



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 120249340 A

(43) 申请公布日 2025. 07. 04

(21) 申请号 202510450562.4

C12N 15/867 (2006.01)

(22) 申请日 2019.03.20

C12N 15/864 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12R 1/19 (2006.01)

62/645,892 2018.03.21 US

(62) 分案原申请数据

201980034026.9 2019.03.20

(71) 申请人 阿尔德夫隆有限责任公司

地址 美国

(72) 发明人 詹姆斯·A·威廉姆斯

(74) 专利代理机构 北京品源专利代理有限公司

11332

专利代理师 刘明海 胡彬

(51) Int. Cl.

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书1页 说明书38页

序列表(电子公布) 附图7页

(54) 发明名称

产生改进的病毒和非病毒纳米质粒载体

(57) 摘要

本发明提供了产生改进的病毒和非病毒纳米质粒载体。具体来说,本发明提供了一种无抗生素标记的共价闭环环状重组DNA分子,其包括:
a. 无抗生素标记的插入物,其包含选自如下组成的组的结构化DNA序列:反向重复序列、正向重复序列、均聚重复序列和真核复制起点;b. Pol III-依赖性复制起点,其包含R6K γ 复制起点,其与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18;和c. RNA-OUT RNA选择标记,其包含与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA。

1. 一种无抗生素标记的共价闭合环状重组DNA分子,其包括:
 - a. 无抗生素标记的插入物,其包含选自由如下组成的组的结构化DNA序列:反向重复序列、正向重复序列、均聚重复序列和真核复制起点;
 - b. Pol III-依赖性复制起点,其包含R6K γ 复制起点,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18;和
 - c. RNA-OUT RNA选择标记,其包含与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA。
2. 根据权利要求1所述的重组DNA分子,其中所述RNA-OUT RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。
3. 根据权利要求1所述的重组DNA分子,其中所述R6K γ 复制起点和所述RNA-OUT RNA选择标记包含R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制-选择区,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。
4. 根据权利要求1所述的重组DNA分子,其中所述结构化DNA序列是均聚重复序列,并且其中所述均聚重复序列是polyA重复序列。
5. 根据权利要求1所述的重组DNA分子,其中所述结构化DNA序列是真核复制起点,并且其中所述真核复制起点是SV40复制起点。
6. 根据权利要求1所述的重组DNA分子,其中所述结构化DNA序列是正向重复序列,并且其中所述正向重复序列选自由如下组成的组:病毒LTR、慢病毒LTR或逆转录病毒LTR。
7. 根据权利要求1所述的重组DNA分子,其中所述结构化DNA序列是反向重复序列,并且其中所述反向重复序列选自由如下组成的组:转座子IR/DR重复序列、睡美人转座子IR/DR重复序列、AAV ITR、转座子ITR或PiggyBac转座子ITR。
8. 根据权利要求1-7中任一项所述的重组DNA分子,进一步包括小于1000bp的间隔区,其中所述Pol III-依赖性复制起点和RNA-OUT RNA选择标记在间隔区中。

产生改进的病毒和非病毒纳米质粒载体

[0001] 本发明是申请日为2019年3月20日,题为《产生改进的病毒和非病毒纳米质粒载体》的中国发明专利申请201980034026.9的分案申请。

[0002] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0003] 不适用。

[0004] 相关申请的交叉引用

[0005] 本申请要求于2018年3月21日提交的美国临时专利申请第62/645,892号的优先权,其标题为“产生改进的病毒和非病毒纳米质粒载体”,该临时申请的全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0006] 本发明涉及重组DNA分子(即载体),其可用于病毒和非病毒基因治疗、病毒和非病毒细胞治疗,更具体地说,用于改进病毒和非病毒载体的产量和质量、降低转染相关毒性、改进非病毒转座子载体的转座、改进病毒载体的包装滴度、改进病毒和非病毒载体编码基因的表达,以及用于消除病毒载体和非病毒载体介导的抗生素选择标记基因转移。

[0007] 这种重组DNA分子可用于生物技术、离体基因治疗、转基因生物、基因治疗、治疗性疫苗接种、农业和DNA疫苗。

背景技术

[0008] 大肠杆菌(E.coli)质粒长期以来一直是研究人员和工业使用的重组DNA分子的重要来源。如今,随着下一代生物技术产品(如基因药物和DNA疫苗)进入临床试验,并最终进入药物市场,质粒DNA的重要性日益增加。质粒DNA疫苗可作为病毒、细菌或寄生虫疾病的预防性疫苗;用于制备高免疫球蛋白产品的免疫制剂;用于传染病的治疗性疫苗;或者作为癌症疫苗。质粒也用于基因治疗或基因替代应用,其中在给患者施用后,从质粒中表达所需的基因产物。质粒也用于用于基因治疗或基因替代应用的非病毒转座子载体中,其中在从质粒转座和基因组整合后,从基因组中表达所需的基因产物。质粒也用于用于基因治疗或基因替代应用的病毒载体中,其中在转染生产细胞系后,将所需基因产物包装在转导病毒颗粒中,然后在病毒转导后从靶细胞中的病毒中表达所需的基因产物。

[0009] 非病毒和病毒载体质粒通常含有pMB1、ColE1或pBR322衍生的复制起点。常见的高拷贝数衍生物具有影响拷贝数调节的突变,如ROP(引物基因阻遏物)缺失,其具有增加拷贝数的第二个位点突变(如pMB1 pUC G至A点突变,或ColE1 pMM1)。较高的温度(42°C)可用于诱导具有pUC和pMM1复制起点的选择性质粒扩增。

[0010] Carnes,AE和Williams,JA的2011美国专利7943377描述了补料分批发酵的方法,其中含质粒的大肠杆菌细胞在补料分批阶段的部分期间在降低的温度下生长,在此期间生长速率受到限制,随后温度升高并在升高的温度下继续生长以积累质粒;受限生长速率下的温度变化改进了质粒产量和纯度。用于质粒生产的其它发酵过程在Carnes A.E.2005BioProcess Intl 3:36-44中有所描述,其全部内容通过引用并入本文。

[0011] 本领域教导了质粒疗法和质粒疫苗应用的限制之一是监管机构(例如食品和药物管理局、欧洲药品管理局)对以下方面的安全关注:1) 在内源性细菌菌群中的质粒转移和复制,或2) 质粒编码的选择标记在人类细胞或内源性细菌菌群中的表达。此外,监管机构指南建议去除载体中所有非必需序列。含有pMB1、ColE1或pBR322衍生的复制起点的质粒可以在大肠杆菌宿主中混杂地复制。这提出了一个安全性问题,即质粒治疗基因或抗原将被转移到患者的内源性菌群中并在其中复制。理想情况下,治疗性或疫苗质粒不会在内源性大肠杆菌菌株中复制。这需要用条件性复制起点替换pMB1、ColE1或pBR322衍生的复制起点,所述条件性复制起点需要用于繁殖的专门细胞系。此外,监管机构(如EMA和FDA)关注在基因治疗和基因疫苗载体中使用抗生素抗性标记或替代蛋白标记,因为担心基因(抗生素抗性标记或蛋白标记)可能在患者细胞中表达。理想情况下,质粒疗法和质粒疫苗将:1) 不能在内源性大肠杆菌菌株中复制,2) 不编码基于蛋白质的选择标记,和3) 最小化以消除所有非必需序列。

[0012] 本领域进一步教导了质粒载体应用的限制之一是由于载体的细菌区(即编码细菌复制起点和选择标记的区域)介导的启动子失活导致的质粒载体的转基因表达持续时间的减少(Chen ZY,He CY,Meuse L,Kay MA.2004.Gene Ther 11:856-864;Suzuki M,Kasai K,Saeki Y.2006.J Virol 80:3293-3300)。这导致转基因表达持续时间不足。改进转基因表达持续时间的策略是去除质粒的细菌区。例如,已经开发了不含细菌区的微环载体。微环载体中细菌区域的去除改进了转基因表达持续时间(Chen et al.,Supra,2004)。在微环载体中,真核区域多聚腺苷酸化信号通过短间隔区共价连接到真核区域启动子,所述短间隔区通常小于200bp,由重组连接位点组成。这种连接(间隔区)可以耐受更长的间隔序列,因为虽然长间隔 $\geq 1\text{kb}$ 长度导致转基因表达在体内沉默,但短间隔 $\leq 500\text{bp}$ 显示出与常规微环DNA载体相似的转基因表达模式(Lu J,Zhang F,Xu S,Fire AZ,Kay MA.2012.Mol Ther.20:2111-9)。

[0013] Williams,2014.DNA plasmids with improved expression.世界专利申请W02014035457公开了极小化的NanoplasmidTM载体,其利用RNA-OUT无抗生素选择,并用新的300bp的R6K起点替代大的1000bp的pUC复制起点。如从Lu et al.,Supra,2012的教导中所预期的,以R6K起点-RNA-OUT骨架将连接转基因表达盒5'和3'末端的间隔区减少至 $<500\text{bp}$,较常规微环DNA载体改进了表达持续时间。

[0014] 与2.2kb的pUC起点-kanR抗生素选择标记间隔区相比,1.1kb的pFAR4载体pUC起点tRNA无抗生素选择标记的间隔区的表达持续时间有所改进(Quiviger,M,Arfi A,Mansard D,Delacotte L,Pastor M,Scherman D,Marie C.2014.Gene Therapy 21:1001-1007)。这教导了用一些最高为1.1kb的细菌区域可以获得改进的表达持续时间。

[0015] 对于某些 $\leq 1.1\text{kb}$ 的间隔区,也观察到了与质粒载体相比表达水平的改进。例如,pVAX1衍生物(其2kb的细菌骨架减少到1.2、1.1或0.7kb)显示出与亲本pVAX1载体相比 ≥ 2 倍的改进的表达量(表1)。与亲本NTC8685载体相比,NTC8685衍生物(其1.5kb的细菌骨架减少到0.9kb、466bp或281bp(NanoplasmidTM载体))显示出 ≥ 2 倍的改进的表达量(表2)。

[0016] 这教导了用最高为1.2kb的短细菌区域可以获得改进的表达水平。

[0017] 表1:pVAX1哺乳动物表达载体间隔区(SR)衍生物表达水平

[0018]

pVAX1 载体 衍生物	细菌骨架 (bp)	选择 标记	选择	体外表达	体内表达
pVAX1	2 kb	KanR	Kan	1X (基线)	1X (基线)
pVAX1-A2 ^a	1.2 kb	RNA-OUT	蔗糖	4x	ND
pVAX1/MINI ^b	0.7 kb	RNAI (pUC 起点)	murA 翻译	2x	ND
pFAR4 ^c	1.1 kb	tRNA (琥 珀)	thyA 琥珀 突变抑制	ND	>5x ID EP
微环 ^d	50 bp	NA, 微环	NA, 微环	1.4-1.6x (等 摩尔量)	1.3x IM (等摩 尔量)

[0019] ^aCarnes et al., (2010) J. Gene Medicine 12:818-31[0020] ^bRibeiro et al., (2011) Cell Reprogram 14:130[0021] ^cMarie et al., (2010) J. Gene Medicine 12:323-32[0022] ^dWang et al., (2014) J Virology 88:1924-34

[0023] 表2NTC8685哺乳动物表达载体间隔区 (SR) 衍生物表达水平

[0024]

NTC8685 载体 衍生物 ^a	复制起点	细菌骨架 (bp)	选择标记	体外表达 (A549)	体内表达 (ID + EP)
NTC8685	pUC 起点	1.5 kb	RNA-OUT	1X (基线)	1X (基线)
NTC8385-Min	最小化的 pUC 起点	0.9 kb	RNA-OUT	2.1x	1.4-1.9 x
NTC9385R Nanoplasmid TM	R6K 起点	466 bp	RNA-OUT	2.5x	5.3-6.3x
NTC9385C Nanoplasmid TM	ColE2 起点	281 bp	RNA-OUT	1.1x	2.7-3.1x

[0025] ^aWilliams, Supra, 2014

[0026] 各种研究人员已经确定, 在生产AAV载体 (改进的转导单位滴度-表3) 和转座子载体 (增加的转座-表3) 方面, 微环载体优于质粒载体。由于短骨架微环载体的表达持续时间延长而导致的性能改进也应该在最高1.1kb的短细菌骨架质粒载体中观察到。

[0027] 表3带有各种病毒和非病毒载体平台的微环应用

[0028]

载体平台	pUC 质粒 (>1.5 kb pUC 起点-抗 生素标记间 隔区)	微环 (MC) 改 造 (<400 bp 间隔 区)	结果-性能	结果-抗生素标记基因 转移
自身互补(sc) AAV	pAAV-scGFP	MC.AAVscGFP	最高改进 30 倍的 转导单元 ^a	包装在最高 26.1%病 毒颗粒 ^a 中的质粒骨 架抗生素抗性标记在 转导细胞中整合基因 组的潜力
单链(ss) AAV	AAV2-ssGFP	MC.AAV-ssGFP	最高改进 3 倍的 转导单元 ^a	包装在最高 2.9% ^a 或 3% ^b 病毒颗粒中的质 粒骨架抗生素抗性标 记在转导细胞中整合 基因组的潜力
睡美人转座 子	SB puroR 报 告质粒	SB puroR 报告 MC	已建立细胞系的 转座率增加了 2 倍 ^c	T 细胞基因组整合的 质粒骨架抗生素抗性 潜力
	SB CD19-CAR	MC: SB CD19 CAR	CD19-CAR T 细 胞产量增加 4 倍; 降低的转染相关 毒性 ^d	
	SB	MC: SB (218 bp MC 骨 架)	向人造血干细胞 的转座增加了 6-7 倍; 降低的转 染相关毒性 ^e	

[0029] ^a Schnödt et al., (2016) Mol Ther-Nucleic Acids 5e355。该引用,连同Chadeuf et al., (2005) Molecular Therapy 12:744-53和Gray, 2017. W02017066579还报道了AAV辅助质粒抗生素抗性标记被包装到病毒颗粒中,证明了需要从AAV辅助质粒以及AAV载体中去除抗生素标记。有趣的是,与质粒相比,对线性Doggybone™ DNA单链(ss) AAV载体改造体没有观察到病毒滴度的改进(Karbownicke et al., 2017. Cell and Gene Therapy Insights 731-8)。这表明,与>1.5kb pUC抗生素标记质粒骨架载体相比,短骨架微环载体的改进需要短骨架微环载体,而不是线性载体(如Doggybone™载体)。

[0030] ^bGray, Supra, 2017描述了添加一个大的间隔区来移动选择标记远离ITRs。与标准质粒AAV载体的5-6kb相比,所产生的载体pAAV CMV GFP为11kb,因此与亲本相比,转导单位减少

[0031] ^cSharma et al., (2013)Molecular Therapy Nucleic Acids 2:e74

[0032] ^d核转染:Monjezi et al., (2017)Leukemia 31:186-94

[0033] ^e核转染:Holstein et al., (2018)Molecular Therapy epub Jan 17, 2018

[0034] 事实上,据报道,与2.8kb的细菌骨架pT2质粒SB转座子载体/SB100x转座酶载体组合相比,1.1kb的细菌骨架pFAR4 SB转座子载体/SB100x转座酶载体组合将睡美人(sleeping beauty)转座到人类细胞中的效果改进了2倍(Pastor, M, Johnen S, Harmening N, Quiviger M, Pailloux J, Kropp, M, Walter P, Ivics Z, Izsvak Z, Thumann G, Scherman D. 2018Molecular Therapy 11:57-67)。

[0035] 然而,病毒载体如AAV、慢病毒和逆转录病毒载体,以及转座子载体在其末端含有结构化DNA序列。例如,睡美人转座子载体含有侧翼IR/DR序列,AAV载体含有侧翼ITRs,慢病毒和逆转录病毒载体含有侧翼LTRs。

[0036] pUC起点与结构化DNA序列的紧密接近导致异常的复制终止,导致复制中间体不可接受地降低质粒质量(Levy J. 2004. US专利6709844)。Levy教导说,当任何高拷贝复制起点距离结构化DNA序列(如增强子、LTR或IRES)小于1kb时,就会形成复制中间体,但当高拷贝复制起点距离结构化DNA序列大于1.5kb时,就不会形成复制中间体。由于pUC起点本身是1kb,因此不存在构建预计不会产生复制中间体的<1.1kb细菌区的含有pUC起点的AAV、慢病毒、逆转录病毒或转座子载体的构造。

[0037] Lu J, Williams JA, Luke J, Zhang F, Chu K, and Kay MA. 2017. Human Gene Therapy 28:125-34公开了不含抗生素的小内含子质粒(MIP) AAV载体,并建议MIP内含子AAV载体可以去除载体骨架以产生短骨架AAV载体。试图在小内含子质粒AAV载体中创建一个类似6或10bp间隔区的微环状结构是有毒性的(见表7,脚注e),可能是由于AAV ITRs的如此紧密的并置产生了一个长回文。虽然可以制备间隔区长度<1kb的MIP载体,但MIP内含子策略的缺点是需要将编码复制和选择的内含子克隆到真核区域,这对于许多载体来说是不可能或不希望的。

[0038] 创建短细菌区AAV、慢病毒、逆转录病毒或转座子载体的微环策略的缺点是生产微环载体的方法昂贵且不容易扩展。对于微环载体,已经开发了基于大肠杆菌的生产系统,其中在质粒生产后,通过噬菌体重组酶对质粒中识别序列的作用,将细菌区和真核区分离并环化成微环(真核区)和细菌区环。在一些方法中,然后利用限制酶在独特的位点消化细菌区环,以消除这种难以去除的污染物。这些生产方法效率很低。例如,微环载体的最佳生产方法每升培养物仅产生5mg的微环(Kay MA, He CY, Chen ZY. 2010. Nat Biotechnol 28:1287-1289)。

[0039] 还没有高产量生产pFAR载体的方法报道;该系统利用质粒携带的抑制性tRNA基因来补充thyA基因的TAG琥珀无义突变,以补充胸腺嘧啶核苷营养缺陷并允许细胞在最小培养基上生长(Marie et al., Supra, 2010)。

[0040] 需要一种解决方案来开发AAV、慢病毒、逆转录病毒或转座子载体,所述载体包含优选小于1000bp的短间隔区,所述短间隔区可以被有效生产而不存在复制中间体或低产

量。这些载体不应编码基于蛋白质的选择标记,并应最小化以消除所有非必需序列。

发明内容

[0041] 本发明涉及用于病毒和非病毒基因治疗、病毒和非病毒细胞治疗的载体,更具体地,用于改进病毒和非病毒载体的生产产量和质量、用于降低转染相关毒性、用于改进非病毒转座子载体的转座、用于改进病毒载体的包装滴度、用于改进病毒和非病毒载体编码的转基因的表达、以及用于消除通过病毒和非病毒载体的抗生素抗性标记基因转移。

[0042] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制结构化DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0043] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制反向重复DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0044] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制正向重复DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0045] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制均聚重复DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0046] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制增强子结构化DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0047] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制polyA重复DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0048] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制SV40复制起点DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0049] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制慢病毒LTR DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0050] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制逆转录病毒LTR DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0051] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制病毒LTR DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0052] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制AAV ITR DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0053] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制转座子IR/DR DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0054] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制睡美人IR/DR DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0055] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制PiggyBac ITR DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0056] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制CMV增强子DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

[0057] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点来复制SV40增强子DNA序列的改进的载体的方法和组合物。

- [0058] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的病毒载体的方法和组合物。
- [0059] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的慢病毒载体、慢病毒包膜载体和慢病毒包装载体的方法和组合物。
- [0060] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的逆转录病毒载体、逆转录病毒包膜载体和逆转录病毒包装载体的方法和组合物。
- [0061] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的AAV载体和AAV辅助载体的方法和组合物。
- [0062] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的腺病毒载体的方法和组合物。
- [0063] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的非病毒转座子和转座酶载体的方法和组合物。
- [0064] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的非病毒睡美人转座子和转座酶载体的方法和组合物。
- [0065] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的非病毒PiggyBac转座子和转座酶载体的方法和组合物。
- [0066] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的非病毒To12转座子和转座酶载体的方法和组合物。
- [0067] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的改进的非病毒包含polyA的mRNA载体的方法和组合物。
- [0068] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的病毒转导单位产量的改进的病毒载体的方法和组合物。
- [0069] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的病毒转导单位产量的改进的慢病毒载体的方法和组合物。
- [0070] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的病毒转导单位产量的改进的逆转录病毒载体的方法和组合物。
- [0071] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的病毒转导单位产量的改进的AAV载体和AAV辅助载体的方法和组合物。
- [0072] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的转座的改进的非病毒转座子和转座酶载体的方法和组合物。
- [0073] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的转座的改进的非病毒睡美人转座子和转座酶载体的方法和组合物。
- [0074] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的转座的改进的非病毒PiggyBac转座子和转座酶载体的方法和组合物。
- [0075] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的转座的改进的非病毒To12转座子和转座酶载体的方法和组合物。
- [0076] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的表达的改进的病毒载体的方法和组合物。
- [0077] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的表达的改进的慢病毒载体的方法和组合物。
- [0078] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的表达的改进的逆转录病毒载

体的方法和组合物。

[0079] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的表达的改进的AAV载体和AAV辅助载体的方法和组合物。

[0080] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的表达的改进的非病毒转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0081] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的表达的改进的非病毒睡美人转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0082] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的表达的改进的非病毒PiggyBac转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0083] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有改进的表达的改进的非病毒To12转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0084] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的无抗生素抗性标记基因转移风险的改进的病毒载体的方法和组合物。

[0085] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的无抗生素抗性标记基因转移风险的改进的慢病毒载体、慢病毒包膜载体和慢病毒包装载体的方法和组合物。

[0086] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的无抗生素抗性标记基因转移风险的改进的逆转录病毒载体、逆转录病毒包膜载体和逆转录病毒包装载体的方法和组合物。

[0087] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的无抗生素抗性标记基因转移风险的改进的AAV载体和AAV辅助载体的方法和组合物。

[0088] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的无抗生素抗性标记基因转移风险的改进的非病毒转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0089] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的无抗生素抗性标记基因转移风险的改进的非病毒睡美人转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0090] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的无抗生素抗性标记基因转移风险的改进的非病毒PiggyBac转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0091] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的无抗生素抗性标记基因转移风险的改进的非病毒To12转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0092] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有降低的转染相关毒性的改进的病毒载体的方法和组合物。

[0093] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有降低的转染相关毒性的改进的慢病毒载体的方法和组合物。

[0094] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有降低的转染相关毒性的改进的逆转录病毒载体的方法和组合物。

[0095] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有降低的转染相关毒性的改进的AAV载体和AAV辅助载体的方法和组合物。

[0096] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有降低的转染相关毒性的非病毒转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0097] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有降低的转染相关毒性的非病毒睡美人转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0098] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有降低的转染相关毒性的非病毒PiggyBac转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0099] 公开了利用Pol III-依赖性复制起点的具有降低的转染相关毒性的非病毒To12转座子和转座酶载体的方法和组合物。

[0100] 上述改进和下述改进中的每一个都是,例如,相对于在相似或相同的情况下但不包括Pol III-依赖性复制起点的不同质粒实现的改进。

[0101] 本发明的一个目的是提供改进的病毒和非病毒载体生产产量。

[0102] 本发明的另一个目的是提供改进的病毒和非病毒载体生产质量。

[0103] 本发明的另一个目的是提供具有改进的包装滴度的病毒载体。

[0104] 本发明的另一个目的是提供具有改进的转座的非病毒转座子载体。

[0105] 本发明的另一个目的是提供具有改进的编码转基因表达的病毒和非病毒载体。

[0106] 本发明的另一个目的是提供消除抗生素抗性标记基因转移的病毒和非病毒载体。

[0107] 本发明的另一个目的是提供具有降低的转染相关毒性的病毒和非病毒载体。

[0108] 在一个实施方案中,本技术提供了一种用于改进共价闭合环状质粒的复制的方法,包括以下步骤:a)提供共价闭合环状质粒,其包含:i)Pol III-依赖性复制起点,和ii)包含结构化DNA序列的插入物,所述结构化DNA序列选自反向重复序列、正向重复序列、均聚重复序列、真核复制起点和真核启动子增强子序列,其中所述结构化DNA序列沿复制方向距离Pol III-依赖性复制起点小于1000bp;b)修饰a)的共价闭合环状重组分子,使得Pol I-依赖性复制起点被Pol III-依赖性复制起点取代,由此得到的Pol III-依赖性复制起点的共价闭合环状质粒具有改进的复制。在另一个实施方案中,所述Pol I-依赖性复制起点选自由如下组成的组:pUC起点、pMB1起点和ColE1起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性复制起点是R6K γ 复制起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述结构化DNA序列选自由如下组成的组:polyA重复、SV40复制起点、病毒LTR、慢病毒LTR、逆转录病毒LTR、转座子IR/DR重复序列、睡美人转座子IR/DR重复序列、AAV ITR、CMV增强子、和SV40增强子。在另一个实施方案中,所述改进的复制选自由如下组成的组:减少复制中间体的产生和增加质粒拷贝数。

[0109] 在一个实施方案中,本技术提供了一种用于改进共价闭合环状质粒的复制的方法,包括以下步骤:a)提供共价闭合环状质粒,其包含:i)Pol III-依赖性复制起点,和ii)包含结构化DNA序列的插入物,所述结构化DNA序列选自反向重复序列、正向重复序列、均聚重复序列、真核复制起点和真核启动子增强子序列,其中所述结构化DNA序列沿复制方向距离Pol III-依赖性复制起点小于1000bp;b)修饰a)的共价闭合环状重组分子,使得抗生素选择标记被RNA选择标记取代,并且所述Pol I-依赖性复制起点被Pol III-依赖性复制起点取代,由此得到的Pol III-依赖性复制起点的共价闭合环状质粒具有改进的复制。在另一个实施方案中,所述Pol I-依赖性复制起点选自由如下组成的组:pUC起点、pMB1起点和ColE1起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性复制起点是R6K γ 复制起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:

4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述RNA选择标记是RNA-OUT RNA选择标记,其编码与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA。在另一个实施方案中,所述细菌复制选择区包含用Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区取代Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记,所述Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。在另一个实施方案中,所述结构化DNA序列选自由如下组成的组:polyA重复、SV40复制起点、病毒LTR、慢病毒LTR、逆转录病毒LTR、转座子IR/DR重复序列、睡美人转座子IR/DR重复序列、AAV ITR、CMV增强子、和SV40增强子。在另一个实施方案中,所述改进的复制选自由如下组成的组:减少复制中间体的产生和增加质粒拷贝数。

[0110] 在一个实施方案中,本技术提供了一种无抗生素标记的共价闭合环状重组DNA分子,其包含:a)无抗生素标记的插入物,其包含选自如下组成的组的结构化DNA序列:反向重复序列、正向重复序列、均聚重复序列、真核复制起点和真核启动子增强子序列;b) Pol III-依赖性复制起点,其包括R6K γ 复制起点,所述R6K γ 复制起点与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18;和c)一种RNA-OUT RNA选择标记,其包含一种RNA-IN调节RNA-OUT功能变体,该变体与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述R6K γ 复制起点和所述RNA-OUT RNA选择标记包含R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区,其与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。在另一个实施方案中,所述结构化DNA序列选自由如下组成的组:polyA重复、SV40复制起点、病毒LTR、慢病毒LTR、逆转录病毒LTR、转座子IR/DR重复序列、睡美人转座子IR/DR重复序列、AAV ITR、CMV增强子、和SV40增强子。在另一个实施方案中,所述重组DNA分子选自由如下组成的组:病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体、AAV载体、Ad载体、非病毒转座子载体、睡美人转座子载体、PiggyBac转座子载体、Tol2转座子载体和含polyA的mRNA载体。

[0111] 在一个实施方案中,本技术提供了一种从共价闭合环状质粒出发改进AAV载体病毒转导单位产量的方法,包括以下步骤:a)提供共价闭合环状质粒,其包含:i)1kb或更大的细菌复制选择区,其包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记,和ii)插入物,其包含选自如下组成的组的真核区域:AAV载体、AAV rep cap载体、Ad辅助载体和Ad辅助rep cap载体;b)修饰a)的共价闭合环状重组分子,使得包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记的1kb的或更大的细菌复制选择区域被小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域取代,由此当转染入哺乳动物细胞时,所得Pol III-依赖性复制起点共价闭合环状质粒具有改进的AAV病毒转导单位产生。在另一个实施方案中,所述Pol I-依赖性复制起点选自由如下组成的组:pUC起点、pMB1起点和ColE1起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性R6K复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自如下组成的组

的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是编码与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA选择标记。在另一个实施方案中,所述小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。

[0112] 在一个实施方案中,本技术提供了一种从共价闭合环状质粒出发改进逆转录病毒或慢病毒载体病毒转导单位产量的方法,包括以下步骤:a) 提供共价闭合环状质粒,其包含:i) 1kb或更大的细菌复制选择区,其包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记,和ii) 插入物,其包含选自由如下组成的组的真核区域:逆转录病毒载体、慢病毒载体、逆转录病毒包膜载体、慢病毒包膜载体、逆转录病毒包装载体和慢病毒包装载体;和b) 修饰a) 的共价闭合环状重组分子,使得包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记的1kb的或更大的细菌复制选择区域被小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域取代,由此当转染入哺乳动物细胞时,所得Pol III-依赖性复制起点共价闭合环状质粒具有改进的病毒转导单位产生。在另一个实施方案中,所述Pol I-依赖性复制起点选自由如下组成的组:pUC起点、pMB1起点和ColE1起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性R6K复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是编码与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA选择标记。在另一个实施方案中,所述小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。

[0113] 在一个实施方案中,本发明设想了一种用于改进共价闭合环状非病毒转座子质粒的转座的方法,包括以下步骤:a) 提供共价闭合环状质粒,其包含i) 1kb的或更大的细菌复制选择区,该细菌复制选择区包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记,和ii) 插入物,该插入物包含非病毒真核区域,所述非病毒真核区域选自转座子载体、睡美人转座子载体、睡美人转座酶载体、PiggyBac转座子载体、PiggyBac转座酶载体、To12转座子载体、To12转座酶载体;b) 修饰(a) 的共价闭合环状重组分子,使得包含Pol I依赖的复制起点和抗生素选择标记的1kb的或更大的细菌复制选择区域被小于1kb的Pol III依赖的R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域取代,由此当转染入哺乳动物细胞时,所得的Pol III依赖的复制起点共价闭合环状质粒具有改进的转座。在另一个实施方案中,所述Pol I-依赖性复制起点选自由如下组成的组:pUC起点、pMB1起点、或ColE1起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性R6K复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自由如下组成的组的序列

具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是编码与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA选择标记。在另一个实施方案中,所述小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17。

[0114] 在一个实施方案中,本技术提供了一种改进共价闭合环状病毒载体或非病毒转座子质粒表达的方法,包括以下步骤:a) 提供共价闭合环状质粒,其包含:i) 1kb的或更大的细菌复制选择区,其包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记,和ii) 插入物,其包含选自由如下组成的组的真核区域:慢病毒载体、逆转录病毒载体和AAV载体或非病毒转座子载体;和b) 修饰(a)的共价闭合环状重组分子,使得包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记的1kb的或更大的细菌复制选择区域被小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域所取代,由此当转染入哺乳动物细胞时,所得的Pol III-依赖性复制起点共价闭合环状质粒具有改进的表达。在另一个实施方案中,所述Pol I-依赖性复制起点选自由如下组成的组:pUC起点、pMB1起点和ColE1起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性R6K复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是编码与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA选择标记。在另一个实施方案中,所述小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。

[0115] 在一个实施方案中,本技术提供了从共价闭合环状病毒载体质粒中消除抗生素抗性标记基因转移的方法,包括以下步骤:a) 提供共价闭合环状质粒,其包含:i) 1kb的或更大的细菌复制选择区,其包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素抗性标记,和ii) 插入物,其包含选自由如下组成的组的不含抗生素抗性标记的真核区域:病毒载体、慢病毒载体、慢病毒包装载体、慢病毒包膜载体、逆转录病毒包膜载体、逆转录病毒包装载体、AAV载体、AAV rep cap载体、Ad辅助载体和Ad辅助rep cap载体;和b) 修饰a)的共价闭合环状重组分子,使得包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记的1kb的或更大的细菌复制选择区被小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区取代,由此当转染入哺乳动物细胞时,所得的Pol III-依赖性复制起点共价闭合环状质粒没有可被包装入慢病毒、逆转录病毒或AAV转导病毒颗粒中的抗生素抗性标记。在另一个实施方案中,所述Pol I-依赖性复制起点选自由如下组成的组:pUC起点、pMB1起点和ColE1起点。在另一个实施方

案中,所述Po1 III-依赖性R6K复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是编码与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA选择标记。在另一个实施方案中,所述小于1kb的Po1 III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。

[0116] 在一个实施方案中,本技术提供了从共价闭合环状非病毒转座子质粒中消除抗生素抗性标记基因转移的方法,包括以下步骤:a) 提供共价闭合环状质粒,其包含:i) 1kb的或更大的细菌复制选择区,其包含Po1 I-依赖性复制起点和抗生素抗性标记,和ii) 插入物,其包含选自如下组成的组的不含抗生素抗性标记的真核区域:非病毒转座子载体、非病毒转座酶载体、睡美人转座子载体、睡美人转座酶载体、PiggyBac转座子载体、PiggyBac转座酶载体、To12转座子载体、To12转座酶载体;和b) 修饰a) 的共价闭合环状重组分子,使得包含Po1 I-依赖性复制起点和抗生素选择标记的1kb的或更大的细菌复制选择区域被小于1kb的Po1 III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域所取代,由此当转染入哺乳动物细胞时,所得的Po1 III-依赖性复制起点共价闭合环状质粒没有可以被转置到基因组中的抗生素抗性标记。在另一个实施方案中,所述Po1 I-依赖性复制起点选自如下组成的组:pUC起点、pMB1起点和ColE1起点。在另一个实施方案中,所述Po1 III-依赖性R6K复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是编码与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA选择标记。在另一个实施方案中,所述小于1kb的Po1 III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。

[0117] 在一个实施方案中,本技术提供了无抗生素标记的共价闭合环状重组DNA分子,其包含:a) 无抗生素标记插入物,其包含选自如下组成的组的真核区域:慢病毒载体、慢病毒包膜载体、慢病毒包装载体、逆转录病毒载体、逆转录病毒包膜载体、逆转录病毒包装载体、AAV载体、AAV rep cap载体、Ad辅助载体、Ad辅助rep cap载体、非病毒转座子载体和非病毒转座酶载体;b) Po1 III-依赖性复制起点,其包括R6K γ 复制起点,其与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18;和c) RNA-OUT RNA选择标记,其包含RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,该变体与选自如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述R6K γ 复制起点和所述RNA-OUT RNA选择标记包含R6K

起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。

[0118] 在一个实施方案中,本技术提供了一种降低来自共价闭合环状病毒载体或非病毒转座子质粒的转染相关毒性的方法,包括以下步骤:a)提供共价闭合环状质粒,其包含:i)1kb的或更大的细菌复制选择区,其包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记,和ii)插入物,其包含选自由如下组成的组的真核区域:慢病毒载体、逆转录病毒载体、AAV载体和非病毒转座子载体;和b)修饰(a)的共价闭合环状重组分子,使得包含Pol I-依赖性复制起点和抗生素选择标记的1kb的或更大的细菌复制选择区域被小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域所取代,由此当通过转染相关哺乳动物细胞而转染时,所得的Pol III-依赖性复制起点共价闭合环状质粒具有降低的毒性。在另一个实施方案中,所述Pol I-依赖性复制起点选自由如下组成的组:pUC起点、pMB1起点和ColE1起点。在另一个实施方案中,所述Pol III-依赖性R6K复制起点是R6K γ 复制起点,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:18。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是RNA-IN调节RNA-OUT功能性变体,其与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:7。在另一个实施方案中,所述RNA-OUT RNA选择标记是编码与SEQ ID NO:6具有至少95%序列同一性的RNA-IN调节RNA-OUT RNA选择标记。在另一个实施方案中,所述小于1kb的Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT RNA选择标记细菌复制选择区域与选自由如下组成的组的序列具有至少95%的序列同一性:SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、和SEQ ID NO:17。

[0119] 所得的Pol III-依赖性复制起点质粒与亲本pMB1、ColE1或pBR322衍生复制起点表达质粒载体相比具有令人惊讶的改进的生产质量和产量。

[0120] 通过参考附图和随后的描述,本发明的其他目的和优点将变得显而易见。

附图说明

[0121] 图1A-1F描述了R6K起点(图1A、1E和1F)、RNA-OUT选择性标记(图1B)和14和3CpGR6K-RNA-OUT细菌骨架(图1C和1D);

[0122] 图2A-2B描述了Pol I-依赖性pUC起点的睡美人转座子载体(图2A)和Pol III-依赖性R6K起点的睡美人转座子载体(图2B);

[0123] 图3A-3C描绘了Pol I-依赖性pUC起点的AAV载体(图3A和3B)和Pol III-依赖性R6K起点的AAV载体(图3C);和

[0124] 图4A-4F描述了Pol I-依赖性pUC起点的A60 polyA重复编码mRNA载体(图4A-4B),Pol III-依赖性R6K起点的A60 polyA重复编码mRNA载体(图4C),Pol I-依赖性pUC起点的A99 polyA重复编码mRNA载体(图4D-4E),和Pol III-依赖性R6K起点的A99 polyA重复编码mRNA载体(图4F)。

[0125] 表1:pVAX1哺乳动物表达载体间隔区(SR)衍生物表达水平

[0126] 表2:NTC8685哺乳动物表达载体间隔区(SR)衍生物表达水平

- [0127] 表3:使用各种病毒和非病毒载体平台的微环应用
- [0128] 表4:侧接R6K起点-RNA-OUT选择标记载体的pNTC多克隆位点
- [0129] 表5:SV40起点的慢病毒载体:pUC起点对比R6K起点的摇瓶生产产量/质量
- [0130] 表6:睡美人转座子载体:pUC起点对比R6K起点的摇瓶生产产量/质量
- [0131] 表7:AAV载体:pUC起点对比R6K起点的摇瓶生产产量/质量
- [0132] 表8:mRNA载体:pUC起点对比R6K起点的DH5 α HyperGR0发酵产量/质量
- [0133] 表9:AAV辅助载体:pUC起点对比R6K起点的质粒生产产量/质量
- [0134] SEQ ID NO:1:R6K γ 起点
- [0135] SEQ ID NO:2:1个CpG的R6K γ 起点
- [0136] SEQ ID NO:3:无CpG的R6K γ 起点
- [0137] SEQ ID NO:4:延长的R6K γ 起点
- [0138] SEQ ID NO:5:RNA-OUT选择标记
- [0139] SEQ ID NO:6:RNA-OUT反义阻遏RNA
- [0140] SEQ ID NO:7:2个CpG的RNA-OUT选择标记
- [0141] SEQ ID NO:8:R6K γ 起点-RNA-OUT细菌区,侧翼为NheI和KpnI限制性位点
- [0142] SEQ ID NO:9:1个CpG的R6K γ 起点-2个CpG的RNA-OUT细菌区,侧翼为NheI和KpnI限制性位点
- [0143] SEQ ID NO:10:pNTC-NP1多接头trpA R6K-RNA-OUT多接头克隆盒:EcoRI/HindIII
- [0144] SEQ ID NO:11:pNTC-NP2多接头trpA R6K-RNA-OUT多接头克隆盒:EcoRI/HindIII
- [0145] SEQ ID NO:12:pNTC-NP3多接头trpA R6K-RNA-OUT多接头克隆盒:EcoRI/HindIII
- [0146] SEQ ID NO:13:pNTC-NP4多接头trpA R6K-RNA-OUT多接头克隆盒:EcoRI/HindIII
- [0147] SEQ ID NO:14:pNTC-NP5多接头trpA R6K-RNA-OUT多接头克隆盒:KasI/HindIII
- [0148] SEQ ID NO:15:pNTC-NP6多接头trpA R6K-RNA-OUT多接头克隆盒:EcoRI/SacI
- [0149] SEQ ID NO:16:pNTC-NP7多接头trpAR6K-RNA-OUT多接头克隆盒:BssHII-BssHII
- [0150] SEQ ID NO:17:pNTC-3xCpG NP1多接头R6K-RNA-OUT多接头克隆盒:HindIII-EcoRI
- [0151] SEQ ID NO:18:R6K γ 起点(7重复子(iteron))
- [0152] SEQ ID NO:19:R6K γ 起点22bp重复子重复序列
- [0153] SEQ ID NO:20:R6K γ 起点22bp重复子重复序列
- [0154] SEQ ID NO:21:R6K γ 起点22bp重复子重复序列
- [0155] SEQ ID NO:22:R6K γ 起点22bp重复子重复序列
- [0156] SEQ ID NO:23:R6K γ 起点22bp重复子区重复序列
- [0157] 术语的定义
- [0158] AAV载体:腺相关病毒载体,一种附加病毒载体。包括自身互补(sc)腺相关病毒载体(scAAV)和单链(ss)腺相关病毒载体(ssAAV)
- [0159] AF:无抗生素
- [0160] amp:氨苄青霉素
- [0161] ampR:氨苄青霉素抗性基因
- [0162] 抗生素选择标记:赋予抗生素抗性的基因,如氨苄青霉素抗性基因、卡那霉素抗性

基因、氯霉素抗性基因、四环素抗性基因

[0163] 近似地:如本文所用,术语“近似地”或“大约”应用于一个或多个目的值,指的是与
所述参考值相同或相似的值

[0164] 细菌区:在细菌宿主中繁殖和选择所需的质粒载体区域

[0165] bp:碱基对

[0166] ccc:共价闭合环状

[0167] cI:Lambda阻遏物

[0168] cITs857:Lambda阻遏物进一步整合了赋予温度敏感性的C到T (Ala到Thr) 突变。
cITs857在28-30℃时是一种功能性阻遏物,但在37-42℃时大部分是无活性的。也称为
cI857。

[0169] Cat^R:氯霉素抗性基因

[0170] cmv:巨细胞病毒

[0171] dcm甲基化:E.coli甲基转移酶,其将序列CC (A/T) GG的第二个胞嘧啶的C5位置甲
基化

[0172] DNA复制子:一种能在自身控制下复制的基因元件;实例包括质粒、粘粒、细菌人工
染色体、噬菌体、病毒载体及其杂交体

[0173] E.coli:大肠杆菌,一种革兰氏阴性菌

[0174] EGFP:增强型绿色荧光蛋白

[0175] EP:电穿孔

[0176] 真核表达载体:使用RNA聚合酶I、II或III启动子在目标真核生物中表达mRNA、蛋
白质抗原、蛋白质治疗剂、shRNA、RNA或微小RNA基因的载体

[0177] 真核区域:质粒的区域,其编码真核序列和/或质粒在目标生物体中发挥功能所需
的序列。这包括在目标生物中表达一种或多种转基因所需的质粒载体区域,包括RNA Pol
II增强子、启动子、转基因和polyA序列。这也包括使用RNA Pol I或RNA Pol III启动子、
RNA Pol I或RNAPol III表达的转基因或RNA在靶生物中表达一种或多种转基因所需的质
粒载体区域。真核区域可以任选地包括其他功能序列,例如真核转录终止子、超螺旋诱导的
DNA双链去稳定(SIDD)结构、S/MARs、边界元件等。在慢病毒或逆转录病毒载体中,真核区域
包含侧翼正向重复LTRs,在AAV载体中,真核区域包含侧翼反向末端重复序列,而在转座子
载体中,真核区域包含侧翼转座子反向末端重复序列或IR/DR末端(如睡美人)。在基因组整
合载体中,所述真核区域可以编码同源臂以指导靶向整合。

[0178] 外显子:由基因编码的核苷酸序列,其在完成RNA剪接去除内含子后,被转录并存
在于成熟的mRNA产物中。

[0179] 表达载体:在目标生物体中表达mRNA、蛋白质抗原、蛋白质治疗剂、shRNA、RNA或微
小RNA基因的载体。

[0180] g:克,kg代表千克

[0181] 目的基因:在目标生物体中表达的基因。包括编码蛋白质或肽抗原、蛋白质或肽治
疗剂的mRNA基因,以及编码RNA治疗剂的mRNA、shRNA、RNA或微小RNA,以及编码RNA疫苗的
mRNA、shRNA、RNA或微小RNA等。

[0182] Hr(s):小时

- [0183] ID:皮内
- [0184] IM:肌内
- [0185] 免疫反应:抗原反应性细胞(如抗原反应性T细胞)或抗体(如抗原反应性IgG)反应
- [0186] 内含子:由基因编码的核苷酸序列,其被转录并随后通过RNA剪接从成熟的mRNA产物中去除
- [0187] IR/DR:各自正向重复两次的反向重复序列。如睡美人转座子IR/DR重复序列。
- [0188] Iteron:复制启动所需的复制起点中正向重复的DNA序列。R6K起点的iteron重复序列是22bp
- [0189] ITR:反向末端重复
- [0190] kan:卡那霉素
- [0191] kanR:卡那霉素抗性基因
- [0192] Kd:千道尔顿
- [0193] kozak序列:ATG起始密码子上游的优化共有DNA序列gccRccATG(R=G或A),其可确保有效的翻译起始。ATG起始密码子上游的一个SalI位点(GTCGAC)是一个有效的kozak序列(GTCGACATG)
- [0194] 慢病毒载体:能感染分裂和非分裂细胞的整合型病毒载体。也叫慢病毒转移质粒。质粒编码慢病毒LTR侧翼表达单元。将转移质粒与慢病毒包膜和制造病毒颗粒所需的包装质粒一起转染到生产细胞中
- [0195] 慢病毒包膜载体:编码包膜糖蛋白的质粒
- [0196] 慢病毒包装载体:一个或两个质粒,其表达包装慢病毒转移载体所需的气gag、pol和Rev功能蛋白
- [0197] 微环:共价闭合环状质粒衍生物,其中细菌区已通过体内或体外位点特异性重组或体外限制性消化/连接从亲本质粒中去除。微环状载体在细菌细胞中没有复制能力
- [0198] mRNA:信使RNA
- [0199] mSEAP:小鼠分泌的碱性磷酸酶
- [0200] NA:不适用
- [0201] NanoplasmidTM载体:将RNA选择性标记与R6K、ColE2或ColE2相关复制起点结合的载体。例如,NTC9385C、NTC9685C、NTC9385R、NTC9685R载体和Williams,Supra,2014描述的修饰,并通过引用并入本文。
- [0202] NTC8385:NTC8385、NTC8485和NTC8685质粒是不含抗生素的pUC起点载体,其含有短RNA(RNA-OUT)选择标记,而不是抗生素抗性标记(如kanR)。这些基于RNA-OUT的无抗生素载体的创建和应用在Williams,JA 2008国际专利申请W02008153733中有所描述,并过引用并入本文。
- [0203] NTC8485:NTC8485是一种不含抗生素的pUC起点载体,其包含短RNA(RNA-OUT)选择标记,而不是抗生素抗性标记(如kanR)。NTC8485的创建和应用在Williams,JA2010US专利申请20100184158中有所描述,并通过引用并入本文。
- [0204] NTC8685:NTC8485是一种不含抗生素的pUC起点载体,其包含短RNA(RNA-OUT)选择标记,而不是抗生素抗性标记(如kanR)。NTC8685的创建和应用在Williams,Supra,2010中有所描述,并通过引用并入本文。

[0205] NTC9385R:在Williams,Supra,2014中描述的NTC9385R NanoplasmidTM载体通过引用并入本文,其具有间隔区编码的NheI-trpA终止子-R6K起点RNA-OUT-KpnI细菌区(SEQ ID NO:8),其通过侧翼的NheI和KpnI位点连接至真核生物区域。

[0206] OD₆₀₀:600nm处的光密度

[0207] PAS:原体组装位点。在单链DNA ssi位点引发DNA合成。OX174型PAS:结合priA的DNA发夹序列,其反过来招募剩余的蛋白质以形成前体[priB,dnaT,招募dnaB(由dnaC递送)],然后其也招募引发酶(dnaG),然后引发酶最终为DNA聚合酶I制造短RNA底物。ABC型PAS:DNA发夹结合dnaA,招募dnaB(由dnaC传递),dnaB然后也招募引发酶(dnaG),然后引发酶最终为DNA聚合酶I制造短RNA底物。例如,所述R6K质粒无CpG的ssiA原体组装位点或二中择一的OX174型或ABC型原体组装位点。

[0208] PAS-BH:重链(前导链)上的原体组装位点

[0209] PAS-BH区:ROP和PAS-BL之间的pBR322起点区(约为pBR322 2067-2351)

[0210] PAS-BL:轻链(滞后链)上的原体组装位点

[0211] PBS:磷酸盐缓冲盐水

[0212] PCR:聚合酶链反应

[0213] pDNA:质粒DNA

[0214] PiggyBac转座子:PB转座子。一种转座子系统,其通过由PB转座酶介导的简单剪切和粘贴机制将ITR侧翼PB转座子整合到基因组中。所述转座子载体通常在PB ITR之间包含一个启动子-转基因-polyA表达盒,该表达盒被切除并整合到基因组中。

[0215] pINT pR pL载体:pINT pR pL att_{HK022}整合表达载体在Luke et al.,2011Mol Biotechnol 47:43中有描述,并通过引用并入本文。待表达的靶基因克隆在pL启动子的下游。该载体编码温度诱导型cI857阻遏物,允许热诱导型靶基因表达。

[0216] P_L启动子:Lambda启动子。P_L是一种强启动子,其被与OL1、OL2和OL3阻遏物结合位点结合的cI阻遏物抑制。所述温度敏感的cI857阻遏物允许通过热诱导控制基因表达,因为在30°C时cI857阻遏物起作用并抑制基因表达,但是在37-42°C时阻遏物失活,因此基因表达随之发生。

[0217] P_L(OL1 G到T)启动子:Lambda启动子。P_L是一种强启动子,其被与OL1、OL2和OL3阻遏物结合位点结合的cI阻遏物抑制。所述温度敏感的cI857阻遏物允许通过热诱导控制基因表达,因为在30°C时cI857阻遏物起作用并抑制基因表达,但是在37-42°C时阻遏物失活,因此基因表达随之发生。如Williams,Supra,2014中所述,cI阻遏物与OL1的结合被OL1 G到T突变降低,导致30°C和37-42°C时启动子活性增加。

[0218] 质粒:一种从染色体DNA中分离出来的染色体外的DNA分子,其能够独立于染色体DNA进行复制

[0219] 质粒拷贝数:每个细胞中质粒的拷贝数。质粒拷贝数的增加增加了质粒生产产量

[0220] Pol:聚合酶

[0221] Pol I:大肠杆菌DNA聚合酶I

[0222] Pol I依赖性复制起点:需要Pol I的复制起点,例如pMB1、ColE1或pBR322或衍生物,如高拷贝pUC起点。对于这些起点,RNAII引物形成了一个由RNase H切割的RNA:DNAR环,从而为DNApol I指导的DNA合成创建引物。DNA合成然后转移到DNA pol III进行。现有技术

中已知许多其他Pol I-依赖性复制起点,其中许多被总结在del Solar et al., 1998Microbiol.Mol.Biol.Rev 62:434-464中,其通过引用并入本文。

[0223] Pol III:大肠杆菌DNA聚合酶III

[0224] Pol III依赖性复制起点:不需要Pol I的复制起点,例如rep蛋白依赖性R6K γ 复制起点。在本领域中已知许多另外的Pol III依赖性复制起点,其中许多被总结在del Solar et al., Supra, 1998中,其通过引用并入本文。

[0225] polyA:聚腺苷酸化信号或位点。聚腺苷酸化是在RNA分子上增加一个poly (A) 尾。所述多聚腺苷酸化信号包含由RNA切割复合物识别的序列基序。大多数人的多聚腺苷酸化信号包含AAUAAA基序和它的保守序列5' 和3'。常用的polyA信号来自兔 β 珠蛋白、牛生长激素、SV40早期或SV40晚期polyA信号。

[0226] pUC起点:具有G到A替换的pBR322衍生的复制起点,其在升高的温度下增加拷贝数并缺失ROP负调控子。

[0227] 无pUC:不含pUC起点的质粒。可以包括pUC起点的非复制片段,例如RNAI选择标记。

[0228] pUC质粒:含有pUC起点的质粒。

[0229] R6K质粒:Williams, Supra, 2014中描述了NTC9385R、NTC9685R、NTC9385R2-01、NTC9385R2-02、NTC9385R2a-01、NTC9385R2a-02、NTC9385R2b-01、NTC9385R2b-02、NTC9385Ra-01、NTC9385Ra-02、NTC9385RaF、和NTC9385RbF载体以及包含R6K复制起点的修饰体和替代载体,其通过引用并入本文。本领域已知的替代R6K载体包括但不限于pCOR载体(Gencell)、无pCpG的载体(Invivogen)和牛津大学的无CpG的载体(包括pGM169)。

[0230] R6K复制起点:被R6K Rep蛋白特异性识别以启动DNA复制的区域。包括但不限于R6K γ 复制起点序列,公开号为SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:4、和SEQ ID NO:18。还包括如Drocourt等人的美国专利7244609中所述的无CpG的版本(例如SEQ ID NO:3),并通过引用并入本文。

[0231] R6K复制起点-RNA-OUT细菌区:包含用于复制的R6K复制起点和RNA-OUT选择标记(例如SEQ ID NO:8;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11;SEQ ID NO:12;SEQ ID NO:13;SEQ ID NO:14;SEQ ID NO:15;SEQ ID NO:16;SEQ ID NO:17)。

[0232] Rep:复制

[0233] 复制中间产物:质粒复制过早终止产生的线性DNA片段

[0234] Rep蛋白依赖性质粒:复制依赖于Trans中提供的复制(Rep)蛋白的质粒。例如,R6K复制起点、ColE2-P9复制起点和ColE2相关复制起点质粒,其中所述Rep蛋白从宿主菌株基因组中表达。在本领域中已知许多另外的Rep蛋白依赖性质粒,其中许多被总结在del Solar et al., Supra, 1998中,其通过引用并入本文。

[0235] 逆转录病毒载体:能感染分裂细胞的整合型病毒载体。也叫转移质粒。质粒编码逆转录病毒LTR侧翼表达单元。将转移质粒与包膜和制造病毒颗粒所需的包装质粒一起转染到生产细胞中。

[0236] 逆转录病毒包膜载体:编码包膜糖蛋白的质粒

[0237] 逆转录病毒包装载体:编码包装逆转录病毒转移载体所需的逆转录病毒gag、pol基因的质粒

[0238] RNA-IN:插入序列10(IS10)编码的RNA-IN,一种与RNA RNA-OUT部分互补和反义的

RNA。当在mRNA的非翻译前导序列中克隆RNA-IN时, RNA-IN到RNA-OUT的退火减少了RNA-IN下游编码基因的翻译。

[0239] RNA-IN调节的选择性标记:一种基因组表达的RNA-IN调节的选择性标记。在质粒携带的RNA-OUT反义阻遏RNA(SEQ ID NO:6)的存在下, RNA-IN下游编码的蛋白质的表达被抑制。RNA-IN调节的选择性标记被配置为使得RNA-IN调节1)蛋白质,所述蛋白质对所述细胞本身是致死性或毒性的或通过产生毒性物质(例如SacB),或2)阻抑蛋白,所述阻抑蛋白通过抑制所述细胞生长所必需的基因的转录对所述细菌细胞是致死性或毒性的(例如由RNA-IN tetR阻抑基因调节的murA必需基因)。例如,用于RNA-OUT质粒选择/复制的基因组表达的RNA-IN-SacB细胞系在Williams, Supra, 2008中有所描述,并通过引用并入本文。本领域描述的替代选择标记可以替代SacB。

[0240] RNA-OUT:插入序列10 (IS10) 编码的RNA-OUT,一种反义RNA,其与RNA-IN下游表达的转座子基因杂交并减少其翻译。RNA-OUT RNA(SEQ ID NO:6)和互补RNA-IN SacB基因组表达的RNA-IN SacB细胞系的序列可以被修饰以结合替代的功能性RNA-IN/RNA-OUT结合对,例如在Mutalik等人, 2012 Nat Chem Biol 8:447中描述的那些,包括但不限于RNA-OUT A08/RNA-IN S49对、RNA-OUT A08/RNA-IN S08对,和无CpG的RNA-OUT A08修饰体,其可将RNA-OUT 5'TTCGC序列中的CG修饰为非CpG序列。Williams 2015. Replicative minicircle vectors with improved expression. 美国专利申请US 2015/0275221中描述了一个无CpG的RNA-OUT选择标记的实例,其中去除了RNA-OUT RNA中的两个CpG基序(其中一个存在于RNA-IN互补区域中),并通过引用并入本文。可以利用大量替代来去除两个CpG基序(将每个CpG突变为CpA、CpC、CpT、ApG、GpG或TpG)来产生无CpG的RNA-OUT。

[0241] RNA-OUT选择标记:一种RNA-OUT选择标记DNA片段,其包括大肠杆菌转录启动子和侧翼为RNA-OUT RNA的终止子序列。在Williams, Supra, 2008中描述了一种RNA-OUT选择性标记,其利用RNA-OUT启动子和终止子序列,其侧翼是DraIII和KpnI限制性酶位点,并设计了用于RNA-OUT质粒复制的基因组表达的RNA-IN-SacB细胞系,并通过引用并入本文。侧翼为RNA-OUT RNA(SEQ ID NO:6; FIG. 1B)的SEQ ID NO:5中的RNA-OUT启动子和终止子序列可以用异源启动子和终止子序列代替。例如, RNA-OUT启动子可以用本领域已知的无CpG的启动子取代,例如I-EC2K启动子或P5/6 5/6或P5/6 6/6启动子,这些启动子在Williams, Supra, 2008中描述,并通过引用并入本文。2个CpG的RNA-OUT选择性标记,其中RNA-OUT启动子中的两个CpG基序被去除,被命名为SEQ ID NO:7。Williams, Supra, 2015描述了一个无CpG的RNA-OUT转录单位的实例,其中RNA-OUT RNA中的两个CpG基序(其中一个存在于RNA-IN互补区)和RNA-OUT启动子中的两个CpG基序被去除,并通过引用并入本文。结合无CpG的RNA-OUT选择标记的载体可以使用RNA-IN-SacB细胞系进行蔗糖抗性选择,所述RNA-IN-SacB细胞系用于RNA-OUT质粒复制并描述于Williams, Supra, 2008。或者,可以对这些细胞系中的RNA-IN序列进行修饰,使其包含1个碱基的变化,以完美匹配与RNA-IN互补的无CpG的RNA-OUT区域。

[0242] RNA聚合酶II启动子:招募RNA聚合酶II以合成mRNA、大多数小核RNA和微小RNA的启动子。例如,组成型启动子,如人或鼠CMV启动子、延伸因子1(EF1)启动子、鸡 β -肌动蛋白启动子、来自其他物种的 β -肌动蛋白启动子、延伸因子1 α (EF1 α)启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子、Rous肉瘤病毒(RSV)启动子、人血清白蛋白(SA)启动子、脾病灶形成病毒

(SFFV) 启动子、 α -1抗胰蛋白酶(AAT) 启动子、甲状腺素结合球蛋白(TBG) 启动子、细胞色素P450 2E1(CYP2E1) 启动子等。所述载体还可以利用组合启动子,例如鸡 β -肌动蛋白/CMV增强子(CAG) 启动子、与延伸因子1 α (EF1 α) 启动子结合的人或鼠CMV衍生增强子元件、与延伸因子1 α (EF1 α) 启动子结合的人或鼠CMV衍生增强子元件的无CpG版本、与甲胎蛋白MERII增强子结合的白蛋白启动子等,或本领域已知的多样的组织特异性或诱导型启动子,例如肌肉特异性启动子肌肉肌酸激酶(MCK)、和C5-12或肝脏特异性启动子载脂蛋白A-I(ApoAI)等。

[0243] RNA聚合酶III启动子:招募RNA聚合酶III以合成tRNAs、5S核糖体RNA和其他小RNA的启动子。例如,第一类启动子如5s rRNA启动子,第二类启动子如tRNA启动子,第三类启动子如U6小核RNA启动子或H1核RNA酶P启动子等。

[0244] RNA选择标记:RNA选择标记是一种质粒携带的表达了非翻译RNA,它调节染色体表达的靶基因以提供选择。如Crouzet J和Soubrier F 2005US专利6,977,174中所述,这可能是一种质粒携带的无义抑制性tRNA,其调节无义的可抑制选择性染色体靶标,并通过引用并入本文。这也可以是质粒携带的反义阻遏物RNA,本文通过引用并入的非限制性列表包括抑制RNA-IN调节靶标的RNA-OUT(Williams,Supra,2008),抑制RNAII调节靶标的pMB1质粒起点编码的RNA I(Grabherr,Pfaffenzeller I.2006US专利申请US20060063232;Cranenburgh RM.2009;US专利7,611,883),IncB质粒pMU720起点编码的抑制RNAII调节靶标的RNAI(Wilson IW,Siemering KR,Praszkier J,Pittard AJ.1997.JBacteriol 179:742-53),抑制Hok调节靶标的R1质粒的ParB基因座Sok,抑制flmA调节靶标的F质粒的Flm基因座FlmB(Morsey MA,1999US专利US5922583)。RNA选择标记可以是本领域已知的另一种天然反义阻遏物RNA,例如在Wagner EGH,Altuvia S,Romby P.2002.Adv Genet 46:361-98和Franch T,和Gerdes K.2000.Current Opin Microbiol 3:159-64中描述的那些。RNA选择标记也可以是工程化的阻遏物RNA,如在Na D,Yoo SM,Chung H,Park H,Park JH, Lee SY.2013.Nat Biotechnol 31:170-4中描述的合成小RNA表达的SgrS,MicC或MicF支架。RNA选择标记也可以是工程化的阻遏物RNA,作为选择标记的一部分,该选择标记可抑制融合到待调控靶基因上的靶RNA(例如SacB),如Williams,Supra,2015所述。

[0245] ROP:引物的阻遏物

[0246] RSM:RNA选择标记:

[0247] SacB:编码枯草芽孢杆菌左旋蔗糖酶的结构基因。在存在蔗糖的情况下,在革兰氏阴性菌中表达SacB是有毒的

[0248] SD:标准差

[0249] SEAP:分泌型碱性磷酸酶

[0250] 选择标记(selectable marker):一种选择标记,例如卡那霉素抗性基因或RNA选择标记

[0251] 选择标记(selection marker):一种选择标记,例如卡那霉素抗性基因或RNA选择标记

[0252] SIDD:超螺旋诱导的DNA双链体去稳定(SIDD)结构。当这些位点被整合到载体中时,可能会改变载体中其他序列被破坏的敏感性。这会改变功能。例如,向表达载体中添加SIDD位点可以减少启动子的螺旋不稳定性。取决于启动子,这可能增加或减少启动子活性,

因为一些启动子随着启动子螺旋去稳定而增加表达,而另一些启动子随着启动子螺旋去稳定而减少表达。

[0253] shRNA:短发夹RNA

[0254] S/MAR:支架/基质附着区。介导DNA附着于核基质的真核序列

[0255] 睡美人转座子SB转座子:一种转座子系统,通过由SB转座酶介导的简单剪切和粘贴机制,将侧翼为SB转座子的IR/DR整合到基因组中。所述转座子载体通常包含一个启动子-转基因-polyA表达盒,该表达盒位于被切除并整合到基因组中的IR/DR之间。

[0256] 间隔区:如本文所用,间隔区是连接真核区序列5'和3'末端的区域。真核区5'和3'末端通常由细菌复制起点和质粒载体中的细菌选择标记(细菌区域)分开,因此许多间隔区由细菌区域组成。在本发明的Pol III依赖性复制起点载体中,该间隔区优选小于1000bp。

[0257] SR:间隔区。

[0258] ssi:单链起始序列

[0259] 结构化DNA序列:如本文所用,能够形成抑制复制的二级结构的DNA序列(Mirkin and Mirkin,2007.Microbiology and Molecular Biology Reviews71:13-35)。这包括但不限于反向重复序列、回文重复序列、正向重复序列、IR/DR、均聚重复序列或含有真核启动子增强子的重复序列,或含有真核复制起点的重复序列。

[0260] SV40起点:包含复制起点的猿猴病毒40基因组DNA

[0261] SV40增强子:包含72bp和任选的21bp增强子重复序列的猿猴病毒40基因组DNA

[0262] 靶抗原:免疫原性蛋白质或肽表位,或蛋白质和表位的组合,可针对其产生免疫反应。靶抗原可以来源于用于传染病或过敏应用的病原体,或者来源于用于癌症、过敏或自身免疫性疾病等应用的宿主生物体。靶抗原在本领域中定义明确。一些实例在Williams, Supra,2008中有所描述,并通过引用并入本文。

[0263] TE缓冲液:一种含有约10mM Tris pH 8和1mM EDTA的溶液

[0264] TetR:四环素抗性基因

[0265] Tol2转座子:一种转座子系统,通过Tol2转座酶介导的简单剪切和粘贴机制,将ITR侧翼的Tol2转座子整合到基因组中。所述转座子载体通常在Tol2 ITR之间含有启动子-转基因-聚腺苷酸表达盒,该表达盒被切除并整合到基因组中。

[0266] 转录终止子:细菌:标记基因或操纵子末端的DNA序列,用于转录。这可能是一个内在的转录终止子或Rho依赖性转录终止子。对于内在终止子,如trpA终止子,转录物中形成发夹结构,其破坏了mRNA-DNA-RNA聚合酶三元复合物。或者,Rho依赖性转录终止子需要Rho因子(一种RNA解旋酶蛋白复合物)来破坏新生的mRNA-DNA-RNA聚合酶三元复合物。真核生物:polyA信号不是“终止子”,而是在polyA位点的内部切割,在3' UTR RNA上留下一个未封闭的5'末端用于核酸酶消化。核酸酶赶上RNA Pol II并导致终止。通过引入RNA Pol II暂停位点(真核转录终止子),可以在poly A位点的短区域内促进终止。RNAPol II的暂停使PolyA切割后引入3' UTR mRNA的核酸酶在暂停位点赶上RNA Pol II。本领域已知的真核转录终止子的非限制性列表包括C2x4和胃泌素终止子。真核转录终止子可以通过增强mRNA的合适的3'末端加工来提高mRNA水平。

[0267] 转染:将核酸递送到细胞中的方法[例如,聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、ISCOM、脂质体(liposomes)、非离子表面活性剂囊泡(niosomes)、病毒体、Pluronic嵌段共聚物、壳

聚糖、和其他可生物降解的聚合物、微粒、微球、磷酸钙纳米粒子、纳米粒子、纳米胶囊、纳米球、poloxamine纳米球、电穿孔、核转染、压电渗透、声穿孔、离子电渗、超声波、SQZ高速细胞变形介导的膜破裂、电晕等离子体、血浆促进递送、组织耐受血浆、激光微穿孔、冲击波能量、磁场、非接触磁渗透、基因枪、微针、显微磨削、流体动力递送,高压尾静脉注射等],如本领域已知的,并通过引用并入本文

[0268] 转基因:目的基因,其被克隆到载体中以在目标生物中表达

[0269] 转座酶载体:编码转座酶的载体

[0270] 转座子载体:编码转座子的载体,所述转座子是转座酶介导的基因整合的底物

[0271] ts:温度敏感

[0272] μg :微克

[0273] μl :微升

[0274] UTR:mRNA的非翻译区(编码区的5'或3')

[0275] 载体:基因传递载体,其包括病毒(如 α 病毒、痘病毒、慢病毒、逆转录病毒、腺病毒、腺病毒相关病毒等)和非病毒(例如质粒、MIDGE、转录活性PCR片段、微环、噬菌体等)载体。这些在本领域中是众所周知的,并通过引用并入本文。

[0276] 载体骨架:载体的真核区和细菌区,不含转基因或靶抗原编码区优选实施方案的具体描述

[0277] 目前的技术一般涉及短的<1kb的细菌区质粒DNA载体的方法和组合物,其提高质粒生产产量和质量,降低转染相关毒性,并增加转基因表达。目前的技术可以用来提高载体的表达和制备,例如非病毒载体(转座子载体、转座酶载体、睡美人转座子载体、睡美人转座酶载体、PiggyBac转座子载体、PiggyBac转座酶载体、表达载体等)和病毒载体(如AAV载体、AAV rep cap载体、AAV辅助载体、Ad辅助载体、慢病毒载体、慢病毒包膜载体、慢病毒包装载体、逆转录病毒载体、逆转录病毒包膜载体、逆转录病毒包装载体等)。

[0278] 与含有编码pUC复制起点的细菌区的转基因编码质粒相比,质粒表达的改进在本文中被定义为在体外或体内转基因表达水平和/或表达持续时间的改进。应当理解,本文引用的所有参考文献都通过引用并入本文。

[0279] 现已令人惊讶地发现,当前技术的质粒修饰方法提供了一种以有效高产率生产制备含有结构化DNA序列的短间隔区载体的解决方案。

[0280] 如本文所使用,术语“序列同一性”指的是任何给定的查询序列(例如SEQ ID NO: 2)和主题序列之间的同一性程度。主题序列可以例如与给定的查询序列具有至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。为了确定序列同一性百分比,使用本领域公知的任何合适的序列比对程序(例如计算机程序ClustalW(版本1.83,默认参数)),将查询序列(例如核酸序列)与一个或多个对象序列进行比对,这允许在核酸序列的整个长度上进行核酸序列的比对(全局比对)。Chema et al.,2003Nucleic Acids Res.,31:3497-500。在优选的方法中,所述序列比对程序(例如ClustalW)计算查询序列和一个或多个主题序列之间的最佳匹配,并对它们进行比对,从而可以确定同一性、相似性和差异性。一个或多个核苷酸的间隙可以插入查询序列、主题序列或两者,以最大化序列比对。对于核酸序列的快速成对比对,可以选择适合特定比对程序的合适默认参数。输出是反映序列之间关系的序列比对。为了进一步确定受试核酸序列与查询序列的同一性百分比,使用比对程序对序列进行比对,比

对中相同匹配的数量除以查询序列的长度,结果乘以100。请注意,同一性百分比值可以四舍五入到最接近的十分之一。例如,78.11、78.12、78.13和78.14向下舍到78.1,而78.15、78.16、78.17、78.18和78.19向上入到78.2。

[0281] 现在转到附图,图1A-1F显示了注释的图:图1A) R6K起点,具有22bp的iteron重复序列的位置,DnaA框1和2,以及包括在SEQ ID NO:1、2、3和4R6K起点中的区域;图1B) SEQ ID NO:5的RNA-OUT选择性标记,其具有RNA-OUT启动子-35和-10元件的位置,SEQ ID NO:6的RNA-OUT反义RNA,其具有RNA-IN互补同源性区域和RNA-OUT终止子3'发夹;图1C) 14个CpG的R6K-RNA-OUT细菌骨架,由SEQ ID NO:1的R6K复制起点和SEQ ID NO:5的RNA-OUT选择标记组成,其包括R6K起点上游的trpA细菌终止子,侧翼是NheI和KpnI克隆位点;图1D) 3个CpG的R6K-RNA-OUT细菌骨架,由SEQ ID NO:2 1x CpG R6K复制起点和SEQ ID NO:7 2x CpG RNA-OUT选择标记组成,侧翼为NheI和KpnI克隆位点;图1E) 来自SEQ ID NO:1的R6K起点,突出显示了6个ITER的位置。单个22bp的重复子重复序列显示在起始图下方;和图1F) 来自SEQ ID NO:18的R6K起点,突出显示了7个ITER的位置。所述单个22bp的重复子重复序列显示在起始图下方。在这个实例中,7重复子载体的重复子5已经被串联复制;然而,本发明的7重复子载体可以通过串联复制重复子1、2、3、4、5或6中的任何一个而获得。

[0282] 图2A-2B显示了注释的图:图2A) Pol I-依赖性pUC起点-卡那霉素选择性睡美人转座子载体pUC57-Kan SB1(见表6);和图2B) Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择的睡美人转座子载体NTC9 SB1(见表6)。显示了相对于细菌骨架复制起点和选择标记的左和右睡美人IR/DR的位置。

[0283] 图3A-3C显示了注释的图:图3A) Pol I-依赖性pUC起点-氨苄青霉素选择性AAV载体pAAV(见表7);图3B) Pol I依赖性pUC起点-RNA-OUT无抗生素选择的AAV载体NTC8-AAV(见表7);和图3C) Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择的AAV载体NTC9-AAV(见表7)。显示了相对于细菌骨架复制起点和选择标记的左和右AAV ITR的位置。

[0284] 图4A-4F显示了注释的图:图4A) Pol I-依赖性pUC起点-氨苄青霉素选择性A60 polyA重复编码mRNA载体pGEM4Z T7 A60 pA(见表8);图4B) Pol I依赖性pUC起点-RNA-OUT无抗生素选择的A60 polyA重复编码mRNA载体NTC8-T7 A60 pA(见表8);图4C) Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择的A60 polyA重复编码mRNA载体NTC9-T7 A60 pA(见表8);图4D) Pol I依赖性pUC起点-氨苄青霉素选择的A99 polyA重复编码mRNA载体pT3/T7 A99pA(见表8);图4E) Pol I依赖性pUC起点-kanR选择的A99 polyA重复编码mRNA载体NTC7-T7 A99 pA(见表8);和图4F) Pol III-依赖性R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择的A99 polyA重复编码mRNA载体NTC9-T7 A99 pA(见表8)。显示了A60或A99 polyA重复序列相对于细菌骨架复制起点和选择标记的位置。

实施例

[0285] 下面的实施例进一步说明了当前技术的方法。这些以示例性的方式提供,并不旨在以任何方式限制本公开的范围。

[0286] 实施例1:pUC和R6K复制起点质粒复制和生产

[0287] pUC起点载体复制和生产背景:绝大多数治疗质粒使用pUC起点,它是pMB1起点(与ColE1起点密切相关)的高拷贝衍生物。对于pMB1复制,质粒DNA合成是单向的,并且不需要

质粒携带的起始蛋白。所述pUC起点是pMB1起点的高拷贝衍生物,它删除了辅助ROP(rom)蛋白,并有一个额外的温度敏感突变,使得RNAI/RNAII相互作用不稳定。将含有这些起点的培养物从30°C移至42°C会导致质粒拷贝数增加。pUC质粒可以在许多大肠杆菌细胞系中产生。

[0288] RNA-OUT无抗生素选择标记背景:无抗生素选择是在大肠杆菌菌株中进行的,该菌株含有噬菌体 λ 附着位点染色体整合的pCAH63-CAT RNA-IN-SacB(P5/66/6),如Williams, Supra, 2008中所述。SacB(枯草芽孢杆菌左旋蔗糖酶)是一种反向选择标记,在蔗糖存在下对大肠杆菌细胞是致命的。质粒编码的RNA-OUT抑制了SacB从RNA-IN-SacB转录物的翻译(图1B)。这通过抑制SacB介导的致死作用,促进了蔗糖存在下的质粒选择。

[0289] R6K起点载体复制和生产背景:所述R6K γ 质粒复制起点需要单个质粒复制蛋白 π ,其作为复制起始单体结合到多个重复的“重复子”位点(包含TGAGNG共有序列的七个核心重复序列),并作为复制抑制二聚体以降低的亲和力结合到抑制位点(TGAGNG)和重复子。复制需要多种宿主因子,包括IHF、DnaA和原核组装蛋白DnaB、DnaC、DnaG (Abhyankar et al., 2003 J Biol Chem 278:45476-45484)。所述R6K核心起点包含DnaA和IHF的结合位点,DnaA和IHF影响质粒复制,因为 π 、IHF和DnaA相互作用启动复制。

[0290] R6K γ 复制起点的不同版本已经用于各种真核表达载体,例如pCOR载体 (Soubrier et al., 1999, Gene Therapy 6:1482-88) 和无CpG版本的pCpGfree载体 (Invivogen, San Diego CA) 和pGM169 (牛津大学)。与优化的pUC起点载体相比,R6K复制起点的掺入本身并不能提高转基因表达水平 (Soubrier et al., Supra, 1999)。然而,使用条件性复制起点(如R6K γ)需要专门的细胞系进行复制,这增加了安全裕度,因为载体如果转移到患者的内源性菌群中不会复制。

[0291] 高度最小化的6重复子R6K γ 衍生的复制起点 (SEQ ID NO:1;图1E) 包含复制所需的核心序列(包括DnaA盒和stb 1-3位点;Wu et al., 1995. J Bacteriol. 177:6338-6345),但是上游的 π 二聚体阻遏物结合位点和下游的 π 启动子被删除(通过去除重复子s的一个拷贝),在Williams, Supra, 2014中有所描述,并通过引用并入本文。这个R6K起点包含6个串联正向重复重复子(图1E)。NTC9385RNanoplasmid™载体包括这种最小化的R6K起点和间隔区中的RNA-OUT AF选择性标记,在Williams, Supra, 2014中有所描述,并通过引用并入本文。

[0292] 典型的R6K生产菌株从基因组中表达 π 蛋白衍生物PIR116,其包含增加拷贝数的P106L取代(通过减少 π 二聚化; π 单体激活,而 π 二聚体抑制)。用pCOR (Soubrier et al., Supra, 1999) 和pCpG质粒 (Hebel HL, Cai Y, Davies LA, Hyde SC, Pringle IA, Gill DR. 2008. Mol Ther 16:S110) 的发酵结果较低,在PIR116细胞系中约为100mg/L。

[0293] pir-116复制蛋白的诱变和增加拷贝数的选择已被用于制造新的生产菌株。例如,TEX2pir42菌株包含P106L和P42L的组合。P42L突变干扰DNA成环复制阻遏。具有pCOR质粒的所述TEX2pir42细胞系提高了拷贝数和发酵产量,据报道产量为205mg/L (Soubrier F. 2004. 国际专利申请W02004033664)。

[0294] 可以提高拷贝数的 π 拷贝数突变体的其他组合包括“P42L和P113S”、以及“P42L、P106L和F107S” (Abhyankar et al., 2004. J Biol Chem 279:6711-6719)。

[0295] Williams, Supra, 2014描述了表达噬菌体HK022附着位点的整合的pL启动子热诱导型 π P42L、P106L和F107S高拷贝突变复制(Rep)蛋白的宿主菌株,用于R6K起点的Nanoplasmid™载体的选择和复制。这是一个额外的Nanoplasmid™安全因子,因为R6K起点

的载体只能在表达Rep蛋白的工程化大肠杆菌宿主菌株中复制。

[0296] 在Williams, Supra, 2014中描述的RNA-OUT选择标记R6K质粒的复制和发酵是使用热诱导型'P42L-P106L和F107S' π 拷贝数突变细胞系(例如DH5 α 宿主菌株NTC711772=DH5 α dcm-att λ ::P_{5/6 6/6}-RNA-IN-SacB, catR; att_{HK022}::pL (OL1-G到T) P42L-P106L-F107S (P3-), SpecR StrepR) 进行的。据报道产量高达695mg/L。

[0297] 本文创建并公开的其它细胞系包括:

[0298] NTC821601DH5 α att λ ::P_{5/6 6/6}-RNA-IN-SacB, catR; att_{HK022}::pL (OL1-G to T) P42L-P106L-F107S (P3-), SpecR StrepR=dcm+NTC711772版本

[0299] NTC940211DH5 α att λ ::P_{5/6 6/6}-RNA-IN-SacB, catR; att_{HK022}::pL (OL1-G到T) P42L-P106I-F107S P113S (P3-), SpecR StrepR=P106I对P106L的高拷贝取代与P113S结合产生NTC821601的四重拷贝数增加突变rep蛋白衍生物

[0300] NTC1050811 DH5 α att λ ::P_{5/6 6/6}-RNA-IN-SacB, catR; att_{HK022}::pL (OL1-G到T) P42L-P106I-F107S P113S (P3-), SpecR StrepR; att _{ϕ 80}::pARA-CI857ts, tetR=NTC940211

的pARA-CI857ts衍生物。该菌株含有阿拉伯糖诱导型CI857ts基因的噬菌体 ϕ 80附着位点染色体整合拷贝。向平板或培养基中添加阿拉伯糖(例如添加至0.2-0.4%最终浓度)诱导pARA介导的CI857ts阻遏物表达,从而通过CI857ts介导的表达pL启动子的Rep蛋白的下调[即,额外的CI857ts介导的在30°C pL (OL1-G到T) 启动子更有效的下调]来减少30°C时的拷贝数。温度升至37-42°C后,拷贝数诱导不受影响,因为CI857ts阻遏物在这些升高的温度下失活。dcm衍生物(NTC1050811dcm-)用于不需要dcm甲基化的情况。

[0301] NTC1011641; Stb14 att λ ::P5/6 6/6-RNA-IN-SacB, catR; att_{HK022}::pL P42L-P106L-F107S (P3-) SpecR StrepR=NTC661135的Stb14版本 (XL1Blue-dcm-att λ ::P_{5/6 6/6}-RNA-IN-SacB, catR; att_{HK022}::pR pL P42L-P106L-F107S (P3-) SpecR StrepR在Williams, Supra, 2014中有所描述

[0302] 与Williams, Supra, 2014中描述的三重突变体热诱导型pL (OL1-G到T) P42L-P106L-F107S (P3-) 相比,四重突变体热诱导型pL (OL1-G到T) P42L-P106I-F107S P113S (P3-) 提高了NanoplasmidTM的产量。用四重突变体NTC1050811细胞系获得了超过2g/L的NanoplasmidTM产量(例如,NTC9 T7 A99pA为2240mg/L,表8)。

[0303] 使用条件性复制起点(如R6K起点)需要专门的细胞系进行复制,这增加了安全裕度,因为载体如果转移到患者的内源性菌群中不会复制。

[0304] 实施例2:pUC和R6K起点载体的生产

[0305] 摇瓶生产:使用专有的质粒+摇瓶培养基进行摇瓶生产。种子培养物从甘油储备或菌落开始,并划线到含有50 μ g/mL抗生素(用于ampR或kanR选择质粒)或6%蔗糖(用于RNA-OUT选择质粒)的LB培养基琼脂平板上。平板在30-32°C下生长;将细胞重新悬浮在培养基中,并用于为500mL质粒+摇瓶提供约2.50D₆₀₀的接种物,该摇瓶含有50 μ g/mL的抗生素用于ampR或kanR选择质粒或0.5%的蔗糖用于选择RNA-OUT质粒。烧瓶在表5、6、7和9所示的生长温度下振荡生长至饱和。

[0306] 发酵生产:在New Brunswick BioFlo 110生物反应器中使用专有的补料分批培养基(NTC3019, HyperGRO培养基)进行发酵,如(Carnes and Williams, Supra, 2011)所述。种

子培养物从甘油储备或菌落开始,并划线到含有50 μ g/mL抗生素(用于ampR或kanR选择质粒)或6%蔗糖(用于RNA-OUT选择质粒)的LB培养基琼脂平板上。平板在30-32 $^{\circ}$ C下生长;将细胞重新悬浮在培养基中,并用于为发酵提供约0.1%的接种物,所述发酵包含50 μ g/mL抗生素用于ampR或kanR选择质粒或0.5%蔗糖用于RNA-OUT质粒。表8和表9显示了HyperGRO温度变化。

[0307] 生产宿主:在大肠杆菌菌株DH5 α [F- Φ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169recA1 endA1 hsdR17(rK-,mK+) phoA supE44 λ -thi-1gyrA96 relA1](Invitrogen,Carlsbad CA)或Stb14中进行pUC起点的AmpR或KanR质粒发酵。

[0308] 在大肠杆菌菌株DH5 α 中进行无抗生素pUC起点的RNA-OUT质粒发酵,该菌株含有噬菌体 λ 附着位点染色体整合的pCAH63-CAT RNA-IN-SacB(P5/66/6),如Williams,Supra,2008中所述。所述生产菌株为NTC4862=DH5 α att λ ::P5/6 6/6-RNA-IN-SacB,catR。

[0309] 使用大肠杆菌RNA-OUT选择宿主进行无抗生素R6K γ 起点的RNA-OUT质粒的复制和发酵,所述宿主进一步编码噬菌体HK022附着位点整合pL启动子热诱导型 π 拷贝数突变细胞系,其产生方法描述于Williams,Supra,2014,并通过引用并入本文。

[0310] 生产菌株:

[0311] pUC起点-AmpR或KanR抗生素选择宿主

[0312] DH5 α

[0313] Stb14

[0314] pUC起点-RNA-OUT蔗糖选择宿主

[0315] NTC4862 DH5 α att λ ::P_{5/6 6/6}-RNA-IN-SacB,catR

[0316] NTC1011592 Stb14 att λ ::P5/6 6/6-RNA-IN-SacB,catR

[0317] R6K起点-RNA-OUT蔗糖选择NanoplasmidTM宿主

[0318] NTC1050811 DH5 α att λ ::P_{5/6 6/6}-RNA-IN-SacB,catR;att_{HK022}::pL(OL1-G到T)

[0319] P42L-P106I-F107S P113S(P3-),SpecR StrepR; att _{ϕ 80}::pARA-CI857ts,tetR

[0320] NTC1011641 Stb14 att λ ::P5/6 6/6-RNA-IN-SacB,catR;att_{HK022}::pLP42L-P106L-F107S(P3-)SpecR StrepR

[0321] 分析方法:在所有发酵过程中,在关键点定期采集培养样品。立即分析样品的生物量(OD₆₀₀)和质粒产量。质粒产量通过定量从Qiagen Spin Miniprep试剂盒制剂中获得的质粒来确定,如(Carnes and Williams,Supra,2011)所述。简而言之,细胞被碱性裂解、澄清、质粒被柱纯化,并在定量前洗脱。质粒质量由琼脂糖凝胶电泳分析(AGE)确定,并在0.8-1% Tris/乙酸盐/EDTA (TAE)凝胶上进行,如Carnes and Williams,Supra,2011中所述。

[0322] 实施例3:pUC和R6K起点结构载体的构建和制备

[0323] 所述R6K γ 起点(SEQ ID NO:1;图1E)-RNA-OUT(SEQ ID NO:5;图1B)细菌复制选择区(SEQ ID NO:8;图1C)被克隆到各种基于pUC57的载体的多接头区,以产生pNTC-NP1、pNTC-NP2、pNTC-NP3、pNTC-NP4、pNTC-NP5、pNTC-NP6、pNTC-NP7载体。每个载体具有不同的侧翼限制性酶切位点,可用于将目标载体改造为R6K复制-RNA-OUT选择。表4显示了pNTC-NP1-7载体中R6K-RNA-OUT插入片段侧翼的5'和3'多接头序列。还创建了基于pUC57的1个CpG的R6K γ 起点-2个CpG的RNA-OUT细菌复制选择区(SEQ ID NO:9;图1D)的版本(pNTC-3xCpG NP1),如表4所示。

[0324] 所述R6K γ 起源 (SEQ ID NO:1) 是经过改造的6重复子的R6K起点 (图1E)。还创建了基于pUC57的7重复子的R6K γ 起点 (SEQ ID NO:18;图1F) -RNA-OUT (SEQ ID NO:5;图1B) 细菌复制选择区,并将其用于构建和评估其他重复子在制备中的效用。类似地,使用区别仅在于包含SEQ ID NO:18的7重复子的R6K γ 起点或六个重复子的R6K γ 起点 (SEQ ID NO:1) 的载体获得了高质量,高产量的生产。例如,在30-42°C 10hr升温温度变换HyperGR0发酵中获得以下收获产量:

[0325] SEQ ID NO:1 6重复子的3203bp的R6K起点的载体:生物量为1200D₆₀₀;质粒滴度为1363mg/L;质粒比重为11.3mg质粒/L/OD₆₀₀

[0326] SEQ ID NO:18 7重复子的3225bp的R6K起点的载体:生物量为1370D₆₀₀;质粒滴度为1503mg/L;质粒比重为11.0mg质粒/L/OD₆₀₀

[0327] SEQ ID NO:18中的7重复子R6K γ 起点是重复子5的串联重复 (图1F;SEQ ID NO:18),但是本发明的7重复子R6K γ 起点载体可以是任何重复子的串联重复,以SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21;SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23 (图1E) 示出,或SEQ ID NO:19;SEQ ID NO:20;SEQ ID NO:21;SEQ ID NO:22;SEQ ID NO:23随机组合成7重复子R6K起点组合物或保留TGAGNG共有序列的重复子重复变体。还考虑了其他的重复子衍生物 (例如8、9或10个重复子载体) 用于实施本发明。

[0328] 表4:pNTC多克隆位点侧接R6K起点-RNA-OUT选择标记载体

[0329]

载体	R6K 5'侧翼限制性位点	trpA 项	R6K 起点	连接位点	RNA OUT 选择标记	RNA-OUT 3'侧翼限制性位点
pNTC-NP 1 (SEQ ID	EcoRI, SacI, KpnI, NruI, NsiI, XmaIII, NotI, <i>NheI</i>	是	SEQ ID NO: 1	DraIII ^a	SEQ ID NO: 5	<i>NheI</i> BamHI, XmaI, ApaI, SalI, HincII,

[0330]

NO:10)						PstI, StuI, AatI, SphI, <i>HindIII</i> (在 R6K 中)
pNTC-NP 2 (SEQ ID NO:11)	EcoRI, SacI, KpnI, NruI, NsiI, XmaIII, NotI, NheI	是	SEQ ID NO: 1	DraIII ^a	SEQ ID NO: 5	SpeI, <i>XmaI</i> , SspI BamHI, <i>XmaI</i> , ApaI, Sall, HincII, PstI, StuI, AatI, SphI, <i>HindIII</i> (在 R6K 中)
pNTC-NP 3 (SEQ ID NO:12)	EcoRI, <i>SacI</i> , <i>KpnI</i> , NruI, NsiI, XmaIII, NotI, NheI	是	SEQ ID NO: 1	DraIII ^a	SEQ ID NO: 5	<i>KpnI</i> , <i>SacI</i> BamHI, <i>XmaI</i> , ApaI, Sall, HincII, PstI, StuI, AatI, SphI, <i>HindIII</i> (在 R6K 中)
pNTC-NP 4 (SEQ ID NO:13)	NheI, XmaIII, NotI, NsiI, NruI, <i>KpnI</i> , <i>SacI</i> BamHI, <i>XmaI</i> , ApaI, Sall, HincII, SfcI, PstI, StuI, AatI, SphI, <i>HindIII</i> (在 R6K 中)	是	SEQ ID NO: 1	DraIII ^a	SEQ ID NO: 5	EcoRI, <i>SacI</i> , <i>KpnI</i>
pNTC-NP 5 (SEQ ID	KasI, NheI	是	SEQ ID NO: 1	DraIII ^a	SEQ ID NO: 5	<i>KpnI</i> AflIII PstI, AatI, SphI, <i>HindIII</i> (在 R6K

[0331]

NO:14)						中)
pNTC-NP 6 (SEQ ID NO:15)	EcoRI, PstI, EcoRV, BstXI, NotI, NheI	是	SEQ ID NO: 1	DraIII ^a	SEQ ID NO: 5	KpnI, ApaI, PvuI, SalI, SacI
pNTC-NP 7 (SEQ ID NO:16)	BssHII PacI NheI	是	SEQ ID NO: 1	DraIII ^a	SEQ ID NO: 5	KpnI PacI BssHII
pNTC-3x CpG NP1 (SEQ ID NO:17)	XhoI, XbaI, ApaI, Sall, HincII, PstI, StuI, AatI, SphI, <i>HindIII</i> (在 R6K 中)	否	SEQ ID NO: 2	BsrGI	SEQ ID NO: 7	EcoRI, SacI, <i>KpnI</i> , NruI, NsiI, XmaIII, NotI, NheI, <i>KpnI</i>

[0332] ^a在定向多片段连接反应中,非回文独特的3bp NNN粘性末端DraIII位点(CACNNGTG)分离序列CACGTTGTG的R6K和RNA-OUT,可用于从单独的pNTC载体组装R6K和RNA-OUT

[0333] 通过以下方法将病毒和非病毒载体pUC起点-抗生素选择细菌骨架改造成R6K-RNA-OUT:

[0334] 1) 选择靶标病毒和非病毒载体中pUC起点和抗生素选择标记区侧翼的限制性位点;

[0335] 2) 确定pNTC-NP相容的多接头-R6K-RNA-OUT多接头盒(pNTC-NP1、2、3、4、5、6或7;表4);

[0336] 3) 切除pUC起点的抗生素选择标记区域,并使用选择的限制性消化方法和标准连接酶介导的克隆用选择的R6K起点RNA-OUT区域替换。

[0337] 在某些情况下,所述R6K起点和RNA-OUT单位是使用非回文DraIII接头位点从单独的限制性片段以多片段连接的方式组装的(见表4)。在fd6 Ad辅助体改造的情况下(表9),使用短的500bp合成基因DraIII RNA-OUT-Ad辅助体-AvrII进行3片段连接,以将RNA-OUT连接到12kb AvrII-SalI限制性片段中fd6 Ad辅助体真核区域的独特AvrII位点,并连接来自pNTC-NP4的SalI-R6K起点-DraIII片段。

[0338] 对于睡美人载体(图2;表6)、AAV载体(图3;表7)和mRNA载体(图4;表8),显示了原始pUC起点-抗生素选择标记载体和经过改造的R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择标记载体的示例性载体图和载体特性。对于AAV辅助载体,显示了原始pUC起点-抗生素选择标记载体和改良的R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择标记载体的载体特征(表8)。对于慢病毒载体(表5)

和AAV载体(表7),显示了pUC起点-RNA-OUT无抗生素选择标记载体和改良的R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择标记载体的载体特征。

[0339] 在所有情况下,R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择标记改造载体中的细菌骨架大小<1kb(460-610bp)。这远远低于提高载体表达水平(表1-2)和持续时间所需的1.1kb的细菌骨架大小的限制(Quiviger et al., Supra, 2014)。在所有情况下,改造前的原始pUC起点-抗生素选择细菌骨架>1.2kb(2340-2750bp),pUC起点-RNA-OUT改造也是如此(1210-1500bp)。因此,与原始pUC起点-抗生素选择标记载体相比,这些AAV、AAV辅助体、睡美人和慢病毒R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择标记改造载体满足了提高表达水平和持续时间的短间隔区的要求。此外,这些AAV、AAV辅助体、睡美人和慢病毒R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择标记改造载体由于去除了亲本载体中的KanR或ampR抗生素抗性选择标记,没有机会通过转导(AAV、慢病毒载体)或转座(睡美人载体)进行抗生素标记基因转移。另外,本技术的载体不需要复杂的难于规模化的昂贵的额外制造步骤,所述步骤需要用微环载体去除真核polyA和启动子之间的大段细菌区域(Kay et al., Supra, 2010)。

[0340] 然而,在慢病毒载体中,所述真核区域包含侧翼的正向重复LTR,在AAV载体中,所述真核区域包含侧翼的反向末端重复序列,而在睡美人转座子载体中,所述真核区域包含侧翼的转座子IR/DR末端。这些侧翼序列都是结构化DNA序列。

[0341] Levy, Supra, 2004教导,当任何高拷贝数原核生物的复制起点距离结构化DNA序列(如增强子、LTR或IRES)<1kb时,就会形成复制中间体,但当高拷贝复制起点距离结构化DNA序列>1.5kb时,就不会形成复制中间体。与此一致,在所有pUC起点-RNA-OUT标记载体(其中所述pUC起点与慢病毒载体LTR距离<1kb(表5:400bp))或pUC起点-抗生素抗性标记载体(其中pUC起点与睡美人IR/DR距离<1kb(表6;280bp))中都形成复制中间体。对于AAV和mRNA载体,所述原始pUC起点-抗生素选择标记载体具有距离ITR 0bp(AAV载体;表7)或距离A99重复170bp(mRNA载体,表8)的pUC起点,它们可能产生太小而不能在琼脂糖凝胶上检测的复制中间体。然而,在这些情况下,产量非常低,表明由于复制阻断,质粒拷贝数低。相比之下,如预期的,在原始pUC起点-抗生素选择标记载体pUC起点与结构化DNA序列(A60重复)的距离>1.5kb的情况下,获得了高质粒产量(表8:mRNA载体pGEM4Z T7 A60)。

[0342] Williams, Supra, 2017报道,当pUC起点距均聚物A64C31重复序列>1.5kb时,具有PAS-BH延伸的pUC起点的pUC起点载体的产量提高。然而,当PAS-BH延伸的pUC起点与A64C31重复序列的定向距离<400bp时,产量较低(表8,见脚注d和e)。这教导了添加PAS-BH原体组装位点不能克服紧密定位的结构化DNA序列的不良pUC起点的定向复制。

[0343] 由于pUC起点本身是1kb,因此不存在构建<1.1kb细菌区的含有pUC起点的AAV、慢病毒、逆转录病毒或转座子载体的构造,所述载体载体像上面看到的和Levy, Supra, 2004所预测的那样不产生复制中间体,并且不会如本文所报道的那样质粒产量低。

[0344] 令人惊讶的是,在任何R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择标记改造载体中未观察到复制中间体,包括那些在其中R6K起点距离慢病毒载体LTR(表5:400bp)或睡美人IR/DR(表6;<40bp)<1kb的载体。此外,对于AAV载体而言,尽管具有与ITR的距离为0bp的pUC起点,所述原始pUC起点-抗生素选择标记载体的产量非常低,而具有与ITR的距离为40bp的R6K起点的两个R6K起点-RNA-OUT无抗生素选择标记改造载体则具有高得多的产量(表7)。这种提高的产量是R6K特异的,而不是RNA-OUT特异的,因为具有与ITR的距离为50bp的pUC起点的两

个AAV pUC-RNA-OUT具有与原始pUC抗生素标记载体相同的差的质粒产量(表7);同样,pUC-RNA-OUT与R6K-RNA-OUT改造体(在慢病毒骨架中距LTR重复序列400bp)的直接比较显示,所有三个pUC-RNA-OUT骨架都有复制中间体,但三个R6K-RNA-OUT骨架都没有复制中间体(表5)。

[0345] R6K起点载体在质粒拷贝数(质粒产量)和质量(消除了复制中间体)方面的这种令人惊讶的改进意味着R6K起点可以比pUC起点更有效地通过结构化DNA序列进行复制。尽管Levy, Supre, 2004教导了当任何高拷贝数原核复制起点距离结构化DNA序列(如增强子、LTR或IRES)小于1kb时,都会形成复制中间体,而当高拷贝复制起点距离结构化DNA序列>1.5kb时,不形成复制中间体,但是Levy, Supre, 2004提供的实例都是pUC起点质粒。

[0346] 这些复制起点之间的一个根本区别是,pUC起点是Pol I-依赖性复制起点,而R6K起点是Pol III-依赖性复制起点。在pUC起点的情况下,RNAII引物形成了一个由RNase H切割的RNA:DNA R环,从而在最初的前导链合成过程中为DNA Pol I指导的DNA合成创建了一个引物。然后,DNA合成从起点下游400bp处至最高为1.3kb处,从慢速DNA Pol I转化为高度加工的DNA Pol III(Allen et al., 2011. Nucleic Acids Research 39:7020-33)。所述R6K gamma复制起点rep蛋白与dnaB解旋酶和dnaG引发酶相互作用,产生用于DNA Pol III复制的短RNA引物,而不需要DNA Pol I(Abhyankar et al., Supra, 2003)。所述pUC起点的DNA Pol I复制区距起点最多为1.3kb,与Levy, Supra, 2004定义的复制中间体形成上限(距起点1至1.5kb)非常接近。我们提出,当非常接近R6K而不是pUC起点时,观察到的结构化DNA复制的惊人改善是由于与DNA Pol I相比,DNA Pol III对结构化DNA序列复制的意外改善。

[0347] 本文公开的载体方法和组合物证明,Pol III-依赖性复制起点(如R6K起点)可用于复制Pol I-依赖性复制起点(如pUC起点)复制不佳的结构化DNA序列。

[0348] 这些结果表明,本发明的载体可用于提高病毒和非病毒载体的生产产量和质量。

[0349] 实施例4:R6K起点结构化载体的改进性能

[0350] 本发明的载体还可用于消除通过病毒和非病毒载体的抗生素抗性标记基因的转移;降低转染相关的毒性;改进非病毒转座子载体的转座;提高病毒载体的包装滴度;提高病毒和非病毒载体编码的转基因的表达等。

[0351] 与具有>1.5kb细菌骨架的pUC起点的载体比较物相比,例如,本发明的R6K起点的第三代慢病毒载体[4种载体:表5转移质粒,gag pol包装质粒;env质粒;具有R6K起点和<1kb的细菌骨架的REV质粒(未示出)]显示出降低的毒性和提高的病毒包装滴度。按照制造商的建议使用Liofectamine 3000(Thermo Fisher Science, Waltham, MA)以表5具有<1kb细菌骨架的R6K起点的第三代慢病毒载体或具有>1.5kb细菌骨架的原始pUC起点的抗生素选择标记载体(对照)在24孔板中转染Lenti-X 293T细胞系(Takara Bio Mountain View, CA),导致更高滴度的慢病毒生产(>1.5kb细菌骨架的pUC起点的对照载体: $1.00x \pm 0.32$; <1kb细菌骨架的R6K起点的载体 $1.45x \pm 0.42$),使用Lenti-X p24 Rapid Titer Kit(Takara Bio Mountain View, CA)测量。如Marino MP, Luce MJ, Reiser J. 2003, Methods Mol Biol 229:43-55所述使用磷酸钙以表5第三代慢病毒载体(>1.5kb细菌骨架的pUC起点(对照)或<1kb细菌骨架的R6K起点)在24孔板中转染Lenti-X 293T细胞系,导致更高滴度的慢病毒产生(>1.5kb细菌骨架的pUC起点(对照): $1.00x \pm 0.30$; <1kb细菌骨架的R6K起点载体: $1.32x \pm 0.19$),使用Lenti-X p24 Rapid Titer Kit(Takara Bio Mountain View, CA)测量。值得

注意的是,与R6K起点的低毒性的<1kb细菌骨架的R6K起点的第三代慢病毒载体相比,>1.5kb细菌骨架的pUC起点的第三代慢病毒载体的磷酸钙转染在24孔板转染中导致了广泛的转染相关毒性(>80%细胞死亡)。这种降低的转染相关毒性应导致大规模生产转染中病毒滴度的显著提高。这些结果表明,与>1.5kb的细菌骨架载体相比,本发明的<1kb的细菌骨架的R6K起点的纳米质粒载体降低了转染相关的毒性并提高了病毒载体的包装滴度。

[0352] 总结

[0353] 虽然以上描述包含许多实施例,但是这些不应被解释为对本公开范围的限制,而是应被视为其优选实施方案的范例。许多其他变化是可能的。

[0354] 例如,在当前技术的载体中,可以利用Pol III依赖性复制起点和RNA选择标记的各种方向。例如,可以使用Pol III依赖性复制起点的八个方向中的任何一个,以及当前技术的载体中的RNA选择标记(即←Pol III复制起点RSM→;←Pol III复制起点←RSM;Pol III复制起点→RSM→;Pol III复制起点→←RSM;←RSM Pol III复制起点→;←RSM←Pol III复制起点;RSM→Pol III复制起点→;RSM→←Pol III复制原点)。

[0355] 此外,本领域已知的多种RNA选择性标记可以替代RNA-OUT。

[0356] 此外,抗生素抗性标记可以替代RNA-OUT,例如在希望简单地将pUC起点改造为R6K起点以提高质粒产量和/或质量的情况下。

[0357] 因此,读者将会看到,当前技术的改进的Pol III依赖性复制起点载体提供了一种方法,以降低转染相关的毒性,改进非病毒转座子载体的转座,改进病毒载体的包装滴度,改进病毒和非病毒载体编码基因的表达,并消除病毒载体和非病毒载体介导的抗生素选择标记基因转移(即通过引入优选小于1000bp的细菌区域),同时与诸如pUC质粒和微环的替代载体相比,显著改进了生产。

[0358] 因此,本公开的范围不应由所示的实施方案来确定,而是由所附权利要求来确定。

[0359]

表 5 慢病毒载体: pUC 起点-RNA-OUT 与 R6K 起点-RNA-OUT 摇瓶产量/质量

慢病毒载体	复制起点	载体大小	转移质粒 细菌骨架 (LTR 间距) ^a	复制起点距 离 SV40 Ori ^b	复制起点距 离 LTR ^c	细胞系 ^d	生产培养 ^e	收获 OD ₆₀₀	收获规格产量 (mg/L/ OD ₆₀₀)	收获产量 (mg/L)	生产质量 ^f
具有 SV40 Ori 的转移 质粒 1	pUC 起点	9.9 kb	1210 bp (1210 bp)	<50 bp	400 bp	DH5α	30 至 37°C	7.5	3.4	26	CCC 单体+ 复制中间体
	R6K 起点	9.2 kb	460 bp (460 bp)	<50 bp	400 bp	DH5α	30 至 37°C	5.0	4.7	24	CCC 单体
具有 SV40 Ori 的转移 质粒 2	pUC 起点	7.3 kb	1210 bp (1210 bp)	<50 bp	400 bp	DH5α	30 至 37°C	9.0	3.9	35	CCC 单体+ 复制中间
	R6K 起点	6.5 kb	460 bp (460 bp)	<50 bp	400 bp	DH5α	30 至 37°C	8.4	7.2	61	CCC 单体
具有 SV40 Ori 的转移 质粒 3	pUC 起点	8.3 kb	1210 bp (1210 bp)	<50 bp	400 bp	DH5α	30 至 37°C	16.8	3.0	51	CCC 单体+ 复制中间
	R6K 起点	7.5 kb	460 bp (460 bp)	<50 bp	400 bp	DH5α	30 至 37°C	11.9	7.7	92	CCC 单体
Gag pol 包 装质粒	pUC 起点	8.4 kb	1210 bp	NA	NA	DH5α	30 至 37°C	10.2	4.3	44	CCC 单体
	R6K 起点	7.5 kb	460 bp	NA	NA	DH5α	30 至 37°C	9.7	7.6	73	CCC 单体
包膜质粒	pUC 起点	5.4 kb	1210 bp	NA	NA	DH5α	30 至 37°C	17.0	5.7	96	CCC 单体
	R6K 起点	4.4 kb	460 bp	NA	NA	DH5α	30 至 37°C	10.8	6.0	65	CCC 单体

^a 所有载体均为无抗生素的 RNA-OUT 选择改造体。原始 pUC 起点-抗生素选择标记载体细菌骨架大小均>1.5kb

^b 从复制起点的 3'末端到复制方向上 SV40 起点的距离, 单位为 bp

^c 从复制起点的 3'末端到复制方向上最近的 LTR 的距离, 单位为 bp

^d DH5α=pUC 起点为 NTC4862, R6K 起点为 NTC1050811

^e 500mL 质粒+摇瓶培养温度从 30°C 转移到 37°C

^f 收获带有所指示的可检测复制中间体的质粒制备物。Levy, *Supra*, 2004 教导当任何高拷贝数原核复制起点距离启动子/增强子或 LTR 启动子或 DNA 重复或复杂二级结构(如 IRES)小于 1000bp 时, 就会形成复制中间体, 而如果复制起点距离大于约 1.5kb 时, 则不会形成复制中间体。

[0360]

表 6 睡美人转座子和转座酶载体:pUC 起点对比 R6K 起点的摇瓶生产产量/质量

复制起点/ 载体	细菌选择	载体 IR/DR 配 置	载体大 小	细菌骨架 大小 (IR/DR 间 距)	复制起点距 离 IR/DR ^a	细胞 系 ^b	生产培养 ^c	收 OD ₆₀₀	获 格产量 (mg/L/ OD ₆₀₀)	收获 量 (mg/L)	生产质量 ^d
转座子载体: pUC 起点 (pUC57-kan- SBI: 见图 2)	KanR	IR DR(R) < pUC<kanR IR DR(L) 启动 子>转基因>	5.5 kb	2600 bp (2600 bp)	280 bp	DH5α	30 至 37C	1.9	2.1	4	CCC 单体+ 复制中间体
转座子载体: R6K 起点 (NTC9-SBI: 见图 2)	RNA-OU T AF	IR DR(R) < R6K R-OUT > IR DR(L) 启动 子>转基因>	3.4 kb	475 bp (475 bp)	<40 bp	DH5α	30 至 37C	11.2	1.0	11	CCC 单体
转座子载体: R6K 起点 (NTC9-SB2)	RNA-OU T AF	IR DR(R) < R6K R-OUT > IR DR(L) 启动 子>转基因>	3.6 kb	475 bp (475 bp)	<40 bp	DH5α	30 至 37C	4.1	6.2	25	CCC 单体
转座酶载体 pUC 起点	KanR	不适用	4.7 kb	2600 bp (NA)	不适用	DH5α	30 至 37C	21.6	1.8	39	CCC 单体
转座酶载体 R6K 起点	RNA-OU T AF	不适用	2.5 kb	475 bp (NA)	不适用	DH5α	30 至 37C	10.9	4.7	51	CCC 单体

^a 从复制起点的 3'末端到复制方向上最近的睡美人 IR/DR 的距离, 单位为 bp
^b DH5α=pUC57-kanRpUC 起点为 DH5α, R6K 起点为 NTC1050811
^c 500mL 质粒+摇瓶培养温度从 30℃转移到 37℃
^d 收获带有所指示的可检测复制中间体的质粒制备物。Levy, *Supra*, 2004 教导当任何高拷贝数原核复制起点距离启动子/增强子或 LTR 启动子或 DNA 重复或复杂二级结构 (如 IRES) 小于 1000bp 时, 就会形成复制中间体, 而如果复制起点距离大于约 1.5kb 时, 则不会形成复制中间体。

[0361]

表 7AAV 载体:pUC 起点对比 R6K 起点的摇瓶生产产量/质量

AAV 载体	复制起点	细菌选择	载体配置	载体大小	细菌骨架大小 (ITR 间距)*	细菌选择	复制起点距离 ITR ^a	细胞系 ^b	生产培养 ^c	收获 OD ₆₀₀	收获规格产量 (mg/L/OD ₆₀₀)	收获产量 (mg/L)	生产质量 ^d
骨架 1*	pUC 起点 (pAAV: 见图 3)	AmpR	ITR <F1Ori-AmpR> pUC> ITR CMV- 转基因 -pA	5.4 kb	2600 bp (2600 bp)	AmpR	0 bp	Stbl4	30-37C 摇瓶	17.8	0.4	8	CCC 单体
	pUC 起点 (NTC8-AA V: 见图 3)	RNA-OUT AF	ITR <pUC R-OUT> ITR CMV- 转基因 -pA	4.0 kb	1240 bp (1240 bp)	RNA-OU T AF	50 bp	Stbl4	30-37C 摇瓶	10.4	0.7	7	CCC 单体
	R6K 起点 (NTC9-AA V: 见图 3)	RNA-OUT AF	ITR <R6K R-OUT> ITR CMV- 转基因 -pA	3.3 kb	490 bp (490 bp)	RNA-OU T AF	40 bp	Stbl4	30-37C 摇瓶	11.8	3.5	42	CCC 单体
	R6K 起点	RNA-OUT AF	ITR <R6K R-OUT> Rep> ITR CMV- 转基因 -pA	7.7 kb	490 bp (4940 bp)	RNA-OU T AF	40 bp	Stbl4	30-37C 摇瓶	11.0	2.1	23	CCC 单体
	pUC 起点 (NTC8)	RNA-OUT AF	ITR <pUC R-OUT> ITR CAG- 转基因 -WPRE-pA	5.5 kb	1250 bp (NA)	RNA-OU T AF	50 bp	Stbl4	30-37C 摇瓶	11.7	0.4	5	CCC 单体
骨架 2	R6K 起点 (NTC9)	RNA-OUT AF	ITR <R6K R-OUT> ITR CAG- 转基因 -WPRE-pA	4.8 kb	490 bp (NA)	RNA-OU T AF	40 bp	Stbl4	30-37C 摇瓶	11.1	1.6	18	CCC 单体

*从复制起点的 3' 末端到复制方向上最近的 AAV ITR 的距离, 单位为 bp

^bStbl4=pUC 起点-ampR 为 Stbl4, pUC 起点-RNA-OUT 为 NTC1011592, R6K 起点-RNA-OUT 为 NTC1011641

^c质粒+摇瓶培养温度从 30°C 转移到 37°C

^d高质量的 CCC 单体, 没有可检测的复制中间体, 并且重组介导的 ITR 缺失量低。凝胶上可能看不到 pUC 起点的复制中间体, 因为与 DNA 结构的距离<50, 但也可能是由于质粒产量低于 R6K 起点

*该载体的 R6K 起点-RNA-OUT MIP 内含子版本具有 6 bp 的 ITR 间距是不可克隆的, 推测是由于将 2 个 AAV ITR 紧邻在一起的毒性。第二个 AAV 载体骨架中的 R6K 起点-RNA-OUT MIP 内含子版本(10 bp ITR 间距)也是不可克隆的

[0362]

表 8: mRNA 载体:pUC 起点对比 R6K 起点的 DH5α^fHyperGRO^g 发酵产量/质量

polyA mRNA 表达载体	复制起点	选择	载体配置	载体大小	细菌骨架大小	复制起点与 polyA 的距离, 单位为 bp	收 OD ₆₀₀	收获规格产量 (mg/L/OD ₆₀₀)	收获规格产量 (mg/gWCW)	收获产量 (mg/L)	收获产量 (g) ^b	生产质量
pT3/T7 A99 pA ^h mRNA 表达载体和改造衍生物	pUC 起点 (pT3/T7 A99 pA)	AmpR	A99<pUC<AmpR T7>转基因	7.2 kb	2660 bp	170 bp	113	3.8	1.6	430 ^a	4.3	CCC 单体 ⁱ
	pUC 起点 +PAS-BH ^d (NTC7 T7 A99 pA)	kanR	A99<KanR pUC>PAS-BH> T7>转基因	7.2 kb	2660 bp	5000 bp	140	8.9	4.1	1250 ^a	12.5	CCC 单体
	R6K 起点 (NTC9 T7 A99 pA)	RNA-OUT AF	A99<R-OUT R6K> T7>转基因	5.2 kb	610 bp	4600 bp	147	15.3	6.7	2240 ^a	22.4	CCC 单体
	pGEM4Z A60 pA ^e mRNA 表达载体和改造衍生物	AmpR	A60 AmpR> pUC> T7>转基因	6.8 kb	2500 bp	4400 bp	112	8.3	4.4	929	9.3	CCC 单体
	pUC 起点 +PAS-BH ^e (NTC8 T7 A60 pA)	RNA-OUT AF	A60<R-OUT pUC> PAS-BH> T7>转基因	5.9 kb	1500 bp	4600 bp	146	11.5	4.9	1673 ^a	16.7	CCC 单体
	R6K 起点 (NTC9 T7 A60 pA)	RNA-OUT AF	A60<R-OUT R6K> T7>转基因	4.9 kb	460 bp	4300 bp	113	13.1	5.0	1483 ^a	14.8	CCC 单体

^a 通过测序正确的 PolyA 区域^b 克隆质粒/10L 发酵罐^c 载体图参见图 4

^d KanR-pUC+ PASBH 载体骨架, 描述于 Williams 2017 WO2017025447 中。相对于距 polyA64-polyC31 重复序列<200bp 的 pUC 起点或距 polyA64-polyC31 重复序列<400bp 的 pUC+PASBH 起点, 此 pUC+PASBH 骨架与 polyA64-polyC31 距离>1.5kb 时, 显著提高了质粒产量。(Williams, *Supra*, 2017, P1140-K2 相比于 P1140 和 P1140-K1, 表 1)。因此, PAS-BH 不能显著改善 pUC 起点复制到的 pUC 起点<400 bp 的重复结构中的情况。

^e RNA-OUT-pUC+PASBH 载体骨架, 描述于 Williams, *Supra*, 2017 中。相对于距 polyA64-polyC31 重复序列<200bp 的 pUC 起点或距 polyA64-polyC31 重复序列<400bp 的 pUC+PASBH 起点, 此 pUC+PASBH 骨架与 polyA64-polyC31 距离>1.5kb 时, 显著提高了质粒产量。(Williams, *Supra*, 2017, Table 1: P1140-AF2 相比于 P1140 和 P1140-AF1)。因此, PAS-BH 不能显著改善 pUC 起点复制到的 pUC 起点<400 bp 的重复结构中的情况。

^f DH5α = NTC8 为 NTC4862; NTC9 为 NTC1050811; NTC1050811 DH5α att_{HK02}::pL (OL1-G 到 T) P42L-P106L-F107S P113S (P3-), SpecR StrepR; att₈₈₀::pARA-CI857ts, TetR。阿拉伯糖诱导 pARA-CI857ts 表达, 其通过 CI857ts 介导的表达 pL 启动子的 Rep 蛋白的下调减少拷贝数

^g HyperGRO 发酵在 OD₆₀₀ 55 时温度变化 30-42°C。对于 NTC9 载体, 发酵培养基含有 0.2%阿拉伯糖

^h Elango *et al.*, 2005. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 330:958-66 报导 polyA100 mRNA 载体在 DH5α 和 XL1Blue 中不稳定并且不能以 mg 量产生。载体图参见图 4

ⁱ 凝胶上可能看不到 pUC 起点的复制中间体, 因为与 DNA 结构的距离<170bp, 但也可能是由于质粒产量低于 R6K 起点载体

[0363]

表 9 AAV 辅助载体-pUC 起点对比 R6K 起点的质粒生产产量/质量

AAV 辅助载体	复制起点	选择	载体大小	细菌骨架大小	细胞系 ^b	生产培养 ^a	收获 OD ₆₀₀	收获产量 (mg/L/OD ₆₀₀)	收获产量 (mg/L)	生产质量
AAV2 Rep/AAV9 Cap (Rep Cap 辅助体)	pUC 起点	RNA-OUT AF	5.7 kb	1220 bp	DH5α	30 到 37C ^a	16.5	2.6	43	CCC 单体
	R6K 起点	RNA-OUT AF	4.9 kb	470 bp	DH5α	30 到 37C ^a	17.5	5.5	96	CCC 单体
Fd6 (Ad 辅助体)	pUC 起点	ampR	15.4 kb	2750 bp	Stbl4 ^c	30C ^{a, e}	20	0.8 ^d	16 ^d	CCC 单体和盐失产物
	R6K 起点	RNA-OUT AF	12.9 kb	540 bp	DH5α	30 到 37C ^a	17.8	1.3	23	CCC 单体
pHelper Rep Cap NP (Ad 辅助体+ Rep Cap 单个辅助质粒)	R6K 起点	RNA-OUT AF	14.2 kb	470 bp	DH5α	30 到 37C ^a	6.8	4.8	33	CCC 单体
pHelper (Ad 辅助体)	pUC 起点	ampR	11.6 kb	2340 bp	DH5α	30-42C HyperGRO 转移	129	14.2	1833	CCC 单体
pHelper-NP (Ad 辅助体)	R6K 起点	RNA-OUT AF	9.8 kb	460 bp	DH5α	30-42C HyperGRO RAMP ^e	84.5	18.1	1530	CCC 单体

^a500mL 质粒+摇瓶培养;

^b: DH5α = NTC1050811: NTC1050811 DH5α att_λ::P₃₆₆-RNA-IN- SacB, catR; att_{HK022}::pL (OL1-G 到 T) P42L-P106I-F107S P113S (P3-), SpecR StrepR; att_{Q80}::pARA-CI857ts, TetR。阿拉伯糖诱导 pARA-CI857ts 表达, 其通过 CI857ts 介导的 pL 启动子的 Rep 蛋白的下调减少拷贝数使用蔗糖+0.2%阿拉伯糖平板以减少拷贝数获得改造体

^cFd6 Stbl4 最佳细胞系, Fd6/Stbl3 见缺失, Fd6/DH5α 和 Fd6/XL1Blue 细胞系不稳定, 自质粒在 30-37C 过程中丢失后, 一直使用 30C

^d微量制备中的高 gDNA 导致实际产量降低

^eHyperGRO 发酵, 从 30℃ 生长的蔗糖+0.2%阿拉伯糖培养物接种, 将阿拉伯糖加入分批培养基至 0.2%最终浓度。30-42℃ 梯度温度转变

具有SEQ ID区域的R6K起点注释

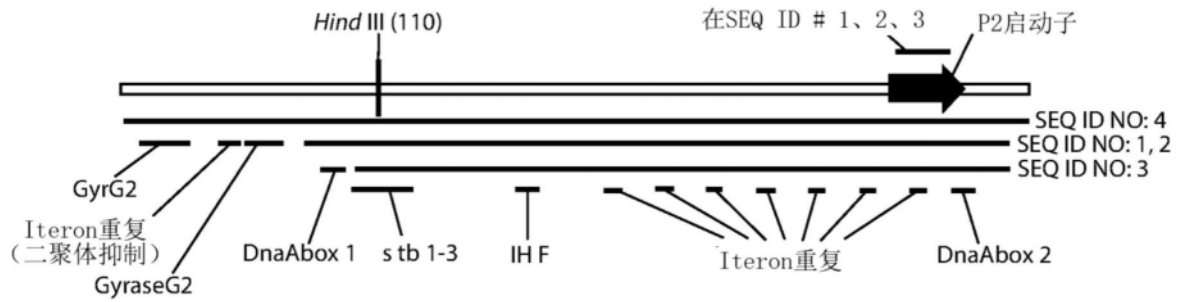


图1A

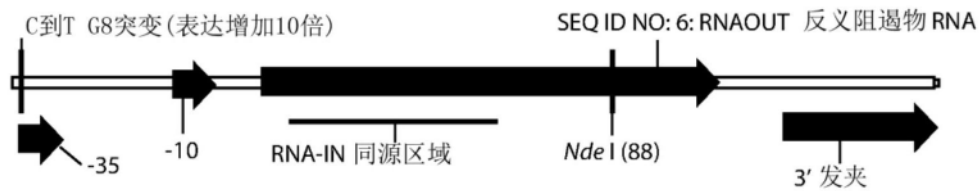
SEQ ID 5 RNA-OUT 选择标记
139 bp

图1B

SEQ ID 8 RNA-OUT (14 CpG)
466 bp

图1C

SEQ ID 9 R6K-RNA-OUT (3 CpG)
439 bp

图1D

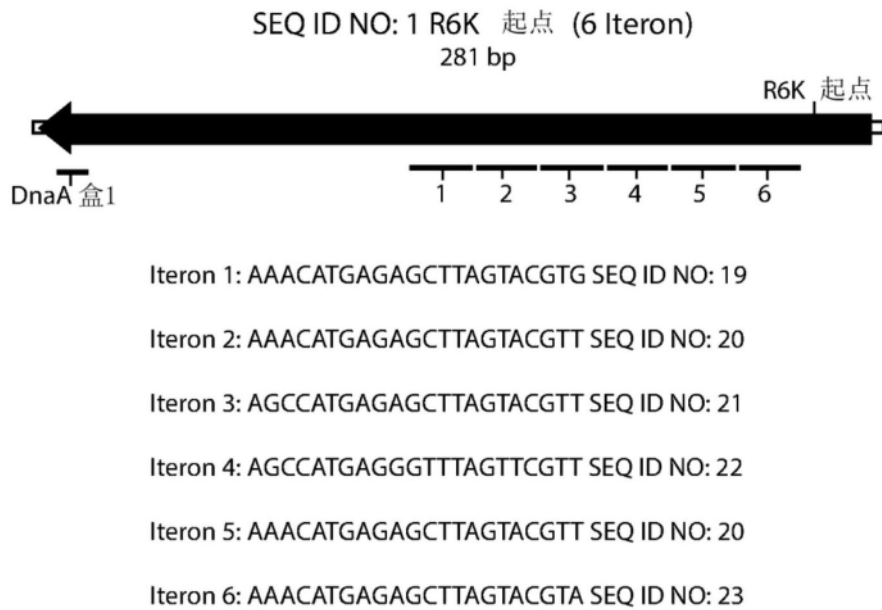


图1E

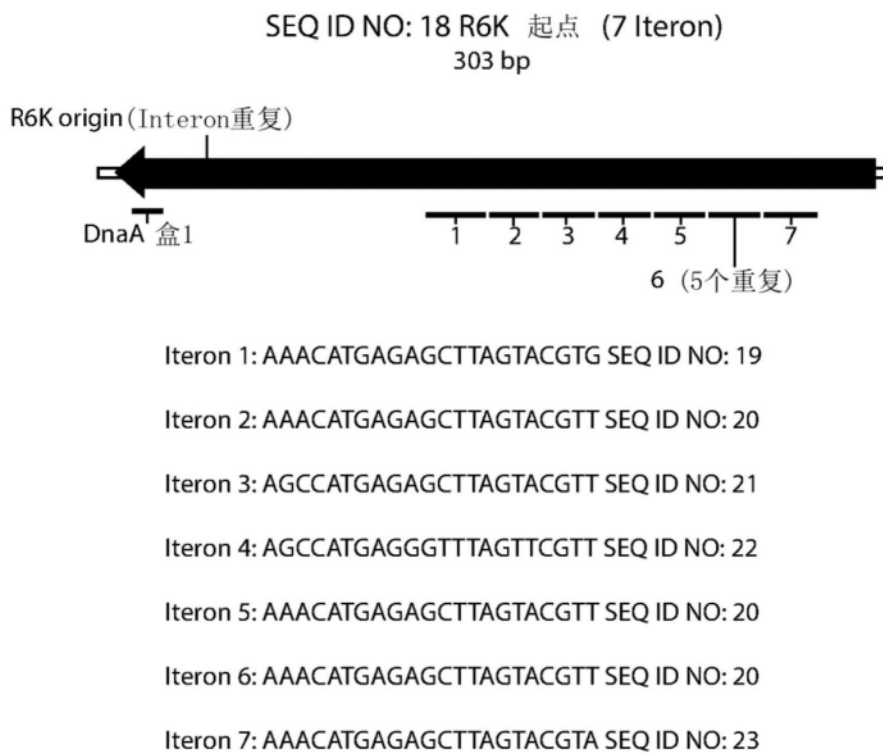


图1F

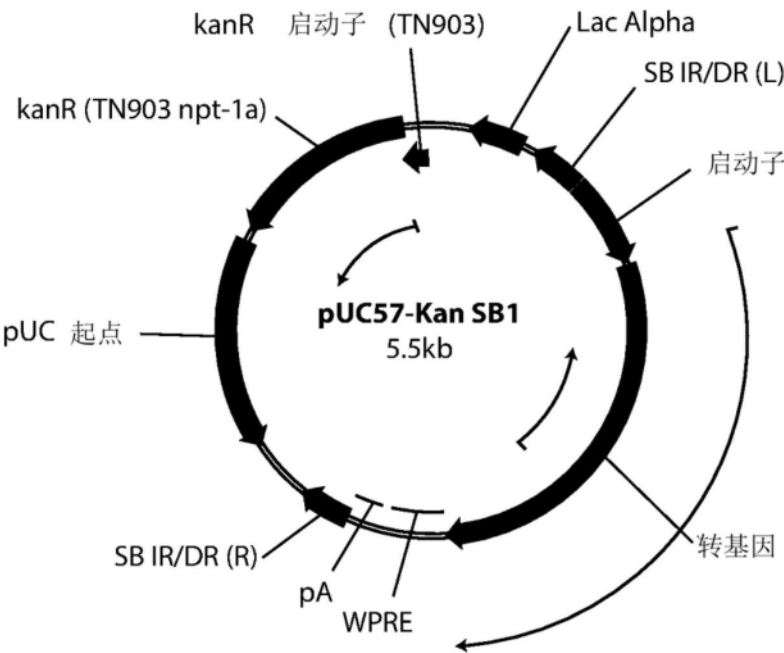


图2A

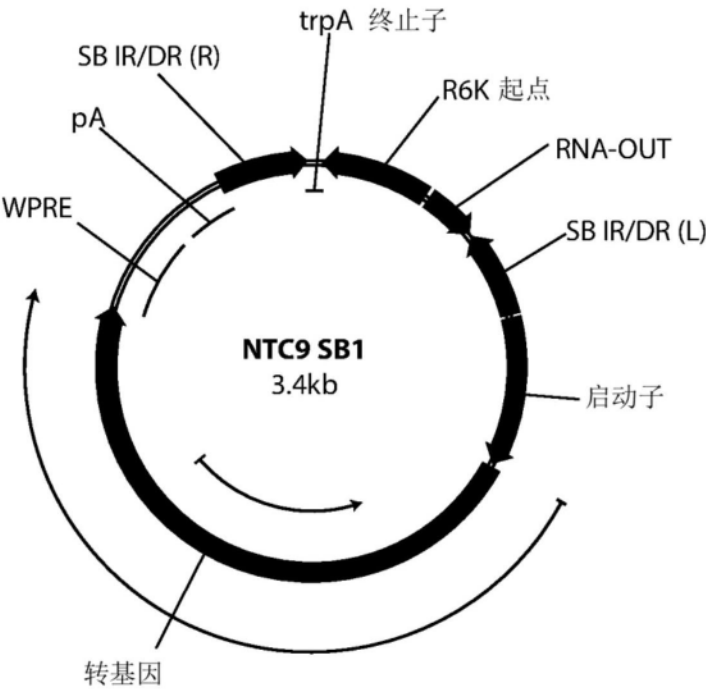


图2B

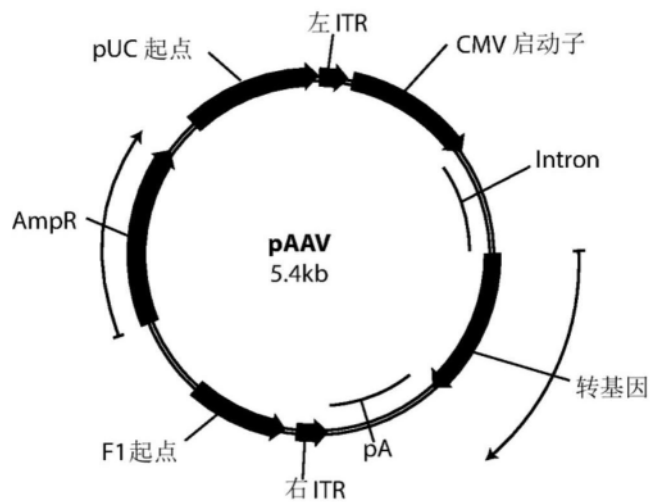


图3A

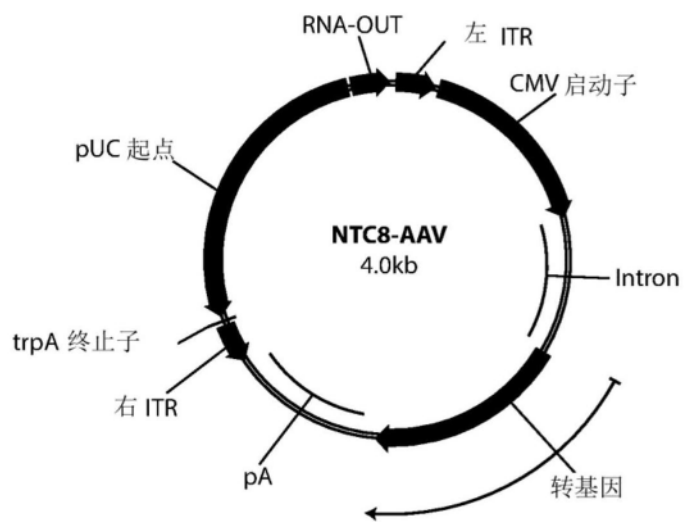


图3B

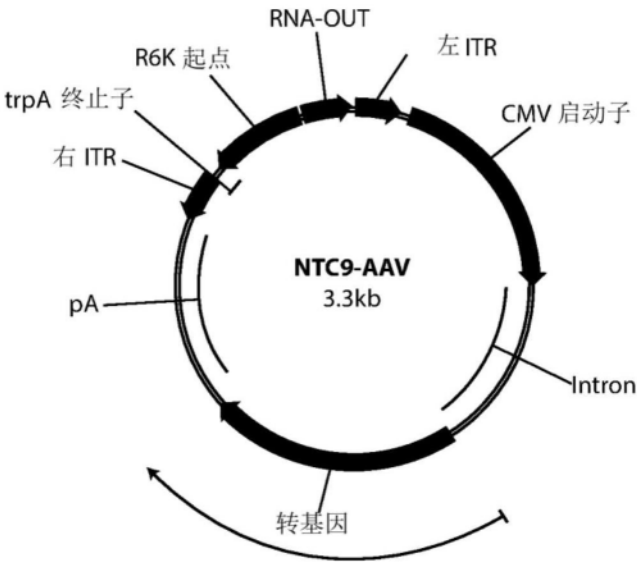


图3C

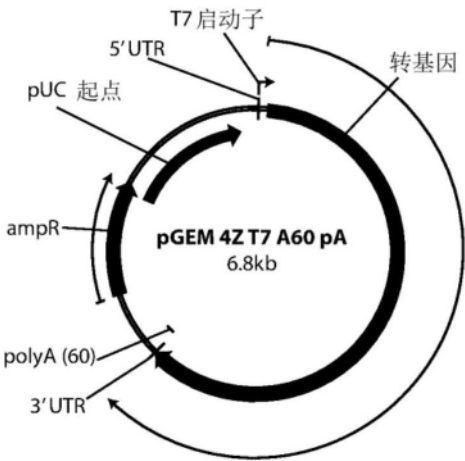


图4A

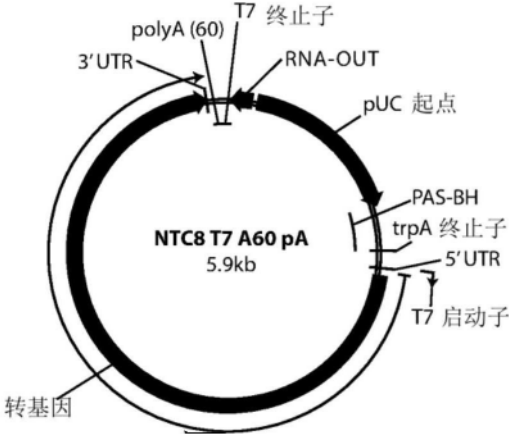


图4B

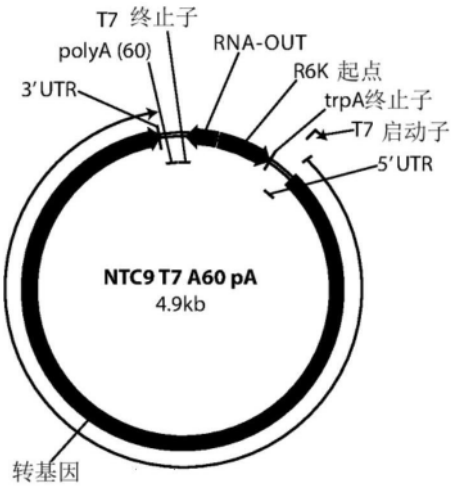


图4C

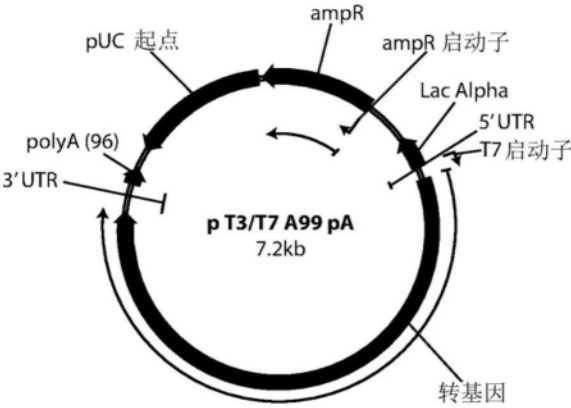


图4D

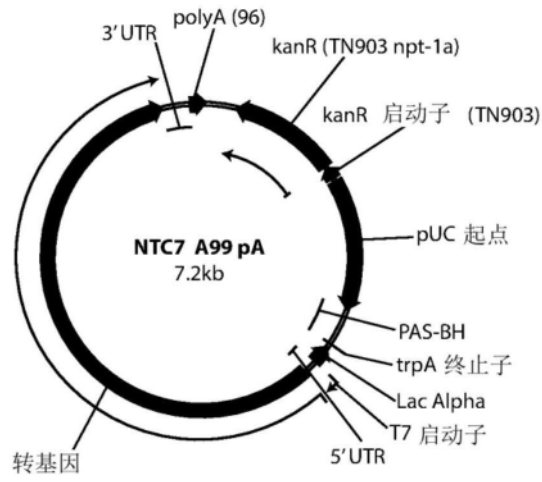


图4E

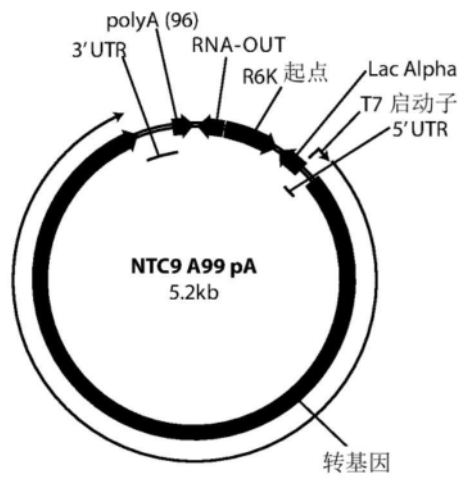


图4F