

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

C12N 15/86

C12N 15/12 C07K 14/47

A61K 48/00



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00817049.5

[43] 公开日 2003 年 4 月 9 日

[11] 公开号 CN 1409767A

[22] 申请日 2000.11.2 [21] 申请号 00817049.5

[30] 优先权

[32] 1999.11.2 [33] US [31] 60/163,055

[32] 1999.12.17 [33] JP [31] 359218/1999

[86] 国际申请 PCT/JP00/07737 2000.11.2

[87] 国际公布 WO01/32898 英 2001.5.10

[85] 进入国家阶段日期 2002.6.12

[71] 申请人 株式会社载体研究所

地址 日本茨城县

[72] 发明人 米满吉和 长谷川护

埃里克·W·阿尔顿

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 1 页 说明书 15 页 序列表 2 页  
附图 17 页

[54] 发明名称 用于将外源基因导入气道上皮的重组仙台病毒载体

[57] 摘要

本发明提供用于将外源基因导入气道上皮的重组仙台病毒，以及利用该载体导入外源基因的方法。所述重组仙台病毒载体能通过与天然的被粘液覆盖的气道上皮细胞短暂接触而将基因有效转移至这些细胞中。此外，所述载体不仅能将基因导入最表层，还可导入至大量表达 CFTR 的粘膜下腺体中。所述载体因此可用于 CF(CFTR - 缺陷型疾病)的基因治疗。

ISSN 1008-4274

- 1.一种用于将外源基因导入气道上皮的组合物,其包含携有外源基因的重组仙台病毒载体。
- 5       2.权利要求1的组合物,其中所述仙台病毒不包含F基因,HN基因,和M基因中的至少一个。
  - 3.权利要求1或2的组合物,其进一步包含鸡胚绒毛膜尿囊液。
  - 4.权利要求1-3中任一项的组合物,其用于治疗囊性纤维变性。
  - 5.权利要求1-4中任一项的组合物,其中所述外源基因是囊性纤维变性跨膜传导调节子(CFTR)基因或它的能编码功能等价于CFTR的蛋白的衍生物。
- 10       6.一种将外源基因导入气道上皮的方法,包括使含有重组仙台病毒载体的组合物与被粘液覆盖的气道上皮接触,其中所述病毒载体上携有外源基因。
  - 15       7.权利要求6的方法,其中所述仙台病毒载体不含有F基因,HN基因,和M基因中的至少一个。
    - 8.权利要求6或7的方法,其中所述组合物进一步包含鸡胚绒毛膜尿囊液。
    - 9.权利要求6-8中任一项的方法,其中所述外源基因是囊性纤维变性跨膜传导调节子(CFTR)基因或它的能编码功能等价于CFTR的蛋白的衍生物。
  - 20       10. 权利要求6-9中任一项的方法,其中所述气道上皮位于鼻、咽、气管、或肺内的任何传气通道或气体交换表面。

## 用于将外源基因导入气道上皮的重组仙台病毒载体

5

发明领域

本发明提供用于将外源基因导入气道上皮的重组仙台病毒, 以及利用该载体导入外源基因的方法。

背景领域

10 随着分子克隆技术的出现, 鉴定并分离出一系列带有导致重要人类疾病的突变基因。人类患者中缺失或突变基因可通过回体(*ex vivo*)技术来置换, 这种技术包括用裸露的 DNA、包裹在脂质体中的 DNA、适当的整合载体体外转化细胞, 然后导入宿主器官(回体基因治疗)。

15 基因治疗提供了将所需基因转移至受试者并随后使其在体内表达的手段(means)。基因转移可通过回体转染受试者的细胞或组织, 再将经转化的材料导入该宿主中来完成。或者, 可将基因直接给与受体。

Nabel 等, *Science* (1990) 249: 1285-1288 涉及用含有  $\beta$ -gal 表达质粒的脂质体体内动脉内转染猪。在动脉壁上观察到位点特异性基因表达。回体治疗存在若干缺点。例如, 如果仅有分化的正在复制的细胞被感染, 新导入的基因功能可能随这些细胞的成熟和死亡而丢失。回体方法仅可用于转染有限量的细胞, 不能用于转染那些并非首次从机体内取出的细胞。

如上所述, 在基因治疗中, 适当选择所要导入的基因、表达导入基因的靶细胞、适应于靶组织的基因转移方法、以及给与的途径是非常重要的。

25 囊性纤维变性(Cystic fibrosis, CF)是一种常染色体隐性遗传病, 它导致代谢的先天性障碍。CF 患者在美国和欧洲较常见。每 2,000 - 2,500 个婴幼儿中就有一个罹患此病。该疾病的主要症状是异常外部分泌产生粘性分泌物, 这些粘性分泌物在诸如肺部、呼吸道、胰腺、肝脏和小肠等器官中积累。目前对 CF 的治疗主要集中在肺移植和对肺传染病(严重致死性)的抗生素治疗。

30 已经鉴定出囊性纤维变性跨膜传导调节子(CFTR)基因作为 CF 的致病基因(Riordan, J.R.等, *Science* 245: 1066-1073, 1989), 预计可开发对 CF 的基

因治疗，其中将携有正常 CFTR 基因的载体导入气道上皮。在 CF 的基因治疗中，外源基因需体内导入，因为回体治疗不能应用于肺部和上呼吸道。

已进行多项尝试来将载体给与肺。Hazinski 等(Am. J. Respir. Cell Mol. Biol. (1991) 4: 206-209)公开了 DNA 经脂质体介导而转移至完整的啮齿动物肺部。将阳离子脂质体与以下三种融合基因构建体复合：1)与劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子相连的氯霉素乙酰转移酶(CAT)基因；2)与小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子相连的 CAT 基因；和 3)巨细胞病毒- $\beta$ -半乳糖苷酶(CMV- $\beta$ -gal)融合基因。将脂质体/DNA 复合体逐步灌入大鼠气管颈部，可检测到基因表达。

10 Brigham 等(Am. J. Med. Sci. (1989) 298: 278-281)描述了 CAT 基因以脂质体为载体向鼠肺的体内转染。转染通过静脉内、气管内、或腹膜内注射而实现。静脉内给药和气管内给药都导致 CAT 基因在肺内的表达。但腹膜内给药不行。

15 Canonico 等(Clin. Res. (1991) 39: 219A)描述了受 CMV 启动子驱动的人类  $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶基因在培养的牛肺上皮细胞中的表达。所述基因利用阳离子脂质体添加至培养的细胞中。试验中还检测了新西蓝白兔(New Zealand white rabbit)静脉运送了与脂质体复合的基因构建体后， $\alpha$ -1 抗胰蛋白酶在其肺组织切片中的表达。

此外，美国专利 5,958,893 公开了利用现有载体如腺病毒载体或阳离子脂质体导入编码截短型 CFTR 的基因的方法。

还证实，利用腺病毒介导向气道上皮的基因转移，其效率较低；腺病毒颗粒被表层浆膜摄入的速率较低可能是由于气道上皮细胞的最表层中基因转移的不足，以及同时缺乏  $\alpha\beta\gamma$  整联蛋白和 CAR 受体(它们是腺病毒的受体)(Goldman, M.等, Gene Ther. 3: 811-818, 1996, Boucher, R.C., J. Clin. Invest 25 103: 441-445, 1999)。在阳离子脂质体的情况中，据报道粘液阻止了它们的摄入，通过除去粘液可提高基因转移效率(Kitson, C.等, Gene Ther. 6: 534-546, 1999, Zabner, J.等, J. Biol. Chem. 270: 18997-19007, 1995, Fasbender, A.等, Gene Ther. 4: 1173-1180, 1997)。

30 迄今为止，尚无能将外源基因有效导入气道上皮的载体系统和基因转移方法。因此，希望开发用于有效地向气道上皮转移基因的载体。

仙台病毒属于副粘病毒科，是非常有效的基因转移载体，对它的开发一直没有间断(Kato, A.等, EMBO J. 16: 578-598, 1997, WO97/16538, WO97/16539)。仙台病毒毒性较低且能以非常高的水平表达导入在其中的基因。这种病毒也非常安全，因为插入该病毒载体的基因从来不会整合至宿主染色体中。据报道，仙台病毒载体的转染能力不同于腺病毒的(Goldman, M.等, Gene Ther. 3: 811-818, 1996, Boucher, R.C., J. Clin. Invest 103: 441-445, 1999)。例如，相对于未受损部位，腺病毒更倾向于感染受损部位(Kitson, C.等, Gene Ther. 6: 534-546, 1999, Zabner, J.等, J. Biol. Chem. 270: 18997-19007, 1995, Fasbender, A.等, Gene Ther. 4: 1173-1180, 1997)。这些报道提示，仙台病毒可互补腺病毒的缺陷。

### 发明内容

本发明的一个目标是提供一种能将外源基因导入气道上皮的载体以及一种利用所述载体导入外源基因的方法。

15 本发明研究了各自含有外源基因的重组仙台病毒载体、腺病毒载体、和阳离子脂质体复合物体外和体内向来自各种动物的气道上皮细胞转移基因的效力。结果显示，仙台病毒载体比腺病毒载体和阳离子脂质体复合物更有效地将外源基因导入气道上皮细胞。

20 本发明人还发现，重组仙台病毒载体不仅能将外源基因有效地导入容许性小鼠呼吸道，还能导入较大的动物如雪貂(ferret)、绵羊和人类的非容许性气道上皮细胞。而且，还发现仙台病毒载体可感染粘膜下腺体以及上皮细胞的最表面。根据这些发现完成本发明。

具体地，本发明提供了将外源基因导入气道上皮的组合物，其中含有携带外源基因的重组仙台病毒载体。

25 本发明还提供了将外源基因导入气道上皮的方法，该方法包括使含有重组仙台病毒载体的组合物与被粘液覆盖的气道上皮接触，其中所述仙台病毒携带有外源基因。

以下将详细说明本发明。

30 本文中“重组仙台病毒载体”指由重组仙台病毒 cDNA 重建的病毒和病毒样颗粒产物，它包含重组仙台病毒 RNA 以及具有感染性的仙台病毒体。本文中术语“感染性”指病毒通过与细胞粘附而将其核酸等转移至细胞中的

能力以及通过包括病毒包膜与宿主细胞膜融合在内的各种机制而穿透细胞的能力。所述重组仙台病毒载体可以是核糖核蛋白体(RNP)。

本文中“基因”是指RNA和cDNA。

“气道上皮细胞”是指出现在鼻、咽、气管、或任何导气通道的内表面的假分层状纤毛上皮细胞以及杯状细胞和无纤毛细胞(Clara cell), 或出现在肺内换气泡包括I型和II型肺细胞(pneumocyte)的表面的细胞。

本发明的重组仙台病毒载体携带重组仙台病毒基因。天然的仙台病毒载体由短的3'前导区、核衣壳(N)基因、磷(phospho, P)基因、基质(M)基因、融合(F)基因、血凝素-神经氨酸酶(HN)基因、大(L)基因、和短的5'拖尾区依此顺序组成。

用于作为起始物质产生重组仙台病毒载体的仙台病毒基因可通过缺失或取代而修饰, 只要所重建的重组仙台病毒载体可以感染细胞, 并在感染细胞中表达该载体所携带的外源基因即可。例如, 可使用不完整的病毒如DI颗粒(J. Virol. 68: 8413-8417, 1994)。

为了在基因治疗中使用, 优选的重组仙台病毒载体具有感染性但传播能力有缺陷。传播能力可通过使F基因, HN基因, 和M基因中的至少一个缺失而丧失。这类载体包含, 例如, 仅在F基因中有缺陷的仙台病毒Z株的基因。其它例子有pSeV18<sup>b</sup>(+)(Yu, D.等, Genes to Cells 2: 457-466, 1997)和pSeV(+)(Kato, A.等, EMBO J. 16: 578-587, 1997)。

重组仙台病毒基因可通过将外源基因如上述插入仙台病毒中而获得。可使用任何外源基因, 只要它编码能在目标气道上皮细胞中表达的蛋白即可。为了对CF进行基因治疗, 可使用CFTR基因(Riordan, J.R.等, Science 245: 1066-1073, 1989), 它是CF的致病基因。外源基因包括编码天然蛋白的基因, 以及通过对上述基因进行缺失、取代、或插入等修饰而获得的能编码相对于天然蛋白的功能等价蛋白的那些基因。例如, 美国专利 5,958,893 公开了一种修饰型CFTR基因。其它外源基因的例子包括编码 $\alpha$ -1胰蛋白酶(Long等, Biochem 23: 4828-2837, 1984) DNA酶, 超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化氢酶等的基因。

携有外源基因的重组仙台病毒载体可如下文引用的Kato, A.等(EMBO J. 16: 578-587, 1997)和Yu, D.等(Genes to Cells 2: 457-466, 1997)的方法所述来制备。

首先，制备含有所需基因的 cDNA 碱基序列的 DNA 样品。优选地，该 DNA 样品以 25ng/ $\mu$ l 或更高的浓度电泳后表现为单个质粒。靶 cDNA 序列中如果有 NotI 识别位点应先除去。制备包含 NotI 识别位点序列；下述转录终止序列(E)、间插序列(I)、和转录起始序列(S)；以及靶基因序列的一部分的正向侧和反向侧(反义链)合成型 DNA 序列作为引物对，从样品中扩增并回收所需基因片段。

制备正向侧合成型 DNA 序列时，从 5'侧任选两个或多个寡核苷酸 DNA，优选不含 NotI 识别位点-衍生序列的 4 个碱基，GCG 和 GCC，更优选 ACTT，并在 3'侧添加 NotI 识别位点 gcggccgc 和任选的 9 个碱基，含或不

10 不含 6 的倍数个碱基作为间隔臂。此外，在 3'侧添加一段对应于 ORF 中始于目标 cDNA 的起始密码子 ATG(含 ATG)的 25 个碱基的序列。在这种情况下，从目标 cDNA 选出近 25 个碱基，使得正向侧合成型寡核苷酸 DNA 的 3'末端为 G 或 C。

制备反向侧合成型 DNA 序列时，从 5'侧任选两个或多个寡核苷酸 DNA，优选不含 NotI 识别位点-衍生序列的 4 个碱基，GCG 和 GCC，更优选 ACTT，并在 3'侧添加 NotI 识别位点 gcggccgc，以及一个寡核苷酸 DNA 插入片段以调整长度。这一寡核苷酸 DNA 的长度被设计成能使仙台病毒基因组的 cDNA 互补链碱基以及 EIS 碱基的总数，包括 NotI 识别位点 gcggccgc，为 6 的倍数(所谓“6 的法则”；Kolakofski, D.等, J. Virol. 72: 891-899, 1998,

15 Calain, P.和 Roux, L., J. Virol. 67: 4822-4830, 1993)。反向侧合成型寡核苷酸 DNA 的 3'末端可如下制备：在所述插入片段的 3'侧添加仙台病毒 S 序列的互补链，优选 5'-CTTTCACCCT-3'，I 序列，优选 5'-AAG-3'，以及 E 序列的互补链，优选 5'-TTTTTCTTACTACGG-3'，一段以 G 或 C 结尾的互补链，其对应于从目标 cDNA 序列终止密码子开始反向计数的 25 个碱基。

25 利用 ExTaq 聚合酶(Takara Shuzo Co.)进行的标准方法可用于 PCR。优选使用 Vent 聚合酶(NEB)，所扩增的靶片段用 NotI 消化以便插入质粒载体 pBluescript 的 NotI 位点。所得 PCR 产物的碱基序列通过测序仪检验，从中选出带有正确序列的质粒。将选出的质粒插入已经用 NotI 裂解的仙台病毒基因组 cDNA 质粒，如 pSeV18+b(+)(Yu, D.等, Genes to Cells 2: 457-466, 1997)

30 或 pSeV(+)(Kato, A.等, EMBO J. 16; 578-587, 1997)中的 NotI 位点，获得重

组仙台病毒 cDNA, 其中已插入外源 cDNA。或者, 重组仙台病毒 cDNA 也可以不使用质粒载体 pBluescript 而直接插入到 NotI 位点中来获得。

通过在体外或在细胞中转录如上述制备的重组仙台病毒 cDNA, 以重建病毒, 可获得重组病毒载体。病毒可通过已知方法从 cDNA 重建(WO97/16538, 5 WO97/16539)。

从 cDNA 重建病毒可如下实施:

将猴肾细胞系 LLCMK2 在 6 孔塑料板上含有 10% 胎牛血清(FCS)和抗生素(100 个单位/ml 青霉素 G 和 100 $\mu$ g/ml 链霉素)的极限必需培养基(MEM)中培养至 70% - 80% 铺满( $1 \times 10^6$  cells)。然后用已被 UV 辐射灭活了的能表达 T7 聚合酶的重组痘苗病毒 vTF7-3 以 2 PFU/细胞感染这些细胞(Fuerst, T. R. 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A.等, Genes Cells 1: 569-579, 1996)。感染的 1 小时后, 这些细胞可进一步被 60-2 $\mu$ g, 更优选 3-5 $\mu$ g 上述重组仙台病毒 cDNA 和能表达出合成完整仙台病毒基因组所必需的反式作用病毒蛋白的质粒(24-0.5 $\mu$ g pGEM-N, 12-0.25 $\mu$ g pGEM-P, 和 24-0.5 $\mu$ g pGEM-L, 更优选 1 $\mu$ g pGEM-N, 0.5 $\mu$ g pGEM-P 和 1 $\mu$ g pGEM-L) (Kato, A.等, Genes Cells 1: 569-579, 1996)共转染, 其通过诸如利用了 Superfect (QIAGEN Inc.)的脂转染方法等来实现。将转染的细胞培养在不含血清、但含有 100 $\mu$ g/ml 利福平(Sigma)和阿糖胞苷(AraC), 更优选 40 $\mu$ g/ml 阿糖胞苷(AraC)的 MEM 中, 以便测定这些药物的最佳浓度, 使得痘苗病毒的细胞毒活性最小而病毒的回收量最大(Kato, A 等, 1996, Genes Cells 1: 569-579)。转染的 48 小时, 收获细胞并通过反复冻融 3 次使细胞破碎, 将它们注射至 10 日龄鸡胚的绒毛尿囊腔中。3 天后, 收获尿囊液, 通过检测血凝素(HA)活性而确定病毒滴度。HA 可通过“终点稀释法”测定(Kato, A.等, 1996, Genes Cells 1: 569-579)。未检测出 HA 的样品再次注射至鸡胚中。所收获的仙台病毒的滴度通常为  $10^8$ - $10^9$  PFU/ml, 同时包含的痘苗病毒 vTF7-3 的滴度是  $10^3$ - $10^4$  PFU/ml 或更低。将样品稀释  $10^6$  倍, 在鸡胚中增殖以便除去痘苗病毒。通过在鸡胚中传至第二代或第三代而获得的重组病毒被保存起来, 以便获得已插入了目标 cDNA 的重组病毒载体。所保存的病毒的空斑形成能力通常为  $10^9$  PFU/ml 或 10,240 HA 单位/ml, 如果将病毒保存在-80 $^{\circ}$ C, 可保持这种能力。

对重建所用的宿主细胞无特别限制,只要能在这些细胞中重建重组型仙台病毒 cDNA 即可。作为宿主的细胞系包括培养细胞如猴肾 CV-1 细胞和仓鼠肾 BHK 细胞,以及 LLCMK2 细胞和人类来源的细胞。

重建的重组仙台病毒可在其包膜表明与粘附分子、配体、受体等结合,从而促进对特定细胞的粘附。

上述含有病毒载体的绒毛尿囊液可作为本发明的含有重组仙台病毒载体的组合物使用。

本发明的组合物可包含任何生理可接受的培养基,如去离子水,5% 葡萄糖的水溶液等。组合物中还可包含其它附加成分,如稳定剂、杀生物剂等。含有重组仙台病毒载体的组合物可以为冻干剂型。这种组合物中除了上述添加剂以外,还可包含诸如白蛋白、Prionex<sup>TM</sup> (Pentapharm, Japan)等其它稳定剂。

重组仙台病毒中所含的外源基因可通过使含有该重组仙台病毒载体的组合物与被粘液覆盖的气道上皮细胞接触而被导入气道上皮细胞中。当使用阳离子脂质将基因转移至气道上皮细胞时,气道粘液严重阻碍阳离子脂质介导的基因转移,为了导入外源基因,需将粘液除去。相反,本发明的含有仙台病毒载体的组合物可以仅通过其与带有粘液的气道上皮细胞的接触而轻易地导入外源基因。

本发明的导入外源基因的方法可用于基因治疗,其通过使预期能治疗气道上皮细胞疾病的外源基因,或编码所述细胞中缺陷的蛋白的内源基因表达而实现。例如,本发明的含有携带 CFTR 基因之病毒载体的组合物可用于治疗 CF。基因治疗可通过将本发明的含有病毒载体的组合物体内或回体施用于病灶部位的气道上皮细胞并使外源基因在这些细胞中表达而实现。体内基因转移可通过局部用药来实施,如利用喷雾器对鼻腔或肺进行灌滴或吸入。喷雾器的实例包括市售商品和通常用于治疗哮喘的那些。

本发明的含有病毒载体的组合物可应用于任何哺乳动物,包括人类、小鼠、兔、绵羊、牛、猴等。

#### 附图简述

图 1 显示本发明重组仙台病毒载体和一种阳离子脂质复合体在小鼠肺部和鼻内的体内基因转移效力。误差范围用 SEM 表示。

图 2 显示本发明的重组仙台病毒载体(A)和一种阳离子脂质复合体(B)向小鼠鼻内转移基因时,接触时间对转移效力的影响,其通过滴鼻(短暂接触)和灌注(较长时间接触)来评估。误差范围用 SEM 表示。

5 图 3 显示本发明的重组仙台病毒载体和腺病毒载体向小鼠鼻内进行基因转移的效力,其通过滴鼻方式来评估。误差范围用 SEM 表示。

图 4 显示通过用本发明的重组仙台病毒载体和腺病毒载体滴鼻而导入  $\beta$ -gal 基因后,小鼠细支气管、气管和鼻内经 X-gal 染色检测  $\beta$ -gal 基因表达的显微镜检照片。

10 图 5 显示通过用本发明的重组仙台病毒载体和腺病毒载体滴鼻而导入  $\beta$ -gal 基因后,小鼠细支气管、气管和鼻内经 X-gal 染色检测基因表达的显微镜检照片。NC 表示非纤毛样分泌细胞,BC 表示基底细胞。

图 6 显示用本发明的重组仙台病毒载体滴鼻而导入  $\beta$ -gal 基因后,该基因在雪貂肺内的表达。R1 表示右下肺叶,L1 表示左上肺叶。

15 图 7 显示用本发明的重组仙台病毒载体滴鼻而导入  $\beta$ -gal 基因后,检测该基因在雪貂肺内表达的显微镜检照片。图 a 为左上肺叶,图 b 为中右肺叶,图 c 粘膜下腺体,图 d 为对照。此外,Lm 表示支气管腔,sm 表示粘膜下腺体。

图 8 显示本发明的重组仙台病毒载体及一种阳离子脂质复合体向来自健康人类供体的人类鼻上皮细胞转移基因的效力。误差范围用 SEM 表示。

20 图 9 显示本发明的重组仙台病毒载体及一种阳离子脂质复合体向绵羊气管细胞转移基因的效力。F 表示新鲜细胞,MD 表示粘液-耗竭型(depleted)细胞。误差范围用 SEM 表示。

25 图 10 显示本发明的重组仙台病毒载体及一种阳离子脂质复合体向添加了粘蛋白的绵羊气管细胞转移基因的效力。F 表示新鲜细胞,MD 表示粘液-耗竭型细胞。误差范围用 SEM 表示。

图 11 显示本发明的重组仙台病毒载体及腺病毒载体向绵羊气管细胞的边缘部分和中部转移基因的效力。误差范围用 SEM 表示。

图 12 显示本发明的重组仙台病毒载体及腺病毒载体向绵羊气管细胞转移 GFP 基因时,GFP 检测信号的显微镜检照片。

30 图 13 图示常规全细胞构成。

图 14 显示,在能表达样品-1 SeV/CFTR 的 COS7 细胞中,-60 mV 时被

毛喉素(forskolin)诱导的向内流入的电流随时间变化的图谱。膜电位保持-60 mV的支持电位。帧偏差(vertical deflection)表示以15秒的间隔从-100 mV到+60 mV的垂直脉冲(rectangular pulses)(持续时间,1秒)。虚线表示0电流水平。

- 5 图15显示毛喉素对能表达样品-1 SeV/CFTR的COS7细胞中膜电流的影响。膜电位保持-60 mV的支持电位。虚线表示0电流水平。优降糖(Glibenclamide)(300 $\mu$ M)抑制毛喉素诱导的Cl<sup>-</sup>电流。

- 10 图16显示在没有或有10 $\mu$ M毛喉素时获得的电流-电压相关性。膜电流振幅测定为最后100毫秒(ms)指令脉冲(持续1秒)的平均值。线条通过最小平方的方法调整(fit)。

图17显示能表达样品-1 SeV/CFTR的COS7细胞的净膜电流,它通过从应用10 $\mu$ M毛喉素期间记录的膜电流中减去应用毛喉素之前记录的膜电流而获得。膜电位保持-60 mV的支持电位。虚线表示0电流水平。

## 15 实施本发明的最佳模式

本发明将参考以下实施例予以举例说明,但不应理解为仅限于这些实施例。

### 实施例1

#### 重组仙台病毒载体的构建和重建

- 20 重组仙台病毒通过已知方法构建(Kato, A.等, EMBO J. 16: 578-598, 1997, Hasan, M.K.等, J. Gen. Virol. 78: 2813-2810, 1997)。首先,将18 bp的带有NotI限制性位点的间隔臂序列(5'-(G)-CGGCCGCAGATCTTCACG-3')插入克隆化SeV基因组cDNA, pSeV(+), 的前导序列与N蛋白编码序列5'端之间的最近的基因座位中, 获得质粒 pSeV18<sup>+</sup>b(+), 它还含有来自丁型肝炎病毒反基因组链(antigenomic strand)的自我-裂解型核酶位点。含有核定位信号、萤光素酶、绿色荧光蛋白(GFP)的大肠杆菌(*E. coli*) lacZ的完整cDNA, 以及大肠杆菌 lacZ用带有NotI位点的引物以及一组新的针对外源基因的SeV E和
- 25 S信号序列标签经聚合酶链式反应扩增, 然后插入克隆化基因组的NotI位点。带有外源基因的模板SeV基因组的全长被安排成6个核苷酸的倍数。将
- 30 带有外源基因的模板SeV基因组, 编码N-, P-和L-蛋白的质粒(pGEM-N, pGEM-P, pGEM-L)与市售阳离子脂质GL-67-DOPE-PEG (Genzyme Co. Ltd.)

混合，然后与痘苗病毒 vT7-3 (Fuerst, T.R.等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, 1986, Kato, A.等, Genes Cells 1: 569-579, 1996)一起共转染 LLCMK2 细胞。40 小时后，将这些细胞通过 3 轮反复冻融而破碎，然后注射至 10 日龄鸡胚的绒毛尿囊腔中。然后回收病毒，通过在受精卵中第二次传代而除去痘苗病毒。病毒滴度通过用鸡红细胞进行的血凝素试验(HA)而测定(Kato, A.等, Genes Cells 1: 569-579, 1996)，将含有病毒的绒毛尿囊液冻存在-80℃备用，它可以作为含有本发明的重组仙台病毒载体的组合物使用。

### 实施例 2

通过鼻滴入或鼻灌注向小鼠鼻和肺内体内转移基因。

#### 10 2-1. 仙台病毒载体与阳离子脂质的对比

pCMV-萤光素酶如下构建：将 pGL3-对照载体 (Promega) 的 HindIII-BamHI 片段插入 pcDNA3 (Invitrogen) 的多克隆位点以便受人类巨细胞病毒立即早期(CMV-IE)启动子驱动。然后将 pCMV-萤光素酶与 GL-67-DOPE-PEG (Genzyme Co. Ltd.)组合以获得 GL-67-pCMV-luc。

15 为了检查所述载体向肺进行基因转移的效力，以及接触时间对基因转移效力的影响，将所述载体通过鼻滴入和鼻灌注的方式给药至鼻腔。首先，将实施例 1 中制备的含有萤光素酶的仙台病毒载体(SeV-luc)或通过已知方法制备的 GL-67-pCMV-luc (80μg DNA/小鼠)以 100μl 的各种浓度经鼻内滴入方式给药至雄性 balb/c 小鼠(6-8 周龄) (Yonemitsu, Y.等, Gene Ther. 4: 631-638, 20 1997)。

鼻灌注通过在鼻内插入一段 5mm 的导管，用蠕动泵(P-1 型, Pharmacia Biotech)以 5-6μl/分钟 的速度灌注每种载体溶液 150μl。基因转移的 2 天后，在充分麻醉的情况下静脉注射过量戊巴比妥而处死小鼠，收获鼻甲骨、气管和肺进行萤光素酶试验。

25 作为对照，将实施例 1 中所用 pSeV18b+也用于如上所述的相同基因转移过程。该质粒在以下实施例中作为对照。

萤光素酶试验如下述按照已知方法进行(Yonemitsu, Y.等, Gene Ther. 4: 631-638, 1997)。首先，用 PBS 洗涤组织，用剪刀在含有蛋白酶抑制剂混合物的 1x 裂解缓冲液中将组织剪碎，于 4℃以 13,000 rpm 离心 10 分钟，取 30μl 30 上清加至 100μl 萤光素酶试验缓冲液(Promega)中。用 Turner TD20e 发光仪 (Turner Co.)在 20℃进行 10 秒钟的预保温，然后紧接 10 秒钟的累计

(integration), 以此测定光密度。在这种情况下, 1 pg 重组萤光素酶(Promega) 相当于  $2.56 \times 10^1$  RLU。蛋白浓度通过 Bradford 方法用市售蛋白分析系统 (Bio-Rad Laboratories Ltd., Hertfordshire, UK) 根据对应于牛血清白蛋白标准曲线来测定。数据表示为 RLU/mg 蛋白, 每份样品测两次以上。

- 5 图 1 (肺) 和 2 (鼻) 显示 SeV-luc 和 GL-67-p-CMV-luc 之间基因转移效力的对比。如图 1 所示, SeV-luc 所转染的肺的萤光素酶活性以剂量依赖性方式高出 GL-67-pCMV-luc 转染的肺的酶活性 1000 倍。SeV 所致的萤光素酶基因表达比 GL-67-pCMV-luc 所致的表达高约 10,000 倍, 但在不同接触时间之间没有显著性差异。这些结果提示, SeV 仅通过与气道上皮接触就能有效地  
10 向小鼠肺部和鼻内转移基因。

#### 2-2. 仙台病毒载体与腺病毒载体的比较

将 SeV-luc 或含有萤光素酶基因的腺病毒载体 AdCMV-萤光素酶 (Ade-luc) (Kendall, J.M.等, Cell Calcium 19: 133-142, 1996) 按照与实施例 1 相同的方式滴入鼻内, 收获鼻甲骨、气管和肺进行萤光素酶试验。

- 15 制备分别携带 lacZ 基因以及猴病毒大 T 抗原的核定位信号的仙台病毒载体和腺病毒载体 (SeV-NLS-lacZ 和 AdCMV-nls-lacZ), 按照如 2-1 中所述的方式滴入鼻内。收获支气管、气管和鼻甲骨。将每种组织用经过冰冷却的 2 % 多聚甲醛和 0.25 % 戊二醛在 0.1M PBS 中的溶液固定 10 分钟, 然后在室温摇床上进行 X-gal 染色 (溶液: 5 mM 氰化亚铁钾, 5 mM 氰化亚铁, 2 mM 氯化镁, 1 mg/ml 5-溴-4-氯-3-吡啶- $\beta$ -D-半乳糖苷) 3 小时。将被 X-gal 染色的组织再固定, 石蜡包埋, 切出  $5\mu\text{m}$  切片进行光学显微镜镜检。结果见图 3, 4, 和 5。  
20

如图 3 所示, 被 SeV-luc 转染的细胞比被 Ade-luc 转染的细胞的基因表达高 5000 倍。

- 25 在两种载体接种中, X-gal 阳性细胞以相似频率分散在细支气管中 (图 4)。另一方面, 在被 SeV-NLS-lacZ 处理的动物中, X-gal 阳性细胞很常见, 但在被 AdCMV-nls-lacZ 处理的小鼠的气管或鼻内, 蓝细胞很少见。如图 5 所示, 蓝染不仅可见于纤毛柱状细胞, 还可见于无纤毛的分泌细胞 (NC)。相比之下, 在基细胞 (BC) 中, 未检测到蓝色信号。

- 30 这些结果揭示, 仙台病毒能将基因转移至气道上皮细胞, 但腺病毒载体不能。

### 实施例 3

#### 向雪貂肺部转移基因

将雪貂(500-600 g 体重)麻醉,以  $3 \times 10^8$  或  $3 \times 10^9$  pfu/ml (每组 n=3)如实施例 2 所述鼻内滴入 3 ml 纯化 SeV-LacZ 的 BSS 溶液。对照(n=2)接受 3 ml  
5 SeV-Luc ( $10^9$  pfu/ml)。感染的 48 小时后,处死雪貂,在气管中原位插入导管,将肺中充满冰冷冷却的固定液(2%福尔马林,0.2%戊二醛,2 mM MgCl<sub>2</sub>,5 mM EGTA 的 PBS 溶液,pH 7.3)。将气管和肺整体切出,如实施例 2 所述进行 X-Gal 染色。将每个肺切成 7 部分:气管、4 个右肺叶(上部(R1)、中部(R2, R3)、下部(R4))和 2 个左肺叶(上部(L1)和下部(L2)),用带格子的镜头进行显微镜  
10 镜检,计数气道上皮和粘膜下腺体中的  $\beta$ -gal 阳性细胞。每个气道评估 10 个放大 20x 的视野以获得 % 蓝细胞/气道,随机从每个肺叶的不同区域取 3-8 气道(近端、中部和远端)进行评估。对于粘膜下腺体,评估 10-28 个视野(含有至少 4 个腺体)/肺叶。重复测量的误差(ERM)表示为方差的系数(CV),这里为 18%。接受了  $10^8$  pfu/ml 的动物之间,CV 为 24-43%,接受了  $10^9$  pfu/ml  
15 的动物之间为 8-14%。

气道上皮(图 6A,图 7a 和 b)和粘膜下腺体(图 6B 和图 7c)显示出剂量依赖形式的  $\beta$ -半乳糖苷酶活性。粘膜下腺体是主要的 CFTR 表达部位。对照中未发现活性(图 7d)。

### 实施例 4

#### 向人类健康供体的鼻上皮细胞转移基因

通过洗刷从人类健康供体(6 例男性和 3 例女性)收集鼻上皮细胞。用磷酸盐缓冲液 (PBS: 137 mM NaCl, 3 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH7.2)洗 2 次后,将细胞重新悬浮在含有 10% 胎牛血清的培养基(Dulbecco 改良的 Eagle 培养基; DMEM),将它们分为 2 或 3 组,分别置于 96 孔培养  
25 板上。通过用相差显微镜观察纤毛摆动以及对台盼蓝阳性细胞计数来证实鼻细胞的活力。将载体溶液(SeV-luc 和 GL-67-pCMV-luc)添加至每个孔。24 小时后收获细胞,用 PBS 洗 3 次,如实施例 2 所述进行萤光素酶试验。结果见图 8。

经证实,被 SeV-luc 转染的细胞中的萤光素酶活性比被 GL-67-pCMV-luc  
30 转染的细胞中的高 1000 倍。

### 实施例 5

### SeV/CFTR的构建和电子生理学鉴定

构建能表达 CFTR(CF 的致病基因)的重组仙台病毒载体。将 CFTR 基因(Riordan, J.R.等, Science 245: 1066-1073, 1989)用含有 E 和 S 信号序列的引物对经 PCR 扩增。所用引物对如下:

5 正向引物: 5'-acttgcggccgcaaaagtcaatgcagaggtcgcctctggaaaaggccagc-3'  
(SEQ ID NO: 4)

反向引物: 5'-atccgcgccgcgatgaactttcacccctaagtttttcttactacggctaaagccttgatcttgcacctttcttc-3' (SEQ ID NO: 5).

10 将所扩增的片段插入 pSeV18<sup>b(+)</sup>的 NotI 位点, 如实施例 1 所述重建该病毒。

将 COS7 细胞用所制备的表达 CFTR 的仙台病毒(样品-1 SeV/CFTR)感染, 通过全细胞钳位电路(patch clamp)技术进行分析。图 13 显示全细胞钳位电路技术概要。将一个含有移液管溶液的玻璃移液管与浸泡液中的细胞接触, 利用负压除去细胞膜。在这种情况下, 移液管溶液含有 145 mM NMDG<sup>+</sup>,  
15 148.4 mM Cl<sup>-</sup>, 6.7 mM Mg<sup>2+</sup>, 5 mM ATP, 10 mM 葡萄糖, 0.1 mM EGTA, 和 10 mM HEPES (用 Tris 滴定, pH 7.4), 浸泡液包含 141 mM Na<sup>+</sup>, 152.4 mM Cl<sup>-</sup>, 152.4 mM H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>, 5 mM K<sup>+</sup>, 1.7 mM Mg<sup>2+</sup>, 2 mM Ca<sup>2+</sup>, 10 mM 葡萄糖, 0.1 mM EGTA, 和 10 mM HEPES (用 Tris 滴定, pH 7.4)。通过全细胞记录检查毛喉素(forskolin)对表达样品-1 SeV/CFTR 的细胞中膜电流的影响(图 14)。结果观  
20 察到毛喉素浓度依赖性内向电流(influx current)(轨道下降), 它受到优降糖(glibenclamide, 一种氯离子通道阻断剂)的抑制(向上位移)。内向电流可通过在一次洗涤后再添加毛喉素而恢复, 并再次受到优降糖的抑制, 这表明所观察到的电流变化是一种特异性的药物诱导型应答。

接着检查每种药物诱导型反应对时间的依赖性(图 15)。毛喉素在表达样  
25 品-1 SeV/CFTR 的 COS7 细胞中诱导了一种 Cl<sup>-</sup> 流, 可观察到氯离子通道的一种时间依赖性反应特性。优降糖(300 μM)可抑制毛喉素诱导的 Cl<sup>-</sup> 流。

图 16 显示, 在能表达样品-1 SeV/CFTR 的 COS7 细胞中, 存在或不存在毛喉素时, 根据上述数据得出的电流-电压相关性。如果不出现 Cl<sup>-</sup> 流, 直线将在起始点处交叉。在所得图中, 直线在 10 - 20 mV 之间交叉。这表明 Cl<sup>-</sup> 流不是由 CFTR 诱导(毛喉素依赖型), 而是在这些 COS7 细胞中流动。图 17 显示在  
30 有或无毛喉素时所得膜电流的差异(净膜电流), 它通过应用毛喉素期间所

## 向绵羊气管上皮转移基因

### 5-1. 粘液对基因转移的影响

用绵羊气管条模型检查粘液对每种载体的基因转移效力的影响,所述模型用已知方法制备(Kitson, C.等, Gene Ther. 6: 534-546, 1999)。处死动物后,将已经切出的绵羊气管的上皮层切至肌肉和动脉外膜,并切成 0.5 cm<sup>2</sup> 的方形小片,然后在相差显微镜下证实纤毛的摆动。在部分组织中,然后用已知方法耗尽(depletion)粘液(Kitson, C.等, Gene Ther. 6: 534-546, 1999)。将这些组织置于气-液界面上。在其顶部表面添加 10 $\mu$ l SeV-luc 或 GL-67-luc 载体溶液以便发生转染。48 小时后,如实施例 2 所述对这些小片进行萤光素酶试验。结果见图 9。

如图 9 所示,相对于 GL-67-luc-介导的基因转移而言,粘液并未显著影响 SeV-介导的基因转移。

### 5-2. 粘液粘性对基因转移的影响

重复 5-1 的过程,不同的是在即将进行基因转移之前应用各种浓度的牛唾液腺粘蛋白。结果见图 10。

如图 10 所示, GL-67-luc 的基因转移因添加粘蛋白而受到抑制。添加了粘蛋白的样品与新鲜样品相比,萤光素酶活性没有显著不同,说明粘蛋白对阳离子脂质介导的基因转移有阻碍活性,但粘液粘性对基因转移没有这种作用。另一方面,血浆粘蛋白成分不影响 SeV 的感染效力,但粘液粘性对 SeV 介导的基因转染有中度影响。

### 5-3. 位点特异性转染效力

将绵羊气管上皮用 SeV-luc 或 AdCMV-luc 如 5-1 所述进行转染。在基因转移之后,切出该组织的边缘,分别测定边缘部分和中部的萤光素酶活性。结果见图 11。用 SeV-GFP 和携有受 CMV-IE 启动子驱动的 GFP 的高滴度腺病毒第 5 血清型 AdCMV-GFP (Kramel Biotech International Ltd.)取代 SeV-luc 和 AdCMV-luc 进行如上所述的相同基因转移过程。基因转移的 2 天后,在荧光相差显微镜下观察绿色荧光蛋白(GFP)的信号。结果见图 12。

如图 11 和 12 所示, AdCMV-luc 在绵羊气管组织的受损边缘区显示较高的表达,而在未受损部位的表达相对很少。相反,被 SeV-luc-处理的组织在边缘区和中部的基因表达未显示出显著差异。

## 实施例6

记录的电流中减去应用毛喉素之前所记录的电流而获得。

### 工业实用性

本发明提供了一种用于将外源基因导入气道上皮中的重组仙台病毒载体，以及将外源基因导入该载体的方法，其中将外源基因导入气道上皮中不能通过传统载体实现。本发明的重组仙台病毒载体能通过与天然被粘液覆盖的气道上皮细胞短暂接触而将基因有效转移至该细胞中。本发明的载体可感染来自比小鼠更大的动物的气道上皮细胞，这说明本发明的载体能在需要向气道上皮细胞转移基因时进行有效基因治疗。此外，本发明的载体不仅可以

5 将基因导入顶部表面，还可导入主要表达 CFTR 的粘膜下腺体中，这说明它

10 可用于 CF，一种 CFTR 缺陷型疾病的基因治疗。

<110> 株式会社载体研究所(DNAVEC Research Inc.)

<120> 用于将外源基因导入气道上皮的重组仙台病毒载体

<130> D3-105PCT

<140>

<141>

<150> US 60/163,055

<151> 1999-11-02

<150> JP 1999-359218

<151> 1999-12-17

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的序列

<400> 1

ctttcaccct

10

<210> 2

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 人工合成的序列

<400> 2

tttttcttac tacgg

15

<210> 3

<211> 18  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 人工合成的序列

<400> 3  
 cggccgcaga tcttcacg 18

<210> 4  
 <211> 51  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 人工合成的序列

<400> 4  
 acttgccgcc gccaaagttc aatgcagagg tcgcctctgg aaaaggccag c 51

<210> 5  
 <211> 76  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 人工序列的描述: 人工合成的序列

<400> 5  
 atccgccgcc gcgatgaact ttcaccctaa gtttttctta ctacggctaa agccttgtat 60  
 cttgcacctc ttcttc 76

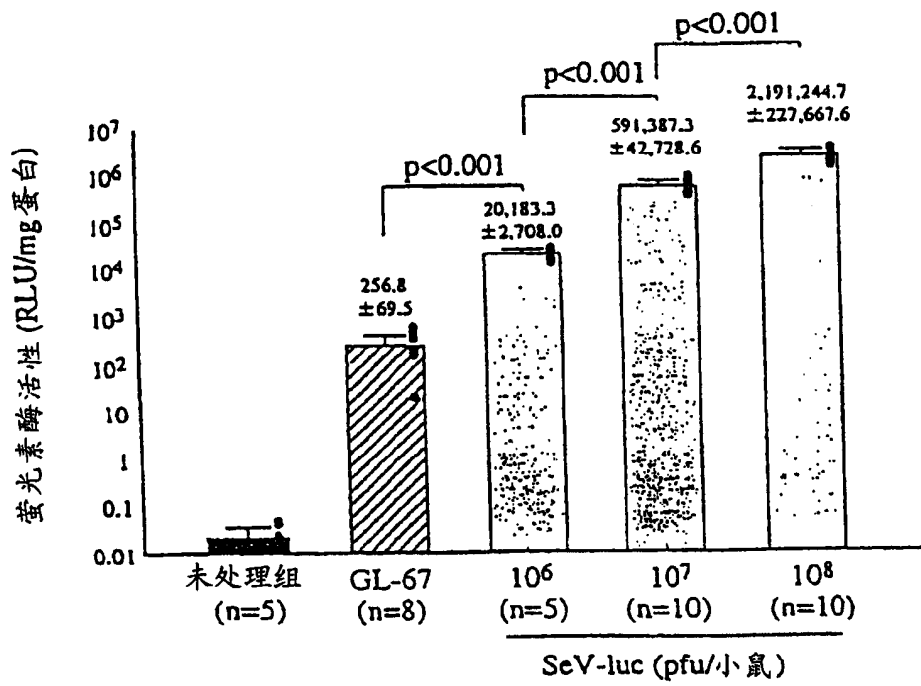


图 1

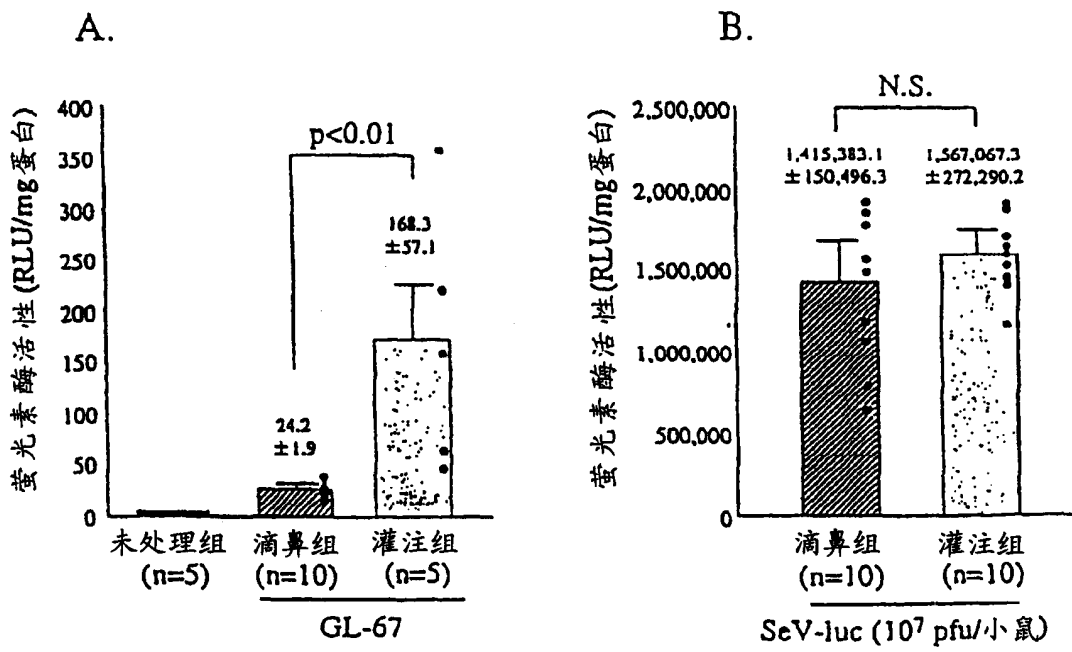


图 2

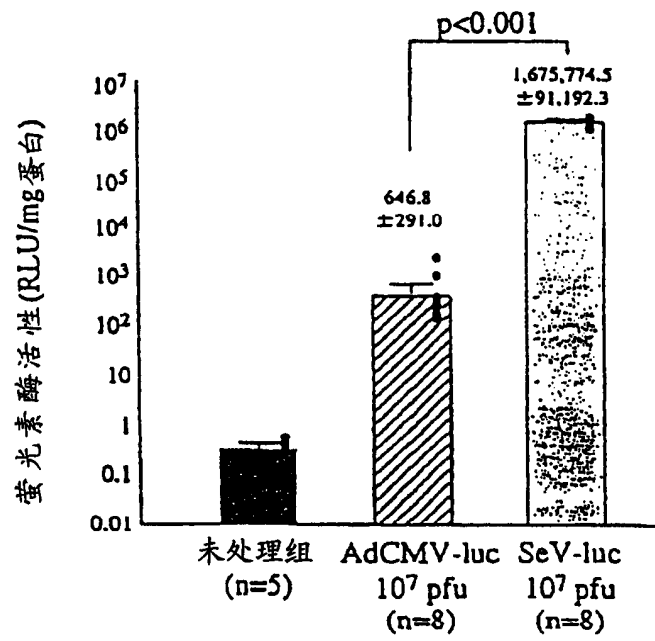


图 3

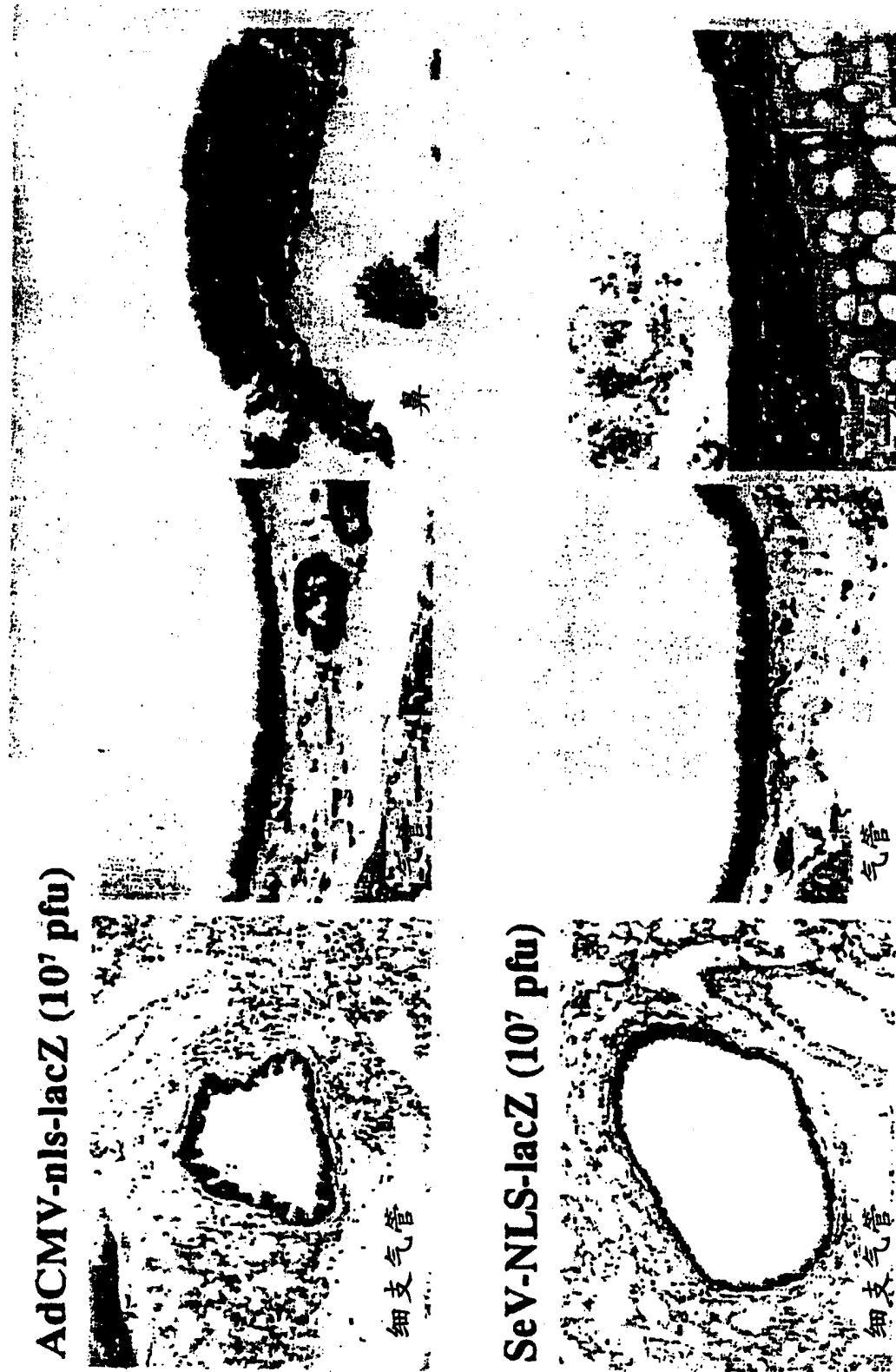


图 4

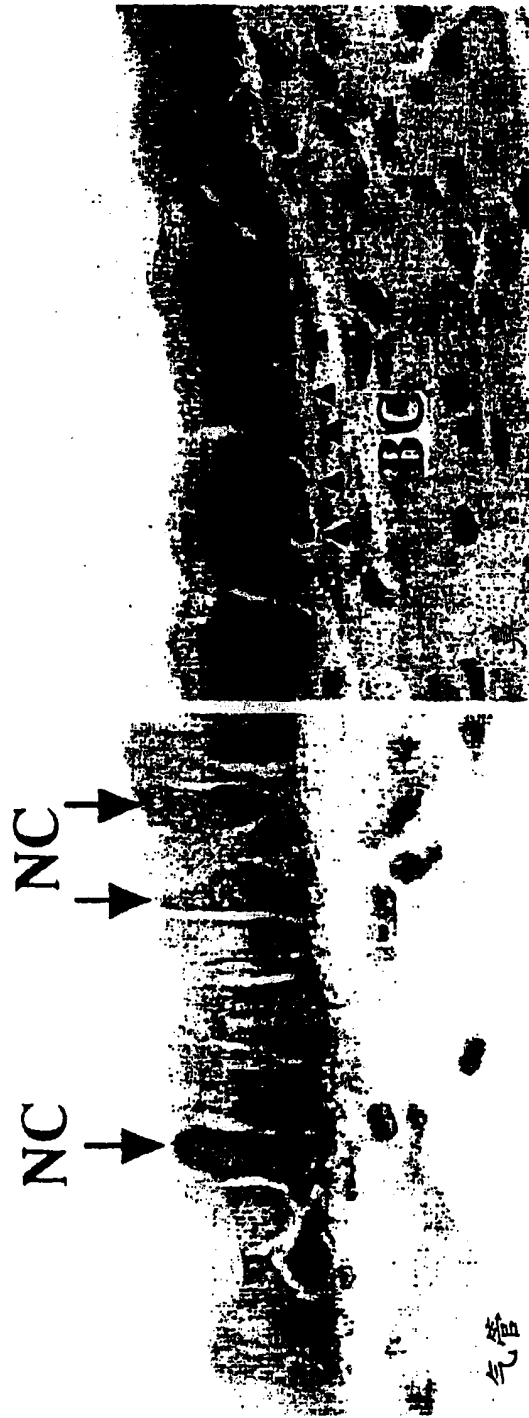


图 5

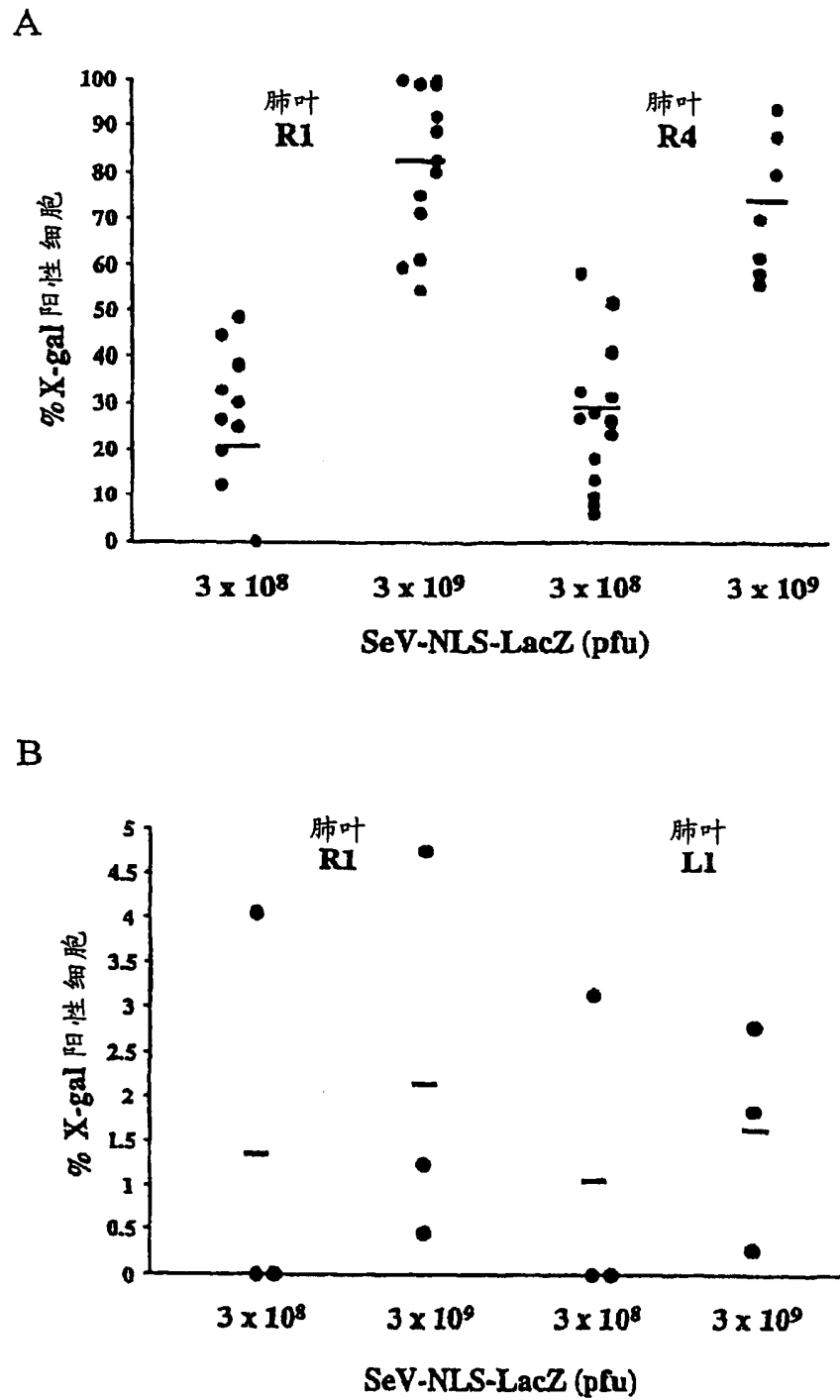


图 6

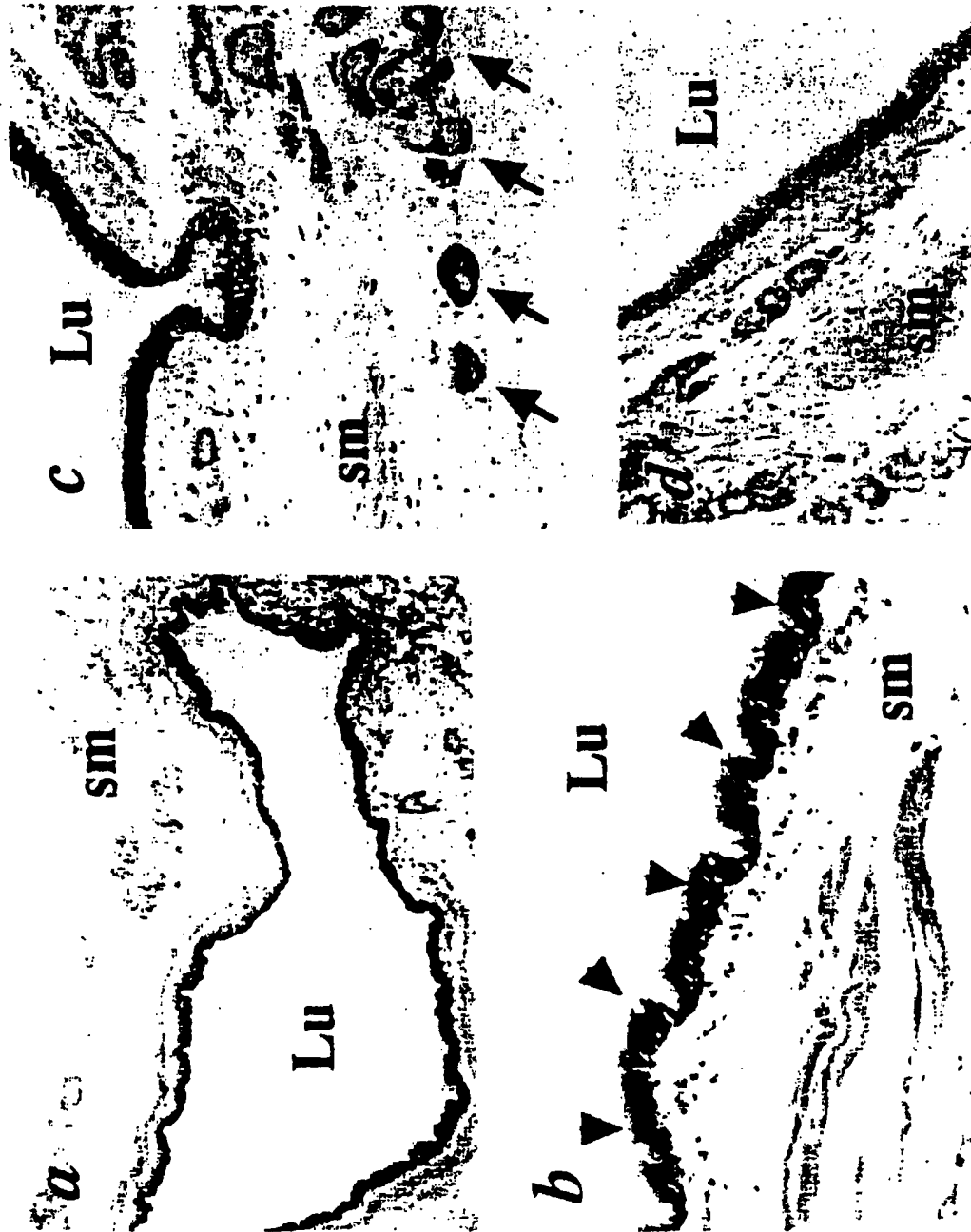


图 7

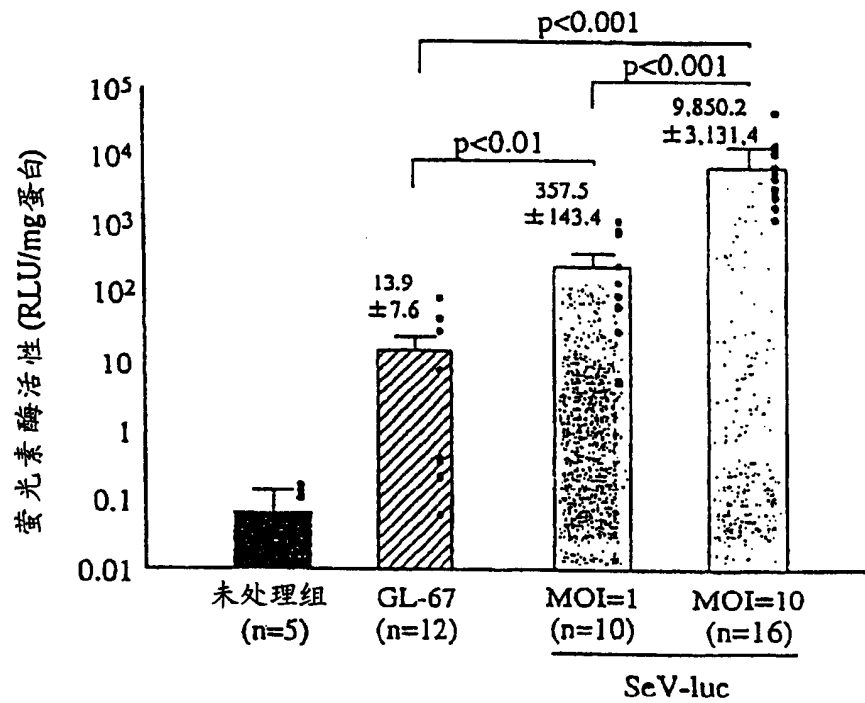


图 8

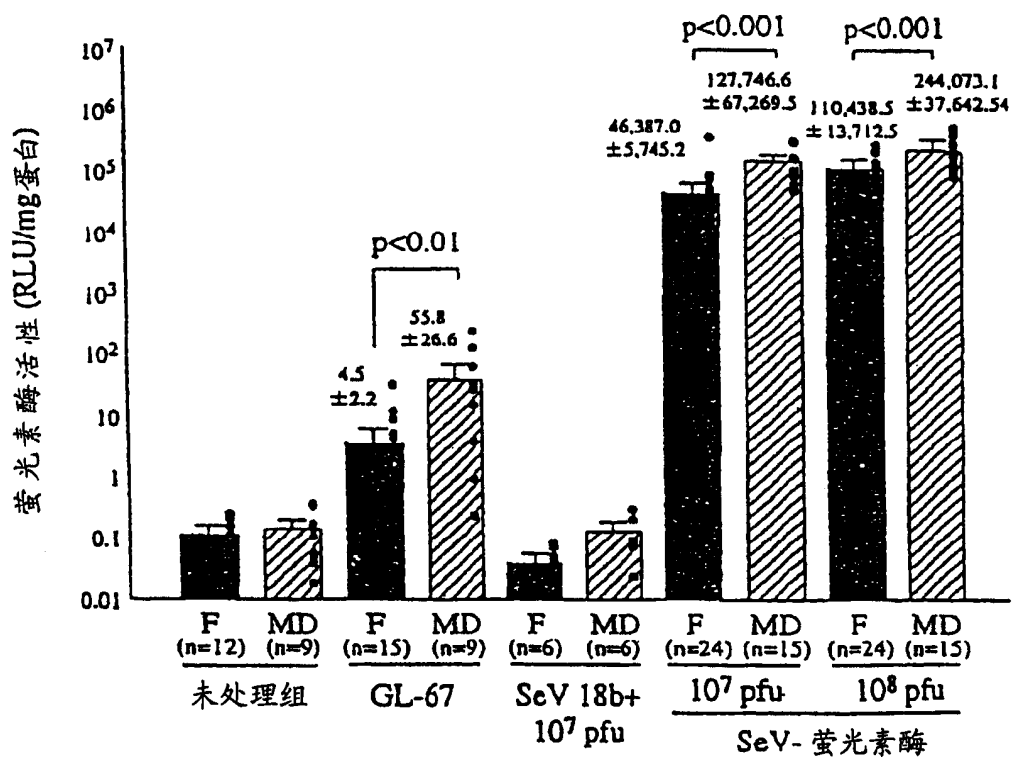


图 9

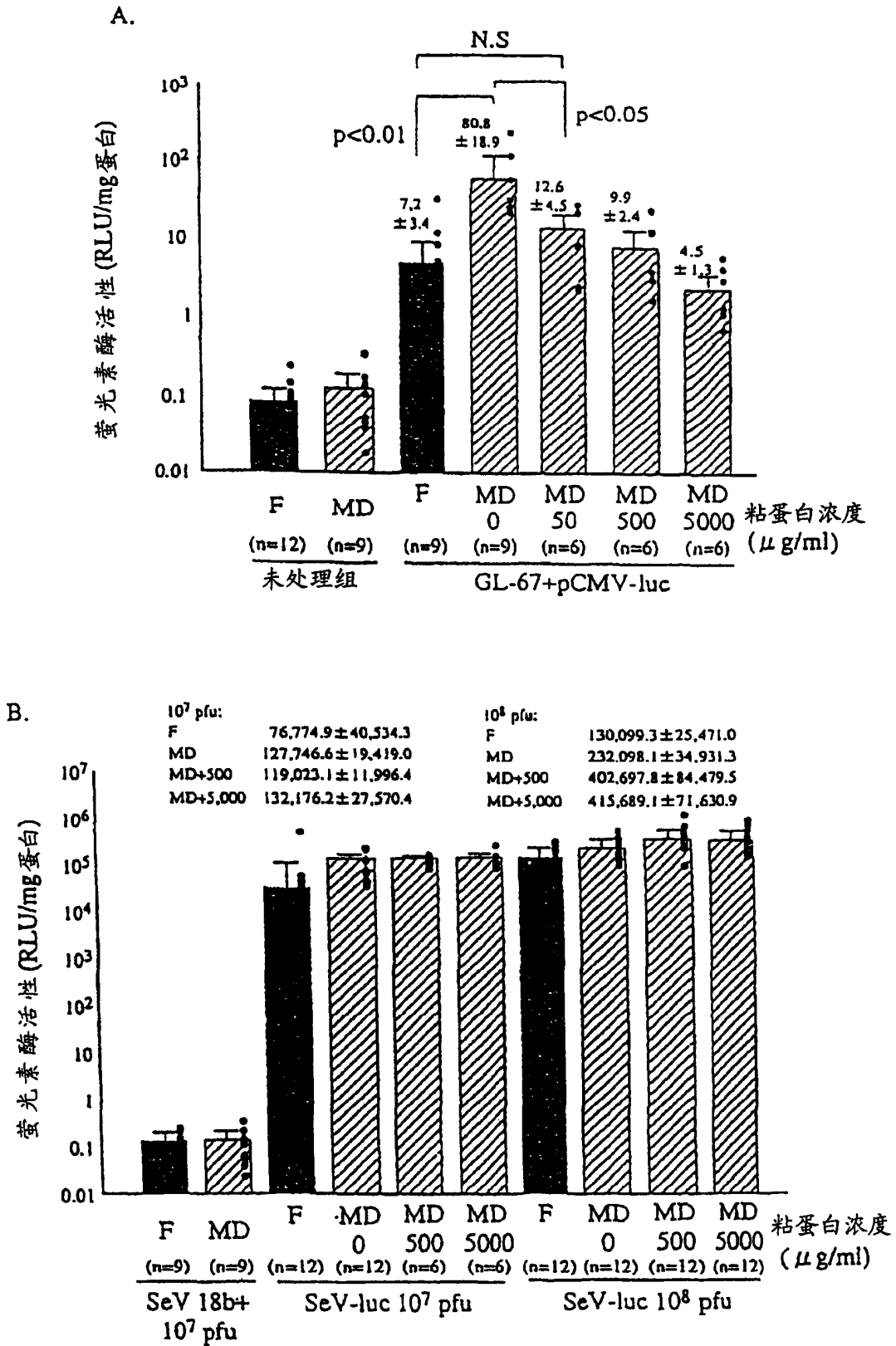


图 10

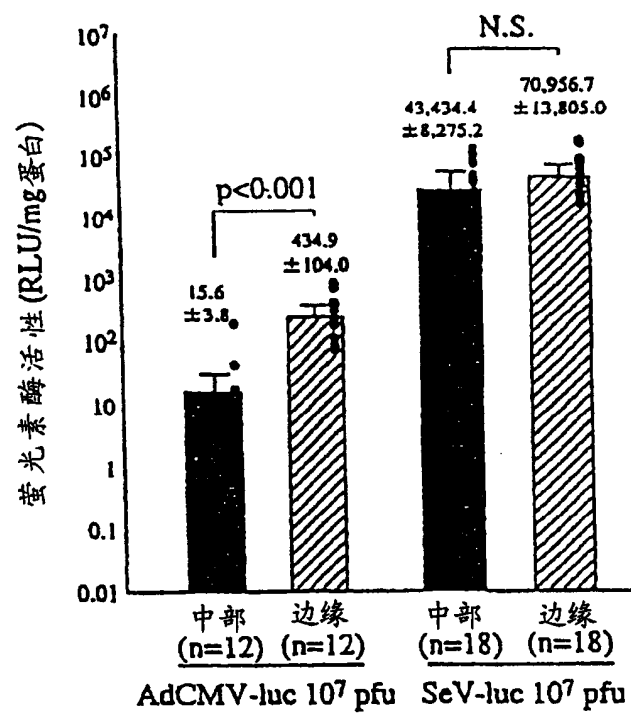


图 11

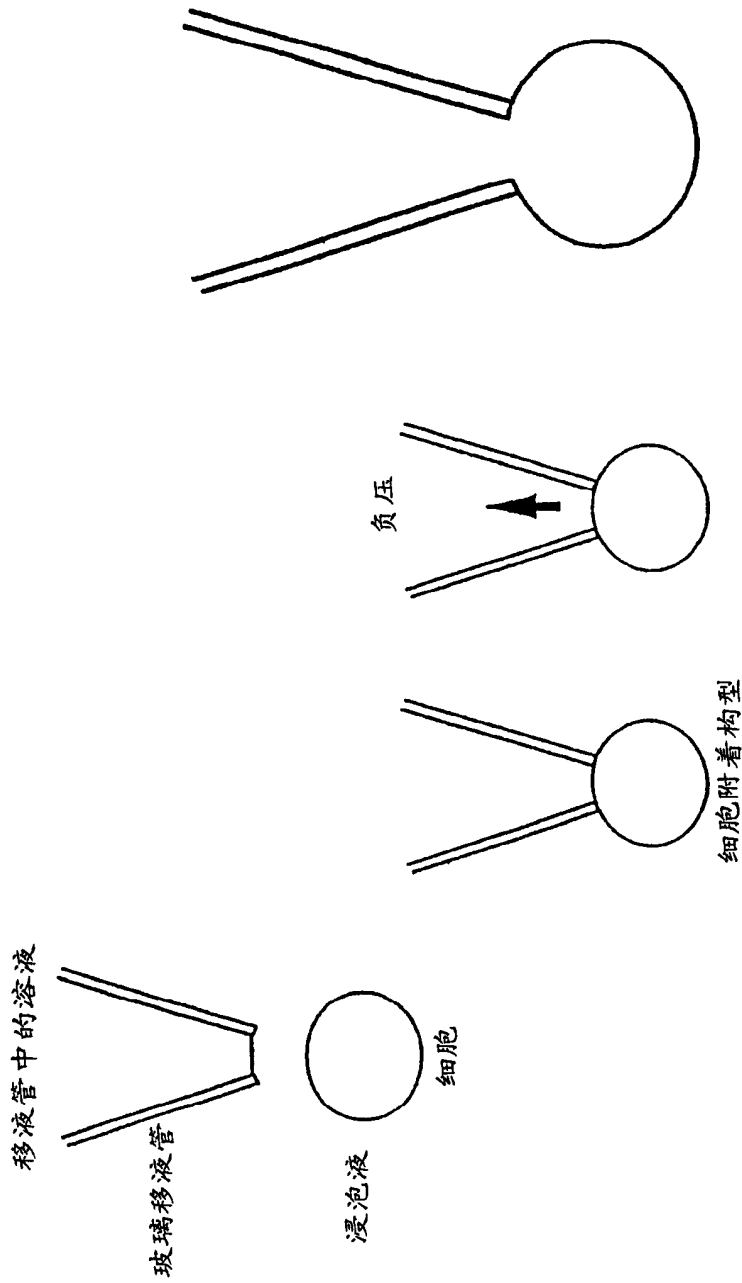


图 13

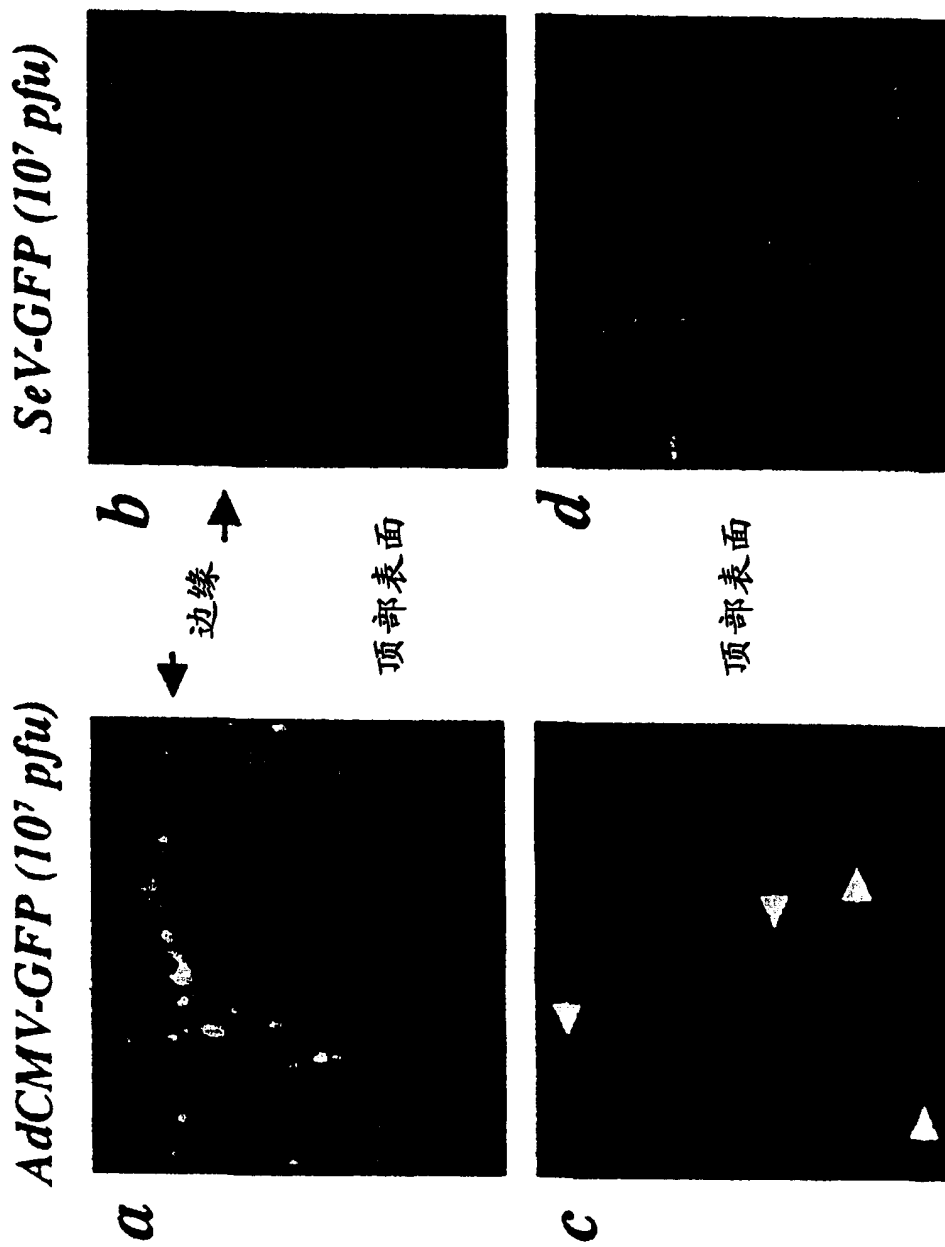


图 12

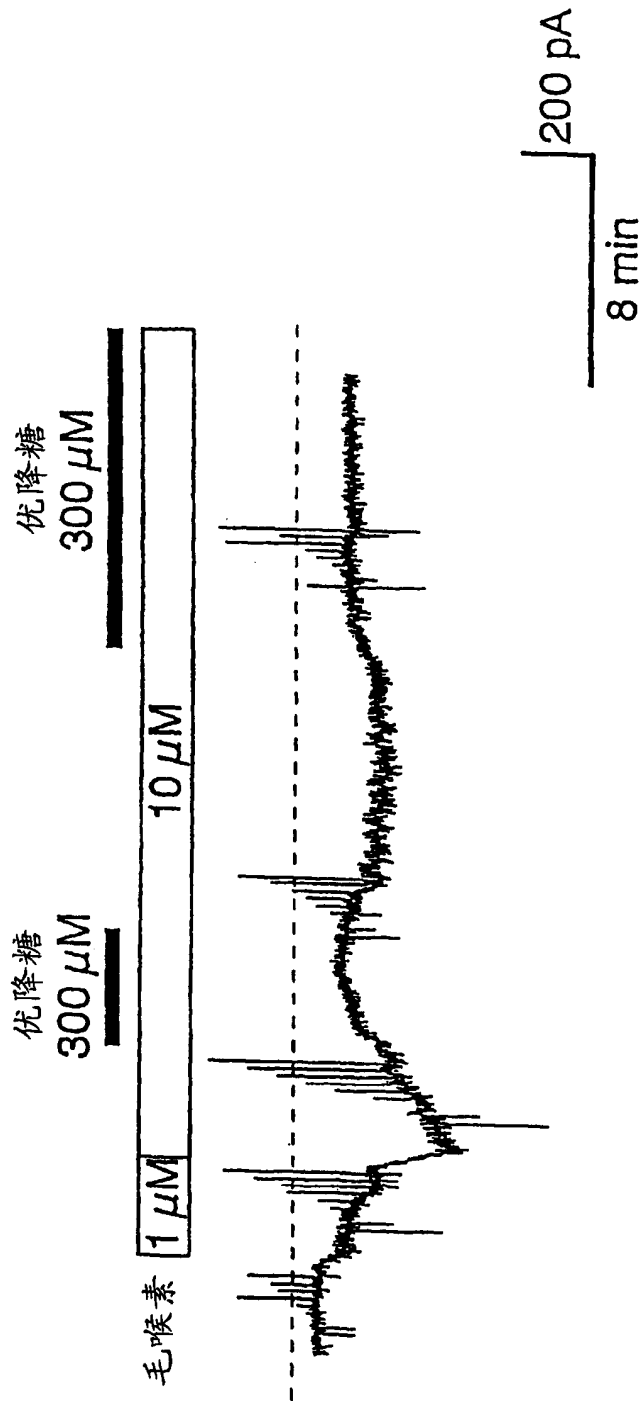


图 14

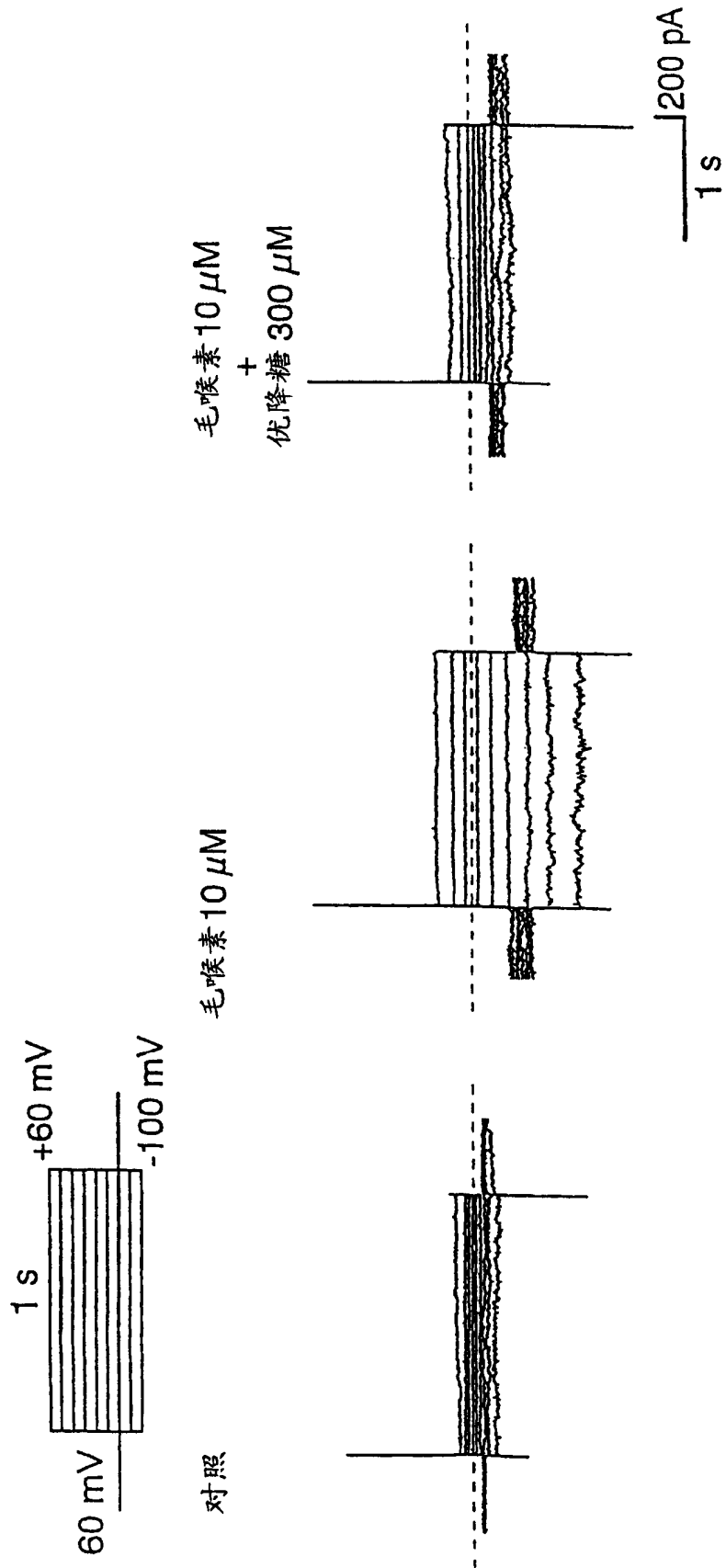


图 15

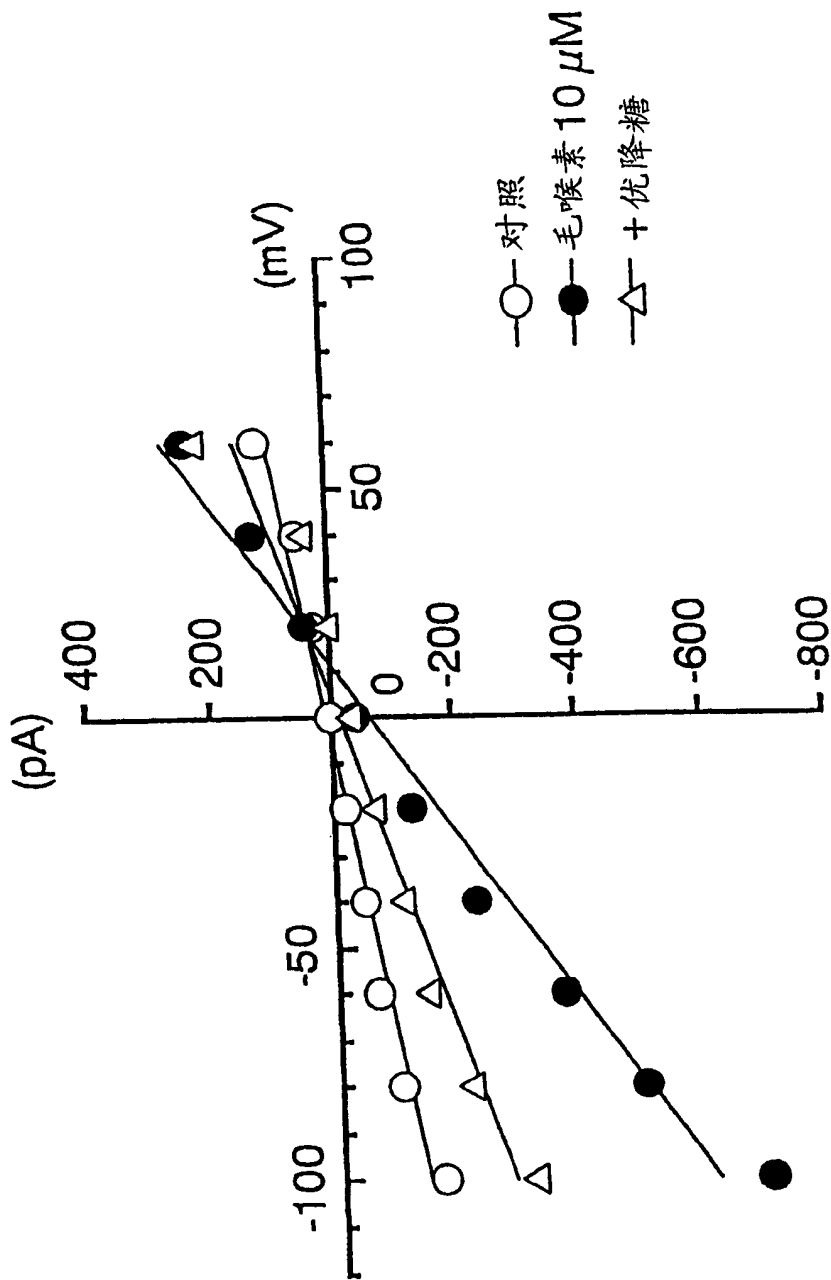


图 16

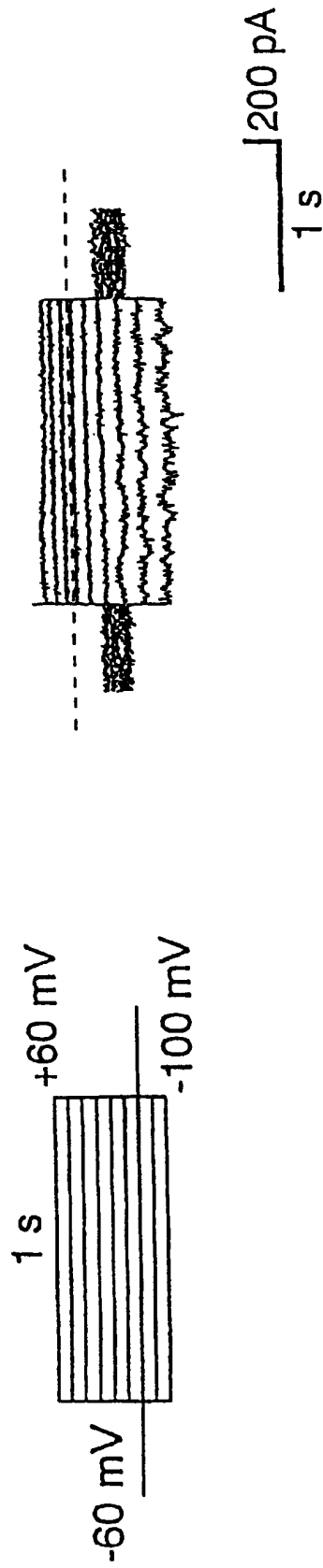


图 17