(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117651775 A
(43)申请公布日 2024.03.05

(21)申请号 202280050463.1
(22)申请日 2022.05.17
(30)优先权数据
63/189,771 2021.05.18 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/029601 2022.05.17
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/245803 EN 2022.11.24
(71)申请人 阿西莫夫公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 J·J·甘 C·S·斯塔奇 A·A·K·尼尔森
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 陈艳娟 王艳波
(51)Int.Cl.
C12N 15/86(2006.01)

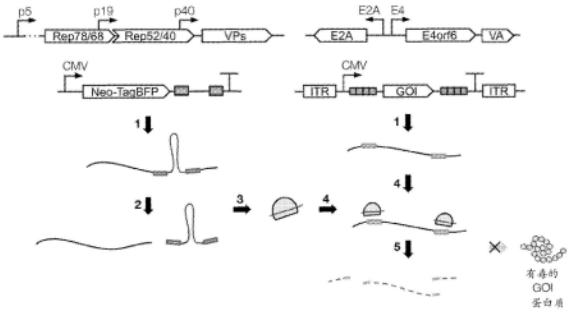
权利要求书6页 说明书20页
序列表10页 附图4页

(54)发明名称

病毒载体产生系统、用于病毒载体产生的工程化细胞及其使用方法

(57)摘要

本文描述的是病毒载体产生系统和用于病毒载体产生的工程化细胞。本文还描述了使用工程化细胞以产生病毒载体的方法。



CN 117651775 A

1.一种病毒载体产生系统,其包括:

(a)工程化细胞,其包含病毒载体产生组分,所述病毒载体产生组分包含共同编码病毒载体的基因产物的一种或多种异源多核酸;

(b)异源核酸序列,其编码第一表达盒,其中所述第一表达盒包含可操作地连接至编码调节性RNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;和

(c)转移多核酸,其包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'和3'端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列。

2.根据权利要求1所述的病毒载体产生系统,其中转移多核酸的中心核酸序列包含编码多克隆位点的核酸序列。

3.根据权利要求2所述的病毒载体产生系统,其中中心核酸序列包含侧翼有与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列的多克隆序列。

4.根据权利要求3所述的病毒载体产生系统,其中多克隆序列侧翼有与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列的串联重复。

5.根据权利要求3或权利要求4所述的病毒载体产生系统,其中多克隆序列在5'端和3'端上侧翼有与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列。

6.根据权利要求2-5中任一项所述的病毒载体产生系统,其中中心核酸序列进一步包含启动子。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的病毒载体产生系统,其中转移多核酸序列的中心核酸序列包含第二表达盒,其中所述第二表达盒包含编码载荷分子的核酸序列,所述编码载荷分子的核酸序列可操作地连接至启动子和与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列二者。

8.根据权利要求7所述的病毒载体产生系统,其中载荷分子的核酸序列包含:5'UTR,其包含与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列;3'UTR,其包含与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列;或

其组合。

9.根据权利要求7或权利要求8所述的病毒载体产生系统,其中载荷分子的核酸序列包含与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列的串联重复。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒包含编码调节性RNA的核酸序列的串联重复。

11.根据权利要求1-10中任一项所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒包含两种或多种不同调节性RNA的核酸序列。

12.根据权利要求1-11中任一项所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒进一步包含编码病毒载体产生组分的基因产物的核酸序列。

13.根据权利要求12所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒中编码基因产物的核酸序列具有:5'UTR,其包含编码调节性RNA的核酸序列;内含子,其包含编码调节性RNA的核酸序列;3'UTR,其包含编码调节性RNA的核酸序列;或其组合。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒进一步包含编码可选标记的核酸序列。

15.根据权利要求14所述的病毒载体产生系统,其中可选标记包括荧光蛋白或抗生素

抗性蛋白。

16.根据权利要求14或权利要求15所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒中编码可选标记的核酸序列具有:5'UTR,其包含编码调节性RNA的核酸序列;内含子,其包含编码调节性RNA的核酸序列;3'UTR,其包含编码调节性RNA的核酸序列;或其组合。

17.根据权利要求1-16中任一项所述的病毒载体产生系统,其中病毒载体产生系统是AAV病毒载体产生系统,其中病毒载体产生组分包含共同编码AAV载体的基因产物的一种或多种多核酸。

18.根据权利要求17所述的病毒载体产生系统,其中病毒载体组分包含Rep52或Rep40;Rep78或Rep68;E2A;E4Orf6;VARNA;VP1;VP2;VP3;和AAP的核酸序列。

19.根据权利要求17或权利要求18所述的病毒载体产生系统,其中转移多核酸的病毒末端重复是AAV反向串联重复。

20.根据权利要求1-16中任一项所述的病毒载体产生系统,其中病毒载体产生系统是慢病毒载体产生系统,其中病毒载体产生组分包含共同编码慢病毒载体的基因产物的一种或多种多核酸。

21.根据权利要求20所述的病毒载体产生系统,其中病毒载体组分包含VSV-G、Gag-Pol和Rev的核酸序列。

22.根据权利要求20或权利要求21所述的病毒载体产生系统,其中转移多核酸的病毒末端重复是慢病毒长末端重复。

23.根据权利要求1-22中任一项所述的病毒载体产生系统,其中病毒载体产生组分的一种或多种异源多核酸中的至少一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的病毒载体产生系统,其中病毒载体产生组分的一种或多种异源多核酸中的每一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

25.根据权利要求1-24中任一项所述的病毒载体产生系统,其中工程化细胞进一步包含编码第一表达盒的异源核酸序列。

26.根据权利要求1-25中任一项所述的病毒载体产生系统,其中工程化细胞源自HEK293细胞、HeLa细胞、BHK细胞或Sf9细胞。

27.根据权利要求1-26中任一项所述的病毒载体产生系统,其中调节性RNA是shRNA或amiRNA。

28.根据权利要求27所述的病毒载体产生系统,其中编码shRNA的核酸序列包含SEQ ID NO:2-11的任一个的核酸序列。

29.根据权利要求27或权利要求28所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒包含编码可选标记的核酸序列,其中编码可选标记的核酸序列包含内含子,所述内含子从5'至3'具有:(i)内含子供体位点;(ii)编码shRNA或amiRNA的核酸序列;和(iii)内含子受体位点。

30.根据权利要求29所述的病毒载体产生系统,其中内含子包含编码shRNA或amiRNA的核酸序列的串联重复、shRNA簇或amiRNA簇。

31.根据权利要求29或权利要求30所述的病毒载体产生系统,其中编码可选标记的核酸序列包含:5'UTR,其中可选标记的内含子位于5'UTR中;3'UTR,并且其中可选标记的内含子位于3'UTR中;或其组合。

32.根据权利要求29-31中任一项所述的病毒载体产生系统,其中可选标记的内含子位

于编码可选标记的核酸序列的编码区中。

33.根据权利要求28-31中任一项所述的病毒载体产生系统,其中内含子包含SEQ ID NO:12的核酸序列。

34.根据权利要求1-26中任一项所述的病毒载体产生系统,其中调节性RNA是Cas13引导RNA。

35.根据权利要求34所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码两种或多种Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子。

36.根据权利要求34或权利要求35所述的病毒载体产生系统,其进一步包含编码Cas13的异源多核酸。

37.根据权利要求36所述的病毒载体产生系统,其中Cas13是Cas13d。

38.根据权利要求37所述的病毒载体产生系统,其中Cas13d包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

39.根据权利要求36-38中任一项所述的病毒载体产生系统,其中编码Cas13的异源多核酸进一步包含第一表达盒。

40.根据权利要求39所述的病毒载体产生系统,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13 gRNA的核酸序列和编码Cas13的核酸序列二者的组成型启动子的核酸序列。

41.根据权利要求36-40中任一项所述的病毒载体产生系统,其中工程化细胞进一步包含编码Cas13的异源多核酸。

42.一种用于病毒载体产生的工程化细胞,其包含一种或多种异源多核酸,所述一种或多种异源多核酸共同包含:

(a)病毒载体产生组分,其共同编码病毒载体的基因产物;

(b)第一表达盒,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码shRNA或amiRNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;和

(c)转移多核酸,其包含在5'和3'端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列的中心核酸序列,其中中心核酸序列包含编码载荷分子的核酸序列,所述编码载荷分子的核酸序列可操作地连接至启动子和与第一表达盒编码的shRNA或amiRNA互补的靶核酸序列二者。

43.根据权利要求42所述的工程化细胞,其中载荷分子的核酸序列包含:5'UTR,其包含与第一表达盒编码的shRNA或amiRNA互补的靶核酸序列;3'UTR,其包含与第一表达盒编码的shRNA或amiRNA互补的靶核酸序列;或其组合。

44.根据权利要求42或权利要求43所述的工程化细胞,其中载荷分子的核酸序列包含与第一表达盒编码的shRNA或amiRNA互补的靶核酸序列的串联重复。

45.根据权利要求42-44中任一项所述的工程化细胞,其中第一表达盒包含编码shRNA或amiRNA的核酸序列的串联重复、shRNA簇或amiRNA簇。

46.根据权利要求42-45中任一项所述的工程化细胞,其中第一表达盒包含两种或多种不同shRNA或两种或多种不同amiRNA的核酸序列。

47.根据权利要求42-45中任一项所述的工程化病毒载体产生系统,其中第一表达盒包含编码可选标记的核酸序列,其中编码所述可选标记的核酸序列包含内含子,所述内含子从5'至3'具有:(i)内含子供体位点;(ii)编码shRNA或amiRNA的核酸序列;和(iii)内含子受体位点。

48.根据权利要求47所述的工程化细胞,其中内含子包含编码shRNA或amiRNA的核酸序列的串联重复、shRNA簇或amiRNA簇。

49.根据权利要求47或权利要求48所述的工程化细胞,其中编码所述可选标记的核酸序列包含:5'UTR,其中可选标记的内含子位于5'UTR中;3'UTR,其中可选标记的内含子位于3'UTR中;或其组合。

50.根据权利要求47-49中任一项所述的工程化细胞,其中可选标记的内含子位于编码可选标记的核酸序列的编码区中。

51.根据权利要求47-50中任一项所述的工程化细胞,其中内含子包含SEQ ID NO:12的核酸序列。

52.根据权利要求42-50中任一项所述的工程化细胞,其中编码shRNA的核酸序列包含SEQ ID NO:2-11中任一个的核酸序列。

53.根据权利要求42-52中任一项所述的工程化细胞,其中病毒载体产生组分包含共同编码AAV载体的基因产物的一种或多种多核酸。

54.根据权利要求53所述的工程化细胞,其中病毒载体组分包含Rep52或Rep40;Rep78或Rep68;E2A;E4Orf6;VARNA;VP1;VP2;VP3;和

AAP的核酸序列。

55.根据权利要求53或权利要求54所述的工程化细胞,其中转移多核酸的病毒末端重复是AAV反向串联重复。

56.根据权利要求42-52中任一项所述的工程化细胞,其中病毒载体产生组分包含共同编码慢病毒载体的基因产物的一种或多种多核酸。

57.根据权利要求56所述的工程化细胞,其中病毒载体组分包含VSV-G、Gag-Pol和Rev的核酸序列。

58.根据权利要求56或权利要求57所述的工程化细胞,其中转移多核酸的病毒末端重复是慢病毒长末端重复。

59.根据权利要求42-58中任一项所述的工程化细胞,其中一种或多种异源多核酸中的至少一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

60.根据权利要求42-59中任一项所述的工程化细胞,其中一种或多种异源多核酸中的每一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

61.根据权利要求42-60中任一项所述的工程化细胞,其中工程化细胞源自HEK293细胞、HeLa细胞、BHK细胞或Sf9细胞。

62.一种在权利要求42-60中任一项所述的工程化细胞中在病毒载体产生期间减少载荷分子表达的方法,其包括在病毒载体产生期间表达shRNA或amiRNA。

63.一种用于病毒载体产生的工程化细胞,其包含一种或多种异源多核酸,所述一种或多种异源多核酸共同包含:

(a)病毒载体产生组分,其共同编码病毒载体的基因产物;

(b)第一表达盒,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;

(c)编码Cas13的核酸序列;和

(d)转移多核酸,其包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'和3'端上侧翼有病毒末

端重复的核酸序列,其中中心核酸序列包含编码载荷分子的核酸序列,所述编码载荷分子的核酸序列可操作地连接至启动子和与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列。

64.根据权利要求63所述的工程化细胞,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码两种或多种Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子。

65.根据权利要求63或权利要求64所述的工程化细胞,其中Cas13是Cas13d。

66.根据权利要求65所述的工程化细胞,其中Cas13d包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

67.根据权利要求63-65中任一项所述的工程化细胞,其中第一表达盒进一步包含编码Cas13的核酸序列。

68.根据权利要求67所述的工程化细胞,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13 gRNA的核酸序列和编码Cas13的核酸序列二者的组成型启动子的核酸序列。

69.根据权利要求63-68中任一项所述的工程化细胞,其中载荷分子的核酸序列包含:5'UTR,其包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列;3'UTR,其包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列;或其组合。

70.根据权利要求63-69中任一项所述的工程化细胞,其中载荷分子的核酸序列包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列的串联重复。

71.根据权利要求63-70中任一项所述的工程化细胞,其中第一表达盒包含编码Cas13引导RNA的核酸序列的串联重复。

72.根据权利要求63-71中任一项所述的工程化细胞,其中第一表达盒包含两种或多种不同Cas13引导RNA的核酸序列。

73.根据权利要求63-72中任一项所述的工程化细胞,其中病毒载体产生组分包含共同编码AAV载体的基因产物的一种或多种多核酸。

74.根据权利要求73所述的工程化细胞,其中病毒载体组分包含Rep52或Rep40;Rep78或Rep68;E2A;E4Orf6;VARNA;VP1;VP2;VP3;和

AAP的核酸序列。

75.根据权利要求73或权利要求74所述的工程化细胞,其中转移多核酸的病毒末端重复是AAV反向串联重复。

76.根据权利要求63-72中任一项所述的工程化细胞,其中病毒载体产生组分包含共同编码慢病毒载体的基因产物的一种或多种多核酸。

77.根据权利要求76所述的工程化细胞,其中病毒载体组分包含VSV-G、Gag-Pol和Rev的核酸序列。

78.根据权利要求76或权利要求77所述的工程化细胞,其中转移多核酸的病毒末端重复是慢病毒长末端重复。

79.根据权利要求63-78中任一项所述的工程化细胞,其中一种或多种异源多核酸中的至少一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

80.根据权利要求63-79中任一项所述的工程化细胞,其中一种或多种异源多核酸中的每一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

81.根据权利要求63-80中任一项所述的工程化细胞,其中工程化细胞源自HEK293细

胞、HeLa细胞、BHK细胞或Sf9细胞。

82.一种在权利要求63-81中任一项所述的工程化细胞中在病毒载体产生期间减少载荷分子表达的方法,其包括在病毒载体产生期间表达Cas13和Cas13引导RNA。

病毒载体产生系统、用于病毒载体产生的工程化细胞及其使用方法

[0001] 领域

[0002] 本文描述的是病毒载体产生系统和用于病毒载体产生的工程化细胞。本文还描述了使用工程化细胞产生病毒载体的方法。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请根据35 U.S.C.§119,要求2021年5月18日提交的美国临时申请序列号63/189,771的权益,其整体内容通过引用并入本文。

[0005] 通过EFS-WEB以文本文件提交的序列表的引用

[0006] 本申请包含序列表,其已经通过EFS-Web以ASCII格式提交,并在此通过引用以其整体并入。所述ASCII副本创建于2022年5月17日,命名为A121070007WO00-SEQ-CRP,并且大小为15,679字节。

[0007] 背景

[0008] 病毒载体是将基因载荷递送到靶细胞中以治疗疾病的有前景的疗法。常见的载荷类型是对全功能感兴趣的基因(GOI)进行DNA编码,以校正患者细胞中相应基因的缺陷或突变。AAV载体是使用产生细胞系(例如HEK293衍生的细胞系)产生的,这些细胞系可产生大量病毒,但它们的生长和产生率可受到许多影响细胞健康和资源分配的因素的影响。

[0009] 概要

[0010] 本文描述的是病毒载体产生系统和用于病毒载体产生的工程化细胞,其允许人们对载荷分子的表达具有增强的控制。本文还描述了使用所述系统和所述工程化细胞的方法。

[0011] 在一些方面中,本公开涉及病毒载体产生系统,其包括:(a)工程化细胞,其包含病毒载体产生组分,所述病毒载体产生组分包含共同编码病毒载体的基因产物的一种或多种异源多核酸;(b)异源核酸序列,其编码第一表达盒,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码调节性RNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;和(c)转移多核酸,其包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'和3'端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列。

[0012] 在一些实施方式中,转移多核酸的中心核酸序列包含编码多克隆位点的核酸序列。在一些实施方式中,中心核酸序列包含侧翼有与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列的多克隆序列。在一些实施方式中,多克隆序列侧翼有与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,多克隆序列在5'端和3'端上侧翼有与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列。在一些实施方式中,中心核酸序列进一步包含启动子。

[0013] 在一些实施方式中,转移多核酸序列的中心核酸序列包含第二表达盒,其中第二表达盒包含编码载荷分子的核酸序列,所述编码载荷分子的核酸序列可操作地连接至启动子和与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列二者。

[0014] 在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含:5'UTR,其包含与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列;3'UTR,其包含与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核

酸序列;或其组合。

[0015] 在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码调节性RNA的核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,第一表达盒包含两种或多种不同调节性RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒进一步包含编码病毒载体产生组分的基因产物的核酸序列。

[0016] 在一些实施方式中,第一表达盒中编码基因产物的核酸序列具有:5'UTR,其包含编码调节性RNA的核酸序列;内含子,其包含编码调节性RNA的核酸序列;3'UTR,其包含编码调节性RNA的核酸序列;或其组合。

[0017] 在一些实施方式中,第一表达盒进一步包含编码可选标记的核酸序列。在一些实施方式中,可选标记包括荧光蛋白或抗生素抗性蛋白。在一些实施方式中,第一表达盒中编码可选标记的核酸序列具有包含编码调节性RNA的核酸序列的5'UTR;包含编码调节性RNA的核酸序列的内含子;包含编码调节性RNA的核酸序列的3'UTR;或其组合。

[0018] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统是AAV病毒载体产生系统,其中病毒载体产生组分包含共同编码AAV载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含Rep52或Rep40;Rep78或Rep68;E2A;E4Orf6;VARNA;VP1;VP2;VP3;和AAP的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是AAV反向串联重复。

[0019] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统是慢病毒载体产生系统,其中病毒载体产生组分包含共同编码慢病毒载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含VSV-G、Gag-Pol和Rev的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是慢病毒长末端重复。

[0020] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分的一种或多种异源多核酸中的至少一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。在一些实施方式中,病毒载体产生组分的一种或多种异源多核酸中的每一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。在一些实施方式中,工程化细胞进一步包含编码第一表达盒的异源核酸序列。

[0021] 在一些实施方式中,工程化细胞源自HEK293细胞、HeLa细胞、BHK细胞或Sf9细胞。

[0022] 在一些实施方式中,上述任一病毒载体产生系统的调节性RNA是shRNA或amiRNA。在一些实施方式中,编码shRNA的核酸序列包含SEQ ID NO:2-11的任一个的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码可选标记的核酸序列,其中编码可选标记的核酸序列包含内含子,所述内含子从5'至3'具有:(i)内含子供体位点;(ii)编码shRNA或amiRNA的核酸序列;和(iii)内含子受体位点。在一些实施方式中,内含子包含编码shRNA或amiRNA的核酸序列的串联重复、shRNA簇或amiRNA簇。

[0023] 在一些实施方式中,编码可选标记的核酸序列包含:5'UTR,其中可选标记的内含子位于5'UTR中;3'UTR,并且其中可选标记的内含子位于3'UTR中;或其组合。在一些实施方式中,可选标记的内含子位于编码可选标记的核酸序列的编码区中。在一些实施方式中,内含子包含SEQ ID NO:12的核酸序列。

[0024] 在一些方面中,如上所述的病毒载体产生系统的调节性RNA是Cas13引导RNA。在一些实施方式中,第一表达盒包含可操作地连接至编码两种或多种Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子。在一些实施方式中,病毒载体产生系统进一步包括编码Cas13的异源多核

酸。在一些实施方式中,Cas13是Cas13d。在一些实施方式中,Cas13d包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方式中,编码Cas13的异源多核酸进一步包含第一表达盒。在一些实施方式中,第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13 gRNA的核酸序列和编码Cas13的核酸序列二者的组成型启动子的核酸序列。在一些实施方式中,工程化细胞进一步包含编码Cas13的异源多核酸。

[0026] 在一些方面中,用于病毒载体产生的工程化细胞包含一种或多种异源多核酸,所述一种或多种异源多核酸共同包含:

[0027] (a)病毒载体产生组分,其共同编码病毒载体的基因产物;

[0028] (b)第一表达盒,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码shRNA或amiRNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;和

[0029] (c)转移多核酸,其包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'和3'端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列,其中中心核酸序列包含编码载荷分子的核酸序列,所述编码载荷分子的核酸序列可操作地连接至启动子和与第一表达盒编码的shRNA或amiRNA互补的靶核酸序列二者。

[0030] 在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含:5'UTR,其包含与第一表达盒编码的shRNA或amiRNA互补的靶核酸序列;3'UTR,其包含与第一表达盒编码的shRNA或amiRNA互补的靶核酸序列;或其组合。在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含与第一表达盒编码的shRNA或amiRNA互补的靶核酸序列的串联重复。

[0031] 在一些实施方式中,第一表达盒包含编码shRNA或amiRNA的核酸序列的串联重复、shRNA簇或amiRNA簇。在一些实施方式中,第一表达盒包含两种或多种不同shRNA或两种或多种不同amiRNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码可选标记的核酸序列,其中编码可选标记的核酸序列包含内含子,所述内含子从5'至3'具有:(i)内含子供体位点;(ii)编码shRNA或amiRNA的核酸序列;和(iii)内含子受体位点。

[0032] 在一些实施方式中,内含子包含编码shRNA或amiRNA的核酸序列的串联重复shRNA簇或amiRNA簇。在一些实施方式中,编码可选标记的核酸序列包含:5'UTR,其中可选标记的内含子位于5'UTR中;3'UTR,其中可选标记的内含子位于3'UTR中;或其组合。

[0033] 在一些实施方式中,其中可选标记的内含子位于编码可选标记的核酸序列的编码区中。

[0034] 在一些实施方式中,内含子包含SEQ ID NO:12的核酸序列。

[0035] 在一些实施方式中,编码shRNA的核酸序列包含SEQ ID NO:2-11中任一个的核酸序列。

[0036] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码AAV载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含Rep52或Rep40;Rep78或Rep68;E2A;E4Orf6;VARNA;VP1;VP2;VP3;和AAP的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是AAV反向串联重复。

[0037] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码慢病毒载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含VSV-G、Gag-Pol和Rev的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是慢病毒长末端重复。

[0038] 在一些实施方式中,一种或多种异源多核酸中的至少一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。在一些实施方式中,一种或多种异源多核酸中的每一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

[0039] 在一些实施方式中,工程化细胞源自HEK293细胞、HeLa细胞、BHK细胞或Sf9细胞。

[0040] 在一些方面中,本申请公开了在如上所述的任一工程化细胞中在病毒载体产生期间减少载荷分子表达的方法,其包括在病毒载体产生期间表达shRNA。

[0041] 在一些方面中,本申请公开了用于病毒载体产生的工程化细胞,所述工程化细胞包含一种或多种异源多核酸,所述一种或多种异源多核酸共同包含:(a)病毒载体产生组分,其共同编码病毒载体的基因产物;(b)第一表达盒,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;(c)编码Cas13的核酸序列;和(d)转移多核酸,其包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'和3'端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列,其中中心核酸序列包含编码载荷分子的核酸序列,所述编码载荷分子的核酸序列可操作地连接至启动子和与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列二者。

[0042] 在一些实施方式中,第一表达盒包含可操作地连接至编码两种或多种Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子。在一些实施方式中,Cas13是Cas13d。在一些实施方式中,Cas13d包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒进一步包含编码Cas13的核酸序列。

[0043] 在一些实施方式中,第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13gRNA的核酸序列和编码Cas13的核酸序列二者的组成型启动子的核酸序列。在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含:5'UTR,其包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列;3'UTR,其包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列;或其组合。

[0044] 在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码Cas13引导RNA的核酸序列的串联重复。

[0045] 在一些实施方式中,第一表达盒包含两种或多种不同Cas13引导RNA的核酸序列。

[0046] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码AAV载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含Rep52或Rep40;Rep78或Rep68;E2A;E4Orf6;VARNA;VP1;VP2;VP3;和AAP的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是AAV反向串联重复。

[0047] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码慢病毒载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含VSV-G、Gag-Pol和Rev的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是慢病毒长末端重复。

[0048] 在一些实施方式中,一种或多种异源多核酸中的至少一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。在一些实施方式中,一种或多种异源多核酸中的每一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

[0049] 在一些实施方式中,工程化细胞源自HEK293细胞、HeLa细胞、BHK细胞或Sf9细胞。

[0050] 在一些方面中,本公开涉及在本文所述的任一种工程化细胞中在病毒载体产生期间减少载荷分子表达的方法,其包括在病毒载体产生期间表达Cas13和Cas13引导RNA。

[0051] 附图的简要说明

[0052] 下列附图形成本说明书的一部分并且被包括以进一步展示本公开的某些方面,通过参考这些附图中的一幅或多幅并结合本文呈现的具体实施方式的详细描述可以更好地理解本公开的某些方面。应当理解,附图中阐释的数据决不限制本公开的范围。

[0053] 图1显示了AAV载荷分子(或感兴趣的基因,“GOI”)的shRNA介导的敲低的示例性示意图。1)RNA对应于GOI以及还有在3’UTR中具有shRNA的基因(此处为Neo-TagBFP)被转录。shRNA(环)侧翼有内含子供体和受体位点(星号)。GOI侧翼有在5’和3’UTR中的shRNA靶位点(阴影框)的串联重复。2)shRNA序列被剪接,释放shRNA发夹。3)shRNA发夹由RNAi机器加工,并且引导链被整合到RNA诱导的沉默复合物(RISC)中。4)具有引导链的RISC结合至GOI mRNA。5)RISC可切割GOI mRNA和/或抑制其翻译。可用于翻译的GOI mRNA的减少导致GOI蛋白质水平降低。

[0054] 图2A-2B显示了具有或缺乏shRNA表达质粒的细胞中载荷分子(EGFP)敲低的比较。图2A显示了在添加和不添加EGFP shRNA的情况下在收获AAV和AAV感染滴度前AAV产生细胞的荧光图像。图2B显示AAV滴度的定量。

[0055] 图3显示了在5’UTR或3’UTR任一中含有FF5靶位点的免疫球蛋白(IG)-EYFP载荷分子、缺乏FF5靶位点的IG-EYFP载荷分子和缺乏FF5靶位点的EGFP载荷分子的比较。左侧是在用于产生AAV的转染细胞内测量的EYFP或EGFP的荧光几何平均值。右侧是使用转导测定测量的病毒滴度。对于带有FF5靶位点的构建体,用FF5 shRNA(蓝色柱)转染导致AAV产生细胞中的载荷分子显著减少,但与未转染FF5 shRNA的对照(红色柱)相比,仍产生相似或更好的病毒滴度。

[0056] 图4显示了AAV载荷分子(或感兴趣的基因,“GOI”)的Cas13介导的敲低的示例性示意图。敲低系统由位于被Cas13d-crRNA复合物识别的5’UTR、3’UTR或两个区域中的靶序列的阵列组成。

[0057] 详细描述

[0058] 本公开的发明人已经理解,在病毒载体产生期间病毒载体的载荷分子(即,感兴趣的基因或“GOI”)的表达可将资源转离产生病毒载体,并且转向产生载荷的RNA和蛋白质。本发明人还理解了,一些载荷分子可以是有毒的,进一步影响产生细胞的生长和生产力。本文描述的是用于病毒载体产生的病毒载体产生系统和工程化细胞,其允许人们在病毒载体产生期间增强对载荷分子的表达的控制。本文还描述了使用所述工程化细胞的方法。

[0059] I.病毒载体产生系统

[0060] 在一些方面中,本公开涉及病毒载体产生系统。如本文所述的病毒载体产生系统包括一种或多种多核酸,所述一种或多种多核酸共同包含:(a)病毒载体产生组分;(b)第一表达盒,其包含可操作地连接至编码调节性RNA的核酸序列的启动子的核酸序列;和(c)转移多核酸。

[0061] 如本文所用,术语“病毒载体产生组分”是指共同编码在重组宿主细胞中生成病毒载体所需的基因产物的一种或多种多核酸。先前已经描述了几种类型的病毒载体(包括其产生所需的组分),包括腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、慢病毒载体、逆转录病毒载体和单纯疱疹病毒载体。本文描述的病毒载体产生系统可包含编码产生任何这些先前描述的病毒载体所需的基因产物的病毒载体产生组分。

[0062] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码在重组宿主细胞中生成AAV载体所需的基因产物的一种或多种多核苷酸。示例性的AAV基因产物包括Rep52、Rep40、Rep78、Rep68、E2A、E4Orf6、VARNA、VP1、VP2、VP3、AAP和MAAP或其功能变体。Rep基因产物(包括Rep52、Rep40、Rep78和Rep68)参与AAV基因组复制。E2A基因产物参与AAV复制期间辅助DNA合成持续过程(processivity)。E4Orf6基因产物支持AAV复制。VARNA基因产物在调节翻译中发挥作用。CAP基因产物(包括VP1、VP2、VP3)编码病毒衣壳蛋白。AAP基因产物在衣壳组装中发挥作用。MAAP是移码VP1蛋白,并且似乎在病毒衣壳中发挥作用,如Ogden等人,Science 366.6469(2019):1139-1143(其通过引用以其整体并入)中描述的。

[0063] 如本文所用,术语“功能变体”是指与野生型序列相比包含修饰的核酸或氨基酸序列并且能够执行野生型基因产物的功能(例如酶促、调节或结合)的基因产物。例如,Rep52的功能变体仍能够在AAV基因组复制中发挥作用。

[0064] 在一些实施方式中,病毒载体组分包含共同编码以下基因产物的一种或多种多核苷酸:Rep52(或其功能变体)或Rep40(或其功能变体);Rep78(或其功能变体)或Rep68(或其功能变体);E2A(或其功能变体);E4Orf6(或其功能变体);VARNA(或其功能变体);VP1(或其功能变体);VP2(或其功能变体);VP3(或其功能变体);和AAP(或其功能变体)。在一些实施方式中,病毒载体组分包含共同编码以下基因产物的一种或多种多核苷酸:Rep52(或其功能变体)、Rep40(或其功能变体)、Rep78(或其功能变体)、Rep68(或其功能变体)、E2A(或其功能变体)、E4Orf6(或其功能变体(例如SEQ ID NO:23))、VARNA(或其功能变体)、VP1(或其功能变体)、VP2(或其功能变体)、VP3(或其功能变体)和AAP(或其功能变体)。

[0065] 移除具有剪接位点的E4Orf6的示例性功能变体:

[0066] atgactacgtccggcgttccatttggcatgacactacgaccaacacgatctcggttgtctcggcgcactccgtacagtagggatcgcct

[0067] acctccttttgagacagagacccgcgctaccatactggaggatcatccgctgctgcccgaatgtaacactttgacaatgcacaaTgtT

[0068] TCCtacgtgcgaggtcttccctgcagtgtgggatttacgctgattcaggaatgggttgttccctgggatatggttctgacgcgggagg

[0069] agcttgtaatcctgaggaagtgtatgcacgtgtgcctgtgttgtgccaacattgatatcatgacgagcatgatgatccatggttacgagtc

[0070] ctgggctctccactgtcattgttccagtcccggttccctgcagtgcatagccggcgggcaggttttggccagctggtttaggatggtggt

[0071] ggatggcgccatgtttaatcagaggtttatatggtaccgggaggtggtgaattacaacatgccaaaaggaggtaatgtttatgtccagcgt

[0072] gtttatgaggggtcgccacttaatctacctgcgcttgtggtatgatggccacgtgggttctgtggtcccccgccatgagctttggatacagc

[0073] gccttgcactgtgggattttgaacaatattgtggtgctgtgctgcagttactgtgctgatttaagtgagatcagggtgcgctgctgtgcccg

[0074] gaggacaaggcgtctcatgctgcgggcggtgcgaatcatcgctgaggagaccactgccatgttgtattcctgcaggacggagcggc

[0075] ggcggcagcagtttattcgcgcgctgctgcagcaccaccgccctatcctgatgcacgattatgactct

accccatgTAGtaa(SEQ ID NO:23)

[0076] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码在重组宿主细胞中产生慢病毒载体所需的基因产物的一种或多种多核苷酸。示例性的慢病毒基因产物包括:VSV-G、Gag-Pol和Rev。在一些实施方式中,病毒载体包含共同编码以下基因产物的一种或多种多核苷酸:VSV-G(或其功能变体)、Gag-Pol(或其功能变体)和Rev(或其功能变体)。

[0077] 在一些实施方式中,病毒载体组分(即,病毒载体组分的基因产物)在单一多核酸上编码。在其他实施方式中,多种多核酸共同构成病毒载体组分(即,病毒载体组分的至少两种基因产物在不同的多核酸上编码)。例如,病毒载体组分可包含至少2、至少3、至少4或至少5种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含2、3、4或5种多核酸。

[0078] 除了病毒载体组分之外,本文所述的病毒载体产生系统包含第一表达盒,所述第一表达盒包含可操作地连接至编码调节性RNA的核酸序列的启动子的核酸序列。

[0079] 如下文(第IA和IB部分)所阐述的,示例性的调节性RNA包括shRNA和Cas13引导RNA。

[0080] 第一表达盒可包含编码调节性RNA的核酸序列的串联重复。例如,在一些实施方式中,串联重复可包含至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10个拷贝的编码调节性RNA的核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的编码调节性RNA的核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个拷贝的编码调节性RNA的核酸序列。

[0081] 第一表达盒可包含编码调节性RNA的核酸序列的两个或多个串联重复。例如,在一些实施方式中,第一表达盒包含编码调节性RNA的核酸序列的至少2、至少3、至少4或至少5个串联重复。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码调节性RNA的核酸序列的2-3、2-4、2-5、3-4、3-5或4-5个串联重复。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码调节性RNA的核酸序列的2、3、4或5个串联重复。

[0082] 第一表达盒可包含编码调节性RNA的核酸序列簇(例如shRNA簇或人工miRNA簇)。如本文所用,术语"簇"是指编码一组两种或多种miRNA的多核酸,所述miRNA物理上相邻(即在约10kb内)、以相同方向转录并且不在相反方向被转录单元或miRNA分开,如Lai,X.和J.Vera.,"MicroRNA clusters."Encyclopedia of Systems Biology.New York:Springer(2013)(其通过引用以其整体并入)中描述的。示例性的miRNA簇包括但不限于miR-30e、miR-30c-1、miR-214、miR-199a-2、miR-215、miR-194-1、miR-217、miR-216、miR-15b、miR-16-2、miR-143、miR-145、miR-25、miR-93、miR-106b、miR-23b、miR-27b、miR-24-1、miR-181a、miR-181b-2、miR-34b、miR-34c、miR-125b-1、let-7a-2、miR-100、miR-16-1、miR-15a、miR-17、miR-18、miR-19a、miR-20、miR-19b-1、miR-92-1、miR-299、miR-323、miR-329、miR-134、miR-154、miR-133a-1、miR-1-2、miR-99b、let-7e、miR-125a、miR-133a-2、miR-1-1、miR-99a、let-7c、miR-125b-2、miR-98、let-7f-2、miR-105-1和miR-105-2。在一些实施方式中,簇编码2、3、4、5、6、7、8、9、10或多于10种miRNA。如本文所述的shRNA簇或人工miRNA簇是指其中miRNA的发夹已被如本文所述的shRNA或人工miRNA的发夹(例如,靶向载荷基因的shRNA发夹)替代的簇。产生amiRNA簇的方法是本领域众所周知的,并且在Bhaskaran,Vivek等人,Nature protocols 14.12(2019):3538-3553(其通过引用以其整体并入)中进行了描

述。在一些实施方式中,shRNA或amiRNA簇包含非天然存在的shRNA或amiRNA发夹。在一些实施方式中,shRNA簇或amiRNA簇的最5′和最3′侧翼区域被不同miRNA簇的侧翼区域替代,产生嵌合shRNA簇或嵌合amiRNA簇。

[0083] 第一表达盒可包含不同调节性RNA的核酸序列(即,具有不同核酸序列的调节性RNA)。例如,在一些实施方式中,第一表达盒包含至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10种不同的调节性RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10种不同的调节性RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同的调节性RNA的核酸序列。

[0084] 如本文描述的,当启动子相对于核酸编码序列的位置使得转录激活子与启动子的结合可诱导编码序列的表达时,启动子“可操作地连接”至核酸编码序列。

[0085] 启动子可以是组成型启动子(即,允许持续转录的不受调控的启动子)。本领域已知的组成型启动子的实例包括但不限于巨细胞病毒(CMV)启动子、延伸因子1α(EF1α)启动子、猿猴空泡病毒40(SV40)启动子、泛素-C(UBC)启动子、U6启动子和磷酸甘油酸激酶(PGK)启动子。参见,例如Ferreira等人,Tuning gene expression with synthetic upstream open reading frames.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.2013Jul;110(28):11284-89;公开号:US 2014/377861 A1;Qin,Jane Yuxia等人,PloS one 5.5(2010):e10611-其整体通过引用并入本文。

[0086] 可替选地,启动子可以是诱导型启动子(即,仅在特定情况下激活转录)。诱导型启动子可以是,例如,化学诱导型启动子、温度诱导型启动子或光诱导型启动子。诱导型启动子的实例在本领域是已知的,并且包括但不限于四环素/多西环素诱导型启动子、cumate诱导型启动子、ABA诱导型启动子、CRY2-CIB1诱导型启动子、DAPG诱导型启动子和米非司酮诱导型启动子。参见例如Stanton等人,ACS Synth.Biol.2014 Dec 19;3(12):880-91;Liang等人,Sci.Signal.2011Mar 15;4(164):rs2;专利号:US 7,745,592 B2;专利号:US 7,935,788 B2-其整体通过引用并入本文。

[0087] 在一些实施方式中,第一表达盒的启动子是组成型启动子,诸如CMV启动子、EF1α启动子、SV40启动子、UBC启动子、U6启动子或PGK启动子。

[0088] 在一些实施方式中,第一表达盒的启动子是诱导型启动子,诸如化学诱导型启动子、温度诱导型启动子或光诱导型启动子。在一些实施方式中,诱导型启动子是四环素/多西环素诱导型启动子、cumate诱导型启动子、ABA诱导型启动子、CRY2-CIB1诱导型启动子、DAPG诱导型启动子或米非司酮诱导型启动子。

[0089] 在一些实施方式中,第一表达盒进一步包含编码上述病毒载体产生组分的基因产物的核酸序列。例如,在其中病毒载体产生组分是AAV病毒载体组分的实施方式中,第一表达盒可进一步包含编码Rep52、Rep40、Rep78、Rep68、E2A、E4Orf6、VARNA、VP1、VP2、VP3、AAP或其组合的核酸序列。类似地,在其中病毒载体产生组分是慢病毒载体组分的实施方式中,第一表达盒可进一步包含编码VSV-G、Gag-Pol、Rev或其组合的核酸序列。

[0090] 在一些实施方式中,第一表达盒的启动子可操作地连接至编码调节性RNA的核酸序列和编码病毒载体产生组分的基因产物的核酸序列二者。例如,在一些实施方式中,编码

基因产物的核酸序列具有包含编码调节性RNA的核酸序列的5'UTR、内含子和/或3'UTR。

[0091] 在一些实施方式中,第一表达盒进一步包含编码可选标记的核酸序列。如本文所用,术语"可选标记"是指-当引入细胞中或在细胞中表达时-赋予适合选择的特征的蛋白质。

[0092] 可选标记可以是荧光蛋白。荧光蛋白的实例是本领域已知的(例如,TagBFP、EBFP2、EGFP、EYFP、mKO2或Sirius)。参见例如专利号:US 5,874,304;专利号:EP 0969284 A1;公开号:US 2010/167394 A-其全部通过引用并入本文。

[0093] 可替选地或另外地,可选标记可以是抗生素抗性蛋白。抗生素抗性蛋白的实例是本领域已知的(例如,促进嘌呤霉素、潮霉素、新霉素、吉欧霉素、杀稻瘟菌素或腐草霉素选择)。参见例如,公开号:WO 1997/15668A2;公开号:WO 1997/43900A1——其全部通过引用并入本文。

[0094] 在一些实施方式中,第一表达盒的启动子可操作地连接至编码调节性RNA的核酸序列和编码可选标记的核酸序列二者。例如,在一些实施方式中,编码可选标记的核酸序列具有包含编码调节性RNA的核酸序列的5'UTR、内含子和/或3'UTR。

[0095] 除了病毒载体组分和第一表达盒之外,本文描述的病毒载体产生系统包含转移多核酸。本文所述的转移多核酸包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'端和3'端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列。如本文所用,术语"病毒末端重复"指将病毒载体载荷的多核酸整合到宿主细胞基因组中所需的核酸序列。示例性的病毒末端重复是本领域普通技术人员已知的。

[0096] 例如,在其中病毒载体产生组分是AAV病毒载体组分的实施方式中,转移多核酸可包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'端和3'端上侧翼有AAV反向串联重复("ITR")的核酸序列。示例性的AAV ITR是本领域普通技术人员已知的。

[0097] 在其中病毒载体产生组分是慢病毒载体组分的实施方式中,转移多核酸可包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'端和3'端上侧翼有慢病毒长串联重复(LTR)的核酸序列。示例性的慢病毒LRT是本领域普通技术人员已知的。

[0098] 转移多核酸的中心核酸可包含与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列。如本文所述,当靶核酸序列在宿主细胞的生理条件下能够被调节性RNA结合(即,能够与调节性RNA杂交)时,它与调节性RNA"互补"。当靶核酸序列包含与调节性RNA反向互补(reverse compliment)的核酸序列时,靶核酸序列被称为与调节性RNA具有100%互补性。在一些实施方式中,靶核酸序列与调节性RNA具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%互补性。在一些实施方式中,靶核酸序列与调节性RNA具有85-100%、90-100%、95-100%、96-100%、97-100%、98-100%或99-100%互补性。

[0099] 可替选地或另外地,转移多核酸的中心核酸可包含多克隆位点的核酸序列。示例性多克隆位点对于具有本领域普通技术的人员是已知的。多克隆位点可用于在宿主细胞中生成病毒载体之前,将载荷分子(或感兴趣的基因)-或编码载荷分子的表达盒-克隆到转移多核酸中。在一些实施方式中,多克隆位点的核酸序列(在5′端、3′端、或5′端和3′端上)侧翼有与第一个表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列-全部包含在中心核酸内。例如,中心核酸可包括包含靶核酸序列(其与第一表达盒编码的调节性RNA互补)的5′UTR序列和/

或3′UTR序列,其可以可操作地连接至克隆到多克隆位点的感兴趣的基因。在一些实施方式中,中心核酸进一步包含(如本文所述的组成型或诱导型)启动子的核酸序列。例如,在一些实施方式中,转移多核酸从5′至3′包含:(i)病毒末端重复的核酸序列;(ii)启动子的核酸序列;(iii)多克隆位点的核酸序列,其(在3′端、5′端、或5′端和3′端上)侧翼有与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列;和(iv)病毒末端重复的核酸序列。

[0100] 可替选地或另外地,转移多核酸的中心核酸可包含表达盒,所述表达盒包含启动子(如本文所述的组成型或诱导型)和与第一表达盒编码的调节性RNA互补的靶核酸序列,两者可操作地连接至编码载荷分子的核酸序列。在一些实施方式中,编码载荷分子的核酸序列包含:包含靶核酸序列的5′UTR;包含靶核酸序列的编码序列;包含靶核酸序列的3′UTR;或其组合。

[0101] 中心核酸可包含靶核酸序列(即,与第一表达盒编码的调节性RNA互补的核酸序列)的串联重复。在一些实施方式中,串联重复可包含至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10个拷贝的靶核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的靶核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个拷贝的靶核酸序列。

[0102] 中心核酸可包含靶核酸序列(即,与第一表达盒编码的调节性RNA互补的核酸序列)的两个或多个串联重复。在一些实施方式中,中心核酸包含编码调节性RNA的核酸序列的至少2、至少3、至少4或至少5个串联重复。在一些实施方式中,中心核酸包含编码调节性RNA的核酸序列的2-3、2-4、2-5、3-4、3-5或4-5个串联重复。在一些实施方式中,中心核酸包含编码调节性RNA的核酸序列的2、3、4或5个串联重复。

[0103] 在其中第一表达盒包含不同的调节性RNA(即,具有不同的核酸序列的调节性RNA)的实施方式中,中心核酸可包含不同的靶核酸序列。例如,在一些实施方式中,中心核酸包含至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10个不同靶核酸序列的核酸序列。在一些实施方式中,中心核酸包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个不同靶核酸序列的核酸序列。在一些实施方式中,中心核酸包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个不同靶核酸序列的核酸序列。

[0104] 在一些实施方式中,本文所述的病毒载体产生系统包含工程化细胞。工程化细胞可包含本文所述的病毒载体产生系统的任何部分(以及部分的任何组合)。

[0105] 例如,工程化细胞可包含病毒载体产生组分的至少一部分。例如,并且如上所述,病毒载体产生组分可包含多种多核酸。在此类实施方式中,工程化细胞包含所述多种多核酸中的一种或多种-其每一种可位于工程化细胞的染色体外或稳定整合到工程化细胞的基因组中。在一些实施方式中,工程化细胞包含完整的病毒载体产生组分。

[0106] 可替选地或另外地,工程化细胞可包含病毒产生系统的第一表达盒。

[0107] 可替选地或另外地,工程化细胞可包含病毒产生系统的转移多核酸。

[0108] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含:(a)工程化细胞,其包含病毒载体产生组分,所述病毒载体产生组分包含共同编码病毒载体的基因产物的一种或多种异源多核酸;(b)异源核酸序列,其编码第一表达盒,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码调节

性RNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;和(c)转移多核酸,其包含中心核酸序列,所述中心核酸序列在5'和3'端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列。

[0109] A.具有shRNA调节性RNA的产生系统。

[0110] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统的调节性RNA是shRNA。小发夹RNA("shRNAs")是模拟microRNA的序列,其下调与microRNA序列具有充分互补性的RNA转录物。shRNA由Pol II或Pol III启动子转录,并被加工和整合到RNA诱导的沉默复合物(RISC)中。在一些实施方式中,病毒载体产生系统的调节性RNA是amiRNA(人工microRNA)。人工miRNA是天然存在的pri-miRNA序列,其已被修饰以包含指导靶基因(例如载荷基因)的下调的序列。shRNA和amiRNA可被设计为与载荷分子(GOI)编码序列和/或UTR(5'UTR或3'UTR)互补。特定的靶序列可并入例如载荷分子的UTR序列中。

[0111] 具有shRNA作为调节性RNA的产生系统可具有任意上述实施方式(第I部分)。具有amiRNA作为调节性RNA的产生系统可具有任意上述实施方式(第I部分)。

[0112] 在一些实施方式中,编码shRNA的核酸序列包含SEQ ID NO:2-11中任一个的核酸序列。在一些实施方式中,shRNA或amiRNA靶向SEQ ID NO:13-22中任一个的序列。

[0113] 在一些实施方式中,第一表达盒包含编码可选标记(如本文所述)的核酸序列,其中编码可选标记的核酸序列包含内含子,所述内含子从5′至3′具有:(i)内含子供体位点;(ii)编码shRNA的核酸序列;和(iii)内含子受体位点。

[0114] 在一些实施方式中,shRNA可操作地连接至PolIII启动子(例如U6启动子)。在一些实施方式中,amiRNA可操作地连接至PolIII启动子(例如U6启动子)。

[0115] 在一些实施方式中,内含子包含编码shRNA的核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,串联重复包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个拷贝的编码shRNA的核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含至少2、至少3、至少4或至少5个拷贝的编码shRNA的核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的编码shRNA的核酸序列。

[0116] 在一些实施方式中,内含子包含编码shRNA的核酸序列的shRNA簇。在一些实施方式中,shRNA簇包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个拷贝的编码shRNA的核酸序列。在一些实施方式中,shRNA簇包含至少2、至少3、至少4或至少5个拷贝的编码shRNA的核酸序列。在一些实施方式中,shRNA簇包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的编码shRNA的核酸序列。

[0117] 在一些实施方式中,内含子包含编码amiRNA的核酸序列的amiRNA簇。在一些实施方式中,amiRNA簇包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个拷贝的编码amiRNA的核酸序列。在一些实施方式中,amiRNA簇包含至少2、至少3、至少4或至少5个拷贝的编码amiRNA的核酸序列。在一些实施方式中,amiRNA簇包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的编码amiRNA的核酸序列。

[0118] 在一些实施方式中,编码可选标记的核酸序列包含:5'UTR,其中可选标记的内含子位于5'UTR中;3'UTR,其中可选标记的内含子位于3'UTR中;或其组合。在一些实施方式

中,可选标记的内含子位于编码可选标记的核酸序列的编码区中。

[0119] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统如图1所描绘的。

[0120] 在一些实施方式中,内含子包含AGgtaagtNNNNTACTTTAGGACCCTTTTTTTTCCacagGT(SEQ ID NO:12)的核酸序列,其中"NNNN"包含shRNA的靶序列。在一些实施方式中,"NNNN"包含SEQ ID NO:2-11中的任一个。

[0121] B.具有Cas13引导RNA调节性RNA的产生系统。

[0122] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统的调节性RNA是Cas13引导RNA。Cas13是可编程的RNA引导、RNA靶向Cas蛋白,具有核酸酶活性,其允许在不改变基因的编码DNA序列的情况下实现靶向mRNA敲低。Cas13由与靶序列互补的引导RNA引导至靶RNA。靶识别导致RNA-RNA杂交和靶RNA的切割。引导RNA可被设计为与载荷分子(GOI)编码序列和/或UTR(5′UTR或3′UTR)互补。特定的靶序列可并入例如载荷分子的UTR序列中。Cas13可用于通过RNA切割来敲低载荷分子("GOI")蛋白质水平,而无需修饰编码DNA序列。Cas13不表现出前间隔区(protospacer)侧翼序列要求,允许靶向转录区内的任何序列。

[0123] 具有Cas13引导RNA作为调节性RNA的产生系统可具有任意上述实施方式(第I部分)。

[0124] 在一些实施方式中,第一表达盒包含可操作地连接至编码两种或多种不同Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子。在一些实施方式中,两种或多种不同的gRNA包含在选自由天然引导RNA阵列、核酶自切割引导RNA阵列、Cys4引导RNA阵列或tRNA引导RNA阵列组成的组的引导RNA阵列中,如McCarty,Nicholas S.等人,"Nature communications11.1(2020):1-13(其通过引用以其整体并入)中所述的。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同Cas13引导RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码至少2、至少3、至少4或至少5种不同Cas13引导RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10种不同Cas13引导RNA的核酸序列。

[0125] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统进一步包含编码Cas13的异源多核酸。示例性的Cas13蛋白是本领域普通技术人员已知的,并且包括但不限于Cas13a、Cas13b、Cas13c和Cas13d。在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含编码Cas13a的异源多核酸。在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含编码Cas13b的异源多核酸。在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含编码Cas13c的异源多核酸。在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含编码Cas13d的异源多核酸。

[0126] 在一些实施方式中,Cas13包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸同一性的功能变体的氨基酸序列。如本文所用,术语"功能变体"-在Cas13蛋白的上下文中-是指相对于野生型Cas13蛋白具有至少50%核酸内切酶活性的变体。

[0127] 确定两个序列(例如,两个氨基酸序列或两个多核酸)之间同一性的程度的方法是本领域普通技术人员已知的。一种示例性的方法是使用具有默认参数的Basic Local Alignment Search Tool(BLAST®)软件(blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)。

[0128] 在一些实施方式中,编码Cas13的异源多核酸进一步包含第一表达盒。在一些实施

方式中,第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13 gRNA的核酸序列和编码Cas13的核酸序列的组成型启动子的核酸序列。

[0129] 在一些实施方式中,工程化细胞包含编码Cas13的异源多核酸。

[0130] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统如图4所描绘的。

[0131] II.用于病毒载体产生的工程化细胞

[0132] 在一些方面中,本公开内容涉及用于病毒载体产生的工程化细胞。这些工程化细胞可包含上述病毒载体产生系统的部分的任意组合。以下提供了用于病毒载体产生的示例性工程化细胞。

[0133] A.包含shRNA调节性RNA的工程化细胞。

[0134] 在一些实施方式中,用于病毒载体产生的工程化细胞包含一种或多种异源多核酸,所述一种或多种异源多核酸共同包含:(a)病毒载体产生组分,其共同编码病毒载体的基因产物;(b)第一表达盒,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码shRNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;和(c)转移多核酸,其包含在5′和3′端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列的中心核酸序列,其中中心核酸序列包含编码载荷分子的核酸序列,所述编码载荷分子的核酸序列可操作地连接至启动子和与第一表达盒编码的shRNA互补的靶核酸序列二者。

[0135] 在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包括包含与第一表达盒编码的shRNA互补的靶核酸序列的5’UTR;包含与第一表达盒编码的shRNA互补的靶核酸序列的3’UTR;或其组合。

[0136] 在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含与第一表达盒编码的shRNA互补的靶核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,串联重复可包含至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10个拷贝的靶核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的靶核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个拷贝的靶核酸序列。

[0137] 在一些实施方式中,第一表达盒包含编码shRNA的核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,串联重复包含2、3、4、5、6、7、8、9或10个拷贝的编码shRNA的核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含至少2、至少3、至少4或至少5个拷贝的编码shRNA的核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的编码shRNA的核酸序列。

[0138] 在一些实施方式中,编码shRNA的核酸序列包含SEQ ID NO:2-11中任一个的核酸序列。

[0139] 在一些实施方式中,第一表达盒包含两种或多种不同shRNA的核酸序列。例如,在一些实施方式中,第一表达盒包含编码2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同shRNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码至少2、至少3、至少4或至少5种不同shRNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10种不同shRNA的核酸序列。

[0140] 在一些实施方式中,第一表达盒包含编码可选标记的核酸序列,其中编码可选标记的核酸序列包含内含子,所述内含子从5'至3'具有:(i)内含子供体位点;(ii)编码shRNA的核酸序列;和(iii)内含子受体位点。

[0141] 在一些实施方式中,内含子包含编码shRNA的核酸序列的串联重复。

[0142] 在一些实施方式中,编码可选标记的核酸序列包含:5'UTR,其中可选标记的内含子位于5'UTR中;3'UTR,其中可选标记的内含子位于5'UTR中;或其组合。在一些实施方式中,可选标记的内含子位于编码可选标记的核酸序列的编码区中。

[0143] 在一些实施方式中,内含子包含SEQ ID NO:12的核酸序列。

[0144] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码AAV载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含Rep52或Rep40;Rep78或Rep68;E2A;E4Orf6;VARNA;VP1;VP2;VP3;和AAP的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是AAV反向串联重复。

[0145] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码慢病毒载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含VSV-G、Gag-Pol和Rev的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是慢病毒长末端重复。

[0146] 在一些实施方式中,工程化细胞包含如图1所描绘的病毒载体产生系统。

[0147] 在一些实施方式中,一种或多种异源多核酸中的至少一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。在一些实施方式中,一种或多种异源多核酸中的每一种稳定整合到工程化细胞的基因组中。

[0148] 在一些实施方式中,工程化细胞源自HEK293细胞或HeLa细胞、BHK细胞或Sf9细胞。

[0149] B.包含Cas13引导RNA和调节性RNA的工程化细胞。

[0150] 在一些实施方式中,用于病毒载体产生的工程化细胞包含一种或多种异源多核酸,所述一种或多种异源多核酸共同包含:(a)病毒载体产生组分,其共同编码病毒载体的基因产物;(b)第一表达盒,其中第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子的核酸序列;(c)编码Cas13的核酸序列;和(d)转移多核酸,其包含在5′和3′端上侧翼有病毒末端重复的核酸序列的中心核酸序列,其中中心核酸序列包含编码载荷分子的核酸序列,所述编码载荷分子的核酸序列可操作地连接至启动子和与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列二者。

[0151] 在一些实施方式中,第一表达盒包含可操作地连接至编码两种或多种Cas13引导RNA的核酸序列的组成型启动子。例如,在一些实施方式中,第一表达盒包含编码2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同Cas13引导RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码至少2、至少3、至少4或至少5种不同Cas13引导RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10种不同Cas13引导RNA的核酸序列。

[0152] 在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含编码Cas13a的异源多核酸。在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含编码Cas13b的异源多核酸。在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含编码Cas13c的异源多核酸。在一些实施方式中,病毒载体产生系统包含编码Cas13d的异源多核酸。

[0153] 在一些实施方式中,Cas13包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列或与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%氨基酸同一性的功能变体的氨基酸序列。

[0154] 在一些实施方式中,第一表达盒进一步包含编码Cas13的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含可操作地连接至编码Cas13 gRNA的核酸序列和编码Cas13的核酸序列二者的组成型启动子的核酸序列。

[0155] 在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含:5'UTR,其包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列;3'UTR,其包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列;或其组合。

[0156] 在一些实施方式中,载荷分子的核酸序列包含与第一表达盒编码的Cas13引导RNA互补的靶核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,串联重复可包含至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10个拷贝的靶核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的靶核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包含2、3、4、5、6、7、8、9、10个拷贝的靶核酸序列。

[0157] 在一些实施方式中,第一表达盒包括编码Cas13引导RNA的核酸序列的串联重复。在一些实施方式中,串联重复可包含至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10个拷贝的编码Cas13引导RNA的核酸序列。在一些实施方式中,串联重复序列包含2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10个拷贝的编码Cas13引导RNA的核酸序列。在一些实施方式中,串联重复包括2、3、4、5、6、7、8、9、10个拷贝的编码Cas13引导RNA的核酸序列。

[0158] 在一些实施方式中,第一表达盒包含两种或多种不同Cas13引导RNA的核酸序列。例如,在一些实施方式中,第一表达盒包含编码2、3、4、5、6、7、8、9或10种不同Cas13引导RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码至少2、至少3、至少4或至少5种不同Cas13引导RNA的核酸序列。在一些实施方式中,第一表达盒包含编码2-3、2-4、2-5、2-6、2-7、2-8、2-9、2-10、3-4、3-5、3-6、3-7、3-8、3-9、3-10、4-5、4-6、4-7、4-8、4-9、4-10、5-6、5-7、5-8、5-9、5-10、6-7、6-8、6-9或6-10种不同Cas13引导RNA的核酸序列。

[0159] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码AAV载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含Rep52或Rep40;Rep78或Rep68;E2A;E4Orf6;VARNA;VP1;VP2;VP3;和AAP的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是AAV反向串联重复。

[0160] 在一些实施方式中,病毒载体产生组分包含共同编码慢病毒载体的基因产物的一种或多种多核酸。在一些实施方式中,病毒载体组分包含VSV-G、Gag-Pol和Rev的核酸序列。在一些实施方式中,转移多核酸的病毒末端重复是慢病毒长末端重复。

[0161] 在一些实施方式中,工程化细胞包括如图4所描绘的病毒载体产生系统。

[0162] 在一些实施方式中,一种或多种异源多核酸中的至少一种被稳定地整合到工程化细胞的基因组中。在一些实施方式中,一种或多种异源多核酸中的每一种被稳定地整合到工程化细胞的基因组中。

[0163] 在一些实施方式中,工程化细胞源自HEK293细胞或HeLa细胞。

[0164] III.在病毒载体产生期间减少载荷表达的方法

[0165] 在一些方面中,本公开涉及利用第II部分描述的工程化细胞在病毒载体产生期间减少载荷表达的方法,其中载荷包括靶核酸序列(其与第一表达盒编码的调节性RNA互补)。

[0166] 在一些实施方式中,其中工程化细胞包括作为调节性RNA的shRNA,减少载荷表达的方法包括在病毒载体产生期间表达shRNA。

[0167] 在一些实施方式中,其中工程化细胞包括编码Cas13的核酸序列和编码Cas13引导RNA的核酸序列,减少载荷表达的方法包括在病毒载体产生期间表达Cas13和Cas13引导RNA。

实施例

[0168] 实施例1.AAV载荷分子的shRNA-介导的敲低。

[0169] 将AAV pHelper、AAV pRepCap和转移质粒在有或没有针对EGFP的shRNA表达质粒的情况下共转染到HEK293FT细胞中。在测试之前,将三种不同的shRNA质粒汇集在一起(图1)。转染后72小时,在干冰异丙醇浴中通过三次冻融循环收获AAV。将病毒原液系列稀释1倍、10倍和100倍,并将10uL的所得病毒原液通过添加到铺在96孔板中的5e4个HEK293FT细胞中进行转导。转导后48小时,收获转导的细胞,并且通过流式细胞术测定EGFP阳性细胞的百分比,并计算每mL转导单位(TU/mL)。(图2A-2B)。EGFP shRNA的加入导致EGFP荧光显著降低,其中AAV滴度仅降低~1.1倍。由于EGFP毒性极小,因此AAV滴度没有增加,并且AAV滴度的极小降低表明shRNA对AAV产生和包装具有极小的影响。当使用FF5 shRNA连同转移质粒上的FF5靶位点连同不同的免疫球蛋白(IG)-EYFP转移序列时,获得了类似的结果(图3)。

[0170] 表1:示例性shRNA序列

[0171]

SEQ ID NO	描述	序列
2	miRE.shRNA.T1	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTAACGTACGCGGAATACTTCGAATAGTGA AGCCACAGATGTATTCGAAGTATTCCGCGTACGTGTGCCTACT GCCTCGGACTTCAAGGGGC
3	miRE.shRNA.T2	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTGCGTTGCTAGTACCAACCCTATAGTGAA GCCACAGATGTATAGGGTTGGTACTAGCAACGCTTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC
4	miRE.shRNA.FF3	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTACGATATGGGCTGAATACAAATAGTGA AGCCACAGATGTATTTGTATTCAGCCCATATCGTTTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC
5	miRE.shRNA.FF4	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGACGCTTGAAGTCTTTAATTAAATAGTGAAG CCACAGATGTATTTAATTAAAGACTTCAAGCGGTGCCTACTGC CTCGGACTTCAAGGGGC
6	miRE.shRNA.FF5	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTAGCACTCTGATTTGACAATTATAGTGAAG CCACAGATGTATAATTGTCAAATCAGAGTGCTTTGCCTACTGC CTCGGACTTCAAGGGGC
7	miRE.shRNA.FF6	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTACCAAAGAGATTCCTCATAAATAGTGAA GCCACAGATGTATTTATGAGGAATCTCTTTGGTTTGCCTACTGC CTCGGACTTCAAGGGGC
8	miRE.shRNA.fluc.130	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTACCAAAGAGATTCCTCATAAATAGTGAA GCCACAGATGTATTTATGAGGAATCTCTTTGGTTTGCCTACTGC CTCGGACTTCAAGGGGC
9	miRE.shRNA.fluc.563	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTATGCACATATCGAGGTGGACATAGTGAA GCCACAGATGTATGTCCACCTCGATATGTGCATCTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC
10	miRE.shRNA.fluc.773	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTGGACAAGACAATTGCACTGATTAGTGAA GCCACAGATGTAATCAGTGCAATTGTCTTGTCCCTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC
11	miRE.shRNA.fluc.1497	CGACTTCTTAACCCAACAGAAGGCTCGAGAAGGTATATTGCTG TTGACAGTGAGCGTTTGGATTTCGAGTCGTCTTAATTAGTGAA GCCACAGATGTAATTAAGACGACTCGAAATCCACTGCCTACTG CCTCGGACTTCAAGGGGC

[0172] 表2:示例性shRNA序列的靶

[0173]

SEQ ID NO	描述	序列
13	T1 靶	CACGTACGCGGAATACTTCGAA
14	T2 靶	AGCGTTGCTAGTACCAACCCTA

[0174]

15	FF3 靶	AACGATATGGGCTGAATACAAA
16	FF4 靶	CCGCTTGAAGTCTTTAATTAAA
17	FF5 靶	AAGCACTCTGATTTGACAATTA
18	FF6 靶	AACCAAAGAGATTCCTCATAAA
19	fluc.130 靶	AACCAAAGAGATTCCTCATAAA
20	fluc.563 靶	GATGCACATATCGAGGTGGACA
21	fluc.773 靶	GGGACAAGACAATTGCACTGAT
22	fluc.1497 靶	GTGGATTTCGAGTCGTCTTAAT

[0175] 实施例2.AAV载荷分子的Cas13-介导的敲低。

[0176] Cas13d可通过RNA切割来敲低AAV载荷GOI蛋白质水平,而不修饰编码DNA序列的GOI(图4)。Cas13d没有表现出前间隔区侧翼序列的要求,允许靶向转录区内的任何序列。

[0177] Cas13的示例性氨基酸序列(SEQ ID NO:1):

[0178]
MSPKKKRKVEASIEKKKSFAKGMGVKSTLVSGSKVYMTTFAEGSDARLEKIVEGDSI
RSVNEGEAFSAEMADKNAGYKIGNAKFSHPKGYAVVANNPLYTGPVQQDMLGLKE
TLEKRYFGESADGNDNICIQVIHNILDIEKILAEYITNAAYAVNNISGLDKDIIGFGKFS
TVYTYDEFKDPEHHRAAFNNNDKLINAIKAQYDEFDNFLDNPRLGYFGQAFFSKEGR
NYIINYGNECYDILALLSGLRHWVVHNNEEESRISRTWLYNLDKNLDNEYISTLNYL
YDRITNELTNSFSKNSAANVNYIAETLGINPAEFAEQYFRFSIMKEQKNLGFNITKLRE
VMLDRKDMSEIRKNHKVFDSIRTKVYTMMDFVIYRYYIEEDAKVAAANKSLPDNEK
SLSEKDIFVINLRGSFNDDQKDALYYDEANRIWRKLENIMHNIKEFRGNKTREYKKK
DAPRLPRILPAGRDVSAFSKLMYALTMFLDGKEINDLLTTLINKFDNIQSFLKVMPLIG
VNAKFVEEYAFFKDSAKIADELRLIKSFARMGEPIADARRAMYIDAIRILGTNLSYDE
LKALADTFSLDENGNKLKKGKHGMRNFIINNVISNKRFHYLIRYGDPAHLHEIAKNE
AVVKFVLGRIADIQKKQGQNGKNQIDRYYETCIGKDKGKSVSEKVDALTKIITGMNY
DQFDKKRSVIEDTGRENAEREKFKKIISLYLTVIYHILKNIVNINARYVIGFHCVERDA
QLYKEKGYDINLKKLEEKGFSSVTKLCAGIDETAPDKRKDVEKEMAERAKESIDSLE
SANPKLYANYIKYSDEKKAEEFTRQINREKAKTALNAYLRNTKWNVIIREDLLRIDN
KTCTLFRNKAVHLEVARYVHAYINDIAEVNSYFQLYHYIMQRIIMNERYEKSSGKVS

[0179]
EYFDAVNDEKKYNDRLLKLLCVPFGYCIPRFKNLSIEALFDRNEAAKFDKEKKKVSG
NSGSGPKKKRKVAAAYPYDVPDYA

[0180] 其他实施方式

[0181] 本说明书中公开的所有特征可以任何组合进行组合。本说明书中公开的每个特征可被用作相同、等同或类似目的的替代特征所代替。因此,除非另有明确说明,公开的每个特征仅是一系列等同或类似特征的实例。

[0182] 从以上描述中,本领域技术人员可容易地确定本公开的基本特征,并且在不偏离其精神和范围的情况下,可对本公开进行各种改变和修改以使其适应各种用法和条件。因此,其他实施方式也在权利要求内。

[0183] 等同形式

[0184] 虽然本文已经描述和说明了几个发明实施方式,但本领域普通技术人员将容易地设想用于执行如本文描述的功能和/或获得如本文描述的结果和/或一个或多个优点的各种其他手段和/或结构,并且此类变化和/或修改中每一个都被认为在如本文描述的发明实施方式的范围内。更一般地说,本领域技术人员将容易理解,如本文描述的所有参数、尺寸、材料和构型都旨在是示例性,并且实际的参数、尺寸、材料和/或构型将取决于使用本发明的教义的一个或多个特定应用。本领域技术人员使用不超过常规实验将认识到或能够确定如本文描述的具体发明实施方式的许多等同形式。因此,应理解,前述实施方式仅以实例的方式呈现,并且在所附权利要求及其等同形式的范围内,可以以不同于具体描述和所要求保护的方式实施发明实施方式。本公开的发明实施方式涉及如本文描述的每个单独的特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法。此外,如果此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法不是相互不一致的,两个或多个此类特征、系统、物品、材料、试剂盒和/或方法的任何组合包含在本公开的发明范围内。

[0185] 本文限定和使用的所有定义应被理解为优先于字典定义、通过引用并入的文件中的定义和/或所定义术语的普通含义。

[0186] 本文公开的所有参考文献、专利和专利申请通过参考有关每个所引用的主题而并入,其在一些情况下可涵盖整个文件。

[0187] 本申请在说明书和权利要求书中使用的不定冠词“一/一个/一种(a/an)”,除非明确指出相反,应理解为“至少一个/至少一种(at least one)”。

[0188] 本文在说明书和权利要求书中使用的短语“和/或”应被理解为如此连接的元素的“其中之一或两者”,即,元素在一些情况下是联合呈现的,并且在其他情况下是分开呈现的。以“和/或”列出的多个元素应以相同的方式解释,即:“一个或多个/一种或多种”如此连接的元素。除了由“和/或”从句具体标识的元素之外,可任选地存在与具体标识的那些元素相关或不相关的其他元素。因此,作为非限制性实例,当与诸如“包含/包括/含有”的开放式语言一起使用时,对“A和/或B”的提及可在一个实施方式中仅指A(任选地包含除B以外的元素);在另一个实施方式中,仅指B(任选地包含除A以外的元素);在又另一个实施方式中,指A和B两者(任选地包含其他元素);等。

[0189] 如本文在说明书和权利要求书中所使用的,“或”应理解为与如上所述定义的“和/或”具有相同的含义。例如,当分隔列表中的项目时,“或”或“和/或”应被解释为包含,即,包含许多元素或元素列表中至少一个,但也包含多于一个,以及任选地其他未列出的项。只有明确相反指出的术语,诸如“只有一个/只有一种/仅一个/仅一种/仅……一个/仅……一种(only one of)”或“正好一个/正好一种/恰好一个/恰好一种(exactly one of)”,或者当在权利要求书中使用时,“由……组成”将指包含许多元素或元素列表中的正好一个元素。一般而言,本文使用的术语“或”仅当前面有排他性术语,诸如“任一/二者其一(either)”、“一个/一种/其中之一(one of)”、“只有一个/只有一种/仅一个/仅一种/仅……一个/仅……一种(only one of)”或“正好一个/正好一种/恰好一个/恰好一种(exactly one of)”等时,应被解释为表示排他性替代物(即“一个或另一个,但不是两者都有”)。在权利要求书中使用的“基本上由……组成”,应与专利法领域中使用的通常含义相同。

[0190] 如本文在说明书和权利要求书中使用的,提及一个或多个元素的列表时,短语“至

少一个/至少一种(at least one)”应被理解为是指从元素列表中任一个或多个元素中选择至少一个元素,但不一定包含元素列表中具体列出的每个元素中的至少一个,并且不排除元素列表中元素的任何组合。该定义还允许,除了在短语“至少一个/至少一种(at least one)”所指的元素列表中具体标识的元素之外,元素可任选地存在,无论与具体标识的那些元素相关还是不相关。因此,作为非限制性实例,在一个实施方式中,“A和B中至少一个”(或等同地“A或B中至少一个”,或等同地“A和/或B中至少一个”)可指至少一个A、任选包含多于一个A,不存在B(并且任选地包含除B以外的元素);在另一个实施方式中,可指至少一个B、任选地包含多于一个B,不存在A(并且任选包含除A以外的元素);在又一个实施方式中,指至少一个A、任选地包含多于一个A,和至少一个B、任选包含多于一个B(并且任选地包含其他元素);等。

[0191] 还应理解,除非明确相反地指出,在本文所要求保护的包括一个以上步骤或动作的任何方法中,所述方法的步骤或动作的顺序不一定限于所叙述的方法的步骤或动作的顺序。

[0192] 在权利要求中,以及在以上说明书中,所有过渡性短语,诸如“包含/包括/含有(comprising/including/containing)”、“携带”、“具有/含有(having)”、“涉及”、“持有”、“包含/包括/含有(composed of)”等,应理解为是开放式的,即,意指包括但不限于。只有过渡短语“由……组成”和“基本上由……组成”应分别为封闭或半封闭的过渡短语,如美国专利局专利审查程序手册第2111.03节所述。应理解的是,在本文件中使用开放式过渡短语(例如,包含/包括/含有)描述的实施方式在替代实施方式中也被考虑为“由开放式过渡短语所描述的特征组成”和“基本上由开放式过渡短语所描述的特征组成”。例如,如果本公开描述“包含A和B的组合物”,则本公开还考虑到“由A和B组成的组合物”和“基本上由A和B组成的组合物”的替代实施方式。

序列表

<110> 阿西莫夫公司

<120> 病毒载体产生系统、用于病毒载体产生的工程化细胞及其使用方法

<130> A1210.70004WO00

<140> 尚未分配

<141> 与此同时

<150> US 63/189,771

<151> 2021-05-18

<160> 23

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 1000

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

Met Ser Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Ala Ser Ile Glu Lys Lys
1 5 10 15
Lys Ser Phe Ala Lys Gly Met Gly Val Lys Ser Thr Leu Val Ser Gly
20 25 30
Ser Lys Val Tyr Met Thr Thr Phe Ala Glu Gly Ser Asp Ala Arg Leu
35 40 45
Glu Lys Ile Val Glu Gly Asp Ser Ile Arg Ser Val Asn Glu Gly Glu
50 55 60
Ala Phe Ser Ala Glu Met Ala Asp Lys Asn Ala Gly Tyr Lys Ile Gly
65 70 75 80
Asn Ala Lys Phe Ser His Pro Lys Gly Tyr Ala Val Val Ala Asn Asn
85 90 95
Pro Leu Tyr Thr Gly Pro Val Gln Gln Asp Met Leu Gly Leu Lys Glu
100 105 110
Thr Leu Glu Lys Arg Tyr Phe Gly Glu Ser Ala Asp Gly Asn Asp Asn
115 120 125
Ile Cys Ile Gln Val Ile His Asn Ile Leu Asp Ile Glu Lys Ile Leu
130 135 140
Ala Glu Tyr Ile Thr Asn Ala Ala Tyr Ala Val Asn Asn Ile Ser Gly
145 150 155 160
Leu Asp Lys Asp Ile Ile Gly Phe Gly Lys Phe Ser Thr Val Tyr Thr

165 170 175
Tyr Asp Glu Phe Lys Asp Pro Glu His His Arg Ala Ala Phe Asn Asn
180 185 190
Asn Asp Lys Leu Ile Asn Ala Ile Lys Ala Gln Tyr Asp Glu Phe Asp
195 200 205
Asn Phe Leu Asp Asn Pro Arg Leu Gly Tyr Phe Gly Gln Ala Phe Phe
210 215 220
Ser Lys Glu Gly Arg Asn Tyr Ile Ile Asn Tyr Gly Asn Glu Cys Tyr
225 230 235 240
Asp Ile Leu Ala Leu Leu Ser Gly Leu Arg His Trp Val Val His Asn
245 250 255
Asn Glu Glu Glu Ser Arg Ile Ser Arg Thr Trp Leu Tyr Asn Leu Asp
260 265 270
Lys Asn Leu Asp Asn Glu Tyr Ile Ser Thr Leu Asn Tyr Leu Tyr Asp
275 280 285
Arg Ile Thr Asn Glu Leu Thr Asn Ser Phe Ser Lys Asn Ser Ala Ala
290 295 300
Asn Val Asn Tyr Ile Ala Glu Thr Leu Gly Ile Asn Pro Ala Glu Phe
305 310 315 320
Ala Glu Gln Tyr Phe Arg Phe Ser Ile Met Lys Glu Gln Lys Asn Leu
325 330 335
Gly Phe Asn Ile Thr Lys Leu Arg Glu Val Met Leu Asp Arg Lys Asp
340 345 350
Met Ser Glu Ile Arg Lys Asn His Lys Val Phe Asp Ser Ile Arg Thr
355 360 365
Lys Val Tyr Thr Met Met Asp Phe Val Ile Tyr Arg Tyr Tyr Ile Glu
370 375 380
Glu Asp Ala Lys Val Ala Ala Ala Asn Lys Ser Leu Pro Asp Asn Glu
385 390 395 400
Lys Ser Leu Ser Glu Lys Asp Ile Phe Val Ile Asn Leu Arg Gly Ser
405 410 415
Phe Asn Asp Asp Gln Lys Asp Ala Leu Tyr Tyr Asp Glu Ala Asn Arg
420 425 430
Ile Trp Arg Lys Leu Glu Asn Ile Met His Asn Ile Lys Glu Phe Arg
435 440 445
Gly Asn Lys Thr Arg Glu Tyr Lys Lys Lys Asp Ala Pro Arg Leu Pro
450 455 460
Arg Ile Leu Pro Ala Gly Arg Asp Val Ser Ala Phe Ser Lys Leu Met
465 470 475 480

Tyr Ala Leu Thr Met Phe Leu Asp Gly Lys Glu Ile Asn Asp Leu Leu
485 490 495
Thr Thr Leu Ile Asn Lys Phe Asp Asn Ile Gln Ser Phe Leu Lys Val
500 505 510
Met Pro Leu Ile Gly Val Asn Ala Lys Phe Val Glu Glu Tyr Ala Phe
515 520 525
Phe Lys Asp Ser Ala Lys Ile Ala Asp Glu Leu Arg Leu Ile Lys Ser
530 535 540
Phe Ala Arg Met Gly Glu Pro Ile Ala Asp Ala Arg Arg Ala Met Tyr
545 550 555 560
Ile Asp Ala Ile Arg Ile Leu Gly Thr Asn Leu Ser Tyr Asp Glu Leu
565 570 575
Lys Ala Leu Ala Asp Thr Phe Ser Leu Asp Glu Asn Gly Asn Lys Leu
580 585 590
Lys Lys Gly Lys His Gly Met Arg Asn Phe Ile Ile Asn Asn Val Ile
595 600 605
Ser Asn Lys Arg Phe His Tyr Leu Ile Arg Tyr Gly Asp Pro Ala His
610 615 620
Leu His Glu Ile Ala Lys Asn Glu Ala Val Val Lys Phe Val Leu Gly
625 630 635 640
Arg Ile Ala Asp Ile Gln Lys Lys Gln Gly Gln Asn Gly Lys Asn Gln
645 650 655
Ile Asp Arg Tyr Tyr Glu Thr Cys Ile Gly Lys Asp Lys Gly Lys Ser
660 665 670
Val Ser Glu Lys Val Asp Ala Leu Thr Lys Ile Ile Thr Gly Met Asn
675 680 685
Tyr Asp Gln Phe Asp Lys Lys Arg Ser Val Ile Glu Asp Thr Gly Arg
690 695 700
Glu Asn Ala Glu Arg Glu Lys Phe Lys Lys Ile Ile Ser Leu Tyr Leu
705 710 715 720
Thr Val Ile Tyr His Ile Leu Lys Asn Ile Val Asn Ile Asn Ala Arg
725 730 735
Tyr Val Ile Gly Phe His Cys Val Glu Arg Asp Ala Gln Leu Tyr Lys
740 745 750
Glu Lys Gly Tyr Asp Ile Asn Leu Lys Lys Leu Glu Glu Lys Gly Phe
755 760 765
Ser Ser Val Thr Lys Leu Cys Ala Gly Ile Asp Glu Thr Ala Pro Asp
770 775 780
Lys Arg Lys Asp Val Glu Lys Glu Met Ala Glu Arg Ala Lys Glu Ser

785 790 795 800
Ile Asp Ser Leu Glu Ser Ala Asn Pro Lys Leu Tyr Ala Asn Tyr Ile
805 810 815
Lys Tyr Ser Asp Glu Lys Lys Ala Glu Glu Phe Thr Arg Gln Ile Asn
820 825 830
Arg Glu Lys Ala Lys Thr Ala Leu Asn Ala Tyr Leu Arg Asn Thr Lys
835 840 845
Trp Asn Val Ile Ile Arg Glu Asp Leu Leu Arg Ile Asp Asn Lys Thr
850 855 860
Cys Thr Leu Phe Arg Asn Lys Ala Val His Leu Glu Val Ala Arg Tyr
865 870 875 880
Val His Ala Tyr Ile Asn Asp Ile Ala Glu Val Asn Ser Tyr Phe Gln
885 890 895
Leu Tyr His Tyr Ile Met Gln Arg Ile Ile Met Asn Glu Arg Tyr Glu
900 905 910
Lys Ser Ser Gly Lys Val Ser Glu Tyr Phe Asp Ala Val Asn Asp Glu
915 920 925
Lys Lys Tyr Asn Asp Arg Leu Leu Lys Leu Leu Cys Val Pro Phe Gly
930 935 940
Tyr Cys Ile Pro Arg Phe Lys Asn Leu Ser Ile Glu Ala Leu Phe Asp
945 950 955 960
Arg Asn Glu Ala Ala Lys Phe Asp Lys Glu Lys Lys Lys Val Ser Gly
965 970 975
Asn Ser Gly Ser Gly Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Ala Ala Ala Tyr
980 985 990
Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
995 1000

<210> 2
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 2
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgtaac 60
gtacgcggaa tacttcgaat agtgaagcca cagatgtatt cgaagtattc cgcgtacgtg 120
tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147
<210> 3
<211> 147

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 3
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttgc 60
gttgctagta ccaaccctat agtgaagcca cagatgtata gggttggtac tagcaacgct 120
tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147
<210> 4
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 4
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttac 60
gatatgggct gaatacaaat agtgaagcca cagatgtatt tgtattcagc ccatatcgtt 120
tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147
<210> 5
<211> 146
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 5
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgacgc 60
ttgaagtctt taattaaata gtgaagccac agatgtattt aattaaagac ttcaagcggt 120
gcctactgcc tcggacttca aggggc 146
<210> 6
<211> 146
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgtagc 60
actctgattt gacaattata gtgaagccac agatgtataa ttgtcaaatc agagtgcttt 120
gcctactgcc tcggacttca aggggc 146
<210> 7

<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 7
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttac 60
caaagagatt cctcataaat agtgaagcca cagatgtatt tatgaggaat ctctttggtt 120
tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147
<210> 8
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 8
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttac 60
caaagagatt cctcataaat agtgaagcca cagatgtatt tatgaggaat ctctttggtt 120
tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147
<210> 9
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 9
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttat 60
gcacatatcg aggtggacat agtgaagcca cagatgtatg tccacctcga tatgtgcatc 120
tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147
<210> 10
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 10
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgttgg 60
acaagacaat tgcactgatt agtgaagcca cagatgtaat cagtgcaatt gtcttgtccc 120
tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147

<210> 11
<211> 147
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 11
cgacttctta acccaacaga aggctcgaga aggtatattg ctgttgacag tgagcgtttg 60
gatttcgagt cgtcttaatt agtgaagcca cagatgtaat taagacgact cgaaatccac 120
tgcctactgc ctcggacttc aaggggc 147
<210> 12
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<220>
<221> misc_feature
<222> (9)..(12)
<223> n是a、c、g或t
<400> 12
aggtaagtnn nntactttag gacccttttt tttccacagg t 41
<210> 13
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 13
cacgtacgcg gaatacttcg aa 22
<210> 14
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 14
agcgttgcta gtaccaaccc ta 22
<210> 15

<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 15
aacgatatgg gctgaataca aa 22
<210> 16
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 16
ccgcttgaag tctttaatta aa 22
<210> 17
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17
aagcactctg atttgacaat ta 22
<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18
aaccaaagag attcctcata aa 22
<210> 19
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 19
aaccaaagag attcctcata aa 22

<210> 20
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 20
gatgcacata tcgaggtgga ca 22
<210> 21
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 21
gggacaagac aattgcactg at 22
<210> 22
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 22
gtggatttcg agtcgtctta at 22
<210> 23
<211> 888
<212> DNA
<213> 未知的
<220>
<223> AAV2
<400> 23
atgactacgt ccggcgttcc atttggcatg acactacgac caacacgatc tcggttgtct 60
cggcgcactc cgtacagtag ggatcgccta cctccttttg agacagagac ccgcgctacc 120
atactggagg atcatccgct gctgcccgaa tgtaacactt tgacaatgca caatgtttcc 180
tacgtgcgag gtcttccctg cagtgtggga tttacgctga ttcaggaatg ggttgttccc 240
tgggatatgg ttctgacgcg ggaggagctt gtaatcctga ggaagtgtat gcacgtgtgc 300
ctgtgttgtg ccaacattga tatcatgacg agcatgatga tccatggtta cgagtcctgg 360
gctctccact gtcattgttc cagtcccggt tccctgcagt gcatagccgg cgggcaggtt 420
ttggccagct ggtttaggat ggtggtggat ggcgccatgt ttaatcagag gtttatatgg 480

taccgggagg tggtgaatta caacatgcca aaagaggtaa tgtttatgtc cagcgtgttt 540
atgaggggtc gccacttaat ctacctgcgc ttgtggtatg atggccacgt gggttctgtg 600
gtccccgcca tgagctttgg atacagcgcc ttgcactgtg ggattttgaa caatattgtg 660
gtgctgtgct gcagttactg tgctgattta agtgagatca gggtgcgctg ctgtgcccgg 720
aggacaaggc gtctcatgct gcgggcggtg cgaatcatcg ctgaggagac cactgccatg 780
ttgtattcct gcaggacgga gcggcggcgg cagcagttta ttcgcgcgct gctgcagcac 840
caccgcccta tcctgatgca cgattatgac tctaccccca tgtagtaa 888

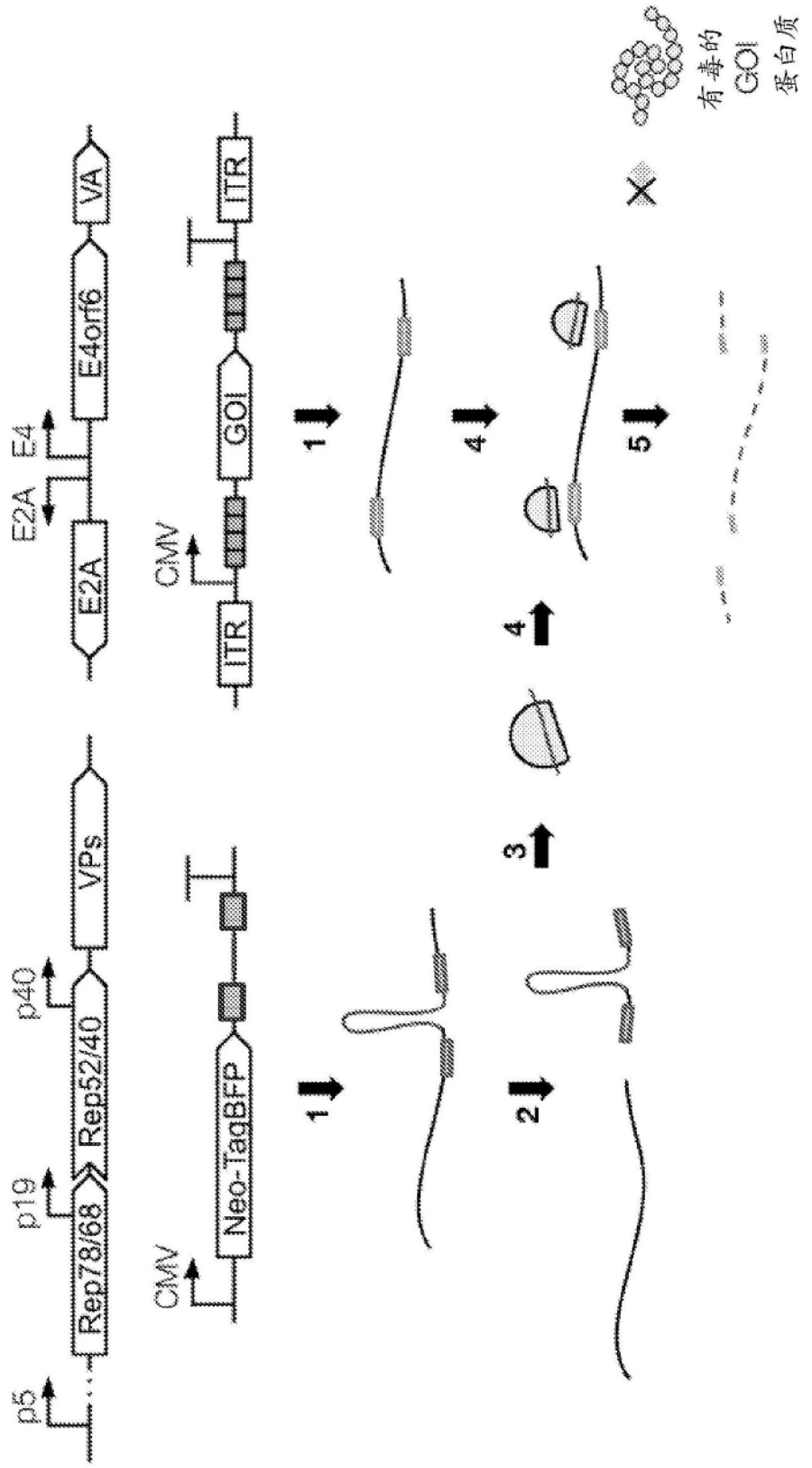

p5
Rep78/68
p19
Rep52/40
p40
VPs
CMV
Neo-TagBFP
E2A
E2A
E4
E4orf6
VA
CMV
ITR
GOI
ITR
1
2
3
4
4
5
有毒的
GOI
蛋白质

图1

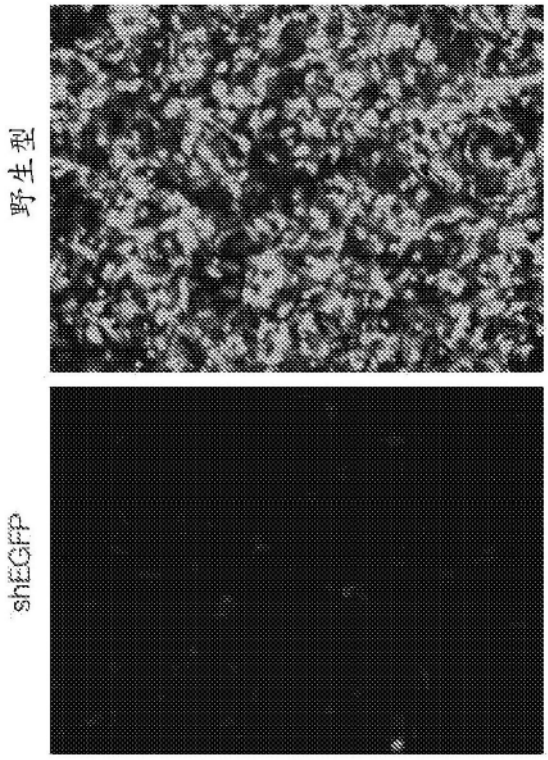


图2A

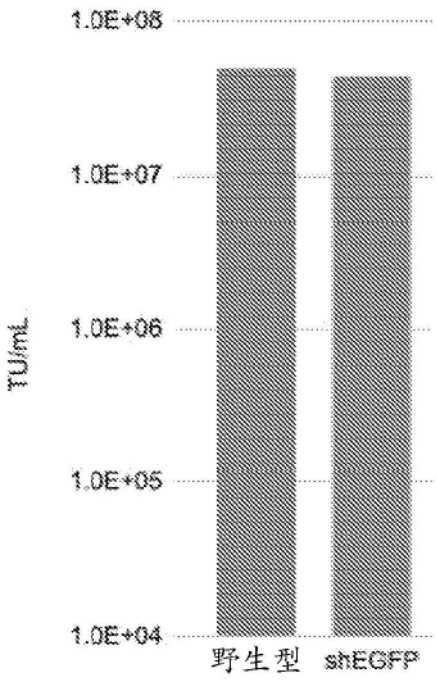


图2B

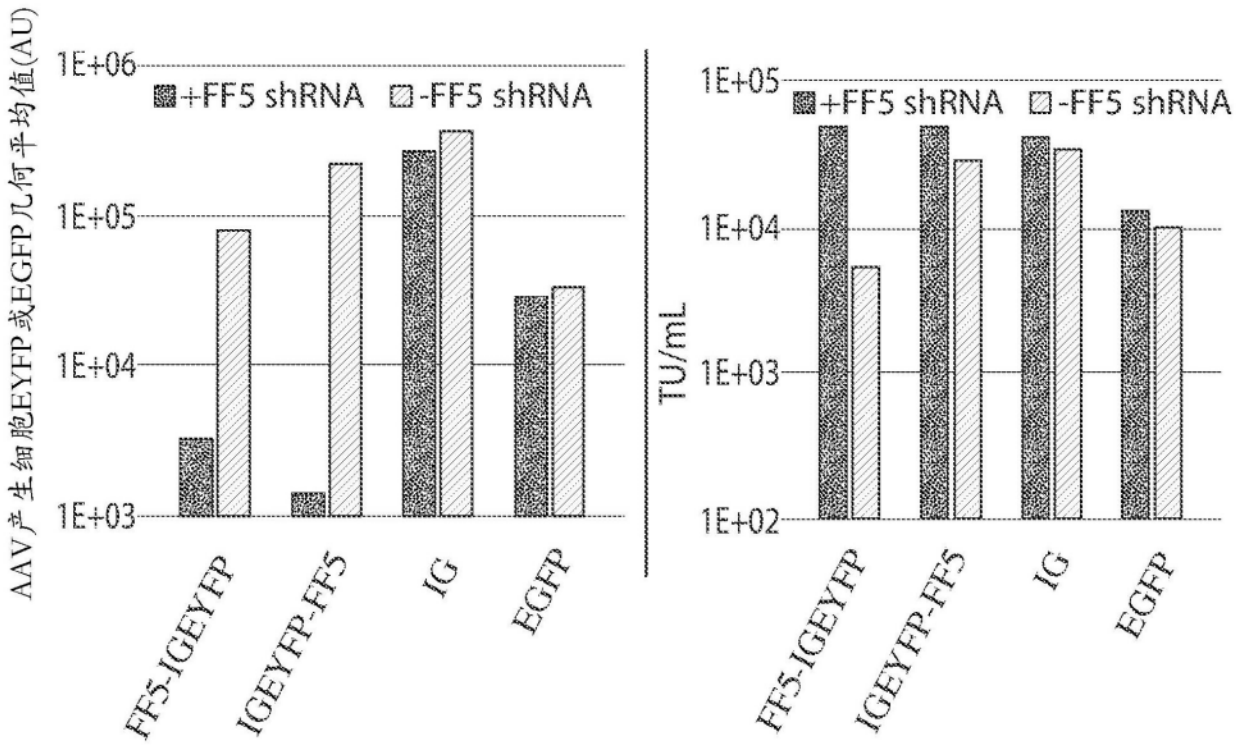

AAV产生细胞EYFP或EGFP几何平均值(AU)
1E+06
1E+05
1E+04
1E+03
+FF5 shRNA
-FF5 shRNA
FF5-IGEYFP
IGEYFP-FF5
IG
EGFP
TU/mL
1E+05
1E+04
1E+03
1E+02
+FF5 shRNA
-FF5 shRNA
FF5-IGEYFP
IGEYFP-FF5
IG
EGFP

图3

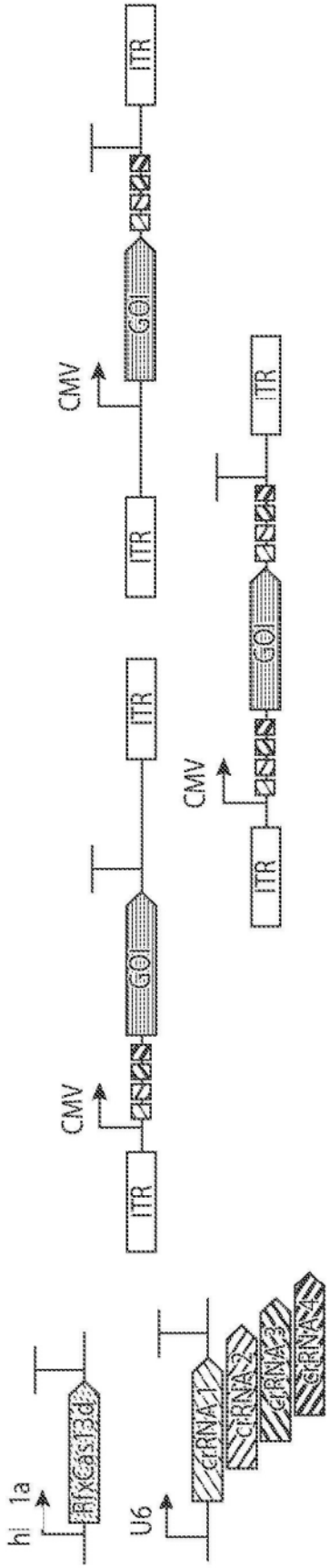

ITR
GOI
CMV
ITR
ITR
GOI
CMV
ITR
ITR
GOI
CMV
ITR
hi 1a
BiXCas13d
U6
crRNA-1
crRNA-2
crRNA-3
crRNA-4

图4