



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101287834 B

(45)授权公告日 2016. 11. 09

(21)申请号 200680027591.5

(22)申请日 2006.05.26

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 101287834 A

(43)申请公布日 2008.10.15

(30)优先权数据

60/684,954 2005.05.27 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2008.01.28

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2006/002266 2006.05.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02007/000668 EN 2007.01.04

(73)专利权人 圣拉法埃莱医院有限公司

地址 意大利米兰

专利权人 泰莱托恩基金会

(72)发明人 L·纳尔迪尼 B·D·布朗

(74)专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 李波 黄可峻

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

(56)对比文件

刘艳霞等.RNA干扰作用研究进展.生理科学
进展.2004,35(1),53-56.

Steven M.Johnson et al.The time of
appearance of the C. elegans let-7
microRNA is transcriptionally controlled
utilizing a temporal regulatory element
in its promoter.DEVELOPMENTAL
BIOLOGY.2003,(2),364-379.

Jennifer H Mansfield et al.MicroRNA-
responsive 'sensor' transgenes encover
Hox-like and other developmentally
regulated patterns of vertebrate microRNA
expression.nature genetics.2004,36(10),
1079-1083.

审查员 冯晓亮

权利要求书2页 说明书37页

序列表5页 附图10页

(54)发明名称

基因载体

(57)摘要

包含miRNA序列靶的基因载体。

1. 包含miRNA靶序列和转基因的基因载体在制备用于治疗的药物中的用途。
2. 根据权利要求1的用途,其中所述miRNA靶序列适于预防或减少包含相应miRNA的细胞中的基因表达。
3. 根据权利要求1的用途,其中所述miRNA靶序列适于预防或减少包含相应miRNA的细胞中的转基因表达。
4. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述基因载体是非病毒基因载体形式。
5. 根据权利要求4的用途,其中所述非病毒基因载体包含质粒,所述质粒包含miRNA靶序列和至少一种转基因。
6. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述基因载体是包含miRNA靶序列和至少一种转基因的病毒载体形式。
7. 根据权利要求6的用途,其中所述病毒载体的载体基因组包含miRNA靶序列。
8. 根据权利要求7的用途,其中所述载体基因组包含可操作性连接于miRNA靶序列的至少一种转基因。
9. 根据权利要求6的用途,其中所述病毒载体选自逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒和单纯疱疹病毒。
10. 根据权利要求9的用途,其中所述病毒载体选自慢病毒、小核糖核酸病毒和甲病毒。
11. 根据权利要求6的用途,其中所述病毒载体来源于慢病毒。
12. 根据权利要求6的用途,其中所述病毒载体是病毒载体颗粒形式。
13. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述基因载体包含两种或更多的miRNA靶序列,其是相同或不同的,任选是串联形式和/或任选是不同方向。
14. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述miRNA靶序列是由hsa-mir-142as (hsa-mir-142-3p)miRNA、let-7a、mir-15a、mir-16、mir-17-5p、mir-19、mir-142-5p、mir-145和/或mir-218miRNA靶定的靶序列。
15. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述转基因编码肿瘤抑制蛋白、工程化的免疫球蛋白样分子、细胞因子或酶。
16. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述转基因编码前药激活酶、抗体、融合蛋白、激素、膜蛋白、血管活性蛋白或肽、趋化因子或抗病毒蛋白。
17. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述转基因编码凝血因子IX。
18. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述基因载体包含组织特异性启动子。
19. 根据权利要求1-3的任一项的用途,其中所述治疗是基因治疗。
20. 用权利要求1-16的任一项中所定义的基因载体感染或转导的细胞在制备用于治疗的药物中的用途。
21. 权利要求20的用途,其中所述细胞是造血细胞、肾细胞、神经元细胞、肺细胞、肝细胞、脾细胞、心脏细胞或肿瘤细胞。
22. 权利要求1-19的任一项中所定义的基因载体在制备用于预防或减少包含相应miRNA的细胞中的转基因表达的药物中的用途,其中所述基因载体包含可操作性连接于miRNA靶序列的转基因。
23. 权利要求1-19的任一项中所定义的基因载体在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中所述基因载体包含可操作性连接于miRNA靶序列的转基因。

24. 权利要求1—19的任一项中所定义的基因载体在制备用于治疗血友病的药物中的用途,其中所述基因载体包含可操作性连接于miRNA靶序列的转基因。

25. 权利要求1—19的任一项中所定义的基因载体在制备用于预防免疫介导的转移基因排斥的药物中的用途,其中所述基因载体包含可操作性连接于miRNA靶序列的转基因。

26. 权利要求1—19的任一项中所定义的基因载体在制备用于预防免疫介导的转移基因排斥的药物中的用途。

27. 权利要求1—19的任一项中所定义的基因载体在制备用于预防针对循环抗原的免疫应答的药物中的用途。

基因载体

发明领域

[0001] 本发明涉及用于基因转移和治疗应用的基因载体,并且涉及用于制备它们的方法及其用途。

[0002] 发明背景

[0003] 慢病毒载体(LVs)和其它病毒载体是用于基因治疗的有吸引力的工具(Thomas et al., 2003)。LVs可以转导广泛的组织,包括非分裂细胞,如肝细胞、神经元和造血干细胞。此外,LVs整合到靶细胞基因组中,并且提供长期的转基因表达。

[0004] 尽管LVs可以提供有效和稳定的基因转移,将表达靶定于特定细胞类型,或从特定细胞类型解除表达的靶定,仍然是困难的。在体内施用载体后,该问题特别相关,其中转基因表达可能仅仅在特定细胞群,如肿瘤细胞或肝细胞中是需要的,但转导了广泛细胞类型。当转导前体或干细胞时,表达的解除靶定也是重要的,但必须使转基因表达限制于分化细胞群的仅仅一种特定细胞系。目前,解决该问题的最多的努力依赖于靶定载体包膜或工程化组织特异性启动子。但是,这两种方法都存在限制。

[0005] 靶定的包膜可以减少载体滴度,并且导致载体感染力降低(Sandrin et al., 2003)。基于但不等同于天然存在的启动子/增强子元件构建的组织特异性启动子与普遍表达的启动子相比通常在靶组织中弱表达。此外,这些组织特异性启动子不总是实现绝对的细胞特异性(Follenzi et al., 2002)。由于多种原因可以发生非靶细胞中的转基因表达,包括“渗漏的”启动子活性和启动子/增强子捕获(De Palma et al., 2005)。捕获现象是由于载体优先在活性转录位点整合而发生,这随后驱动不依赖于载体的启动子的转基因转录。

[0006] 为了避开这些问题,并且制备可以维持高感染力和强表达的载体,而使转基因在特定细胞类型的表达受到紧密限制,我们开发了受到外源表达的微RNA(miRNA)调节的载体。

[0007] W003/020931描述了展示miRNA的报道系统测定系统,提供了测量容易测定的基因的敲除的方法。该系统用于确定siRNAs和嵌合RNAs可以减少容易测定的荧光素酶基因的表达。

[0008] 美国专利申请20050266552描述了报道构建体的构建,所述构建体适于导入哺乳动物细胞以建立可以用于鉴定参与miRNA翻译阻抑途径和/或所述途径的化学调节剂的细胞系。

[0009] Mansfield JH et al(2004)Nat Genet 36(10):1079-83 Epub, erratum in Nat Genet(2004)36(11):1238;和Brennecke J et al(2005)PloS Biol3(3):e85描述了含有报道基因和miRNA靶序列的质粒。在两篇报道中,设计了构建体,用于监测内源miRNAs的表达,并且不是为了调节转基因和/或将表达限制在特定细胞类型的目的。

[0010] 应该强调我们的发明的一个重要特征是我们描述了如何设计载体,以受到内源miRNAs调节,用于控制转基因表达,以实现载体的特定表达谱。尽管已经存在报道证明miRNA靶序列可以导入报道构建体(表达标记基因如荧光素酶的质粒)以对miRNA的表达进行示踪,它们没有描述特别利用miRNAs进行载体调节。它们特别没有描述利用本发明的载

体进行基因治疗方法,以预防感兴趣的转基因的免疫介导的排斥,或增加表达毒性基因的病毒颗粒滴度的制造方法,所述毒性基因对产生病毒颗粒的细胞通常是有毒性的。

[0011] 发明描述

[0012] 根据本发明的一方面,提供了适用于基因工程方法的基因转移载体,所述基因工程方法例如基因治疗、基因转移和/或包含miRNA序列靶的转基因的表达的调节。miRNA“可操作性连接”于转基因。术语“可操作性连接”表示描述的成分处于允许它们以其预期方式起作用的关系。

[0013] 在一种实施方案中,载体是包含miRNA序列靶的病毒载体颗粒。

[0014] 在一种实施方案中,颗粒包含载体颗粒的基因组(DNA或RNA),所述基因组包含miRNA序列靶。

[0015] 在一种实施方案中,颗粒包含载体颗粒的基因组,所述RNA基因组包含miRNA序列靶。

[0016] 在一种实施方案中,颗粒包含载体颗粒的RNA基因组,所述RNA基因组包含多个miRNA序列靶,它们可以是串联的。

[0017] 在一种实施方案中,颗粒包含载体颗粒的RNA基因组,所述RNA基因组包含多个不同的miRNA序列靶,它们可以是串联的。

[0018] 载体中包含的一个拷贝以上的miRNA靶序列可以增加系统的效力。我们也预见到可以包含不同的miRNA靶序列。例如,表达一个以上转基因的载体可以具有一个以上miRNA靶序列控制下的转基因,所述靶序列可以相同或不同。miRNA靶序列可以是串联的,但也可以预见其它排列方式,如采用反义方向。反义方向在生产病毒颗粒中可能是有用的,以避免原本可能对生产细胞有毒的基因产物的表达。

[0019] 在另一实施方案中,颗粒包含载体颗粒的基因组,所述RNA基因组包含转基因。

[0020] 优选地,颗粒可来源于慢病毒。

[0021] 在另一实施方案中,基因转移载体是非病毒基因转移载体形式。在该实施方案中,基因转移载体可以包含表达载体或质粒,或可以是表达载体或质粒形式,所述表达载体或质粒包含miRNA靶序列,任选包含转基因。

[0022] 本文描述的表达载体包含核酸区域,所述区域包含能够被转录的序列。因此,编码mRNA、tRNA和rRNA的序列包括在该定义内。

[0023] 本发明的基因载体或基因转移载体可以用于将转基因递送到感兴趣的位点或细胞。本发明的载体可以通过病毒或非病毒载体递送到靶位点。

[0024] 载体是使一种实体能够从一个环境转移到另一个环境,或促进所述转移的工具。例如,一些用于重组DNA技术的载体使得诸如DNA区段(如异源DNA区段,如异源cDNA区段)的实体能够转移到靶细胞中。任选地,一旦位于靶细胞中,载体可以用于使异源DNA保持在细胞中,或可以作为DNA复制的单位。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。

[0025] 非病毒递送系统包括但不限于DNA转染方法。本文中转染包括利用非病毒载体将基因递送到靶哺乳动物细胞中的过程。

[0026] 典型转染方法包括电穿孔、DNA生物射弹、脂质介导的转染、密集DNA介导的转染、脂质体、免疫脂质体、脂转染、阳离子试剂介导的、阳离子表面两性分子(CFAs)(Nature

Biotechnology 1996 14;556),及其组合。

[0027] 病毒送递系统包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体。载体的其它实例包括离体送递系统,包括但不限于DNA转染方法,如电穿孔、DNA生物射弹、脂质介导的转染、密集DNA介导的转染。

[0028] 术语“载体颗粒”是指包装的逆转录病毒载体,其优选能够结合并进入靶细胞。已经针对载体讨论过的颗粒的成分可以根据野生型逆转录病毒而改变。例如,颗粒的蛋白外壳中的Env蛋白可以进行遗传学修饰,从而改变它们的靶定特异性或实现一些其它需要的功能。

[0029] 优选地,病毒载体优先转导某种细胞类型或某些细胞类型。

[0030] 更优选地,病毒载体是被靶定的载体,即,它具有相对于天然病毒改变的组织亲嗜性,因此载体被靶定到特定细胞。

[0031] 在另一种实施方案中,包含miRNA靶序列的颗粒是被mir-142as(也称作hsa-mir-142-3p)、let-7a、mir-15a、mir-16、mir-17-5p、mir-19、mir-142-5p、mir-145、mir-218miRNA靶定的颗粒。

[0032] 根据本发明的另一方面,提供了一组DNA构建体,用于制备包含编码可包装的载体基因组的DNA构建体的病毒载体颗粒,所述基因组包含miRNA序列靶,任选包含转基因。可包装的载体基因组表示载体基因组处于可以使其包装到病毒载体颗粒中的环境中。这通常要求存在Gag-Pol和Env。

[0033] 根据本发明的另一方面,提供了制备病毒载体颗粒的方法,包括将要求保护的DNA构建体组导入宿主细胞,并且获得病毒载体颗粒。

[0034] 根据本发明的另一方面,提供了通过本发明的方法生产的病毒载体颗粒。

[0035] 根据本发明的另一方面,提供了一种药物组合物,包含本发明的基因载体或载体颗粒,以及可药用的稀释剂、赋形剂或载体。

[0036] 根据本发明的另一方面,提供了用本发明的载体颗粒感染或转导的细胞。在一种实施方案中,该细胞包含相应miRNA。可以在体内或体外场合下转导或感染细胞。细胞可以来源于动物,或形成动物的部分,所述动物优选是哺乳动物,如人或小鼠。因此,可以理解,本发明可以用于提供例如用于疾病模型的转基因动物。在一种实施方案中,所述哺乳动物是非人哺乳动物。

[0037] 目前的载体转录控制方法大多数依赖于取自内源基因的增强子-启动子元件的送递(Thomas et al.,2003;Verma and Weitzman,2005)。采用这些方法,基因转移和治疗应用通常需要的高度特异性的基因表达模式的重建受到送递系统、载体容量和插入的位置效应(用于整合载体)的限制。通过开发利用内源表达的miRNAs进行调节的新载体,发明人添加了以前不存在的一层对载体的控制。这种新方法使得基因表达在选定的细胞类型和细胞系中能够受到特异性阻抑。

[0038] 采用该系统,相对于现有技术可能达到的程度,我们能够实现对转基因表达的更严格控制。

[0039] 当用于整合载体时,它可以避免可能由于插入位置效应(邻接克服载体内部启动子的转录控制的强启动子/增强子序列的整合)导致的转基因失调的问题,并且使得转基因表达具有高度的细胞特异性模式。

[0040] 本发明的一些其它关键优点

[0041] 可以用miRNA靶序列对用于基因表达,从而进行基因转移和治疗的载体,如病毒载体,包括慢病毒载体进行工程化,以便被细胞类型特异性的内源性miRNAs识别,由此调节一个细胞亚组中的转基因表达。此外,可以用miRNA靶序列的组合获得具有高度特异性的细胞表达模式的载体。

[0042] 发明人用9种不同的miRNAs证明了该优点,所述miRNAs包括let-7a、mir-15a、mir-16、mir-17-5p、mir-19、mir-142-3p、mir-142-5p、mir-145和mir-218。他们证明了细胞内miRNA的浓度可以用于预测载体的表达谱。因此,本专利申请描述的方法提供了设计具有高度特异性的细胞表达模式的载体的简单方法。

[0043] 可以预见到本发明的多种用途。

[0044] 实际上,作为一个实例,发明人证明了通过使用如下图中示出的在转基因的3'UTR中展示mir-142-3p靶序列的载体,可以在造血细胞系中准确防止从普遍表达的启动子进行转基因表达,因为miR-142-3p在造血组织中具有细胞类型特异性表达模式。因此,该系统不减少其它细胞类型中的转基因表达。

[0045] 发明人也证明了将mir-19a的靶序列掺入载体中,可以抑制293T生产细胞中的转基因表达,所述细胞表达高水平mir-19a,并且这种抑制对载体的生产没有不利的影响。该策略提供了重要的、迄今为止不能得到的生产高滴度的携带毒性转基因的载体。

[0046] 我们的发明的进一步的用途是在设计表达两种具有不同表达谱的转基因的载体系统中。发明人通过将mir-142-3p的靶序列掺入双向慢病毒载体的两个基因之一而证明了这一点。在肾细胞中,两种转基因都表达,因为mir-142-3p不存在。但是,在造血细胞中,仅仅两种转基因之一被表达。该构建体提供了原理上的证据,表明miRNA调节可以用于趋异调节来自单个载体构建体的两种转基因。该载体设计的使用包括以下场合,即异质性细胞群将被转导,并且在存在的细胞类型之一中需要基因1的表达,并且在另一细胞类型中需要基因2的表达。该设计可以用于同时需要特定细胞的阴性和阳性选择的治疗应用。例如,可以通过单个载体转导胚胎干细胞,在所述载体中,基因1是毒性转基因,基因2是给细胞提供生长益处的转基因。基因1应该包含对神经元特异的miRNA靶序列,基因2应该包含对胚胎干细胞特异的miRNA靶序列。以此方式,可以指导转导的胚胎干细胞分化成神经元,并且将选择性杀伤不分化并且保持为未分化的胚胎干细胞的任何细胞。

[0047] 发明人证明,将miRNA靶序列转移到细胞中,即使在高拷贝,也不干扰靶定载体序列的内源miRNA的天然活性或表达。

[0048] 我们也可以添加miRNA靶序列的组合,以获得具有高度特异性的细胞表达模式的载体。

[0049] miRNA介导的限制基因表达的方法相对于其它调节转基因的策略具有一些优点。迄今为止,大多数限制专门的抗原呈递细胞(APCs)表达的努力都依赖于组织特异性启动子(Brown et al.,2004b;Follenzi et al.,2004;Mingozzi et al.,2003)。尽管该方法可以成功将表达限制于靶细胞,观察到一部分非靶细胞中的“渗漏”表达。这是由于进行修饰以便引入载体系统的重构启动子常常失去一些细胞特异性,并且也是由于活性启动子和增强子附近的载体整合可以激活组织特异性启动子并且驱动转基因表达。由于miRNA介导的沉默发生在转录后水平,启动子和增强子捕获是不相关的。因此,miRNA调节可以用于使转基

因表达从特定细胞类型有效解除靶定,而仍然允许广泛的组织表达,如我们在本文中描述的。miRNA调节也可以用作通过启动子/增强子调节转基因的补充方法。通过将miRNA靶序列引入已经处于组织特异性启动子控制下的表达盒,我们添加了额外的一层调节,将消除脱靶表达。

[0050] 作为miRNA可以用于使转基因表达从特定细胞类型解除靶定的原理性证据,我们开发了LV,其可以提供在肝细胞和其它非造血细胞中的强表达,而防止造血细胞表达。该设计对于系统基因治疗特别相关,其中抗转基因的宿主免疫应答限制了疗效(Brown and Lillicrap, 2002)。我们实验室和其它实验室的研究表明,导致基因转移后转基因特异性免疫应答诱导的主要因素与转基因表达位点相关(Brown et al., 2004b; Follenzi et al., 2004)。已知在造血系统的APCs,如巨噬细胞和树突细胞中表达的载体有效引发抗转基因的免疫应答(De Geest et al., 2003)。

[0051] 实际上,在CMV启动子控制下表达转基因的LV的系统施用导致肝和脾的APCs中转基因表达的高发生率,这导致表达转基因的细胞的免疫介导的清除(Follenzi et al., 2004)。相反,当CMV启动子用肝特异性白蛋白启动子取代时,存在免疫应答频率和强度的减少。尽管通过使用白蛋白启动子减少了免疫的发生率,仍然观察到了一定水平的免疫应答。这可能是由于APCs中从白蛋白启动子的低水平转基因表达,这是渗漏的转录活性和启动子/增强子捕获的结果。因此,通过利用转录后起作用的基因调节miRNA系统,可以克服由于转录调节水平发生的事件导致的非靶细胞中的转基因表达的问题。将转基因表达限制于特定细胞类型,也可能通过限制表达转基因的细胞库,减少基因转移的潜在效力。

[0052] 因此,我们假定,使基因表达解除靶定而不是靶定基因表达并且在转录后水平起作用的miRNA调节可能提供克服目前的基因递送系统的限制的独特手段。通过防止造血细胞系中的转基因表达,同时允许非造血细胞中的高水平表达,我们推断miRNA调节使得在缺乏免疫应答的条件下能够进行强和稳定的基因转移。

[0053] 我们修饰以前存在的含有普遍表达的PGK启动子控制下的绿色荧光蛋白(GFP)报道分子的LV,以便引入已知在造血源细胞中表达的miRNA的靶序列。在通过系统载体施用我们的miRNA调节的LV后,几乎排他地在肝细胞和肝内皮细胞中检测到基因表达。在Kupffer细胞,即存在于肝内的巨噬细胞中的表达几乎是不可检测的。这些结果与施用不含miRNA靶序列的LV形成鲜明对比,其中大多数转基因表达发生在Kupffer细胞中。

[0054] 在随后的实验中(其中将载体注射到具有免疫能力的Balb/c小鼠中),到注射后两周,我们在LV.PGK.GFP处理的小鼠肝内没有观察到GFP阳性细胞。形成鲜明对比的是, LV.PGK.GFP.142-3pT处理的小鼠在施用载体后2周具有显著的GFP阳性肝细胞频率。此外,发现GFP表达在注射后持续超过120天(分析了最后的时间点)。类似地,miRNA调节策略对防止针对循环抗原的免疫应答也是有效的。具体地,我们用表达人因子IX(hFIX)的慢病毒载体处理B型血友病小鼠,发现当在载体中引入mir-142-3pT序列时,hFIX表达保持稳定,而在不含mir-142-3pT序列的类似载体处理的小鼠中,注射后3周没有检测到hFIX表达。

[0055] 这些结果首次证明了miRNA可以用于重新靶定病毒载体的表达,并且导致疾病的长期持续治疗。它们也提供了证据,表明载体的miRNA调节可以减少抗转基因免疫应答。其类型中的第一种,即miRNA调节的LV,将对定向于肝的基因治疗具有重要意义,其中造血细胞内的基因表达对治疗目标可能是有害的。因此,本发明可以用于防止转移基因的免疫介

导的排斥。

[0056] 在体内施用载体时,本发明将避免作为造血系统的一部分的、免疫系统的抗原呈递细胞中的载体表达,从而防止抗转基因的免疫应答的起始。可以预见到,当应用于将表达靶定于肝细胞的组织特异性启动子时,将允许抑制转导的APC的异位表达。这将很可能解决基因转移中的主要障碍和长期问题,即,转移基因的免疫介导的排斥。

[0057] 在所附独立和从属权利要求中阐述了本发明的其它具体和优选的方面。从属权利要求的特征在合适时可以与独立权利要求的特征合并,并且以权利要求中特别阐述的方式之外的方式合并。

[0058] 除非另外指出,本发明的实施将采用化学、分子生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,它们都在本领域技术人员的能力之内。所述技术在文献中解释。参见例如J.Sambrook,E.F.Fritsch,and T.Maniatis,1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Second Edition,Books 1-3,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Ausubel,F.M.et al.(1995 and periodic supplements;Current Protocols in Molecular Biology,ch.9,13,and 16,John Wiley & Sons,New York,N.Y.);B.Roe,J.Crabtree,and A.Kahn,1996,DNA Isolation and Sequencing:Essential Techniques,John Wiley & Sons;J.M.Polak and James O'D.McGee,1990,In Situ Hybridization:Principles and Practice;Oxford University Press;M.J.Gait(Editor),1984,Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach,Irl Press;D.M.J.Lilley and J.E.Dahlberg,1992,Methods of Enzymology:DNA Structure Part A:Synthesis and Physical Analysis of DNA Methods in Enzymology,Academic Press;Using Antibodies:A Laboratory Manual:Portable Protocol NO.1 by Edward Harlow,David Lane,Ed Harlow(1999,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN 0-87969-544-7);Antibodies:A Laboratory Manual by Ed Harlow(Editor),David Lane(Editor)(1988,Cold Spring Harbor Laboratory Press,ISBN 0-87969-314-2),1855.Handbook of Drug Screening,edited by Ramakrishna Seethala,Prabhavathi B.Fernandes(2001,New York,NY,Marcel Dekker,ISBN 0-8247-0562-9);和Lab Ref:A Handbook of Recipes,Reagents,and Other Reference Tools for Use at the Bench,Edited Jane Roskams and Linda Rodgers,2002,Cold Spring Harbor Laboratory,ISBN 0-87969-630-3。在此全文引入这些文献作为参考。

[0059] 附图简述

[0060] 下文仅仅通过举例进一步描述本发明,其优选实施方案在附图中说明,其中:

[0061] 图1a.miRNA调节的慢病毒载体系统的示意图。此处示出的是普遍表达的人PGK启动子的转录控制下的编码增强的绿色荧光蛋白(eGFP)的亲本慢病毒载体(LV.PGK.GFP),和修饰的载体,其含有内源miRNA靶定的序列的4个串联拷贝(LV.PGK.GFP.mirT)。

[0062] 图1b.利用miRNA调节进行趋异调节的慢病毒载体系统的示意图。此处显示的是双向启动子构建体(Bd.LV)的转录控制下的编码eGFP和突变的低亲和力神经生长因子受体(Δ LNFR)的亲本双向慢病毒载体,其使得能够协调转录两种转基因为不同的转录物。修饰了Bd.LV,以便在eGFP表达盒的3'非翻译区(3'UTR)中引入mirT序列。

[0063] 图1c.肝细胞特异性的、miRNA调节的慢病毒载体系统的示意图。此处示出了合成

的肝特异性启动子/增强子元件的转录控制下的编码人凝血因子IX(hFIX)的亲本慢病毒载体(LV.ET.hFIX),和修饰的载体,其含有内源miRNA靶定的序列的4个串联拷贝(LV.ET.hFIX.mirT)。

[0064] 图2a.miRNA谱分析。通过实时PCR进行的293T和U937细胞中选定的miRNAs的表达分析。表达水平是相对于let-7a报道的,所述let-7a是一种组成型表达的“管家”miRNA。

[0065] 图2b.miRNA调节可以用于使表达从造血细胞系解除靶定。转导后14天,用剂量匹配浓度的指出的LV转导的293T(肾来源)、U937(单核细胞来源)和原代树突细胞(外周血来源的)的FACS分析。示出了含有肝特异性白蛋白启动子的LV(LV.ALB.GFP),用于比较该启动子的脱靶活性。柱形图代表三次独立实验。通过Taqman分析确定每个基因组的载体拷贝(C/G)。灰色示出的是未转导的细胞。

[0066] 图2c.可以利用miRNA调节来构建用于趋异调节两种转基因的载体。转导后14天,用紧密匹配浓度的表达GFP(含有或不含mir-142-3pT)和 Δ LNGFR的Bd.LV转导的293T和U937细胞的GFP和 Δ LNGFR表达的FACS分析。点图代表两次独立实验。

[0067] 图2d.miRNA调节的载体设计可以用于构建多种受到不同内源miRNA调节,并且介导多种载体表达谱的载体。转导后14天,用紧密匹配浓度的表达GFP(含有或不含指出的mirT序列)和 Δ LNGFR的Bd.LV转导的293T和U937细胞的GFP和 Δ LNGFR表达的FACS分析。

[0068] 图3a.LV.PGK.GFP或LV.PGK.GFP.142-3pT转导的293T和U937细胞的GFP表达的定量RT-PCR分析。所有样品都标准化为GAPDH表达,所得的值是相对于从 10^5 TU/mL LV.PGK.GFP转导的293T细胞检测的转录物报道的,该转录物设定为校准物。

[0069] 图3b.指出的Bd.LV转导的U937细胞的GFP和 Δ LNGFR表达的定量RT-PCR分析。从图1c示出的细胞采集cDNA。所有值是相对于在 10^5 TU/mL Bd.LV转导的细胞中的 Δ LNGFR转录物水平报道的。

[0070] 图3c.含有或不含mir-142-3pT的LV和Bd.LV(分别示于图1b和1c)转导的细胞的RNA印迹分析。每种样品加入20微克总RNA,并且探测GFP。对于LV(上)和Bd.LV(下),用箭头表示GFP转录物的预期大小。

[0071] 图3d.用LV.PGK.GFP.142-3pT重复感染U937细胞,以获得增加的载体含量。通过FACS分析测量GFP。指出了细胞群的平均载体C/G。包括了显示LV.PGK.GFP.142-3pT的增加的载体剂量和转基因表达之间的关系的回归分析。注意到在U937细胞中,单拷贝的LV.PGK.GFP(左下图)以比175C/G LV.PGK.GFP.142-3pT更高的水平表达GFP。

[0072] 图3e.通过用递增浓度的LV.PGK. Δ LNGFR.mir-142-3pT超感染含有4C/G LV.PGK.GFP.mir-142-3pT的U937细胞,测量mir-142-3p-介导RNA干扰的强度。用Taqman分析检测超感染的细胞的载体拷贝数,通过FACS分析测量GFP和 Δ LNGFR表达的改变。

[0073] 图4.可以利用miRNA调节防止生产细胞中的转基因表达,而不减少载体滴度。比较了三种不同的慢病毒载体构建体的转基因表达和生产滴度。柱形图显示了载体生产期间293T细胞中的GFP表达。点图代表用生产的载体转导后293T细胞中的GFP表达。构建体pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas和pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas具有反义方向的表达盒。如图中所示,当表达盒以反义方向放置时(pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas),与规范的pLV.PGK.GFP载体相比,载体滴度减少10倍。但是,在反义表达盒中引入mir-19aT序列,使滴度恢复为规范构建体的滴度。

[0074] 图5a.可以设计miRNA调节的载体,以实现在体内从特定细胞系使表达选择性解除靶定。两周前用指定的LV通过尾静脉注射的裸鼠肝脏的共焦显微镜分析。图像代表3只小鼠。通过直接荧光显现GFP。针对巨噬细胞特异性标记物F4/80(左)和内皮细胞标记物CD31(右)对肝切片进行免疫染色。当采用mir-142-3pT载体时,F4/80+Kupffer细胞几乎都不以可检测水平表达GFP,而当用另一种载体转导时,这些细胞中的许多都表达GFP。注意当通过所有载体,包括LV.PGK.GFP.142-3pT(箭头)转导时,CD31+肝血窦内皮细胞表达GFP。

[0075] 图5b.可以设计miRNA调节的载体,以实现在体内从特定细胞系使表达解除靶定。对与上文描述的小鼠相同的小鼠的脾切片进行针对全白细胞CD45标记物的免疫染色。LV.PGK.GFP.142-5pT有效从CD45+白细胞解除GFP表达的靶定,但允许边缘区血窦的非造血基质细胞(CD45阴性)中的强GFP表达。

[0076] 图5c.可以设计miRNA调节的慢病毒载体,以防止静脉内载体注射后造血细胞中的转基因表达。LV.PGK.GFP和LV.PGK.GFP.142-3pT处理的动物的脾细胞GFP表达的FACS分析。

[0077] 图6a.可以设计miRNA调节的载体,以便甚至在高载体拷贝时也可以防止体内的造血细胞系中的转基因表达。代表性的TgN.PGK.GFP.142-3pT(24C/G)和TgN.PGK.GFP(4C/G)转基因小鼠的外周血和骨髓中的GFP表达的FACS分析显示几乎不可检测的转基因表达,尽管这些小鼠携带高数目的载体拷贝。

[0078] 图6b.可以设计miRNA调节的载体,以区分转基因小鼠的造血和非造血细胞系的基因表达。来自上述小鼠的指定器官的免疫荧光。通过直接荧光显现GFP。通过分析的所有器官(除胸腺外)中的CD45免疫染色,标记造血细胞系的细胞,其中用CD3标记胸腺细胞。在TgN.PGK.GFP小鼠中,在所有器官的实质和基质中检测到了全细胞GFP表达。造血细胞系的细胞看起来是黄色的,这是因为CD45染色和GFP表达之间的重叠。相反,PGK.GFP.142-3pT转基因小鼠中的GFP表达在CD45+Kupffer细胞(肝)、肺泡(肺)和固有层(肠)巨噬细胞中受到选择性抑制,其表现为红色,并且用箭头表示。在脾和胸腺中,GFP表达在所有造血系的细胞中也是阴性的,但在这些器官的基质中是强表达。

[0079] 图7a.miRNA调节的LV使得能够在具有免疫能力小鼠中进行稳定的基因转移。施用指出的LV的Balb/c小鼠的肝和脾切片的共焦免疫荧光分析。通过直接荧光在肝中显现GFP;分别通过用抗-F4/80、抗-CD8或抗-CD31染色,检测Kupffer细胞、CD8+T细胞或内皮细胞。到2周时从LV.PGK.GFP和LV.ALB.GFP小鼠的肝清除GFP+细胞,其与CD8+T细胞浸润物的存在相关。相反,在注射LV.PGK.GFP.142-3pT的小鼠中大量GFP+肝细胞和内皮细胞持续存在>120天(分析的最长时间点)。

[0080] 图7b.LV.PGK.GFP.142-3pT处理第70天的小鼠肝中的GFP+细胞具有肝细胞的典型外形,或是CD31+内皮细胞(箭头)。这证明该方法的一个新的方面,即从特定细胞类型对表达进行选择性的解除靶定,同时允许在宽范围的细胞系中进行转基因表达。

[0081] 图7c.苏木精和伊红(H&E)染色显示注射后第42天,LV.PGK.GFP.142-3pT小鼠中的正常组织学和缺乏单核细胞浸润。

[0082] 图7d.5天前用指出的载体注射的具有免疫能力的小鼠脾的分析。主要在边缘区血窦(MS)中观察到从mir-142-3pT载体的GFP表达;这些GFP+细胞中的一些表达 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA),并且鉴定为成纤维细胞样基质细胞(箭头)。注意分散的GFP+细胞,包括一些CD45+造血细胞,存在于LV.ALB.GFP小鼠的脾中(箭头)。这进一步证明相对于组织特异性启

动子,miRNA调节策略可以提供改进的转基因调节手段。

[0083] 图8a.miRNA调节的慢病毒载体介导小鼠模型中的B型血友病的稳定纠正。B型血友病小鼠(因子IX敲除)通过尾部注射编码肝细胞特异性ET启动子控制下的hFIX的慢病毒载体(LV.ET.hFIX)或在转基因的3'UTR中含有mir-142-3pT序列的修饰的LV.ET.hFIX(LV.ET.hFIX.142-3pT)。通过hFIX特异性ELISA确定hFIX抗原的血浆浓度(上图),而通过测量激活的部分促凝血酶原激酶时间而确定FIX凝血活性(下图)。结果表示为每个载体处理的3只小鼠的平均值+或-标准误。

[0084] 图9A显示成熟的hsa-mir-142茎环序列。

[0085] 图9B显示作为靶的mir-142的序列。

[0086] 微RNAs(miRNAs)

[0087] miRNA是植物和动物基因组中编码的小RNA分子。这些高度保守的约21聚体RNAs通过结合于特定mRNAs调节基因表达(He and Hannon, 2004)。

[0088] miRNAs是以序列特异性方式调节基因表达的非编码RNAs。

[0089] 从microRNAs: SMALL RNAs WITH A BIG ROLE IN GENE REGULATION, Lin He & Gregory J. Hannon Nature Reviews Genetics 5, 522-531 (2004)中概括:

[0090] ●微RNAs(miRNAs)是约21-25个核苷酸的小RNAs,其在转录后水平负调节基因表达。

[0091] ●通过基因筛选鉴定miRNA家族的基本成员,即lin-4和let-7,以筛选秀丽新杆线虫幼虫发育的时间调节。

[0092] ●由于基因组范围的克隆努力,已经在几乎所有的后生动物,包括苍蝇、植物和哺乳动物中鉴定了数百种miRNAs。

[0093] ●miRNAs在多种发育和生理过程过程中表现出时间和空间调节的表达模式。

[0094] ●目前已经鉴定的大多数动物miRNAs影响从它们的靶mRNAs进行蛋白合成。另一方面,目前研究的大多数植物miRNAs指导它们的靶的切割。

[0095] ●miRNA及其靶之间的互补程度至少部分决定调节机理。

[0096] ●在动物中,通过两种RNA酶-III,即Drosha和Dicer,将miRNAs的一级转录物序贯处理为小的、不完美的dsRNA双链体(miRNA:miRNA*),其含有成熟miRNA链及其互补链(miRNA*)。成熟miRNA的5'末端的相对不稳定性导致成熟miRNA不对称组装为效应物复合物,即RNA诱导的沉默复合物(RISC)。

[0097] ●Ago蛋白是RISC的关键成分。多种后生动物基因组中的多种Ago同源物表明存在行使相关但特异的生物功能的多种RISCs。

[0098] ●miRNA靶的生物信息预测提供了探测miRNAs功能的重要工具。

[0099] 已经从小鼠、人、果蝇、秀丽新杆线虫和拟南芥克隆了几百种miRNAs并且测序。所述序列的实例可以参见www.sanger.ac.uk(Griffiths-Jones et al., 2006)。其它miRNA靶序列可以在www.miRNA.org检索。

[0100] 类似于mRNAs,miRNA表达谱似乎在组织之间不同,但对不同个体中的相同组织是类似的(Baskerville and Bartel, 2005)。采用本领域技术人员已知的技术,可以确定具有需要的表达谱的miRNA。一旦miRNA被鉴定,利用例如上文指出的数据库,可以容易地确定相应的靶序列。

[0101] 例如,可以根据制造商的说明书,用从Ambion, Inc.得到的mirVana™ miRNA探针组和mirVana™ miRNA标记试剂盒比较人组织中的miRNA表达谱。

[0102] 鉴定组织特异性miRNAs的另一种常用途径是利用RNA印迹。所述技术的一个实例描述于Lagos-Quintana M et al, Current Biol(2002)12:735-739,其中他们通过从小鼠进行了大约21个核苷酸的RNAs的组织特异性克隆,鉴定了34种新的miRNAs(Lagos-Quintana et al.,2002)。

[0103] 类似地,Michael M et al, Mol Can Res(2003)1:882-891描述了在结肠腺癌和正常粘液中鉴定了28种不同的miRNA序列。

[0104] Chen C-Z et al, Science(2004)303:83-86描述了三种miRNAs,即miR-181、miR-142和miR-223,它们在造血细胞中特异性表达(Chen et al.,2004)。

[0105] Sempere L et al, Genome Biology(2004)5:R13公开了专门在特定小鼠器官中检测到的总共17种miRNAs;这些包括:7种脑特异性miRNAs(miR-9、-124a、-124b、-135、-153、-183、-219)、六种肺特异性miRNAs (miR-18、-19a、-24、-32、-130、-213)、两种脾特异性miRNAs(miR-189、-212)、一种肝特异性miRNA(miR-122a)和一种心脏特异性miRNA(miR-208)。也在人的对应器官中检测到了所有指出的小鼠脑、肝和心脏特异性miRNAs(在人肾、肺或脾中没有检测到miRNA表达),例外是人脑中的miR-183。在两个或多个小鼠器官中检测到的75种miRNAs中,以比任何其它器官高至少2倍的水平在特定小鼠器官中检测到其中14种的水平;这些包括7种脑富集的miRNAs(miR-9*、-125a、-125b、-128、-132、-137、-139)、3种骨骼肌富集的miRNAs(miR-1d、-133、-206)、两种肾富集的miRNAs(miR-30b、-30c)、和一种脾富集的miRNA(miR-99a)。所有脑富集的和骨骼肌富集的miRNAs在人对应器官中具有相似的升高的水平。小鼠和人之间这些器官特异性和器官富集的miRNAs的表达的高度保守表明它们可以在该特定器官的细胞或组织类型的建立和/或维持中起保守左右(Sempere et al.,2004)。

[0106] Baskerville & Bartel, RNA(2005)11:241-247公开了跨24种不同人器官的175种人miRNAs的微阵列谱调查和表达模式。结果显示通常共同表达最接近的miRNAs对(Baskerville and Bartel,2005)。此外,表达的miRNAs对之间的相关性的迅速转变发生在50kb的距离,表明隔开<50kb的miRNAs典型地来源于共同的转录物。一些miRNAs在宿主基因的内含子内部。内含子miRNAs通常与它们的宿主基因mRNA协调表达,表明它们也通常来源于共同的转录物,并且,宿主基因表达的原位分析可以用于探测内含子miRNAs的空间和时间定位。

[0107] Barad et al, Genome Research(2004)14:2486-2494建立了miRNA特异性寡核苷酸微阵列系统,其使得能够有效分析迄今为止鉴定的人miRNAs的表达。其显示微阵列上的60聚体寡核苷酸探针与miRNAs的标记的cRNA杂交,但不与它们的前体发夹RNAs杂交,所述前体发夹RNAs来源于扩增的、大小分级分离的、人来源的总RNA。信号强度与60聚体探针内的miRNA序列定位相关,在5'区的定位产生最高的信号,在3'末端产生最低的信号。因此,在5'末端的具有1个miRNA拷贝的60聚体探针产生了与含有两个或三个miRNA拷贝的探针相似强度的信号。错配分析显示miRNA序列内的突变显著减少或消除信号,表明观察到的信号忠实反映了标记的cRNA中匹配miRNAs的充足。150种miRNAs在5种人组织和HeLa细胞中表达谱分析发现与以前公开的结果的良好总体一致性,但也有一些差异。他们提出了关于胸腺、睾

丸和胎盘中miRNA表达的数据,并且鉴定了在这些组织中高度富集的miRNAs。综合起来,这些结果强调了DNA微阵列相对于miRNAs的检测和研究方法的增加的灵敏度,以及将所述微阵列用于健康和疾病中miRNA研究的广阔前景(Barad et al.,2004)。

[0108] Kasashima K et al,Biochem Biophys Res Commun(2004)322(2):403-10描述了在人白血病细胞(HL-60)中表达的三种新的和38种已知miRNAs的鉴定(Kasashima et al.,2004)。

[0109] Mansfield J et al,Nature Genetics(2004)36:1079-1083公开了胚胎发生期间一些miRNAs,包括miR-10a和miR-196a的组织特异性表达(Mansfield et al.,2004)。

[0110] Chen C-Z and Lodish H,Seminars in Immunology(2005)17(2):155-165公开了miR-181,即一种在小鼠骨髓内的B细胞中特异性表达的miRNA(Chen and Lodish,2005)。其中也公开了一些人miRNAs与白血病相关;miR-15a/miR-16基因座在B细胞慢性淋巴细胞白血病患者中通常缺失或下调,并且miR-142位于迅速发展的B细胞白血病中存在的易位位点。其中指出,这些结果表明miRNA可能是哺乳动物造血的重要调节剂。

[0111] 采用计算方法鉴定新miRNAs及其靶序列的方法公开于W02004/066183and Brennecke J et al,PLoS Biology(2005)3(3):0404-0418(Brennecke et al.,2005)。

[0112] 下表1概括了可以用于本发明的miRNA。

[0113]

表1对哺乳动物miRNAs的表达研究		
表达模式	miRNA	参考文献
哺乳动物miRNAs的组织特异性表达模式		
ES细胞特异	miR-296	a
在ES细胞中表达,但在分化时上调	miR-21和miR-22	a
在ES细胞和多种成体组织中表达	miR-15a,miR-16,miR-19b,miR-92,miR-93 miR-96,miR-130和miR-130b	a
在小鼠脑发育过程中富集	miR-128,miR-19b,miR-9,miR-125b,miR-131 miR-178,miR-124a,miR-266和miR-103	b,c
在成体脑中富集	miR-9*,miR-125a,miR-125b,miR-128,miR-132b miR-137,miR-139,miR-7,miR-9,miR124a, miR-124b,miR-135,miR-153,miR-149,miR-183, miR-190和miR-219	

在肺中富集	miR-18,miR-19a,miR-24,miR-32,miR-130 miR-213,miR-20,miR-141,miR-193和miR-200b	b
在脾中富集	miR99a,miR-127,miR-142-a,miR-142-s, miR-151,miR-189b和miR-212	b

[0114]

造血组织	miR-181,miR-223和miR-142	b
在肝中富集	miR-122a,miR-152,miR-194,miR-199和 miR-215	b
在心脏中富集	miR-1b,miR-1d,miR-133,miR-206,miR-208 和miR-143	b
在肾中富集	miR-30b,miR-30c,miR-18,miR-20,miR-24 miR-32,miR-141,miR-193和miR-200b	b
普遍表达	miR-16,miR-26a,miR-27a,miR-143a,miR-21 let-7a,miR-7b,miR-30b和miR-30c	b

[0115]

在肿瘤发生过程中的异常 miRNA表达		
在慢性淋巴细胞白血病 中下调	miR-15和miR-16	d
在肺癌细胞系中表达	miR-26a和miR-99a	e
在结肠癌中下调	miR143/miR-145簇	f
在伯基特淋巴瘤中上调	miR-155	g
ES 细胞,胚胎干细胞		

[0116] a-Honbaviy et al,Dev.Cell(2003)5:351-358.

[0117] b-Sempere et al,Genome Biol.(2004)5,R13.

[0118] c-Krichevsky et al,RNA(2003),9:1274-1281.

[0119] d-Calin et al,Proc Natl Acad Sci(2002)99:15524-15529.

[0120] e-Calin et al,Proc Natl Acad Sci(2004)101:2999-3004.

[0121] f-Michael et al,Mol Cancer Res(2003)1:882-891.

[0122] g-Metzier et al,Genes Chromosomes Cancer(2004)39:167-169.

[0123] 尽管我们的数据证明了该方法限制造血细胞表达的用途,内源miRNA调节网将导致紧密限制转基因表达的更大的可能性。表达研究已经揭示了对很多细胞类型,包括神经元、胰岛和脂肪组织特异的miRNAs。采用我们的设计,可以建立一种载体,其包含miR-21和miR-22的靶序列,即在胚胎干细胞(ESCs)分化后上调的两种miRNAs(Houbaviy et al., 2003),其束缚于自杀基因,如胸苷激酶。该载体可以用于选择性杀伤ESC来源的组织中的未分化ESCs,这是将基于ESC的治疗带入临床的更需要的安全控制。

[0124] miRNA调节的载体设计的另一种可能用途是治疗癌症。一些报道表明特定miRNAs在某些肿瘤中下调。例如,miR-15和mir-45在慢性淋巴细胞白血病和乳腺癌中下调(Calin et al., 2004a; Calin et al., 2004b; Iorio et al., 2005)。miR-15或mir-145靶序列可以包含在表达毒性转基因的载体中。表达miR-15或mir-145的正常细胞,包括产生载体的细胞,将抑制毒素的产生,由此存活,而转导的肿瘤细胞不再表达miR-15或mir-145,将容易地产生毒素基因并且死亡。

[0125] miRNA调节的载体设计的另一种可能的用途是防止载体从野生型病毒超感染的转导的造血细胞动员。miRNA靶序列也可以包含在与转基因的表达盒不同的载体的区域中。

[0126] miRNA载体可以与双向启动子联合使用(Amendola et al., 2005)。这些具有从单个启动子产生两种不同mRNA转录物的独特特性的载体可以进行修饰,使其包括位于一个或两个表达盒的miRNA靶序列。因此,将mir-142-3pT加入转基因1,而不是转基因2,将使转基因2普遍表达,同时防止转基因1在造血细胞中的表达。该设计将使两种转基因能够趋异调节,这是现有技术不能达到的技艺。

[0127] 可以用合适的基因载体使用miRNA,即适于递送感兴趣的基因(转基因)的载体,如病毒载体。这些载体的实例描述于下文。

[0128] 逆转录病毒

[0129] 在过去10年中,已经将基因治疗用于在数百个临床试验中治疗疾病。已经开发了多种工具,将基因递送到人细胞中;其中,基因工程化的逆转录病毒,包括慢病毒,目前属于用于基因递送的最常见工具。大多数所述系统含有能够容纳感兴趣的基因的载体和能够提供病毒结构蛋白和酶的辅助细胞,使得能够产生含有载体的感染性病毒颗粒。逆转录病毒科是一种逆转录病毒家族,它们的核苷酸和氨基酸序列、基因组结构、致病性和宿主范围不同。这种多样性提供了利用具有不同生物特征的病毒来开发不同治疗应用的机会。对于任何递送工具,效力、靶定某些组织或细胞类型的能力、感兴趣基因的表达和基于逆转录病毒的系统的安全性,对于成功应用基因治疗是重要的。近年来在这些研究领域付出了重大的努力。对基于逆转录病毒的载体和辅助细胞进行了多种修饰,以改变基因表达、靶定递送、改进病毒滴度和增加安全性。本发明代表了该设计过程的改进,因为它将感兴趣的基因有效递送到所述病毒载体中。

[0130] 病毒是用于基因递送的合理工具。它们在细胞内复制,并且因此具有进化的机制,以进入细胞并且利用细胞机制表达它们的基因。基于病毒的基因递送的概念是将病毒工程化,使得它能够表达感兴趣的基因。根据具体应用和病毒的类型,大多数病毒载体含有突变,该突变阻碍它们在宿主中作为野生型病毒自由复制的能力。

[0131] 已经修饰了来自一些不同科的病毒,以制备用于基因递送的病毒载体。这些病毒包括逆转录病毒、慢病毒、腺病毒、腺伴随病毒、单纯疱疹病毒、小核糖核酸病毒和甲病毒。

本发明优选使用逆转录病毒,包括慢病毒。

[0132] 用于基因递送的理想逆转录病毒载体必须是有效的、细胞特异性的、受调节的和安全的。递送的有效性是重要的,因为它能够决定治疗的效力。目前的努力致力于用逆转录病毒载体实现细胞类型特异性感染和基因表达。此外,正在开发逆转录病毒载体,用于调节感兴趣基因的表达,因为该治疗可能需要长期持续或受调节的表达。安全性是病毒基因递送的主要问题,因为大多数病毒是病原体或具有致病潜能。重要的是在基因递送过程中,患者也不会意外接受具有完全复制潜能的致病病毒。

[0133] 逆转录病毒是通过整合的DNA中间体复制的RNA病毒。逆转录病毒颗粒用壳体包裹两个拷贝的全长病毒RNA,每个拷贝含有病毒复制所需的完整遗传信息。逆转录病毒具有脂质包膜,并且利用包埋在细胞膜中的病毒编码的包膜蛋白和细胞受体之间的相互作用进入宿主细胞。利用存在于病毒体中的病毒编码的酶-逆转录酶,病毒RNA逆转录为DNA拷贝。该DNA拷贝通过整合酶整合到宿主基因组中,整合酶是另一种病毒编码的酶。这种整合的病毒DNA称作前病毒,并且成为宿主基因组的永久部分。该细胞转录和翻译机制进行病毒基因的表达。宿主RNA聚合酶II使前病毒转录,产生RNA,另一种细胞过程修饰RNA,并且将其转运到细胞核外。对一部分病毒RNAs进行剪接,使一些基因表达,而其它病毒RNAs保持全长。宿主翻译机制合成并且修饰病毒蛋白。新合成的病毒蛋白和新合成的全长病毒RNAs组装在一起,形成新的病毒,出芽到宿主细胞外。

[0134] 基于基因组结构,可以将逆转录病毒分类成简单和复杂逆转录病毒。简单和复杂逆转录病毒编码gag(组特异性抗原)、pro(蛋白酶)、pol(聚合酶)和env(包膜)基因。除了这些基因,复杂逆转录病毒也编码一些辅助基因。

[0135] 逆转录病毒也可以分类为肿瘤病毒、慢病毒和泡沫病毒。大多数肿瘤病毒是简单逆转录病毒。慢病毒、泡沫病毒和一些肿瘤病毒是复杂逆转录病毒。目前,正在将所有三种类型的病毒开发为基因治疗工具。下文将讨论每种类型的实例。

[0136] 鼠白血病病毒(MLV)是肿瘤病毒的实例,人免疫缺陷病毒-1(HIV-1)是慢病毒的一个实例,人泡沫病毒是泡沫病毒的一个实例。

[0137] 当能够复制的逆转录病毒感染天然宿主细胞时,它能够在宿主细胞中形成前病毒,表达病毒基因,并且释放新的感染性颗粒,以感染其它宿主。在大多数基因治疗应用中,不需要将能够复制的病毒递送到患者中,因为病毒可能播散超过靶定的组织,并且导致不利的致病作用。因此,在大多数设计用于基因递送的逆转录病毒系统中,使病毒成分分成载体和辅助构建体,以限制病毒自由复制的能力。

[0138] 术语载体通常是指修饰的病毒,其含有感兴趣的基因(或转基因)和基因表达和复制所需的顺式作用元件。大多数载体含有一些或全部病毒蛋白编码序列的缺失,使它们不能复制。设计了辅助构建体,以表达载体中缺乏的病毒基因,并且支持载体的复制。辅助功能最通常以辅助细胞形式提供,但也可以作为辅助病毒或共转染的质粒形式提供。

[0139] 辅助细胞是工程化的培养细胞,其表达逆转录病毒载体增殖所需的病毒蛋白;这通常是通过将表达病毒蛋白的质粒转染到培养细胞中而实现的。大多数辅助细胞系来源于细胞克隆,以确保支持逆转录病毒载体复制的统一性。不经常使用辅助病毒,这是因为可以通过高频重组产生能够复制的病毒的可能性。也可以通过辅助构建体的瞬时转染提供辅助功能,以实现逆转录病毒载体的迅速增殖。

[0140] 大多数逆转录病毒载体作为细菌质粒维持,以促进载体DNA的操作和增殖。这些双链DNA载体可以通过诸如DNA转染、脂转染或电穿孔的常规方法导入辅助细胞。辅助细胞表达所有病毒蛋白(Gag、Gag-Pol和Env),但缺乏含有包装信号的RNA。病毒RNA是感染性病毒颗粒形成和释放所必须的,但对于形成“空的”非感染性病毒颗粒不是必须的。当载体DNA导入辅助细胞时,含有包装信号的载体RNA被转录,并且有效包装成病毒颗粒。病毒颗粒含有从辅助构建体表达的病毒蛋白和从载体转录的RNA。这些病毒颗粒可以感染靶细胞,逆转录载体RNA,形成双链DNA拷贝,并且将DNA拷贝整合到宿主基因组中,形成前病毒。这种前病毒编码感兴趣的基因,并且由宿主细胞机制表达。但是,由于载体不表达任何病毒蛋白,它不能产生能够播散到其它靶细胞的感染性病毒颗粒。

[0141] 设计辅助细胞,用于支持逆转录病毒载体的增殖。辅助细胞中的病毒蛋白从转染到哺乳动物细胞中的辅助构建体表达。辅助构建体的表达模式和编码的基因不同。

[0142] 一个基因组的辅助构建体

[0143] 在最初开发的辅助细胞系中,所有病毒基因都是从一个辅助构建体表达。这些辅助细胞的实例是C3A2和-2。这些细胞系的辅助构建体是缺乏包装信号的克隆的前病毒DNAs。这些辅助细胞能够支持逆转录病毒载体的有效增殖。但是,这些辅助细胞的主要问题是病毒载体增殖过程中会频繁产生能够复制的病毒。辅助构建体含有病毒基因组的大部分,并且因此与逆转录病毒载体具有显著的序列同源性。序列同源性能够促进辅助构建体和逆转录病毒载体之间的重组,产生能够复制的病毒。尽管辅助RNA缺乏包装信号,它仍然能够低效包装为病毒体(比含有包装信号的RNA低约100到1000倍)。逆转录病毒重组在两个共同包装的病毒RNAs之间频繁发生,产生含有来自两个亲本的遗传信息的DNA拷贝。如果辅助RNA和载体RNA包装为相同的病毒体,两个RNAs之间的大的序列同源区能够促进逆转录期间的同源重组,以产生能够复制的病毒。在辅助RNA和来源于内源病毒的RNA之间也能够以低效发生相似的重组事件,产生能够复制的病毒。

[0144] 分裂基因组辅助构建体

[0145] 与能够复制的病毒的产生相关的安全性考虑促进了用“分裂基因组”设计很多辅助细胞系,包括CRIP、GP+envAm12和IDSN。在这些辅助细胞中,从一个质粒表达病毒Gag/Gag-Pol多蛋白,从另一个质粒表达Env蛋白。此外,这两种辅助构建体也含有病毒顺式作用元件的缺失,以减少或消除与逆转录载体之间的序列同源性。在这些辅助细胞中,将编码病毒蛋白的基因分离到两个不同的构建体中,病毒顺式作用元件位于载体中。因此,发生了一些重组事件,以重建病毒基因组。此外,减少同源性区域,减少了这些重组事件发生的可能性。因此,含有分裂基因组辅助构建体的辅助细胞被认为比含有一个基因组的辅助构建体的辅助细胞更安全。

[0146] 诱导型辅助构建体

[0147] 与上文描述的组成型表达病毒蛋白的辅助细胞系相反,设计了一些辅助细胞系,用于以诱导型方式表达病毒蛋白。制备诱导型辅助细胞系的一个原理是一些病毒蛋白是细胞毒性的,并且不能容易地以高水平表达。通过采用诱导型系统,细胞毒性蛋白的表达可以限于病毒增殖的阶段。通过控制细胞毒性蛋白的表达,可以达到高病毒滴度。诱导型辅助细胞的实例包括293GPG细胞和HIV-1辅助细胞系。

[0148] 瞬时转染系统

[0149] 随着有效转染方法的开发,也开发了瞬时转染系统,用于增殖逆转录病毒载体。在这些系统中,通常从两个不同的构建体表达辅助功能,所述构建体中的一个表达gag-pol,另一个表达env。这两个构建体通常具有很小的序列同源性。该逆转录病毒载体和辅助构建体转染到细胞中,在转染后几天收获病毒。

[0150] 产生假型病毒的系统

[0151] 假型是指含有来自一种病毒的病毒基因组和来自一种不同病毒的部分(或全部)病毒蛋白的病毒颗粒。假型的最常见形式包括利用另一种病毒的包膜蛋白的病毒。一些辅助细胞系含有从一种病毒表达gag-pol并且从另一种病毒表达env的辅助构建体。由于Gag多蛋白选择病毒RNA,要增殖的病毒载体含有被这些细胞中表达的Gag多蛋白识别的RNA。但是,产生的病毒颗粒含有来源于另一病毒的Env蛋白。因此,这些病毒颗粒仅仅能够感染表达与异源包膜蛋白相互作用的报道物的细胞。例如,辅助细胞系PG13从MLV表达gag-pol,并且从长臂猿白血病毒(GaLV)表达env。由于PG13细胞系表达MLV Gag多蛋白,它能够有效包装基于MLV的逆转录病毒载体。也表明了一些来源于不同科的病毒的包膜也能够使逆转录病毒假型化,并且产生感染性病毒颗粒。例如,可以用疱疹性口炎病毒(VSV),即一种杆状病毒的G蛋白产生假型逆转录病毒载体。这些VSV G假型病毒表现出非常宽的宿主范围,并且能感染多种正常条件下不能被逆转录病毒感染的细胞。其它可以用于载体假型化的包膜是以下病毒的包膜:有效靶定造血细胞的RD114内源性猫逆转录病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、狂犬病病毒、Ebola和Mokola病毒、Ross河病毒和Semliki森林病毒和杆状病毒gp64包膜。

[0152] 假型化可以涉及例如基于诸如HIV的慢病毒的逆转录病毒基因组或马感染性贫血病毒(EIAV),并且包膜蛋白可以例如是称作4070A的两亲包膜蛋白。或者,包膜蛋白可以是来自于另一种病毒的蛋白如流感病毒血凝素。在另一种替代方案中,包膜蛋白可以是修饰的包膜蛋白,如突变的、截短的或工程化的包膜蛋白(如工程化的RD114包膜)。可以进行修饰或选择修饰,以诱导靶定能力或减少毒性或用于其它目的。

[0153] 含有遗传修饰的env,用于细胞或组织靶定的系统

[0154] 病毒包膜蛋白和细胞受体之间的相互作用决定了病毒的宿主范围。开发了一些策略,用于通过改变病毒Env将病毒靶向递送到某些细胞类型中。翻译和修饰后,Env的SU部分与细胞受体相互作用。Env的SU部分的修饰通常通过去除SU的编码区的一部分并且用其它蛋白的区域替代而实现。用于修饰Env的SU部分的蛋白包括红细胞生成素、heregulin、胰岛素样生长因子和抗多种蛋白的单链可变片段抗体。

[0155] 杂交系统

[0156] 一些最近开发的系统利用杂交方法使逆转录病毒载体增殖。用辅助细胞系组成型表达一些病毒蛋白,而通过瞬时转染将其他病毒蛋白导入辅助细胞系。例如,可以将逆转录病毒载体导入组成型表达MLVgag-pol的辅助细胞系。为了增殖逆转录病毒载体,设计用于表达VSVG的质粒可以通过瞬时转染导入系统中。作为该方案的另一变化,逆转录病毒自身可以编码一些病毒蛋白(例如Gag/Gag-Pol),并且辅助细胞系可以提供其他病毒蛋白(Env)(Boerkoel et al.,1993)。利用其他病毒递送逆转录病毒辅助构建体的方法也可以使用。例如,制备了修饰的单纯疱疹病毒,使其含有逆转录病毒gag-pol和env,以便形式辅助功能。类似地,也采用了腺病毒载体和Semliki森林病毒来源的表达载体将编码MLV病毒蛋白

的基因送递到辅助细胞中。

[0157] 基于不同逆转录病毒的载体

[0158] 已经修饰了很多逆转录病毒,用于产生能够携带感兴趣的基因(转基因)的载体。病毒载体通常含有病毒复制和基因表达所需的全部顺式作用元件。在来源于一些病毒的载体中也可能需要其它元件,用于确保成功的基因送递。这些顺式作用元件的要求通常由于对这些病毒的生物学的理解更强而变得明显。此外,为了允许细菌细胞中的简单操作,大多数逆转录病毒载体是质粒形式,并且具有含有细菌复制起点和抗生素抗性基因的主链。典型地进行以下步骤,产生来自逆转录病毒载体的病毒颗粒。首先通过转染、电穿孔或脂转染将载体DNA导入辅助细胞。将DNA导入辅助细胞后,将载体DNA整合到辅助细胞中,并且表达。从5' LTR表达病毒RNA,并且组成两个R区域之间的所有序列。该病毒RNA含有包装信号,并且有效包装到病毒颗粒中。在逆转录病毒复制期间,两个LTRs外的质粒主链序列不转移到靶细胞中。下文描述了来源于不同逆转录病毒的一些逆转录病毒载体的基本结构。

[0159] 来源于肿瘤病毒的载体

[0160] 本文将描述来自三种不同肿瘤病毒的载体,用于代表一些最广泛使用的逆转录病毒载体。肿瘤病毒仅仅能够感染分裂的细胞;因此,来源于肿瘤病毒的载体仅仅能够用于有效将基因送递到分裂的细胞中。细胞增殖的要求有时可以用作选择性靶定迅速分裂的细胞(例如癌细胞)的优点。

[0161] 1. 基于鼠白血病病毒的载体。目前,基于MLV的逆转录病毒载体和辅助细胞是最常用的基因送递系统。工程化载体和辅助细胞系的开发和可获得性促进了基于MLV的载体的普及。载体含有基因表达和病毒复制所需的顺式作用病毒序列,如LTRs、PBS、PPT和att。包装信号可以是最低信号或延伸到gag开放读码框(+)的更长的信号。当载体中存在+时,必须使gag的翻译起始密码子突变,以防止截短的Gag蛋白表达。设计了一些载体,使其含有位于包装信号和3'非翻译区之间的多个限制酶位点。这些克隆位点的存在促进了能够表达感兴趣基因的载体的构建。

[0162] 基于MLV的载体可以在所有MLV辅助细胞系中有效增殖。存在一些MLV包膜蛋白,其决定MLV载体的宿主范围。利用亲嗜性包膜的病毒可以感染小鼠细胞,但是不能感染来源于其它物种的病毒。利用双嗜性包膜的病毒可以感染小鼠细胞和来源于其它物种的细胞,包括人细胞。利用异种包膜的病毒不能感染小鼠细胞,但是能够感染来源于其它物种的细胞。此外,MLV载体也能够基于脾坏死病毒(SNV)的辅助细胞系中增殖。SNV是与MLV远相关的鸟类病毒。出乎意料地,SNV蛋白保留了以下能力:与MLV顺式作用序列相互作用和包装MLV RNA、逆转录MLV基因组,并将MLV RNA整合到宿主中。

[0163] 2. 基于脾坏死病毒的载体。这些载体中需要的病毒序列与MLV载体的序列非常相似。称作E的SNV的包装信号不延伸到gag开放读码框中;因此,大多数基于SNV的载体不含有gag编码区。类似于MLV载体,感兴趣的基因插入接头区,该接头区含有多个位于包装信号和3'非翻译区之间的限制位点。基于SNV的载体可以在基于SNV的辅助细胞系如C3A2、DSDH、DSH134G和DSN中增殖。

[0164] 3. 基于劳斯肉瘤病毒和禽类白血病病毒的载体。RSV是唯一已知的能够复制的急性致癌逆转录病毒。除了gag-pol和env,RSV也编码env和3'LTR之间的致癌基因v-src。v-src上游的剪接受体位点使得基因能够以剪接形式表达。RSV具有编码其它基因的能力。已

经进行了多种修饰,以制备能够复制的病毒载体,其一个实例是用剪接受体位点和一些限制酶位点替代v-src。可以将DNA片段插入限制位点,以制备能够复制的载体,该载体表达感兴趣的基因。

[0165] 已经修饰了ALV,以制备需要辅助细胞进行增殖的载体。类似于上文描述的MLV和SNV载体,ALV载体的基本结构也包含5'和3'LTRs、att、PBS、PPT和包装信号。ALV的包装信号延伸到gag开放读码框中,并且gag的相关部分包含在基于ALV的载体中,以获得有效包装。

[0166] 来源于慢病毒的载体

[0167] 与肿瘤病毒相反,一些慢病毒表现出感染非分裂的静止细胞。慢病毒是复杂逆转录病毒,可能需要表达用于调节它们的复制周期的辅助蛋白。这些辅助蛋白中的一些结合于病毒基因组的区域,以调节基因表达。因此,基于慢病毒的载体需要掺入额外的顺式作用元件,使得能够发生有效病毒复制和基因表达。作为基于慢病毒的载体的实例,下文描述了基于HIV-1和HIV-2的载体。

[0168] 含有顺式作用元件的HIV-1载体也存在于简单逆转录病毒中。已经表明这些序列延伸到对HIV-1的包装重要的gag开放读码框中。因此,HIV-1载体通常含有gag的相关部分,其中翻译起始密码子进行了突变。此外,大多数HIV-1载体也含有一部分env基因,其包含RRE。Rev结合于RRE,其允许全长或单独剪接的mRNAs从细胞核转运到细胞质中。在缺乏Rev和/或RRE的条件下,全长HIV-1 RNAs在细胞核中积累。或者,来自某些简单逆转录病毒,如Mason-Pfizer猴病毒的组成型转运元件可以用于解除对Rev和RRE的需要。从HIV-1 LTR启动子的有效转录需要病毒蛋白Tat。因此,重要的是如果需要从HIV-1LTR有效转录,则Tat在靶细胞中表达。可以通过从逆转录病毒载体表达Tat基因满足对Tat表达的需要。或者,从异源的内部启动子表达感兴趣的基因能够避开对Tat表达的需要。

[0169] 大多数基于HIV-2的载体在结构上与HIV-1载体非常相似。类似于基于HIV-1的载体,HIV-2载体也需要RRE,用于有效转运全长或单独剪接的病毒RNAs。

[0170] 也已经证明了利用来自猿猴免疫缺陷病毒的病毒蛋白,HIV-1载体可以增殖到高病毒滴度。在一个系统中,载体和辅助构建体来自两种不同的病毒,减少的核苷酸同源性可以减少重组的可能性。除了基于灵长类动物慢病毒的载体,也已经开发了基于猫免疫缺陷病毒的载体,作为来源于致病HIV-1基因组的载体的替代。这些载体的结构也类似于基于HIV-1的载体。

[0171] 来源于泡沫病毒的载体

[0172] 泡沫病毒是非常规的逆转录病毒,因为它们的复制周期中的很多特征与肿瘤病毒和慢病毒不同。尽管这些病毒对培养的细胞可能是有毒的,但这些泡沫病毒在宿主中都不导致疾病。

[0173] 泡沫病毒载体的一个实例含有典型的逆转录病毒顺式作用序列。除了5'非翻译区中的序列,gag开放读码框的5'部分和pol开放读码框的3'部分中的序列对于有效包装是重要的。类似于慢病毒,从人泡沫病毒启动子的表达由病毒蛋白Tas激活。

[0174] 逆转录病毒载体的设计

[0175] 逆转录病毒载体可以含有很多不同的修饰,其对基因治疗起多种作用。可以导入这些修饰,以便允许一个以上基因表达,调节基因表达,激活或灭活病毒载体,并且去除病毒序列,以避免能够复制的病毒的产生。下文描述了这些修饰的一些实例。

[0176] A. 标准载体

[0177] 1. U3启动子驱动的基因表达。从位于5' LTR的U3区中的逆转录病毒启动子表达全长病毒RNA。病毒RNA含有R、U5、5' 非翻译区、感兴趣的基因、3' 非翻译区、U3和R。可以从全长RNA翻译插入在5' 和3' 非翻译区之间的基因,所述RNA从U3启动子转录。

[0178] 在病毒原种增殖期间,通常需要表达载体中的选择标记基因,使得能够选择病毒载体转染或感染的辅助细胞。因此,通常需要设计表达选择标记基因和感兴趣基因的逆转录病毒载体。通常将药物抗性基因用作选择标记,但其它标记基因,如绿色荧光蛋白基因也可以用于选择转染或感染的细胞。可以通过采用内部启动子、RNA剪接或内部核糖体进入位点(IRES)实现逆转录病毒载体内两种基因的表达。

[0179] 2. 利用内部启动子表达其它基因的载体。基因表达的一个实例来自含有内部启动子的逆转录病毒载体,其中例如采用从病毒U3启动子表达的全长RNA来翻译第一个感兴趣的基因。从内部启动子表达的亚基因组RNA用于翻译第二种感兴趣的基因。

[0180] 3. 利用剪接来表达其它基因的载体。逆转录病毒通过受调节的剪接表达env。用于表达env的剪接供体位点位于逆转录病毒的5' 非翻译区。在复制过程中,剪接了一些全长病毒RNAs,以产生用于表达Env蛋白的亚基因组病毒RNAs。通过采用病毒剪接供体和剪接受体位点,采用相同原理表达两种不同基因,从而开发剪接载体。剪接载体的优点是仅仅需要一个启动子,并且消除了启动子干扰的任何可能。

[0181] 4. 利用翻译控制信号表达其它基因的载体

[0182] 首先在小核糖核酸病毒中证明了mRNA中的序列可以作为使核糖体能够结合mRNA的中部,并且翻译远离mRNA的5' 末端基因。这些序列(称作IRES)目前通常用于逆转录病毒载体。除了在小核糖核酸病毒中鉴定了IRES序列,也在一些逆转录病毒,如MLV、SNV和内源性病毒样颗粒(VL30)的5' 非翻译区鉴定了IRES序列。因此,也能够利用这些逆转录病毒IRES序列表达第二基因。其它允许从单个转录物表达多个蛋白的序列是自我切割的2A样肽(也称作CHYSEL,即顺式作用的水解酶元件),其来源于口蹄疫病毒和其它picoRNA病毒。或者,可以用双向启动子从相同的启动子表达两种基因。

[0183] B. 双拷贝载体

[0184] 利用了LTR序列在逆转录病毒载体中复制的事实构建了含有两个拷贝的感兴趣基因的载体。例如,第一组双拷贝载体含有病毒上游U3区中的感兴趣基因。采用RNA聚合酶II启动子或RNA聚合酶III启动子表达这些基因。已经证明了这种策略成功增加基因表达水平。在双拷贝载体的另一个实例中,载体含有R区中部的感兴趣基因。

[0185] C. 自灭活载体

[0186] 与用逆转录病毒载体进行基因治疗相关的一个安全性考虑是在载体增殖期间会产生能够复制的病毒,这会导致治疗载体意外传播到非靶组织。为了解决这一问题,设计了一类载体,进行自灭活。其原理是在基因送递后,载体将去除一些完成另一轮复制所需的顺式作用元件。因此,即使存在能够复制的病毒,这些载体不能有效转移到其它靶细胞。能够复制的病毒的产生有时涉及缺陷性辅助质粒和编码感兴趣基因的载体之间的重组。因此,自灭活载体的另一个可能的益处是它可以减少产生能够复制的病毒的可能性。

[0187] 1. U3⁻载体。U3⁻载体是要开发的第一种自灭活逆转录病毒载体。这些载体设计为在逆转录过程中去除了病毒U3启动子,使得靶细胞中的前病毒缺乏病毒启动子。在这些载体

中,5' LTR的U3是完整的,而3' LTR的U3由于大的缺失而灭活。从该载体产生的RNA含有R、U5、5' 非翻译区、感兴趣的基因、3' 非翻译区、缺失的U3和R。在逆转录过程中,病毒RNA的3'末端处的U3通常用作模板,产生LTR。因此,通过逆转录从U3⁻载体合成的病毒DNA在两个LTRs中都含有缺失的U3序列。由于在逆转录过程中缺失了病毒启动子,感兴趣的基因处于内部启动子的控制下。U3⁻载体的优点是它可能更安全,因为产生能够复制的病毒的可能性减少。但是,DNA转染过程中的重组可以以低频率发生,以重新产生3' LTR处的U3。如果发生这种情况,得到的载体仍然在U3中含有启动子,因此保留两个完整的LTRs。在一些U3⁻载体中进行了其它修饰,以减少5' 和3' LTRs之间的同源性,其减少了DNA转染过程中重组和再次产生完整LTR的可能性。

[0188] 2.Cre/loxP载体。Cre重组酶,即噬菌体P1的一种天然存在的定点重组酶,识别一种32bp的序列,称作loxP。采用由不同长度的序列分隔的两个loxP位点,Cre可以有效介导定点重组。重组事件包括loxP位点之间的序列的缺失、插入和倒置。已经利用该系统开发自灭活的逆转录病毒载体(Choulika et al.,1996;Russ et al.,1996)。这种载体的一个实例包含完整的5' LTR和逆转录病毒复制所需的所有顺式作用元件。该载体含有采用内部启动子表达的cre重组酶基因。通过在U3中插入一些序列,包括loxP位点、启动子和感兴趣的基因,修饰了3' LTR;此外,3' U3通常含有缺失,以减少启动子活性。全长病毒RNA包装到病毒体中,在感染靶细胞后,对病毒RNA进行逆转录。3' U3序列用作模板,合成两个LTRs;因此,两个LTRs中的序列含有一个拷贝的loxP位点、启动子和感兴趣的基因。表达cre基因,并且在感染的靶细胞中合成Cre重组酶。Cre重组酶然后介导病毒DNA中两个loxP位点之间的序列缺失,其导致5' LTR、5' 非翻译区、内部启动子和cre的缺失。因此,靶细胞中的前病毒仅仅含有一个表达感兴趣的基因的LTR。

[0189] 采用相同的原理,可以用Cre/loxP系统去除逆转录病毒载体中的不同序列,以及去除包装细胞中辅助构建体的部分。Cre/loxP系统的另一种应用是其可以用于在病毒DNA整合到靶细胞的染色体内之后从逆转录病毒去除选择标记。选择标记包含在载体中,使得可以选择载体DNA转染的辅助细胞。选择标记的去除是需要的,因为选择标记的存在能够导致启动子干扰或抗转导细胞的免疫应答。选择标记的去除是通过插入侧翼于选择标记基因的两个loxP位点而实现的。通过感染将载体导入靶细胞后,用另一种表达Cre重组酶的载体感染靶细胞。然后Cre重组酶去除两个loxP位点之间的包含选择标记的序列。因此,最终的前病毒仅仅表达感兴趣的基因。

[0190] D.自灭活和自激活载体

[0191] 根据基因产物的性质和作用,可能需要在辅助细胞中引入灭活的感兴趣基因,并且在将其递送到靶细胞之后灭活该基因。例如,如果来自感兴趣的基因的产物是细胞毒性的,那么,在辅助细胞中表达基因,将导致细胞毒性,并且最可能减少或消除病毒产生。制备了一系列载体,用于在基因递送期间同时激活基因和灭活载体。这是通过逆转录期间频繁去除直接重复的序列而实现的。如果病毒中存在直接重复的序列,一个拷贝的直接重复序列和两个重复序列之间的所有序列可以在逆转录期间以高频去除。已经利用逆转录酶的这种特性制备了自激活和自灭活逆转录病毒载体。

[0192] E.靶定于特定细胞的载体

[0193] 基因治疗的一个重要目的是开发将基因递送靶定到特定细胞类型或组织的方法。

在一种尝试中采用了至少两种策略,用逆转录病毒载体靶定基因送递。一种策略设计为通过采用与细胞类型特异性受体相互作用的天然或基因工程化包膜蛋白,在病毒进入宿主细胞的点控制基因送递。另一种策略设计用于通过利用组织特异性启动子控制治疗基因在特定细胞类型中的表达。

[0194] F. 利用细胞类型特异性启动子的载体

[0195] 启动子在某些组织中有活性,或者反应于某些可以用于调节感兴趣基因表达的试剂。这些启动子可以插入逆转录病毒载体的LTRs之间。或者,受调节的启动子可以用于替代U3区中的病毒启动子。用内部组织特异性启动子设计逆转录病毒载体,类似于其它含有内部启动子的逆转录病毒载体的设计。

[0196] 病毒宿主范围

[0197] 1. 包膜选择和病毒宿主范围的考虑。病毒包膜蛋白的性质决定某种病毒是否能够进入靶细胞。因此,重要的是考虑靶细胞在选择用于病毒生产的包膜蛋白之前是否具有正确的细胞表面受体(如上文的讨论)。

[0198] 本发明的逆转录病毒载体颗粒也能够转导缓慢分裂、并且诸如MLV的非慢病毒不能有效转导的细胞。缓慢分裂的细胞每3-4天分裂一次,包括某些肿瘤细胞。尽管肿瘤含有迅速分裂的细胞,一些肿瘤细胞,特别是肿瘤中心的那些,不经常分裂。或者,靶细胞可以是能够进行细胞分裂的生长停滞的细胞,如肿瘤团块中部的细胞或诸如造血干细胞或CD34阳性细胞的干细胞。作为进一步的替代,靶细胞可以是分化细胞的前体,如单核细胞前体、CD33阳性细胞或骨髓前体。作为进一步的替代,靶细胞可以是分化细胞,如神经元、星形细胞、胶质细胞、小胶质细胞、巨噬细胞、单核细胞、表皮细胞、内皮细胞或肝细胞。可以在从人个体分离后体外转导靶细胞,或可以体内直接转导。

[0199] 来源于腺病毒的载体

[0200] 腺病毒是一种双链的线性DNA病毒,其不经过RNA中间体。存在超过50种不同的腺病毒的人血清型,基于基因序列同源性分为6个亚组,所有亚组都表现出相似的基因组。人C组腺病毒血清型2和5(具有95%序列同源性)最常用于腺病毒载体系统,并且通常与年轻人的上呼吸道感染相关。

[0201] 本发明的腺病毒/腺病毒载体可以来源于人或动物。对于来源于人的腺病毒,优选的腺病毒是分类到C组的那些,特别是2(Ad2)、5(Ad5)、7(Ad7)或12(Ad12)型的腺病毒。更优选地,它是Ad2或Ad5腺病毒。在来源于动物的各种腺病毒中,可以使用犬腺病毒、小鼠腺病毒或禽类腺病毒,如CEL0病毒(Cotton et al., 1993, J Virol 67:3777-3785)。至于动物腺病毒,优选采用来源于犬类的腺病毒,特别是CAV2腺病毒的病毒株[例如曼哈顿株或A26/61(ATCC VR-800)]。其它来源于动物的腺病毒包括申请W0-A-94/26914中提到的那些,在此引入该申请作为参考。

[0202] 如上文提到的,腺病毒基因组的组构在所有腺病毒组中是类似的,特定功能通常位于研究的每种血清型的相同位置。腺病毒基因组包含位于每个末端的倒置的末端重复序列(ITR)、包壳序列(Psi)、早期基因和晚期基因。主要的早期基因分类为中间早期(E1a)、延迟早期(E1b、E2a、E2b、E3和E4)和中间区的系列。其中,包含在E1区中的基因对于病毒增殖是特别需要的。主要的晚期基因包含在L1-L5区中。已经对Ad5腺病毒的基因组进行了完全测序,并且在数据库中可获得(特别参见Genbank登录号M73260)。同样,也已经对部分或甚

至全部其它腺病毒基因组(如Ad2、Ad7、Ad12)进行了测序。

[0203] 为了用作重组载体,典型地对腺病毒进行了修饰,使其不能在感染的细胞中复制。

[0204] 因此,现有技术描述的构建体包括缺失了对病毒复制来说关键的E1区,其中插入了异源DNA序列(Levrero et al.,1991,Gene 101:195;Gosh-Choudhury et al.,1986,Gene 50:161)。此外,为了改进载体的性质,提出了在腺病毒基因组中建立其它缺失或修饰。因此,将热敏性点突变导入了ts125突变体,使其能够灭活72kDa DNA结合蛋白(DBP)。优选地,用于本发明的重组腺病毒载体在其基因组的E 1区包含缺失。更具体地,其在E1a和E1b区包含缺失。根据特别优选的方式,通过Ad5腺病毒序列(Genbank Accession No.M73260)中的核苷酸454-核苷酸3328的PvuII-BglIII片段的缺失,灭活E1区。在另一种优选实施方案中,通过缺失核苷酸382-核苷酸3446的HinfII-Sau3A片段,灭活E1区。

[0205] 其它腺病毒载体包含对于病毒复制和/或增殖来说关键的另一个区域,即E4区的缺失。E4区参与调节晚期基因的表达、晚期核RNAs的稳定性、宿主细胞蛋白表达的减少和病毒RNA的复制效率。因此,缺失E1和E4区的腺病毒载体具有极度减少的病毒基因表达和转录背景噪音。所述载体描述于例如申请W0-A-94/28152、W0-A-95/02697、W0-A-96/22378。此外,也已经描述了携带IVa2基因的修饰的载体(W0-A-96/10088)。

[0206] 根据优选的变体,用于本发明中的重组腺病毒载体还包含其基因组E4区中的缺失。更具体地,E4区中的缺失影响所有开放读码区。通过精确的实例可以提到的是核苷酸33466-35535或33093-35535的缺失。具体地,优选的载体包含整个E4区的缺失。这可以实施相应于核苷酸35835-32720的MaeII-MscI片段的缺失或切除。E4区中其它类型的缺失描述于申请W0-A-95/02697和W0-A-96/22378,在此引入作为参考。

[0207] 或者,仅仅缺失了E4的一个功能部分。该部分至少包含ORF3和ORF6框。例如,这些编码框可以分别以PvuII-AluI和BglIII-PvuII片段的形式从基因组缺失,分别相应于核苷酸34801-34329和34115-33126。病毒Ad2 d1808或病毒Ad5 d11004、Ad5 d11007、Ad5 d11011或Ad5d11014的E4区的缺失也可以在本发明的范围内使用。

[0208] 上文给出的位置是指公开并且在数据库中可以读取的野生型Ad5腺病毒序列。尽管不同腺病毒血清型之间可以存在小的变异,这些位置通常适用于从任何血清型,特别是腺病毒Ad2和Ad7构建本发明的重组腺病毒。

[0209] 此外,产生的腺病毒可以在基因组中有其它改变。具体地,可以去除其它区域,以增加病毒的容量并且减少其与病毒基因表达相关的副作用。因此,特别是E3或IVa2区的全部或部分可以去除。但是,至于E3区,保留编码gp19K蛋白的部分是特别优选的。这种蛋白实际上使其能够防止腺病毒载体成为免疫反应的对象,所述免疫反应(i)将限制其作用,和(ii)具有不需要的副作用。根据特定模式,去除了E3区,并且重新导入编码gp19K蛋白的序列,受异源启动子的控制。

[0210] 本发明的多核苷酸/NOI可以插入重组基因组的多个位点。可以插入E1、E3或E4区,作为缺失或多余序列的替代。也可以将其插入任何其它位点,顺式位于生产病毒所需的序列(ITR序列和包壳序列)外。

[0211] E2区是必须的,因为它编码72kDa DNA结合蛋白、DNA聚合酶和引发起始DNA合成的蛋白必须的55kDa末端蛋白(TP)的80kDa前体。

[0212] 作为制备更具有缺陷的病毒的一种替代方法是完全“摧毁病毒的内部结构”,仅仅

留下病毒复制所需的末端重复序列。“摧毁内部结构的”或“无内部结构的”病毒可以在293细胞系中用第一代辅助病毒生长到高滴度。

[0213] 重组腺病毒典型地在包壳细胞系中产生,这种细胞系是能够反式补充重组腺病毒基因组中缺乏的一个或多个功能的细胞系。所述细胞系之一是例如细胞系293,其中整合了部分腺病毒基因组。更精确地,细胞系293是一种人肾胚细胞系,其含有血清型5腺病毒(Ad5)基因组的左端(约11-12%),其中包含左ITR、包壳区、E1区,包括E1a和E1b、编码蛋白pIX的区域、和编码蛋白pIVa2的区域的一部分。这种细胞系能够反式补充E1缺陷,即缺乏所有或部分E1区的重组腺病毒,并且能够产生具有高滴度的病毒原种。这种细胞系也能够允许的允许的温度下(32℃)产生病毒原种,其额外包含热敏性E2突变。

[0214] 已经特别基于人肺癌细胞A549(WO-A-94/28152)或人成视网膜细胞(Hum.Gen.Ther.(1996)215)描述了能够补充E1区的其它细胞系。此外,也已经描述了能够反式补充一些腺病毒功能的细胞系,例如补充E1和E4区的细胞系(Yeh et al.,1996, J.Virol.70:559;Krougliak et al.,1995,Hum.Gen.Ther.6:1575)和补充E1和E2区的细胞系(WO-A-94/28152,WO-A-95/02697,WO-A-95/27071)。

[0215] 通常通过将病毒DNA导入包壳细胞系,然后在大约2或3天后裂解细胞(腺病毒周期的动力学是24-36小时)而制备重组腺病毒。为了执行该程序,导入的病毒DNA可以是完整的重组病毒基因组,任选在转染到细胞中细菌(WO-A-96/25506)或酵母(WO-A-95/03400)中构建。它也可以是用于感染包壳细胞系的重组病毒。病毒DNA也可以以携带部分重组病毒基因组的片段和同源区形式导入,所述同源区使在导入包壳细胞后,能够通过各个片段之间的同源重组重建重组病毒基因组。

[0216] 能够复制的腺病毒也能够用于基因治疗。例如,E1a基因可以在肿瘤特异性启动子的调节下插入第一代病毒。理论上,将病毒注射到肿瘤后,它能够特别在肿瘤中而不是在周围的正常细胞中复制。这种类型的载体可以用于通过裂解直接杀伤肿瘤细胞或递送“自杀基因”,如单纯疱疹病毒胸苷激酶基因(HSV tk),其能够在更昔洛韦处理后杀伤受感染的细胞和旁观细胞。

[0217] 因此,考虑到本发明的HRE构建体可以由于很多实体瘤团块中存在的低氧条件而在某些肿瘤组织中优先有活性,本发明提供了包含本发明的多核苷酸的载体,所述多核苷酸任选与编码腺病毒E1a多肽的核酸序列可操作连接。HRE增强子控制下的E1a多肽仅仅在低氧条件下表达,因此腺病毒仅仅在低氧条件下能够复制。腺病毒缺乏内源性E1基因,优选也缺乏内源性E3基因。上文描述了可以缺失的腺病毒基因组的其它区域。也可能需要引入低氧反应元件控制下的全部或部分E3基因,使得宿主细胞免疫调节平衡,获得病毒在肿瘤内的正确传播和对感染的细胞的免疫应答。

[0218] 仅仅E1b缺陷的腺病毒已经特别用于抗肿瘤治疗的1期临床试验。E1b编码的多肽能够阻断p53介导的凋亡,防止细胞反应于病毒感染而自身杀伤。因此,在正常非肿瘤细胞中,在缺乏E1b的条件下,病毒不能够阻断凋亡,并且因此不能够产生感染性病毒并传播。在p53缺陷的肿瘤细胞中,E1b缺陷病毒能够生长并且传播到邻近的p53缺陷肿瘤细胞,而不是正常细胞。再次,这种类型的载体能够用于递送治疗基因,如HSV tk。

[0219] 因此,优选的是本发明的表达E1a的腺病毒缺乏功能性E1b基因。

[0220] 其它必须的病毒基因也可以置于低氧反应性调节元件的控制下。

[0221] 来源于单纯疱疹病毒的载体

[0222] 1.病毒株

[0223] 本发明的HSV载体可以来源于例如HSV1或HSV2株,或其衍生物,优选HSV1。衍生物包括含有来自于HSV1和HSV2株的DNA的型间重组体。衍生物优选与HSV1或HSV2基因组具有至少70%序列同源性,更优选具有至少90%,甚至更优选95%同源性。

[0224] HSV株在治疗程序中的应用将需要对病毒株进行减毒,使得它们不能建立裂解周期。特别地,如果HSV载体用于人类中的基因治疗,多核苷酸应该优选插入必须基因。这是由于如果载体病毒遇到野生型病毒,可以通过重组,发生异源基因向野生型病毒的转移。但是,只要多核苷酸插入必须基因,这种重组转移也将去除受体病毒中的必须基因,并且防止异源基因“逃离”到能够复制的野生型病毒群体中。

[0225] 减毒株也可以用于产生本发明的HSV株,在此仅仅是举例,包括在ICP34.5或ICP27具有突变的株,例如1716株(MacLean et al.,1991,J Gen Virol 72:632-639)、R3616和R4009株(Chou and Roizman,1992,PNAS 89:3266-3270)以及R930(Chou et al.,1994,J.Virol 68:8304-8311),它们都在ICP34.5中具有突变,和d27-1(Rice and Knipe,1990,J.Virol 64:1704-1715),它在ICP27中具有缺失。或者,缺失ICP4、ICP0、ICP22、ICP6、ICP47、vhs或gH,在VMW65中具有灭活突变,或具有上述任何组合的病毒株也可以用于生产本发明的HSV株。

[0226] 用于描述多种HSV基因的术语参见Coffin and Latchman,1996.Herpes simplex virus-based vectors.In:Latchman DS(ed).Geneticmanipulation of the nervous system.Academic Press:London,pp99-114。

[0227] 2.补充细胞系

[0228] 在表达ICP27的细胞系,例如V27细胞(Rice and Knipe,1990,J.Virol 64:1704-1715)或2-2细胞(Smith et al.,1992,Virology 186:74-86)中增殖ICP27缺陷的HSV病毒。也可以用包含能够在哺乳动物细胞,例如Vero或BHK细胞中表达的功能性HSV ICP27基因的载体,优选质粒载体,和编码选择标记,例如新霉素抗性的载体,优选质粒载体,共转染上述细胞,从而制备表达ICP27的细胞系。然后利用本领域技术人员已知的方法(例如Rice and Knipe,1990中的描述),基于支持ICP27⁻突变HSV株生长的能力,进一步筛选具有选择标记的克隆,从而确定哪些克隆也表达功能性ICP27。

[0229] 按照上文的描述生产了不允许ICP27⁻突变HSV株转变为具有功能性ICP27的病毒株的细胞系,确保包含功能性ICP27基因的载体不包含与保留在ICP27⁻突变病毒中的序列重叠(即同源)的序列。

[0230] 当本发明的HSV株在其它必须基因中包含灭活修饰,如ICP4时,补充细胞系将进一步包含功能性HSV基因,其以上文对ICP27描述的相同方式补充修饰的必须基因。

[0231] 3.突变方法

[0232] 可以通过本领域公知的一些技术使HSV基因变得功能上无活性。例如,可以通过缺失、取代或插入,优选通过缺失,使它们功能上无活性。缺失可以除去部分基因或完整基因。插入的序列可以包括上文描述的表达盒。

[0233] 通过本领域技术人员公知的同源重组方法,在HSV株中产生突变。例如,与包含侧翼于同源HSV序列的突变序列的载体,优选质粒载体一起转染HSV基因组DNA。突变的序列可

以包含缺失、插入或取代,所有这些可以通过常规技术构建。插入可以包含选择标记基因,例如lacZ,用于通过例如 β -半乳糖苷酶活性筛选重组病毒。

[0234] 也可以在其它HSV基因,例如诸如ICP0、ICP4、ICP6、ICP22、ICP47、VMW65、gH或vhs的基因中产生突变。在VMW65基因的情况下,不去除完整基因,因为它编码必须的结构蛋白,但进行小的灭活插入,其消除VMW65转录激活IE基因的能力(Ace et al.,1989,J Virol63:2260-2269)。

[0235] 4.包含本发明的转基因和miRNA的HSV株

[0236] 本发明的转基因和mircoRNA可以在任何位置插入HSV基因组,前提是病毒仍然可以增殖,如果NOI插入必须基因,其可能需要利用携带另一HSV必须基因的细胞系(如2.部分的描述)。

[0237] 可以通过HSV株与例如携带侧翼于HSV序列的表达盒的质粒的同源重组将本发明的序列插入HSV基因组,所述质粒如上文所述,用于导入突变。可以采用本领域公知的克隆技术,将多核苷酸导入包含HSV序列的合适的质粒载体。

[0238] 其它病毒载体

[0239] 可以用于本发明的其它病毒载体包括腺伴随病毒、疱疹性口炎病毒、痘苗病毒和基于SV-40的病毒载体。

[0240] 施用

[0241] miRNA和转基因可以施用于患者,或用于制备转基因植物或非人动物。术语“施用”包括通过病毒或非病毒技术递送。病毒递送机制包括但不限于上文描述的腺病毒载体、腺伴随病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体和杆状病毒载体等。非病毒递送机制包括脂质介导的转染、脂质体、免疫脂质体、脂转染、阳离子表面两性分子(CFAs)及其组合。

[0242] 疾病

[0243] 通过本发明的载体系统对一种或多种治疗基因的递送可以单独使用或与其它治疗或治疗组分组合。

[0244] 例如,本发明的载体可以用于递送一种或多种用于治疗WO-A-98/05635中列出的病症的转基因。为了容易参考,现在提供该列表的一部分:癌症、炎症或炎性疾病、皮肤病、发热、心血管作用、出血、凝血和急性期反应、恶病质、食欲减退、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、偏头痛和阿司匹林依赖性抗血栓形成;肿瘤生长、侵入和传播、血管发生、转移、恶性肿瘤、腹水和恶性胸膜渗出;脑血管缺血、缺血性心脏病、骨关节炎、类风湿关节炎、骨关节炎、哮喘、多发性硬化、神经变性、阿尔茨海默病、动脉粥样硬化、卒中、血管炎、克隆氏病和溃疡性结肠炎;牙周炎、牙龈炎;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;再狭窄、充血性心力衰竭、子宫内膜异位、动脉硬化或内皮硬化(endosclerosis)。

[0245] 此外,或替代地,本发明的载体可以用于递送一种或多种用于治疗WO-A-98/07859中列出的病症的转基因。为了容易参考,现在提供该列表的一部分:细胞因子和细胞增殖/分化活性;免疫抑制或免疫刺激活性(例如,用于治疗免疫缺陷,包括人免疫缺陷病毒感染;调节淋巴细胞生长;治疗癌症和很多自身免疫病,以及防止移植物排斥或诱导肿瘤免疫);

调节造血,如治疗骨髓或淋巴疾病;促进骨、软骨、腱、韧带和神经组织的生长,例如用于创伤愈合、治疗烧伤、溃疡和牙周病以及神经退化;抑制或激活卵泡刺激激素(调节不育);趋化/化学动力活性(例如用于动员特定细胞类型到达损伤或感染位点);止血和溶栓活性(如用于治疗血友病和卒中);抗炎活性(用于治疗例如脓毒性休克或克隆氏病);作为抗微生物剂;例如代谢或行为的调节剂;作为镇痛剂;治疗特定缺陷病症;用于治疗例如牛皮癣、用于人或兽医药物。

[0246] 此外,或替代地,本发明的逆转录病毒载体可以用于递送一种或多种用于治疗WO-A-98/09985中列出的病症的转基因。为了容易参考,现在提供该列表的一部分:巨噬细胞抑制和/或T细胞抑制活性,以及因此产生的抗炎活性;抗免疫活性,即抗细胞和/或体液免疫应答的抑制作用,包括与炎症无关的应答;抑制巨噬细胞和T细胞粘附细胞外基质成分和纤连蛋白的活性,以及上调T细胞中的fas受体表达;抑制不需要的免疫反应和炎症,包括关节炎,包括类风湿关节炎、与过敏相关的炎症、过敏反应、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、动脉硬化、动脉粥样硬化性心脏病、缺血再灌注损伤、心脏骤停、心肌梗塞、血管炎性病症、呼吸窘迫综合征或其它心肺疾病相关的炎症、与胃溃疡、溃疡性结肠炎和其它胃肠道疾病、肝纤维化、肝硬化或其它肝脏疾病相关的炎症、甲状腺炎或其它腺体疾病、肾小球肾炎或其它肾和泌尿疾病、耳炎或其它耳鼻喉科疾病、皮炎或其它皮肤病、牙周病或其它牙科疾病、睾丸炎或附睾-睾丸炎、不育、睾丸创伤或其它免疫相关睾丸疾病、胎盘功能障碍、胎盘不全、习惯性流产、惊厥、惊厥前状况或其它免疫和/或炎症相关妇科疾病、后葡萄膜炎、中间葡萄膜炎、前葡萄膜炎、结膜炎、脉络视网膜炎、葡萄膜视网膜炎、视神经炎、眼内炎症,如视网膜炎或囊样黄斑水肿、交感神经性眼炎、巩膜炎、色素性视网膜炎、退化性颜色疾病的免疫和炎症部分、眼肿瘤的炎症部分、感染导致的眼炎、增生性玻璃体-视网膜病、急性缺血性视神经病、斑痕过量,如青光眼过滤手术后的斑痕过量、抗眼移植物的免疫和/或炎症反应和其它免疫和炎症相关眼病、中枢神经系统(CNS)或任何其它器官中从免疫和/或炎症抑制获益的与自身免疫疾病或状况或病症相关的炎症、帕金森病、帕金森病治疗导致的并发症和/或副作用、艾滋病相关痴呆合并HIV相关脑病、Devic病、小舞蹈病、阿尔茨海默病和CNS的其它变性疾病、状况或病症、卒中的炎症部分、脊髓灰质炎后综合征、精神病的免疫和炎症部分、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、Guillain-Barre综合征、小舞蹈病、重症肌无力、假脑瘤、唐氏综合征、亨廷顿病、肌萎缩性侧索硬化、CNS压缩损伤或CNS创伤或CNS感染的炎症部分、肌萎缩和营养不良的炎症部分、以及中枢和周围神经系统的免疫和炎症相关疾病、状况或病症、创伤后炎症、脓毒性休克、传染病、手术的炎症合并症或副作用、骨髓移植或其它移植合并症和/或副作用、例如由于病毒载体感染导致的基因治疗的炎症和/或免疫合并症和副作用、或与艾滋病相关的炎症、用于阻抑或抑制体液和/或细胞免疫应答、用于通过减少单核细胞或淋巴细胞的量治疗或改善单核细胞或白血病增生性疾病例如白血病、用于预防和/或治疗天然或人工细胞、组织和器官,如角膜、骨髓、器官、晶状体、起搏器、天然或人工皮肤移植情况下的移植物排斥。

[0247] 本发明也提供了用于通过基因疗法治疗个体的药物组合物,其中该组合物包含治疗有效量的本发明的载体或由其制备或获得的病毒颗粒,所述载体包含一种或多种可递送的治疗性和/或诊断性转基因。所述药物组合物可以用于人或动物。典型地,医生确定最适

于个体受试者的实际剂量,该剂量随着特定个体的年龄、体重和反应而改变。

[0248] 组合物可以任选包含药学可接受的载体、稀释剂、赋形剂或佐剂。可以根据预期的施用途径和标准药学实践选择药学载体、赋形剂或稀释剂。药物组合物可以包含以下成分作为载体、赋形剂或稀释剂,或除载体、赋形剂或稀释剂还包含以下成分:任何合适的粘合剂、润滑剂、悬浮剂、包衣剂、增溶剂和其它可以辅助或增加病毒进入靶位点的载体试剂(例如脂质递送系统)。

[0249] 合适的时候,可以通过以下方式中的一种或多种方式施用药物组合物:吸入,以栓剂或阴道栓形式,以洗液、溶液、霜、油膏或爽身粉形式表面施用,采用皮肤贴片,以含有赋形剂如淀粉或乳糖的片剂形式,或以单独存在或与赋形剂混合的胶囊或珠形式、或以含有调味剂或着色剂的酏剂、溶液或悬浮液形式口服,或它们可以肠胃外注射,例如海绵体内注射、静脉内注射、肌肉注射或皮下注射。对于腹膜内施用,组合物最好以含有使溶液与血液等渗的其它物质,如足够的盐或单糖的无菌水溶液形式使用。对于经颊或舌下施用,组合物可以以常规方式制剂化的片剂或锭剂形式施用。

[0250] 通过本发明的载体系统对一种或多种治疗基因的递送可以单独使用,或与其它治疗或治疗成分组合。可以治疗的疾病包括但不限于:癌症、神经系统疾病、遗传疾病、心脏病、卒中、关节炎、病毒感染和免疫系统的疾病。合适的治疗性基因包括编码肿瘤抑制蛋白、酶、前药激活酶、免疫调节分子、抗体、工程化的免疫球蛋白样分子、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和核酶的基因。

[0251] 实施例

[0252] 质粒构建

[0253] 从miRNA库获得本文采用的所有miRNAs的序列(Griffiths-Jones et al., 2006) (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/miRNA/index.shtml>)。按照下文构建miRNA靶(mirT)序列:

[0254] 对于4x.mir-142-3p.靶(mir-142-3pT),使以下寡核苷酸退火:

[0255] 5'CTAGAGTCGACTCCATAAAGTAGGAAACACTACACGATTCCATAAAGTAGGAAACACTACAACCGGT(S1)

[0256] 5'TGTAGTGTTCCTACTTTATGGAATCGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGAGTCGACT(AS1),

[0257] 5'TCCATAAAGTAGGAAACACTACATCACTCACTCCATAAAGTAGGAAACACTACAC(S2),

[0258] 5'TCGAGTGTAGTGTTCCTACTTTATGGAGTGATGTAGTGTTCCTACTTTATGGAACCGGT(AS2)。

[0259] 连接这些寡核苷酸,产生具有XbaI和XhoI粘端的双链RNA片段。加下划线的序列设计为与特定miRNA完全互补。将退火的寡核苷酸亚克隆到pBluescriptII.KS的XbaI和XhoI位点。随后用SacII和KpnI、NheI和AgeI、或SalI消化得到的载体,并且分离mirT片段,用于连接到接受载体的合适位点中:

[0260] pCCL.sin.cPPT.PGK.GFP.WPRE,得到pCCL.sin.cPPT.PGK.GFP.WPRE.mirT

[0261] pCCL.sin.cPPT.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas,得到pCCL.sin.cPPT.PGKas.GFPas.mirTas.CTEas.polyAas

[0262] pCCL.sin.cPPT.PGK.ΔLNGFR.WPRE,得到pCCL.sin.cPPT.PGK.ΔLNGFR.mirT.WPRE

[0263] pRRL.sin.cPPT.CMV.hFIX.WPRE,得到pRRL.sin.cPPT.CMV.hFIX.WPRE.mirT。

[0264] pRRL.sin.cPPT.ET.hFIX.WPRE,得到pRRL.sin.cPPT.ET.hFIX.WPRE.mirT。

[0265] pCCL.sin.cPPT.polyA.CTE.eGFP.minhCMV.hPGK.deltaNGFR.Wpre,得到pCCLsin.cPPT.polyA.CTE.mirT.eGFP.minhCMV.hPGK.deltaNGFR.Wpre。

[0266] 用Marlingen Biosciences不含内毒素的高纯度质粒最大制备系统,进行大规模DNA制备。

[0267] 载体制备和滴定

[0268] 通过瞬时四质粒共转染到293T细胞,制备VSV假型化的第三代LVs,并且按照上文通过超速离心纯化(De Palma and Naldini,2002)。通过有限稀释在293T细胞上估计GFP的表达滴度。通过HIV-1 gag p24抗原免疫捕获测量载体颗粒(NEN Life Science Products)。对于所有载体,浓缩的载体表达滴度范围是 $0.15-1.5 \times 10^{10}$ 转导单位^{293T}(TU)/ml。

[0269] 细胞培养物

[0270] 在补充了10%胎牛血清(FBS;Gibco)以及青霉素-链霉素和谷氨酰胺的组合的Iscove修饰的Dulbecco培养基(IMDM;Sigma)中维持293T细胞。在按照上文补充的RPMI(完全RPMI)中维持U937单核细胞系。按照以前的描述从外周血分离人树突细胞的原代培养物,并且在补充GM-CSF和IL-4的完全RPMI中维持(Bender et al.,1996)。

[0271] DNA和RNA提取

[0272] 根据制造商的说明书,采用“血液和细胞培养物DNA Midi试剂盒”(Qiagen,Hilden,Germany)提取来自细胞和组织的DNA。根据制造商的说明书,采用“Tri试剂”(Sigma,Saint Louis,Missouri)提取来自细胞的RNA。

[0273] RNA印迹

[0274] 按照以前的描述进行RNA印迹(De Palma and Naldini,2002)。加入20微克总RNA,并且采用100ng³²P标记的GFP探针。

[0275] 载体拷贝数定量

[0276] 从提取自小鼠组织的100ng模板DNA或提取自细胞系的200ng模板DNA开始,通过实时PCR对载体C/G进行定量。用于分析的引物和探针组如下:

[0277] LV主链:

[0278] 750nmol正向引物(F):5'TGAAAGCGAAAGGGAAACCA3',200nmol反向引物(R):5'-CCGTGCGCGCTTCAG-3',200nmol探针(P):5'-VIC-CTCTCTCGACGCAGGACT-MGB-3';鼠基因组DNA:β-肌动蛋白:300nmol F:5'-AGAGGGAAATCGTGCGTGAC-3',750nmol R:5'-CAATAGTGATGACCTGGCCGT-3',200nmol P:5'-VIC-CACTGCCGCATCCTCTTCCTCCC-MGB-3';人基因组DNA:hTERT:200nmol F:5'-GGCACACGTGGCTTTTTCG-3',600nmol R:5'-GGTGAACCTCGTAAGTTTATGCAA-3',200nmol P:5'-6FAM-TCAGGACGTCGAGTGGACACGGTG-TAMRA-3'。

[0279] 对于标准曲线,采用了来自具有已知数目的LV整合(通过DNA印迹确定)的转基因小鼠或人细胞系的DNA的系列稀释液。在ABI Prism 7900 HT序列检测系统(Applied Biosystems)中以三次重复进行反应。如下计算C/G:(ng LV/ng内源性DNA)X(标准曲线中LV整合的n°)。

[0280] 基因表达分析

[0281] 用RT-PCR的Superscript III第一链合成系统(Invitrogen, Carlsbad, CA)的随机六聚体方案,在2 μ g总RNA上进行逆转录。进行了定量PCR分析,以便对GFP mRNA浓度进行定量,将GAPDH表达用于标准化。采用了两组引物和探针:

[0282] 对于GFP,按需进行20次测定(Applied Biosystems),F:5'-CAGCTCGCCGACCACTA-3',R:5'-GGGCCGTCGCCGAT-3'和P:5'-6FAM-CCAGCAGAACACCCCC-MGB-3',对于GAPDH:200nmol F:5'-ACCACAGTCCATGCCATCACT-3',900nmolR:5'-GGCCATCACGCCACAGSTT-3'和200nmol P:5'-TET-CCACCCAGAAGACTGTGGATGGCC-TAMRA-3'。

[0283] 在ABI Prism 7900 HT序列检测系统(Applied Biosystems)中以三次重复进行反应。

[0284] miRNA表达分析

[0285] 根据制造商的说明书,用Applied Biosystems Taqman微RNA测定系统进行miRNA检测。针对has-mir-16对结果进行标准化,并且将let-7a用作校准物。相对于let-7a的表达报道数值。

[0286] 流式细胞术

[0287] 在FACS分析前至少使转导的293T细胞生长14天,达到稳态GFP表达,并且排除假转导。FACS前,用0.05%胰蛋白酶-EDTA分离贴壁的细胞,洗涤并且重悬于含有2%FBS的PBS。洗涤悬浮液中生长的细胞,重悬于含有2%FBS的OBS中。为了进行免疫染色,4℃下在PBS,5%人血清,2%FBS中阻断10⁵个细胞15分钟。阻断后,加入R-藻红素(RPE)缀合的抗体(抗- Δ LNGFR或抗-CD45,BD Pharmingen, San Diego, CA),4℃下将细胞温育30分钟,洗涤,并且在Beckman CoulterCytomics FC500(Beckman Coulter, Miami, FL)上通过两色流式细胞术进行分析。

[0288] 体内载体施用

[0289] 从Charles Rivers Laboratories(Milan, Italy)购买6-8周龄的裸鼠和Balb/c小鼠,保持在无特异性病原体的条件下。从Salk Institute(La Jolla, CA)获得B型血友病(凝血因子IX敲除)小鼠,繁殖,并且保持在无特异性病原体的条件下。通过对小鼠的尾静脉注射,进行载体施用。根据Hospital San Raffaele机构动物管理和使用委员会的方案进行所有动物操作。

[0290] 转基因

[0291] 按照以前的描述(Lois et al., 2002)用LVs制备转基因小鼠。简言之,用怀孕的母马血清和人绒毛膜促性腺激素的组合使雌性FVB小鼠超数排卵。每只雌鼠收集平均20-30个胚胎,在同一天用10 $\times$ 100p1 5 $\times$ 10⁷TU/ml LV原种微量注射到卵周隙中。立即将操作的胚胎植入假孕CD1小鼠的输卵管中。通过PCR对幼鼠进行基因型分析,以分析GFP序列的存在。繁殖阳性小鼠,以测试转基因的种系传递。从尾部提取DNA,用于在建立者小鼠和F1孕鼠中通过实时PCR对载体拷贝数进行定量。

[0292] 免疫组化

[0293] 对于免疫荧光,在4%低聚甲醛中固定组织,4℃下在含20%蔗糖的PBS中平衡48小时,在最佳切割温度(OCT)下包埋,并且冷冻。用低聚甲醛对冷冻状态的切片(5- μ m厚)进行后固定,在5%山羊血清(Vector Laboratories, Burlingame, CA)、%1牛血清白蛋白(BSA)、含0.1%Triton的PBS中封闭,用大鼠抗小鼠F4/80(Serotec, Raleigh, NC)或抗小鼠CD45、

CD31或CD8(BD Pharmingen)温育。通过3-激光共焦显微镜(Radiance 2100;Bio-Rad, Hercules,CA)获得来自单个光学切片的荧光信号。

[0294] 因子IX(hFIX)定量

[0295] 按照以前的描述(Brown et al.,2004b),通过因子IX:Ag(Roche,Milan,Italy)的酶免疫测定确定小鼠的加入柠檬酸盐的血浆中的hF.IX浓度,并且通过激活的部分促凝血酶原激酶时间(aPTT)测定,确定FIX活性。

[0296] 结果

[0297] 为了建立具有解除靶定的表达谱的整合载体系统,我们利用了最近鉴定的miRNA介导的转录后沉默系统。通过将mir-30a,mir-142-5p或mir-142-3p完全互补的23bp序列(mirT)的四个串联拷贝插入普遍表达的磷酸甘油激酶(PGK)启动子驱动GFP表达盒的3'-非翻译区(3'UTR),我们构建了miRNA调节的慢病毒载体(LV)(图1a)。采用多个拷贝的完全互补靶的这种设计,目的在于优化miRNA存在下的转基因阻抑,并且是基于控制miRNA介导的调节的规则的理解(Bartel andChen,2004;Doench et al.,2003)。选择了mir-142-5p和mir-142-3p,因为最近采用RNA印迹和微阵列分析的报道表明这些miRNAs在造血细胞中富集(Baskerville and Bartel,2005;Chen et al.,2004)。通过进行定量实时PCR分析确定我们的靶细胞中的特定miRNAs的浓度,我们证实了这些以前的发现(图2a)。如图2a中所示,mir-142-3p和mir-142-5p在U937细胞中高表达,但在293T细胞中仅仅以低水平检测到。发现mir-30a在293T和U937细胞中水平都很低,因此作为我们的研究的对照。

[0298] 按照以前的描述制备和浓缩载体。miRNA调节的LV的滴定表明引入靶序列不会对载体感染力或非造血细胞中的转基因表达水平产生不利影响(图2b)。实现了与不含miRNA靶序列的亲本载体(LV.PGK.GFP)相似的转导和转基因表达水平。相反,人U937单核细胞系或人原代树突细胞的转导导致这两种载体,即LV.PGK.GFP和LV.PGK.GFP.142-3pT之间显著不同的表达谱。在U937细胞中,即使Taqman分析发现每个基因组的相似载体拷贝数(C/G),在LV.PGK.GFP转导的细胞中平均荧光强度高5-100倍。在树突细胞中也观察到了相似发现,其中甚至在高载体浓度(>50 MOI)转导后,在接受LV.PGK.GFP.142-3pT载体的细胞中存在几乎完全的转基因表达消除。作为对照载体,将mir-30a的靶序列克隆到LV.PGK.GFP中,产生LV.PGK.GFP.mir-30aT。造血细胞中不表达mir-30a(Zeng et al.,2002),并且,如预期的,我们没有发现细胞转导后GFP表达减少。因此,我们的结果明确证明在人细胞中,我们的载体设计保持了高载体感染力,同时防止特定细胞类型中的基因表达。

[0299] 我们以前描述了一种载体系统,其利用单启动子元件的双向活性协调表达两种不同的转录物(Amendola et al.,2005)。这种系统使得两种转基因能够在单载体转导后在细胞中表达。尽管该系统可以用于很多基因治疗应用,也存在可能必须仅仅表达两种转基因之一的情况。不幸的是,目前没有允许从单个载体进行两种转基因的驱异调节的基因转移系统。

[0300] 为了开发驱异调节的载体系统,我们修饰了双向LV(Bd.LV),以便在GFP报道盒的3'UTR中引入mir-142-3pT(图1b)。这种载体利用了PGK启动子的内在双向活性,驱动两种转基因的驱异转录。293T细胞的转导发现在具有或不具有mirT的GFP或低亲和力神经生长因子受体(Δ LNGFR)表达之间没有差异(图2c)。但是,在转导的单核细胞中,不含mirT的Bd.LV表达GFP和 Δ LNGFR,而标记的载体仅仅表达 Δ LNGFR。这表明标记的转基因的阻抑在转录后

水平存在,而不进行转录沉默,因为启动子的沉默将阻止两种转基因的表达。这些结果也证明我们的miRNA调节策略与双向载体系统的组合在提供载体设计中的用途,所述载体设计可以用于驱异调节单个载体中的两种转基因。

[0301] 为了进一步证明该方法的多功能性,我们基于在293T和U937细胞中的差异表达,选择了一组miRNAs(图2a),并且将这些miRNAs的靶序列克隆到Bd.LV载体的GFP表达盒中。如图2d所示,两种细胞群的转导发现每种载体之间高度不同的表达模式。重要的是,通过实时PCR确定的miRNA的浓度显示出与观察到的阻抑程度的强相关。例如,218T.GFP.mCMV.PGK.ΔNGFR的GFP表达在293T细胞中减少10倍以上,但在U937细胞中观察到很少的阻抑或没有阻抑,其中mir-218仅仅以低水平表达。因此,该数延伸了我们的方法用于其它miRNAs的可能用途,并且证明表达谱分析可以提供设计具有需要的组织表达模式的载体系统的简单方法。

[0302] 由于对miRNA活性的强度了解很少,我们开始确定通过增加靶细胞中携带mirTs的载体拷贝,是否存在可以被避开的调节阈值。在U937细胞的多轮转导后,仅仅存在转基因表达的增加,这与载体C/G线性相关(图3d)。这些结果表明,使阻抑维持到与测试的所有载体剂量的相同程度,并且甚至在175载体C/G时也没有达到饱和。我们随后询问了表达携带mirTs的外源序列是否能够抑制内源miRNA结合其天然靶。由于没有鉴定出针对mir-142-3p的靶mRNAs,我们用在不同表达盒中携带相同mirT的第二种载体加载细胞。用LV.PGK.ΔLNGFR.142-3pT超感染携带4C/G的LV.PGK.GFP.142-3pT的U937细胞,并且,如图3e所示,甚至在导入30个拷贝的新载体后,GFP表达没有增加。此外,mir-142-3p抑制了ΔLNGFR表达(图3e)。总体上,我们的数据表明mir-142-3p在RNA干扰途径中不是反应限制性的,并且,含有mir-142-3pT的新遗传材料的导入不应该干扰该miRNA的天然活性。

[0303] 该miRNA调节策略的新颖性提供了以以前不可能的方式对载体进行工程化的可能性。除了其在防止造血细胞中的表达中的用途,我们试图用miRNA调节选择性防止载体生产细胞中的转基因表达。通常,在载体生产过程中,除了从转移质粒表达载体基因组,也存在转基因的表达。在编码毒性分子的载体的情况下,这可能特别有问题,因为毒性蛋白的表达杀伤生产细胞,并且导致载体滴度的总体减少。因此,选择性防止生产细胞中的转基因表达的能力将是生产特定载体,如编码毒性分子的载体的主要进步。

[0304] 我们的miRNA谱分析数据发现mir-19a在293T细胞中高表达。以前已经显示该miRNA与癌症相关,但在正常组织中不存在,并且可能解释其在转化和肿瘤细胞系中的高表达。我们推理出mir-19aT序列的导入将阻止293T生产细胞中的转基因表达。为了不减少载体滴度,我们构建了载体,使得包含19aT序列的表达盒是反义方向。以该构型存在,载体基因组可以转录,并且因为19aT序列是反义方向,转录物将不会被mir-19a介导RNAi降解。

[0305] 如图4所示,瞬时转染293T后,pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas和pLV.PGK.GFP以及pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas之间的GFP表达分别减少了100倍和10倍以上。因此,表明mir-19aT序列的引入能够防止293T细胞中的基因表达。重要的是,与pLV.PGKas.GFPas.CTEas.polyAas(其导致与规范质粒相比,载体滴度减少10倍,这是由于质粒产生的互补转录物的反义作用)不同,pLV.PGKas.GFPas.19aT.CTEas.polyAas不产生与pLV.PGK.GFP构建体相比具有更低滴度的载体。因此,我们的数据证明miRNA调节可以用于防止载体生产过程中转基因的表达,而对载体滴度没有不利影响。

[0306] 在人细胞中体外表征我们的miRNA调节的LV后,我们将研究延伸到了小鼠。尽管没有原位建立组织表达模式(Lagos-Quintana et al.,2002),体外测试了表达每种人miRNA的精确同源物的小鼠。给裸鼠施用 2×10^8 个LV颗粒。对于所有处理组,脾和肝的定量PCR(Q-PCR)分析发现相似的载体含量(数据未示出)。但是,表达谱显著不同。LV.PGK.GFP和LV.PGK.GFP.30aT处理的动物显示出肝脏内,包括Kupffer细胞、肝细胞和内皮细胞中广泛的细胞表达模式(图5a)。相反,LV.PGK.GFP.142-3pT处理的动物在Kupffer细胞中具有几乎检测不到的GFP表达,但在肝细胞和内皮细胞中保持高水平的GFP。

[0307] 在处理的动物脾中观察到一致的发现。在接受LV.PGK.GFP载体的小鼠中,存在高频率的GFP+脾细胞($>5\%$),具有强水平表达,这是通过FACS分析显示的(图5c)。相比之下,来自LV.PGK.GFP.142-3pT处理的动物的脾细胞中1%以下是GFP+,并且仅仅是低强度。这些小鼠的免疫组化分析表明,GFP+细胞的存在几乎只在边缘区中存在。通过全白细胞标记CD45的阴性共染色显示(图5b),这些细胞不是造血系的,但很可能是网状成纤维细胞(Steiniger et al.,2003),即脾的支持基质的一部分。这证明了该方法的一个新的方面,其中可以在多种细胞类型中保持基因表达,而限制特定细胞系的基因表达。

[0308] 为了更好地表征我们的载体的表达谱,并且相应表征mir-142-3p的调节活性,用LV.PGK.GFP.142-3pT载体制备转基因小鼠。分析了携带一系列载体C/G(4-24)的F1后代的外周血,GFP表达在所有造血细胞系中几乎检测不到($n=26$;图6a)。此外,尽管在肝、肠道和肺以及脾、胸腺和骨髓的基质结构中具有明亮的全细胞荧光,我们在这些器官的造血细胞系内没有观察到GFP表达(图6b)。这些结果证明内源性mir-142-3p急剧和强烈地限制造血细胞系的转基因表达。

[0309] 最后,我们评估了我们的miRNA调节的LV对于具有免疫能力的成年Balb/c小鼠中的系统基因转移的用途。我们施用了 5×10^8 个转导单位(TU)/小鼠的LV.PGK.GFP、LV.PGK.GFP.142-3pT或表达白蛋白启动子控制下的GFP的LV(LV.ALB.GFP)。在多个时间分析小鼠脾和肝中的GFP表达,GFP是一种强新抗原(Stripecke et al.,1999)。在LV.PGK.GFP处理的小鼠中,在第5天检测GFP+细胞,但是与我们以前的发现(Follenzi et al.,2004)一致,到第14天,观察到很少的GFP+细胞,或没有观察到GFP+细胞,并且载体含量降低到几乎检测不到的水平(图7a)。尽管表达主要限于肝细胞,采用LV.ALB.GFP也发生了GFP+细胞的清除。但是,值得注意的是,在脾中检测到了该载体的解除靶定的表达,包括在一小部分造血细胞中,并且可能在免疫介导的载体清除的起始中起作用(图7d)。

[0310] 与我们用LV.PGK.GFP和LV.ALB.GFP得到的结果相反,GFP+肝细胞和内皮细胞在分析的所有时间点,在所有LV.PGK.GFP.142-3pT处理的小鼠的肝中以高频率存在(>120 天,图7a、b)。形态分析表明10-20%的肝细胞是GFP+($n=10$),并且,重要的是,阳性细胞的频率保持稳定。载体C/Gs最初对于所有的处理组都是相似的,但到第14天,它们在LV.PGK.GFP和LV.ALB.GFP小鼠中迅速减少,并且在LV.PGK.GFP.142-3pT处理的动物中保持在容易检测的水平。在最长的随访中观察到了C/G的缓慢减少,但这种减少不与GFP+肝细胞中的减少相符,很可能是由于正常造血细胞更新过程中转导的Kupffer细胞的更替。

[0311] 尽管在肝中有广泛GFP表达,我们没有检测到任何GFP+Kupffer细胞。此外,尽管我们确实观察到脾边缘区中的GFP+网状成纤维细胞,但在造血系细胞中没有检测到转基因表达。与持续的GFP表达一致,我们没有观察到肝中的显著CD8+浸润或病理指征(图7c)。

[0312] 作为我们的方法在建立长期转基因表达中的用途的进一步证明,我们利用我们的系统治疗B型血友病。B型血友病小鼠完全缺乏凝血FIX,并且因此具有<1%的正常凝血活性。此外,由于它们天然不表达FIX,他们在引入FIX抗原后高度容易发生抗FIX免疫。为了避开这种问题,很多研究组,包括我们,构建了肝细胞特异性FIX表达载体,以便防止APCs中的基因表达,并且避免引入抗FIX免疫(Brown et al.,2004a;Brown et al.,2004b;Follenzi et al.,2004;Mingozzi et al.,2003)。但是,如图8中所示,肝细胞特异性LV.ET.hFIX载体在静脉内施用后不能提供在B型血友病小鼠中的长期FIX表达。相反,在FIX表达盒的3'UTR中含有mir-142-3pT序列的LV.ET.hFIX.142-3pT载体的注射,导致长期FIX表达,并且保留>40%正常水平的凝血活性。

[0313] 总体上,这些结果表明,利用miRNA调节的LV,在具有免疫能力的小鼠中可以成功建立细胞内或细胞外的新抗原的高水平稳定表达,并且甚至可以用于校正该疾病的表型,如在B细胞血友病小鼠中所证实的。

[0314] 在此我们描述了第一种病毒基因转移系统,其利用内源性miRNA机制进行转基因调节。通过使用LV介导的递送,体内基因转移是可能的,因此,我们提供了成年哺乳动物内miRNA活性的第一批原位数据中的一些。类似于在低等后生动物中的研究(Brennecke et al.,2005;Reinhart et al.,2000),我们观察到miRNA调节非常有效。在转基因小鼠以及静脉内施用LV的小鼠中,我们观察到了所有造血细胞中一致的mir-142-3p活性。通过在转基因中加入mir-142-3pT序列,在造血细胞系中存在转基因表达的高至100倍的减少,对非造血细胞中的表达没有影响。

[0315] 在我们的系统中,内源性miRNA调节提供了用于防止载体在造血细胞系的细胞中表达,以及利用肝细胞特异性白蛋白启动子的更好手段。这最可能发生,因为转录后调节可以克服由于插入的位置效应和/或组织特异性启动子的不完美重建导致的脱靶表达。这种现象可能类似于提出的miRNA调节的天然功能之一,其防止以以前的细胞状态转录或由于渗漏表达导致的mRNAs的翻译(Bartel and Chen,2004;Farhet al.,2005)。因此,在载体中掺入miRNA调节,可以提供对转基因表达的一层重要控制,无论使用普遍存在的启动子还是与组织特异性转录元件组合。

[0316] 通过使用miRNA调节从造血细胞系解除转基因表达的靶定,我们能够防止免疫介导的载体清除,并且能够进行基因转移,从而克服临床基因治疗的最显著障碍之一(Thomas et al.,2003)。特别相关的是,我们证明了该方法对细胞内和细胞外循环抗原的用途。采用该miRNA调节策略,我们能够实现稳定和高水平的B型小鼠凝血表型校正。据我们所知,这是第一次证明利用内源性miRNA调节的治疗用途。

[0317] 本文描述的研究也首次提供了证据,证明miRNA介导的调节是用于基本消除强的组成型活性载体启动子的表达,或甚至改进组织特异性启动子的性能的强和高度有效手段。总体上,从该研究可以明确,miRNAs可以提供有力的途径来调节转基因,并且通过利用该复杂网络,我们开辟了载体设计的新规范,其对于治疗性基因转移具有重要意义。

[0318] 通过我们的允许组合mirT排列的方法,可以建立多种体外或体内用于基因治疗或用于动物转基因的基因递送构建体,以实现精密的基因表达模式,包括趋异调节两种不同转基因的能力。由于我们继续发现新的组织特异性和发育及肿瘤特异性miRNAs,可以构建条件性反应于生长或分化,甚至是肿瘤发生的载体。

[0319] 在此引入本文件中提到的每个申请和专利,以及在上述每一申请和专利,包括在上述每一申请和专利的审查过程中(“申请引用的文件”)引用或参考的每篇文件,以及在每一申请和专利中和在任何申请引用的文件中引用或提到的制造商说明书或目录作为参考。此外,在此引入在本文中引用的所有文件,和在本文中引用的文件中引用或参考的文件,和本文中引用或提到的任何产品的任何制造商说明书或目录作为参考。

[0320] 对本发明描述的方法和系统的各种修饰和改变将是本领域技术人员能够理解的,而不背离本发明的范围和精神。尽管联系特定的优选实施方案描述了本发明,应该理解,要求保护的本发明不应过度限制为所述特定实施方案。实际上,对于描述的实施例本发明的方式的各种修饰(其对于分子生物或相关领域技术人员来说是明显的)也包含在权利要求的范围内。

[0321] 参考文献

[0322] Amendola,M.,Venneri,M.A.,Biffi,A.,Vigna,E.,and Naldini,L.(2005).Coordinate dual-gene transgenesis by lentiViral vectors carrying synthetic bidirectional promoters.Nat Biotechnol 23,108-116.

[0323] Barad,O.,Meiri,E.,Avniel,A.,Aharonov,R.,Barzilai,A.,Bentwich,I.,Einav,U.,Gilad,S.,Hurban,P.,Karov,Y.,et al.(2004).MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays:system establishment and expression profiling in human tissues.Genome Res 14,24 86-2494.

[0324] Bartel,D.P.,and Chen,C.Z.(2004).Micromanagers of gene expression:the potentially widespread influence of metazoan microRNAs.Nat Rev Genet 5,396-400.

[0325] Baskerville,S.,and Bartel,D.P.(2005).Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes.Rna 11, 241-247.

[0326] Bender,A.,Sapp,M.,Schuler,G.,Steinman,R.M.,and Bhardwaj,N.(1996).Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood.J Immunol Methods 196,121-135.

[0327] Brennecke,J.,Stark,A.,Russell,R.B.,and Cohen,S.M.(2005).Principles of microRNA-target recognition.PLoS Biol 3,e85.

[0328] Brown,B.D.,and Lillicrap,D.(2002).Dangerous liaisons:the role of “danger” signals in the immune response to gene therapy.Blood 100,1133-1140.

[0329] Brown,B.D.,Shi,C.X.,Powell,S.,Hurlbut,D.,Graham,F.L.,and Lillicrap,D.(2004a).Helper-dependent adenoviral vectors mediate therapeutic factor VIII expression for several months with minimal accompanying toxicity in a canine model of severe hemophilia A.Blood 103,804-810.

[0330] Brown,B.D.,Shi,C.X.,Rawle,F.E.,Tinlin,S.,McKinven,A.,Hough,C.,Graham,F.L.,and Lillicrap,D.(2004b).Factors influencing therapeutic efficacy and the host immune response to helper-dependent adenoviral gene therapy in hemophilia A mice.J Thromb Haemost 2,111-118.

- [0331] Calin,G.A.,Liu,C.G.,Sevignani,C.,Ferracin,M.,Felli,N.,Dumitru,C.D., Shimizu,M.,Cimmino,A.,Zupo,S.,Dono,M.,et al.(2004a).MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cellchronic lymphocytic leukemias.Proc Natl Acad Sci U S A 101,11755-11760.
- [0332] Calin,G.A.,Sevignani,C.,Dumitru,C.D.,Hyslop,T.,Noch,E.,Yendamuri,S., Shimizu,M.,Rattan,S.,Bullrich,F.,Negrini,M.,and Croce,C.M.(2004b).Human microRNA genes are frequently locatedat fragile sites and genomic regions involved in cancers.Proe Natl AcadSci U S A 101,2999-3004.
- [0333] Chen,C.Z.,Li,L.,Lodish,H.F.,and Bartel,D.P.(2004).MicroRNAsmodulate hematopoietic lineage differentiation.Science 303,83-86.
- [0334] Chen,C.Z.,and Lodish,H.F.(2005).MicroRNAs as regulators ofmammalian hematopoiesis.Semin Immunol 17,155-165.
- [0335] De Geest,B.R.,Van Linthout,S.A.,and Collen,D.(2003).Humoralimmune response in mice against a circulating antigen induced byadenoviral transfer is strictly dependent on expression inantigen-presenting cells.Blood 101, 2551-2556.
- [0336] De Palma,M.,Montini,E.,de Sio,F.R.,Benedicenti,F.,Gentile,A.,Medico, E.,and Naldini,L.(2005).Promoter trapping revealssignificant differences in integration site selection between MLV and HIVvectors in primary hematopoietic cells.Blood 105,2307-2315.
- [0337] De Palma,M.,and Naldini,L.(2002).Transduction of a gene expressioncassette using advanced generation lentiviral vectors.Methods Enzymol346,514-529.
- [0338] Doench,J.G,Petersen,C.P.,and Sharp,P.A.(2003).siRNAs canfunction as miRNAs.Genes Dev 17,438-442.
- [0339] Farh,K.K.,Grimson,A.,Jan,C.,Lewis,B.P.,Johnston,W.K.,Lim,L.P.,Burge, C.B.,and Bartel,D.P.(2005).The widespread impactof mammalian MicroRNAs on mRNA repression and evolution.Science310,1817-1821.
- [0340] Follenzi,A.,Battaglia,M.,Lombardo,A.,Annoni,A.,Roncarolo,M.G.,and Naldini,L.(2004).Targeting lentiviral vector expression tohepatocytes limits transgene-specific immune response and establisheslong-term expression of human antihemophilic factor IX in mice.Blood103,3700-3709.
- [0341] Follenzi,A.,Sabatino,G.,Lombardo,A.,Boccaccio,C.,and Naldini,L. (2002).Efficient gene delivery and targeted expression to hepatocytesin vivo by improved lentiviral vectors.Hum Gene Ther 13,243-260.
- [0342] Griffiths-Jones,S.,Grocock,R.J.,van Dongen,S.,Bateman,A.,and Enright, A.J.(2006).miRBase:microRNA sequences,targets andgene nomenclature.Nucleic Acids Res 34,D140-144.
- [0343] He,L.,and Hannon,G.J.(2004).MicroRNAs:small RNAs with a big rolein

gene regulation. *Nat Rev Genet* 5,522-531.

[0344] Houbaviy, H.B., Murray, M.F., and Sharp, P.A. (2003). Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell* 5,351-358.

[0345] Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., et al. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res* 65,706 5-7070.

[0346] Kasashima, K., Sakota, E., and Kozu, T. (2004). Discrimination of target by siRNA: designing of AML 1-MTG8 fusion mRNA-specific siRNA sequences. *Biochimie* 86,713-721.

[0347] Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2002). Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol* 12,735-739.

[0348] Lois, C., Hong, E.J., Pease, S., Brown, E.J., and Baltimore, D. (2002). Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* 295,868-872.

[0349] Mansfield, J.H., Harfe, B.D., Nissen, R., Obenaus, J., Srineel, J., Chaudhuri, A., Farzan-Kashani, R., Zuker, M., Pasquinelli, A.E., Ruvkun, G., et al. (2004). MicroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate microRNA expression. *Nat Genet* 36,1079-1083.

[0350] Mingozi, F., Liu, Y.L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J.H., Wang, Y., Arruda, V.R., High, K.A., and Herzog, R.W. (2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J Clin Invest* 111,1347-1356.

[0351] Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403,901-906.

[0352] Sandrin, V., Russell, S.J., and Cosset, F.L. (2003). Targeting retroviral and lentiviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 281,137-178.

[0353] Sempere, L.F., Freemantle, S., Pitha-Rowe, I., Moss, E., Dmitrovsky, E., and Ambros, V. (2004). Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol* 5, R13.

[0354] Steiniger, B., Ruttinger, L., and Barth, P.J. (2003). The three-dimensional structure of human splenic white pulp compartments. *J Histochem Cytochem* 51,655-664.

[0355] Stripecke, R., Carmen Villacres, M., Skelton, D., Satake, N., Halene, S., and Kohn, D. (1999). Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther* 6,1305-1312.

- [0356] Thomas,C.E.,Ehrhardt,A.,and Kay,M.A.(2003).Progress andproblems with the use of Viral vectors for gene therapy.Nat Rev Genet 4,346-358.
- [0357] Verma,I.M.,and Weitzman,M.D.(2005).GENE THERAPY:Twenty-First Century Medicine.Annu Rev Biochem 74,711-738.
- [0358] Zeng,Y.,Wagner,E.J.,and Cullen,B.R.(2002).Both natural anddesigned micro RNAs can inhibit the expression of cognate mRNAs whenexpressed in human cells.Mol Cell 9,1327-1333.

序列表

<110>	Fondazione Centro San Raffaele del Monte Tabor and Fondazione Telethon	
<120>	基因载体	
<130>	P023380W0	
<140>	PCT/IB2006/002266	
<141>	2006-05-26	
<150>	US 60/684,954	
<151>	2005-05-27	
<160>	21	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	67	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	1	
[0001]	ctagagtcca ctccataaag taggaaacac tacacgattc cataaagtag gaaacactac	60
	aaccgggt	67
<210>	2	
<211>	57	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	2	
	tgtagtgttt cctactttat ggaatcgtgt agtgtttcct actttatgga gtcgact	57
<210>	3	
<211>	51	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸	
<400>	3	
	tcataaagt aggaaacact acatcaactcc ataaagtagg aaacactaca c	51
<210>	4	

[0002]	<211>	61	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸	
	<400>	4	
		tcgagtgtag tgtttcctac tttatggagt gatgtagtgt ttcctacttt atggaaccgg	60
		t	61
	<210>	5	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物	
	<400>	5	
		tgaaagcgaa agggaaacca	20
	<210>	6	
	<211>	15	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物	
	<400>	6	
		cegtgcgcgc ttcag	15
	<210>	7	
	<211>	18	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸探针	
	<400>	7	
		ctctctcgac gcaggact	18
	<210>	8	
	<211>	20	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	寡核苷酸引物	
	<400>	8	

	agagggaat cgtgcgtgac	20
	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸引物	
	<400> 9	
	caatagtgat gacctggccg t	21
	<210> 10	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸探针	
	<400> 10	
	cactgccgca tcctcttcct ccc	23
[0003]	<210> 11	
	<211> 18	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸引物	
	<400> 11	
	ggcacacgtg gcttttcg	18
	<210> 12	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸引物	
	<400> 12	
	ggtgaacctc gtaagtttat gcaa	24
	<210> 13	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 寡核苷酸探针	

	<400> 13 tcaggacgtc gaggacac ggtg	24
	<210> 14 <211> 17 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸引物	
	<400> 14 cagtcgcgc accacta	17
	<210> 15 <211> 14 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸引物	
	<400> 15 gggcgcgc gcgat	14
[0004]	<210> 16 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸探针	
	<400> 16 ccagcagaac accccc	16
	<210> 17 <211> 21 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 寡核苷酸引物	
	<400> 17 accacagtc atgcatcac t	21
	<210> 18 <211> 19 <212> DNA <213> 人工序列	

[0005]

<220>		
<223>	寡核苷酸引物	
<400>	18	
ggccatcacg ccacagstt		19
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	寡核苷酸探针	
<400>	19	
ccaccagaa gactgtggat ggcc		24
<210>	20	
<211>	87	
<212>	RNA	
<213>	小鼠	
<220>		
<221>	茎_环	
<222>	(1)..(87)	
<400>	20	
gacagugcag ucacccauaa aguagaaagc acuacuaaca gcacuggagg guguaguguu		60
uccuacuuua uggauagagug uacugug		87
<210>	21	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	miR-142 靶序列	
<400>	21	
tccataaagt aggaaacact aca		23

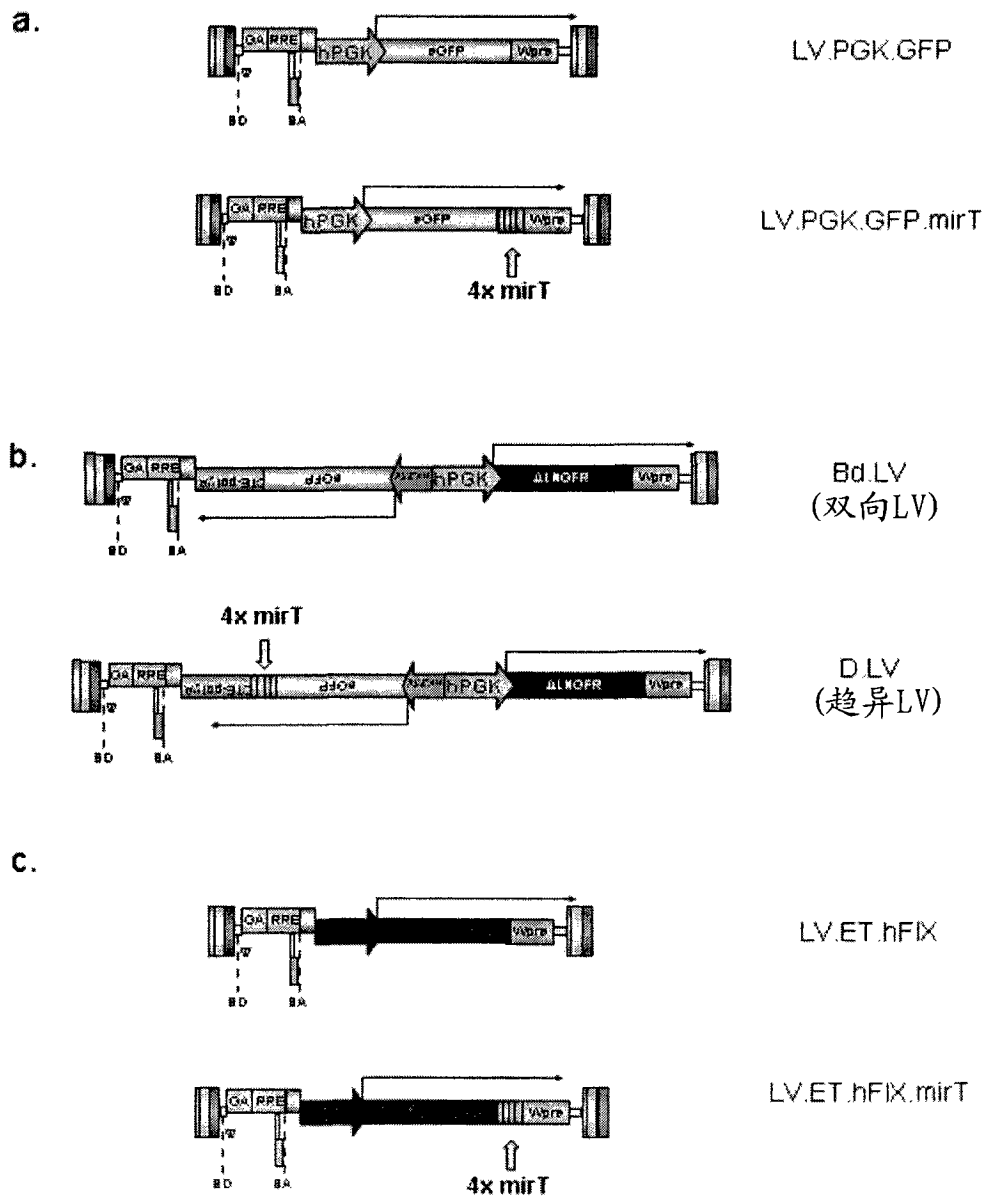
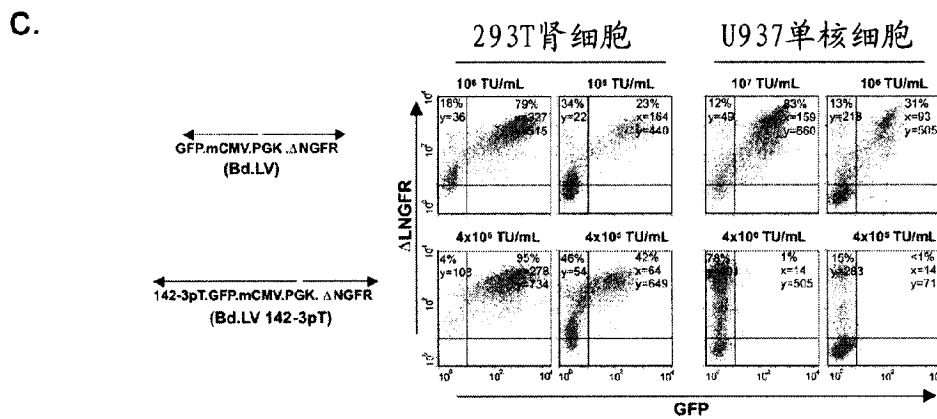
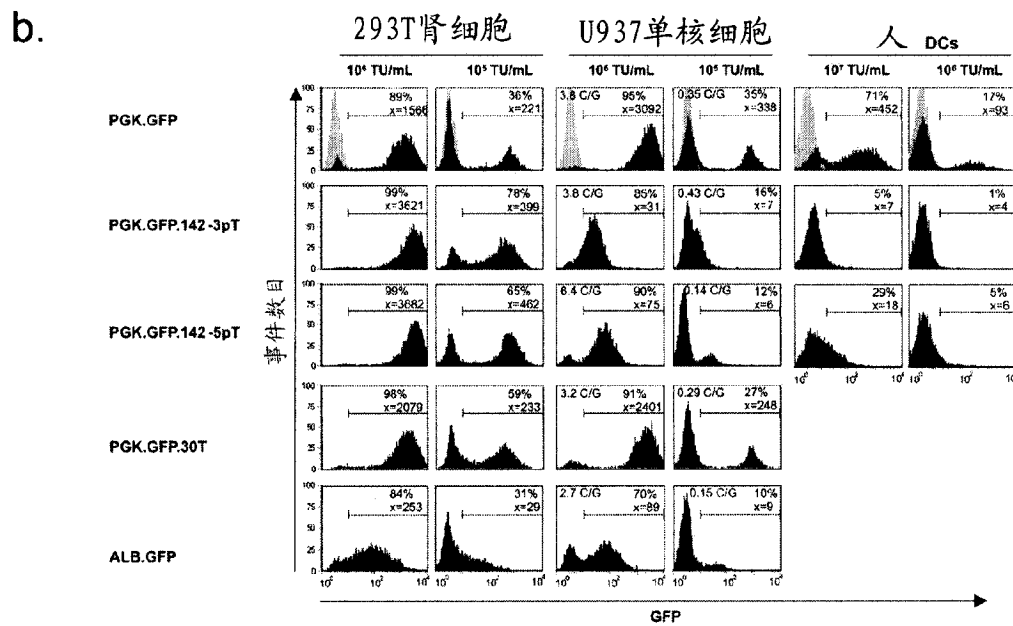
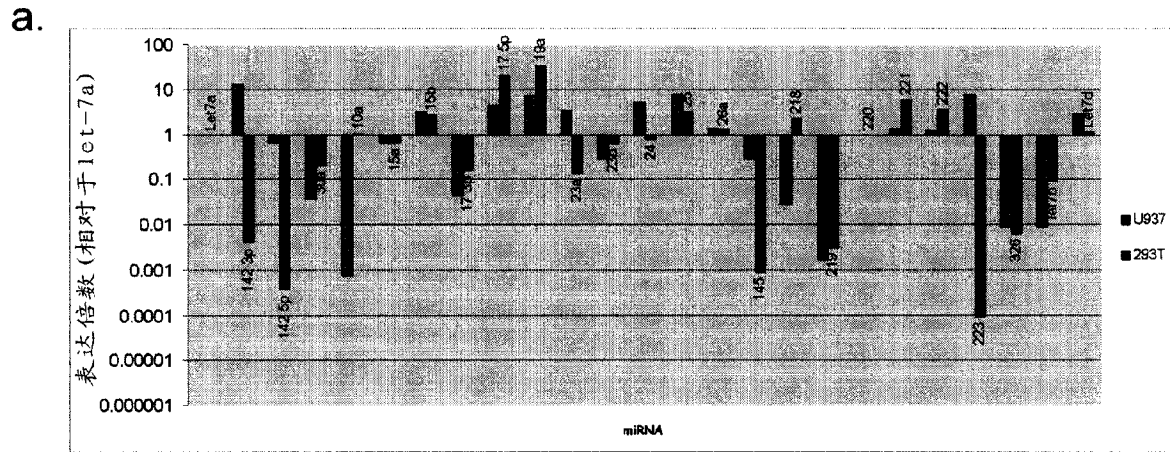


图 1



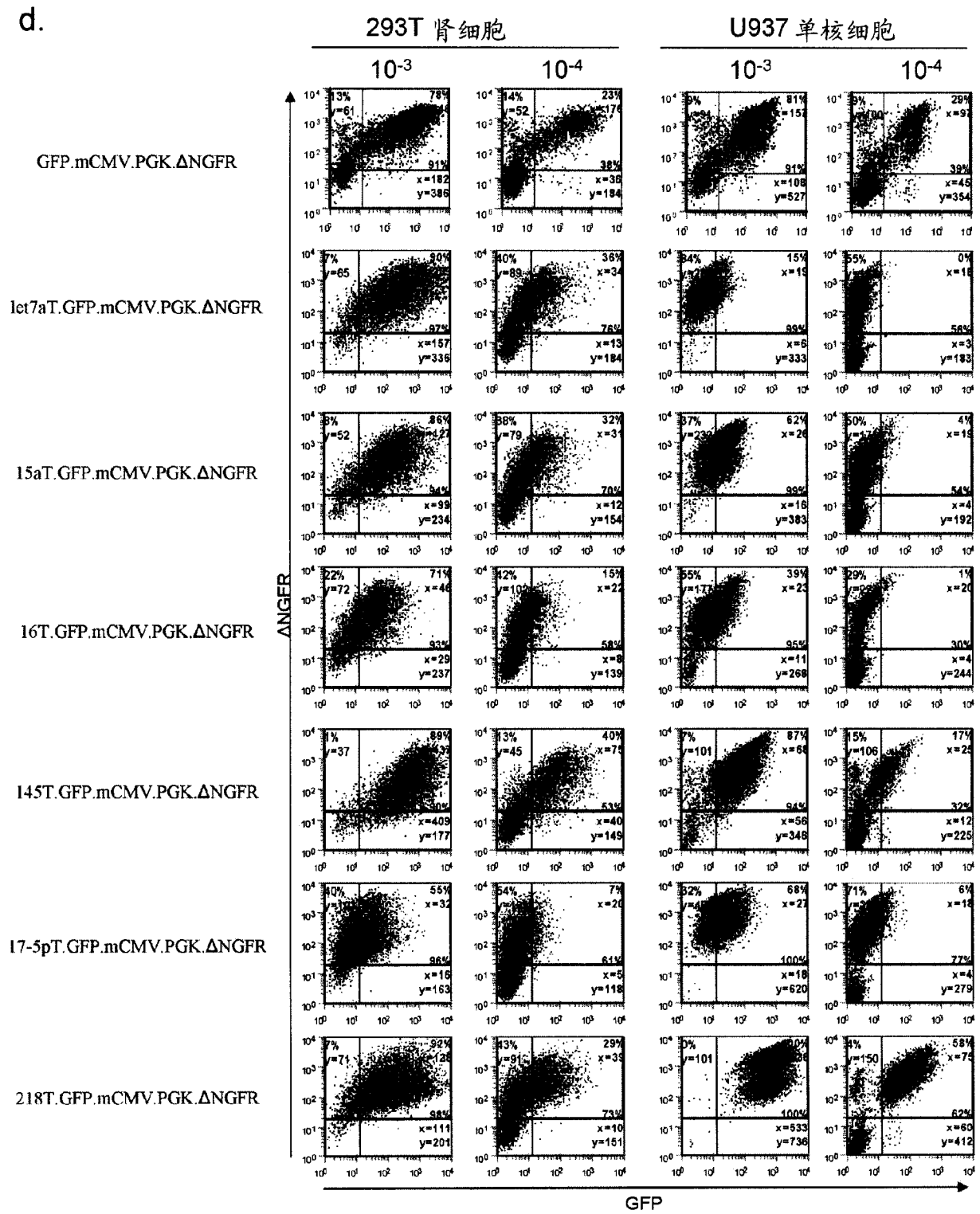


图2

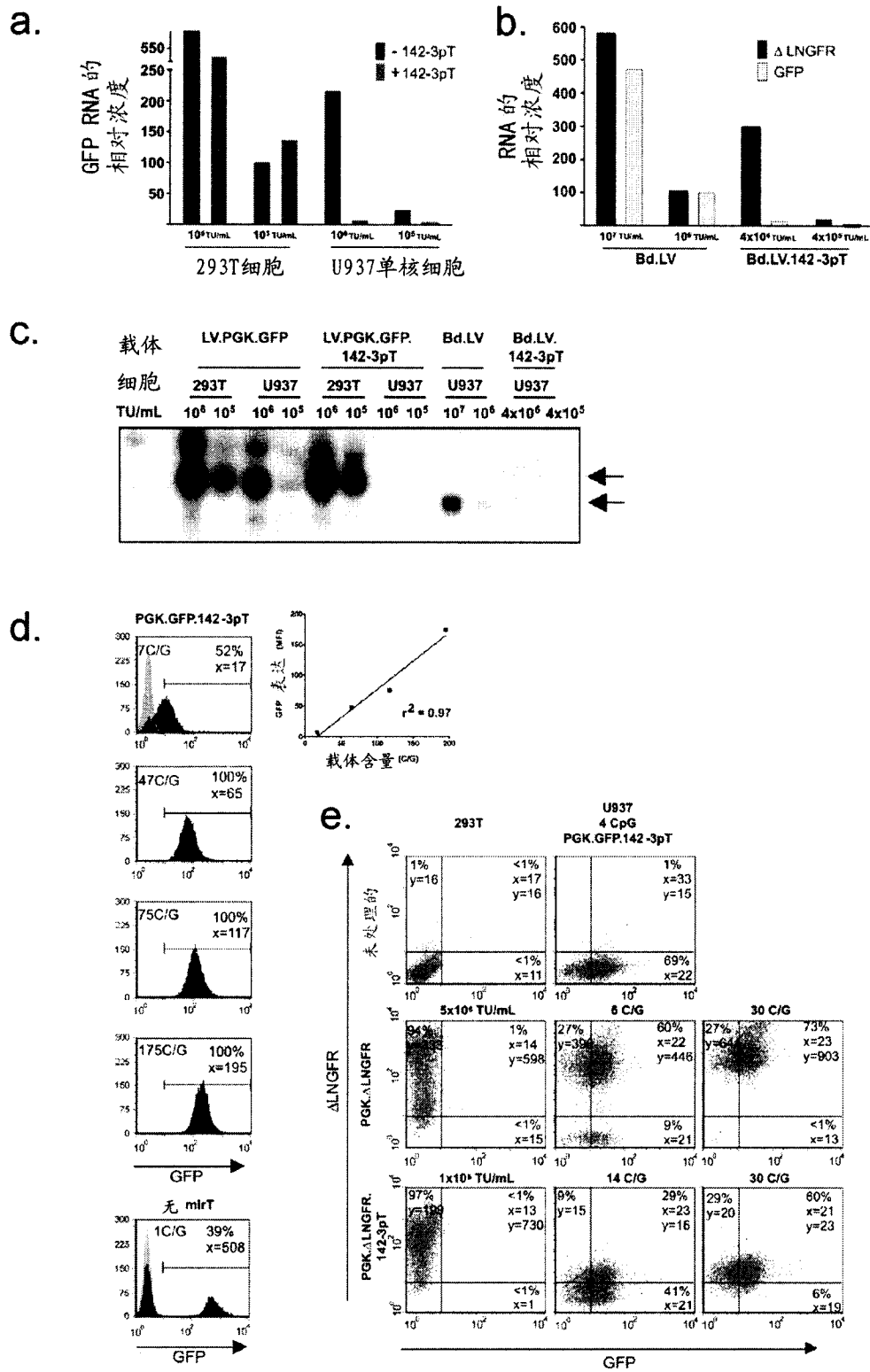


图3

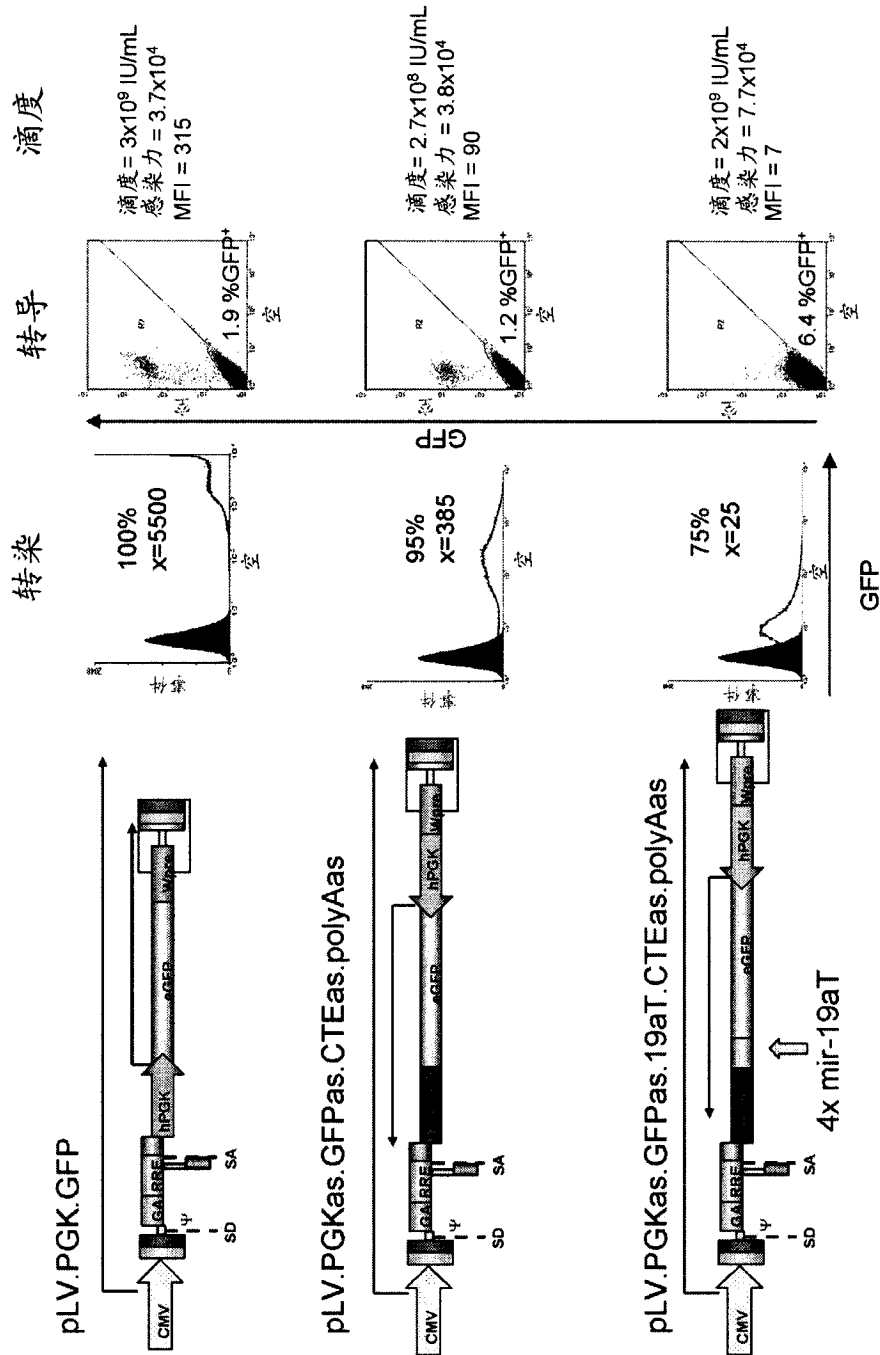


图 4

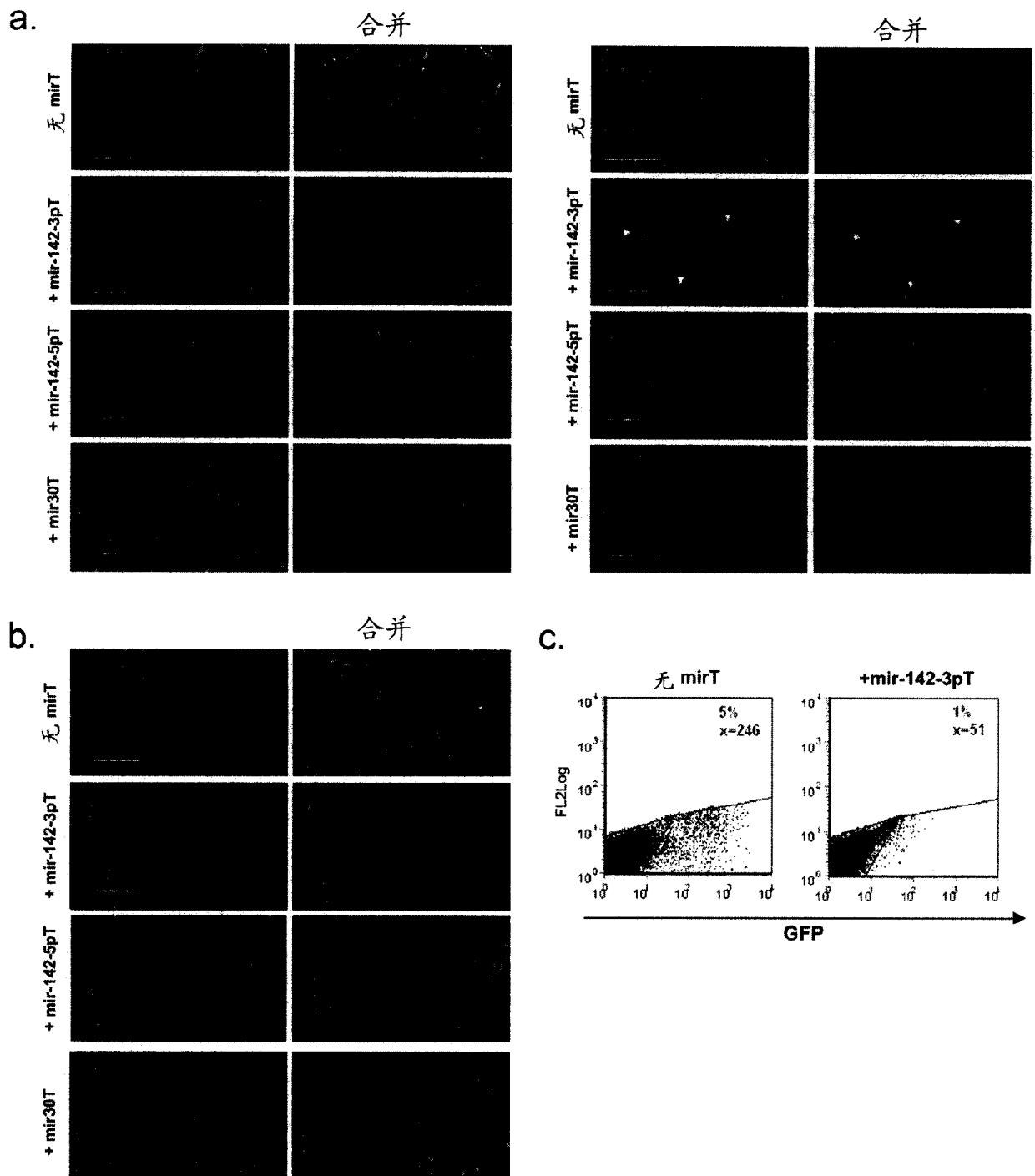


图5

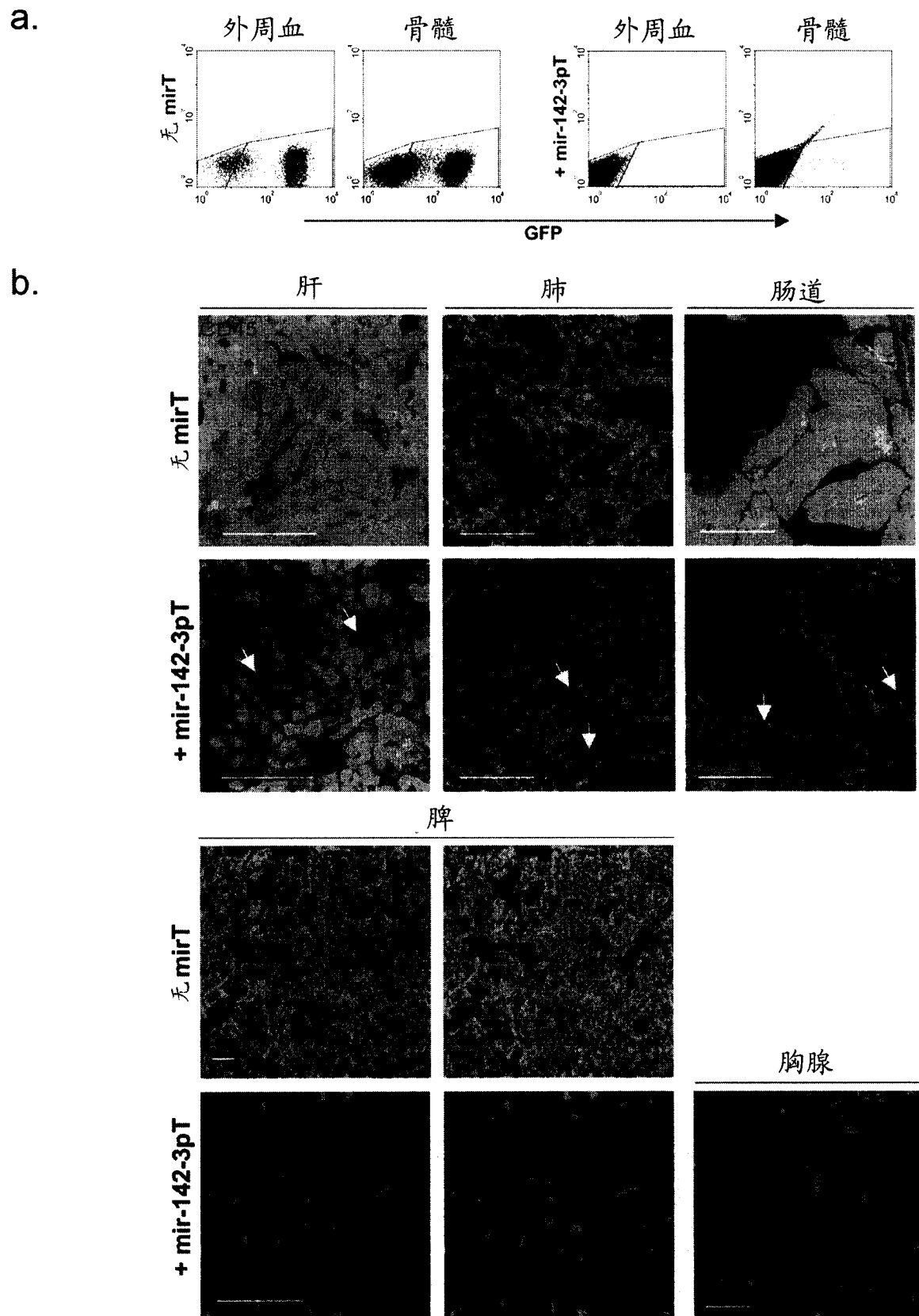


图6

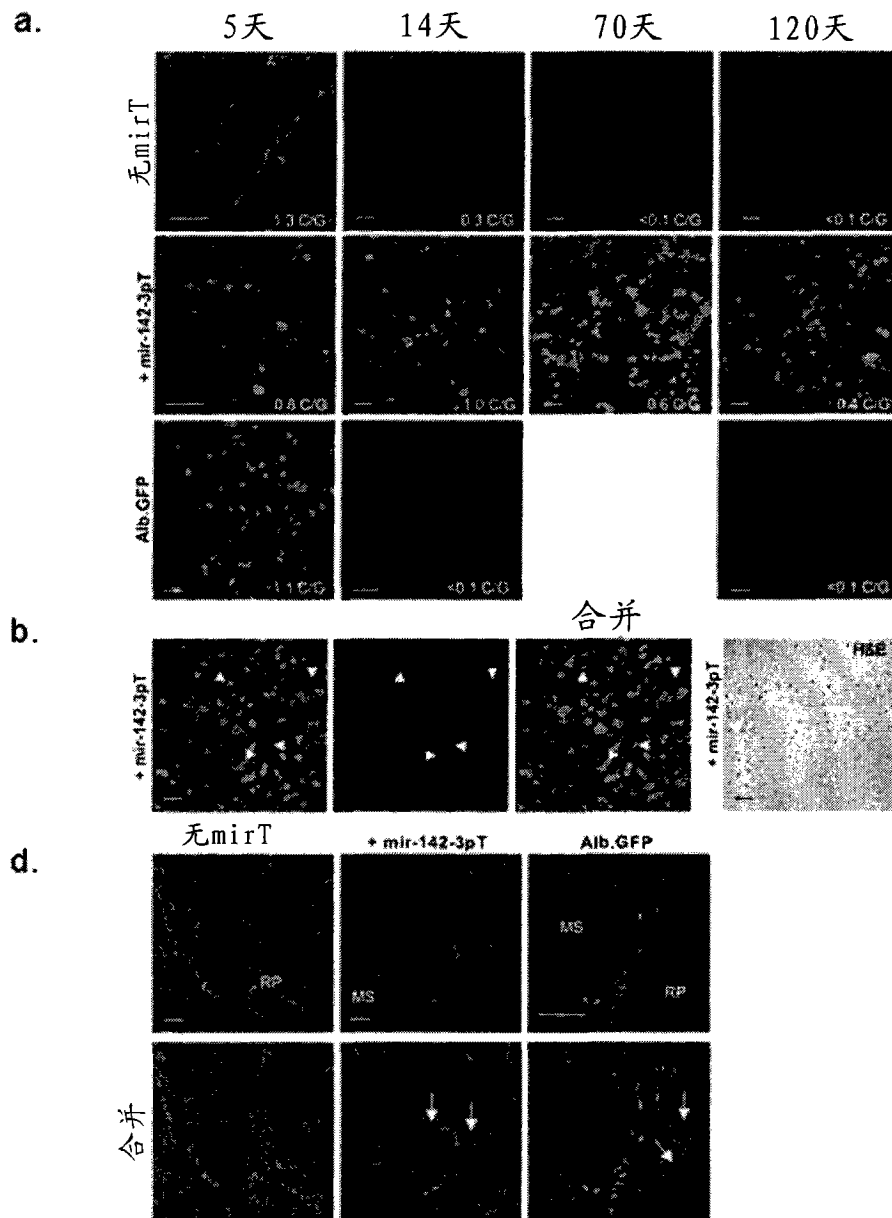


图 7

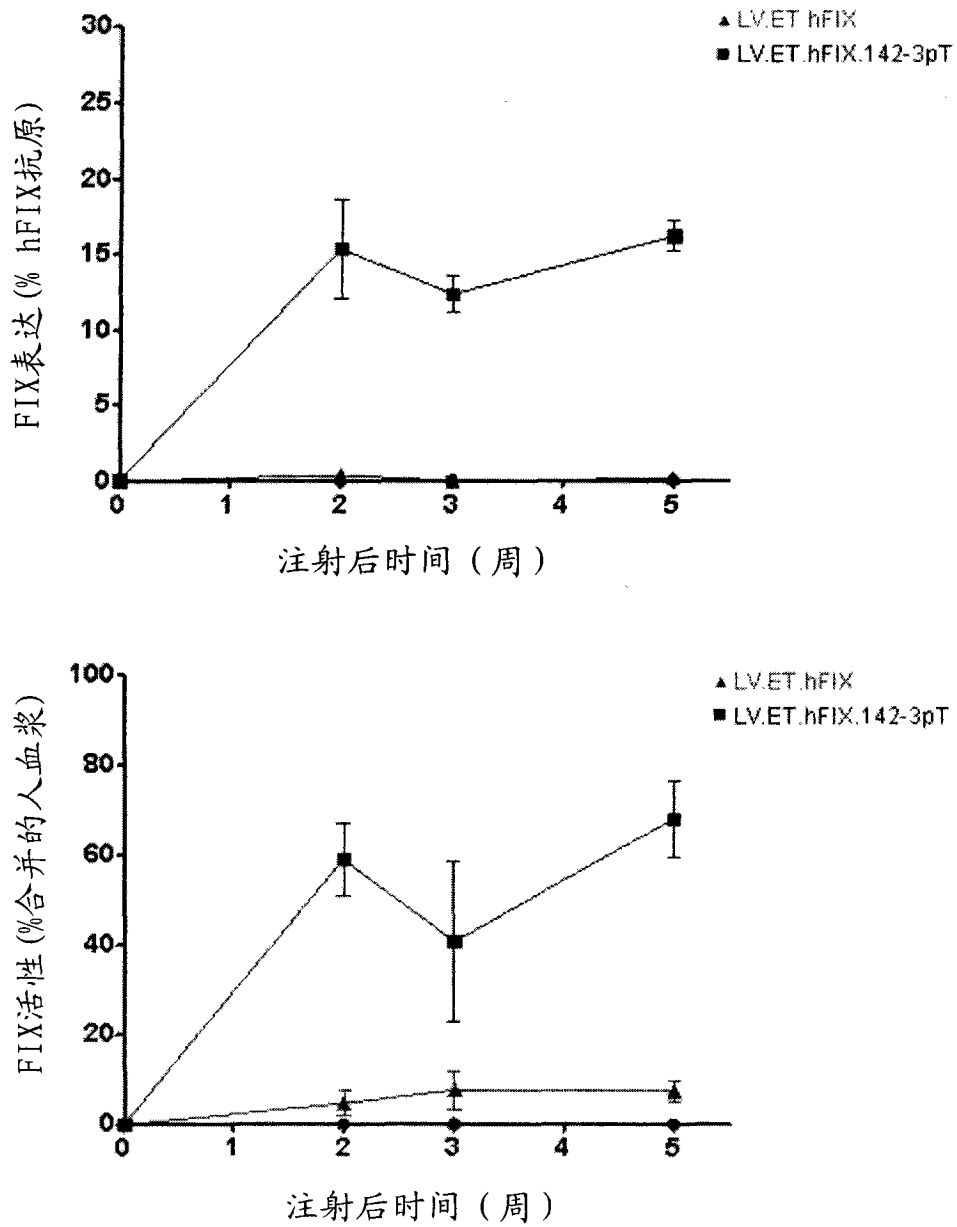
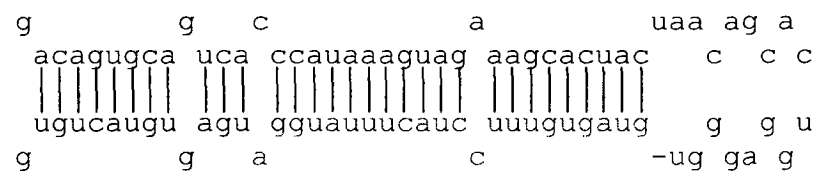


图 8

A. 成熟hsa-mir-142茎环序列



B. 1x.mir-142as.靶

TCCATAAAGTAGGAAACACTACA

图 9