

[19]中华人民共和国专利局

[51]Int.Cl⁶

C12N 15/85

C12N 15/90



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 96197732.9

[43]公开日 1998 年 11 月 25 日

[11] 公开号 CN 1200149A

[22]申请日 96.8.27

[30]优先权

[32]95.9.1 [33]US[31]08 / 522,684

[86]国际申请 PCT / US96 / 14123 96.8.27

[87]国际公布 WO97 / 09439 英 97.3.13

[85]进入国家阶段日期 98.5.4

[71]申请人 金维克有限公司

地址 美国马里兰州

[72]发明人 D · L · 麦维

I · 科维斯迪

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 齐曾度

权利要求书 16 页 说明书 55 页 附图页数 15 页

[54]发明名称 用于位点特异性重组的方法和载体

[57]摘要

本发明提供用于细胞内位点特异性重组的方法以及用于这类方法的载体。本发明的方法和载体可以用来获得细胞内持久的基因表达和用来调节基因表达。按照本发明的一种推荐方法包括将细胞与一种载体接触,该载体包含一个在哺乳动物中有功能的复制起点,后者位于平行定位的第一重组位点和第二重组位点之间。另一种推荐的方法,部分包括将细胞与一种包含反向定向的第一重组位点和第二重组位点的载体接触,使得该载体被该细胞内在化。在两种方法中,还提供给该细胞一种位点特异性重组酶,后者在该载体的第一重组位点和第二重组位点之间实现重组。

权 利 要 求 书

1. 在真核细胞中实现位点特异性重组的方法, 包括:

5 (a) 将所述细胞与一种载体接触, 后者包含一个在哺乳动物细胞中起作用的位于平行设置的第一重组位点和第二重组位点之间的复制起点, 使得所述载体被所述细胞内在化, 以及

(b) 为所述细胞提供在所述载体的所述第一重组位点和第二重组位点之间实现重组的位点特异性重组酶。

2. 权利要求 1 的方法, 其中所述载体还包含一个编码序列。

10 3. 权利要求 2 的方法, 其中:

(a) 所述编码序列位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中, 并邻接所述第一重组位点, 使得所述编码序列的定向使其转录方向为从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点,

15 (b) 所述编码序列不操作性地连接任何启动子, 以及

(c) 一个启动子位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中, 并邻接所述第二重组位点, 使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点。

20 4. 权利要求 2 的方法, 其中:

(a) 一个启动子位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中, 并邻接所述第二重组位点, 使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点, 以及

25 (b) 所述编码序列位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以外的一个区域中, 并邻接所述第二重组位点, 使得所述编码序列操作性地连接所述启动子。

5. 权利要求 3 的方法，其中所述载体还包含一个第二编码序列，后者位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以外的一个区域中，并邻接所述第二重组位点，所述编码序列操作性地连接所述启动子。

5 6. 权利要求 5 的方法，其中所述载体还包含：

(a) 一个剪接受体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述原点区域中的所述第一重组位点和第二重组位点之间，

10 (b) 一个剪接供体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述原点区域中的所述启动子和所述第二重组位点之间，以及

(c) 一个剪接受体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间包含所述原点区域以外的一个区域中的所述第二重组位点和所述第二编码序列之间。

15 7. 权利要求 1 的方法，其中所述载体还包含：

(a) 一个启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以外的一个区中，并邻接第一重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从所述启动子通过所述第一重组位点进行至所述第二重组位点，以及

20 (b) 一个编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以外的一个区中，并邻接所述第二重组位点。

8. 权利要求 7 的方法，其中所述载体还包含一个第二编码序列，后者位于所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述原点区域中，并邻接所述第一重组位点，使得所述第二编码序列的定向使其转录方向为从所述第一重组位点通过所述第二编码序列进行至所述第二重组位点。

25

9. 权利要求 7 的方法，其中所述载体还包含：

(a) 一个第二编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并包

含所述原点的区域中，并邻接所述第二重组位点，使得所述第二编码序列的定向使其转录方向与从所述第一重组位点通过所述第二编码序列进行至所述第二重组位点的方向相反，而且其中所述第二编码序列不操作性地连接任何启动子，以及

5 (b) 一个第二启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中，并邻接所述第一重组位点，使得所述第二启动子的定向使其指导的转录方向与从所述第一重组位点通过所述第二启动子进行至所述第二重组位点的方向相反。

10 10. 权利要求 9 的方法，其中所述载体还包含一个第三编码序列，后者：

(a) 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以外一个区域中，并且在所述启动子和所述第一重组位点之间，

15 (b) 邻接所述第一重组位点，使得所述第三编码序列的定向使其转录方向与从所述第一重组位点通过所述第二启动子进行至所述第二重组位点的方向相反，以及

(c) 操作性地连接所述第二启动子。

11. 实现细胞内位点特异性重组的方法，包括：

(a) 将所述细胞与一种载体接触，使得所述载体被所述细胞内在化，其中所述载体包含：

20 (i) 一个启动子，位于反向定向的第一和第二重组位点之间并邻接所述第二重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点，以及

25 (ii) 一个编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域之外的一个区域中，并邻接所述第一重组位点，使得所述编码序列的定向使其转录方向与从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点的方向相反，其中所述编码序列不操作性地连接任何启动子；以及

(b) 提供给所述细胞一个位点特异性重组酶，后者在所述载体的所述第一和第二重组位点之间实现重组。

12. 权利要求 11 的方法，其中所述载体还包含一个第二编码序列，后者位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域以外的一个区域中，并邻接所述第二重组位点，所述第二编码序列操作性地连接所述启动子。

13. 实现细胞内位点特异性重组的方法，包括：

(a) 将所述细胞与一种载体接触，使得所述载体被所述细胞内化，其中所述载体包含：

10 (i) 一个启动子，位于反向定向的第一和第二重组位点之间并邻接所述第二重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点，以及

15 (ii) 一个编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域之外的一个区中，邻接所述第二重组位点，使得所述编码序列操作性地连接所述启动子；以及

(b) 提供给所述细胞一个位点特异性重组酶，后者在所述载体的所述第一和第二重组位点之间实现重组。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述载体还包含：

20 (a) 一个剪接受体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述启动子区域以外的一个区域中的所述第一重组位点和所述编码序列之间，

25 (b) 一个剪接供体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域中的所述启动子和所述第二重组位点之间，以及

(c) 一个剪接受体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间包含所述原点区域以外的一个区域中的所述第二重组位点和所述第二编码序列之间。

15. 实现细胞内位点特异性重组的方法，包括：

(a) 将所述细胞与一种载体接触，使得所述载体被所述细胞内在化，其中所述载体包含：

(i) 一个编码序列，位于反向定向的第一和第二重组位点之间并邻接所述第二重组位点，使得所述编码序列的定向使其转录方向与从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点的反向相反，其中所述编码序列不操作性地连接任何启动子，以及

(ii) 一个启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域之外的一个区中，邻接所述第一重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点；以及

(b) 提供给所述细胞一个位点特异性重组酶，后者在所述载体的所述第一和第二重组位点之间实现重组。

16. 权利要求 15 的方法，其中所述载体还包含一个第二编码序列，后者位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域中，并邻接所述第一重组位点，所述第二编码序列操作性地连接所述启动子。

17. 实现细胞内位点特异性重组的方法，包括：

(a) 将所述细胞与一种载体接触，使得所述载体被所述细胞内在化，其中所述载体包含：

(i) 一个编码序列，位于反向定向的第一和第二重组位点之间并邻接所述第一重组位点，使得所述编码序列的定向使其转录方向为从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点，以及

(ii) 邻接所述第一重组位点的一个启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域之外的一个区域中，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重

组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点，其中所述编码序列操作性地连接所述启动子；

(b) 提供给所述细胞一个位点特异性重组酶，后者在所述载体的所述第一和第二重组位点之间实现重组。

5 18. 将 Rep 蛋白提供给细胞的方法，包括：

(a) 将所述细胞与一种载体接触，使得所述载体被所述细胞内在化，所述载体包含位于平行定位的第一和第二重组位点之间的一个 Rep 编码序列，

10 (b) 提供给所述细胞一个位点特异性重组酶，后者在所述载体的所述第一和第二重组位点之间实现重组。

19. 权利要求 18 的方法，其中：

(a) 所述载体还包含一个邻接所述第一重组位点的编码序列，使得所述编码序列的定向使其转录方向为从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点，

15 (b) 所述编码序列不操作性地连接任何启动子，以及

(c) 一个启动子位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中，并邻接所述第二重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点。

20 20. 在真核细胞中实现位点特异性重组的方法，包括：

(a) 将所述细胞与一个包含平行的第一和第二重组位点的载体接触，使得所述载体被所述细胞内在化，以及

(b) 提供给所述细胞一个位点特异性重组酶，后者在所述载体的所述第一和第二重组位点之间实现重组。

25 21. 权利要求 20 的方法，其中所述载体还包含：

(a) 一个邻接所述第一重组位点的启动子，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从所述启动子通过所述第一重组位点进行至所述第二重组位点，以及

(b) 一个邻接所述第二重组位点的编码序列。

22. 权利要求 21 的方法，其中所述载体还包含一个邻接所述第一重组位点的第二编码序列，使得第二编码序列的定向使其转录方向为从所述第一重组位点通过所述第二编码序列进行至所述第二重组位点。

23. 权利要求 21 的方法，其中所述载体还包含：

(a) 一个第二编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间的区域中，并邻接所述第二重组位点，使得所述第二编码序列的定向使其转录方向与从所述第一重组位点通过所述第二编码序列进行至所述第二重组位点的方向相反，其中所述第二编码序列不操作性地连接任何启动子，以及

(b) 一个第二启动子，位于所述第一和第二重组位点之间区域中，并邻接所述第一重组位点，使得所述第二启动子的定向使其指导的转录方向与从所述第一重组位点通过所述第二启动子进行至所述第二重组位点的方向相反。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述载体还包含一个第三编码序列，后者：

(a) 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述第二启动子和第二编码序列的区域以外一个区域中，并且在所述启动子和所述第一重组位点之间，

(b) 邻接所述第一重组位点，使得所述第三编码序列的定向使其转录方向与从所述第一重组位点通过所述第二启动子进行至所述第二重组位点的方向相反，以及

(c) 操作性地连接所述第二启动子。

25. 一种载体，包含：

(a) 平行定位的第一和第二重组位点，

(b) 位于所述第一和第二重组位点之间的一个复制起点，

(c) 一个编码序列，在所述第一和第二重组位点之间并包含所述

原点的区域中，并邻接所述第一重组位点，使得所述编码序列的定向使其转录方向为从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点，所述编码序列不操作性地连接任何启动子，以及

5 (d) 一个启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中，并邻接所述第二重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点。

26. 权利要求 25 的载体，其中所述载体还包含一个第二编码序列，后者位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以
10 外的一个区域中，并邻接所述第二重组位点，所述编码序列操作性地连接所述启动子。

27. 权利要求 26 的载体，它还包含：

(a) 一个剪接受体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中的所述第一重组位点和所述编码序列之
15 间，

(b) 一个剪接供体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述原点区域中的所述启动子和所述第二重组位点之间，以及

(c) 一个剪接受体位点，位于所述第一重组位点和第二重组位点之间包含所述原点区域以外的一个区域中的所述第二重组位点和所述
20 第二编码序列之间。

28. 一种载体，包含：

(a) 平行定位的第一和第二重组位点，

(b) 位于所述第一和第二重组位点之间的一个复制起点，

25 (c) 一个启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中，并邻接所述第二重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点，以及

(d) 一个编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以外的一个区域中，并邻接所述第二重组位点，使得所述编码序列操作性地连接所述启动子。

29. 一种载体，包含：

- 5 (a) 平行定位的第一和第二重组位点，
- (b) 一个或多个邻接所述第一或第二重组位点的启动子，
- (c) 一个或多个邻接所述第一和第二重组位点的编码序列。

30. 一种载体，包含：

- (a) 平行定位的第一和第二重组位点，
- 10 (b) 一个在哺乳动物细胞中起作用的并位于所述第一或第二重组位点之间的原点。

31. 权利要求 30 的载体，其中所述载体还包含一个或多个邻接所述第一或第二重组位点的启动子。

15 32. 权利要求 30 的载体，其中所述载体还包含一个或多个邻接所述第一或第二重组位点的编码序列。

33. 一种载体，包含：

- (a) 反向定位的第一和第二重组位点，
- (b) 一个启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并邻接所述第二重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点，
- 20 (c) 一个编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域以外的区域中，并邻接所述第一重组位点，使得所述编码序列的定向使其转录方向与从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点的方向相反，其中所述编码序列不操作性地

25 连接任何启动子。

34. 权利要求 33 的载体，它还包含一个第二编码序列，后者位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域以外的一个区域中，并邻接所述第二重组位点，所述第二编码序列操作性地连接所

述启动子。

35. 权利要求 34 的载体，其中所述载体还包含：

(a) 一个剪接受体位点，在所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域以外的一个区域中，位于所述第一重组位点和所述编码序列之间，

(b) 一个剪接供体位点，在所述第一重组位点和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域中，位于所述启动子和所述第二重组位点之间，以及

(c) 一个剪接受体位点，在所述第一重组位点和第二重组位点之间包含所述启动子区域以外的一个区域中，位于所述第二重组位点和所述第二编码序列之间。

36. 一种载体，包含：

(a) 反向定位的第一和第二重组位点，

(b) 一个启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并邻接所述第二重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述启动子进行至所述第二重组位点，以及

(c) 一个编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域以外的区域中，并邻接所述第二重组位点，使得所述编码序列操作性地连接所述启动子。

37. 一种载体，包含：

(a) 反向定位的第一和第二重组位点，

(b) 一个编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并邻接所述第二重组位点，使得所述编码序列的定向使其转录方向与从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点的方向相反，其中所述编码序列不操作性地连接任何启动子，以及

(c) 一个启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域以外的一个区域中，并邻接所述第一重组位点，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所

述编码序列进行至所述第二重组位点。

38. 权利要求 37 的载体，它还包含一个第二编码序列，后者位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域中，并邻接所述第一重组位点，所述第二编码序列操作性地连接所述启动子。

5 39. 一种载体，包含：

(a) 反向定位的第一和第二重组位点，

(b) 一个编码序列，位于所述第一和第二重组位点之间并邻接所述第一重组位点，使得所述编码序列的定向使其转录方向为从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点，以及

10 (c) 一个邻接所述第一重组位点的启动子，位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域以外的一个区域中，使得所述启动子的定向使其指导的转录方向为从所述第一重组位点通过所述编码序列进行至所述第二重组位点，其中所述编码序列操作性地连接所述启动子。

15 40. 权利要求 1-24 的方法，其中所述重组酶包括 Cre。

41. 权利要求 1-24 的方法，其中所述第一和第二重组位点包括 Lox 位点。

42. 权利要求 1-24 的方法，其中所述载体还包含一个过客基因。

20 43. 权利要求 42 的方法，其中所述过客基因选自 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和 E2 编码序列。

44. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中所述原点来自多瘤病毒。

45. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中所述原点来自乳突瘤病毒。

25 46. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中所述原点来自爱玻斯坦-巴尔病毒。

47. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中所述原点包括 oriP 原点。

48. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中所述方法包括提供给所述细胞顺式或反式的细胞复制蛋白。

49. 权利要求 48 的方法，其中所述细胞复制蛋白选自 EBNA-1、大 T 抗原、E1 和/或 E2 蛋白。

5 50. 权利要求 1-10 中任一项的方法，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

51. 权利要求 11-14 中任一项的方法，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

10 52. 权利要求 15-19 中任一项的方法，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

53. 权利要求 20-21 中任一项的方法，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

54. 权利要求 22-24 中任一项的方法，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

15 55. 权利要求 50 的方法，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域中。

56. 权利要求 51 的方法，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域中。

20 57. 权利要求 52 的方法，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域中。

58. 权利要求 54 的方法，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述第二编码序列的区域中。

59. 权利要求 50 的方法，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以外的一个区域中。

25 60. 权利要求 51 的方法，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域以外的一个区域中。

61. 权利要求 52 的方法，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域以外的一个区域中。

62. 权利要求 54 的方法, 其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域以外的一个区域中。

63. 权利要求 2-19 和 21-24 中任一项的方法, 其中所述编码序列选自 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和 E2 编码序列。

5 64. 权利要求 5、6、8-10、13、14、16 和 22-24 中任一项的方法, 其中所述第二编码序列选自 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和 E2 编码序列。

65. 权利要求 10 或 24 中任一项的方法, 其中所述第三编码序列选自 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和 E2 编码序列。

10 66. 权利要求 2-19 和 21-24 中任一项的方法, 其中所述编码序列包括一个编码一个激素受体配体结合域的序列, 该结合域能够结合外源(但不是天然产生的)激素。

67. 权利要求 5、6、8-10、13、14、16 和 22-24 中任一项的方法, 其中所述第二编码序列包括一个编码一个激素受体配体结合域的序列, 该结合域能够结合外源(但不是天然产生的)激素。
15

68. 权利要求 10 或 24 中任一项的方法, 其中所述第三编码序列包括一个编码一个激素受体配体结合域的序列, 该结合域能够结合外源(但不是天然产生的)激素。

69. 权利要求 42 的方法, 其中所述过客基因包括一个编码一个激素受体配体结合域的序列, 该结合域能够结合外源(但不是天然产生的)激素。
20

70. 权利要求 2-19、21-24 和 66 中任一项的方法, 其中所述编码序列包含一个或多个编码甘氨酸-丙氨酸重复的序列。

71. 权利要求 5、6、8-10、13、14、16、22-24 和 67 中任一项的方法, 其中所述第二编码序列包含一个或多个编码甘氨酸-丙氨酸重复的序列。
25

72. 权利要求 10、24 和 68 中任一项的方法, 其中所述第三编码序列包含一个或多个编码甘氨酸-丙氨酸重复的序列。

73. 权利要求 42 或 69 的方法，其中所述过客基因包含一个或多个编码甘氨酸-丙氨酸重复的序列。

74. 权利要求 25-29 中任一项的载体，其中所述第一和第二重组位点包括 Lox 位点。

5 75. 权利要求 25-29 中任一项的载体，其中所述载体还包含一个过客基因。

76. 权利要求 75 的载体，其中所述过客基因选自 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和 E2 编码序列。

10 77. 权利要求 25-28 中任一项的载体，其中所述原点来自多瘤病毒。

78. 权利要求 25-28 中任一项的载体，其中所述原点来自乳突瘤病毒。

79. 权利要求 25-28 中任一项的载体，其中所述原点来自爱泼斯坦-巴尔病毒。

15 80. 权利要求 79 的载体，其中所述原点包括 oriP 原点。

81. 权利要求 29-31 中任一项的载体，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

82. 权利要求 25-28 和 32 中任一项的载体，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

20 83. 权利要求 33-36 中任一项的载体，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

84. 权利要求 37 或 39 的载体，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

25 85. 权利要求 38 的载体，其中所述载体还包含一个或多个腺病毒相关病毒的 ITR。

86. 权利要求 82 的载体，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点并包含所述原点的区域中。

87. 权利要求 83 的载体，其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一

和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域中。

88. 权利要求 84 的载体, 其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域中。

89. 权利要求 85 的载体, 其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域中。

90. 权利要求 82 的载体, 其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述原点的区域以外的一个区域中。

91. 权利要求 83 的载体, 其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述启动子的区域以外的一个区域中。

92. 权利要求 84 的载体, 其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述编码序列的区域以外的一个区域中。

93. 权利要求 85 的载体, 其中所述一个或多个 ITR 位于所述第一和第二重组位点之间并包含所述第二编码序列的区域以外的一个区域中。

94. 权利要求 25-29、31 和 33-39 中任一项的载体, 其中所述编码序列选自 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和 E2 编码序列。

95. 权利要求 26、27、34、35 和 38 中任一项的载体, 其中所述第二编码序列选自 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和 E2 编码序列。

96. 权利要求 25-29、31 和 33-39 中任一项的载体, 其中所述编码序列包括一个编码一个激素受体配体结合域的序列, 该结合域能够结合外源(但不是天然产生的)激素。

97. 权利要求 26、27、34、35 和 38 中任一项的载体, 其中所述第二编码序列包括一个编码一个激素受体配体结合域的序列, 该结合域能够结合外源(但不是天然产生的)激素。

98. 权利要求 75 的载体, 其中所述过客基因包括一个编码一个激素受体配体结合域的序列, 该结合域能够结合外源(但不是天然产生的)

激素。

99. 权利要求 25-29、 31、 33-39 和 96 中任一项的载体, 其中所述编码序列包含一个或多个编码甘氨酸-丙氨酸重复的序列。

5 100. 权利要求 26、 27、 34、 35、 38 和 97 中任一项的载体, 其中所述第二编码序列包含一个或多个编码甘氨酸-丙氨酸重复的序列。

101. 权利要求 75 或 98 的载体, 其中所述过客基因包含一个或多个编码甘氨酸-丙氨酸重复的序列。

说明书

用于位点特异性重组的方法和载体

发明技术领域

本发明涉及用于细胞内位点特异性重组的方法以及可以用于这类方法的载体。本发明的方法和载体可以用来获得细胞内持续的基因表达并调节基因的表达。

发明背景

过去几年已经宣布，在基因治疗新途径的可用性和看来潜在地适合于用所谓“治疗基因”治疗的疾病数将迅速增加。一般来说，治疗基因是在给定疾病或综合症中，更正或补偿加下划线蛋白缺陷的基因，或者是能够调节下游一个特殊基因或抵消其编码产物负作用的基因。此外，治疗基因可以是例如在癌的治疗中介导细胞杀伤的基因。采用基因治疗，治疗结果成功的关键在于治疗基因的适当表达及其在宿主中潜在的长期稳定性。尽管通常采用的本领域技术人员众所周知的各种克隆策略可以有效地控制表达，但已经证明稳定性(即基因在宿主细胞中的长期表达)更难以捉摸。

关于获得较长时间基因表达的一般方法，研究人员使用证明在宿主中有耐久性的载体作为治疗基因转移的一种载体。使用整合到宿主基因组的载体，使稳定性最大，便于同时整合该载体携带的治疗基因。根据这些方法，在其部分生活周期整合到宿主基因组中的逆转录病毒证明是有用的工具。然而，逆转录病毒的使用不是没有其伴随的问题。例如，逆转录病毒载体的稳定整合限于活跃合成 DNA 的靶细胞；由于该载体的大小相对小，因此其携带容量有限；该载体表现出缺乏组织

向性；以及当全身性给予时，这一载体容易被抗体失活。由于使用逆转录病毒伴随的这些和其它缺点，许多研究人员已经转向作为基因治疗另一选择载体的腺病毒(Ad)(参见例如 Rosenfeld 等, Science, 252, 431-434 (1991); Rosendeld 等, Cell, 68, 143-155 (1992))。

5 Ad 为无包膜规则二十面体，直径为 65-80 纳米，它由外部衣壳和内部核心组成(Ginsberg (ed.)腺病毒, Plenum Press, NY (1984))。Ad 核心含有一个线性双链 DNA 分子。已经广泛地研究了两种人血清型腺病毒，即 Ad2 和 Ad5，并提供了可获得的 Ad 的大多数资料。这种资料以及 Ad 的各种有用性质(除其它性质外，采用互补细胞系容易大量制
10 备和生产复制缺陷型重组病毒，Ad 能够感染几乎所有的细胞类型，包括最终分化的细胞或非多育细胞，恶性肿瘤与 Ad 感染无关)已经使得研究人员能够研究作为体内和体外有效基因传递载体的 Ad(参见例如 Rosenfeld 等, (1991), 见上述；Rosenfeld 等, (1992), 见上述；Engelhardt 等, Hum. Gene Ther., 4, 79-769 (1993); Crystal 等, Nat. Genet.,
15 8, 42-51 (1994); Lemarchand 等, Circ. Res., 72, 1132-1138 (1993); Guzman 等, Circ. Res., 73, 1202-1207 (1993); Bajocchi 等, Nat. Genet., 3, 229-234 (1993); Mastrangeli 等, J. Clin. Invest, 91, 225-234 (1993))。

 尽管 Ad 载体有这些优点，但采用 Ad 作为基因转移载体尚未令人满意地得到给予的治疗基因的长期表达。第一代 Ad 载体缺失该病毒
20 基本的 E1 区(Rosenfeld 等, (1992), 见上述；Boucher 等, Hum. Gene Ther., 5, 615-39 (1994))。在啮齿动物模式系统中来自这些病毒载体的转基因产物在回到背景水平前，可在大约 2 周在内检测到。相比之下，在免疫抑制的小鼠中，在感染后可以检测到基因表达的时间大大增加，表达水平也大幅增加(Yang 等, J. Virol., 69, 2004-15 (1995); Yang 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 10, 4407-11 (1994))。这些数据表明，免疫监视是造成
25 第一代 Ad 载体表现相对差的原因。此外，要在细胞内维持的 Ad 不能整合到宿主基因组中意味着，表达该载体编码的治疗基因的细胞最终将从细胞中消失。

因此, 许多研究 Ad 的研究人员已经寻找了可供选择的稳定重组载体的方法, 以便可以获得长期的基因表达。一个在其它系统证明有效的这类方法是以附加体形式在该宿主中保持该转移基因完整的方法。附加体是一种独立于宿主染色体外进行复制的染色体外遗传因子。为此, 研究人员已经利用爱坡斯坦-巴尔疱疹病毒(EBV)在潜伏状态下形成附加体的能力作为由各种双链 DNA 模板产生附加体的手段。

EBV 是引起传染性单核细胞增多症的一种人嗜淋巴疱疹病毒, 至少与两种人类癌症有关(Reisman 等, Molec. Cell Biol., 5, 1822-1832 (1985))。EBV 含有两个复制起点: oriLyt 和 oriP。潜伏期间, EBV 以闭环双链 DNA 分子存在, 在其复制中使用 oriP, 并且每个细胞保持 10-200 个拷贝(Young 等, Gene, 62, 171-185 (1988))。含有 oriP 的质粒可以在也表达核抗原 EBNA-1 的细胞中保持(参见例如 Yates 等, Nature, 313, 812-815 (1985); Jalanko 等, Biochemica et Biophysica Acta, 949, 206-212 (1988); Kioussis 等, EMBO J., 6, 355-361 (1987); Jalanko 等, Arch. Virol., 103, 157-166 (1988); Sugden 等, J. Virol., 63, 2644-2649 (1989))。在 EBNA-1 存在时, oriP 允许质粒在多种哺乳动物细胞中复制, 且在培养时 EBV 不能感染这些细胞(Reisman 等, 见上述; Yates 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 81, 3806-3810 (1984))。oriP 原点含有其活性需要的两个顺式作用元件(在 Middleton 等, Advances in Virus Research, 40, 19-55 (1991)中进行了综述)。这些元件被 1,000 碱基对(bp)分离, 两个元件都由多个简并拷贝组成, 该拷贝为 30 bp 区段。称为重复家族或 FR 的第一个元件含有 20 个串联的 30 bp 重复。第二个元件由包含 65 bp 二重对称元件或 DS 的 114 bp 区段组成。

诱变研究揭示, oriP 的两个区域以与定向和距离无关的方式相互面对面起作用(Middleton 等, 见上述)。间插间隔区的缺失或在该区插入大于 1,000 bp 的片段不影响 oriP 的功能。已知 FR 元件具有增强子的功能, 但它在复制中的作用仍是未知的。此外, 包含 FR 的 20 个串

联重复可以由多拷贝 DS 取代。在 FR 增强子中发现的 20 个串联重复少至 8 个，在两个增强子活性和质粒复制的短期分析中是足够的。

EBNA-1 结合到存在于 oriP 的两个元件中的 30 bp 重复上。在 EBV 细胞周期的 S 期期间，每个周期在 DS 附近发生一次的 DNA 复制的起始需要 EBNA-1 蛋白(Middleton 等，见上述)。甘氨酸-丙氨酸重复序列约占该蛋白的 1/3，该蛋白羧基末端的一个小区是质粒复制非必需的(Yates 等，(1985)，见上述；Lupton 等，Mol. Cell Biol., 5, 2533-2542 (1985))。然而，该序列组织阻止免疫系统检测到 EBNA-1，因此大概是 EBV 和 EBV 衍生载体的稳定所必需的(Levitskaya 等，Nature, 375, 685-688 (1995))。

由于在子细胞之间分配新合成的附加体可能至少有一些错误，并且由于对染色体外遗传因子的普遍负选择压力，因此用 EBV 获得的附加体的稳定性潜在地限制治疗基因的长期稳定性和表达。该附加体整合到该基因组的无害座位即转移基因的安全庇护所中，将消除这种稳定性的潜在丧失。根据这些方法，腺病毒相关病毒(AAV)表明具有高频整合到人染色体 19q13.3-qter 的独特能力(Kotin 等，Human Gene Therapy, 5, 793-801 (1994))。AAV 整合到限定的良性基因组位点的这种能力消除了由伴随 DNA 随机插入而引起的不慎基因激活或失活所造成的插入诱变风险(Shelling 等，Gene Therapy, 165-169 (1994))。

根据 AAV 的一般特征，它是一种人细小病毒，可以作为整合的前病毒繁殖，或者通过裂解性感染繁殖(Muzyczka, Current Topics in Microbiol. and Immunol., 158, 97-129 (1992))，它已经用作真核细胞的载体(参见例如美国专利 4,797,368 和 5,173,414；Tratschin 等，Mol. Cell Biol., 4, 2072-2081 (1984)；GenBank 资料库登记号 J01901 或 AA2C)。AAV 感染的裂解期需要表达 Ad 早期基因产物 E1a、E1b、E2a、E4 和 VA RNA(Kotin 等，见上述)。在缺乏辅助病毒的情况下感染 AAV，产生潜伏感染。在这些情况下，AAV 有效地整合到细胞基因组中，并以该状态保持，除非用 Ad 攻击。

将外源基因定点整合到人基因组中只需要两个 AAV 组分: Rep 蛋白和 AAV 反向末端重复(ITR)。四种 Rep 蛋白的每种由同一基因编码, 并且通过新生 mRNA 的选择剪接产生(Kyöstiö 等, J. Virol., 68, 2947-2957 (1994))。两个较大的 Rep 蛋白 Rep78 和 Rep68 结合 AAV 的 ITR, 象依赖于 ATP 的序列特异性内切核酸酶那样起作用, 并具有在 AAV DNA 复制期间使 ITR 区域解旋的螺旋酶活性(Hölscher 等, J. Virol., 68, 7169-7177 (1994))。较小的 Rep 蛋白 Rep52 和 Rep40 看来对用于包装该病毒的单链子代基因组的累积是必需的。

AAV ITR 位于该基因组的两端。当病毒 ITR 为单链时, 它们形成 T 形发夹结构(Snyder 等, J. Virol., 67, 6096-6104 (1993))。也发现复制起点、包装、整合和切除信号位于该病毒的 ITR 区域内。Rep 蛋白与 AAV ITR 的结合与该区域在依赖于 ITR 的复制和座位指导的整合中的基本作用相符。缺乏 Rep 蛋白时, 不发生复制, 在基因组中的整合看来是随机事件(Kotin 等, 见上述)。ITR 可以或者以其天然状态起作用, 或者象双链 DNA 一样克隆到一个质粒中。适当地应用 Rep 蛋白(例如通过反式存在的编码序列提供 Rep 蛋白)时, 在 ITR 之间整合的外源序列可以从质粒上切除、复制并整合到宿主细胞基因组中。

实现产生附加体的 EBV 策略、或稳定附加体或通过整合到宿主细胞基因组中稳定附加体携带的序列的 AAV 策略, 需要在每个系统中紧密调节相关调节蛋白(例如用于 EBV 的 EBNA-1 和用于 AAV 的 Rep 蛋白)。研究人员已经用来得到基因表达紧密调节的一种方法是通过定点重组事件控制一个基因或遗传序列的表达。通过很好研究、允许实现位点特异性重组并已经用于多种应用的两个系统是噬菌体 P1 的 Cre/Lox 系统和酵母的 Flp/Frt 系统。

Cre 蛋白和 Flp 蛋白属于 DNA 重组酶的 λ 整合酶家族(在 Kilby 等, TIG, 9, 413-421 (1993); Landy, Current Opinion in Genetics and Development, 3, 699-707 (1993); Argos 等, EMBO J., 5, 433-440 (1986) 中进行了综述)。Cre 和 Flp 重组酶在它们进行的反应类型上和在它们

的重组靶位点结构和重组机制方面都显示出惊人的相似性(参见例如 Jayaram, TIBS, 19, 78-82 (1994); Lee 等, J. Biolog. Chem., 270, 4042-4052 (1995); Whang 等, Molec. Cell Biolog., 14, 7492-7498 (1994); Lee 等, EMBO J., 5, 5346-5354 (1994); Abremski 等, J. Mol. Biol., 192, 17-26 (1986); Adams 等, J. Mol. Biol., 226, 661-673 (1992))。例如, 重组事件与复制和外源能源(诸如 ATP)无关, 在超螺旋 DNA 模板和线性 DNA 模板上都起作用。

Cre 和 Flp 重组酶通过分别促进它们的两个靶重组位点 Lox 和 Frt 之间的重组而施加其影响, 两个靶位点由一对不对称序列分隔的反向回文结构组成(参见例如 Mack 等, Nucleic Acids Research, 20, 4451-4455 (1992); Hoess 等, Nucleic Acids Research, 14, 2287-2300 (1986); Kilby 等, 见上述)。不对称性提供重组事件的方向性。即在同一线性 DNA 分子上平行布置的靶位点(即所谓的“直接重复”)之间的重组导致间插 DNA 序列作为环状分子而被切除(Kilby 等, 见上述)。在环状 DNA 分子上直接重复之间的重组切除间插 DNA, 产生两个环状分子。相比之下, 线性或环状 DNA 分子上的反向平行位点(即相反定向的位点或所谓的“反向重复序列”)之间的重组导致内部序列的倒位。即使这些靶存在于分开的线性分子上时, 重组酶的作用可以导致该靶位点末端区域的相互交换, 但与分子间重组相比, 更优选分子内重组。

Cre/Lox 和 Flp/Frt 重组系统都已经用于多种目的。例如, 已经报道了植物、昆虫、细菌、酵母和哺乳动物染色体中的位点特异性整合(参见例如 Sauer 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 85, 5166-5170 (1988); Fukushima 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 7905-7907 (1992); Baubonis 等, Nucleic Acids Research, 21, 2025-2029 (1993); Hasan 等, Gene, 150, 51-56 (1994); Golic 等, Cell, 59, 499-509 (1989); Sauer 等, Mol. Cell Biolog., 7, 2087-2096 (1987); Sauer 等, Methods: Companion to Methods in Enzymol., 4, 143-149 (1992); Sauer 等, The New Biologist, 2, 441-449 (1990); Sauer 等, Nucleic Acids Res., 17, 147-161 (1989); Qin 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 91,

1706-1710 (1994); Orban 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6861-6865 (1992)). 已经用这些系统装配了真核病毒载体, 并且回收了插入的 DNA(参见例如 Sauer 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 9108-9112 (1987); Gage 等, J. Virol., 66, 5509-5515 (1992); Holt 等, Gene, 133, 95-97 (1993); Peakman 等, Nucleic Acids Res., 20, 495-500 (1992)). 染色体序列的特异性缺失和重排也已工程化了, 将外源 DNA 作为质粒从 λ 载体上切除目前是可能的(参见例如 Barinaga 等, Science, 265, 27-28 (1994); Rossant 等, Nature Medicine, 1, 592-594 (1995); Sauer 等, Methods in Enzymol., 225, 890-900 (1993); Sauer 等, Gene, 70, 331-341 (1988); Brunelli 等, Yeast, 9, 1309-1318 (1993); InVitrogen (San Diego, CA) 1995 目录, 35; Clontech (Palo Alto, CA) 1995/1996 目录, 187-188)。已经产生了克隆流程, 使得通过重组位点之间序列的缺失或者倒位, 进行重建或失活一个功能转录单位(参见例如 Odell 等, Plant Physiol., 106, 447-458 (1994); Gu 等, Cell, 73, 1155-1164 (1993); Lakso 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6232-6236 (1992); Fiering 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 90, 8469-8473 (1993); O’Gorman 等, Science, 251, 1351-55 (1991); Jung 等, Science, 259, 984-987 (1993)). 同样地, 已经开发了选择和筛选重组体的积极策略和消极策略(参见例如 Sauer 等, J. Mol. Biol., 223, 911-928 (1992)). 已经提供了在组成型启动子、诱导型启动子或者发育调节启动子控制下的编码 Cre 或 Flp 重组酶的反式基因, 或者导入纯化的重组酶(参见例如 Baubonis 等, 见上述; Dang 等, Devolp. Genet., 13, 367-375 (1992); Chou 等, Genetics, 131, 643-653 (1992); Morris 等, Nucleic Acids Res., 19, 5895-5900 (1991)). 其中, 在转基因小鼠、植物和昆虫中使用重组系统或其组分揭示出, 宿主表达重组酶基因且没有出现明显的有害影响, 因此证实宿主一般能很好地耐受这些蛋白(参见例如 Orbin 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6861-6865 (1992)).

新近, 研究人员已经采用含有噬菌体 P1 Cre 基因的复制缺陷型 Ad 载体作为研究细胞内 Cre 介导的重组的一个工具(Anton 等, J. Virol.,

69, 4600-4606 (1995)). 在这些实验中, 将表达 Cre 的 Ad 载体与另一 Ad 载体一起供应给细胞, 其中侧翼为平行 Lox 位点的外源间隔序列将报道基因的编码序列与任一启动子分离。 Cre 介导的重组导致间隔序列的切除, 开启从前沉默的报道基因。 由于只要复制缺陷型 Ad 载体保持 5 在宿主细胞中, 由重组事件开启的该基因就能表达, 因此该方法看来只允许基因表达的正调节, 而不是稳定的基因表达。此外, 由于 Cre 继续在该宿主细胞内产生, 有可能在反向重组反应的同时关闭该报道基因, 并在获得的表达水平上加上一个上限(Anton 等, 见上述, 第 4605 页)。

10 因此, 仍需要一些可以更完全地实现 Ad 和其它基因治疗载体潜力的表达系统。本发明设法提供这类表达系统。具体地说, 本发明的一个目的是提供细胞内位点特异性重组的方法, 提供可以用于这类方法的载体, 以达到较长时间的基因表达以及调节基因的表达, 克服现有基因表达系统中固有的上述一些问题。从本文提供的本发明说明书 15 中将明显地看出本发明的这些和其它目的和优点以及本发明另外的特征。

发明概述

20 本发明涉及细胞内位点特异性重组的方法以及可以用于这类方法的载体。本发明的方法和载体可以用来在细胞中获得持久的基因表达和调节基因表达。

25 更具体地讲, 按照本发明的一个推荐方法包括以下步骤: (a) 将一个细胞与一种载体接触, 后者包含一个在哺乳动物细胞中起作用的位于平行设置的第一重组位点和第二重组位点之间的复制起点, 接触使得该载体被该细胞内在化, 以及(b) 为该细胞提供在该载体第一重组位点和第二重组位点之间实现重组的位点特异性重组酶。

按照本发明的另一推荐方法, 部分地包括以下步骤: (a) 将一个细胞与一种载体接触, 使得该载体被该细胞内在化, 该载体包含反向

定向的第一重组位点和第二重组位点, 以及(b) 为该细胞提供在该载体第一重组位点和第二重组位点之间实现重组的位点特异性重组酶。

图的简述

5 图 1A-1C 为示意图, 描述在传递到宿主细胞前用于本发明正文的具有平行重组位点的一种载体(图 1A)和缩短的病毒或环状结构 (图 1B) 以及附加体(图 1C), 后者由在该载体按照本发明传递到该宿主细胞后发生的细胞内重组事件产生。或闭环载体(即虚线表示的侧翼质粒或病毒序列)或线性载体(即虚线盒表示的侧翼病毒序列)可以被用来将该附加体传递到宿主细胞中。在 FRS 和 SCS 之间并包括 FRS 和 SCS 的区域相对于侧翼载体序列可以有两种定向。箭头表示转录方向。缩写: 10 RS, 重组位点; FRS, 第一重组位点; SRS, 第二重组位点; SA, 剪接受体位点; SD, 剪接供体位点; FCS, 第一编码序列; SCS, 第二编码序列; P, 启动子; PG, 过客基因; ori, 复制起点。

15 图 2A-2F 为示意图, 描述甘氨酸-丙氨酸(Gly Ala)重复序列相对于该编码序列(CS)和激素结合域(HBD)的潜在位置。甘氨酸-丙氨酸重复序列可以在缺乏激素结合域的情况下同样使用。

 图 3A-3X 为示意图, 描述平行重组方法按照本发明的其它应用。箭头表示转录方向。虚线表示该载体可以或者为线性, 或者为环状。20 空心萝卜表示特定序列可以存在于该载体的任何地方。该载体特定区域内的空心棒表示该特定序列可以定位的载体部分。缩写: RS, 重组位点; FRS, 第一重组位点; SRS, 第二重组位点; SA, 剪接受体位点; SD, 剪接供体位点; FCS, 第一编码序列; SCS, 第二编码序列; TCS, 第三编码序列; P, 启动子; SP, 第二启动子; PG, 25 过客基因; N, 复制起点; ITR, 反向末端重复; Rep, Rep 蛋白编码序列。

 图 4 为描述一载体的示意图, 该载体具有反向平行重组位点, 用于本发明, 特别是用于通过定点重组调节基因的表达, 而没有附加体

的切除。可以或者使用闭环载体(即虚线表示的侧翼质粒或病毒序列),或者使用线性载体(即虚线盒表示的侧翼病毒序列)。在 FCS 和 SCS 之间并包括 FRS 和 SCS 的区域可以相对于侧翼载体序列为两种定向。箭头表示转录方向。缩写: FRS, 第一重组位点; SRS, 第二重组位点; SA, 剪接受体位点; SD, 剪接供体位点; FCS, 第一编码序列; SCS, 第二编码序列; P, 启动子。

图 5A-5G 为示意图, 描述反向重组方法按照本发明的其它应用。箭头表示转录方向。虚线表示该载体可以或者为线性, 或者为环状。缩写: RS, 重组位点; FRS, 第一重组位点; SRS, 第二重组位点; SA, 剪接受体位点; SD, 剪接供体位点; FCS, 第一编码序列; SCS, 第二编码序列; P, 启动子。

图 6 为描述质粒 pEOBspLx-Puro-CMV Lx 的限制图谱。

图 7 为描述质粒 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 的限制图谱。

图 8 为描述质粒 pAdCMV Cre 的限制图谱。

图 9 为描述质粒 pAdCMV CreRSVOrf6 的限制图谱。

图 10 为描述质粒 pKSEBNAOriP(NR)的限制图谱。

图 11 为描述质粒 pKSEBNA(NS)的限制图谱。

图 12 为描述质粒 pAdCLxPyTagOri 的限制图谱。

图 13 为描述质粒 pAdEPrRlr 的限制图谱。

图 14 为描述线性质粒 pCGE1E2ori 的限制图谱。该质粒通常以闭环状式存在。

本发明的详细描述

本发明提供在宿主细胞中获得持久性基因表达的方法和可以用于这类方法的载体。这些方法和载体也可以用来调节基因表达。按照本发明的方法和载体以新方式结合 (1) 独特能力的 EBV 和 AAV(即 EBV 产生附加体的能力, AAV 整合到人基因组中的能力), (2) 重组系统(诸如 Cre/Lox 和 Flp/Frt 重组系统)的重组酶活性, (3) Ad 和其它相

似的病毒载体和质粒载体的各种所需性质。

定义

5 为了易于参考，本文所用的描述本发明方法和载体的缩写和命名示于表 1 中。

表 1. 缩写和命名

AAV	腺病毒相关病毒
Ad	腺病毒
bp	碱基对
cDNA	互补 DNA
CMV	巨细胞病毒
Cre	噬菌体 P1 的位点特异性重组酶
DNA	脱氧核糖核酸
DS	包含一个 oriP 元件的二重对称元件
EBV	爱坡斯坦-巴尔病毒
EBNA-1	结合 oriP 并调节 EBV 和 EBV 衍生的附加体复制的蛋白质
FCS	第一编码序列
Flp	由酵母 Frt 蛋白识别的靶位点
FR	包含一个 oriP 元件的 EBV 重复家族
FRS	第一重组位点
Frt	酵母的位点特异性重组酶
HSV	I 型和 II 型单纯疱疹病毒
ITR	含有具复制起点功能序列的 AAV 反向末端重复序列
kb	千碱基对

Lox	由噬菌体 P1 Cre 蛋白识别的靶位点
oriLyt	参与裂解期复制的 EBV 复制起点
oriP	参与潜伏期复制的 EBV 复制起点
P	启动子
PCR	聚合酶链式反应
PG	过客基因
Rep	结合 ITR 的蛋白, ITR 在 AAV 和 AAV 衍生载体复制和整合到基因组中起作用
RNA	核糖核酸
RS	重组位点
RSV	劳氏肉瘤病毒
SA	剪接受体位点
SCS	第二编码序列
SD	剪接供体位点
SRS	第二重组位点
SV40	猿猴病毒 40

此外, 按照本发明和按照本文进一步的定义, “载体”为用来将编码信息转移到宿主细胞中的一个分子(例如病毒或质粒)。“复制起点”为载体或宿主细胞染色体上的一个序列(例如病毒或质粒), 提供能够独立于宿主细胞基因组而进行复制的基因组外元件(例如病毒或质粒)。

“基因”为编码一个蛋白或新生 RNA 分子的任一核酸序列。“过客基因”为通常不存在于按照本发明的载体中并被亚克隆到按照本发明载体中的任一基因, 当它导入宿主细胞时, 伴随细胞内环境可识别的变化(例如脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、肽或蛋白浓度的增加, 或改变它们的生产速率或降解速率)。“基因产物”或者是由给定基因或编码序列转录的尚未翻译的 RNA 分子(例如 mRNA 或反义

RNA), 或者是由给定基因或编码序列转录的 mRNA 分子翻译的多肽链(即蛋白或肽)。基因包括编码序列加上任何非编码序列, 而“编码序列”不包括任何非编码(例如调节)DNA。如果沿该分子的碱基序列已经由通常天然发现的该基因或该编码序列发生改变, 或者如果通常在自然界中没有发现该碱基序列, 那么该基因或编码序列为“重组体”。按照本发明, 一个基因或编码序列可以全部合成制备或部分合成制备, 可以包含基因组序列或互补 DNA(cDNA)序列, 可以以或者 DNA 或者 cDNA 的形式提供。

非编码序列或调节序列包括启动子序列。“启动子”为指导 RNA 聚合酶结合并由此启动 RNA 合成的 DNA 序列。“增强子”为刺激或抑制相邻基因转录的 DNA 顺式作用元件。抑制转录的增强子也称为“沉默子”。增强子不同于仅在启动子中发现的序列特异性 DNA 结合蛋白的 DNA 结合位点(它也称为“启动子元件”), 因为增强子可以以两个方向中任何一个而起作用, 并且越过至多几个千碱基对的距离起作用, 甚至在转录区下游位置起作用。

按照本发明, “重组位点”由被不对称序列分离的可以发生位点特异性重组反应的反向回文结构组成。本发明描述了推荐实施方案, 其中最好使用重组位点(例如第一和/或第二重组位点)。然而, 也可以使用更多或更少的重组位点(例如 1 个或多个位点, 诸如 3、4、5 或 6 个重组位点)。此外, 可以使用不同类型的重组位点, 例如两个 Lox 位点与两个 F1p 位点的组合。“重组酶”为在特殊重组位点之间实现重组的蛋白质。

此外, 按照本发明, 当一个启动子能够指导一个编码序列转录时, 将该编码序列与该启动子“操作性地连接”。当一个启动子能够通过重组位点区域对转录和对连接重组位点的序列施加影响时, 该启动子“邻接”一个重组位点(即第一或第二重组位点)。当一个编码序列(即一个编码序列或一个第二编码序列)距重组位点的距离, 使得它可以由一个连接重组位点的启动子(该启动子通过重组位点区域对该编码序

列施加影响)进行转录控制时, 该编码序列“邻接”一个重组位点(即第一或第二重组位点)。为此, 该编码序列最好位于大约 1000 bp 的重组位点内, 甚至该编码序列更优选位于大约 500 bp 的重组位点在内。然而, 当一个反向间插编码序列将该启动子与它控制的编码序列分离时, 该启动子和它控制的编码序列之间的距离最好为不大于大约 5000 bp, 更优选不大于大约 2000 bp。“多顺反子信使”为单个 mRNA, 如本文进一步描述的, 由它翻译一个以上的肽或蛋白质。

定点重组方法

10 本发明提供实施细胞内位点特异性重组的两种方法。两个重组方法都包括将一个细胞与一个包含第一和第二重组位点的载体接触, 使得该载体被该细胞内在化, 然后为细胞提供在该载体第一和第二重组位点之间实现重组的位点特异性重组酶。第一个位点特异性重组方法包括使用包含平行定向的第一和第二重组位点的一种载体(即“平行重组载体”), 而第二个位点特异性重组方法包括使用包含反向(或相反)定向的第一和第二重组位点的一种载体(即“反向重组载体”)。

15 平行重组方法能够在一个细胞内实现位点特异性重组, 使得该重组事件产生一个包含能够在哺乳动物细胞中起作用的复制起点的附加体, 当载体携带一个或多个过客基因时, 它可以于宿主基因组外自主复制并可以用来在宿主细胞内提供稳定的持久性。平行重组方法的用处在于, 它通过赋予通常不整合到宿主细胞基因组中的载体(例如 Ad 或 HSV 载体)通过“溶原样”途径进行复制的能力, 可以用来稳定这类载体。因此, 该方法可以用来通过稳定携带一个或多个过客基因的载体, 用来获得稳定的基因表达。

25 平行重组方法也可以用来在细胞中实现位点特异性重组, 使得该重组事件产生一个所谓的“小质粒”, 后者不包含能够在哺乳动物细胞中起作用的复制起点, 不能于宿主基因组外进行自主复制。值得注意的是, 平行重组事件产生的第二重组产物(即除附加体或小质粒以外的

产物，其本身包含不是线性结构就是闭环结构，取决于重组反应的原始底物分别是线性还是闭环)也可以在该细胞中起作用。如本文所述，可以证明这一小质粒可用于向细胞短期传递蛋白质(例如 Rep 蛋白)。

5 或者，用于位点特异性重组的载体在重组事件之前，也可以包含一个以上的复制起点。包含一个以上复制起点的载体是本领域已知的。

如本文进一步描述的，平行重组方法和反向重组方法都可以用来通过重组事件，或者调节上游或下游一个编码序列的转录，或者同时调节上游一个编码序列的转录和调节下游另一编码序列的转录。反向重组方法与平行重组方法不同，因为它不涉及附加体或小质粒的形成。

按照本发明的重组方法是在细胞内进行，最好是在真核细胞内进行。真核细胞是具有核膜包围的真正核的细胞。真核细胞最好为多细胞物种的细胞(例如与单细胞的酵母细胞相对)，甚至更优选为哺乳动物(最好为人)细胞。然而，采用多种不同的细胞类型，诸如鸟类细胞和鱼细胞以及包括(但不限于)啮齿动物、猿、黑猩猩、猫科动物、犬、有蹄类动物(诸如反刍动物或天鹅)以及人细胞在内的哺乳动物细胞，也可以有效地进行这些方法。此外，如果由于例如缺乏特殊病毒(诸如腺病毒)的受体，使载体向特殊细胞类型的转移受到限制，那么例如采用用来将人腺病毒携带到血液或其它细胞类型的方法，可以增加转移。例如，可以将该病毒结合到含有一个哺乳动物细胞配体(例如运铁蛋白)的 DNA-多聚赖氨酸复合体上 (Wanger 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 89, 6099-6103 (1992))，或采用本领域技术人员已知的其它相似方法。

25 任何适宜的载体都可以用于本发明方法中，特别是本文描述的新载体。因此，按照本发明方法使用的载体可以包括任何线性的或环状的载体，也就是说适于将核酸导入真核细胞并能够作为本领域普通技术人员理解的起作用的载体，只要该载体在其存在的某个阶段主要由

双链 DNA 组成即可。产生的载体最好与该宿主细胞相容，即能够转录该载体中亚克隆的该核酸序列，并且需要时，也能够翻译新生的 mRNA。

该载体最好来源于病毒，并且可以含有一个或多个异源或重组序列，例如一个编码序列、一个过客基因、启动子等等。该载体最好含有包装和传递到该细胞所需的基本序列。希望该载体一部分由包膜或未包膜的病毒组成。例如载体最好为来自肝脱氧核糖核酸病毒科、小球病毒科、肿瘤病毒科或腺病毒科的未包膜病毒。按照本发明推荐的未包膜病毒为肝脱氧核糖核酸病毒科的病毒，特别是肝脱氧核糖核酸病毒属病毒。小球病毒科病毒希望为小球病毒属病毒(例如哺乳动物和鸟的小球病毒)或依赖病毒(例如腺病毒相关病毒(AAV))。肿瘤病毒科病毒最好为乳突瘤病毒亚科病毒(例如乳突瘤病毒，包括(但不限于)人乳突瘤病毒(HPV)1-48 和牛乳突瘤病毒(BPV))或多瘤病毒亚科病毒(例如多瘤病毒，包括(但不限于)JC、SV40、BK 病毒和小鼠多瘤病毒)。腺病毒科病毒希望为乳腺病毒属病毒(例如哺乳动物腺病毒)或禽腺病毒(例如鸟类腺病毒)。同样地，载体可以是来自疱疹病毒科的包膜病毒，或可以是辛德毕斯病毒。按照本发明推荐的包膜病毒是疱疹病毒科病毒，特别是 α -疱疹病毒亚科(例如单纯疱疹样病毒)、单纯病毒(Simplexvirus)属(例如单纯疱疹样病毒)、水痘带状疱疹病毒属(例如水痘带状疱疹病毒或伪狂犬病样病毒)、 β -疱疹病毒亚科(例如巨细胞病毒)、巨细胞病毒属(例如人巨细胞病毒)、 γ -疱疹病毒亚科(例如淋巴细胞相关病毒)或淋巴隐病毒属(例如 EB 样病毒)。具体地讲，该载体的病毒组分最好选自 Ad、I 型和 II 型单纯疱疹病毒(HSV)、EBV、痘苗病毒、乳突瘤病毒(例如或是人的(HPV)，或是牛的(BPV)、JC、猿猴病毒 40(SV40)、多瘤病毒(例如或者人的或者小鼠的)、乙型肝炎病毒和巨细胞病毒(CMV)。此外，对于希望形成附加体的平行重组方法的实施，最好该载体部分由来源于病毒的载体组成，且该病毒不形成前病毒作为其复制周期的一部分。

按照本发明特别推荐的载体是腺病毒载体(即腺病毒科、最好是乳腺病毒属的病毒载体)。腺病毒为任一血清型的载体。可以由目前可得自美国典型培养物保藏中心(ATCC, Rokville, MD)的 1-47 型腺病毒血清型或得自任何其它来源的任何其它腺病毒血清型, 扩增可以用作腺病毒源的腺病毒贮液。例如, 腺病毒可以为 A 亚组(例如血清型 12、18、31)、B 亚组(例如血清型 3、7、11、14、16、21、34、35)、C 亚组(例如血清型 1、2、5、6)、D 亚组(例如血清型 8、9、10、13、15、17、19、20、22-30、32、33、36-39、42-47)、E 亚组(血清型 4)、F 亚组(血清型 40、41)或任何其它腺病毒血清型。然而, 腺病毒最好为 Ad2 或 Ad5 血清型。

用于核酸转移的 Ad 可以是野生型的(即复制感受型)。或者, Ad 可以包括至少一种修饰的遗传材料, 它可以赋予该病毒复制缺陷性。对 Ad 基因组的修饰包括(但不限于)DNA 区段的插入、DNA 区段的重排、DNA 区段的缺失、DNA 区段的取代或 DNA 损害的导入。DNA 区段可以小至 1 个核苷酸, 大至 36 千碱基对(kb)(即大约 Ad 基因组的大小), 或者可以等于可以包装入 Ad 病毒颗粒的最大量(即大约 38kb)。对 Ad 基因组推荐的修饰包括在 E1、E2、E3 或 E4 区域中的修饰。

在本发明的方法和载体中, 这些载体可以还包含一个过客基因。过客基因可以在该载体中任意定向。可以使用任何适宜的过客基因, 诸如报道基因或治疗基因, 只要该过客基因能够在已经内在化该载体的细胞中表达即可。例如, 该基因可以包含一个报道基因或一个可以编码蛋白质的核酸序列, 其编码的蛋白质能以某种方式在细胞中检测到。该基因也可以包含一个治疗基因, 后者在 RNA 或蛋白质水平上发挥其作用。例如, 该蛋白可以用于遗传病的治疗, 诸如用于治疗胰囊性纤维变性的胰囊性纤维变性跨膜传导调节因子 cDNA。该治疗基因编码的蛋白可以通过导致细胞杀伤而发挥其作用。例如, 该基因本身的表达可能导致细胞杀伤, 如白喉毒素 A 基因的表达; 或该基因的表达可能赋予细胞选择性地对某些药物的杀伤作用敏感, 例如 HSV 胸苷

激酶基因的表达赋予细胞对包括无环鸟苷、 gancyclovir 和 FIAU (1-(2-脱氧-2-氟- β -D-阿拉伯呋喃糖基)-5-碘尿嘧啶)在内的抗病毒化合物敏感。在该载体中采用本文进一步描述的所谓“失控复制起点”，可以进一步增强用于基因治疗的该细胞杀伤途径(例如它可以用于癌的治疗)。然而，这一失控复制系统的用途不限于细胞杀伤，例如可以在希望瞬时高水平表达的情况下(例如用于通过重组体方法进行的蛋白“大丸药型”传递)使用。

此外，该治疗基因可以在 RNA 水平上发挥其作用，例如通过编码一个反义信使或核酶、一种影响剪接或 3'加工(例如多聚腺苷酸化)的蛋白，或可以编码一个蛋白，它在细胞内通过影响另一基因表达水平而起作用(即这里广义地认为基因表达包括从转录起始至加工蛋白产生的所有步骤)，也许除此之外，通过介导 mRNA 累积速率的改变、mRNA 运输的改变和/或转录后调节的变化而起作用。这一过客基因可以编码任一其它蛋白(例如 EBNA-1)，并且可以单独存在或除其它过客基因外在第一和第二重组位点之间存在。

采用本发明方法并鉴于病毒载体的包装限制或质粒载体大小的上限，被转移的过客基因可以包括的 DNA，可以小至 1 个重复单元(即对于 DNA 为 1 个核苷酸)，大至可以合理地分离和合成、或转移到宿主细胞的大小。该过客基因可以组成或编码编码序列或非编码序列、包括核酶在内的有义或反义序列、或诸如本领域中描述的催化性 RNA 物质(Hampel 等, Nucleic Acids Research, 18, 299-304 (1990); Cech 等, Annual Rev. Biochem., 55, 599-629 (1986))以及工程序列或体内通常不存在的序列。

同样地，用于平行重组方法和反向重组方法的载体可以包括其它基因或编码序列。例如按照本发明的一个编码序列或第二编码序列可以包含 Cre 或 Flp 的编码序列、EBNA-1 的编码序列或本文描述的任何其它编码序列。

特别是，本发明的平行重组方法和反向重组方法可以用来将 Rep

蛋白或者作为一个编码序列或者作为一个过客基因传递到细胞。可以使用诸如已知的和已经在文献中报道的各种突变 Rep 蛋白和 Rep 编码序列的变异(参见例如 McCarty 等, *J. Virol.*, **66**, 4050-7 (1992); Kyöstiö 等, 见上述)。这些方法允许以这种方式促进 Rep 介导的重组, 该重组将侧翼为一个或多个腺病毒相关病毒 ITR(或含有本领域技术人员已知的这些 ITR 的序列)的序列重组到人第 19 染色体中或本领域描述的序列中(参见例如 Linden 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **93**, 7966-7972 (1996))。这些方法也可以用来启动 Rep 介导的将侧翼为腺病毒相关病毒 ITR 的序列重组到其它基因组区域中, 因为 Rep 蛋白优先指导重组到第 19 染色体中, 但也可以指导重组到其它位点上。病毒 ITR 最好已经提供包装缺陷(例如 Muzyczka, 见上述)。

按照本发明的任何编码序列(即第一、第二或其它编码序列)或过客基因后面可以接允许生产多顺反子信使的序列。有几种方法可以生产这一多顺反子信使, 后者反映了载体空间的高效利用。例如, 通过在两个编码区之间放置来自脊髓灰质炎病毒的 300-400 bp 片段, 一个核糖体基本上可以补充到第二信使的 AUG 起始密码子区上。这在真核细胞中提供不依赖于帽状结构的翻译旁路或非加帽信使的翻译。这一策略(和因此允许在其它物种中使用该策略的这类相似序列)也已经在 α 花叶植物病毒中进行了描述。在产生多顺反子信使的第三种方法中, 将一个心病毒的序列置于多顺反子信使编码序列之间的阅读框中。下游蛋白的编码序列不需要起始密码子(AUG)。翻译时, 通过积极研究下的机制释放蛋白。根据同样的方法, 允许生产多顺反子信使的序列也可以置于该编码序列编码区之后。

因此, 这些方法可以用来从该编码序列和介于第一重组位点和该编码序列之间的间插编码序列产生一个多顺反子信使。例如, EBNA-1 编码序列(或一些其它编码序列)可以通过重组激活的双顺反子(或多顺反子)盒中的第二可读框(ORF)。驱动 EBNA-1 表达的 EBV 病毒启动子只提供使用 CMV 启动子观察到的启动子活性的 0.1%。然而在双顺

反子盒中, 第二基因的表达为第一基因的 0.1%, 高于背景 10 倍。在该方案中, 通过该重组事件诱导 EBNA-1。这在病毒载体繁殖期间 EBNA-1 的表达可以潜在地作用于 oriP 并使该病毒去稳定的情况下特别需要。或者, 由于每个细胞周期 oriP 仅仅复制一次, 因此在某些情况下可能产生一个病毒, 其中 EBNA-1 不受调节, 但在弱组成型启动子的控制下。

任何重组位点和重组酶适宜的组合都可以用于平行重组和反向重组方法和载体。最好是第一和第二重组位点包含 Lox 位点, 而重组酶包含 Cre, 或第一和第二重组位点包含 Frt 位点, 而重组酶包含 Flp。或者, 该重组酶可以为重组酶 λ 整合酶家族的另一成员(或任何其它适宜的重组酶), 而重组位点可以为该重组酶作用的相应序列。可以通过任何适宜的方法, 为细胞提供该重组酶, 例如通过将该重组酶编码序列置于传递载体上(例如作为一个编码序列或过客基因), 共同给予编码该重组酶基因的第二载体, 或供应异源重组酶,。

Cre 编码序列最好由噬菌体 P1 的重组酶 Cre 的编码序列组成或包括诸如本领域描述的该序列的各种突变(例如 Wierzbicki 等, J. Mol. Biol., 195, 785-794 (1987); Abremski 等, J. Mol. Biol., 202, 59-66 (1988); Abremski 等, J. Mol. Biol., 184, 211-20 (1988); Abremski 等, Protein Engineering, 5, 87-91 (1992); Hoess 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 84, 6840-6844 (1987); Sternberg 等, J. Mol. Biol., 187, 197-212 (1986)), 或通过重组方法, 由这些序列中的一个产生供应给细胞的 Cre 蛋白。也可以使用尚待分离的该编码序列的其它突变, 只要由这类突变产生的变异蛋白能够在 Lox 位点实现重组即可。此外, 可以将一个核定位信号附在 Cre 编码序列上, 以提高细胞核中 Cre 蛋白的浓度。此外, 考虑到通过基因内或基因间互补的重组酶活性, 可以共同供应给细胞编码互补 Cre 或其它突变重组酶蛋白的载体。可以按 Abremski 等(Abremski 等, J. Biolog. Chem., 259, 1509-1514 (1984))和 Sauer 等(Sauer 等, (1990), 见上述)描述的方法分析 Cre 在 Lox 位点功能。

在 Cre/Lox 驱动的重组方面, loxP 位点最好用作 Lox 位点, 或加入诸如文献中已经描述的该序列的各种突变(例如参见 Mack 等, 见上述; Hoess 等, (1986), 见上述; Hoess 等, Biochemistry, 81, 1026-29 (1984); Hoess 等, Gene, 40, 325-329 (1985); Abemski 等, J. Biolog. Chem., 261, 391-396 (1986)). 也可以使用尚待分离的 loxP 的相似突变序列, 只要这类序列能够作为 Cre 的重组位点即可。

参考本文提供参考的附图, 特别是图 1A-1C 至图 5A-5G, 后者描述分别用于本发明平行重组方法和反向重组方法的平行重组载体和反向重组载体的各种说明性实施方案, 可以使人们更好地理解第一个或平行重组方法和第二个或反向重组方法。

a. 平行重组方法

本发明的平行重组方法为来自染色体外遗传因子的或者小质粒或者附加体的产生创造条件。尽管小质粒不在细胞内复制(因此在需要瞬时传递或整合一个序列时使用), 但附加体却能够在细胞内进行基因组外复制。当在由于重组事件环化的重组底物的部分中存在复制起点时, 获得一个附加体(如图 1A-1C 中描述的); 当没有这种原点时, 获得小质粒。因此, 平行重组方法已经具体用于由于不能作为前病毒整合到该宿主基因组中而不稳定保持在细胞中的病毒载体, 或用于诸如在潜伏期中基因组静止的 HSV 之类的病毒。通过赋予通常不稳定保持或潜伏时静止的携带过客基因的载体在宿主细胞中稳定的保持, 该方法可以用来获得持久的基因表达, 或该方法也可以用来调节该载体携带基因的表达。一般来讲, 按照该方法传递附加体有三点考虑: (1) 复制起点, (2) 从该传递载体上切下该附加体的方法, 以及(3) 确保子分子在减数分裂时分配到每个细胞的方法。

因此, 在真核细胞中实现位点特异性重组的平行重组方法包括: (a) 使该细胞与包含复制起点的载体接触, 使得该载体被该细胞内在化, 该复制起点在哺乳动物中起作用, 且位于平行布置的第一和第二

重组位点之间, (b) 为该细胞提供在该载体的第一和第二重组位点之间实现重组的位点特异性重组酶。

如图 1A 中描述的推荐载体所示, 或者线性病毒(即虚线盒显示的病毒序列)或环状分子(即虚线表示的质粒或病毒序列)可以与平行重组方法结合使用。按照上述附加体传递的考虑, 平行重组方法和最好是反向重组方法可以利用在哺乳动物细胞中有功能的复制起点(例如由哺乳动物细胞分离的原点或病毒复制起点, 诸如(但不限于)来自 Ad、HSV、EBV、乳突瘤病毒、痘苗病毒或多瘤病毒的复制起点。因此, 本发明提供一组载体, 它们或者提供单个整合模板, 提供每个细胞少数或中等数量的附加体或小质粒, 或者提供至多每个细胞上千个附加体, 其中每个附加体或小质粒可以包含各种编码序列、启动子和/或过客基因, 如本文所述。

希望用于本发明方法的载体具有一个复制起点, 它包含 EBV 潜伏复制子的序列 oriP 或本领域已知并已经描述的该序列的变异(例如 Middleton 等, 见上述; Reisman 等, 见上述)。该序列可以还包含尚待获得的 oriP 序列的变异, 只要这类突变的序列按本领域技术人员已知的方法(例如 Middleton 等, 见上述; Reisman 等, 见上述)测定, 能够提供基因组外 DNA 的自主复制即可。此外, 在平行重组方法和反向重组方法中, 该复制起点可以是能够在包括非真核或单细胞真核细胞(例如原核生物和酵母)在内的任何细胞中起作用的任一复制起点(参见例如 Depamphilis, Ed., DNA Replication in Eukaryotic Cells (Cold Spring Harbor Press, NY, 1996))。

值得注意的是, oriP 的生物学功能与已经由病毒表征的许多 DNA 复制起点的生物系功能不同。即 oriP 允许质粒 DNA 的受控复制, 使得不损害细胞的存活。相反, 称为“失控复制起点”的其它复制起点在细胞周期内允许以指数速率进行 DNA 复制, 最终可以导致细胞死亡, 随该载体上存在的其它基因而定。这类失控复制起点包括(但不限于)SV40、BK、多瘤病毒、Ad 和 HSV-1 的复制起点。最好这些失

控复制起点也可以用于本发明的方法和载体中，并且可以用于细胞杀伤以外的应用。当然，可能需要其它辅助因子共同为该细胞供应在该细胞中适当起作用的原点。

特别是，采用多瘤病毒的失控复制起点(例如 Muller, Mol. Cell Biol., 8, 5000-5015 (1988)和 GenBank 资料库登记号 J02288 或 PLY 2CG 中描述的)时，需要病毒的大 T 抗原起始病毒 DNA 的复制。该蛋白通过结合到复制起点区内，将其附近的 DNA 解旋并允许其它细胞酶(诸如 DNA 聚合酶)起作用而起作用。因此，采用这一多瘤病毒的复制原点时，最好至少也将病毒 T 抗原提供给该细胞，例如或者作为一个编码序列(例如第一、第二或其它编码序列)或作为过客基因(即以顺式或反式)。也可以从外部提供病毒 T 抗原。在某些情况下，可能需要提供其它允许因子，例如以使病毒复制最适化。希望使用的多瘤病毒原点为小鼠多瘤病毒原点。然而，该原点也优选人的或其它的多瘤病毒原点。编码这些原点的序列以及这些序列的变异是本领域已知的(Muller, 见上述)。

同样地，可以使用允许每个细胞获得多拷贝附加体的原点。例如乳突瘤病毒原点(例如 GenBank 资料库登记号 PAPABPV1 中描述的，在 GenBank 资料库登记号 X02346 中描述了 BPV1 的整个基因组，而在 GenBank 资料库登记号 D00146 中描述了 BPV4 的早期编码序列)可以用于本发明的载体中。乳突瘤病毒基因组在转化细胞中作为多拷贝质粒而保持。使用这一乳突瘤病毒原点时，希望也将该病毒的 E1 蛋白提供给该细胞(例如作为一个顺式或反式定位的编码序列或过客基因，或由外部提供)。在某些情况下，也可能希望同样为该细胞供应病毒的 E2 蛋白源，以使复制最适化。乳突瘤病毒原点和 E1 蛋白和 E2 蛋白是本领域技术人员已知的，可以使用这些序列或这些序列的变异(参见例如 Pirsoo 等, EMBO J., 15, 1-11 (1996), Grossel 等, Virology, 217, 301-310 (1996))。特别是，该乳突瘤病毒原点最好是牛乳突瘤病毒原点。或者，该乳突瘤病毒最好是人乳突瘤病毒，但可以是该病毒的

任何其它来源。

5 尽管同样赋予环状 DNA 元件在宿主细胞基因组内自主复制能力的这些和其它复制起点可以用来代替 oriP，但使用 oriP 原点时，也可以将 EBNA-1 供应给该细胞。对于其它细胞复制蛋白，可以以所描述的将重组酶传递到细胞的相同方式，从外部提供 EBNA-1 蛋白，或可以提供对 oriP 为顺式或反式的 EBNA-1 编码序列。尽管缺乏 EBNA-1 蛋白时具有 oriP 的质粒可以稳定地保持在感染 EBV 的细胞中(Lupton 等，见上述； Teshigawara 等, Nuc. Acids Res., 20, 2607 (1992))，但在 EBV 感染时， EBNA-1 的编码序列与 oriP 一起组成缺乏 EBV 衍生的环状质粒在培养细胞中稳定保持的基本的必需组分。此外，如本文进一步描述的，平行重组方法可以用来将 Rep 蛋白(以及其它蛋白)传递到没利用复制起点的细胞中。

15 通过应用在该载体内包含第一和第二重组位点(图 1A 中的 FRS 和 SRS)的重组系统和作用于该载体第一和第二重组位点以在第一和第二重组位点之间实现重组的位点特异性 重组酶，完成从平行重组载体上切下该附加体或小质粒及其随后的环化。在单个 DNA 分子上存在平行布置的两个重组位点导致由适当的重组酶切下该间插序列，以便形成一个闭环分子。通过应用 EBNA-1 或具有相似功能的蛋白，可以在子细胞之间分配该附加体， EBNA-1 看来是通过结合到宿主细胞基因组和 oriP(或其它复制起点)上而起作用的，并且基本上将该附加体拉到新生细胞中。

25 因此，通过在该载体的两个平行重组位点之间编码 oriP 或在哺乳动物中有功能的其它复制起点，当适当地将重组酶用于该细胞时，将通过重组产生一个附加体。即提供给将该平行重组载体内在化的细胞这一位点特异性重组酶时，该平行重组载体(如图 1A 例举的)在第一和第二重组位点之间重组，以便形成一个附加体(如图 1C 中例举的)。同样可以产生在平行重组位点之间不存在复制起点的小质粒。当一个病毒载体用作一个附加体或小质粒传递载体时，重组事件的第二产物(如

图 1B 例举的)为一个缩短的病毒, 而使用质粒时, 同样地将产生缩短的质粒或小质粒。

该载体最好还包含重组酶的编码序列, 特别是 Cre 的编码序列。该载体最好也能包含一个或多个其它编码序列, 诸如第一编码序列、第二编码序列和/或第三编码序列, 和/或包含一个启动子的另外的编码序列, 诸如一个过客基因。因此, 在平行重组方法中, 该载体最好还包含一个过客基因。该过客基因最好位于第一和第二重组位点之间, 如图 1A 的平行重组载体中描述的, 产生携带该过客基因(PG)的附加体, 如图 1C 中描述的。

同样地, 该载体最好还包含一个编码序列。这一编码序列可以是任一适宜的编码序列, 最好为 EBNA-1 或 Rep 的编码序列或本领域已知和已经描述的这些序列的各种变异(参见例如 Yates 等, (1985), 见上述; Lupton 等, 见上述; Middleton 等, *J. Virol.*, 66, 1795-1798 (1992); Levitskaya 等, 见上述)。使用 oriP 之外的复制起点时, 可以同样提供作为一个编码序列的其它病毒复制蛋白(例如大 T 抗原、E1 或 E1 和 E2)。希望该编码序列位于含有该复制起点的第一和第二重组位点之间, 产生携带该编码序列的一个附加体。

根据这些方法, 该平行重组方法使得可以通过重组事件, 调节上游或下游的一个编码序列, 或同时调节上游一个编码序列和下游另一个编码序列。例如如图 1A 所示, 第一编码序列(FCS)可以位于第一和第二重组位点(FRS 和 SRS)之间, 其定向使其转录方向为从第一重组位点(FRS)至第二重组位点(SRS)。在同一 DNA 分子上, 一个启动子(P)可以位于 FCS 和 SRS 之间, 使得 P 能够转录 SRS 下游的一个编码序列。在这一情况下, 在重组之前, FCS 不转录为新生的 mRNA。然而在重组后, 由于重组事件将 FCS 置于 P 的控制下, 因此将转录 FCS。

平行重组方法也使得可以通过重组事件, 调节下游一个编码序列的转录, 同时调节上游另一编码序列。即如果一个第二编码序列(SCS)恰好位于 P 下游, 并且操作性地连接 P, 使得 P 能够控制 SCS 的表达,

那么在重组前转录 SCS。在重组后，先前命令 SCS 转录的 P 将置于 FCS 的上游，因此转录 FCS，而不转录 SCS。然而，在重组前该启动子不必控制任何下游序列的表达。同样地，该启动子在重组后不必控制另一编码序列的表达。该方法也可以例如在缺乏 FCS 时通过将 SCS 加入图 1A 的载体中，允许独立地调节下游单个编码序列。

因此，在可以用来调节上游一个编码序列的平行重组方法的一个实施方案中，最好进行这样的方法，其中：(a) 该编码序列位于第一和第二重组位点之间并包含该原点的区域中，并邻接第一重组位点，使得该编码序列的定向使其转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点，(b) 该编码序列不操作性地连接任何启动子，以及(c) 一个启动子位于第一和第二重组位点之间并包含该原点的区域中，并邻接所述第二重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点。在第一重组位点和该编码序列之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。

用来调节上游一个编码序列表达的载体最好还包含一个第二编码序列，后者位于在第一和第二重组位点之间并包含所述原点区域外的一个区域中，并邻接第二重组位点，该第二编码序列操作性地连接该启动子。该方法便于同时调节上游和下游独立的编码序列。在该启动子和该第二编码序列之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。

在不调节上游另一序列的情况下，可以用来独立地调节下游一个编码序列的平行重组方法的另一实施方案中，最好进行这样的方法，其中：(a) 一个启动子位于第一和第二重组位点之间并包含该原点的区域中，并邻接所述第二重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点，并且 (b) 该编码序列位于第一和第二重组位点之间并包含该原点区域以外的一个区域中，并邻接第二重组位点，使得该编码序列操作性地连接

该启动子。

当该附加体传递载体还携带一个过客基因时，最好也可以使用这些其它方法。此外，为了在重组后优化由该编码序列编码的蛋白的生产，在用于平行重组方法中的载体中可以包括剪接供体位点和剪接受体位点。

按照本发明，任何启动子(例如由于重组与一个编码序列连接的一个启动子以及作为一个过客基因一部分存在的启动子)不管是从天然分离的，还是由重组 DNA 或合成技术生产的，都可以用来提供基因转录，只要该启动子最好能够指导真核(希望是哺乳动物)细胞中的转录即可。

适于在真核细胞中表达的 DNA 序列(即“真核启动子”)不同于适于在原核细胞中表达的那些 DNA 序列。一般来讲，真核启动子和伴随的遗传信号在原核系统中不被识别或不起作用，原核启动子在真核细胞中不被识别或不起作用。

在真核生物中起作用的启动子的序列比较已经揭示出保守序列元件。一般来讲，由 RNA 聚合酶 II 转录的真核启动子的特征为中心约在-25 位的“TATA 盒”，后者看来是转录起始精确定位所必需的。TATA 盒在哺乳动物系统中指导 RNA 聚合酶开始转录下游大约 30 bp。TATA 盒通常与至少两个位于转录起始上游大约 40 bp 和 110 bp 的其它上游序列结合而起作用。所谓的“CCAAT 盒”通常作为两个上游序列中的一个，另一个序列通常为富含 GC 的区段(例如由例如序列 GGGCGG 或序列 GCCACACCC 和 ATGCAAAT 组成的“GC 盒”)。CCAAT 的同源性可以位于该 DNA 的不同链上。上游启动子元件也可以是一个特定信号，诸如本领域已经描述并且似乎表征某个基因亚组的那些信号。

为了起始转录，TATA 盒和上游序列分别由与这些位点结合的调节蛋白识别，并通过使 RNA 聚合酶 II 结合该 DNA 区段而激活转录，并适当地起始转录。在 TATA 盒和上游序列内碱基的改变实际上可以

降低转录速率(例如 Myers 等, Science, 229,242-7 (1985); McKnight 等, Science, 217, 316-324 (1982))。这些元件相互之间和相对于起始位点的位置和定向对某些(但不是所有的)编码序列的有效转录是重要的。例如, 某些启动子在缺乏 TATA 盒时很好地起作用。同样地, 由 RNA 聚合酶 I 或 III 或其它 RNA 聚合酶识别的启动子的这些和其它序列的需要可以不同。

因此, 启动子区域的长度和序列不同, 可以还包括一个或多个序列特异性 DNA 结合蛋白的 DNA 结合位点和/或一个增强子或沉默子。本发明优先采用 CMV 启动子或 P5 启动子作为调节一个感兴趣的基因或编码序列(例如本文进一步描述的“第一编码序列”或“第二编码序列”)的启动子。这类启动子及其突变是本领域已知的和已经描述的(参见例如 Hennighausen 等, EMBO J., 5, 1367-1371 (1986); Lehner 等, J. Clin. Microbiol., 29, 2494-2502 (1991); Lang 等, Nucleic Acids Res., 20, 3287-95 (1992); Srivastava 等, J. Virol., 45, 555-564 (1983); Green 等, J. Virol., 36, 79-92 (1980); Kyöstiö 等, 见上述)。然而, 也可以使用其它启动子, 诸如 Ad2 或 Ad5 的主要晚期启动子和三分前导序列、劳氏肉瘤病毒(RSV)的长末端重复序列和诸如文献中已经描述的其它组成型启动子。例如, 可以使用疱疹胸苷激酶启动子(Wagner 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 78, 144-145 (1981))、金属硫蛋白基因的调节序列(Brinster 等, Nature, 296, 39-42 (1982))、来自酵母或其它真菌的启动子元件, 诸如 Gal 4 启动子、乙醇脱氢酶启动子、磷酸甘油激酶启动子和碱性磷酸酶启动子。同样地, 可以使用由哺乳动物细胞基因组分离的启动子或由生长于这些细胞中的病毒(例如 Ad、SV40、CMV 等等)分离的启动子。

除使用组成型启动子外, 最好也可以响应适当的信号而调节上游和/或调节下游的该启动子。例如, 可以使用诸如 IL-8 启动子之类的诱导型启动子, 后者响应 TNF 或另一细胞因子。适宜的诱导型启动子系统的其它实例包括(但不限于)金属硫蛋白诱导型启动子系统、细菌 lac

表达系统和 T7 聚合酶系统。此外,可以使用在不同发育阶段选择性激活的启动子(例如球蛋白基因在胚和成体中进行分化性转录)。特别是,可以使用能由外源因子(诸如四环素)或合成激素(诸如 RU-486)调节的启动子。这些启动子(和同样可以提供给该细胞的伴随调节因子)全是本领域已经描述的(参见例如 Delort 等, Human Gene Therapy, 7, 809-820 (1996); Clontech, CLONTECHniques, “Tet-off™和 Tet-on™基因表达系统和细胞系”, 第 XI 卷, 第 3 期, 2-5 (1996 年 7 月))。

另一选择是采用组织特异性启动子(即在给定组织中优先激活并导致激活组织中基因产物表达的启动子), 诸如用于白蛋白和 α -抗胰蛋白酶的肝细胞特异性启动子(Frain 等, Mol. Cell Biol., 10: 991-999 (1990); Ciliberto 等, Cell 41: 531-540 (1985); Pinkert 等, Genes and Devel., 1, 268-276 (1987); Kelsey 等, Genes and Devel., 1, 161-171 (1987))、在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶 I 基因控制区(例如 Swift 等, Cell, 38, 639-646 (1984); MacDonald, Hepatology, 7, 425-515 (1987))、在胰 β 细胞中有活性的胰岛素基因控制区(Hanahan, Nature, 315, 115-122 (1985))、在睾丸细胞、乳房细胞、淋巴样细胞和肥大细胞中有活性的小鼠乳房肿瘤病毒控制区(Leder 等, Cell, 45, 485-495 (1986))、在脑中少突神经胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性蛋白基因控制区(Readhead 等, Cell, 48, 703-712 (1987))和在丘脑下部有活性的促性腺释放素基因控制区(Mason 等, Science, 234, 1372-1378 (1986))。同样地, 在该载体中可以使用诸如用于结肠癌的癌胚抗原(Schrewe 等, Mol. Cell Biol. 10: 2738-2748 (1990))之类的肿瘤特异性启动子。按照本发明, 可以通过诱变改变任何启动子, 只要它具有所需的结合能力和启动子强度即可。

此外, 现在已知通过将激素受体的 C-末端配体结合域融合到特殊蛋白的编码序列上, 可以获得诱导活性(参见例如 Kellendock 等, Nucleic Acids Res., 24, 1404-1411 (1996); Metzger 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 92, 6991-6995 (1995))。该方法的优点在于, 当用来创造一个重组酶融合物时, 它赋予重组事件诱导性, 并且在结合类固醇受体的外

源物质控制下。然而，该方法最好也用于按照本发明的任何编码序列（例如第一和第二编码序列）和/或任何过客基因。特别是，最好采用能够结合异源（但不是天然产生的）类固醇的激素受体的配体结合域（例如一个激素结合域），使用该方法。例如，可以使用突变的激素黄体酮受体（hPR891）的配体结合域，后者对低水平的合成类固醇（诸如 RU-486）反应，但对内源类固醇不反应（Kellendock 等，见上述）。或者，可以将来自雌激素、糖皮质激素和雄激素受体的配体结合域与重组酶或其它编码序列融合。本领域也已经描述了其它相似的方法，在此可以用来或者通过创造产生嵌合蛋白的翻译融合，或者通过将该基因置于外源物质控制下的转录融合，提供该重组酶活性或由按照本发明的配体依赖性编码序列编码的其它蛋白的活性，如前所述。此外，诸如雷帕霉素之类的独特蛋白允许通常相互忽视的蛋白进行连接，增加对本文描述系统的另一水平的控制（参见例如 Balter 等，*Science*, 273, 183 (1996); Choi 等，*Science*, 273, 239-242 (1996)）。

此外，在某些情况下，用来自自主复制载体的原点也可以包含起启动子作用的序列（例如由于 DNA 复制和转录的紧密缠绕）。例如，多瘤病毒原点含有一个组成型启动子，可以用来例如驱动一个过客基因的表达。同样地，牛乳突瘤病毒复制起点包含一个由乳突瘤病毒 E2 蛋白诱导的启动子。在按照本发明的载体中，该原点可以潜在地用作基因工具。同样地，EBV 原点含有在 EBNA-1 存在下起增强子作用的重复序列。这些重复序列例如在进行重组介导的调节上游的 EBNA-1 时，可以用来调节上游一个基因的表达。

普通技术人员知道，诸如转录、mRNA 翻译和翻译后加工之类的不同的遗传信号和加工事件控制细胞中核酸和蛋白/肽的水平。将 DNA 转录为 RNA 需要一个功能启动子。RNA 聚合酶可以在特定信号上进行识别、起始和终止转录的效率调节转录量。这些步骤以及新生 mRNA 的延伸和其它步骤都易受同样存在于该细胞中的各种其它组分的影响，例如受可能是转录过程部分的其它蛋白、该细胞中存在的核糖核

酸浓度等等的影响。

蛋白的表达也取决于由 DNA 信号和 DNA 模板水平调节的 RNA 转录水平。同样地，mRNA 的翻译起码需要一个起始密码子(最好是 AUG 起始密码子)，后者通常位于该信使 5'端的 10-100 个核苷酸内。

在 AUG 起始密码子侧翼的序列已经表明影响真核核糖体的识别，与导致最佳翻译的理想的 Kozak 共有序列一致(参见例如 Kozak, J. Molec. Biol., 196, 947-950 (1987))。此外，外源核酸序列在细胞中的成功表达可能需要所产生的蛋白/肽的翻译后修饰。因此，一个重组蛋白或肽的生产可能受 DNA 转录为 mRNA 的效率、mRNA 翻译为蛋白质的效率和该细胞进行翻译后修饰的能力的影响。这些都是普通技术人员知道并能够采用标准方法操作，以达到所需最终结果的所有因素。

根据这些方法，为了优化重组后的蛋白生产，用来同时调节上游和下游各个编码序列的载体最好还包含：(a) 一个剪接受体位点，位于在第一重组位点和该编码序列之间包含该原点区域中的第一重组位点和第二重组位点之间，(b) 一个剪接供体位点，位于在第一重组位点和第二重组位点之间包含该原点区域中的该启动子和第二重组位点之间，以及(c) 一个剪接受体位点，位于在第一重组位点和第二重组位点之间包含该原点区域以外的一个区域中的第二重组位点和第二编码序列之间。

普通技术人员也知道，对某些免疫原蛋白的免疫应答可导致体内该蛋白水平的降低。Cre 蛋白是这样一种可以对其产生免疫应答的蛋白的实例。相比之下，EBV 的 EBNA-1 蛋白有效地逃避免疫系统的探测。因此，本发明也提供一种方法，提供 Cre 或用于本发明正文中不被免疫系统察觉的其它相似的免疫原蛋白。该方法包括将多拷贝 EBNA-1 蛋白的甘氨酸-丙氨酸重复(或其保守变异)置于该蛋白的或者 C-末端或者 N-末端。这种放置最好在编码序列(例如第一或第二编码序列、其它编码序列或过客基因)中的 DNA 水平上进行。该甘氨酸-丙氨酸重复是本领域已知的(参见例如 Yates 等，见上述；Lupton 等，见上

述; Levitskaya 等, 见上述)。这最好通过在目的编码序列的或者 5'端或者 3'端加入该甘氨酸-丙氨酸重复的核酸序列(或其变形体)来进行。特别是, 也可以采用前述配体结合域使用该方法。如图 2A-2F 中描述的, 可以将该甘氨酸-丙氨酸重复(Gly Ala)用于与该编码序列(CS)和配体结合域(HBD)(如果存在)相对的多个位置中。

平行重组方法可以用来提供基因和编码序列的暂时的调节。例如, 第一编码序列可以是前述 EBNA-1 或 Rep 的编码序列。同样地, 第二编码序列可以包括前述 Cre 或 Flp 的编码序列。然而, 更一般的是, 不是第一编码序列就是第二(或其它)编码序列可以包含不是 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1, 就是 E2 编码序列。

由于重组事件而进行的调节也可以用来提供重组酶编码序列的暂时表达。即重组酶的编码序列可以位于图 1A 中的 SCS 位置中。切下该附加体后, 该宿主细胞中不再生产该重组酶。该方法的优点在于, 最好在附加体产生后不产生重组酶活性。这降低该附加体重新整合的可能性或由于分子间重组引起的多聚化。

根据同样的方法, EBNA-1 的编码序列可以位于图 1A 中的 FCS 位置中。由于在病毒生产期间, EBNA-1 介导的顺式 oriP 的复制(即当病毒用作附加体传递载体时)在某些情况下可能导致不希望的基因组的不稳定性和产量的降低, 因此这允许调节 EBNA-1 编码序列的表达, 这是有利的。如果 EBNA-1 编码序列作为 FCS 提供, 那么当最需要它时, 其表达将仅仅发生在该附加体切下之后。

通过将 SRS 置于一个内含子内, 可以将 EBNA-1 或由 P 命令转录的编码序列(即 FCS 或 SCS)编码的任何蛋白的生产最大化。这排除了在 SRS 内存在的任何意外的起始密码子上起始的可能性, 同样排除了任何融合蛋白的形成。如图 1A 所述, 这可以通过将多个剪接受体位点(SA)置于 FRS 和 FCS 之间以及 SRS 和 SCS 之间, 并且将一个剪接供体位点(SD)也置于 P 和 SRS 之间来完成。通过将加 A 位点恰好置于 FCS、SCS 或 TG 序列编码区的下游, 同样可以使 FCS、SCS 或 TG

编码的蛋白生产最大化。

用来控制 EBNA-1 表达的方法同样可以用作控制 AAV 的 Rep 蛋白转录和随后翻译的方法。希望严格调节 Rep 基因的暂时表达和表达水平，以避免两个潜在的问题。第一，与 EBNA-1 相似，当将一个病毒用作附加体传递载体时，在病毒生产期间，宿主细胞中 Rep 蛋白的存在可能引起病毒不稳定并降低产量。第二，Rep 基因的过量表达对该细胞有细胞毒性，并且可能引起免疫应答。将 Rep 编码序列克隆到图 1A 中的 FCS 位置中，可以避免这些潜在的问题。这确保在病毒生产期间缺乏 Rep 基因的表达。感染并将重组酶传递到含有 Rep 编码载体的细胞时(例如或者通过在同一载体上供应可能作为 SCS 的重组酶编码序列，或者在共同给予的载体上供应重组酶编码序列)，将发生重组，将 P 带到 Rep 编码序列的上游，将 Rep 编码序列置于 P 的控制下。Rep 基因的天然启动子 P5 启动子可以用作 P，因为该启动子应该命令适当水平的 Rep 基因表达，以允许 Rep 介导基因组的整合而没有细胞毒性作用或引起免疫应答。

当存在 Rep 蛋白时，侧翼为一个或多个 AAV ITR 的序列优先整合到人第 19 染色体上。因此在本发明方法的一个实施方案中，该编码序列为 Rep 编码序列。该载体最好还包含一个或多个(例如第一和第二)腺病毒相关病毒的 ITR。在本发明方法中，由于理论上 ITR 与位置无关的，因此可以使用 AAV ITR 的多个位置。因此，在该方法中，一个或多个 AAV 的 ITR 最好位于第一和第二重组位点之间并包含该原点的区域中。然而，一个或多个 ITR 也可以位于第一和第二重组位点之间并包含该原点区域之外的一个区域中。将一个或多个 AAV 的 ITR 恰好定位于该过客基因的侧翼，将允许该基因整合到另一遗传位置中。也可以将一个或多个 AAV 的 ITR 如此定位，使得在 Rep 介导重组时 Rep 蛋白失活。例如，一个或多个 AAV 的 ITR 可以置于编码 Rep 的 FCS 和一个下游加 A 位点之间。这样，Rep 介导的将附加体序列重组到另一遗传位点使 Rep 编码序列与加 A 位点分离，那么由于转录物

在真核细胞中易于降解，因此消除 Rep 活性，除非转录物多聚腺苷酸化。同样地，采用本发明的平行重组方法，可以同样地调节、激活或失活其它基因。

5 或者，通过提供用平行重组方法产生的小质粒编码的 Rep 蛋白，可以将 Rep 蛋白传递到细胞中。如前所述的该方法包括，通过采用包含位于两个直接重复的重组位点之间的感兴趣的序列的载体，产生一个含有 Rep 蛋白编码序列或其它蛋白编码序列的小质粒，其中没有同样位于重组位点之间的复制起点。

10 因此，将 Rep 蛋白提供给细胞的方法包括：(a) 将该细胞与一种载体接触，使得该载体被该细胞内在化，该载体包含位于平行布置的第一和第二重组位点之间的一个 Rep 编码序列，以及(b) 为该细胞提供一个位点特异性重组酶，该酶在该载体的第一和第二重组位点之间实现重组。最好 Rep 编码序列操作性地与该载体内的一个启动子连接，或由于重组事件 Rep 编码序列操作性地与该载体内的一个启动子连接。
15

该方法最好如下进行，其中：(a) Rep 编码序列邻接第一重组位点，使得该编码序列的定向使其转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点，(b) 该编码序列不操作性地与任何启动子连接，以及(c) 一个启动子位于第一和第二重组位点之间并包含该编码序列的区域内，并邻接第二重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点。
20

此外，用于传递 Rep 蛋白的载体最好还包含第一和第二腺病毒相关病毒的 ITR。最好一个或多个 ITR 位于第一和第二重组位点之间并包含该编码序列的区域内。或者，一个或多个 ITR 位于第一和第二重组位点之间包含该原点区域以外的一个区域内。
25

这些平行重组方法实施方案中的一些在图 3A-3X 中进行了描述。具体地讲，图 3A 描述了这样一个本发明方法，其中提供给细胞

细胞,例如其中 Rep 基因最初是沉默的,通过重组事件调节上游的 Rep 基因(图 3O)。同其它实施方案一样,在该实施方案中,该载体还可以加入位于该载体上任何位置的一个或多个 ITR(图 3O),在重组位点之间并含 ori 的区域中(图 3P),或在含 ori 区域之外(图 3Q)。

也可以采用在第一和第二重组位点之间不包含复制起点的一种载体(图 3R)进行平行重组方法。也可以可选地进行该方法,以将 Rep 或者作为存在于重组事件形成的小环上的一个过客基因或者编码序列传递到细胞(图 3S)。这样一种载体还可以包含通过重组事件在上游受调节的另一编码序列(图 3T)。同采用含 ori 的载体一样,缺乏复制起点的载体可以通过重组事件,用来调节上游的一个编码序列(图 3U),同时调节上游一个第一编码序列和下游一个第二编码序列(图 3V),以及调节上游的第一编码序列和第二编码序列(图 3W)。也可以采用前述的一个第三编码序列(图 3X)应用该实施方案。按照本发明,任一编码序列(即第一、第二或第三)和/或该过客基因都可以编码 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和 E2 编码序列。该方法的其它变化对本领域技术人员是显而易见的。

b. 反向重组方法

反向重组方法与平行重组方法的相似之处在于,它依赖于通过适当的重组系统(诸如最好是噬菌体 P1 的 Cre/Lox 系统、酵母的 Flp/Frt 系统或其它合适的重组系统)实现位点特异性重组。然而,与平行重组方法相反,反向重组方法涉及的载体具有反向定位于同一 DNA 分子上的第一和第二重组位点。这种重组位点的另一种布置导致应用重组酶时间插序列的倒位,而不是切下附加体。反向重组方法可以用来通过重组事件调节基因表达,例如通过提供调节上游或下游一个编码序列,或同时调节上游一个编码序列和下游一个编码序列。

根据这些方法,在细胞中实现位点特异性重组的反向重组方法包括:(a) 将该细胞与一种载体接触,使得该载体被该细胞内在化,其中

该载体包含(i) 一个启动子, 位于反向的第一和第二重组位点之间并邻接第二重组位点, 使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点, 以及(ii) 一个编码序列, 位于第一和第二重组位点之间并包含该启动子区域之外的一个区域中, 邻接第一重组位点, 使得该编码序列的定向使其转录方向与从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点的方向相反, 其中该编码序列不操作性地连接任何启动子; 并且(b) 提供给该细胞一个位点特异性重组酶, 后者在该载体的第一和第二重组位点之间实现重组。在第一重组位点和该编码序列之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。

该方法最好还包含一个第二编码序列, 它位于第一和第二重组位点之间并包含该启动子的区域之外的一个区域中, 并邻接第二重组位点, 该第二编码序列操作性地连接该启动子。在该启动子和第二编码序列之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。

此外, 反向重组方法也可以用来在不调节上游另一编码序列的情况下调节下游单个编码序列。该方法包括: (a) 将该细胞与一种载体接触, 使得该载体被该细胞内在化, 其中该载体包含(i) 一个启动子, 位于反向的第一和第二重组位点之间并邻接第二重组位点, 使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点, 以及(ii) 一个编码序列, 位于第一和第二重组位点之间并包含该启动子区域之外的一个区域中, 并邻接第二重组位点, 使得该编码序列操作性地连接该启动子; 并且(b) 提供给该细胞一个位点特异性重组酶, 后者在该载体的第一和第二重组位点之间实现重组。在重组后, 在该启动子和该编码序列之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点插入。

此外, 用来调节上游和/或下游一个编码序列的任何载体最好可以还包含一个过客基因和/或前述的或者 Rep、EBNA-1、Cre 或者 Flp 基因的编码序列。对于反向重组方法, 任何编码序列(例如第一、第二

或其它编码序列)和/或过客基因都可以包含 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 或 E2 编码序列。

此外，为了优化重组后的蛋白生产，用来同时调节上游和下游独立编码序列的载体最好还包含：(a) 一个剪接受体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间包含该启动子区域之外一个区域中的第一重组位点和该编码序列之间，(b) 一个剪接供体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该启动子区域中的该启动子和第二重组位点之间，以及(c) 一个剪接受体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该启动子区域之外的一个区域中的第二重组位点和第二编码序列之间。

图 4 描述了结合反向重组方法使用的一个推荐载体。如图 4 描述的，该反向重组载体包含一个邻接第一重组位点(FRS)的第一编码序列(FCS)，使得 FCS 的定向使其转录方向与从第一重组位点(FRS)至第二重组位点(SRS)的方向相反。由于 FCS 不操作性地连接任何上游启动子，因此它不被转录。放置一个第二编码序列(SCS)，邻接第二重组位点(SRS)，其定向使其转录方向为从第一重组位点(FRS)至第二重组位点(SRS)。

例如通过重组事件调节上游一个编码序列的表达，但不调节下游另一编码序列时，不必存在 SCS。然而，当存在 SCS 时，由于它操作性地连接位于第一和第二重组位点(FRS 和 SRS)之间的一个启动子(P)，因此它至少最初是转录的。同样地，例如当通过重组事件调节下游一个编码序列的表达，但不调节上游另一编码序列时，不必存在 FCS。然而，存在 FCS 时，在重组后，将 P 置于 FCS 上游，FCS 转录。

因此，在将重组酶用于含有该载体的细胞之前，SCS 转录而 FCS 不转录。应用重组酶后，重组事件将 P 置于 FCS 上游，FCS 转录，而 SCS 不转录。在 FCS 和 FRS 之间以及 SCS 和 SRS 之间最好都没有编码序列、其它启动子或转录终止位点。

此外，为了使基因表达和蛋白生产最大化，可以将多个剪接受体位点(SA)置于 FCS 和 FRS 之间以及 SCS 和 SRS 之间。此外，可以将一个剪接供体位点(SD)置于 P 和 SRS 之间。同样地，可以在 FCS 和 SCS 序列的编码区之后插入加 A 位点。

5 在这样一种重组方法中，SCS 最好可以编码一个重组酶编码序列，并且最好 FCS 可以编码一个 Rep 编码序列或一个 EBNA-1 编码序列。图 4 中描述的反向重组载体及其变异同样可以用于其它基因，例如用于需要适当暂时表达的基因(诸如发育调节的基因)，或其表达必须严格控制的基因(诸如编码有毒或有害蛋白的那些基因)。

10 此外，按照反向重组方法，也可以通过将该编码序列置于重组位点之间，并将一个或多个启动子置于重组位点之外，调节上游和/或下游一个编码序列(例如一个 Rep、EBNA-1 或重组酶的编码序列)。在允许调节上游的一个实施方案中，该方法包括：(a) 将该细胞与一种载体接触，使得该载体被该细胞内在化，其中该载体包含：(i) 一个编码
15 序列，位于反向定向的第一和第二重组位点之间，并邻接第二重组位点，使得该编码序列的定向使其转录方向与从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点的方向相反，其中该编码序列不操作性地连接任何启动子；以及(ii) 一个启动子，位于第一和第二重组位点之间并包含该编码序列区域之外的一个区域中，并邻接第一重组位点，
20 使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点，并且(b) 提供给细胞一个位点特异性重组酶，后者在该载体的第一和第二重组位点之间实现重组。

为了便于同时调节上游和下游单独的编码序列，该载体最好还包含一个第二编码序列，后者位于第一重组位点和该编码序列之间并包含
25 该编码序列的区域中，第二编码序列不操作性地连接该启动子。

此外，在提供调节下游单个编码序列的另一实施方案中，该方法包括：(a) 将该细胞与一种载体接触，使得该载体被该细胞内在化，其中该载体包含：(i) 一个编码序列，位于反向定向的第一和第二重组位

点之间，并邻接第一重组位点，使得该编码序列的定向使其转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点，以及(ii) 邻接第一重组位点的一个启动子，位于第一和第二重组位点之间并包含该编码序列区域之外的一个区域中，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点，其中该编码序列操作性地连接该启动子，并且(b) 提供给该细胞一个位点特异性重组酶，后者在该载体的第一和第二重组位点之间实现重组。

这些载体最好还包含一个或多个过客基因。在该启动子和该重组位点之间，或在该编码序列或第二编码序列和该重组位点之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。此外，可以将多个剪接位点(即剪接受体位点和剪接供体位点)和加 A 位点方法加入用于前述这些方法中的载体中，以使编码蛋白的基因表达和生产最大化。

图 5A-5G 描述了这些反向重组方法实施方案中的一些。具体地讲，描述了其中提供给细胞一个包含反向重组位点(FRS 和 SRS)的载体的本发明方法，最好也将或者顺式或者反式的重组酶提供给该细胞。用于该方法的载体(或者线性或者环状)最好也包含一个编码序列(CS)。当一个启动子位于第一和第二重组位点之间的区域中时，反向重组方法可以用来通过重组事件，调节上游一个编码序列(图 5A)，调节下游一个编码序列(图 5B)，或同时调节上游一个第一编码序列(CS)和下游一个第二编码序列(SCS；图 5C)。可以将一个或多个剪接供体(SD)和剪接受体(SA)位点加入该载体中，以使蛋白生产最适化(图 5D)。

采用在第一和第二重组位点之间并含 ori 区域以外的一个区域中具有一个启动子的载体，同样可以完成通过重组事件实现的基因表达的调节(例如当使用线性底物时)。这样一种载体可以用来通过重组事件，调节上游一个编码序列(图 5E)，调节下游一个编码序列(图 5F)，

或同时调节上游一个第一编码序列和下游一个第二编码序列(图 5G)。按照本发明,该载体中存在的任一编码序列(即第一、第二和任一其它编码序列)和/或任一过客基因都可以编码 EBNA-1、Rep、Flp、Cre、大 T 抗原、E1 或 E2 编码序列。该方法的其它改变对本领域技术人员是显而易见的。

新载体

尽管如上面关于本发明方法所述的,有多种可以用于本发明正文的载体,但本发明也提供一些在本发明平行重组方法和反向重组方法中特别有用的新载体。

本发明的载体包含平行定向或反向定向的第一和第二重组位点。第一和第二重组位点可以是任何适宜的重组位点,使得该载体被细胞内在化和接触适当的重组酶后,在该载体的第一和第二重组位点之间发生重组。

关于位于本发明正文的所有载体中的重组位点、重组酶、编码序列、重组位点之间的区域、启动子、过客基因等等,这类元件如前已经描述的,它们可以作为一个盒的部分或者独立存在,或者结合存在。在本发明的正文中,一个“盒”就是一个特殊的碱基序列,它具有便于亚克隆和回收核酸序列(例如一个或多个限制位点)或表达(例如加 A 位点或剪接位点)特殊核酸序列的功能。

采用本领域技术人员已知的多种方法,可以完成载体的鉴定和/或选择。例如,通过杂交、所谓“标记”基因功能的存在和缺乏以及特殊插入序列的表达,可以鉴定含有特殊基因或编码序列的载体。在第一种方法中,采用包含与插入核酸序列同源的序列的探针,通过杂交(例如通过 DNA-DNA 杂交),可以检测插入载体中的外源序列的存在。在第二种方法中,通过将编码这些功能的特殊基因插入该载体中引起某些标记基因功能(诸如抗生素抗性、胸苷激酶活性等等)的存在或缺乏,在此基础上,可以鉴定和选择重组载体/宿主系统。在第三种方法

中，通过分析插入的核酸序列表达的外源基因产物，可以鉴定载体。这类分析可以基于该基因产物的物理性质、免疫学性质或功能性质。

下面进一步描述在平行重组方法和反向重组方法中特别有用的本发明载体。

5

a. 平行重组载体

在一个实施方案中，本发明的平行重组载体包含：(a) 平行定位的第一和第二重组位点，(b) 位于第一和第二重组位点之间的一个复制起点，(c) 一个编码序列，它在第一和第二重组位点之间并包含该原点的区域中，并邻接第一重组位点，使得该编码序列的定向使其转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点，该编码序列不操作性地连接任何启动子，(d) 一个启动子，位于第一和第二重组位点之间并包含该原点的区域中，并邻接第二重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点。在第一重组位点和该编码序列之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。

此外，该载体最好还包含一个第二编码序列，后者位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该原点的区域之外的一个区域中，并邻接第二重组位点，第二编码序列操作性地连接该启动子。在该启动子和第二编码序列之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。该载体还可以包含其它编码序列，例如前述的一个第三编码序列。

为了优化基因表达和蛋白生产，该载体最好还包含：(a) 一个剪接受体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该原点区域中的第一重组位点和该编码序列之间，(b) 一个剪接供体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该原点区域中的该启动子和第二重组位点之间，以及(c) 一个剪接受体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该原点区域之外的一个区域中的第二重组位点和第二编码序列之间。这样一种载体提供一个通过提供一个附加

25

体调节基因表达的方法，其中通过形成附加体的重组事件，调节上游第一编码序列和调节下游第二编码序列。

在再一实施方案中，本发明的平行重组载体包含：(a) 平行定位的第一和第二重组位点，(b) 位于第一和第二重组位点之间的一个复制起点，(c) 一个启动子，位于第一和第二重组位点之间并包含该原点的区域中，并邻接第二重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点，以及(d) 一个编码序列，位于第一和第二重组位点之间并包含该原点的区域以外的一个区域中，并邻接第二重组位点，使得该编码序列操作性地连接该启动子。

该平行重组载体内的重组位点可以是上述本发明方法描述的任何适宜的重组位点。该平行重组载体内的重组位点最好是 Lox 位点，在该情况中，该平行重组载体最好还包含或者位于第一 Lox 位点上游或者位于第二 Lox 位点下游的 Cre 编码序列，或该平行重组载体内的重组位点是 Frt 位点，在该情况下该平行重组载体最好还包含或者位于第一 Frt 位点上游或者位于第二 Frt 位点下游的 Flp 编码序列。

该复制起点在前面进行了描述，它最好包含一个 EBV 的 oriP 序列、一个多瘤病毒或乳突瘤病毒的复制起点或任何其它复制起点。采用这些(以及其它)复制起点，最好可以将能使细胞复制或便于细胞复制的其它蛋白提供给该细胞。在某种意义上可以认为是“细胞复制蛋白”的这些其它蛋白最好选自 EBNA-1、大 T 抗原、E1 和 E2 蛋白。

该编码序列可以是任一适宜的编码序列。最好第一编码序列为 EBNA-1 或 Rep 编码序列，如本发明方法所述的。然而，第一编码序列(和第二编码序列或任一其它编码序列)最好也可以包含一个 Flp、Cre、大 T 抗原、E1 和/或 E2 编码序列。这样一种载体提供一种方法，通过提供一个附加体调节基因表达，其中通过形成附加体的重组事件，调节该编码序列。

该载体最好还包含一个过客基因，后者最好位于该编码序列和该

启动子之间。可以使用任一适宜的过客基因，诸如一个报道基因，或最优选使用本发明方法正文中描述的一个治疗基因。此外，本发明提供前述和附图中描述的其它载体。

5 b. 反向重组载体

本发明的反向重组载体包含：(a) 一个启动子，位于反向定向的第一和第二重组位点之间并邻接第二重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点，(b) 一个编码序列，位于第一和第二重组位点之间并包含该启动子区域以外的一个区域域中，并邻接第一重组位点，使得该编码序列的定向使其转录方向与从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点的方向相反，其中该编码序列不操作性地连接任何启动子。

该载体最好还包含一个第二编码序列，后者位于第一和第二重组位点之间并包含该启动子的区域以外的一个区域域中，并邻接第二重组位点，第二编码序列操作性地连接该启动子。在第一重组位点和第一编码序列之间，或在该启动子和第二编码序列之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。

此外，在本发明的另一实施方案中提供的一种载体包含：(a) 一个启动子，位于反向定向的第一和第二重组位点之间并邻接第二重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该启动子进行至第二重组位点，(b) 一个编码序列，位于第一和第二重组位点之间并包含该启动子的区域以外的一个区域域中，并邻接第二重组位点，使得该编码序列操作性地连接该启动子。

为了优化基因表达和蛋白生产，该反向重组载体还包含：(a) 一个剪接受体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该启动子的区域以外的一个区域域中的第一重组位点和该编码序列之间，(b) 一个剪接供体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该启动子区域中的该启动子和第二重组位点之间，以及(c) 一个剪接

受体位点，位于第一重组位点和第二重组位点之间并包含该启动子区域之外的区域中的第二重组位点和第二编码序列之间。

此外，本发明也提供一个反向重组载体，它包含：(a) 一个编码序列，位于反向定向的第一和第二重组位点之间并邻接第二重组位点，使得该编码序列的定向使其转录方向与从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点的方向相反，其中该编码序列不操作性地连接任何启动子，(b) 一个启动子，位于第一和第二重组位点之间并包含该编码序列的区域以外的一个区域中，并邻接第一重组位点，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点。

该载体最好还包含一个第二编码序列，它位于第一和第二重组位点之间并包含该编码序列的区域中，并邻接第一重组位点，第二编码序列操作性地连接该启动子。该载体最好也包含前述其它编码序列(例如一个第三编码序列和/或其它编码序列)。

此外，在另一实施方案中，该载体包含：(a) 一个编码序列，位于反向定向的第一和第二重组位点之间并邻接第一重组位点，使得该编码序列的定向使其转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点，(b) 一个邻接第一重组位点的启动子，位于第一和第二重组位点之间并包含该编码序列的区域以外的一个区域中，使得该启动子的定向使其指导的转录方向为从第一重组位点通过该编码序列进行至第二重组位点，其中该编码序列操作性地连接该启动子。

这些载体最好还包含一个过客基因。在该启动子和该重组位点之间，或在该编码序列或第二编码序列和该重组位点之间最好没有编码序列、启动子或转录终止位点。此外，可以将剪接位点(即剪接受体位点和剪接供体位点)和加 A 位点加入用于前述这些方法的载体中，以使编码蛋白的基因表达和生产最大化。

按照本发明的这样一种载体提供一个调节基因表达的方法，由于重组酶驱动的重组事件而不产生附加体。本发明也提供前述和附图中

描述的其它载体。

其它一般性考虑

在本发明方法中，通过将本发明的各个方面提供给细胞，将载体转移到宿主细胞中，该宿主细胞最好是真核宿主细胞中。真核宿主细胞可以体外存在或体内存在。按照本发明，通过将载体导入该细胞的任何方法，可以使细胞“接触”本发明的载体。最好利用病毒能够进入细胞的天然能力(例如，腺病毒通过受体介导的胞吞作用进入细胞的能力)，通过感染导入病毒载体。然而，可以通过任何适宜的方法，例如转染、磷酸钙介导的转化、微注射、电穿孔、渗透冲击等等，导入该病毒载体和质粒载体。同样地，在本发明的一个推荐实施方案中，考虑进行载体的体内转移。因此，本发明方法也计划通过本文提出的方法或通过标准方法进行载体的体内转移。

此外，按照本发明方法，“提供给该细胞一个位点特异性重组酶”包括提供载体编码的重组酶，或提供蛋白形式的重组酶。可以通过适于将蛋白导入细胞的方法，例如微注射和用于体外传递的腺病毒介导的吸收、注射或浸渍或本文描述的用于体内传递的其它方法，以及通过本领域技术人员已知的其它标准导入方法导入蛋白。

体内实施时，载体或蛋白传递的靶可以是任何适宜的器官或组织或组成细胞。所用的器官/组织/细胞最好属于循环系统(即心脏、血管或血液)、呼吸系统(即鼻、咽、喉、气管、支气管、细支气管、肺)、消化系统(即口、咽、食管、胃、肠、唾液腺、胰、肝、胆囊)、泌尿系统(即肾、输尿管、膀胱、尿道)、神经系统(即脑和脊髓，以及特殊感觉器官，诸如眼)和外皮系统(即皮肤)。甚至更优选的靶细胞选自心脏、血管、肺、肝、胆囊、膀胱和眼细胞。

对于这些实施方案，当以本文描述的方法使用一种或多种载体时，或当诸如 Cre 或 Frt 之类的重组酶以蛋白形式由外部给予时，细胞与本发明各种组分的接触可以以任何顺序进行或可以同时进行。该接

触最好同时进行。在一个推荐实施方案中，本发明的组分载体可以一起混合，并在接触该细胞前进行预保温。当给予多载体时，该细胞最好在接触第一载体不到大约 6 周后或不到 6 周前，接触另一载体。甚至优选该细胞在接触第一载体不到大约 2 周后或不到 2 周前，接触另一载体。当结合诸如 Cre 或 Frt 之类的重组酶给予载体时，该细胞最好在接触该蛋白不到大约 12 小时后或不到 12 小时前，接触一种载体。甚至更优选该细胞最好在接触该蛋白不到大约 12 小时后或不到 12 小时前，接触一种载体。

本发明的组合物(即包含本发明的载体和/或重组酶的一个组合物)可以制成具有适当药学可接受的载体或稀释剂的药物组合物，合适时，可以制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂，诸如片剂、胶囊剂、散剂、颗粒剂、软膏剂、溶液剂、栓剂、注射剂、吸入剂和气雾剂，以通常方式用于各自的给药途径。可以使用本领域已知的方法防止该组合物的释放和吸收，直至该组合物到达靶器官、组织或细胞，或确保该组合物的定时释放。应该使用不使本发明组合物失效的药学可接受形式。可以单独使用药物剂量形式的该组合物，或适当地联合以及结合其它药学活性化合物使用。

因此，本发明的药物组合物可以通过各种途径传递，并传递到动物体内的各个位点，以达到特殊的效果。可以通过包括将该制剂涂到或装入体腔内、吸入或吹入气雾剂在内的给药，或通过包括肌肉、静脉内、腹膜、皮下、皮内在内的非胃肠导入以及局部的给药，完成局部性传递或全身性传递。

可以提供单位剂量形式的本发明的组合物，其中每个剂量单位例如一茶匙、一片、一定量的溶液或一个栓剂，含有预定量的单独或适当地与其它活性药剂一起使用的该组合物。本文使用的术语“单位剂量形式”是指适用作人或动物对象的物理上分离的单位，每个单位含有预定量的单独使用或与其它活性药剂一起使用的本发明组合物，按足以产生所需效果的量计算，该组合物合适时与药学可接受的稀释剂、载

体或赋形剂结合使用。本发明新单位剂量形式的规格取决于待到达的特定作用和与该药物组合物在特定宿主中有关的特定药效学。

因此，本发明也提供一个获得宿主内稳定基因表达、或调节宿主内基因表达的方法，该方法包括采用任何上述给药途径或本领域技术人员已知并适用于特殊应用的可供选择的途径，给予本发明的组合物。该组合物的“有效量”使得在宿主中产生所需效果，后者可以采用本领域技术人员已知的几个终点进行监测。例如，一个所需作用可能包括将核酸有效地转移至一个宿主细胞中。可以通过治疗效果(例如减轻与待治疗疾病或综合症有关的症状)，或通过宿主内该转移基因或编码序列或其表达的进一步的证据(例如采用检测宿主细胞内该核酸的聚合酶链式反应、Northern 或 Southern 杂交或转录分析，或采用免疫印迹分析、或抗体介导的检测、或列举的检测该转移核酸编码的或由于这种转移影响水平或功能的蛋白或多肽的分析)监测这种转移。在下面实施例中描述的一个这种详述分析包括一种用于 β -葡糖苷酸酶基因表达的分析。

这些描述的方法决不是包括所有方法，适合特定应用的其它方法对本领域一般技术人员是显而易见的。此外，如上所述，可以通过该重组反应的适当分析，进一步接近该组合物的有效量。

一般来讲，为了确保本发明载体的有效转移，在考虑到给定给药途径接触的大致细胞数的基础上，最好每个待接触细胞使用大约 1-5,000 拷贝的该载体，甚至更优选每个细胞进入大约 1-300 pfu。然而，这仅仅是一个一般方针，决不排除在体外或体内的特定应用中使用较高或较低量的组分。例如，实际剂量或时间表的变化可以取决于该组合物是否结合其它药物组合物给药，或取决于药物动力学个体间的差异、药物配置和代谢。同样地，体外应用用量的变化可以取决于所用的特定细胞类型或转移该载体的方法。本领域技术人员可以按照特殊情况的需要，容易地作出必要的调整。

实施例

以下实施例进一步说明本发明，但是当然不应解释为以任何方式限制本发明的范围。

实施例 1

该实施例描述可以用来产生图 1A-1C 中提出的附加体的细胞内位点特异性重组方法和重组载体。特别是，该实施例证明通过重组事件传递附加体和调节上游基因转录的方法。

可以进行诸如产生菌株和质粒、凝胶电泳、DNA 操作，包括粒子分离、DNA 克隆和测序、Southern 印迹分析等等的标准分子和遗传技术，诸如本领域技术人员已知和在标准实验手册中详细描述(例如 Maniatis 等，分子克隆：实验手册，第二版(Cold Spring Harbr, NY, 1992); Ausubel 等，当前分子生物学的操作步骤，(1987))。限制酶和用于分子操作的其它酶由商业来源购买(例如 Boehringer Mannheim, Inc., Indianapolis, Indiana; New England Biolabs, Beverly, Massachusetts; Bethesda Research Laboratories, Bethesda, Maryland 等等)，并按照生产商的建议使用。采用以前描述的标准无菌培养试剂、培养基和培养技术(Erzerum 等，Nucleic Acids Research, 21, 1607-1612 (1993))培养和保持转化的人胚性肾细胞系 293 细胞(美国典型培养物保藏中心 CRL 1573)。合适时，使用嘌呤霉素用于选择转染细胞。

产生几个质粒，以测试和证实图 1A-1C 中提出的本发明方法。这些质粒包括图 6 描述的 pEOBspLx-Puro-CMV Lx，它包含作为 FCS 的 EBNA-1 编码序列。图 7 描述了质粒 pEOBspLx-Puro-CMV Lx- β glu，它包含作为 FCS 的 β -葡萄糖苷酸酶编码序列。质粒 pEOBspLx-Puro-CMV Lx 和 pEOBspLx-Puro-CMV Lx- β glu 都包含 Lox 位点(平行)作为重组位点，并包含一个 CMV 启动子作为调节上游基因表达的启动子。使用 CMV 启动子是因为它在大多数组织培养细胞中能够驱动相对高水平的组成型基因表达(Boshart 等，Cell, 41, 521-530 (1985))。同样

地, 质粒 pEOBspLx-Puro-CMV Lx 和 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 都包含 RSV 启动子控制下的嘌呤霉素编码序列。图 8 描述了 Cre 的表达质粒 pAdCMV Cre, 后者将噬菌体 P1 的 Cre 编码序列置于 CMV 启动子和 SV40 加 A 信号的控制下。

5 由 Invitrogen 的 pREP 4 载体(Invitrogen, San Diego, California)产生质粒 pEOBspLx-Puro-CMV Lx。pREP 4 用 *HpaI* 和 *BsmI* 进行限制性酶解, 将含有 *MluI*、*PvuII* 和 *KpnI* 限制位点的寡核苷酸在修饰该载体中特有的 *MluI* 位点后导入。将 *MluI*/*PvuI* DNA 片段上含有 SRV 启动子和牛生长激素(BGH)的加 A 信号控制下的嘌呤霉素基因的一个盒克隆
10 到该载体骨架中。将含有一个剪接信号、后面接一个多接头和 SV40 加 A 序列的一个 CMV 启动子导入该载体骨架的 *PvuII*/*KpnI* 位点中。将一个 *Lox* 位点导入 CMV 表达盒的内含子中。通过加入合成的剪接受体位点和 *Lox* 位点, 修饰 EBNA-1 编码序列上游的序列。该剪接受体位点接近 pEOBspLx-Puro-CMV Lx 中的 EBNA-1。

15 用β-葡萄糖苷酶编码序列和 SV40 加 A 信号取代 EBNA-1 编码序列, 由 pEOBspLx-Puro-CMV Lx 衍生质粒 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu。在 EBNA-1 编码序列内产生的缺失横跨从起始密码子至 EBNA-1 的 *BsgI* 位点的区域。

20 质粒 pAdCMV Cre 含有侧翼为 Ad5 序列的 1-355 和 3333-5788 的一个表达盒, 包含 CMV 启动子、Cre 编码序列和 SV40 加 A 信号。当然, 用于重组的序列的精确限制可以随所需的特定重组产物而变化(例如大约为 1-100 bp)。pAdCMV Cre 质粒可以与 Ad 重组, 产生一个 E1 缺陷型病毒(参见例如 Rosenfeld 等, (1991), 见上述; Rosenfeld 等, (1992), 见上述)。

25 为了测试通过选择 RSV/嘌呤霉素盒赋予的嘌呤霉素抗性选择含有 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 的细胞的能力, 可以进行 CaPO₄-介导的将 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 转染入表达 EBNA-1 的 293 细胞中(293-EBNA; Invitrogen, San Diego, CA)。转染后, 细胞在大约 0.5 mg/ml

的嘌呤霉素存在下保持。存活的细胞群体由于 RSV/嘌呤霉素盒表达嘌呤霉素而对嘌呤霉素有抗性。

将 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 与或不与 pAdCMV Cre 一起通过 CaPO₄-介导, 转染到 293 细胞中(Graham 等, *J. Gen. Virol.*, 36, 59-72 (1977)), 以测定由反式供应给 293 细胞的 Cre 基因产生的 Cre 重组酶是否在 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 中存在的 Lox 位点之间实现重组, 由此产生一个附加体, 并将该附加体中的β-葡萄糖苷酸酶编码序列置于 CMV 启动子的控制下。48 小时后, 加工细胞, 采用市售试剂盒, 按照生产商的建议(Tropix Inc., Bedford, MA)分析β-葡萄糖苷酸酶活性。表 2 表示获得的结果。

表 2. 转染后的β-葡萄糖苷酸酶水平

质粒	β-葡萄糖苷酸酶单位
无质粒	850
pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu	6.9×10^3
pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu + pAdCMV Cre	1.6×10^5

如表 2 所示, 在含有 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 和 pAdCMV Cre 两者 的那些细胞中β-葡萄糖苷酸酶水平最高。缺乏 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 和 pAdCMV Cre 时(即“无质粒”条件), 尽管观察到低的基础水平活性, 但在 293 细胞中几乎检测不到β-葡萄糖苷酸酶的水平。相比之下, 在缺乏 pAdCMV Cre 的情况下, 在含有 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 的细胞中观察到较高水平的β-葡萄糖苷酸酶。

后来, 我们发现 pEOBspLx-Puro-CMV Lx-βglu 中的重组位点是反向定向, 而不是平行定向。因此, 观察到的β-葡萄糖苷酸酶活性显然是因为通过重组事件置于该报道基因上游的隐性启动子的存在。然而, 这些结果确实证实本发明的方法可以用来获得反向重组载体。

实施例 2

该实施例描述用于细胞内位点特异性重组的载体，它可以用来产生一个附加体，如图 1A-1C 所示。更具体地讲，该实施例描述线性 Ad 载体的这类载体。

5 通过修改前一实施例中描述了这些载体和途径，本发明方法同样可以用于病毒附加体传递载体，特别是 Ad 附加体传递载体。即通过将 pEOBspLx-Puro-CMV_Lx- β glu 转染到组成型表达 EBNA-1 的细胞系中，可以证实这一病毒载体中 oriP 或能够在哺乳动物细胞中起作用的相似的复制起点的功能性(诸如 Reisman 等描述的，见上述)。可以选择和增殖抗嘌呤霉素的细胞。可以用 Southern 印迹分析证实该质粒作为
10 附加体保持。可以同样证实 EBNA-1 的功能性。

为了产生 Ad 载体，可以将 EBNA-1 和基于 β -葡糖苷酸酶的质粒都转移到穿梭载体中，并以与 pAdCMV Cre 的相似方式进行构建。基本上，该穿梭载体基本上包含一个侧翼为 *Bcl*I 和 *Bam*HI 限制位点的填充片段，一端周围为左侧的 355 bp，另一端周围为 Ad5 的残基 3333-
15 5788。用含有来自产生 pEOBspLx-Puro-CMV_Lx 的质粒 pAdER-Puro 的两个 Lox 位点的 *Bgl*II-*Bam*HI 限制片段取代该填充片段。同样地，可以用含有来自 pEOBspLx-Puro-CMV_Lx- β glu 的两个 Lox 位点的 *Bgl*II-*Bam*HI 限制片段取代该填充片段。然后，可以用这些载体中的一个，
20 通过先前描述的同源重组(参见例如 Rosenfeld 等，(1991)，见上述；Rosenfeld 等，(1992)，见上述)产生基于 Ad5 的载体。

实施例 3

附录实施例进一步描述可以用来实现细胞内位点特异性重组的
25 载体。具体地讲，该实施例描述可以用来提供 Cre 重组酶的载体一个代表实施例。

为了便于构建载体，特别是图 1A-1C 描述的载体，将 Cre 基因亚克隆到一个单独的 Ad 中。由 ATCC 获得的 P1 用作 Cre 重组酶编码序

列源，采用 PCR 将其克隆到 pCR-Script™ (Stratagene, La Jolla, CA) 中，提供一个更易接近的该基因源。然后，将该 Cre 基因转移到一个穿梭载体中，将其置于 CMV 启动子的控制下，后接一个 SV40 加 A 信号，产生图 9 描述的载体 pAdCMVCreRSVOrf6。该穿梭载体用来产生 Ad 载体 AdCMVCre6(采用前述方法)，其中 Cre 基因取代腺病毒基因组的 E1 区。

通过 PCR 并采用实施例 1 中描述的功能性分析，证实了 AdCMVCre6 的产生。即在基于 293 的细胞系 835 中以及在人肺癌细胞系 A549 中采用一个测试质粒，证实 AdCMVCre6 指导的重组的 Southern 印迹分析。同样地，也证实用于该实施例和先前实施例中各种构建物中的启动子、剪接供体位点和剪接受体位点的功能性。特别是，将β-葡萄糖苷酸酶置于图 1A 中的第一编码序列位置中，产生质粒 pEOBglugl。pEOBglugl 与一个表达 Cre 的质粒的共同转染导致β-葡萄糖苷酸酶高于千倍(3-log)的诱导。

这些结果证实该载体中 Cre 重组酶的功能性，并且进一步证实用于随后载体构建的基本载体组分的功能性。

实施例 4

该实施例进一步描述用来实现细胞内位点特异性重组的载体。具体地说，该实施例描述的载体包含一个多瘤病毒复制起点并可以用来例如获得失控复制。

采用先前实施例描述的标准克隆技术构建含有多瘤病毒原点的载体。采用 *Dpn* I 分析，证实各种载体中含有的和复制需要的 EBV 系统和多瘤病毒系统组分(特别是复制起点)的功能性。该分析的基础是大肠杆菌中产生的质粒甲基化，这些质粒对 *Dpn* I 的限制性酶切敏感。相比之下，如果该质粒在哺乳动物细胞中复制，那么它或者半甲基化或者根本不甲基化，这赋予它对 *Dpn* I 限制性酶切有抗性。

测试同基因构建物 pKSEBNAOriP(NR)(图 10 中描述的)和

pKSEBNA(NS)(图 11 中描述的), 以证实 BEV 组分的功能性。这些质粒在或者存在(即质粒 pKSEBNAOriP(NR))或者缺乏(即质粒 pKSEBNA(NS))恰好位于该基因 5'端的 oriP 的情况下, 含有在其自身病毒启动子控制下的 EBNA-1。pKSEBNAOriP(NR)中的 oriP 原点具有一个从 *Nco* I 至 *Eco* RV(即 EBV 的坐标为 8033-8995)的缺失, 导致缺失 962 bp。将这些质粒转染到得自 293 的细胞中, 5 天后收获细胞。将细胞沉淀经过 Hirt 抽提(Hirt, *J. Mol. Biol.*, 26, 365-369 (1967)), 进行 *Dpn* I 分析。发现仅有含有 oriP 的质粒进行复制。

同样地, 将质粒 pAdCLxPyTagOri(图 12 描述的)转染到 NIH 3T3 细胞中。该质粒含有 CMV 启动子控制下的多瘤病毒大 T 抗原编码序列, 也含有多瘤病毒复制起点, 后者恰好在 T 抗原编码序列侧翼的加 A 信号的 3'端。发现当将 T 抗原提供给该细胞时, 含有 T 抗原以外的这些元件的一个相似质粒进行复制。因此, 这些结果证实, 同 pKSEBNAOriP(NR)中存在的 EBV 组分一样, 该载体中存在的多瘤病毒组分能够在它存在的质粒上提供自主复制。

证实多瘤病毒组分的功能后, 将 pAdCLxPyTagOri 中存在的盒转移到图 13 描述的 Ad E1 缺失的穿梭载体 pADEPrRLr 中。该质粒基本上如图 1A 描述的, 具有第一编码序列(FCS), 后者包含 T 抗原编码序列, 该操纵子为多瘤病毒的复制起点。该质粒中的启动子(P)是 RSV 启动子, 第二编码序列(SCS)包含一个荧光素酶报道基因。证实了荧光素酶转录单位的活性。此外, 具有 Cre 表达盒的该质粒的转染导致该穿梭载体的位点特异性重组。因此, 这些结果证实这些载体中各种组分的功能。

这些结果证实, 可以构建并按照本发明使用用来实现细胞内位点特异性重组的其它载体。特别是, 这些结果证实, 可以构建包含多瘤病毒复制起点的载体, 并用它来例如获得失控复制。

实施例 5

该实施例进一步描述用来实现细胞内位点特异性重组的载体。具体地讲，该实施例描述包含牛乳突瘤病毒复制起点并用来在多种宿主中获得多拷贝数的载体。

5 使用先前实施例中描述的相似技术，构建包含牛乳突瘤病毒复制起点的载体。具体地讲，构建图 14 描述的载体 pCGE1E2ori。该载体包含具有 CMV 启动子控制下的牛乳突瘤病毒 E1 和 E1 基因的一个双顺反子表达盒。该载体恰好在该表达盒 3'端包含乳突瘤病毒复制起点，后者包括牛乳突瘤病毒基因组的第 7351-57 核苷酸。以前已报道了含有该牛乳突瘤病毒原点的另一构建物在 E1 和 E2 存在下稳定保持，它支持 pCGE1E2ori 载体的复制感受态。

10

本文引用的所有参考文献(包括专利、专利应用和出版物)都通过引用结合到本文中。

15 尽管重点在推荐实施方案上描述了本发明，但本领域技术人员会明显看出，可以进行和使用推荐实施方案中的变更法，可以在本文具体描述的实施方案之外实施本发明。本发明将包括这类变更法和其它的实施。因此，本发明包括下面权利要求书限定的本发明精神和范围内包括的所有修改。

说明书附图

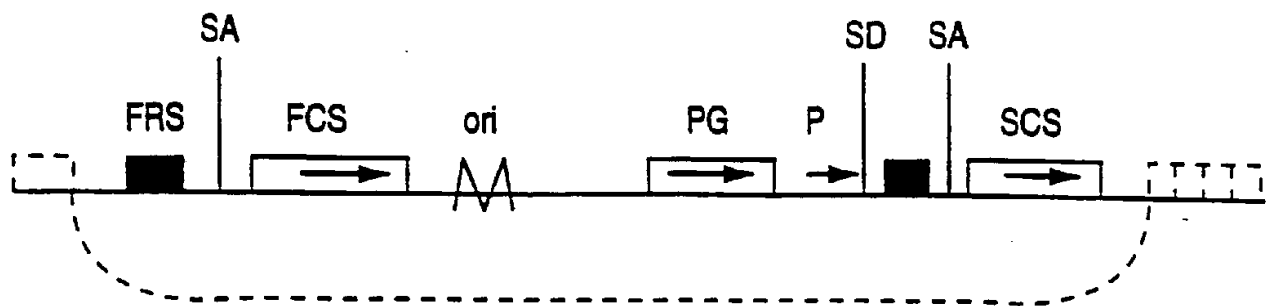


图. 1A

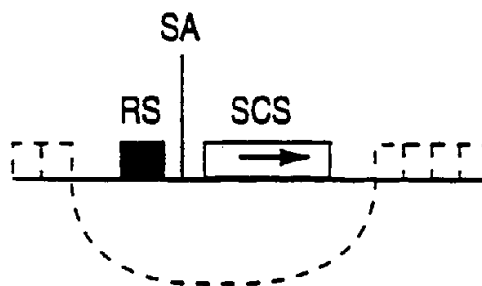


图. 1B

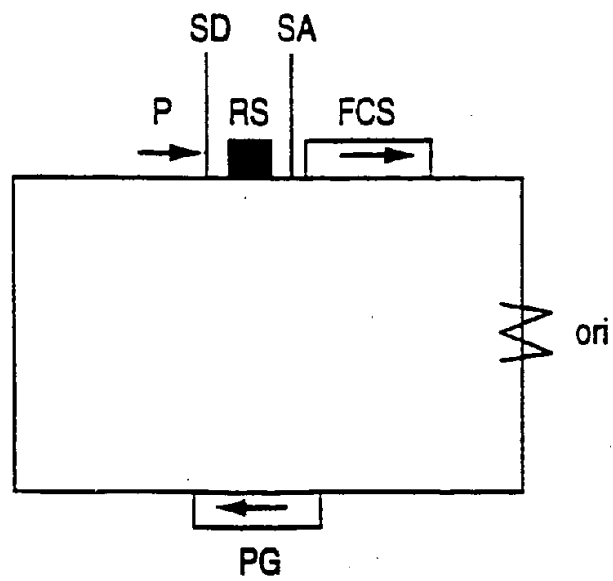


图. 1C

图. 2A

CS	HBD	Gly Ala
----	-----	---------

图. 2B

CS	Gly Ala	HBD
----	---------	-----

图. 2C

Gly Ala	CS	HBD
---------	----	-----

图. 2D

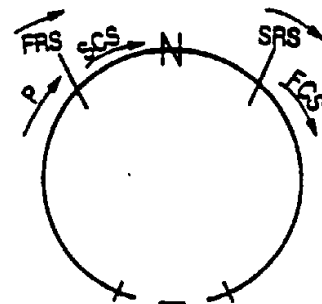
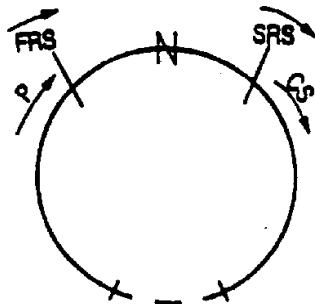
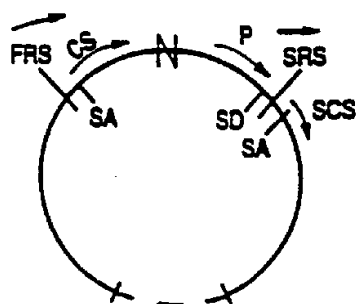
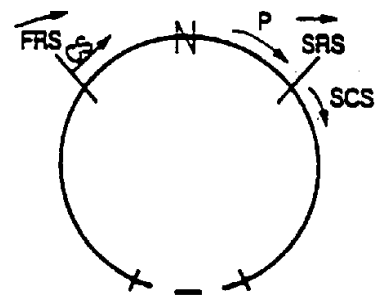
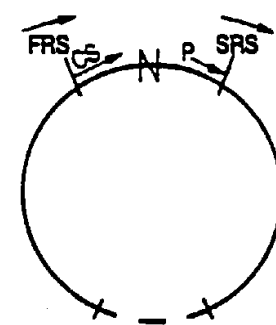
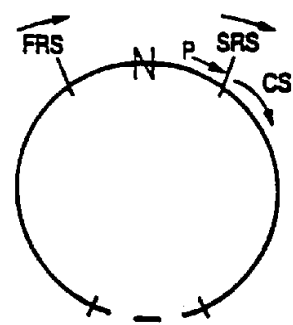
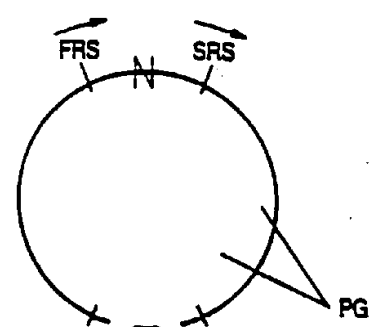
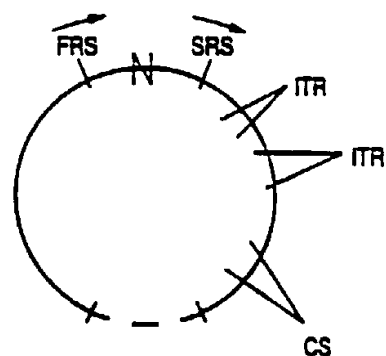
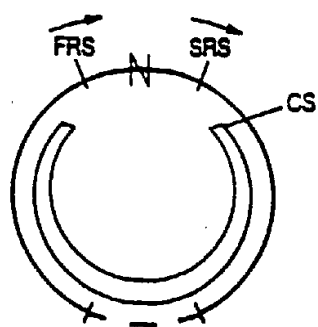
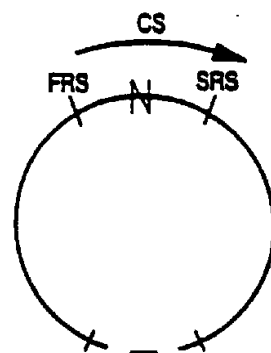
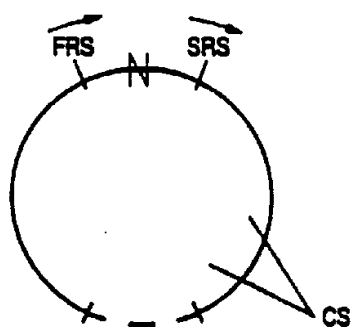
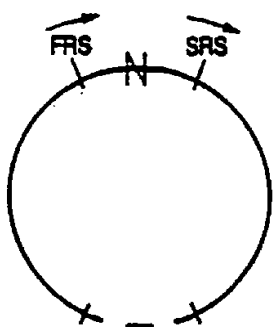
HBD	CS	Gly Ala
-----	----	---------

图. 2E

Gly Ala	HBD	CS
---------	-----	----

图. 2F

HBD	Gly Ala	CS
-----	---------	----



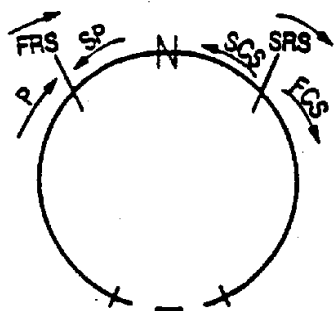


图. 3M

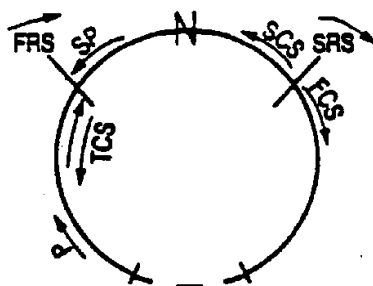


图. 3N

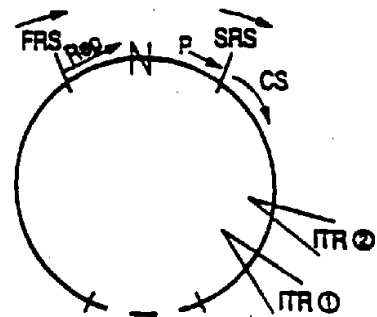


图. 3O

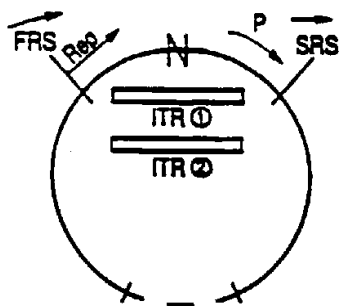


图. 3P

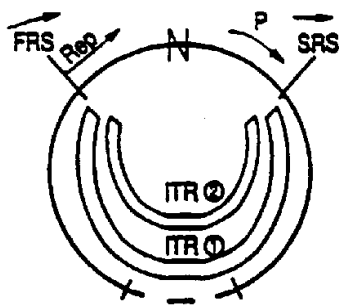


图. 3Q

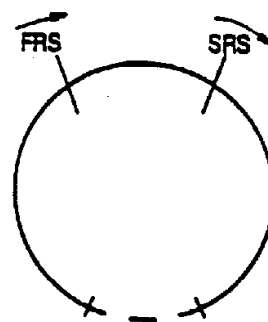


图. 3R

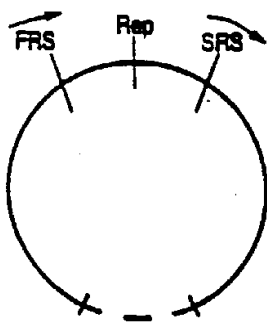


图. 3S

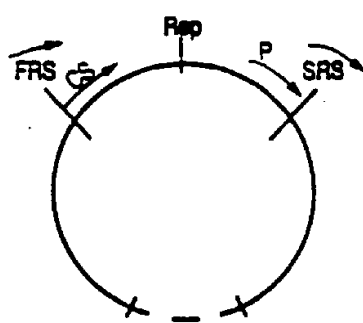


图. 3T

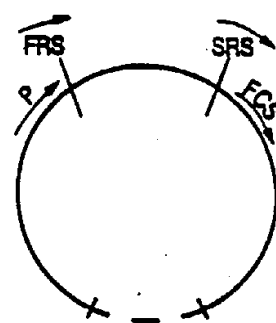


图. 3U

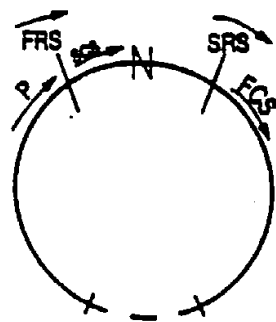


图. 3V

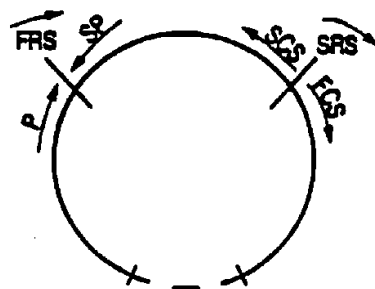


图. 3W

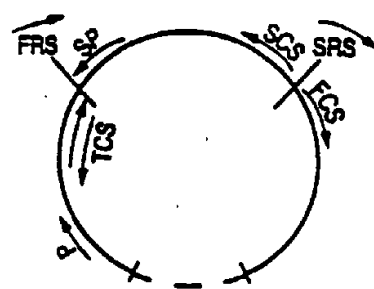


图. 3X

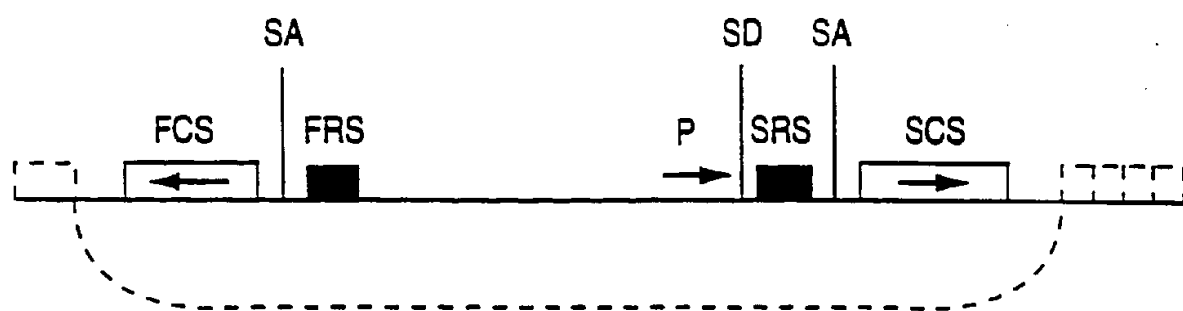


图. 4

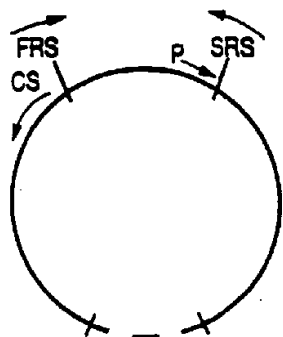


图. 5A

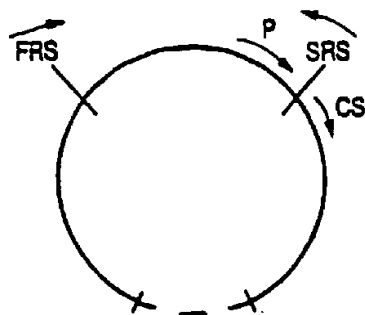


图. 5B

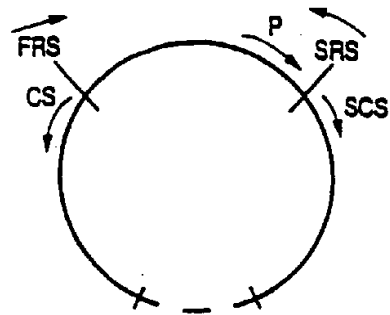


图. 5C

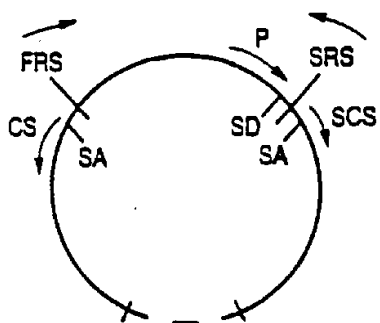


图. 5D

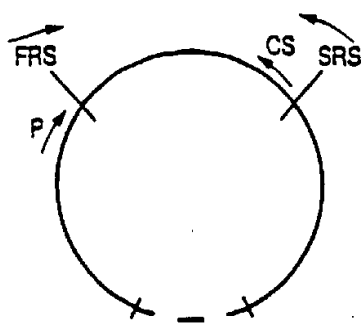


图. 5E

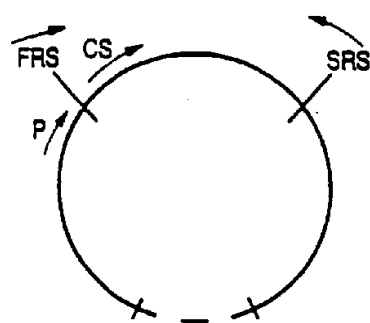


图. 5F

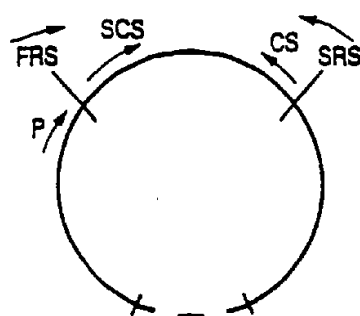


图. 5G

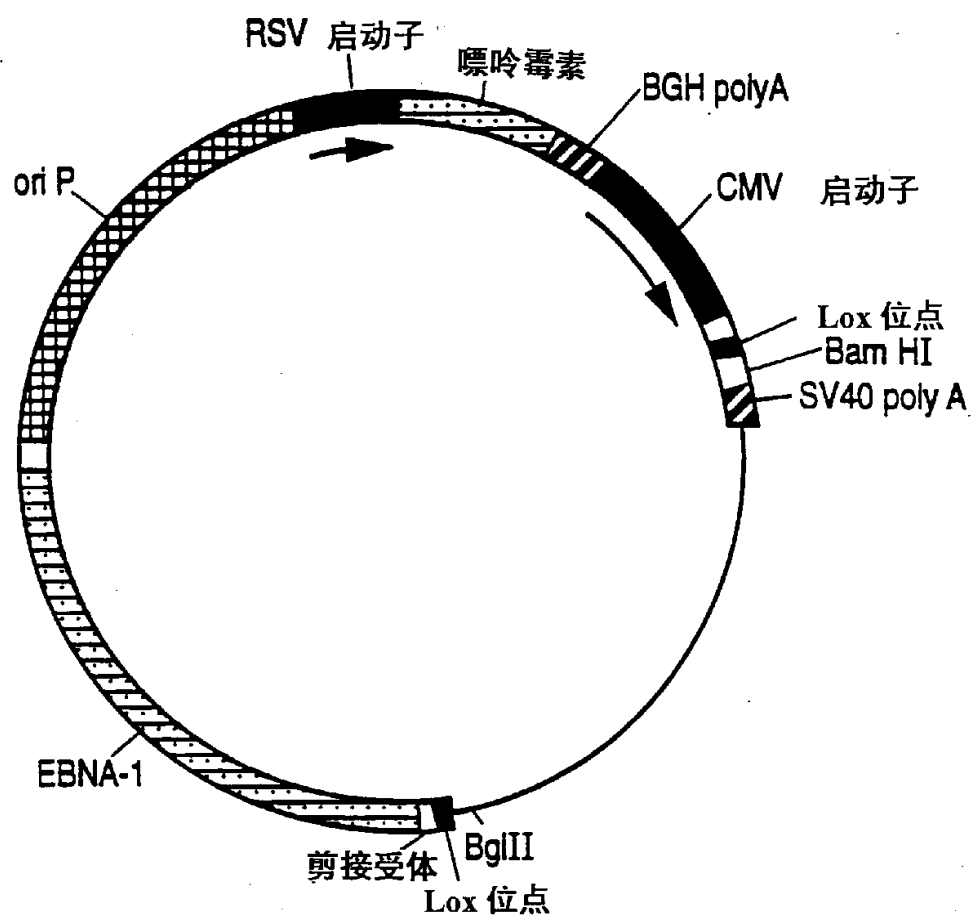


图 6

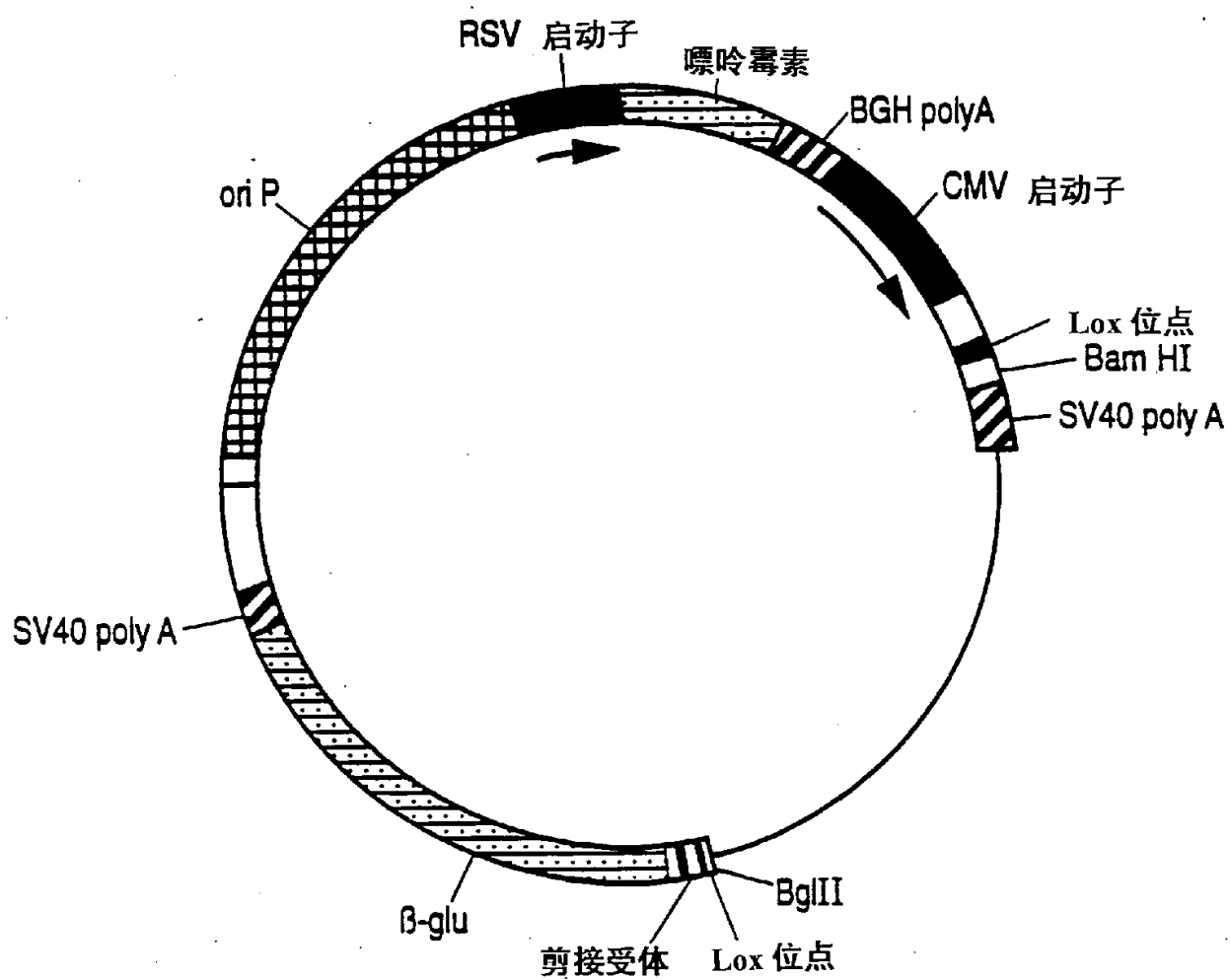


图 7

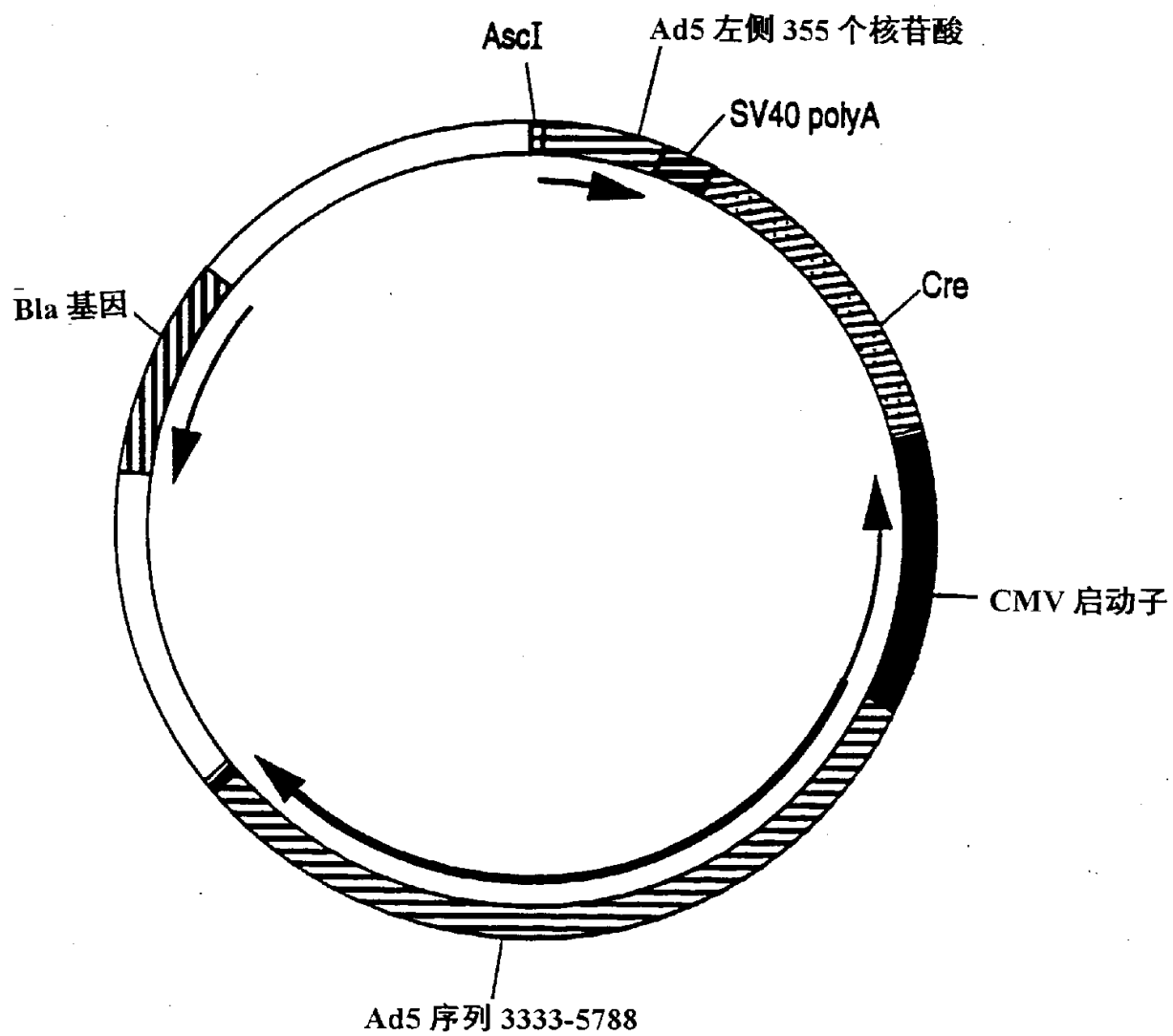


图 8

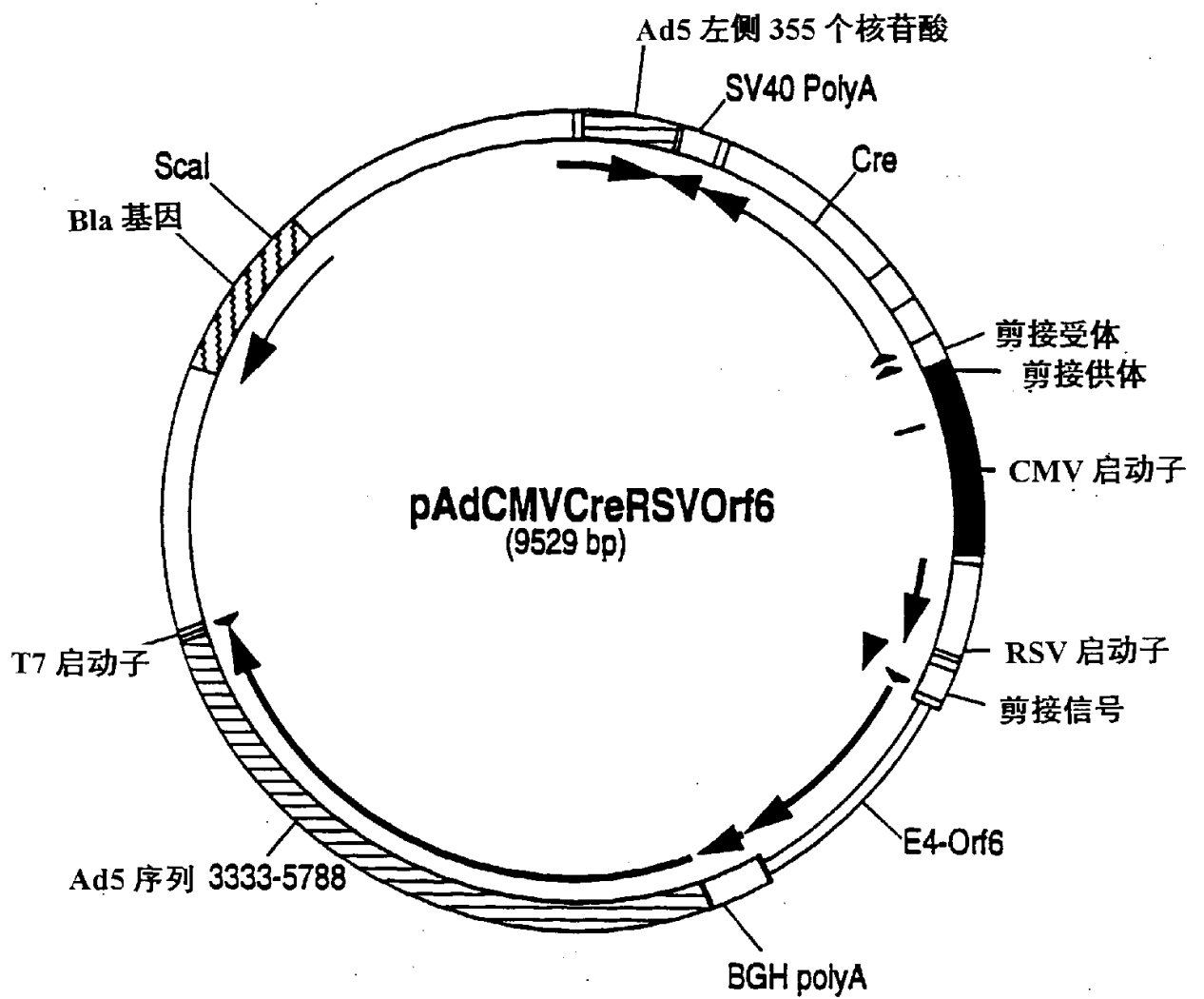


图 9

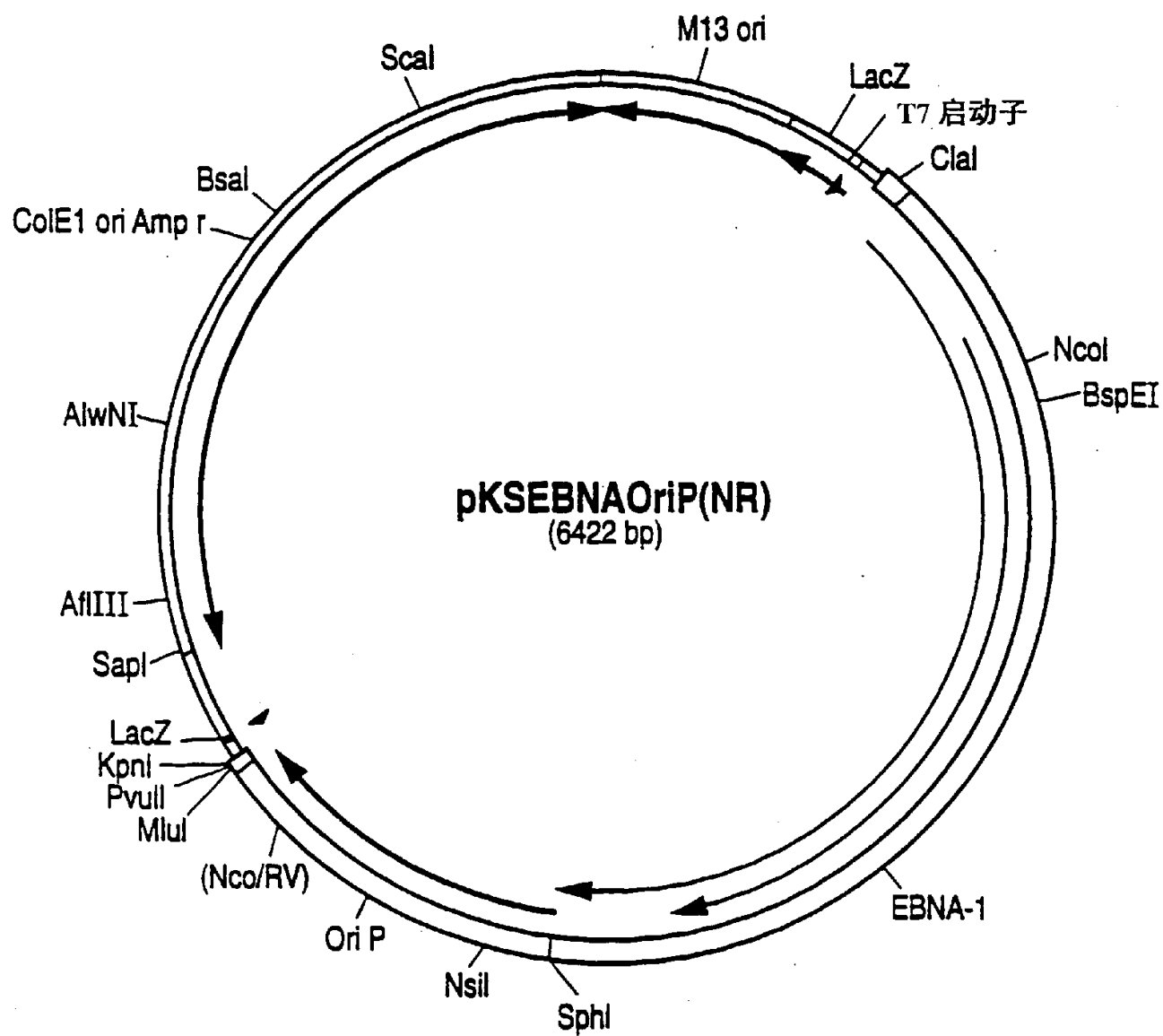


图 10

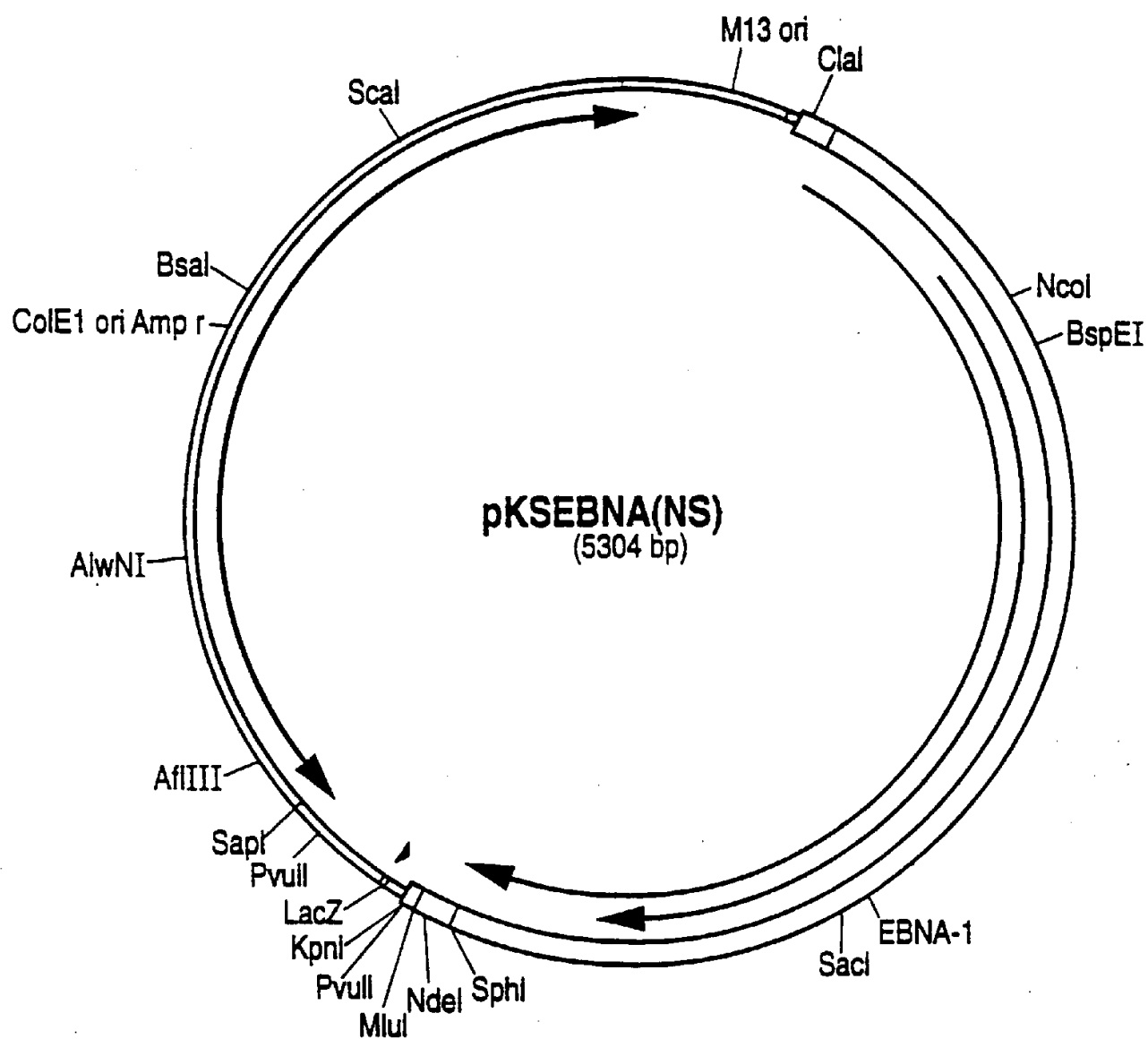


图 11

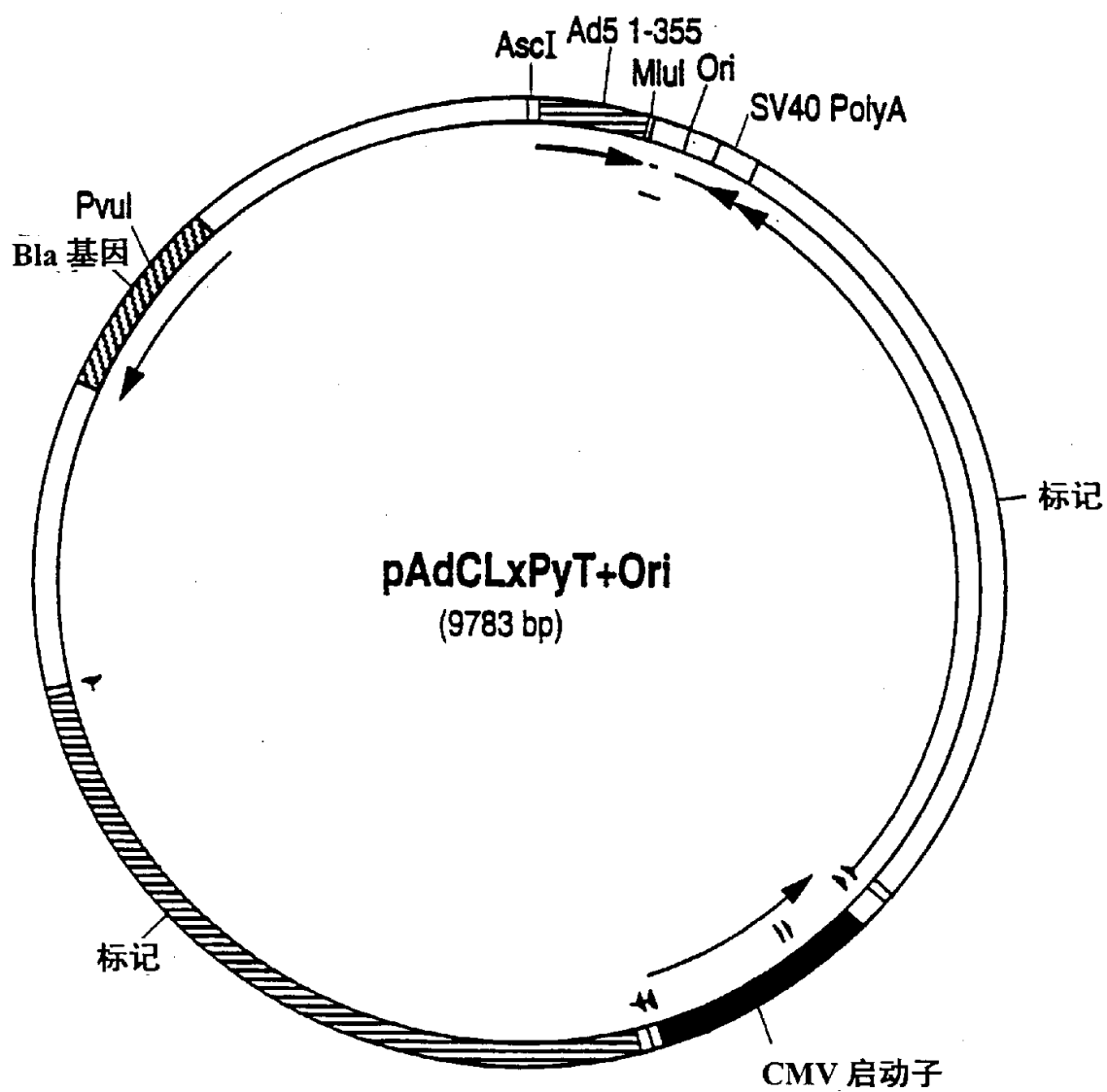


图 12

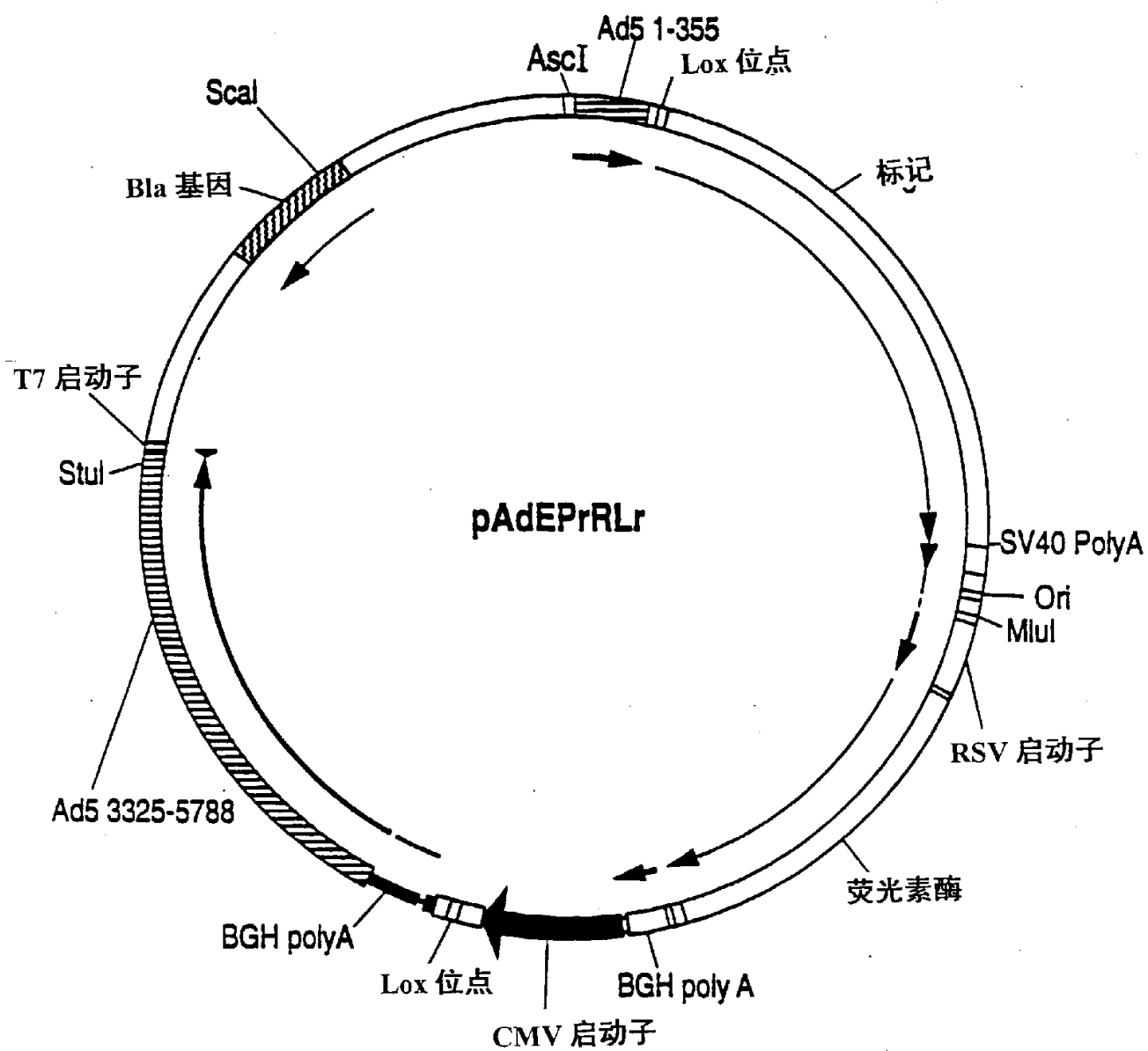


图 13

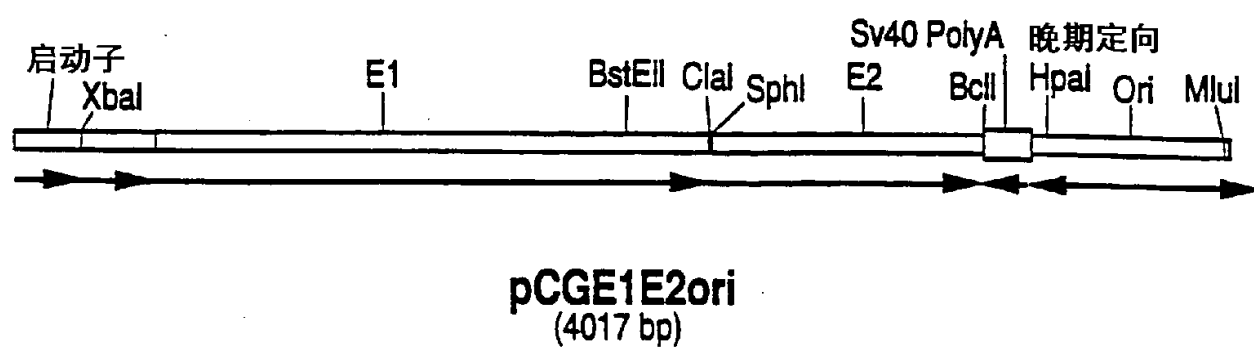


图 14