



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102124115 B

(45)授权公告日 2020.03.03

(21)申请号 200980132555.9

(22)申请日 2009.06.18

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 102124115 A

(43)申请公布日 2011.07.13

(30)优先权数据  
61/073685 2008.06.18 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2011.02.17

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/GB2009/001527 2009.06.18

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02009/153563 EN 2009.12.23

(73)专利权人 牛津生物医学(英国)有限公司  
地址 英国牛津

(72)发明人 R·特鲁兰 R·巴克利  
P·拉德克利夫 J·米斯金  
K·米特罗法诺斯

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公  
司 72001

代理人 梁谋 李炳爱

(51)Int.Cl.  
C12N 15/867(2006.01)

审查员 朱琳

权利要求书2页 说明书24页 附图2页

(54)发明名称  
病毒纯化

(57)摘要

本发明公开了用于生产反转录病毒或慢病毒载体制剂的方法,该方法包括过滤除菌步骤,其中该过滤除菌步骤不是纯化方法中的最后步骤。

1. 一种生产反转录病毒载体制剂的方法, 所述方法包括过滤除菌步骤, 其中所述过滤除菌步骤不是该生产方法中的最终步骤, 其中所述反转录病毒载体源自EIAV, 且所述反转录病毒载体在过滤除菌之前的浓度小于或等于 $4.6 \times 10^{11}$ 个RNA基因组拷贝/ml反转录病毒载体制品, 并且其中所述过滤除菌使所得的制剂不含污染物, 使得所述制剂适用于临床应用。

2. 权利要求1的方法, 其中所述过滤除菌步骤在浓缩步骤之前进行。

3. 权利要求1或2的方法, 所述方法包括过滤除菌步骤, 其中所述过滤除菌步骤不是该生产方法中的最终步骤, 其中所述过滤除菌步骤在浓缩步骤之前进行, 且其中所述浓缩步骤是该方法中的最后步骤, 且所述过滤除菌步骤是该方法中的倒数第二个步骤。

4. 权利要求2的方法, 其中所述浓缩步骤用超滤来进行。

5. 权利要求4的方法, 其中所述超滤包括切向流过滤。

6. 权利要求4或5的方法, 其中所述超滤包括中空纤维超滤。

7. 权利要求1或2的方法, 其中所述过滤除菌步骤用最大孔径大小最多为 $0.22 \mu\text{m}$ 的除菌过滤器进行。

8. 权利要求1或2的方法, 其中将包含反转录病毒载体的制品先稀释再进行过滤除菌步骤。

9. 一种用于生产反转录病毒载体制剂的方法, 该方法按时间顺序包括以下步骤(i)至(vi):

(i) 培养产生反转录病毒载体的细胞;

(ii) 收获含有反转录病毒载体的上清液;

(iii) 任选澄清上清液;

(iv) 纯化反转录病毒载体以得到反转录病毒载体制品;

(v) 对反转录病毒载体制品进行过滤除菌, 其中所述过滤除菌使所得的制剂不含污染物, 使得所述制剂适用于临床应用; 和

(vi) 浓缩反转录病毒载体制品以生产出最终的批量产品,

其中所述反转录病毒载体源自EIAV, 并且所述反转录病毒载体在过滤除菌之前的浓度小于或等于 $4.6 \times 10^{11}$ 个RNA基因组拷贝/ml反转录病毒载体制品。

10. 权利要求9的方法, 其中步骤(iv)用选自色谱法、超滤/渗滤或离心的方法或方法组合来进行。

11. 权利要求10的方法, 其中所述色谱方法选自离子交换色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、亲和色谱和反相色谱、固定化金属离子亲和色谱。

12. 权利要求10的方法, 其中所述离心方法选自区带离心、等密度离心和粒化离心。

13. 权利要求10的方法, 其中所述超滤/渗滤方法选自切向流渗滤、搅拌池渗滤和透析。

14. 权利要求9-13中任一项的方法, 其中包括至少一个降解核酸以改善纯化的步骤。

15. 权利要求14的方法, 其中所述步骤是核酸酶处理。

16. 权利要求15的方法, 其中所述核酸酶是Benzonase®核酸酶。

17. 权利要求14的方法, 其中在直到步骤(iv)为止并包括步骤(iv)的任何时间点进行核酸降解步骤。

18. 权利要求14的方法, 其中所述纯化步骤(iv)包括一个或多个缓冲液交换步骤。

19. 权利要求9的方法, 其中步骤(vi)用超滤来进行。

20. 权利要求19的方法,其中所述超滤包括切向流过滤。
21. 权利要求19或20的方法,其中所述超滤包括中空纤维超滤。
22. 权利要求9-13中任一项的方法,其中步骤(v)中的所述过滤除菌用最大孔径大小最多为0.22  $\mu\text{m}$ 的除菌过滤器进行。
23. 权利要求9-13中任一项的方法,其中步骤(iii)通过过滤器澄清来进行。
24. 权利要求18的方法,其中所述缓冲液交换包括将超滤/渗滤截留液用制剂缓冲液交换。
25. 权利要求24的方法,其中所述制剂缓冲液是含有糖类的pH缓冲盐溶液。
26. 权利要求25的方法,其中所述缓冲液是TRIS。
27. 权利要求9-13中任一项的方法,其中将反转录病毒载体制品先稀释再进行过滤除菌。
28. 权利要求1、2和9-13中任一项的方法,其中所述反转录病毒载体包含目的核苷酸(NOI)。
29. 权利要求1、2和9-13中任一项的方法,其中所述反转录病毒载体制剂适合于给予患者。
30. 权利要求29的方法,其中所述反转录病毒载体制剂适合于给予患者的眼睛。
31. 权利要求29的方法,其中所述反转录病毒载体制剂适合于给予患者的大脑。
32. 权利要求29的方法,其中所述反转录病毒载体制剂适合于通过注射给予。
33. 权利要求32的方法,其中所述反转录病毒载体制剂适合于直接视网膜下注射,所述注射任选在人或动物眼睛的玻璃体切除术后进行。
34. 权利要求32的方法,其中所述反转录病毒载体制剂适合于直接注射到人或动物大脑的纹状体中。
35. 权利要求1、2和9-13中任一项的方法,其中所述反转录病毒载体制剂适合于离体给予。
36. 权利要求1、2和9-13中任一项的方法,其中所述反转录病毒载体制剂适合于给予可从患者获得的细胞。

## 病毒纯化

### 发明领域

[0001] 本发明涉及反转录病毒载体生产和纯化的改进方法。

### [0002] 发明背景

[0003] 基因治疗技术的成功有赖于能够以对人体安全的方式实现转移的基因的充分表达。反转录病毒常常用作递送系统(或者称为递送介质或递送载体),用来(尤其是)将某种目的核苷酸(NOI)或多种目的核苷酸转移到一个或多个目的位点。人们对慢病毒载体系统的开发也表现出极大的兴趣,因为慢病毒能够感染非分裂细胞(Lewis & Emerman (1993) J.Virol.68:510)。另外,慢病毒载体使得目的基因能够得到非常稳定的长期表达。对于体内转导的大鼠神经元细胞来说,这已证实为至少一年(Bienemann等人.(2003) Mol.Ther.5:588)。

[0004] 载体纯化过程是临床基因转移治疗中的一个重要步骤,就纯度和滴度而言与安全性和功效直接相关。在大多数小规模实验应用中,可采用离心技术通过相对简单的方法来浓缩和纯化载体。但是,将纯化方法进行放大以便为临床使用进行大规模生产,这是一个重大挑战。具体地讲,当考虑生产人用载体时,必须采取诸如过滤除菌的额外步骤来确保载体制品的纯度和安全性。

[0005] 载体制备方法一般包括从稳定或短暂产生载体的细胞获取载体和使用例如色谱法纯化病毒载体。在工业过程中,最后一个步骤是灭菌步骤,并且在灭菌步骤之前通常使用至少一个超滤步骤以浓缩病毒载体和/或交换保持病毒载体的缓冲液。

[0006] 有几个出版物描述了从细胞纯化病毒,其中大多数讨论了使用特异性色谱基质来从细胞裂解物纯化病毒。例如,美国专利No.6,261,823和美国专利No.5,661,023公开了包括使用单独的阴离子交换树脂的方法,而美国专利5,837,520公开了阴离子交换接着是亲和色谱的这样一种相续组合。Yamada等人证实用阴离子交换HPLC纯化慢病毒载体能使基因转移得到改善(Yamada等人.(2003) Biotechniques34(5):1074-8,1080)。

[0007] 仍需要能产出纯产品而又能保持高滴度的大规模反转录病毒载体纯化方法。本发明解决了这个需求。

### [0008] 发明概述

[0009] 我们证明了,出乎意料的是,当过滤除菌步骤不是生产过程中的最后步骤时,可实现生产反转录病毒和慢病毒载体制剂的改进方法。具体地讲,我们发现了在浓缩步骤(例如通过超滤)之后进行过滤除菌步骤会导致病毒载体滴度相当大的损失。这是出乎预料的,因为反转录病毒颗粒的直径在80-120nm的范围内,因此它们应当容易通过除菌过滤器的孔道;对于含有载体的细胞培养物上清液来说这的确如此,这种上清液进行常规过滤没有观察到功能滴度的损失。因此不清楚为什么一旦载体制品经过了加工就不再可能做到对制品进行过滤除菌而又不损失回收率。

[0010] 此外,我们出乎预料地发现,如果在过滤除菌步骤之后进行最后的浓缩步骤,可获得载体颗粒收率的增加。这与确立的病毒生产方法是相反的,在这些生产方法中浓缩步骤传统上是在过滤除菌步骤之前进行的。我们还发现了,在过滤除菌之前例如通过稀释载体

颗粒制品来维持合适的载体颗粒浓度,也能改进载体颗粒收率。出乎预料的是,在该方法中的一些阶段中降低载体颗粒浓度可实际上最终导致产品收率提高。

[0011] 应理解,可通过无菌稀释由本发明方法生产的制剂来生产较低剂量的制剂。本发明的生产方法优选是用于生产适合作为治疗剂给予人体的临床级制剂的大规模方法。

[0012] 本文所述的反转录病毒和慢病毒载体制剂优选适合作为治疗剂给予人体。

[0013] 本发明的第一方面提供包括过滤除菌步骤的反转录病毒或慢病毒载体制剂生产方法,其中该过滤除菌步骤不是该生产方法中的最后步骤。

[0014] 优选地,反转录病毒载体是慢病毒载体。

[0015] 优选地,过滤除菌步骤在浓缩步骤之前进行。

[0016] 优选地,浓缩步骤是该方法中的最后步骤,而过滤除菌步骤是该方法中的倒数第二个步骤。

[0017] 优选地,浓缩步骤用超滤、优选切向流过滤、更优选中空纤维超滤来进行。

[0018] 优选地,过滤除菌步骤用最大孔径大小为约0.22 $\mu$ m的除菌过滤器进行。在另一个优选的实施方案中,最大孔径大小为0.2 $\mu$ m。

[0019] 在优选的实施方案中,为使EIAV颗粒的回收率达到最佳,在过滤除菌之前载体浓度应小于或等于约 $4.6 \times 10^{11}$ 个RNA基因组拷贝/ml制品。该适当浓度水平可通过使用例如稀释步骤(如果适当的话)控制载体浓度来实现。因此,在一个实施方案中,在过滤除菌之前将反转录病毒载体制品进行稀释。因此,如果技术人员碰到载体颗粒回收率低于预期的情况,他应考虑在过滤除菌之前先降低载体颗粒的浓度。实现最佳回收率的适当滴度水平可用下文(具体而言实施例部分)描述的技术来确定。

[0020] 本发明的第二方面提供生产反转录病毒载体制剂的方法,该方法按时间顺序包括以下步骤(i)至(vi):

[0021] (i) 培养能产生反转录病毒载体的细胞;

[0022] (ii) 收获含有反转录病毒载体的上清液;

[0023] (iii) 任选澄清上清液;

[0024] (iv) 纯化反转录病毒载体以得到反转录病毒载体制品;

[0025] (v) 对反转录病毒载体制品进行过滤除菌;和

[0026] (vi) 浓缩反转录病毒载体制品以生产出最终的批量产品。

[0027] 在一个实施方案中,该方法不包括澄清步骤(iii)。

[0028] 在另一个实施方案中,该方法确实包括澄清步骤(iii)。

[0029] 优选地,步骤(vi)用超滤、或切向流过滤、更优选中空纤维超滤来进行。

[0030] 优选地,步骤(iv)中的纯化方法是离子交换色谱,更优选是阴离子交换色谱。

[0031] 优选地,步骤(v)中的过滤除菌用0.22 $\mu$ m或0.2 $\mu$ m除菌过滤器进行。

[0032] 优选地,步骤(iii)通过过滤澄清来进行。

[0033] 优选地,步骤(iv)用选自色谱、超滤/渗滤或离心的方法或这些方法的组合来进行。

[0034] 优选地,色谱方法或方法组合选自离子交换色谱、疏水相互作用色谱、尺寸排阻色谱、亲和色谱、反相色谱和固定化金属离子亲和色谱。

[0035] 优选地,离心方法选自区带离心、等密度离心和粒化离心(pelleting)

centrifugation)。

[0036] 优选地,超滤/渗滤方法选自切向流渗滤、搅拌池渗滤(stirred cell diafiltration)和透析。

[0037] 优选地,在本发明方法中包括至少一个用以降解核酸以改善纯化的步骤。

[0038] 优选地,所述步骤是核酸酶处理。

[0039] 优选地,所述核酸酶是Benzonase®核酸酶。

[0040] 优选地,(一个或多个)核酸降解步骤在本发明方法中的到步骤(iv)为止(包括步骤(iv)在内)的任何(一个或多个)时间点进行。

[0041] 优选地,该方法的纯化步骤(iv)包括缓冲液交换步骤。

[0042] 优选地,该方法的纯化步骤(vi)用超滤进行。

[0043] 优选地,超滤包括切向流过滤。

[0044] 优选地,超滤包括中空纤维超滤。

[0045] 优选地,该方法的步骤(v)中的过滤除菌用最大孔径大小为约0.22μm的除菌过滤器进行。

[0046] 优选地,缓冲液交换包括以制剂缓冲液交换前面的步骤所用的缓冲液。

[0047] 优选地,制剂缓冲液是含有糖类的pH缓冲的盐溶液。

[0048] 优选地,缓冲液是基于TRIS的缓冲液。

[0049] 在一个实施方案中,在进行过滤除菌之前先稀释载体颗粒浓度。

[0050] 优选地,反转录病毒载体是慢病毒载体。

[0051] 更优选地,慢病毒载体是非灵长类动物慢病毒载体。

[0052] 更优选地,慢病毒载体源自EIAV。当慢病毒载体源自EIAV时,过滤除菌之前载体颗粒制品中的EIAV颗粒的载体浓度小于或等于 $4.6 \times 10^{11}$ 个RNA基因组拷贝/ml。

[0053] 优选地,反转录病毒载体包含目的核苷酸。

[0054] 优选地,本发明的生产方法用于生产反转录病毒载体制剂,其中该反转录病毒载体制剂适合给予患者。患者可以是人或动物。在一个实施方案中,反转录病毒载体制剂适合给予患者的眼睛。在另一个实施方案中,反转录病毒载体制剂适合给予患者的大脑。

[0055] 在一些实施方案中,所述生产方法用于生产反转录病毒载体制剂,其中该反转录病毒载体制剂适合通过注射给予患者。在一个实施方案中,反转录病毒载体制剂适合直接注射到视网膜下,任选在人或动物的眼睛的玻璃体切除术之后注射。在另一个实施方案中,反转录病毒载体制剂适合直接注射到人或动物的大脑的纹状体中。

[0056] 在一些实施方案中,所述生产方法用于生产反转录病毒载体制剂,其中该反转录病毒载体制剂适合离体给予。

[0057] 在其他实施方案中,所述生产方法用于生产反转录病毒载体制剂,其中该反转录病毒载体制剂适合给予可从患者获取的细胞。

[0058] 本发明的第四方面提供可通过本发明的方法获得的反转录病毒载体制剂。在一些实施方案中,反转录病毒载体制剂供用于基因治疗。还提供了反转录病毒载体制剂在制备基因治疗用药物中的用途。

[0059] 附图简述

[0060] 图1是反转录病毒载体生产方法的示意图。

[0061] 发明详述

[0062] 现将通过非限制性的例子描述本发明的各个优选特征和实施方案。

[0063] 除非另有指明,否则本发明的实施将采用到化学、分子生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,这些技术在本领域普通技术人员的能力范围内。这些技术在文献中有说明。参见例如J.Sambrook,E.F.Fritsch和T.Manias(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第二版,第1-3册,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Ausubel,F.M.等人.(1995年和定期增补本)Current Protocols in Molecular Biology,第9、13和16章,John Wiley & Sons,纽约,纽约州;B.Roe,J.Crabtree和A.Kahn(1996)DNA Isolation and Sequencing:Essential Techniques,John Wiley & Sons;J.M.Polak和James O'D.McGee(1990)In Situ Hybridization:Principles and Practice,Oxford University Press;M.J.Gait(编辑)(1984)Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach,IRL Press;以及D.M.J.Lilley和J.E.Dahlberg(1992)Methods of Enzymology:DNA Structure Part A:Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology,Academic Press.Roe,Simon(编辑),Protein Purification Techniques.第2版.牛津:Oxford University Press,2001;Sofer,Gail和Hagel,Lars.Handbook of Process Chromatography:A Guide to Optimization,Scale-up,and Validation.伦敦和圣迭哥:Academic Press,1997;Janson,Jan-Christer和Rydén,Lars(编辑).Protein Purification:Principles,High Resolution Methods,and Applications.第2版.纽约:John Wiley & Sons,Inc.,1998;Masters,John R.W.(编辑).Animal Cell Culture:A Practical Approach.第3版.牛津:Oxford University Press,2000。这些通用教科书的每一个都通过引用并入本文。

[0064] 多核苷酸

[0065] 用于本发明的多核苷酸可包含DNA或RNA序列。它们可以是单链的或双链的。技术人员会理解,由于遗传密码的简并性,有许多不同的多核苷酸可编码同一多肽。另外,应理解,技术人员可使用常规技术作出不会影响用于本发明的多核苷酸所编码的多肽序列的核苷酸取代,以反映要在其中表达多肽的任何具体宿主生物的密码子用法。多核苷酸可通过本领域可获得的任何方法进行修饰。可进行这类修饰以提高本发明的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0066] 多核苷酸如DNA多核苷酸可用重组法产生、合成法产生或本领域技术人员可获得的任何方法产生。它们还可通过标准的技术进行克隆。

[0067] 通常将使用重组方法来产生较长的多核苷酸,例如使用PCR(聚合酶链反应)克隆技术。这将涉及到制备一对能侧接于需要克隆的序列区域的引物(例如约15至30个核苷酸),使引物与从动物细胞或人细胞获得的mRNA或cDNA接触,在能引起该需要的区域的扩增的条件下进行聚合酶链反应,分离扩增的片段(例如通过在琼脂糖凝胶上纯化反应混合物)和回收扩增的DNA。可将引物设计成含有合适的限制性内切核酸酶识别位点,使得扩增的DNA可被克隆到合适的克隆载体中。

[0068] 蛋白质

[0069] 本文所用的术语“蛋白质”包括单链多肽分子以及多个多肽的复合物,在所述复合物中各个组成多肽通过共价方式或非共价方式连接。本文所用的术语“多肽”和“肽”指其中

单体为氨基酸并通过肽键或二硫键连接在一起的聚合物。

[0070] 变体、衍生物、类似物、同源物和片段

[0071] 除了本文提到的具体蛋白质和核苷酸之外,本发明还涵盖变体、衍生物、类似物、同源物和它们的片段的使用。

[0072] 在本发明的情况中,任何给定序列的变体是这样的序列,其中各残基(无论是氨基酸残基还是核酸残基)的具体序列已在所涉及的多肽或多核苷酸能保持其内源功能中的至少一种的前提下进行过改变。可通过对天然蛋白质中存在的至少一个残基进行添加、缺失、取代、修饰、替代和/或变异,来获得变体序列。

[0073] 与本发明的蛋白质或多肽相关的本文所用术语“衍生物”包括对序列的一个(或多个)氨基酸残基进行的任何取代、变异、修饰、替代、缺失和/或添加,只要所产生的蛋白质或多肽能保持其内源功能中的至少一种。

[0074] 与多肽或多核苷酸相关的本文所用术语“类似物”包括任何模拟物,即这样的化合物,它具有其所模拟的多肽或多核苷酸的内源功能中的至少一种。

[0075] 通常,可例如从1、2或3至10或20个取代作出氨基酸取代,只要被修饰的序列能保持所需的活性或能力。氨基酸取代可包括非天然类似物的使用。

[0076] 用于本发明的蛋白质还可具有这样的氨基酸残基缺失、插入或取代,即缺失、插入或取代能产生不活跃的变化而导致功能上等同的蛋白质。还可在残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲特性的相似性的基础上作出谨慎的氨基酸取代,只要转运或调控功能得以保持。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;含具有相似亲水性值的无电荷极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0077] 保守取代可例如按下表作出。第二列同一格中的氨基酸、优选地第三列同一行中的氨基酸可互相取代:

[0078]

脂族	非极性	G A P
		I L V
	极性 - 无电荷	C S T M
		N Q
	极性 - 带电荷	D E
		K R
芳族		H F W Y

[0079] “片段”也是变体,这个术语通常指多肽或多核苷酸中的在功能上或者在例如测定法中令人感兴趣的选定区域。“片段”因此指属于全长多肽或多核苷酸的一部分的氨基酸或核酸序列。

[0080] 这类变体可用标准的重组DNA技术如定点诱变来制备。在要作出插入的情况中,编码该插入以及对应于天然序列该插入位点任一侧的5'和3'侧翼区的合成DNA。所述侧翼区将含有对应于天然序列中的位点的便利的限制位点,使得该序列可用适当的酶进行切割和



该合成DNA可连接到该切口中。然后按照本发明表达DNA以制备所编码的蛋白质。这些方法仅仅是举例说明许多本领域已知的用于操纵DNA序列的标准技术,其他已知的技术也可使用。

#### [0081] 反转录病毒

[0082] 如本领域所公知,载体是一种使某个实体(entity)得以或便于从一个环境转移到另一个环境的工具。根据本发明,且举例来说,一些用于重组DNA技术的载体使诸如DNA区段(如异源DNA区段,比如异源cDNA区段)的实体得以转移到宿主细胞中。用于重组DNA技术的载体的例子包括但不限于质粒、染色体、人工染色体或病毒。

[0083] 术语“表达载体”意指能够进行体内或者体外/离体表达的构建物。

[0084] 在本发明的各方面中采用的反转录病毒载体可能源自或者可能可源自任何合适的反转录病毒。已鉴定了大量不同的反转录病毒。例子包括:鼠白血病病毒(MLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、人T细胞白血病病毒(HTLV)、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、Rous肉瘤病毒(RSV)、Fujinami肉瘤病毒(FuSV)、Moloney鼠白血病病毒(Mo-MLV)、FBR鼠骨肉瘤病毒(FBR MSV)、Moloney鼠肉瘤病毒(Mo-MSV)、Abelson鼠白血病病毒(A-MLV)、禽髓细胞瘤病毒-29(MC29)和禽骨髓成红血细胞增多症病毒(AEV)。反转录病毒的详细列表可见于Coffin等人.,1997,“Retroviruses”,Cold Spring Harbor Laboratory Press,编辑:JM Coffin,SM Hughes,HE Varmus,第758-763页。

[0085] 反转录病毒可大体上分为以下两个类别:即,“简单”和“复杂”。反转录病毒甚至可进一步区分成七个组。其中五个组代表具有致癌潜力的反转录病毒。其余两个组是慢病毒和泡沫病毒。有关这些反转录病毒的综述在Coffin等人.1997(出处同上)中给出。

[0086] 重组反转录病毒载体颗粒能够以目的核苷酸转导受体细胞。一旦在该细胞中,来自载体颗粒的RNA基因组被反转录成DNA并整合到受体细胞的DNA中。

[0087] 在供用于本发明方法的典型载体中,一个或多个为复制所必需的蛋白质编码区的至少一部分可从该病毒去除。这使得该病毒载体是复制缺陷型的。病毒基因组的一些部分还可被目的核苷酸替代,以产生出包含目的核苷酸的、能够转导非分裂目标宿主细胞和/或将其基因组整合到宿主基因组中的载体。

#### [0088] 慢病毒载体

[0089] 根据本发明的慢病毒载体可能源自或者可能可源自任何合适的慢病毒。

[0090] 慢病毒载体是更大组的反转录病毒载体的一部分。慢病毒的详细列表可见于Coffin等人.(1997)“Retroviruses”Cold Spring Harbor Laboratory Press,编辑:JM Coffin,SM Hughes,HE Varmus,第758-763页)。简言之,慢病毒可分成灵长类动物组和非灵长类动物组。灵长类动物慢病毒的例子包括但不限于:人免疫缺陷病毒(HIV)(人自身免疫缺陷综合征(AIDS)的致病因子)和猿免疫缺陷病毒(SIV)。非灵长类动物慢病毒组包括原型“慢病毒”即visna/maedi病毒(VMV)以及相关的山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)、马传染性贫血病毒(EIAV)和最近得到描述的猫免疫缺陷病毒(FIV)和牛免疫缺陷病毒(BIV)。

[0091] 慢病毒家族与反转录病毒不同之处在于慢病毒具有感染分裂细胞和非分裂细胞两者的能力(Lewis等人.(1992);Lewis和Emerman(1994))。相反,其他反转录病毒如MLV不能够感染非分裂细胞或者缓慢分裂细胞,如那些构成例如肌肉、大脑、肺和肝组织的细胞。

[0092] 本文所用的慢病毒载体是包含至少一个可源自慢病毒的组成部分的载体。优选

地,该组成部分参与载体感染细胞、表达基因或进行复制的生物学机制。

[0093] 反转录病毒和慢病毒基因组的基本结构共享许多共同的特征,如5' LTR和3' LTR (包装信号位于5' LTR和3' LTR之间或当中以使得基因组能够被包装)、引物结合位点、整合位点 (以使得能够整合到宿主细胞基因组中) 和编码包装成分的gag、pol和env基因 (这些包装成分是病毒颗粒的装配所需要的多肽)。慢病毒具有额外的特征,如HIV中的rev序列和RRE序列,它们使得整合的原病毒的RNA转录物能够有效地从受感染目标细胞的细胞核输出到细胞质。

[0094] 在原病毒中,病毒基因在其两端侧接有称为长末端重复序列 (LTR) 的区域。LTR负责原病毒整合和转录。LTR还充当增强子-启动子序列,能控制病毒基因的表达。

[0095] 各LTR本身是相同的序列,可分成称为U3、R和U5的三个元件。U3源自RNA的3' 端所特有的序列。R衍自在RNA的两端重复的序列,而U5源自RNA的5' 端所特有的序列。在不同的病毒当中,这三个元件的大小可相差甚大。

[0096] 在缺陷型慢病毒载体基因组中,gag、pol和env可不存在或者没有功能。RNA两端的R区域是重复序列。U5和U3分别代表RNA基因组的5' 末端和3' 末端的独特序列。

[0097] 在本发明的典型慢病毒载体中,一个或多个对复制必需的蛋白质编码区域的至少一部分可从该病毒去除。这使得该病毒载体成为复制缺陷型。病毒基因组的一些部分还可被目的核苷酸替代,以产生包含能够转导非分裂靶标宿主细胞和/或能够将其的基因组整合到宿主基因组中的目的核苷酸的载体。

[0098] 在一个实施方案中,反转录载体是如WO 2007/071994中所述的非整合型载体。

[0099] 在又一个实施方案中,载体具有递送没有或缺乏病毒RNA的序列的能力。在又一个实施方案中,可使用位于要递送的RNA上的异源结合结构域 (异源于gag) 和gag或pol上的同源结合结构域来确保要递送的RNA的包装。这两种载体在WO 2007/072056中都有描述。

[0100] 慢病毒载体可为“非灵长类动物”载体,即衍自主要不是感染灵长类动物 (特别是人类) 的病毒。

[0101] 非灵长类慢病毒的例子可以是天然不会感染灵长类动物的慢病毒科 (lentiviridae) 的任何成员,可包括猫免疫缺陷病毒 (FIV)、牛免疫缺陷病毒 (BIV)、山羊关节炎脑炎病毒 (CAEV)、Maedi visna病毒 (MVV) 或马传染性贫血病毒 (EIAV)。

[0102] 在一个特别优选的实施方案中,病毒载体衍自EIAV。EIAV具有慢病毒的最简单的基因组结构,特别优选用于本发明。除了gag、pol和env基因之外,EIAV还编码其他三种基因:tat、rev和S2。Tat充当病毒LTR的转录激活物 (Derse和Newbold (1993); Maury等人, (1994)), Rev通过rev应答元件 (RRE) 调节和协调病毒基因的表达 (Martarano等人, (1994))。这两种蛋白质的作用机制据认为大体上相似于灵长类动物病毒中的类似机制 (Martano等人, 出处同上)。S2的功能未知。另外,已鉴定了称为Ttm的EIAV蛋白,它由被剪接到跨膜蛋白起始处的env编码序列的tat的第一个外显子编码。

[0103] 本发明的优选载体是重组慢病毒载体。

[0104] 术语“重组慢病毒载体”指这样的载体,其具有足够的慢病毒遗传信息,以让RNA基因组在包装成分存在下得以包装到能够感染靶标细胞的病毒颗粒中。靶标细胞的感染可包括逆转录和整合到靶标细胞基因组中。重组慢病毒载体携带着要通过载体递送到靶标细胞的非病毒编码序列。重组慢病毒载体不能够进行独立复制以在最终的靶标细胞中产生传染

性慢病毒颗粒。通常,重组慢病毒载体缺乏复制所必需的功能性gag-pol基因和/或env基因和/或其他基因。本发明的载体可构造成分裂-内含子载体(split-intron vector)。分裂-内含子载体在PCT专利申请WO 99/15683中有描述。

[0105] 优选地,本发明的重组慢病毒载体具有最低限度的病毒基因组。

[0106] 本文所用的术语“最低限度的病毒基因组”意指病毒载体已经过操纵,从而去除非必需元件和保留必需元件,以提供感染、转导和递送目的核苷酸序列到靶标宿主细胞所需的功能性。这个策略的更多细节可见于本申请人的WO 98/17815。

[0107] 在本发明的一个实施方案中,载体是自身失活型载体(self-inactivating vector)。

[0108] 举例说,已通过缺失掉转录增强子或者3'LTR的U3区域中的增强子和启动子,构建了自身失活型反转录病毒载体。经过一轮的载体反转录和整合之后,这些变化被拷贝到5'和3'LTR中,从而产生无转录活性的原病毒(Yu等人.(1986) Proc.Natl.Acad.Sci.83:3194-3198;Dougherty和Temin(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.84:1197-1201;Hawley等人.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.84:2406-2410;Yee等人.(1987) Proc.Natl.Acad.Sci.91:9564-9568)。但是,在这种载体中位于LTR内部的任何启动子将仍是具有转录活性。这个策略已被应用于消除病毒LTR中的增强子和启动子对内部放置的基因的转录的影响。这种影响包括转录增加(Jolly等人.(1983) Nucleic Acids Res.11:1855-1872)或者转录抑制(Emerman和Temin(1984) Cell 39:449-467)。这个策略还可用于消除从3'LTR向基因组DNA中的下游转录(Herman和Coffin(1987) Science 236:845-848)。这在人类基因疗法中是特别值得关注的,在人类基因疗法中非常重要是防止内源癌基因的偶发性激活。

[0109] 但是,用于在宿主细胞/包装细胞当中产生病毒基因组的质粒载体也将包括转录调节控制序列,这些调节序列被有效连接到慢病毒基因组以指导基因组在宿主细胞/包装细胞中的转录。这些调节序列可以是与被转录的慢病毒序列即5' U3区域相关的天然序列,或者它们可以是异源启动子,如另一病毒启动子,例如CMV启动子。一些慢病毒基因组要求额外的序列以便有效产生病毒。例如,在HIV的情况中,优选包括rev和RRE序列。但是,通过密码子优化,可减少或消除对rev和RRE的要求。这个策略的更多细节可见于本申请人的WO 01/79518。执行与rev/RRE系统相同的功能的替代性序列也是已知的。例如,rev/RRE系统的功能性类似物存在于Mason Pfizer猴病毒中。这被称为组成型转运元件(CTE),包含基因组中的据认为与受感染细胞中的某种因子发生相互作用的RRE型序列。该细胞因子可认为是rev类似物。因此,CTE可用作rev/RRE系统的替代物。任何其他已知的或可获得的功能等同物也可以是与本发明相关的。例如,还已知HTLV-I的Rex蛋白能在功能上替代HIV-1的Rev蛋白。还已知Rev和Rex具有与IRE-BP相似的作用。

[0110] 在一个特别优选的实施方案中,根据本发明的慢病毒载体由自身失活型最小限度慢病毒载体组成,该自身失活型最小限度慢病毒载体源自马传染性贫血病毒(EIAV),优选编码三个参与多巴胺合成途径的酶。由这种载体编码的蛋白质可包含截短形式的人酪氨酸羟化酶(TH\*)基因(其缺乏参与TH的反馈调节的N末端160个氨基酸)、人芳族L-氨基酸脱羧酶(AADC)和人GTP-环化水解酶1(CH1)基因。该载体可通过用三个编码以下载体的质粒对细胞(例如HEK293T细胞)进行瞬时转染来产生:(1)重组EIAV ProSavin®(Oxford BioMedica plc,Oxford UK)载体基因组(pONYK1-ORT,WO 02/29065和Farley等人.(2007)

J.Gen.Med.9:345-356)、(2)合成的EIAV gag/pol表达载体(pESGPK,W0 01/79518、W0 05/29065)、(3)VSV-G包膜表达载体(pHGK)。

[0111] 包装序列

[0112] 在本发明情形中使用的术语“包装信号”可与“包装序列”或“psi”互换使用,是用来指在病毒颗粒形成过程中慢病毒RNA链的包壳作用所需的非编码性顺式作用序列。在HIV-1中,这个序列已被定位于从主要剪接供体位点(SD)的上游延伸到至少gag起始密码子的基因座。

[0113] 本文所用的术语“延伸的包装信号”或“延伸的包装序列”指在psi序列的周围使用进一步延伸到gag基因中的序列。包含这些额外的包装序列可提高载体RNA向病毒颗粒中的插入效率。

[0114] 假型包装

[0115] 优选地,根据本发明的反转录载体已经过假型包装。在这点上,假型包装可赋予一个或多个优点。例如,对于慢病毒载体,基于HIV的载体的env基因产物会使这类载体局限于仅感染能表达称为CD4的蛋白质的细胞。但如果这些载体中的env基因已被来自其他RNA病毒的env序列取代,则它们可具有更广的感染谱(Verma和Somia(1997))。举例说,Miller等人对具有来自双嗜性反转录病毒4070A的包膜的MoMLV载体进行了假型包装(Mol.Cell.Biol.5:431-437),其他研究者对基于HIV的、具有来自VSV的糖蛋白的载体进行了假型包装(Verma和Somia(1997))。

[0116] 或者,Env蛋白可以是修饰的Env蛋白,如突变的或工程改造的Env蛋白。可作出或选择修饰,以引入靶向能力或者减少毒性或者为了别的目的(Valsesia-Wittman等人.(1996);Nilson等人.(1996);Fielding等人.(1998)及其中引用的参考文献)。

[0117] 反转录病毒载体可用任何所选的分子进行假型包装,但特别优选的是VSV-G包膜。

[0118] VSV-G:

[0119] 水疱性口腔炎病毒(VSV,一种棒状病毒)的包膜糖蛋白(G)是已被证实能够对某些反转录病毒进行假型包装的包膜蛋白。

[0120] Emi等人.(1991)J.Virol.65:1202-1207)首先证明了它在不存在任何反转录病毒包膜蛋白的情况下对基于MoMLV的反转录病毒载体进行假型包装的能力。W0 94/294440教导了反转录病毒载体可成功地用VSV-G进行假型包装。这些经假型包装的VSV-G载体可用于转导很多种哺乳动物细胞。更近期,Abe等人.(1998)J.Virol.72(8)6356-6361教导了可通过加入VSV-G使非传染性反转录病毒颗粒变成传染性的。Burns等人.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-7)成功地对具有VSV-G的反转录病毒MLV进行假型包装,这导致产生与天然形式的MLV相比改变了宿主范围的载体。已证实VSV-G假型包装的载体不仅感染哺乳动物细胞,而且感染源自鱼类、爬行动物和昆虫的细胞系(Burns等人.(1993)出处同上)。还证实了它们对于多种细胞系而言比传统的双嗜性包膜更有效(Yee等人.,(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:9564-9568,Lin,Emi等人.(1991)J.Virol.65:1202-1207)。VSV-G蛋白还可用于对某些慢病毒和反转录病毒进行假型包装,因为它的胞质尾区能够与反转录病毒核心发生相互作用。

[0121] 非慢病毒假型包装包膜如VSV-G蛋白的提供可得到这样的优点,即载体颗粒能被浓缩至高滴度而不损失传染性(Akkina等人.(1996)J.Virol.70:2581-5)。慢病毒和反转录

病毒包膜蛋白显然不能够承受超离心法过程中的剪切力,大概是因为它们由两个非共价连接的亚单位组成。离心可破坏亚单位之间的相互作用。相比之下,VSV糖蛋白由单一单位组成。VSV-G蛋白假型包装因此可提供潜在的优点。

[0122] WO 00/52188描述了从具有水疱性口腔炎病毒G蛋白(VSV-G)作为膜缔合性病毒包膜蛋白的稳定的生产细胞系产生假型包装的反转录病毒载体,并提供了VSV-G蛋白的基因序列。

[0123] 罗斯河病毒

[0124] 罗斯河病毒包膜已被用于对非灵长类动物慢病毒载体(FIV)进行假型包装,经全身给予后主要转导肝脏(Kang等人.(2002))。据报道效率是用VSV-G假型包装载体获得的效率20倍高,并且造成更低的细胞毒性,细胞毒性是通过提示肝脏毒性的肝脏酶类的血清水平来测量。

[0125] 罗斯河病毒(RRV)是一种由蚊子传播的甲病毒,在澳大利亚的热带和温带地区地方性和流行性传播。温带沿海地区正常人口中的抗体比率往往较低(6%至15%),但在澳大利亚墨累河流域的平原中血清流行率达到27至37%。在1979到1980罗斯河病毒在太平洋诸岛流行开来。这种疾病在人群中没有传染性且决不会致命,在大约一半的患者中初始症状为关节痛伴疲乏和嗜眠(Fields Virology)。

[0126] 杆状病毒GP64

[0127] 对于用于大规模生产临床和商业应用所需的高滴度病毒的病毒载体而言,已证实杆状病毒GP64蛋白是VSV-G的引人注目的替代物(Kumar M,Bradow BP,Zimmerberg J (2003) Hum. Gene Ther. 14(1):67-77)。与VSV-G假型包装的载体相比,GP64假型包装的载体具有相似的广泛向性和相似的天然滴度。由于GP64表达不会杀死细胞,可产生出组成型表达GP64的基于293T的细胞系。

[0128] 狂犬病G

[0129] 在本发明中,可用狂犬病G蛋白的至少一部分或其突变体、变体、同源物或片段对载体进行假型包装。

[0130] 有关狂犬病G蛋白及其突变体的教导可见于WO 99/61639以及Rose等人.(1982) J. Virol. 43:361-364, Hanham等人.(1993) J. Virol. 67:530-542, Tuffereau等人.(1998) J. Virol. 72:1085-1091, Kucera等人.(1985) J. Virol. 55:158-162, Dietzschold等人.(1983) PNAS 80:70-74, Seif等人.(1985) J. Virol. 53:926-934, Coulon等人.(1998) J. Virol. 72:273-278, Tuffereau等人.(1998) J. Virol. 72:1085-10910, Burger等人.(1991) J. Gen. Virol. 72:359-367, Gaudin等人.(1995) J. Virol. 69:5528-5534, Benmansour等人.(1991) J. Virol. 65:4198-4203, Luo等人.(1998) Microbiol. Immunol. 42:187-193, Coll (1997) Arch. Virol. 142:2089-2097, Luo等人.(1997) Virus Res. 51:35-41, Luo等人.(1998) Microbiol. Immunol. 42:187-193, Coll (1995) Arch. Virol. 140:827-851, Tuchiya等人.(1992) Virus Res. 25:1-13, Morimoto等人.(1992) Virology 189:203-216, Gaudin等人.(1992) Virology 187:627-632, Whittetal (1991) Virology 185:681-688, Dietzschold等人.(1978) J. Gen. Virol. 40:131-139, Dietzschold等人.(1978) Dev. Biol. Stand. 40:45-55, Dietzschold等人.(1977) J. Virol. 23:286-293和Otvos等人.(1994) Biochim. Biophys. Acta 1224:68-76。狂犬病G蛋白在EP 0445625也有描述。

[0131] 另选的包膜

[0132] 其他可用于对反转录病毒载体进行假型包装的包膜包括Mokola、Ebola、4070A和LCMV(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒)。

[0133] 目的核苷酸

[0134] 在一个实施方案中,根据本发明的病毒是野生型反转录病毒载体,或者其在根据本发明的细胞中仍有传染性的突变体或部分。在另一个实施方案中,病毒是包含异源信息的重组反转录病毒载体,其可出于基因治疗目的用于治疗环境中,或者出于接种目的用作抗原。这是使用例如反转录病毒载体的一个优选实施方案。异源信息称为“目的核苷酸”。

[0135] 目的核苷酸可具有治疗或诊断应用。合适的目的核苷酸包括但不限于:编码以下物质的序列:酶、细胞因子、趋化因子、激素、抗体、抗氧化分子、工程改造的免疫球蛋白样分子、单链抗体、融合蛋白、免疫共刺激分子、免疫调节分子、反义RNA、微RNA、shRNA、siRNA、核酶、靶标蛋白的跨结构域负突变体、毒素、条件毒素、抗原、肿瘤抑制蛋白和生长因子、膜蛋白、血管活性蛋白和肽、抗病毒蛋白和核酶,以及它们的衍生物(如带有结合的报道基因)。目的核苷酸还可编码前药激活酶。

[0136] 在另一个实施方案中,目的核苷酸可用于治疗神经退化性疾病。

[0137] 在另一个实施方案中,目的核苷酸可用于治疗帕金森病。

[0138] 在又一个实施方案中,目的核苷酸可编码(一种或多种)参与多巴胺合成的酶。例如,该酶可以是以下之一者或多者:酪氨酸羟化酶、GTP环化水解酶I和/或芳族氨基酸多巴脱羧酶。所有这三个基因的序列可分别获自:GenBank®登录号X05290、U19523和M76180。

[0139] 或者,目的核苷酸可编码囊泡单胺转运体2 (VMAT2)。在一个另选的实施方案中,病毒基因组包含编码芳族氨基酸多巴脱羧酶的目的核苷酸和编码VMAT2的目的核苷酸。这种基因组可用于治疗帕金森病,特别是与L-DOPA的外周给予联用。

[0140] 在另一个实施方案中,目的核苷酸可编码治疗蛋白或治疗蛋白的组合。

[0141] 在另一个实施方案中,目的核苷酸可编码选自以下的(一种或多种)蛋白质:神经胶质细胞衍生的神经营养因子(GDNF)、大脑衍生的神经营养因子(BDNF)、睫状神经营养因子(CDNF)、神经营养蛋白-3 (NT-3)、酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)、碱性成纤维细胞生长因子(bFGF)、白细胞介素-1 beta (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子alpha (TNF- $\alpha$ )、胰岛素生长因子-2、VEGF-A、VEGF-B、VEGF-C/VEGF-2、VEGF-D、VEGF-E、PDGF-A、PDGF-B、PDGF-A和PDGF-B的异型二聚体和同型二聚体。

[0142] 在另一个实施方案中,目的核苷酸可编码选自以下的(一种或多种)抗血管发生蛋白:血管生长抑素、内皮生长抑素、血小板因子4、色素上皮衍生因子(PEDF)、列斯蛋白(restin)、 $\alpha$ 干扰素、干扰素诱导蛋白、gro-beta和tubedown-1、白细胞介素(IL)-1、IL-12、视黄酸、抗VEGF抗体、适体、反义寡核苷酸、siRNA、血小板反应蛋白、VEGF受体蛋白(如US 5,952,199和US 6,100,071中描述的那些)和抗VEGF受体抗体。

[0143] 在另一个实施方案中,目的核苷酸可编码通常在眼细胞中表达的蛋白质。

[0144] 在另一个实施方案中,目的核苷酸可编码通常在感光细胞中表达的蛋白质。

[0145] 在另一个实施方案中,目的核苷酸可编码选自以下的蛋白质:RPE65、芳基羟相互作用受体蛋白样1(AIPL1)、CRB1、卵磷脂视黄醛乙酰转移酶(LRAT)、光受体特异性同源框(CRX)、视网膜鸟苷酸环化酶(GUCY2D)、RPGR相互作用蛋白1(RPGRIP1)、LCA2、LCA3、LCA5、肌

养蛋白、PRPH2、CNTF、ABCR/ABCA4、EMP1、TIMP3、MERTK、ELOVL4、MYO7A、USH2A和opticin。

[0146] 因此,根据本发明的反转录病毒载体可用于递送一种或多种可用于治疗WO 98/05635、WO 98/07859、WO 98/09985中列举的疾病的核苷酸。目的核苷酸可以是DNA或RNA。这类疾病的例子给出如下:

[0147] 能对以下方面作出响应的疾病:细胞因子和细胞增殖/分化活性;免疫抑制或免疫刺激活性(例如用于治疗免疫缺陷,包括人免疫缺陷病毒的感染;调节淋巴细胞生长;治疗癌症和许多自身免疫疾病,和预防移植物排斥或诱导肿瘤免疫性);造血作用的调节,例如骨髓或淋巴疾病的治疗;促进骨、软骨、腱、韧带和神经组织的生长,例如用于愈合伤口,治疗烧伤、溃疡和牙周疾病和神经退化;卵泡刺激激素的抑制或激活(生育力的调节);趋化/化动活性(例如用于将特定细胞类型动员到损伤或感染部位);止血和溶栓活性(例如用于治疗血友病和中风);抗炎活性(用于治疗例如败血性休克或节段性回肠炎);巨噬细胞抑制活性和/或T细胞抑制活性,因而抗炎活性;抗免疫活性,即对细胞和/或体液免疫应答(包括与炎症不相关的应答)的抑制作用;抑制巨噬细胞和T细胞附着于胞外基质成分和纤连蛋白的能力,以及T细胞中的上调的fas受体表达。

[0148] 恶性疾病,包括癌症,良性和恶性肿瘤生长、侵入和扩散,血管发生,转移瘤,腹水和恶性胸腔积液。

[0149] 自身免疫性疾病,包括关节炎(包括类风湿性关节炎)、超敏性、变态反应、哮喘、系统性红斑狼疮、胶原疾病和其他疾病。

[0150] 心血管疾病,包括动脉硬化症、动脉硬化性心脏病、再灌注损伤、心跳停止、心肌梗塞、血管炎性疾病、呼吸窘迫综合征、心血管病、偏头痛和阿斯匹林依赖性抗血栓症、中风、大脑局部缺血、缺血性心脏病或其他疾病。

[0151] 胃肠道的疾病,包括消化性溃疡、溃疡性结肠炎、节段性回肠炎和其他疾病。

[0152] 肝病,包括肝纤维化、肝硬化或其他疾病。

[0153] 肾病和泌尿疾病,包括甲状腺炎或其他腺体疾病、血管球性肾炎或其他疾病。

[0154] 耳、鼻和喉疾病,包括耳炎或其他耳鼻喉疾病、皮炎或其他皮肤疾病。

[0155] 牙齿和口腔疾病,包括牙周病、牙周炎、齿龈炎或其他牙齿/口腔疾病。

[0156] 睾丸疾病,包括睾丸炎或附睾-睾丸炎、不育症、睾丸创伤或其他睾丸疾病。

[0157] 妇科疾病,包括胎盘功能异常、胎盘功能不全、习惯性流产、子痫、子痫前期、子宫内膜异位和其他妇科疾病。

[0158] 眼科疾病,例如后色素层炎、中色素层炎、前色素层炎、结膜炎、脉络视网膜炎、葡萄膜视网膜炎、视神经炎、眼内炎症(例如视网膜炎或囊样黄斑水肿)、交感性眼炎、巩膜炎、色素性视网膜炎、黄斑变性(包括年龄相关性黄斑变性(AMD)和青少年黄斑变性,包括Best病、Stargardt病、Usher综合征、Doyme蜂窝状视网膜营养失调、Sorby黄斑营养失调、青年性视网膜劈裂症、视锥-视杆营养失调、角膜营养失调、Fuch营养失调、Leber先天性黑内障、Leber遗传性视神经病(LHON)、Adie综合征、Oguchi病、退行性眼底病、眼创伤、由感染引起的眼睛炎症、增殖性玻璃体-视网膜病、急性局部缺血性视神经病、过度疤痕(例如在青光眼滤过手术后)、对眼睛植入物的反应、角膜移植物移植排斥和其他眼科疾病。

[0159] 神经疾病和神经退化性疾病,包括帕金森病、治疗帕金森病引起的并发症和/或副作用、AIDS相关痴呆综合症、HIV相关脑病、Devic病、Sydenham舞蹈病、阿尔兹海默病和其他

退行性疾病、CNS的病症或紊乱、中风、脊髓灰质炎后综合征、精神疾病、脊髓炎、脑炎、亚急性硬化性全脑炎、脑脊髓炎、急性神经病、亚急性神经病、慢性神经病、Guillain-Barre综合征、Sydenham舞蹈病、重症肌无力、大脑假性肿瘤、唐氏综合征、亨廷顿舞蹈病、CNS压缩或CNS创伤或CNS的感染、肌肉萎缩和营养失调、中枢神经系统和外周神经系统的疾病、病症或紊乱、运动神经元疾病(包括肌萎缩性侧索硬化、脊髓性肌萎缩症、脊髓和撕脱伤)。

[0160] 其他的疾病和病症,例如创伤后炎症、出血、血凝固和急性期反应、恶病质、厌食、急性感染、败血性休克、传染病、手术的并发症或副作用、骨髓移植或其他移植并发症和/或副作用、基因治疗的并发症和副作用(例如由于感染病毒载体)、或者AIDS,以压制或抑制体液和/或细胞免疫应答,在天然或人工的细胞、组织和器官(如角膜、骨髓、器官、晶状体、起搏器、天然或人工皮肤组织)的移植的情况中用于预防和/或治疗移植排斥。

[0161] siRNA/微RNA

[0162] 目的核苷酸可包含或编码siRNA或微RNA或shRNA或者经调节的微RNA或shRNA(Dickins等人.(2005) Nature Genetics 37:1289-1295, Silva等人.(2005) Nature Genetics 37:1281-1288)。

[0163] 由双链RNA(dsRNA)介导的转录后基因沉默(PTGS)是控制外来基因表达的保守的细胞防御机制。据认为,诸如转座子的元件或病毒的随机整合,会引起能激活同源单链mRNA或病毒基因组RNA的序列特异性降解的dsRNA的表达。这个沉默作用称为RNA干扰(RNAi)(Ralph等人.(2005) Nature Medicine 11:429-433)。RNAi的机制涉及将长的dsRNA加工成大约21-25个核苷酸(nt)的RNA的双链体。这些产物称为小干扰RNA或沉默RNA(siRNA),它们是mRNA降解的序列特异性介质。在分化的哺乳动物细胞中,已发现>30bp的dsRNA能激活干扰素应答,从而导致蛋白质合成的停止和非特异性的mRNA降解(Stark等人.(1998))。但是,可用21nt siRNA双链体来绕过这个响应(Elbashir等人.(2001), Hutvagner等人.(2001)),使得可以在培养的哺乳动物细胞中分析基因功能。

[0164] 在另一个实施方案中,目的核苷酸包含微RNA。微RNA是生物体中天然产生的非常大的一组小RNA,其中至少一些能调节靶标基因的表达。微RNA家族的创始成员是let-7和lin-4。let-7基因编码小的、高度保守的RNA物质,该RNA物质在蠕虫发育过程中调节内源蛋白质编码基因的表达。该活性RNA物质最初被转录为约70nt的前体,该前体在转录后被加工成成熟的约21nt的形式。let-7和lin-4两者都被转录成发夹RNA前体,所述前体由切酶加工成它们的成熟形式。

[0165] 启动子

[0166] 目的核苷酸的表达可用控制序列进行控制,这些控制序列包括启动子/增强子和其他表达调节信号。可以使用在真核细胞中能发挥功能的原核生物启动子。可以使用组织特异性启动子或刺激特异性启动子。还可使用包含来自两种或更多种不同启动子的序列元件的嵌合启动子。

[0167] 合适的启动序列是强启动子,包括那些源自病毒(如多瘤病毒、腺病毒、禽痘病毒、牛乳头状瘤病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒(CMV)、反转录病毒和猿猴病毒40(SV40))的基因组的启动子,或者源自异源哺乳动物启动子(如肌动蛋白启动子或核糖体蛋白启动子)的启动子。可通过将增强序列插入到载体中,来进一步提高基因的转录。增强子相对不依赖于取向和位置;但是,可以采用来自真核细胞病毒的增强子,如在复制起点的后侧(late side)



上的SV40增强子 (bp 100-270) 和CMV早期启动子增强子。增强子可在相对于启动子的5' 或3' 的位置剪接到载体中,但优选位于相对于启动子的5' 位点。

[0168] 启动子可另外包括用以确保或提高在合适宿主中的表达的特征。例如,特征可以是保守区域,例如Pribnow框或TATA框。启动子可甚至含有用以影响(如维持、增强、降低)核苷酸序列的表达水平的其他序列。合适的其他序列包括Sh1内含子或ADH内含子。其他序列包括可诱导元件,如温度、化学、光和应激可诱导元件。还可存在用以增强转录或翻译的合适元件。

#### [0169] 密码子优化

[0170] 本发明中所用的多核苷酸(包括目的核苷酸和/或载体成分)可经过密码子优化。密码子优化之前在WO 99/41397和WO 01/79518中已有描述。不同的细胞在它们对具体密码子的用法上存在差异。这个密码子偏向对应于具体tRNA在该细胞类型中的相对丰度的偏向。通过改变序列中的密码子,从而将它们定制成匹配相应的tRNA的相对丰度,则有可能提高表达。相似地,通过有意选择已知其相应的tRNA在特定细胞类型中稀有的密码子,有可能降低表达。因此,可以对翻译进行更多的控制。

[0171] 许多病毒(包括HIV和其他慢病毒)使用大量的稀有密码子,通过将改变这些密码子以对应于常用的哺乳动物密码子,可实现目的基因(例如目的核苷酸或包装成分)在哺乳动物生产细胞中的表达增加。本领域已知哺乳动物细胞以及多种其他生物的密码子用法表。

[0172] 病毒载体成分的密码子优化具有许多其他优点。对于编码为病毒颗粒在生产细胞/包装细胞中的装配所必需的病毒颗粒包装成分的核苷酸序列,通过在它们的序列中作出变更,可使RNA不稳定性序列(INS)从中去除。同时,包装成分的氨基酸序列编码序列得以保持,使得由所述核苷酸序列编码的病毒成分保持相同或至少充分相似,从而包装成分的功能不受损害。在慢病毒载体中,密码子优化还能克服输出对Rev/RRE的需求,从而使得经优化的序列不依赖于Rev。密码子优化还能减少载体系统当中的不同构建物之间(例如gag-pol开放阅读框和env开放阅读框中的重叠区域之间)的同源重组。因此,密码子优化的总体效果是病毒滴度明显提高和安全性改善。

[0173] 在一个实施方案中,仅对与INS相关的密码子进行密码子优化。但是,在更为优选和实用的实施方案中,序列全部都进行密码子优化,但有一些例外,例如涵盖gag-pol的移码位点的序列(见下)。

[0174] gag-pol基因包含编码gag-pol蛋白的两个重叠阅读框。两种蛋白质的表达都依赖于翻译过程中的移码。这个移码是因为核糖体在翻译过程中“滑动”而产生。这个滑动据认为至少部分上由核糖体延宕性(ribosome-stalling) RNA二级结构造成。这种二级结构存在于gag-pol基因中的移码位点的下游。对于HIV,重叠区域从gag始端下游的核苷酸1222(其中核苷酸1为gag ATG的A)延伸至gag的末端(nt 1503)。因此,横跨两个阅读框的移码位点和重叠区域的281bp片段优选不进行密码子优化。保留这个片段将使得能够更有效地表达gag-pol蛋白。

[0175] 对于EIAV,重叠的始端据认为是nt 1262(其中核苷酸1为gag ATG的A)。重叠的末端在1461bp。为了确保移码位点和gag-pol重叠得到保存,已保持了野生型序列的nt 1156至1465。

[0176] 可作出与最佳密码子用法的偏差,例如以适应便利的限制位点,并且可将保守氨基酸变化引入到gag-pol蛋白中。

[0177] 在一个实施方案中,密码子优化是基于轻表达的(lightly expressed)哺乳动物基因。可改变第三个碱基,有时可改变第二和第三个碱基。

[0178] 由于遗传密码的简并性,应理解,技术人员可作出许多个gag-pol序列。另外,有许多反转录病毒变体得到了描述,它们可用作产生经密码子优化的gag-pol序列的起始点。慢病毒基因组可以是十分易变的。例如,存在着许多仍能发挥功能的准HIV-1物质。对于EIAV情况也是一样。这些变体可用于增强转导过程的各个具体部分。HIV-1变体的例子可在Los Alamos National Security,LLC运行的HIV数据库(<http://hiv-web.lanl.gov>)中找到。有关EIAV克隆的细节可在美国国家生物技术信息中心(NCBI)数据库(位于<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)中找到。

[0179] 用于密码子优化的gag-pol序列的策略可针对任何反转录病毒使用。这将适用于所有的慢病毒,包括EIAV、FIV、BIV、CAEV、VMR、SIV、HIV-1和HIV-2。另外,这个方法可用于提高来自HTLV-1、HTLV-2、HFV、HSRV和人内源反转录病毒(HERV)、MLV及其他反转录病毒的基因的表达。

[0180] 密码子优化可使gag-pol表达不依赖于Rev。但是,为了使得能够在慢病毒载体中使用抗rev或RRE因子,有必要使病毒载体产生系统完全不依赖于Rev/RRE。因此,基因组还需要加以修饰。这通过优化载体基因组成分来实现。有利地,这些修饰还导致产生出在生产细胞和在被转导的细胞中都没有所有附加蛋白质的更安全的系统。

[0181] 反转录病毒载体产生系统

[0182] 反转录病毒载体可合适地在细胞(有时称为“宿主细胞”)中进行增殖。

[0183] 根据本发明的细胞可以是任何在其中可增殖所需的反转录病毒载体的细胞。

[0184] 通过使用稳定的生产细胞系/包装细胞系,有可能增殖出大量的病毒载体颗粒(例如制备出适当滴度的慢病毒载体)供后续纯化。

[0185] 本文所用的术语“生产细胞”或“载体生产细胞”指含有为产生慢病毒载体颗粒所需的全部元件的细胞。

[0186] 本文所用的术语“包装细胞”指含有那些在RNA基因组中缺乏的、为产生传染性重组病毒所需的元件的细胞。通常,这种包装细胞含有一个或多个能够表达病毒结构蛋白质(如密码子优化的gag-pol和env)的生产质粒,但它们不含有包装信号。

[0187] 优选地,根据本发明的生产细胞/包装细胞源自哺乳动物细胞,且优选地源自灵长类动物细胞,如特别优选的人胚胎肾细胞。虽然优选的是灵长类动物细胞,但在本发明的实施中任何类型的能够支持病毒的复制的细胞都是可接受的。其他细胞类型可包括但不限于任何建立了组织培养技术的真核细胞,只要细胞能容许反转录病毒。

[0188] 细胞可源自现有的细胞系,例如源自HEK 293细胞系。

[0189] 为了改进安全性,已产生了其中原病毒的3' LTR被缺失的细胞系。在这种细胞中,将需要两个重组以产生野生型病毒。进一步的改进涉及在分别的构建物上引入gag-pol基因和env基因。这些构建物可依次引入以防止在转染过程中发生重组。在这些分裂构建物(split-construct)细胞系中,可通过改变密码子进一步减少重组。这个基于遗传密码的简并性的技术旨在减少分别的构建物之间的同源性,例如gag-pol和env开放阅读框中的重叠

区域之间的同源性。

[0190] 在一个实施方案中,用于本发明的载体产生细胞使用三个表达基因组的转录单位即gag-pol成分和包膜作为它们的产生系统。包膜表达盒可包括多种包膜(如VSV-G或各种鼠反转录病毒包膜如4070A)之一。特别优选VSV-G包膜。

[0191] 在一个实施方案中,包膜蛋白序列和核衣壳序列都稳定地整合在生产细胞和/或包装细胞中。但是,这些序列中的一个或多个还可以附加体形式存在,且基因表达可从附加体发生。

[0192] 又一个实施方案采用可诱导系统(例如Tet系统(Gossen和Bujard))来产生能表达毒性基因产物(如VSV-G)的稳定的生产细胞/包装细胞(EP 0572401B)。

[0193] 在一个另选的实施方案中,采用瞬时转染来产生本发明的病毒生产细胞。瞬时转染可避免为产生稳定的载体生产细胞系所需的较长时间,如果载体基因组或慢病毒包装成分对细胞有毒的话,可以使用瞬时转染。

[0194] 在一个特别优选的实施方案中,用于产生本发明的反转录病毒载体的包装细胞是通过用三种编码以下载体的质粒转染细胞(例如HEK293T细胞)来产生:(i)重组反转录病毒载体基因组,(ii)编码gag/pol的表达载体和(iii)编码env的表达载体。

[0195] 转染方法可用本领域公知的方法进行。例如,转染过程可用磷酸钙或市售配方如Lipofectamine™ 2000CD(Invitrogen,CA)或聚乙烯亚胺(PEI)进行。

[0196] 还可如W0 2004/022761中所述,通过用能表达包装细胞/生产细胞(即基因组)的成分即gag-pol成分和包膜之一的反转录病毒载体转导合适的细胞系,来产生包装细胞/生产细胞。

[0197] 将转染有编码这些成分的反转录病毒载体的细胞进行培养,以增加细胞和病毒数目和/或病毒滴度。进行细胞培养是为了使得它能够代谢和/或生长和/或分裂和/或产生根据本发明的目的病毒。这可通过本领域技术人员公知的方法实现,包括但不限于给细胞提供营养物,例如在适当的培养基中。所述方法可包括贴壁生长、悬浮生长或者它们的组合。可例如在组织培养瓶、皿、摇瓶中或者在生物反应器中,采用分批系统、补料分批系统、连续系统、中空纤维等来进行培养。为了通过细胞培养实现病毒的大规模(连续)生产,本领域优选的是具有能够悬浮生长的细胞。合适的细胞培养条件是已知的(参见例如Tissue Culture,Academic Press,Kruse和Paterson编辑(1973),及R.I.Freshney,Culture of animal cells:A manual of basic technique,第四版(Wiley-Liss Inc.,2000,ISBN 0-471-34889-9)。

[0198] 优选地,细胞最初在组织培养瓶中“扩大数量”,随后在多层培养罐中生长以产生本发明的载体生产细胞。

[0199] 优选地,细胞以贴壁模式生长,以产生本发明的载体生产细胞。

[0200] 优选地,细胞以分批模式生长,以产生本发明的载体生产细胞。

[0201] 澄清

[0202] 在本发明的优选实施方案中,将从细胞培养物收获的上清液进行澄清。

[0203] 根据某些优选的实施方案,澄清步骤在添加核酸酶之前进行。

[0204] 可通过过滤步骤进行澄清,从而除去细胞碎片和其他杂质。合适的过滤器可采用纤维素过滤器、再生纤维素纤维、与无机助滤剂(例如硅藻土、珍珠岩、热解法二氧化硅)组

合的纤维素纤维、与无机助滤剂和有机树脂组合的纤维素过滤器、或者它们的任何组合,以及聚合物过滤器(例子包括但不限于尼龙、聚丙烯、聚醚砜),以实现有效除杂和可接受的回收率。一般而言,优选多级过程,但并非必需。示例性的两级或三级过程是由粗过滤器和其后的精修性(polishing)二级过滤器组成,前者用于去除大的沉淀物和细胞碎片,后者具有大于0.2微米但小于1微米的名义孔径。最佳组合可由沉淀物尺寸分布以及其他变量而定。另外,采用相对较小孔径的过滤器或离心的单级操作也可用于进行澄清。更一般而言,任何能提供合适澄清度的滤液以免堵塞后续步骤中的膜和/或树脂的澄清方法,将可以接受用于本发明的澄清步骤,这些澄清方法包括但不限于盲端(dead-end)过滤、微滤、离心、或者助滤剂(例如硅藻土)主体加料与盲端过滤或深度过滤相组合。

[0205] 在一个实施方案中,使用深度过滤和膜过滤。可用于这方面的市售产品例如在W0 03/097797第20-21页中提及。可使用的膜可由不同的材料组成,可具有不同的孔径大小,且可组合使用。它们可从几个供应商市售获得。

[0206] 优选地,用于澄清的过滤器在1.2至0.22 $\mu\text{m}$ 的范围内。

[0207] 更优选地,用于澄清的过滤器为1.2/0.45 $\mu\text{m}$ 过滤器或者最小名义孔径大小为0.22 $\mu\text{m}$ 的不对称过滤器。

[0208] 核酸酶处理

[0209] 在优选的实施方案中,本发明采用核酸酶来降解污染性DNA/RNA,即主要是宿主细胞核酸。示例性的适用于本发明的核酸酶包括能攻击和降解所有形式的DNA和RNA(单链、双链线性或环状)的Benzonase®核酸酶(EP 0229866),或者任何其他在本领域中常用于从制品清除不需要的或污染性的DNA和/或RNA的DNA酶和/或RNA酶。在优选的实施方案中,核酸酶是Benzonase®核酸酶,其通过水解特定核苷酸之间的内部磷酸二酯键而快速水解核酸,从而降低含有载体的上清液中的多核苷酸的大小。Benzonase®核酸酶可从Merck KgaA市售获得(编号W214950)。核酸酶的应用浓度优选在1-100单位/ml的范围内。

[0210] 某些优选的实施方案包括超过一种核酸酶处理。例如Benzonase®核酸酶可在载体进行色谱纯化之前和/或之后加到含载体的上清液。作为非限制性例子,将Benzonase®核酸酶加到在37℃和环境温度之间的含载体的上清液,然后将混合物在2至8℃下温育,优选温育过夜。

[0211] 除了用核酸酶处理以打碎游离核酸(主要是宿主细胞DNA)之外,还可对细胞培养基中的杂质DNA进行选择性的沉淀(去除),或者,不是用核酸酶处理以打碎游离核酸,而是对细胞培养基中的杂质DNA进行选择性的沉淀(去除),所述选择性沉淀例如是用适量的选择性沉淀剂进行,所述沉淀剂例如度米芬(DB)、CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)、十六烷基氯化吡啶鎓(CPC)、苄索氯铵(BTC)、十四烷基三甲基氯化铵(TTA)、聚乙烯亚胺(PEI)等,如在W0 03/097797中详细公开。

[0212] 超滤/渗滤

[0213] 根据本发明的实施方案,在本发明方法中将载体悬浮液进行超滤(当用于缓冲液交换时,有时称为渗滤)至少一次,例如以浓缩载体和/或进行缓冲液交换。用于浓缩根据本发明方法的载体的方法可包括任何这样的过滤方法(例如超滤(UF)),其中通过迫使稀释剂穿过过滤器,使得稀释剂从载体制品中去除,而载体不能够穿过过滤器,使载体浓度提高,从而以浓缩形式保留在载体制品中。UF在例如以下文献中有详细描述:Microfiltration

and Ultrafiltration: Principles and Applications, L. Zeman 和 A. Zydney (Marcel Dekker, Inc., New York, NY, 1996); Ultrafiltration Handbook, Munir Cheryan (Technomic Publishing, 1986; ISBN No. 87762-456-9)。优选的过滤方法是切向流过滤 ("TFF"), 如在标题为 "Pharmaceutical Process Filtration Catalogue" 的 MILLIPORE 商品目录第 177-202 页 (Bedford, Massachusetts, 1995/96) 中描述。TFF 在生物加工行业中广泛用于细胞收获、澄清、产物 (包括病毒在内) 的纯化和浓缩。该系统由三个不同的过程流组成: 进料液、透过液和截留液。视应用而定, 可使用不同孔径大小的过滤器。在本发明中, 截留液含有产物 (慢病毒载体)。为此, 所选的具体超滤膜其孔径大小要小得足以保持载体, 但也要大得足以有效清除杂质。取决于生产商和膜类型, 对于反转录病毒载体而言, 100 至 1000kDa 之间的名义截留分子量 (NMWC) 可以是适当的, 例如具有 300kDa 或 500kDa NMWC 的膜。膜的组成可为但不限于再生纤维素、聚醚砜、聚砜或者它们的衍生物。膜可以是平板 (也称平网) 或中空纤维。优选用于本发明的 UF 是中空纤维 UF。UF 通常指用孔径大小小于  $0.1\mu\text{m}$  的过滤器进行的过滤。产物通常保留, 而体积可通过透过作用而减少 (或者在渗滤过程中通过加入缓冲液来保持恒定, 缓冲液的加入速度与含有缓冲液和杂质的透过液被移除在透过液一侧的速度相同)。

[0214] 在生物医药行业中两种最广泛使用的 TFF 几何构造是板框 (平网) 组件和中空纤维组件。超滤和微滤用中空纤维组件是由 Amicon 和 Ramicon 在二十世纪七十年代初开发 (Cheryan, M. Ultrafiltration Handbook), 而现在有多个销售商, 包括 Spectrum 和 GE Healthcare。中空纤维组件由具有致密表层的自支撑纤维的阵列组成。纤维直径在  $0.5\text{mm}$  -  $3\text{mm}$  的范围内。中空纤维组件的优点是从膜面积小的过滤器 (大约  $16\text{cm}^2$ ) 到膜面积非常大的过滤器 (大约  $20\text{m}^2$ ) 都有提供, 可以进行线性和简单放大。在本发明的某些优选实施方案中, 将中空纤维用于 TFF。这些中空纤维据报道与平网膜相比产生较小的剪切和更好的病毒颗粒/感染单位比 (VP/IU)。此外, 中空纤维中的跨膜压差通常低于平网。在某些实施方案中, 根据本发明使用 500kDa ( $0.05\mu\text{m}$ ) 孔径大小的中空纤维。超滤可包括使用超滤器进行的渗滤 (DF), 是去除和交换盐类、糖类、非水溶剂, 将游离的物质与结合的物质分离开来, 去除低分子量的物质或者快速改变离子环境和/或 pH 环境的理想方式。通过将溶剂以与超滤速度相等的速度加到被超滤的溶液, 微小溶质得以最有效地去除。这可以以恒定的体积从溶液洗涤微小物质, 从而纯化被保留的载体。

[0215] UF/DF 可用于在纯化过程在不同阶段对根据本发明的载体悬浮液进行浓缩和/或缓冲液交换。本发明优选利用 DF 步骤来在色谱或其他纯化步骤之后交换上清液的缓冲液, 但也可在色谱之前使用。

[0216] 优选地, 将得自本发明的色谱步骤的洗脱液通过超滤-渗滤进行浓缩和进一步纯化。在这个过程中, 载体被交换到配方缓冲液中。但是, 出乎意料地发现, 如果在过滤除菌步骤之后才进行浓缩至最终所需的浓度, 可实现载体生产的改进。在所述无菌过滤之后, 将过滤除菌过的物质通过无菌 UF 进行浓缩以产生批量载体产物。

[0217] 在本发明的实施方案中, 超滤/渗滤可以是切向流渗滤、搅拌池超滤装置 (stirred cell) 渗滤和透析。

[0218] 色谱法

[0219] 纯化技术是本领域技术人员公知的。这些技术往往涉及将载体颗粒从细胞环境分

离,并且如果需要的话对载体颗粒进行进一步的纯化。各种各样的色谱方法中的一种或多种可用于这个纯化。虽然离子交换色谱、更具体地讲阴离子交换色谱对于本发明是优选的方法,但其他方法也可使用。一些相关的色谱技术的说明在下面给出。

#### [0220] 离子交换色谱

[0221] 离子交换色谱利用到这样的事实,即带电物质如生物分子和病毒载体能可逆地结合在其表面上固定着带相反电荷的基团的固定相(如膜,或者柱中的填料)。有两种类型的离子交换剂。阴离子交换剂是具有带正电荷的基团的固定相,因此能结合带负电荷的物质。阳离子交换剂具有带负电荷的基团,因此能结合带正电荷的物质。介质的pH对此具有重要影响,因为它能改变物质上的电荷。因此,对于诸如蛋白质的物质,如果pH在pI之上,则净电荷将为阴性,而如果在pI之下,则净电荷将为阳性。

[0222] 可通过使用合适的缓冲液实现结合的物质置换(洗脱)。因此,通常将缓冲液的离子浓度提高,直到该物质通过缓冲液离子竞争固定相上的离子位点而被置换。另一种洗脱方法是改变缓冲液的pH,直到该物质的净电荷不再有利于结合固定相。一个例子是降低pH,直到该物质呈净阳电荷而将不再结合阴离子交换剂。

[0223] 如果杂质不带电荷,或者如果它们所带电荷的极性与所需物质的电荷相反,但与离子交换剂上的电荷相同,则可以实现一定的纯化。这是因为不带电荷的物质和电荷极性与离子交换剂相同的物质通常不会发生结合。对于不同的结合的物质,结合强度随诸如电荷密度和电荷在各个物质上的分布等因素而异。因此,通过施加离子梯度或pH梯度(作为连续梯度或作为一系列步骤),可将所需的物质分别从杂质中洗脱出来。

#### [0224] 尺寸排阻色谱

[0225] 尺寸排阻色谱是一项将物质根据其大小进行分离的技术。通常,它是通过使用装填有具有确定大小的孔道的颗粒的柱子来进行。对于这种色谱分离,选择孔径大小与混合物中要分离的物质的大小相适应的颗粒。当将混合物作为溶液(或者在病毒的情况中作为悬浮液)施加到柱子然后用缓冲液洗脱时,最大的粒子将首先洗脱,因为它们进入孔道受限(或不能进入)。较小的粒子将稍后洗脱,因为它们能进入孔道,因此要走较长的路程才能穿过柱子。因此,在考虑将尺寸排阻色谱用于纯化病毒载体时,可预期载体会在较小的杂质如蛋白质的前面先被洗脱。

#### [0226] 疏水相互作用色谱(HIC)

[0227] 诸如蛋白质的物质在其表面上具有能可逆结合固定相上的弱疏水位点的疏水区域。在具有相对较高盐浓度的介质中,这个结合得到促进。通常,在HIC中,要纯化的样品在高盐环境中结合到固定相。然后通过施加渐减的盐浓度的梯度(连续,或者作为一系列步骤)实现洗脱。常用的盐是硫酸铵。具有不同疏水性水平的物质将趋向于在不同的盐浓度下被洗脱,因此可将目标物质从杂质中纯化。其他因素例如pH、温度和添加到洗脱介质的添加剂如去污剂、离液盐和有机溶剂,也会影响物质与HIC固定相的结合强度。可调节或利用这些因素中的一个或多个来优化产物的洗脱和纯化。

[0228] 病毒载体在其表面上具有疏水部分(如蛋白质),因此HIC可潜在地用作纯化方法。

#### [0229] 反相色谱(RPC)

[0230] 和HIC一样,RPC是根据物质的疏水性差异来分离物质。使用的固定相具有比HIC中所用固定相高的疏水性。该固定相往往由结合有疏水部分如烷基基团或苯基基团的材料

(通常为二氧化硅)组成。或者,固定相可以是没有连接的基团的有机聚合物。将含有要拆分的物质的混合物的样品上样到在相对较高级性(可促进结合)的含水介质中的固定相。然后通过加入有机溶剂如异丙醇或乙腈降低含水介质的极性来实现洗脱。通常使用渐增的有机溶剂浓度的梯度(连续,或者作为一系列步骤),各物质按其各自疏水性的顺序被洗脱。

[0231] 其他因素例如洗脱介质的pH和添加剂的使用,也会影响物质与RPC固定相的结合强度。可调节或利用这些因素中的一个或多个来优化产物的洗脱和纯化。常用的添加剂是三氟乙酸(TFA)。这能抑制样品中的酸性基团如羧基部分的电离。它还可降低洗脱介质中的pH,而这可抑制具有二氧化硅基质的固定相的表面上可能存在的游离硅烷醇基团的电离。TFA是一类被称为离子配对剂的添加剂中的一种。这些添加剂能与样品中具有相反电荷的物质上存在的离子基团发生相互作用。该相互作用趋向于掩盖电荷,从而提高物质的疏水性。阴离子型离子配对剂如TFA和五氟丙酸能与物质上的带正电荷的基团发生相互作用。阳离子型离子配对剂如三乙胺能与带负电荷的基团发生相互作用。

[0232] 病毒载体在其表面上具有疏水部分(如蛋白质),因此RPC可潜在地用作纯化方法。但是,在考虑使用这种技术时,需要小心谨慎以减少因为有机溶剂的使用还有这种技术中常用的低pH条件而造成的对载体的损害。

#### [0233] 亲和色谱

[0234] 亲和色谱利用到这样的事实,即可将某些能特异性结合生物分子如蛋白质或核苷酸的配体固定化在固定相上。该经修饰的固定相然后可用于从混合物中分离相关的生物分子。高度特异性的配体的例子是用于纯化目标抗原的抗体和用于纯化酶的酶抑制剂。还可利用更一般性的相互作用,如使用A蛋白配体来分离多种抗体。

[0235] 通常,亲和色谱是这样进行的:将含有感兴趣的物质的混合物上样到连接有相关配体的固定相。在适当的条件下,这将导致物质与固定相的结合。然后在施加洗脱介质之前,先洗涤掉未结合的成分。选择洗脱介质,以破坏配体与目标物质的结合。这通常是通过选择适当的离子强度、pH或者通过使用会与目标物质竞争配体位点的材料来实现。对于一些结合的物质,使用离液剂如尿素来实现从配体置换下来。但是,这可能会导致物质的不可逆变性。

[0236] 病毒载体在其表面上具有可能能够特异性结合适当配体的部分(如蛋白质)。这意味着亲和色谱潜在地可用于分离病毒载体。

#### [0237] 固定化金属离子亲和色谱(IMAC)

[0238] 生物分子如蛋白质可在其表面上具有能与金属离子形成配位键的供电子部分。这可促进它们与携带固定化金属离子(如 $\text{Ni}^{2+}$ 、 $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 或 $\text{Fe}^{3+}$ )的固定相的结合。IMAC中所用的固定相具有共价连接到其表面的螯合剂,通常是次氨基乙酸或亚氨基二乙酸,正是这个螯合剂保持着金属离子。螯合的金属离子必需留有至少一个配位位点以供与生物分子形成配位键。潜在地,在生物分子的表面上存在着几个可能能够结合固定化金属离子的部分。这些部分包括组氨酸、色氨酸和半胱氨酸残基以及磷酸根基团。但是,对于蛋白质而言,主要的供体似乎是组氨酸残基的咪唑基团。天然蛋白质如果在其表面上展示合适的供体部分,则可用IMAC进行分离。否则,IMAC可用于分离具有由几个连接的组氨酸残基构成的链的重组蛋白质。

[0239] 通常,IMAC是这样进行的:将含有感兴趣的物质的混合物上样到固定相。在适当的

条件下,这将导致物质与固定相的配位键合。然后在施加洗脱介质之前,先洗涤掉未结合的成分。为进行洗脱,可使用渐增的盐浓度或渐减的pH的梯度(连续,或者作为一系列步骤)。另外,一个常用程序是施加渐增的咪唑浓度的梯度。在不同环境中具有不同供体特性(例如具有组氨酸残基)的生物分子,可用梯度洗脱来进行分离。

[0240] 病毒载体在其表面上具有可能能够结合IMAC固定相的部分(如蛋白质)。这意味着IMAC潜在地可用于分离病毒载体。

#### [0241] 离心

[0242] 合适的离心技术包括区带离心、等密度超离心和粒化离心(pelleting centrifugation)。

#### [0243] 过滤除菌

[0244] 过滤除菌在用于药物级材料的方法中是常用的,并且是本领域技术人员知道的。过滤除菌能使所得的制剂基本上不含污染物。过滤除菌后的污染物水平使得制剂适合于临床使用。根据本发明,过滤除菌步骤后的任何进一步浓缩(例如通过超滤)优选在无菌条件下进行。

[0245] 适用于本发明的除菌过滤器是本领域技术人员公知的。优选地,除菌过滤器的最大孔径大小为0.22 $\mu\text{m}$ 。

#### [0246] 验证载体完整性

[0247] 有各种测定法可用于验证纯化过程中反转录病毒载体的遗传完整性。这类方法之一是证实由该载体编码的基因的存在。在一个优选的实施方案中,该方法可证实由该载体编码的一个或多个目的核苷酸的存在。这可例如这样来实现:从载体制品分离RNA,并用DNA酶I进行消化以降解除质粒DNA,反转录酶(RT)反应将RNA转化成cDNA序列,此后对目的核苷酸序列的选定区域进行特异性PCR扩增。

#### [0248] 药用组合物和给药

[0249] 本发明提供用于通过基因疗法治疗个体的制剂(药物组合物),其中该组合物包含治疗有效量的载体。药用组合物可供人类或动物使用。通常,医师会确定对于个体受试者将最为合适的实际剂量,该剂量将随具体个体的年龄、体重和响应而变。

[0250] 组合物可任选包含药物可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。药物载体、赋形剂或稀释剂的选择可根据预定的给药途径和标准的制药规范来进行。除了载体、赋形剂或稀释剂之外,药用组合物还可包含任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂和其他可帮助或增加病毒进入靶标位点的运载剂(例如脂质递送系统)。

[0251] 在适当情况下,组合物可通过以下方式中的任何一种或多种来给予:吸入,以栓剂或阴道栓剂的形式,通常以洗剂、溶液剂、乳膏剂、软膏剂或撒布粉的形式,通过使用皮肤贴剂,以含有赋形剂(如淀粉或乳糖)的片剂的形式口服,或者以单独的或与赋形剂混合的胶囊剂或小丸(ovule)口服,或者以含有矫味剂或着色剂的酏剂、溶液剂或混悬剂口服,或者组合物可进行胃肠外注射,例如海绵体内(intracavernosally)、静脉内、肌肉内、颅内、眼内或皮下注射。对于胃肠外给药,组合物可最好以无菌含水溶液剂的形式使用,该溶液剂可含有其他的物质,例如足够的盐或单糖,以使得溶液与血液等渗。对于口腔或舌下给药,组合物可以以按常规方式配制的片剂或锭剂的形式给予。

#### [0252] 治疗



[0253] 通过本发明方法生产的反转录病毒载体可用于治疗。应理解,本文所指的治疗包括治本性治疗、治标性治疗和预防性治疗。特别优选哺乳动物的治疗。人类治疗和兽医治疗都在本发明的范围之内。

[0254] 在一个实施方案中,本发明方法生产的反转录病毒载体制剂可用于引入三个编码多巴胺合成途径的三个酶的基因以治疗帕金森病。该反转录病毒载体是衍自马传染性贫血病毒(EIAV)的非复制型、自身失活型最小限度慢病毒载体,该病毒可用VSV-G或另选的病毒包膜蛋白进行假型包装。反转录病毒载体所携带的基因可包含截短形式的人酪氨酸羟化酶(TH\*)基因(其缺乏参与TH的反馈调节的N末端160个氨基酸)、人芳族L-氨基酸脱羧酶(AADC)和人GTP-环化水解酶1(CH1)基因。反转录病毒载体可通过用三个编码以下载体的质粒对HEK293T进行瞬时转染来产生:(1)重组EIAV载体基因组(pONYK1-ORT)、(2)合成的EIAV gag/pol表达载体(pESGPK)、(3)VSV-G包膜表达载体(pHGK)。反转录病毒载体制剂可通过直接注射到大脑的纹状体中来给予。

[0255] 在另一个实施方案中,本发明方法生产的反转录病毒载体制剂可用作这样的基因治疗产品,该产品设计成能将矫正性MYO7A基因引入到感光细胞和支撑性的视网膜色素上皮(RPE)细胞,从而减弱或逆转与Usher 1B综合征相关的视力退化。反转录病毒载体是衍自马传染性贫血病毒(EIAV)的非复制型、自身失活型最小限度慢病毒载体,该病毒可用VSV-G或另选的病毒包膜蛋白进行假型包装。反转录病毒载体所携带的基因是编码MYO7A蛋白的MYO7A cDNA(长度超过10mb的大基因)。大的MYO7A蛋白的表达可通过使用新型的CMV/MYO7A嵌合启动子来优化以靶向RPE和感光细胞,该启动子能防止这个肌球蛋白亚型的过量表达。但是,还可能可以使用另选的启动子如CMV。反转录病毒载体制剂可通过在眼睛的玻璃体切除术后进行直接视网膜下注射来给予。

[0256] 在另一个实施方案中,本发明方法生产的反转录病毒载体制剂可用于将矫正性ATP结合框基因ABCA4(也称ABCR)引入到感光细胞,从而减弱或逆转会导致Stargardt病的病理生理。反转录病毒载体是衍自马传染性贫血病毒(EIAV)的非复制型、自身失活型最小限度慢病毒载体,该病毒可用VSV-G或另选的病毒包膜蛋白进行假型包装。反转录病毒载体所携带的该基因是编码ABCA4蛋白的ABCA4 cDNA。可通过使用感光细胞特异性启动子如视紫红质激酶来优化ABCA4蛋白的表达,以在视杆细胞和视锥细胞中都表达,但是还可能可以使用另选的启动子,如CMV。反转录病毒载体制剂可通过在眼睛的玻璃体切除术后进行直接视网膜下注射来给予。

[0257] 在另一个实施方案中,本发明方法生产的反转录病毒载体制剂可用作这样的基因治疗产品,该产品设计成能防止湿型年龄相关性黄斑变性(AMD)患者眼睛中的水肿中的异常血管生长的复发。这个反转录病毒载体可递送(一个或多个)编码(一个或多个)抗血管发生蛋白如血管生长抑素和/或内皮生长抑素的基因。反转录病毒载体是衍自马传染性贫血病毒(EIAV)的非复制型、自身失活型最小限度慢病毒载体,该病毒可用VSV-G或另选的病毒包膜蛋白进行假型包装。在一个实施方案中,反转录病毒载体以双顺反子构型表达人内皮生长抑素基因和血管生长抑素基因,利用内部核糖体进入位点(IRES)以递送到视网膜色素上皮细胞。可通过使用RPE特异性启动子,如卵黄样黄斑萎缩2(VMD2)启动子(更近期称为斑萎缩蛋白启动子),使抗血管发生基因的表达局限于目标视网膜色素上皮,但是还可能可以使用另选的启动子如CMV。反转录病毒载体制剂可通过在眼睛的玻璃体切除术后进行直接视

网膜下注射来给予。

[0258] 在又一个实施方案中,本发明方法生产的反转录病毒载体制剂可用作这样的基因治疗产品,该产品设计成能通过在角膜移植之前将抗血管发生基因递送到供体角膜来防止新血管形成所导致的角膜移植排斥。反转录病毒载体是源自马传染性贫血病毒(EIAV)的非复制型、自身失活型最小限度慢病毒载体,该病毒可用VSV-G或另选的病毒包膜蛋白进行假型包装。在一个实施方案中,反转录病毒载体将以双顺反子构型表达抗血管发生基因如人内皮生长抑素基因和血管生长抑素基因,利用内部核糖体进入位点(IRES)以离体递送到角膜移植物。反转录病毒载体制剂可离体应用于角膜移植组织,且被转导的供体组织在移植之前还可保存。抗血管发生基因的表达可由组成型启动子如CMV启动子驱动,但是还可能可以使用另选的启动子。

## 实施例

[0259] 现结合实施例通过非限制性例子描述本发明的各个优选特征和实施方案。

### [0260] 生产工艺的说明

[0261] ProSavin®是一种慢病毒载体,设计成能通过递送三个编码多巴胺生物合成途径的三个酶的基因来治疗帕金森病。

[0262] ProSavin®载体活性物质由自身灭活型最低限度慢病毒载体组成,该载体源自马传染性贫血病毒(EIAV)并用VSV-G进行假型包装,编码参与多巴胺合成途径的三个酶。

[0263] ProSavin®载体所编码的蛋白质是截短形式的人酪氨酸羟化酶(TH\*)基因(其缺乏参与TH的反馈调节的N末端160个氨基酸)、人芳族L-氨基酸脱羧酶(AADC)和人GTP-环化水解酶1(CH1)基因。ProSavin®载体通过用三个编码以下载体的质粒对HEK293T细胞进行瞬时转染来产生:(1)重组EIAV ProSavin®载体基因组(pONYK1-ORT)、(2)合成的EIAV gag/pol表达载体(pESGPK)、(3)VSV-G包膜表达载体(pHGK)。

[0264] 如图1所示,将HEK293T细胞在组织培养瓶中增殖成10层的“细胞工厂(cell factory)”。转染前的上清液体积大约为24升。将含有固定数量的质粒和Lipofectamine™ 2000试剂(Invitrogen,CA)CD或PEI的转染混合物转移到与“细胞工厂”连接的贮存器。将来自“细胞工厂”的培养基排到贮存器中,混合后将含有质粒的培养基返回“细胞工厂”。对所有“细胞工厂”重复这个过程。在转染后14-19小时,将培养基用补加有10mM丁酸钠的新鲜生长培养基替换。在丁酸钠诱导6-8小时后,将含有丁酸钠的培养基用没有丁酸钠的新鲜生长培养基替换。再过21-23小时后,将含有载体的上清液收获到无菌柔性袋中。

[0265] 收获含有载体的上清液后,从所有“细胞工厂”收集生产后的细胞的样品。对生产后的细胞测试可复制型慢病毒(RCL)(见下)。用1.2/0.45μm过滤器对含有载体的上清液进行过滤澄清,并加入Benzonase®核酸酶至5U/ml的终浓度以消化DNA(图1)。在2-8℃下温育过夜后,通过阴离子交换膜色谱,用氯化钠的分步洗脱梯度,纯化经Benzonase®核酸酶处理的载体。然后将含有载体的洗脱液流份浓缩,并通过中空纤维超滤/渗滤进一步纯化。在此过程中,载体被交换到制剂缓冲液以生产出大约400ml的各批药物物质,将其分成等份并在≤-70℃下冻存(图1)。

[0266] 将药物物质解冻、集中在一起并进行过滤除菌(0.2μm)。然后通过中空纤维超滤将过滤除菌过的批量(bulk)药物物质浓缩,以生产出图1所示的批量药物产品。

**[0267] ProSavin®载体制品的过滤除菌**

[0268] 为了测定各个批次当中的载体颗粒的数量和浓度,采用了用以定量载体制品当中的载体基因组RNA序列的实时反转录酶PCR测定(qRT-PCR)。这基于反转录病毒载体RNA包装的可预测性,在之前已有描述(Radcliffe等人.(2008) Gene Therapy 15:289-297)。一种EIAV制品即IH18在最终产品阶段具有 $5.6 \times 10^{12}$ 个RNA拷贝/ml的载体颗粒浓度。在此浓度下尝试滤过灭菌过滤组件,仅得到18.5%回收率(总RNA拷贝数在过滤前为 $3.93 \times 10^{13}$ 个拷贝,在过滤后为 $7.26 \times 10^{12}$ 个拷贝)。各种其他的制品也是得到了不良的过滤回收率。因此决定验证这样一个假设:在制造过程的较早期阶段进行过滤可从过滤过程得到较高的回收率,在该较早期阶段中由于总体浓缩较少,载体颗粒浓度较低。制造过程已包括了一个中间保持阶段,因此为方便起见将过滤研究集中在这个制造阶段。为验证较低浓度的载体会导致过滤除菌的回收率改进的这么一个假设,将来自颗粒浓度已知较低的较早期载体制品的材料进行过滤。这个批次即IH17最初没有加工到“最终产品”阶段,因为在离子交换阶段中已发生的损失,这导致在中间阶段RNA拷贝数低于预期; $5.5 \times 10^{10}$ 个拷贝/ml。这个材料的过滤导致回收率大大改进,达82.4%。随后用两个不同的批次即IH19和IH21,证实了较低浓度但较大体积的载体颗粒导致了灭菌过滤的回收率改进。对于IH19,在制造的中间保持阶段RNA拷贝数为 $1.2 \times 10^{12}$ 个拷贝/ml。将此稀释成 $4.6 \times 10^{11}$ 个拷贝/ml然后进行过滤,得到84.5%的载体颗粒回收率(总RNA拷贝数在过滤前为 $9.21 \times 10^{13}$ 个拷贝,在过滤后为 $7.80 \times 10^{13}$ 个拷贝)。后来通过有关载体质量的多种其他度量(包括载体强度测定)证明了这个批次的载体的制造是成功的。对于IH21,在制造的中间保持阶段RNA拷贝数为 $8.1 \times 10^{10}$ 个拷贝/ml。将此进行过滤,得到86.6%的载体颗粒回收率(总RNA拷贝数在过滤前为 $1.64 \times 10^{13}$ 个拷贝,在过滤后为 $1.42 \times 10^{13}$ 个拷贝)。通过有关载体质量的多种其他度量(包括载体强度测定)也证明了这个批次的载体的制造是成功的。

[0269] 从这些研究得出结论,即当载体浓度低于或等于 $4.6 \times 10^{11}$ 拷贝/ml时,实现了高回收率地过滤EIAV颗粒。

[0270] 以上说明书中提及的所有出版物都通过引用并入本文。对本领域技术人员显而易见的是,可在不背离本发明的范围和精神的情况下,对所描述的本发明方法和系统作出各种修改和变化。虽然已结合了具体优选的实施方案描述了本发明,但应理解,所要求保护的本发明不应不当地限于这些具体实施方案。事实上,对于分子生物学领域或相关领域技术人员而言显而易见的本文所述本发明实施方式的各种修改方案,都旨在落入以下权利要求书的范围内。

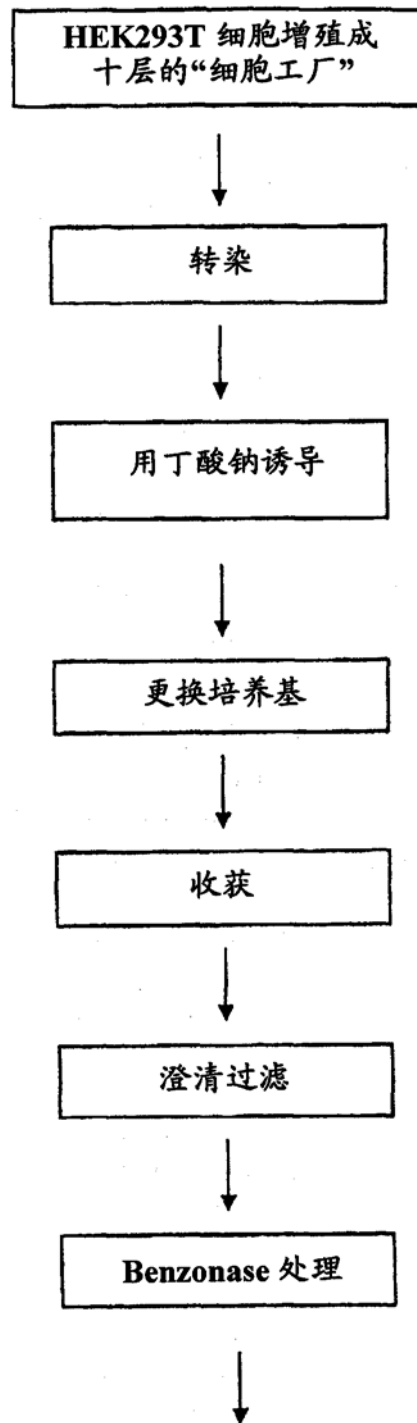


图1

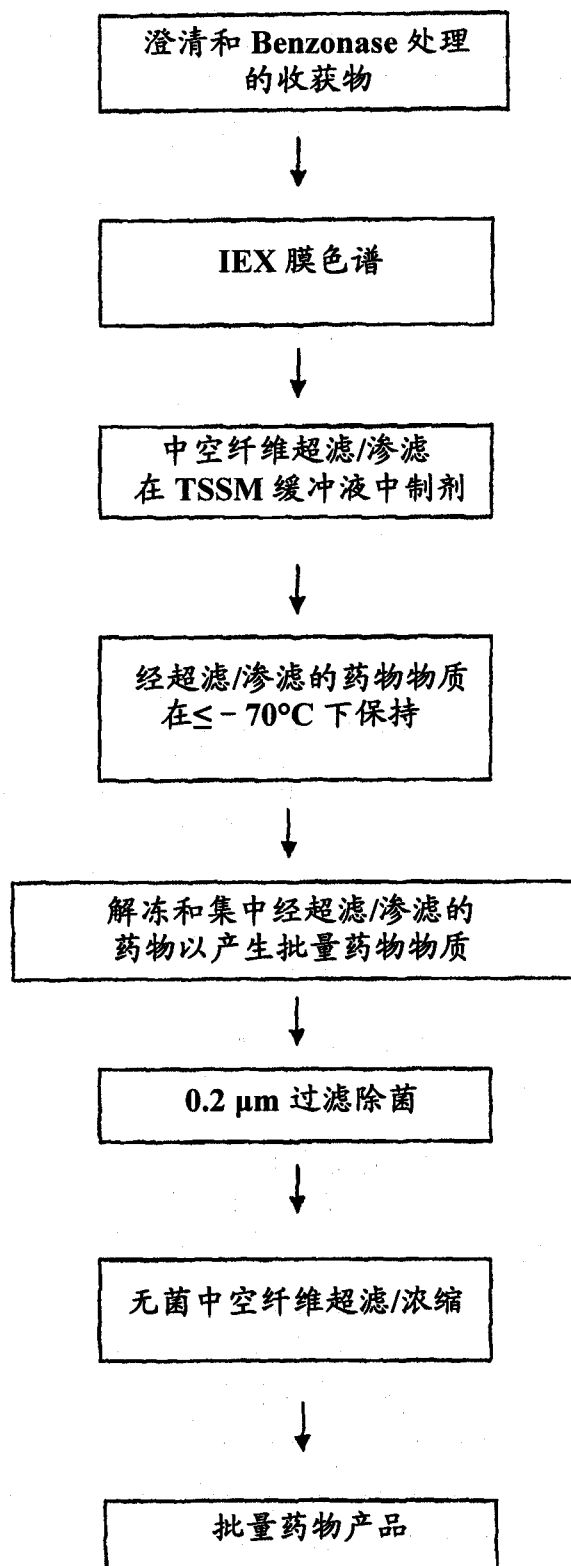


图1 (续)