vectors), Virology 280(1):124-131。

[0080] Jacome, A., S. Navarro, P. Rio, R. M. Yanez, A. Gonzalez-Murillo, M. L. Lozano 等, (2009), “来自于范可尼贫血患者的造血和间质祖细胞的慢病毒介导的遗传校正”(Lentiviral-mediated genetic correction of hematopoietic and mesenchymal progenitor cells from Fanconi anemia patients), Mol. Ther. 17(6):1083-1092。

[0081] Merten, O. W. (2004), “反转录病毒载体的生产现状”(State-of-the-art of the production of retroviral vectors), J. Gene Med. 6 Suppl 1:S105-124。

[0082] Merten, O. W., S. Charrier, N. Laroudie, S. Fauchille, C. Dugue, C. Jenny 等, (2011), “为临床离体基因治疗应用而生产的慢病毒载体的大规模制造和表征”(Large-scale manufacture and characterization of a lentiviral vector produced for clinical ex vivo gene therapy application), Hum. Gene Ther. 22(3):343-356。

[0083] Miller, A. D. (2001), “反转录病毒的生产”(Production of retroviral vectors), Curr. Protoc. Hum. Genet. Chapter 12:Unit 12 15。

[0084] Miller, A. D., J. V. Garcia, N. von Suhr, C. M. Lynch, C. Wilson 和 M. V. Eiden (1991), “基于长臂猿白血病病毒的反转录病毒包装细胞的构建和性质”(Construction and properties of retrovirus packaging cells based on gibbon ape leukemia

virus), J Virol 65 (5):2220-2224.

[0085] Miller AD, Chen F. (1996), “用于生产利用多个受体进行细胞侵入的载体的基于10A1鼠类白血病病毒的反转录病毒包装细胞” (Retrovirus packaging cells based on 10A1 murine leukemia virus for production of vectors that use multiple receptors for cell entry), J. Virol. 70:5564-5571.

[0086] Munch, R.C., M.D. Muhlebach, T. Schaser, S. Kneissl, C. Jost, A. Pluckthun等, (2011), “DARPin: 一种用于慢病毒载体的高效靶向结构域” (DARPin: an efficient targeting domain for lentiviral vectors), Mol. Ther. 19 (4):686-693.

[0087] Rodrigues, A.F., P.M. Alves和A.S. Coroadinha (2011), “反转录病毒和慢病毒基因治疗载体的生产: 制造脂类包膜病毒中的挑战” (Production of Retroviral and Lentiviral Gene Therapy Vectors: Challenges in the Manufacturing of Lipid Enveloped Virus), Viral Gene Therapy. K. Xu, InTech. Chapter 2:15-40.

[0088] Sandrin, V., B. Boson, P. Salmon, W. Gay, D. Negre, R. Le Grand等, (2002), “具有修饰的RD114包膜糖蛋白的假型慢病毒载体显示出提高的血清稳定性和源自于人类和非人类灵长动物的初代淋巴细胞和CD34+细胞的增强的转导” (Lentiviral vectors pseudotyped with a modified RD114 envelope glycoprotein show increased stability in sera and augmented transduction of primary lymphocytes and CD34+ cells derived from human and non-human primates), Blood 100 (3):823-832.

[0089] Schweizer, M. 和 O.W. Merten (2010), “用于制造慢病毒载体的大规模生产手段” (Large-scale production means for the manufacturing of lentiviral vectors), Curr. Gene Ther. 10 (6):474-486.

[0090] Segura, M.M., A.A. Kamen和A. Garnier (2011), “用于纯化病毒载体的现有可变规模方法的概述” (Overview of current scalable methods for purification of viral vectors), Methods Mol Biol 737:89-116.

[0091] Stacey GN, Merten O-W (2011), 第3章, “宿主细胞和细胞库制作” (Chapter 3: Hosts cells and cell banking), 在 Merten O-W, Al-Rubeai M 主编的《用于基因治疗的病毒载体: 方法和流程》(Viral Vectors for Gene Therapy: Methods and Protocols) 中, 分子生物学方法丛书 (Methods in Molecular Biology 737), Humana Press, New York, NY, pp 45-88.

[0092] Strang, B.L., Y. Ikeda, F.L. Cosset, M.K. Collins和Y. Takeuchi (2004), “从稳定包装细胞生产的具有 γ 反转录病毒包膜糖蛋白的HIV-1载体的表征” (Characterization of HIV-1 vectors with gamma retrovirus envelope glycoproteins produced from stable packaging cells), Gene Ther. 11 (7):591-598.

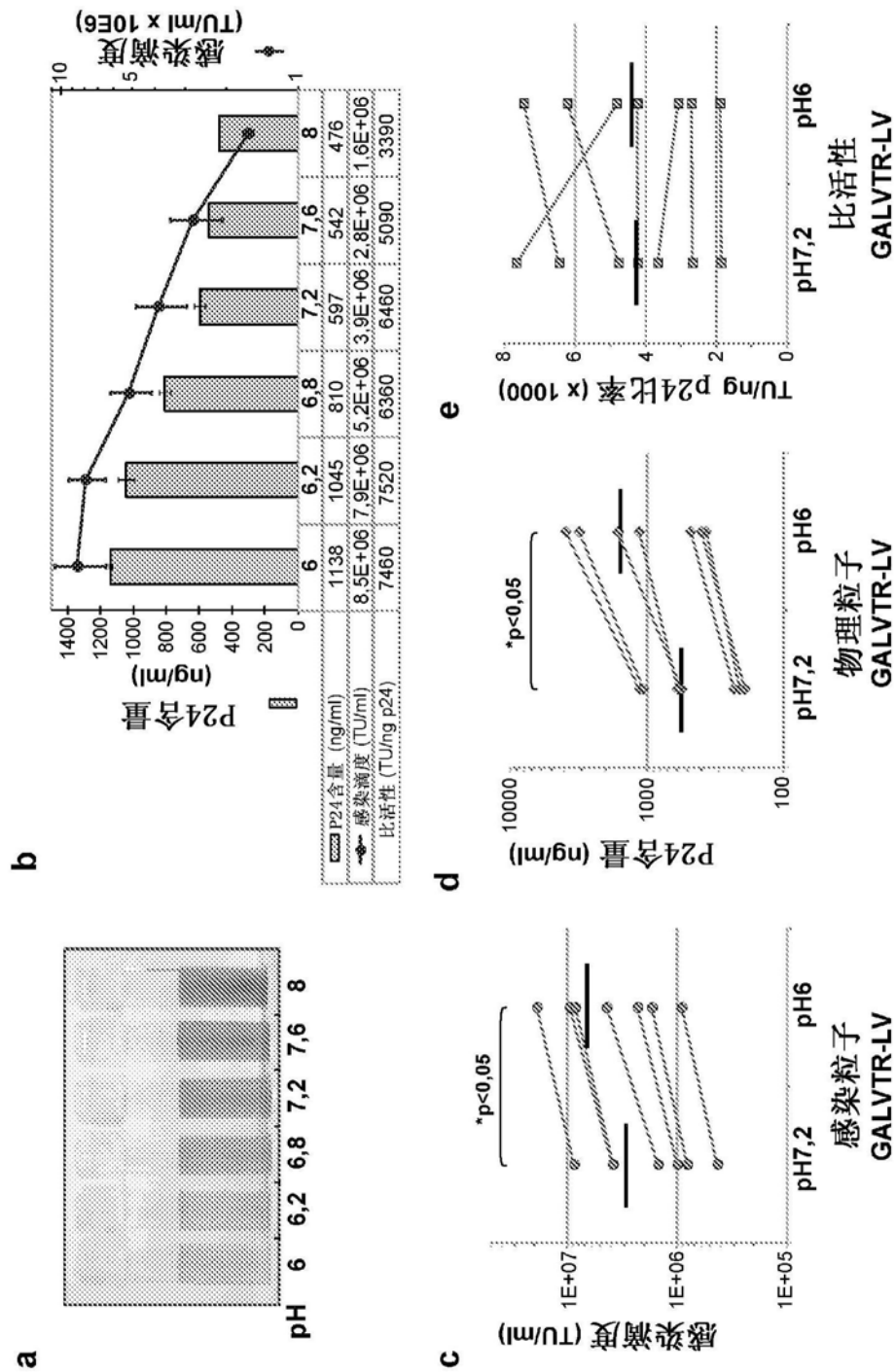


图1

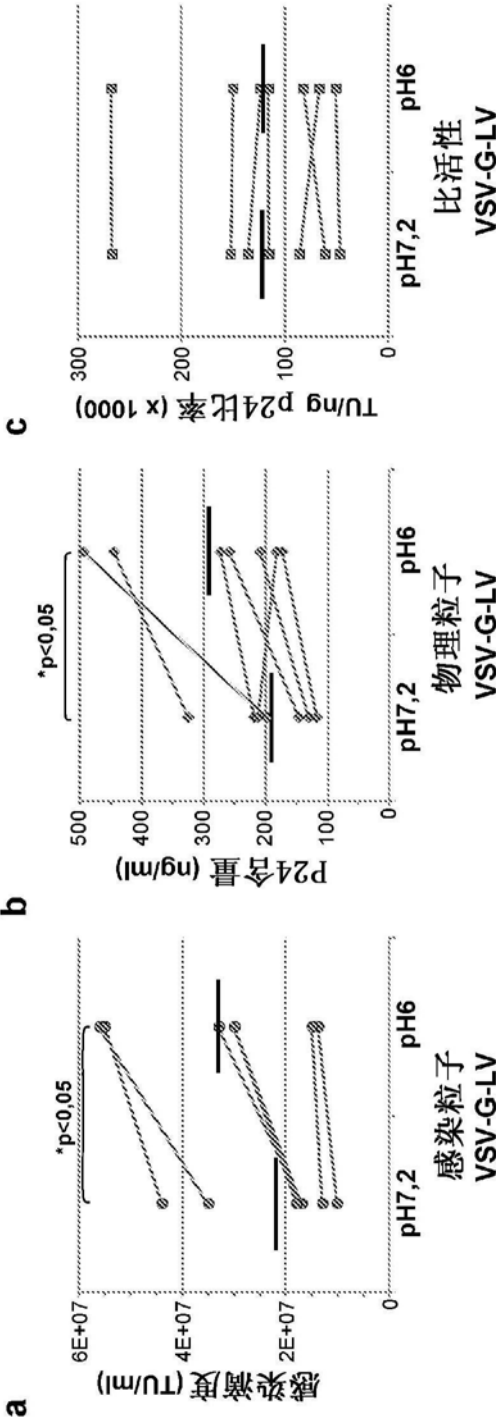


图2

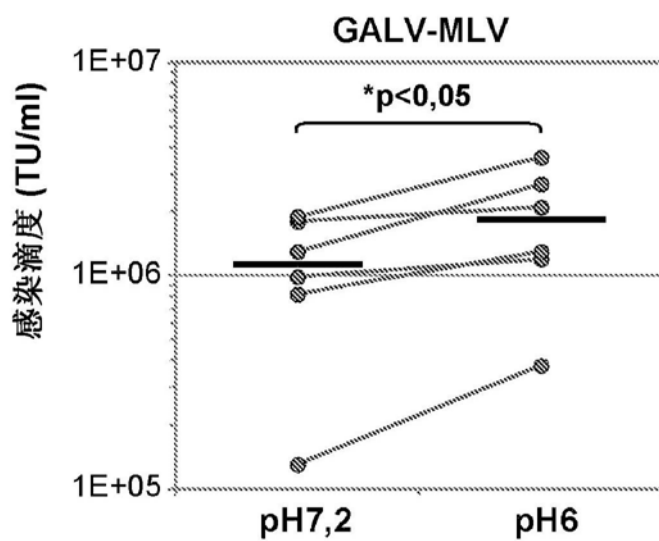


图3

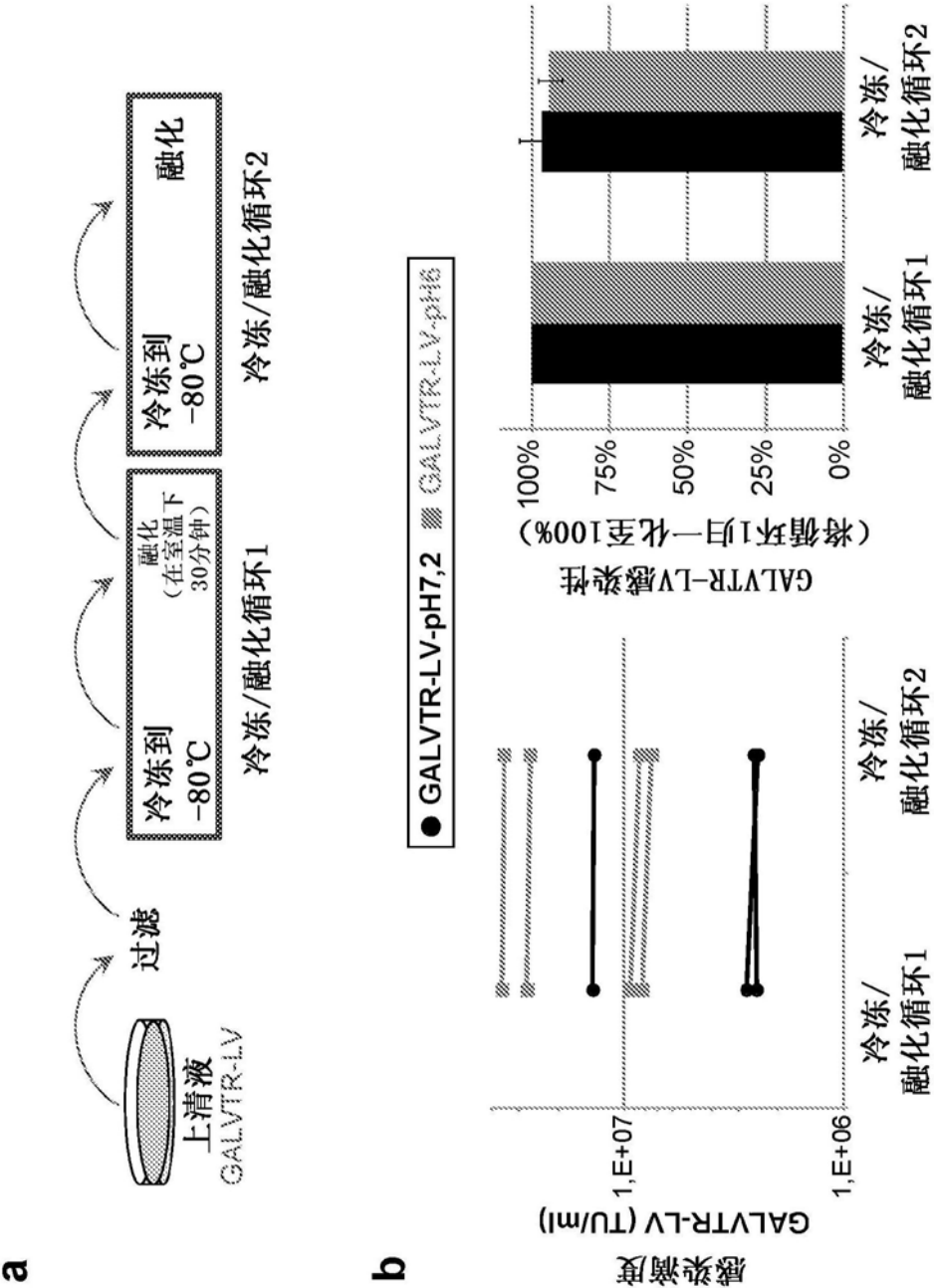


图4

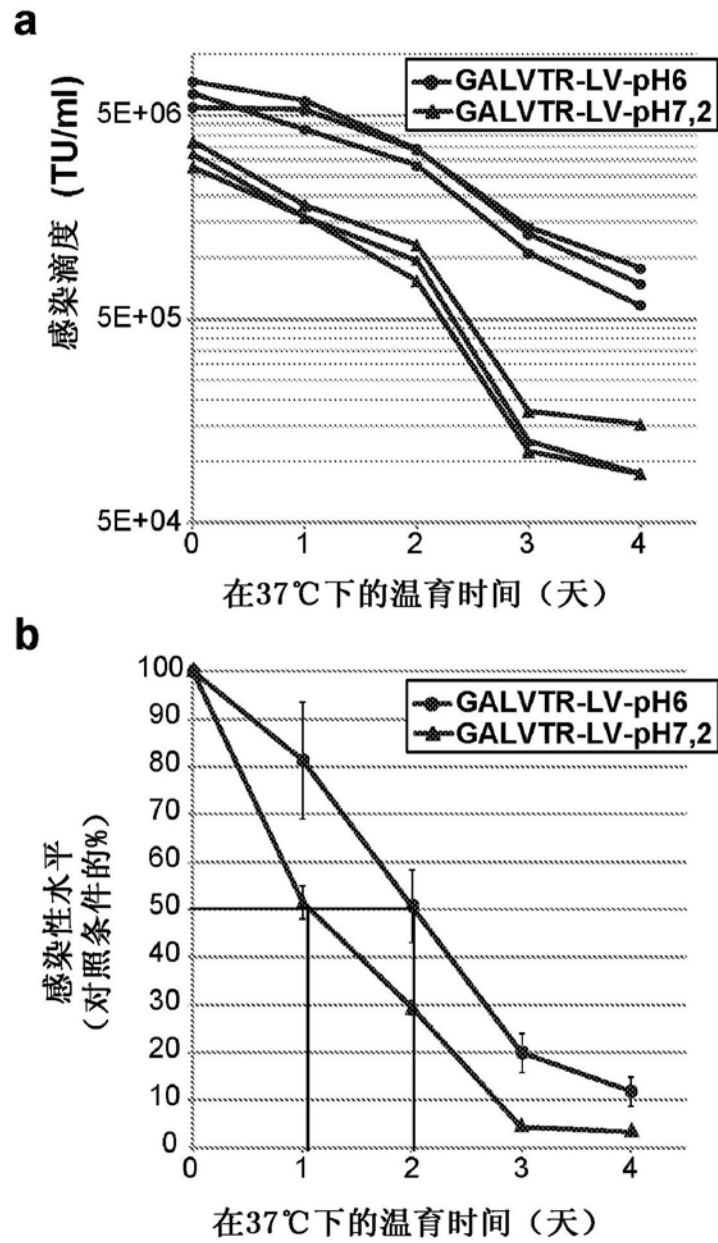


图5

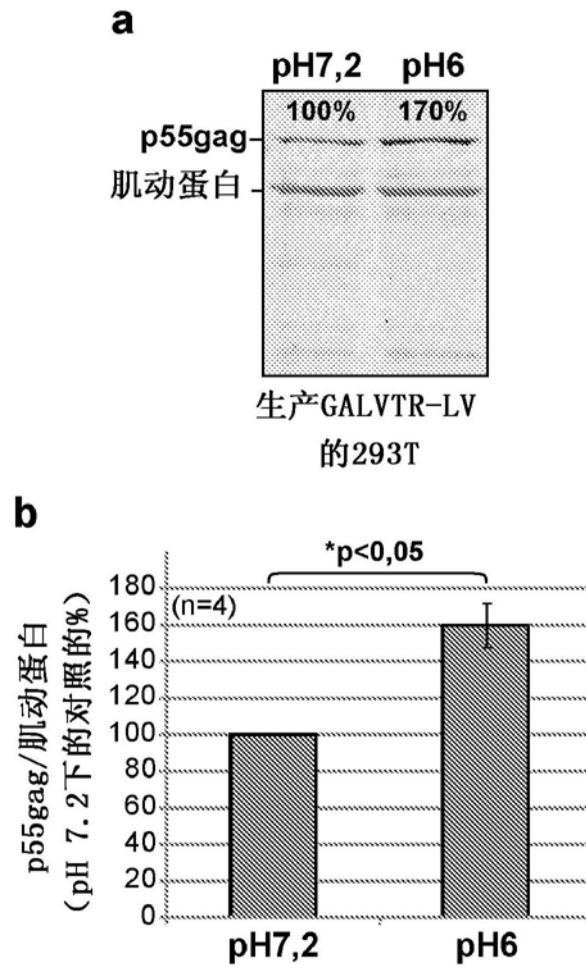


图6