[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12N 15/86
C12N 15/63 C12N 5/10
A61K 48/00

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 98811427.5

[43]公开日 2001年7月11日

[11]公开号 CN 1303442A

[22]申请日 1998.9.23 [21]申请号 98811427.5
[30]优先权
[32]1997.9.23 [33]GB [31]9720216.2
[32]1997.9.25 [33]GB [31]9720465.5
[86]国际申请 PCT/GB98/02885 1998.9.23
[87]国际公布 WO99/15684 英 1999.4.1
[85]进入国家阶段日期 2000.5.22
[71]申请人 牛津生物医学(英国)有限公司
地址 英国牛津
[72]发明人 C·路易斯 K·M·宾莱 C·贝冰顿
S·奈洛

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 谭明胜

权利要求书2页 说明书195页 附图页数43页

[54]发明名称 方法

[57]摘要

描述了修饰的造血干细胞(MHSC)。所述MHSC包含至少一种可表达目 的核苷酸序列(NOI),其中所述NOI或每种NOI可操作地连接于一种 或多种局部缺血样效应元件(ILRE)。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 修饰的造血干细胞(MHSC)，包含至少一种可表达目的核苷酸序列(NOI)，其中所述 NOI 或每种 NOI 可操作地连接于一种或多种局部缺血样效应元件(ILRE)。

2. 结合一种或多种药物的权利要求 1 的 MHSC，所述药物能够使所述 MHSC 分化。

3. 药用组合物，包含可任选地与药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体混合的权利要求 1 或权利要求 2 的 MHSC。

4. 用于医药的根据权利要求 1 或权利要求 2 的 MHSC。

5. 在局部缺血环境中表达一种或多种 NOI 的方法，包括在所述局部缺血环境中在根据权利要求 1 或权利要求 2 的 MHSC 中表达一种或多种 NOI。

6. 根据权利要求 1 或权利要求 2 的 MHSC 的用途，用于生产治疗与局部缺血相关或由其引起的疾病的药物。

7. 治疗需要治疗的个体的方法，包括给予根据权利要求 1 或权利要求 2 的 MHSC 或根据权利要求 3 的药用组合物，并允许所述一种或多种 NOI 的一种或多种表达。

8. 基于或得自任何一种或多种以下实体的载体或质粒：pE1sp1A、pCI-Neo、pE1RevE、pE1HORSE3.1、pE1PEGASUS4、pCI-Rab、pE1Rab。

9. 修饰的 HSC (MHSC)，它包含在巨噬细胞中可操作的效应元件。

10. 修饰的细胞，包含在所述细胞中有活性的效应元件；和一种 NOI；其中通过用一种或多种病毒载体经病毒转导而转化细胞，制备所述修饰的细胞，其中至少一种所述病毒载体包含所述 NOI 和/或所述效应元件。

11. 用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统包含一种

或多种编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一病毒载体能够感染第一靶细胞，并表达其中的所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞，其中所述第一病毒载体和/或所述第二病毒载体包含本发明的 ILRE。

12. 根据权利要求 11 的杂种病毒载体系统，其中所述第一载体得自或基于腺病毒载体和/或所述第二病毒载体得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体。

13. 腺病毒载体的用途，即将 ILRE 调节的基因传递至任何细胞类型，以用于任何疾病。

14. 反转录病毒载体的用途，即将 ILRE 调节的基因传递至任何细胞类型，以用于任何疾病。

15. 腺病毒载体和慢病毒载体组合的用途，将 ILRE 调节的基因传递至任何细胞类型，以用于治疗疾病。

16. 修饰的分化细胞(最好是终末分化细胞)，包含至少一种可表达目的核苷酸序列(NOI)，其中所述 NOI 或每种 NOI 可操作地连接于一种或多种在所述分化细胞中有活性的效应元件。

17. 一种或多种腺病毒载体构成物，它们在正常组织中显示低基础活性，但在局部缺血条件下被强诱导。

18. 一种或多种慢病毒载体构成物，它们在正常组织中显示低基础活性，但在局部缺血条件下被强诱导。

19. 一种或多种腺病毒构成物和慢病毒载体构成物的组合，它们在正常组织中显示低基础活性，但在局部缺血条件下被强诱导。

20. 一种或多种本文定义的新型载体或构成物或启动子或调节元件。

说　明　书

方法

本发明涉及一种方法。特别是，本发明涉及将目的核苷酸序列(NOI)传递至造血干细胞(HSC)的方法。

本发明也涉及应用载体将目的核苷酸序列(NOI)传递至造血干细胞(HSC)。

基因转移涉及将由一种或多种 NOI 和控制其表达的序列构成的表达盒传递至诸如 HSC 的靶细胞。这可以用一种方法在活体外进行，在该方法中，在实验室中将所述盒转移至细胞，然后将修饰的细胞给予接受者。或者，可以用一种方法体内进行基因转移，在所述方法中将所述表达盒直接转移至个体内的细胞。在两种策略中，转移方法通常由载体辅助，所述载体帮助将所述盒传递至合适的细胞内位点。

可以用启动子和增强子元件调节治疗基因在靶位点的表达。启动子和增强子包括与参与转录的细胞蛋白特异性相互作用的多段短的 DNA 序列(Maniatis 等 1987 Science 236:1237)。已经从包括酵母、昆虫、哺乳动物细胞和病毒中的基因的多种真核来源中分离出启动子和增强子元件。特定启动子和增强子的选择取决于使用何种细胞类型表达目的蛋白/基因。

启动子可以在多种组织类型和几种不同的生物物种中起作用，或其功能可能局限于特定物种和/或特定组织。启动子/增强子可以具有广泛的宿主范围(诸如 SV40 、人 CMV)，或它可以在有限的细胞类型亚群中起作用。此外，启动子可以具有组成型活性，或在某些条件下(例如低氧或存在增强子元件)，或在该生物的某些发育阶段(例如在胎儿中有活性，而在成体中沉默)，它可以被某些物质(例如组织特异性因子)选择性地激活。骨髓一直是传统的用于转导的 HSC 源，新近的研究已经表明，外周血干细胞或脐带血细胞可能是同样好的或更好的靶

细胞(Cassel 等 1993 Exp Hematol 21:585-591; Bregni 等 1992 Blood 80:1418-1422; Lu 等 1993 J Exp Med 178:2089-2096)。

最近，从通过从胎牛成纤维细胞进行核转移克隆的胚胎中，已经提取出有效的(potent)干细胞(First 和 Thompson 1998 Nature Biotechnology 16:620; Cohen 1998 New Scientist 7 月 11 日 4-5)。当可得到人胚胎干细胞系时，它们能够提供不受限制的体外衍生分化细胞源，以通过基因治疗和/或移植治疗特定的疾病。

也已经研究了通过正选择诸如 $CD34^+$的抗原或负选择谱系特异性抗原而预转导富集 HSC。尽管它似乎不大影响转导效率，但它的确提供更实际得多的体积用于体外操作和转导(Hughes 等 1992，见上文; Berenson 等 1988 J Clin Invest 81:951-955)。

已经表明，向 HSC 的低效率转移可以是由于缺乏细胞循环和整合，但也可以是由于病毒受体密度不足。

为了试图解决这一问题，已经采用了各种策略，以将病毒载体导向特定的位点。这些策略包括：(i) 修饰反转录病毒载体上的包膜蛋白；(ii) 采用启动子/增强子以将表达限于特定位点；和(iii) 提供具有对靶细胞上受体特异性的配体的载体。

作为实例，已经工程改造了能够通过配体-受体相互作用导向表达 c-Kit 受体的人细胞的重组反转录病毒载体(Yajima 等 1998 Hum Gen Ther 10:779-787)。通过插入编码鼠类干细胞因子(mSCF) N-末端 161 个氨基酸的序列，修饰嗜亲性(莫洛尼鼠类白血病病毒)包膜蛋白。已经表明，可以证明该载体在导向其表面表达 c-Kit 的细胞方面是有用的。

作为另一实例，其它研究者(Fielding 等 1998 Blood 91:1802-1809)已经表明，鉴于 HSC 可以用呈现表皮生长因子(EGF)作为其包膜部分的反转录病毒载体选择性地转导，可以用呈现干细胞因子(SFC)作为嵌合包膜糖蛋白部分的反转录病毒，在体外转导癌细胞。

另外，也可以用带有水泡性口炎病毒 G (VSV-G)的病毒载体转导 HSC。根据 WO9609400，与 $CD34^+$成体骨髓细胞相比，以及与常规

兼嗜性载体的转导效率相比，$CD34^+$ Thy-1+活动化血细胞以惊人的高效率被 VSV-G 假型化反转录病毒载体转导。

对于因其基因组成而发生癌的风险增加(Cornelisse 等 1996 Pathol Res Pract. 192:684-694)的个体，在群体中检测出这类个体的能力的提高，意味着需要在尤其具有风险个体中提供预防，以防止患有这些疾病。这同样适用于群体中的这类个体，他们已经基因预处理，以防止患上冠心病或类风湿性关节炎，或他们已经暴露于引起脑型疟的疟原虫寄生物，意味着需要在尤其具有风险的个体中提供预防，以防止患上这些疾病。

特别是，增加对癌症分子遗传学的了解，已经导致开发了各种新的癌症治疗策略。目前正在进行临床试验测试的基于基因的治疗，主要涉及体外或体内应用病毒载体或脂质体载体将基因传递至肿瘤，用于：(i) 肿瘤抑制基因的取代或癌基因的失活，(ii) 表达已知激活或增强抗肿瘤免疫机制的细胞因子/疫苗，(iii) 增强药物敏感性(例如前体药物的传递或激活)(iv)药物抗性，用于保护骨髓抵抗高剂量的化疗，和(v)肿瘤血管发生抑制剂(Roth 和 Cristiano 1997 J Natl Cancer Inst 89:21; Jaggar 和 Bicknell R 1997 载于：'Tumour Angiogenesis' 编辑 Bicknell, Lewis 和 Ferarra 第 357-372 页. Oxford University Press, Oxford. UK)。

直到最近，将这类治疗基因的表达特异性地导向实体瘤已经产生以下问题。在某些情况下，通过将配体/抗体插入病毒壳体中，已经将带有治疗基因的重组病毒载体导向特定的细胞类型。该方法要求恶性细胞表达肿瘤抗原以及组织特异性抗原。因此，任何治疗均限于用于特定类别的患者和显示所选定肿瘤抗原表达的肿瘤类型。或者，将裸 DNA 或病毒加入的 DNA 直接注射入肿瘤中(或至少注射到供给肿瘤的局部血液中)，以使肿瘤部位的传递和表达的特异性最大化。尽管该方法对于浅表肿瘤(例如乳腺损害和黑素瘤损害)获得了有限的成功，但它依赖于肿瘤的精确定位，并且不保证整个肿瘤块摄入 DNA 或治疗继发性局部或远的转移沉积物(Roth 和 Cristiano 1997 J Natl Cancer Inst

89:21)。

最近，已经开发了将治疗基因表达导向肿瘤的一个替代方法(Dachs 等 1997 Nature Med 5: 515)。该方法利用存在于几乎所有实体瘤中异常生理学，与其起源或位置无关，并且使用肿瘤特异性的严重局部缺血的病症及其对某些基因的特定增强子区的效应，以控制异源基因的表达(Dachs 等 1997 出处同上；英国专利申请第 9701975.6 号)。

侵袭性肿瘤一般血液供应不足，部分是因为肿瘤细胞生长比构成血管的内皮细胞生长快，以及部分因为新形成的血管供应被打乱(Vaupel 1993 载于'Drug Resistance in Oncology'. 第 53-85 页.编辑 Teicher BA. Marel Dekker, New York)。这产生局部缺血和营养缺乏的区域，包括氧张力降低(低氧)和低葡萄糖的区域。对肿瘤的氧电极测量结果已经显示显著部分的读数低于 2.5 mmHg (正常组织的范围为 24-66 mmHg)(Kallinowski 1996 The Cancer J. 9: 37)。此外，低氧细胞对放疗和化疗的敏感性明显较低，这是肿瘤低氧水平的增加与许多形式癌存活降低相关的部分原因(Kallinowski 1996, 出处同上)。

因此，局部缺血是实体瘤的一般特征，与其细胞起源或患者群体无关。最近已经表明，利用肿瘤低氧获得基因在肿瘤中选择性表达是可能的(Dachs 1997 同上文)。低氧是在范围广泛的不同细胞类型中的基因表达的强力调节剂(Wang 和 Sememnza 1993 Proc Natl Acad Sci USA 90:4304)，并且通过诱导低氧诱导型转录因子诸如低氧诱导型因子-1 (HIF-1)的活性而起作用(Wang 和 Sememnza 1993 出处同上)，所述低氧诱导型转录因子结合至同源 DNA 识别位点，这是不同基因启动子上的低氧效应元件(HRE)。 Dachs 等(1997 出处同上)使用来自小鼠磷酸甘油激酶-1 (PGK-1)基因的多体形式的 HRE (Firth 等 1994 Proc Natl Acad Sci USA 91:6494)，以在体外和在体内的实体瘤中控制人纤维肉瘤细胞对低氧应答的标记和治疗基因两者的表达(Dachs 等 1997 出处同上)。或者，由于在肿瘤的局部缺血区中也存在显著的葡萄糖缺乏的事实， HRE 可以用来在肿瘤中特异性地激活异源基因的表达。已

知被葡萄糖缺乏特异性激活的 grp78 基因启动子的截短的 632 个碱基对序列，表明它能够在体内在鼠类肿瘤中驱动高水平的报道基因的表达(Gazit 等 1995 Cancer Res. 55:1660)。

在其它组织中，当对组织的血液供应减小或被切断时，局部缺血损害也可以发生。中风、深部静脉血栓形成、肺部栓子和肾衰竭是可以引起这种损害的病症的实例。称为心肌梗塞的心脏组织的细胞死亡主要是因为由局部缺血和/或局部缺血后再灌注引起的组织损害。复发性局部缺血和再灌注通常导致活性氧种类对细胞的氧化损害。损害的程度和类型取决于低氧胁迫的严重性和性质。例如，所述胁迫可以引起组织坏死。或者，所述胁迫可以引起细胞凋亡(程序性细胞死亡)以消除损害的细胞。

迄今为止，临床前研究仅使用用标记基因或治疗基因转染的肿瘤细胞，以显示他们在肿瘤中的特异性表达。(参见 Dunbar 和 Eammons 的综述 1994 Stem Cells 12: 563-576; Crystal 1995 Science 270: 404-410; Lee 和 Klein 1995 Transfusion Medicine II 9: 91-113)。因此，存在如何最好地把这些构成物体内引入实体瘤以用于基因治疗方案的问题。

也已经描述了一些方法，利用免疫系统中称为巨噬细胞的细胞作为传递载体，以将药物和治疗基因导向实体瘤(英国专利申请第 9701975.6; 英国专利申请第 9620852.3)。已经表明，衍生自血流中单核细胞的巨噬细胞持续进入实体瘤，并在乳腺癌中血管形成差的局部缺血部位集聚(Leek 等 1996 Cancer Res. 56: 4626)。此外，在这些肿瘤中局部缺血诱导的坏死程度与肿瘤内巨噬细胞浸润的程度正相关(lewis 1997 Clin Exp Met 15:74)。

单核细胞和巨噬细胞也浸润局部缺血损害，这是包括以下疾病在内的其它疾病状态的特征: 脑型疟(Kato 等 1996 Brain Res 734: 203-212; Patnaik 等 1994 Am J Trop Med Hyg 51: 642-647; Sakurai 等 1995 J Cardiol 26: 139-147); 冠心病(Stary 等 1994 J. Arterio Thromb 14: 840-856; Ueda 等 1997 Hiroshima J. Med Sci 46: 31-42); 和类风湿性关节炎(Mapp

等 1995 Br Med Bull 51: 419-436; Sack 等 1994 Rheumatol Int 13: 181-186; Liote 等 1996 Clin Exp Immunol 106: 13-19)。

尽管单核细胞及其分化衍生物巨噬细胞是相对长寿命的细胞，但在体内与其应用相关的缺点是其非常有限的增殖潜力。

巨噬细胞在机体中不能持续足够长的时间，以用于将治疗基因引入其中，以在个体的潜在的生存期中提供预防。因此，依赖于将基因转移至这类细胞的任何疗法，将不可避免地作用时间长，这受到受体细胞寿命的限制。

尽管已经描述了利用巨噬细胞作为传递载体以将标记和治疗基因传递至实体瘤的方法，但仍需要提供方法，以利用 HSC 将 NOI 传递至特征为局部缺血、诸如低氧或葡萄糖浓度低的部位，诸如实体瘤。

此外，需要提供用于癌症和特征为局部缺血(诸如低氧和葡萄糖浓度低)的其它相关疾病的的预防性疫苗接种。

按照本发明的第一方面，提供修饰的造血干细胞(MHSC)，它包含至少一个可表达的目的核苷酸序列(NOI)，其中所述 NOI 或每个 NOI 操作性地连接至一个或多个局部缺血样效应元件(ILRE)。

按照本发明的第二方面，提供按照本发明的 MHSC 并结合能够使所述 MHSC 分化的一种或多种药物。

按照本发明的第三方面，提供一种药用组合物，它包含按照本发明的 MHSC 并可任选地混合药学上可接受的稀释剂、赋形剂或载体。

按照本发明的第四方面，提供用于药物的按照本发明的 MHSC。

按照本发明的第五方面，提供在局部缺血环境中表达一种或多种 NOI 的方法，包括在局部缺血环境中使按照本发明 MHSC 表达一种或多种 NOI。

按照本发明的第六方面，提供按照本发明的 MHSC 的应用，即用于生产治疗与局部缺血相关或由局部缺血引起的病症的药物。

按照本发明的第七方面提供治疗有需要个体的方法，包括给予按照本发明的 MHSC 或按照本发明的药用组合物，并允许一种或多种所

述 NOI 的一种或多种表达。

按照本发明的第八方面，提供修饰细胞，所述修饰细胞包含在该细胞中有活性的元件；和一种 NOI；其中通过病毒转导，用其中至少一个包含所述 NOI 的一种或多种病毒载体转化细胞，制备所述修饰细胞。

按照本发明的第九方面，提供用于体内基因传递的杂种病毒载体，所述系统包含一种或多种编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一病毒载体能够感染第一靶细胞，并表达其中的所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞，其中所述第一病毒载体和/或所述第二病毒载体包含本发明的 ILRE 或按照本发明的细胞特异性调节元件。

按照本发明的第十方面提供一种杂种病毒载体系统，其中所述第一载体可得自或基于腺病毒载体和/或所述第二病毒载体可得自或基于反转录病毒，最好是慢病毒载体，其中所述第一病毒载体和/或所述第二病毒载体包含本发明的 ILRE 或按照本发明的细胞特异性调节元件。

按照本发明的第十一方面，提供一种或多种本文定义的新载体或构成物或启动子或调节元件。

按照本发明的的第十二方面，提供腺病毒载体构成物，它们在正常组织中显示低基础活性，但在局部缺血条件下被强诱导。

按照本发明的第十三方面，提供慢病毒载体构成物，它们在正常组织中显示低基础活性，但在局部缺血条件下被强诱导。

按照本发明的第十四方面，提供一种或多种腺病毒和慢病毒载体构成物的组合物，它们在正常组织中显示低基础活性，但在局部缺血条件下被强诱导。

按照本发明的第十五方面，提供应用腺病毒载体将 ILRE 调节基因传递至任何细胞类型，以用于任何疾病。

按照本发明的第十六方面，提供应用反转录病毒载体将 ILRE 调

节基因传递至任何细胞类型，以用于任何疾病。

按照本发明的第十七方面，提供应用腺病毒和慢病毒载体的组合物将 ILRE 调节基因传递至任何细胞类型，以用于任何疾病。

所述 ILRE 最好结合转录调节元件(诸如启动子)使用，所述转录调节元件最好在一种或多种选定的细胞类型中有活性，最好仅在一种细胞类型中有活性。

本发明的该组合方面称为效应元件，其中所述效应元件包含至少本文定义的 ILRE。

这种效应元件的非限制性实例为 OBHRE1 和 XiaMac。另一非限制性实例包括使用中结合 MLV 启动子和/或组织限制性局部缺血效应启动子的所述 ILRE。

所述局部缺血效应启动子最好是组织限制性局部缺血效应启动子。

所述组织限制性局部缺血效应启动子最好是由阻抑限制的巨噬细胞特异性启动子。

所述组织限制性局部缺乏效应启动子最好是内皮特异性启动子。

所述载体最好是 ILRE 调节的反转录病毒载体。

所述载体最好是 ILRE 调节的慢病毒载体。

所述载体最好是 ILRE 调节的腺病毒载体。

所述载体最好是 ILRE 调节的杂种腺病毒/慢病毒载体。

所述载体最好是自身调节的低氧效应慢病毒载体。

术语“局部缺血样效应元件”－或者写为 ILRE －包括对局部缺血病症或局部缺血样病症或由局部缺血引起的病症应答或在这些病症下有活性的元件。作为实例，局部缺血样调节或由局部缺血引起的病症包括低氧和/或葡萄糖浓度低。

局部缺血可以是对特定器官或组织的血液供应不足。血液供应降低的结果是对所述器官或组织的氧供应不足(低氧)。延长时间的低氧

可以导致对受影响器官或组织的伤害。

优选的 ILRE 是低氧效应元件(HRE)。

本发明的 MHSC 可以用病毒载体制备 - 所述载体可以进而通过病毒和/或非病毒方法传递至 HSC。

能够使所述 MHSC 分化的合适药物的一个实例是细胞因子和/或生长因子。在该实施方案中，所述 MHSC 然后可以分化为一种或多种不同的细胞类型。

在某些应用中，可能最好诸如在传递至个体之前，分离所述 MHSC 。可以用诸如过滤、离心和微量吸移的标准技术来分离所述 MHSC。

本发明的一个优点是，提供用于治疗或预防特征为局部缺血、低氧或低葡萄糖的病症的手段和方法，所述病症诸如但不限于癌症、脑型疟、局部缺血性心脏病或类风湿性关节炎。

在一方面，本发明涉及应用传递系统将 NOI 传递至 HSC，更特别是传递至 $CD34^+$ HSC。

另一方面，本发明提供将 HSC 基因工程改造为含有至少一种 NOI 的方法，所述方法包括用包含至少一个 NOI 的载体转染或转导 HSC 群体，其中选择所述 NOI 用于治疗或预防特征为局部缺血、低氧或低葡萄糖的病症。

再一方面，本发明提供用按照本发明的上述方法产生的 MHSC。

又一方面，本发明提供适用于上述方法的载体，所述载体包含至少一种 NOI 和/或具有至少一个可以插入所述 NOI 的插入位点。这类载体适用于将至少一种 NOI 传递至 HSC。

再一方面，本发明提供用于治疗或预防特征为局部缺血、低氧或低葡萄糖的病症的药物，所述药物包含上述的一种载体和/或 MHSC 以及合适的药学上可接受的载体。

又一方面，本发明提供将至少一种 NOI 传递至得自待治疗个体的 HSC 群体的方法，所述方法包括在允许转染或转导所述细胞的条件

下，使所述细胞与上述载体接触；且将所述转染或转导的细胞再引回入所述个体中。

本发明还提供将至少一种 NOI 传递至待治疗个体的 HSC 群体的方法，所述方法包括给予所述个体本文所述的药物。

按照本发明还提供治疗或预防哺乳动物癌症的方法，所述方法包括从待治疗个体分离 HSC 中富集的细胞群体；在允许转染或转导所述细胞的条件下，使所述细胞与本文所述的含至少一种 NOI 的载体接触；在合适的条件下培养所得的工程改造的 MHSC；和将培养的 MHSC 或其分化的子代再引入所述个体。

按照本发明，所述 NOI 可以是任何合适的核苷酸序列。例如，每种序列可以独立地为 DNA 或 RNA，它们可以合成制备，或可以采用重组 DNA 技术制备，或可以从天然分离，或可以是它们的组合。该序列可以是有义序列或反义序列。可以有多个序列，可以将它们直接或间接相互连接或是其组合。

在一个优选实施方案中，本发明基于反转录病毒载体的意外用途，即用一种或多种 NOI 转化一种或多种 HSC －其中所述转化的 MHSC 可以以特定方式使用。

本发明的反转录病毒载体可以衍生自任何合适的反转录病毒，或可以可衍生自任何合适反转录病毒。任何以下内容均适用于本发明。

作为背景信息，反转录病毒是生活周期不同于裂解病毒的 RNA 病毒。在该方面，反转录病毒是通过 DNA 中间体复制的感染性实体。当反转录病毒感染细胞时，其基因组由反转录酶转化为 DNA 形式。所述 DNA 拷贝用作模板，产生新的 RNA 基因组和感染性病毒颗粒装配所必需的病毒编码的蛋白。

有许多反转录病毒，实例包括：鼠类白血病病毒(MLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、弗吉纳米肉瘤病毒(FuSV)、莫洛尼鼠类白血病病毒(Mo-MLV)、FBR 鼠类骨肉瘤病毒(FRB MSV)、莫洛尼

鼠类肉瘤病毒(Mo-MSV)、艾贝尔逊鼠类白血病病毒(A-MLV)、鸟类髓细胞瘤病病毒-29 (MC29)和鸟类成红细胞增生病毒(AEV)。在 Coffin 等("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press 编辑: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus 第 758-763 页)中，可以找到详细的反转录病毒一览表。

在本领域中可以找到关于某些反转录病毒的基因组结构的细节。作为实例，可以从 NCBI Genbank 中可以找到关于 HIV 的细节(即基因组登记号 AF033819)。

所有野生型反转录病毒基本上均含有三种主要的编码域 - *gag*、*pol*、*env*，它们编码必需的病毒体蛋白。然而，反转录病毒可以大致分为两类: 即"简单的"和"复杂的"。这些类别的区别在于其基因组结构。简单的反转录病毒通常仅携带基本信息。相反，复杂的反转录病毒也编码得自多重剪接信息的另外的调节蛋白。

反转录病毒甚至可以进一步分为 7 组。其中 5 组是具有致癌潜力的反转录病毒。其余 2 组是慢病毒和 spumavirus 。这些反转录病毒的综述出现于"Retroviruses"(1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press 编辑: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus 第 1-25 页)。

除人 T 细胞白血病病毒-牛白血病病毒群(TLV-BLV)外的所有致癌成员均为简单的反转录病毒。 HTLV 、 BLV 和慢病毒以及 spumaviruses 是复杂的反转录病毒。某些研究最清楚的致癌反转录病毒是劳斯肉瘤病毒(RSV)、小鼠乳腺瘤肿瘤病毒(MMTV)和鼠类白血病病毒(MLV)和人 T 细胞白血病病毒(HTLV)。

慢病毒群甚至再分为"灵长类"和"非灵长类"慢病毒。灵长类慢病毒的实例包括人免疫缺陷病毒(HIV)(即人自身免疫缺陷综合征(AIDS)的致病因子)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。非灵长类慢病毒群包括原型"慢病毒"维斯那/梅迪病毒(VMV)以及相关的羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)、马传染性贫血病毒(EIAV)和新近描述的猫免疫缺陷病毒(FIV)和牛免疫缺陷病毒。

慢病毒科和其它类型反转录病毒之间的不同之处在于，慢病毒具有感染分裂细胞和非分裂细胞的能力(Lewis 等 1992 EMBO. J 11: 3053-3058; Lewis 和 Emerman 1994 J. Virol. 68: 510-516)。相反，诸如 MLV 的其它反转录病毒不能感染非分裂细胞，诸如构成例如肌肉、脑、肺和肝脏组织的细胞。

在感染过程中，反转录病毒最初附着于特定的细胞表面受体。在进入敏感性宿主细胞时，反转录病毒 RNA 基因组则由亲代病毒携带的病毒编码的反转录酶拷贝为 DNA。该 DNA 转运到宿主细胞核，随后在核内整合入宿主基因组。在此阶段，它通常称为原病毒。在细胞分裂期间，原病毒稳定地存在于宿主染色体中，并同其它细胞蛋白一样被转录。原病毒编码制造更多病毒所需的蛋白和包装机器，原病毒可以通过有时称为“芽生”的过程离开细胞。

正如已经表明的，每个反转录病毒基因组均包含称为 *gag* 、 *pol* 和 *env* 的基因，它们编码病毒体蛋白和酶。在原病毒中，这些基因两端的侧翼为称为长末端重复序列(LTR)的区域。 LTR 负责原病毒的整合和转录。它们也作为增强子-启动子序列起作用。换句话说， LTR 可以控制病毒基因的表达。反转录病毒 RNA 的包衣壳借助于位于病毒基因组 5’端的 *psi* 序列而发生。

LTR 本身是相同的序列，它们可以分为三种元件，它们称为 U3 、 R 和 U5 。 U3 得自所述 RNA 3’端特有的序列。 R 得自于所述 RNA 两端重复的序列，而 U5 得自所述 RNA 5’端特有的序列。在不同反转录病毒中，这三种元件的大小可以显著变化。

为了易于理解，在图 33 中显示 RNA 和 DNA 形式的所述反转录病毒的简单的一般结构(未按比例制图)，其中显示 LTR 基本特征和 *gag* 、 *pol* 和 *env* 的相对定位。

如图 3 所示，传染性反转录病毒 RNA 基因组的基本分子结构是(5’) R- U5 - *gag*, *pol*, *env* -U3-R (3’)。在缺陷型反转录病毒载体基因组中， *gag* 、 *pol* 和 *env* 可能不存在或没有功能。该 RNA 两端的 R 区是重复

序列。 U5 和 U3 分别代表 RNA 基因组 5'和 3'端特有的序列。

病毒体 RNA 反转录为双链 DNA 发生于细胞质中，涉及反转录酶从模板分子的 5'末端至 3'末端的两次跳跃。这些跳跃的结果是位于病毒体 RNA 5'和 3'端的序列复制。然后这些序列在病毒 DNA 两端发生串联融合，形成包含 R U5 和 U3 区的长末端重复序列(LTR)。反转录完成时，病毒 DNA 易位到细胞核中，在此称为前整合复合物(PIC)的反转录病毒基因组的线性拷贝，借助病毒体整合酶随机插入染色体 DNA 中，形成稳定的原病毒。整合入宿主细胞基因组中的可能位点的数目非常大并且分布非常广。

原病毒转录的控制主要归于病毒 LTR 的非编码序列。转录起始位点位于左手边 LTR (未显示)中 U3 和 R 之间的边界， poly (A)添加(终止)位点位于右手边 LTR (未显示)中 R 和 U5 之间的边界。 U3 含有所述原病毒的大多数转录控制元件，它们包括对细胞的转录激活蛋白和在某些情况下对病毒的转录激活蛋白应答的启动子和多个增强子序列。某些反转录病毒具有任何一种或多种以下基因：诸如 *tat* 、 *rev* 、 *tax* 和 *rex* ，它们编码参与基因表达调节的蛋白。

原病毒 DNA 的转录再产生全长的病毒 RNA 基因组大小的 RNA 分子和通过 RNA 加工产生的亚基因组大小的 RNA 分子。通常，所有的 RNA 产物均用作产生病毒蛋白的模板。通过 RNA 转录物剪接和翻译期间核糖体移码的组合，完成 RNA 产物的表达。

RNA 剪接是去除间插或“内含子” RNA 序列且剩余的“外显子”序列连接以提供用于翻译的连续读框的过程。反转录病毒 DNA 的第一转录物以几种方式修饰，非常类似细胞 mRNA 。然而，与其中有效剪接所有内含子的大多数细胞 mRNA 不同，新合成的反转录病毒 RNA 必须转变为两个群体。一个群体保持未剪接，以用作基因组 RNA ，而另一群体进行剪接，以提供亚基因组 RNA 。

全长未剪接的反转录病毒 RNA 转录物有两个功能： (i) 它们编码 *gag* 和 *pol* 基因产物，和(ii) 它们作为基因组 RNA 包装入子代病毒体

颗粒中。亚基因组大小的 RNA 分子为其余的病毒基因产物提供 mRNA。所有剪接的反转录病毒转录物均带有第一外显子，它跨越 5' LTR 的 U5 区。最后一个外显子总是保留 3' LTR 编码的 U3 和 R 区，尽管其大小不同。其余 RNA 结构的组成取决于剪接事件数和可变剪接位点的选择。

在简单反转录病毒中，一个群体的新合成的反转录病毒 RNA 保持未剪接，以用作基因组 RNA 并作为 *gag* 和 *pol* 的 mRNA。另一群体进行剪接，将基因组 RNA 的 5'部分融合至下游基因，最常见为 *env*。用位于 *gag* 上游的剪接供体和 *pol* 3'末端附近的剪接受体完成剪接。在剪接供体和剪接受体之间、通过剪接去除的内含子含有 *gag* 和 *pol* 基因。这一剪接事件产生包膜(Env)蛋白的 mRNA。所述剪接供体通常位于 *gag* 上游，但在诸如 ASLV 的某些病毒中，剪接供体位于 *gag* 基因中的少数密码子，产生第一 Env 翻译产物，包括与 Gag 共同的少数氨基末端氨基酸残基。Env 蛋白在膜结合多核糖体上合成，并通过细胞的囊泡输运转运至质膜，在此它被加入病毒颗粒中。

复杂的反转录病毒既产生单剪接转录物，也产生多剪接转录物，它们不仅编码 *env* 基因产物，而且编码数组这些病毒独特的调节蛋白和辅助蛋白。复杂的反转录病毒诸如慢病毒，尤其是 HIV，提供了在反转录病毒感染期间可能发生的可变剪接复杂性的突出实例。例如，现在已知，HIV-1 能够通过亚适剪接，由第一基因组转录物产生 30 种以上的不同 mRNA。由于破坏竞争性剪接受体的突变可以引起剪接模式的变化，并且可以影响病毒的感染性，因此看来这种选择过程受到调节(Purcell 和 Martin 1993 J Virol 67: 6365-6378)。

在感染细胞中，全长 RNA 和亚基因组大小 RNA 的相对比例是变化的，在反转录病毒基因表达期间，这些转录物水平的调节是潜在的控制步骤。对于反转录病毒基因的表达，未剪接 RNA 和剪接的 RNA 均必须转运到胞质，并且必须维持剪接的和未剪接的 RNA 的合适比例，以有效的进行反转录病毒的基因表达。不同类别的反转录病毒已

经进化出对该问题的不同解决方法。仅使用全长和单剪接RNA的简单的反转录病毒，或者利用不定的有效剪接位点，或者通过在其基因组中加入几种仅部分限定的顺式作用元件，来调节这些种类的胞质比率。既指导单剪接RNA的合成、也指导多剪接RNA的合成的复杂的反转录病毒，通过RNA上的序列与辅助基因之一(诸如HIV-1中的*rev*和HTLV-1中的*rex*)的蛋白产物相互作用，调节不同基因组和亚基因组大小的RNA种类的转运和可能的剪接。

关于结构基因*gag*、*pol*和*env*本身以及略微更详细的细节，*gag*编码病毒的内部结构蛋白。Gag被蛋白水解加工为成熟蛋白MA (基质)、CA (壳体)和NC (核壳)。*pol*基因编码反转录酶(RT)，RT含有DNA聚合酶和相关的RNA酶H两者的活性，*pol*基因还编码整合酶(IN)，IN介导基因组的复制。*env*基因编码病毒体的表面(SU)糖蛋白和跨膜(TM)蛋白，它们形成与细胞受体蛋白特异性相互作用的复合物。这种相互作用最终导致病毒膜与细胞膜的融合。

Env蛋白是覆盖病毒颗粒并在允许病毒进入靶细胞中起主要作用的病毒蛋白。反转录病毒的包膜糖蛋白复合物包括两种多肽：一种外部的糖基化亲水多肽(SU)和一种跨膜蛋白(TM)。这些蛋白一起形成病毒体表面上的寡聚“隆起(knob)”或“隆起的刺突”。两种多肽均由*env*基因编码，并以多肽前体形式合成，多肽前体在其转运至细胞表面期间被蛋白水解切割。尽管未切割的Env蛋白能够结合于所述受体，但切割事件本身是激活该蛋白的融合潜力所必需的，这对于病毒进入宿主细胞是必需的。通常，SU和TM蛋白均于多个位点糖基化。然而，在某些病毒中，例如MLV，TM不糖基化。

尽管SU和TM蛋白本身不总是有包膜病毒体颗粒装配所需的，但它们在进入过程中起重要作用。在该方面，SU域结合于靶细胞上的受体分子，通常是特定的受体分子。据信这一结合事件激活TM蛋白的膜融合诱导潜力，此后病毒膜和细胞膜融合。在某些病毒中，特别是MLV，人们认为导致TM胞质尾的短部分去除的切割事件在暴

露该蛋白全部融合活性中起关键作用(Brody 等 1994 J Virol 68:4620-4627; Rein 等 1994 J Virol 68:1773-1781)。TM 跨膜区段远侧的该胞质“尾”仍在病毒膜内侧上，它在不同的反转录病毒中其长度显著不同。

因此，SU/受体相互作用的特异性可以限定反转录病毒的宿主范围和组织嗜性。在某些情况下，这种特异性可能限制重组反转录病毒载体的转导潜力。这里，转导包括用病毒载体将非病毒基因传递至靶细胞的过程。因此，许多基因治疗试验使用 MLV 。具有称为 4070A 的包膜蛋白的特定 MLV 称为兼嗜性病毒，它也可以感染人细胞，因为其包膜蛋白与人和小鼠之间保守的磷酸转运蛋白“对接”。这种转运蛋白是普遍存在的，因此这些病毒能够感染许多细胞类型。然而，在某些情况下，尤其从安全的角度来看，它可能对特异性导向限定的细胞有益。为此，几个研究小组已经工程改造了一种小鼠亲嗜性反转录病毒，这种反转录病毒不同于相对正常地仅感染小鼠细胞的其兼嗜性病毒，而是特异性地感染特定的人细胞。用红细胞生成素区段取代 Env 蛋白的片段，产生重组反转录病毒，该反转录病毒随后特异性地结合至表面表达红细胞生成素受体的人细胞，诸如红细胞前体(Maulik 和 Patel 1997 “Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies” 1997 Wiley-Liss Inc. 第 45 页)。

用异源 *env* 基因取代所述 *env* 基因，是称为假型化的技术或策略的一个实例。假型化不是一种新现象，在 WO-A-98/05759 、 WO-A-98/05754 、 WO-A-97/17457 、 WO-A-96/09400 、 WO-A-91/00047 和 Mebatsion 等 1997 Cell 90, 841-847 中可以找到实例。

除 *gag* 、 *pol* 和 *env* 外，复杂的反转录病毒也含有“辅助”基因，它们编码辅助蛋白。辅助蛋白定义为由通常的复制基因或结构基因 *gag* 、 *pol* 和 *env* 编码的蛋白以外的、由辅助基因编码的蛋白。这些辅助蛋白不同于参与基因表达调节的蛋白，如由 *tat* 、 *rev* 、 *tax* 和 *rex* 编码的蛋白。辅助基因的实例包括 *vif* 、 *vpr* 、 *vpx* 、 *vpu* 和 *nef* 中的一个或多个。这些辅助基因可以发现于例如 HIV (参见例如

"Retroviruses" Coffin 等编辑, Pub. CSHL 1997 的第 802 和 803 页)。非必需辅助蛋白可以在特化的细胞类型中起作用，提供细胞蛋白提供的至少部分重复功能。通常，辅助基因位于 *pol* 和 *env* 之间，恰好在 *env* 下游，包括 LTR 的 U3 区或 *env* 和每种其它基因的重叠部分。

复杂的反转录病毒已经进化出调节机制，所述调节机制使用病毒编码的转录激活蛋白以及细胞转录因子。这些反式作用的病毒蛋白用作由 LTR 指导的 RNA 转录的激活蛋白。慢病毒的转录反式激活蛋白由病毒 *tat* 基因编码。 Tat 结合于稳定的称为 TAR 的茎-环 RNA 二级结构，其一种功能是使 Tat 明显最佳定位，以反式激活转录。

一般来说，已经提议将反转录病毒作为传递系统(或者作为传递载体进行表达)，特别是用于将 NOI 或多个 NOI 传递至一个或多个目的位点。这种转移可以在体外、活体外、体内发生，或是它们的组合。当以该方式使用时，反转录病毒通常称为反转录病毒载体或重组反转录病毒载体。反转录病毒载体已经用来研究反转录病毒生活周期的各个方面，包括受体使用、反转录和 RNA 包装(由 Miller 综述, 1992 Curr Top Microbiol Immunol 158:1-24)。

在用于基因治疗的典型的重组反转录病毒载体中，可以从病毒除去 *gag*、 *pol* 和 *env* 蛋白编码区中的一种或多种的至少一部分。这使得反转录病毒载体为复制缺陷型。除去的部分甚至可以用一种 NOI 取代，以便产生能够将其基因组整合入宿主基因组的病毒，但其中修饰的病毒基因组由于缺乏结构蛋白而本身不能繁殖。当整合入宿主基因组中时，发生所述 NOI 的表达，产生例如治疗和/或诊断效应。因此，通常通过：将 NOI 整合入重组病毒载体中；将修饰的病毒载体包装入病毒体外壳中；并允许转导目的位点，诸如靶细胞或靶细胞群体，而将所述 NOI 转移至目的位点。

繁殖并分离大量的反转录病毒载体(例如以制备合适滴度的反转录病毒载体)，以采用包装细胞系或辅助细胞系和重组载体的组合，用于后续的例如目的位点的转导，这是可能的。

在某些情况下，繁殖和分离可能需要将反转录病毒的 *gag* 、 *pol* 和 *env* 基因分离，并将其分别引入宿主细胞中，以产生“包装细胞系”。所述包装细胞系产生包装反转录病毒 DNA 所需的蛋白，但由于缺乏 *psi* 区而导致不能包衣壳。然而，当将携带 NOI 和 *psi* 区的重组载体引入包装细胞系时，所述辅助蛋白可以包装 *psi* 阳性重组载体，产生重组病毒原种。这可以用来转导细胞，以将所述 NOI 引入细胞基因组中。其基因组缺乏制造病毒蛋白所需的所有基因的重组病毒，仅可以转导一次，并且不能繁殖。这些仅能转导一轮靶细胞的病毒载体被称为复制缺陷型载体。因此，将所述 NOI 引入宿主/靶细胞基因组，而不产生潜在有害的反转录病毒。在“ Retroviruses ” (1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press 编辑: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus 第 449 页)中概述了可用的包装系。

已经发展了反转录病毒包装细胞系的设计，以解决特别是早先设计通常遇到的自发产生辅助病毒的问题。因为同源性大大促进重组，所以降低或消除该载体和辅助病毒基因组之间的同源性已经减少了辅助病毒产生的问题。新近，已经研制出包装细胞，其中在独立转染入包装细胞系的分离的表达质粒中携带 *gag* 、 *pol* 和 *env* 病毒编码区，使得野生型病毒的产生需要三次重组事件。这降低了可复制病毒产生的潜力。该策略有时称为三质粒转染法(Soneoka 等 1995 Nucl. Acids Res. 23: 628-633)。

当研制载体时，瞬时转染也可以用来测量载体的产生。在该方面，瞬时转染避免了产生稳定的载体生产细胞系所需的较长时间，如果该载体或反转录病毒包装组分对细胞有毒性，则使用瞬时转染。通常用来产生反转录病毒载体的组分包括编码 Gag/Pol 蛋白的质粒、编码 Env 蛋白的质粒和含有 NOI 的质粒。载体的产生包括将这些组分中的一种或多种瞬时转染入含其它所需组分的细胞中。如果该载体编码有毒基因或编码干扰宿主细胞复制的基因，诸如细胞周期抑制剂或诱导细胞凋亡的基因，则可能难以产生稳定的载体生产细胞系，但瞬时

转染可以用来在细胞死亡之前产生所述载体。此外，利用瞬时转染，已经开发出产生的载体滴度水平与得自稳定的载体生产细胞系的水平相当的细胞系(Pear 等 1993, Proc Natl Acad Sci 90:8392-8396)。

某些 HIV 蛋白的毒性，可能使得难以产生稳定的基于 HIV 的包装系，由于这种毒性，通常通过载体和辅助病毒的瞬时转染制备 HIV 载体。某些工作者已经用水泡性口膜炎病毒(VSV)的 Env 蛋白取代 HIV 的 Env 蛋白。 VSV Env 蛋白的插入促进载体的浓缩，因为通过瞬时转染，已经产生滴度为 5×10^5 (浓缩后为 10^8)的 HIV/VSV-G 载体(Naldini 等 1996 Science 272: 263-267)。因此， HIV 载体的瞬时转染可以提供有用的策略，以产生高滴度的载体(Yee 等 1994 PNAS. 91: 9564-9568)。

关于载体滴度，反转录病毒载体的实际用途主要受限于可以在体外培养物中获得的转导颗粒的滴度(通常不等于 10^8 颗粒/ml)和许多包膜病毒对用于浓缩和纯化病毒的传统生化技术和物理化学技术的敏感性。

作为实例，已经开发了几种浓缩反转录病毒载体的方法，包括使用离心(Fekete 和 Cepko 1993 Mol Cell Biol 13:2604-2613)、中空纤维过滤(Paul 等 1993 Hum Gene Ther 4: 609-615)和切向流过滤(Kotani 等 1994 Hun Gene Ther 5: 19-28)。尽管可以达到将病毒滴度提高 20 倍，但反转录病毒的 Env 蛋白的相对脆性限制了浓缩反转录病毒载体的能力，浓缩该病毒通常导致感染性病毒体的回收差。尽管如上所述，通过用更稳定的 VSV-G 蛋白取代反转录病毒的 Env 蛋白可以克服该问题，这允许以更好的得率更有效地浓缩载体，但其缺点是 VSV-G 蛋白对细胞的毒性相当大。

尽管用目前可利用的载体可获得 10^7 cfu/ml 的无辅助病毒载体的滴度，但通常可以用滴度低得多的载体储液进行试验。然而，由于实用原因，需要高滴度的病毒，尤其是当必须感染大量的细胞时。另外，转导高百分率的某些细胞类型需要高滴度。例如，人造血祖细胞感染的频率主要取决于载体的滴度，仅用滴度非常高的储液才能发生有用

频率的感染(Hock 和 Miller 1986 Nature 320: 275-277; Hogge 和 Humphries 1987 Blood 69: 611-617)。在这些情况下，仅仅将所述细胞暴露于大体积的病毒以补偿低病毒滴度是不够的。相反，在某些情况下，感染性载体病毒体的浓度对于促进有效的转导可能是关键性的。

研究人员正在尝试产生高滴度的载体以用于基因传递。作为实例，已经证明不同载体设计的比较，可用来帮助限定高滴度病毒产生所需的必需元件。关于不同反转录病毒载体设计的早期工作表明，几乎所有的 MLV 内部蛋白编码区均可以缺失，而不消除该载体的感染性(Miller 等 1983 Proc Natl Acad Sci 80: 4709-4713)。这些早期载体仅保留 *env* 编码区 3'端的小部分。后续的工作已经表明，所有的 *env* 基因编码序列均可以去除，而不会进一步降低载体的滴度(Miller 和 Rosman 1989 Biotechnique 7: 980-990; Morgenstern 和 Land 1990 Nucleic Acids Res 18: 3587-3596)。仅病毒 LTR 和连接所述 LTR、包括正链和负链 DNA 引发所需区段和将病毒 RNA 选择性包装入病毒体所需的区(*psi* 位点; Mann 等 1983 Cell 33: 153-159)在内的短区域，被认为是载体传递必需的。尽管如此，用这些早期载体获得的病毒滴度仍低于亲代辅助病毒滴度的约 10 倍。

其它试验表明，*gag* 基因 5'端序列的保留显著提高病毒载体的滴度，这是因为将病毒 RNA 包装入病毒体中的包装效力提高(Armentano 等 1987 J Virol 61: 1647-1650; Bender 等 1987 J Virol 61:1639-1646; Adam 和 Miller 1988 J Virol 62: 3802-3806)。这种效应不是因为由该载体的 *gag* 区合成病毒蛋白，而是因为 *gag* 读框破坏或 *gag* 的密码子突变为终止密码子对载体的滴度无影响(Bender 等 1987 出处同上)。这些试验证明，将基因组 RNA 有效包装入 MLV 所需的序列比先前通过缺失分析限定的 *psi* 信号大(Mann 等 1983 出处同上)。为了获得高滴度(10^6 至> 10^7)，表明在反转录病毒载体中包括这种称为 *psi*+ (*psi* plus)的较大的信号是重要的。现在已经证明，该信号从所述剪接供体上游跨越至 *gag* 起始密码子下游(Bender 等 1987 出处同上)。因为该信号的位置使

得在剪接的 *env* 表达转录物中该信号缺失。这确保仅含有病毒生活周期的所有三种必需基因的全长转录物被包装。

除在提高载体滴度方面操作所述反转录病毒载体外，也已经设计了反转录病毒载体，以诱导在转导的细胞中产生特定的 NOI (通常为标记蛋白)。正如已经提及的，最常用的反转录病毒载体设计包括用一种或多种 NOI 取代反转录病毒序列，产生复制缺陷型载体。这种最简单的方法已经使用所述反转录病毒 5' LTR 中的启动子，来控制编码 NOI 的 cDNA 的表达，或改变所述 LTR 的增强子/启动子，以提供组织特异性表达或诱导性。

或者，已经用在启动子选择中提供更大灵活性的内部启动子表达了单一的编码区。

当 NOI 为选择标记时，如在次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(*hprt*)的情况下，最容易实现表达 NOI 的这些策略(Miller 等 1983 Proc Natl Acad Sci 80: 4709-4713)，这促进载体转导的细胞的选择。如果该载体含有不是选择标记的 NOI，则可以通过与存在于分离的质粒上的选择标记共转染，将该载体引入包装细胞。该策略对于基因治疗有吸引力的优点是：在最终的靶细胞中表达单一的蛋白，并且避免了选择标记的可能毒性和抗原性。然而，当所插入的基因不可选择时，该方法的缺点是，更难以产生产生高滴度载体储液的细胞。另外，通常更难以测定该载体的滴度。

目前用来设计表达两种或两种以上蛋白的反转录病毒载体的方法，依赖于三种通用的策略。这些策略包括：(i)由一种启动子转录的可变剪接的 mRNA 表达不同的蛋白；(ii)使用 5' LTR 中的启动子和内部启动子，驱动不同 cDNA 的转录，和(iii)使用内部核糖体进入位点(IRES)元件，以允许由或者单一 mRNA 或者由可以从一个可读框表达的融合蛋白翻译多个编码区。

含内部启动子的载体已经广泛用来表达多个基因。一种内部启动子使得可以利用非病毒 LTR 的启动子/增强子组合，来驱动基因表达。

多个内部启动子可以包括在反转录病毒载体中，已经证明它可以表达至少三种不同的每种来自其自身的启动子的 cDNA (Overell 等 1988 Mol Cell Biol 8: 1803-1808)。

在反转录病毒科慢病毒亚科的不同成员的基础上，已经开发了许多载体，其中许多这些载体是专利申请的主题(PCT/GB 97/02857; PCT US96/15406)。由 HIV-1 构成的最简单的载体除缺失部分 env 编码区或取代 nef 编码区外，具有全部 HIV 基因组(Richardson, J. H., Child, L. A. 和 Lever, A. M. (1993) J Virol 67, 3997-4005., Buchschacher, G. L., Jr.和 Panganiban, A. T. (1992) J Virol 66, 2731-9, Richardson, J. H., Kaye, J. F., Child, L. A.和 Lever, A. M. (1995) J Gen Virol 76, 691-6, Kaye, J. F., Richardson, J. H.和 Lever, A. M. (1995) J Virol 69, 6588-92, Carroll, R., Lin, J. T., Dacquel, E. J., Mosca, J. D., Burke, D. S.和 St Louis, D. C. (1994) J Virol 68, 6047-51)。已经将许多启动子/报道基因盒插入这些位置 ADDIN ENRf8 (Page, K. A., Landau, N. R.和 Littman, D. R. (1990) J Virol 64, 5270-6., Shimada, T., Fujii, H., Mitsuya, H.和 Nienhius, A. W. (1991) J Clin Invest 88, 1043-76, 7)。特别是这些载体表达 gag/pol，因此所有辅助基因均仅需要包膜来产生感染性病毒颗粒。在辅助基因中，vif、vpr、vpu 和 nef 是非必需的，然而，已经提出辅助基因的表达的确影响滴度。(Fan, L.和 Peden, K. (1992) Virology 190, 19-29, Gabuzda, D. H., Lever, A., Terwilliger, E.和 Sodroski, J. (1992) J Virol 66, 3306-15, Schubert, U., Clouse, K. A.和 Strebel, K. (1995) J Virol 69, 7699-711, Miller, M. D., Warmerdam, M. T., Gaston, I., Greene, W. C.和 Feinberg, M. B. (1994) J Exp Med 179, 101-13 Zufferey, R., Nagy, D., Mandel, R.J., Naldini, L.和 Trono, (1997) Nature Biotechnology 15, 871-875, Takahashi, K., Wesselingh, S. L., Griffin, D.E., McArthur, J. C. Johnson, R. T.和 Glass, J. D. (1996) Ann, Neurol. 39, 705-711)。然而，新近已经描述了有效但缺乏大多数或所有辅助因子的载体。Poeschla, E., Corbeau, P.和 Wong-Staal, F. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 11395-

9． Naldini, L., Blomer, U., Gage, F. H., Trono, D.和 Verma, I. M. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 11382-8． Naldini, L., Blomer, U., Gallay, P., Ory, D., Mulligan, R., Gage, F. H., Verma, I. M.和 Trono, D. (1996) Science 272, 263-7, Blomer, U., Naldini, L., Kafri, T., Trono, D., Verma, I. 和 Gage, F. (1997) Journal of Virology 71, 6641-6649, Kim, V.N., Mitrophanous, K., Kingsman, S.M.和 Kingsman, A.J. 1998. J. Vriol., 72, 811-816．

这些慢病毒载体的一般形式为 HIV-1 5'LTR 和前导序列、某些 gag 编码区序列(以提供包装功能)、报道基因盒、 rev 效应元件(RRE)和 3'LTR．在这些载体中， gag/pol、辅助基因产物和包膜功能或者由单质粒或者由两种或两种以上共转染的质粒供应，或者通过用 HIV 共转染含载体的细胞来提供。在基于 HIV 的载体中，也已经利用反式激活，在所述载体中，改变 5'LTR 的 U3 区，以含有两个拷贝的 tax 效应元件(TRE)，这使得可以由 HTLV-1 的 tax 蛋白进行反式激活。这提出作为成体 T 细胞白血病/淋巴瘤的治疗(Lin, H. C., Bodkin, M., Lal, R. B.和 Rabson, A. B. (1995) J Virol 69, 7216-25)。也已经构建了可以用诸如 CMV 启动子的组成型启动子表达的载体(例如 Kim 等 1998 出处同上)。新近，已经进一步精修了慢病毒载体结构。例如，已经产生了自身失活的 HIV 载体，其中缺失 HIV LTR，以将表达限于内部盒(Myoshi 等 1998 J. Virol 72, 8150)。

当发生与 HIV 共感染靶细胞时，所述载体可以通过 HIV 允许细胞的培养物传播。这一原理已经用来研制用于治疗或限制 HIV-1 感染的载体(Dropulic, B., Hermankova, M.和 Pitha, P. M. (1996) Proc Natl Acad Sci USA 93, 11103-8., Kim, J. H., McLinden, R. J., Mosca, J. D., Vahey, M. T., Greene, W. C.和 Redfield, R. R. (1996) J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol 12, 343-51, Poeschla 等 1996 PNAS 93, 11395．

现在大量的研究已经描述使用基于 HIV 的载体用于将基因转移至非分裂细胞(例如视网膜, Myoshi 等 1997, PNAS 94, 10319-23., 神经

元, Blomer 等 1997 J. Virol 71, 6641, Blomer 等 1998 95, 2603, 肝脏、肌肉 Kafri 等 Nature Genetics 1997 17, 314). 也已经研制出其它慢病毒载体, 例如EIAV (GB 9727135.7)和FIV (Poeschla等1998, Nature Medicine, 4, 354)和梅迪-维斯那(国际申请号: PCT/GB95/00663 , 优先权日: 1994 年 12 月 9 日/1995 年 3 月 24 日包装缺陷型慢病毒 Lever, A.M.L., Harrison, G.P., Hunter, E.).

已经报道了以通常的有义方向将反转录病毒基因转移至鼠类 HSC 中(Williams 等 Nature 1984 310:476-479). 这里, 已经表明, 全长 MDRI (多抗药性) cDNA 基因在鼠类 HSC 中的表达, 使得它们抗各种抗癌药物. 同样, 已经表明, 通过反转录病毒转导 MDRI 基因, 保护骨髓或外周血细胞中的鼠类造血祖细胞免受抗癌化疗的毒性(Licht 等 1995 Cytokines Mol Ther 1: 11-20). 已经在体外用含或者新霉素磷酸转移酶基因(*neo*)或人葡糖脑苷脂酶 cDNA 的重组反转录病毒载体转导 $CD34^+$祖细胞, 通过共移植所述转导的 $CD34^+$祖细胞, 也已经证明了在免疫缺陷小鼠中持续的人血细胞生成作用(Nolta 等 1994 Blood 83:3041-3051). 也已经用含报道基因(*LacZ*)和选择标记(*neo*)的两种基因的反转录病毒载体转导鼠类 HSC。在受体的 PBL 中可检测到的 *LacZ* 表达(Asami 等 1996 Eur J Haematol 57:278-285).

体内鼠类研究已经表明, 在收获骨髓之前用 5-氟尿嘧啶预处理供体小鼠, 可以通过诱导原始细胞的循环并提高对反转录病毒感染和整合的敏感性, 提供转导效率. 靶细胞与反转录病毒产生细胞系的协同培养并利用能够每 ml 产生至少 10^5 病毒颗粒的细胞系, 也已经提高了效率(Bodine 等 1991 Exp Hematol 19:206-212). 事实上, 在用 1-50%或更多的携带原病毒基因组的细胞重建多个造血谱系的所有受体小鼠中, 已经将基因成功转移入长期种群恢复细胞中(Fraser 等 1990 Blood 76: 1071-1076).

已经一般报道了用反转录病毒将基因转移入人 HSC 中(Duphar 和 Emmons 1994 Stem Cells 12: 563-576). 此外, 在各种组合的生长因子

诸如 IL-3 、 IL-6 和干细胞因子(SVF)存在下，或在初级骨髓基质或所述反转录病毒生产细胞系存在下，已经用反转录病毒载体以非常高的效率(通常高于 50%)转导定向人祖细胞，诸如集落形成单位-粒细胞巨噬细胞(CFU-GM)或爆发集落形成单位-红细胞类(BFU-E)(Nolta 等 1990 Hum Gen Ther 1: 256-268; Moore 等 1992 Blood 79:1393-1399; Cournoyer 等 1991 Hum Gen Ther 2:203-213)。

诸如纤连蛋白的特定细胞外基质组分的存在也可能具有一些重要性(Moritz 等 J Clin Invest 1994 93:1451-1457)。在相似的转导条件下，已经以同样的效率转导了更原始的人长期培养起始细胞(LTC-IC)(Moore 等 1992 出处同上; Hughes 等 1989 Blood 74:1915-1922; Hughes 等 1992 J Clin Invest 89: 1817-1824)。通过反转录病毒转导 $CD34^+$祖细胞，并将其随后用细胞因子诱导分化为树突细胞，已经完成了在人树突细胞(DC)上高水平表达人肿瘤抗原表皮细胞粘蛋白(MUC-1)(Henderson 等 1996 Cancer Res 56:3763-3770)。

尽管本领域有关于已经用反转录病毒系统将基因转移入 HSC 中的一般认识，但现有技术没有指出或提示其中用一种或多种 NOI 以特定方式转化一种或多种 HSC 的本发明。

按照本发明，合适的 NOI 序列包括具有治疗和/或诊断应用的 NOI 序列，诸如但不限于编码以下分子的序列：细胞因子、趋化因子、激素、抗体、工程免疫球蛋白样分子、单链抗体、融合蛋白、酶、免疫共同刺激分子、免疫调节分子、反义 RNA 、靶蛋白的反式显性负突变体、毒素、条件毒素、抗原、肿瘤抑制蛋白和生长因子、膜蛋白、血管活性蛋白和肽、抗病毒蛋白和核酶以及它们的衍生物(诸如具有相关的报道分子基团的衍生物)。当包括时，这类编码序列通常可以操作性地连接于合适的启动子，所述启动子可以是在一种或多种特定的细胞类型中驱动核酶表达的启动子，或是一种或多种不同的启动子。

在本发明中用于治疗或预防癌症的合适 NOI 包括编码蛋白的 NOI，所述蛋白：破坏靶细胞(例如核糖体毒素),用作：肿瘤抑制因子(诸

如野生型 p53)；抗肿瘤免疫机制的激活蛋白(诸如细胞因子、共同刺激分子和免疫球蛋白)；血管生成抑制剂；或所述蛋白提供增强的药物敏感性(诸如前体药物活化酶)；用天然效应细胞间接刺激破坏靶细胞(例如刺激免疫系统的强抗原或将前体物质转化为破坏靶细胞的毒性物质(例如前体药物活化酶))。所编码的蛋白也可以破坏旁观者肿瘤细胞(例如用分泌的抗肿瘤抗体-核糖体毒素融合蛋白)、间接刺激旁观者肿瘤细胞的破坏(例如刺激免疫系统的细胞因子或引起局部血管闭塞的前凝血蛋白)或将前体物质转化为破坏旁观者肿瘤细胞的毒性物质(例如将前体药物活化为可扩散药物的酶)。

此外，传递了干扰肿瘤存留的细胞基因表达的反义转录物或核酶(例如伯基特淋巴瘤中的抗异常 *myc* 转录物或慢性髓细胞性白血病中的抗 *bcr-abl* 转录物)的编码 NOI。也设想了使用这类 NOI 的组合。

不在靶细胞中选择性表达，或者也在靶细胞中选择性表达时，所述一种或多种 NOI 可以编码一种或多种前体药物活化酶，所述前体药物活化酶直至用所述酶作用的一种或多种前体药物治疗个体时才具有显著效应或具有有害效应。在所述活性 NOI 存在下，用合适的前体药物治疗个体，导致增强降低肿瘤的生长或存活。

可以将前体药物活化酶传递至肿瘤位点，以治疗癌症。在每种情况下，合适的前体药物与合适的前体药物活化酶联合用于治疗所述患者。将合适的前体药物结合所述载体给予。前体药物的实例包括：磷酸鬼臼亚乙苷(与碱性磷酸酶一起使用， Senter 等 1988 Proc Natl Acad Sci 85:4842-4846)； 5-氟胞嘧啶(与胞嘧啶脱氨酶一起使用， Mullen 等 1994 Cancer Res. 54: 1503-1506)；阿霉素-N-对羟基苯氧基乙酰胺(与青霉素-V 酰胺酶一起使用， Kerr 等 1990 Cancer Immonol Immunother 31: 202-206)；对-N-双(2-氯乙基)氨基苯甲酰谷氨酸(与羧肽酶 G2 一起使用)；氨基甲酸头孢菌素氮芥(与β-内酰胺酶一起使用)； SR4233 (与 P450 还原酶一起使用)；丙氧鸟苷(与 HSV 胸苷激酶一起使用， Borrelli 等 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 7572-7576)；与硝基还原酶一起使用的芥

子前体药物(Friedlos 等 1997 J Med Chem 40: 1270-1275)和环磷酰胺(与 P450 一起使用, Chen 等 1996 Cancer Res 56: 1331-1340).

用于本发明的合适前体药物活化酶的实例包括: 胸苷磷酸化酶, 它活化 5-氟-尿嘧啶前体药物 capcetabine 和去氧氟尿苷; 单纯疱疹病毒的胸苷激酶, 它活化丙氧鸟苷; 细胞色素 P450, 它将诸如环磷酰胺的前体药物活化为 DNA 损害剂; 和胞嘧啶脱氨酶, 它活化 5-氟胞嘧啶。最好使用人来源的酶。

用于治疗或预防局部缺血性心脏病的合适 NOI 包括编码纤溶酶原激活蛋白的 NOI。用于治疗或预防类风湿性关节炎或脑型疟的合适的 NOI, 包括编码抗炎蛋白、针对肿瘤坏死因子(TNF) α 的抗体和抗粘着分子(诸如粘着分子特异性的抗体分子或受体)的基因。

在 PCT/GB95/00322 (WO-A-9521927)中, 可以找到低氧可调节治疗性 NOI 的实例。

所述 NOI 编码的表达产物可以是从所述细胞分泌的蛋白。或者, 所述 NOI 的表达产物不被分泌, 而在所述细胞中有活性。在这两者的任一事件中, 最好证明所述 NOI 的表达产物是旁观者效应物或具有远距离旁观者效应; 也就是说, 在一个细胞中产生所述表达产物, 导致杀伤另外的具有共同表型的相关细胞, 或者是相邻细胞或者是远距离细胞(例如转移的细胞)。

所述载体也可以含有一种或多种细胞因子编码 NOI, 它们用作指导含所述载体的 MHSC 进行后续分化。合适的细胞因子和生长因子包括但不限于: ApoE、 Apo-SAA、 BDNF、 Cardiotrophin-1、 EGF、 ENA-78、 Eotaxin、 Eotaxin-2、 Exodus-2、 酸性 FGF、 碱性 FGF、 成纤维细胞生长因子-10 (Marshall 1998 Nature Biotechnology 16:129)、 FLT3 配体(Kimura 等 1997)、 Fractalkine (CX3C)、 GDNF、 G-CSF、 GM-CSF、 GF-β1、 胰岛素、 IFN-γ、 IGF-I、 IGF-II、 IL-1α、 IL-1β、 IL-2、 IL-3、 IL-4、 IL-5、 IL-6、 IL-7、 IL-8 (72 a.a.)、 IL-8 (77 a.a.)、 IL-9、 IL-10、 IL-11、 IL-12、 IL-13、 IL-15、 IL-16、

IL-17、IL-18 (IGIF)、抑制素α、抑制素β、IP-10、角质细胞生长因子-2 (KGF-2)、KGF、Leptin、LIF、Lymphotactin、Mullerian 抑制物质、单核细胞集落抑制因子、单核细胞诱引蛋白(marshall 1998 出处同上)、M-CSF、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、MCP-1 (MCAF)、MCP-2、MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.)、MIG、MIP-1α、MIP-1β、MIP-3α、MIP-3β、MIP-4、髓样祖细胞(myeloid progenitor)抑制因子-1 (MIPIF-1)、NAP-2、Neurturin、神经生长因子、β-NFG、NT-3、NT-4、制癌蛋白 M、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PF-4、RANTES、SDF1α、SDF1β、SCF、SCGF、干细胞因子(SCF)、TARC、TGF-α、TGF-β、TGF-β2、TGF-β3、肿瘤坏死因子(TNF)、TNF-α、TNF-β、TNIL-1、TPO、VEGF、GCP-2、GRO/MGSA、GRO-β、GRO-γ、HCC1、1-309，

对于某些应用，可能最好是这些细胞因子中某些因子的组合物，特别是包括 IL-3、IL-6 和 SCF 的组合物，以维持和扩增干细胞群体。对于体外分化，可以加入其它细胞因子，诸如 GM-CSF 和 M-CSF，以诱导巨噬细胞分化，或加入 GM-CSF 和 G-CSF 以获得嗜中性粒细胞。当将工程细胞再引入得到所述细胞的个体时，机体自身的机制则允许所述细胞或其分化的子代迁移到受影响的区域，例如所述肿瘤。

可以融合一种或多种所述 NOI。也就是说，所述 NOI 编码序列可以编码融合蛋白或编码序列的区段。例如，pIXY321 是一种 GM-CSF 和 IL-3 的基因工程融合蛋白(Bhalla 等 1995 Leukemia 11: 1851-1856)，在体外和在临床前研究中，它表现出两种其亲代细胞因子的生物活性(Vadhan-Raj 等 1995 Blood 86: 2098-2105)。

可任选地，另一种 NOI 可以是自杀基因，在外源物质存在下它的表达导致转染或转导细胞的破坏。自杀基因的一个实例包括单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV *tk*)，在用丙氧鸟苷处理后，它可以杀伤受感染细胞和旁观者细胞(Robbins 等 Tibtech 1998 16: 35-40)。

可任选地，另一种 NOI 可以是靶向蛋白(targeting protein) (诸如抗

干细胞因子受体的抗体(WO9217505; WO9221766))。例如，对于定向细胞的传递，可以或者通过将未分级骨髓与病毒一起孵育在活体外，或者通过静脉内传递病毒，将呈现针对 HSC 上存在的受体(例如 CD34 或干细胞因子)的抗体(或生长因子或肽)的重组(嗜亲性)反转录病毒用于这些细胞。

可以利用配体和抗体导向选定的细胞类型，包括例如：单克隆抗体 c-SF-25，导向人肺癌上的 125kD 抗原(Takahashi 等 1993 Science 259:1460)；抗各种肺癌抗原 14C1 的抗体(Souhami 1992 Thorax 47: 53-56)；抗人卵巢癌抗原的抗体(Gallagher 等 1991 Br J Cancer 64: 35-40)；抗 H/Lev/1Leb 抗原的抗体，导向肺癌(Masayuki 等 1992 N Eng J Med 327:14-18)；神经生长因子，导向神经肿瘤上的神经生长因子受体(Chao 等 1986 Science 232: 518)；Fc 受体，导向巨噬细胞(Anderson 和 Looney 1987 Immunol Today 1: 264-266)；凝集素(Sharon 和 Lis 1989 Science 246: 277)；I 型胶原蛋白，导向结肠癌(Pullam 和 Bodmer 1992 Nature 356:529)；白介素-1，导向 T Cess 上的白介素-1 受体(Fanslow 等 1990 Science 248: 739)；乙酰化低密度脂蛋白("LDL")，导向巨噬细胞清除受体(和动脉粥样斑块；参见 Brown 等 1983 Ann Rev Biochem 52: 223-261)；以及导向巨噬细胞清除受体的其它乙酰化分子(Paulinski 等 PNAS 86: 1372-1376)；病毒受体(Haywood 1994 J Virol 68(1): 1-5)；运铁蛋白，导向肿瘤细胞上的运铁蛋白受体(Huebers 等 1987 Physio Rev 67: 520-582)；血管内皮生长因子("vegF")，导向其中发生的血管形成增加的靶细胞；和尿激酶纤溶酶原激活蛋白受体(UPAR)。

或者，可以从用重组技术(Scott 和 Smith 1990 Science 249: 386; Devlin 等 1990 Science 249: 404; Houghten 等 1991 Nature 354: 84; Matthews 和 Wells 1993 Science 260: 1113; Nisim 等 1994 EMBO J 13(3) 692-698)或利用有机化合物文库的相当的技术产生的文库中选择配体。

除所述的治疗基因和表达调节元件外，所述载体可以含有额外的

基因元件，以有效表达所述基因或调节所述基因的表达，所述基因元件包括启动子/增强子、翻译起始信号、内部核糖体进入位点(IRES)、剪接信号和多腺甘酸化信号。

所述 NOI 可以在表达调节元件的表达控制之下，通常在启动子或启动子和增强子的控制之下。所述增强子和/或启动子可以优先在低氧或局部缺血或低葡萄糖环境中有活性，使得所述 NOI 优先在特定的目的组织中表达，诸如在肿瘤、关节炎关节或其它局部缺血部位中表达。因此，可以降低或消除对待治疗个体的任何显著生物效应或有害效应。增强子元件或赋予受调节表达的其它元件可以以多拷贝存在。同样，或另外，所述增强子和/或启动子可以优先在一种或多种特定的细胞类型中有活性，诸如巨噬细胞、内皮细胞或它们的组合中的任何一种或多种中有活性。其它实例包括呼吸道上皮细胞、肝细胞、肌细胞、心肌细胞、滑膜细胞(synoviocytes)、初级乳房上皮细胞(mammary epithelial cess)和有丝分裂后终末分化的非复制细胞，诸如巨噬细胞、神经元。

术语“启动子”以本领域正常的含义使用，例如为 Jacob-Monod 基因表达理论中的 RNA 聚合酶结合位点。

术语“增强子”包括结合于转录起始复合物的其它蛋白组分并由此促进由其相关启动子指导的转录起始的 DNA 序列。

编码第二载体的转录单位的启动子和增强子最好在产生所述第二病毒载体的条件下，在所述第一靶细胞中有强活性，或能够被强诱导。所述启动子和/或增强子可以是组成型有效的，或其活性可以受组织限制或受时间限制。合适的组织限制启动子/增强子的实例是在肿瘤细胞中有高活性的启动子/增强子，诸如来自 MUC1 基因、CEA 基因或 5T4 抗原基因的启动子/增强子。时间限制的启动子/增强子的实例是对局部缺血/或低氧应答的启动子/增强子，诸如低氧效应元件或 grp78 或 grp94 基因的启动子/增强子。α 甲胎蛋白(AFP)启动子也是肿瘤特异性启动子。一个优选的启动子-增强子组合是人巨细胞病毒(hCMV)主

要立即早期(MIE)启动子/增强子组合。

本发明的启动子最好是组织特异性的。也就是说，它们能够驱动一种或多种NOI在一种组织中转录，而在其它组织类型中主要保持"沉默"。

术语"组织特异性的"是指这样一种启动子，其活性不限于单一组织类型，但它们仍然显示选择性，因为它们在一类组织中可以有活性，而在另一类组织中活性较低或沉默。本发明启动子的所希望的特征是，它们在缺乏激活的低氧调节增强子元件的情况下，甚至在靶组织中，其具有的活性也相对低。达到这一点的一种方法是使用"沉默子"元件，它们在缺乏低氧的情况下抑制选定启动子的活性。

在特定启动子控制下的一种或多种NOI的表达水平，可以通过调节所述启动子区来进行调节。例如，启动子区中的不同结构域可以具有不同的基因调节活性。通常采用具有特定区缺失的不同启动子突变体(即缺失分析)的载体构成物，评价这些不同区的作用。这种方法可以用来鉴定例如能够赋予组织特异性的最小区域或赋予低氧敏感性的最小区域。

许多上述组织特异性启动子可能在实施本发明中特别有利。在大多数情况下，这些启动子可以作为方便的适用于克隆入选定载体中的限制性消化片段来分离。或者，可以用聚合酶链式反应分离启动子片段。通过于引物的5'端加入限制性位点，可以便于扩增片段的克隆。

适用于心脏特异性表达的启动子包括来自鼠类心脏α-肌球蛋白重链(MHC)基因的启动子。合适的血管内皮特异性启动子包括Et-1启动子和von Willebrand因子启动子。

前列腺特异性启动子包括人腺激肽释放酶1 (hKLK2)基因和前列腺特异性抗原(hKLK3)的5'侧翼区。

细胞特异性的启动子/增强子的实例包括巨噬细胞特异性启动子或增强子，诸如CSF-1启动子-增强子、或来自甘露醇受体基因启动子-增强子的元件(Rouleux等1994 Exp Cell Res 214:113-119)。或者，可

以使用在嗜中性粒细胞中优先有活性的启动子或增强子元件或淋巴细胞特异性增强子，诸如 IL-2 基因增强子。

如上所述，本发明基于一个惊人的发现：转化一种或多种 HSC 并且用于特定目的是可能的。

作为背景信息，单核细胞及其分化衍生物巨噬细胞得自称为 HSC 的胚细胞贮源，它们能够产生多种不同的细胞类型。在哺乳动物中，HSC 发现在胎儿肝脏、脾脏和骨髓中，但在出生后和整个成体生活中，通常只在骨髓中发现它们。在诸如细胞-细胞相互作用和存在可溶性细胞因子的微环境因素影响下， HSC 分化为各种细胞谱系。

由 HSC 产生四种主要的细胞谱系。这些谱系包括：红细胞类谱系(红细胞)；巨核细胞谱系(血小板)；骨髓谱系(粒细胞和单核吞噬细胞)；和淋巴谱系(淋巴细胞)。特别是，骨髓谱系和淋巴谱系对于免疫系统的功能是关键性的。

在妊娠约 6 周的人类胎儿的肝脏中开始成髓作用。其中已经由个体干细胞体外生长出集落的研究，已经表明得自 HSC 的第一祖细胞为可以产生粒细胞、红细胞和巨核细胞的集落形成单位(CFU)(CFU-GEMM)。

在组织特异性蛋白调节物网络的影响下，发生这些细胞的成熟，其中已经给出所述调节物许多名称，包括生长因子、细胞因子和白介素。大体上，没有区别不同类别生长因子的功能或结构特征。大多数因子看来能够刺激多种生物反应，关键依赖于其靶细胞的不同分化状态。例如，一种造血生长因子粒细胞集落刺激因子(G-CSF)刺激未成熟骨髓细胞的增殖以及激活成熟嗜中性粒细胞对细菌的杀伤。红细胞生成素(EPO)和血小板生成素(TPO)是结构相似的细胞因子，分别支持红细胞类谱系和巨核细胞谱系以及更原始祖先的增殖和分化(Gotoh 等 1997 Ann Hematol 75: 207-213)。 TPO 通过结合于造血受体家族一成员 Mpl 受体而启动其生物效应(Broudy 等 1997 Blood 89: 1896-1904)。已经表明 HOXB4 是非常早期的重要调节物，而不是晚期造血细胞增殖

的重要调节物(Sauvageau 等 1995 Genes Dev 9: 1753-1765)。可溶性 Kit 配体蛋白(Kls)作为跨膜酪氨酸激酶受体 C-kit 的配体起作用，并刺激肥大细胞和红细胞类祖先(91EP-810609)。白介素包括 IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6 和 IL-12，它们能够激活 HSC (参见"Molecular Biology and Biotechnology 编辑 RA Meyers 1995 VCH Publishers Inc 第 392-397 页)。

这些介质在血生成的正调节中是重要的，主要得自骨髓中的基质细胞，但它们也由成熟形式的分化的骨髓细胞和淋巴样细胞产生。有许多成功的生长因子组合可使用，但在原始细胞上有活性的 IL-3 和 IL-6 以及具有或不具有其它因子(诸如干细胞因子(SCF))的组合已经得到最佳结果(Bodine 等 1989 Proc Natl Acad Sci 86: 8897-8901; Luskey 等 1992 Blood 80: 396-402; Fraser 等 1990 Blood 76: 1071-1076)。其它细胞因子(诸如 TGFβ)可以向下调节血生成。

CFU-GM 细胞是嗜中性粒细胞和单核吞噬细胞的前体。由于 CFU-GM 沿嗜中性粒细胞途径分化，因此可以观察到几种不同的形态学阶段。原粒细胞发育为早幼粒细胞和中幼粒细胞，它们成熟并作为嗜中性粒细胞释放到循环中。由 CFU-GM 至成熟嗜中性粒细胞的单向分化可能是于不同发育阶段获得特定生长/分化因子受体的结果。

由于所述细胞发育为粒细胞，因而所述细胞上的表面分化标记消失或出现。例如，II 类 MHC 和 CD38 在 CFU-GM 上表达，但不在成熟的嗜中性粒细胞上表达。在分化过程中获得的其它表面分子包括 CD13、低密度的 CD14、CD15、β_1 整联蛋白、VLA-4、与 CD18 β_2 链相关的 β_2 整联蛋白 CD11a、b 和 c、补体受体和 CD16 Fcγ 受体。

采用单核细胞途径的 CFU-GM 最初产生增殖性原单核细胞。这些细胞分化为幼单核细胞，最后分化为成熟循环单核细胞。循环单核细胞被认为是组织停留巨噬细胞的取代库。不同形式的巨噬细胞包括视网膜内皮系统。

同成熟的嗜中性粒细胞一样，成熟的单核细胞和巨噬细胞丧失了

CD34．然而，与嗜中性粒细胞不同，它们继续表达显著水平的 II 类 MHC 分子。这些分子显然对于将抗原提呈给 T 细胞是重要的。单核细胞也与成熟的嗜中性粒细胞一样获得许多的这些表面分子。

除巨噬细胞外，出生时存在大多数典型的抗原提呈细胞(APC)，包括小结树突细胞、朗格汉斯细胞和交错突细胞。尽管其起源仍不清楚，但可能大多数得自骨髓干细胞。一种可能性是，它们得自相同的 CFU-GEMM 前体，则细胞形态、细胞化学和功能的差异可以是由于局部微环境的影响，诸如细胞因子。或者， APC 可能得自不同的干细胞，并且代表单独的分化谱系。

在分化为集落形成细胞(诸如 CFU-GEMM)的第一阶段， HSC 表达 CD33 和 CD34．因此， HSC 通常可以根据细胞表面的细胞糖蛋白 CD34 (可能是 CD33)的存在来特征鉴定。

在分化为红细胞类谱系、骨髓单核细胞谱系和巨核细胞谱系的下一阶段中，重要的红细胞类谱系的爆发集落形成单位-红细胞类(BFUE)细胞携带抗原 CD33 和 CD34，但这些抗原在后来的分化中丧失。包括 CFU-GM 细胞在内的骨髓单核细胞谱系携带 CD33，但不携带 CD34，并且这种 CD33 随后丧失。巨核细胞谱系最初产生携带 CD34 的 CFU Mega 细胞， CD34 也随后丧失。

HSC 和其它细胞上再一重要的抗原系统是 II 类 MHC (主要组织相容性复合物)群。已经发现，大多数 HSC 携带称为 DR 的抗原，并且在分化时表达称为 DP 的抗原，然后表达另一称为 DQ 的抗原。因此， II 类 MHC DR 抗原是相对早期干细胞的特征。

分离 HSC 及其在培养物中维持和分化的方法在本领域(Santiago-Schwartz 等 1992 J Leuk Biol 52:274-281; Charbord 等 1996 Br J Haematol 94:449-454; Dao 等 1997 Blood 89: 446-456; Piacibello 等 1997 Blood 89: 2644-2653)和 WO91/09938 中是已知的。也描述了反转录病毒介导的 HSC 转导以及转移至患者的方法(Dunbar 等 1996 Hum Gene Ther 7:231-253).

将本发明的工程HSC以合适的制剂给予患者或有风险的个体。所述制剂可以包括等渗盐水溶液、缓冲盐溶液或组织培养基。通过大剂量注射或通过静脉内输注给予所述细胞，或将所述细胞直接给予肿瘤部位或给予骨髓，其浓度例如为约 10^6 和大约 10^{12} 细胞/剂之间。

所述个体可以首先进行治疗，以耗尽骨髓干细胞，或用一种或多种诸如 G-CSF 的细胞因子进行治疗，以增加干细胞移动到外周血中，或用一种或多种细胞因子治疗，以增强骨髓的种群恢复。也设想了这类处理的组合。本发明的疗法可以与目前可利用的抗癌疗法联合。

在用于干细胞工程的载体编码前体药物活化酶的情况下，癌症患者另外用相应的前体药物治疗，按照本领域已知的原理，采用适当的方案给药。

如上所述，本发明基于一个惊人的发现：用特别是 IRLE 转化一种或多种 HSC 并用于特定目的是可能的。

一种优选的 IRLE 是低氧效应元件。

通过存在一种或多种低氧效应增强子(HRE)元件，诱导在低氧条件下治疗基因提高的表达。 RHE 元件含有可以位于所述启动子和/或治疗基因上游(5')或下游(3')的多核苷酸序列。HRE增强子元件(HREE)通常为反式作用元件，通常长约 10-300 bp，它作用于启动子，以增加所述启动子控制下的基因的转录。最好是，选择所述启动子和增强子元件，使得由这些元件调节的基因的表达在存在健康供应氧的情况下最小，而在低氧或缺氧条件下向上调节。

术语“低氧”是指特定器官或组织接受的氧供应不足的情况。

低氧效应元件也可以选自例如红细胞生成素 HRE 元件(HREE1)、肌肉丙酮酸激酶(PKM)、RHE元件、B-烯醇化酶(烯醇化酶3； ENO3) HRE 元件、内皮缩血管肽-1 (ET-1) HRE 元件和金属硫蛋白 II (MTII) HRE 元件。

低氧调节增强子的再一实例是转录因子 HIF-1 的结合元件(Dachs 等 1997 Nature Med 5: 515; Wang 和 Sememnza 1993 Proc Natl Acad Sci

USA 90:4304; Firth 等 1994 Proc Natl Acad Sci USA 91: 6496). 也发现低氧效应增强子元件与许多基因相连，包括红细胞生成素(EPO)基因(Madan 等 1993 Proc Natl Acad Sci 90: 3928; Semenza 和 Wang 1992 Mol Cell Biol 1992 12: 5447-5454)。已经从肌肉糖酵解酶和丙酮酸激酶(PKM)基因(Takenaka 等 1989 J Biol Chem 264: 2363-2367)、人肌肉特异性β-烯醇化酶基因(ENO3; Peshavaria 和 Day 1991 Biochem J 275: 427-433)和内皮缩血管肽-1 (ET-1)基因(Inoue 等 1989 J Biol Chem 264: 14954-14959)中均分离出其它 HREE。

或者，可以通过葡萄糖浓度调节治疗基因的表达。

例如，诸如 grp78 和 grp79 的葡萄糖调节蛋白(grp)是高度保守的蛋白，已知它们由葡萄糖缺乏诱导(Attenello 和 Lee 1984 Science 226 187-190)。在基础水平的启动子元件影响下，grp78 基因在大多数正常健康的组织中以低水平表达，但在 TATA 元件上游具有至少两个关键的“胁迫诱导型调节元件”(Attenello 1984 出处同上; Gazit 等 1995 Cancer Res 55: 1660-1663)。连接至 grp78 启动子的 5’端截短的 632 个碱基对序列，在体外赋予葡萄糖缺乏对报道基因的高诱导性(Gazit 等 1995 出处同上)。此外，在反转录病毒载体中该启动子序列能够驱动在鼠类纤维肉瘤的肿瘤细胞中、特别是在中心相对局部缺血/纤维变性部位，高水平地表达报道基因(Gazit 等出处同上)。

相信本发明具有广泛的治疗适用性 - 取决于特别是一种或多种 NOI 的选择。

例如，本发明可以用于治疗 WO-A-98/05635 中所列的疾病。为了易于参考，现在提供部分该表：癌症、炎症和炎症疾病、皮肤病、发热、心血管效应、出血、血凝固和急性期反应、恶病质、厌食、急性感染、HIV 感染、休克状态、移植物抗宿主病、自身免疫病、再灌注损伤、脑膜炎、偏头痛和阿斯匹林依赖性抗血栓形成；肿瘤的生长、侵入和扩散、血管生成、转移、恶性腹水和恶性胸膜渗漏；脑局部缺血、局部缺血性心脏病、骨关节炎、类风湿性关节炎、骨质疏松、哮

喘、多发性硬化、神经变性、早老性痴呆、动脉粥样硬化、中风、脉管炎、节段性回肠炎和溃疡性结肠炎；牙周炎、龈炎；牛皮癣、特应性皮炎、慢性溃疡、大疱性表皮松解；角膜溃疡、视网膜病和手术伤口愈合；鼻炎、过敏性结膜炎、湿疹、过敏反应；再狭窄、充血性心力衰竭、子宫内膜异位、动脉粥样硬化或 endosclerosis。

另外，或在替代方法中，本发明可以用于治疗 WO-A-98/07859 中所列的疾病。为了易于参考，现在提供部分该表：细胞因子和细胞增殖/分化活性；免疫抑制或免疫刺激活性(例如用于治疗免疫缺陷，包括感染人免疫缺陷病毒；调节淋巴细胞的生长；治疗癌症和许多自身免疫病，和预防移植排斥或诱导肿瘤免疫)；调节血生成，例如治疗骨髓疾病或淋巴疾病；促进骨、软骨、腱、韧带和神经组织的生长，例如用于使伤口愈合、治疗烧伤、溃疡和牙周病和神经变性；抑制或激活促卵泡激素(调节生育力)；趋化活性(例如使特定的细胞类型移动至伤害位点或感染位点)；止血或溶解血栓活性(例如用于治疗血友病和中风)；抗炎活性(用于治疗例如脓毒性休克或节段性回肠炎)；作为抗微生物药；例如代谢或行为的调节物；作为镇痛药；治疗特定的缺陷疾病；用于治疗例如牛皮癣，用于人类或兽医医学领域。

另外，或在替代方法中，本发明可以用于治疗 WO-A-98/09985 中所列的疾病。为了易于参考，现在提供部分该表：巨噬细胞抑制活性和/或 T 细胞抑制活性和由此的抗炎活性；抗免疫活性，即对细胞免疫应答和/或体液免疫应答的抑制效应，包括与炎症不相关的应答；抑制巨噬细胞和 T 细胞附着于细胞外基质组分和纤连蛋白的能力，以及向上调节 T 细胞中 fas 受体的表达；抑制不想要的免疫反应和炎症，包括关节炎，包括类风湿性关节炎、与过敏性相关的炎症、变态反应、哮喘、系统性红斑狼疮、胶原疾病和其它自身免疫病、与动脉粥样硬化相关的炎症、动脉粥样硬化、动脉粥样硬化性心脏病、再灌注损伤、心博停止、心肌梗塞、血管炎症疾病、呼吸窘迫综合征或其它心肺疾病、与消化性溃疡、溃疡性结肠炎和其它胃肠道疾病相关的炎症、肝

纤维变性、肝硬变或其它肝病、甲状腺炎或其它腺体疾病、肾小球性肾炎或其它肾病和泌尿学疾病、耳炎或其它耳鼻咽疾病、皮炎或其它皮肤病、牙周病或其它牙病、睾丸炎或附睾炎(dpididimo-orchitis)、不育症、睾丸创伤或其它免疫相关的睾丸疾病、胎盘功能障碍、胎盘机能不全、习惯性流产、子痫、先兆子痫和其它免疫和/或炎症相关的妇科疾病、后色素层炎、中色素层炎、前色素层炎、结膜炎、脉络膜视网膜炎、眼色素层视网膜炎(uveoretinitis)、视神经炎、眼内炎症例如视网膜炎或囊性斑状水肿(cystoid macular oedema)、交感性眼炎、巩膜炎、色素性视网膜炎、退行性 fondus 病的免疫和炎性组分、眼外伤的炎性组分、眼部炎症、由感染引起的眼炎、增生性玻璃体-视网膜病(vitreo-retinopathy)、急性局部缺血性视神经病、例如在青光眼过滤手术后的过度瘢痕形成、针对眼植入物的免疫和/或炎性反应以及其它免疫和炎症相关的眼病、与自身免疫病相关的炎症或在中枢神经系统(CNS)或任何其它器官中免疫和/或炎症抑制将为有益的病症或障碍、Parkinson 病、由治疗 Parkinson 病引起的并发症/或副作用、 AIDS 相关的痴呆综合征 HIV 相关的脑病、 Devic 病、 Sydenham 舞蹈病、早老性痴呆和 CNS 的其它退行性疾病、病症或障碍、中风的炎性组分、小儿麻痹后综合征、精神障碍的免疫和炎性组分、脊髓炎、脑炎、急性硬化性全脑炎、脑脊髓炎、急性神经病、亚急性神经病、慢性神经病、 Guillaim-Barre 综合征、 Sydenham 舞蹈病、重症肌无力、脑假肿瘤、 Down 综合征、 Huntington 病、肌萎缩性侧索硬化、 CNS 压迫或 CNS 外伤或 CNS 感染的炎性组分、肌肉萎缩和营养不良的炎性组分、以及中枢神经系统和外周神经系统的免疫和炎症相关的疾病、病症或障碍、外伤后炎症、脓毒性休克、传染病、手术的炎症并发症或副作用、骨髓移植或其它移植并发症和/或副作用、例如由于感染病毒载体引起的基因治疗的炎症和/或免疫并发症和副作用、与 AIDS 相关的炎症、为了抑制体液和/或细胞免疫应答、为了通过减少单核细胞或淋巴细胞的量来治疗或减轻单核细胞或白血病增生性疾病例如白血病、在

移植天然或人工细胞、组织或器官(诸如角膜、骨髓、器官、晶状体、起博器、天然或人工皮肤组织)的情况下用于预防和/或治疗移植排斥。

可以单独应用或结合其它治疗和所述治疗组分应用用按照本发明的载体系统进行的一种或多种 NOI 的传递。

如上所述，本发明的优选方面基于一个惊人的发现：用反转录病毒载体转化一种或多种 HSC 并用于特定目的的可能的。

本发明的甚至更优选的方面基于一个惊人的发现：装配慢病毒载体以增强所述载体的体外产生或体内对正常生理信号应答而调节基因表达，这是可能的。

先前的工作已经表明，可能研制基于慢病毒科成员的载体，所述成员包括 HIV-1、HIV-2、SIV、FIV 和 EIAV。迄今为止，所有所述载体或者组成型表达治疗基因，或者对所述病毒载体本身的天然调节信号应答而表达治疗基因。或者任一种结构对于治疗需要基因表达水平受控的疾病均没有广泛的实用性。我们现在首次描述对低氧或对模拟低氧的药物应答的慢病毒载体。在体外可以利用这种调节来增强该载体的产生，并且它可以用于体内调节对正常生理信号应答的基因表达。这类载体在范围广泛的特征为局部缺血的疾病中具有实用性，所述疾病例如为心血管疾病、外周动脉疾病、癌症和关节炎。

尽管进行了深入的研究，但迄今尚未描述含有受调节基因的慢病毒载体，从文献中尚不清楚这种载体可以产生。这种载体对许多疾病具有广泛的实用性。我们现在已经产生了一组慢病毒载体，所述载体受组织生理和化学调节物的调节。可以装配这些载体，其中所述表达盒置于上述载体内部。然而，我们已经表明，作为单一转录单位载体装配这类载体有另一优点。在该装配中，调节序列的所得重复增强所述应答。我们已经研究的调节系统利用基因表达对局部缺血应答而激活的事实。局部缺血的生理标记是低氧、低 pH 和低葡萄糖，这些条件在细胞中被感觉到，导致一组有限基因的激活。一组这种基因含有所述 DNA 中主要介导对低氧应答的序列，这些序列是低氧效应元件

(HRE)。先前在专利申请[PCT/GB95/00322; PCT/GB97/02709]和文献(例如 Dachs 等 1997 出处同上)中，已经描述了使用这些元件驱动质粒、反转录病毒和腺病毒载体中的基因的表达。然而，先前尚未证明它们在慢病毒载体中具有实用性。

除对低氧应答外，所述 HRE 元件已知对模拟低氧的化学诱导物应答。其中两种这些诱导物是已知的，它们是钴和去铁敏(Meliillo 等 1996 J. Biol. Chem 272, 12236-12243; Wang 和 Semenza 1993, Blood, 82, 3610)。

对于用于局部缺血明显的任何疾病、或对于其中可以使用化学激活蛋白去铁敏或类似的化学药物的任何疾病，例如成神经细胞瘤(Blatt 1994, Anticancer Res., 14, 2109)、β 地中海贫血(Giardina 和 Grady 1995, Semin. Hematol. 32, 304)、早老性痴呆(Crapper 等 1991, The Lancet, 337, 1304)、 VEGF 缺乏(Beerrepoot 等 1996, 56, 3747)、红细胞生成素缺乏(Wang 和 Semenza 在所引用的书中)和肿瘤化疗的增强(Voest 等 1993, Cancer Chemother. Pharmacol. 31, 357)，本发明适用于在任何细胞类型中使用的任何慢病毒载体。

正如本领域众所周知的，载体是允许或促进一种实体从一种环境转移至另一种环境的工具。按照本发明，并且作为实例，用于重组 DNA 技术的某些载体允许诸如 DNA 区段(诸如异源 DNA 区段，诸如异源 cDNA 区段)的实体转移入靶细胞。可任选地，一旦处于靶细胞中，所述载体则可以用来将异源 DNA 维持在所述细胞中，或可以用作 DNA 复制单位。用于重组 DNA 技术的载体的实例包括质粒、染色体、人工染色体或病毒。

所述载体可以通过病毒或非病毒技术传递。

非病毒传递系统包括但不限于 DNA 转染法。在此，转染包括使用非病毒载体将基因传递至靶哺乳动物细胞的过程。

典型的转染方法包括电穿孔、 DNA 生物发射(biolistics)、脂质介导的转染、紧密(compacted) DNA 介导的转染、脂质体、免疫脂质体、

脂转染试剂、阳离子试剂介导的转染、阳离子表面两亲物(CFA) (Nature Biotechnology 1996 14; 556)、多价阳离子诸如精胺、阳离子脂质或聚赖氨酸、 1,2-双(油酰氧基)-3-(三甲基铵基)丙烷(DOTAP)-胆固醇复合物(Wolff 和 Trubetskoy 1998 Nature Biotechnology 16: 421)和它们的组合物。

病毒传递系统包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、反转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体。其它的载体实例包括体外传递系统，它们包括但不限于 DNA 转染法，诸如电穿孔、 DNA 生物发射、脂质介导的转染、紧密 DNA 介导的转染。

所述载体可以是质粒 DNA 载体。合适的重组病毒载体包括腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体或优选为反转录病毒载体。在病毒载体的情况下，基因传递通过病毒感染靶细胞而介导。

本发明的载体可以作为断裂-内含子载体构建。断裂内含子载体描述于 GB 9720465.5，现在在要求其优先权(题目为载体)并于该 PCT 专利申请同日申请的 PCR 专利申请中进行了描述。为了易于参考，该 PCT 专利申请要求：包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点的反转录病毒载体；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列("NOI")；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体(pro-vector)；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列(NS)和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二 NS ；其中所述第一 NS 位于所述第二 NS 上游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。在该申请中，所述第一 NOI 为本文定义的 NOI 。在以下提供的实施例小节结尾处，提供了断裂内含子方面的内容。这些内容提供了关于该优选方面－即如何构建断裂内含子病毒载体的信息。

因此，在本发明的该优选方面，提供修饰的细胞，它包含在该细胞中有活性的元件；和一个 NOI；其中通过用一种或多种反转录病毒载体经病毒转导转化细胞，制备所述修饰的细胞，其中至少一种所述反转录病毒载体包含所述 NOI；其中所述反转录病毒载体包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列("NOI")；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列(NS)和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二 NS；其中所述第一 NS 位于所述第二 NS 上游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。

本发明的载体可以是腺病毒载体。

腺病毒是一种双链线性 DNA 病毒，它不经过 RNA 中间体。根据基因序列的同源性，将超过 50 种不同的人血清型腺病毒分为 6 个亚群。腺病毒的天然靶是呼吸道上皮和胃肠道上皮，一般仅产生轻度症状。血清型 2 和 5 (具有 95%序列同源性)最常用于腺病毒载体系统中，通常与年轻人的上呼吸道感染相关。

腺病毒是无包膜的规则二十面体。典型的腺病毒包括 140nm 壳内 DNA 病毒。二十面体对称的该病毒由 152 个壳粒组成： 240 个六邻体和 12 个五邻体。所述颗粒的核心含有 36 kb 线性双链体 DNA，它于 5'端与用作 DNA 复制引物的末端蛋白(TP)共价连接。所述 DNA 具有反向末端重复序列(ITR)，其长度随血清型而变化。

腺病毒进入细胞涉及一系列不同的事件。病毒通过病毒纤丝(37 nm)和细胞上的纤丝受体的相互作用而附着于细胞。 Ad2/5 血清型的该受体最近已经鉴定出，命名为 CAR (Coxsackie 和 Adeno 受体, Tomko 等(1997 Proc Natl Acad Sci 94:3352-3358). 所述病毒通过细胞αvβ3 和αvβ5 整联蛋白内化入内体，是由五邻体-碱性壳体蛋白(base capsid

protein)中的病毒 GRD 序列介导的(Wickham 等, 1993 Cell 73: 309-319)。内化后，内体通过称为内体裂解(endosomolysis)的过程破裂，据信这是由细胞αvβ5 整联蛋白优先促进的事件(Wickham 等 1994 J Cell Biol 127: 257-264)。另外，最近有证据表明， Ad5 的纤丝隆起以高亲和性结合于某些细胞类型表面上的 1 类 MHC α2 结构域，所述细胞类型包括上皮细胞和 B 原淋巴细胞(Hong 等， 1997 EMBO 16: 2294-2306)。

随后，病毒易位至细胞核，在此发生早期区的激活，并且不久后进行 DNA 复制和激活晚期区。腺病毒 DNA 的转录、复制和包装需要宿主和病毒两者的功能性蛋白机器。

病毒基因的表达可以分为早期(E)和晚期(L)。晚期定义为病毒 DNA 复制的开始。腺病毒结构蛋白一般在晚期合成。在腺病毒感染后，在感染大多数血清型的细胞中，宿主细胞 mRNA 和蛋白的合成被抑制。腺病毒 2 和腺病毒 5 的腺病毒裂解循环非常有效，每个受感染细胞产生约 10,000 病毒体，并且合成过量的病毒蛋白和不加入病毒体中的 DNA。早期腺病毒转录是相关互连的生化事件的复杂顺序，但它主要需要在 DNA 复制开始之前合成病毒 RNA。

图 34 的示意图是腺病毒基因组的示意图，显示早期和晚期基因转录的相对方向和位置。腺病毒基因组的结构在所有腺病毒群中是相似的，特定的功能一般位于所研究的每种血清型的相同位置。早期胞质信使 RNA 与病毒 DNA 上的四个限定的非相连区互补。这些区命名为 E1-E4 。早期转录物已经分类为一系列的立即早期(E1a)、延迟早期(E1b 、 E2a 、 E2b 、 E3 和 E4)以及中间区(intermediate region)。

早期基因在感染后约 6-8 小时表达，并由基因区段 E1-4 中的 7 个启动子驱动。

E1a 区参与病毒基因和细胞基因的转录反式激活以及其它序列的转录阻抑。E1a基因对所有其它早期腺病毒信使RNA发挥重要的控制功能。在正常组织中，为了有效地转录 E1b 、 E2a 、 E2b 、 E3 或 E4

区，需要活性E1a产物。然而，可以绕过E1a功能。可以调节细胞，以提供E1a样功能，或可以天然含有这类功能。也可以操作病毒以绕过E1a功能。病毒包装信号与E1a增强子(194-358 nt)重叠。

E1b区影响病毒和细胞的代谢和宿主蛋白的关闭。也包括编码pIX蛋白的基因(3525-4088 nt)，包装全长病毒DNA需要此蛋白，它对于病毒的热稳定性是重要的。感染晚期病毒事件的正常进程需要病毒 E1b区。 E1b产物在宿主细胞核中起作用。在E1b序列中产生的突变体表现出晚期病毒mRNA积累减少以及对腺病毒感染晚期正常观察到的宿主细胞转运的抑制受损。改变宿主细胞功能需要E1b，使得加工和转运改变而有利于病毒晚期基因产物。这些产物则导致病毒包装并释放病毒体。E1b产生防止细胞凋亡的19 kD蛋白。E1b也产生结合于p53的55 kD蛋白。关于腺病毒及其复制的综述，参见WO 96/17053 。

E2区是必需的，因为它编码72 kDa DNA结合蛋白、 DNA聚合酶和55 kDa末端蛋白(TP)的80 kDa前体， TP是起始DNA合成的蛋白引发所需的。

19 kDa蛋白(gp 19K)在E3区中编码，它与调节宿主对病毒的应答有关。在感染的第一阶段该蛋白的表达对TNFα应答而向上调节，该蛋白然后结合I类MHC抗原并防止该抗原迁移至上皮细胞表面，由此减少细胞毒T淋巴细胞对腺病毒感染的细胞的识别。在体外研究中E3区是不必要的，并且可以通过缺失1.9 kb *Xba*I片段而被去除。

E4区涉及减少宿主蛋白的合成并增加病毒的DNA复制。

有5个家族的晚期基因，所有这些晚期基因均从主要晚期启动子起始。晚期基因的表达包括涉及RNA剪接的非常复杂的转录后控制机制。纤丝蛋白在L5区中编码。腺病毒基因组邻接反向末端重复序列，所述序列在Ad5中为103 bp，并且是DNA复制所必需的。感染后30-40小时，完成病毒的生产。

可以通过缺失对E2、 E3和E4启动子诱导重要的E1基因来转变腺病毒，以用作基因转移的载体。 E1复制缺陷型病毒可以在反式提供

E1 多肽的细胞系中繁殖，所述细胞系诸如人胚肾细胞系 293。可以通过重组，插入一种或多种治疗基因来取代 E1 基因。由或者 E1 启动子或者异源启动子驱动该基因的表达。

通过缺失某些或所有 E4 可读框(ORF)，已经研制出甚至更加减毒的腺病毒载体。然而，某些第二代载体看来不产生长期的基因表达，即使所述 DNA 似乎被保持。因此，看来一种或多种 E4 ORF 的功能可以增强来自病毒携带的至少某些病毒启动子的基因表达。

制造缺陷更多的病毒的替代方法已经将所述病毒完全“去内脏”，仅保留病毒复制所需的末端重复序列。用第一代辅助病毒，已经在 293 细胞系中使“去内脏的”或“无内脏的”病毒生长至高滴度，但难以从辅助病毒中分离出“去内脏的”载体。

有复制能力的腺病毒也可以用于基因治疗。例如，可以将 E1a 基因插入第一代病毒中，处于肿瘤特异性启动子的调节之下。理论上，在将病毒注射入肿瘤后，病毒可以在肿瘤中特异性地复制，但在周围正常细胞中不复制。该类型的载体可以或者用来通过裂解直接杀伤肿瘤细胞，或者用来传递“自杀基因”，诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV *tk*)，它可以在用丙氧鸟苷处理后杀伤受感染细胞和旁观者细胞。或者，仅 E1b 缺陷的腺病毒已经特别在 1 期临床试验中用于抗肿瘤治疗。由 E1b 编码的多肽能够阻断 p53 介导的细胞凋亡，防止细胞对病毒感染应答而自杀。因此，在正常的非肿瘤细胞中，在缺乏 E1b 时，病毒不能阻断细胞凋亡，并因此不能产生感染性病毒并传播。在 p53 缺陷型肿瘤细胞中，E1b 缺陷型病毒可以生长并传播至相邻的 p53 缺陷型肿瘤细胞，而不传播至正常的细胞。再者，该类型的载体也可以用来传递诸如 HSV *tk* 的治疗基因。

作为用于基因传递的载体，腺病毒提供优于其它基因治疗载体系统的优点，原因如下:

它是双链 DNA 无包膜病毒，能够在体内和体外转导范围广泛的人类和非人类起源的细胞类型。这些细胞包括呼吸道上皮细胞、肝细

胞、肌细胞、心肌细胞、滑膜细胞、初级乳房上皮细胞和有丝分裂后终末分化的非复制细胞，诸如巨噬细胞、神经元(也许重要的例外为某些淋巴样细胞，包括单核细胞)。

腺病毒载体能够转导分裂细胞，也能够转导非分裂细胞。对于诸如囊性纤维化、其中肺上皮中的受感染细胞周转率慢的疾病而言，这是非常重要的。事实上，正在进行的几个试验利用腺病毒介导的将囊性纤维化转运蛋白(CFTR)转移入受影响的囊性纤维化成年患者的肺脏中。

腺病毒已经用作基因治疗的载体，并用于表达异源基因。第一代重组腺病毒载体(E1/E3 缺失)可以容纳 7-8kb 外源插入片段 DNA，第二代(E1/E3/E4 缺失)和第三代(“无内脏”)可以携带大得多的 DNA 插入片段。重组腺病毒载体可以繁殖并累积到非常高的滴度。腺病毒载体在互补细胞系中复制，可以产生非常高滴度，至多 10^{13} 病毒颗粒/ml。因此，腺病毒是研究基因在初级非复制型细胞中表达的最佳系统之一。

由腺病毒基因组表达病毒基因或外源基因，不需要复制型细胞。腺病毒载体通过受体介导的内吞作用进入细胞。一旦在细胞内，腺病毒载体极少整合入宿主染色体中。而是它在染色体外(独立于宿主基因组)作为线性基因组在宿主细胞核中发挥作用。因此，使用重组腺病毒缓解了所述问题，并避免了与随机整合入宿主基因组中相关的风险。

人类恶性肿瘤与腺病毒感染无关。已经研制出减毒的腺病毒株，并已经作为肝脏疫苗用于人类。

然而，目前的腺病毒载体对于体内治疗应用有一些主要的限制。这些限制包括：(i)瞬时基因表达－腺病毒载体一般保持为附加体并且不复制，使得它不能传递到随后的子代，(ii)因为它不能复制，所以靶细胞的增殖可能导致稀释该载体，(iii)产生针对腺病毒蛋白的免疫应答，使得甚至低水平表达腺病毒蛋白的细胞被破坏，(iv)不能得到有效的治疗指数，因为体内的传递导致仅在一部分靶细胞中摄入该载体并

表达所传递的基因，(v)腺病毒的广泛的靶范围可以对于基因治疗方法产生一些问题，基因治疗方法需要导向患病组织，而对正常组织的毒性最小。对于该载体系统而言，可以用来将治疗集中于所需区室的任何额外的控制均可能是有利的。

用于本发明的腺病毒载体可以衍生自人腺病毒或通常不感染人类的腺病毒。所述载体最好衍生自 2 型腺病毒或 5 型腺病毒(Ad2 或 Ad5)、或小鼠腺病毒或鸟类腺病毒，诸如 CELO 病毒(Cotton 等 1993 J Virol 67: 3777-3785)。所述载体可以是具有复制能力的腺病毒载体，但更优选是缺陷型腺病毒载体。可以通过缺失病毒复制必需的一种或多种组分，使腺病毒载体为缺陷型。通常，每个腺病毒载体含有至少一个 E1 区的缺失。为了产生感染性腺病毒载体颗粒，通过使病毒在诸如人 293 细胞系的人胚胎成纤维细胞细胞系中传代，可以互补这一缺失，其中 293 细胞系含有整合拷贝的 Ad5 的左边部分，包括 E1 基因。异源 DNA 插入这类载体的容量可以至多为 7 kb。因此，这类载体可以用来构建按照本发明的包含三种分离重组载体的系统，每种载体含有其中一个必需的转录单位以用于构建所述反转录病毒第二载体。

迄今为止，尚未有关于生理调节的重组腺病毒的公开资料。然而，在腺病毒载体方面已经研究的许多组织特异性启动子的其中 5 种启动子描述如下:

胰腺炎相关蛋白 I 启动子(它在胰腺炎急性期被强诱导)显示，在用 IL6 和地塞米松组合进行体外刺激后，在 AR-42J 胰腺细胞系中诱导 90 倍的 CAT 活性(Dusetti 等 1997 J. Biol. Chem. **272**(9) 5800-5804)。小鼠体内试验(通过静脉注射入尾静脉给予腺病毒)表明，在患有胰腺炎的动物中诱导高 10 倍的活性(在对照动物的某些其它组织中观察到低活性的 CAT)。

构建含有鼠类甲胎蛋白启动子的重组腺病毒，以指导人白介素-2 基因的肝细胞(HCC)特异性表达。在 AFP 生产的 HCC 细胞系中，IL-2 的表达比非 AFP 生产的非 HCC 系高 3-4 倍(Bui 等 1997 Human Gene

Therapy. 8 2173-2182)。将 AdVAFP1-IL2 肿瘤内注射入在 CB-17/SCID 小鼠的背侧确立的 Hep3B 肿瘤，在 3 次注射后导致明显的生长停止和肿瘤消退。

构建重组腺病毒，它含有控制或者 lacZ 、 EGFG 或者肌内质网 (sarcoendoplasmic reticulum) Ca-ATP 酶(SERCA)基因表达的心肌钙蛋白 T (cTnT)启动子区段(Inesi 等 1998 American J. Physiol. 274(3,1) C645-C653)。然后，所述重组病毒可以用来转导培养物中的鸡肌细胞和成纤维细胞，显示来自 cTnT 启动子的表达局限于心肌细胞。

平滑肌特异性启动子(SM22α)用来驱动细菌 lacZ 报道基因在重组腺病毒中的表达(Kim 等(1997 J. Clin. Invest. 100(5) 1006-1014)。在初级大鼠主动脉 SMC 和无限增殖化 A7r5 SMC 中检测到表达，但在 HUVEC 或 NIH3T3 细胞中没有检测到表达。将所述重组腺病毒静脉注射入 Sprague Dawley 大鼠中，尽管来自 CMVlacZ 腺病毒的表达在整个肝脏和肺脏中检测到，但在这些组织中任何一个中均没有检测到来自 SM22 驱动的 lacZ 腺病毒的表达，转基因表达局限于 SMC 。该论文的结论陈述：当动脉内、静脉内或肌内给予所述病毒时， AdSMCC-lacZ 表达限于内脏和血管 SMC 。

将 KDR 和 E-选择蛋白启动子工程改造，以在内皮细胞中向上调节来自 SIN 反转录病毒载体的鼠类 TNF-α 的表达(Jaggar 等 1997 Human Gene Therapy 8(18) 2239-2247)。观察到，与 NIH-353 成纤维细胞相比，在 sEND 内皮细胞中来自这些启动子元件的表达增加 10 倍。

如果将腺病毒的特征与反转录病毒/慢病毒的遗传稳定性结合，则基本上可以用所述腺病毒来转导靶细胞，使其成为可以稳定感染相邻细胞的瞬时反转录病毒生产细胞。

按照本发明使用的优选载体是重组病毒载体，特别是重组反转录病毒载体。

按照本发明使用的优选载体是重组病毒载体，特别是重组腺病毒载体。

按照本发明使用的优选载体是重组病毒载体，特别是腺病毒载体和反转录病毒载体的组合。

术语“重组反转录病毒载体”(RRV)是指这样的载体，它具有足够的反转录病毒遗传信息，以在存在包装组分的情况下，允许将RNA基因组包装为能够感染靶细胞的病毒颗粒。靶细胞的感染包括反转录和整合入靶细胞基因组中。使用的RRV携带将由所述载体传递至靶细胞的非病毒编码序列。RRV不能独立复制，以在最终的靶细胞中产生感染性反转录病毒颗粒。通常，所述RRV缺乏功能性*gag-pol*和/或*env*基因和/或复制必需的其它基因。

当本发明使用将NOI或基因体内传递至HSC的载体时，所述载体最好是能够导向$CD34^+$ HSC的定向载体。

术语“定向载体”是指感染/转染细胞或在靶细胞中表达的能力限于宿主生物中某些细胞类型的载体，所述细胞类型通常是具有共同表型或相似表型的细胞。

定向载体的一个实例是具有基因修饰包膜蛋白的定向反转录病毒载体，所述包膜蛋白结合于仅在宿主生物数目有限的细胞类型中发现的细胞表面分子。定向载体的另一个实例是含有仅允许一种或多种反转录病毒转录物在宿主生物一部分细胞类型中表达的启动子/增强子元件的载体。因此，可以为所述载体提供CD34特异性的配体，诸如导向CD34的抗体或免疫球蛋白样分子。当引入被治疗个体中时，这种载体将特异性地转染$CD34^+$ HSC。所述载体可以系统给予至外周循环。

按照本发明的反转录病毒载体颗粒也将能够转导缓慢分裂的细胞、以及诸如MLV的非慢病毒不能有效转导的细胞。包括某些肿瘤细胞在内的缓慢分裂的细胞，约每3-4天分裂一次。尽管肿瘤含有快速分裂细胞，但某些肿瘤细胞尤其是肿瘤中心的细胞很少发生分裂。

可以用本发明治疗的肿瘤实例包括但不限于：包括成骨性肉瘤和软组织肉瘤的肉瘤；诸如乳腺癌、肺癌、膀胱癌、甲状腺癌、前列腺

癌、结肠癌、直肠癌、胰腺癌、胃癌、肝癌、子宫癌和卵巢癌的癌症；包括 Hodgkin 和非 Hodgkin 淋巴瘤在内的淋巴瘤；成神经细胞瘤、黑素瘤、骨髓瘤、 Wolms 肿瘤；和白血病，包括急性成淋巴细胞型白血病和急性成髓细胞型白血病；神经胶质瘤和成视网膜细胞瘤。

或者，靶细胞可以是能够经历细胞分裂的生长停滞的细胞，诸如肿瘤块中心部分的细胞或诸如 HSC 的干细胞或 $CD34^+$细胞。作为另一种选择，靶细胞可以是分化细胞前体，诸如单核细胞前体、 $CD33^+$细胞或骨髓前体。作为再一选择，靶细胞可以是分化细胞，诸如神经元、星形胶质细胞、神经胶质细胞、小胶质细胞、巨噬细胞、单核细胞、上皮细胞、内皮细胞或肝细胞。可以或者在从人类个体分离后在体外转导靶细胞，或者可以直接在体内转导靶细胞。

提供本领域中标准的另外的载体组分用于其它方面的载体功能，所述其它方面的载体功能诸如载体的维持、核定位、复制和合适时整合。

当从待治疗个体中取出 HSC 并用所述载体体外转染或转导时，在引入一种或多种所述 NOI 之前或之后，将所述细胞一般在培养物中扩增。当在合适的条件下体外培养时，或在体内接受合适的信号时， HSC 具有分化为内皮细胞、骨髓样细胞、树突细胞和免疫效应细胞，诸如嗜中性粒细胞、淋巴细胞、单核巨噬细胞和 NK 细胞。

这涉及应用组织培养法，所述方法是本领域已知的，包括暴露于细胞因子和/或生长因子以维持 HSC (Santiago-Schwartz 等 1992 J Leuk Biol 52: 274-281; Charbord 等 1996 Br J Haematol 94: 449-454; Dao 等 1997 Blood 89: 446-454; Piacibello 等 1997 Blood 89: 2644-2653)。也可以加入诱导 HSC 分化的药物。

正如所指出的，本发明的载体可以通过病毒载体或非病毒载体传递至靶位点。

本发明也提供用于治疗诸如癌症的疾病的试剂和方法，也提供用于预防医学的试剂和方法。因此，用于本发明的 NOI 可以通过预防具

有治疗效应。例如，当诊断出发生癌症的风险增加时，本发明可以用来为有风险的个体进行疫苗接种。

本发明也提供用于通过基因治疗治疗个体的药用组合物，其中所述组合物包含治疗有效量的本发明的反转录病毒载体，所述载体包含一种或多种可传递的治疗性和/或诊断性 NOI 或由其产生或得自其的病毒颗粒。所述药用组合物可以用于人类或动物用途。通常，医师会确定最适于个别受治疗者的实际剂量，所述剂量将随特定患者的年龄、体重和反应而变化。

所述组合物可以可任选地包含药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或辅助剂。药用载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据计划的给药途径和标准的药物实践来选择。所述药用组合物可以包含作为载体、赋形剂或稀释剂的或除此之外的任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂和可以辅助或增加病毒进入靶位点的其它载体剂(诸如脂质传递系统)。

合适时，所述药用组合物可以通过以下任何一种或多种方式给予：吸入；栓剂或子宫托形式；通常的洗剂、溶液剂、乳膏、软膏或撒布粉剂(dusting powder)形式；通过使用皮肤贴剂；口服，为含赋形剂(诸如淀粉或乳糖)的片剂形式、或单独的或结合赋形剂的胶囊或 ovule 形式、或含调味剂或着色剂的酏剂、溶液剂或悬浮液形式；或它们可以胃肠外注射，例如阴茎海绵体内、静脉内、肌内或皮下注射。对于胃肠外给药，所述组合物最好以无菌水溶液形式使用，所述水溶液可以含有其它物质，例如足够的盐或单糖，以使得溶液与血液等渗。对于颊或舌下给药，所述组合物可以以用常规方法配制的片剂或锭剂给予。

用于预防的适用性可以基于对癌症的遗传素因，例如乳腺癌或卵巢癌是因为 BRCA-1 基因、 BRAC-2 基因(Cornelisse 等 1996 Pathol Res Pract 192: 684-693)或另一相关基因中的一个或多个突变。

根据本发明，可以使用本领域技术人员水平内的标准分子生物学

技术。这类技术在文献中进行了全面地描述。参见例如 Sambrook 等 (1989) Molecular Cloning: a laboratory manual; Mames 和 Glover (1985-1997) DNA Cloning: a practical approach, 第 1-IV 卷 (第 2 版); 在 McCafferty 等(1996) "Antibody Engineering: A Practical Approach"中给出了免疫球蛋白基因的工程方法。

总之，本发明涉及：适用于将一种或多种 NOI 引入 HSC 的传递系统。

本发明也涉及含载体的 MHSC，而所述载体包含一种或多种 NOI。

本发明也涉及包含上述载体和/或 MHSC 的疫苗。

本发明的一个优选方面涉及应用上述任何制品治疗或预防特征为局部缺血、低氧或低葡萄糖的病症；特别是但非只限于诸如癌症、脑型疟、局部缺血性心脏病或类风湿性关节炎的病症。

在再一广义方面，本发明提供修饰的 HSC (MHSC)，它包含一种效应元件，所述效应元件包含在巨噬细胞中可操作的元件("巨噬细胞效应元件")。

因此，本发明也提供包含至少一种可表达目的核苷酸序列(NOI)的修饰的分化细胞(最好是终末分化细胞)，其中所述 NOI 或每种 NOI 可操作地连接于在该分化细胞中有活性的一种或多种效应元件。

因此，在一个优选方面，本发明也提供包含至少一种可表达目的核苷酸序列(NOI)的修饰的巨噬细胞，其中所述 NOI 或每种 NOI 可操作地连接于在该分化细胞中有活性的一种或多种效应元件。

因此，在一个优选方面，本发明也提供包含至少一种可表达目的核苷酸序列(NOI)的修饰的内皮细胞，其中所述 NOI 或每种 NOI 可操作地连接于在该分化细胞中有活性的一种或多种效应元件。

关于本发明的这些广义方面，本发明的 HRE 最好是这种效应元件的高度优选的组分。

所述分化细胞最好衍生自所述 MHSC。该方面是有利的，因为它

提供一种方法，提供在例如由 MHSC 分化的巨噬细胞中、或通过所述巨噬细胞或由所述巨噬细胞进行选择性表达。

在再一广义方面，本发明提供修饰的细胞，所述细胞可以是分化或未分化的细胞，所述非分化细胞能够分化为分化细胞，所述修饰的细胞包含在该细胞中有活性(最好仅在该细胞类型中有活性)的元件；和一种 NOI (如上定义)；其中通过经病毒转导、最好经腺病毒转导和/或慢病毒转导转化细胞，制备所述修饰的细胞。在此，所述元件最好是本发明的 ILRE 。

在再一广义方面，本发明提供杂种病毒载体系统用于体内基因传递，所述系统包含一种或多种编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能够感染第一靶细胞并能够在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞。

所述第一载体最好可得自或基于腺病毒载体/或所述第二病毒载体可得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体。

现在通过实施例进一步描述本发明，所述实施例是用来帮助本领域技术人员实施本发明，并决不是限制本发明的范围。

参考以下附图:

图 1，显示对低氧应答的核苷酸序列;

图 2，图示质粒 OB37 。该质粒含有 OBHRE 启动子;

图 3，显示在用 Xiavector 转导的乳腺癌细胞中诱导 B-半乳糖苷酶表达;

图 4a，显示结合 SV40 基本启动子(minimal promoter)的合成低氧效应启动子;

图 4b，描述合成低氧效应启动子的相对强度。所述条带显示报道基因活性的水平。条带上的数字给出诱导倍数;

图 5 显示蛋白质印迹。由初级人巨噬细胞和人乳腺癌 T47D 细胞制备蛋白提取物，并通过蛋白质印迹进行分析。所述抗体为针对纯化的 HIF-1 和 EPAS 蛋白产生的单克隆抗体。顶部一组显示用 EPAS 抗

体探测的滤膜，底部一组显示用 HIF-1 抗体探测的滤膜。

图 6，显示 OBHRE1 介导的在巨噬细胞中的低氧诱导;

图 7，显示 XiaMac 和合成低氧效应巨噬细胞特异性启动子的核苷酸序列;

图 8，显示在巨噬细胞和乳腺癌细胞系中，相对于 CMV 启动子的、由 XiaMac 启动子(标记的 OBHREMAC)驱动的报道基因的低氧激活。

图 9，显示所述 HRE 对于 XiaMac 启动子的低氧效应是重要的。所述 HRE 在 XiaMac 中有缺失(XiaMac-HRE)，没有观察到低氧的诱导;

图 10，提供通过涉及干扰素γ和 IRE 的自身调节回路调节我们的低氧效应启动子的策略的概述;

图 11 显示仅在低氧和干扰素γ存在下有活性的 XiaMacURE 序列的核苷酸序列;

图 12 为由 e-选择蛋白或 KDR 启动子导向血管内皮的低氧调节慢病毒载体的示意图;

图 13，显示 WTPGK 和 MUTPGK 的序列;

图 14，显示 pKAHRE 构成物的图解;

图 15a 显示包含在 HRE 控制下的治疗基因的反转录病毒 XiaGen-P450 载体的图解图谱;

图 15b 显示通过低氧诱导 XiaGen-P450 (Xiavector 反转录病毒)的分析。当有诱导时，细胞染成黑色;

图 16a 显示 pEGASUS 的质粒图谱的示意图;

图 16b 显示 pONY2.1 的质粒图谱的示意图;

图 16c 显示 pONYHRELucLac 的质粒图谱的示意图;

图 16d 显示 pEGHRElacZ 的质粒图谱的示意图;

图 17 为 pSecTSP-1 和 pEGHRE-TSP1 的图解;

图 18 显示一示意图，将表达 LacZ 的 Pegasus 载体平板接种于培

养物中的细胞上。然后将细胞置于氧正常或低氧环境下。在低氧环境下，所述报道基因表达，并因此表达 B-半乳糖苷酶，使得可对细胞计数。这给出了所述载体的滴度。这在低氧下高 20 倍，显示该报道基因优先在这种条件下有活性;

图 19 显示慢病毒载体中荧光素酶报道基因的低氧介导的激活;

图 20a 显示作为单一转录单位构建的低氧效应 EIAV 载体;

图 20b 显示作为单一转录单位构建的低氧效应自身调节 EIAV 载体;

图 21 显示 pE1sp1A 和 pJM17 的示意图;

图 22 显示构建重组腺病毒载体的方案。 Adeno PGKlacZ 是得自 OB37 、插入 Microbix 转移载体 pE1sp1A 中的 OBHRElacZ 盒;

图 23 显示来自 PGKLacZ Ad 转导的 Chiang 肝脏细胞的低氧诱导 (0.1%);

图 24 显示β-半乳糖苷酶基因表达在用 AdHRE LacZ 转导的初级人巨噬细胞中的低氧调节;

图 25a 显示 pE1sp1A 质粒图谱的示意图;

图 25b 显示 pE1HREPG 质粒图谱的示意图;

图 25c 显示 pE1CMVPG 质粒图谱的示意图;

图 26 显示 pE1RevE 质粒图谱的示意图;

图 27 显示 pE1HORES3.1 质粒图谱的示意图;

图 28 显示 pE1PEGASUS4 质粒图谱的示意图;

图 29 显示 pCI-Neo 质粒图谱的示意图;

图 30 显示 pCI-Rab 质粒图谱的示意图;

图 31 显示 pE1Rab 治疗图谱的示意图;

图 32 显示含两种治疗基因的低氧效应 EIAV 载体; 和

图 33 为示意图。

图 34 为一示意图。

实施例

实施例 1：局部缺血效应启动子的构建

可以用于本发明的局部缺血效应元件(ILRE)可以取自对局部缺血应答的任何基因。低氧为与局部缺血有关的条件之一，低氧效应启动子特别有用。合适序列的某些实例示于图 1 。合适的序列通常在所述编码序列上游的 DNA 中发现，但它们不必存在于该这类位置。内含子内和所述编码序列下游的序列也可以介导对低氧的应答。例如，众所周知， Epo 基因 5'非翻译区中的序列介导对低氧的转录应答，而 VEGF 基因 3'区中的序列介导对低氧的翻译应答(Nunn 和 Poyton 1996, Physiol Rev 76, 839)。

所述 ILRE 可以与在反转录病毒载体的 LTR 中或与组成型或组织特异性启动子的其它组合中存在的启动子元件组合。特别是，如下描述的 PGK HRE 与得自 SV40 启动子的元件的组合是有用的。

OBHRE1：基于鼠类 PGK HRE 的启动子

合成包含低氧效应元件(HRE)序列的合成寡核苷酸，并作为 BglII/BamH1 片段克隆入 pGL3 启动子质粒(Promage 登记号 U47298)的 BamH1 位点。作为 Xba1/Nhe1 合成 PGK 序列，并克隆入该载体的 Nhe1 位点。 pGL3 为无增强子表达质粒，在荧光素酶编码序列上游具有一个基本 SV40 启动子。将所述 HRE 插入该位点，将其置于基本 SV40 启动子的上游。进行荧光素酶分析，以比较在氧正常和低氧(0.1%氧)中该元件的功能，并且建立启动子强度与 SV40 和 CMV 的强度的关系。显示包含天然方向的鼠 PGK -307/-290 序列(Firth 等 1995, J Biol Chem 270, 2021)、连接于 SV40 启动子的该三联体。

GCTAGAGTCGTGCAGGACGTGACATCTAGTGTCGTGCAGGACGTGACA

HRE HRE

TCTAGTGTCGTGCAGGACGTGACAGCTAGCCCGGGCTCGAGATCTGCG

HRE

ATCTGCATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCC

SP 1 SP 1

CATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCGCCCATTCTCCGCCCCATCG

(SP 1) SP 1 SP 1 SP 1

CTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTG

定义为 OBRHE 的启动子序列存在于图 2 描述的质粒 OB37 中。起始 起始

OBHRE1 为新的启动子。

所述 HRE 也结合反转录病毒 LTR 中的例如以下显示的 MLV LTR 的启动子元件起作用。

在 MLV 反转录病毒启动子环境中的 PGK 驱动的增强子序列

在 MLV 反转录病毒启动子环境中 PGK 三联体为正向(天然)取向。这与 OB HRE 相同，所述序列置于莫洛尼 MLV 反转录病毒启动子的上游，而不是置于 SV40 上游。序列显示至转录起始。

AGCTAGCCTAGCGTCGTGCAGGACGTGACATCTAGTGTCGTGCAGGACGTGAC
ATCTAGTGTCGTGCAGGACGTGACATCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGG
TGCCCCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTC
GCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCA
CAACCCCTCACTCGG

在 MLV 反转录病毒启动子环境中 PGK 三联体为反向取向。序列显示至转录起始。

AAGCTAGCTGTCACGTCCTGCACGACACTAGATGTCACGTCCTGCACGACACT
AGATGTCACGTCCTGCACGACTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCC
CCAAGGACCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTT
CTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCTCCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAAC
CCCTCACTCGG

所述 HRE 可以以相对于所述启动子元件的任一取向起作用。

与 MLV 启动子结合的 OBHRE

构建一系列载体，在瞬时测定中分析连接于 MoMLV 启动子的所

述 HRE 的活性。从 pLNheHRE 中取出作为 Nhe1-Sma1 片段的所述 HRE 和 MoMLV 启动子，将其插入 pGL3 basic (Promega)的 MCS 中，产生 pGLHRE 和 pGLMUT． pGL3 启动子和 pGL3 对照(Promega)分别用作阴性和阳性对照。

通过用 Sac1 消化 pHRE 和 pMUT，并使所得的反转录病毒基因组与用同一酶切割的线性化 pLNhrHRE 连接，构建载体 p5'HRE3'MUT、 p5'MUT3'HRE、 p5'MUT3'MUT 和 p5'HRE3'HRE。

显示的数据(FIG3)清楚地证明， 5'和 3' HRE 均参与转录调节，此外在两者之间有真正的协同作用。这些数据表明，低氧调节载体的最适结构是在 5'和 3' LTR 中有重复 HRE 的载体。这已经使得我们设计了受调节的单一转录单位慢病毒载体(参见下文)。

重要的是注意到，这些数据可以外推至可以想象具有相似协同作用的其它非 HRE 增强子系统。

作为再一实例，也可以构建用于本发明的如图 4a 所示的其它启动子。

这些启动子的相对强度示于图 4b。所有这些序列均在基本 SV40 启动子上赋予低氧诱导的表达。然而，清楚的是在低氧下的不同诱导比率和表达范围。

这些启动子结构的任一种均可以用于本发明中，其选择由治疗基因决定。例如，诸如 TNF-α 的高毒性细胞因子将得益于简单烯醇化酶启动子的应用，因为基础水平在氧正常下不可检测，因此保证没有不合适的表达。在表达的最大水平非常高，但基础水平可检测时，使用 OBHRE1，需要高水平的诸如人细胞色素 P450 的低毒性蛋白将从中获益。

上述这些启动子均含有典型 HRE 结合转录因子的 DNA 序列基元 HIF 1。这是由 HIF 1a 和 HIF 1b 组成的异二聚体，这是基本螺旋-环-螺旋(bHLH)/PAS 域蛋白家族(来自该基因家族发现的成员； Period,

ARNT和SIM)的一个成员。 HIF 1a最初鉴定为在红细胞中结合于红细胞生成素基因 HRE 的蛋白(Wang 等 1995, J Biol Chem 270, 1230)，但此后将其与在大多数细胞类型中由低氧调节的基因的扩展家族的调节相联系。已表达 cDNA 序列的数据库检索，已经鉴别出与 HIA 1 密切相关的再一 bHLH/PAS 家族成员，称为 EPAS-1 (内皮 PAS 域蛋白)或 HRF (HIF 相关因子) (Ema 等 1997, Proc Natl Acad Sci USA 94, 4273; Flamme 等 1997, Mech Dev 63, 51; Tian 等 1997, Genes Dev 11, 72)。与 HIF 1 不同， EPAS-1 主要在内皮细胞中表达，其表达看来在发育期间受显著调节。正如根据这两种蛋白的 DNA 结合域的保守性预测的，EPAS-1 看来结合于与 HIF-1 相同的共有序列(定义为 HRE)。然而，公开的数据已经表明， EPAS 的表达限于内皮细胞。我们现在意外地发现(图 5)，在巨噬细胞中，甚至在氧正常的情况下也不可能检测到 HIF-1 蛋白，并且当将它们置于低氧条件下， OBHRE 启动子(PGK)在这些细胞中也被激活(图 6)。我们已经在这两种条件下，采用对 HIF-1 和 EPAS 特异性的抗体分析了巨噬细胞。我们在巨噬细胞中没有检测到 HIF-1，但我们可以检测到 EPAS 。这是首次在内皮细胞以外发现 EPAS 。因此， OB HRE 在巨噬细胞中的诱导或者主要由 EPAS-1 介导，或者完全由 EPAS-1 介导，因此代表 EPAS 效应增强子。

从这些观察可以推定，可以有许多已知或尚未发现的因子，介导局部缺血条件下的转录应答。对与所涉及因子无关的这类条件操作应答的 DNA 的任何片段，均可用于本发明。

作为局部缺血结果的其它情况，诸如低酸度或低葡萄糖水平，也可以用来特异性地激活基因。例如，可以通过 PCR 扩增，从人基因组 DNA 中分离出人 grp78 基因的启动子，该启动子包括 grp78 基因的完整启动子-增强子序列和 5'UTR。这描述于 Chuck 等 1992, Nucleic Acids Res 20, 6481 。在该论文中描述的 579 bp 的克隆片段对应于碱基 6-585 。用于扩增反应的引物于 5'端加入一个 *Asel* 位点，于 3'端加入一个 *Xhol* 位点。然后将所述 grp78 启动子片段克隆入 Clontech pEGFP-

N1 载体中存在的这些位点，提供来自该启动子的β-*gal*/GFP 融合蛋白的表达。

实施例 2. 组织限制的局部缺血效应启动子的构建

一种替代的基因表达结构将表达限于已经分化为粒细胞-单核细胞谱系的细胞。采用对单核细胞/巨噬细胞谱系特异性的或在所述谱系中向上调节的启动子，会将治疗基因的表达限于这些细胞类型。适用于此目的的启动子包括具有结合骨髓特异性转录因子(诸如 PU1)或结合在分化为巨噬细胞期间向上调节的转录因子(诸如 CEBP-β (NF IL 6)的共有序列的启动子(参见 Clarke 和 Gordon 1998, J Leukoc Biol 63, 153)。

可以通过标准方法分离或合成这些启动子元件。作为实例，描述衍生自细胞基因和病毒基因的两种巨噬细胞特异性启动子的分离。所述 HRE 元件可以与这些启动子中的任一种结合。作为实例，用产生称为 XiaMac 的合成启动子的 HIV 衍生启动子显示这一点。

细胞启动子

根据邻接 *Hind*III/*Nco*I 位点的 M CSF 受体启动子中存在的组织特异性控制元件(Zhang 等 1994, Mol Cell Biol 14, 8085)，以两个部分合成寡核苷酸，所述 *Hind*III/*Nco*I 位点用于克隆入 pGL3 基本载体(basic vector) (Promega)和随后的在荧光素酶报道基因测定中的分析。转录因子结合的位点以下划线表示。

AGCTTCCTGCCCCAGACTGCGACCCCTCCCTCTTGGGTTCAAGGCTTTGTTTTCT
T

SP1

CTTAAAGACCCAAGATTTCCAAACTCTGTGGTTGCCTTGCCTAGCTAAAAGGG
GAA

CEBP? **PEBP2/CBF** **PU. 1**

GAAGAGGATCAGCCCAAGGAGGAC

HIV 启动子

LTR 中存在的 HIV 的转录控制序列一般由 ATATAA 框上游的两个 NFkB 位点和三个 SP1 位点组成(Koong 等 1994, Cancer Res 54, 1425)。

对 HIV LTR 序列进行 Entrez 数据库核苷酸检索，分析这些序列的上述基元的完整性。 Submission U63538 (Zacharova 等 1997, AIDS Res Hum Retroviruses 13, 719)描述了一个分离物，它显示很好保守的两个 NFkB 位点和三个 SP1 位点的基元。然而，我们观察到，这种特殊的分离物也具有 NF-IL6 结合的共有序列(C/EBPβ)。如上所讨论的，这种转录因子已知在巨噬细胞中有活性。

以两个部分合成寡核苷酸，产生登记号 U63538 的 279-447 位的序列。合成具有 Nhe1/Sma1 末端的这些序列，以促进克隆。将退火并连接的寡核苷酸克隆入 OB37 。

图 7 显示最终的构成物。

因此，我们已经构建一种新的合成启动子(XiaMac)，它将“典型的” HRE 介导的应答与组织特异性(巨噬细胞)结合在一起。如图 8 所示，当在诸如乳腺癌细胞的非巨噬细胞中测试 XiaMac 启动子时，根本没有活性。然而，如果所述细胞经受低氧，则观察到激活。相反，所述启动子在巨噬细胞细胞系中有活性，并且通过低氧增强所述活性。如果所述 HRE 被失活，则消除了 XiaMAc 启动子对低氧的应答(图 9)。

实施例 3. 经阻抑限制的巨噬细胞特异性启动子的构建

一种替代的启动子结构是加入序列以在限定条件下进一步将所述表达限于巨噬细胞的启动子结构。

该方法的一个实例是 IRE 系统(Taniguchi 等 1995, J Cancer Res Clin Oncol 121, 516; Kuhl 等 1987, Cell 50, 1057)。在这种情况下，干扰素效应元件(IRE)可以结合转录因子 IRF1 和 IRF 2 。 IRF 2 在巨噬细胞

中组成型结合于此元件，并缺乏激活转录的能力。干扰素激活 IRF 1 的表达，IRF 1 然后可以竞争与 IRF 2 的结合。IRF 1 激活转录的能力由此逆转 IRF 2 的阻抑。IRF 1 也诱导 IRF 2 的基因表达，由此通过"自身关闭"限制转录的激活。在缺乏 IRF 1 激活的情况下，包含 IRE 四聚物可以阻断 SV40 启动子的功能。在缺乏干扰素激活的情况下，包含 HRE 5' 上游的该四聚物序列至 ATATAA (即 SV40 启动子中 TATA 框样元件)赋予阻抑。

干扰素γ 天然存在于炎症反应中，包括对肿瘤的反应。或者，干扰素γ 可以作为蛋白或作为基因外部提供，并可以作为基因治疗传递。在本发明的一个特定方面，自分泌调节回路可以提供干扰素γ 。在这种情况下，诸如 OBHRE 的简单 HRE 启动子连接于干扰素γ 编码序列。第二基因例如前体药物活化酶或以上一览表中的任一基因，连接于含有一个 IRF-1 效应序列的 XiaMac 启动子。所述启动子包括巨噬细胞在内的所有细胞中均无活性。在病理条件下暴露于低氧时，则干扰素γ 表达。该治疗基因的表达则被巨噬细胞特异性因子和低氧效应因子激活。这种两阶段策略可以应用于任何阻抑蛋白。该策略的总体综述示于图 10 。

将所述 IRE 如下克隆入 XiaMAc 启动子中:

设计如下由具有 BanII 粘性末端的所述 IRE 位点四聚物组成的寡核苷酸:

$C(AAGTGA)_4GAGCC$

在 XiaMac 启动子中有一个 BanII 位点，它位于最后一个 SPI 位点的 3'端，在 TATAA 上游 15 bp 。于该位点插入所述 IRE 元件，产生仅可以在存在干扰素和低氧的情况下变为有活性的受阻抑的启动子 (XiaMac-IRE)。该启动子示于图 11 。

实施例 4. 内皮细胞特异性启动子的构建

本发明不限于由 HSC 产生巨噬细胞谱系。例如，包含内皮细胞特

异性启动子将治疗基因的表达限于血管内皮。特别是，启动子的正确选择可以将表达限于肿瘤特异性的新血管系统。例如，Jaggar 等(1997, Hum Gene Ther 8 2239)已经描述了应用 e-选择蛋白和 KDR 启动子，在内皮细胞中特异性地表达来自反转录病毒载体的治疗基因。我们现在表明，这些启动子可以构建为反转录病毒/慢病毒载体，此外，它们可以另外受低氧调节。结构示于图 12。这些 ILRE 调节的内皮细胞特异性启动子对于将抗血管生成因子传递至肿瘤血管系统特别有用。慢病毒载体的构建更详细地概述于实施例 6。

因而，将所述表达限于衍生自 HSC 的特定谱系的任何启动子，均可以结合局部缺血样效应元件使用。

实施例 5. ILRE 调节的反转录病毒载体的构建

用诸如 FLYRD18 (Cosset 等 1995, J Virol 69, 7430)的包装细胞系系统构建 RRV。将含待包装的载体基因组的质粒载体转染入上述包装细胞系(Cosset 等 1995, J Virol 69, 7430)，以衍生生产细胞系。含载体基因组的合适质粒为 pHIT111 (Soneoka 等 1995, Nucl Acids Res 23, 628)。采用标准分子生物学技术，插入所需的 NOI 以取代 pHIT111 中的 LacZ 基因。可以将诸如 HRE 或 grp78 的启动子-增强子的调节元件相似地引入 pHIT111 中反转录病毒的 LTR 中，以取代反转录病毒增强子，以确保所述 NOI 的表达受调节。然后，将该质粒与适用于 FLYRD18 细胞的选择标记 NOI (例如 pSV2neo)一起共同转染，并在 1 mg/ml G418 (Sigma)中选择转染的细胞。

一种合适的含 HRE 增强子(图 13)由三个拷贝的 PGK 基因的 HRE (Firth 等 1994, Proc Natl Acad Sci USA 91, 6496)组成。图 13 也显示了不受低氧调节的、待用作对照的突变的含 HRE 序列。将示于图 13 的合成寡核苷酸插入 pHIT111 3'LTR 中的 Nhe1 和 Xba1 位点之间，产生其中在靶细胞中的表达处于低氧控制下的反转录病毒载体。以相同方式构建的一种替代的反转录病毒载体为示于图 14 的 pKAHRE。

在Xia-Gen-P450-G (图15)中发现按照以上概述的原理构建的另一种结构。该载体含有人细胞色素P450的治疗基因，细胞色素P450激活抗癌化合物环磷酰胺。通过PCR扩增，从人肝细胞衍生mRNA获得CYP2B6基因。通过与建立的序列(Yamano等1989 GenBank登记号M29874)进行比较，证实正确的基因序列。以上引用的任一其它的治疗基因均可以使用。所述RVV也含有一种为绿荧光蛋白的报道基因和为新霉素抗性基因的可选择基因。作为实例，显示在人肿瘤细胞中的低氧介导的该载体的诱导(图15b)。

实施例6. 低氧调节的慢病毒载体的构建

现在，干细胞分离和操作的技术发展水平描述了可能分裂的细胞的制备。人们普遍认为，具有发育为所有谱系潜力(全能)的真正干细胞是不分裂的。因此，反转录病毒载体错过来自多能CD34+ve细胞群体的这些细胞。慢病毒载体提供优于常规基于MLV的反转录病毒载体的显著优点，因为它们可以将基因转移至非分裂细胞和分裂缓慢的细胞。

已经将低氧效应启动子构建到慢病毒载体pEGASUS (图16a)和相关的载体pONY2.1 (图16b)中。这两种均衍生自感染性原病毒EIAV克隆pSOEIAV19 (Payne等1998, J Virol 72, 483)。构建策略示于图16系列。pONY 2.1中的CMV启动子作为Xba1/Asc 1片段切下，并用含Mlu1/Xba 1位点的寡核苷酸取代。这因此允许插入从OB37 (图2)分离的Mlu/Xba片段，产生pONY HRE luc/lac (图16c)。去除作为Nco 1片段的荧光素酶编码序列，将骨架再连接，产生pONY HRE lac。同样，去除作为Xba 1/Sal1的lacZ，然后将骨架再连接，产生pONY HRE luc。在高级EIAV载体质粒pEGASUS中，用EcoR1切下CMV启动子lacZ盒，用含一个SacII位点和一个Bsu36位点的合成寡核苷酸取代。这允许来自pONY 2.1的HRE luc/HRE lac盒分别作为Sac1/Bsu36和Sacl/EcoR1片段克隆。最终的载体命名为pEG-HRE-lacZ (示于图

16d)、 pEG-HRE-luc。用同一方法，构建pEGHRE载体，以表达取代lacZ或Luc基因的治疗基因。

以上所列的任一治疗基因均是合适的。作为实例显示了pEGHRE-TSP1 。这种治疗基因表达抗血管生成因子血小板反应蛋白-1。这以两种典型的结构示于图17。 A)为沉默LTR，用于EIAV LTR主要为惰性的细胞中。 B)为去除U3序列的典型的SIN (自身失活)载体。

在瞬时三质粒系统(Soneoka等1995, Nucl. Acids Res 23, 628)中，产生具有pEGHRE基因组的病毒颗粒。但病毒在平行板上的D17细胞上测定滴度，将所述板在氧正常(21%氧)或低氧(0.1%氧)下培养。细胞通过X gal组织化学染色，并计算终点滴度(参见图18)。滴度为b-半乳糖苷酶基因表达的测量，反映出在氧正常和低氧条件下细胞群体之间基因表达的变化。

在所示的试验中，由亲代pEGASUS载体(具有一个CMV lacZ转录单位)获得的滴度在低氧下不显著改变，而受调节的载体pEG-HRE-lacZ的滴度被诱导至少100倍。这些数据首次表明，在慢病毒载体环境中获得高效调节是可能的。

也用荧光素酶报道基因评价低氧调节。该数据反映出在所述群体内的细胞中的启动子活性的变化。如上概述产生载体颗粒，并用来转导D17细胞。将转导的细胞群体分开，在氧正常和低氧下培养过夜。处理细胞以用于荧光素酶测定和发光测定。用pEG-HRE-luc转导的细胞的荧光素酶活性在低氧条件下提高12倍(图19)。

用于本发明的一个替代的EIAV载体是其中由单一转录单位表达所述治疗基因和标记基因的载体。因为在载体产生方面的优势，单一转录单位载体一般优于SIN载体和含内部转录单位的载体。这些优势是，必须通过非转导的转染将SIN载体引入生产细胞中，这通常减小可以获得的高效率生产克隆的数目。也观察到，含有内部转录单位的载体的得率一般低于单一转录单位载体。此外，如我们以上所述，在

单一转录单位载体中可以达到的HRE的重复，使得调节最适化。以下描述受低氧载体调节的单一转录单位慢病毒载体:

在这种情况下，将lacZ作为Xho 1-Sph1片段分离出，克隆入pSP72中，制备pSPLacZ。通过PCR由pRIES-1hyg (Clontech)产生所述IRES，将其邻接限制性位点加入，使得可以进行随后的克隆;

ST1(前导序列(lead))

ATCGCTCGAGCTGCAGGGCCGCACTAGAGGAATTCGC

ST2(互补)

GGTTGTGGCCCATGGTATCATCGTGTTTTTCAAAGG

这产生 Xho1 IRES NcoI 盒。然后将该盒克隆入 lacZ 上游的 pSPlacZ 中，使得所述 Nco1 位点符合 lacZ 的 ATG 起始子(pSPIRESlacZ)。将IRES lacZ盒作为Pst1/Bst1107片段分离，并用来取代pE1PEGASUS+的CMV lacZ盒(作为sse8387/Bst1107片段切下)。该质粒命名为pEG4+ IRES Z。

使用重叠PCR法，以用RHE取代3'LTR中的EIAV U3增强子区的部分。可以构建相似的载体，其中U3区主要衍生自任何反转录病毒或慢病毒或和其它杂种启动子，诸如上述的启动子。唯一的限制是保留亲代载体的末端核苷酸，以确保与慢病毒整合酶匹配，并且两个R区是同源的，以允许有效地进行反转录。用于这种杂种LTR的典型结构详细描述于PCT GB96/01230和PCT/GB97/02858中。该载体的最终结构示于图20。

或者在Soneoka等1995, Nucl Acids Res 23, 628中描述的瞬时三质粒系统中产生具有pEGHRE基因组的病毒颗粒。或者，可以将该载体引入包装细胞系中，以制备合适的生产细胞。已经描述了表达VSV-G包膜的合适的包装细胞系[Yee等(1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9564-9568; Ory等(1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 11400-11406; Yang等(1995) Human Gene Therapy 6: 1203-1213; Chen等(1996) Proc.

Natl. Acad. Sci. USA 93: 10057-10062; Lefkowitz 等 1990, Virology 178: 373-383; Arai 等(1998) J. Virol. 72:1115-1121]。

在平行板上诸如狗细胞系 D17 细胞的合适的指示细胞上，测定病毒的滴度，并将板在氧正常(21%氧)或低氧(0.1%氧)下培养过夜。细胞通过 X gal 组织化学染色，并计算终点滴度(参见图 18)。滴度为 B-半乳糖苷酶基因表达的测量，反映出在氧正常和低氧条件下细胞群体之间基因表达的变化。

在所示的试验中，由亲代 pEGASUS 载体(具有一个 CMV lacZ 转录单位)获得的滴度在低氧下不显著改变，而受调节的载体 pEG-HRE-lacZ 的滴度被诱导至少 100 倍。这些数据首次表明，在慢病毒载体环境中获得高效调节是可能的。

也用荧光素酶报道基因评价低氧调节。该数据反映出在所述群体内的细胞中的启动子活性的变化。如上概述产生载体颗粒，并用来转导 D17 细胞。将转导的细胞群体分开，在氧正常和低氧下培养过夜。处理细胞以用于荧光素酶测定和发光测定。用 pEG-HRE-luc 转导的细胞的荧光素酶活性在低氧条件下提高约 12 倍(图 19)。

自身调节的低氧效应慢病毒载体的构建

先前已经表明，HF-1α的过量表达可以提高来自许多低氧调节启动子的表达(Semanza 等 JBC 1996)。该蛋白已知在正常细胞中不稳定，但可以通过过量表达绕过这一点。这种过量表达因此危害低氧效应的特异性。OBHRE 启动子对 E-PAS 应答的发现，打开了放大对低氧应答的新途径。为了避免组成型表达 HIF-1 的问题，我们已经将 E-PAS 基因构建入自身对低氧应答的慢病毒载体中。以这种方式，该载体被低氧激活，以表达 E-PAS 基因，然后 E-PAS 蛋白进一步作用于所述 HRE，以增加表达。在已知 HIF-1 不稳定的条件下，一旦氧水平回到正常水平，则该载体系统的优点是提供较长期的对低氧的应答。由于

所述 HRE 与 HIF-1 或 E-PAS 相互作用，则该载体的起始引发是特异性的。在初始的低氧刺激结束后， E-PAS 的产生维持所述表达，最终，所述应答将根据 E-PAS 蛋白的半衰期而衰退。

表达 TSP-1 的自身调节载体示于图 20b。根据所述 cDNA 的已知序列(登记号 U81984; Trian 等 1997, Gene Dev. 11, 72)，用引物通过 PCR 扩增获得 E-PAS 编码序列。

实施例 7. 用于表达治疗基因的低氧效应腺病毒载体的构建

当干细胞迁移至靶组织时，在不分裂和分化的情况下它们则仍能够传递治疗物，尽管这种分裂可能发生在某些阶段。在这种情况下，可以使用诸如腺病毒的载体。这类载体不将其基因整合入细胞基因组中，因此当细胞分裂时，所述载体逐渐由细胞群体中丧失。然而，在分化为各种谱系后，大量的载体仍存在于细胞中。按照多种方法，用重组腺病毒载体转导 CD34+干细胞。(Neering 等 1996 Blood 88, 1147; Watanabe 等 1996, Blood 87, 5032; Watanabe 等 1998, Leukaemia and Lymphoma 29, 439; Bregni 等 1998, Gene Ther 5, 465; Frey 等 1998, Blood 91, 2871)。

已经构建的第一代重组腺病毒载体(E1/E3 缺失)，使得细菌β-半乳糖苷酶报道基因处于低氧调节启动子的控制之下。

第一代腺病毒载体包含该病毒 E1 和 E3 区的缺失，允许外源 DNA 通常插入该病毒左臂邻近左反向末端重复(ITR)之处。病毒包装信号(194-358nt)与 E1a 增强子重叠，并因此存在于大多数 E1 缺失载体中。该序列可以易位至该病毒基因组的右端(Hearing 和 Shenk 1983, Cell 33, 695)。因此，在 E1 缺失载体中，可以缺失 3.2 kb (358-3525nt)。

腺病毒能够包装 105%长度的所述基因组，因此允许加入额外的 2.1 kb。因此，在 E1/E3 缺失病毒载体中，克隆能力变为 7-8 kb (2.1 kb + 1.9 kb (去除 E3)和 3.2 kb (去除 E1)。由于所述重组腺病毒缺乏必需的 E1 早期基因，因此它不能在非 E1 互补细胞系中复制。 293 细胞系由

Graham 等研制(1977, J Gen Virol 36, 59)，含有 Ad5 基因组左端的约 4 kb，包括 ITR、包装信号、E1a、E1b 和 pIX。所述细胞稳定地表达 E1a 和 E1b 基因产物，但即使 pIX 序列在 E1b 中也不表达晚期蛋白 IX。在非互补细胞中，E1 缺失病毒转导所述细胞，并被转运至细胞核，但没有来自 E1 缺失基因组的表达。

图 21 的图显示一般的策略，用来用 Microbix Biosystems-NBL Gene Sciences 系统产生重组腺病毒。

一般策略涉及将外源 DNA 克隆入 E1 穿梭载体，其中 402-3328 bp 的 E1 区被所述外源 DNA 盒取代。然后，将所述重组质粒与 pJM17 质粒一起共同转染入 293 细胞。pJM17 含有 E3 区的缺失和于 3.7 图谱单位的 E1 区中的原核 pBRX 载体的插入(包括氨苄青霉素抗性序列和细菌 ori 序列)。该 40 kb 质粒因太大而不能被包装入腺核壳中，但是可以在细菌中繁殖。293 细胞中的细胞内重组，导致外源 DNA 插入片段取代 amp^r 和 ori 序列。

在本文引用的实施例中，已经使用两种转移载体。由 Microbix 获得的第一种载体称为 pE1sp1A，得自 Quantum Biotechnologies 的第二种载体称为 pADBN。pADBN 质粒的优点是，新(外源) DNA 可以以任一取向插入。这将所述插入片段以与存在的腺病毒基因不同的空间关系放置，这在某些情况下可能不利地影响表达。在两种情况下，所述第二 DNA 均为缺陷型腺病毒基因组，或者作为例如 pJM17 的质粒，或者作为病毒 DNA 的一部分，例如所谓的 Ad5 的右臂。同源重组产生最终的基因转移载体。

以下描述局部缺血调节的腺病毒载体的构建:

通过来自 pONY2.1 载体(图 16b)的 *Nco* I-*Xba* I 片段的交换，用细菌 b-半乳糖苷酶编码基因取代 OB37 (图 2)中的荧光素酶基因。

从 OB37 载体取出作为 *Kpn*I-*Sal*I 片段的所得 OB HRE LacZ 盒，将其克隆入 Quantum Biotechnologies™ pAdBN 转移载体中，产生 AdenoOBHRElacZ。

将重组 AdenoOBHRElacZ 转移载体线性化(*Ase* I)，并与纯化的 Ad5 病毒的右臂(从 *Cla* I 位点)一起共同转染入 293 细胞，允许进行体内同源重组，以导致形成所需的重组腺病毒。这概述于图 22。含所述 HRE 的腺病毒载体称为后接插入基因的 AdHRE，例如 AdHRE-lacZ 具有由 OBHRE 启动子表达的细菌β-半乳糖苷酶基因。已经用 AdHRE-lacZ 转导了一定范围的不同细胞系。转导 6 小时后，取出所述病毒，用新鲜的培养基取代，将细胞分为两个单独的平板，用于在或者氧正常或者低氧(0.1%氧)下培养过夜。结果(图 23)证实了在 Chiang 肝和 MCF-7 人乳腺癌细胞系中，腺病毒载体内 LacZ 报道基因的低氧诱导性。

此外，7-14 日龄的初级人巨噬细胞已经同样用 AdHRE-LacZ 转导。该结果不仅证明了转导性，而且证明了用 HRE 调节的重组腺病毒在造血谱系的细胞中的实用性。

所述腺病毒转移载体中存在的插入 DNA 构成物为自主表达盒形式，含有 OBHRE 启动子、LacZ 编码序列和 SV40 多腺甘酸化信号(如果必要也可以包括剪接位点)。在所述用于构建 AdHRE 的系统(Quantum Biotech)中，我们观察到，如果以 E1 基因的取向指导表达盒，则获得高水平的蛋白表达。

如先前所述，也可以使用替代的低氧效应元件。

所述 HRE 可以以多拷贝存在于所述基因的 5'和 3'，以进一步提供低氧诱导的水平。

另外，所述 HRE 可以与组织特异性启动子元件结合，以将表达限于特定的组织类型或患病组织。例如，OBHRE 可以与 XiaMac 启动子结合使用，以特异性地调节/增加在巨噬细胞中的表达。

已经构建了 AdHRE 载体以含有治疗基因。

以下描述一个实例，用于采用 Microbix Biosystems 构建系统构建 AdHRE-2B6 和 AdCMV-2B6 重组腺病毒载体。质粒示于图 24，它们如下:

pE1HREPG - 工程改造以含有所述 HRE 驱动的 2B6 表达盒的转移载体

Microbix 的 E1sp1A 转移质粒，制备转移载体 PE1HREPG。

将 pCPGHRE 的 EMCV IRES GFP *Xba*I 片段克隆入 pGL3OBHRE1p450 载体中 2B6 编码序列 3'的 *Xba*I 位点。将所述完整的表达盒作为 *Mlu*I-*PshA*I 片段克隆入 Microbix 转移载体 pΔE1sp1B，产生 pE1HREPG (图 25b)。

pE1CMVPG - 工程改造以含有 CMV 驱动的 2B6 表达盒的转移载体 (图 25c)

将 pCI-2B6 的 BglII-NaeI CMV2B6 片段克隆入 pΔE1sp1B 的 *BamH*I-*EcoR*V 位点。将 pCPGHRE 的 EMCV IRES GFP *Xba*I 片段克隆入所得质粒中 2b6 编码序列 3'的 *Xba*I 位点，产生 pE1CMVPG (图 25c)。

注意：ires GFP 报道基因的应用，允许较容易进行重组腺病毒的噬斑纯化，并提供活细胞标记，用于不同生理条件期间研究基因的表达。

以上概述的任一种治疗基因均可以插入低氧调节的腺病毒载体中。

实施例 8. 构建腺病毒载体以传递慢病毒组分

在本发明的特定方面，将含有制备反转录病毒或慢病毒载体所需组分的腺病毒载体，用来转导 CD34+ve 干细胞。已经用腺病毒载体转导的干细胞因此分泌反转录病毒/慢病毒载体。因此，如前所述 [PCTGB97/00210]，CD34 细胞中的腺病毒载体用作原位反转录病毒工厂。可以以几种方式构建腺病毒载体。首先，可以如上所述，将反转录病毒/慢病毒载体组分的一种或多种的表达置于 HRE 调节的腺病毒载体中。或者，所述载体组分可以置于以下启动子之下：诸如 CMV

启动子的组成型启动子、或诸如上述 e-选择蛋白启动子或巨噬细胞特异性启动子的谱系特异性启动子、或诸如四环素调节系统的受调节启动子(Gosten 和 Bujard 1992 Proc Natl Acad Sci 89: 5547-5551)或任何其它受调节的启动子/增强子。在后一种情况下，通过使所述治疗基因由上述的低氧调节的反转录病毒/慢病毒载体表达，赋予特异性。作为实例，现在描述可以产生慢病毒载体的腺病毒载体的产生。

为了产生慢病毒载体，需要制造四种腺病毒载体：基因组、gagpol、包膜(例如狂犬病 G)和 Rev。由异源启动子表达慢病毒组分，它们含有内含子(需要时(用于高表达 gagpol、Rev 和狂犬病包膜))以及多腺甘酸化信号。当将这四种病毒转导入 E1a⁻细胞中时，所述腺病毒组分将不表达，但异源启动子将允许表达慢病毒组分。以下概述一个构建 EIAV 腺病毒系统的实例(申请号：9727135.7)。所述 EIAV 基于缺失任何非必需 EIAV 编码蛋白(S2、Tat 或包膜)的基本系统。用来假型化 EIAV 的包膜是狂犬病包膜(G 蛋白)。已经表明这很好地使 EIAV 假型化(申请号：9811152.9)。

转移质粒

以下描述含 EIAV 组分的转移质粒的构建。所述转移质粒为 pE1sp1A (图 25a)。

然后所述重组转移质粒可以用来通过在 293 细胞中同源重组来制备重组腺病毒。

附上以下质粒的示意图。

A) pE1RevE. 该质粒提供有效表达 gag 和 pol 所需的 Rev 蛋白

用 Apa LI 和 Cla I 切割质粒 pCI-Rev。用 Klenow 聚合酶将编码 EIAV Rev 的 2.3 kb 带平端化，将其插入 pE1sp1A 的 Eco RV 位点，产生质粒 pE1RevE (图 26)。

B) **pE1HORSE3.1 – gagpol 构成物**

用 Sna BI 和 Not I 切割 pHORSE3.1。将编码 EIAV gagpol 的 6.1 kb 带插入用 Sna BI 和 Not I 切割的 pE1RevE (纯化 7.5 kb 带)。这产生质粒 pE1HORSE3.1 (图 27)。

C) **pE1PEGASUS – 基因组构成物**

用 Bgl II 和 Not I 切割 pEGASUS4。将含有 EIAV 载体基因组的 6.8 kb 带插入用 Bgl II 和 Not I 切割的 pE1RevE (纯化 6.7 kb 带)。这产生质粒 pE1PEGASUS (图 28)。

D) **pCI-Rab – 狂犬病构成物**

为了制备 pE1Rab，通过用 Nsi I 和 Ahd I 切割质粒 pSA91RbG，将狂犬病可读框插入 pCI-Neo (图 29)中。用 T4 DNA 聚合酶将 1.25 kb 带平端化，将其插入用 Sma I 切割的 pCI-Neo 中。这产生质粒 pCI-Rab (图 30)。

E) **pE1Rab – 狂犬病构成物**

用 Sna BI 和 Not I 切割 pCI-Rab。将编码狂犬病包膜的 1.9 kb 带插入用 Sna BI 和 Not I 切割的 pE1RevE (纯化 7.5 kb 带)。这产生质粒 pE1Rab (图 31)。

可以将任何治疗基因或基因的组合插入如上所述的慢病毒载体中。

实施例 9. 工程改造干细胞，以对低氧应答表达前体药物活化酶

用反转录病毒载体 XiaGen-P450-G 或慢病毒载体 pSec-TSp1 转导任何细胞类型。作为实例，我们使用人造血干细胞、人外周血血沉棕黄层和人脐带血。描述了分离 $CD34^+$ HSC 的方法和反转录病毒介导的将基因转移入这些细胞中(诸如 Charbord 等 1996, Br J Haematol 94, 449;

Dunbar等1996, Hum Gene Ther 7, 231; Cassel等, 1993, Exp Haematol 21, 585; Emmons 等 1997, Blood 89, 4040; Jolly 等 1996 WO 96/33281; Kerr 等 WO96/09400)。一个合适方法的实例如下:

从用 G-CSF 和/或环磷酰胺活动化后，从外周血收获 HSC (Casset 等 1993, Exp Haematol 21, 585)。皮下给予 7 天 10 μg/kg/天剂量的 G-CSF (Amgen)。用 CellPro 干细胞分离系统进行单采血液成分术和 HSC 的富集(Cassel 等 1993, Exp Haematol 21, 585)。在 4 μg/ml 硫酸鱼精蛋白和 20 ng/ml IL-3 (Sandoz)、 50 ng/ml IL-6 (Sandoz)、 100 ng/ml SCF (Amgen)存在下，以 10^5 细胞/ml 在 RRV 生产细胞(实施例 1)用过的培养基中培养 HSC 富集群体(Santiago-Schwartz 等 1992, J Leuk Biol 52, 274; Charbord等1996, Br J Haematol 94, 449; Dao等1997, Blood 89, 446; Piacibello 等 1997, Blood, 89, 2644; Cassel 等 1993, Exp Haematol 21, 585)。也可以加入其它细胞因子和/或如上述(Dunbar 等 1996, Hym Gene Ther, 7, 231)制备的自身基质细胞。 24 小时后，将细胞离心，并再悬浮于上述具有生长因子和硫酸鱼精蛋白新鲜的含 RRV 培养基中。再过 24 小时后，重复该步骤，再将细胞培养长达 48 小时。此后，用胰蛋白酶处理细胞，通过离心在新鲜培养基中洗涤数次，再悬浮于 Plasma-Lyte A 用于再输注。再输注的总体积约为 25-50 ml。为患者输注多至 2 小时。输注的细胞数目至少为 10^5 细胞，可以高达约 10^{12} 细胞。

在再输注之前，也可以按照公开的方法(Haylock 等 1992, Blood 80, 1405)使细胞沿骨髓分化途径成熟。

如下所述对反转录病毒进行转导，但使用用于慢病毒载体的相同方法:

通过使分离的 CD34 细胞的培养条件最适化，使得它们于转导时循环，已经增强了用反转录病毒或慢病毒载体的基因转移。对于需要细胞分裂使得可以接近细胞核和整合的基于 MLV 的载体，这是特别必要的。用不同包膜使 MLV 载体假型化也对基因转移具有主要影响。

如文献中报道的， GALV 明显优于 VSVG。

我们已经采用了含的成分已知培养基，以确保细胞于转导时循环。使用成分已知培养基，确保在缺乏可以在血清或更复杂的培养基中发现的抗增殖因子的情况下，存在增殖因子。

在转导之前，在分离时将 CD34 细胞转移至以下培养基(主要基于 Becker 等 1998, Hym Gene Ther 9, 1561)至少 24 小时。无血清培养基 X-VIVO 10 、 1% BSA 、 2 mM L-谷胺酰胺、 1%青霉素/链霉素、 20 ng/ml IL-3 、 100U/ml IL6 、 50 ng/ml SCF 、 100ng/ml 抗 TGFb 、 100 ng/ml Flt 3-L 。使用概述的转导方案(Becker 等 1998 HGT 9 1561-1570)。这涉及在 3 天内 3 个循环，并使在病毒载体存在下大多数细胞经历有丝分裂的可能性最佳化。方法简述如下:

用纤连蛋白片段 CH-269 以 10μg/cm^2 包被非组织培养级板(Takahara)。将病毒加入空白孔中，并允许结合 30 分钟。用 PBS 洗涤。每孔加入 0.5 ml 培养基中的 10^5 细胞。加入 0.5 ml 上清液的病毒。以 1020xg 离心 90 分钟。 4 小时后，如上用新鲜的培养基取代。连续 3 天重复该步骤。

由外周血或衍生自外周血的来源分离的细胞优先形成较高比例的红细胞类祖细胞，而来自脐带血的 CD34 细胞导致形成范围较宽的祖细胞类型。脐带血衍生细胞具有较高的固有增殖能力。提高的干细胞数目已经得自在分离前用 GM CSF “活动化”的外周血。该方法广泛用于移植患者。

然后按照以下方案，在黑暗的 II 类安全橱中将细胞平板接种于含生长因子的 methocel 培养基(含 10%胎牛血清、运铁蛋白、谷胺酰胺、2-巯基乙醇、牛血清白蛋白、 IL3、 Il6、 IL11、 SCF、 Epo、 GCSF、 GMCSF)中。用连接 2.5 ml 注射器的钝针头，将 2.5ml methocel 分装到 10ml U 形管中，避免气泡。将 0.5ml Iscove 培养基(Gibco)中的细胞悬液(含 3x 每孔所需的细胞数，使得 1 ml methocel 将含有 500/2000 细胞/孔的所需细胞数)分装到含 methocel 的管中，并温和涡旋混合。用钝

针头和注射器，将 1 ml methocel 和细胞的混合物温和加入非组织培养培养皿(35x10mm)或单孔盖玻片室中。可以由每种样品建立三份培养皿/孔。将培养皿/室置于装有无菌蒸馏水的小培养皿的 Falcon 3025 培养皿(150x25mm)中，以确保适当的湿度。将培养皿于 37 ℃、 5% CO_2 和 5% O_2 下培养， 14 天后分析集落。

为了增强 CD34 衍生单核细胞的产生，分阶段调节(phase)培养条件，以使 GM 祖细胞(Haylock 等 1992, Blood 80, 1405)和随后单核细胞祖细胞的形成最适化。这使得能够采用 CFU 测定监测初级培养物的等分样品，并确保条件最适于单核细胞的产生。为培养基补充相对高剂量 GM CSF，以使 GM 祖细胞的产生最佳化，然后分段给予(phased administration)作为占优势的生长因子的 MCSF，使分化倾向于骨髓谱系。转导 HSC 后，它们分化形成 GM 前体。

通过观察 GFP 的荧光，分析 GM 前体集落的反转录病毒的表达。在氧正常和低氧下评价这一点。

或者，可以用于上述相同的方法，但在分离后立即转导干细胞群体。然后，可以将它们冷冻或立即用于转移入患者中。在这种情况下，保存全能干细胞。

实施例 10. 工程 HSC 与卵巢癌异种移植物的相互作用

作为本发明的一个实例，我们已经选择采用作为试验系统的卵巢癌，研究 HSC 向肿瘤中的浸润。该癌症主要限于腹膜腔。可得到多种动物模型分析 HSC 至卵巢肿瘤中的浸润。已经从原发性人肿瘤衍生出 3 种人卵巢癌异种移植物 OS、 HU 和 LA，并在腹膜内进行确立，并通过用该途径系列传代(Ward 等 1987, Cancer Res 47, 2662)维持这些异种移植物。这些系中无一种在长期培养中生长良好。所有系主要作为由粘蛋白包围游离飘浮的腹水生长。这未反映出以实体植入的伴有腹水的肿瘤沉积物存在的人类疾病。腹膜内给予 TNF 将 HU 和 LA 模型从该腹水状态转化为腹膜和相关器官表面上植入的实体瘤沉积物

(Malik 等 1989, Int. J. Cancer 44, 918)。这接近代表所述人类疾病的病理学，更特别类似衍生肿瘤的原始病理学。该实体瘤模型已经用作研究卵巢癌的治疗剂的更相关的起始点。(例如干扰素γ, Malik 等 1991, Cancer Res 51, 6643; Burke 等 1997, Eur. J. Cancer, 33 1114)。将用腺病毒或慢病毒或上述慢病毒载体工程改造的人干细胞，以 10^6/0.1ml 的浓度引入带有上述肿瘤的小鼠腹膜腔中。所述 HSC 表达所述治疗基因。这些基因的作用扩展至所述 HSC 之外，即有旁观者效应，使得周围的肿瘤组织被杀伤。在本发明的一个特定实施例中，使用载体 XiaGen-P450 。用所述工程 HSC 处理小鼠，然后用腹膜内给予的 100 mg/Kg 的环磷酰胺处理。用工程 HSC 处理的小鼠肿瘤被环磷酰胺杀伤。

对于 AdHRE 载体，按照如下的公开的干细胞转导方法，使用相似的方法。在含 200 单位/ml IL-3 、 200 单位/ml GM-CSF 、 200 单位/ml G-CSF 的小体积培养基中，用腺病毒载体以高感染复数(100-500)转导 HSC 24 小时。用腺病毒载体转导后，或者可以使所述 HSC 分化，或者可以直接使用所述 HSC 。如果将使用分化细胞，则在培养 14 天后，在含上述细胞因子的软琼脂中定量测定集落形成单位-粒细胞/巨噬细胞(CFU-GM)。将 CD34+细胞或分化细胞引入所述动物中，并迁移至靶组织，并表达治疗基因。

实施例 11. 用修饰的人干细胞治疗卵巢癌

如下从卵巢癌患者收集外周血淋巴细胞。用如上所述的 XiaGen-P450 反转录病毒载体转导细胞。大致如 Stevenson 等 1987, Cancer Res 47, 6100 中对于单核细胞的所述，将工程干细胞通过腹膜内注射送回所述患者。基本上将 50 ml 等渗盐水中的 10^8-10^9 细胞通过由超声监测的针状导管直接引入腹腔。所述细胞在腹膜腔中广泛分布，保持与浆膜表面相连，并且不被运送至其它器官。 1-7 天后，用环磷酰胺治疗所述患者，另外 2 周后分析肿瘤。肿瘤块的减小为工程干细胞对环磷酰胺的局部激活的结果。

按照以上概述的干细胞转导方法，用 AdHRE 载体使用相似的方法。

实施例 12.用慢病毒载体转导肿瘤细胞

作为本发明再一实例，我们已经选择研究将基因转移至神经胶质瘤。神经胶质瘤的特征为血管过多和侵入性，但它们是已经研究的低氧性最强的肿瘤之一[J. Folkman 第 3075-3085, Cancer: Principles and Practice of Oncology, 第 5 版, 编辑 DeVita, Hellman, Rosenberg. Pub. Lippincott-Raven 1997]。构建慢病毒载体，以传递前体药物活化酶和抗血管生成因子的治疗组合，在该实施例中，该组合是人细胞色素 P450 基因和抗血管生成因子 TSP-1 。在低氧下表达被激活，由此确保所述治疗药物给予到所述肿瘤的局部环境中。图 32 中描述了合适的慢病毒载体。模型系统或者使用人细胞系 U87MG，或者使用大鼠 RT-2 系。这两种模型系统均产生可以或者在正常大鼠中或者在裸鼠或 SCID 小鼠中分析的典型血管形成的肿瘤(例如 Wei 等 1994, Human Gene Therapy, 5, 969)。在两种情况下，通过脑内植入肿瘤细胞系，产生所述肿瘤模型。在多个部位将慢病毒载体制剂直接注射入肿瘤块中。载体的传递量为 1-3μl，滴度至少为 10^4 转导单位/μl 。使用相同的方法治疗人类患者。在这种情况下，通过 PET 或 MRI 扫描将肿瘤定位，并注射 0.1ml 等份的载体，或者在外科缩小体积手术时，可以用载体处理所述部位。用环磷酰胺治疗患者，通过 MRI 扫描监测肿瘤生长的减少。

实施例 13.去铁敏对慢病毒载体产生和表达的诱导

去铁敏得自 Sigma 或作为得自 Novartis Pharmaceuticals 的批准的制品 Deferal 的临床制剂获得。用 Desferal 获得的诱导水平等于或高于通过低氧达到的水平。

对于体外应用，在 50mM-1mM 去铁敏存在下，将含低氧调节慢

病毒载体的生产细胞在烧瓶中培养 10 天。在此期间培养物释放载体颗粒，产生的总得率超过 10^7/ml。为了扩大培养，将细胞在滚瓶中培养，使用 50-200 mM 的去铁敏 7 天。因此，该系统利用所述 HRE 的存在，允许病毒载体的诱导。描述了用来使所述基因组对去铁敏应答而受 HRE 调节的系统。可以推论出，其它组分(即 gagpol 和所述包膜)可以同样受调节。可以推论出，该系统可以用来调节任何反转录病毒载体或慢病毒载体的组分的产生。

对于体内应用，用低氧调节慢病毒载体或用含低氧调节慢病毒载体的细胞治疗患者。然后给予患者用去铁敏的标准疗程。这除任何低氧效应外还激活所述治疗，在某些情况下，可以取代对局部低氧的需求。例如，如果将所述细胞植入，以提供诸如 Epo 或凝血因子(诸如因子 IX)的治疗蛋白，则可以通过调节 Desferal 的剂量调节所述传递。

断裂内含子技术

以下内容取自我们同时待审的 PCT 申请，提供关于如何设计具有断裂内含子特征的反转录病毒载体的内容。可以采用这些内容，制备能够将 ILRE 调节的 NOI 传递至细胞的、具有断裂内含子结构的一种或多种载体。题目为“载体”的该 PCT 专利申请附加于此，其全部内容通过引用结合到本文中。

总结

在广义方面，本发明提供包含在修饰细胞中有活性的效应元件的修饰细胞；其中通过用一种或多种病毒载体经病毒转导而转化细胞或祖细胞，制备所述修饰细胞，其中至少一种所述病毒载体包含所述效应元件。

在一个优选方面，本发明提供包含在修饰细胞中有活性的效应元件的修饰细胞；其中通过用一种或多种病毒载体经病毒转导而转化细胞或祖细胞，制备所述修饰细胞，其中至少一种所述病毒载体包含所

述效应元件，并且其中所述效应元件包含 ILRE .

在一个优选方面，本发明提供包含在修饰细胞中有活性的效应元件的修饰细胞；其中通过用一种或多种病毒载体经病毒转导而转化细胞或祖细胞，制备所述修饰细胞，其中至少一种所述病毒载体包含所述效应元件，并且其中所述效应元件包含 HRE .

在一个更优选方面，本发明提供包含至少一种可表达目的核苷酸序列(NOI)的修饰的造血干细胞(MHSC)，其中所述 NOI 或每种 NOI 可操作地连接于包含局部缺血样效应元件(ILRE)的一种或多种效应元件。

本发明也包括在实施例小节中描述的载体、构成物、调节元件和启动子，它们每种均是新型的。

上述说明书中提及的所有出版物均通过引用结合到本文中。在不偏离本发明的范围和精神的情况下，对本发明所述方法和系统的各种修改和变化对于本领域技术人员而言是显而易见的。尽管本发明结合具体的优选实施方案进行了描述，但应该理解，要求保护的本发明不应不当地限于这类具体的实施方案。实际上，对分子生物学领域和相关领域的技术人员显而易见的、对实施本发明的所述方法的各种修改，均应属于以下权利要求书的范围内。

载体

本发明涉及载体。

具体地说，本发明涉及用于包装并表达反转录病毒颗粒中的遗传物质的新系统。

更具体地讲，本发明涉及能够表达反转录病毒颗粒的新系统，它能够将目的核苷酸序列(下文缩写为"NOI")或甚至多种 NOI 传递至一个或多个靶位点。

另外，本发明特别涉及可用于基因治疗的新型反转录病毒载体。

基因治疗可以包括以下的任何一种或多种形式：例如在一个或多个靶位点诸如靶细胞中对一种或多种核苷酸序列进行加入、取代、缺失、补充、操作等。如果所述靶位点为靶细胞，则所述细胞可以为组织或器官的部分。在 Molecular Biology (编辑 Robert Meyers, Pub VCH, 诸如第 556-558 页)中可以找到关于基因治疗的的一般内容。

作为再一实例，基因治疗也可以提供用于以下任何一种或多种目的的方法：可以应用诸如基因的核苷酸序列以取代或补充缺陷基因；可以消除致病核苷酸序列，诸如基因或其表达产物；可以加入或引入核苷酸序列，诸如基因或其表达产物，以便例如产生更合适的表型；可以加入或引入核苷酸序列，诸如基因或其表达产物，例如用于选择目的(即在非转化细胞上选择转化细胞等)；可以在分子水平上操作细胞，以治疗、治愈或预防疾病病症－诸如癌症(Schmidt-Wolf 和 Schmidt-Wolf, 1994, Annals of Hematology 69, 273-279)或其它疾病病症，诸如免疫疾病、心血管疾病、神经病、炎症疾病或传染病；可以操作抗原和/或将其引入以诱发免疫应答，诸如基因疫苗接种。

在最近数年中，已经提出将反转录病毒用于基因治疗。本质上说，反转录病毒是生活周期不同于裂解病毒的 RNA 病毒。在该方面，反转录病毒是通过 DNA 中间体复制的感染性实体。当反转录病毒感染细胞时，其基因组由反转录酶转变为 DNA 形式。所述 DNA 拷贝用作

模板，以产生新的RNA基因组和感染性病毒颗粒装配所必需的病毒编码的蛋白。

有许多反转录病毒，实例包括：鼠类白血病病毒(MLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、弗吉纳米肉瘤病毒(FuSV)、莫洛尼鼠类白血病病毒(Mo-MLV)、FBR鼠类骨肉瘤病毒(FRB MSV)、莫洛尼鼠类肉瘤病毒(Mo-MSV)、艾贝尔逊鼠类白血病病毒(A-MLV)、鸟类髓细胞瘤病病毒-29 (MC29)和鸟类成红细胞增生病毒(AEV)。

在Coffin等("Retroviruses" 1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press编辑: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus第758-763页)中，可以找到详细的反转录病毒一览表。

在本领域中可以找到关于某些反转录病毒基因组结构的细节。作为实例，可以从NCBI Genbank中可以找到关于HIV的细节(即基因组登记号AF033819)。

所有野生型反转录病毒基本上均含有三种主要的编码域－ *gag*、*pol*、*env*，它们编码必需的病毒体蛋白。然而，反转录病毒可以大致分为两类：即"简单的"和"复杂的"。这些类别的区别在于其基因组结构。简单的反转录病毒通常仅携带基本信息。相比之下反，复杂的反转录病毒也编码得自多重剪接信息的另外的调节蛋白。

反转录病毒甚至可以进一步分为7组。其中5组代表具有致癌潜力的反转录病毒。其余2组是慢病毒和泡沫病毒。这些反转录病毒的综述出现于"Retroviruses"(1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press编辑: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus 第1-25页)。

除人T细胞白血病病毒-牛白血病病毒群(TLV-BLV)外的所有致癌成员均为简单的反转录病毒。HTLV、BLV和慢病毒以及泡沫病毒是复杂的反转录病毒。研究得最清楚的一些致癌反转录病毒是劳斯肉瘤病毒(RSV)、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)和鼠类白血病病毒(MLV)和人T细胞白血病病毒(HTLV)。

慢病毒群甚至再分为“灵长类”和“非灵长类”慢病毒。灵长类慢病毒的实例包括人免疫缺陷病毒(HIV)(即人自身免疫缺陷综合征(AIDS)的致病因子)和猿猴免疫缺陷病毒(SIV)。非灵长类慢病毒群包括原型“慢病毒”维斯那/梅迪病毒(VMV)以及相关的山羊关节炎-脑炎病毒(CAEV)、马传染性贫血病毒(EIAV)和新近描述的猫免疫缺陷病毒(FIV)和牛免疫缺陷病毒。

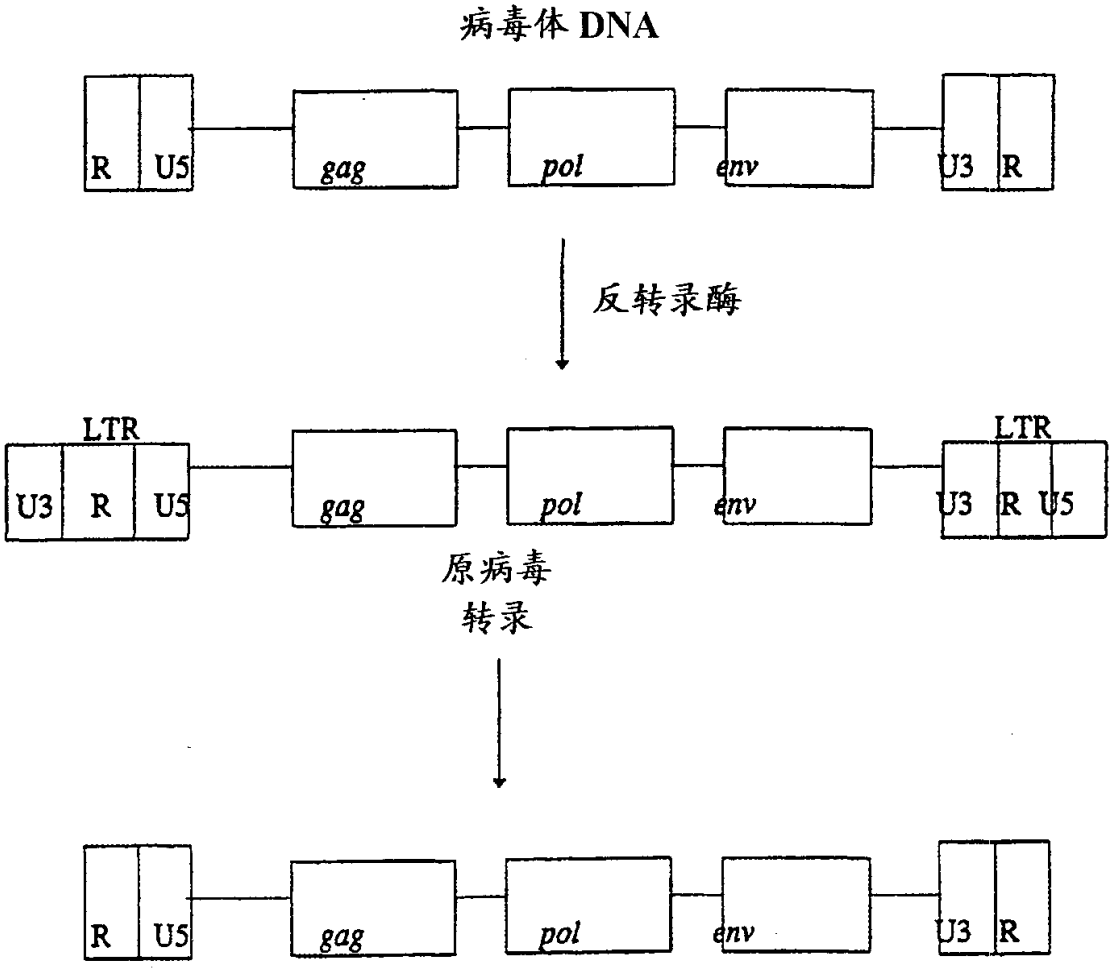
慢病毒科和其它类型反转录病毒之间的不同之处在于，慢病毒具有感染分裂细胞和非分裂细胞的能力(Lewis 等 1992 EMBO. J 11: 3053-3058; Lewis 和 Emerman 1994 J. Virol. 68: 510-516)。相比之下，诸如 MLV 的其它反转录病毒不能感染非分裂细胞，诸如构成例如肌肉、脑、肺和肝脏组织的细胞。

在感染过程中，反转录病毒最初附着于特定的细胞表面受体。在进入敏感性宿主细胞时，反转录病毒 RNA 基因组则由亲代病毒内携带的病毒编码的反转录酶拷贝为 DNA 。该 DNA 被转运到宿主细胞核，随后在核内整合入宿主基因组。在此阶段，它通常被称为原病毒。在细胞分裂期间，原病毒稳定地存在宿主染色体上，并同其它细胞蛋白一样被转录。原病毒编码制造更多病毒所需的蛋白和包装机器，病毒可以通过有时称为“芽生”的过程离开细胞。

正如已经表明的，每个反转录病毒基因组均包含称为 *gag* 、 *pol* 和 *env* 的基因，它们编码病毒体蛋白和酶。在原病毒中，这些基因两端的侧翼为称为长末端重复序列(LTR)的区域。 LTR 负责原病毒的整合和转录。它们也作为增强子-启动子序列而起作用。换句话说， LTR 可以控制病毒基因的表达。反转录病毒 RNA 的包衣壳借助于位于病毒基因组 5’端的 *psi* 序列而发生。

LTR 本身是相同的序列，它们可以分为三种元件，这些元件称为 U3 、 R 和 U5 。 U3 得自所述 RNA 3’端特有的序列。 R 得自于所述 RNA 两端重复的序列，而 U5 得自所述 RNA 5’端特有的序列。在不同反转录病毒中，这三种元件的大小可以显著变化。

为了易于理解，以下显示 RNA 和 DNA 形式的所述反转录病毒的简单的一般结构(未按比例制图)，其中显示了 LTR 的基本特征和 *gag*、*pol* 和 *env* 的相对定位。



如上图所示，传染性反转录病毒 RNA 基因组的基本分子结构是 (5') R- U5 - *gag*, *pol*, *env* -U3-R (3')。在缺陷型反转录病毒载体基因组中，*gag*、*pol* 和 *env* 可能不存在或没有功能。该 RNA 两端的 R 区是重复序列。U5 和 U3 分别代表 RNA 基因组 5'和 3'端特有的序列。

病毒体 RNA 反转录为双链 DNA 发生于细胞质中，涉及反转录酶从模板分子的 5'末端至 3'末端的两次跳跃。这些跳跃的结果是位于病毒体 RNA 5'和 3'端的序列复制。然后这些序列在病毒 DNA 两端发生串联融合，形成包含 R U5 和 U3 区的长末端重复序列(LTR)。反转录

完成时，病毒 DNA 易位到细胞核中，在此称为前整合复合物(PIC)的反转录病毒基因组的线性拷贝，借助病毒体整合酶随机插入染色体 DNA 中，形成稳定的原病毒。整合入宿主细胞基因组中的可能位点的数目非常大并且分布非常广。

原病毒转录的控制主要归于病毒 LTR 的非编码序列。转录起始位点位于左手边 LTR (未显示)中 U3 和 R 之间的边界， poly (A)添加(终止)位点位于右手边 LTR (未显示)中 R 和 U5 之间的边界。 U3 含有所述原病毒的大多数转录控制元件，它们包括对细胞转录激活蛋白和在某些情况下对病毒的转录激活蛋白应答的启动子和多个增强子序列。某些反转录病毒具有任何一种或多种的以下基因：诸如 *tat*、 *rev*、 *tax* 和 *rex*，它们编码参与基因表达调节的蛋白。

原病毒 DNA 的转录再产生全长病毒 RNA 基因组大小的 RNA 分子和通过 RNA 加工产生的亚基因组大小的 RNA 分子。通常，所有的 RNA 产物均用作产生病毒蛋白的模板。通过 RNA 转录物剪接和翻译期间核糖体移码的组合，完成 RNA 产物的表达。

RNA 剪接是去除间插或“内含子” RNA 序列且将剩余的“外显子”序列连接以提供用于翻译的连续读框的过程。反转录病毒 DNA 的最初转录物以几种方式修饰，其方式非常类似于细胞 mRNA。然而，与其中所有内含子被有效剪接的大多数细胞 mRNA 不同，新合成的反转录病毒 RNA 必须转变为两个群体。一个群体保持未剪接，以用作基因组 RNA，而另一群体进行剪接，以提供亚基因组 RNA。

全长未剪接的反转录病毒 RNA 转录物有两个功能： (i) 它们编码 *gag* 和 *pol* 基因产物，和(ii) 它们作为基因组 RNA 被包装入子代病毒体颗粒中。亚基因组大小的 RNA 分子为其余的病毒基因产物提供 mRNA。所有剪接的反转录病毒转录物均带有第一外显子，它跨越 5’ LTR 的 U5 区。最后一个外显子总是保留 3’ LTR 编码的 U3 和 R 区，尽管其大小不同。其余 RNA 结构的组成取决于剪接事件数和可变剪接位点的选择。

在简单反转录病毒中，一个群体的新合成的反转录病毒 RNA 保持未剪接，以用作基因组 RNA 并作为 *gag* 和 *pol* 的 mRNA。另一群体进行剪接，将基因组 RNA 的 5'部分融合至下游基因，最常见为 *env*。用位于 *gag* 上游的剪接供体和 *pol* 3'末端附近的剪接受体完成剪接。在剪接供体和剪接受体之间、通过剪接去除的内含子含有 *gag* 和 *pol* 基因。这一剪接事件产生包膜(Env)蛋白的 mRNA。所述剪接供体通常位于 *gag* 上游，但在诸如 ASLV 的某些病毒中，剪接供体位于 *gag* 基因中的少数密码子，产生第一 Env 翻译产物，包括与 Gag 共同的少数氨基末端氨基酸残基。Env 蛋白在膜结合多核糖体上合成，并通过细胞的囊泡输运转运至质膜，在此它被加入病毒颗粒中。

复杂的反转录病毒既产生单剪接转录物，也产生多剪接转录物，它们不仅编码 *env* 基因产物，而且编码数组这些病毒独特的调节蛋白和辅助蛋白。复杂的反转录病毒诸如慢病毒，尤其是 HIV，提供了在反转录病毒感染期间可能发生的可变剪接复杂性的突出实例。例如，现在已知，HIV-1 能够通过亚适剪接，由最初的基因组转录物产生 30 种以上的不同 mRNA。由于破坏竞争性剪接受体的突变可以引起剪接模式的变化，并且可以影响病毒的感染性，因此看来这种选择过程受到调节(Purcell 和 Martin 1993 J Virol 67: 6365-6378)。

在受感染细胞中，全长 RNA 和亚基因组大小 RNA 的相对比例是变化的，在反转录病毒基因表达期间，这些转录物水平的调节是潜在的控制步骤。对于反转录病毒基因的表达，未剪接 RNA 和剪接的 RNA 均必须转运到胞质，并且必须维持剪接的和未剪接的 RNA 的合适比例，以有效地进行反转录病毒的基因表达。不同类别的反转录病毒已经进化出对该问题的不同解决方法。仅使用全长和单剪接 RNA 的简单反转录病毒，或者利用不定的有效剪接位点，或者通过在其基因组中加入几种仅部分限定的顺式作用元件，来调节这些种类的胞质比率。既指导单剪接 RNA 的合成、也指导多剪接 RNA 的合成的复杂反转录病毒，通过 RNA 上的序列与辅助基因之一(诸如 HIV-1 中的 *rev* 和

HTLV-1 中的 *rex*)的蛋白产物相互作用，来调节不同基因组和亚基因组大小的 RNA 种类的转运和可能的剪接。

关于结构基因 *gag*、*pol* 和 *env* 本身以及略微更详细的细节，*gag* 编码病毒的内部结构蛋白。Gag 被蛋白水解加工为成熟蛋白 MA (基质)、CA (壳体)和 NC (核壳)。*pol* 基因编码反转录酶(RT)，RT 含有 DNA 聚合酶和相关的 RNA 酶 H 两者的活性，*pol* 基因还编码整合酶(IN)，IN 介导基因组的复制。*env* 基因编码病毒体的表面(SU)糖蛋白和跨膜(TM)蛋白，它们形成与细胞受体蛋白特异性相互作用的复合物。这种相互作用最终导致病毒膜与细胞膜的融合。

Env 蛋白是覆盖病毒颗粒并在允许病毒进入靶细胞中起主要作用的病毒蛋白。反转录病毒的包膜糖蛋白复合物包括两种多肽：一种外部的糖基化亲水多肽(SU)和一种跨膜蛋白(TM)。这些蛋白一起形成病毒体表面上的寡聚“隆起(knob)”或“隆起的刺突”。两种多肽均由 *env* 基因编码，并以多肽前体形式合成，多肽前体在其转运至细胞表面期间被蛋白水解切割。尽管未切割的 Env 蛋白能够结合于所述受体，但切割事件本身对激活该蛋白的融合潜力是必需的，这对于病毒进入宿主细胞是必需的。通常，SU 和 TM 蛋白均于多个位点糖基化。然而，在某些病毒中，例如 MLV，TM 不被糖基化。

尽管 SU 和 TM 蛋白本身不总是有包膜病毒体颗粒装配所需的，但它们在进入过程中起重要作用。在该方面，SU 域结合于靶细胞上的受体分子，通常是特定的受体分子。据信这一结合事件激活 TM 蛋白的膜融合诱导潜力，此后病毒膜和细胞膜融合。在某些病毒中，特别是 MLV，人们认为导致 TM 胞质尾的短部分去除的切割事件在暴露该蛋白全部融合活性中起关键作用(Brody 等 1994 J Virol 68:4620-4627; Rein 等 1994 J Virol 68:1773-1781)。TM 跨膜区段远侧的该胞质“尾”仍在病毒膜内侧上，在不同的反转录病毒中其长度显著不同。

因此，SU/受体相互作用的特异性可以限定反转录病毒的宿主范围和组织嗜性。在某些情况下，这种特异性可能限制重组反转录病毒

载体的转导潜力。这里，转导包括用病毒载体将非病毒基因传递至靶细胞的过程。因此，许多基因治疗试验使用 MLV 。具有称为 4070A 的包膜蛋白的特定 MLV 被称为兼嗜性病毒，它也可以感染人细胞，因为其包膜蛋白与人和小鼠之间保守的磷酸转运蛋白“对接”。这种转运蛋白是普遍存在的，因此这些病毒能够感染许多细胞类型。然而，在某些情况下，尤其从安全的角度来看，它可能对特异性导向限定的细胞有益。为此，几个研究小组已经工程改造了一种小鼠亲嗜性反转录病毒，这种反转录病毒不同于相对正常地仅感染小鼠细胞的其兼嗜性病毒，而是特异性地感染特定的人细胞。用红细胞生成素区段取代 Env 蛋白的片段，产生重组反转录病毒，该反转录病毒则特异性地结合至在其表面表达红细胞生成素受体的人细胞，诸如红细胞前体 (Maulik 和 Patel 1997 “Molecular Biotechnology: Therapeutic Applications and Strategies” 1997 Wiley-Liss Inc. 第 45 页)。

除 *gag*、 *pol* 和 *env* 外，复杂的反转录病毒也含有“辅助”基因，它们编码辅助蛋白。辅助蛋白定义为由通常的复制基因或结构基因 *gag*、 *pol* 和 *env* 编码的蛋白以外的、由辅助基因编码的蛋白。这些辅助蛋白不同于参与基因表达调节的蛋白，如由 *tat* 、 *rev* 、 *tax* 和 *rex* 编码的蛋白。辅助基因的实例包括 *vif*、 *vpr* 、 *vpx* 、 *vpu* 和 *nef* 中的一个或多个。这些辅助基因可以发现于例如 HIV 中(参见例如 “ Retroviruses ” Coffin 等编辑, Pub. CSHL 1997 的第 802 和 803 页)。非必需辅助蛋白可以在特化的细胞类型中起作用，提供与由细胞蛋白提供的功能至少部分重复的功能。通常，辅助基因位于 *pol* 和 *env* 之间，恰好在 *env* 下游，包括 LTR 的 U3 区或 *env* 和每种其它基因的重叠部分。

复杂的反转录病毒已经进化出调节机制，所述调节机制使用病毒编码的转录激活蛋白以及细胞转录因子。这些反式作用的病毒蛋白用作由 LTR 指导的 RNA 转录的激活蛋白。慢病毒的转录反式激活蛋白由病毒 *tat* 基因编码。 Tat 结合于稳定的称为 TAR 的茎-环 RNA 二级

结构，其一种功能是使 Tat 明显最佳定位，以反式激活转录。

如早前所述，已经提议将反转录病毒作为传递系统(要不然作为传递载体进行表达)，特别是将 NOI 或多个 NOI 传递至一个或多个目的位点。这种转移可以在体外、活体外或体内发生，或是它们的组合。当以该方式使用时，反转录病毒通常称为反转录病毒载体或重组反转录病毒载体。反转录病毒载体已经被用来研究反转录病毒生活周期的各个方面，包括受体使用、反转录和 RNA 包装(由 Miller 综述，1992 Curr Top Microbiol Immunol 158:1-24)。

在用于基因治疗的典型的重组反转录病毒载体中，可以从病毒除去 *gag*、*pol* 和 *env* 蛋白编码区中的一种或多种的至少一部分。这使得反转录病毒载体为复制缺陷型。除去的部分甚至可以用一种 NOI 取代，以便产生能够将其基因组整合入宿主基因组的病毒，但其中修饰的病毒基因组由于缺乏结构蛋白而本身不能繁殖。当整合入宿主基因组中时，发生所述 NOI 的表达，产生例如治疗和/或诊断效应。因此，通常通过：将 NOI 整合入重组病毒载体中；将修饰的病毒载体包装入病毒体外壳中；并允许转导目的位点，诸如靶细胞或靶细胞群体，而达到将所述 NOI 转移至目的位点。

繁殖并分离大量的反转录病毒载体(例如制备合适滴度的反转录病毒载体)，通过采用包装细胞系或辅助细胞系和重组载体的组合，用于后续的例如目的位点的转导，这是可能的。

在某些情况下，繁殖和分离可能需要将反转录病毒的 *gag*、*pol* 和 *env* 基因分离，并将其分别引入宿主细胞中，以产生“包装细胞系”。所述包装细胞系产生包装反转录病毒 DNA 所需的蛋白，但由于缺乏 *psi* 区而导致不能包衣壳。然而，当将携带 NOI 和 *psi* 区的重组载体引入包装细胞系时，所述辅助蛋白可以包装 *psi* 阳性重组载体，产生重组病毒原种。这可以用来转导细胞，以将所述 NOI 引入细胞基因组中。其基因组缺乏制造病毒蛋白所需的所有基因的重组病毒，仅可以转导一次，并且不能繁殖。这些仅能转导一轮靶细胞的病毒载体被称为复

制缺陷型载体。因此，将所述 NOI 引入宿主/靶细胞基因组，而不产生潜在有害的反转录病毒。在“ Retroviruses ” (1997 Cold Spring Harbour Laboratory Press 编辑: JM Coffin, SM Hughes, HE Varmus 第 449 页)中概述了可用的包装系。

已经发展了反转录病毒包装细胞系的设计，以解决特别是早先设计所通常遇到的自发产生辅助病毒的问题。因为同源性大大促进重组，所以降低或消除该载体和辅助病毒基因组之间的同源性已经减少了辅助病毒产生的问题。新近，已经研制出包装细胞，其中在独立转染入包装细胞系的分离的表达质粒中携带 *gag* 、 *pol* 和 *env* 病毒编码区，使得野生型病毒的产生需要三次重组事件。这降低了可复制病毒产生的潜力。该策略有时称为三质粒转染法(Soneoka 等 1995 Nucl. Acids Res. 23: 628-633)。

当研制载体时，瞬时转染也可以用来测量载体的产生。在该方面，瞬时转染避免了产生稳定的载体生产细胞系所需的较长时间，如果该载体或反转录病毒包装组分对细胞有毒性，则使用瞬时转染。通常用来产生反转录病毒载体的组分包括编码 Gag/Pol 蛋白的质粒、编码 Env 蛋白的质粒和含有 NOI 的质粒。载体的产生包括将这些组分中的一种或多种瞬时转染入含其它所需组分的细胞中。如果该载体编码有毒基因或编码干扰宿主细胞复制的基因，诸如细胞周期抑制剂或诱导细胞凋亡的基因，则可能难以产生稳定的载体生产细胞系，但瞬时转染可以用来在细胞死亡之前产生所述载体。此外，利用瞬时转染，已经开发出产生的载体滴度水平与得自稳定的载体生产细胞系的水平相当的细胞系(Pear 等 1993, Proc Natl Acad Sci 90:8392-8396)。

某些 HIV 蛋白的毒性，可能使得难以产生稳定的基于 HIV 的包装细胞，由于这种毒性，通常通过载体和辅助病毒的瞬时转染制备 HIV 载体。某些工作者甚至已经用水泡性口膜炎病毒(VSV)的 Env 蛋白取代 HIV 的 Env 蛋白。 VSV Env 蛋白的插入促进载体的浓缩，因为通过瞬时转染，已经产生滴度为 5×10^5 (浓缩后为 10^8)的 HIV/VSV-G 载体

(Naldini 等 1996 Science 272: 263-267)。因此， HIV 载体的瞬时转染可以提供有用的策略，以产生高滴度的载体(Yee 等 1994 PNAS. 91: 9564-9568)。

关于载体的滴度，反转录病毒载体的实际使用主要受以下因素的限制：在体外培养物中可以获得的转导颗粒滴度(通过不超过 10^8 颗粒/ml)和许多有包膜病毒对用于浓缩和纯化病毒的常规生化和物化技术的敏感性。

作为实例，已经开发了几种浓缩反转录病毒载体的方法，包括使用离心(Fekete 和 Cepko 1993 Mol Cell Biol 13:2604-2613)、中空纤维过滤(Paul 等 1993 Hum Gene Ther 4: 609-615)和切向流过滤(Kotani 等 1994 Hun Gene Ther 5: 19-28)。尽管可以达到将病毒滴度提高 20 倍，但反转录病毒的 Env 蛋白的相对脆性限制了浓缩反转录病毒载体的能力，且浓缩该病毒通常导致感染性病毒体的回收差。尽管如上所述，通过用更稳定的 VSV-G 蛋白取代反转录病毒的 Env 蛋白可以克服该问题，这允许以更好的得率更有效地浓缩载体，但其缺点是 VSV-G 蛋白对细胞的毒性相当大。

尽管用目前可利用的载体可获得 10^7 cfu/ml 的无辅助病毒载体的滴度，但通常可以用滴度低得多的载体贮液进行试验。然而，由于实用原因，需要高滴度的病毒，尤其是当必须感染大量的细胞时。另外，转导大百分率的某些细胞类型需要高滴度。例如，人造血祖细胞感染的频率主要取决于载体的滴度，仅用滴度非常高的贮液才能发生有用频率的感染(Hock 和 Miller 1986 Nature 320: 275-277; Hogge 和 Humphries 1987 Blood 69: 611-617)。在这些情况下，仅仅将所述细胞暴露于大体积的病毒以补偿低病毒滴度是不够的。相反，在某些情况下，感染性载体病毒体的浓度对于促进有效的转导可能是关键性的。

研究人员正在尝试产生高滴度的载体以用于基因传递。作为实例，已经证明不同载体设计的比较，可用来帮助限定高滴度病毒产生所需的必需元件。关于不同反转录病毒载体设计的早期工作表明，几

乎所有的 MLV 内部蛋白编码区均可以缺失，而不消除该载体的感染性(Miller 等 1983 Proc Natl Acad Sci 80: 4709-4713)。这些早期载体仅保留 *env* 编码区 3'端的小部分。后续的工作已经表明，所有的 *env* 基因编码序列均可以去除，而不会进一步降低载体的滴度(Miller 和Rosman 1989 Biotechnique 7: 980-990; Morgenstern 和 Land 1990 Nucleic Acids Res 18: 3587-3596)。仅病毒 LTR 和连接所述 LTR 、包括正链和负链 DNA 引发所需区段和将病毒 RNA 选择性包装入病毒体所需的区(*psi* 位点; Mann 等 1983 Cell 33: 153-159)在内的短区域，被认为是载体传递必需的。尽管如此，用这些早期载体获得的病毒滴度仍低于亲代辅助病毒滴度的约 10 倍。

其它试验表明，*gag* 基因 5'端序列的保留显著提高病毒载体的滴度，这是因为将病毒 RNA 包装入病毒体中的包装效率提高(Armentano 等 1987 J Virol 61: 1647-1650; Bender 等 1987 J Virol 61:1639-1646; Adam 和 Miller 1988 J Virol 62: 3802-3806)。这种效应不是因为由该载体的 *gag* 区合成病毒蛋白，而是因为 *gag* 读框破坏或 *gag* 的密码子突变为终止密码子已经对载体的滴度无影响(Bender 等 1987 出处同上)。这些试验证明，将基因组 RNA 有效包装入 MLV 所需的序列比先前通过缺失分析限定的 *psi* 信号大(Mann 等 1983 出处同上)。为了获得高滴度(10^6 至> 10^7)，已表明在反转录病毒载体中包括这种称为 *psi*+ (*psi* plus)的较大的信号是重要的。现在已经证明，该信号从所述剪接供体上游跨越至 *gag* 起始密码子下游(Bender 等 1987 出处同上)。因为该信号的位置而使得在剪接的 *env* 表达转录物中该信号缺失。这确保仅含有病毒生活周期的所有三种必需基因的全长转录物被包装。

除在提高载体滴度方面操作所述反转录病毒载体外，也已经设计了反转录病毒载体，以诱导在转导的细胞中产生特定的 NOI (通常为标记蛋白)。正如已经提及的，最常用的反转录病毒载体设计包括用一种或多种 NOI 取代反转录病毒序列，以产生复制缺陷型载体。这种最简单的方法是使用所述反转录病毒 5' LTR 中的启动子，来控制编码 NOI

的 cDNA 的表达，或改变所述 LTR 的增强子/启动子，以提供组织特异性表达或诱导性。或者，已经通过用在启动子选择中提供更大灵活性的内部启动子表达了单一的编码区。

当所述 NOI 为选择标记时，如在次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(*hprt*)的情况下，最容易实现表达目的基因的这些策略(Miller 等 1983 Proc Natl Acad Sci 80: 4709-4713)，这便于载体转导的细胞的选择。如果该载体含有不是选择标记的 NOI，则可以通过与存在于分离的质粒上的选择标记共转染，将该载体引入包装细胞。该策略对于基因治疗有吸引力的优点是：在最终的靶细胞中表达单一的蛋白，并且避免了选择标记的可能毒性和抗原性。然而，当所插入的基因不可选择时，该方法的缺点是：更难以产生生产高滴度载体贮液的细胞。另外，通常更难以测定该载体的滴度。

目前用来设计表达两种或两种以上蛋白的反转录病毒载体的方法，依赖于三种通用的策略。这些策略包括：(i)由一种启动子转录的可变剪接的 mRNA 表达不同的蛋白；(ii)使用 5' LTR 中的启动子和内部启动子，驱动不同 cDNA 的转录，和(iii)使用内部核糖体进入位点(IRES)元件，以允许由或者单一 mRNA 或者由可以从一个可读框表达的融合蛋白翻译多个编码区。

含内部启动子的载体已经广泛用来表达多个基因。一种内部启动子使得利用非病毒 LTR 的启动子/增强子组合来驱动基因表达成为可能。多个内部启动子可以包括在反转录病毒载体中，且已经证明可以分别由来自其自身的启动子表达至少三种不同的 cDNA (Overell 等 1988 Mol Cell Biol 8: 1803-1808)。

尽管现在有许多这类修饰的反转录病毒载体可以用于在多种哺乳动物细胞中表达 NOI，但大多数这些反转录病毒载体衍生自不能转导非分裂细胞的简单的反转录病毒，诸如鼠类致癌反转录病毒。

作为实例，广泛使用的利用可变剪接以由病毒 LTR SV (X) (Cepko 等 1984 Cell 37: 1053-1062)表达基因的载体，含有新霉素磷酸转移酶基

因作为选择标记。这类类型载体的模型是亲代病毒 MO-MLV，在该病毒中 Gag 和 Gag-Pol 蛋白由全长病毒 mRNA 翻译，而 Env 蛋白由剪接的 mRNA 产生。由该载体编码的其中一种蛋白由全长 RNA 翻译，而将 5'LTR 附近的剪接供体恰好连接于第二基因上游的剪接受体的剪接作用产生一种 RNA，由该 RNA 可以翻译第二基因产物。该策略的一个缺点是将外源序列插入剪接的基因的内含子中。这可以影响剪接 RNA 与未剪接 RNA 之比，或提供干扰编码第二基因产物的剪接 RNA 产生的可变剪接受体(Korman 等 1987 Proc Natl Acad Sci 84: 2150-2154)。因为这些效应是不可预测的，所以它们可能影响所编码基因的生产。

其它修饰的反转录病毒载体可以根据剪接能力分为两类。

第一类修饰的反转录病毒载体含有剪接供体内的、抑制病毒转录物剪接的突变(GT 至 GC)，其典型为 pBABE 载体(Morgenstern 等 1990 Nucleic Acid Reseasrch 18: 3587-3596)。这种剪接抑制是有益的，原因有两个：首先，它确保所有的病毒转录物均含有包装信号，并因此所有的病毒转录物均可以包装入所述生产细胞。其次，它防止病毒剪接供体和所插入基因的可能的隐蔽剪接受体之间的潜在的异常剪接。

第二类修饰的反转录病毒载体含有功能性内含子，其典型为 N2 (Miller 等 1989 Biotechniques 7: 980-990)和新近的 MFG (Dranoff 等 1993 Proc Natl Acad Sci 19: 3979-3986)。这两种载体均使用在包装信号内发现的正常的剪接供体。然而，它们各自的剪接受体(SA)不同。对于 N2，SA 发现于“延伸的”包装信号内(Bender 等 1987 出处同上)。对于 MFG，使用天然的 SA (发现于 *pol* 内，参见图 1)。对于这两种载体，已经表明，剪接大大增强转导细胞中的基因表达(Miller 等 1989 出处同上; Krall 等 1996 Gene Therapy 3: 37-48)。这类观察支持先前的发现：一般而言，剪接可以增强 mRNA 的翻译(Lee 等 1981 Nature 294: 228-232; Lewis 等 1986 Mol Cell Biol 6: 1998-2010; Chapman 等 1991 Nucleic Acids Res 19: 3979-3986)。对此，一个可能的原因是：参与转录物剪接

的相同机器可能也有助于将转录物输出细胞核。

与上述修饰的反转录病毒载体不同，对能够感染非分裂细胞的反转录病毒慢病毒系统中可变剪接的研究工作非常少(Naldini 等 1996 Science 272: 263-267)。迄今为止，仅有的公开的慢病毒载体为衍生自 HIV-1 (Kim 等 1997 J Virol 72: 811-816)和 FIV (Poeschla 等 1998 Nat Med 4: 354-357)的慢病毒载体。这些载体仍含有病毒衍生的剪接供体和受体序列(Naldini 等 1996 出处同上)。

一些研制用于基因传递的高滴度载体的替代方法包括使用：(i)缺陷型病毒载体，诸如腺病毒、腺相关病毒(AAV)、疱疹病毒和痘病毒和(ii)修饰的反转录病毒载体设计。

腺病毒是一种双链线性 DNA 病毒，它不经过 RNA 中间体。根据基因序列的同源性，将超过 50 种不同的人血清型腺病毒分为 6 个亚群。腺病毒的天然靶是呼吸道上皮和胃肠道上皮，一般仅产生轻度症状。血清型 2 和 5 (具有 95%序列同源性)最常用于腺病毒载体系统中，通常与年轻人的上呼吸道感染相关。

腺病毒是无包膜的规则二十面体。典型的腺病毒包括 140nm 壳内 DNA 病毒。二十面体对称的该病毒由 152 个壳粒组成： 240 个六邻体和 12 个五邻体。所述颗粒的核心含有 36 kb 线性双链体 DNA，它于 5'端与用作 DNA 复制引物的末端蛋白(TP)共价连接。所述 DNA 具有反向末端重复序列(ITR)，且其长度随血清型而变化。

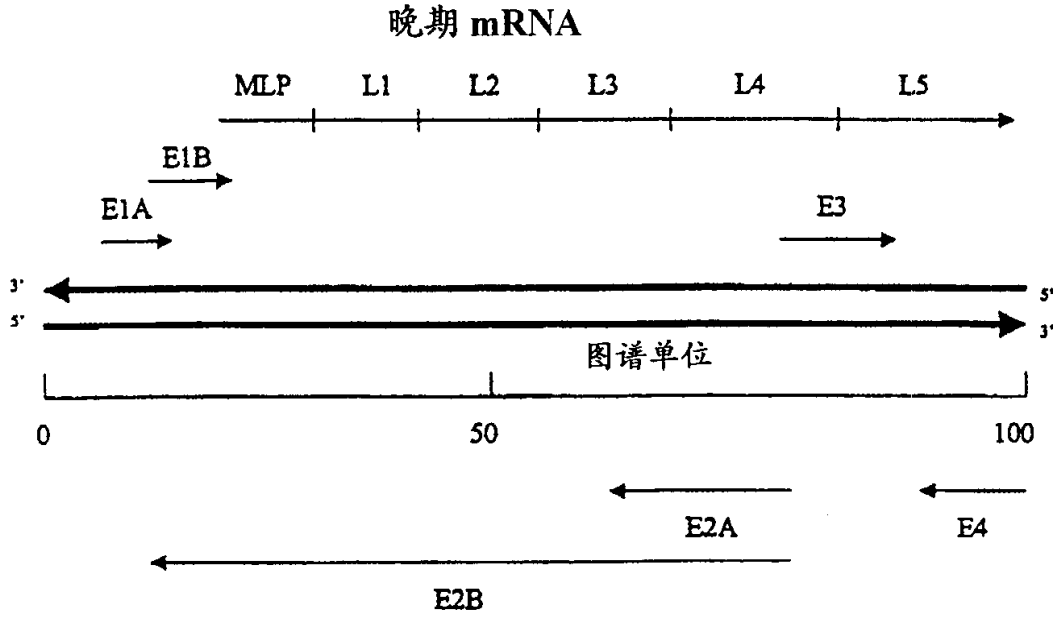
腺病毒进入细胞涉及一系列不同的事件。病毒通过病毒纤丝(37 nm)和细胞上的纤丝受体的相互作用而附着于细胞。 Ad2/5 血清型的该受体最近已经鉴定出，命名为 CAR (Coxsackie 和 Adeno 受体, Tomko 等(1997 Proc Natl Acad Sci 94:3352-3358)。所述病毒通过细胞αvβ3 和 αvβ5 整联蛋白内化入内体，是由五邻体-基质壳体蛋白(base capsid protein)中的病毒 GRD 序列介导的(Wickham 等, 1993 Cell 73: 309-319)。内化后，内体通过称为内体裂解(endosomolysis)的过程破裂，据信这是由细胞αvβ5 整联蛋白优先促进的事件(Wickham 等 1994 J Cell

Biol 127: 257-264)。另外，最近有证据表明， Ad5 的纤丝隆起以高亲和性结合于某些细胞类型表面上的 1 类 MHC α2 结构域，所述细胞类型包括上皮细胞和 B 原淋巴细胞(Hong 等 1997 EMBO 16: 2294-2306)。

随后，病毒易位至细胞核，在此发生早期区的激活，并且不久后进行 DNA 复制和晚期区的激活。腺病毒 DNA 的转录、复制和包装需要宿主和病毒两者的功能性蛋白机器。

病毒基因的表达可以分为早期(E)和晚期(L)。晚期定义为病毒 DNA 复制的开始。腺病毒结构蛋白一般在晚期合成。在腺病毒感染后，在大多数血清型病毒感染的细胞中，宿主细胞 mRNA 和蛋白的合成被抑制。腺病毒 2 和腺病毒 5 的腺病毒裂解循环非常有效，每个受感染细胞产生约 10,000 病毒体，并且合成过量的病毒蛋白和不加入病毒体中的 DNA 。腺病毒早期转录是一连串复杂的相关互连的生化事件，但它主要需要在 DNA 复制开始之前合成病毒 RNA 。

以下示意图是腺病毒基因组的示意图，显示早期和晚期基因转录的相对方向和位置。



腺病毒基因组的结构在所有腺病毒群中是相似的，特定的功能一般位于所研究的每种血清型的相同位置。早期胞质信使 RNA 与病毒 DNA 上的四个限定的非相连区互补。这些区命名为 E1-E4。早期转录物已经分类为一系列的立即早期区(E1a)、延迟早期区(E1b 、 E2a 、 E2b 、 E3 和 E4)以及中间区(intermediate region)。

早期基因在感染后约 6-8 小时表达，由基因区段 E1-4 中的 7 个启动子驱动。

E1a 区参与病毒基因和细胞基因的转录反式激活以及其它序列的转录阻抑。E1a基因对所有其它早期腺病毒信使RNA发挥重要的控制功能。在正常组织中，为了有效地转录 E1b 、 E2a 、 E2b 、 E3 或 E4 区，需要活性 E1a 产物。然而，可以绕过 E1a 功能。可以操作细胞，以提供 E1a 样功能，或可以天然含有这类功能。也可以操作病毒以绕过 E1a 功能。病毒包装信号与 E1a 增强子(194-358 nt)重叠。

E1b 区影响病毒和细胞的代谢和宿主蛋白的关闭。也包括编码 pIX 蛋白的基因(3525-4088 nt)，包装全长病毒 DNA 需要此蛋白，它对于病毒的热稳定性是重要的。感染晚期病毒事件的正常进程需要病毒 E1b 区。 E1b 产物在宿主细胞核中起作用。在 E1b 序列中产生突变的突变体表现出晚期病毒 mRNA 积累减少以及对腺病毒感染晚期正常观察到

的宿主细胞转运的抑制的削弱。改变宿主细胞功能需要E1b，以使得加工和转运的改变有利于病毒晚期基因产物。这些产物则导致病毒包装并释放病毒体。E1b产生防止细胞凋亡的19 kD蛋白。E1b也产生结合于p53的55 kD蛋白。关于腺病毒及其复制的综述，参见WO 96/17053。

E2区是必需的，因为它编码72 kDa DNA结合蛋白、DNA聚合酶和55 kDa末端蛋白(TP)的80 kDa前体，TP是蛋白引发以起始DNA合成所需的。

19 kDa蛋白(gp 19K)在E3区中编码，它与调节宿主对病毒的免疫应答有关。在感染的第一阶段该蛋白的表达对TNFα应答而向上调节，该蛋白然后结合I类MHC抗原并防止该抗原迁移至上皮细胞表面，由此减少细胞毒T淋巴细胞对腺病毒感染的细胞的识别。在体外研究中E3区是不必要的，并且可以通过缺失1.9 kb *Xba*I片段而被去除。

E4区涉及减少宿主蛋白的合成并增加病毒的DNA复制。

有5个家族的晚期基因，所有这些晚期基因均从主要晚期启动子起始。晚期基因的表达包括涉及RNA剪接的非常复杂的转录后控制机制。纤丝蛋白在L5区中编码。腺病毒基因组邻接反向末端重复序列，所述序列在Ad5中为103 bp，并且是DNA复制所必需的。感染后30-40小时，完成病毒的生产。

通过缺失对E2、E3和E4启动子的诱导重要的E1基因，可以转变腺病毒，以用作基因转移的载体。E1复制缺陷型病毒可以在反式提供E1多肽的细胞系中繁殖，所述细胞系诸如人胚肾细胞系293。可以通过重组，插入一种或多种治疗基因来取代E1基因。由或者E1启动子或者异源启动子驱动该基因的表达。

通过缺失某些或所有E4可读框(ORF)，已经研制出甚至更加减毒的腺病毒载体。然而，某些第二代载体看来不产生长期的基因表达，即使所述DNA似乎被保持。因此，看来一种或多种E4 ORF的功能可

以增强来自病毒携带的至少某些病毒启动子的基因表达。

制造缺陷更多的病毒的替代方法已经将所述病毒完全“去内脏”，仅保留病毒复制所需的末端重复。可以用第一代辅助病毒，在293 细胞系中使“去内脏的”或“无内脏的”病毒生长至高滴度，但难以从辅助病毒中分离出“去内脏的”载体。

有复制能力的腺病毒也可以用于基因治疗。例如，可以将E1A基因插入第一代病毒中，使其处于肿瘤特异性启动子的调节之下。理论上，在将病毒注射入肿瘤后，病毒可以在肿瘤中特异性地复制，但在周围正常细胞中不复制。该类型的载体可以或者用来通过裂解直接杀伤肿瘤细胞，或者用来传递“自杀基因”，诸如单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV *tk*)，它可以在用丙氧鸟苷处理后杀伤受感染细胞和旁观者细胞。或者，仅E1b缺陷的腺病毒已经特别在1期临床试验中用于抗肿瘤治疗。由E1b编码的多肽能够阻断p53介导的细胞凋亡，防止细胞对病毒感染应答而自杀。因此，在正常的非肿瘤细胞中，在缺乏E1b时，病毒不能阻断细胞凋亡，并因此不能产生感染性病毒并传播。在p53缺陷型肿瘤细胞中，E1b缺陷型病毒可以生长并传播至相邻的p53缺陷型肿瘤细胞，而不传播至正常的细胞。再者，该类型的载体也可以用来传递诸如HSV *tk* 的治疗基因。

作为用于基因传递的载体，腺病毒提供优于其它基因治疗载体系统的优点，原因如下:

它是双链 DNA 无包膜病毒，能够在体内和体外转导范围广泛的人类和非人类起源的细胞类型。这些细胞包括呼吸道上皮细胞、肝细胞、肌细胞、心肌细胞、滑膜细胞、初级乳房上皮细胞和有丝分裂后终末分化的细胞，诸如神经元(也许重要的例外为某些淋巴样细胞，包括单核细胞)。

腺病毒载体也能转导非分裂细胞。对于诸如囊性纤维化、其中肺上皮中的受侵袭细胞更新率慢的疾病而言，这是非常重要的。事实上，正在进行的几个试验利用腺病毒介导的将囊性纤维化转运蛋白(CFTR)

转移入受影响的囊性纤维化成年患者的肺脏中。

腺病毒已经用作基因治疗的载体，并用于表达异源基因。大(36千碱基)基因组可以容纳至多 8 kb 的外源插入 DNA，并且能够在互补细胞系中有效复制，产生至多 10^{12} 的非常高的滴度。因此，腺病毒是研究基因在初级非复制型细胞中表达的最佳系统之一。

由腺病毒基因组表达病毒基因或外源基因，不需要复制型细胞。腺病毒载体通过受体介导的内吞作用进入细胞。一旦在细胞内，腺病毒载体极少整合入宿主染色体中，而是在染色体外(独立于宿主基因组)作为线性基因组在宿主细胞核中发挥作用。因此，使用重组腺病毒缓解了与随机整合入宿主基因组中有关的问题。

人类恶性肿瘤与腺病毒感染无关。已经研制出减毒的腺病毒株，并已经作为活疫苗用于人类。

然而，目前的腺病毒载体在体内治疗应用方面有一些主要的限制。这些限制包括：(i)瞬时基因表达－腺病毒载体一般保持为附加体并且不复制，使得它不能传递到随后的子代，(ii)因为它不能复制，所以靶细胞的增殖可能导致稀释该载体，(iii)产生针对腺病毒蛋白的免疫应答，使得甚至低水平表达腺病毒蛋白的细胞被破坏，以及(iv)不能得到有效的治疗指数，因为体内的传递导致仅在一部分靶细胞中摄入该载体并表达所传递的基因。

如果将腺病毒的特征与反转录病毒/慢病毒的遗传稳定性结合，则所述腺病毒基本上可以用来转导靶细胞，以成为可以稳定感染相邻细胞的瞬时反转录病毒生产细胞。

本发明设法提供新型反转录病毒载体。

具体地说，本发明设法提供能够在一个或多个所需靶位点提供一种 NOI 或甚至多种 NOI 有效表达的新型反转录病毒载体。

本发明也设法提供一种用于制备高滴度载体病毒体的新系统，所述系统加入了体内使用安全的特征，并能够提供于一个或多个所需靶位点提供一种 NOI 或甚至多种 NOI 的有效表达。

按照本发明的第一方面，提供包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点的反转录病毒载体；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列（"NOI"）；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列(NS)和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二NS；其中所述第一NS位于所述第二NS下游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。

按照本发明的第二方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述反转录病毒原载体包含一个反转录病毒包装信号；并且其中所述第二NS位于所述反转录病毒包装信号下游，使得可于主要靶位点阻止剪接。

按照本发明的第三方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述第二NS置于所述第一NOI下游，使得所述第一NOI能够于主要靶位点表达。

按照本发明的第四方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述第二NS位于多克隆位点上游，使得可以插入一种或多种另外的NOI。

按照本发明的第五方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述第二NS为编码免疫分子或其部分的核苷酸序列。

按照本发明的第六方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述免疫分子为免疫球蛋白。

按照本发明的第七方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述第二NS为编码免疫球蛋白重链可变区的核苷酸序列。

按照本发明的第八方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述载体还包含一种功能性内含子。

按照本发明的第九方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述功能性内含子的定位使得它能够将至少一种所述NOI的表达限于所需靶位点。

按照本发明的第十方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述靶位点为一种细胞。

按照本发明的第十一方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述载体或原载体衍生自鼠类致癌反转录病毒或慢病毒。

按照本发明的第十二方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述载体衍生自 MMLV、MSV、MMTV、HIV-1 或 EIAV。

按照本发明的第十三方面，提供一种反转录病毒载体，其中所述反转录病毒载体为整合的原病毒。

按照本发明的第十四方面，提供可得自反转录病毒载体的反转录病毒颗粒。

按照本发明的第十五方面，提供用反转录病毒载体转染或转导的细胞。

按照本发明的第十六方面，提供用于医学的反转录病毒载体或病毒颗粒或细胞。

按照本发明的第十七方面，提供一种反转录病毒载体或病毒颗粒或细胞，以用于生产将一种或多种 NOI 传递至有需要的靶位点的药用组合物。

按照本发明的第十八方面，提供包括用反转录病毒载体或病毒颗粒转染或转导细胞或使用细胞的方法。

按照本发明的第十九方面，提供反转录病毒载体或病毒颗粒或细胞的传递系统，其中所述传递系统包含一种或多种非反转录病毒表达载体、腺病毒或质粒或它们的组合，以将一种 NOI 或多种 NOI 传递至第一靶细胞，所述传递系统还包含一种反转录病毒载体，以将一种或多种 NOI 传递至第二靶细胞。

按照本发明的第二十方面，提供一种反转录病毒原载体。

按照本发明的第二十一方面，提供一种功能性内含子的用法，以将一种或多种 NOI 的表达限于所需靶细胞。

按照本发明的第二十二方面，提供应用反转录酶将第一 NS 从反

转录病毒原载体的3'端传递至反转录病毒载体的5'端。

按照本发明的第二十三方面，提供用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统包含一种或多种编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能够感染第一靶细胞并在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞。

按照本发明的第二十四方面，提供一种杂种病毒载体系统，其中所述第一载体可得自或基于腺病毒载体和/或所述第二病毒载体可得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体。

按照本发明的第二十五方面，提供一种杂种病毒载体系统，其中所述慢病毒载体包含或能够传递断裂内含子结构。

按照本发明的第二十六方面，提供一种慢病毒载体系统，其中所述慢病毒载体包含或能够传递断裂内含子结构。

按照本发明的第二十七方面，提供一种腺病毒载体系统，其中所述腺病毒载体包含或能够传递断裂内含子结构。

按照本发明的第二十八方面，提供基于或得自以下任何一种或多种实体的载体或质粒：pE1sp1A、pCI-Neo、pE1RevE、pE1HORSE3.1、pE1PEGASUS4、pCI-Rab、pE1Rab。

按照本发明的第二十九方面，提供能够在靶细胞中差异表达NOI的反转录病毒载体。

本发明的另一方面包括用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统包含编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能够感染第一靶细胞并在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞，其中所述第一载体可得自或基于腺病毒载体，而所述第二病毒载体可得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体。

本发明的另一方面包括用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统包含编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能够感染第一靶细胞并在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体

能够转导第二靶细胞，其中所述第一载体可得自或基于腺病毒载体，而所述第二病毒载体可得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体；其中所述病毒载体系统包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列("NOI")；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列("NS")和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二 NS；其中所述第一 NS 位于所述第二 NS 下游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。

最好是，所述反转录病毒原载体包含一个位于所述第二核苷酸序列上游的第三 NS；其中所述第三 NS 能够产生一个非功能性剪接供体位点。

所述反转录病毒载体最好还包含一个第二 NOI；其中所述第二 NOI 位于所述功能性剪接受体位点下游。

所述反转录病毒原载体最好包含所述第二 NOI；其中所述第二 NOI 位于所述第二核苷酸序列下游。

所述第二 NOI 或其表达产物最好是治疗剂或诊断剂，或包含治疗剂或诊断剂。

所述第一 NOI 或其表达产物最好是或包含一种或多种赋予可选择性的因子(例如标记元件)、病毒必需元件或其部分或其组合。

所述第一 NS 最好位于反转录病毒原载体 3'端或其附近；最好是其中所述 3'端包含一个 U3 区和一个 R 区；并且最好其中所述第一 NS 位于所述 U3 区和所述 R 区之间。

所述反转录病毒原载体的 U3 区和/或所述第一 NS 最好包含为第三 NOI 的 NS；其中所述 NOI 为转录控制元件、编码序列或其部分的一种或多种。

所述第一 NS 最好可得自病毒。

所述第一 NS 最好为内含子或其部分。

所述内含子最好可得自 SV40 病毒的小 t-内含子。

所述载体组分最好受调节。在本发明的一个优选方面，所述载体组分由低氧调节。

在本发明的另一优选方面，所述载体组分由四环素开/关系统调节。

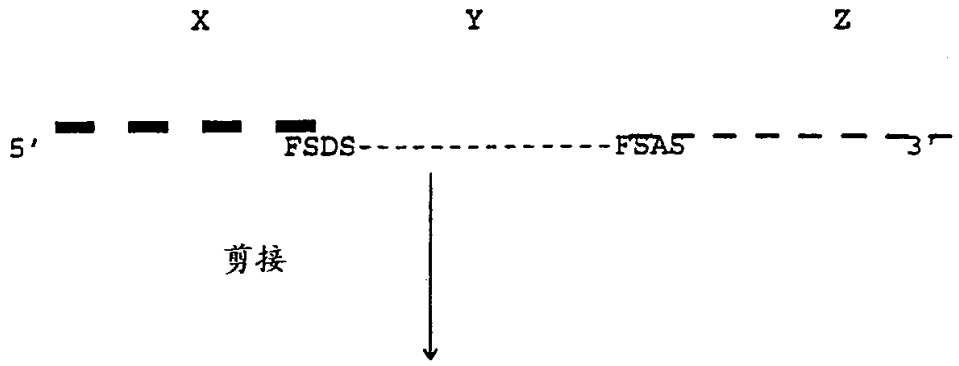
因此，本发明提供利用反转录病毒载体的传递系统。

本发明传递系统的反转录病毒载体包含一个功能性剪接供体位点("FSDS")和一个功能性剪接受体位点("FSAS")，它们连接一个第一 NOI 。所述反转录病毒载体因反转录病毒原载体的反转录而形成，该反转录病毒原载体可以包含多个 NOI 。

当所述 FSDS 位于所述 FSAS 上游时，任何间插序列均能被剪接。通常，剪接去除间插或“内含子” RNA 序列，连接剩余的“外显子”序列以提供连续的序列用于翻译。

剪接过程图可示于下:

未剪接形式



剪接形式



在该图示中，Y 代表因剪接而被去除的间插序列。

反转录病毒载体的天然剪接结构示于图 27a。已知载体的剪接结构示于图 27b。按照本发明的剪接结构示于图 27c。

按照本发明，如果所述 FSDS 位于所述 FSAS 下游，则剪接不能发生。

同样，如果所述 FSDS 为非功能性剪接供体位点(NFSDS)和/或所述 FSAS 为非功能性受体受体位点(NFAS)时，则剪接不能发生。

NFSDS 的一个实例是突变的 FSDS，使得所述 FSDS 不再能够被剪接机制识别。

按照本发明，每种 NS 均可以是任何合适的核苷酸序列。例如，每种序列可以是独立的 DNA 或 RNA - 它们可以合成制备或可以用重组 DNA 技术制备，或可以从天然来源分离，或可以是它们的组合。所述序列可以是有义序列或反义序列。可以有多种可以直接或间接地相互连接的序列或其组合。

按照本发明，每种 NOI 均可以是任何合适的核苷酸序列。例如，每种序列可以是独立的 DNA 或 RNA - 它们可以合成制备或可以用重

组 DNA 技术制备，或可以从天然来源分离，或可以是它们的组合。所述序列可以是有义序列或反义序列。可以有多种可以直接或间接地相互连接的序列或其组合。

所述第一 NOI 可以包括任何一种或多种以下选择标记，所述选择标记已经成功地用于反转录病毒载体：细菌新霉素和潮霉素磷酸转移酶基因，它们分别赋予 G418 抗性和潮霉素抗性(Palmer 等 1987 Proc Natl Acid Sci 84: 1055-1059; Yang 等 1987 Mol Cell Biol 7: 3923-3928)；突变的小鼠二氢叶酸还原酶基因(*dhfr*)，它赋予对氨甲蝶呤抗性(Miller 等 1985 Mol Cell Biol 5: 431-437)；细菌 *gpt* 基因，它允许细胞在含霉酚酸、黄嘌呤和氨基蝶呤的培养基中生长(Mann 等 1983 Cell 33: 153-159)；细菌 hisD 基因，它允许细胞在无组氨酸但含组氨醇的培养基中生长(Danos 和 Mulligan 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 6460-6464)；多种抗药性基因(*mdr*)，赋予对多种药物的抗性(Guild 等 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 1595-1599; Pastan 等 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 4486-4490)和细菌赋予对嘌呤霉素或腐草霉素抗性的基因(Morgenstern 和 Land 1990 Nucleic Acid Res 18: 3587-3596)。

所有这些标记均为显性选择标记，并允许化学选择表达这些基因的大多数细胞。β-半乳糖苷酶也可以认为是显性标记；表达β-半乳糖苷酶的细胞可以通过采用荧光激活细胞分类器而被选择。事实上，任何细胞表面蛋白均可以为已经不制造所述蛋白的细胞提供选择标记。通过采用抗所述蛋白的荧光抗体和细胞分类器，可以选择表达所述蛋白的细胞。已经包括在载体中的其它选择标记包括 *hprt* 和 HSV 胸苷激酶，后者允许细胞在含次黄嘌呤、氨甲蝶呤和胸苷的培养基中生长。

所述第一 NOI 可以含有非编码序列，例如反转录病毒包装位点或使得所述第二 NOI 在所述原载体中无功能性的无义序列，但当它们通过剪接所述载体而被去除时，所述第二 NOI 显露出，进行功能表达。

所述第一 NOI 也可以编码病毒必需元件，诸如编码 Env 蛋白的 *env*，这可以降低生产系统的复杂度。作为实例，在腺病毒载体中，这

允许所述反转录病毒载体基因组和包膜配置于单一的腺病毒载体中，并置于同一启动子控制之下，由此提供更简单的系统，并在所述腺病毒载体中留下更大的容纳额外序列的容量。一方面，那些额外的序列可以是 gag-pol 盒本身。因此，在一个腺病毒载体中，人们可以生产反转录病毒载体颗粒。先前的研究(Feng 等 1997 Nature Biotechnology 15: 866)需要使用多个腺病毒载体。

如果所述反转录病毒组分包括一个 *env* 核苷酸序列，则全部或部分该序列可以任选地用另一 *env* 的全部或部分核苷酸序列取代，所述另一 *env* 核苷酸序列的实例诸如命名为 4070A 的兼嗜性 Env 蛋白或流感血细胞凝集素(HA)或水泡性口腔炎病毒 G (VSV-G)蛋白。用异源 *env* 基因取代所述 *env* 基因，是称为假型化的技术或策略的一个实例。假型化不是一种新现象，在 WO-A-98/05759、WO-A-98/05754、WO-A-97/17457、WO-A-96/09400、WO-A-91/00047 和 Mebatsion 等 1997 Cell 90, 841-847 中可以找到实例。

在一个优选方面，已经将本发明的反转录病毒载体假型化。在该方面，假型化可以提供一个或多个优点。例如，用所述慢病毒载体，基于 HIV 的载体的 *env* 基因产物将限制这些载体，使其仅感染表达称为 CD4 的蛋白的细胞。但如果这些载体中的所述 *env* 基因已经用来自其它 RNA 病毒的 *env* 序列取代，则它们的感染范围可能更广(Verma 和 Somia 1997 Nature 389: 239-242)。作为实例，研究人员已经用来自 VSV 的糖蛋白将基于 HIV 的载体假型化(Verma 和 Somia 1997 出处同上)。

在另一替代方法中，所述 Env 蛋白可以是修饰的 Env 蛋白，诸如突变的或工程改造的 Env 蛋白。可以制造修饰或选择修饰，以引入寻靶能力或降低毒性或用于另一目的(Valsesia-Wittman 等 1996 J Virol 70: 2056-64; Nilson 等 1996 Gene Therapy 3: 280-6; Fielding 等 1998 Blood 9: 1802 和其中引用的参考文献)。

合适的第二 NOI 编码序列包括治疗和/或诊断应用的序列，诸如

但不限于编码以下的序列：细胞因子、趋化因子、激素、抗体、工程免疫球蛋白样分子、单链抗体、融合蛋白、酶、免疫共同刺激分子、免疫调节分子、反义 RNA、靶蛋白的反式显性阴性突变体(transdominat negative mutant)、毒素、条件毒素、抗原、肿瘤抑制蛋白和生长因子、膜蛋白、血管活性蛋白和肽、抗病毒蛋白和核酶以及它们的衍生物(诸如具有结合的报道基团)。但包括这类编码序列时，这类编码序列通常可以操作性地连接于合适的启动子，所述启动子可以是驱动核酶表达的启动子、或是一种不同的启动子或多种启动子。

所述第二 NOI 编码序列可以编码融合蛋白或编码序列的区段。

本发明反转录病毒载体可以用来将诸如前体药物活化酶的第二 NOI 传递至肿瘤位点，以治疗癌症。在每种情况下，使用合适的前体药物联合合适的前体药物活化酶治疗所述个体(诸如患者)。合适的前体药物结合所述载体给予。前体药物的实例包括：磷酸鬼臼亚乙苷(与碱性磷酸酶一起使用， Senter 等 1988 Proc Natl Acad Sci 85:4842-4846)； 5-氟胞嘧啶(与胞嘧啶脱氨酶一起使用， Mullen 等 1994 Cancer Res. 54: 1503-1506)；阿霉素-N-对羟基苯氧基乙酰胺(与青霉素-V 酰胺酶一起使用， Kerr 等 1990 Cancer Immunol Immunother 31: 202-206)；对-N-双(2-氯乙基)氨基苯甲酰谷氨酸(与羧肽酶 G2 一起使用)；氨基甲酸头孢菌素氮芥(与β-内酰胺酶一起使用)； SR4233 (与 P450 还原酶一起使用)；丙氧鸟苷(与 HSV 胸苷激酶一起使用， Borrelli 等 1988 Proc Natl Acad Sci 85: 7572-7576)；与硝基还原酶一起使用的芥子前体药物(Friedlos 等 1997 J Med Chem 40: 1270-1275)和环磷酰胺(与 P450 一起使用, Chen 等 1996 Cancer Res 56: 1331-1340)。

本发明的载体可以通过病毒或非病毒载体传递至靶位点。

正如本领域众所周知的，载体是允许或促进一种实体从一种环境转移至另一种环境的工具。并且作为实例，用于重组 DNA 技术的某些载体允许诸如 DNA 区段(诸如异源 DNA 区段，诸如异源 cDNA 区段)的实体转移入靶细胞。可任选地，一旦处于靶细胞中，所述载体则可

以用来将异源 DNA 维持在所述细胞中，或可以用作 DNA 复制单位。用于重组 DNA 技术的载体实例包括质粒、染色体、人工染色体或病毒。

非病毒传递系统包括但不限于 DNA 转染法。在此，转染包括使用非病毒载体将基因传递至靶哺乳动物细胞的过程。

典型的转染方法包括电穿孔、 DNA 生物发射(biolistics)、脂质介导的转染、紧密(compacted) DNA 介导的转染、脂质体、免疫脂质体、脂转染试剂、阳离子试剂介导的转染、阳离子表面两亲物(CFA) (Nature Biotechnology 1996 14; 556)和它们的组合物。

病毒传递系统包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、反转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体。其它的载体实例包括活体外传递系统，它们包括但不限于 DNA 转染法，诸如电穿孔、 DNA 生物发射、脂质介导的转染、紧密 DNA 介导的转染。

本发明的载体传递系统可以包括在体外制备的一个第一载体，它编码在体内产生第二载体所必需的基因。

一种或多种所述第一病毒载体可以是多种不同的病毒载体，诸如反转录病毒、腺病毒、疱疹病毒或痘病毒载体，或在多个第一病毒载体的情况下，它们可以是不同病毒起源的载体的混合物。无论在何种情况下，所述第一病毒载体均最好是缺陷型的，因为缺陷型载体不能独立地复制。因此，它们能够进入靶细胞并传递所述第二载体序列，但并不能复制以继续进一步感染靶细胞。

在所述杂种病毒载体系统包含一种以上第一载体以编码所述第二载体的情况下，两种或所有三种第一载体将用来转染或转导第一靶细胞群体，通常是同时转染或转导。

最好有编码所述第二病毒载体所有组分的单一的第一病毒载体。

优选的单一或多个第一病毒载体是腺病毒载体。

用于本发明的腺病毒载体可以衍生自人腺病毒或通常不感染人类的腺病毒。所述载体最好衍生自 2 型腺病毒或 5 型腺病毒(Ad2 或 Ad5)、或小鼠腺病毒或鸟类腺病毒，诸如 CELO 病毒(Cotton 等 1993 J Virol 67: 3777-3785)。所述载体可以是具有复制能力的腺病毒载体，但更优选是缺陷型腺病毒载体。可以通过缺失病毒复制必需的一种或多种组分，使腺病毒载体为缺陷型。通常，每个腺病毒载体含有至少一个 E1 区的缺失。为了产生感染性腺病毒载体颗粒，通过使病毒在诸如人 293 细胞系的人胚胎成纤维细胞细胞系中传代，可以互补这一缺失，其中 293 细胞系含有整合拷贝的 Ad5 的左边部分，包括 E1 基因。异源 DNA 插入这类载体的容量至多可以为约 7 kb。因此，这类载体可以用来构建按照本发明的包含三种分离重组载体的系统，每种载体含有其中一个必需的转录单位以构建所述反转录病毒第二载体。

替代的腺病毒载体是本领域已知的，它们在其它腺病毒基因中含有进一步的缺失，这些载体也适用于本发明。这些第二代腺病毒载体中的数种已经显示免疫原性降低(例如 E1 + E2 缺失 Gorziglia 等 1996 J Virol 70: 4173-4178; E1 + E4 缺失 Yeh 等 1996 J Virol 70: 559-565)。延伸的缺失用来提供额外的克隆容量以将多个基因引入所述载体。例如已经描述了 25 kb 的缺失(Lieber 等 1996 J Virol 70: 8944-8960)，也报道了缺失所有病毒基因的克隆载体(Fisher 等 1996 Virology 217: 11-22)，所述载体允许引入 35 kb 以上的异源 DNA。这类载体可以用来产生按照本发明的腺病毒第一载体，所述第一载体编码用于构建所述反转录病毒第二载体的两种或三种转录单位。

所述第二病毒载体最好是反转录病毒载体。通过在所述第一靶细胞中缺陷型病毒载体颗粒装配和包装的必需基因的表达，产生所述第二载体。因为该载体不能独立复制，因而为缺陷型的。因此，一旦所述第二反转录病毒载体已经转导了一个第二靶细胞，则它不能通过复制而传播至任何其它靶细胞。

术语“反转录病毒载体”通常包括能够感染但本身不能复制的反

转录病毒核酸。因此，它是复制缺陷型。反转录病毒载体通常包含一种或多种NOI，最好是非反转录病毒起源的NOI，以将其传递至靶细胞。反转录病毒载体也可以包含一个功能性剪接供体位点(FSDS)和一个功能性剪接受体位点(FSAS)，使得当所述FSDS位于所述FSAS上游时，任何间插序列均能够被剪接。反转录病毒载体可以在U3区包含其它非反转录病毒序列，诸如非反转录病毒控制序列，一旦所述反转录病毒载体作为原病毒整合入靶细胞中时，所述U3区可以影响NOI的表达。所述反转录病毒载体不需要含有仅来自单一反转录病毒的元件。因此，按照本发明，可以具有可得自两种或两种以上不同反转录病毒或其它来源的元件。

术语“反转录病毒原载体”通常包括上述的反转录病毒载体基因组，但它包含一个能够产生一个功能性剪接供体位点(FSDS)的第一核苷酸序列(NS)和一个能够产生一个功能性剪接受体位点(FSAS)的第二NS，使得所述第一NS位于所述第二NS下游，以致不能发生与所述第一NS和所述第二NS有关的剪接。当所述反转录病毒原载体反转录时，形成反转录病毒载体。

术语“反转录病毒载体颗粒”是指包装的反转录病毒载体，它最好能够结合于靶细胞并进入靶细胞。如上讨论的所述载体颗粒的组分可以相对于野生型反转录病毒进行修饰。例如，可以将所述颗粒的蛋白性外壳中的Env蛋白进行遗传修饰，以便改变其寻靶特异性或完成某些其它所需功能。

本发明该方面的反转录病毒载体可以衍生自鼠类致癌反转录病毒，诸如MMLV、MSV或MMTV；或可以衍生自慢病毒，诸如HIV-1、EIAV；或可以衍生自另一反转录病毒。

可以将本发明的反转录病毒载体修饰，以使得所述反转录病毒的天然剪接供体位点无功能性。

术语“修饰”包括使所述天然剪接供体沉默或去除。所述剪接供体位点已去除的载体诸如基于MLV的载体，是本领域已知的。这种

载体的一个实例是 pBABE (Morgenstren 等 1990 出处同上)。

可以由所述第一载体中 DNA 编码的反转录病毒载体生产的必需基因的表达，产生所述第二载体。这类基因可以包括反转录病毒的 *gag-pol* 基因、有包膜病毒的 *env* 基因和含一种或多种治疗或诊断 NOI 的缺陷型反转录病毒载体。所述缺陷型反转录病毒载体一般含有使得能进行反转录的序列、 5'长末端重复序列(LTR)的至少一部分、3'LTR 的至少一部分和包装信号。

如果期望使所述第二载体为复制缺陷型，则所述第二载体可以由多个转录单位编码，所述转录单位可以位于单一的或位于两种或两种以上的腺病毒载体或其它第一载体中。因此，可能有编码所述第二载体基因组的转录单位、编码 *gag-pol* 的转录单位和编码 *env* 的转录单位。或者，可以结合两种或多种这些转录单位。例如，编码 *gag-pol* 和 *env* 或 *env* 和基因组的核酸序列，可以结合在单一转录单位中。完成这一点的方法是本领域已知的。

本文所述的转录单位为含编码序列和完成这些编码序列表达的信号的核酸区，其独立于任何其它编码序列。因此，每个转录单位通常包含包含至少一个启动子、一个增强子和一个多腺苷酸化信号。

术语“启动子”以本领域的正常含义使用，例如 Jacob-Monod 基因表达理论中的 RNA 聚合酶结合位点。

术语“增强子”包括结合于转录起始复合物的其它蛋白组分并由此促进由其相关启动子指导的转录起始的 DNA 序列。

编码第二载体的转录单位的启动子和增强子最好在生产所述第二病毒载体的条件下，在所述第一靶细胞中有强活性，或能够被强烈诱导。所述启动子和/或增强子可以是组成型有效的，或其活性可以受组织限制或受时间限制。合适的组织限制启动子/增强子的实例是在肿瘤细胞中有高活性的启动子/增强子，诸如来自 MUC1 基因、 CEA 基因或 5T4 抗原基因的启动子/增强子。时间限制的启动子/增强子的实例是对局部缺血/或低氧应答的启动子/增强子，诸如低氧效应元件或

grp78 或 grp94 基因的启动子/增强子。一个优选的启动子-增强子组合是人巨细胞病毒(hCMV)主要立即早期(MIE)启动子/增强子组合。

其它优选的额外组分包括能够有效表达 NOI 或多个 NOI 的实体。

在本发明的一个优选方面，有所述第二载体组分的低氧或局部缺血可调节表达。在该方面，低氧是在范围广泛的不同细胞类型中基因表达的有效的调节物，并通过诱导诸如低氧诱导型因子-1 (HIF-1; Wang 和 Semenza 1993 Proc Natl Acad Sci 90:430)的低氧诱导型转录因子的活性而起作用，低氧诱导型转录因子结合于同类的 DNA 识别位点，即各种基因启动子上的低氧效应元件(HRE)。 Dachs 等(1997 Nature Med 5: 515)已经使用了多体形式的小鼠磷酸甘油激酶-1 (PGK-1)基因的 HRE (Firth 等 1994 Proc Natl Acad Sci 91: 6496-6500)，来在体外控制对低氧应答的人纤维肉瘤细胞的标记基因和治疗基因的表达，以及在体内控制在实体瘤中的标记基因和治疗基因的表达(Dachs 等出处同上)。或者，显著的葡萄糖缺乏也存在于肿瘤的局部缺血区的事实，能被用来在肿瘤中特异性地激活异源基因的表达。已知被葡萄糖缺乏特异性激活的 grp78 基因启动子的截短的 632 个碱基对的序列，也显示出能够在体内鼠类肿瘤中驱动高水平的报道基因的表达(Gazit 等 1995 Cancer Res. 55:1660)。

调节这类组分表达的一个替代方法是如 Yorshida 等所述的使用 Gossen 和 Bujard 描述的四环素开/关系统(1992 Proc Natl Acad Sci 89: 5547)来生产反转录病毒的 *gal* 、 *pol* 和 VSV-G 蛋白(1997 Biochem Biophys Res Comm 230: 426)。不寻常的是，该调节系统也用于本发明来控制所述原载体基因组的生产。这确保在缺乏四环素时没有载体组分从所述腺病毒载体表达。

以下描述可以加入到所述杂种病毒载体系统的安全特征。可以存在一种或多种这类特征。

所述第二载体对于体内应用也是有利的，因为将消除产生能够独

立复制的感染性病毒的重组的可能性的一种或多种特征加入其中。在先前公开的研究中不包括这类特征(Feng 等 1997 出处同上)。特别是，Feng 等没有描述由下述三种组分构建反转录病毒载体(出处同上)。

首先，通过缺失同源区，可以避免编码所述第二载体组分的序列之间的序列同源性。同源区允许发生基因重组。在一个特定的实施方案中，用三种转录单位构建第二反转录病毒载体。第一转录单位含有在非反转录病毒启动子和增强子控制下的反转录病毒的 *gag-pol* 基因。第二转录单位含有在非反转录病毒启动子和增强子控制下的反转录病毒的 *env* 基因。第三转录单位包含在非反转录病毒启动子和增强子控制下的缺陷型反转录病毒基因组。在天然的反转录病毒基因组中，包装信号的位置使得正确起作用需要部分 *gag* 序列。通常，当由其构建反转录病毒载体系统时，包括部分 *gag* 基因在内的包装信号仍在所述载体基因组中。然而，在本发明的情况下，所述缺陷型反转录病毒基因组含有基本包装信号，它不包含与所述第一转录单位中的 *gag* 序列同源的序列。同样外，在反转录病毒中，例如在莫洛尼鼠类白血病病毒(MMLV)中，在 *pol* 编码序列 3'端和 *env* 5'端之间有重叠小区。通过改变或者 *pol* 编码序列 3'端或者 *env* 5'端的序列，以改变密码子用法，而不改变所编码蛋白的氨基酸序列，可以去除所述第一和第二转录单位之间的相应的同源性区域。

其次，通过用另一反转录病毒或另一有包膜病毒的 Env 蛋白将一种反转录病毒的基因组假型化，使得避免 *env* 组分和 *gag-pol* 组分之间的同源区，可以避免有复制能力的第二病毒载体的可能性。

在一个具体实施方案中，由以下三种组分构建所述反转录病毒载体：第一转录单位含有非反转录病毒启动子和增强子控制下的反转录病毒的 *gag-pol* 基因。第二转录单位含有在非反转录病毒启动子和增强子控制下的替代的有包膜病毒的 *env* 基因。第三转录单位包含在非反转录病毒启动子和增强子控制下的缺陷型反转录病毒基因组。所述缺陷型反转录病毒基因组含有基本包装信号，它不含有与所述第一转录

单位中的 *gag* 序列同源的序列。

第三，通过采用以特定方式构建的两种转录单位，可以消除有复制能力的反转录病毒的可能性。第一转录单位含有在第一靶细胞中有活性的启动子-增强子(诸如 hCMV 启动子-增强子或组织限制启动子-增强子)控制下的 *gag-pol* 编码区。第二转录单位编码能够被包装入反转录病毒颗粒中的反转录病毒基因组 RNA。第二转录单位含有包装、整合和反转录所必需的反转录病毒序列，也含有有包膜病毒的 *env* 蛋白编码序列和一种或多种治疗基因的编码序列。

在该实施例中，设计所述 *env* 和 NOI 编码序列的转录，使得所述 Env 蛋白优先在第一靶细胞中生产，而所述 NOI 的表达产物优先在第二靶细胞中生产。

一种合适的内含子剪接布置在后面实施例 5 中进行了描述，并在图 17 和图 27c 中图示。这里，在由所述第一载体传递至第一靶细胞的反转录病毒基因组序列中，剪接供体位点位于剪接受体位点下游。因此在第一靶细胞中不存在剪接，或很少发生剪接，所以所述 Env 将蛋白优先表达。然而，一旦所述载体基因组已经通过反转录过程并整合入第二靶细胞，则功能性剪接供体序列将位于 5'LTR 中，位于功能性剪接受体序列上游。发生剪接，将所述 *env* 序列剪接出，产生所述 NOI 的转录物。

在该实施例的第二布置中，所述 NOI 的表达限于第二靶细胞，并防止在第一靶细胞中表达，如下所述。该布置在后面的实施例 6 中描述，并图示于图 18。在此，启动子-增强子和含所述编码序列 5'端的 NOI 第一片段和天然或人工衍生或可衍生的剪接供体序列，被插入所述反转录病毒基因组构成物 3'端 R 区的上游。含有完成所述编码区所需的所有序列的所述 NOI 的第二片段，置于所述反转录病毒基因组构成物中包装信号下游的天然或人工衍生或可衍生剪接受体序列的下游。反转录病毒基因组在第二靶细胞中反转录并整合时，所述 NOI 的启动子'5 片段和所述功能性剪接供体序列位于所述功能性剪接受体和

所述 NOI 3'端上游。来自所述启动子和剪接的转录，允许在第二靶细胞中翻译所述 NOI。

在一个优选实施方案中，按照本发明的杂种病毒载体系统包含编码反转录病毒第二载体的单一的或多个腺病毒第一载体。

描述的本发明的优选实施方案解决一个与腺病毒载体和其它病毒载体有关的一个主要问题，即来自这类载体的基因表达是瞬时的。由第一靶细胞产生的反转录病毒颗粒可以转导第二靶细胞，在所述第二靶细胞中的基因表达稳定地保持，因为所述反转录病毒载体基因组整合入宿主细胞基因组中。所述第二靶细胞不表达大量的病毒蛋白抗原，因此免疫原性低于用腺病毒载体转导的细胞。

用反转录病毒载体作为所述第二载体是有利的，因为它例如通过允许导向快速分裂细胞，而允许一定程度的细胞辨别。此外，反转录病毒的整合允许在靶组织中稳定表达治疗基因，包括在增殖性靶细胞中的稳定表达。

应用本发明的新型反转录病毒载体设计也是有利的，因为基因表达可以限于第一靶位点或第二靶位点。以该方式，单一的或多个 NOI 可以优先于第二靶位点表达，而在第一靶位点表达差或不以生物学显著水平表达。结果，可以避免 NOI 的可能毒性或抗原性。

优选的是，所述第一病毒载体优先转导某种或某些细胞类型。

所述第一载体更优选为定向载体，也就是说它与天然病毒相比组织嗜性改变，使得所述载体导向特定的细胞。

术语“定向载体”不必与术语“靶位点”或“靶细胞”关连。

“靶位点”是指天然或定向载体能够转染或转导的位点。

“第一靶位点”是指天然或定向载体能够转染或转导的第一位点。

“第二靶位点”是指天然或定向载体能够转染或转导的第二位点。

“靶细胞”就是指是天然或定向载体能够转染或转导的细胞。

"第一靶细胞"是指天然或定向载体能够转染或转导的第一细胞。

"第二靶细胞"是指天然或定向载体能够转染或转导的第二细胞。

按照本发明的优选的腺病毒第一载体也最好是定向载体，其中所述载体的组织嗜性因改变而不同于野生型腺病毒。可以修饰腺病毒载体，以产生例如以下描述的定向腺病毒载体： Krasnykh 等 1996 J. Virol 70: 6839-6846; Wickham 等 1996 J. Virol 70: 6831-6838; Stevenson 等 1997 J. Virol 71: 4782-4790; Wickham 等 1995 Gene Therapy 2: 750-756; Douglas 等 1997 Neuromuscul. Disord 7: 284-298; Wickham 等 1996 Nature Biotechnology 14: 1570-1573 。

用于按照本发明的载体系统的第一靶细胞包括：造血细胞(包括单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、粒细胞或任何这些细胞的祖细胞)；内皮细胞；肿瘤细胞；基质细胞；星形胶质细胞或神经胶质细胞；肌细胞；和上皮细胞。

因此，能够产生所述第二病毒载体的按照本发明的第一靶细胞可以是上述细胞类型中的任何一种。

在一个优选的实施方案中，按照本发明的第一靶细胞是用一种缺陷型腺病毒载体转导的单核细胞或巨噬细胞，所述缺陷型腺病毒载体含有用于反转录病毒 *gag-pol* 的第一转录单位和能够产生可包装缺陷型反转录病毒基因组的第二转录单位。在这种情况下，所述第二转录单位最好处于在机体内患病位置中优先有活性的启动子-增强子的控制之下，其中所述患病位置诸如局部缺血位点或实体瘤的微环境。

在一个具体的优先实施方案中，构建所述第二转录单位，使得将所述基因组插入所述第二靶细胞中时，产生一个内含子，它用来降低病毒必需元件(诸如病毒 *env* 基因)的表达，并允许有效地表达一种或多种治疗和/或诊断 NOI 。

所述包装细胞可以是待治疗个体机体内的体内包装细胞，或它可

以是在体外培养的细胞，诸如组织培养细胞系。合适的细胞系包括哺乳动物细胞，诸如鼠类成纤维细胞衍生的细胞系或人细胞系。所述包装细胞系最好是人细胞系，诸如HEK293、293T、TE671、HT1080。

或者，所述包装细胞可以是得自待治疗个体的细胞，诸如单核细胞、巨噬细胞、血细胞或成纤维细胞。所述细胞可以从个体分离，活体外给予所述包装组分和载体组分，然后再给予自身包装细胞。或者，可以将所述包装组分和载体组分体内给予所述包装细胞。将反转录病毒的包装组分和载体组分给予个体细胞的方法是本领域已知的。例如，一种方法是：通过瞬时三重转染(Landau 和 Littman 1992 J. Virol. 66, 5110; Soneoka 等 1995 Nucleic Acids Res 23: 628-633)，将产生反转录病毒颗粒所需的不同的DNA序列(例如 *env* 编码序列、*gag-pol* 编码序列和缺陷型反转录病毒基因组)同时引入所述细胞。

所述第二病毒载体也可以是定向载体。对于反转录病毒载体，这可以通过修饰所述 Env 蛋白来完成。所述反转录病毒第二载体的 Env 蛋白需要是无毒的包膜或可以以无毒量在所述第一靶细胞中生产的包膜，诸如 MMLV 兼嗜性包膜或修饰的兼嗜性包膜。在这种情况下，所述安全特征最好是缺失反转录病毒组分之间同源的区域或序列。

所述包膜最好是允许转导人细胞的包膜。合适的 *env* 基因的实例包括但不限于 VSV-G、MLV 兼嗜性 *env* 诸如 4070A *env*、RD114 猫白血病病毒 *env* 或流感病毒的血细胞凝集素(HA)。所述 Env 蛋白可以是能够结合于数目有限的人类细胞类型上的受体的 Env 蛋白，可以是含有导向部分的工程包膜。由在所选择的包装细胞系中有活性的启动子和任选增强子，转录所述 *env* 和 *gag-pol* 编码序列，所述转录单位由一个多腺苷酸化信号终止。例如，如果所述包装细胞是人类细胞，则合适的启动子-增强子组合是来自人巨细胞病毒主要立即早期(hCMV-MIE)基因的启动子-增强子，并可以使用来自 SV40 病毒的多腺苷酸化信号。其它合适的启动子和多腺苷酸化信号是本领域已知的。

所述第二靶细胞群体可以与所述第一靶细胞群体相同。例如，将

本发明的第一载体传递至肿瘤细胞，导致可以转导其它肿瘤细胞的其它载体颗粒的复制和产生。

或者，所述第二靶细胞群体可以不同于所述第一靶细胞群体。在这种情况下，所述第一靶细胞用作被治疗个体机体内的内源工厂，产生可以转导所述第二靶细胞群体的另外的载体颗粒。例如，所述第一靶细胞群体可以是用所述第一载体体内或活体外转导的造血细胞。然后，将所述第一靶细胞传递至或迁移至机体内诸如肿瘤的位点，并产生能够转导例如实体瘤中有丝分裂活性的肿瘤细胞的所述第二载体颗粒。

按照本发明的反转录病毒载体颗粒也将能够转导缓慢分裂的细胞和诸如 MLV 的非慢病毒不能有效转导的细胞。缓慢分裂的细胞在约每 3-4 天内分裂一次，包括某些肿瘤细胞。尽管肿瘤含有快速分裂的细胞，但某些肿瘤细胞尤其是肿瘤中心的某些细胞很少分裂。或者，所述靶细胞可以是能够经历细胞分裂的生长停滞的细胞，诸如肿瘤块中心部分的细胞或干细胞，诸如造血干细胞或 CD34 阳性细胞。作为再一替代方法，所述靶细胞可以是分化细胞的前体，诸如单核细胞前体、 CD33 阳性细胞或骨髓前体。作为再一替代方法，所述靶细胞可以是分化细胞，诸如神经元、星形胶质细胞、神经胶质细胞、小胶质细胞、巨噬细胞、单核细胞、上皮细胞、内皮细胞、肝细胞、精母细胞、精子细胞或精子。可以或者在从人类个体分离后在体外转导靶细胞，或者在体内直接转导靶细胞。

本发明允许在随后有效转导第二靶细胞所需的一种或多种治疗蛋白的作用位点或其附近，体内定位产生高滴度的缺陷型反转录病毒载体颗粒。这比或者采用缺陷型腺病毒载体或者采用单独的缺陷型反转录病毒载体更加有效。

本发明也允许体内在非分裂细胞或缓慢分裂的细胞中产生诸如基于 MMLV 的载体的反转录病毒载体。仅在诸如体外增殖的适应于组织培养的细胞的快速分裂的细胞中，或在体内的快速分裂的肿瘤细胞

中，产生基于MMLV的反转录病毒载体，这在先前已经是可能的。对于将基因传递至实体瘤的细胞(其许多实体瘤细胞分裂缓慢)而言，以及对于应用非分裂细胞(诸如内皮细胞)和各种造血谱系细胞作为生产治疗蛋白产物的内源工厂而言，扩展能够产生反转录病毒载体的细胞类型的范围是有利的。

由按照本发明的载体系统传递一种或多种治疗基因的方法可以单独采用或结合其它治疗或所述治疗组分使用。

例如，本发明的反转录病毒载体可以用来传递可用于治疗 WO-A-98/05635 中所列疾病的一种或多种NOI。为了易于参考，现在提供部分该表：癌症、炎症和炎症疾病、皮肤病、发热、心血管效应、出血、血凝固和急性期反应、恶病质、厌食、急性感染、 HIV 感染、休克状态、移植物抗宿主反应、自身免疫病、再灌注损伤、脑膜炎、偏头痛和阿斯匹林依赖性抗血栓形成；肿瘤的生长、侵入和扩散、血管发生、转移、恶性腹水和恶性胸膜渗漏；脑局部缺血、局部缺血性心脏病、骨关节炎、类风湿性关节炎、骨质疏松、哮喘、多发性硬化、神经变性、早老性痴呆、动脉粥样硬化、中风、脉管炎、节段性回肠炎和溃疡性结肠炎；牙周炎、龈炎；牛皮癣、特应性皮炎、慢性溃疡、大疱性表皮松解；角膜溃疡、视网膜病和手术伤口愈合；鼻炎、过敏性结膜炎、湿疹、过敏反应；再狭窄、充血性心力衰竭、子宫内膜异位、动脉粥样硬化或 endosclerosis 。

另外，或在替代方法中，本发明的反转录病毒载体可以用来传递可用于治疗 WO-A-98/07859 中所列疾病的一种或多种 NOI。为了易于参考，现在提供部分该表：细胞因子和细胞增殖/分化活性；免疫抑制或免疫刺激活性(例如用于治疗免疫缺陷，包括感染人免疫缺陷病毒；调节淋巴细胞的生长；治疗癌症和许多自身免疫病，以及预防移植排斥或诱导肿瘤免疫)；调节血生成，例如治疗骨髓疾病或淋巴疾病；促进骨、软骨、腱、韧带和神经组织的生长，例如用于使伤口愈合、治疗烧伤、溃疡和牙周病及神经变性；抑制或激活促卵泡激素(调节生育

力)；趋化活性(例如使特定的细胞类型移动至伤害位点或感染位点)；止血和溶解血栓活性(例如用于治疗血友病和中风)；抗炎活性(用于治疗例如脓毒性休克或节段性回肠炎)；作为抗微生物药；例如代谢或行为的调节物；作为镇痛药；治疗特定的缺陷疾病；用于治疗例如牛皮癣，用于人类或兽医医学领域。

另外，或在替代方法中，本发明的反转录病毒载体可以用来传递可用于治疗 WO-A-98/09985 中所列疾病的一种或多种 NOI。为了易于参考，现在提供部分该表：巨噬细胞抑制活性和/或 T 细胞抑制活性和由此的抗炎活性；抗免疫活性，即对细胞免疫应答和/或体液免疫应答的抑制效应，包括与炎症不相关的应答；抑制巨噬细胞和 T 细胞附着于细胞外基质组分和纤连蛋白的能力，以及向上调节 T 细胞中 fas 受体的表达；抑制不想要的免疫反应和炎症，包括关节炎，包括类风湿性关节炎、与过敏性相关的炎症、变态反应、哮喘、系统性红斑狼疮、胶原疾病和其它自身免疫病、与动脉粥样硬化相关的炎症、动脉粥样硬化、动脉粥样硬化性心脏病、再灌注损伤、心搏停止、心肌梗塞、血管炎症疾病、呼吸窘迫综合征或其它心肺疾病、与消化性溃疡、溃疡性结肠炎和其它胃肠道疾病相关的炎症、肝纤维变性、肝硬变或其它肝病、甲状腺炎、或其它腺病、肾小球性肾炎、或其它肾病和泌尿学疾病、耳炎或其它耳鼻咽疾病、皮炎或其它皮肤病、牙周病或其它牙病、睾丸炎或附睾炎(epididimo-orchitis)、不育症、睾丸创伤或其它与免疫相关的睾丸疾病、胎盘功能障碍、胎盘机能不全、习惯性流产、子痫、先兆子痫和其它与免疫和/或炎症相关的妇科疾病、后色素层炎、中色素层炎、前色素层炎、结膜炎、脉络膜视网膜炎、眼色素层视网膜炎(uveoretinitis)、视神经炎、眼内炎症例如视网膜炎或囊性斑状水肿(cystoid macular oedema)、交感性眼炎、巩膜炎、色素性视网膜炎、退行性 fondus 病的免疫和炎性组分、眼外伤的炎性组分、由感染引起的眼部炎症、增生性玻璃体-视网膜病(vitreo-retinopathies)、急性局部缺血性视神经病、例如在青光眼过滤手术后的过度瘢痕形成、针对眼

植入物的免疫和/或炎性反应以及其它免疫和炎症相关的眼病、与自身免疫病相关的炎症或在中枢神经系统(CNS)或任何其它器官中免疫和/或炎症抑制将为有益的病症或障碍、 Parkinson 病、由治疗 Parkinson 病引起的并发症/或副作用、与 AIDS 相关的痴呆综合征、 HIV 相关的脑病、 Devic 病、 Sydenham 舞蹈病、早老性痴呆和 CNS 的其它退行性疾病、病症或障碍、中风的炎性组分、小儿麻痹后综合征、精神障碍的免疫和炎性组分、脊髓炎、脑炎、亚急性硬化性全脑炎、脑脊髓炎、急性神经病、亚急性神经病、慢性神经病、 Guillaim-Barre 综合征、Sydenham 舞蹈病、重症肌无力、脑假肿瘤、 Down 综合征、 Huntington 病、肌萎缩性侧索硬化、 CNS 压迫或 CNS 外伤或 CNS 感染的炎性组分、肌肉萎缩和营养不良的炎性组分、以及中枢神经系统和外周神经系统的与免疫和炎症相关的疾病、病症或障碍、外伤后炎症、脓毒性休克、传染病、手术的炎症并发症或副作用、骨髓移植或其它移植并发症和/或副作用、例如由于感染病毒载体引起的基因治疗的炎症和/或免疫并发症和副作用、或与 AIDS 相关的炎症、为了抑制或阻止体液和/或细胞免疫应答、为了通过减少单核细胞或淋巴细胞的量来治疗或减轻单核细胞或白细胞增生性疾病例如白血病、在移植天然或人工细胞、组织或器官(诸如角膜、骨髓、器官、晶状体、起搏器、天然或人工皮肤组织)的情况下用于预防和/或治疗移植排斥。

按照本发明还提供控制一种或多种治疗 NOI 生产的方法，使得所述治疗 NOI 优先在第二靶细胞群体中表达，而在第一靶细胞中表达差或不以生物学显著水平表达。

本发明也提供用于通过基因疗法治疗个体的药用组合物，其中所述组合物包含治疗有效量的本发明反转录病毒载体，所述反转录病毒载体包含一种或多种可传递治疗和/或诊断 NOI 或由所述反转录病毒载体产生或可得自所述反转录病毒载体的病毒颗粒。所述药用组合物可以用于人类或动物。通常，医师会确定最适于个体受治疗者的精确的剂量，所述剂量将随特定个体的年龄、体重和反应而变化。

所述组合物可以可任选地包含药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或辅助剂。药用载体、赋形剂或稀释剂的选择可以根据计划的给药途径和标准的药物实践来选择。所述药用组合物可以包含作为载体、赋形剂或稀释剂的或除此之外的任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂和可以辅助或增加病毒进入靶位点的其它载体剂(诸如脂质传递系统)。

合适时，所述药用组合物可以通过以下任何一种或多种方式给予：吸入；栓剂或子宫托形式；通常以洗剂、溶液剂、乳膏、软膏或撒布粉剂(dusting powder)形式；通过使用皮肤贴剂；口服，为含赋形剂(诸如淀粉或乳糖)的片剂形式、或单独的或结合赋形剂的胶囊或ovule形式、或含调味剂或着色剂的酏剂、溶液剂或悬浮液形式；或它们可以胃肠外注射，例如经阴茎海绵体内、静脉内、肌内或皮下注射。对于胃肠外给药，所述组合物最好以无菌水溶液形式使用，所述水溶液可以含有其它物质，例如足够的盐或单糖，以使得溶液与血液等渗。对于颊或舌下给药，所述组合物可以以用常规方法配制的片剂或锭剂形式给予。

在本发明的再一方面，提供一般意义(即不必限于以上限定的本发明的上述第一方面)的用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统系统包含一种或多种编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能感染第一靶细胞并在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞。

关于该具体实施方案，本发明的基因载体因此为用于基因传递的杂种病毒载体系统，它能够从靶细胞内产生缺陷型感染性颗粒。因此，本发明的基因载体包括一种体外制造的第一载体，所述第一载体编码体内产生第二载体必需的基因。在应用中，所述第二载体携带一种或多种用于插入所述第二靶细胞的选定基因。所述选定基因可以是一种或多种标记基因和/或治疗基因。标记基因编码可选择和/或可检测蛋白。

以下是涉及本发明该特定方面的更多方面，所述内容也可应用于本发明的上述方面。

另一方面，本发明提供用一种或多种所述第一病毒载体感染、并能够产生感染性的第二病毒载体颗粒的靶细胞。

再一方面，本发明提供治疗人类和非人类哺乳动物的方法，所述方法包括如本文所述的给予杂种病毒载体系统或用一种或多种所述第一病毒载体感染的靶细胞。

一种或多种所述第一病毒载体可以是多种不同的病毒载体，诸如反转录病毒、腺病毒、疱疹病毒或痘病毒载体，或在多个第一病毒载体的情况下，它们可以是不同病毒起源的载体的混合物。无论在何种情况下，所述第一病毒载体均最好是缺陷型的，因为缺陷型载体不能独立地复制。因此，它们能够进入靶细胞并传递所述第二载体序列，但并不能复制以继续感染其它靶细胞。

在所述杂种病毒载体系统包含一种以上编码所述第二载体的第一载体的情况下，两种或所有三种第一载体将用来感染第一靶细胞群体，通常是同时感染。最好有编码所述第二病毒载体所有组分的单一的第一病毒载体。

优选的单一或多种第一病毒载体是腺病毒载体。在可以从体外培养物获得的滴度方面，腺病毒载体具有优于其它病毒载体的显著优点。与有包膜病毒相比，所述腺病毒颗粒也比较稳定，因此更容易纯化和贮存。然而，目前的腺病毒载体用于体内治疗应用的主要限制，是由于来自缺陷型腺病毒载体的基因表达仅为瞬时的。因为所述载体基因组不复制，所述靶细胞的增殖导致稀释所述载体。此外，针对腺病毒蛋白产生的免疫应答，破坏甚至低水平表达所述腺病毒蛋白的细胞。

所述第二病毒载体最好是反转录病毒载体。通过在所述第一靶细胞中缺陷型病毒载体颗粒装配和包装的必需基因的表达，产生所述第二载体。因为该载体不能独立复制，因而为缺陷型的。因此，一旦所

述第二反转录病毒载体已经转导了一个第二靶细胞，则它不能通过复制而传播至任何其它靶细胞。

可以由所述第一载体中 DNA 编码的反转录病毒载体生产的必需基因的表达，产生所述第二载体。这类基因可以包括反转录病毒的 gag-pol 基因、有包膜病毒的包膜基因和含一种或多种治疗基因的缺陷型反转录病毒基因组。所述缺陷型反转录病毒基因组一般含有使得能进行反转录的序列、 5'长末端重复序列(LTR)的至少一部分、 3'LTR 的至少一部分和包装信号。

重要的是，所述第二载体对于体内使用也是安全的，因为它加入了消除重组产生能独立复制的感染性病毒的可能性的一种或多种安全特征。

为了确保所述第二载体为复制缺陷型的，可以用多个转录单位编码所述第二载体，所述转录单位可以位于单一的或位于两种或两种以上腺病毒或其它第一载体中。因此，可以有一个转录单位编码所述第二载体基因组、一个转录单位编码 *gag-pol*，而一个转录单位编码 *env*。或者，可以组合两种或多种这些转录单位。例如，编码 *gag-pol* 和 *env*、或 *env* 和所述基因组的核酸序列可以组合在一个单一转录单位中。完成这一点的方法是本领域已知的。

本文所述的转录单位为含编码序列和完成那些编码序列表达的信号的核酸区，其独立于任何其它编码序列。因此，每个转录单位一般包含至少一个启动子、一个增强子和一个多腺苷酸化信号。编码所述第二载体的转录单位的启动子和增强子最好在生产所述第二病毒载体的条件下，在所述第一靶细胞中是强活性的，或能够被强烈诱导。所述启动子和/或增强子可以是组成型有效的，或其活性可以受组织限制或受时间限制。合适的组织限制启动子/增强子的实例是在肿瘤细胞中有高活性的启动子/增强子，诸如来自 MUC1 基因、 CEA 基因或 5T4 抗原基因的启动子/增强子。时间限制的启动子/增强子的实例是对局部缺血和/或低氧应答的启动子/增强子，诸如低氧效应元件或 grp78 或

grp94 基因的启动子/增强子。一个优选的启动子-增强子组合是人巨细胞病毒(hCMV)主要立即早期(MIE)启动子/增强子组合。

在某些环境下，第二载体组分的低氧或局部缺血可调节表达可能特别有用。低氧是在范围广泛的不同细胞类型中基因表达的强效的调节物，并通过诱导诸如低氧诱导型因子-1 (HIF-1; Wang 和 Semenza 1993 Proc. Natl. Acad. Sci USA 90:430)的低氧诱导型转录因子的活性而起作用，低氧诱导型转录因子结合于同类的 DNA 识别位点，即各种基因启动子上的低氧效应元件(HRE)。Dach 等(1997 Nature Med 5: 515)已经使用了多体形式的小鼠磷酸甘油激酶-1 (PGK-1)基因的 HRE (Firth 等 1994 Proc. Natl. Acad. Sci USA 91: 6496-6500)，来在体外控制对低氧应答的人纤维肉瘤细胞的标记基因和治疗基因的表达，以及在体内控制在实体瘤中的标记基因和治疗基因的表达(Dachs 等出处同上)。或者，显著的葡萄糖缺乏也存在于肿瘤的局部缺血区的事实，能被用来在肿瘤中特异性地激活异源基因的表达。已知被葡萄糖缺乏特异性激活的 grp78 基因启动子的截短的 632 个碱基对序列，也显示出能够在体内在鼠类肿瘤中驱动高水平的报道基因的表达(Gazit 等 1995 Cancer Res. 55:1660)。

以下描述可以加入到所述杂种病毒载体系统的安全特征。可以存在一种或多种这类特征。

首先，通过缺失同源区，可以避免编码所述第二载体组分的序列之间的序列同源性。同源区允许发生基因重组。在一个特定的实施方案中，用三种转录单位构建第二反转录病毒载体。第一转录单位含有在非反转录病毒启动子和增强子控制下的反转录病毒的 *gag-pol* 基因。第二转录单位含有在非反转录病毒启动子和增强子控制下的反转录病毒的 *env* 基因。第三转录单位包含在非反转录病毒启动子和增强子控制下的缺陷型反转录病毒基因组。在天然的反转录病毒基因组中，包装信号的位置使得正确起作用需要部分 *gag* 序列。通常，当由其构建反转录病毒载体系统时，包括部分 *gag* 基因在内的包装信号仍

在所述载体基因组中。然而，在本发明的情况下，所述缺陷型反转录病毒基因组含有基本包装信号，它不含与所述第一转录单位中的 *gag* 序列同源的序列。此外，在反转录病毒中，例如在莫洛尼鼠类白血病病毒(MMLV)中，在 *pol* 编码序列 3'端和 *env* 5'端之间有重叠小区。通过改变或者 *pol* 编码序列 3'端的序列或者 *env* 5'端的序列，以改变密码子用法，而不改变所编码蛋白的氨基酸序列，可以去除所述第一和所述第二转录单位之间的相应的同源性区域。

其次，通过用另一反转录病毒或另一有包膜病毒的包膜蛋白将一种反转录病毒的基因组假型化，使得避免 *env* 组分和 *gag-pol* 组分之间的同源区，可以避免有复制能力的第二病毒载体的可能性。在一个具体实施方案中，由以下三种组分构建所述反转录病毒载体。第一转录单位含有在非反转录病毒启动子和增强子控制下的反转录病毒的 *gag-pol* 基因。第二转录单位含有在非反转录病毒启动子和增强子控制下的替代有包膜病毒的 *env* 基因。第三转录单位包含在非反转录病毒启动子和增强子控制下的缺陷型反转录病毒基因组。所述缺陷型反转录病毒基因组含有基本包装信号，它不含有与所述第一转录单位中的 *gag* 序列同源的序列。

假型化可能涉及例如基于慢病毒(诸如 HIV 或马传染性贫血病毒(EIAV))的反转录病毒基因组，所述包膜蛋白可以例如是命名为 4070A 的兼嗜性包膜蛋白。或者，所述反转录病毒基因组可以基于 MMLV，所述包膜蛋白可以是来自可以在所述第一靶细胞中以无毒量生产的另一病毒的蛋白，诸如流感血细胞凝集素或水泡性口腔炎病毒 G 蛋白。在另一替代方法中，所述包膜蛋白可以是修饰的包膜蛋白，诸如突变的或工程改造的包膜蛋白。可以制备修饰或选择修饰，以引入寻靶能力或降低毒性或用于另一目的。

第三，通过采用以特定方式构建的两种转录单位，可以消除有复制能力的反转录病毒的可能性。第一转录单位含有在第一靶细胞中有活性的启动子-增强子(诸如 hCMV 启动子-增强子或组织限制性启动子

-增强子)控制下的 *gag-pol* 编码区。第二转录单位编码能够包装入反转录病毒颗粒中的反转录病毒基因组 RNA。第二转录单位含有包装、整合和反转录所必需的反转录病毒序列，也含有有包膜病毒的 *env* 蛋白编码序列和一种或多种治疗基因的编码序列。

在一个优选实施方案中，按照本发明的杂种病毒载体系统包含单一或多种编码反转录病毒第二载体的腺病毒第一载体。用于本发明的腺病毒载体可以衍生自人腺病毒或通常不感染人类的腺病毒。所述载体最好衍生自 2 型腺病毒或 5 型腺病毒(Ad2 或 Ad5)、或小鼠腺病毒或鸟类腺病毒，诸如 CELO 病毒(Cotton 等 1993 J. Virol 67: 3777-3785)。所述载体可以是具有复制能力的腺病毒载体，但更优选缺陷型腺病毒载体。可以通过缺失病毒复制必需的一种或多种组分，使腺病毒载体为缺陷型。通常，每个腺病毒载体含有至少一个 E1 区的缺失。为了产生感染性腺病毒载体颗粒，通过使病毒在诸如人 293 细胞系的人胚胎成纤维细胞细胞系中传代，可以互补这一缺失，其中 293 细胞系含有整合拷贝的 Ad5 的左边部分，包括 E1 基因。异源 DNA 插入到这类载体的容量可以至多为约 7 kb。因此，这类载体可以用来构建按照本发明的包含三种分离重组载体的系统，每种载体含有其中一个必需的转录单位以构建所述反转录病毒第二载体。

替代的腺病毒载体是本领域已知的，它们在其它腺病毒基因中含有进一步的缺失，这些载体也适用于本发明。这些第二代腺病毒载体中的数种显示出免疫原性降低(例如 E1 + E2 缺失 Gorziglia 等 1996 J. Virol. 70: 4173-4178; E1 + E4 缺失 Yeh 等 1996 J. Virol. 70: 559-565)。延伸的缺失用来提供额外的克隆容量以将多个基因引入所述载体。例如已经描述了 25 kb 的缺失(Lieber 等 1996 J. Virol. 70: 8944-8960)，也报道了缺失所有病毒基因的克隆载体(Fisher 等 1996 Virology 217: 11-22)，所述载体允许引入 35 kb 以上的异源 DNA。这类载体可以用来产生按照本发明的腺病毒第一载体，所述第一载体编码用于构建所述反转录病毒第二载体的两种或三种转录单位。

所述本发明的实施方案解决了与腺病毒载体和其它病毒载体有关的一个主要问题，即来自这类载体的基因表达是瞬时的。由所述第一靶细胞产生的反转录病毒颗粒可以感染第二靶细胞，在所述第二靶细胞中的基因表达稳定地保持，因为所述反转录病毒载体基因组整合入宿主细胞基因组中。所述第二靶细胞不表达大量的病毒蛋白抗原，因此其免疫原性低于用腺病毒载体转导的细胞。

用反转录病毒载体作为所述第二载体也是有利的，因为它例如通过允许导向快速分裂细胞，而允许一定程度的细胞辨别。此外，反转录病毒的整合允许在靶组织中稳定地表达治疗基因，包括在增殖性靶细胞中的稳定地表达。

所述第一病毒载体最好优先感染某种或某些细胞类型。所述第一载体更优选为定向载体，也就是说它与天然病毒相比组织嗜性改变，使得所述载体导向特定的细胞。术语“定向载体”不必与术语“靶位点”或“靶细胞”相关连。“靶细胞”就是指是天然或定向载体能够感染或转导的细胞。

按照本发明的优选的腺病毒第一载体也最好是定向载体，其中所述载体的组织嗜性改变而不同于野生型腺病毒。可以修饰腺病毒载体，以产生例如以下描述的定向腺病毒载体： Krasnykh 等 1996 J. Virol 70: 6839-6846; Wickham 等 1996 J. Virol 70: 6831-6838; Stevenson 等 1997 J. Virol 71: 4782-4790; Wickham 等 1995 Gene Therapy 2: 750-756; Douglas 等 1997 Neuromuscul. Disord 7: 284-298; Wickham 等 1996 Nature Biotechnology 14: 1570-1573 。

用于按照本发明的载体系统的第一靶细胞包括但不限于： 造血细胞(包括单核细胞、巨噬细胞、淋巴细胞、粒细胞或任何这些细胞的祖细胞)； 内皮细胞； 肿瘤细胞； 基质细胞； 星形胶质细胞或神经胶质细胞； 肌细胞； 和上皮细胞。

因此，能够产生所述第二病毒载体的按照本发明的第一靶细胞可以是上述细胞类型中的任何一种。在一个优选的实施方案中，按照本

发明的第一靶细胞是用一种缺陷型腺病毒载体感染的单核细胞或巨噬细胞，所述缺陷型腺病毒载体含有用于反转录病毒 *gag-pol* 的第一转录单位和能够产生可包装缺陷型反转录病毒基因组的第二转录单位。在这种情况下，至少所述第二转录单位最好处于在机体内患病位置中优先有活性的启动子-增强子的控制之下，其中所述患病位置诸如局部缺血位点或实体瘤的微环境。在本发明该方面的一个具体的优选实施方案中，构建所述第二转录单位，使得将所述基因组插入所述第二靶细胞中时，产生一个内含子，以用来降低病毒 *env* 基因的表达，并允许有效地表达治疗基因。

所述第二病毒载体也可以是定向载体。对于反转录病毒载体，这可以通过修饰所述包膜蛋白来完成。所述反转录病毒第二载体的包膜蛋白需要是无毒的包膜或可以以无毒量在所述第一靶细胞中生产的包膜，诸如 MMLV 兼嗜性包膜或修饰的兼嗜性包膜。在这种情况下，所述安全特征最好是缺失反转录病毒组分之间同源的区域或序列。

所述第二靶细胞群体可以与所述第一靶细胞群体相同。例如，将本发明的第一载体传递至肿瘤细胞，导致可以转导其它肿瘤细胞的其它载体颗粒的复制和产生。或者，所述第二靶细胞群体可以不同于所述第一靶细胞群体。在这种情况下，所述第一靶细胞用作被治疗个体机体内的内源工厂，产生可以感染所述第二靶细胞群体的另外的载体颗粒。例如，所述第一靶细胞群体可以是用所述第一载体体内或活体外转导的造血细胞。然后，将所述第一靶细胞传递至或迁移至机体内诸如肿瘤的位点，并产生能够转导例如实体瘤中肿瘤细胞的所述第二载体颗粒。

本发明允许在随后有效转导第二靶细胞所需的一种或多种治疗蛋白的作用位点或其附近，体内定位产生高滴度的缺陷型反转录病毒载体颗粒。这比或者采用缺陷型腺病毒载体或者采用单独的缺陷型反转录病毒载体更加有效。

本发明也允许体内在非分裂细胞或缓慢分裂的细胞中产生诸如

基于MMLV的载体的反转录病毒载体。仅在诸如体外增殖的适应于组织培养的细胞的快速分裂的细胞中，或在体内的快速分裂的肿瘤细胞中，产生基于MMLV的反转录病毒载体，这在先前已经是可能的。对于将基因传递至实体瘤的细胞(许多实体瘤细胞分裂缓慢)而言，以及对于应用非分裂细胞(诸如内皮细胞)和各种造血谱系的细胞作为生产治疗蛋白产物的内源工厂而言，扩展能够产生反转录病毒载体的细胞类型的范围是有利的。

由按照本发明的载体系统传递一种或多种治疗基因的方法可以单独采用或结合其它治疗或所述治疗组分使用。可以治疗的疾病包括但不限于：癌症、神经病、遗传病、心脏病、中风、关节炎、病毒感染和免疫系统疾病。合适的治疗基因包括编码以下物质的基因：肿瘤抑制蛋白、酶、前体药物活化酶、免疫调节分子、抗体、工程免疫球蛋白样分子、融合蛋白、激素、膜蛋白、血管活性蛋白或肽、细胞因子、趋化因子、抗病毒蛋白、反义RNA和核酶。

在按照本发明的治疗方法的一个优选实施方案中，用本发明的载体系统将编码前体药物活化酶的基因传递至肿瘤，并且随后用合适的前体药物治疗所述个体。前体药物的实例包括：磷酸鬼臼亚乙苷(与碱性磷酸酶一起使用， Senter 等 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 4842-4846)； 5-氟胞嘧啶(与胞嘧啶脱氨酶一起使用， Mullen 等 1994 Cancer Res. 54: 1503-1506)；阿霉素-N-对羟基苯氧基乙酰胺(与青霉素-V 酰胺酶一起使用， Kerr 等 1990 Cancer Immunol. Immunother. 31: 202-206)；对-N-双(2-氯乙基)氨基苯甲酰谷氨酸(与羧肽酶 G2 一起使用)；氨基甲酸头孢菌素氮芥(与 b-内酰胺酶一起使用)； SR4233 (与 P450 还原酶一起使用)；丙氧鸟苷(与 HSV 胸苷激酶一起使用， Borrelli 等 1988 Proc. Natl. Acad. Sci. 85: 7572-7576)；与硝基还原酶一起使用的芥子前体药物(Friedlos 等 1997 J Med Chem 40: 1270-1275)和环磷酰胺或异环磷酰胺(与细胞色素 P450 一起使用, Chen 等 1996 Cancer Res 56: 1331-1340)。

按照本发明还提供一种方法，控制治疗基因的生产，使得所述治疗基因优先在所述第二靶细胞群体中表达，而在所述第一靶细胞中表达差或不以生物学显著水平表达。

按照本发明，可以使用本领域技术人员技术水平内的标准分子生物学技术。这类技术全面描述于文献中。参见例如 Sambrook 等(1989) Molecular Cloning: a laboratory manual; Hames 和 Glover (1985-1997) DNA Cloning: a practical approach, 第 I-IV 卷(第二版)；在 McCafferty 等(1996) " Antibody Enginnering: A Practical Approach"中给出了将免疫球蛋白基因工程改造的方法。

总之，本发明涉及适用于将一种或多种 NOI 引入靶细胞的新型传递系统。

在一个广义方面，本发明涉及包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点的反转录病毒载体；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列("NOI")；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列("NS")和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二 NS；其中所述第一 NS 位于所述第二 NS 下游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。

在再一广义方面，本发明提供用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统包含一种或多种编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能够感染第一靶细胞并能在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞。

最好是，所述第一载体可得自或基于腺病毒载体和/或所述第二病毒载体可得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体。

现在参考以下附图，通过实施例进一步描述本发明：

图 1 显示反转录病毒原病毒基因组的结构；

图 2 显示小 T 剪接供体 pLTR 的加入;

图 3 显示 pL-SA-N 的图解说明;

图 4 显示缺失一个剪接供体的 pL-SA-N 的图解说明;

图 5 显示 MLV pICUT 的序列;

图 6 显示于 EIAV LTR 质粒的 CMV/R 接点处插入一个剪接供体;

图 7 显示将一个剪接受体插入 pEGASUS-1 ;

图 8 显示从 EIAV 载体去除一个野生型剪接供体;

图 9 显示 pCMVLTR+SD 与 pEGASUS+SA (noSD)组合，产生 pEICUT-1 ;

图 10 显示 pEICUT-*LacZ* 的构建;

图 11 显示 pEICUT-*LacZ* 序列;

图 12 显示在转染和转导的细胞中所述载体的结构;

图 13 显示基因表达限于或者包装细胞或者转导细胞;

图 14 显示 MLV pICUT *Neo*-p450 载体的构建，所述载体将潮霉素的表达限于生产细胞，而将 2B6 (一种 p450 同种型)的表达限于转导细胞;

图 15 显示突变的 *env* (m4070A)与来自 *pol* 基因 3'端的野生型 MMLV 序列的序列比较;

图 16 显示修饰的 *env* 基因 m4070A 的完整序列;

图 17 显示限制的基因表达构成物； 4070A 包膜限于第一细胞; p450 限于第二细胞;

图 18 显示使用内含子将 NOI (在该实施例中为 p450)的表达限于转导细胞;

图 19 显示转移载体 pE1sp1A 的图解说明;

图 20 显示 pE1sp1A 构成物的图解说明;

图 21 显示 pE1RevE 构成物的图解说明;

图 22 显示 pE1HORSE3.1-*gagpol* 构成物的图解说明;

图 23 显示 pE1PEGASUS4-基因组构成物的图解说明;

图 24 显示 pCI-*Neo* 构成物的图解说明;

图 25 显示 pCI-Rab 构成物的图解说明;

图 26 显示 pE1Rab 构成物的图解说明;

图 27a 以图解说明反转录病毒载体中的天然剪接结构;

图 27b 以图解说明已知的反转录病毒载体中的剪接结构;

图 27c 以图解说明按照本发明的剪接结构; 和

图 28 以图解说明按照本发明的双杂种病毒载体系统。

以下是略为更详细的细节:

图 1 显示反转录病毒原病毒基因组的结构。在该方面, 诸如鼠类致癌反转录病毒的最简单的反转录病毒具有三个可读框: *gag* 、 *pol* 和 *env*。在 *gag* 翻译期间的移码导致 *pol* 翻译。通过所示的剪接供体(SD)和剪接受体(SA)之间的剪接, 完成 Env 的表达和翻译。包装信号以 *psi* 表示, 且仅包含于全长的转录物中 - 而不包含于表达 *env* 的亚基因组转录物中, 其中该信号在所述剪接事件期间被去除。

图 2 图示将小 T 剪接供体加入 pLTR 。在此, 将所述小 t 剪接供体序列插入 LTR 载体的转录起始下游, 但位于 *R* 序列上游, 使得反转录时(在最终的构成物中), 所述 U3-剪接供体-R 盒“遗传”至所述原病毒载体的 5'端, 并且所表达的 RNA 转录物在其 5'末端附近含有一个剪接供体序列。

图 3 显示 pL-SA-N 的示意图。共有剪接受体(T/C)nNC/TAG-G (Mount 1982 Nucleic Acids Res 10: 459-472)和分支点用下划线和粗体显示。箭头显示内含子/外显子接点。在此, 将所述共有剪接受体序列插入到 pLXSN 的 *Stu*1/*BamH*1 位点。因此通过这种定位, 该受体将与任何上游的剪接供体(在最终的 RNA 转录物中)相互作用。

图 4 显示构建缺失一个剪接供体的 pL-SA-N 的示意图。通过用以下显示的两种寡核苷酸对 pL-SA-N 载体进行 PCR 反应, 将 gT 变为 gC 。然后, 将所得的产物以 *Spe*1-*Asc*1 片段克隆入 pL-SA-N 中, 因而用 gC 取代野生型剪接供体 gT 。 *Spe*1 和 *Asc*1 位点均以粗体显示,

*Spe*1 寡核苷酸中的突变以大写粗体显示。

图 5 显示 MLV pICUT 的序列。

图 6 显示于 EIAV LTR 质粒的 CMV/R 接点处插入一个剪接供体的示意图。用以下概述的两种寡核苷酸进行 PCR，将所得的 PCR 产物以 *Sac*1-*BamH*1 片段克隆入 CMVLTR 中，并去除相当的片段。在 *Sac*1 寡核苷酸中，所述箭头指示转录起始，新的插入片段以大写显示，并将剪接供体序列下划线。R 的起始以斜体显示。

图 7 显示将一个剪接受体插入 pEGASUS-1 的示意图。在此，将下述的双链寡核苷酸插入 *Xho*1-*Bpul*102 消化的 pEGASUS-1，产生质粒 pEGASUS+SA。共有剪接受体(T/C)nNC/TAG-G (Mount 1982 出处同上)和分支点均以下划线和粗体显示。箭头指出内含子/外显子接点。

图 8 显示从 EIAV 载体去除一个野生型剪接供体的示意图。用下述的寡核苷酸和模板 pEGASUS+SA，通过重叠 PCR，去除剪接供体序列。用寡聚物 1+2 和寡聚物 3+4 进行第一个单独的 PCR 反应。然后洗脱出所得的扩增产物，将其混合用于第三个 PCR 反应。该第三反应进行 10 个循环后，加入寡聚物 2 和寡聚物 4。然后将所得的产物以 *Sal*1-*Sac*1 片段克隆入 pEGASUS+SA 中，产生质粒 pEGASUS+SA(noSD)。显示了所述剪接供体(SD)的位置。在寡聚物 1 和互补的寡聚物 3 中，将野生型剪接供体从 GT 变为 GC 的点突变以粗体显示。

图 9 显示 pCMVLTR+SD 与 pEGASUS+SA(noSD)组合，产生 pEICUT-1 的示意图。在此，我们将 pEGASUS+SA(noSD)的 *Mlu*1 片段插入 pCMV-LTR 唯一的 *Mlu*1 位点。

图 10 显示构建 pEICUT-LacZ 的示意图。这通过如下概述的将 pEGASUS-1 的 *Xho1-Bpu*1102 LacZ 片段插入 pEICUT-1 的 *Xho1-Bpu*1102 位点来进行。

图 11 显示 pEICUT-*LacZ* 序列。

图 12 显示在转染和转导的细胞中所述载体结构的示意图。在此，

起始 pICUT 载体在剪接受体(在该实例中，所述共有剪接受体衍生自 IgSA)上游不含剪接供体，因此所得的 RNA 转录物将不被剪接。因此，所有转录物将为含包装信号的全长转录物(A)。然而转导时，所述剪接供体(在该实例中为小 T 剪接的供体)“遗传”至所述原病毒载体的 5’端，使得现在产生的所有 RNA 转录物于剪接受体(即内含子)上游均含有剪接供体，并因此完成最大剪接(B)。

图 13 显示基因表达限于或者包装细胞或者转导细胞的示意图。通过将新霉素 ORF 上游的潮霉素 ORF 置于 MLV pEICUT 中，完成在该实例中基因表达的限制(a)。用该克隆策略，所得的载体现在表达的 RNA 转录物，仅在转染的细胞中表达潮霉素，因为核糖体依赖于 5’帽的翻译将仅有效阅读上游 ORF。然而，转导时，潮霉素现在包含于功能性内含子内，并因此从成熟的转录物(b)中缺失，因此新霉素 ORF 现在以 5’帽依赖性方式翻译。

图 14 显示 MLV pICUT *Neo*-p450 载体构建的示意图，所述载体将潮霉素的表达限于生产细胞，而将 2B6 (一种 p450 同种型)的表达限于转导细胞。用于该构建的起始载体为图 13 的 pICUT 载体，它含有 *hygo* 和 *neo* 两者。*neo* 基因用完整的 p450 2B6 cDNA 如下取代：通过用以下引物对人肝 RNA (Clontech)进行 RT-PCR，获得完整的 2B6 cDNA：

5’ttcgatgatcaccaccatggaactcagcgtcctcctcttccttgcac3’

5’ttcgagccggctcatcagcggggcaggaagcggatctggtatgttg3’

这产生完整的 2B6 cDNA，它具有邻接仅有的 *Bcl*I 和 *NgoM*1 位点的最适化 kosak 序列。然后将该 cDNA 克隆入 pICUT-*Hyg-Neo* 的 *Bcl*1-*NgoM*1 位点，因此用 p450 取代 *Neo* (参见以下(A))。以下也显示了在转染(B)和转导(C)的细胞中的所述原病毒 DNA 构成物。

图 15 是突变的 *env* (m4070A)与来自 *pol* 基因 3’端的野生型 MMLV 序列的序列比较。

图 16 是改变的 4070A 的完整序列。

图 17 显示基因限制表达的反转录病毒载体，采用该载体，在所述起始载体中表达所述第一 NOI (所述 4070A 包膜 ORF)，而仅在载体复制后表达所述第二 NOI (在该实例中为 p450)。在复制后， 4070A 基因位于功能性内含子内，因此在 RNA 剪接期间被去除。

图 18 显示一种反转录病毒表达载体，使用该载体，在复制后 p450 基因的 5'端(补平为(flush to)剪接供体)仅在 p450 基因的 3'端(补平为 SA)上游发现，因而仅在复制后为表达的功能性 p450 基因(来自剪接的 mRNA)。

实施例

实施例 1 断裂-内含子 MLV 载体的构建。

(i) 小 T 剪接供体的加入:

用于该构成物的起始质粒为 pLXSN (Miller 等 1989 出处同上); 首先，用 *Nhe*1 消化该构成物，将骨架再连接，产生一个 LTR (U3-R-U5) 质粒。然后，将含有所述剪接供体序列的寡核苷酸插入该质粒的 *Kpn*1-*Bbe*1 位点之间。 MLV R 序列至 *Kpn*1 也包含于该寡核苷酸内，位于所述剪接供体下游。所得的质粒命名为 3'LTR-SD (参见图 2)。

(ii) 剪接受体的加入:

用于该构成物的剪接受体序列(包括分支点 - 参与内含子套索形成(Aebi 等 1987 Trends in Genetics 3: 102-107)的剪接受体上游 20 碱基和 40 碱基之间的一个 A 残基)衍生自免疫球蛋白重链可变区 mRNA (Bothwell 等 1981 Cell 24: 625-637)，但具有共有/最适化受体位点。这种序列信号也存在于 pCI (Promega)中。首先将该受体序列作为双链寡核苷酸插入 pLXSN 的 *BamH*1-*Stu*1 位点，产生载体 pL-SA-N (注意: 在克隆期间 SV40 启动子从 pLXSN 中丧失)。关于克隆策略的概述请参见图 3 。

(iii) 从 pL-SA-N 中去除原始剪接供体。

通过基于 PCR 的定点诱变，完成包含于 pL-SA-N 的 *gag* 序列内的剪接供体的去除。使用两种寡核苷酸，以 PCR 扩增跨越 pL-SA-N 的 *Asc*1 和 *Spe*1 特有位点的区域。在所述跨越 *Spe*1 的寡核苷酸中，也加入 agGTaag 至 agGCaag 的改变，该改变也在剪接阴性 pBABE 载体中发现(Morgenstern 等 1990 出处同上)。关于克隆策略的概述请参见图 4。

(iv) 将 pL(noSD)-SA-N 与 3'LTR-SD 组合。

pL(noSD)SA-N 质粒含有一个正常 MLV 衍生的 3'LTR。通过从 pL(noSD)SA-N 取出 *Nhe*1 插入片段，并将其加入 *Nhe*1 消化的 3'LTR-SD 载体中，用 3'LTR-SD 序列取代所述 3'LTR。名为 pICUT (转导时产生的内含子(*I*ntron *C*reated *U*pon *T*ransduction))的所得的质粒含有这种新一代反转录病毒载体的所有特征(关于序列信息请参见图 5)。

实施例 2 断裂-内含子慢病毒载体的构建。

起始 EIAV 慢病毒表达载体的构建(也参见专利申请 GB 9727135.7)。

为了构建断裂功能的慢病毒载体，起始点为名为 pEGASUS-1 的载体(参见专利申请 GB 9727135.7)。该载体衍生自感染性原病毒 EIAV 克隆 pSPEIAV19 (登记号: U01866; Payne 等 1994)。其构建概述如下：首先，将通过 PCR 扩增的 EIAV LTR 克隆入 pBluescript II KS+ (Stratagene)中。然后插入 pSEIAV19 的 *Mlu*I/*Mlu*I (216/8124)片段，产生 pBluescript II KS+中的野生型原病毒克隆(pONY2) (图 1)。然后通过去除 *Hind* III/*Hind* III 片段使 *env* 区缺失，产生 pONY2-H。另外，缺失 *pol* 中的 *Bgl*II/*Nco*I 片段(1901/4949)，并将由 HCMV IE 增强子/启动子驱动的 β-半乳糖苷酶基因插入其位置。该质粒命名为 pONY2.10nls*LacZ*。为了将 EIAV 序列减至 759 个碱基对并将第一转录物与 CMV 启动子分离：首先，采用以下引物，从 pONY2.10*LacZ* PCR

扩增包含 EIAV 多嘌呤序列段(polypurine tract) (PPT)和 3'LTR 的序列:

PPTEIAV+ (Y8198): GACTACGACTAGTGTATGTTTAGAAAAACAAGG,

和

3'NEG*Spe*I(Y8199): CTAGGCTACTAGTACTGTAGGATCTCGAACAG

然后将 PCR 产物克隆入 pBS II KS$^+$的 *Spe*1 位点; 其取向使得 U5 邻近 pBluescript II KS$^+$中的 *Not*1 。

下一步, 对于报道基因盒, 通过 *Pst*1 消化取出来自 pONY2.10nls*LacZ* 的 CMV 启动子/*LacZ*, 并将其克隆入 pBS.3'LTR 的 *Pst*1 位点, 其取向使得 *LacZ* 基因邻近所述 3'LTR, 该载体命名为 pBS CMV*LacZ*.3'LTR 。

在表达载体 pCIE*neo* 中构建所述 EIAV 载体的 5'区, pCIE*neo* 为 pCI*neo* (Promega)的衍生物, 由于包含得自先前定义的全长 CMV 启动子 5'端的约 400 个碱基对而被修饰。采用以下引物, 用 pHIT60 (Snoeoka 等 1995 Nucleic Aicds Res 23: 628-633)作为模板, 经 PCR 扩增获得该 400 个碱基对的片段:

VSAT1: (GGGCTATATGAGATCTTGAATAATAAAATGTGT) 和

VSAT2: (TATTAATAACTAGT)

该产物用 *Bgl*II 和 *Spe*I 消化, 并克隆入的 pCIE*neo* 的 *Bgl*II/*Spe*I 位点。

用以下引物, 从 pSEIAV 扩增 EIAV 基因组中从 R 区至 *gag* 编码区的 nt 150 的片段(nt 268-675):

CMV5'EIAV2:

(Z0591)(GCTACGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCTG:

(下划线的序列退火于 EIAV R 区)和

3'PSI.NEG (GCTGAGCTCTAGAGTCCTTTTCTTTTACAAAGTTGG)

所得的 PCR 产物邻近 *Xba*1 和 *Sac*1 位点。然后, 将该产物酶切, 并克隆入 pCIE*neo* 的 *Xba*1/*Sac*1 位点。称为 pCIE*neo*5'EIAV 的所得质粒现在于 CMV 启动子转录起始点含有 EIAV R 区的起始段。然后, 通

过从 pBS.CMV*LacZ*.3LTR 中取出 *Apa*1 至 *Not*1 的片段，并将其克隆入 *Sal*1-*Not*1 消化的 pCIE*neo*5'EIAV 中(在载体和插入片段分别以 *Not*1 消化之前，将所述 *Sal*1 和 *Apa*1 位点用 T4 "磨光"产生平端)，将 CMV*LacZ*/3TLR 盒插入 pCIE*neo*5'EIAV 质粒中。所得的质粒命名为 pEGASUS-1 。

为了用作基因传递载体， pEGASUS-1 需要由包装细胞以反式提供的 *gag/pol* 和 *env* 的表达。关于 *gag/pol* 源，通过将 pONY2-H 的 *Mlu* I/*Mlu* I 片段插入哺乳动物表达质粒 pCI-*neo* (Promega)中，制备 EIAV *gagpol* 表达质粒(pONY3)，使得 *gag-pol* 基因由 hCMV-MIE 启动子-增强子表达，并不含 LTR 序列。对于 *env* 源；常规使用 pRV583 VSV-G 表达质粒。这三种载体用于关于基于 MLV 的载体所述的三质粒共转染中(Someoka 等 1995 Nucl. Acids Res. 23:628-633)。在 D17 成纤维细胞上通常所得病毒的滴度为 10^4-10^5 *lacZ* 形成单位/ml 。

构建 pICUT 的 EIAV 慢病毒形式的载体，命名为 pEICUT

为了构建 pEICUT ，首先从 pEIASUS-1 中去除 pEIASUS-1 的 *Xma*1-*SexA*1 片段，用 T4 聚合酶将末端"平端化"，将质粒再连接，产生仅含 pEGASUS-1 CMV-R-U5 部分的质粒，该质粒在骨架中保留 SV40-*Neo* 盒。该质粒命名为 CMVLTR 。为了于 CMV-R 边界插入一个剪接供体，用以下在图 6 显示和在图 6 说明中概述的两种寡核苷酸进行 PCR 。所得的质粒命名为 pCMVLTR+SD 。在该 EIAV 形式中使用与 MLV pICUT (参见上文)相同的基于免疫球蛋白的共有剪接受体。用图 7 所述的寡核苷酸，将该共有剪接受体插入 pEGASUS-1 的 *Xho*I-*Bpu*1102 位点，产生质粒 pEGASUS+SA 。通过采用图 8 描述的寡核苷酸和方法，用 pEGASUS+SA 作为模板进行重叠 PCR，去除 EIAV 的野生型剪接供体，产生质粒 pEGASUS+SA(noSD)。然后为了产生 pEICUT-1 ，则将 pEGASUS+SA(noSD) 的 *Mlu*1-*Mlu*1 片段插入 pCMVLTR+SD 的仅有的 *Mlu*1 位点，产生 pEICUT-1 (参见图 9)。然后，

通过 *Xho*1-*Bpu*l102 消化和插入，可以将 *LacZ* 从 pEGASUS-1 转移入 pEICUT-1,产生 pEICUT-Z (参见图 10；对于序列信息参见图 11)。

MLV 和 EIAV 的 pICUT 载体均含有所述剪接供体上游的强剪接受体，因此不含功能性内含子(内含子需要位于剪接受体 5'的剪接供体)。为此，当将所述载体转染入生产细胞中时，产生的所得转录物将不剪接。因此，包装信号将不丧失，结果是可完成最大的包装(参见图 12)。

然而，由于反转录病毒复制的特有方式，因此，在转导时，由整合的 pICUT 载体产生的转录物将不同于上述转染细胞的转录物。这是因为在复制期间，3'U3 启动子(直至 R 的 5'起始)拷贝，并用作转导细胞中的 5'启动子。为此，由整合的 pICUT 产生的转录物现在将含有强剪接受体 5'端的强剪接供体，这两者均位于 *neo* ORF 上游。这类转录物将因此在 5'UTR 中(非翻译区)含有一个功能性内含子，并因此进行最大剪接和翻译。

上述这类载体的另一优点是，因为所述内含子仅在转导时产生，因而将基因表达限于或者包装细胞或者转导细胞是可能的。如何完成这一点的一个实例概述于图 13 。该策略需要克隆所述剪接受体上游的一个第二基因(在该实施例中为潮霉素)。通过取出 SelctaVector Hygro (Ingenius; Oxfordshire, UK)的 *Sal*I 片段上的潮霉素 cDNA，并将其克隆入 pICUT 的 *Xho*1 位点(位于所述剪接受体上游)，而完成这一步。该载体在转染的细胞中选择性地表达潮霉素，而在转导的细胞中选择性地表达新霉素。其原因是，在任何一种 mRNA 转录物中，在无内部核糖体结合位点(IRES)的辅助下，仅所述第一基因由核糖体翻译。在转染的细胞中，该基因为潮霉素。然而，在转导的细胞中，因为潮霉素可读框(ORF)包含于一种功能性内含子内，所以该基因现在将从成熟 mRNA 转录物中去除，因此允许 *neo* ORF 翻译。

具有这类细胞特异性基因表达的载体因种种原因可能具有临床用途；作为实例，可以将抗性标记的表达局限于需要它们的生产细胞

中，而不在它们可能具有免疫原性的转导细胞中表达。作为另一实例，诸如蓖麻毒蛋白的毒性基因的表达和显性负信号蛋白的表达，可以被局限于转导的细胞，在此可能需要它们来任选地使细胞生长停滞或杀伤细胞，但在这类特征阻止高滴度病毒产生的生产细胞中不表达。图14显示 *Neo*-p450 MLV pICUT 构成物，使得仅 *Neo* 在生产细胞中表达，而前体药物 p450 2B6 同种型在转导细胞中表达。

转导时产生内含子的另一个益处是，载体功能所需的任何必需元件现在均可以置于功能性内含子内，该内含子在转导时产生，并从转导细胞的转录物中去除。作为实例，关于MLV和慢病毒载体(lentivector)的 pICUT 载体，所述病毒转录物在一个内含子内含有功能性 *Psi* 包装信号(关于 *Psi* 在 MLV 中的位置，参见 Bender 等 1987；关于 *Psi* 在 EIAV 中的位置，参见专利申请 GB 9727135.7)，所述内含子在转导时产生，而从转导细胞的转录物中去除。

得自这种布置的益处包括:

(i) 增强来自所得转录物的翻译，因为在存在 *Psi* 二级结构(如果有的话)的情况下，核糖体可能“一阵一阵地动(stutter)”(Krall 等 1996 出处同上和其中引用的参考文献)。

(ii) 在缺乏包装信号的情况下，防止由内源反转录病毒进行转录物包装。

(iii) 当诸如 *gag* (和其它潜在的 ATG 翻译起始位点)的病毒基本元件从转导细胞中表达的转录物中去除时，防止不想要的成熟前翻译起始。当 EIAV 和 MLV pICUT 载体均将包装信号延伸到 *gag* 中时，这特别有益。

(iv) 可以将启动子、增强子和抑制基因置于转导时产生的内含子内，因此模仿其它转录物布置，如由 CMV 产生的在内含子中含有这类实体的布置(Chapman 等 1991 出处同上)。

总之，本发明描述的新型 pICUT 载体系统促进以下布置:

(i) 在生产细胞中进行最大包装和减少转录物的翻译。

(ii) 在转导细胞中进行最大剪接，且因此进行内含子增强的转录物翻译。

(iii) 将基因和/或病毒基本元件的表达局限于或者生产细胞或者转导细胞。

实施例 3 构建与 *pol* 基因和 *gag-pol* 转录盒具有最小同源性的 MMLV 兼嗜性 *env* 基因

在莫洛尼鼠类白血病病毒(MMLV)中，*env* 编码序列的前约 60 bp 与 *pol* 基因的 3'端序列重叠。去除这两个基因之间的同源区，以在表达这两种基因的细胞中防止它们之间重组的可能性。

如下将 *env* 编码序列的前 60bp 的 DNA 序列改变，而保留所编码蛋白的氨基酸序列。构建合成的寡核苷酸，以改变 *env* 5'端的密码子用法(参见图 15)，并将其插入如下的 *env* 的其余部分中。

用于再构建 4070A 基因 5'端的起始质粒是 pCI 质粒(Promega)，其中先前已经克隆了含 pHIT456 (Soneoka 等 1995 出处同上)的 4070A 基因的 *Xba*1-*Xba*1 片段，以形成 pCI-4070A。用引物 A 和 B (图 15)，在 pCI4070A 上进行 PCR 反应，产生 600 个碱基对的产物。然后将该产物克隆到 pCI-4070A 的 *Nhe*1 和 *Xbo*1 位点之间。对所得构成物的 *Nhe*1/*Xho*1 区进行测序。尽管所得基因的氨基酸序列与原始 4070A 的序列相同，但去除了与 *pol* 基因的同源区。

图 16 给出了修饰的 *env* 基因 m4070A 的完整序列。用标准技术将该序列插入表达载体 pCI (Promega)中。由 pHIT60 (Soneoka 等 1995 出处同上)获得 CMV *gag-pol* 转录单位。

实施例 4 从反转录病毒包装信号缺失 *gag* 序列

采用以下寡核苷酸引物，经 PCR 反应，由反转录病毒载体 MFG (Bandara 等 1993 Proc Natl Acad Sci 90: 10764-10768)或 MMLV 原病毒 DNA 获得含 LTR 和最小功能包装信号的 DNA 片段:

*Hind*IIIR: GCATTAAAGCTTTGCTCT

L523: GCCTCGAGCAAAAATTCAGACGGA

该 PCR 片段含有 MMLV 核苷酸+1 至+523，因此不含起始于+621 的 *gag* 编码序列(编号基于 MMLV 的核苷酸序列, Shinnick 等 1981 Nature 293: 543-548)。

通过用 *Hind*III 和 *Xho*I 限制性酶消化，并用标准技术进行亚克隆，用所述 PCR 片段可构建反转录病毒基因组载体。这类载体与 *gag* 编码序列无同源性。

实施例 5 缺陷型反转录病毒基因组的构建

能够产生缺陷型反转录病毒基因组的转录单位示于图 17。它含有以下元件：低氧调节启动子增强子，包含 3 个拷贝的 PGK 基因 HRE 以及缺失 72bp 的 SV40 启动子和 pGL3 (Promega)的重复增强子；一个含 R、U5 和包装信号的 MMLV 序列；m4070A 的编码序列(实施例 3)；一个剪接受体；一个用于插入治疗蛋白编码序列的克隆位点；MMLV 的多嘧啶序列段；一个第二拷贝的含 HRE 启动子-增强子；一个剪接供体位点；和一个第二拷贝的 R、U5。

在所述载体反转录并整合入第二靶细胞后，所述剪接供体立即被引入 *env* 基因的上游，从而导致将其从 mRNA 中剪接去除，因此仅允许治疗基因在第二靶细胞中有效地表达(参见图 17)。

实施例 6 构建用于细胞色素 P450 的条件表达载体

图 18 显示了把细胞色素 P450 基因分为两半的反转录病毒表达载体 cDNA 编码序列的结构，该结构使得仅转导后完成了正确的剪接，才允许 P450 表达。因此这将表达局限于转导的细胞。

1) 用于构建该载体的起始质粒为 pLNSX (Miller 和 Rosman 1989 BioTechniques 7: 980-990)。通过用 ALTERED SITES II 诱变试剂盒

(Promega)和以下序列的合成寡核苷酸，经 PCR 诱变使包含于 pLNSX 的包装信号内的天然剪接供体(...agGTaag...) (781/782 位)突变:

5'-caaccaccgggagGCaagctggccagcaactta-3'

2) 用以下两种寡核苷酸，经 PCR 分离 pCI 表达载体(Promega)的 CMV 启动子:

引物 1: **5'-atcggctagcagatcttcaatattggccattagccatat-3'**

引物 2: **5'-atcgagatctgcggccgcttacctgcccagtgcctcacgaccaa-3'**

这产生含 CMV 启动子与 5'*Nhe*1 位点(引物 1)和 3' *Not*1 和 *Xba*1 位点(引物 2)的片段。用 *Nhe*1 和 *Xba*1 将其酶切，将其克隆入已经去除 *Nhe*1-*Nhe*1 片段的 pLNSX 中。

3) 用以下引物，经 RT-PCR 从人肝 RNA (Clontech)中分离细胞色素 P450 cDNA 编码序列的 5'端:

引物 3: **5'-atcggcggccgcccaccatggaactcagcgtcctcctcttccttgcaccctagg-3'**

引物 4: **5'-atcggcggccgcacttacCtgtgtgccccaggaaagtatttcaagaagccag-3'**

这扩增了 p450 从 ATG 至残基 693 的 5'端(从翻译起始位点编号 Yamano 等 1989 Biochem 28:7340-7348)。在该片段的 5'端(衍生自引物 3)上也含有一个 *Not*1 位点和一个最佳化的“ Kozak ”翻译起始信号。在该序列的 3'端(衍生自引物 4)含有另一个 *Not*1 位点和一个共有剪接供体序列(也发现于 pCI 中，最初衍生自人β 珠蛋白基因)， GT 剪接供体对直接对着 P450 的残基 704 的位置(在引物 4 中互补残基以大写显示)。该片段用 *Not*1 消化，并克隆入用 *Not*1 消化的步骤 2 中产生的质粒中。

4) 然后将步骤 2 克隆期间取出的 *Nhe*1-*Nhe*1 片段再引入步骤 3 的质粒中。这产生图 17 所述的反转录病毒载体，但缺失 P450 3'端。

5) 用以下引物，经 RT-PCR 扩增，从人肝 RNA (Clontech)中分离 P450 编码序列的 3'端:

引物 5： actgtgatcataggcacctattggtcttactgacatccactttctctccacagGcaagtttacaaaacctgc aggaaatcaatgcttacatt-3'

引物 6： actgatcgatttccctcagccccttcagcggggcaggaagc-3'

这产生 PCR 扩增的从残基 705 (在引物 5 中以大写显示)并延伸通过翻译终止密码子的 P450 3'端。在该产物 5'端内包含一个由引物 5 产生的 *Bcl*1 限制性位点和一个共有剪接受体，分支点(也发现于 pCI 中，最初来自免疫球蛋白基因)位于残基 705 的上游。于终止密码子下游的该产物的 3'端包含一个由引物 6 产生的 *Cla*1 位点。然后将该 PCR 产物用 *Bcl*1 和 *Cla*1 消化，并克隆入除去 *Bcl*1-*Cla*1 片段的步骤 3 的载体中，产生图 18 所示的反转录病毒载体。

以下实施例描述一种腺慢病毒(adenolentiviral)系统的构建，所述系统可用来在体外或体内瞬时产生慢病毒。

第一代重组腺病毒

第一代腺病毒载体包含所述病毒的 E1 和 E3 区缺失，允许插入外源 DNA，通常插入该病毒左臂，邻近左反向末端重复序列(ITR)。病毒包装信号(194-358 nt)与 E1a 增强子重叠，因此存在于大多数 E1 缺失的载体中。该序列可以易位至病毒基因组的右端(Hearing 和 Shenk, 1983 Cell 33: 59-74)。因此，在 E1 缺失载体中，可以缺失 3.2 kb (358-3525 nt)。

腺病毒能够包装 105%长度的基因组，因此允许加入额外的 2.1 kb。因此，在 E1/E3 缺失病毒载体中，其克隆容量变为 7-8 kb (2.1 kb + 1.9 kb (除去 E3) + 3.2 kb (除去 E1))。因为所述重组腺病毒缺乏必需的 E1 早期基因，所以它不能在非 E1 互补细胞系中复制。293 细胞系由 Graham 等研制(1977 J Gen Virol 36: 59-74)，含有来自 Ad5 基因组左端的约 4 kb，包括 ITR、包装信号、E1a、E1b 和 pIX。所述细胞稳定地表达 E1a 和 E1b 基因产物，但即使 pIX 序列在 E1b 内，也不表达晚

期蛋白 IX。在非互补细胞中， E1 缺失病毒转导所述细胞，并被转运至细胞核，但没有来自 E1 缺失基因组的表达。

第一代腺病毒生产系统

Microbix Biosystems - nb1 Gene Science

图 19 中的图解显示采用 microbix 系统用来产生重组腺病毒的一般策略。

所述一般策略涉及将外源 DNA 克隆入 E1 穿梭载体，其中 402-3328 bp 的 E1 区被所述外源 DNA 盒取代。然后，将所述重组质粒与 pJM17 质粒一起共同转染入 293 细胞。 pJM17 含有 E3 区的缺失和于 3.7 图谱单位的 E1 区中的原核 pBRX 载体的插入(包括氨苄青霉素抗性序列和细菌 ori 序列)。因此，该 40 kb 质粒太大而不能包装入腺核壳中，但可以在细菌中增殖。在 293 细胞中的细胞内重组，导致外源 DNA 插入片段取代 amp^r 和 ori 序列。

实施例 7 构建转移质粒用于产生含 EIAV 组分的腺病毒

为了产生慢病毒载体，需要制造四种腺病毒：基因组、 *gagpol* 、包膜(狂犬病 G)和 *Rev* 。由异源启动子表达慢病毒组分，它们含有内含子(需要时(用于高表达 *gagpol* 、 *Rev* 和狂犬病包膜))以及多腺苷酸化信号。当将这四种病毒转导入 $E1a^-$ 细胞中时，所述腺病毒组分将不表达，但异源启动子将允许表达慢病毒组分。以下(例 1)概述一个构建 EIAV 腺病毒系统的实例(申请号： 9727135.7)。所述 EIAV 基于缺乏任何非必需 EIAV 编码蛋白(S2 、 Tat 或包膜)的基本系统。用来使所述 EIAV 假型化的包膜是狂犬病包膜(G 蛋白)。已经表明这很好地使 EIAV 假型化(申请号： 9811152.9)。

转移质粒

以下描述含 EIAV 组分的转移质粒的构建。所述转移质粒为

pE1sp1A (图 20)。

所述重组转移质粒可以用来通过在 293 细胞中的同源重组，来制备重组腺病毒。

附上以下质粒的图解说明。

A) pE1RevE – Rev 构成物

用 *Apa* LI 和 *Cla* I 切割质粒 pCI-Rev。用 Klenow 聚合酶将编码 EIAV Rev 的 2.3 kb 带平端化，并将其插入 pE1sp1A 的 *Eco* RV 位点，产生质粒 pE1RevE (图 21)。

B) pE1HORSE3.1 – *gagpol* 构成物

用 *Sna* BI 和 *Not* I 切割 pHORSE3.1。将编码 EIAV *gagpol* 的 6.1 kb 带插入用 *Sna* BI 和 *Not* I 切割的 pE1RevE (纯化 7.5 kb 带)。这产生质粒 pE1HORSE3.1 (图 22)。

C) pE1PEGASUS – 基因组构成物

用 *Bgl* II 和 *Not* I 切割 pEGASUS4。将含有 EIAV 载体基因组的 6.8 kb 带插入用 *Bgl* II 和 *Not* I 切割的 pE1RevE (纯化 6.7 kb 带)。这产生质粒 pE1PEGASUS (图 23)。

D) pCI-Rab – 狂犬病构成物

为了制备 pE1Rab，通过用 *Nsi* I 和 *Ahd* I 切割质粒 pSA91RbG，将狂犬病可读框插入 pCI-*Neo* (图 24)中。用 T4 DNA 聚合酶将 1.25 kb 带平端化，并将其插入用 *Sma* I 切割的 pCI-*Neo* 中。这产生质粒 pCI-Rab (图 25)。

F) pE1Rab – 狂犬病构成物

用 *Sna* BI 和 *Not* I 切割 pCI-Rab。将编码狂犬病包膜的 1.9 kb 带

插入用 *Sna* BI 和 *Not* I 切割的 pE1RevE (纯化 7.5 kb 带)。这产生质粒 pE1Rab (图 26)。

概要

本发明涉及适用于将一种或多种 NOI 引入靶细胞的新型传递系统。

在一个优选方面，本发明包括包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点的反转录病毒载体；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列("NOI")；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列("NS")和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二 NS；其中所述第一 NS 位于所述第二 NS 下游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。

换句话说，该方面包括一种新型传递系统，所述系统包含一种或多种邻接一个功能性 SD 和 SA 的 NOI，条件是该系统已经由原载体产生，在原载体中，所述 SD 和 SA 的顺序反转，使得所述剪接无功能。

本发明的该方面可称为"断裂-内含子"方面。图 27c 中提供了显示本发明该方面的示意图。相比之下，图 27a 和图 27b 显示已知反转录病毒载体中的剪接结构。

本发明的另一广义方面包括一种新型传递系统，所述系统包含能够包装一种或多种慢病毒载体组分的一种或多种腺病毒载体组分，其中所述慢病毒载体任选地包含一个断裂内含子结构。

一般而言，本发明的该方面可以称为杂种病毒载体系统。在该特定情况下，腺病毒组分和慢病毒组分的组合可以称为双杂种病毒载体系统。

图 28 提供了显示本发明该方面的示意图。

本文讨论了本发明的这些方面和其它广义方面。

以上说明书中提及的所有出版物均通过引用结合到本文中。在不偏离本发明范围和精神的情况下进行的本发明所述方法和系统的各种修改和变化，对本领域技术人员而言是显而易见的。尽管本发明已经结合具体优选实施方案进行了描述，但应该理解，要求保护的本发明不应过度限于这类具体实施方案。实际上，对分子生物学相关领域技术人员显而易见的用于实施本发明的所述模式的各种修改，均属于以下权利要求书的范围。

01.02.19

序列表

SEQ ID NO. 1

GCTAGCTTAAGTAACGCCACTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAAAAGTTCAGATCAAGG
TCAGGAACAAAGAAACAGCTGAATACCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCGGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCA
AGAACAGATGAGACAGCTGAGTGATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCGGGG
CCAAGAACAGATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGTGAATCATCAGATGTTTCCAGGGT
GCCCCAAGGACCTGAAAATGACCCTGTACCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGC
GCGCTTCCGCTCTCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGCGCGCCAGTCTTCCGATAGACTG
CGTCGCCCGGGTACCCGTATTCCCAATAAAGCCTCTTGCTGTTTGCATCCGAATCGTGGTCTCGCTGTTCCTT
GGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCACGACGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATTTGGA
GACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCACCACCGGGAGGCAAGCTGGCCAGCAACTTATCTGTGTCTGTCCGAT
TGTCTAGTGTCTATGTTTGATGTTATGCGCCTGCGTCTGTACTAGTTAGCTAACTAGCTCTGTATCTGGCGGA
CCCGTGGTGGAACTGACGAGTTCTGAACACCCGGCCGCAACCCTGGGAGACGTCCCAGGGACTTTGGGGGCCG
TTTTTGTGGCCCGACCTGAGGAAGGGAGTCGATGTGGAATCCGACCCCGTCAGGATATGTGGTTCTGGTAGGA
GACGAGAACCTAAAACAGTTCCCGCCTCCGTCTGAATTTTTGCTTTCGGTTTGGAACCGAAGCCGCGCGTCTT
GTCTGCTGCAGCGCTGCAGCATCGTTCTGTGTTGTCTCTGTCTGACTGTGTTTCTGTATTTGTCTGAAAATTA
GGGCCAGACTGTTACCACTCCCTTAAGTTTGACCTTAGGTCACTGGAAAGATGTCGAGCGGATCGCTCACAAC
CAGTCGGTAGATGTCAAGAAGAGACGTTGGGTTACCTTCTGCTCTGCAGAATGGCCAACCTTTAACGTCGGAT
GGCCGCGAGACGGCACCTTTAACCGAGACCTCATCACCCAGGTTAAGATCAAGGTCTTTTCACCTGGCCCGCA
TGGACACCCAGACCAGGTCCCCTACATCGTGACCTGGGAAGCCTTGGCTTTTGACCCCCCTCCCTGGGTCAAG
CCCTTTGTACACCCTAAGCCTCCGCCTCCTCTTCCTCCATCCGCCCCGTCTCTCCCCCTTGAACCTCCTCGTT
CGACCCCGCCTCGATCCTCCCTTTATCCAGCCCTCACTCCTTCTCTAGGCGCCGGAATTCGTTAACTCGAGGA
TCTAACCTAGGTCTCGAGTGTTTAAACACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCA
CCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTGG
GCTGCAGGTCGAGGCGGATCTGATCAAGAGACAGGATGAGGATCGTTTCGCATGATTGAACAAGATGGATTGC
ACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTC
TGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCC
CTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAGCGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGC
TCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAGGGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATC
TCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCT
ACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGAAACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCG
ATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCATCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCAT
GCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTGACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGC
TTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCCGGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTG
ATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGAATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTC
GCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTTCTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGATAAAATAAAAG
ATTTTATTTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGGAATGAAAGACCCCACCTGTAGGTTTGGCAAGCTAGCTTAAGTAA
CGCCATTTTGCAAGGCATGGAAAAATACATAACTGAGAATAGAGAAGTTCAGATCAAGGTCAGGAACAGATGG
AACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAGAT
GGAACAGCTGAATATGGGCCAAACAGGATATCTGTGGTAAGCAGTTCCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGAACAG
ATGGTCCCCAGATGCGGTCCAGCCCTCAGCAGTTTCTAGAGAACCATCAGATGTTTCCAGGGTGCCCCAAGGA
CCTGAAATGACCCTGTGCCTTATTTGAACTAACCAATCAGTTCGCTTCTCGCTTCTGTTCGCGCGCTTCTGCT
CCCCGAGCTCAATAAAAGAGCCCACAACCCCTCACTCGGGGCGCCGTTAACACTAGTAAGCTTGCTCTAAGGT
AAATATGTCGACAGGCCTGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTACCCGTGTATCCAATAAACCC
TCTTGCAGTTGCATCCGACTTGTGGTCTCGCTGTTCCTTGGGAGGGTCTCCTCTGAGTGATTGACTACCCGTC
AGCGGGGGTCTTTCATTTGGGGGCTCGTCCGGGATCGGGAGACCCCTGCCCAGGGACCACCGACCCACCACCG
GGAGGTAAGCTGGCTGCCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAAAACCTCTGACACATGCAGCTCCCGGAGAC
GGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTTGGCGGG
TGTCGGGGCGCAGCCATGACCCAGTCACGTAGCGATAGCGGAGTGTATACTGGCTTAACTATGCGGCATCAGA
GCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATACCGCATC
AGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTC
ACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCA
GCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCCTGACGAGCAT

CACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTG
GAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGG
AAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTCGCTCCAAGCTGGGC
TGTGTGCACGAACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGG
TAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGC
TACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTG
AAGCCAGTTACCTTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTT
TTTTTGTTTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGG
GTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACC
TAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTT
ACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCGTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCC
CGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCA
CGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAA
CTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTT
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTCACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTCAGCTCC
GGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTC
CGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTAC
TGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATG
CGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGC
TCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTA
ACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGA
AGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAAT
ATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACA
AATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTA
ACCTATAAAAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCATACCAGATCACCGAAAACTGTCCT
CCAAATGTGTCCCCCTCACACTCCCAAATTCGCGGGCTTCTGCCTCTTAGACCACTCTACCCTATTCCCCACA
CTCACCGGAGCCAAAGCCGCGGCCCTTCCGTTTCTTTGCTTTTGAAAGACCCCACCCGTAGGTGGCAA

SEQ ID NO. 2

TGAATAATAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTCGCCGACTAAATTCATGTCGCGC
GATAGTGGTGTTTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAAAAATTGATATTTGAAAATATGGCATATTGAAA
ATGTCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAACTGATATCGCCATTTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGCGATA
TCTGGCGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTG
TCGCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGGCGACATCAAGC
TGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTA
TATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATT
GGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGT
CATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCC
CAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGA
CGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGC
CCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCC
TACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGG
CGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGC
ACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTGCGATCGCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGT
AGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCTGCGGTCTGA
GTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCTTTGTAATAAATATAATTCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTG
TCTGTTCGAGATCCTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTACCTGTTGAACCTGG
CTGATCGTAGGATCCCCGGGACAGCAGAGGAGAACTTACAGAAGTCTTCTGGAGGTGTTCCTGGCCAGAACAC
AGGAGGACAGGTAAGATGGGAGACCCTTTGACATGGAGCAAGGCGCTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTAC
AAGGGTCTCAGAAATTAACTACTGGTAACTGTAATTGGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTTCATGATACCAA
CTTTGTAAAAGAAAAGGACTCTAGAGTCGACCCCCTCGACGTTTAAACACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGA
CTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTCACGTGA
AGCTAGCCTCGAGGATCTGCGGATCCGGGGAATTCCCCAGTCTCAGGATCCACCATGGGGGATCCCGTCGTTT
TACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAG

CTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGC
TTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTG
TCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGATGCACGGTTACGATGCGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATTAC
GGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGC
TGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATTATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGC
GCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGA
AAACCGCCTCGCGGTGATGGTGCTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATG
AGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTC
GCTTTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCT
ACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGCGGTGAAATT
ATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCG
CCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGGCACGCTGATTGAAGCAGAAGC
CTGCGATGTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATT
CGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCATGGTCAGGTCATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATA
TCCTGCTGATGAAGCAGAACAACTTTAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACAC
GCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTGGTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAAT
CGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTA
ATCACCCGAGTGTGATCATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCG
CTGGATCAAATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGAT
ATTATTTGCCCGATGTACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAA
AATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCCACGCGATGGGTAACAGTCT
TGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGG
GTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTACGGCGGTGATTTTGGCGATA
CGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGA
AGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCGGGCAAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTG
TTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAG
TGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAAACAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGG
GCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCC
TGGCAGCAGTGGCGTCTGGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCTGA
CCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCT
TTCACAGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACTGCTGACGCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTG
GATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTGGGTCGAACGCTGGAAGGCGGCGG
GCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGAC
CGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTACCGGATTGATGGTAGTGGT
CAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCC
AGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAGGGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCGCCTTAC
TGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAAC
GGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAATTATGGCCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCA
GCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCT
GAATATCGACGGTTTCCATATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAG
CTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAATAACCGGGCAGGGGGGATCCGC
AGATCCGGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCA
AAGCATGCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTGTATGTTTAGAAAAACAAGGGGGGAACTGTGGGGTTTTTAT
GAGGGGTTTTATAAATGATTATAAGAGTAAAAAGAAAGTTGCTGATGCTCTCATAACCTTGTATAACCCAAAG
GACTAGCTCATGTTGCTAGGCAACTAAACCGCAATAACCGCATTTGTGACGCGAGTTCCCCATTGGTGACGCG
TTTTGAGATTTCTGTCGCCGACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTTTATCGCCGATAGAGATGGCGATA
TTGGAAAAATTGATATTTGAAAATATGGCATATTGAAAATGTCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAACTGATATC
GCCATTTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGGATG
GCGATAGACGACTTTGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTCGCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGAC
GATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGGCGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTG
AATCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGC
ATACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTG
ATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTT
ACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGT
ATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCA
CTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCC
TGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTA

TTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAG
TCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAAC
AACTGCGATCGCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
TCGTTTAGTGAACCGACTTAAGTCTTCCTGCAGGGGCTCTAAGGTAAATAGGGCACTCAGATTCTGCGGTCTG
AGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCTTTGTAATAAATATAATTCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTT
GTCTGTTCGAGATCCTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTACCTGTTGAACCTG
GCTGATCGTAGGATCCCCGGCCAGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATG
CATCTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCCTAACTCCGCCCATCCCGCCCCTAACTCCGCCCAGTTCCG
CCCATTCTCCGCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTGAGCT
ATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGCAAAAAGCTTGATTCTTCTGACACAACA
GTCTCGAACTTAAGGCTAGAGCCACCATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT
GGAGAGGCTATTCGGCTATGACTGGGCACAACAGACAATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCA
GCGCAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCCGGTGCCCTGAATGAACTGCAGGACGAGGCAG
CGCGGCTATCGTGGCTGGCCACGACGGGCGTTCCTTGCGCAGCTGTGCTCGACGTTGTCACTGAAGCGGGAAG
GGACTGGCTGCTATTGGGCGAAGTGCCGGGGCAGGATCTCCTGTCATCTCACCTTGCTCCTGCCGAGAAAGTA
TCCATCATGGCTGATGCAATGCGGCGGCTGCATACGCTTGATCCGGCTACCTGCCCATTCGACCACCAAGCGA
AACATCGCATCGAGCGAGCACGTACTCGGATGGAAGCCGGTCTTGTCGATCAGGATGATCTGGACGAAGAGCA
TCAGGGGCTCGCGCCAGCCGAACTGTTCGCCAGGCTCAAGGCGCGCATGCCCGACGGCGAGGATCTCGTCGTG
ACCCATGGCGATGCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGGAAAATGGCCGCTTTTCTGGATTCATCGACTGTGGCC
GGCTGGGTGTGGCGGACCGCTATCAGGACATAGCGTTGGCTACCCGTGATATTGCTGAAGAGCTTGGCGGCGA
ATGGGCTGACCGCTTCCTCGTGCTTTACGGTATCGCCGCTCCCGATTCGCAGCGCATCGCCTTCTATCGCCTT
CTTGACGAGTTCTTCTGAGCGGGACTCTGGGGTTCGAAATGACCGACCAAGCGACGCCCAACCTGCCATCACG
ATGGCCGCAATAAAATATCTTTATTTTCATTACATCTGTGTGTTGGTTTTTTGTGTGAATCGATAGCGATAAG
GATCGATCCGCGTATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCC
GCCAACACCCGCTGACGCGCCCTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTC
TCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTCACCGTCATCACCGAAACGCGCGAGACGAAAGGGCCTCGTGATAC
GCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGT
GCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGA
TAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTT
TTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTT
GGGTGCACGAGTGGGTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAA
CGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAG
AGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCT
TACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTA
CTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCC
TTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAAT
GGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGG
ATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAAT
CTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGT
AGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCA
CTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAAACTTCATTTTT
AATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTT
CCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGC
TGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTC
CGAAGGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCA
CTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGC
GATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGG
GGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATG
AGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAG
CGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTG
AGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGGCTCGACAGATCT

SEQ ID NO. 3

参见图 16

权利要求书

1.包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点的反转录病毒载体；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列("NOI")；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列("NS")和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二NS；其中所述第一NS位于所述第二NS下游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。

2. 根据权利要求1的反转录病毒载体，其中所述反转录病毒原载体包含一个位于所述第二核苷酸序列上游的第三NS；其中所述第三NS能够产生非功能性剪接供体位点。

3. 根据权利要求1或权利要求2的反转录病毒载体，其中所述反转录病毒载体还包含一个第二NOI；其中所述第二NOI位于所述功能性剪接受体位点的下游。

4. 根据权利要求3的反转录病毒载体，其中所述反转录病毒原载体包含所述第二NOI，其中所述第二NOI位于所述第二核苷酸序列下游。

5. 根据权利要求3或权利要求4的反转录病毒载体，其中所述第二NOI或其表达产物为治疗剂或诊断剂或包含治疗剂或诊断剂。

6. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述第一NOI或其表达产物为或包含任何一种或多种赋予选择性的因子(例如标记元件)、病毒必需元件或其部分或它们的组合。

7. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述第一NS位于反转录病毒原载体3'端或其附近；最好是其中所述3'端包含一个U3区和一个R区；并且最好其中所述第一NS位于所述U3区和所述R区之间。

8. 根据权利要求 7 的反转录病毒载体，其中所述反转录病毒载体的所述 U3 区和/或所述第一 NS 包含为第三 NOI 的 NS；其中所述 NOI 为转录控制元件、编码序列或其部分的任何一种或多种。

9. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述第一 NS 可得自病毒。

10. 根据权利要求 9 的反转录病毒载体，其中所述第一 NS 为内含子或其部分。

11. 根据权利要求 10 的反转录病毒载体，其中所述内含子可得自 SV40 病毒的小 t-内含子。

12. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述反转录病毒原载体包含一个反转录病毒包装信号；并且其中所述第二 NS 位于所述反转录病毒包装信号下游，使得防止于第一靶位点进行剪接。

13. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述第二 NS 位于所述第一 NOI 下游，使得所述第一 NOI 能够于第一靶细胞表达。

14. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述第二 NS 置于一个多克隆位点上游，使得可以插入一种或多种额外的 NOI。

15. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述第二 NS 为编码免疫分子或其部分的核苷酸序列。

16. 根据权利要求 15 的反转录病毒载体，其中所述免疫分子为免疫球蛋白。

17. 根据权利要求 16 的反转录病毒载体，其中所述第二 NS 为编码免疫球蛋白重链可变区的核苷酸序列。

18. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述载体还包含一种功能性内含子。

19. 根据权利要求 18 的反转录病毒载体，其中所述功能性内含子的定位使得它能够将至少一种所述 NOI 的表达限于所需靶位点。

20. 根据权利要求 19 的反转录病毒载体，其中所述靶位点为一种细胞。

21. 根据任一前述权利要求的反转录病毒载体，其中所述载体或原载体可衍生自鼠类致癌反转录病毒或慢病毒。

22. 根据权利要求 21 的反转录病毒载体，其中所述载体可衍生自 MMLV、MSV、MMTV、HIV-1 或 EIAV。

23. 任一前述权利要求定义的反转录病毒载体，其中所述反转录病毒载体为整合的原病毒。

24. 可得自根据任一前述权利要求的反转录病毒载体的反转录病毒颗粒。

25. 用根据权利要求 1-23 中任一项的反转录病毒载体或根据权利要求 24 的反转录病毒颗粒转染或转导的细胞。

26. 用于医学领域的根据权利要求 1-23 中任一项的反转录病毒载体或根据权利要求 24 的反转录病毒颗粒或根据权利要求 25 细胞。

27. 根据权利要求 1-23 中任一项的反转录病毒载体或根据权利要求 24 的反转录病毒颗粒或根据权利要求 25 细胞的用途，用于生产将一种或多种 NOI 传递至有需要的靶位点的药用组合物。

28. 一种方法，包括用根据权利要求 1-23 中任一项的反转录病毒载体或根据权利要求 24 的反转录病毒颗粒转染或转导细胞或利用根据权利要求 25 细胞。

29. 用于根据权利要求 1-23 中任一项的反转录病毒载体或根据权利要求 24 的反转录病毒颗粒或根据权利要求 25 细胞的传递系统，其中所述传递系统包含一种或多种非反转录病毒表达载体、腺病毒或质粒或它们的组合，以将一种 NOI 或多种 NOI 传递至第一靶细胞，所述系统还包含一种反转录病毒载体，以将一种或多种 NOI 传递至第二靶细胞。

30. 任一前述权利要求中定义的反转录病毒原载体。

31. 功能性内含子将一种或多种 NOI 的表达限于所需靶细胞的用途。

32. 反转录酶将第一 NS 从反转录病毒原载体的 3'端传递至反转

录病毒载体的5'端的用途。

33. 用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统包含一种或多种编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能够感染第一靶细胞并在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞。

34. 根据权利要求33的杂种病毒载体系统，其中所述第一载体可得自或基于腺病毒载体和/或所述第二病毒载体可得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体。

35. 根据权利要求33和34的杂种病毒载体系统的用途，其中所述慢病毒载体包含断裂-内含子结构或能够传递断裂-内含子结构。

36. 杂种病毒载体系统，其中所述慢病毒载体包含断裂-内含子结构或能够传递断裂-内含子结构。

37. 慢病毒载体系统，其中所述慢病毒载体包含断裂-内含子结构或能够传递断裂-内含子结构。

38. 腺病毒载体系统，其中所述腺病毒载体包含断裂-内含子结构或能够传递断裂-内含子结构。

39. 基于或得自以下任何一种或多种实体的载体或质粒：pE1sp1A、pCI-Neo、pE1RevE、pE1HORSE3.1、pE1PEGASUS4、pCI-Rab、pE1Rab。

40. 用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统包含编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能够感染第一靶细胞并能在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞，其中所述第一载体可得自或基于腺病毒载体，而所述第二病毒载体可得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体。

41. 用于体内基因传递的杂种病毒载体系统，所述系统包含编码第二病毒载体的第一病毒载体，所述第一载体能够感染第一靶细胞并能在其中表达所述第二病毒载体，所述第二载体能够转导第二靶细胞，其中所述第一载体可得自或基于腺病毒载体，而所述第二病毒载

体可得自或基于反转录病毒载体，最好是慢病毒载体；其中所述病毒载体系统包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列("NOI")；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列("NS")和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二NS；其中所述第一NS位于所述第二NS下游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。

42. 能够在大致如本文所述的靶细胞中差异表达NOI的反转录病毒载体。

摘要

描述了一种反转录病毒载体。所述反转录病毒载体包含一个功能性剪接供体位点和一个功能性剪接受体位点的反转录病毒载体；其中所述功能性剪接供体位点和所述功能性剪接受体位点邻接一个第一目的核苷酸序列(“NOI”)；其中所述功能性剪接供体位点位于所述功能性剪接受体位点上游；其中所述反转录病毒载体衍生自反转录病毒原载体；其中所述反转录病毒原载体包含一个能够产生所述功能性剪接供体位点的第一核苷酸序列(“NS”)和一个能够产生所述功能性剪接受体位点的第二NS；其中所述第一NS位于所述第二NS下游；使得所述反转录病毒载体因所述反转录病毒原载体的反转录而形成。

图 1

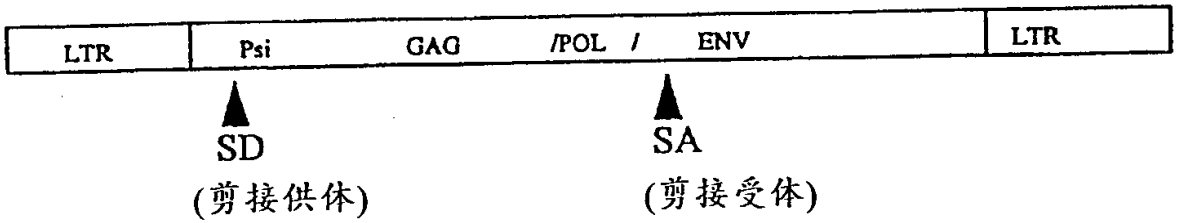


图 2

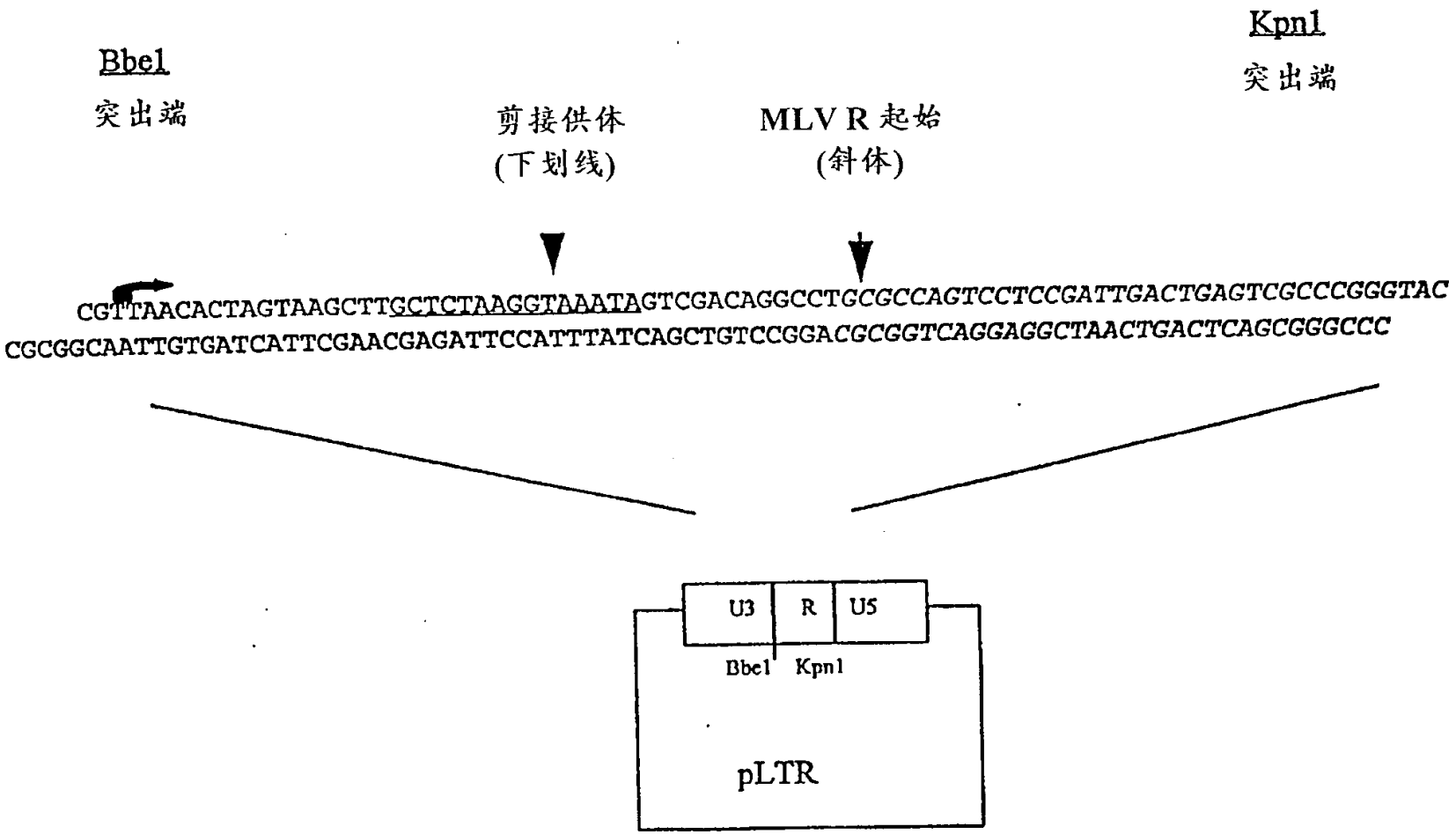

Bbe1
突出端
剪接供体
(下划线)
MLV R 起始
(斜体)
Kpn1
突出端
CGTTAACACTAGTAAGCTTGCTCTAAGGTAAATAGTCGACAGGCCTGCGCCAGTCCTCCGATTGACTGAGTCGCCCGGGTAC
CGCGGCAATTGTGATCATTCGAACGAGATTCCATTTATCAGCTGTCCGGACGCGGTCAGGAGGCTAACTGACTCAGCGGGCCC
U3
R
U5
Bbe1
Kpn1
pLTR

图 3

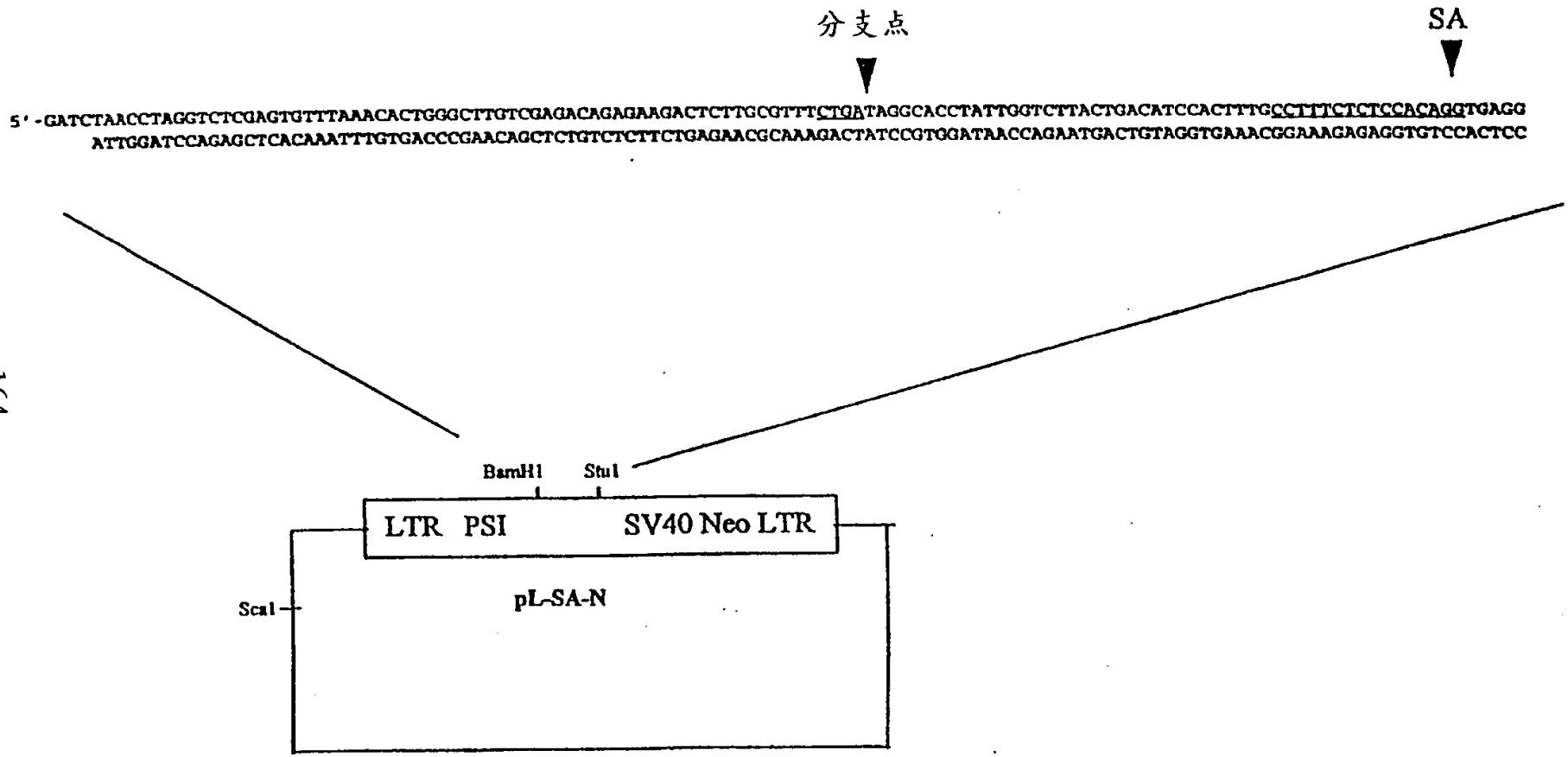
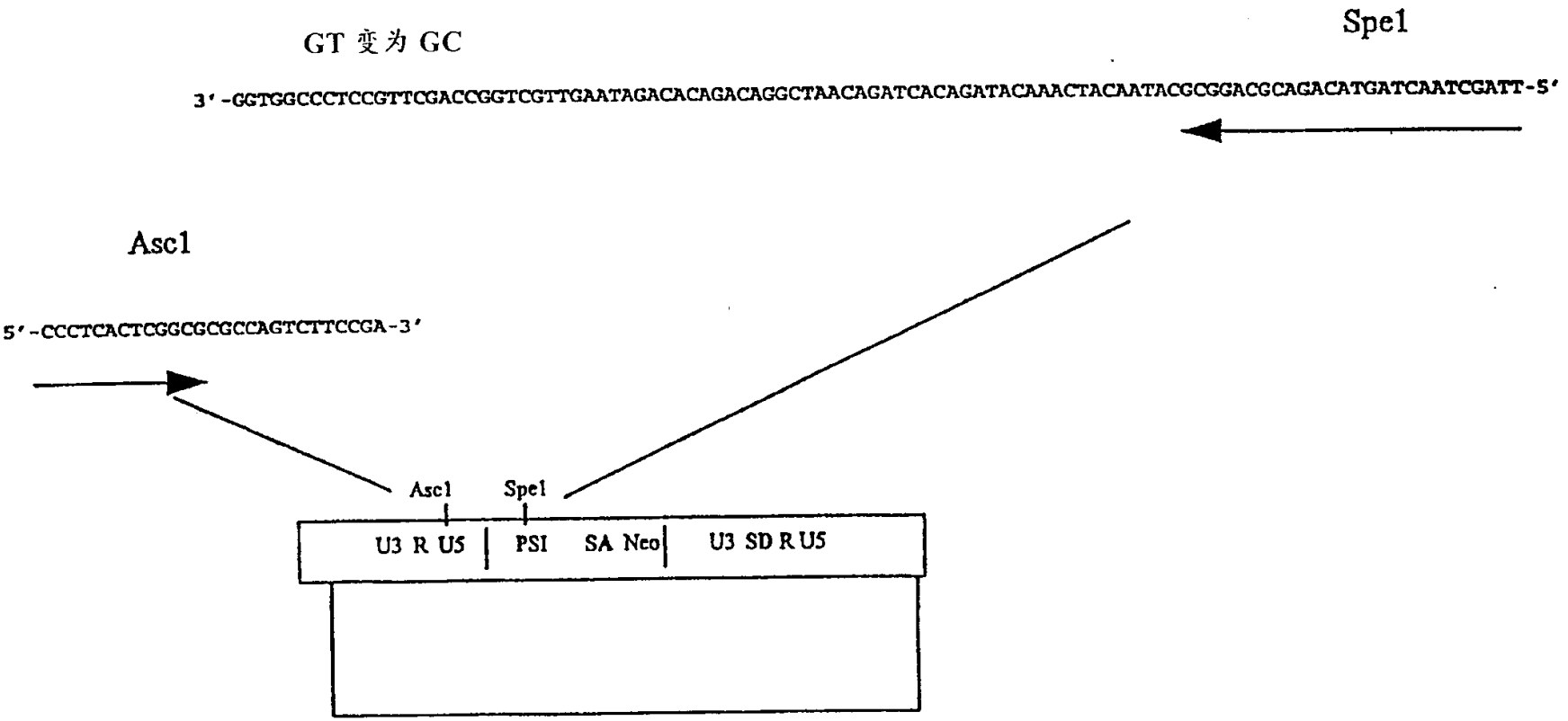

分支点
SA
5'-GATCTAACCTAGGTCTCGAGTGTTTAAACACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGAGG
ATTGGATCCAGAGCTCACAAATTTGTGACCCGAACAGCTCTGTCTCTTCTGAGAACGCAAAGACTATCCGTGGATAACCAGAATGACTGTAGGTGAAACGGAAAGAGAGGTGTCCACTCC
BamH1
Stu1
LTR PSI
SV40 Neo LTR
pL-SA-N
Sca1

图 4


GT 变为 GC
Spe1
3'-GGTGGCCCTCCGTTCGACCGGTCGTTGAATAGACACAGACAGGCTAACAGATCACAGATACAAACTACAATACGCGGACGCAGACATGATCAATCGATT-5'
Asc1
5'-CCCTCACTCGGCGCGCCAGTCTTCCGA-3'
Asc1
Spe1
U3 R U5
PSI
SA Neo
U3 SD R U5

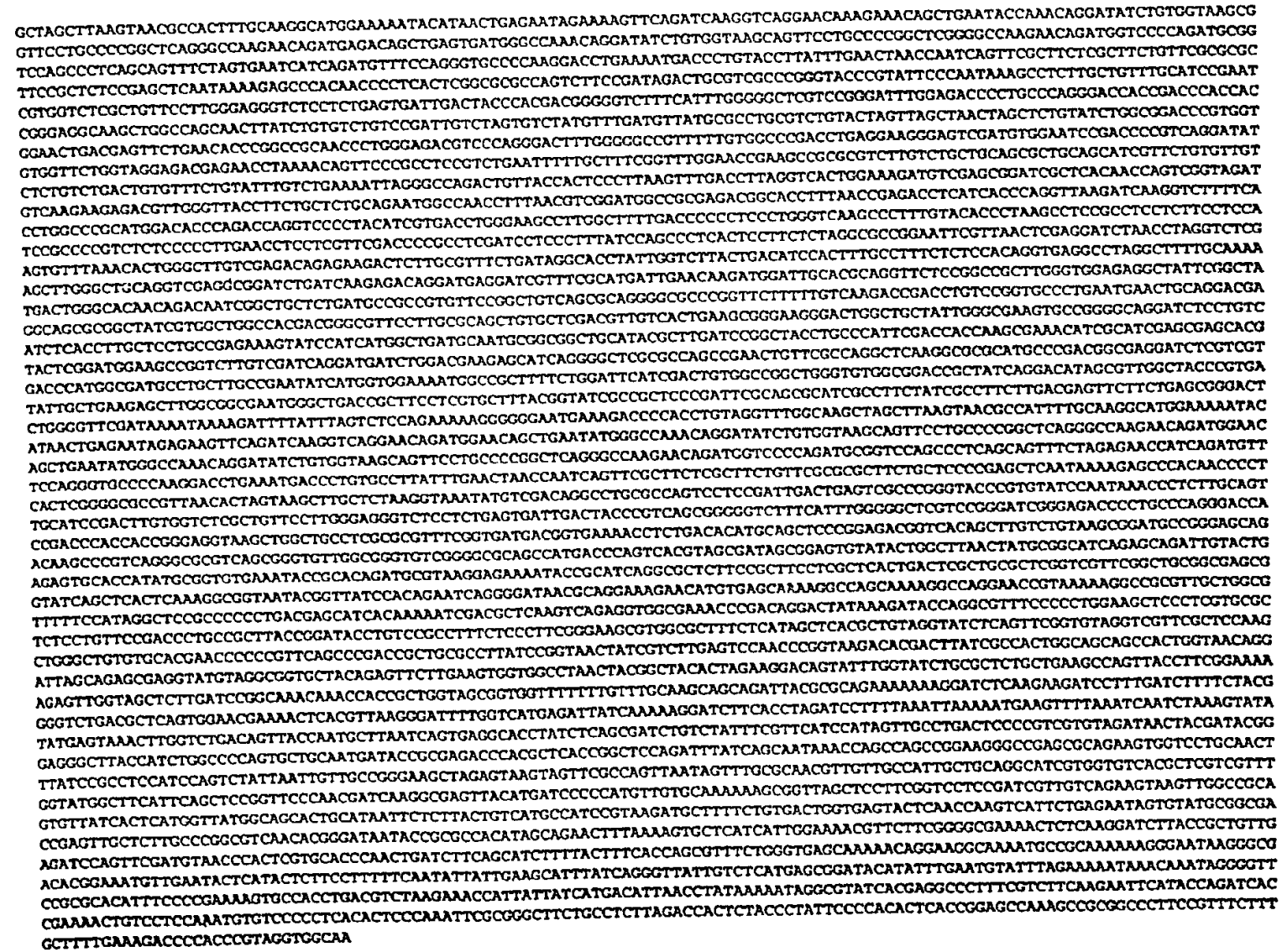


图 5

图 6

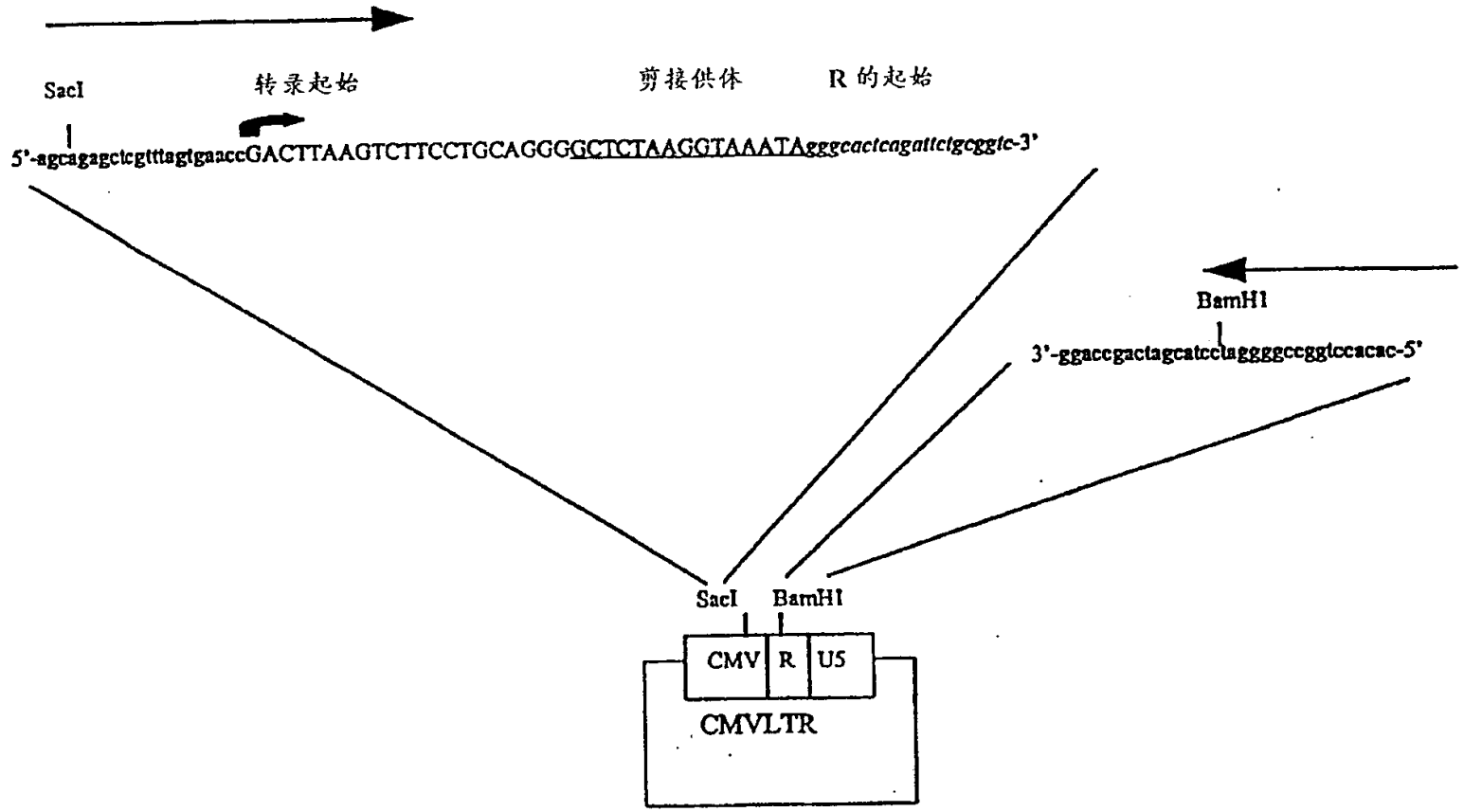

SacI
转录起始
剪接供体
R 的起始
5'-agcagagctcgtttagtgaaccGACTTAAGTCTTCCTGCAGGGGCTCTAAGGTAAATAgggcactcagattctgcgggtc-3'
BamHI
3'-ggaccgactagcatcctaggggccggtccacac-5'
SacI
BamHI
CMV
R
U5
CMVLTR

图 7

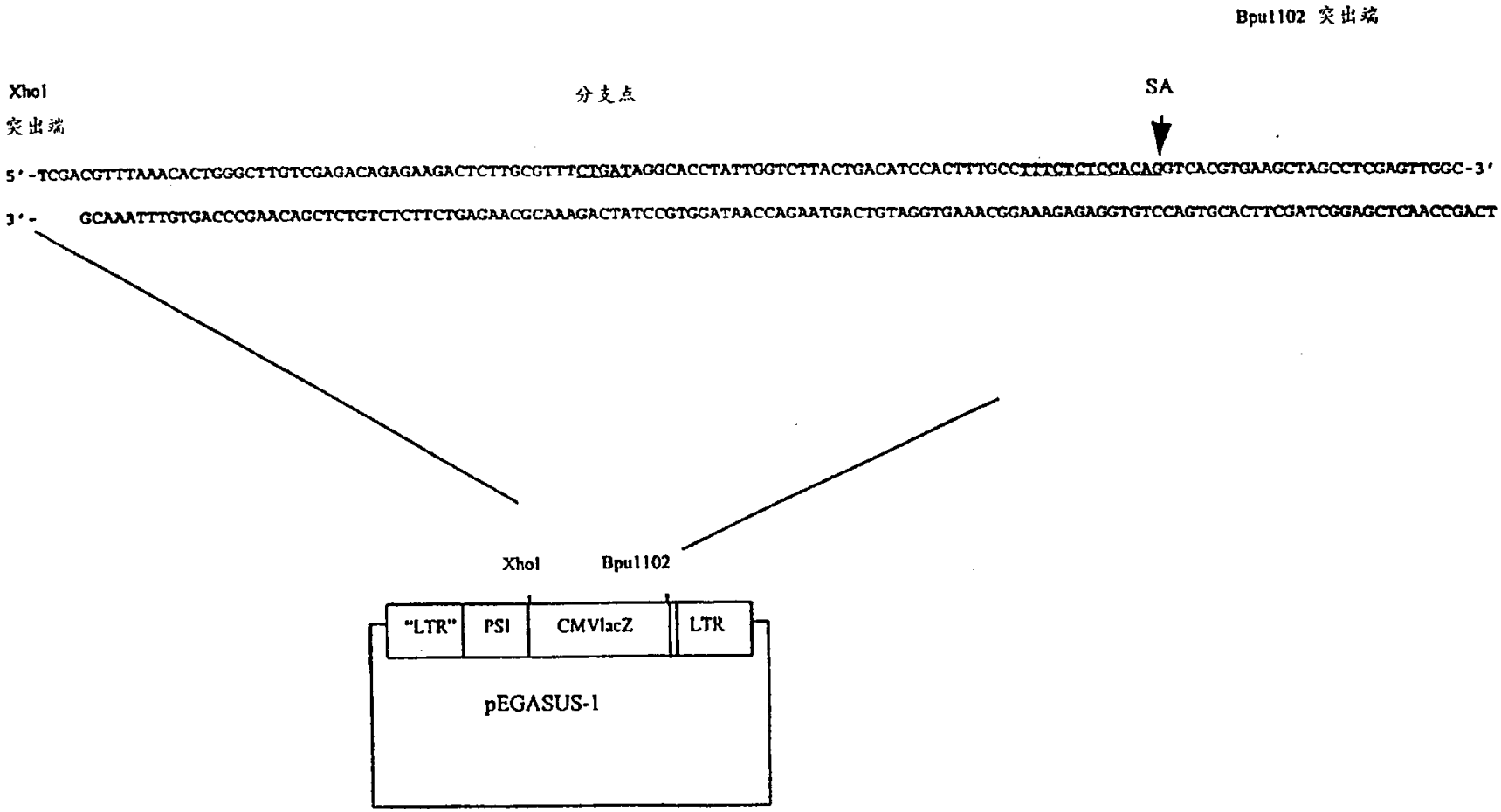
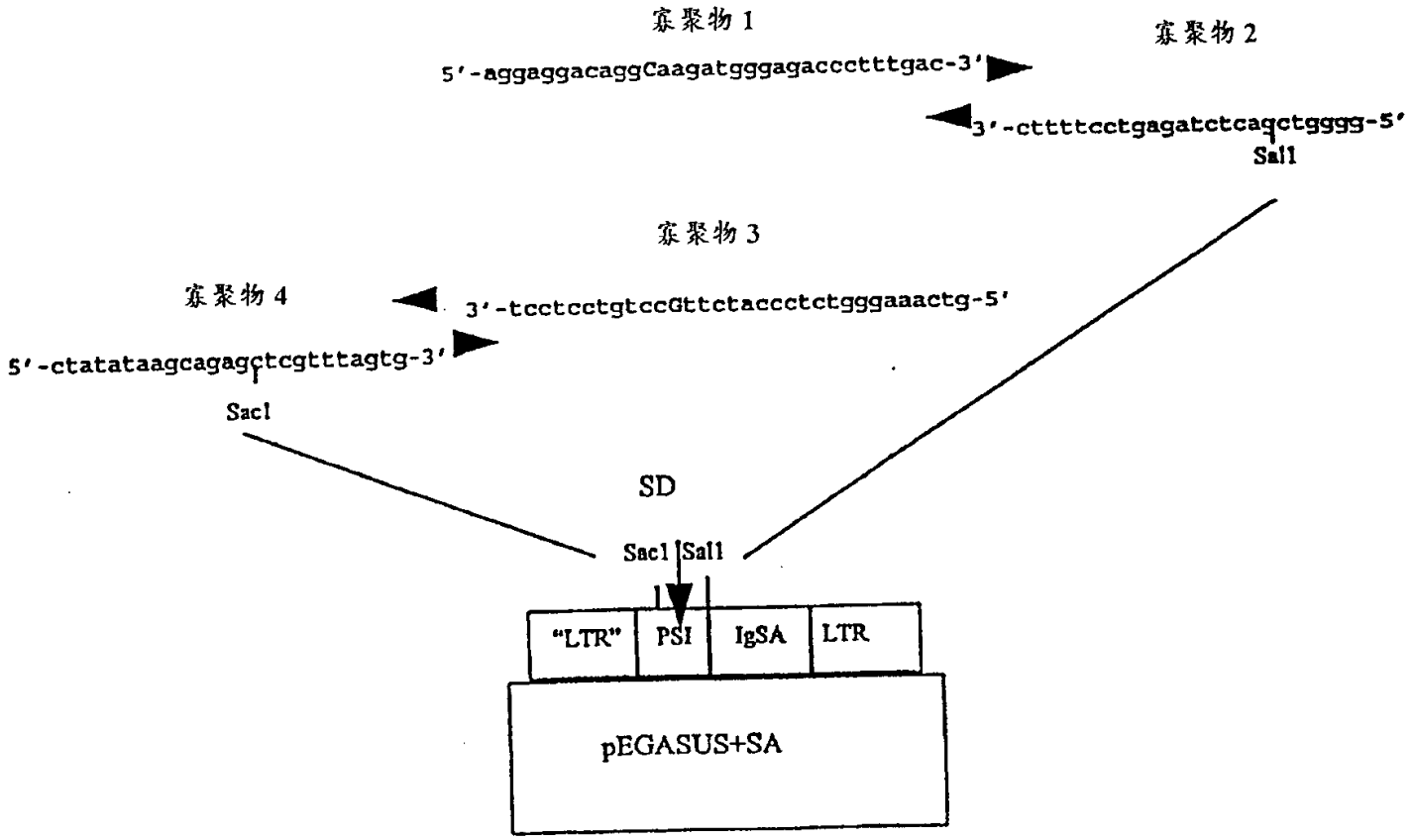
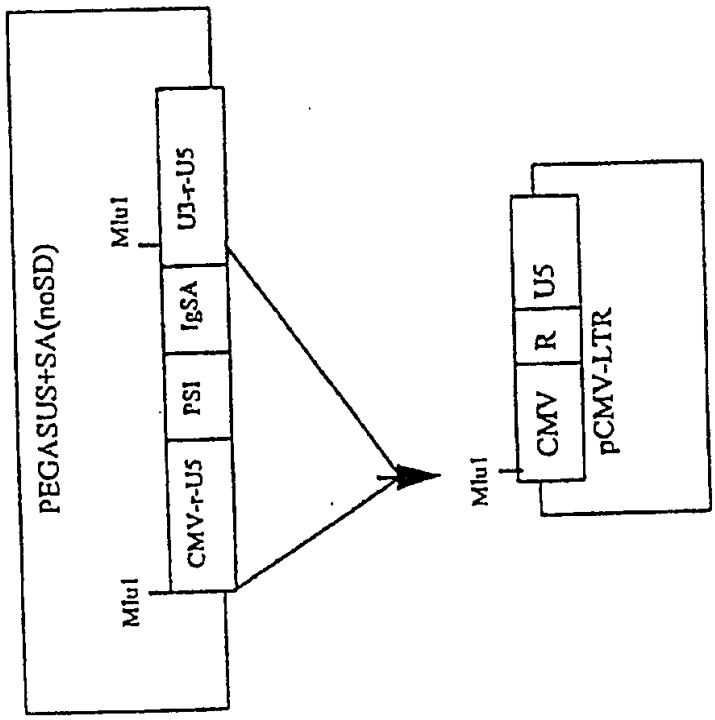

Bpu1102 突出端
Xhol
突出端
分支点
SA
5'-TCGACGTTTAAACACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACTCTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTCACGTGAAGCTAGCCTCGAGTTGGC-3'
3'- GCAAATTTGTGACCCGAACAGCTCTGTCTCTTCTGAGAACGCAAAGACTATCCGTGGATAACCAGAATGACTGTAGGTGAAACGGAAAGAGAGGTGTCCAGTGCACTTCGATCGGAGCTCAACCGACT
Xhol
Bpu1102
"LTR"
PSI
CMVlacZ
LTR
pEGASUS-1

图 8


寡聚物 1
5'-aggaggacaggCaagatgggagacccttgac-3'
寡聚物 2
3'-cttttcctgagatctcagctgggg-5'
SalI
寡聚物 3
寡聚物 4
3'-tcctcctgtccGttctaccctctgggaaactg-5'
5'-ctatataagcagagctcgtttagtg-3'
SacI
SD
SacI SalI
"LTR"
PSI
IgSA
LTR
pEGASUS+SA

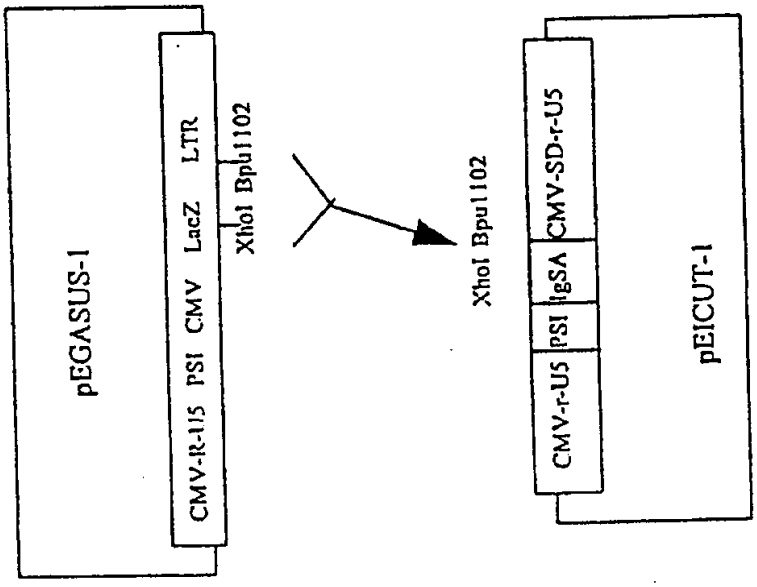
01-02-19

图 9


PEGASUS+SA(noSD)
MluI
U3-r-U5
IgSA
PSI
CMV-r-U5
MluI
MluI
CMV
R
U5
pCMV-LTR

01-02-19

图 10


pEGASUS-1
CMV-R-U5 PSI CMV LacZ LTR
XhoI Bpu1102
XhoI Bpu1102
CMV-R-U5 PSI IgSA CMV-SD-R-U5
pEICUT-1

TGAATAATAAAATGTGTGTTTGTCCGAAATACGCGTTTTGAGATTTCTGTCGCCGACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTTTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAAAAATTGATATTTGAAAATAT
GGCATATTGAAAATGTCGCCGATGTGAGTTTCTGTGTAACTGATATCGCCATTTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTT
TGGTGACTTGGGCGATTCTGTGTGTCGCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGGCGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAA
TCAATATTGGCCATTAGCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCAT
GTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCCGC
CCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCC
CCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGT
ACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTGCGATCGCCCG
CCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGGGCACTCAGATTCTGCGGTCTGAGTCCCTTCTCTGCTGGGCTGAAAAGGCCTTTGTAATAA
ATATAATTCTCTACTCAGTCCCTGTCTCTAGTTTGTCTGTTCGAGATCCTACAGTTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAGAGGGGCGCAGACCCTACCTGTTGAACCTGGCTGATCGTAGGATCCCCGGGACAGCA
GAGGAGAACTTACAGAAGTCTTCTGGAGGTGTTCCTGGCCAGAACACAGGAGGACAGGTAAGATGGGAGACCCTTTGACATGGAGCAAGGCGCTCAAGAAGTTAGAGAAGGTGACGGTACAAGGGTCTCAGAAA
TTAACTACTGGTAACTGTAATTGGGCGCTAAGTCTAGTAGACTTATTTCATGATACCAACTTTGTAAAAGAAAAGGACTCTAGAGTCGACCCCCTCGACGTTTAAACACTGGGCTTGTCGAGACAGAGAAGACT
CTTGCGTTTCTGATAGGCACCTATTGGTCTTACTGACATCCACTTTGCCTTTCTCTCCACAGGTCACGTGAAGCTAGCCTCGAGGATCTGCGGATCCGGGGAATTCCCCAGTCTCAGGATCCACCATGGGGGAT
CCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGTTACCCAACTTAATCGCCTTGCAGCACATCCCCCTTTCGCCAGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTGCG
CAGCCTGAATGGCGAATGGCGCTTTGCCTGGTTTCCGGCACCAGAAGCGGTGCCGGAAAGCTGGCTGGAGTGCGATCTTCCTGAGGCCGATACTGTCGTCGTCCCCTCAAACTGGCAGATGCACGGTTACGATG
CGCCCATCTACACCAACGTAACCTATCCCATTACGGTCAATCCGCCGTTTGTTCCCACGGAGAATCCGACGGGTTGTTACTCGCTCACATTTAATGTTGATGAAAGCTGGCTACAGGAAGGCCAGACGCGAATT
ATTTTTGATGGCGTTAACTCGGCGTTTCATCTGTGGTGCAACGGGCGCTGGGTCGGTTACGGCCAGGACAGTCGTTTGCCGTCTGAATTTGACCTGAGCGCATTTTTACGCGCCGGAGAAAACCGCCTCGCGGT
GATGGTGCTGCGTTGGAGTGACGGCAGTTATCTGGAAGATCAGGATATGTGGCGGATGAGCGGCATTTTCCGTGACGTCTCGTTGCTGCATAAACCGACTACACAAATCAGCGATTTCCATGTTGCCACTCGCT
TTAATGATGATTTCAGCCGCGCTGTACTGGAGGCTGAAGTTCAGATGTGCGGCGAGTTGCGTGACTACCTACGGGTAACAGTTTCTTTATGGCAGGGTGAAACGCAGGTCGCCAGCGGCACCGCGCCTTTCGGC
GGTGAAATTATCGATGAGCGTGGTGGTTATGCCGATCGCGTCACACTACGTCTGAACGTCGAAAACCCGAAACTGTGGAGCGCCGAAATCCCGAATCTCTATCGTGCGGTGGTTGAACTGCACACCGCCGACGG
CACGCTGATTGAAGCAGAAGCCTGCGATGTCGGTTTCCGCGAGGTGCGGATTGAAAATGGTCTGCTGCTGCTGAACGGCAAGCCGTTGCTGATTCGAGGCGTTAACCGTCACGAGCATCATCCTCTGCATGGTC
AGGTCATGGATGAGCAGACGATGGTGCAGGATATCCTGCTGATGAAGCAGAACAACTTTAACGCCGTGCGCTGTTCGCATTATCCGAACCATCCGCTGTGGTACACGCTGTGCGACCGCTACGGCCTGTATGTG
GTGGATGAAGCCAATATTGAAACCCACGGCATGGTGCCAATGAATCGTCTGACCGATGATCCGCGCTGGCTACCGGCGATGAGCGAACGCGTAACGCGAATGGTGCAGCGCGATCGTAATCACCCGAGTGTGAT
CATCTGGTCGCTGGGGAATGAATCAGGCCACGGCGCTAATCACGACGCGCTGTATCGCTGGATCAAATCTGTCGATCCTTCCCGCCCGGTGCAGTATGAAGGCGGCGGAGCCGACACCACGGCCACCGATATTA
TTTGCCCGATGTACGCGCGCGTGGATGAAGACCAGCCCTTCCCGGCTGTGCCGAAATGGTCCATCAAAAAATGGCTTTCGCTACCTGGAGAGACGCGCCCGCTGATCCTTTGCGAATACGCCCACGCGATGGGT
AACAGTCTTGGCGGTTTCGCTAAATACTGGCAGGCGTTTCGTCAGTATCCCCGTTTACAGGGCGGCTTCGTCTGGGACTGGGTGGATCAGTCGCTGATTAAATATGATGAAAACGGCAACCCGTGGTCGGCTTA
CGGCGGTGATTTTGGCGATACGCCGAACGATCGCCAGTTCTGTATGAACGGTCTGGTCTTTGCCGACCGCACGCCGCATCCAGCGCTGACGGAAGCAAAACACCAGCAGCAGTTTTTCCAGTTCCGTTTATCCG
GGCAAACCATCGAAGTGACCAGCGAATACCTGTTCCGTCATAGCGATAACGAGCTCCTGCACTGGATGGTGGCGCTGGATGGTAAGCCGCTGGCAAGCGGTGAAGTGCCTCTGGATGTCGCTCCACAAGGTAAA
CAGTTGATTGAACTGCCTGAACTACCGCAGCCGGAGAGCGCCGGGCAACTCTGGCTCACAGTACGCGTAGTGCAACCGAACGCGACCGCATGGTCAGAAGCCGGGCACATCAGCGCCTGGCAGCAGTGGCGTCT
GGCGGAAAACCTCAGTGTGACGCTCCCCGCCGCGTCCCACGCCATCCCGCATCTGACCACCAGCGAAATGGATTTTTGCATCGAGCTGGGTAATAAGCGTTGGCAATTTAACCGCCAGTCAGGCTTTCTTTCAC
AGATGTGGATTGGCGATAAAAAACAACTGCTGACGCCGCTGCGCGATCAGTTCACCCGTGCACCGCTGGATAACGACATTGGCGTAAGTGAAGCGACCCGCATTGACCCTAACGCCTGGGTCGAACGCTGGAAG
GCCGCGGGCCATTACCAGGCCGAAGCAGCGTTGTTGCAGTGCACGGCAGATACACTTGCTGATGCGGTGCTGATTACGACCGCTCACGCGTGGCAGCATCAGGGGAAAACCTTATTTATCAGCCGGAAAACCTA
CCGGATTGATGGTAGTGGTCAAATGGCGATTACCGTTGATGTTGAAGTGGCGAGCGATACACCGCATCCGGCGCGGATTGGCCTGAACTGCCAGCTGGCGCAGGTAGCAGAGCGGGTAAACTGGCTCGGATTAG
GGCCGCAAGAAAACTATCCCGACCGCCTTACTGCCGCCTGTTTTGACCGCTGGGATCTGCCATTGTCAGACATGTATACCCCGTACGTCTTCCCGAGCGAAAACGGTCTGCGCTGCGGGACGCGCGAATTGAAT
TATGGCCCACACCAGTGGCGCGGCGACTTCCAGTTCAACATCAGCCGCTACAGTCAACAGCAACTGATGGAAACCAGCCATCGCCATCTGCTGCACGCGGAAGAAGGCACATGGCTGAATATCGACGGTTTCCA
TATGGGGATTGGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCGTCAGTATCGGCGGAATTCCAGCTGAGCGCCGGTCGCTACCATTACCAGTTGGTCTGGTGTCAAAAATAATAATAACCGGGCAGGGGGGATCCGCAGATCC
GGCTGTGGAATGTGTGTCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCCTGCAGCCCGGGGGATCCACTAGTGTATGTTTAGAAAAACAAGGGGGGAACTGTGGGGT
TTTTATGAGGGGTTTTATAAATGATTATAAGAGTAAAAAGAAAGTTGCTGATGCTCTCATAACCTTGTATAACCCAAAGGACTAGCTCATGTTGCTAGGCAACTAAACCGCAATAACCGCATTTGTGACGCGAG
TTCCCCATTGGTGACGCGTTTTGAGATTTCTGTCGCCGACTAAATTCATGTCGCGCGATAGTGGTGTTTATCGCCGATAGAGATGGCGATATTGGAAAAATTGATATTTGAAAATATGGCATATTGAAAATGTC
GCCGATGTGAGTTTCTGTGTAACTGATATCGCCATTTTTCCAAAAGTGATTTTTGGGCATACGCGATATCTGGCGATAGCGCTTATATCGTTTACGGGGGATGGCGATAGACGACTTTGGTGACTTGGGCGATT
CTGTGTGTCGCCAAATATCGCAGTTTCGATATAGGTGACAGACGATATGAGGCTATATCGCCGATAGAGGCGACATCAAGCTGGCACATGGCCAATGCATATCGATCTATACATTGAATCAATATTGGCCATTA
GCCATATTATTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCCATATCGTAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAACATTACCGCCATGTTGACATTGATTATT
GACTA

图 11

图 11(接上页)

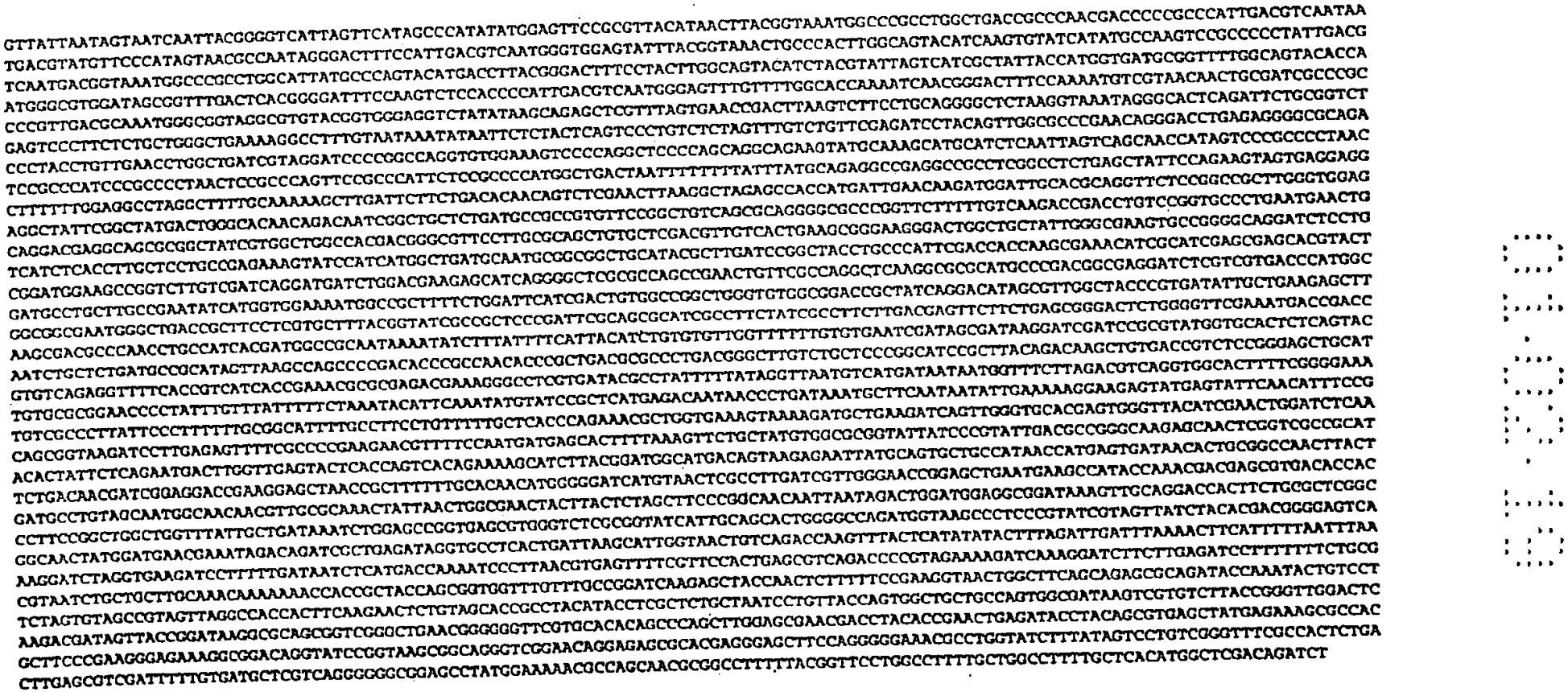
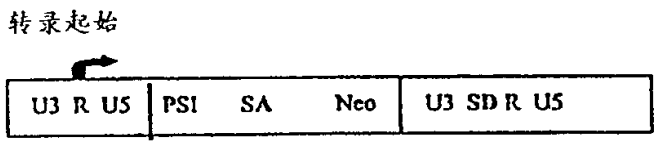


图 12

(A) 转染细胞中的 pICUT 载体



(B) 转导细胞中的 pICUT 载体

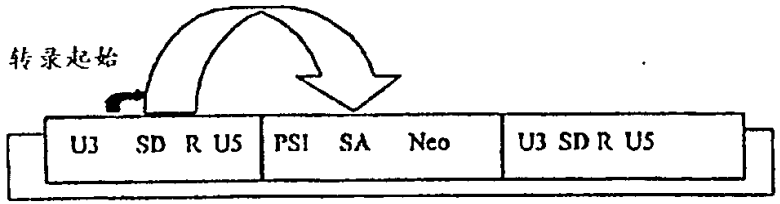
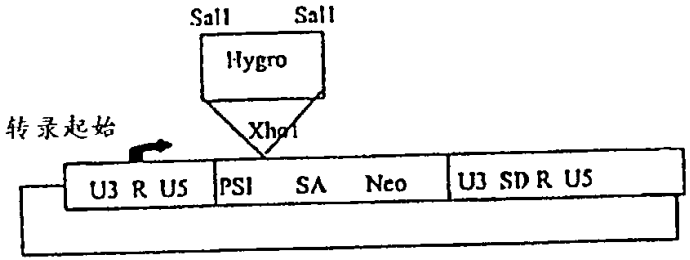


图 13

(a) 转染细胞中的载体结构



(B) 转导细胞中的载体结构

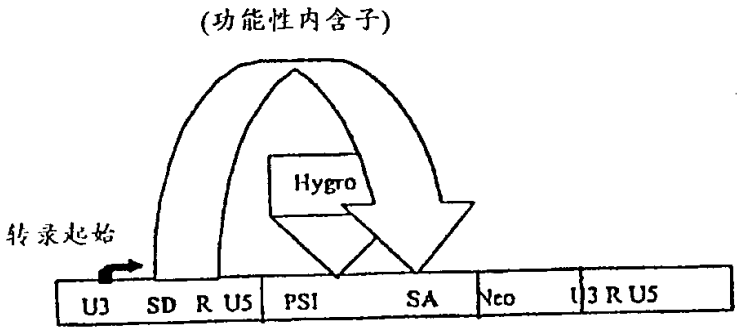
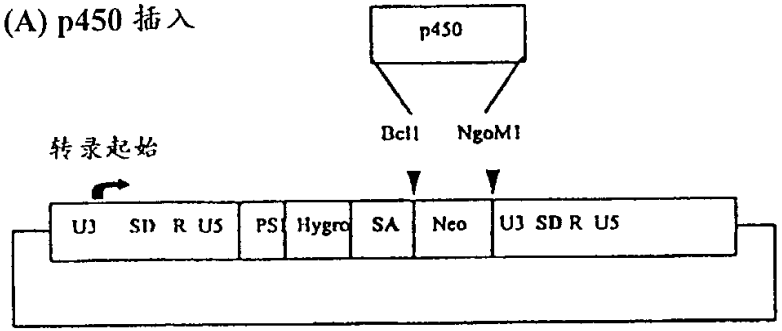
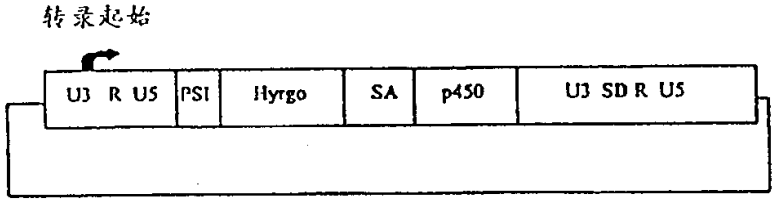


图 14

(A) p450 插入



(B) 转染细胞中的潮霉素表达



(C) 转导细胞中的 p450 表达

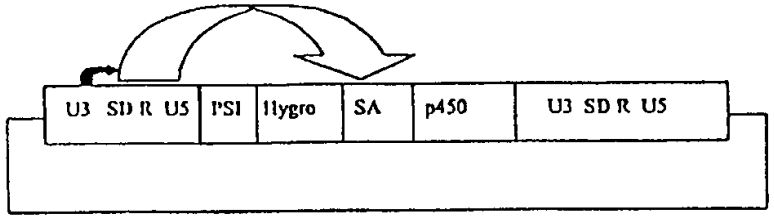


图 15

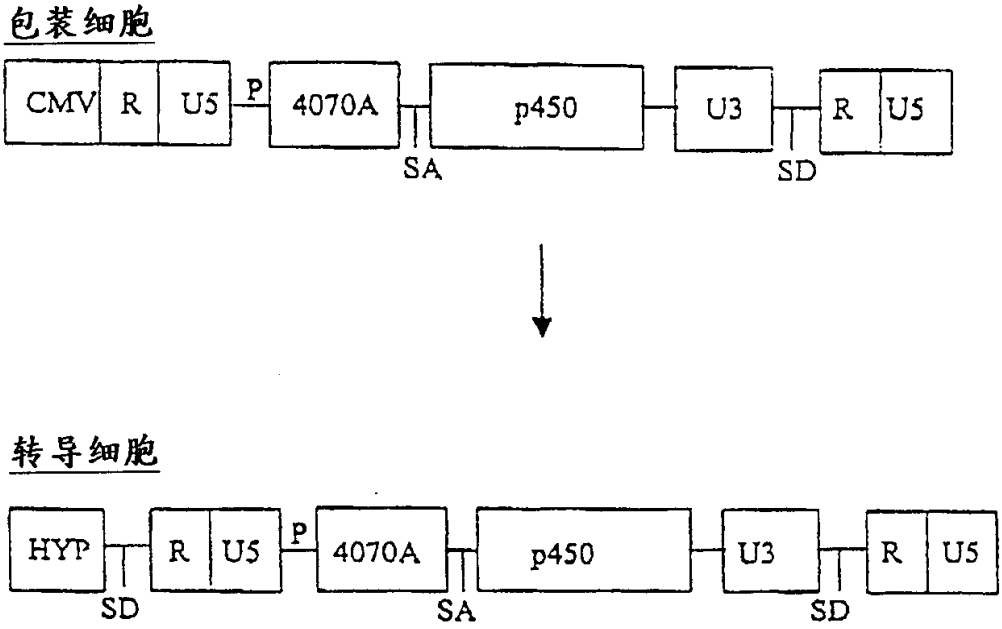
pol 的 3'端　　5'-ATG CGT TCA ACG CTC TCA AAA CCC CTT AAA AAT AAG
5'改变的 4070A　5'-ATG GCC AGA AGC ACC CTG AGC AAG CCA CCC CAG GAC

GTT AAC CCG CGA GGC CCC CTA ATC CCC-3'
AAA AAT CCC TGG AAA CCT CTG ATC GTC-3'

图 16

ATGGCCAGAA GCACCCTGAG CAAGCCACCC CAGGACAAAA TCAATCCCTG GAAACCTCTG
ATCGTCATGG GAGTCCTGTT AGGAGTAGGG ATGGCAGAGA GCCCCCATC AGGTC
TTTAATGTAA CCTGGAGAGT CACCAACCTG
ATGACTGGGC GTACCGCCAA TGCCACCTCC CTCCTGGGAA CTGTACAAGA TGCCTTCCCA
AAATTATATT TTGATCTATG TGATCTGGTC GGAGAGGAGT GGGACCCTTC AGACCAGGAA
CCGTATGTCG GGTATGGCTG CAAGTACCCC GCAGGGAGAC AGCGGACCCG GACTTTTGAC
TTTTACGTGT GCCCTGGGCA TACCGTAAAG TCGGGGTGTG GGGGACCAGG AGAGGGCTAC
TGTGGTAAAT GGGGGTGTGA AACCACCGGA CAGGCTTACT GGAAGCCCAC ATCATCGTGG
GACCTAATCT CCCTTAAGCG CGGTAACACC CCCTGGGACA CGGGATGCTC TAAAGTTGCC
TGTGGCCCCT GCTACGACCT CTCCAAAGTA TCCAATTCCT TCCAAGGGGC TACTCGAGGG
GGCAGATGCA ACCCTCTAGT CCTAGAATTC ACTGATGCAG GAAAAAAGGC TAACTGGGAC
GGGCCCAAAT CGTGGGGACT GAGACTGTAC CGGACAGGAA CAGATCCTAT TACCATGTTC
TCCCTGACCC GGCAGGTCCT TAATGTGGGA CCCCGAGTCC CCATAGGGCC CAACCCAGTA
TTACCCGACC AAAGACTCCC TTCCTCACCA ATAGAGATTG TACCGGCTCC ACAGCCACCT
AGCCCCCTCA ATACCAGTTA CCCCCCTTCC ACTACCAGTA CACCCTCAAC CTCCCCTACA
AGTCCAAGTG TCCCACAGCC ACCCCCAGGA ACTGGAGATA GACTACTAGC TCTAGTCAAA
GGAGCCTATC AGGCGCTTAA CCTCACCAAT CCCGACAAGA CCCAAGAATG TTGGCTGTGC
TTAGTGTCGG GACCTCCTTA TTACGAAGGA GTAGCGGTCG TGGGCACTTA TACCAATCAT
TCCACCGCTC CGGCCAACTG TACGGCCACT TCCCAACATA AGCTTACCCT ATCTGAAGTG
ACAGGACAGG GCCTATGCAT GGGGGCAGTA CCTAAAACTC ACCAGGCCTT ATGTAACACC
ACCCAAAGCG CCGGCTCAGG ATCCTACTAC CTTGCAGCAC CCGCCGGAAC AATGTGGGCT
TGCAGCACTG GATTGACTCC CTGCTTGTCC ACCACGGTGC TCAATCTAAC CACAGATTAT
TGTGTATTAG TTGAACTCTG GCCCAGAGTA ATTTACCACT CCCCCGATTA TATGTATGGT
CAGCTTGAAC AGCGTACCAA ATATAAAAGA GAGCCAGTAT CATTGACCCT GGCCCTTCTA
CTAGGAGGAT TAACCATGGG AGGGATTGCA GCTGGAATAG GGACGGGGAC CACTGCCTTA
ATTAAAACCC AGCAGTTTGA GCAGCTTCAT GCCGCTATCC AGACAGACCT CAACGAAGTC
GAAAAGTCAA TTACCAACCT AGAAAAGTCA CTGACCTCGT TGTCTGAAGT AGTCCTACAG
AACCGCAGAG GCCTAGATTT GCTATTCCTA AAGGAGGGAG GTCTCTGCGC AGCCCTAAAA
GAAGAATGTT GTTTTTATGC AGACCACACG GGGCTAGTGA GAGACAGCAT GGCCAAATTA
AGAGAAAGGC TTAATCAGAG ACAAAAACTA TTTGAGACAG GCCAAGGATG GTTCGAAGGG
CTGTTTAATA GATCCCCCTG GTTTACCACC TTAATCTCCA CCATCATGGG ACCTCTAATA
GTACTCTTAC TGATCTTACT CTTTGGACCT TGCATTCTCA ATCGATTGGT CCAATTTGTT
AAAGACAGGA TCTCAGTGGT CCAGGCTCTG GTTTTGACTC AGCAATATC CCAGCTAAAA
CCCATAGAGT ACGAGCCATG A

图 17



CMV	**= CMV 启动子**
HYP	**=低氧效应启动子**
P	**= MLV 包装信号**
4070A	**=MLV 兼嗜性 Env 基因**
p450	**=编码 p450 还原酶的 cDNA**
SD	**=剪接供体**
SA	**=剪接受体**

图 18

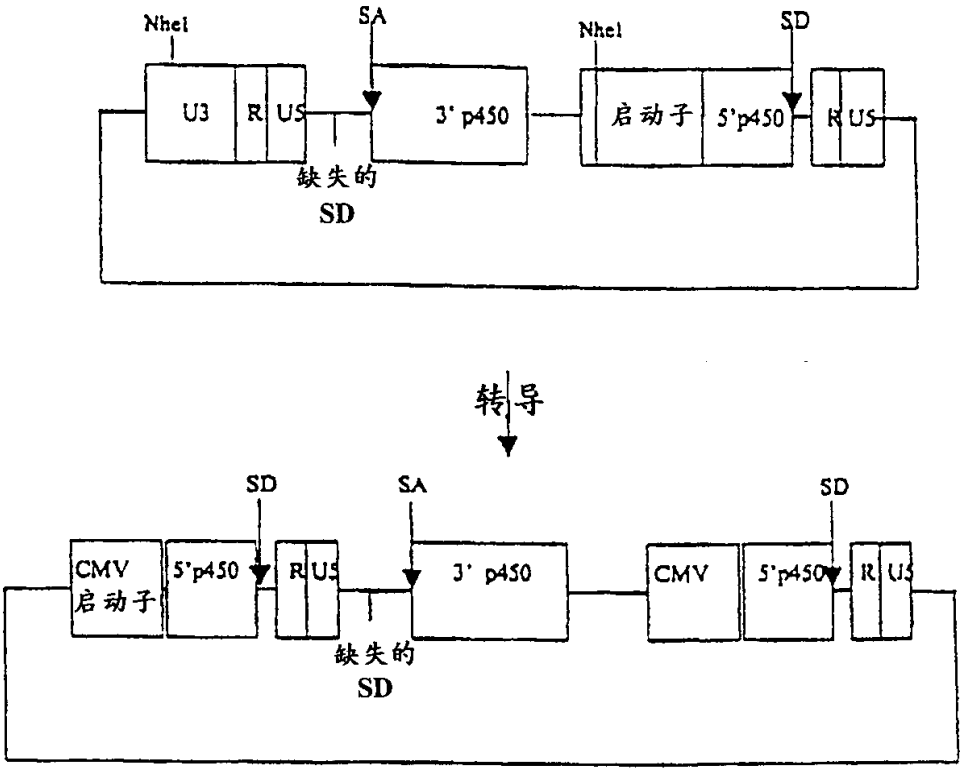
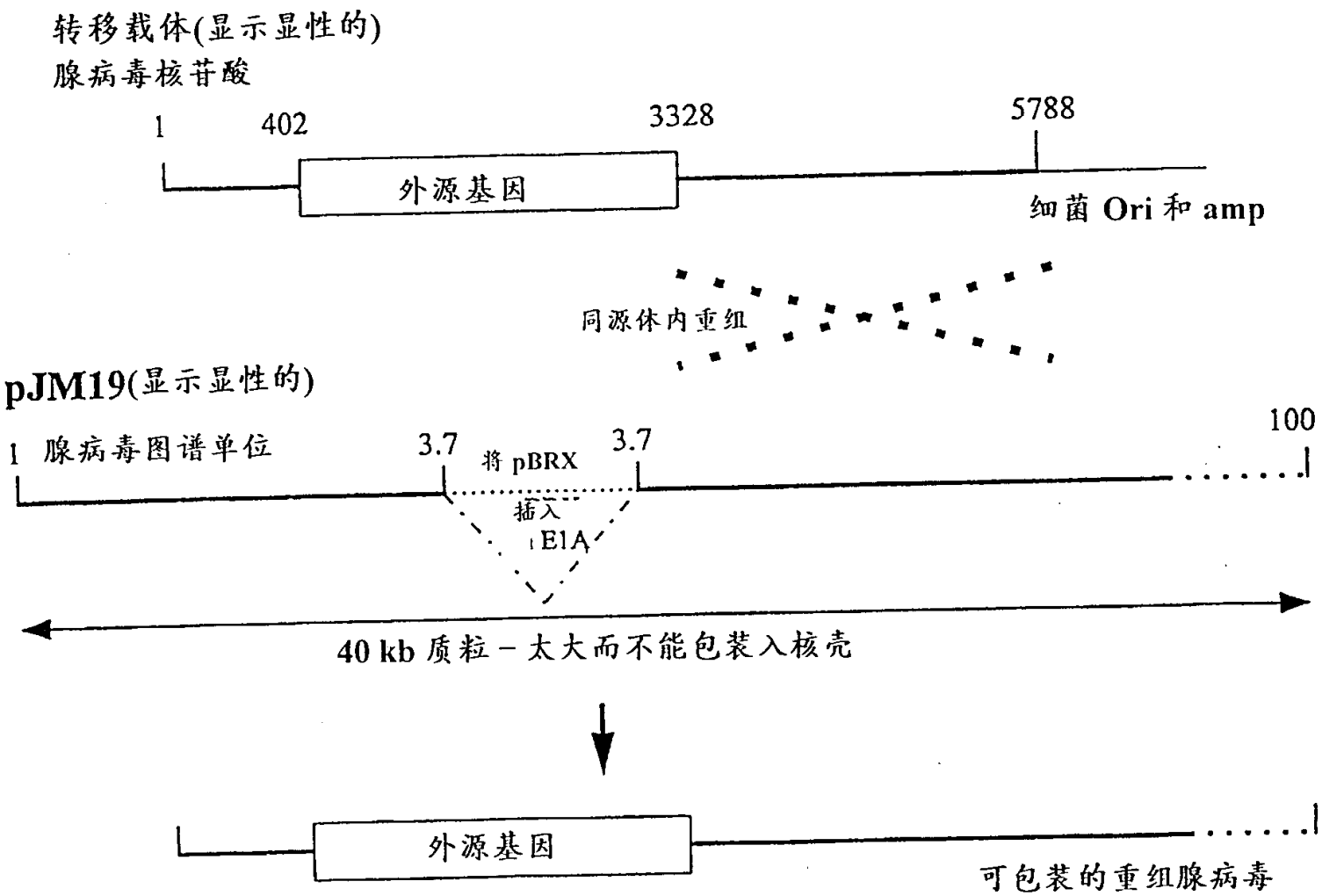
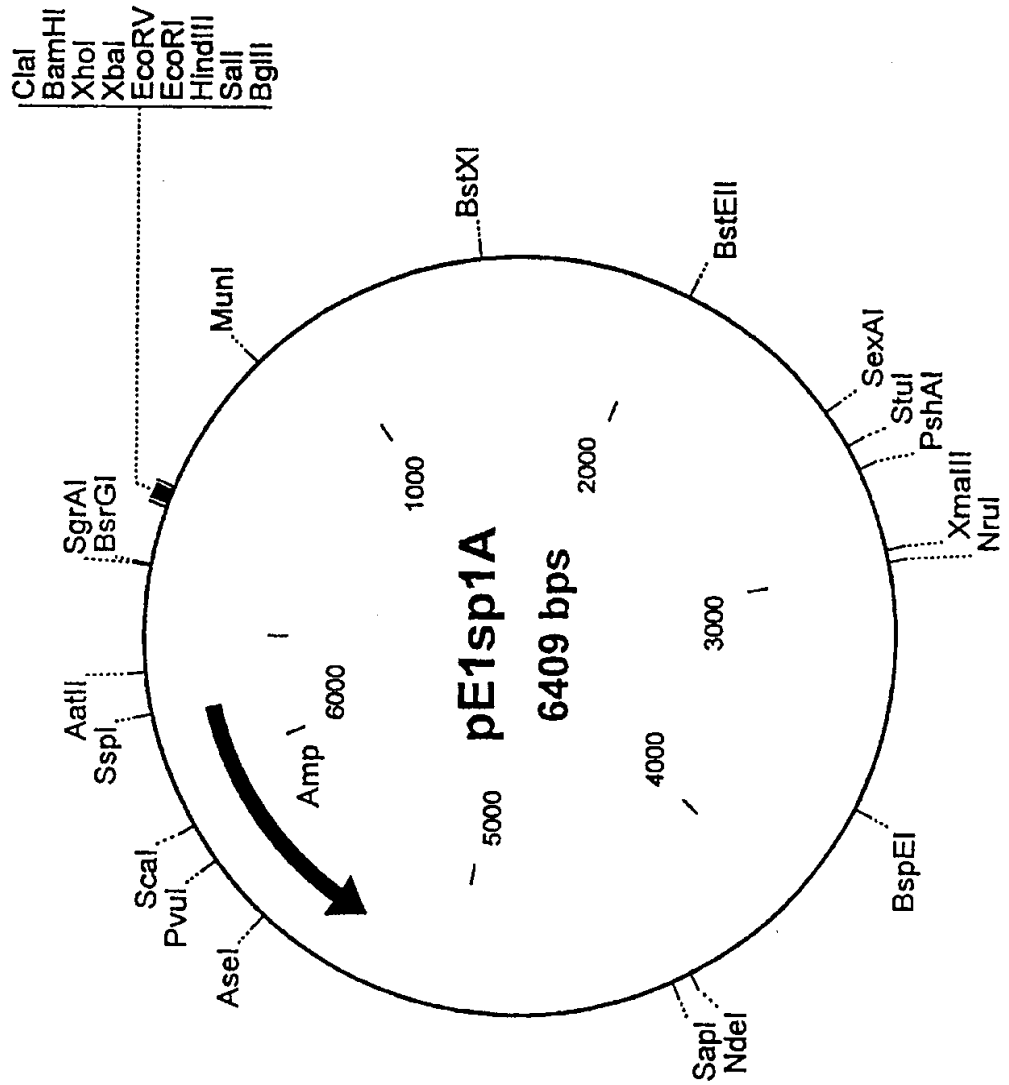

Nhel
SA
Nhel
SD
U3
R
U5
3' p450
启动子
5'p450
R
U5
缺失的
SD
转导
SD
SA
SD
CMV
启动子
5'p450
R
U5
3' p450
CMV
5'p450
R
U5
缺失的
SD

图 19


转移载体(显示显性的)
腺病毒核苷酸
1
402
3328
5788
外源基因
细菌 Ori 和 amp
同源体内重组
pJM19(显示显性的)
1 腺病毒图谱单位
3.7
将 pBRX
3.7
100
插入
E1A
40 kb 质粒－太大而不能包装入核壳
外源基因
可包装的重组腺病毒

01.02.19

图 20


ClaI
BamHI
XhoI
XbaI
EcoRV
EcoRI
HindIII
SalI
BglII
BstXI
BstEII
SexAI
StuI
PshAI
XmaIII
NruI
BspEI
SapI
NdeI
AseI
PvuI
ScaI
SspI
AatII
SgrAI
BsrGI
MunI
Amp
1000
2000
3000
4000
5000
6000
pE1sp1A
6409 bps

01.02.19

图 21

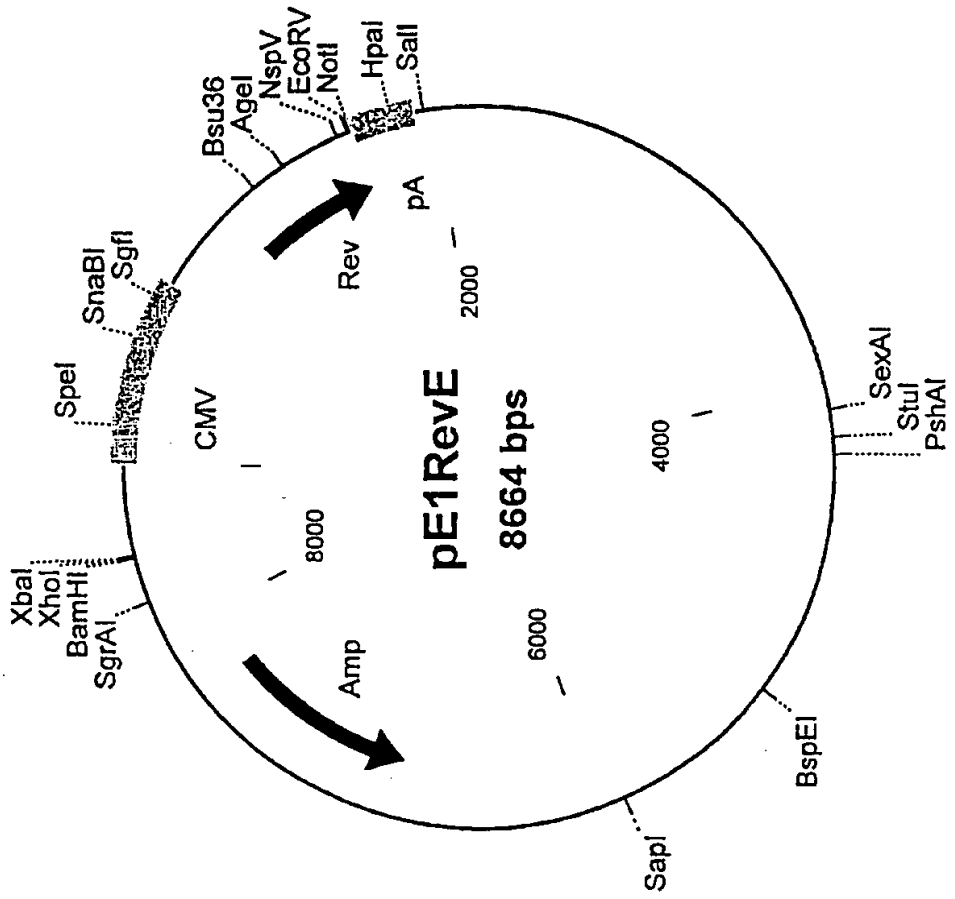

pE1RevE
8664 bps
2000
4000
6000
8000
CMV
Rev
pA
Amp
Bsu36
AgeI
NspV
EcoRV
NotI
HpaI
SalI
SnaBI
SgfI
SpeI
XbaI
XhoI
BamHI
SgrAI
SexAI
StuI
PshAI
BspEI
SapI

图 22

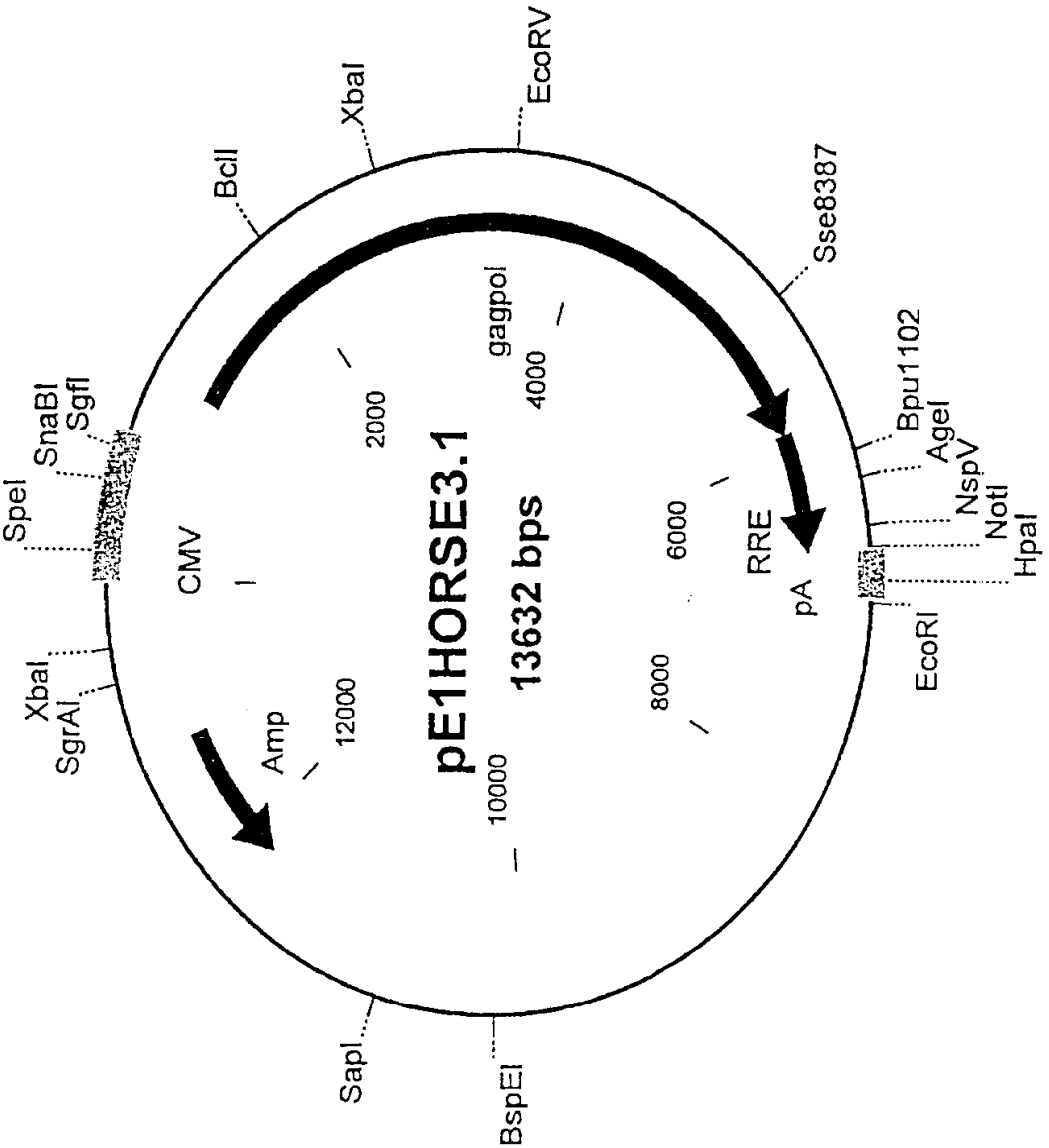

pE1HORSE3.1
13632 bps
CMV
gagpol
RRE
pA
Amp
2000
4000
6000
8000
10000
12000
BclI
XbaI
EcoRV
Sse8387
Bpu1102
AgeI
NspV
NotI
HpaI
EcoRI
SapI
BspEI
XbaI
SgrAI
SpeI
SnaBI
SgfI

图 23

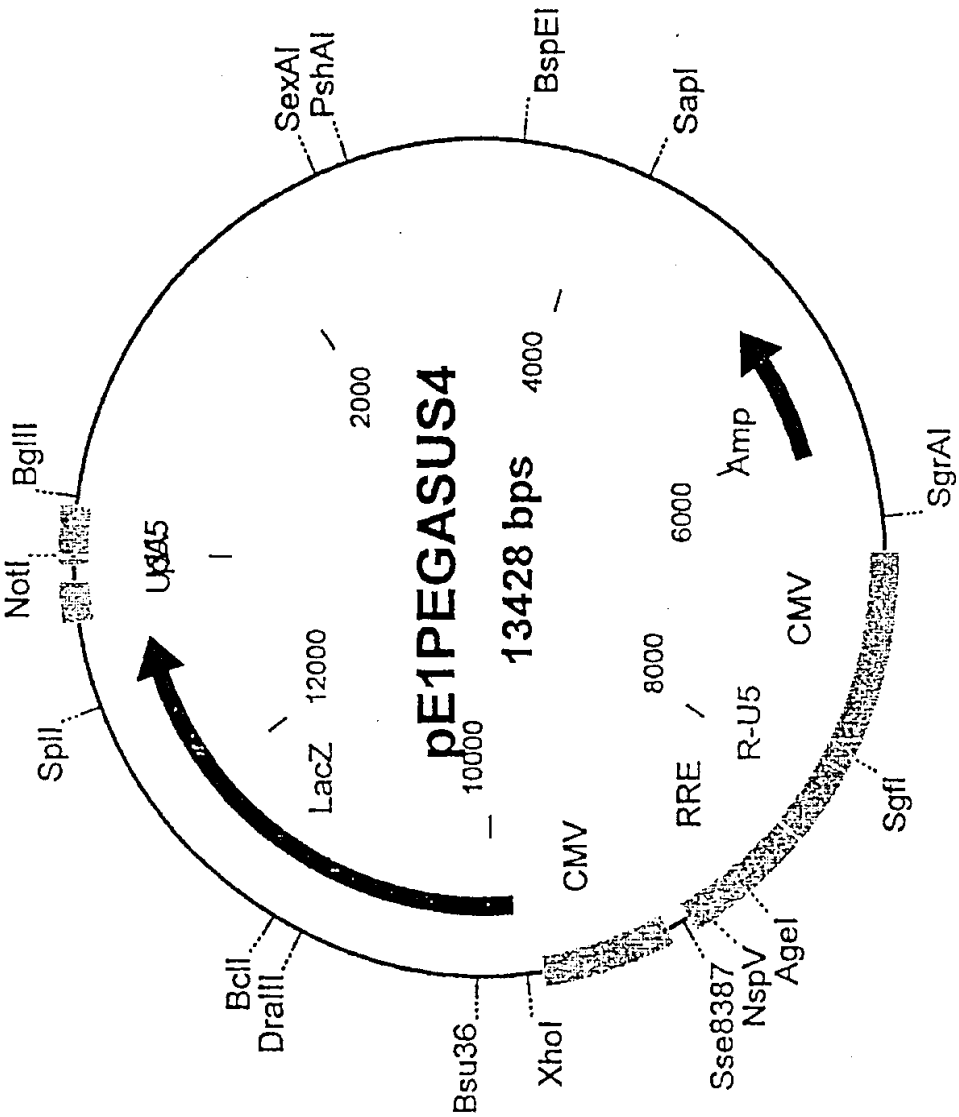

pE1PEGASUS4
13428 bps
2000
4000
6000
8000
10000
12000
LacZ
CMV
RRE
R-U5
CMV
Amp
SexAI
PshAI
BspEI
SapI
SgrAI
SgfI
AgeI
NspV
Sse8387
XhoI
Bsu36
DraIII
BclI
SpII
NotI
BglII

图 24

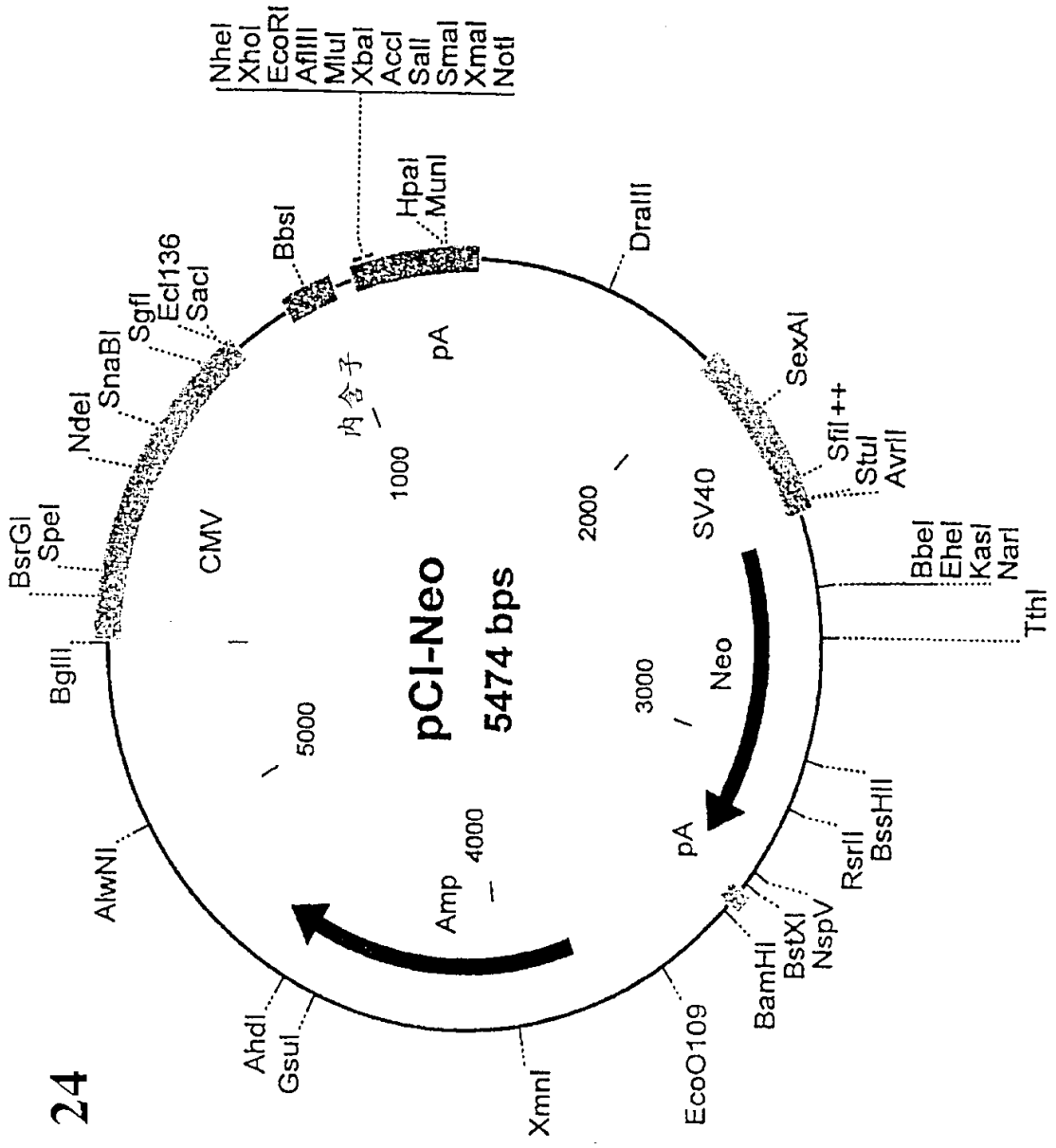

pCI-Neo
5474 bps
CMV
内含子
pA
SV40
Neo
pA
Amp
1000
2000
3000
4000
5000
NheI
XhoI
EcoRI
AflIII
MluI
XbaI
AccI
SalI
SmaI
XmaI
NotI
HpaI
MunI
BbsI
DraIII
SexAI
SfiI++
StuI
AvrII
BbeI
EheI
KasI
NarI
TthI
BssHII
RsrII
NspV
BstXI
BamHI
EcoO109
XmnI
AhdI
GsuI
AlwNI
BglII
BsrGI
SpeI
NdeI
SnaBI
SgfI
Ecl136
SacI

图 25

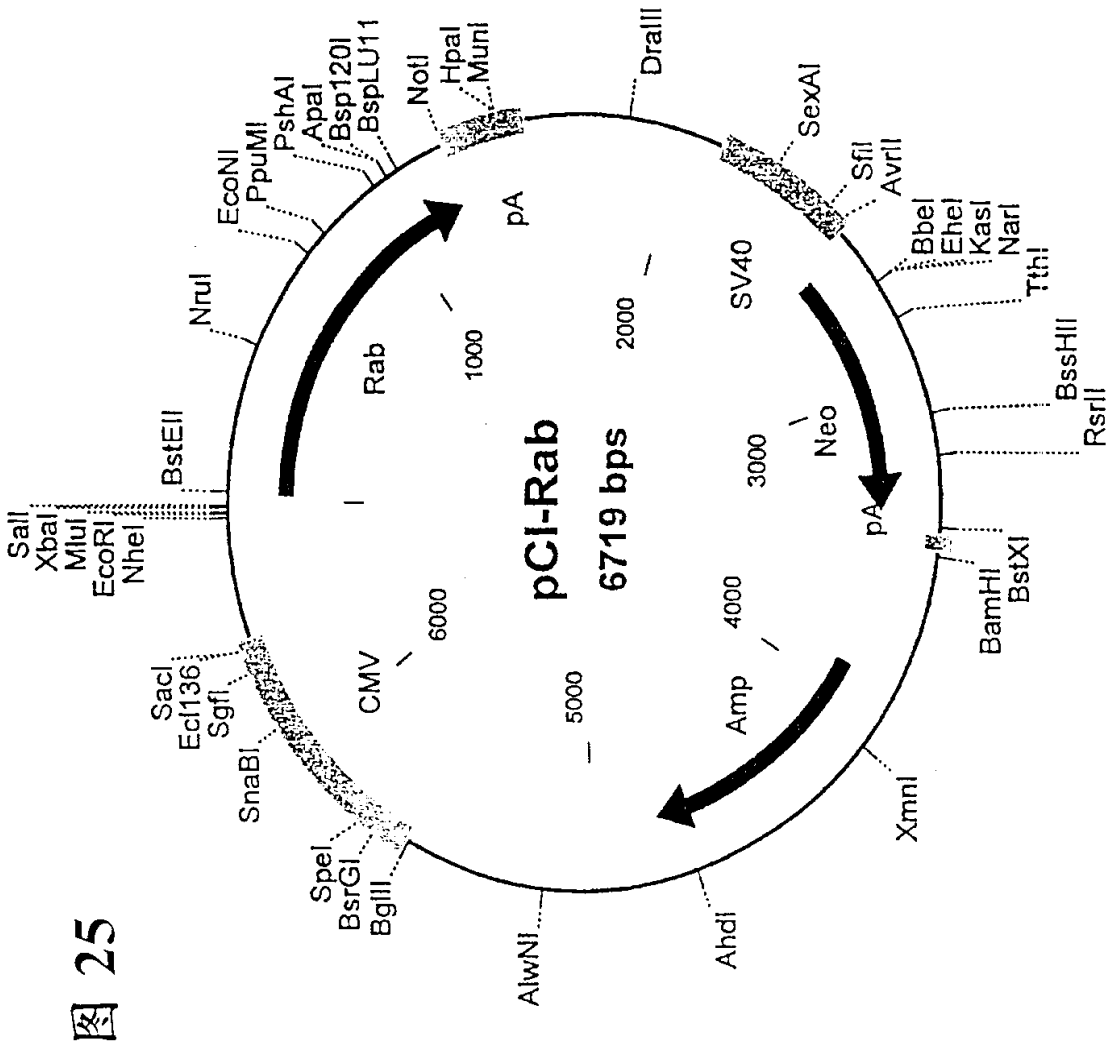

pCI-Rab
6719 bps
1000
2000
3000
4000
5000
6000
Rab
pA
SV40
Neo
pA
Amp
CMV
DraIII
SexAI
SfiI
AvrII
BbeI
EheI
KasI
NarI
TthI
BssHII
RsrII
BamHI
BstXI
XmnI
AhdI
AlwNI
BglII
BsrGI
SpeI
SnaBI
SgfI
Ecl136
SacI
BstEII
NheI
EcoRI
MluI
XbaI
SalI
NruI
EcoNI
PpuMI
PshAI
ApaI
Bsp120I
BspLU11
NotI
HpaI
MunI

图 26

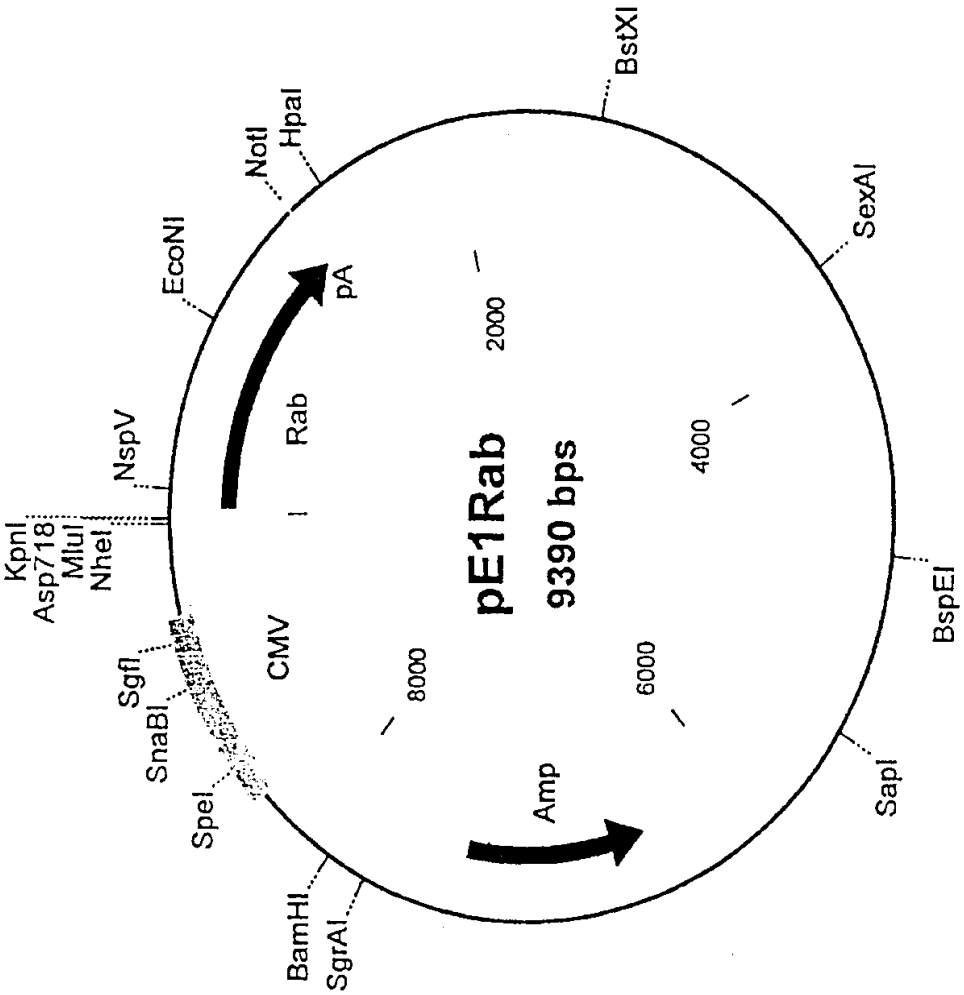
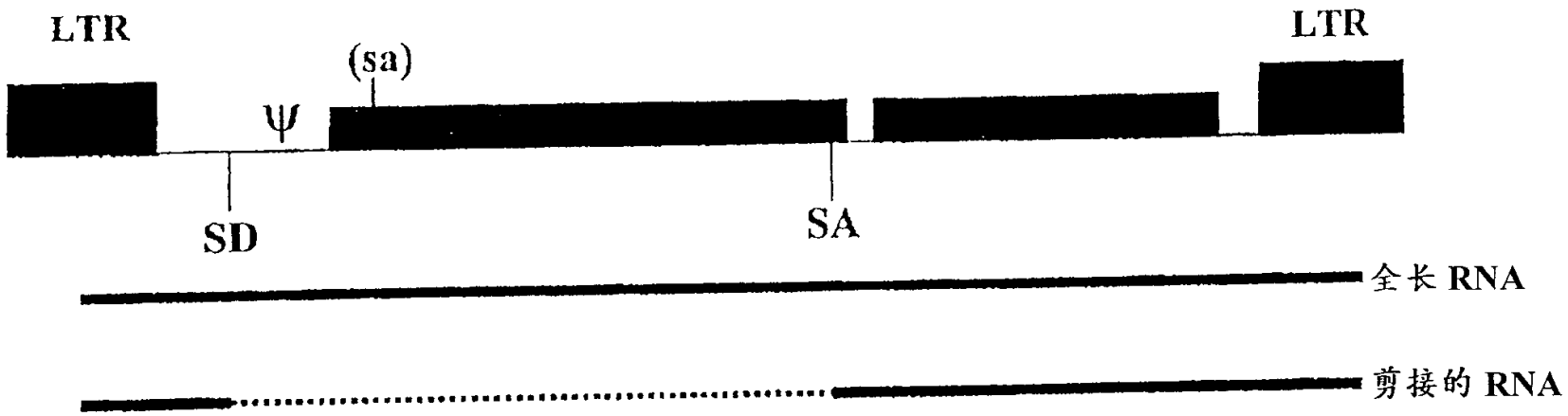

pE1Rab
9390 bps
CMV
Rab
pA
Amp
2000
4000
6000
8000
BstXI
SexAI
BspEI
SapI
SgrAI
BamHI
SpeI
SnaBI
SgfI
KpnI
Asp718
MluI
NheI
NspV
EcoNI
NotI
HpaI

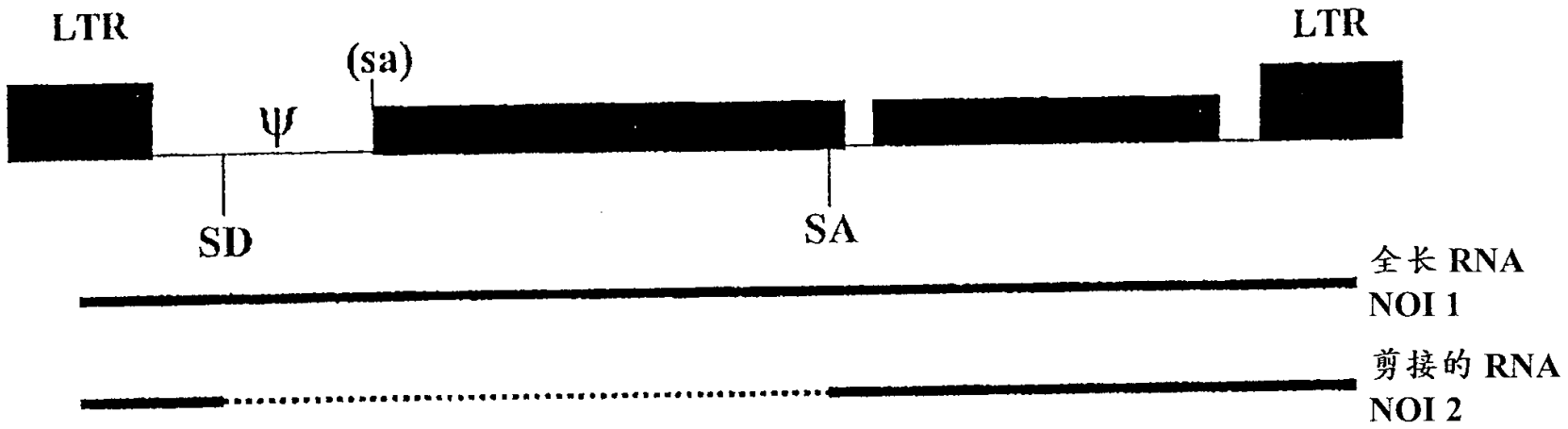
图 27a

A)



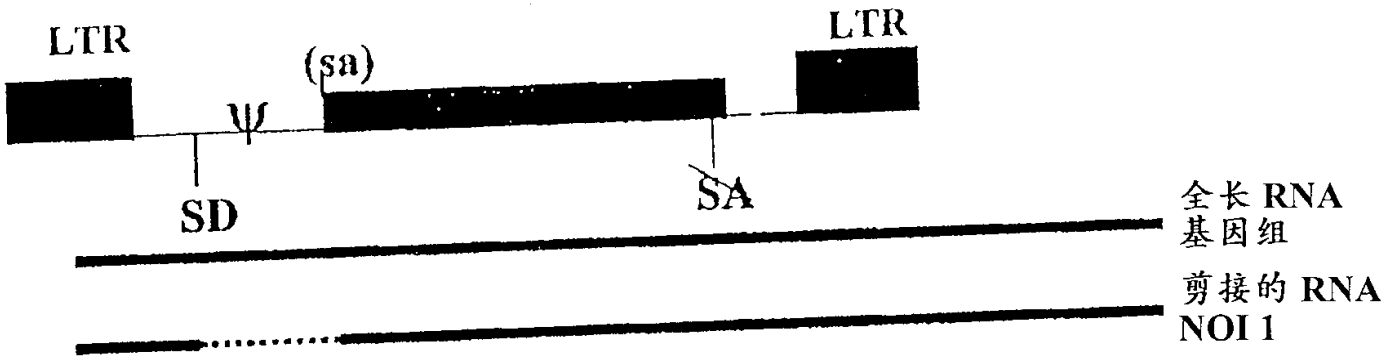
SD = 剪接供体
SA = 剪接受体
(sa) = 隐蔽剪接受体
Ψ = 包装位点

图 27b



SD = 剪接供体
SA = 剪接受体
(sa) = 隐蔽剪接受体
Ψ = 包装位点

图 27b (续)



SD = 剪接供体
SA = 剪接受体
(sa) = 隐蔽剪接受体
Ψ = 包装位点
~~SA~~ =非功能性剪接受体

例如 MFG

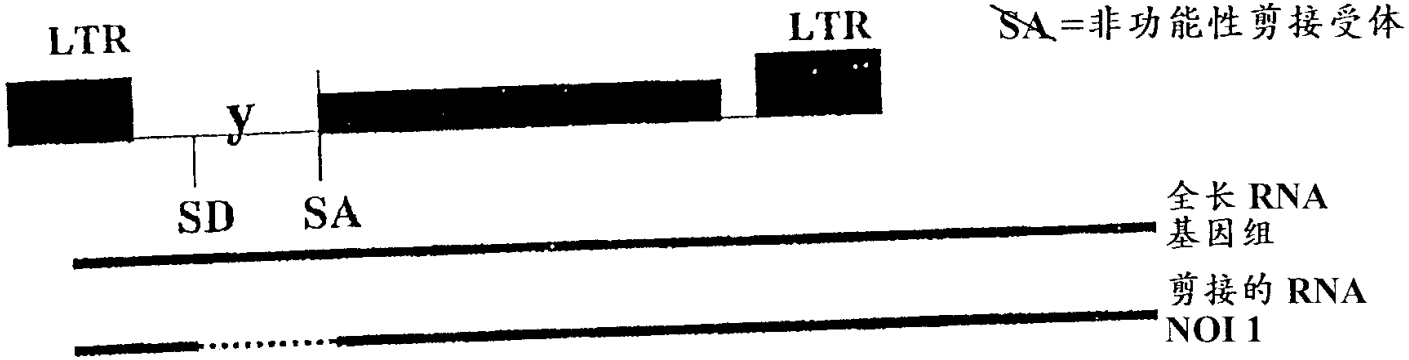
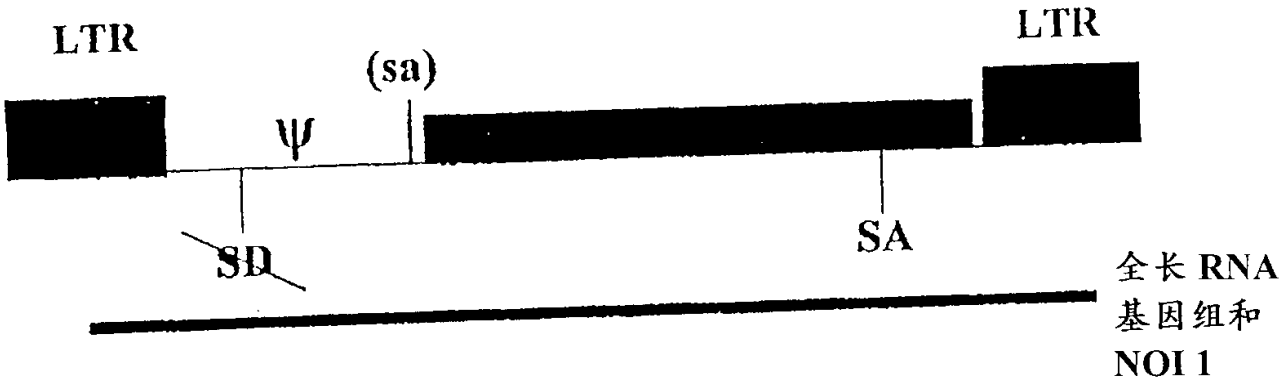


图 27b (续)



SD = 非功能性剪接供体
SA = 剪接受体
(sa) = 隐蔽剪接受体
Ψ = 包装位点

图 27c

SD = 剪接供体
~~SD~~ = 非功能性剪接供体
SA = 剪接受体
(sa) = 隐蔽剪接受体
Ψ = 包装位点
IRES = 内部核糖体进入位点(任选的)

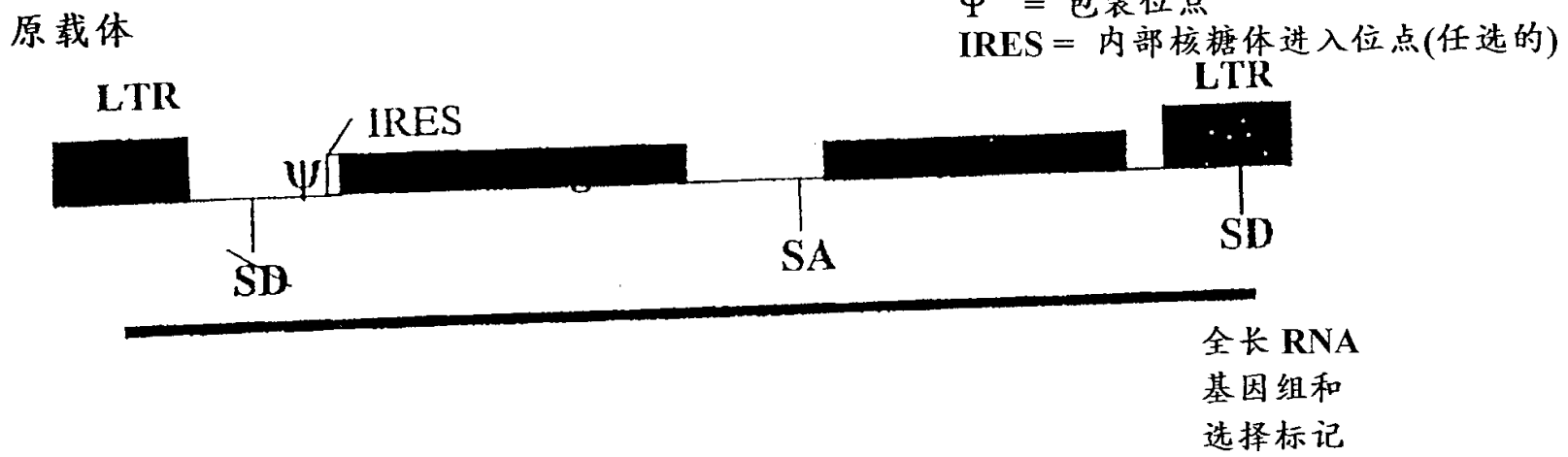


图 27c (续)



NOI3 是任选的，如果需要表达，则在上游紧接放置一个 IRES

图 28

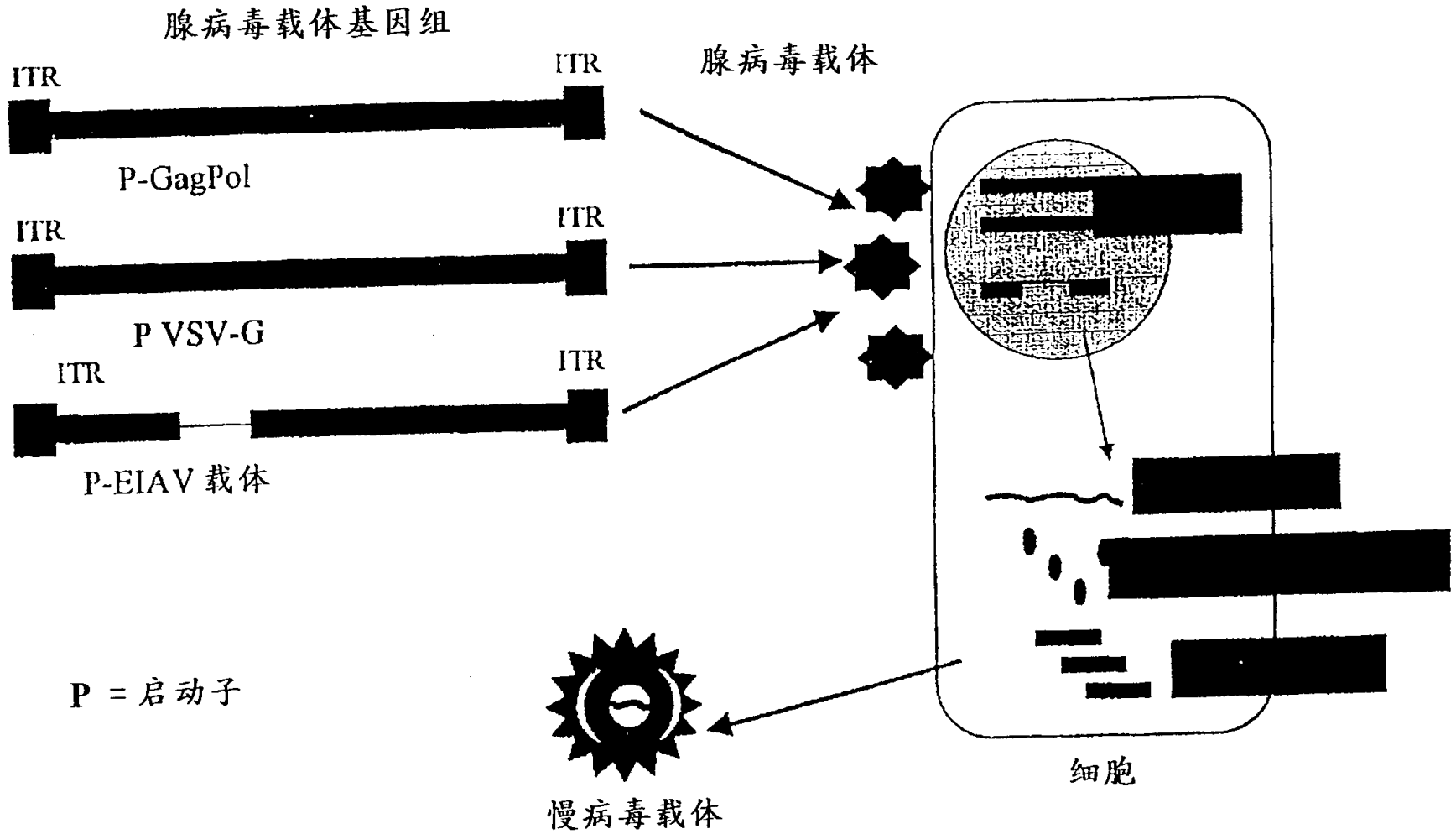

腺病毒载体基因组
ITR
ITR
P-GagPol
ITR
ITR
P VSV-G
ITR
ITR
P-EIAV 载体
P = 启动子
腺病毒载体
慢病毒载体
细胞

图 1

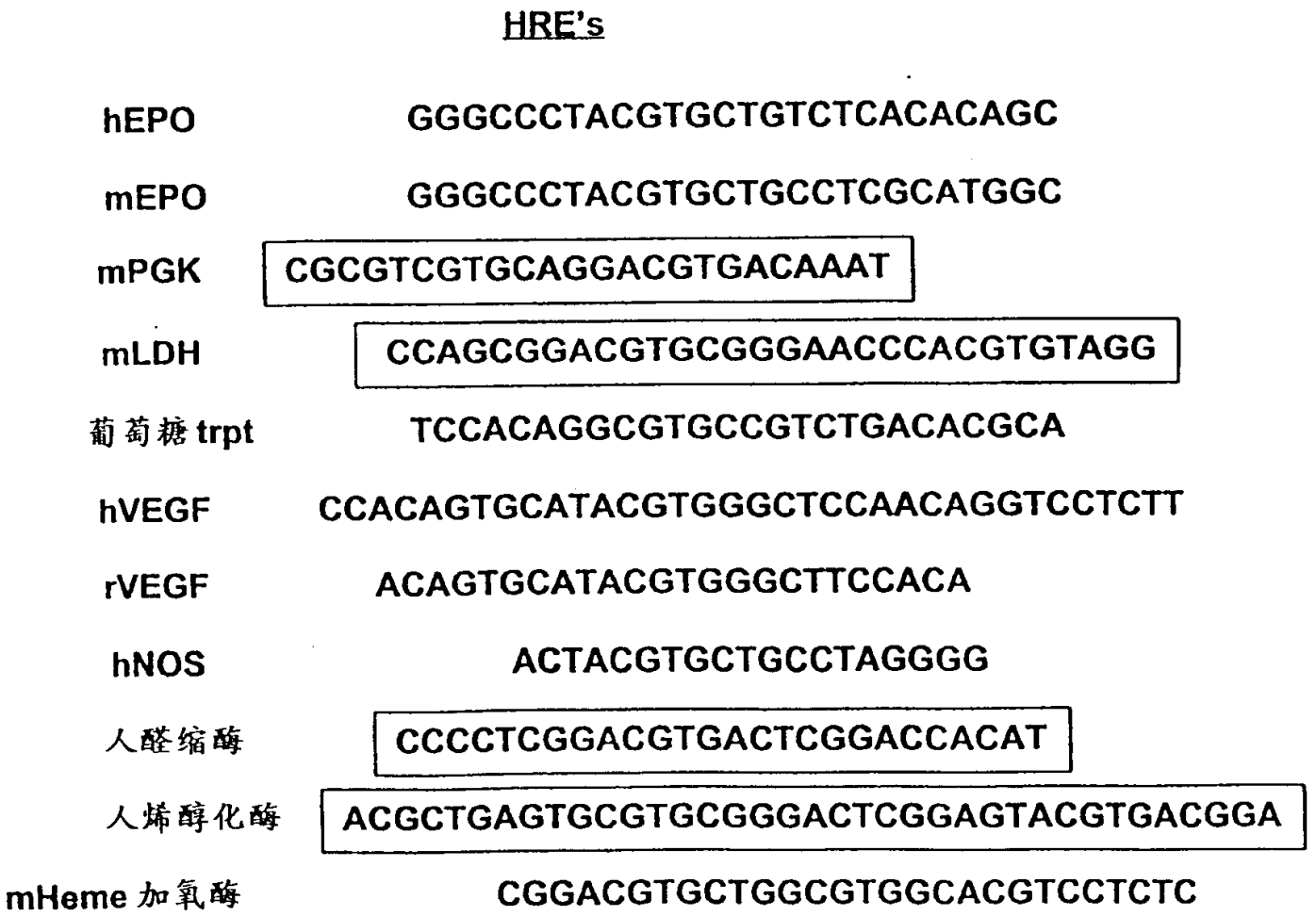

HRE's
hEPO
GGGCCCTACGTGCTGTCTCACACAGC
mEPO
GGGCCCTACGTGCTGCCTCGCATGGC
mPGK
CGCGTCGTGCAGGACGTGACAAAT
mLDH
CCAGCGGACGTGCGGGAACCCACGTGTAGG
葡萄糖 trpt
TCCACAGGCGTGCCGTCTGACACGCA
hVEGF
CCACAGTGCATACGTGGGCTCCAACAGGTCCTCTT
rVEGF
ACAGTGCATACGTGGGCTTCCACA
hNOS
ACTACGTGCTGCCTAGGGG
人醛缩酶
CCCCTCGGACGTGACTCGGACCACAT
人烯醇化酶
ACGCTGAGTGCGTGCGGGACTCGGAGTACGTGACGGA
mHeme 加氧酶
CGGACGTGCTGGCGTGGCACGTCCTCTC

图 2

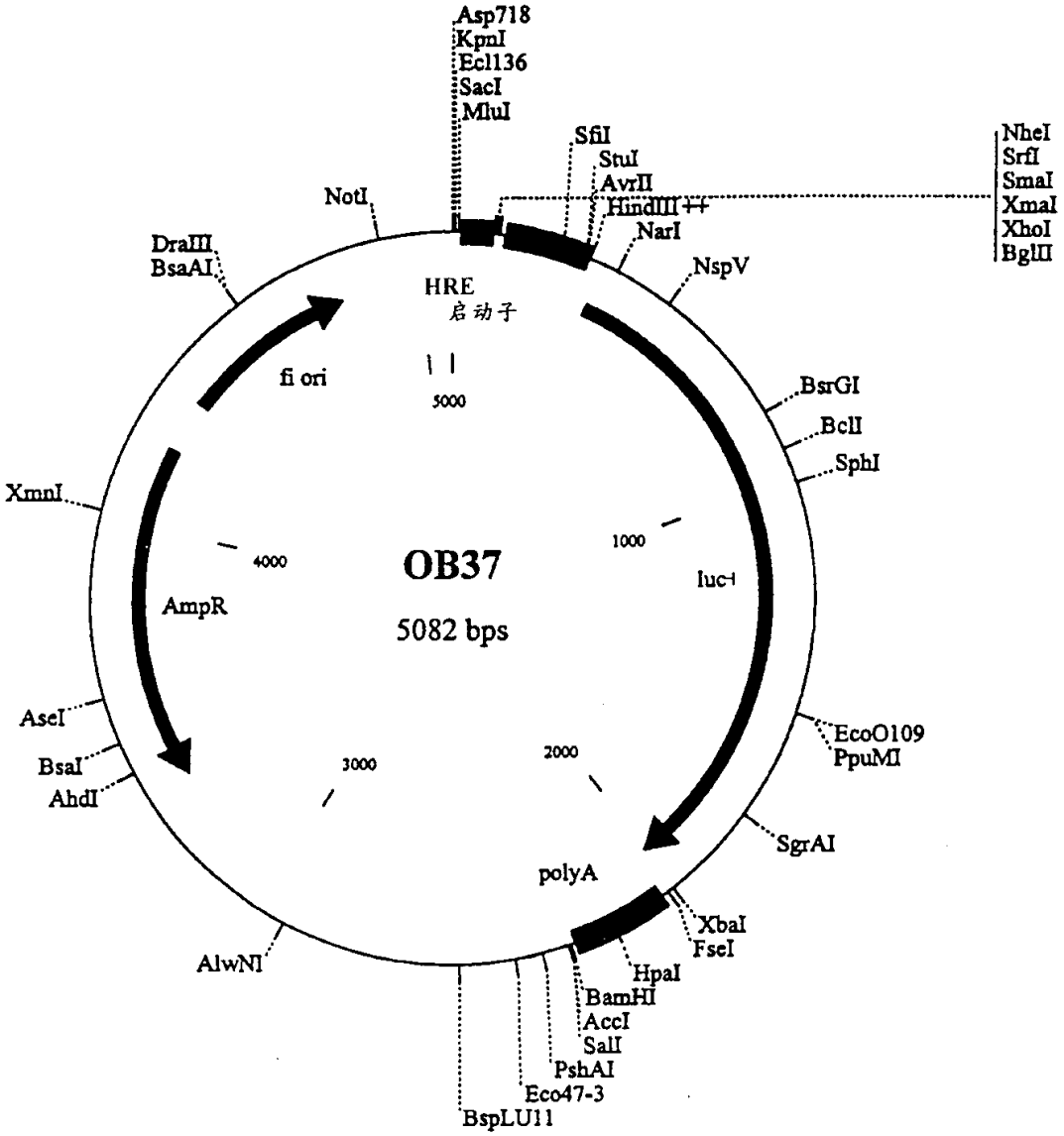
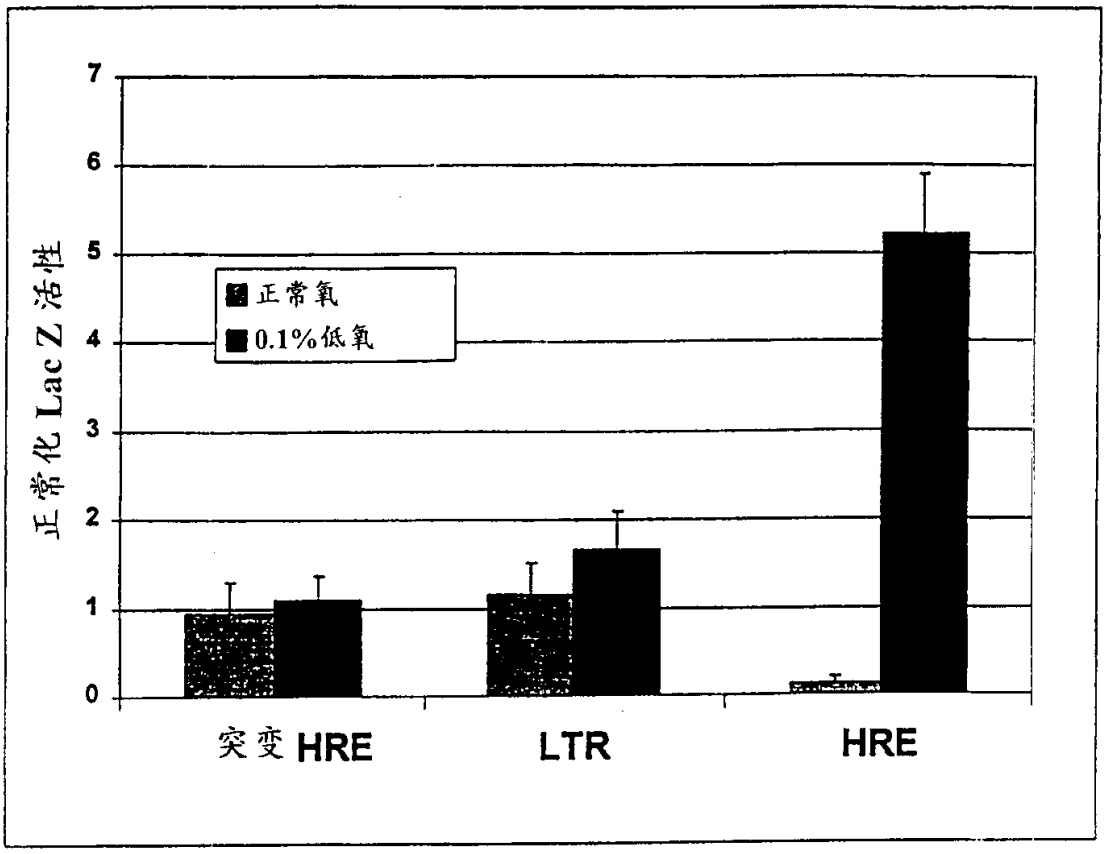

Asp718
KpnI
Ecl136
SacI
MluI
SfiI
StuI
AvrII
HindIII ++
NarI
NspV
NheI
SrfI
SmaI
XmaI
XhoI
BglII
NotI
DraIII
BsaAI
HRE
启动子
fi ori
5000
BsrGI
BclI
SphI
XmnI
1000
4000
OB37
5082 bps
luc+
AmpR
AseI
BsaI
AhdI
3000
2000
EcoO109
PpuMI
SgrAI
polyA
XbaI
FseI
HpaI
BamHI
AccI
SalI
PshAI
Eco47-3
BspLU11
AlwNI

图 3



在用 Xiavector 转导的乳腺癌细胞中诱导β-半乳糖苷酶表达。

图 4a

PGK (在图 1a 中 PGK × 3)

CTAGCTGTCACGTCCTGCACGACACTAGATGTCACGTCCTGCACGACA

HRE HRE

CTAGATGTCACGTCCTGCACGACTCTAGCCCG

HRE

GCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTG

烯醇化酶 A

GATCTGAGGGCCGGACGTGGGGCCCCAGAGCGACGCTGAGTGCGTGC

HRE HRE

GGGACTCGGAGTACGTGACGGAGCCCCG

HRE

GCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTG

图 4a (续)

烯醇化酶 × 2

GATCTGAGGGCCGGACGTGGGGCCCCAGAGCGACGCTGAGTGCGTGC

(HRE) HRE

GGGACTCGGAGTACGTGACGGAGCCCCGGATCTGAGGGCCGGACGTG

HRE (HRE)

GGGCCCCAGAGCGACGCTGAGTGCGTGCGGGACTCGGAGTACGTGAC

HRE (HRE)

GGAGCCCCG[redacted]

[redacted]

[redacted]GCAGAGGCCGAGGCCGC

CTCGGCCTCTG

Epo x 4

GATCTGCCCTACGTGCTGTCTCA*CACAG*CCTGGCCCTACGTGCTGTCTC

HRE (HRE?) HRE

A*CACAG*CCTGGATCTGCCCTACGTGCTGTCTCA*CACAG*CCTGGCCCTA

(HRE?) HRE (HRE?)

CGTGCTGTCTCA*CACAG*CCTGG[redacted]

HRE (HRE?)

[redacted]

[redacted]GCAGA

GGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCTG

图 4a (续)

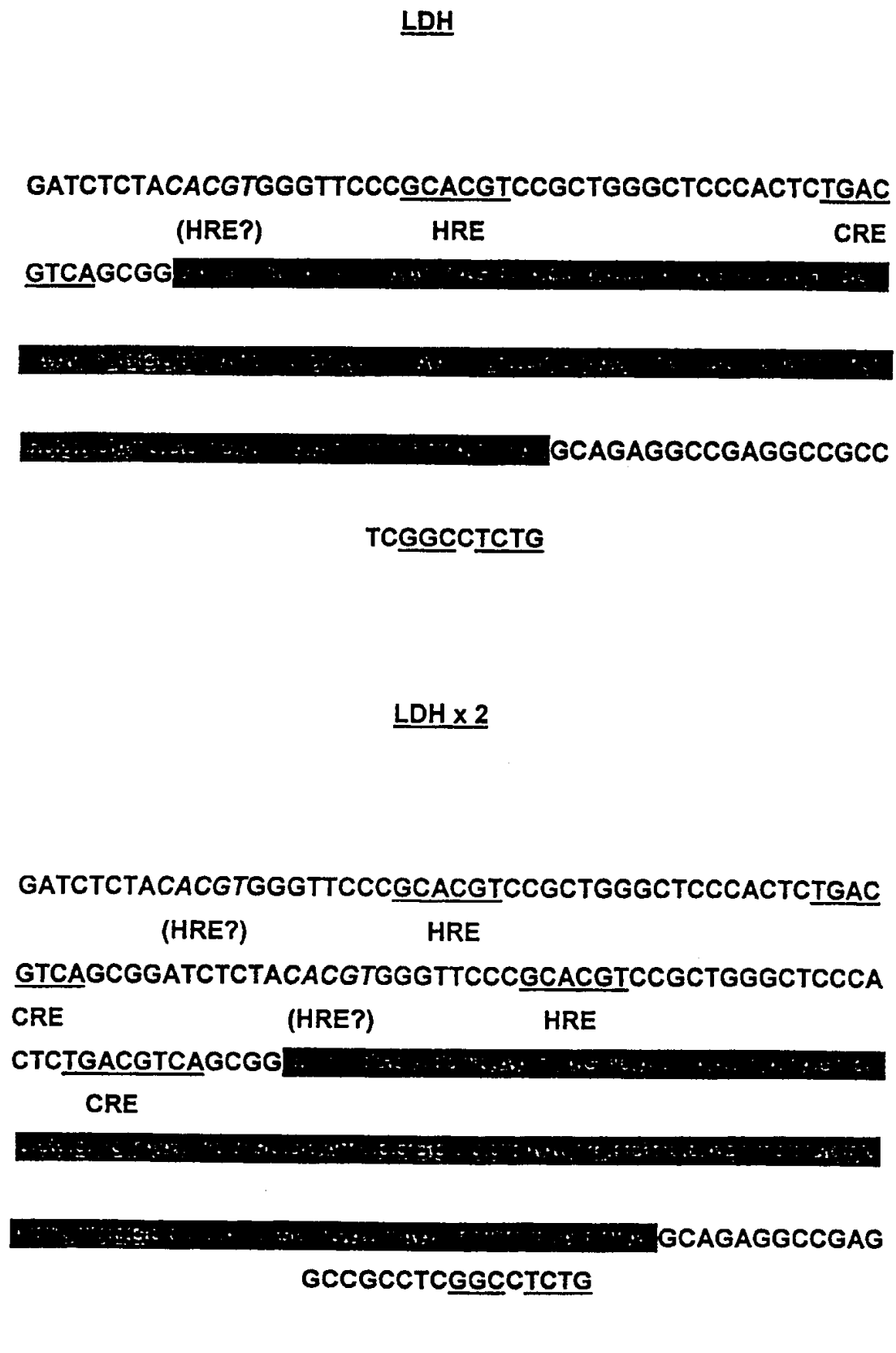

LDH
GATCTCTACACGTGGGTTCCCGCACGTCCGCTGGGCTCCCACTCTGAC
(HRE?)
HRE
CRE
GTCAGCGG
GCAGAGGCCGAGGCCGCC
TCGGCCTCTG
LDH x 2
GATCTCTACACGTGGGTTCCCGCACGTCCGCTGGGCTCCCACTCTGAC
(HRE?)
HRE
GTCAGCGGATCTCTACACGTGGGTTCCCGCACGTCCGCTGGGCTCCCA
CRE
(HRE?)
HRE
CTCTGACGTCAGCGG
CRE
GCAGAGGCCGAG
GCCGCCTCGGCCTCTG

图 4b

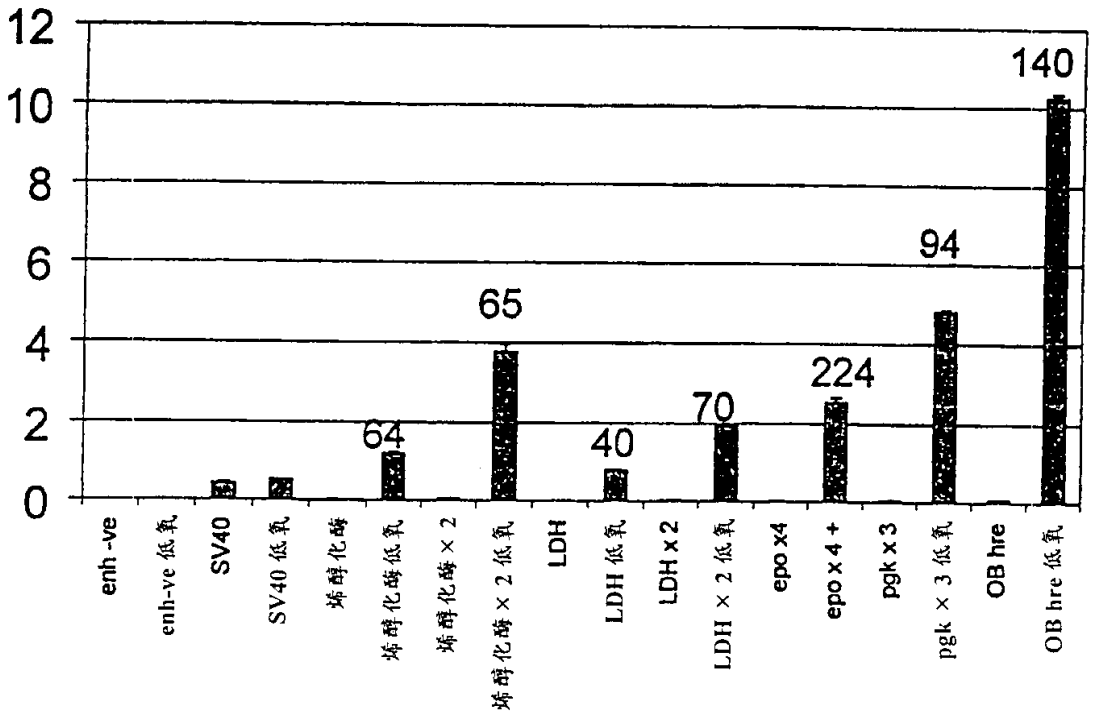

12
10
8
6
4
2
0
140
94
65
64
40
70
224
enh -ve
enh-ve 低氧
SV40
SV40 低氧
烯醇化酶
烯醇化酶低氧
烯醇化酶 × 2
烯醇化酶 × 2 低氧
LDH
LDH 低氧
LDH x 2
LDH × 2 低氧
epo x4
epo x 4 +
pgk x 3
pgk × 3 低氧
OB hre
OB hre 低氧

图 5

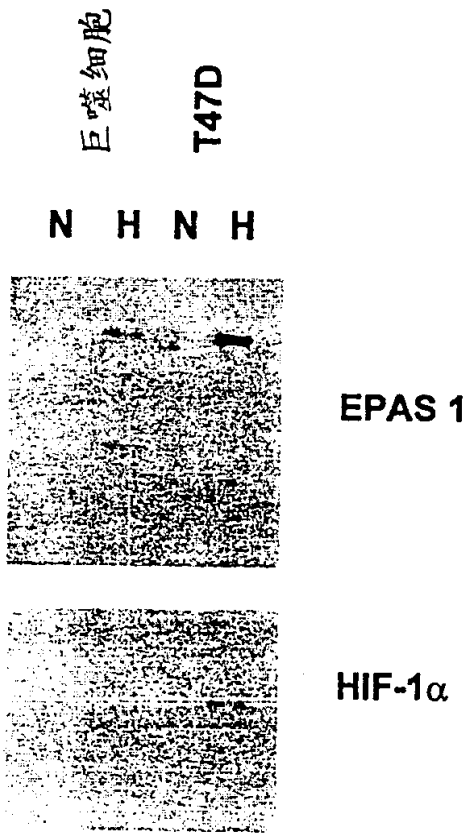


图 6

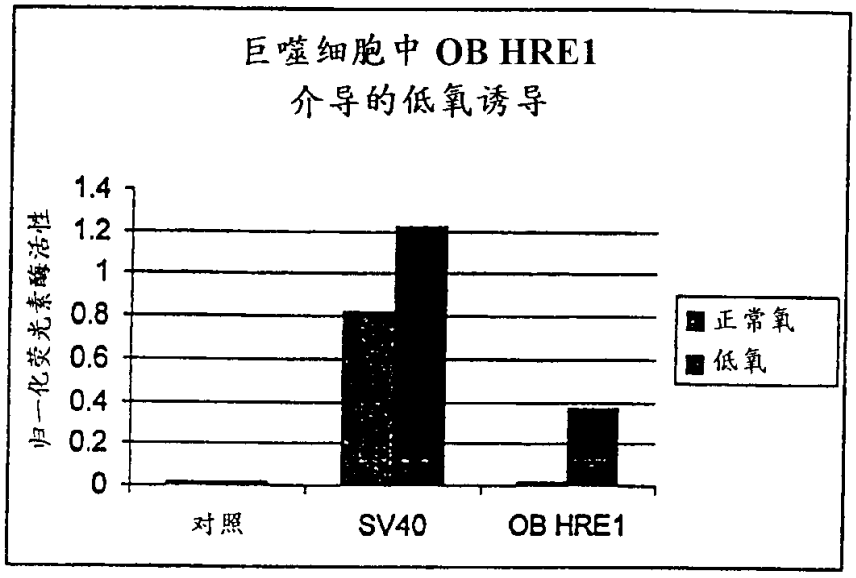

巨噬细胞中 OB HRE1
介导的低氧诱导
归一化荧光素酶活性
1.4
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
对照
SV40
OB HRE1
正常氧
低氧

图 7

XiaMac 序列

GCTAGAGTCGTGCAGGACGTGACATCTAGTGTCGTGCAGGACGTGACA

HRE HRE

TCTAGTGTCGTGCAGGACGTGACAGCTAGCATTCCATCACGTGGCCCG

HRE NF-IL6

AGAGAAGCATCCGGAGTACTACAAGGACTGCTGACAGCGAGATTTCTA

CAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGTGTGGCCTGGGCG

NFkB NFkB SP1 SP1

GGACTGGGGAGTGGCGAGCCCTCAGATGCTGCATATAAGCAGCTGCTT

SP1

TTGCCC

图 8

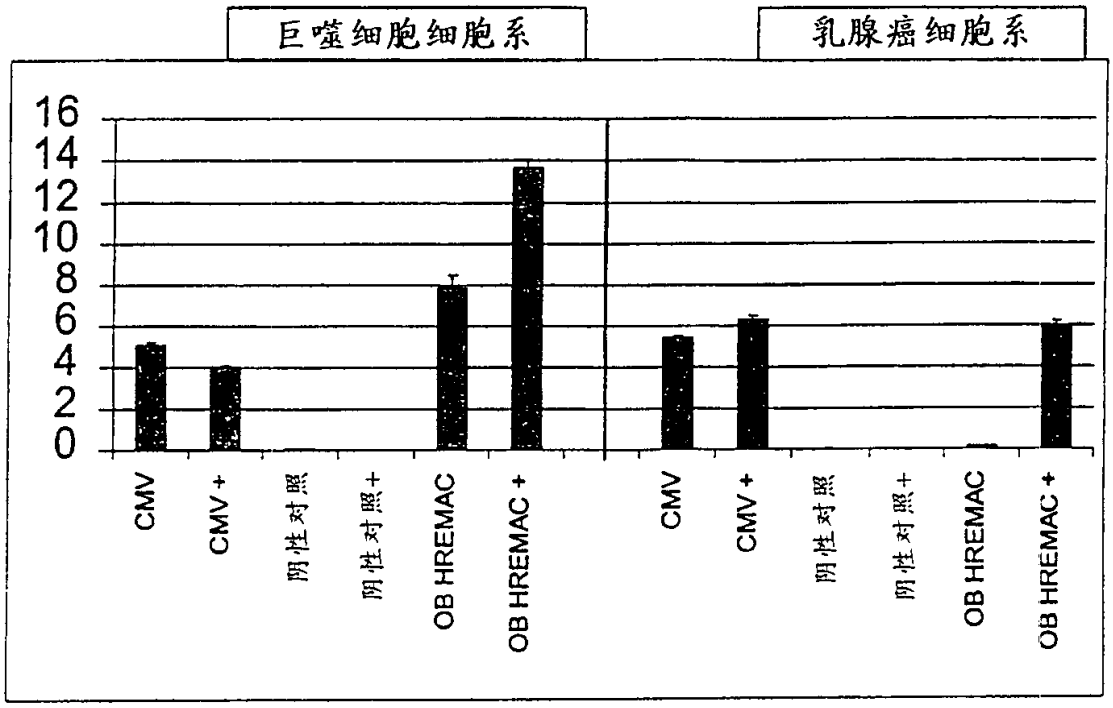

巨噬细胞细胞系
乳腺癌细胞系
16
14
12
10
8
6
4
2
0
CMV
CMV +
阴性对照
阴性对照+
OB HREMAC
OB HREMAC +
CMV
CMV +
阴性对照
阴性对照+
OB HREMAC
OB HREMAC +

图 9

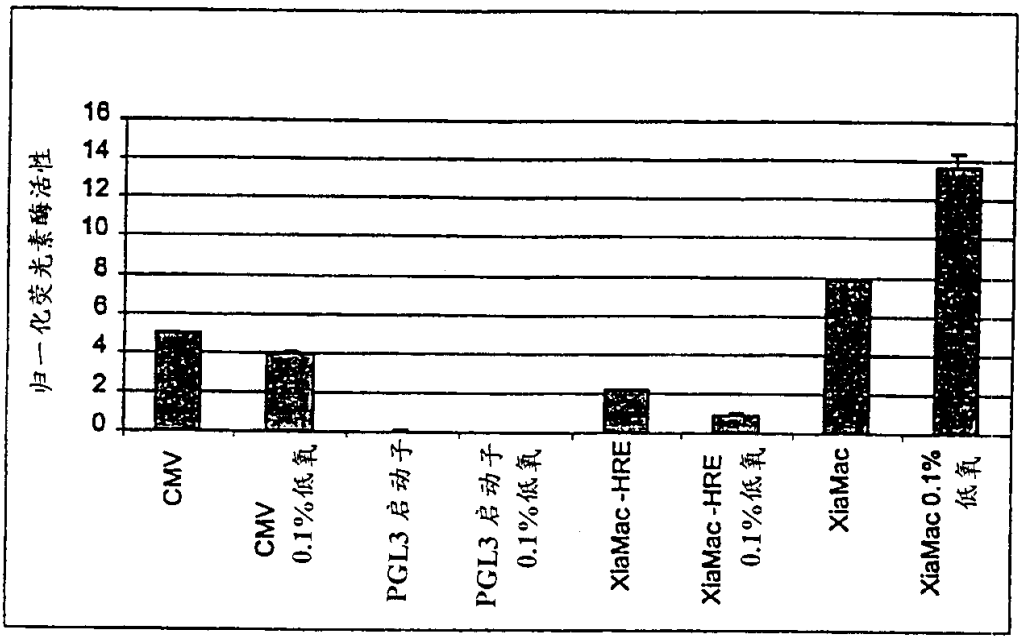
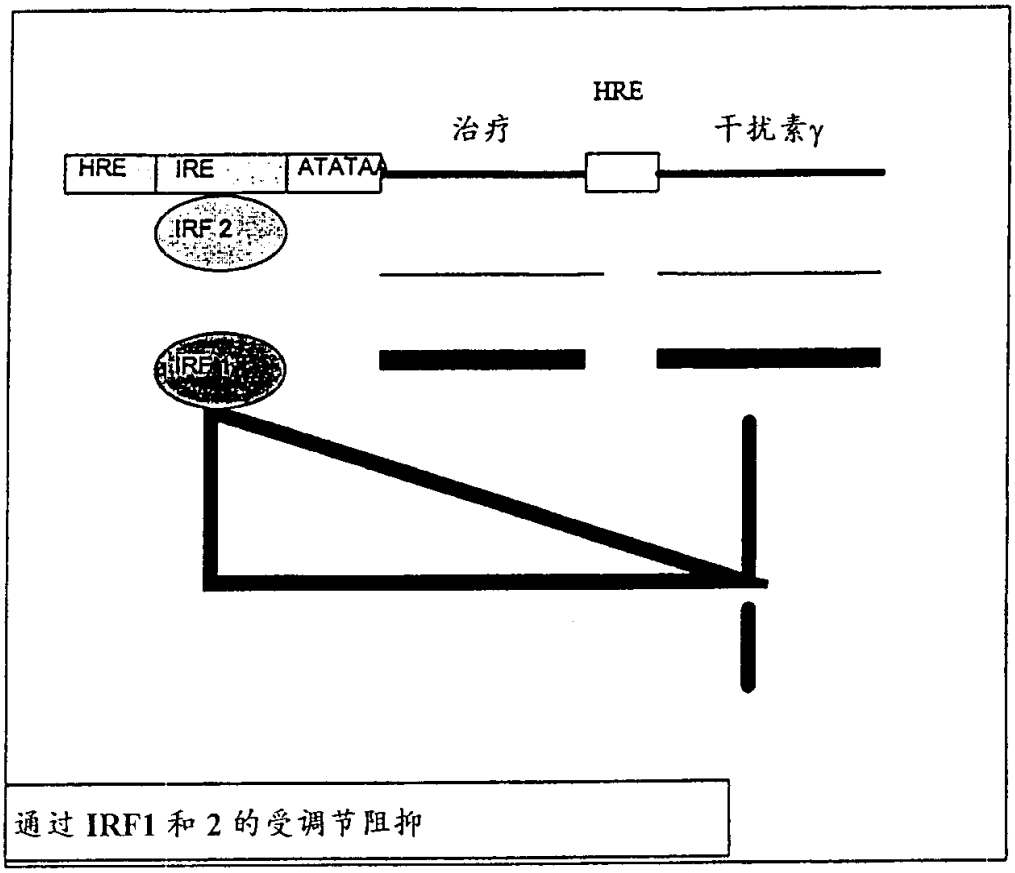

归一化荧光素酶活性
16
14
12
10
8
6
4
2
0
CMV
CMV 0.1%低氧
PGL3 启动子
PGL3 启动子 0.1%低氧
XlaMac -HRE
XlaMac -HRE 0.1%低氧
XlaMac
XlaMac 0.1% 低氧

图 10



通过 IRF1 和 2 的受调节阻抑

图 11

XiaMac-IRE序列

GCTAGAGTCGTGCAGGACGTGACATCTAGTGTCGTGCAGGACGTGACA

HRE HRE

TCTAGTGTCGTGCAGGACGTGACAGCTAGCATTCCATCACGTGGCCCG

HRE NF-IL6

AGAGAAGCATCCGGAGTACTACAAGGACTGCTGACAGCGAGATTTCTA

CAAGGGACTTTCCGCTGGGGACTTTCCAGGGAGGTGTGGCCTGGGCG

NFkB NFkB SP1 SP1

GGACTGGGGAGTGGC *AAGTGAAAGTGAAAGTGAAAGTGA*

SP1 IRE IRE IRE IRE

GAGCCCTCAGATGCTGCATATAAGCAGCTGCTTTTGCCC

图 12 HRE 调节的内皮细胞特异性慢病毒载体的结构

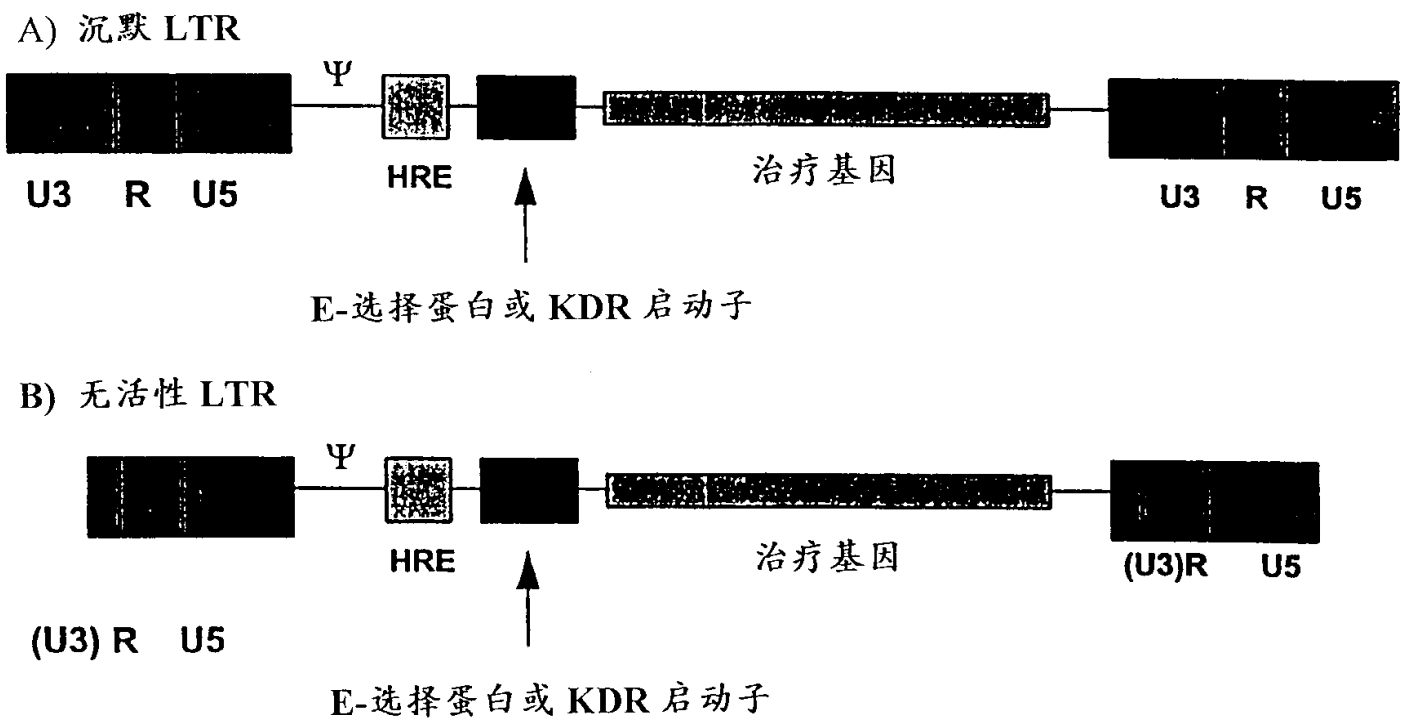


图 13

WTPGK18+++

(Nhe1)
5' CTA GCT GTC ACG TCC TGC ACG ACA CTA GAT GTC ACG TCC TGC
GA CAG TGC AGG ACG TGC TGT GAT CTA CAG TGC AGG ACG

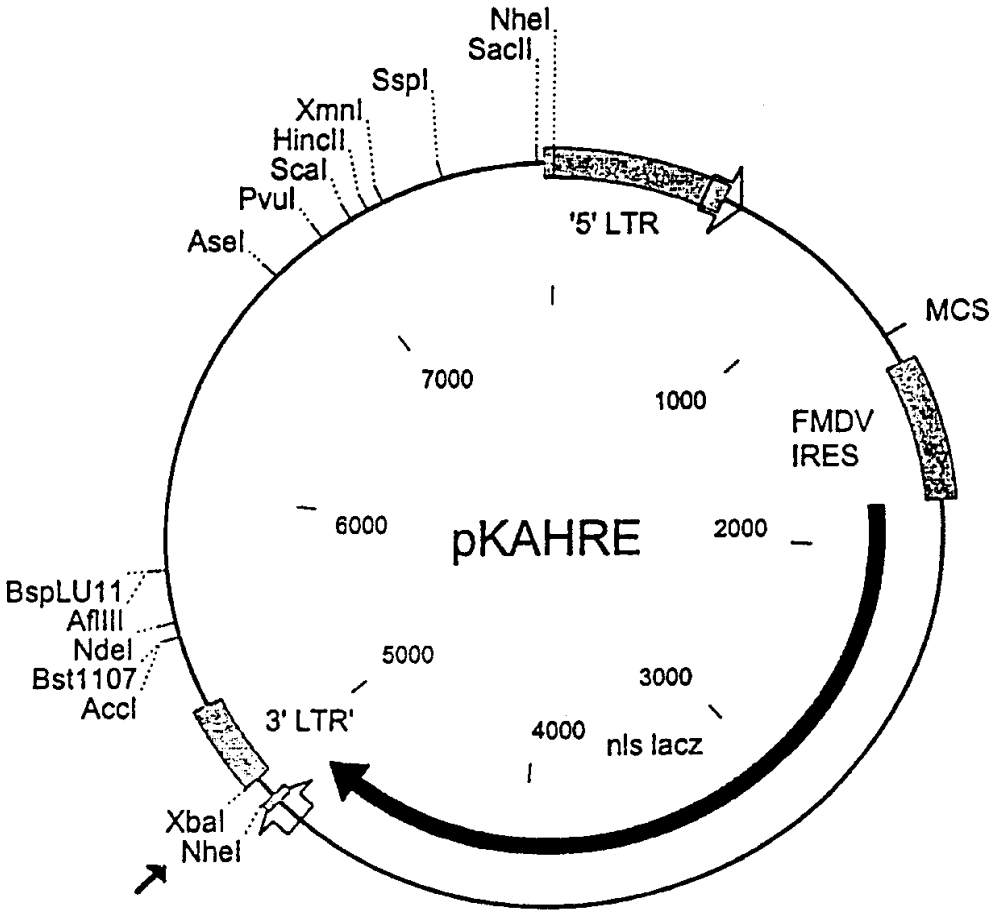
AGG ACA CTA GAT GTC ACG TCC TGC ACG ACT
TGC TGT GAT CTA CAG TGC AGG ACG TGC TGA GAT C 3'
(Xba1)

MUT PGK18+++

(Nhe1)
5' CTA GCT GTC CAT TCC TGC ACG ACA CTA GAT GTC CAT TCC TGC
GA CAG GTA AGG ACG TGC TGT GAT CTA CAG GTA AGG ACG

ACG ACA CTA GAT GTC CAT TCC TGC ACG ACT
TGC TGT GAT CTA CAG GTA AGG ACG TGC TGA GAT C 3'
(Xba1)

图 14



PGK 低氧效应增强子的三联体

用 PGK 低氧效应元件取代内源病毒增强子的反转录病毒载体。

图 15a

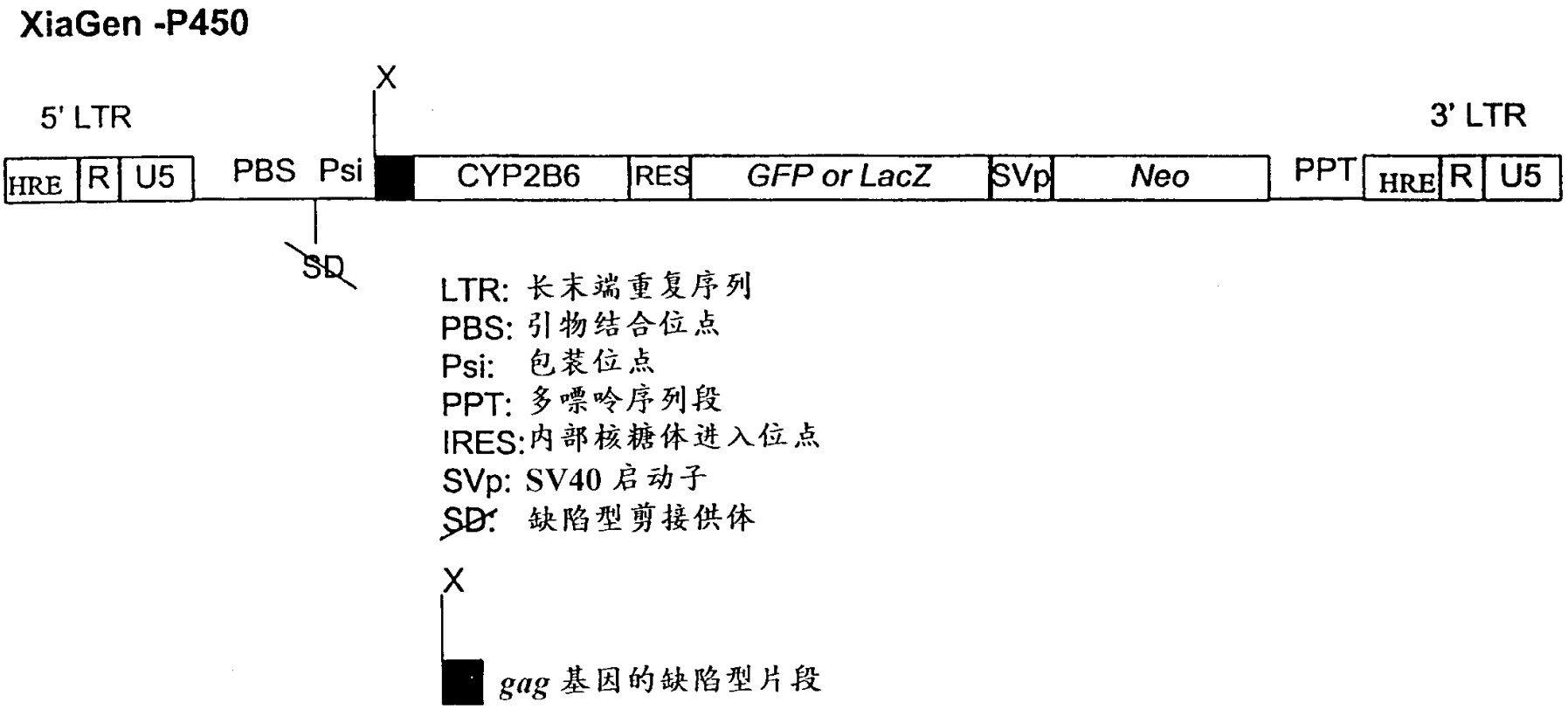
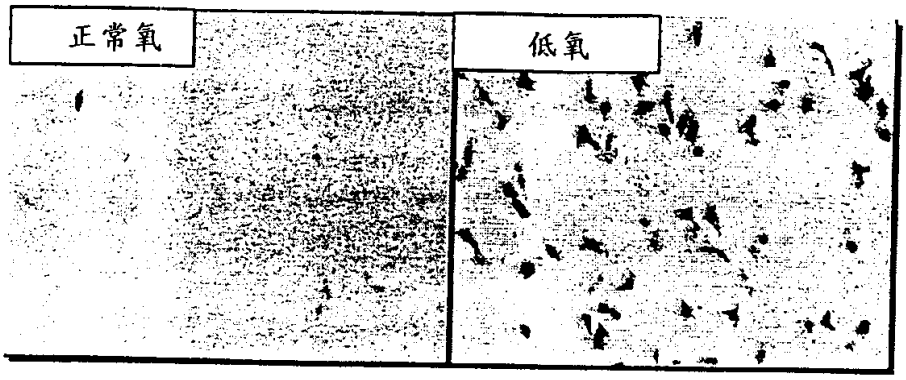

XiaGen -P450
X
5' LTR
3' LTR
HRE
R
U5
PBS
Psi
CYP2B6
RES
GFP or LacZ
SVp
Neo
PPT
HRE
R
U5
SD
LTR: 长末端重复序列
PBS: 引物结合位点
Psi: 包装位点
PPT: 多嘌呤序列段
IRES:内部核糖体进入位点
SVp: SV40 启动子
SD: 缺陷型剪接供体
X
gag 基因的缺陷型片段

图 15b



用 Xiavector 反转录病毒转导的 HT1080 细胞中β-半乳糖苷酶的低氧诱导。

图 16a

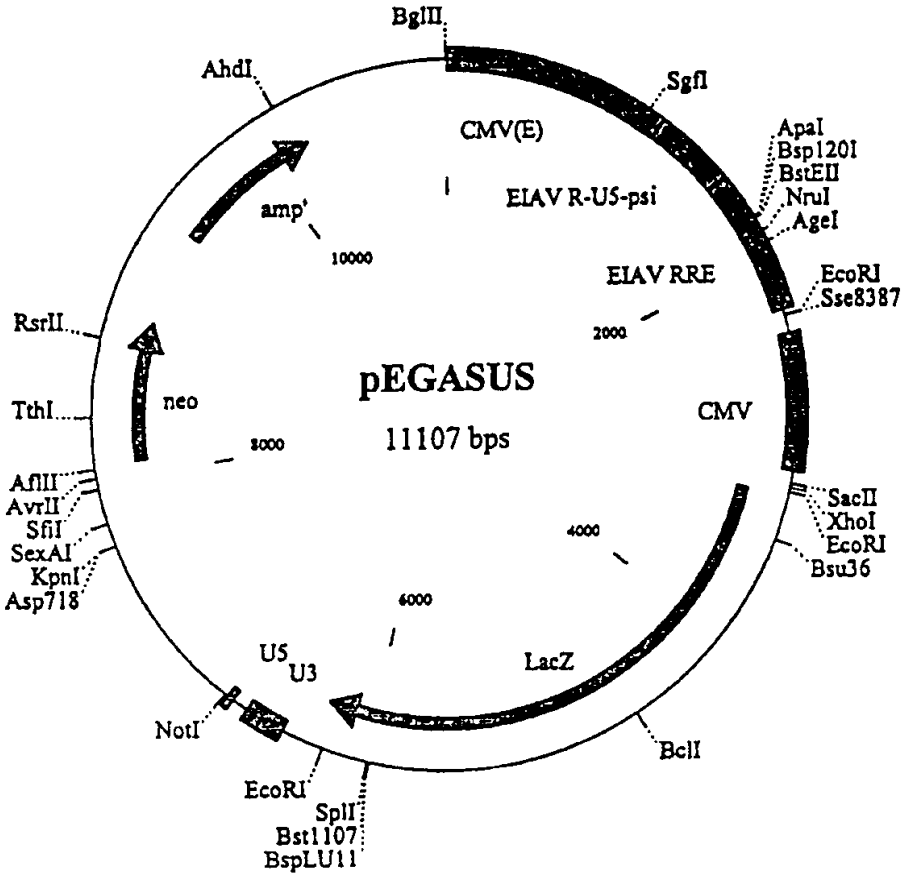

pEGASUS
11107 bps
BglII
SgfI
ApaI
Bsp120I
BstEII
NruI
AgeI
EcoRI
Sse8387
SacII
XhoI
EcoRI
Bsu36
BclI
LacZ
CMV
CMV(E)
EIAV R-U5-psi
EIAV RRE
amp'
neo
U5
U3
NotI
EcoRI
SpII
Bst1107
BspLU11
AflII
AvrII
SfiI
SexAI
KpnI
Asp718
TthI
RsrII
AhdI
2000
4000
6000
8000
10000

图 16b

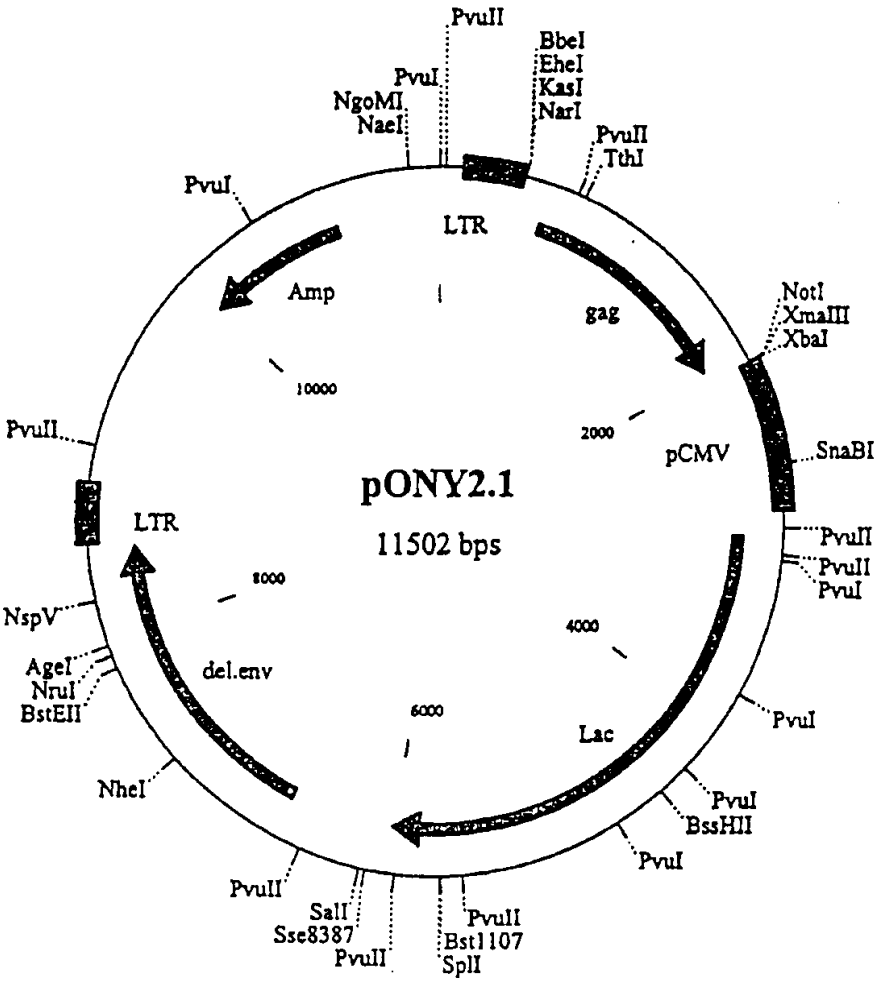

pONY2.1
11502 bps
LTR
gag
pCMV
SnaBI
Lac
del.env
Amp
LTR
PvuII
PvuII
BbeI
EheI
KasI
NarI
PvuII
TthI
NotI
XmaIII
XbaI
PvuII
PvuII
PvuI
PvuI
BssHII
PvuI
PvuI
PvuII
SalI
Sse8387
PvuII
PvuII
Bst1107
SplI
NheI
NspV
AgeI
NruI
BstEII
PvuI
PvuI
NgoMI
NaeI
PvuI
PvuI
10000
2000
4000
6000
8000

图 16c

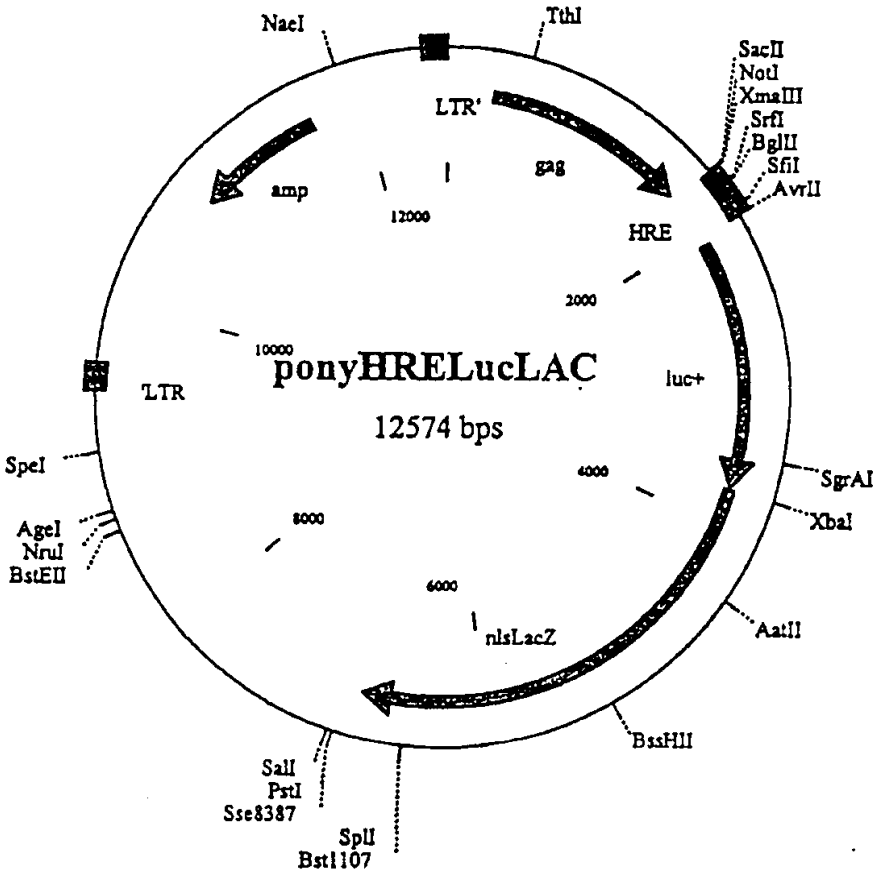

NaeI
TthI
SacII
NotI
XmaIII
SrfI
BglII
SfiI
AvrII
LTR'
gag
amp
12000
HRE
2000
10000
ponyHRELucLAC
12574 bps
LTR
luc+
SpeI
4000
SgrAI
XbaI
AgeI
NruI
BstEII
8000
6000
nlsLacZ
AatII
BssHII
SalI
PstI
Sse8387
SpII
Bst1107

图 16d

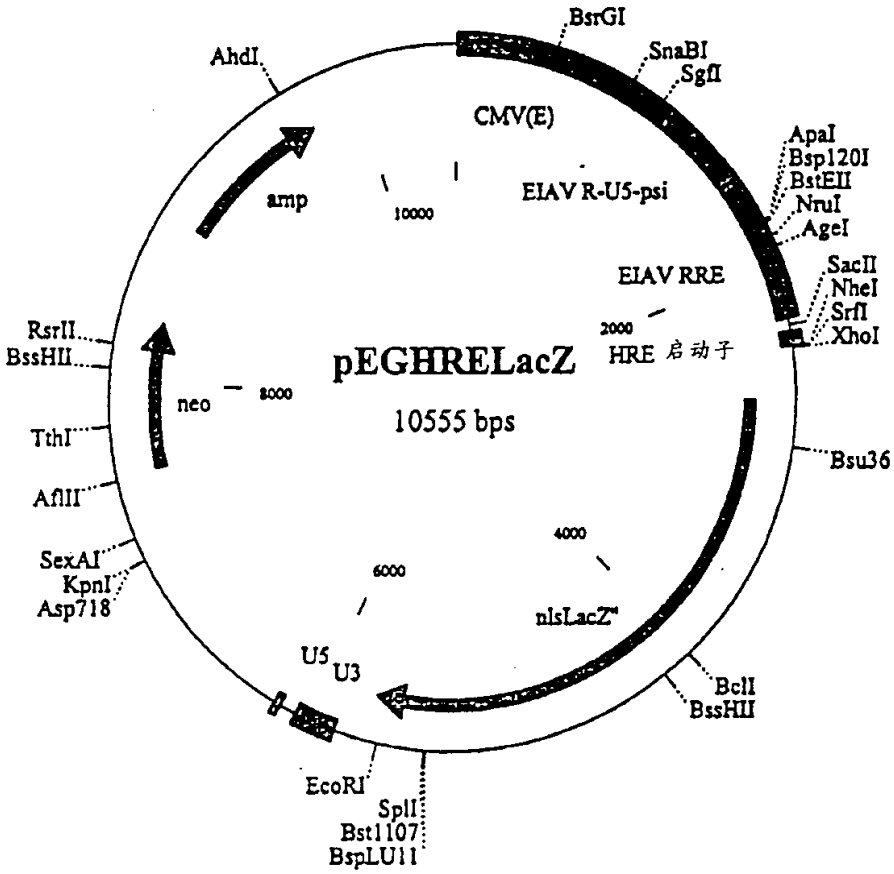
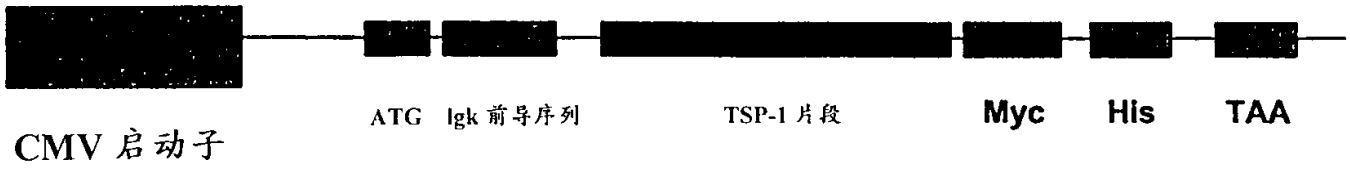
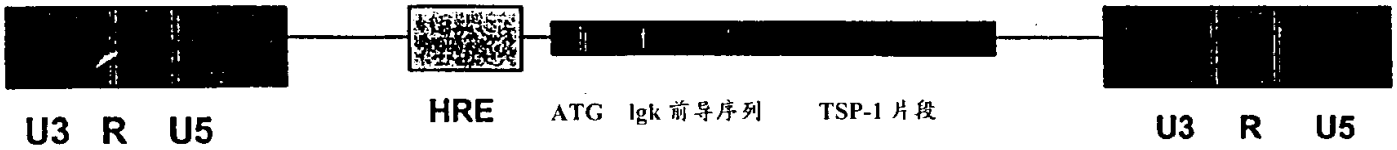

BsrGI
SnaBI
SgfI
AhdI
CMV(E)
ApaI
Bsp120I
BstEII
NruI
AgeI
amp
10000
EIAV R-U5-psi
EIAV RRE
SacII
NheI
SrfI
XhoI
2000
HRE 启动子
RsrII
BssHII
pEGHRELacZ
neo
8000
10555 bps
TthI
Bsu36
AflII
4000
SexAI
KpnI
Asp718
6000
nlsLacZ"
U5
U3
BclI
BssHII
EcoRI
SpII
Bst1107
BspLU11

图 17

pSecTSP-1



pEGHRE-TSP1



pEGHRE-SIN-TSP1

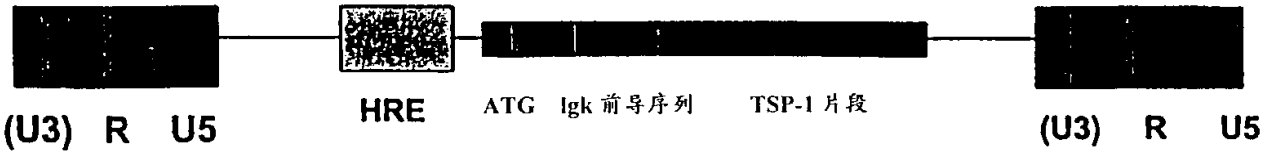


图 18

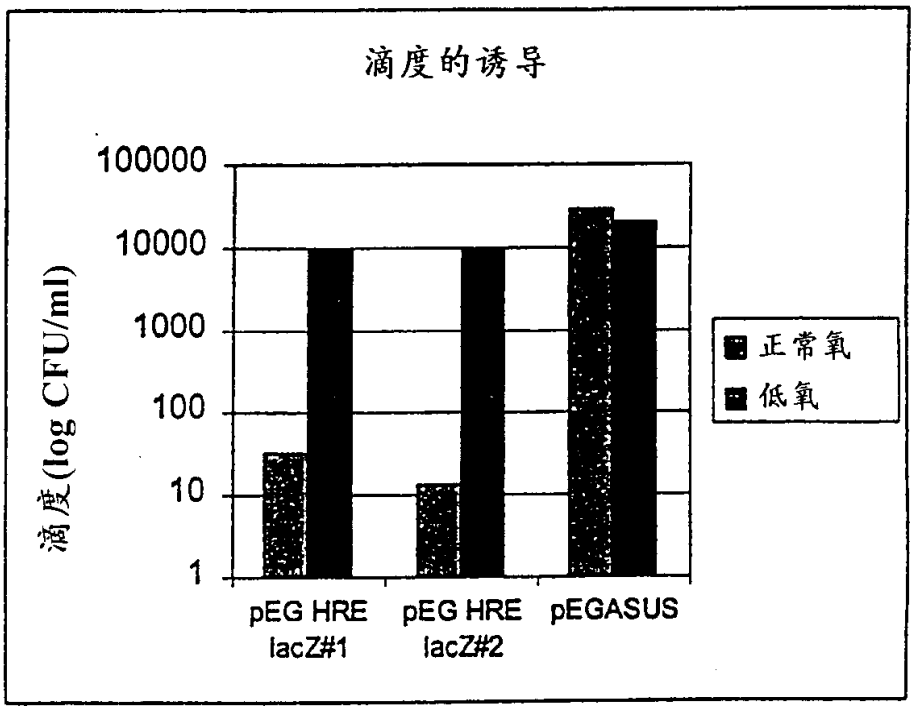

滴度的诱导
滴度(log CFU/ml)
100000
10000
1000
100
10
1
pEG HRE lacZ#1
pEG HRE lacZ#2
pEGASUS
正常氧
低氧

图 19

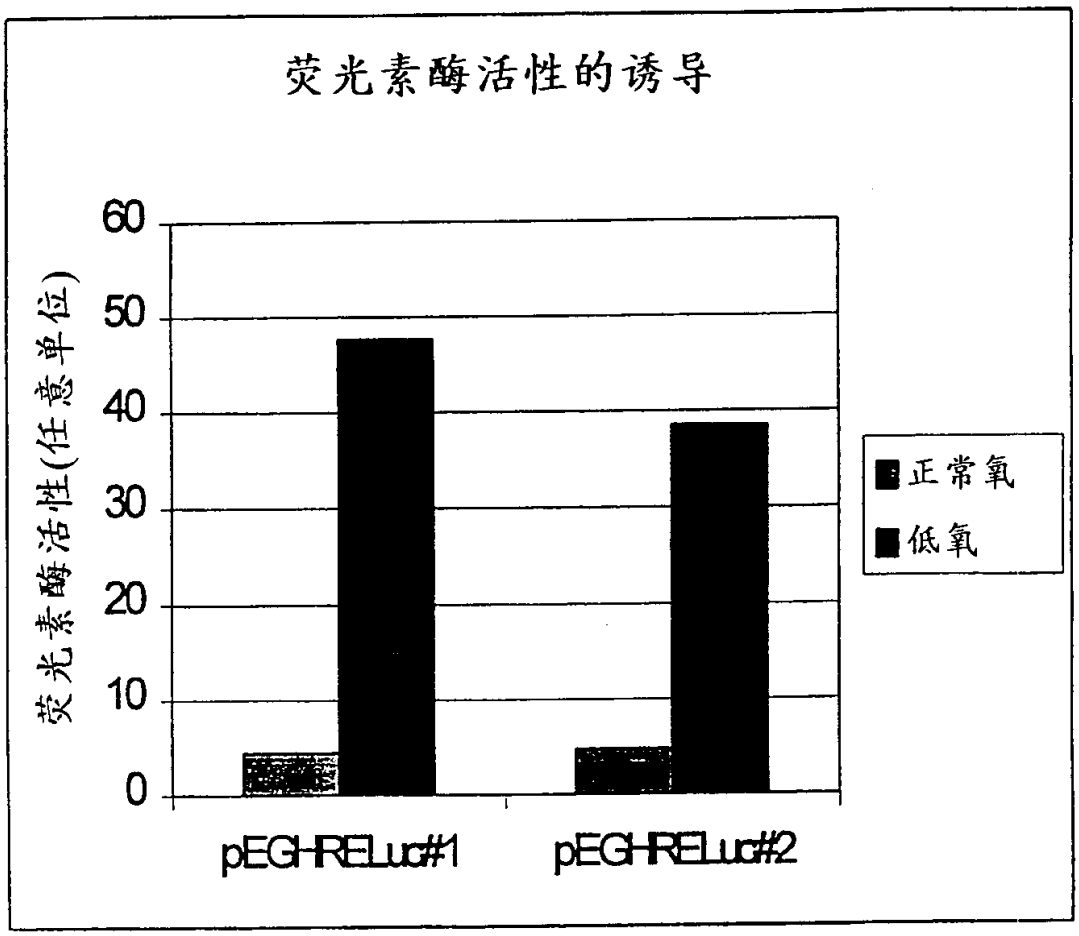
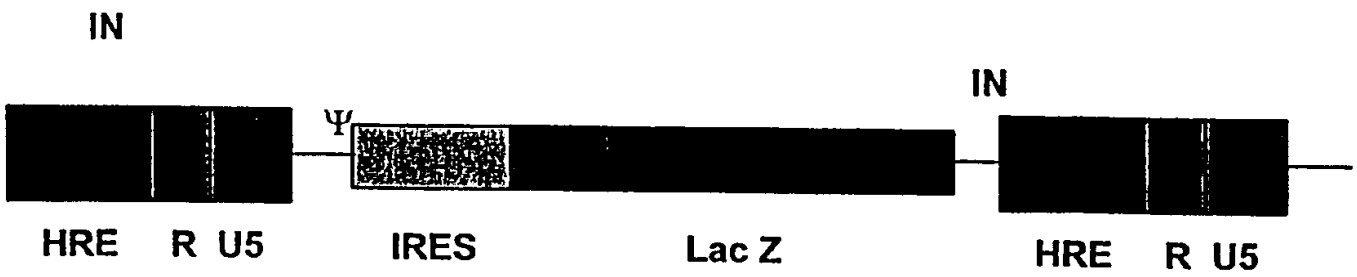

荧光素酶活性的诱导
荧光素酶活性(任意单位)
60
50
40
30
20
10
0
pEGHRELuc#1
pEGHRELuc#2
正常氧
低氧

图 20a

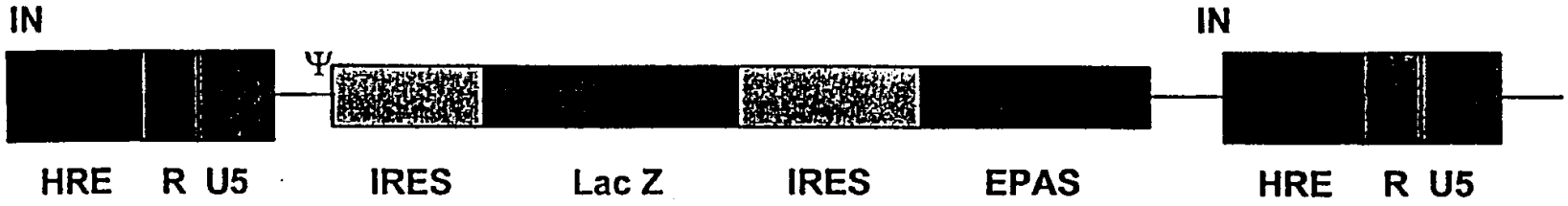
作为单一转录单位构建的低氧效应 EIAV 载体



IN = 通过 EIAV 整合酶整合的位点
HRE = 低氧效应元件
IRES = 内部核糖体进入位点
R = 反转录所需的重复
U5 = EIAV LTR 的部分
Ψ = 包装位点

图 20b

作为单一转录单位构建的低氧效应自身调节 EIAV 载体



IN = 通过 EIAV 整合酶整合的位点
HRE = 低氧效应元件
IRES = 内部核糖体进入位点
R = 反转录所需的重复
U5 = EIAV LTR 的部分
Ψ = 包装信号
E-PAS = 内皮细胞 PAS 基因

转移载体(显示线性的)
腺病毒核苷酸

图 21

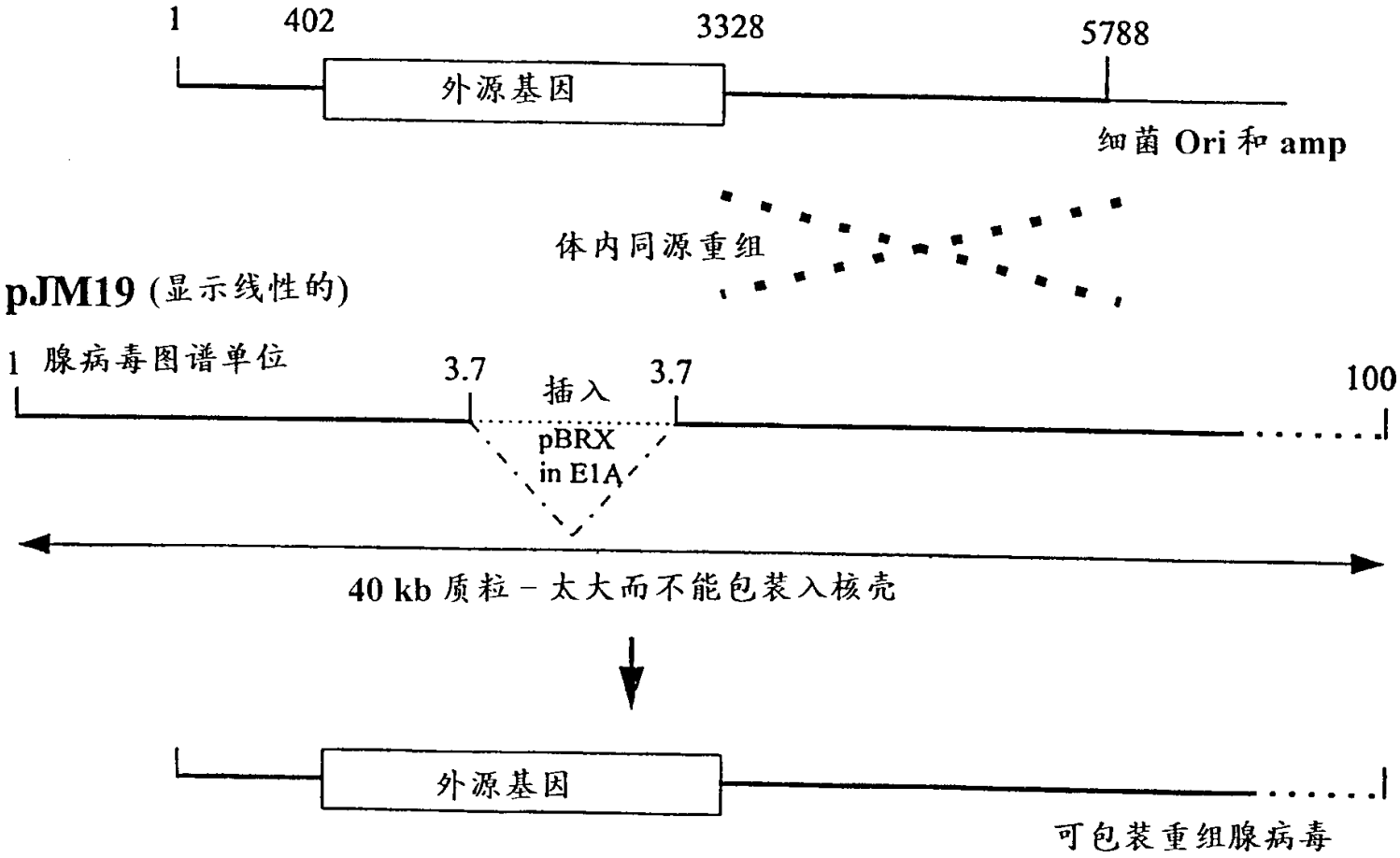
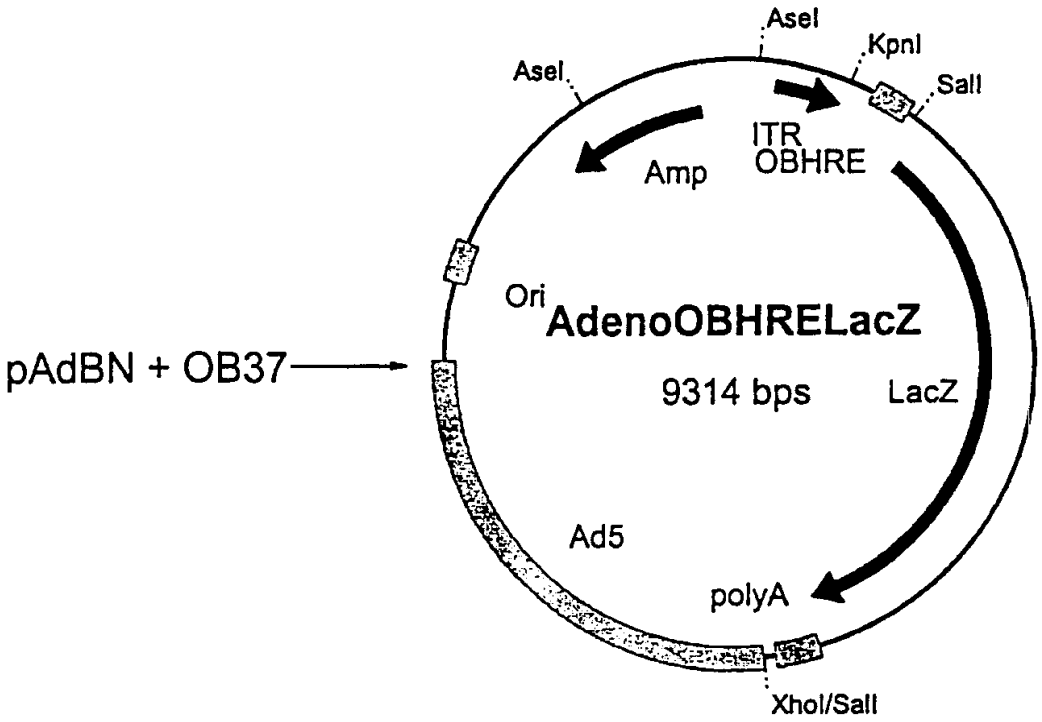
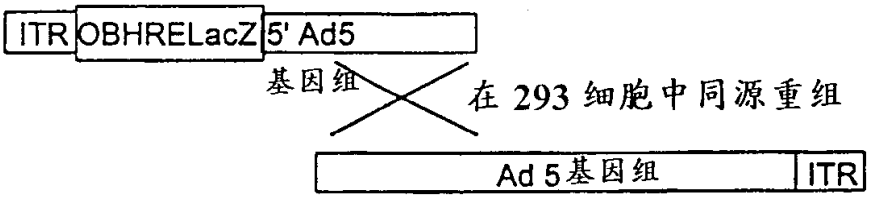


图 22



↓ AseI 消化和与 Ad5 基因组共同转染入 293 细胞



↓ 重组腺病毒的重复噬斑纯化



AdHRE LacZ

图 23

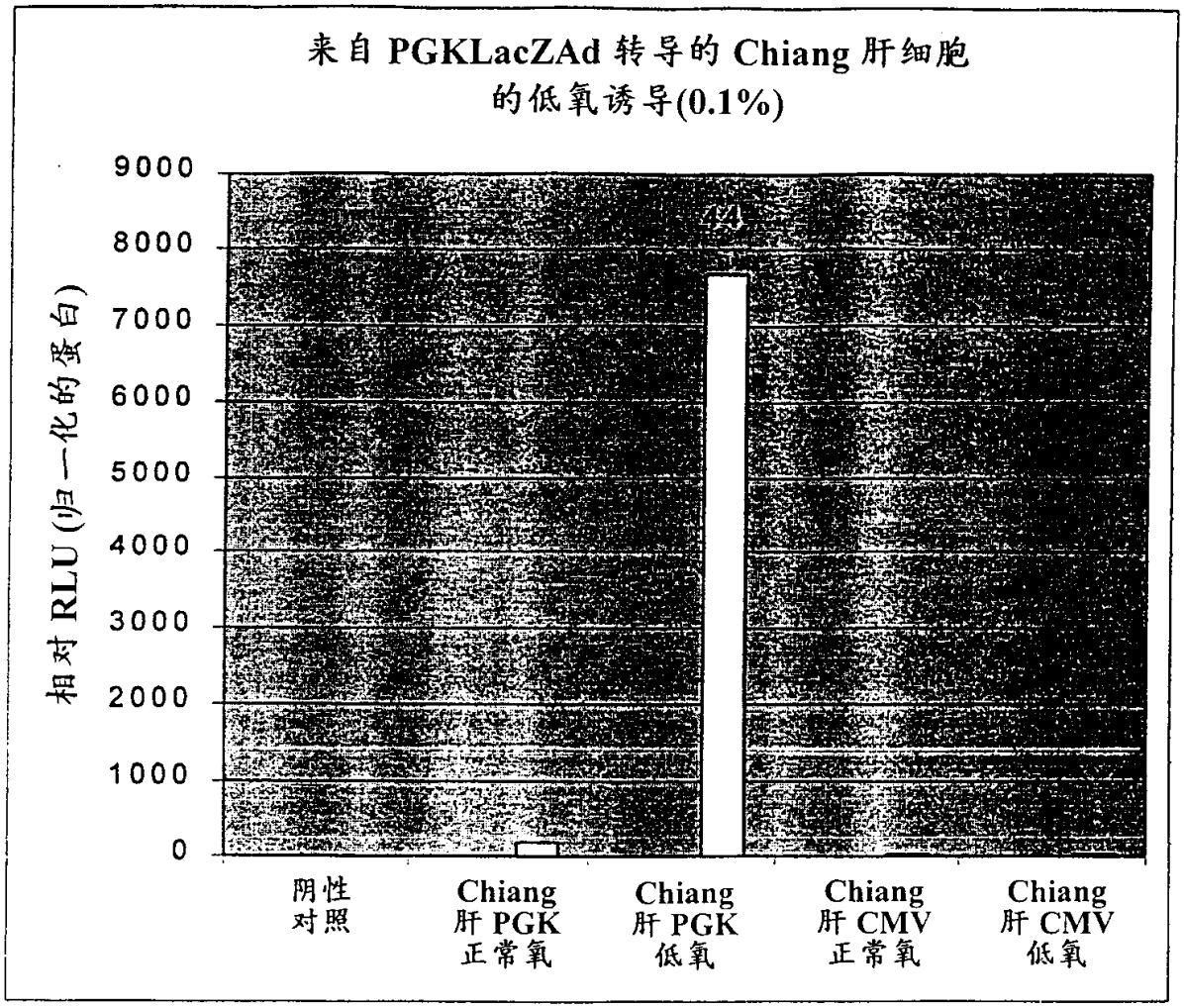

来自 PGKLacZAd 转导的 Chiang 肝细胞
的低氧诱导(0.1%)
相对 RLU (归一化的蛋白)
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
阴性
对照
Chiang
肝 PGK
正常氧
Chiang
肝 PGK
低氧
Chiang
肝 CMV
正常氧
Chiang
肝 CMV
低氧

图 24

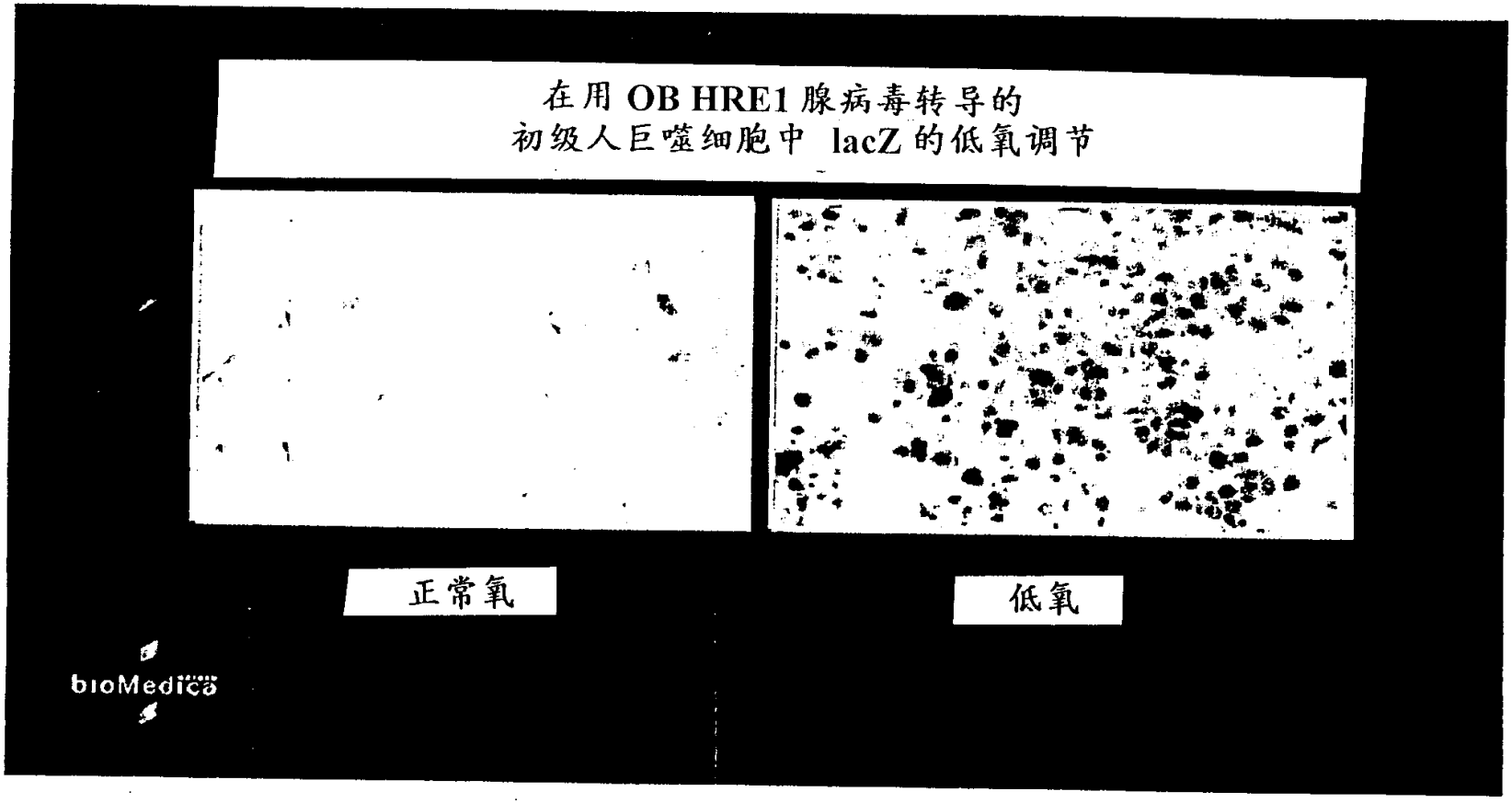


图 25a

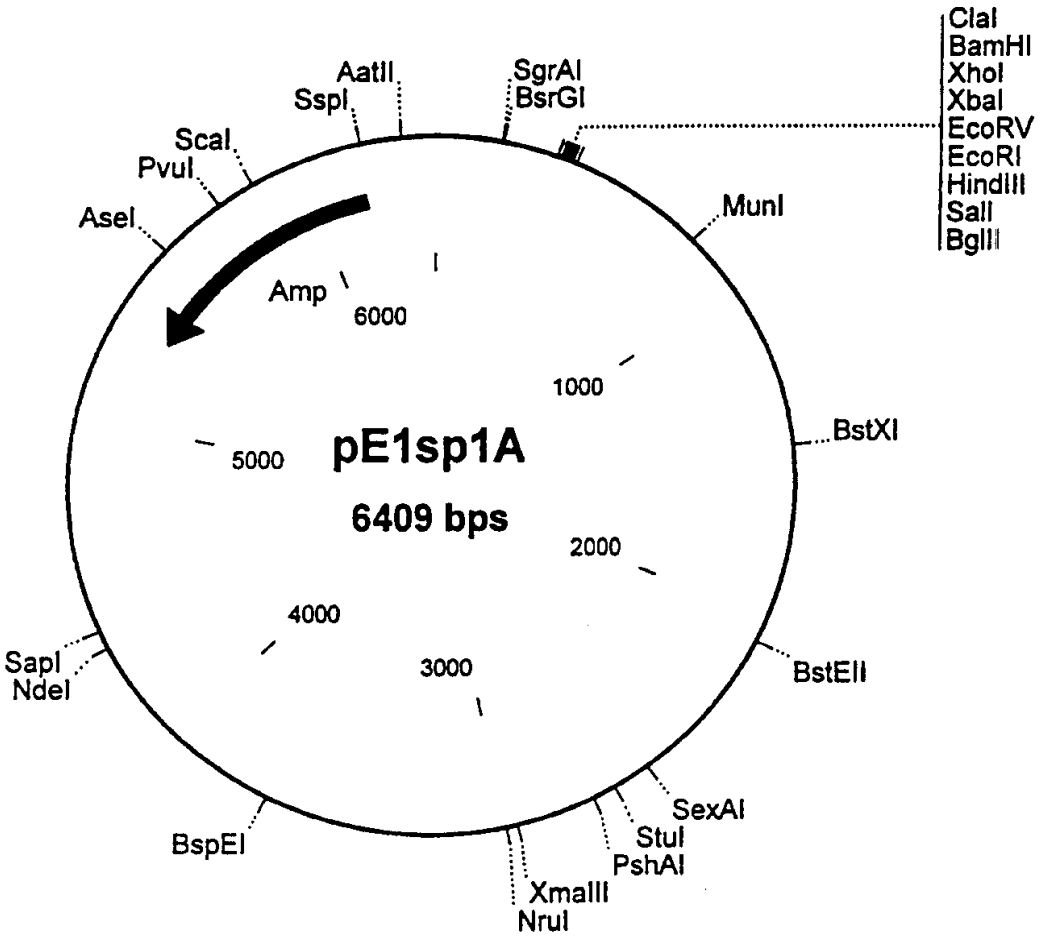

ClaI
BamHI
XhoI
XbaI
EcoRV
EcoRI
HindIII
SalI
BglII
AatII
SspI
SgrAI
BsrGI
ScaI
PvuI
AseI
MunI
Amp
6000
1000
5000
pE1sp1A
6409 bps
BstXI
2000
4000
3000
SapI
NdeI
BstEII
SexAI
StuI
PshAI
BspEI
XmaIII
NruI

图 25b

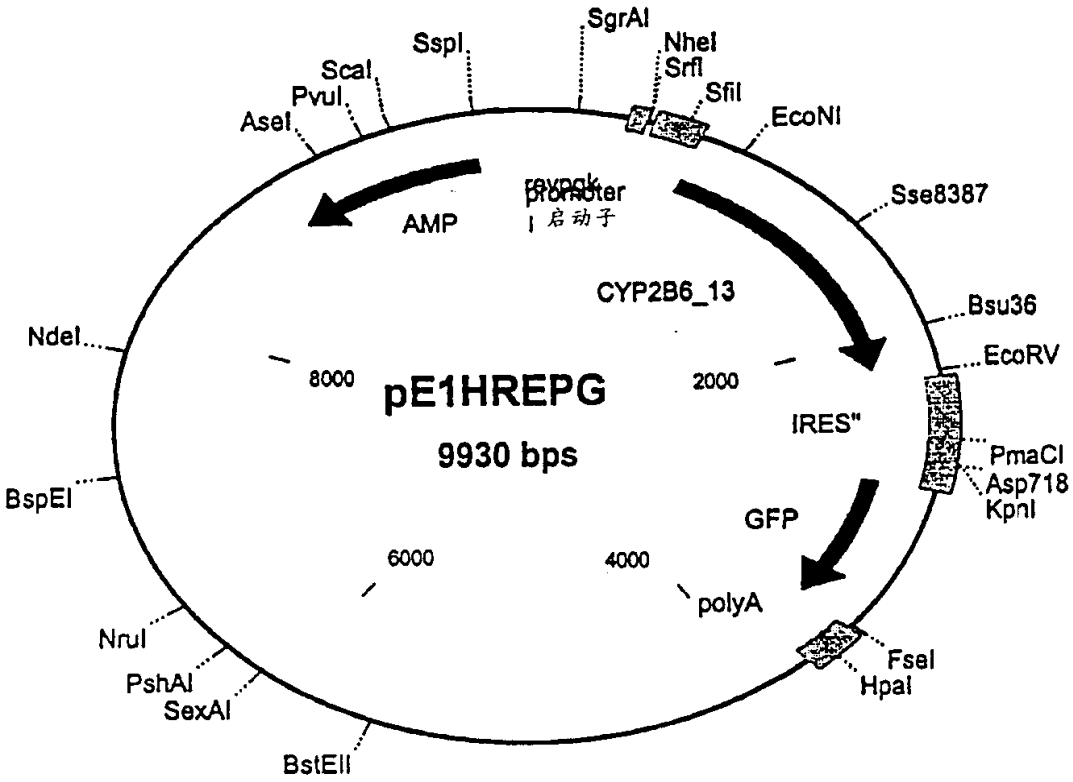

SgrAI
SspI
NheI
SrfI
ScaI
PvuI
SfiI
AseI
EcoNI
Sse8387
AMP
promoter
启动子
CYP2B6_13
Bsu36
NdeI
8000
pE1HREPG
2000
EcoRV
IRES"
9930 bps
PmaCI
Asp718
KpnI
BspEI
GFP
6000
4000
polyA
NruI
FseI
PshAI
HpaI
SexAI
BstEII

图 25c

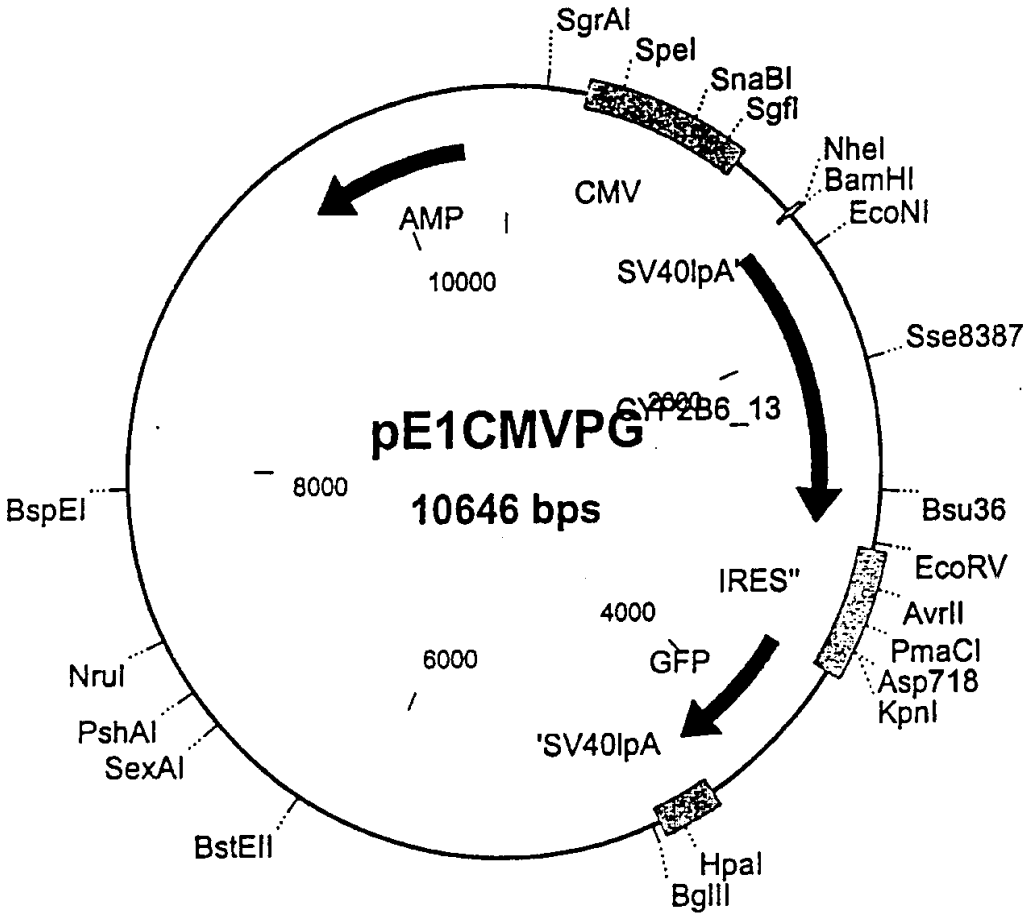

SgrAI
SpeI
SnaBI
SgfI
NheI
BamHI
EcoNI
Sse8387
Bsu36
EcoRV
AvrII
PmaCI
Asp718
KpnI
HpaI
BglII
BstEII
NruI
PshAI
SexAI
BspEI
CMV
AMP
10000
SV40lpA
pE1CMVPG
10646 bps
8000
IRES"
4000
6000
GFP
'SV40lpA

图 26

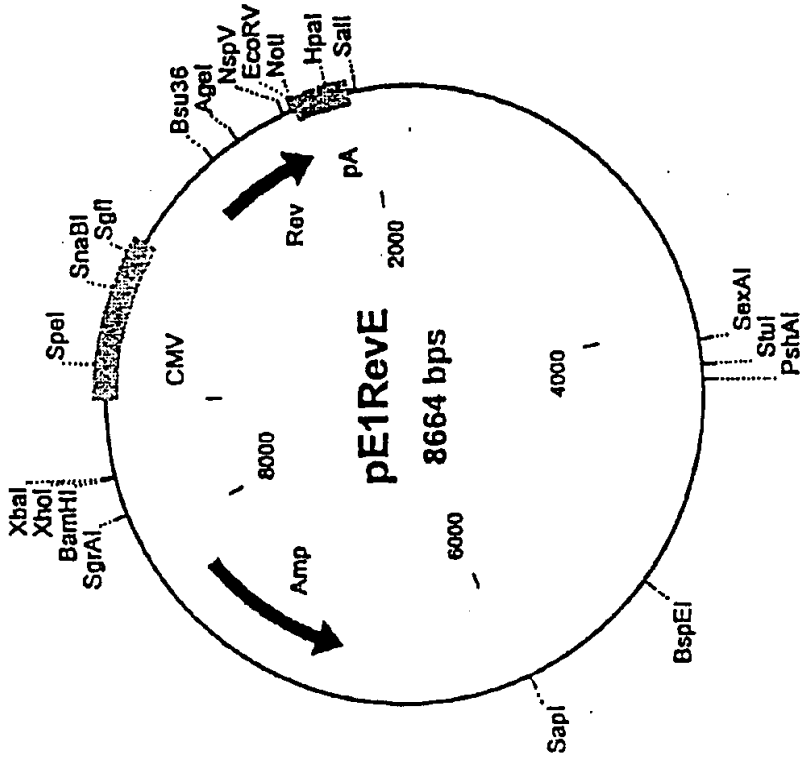

pE1RevE
8664 bps
CMV
Rev
pA
Amp
2000
4000
6000
8000
Bsu36
AgeI
NspV
EcoRV
NotI
HpaI
SalI
SnaBI
SgfI
SpeI
XbaI
XhoI
BamHI
SgrAI
SapI
BspEI
SexAI
StuI
PshAI

图 27

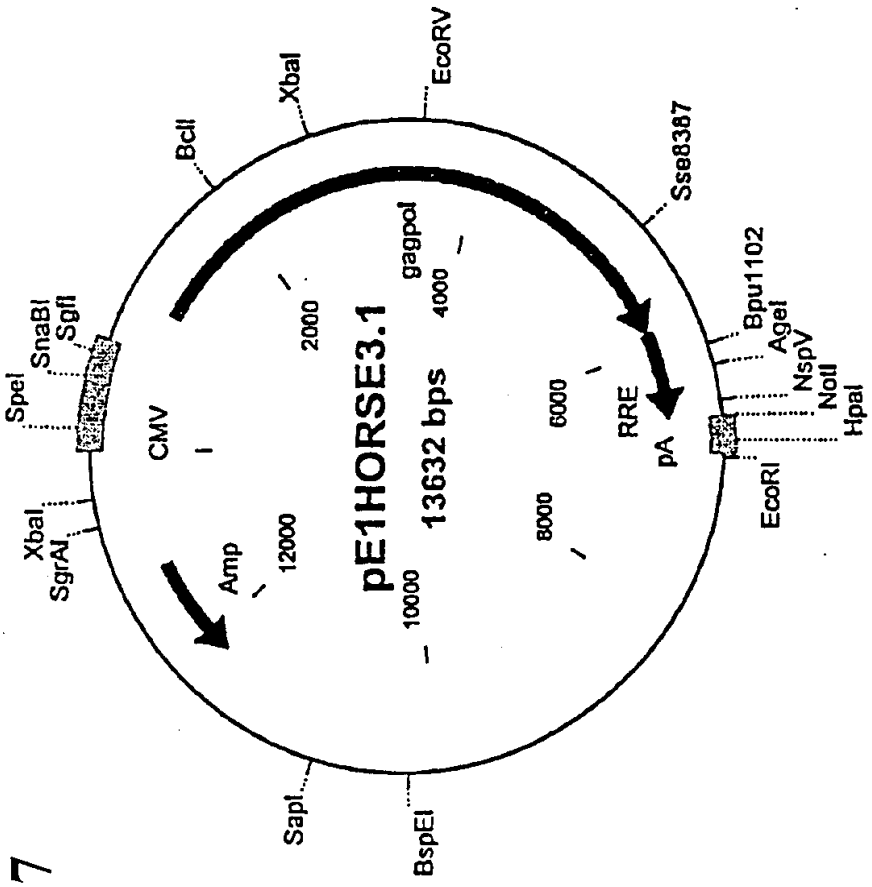

pE1HORSE3.1
13632 bps
CMV
gagpol
RRE
pA
Amp
2000
4000
6000
8000
10000
12000
EcoRV
XbaI
BclI
Sse8387
Bpu1102
AgeI
NspV
NotI
HpaI
EcoRI
BspEI
SapI
XbaI
SgrAI
SpeI
SnaBI
SgfI

图 28

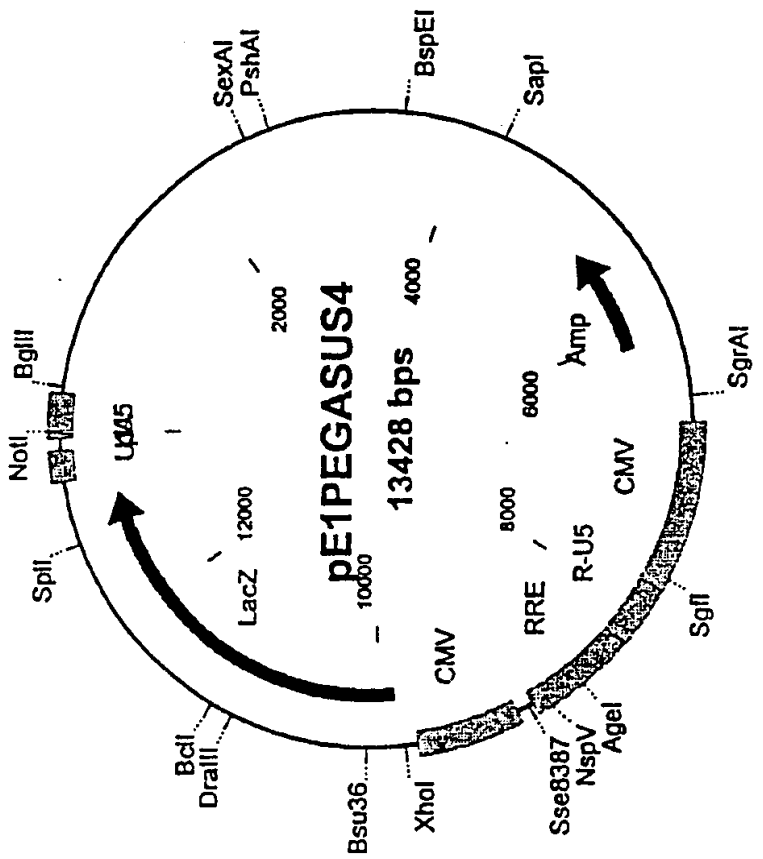

pE1PEGASUS4
13428 bps
2000
4000
6000
8000
10000
12000
SexAI
PshAI
BspEI
SapI
SgrAI
SgfI
CMV
R-U5
RRE
λmp
LacZ
U145
BglII
NotI
SpiI
BclI
DraIII
Bsu36
XhoI
Sse8387
NspV
AgeI

图 29

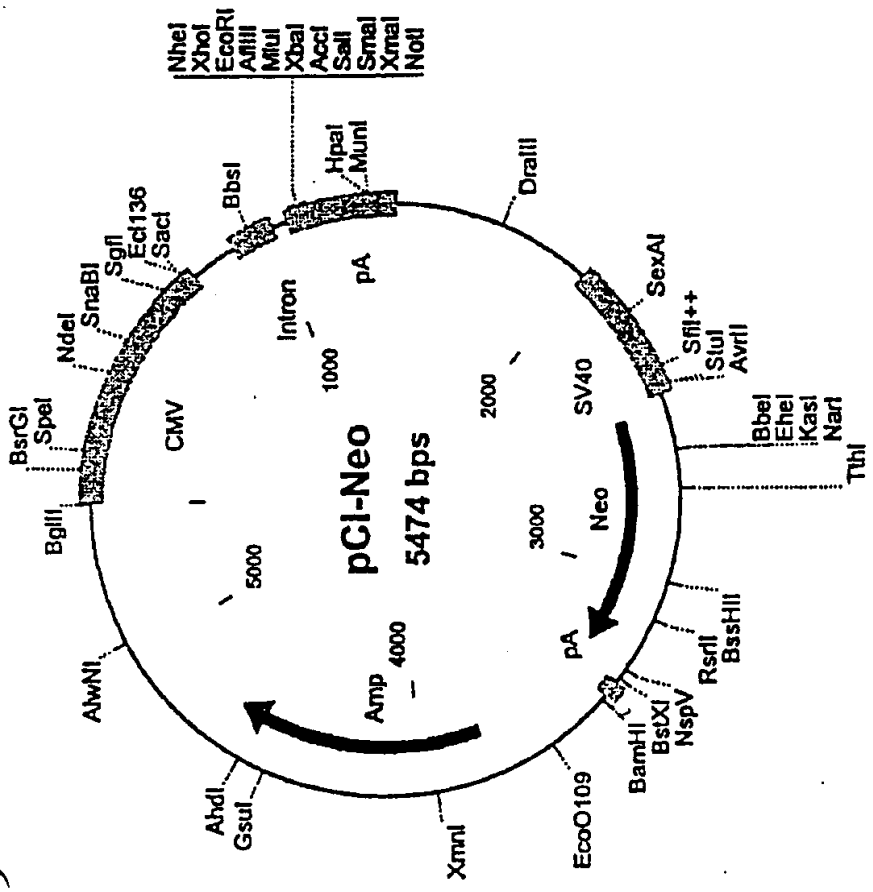

pCI-Neo
5474 bps
CMV
Intron
pA
SV40
Neo
pA
Amp
1000
2000
3000
4000
5000
NheI
XhoI
EcoRI
AflIII
MluI
XbaI
AccI
SalI
SmaI
XmaI
NotI
HpaI
MunI
DraIII
SexAI
SfiI++
StuI
AvrII
BbeI
EheI
KasI
NarI
TthI
BssHII
RsrII
NspV
BstXI
BamHI
EcoO109
XmnI
AhdI
GsuI
AhwNI
BglII
BsrGI
SpeI
NdeI
SnaBI
SgfI
Ecl136
SacI
BbsI

图 30

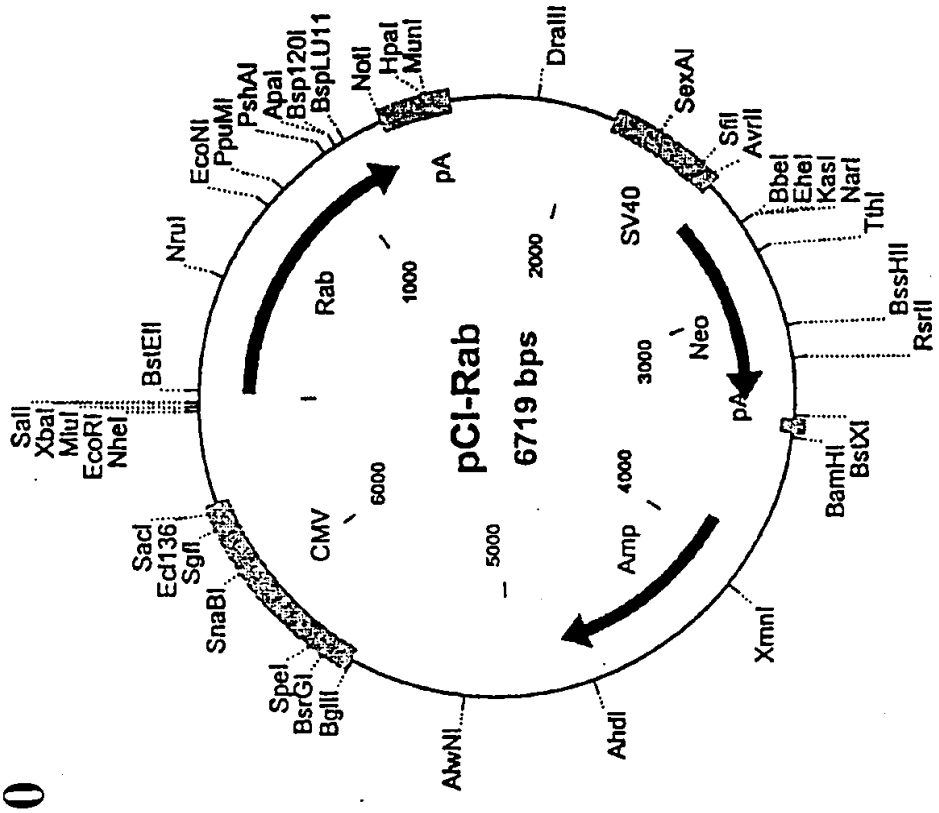

pCI-Rab
6719 bps
Rab
pA
SV40
Neo
pA
Amp
CMV
1000
2000
3000
4000
5000
6000
DraIII
SexAI
SfiI
AvrII
BbeI
EheI
KasI
NarI
TthI
BssHII
RsrII
BamHI
BstXI
XmnI
AhdI
AlwNI
SpeI
BsrGI
BglII
SnaBI
SacI
Ecl136II
SgfI
BstEII
SalI
XbaI
MluI
EcoRI
NheI
NruI
EcoNI
PpuMI
PshAI
ApaI
Bsp120I
BspLU11I
NotI
HpaI
MunI

图 31

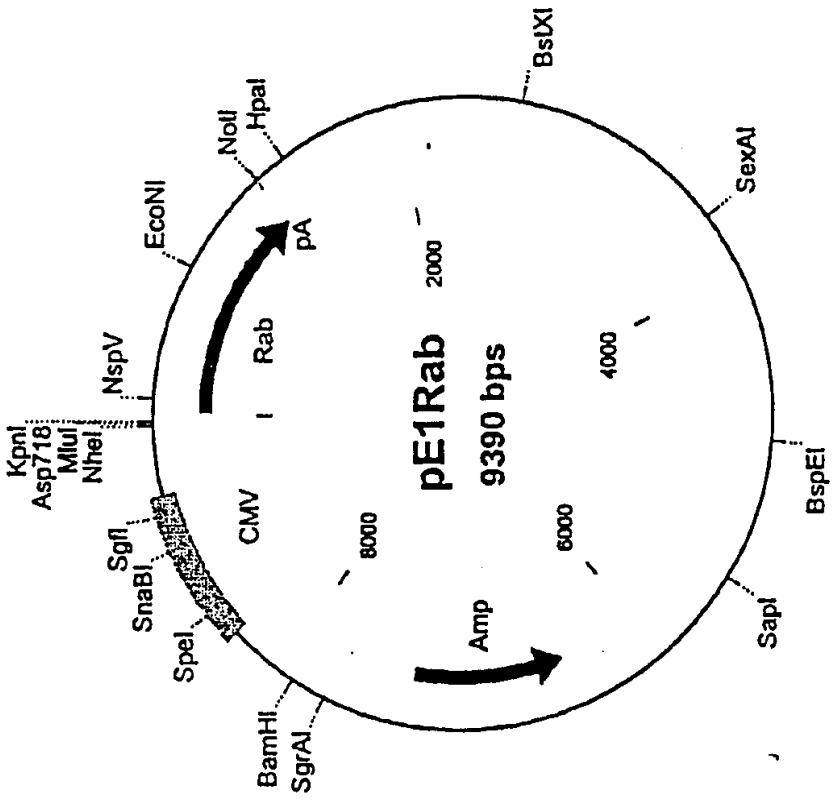
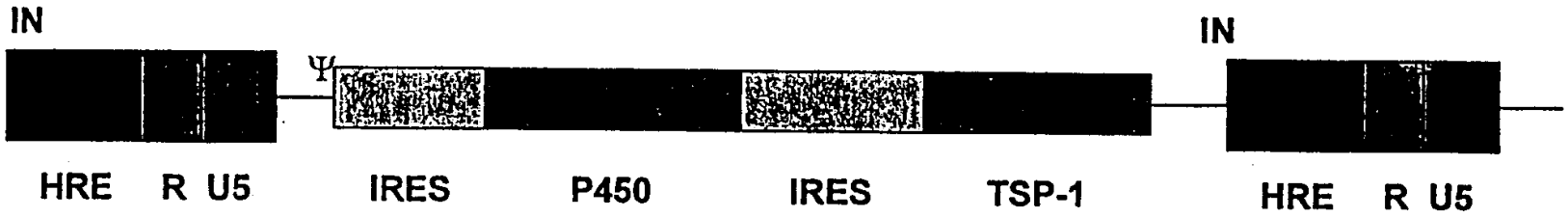

pE1Rab
9390 bps
2000
4000
6000
8000
CMV
Rab
pA
Amp
BsiXI
SexAI
BspEI
SapI
BamHI
SgrAI
SpeI
SnaBI
SgfI
KpnI
Asp718
MluI
NheI
NspV
EcoNI
NotI
HpaI

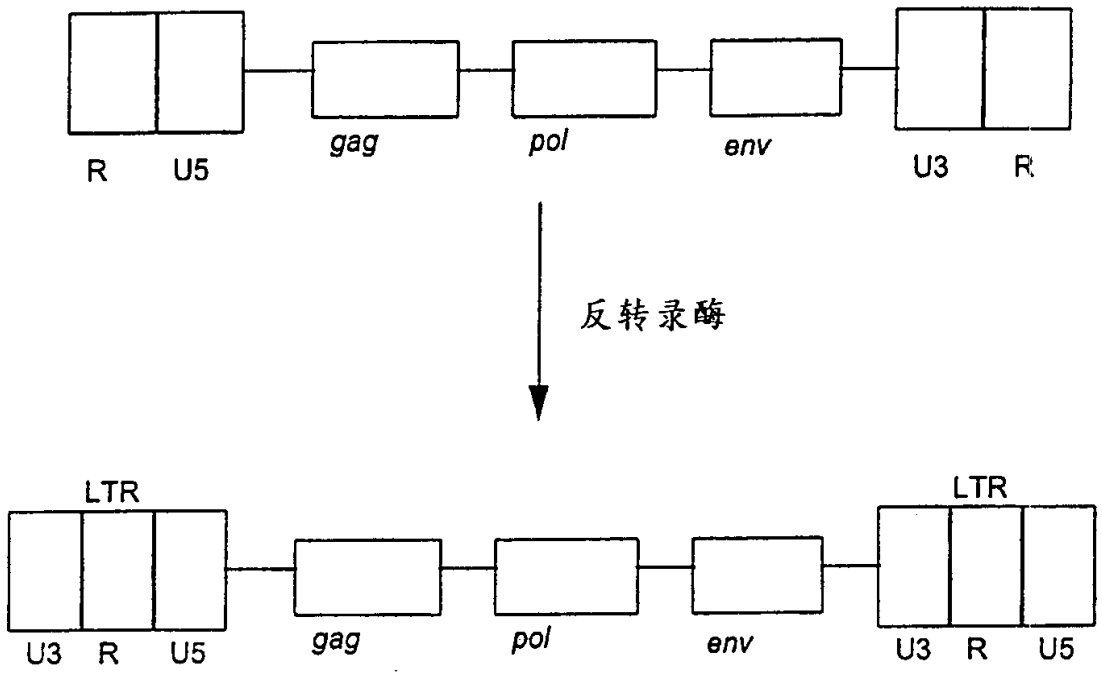
图 32

含两种治疗基因的低氧效应 EIAV 载体

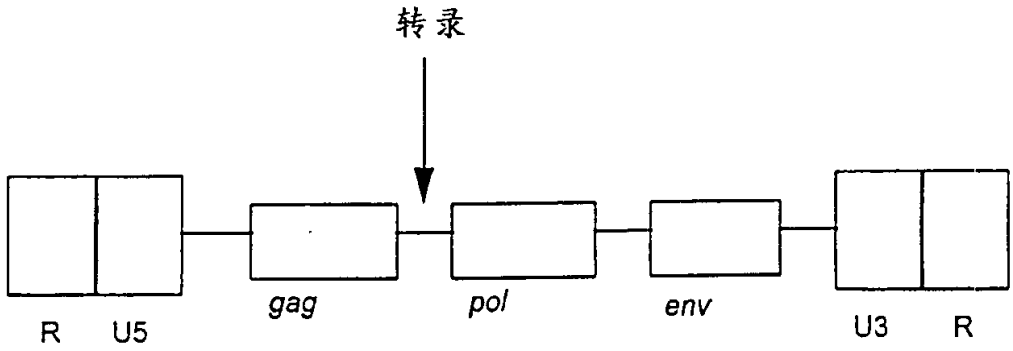


IN = 通过 EIAV 整合酶整合的位点
HRE = 低氧效应元件
IRES = 内部核糖体进入位点
R = 反转录所需的重复
U5 = EIAV LTR 的部分
Ψ = 包装位点
P450 = 人 CYP2B6 基因
TSP-1 = 人血小板反应蛋白-1

图 33　　病毒体 RNA



原病毒



转录物