(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107660231 A
(43)申请公布日 2018.02.02

(21)申请号 201680031516.X

(22)申请日 2016.05.12

(30)优先权数据
62/161,133 2015.05.13 US
62/161,152 2015.05.13 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.12.01

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/031959 2016.05.12

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/183260 EN 2016.11.17

(71)申请人 卡琳缪恩股份有限公司
地址 美国亚利桑那州

(72)发明人 C-L·李 J·S·巴特利特

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所(普通合伙) 44240
代理人 金辉

(51)Int.Cl.
C12N 15/63(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)

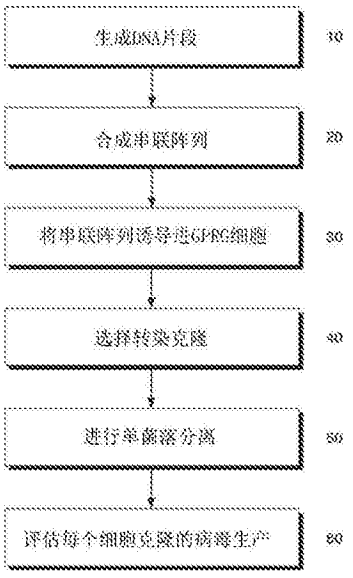
权利要求书4页 说明书25页
序列表12页 附图15页

(54)发明名称

慢病毒载体的生物生产

(57)摘要

本公开提供了生成稳定生产细胞系的方法。稳定生产细胞系的生成,例如根据本发明提供的那些,增加了重现性,并且使创建高滴度的慢病毒种群更加容易,同时缓解生物安全问题,并且在表达的包膜蛋白中的变化限定了所生成的病毒的向性。本公开还提供了新的慢病毒转移载体质粒。



CN 107660231 A

1.一种重组质粒,包含与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的核苷酸序列。

2.根据权利要求1所述的重组质粒,其中所述核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少95%同一性。

3.一种重组质粒,包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列。

4.一种重组质粒,包含与SEQ NO:2具有至少90%同一性的核苷酸序列。

5.一种重组质粒,具有与SEQ ID NO:1所示的序列不同不超过100个核苷酸的序列。

6.根据权利要求5所述的重组质粒,其中所述序列与SEQ ID NO:1所示的序列不同不超过50个核苷酸。

7.一种重组质粒,包含大约6500个至大约6750个之间的核苷酸,其中所述质粒包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的序列。

8.根据权利要求7所述的重组质粒,其中所述质粒包含大约6600个至大约6700个之间的核苷酸。

9.根据权利要求7所述的重组质粒,其中所述质粒包含大约6611个核苷酸。

10.一种重组质粒,如图11所示的如pUC57-TL20c。

11.一种重组质粒,包含本质上由BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点组成的多克隆位点。

12.根据权利要求11所述的重组质粒,其中所述质粒进一步包含编码包装信号的核苷酸序列、编码中央多嘌呤段的核苷酸序列、编码Rev应答元件的核苷酸序列以及编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列。

13.一种重组质粒,包含(a)编码包装信号的核苷酸序列;(b)编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列;(c)编码Rev应答元件的核苷酸序列;(d)编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列;和(e)编码具有用于酶BstBI、Mlu I、Not I和Cla I的限制性位点的多克隆位点的核苷酸序列。

14.根据权利要求13所述的重组质粒,其中编码包装信号的核苷酸序列包含SEQ ID NO:3的序列。

15.根据权利要求13所述的重组质粒,其中编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列包含SEQ ID NO:4的序列。

16.根据权利要求13所述的重组质粒,其中编码Rev应答元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:5的序列。

17.根据权利要求13所述的重组质粒,其中编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的序列。

18.根据权利要求13所述的重组质粒,其中编码多克隆位点的核苷酸序列包含SEQ ID NO:7的序列。

19.一种重组质粒,包含(a)包装序列,所述包装序列存在于质粒的核苷酸序列的约第762位核苷酸至约第1104位核苷酸;(b)中央多嘌呤段,所述中央多嘌呤段存在于质粒核苷酸序列的大约第1121位核苷酸至大约第1597位核苷酸;(c)Rev应答元件,所述Rev反应元件存在于质粒核苷酸序列的大约第1598位核苷酸至大约第2366位核苷酸;(d)自灭活的长终末重复序列,所述自灭活的长终末重复序列存在于质粒核苷酸序列的大约第409位核苷酸至大约第589位核苷酸;和(e)多克隆位点,所述多克隆位点存在于质粒核苷酸序列的大约

第2376位核苷酸至大约2400位核苷酸。

20.根据权利要求19所述的重组质粒，其中所述质粒核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的序列。

21.根据权利要求19所述的重组质粒，其中编码包装信号的核苷酸序列含SEQ ID NO:3的序列。

22.根据权利要求19所述的重组质粒，其中编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列包含SEQ ID NO:4的序列。

23.根据权利要求19所述的重组质粒，其中编码Rev应答元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:5的序列。

24.根据权利要求19所述的重组质粒，其中编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的序列。

25.根据权利要求19所述的重组质粒，其中编码多克隆位点的核苷酸序列包含SEQ ID NO:7的序列。

26.一种重组质粒，包含多克隆位点，所述多克隆位点包含BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点，并且其中所述质粒包含与SEQ ID NO:1具有至少80％同一性的核苷酸序列。

27.一种重组质粒，包含编码与SEQ ID NO:2具有至少95％同一性的载体盒的核苷酸序列，并且其中所述载体盒的侧翼具有至少两个限制性核酸内切酶位点，所述至少两个限制性核酸内切酶位点独立选自sfiI和Bsu36I。

28.一种重组质粒，包含编码与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的载体盒的核苷酸序列，所述载体盒包含具有BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点的多克隆位点，其中所述质粒进一步包含载体盒的四环素阻抑型启动子上游区。

29.一种细胞，包含权利要求1至28任意一项所述的质粒。

30.一种试剂盒，包括权利要求1至28任意一项所述的质粒和博来霉素抗性(ble)盒。

31.一种生产稳定生产细胞系的方法，包括：(a)通过将一个或多个基因克隆到权利要求1至28任意一项所述的质粒中而合成慢病毒载体；(b)从合成的慢病毒载体生成DNA片段；(c)由合成的慢病毒载体生成的DNA片段和来自抗生素抗性盒质粒的DNA片段形成串联阵列；(d)用形成的串联阵列转染GPR、GPRG、GPRT、GPRGT或GPRT-G包装细胞系或其衍生物；以及(e)分离稳定生产细胞系。

32.一种生产稳定生产细胞系的方法，包括：(a)合成编码用于下调HIV-1共受体的短发夹RNA和编码HIV-1融合抑制剂的慢病毒载体，所述慢病毒载体通过将编码短发夹RNA和融合抑制剂的cDNA克隆到权利要求1至28中任意一项所述的质粒中而合成；(b)从合成的慢病毒载体生成DNA片段；(c)由合成的慢病毒载体生成的DNA片段和来自于抗生素抗性盒质粒的DNA片段形成串联阵列；(d)用形成的串联阵列转染aGPR、GPRG、GPRT、GPRGT或GPRT-G包装细胞系或其衍生物；以及(e)分离稳定生产细胞系。

33.一种从稳定生产细胞系收获载体上清液的方法，其中所述载体上清液每约40小时至约56小时收获一次。

34.一种收获包含LVsh5/C46慢病毒载体的载体上清液的方法，其中所述载体上清液每约40小时至约56小时收获一次。

35.用于生产LVsh5/C46的稳定生产细胞系。

36.根据权利要求35所述的稳定生产细胞系，其中所述稳定生产细胞系基于GPRG包装细胞系。

37.根据权利要求35所述的稳定生产细胞系，其中所述稳定生产细胞系基于GPRT包装细胞系。

38.根据权利要求35所述的稳定生产细胞系，其中所述稳定生产细胞系基于GPR包装细胞系。

39.一种适合于生产自灭活慢病毒载体的稳定生产细胞系，所述慢病毒载体包含与SEQ ID NO:8具有至少90％同一性的核苷酸序列。

40.根据权利要求39所述的稳定生产细胞系，其中所述稳定生产细胞系基于GPRG包装细胞系。

41.根据权利要求39所述的稳定生产细胞系，其中所述稳定生产细胞系基于GPRT包装细胞系。

42.根据权利要求39所述的稳定生产细胞系，其中所述稳定生产细胞系基于GPR包装细胞系。

43.一种串联阵列，包含来自于第一质粒和第二质粒的DNA片段，所述第一质粒衍生自pUC57-TL20c；所述第二质粒包含博来霉素抗生素抗性盒；其中来自于第一质粒和第二质粒的DNA片段的比例的范围为约25:1至约1:25。

44.一种稳定生产细胞系，所述稳定生产细胞系通过将选自GPR、GPRG、GPRT、GPRGT和GPRT-G包装细胞系的包装细胞系或其衍生物与权利要求43的串联阵列转染而生成。

45.根据权利要求44所述的稳定生产细胞系，其中所述稳定生产细胞系生产LVsh5/C46。

46.根据权利要求45所述的稳定生产细胞系，其中所述LVsh5/C46能够每约40小时至约56小时收获一次。

47.一种具有图11的质粒图谱的分离的载体，包含多克隆位点，所述多克隆位点包含SEQ ID NO:7所示的核苷酸序列。

48.一种制备质粒载体的方法，包括切割权利要求1-28任意一项所述的质粒以及将切割的质粒的末端连接至引入的多核苷酸的相容末端。

49.根据权利要求48所述的方法，其中所述引入的多核苷酸编码用于下调HIV-1共受体的短发夹RNA或编码HIV-1融合抑制剂的至少一个。

50.一种试剂盒，包含(a)权利要求1至28任意一项所述的慢病毒转移载体质粒和(b)包装细胞系细胞。

51.根据权利要求50所述的试剂盒，其中包装细胞系细胞选自GPR、GPRG、GPRT、GPRTG及其衍生物。

52.根据权利要求50所述的试剂盒，进一步包含博来霉素抗性(ble)盒。

53.一种慢病毒载体，衍生自权利要求1至28任意一项所述的质粒。

54.根据权利要求53所述的慢病毒载体，其中所述慢病毒载体包含至少一个附加的核苷酸序列。

55.根据权利要求54所述的慢病毒载体，其中所述至少一个附加的核苷酸序列选自编

码用于下调HIV-1共受体的短发夹RNA的核苷酸序列和编码HIV-1融合抑制剂的核苷酸序列。

56.根据权利要求55所述的慢病毒载体，其中所述慢病毒载体为LVsh5/C46。

57.根据权利要求55所述的慢病毒载体，其中所述慢病毒载体包含与SEQ ID NO:8具有至少95％同一性的序列。

58.一种细胞，包含权利要求53至57任意一项所述的慢病毒载体。

59.一种药物组合物，包括权利要求53至57任意一项所述的慢病毒载体和载剂。

慢病毒载体的生物生产

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2015年5月13日提交的美国临时专利申请No.62/161,133的权益;也要求2015年5月13日提交的美国临时专利申请No.62/161,152的权益,其公开的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本公开总体上涉及分子生物学和病毒学领域。特别地,本公开涉及慢病毒载体和慢病毒转移质粒的生物生产。

[0004] 工业实用性的声明

[0005] 本公开在基因治疗和生物制造领域具有工业实用性。

背景技术

[0006] HIV-1是获得性免疫缺陷综合症(AIDS)的病原体,在全世界具有3000万量级的患病个体。HIV引起免疫系统失灵并增加了机会性感染导致的死亡的可能性。HIV感染是一主要的全球健康问题,这可以从世界卫生组织已将其归为流行性疾病来证实。很多感染了HIV的人,特别是在发展中国家,最终发展为每年夺走多于一百万人生命的AIDS。

[0007] HIV-1属于病毒的逆转录病毒家族,并且为其基因组是由两条单链RNA分子(ssRNA)组成的包膜病毒。HIV-1的主要靶标是CD4+表达细胞,诸如CD4+ T细胞。HIV-1病毒的糖蛋白与靶细胞的CD4分子和靶细胞表面上的趋化因子共受体、CCRS或CXCR4相互作用。融合并进入靶细胞后,包含病毒基因组的病毒粒子解离,释放包括ssRNA的病毒的内容物进入细胞质中。HIV-1的逆转录(RT)酶从ssRNA基因组合成病毒的双链DNA(dsDNA)。在双链HIV-1DNA分子的合成之后,将HIV-1DNA整合进宿主基因组。

[0008] 整合的HIV-1DNA侧翼具有相同的5'和3'长的末端重复序列(LTR),HIV-1可以从其启动整合的HIV-1基因组的转录。病毒DNA的转录需要转录因子,如NF-kB,其在活化的T细胞中上调。因此,病毒转录在T细胞活化后的T细胞中是最活跃的,例如在感染期间。随后将整合的HIV-1基因组的转录产生的病毒RNA翻译并包装成病毒颗粒,然后该病毒颗粒离开细胞成为感染性病毒。

[0009] HIV-1感染的治疗包括联合抗逆转录病毒疗法(cART)。包括核苷类似物逆转录酶抑制剂、蛋白酶抑制剂、非核苷逆转录酶抑制剂、整合酶和融合抑制剂的组合的cART可减缓HIV进展。这反过来在世界上有治疗的地区大大降低了HIV/AIDS的发病率和死亡率。然而,cART不能治愈或完全消除HIV/AIDS的所有症状。另外,cART治疗可被耐药突变损害,并且具有可能严重并且似乎是累积的一系列副作用。进一步地,cART治疗的中断几乎总是导致可检测的病毒复制的再次出现和进展为AIDS,并且已显示与所有死亡原因和严重的非AIDS事件的发病率增加有关。由于这些原因,以及cART的高成本和严格遵守的需要,这种治疗对于大量患者可能相对无效。

[0010] 基于HIV的慢病毒载体正在迅速成为研究和临床基因转移应用所选的逆转录病毒

载体系统。慢病毒载体转导静止干细胞和非分裂终末分化细胞的能力增强导致了广泛的治疗性基因递送载体的发展，以及有希望的研究工具，诸如短发夹RNA(shRNA)基因敲减文库和载体用于终末分化细胞中多能性的诱导。早期γ-逆转录病毒临床基因治疗载体恢复了X染色体连锁严重联合免疫缺陷(SCID-X1)患者的免疫功能，但随后发现它们通过原癌基因的反式激活引起增殖性疾病。较新的慢病毒载体设计可以显著降低这种风险，并且它们在等待临床测试，以最终验证其预期的安全性。该领域处于不断变化中，并且临床测试的结果是不可预测的。

[0011] 规模生产SIN-慢病毒载体以支持临床试验是该领域内的一个重要挑战。虽然γ-逆转录病毒载体可以通过瞬时转染或稳定生产细胞系的生成来产生，但慢病毒需要多种细胞毒性辅助基因的表达，这使得生产细胞的生成更加复杂(Greene et al.,Transduction of Human CD34+ Repopulating Cells with a Self-Inactivating Lentiviral Vector for SCID-X1 Produced at Clinical Scale by a Stable Cell Line,HGTM,23,297-308(October 2012)，其全部内容通过引用并入本文)。瞬时转染是用于LV的试生产的现有技术的替代，在安全、成本和重现性的观点下对于非常大规模的应用是不切实际的。事实上，这项技术昂贵，难以标准化和规模化，并且受到批次间变异性和低逆转录酶保真度的影响(Stornaiuolo et al.,RD2-MolPack-Chim3,a Packaging Cell Line for Stable Production of Lentiviral Vectors for Anti-HIV Gene Therapy,HGTM,24:228-240(August 2013)，其全部内容通过引用并入本文)。

发明内容

[0012] 在本公开的一个方面为包含与SEQ ID NO:1具有至少90％同一性的核苷酸序列的质粒。在一些实施例中，该核苷酸序列与SEQ ID NO:1的序列具有至少95％同一性。在一些实施例中，慢病毒载体衍生自该质粒。在一些实施例中，衍生的慢病毒载体包含一个或多个编码用于下调HIV-1共受体和/或HIV-1融合抑制剂的短发夹RNA的附加序列。在一些实施例中，从其衍生的慢病毒载体是LVsh5/C46(如本文限定的)。

[0013] 在本公开的另一个方面为包含SEQ ID NO:1的核苷酸序列的质粒。在一些实施例中，慢病毒载体衍生自该质粒。在一些实施例中，衍生的慢病毒载体包含一个或多个编码用于下调HIV-1共受体(例如CCR5)和/或HIV-1融合抑制剂(例如C46)的短发夹RNA的附加序列。关于CCR5和C46的信息，包括它们的核苷酸序列，在No.US2012/0201794美国专利公布中进一步列出，其公开的全部内容通过引用并入本文。

[0014] 在本公开的另一个方面为包含与SEQ NO:2具有至少80％同一性的核苷酸序列的质粒。在一些实施例中，该质粒包含与SEQ NO:2具有至少90％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，该质粒包含与SEQ NO:2具有至少95％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，该质粒包含与SEQ NO:2具有至少97％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，该质粒包含SEQ NO:2的核苷酸序列。在一些实施例中，慢病毒载体衍生自该质粒。在一些实施例中，衍生的慢病毒载体包含一个或多个编码用于下调HIV-1共受体(例如CCR5)和/或HIV-1融合抑制剂(例如C46)的短发夹RNA的附加序列。

[0015] 在本公开的另一个方面为具有与SEQ ID NO:1(例如非连续或连续)所示的序列不超过500个核苷酸不同的序列的质粒。在本公开的另一个方面为具有与SEQ ID NO:1(例如

非连续或连续)所示的序列不超过250个核苷酸不同的序列的质粒。在本公开的另一个方面为具有与SEQ ID NO:1(例如非连续或连续)所示的序列不超过150个核苷酸不同的序列的质粒。在本公开的另一个方面为具有与SEQ ID NO:1(例如非连续或连续)所示的序列不超过100个核苷酸不同的序列的质粒。在一些实施例中,该序列与SEQ ID NO:1(例如非连续或连续)所示的序列不超过50个核苷酸不同。

[0016] 在本公开的另一个方面为包含在大约6500个至大约6750个之间的核苷酸的质粒,其中该质粒包含与SEQ ID NO:2具有至少90%同一性的序列或其片段。在一些实施例中,该质粒包含在大约6600个至大约6700个之间的核苷酸。在一些实施例中,该质粒包含大约6611个核苷酸。

[0017] 在本公开的另一个方面为如图11所示的如pUC57-TL20c的质粒。在一些实施例中,慢病毒载体衍生自该质粒。在一些实施例中,衍生的慢病毒载体包含一个或多个编码用于下调HIV-1共受体和/或HIV-1融合抑制剂的短发夹RNA的附加序列。

[0018] 在本公开的另一个方面为包含本质上由BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点组成的多克隆位点的质粒。在一些实施例中,该质粒进一步包含编码包装信号的核苷酸序列、编码中央多嘌呤段的核苷酸序列、编码Rev应答元件的核苷酸序列以及编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列。在其它实施例中,该质粒包含由BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点组成的多克隆位点。在一些实施例中,慢病毒载体衍生自该质粒。在一些实施例中,衍生的慢病毒载体包含一个或多个编码用于下调HIV-1共受体和/或HIV-1融合抑制剂的短发夹RNA的附加序列。

[0019] 在本公开的另一方面中为质粒,其包含(a)编码包装信号的核苷酸序列;(b)编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列;(c)编码Rev应答元件的核苷酸序列;(d)编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列;和(e)编码具有用于酶BstBI、Mlu I、Not I和Cla I的限制性位点的多克隆位点的核苷酸序列。在一些实施例中,编码包装信号的核苷酸序列包含SEQ ID NO:3的序列。在一些实施例中,编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列包含SEQ ID NO:4的序列。在一些实施例中,编码Rev应答元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:5的序列。在一些实施例中,编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的序列。在一些实施例中,编码多克隆位点的核苷酸序列包含SEQ ID NO:7的序列。

[0020] 在本公开的另一个方面为质粒,其包括(a)包装序列,该包装序列存在于质粒的核苷酸序列的约第762位核苷酸至约第1104位核苷酸;(b)中央多嘌呤段,该中央多嘌呤段存在于质粒核苷酸序列的大约第1121位核苷酸至大约第1597位核苷酸;(c)Rev应答元件,该Rev应答元件存在于质粒核苷酸序列的大约第1598位核苷酸至大约第2366位核苷酸;(d)自灭活的长终末重复序列,该自灭活的长终末重复序列存在于质粒核苷酸序列的大约第409位核苷酸至大约第589位核苷酸;和(e)多克隆位点,该多克隆位点存在于质粒核苷酸序列的大约第2376位核苷酸至大约2400位核苷酸。在一些实施例中,该质粒核苷酸序列包含与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的序列。在一些实施例中,编码包装信号的核苷酸序列包含SEQ ID NO:3的序列。在一些实施例中,编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列包含SEQ ID NO:4的序列。在一些实施例中,编码Rev应答元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:5的序列。在一些实施例中,编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的序列。在一些实施例中,编码多克隆位点的核苷酸序列包含SEQ ID NO:7的序列。

[0021] 在本公开的另一个方面为包含多克隆位点的质粒，该多克隆位点包含BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点，其中该质粒包含与SEQ ID NO:1具有至少80％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，慢病毒载体衍生自该质粒。在一些实施例中，衍生的慢病毒载体包含一个或多个编码用于下调HIV-1共受体和/或HIV-1融合抑制剂的短发夹RNA的附加序列。

[0022] 在本公开的另一个方面为包含编码与SEQ ID NO:2具有至少95％同一性的载体骨架的核苷酸序列的质粒，并且其中该载体骨架的侧翼有至少两个附加限制性核酸内切酶位点，该至少两个附加限制性核酸内切酶位点独立选自sfiI和Bsu36I。在一些实施例中，慢病毒载体衍生自该质粒。在一些实施例中，衍生的慢病毒载体包含一个或多个编码用于下调HIV-1共受体和/或HIV-1融合抑制剂的短发夹RNA的附加序列。

[0023] 在本公开的另一个方面为包括编码与SEQ ID NO:2具有至少90％同一性的载体骨架的核苷酸序列的质粒，该载体骨架包含具有BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点的多克隆位点，其中该质粒进一步包含载体骨架的四环素阻抑型启动子上游区。在本公开的另一个方面为包含编码与SEQ ID NO:2具有至少85％同一性的载体骨架的核苷酸序列的质粒，该载体骨架由具有BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点的多克隆位点组成，

[0024] 在本公开的另一个方面为包含质粒或如本文所述由其衍生的慢病毒载体的细胞。在一些实施例中，该细胞是造血祖细胞/干细胞、单核细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞、CD4+ T淋巴细胞、CD8+ T淋巴细胞或树突细胞。在本公开的另一个方面为包含在第一容器内的造血祖细胞/干细胞以及图11的质粒或由其衍生的慢病毒载体的试剂盒。

[0025] 在本公开的另一个方面为生产稳定生产细胞系的方法，包括：(a)通过将一个或多个基因克隆到如本文所描述的质粒中来合成慢病毒载体，例如pUC57-TL20c；(b)从合成的慢病毒载体生成DNA片段；(c)由合成的慢病毒载体所生成的DNA片段和来自抗生素抗性盒质粒的DNA片段形成串联阵列；(d)用形成的串联阵列转染GPR、GPRG、GPRT、GPRGT或GPRT-G包装细胞系或其衍生物；以及(e)分离一个或多个稳定生产细胞系克隆。在一些实施例中，该方法进一步包括诱导该稳定生产细胞系以产生慢病毒载体。

[0026] 在本公开的另一个方面为生产稳定生产细胞系的方法，包括：(a)合成编码用于下调HIV-1共受体的短发夹RNA和编码HIV-1融合抑制剂的慢病毒载体，该慢病毒载体通过将编码短发夹RNA和融合抑制剂的cDNA克隆到如本文所描述的质粒中而合成；(b)从合成的慢病毒载体生成DNA片段；(c)由合成的慢病毒载体的所生成的DNA片段和来自于抗生素抗性盒质粒的DNA片段形成串联阵列；(d)用形成的串联阵列转染GPR、GPRG、GPRT、GPRGT或GPRT-G包装细胞系或其衍生物；以及(e)分离一个或多个稳定生产细胞系克隆。在一些实施例中，该方法进一步包括诱导该稳定生产细胞系以产生编码用于下调HIV-1共受体的短发夹RNA和编码HIV-1融合抑制剂(LVsh5/C46)的慢病毒载体。

[0027] 本公开的另一个方面是从稳定生产细胞系收获载体上清液的方法，其中该载体上清液大约每48小时收获一次。本公开的另一个方面是从稳定生产细胞系收获载体上清液的方法，其中该载体上清液大约每40至56小时收获一次。

[0028] 本公开的另一个方面是从稳定生产细胞系收获包含LVsh5/C46慢病毒载体的载体上清液的方法，其中该载体上清液大约每48小时收获一次。

[0029] 在本公开的另一个方面为适合于产生LVsh5/C46的稳定生产细胞系。在一些实施例中，该稳定生产细胞系基于GPRG包装细胞系。在一些实施例中，该稳定生产细胞系基于GPRT包装细胞系。在一些实施例中，该稳定生产细胞系基于GPR包装细胞系。在一些实施例中，该稳定生产细胞系基于GPRT-G包装细胞系。

[0030] 在本公开的另一个方面为适合于产生与SEQ ID NO:8具有至少90％同一性的自灭活慢病毒载体的稳定生产细胞系。在一些实施例中，该稳定生产细胞系基于GPRG包装细胞系。在一些实施例中，该稳定生产细胞系基于GPRT包装细胞系。在一些实施例中，该稳定生产细胞系基于GPR包装细胞系。在一些实施例中，该稳定生产细胞系基于GPRT-G包装细胞系。

[0031] 在本公开的另一个方面为包含来自于第一质粒和第二质粒的DNA片段的串联阵列，该第一质粒衍生自pUC57-TL20c；该第二质粒包括博来霉素抗生素抗性盒；其中来自于第一质粒和第二质粒的DNA片段的比的范围为约50:1至约1:50。在一些实施例中，来自于第一质粒和第二质粒的DNA片段的比的范围为约25:1至约1:25。在一些实施例中，来自于第一质粒和第二质粒的DNA片段的比的范围为约15:1至约1:15。

[0032] 在本公开的另一方面是稳定生产细胞系，该稳定生产细胞系通过用串联阵列转染选自GPR、GPRG、GPRT、GPRT-G及其衍生物的包装细胞系而生成，该串联阵列包含来自第一质粒和第二质粒的DNA片段；第一质粒衍生自pUC57-TL20c；第二质粒包含博来霉素抗生素抗性盒；其中来自第一质粒与第二质粒的DNA片段的比例在约25:1至约1:25的范围内。在一些实施例中，该稳定生产细胞系产生LVsh5/C46。在一些实施例中，能够大约每48小时收获该LVsh5/C46。

[0033] 在本公开的另一个方面为具有图11的质粒图谱的单独的载体，其包含多克隆位点，该多克隆位点包含在SEQ ID NO:7中列出的核苷酸序列。

[0034] 在本公开的另一个方面为包含(1)如本文所描述的质粒和(2)博来霉素抗性(ble)盒的试剂盒。在一些实施例中，该试剂盒进一步包含诸如根据本文所描述的程序用于制备慢病毒载体和/或串联阵列的说明书。

[0035] 在本公开的另一个方面为包含(a)如本文所描述的慢病毒转移载体质粒和(b)包装细胞的试剂盒。在一些实施例中，包装细胞选自GPR、GPRG、GPRT、GPRTG及其衍生物。在一些实施例中，该试剂盒还包含博来霉素抗性(ble)盒。在一些实施例中，该试剂盒进一步包含诸如根据本文所描述的程序用于制备慢病毒载体和/或串联阵列的说明书。

[0036] 在本公开的另一个方面为衍生自本文所描述的质粒的慢病毒载体。在一些实施例中，慢病毒载体包含至少一个附加的核苷酸序列。在一些实施例中，该至少一个附加的核苷酸序列选自编码用于下调HIV-1共受体的短发夹RNA的核苷酸序列和编码HIV-1融合抑制剂的核苷酸序列。在一些实施例中，该慢病毒载体是LVsh5/C46。在一些实施例中，该慢病毒载体包含与SEQ ID NO:8具有至少95％同一性的序列。

[0037] 在本公开的另一个方面为包含上述的慢病毒载体和药学上可接受的载剂的药物组合物。在一些实施例中，该药学上可接受的载剂包括可用于配制成药物诸如适合于给人施用的药物的溶剂、缓冲液、溶液、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂等。配制具有药学载剂的化合物的方法在本领域是已知的，并且例如在Remington's Pharmaceutical Science,(17th ed.Mack Publishing Company,Easton,Pa.1985)；和

Goodman&Gillman's:The Pharmacological Basis of Therapeutics(11th Edition, McGraw-Hill Professional,2005)中有所描述,其每个的全部内容通过引用并入本文。

附图说明

[0038] 图1示出了通过根据已建立的程序在HEK293T/17细胞上瞬时转染或使用基于GPRG的稳定生产细胞系而重复产生相同的慢病毒载体。含有载体的培养基(VCM)通过超速离心浓缩100倍,通过基因转导测定法来确定慢病毒(LV)的滴度。

[0039] 图2是示出生成稳定生产细胞系并收获由所生成的稳定生产细胞系产生的慢病毒载体的方法的流程图。

[0040] 图3示出了在三个月的连续传代期间评估两种不同细胞系MWCB的生产细胞系稳定性。定期通过四环素(TET)去除诱导LV,并通过基因转导测定法评价VCM的LV滴度。两种细胞系都是稳定的,并且在三个月期间能够产生超过1e6/ml的LV,并且超过约25代。

[0041] 图4示出了通过去除TET而诱导后的慢病毒载体产生的动力学。通过基因转导测定法评估在VCM中的载体滴度。在所有情况下,基于GPRG的稳定生产细胞系已经能够在诱导后将LV生产维持在高于1e6TU/ml(未浓缩)的水平至少5天。

[0042] 图5示出了来自稳定细胞系的慢病毒载体产生的动力学。(A)在载体产生期间,每天(■)或每2天(□)用新鲜培养基更换培养基。(B)在293T细胞上滴定收获培养基中LVs的总量。显示的数据是平均值±SD(N=2)。TUs,转导单元。

[0043] 图6-(A)示出了在没有多西环素(Dox)的培养基中诱导GPRG和293T细胞。将诱导的细胞用抗VSVG抗体染色以检测VSVG表达并通过流式细胞术测量;(B)示出了在延长培养后评估GPRG产生LV的能力。

[0044] 图7示出了在不同的培养基条件下的慢病毒的产生。(A)在含有血清的培养基中培养/产生。(B,左)在含有血清的培养基中培养/在无血清的培养基中产生;(B,右)在无血清的培养基中培养/产生。D10:500mL DMEM/GlutaMAX™;50mL FBS(10%w/v);5mL Pen/Strep;SFM:无血清培养基。

[0045] 图8列出了用新鲜培养基(无载体)或LVsh5/C46载体温育的293T或TF-1a细胞的FACS分析。

[0046] 图9示出了在感染的细胞中慢病毒载体拷贝数的定量。C46qPCR用于确定在两种剂量(MOI=1或0.3)转导后每个宿主基因组的载体拷贝数。

[0047] 图10-Ghost-CCR5细胞用LVsh5/C46载体转导。通过FACS测量CCR5表达水平的降低。

[0048] 图11列出了pUC57-TL20的示意图。

[0049] 图12示出了根据本公开一些实施例的基于HIV-1的慢病毒转移载体。该特定的转移载体与HIV-1融合抑制剂(C46)组合编码用于下调HIV-1共受体CCR5的短发夹RNA(shRNA)。

[0050] 图13示出了用本文公开的方法使用和不使用血清的慢病毒诱导。在无血清培养基中培养的细胞与那些用10%PBS培养的细胞产生了几乎一样多的病毒。相信这里公开的方法可适用于无血清培养环境。

[0051] 图14是示出了生成DNA片段的方法的流程图。

[0052] 图15是示出了合成串联阵列的方法的流程图。

[0053] 图16是示出了将串联阵列导入包装细胞系的方法的流程图。

[0054] 图17是示出了选择转染的克隆的方法的流程图。

[0055] 图18是示出了实施单菌落分离的方法的流程图。

[0056] 图19是示出了评估病毒产生的方法的流程图。

[0057] 图20A、20B和20C总体上描述了用于合成TL20-Ca11-wpre和TL20-Unc-GFP载体的生产细胞。图20A示出了用从最有效的生产克隆获得的新鲜培养基(左:无载体)或TL20-Ca11-WPRE(右)温育的293T细胞的流式细胞术分析。图20B示出了用从最有效的生产克隆获得的新鲜培养基(深灰色条:无载体)或TL20-UbcGFP(浅灰色条)温育的293T细胞的流式细胞术分析。图20C示出了上清液的测得的载体滴度的分布,该上清液来自于用于制备TL20-Ca11-WPRE(左)或TL20-UbcGFP(右)载体的独立生产克隆。载体在293T细胞上滴定并通过流式细胞术分析。使用多克隆生产细胞制备的载体(在单克隆选择之前)而获得的最高滴度用虚线表示。图例:Ubc:泛素C启动子;GFP:增强的绿色荧光蛋白。

具体实施方式

[0058] 总体上,本公开提供了生成稳定生产细胞系的方法。稳定生产细胞系的生成,诸如根据本发明提供的那些,增加了重现性,并且易于产生高滴度的慢病毒种群,同时缓解生物安全问题,并且在表达的包膜蛋白中的变化限定了所生成的病毒的向性。本公开还提供了新的慢病毒转移载体质粒。

[0059] 如本文所使用的,除非上下文另有明确的指出,否则单数术语“一”、“一个”和“该”包括复数指代物。类似地,词语“或”旨在包括“和”,除非上下文另有明确的指出。

[0060] 进行时态的术语“包含”、“包括”、“具有”等可以互换使用并且具有相同的含义。类似地,现在时态的“包含”、“包括”、“具有”等可以互换使用并且具有相同的含义。具体地,将术语中的每一个定义为与“包含”的共同美国专利法的定义一致,因此解释为意指“至少以下”的开放术语,并且也解释为不排除附加的特征、限制、方面等。因此,例如,“具有组件a、b和c的设备”意味着该设备至少包括组件a、b和c。类似地,短语:“涉及步骤a、b和c的方法”意味着该方法至少包括步骤a、b和c。而且,虽然这些步骤和过程在本文中可以按照特定的顺序概述,但是本领域技术人员将认识到,这些按顺序的步骤和过程可以变化。

[0061] 如本文所使用的,术语“克隆”是指将核酸分子连接到质粒中并将其转移到合适宿主细胞中用于在宿主繁殖过程中复制的过程。

[0062] 如本文所使用的,术语“HIV”不仅包括HIV-1,也包括HIV-1的各种毒株(例如菌株BaL或毒株SF162)和HIV-1的各种亚型(例如A,B,C,D,F,G H,J和K亚型)。

[0063] 如本文所使用的,术语“多克隆位点”(MCS)是指包含限制性位点的核苷酸序列,其目的为将核酸片段克隆到克隆载体质粒中。也称为多接头或多个克隆位点的MCS是克隆位点簇,使得许多限制酶能够在该位点内进行操作。克隆位点在一些实施例中是限制性酶在其上操作以线性化或切割质粒的已知序列。

[0064] 如本文所使用的,术语“生产细胞”是指含有产生慢病毒载体颗粒所需的全部元件的细胞。

[0065] 如本文所使用的,术语“包装细胞”是指包含缺乏重组病毒载体或慢病毒转移载体

质粒的传染性重组病毒的生产所必需的那些元件的细胞。通常，这样的包装细胞包含一个或多个能够表达病毒结构蛋白(如gag，pol和env)但不包含包装信号的表达盒。

[0066] 如本文所使用的，术语“限制性核酸内切酶”或“限制性酶”是指结合核酸分子(例如DNA)的同源序列并在该序列内的精确位置处将其切割的一类催化分子中的一个或多个成员。

[0067] 如本文所使用的，本文可互换使用的术语“自灭活”或“SIN”是指经修饰的载体，其中该修饰极大地降低了载体一旦整合到受体基因组中就会动员的能力，由此增加了使用载体作为基因递送载体的安全性。

[0068] 如本文所使用的，术语“载体”是指能够介导(例如转移，输送等)另一种核酸分子进入细胞的核酸分子。通常将转移的核酸连接至(例如插入)载体核酸分子。载体可以包括指导自主复制的序列，或者可以包括足以允许整合到宿主细胞DNA中的序列。对于本领域普通技术人员来说显而易见的是，病毒载体除了介导转移的核酸进入的核酸外还可以包括各种病毒组分。

[0069] 方法的概述

[0070] 慢病毒载体(LV)因为它们的效率和稳定转导分裂和非分裂细胞的能力，是基因转移的重要工具。因此，研究人员在各种临床应用中将它们用作基因递送载体。然而，使用目前的生产质量管理规范(cGMP)方法的大规模临床生产带来了一系列挑战，其被认为是使用慢病毒载体的更多的临床试验获得监管部门的批准。在设计与cGMP兼容的过程中的一个重要考虑是需要将监管考虑因素整合到能够为多种cGMP生产产生一致的慢病毒的生产过程中。临床上使用的绝大多数慢病毒载体是通过瞬时转染产生的。然而，基于瞬时转染的生产通常是劳动密集型的且易于变化。为此，近来已经开发了几种稳定的包装细胞系系统。尽管使用这些细胞系用于LV的生物制造对于可扩展性和一致性来说是特别有吸引力的，但是这些细胞系的开发是耗时的，并且这些细胞系的cGMP使用的控制途径还没有被牢固确立。

[0071] 鉴于此，本公开提出了用于自灭活慢病毒载体(SIN-LV)的临床生产的过程。可以相信，通过新的慢病毒转移载体质粒与GPR、GPRG、GPRT、GPRGT或GPRT-G包装细胞系(或由其衍生的衍生物或类似物包装细胞系)的一起使用，可生成该稳定生产细胞系，以便能够产生自灭活慢病毒载体(例如LVsh5/C46)。尽管本文描述的某些实施例和实例涉及LVsh5/C46的产生，所述LVsh5/C46是编码用于下调HIV-1共同受体CCR5以及HIV-1融合抑制剂(即C46)的短发夹RNA(shRNA)的自灭活慢病毒载体，本领域技术人员将认识到本文所描述的方法适合于能够产生任何SIN-LV的稳定生产细胞系的生成，其包含任何所需的或客户提供的基因或序列。

[0072] 申请人已经证明，与通过瞬时转染产生的SIN-LV相比，本公开的方法(i)能够生成类似质量和数量的SIN-LV；(ii)生产可具有更好效力的LV；和(ii)维持产量，同时大大降低瞬时转染所预见的制备物差异性。

[0073] pUC57-TL20c

[0074] 在本公开的一个方面为包含新型的、多功能多克隆位点(MCS)(参见图11)的基于人类免疫缺陷病毒类型1(HIV-1)的第三代自灭活(SIN)慢病毒转移载体质粒(下文用“pUC57-TL20”指代)。

[0075] 在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒包含自身不包含内部启动子(因此，其为

“无启动子”)的载体骨架(“TL20c”)。在一些实施例中,慢病毒载体转移质粒包含一个启动子,例如四环素阻抑型启动子,载体骨架的上游(参见图12)。不希望受任何特定理论的约束,可以相信,载体骨架的无启动子设计允许生成能够从用户确定的启动子递送和随后表达目的基因的慢病毒转移载体质粒。

[0076] 图11列出了说明慢病毒载体转移质粒的构成元件的基因图谱。在一些实施例中,慢病毒载体转移质粒包含大约6500个至大约6750个之间的核苷酸。在其它实施例中,慢病毒载体转移质粒包含在大约6600个至大约6700个之间的核苷酸。在一些实施例中,慢病毒载体转移质粒的载体骨架包含在大约3850个至大约3950个之间的核苷酸。在一些实施例中,慢病毒载体转移质粒的载体骨架包含大约3901个核苷酸。

[0077] 如图11所示,质粒包含5’侧翼HIV LTR,包装信号或ψ+,中央多嘌呤段(cPPT),Rev应答元件(RRE),多克隆位点(MCS),以及3’侧翼HIV LTR。LTR区进一步包含U3和U5区,以及R区。

[0078] 根据本公开的某些实施例,转移质粒包含自灭活(SIN)LTR。在本领域中已知,在逆转录病毒生命周期中,在逆转录和病毒DNA合成的过程中,复制3’LTR的U3区以形成5’LTR的相应区。SIN LTR的创建通过灭活3’LTR(优选通过删除其一部分,例如移除TATA序列)的U3区来实现。在逆转录后将该变更转移至5’LTR,因此在原病毒中消除了LTR的转录单元,其被认为是通过可复制的病毒来阻止动员。通过用异种启动子代替5’LTR的U3区而提供额外的安全性增强来驱动病毒基因组在病毒颗粒生产期间的转录。

[0079] 在一些实施例中,包装信号包含大约361个碱基对的Gag序列和大约448个碱基对的野生型HIV的Pol序列(例如HIV01HXB2_LAI_IIIB)。在一些实施例中,cPPT包含大约85个碱基对的野生型HIV的Vif序列。在一些实施例中,HIV多嘌呤段(pPu)包含大约106个碱基对的野生型HIV的Nef序列。在一些实施例中,RRE包含大约26个碱基对的Rev序列、大约25个碱基对的tat序列、以及大约769个碱基对的野生型HIV的Env序列。在一些实施例中,转移质粒包含染色质隔离子和/或β-球蛋白多腺苷酸化信号。

[0080] 在一些实施例中,编码包装信号的核苷酸序列包含SEQ ID NO:3的序列,或与SEQ ID NO:3具有至少85%同一性的序列。在一些实施例中,编码包装信号的核苷酸序列包含SEQ ID NO:3的序列,或与SEQ ID NO:3具有至少90%同一性的序列。在一些实施例中,编码包装信号的核苷酸序列包含SEQ ID NO:3的序列,或与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的序列。

[0081] 在一些实施例中,编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列包含SEQ ID NO:4的序列,或与SEQ ID NO:4具有至少85%同一性的序列。在一些实施例中,编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列包含SEQ ID NO:4的序列,或与SEQ ID NO:4具有至少90%同一性的序列。在一些实施例中,编码中央多嘌呤段(cPPT)的核苷酸序列包含SEQ ID NO:4的序列,或与SEQ ID NO:4具有至少95%同一性的序列。

[0082] 在一些实施例中,编码Rev应答元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:5的序列,或与SEQ ID NO:5具有至少85%同一性的序列。在一些实施例中,编码Rev应答元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:5的序列,或与SEQ ID NO:5具有至少90%同一性的序列。在一些实施例中,编码Rev应答元件的核苷酸序列包含SEQ ID NO:5的序列,或与SEQ ID NO:5具有至少95%同一性的序列。

[0083] 在一些实施例中，编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的序列，或与SEQ ID NO:6具有至少85％同一性的序列。在一些实施例中，编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的序列，或与SEQ ID NO:6具有至少90％同一性的序列。在一些实施例中，编码自灭活长终末重复序列的核苷酸序列包含SEQ ID NO:6的序列，或与SEQ ID NO:6具有至少95％同一性的序列。

[0084] 在一些实施例中，质粒包含编码多西环素阻抑型启动子的与SEQ ID NO:10具有至少85％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码多西环素阻抑型启动子的与SEQ ID NO:10具有至少90％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码多西环素阻抑型启动子的与SEQ ID NO:10具有至少95％同一性的核苷酸序列。

[0085] 在一些实施例中，质粒包含编码HIV LTR R5区的与SEQ ID NO:11具有至少85％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码HIV LTR R5区的与SEQ ID NO:11具有至少90％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码HIV LTR R5区的与SEQ ID NO:11具有至少95％同一性的核苷酸序列。

[0086] 在一些实施例中，质粒包含编码HIV LTR U5区的与SEQ ID NO:12具有至少85％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码HIV LTR U5区的与SEQ ID NO:12具有至少90％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码HIV LTR U5区的与SEQ ID NO:12具有至少95％同一性的核苷酸序列。

[0087] 在一些实施例中，质粒包含编码染色质隔离子的与SEQ ID NO:13具有至少85％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码染色质隔离子的与SEQ ID NO:13具有至少90％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码染色质隔离子的与SEQ ID NO:13具有至少95％同一性的核苷酸序列。

[0088] 在一些实施例中，质粒包含编码β-球蛋白多腺苷酸化信号的与SEQ ID NO:14具有至少85％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码β-球蛋白多腺苷酸化信号的与SEQ ID NO:14具有至少90％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含编码β-球蛋白多腺苷酸化信号的与SEQ ID NO:14具有至少95％同一性的核苷酸序列。

[0089] 在一些实施例中，质粒包含与SEQ ID NO:15具有至少85％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含与SEQ ID NO:15具有至少90％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，质粒包含与SEQ ID NO:15具有至少95％同一性的核苷酸序列。

[0090] 本公开提供了合并MCS用于多种不同的限制性酶的慢病毒转移载体质粒。根据本公开的某些实施例，MCS包含具有大约20到40个核苷酸的序列。在一些实施例中，本公开的质粒的MCS包含至少两个限制性酶切割位点。在其它实施例中，本公开的质粒的MCS包含至少三个限制性酶切割位点。在另外的其它实施例中，本公开的质粒的MCS包含大约2个至大约10个之间的限制性位点。在一些实施例中，MCS中的限制性位点选自BstBI、MluI、NotI、ClaI、ApaI、XhoI、XbaI、HpaI、NheI、PacI、NsiI、SphI、Sma/Xma、AccI、BamHI、SphI或者其任意衍生物或类似物。

[0091] 在一些实施例中，慢病毒转移载体质粒的MCS区携带4个特定的限制性酶切割位点，其被认为有助于容易地进行所需的转基因盒的亚克隆。在一些实施例中，多克隆位点包含BstBI、MluI、NotI和ClaI限制性核酸内切酶位点。在一些实施例中，编码多克隆位点的核苷酸序列包含SEQ ID NO:7的序列，或与SEQ ID NO:7具有至少90％同一性的序列。限制性

位点能够以任意顺序排布。

[0092] 在一些实施例中，转移质粒包含一个或多个位于载体骨架侧翼(参见图11)的额外的限制性酶切割位点。不希望受任何特定理论所约束，可以相信，额外的位于侧翼的限制性酶切割位点允许定向的(头到尾)串联阵列的生成。在一些实施例中，限制性酶切割位点选自Sfil和Bsu36I。在一些实施例中，包含一个或多个基因的慢病毒载体衍生自该质粒。

[0093] 在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少80％同一性的核苷酸序列。在其它实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少85％同一性的核苷酸序列。在另外其它实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少90％同一性的核苷酸序列。在进一步的实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少95％同一性的核苷酸序列。在另外进一步的实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:1的序列具有至少97％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒包括SEQ ID NO:1的序列。在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒具有与SEQ ID NO:1所示的序列不同不超过100个核苷酸的序列。

[0094] 在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:2的序列具有至少80％同一性的核苷酸序列。在其它实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:2的序列具有至少85％同一性的核苷酸序列。在另外其它实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:2的序列具有至少90％同一性的核苷酸序列。在进一步的实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:2的序列具有至少95％同一性的核苷酸序列。在另外进一步的实施例中，慢病毒载体转移质粒包含与SEQ ID NO:2的序列具有至少97％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒包含SEQ ID NO:2的序列。在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒具有与SEQ ID NO:2所示的序列不同不超过100个核苷酸的序列。

[0095] 在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒根据本领域技术人员已知的那些方法来合成。例如，可使用本领域普通技术人员已知的常规的限制性消化和连接技术来合成质粒。例如，可以使用本领域普通技术人员已知的标准消化和连接程序(参见，例如，Sambrook et al.(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2nd Ed.Cold Spring Harbor,N.Y.,其公开通过引用以其全部并入本文)将包含TL20c载体骨架的供体质粒亚克隆到pU57C受体质粒中(例如，诸如可从Genescript商业获得的那些)。

[0096] 本公开还包括生产慢病毒载体例如LVsh5/C46的方法。在一个实施例中，该方法包括合成基因的cDNA以及将合成的cDNA克隆到质粒诸如pUC57-TL20c的限制性位点。使用本领域技术人员已知的方法可将基因插入合适的克隆位点。例如，可通过PCR扩增基因，并随后克隆到包含所需要的启动子或基因表达控制元件的质粒中。

[0097] 在一些实施例中，并且仅作为举例，该方法包括合成基因的cDNA以及随后将合成的cDNA克隆到如本文所公开的质粒的限制性位点中，所述cDNA表达能够阻止HIV融合到细胞中或阻止HIV复制的蛋白。

[0098] 稳定生产细胞系的生成以及从其生产的慢病毒载体的收获

[0099] 在本公开一些实施例中为形成稳定生产细胞系以及从生成的稳定生产细胞系收获所生产的慢病毒载体的方法。参考图2，在生产稳定生产细胞系中的第一步是生成DNA片段(10)，诸如从慢病毒载体转移质粒和诸如抗生素抗性盒质粒的第二质粒生成DNA片段(10)。在DNA片段生成(10)之后，随后使用DNA形成串联阵列(20)。然后，导入串联阵列，诸如

通过转染，到包装细胞系(30)(例如，GPR、GPRG、GPRT、GPRG、GPRT-G或者其衍生物包装细胞系)。在导入阵列(30)和随后的转染之后，选择(40)并分离(50)克隆以生成稳定生产细胞系(60)。随后可以收获包含慢病毒载体的载体上清液。

[0100] 串联阵列形成和纯化

[0101] 生成“串联体”或“串联阵列”(本文中可互换使用)(包含直接或间接串联的相同DNA序列的多个拷贝的长连续DNA分子)并将其用于包装细胞系的转染。在一些实施例中，串联体是连接的载体基因组表达盒的大的阵列，具有穿插在其中的抗生素抗性盒。

[0102] 参考图14，为了形成串联阵列，生成来自于慢病毒转移载体质粒(步骤100)和抗生素抗性盒质粒的DNA片段(步骤110)。在一些实施例中，可以通过根据本领域普通技术人员已知的方案消化质粒中的每一个并随后连接消化的片段来制备DNA片段。在一些实施例中，可以使用电泳和琼脂凝胶来获得所需的DNA片段(步骤120)。在一些实施例中，使用NanoDrop分光光度计确定DNA片段浓度(步骤130)。可以获得用于连接DNA片段的多种策略，其选择取决于DNA片段末端的性质以及本领域技术人员可以容易地做出哪些选择。

[0103] 在一些实施例中，慢病毒载体转移质粒基于pUC57-TL20c。在一些实施例中，抗生素抗性盒质粒由PGK启动子驱动。在一些实施例中，抗生素抗性盒质粒包含用于与慢病毒转移载体质粒中的慢病毒盒串联的侧翼位点。在一些实施例中，抗生素抗性盒质粒为PGK-ble(博来霉素抗性)。在一些实施例中，PGK-ble质粒包含与SEQ ID NO:9的序列具有至少90％同一性的核苷酸序列。在一些实施例中，串联阵列通过来自于慢病毒转移载体质粒与PGK-ble质粒的DNA片段在体外的连接而形成。

[0104] 图15概述了用于形成串联阵列的一般步骤。在步骤200中，混合生成的DNA片段并将在连接反应中的片段的量最大化以维持所需要的比例(步骤210)。在一些实施例中，慢病毒转移载体质粒DNA的量与抗生素抗性盒质粒DNA的量的比例范围为约100:1至约1:100。在其它实施例中，慢病毒转移载体质粒DNA的量与抗生素抗性盒质粒DNA的量的比例范围为约50:1至约1:50。在另外的其它实施例中，慢病毒转移载体质粒DNA的量与抗生素抗性盒质粒DNA的量的比例范围为约25:1至约1:25。在进一步的实施例中，慢病毒转移载体质粒DNA的量与抗生素抗性盒质粒DNA的量的比例范围为约10:1至约1:10。

[0105] 在一些实施例中，串联反应混合物在室温下温育过夜(步骤220)。随后，可以使用NanoDrop分光光度计测量每个样品的DNA片段浓度(步骤230)。

[0106] 在一些实施例中，形成并在包装细胞系的转染中使用定向的串联阵列。在一些实施例中，定向阵列的形成通过使用位于慢病毒载体骨架侧翼的慢病毒转移载体质粒的限制性酶位点而实现。在一些实施例中，限制性消化使用位于TL20c载体盒侧翼的限制性酶位点，并允许仅能够用于从头到尾连接的核苷酸非回纹状悬突体的形成。在一些实施例中，根据本文所述方法，定向连接允许主要包含从头到尾的DNA产品的串联阵列的生成。

[0107] 在一些实施例中，根据本文实例3中示出的方法形成串联阵列。当然，本领域技术人员将认识到，实例3中提供的程序可适合于具有第一质粒和第二质粒的不同比例并用于转移不同于LVsh5/C46的质粒的串联阵列的形成。

[0108] 在一些实施例中，在转染至包装细胞系之前通过苯酚-提取和乙醇沉淀来纯化串联阵列。虽然该常规技术低廉且有效，但是，该过程耗时长并且不能获得可重现的收益量。可以相信，具有将苯酚/氯仿带进最终样品的危险。此外，认为该处理涉及有害化学品，并且

会生成必须小心并参照危险废弃物指南进行处理的有毒废弃物。

[0109] 或者，在其它实施例中，在连接后使用基于硅的方法来纯化新合成的串联阵列。可以相信，该方法提供了简单、可靠、迅速且方便的方式用于分离高质量的转染级别的串联阵列。在一些实施例中，使用可从Qiagen获得的DNeasy Mini旋转柱纯化串联阵列，诸如使用实例6中列出的程序。

[0110] 转染/单克隆分离

[0111] 纯化串联阵列后，随后用该阵列转染包装细胞系细胞。如本文中所使用的，术语“转化”和“转染”意图指用于将外源核酸(例如DNA或RNA)导入细胞的本领域公认的多种技术。从本文提供的实例显而易见的是，当用生成的串联阵列转染容许生产慢病毒颗粒的宿主细胞时，该细胞变为生产细胞，即生产传染性的慢病毒颗粒的细胞。

[0112] 通常，通过常规转染技术可将串联阵列或定向的串联阵列导入细胞中。参考图16，在一些实施例中，在转染(步骤300)前收获和接种细胞20-24小时，并随后用合成(步骤310)的串联阵列转染(步骤320)细胞。本文实例4提供了用于转染包装细胞系细胞的程序。

[0113] 一个适合于用形成的串联阵列转染的包装细胞系是GPR包装细胞系。GPR系是源于具有必要的病毒成分gagpol和rev的293T/17细胞的基于HIV-1的包装细胞系(参见Throm et al.,Efficient construction of producer cell lines for a SIN lentiviral vector for SCID-X1gene therapy by concatemeric array transfection.Blood 113:5104-5110，本公开的全部内容通过引用并入本文)。

[0114] 另一个适合于用形成的串联阵列转染的包装细胞系是GPRG包装细胞系。在一些实施例中，GPRG包装细胞系包含gagpol、rev和VSV-G。

[0115] 再一个适合于用形成的串联阵列转染的包装细胞系是GPRT包装细胞系(gagpol、rev和tat)。GPRG和GPRT包装细胞系以及形成其的方法也由Throm et.al公开，其公开再次特此通过引用以其整体并入本文。其它合适的包装细胞系(例如GPRT-G)由Wielgosz et al描述“Generation of a lentiviral vector producer cell clone for human Wiskott-Aldrich syndrome gene therapy,”Molecular Therapy—Methods&Clinical Development 2,Article number:14063(2015)，其公开特此通过引用以其整体并入本文。

[0116] 本领域技术人员应当理解，也可以使用适合于本公开的方法使用的其它包装细胞系。在一些实施例中，其它包装细胞系可以源自GPR、GPRG、GPRT或GPRT-G包装细胞系。不希望受任何特定理论所约束，可以相信，GPRT-G细胞系在CD34+细胞中具有更高的转导效率(参见Wielgosz)。通过“源自”所意味的是从单个细胞克隆遗传下来的并具有一些所选性质，诸如在给定的滴度能够生产活性蛋白或能够增殖至特定密度的细胞群体。

[0117] 图17示出了选择转染的细胞的一般程序。在一些实施例中，并在转染后的大约72小时后，用选择性培养基(博来霉素和多西环素)培养GPRG细胞(步骤400)。随后每3-4天用选择性培养基(博来霉素和多西环素)饲喂这些细胞直至识别出细胞病灶(步骤410)。随后，扩增并评估细胞系(步骤420)。

[0118] 在一些实施例中，转染后使用单个病灶选择/筛选过程以识别具有良好生产潜力的单细胞克隆。根据该方法，在一些实施例中，在150×25mm的培养皿中分散地接种所选的细胞，并允许在2-3周间扩增并形成可辨识的菌落。可随后将单个菌落转移至另一个较小的培养皿用于单克隆扩增。可以相信，该方法具有成本效益并将成为常用技术，但是，由于在

单个病灶选择技术中的天然限制，大概率实现良好生产细胞系的单克隆性可能具有挑战。

[0119] 图18示出了单菌落分离。在步骤500，使用流式细胞术准备单细胞分选。随后将细胞涂布(步骤510)于条件培养基，并扩增(步骤520)。

[0120] 在其它实施例中，为了生成高滴度慢病毒载体稳定生产细胞系，使用荧光激活细胞分选仪(FACS)分离单个克隆(参见，例如图8)。也可以在分选过程中添加条件培养基，例如博来霉素(50ug/mL)和多西环素(1ng/mL)以增加细胞粘附和生存能力，并促进菌落形成。可以相信，条件生长培养基和FACS系统的高通量能力的使用能够筛选大量克隆，并因此可以相信增加了发现高滴度慢病毒载体生产克隆的可能性。

[0121] 在一些实施例中，具有好的生长速率和病毒生产能力的克隆在约20代传代中测试稳定性。

[0122] 诱导生产细胞系以生成病毒

[0123] 选择和扩增所选克隆之后，诱导所选克隆以生产载体上清液，并且可根据本领域普通技术人员已知的程序实施诱导。为了生成由诱导的稳定生产系产生的慢病毒载体，在一些实施例中，每天获取培养上清液，持续多达7天。可以容易地使用该生产方案用来小规模产生多种测试载体。重复的病毒收获方案也能增加病毒载体的最后收率。但是，每日获取和培养基交换通常并不经济，并且作为每日收获的代替，设计了新的两日收获方案。下文所述的这种新的病毒载体生产方案允许用较少的培养基消耗生成相同量的病毒载体。

[0124] 图19进一步示出了诱导和评估的过程。在步骤600中，诱导病毒载体并随后进行293T的离心以确定转导效率(步骤610)。筛选前三个克隆(步骤620)并扩增(步骤630)。然后储存该克隆(例如在液氮下)(步骤640)。

[0125] 每两日收获

[0126] 申请人已经意外地发现，两日收获允许生成与更传统的每日收获相同的量的病毒载体，同时还提供需要较少培养基的益处。

[0127] 在一个实施例中，是根据本发明的从两日收获生成病毒载体的第一方法，该第一方法包括以下步骤：

[0128] (1)尽可能完全去除生产系培养皿的旧的培养基，并用1×PBS洗涤细胞。

[0129] (2)将TrypLE™ Express酶(1×)加入到培养皿(可从ThermoFisher Scientific获得)。

[0130] (3)放置在37℃温育2分钟。

[0131] (4)通过加入D10培养基(无药物)冲洗细胞，并通过上下移液将细胞团解离成单个细胞(D10培养基：具有高葡萄糖的Dulbecco's改良的Eagle培养基，GlutaMAX™补充物以及10％(w/v)FBS和1％(w/v)Pen/Strep)。

[0132] (5)在4℃以1200rpm离心细胞5分钟。

[0133] (6)吸出培养基，将小球轻轻悬浮在新鲜的D10培养基(无药物)中。

[0134] (7)在培养皿中接种约95％汇合的细胞(粗略地通过涂布4×106个细胞/6-mm培养皿，载体诱导)。

[0135] (8)在24小时后(诱导后第1天)，将接种的细胞用新鲜的预温D10培养基补增。

[0136] (9)可以在首次培养基变化后48小时(诱导后第3天)首次从细胞中收获病毒载体。

[0137] (10)将新鲜的预温培养基加入培养皿中。

[0138] (11)可以在第二次培养基变化后48小时(诱导后第5天)进行第二次病毒载体收获。

[0139] (12)将新鲜的预温培养基加入培养皿中。

[0140] (13)可以在第三次培养基变化后48小时(诱导后第7天)进行第三次病毒载体收获。

[0141] 申请人已经发现与诱导后7天可收集病毒载体的更传统的方法相比,可以在诱导后第4天和第5天第二次收集病毒载体时得到病毒滴度。

[0142] 在另一个实施例中,是根据本发明的从两日收获生成病毒载体的第二方法,该第一方法包括以下步骤:

[0143] (1)尽可能完全去除生产系培养皿的培养基,并用1×PBS洗涤细胞。

[0144] (2)轻轻移取1×TrypLE Express到洗涤的细胞单层上,使用3mL用于100mm培养皿。

[0145] (3)用TrypLE Express旋转烧瓶以覆盖单层。

[0146] (4)将烧瓶放回温育箱中,放置2分钟。

[0147] (5)轻轻敲打烧瓶的一侧,释放任何残留的贴壁细胞。

[0148] (6)将细胞重新悬浮在2mL新鲜的D10培养基(无抗生素)中并转移到15mL锥形离心管中。

[0149] (7)以1200rpm离心细胞5分钟。

[0150] (8)吸出培养基,将小球轻轻悬浮在5mL新鲜的D10培养基(无药物)中。

[0151] (9)通过TC10™自动细胞计数器确定细胞计数

[0152] (10)在培养皿中接种>95%汇合的细胞(通过在60-mm培养皿上涂布4×106个活细胞)。

[0153] (11)每天(每24小时)用新鲜的预温D10培养基补增接种的细胞。

[0154] 申请人已经发现病毒载体可以在诱导后48小时从细胞中收获,并且在诱导后72小时可以得到最高的病毒滴度。申请人再次出乎意料地发现病毒载体可以从诱导后的第2-4天收获。

[0155] 在一些实施例中,收获的载体通过过滤纯化。在一些实施例中,收获的载体通过确定病毒滴度、每细胞基因组病毒拷贝和p24浓度来表征。

[0156] 每日收获与两日收获的每日比较如图5所示。

[0157] 实例1-由瞬时转染产生的自灭活慢病毒载体与由所公开的稳定细胞系方法产生的载体的详细比较

[0158] 本文所述的方法用于产生稳定的细胞系,其用于生成LVsh5/C46,一编码用于下调HIV-1共受体CCR5与HIV-1融合抑制剂C46组合的的短发夹RNA(shRNA)的自灭活慢病毒载体(SIN-LV)。这种由瞬时转染产生的LV目前正在HIV感染者的临床试验中进行评估。在此我们对瞬时转染产生的LVsh5/C46和使用本文所描述方法产生的LVsh5/C46进行比较分析,以支持该系统用于临床制造LVsh5/C46和其它SIN-LVs的应用。

[0159] 使用4-质粒系统(一个转移载体,两个包装载体和一个包膜载体),通过磷酸钙转染在293T细胞中产生慢病毒载体(LV)。在转染后48小时收获包含病毒的培养基(VCM),通过20%蔗糖缓冲液超速离心浓缩。

[0160] 对于细胞系生产，在没有多西环素(Dox)的培养基中诱导生产细胞，并且在72小时收获VCM，并通过超速离心相似地浓缩。参考表1和图8、图9，通过每种方法产生的LV基于颗粒滴度并使用三种独立的对293T和TF-1a T细胞系的基因转导效力的测定法进行比较。这些包括用于细胞表面C46表达和CCR5表达的shRNA介导的敲减的FACS测定法，以及用于每个宿主细胞基因组的载体拷贝数(VCN)的qPCR测定法。对于所有测定法，在一定范围的载体稀释度下测定滴度以确定线性关系。qPCR测定法利用从转导细胞中提取的基因组DNA，并检测C46转基因和来自内源性β-球蛋白基因的序列。照此，C46VCN可以被归一化为细胞基因组。

[0161]

表1. 稳定vs瞬时病毒载体生产

VCM[1]	方法	293T滴度 (TU/mL)	TF-1a滴度 (TU/mL)	p24 (ng/mL)
LVsh5/C46	瞬时转染	2.78×10^{9}	2.64×10^{8}	5250
TL20sh5/C46	稳定生产细胞	1.40×10^{9}	1.46×10^{8}	13430

1. 缩写：TU，转导单位；VCM，包含病毒的培养基

2. 通过超速离心将VCM通过20％蔗糖缓冲液浓缩100倍

[0162] 相对于瞬时转染方法，在生产细胞系产生的VCM中观察到更高浓度的p24。然而，使用这两种不同系统产生的LVsh5/C46的产量和效力是相似的。首先使用等体积的VCM通过FACS评估载体的C46滴度。尽管通过瞬时转染产生的载体具有适度增加的滴度，但是当将C46滴度标准化并且使用qPCR测定法或通过功能性敲减CCR5使载体制备物用于基因转导时，由稳定生产细胞系产生的载体显示出更高的效价(见表2)。与用瞬时转染生产的载体的处理相比，在用本文公开的方法生产的LVsh5/C46处理的靶细胞中，CCR5表达的下调和基因组C46转基因(VCN)均显着更高。(参见表3和图10)

[0163]

表 2. C46 在转导的细胞中通过 qPCR 的分析

条件	MOI[3]	C46 拷贝/细胞
无病毒，阴性对照	-	ND
Tf-1a[2]，阳性对照	-	1.36±0.58
瞬时转染	1	5.34±0.55

[0164]

稳定生产系	1	10.7±2.17
瞬时转染	0.3	1.01±0.30
稳定生产系	0.3	3.67±0.66

1. 缩写：ND，未检测到；MOI，感染复数

2. LVsh5/C46 单拷贝细胞系

3. 基于 C46 转导滴度的 MOI

[0165]

表3. C46在转导的细胞中通过qPCR的分析

条件	MOI[3]	C46拷贝/细胞
无病毒，阴性对照	-	ND
Tf-1a[2]，阳性对照	-	1.36±0.58
瞬时转染	1	5.34±0.55
稳定生产系	1	10.7±2.17
瞬时转染	0.3	1.01±0.30
稳定生产系	0.3	3.67±0.66

1. 缩写：ND，未检测到；MOI，感染复数

2. LVsh5/C46单拷贝细胞系

3. 基于C46转导滴度的MOI

[0166] 基于三个独立的测定法，我们证明本文所描述的方法提供了稳定的LV生产系统，与瞬时转染方法相比，其能够生成类似的质量和数量的SIN-LV。转导细胞中较高的CCR5下调效力和C46VCN(标准化为C46滴度)表明由生产细胞产生的LVsh5/C46比使用常规4-质粒瞬时转染生成的那些载体具有更好的效力。通过去除繁琐的瞬时转染步骤，不希望受任何特定理论的束缚，可以相信，该生产系统能够容易地适应cGMP条件用于制造人类使用的临床级材料。

[0167] 实例2-用于HIV基因治疗的慢病毒载体的生物生产的基于GPRG的生产细胞系的开发和表征

[0168] 之前已经建立了GPRG细胞系系统用于自灭活慢病毒载体(SIN-LV)的临床生产。在这里，我们试图建立基于GPRG的生产细胞系用于LVsh5/C46的产生，目前正在临床上评估用于治疗HIV感染个体的SIN-LV。该载体编码两种病毒进入抑制剂；sh5，对HIV共受体CCR5的短发夹RNA，以及C46，病毒融合抑制剂。我们还试图确定GPRG包装细胞系、基于GRPG的LVsh5/C46生产细胞系和LVsh5/C46生产在四环素诱导后的稳定性，作为用于LVsh5/C46的生物生产的GPRG系统所需要的调节填充和临床应用。

[0169] GPRG细胞在含有多西环素(Dox)和嘌呤霉素(Puro)的D10培养基中培养。为了生成LVsh5/C46生产细胞，用转移质粒TL20-LVsh5/C46和博来霉素-抗性质粒作为串联阵列转染GPRG细胞。评估各个克隆产生LVsh5/C46载体的能力，并维持在具有Dox、Puro和博来霉素(Zeocin)的D10培养基中。为了评估亲本GPRG细胞系对LV产生的稳定性，在3个月期间(50+总传代)中每10代用转移载体转染GPRG细胞(参见图3A和3B)。在转染后48小时收获包含病

毒的培养基(VCM)，通过互补基因转导测定法评估载体滴度。为了评价来自于稳定生产细胞克隆的LV产生的稳定性，在不含Dox的D10培养基中诱导细胞。诱导后72小时收获VCM并在载体稀释范围内类似地评估滴度。为了分析长期传代后在诱导之后的VSV-G表达的稳定性，通过Dox撤回诱导GPRG细胞，然后使用生物素缀合的抗VSV-G抗体染色，随后用链霉亲和素-藻红蛋白进行次级染色。

[0170] GPRG细胞显示了严格的VSV-G的四环素调节的表达。该包装细胞系在用LV转移载体转染后能够产生高达107LV的转导单位(TU)/mL，并在连续培养中保持高水平的LV产生超过50代(参见图6A和6B)。通过利用串联阵列转染，我们证明了基于GPRG生产LVsh5C46的生产细胞系的有效构建。该细胞系始终产生高于106TU/mL的滴度。通过重新克隆和选择次级生产细胞系可以实现滴度的进一步提高。滴度在诱导后2至5天达到峰值。我们还表明，已建立的稳定生产细胞系可以在超过25代的连续培养期间常规地维持具有超过106TU/mL的滴度的LVsh5/C46产量。

[0171] 在除去Dox后GPRG细胞系在细胞表面有效表达VSV-G。在转染载体质粒的转染后也可以生成高滴度LV。此外，该细胞系允许高滴度生产细胞系用于SIN-LVs的衍生。生产者细胞系在延长培养期间证实了稳定的载体产生，并且已经探索了使载体生产适应无血清和悬浮培养系统的适应性的评估(参见图7A和7B)。

[0172] 实例3-用于生成串联阵列的方案

[0173] 步骤1

[0174] 通过将490mL去离子水与10mL50×TAE((Tris-乙酸盐-EDTA)缓冲液)混合准备500mL的1×TAE运行缓冲液。

[0175] 通过加入1克琼脂糖和100毫升1×TAE缓冲液(加2mL50×TAE与98mL高压灭菌水)到烧杯中，并微波处理该混合物直到没有固体颗粒或气泡(约2.5分钟)而制作1％琼脂糖凝胶。

[0176] 让混合物冷却3分钟。

[0177] 将10μL的GelRed™加入至琼脂糖凝胶混合物并搅拌(可从Biotium获得)。

[0178] 装配制胶盘架(gel caster)和制胶梳(gel comb)。将混合物倒入凝胶模具并冷却30分钟(容量:60μL用于大梳子)

[0179] 一旦凝胶冷却，用1×TAE缓冲液填充盒子，直到凝胶完全浸没。

[0180] 在室温下准备消化反应混合物以线性化DNA

[0181] 用限制性酶SfiI消化25μg载体质粒。在单独的反应中，用PflMI(10μg是多于足够的)消化抗性盒质粒PGK-ble。

[0182]

要素	ble标记物	载体
DNA名	PGK-ble	
10快速消化绿色缓冲液	5μL	10μL
质粒DNA	10μg	25μg
快速消化酶1:PflMI	5μL	0μL
快速消化酶2:SfiI	0μL	5μL
水，无核酸酶	至50	至100

总体积	50μL	100μL

[0183] 轻轻混合并在37℃下加热温育15分钟。

[0184] 添加10μL的GeneRuler 1kb plus DNA梯度混合物(2μL的DNA梯度+8μL无核酸酶的水)和50μL的样品混合物到可用的插槽中。.

[0185] 打开电泳机,以150V的电压运行1小时。

[0186] 将凝胶转移到UVP PhotoDoc-It成像系统中,并获得结果图像。

[0187] 从Eye-Fi网站下载凝胶图片。

[0188] 用NanoDrop 2000分光光度计确定每个样品的DNA浓度。

[0189] 步骤2

[0190] 从琼脂糖凝胶中切出DNA带。

[0191] 加入3体积的缓冲液QG到1体积的凝胶(一般加入500μL QG)。

[0192] 凝胶片完全溶解后,在50℃温育10分钟。

[0193] 将样品施加到QIAquick柱上,并以17900rpm离心1分钟(可从Qiagen获得)。

[0194] 丢弃流通液并将QIAquick柱放回同一个收集管中。

[0195] 向QIAquick柱中加入0.5ml缓冲液QG并离心1分钟。

[0196] 向QIAquick柱中加入0.75ml缓冲液PE并离心1分钟。

[0197] 丢弃流通液并以17900rpm将QIAquick柱再离心1分钟。

[0198] 将QIAquick柱放入干净的1.5ml离心管中。

[0199] 为了洗脱DNA,将35μL缓冲液EB添加到QIAquick膜的中央并以17900rpm离心该柱1分钟(缓冲液EB是10mM Tris-cl,pH8.5)。

[0200] 使用NanoDrop 2000分光光度计测量DNA片段浓度(表1;使用EB缓冲液进行空白测量)

[0201] 步骤3

[0202] 在位于冰上的1.7mL Eppendorf微量离心管中建立连接反应。

[0203] 使用预先构建的电子表格(Concatemeric Ligations.xlsx)来计算每个片段的量,其需要混合以创建载体与PGK-ble的约25:1的摩尔比。

[0204] 在连接反应中将片段的量最大化并保持所需的摩尔比。

[0205] 应将T4DNA连接酶缓冲液在室温下解冻并重新悬浮(T4DNA连接酶缓冲液包含以下组分:50mM Tris-HCl,10mM MgCl2,1mM ATP,10mM DTT,pH 7.5)。

[0206] 吸取连接反应。在上述例子中,我们通过加入10μL的10X连接缓冲液(NEB快速连接试剂盒)和0.5μL连接酶(购自New England BioLabs)使用90μL DNA混合物。

[0207] 准备随后的反应混合物,其在室温下含有:

[0208]

要素	载体
载体片段	
ble-抗性片段	
10×T4 DNA 连接酶缓冲液	10
T4 DNA 连接酶	0.5
水，无核酸酶	至 90

[0209]

总体积	90

[0210] 通过上下移液而轻轻混合。

[0211] 在室温下温育过夜

[0212] 步骤4

[0213] 在通过基于二氧化硅的膜(DNeasy血液和组织试剂盒)转染入GPRG细胞之前，收获并纯化串联阵列。

[0214] 吸取串联阵列混合物到置于2ml收集管中的DNeasy Mini自旋柱中。

[0215] 以8000×g离心1分钟。丢弃流通液和收集管。

[0216] 将DNeasy Mini自旋柱放入新的2ml收集管(已提供)(可从Qiagen获得)。

[0217] 加入500μL缓冲液AW1，在8000×g下离心1分钟。

[0218] 丢弃流通液和收集管。

[0219] 将DNeasy Mini自旋柱放入新的2ml收集管(已提供)。

[0220] 加入500μL缓冲液AW2，在20000×g下离心3分钟以干燥DNeasy膜。

[0221] 丢弃流通液和收集管。

[0222] 将DNeasy Mini自旋柱放入干净的1.7ml Eppendorf微量离心管中。

[0223] 直接加入200μL缓冲液AE至DNeasy膜上。

[0224] 在室温下温育4分钟

[0225] 在8000×g下离心1分钟以洗脱DNA混合物。

[0226] 重复洗脱一次

[0227] 用NanoDrop Lite分光光度计测量串连DNA浓度

[0228] 实例4-使用串联阵列生成生产细胞系的方案

[0229] 在解冻后至少将细胞传代4次，然后将它们用于病毒载体生产。

[0230] 在载体诱导前使用台盼蓝法确认细胞是健康的且大于95％存活。(台盼蓝通常用于活细胞计数的染色排除程序。该方法是基于这样的原理：活的(存活的)细胞不吸收某些染料，而死的(不存活的)细胞则吸收某些染料。染色有利于细胞形态的可视化)。

[0231] 培养所需量的GPRG细胞

[0232] 在接种细胞之前，再次培养细胞每日传代至少两次。

[0233] 第一天，去除GPRG细胞系培养皿的培养基，并用1×PBS洗涤细胞。

[0234] 轻轻移取1×TrypLE Express到洗涤的细胞单层上，对T75烧瓶使用3mL或者对T25烧瓶使用1mL。

[0235] 用TrypLE Express旋转烧瓶以覆盖单层。

[0236] 将烧瓶放回温育箱中，放置2分钟。

[0237] 轻轻敲打烧瓶的一侧，释放任何残留的贴壁细胞。

[0238] 将细胞重新悬浮在2mL新鲜的D10培养基中并转移到15mL锥形离心管中。

[0239] 以1200rpm离心细胞5分钟。

[0240] 吸出培养基，并将小球轻轻悬浮在5mL具有多西环素(1ng/mL)的新鲜的D10培养基中。

[0241] 通过TC10™自动细胞计数器确定细胞计数(表5)

[0242] 转染前20-24小时，将细胞在培养皿中以80％汇合接种(通过在具有多西环素的60-mm培养皿中接种3.2×106活细胞；表9)

[0243] 准备串联阵列形成(参见，例如，实例3)。

[0244] 第二天，允许CalPhosTM哺乳动物转染试剂盒在转染之前达到室温(表7)(可从ClonTech获得)。

[0245] 纯化串联DNA并测量浓度(串联阵列可根据本文所描述的方法纯化)

[0246] 准备转染质粒DNA表(表8；4毫升，60毫米培养皿)。

[0247] 对于每次转染，在15mL锥形离心管中分别准备溶液A和溶液B

[0248] 用移液助剂起泡溶液B(2×HBS)并滴加溶液A(DNA混合物)。

[0249] 在室温下温育转染溶液15分钟

[0250] 将转染溶液轻轻加入培养皿中。

[0251] 轻轻地来回移动平板，均匀分配转染溶液。

[0252] 在CO2温育箱中37℃温育培养盘4小时。

[0253] 在37℃的二氧化碳温育箱中，每60mm培养皿预热5毫升新鲜的D10培养基

[0254] 4小时后用1mL预热的D10洗涤，并用4mL预热的新鲜D10培养基更换

[0255] 在5％CO2 37℃温育箱中温育

[0256] 在串联体转染后48小时，收获转染的GPRG细胞(进行亚培养细胞)。

[0257] 用含博来霉素(50ug/ml)和多西环素(1ng/mL)的新鲜D10培养基在T150烧瓶或30mL、150mm培养皿中重新涂布细胞。

[0258] 每3-4天用具有多西环素(1ng/mL)的选择性培养基(博来霉素，50ug/ml)饲喂细胞，直至细胞病灶被鉴定(通常在1-2周内观察)

[0259] 实例5—描述用于生成GPRG包装细胞系的细胞系和序列

[0260] HEK-293T/17是HEK-293T的亚克隆。这些细胞稳定表达SV-40T抗原，并特异性地选择特定的克隆，因为其具有高度的转染能力。生成基于HEK-293T/17的主细胞库(HEK-293T/17MCB)。

[0261] SFG-IC-HIVgp-Ppac2是γ逆转录病毒载体，其在CMV启动子的控制下表达密码子优化的HIV gagpol，具有嘌呤霉素抗性。用来制作该载体的质粒(pSFG-IC-HIVgp-Ppac2)使用以下组分构建：

[0262] (1)pSFG tcLuc ECT3是逆转录病毒载体骨架质粒(SFG)的衍生物,适合于用四环素调节的启动子系统调节的基因表达(Lindemann,D.,Patriquin,E.,Feng,S.,&Mulligan,R.C.Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo.Mol.Med.3,466-476(1997));

[0263] (2)CMV增强子/启动子驱动的密码子优化的HIV NL4-3gagpol基因;

[0264] (3)PGK启动子驱动的来自pMSCVpac的嘌呤霉素抗性基因(Hawley,R.G.,Lieu,F.H.,Fong,A.Z.,&Hawley,T.S.Versatile retroviral vectors for potential use in gene therapy.Gene Ther.1,136-138(1994))。

[0265] HEK-293T/17MCB用SFG-IC-HIVgp-Ppac2逆转录病毒载体的感染产生GP细胞系。

[0266] SFG-tc-revco是在四环素响应性启动子的控制下表达密码子优化的HIV rev的γ逆转录病毒载体。使用以下组分构建用于产生该载体的质粒(pSFG-tc-revco):

[0267] (1)基于上述NL4-3株序列的HIV rev基因,和

[0268] (2)pSFG tcLuc ECT3(如上所述)

[0269] SFG-tTA是在逆转录病毒LTR的控制下表达嵌合转录反式激活子的γ逆转录病毒载体(Lindemann,D.,Patriquin,E.,Feng,S.,and Mulligan,R.C.Versatile retrovirus vector systems for regulated gene expression in vitro and in vivo.Mol.Med.3,466-476(1997))。它基于SFG逆转录病毒载体,包含来自质粒pUHD15-1的Tet启动子元件(Gossen M,和Bujard,H.(1992)PNAS 89 12:5547-5551)。

[0270] GP细胞系用SFG-tc-revco和SFG-tTA的感染产生GPR细胞系

[0271] SFG-tc-VSVG是在四环素调节的启动子控制下表达VSV糖蛋白G的γ逆转录病毒载体。使用与其他载体相同的pSFGtcLucECT3骨架产生用于生成该载体(pSFG-tc-VSVG)的质粒,并且质粒pMD.G作为VSVG包膜蛋白的来源(参见Ory,D.S.,Neugeboren,B.A.,and Mulligan,R.C.A stable human-derived packaging cell line for production of high titer retrovirus/vesicular stomatitis virus G pseudotypes.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93,11400-11406(1996)and Rose,J.K.& Gallione,C.(1981)J.Virol.39,519-528)。

[0272] GPR细胞系用SFG-tc-VSVG的感染产生GPRG细胞系。

[0273] Lee,Chi-Lin等描述了通过Retro-SVGmu感染GPR细胞系生成GPRS细胞系“Construction of Stable Producer Cells to Make High-Titer Lentiviral Vectors for Dendritic Cell-Based Vaccination.”Biotechnology and Bioengineering 109.6(2012):1551-1560.PMC.Web.14Apr.2016。

[0274] 实例6-串联阵列纯化

[0275] 在通过基于二氧化硅的膜(DNeasy血液和组织试剂盒)转染入GPRG细胞之前,收获并纯化串联子。

[0276] 吸取串联阵列混合物到置于2ml收集管中的DNeasy Mini自旋柱中。

[0277] 以6000×g离心1分钟。丢弃流通液和收集管

[0278] 将DNeasy Mini自旋柱放入新的2ml收集管(已提供)中。

[0279] 加入500μL缓冲液AW1,在6000×g下离心1分钟。

[0280] 丢弃流通液和收集管

[0281] 将DNeasy Mini自旋柱放入新的2ml收集管(已提供)。

[0282] 加入500μL缓冲液AW2,在20000×g下离心3分钟以干燥DNeasy膜。

[0283] 丢弃流通液和收集管。

[0284] 将DNeasy Mini自旋柱放入干净的1.7ml Eppendorf微量离心管中

[0285] 直接加入200μL缓冲液AE至DNeasy膜上。

[0286] 在室温下温育4分钟

[0287] 在6000×g下离心1分钟以洗脱DNA混合物。

[0288] 重复洗脱一次(添加新的洗脱缓冲液)

[0289] 用NanoDrop Lite分光光度计测量串联DNA浓度。

[0290] 实例7-TL20-UbcGFP&Cal1-WPRE生产细胞系

[0291] 下表总结了根据本文所描述的方法合成的两个生产细胞系。与TL20-Cal1-wpre和TL20-Unc-GFP载体有关的数据在图20A、20B和20C中进一步说明。

[0292]

选择和筛选	TL20c-Ubc-GFP	TL20c-Cal1-WPRE
方法	单细胞分选[2]	单细胞分选[2]
接种细胞密度	1细胞/孔	1细胞/孔

[0293]

培养基	条件培养基	条件培养基
克隆形成的效率	28/96	22/96
完全扩增	16	17
评价克隆	16	5
多克隆载体生产	5.77×10^{6}TU/mL	4.50×10^{6}TU/mL
最佳克隆的生产率	1.36×10^{6}TU/mL	3.0×10^{6}TU/mL

1. 缩写：TU，转导单元。

2. 在USC流式细胞仪核心设备上使用流式细胞术进行单细胞分选

3. 条件培养基：DMEM w GlutaMax；FBS(10% w/v)；Pen/Strep(1% w/v)；多西环素(1 ng/mL)

[0294] 本说明书中提到的所有出版物均通过引用以其整体并入本文。本领域技术人员将会理解，可以对具体实施例中所示的本公开进行许多变化和/或修改，而不脱离如广泛描述的本公开的精神或范围。因此，本实施例在所有方面都被认为是说明性的而不是限制性的。

[0295] 尽管已经参照特定实施例描述了本公开，但是应该理解的是，这些实施例仅仅是本公开的原理和应用的说明。因此可以理解的是，可以对说明性实施例作出许多修改，并且在不脱离由所附权利要求限定的本公开的精神和范围的情况下可以设计出其它布置。

序列表

<110> C-L·李(LEE, Chi-Lin)

J·S·巴特利特(BARTLETT, Jeffrey S.)

<120> 慢病毒载体的生物生产

<130> Cal-0013WO

<140> PCT/US2016/031959

<141> 2016-05-12

<150> US 62/161,133

<151> 2015-05-13

<150> US 62/161,152

<151> 2015-05-13

<160> 15

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 6565

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的(Synthetic): PUC57-TL20C

<400> 1

ggccgcctcg gccaaacagc ccttgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg 60
aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact 120
ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca ctccctatca gtgatagaga 180
aaagtgaaag tcgagtttac cagtccctat cagtgataga gaaaagtgaa agtcgagttt 240
accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga 300
tagagaaaag tgaaagtcga gctcgccatg ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 360
ggcgagccct cagatcctgc atataagcag ctgcttttg cctgtactgg gtctctctgg 420
ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaacccact gcttaagcct 480
caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt 540
aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcag tggcgcccga 600
acagggactt gaaagcgaaa gggaaaccag aggagctctc tcgacgcagg actcggcttg 660
ctgaagcgcg cacggcaaga ggcgaggggc ggcgactggt gagtacgcca aaaattttga 720
ctagcggagg ctagaaggag agagatgggt gcgagagcgt cagtattaag cgggggagaa 780
ttagatcgcg atgggaaaaa attcggttaa ggccaggggg aaagaaaaaa tataaattaa 840
aacatatagt atgggcaagc agggagctag aacgattcgc agttaatact ggcctgttag 900
aaacatcaga aggctgtaga caaatactgg gacagctaca accatccctt cagacaggat 960
cagaagaact tagatcatta tataatacag tagcaaccct ctattgtgtg catcaaagga 1020
tagagataaa agacaccaag gaagctttag acaagataga ggaagagcaa aacaaaagta 1080

agaaaaaagc acagcaagca gcaggatctt cagacctgga aattccctac aatccccaaa 1140
gtcaaggagt agtagaatct atgaataaag aattaaagaa aattatagga caggtaagag 1200
atcaggctga acatcttaag acagcagtac aaatggcagt attcatccac aattttaaaa 1260
gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag 1320
acatacaaac taaagaatta caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt cgggtttatt 1380
acagggacag cagaaatcca ctttggaaag gaccagcaaa gctcctctgg aaaggtgaag 1440
gggcagtagt aatacaagat aatagtgaca taaaagtagt gccaagaaga aaagcaaaga 1500
tcattaggga ttatggaaaa cagatggcag gtgatgattg tgtggcaagt agacaggatg 1560
aggattagaa catggaaaag tttagtaaaa caccataagg aggagatatg agggacaatt 1620
ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca 1680
ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt 1740
tccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg 1800
tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta 1860
ttgaggcgca acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa 1920
gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct 1980
ctggaaaact catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc 2040
tggaacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca 2100
caagcttaat acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag 2160
aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc 2220
tgtggtatat aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt 2280
ttgctgtact ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga 2340
cccacctccc aaccccgagg ggaccgagct caagcttcga acgcgtgcgg ccgcatcgat 2400
gccgtagtac ctttaagacc aatgacttac aaggcagctg tagatcttag ccacttttta 2460
aaagaaaagg ggggactgga agggctaatt cactcccaaa gaagacaaga tccctgcagg 2520
cattcaaggc caggctggat gtggctctgg gcagcctggg ctgctggttg atgaccctgc 2580
acatagcagg gggttggatc tggatgagca ctgtgctcct ttgcaaccca ggccgttcta 2640
tgattctgtc attctaaatc tctctttcag cctaaagctt tttccccgta tccccccagg 2700
tgtctgcagg ctcaaagagc agcgagaagc gttcagagga aagcgatccc gtgccacctt 2760
ccccgtgccc gggctgtccc cgcacgctgc cggctcgggg atgcgggggg agcgccggac 2820
cggagcggag ccccgggcgg ctcgctgctg ccccctagcg ggggagggac gtaattacat 2880
ccctgggggc tttgggggggg ggctgtcccc gtgagctccc cagatctgct ttttgcctgt 2940
actgggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac 3000
ccactgctta agcctcaata aagcttcagc tgctcgagct agcagatctt tttccctctg 3060
ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga 3120
aatttatttt cattgcaata gtgtgttgga atttttttgtg tctctcactc ggaaggacat 3180
atgggagggc aaatcattta aaacatcaga atgagtattt ggtttagagt ttggcaacat 3240
atgcccatat gctggctgcc atgaacaaag gttggctata aagaggtcat cagtatatga 3300
aacagccccc tgctgtccat tccttattcc atagaaaagc cttgacttga ggttagattt 3360
tttttatatt ttgttttgtg ttatttttttt ctttaacatc cctaaaattt tccttacatg 3420

ttttactagc cagatttttc ctcctctcct gactactccc agtcatagct gtccctcttc 3480
tcttatggag atccctcgac ctgcagccca agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt 3540
cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag 3600
tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg 3660
cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagcggatcc gcatctcaat tagtcagcaa 3720
ccatagtccc gcccctaact ccgcccatcc cgcccctaac tccgcccagt tccgcccatt 3780
ctccgcccca tggctgacta attttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct 3840
ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc 3900
tgtcgactgc agaggcctgc atgcaagctt ggcgtaatca tggtcatagc tgtttcctgt 3960
gtgaaattgt tatccgctca caattccaca caacatacga gccggaagca taaagtgtaa 4020
agcctggggt gcctaatgag tgagctaact cacattaatt gcgttgcgct cactgcccgc 4080
tttccagtcg ggaaacctgt cgtgccagct gcattaatga atcggccaac gcgcggggag 4140
aggcggtttg cgtattgggc gctcttccgc ttcctcgctc actgactcgc tgcgctcggt 4200
cgttcggctg cggcgagcgg tatcagctca ctcaaaggcg gtaatacggt tatccacaga 4260
atcaggggat aacgcaggaa agaacatgtg agcaaaaggc cagcaaaagg ccaggaaccg 4320
taaaaaggcc gcgttgctgg cgtttttcca taggctccgc cccctgacg agcatcacaa 4380
aaatcgacgc tcaagtcaga ggtggcgaaa cccgacagga ctataaagat accaggcgtt 4440
tccccctgga agctccctcg tgcgctctcc tgttccgacc ctgccgctta ccggatacct 4500
gtccgccttt ctcccttcgg gaagcgtggc gctttctcat agctcacgct gtaggtatct 4560
cagttcggtg taggtcgttc gctccaagct gggctgtgtg cacgaacccc ccgttcagcc 4620
cgaccgctgc gccttatccg gtaactatcg tcttgagtcc aacccggtaa gacacgactt 4680
atcgccactg gcagcagcca ctggtaacag gattagcaga gcgaggtatg taggcggtgc 4740
tacagagttc ttgaagtggt ggcctaacta cggctacact agaagaacag tatttggtat 4800
ctgcgctctg ctgaagccag ttaccttcgg aaaaagagtt ggtagctctt gatccggcaa 4860
acaaaccacc gctggtagcg gtggtttttt tgtttgcaag cagcagatta cgcgcagaaa 4920
aaaaggatct caagaagatc ctttgatctt ttctacgggg tctgacgctc agtggaacga 4980
aaactcacgt taagggattt tggtcatgag attatcaaaa aggatcttca cctagatcct 5040
tttaaattaa aaatgaagtt ttaaatcaat ctaaagtata tatgagtaaa cttggtctga 5100
cagttaccaa tgcttaatca gtgaggcacc tatctcagcg atctgtctat ttcgttcatc 5160
catagttgcc tgactccccg tcgtgtagat aactacgata cgggagggct taccatctgg 5220
ccccagtgct gcaatgatac cgcgagaccc acgctcaccg gctccagatt tatcagcaat 5280
aaaccagcca gccggaaggg ccgagcgcag aagtggtcct gcaactttat ccgcctccat 5340
ccagtctatt aattgttgcc gggaagctag agtaagtagt tcgccagtta atagtttgcg 5400
caacgttgtt gccattgcta caggcatcgt ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatggcttc 5460
attcagctcc ggttcccaac gatcaaggcg agttacatga tcccccatgt tgtgcaaaaa 5520
agcggttagc tccttcggtc ctccgatcgt tgtcagaagt aagttggccg cagtgttatc 5580
actcatggtt atggcagcac tgcataattc tcttactgtc atgccatccg taagatgctt 5640
ttctgtgact ggtgagtact caaccaagtc attctgagaa tagtgtatgc ggcgaccgag 5700
ttgctcttgc ccggcgtcaa tacgggataa taccgcgcca catagcagaa ctttaaaagt 5760

gctcatcatt ggaaaacgtt cttcggggcg aaaactctca aggatcttac cgctgttgag 5820
atccagttcg atgtaaccca ctcgtgcacc caactgatct tcagcatctt ttactttcac 5880
cagcgtttct gggtgagcaa aaacaggaag gcaaaatgcc gcaaaaaagg gaataagggc 5940
gacacggaaa tgttgaatac tcatactctt cctttttcaa tattattgaa gcatttatca 6000
gggttattgt ctcatgagcg gatacatatt tgaatgtatt tagaaaaata aacaaatagg 6060
ggttccgcgc acatttcccc gaaaagtgcc acctgacgtc taagaaacca ttattatcat 6120
gacattaacc tataaaaata ggcgtatcac gaggcccttt cgtctcgcgc gtttcggtga 6180
tgacggtgaa aacctctgac acatgcagct cccggagacg gtcacagctt gtctgtaagc 6240
ggatgccggg agcagacaag cccgtcaggg cgcgtcagcg ggtgttggcg ggtgtcgggg 6300
ctggcttaac tatgcggcat cagagcagat tgtactgaga gtgcaccata tgcggtgtga 6360
aataccgcac agatgcgtaa ggagaaaata ccgcatcagg cgccattcgc cattcaggct 6420
gcgcaactgt tgggaagggc gatcggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa 6480
aggggggatgt gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg 6540
ttgtaaaacg acggccagtg aattc 6565

<210> 2
<211> 3901
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: TL20C载体骨架(Synthetic:TL20C vector backbone)
<400> 2

ggccgcctcg gccaaacagc ccttgagttt accactccct atcagtgata gagaaaagtg 60
aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga tagagaaaag tgaaagtcga gtttaccact 120
ccctatcagt gatagagaaa agtgaaagtc gagtttacca ctccctatca gtgatagaga 180
aaagtgaaag tcgagtttac cagtccctat cagtgataga gaaaagtgaa agtcgagttt 240
accactccct atcagtgata gagaaaagtg aaagtcgagt ttaccactcc ctatcagtga 300
tagagaaaag tgaaagtcga gctcgccatg ggaggcgtgg cctgggcggg actggggagt 360
ggcgagccct cagatcctgc atataagcag ctgcttttg cctgtactgg gtctctctgg 420
ttagaccaga tctgagcctg ggagctctct ggctaactag ggaacccact gcttaagcct 480
caataaagct tgccttgagt gcttcaagta gtgtgtgccc gtctgttgtg tgactctggt 540
aactagagat ccctcagacc cttttagtca gtgtggaaaa tctctagcag tggcgcccga 600
acagggactt gaaagcgaaa gggaaaccag aggagctctc tcgacgcagg actcggcttg 660
ctgaagcgcg cacggcaaga ggcgaggggc ggcgactggt gagtacgcca aaaattttga 720
ctagcggagg ctagaaggag agagatgggt gcgagagcgt cagtattaag cgggggagaa 780
ttagatcgcg atgggaaaaa attcggttaa ggccaggggg aaagaaaaaa tataaattaa 840
aacatatagt atgggcaagc agggagctag aacgattcgc agttaatact ggcctgttag 900
aaacatcaga aggctgtaga caaatactgg gacagctaca accatccctt cagacaggat 960
cagaagaact tagatcatta tataatacag tagcaaccct ctattgtgtg catcaaagga 1020
tagagataaa agacaccaag gaagctttag acaagataga ggaagagcaa aacaaaagta 1080

agaaaaaagc acagcaagca gcaggatctt cagacctgga aattccctac aatccccaaa 1140
gtcaaggagt agtagaatct atgaataaag aattaaagaa aattatagga caggtaagag 1200
atcaggctga acatcttaag acagcagtac aaatggcagt attcatccac aattttaaaa 1260
gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat agtagacata atagcaacag 1320
acatacaaac taaagaatta caaaaacaaa ttacaaaaat tcaaaatttt cgggtttatt 1380
acagggacag cagaaatcca ctttggaaag gaccagcaaa gctcctctgg aaaggtgaag 1440
gggcagtagt aatacaagat aatagtgaca taaaagtagt gccaagaaga aaagcaaaga 1500
tcattaggga ttatggaaaa cagatggcag gtgatgattg tgtggcaagt agacaggatg 1560
aggattagaa catggaaaag tttagtaaaa caccataagg aggagatatg agggacaatt 1620
ggagaagtga attatataaa tataaagtag taaaaattga accattagga gtagcaccca 1680
ccaaggcaaa gagaagagtg gtgcagagag aaaaaagagc agtgggaata ggagctttgt 1740
tccttgggtt cttgggagca gcaggaagca ctatgggcgc agcgtcaatg acgctgacgg 1800
tacaggccag acaattattg tctggtatag tgcagcagca gaacaatttg ctgagggcta 1860
ttgaggcgca acagcatctg ttgcaactca cagtctgggg catcaagcag ctccaggcaa 1920
gaatcctggc tgtggaaaga tacctaaagg atcaacagct cctggggatt tggggttgct 1980
ctggaaaact catttgcacc actgctgtgc cttggaatgc tagttggagt aataaatctc 2040
tggaacagat ttggaatcac acgacctgga tggagtggga cagagaaatt aacaattaca 2100
caagcttaat acactcctta attgaagaat cgcaaaacca gcaagaaaag aatgaacaag 2160
aattattgga attagataaa tgggcaagtt tgtggaattg gtttaacata acaaattggc 2220
tgtggtatat aaaattattc ataatgatag taggaggctt ggtaggttta agaatagttt 2280
ttgctgtact ttctatagtg aatagagtta ggcagggata ttcaccatta tcgtttcaga 2340
cccacctccc aaccccgagg ggaccgagct caagcttcga acgcgtgcgg ccgcatcgat 2400
gccgtagtac ctttaagacc aatgacttac aaggcagctg tagatcttag ccacttttta 2460
aaagaaaagg ggggactgga agggctaatt cactcccaaa gaagacaaga tccctgcagg 2520
cattcaaggc caggctggat gtggctctgg gcagcctggg ctgctggttg atgaccctgc 2580
acatagcagg gggttggatc tggatgagca ctgtgctcct ttgcaaccca ggccgttcta 2640
tgattctgtc attctaaatc tctctttcag cctaaagctt tttccccgta tccccccagg 2700
tgtctgcagg ctcaaagagc agcgagaagc gttcagagga aagcgatccc gtgccacctt 2760
ccccgtgccc gggctgtccc cgcacgctgc cggctcgggg atgcgggggg agcgccggac 2820
cggagcggag ccccgggcgg ctcgctgctg ccccctagcg ggggagggac gtaattacat 2880
ccctgggggc tttgggggggg ggctgtcccc gtgagctccc cagatctgct ttttgcctgt 2940
actgggtctc tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac 3000
ccactgctta agcctcaata aagcttcagc tgctcgagct agcagatctt tttccctctg 3060
ccaaaaatta tggggacatc atgaagcccc ttgagcatct gacttctggc taataaagga 3120
aatttatttt cattgcaata gtgtgttgga atttttttgtg tctctcactc ggaaggacat 3180
atgggagggc aaatcattta aaacatcaga atgagtattt ggtttagagt ttggcaacat 3240
atgcccatat gctggctgcc atgaacaaag gttggctata aagaggtcat cagtatatga 3300
aacagccccc tgctgtccat tccttattcc atagaaaagc cttgacttga ggttagattt 3360
tttttatatt ttgttttgtg ttatttttttt ctttaacatc cctaaaattt tccttacatg 3420

ttttactagc cagatttttc ctcctctcct gactactccc agtcatagct gtccctcttc 3480
tcttatggag atccctcgac ctgcagccca agcttggcgt aatcatggtc atagctgttt 3540
cctgtgtgaa attgttatcc gctcacaatt ccacacaaca tacgagccgg aagcataaag 3600
tgtaaagcct ggggtgccta atgagtgagc taactcacat taattgcgtt gcgctcactg 3660
cccgctttcc agtcgggaaa cctgtcgtgc cagcggatcc gcatctcaat tagtcagcaa 3720
ccatagtccc gcccctaact ccgcccatcc cgcccctaac tccgcccagt tccgcccatt 3780
ctccgcccca tggctgacta attttttta tttatgcaga ggccgaggcc gcctcggcct 3840
ctgagctatt ccagaagtag tgaggaggct tttttggagg cctaggcttt tgcaaaaagc 3900
t 3901

<210> 3
<211> 343
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: 编码包装信号的核苷酸序列(Synthetic: nucleotide sequence encoding the packing signal)
<400> 3
agtattaagc gggggagaat tagatcgcga tgggaaaaaa ttcggttaag gccaggggga 60
aagaaaaaat ataaattaaa acatatagta tgggcaagca gggagctaga acgattcgca 120
gttaatactg gcctgttaga aacatcagaa ggctgtagac aaatactggg acagctacaa 180
ccatcccttc agacaggatc agaagaactt agatcattat ataatacagt agcaaccctc 240
tattgtgtgc atcaaaggat agagataaaa gacaccaagg aagctttaga caagatagag 300
gaagagcaaa acaaaagtaa gaaaaaagca cagcaagcag cag 343
<210> 4
<211> 477
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: 中央多嘌呤段(cppt)(Synthetic: Central polypurine tract (cppt))
<400> 4
aattccctac aatccccaaa gtcaaggagt agtagaatct atgaataaag aattaaagaa 60
aattatagga caggtaagag atcaggctga acatcttaag acagcagtac aaatggcagt 120
attcatccac aattttaaaa gaaaaggggg gattgggggg tacagtgcag gggaaagaat 180
agtagacata atagcaacag acatacaaac taaagaatta caaaaacaaa ttacaaaaat 240
tcaaaatttt cgggtttatt acagggacag cagaaatcca ctttggaaag gaccagcaaa 300
gctcctctgg aaaggtgaag gggcagtagt aatacaagat aatagtgaca taaaagtagt 360
gccaagaaga aaagcaaaga tcattaggga ttatggaaaa cagatggcag gtgatgattg 420
tgtggcaagt agacaggatg aggattagaa catggaaaag tttagtaaaa caccata 477

<210> 5

<211> 769

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: 编码rev应答元件的核苷酸序列(Synthetic: nucleotide sequence encoding the rev response element)

<400> 5

aggaggagat atgagggaca attggagaag tgaattatat aaatataaag tagtaaaaat 60
tgaaccatta ggagtagcac ccaccaaggc aaagagaaga gtggtgcaga gagaaaaaag 120
agcagtggga ataggagctt tgttccttgg gttcttggga gcagcaggaa gcactatggg 180
cgcagcgtca atgacgctga cggtacaggc cagacaatta ttgtctggta tagtgcagca 240
gcagaacaat ttgctgaggg ctattgaggc gcaacagcat ctgttgcaac tcacagtctg 300
gggcatcaag cagctccagg caagaatcct ggctgtggaa agatacctaa aggatcaaca 360
gctcctgggg atttggggtt gctctggaaa actcatttgc accactgctg tgccttggaa 420
tgctagttgg agtaataaat ctctggaaca gatttggaat cacacgacct ggatggagtg 480
ggacagagaa attaacaatt acacaagctt aatacactcc ttaattgaag aatcgcaaaa 540
ccagcaagaa aagaatgaac aagaattatt ggaattagat aaatgggcaa gtttgtggaa 600
ttggtttaac ataacaaatt ggctgtggta tataaaatta ttcataatga tagtaggagg 660
cttggtaggt ttaagaatag tttttgctgt actttctata gtgaatagag ttaggcaggg 720
atattcacca ttatcgtttc agacccacct cccaaccccg aggggaccg 769

<210> 6

<211> 181

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: 编码自灭活长终末重复的核苷酸序列(Synthetic: nucleotide sequence encoding the self-inactivating long terminal repeat)

<400> 6

gggtctctct ggttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca 60
ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag tagtgtgtgc ccgtctgttg 120
tgtgactctg gtaactagag atccctcaga ccctttttagt cagtgtggaa aatctctagc 180
a 181

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: 编码多克隆位点的核苷酸序列(Synthetic: nucleotide sequence

encoding the multiple cloning site)

<400> 7

ttcgaacgcg tgcggccgca tcgat 25

<210> 8

<211> 1978

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的(Synthetic): LVSH5/C46

<400> 8

gaacgctgac gtcatcaacc cgctccaagg aatcgcgggc ccagtgtcac taggcgggaa 60
cacccagcgc gcgtgcgccc tggcaggaag atggctgtga gggacagggg agtggcgccc 120
tgcaatattt gcatgtcgct atgtgttctg ggaaatcacc ataaacgtga aatgtctttg 180
gatttgggaa tcttataagt tctgtatgag accacggatc cccgagcaag ctcagtttac 240
accttgtccg acggtgtaaa ctgagcttgc tctttttgag acgagtcctc gagccataaa 300
gatggttaat taacccaccc aagatctggc ctccgcgccg ggttttggcg cctcccgcgg 360
gcgccccccc cctcacggcg agcgctgcca cgtcagacga agggcgcagc gagcgtcctg 420
atccttccgc ccggacgctc aggacagcgg cccgctgctc ataagactcg gccttagaac 480
cccagtatca gcagaaggac attttaggac gggacttggg tgactctagg gcactggttt 540
tctttccaga gagcggaaca ggcgaggaaa agtagtccct tctcggcgat tctgcggagg 600
gatctccgtg gggcggtgaa cgccgatgat tatataagga cgcgccgggt gtggcacagc 660
tagttccgtc gcagccggga tttgggtcgc ggttcttgtt tgtggatcgc tgtgatcgtc 720
acttggtgag tagcgggctg ctgggctggc cggggctttc gtggccgccg ggccgctcgg 780
tgggacggaa gcgtgtggag agaccgccaa gggctgtagt ctgggtccgc gagcaaggtt 840
gccctgaact gggggttggg gggagcgcag caaaatggcg gctgttcccg agtcttgaat 900
ggaagacgct tgtgaggcgg gctgtgaggt cgttgaaaca aggtgggggg catggtgggc 960
ggcaagaacc caaggtcttg aggccttcgc taatgcggga aagctcttat tcgggtgaga 1020
tgggctgggg caccatctgg ggaccctgac gtgaagtttg tcactgactg gagaactcgg 1080
tttgtcgtct gttgcggggg cggcagttat ggcggtgccg ttgggcagtg cacccgtacc 1140
tttgggagcg cgcgccctcg tcgtgtcgtg acgtcacccg ttctgttggc ttataatgca 1200
gggtggggcc acctgccggt aggtgtgcgg taggcttttc tccgtcgcag gacgcagggt 1260
tcgggcctag ggtaggctct cctgaatcga caggcgccgg acctctggtg aggggaggga 1320
taagtgaggc gtcagtttct ttggtcggtt ttatgtacct atcttcttaa gtagctgaag 1380
ctccggtttt gaactatgcg ctcggggttg gcgagtgtgt tttgtgaagt tttttaggca 1440
ccttttgaaa tgtaatcatt tgggtcaata tgtaattttc agtgttagac tagtaaattg 1500
tccgctaaat tctggccgtt tttggctttt ttgttagacg aagcttggta ccgagctcgg 1560
atccgccacc atgggagcag gagcaaccgg aagggcaatg gacggaccaa gattgttact 1620
tctgctcctg ctaggcgtga gcctgggagg agcaaggagc tggatggagt gggacaggga 1680
gatcaacaac tacaccagcc tgatccacag cctgatcgag gagagccaga accagcagga 1740

gaagaacgag caggagctgc tggagctgga caagtgggcc agcctgtgga actggttccg 1800
gagcgagcgg aagtgctgcg tggagtgccc accatgccca gcaccaccag tggcaggacc 1860
cctgatcgca ctggtgacca gcggagccct gctggccgtg ctgggcatca caggctactt 1920
cctgatgaac aggaggagct ggagcccaac cggagagcgg ctggagctgg agccatga 1978

<210> 9
<211> 1113
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: PGK-BLE序列(Synthetic: PGK-BLE SEQUENCE)
<400> 9

ccagcctttg gaattcctgc aggatgggat tctaccgggt aggggaggcg cttttcccaa 60
ggcagtctgg agcatgcgct ttagcagccc cgctgggcac ttggcgctac acaagtggcc 120
tctggcctcg cacacattcc acatccaccg gtaggcgcca accggctccg ttctttggtg 180
gcccccttcgc gccaccttct actcctcccc tagtcaggaa gttccccccc gccccgcagc 240
tcgcgtcgtg caggacgtga caaatggaag tagcacgtct cactagtctc gtgcagatgg 300
acagcaccgc tgagcaatgg aagcgggtag gcctttgggg cagcggccaa tagcagcttt 360
gctccttcgc tttctgggct caggggcggg gcgggcgccc gaaggtcctc cggaggcccg 420
gcattctgca cgcttcaaaa gcgcacgtct gccgcgctgt tctcctcttc ctcatctccg 480
ggcctttcga cctggatcct gcagcacgtg ttgacaatta atcatcggca tagtatatcg 540
gcatagtata atacgactca ctataggagg gccaccatgg ccaagttgac cagtgccgtt 600
ccggtgctca ccgcgcgcga cgtcgccgga gcggtcgagt tctggaccga ccggctcggg 660
ttctcccggg acttcgtgga ggacgacttc gccggtgtgg tccgggacga cgtgaccctg 720
ttcatcagcg cggtccagga ccaggtggtg ccggacaaca ccctggcctg ggtgtgggtg 780
cgcggcctgg acgagctgta cgccgagtgg tcggaggtcg tgtccacgaa cttccgggac 840
gcctccgggc cggccatgac cgagatcggc gagcagccgt gggggcggga gttcgccctg 900
cgcgacccgg ccggcaactg cgtgcacttc gtggccgagg agcaggactg atgctttatt 960
tgtgaaattt gtgatgctat tgctttattt gtaaccatta taagctgcaa taaacaagtt 1020
aacaacaaca attgcattca ttttatgttt caggttcagg gggaggtgtg ggaggttttt 1080
taaactagtg agtcgtatta cccagccttt ggg 1113

<210> 10
<211> 288
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: (7tet0): 多西环素阻抑启动子(Synthetic: (7tet0): doxycycline repressible promoter)
<400> 10

tttaccactc cctatcagtg atagagaaaa gtgaaagtcg agtttaccac tccctatcag 60

tgatagagaa aagtgaaagt cgagtttacc actccctatc agtgatagag aaaagtgaaa 120
gtcgagttta ccactcccta tcagtgatag agaaaagtga aagtcgagtt taccagtccc 180
tatcagtgat agagaaaagt gaaagtcgag tttaccactc cctatcagtg atagagaaaa 240
gtgaaagtcg agtttaccac tccctatcag tgatagagaa aagtgaaa 288

<210> 11
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: HIV LTR R5区(Synthetic: HIV LTR R5 region)
<400> 11
gggtctctct ggttagacca gatctgagcc tgggagctct ctggctaact agggaaccca 60
ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttca 98

<210> 12
<211> 83
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: HIV LTR U5区(Synthetic: HIV LTR U5 region)
<400> 12
agtagtgtgt gcccgtctgt tgtgtgactc tggtaactag agatccctca gacccttta 60
gtcagtgtgg aaaatctcta gca 83

<210> 13
<211> 412
<212> DNA
<213> 人工序列(Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成的: 鸡HS4 400碱基对染色质隔离子(Synthetic: chicken HS4 400 bp chromatin insulator)
<400> 13
atccctgcag gcattcaagg ccaggctgga tgtggctctg ggcagcctgg gctgctggtt 60
gatgaccctg cacatagcag ggggttggat ctggatgagc actgtgctcc tttgcaaccc 120
aggccgttct atgattctgt cattctaaat ctctctttca gcctaaagct ttttccccgt 180
atccccccag gtgtctgcag gctcaaagag cagcgagaag cgttcagagg aaagcgatcc 240
cgtgccacct tccccgtgcc cgggctgtcc ccgcacgctg ccggctcggg gatgcggggg 300
gagcgccgga ccggagcgga gccccgggcg gctcgctgct gccccctagc gggggaggga 360
cgtaattaca tccctggggg ctttgggggg gggctgtccc cgtgagctcc cc 412

<210> 14
<211> 449

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: 兔子β-球蛋白多腺苷酸化信号(Synthetic: rabbit beta-globin polyadenylation signal)

<400> 14

gatcttttc cctctgccaa aaattatggg gacatcatga gccccttga gcatctgact 60
tctggctaat aaaggaaatt tattttcatt gcaatagtgt gttggaattt tttgtgtctc 120
tcactcggaa ggacatatgg gagggcaaat catttaaaac atcagaatga gtatttggtt 180
tagagtttgg caacatatgc ccatatgctg gctgccatga acaaaggttg gctataaaga 240
ggtcatcagt atatgaaaca gccccctgct gtccattcct tattccatag aaaagccttg 300
acttgaggtt agatttttt tatattttgt tttgtgttat ttttttcttt aacatcccta 360
aaattttcct tacatgtttt actagccaga tttttcctcc tctcctgact actcccagtc 420
atagctgtcc ctcttctctt atggagatc 449

<210> 15

<211> 2664

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成的: pUC57质粒部分(Synthetic: pUC57 Plasmid portion)

<400> 15

gtcgactgca gaggcctgca tgcaagcttg gcgtaatcat ggtcatagct gtttcctgtg 60
tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aacatacgag ccggaagcat aaagtgtaaa 120
gcctggggtg cctaatgagt gagctaactc acattaattg cgttgcgctc actgcccgct 180
ttccagtcgg gaaacctgtc gtgccagctg cattaatgaa tcggccaacg cgcggggaga 240
ggcggtttgc gtattgggcg ctcttccgct tcctcgctca ctgactcgct gcgctcggtc 300
gttcggctgc ggcgagcggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacggtt atccacagaa 360
tcaggggata acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaggcc agcaaaaggc caggaaccgt 420
aaaaaggccg cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa 480
aatcgacgct caagtcagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt 540
cccccctggaa gctccctcgt gcgctctcct gttccgaccc tgccgcttac cggatacctg 600
tccgcctttc tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc 660
agttcggtgt aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc 720
gaccgctgcg ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtaag acacgactta 780
tcgccactgg cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggtatgt aggcggtgct 840
acagagttct tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaagaacagt atttggtatc 900
tgcgctctgc tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa 960
caaaccaccg ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa 1020
aaaggatctc aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa 1080

aactcacgtt aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt 1140
ttaaattaaa aatgaagttt taaatcaatc taaagtatat atgagtaaac ttggtctgac 1200
agttaccaat gcttaatcag tgaggcacct atctcagcga tctgtctatt tcgttcatcc 1260
atagttgcct gactccccgt cgtgtagata actacgatac gggagggctt accatctggc 1320
cccagtgctg caatgatacc gcgagaccca cgctcaccgg ctccagattt atcagcaata 1380
aaccagccag ccggaagggc cgagcgcaga agtggtcctg caactttatc cgcctccatc 1440
cagtctatta attgttgccg ggaagctaga gtaagtagtt cgccagttaa tagtttgcgc 1500
aacgttgttg ccattgctac aggcatcgtg gtgtcacgct cgtcgtttgg tatggcttca 1560
ttcagctccg gttcccaacg atcaaggcga gttacatgat cccccatgtt gtgcaaaaaa 1620
gcggttagct ccttcggtcc tccgatcgtt gtcagaagta agttggccgc agtgttatca 1680
ctcatggtta tggcagcact gcataattct cttactgtca tgccatccgt aagatgcttt 1740
tctgtgactg gtgagtactc aaccaagtca ttctgagaat agtgtatgcg gcgaccgagt 1800
tgctcttgcc cggcgtcaat acgggataat accgcgccac atagcagaac tttaaaagtg 1860
ctcatcattg gaaaacgttc ttcggggcga aaactctcaa ggatcttacc gctgttgaga 1920
tccagttcga tgtaacccac tcgtgcaccc aactgatctt cagcatcttt tactttcacc 1980
agcgtttctg ggtgagcaaa aacaggaagg caaaatgccg caaaaaaggg aataagggcg 2040
acacggaaat gttgaatact catactcttc ctttttcaat attattgaag catttatcag 2100
ggttattgtc tcatgagcgg atacatattt gaatgtattt agaaaaataa acaaataggg 2160
gttccgcgca catttccccg aaaagtgcca cctgacgtct aagaaaccat tattatcatg 2220
acattaacct ataaaaatag gcgtatcacg aggccctttc gtctcgcgcg tttcggtgat 2280
gacggtgaaa acctctgaca catgcagctc ccggagacgg tcacagcttg tctgtaagcg 2340
gatgccggga gcagacaagc ccgtcagggc gcgtcagcgg gtgttggcgg gtgtcggggc 2400
tggcttaact atgcggcatc agagcagatt gtactgagag tgcaccatat gcggtgtgaa 2460
ataccgcaca gatgcgtaag gagaaaatac cgcatcaggc gccattcgcc attcaggctg 2520
cgcaactgtt gggaagggcg atcggtgcgg gcctcttcgc tattacgcca gctggcgaaa 2580
gggggatgtg ctgcaaggcg attaagttgg gtaacgccag ggttttccca gtcacgacgt 2640
tgtaaaacga cggccagtga attc 2664

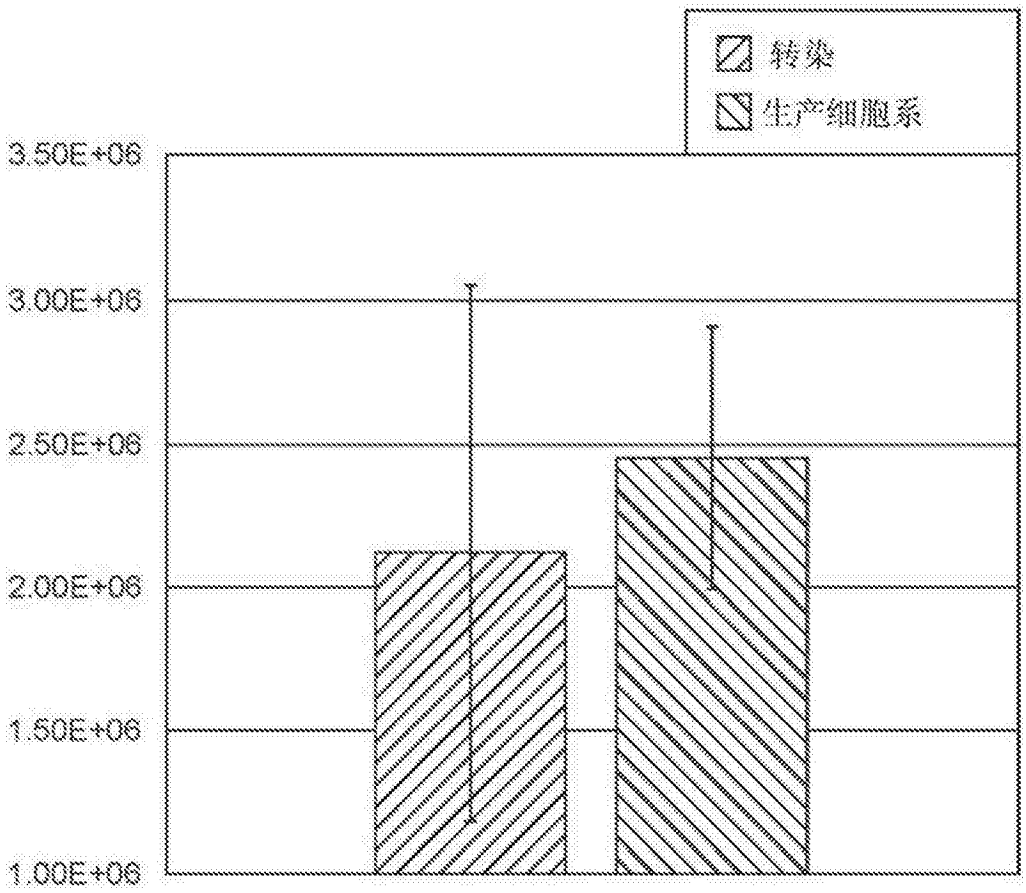


图1

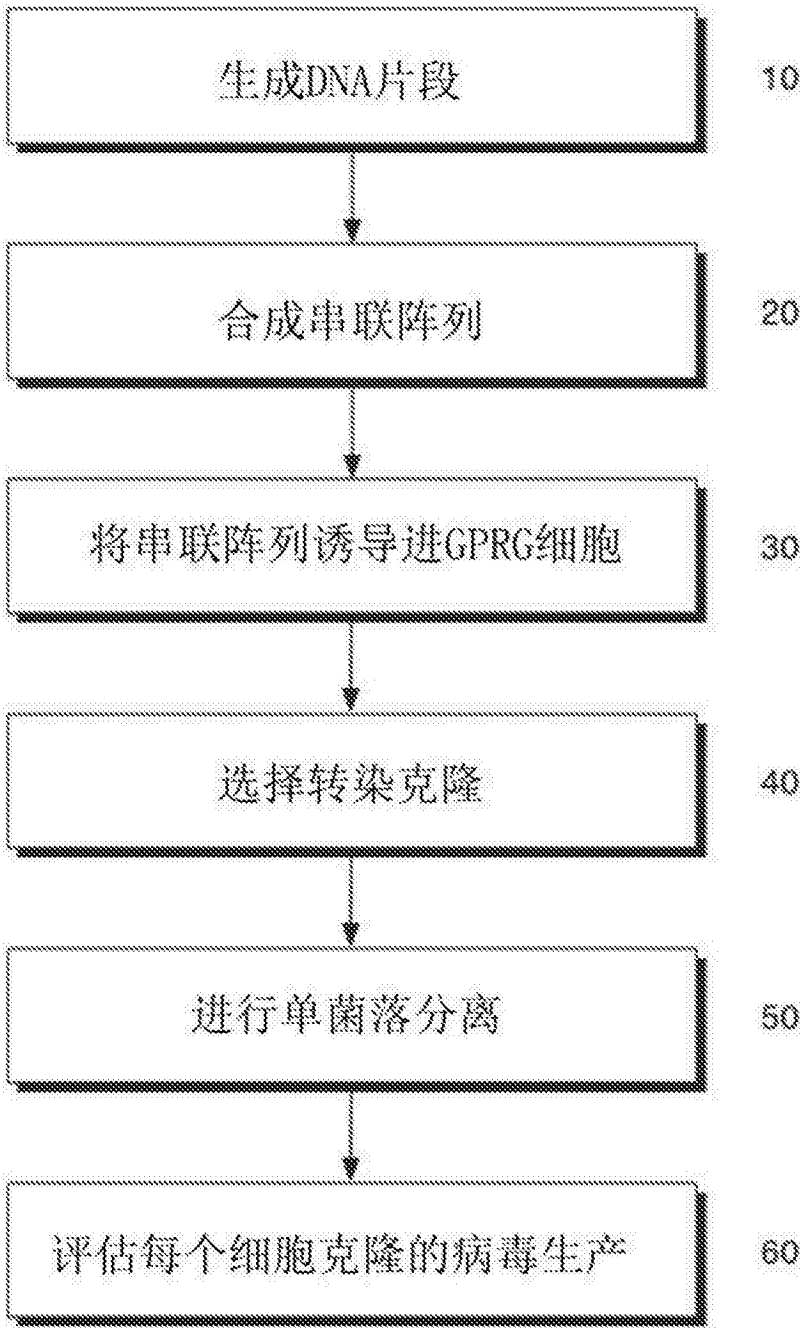

生成DNA片段
10
合成串联阵列
20
将串联阵列诱导进GPRG细胞
30
选择转染克隆
40
进行单菌落分离
50
评估每个细胞克隆的病毒生产
60

图2

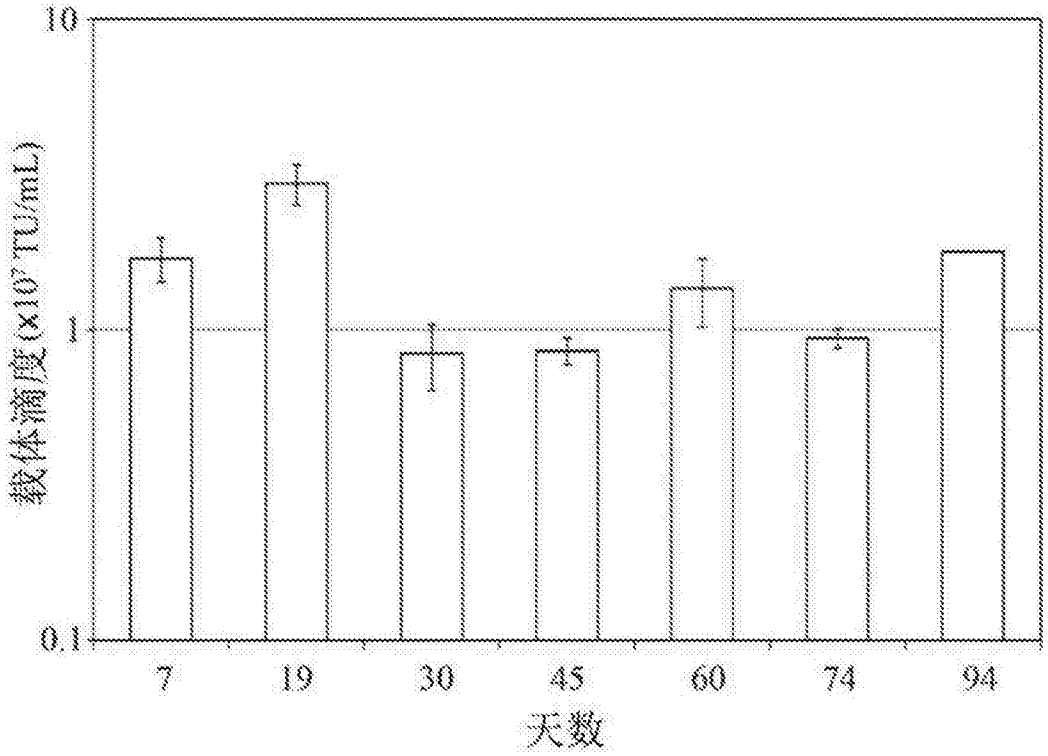

10
1
0.1
载体滴度(×10⁷ TU/mL)
7
19
30
45
60
74
94
天数

图3

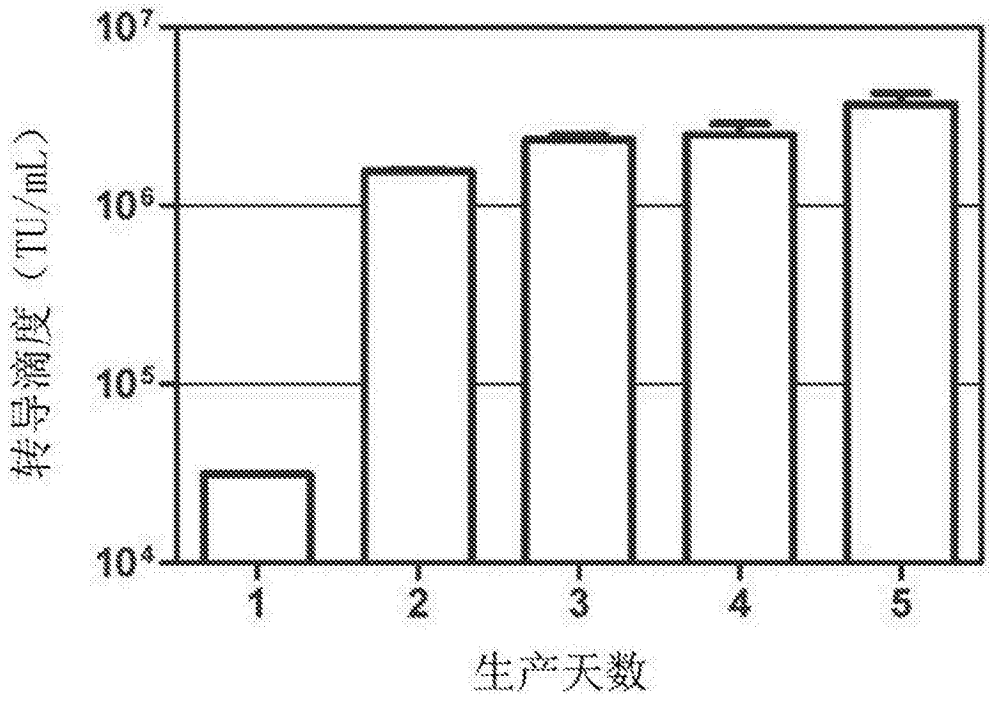

10⁷
10⁶
10⁵
10⁴
转导滴度（TU/mL）
1
2
3
4
5
生产天数

图4

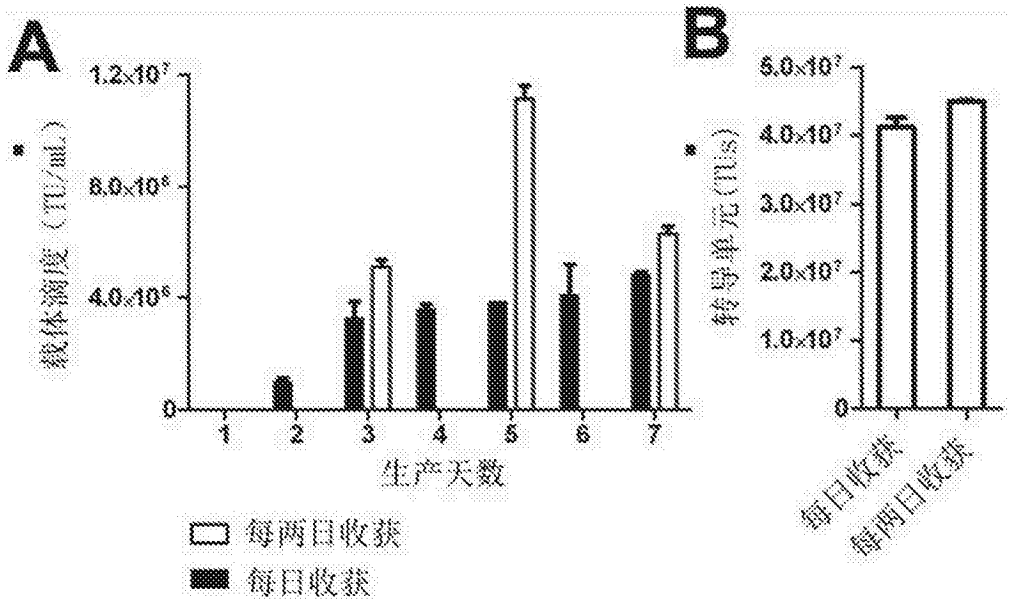

A
B
1.2×10⁷
8.0×10⁶
4.0×10⁶
0
载体滴度（TU/mL）
1
2
3
4
5
6
7
生产天数
每两日收获
每日收获
5.0×10⁷
4.0×10⁷
3.0×10⁷
2.0×10⁷
1.0×10⁷
转导单元(TUs)
每日收获
隔两日收获

图5

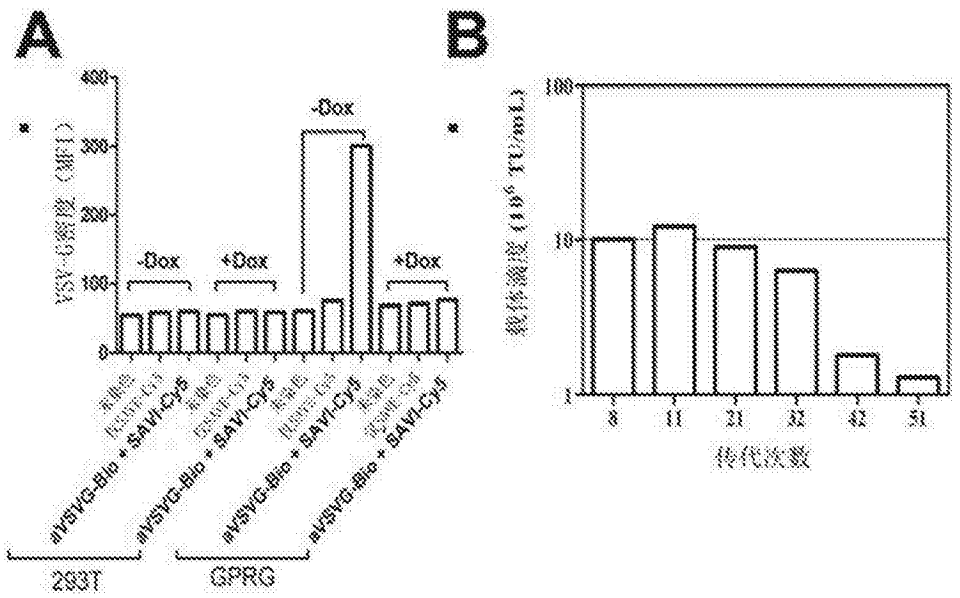

A
B
400
300
200
100
0
VSV-G浓度（ng/mL）
-Dox
+Dox
+Dox
-Dox
+Dox
#VSVG-Bio + SAVI-Cy5
#VSVG-Bio + SAVI-Cy5
#VSVG-Bio + SAVI-Cy5
#VSVG-Bio + SAVI-Cy5
293T
GPRG
100
10
1
载体滴度（10⁶ TU/mL）
8
11
21
32
42
51
传代次数

图6

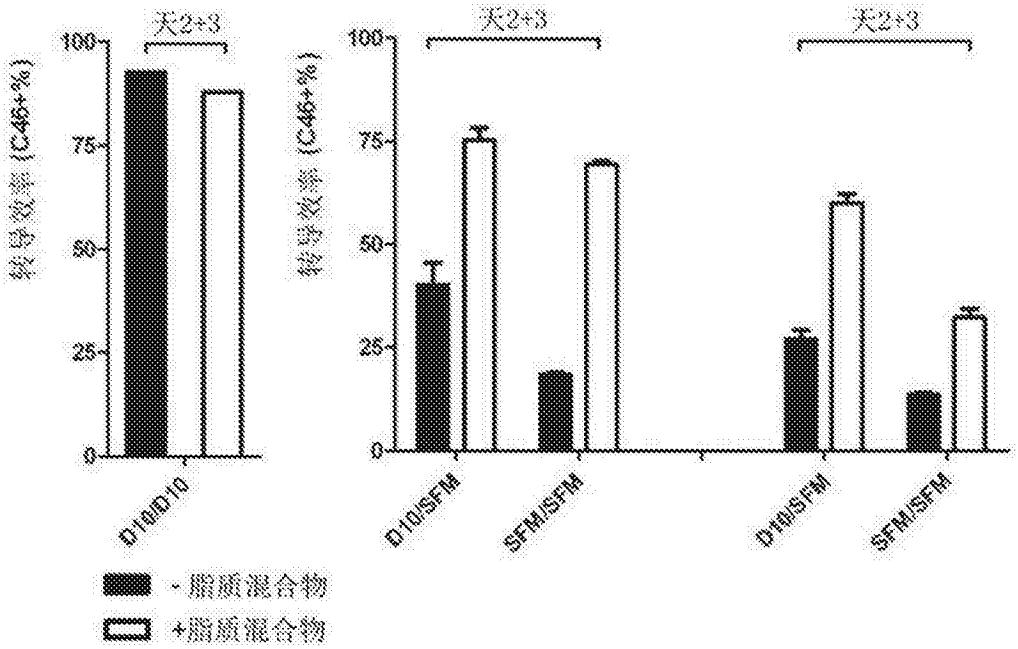

天2+3
天2+3
天2+3
转导效率 (C46+%)
转导效率 (C46+%)
100
75
50
25
0
D10D10
D10/SFM
SFM/SFM
D10/SFM
SFM/SFM
-脂质混合物
+脂质混合物

图7

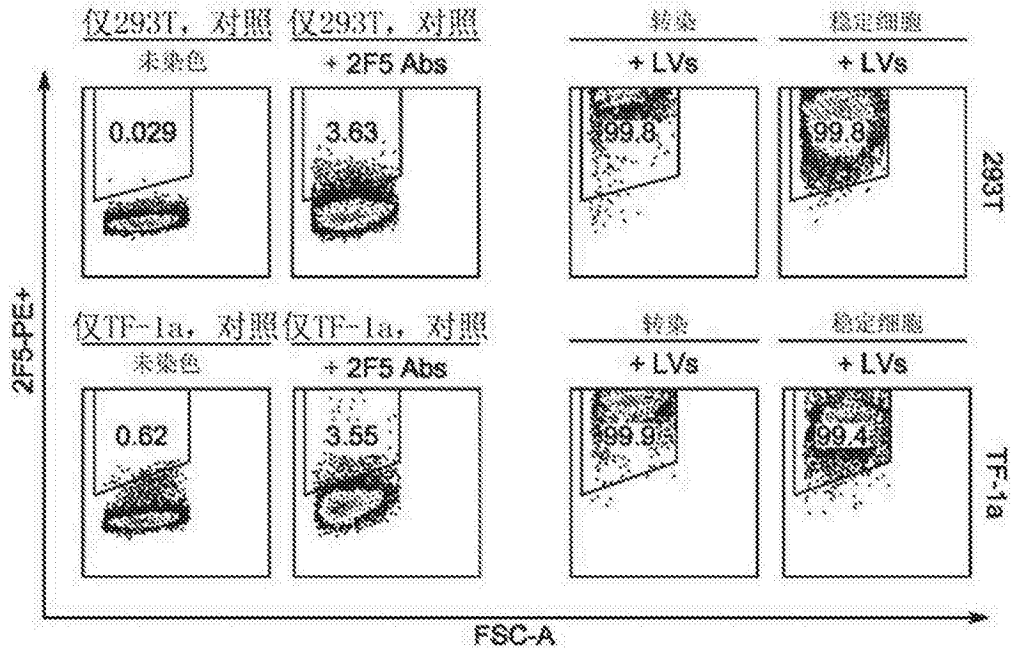

仅293T，对照
仅293T，对照
转染
稳定细胞
未染色
+ 2F5 Abs
+ LVs
+ LVs
0.029
3.63
99.8
99.8
293T
仅TF-1a，对照
仅TF-1a，对照
转染
稳定细胞
未染色
+ 2F5 Abs
+ LVs
+ LVs
0.62
3.55
99.9
99.4
TF-1a
2F5-PE+
FSC-A

图8

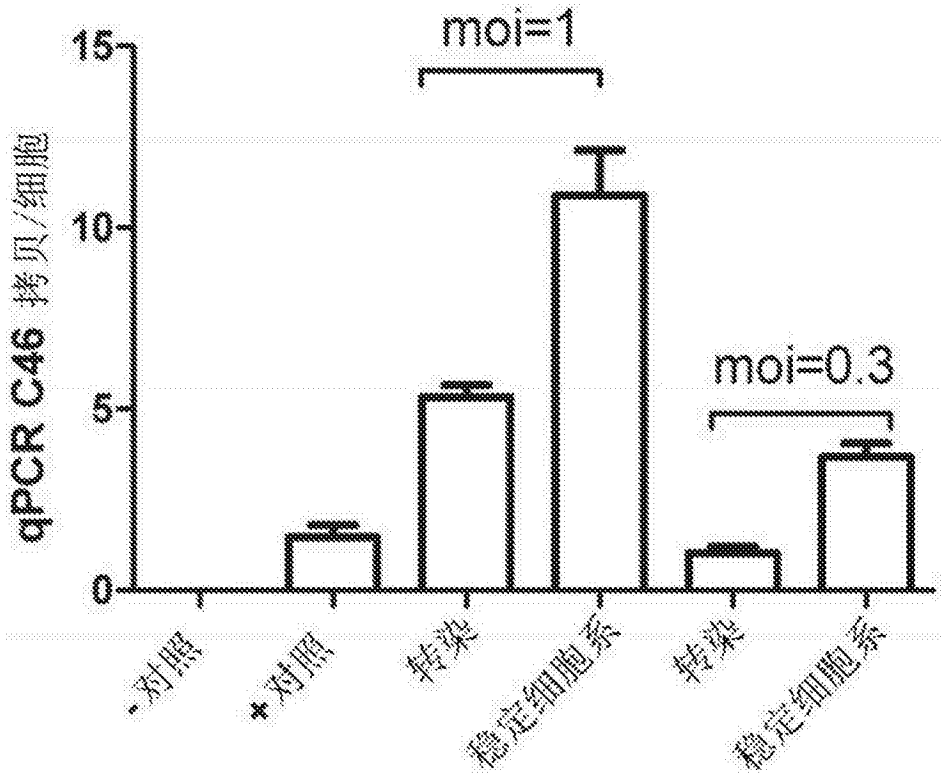

moi=1
moi=0.3
qPCR C46 拷贝/细胞
15
10
5
0
-对照
+对照
转染
稳定细胞系
转染
稳定细胞系

图9

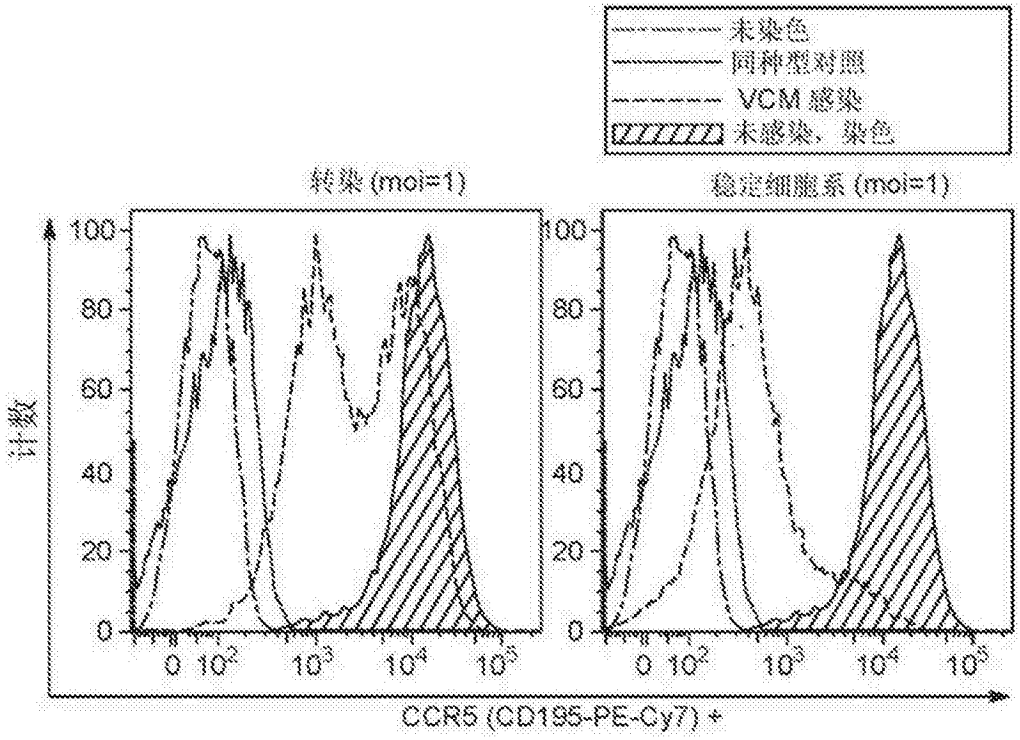

未染色
同种型对照
VCM 感染
未感染、染色
转染 (moi=1)
稳定细胞系 (moi=1)
计数
100
80
60
40
20
0
0 10^2 10^3 10^4 10^5
CCR5 (CD195-PE-Cy7) +

图10

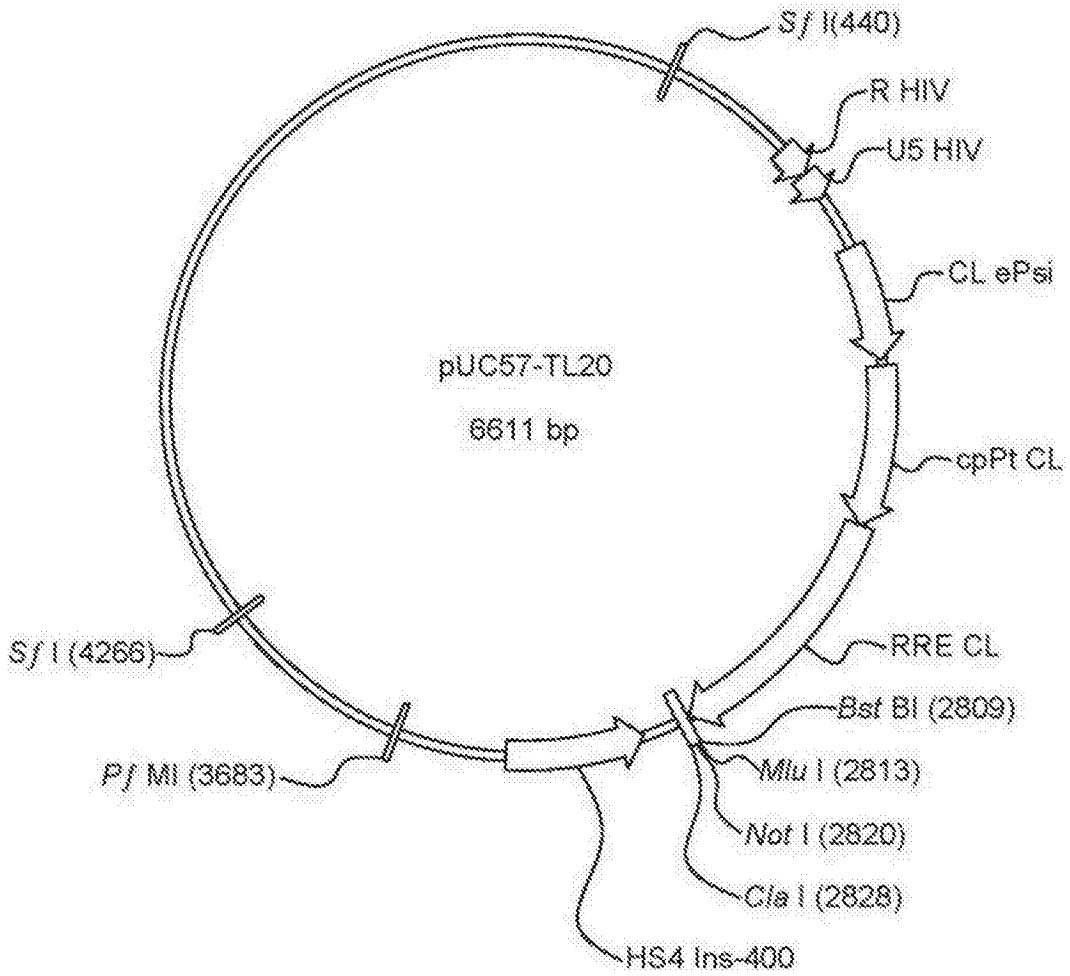

Sf I(440)
R HIV
U5 HIV
CL ePsi
pUC57-TL20
6611 bp
cpPt CL
RRE CL
Bst BI (2809)
Mlu I (2813)
Not I (2820)
Cla I (2828)
HS4 Ins-400
Sf I (4266)
Pf MI (3683)

图11

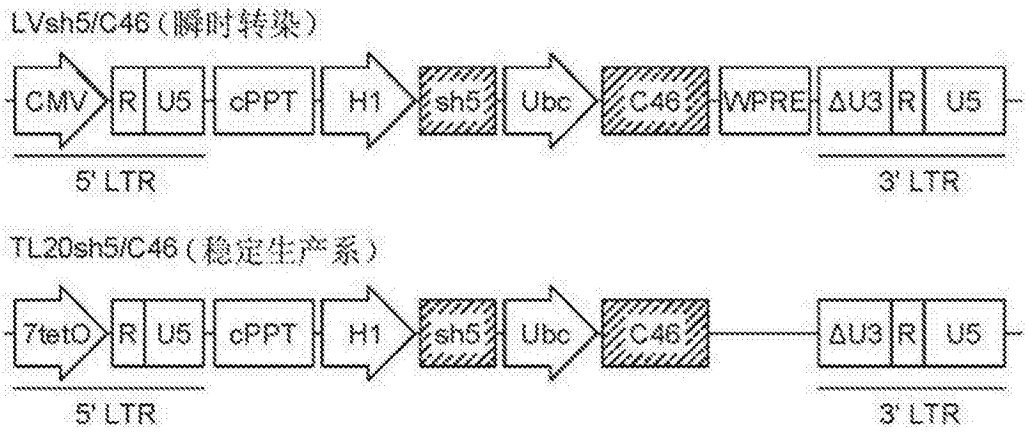

LVsh5/C46（瞬时转染）
CMV
R
U5
cPPT
H1
sh5
Ubc
C46
WPRE
ΔU3
R
U5
5' LTR
3' LTR
TL20sh5/C46（稳定生产系）
7tetO
R
U5
cPPT
H1
sh5
Ubc
C46
ΔU3
R
U5
5' LTR
3' LTR

图12

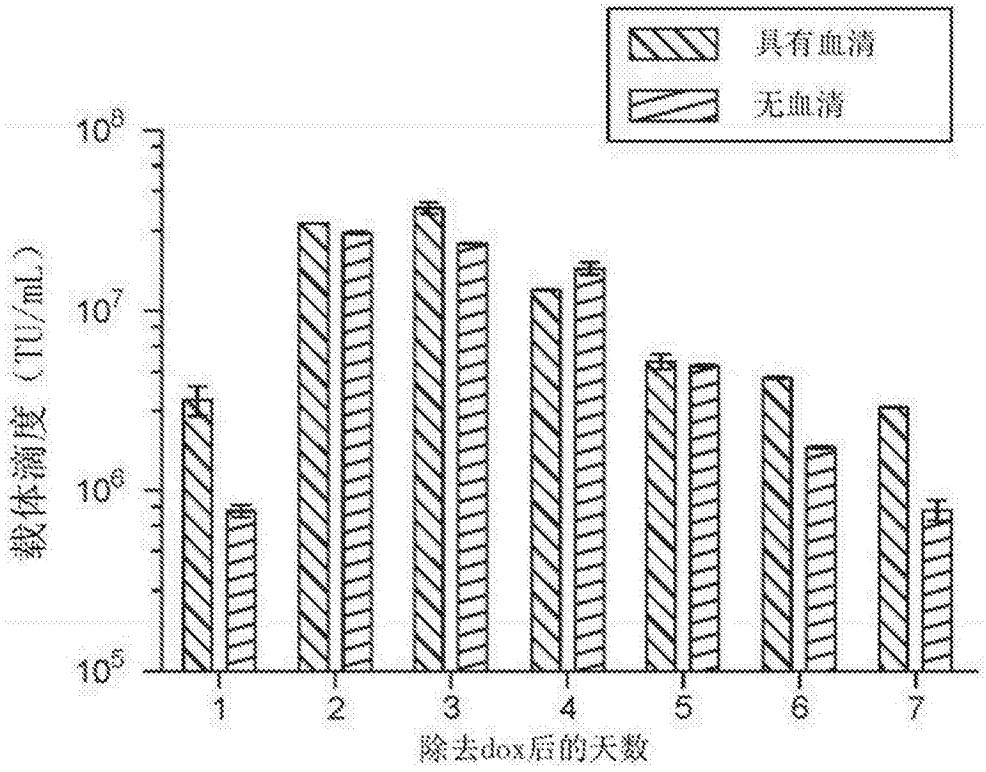


图13

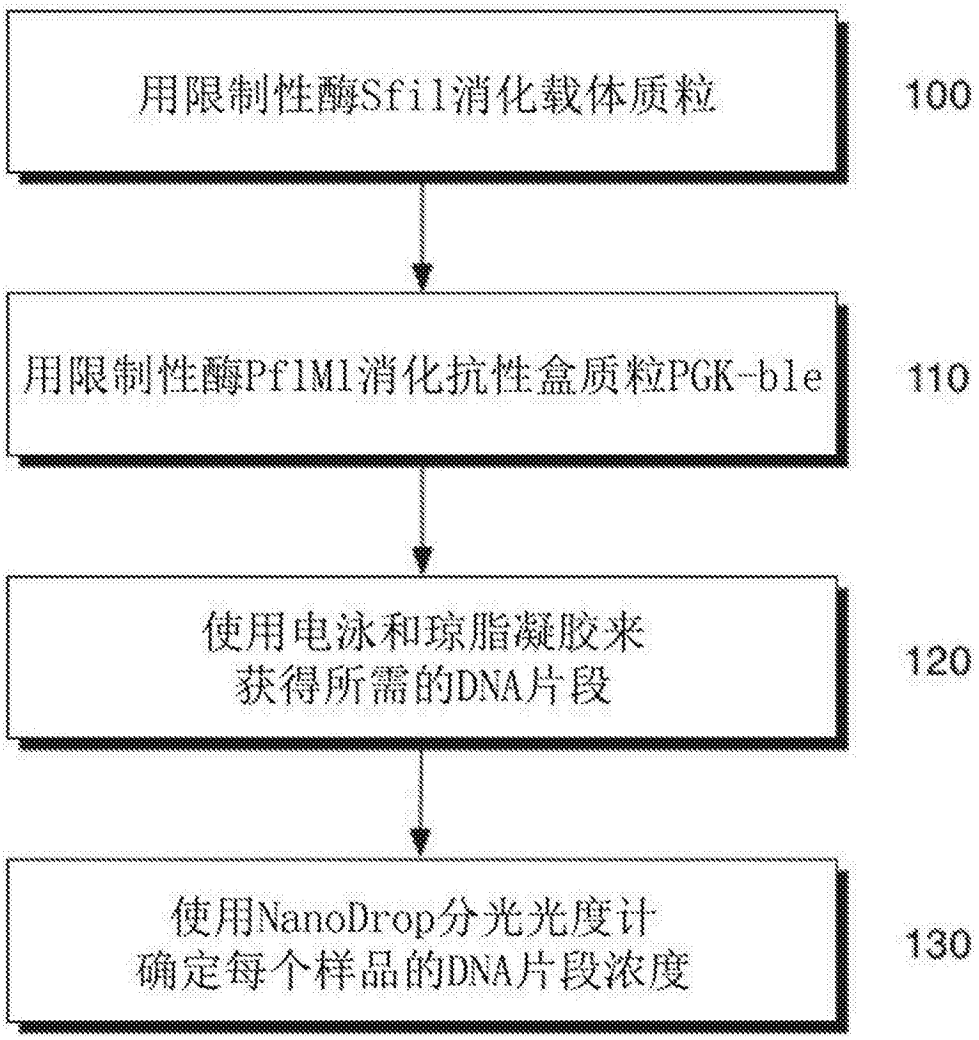

用限制性酶Sfi1消化载体质粒
100
用限制性酶Pf1M1消化抗性盒质粒PGK-ble
110
使用电泳和琼脂凝胶来
获得所需的DNA片段
120
使用NanoDrop分光光度计
确定每个样品的DNA片段浓度
130

图14

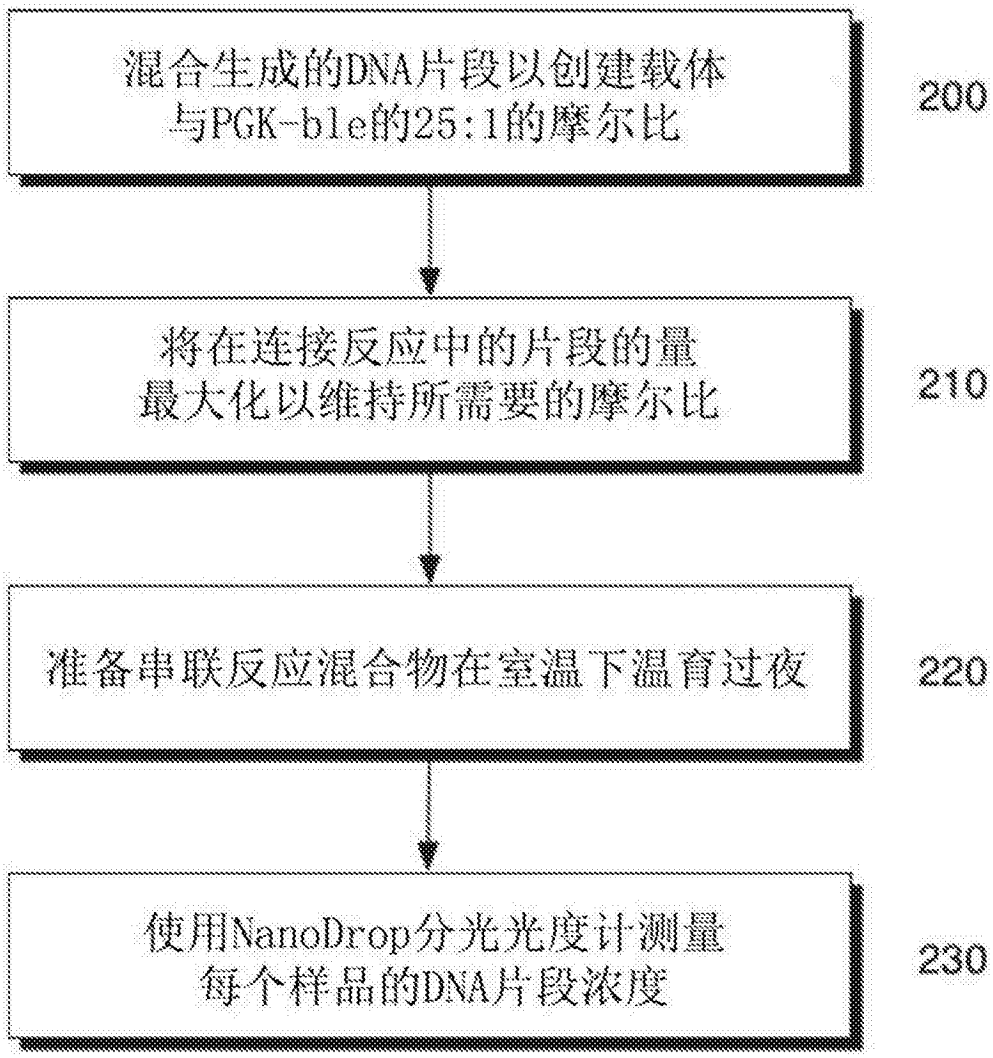

混合生成的DNA片段以创建载体
与PGK-ble的25:1的摩尔比
200
将在连接反应中的片段的量
最大化以维持所需要的摩尔比
210
准备串联反应混合物在室温下温育过夜
220
使用NanoDrop分光光度计测量
每个样品的DNA片段浓度
230

图15

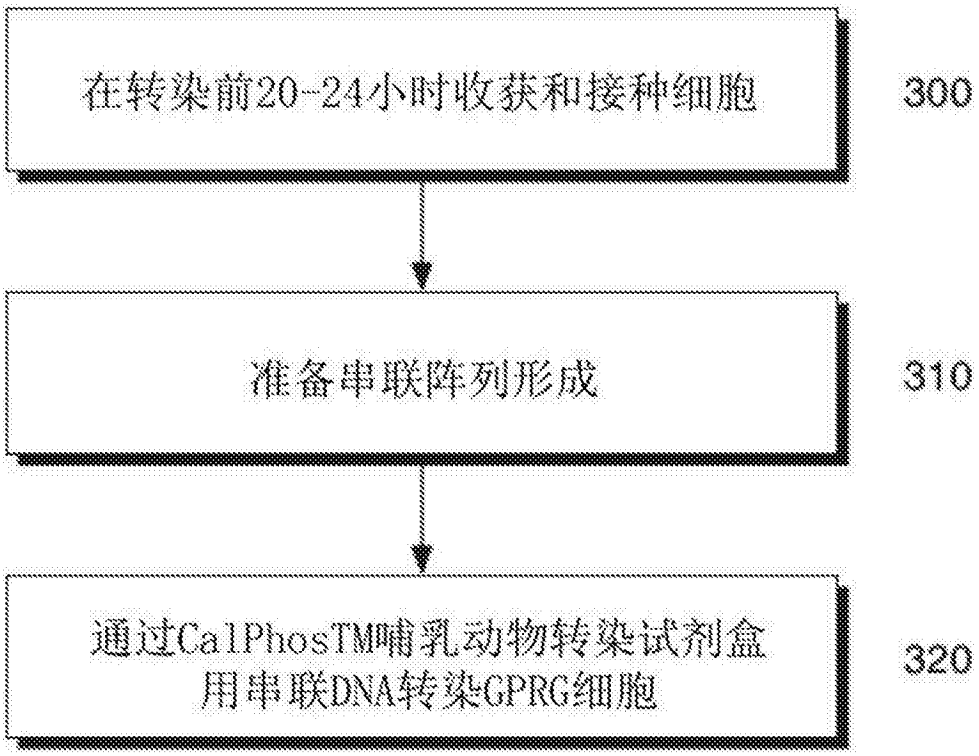

在转染前20-24小时收获和接种细胞
300
准备串联阵列形成
310
通过CalPhosTM哺乳动物转染试剂盒
用串联DNA转染GPRG细胞
320

图16

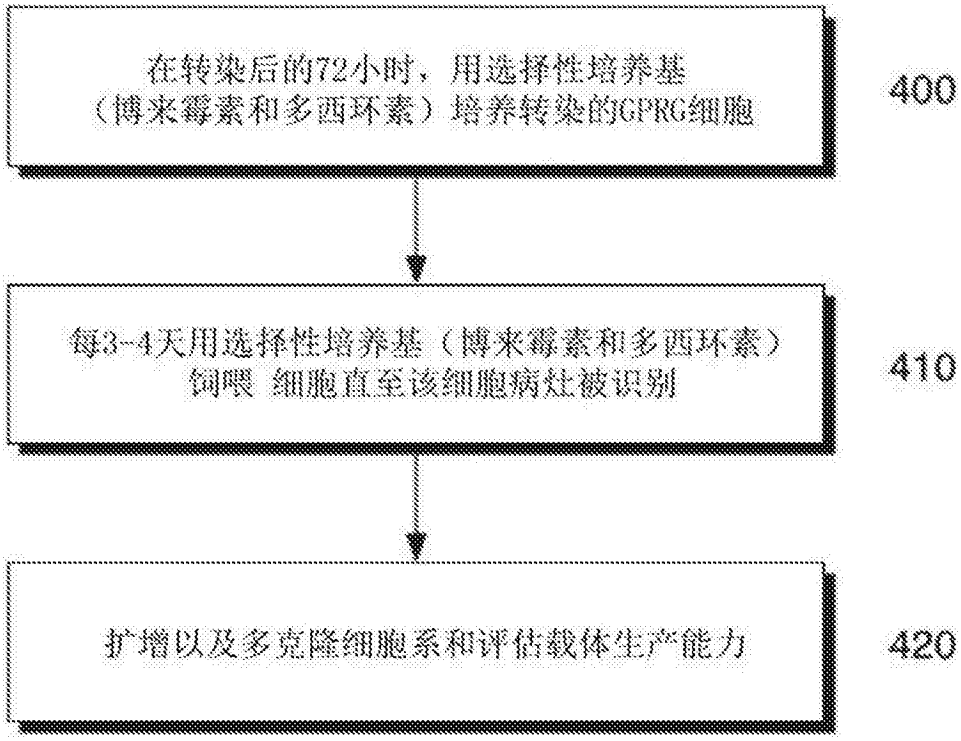

在转染后的72小时，用选择性培养基
（博来霉素和多西环素）培养转染的GPRG细胞
400
每3-4天用选择性培养基（博来霉素和多西环素）
饲喂 细胞直至该细胞病灶被识别
410
扩增以及多克隆细胞系和评估载体生产能力
420

图17

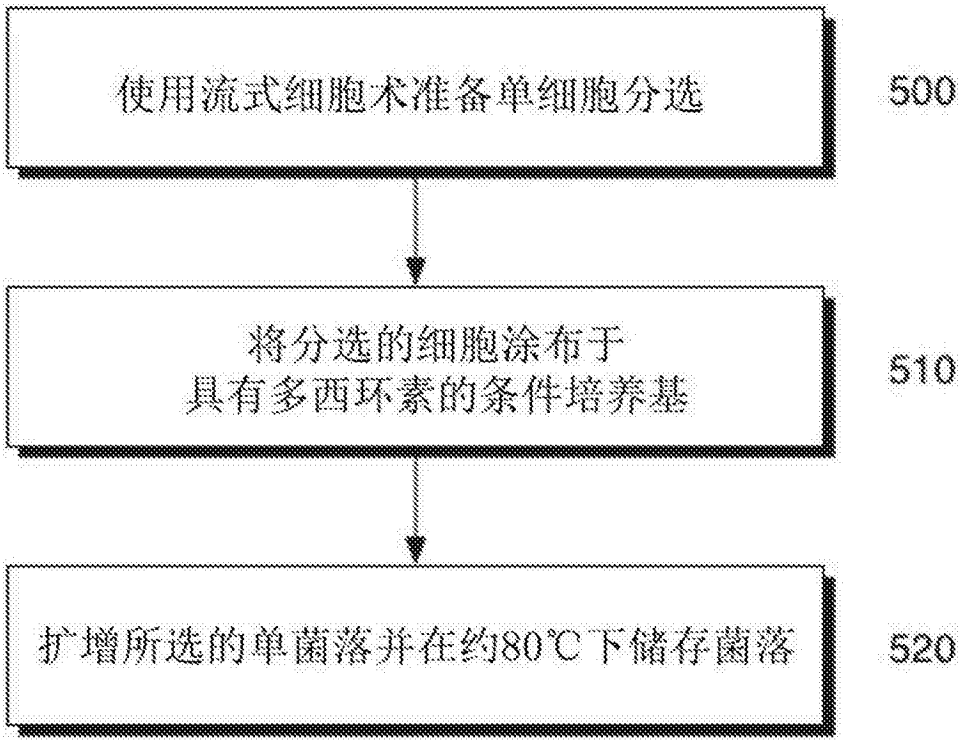

使用流式细胞术准备单细胞分选
500
将分选的细胞涂布于
具有多西环素的条件培养基
510
扩增所选的单菌落并在约80℃下储存菌落
520

图18

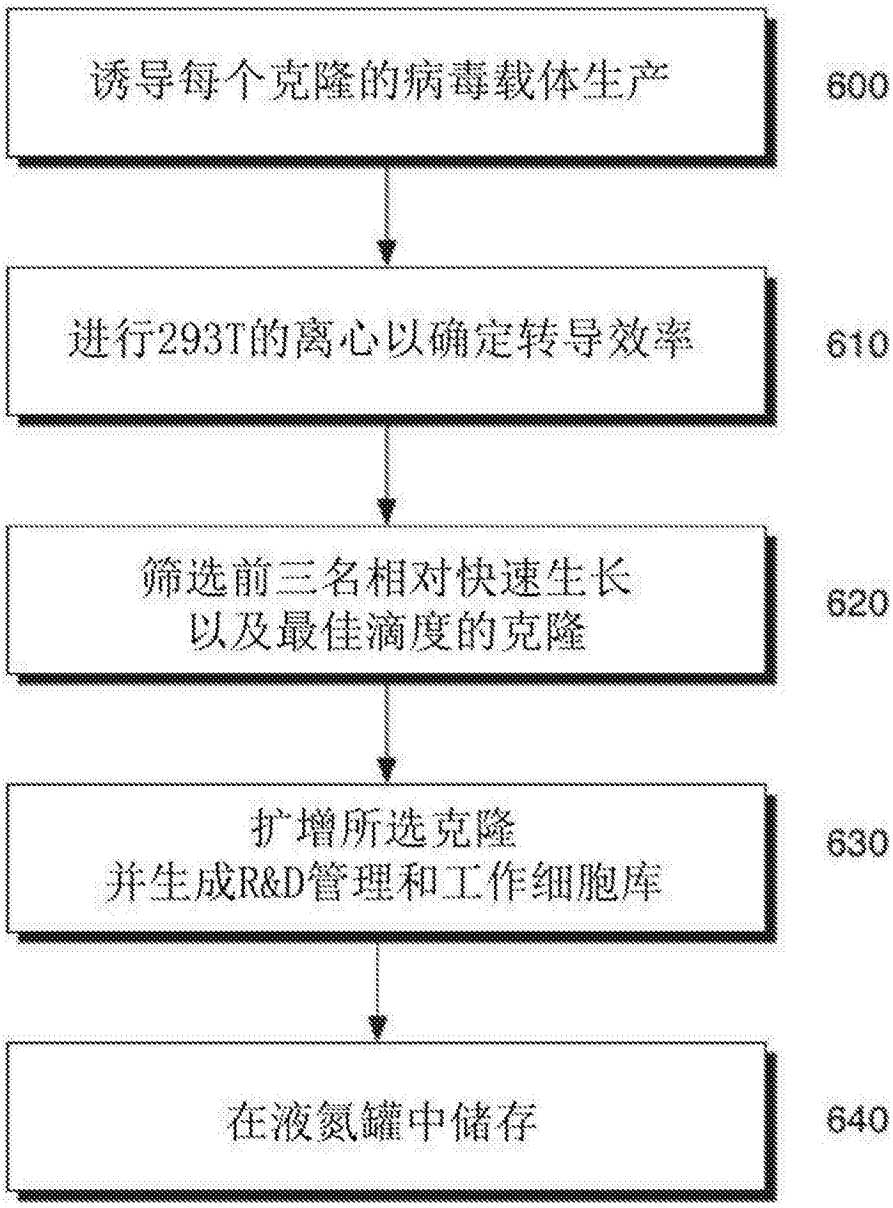

诱导每个克隆的病毒载体生产
600
进行293T的离心以确定转导效率
610
筛选前三名相对快速生长
以及最佳滴度的克隆
620
扩增所选克隆
并生成R&D管理和工作细胞库
630
在液氮罐中储存
640

图19

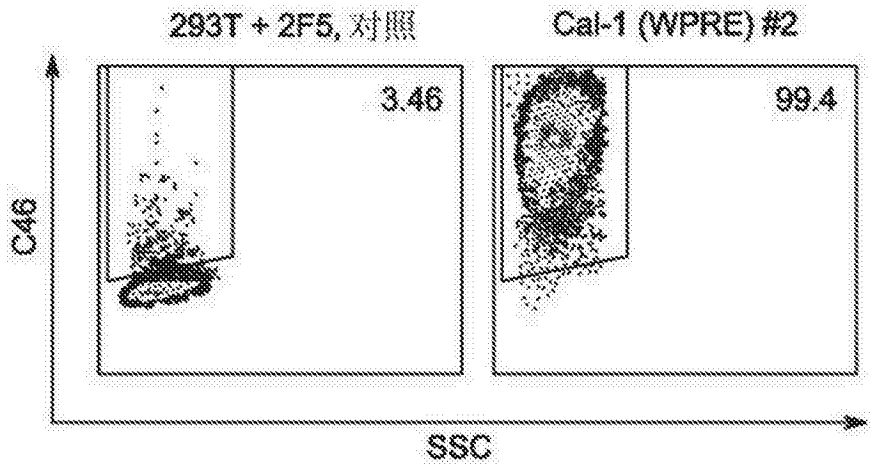

293T + 2F5, 对照
Cal-1 (WPRE) #2
3.46
99.4
C46
SSC

图20A

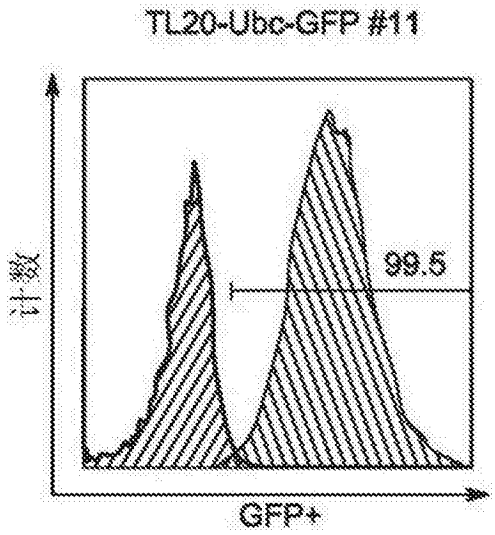

TL20-Ubc-GFP #11
99.5
计数
GFP+

图20B

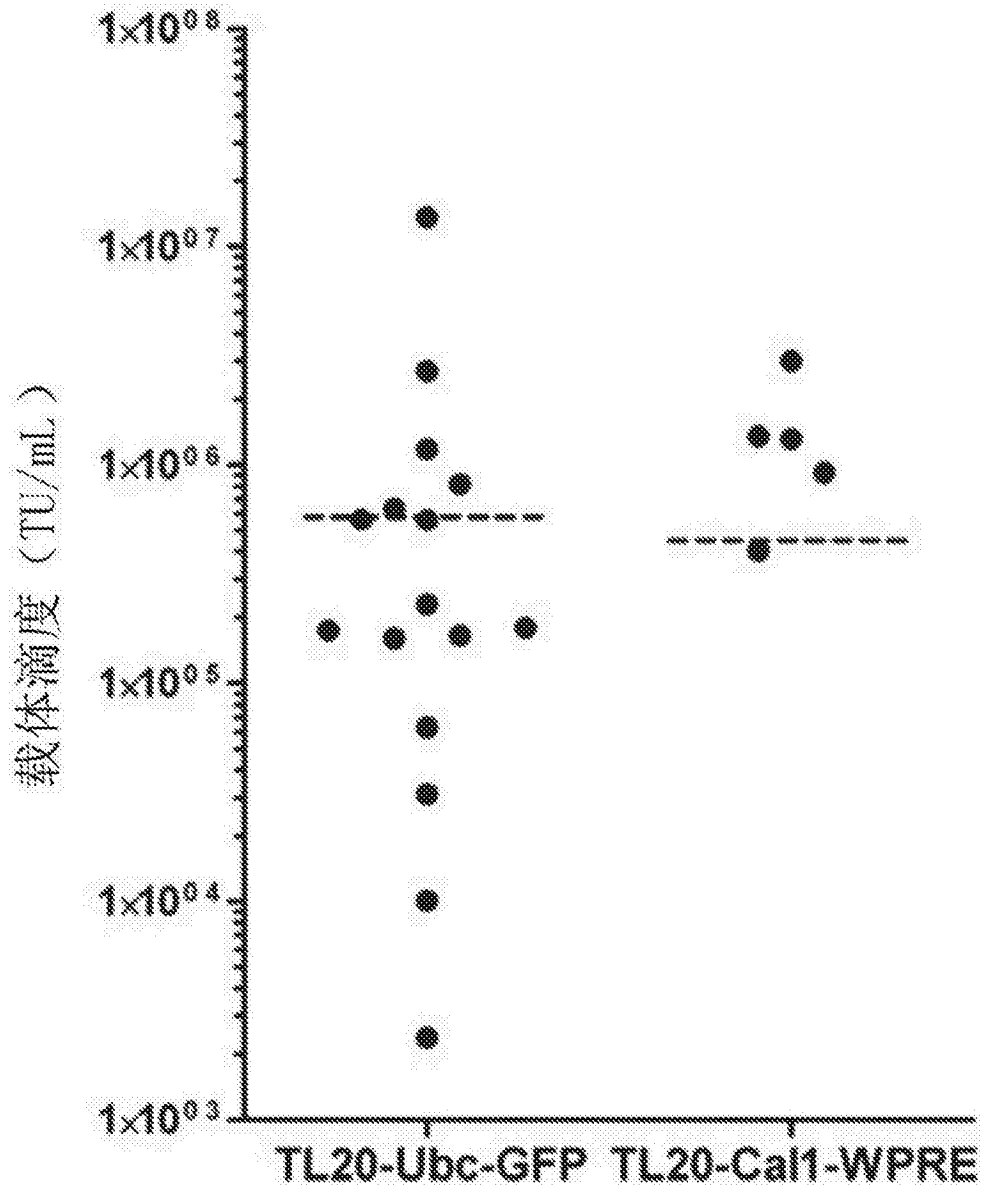

1×10^08
1×10^07
1×10^06
1×10^05
1×10^04
1×10^03
载体滴度（TU/mL）
TL20-Ubc-GFP
TL20-Cal1-WPRE

图20C