



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116034160 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 28

(21) 申请号 202180056408.9

(22) 申请日 2021.06.11

(30) 优先权数据

63/038,603 2020.06.12 US

63/147,056 2021.02.08 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2023.02.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2021/037076 2021.06.11

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/252943 EN 2021.12.16

(71) 申请人 旗舰先锋创新V股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 S·德拉格拉夫 J·D·皮茨

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

专利代理师 涂滔

(51) Int.Cl.
C12N 15/11 (2006.01)

权利要求书2页 说明书167页 附图38页

(54) 发明名称
杆状病毒表达系统

(57) 摘要
本发明总体上涉及用于制备指环载体的组合物及其用途。例如,本披露内容提供了用于使用昆虫细胞产生指环病毒蛋白例如ORF1的组合物和方法。

1. 一种组合物,该组合物包含
 - (i) 核酸(例如,DNA)构建体,其包含:
 - a) 可操作地连接至编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子)的序列的启动子;以及
 - b) 适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域),任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制;以及
 - (ii) 包含启动子的指环病毒遗传元件,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列。
2. 一种核酸(例如,DNA)构建体,其包含:
 - a) 包含启动子的指环病毒遗传元件,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列;以及
 - b) 适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域),任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制。
3. 一种细菌细胞,其包含如权利要求1或2所述的核酸构建体或核酸制剂。
4. 一种昆虫细胞,其包含如权利要求1-3中任一项所述的核酸构建体或核酸制剂。
5. 一种昆虫细胞,其包含指环病毒ORF1分子,该分子包含指环病毒ORF1精氨酸富集区和指环病毒ORF1 C-末端结构域。
6. 一种昆虫细胞,其包含如权利要求2所述的核酸构建体,进一步包含含有如下项的核酸构建体:
 - a) 编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子)的序列;以及
 - b) 适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域),任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制。
7. 一种组合物,该组合物包含分离的指环病毒ORF1分子,该分子包含指环病毒ORF1精氨酸富集区和指环病毒C-末端结构域,并且不包含可检测水平的指环病毒遗传元件。
8. 一种组合物,该组合物包含分离的指环病毒ORF1分子,该分子具有至少101kDa的分子量,并且不包含可检测水平的指环病毒遗传元件。
9. 一种杆状病毒颗粒,其包含如权利要求2所述的核酸构建体。
10. 一种杆状病毒颗粒群体,其包含如权利要求2所述的核酸构建体。
11. 一种反应混合物,其包含如权利要求10所述的杆状病毒颗粒群体和多个昆虫细胞。
12. 一种核酸构建体,其按顺序包含:
 - a) 第一转座酶识别序列(例如,Tn7R序列);
 - b) 包含启动子的指环病毒遗传元件,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列;
 - c) 第二转座酶识别序列(例如,Tn7L序列);以及
 - d) 任选地,骨架区域,例如,其中该骨架区域适于该DNA构建体的复制。
13. 一种核酸构建体,其按顺序包含:
 - a) 第一转座酶识别序列(例如,Tn7R序列);
 - b) 可操作地连接至编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1

和/或ORF1/2分子)的序列的启动子;

c) 第二转座酶识别序列(例如,Tn7L序列);以及

d) 任选地,骨架区域,例如,其中该骨架区域适于该DNA构建体的复制。

14. 一种制备杆状病毒颗粒的方法,该方法包括:

(i) 提供昆虫细胞(例如,Sf9细胞),该昆虫细胞包含如权利要求2所述的核酸构建体;以及

(ii) 将该昆虫细胞在适于产生包含该核酸构建体或其拷贝的杆状病毒颗粒的条件下孵育;

从而制备杆状病毒颗粒。

15. 一种制备昆虫细胞的方法,该昆虫细胞包含杆粒构建体,该杆粒构建体包含指环病毒遗传元件,该方法包括:

(i) 提供昆虫细胞(例如,Sf9细胞),该昆虫细胞包含如权利要求2所述的核酸构建体和空杆粒构建体;以及

(ii) 将该昆虫细胞在适于该核酸构建体与该空杆粒构建体之间重组的条件下孵育;

从而制备昆虫细胞,该昆虫细胞包含杆粒构建体,该杆粒构建体包含指环病毒遗传元件。

16. 一种制备指环载体的方法,该方法包括:

(i) 提供昆虫细胞,该昆虫细胞包含:

a) 包含启动子的指环病毒遗传元件,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列,和

b) 指环病毒ORF1分子;

(ii) 在适于将该指环病毒遗传元件包封在蛋白质外壳中的条件下孵育该昆虫细胞,该蛋白质外壳包含该指环病毒ORF1分子。

杆状病毒表达系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2020年6月12日提交的美国临时申请号63/038,603和2021年2月8日提交的美国临时申请号63/147,056的权益。上述申请的内容特此通过引用以其全文并入。

背景技术

[0003] 一直需要开发用于制备合适载体的组合物和方法,以将治疗性效应物递送至患者。例如,基于指环病毒的载体是一种有前途的治疗递送方式。然而,难以产生全长纯化的指环病毒ORF1蛋白阻碍了该领域的发展。本领域需要产生纯化的指环病毒蛋白的新方法。

发明内容

[0004] 本披露内容提供了用于产生指环载体(例如合成的指环载体)的组合物和方法,这些指环载体可以用作递送媒介物,例如,用于将遗传物质、用于将效应物(例如有效载荷)、或者用于将治疗剂或治疗性效应物递送至真核细胞(例如,人类细胞或人类组织)。本文描述了例如杆状病毒颗粒和包含如本文所述的遗传元件区域及适于产生杆状病毒的元件(例如,杆状病毒基因组或其片段)的核酸构建体(在本文中也称作杆粒),以及适于产生杆状病毒的细胞(例如昆虫细胞),例如包含这样的核酸构建体的细胞。还描述了包含遗传元件区域和适于将遗传元件区域转移到杆粒骨架中的一个或多个元件(例如,同源重组酶识别位点,例如,Tn7R和Tn7L位点)的供体载体。本文还描述了例如使用这样的核酸构建体(例如,杆粒和/或供体载体)、杆状病毒和/或细胞产生指环载体的方法。此外,本文提供了产生适于产生指环载体的核酸构建体(例如,杆粒和/或供体载体)、杆状病毒和细胞的方法。

[0005] 指环载体(例如,使用如本文所述的组合物或方法产生的指环载体)通常包含封装在蛋白质外壳(例如,包含指环病毒衣壳蛋白例如指环病毒ORF1蛋白或由指环病毒ORF1核酸编码的多肽的蛋白质外壳,例如,如本文所述)中的遗传元件(例如,包含或编码效应物(例如外源性或内源性效应物,如治疗性效应物)的遗传元件),能够将该遗传元件引入细胞(例如,哺乳动物细胞,如人类细胞)中。在一些实施例中,指环载体是感染性媒介物或颗粒,其包含蛋白质外壳,该蛋白质外壳包含由指环病毒ORF1核酸(例如,甲型细环病毒、乙型细环病毒或丙型细环病毒的ORF1核酸,如甲型细环病毒分支1、甲型细环病毒分支2、甲型细环病毒分支3、甲型细环病毒分支4、甲型细环病毒分支5、甲型细环病毒分支6或甲型细环病毒分支7的ORF1,例如,如本文所述)编码的多肽。本披露内容的指环载体的遗传元件通常是环状和/或单链DNA分子(例如,环状和单链的),并且通常包括与包封它的蛋白质外壳结合的蛋白结合序列,或与之相连的多肽,这可能有助于将遗传元件包封在蛋白质外壳内,和/或相对于其他核酸而言,将遗传元件富集在蛋白质外壳内。在一些实施例中,指环载体的遗传元件是使用杆状病毒、核酸构建体(例如,杆粒和/或供体载体)和/或昆虫细胞产生的,例如,如本文所述。

[0006] 在一些情况下,遗传元件包含或编码效应物(例如,核酸效应物如非编码RNA,或多肽效应物如蛋白质),例如,可以在细胞中表达的效应物。在一些实施例中,效应物是治疗剂

或治疗性效应物,例如,如本文所述的。在一些实施例中,效应物是内源性效应物或外源性效应物,例如针对野生型指环病毒或靶细胞而言的内源性效应物或外源性效应物。在一些实施例中,效应物针对野生型指环病毒或靶细胞而言是外源性的。在一些实施例中,指环载体可以通过接触细胞并将编码效应物的遗传元件引入细胞中,从而将效应物递送到细胞内,使得效应物由细胞产生或表达。在某些情况下,效应物是内源性效应物(例如,针对靶细胞而言是内源性的,但是,例如由指环载体以更大的量提供的内源性效应物)。在其他情况下,效应物是外源性效应物。在一些情况下,效应物可以调节细胞的功能或者调节细胞中靶分子的活性或水平。例如,效应物可以降低细胞中靶蛋白的水平(例如,如PCT/US19/65995的实例3和4中所述)。在另一实例中,指环载体可以在体内递送和表达效应物,例如外源性蛋白(例如,如PCT/US19/65995的实例19和28中所述)。例如,指环载体可用于将遗传物质递送至靶细胞、组织或受试者;将效应物递送至靶细胞、组织或受试者;或者用于治疗疾病和障碍,例如通过将可作为治疗剂起作用的效应物递送至所期望的细胞、组织或受试者。

[0007] 在一些实施例中,本文所述的组合物和方法可用于产生合成指环载体的遗传元件,例如在宿主细胞中。合成指环载体与野生型病毒(例如,野生型指环病毒,例如,如本文所述)相比具有至少一种结构差异,例如,相对于野生型病毒的缺失、插入、置换、修饰(例如,酶促修饰)。一般而言,合成指环载体包括包封在蛋白质外壳内的外源性遗传元件,其可用于将遗传元件或在其中编码的(例如,多肽或核酸效应物)效应物(例如,外源性效应物或内源性效应物)递送至真核(例如,人类)细胞中。在实施例中,指环载体不会造成可检测的和/或不必要的免疫或炎症反应,例如,不会造成一种或多种炎症分子标志如TNF- α 、IL-6、IL-12、IFN增加超过1%、5%、10%、15%,以及不会造成B细胞应答,如反应性或中和性抗体,例如,指环载体对靶细胞、组织或受试者是基本上非免疫原性的。

[0008] 在一些实施例中,本文所述的组合物和方法可用于产生指环载体的遗传元件,该指环载体包括:(i)遗传元件,其包含启动子元件和编码效应物(例如内源性或外源性效应物)的序列,和蛋白结合序列(例如,外壳蛋白结合序列,如包装信号);以及(ii)蛋白质外壳;其中将遗传元件包封在蛋白质外壳(例如,衣壳)内;并且其中指环载体能够将遗传元件递送至真核(例如,哺乳动物,如人类)细胞中。在一些实施例中,遗传元件是单链和/或环状DNA。可替代地或组合地,遗传元件具有以下特性中的一种、两种、三种或全部:是环状的,是单链的,它整合到细胞基因组中的频率低于进入细胞的遗传元件的约0.0001%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%,和/或它以少于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30个拷贝/基因组整合到靶细胞的基因组中。在一些实施例中,整合频率是通过对从游离载体中分离出来的基因组DNA进行定量凝胶纯化测定来确定的,例如,如Wang等人中所述(2004, Gene Therapy [基因治疗], 11:711-721, 其通过引用以其全文并入本文)。在一些实施例中,将遗传元件包封在蛋白质外壳内。在一些实施例中,指环载体能够将遗传元件递送到真核细胞中。在一些实施例中,遗传元件包含与野生型指环病毒序列(例如,野生型细环病毒(TTV)、小细环病毒(TTMV)或TTMDV序列,例如,如本文所述的野生型指环病毒序列)具有至少75%(例如,至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的核酸序列(例如,300-4000个核苷酸的核酸序列,如300-3500个核苷酸、300-3000个核苷酸、300-2500个核苷酸、300-2000个核苷酸、300-1500个核苷酸的核酸序列)。在一些实施例中,遗传元件包含与野

生型指环病毒序列(例如,如本文所述的野生型指环病毒序列)具有至少75%(例如,至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的核酸序列(例如,至少300个核苷酸、500个核苷酸、1000个核苷酸、1500个核苷酸、2000个核苷酸、2500个核苷酸、3000个核苷酸或更多个核苷酸的核酸序列)。在一些实施例中,核酸序列经过密码子优化,例如,用于在哺乳动物(如,人类)细胞中表达。在一些实施例中,核酸序列中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的密码子经过密码子优化,例如,用于在哺乳动物(如,人类)细胞中表达。

[0009] 在一些实施例中,本文所述的核酸包含一个或多个密码子优化的开放阅读框(例如,编码指环病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3和/或ORF2t/3的序列,其中该序列经过密码子优化,如用于在动物细胞、例如昆虫细胞中表达)。在一些实施例中,本文所述的核酸包含编码指环病毒ORF1分子的密码子优化序列。不希望受到理论的束缚,在一些实施例中,与非密码子优化的序列相比,针对昆虫细胞的密码子优化增加了指环病毒ORF1分子在昆虫细胞中的表达。

[0010] 在一些实施例中,本文所述的组合物和方法可用于产生包含衣壳(例如,包含指环病毒ORF如ORF1、多肽的衣壳)的感染性(例如,对人类细胞具有感染性)指环载体、媒介物或颗粒的遗传元件,该衣壳封装遗传元件,该遗传元件包含与衣壳结合的蛋白结合序列和编码治疗性效应物的异源(针对指环病毒而言)序列。在实施例中,指环载体能够将遗传元件递送至哺乳动物(例如,人类)细胞中。在一些实施例中,遗传元件与野生型指环病毒基因组序列具有小于约6%(例如,小于10%、9%、8%、7%、6%、5.5%、5%、4.5%、4%、3.5%、3%、2.5%、2%、1.5%或更小)的同一性。在一些实施例中,遗传元件与野生型指环病毒基因组序列具有不超过1.5%、2%、2.5%、3%、3.5%、4%、4.5%、5%、5.5%或6%的同一性。在一些实施例中,遗传元件与野生型指环病毒具有至少约2%到至少约5.5%(例如,2%至5%、3%至5%、4%至5%)的同一性。在一些实施例中,遗传元件具有大于约2000、3000、4000、4500或5000个核苷酸的非病毒序列(例如,非指环病毒基因组序列)。在一些实施例中,遗传元件具有大于约2000至5000、2500至4500、3000至4500、2500至4500、3500或4000、4500(例如,约3000至4500)个核苷酸的非病毒序列(例如,非指环病毒基因组序列)。在一些实施例中,遗传元件是单链环状DNA。可替代地或组合地,遗传元件具有以下特性中的一种、两种或三种:是环状的,是单链的,它整合到细胞基因组中的频率低于进入细胞的遗传元件的约0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%,它以少于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30个拷贝/基因组的方式整合到靶细胞的基因组中或者整合的频率低于进入细胞的遗传元件的约0.0001%、0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%(例如,通过比较进入基因组DNA的整合频率与来自细胞裂解物的遗传元件序列)。在一些实施例中,整合频率是通过从游离载体中分离出来的基因组DNA进行定量凝胶纯化测定来确定的,例如,如Wang等人中所述(2004, Gene Therapy [基因治疗], 11:711-721,其通过引用以其全文并入本文)。

[0011] 在一些实施例中,如本文所述的指环病毒或指环载体可用作有效的递送媒介物,用于将作用剂如本文所述的效应物引入靶细胞中,例如,待接受治疗性或预防性治疗的受试者中的靶细胞。

[0012] 在一些实施例中,本文所述的组合物和方法可用于产生包含蛋白质外壳的指环载体的遗传元件,该蛋白质外壳包含多肽(例如合成多肽,如ORF1分子),该多肽包含(例如,以串联方式):

[0013] (i) 第一区域,其包含精氨酸富集区,例如,包含至少60%、70%或80%碱性残基(例如,精氨酸、赖氨酸或其组合)的至少约40个氨基酸的序列,

[0014] (ii) 第二区域,其包含胶冻卷结构域,例如,包含至少6个 β 链的序列,

[0015] (iii) 第三区域,其包含本文所述的N22结构域序列,

[0016] (iv) 第四区域,其包含本文所述的指环病毒ORF1 C-末端结构域(CTD)序列,以及

[0017] (v) 任选地,其中该多肽具有与例如本文所述的野生型指环病毒ORF1蛋白存在小于100%、99%、98%、95%、90%、85%、80%序列同一性的氨基酸序列。

[0018] 在一方面,本发明的特征在于包含遗传元件序列的分离的核酸分子(例如,核酸构建体,如杆粒或供体载体),该遗传元件序列包含与编码效应物例如有效载荷的序列可操作地连接的启动子元件,以及外壳蛋白结合序列。在一些实施例中,外壳蛋白结合序列包括与例如本文披露的指环病毒的5' UTR序列存在至少75%(至少80%、85%、90%、95%、97%、100%)同一性的序列。在实施例中,遗传元件是单链DNA,是环状的,以少于进入细胞的遗传元件的约0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%、或2%的频率整合,和/或以小于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30个拷贝/基因组整合进入靶细胞的基因组中或以少于进入细胞的遗传元件的约0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%的频率整合。在一些实施例中,整合频率是通过从游离载体中分离出来的基因组DNA进行定量凝胶纯化测定来确定的,例如,如Wang等人中所述(2004, Gene Therapy[基因治疗], 11:711-721,其通过引用以其全文并入本文)。在实施例中,效应物并非源自TTV,也不是SV40-miR-S1。在实施例中,核酸分子不包含TTMV-LY2的多核苷酸序列。在实施例中,启动子元件能够指导效应物在真核(例如哺乳动物,例如人类)细胞中的表达。

[0019] 在一些实施例中,核酸分子包含适于核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域,例如包含一个或多个杆状病毒元件)。在一些实施例中,核酸分子是杆粒。在一些实施例中,核酸分子包含杆状病毒基因组或其功能性片段。在一些实施例中,骨架区域适于核酸分子在细菌细胞中复制(例如,供体载体,例如,如本文所述)。

[0020] 在一些实施例中,核酸分子是环状的。在一些实施例中,核酸分子是线性的。在一些实施例中,本文所述的核酸分子包含一个或多个经修饰的核苷酸(例如碱基修饰、糖修饰或骨架修饰)。

[0021] 在一些实施例中,核酸分子包含编码ORF1分子(例如,指环病毒ORF1蛋白,例如,如本文所述)的序列。在一些实施例中,核酸分子包含编码ORF2分子(例如,指环病毒ORF2蛋白,例如,如本文所述)的序列。在一些实施例中,核酸分子包含编码ORF3分子(例如,指环病毒ORF3蛋白,例如,如本文所述)的序列。在一方面,本发明的特征在于遗传元件,其包含以下中的一种、两种或三种:(i) 启动子元件和编码效应物例如外源性或内源性效应物的序列;(ii) 至少72个连续核苷酸(例如,至少72、73、74、75、76、77、78、79、80、90、100或150个核苷酸),其与野生型指环病毒序列具有至少75%(例如,至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性;或至少100(例如,至少300、500、1000、1500)个连续核苷酸,其与野生型指环病毒序列具有至少

72% (例如, 至少72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%) 序列同一性; 以及 (iii) 蛋白结合序列, 例如外壳蛋白结合序列, 并且其中核酸构建体是单链DNA; 并且其中核酸构建体是环状的, 整合的频率低于进入细胞的遗传元件的约0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%, 和/或以少于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25或30个拷贝/基因组的方式整合到靶细胞的基因组中。在一些实施例中, 编码效应物 (例如, 外源性或内源性效应物, 例如, 如本文所述) 的遗传元件经过密码子优化。在一些实施例中, 遗传元件是环状的。在一些实施例中, 遗传元件是线性的。在一些实施例中, 本文所述的遗传元件包含一个或多个经修饰的核苷酸 (例如碱基修饰、糖修饰或骨架修饰)。在一些实施例中, 遗传元件包含编码ORF1分子 (例如, 指环病毒ORF1蛋白, 例如, 如本文所述) 的序列。在一些实施例中, 遗传元件包含编码ORF2分子 (例如, 指环病毒ORF2蛋白, 例如, 如本文所述) 的序列。在一些实施例中, 遗传元件包含编码ORF3分子 (例如, 指环病毒ORF3蛋白, 例如, 如本文所述) 的序列。

[0022] 在一方面, 本发明的特征在于宿主细胞, 其包含杆粒或供体载体, 例如, 如本文所述。在一些实施例中, fa杆粒是核酸构建体, 其包含适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域 (例如, 杆状病毒骨架区域, 例如包含杆状病毒基因组或其元件)。在一些实施例中, 杆粒的骨架区域适于核酸构建体在细菌细胞中复制 (例如, 大肠杆菌, 例如, DH 10Bac细胞)。在一些实施例中, 供体载体是核酸构建体 (例如, 质粒), 该核酸构建体包含适于该核酸构建体在细菌细胞中复制的骨架区域 (例如, 大肠杆菌, 例如, DH 10Bac细胞)。在一些实施例中, 宿主细胞是例如包含杆粒的昆虫细胞 (例如, Sf9细胞)。在一些实施例中, 宿主细胞是例如包含供体载体和/或杆粒的细菌细胞 (例如, 大肠杆菌细胞, 例如, DH 10Bac细胞)。在一些实施例中, 宿主细胞包含: (a) 杆粒和/或供体细胞, 其包含编码ORF1分子、ORF2分子或ORF3分子中的一个或多个的序列 (例如, 编码本文所述的指环病毒ORF1多肽的序列); 和 (b) 遗传元件 (例如, 包含在同一杆粒和/或供体载体中, 或者包含在第二杆粒和/或供体载体中), 其中该遗传元件包含 (i) 可操作地连接至编码效应物 (例如, 外源性效应物或内源性效应物) 的核酸序列 (例如, DNA序列) 的启动子元件和 (ii) 结合 (a) 的多肽的蛋白结合序列, 其中任选地, 该遗传元件不编码ORF1多肽 (例如, ORF1蛋白)。例如, 宿主细胞包含以顺式 (均是同一核酸分子的一部分) 或反式 (各自是不同核酸分子的一部分) 存在的 (a) 和 (b)。在实施例中, (b) 的遗传元件是环状单链DNA。在一些实施例中, 宿主细胞是生产细胞系, 例如, 如本文所述的。在一些实施例中, 宿主细胞是贴壁的或悬浮的, 或者二者兼有。在一些实施例中, 宿主细胞或辅助细胞在微载剂中生长。在一些实施例中, 宿主细胞或辅助细胞符合cGMP生产规范。在一些实施例中, 宿主细胞或辅助细胞在适合促进细胞生长的培养基中生长。在某些实施例中, 一旦宿主细胞或辅助细胞已经充分生长 (例如, 达到适当的细胞密度), 就可以将培养基更换为适于宿主细胞或辅助细胞产生指环载体的培养基。

[0023] 在一方面, 本发明的特征在于药物组合物, 其包含如本文所述的指环载体 (例如, 合成指环载体)。在实施例中, 药物组合物进一步包含药学上可接受的载剂或赋形剂。在实施例中, 药物组合物包含单位剂量, 该单位剂量包含每千克目标受试者约 10^5 - 10^{14} (例如, 约 10^6 - 10^{13} 、 10^7 - 10^{12} 、 10^8 - 10^{11} 或 10^9 - 10^{10}) 个基因组当量的指环载体。在一些实施例中, 包含制剂的药物组合物在可接受的期限和温度范围内是稳定的, 和/或与所期望的施用途径和/或该施用途径所需的任何装置 (例如, 针头或注射器) 相容。在一些实施例中, 将药物组合物配

制用于作为单剂量或多剂量施用。在一些实施例中,将药物组合物在施用场所配制,例如由医疗保健专业人员配制。在一些实施例中,药物组合物包含所期望的浓度的指环载体基因组或基因组当量(例如,由每体积的基因组数量来定义)。

[0024] 在一方面,本发明的特征在于治疗受试者中疾病或障碍的方法,该方法包括向该受试者施用指环载体,例如,合成指环载体,例如,如本文所述的。

[0025] 在一方面,本发明的特征在于将效应物或有效载荷(例如,内源性或外源性效应物)递送至细胞、组织或受试者的方法,该方法包括向该受试者施用指环载体,例如合成指环载体,例如,如本文所述的,其中该指环载体包含编码该效应物的核酸序列。在实施例中,有效载荷是核酸。在实施例中,有效载荷是多肽。

[0026] 在一方面,本发明的特征在于将指环载体递送至细胞的方法,该方法包括使该指环载体(例如合成指环载体,例如,如本文所述)与细胞(例如真核细胞,如哺乳动物细胞)进行接触,例如,在体内或离体条件下进行接触。

[0027] 在一方面,本发明的特征在于制备指环病毒ORF分子的方法。该方法包括:

[0028] (a) 提供包含核酸分子的宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞),该核酸分子包含:

[0029] (i) 可操作地连接至编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子)的序列的启动子;以及

[0030] (ii) 适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域),任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制;以及

[0031] (b) 将宿主细胞在适于指环病毒ORF分子的表达的条件下孵育,从而产生指环病毒ORF分子。

[0032] 在一些实施例中,宿主细胞是昆虫细胞(例如,Sf9细胞)。在一些实施例中,宿主细胞是细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞,例如,DH 10Bac细胞)。

[0033] 例如,在生产方法中提供的宿主细胞包含(a) 核酸分子(例如,杆粒或供体载体),该核酸包含编码本文所述的指环病毒ORF1多肽的序列;和(b) 核酸构建体(例如,杆粒),该核酸构建体能够产生遗传元件(例如,该遗传元件包含遗传元件序列和/或遗传元件区域,例如,如本文所述),其中该遗传元件包含(i) 可操作地连接至编码效应物(例如,外源性效应物或内源性效应物)的核酸序列(例如,DNA序列)的启动子元件和(ii) 结合(a)的多肽的蛋白结合序列(例如包装序列),其中该宿主细胞包括以顺式或以反式的(a)和(b)。在实施例中,(b)的遗传元件是环状单链DNA。在一些实施例中,宿主细胞是生产细胞系。

[0034] 在一些实施例中,将指环载体的组分在产生时引入宿主细胞中(例如,通过瞬时转染)。在一些实施例中,宿主细胞稳定表达指环载体的组分(例如,其中将编码指环载体组分的一种或多种核酸引入宿主细胞或其祖细胞中,例如,通过稳定转染)。

[0035] 在一方面,本发明的特征在于生产指环载体组合物的方法,该方法包括:a) 提供本文所述的多种指环载体,或本文所述的指环载体制剂;和b) 配制指环载体或其制剂,例如,作为适于向受试者施用的药物组合物。

[0036] 在一方面,本发明的特征在于制备包含指环载体的宿主细胞的方法,该宿主细胞是例如第一宿主细胞或生产细胞(例如,如PCT/US19/65995的图12所示)(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞),例如第一宿主细胞群,该方法包括将能够产生遗传元件的核酸构建体(例

如,杆粒,例如,如本文所述)引入宿主细胞中并在适于产生指环载体的条件下培养该宿主细胞。在实施例中,该方法进一步包括将辅助物、例如辅助病毒引入宿主细胞中。在实施例中,引入包括用指环载体对宿主细胞进行转染(例如,化学转染)或电穿孔。

[0037] 在一方面,本发明的特征在于制备指环载体的方法,该方法包括提供包含指环载体(例如,如本文所述)的宿主细胞,例如,第一宿主细胞或生产细胞(例如,如PCT/US19/65995的图12所示)(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞),以及将指环载体从宿主细胞纯化。在一些实施例中,该方法进一步包括在提供步骤之前,将宿主细胞与核酸构建体(例如,杆粒)或指环载体(例如,如本文所述)接触,并且将宿主细胞在适于产生指环载体的条件下孵育。在实施例中,宿主细胞是上述制备宿主细胞的方法中描述的第一宿主细胞或生产细胞。在实施例中,从宿主细胞中纯化指环载体包括裂解宿主细胞。

[0038] 在一些实施例中,该方法进一步包括使由第一宿主细胞或生产细胞产生的指环载体与第二宿主细胞进行接触的第二步骤,该第二宿主细胞是例如允许细胞(例如,如PCT/US19/65995的图12所示),例如,第二宿主细胞群。在一些实施例中,该方法进一步包括在适于产生指环载体的条件下孵育第二宿主细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括从第二宿主细胞中纯化指环载体,例如,从而产生指环载体种子群。在实施例中,从第二宿主细胞群中产生的指环载体比从第一宿主细胞群中产生的指环载体多出至少约2-100倍。在实施例中,从第二宿主细胞中纯化指环载体包括裂解第二宿主细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括使由第二宿主细胞产生的指环载体与第三宿主细胞进行接触的第三步骤,该第三宿主细胞是例如允许细胞(例如,如PCT/US19/65995的图12所示),例如,第三宿主细胞群。在一些实施例中,该方法进一步包括在适于产生指环载体的条件下孵育第三宿主细胞。在一些实施例中,该方法进一步包括从第三宿主细胞中纯化指环载体,例如,从而产生指环载体储备群。在实施例中,从第三宿主细胞中纯化指环载体包括裂解第三宿主细胞。在实施例中,从第三宿主细胞群中产生的指环载体比从第二宿主细胞群中产生的指环载体多出至少约2-100倍。

[0039] 在一些实施例中,宿主细胞在适合促进细胞生长的培养基中生长。在某些实施例中,一旦宿主细胞已经充分生长(例如,达到适当的细胞密度),就可以将培养基更换为适于宿主细胞产生指环载体的培养基。在一些实施例中,在与第二宿主细胞接触之前,将由宿主细胞产生的指环载体从宿主细胞中分离出来(例如,通过裂解宿主细胞)。在一些实施例中,使由宿主细胞产生的指环载体与第二宿主细胞进行接触,而无需中间的纯化步骤。

[0040] 在一方面,本发明的特征在于制备药用指环载体制剂的方法。该方法包括(a)制备如本文所述的指环载体制剂,(b)评价该制剂(例如,药用指环载体制剂、指环载体种子群或指环载体储备群)的一种或多种药物质量控制参数,例如,鉴别、纯度、效价、效力(例如,以每个指环载体颗粒的基因组当量计算),和/或核酸序列,例如,来自指环载体所包含的遗传元件的核酸序列,以及(c)配制符合预定标准、例如符合药物规范的用于评价药物用途的制剂。在一些实施例中,评价鉴别包括评价(例如,确认)指环载体遗传元件的序列,例如,编码效应物的序列。在一些实施例中,评价纯度包括评价杂质的量,例如,支原体、内毒素、宿主细胞核酸(例如,宿主细胞DNA和/或宿主细胞RNA)、动物源性的工艺杂质(例如,血清白蛋白或胰蛋白酶)、可复制型因子(RCA),例如可复制型病毒或不必要的指环载体(例如,除了所期望的指环载体,例如本文所述合成指环载体之外的指环载体)、游离病毒衣壳蛋白、外源

因子和聚集体。在一些实施例中,评价效价包括评价制剂中功能性与非功能性(例如,感染性与非感染性)指环载体的比率(例如,通过HPLC进行评价)。在一些实施例中,评价效力包括评价制剂中可检测到的指环载体功能(例如,其中编码的效应物或基因组当量的表达和/或功能)水平。

[0041] 在实施例中,配制的制剂基本上不含病原体、宿主细胞污染物或杂质;具有预定水平的非感染性颗粒或预定比率的颗粒:感染单位(例如,<300:1、<200:1、<100:1或<50:1)。在一些实施例中,可以在单个批次中产生多种指环载体。在实施例中,可以评价在该批次中产生的指环载体的水平(例如,单独或一起评价)。

[0042] 在一方面,本发明的特征在于宿主细胞,其包含:

[0043] (i) 包含如本文所述的核酸构建体(例如,杆粒或供体载体)的第一核酸分子,和

[0044] (ii) 任选地,第二核酸分子(例如,杆粒或供体载体),其编码选自ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2的氨基酸序列中的一种或多种,例如,如本文所述的,或与其具有至少约70%(例如,至少约70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的氨基酸序列。

[0045] 在一方面,本发明的特征在于包含本文所述的指环载体和辅助病毒的反应混合物,其中该辅助病毒包含例如编码外壳蛋白的多核苷酸(例如,能够结合外壳蛋白结合序列的外壳蛋白,以及任选的脂质包膜)、编码复制蛋白(例如,聚合酶)的多核苷酸或其任何组合。

[0046] 在一些实施例中,指环载体(例如,合成指环载体)是分离出来的,例如,从宿主细胞中分离出来和/或从溶液的其他成分(例如,上清液)中分离出来。在一些实施例中,指环载体(例如,合成指环载体)是经纯化的,例如,从溶液(例如,上清液)中纯化。在一些实施例中,相对于溶液中的其他成分,指环载体在溶液中是经富集的。

[0047] 在任何前述指环载体、组合物或方法的一些实施例中,提供指环载体包括从组合物中分离(例如,收获)指环载体,该组合物包含指环载体产生细胞,例如,如本文所述的。在其他实施例中,提供指环载体包括获得指环载体或其制剂,例如,从第三方获得。

[0048] 在任何前述指环载体、组合物或方法的一些实施例中,遗传元件包含指环载体基因组,例如,如根据本文所述的方法鉴定的基因组。在实施例中,指环载体基因组包含TTV-tth8核酸序列,例如,TTV-tth8核酸,例如,TTV-tth8核酸序列中3436-3707位核苷酸缺失至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的序列。在实施例中,指环载体基因组包含TTMV-LY2核酸序列,例如TTMV-LY2核酸序列,例如,TTMV-LY2核酸序列中574-1371、1432-2210、574-2210和/或2610-2809位核苷酸缺失至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或100%的序列。在实施例中,遗传元件能够进行自我复制和/或自我扩增。在实施例中,遗传元件不能进行自我复制和/或自我扩增。在实施例中,遗传元件能够以反式进行复制和/或被扩增,例如,在辅助物存在的条件下,如在辅助病毒存在的条件下。

[0049] 任何前述指环载体、组合物或方法的其他特征包括以下列举的实施例中的一个或多个。

[0050] 本领域技术人员将会认识到,或者仅使用常规实验就能够确定本文所述本发明的具体实施例的许多等同形式。这样的等同形式意在由以下列举的实施例所涵盖。

- [0051] 列举的实施例
- [0052] 1. 一种组合物, 该组合物包含
- [0053] (i) 核酸 (例如, DNA) 构建体, 其包含:
- [0054] a) 可操作地连接至编码指环病毒ORF分子 (例如, ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子) 的序列的启动子; 以及
- [0055] b) 适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域 (例如, 杆状病毒骨架区域), 任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制; 以及
- [0056] (ii) 包含启动子的指环病毒遗传元件, 该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列。
- [0057] 2. 如实施例1所述的组合物, 其中该指环病毒遗传元件是该核酸构建体的一部分。
- [0058] 3. 如实施例1所述的组合物, 该组合物包含第二核酸构建体, 该第二核酸构建体包含该指环病毒遗传元件。
- [0059] 4. 一种核酸 (例如, DNA) 构建体, 其包含:
- [0060] a) 包含启动子的指环病毒遗传元件, 该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列; 以及
- [0061] b) 适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域 (例如, 杆状病毒骨架区域), 任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制。
- [0062] 5. 如实施例4所述的核酸构建体, 其进一步包含一个或多个包含启动子的盒, 该启动子可操作地连接至编码指环病毒ORF分子 (例如, ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子) 的序列。
- [0063] 6. 如实施例5所述的核酸构建体, 其中该启动子是指环病毒启动子或外源性启动子 (例如, 多面体启动子)。
- [0064] 7. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体, 其中该核酸构建体是分离的核酸构建体。
- [0065] 8. 一种细菌细胞, 其包含如前述实施例中任一项所述的核酸构建体或核酸制剂。
- [0066] 9. 一种昆虫细胞, 其包含如前述实施例中任一项所述的核酸构建体或核酸制剂。
- [0067] 10. 一种昆虫细胞, 其包含指环病毒ORF1分子, 该分子包含指环病毒ORF1精氨酸富集区和指环病毒ORF1 C-末端结构域。
- [0068] 11. 如实施例10所述的昆虫细胞, 其中该指环病毒ORF1分子包含指环病毒ORF1胶冻卷结构域。
- [0069] 12. 如实施例10或11所述的昆虫细胞, 其中该指环病毒ORF1分子包含指环病毒ORF1高变结构域。
- [0070] 13. 如实施例10-12中任一项所述的昆虫细胞, 其中该指环病毒ORF1分子包含指环病毒ORF1 N22结构域。
- [0071] 14. 如实施例9-13中任一项所述的昆虫细胞, 该昆虫细胞包含至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500、1000、10,000、50,000或100,000个拷贝的指环病毒ORF1分子。
- [0072] 15. 一种昆虫细胞, 其包含如实施例4至7中任一项所述的核酸构建体, 进一步包含含有如下项的核酸构建体:
- [0073] a) 编码指环病毒ORF分子 (例如, ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2

分子)的序列;以及

[0074] b) 适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域),任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制。

[0075] 16. 一种组合物,该组合物包含分离的指环病毒ORF1分子,该分子包含指环病毒ORF1精氨酸富集区和指环病毒C-末端结构域,并且不包含可检测水平的指环病毒遗传元件。

[0076] 17. 如实施例16所述的组合物,其中该指环病毒ORF1分子包含指环病毒ORF1胶冻卷结构域。

[0077] 18. 如实施例16至17中任一项所述的组合物,其中该指环病毒ORF1分子包含指环病毒ORF1高变结构域。

[0078] 19. 如实施例16至18中任一项所述的组合物,其中该指环病毒ORF1分子包含指环病毒ORF1 N22结构域。

[0079] 20. 如实施例16至19中任一项所述的组合物,其中该指环病毒ORF1分子或编码其的核酸分子相对于野生型指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述)包含至少一个差异(例如,突变、化学修饰或表观遗传改变),例如,插入、置换、化学或酶促修饰、和/或缺失,例如,结构域(例如,精氨酸富集区、胶冻卷结构域、HVR、N22或CTD中的一个或多个,例如,如本文所述)的缺失。

[0080] 21. 一种组合物,该组合物包含分离的指环病毒ORF1分子,该分子具有至少101kDa的分子量,并且不包含可检测水平的指环病毒遗传元件。

[0081] 22. 如实施例21所述的组合物,其中该指环病毒ORF1分子或编码其的核酸分子相对于野生型指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述)包含至少一个差异(例如,突变、化学修饰或表观遗传改变),例如,插入、置换、化学或酶促修饰、和/或缺失,例如,结构域(例如,精氨酸富集区、胶冻卷结构域、HVR、N22或CTD中的一个或多个,例如,如本文所述)的缺失。

[0082] 23. 一种杆状病毒颗粒,其包含如前述实施例中任一项所述的核酸构建体。

[0083] 24. 一种杆状病毒颗粒群体,其包含如前述实施例中任一项所述的核酸构建体。

[0084] 25. 一种反应混合物,其包含如实施例24所述的杆状病毒颗粒群体和多个昆虫细胞。

[0085] 26. 一种核酸构建体,其按顺序包含:

[0086] a) 第一转座酶识别序列(例如,Tn7R序列);

[0087] b) 包含启动子的指环病毒遗传元件,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列;

[0088] c) 第二转座酶识别序列(例如,Tn7L序列);以及

[0089] d) 任选地,骨架区域,例如,其中该骨架区域适于该DNA构建体的复制。

[0090] 27. 如实施例26所述的核酸构建体,其进一步包含编码指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子的序列。

[0091] 28. 一种核酸构建体,其按顺序包含:

[0092] a) 第一转座酶识别序列(例如,Tn7R序列);

[0093] b) 可操作地连接至编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子)的序列的启动子;

- [0094] c) 第二转座酶识别序列(例如,Tn7L序列);以及
- [0095] d) 任选地,骨架区域,例如,其中该骨架区域适于该DNA构建体的复制。
- [0096] 29.如实施例28所述的核酸构建体,其进一步包括包含启动子的指环病毒遗传元件区域,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列。
- [0097] 30.一种细菌细胞,其包含如实施例26至29中任一项所述的核酸构建体。
- [0098] 31.一种反应混合物,其包含如实施例26至30中任一项所述的核酸构建体和细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞)。
- [0099] 32.一种昆虫细胞,其包含指环病毒遗传元件。
- [0100] 33.一种昆虫细胞,其包括包含启动子的指环病毒遗传元件,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列。
- [0101] 34.如实施例32或33所述的昆虫细胞,其进一步包含一个或多个ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子)。
- [0102] 35.如实施例34所述的昆虫细胞,其中该ORF1分子包封该指环病毒遗传元件。
- [0103] 36.一种制备杆状病毒颗粒的方法,该方法包括:
- [0104] (i) 提供包含如前述实施例中任一项所述的核酸构建体的昆虫细胞(例如,Sf9细胞);以及
- [0105] (ii) 将该昆虫细胞在适于产生包含该核酸构建体或其拷贝的杆状病毒颗粒的条件下孵育;
- [0106] 从而制备杆状病毒颗粒。
- [0107] 37.如实施例36所述的方法,其中提供包含核酸构建体的昆虫细胞包括将该核酸构建体引入(例如,转染或感染入)该昆虫细胞中。
- [0108] 38.如实施例36或37所述的方法,其进一步包括分离该杆状病毒颗粒。
- [0109] 39.如实施例36至38中任一项所述的方法,其进一步包括将该杆状病毒颗粒与第二昆虫细胞接触。
- [0110] 40.如实施例39所述的方法,其进一步包括将该第二昆虫细胞在适于产生包含该核酸构建体或其拷贝的第二杆状病毒颗粒的条件下孵育。
- [0111] 41.一种将如前述实施例中任一项所述的核酸构建体引入昆虫细胞中的方法,该方法包括将昆虫细胞与包含该核酸构建体的杆状病毒颗粒接触。
- [0112] 42.一种制备杆状病毒颗粒的方法,该方法包括:
- [0113] (i) 将如前述实施例中任一项所述的核酸构建体引入(例如,转染入)第一昆虫细胞中;
- [0114] (ii) 将该昆虫细胞在适于产生包含该核酸构建体或其拷贝的第一杆状病毒颗粒的条件下孵育;
- [0115] (iii) 分离该第一杆状病毒颗粒;
- [0116] (iv) 将该第一杆状病毒颗粒与第二昆虫细胞接触;以及
- [0117] (v) 将该第二昆虫细胞在适于产生包含该核酸构建体或其拷贝的第二杆状病毒颗粒的条件下孵育。
- [0118] 43.一种制备昆虫细胞的方法,该昆虫细胞包含杆粒构建体,该杆粒构建体包含指环病毒遗传元件,该方法包括:

[0119] (i) 提供昆虫细胞(例如,Sf9细胞),其包含如前述实施例中任一项所述的核酸构建体和空杆粒构建体;以及

[0120] (ii) 将该昆虫细胞在适于该核酸构建体与该空杆粒构建体之间重组的条件下孵育;

[0121] 从而制备昆虫细胞,该昆虫细胞包含杆粒构建体,该杆粒构建体包含指环病毒遗传元件。

[0122] 44.一种制备昆虫细胞的方法,该昆虫细胞包含杆粒构建体,该杆粒构建体包含指环病毒遗传元件,该方法包括:

[0123] (i) 提供昆虫细胞(例如,Sf9细胞),其包含空杆粒构建体和核酸构建体,该核酸构建体按顺序包含:

[0124] a) 第一转座酶识别序列(例如,Tn7R序列);

[0125] b) 包含启动子的指环病毒遗传元件,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列;

[0126] c) 第二转座酶识别序列(例如,Tn7L序列);以及

[0127] d) 任选地,骨架区域,例如,其中该骨架区域适于该DNA构建体的复制;以及

[0128] (ii) 将该昆虫细胞在适于该核酸构建体与该空杆粒构建体之间重组的条件下孵育;

[0129] 从而制备昆虫细胞,该昆虫细胞包含杆粒构建体,该杆粒构建体包含指环病毒遗传元件。

[0130] 45.一种制备指环载体的方法,该方法包括:

[0131] (i) 提供昆虫细胞,该昆虫细胞包含:

[0132] a) 包含启动子的指环病毒遗传元件,该启动子可操作地连接至编码外源性效应物的序列,和

[0133] b) 指环病毒ORF1分子;

[0134] (ii) 在适于将该指环病毒遗传元件包封在蛋白质外壳中的条件下孵育该昆虫细胞,该蛋白质外壳包含该指环病毒ORF1分子。

[0135] 46.如实施例45所述的方法,其中该方法进一步包括将该指环病毒遗传元件引入(例如,转染入)该昆虫细胞中。

[0136] 47.如实施例46所述的方法,其中该昆虫细胞在该引入前包含该ORF1分子。

[0137] 48.如实施例45至47中任一项所述的方法,其中该昆虫细胞包含编码该ORF1分子的核酸构建体(例如,杆粒)。

[0138] 49.如实施例48所述的方法,其中该ORF1分子由编码该ORF1分子的核酸构建体表达。

[0139] 50.如实施例45至49中任一项所述的方法,其进一步包括,在步骤(i)之前,向该昆虫细胞中引入核酸构建体,该核酸构建体包含该指环病毒遗传元件和适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域),任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制。

[0140] 51.如实施例45至50中任一项所述的方法,其进一步包括,在步骤(i)之前,向该昆虫细胞中引入核酸构建体,该核酸构建体包含编码该指环病毒ORF1分子的序列和适于该核

酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域),任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制。

[0141] 52.如实施例45至51中任一项所述的方法,其进一步包括,在步骤(i)之前,向该昆虫细胞中引入该核酸构建体,该核酸构建体包含:

[0142] 编码指环病毒ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子的序列,和

[0143] 适于该核酸构建体在昆虫细胞中复制的骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域),任选地其中该骨架区域还适于该核酸构建体在细菌细胞中复制。

[0144] 53.如实施例45至52中任一项所述的方法,其中产生了至少1、2、3、4、5、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、500、1000、5000、10,000、50,000或100,000个指环载体。

[0145] 54.如实施例45至53中任一项所述的方法,其进一步包括将这些指环载体与这些昆虫细胞分离。

[0146] 55.如实施例45至54中任一项所述的方法,其中该昆虫细胞符合cGMP生产规范。

[0147] 56.一种制备两种或更多种不同的指环病毒ORF分子的方法,该方法包括:

[0148] (i) 提供昆虫细胞,该昆虫细胞包含编码两种或更多种不同的指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子中的两种或更多种)的核酸构建体;

[0149] (ii) 将该昆虫细胞在适于表达该两种或更多种不同的指环病毒ORF分子的条件下游育。

[0150] 57.如实施例56所述的方法,其中该指环病毒遗传元件包含编码所有ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子的序列。

[0151] 58.如实施例56所述的方法,其中该指环病毒遗传元件包含全长指环病毒基因组(例如,如表A1、B1或C1中任一个所列),任选地其中该全长指环病毒基因组进一步包含编码外源性效应物的序列。

[0152] 59.如实施例56所述的方法,其中该指环病毒遗传元件包含全长指环病毒编码区。

[0153] 60.如实施例56所述的方法,其进一步包括将该昆虫细胞在适于分泌该指环病毒ORF分子的条件下游育。

[0154] 61.如实施例56所述的方法,其进一步将该指环病毒ORF分子与该昆虫细胞分离。

[0155] 62.如实施例61所述的方法,其中分离步骤包括裂解该昆虫细胞。

[0156] 63.如实施例56-62中任一项所述的方法,其中该指环病毒ORF包含指环病毒ORF1分子。

[0157] 64.一种制备指环病毒ORF1分子的方法,该方法包括:

[0158] (i) 提供包含核酸构建体的昆虫细胞,该核酸构建体编码指环病毒ORF1分子,其中:

[0159] (a) 该指环病毒ORF1分子的分子量为至少101kDa,

[0160] (b) 该指环病毒ORF1分子是全长指环病毒ORF1蛋白,

[0161] (c) 多个该指环病毒ORF1分子在存在指环病毒遗传元件时包封该指环病毒遗传元件,

[0162] (d) 该指环病毒ORF1分子不是TTV ORF1蛋白,

[0163] (e) 该指环病毒ORF1分子是乙型细环病毒或丙型细环病毒ORF1分子;或

- [0164] (f) 该指环病毒ORF1分子包含指环病毒ORF1精氨酸富集区和指环病毒C-末端结构域;
- [0165] (ii) 将该昆虫细胞在适于表达该指环病毒ORF1分子的条件下游育。
- [0166] 65. 如实施例64所述的方法, 其进一步包括将该昆虫细胞在适于分泌该指环病毒ORF1分子的条件下游育。
- [0167] 66. 如实施例64所述的方法, 其进一步将该指环病毒ORF1分子与该昆虫细胞分离。
- [0168] 67. 如实施例66所述的方法, 其中分离步骤包括裂解该昆虫细胞。
- [0169] 68. 如前述实施例中任一项所述的方法, 其中下游育步骤产生通过免疫印迹可检测的量的该指环病毒ORF1分子, 例如, 如实例1或2中所述。
- [0170] 69. 一种杆状病毒颗粒, 其根据如实施例36-42中任一项所述的方法产生。
- [0171] 70. 一种组合物, 该组合物包含根据如实施例36-42中任一项所述的方法产生的多个杆状病毒颗粒。
- [0172] 71. 一种指环载体, 其根据如实施例45至68中任一项所述的方法产生。
- [0173] 72. 一种组合物, 该组合物包含根据如实施例45至68中任一项所述的方法产生的多个指环载体。
- [0174] 73. 如实施例72所述的组合物, 该组合物具有预定水平的非感染性颗粒或预定比率的非感染性颗粒: 感染单位 (例如, 小于300:1、200:1、100:1或50:1)。
- [0175] 74. 一种指环病毒ORF分子, 其根据如实施例45至68中任一项所述的方法产生。
- [0176] 75. 一种组合物, 该组合物包含根据如实施例45至68中任一项所述的方法产生的多个指环病毒ORF分子。
- [0177] 76. 如实施例69-75中任一项所述的组合物、指环载体或指环病毒ORF分子, 其满足药物或良好生产规范 (GMP) 标准。
- [0178] 77. 如实施例69-76中任一项所述的组合物、指环载体或指环病毒ORF分子, 其是根据良好生产规范 (GMP) 标准制成的。
- [0179] 78. 如实施例69-77中任一项所述的组合物、指环载体或指环病毒ORF分子, 其具有低于预定参考值的病原体水平, 例如, 其基本不含病原体。
- [0180] 79. 如实施例69-78中任一项所述的组合物、指环载体或指环病毒ORF分子, 其具有低于预定参考值的污染物水平, 例如, 基本不含污染物。
- [0181] 80. 如实施例69-79中任一项所述的组合物、指环载体或指环病毒ORF分子, 其是基本上非免疫原性的。
- [0182] 81. 一种治疗受试者的方法, 该方法包括向该受试者施用如实施例71所述的指环载体。
- [0183] 82. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该指环病毒不是细环病毒 (TTV)。
- [0184] 83. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该昆虫细胞是鳞翅目细胞。
- [0185] 84. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该昆虫细胞是夜蛾总科 (Noctuoidea) 细胞。

[0186] 85. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该昆虫细胞是夜蛾科(Noctuidae)细胞。

[0187] 86. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该昆虫细胞是灰翅夜蛾属(Spodoptera)细胞。

[0188] 87. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该昆虫细胞是草地贪夜蛾(S.frugiperda)细胞。

[0189] 88. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该昆虫细胞是Sf9细胞。

[0190] 89. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该指环病毒ORF1的分子量为至少101kDa。

[0191] 90. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该指环病毒ORF1分子是全长指环病毒ORF1蛋白。

[0192] 91. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中多个该指环病毒ORF1分子在存在指环病毒遗传元件时封装该指环病毒遗传元件。

[0193] 92. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该指环病毒ORF分子不是TTV ORF蛋白。

[0194] 93. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该指环病毒ORF1分子不是TTV ORF1蛋白。

[0195] 94. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该指环病毒ORF分子是乙型细环病毒或丙型细环病毒ORF1分子。

[0196] 95. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该指环病毒ORF1分子是乙型细环病毒或丙型细环病毒ORF1分子。

[0197] 96. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该指环病毒ORF1分子包含指环病毒ORF1精氨酸富集区和指环病毒C-末端结构域。

[0198] 97. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法, 其中该遗传元件或遗传元件区域包含:

[0199] a) 第一指环病毒基因组, 任选地突变体指环病毒基因组, 其包含编码外源性效应

物的序列;

[0200] b) 第二指环病毒基因组或其片段,其与该第一指环病毒基因组串联放置;以及

[0201] c) 任选地,位于(a)和(b)之间的间隔序列。

[0202] 98. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法,其中该遗传元件或遗传元件区域包含:

[0203] a) 第一指环病毒遗传元件区域,其包含编码外源性效应物的序列;

[0204] b) 第二指环病毒遗传元件区域或其片段;以及

[0205] c) 任选地,位于(a)和(b)之间的间隔序列。

[0206] 99. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法,其中该遗传元件是环状的(例如,其中该遗传元件通过体外环化生成),例如,如实例5中所述。

[0207] 100. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法,其中该指环病毒ORF1分子的精氨酸富集区缺失或截短(例如,缺失或截短了至少5、10、15、20、25、30、40、50、60或65个氨基酸)。

[0208] 101. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法,其中这些指环病毒ORF分子是通过等密度离心分离、纯化或富集的,例如,如实例6中所述。

[0209] 102. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法,其中各自包含指环病毒ORF1分子和遗传元件的复合物是通过等密度离心分离、富集或纯化的,例如,如实例6中所述。

[0210] 103. 如前述实施例中任一项所述的核酸构建体、细胞、组合物、杆状病毒颗粒、群体、反应混合物、指环载体、指环病毒ORF分子或方法,其中对该编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1分子)的序列进行密码子优化以在动物细胞(例如,昆虫细胞)中表达。

[0211] 104. 一种制备指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子)的方法,该方法包括:

[0212] (i) 提供昆虫细胞(例如,Sf9细胞),其包含编码该指环病毒ORF分子的核酸构建体;

[0213] (ii) 将该昆虫细胞在适于表达多个这些指环病毒ORF分子的条件下游育;以及

[0214] (iii) 任选地从该昆虫细胞、或该昆虫细胞的其他组分或成分分离、纯化和/或富集多个指环病毒ORF分子;

[0215] 从而制备该指环病毒ORF分子。

[0216] 105. 如实施例104所述的方法,其中该指环病毒ORF分子与标志(例如,His标签)融合,例如在其N-末端或在其C-末端(例如,如表X和/或实例1中所述)融合。

[0217] 106. 如实施例104-105中任一项所述的方法,其中该昆虫细胞进一步包含核酸构建体,该核酸构建体编码一个或多个另外的指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子中的一个或多个),并且其中该方法进一步包括:

[0218] 将该昆虫细胞在适于表达多个该一个或多个另外的指环病毒ORF分子的条件下游育,例如,在步骤(ii)之前、同时或之后;以及

[0219] 任选地从该昆虫细胞或该昆虫细胞的其他组分或成分分离、纯化和/或富集多个该一个或多个另外的指环病毒ORF分子,例如,在步骤(iii)之前、同时或之后。

[0220] 107.如实施例106所述的方法,其中编码该一个或多个另外的指环病毒ORF分子的核酸构建体与(i)的核酸构建体相同。

[0221] 108.如实施例107所述的方法,其中(i)的核酸构建体包含编码指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子中的2、3、4、5或全部6种的序列。

[0222] 109.如实施例107所述的方法,其中(i)的核酸构建体编码指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和ORF1/2分子。

[0223] 110.如实施例107所述的方法,其中(i)的核酸构建体包含指环病毒基因组的全开放阅读框区域。

[0224] 111.如实施例106所述的方法,其中编码该一个或多个另外的指环病毒ORF分子的核酸构建体与(i)的核酸构建体不同。

[0225] 112.如实施例106-111中任一项所述的方法,其中这些指环病毒ORF分子来自相同的指环病毒基因组。

[0226] 113.如实施例106-111中任一项所述的方法,其中这些指环病毒ORF分子来自多个指环病毒基因组(例如,其中该ORF1分子来自一个指环病毒基因组并且该ORF2分子来自不同的指环病毒基因组)。

[0227] 114.如实施例106-113中任一项所述的方法,其中这些指环病毒ORF分子中的一个或多个来自甲型细环病毒(例如,如表Y所列)。

[0228] 115.如实施例106-114中任一项所述的方法,其中这些指环病毒ORF分子中的一个或多个来自乙型细环病毒(例如,如表Y所列)。

[0229] 116.如实施例106-115中任一项所述的方法,其中这些指环病毒ORF分子中的一个或多个来自丙型细环病毒(例如,如表Y所列)。

[0230] 117.如实施例104-116中任一项所述的方法,其中该核酸构建体各自包含启动子(例如,控制指环病毒ORF分子中一个或多个的表达的启动子,例如,杆状病毒多面体启动子)。

[0231] 118.如实施例104-117中任一项所述的方法,其进一步包括将该昆虫细胞在适于分泌这些指环病毒ORF分子的条件下游育。

[0232] 119.如实施例104-118中任一项所述的方法,其中分离步骤包括裂解该昆虫细胞。

[0233] 120.如实施例104-119中任一项所述的方法,其中孵育步骤产生通过免疫印迹可检测的量的该指环病毒ORF分子(例如,ORF1分子),例如,如实例1或2中所述。

[0234] 121.如实施例104-120中任一项所述的方法,其中孵育步骤产生每1L细胞培养物(例如,Sf9培养物)至少1、2、3、4、5或6mg的该指环病毒ORF1分子。

[0235] 122.如前述实施例中任一项所述的方法,其中这些指环病毒ORF分子是通过等密度离心分离、富集或纯化的。

[0236] 123.如前述实施例中任一项所述的方法,其中该指环病毒ORF分子是指环病毒ORF1分子,并且其中该方法进一步包括:

[0237] 使分离、纯化或富集的指环病毒ORF1分子与遗传元件在适于将该遗传元件包封在包含该指环病毒ORF1分子的蛋白质外壳内的条件下进行体外接触,例如,如实例8中所述。

[0238] 根据说明书和附图并且根据权利要求,本发明的其他特征、目的和优点将是显而易见的。

[0239] 除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同含义。本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献均通过引用以其全文并入。另外,材料、方法和实例仅是说明性的,而并非意在进行限制。

附图说明

[0240] 图1描绘了具有C-末端His标签的Ring2 ORF1在昆虫细胞中的表达。

[0241] 图2描绘了具有C-末端His标签的Ring1 ORF1和ORF1/1在昆虫细胞中的表达。

[0242] 图3描绘了在有或没有PreScission切割序列的情况下具有N-末端His标签的Ring2 ORF1在昆虫细胞中的表达。

[0243] 图4描绘了Ring1 ORF 1/1、1/2、2、2/2和2/3作为C-末端His标记的重组蛋白在昆虫细胞中的表达。

[0244] 图5描绘了单独的Ring2 ORF在昆虫细胞中的表达。同一印迹的两次曝光显示在中间和右侧的分图中。左侧分图示出了如所示测试的Ring2构建体的结构。

[0245] 图6描绘了Ring2 ORF1+“FullORF”、ORF1+ORF2、ORF1+ORF2/2和ORF1+ORF2/3在昆虫细胞中的杆状病毒介导的共表达。

[0246] 图7描绘了使用杆状病毒的多种Ring2蛋白在昆虫细胞中的同时共表达。

[0247] 图8描绘了来自通过杆状病毒和通过转染递送到昆虫细胞中的指环病毒基因组的ORF的表达。

[0248] 图9示出了在Sf9细胞中Ring1 ORF2的表达与多面体启动子(标记pH的箭头)无关。

[0249] 图10描绘了Ring2 ORF1-His和Ring2基因组DNA共同递送到Sf9细胞中,随后孵育并在CsCl线性密度梯度上分级。在该图上方示出了级分的抗His标签免疫印迹,以及每个级分的qPCR测定。下方分图示出了两种单独级分和级分池的透射电子显微术图像,如免疫印迹上的框所示。中间分图中的插图是放大视图,示出了蛋白酶体样结构。

[0250] 图11描绘了通过免疫金电子显微术来表征Sf9等密度级分。

[0251] 图12描绘了从另外的指环病毒株表达ORF1。

[0252] 图13描绘了编码TTMiniV的LY1株的卡那霉素载体(“指环载体1”)的示意图。

[0253] 图14描绘了编码TTMiniV的LY2株的卡那霉素载体(“指环载体2”)的示意图。

[0254] 图15描绘了合成指环载体在293T和A549细胞中的转染效率。

[0255] 图16A和16B描绘了定量PCR结果,这些结果说明了合成指环载体对293T细胞的成功感染。

[0256] 图17A和17B描绘了定量PCR结果,这些结果说明了合成指环载体对A549细胞的成功感染。

[0257] 图18A和18B描绘了定量PCR结果,这些结果说明了合成指环载体对Raji细胞的成功感染。

[0258] 图19A和19B描绘了定量PCR结果,这些结果说明了合成指环载体对Jurkat细胞的成功感染。

[0259] 图20A和20B描绘了定量PCR结果,这些结果说明了合成指环载体对Chang细胞的成功感染。

[0260] 图21是示出了用于产生指环载体(例如,如本文所述的可复制型或复制缺损型指环载体)的示例性工作流程的示意图。

[0261] 图22是示出了用所示质粒转染的HEK293T细胞中miR-625表达倍数变化的图。

[0262] 图23是示出了用编码靶向n-myc相互作用蛋白(NMI)的miRNA的指环载体感染Raji B细胞的图示。显示了用编码NMI miRNA的指环载体感染Raji B细胞(箭头)或对照细胞后检测到的对指环载体基因组当量的定量。

[0263] 图24是示出了用编码靶向n-myc相互作用蛋白(NMI)的miRNA的指环载体感染Raji B细胞的图。免疫印迹示出了编码针对NMI的miRNA的指环载体降低了Raji B细胞中NMI蛋白的表达,而用缺乏该miRNA的指环载体感染的Raji B细胞示出了与对照类似的NMI蛋白表达。

[0264] 图25是一系列图,其示出了在用包含内源性miRNA编码序列的指环载体和其中内源性miRNA编码序列缺失的相应指环载体感染后,对宿主细胞中产生的指环载体颗粒的定量。

[0265] 图26A-26B是一系列图示,其示出了用于产生表达纳米萤光素酶的指环载体的构建体(A)和用于转染细胞的一系列指环载体/质粒组合(B)

[0266] 图27A-27C是一系列图示,其示出了注射了指环载体的小鼠中纳米萤光素酶的表达。(A)注射后第0-9天小鼠中纳米萤光素酶的表达。(B)注射了各种指环载体/质粒构建体组合的小鼠中纳米萤光素酶的表达,如图所示。(C)注射后,对在小鼠中检测到的纳米萤光素酶发光的定量。A组接受TTMV-LY2载体±纳米萤光素酶。B组接受纳米萤光素酶蛋白和TTMV-LY2 ORF。

[0267] 图28A是示出了TTMV-LY2质粒pVL46-063和pVL46-240环化的凝胶电泳图像。

[0268] 图28B是示出了线性和环状TTMV-LY2构建体拷贝数的层析谱,如通过尺寸排阻层析(SEC)所确定的。

[0269] 图28C是示出了指环病毒ORF1分子的结构域和要用来自不同指环病毒的高变结构域替换的高变区的示意图。

[0270] 图28D是示出了ORF1的结构域和将要来自非指环病毒来源的感兴趣的蛋白质或肽(POI)替换的高变区的示意图。

[0271] 图29是示出了基于tth8或LY2的指环载体,经工程化以含有编码人促红细胞生成素(hEpo)的序列,可将功能性转基因递送至哺乳动物细胞的图。

[0272] 图30A和30B是一系列图,其示出了在静脉内注射后七天,可检测到施用于小鼠的工程化指环载体。

[0273] 图31是示出了在静脉内施用编码hGH的工程化指环载体后七天,在全血的细胞级分中检测到hGH mRNA的图。

[0274] 图32是示出了体外环化的(IVC)TTV-tth8基因组(IVC TTV-tth8)与质粒中TTV-tth8基因组相比,在HEK293T细胞中以预期密度产生TTV-tth8基因组拷贝的能力的图。

[0275] 图33是一系列图,其示出了体外环化的(IVC)LY2基因组(WT LY2IVC)和质粒中野生型LY2基因组(WT LY2质粒)在Jurkat细胞中以预期密度产生LY2基因组拷贝的能力。

[0276] 当结合附图阅读时,将会更好地理解以下对本发明实施例的详细描述。出于说明本发明的目的,在附图中示出了现在举例说明的实施例。然而,应该理解的是,本发明不限于附图中所示实施例的精确布置及手段。

具体实施方式

[0277] 定义

[0278] 本发明将针对特定实施例并参考某些附图进行描述,但本发明并不限于此,而是仅由权利要求书来限定。除非另有说明,否则通常应以其通常意义来理解下文中所阐述的术语。

[0279] 在本说明书和权利要求书中使用术语“包含”时,它并不排除其他要素。出于本发明的目的,术语“由……组成”被认为是术语“包含……”的优选实施例。如果在下文中将组定义为包含至少一定数量的实施例,则这应理解为优选地还披露了仅由这些实施例组成的组。

[0280] 当提及单数名词时,如果使用了不定冠词或定冠词,例如“一种/一个(a)”、“一种/一个(an)”或“该(the)”,这包括该名词的复数,除非另有明确说明。

[0281] 词语“用于治疗、调节等的化合物、组合物、产物等”应理解是指本身适合于所指定的治疗、调节等目的的化合物、组合物、产物等。词语“用于治疗、调节等的化合物、组合物、产物等”另外作为实施例披露了这样的化合物、组合物、产物等用于治疗、调节等。

[0282] 词语“用于……的化合物、组合物、产物等”、“化合物、组合物、产物等在生产用于……的药物、药物组合物、兽用组合物、诊断组合物等中的用途”或“用作药物……的化合物、组合物、产物等”表示这些化合物、组合物、产物等将用于可在人体或动物体上实施的治疗方法中。它们被认为是关于治疗方法等的实施例和权利要求的等同披露。因此,如果实施例或权利要求是指“用于治疗疑似患有某种疾病的人或动物的化合物”,则这也被认为是披露了“化合物在生产用于治疗疑似患有某种疾病的人或动物的药物中的用途”或“通过向疑似患有某种疾病的人或动物施用化合物的治疗方法”。词语“用于治疗、调节等的化合物、组合物、产物等”应理解是指本身适合于所指定的治疗、调节等目的的化合物、组合物、产物等。

[0283] 如果在下文的括号中提供了术语、值、数量等的实例,则这应理解为表示在括号中提及的实例可以构成实施例。例如,如果指出“在实施例中,核酸分子包含与表1的指环病毒ORF1编码核苷酸序列(例如,表1的核酸序列中571-2613位核苷酸)具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列”,则一些实施例涉及包含与表1的核酸序列的571-2613位核苷酸具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列的核酸分子。

[0284] 如本文所用的术语“扩增”,指的是核酸分子或其部分的复制,以产生一个或多个另外拷贝的该核酸分子或其部分(例如,遗传元件或遗传元件区域)。在一些实施例中,扩增导致核酸序列的部分复制。在一些实施例中,扩增经由滚环式复制进行。

[0285] 如本文所用的,术语“指环载体”指的是包含遗传元件,例如包封在蛋白质外壳中的环状DNA的媒介物,例如,该遗传元件基本上受到蛋白质外壳保护,使其免受DNA酶I的酶切。如本文所用的“合成指环载体”通常指的是非天然存在的指环载体,例如,其具有与野生

型病毒(例如,如本文所述的野生型指环病毒)不同的序列。在一些实施例中,合成指环载体是工程化的或重组的,例如,其包含遗传元件,该遗传元件包含相对于野生型病毒基因组(例如,如本文所述的野生型指环病毒基因组)的差异或修饰。在一些实施例中,包封在蛋白质外壳内涵盖100%的蛋白质外壳覆盖率,以及小于100%的覆盖,例如95%、90%、85%、80%、70%、60%、50%或更少。例如,蛋白质外壳可能存在缺口或间断(例如,这使得蛋白质外壳对水、离子、肽或小分子具有可渗透性),只要遗传元件保留在蛋白质外壳中或免受DNA酶I的酶切,例如,在进入宿主细胞之前。在一些实施例中,将指环载体纯化,例如,将其从其原始来源中分离和/或基本上不含(>50%、>60%、>70%、>80%、>90%)其他组分。在一些实施例中,指环载体能够将遗传元件引入靶细胞中(例如,经由感染)。在一些实施例中,指环载体是感染性合成指环病毒病毒颗粒。

[0286] 如本文所用的,术语“抗体分子”是指包含至少一个免疫球蛋白可变结构域序列的蛋白质,例如免疫球蛋白链或其片段。术语“抗体分子”涵盖全长抗体和抗体片段(例如,scFv)。在一些实施例中,抗体分子是多特异性抗体分子,例如,该抗体分子包含多个免疫球蛋白可变结构域序列,其中该多个中第一免疫球蛋白可变结构域序列对第一表位具有结合特异性,而该多个中第二免疫球蛋白可变结构域序列对第二表位具有结合特异性。在实施例中,多特异性抗体分子是双特异性抗体分子。双特异性抗体分子的特征通常在于对第一表位具有结合特异性的第一免疫球蛋白可变结构域序列和对第二表位具有结合特异性的第二免疫球蛋白可变结构域序列。

[0287] 如本文所用的,术语“骨架”或“骨架区域”是指核酸分子内(例如,杆粒或供体载体内,例如,如本文所述)包含一个或多个参与核酸分子在宿主细胞中的复制和/或维持(例如,对于复制和/或维持来说必要和/或足够)的元件的区域。在一些实施例中,骨架区域,例如“杆状病毒骨架区域”包含一个或多个杆状病毒元件(例如,杆状病毒基因组其功能性片段),这些杆状病毒元件例如适于核酸构建体在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中复制。在一些实施例中,骨架进一步包含选择性标志。在一些实施例中,核酸分子包含遗传元件区域和骨架区域(例如,杆状病毒骨架区域和/或适于在细菌细胞中复制的骨架区域)。

[0288] 如本文所用的,术语“杆粒”是指包含足够的杆状病毒骨架元件以使其适于在昆虫细胞中复制而且还适于在细菌细胞中复制的核酸分子。在一些实施例中,核酸分子适于在细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞,例如,DH 10Bac细胞)中复制。

[0289] 如本文所用的,“编码……”的核酸是指编码氨基酸序列或者多核苷酸例如mRNA或功能性多核苷酸(例如非编码RNA,例如siRNA或miRNA)的核酸序列。

[0290] 如本文所用的“外源性”作用剂(例如,效应物、核酸(例如,RNA)、基因、有效载荷、蛋白质)是指不由相应的野生型病毒,例如,如本文所述的指环病毒包含或编码的作用剂。在一些实施例中,外源性作用剂不是天然存在的,例如具有相对于天然存在的蛋白质或核酸而言发生改变(例如,通过插入、缺失或置换)的序列的蛋白质或核酸。在一些实施例中,外源性作用剂并非天然存在于宿主细胞中。在一些实施例中,外源性作用剂天然存在于宿主细胞中,但对病毒而言是外源性的。在一些实施例中,外源性作用剂天然存在于宿主细胞中,但是不以期望的水平或在期望的时间存在。

[0291] 如本文中针对另一种作用剂或元件(例如,效应物、核酸序列、氨基酸序列)所用的“异源”作用剂或元件(例如,效应物、核酸序列、氨基酸序列),指的是并非天然存在于一起

的作用剂或元件,例如,在野生型病毒,如指环病毒中。在一些实施例中,异源核酸序列可以与天然存在的核酸序列(例如,天然存在于指环病毒中的序列)存在于同一核酸中。在一些实施例中,相对于指环载体的其他(例如,其余的)元件所基于的指环病毒而言,异源作用剂或元件是外源性的。

[0292] 如本文所用的,术语“遗传元件”指的是核酸分子,其包封在或可以包封在蛋白质外壳内(例如,蛋白质外壳保护其免受DNA酶I的酶切),例如,以形成如本文所述的指环载体。应当理解的是,遗传元件可以作为裸DNA产生,并且任选地进一步组装到蛋白质外壳中。还应理解的是,指环载体可将其遗传元件插入细胞中,其结果是遗传元件存在于细胞中,而蛋白质外壳不一定进入细胞。

[0293] 如本文所用的,“遗传元件构建体”是指包含遗传元件序列或其片段的核酸构建体(例如,质粒、杆粒、供体载体、粘粒或微环)。在一些实施例中,如本文所述的杆粒或供体载体是包含遗传元件序列或其片段的遗传元件构建体。

[0294] 如本文所用的术语“遗传元件区域”指的是包含遗传元件序列的构建体区域。在一些实施例中,遗传元件区域包含与野生型指环病毒序列或其片段具有足够同一性的序列,由蛋白质外壳包封,从而形成指环载体(例如,与野生型指环病毒序列或其片段具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列)。在实施例中,遗传元件区域包含蛋白结合序列,例如,如本文所述的(例如,如本文所述的5' UTR、3' UTR和/或GC富集区,或与其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列)。在一些实施例中,遗传元件区域可以进行滚环式复制。在一些实施例中,遗传元件包含Rep蛋白结合位点。在一些实施例中,遗传元件包含Rep蛋白移位位点。在一些实施例中,包含遗传元件区域的构建体没有包封在蛋白质外壳中,但是由构建体产生的遗传元件可以包封在蛋白质外壳中。在一些实施例中,包含遗传元件区域的构建体进一步包括载体骨架(例如,杆粒骨架或供体载体骨架)。在一些实施例中,构建体(例如,杆粒)包含一个或多个杆状病毒元件(例如,杆状病毒基因组,其例如包含遗传元件区域)。

[0295] 如本文所用的,当用于基因组(例如,指环病毒基因组)或其片段时,术语“突变体”指的是相对于相应的野生型指环病毒序列具有至少一处变化的序列。在一些实施例中,相对于相应的野生型指环病毒序列,突变体基因组或其片段包含至少一个单核苷酸多态性、添加、缺失或移码。在一些实施例中,相对于相应的野生型指环病毒序列,突变体基因组或其片段包含至少一种指环病毒ORF(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2中一种或多种)的缺失。在一些实施例中,相对于相应的野生型指环病毒序列,突变体基因组或其片段包含所有指环病毒ORF(例如,所有ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和ORF1/2)的缺失。在一些实施例中,相对于相应的野生型指环病毒序列,突变体基因组或其片段包含至少一种指环病毒非编码区(例如,5' UTR、3' UTR和/或GC富集区中一种或多种)的缺失。在一些实施例中,突变体基因组或其片段包含或者编码外源性效应物。

[0296] 如本文所用的,术语“ORF分子”是指具有指环病毒ORF蛋白(例如,指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2蛋白)或其功能性片段的活性和/或结构特征的多肽。当一般使用(即,“ORF分子”)时,多肽可以包含本文所述的任何指环病毒ORF(例如,指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2)或其功能性片段的活性和/或结构

特征。当与修饰词一起使用以说明特定的开放阅读框(例如,“ORF1分子”、“ORF2分子”、“ORF2/2分子”、“ORF2/3分子”、“ORF1/1分子”或“ORF1/2分子”)时,通常表示多肽包含相应的指环病毒ORF蛋白或其功能性片段(例如,如下文针对“ORF1分子”所定义)的活性和/或结构特征。例如,“ORF2分子”包含指环病毒ORF2蛋白或其功能性片段的活性和/或结构特征。

[0297] 如本文所用,术语“ORF1分子”是指具有指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述的指环病毒ORF1蛋白)或其功能性片段的活性和/或结构特征的多肽。在一些情况下,ORF1分子可以包含以下中一种或多种(例如,1、2、3或4种):包含至少60%碱性残基(例如,至少60%精氨酸残基)的第一区域、包含至少约六个 β 链(例如,至少4、5、6、7、8、9、10、11或12个 β 链)的第二区域、包含指环病毒N22结构域(例如,如本文所述的,例如来自如本文所述的指环病毒ORF1蛋白的N22结构域)的结构或活性的第三区域和/或包含指环病毒C-末端结构域(CTD)(例如,如本文所述的,例如来自如本文所述的指环病毒ORF1蛋白的CTD)的结构或活性的第四区域。在一些情况下,ORF1分子按照从N-末端到C-末端的顺序包含该第一、第二、第三和第四区域。在一些情况下,指环载体包含ORF1分子,该分子按照从N-末端到C-末端的顺序包含该第一、第二、第三和第四区域。在一些情况下,ORF1分子可以包含由指环病毒ORF1核酸编码的多肽。在一些情况下,ORF1分子可进一步包含异源序列,例如高变区(HVR),例如来自指环病毒ORF1蛋白的HVR,例如,如本文所述的。如本文所用的“指环病毒ORF1蛋白”指的是由指环病毒基因组(例如,野生型指环病毒基因组,例如,如本文所述)编码的ORF1蛋白。

[0298] 如本文所用的,术语“ORF2分子”是指具有指环病毒ORF2蛋白(例如,如本文所述的指环病毒ORF2蛋白)或其功能性片段的活性和/或结构特征的多肽。如本文所用的“指环病毒ORF2蛋白”指的是由指环病毒基因组(例如,野生型指环病毒基因组,例如,如本文所述)编码的ORF2蛋白。

[0299] 如本文所用的,术语“蛋白质外壳”是指主要(例如,>50%、>60%、>70%、>80%、>90%)是蛋白质的外壳组分。

[0300] 如本文所用的,术语“调节性核酸”是指修饰编码表达产物的DNA序列的表达,例如转录和/或翻译的核酸序列。在实施例中,表达产物包括RNA或蛋白质。

[0301] 如本文所用的,术语“调节性序列”是指修饰靶基因产物的转录的核酸序列。在一些实施例中,调节性序列是启动子或增强子。

[0302] 如本文所用的,术语“Rep”或“复制蛋白”指的是促进病毒基因组复制的蛋白质,例如,病毒蛋白。在一些实施例中,复制蛋白是指环病毒Rep蛋白。

[0303] 如本文所用的,术语“Rep结合位点”指的是核酸分子内的核酸序列,其由Rep蛋白(例如,指环病毒Rep蛋白)识别和结合。在一些实施例中,Rep结合位点包含5' UTR(例如,包含发夹环)。在一些实施例中,Rep结合位点包含复制起点(ORI)。

[0304] 如本文所用的,术语“Rep移位位点”指的是核酸分子内的核酸序列,其能够引起与该核酸分子相关的(例如,结合的)Rep蛋白(例如,指环病毒Rep蛋白)在到达Rep移位位点时释放该核酸分子。在一些实施例中,Rep移位位点包含5' UTR(例如,包含发夹环)。在一些实施例中,Rep移位位点包含复制起点(ORI)。

[0305] 如本文所用的,“基本上非致病性”生物体、颗粒或组分是指不会导致或诱发不可接受的疾病或致病性状况的生物体、颗粒(例如,病毒或指环载体,例如,如本文所述)或其

组分,例如,在宿主生物体,例如哺乳动物,如人类中。在一些实施例中,向受试者施用指环载体可导致轻微的反应或副作用,作为标准治疗的一部分,这些反应或副反应是可以接受的。

[0306] 如本文所用的,术语“非致病性”是指不会导致或诱发不可接受的疾病或致病性状况的生物体或其组分,例如,在宿主生物体,例如,哺乳动物,如人类中。

[0307] 如本文所用的,“基本上非整合的”遗传元件是指遗传元件,例如,病毒或指环载体中的遗传元件,例如,如本文所述的,其中进入宿主细胞(例如,真核细胞)或生物体(例如,哺乳动物,如人类)的遗传元件中低于约0.01%、0.05%、0.1%、0.5%或1%整合到基因组中。在一些实施例中,无法检测到遗传元件整合到基因组中,例如,宿主细胞的基因组中。在一些实施例中,可以使用如本文所述的技术,例如,核酸测序、PCR检测和/或核酸杂交,来检测遗传元件整合到基因组中。在一些实施例中,整合频率是通过从游离载体中分离出来的基因组DNA进行定量凝胶纯化测定来确定的,例如,如Wang等人中所述(2004, Gene Therapy [基因治疗], 11:711-721,其通过引用以其全文并入本文)。

[0308] 如本文所用的,“基本上非免疫原性”生物体、颗粒或组分是指不会导致或诱发不期望的或非靶向的免疫应答的生物体、颗粒(例如,病毒或指环载体,例如,如本文所述)或其组分,例如,在宿主组织或生物体(例如,哺乳动物,如人类)中。在实施例中,基本上非免疫原性生物体、颗粒或组分不会产生具有临床意义的免疫应答。在实施例中,基本上非免疫原性指环载体不会产生针对包含氨基酸序列或者由指环病毒或指环载体遗传元件的核酸序列编码的蛋白质的具有临床意义的免疫应答。在实施例中,通过测定受试者中抗体(例如,中和性抗体)的存在或水平(例如,抗指环载体抗体的存在或水平,例如,针对如本文所述的指环载体的抗体的存在或水平),来检测免疫应答(例如,不期望的或非靶向的免疫应答),例如,根据在Tsuda等人(1999; J. Virol. Methods [病毒学方法杂志] 77:199-206;其通过引用并入本文)中描述的抗TTV抗体检测方法和/或根据在Kakkola等人(2008; Virology [病毒学] 382:182-189;其通过引用并入本文)中描述的用于测定抗TTV IgG水平的方法。还可以通过本领域用于检测抗病毒抗体的方法来检测针对指环病毒或基于指环病毒的指环载体的抗体(例如,中和性抗体),这些方法是例如检测抗AAV抗体的方法,例如,如Calcedo等人(2013; Front. Immunol. [免疫学前沿] 4 (341):1-7;其通过引用并入本文)中所述。

[0309] 如本文所用的“子序列”是指分别包含在较大核酸序列或氨基酸序列中的核酸序列或氨基酸序列。在一些情况下,子序列可以包含较大序列的结构域或功能性片段。在一些情况下,子序列可以包含较大序列的片段,当从较大序列中分离出来时,该片段能够形成二级和/或三级结构,类似于当与较大序列的其余部分一起存在时由该子序列形成的二级和/或三级结构。在一些情况下,子序列可以替换为另一序列(例如,包含外源性序列或对较大序列的其余部分而言异源的序列的子序列,例如,来自不同指环病毒的相应子序列)。

[0310] 如本文所用,“转座酶识别序列”是指被转座酶识别(例如,能够被其特异性结合)的核酸序列。在一些实施例中,转座酶是Tn7转座酶。在一些实施例中,核酸分子(例如,杆粒或供体载体,例如,如本文所述)包含第一转座酶识别序列(例如,Tn7R或Tn7L序列)。在一些实施例中,核酸分子(例如,杆粒或供体载体,例如,如本文所述)包含第二转座酶识别序列(例如,与第一转座酶识别序列同源的序列,例如,Tn7R或Tn7L序列中的另一个)。

[0311] 本发明总体上涉及指环载体,例如,合成指环载体,及其用途。本披露内容提供指

环载体、包含指环载体的组合物,以及制备或使用指环载体的方法。指环载体通常用作递送媒介物,例如,用于将治疗剂递送至真核细胞。一般而言,指环载体将包括遗传元件,该遗传元件包含包封在蛋白质外壳内的核酸序列(例如,编码效应物,例如,外源性效应物或内源性效应物)。相对于指环病毒序列(例如,如本文所述),指环载体可包括序列(例如,如本文所述的区域或结构域)的一个或多个缺失。指环载体可以用作基本上非免疫原性媒介物,用于将遗传元件或其中编码的效应物(例如,多肽或核酸效应物,例如,如本文所述)递送到真核细胞中,例如,用以治疗包含这些细胞的受试者中的疾病或障碍。

[0312] 目录

[0313] I. 用于制备指环载体的组合物和方法

[0314] A. 杆状病毒表达系统

[0315] B. 昆虫细胞

[0316] C. 指环载体的组分和组装

[0317] i. 用于组装指环载体的ORF1分子

[0318] ii. 用于组装指环载体的ORF2分子

[0319] D. 遗传元件构建体

[0320] i. 质粒

[0321] ii. 环状核酸构建体

[0322] iii. 体外环化

[0323] iv. 顺式/反式构建体

[0324] v. 表达盒

[0325] vi. 遗传元件构建体的设计和产生

[0326] C. 效应物

[0327] D. 宿主细胞

[0328] i. 将遗传元件引入宿主细胞中

[0329] ii. 用于以顺式或反式提供一种或多种指环病毒蛋白的方法

[0330] iii. 辅助物

[0331] iv. 示例性细胞类型

[0332] E. 培养条件

[0333] F. 收获

[0334] G. 富集和纯化

[0335] II. 指环载体

[0336] A. 指环病毒

[0337] B. ORF1分子

[0338] C. ORF2分子

[0339] D. 遗传元件

[0340] E. 蛋白结合序列

[0341] F. 5'UTR区域

[0342] G. GC富集区

[0343] H. 效应物

[0344] I. 调节性序列

[0345] J. 复制蛋白

[0346] K. 其他序列

[0347] L. 蛋白质外壳

[0348] III. 核酸构建体

[0349] IV. 组合物

[0350] V. 宿主细胞

[0351] VI. 使用方法

[0352] VII. 施用/递送

[0353] I. 用于制备指环载体的组合物和方法

[0354] 在一些方面,本披露内容提供了可以用于产生例如本文所述的指环载体的组合物(例如,杆粒、供体载体、杆状病毒颗粒和包含其的细胞)和方法。在一些实施例中,本文所述的组合物和方法可以用于产生遗传元件或遗传元件构建体。在一些实施例中,本文所述的组合物和方法可以用于产生一个或多个指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2分子或其功能性片段或剪接变体)。在一些实施例中,本文所述的组合物和方法可以用于在例如宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞)中产生蛋白质外壳或其组分(例如,ORF1分子)。

[0355] 在一些实施例中,杆粒是包含遗传元件序列(例如,遗传元件区域)和一个或多个杆状病毒元件(例如,杆状病毒基因组)的核酸构建体。在一些实施例中,杆粒可以用于杆状病毒表达系统中,例如,在昆虫细胞中(例如,如本文所述),例如用于产生遗传元件构建体和/或指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2分子或其功能性片段或剪接变体)。

[0356] 不希望受到理论的束缚,滚环式扩增可能经由与相对于遗传元件区域位于5'方向(或位于其5'区域内)的Rep结合位点(例如,包含5' UTR,例如,包含发夹环和/或复制起点,例如,如本文所述)(例如,在杆粒中,例如,如本文所述)结合的Rep蛋白来进行。然后,Rep蛋白可以继续通过遗传元件区域,引起遗传元件的合成。然后,可以将遗传元件环化,随后将其包封在蛋白质外壳内,以形成指环载体。

[0357] 杆状病毒表达系统

[0358] 病毒表达系统(例如,杆状病毒表达系统)可以用于表达蛋白质(例如,用于产生指环载体),例如,如本文所述。杆状病毒为具有环状、超螺旋的双链DNA基因组的杆状的病毒。杆状病毒属包括:甲型杆状病毒(核型多角体病毒(nucleopolyhedrovirus, NPV),从鳞翅目分离)、乙型杆状病毒(颗粒体病毒(GV),从鳞翅目分离)、丙型杆状病毒(NPV,从膜翅目(Hymenoptera)分离)和丁型杆状病毒(NPV,从双翅目(Diptera)分离)。GV通常每个包膜仅含有一个核衣壳,而NPV通常每个包膜含有单个(SNPV)或多个(MNPV)核衣壳。有包膜的病毒体被进一步包含在GV的颗粒蛋白基质中和NPV的多角体蛋白中。杆状病毒通常具有裂解和包含的生命周期。在一些实施例中,裂解和包含的生命周期在病毒复制的三个阶段中独立出现:这三个阶段为早期、晚期和极晚期。在一些实施例中,在早期期间,病毒DNA复制在病毒进入宿主细胞、早期病毒基因表达和宿主基因表达机构切断之后发生。在一些实施例中,在晚期,编码病毒DNA复制的晚期基因被表达,病毒颗粒被组装,并且细胞外病毒(EV)由宿

主细胞产生。在一些实施例中,在极晚期,多角体蛋白和p10基因被表达,宿主细胞产生包含病毒(OV),并且宿主细胞被裂解。由于杆状病毒感染昆虫物种,它们可以用作在生物制剂,在杆状病毒允许性昆虫细胞或幼虫中产生外源性蛋白。杆状病毒的不同分离株,例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)多核多角体病毒(AcMNPV)和家蚕(*Bombyx mori*) (桑蚕)核多角体病毒(BmNPV)可以用于外源性蛋白表达。各种杆状病毒表达系统是市售的,例如,购自赛默飞世尔公司(ThermoFisher)。

[0359] 在一些实施例中,本文所述的蛋白质(例如,指环病毒ORF分子,例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2或其功能性片段或剪接变体)可以使用包含本文所述的一种或多种组分的杆状病毒表达载体(例如,杆粒)表达。例如,杆状病毒表达载体可以包含选择性标志(例如,kanR)、复制起点(例如,细菌复制起点和昆虫细胞复制起点中的一种或两种)、重组酶识别位点(例如,att位点)和启动子中的一种或多种(例如,所有)。在一些实施例中,可以通过用编码本文所述蛋白质的基因替换天然存在的编码杆状病毒包含体的野生型多角体蛋白基因来产生杆状病毒表达载体(例如,如本文所述的杆粒)。在一些实施例中,将编码本文所述蛋白质的基因克隆到含有杆状病毒启动子的杆状病毒表达载体(例如,如本文所述的杆粒)。在一些实施例中,杆状病毒载体包含一个或多个非杆状病毒启动子,例如,哺乳动物启动子或指环病毒启动子。在一些实施例中,将编码本文所述蛋白质的基因克隆到供体载体(例如,如本文所述)中,随后将该载体与空杆状病毒表达载体(例如,空杆粒)接触,使得编码本文所述蛋白质的基因从供体载体转移(例如,通过同源重组或转座酶活性)至杆状病毒表达载体(例如,杆粒)中。在一些实施例中,杆状病毒启动子的侧翼是来自非必要多角体蛋白基因座的杆状病毒DNA。在一些实施例中,本文所述的蛋白质在病毒复制的极晚期处于AcNPV多角体蛋白启动子的转录控制下。在一些实施例中,适合用于昆虫细胞中的杆状病毒表达的强启动子包括但不限于杆状病毒p10启动子、多角体蛋白(polh)启动子、p6.9启动子和衣壳蛋白启动子。适合用于昆虫细胞中的杆状病毒表达的弱启动子包括杆状病毒的ie1、ie2、ie0、et1、39K(aka pp31)和gp64启动子。

[0360] 在一些实施例中,通过杆状病毒基因组(例如,野生型或突变型杆状病毒基因组)与转移载体之间的同源重组来产生重组杆状病毒。在一些实施例中,将一个或多个编码本文所述蛋白质的基因克隆到转移载体中。在一些实施例中,转移载体进一步含有杆状病毒启动子,该启动子的侧翼是来自非必要基因座例如多角体蛋白基因的DNA。在一些实施例中,通过杆状病毒基因组与转移载体之间的同源重组将一个或多个编码本文所述蛋白质的基因插入杆状病毒基因组中。在一些实施例中,将杆状病毒基因组在一个或多个独特位点处线性化。在一些实施例中,线性化的位点位于靶位点附近,该靶位点用于将编码本文所述蛋白质的基因插入杆状病毒基因组中。在一些实施例中,可以使用缺失基因(例如多角体蛋白基因)下游的杆状病毒基因组的线性化杆状病毒基因组进行同源重组。在一些实施例中,将杆状病毒基因组和转移载体共转染到昆虫细胞中。在一些实施例中,产生重组杆状病毒的方法包括以下步骤:制备用于与含有编码一种或多种本文所述蛋白质的基因的转移载体进行同源重组的杆状病毒基因组,并且将该转移载体与杆状病毒基因组DNA共转染到昆虫细胞中。在一些实施例中,杆状病毒基因组包含与转移载体的区域同源的区域。这些同源区域可以增强杆状病毒基因组与转移载体之间重组的可能性。在一些实施例中,转移载体中的同源区域位于启动子上游或下游。在一些实施例中,为诱导同源重组,将杆状病毒基因组

与转移载体以约1:1至10:1的重量比混合。

[0361] 在一些实施例中,通过以下方法产生重组杆状病毒:该方法包括用Tn7进行位点特异性转座,例如,从而将编码本文所述蛋白质的基因插入杆粒DNA中,例如,在细菌中繁殖,这些细菌是例如大肠杆菌(例如,DH 10Bac细胞)。在一些实施例中,将编码本文所述蛋白质的基因克隆到pFASTBAC®载体中并且转化到感受态细胞例如DH10BAC®感受态细胞(含有具有最小attTn7靶位点的杆粒DNA)中。在一些实施例中,杆状病毒表达载体(例如,pFASTBAC®载体)可以具有启动子,例如双启动子(例如,多角体蛋白启动子、p10启动子)。市售的pFASTBAC®供体质粒包括:pFASTBAC 1、pFASTBAC HT和pFASTBAC DUAL。在一些实施例中,鉴定含有重组杆粒DNA的集落并且分离杆粒DNA以转染昆虫细胞。

[0362] 在一些实施例中,将杆状病毒载体与辅助核酸一起引入昆虫细胞中。引入可以为同时进行或依次进行。在一些实施例中,辅助核酸提供了一种或多种杆状病毒蛋白,例如,以促进杆状病毒载体的包装。

[0363] 在一些实施例中,在昆虫细胞中产生(例如,通过同源重组)的重组杆状病毒被扩增并用于感染昆虫细胞(例如,在中对数生长期)以进行重组蛋白表达。在一些实施例中,通过在细菌例如大肠杆菌中的位点特异性转座产生的重组杆粒DNA用于使用转染剂(例如Cellfectin®II)来转染昆虫细胞。关于杆状病毒表达系统的其他信息在美国专利申请号14/447,341、14/277,892和12/278,916中讨论,以上申请通过引用特此并入。

[0364] 昆虫细胞

[0365] 本文所述的蛋白质可以在用重组杆状病毒或杆粒DNA(例如,如上所述)感染或转染的昆虫细胞中表达。在一些实施例中,昆虫细胞包括:来源于草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的Sf9和Sf21细胞以及来源于粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)的Tn-368和High FiveTMBTI-TN-5B1-4细胞(也称为Hi5细胞)。在一些实施例中,来源于蛹期草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*, fall army worm)卵巢的昆虫细胞系Sf21和Sf9可以用于使用杆状病毒表达系统表达重组蛋白。在一些实施例中,Sf21和Sf9昆虫细胞可以在市售的补充血清的培养基或无血清培养基中培养。用于培养昆虫细胞的合适培养基包括:格雷斯科补充培养基(Grace's Supplemented, TNM-FH)、IPL-41、TC-100、施耐德果蝇培养基(Schneider's *Drosophila*)、SF-900II SFM和EXPRESS-FIVETMSFM。在一些实施例中,一些无血清培养基配制品利用磷酸盐缓冲系统将培养物pH维持在6.0-6.4范围内(Licari等人, *Insect cell hosts for baculovirus expression vectors contain endogenous exoglycosidase activity* [用于杆状病毒表达载体的昆虫细胞宿主含有内源性外切糖苷酶活性] . *Biotechnology Progress* [生物技术进展] 9:146-152 (1993) 和Drugmand等人, *Insect cells as factories for biomanufacturing* [作为生物制造工厂的昆虫细胞] . *Biotechnology Advances* [生物技术进展] 30:1140-1157 (2012)), 用于培养和重组蛋白产生。在一些实施例中,对于培养不同昆虫细胞系而言,可以使用6.0-6.8的pH。在一些实施例中,昆虫细胞在25℃至30℃的温度在通气情况下在悬浮液中培养或作为单层培养。关于昆虫细胞的其他信息在例如专利申请号14/564,512和14/775,154中讨论,以上每篇申请均通过引用特此并入。

[0366] 指环载体的组分和组装

[0367] 本文的组合物和方法可用于产生指环载体。如本文所述的,指环载体通常包含包封在蛋白质外壳(例如,包含由指环病毒ORF1核酸编码的多肽,例如,如本文所述)内的遗传元件(例如,单链环状DNA分子,例如,包含如本文所述的5' UTR区域)。在一些实施例中,遗传元件包含一个或多个编码指环病毒ORF(例如,指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2中的一种或多种)的序列。如本文所用的,指环病毒ORF或ORF分子(例如,指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2)包括包含与相应指环病毒ORF序列,例如,如PCT/US2018/037379或PCT/US19/65995(其各自通过引用以其全文并入本文)中所述的ORF序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列的多肽。在实施例中,遗传元件包含编码指环病毒ORF1或者其剪接变体或功能性片段(例如,胶冻卷区域,例如,如本文所述)的序列。在一些实施例中,蛋白质外壳包含由指环病毒ORF1核酸编码的多肽(例如,指环病毒ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段)。

[0368] 在一些实施例中,通过将遗传元件(例如,如本文所述)包封在蛋白质外壳(例如,如本文所述)内来组装指环载体。在一些实施例中,将遗传元件包封在宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞)的蛋白质外壳内。在一些实施例中,宿主细胞表达蛋白质外壳中包含的一种或多种多肽(例如,由指环病毒ORF1核酸编码的多肽,如ORF1分子)。例如,在一些实施例中,宿主细胞包含编码指环病毒ORF1分子,例如,指环病毒ORF1多肽(例如,野生型指环病毒ORF1蛋白或由野生型指环病毒ORF1核酸编码的多肽,例如,如本文所述)的剪接变体或功能性片段的核酸序列。在实施例中,编码指环病毒ORF1分子的核酸序列包含在宿主细胞中包含的核酸构建体(例如,质粒、病毒载体、病毒、微环、杆粒或人工染色体)中。在实施例中,编码指环病毒ORF1分子的核酸序列整合到宿主细胞的基因组中。

[0369] 在一些实施例中,宿主细胞包含遗传元件和/或包含遗传元件序列的核酸构建体。在一些实施例中,核酸构建体选自质粒、病毒核酸、微环、杆粒或人工染色体。在一些实施例中,将遗传元件从核酸构建体(例如,杆粒)上切离,并且任选地,从双链形式转化为单链形式(例如,通过变性)。在一些实施例中,遗传元件是通过聚合酶根据核酸构建体(例如,杆粒)中的模板序列生成的。在一些实施例中,聚合酶产生遗传元件序列的单链拷贝,其可以任选地进行环化以形成如本文所述的遗传元件。

[0370] 在一些实施例中,宿主细胞包含遗传元件构建体(例如,杆粒、质粒或微环)和包含一个或多个编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2 ORF分子)或其功能性片段的序列的杆粒。在一些实施例中,蛋白质外壳蛋白质从杆粒表达。在实施例中,从杆粒表达的蛋白质外壳蛋白质包封遗传元件,从而形成指环载体。在一些实施例中,杆粒包含适于核酸构建体在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中复制的骨架,例如,杆状病毒骨架区域。在一些实施例中,杆粒包含适于遗传元件构建体在细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞,例如,DH 10Bac细胞)中复制的骨架区域。在一些实施例中,遗传元件构建体包含适于核酸构建体在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中复制的骨架,例如,杆状病毒骨架区域。在一些实施例中,遗传元件构建体包含适于遗传元件构建体在细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞,例如,DH 10Bac细胞)中复制的骨架区域。在一些实施例中,将杆粒经由杆状病毒颗粒引入宿主细胞中。在实施例中,通过生产细胞例如昆虫细胞(例如,Sf9细胞)或细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞,例如,DH10Bac细胞)来产生杆粒。在实施例中,生产细胞包含杆粒和/或供体

载体,例如,如本文所述。在实施例中,生产细胞进一步包含足以用于杆粒和/或供体载体的复制的细胞机构。

[0371] ORF1分子,例如用于组装指环载体的ORF1分子

[0372] 例如,可以通过将遗传元件包封在蛋白质外壳内来制备指环载体。在一些实施例中,包封在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中发生。指环载体的蛋白质外壳通常包含由指环病毒ORF1核酸编码的多肽(例如,指环病毒ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段,例如,如本文所述)。在一些实施例中,指环病毒ORF1核酸被包含在杆粒或供体载体中,例如,如本文所述。在一些实施例中,杆粒进一步包含编码外源性效应物的序列(例如,遗传元件区域,例如,如本文所述)。在其他实施例中,杆粒不包含编码外源性效应物的序列(例如,杆粒不包含遗传元件区域,例如,如本文所述)。在一些实施例中,ORF1分子可以包含以下中的一种或多种:包含精氨酸富集区的第一区域,例如,具有至少60%碱性残基的区域(例如,至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%碱性残基;例如,60%-90%、60%-80%、70%-90%或70-80%碱性残基),和包含胶冻卷结构域的第二区域,例如,至少六个 β 链(例如,4、5、6、7、8、9、10、11或12个 β 折叠)。在实施例中,蛋白质外壳包含指环病毒ORF1精氨酸富集区、胶冻卷区域、N22结构域、高变区和/或C-末端结构域中的一种或多种(例如,1、2、3、4种或全部5种)。在一些实施例中,蛋白质外壳包含指环病毒ORF1胶冻卷区域(例如,如本文所述)。在一些实施例中,蛋白质外壳包含指环病毒ORF1精氨酸富集区(例如,如本文所述)。在一些实施例中,蛋白质外壳包含指环病毒ORF1 N22结构域(例如,如本文所述)。在一些实施例中,蛋白质外壳包含指环病毒高变区(例如,如本文所述)。在一些实施例中,蛋白质外壳包含指环病毒ORF1 C-末端结构域(例如,如本文所述)。

[0373] 在一些实施例中,指环载体包含ORF1分子和/或编码ORF1分子的核酸。一般而言,ORF1分子包括具有指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述的指环病毒ORF1蛋白)的结构特征和/或活性的多肽或其功能性片段。在一些实施例中,ORF1分子包含相对于指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述的指环病毒ORF1蛋白)的截短。在一些实施例中,ORF1分子是截短了至少10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650或700个氨基酸的指环病毒ORF1蛋白。在一些实施例中,ORF1分子包含与甲型细环病毒、乙型细环病毒或丙型细环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述)具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。ORF1分子通常可以结合核酸分子,例如DNA(例如,遗传元件,例如,如本文所述)。在一些实施例中,ORF1分子定位于细胞核。在某些实施例中,ORF1分子定位于细胞的核仁。

[0374] 不希望受到理论的束缚,ORF1分子可能能够与其他ORF1分子结合,例如,以形成蛋白质外壳(例如,如本文所述)。可以将这样的ORF1分子描述为具有形成衣壳的能力。在一些实施例中,蛋白质外壳可以包封核酸分子(例如,如本文所述的遗传元件,例如,使用杆粒、供体载体、杆状病毒或包含其的细胞产生的遗传元件,例如,如本文所述)。在一些实施例中,多个ORF1分子可形成多聚体,例如,以产生蛋白质外壳。在一些实施例中,多聚体可以是同型多聚体。在其他实施例中,多聚体可以是异型多聚体。

[0375] ORF2分子,例如用于组装指环载体的ORF2分子

[0376] 使用本文所述的组合物或方法产生指环载体可能涉及表达指环病毒ORF2分子(例如,如本文所述)或者其剪接变体或功能性片段。在一些实施例中,指环载体包含ORF2分子

或者其剪接变体或功能性片段,和/或编码ORF2分子或者其剪接变体或功能性片段的核酸。在一些实施例中,指环载体不包含ORF2分子或者其剪接变体或功能性片段,和/或编码ORF2分子或者其剪接变体或功能性片段的核酸。在一些实施例中,产生指环载体包括ORF2分子或者其剪接变体或功能性片段的表达,但是该ORF2分子未并入指环载体中。

[0377] 包含ORF分子编码序列的构建体

[0378] 在一些实施例中,通过核酸构建体(例如,杆粒)提供一个或多个ORF分子(例如,ORF1、ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和ORF1/2分子)或其剪接变体或功能性片段,该核酸构建体可以与遗传元件或包含遗传元件区域的核酸构建体分离。编码一个或多个ORF分子或其剪接变体或片段的核酸构建体可以包含骨架区域。在一些实施例中,骨架区域为适于核酸构建体在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中复制,例如,杆状病毒骨架区域。在实施例中,核酸构建体是杆粒。在一些实施例中,骨架区域适于核酸构建体在细菌细胞中复制。在一些实施例中,核酸构建物编码ORF1分子或其剪接变体或功能性片段。在一些实施例中,核酸构建体进一步包括遗传元件区域(例如,包含待被蛋白质外壳包封的遗传元件序列,例如,包含ORF1分子或其剪接变体或功能性片段,例如,由核酸构建体编码)。

[0379] 在一些实施例中,本文所述的方法涉及宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞),该宿主细胞包含编码一个或多个ORF分子的核酸构建体,例如,如上文所述。宿主细胞可以表达一个或多个ORF分子。在一些实施例中,宿主细胞表达能够从例如核酸构建体形成指环载体蛋白质外壳(例如,ORF1分子或其剪接变体或功能性片段)的多肽。在一些实施例中,将遗传元件构建体(例如,如本文所述)引入宿主细胞中(例如,在表达能够形成指环载体蛋白质外壳的多肽之前、同时或之后)。在其他实施例中,编码一个或多个ORF分子的核酸构建体也是遗传元件构建体(例如,包含遗传元件区域,例如,如本文所述)。在一些实施例中,遗传元件(例如,由遗传元件构建体产生的,例如,如本文所述)被包封在宿主细胞中的蛋白质外壳内,从而产生指环载体。在一些实施例中,从宿主细胞或周围上清液收获指环载体,例如,如本文所述。在一些实施例中,宿主细胞产生包含核酸构建体的杆状病毒颗粒。

[0380] 在一些实施例中,本文所述的方法涉及包含核酸构建体(例如,供体载体)的宿主细胞(例如,细菌细胞,例如,大肠杆菌细胞,例如,DH 10Bac细胞),该核酸构建体包含编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1和/或ORF1/2分子)或其功能性片段或剪接变体和/或遗传元件区域的序列。在一些实施例中,宿主细胞进一步包括杆粒(例如,缺少编码指环病毒ORF分子的序列和/或遗传元件区域的杆粒)。在一些实施例中,将编码指环病毒ORF分子或其功能性片段或剪接变体的序列转移到宿主细胞内的杆粒中。在一些实施例中,宿主细胞产生包含杆粒的杆状病毒颗粒,该杆粒包含转移的编码指环病毒ORF分子或其功能性片段或剪接变体的序列。在一些实施例中,将遗传元件区域转移到宿主细胞内的杆粒中。在一些实施例中,宿主细胞产生包含杆粒的杆状病毒颗粒,该杆粒包含转移的遗传元件区域。

[0381] 遗传元件构建体,例如,用于组装指环载体的遗传元件构建体

[0382] 如本文所述的指环载体的遗传元件可以从遗传元件构建体产生,该构建体包含遗传元件区域和任选的其他序列,例如杆粒(例如,包含杆状病毒基因组或其片段,例如,一个或多个杆状病毒元件)或供体载体骨架。一般而言,遗传元件构建体包含指环病毒5' UTR(例如,如本文所述)。遗传元件构建体可以是适于将遗传元件序列递送到宿主细胞中的任何核

酸构建体,其中该遗传元件可以包封在蛋白质外壳内。在一些实施例中,遗传元件构建体包含启动子。在一些实施例中,遗传元件构建体是线性核酸分子。在一些实施例中,遗传元件构建体是环状核酸分子(例如,质粒、杆粒、供体载体或微环,例如,如本文所述)。在一些实施例中,遗传元件构建体包含杆状病毒序列(例如,使得包含遗传元件构建体的昆虫细胞可以产生包含遗传元件构建体的遗传元件序列或其片段的杆状病毒)。在一些实施例中,遗传元件构建体可以是双链的。在其他实施例中,遗传元件是单链的。在一些实施例中,遗传元件构建体包含DNA。在一些实施例中,遗传元件构建体包含RNA。在一些实施例中,遗传元件构建体包含一个或多个经修饰的核苷酸。

[0383] 在一些方面,本披露内容提供了用于复制和繁殖如本文所述的指环载体的方法(例如,在细胞培养系统中),该方法可以包括以下步骤中的一个或多个:(a)将遗传元件(例如,线性化遗传元件)引入(例如,转染入)对指环载体感染敏感的细胞系中;(b)收获这些细胞,并且任选地分离出显示存在遗传元件的细胞;(c)根据实验条件和基因表达,培养在步骤(b)中获得的细胞(例如,持续至少三天,如至少一周或更长时间);以及(d)收获步骤(c)的细胞,例如,如本文所述的。

[0384] 质粒

[0385] 在一些实施例中,遗传元件构建体是质粒。质粒通常包含如本文所述的遗传元件序列以及适于在宿主细胞中复制的复制起点(例如,用于在细菌细胞中复制的细菌复制起点)和选择性标志(例如,抗生素抗性基因)。在一些实施例中,可以将遗传元件序列从质粒上切离。在一些实施例中,质粒能够在细菌细胞中复制。在一些实施例中,质粒能够在哺乳动物细胞(例如,人类细胞)中复制。在一些实施例中,质粒的长度为至少300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000或5000bp。在一些实施例中,质粒的长度小于600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000或10,000bp。在一些实施例中,质粒的长度为300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-1500、1500-2000、2000-2500、2500-3000、3000-4000或4000-5000bp。在一些实施例中,例如,可以将遗传元件从质粒上切离(例如,通过体外环化),以形成微环,例如,如本文所述的微环。在实施例中,遗传元件的切离将遗传元件序列从质粒骨架中分离出来(例如,将遗传元件从细菌骨架中分离出来)。在一些实施例中,质粒包含一个或多个杆状病毒元件(例如,杆状病毒基因组)。

[0386] 小型环状核酸构建体

[0387] 在一些实施例中,遗传元件构建体是环状核酸构建体,例如,缺少骨架(例如,缺少细菌复制起点和/或选择性标志)。在实施例中,遗传元件是双链环状核酸构建体。在实施例中,通过体外环化(IVC),例如,如本文所述的体外环化(IVC)来产生双链环状核酸构建体。在实施例中,可以将双链环状核酸构建体引入宿主细胞中,在宿主细胞中它可以转化为单链环状遗传元件或用作生成单链环状遗传元件的模板,例如,如本文所述的。在一些实施例中,环状核酸构建体不包含质粒骨架或其功能性片段。在一些实施例中,环状核酸构建体的长度为至少2000、2100、2200、2300、2400、2500、2600、2700、2800、2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400或4500bp。在一些实施例中,环状核酸构建体的长度小于2900、3000、3100、3200、3300、3400、3500、3600、3700、3800、3900、4000、4100、4200、4300、4400、4500、4600、4700、4800、4900、5000、5500或

6000bp。在一些实施例中,环状核酸构建体的长度为2000-2100、2100-2200、2200-2300、2300-2400、2400-2500、2500-2600、2600-2700、2700-2800、2800-2900、2900-3000、3000-3100、3100-3200、3200-3300、3300-3400、3400-3500、3500-3600、3600-3700、3700-3800、3800-3900、3900-4000、4000-4100、4100-4200、4200-4300、4300-4400或4400-4500bp。在一些实施例中,环状核酸构建体是微环。

[0388] 体外环化

[0389] 在一些情况下,要包装到蛋白质外壳内的遗传元件是单链环状DNA。在一些情况下,可以经由具有不同于单链环状DNA的形式的遗传元件构建体将遗传元件引入宿主细胞中。例如,遗传元件构建体可以是双链环状DNA。然后,双链环状DNA可以在宿主细胞(例如,包含用于滚环式复制的合适酶的宿主细胞,例如,指环病毒Rep蛋白,例如,Rep68/78、Rep60、RepA、RepB、Pre、MobM、TraX、TrwC、Mob02281、Mob02282、NikB、ORF50240、NikK、TecH、OrfJ或TraI,例如,如在以下文献中描述的:Wawrzyniak等人,2017,Front.Microbiol.[微生物学前沿]8:2353;就所列出的酶而言,通过引用并入本文)中转化为单链环状DNA。在一些实施例中,通过体外环化(IVC),例如,如在PCT/US19/65995的实例35中所述的体外环化(IVC),来产生双链环状DNA。

[0390] 一般而言,体外环化的DNA构建体可以通过酶切包含待包装的遗传元件序列的质粒来产生,使得将遗传元件序列作为线性DNA分子而切离。然后,可以连接由此产生的线性DNA,例如,使用DNA连接酶,以形成双链环状DNA。在一些情况下,由体外环化产生的双链环状DNA可以进行滚环式复制,例如,如本文所述的。不希望受到理论的束缚,设想体外环化产生双链DNA构建体,该构建体可以进行滚环式复制而无需进一步修饰,从而能够产生合适大小的单链环状DNA以包装到指环载体,例如,如本文所述的指环载体中。在一些实施例中,双链DNA构建体比质粒(例如,细菌质粒)小。在一些实施例中,将双链DNA构建体从质粒(例如,细菌质粒)上切离,然后进行环化,例如,通过体外环化。

[0391] 顺式/反式构建体

[0392] 在一些实施例中,如本文所述的遗传元件构建体(例如,杆粒或供体载体)包含一个或多个编码一种或多种指环病毒ORF,例如,蛋白质外壳组分(例如,由指环病毒ORF1核酸编码的多肽,例如,如本文所述)的序列。例如,遗传元件构建体可以包含编码指环病毒ORF1分子的核酸序列。这样的遗传元件构建体可适于将遗传元件和一种或多种指环病毒ORF以顺式引入宿主细胞中。在其他实施例中,如本文所述的遗传元件构建体不包含编码一种或多种指环病毒ORF,例如,蛋白质外壳组分(例如,由指环病毒ORF1核酸编码的多肽,例如,如本文所述)的序列。例如,遗传元件构建体可以不包含编码指环病毒ORF1分子的核酸序列。这样的遗传元件构建体可适用于将遗传元件引入宿主细胞中,其中一种或多种指环病毒ORF以反式提供(例如,经由引入编码一种或多种指环病毒ORF的第二核酸构建体,或者经由整合到宿主细胞基因组中的指环病毒ORF盒)。在一些实施例中,遗传元件构建体包含适于核酸构建体在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中复制的骨架,例如,杆状病毒骨架区域。在一些实施例中,遗传元件构建体包含适于遗传元件构建体在细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞,例如,DH 10Bac细胞)中复制的骨架区域。

[0393] 在一些实施例中,遗传元件构建体(例如,杆粒或供体载体)包含编码指环病毒ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段(例如,胶冻卷区域,例如,如本文所述)的序列。在

实施例中,不包含遗传元件序列的遗传元件部分包含编码指环病毒ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段的序列(例如,在包含启动子和编码指环病毒ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段的序列的盒中)。在另外的实施例中,包含遗传元件序列的构建体部分包含编码指环病毒ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段(例如,胶冻卷区域,例如,如本文所述)的序列。在实施例中,将这样的遗传元件包封在蛋白质外壳中(例如,如本文所述)产生了可复制型组分指环载体(例如,指环载体在感染细胞后,使细胞能够产生另外拷贝的指环载体,而无需将另外的核酸构建体,例如,编码一种或多种如本文所述的指环病毒ORF的核酸构建体引入细胞中)。

[0394] 在其他实施例中,遗传元件不包含编码指环病毒ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段(例如,胶冻卷区域,例如,如本文所述)的序列。在实施例中,将这样的遗传元件包封在蛋白质外壳中(例如,如本文所述)产生了非复制型指环载体(例如,指环载体在感染细胞后,不能使受感染细胞产生另外的指环载体,例如,在缺乏一种或多种另外构建体(例如,编码一种或多种如本文所述的指环病毒ORF)的情况下)。

[0395] 表达盒

[0396] 在一些实施例中,遗传元件构建体(例如,杆粒或供体载体)包含一个或多个用于表达多肽或非编码RNA(例如,miRNA或siRNA)的盒。在一些实施例中,遗传元件构建体包含用于表达效应物(例如,外源性或内源性效应物),例如,如本文所述的多肽或非编码RNA的盒。在一些实施例中,遗传元件构建体包含用于表达指环病毒蛋白(例如,指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2,或者其功能性片段)的盒。在一些实施例中,表达盒可以位于遗传元件序列内。在实施例中,效应物的表达盒位于遗传元件序列内。在实施例中,指环病毒蛋白的表达盒位于遗传元件序列内。在其他实施例中,表达盒位于遗传元件序列之外的遗传元件构建体内的某个位置(例如,在骨架中)。在实施例中,指环病毒蛋白的表达盒位于遗传元件序列之外的遗传元件构建体内的某个位置(例如,在骨架中)。

[0397] 多肽表达盒通常包含启动子和编码多肽的编码序列(例如,编码指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2或者其功能性片段的序列),该多肽例如是效应物(例如,如本文所述的外源性或内源性效应物)或指环病毒蛋白。可以包含在多肽表达盒中的示例性启动子(例如,以驱动多肽的表达)包括但不限于组成型启动子(例如,CMV、RSV、PGK、EF1a或SV40启动子)、细胞或组织特异性启动子(例如,骨骼肌 α -肌动蛋白启动子、肌球蛋白轻链2A启动子、抗肌萎缩蛋白启动子、肌肉型肌酸激酶启动子、肝白蛋白启动子、乙型肝炎病毒核心启动子、骨钙素启动子、骨唾液酸蛋白启动子、CD2启动子、免疫球蛋白重链启动子、T细胞受体 α 链启动子、神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子或神经丝蛋白轻链启动子)以及诱导型启动子(例如,锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子;地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺癌病毒(MMTV)启动子;T7聚合酶启动子系统、四环素阻遏系统、四环素诱导系统、RU486诱导系统、雷帕霉素诱导系统),例如,如本文所述的。在一些实施例中,表达盒进一步包含增强子,例如,如本文所述的增强子。

[0398] 遗传元件构建体的设计和产生

[0399] 各种方法可用于合成遗传元件构建体(例如,杆粒或供体载体)。例如,可以将遗传元件构建体序列分成更容易合成的更小的重叠片段(例如,范围为约100bp至约10kb的区段或单个ORF)。这些DNA区段由一组重叠的单链寡核苷酸合成。然后,将所得重叠合成子组装

成较大的DNA片段,例如,遗传元件构建体。可以将区段或ORF组装成遗传元件构建体,例如,通过体外重组或在5'和3'端的独特限制性位点来实现连接。

[0400] 可以用设计算法来合成遗传元件构建体,该设计算法将构建体序列解析为寡核苷酸长度的片段,考虑到序列空间的复杂性,从而为合成创造合适的设计条件。然后,在基于半导体的高密度芯片上以化学方式合成寡核苷酸,其中每个芯片上合成超过200,000个单独的寡核苷酸。通过组装技术,如BioFab®,来组装这些寡核苷酸,以由较小的寡核苷酸构建更长的DNA区段。这是以并行方式完成的,因此一次构建成百上千个合成的DNA区段。

[0401] 可以对每个遗传元件构建体或遗传元件构建体的区段进行序列验证。在一些实施例中,可以使用AnyDot.chips(德国Genovoxx公司)对RNA或DNA进行高通量测序,其允许监测生物学过程(例如,miRNA表达或等位基因变异性(SNP检测))。其他高通量测序系统包括在以下文献中披露的系统:Venter,J.等人,Science[科学]2001年2月16日;Adams,M.等人,Science[科学]2000年3月24日;和M.J,Levene等人Science[科学]299:682-686,2003年1月;以及美国申请公布号20030044781和2006/0078937。总体而言,这样的系统涉及对具有多个碱基的靶核酸分子进行测序,方法是经由在核酸分子上测量的聚合反应临时添加碱基,即实时跟踪待测序的模板核酸分子上的核酸聚合酶的活性。在一些实施例中,进行鸟枪法测序。

[0402] 可以设计遗传元件构建体,使得可以相对于遗传元件,以顺式或反式提供用于复制或包装的因子。例如,当以顺式提供时,遗传元件可以包含一种或多种编码指环病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3,例如,如本文所述的这些蛋白的基因。在一些实施例中,复制和/或包装信号可以并入遗传元件中,例如,以诱导扩增和/或封装。在一些实施例中,可以将效应物插入基因组中的特定位点。在一些实施例中,将一种或多种病毒ORF替换为效应物。

[0403] 在另一实例中,当复制或包装因子以反式提供时,遗传元件可能缺少编码指环病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3中一种或多种,例如,如本文所述的这些蛋白的基因;该一种或多种蛋白质可以由例如另一核酸,例如辅助核酸来提供。在一些实施例中,遗传元件中存在极小的顺式信号(例如,5' UTR和/或GC富集区)。在一些实施例中,遗传元件不编码复制或包装因子(例如,复制酶和/或衣壳蛋白)。在一些实施例中,这样的因子可由一种或多种辅助核酸(例如,辅助病毒核酸、辅助质粒或整合到宿主细胞基因组中的辅助核酸)提供。在一些实施例中,辅助核酸表达足以诱导扩增和/或包装的蛋白质和/或RNA,但可能缺乏它们自身的包装信号。在一些实施例中,将遗传元件和辅助核酸引入宿主细胞中(例如,同时进行或分别进行),结果是遗传元件而非辅助核酸的扩增和/或包装。

[0404] 在一些实施例中,可以使用计算机辅助设计工具来设计遗传元件构建体。

[0405] 在以下文献中描述了制备构建体的通用方法:例如,Khudyakov和Fields,Artificial DNA:Methods and Applications[人工DNA:方法与应用],CRC出版社(2002);Zhao,Synthetic Biology:Tools and Applications[合成生物学:工具和应用],(第一版),Academic Press[美国学术出版社](2013);以及Egli和Herdewijn,Chemistry and Biology of Artificial Nucleic Acids[人工核酸的化学与生物学],(第一版),Wiley-VCH[威利出版集团](2012)。

[0406] 效应物

[0407] 本文所述的组合物(例如,杆粒、供体载体、细胞和杆状病毒)和方法可用于产生包含编码效应物(例如,外源性效应物或内源性效应物),例如,如本文所述的效应物的序列的指环载体的遗传元件。在一些情况下,效应物可以是内源性效应物或外源性效应物。在一些实施例中,效应物是治疗性效应物。在一些实施例中,效应物包括多肽(例如,治疗性多肽或多肽,例如,如本文所述)。在一些实施例中,效应物包括非编码RNA(例如,miRNA、siRNA、shRNA、mRNA、lncRNA、RNA、DNA、反义RNA或gRNA)。在一些实施例中,效应物包括调节性核酸,例如,如本文所述的调节性核酸。

[0408] 在一些实施例中,可以将效应物编码序列插入遗传元件中,例如,在非编码区,例如,位于开放阅读框的3'方向和遗传元件GC富集区的5'方向的非编码区、在TATA盒上游的5'非编码区中、在5' UTR中、在多A信号下游或GC富集区上游的3'非编码区中。在一些实施例中,可以将效应物编码序列插入遗传元件中,例如,在编码序列中(例如,在编码例如,如本文所述的指环病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3和/或ORF2t/3的序列中)。在一些实施例中,效应物编码序列替换开放阅读框的全部或一部分。在一些实施例中,遗传元件包含与效应物编码序列可操作地连接的调节性序列(例如,启动子或增强子,例如,如本文所述)。

[0409] 在一些实施例中,包含效应物的遗传元件由如本文所述的遗传元件构建体(例如,杆粒)产生,例如,通过对位于其上的遗传元件序列进行滚环式复制。在一些实施例中,杆粒包含效应物编码序列的一个拷贝。在一些实施例中,杆粒包含编码指环病毒ORF蛋白(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2)或其功能性片段的一个或多个(例如,1、2、3、4、5或全部)序列。在一些实施例中,杆粒不包含一个或多个编码指环病毒ORF蛋白(例如,ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2)或其功能性片段的序列。在实施例中,杆粒不包含编码指环病毒ORF蛋白或其功能性片段的任何序列。

[0410] 宿主细胞

[0411] 本文所述的指环载体可以例如在宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞)中产生。一般而言,提供了宿主细胞,其包含指环载体遗传元件和指环载体蛋白质外壳的组分(例如,由指环病毒ORF1核酸编码的多肽或指环病毒ORF1分子)。在一些实施例中,宿主细胞包含编码指环载体蛋白质外壳的一种或多种组分的杆粒。在实施例中,指环载体蛋白质外壳的组分在宿主细胞中由杆粒表达。在一些实施例中,宿主细胞包含杆粒(例如,相同的杆粒或不同的杆粒),该杆粒包含指环载体遗传元件的序列。在实施例中,遗传元件由包含其序列的杆粒产生。然后,在适于将遗传元件包封在蛋白质外壳内的条件(例如,如本文所述的培养条件)下孵育宿主细胞。在一些实施例中,在适于从宿主细胞中释放指环载体,例如,释放到周围上清液中的条件下进一步孵育宿主细胞。在一些实施例中,裂解宿主细胞以从细胞裂解物中收获指环载体。在一些实施例中,可以将指环载体引入生长至高细胞密度的宿主细胞系。

[0412] 将遗传元件引入宿主细胞中

[0413] 可以将遗传元件或包含遗传元件的序列的核酸构建体引入宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞)中,该宿主细胞是例如包含指环载体蛋白质外壳的一种或多种组分(例如,ORF1分子或其功能性片段)的宿主细胞。在一些实施例中,将遗传元件本身引入宿主细胞中。在一些实施例中,将包含遗传元件序列的遗传元件构建体(例如,如本文所述)引入

宿主细胞中。例如,可以使用本领域已知的方法将遗传元件或遗传元件构建体引入宿主细胞中。例如,可以通过转染(例如,稳定转染或瞬时转染)将遗传元件或遗传元件构建体引入宿主细胞中。在实施例中,通过阳离子脂质体转染将遗传元件或遗传元件构建体引入宿主细胞中。在实施例中,通过磷酸钙转染将遗传元件或遗传元件构建体引入宿主细胞中。在一些实施例中,通过电穿孔将遗传元件或遗传元件构建体引入宿主细胞中。在一些实施例中,使用基因枪将遗传元件或遗传元件构建体引入宿主细胞中。在一些实施例中,通过核转染将遗传元件或遗传元件构建体引入宿主细胞中。在一些实施例中,通过PEI转染将遗传元件或遗传元件构建体引入宿主细胞中。在一些实施例中,通过使宿主细胞与包含遗传元件的指环载体接触,将遗传元件引入宿主细胞中。

[0414] 在实施例中,一旦引入宿主细胞中,遗传元件构建体就能够复制。在实施例中,一旦引入宿主细胞中,遗传元件就可以由遗传元件构建体产生。在一些实施例中,遗传元件通过聚合酶在宿主细胞中产生,例如,使用遗传元件构建体作为模板。

[0415] 在一些实施例中,将遗传元件或包含遗传元件的载体引入(例如,转染入)表达病毒聚合酶蛋白的细胞系中,以实现指环载体的表达。为此,可以将表达指环载体聚合酶蛋白的细胞系用作合适的宿主细胞。可以对宿主细胞进行类似地工程化,以提供其他病毒功能或其他功能。

[0416] 为了制备本文披露的指环载体,可以使用遗传元件构建体来转染提供复制和产生所需的指环载体蛋白和功能的宿主细胞。可替代地,可以在由本文披露的遗传元件或包含遗传元件的载体转染之前、期间或之后,用提供指环载体蛋白质和功能的第二构建体(例如,杆粒)转染宿主细胞。在一些实施例中,第二构建体可用于补充不完整病毒颗粒的产生。第二构建体(例如,杆粒)可能具有条件性生长缺陷,如宿主范围局限性或温度敏感性,例如,这允许随后对转染子病毒进行选择。在一些实施例中,第二构建体可以提供一种或多种由宿主细胞利用的复制蛋白,以实现指环载体的表达。在一些实施例中,可以用编码病毒蛋白例如一种或多种复制蛋白的载体转染宿主细胞。在一些实施例中,第二构建体具有抗病毒敏感性。

[0417] 在一些情况下,可以使用本领域已知的技术将本文披露的遗传元件或包含遗传元件的载体复制并产生到指环载体中。例如,在以下文献中描述了多种病毒培养方法:例如,美国专利号4,650,764;美国专利号5,166,057;美国专利号5,854,037;欧洲专利公开EP 0702085 A1;美国专利申请系列号09/152,845;国际专利公开PCT WO 97/12032;WO 96/34625;欧洲专利公开EP-A780475;WO 99/02657;WO 98/53078;WO 98/02530;WO 99/15672;WO 98/13501;WO 97/06270;和EP0 780 47SA1,其各自通过引用以其全文并入本文。

[0418] 用于以顺式或反式提供一种或多种指环病毒蛋白的方法

[0419] 在一些实施例(例如,本文所述的顺式实施例)中,遗传元件构建体(例如,杆粒)进一步包含一个或多个表达盒,这些表达盒包含指环病毒ORF(例如,指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2或者其功能性片段)的编码序列。在实施例中,遗传元件构建体包含表达盒,该表达盒包含指环病毒ORF1或者其剪接变体或功能性片段的编码序列。可以将包含效应物以及一种或多种指环病毒ORF表达盒的这样的遗传元件构建体引入宿主细胞中。在一些情况下,包含这样的遗传元件构建体的宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞)能够产生用于蛋白质外壳的遗传元件和组分,以及用于将遗传元件包封在蛋白质外

壳内的遗传元件和组分,而无需另外的核酸构建体或将表达盒整合到宿主细胞基因组中。换言之,这样的遗传元件构建体可用于在宿主细胞,例如,如本文所述的宿主细胞中的顺式指环载体产生方法。

[0420] 在一些实施例(例如,本文所述的反式实施例)中,遗传元件构建体不包含表达盒,该表达盒包含一种或多种指环病毒ORF(例如,指环病毒ORF1、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF1/1或ORF1/2或者其功能性片段)的编码序列。在实施例中,遗传元件构建体是杆粒。在实施例中,遗传元件构建体不是杆粒。在实施例中,遗传元件构建体不包含表达盒,该表达盒包含指环病毒ORF1或者其剪接变体或功能性片段的编码序列。可以将包含效应物表达盒但缺少一种或多种指环病毒ORF(例如,指环病毒ORF1或者其剪接变体或功能性片段)表达盒的这样的遗传元件构建体引入宿主细胞中。在一些情况下,包含这样的遗传元件构建体的宿主细胞可能需要另外的核酸构建体或将表达盒整合到宿主细胞基因组中,以产生指环载体的一种或多种组分(例如,蛋白质外壳蛋白质)。在一些实施例中,在缺乏编码指环病毒ORF1分子的另外核酸构建体的情况下,包含这样的遗传元件构建体的宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞)不能将遗传元件包封在蛋白质外壳内。换言之,这样的遗传元件构建体可用于在宿主细胞,例如,如本文所述的宿主细胞中的反式指环载体产生方法。

[0421] 辅助物

[0422] 在一些实施例中,将辅助构建体引入宿主细胞(例如,包含如本文所述的遗传元件构建体或遗传元件的宿主细胞)中,例如,昆虫细胞(例如,Sf9细胞)。在一些实施例中,在引入遗传元件构建体之前,将辅助构建体引入宿主细胞中。在一些实施例中,在引入遗传元件构建体的同时,将辅助构建体引入宿主细胞中。在一些实施例中,在引入遗传元件构建体之后,将辅助构建体引入宿主细胞中。

[0423] 示例性细胞类型

[0424] 适于产生指环载体的示例性宿主细胞包括但不限于昆虫细胞(例如,Sf9细胞、Sf21细胞或Hi5细胞),例如,如本文所述。在一些实施例中,昆虫细胞来源于家蚕、甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)、草地贪夜蛾、粉纹夜蛾或黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)。

[0425] 在一些实施例中,将指环载体在连续昆虫细胞系(例如,可以连续传代的永生细胞系)中培养。

[0426] 培养条件

[0427] 可以在适于将遗传元件包封在蛋白质外壳内的条件下,孵育包含遗传元件和蛋白质外壳组分的宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞),从而产生指环载体。合适的培养条件包括例如实例1、9-11和13-15中所述的那些条件。在一些实施例中,将宿主细胞在液体培养基(例如,格雷斯补充培养基(Grace's Supplemented)(TNM-FH)、IPL-41、TC-100、果蝇培养基(Schneider's *Drosophila*)、SF-900II SFM或EXPRESS-FIVETmSFM)中孵育。在一些实施例中,将宿主细胞以贴壁培养形式孵育。在一些实施例中,将宿主细胞以悬浮培养形式孵育。在一些实施例中,将宿主细胞在试管、瓶子、微载剂或烧瓶中孵育。在一些实施例中,将宿主细胞在培养皿或孔(例如,板上的孔)中孵育。在一些实施例中,在适于宿主细胞增殖的条件下孵育宿主细胞。在一些实施例中,在适于宿主细胞将其中产生的指环载体释放到周围上清液中的条件下孵育宿主细胞。

[0428] 根据本发明的含指环载体的细胞培养物的产生可以以不同的规模进行(例如,在

烧瓶、滚瓶或生物反应器中)。用于培养待感染细胞的培养基通常包含细胞存活所需的标准营养物质,但根据细胞类型还可以包含其他营养物质。任选地,培养基可以不含蛋白质和/或不含血清。根据细胞类型,可以将细胞悬浮培养或在基质上培养。在一些实施例中,不同的培养基用于宿主细胞的生长和产生指环载体。

[0429] 收获

[0430] 可以收获由宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞)产生的指环载体,例如,根据本领域已知的方法。例如,由培养中的宿主细胞释放到周围上清液中的指环载体可以从上清液中收获(例如,如实例10中所述)。在一些实施例中,从宿主细胞中分离出上清液以获得指环载体。在一些实施例中,在收获之前或收获期间裂解宿主细胞。在一些实施例中,指环载体是从宿主细胞裂解物中收获的(例如,如实例16中所述)。在一些实施例中,从宿主细胞裂解物和上清液中收获指环载体。在一些实施例中,根据已知的病毒生产方法来纯化和分离指环载体,例如,如在以下文献中描述的方法:Rinaldi等人,DNA Vaccines:Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) [DNA疫苗:方法和方案(分子生物学方法)],第3版2014,Humana Press[胡马纳出版社](其通过引用以其全文并入本文)。在一些实施例中,在与药用赋形剂一起配制之前,可以通过基于生物物理学特性的溶质分离,例如,离子交换层析或切向流过滤,来收获和/或纯化指环载体。

[0431] 富集和纯化

[0432] 可以纯化和/或富集收获的指环载体,例如,以产生指环载体制剂。在一些实施例中,从收获溶液中存在的其他成分或污染物中分离出收获的指环载体,例如,使用本领域已知的纯化病毒颗粒的方法(例如,通过沉降、层析和/或超滤进行纯化)。在一些实施例中,纯化步骤包括从制剂中去除血清、宿主细胞DNA、宿主细胞蛋白质、缺少遗传元件的颗粒和/或酚红中的一种或多种。在一些实施例中,相对于收获溶液中存在的其他成分或污染物,富集收获的指环载体,例如,使用本领域已知的富集病毒颗粒的方法。

[0433] 在一些实施例中,由此产生的制剂或包含该制剂的药物组合物在可接受的期限和温度范围内是稳定的,和/或与所期望的施用途径和/或该施用途径所期望的任何装置,例如,针头或注射器相容。

[0434] II. 指环载体

[0435] 在一些方面,本文所述的本发明包括使用和制备指环载体、指环载体制剂和治疗性组合物的组合物和方法。在一些实施例中,使用如本文所述的杆粒来制备指环载体。在某些实施例中,指环载体的遗传元件。在一些实施例中,指环载体包含一种或多种核酸或多肽,这些核酸或多肽包含基于指环病毒(例如,如本文所述的指环病毒)或者其片段或部分或者其他基本上非致病性病毒(例如,共生病毒(symbiotic virus)、共栖病毒(commensal virus)、原生病毒)的序列、结构和/或功能。在一些实施例中,基于指环病毒的指环载体包含至少一个针对该指环病毒而言具有外源性的元件,例如,外源性效应物或编码位于指环载体遗传元件内的外源性效应物的核酸序列。在一些实施例中,基于指环病毒的指环载体包含至少一个针对来自该指环病毒的另一元件具有异源性的元件,例如,效应物编码核酸序列,其针对另一相连的核酸序列,如启动子元件,具有异源性。在一些实施例中,指环载体包含遗传元件(例如,环状DNA,例如,单链DNA),其包含至少一个相对于该遗传元件的其余部分和/或蛋白质外壳而言具有异源性的元件(例如,编码效应物的外源性元件,例如,如本

文所述)。指环载体可以是用于使有效载荷进入宿主,例如人类中的递送媒介物(例如,基本上非致病性递送媒介物)。在一些实施例中,指环载体能够在真核细胞,例如,哺乳动物细胞,如人类细胞中复制。在一些实施例中,指环载体在哺乳动物(例如,人类)细胞中是基本上非致病性的和/或基本上非整合的。在一些实施例中,指环载体在哺乳动物,例如人类中是基本上非免疫原性的。在一些实施例中,指环载体是复制缺损型。在一些实施例中,指环载体是可复制型。

[0436] 在一些实施例中,指环载体包含愈合子(curon)或其组分(例如,遗传元件,例如,包含编码效应物和/或蛋白质外壳的序列),例如,如PCT申请号PCT/US2018/037379中所述的,其通过引用以其全文并入本文。在一些实施例中,指环载体包含指环载体或其组分(例如,遗传元件,例如,包含编码效应物和/或蛋白质外壳的序列),例如,如PCT申请号PCT/US19/65995中所述的,其通过引用以其全文并入本文。

[0437] 在一方面,本发明包括指环载体,该指环载体包含:(i) 遗传元件,其包含启动子元件、编码效应物(例如,内源性效应物或外源性效应物,例如,有效载荷)的序列和蛋白结合序列(例如,外壳蛋白结合序列,例如,包装信号),其中该遗传元件是单链DNA,并具有以下特性之一或二者:是环状的和/或整合到真核细胞基因组中的频率低于进入细胞的遗传元件的约0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%;以及(ii) 蛋白质外壳;其中该遗传元件包封在该蛋白质外壳内;并且其中该指环载体能够将遗传元件递送到真核细胞中。

[0438] 在本文所述的指环载体的一些实施例中,遗传元件整合的频率低于进入细胞的遗传元件的约0.001%、0.005%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、1.5%或2%。在一些实施例中,低于约0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、2%、3%、4%或5%的来自施用于受试者的多种指环载体的遗传元件将整合到受试者中一种或多种宿主细胞的基因组中。在一些实施例中,指环载体,例如,如本文所述的指环载体群体的遗传元件整合到宿主细胞基因组中的频率低于同类的AAV病毒群体的频率,例如,其频率比同类的AAV病毒群体低约50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多。

[0439] 在一方面,本发明包括指环载体,该指环载体包含:(i) 遗传元件,其包含启动子元件和编码效应物(例如,内源性效应物或外源性效应物,例如,有效载荷)的序列,以及蛋白结合序列(例如,外壳蛋白结合序列),其中该遗传元件与野生型指环病毒序列(例如,野生型细环病毒(TTV)、小细环病毒(TTMV)或TTMDV序列,例如,如本文所述的野生型指环病毒序列)具有至少75%(例如,至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性;以及(ii) 蛋白质外壳;其中该遗传元件包封在该蛋白质外壳内;并且其中该指环载体能够将遗传元件递送到真核细胞中。

[0440] 在一个方面中,本发明包括指环载体,该指环载体包含:

[0441] a) 遗传元件,其包含(i) 编码外壳蛋白(例如,非致病性外壳蛋白)的序列,(ii) 使该遗传元件与该非致病性外壳蛋白结合的外壳蛋白结合序列,和(iii) 编码效应物(例如,内源性效应物或外源性效应物)的序列;以及

[0442] b) 蛋白质外壳,其与该遗传元件相关联,例如,包裹或包封该遗传元件。

[0443] 在一些实施例中,指环载体包括来自非包膜环状单链DNA病毒的序列或表达产物(或与其具有>70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、100%同源性)。动物性

环状单链DNA病毒通常是指感染真核非植物宿主并具有环状基因组的单链DNA (ssDNA) 病毒亚群。因此,动物性环状ssDNA病毒可区别于感染原核生物的ssDNA病毒(即,微小噬菌体科和丝状噬菌体科)和感染植物的ssDNA病毒(即,双生病毒科和矮化病毒科)。它们也可区别于感染非植物真核生物的线性ssDNA病毒(即,细小病毒科)。

[0444] 在一些实施例中,指环载体调节宿主细胞功能,例如,短暂或长期调节。在某些实施例中,细胞功能发生稳定改变,例如持续存在以下时间的调节:至少约1小时至约30天,或至少约2小时、6小时、12小时、18小时、24小时、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、60天或更长时间或者其间的任何时间。在某些实施例中,细胞功能发生短暂改变,例如持续存在以下时间的调节:不超过约30分钟至约7天,或不超过约1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、24小时、36小时、48小时、60小时、72小时、4天、5天、6天、7天或其间的任何时间。

[0445] 在一些实施例中,遗传元件包括启动子元件。在实施例中,启动子元件选自RNA聚合酶II依赖性启动子、RNA聚合酶III依赖性启动子、PGK启动子、CMV启动子、EF-1 α 启动子、SV40启动子、CAGG启动子或UBC启动子、TTV病毒启动子、组织特异性启动子、U6 (polIII)、具有活化蛋白 (TetR-VP16、Gal4-VP16、dCas9-VP16等) 的上游DNA结合位点的最小CMV启动子。在实施例中,启动子元件包含TATA盒。在实施例中,启动子元件对于野生型指环病毒,例如,如本文所述的野生型指环病毒而言是内源性的。

[0446] 在一些实施例中,遗传元件包括以下特征中的一种或多种:单链、环状、负链和/或DNA。在实施例中,遗传元件包括附加体。在一些实施例中,除效应物之外的遗传元件部分的组合大小为约2.5kb-5kb(例如,约2.8kb-4kb、约2.8kb-3.2kb、约3.6kb-3.9kb或约2.8kb-2.9kb)、小于约5kb(例如,小于约2.9kb、3.2kb、3.6kb、3.9kb或4kb)或至少100个核苷酸(例如,至少1kb)。

[0447] 在一些情况下,如本文所述的指环载体、包含指环载体的组合物、使用这样的指环载体的方法等部分基于实例,这些实例说明了不同的效应物(例如,miRNA(例如,针对IFN或miR-625)、shRNA等)和蛋白结合序列(例如,与衣壳蛋白如Q99153结合的DNA序列)如何与蛋白质外壳(例如,在Arch Virol[病毒学档案](2007) 152:1961-1975中披露的衣壳)组合,以产生随后可用于将效应物递送至细胞(例如,动物细胞,例如,人类细胞或非人动物细胞,如猪或小鼠细胞)的指环载体。在实施例中,效应物可以沉默某种因子如干扰素的表达。实例进一步描述了如何通过可以将效应物插入序列,例如,源自指环病毒的序列中来制备指环载体。正是基于这些实例,下文中的描述设想了实例中所考虑的具体发现和组合的各种变型。例如,技术人员将从实例中理解的是,特定miRNA仅用作效应物的实例,而其他效应物可以是例如其他调节性核酸或治疗性肽。类似地,实例中使用的特定衣壳可以替换为下文所述的基本上非致病性蛋白质。在实例中描述的特定指环病毒序列也可以替换为下文描述的指环病毒序列。这些考虑同样适用于蛋白结合序列、调节性序列如启动子等。独立于此,本领域技术人员将特别考虑与实例紧密相关的这些实施例。

[0448] 在一些实施例中,将指环载体或指环载体中包含的遗传元件引入细胞(例如,人类细胞)中。在一些实施例中,例如,一旦已将指环载体或遗传元件引入细胞(例如,人类细胞)

中,效应物(例如,RNA,如miRNA),例如,由指环载体的遗传元件编码的效应物就在该细胞中表达。在实施例中,将指环载体或其中包含的遗传元件引入细胞中,调节(例如,提高或降低)细胞中靶分子(例如,靶核酸,如RNA,或靶多肽)的水平,例如,通过改变细胞对靶分子的表达水平。在实施例中,引入指环载体或其中包含的遗传元件,降低细胞产生的干扰素水平。在实施例中,将指环载体或其中包含的遗传元件引入细胞中,调节(例如,提高或降低)细胞的功能。在实施例中,将指环载体或其中包含的遗传元件引入细胞中,调节(例如,提高或降低)细胞的活力。在实施例中,将指环载体或其中包含的遗传元件引入细胞中,降低细胞(例如,癌细胞)的活力。

[0449] 在一些实施例中,本文所述的指环载体(例如,合成指环载体)诱发的抗体阳性率低于70%(例如,低于约60%、50%、40%、30%、20%或10%的抗体阳性率)。在实施例中,根据本领域已知的方法确定抗体阳性率。在实施例中,通过检测生物样品中针对指环病毒(例如,如本文所述)或基于其的指环载体的抗体来确定抗体阳性率,例如,根据在以下文献中描述的抗TTV抗体检测方法:Tsuda等人(1999;J.Virol.Methods[病毒学方法杂志]77:199-206;其通过引用并入本文)和/或根据在以下文献中描述的用于测定抗TTV IgG血清阳性率的方法:Kakkola等人(2008;Virology[病毒学]382:182-189;其通过引用并入本文)。还可以通过本领域用于检测抗病毒抗体的方法来检测针对指环病毒或基于其的指环载体的抗体,例如,检测抗AAV抗体的方法,例如,在以下文献中描述的方法:Calcedo等人(2013;Front.Immunol.[免疫学前沿]4(341):1-7;其通过引用并入本文)。

[0450] 在一些实施例中,复制缺损型、复制缺陷型或非复制型遗传元件不编码遗传元件复制所需的所有必要机构或组分。在一些实施例中,复制缺陷型遗传元件不编码复制因子。在一些实施例中,复制缺陷型遗传元件不编码一种或多种ORF(例如,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3和/或ORF2t/3,例如,如本文所述)。在一些实施例中,可以以反式提供不由遗传元件编码的机构或组分(例如,使用辅助物,例如辅助病毒或辅助质粒,或者在由宿主细胞包含的核酸中编码,例如整合到宿主细胞的基因组中),例如,使得遗传元件可以在以反式提供的机构或组分存在的情况下进行复制。

[0451] 在一些实施例中,包装缺损型、包装缺陷型或非包装型遗传元件不能被包装到蛋白质外壳(例如,其中蛋白质外壳包含衣壳或其部分,例如,包含由ORF1核酸编码的多肽,例如,如本文所述)中。在一些实施例中,与野生型指环病毒(例如,如本文所述)相比,包装缺损型遗传元件被包装到蛋白质外壳中的效率低于10%(例如,低于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.01%或0.001%)。在一些实施例中,即使在存在允许包装野生型指环病毒遗传元件(例如,如本文所述)的因子(例如,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、或ORF2t/3)的情况下,包装缺陷型遗传元件也不能被包装到蛋白质外壳中。在一些实施例中,即使在存在允许包装野生型指环病毒遗传元件(例如,如本文所述)的因子(例如,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3)的情况下,与野生型指环病毒(例如,如本文所述)相比,包装缺损型遗传元件被包装到蛋白质外壳中的效率也低于10%(例如,低于10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.1%、0.01%或0.001%)。

[0452] 在一些实施例中,可包装型遗传元件可被包装到蛋白质外壳(例如,其中蛋白质外壳包含衣壳或其部分,例如,包含由ORF1核酸编码的多肽,例如,如本文所述)中。在一些实

施例中,与野生型指环病毒(例如,如本文所述)相比,可包装型遗传元件被包装到蛋白质外壳中的效率为至少20%(例如,至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更高)。在一些实施例中,在存在允许包装野生型指环病毒遗传元件(例如,如本文所述)的因子(例如,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、或ORF2t/3)的情况下,可包装型遗传元件可以被包装到蛋白质外壳中。在一些实施例中,在存在允许包装野生型指环病毒遗传元件(例如,如本文所述)的因子(例如,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3或ORF2t/3)的情况下,与野生型指环病毒(例如,如本文所述)相比,可包装型遗传元件被包装到蛋白质外壳中的效率为至少20%(例如,至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或更高)。

[0453] 指环病毒

[0454] 在一些实施例中,指环载体,例如,如本文所述的指环载体包含源自指环病毒的序列或表达产物。在一些实施例中,指环载体包括一个或多个相对于指环病毒而言具有外源性的序列或表达产物。在一些实施例中,指环载体包括一个或多个相对于指环病毒而言具有内源性的序列或表达产物。在一些实施例中,指环载体包括一个或多个相对于指环载体中一个或多个其他序列或表达产物而言具有异源性的序列或表达产物。指环病毒通常具有负极性的单链环状DNA基因组。指环病毒通常与任何人类疾病都无关联。然而,试图将指环病毒感染与人类疾病联系起来的努力受到以下因素的妨碍:在一个或多个对照队列群体中无症状指环病毒病毒血症的高发生率、指环病毒病毒家族内显著的基因组多样性、历史上无法在体外繁殖该病原体以及缺乏指环病毒疾病的一种或多种动物模型(Yzebe等人, *Panminerva Med.* [意大利医学会志] (2002) 44:167-177; Biagini, P., *Vet. Microbiol.* [兽医微生物学] (2004) 98:95-101)。

[0455] 指环病毒通常是通过口鼻或粪口感染、母婴传播和/或子宫内传播而传播的(Gerner等人, *Ped. Infect. Dis. J.* [儿科传染病杂志] (2000) 19:1074-1077)。在一些情况下,感染者的特征可能是长期(数月至数年)的指环病毒病毒血症。人类可能同时感染多于一种的基因群或毒株(Saback等人, *Scad. J. Infect. Dis.* [斯堪的纳维亚传染病杂志] (2001) 33:121-125)。有迹象表明这些基因群可以在受感染的人体内重组(Rey等人, *Infect.* [感染] (2003) 31:226-233)。双链同工型(可复制)中间体已在多种组织中发现,如肝脏、外周血单个核细胞和骨髓(Kikuchi等人, *J. Med. Virol.* [医学病毒学杂志] (2000) 61:165-170; Okamoto等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* [生物化学与生物物理研究通讯] (2002) 270:657-662; Rodriguez-Inigo等人, *Am. J. Pathol.* [美国病理学杂志] (2000) 156:1227-1234)。

[0456] 在一些实施例中,遗传元件包含编码以下的核苷酸序列:氨基酸序列或其功能性片段或与本文所述的氨基酸序列中任一个(例如,指环病毒氨基酸序列)具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0457] 在一些实施例中,如本文所述的指环载体包含一种或多种核酸分子(例如,如本文所述的遗传元件),这些核酸分子包含与指环病毒序列,例如,如本文所述的指环病毒序列或者其片段具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0458] 在一些实施例中,如本文所述的指环载体包含一种或多种核酸分子(例如,如本文

所述的遗传元件),这些核酸分子包含与指环病毒(例如,如本文所述的指环病毒)的TATA盒、加帽位点、起始元件、转录起始位点、5' UTR保守结构域、ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3、三个开放阅读框区域、多(A)信号、GC富集区或其任何组合中的一种或多种具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施例中,核酸分子包含编码衣壳蛋白,例如,本文所述任一指环病毒的ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3的序列。在实施例中,核酸分子包含编码衣壳蛋白的序列,该衣壳蛋白包含与指环病毒ORF1蛋白(或者其剪接变体或功能性片段)或由指环病毒ORF1核酸编码的多肽具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0459] 在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒ORF1核酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒ORF1/1核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒ORF1/2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒ORF2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒ORF2/2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒ORF2/3核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒ORF2t/3核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒TATA盒核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒起始元件核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒转录起始位点核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒5' UTR保守结构域核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒三个开放阅读框区域核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒多(A)信号核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表A1的指环病毒GC富集核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。

[0460] 在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒ORF1核酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒ORF1/1核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒ORF1/2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒ORF2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒ORF2/2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒ORF2/3核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒TATA盒核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒起始元件核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒转录起始位点核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒5' UTR保守结构域核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒三个开放阅读框区域核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒多(A)信号核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表B1的指环病毒GC富集核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。

[0461] 在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒ORF1核酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒ORF1/1核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒ORF1/2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒ORF2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒ORF2/2核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒ORF2/3核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒TAIP核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒TATA盒核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒起始元件核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例

中,核酸分子包含与表C1的指环病毒转录起始位点核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒5' UTR保守结构域核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒三个开放阅读框区域核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒多(A)信号核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在实施例中,核酸分子包含与表C1的指环病毒GC富集核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。

[0462] 在一些实施例中,遗传元件包含编码以下的核苷酸序列:氨基酸序列或其功能性片段或与本文所述的氨基酸序列中任一个(例如,指环病毒氨基酸序列)具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0463] 在一些实施例中,如本文所述的指环载体包含一种或多种核酸分子(例如,如本文所述的遗传元件),这些核酸分子包含与指环病毒序列,例如,如本文所述的指环病毒序列或者其片段具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在实施例中,指环载体包含选自如表A1-M2中任一个所示的序列或与其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列的核酸序列。在实施例中,指环载体包含多肽,该多肽包含表A2-M2中任一个所示的序列,或与其具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。

[0464] 在一些实施例中,如本文所述的指环载体包含一种或多种核酸分子(例如,如本文所述的遗传元件),这些核酸分子包含与本文所述的指环病毒中任一个的TATA盒、加帽位点、起始元件、转录起始位点、5' UTR保守结构域、ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3、三个开放阅读框区域、多(A)信号、GC富集区或其任何组合中的一种或多种具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列(例如,表A-M中任一个所注释的指环病毒序列或表A-M中任一个所列序列编码的指环病毒序列)。在一些实施例中,核酸分子包含编码衣壳蛋白,例如,本文所述任一指环病毒的ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3序列(例如,表A-M中任一个所注释的指环病毒序列或表A-M中任一个所列序列编码的指环病毒序列)。在实施例中,核酸分子包含编码衣壳蛋白的序列,该衣壳蛋白包含与指环病毒ORF1或ORF2蛋白(例如,表A2-M2中任一个所示的ORF1或ORF2氨基酸序列,或者由表A1-M1中任一个所示的核酸序列编码的ORF1或ORF2氨基酸序列)具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在实施例中,核酸分子包含编码衣壳蛋白的序列,该衣壳蛋白包含与指环病毒ORF1蛋白(例如,表A2-M2中任一个所示的ORF1氨基酸序列,或者由表A1-M1中任一个所示的核酸序列编码的ORF1氨基酸序列)具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0465] 在一些实施例中,如本文所述的指环载体是嵌合指环载体。在一些实施例中,嵌合指环载体进一步包含一种或多种来自除指环病毒以外的病毒的元件、多肽或核酸。

[0466] 在实施例中,嵌合指环载体包含多种多肽(例如,指环病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3和/或ORF2t/3),这些多肽包含来自多种不同指环病毒(例如,如本文所述的指环病毒)的序列。例如,嵌合指环载体可以包含来自一种指环病毒的ORF1分子(例如,Ring1 ORF1分子,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1分子);和来自不同指环病毒的ORF2分子(例如,Ring2 ORF2分子,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2分子)。在另一实例中,嵌合指环载体可以包含来自一种指环病毒的第一ORF1分子(例如,Ring1 ORF1分子,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1分子)和来自不同指环病毒的第二ORF1分子(例如,Ring2 ORF1分子,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1分子)。

[0467] 在一些实施例中,指环载体包含嵌合多肽(例如,指环病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3和/或ORF2t/3),例如,该嵌合多肽包含至少一个来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的部分和至少一个来自不同病毒(例如,如本文所述)的部分。

[0468] 在一些实施例中,指环载体包含嵌合多肽(例如,指环病毒ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3和/或ORF2t/3),例如,该嵌合多肽包含至少一个来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的部分和至少一个来自不同指环病毒(例如,如本文所述)的部分。在实施例中,指环载体包含嵌合ORF1分子,其包含来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的ORF1分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1分子的至少一个部分,和来自不同指环病毒(例如,如本文所述)的ORF1分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1分子的至少一个部分。在实施例中,嵌合ORF1分子包含来自一种指环病毒的ORF1胶冻卷结构域,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列;和来自不同指环病毒的ORF1氨基酸子序列(例如,如本文所述)或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在实施例中,嵌合ORF1分子包含来自一种指环病毒的ORF1精氨酸富集区,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列;和来自不同指环病毒的ORF1氨基酸子序列(例如,如本文所述),或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在实施例中,嵌合ORF1分子包含来自一种指环病毒的ORF1高变结构域,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列;和来自不同指环病毒的ORF1氨基酸子序列(例如,如本文所述),或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在实施例中,嵌合ORF1分子包含来自一种指环病毒的ORF1N22结构域,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列;和来自不同指环病毒的ORF1氨基酸子序列(例如,如本文所述),或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在实施例中,嵌合ORF1分子包含来自一种指环病毒的ORF1 C-末端结构域,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列;和来自不同指环病毒的ORF1氨基酸子序列(例如,如本文所述),或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0469] 在实施例中,指环载体包含嵌合ORF1/1分子,其包含来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的ORF1/1分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1/1分子的至少一个部分,和来自不同指环病毒(例如,如本文所述)的ORF1/1分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1/1分子的至少一个部分。在实施例中,指环载体包含嵌合ORF1/2分子,其包含来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的ORF1/2分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1/2分子的至少一个部分,和来自不同指环病毒(例如,如本文所述)的ORF1/2分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF1/2分子的至少一个部分。在实施例中,指环载体包含嵌合ORF2分子,其包含来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的ORF2分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2分子的至少一个部分,和来自不同指环病毒(例如,如本文所述)的ORF2分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2分子的至少一个部分。在实施例中,指环载体包含嵌合ORF2/2分子,其包含来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的ORF2/2分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2/2分子的至少一个部分,和来自不同指环病毒(例如,如本文所述)的ORF2/2分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2/2分子的至少一个部分。在实施例中,指环载体包含嵌合ORF2/3分子,其包含来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的ORF2/3分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2/3分子的至少一个部分,和来自不同指环病毒(例如,如本文所述)的ORF2/3分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2/3分子的至少一个部分。在实施例中,指环载体包含嵌合ORF2T/3分子,其包含来自一种指环病毒(例如,如本文所述)的ORF2T/3分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2T/3分子的至少一个部分,和来自不同指环病毒(例如,如本文所述)的ORF2T/3分子或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%氨基酸序列同一性的ORF2T/3分子的至少一个部分。

[0470] 例如,在PCT申请号PCT/US2018/037379和PCT/US19/65995(其通过引用以其全文并入本文)中描述了其他示例性指环病毒基因组,其中包含的序列或子序列可用于本文所述的组合物和方法中(例如,以形成指环载体的遗传元件或作为杆粒中的遗传元件序列,例如,如本文所述)。在一些实施例中,示例性指环病毒序列包含如PCT/US19/65995(其通过引用并入本文)的表A1、A3、A5、A7、A9、A11、B1-B5、1、3、5、7、9、11、13、15或17中任一个所列的核酸序列。在一些实施例中,示例性指环病毒序列包含如PCT/US19/65995(其通过引用并入本文)的表A2、A4、A6、A8、A10、A12、C1-C5、2、4、6、8、10、12、14、16或18中任一个所列的氨基酸序列。在一些实施例中,示例性指环病毒序列包含ORF1分子序列或编码其的核酸序列,例如,如PCT/US19/65995(其通过引用并入本文)的表21、23、25、27、29、31、33、35、D2、D4、D6、D8、D10或37A-37C中任一个所列。

[0471] 表A1. 示例性指环病毒核酸序列(甲型细环病毒,分支3)

[0472] 名称 Ring1

[0473] 属/分支 甲型细环病毒,分支3

[0474] 登录号 AJ620231.1

[0475] 全序列:3753bp

1	10	20	30	40	50

[0476] TGCTACGTCACCTAACCACGTCCTCTACAGGCCAATCGCAGTCTATGT

CGTGCACTTCCTGGGCATGGTCTACATAATTATATAAATGCTTGCACTTC

[0477]

CGAATGGCTGAGTTTTTGTGCTGCCCCGTCCGCGGAGAGGAGCCACGGCAGGG
GATCCGAACGTCTTGAGGGCGGGTGCCGGAGGTGAGTTTACACACCGAAG
TCAAGGGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCTTTGGGCAAGGCTCTT
AAAAATGCACTTTTCTCGAATAAGCAGAAAAGAAAAGGAAAGTGCTACTGC
TTTGCGTGCCAGCAGCTAAGAAAAAACCACTGCTATGAGCTTCTGGAAA
CCTCCGGTACACAATGTACGGGGATCCAACGCATGTGGTATGAGTCCTT
TCACCGTGGCCACGCTTCTTTTTGTGGTTGTGGGAATCCTATACTTCACA
TTACTGCACTTGCTGAAACATATGGCCATCCAACAGGCCCGAGACCTTCT
GGGCCACCGGAGTAGACCCCAACCCCAACATCCGTAGAGCCAGGCCTGC
CCCGGCCGCTCCGGAGCCCTCACAGGTTGATTCGAGACCAGCCCTGACAT
GGCATGGGGATGGTGGAAGCGACGGAGGCGCTGGTGGTTCCGGAAGCGGT
GGACCCGTGGCAGACTTCGCAGACGATGGCCTCGATCAGCTCGTCGCCGC
CCTAGACGACGAAGAGTAAGGAGGCGCAGACGGTGGAGGAGGGGGAGACG
AAAAACAAGGACTTACAGACGCAGGAGACGCTTTAGACGCAGGGGACGAA
AAGCAAACTTATAATAAACTGTGGCAACCTGCAGTAATTAAGATGC
AGAATAAAGGGATACATACCACTGATTATAAGTGGGAACGGTACCTTTGC
CACAACTTTACCAGTCACATAAATGACAGAATAATGAAAGGCCCTTCG
GGGGAGGACACAGCACTATGAGGTTTCAGCCTCTACATTTTGTGAGGAG
CACCTCAGACACATGAACCTTCTGGACCAGAAGCAACGATAACCTAGAGCT
AACCAGATACTTGGGGGCTTCAGTAAAAATATACAGGCACCCAGACCAAG
ACTTTATAGTAATATACAACAGAAGAACCCTCTAGGAGGCAACATCTAC
ACAGCACCTCTCTACACCCAGGCAATGCCATTTTAGCAAAACACAAAAT
ATTAGTACCAAGTTTACAGACAAGACCAAGGGTAGAAAAGCAATTAGAC
TAAGAATAGCACCCCCCACACTCTTTACAGACAAGTGGTACTTTCAAAAG
GACATAGCCGACCTCACCCTTTTCAACATCATGGCAGTTGAGGCTGACTT
GCGGTTTCCGTTCTGCTCACCACAACTGACAACACTTGCATCAGCTTCC
AGGTCCTTAGTTCCGTTTACAACAACTACCTCAGTATTAATACCTTTAAT
AATGACAACCTCAGACTCAAAGTTAAAAGAATTTTTAAATAAAGCATTTCC
AACAACAGGCACAAAAGGAACAAGTTAAATGCACTAAATACATTTAGAA
CAGAAGGATGCATAAGTCACCCACAACATAAAAAACCAACCCACAAATA
AACAAACCATTAGAGTCACAATACTTTGCACCTTTAGATGCCCTCTGGGG
AGACCCCATATACTATAATGATCTAAATGAAAACAAAAGTTTGAACGATA
TCATTGAGAAAATACTAATAAAAAACATGATTACATACCATGCAAACTA
AGAGAATTTCCAAATTCATACCAAGGAAACAAGGCCTTTTGCCACCTAAC
AGGCATATACAGCCCACCATACCTAAACCAAGGCAGAATATCTCCAGAAA
TATTTGGACTGTACACAGAAATAATTTACAACCCTTACACAGACAAAGGA
ACTGGAAACAAAGTATGGATGGACCCACTAACTAAAGAGAACAACATATA
TAAAGAAGGACAGAGCAAATGCCTACTGACTGACATGCCCCTATGGACTT
TACTTTTTGGATATACAGACTGGTGTAAGGACACTAATAACTGGGAC
TTACCACTAACTACAGACTAGTACTAATATGCCCTTATACCTTTCCAAA
ATTGTACAATGAAAAGTAAAAGACTATGGGTACATCCCGTACTCCTACA
AATTCGGAGCGGGTCAGATGCCAGACGGCAGCAACTACATACCCTTTTCAG

[0478]

TTTAGAGCAAAGTGGTACCCACAGTACTACACCAGCAACAGGTAATGGA
 GGACATAAGCAGGAGCGGGCCCTTTGCACCTAAGGTAGAAAAACCAAGCA
 CTCAGCTGGTAATGAAGTACTGTTTTAACTTTAACTGGGGCGGTAACCCCT
 ATCATTGAACAGATTGTTAAAGACCCCAGCTTCCAGCCACCTATGAAAT
 ACCCGGTACCGGTAACATCCCTAGAAGAATACAAGTCATCGACCCGCGGG
 TCCTGGGACCGCACTACTCGTTCGGGTCATGGGACATGCGCAGACACACA
 TTTAGCAGAGCAAGTATTAAGAGAGTGTCAGAACAACAAGAACTTCTGA
 CCTTGTATTCTCAGGCCCAAAAAAGCCTCGGGTCGACATCCCCAAACAAG
 AAACCCAAGAAGAAAGCTCACATTCCTCAAAGAGAATCGAGACCGTGG
 GAGACCGAGGAAGAAAGCGAGACAGAAGCCCTCTCGCAAGAGAGCCAAGA
 GGTCCCTTCCAACAGCAGTTGCAGCAGCAGTACCAAGAGCAGCTCAAGC
 TCAGACAGGGAATCAAAGTCTCTTCGAGCAGCTCATAAGGACCCAACAA
 GGGGTCCATGTAAACCCATGCCTACGGTAGGTCCCAGGCAGTGGCTGTTT
 CCAGAGAGAAAGCCAGCCCCAGCTCCTAGCAGTGGAGACTGGGCCATGGA
 GTTTCTCGCAGCAAAAATATTTGATAGGCCAGTTAGAAGCAACCTTAAAG
 ATACCCCTTACTACCCATATGTTAAAAACCAATACAATGTCTACTTTGAC
 CTTAAATTTGAATAAACAGCAGCTTCAAACCTTGCAAGGCCGTGGGAGTTT
 CACTGGTCGGTGTCTACCTCTAAAGGTCCTAAGCACTCCGAGCGTAAGC
 GAGGAGTGCGACCCCTCCCCCTGGAACAACTTCTTCGGAGTCCGGCGCTA
 CGCCTTCGGCTGCGCCGGACACCTCAGACCCCCCTCCACCCGAAACGCT
 TGCGCGTTTTCGGACCTTCGGCGTCGGGGGGGTCGGGAGCTTTATTAAACG
 GACTCCGAAGTGCTCTTGGACACTGAGGGGGTGAACAGCAACGAAAGTGA
 GTGGGGCCAGACTTCGCCATAAGGCCCTTATCTTCTTGCCATTTGTCAGT
 GTCCGGGGTCGCCATAGGCTTCGGGCTCGTTTTTAGGCCTTCGGGACTAC
 AAAAATCGCCATTTTGGTGACGTCACGGCCGCCATCTTAAGTAGTTGAGG
 CGGACGGTGGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACTCAAAA
 TGGTGGACAATTTCTTCGGGTCAAAGGTTACAGCCGCCATGTTAAACA
 CGTGACGTATGACGTCACGGCCGCCATTTTGTGACACAAGATGGCCGACT
 TCCTTCCTCTTTTTCAAAAAAAGCGGAAGTGCCGCCGCGGCGGGGGG
 GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCAGTAGGGGGAGCCATGCGCCCCCCCCC
 GCGCATGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCGGCCCCC
 CCG (SEQ ID NO: 16)

[0479] 注释:

[0480]	推定的结构域	碱基范围
[0481]	TATA盒	83-88
[0482]	加帽位点	104-111
[0483]	转录起始位点	111
[0484]	5'UTR保守结构域	170-240
[0485]	ORF2	336-719
[0486]	ORF2/2	336-715;2363-2789
[0487]	ORF2/3	336-715;2565-3015
[0488]	ORF2t/3	336-388;2565-3015

[0489]	ORF1	599-2830
[0490]	ORF1/1	599-715;2363-2830
[0491]	ORF1/2	599-715;2565-2789
[0492]	三个开放阅读框区域	2551-2786
[0493]	多(A)信号	3011-3016
[0494]	GC富集区	3632-3753
[0495]	表A2. 示例性指环病毒氨基酸序列(甲型细环病毒, 分支3)	

[0496]

Ring1 (甲型细环病毒分支3)	
ORF2	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGHPTGPRPSG PPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDGGAGGSGSGGPVADFA DDGLDQLVAALDDEE (SEQ ID NO: 17)
ORF2/2	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGHPTGPRPSG PPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDGGAGGSGSGGPVADFA DDGLDQLVAALDDEELLKTPASSPPMKYPVPVTSLEEYKSSTRGSWDRTTTRSGHGT CADTHLAEQVLRECQNNKKLLTLYSQAQKSLGSTSQNKKPKKKAHIHSKENRDRG RPRKKARQKPSRKRAKRSPSNSSCSSSTKSSSSSDRESKSSSSSS (SEQ ID NO: 18)
ORF2/3	MSFWKPPVHNVTGIQRMWYESFHRGHASFCGCGNPILHITALAETYGHPTGPRPSG PPGVDPNPHIRRARPAPAAPEPSQVDSRPALTWHGDGGSDGGAGGSGSGGPVADFA DDGLDQLVAALDDEEPKKASGRHPKTRNPRRKLTFTPKRIETVGDRGRKRDRSPLA REPRGPLPTAVAAAVPRAAQAQTGNQSPLRAAHKDPTRGPCKPMPTVGPRQWLPF ERKPAPAPSSGDWAMEFLAAKIFDRPVRSNLKDTPIYPYVKNQYNVYFDLKFE (SEQ ID NO: 19)
ORF2t/3	MSFWKPPVHNVTGIQRMWPKKASGRHPKTRNPRRKLTFTPKRIETVGDRGRKRDR SPLAREPRGPLPTAVAAAVPRAAQAQTGNQSPLRAAHKDPTRGPCKPMPTVGPRQ WLFPERKPAPAPSSGDWAMEFLAAKIFDRPVRSNLKDTPIYPYVKNQYNVYFDLK FE (SEQ ID NO: 20)
ORF1	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGLRRRWPRSAARRRPRRRRVRRRRRWRRGRRK TRTYRRRRRFRRRGRKAKLIKLWQPAVIKRCRIKGYIPLISGNGTFATNFTSHINDR IMKGPFGGGHSTMRFSLYLFEHLRHMNFWTRSNDNLELTRYLGASVKIYRHPDQ

[0497]

	DFIVIYNRRRTPLGGNIYTAPSLHPGNAILAKHKILVPSLQTRPKGRKAIRLRIAPPTLFT DKWYFQKDIADLTLFNIMAVEADLRFPFCSPQTDNTCISFQVLSSVYNNYLSINTFN NDNSDSLKEFLNKAFTTGKGTSLNALNTRTEGCISHPQLKKPNPQINKPLESQ YFAPLDALWGDPIYYNDLNENKSLNDIIEKILIKNMITYHAKLREFPNSYQGNKAFC HLTGIYSPPYLNQGRISPEIFGLYTEIINYNPYTDKGTGNKVWMDPLTKENNIYKEGQS KCLLTDMPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRLVLICPYTFPKLYNEKVVDY GYIPYSYKFGAGQMPDGSNIYPFQFRAKWYPTVLHQQQVMEDISRSGPFAPKVEKP STQLVMKYCFNFWGGNPIIEQIVKDPSFQPTYEIPGTGNIPRIQVIDPRVLGPHYSF RSWDMRRHTFSRASIKRVSEQQETSDLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESHSLSQRESR PWETEESETEALSQESQEVFPQQQLQQQYQEQLKLRQGIKVLFEQLIRTQQGVHV NPCLR (SEQ ID NO: 21)
ORF1/1	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSAARRRPRRRRIVKDPSFQPTYEIPG TGNIPRIQVIDPRVLGPHYSFRSWDMRRHTFSRASIKRVSEQQETSDLVFSGPKKPR VDIPKQETQEESHSLSQRESRPWETEESETEALSQESQEVFPQQQLQQQYQEQLKL RQGIKVLFEQLIRTQQGVHVNPCR (SEQ ID NO: 22)
ORF1/2	MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSAARRRPRRRRAQKSLGSTSQNKK PKKKAHIHSENDRGRPRKKARQKPSRKRAKRSPSNSSCSSSTKSSSSSDRESKSSS SSS (SEQ ID NO: 23)

[0498] 表B1. 示例性指环病毒核酸序列 (乙型细环病毒)

[0499] 名称 Ring2

[0500] 属/分支 乙型细环病毒

[0501] 登录号 JX134045.1

[0502] 全序列: 2797bp

[0503]

```

1           10           20           30           40           50
|           |           |           |           |           |
TAATAAATATTCAACAGGAAAACACCTAATTTAAATTGCCGACCACAAA
CCGTCACCTTAGTTCCCTTTTTGCAACAACCTCTGCTTTTTTCCAACCTGC
CGGAAAACCATATAATTTGCATGGCTAACCAAACTGATATGCTAATTA
ACTTCCACAAAACAACTTCCCTTTTAAAACACACCTACAAATTAATTA
TTAAACACAGTCACATCCTGGGAGGTACTACCACACTATAATACCAAGTG
CACTTCCGAATGGCTGAGTTTATGCCGCTAGACGGAGAACGCATCAGTTA
CTGACTGCGGACTGAACTTGGGCGGGTGCCGAAGGTGAGTGAAACCACCG
AAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGTTCAGTCTAGCGGAACGGGCAAGAAA
CTTAAATTTATTTTATTTTTCAGATGAGCGACTGCTTTAAACCAACATGC

```

[0504]

TACAACAACAAAACAAAGCAAACCTCACTGGATTAATAACCTGCATTTAAC
CCACGACCTGATCTGCTTCTGCCAACACCAACTAGACACTTATTACTAG
CTTTAGCAGAACAACAAGAAACAATTGAAGTGTCTAAACAAGAAAAAGAA
AAAATAACAAGATGCCTTATTACTACAGAAGAAGACGGTACAACCTACAGA
CGTCCTTAGATGGTATGGACGAGGTTGGATTAGACGCCCTTTTCGCAGAAG
ATTTCGAAGAAAAAGAAGGTAAGACCTACTTATACTACTATTCCCTCTAA
AGCAATGGCAACCGCCATATAAAAGAACATGCTATATAAAAGGACAAGAC
TGTTTTAATACTATAGCAACTTAAGACTGGGAATGAATAGTACAATGTA
TGAAAAAAGTATTGTACCTGTACATTGGCCGGGAGGGGGTTCTTTTTCTG
TAAGCATGTTAACTTTAGATGCCTTGTATGATATACATAAACTTTGTAGA
AACTGGTGGACATCCACAAACCAAGACTTACCCTAGTAAGATATAAAGG
ATGCAAAATAACATTTTATCAAAGCACATTTACAGACTACATAGTAAGAA
TACATACAGAACTACCAGCTAACAGTAACAACTAACATACCCAAACACA
CATCCACTAATGATGATGATGTCTAAGTACAAACACATTATACCTAGTAG
ACAAACAAGAAGAAAAAGAAACCATACACAAAATATTTGTAAACCAC
CTCCGCAATTTGAAAACAAATGGTACTTTTGCTACAGACCTCTACAAAATT
CCATTACTACAAATACACTGCACAGCATGCAACTTACAAAACCCATTTGT
AAAACCAGACAAATTATCAAACAATGTTACATTATGGTCACTAAACACCA
TAAGCATACAAAATAGAAACATGTCAGTGGATCAAGGACAATCATGGCCA
TTTAAATACTAGGAACACAAAGCTTTTATTTTACTTTTACACCGGAGC
AAACCTACCAGGTGACACAACACAAATACCAGTAGCAGACCTATTACCAC
TAACAAACCCAAGAATAAACAGACCAGGACAATCACTAAATGAGGCAAAA
ATTACAGACCATATTACTTTACAGAATACAAAACAAATTTACAAATTA
TTGGGGTAACCCATTTAATAAACACATTCAAGAACACCTAGATATGATAC
TATACTCACTAAAAAGTCCAGAAGCAATAAAAAACGAATGGACAACAGAA
AACATGAAATGGAACCAATTAAACAATGCAGGAACAATGGCATTAACACC
ATTTAACGAGCCAATATTCACACAAATACAATATAACCCAGATAGAGACA
CAGGAGAAGACACTCAATTATACCTACTCTCTAACGCTACAGGAACAGGA
TGGGACCCACCAGGAATTCCAGAATTAATACTAGAAGGATTTCCACTATG
GTTAATATATTTGGGATTTGCAGACTTTCAAAAAACCTAAAAAAGTAA
CAAACATAGACACAAATTACATGTTAGTAGCAAAAACAAAATTTACACAA
AAACCTGGCACAATTCTACTTAGTAATACTAAATGACACCTTTGTAGAAGG
CAATAGCCCATATGAAAAACAACCTTTACCTGAAGACAACATTAAATGGT
ACCCACAAGTACAATACCAATTAGAAGCACAAAACAACTACTACAACT
GGGCCATTTACACCAAACATACAAGGACAACTATCAGACAATATATCAAT
GTTTTATAAATTTTACTTTAAATGGGGAGGAAGCCACCAAAAGCAATTA
ATGTTGAAAAATCCTGCCACACAGATTCAATATCCCATACCCCGTAACGAG
CATGAAACAACCTTCGTTACAGAGTCCAGGGGAAGCCCCAGAATCCATCTT
ATACTCCTTCGACTATAGACACGGGAACCTACACAACAACAGCTTTGTAC
GAATTAGCCAAGACTGGGCACCTAAAGACACTGTTTCTAAAATTACAGAG
CCAGATCGACAGCAACTGCTCAAACAAGCCCTCGAATGCCTGCAAACTCTC
GGAAGAAACGCGAGGAGAAAAAGAAAAAGTACAGCAGCTCATCAGCA

ACCTCAGACAGCAGCAGCAGCTGTACAGAGAGCGAATAATATCATTATTA
 AAGGACCAATAACTTTTAACTGTGTAAAAAGGTGAAATTGTTTGATGAT
 AAACCAAAAAACCGTAGATTTACACCTGAGGAATTTGAACTGAGTTACA
 AATAGCAAAATGGTTAAAGAGACCCCCAAGATCCTTTGTAAATGATCCTC
 [0505] CCTTTTACCCATGGTTACCACCTGAACCTGTTGTAAACTTTAAGCTTAAT
 TTTACTGAATAAAGGCCAGCATTAATTCACCTAAGGAGTCTGTTTATTTA
 AGTTAAACCTTAATAAACGGTCACCGCCTCCCTAATACGCAGGCGCAGAA
 AGGGGGCTCCGCCCCCTTTAACCCCCAGGGGGCTCCGCCCCCTGAAACCC
 CCAAGGGGGCTACGCCCCCTTACACCCCC (SEQ ID NO: 54)

[0506] 注释:

[0507]	推定的结构域	碱基范围
[0508]	TATA盒	237-243
[0509]	加帽位点	260-267
[0510]	转录起始位点	267
[0511]	5'UTR保守结构域	323-393
[0512]	ORF2	424-723
[0513]	ORF2/2	424-719;2274-2589
[0514]	ORF2/3	424-719;2449-2812
[0515]	ORF1	612-2612
[0516]	ORF1/1	612-719;2274-2612
[0517]	ORF1/2	612-719;2449-2589
[0518]	三个开放阅读框区域	2441-2586
[0519]	多(A)信号	2808-2813
[0520]	GC富集区	2868-2929
[0521]	表B2. 示例性指环病毒氨基酸序列(乙型细环病毒)	

[0522]	Ring2 (乙型细环病毒)	
	ORF2	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQETIEVSKQE KEKITRCLITTEEDGTTTDLVDGMDEVGLDALFAEDFEEKEG (SEQ ID NO: 55)
	ORF2/2	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQETIEVSKQE KEKITRCLITTEEDGTTTDLVDGMDEVGLDALFAEDFEEKEGFNIPYPVTSMKQLRY RVQGKPQNPSYTPSTIDTGTQQLCHELAKTGHLKTLFLKLQSQIDSNCNKPSSNA CKSRKKRRRKKKKKYSSSSATSDSSSSCTESE (SEQ ID NO: 56)
	ORF2/3	MSDCFKPTCYNNKTKQTHWINNLHLTHDLICFCPTPTRHLLLALAEQQETIEVSKQE

[0523]

	KEKITRCLITTEEDGTTTDDVLDGMDEVGLDALFAEDFEEKEGARSTATAQTSPRMP ANLGRNAGEKRKRSTAAHQPPQTAAAAVQRANNIIKGPITFNCVKKVKLFDDKPK NRRFTPEEFETELQIAKWLKRPPRSFVNDPPFYWLPPEPVVNFKNFTE (SEQ ID NO: 57)
ORF1	MPYYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVRPTYTTIPLKQWQPPYKR TCYIKGQDCLIIYSNLRLGMNSTMYEKSIVPVHWPGGGSFSVSMLTLDALYDIHKL CRNWWTSTNQDLPLVRYKGCKITFYQSTFTDYIVRIHTELPANSNKLTYPNTHPLM MMMSKYKHIIPSRQTRRKKKPYTKIFVKPPPQFENKWFATDLYKIPLLQIHCTACN LQNPVVKPDKLSNNVTLSLNTISIQNRNMSVDQGSWPFKILGTQSFYFYFYTG NLPGDTTQIPVADLLPLTNPRINRPGQSLNEAKITDHITFTEYKNKFTNYWGNPFNK HIQEHLDMILYSLSPEAIKNEWTTENMKWNQLNNAAGTMALTPNEPIFTQIQYNP DRDTGEDTQLYLLSNATGTGWDPGPIELILEGFPLWLIYWGFADFQKNLKKVTNID TNYMLVAKTKFTQKPGTFYLVILNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKWYPQVQYQLEA QNKLLQTGPFTPNIQGQLSDNISMFYKFYFKWGGSPKAINVENPAHQIQYPIPRNE HETTSLSQSPGEAPESILYSFDYRHGNYTTTALSRSQDWALKDTVSKITEPDRQQLLK QALECLQISEETQEKKKEVQQLISNLRQQQQLYRERIISLLKDQ (SEQ ID NO: 58)
ORF1/1	MPYYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRRIQYPIPRNEHETTSLSQSPGE APESILYSFDYRHGNYTTTALSRSQDWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEE TQEKKKEVQQLISNLRQQQQLYRERIISLLKDQ (SEQ ID NO: 59)
ORF1/2	MPYYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRSQIDSNCNKNPSNACKSRK KRRRKKKKKYSSSSATSDSSSSCTESE (SEQ ID NO: 60)

[0524] 表C1. 示例性指环病毒核酸序列 (丙型细环病毒)

[0525] 名称 Ring4

[0526] 属/分支 丙型细环病毒

[0527] 登录号

[0528] 全序列:3176bp

[0529]

```

1      10      20      30      40      50
|      |      |      |      |      |
TAAATGCGGGGAGCCAATCATTTTATACTTTCACTTTCCAATTAAAAAT
GGCCACGTCACAAACAAGGGGTGGAGCCATTTAACTATATACTAAGTG
GGGTGGCGAATGGCTGAGTTTACCCCGCTAGACGGTGCAGGGACCGGATC
GAGCGCAGCGAGGAGGTCCCCGGCTGCCCATGGGCGGGAGCCGAGGTGAG
TGAAACCACCGAGGTCTAGGGGCAATTCGGGCTAGGGCAGTCTAGCGGAA
CGGGCAAGAACTTAAACAATATTGTTTTACAGATGGTTAGTATATCC
TCAAGTGATTTTTTTAAGAAAACGAAATTTAATGAGGAGACGCAGAACCA
AGTATGGATGTCTCAAATTGCTGACTCTCATGATAATATCTGCAGTTGCT

```

[0530]

GGCATCCATTTGCTCACCTTCTTGCTTCCATATTTTCCTCCTGGCCACAAA
GATCGTGATCTTACTATTAACCAAATTCCTTCTAAGAGATTATAAAGAAAA
ATGCCATTCTGGTGGAGAAGAAGGAGAAAAATTCTGGACCAACAACAGGTT
TAATTACACCAAAAGAAGAAGATATAGAAAAAGATGGCCCAGAAGGCGCC
GCAGAAGAAGACCATAACAGACGCCCTGTTCCGCCGCCCGTAGAAAACTT
CGAAAGGTAAAGAGAAAAAAAATCTTTAATTGTTAGACAATGGCAACC
AGACAGTATAAGAATTGTAAAATTATAGGACAGTCAGCTATAGTTGTTG
GGGCTGAAGGAAAGCAAATGTACTGTTATACTGTCAATAAGTTAATTAAT
GTGCCCCCAAAAACACCATATGGGGGAGGCTTTGGAGTAGACCAATACAC
ACTGAAATACTTATATGAAGAATACAGATTTGCACAAAACATTTGGACAC
AATCTAATGTACTGAAAGACTTATGCAGATACATAAATGTTAAGCTAATA
TTCTACAGAGACAACAAAACAGACTTTGTCCTTTCTATGACAGAAACCC
ACCTTTTCAACTAACAAAATTTACATACCCAGGAGCACACCCACAACAAA
TCATGCTTCAAAAACACCACAAATTCATACTATCACAAATGACAAAGCCT
AATGGAAGACTAACAAAAAACTCAAAATTAACCTCCTAAACAAATGCT
TTCTAAATGGTTCTTTTCAAAACAATTCTGTAATACCCTTTACTATCTC
TTAAAGCTTCTGCACTAGACCTTAGGCACTCTTACCTAGGCTGCTGTAAT
GAAAAATCCACAGGTATTTTTTTTATTATTTAAACCATGGATACTACACAAT
AACAAACTGGGGAGCACAATCCTCAACAGCATACAGACCTAACTCCAAGG
TGACAGACACAACATACTACAGATACAAAAATGACAGAAAAAATATTAAC
ATTAAGGCCATGAATACGAAAAAGTATATCATATGAAAAACGGTTATTT
TCAATCTAGTTTCTTACAAACACAGTGCATATATACCAGTGAGCGTGGTG
AAGCCTGTATAGCAGAAAAACCACTAGGAATAGCTATTTACAATCCAGTA
AAAGACAATGGAGATGGTAATATGATATACCTTGTAAAGCACTCTAGCAAA
CACTTGGGACCAGCCTCCAAAAGACAGTGCATTTTAATACAAGGAGTAC
CCATATGGCTAGGCTTATTTGGATATTTAGACTACTGTAGACAAATTAAA
GCTGACAAAACATGGCTAGACAGTCATGTACTAGTAATTCAAAGTCCTGC
TATTTTTACTTACCCAAATCCAGGAGCAGGCAAAATGGTATTGTCCACTAT
CACAAAGTTTATAAATGGCAATGGTCCGTTTAATCAACCACCTACACTG
CTACAAAAGCAAAGTGGTTTCCACAAATACAATACCAACAAGAAATTAT
TAATAGCTTTGTAGAATCAGGACCATTTGTTCCCAAATATGCAAATCAAA
CTGAAAGCAACTGGGAATAAAATATAAATATGTTTTTACATTTAAGTGG
GGTGGACCACAATTCATGAACCAGAAATGCTGACCCTAGCAAACAAGA
GCAGTATGATGTCCCGATACTTTCTACCAAACAATACAAATTGAAGATC
CAGAAGGACAAGACCCCAGATCTCTCATCCATGATTGGGACTACAGACGA
GGCTTTTATTAAGAAAGATCTCTTAAAAGAATGTCAACTTACTTCTCAAC
TCATACAGATCAGCAAGCAACTTCAGAGGAAGACATTTCCAAAAAAGAAAA
AGAGAATTGGACCCCCAACTCACAGTCCCACAACAAAAAGAGGAGACA
CTGTATGTCTCTCTCTCTCTGCAAAAAAGATACCTTCCAAGAAACAGA
GACACAAGAAGACCTCCAGCAGCTCATCAAGCAGCAGCAGGAGCAGCAGC
TCCTCCTCAAGAGAAACATCCTCCAGCTCATCCACAACTAAAAGAGAAT
CAACAAATGCTTCAGCTTCACACAGGCATGTTACCTTAACCAGATTTAAA
CCTGGATTTGAAGAGCAAACAGAGAGAGAATTAGCAATTATATTTCATAG
GCCCCCTAGAACCTACAAAGAGGACCTTCCATTCTATCCCTGGCTACCAC
CTGCACCCCTTGTACAATTTAACCTTAACCTCAAAGGCTAGGCCAACAAAT
GTACACTTAGTAAAGCATGTTTATTAAAGCACACCCCCAAAATAAATGT
AAAAATAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAATTGAAAAATTGCGCGCT
CGCGCGCATGTGCGCCTCTGGCGCAAATCACGCAACGCTCGCGCGCCCGC
GTATGTCTCTTTACCACGCACCTAGATTGGGGTGCAGCGCTAGCGCGCG
CACCCCAATGCGCCCCGCCCTCGTTCCGACCCGCTTGCGCGGGTCGGACC
ACTTCGGGCTCGGGGGGGCGCGCCTGCGGCGCTTTTTTACTAAACAGACT
CCGAGCCGCCATTTGGCCCCCTAAGCTCCGCCCCCTCATGAATATTCAT
AAAGGAAACCACATAATTAGAATTGCCGACCACAACTGCCATATGCTAA
TTAGTTCCCCTTTTACAAAGTAAAAGGGGAAGTGAACATAGCCCCACACC
CGCAGGGGCAAGGCCCGCACCCCTACGTCACTAACCACGCCCCCGCCGC
CATCTTGGGTGCGGCAGGGCGGGGGC (SEQ ID NO: 886)

[0531] 注释:

[0532] 推定的结构域

碱基范围

[0533]	TATA盒	87-93
[0534]	加帽位点	110-117
[0535]	转录起始位点	117
[0536]	5'UTR保守结构域	185-254
[0537]	ORF2	286-660
[0538]	ORF2/2	286-656;1998-2442
[0539]	ORF2/3	286-656;2209-2641
[0540]	TAIP	385-484
[0541]	ORF1	501-2489
[0542]	ORF1/1	501-656;1998-2489
[0543]	ORF1/2	501-656;2209-2442
[0544]	三个开放阅读框区域	2209-2439
[0545]	多(A)信号	2672-2678
[0546]	GC富集区	3076-3176
[0547]	表C2. 示例性指环病毒氨基酸序列 (丙型细环病毒)	

Ring4 (丙型细环病毒)		
[0548]	ORF2	MVSISSDFFKKTKEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIFPP GHKDRDLTINQILLR DYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDGPGEAAEEDHTDALFAAAV ENFER (SEQ ID NO: 887)
	ORF2/2	MVSISSDFFKKTKEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIFPP GHKDRDLTINQILLR DYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDGPGEAAEEDHTDALFAAAV ENFESGVDHNSMNQKLLTLANKSSMMSPILSTKQYKL KIQKDKTPDLSSMIGTTDEALLKKDLLKECQLTSQLIQISKQLQRKTFPKRKR ELDPNSQSHNKKRRHCHVSSLSAKKIPSKKQRHKKTSSSSSSSSSSSSSSSR ETSSSSSTN (SEQ ID NO: 888)
	ORF2/3	MVSISSDFFKKTKEETQNQVWMSQIADSHDNICSCWHPFAHLLASIFPP GHKDRDLTINQILLR DYKEKCHSGGEEGENSGPTTGLITPKEEDIEKDGPGEAAEEDHTDALFAAAV ENFERSASNFRGRHSQKEKENWTPHSPPTTKRRGDTV MSPLSLQKRYLPRNRDTRRPPAAHQAAAGAAAPPQEKHPPAHPQTKRESTN

[0549]

	ASASHRHVTLTRFKPGFEEQTERELAIIFHRPPRTYKEDLPFYFPLPPAPLVQ FNLNFKG (SEQ ID NO: 889)
TAIP	MRRRRTKYGCLKLLTLMISAVAGIHLTFLLPYFLLATKIVILLTKFF (SEQ ID NO: 890)
ORF1	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRRRK LRKVKRKKKSLIVRQWQPDSIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVNKLINV PPKTPYGGGFGVDQYTLKYLVEEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYINVKLIFY RDNKTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILSQMTKPNGR LTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALDLRHSYLGCCNENPQ VFFYYLNHGYYTITNWGAQSSTAYRPNSKVTDTTYRYKNDRKNNIKSHE YEKSISYENGYFQSSFLQTQCIYTSEERGEACIAEKPLGIAIYNPVKDNGDGNM IYLVSTLANTWDQPPKDSAILIQGVPIWLGLFGYLDYCRQIKADKTWLD SHV LVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQSFINGNGPFNPPTLLQKAKWFPQIQYQ QEINSFVESGPFVPKYANQTESNWELKYKYVFTFKWGGPQFHEPEIADPSK QEYDVPDFTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDYRRGFIKERSLKRMSTYFST HTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKEEETLSCLLSLCKKDTFQETETQE DLQQLIKQQEQQLLLKRNILQLIHKLKENQQMLQLHTGMLP (SEQ ID NO: 891)
ORF1/1	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRRRK LRKWGGPQFHEPEIADPSKQEYDVPDFTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDY RRGFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKEEETL SCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQEQQLLLKRNILQLIHKLKENQQM LQLHTGMLP (SEQ ID NO: 892)
ORF1/2	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRRPYRRPVRRRRRK LRKISKQLQRKTFPKRKR ELDPNSQSHNKKRRHCHVSSLSAKKIPSKKQRHKKTSSSSSSSSRSSSSSR ETSSSSSTN (SEQ ID NO: 893)

[0550] 在一些实施例中,指环载体包含核酸,该核酸包含在PCT申请号PCT/US2018/037379(其通过引用以其全文并入本文)中列出的序列。在一些实施例中,指环载体包含多肽,该多肽包含在PCT申请号PCT/US2018/037379(其通过引用以其全文并入本文)中列出的序列。在一些实施例中,指环载体包含核酸,该核酸包含在PCT申请号PCT/US19/65995(其通过引用以其全文并入本文)中列出的序列。在一些实施例中,指环载体包含多肽,该多肽包含在PCT申请号PCT/US19/65995(其通过引用以其全文并入本文)中列出的序列。

[0551] ORF1分子

[0552] 在一些实施例中,指环载体包含ORF1分子和/或编码ORF1分子的核酸。一般而言,ORF1分子包括具有指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述的指环病毒ORF1蛋白)的结构特征和/或活性的多肽。在一些实施例中,ORF1分子包含相对于指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文

所述的指环病毒ORF1蛋白)的截短。ORF1分子可能能够与其他ORF1分子结合,例如,以形成蛋白质外壳(例如,如本文所述的蛋白质外壳),例如,衣壳。在一些实施例中,蛋白质外壳可以包封核酸分子(例如,如本文所述的遗传元件)。在一些实施例中,多个ORF1分子可形成多聚体,例如,以形成蛋白质外壳。在一些实施例中,多聚体可以是同型多聚体。在其他实施例中,多聚体可以是异型多聚体。

[0553] 在一些实施例中,ORF1分子可以包含以下中的一种或多种:包含精氨酸富集区的第一区域,例如,具有至少60%碱性残基的区域(例如,至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%碱性残基;例如,60%-90%、60%-80%、70%-90%或70-80%碱性残基),和包含胶冻卷结构域的第二区域,例如,至少六个 β 链(例如,4、5、6、7、8、9、10、11或12个 β 折叠)。

[0554] 精氨酸富集区

[0555] 精氨酸富集区与本文所述的精氨酸富集区序列或者包含至少60%、70%或80%碱性残基(例如,精氨酸、赖氨酸或其组合)的至少约40个氨基酸的序列具有至少70%(例如,至少约70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性。

[0556] 胶冻卷结构域

[0557] 胶冻卷结构域或区域包含(例如,由其组成)具有以下特征中一种或多种(例如,1、2或3种)的多肽(例如,较大多肽中包含的结构域或区域):

[0558] (i) 胶冻卷结构域的至少30%(例如,至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、90%或更多)的氨基酸是一个或多个 β -折叠的部分;

[0559] (ii) 胶冻卷结构域的二级结构包含至少四个(例如,至少4、5、6、7、8、9、10、11或12个)个 β -链;和/或

[0560] (iii) 胶冻卷结构域的三级结构包含至少两个(例如,至少2、3或4个) β -折叠;和/或

[0561] (iv) 胶冻卷结构域包含 β -折叠与 α -螺旋的比例为至少2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1或10:1。

[0562] 在某些实施例中,胶冻卷结构域包含两个 β -折叠。

[0563] 在某些实施例中,一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个) β -折叠包含约八个(例如,4、5、6、7、8、9、10、11或12个) β -链。在某些实施例中,一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个) β -折叠包含八个 β -链。在某些实施例中,一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个) β -折叠包含七个 β -链。在某些实施例中,一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个) β -折叠包含六个 β -链。在某些实施例中,一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个) β -折叠包含五个 β -链。在某些实施例中,一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个) β -折叠包含四个 β -链。

[0564] 在一些实施例中,胶冻卷结构域包含与第二 β -折叠反向平行取向的第一 β -折叠。在某些实施例中,第一 β -折叠包含约四个(例如,3、4、5或6个) β -链。在某些实施例中,第二 β -折叠包含约四个(例如,3、4、5或6个) β -链。在实施例中,第一和第二 β -折叠总共包含约八个(例如,6、7、8、9、10、11或12个) β -链。

[0565] 在某些实施例中,胶冻卷结构域是衣壳蛋白(例如,如本文所述的ORF1分子)的组分。在某些实施例中,胶冻卷结构域具有自组装活性。在一些实施例中,包含胶冻卷结构域

的多肽与另一拷贝的包含胶冻卷结构域的多肽结合。在一些实施例中，第一多肽的胶冻卷结构域与该多肽的第二拷贝的胶冻卷结构域结合。

[0566] N22结构域

[0567] ORF1分子还可包括包含指环病毒N22结构域(例如,如本文所述的,例如,来自如本文所述的指环病毒ORF1蛋白的N22结构域)的结构或活性的第三区域,和/或包含指环病毒C-末端结构域(CTD)(例如,如本文所述的,例如,来自如本文所述的指环病毒ORF1蛋白的CTD)的结构或活性的第四区域。在一些实施例中,ORF1分子按照N-末端到C-末端的顺序包含该第一、第二、第三和第四区域。

[0568] 高变区(HVR)

[0569] 在一些实施例中,ORF1分子可以进一步包含高变区(HVR),例如来自指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述)的HVR。在一些实施例中,HVR位于该第二区域和该第三区域之间。在一些实施例中,HVR包含至少约55个(例如,至少约45、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60或65个)氨基酸(例如,约45-160、50-160、55-160、60-160、45-150、50-150、55-150、60-150、45-140、50-140、55-140或60-140个氨基酸)。

[0570] 示例性ORF1序列

[0571] 下表中提供了示例性指环病毒ORF1氨基酸序列和示例性ORF1结构域的序列。在一些实施例中,本文所述的多肽(例如,ORF1分子)包含与一个或多个指环病毒ORF1子序列(例如,如表N-Z中任一个所述)具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,本文所述的指环载体包含ORF1分子,该分子包含与一种或多种指环病毒ORF1子序列(例如,如表N-Z中任一个所述)具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,本文所述的指环载体包含编码ORF1分子的核酸分子(例如,遗传元件),该分子包含与一种或多种指环病毒ORF1子序列(例如,如表N-Z中任一个所述)具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0572] 在一些实施例中,一个或多个指环病毒ORF1子序列包含精氨酸(Arg)富集结构域、胶冻卷结构域、高变区(HVR)、N22结构域或C-末端结构域(CTD)中的一种或多种(例如,如表N-Z中任一个所列的),或与其具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施例中,ORF1分子包含来自不同指环病毒的多个子序列(例如,选自表N-Z中所列的甲型细环病毒分支1-7子序列中ORF1子序列的任何组合)。在实施例中,ORF1分子包含来自一种指环病毒的Arg富集结构域、胶冻卷结构域、N22结构域和CTD中的一种或多种,以及来自另一种指环病毒的HVR。在实施例中,ORF1分子包含来自一种指环病毒的胶冻卷结构域、HVR、N22结构域和CTD中的一种或多种,以及来自另一种指环病毒的Arg富集结构域。在实施例中,ORF1分子包含来自一种指环病毒的Arg富集结构域、HVR、N22结构域和CTD中的一种或多种,以及来自另一种指环病毒的胶冻卷结构域。在实施例中,ORF1分子包含来自一种指环病毒的Arg富集结构域、胶冻卷结构域、HVR和CTD中的一种或多种,以及来自另一种指环病毒的N22结构域。在实施例中,ORF1分子包含来自一种指环病毒的Arg富集结构域、胶冻卷结构域、HVR和N22结构域中的一种或多种,以及来自另一种指环病毒的CTD。

[0573] 例如,在PCT申请号PCT/US2018/037379和PCT/US19/65995(其通过引用以其全文并入本文)中描述了其他示例性指环病毒,这些指环病毒的ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段可用于本文所述组合物和方法中,例如,以形成指环载体的蛋白质外壳,例如,通过包封遗传元件。

[0574] 表N. 示例性指环病毒ORF1氨基酸子序列(甲型细环病毒,分支3)

[0575] 名称 Ring1

[0576] 属/分支 甲型细环病毒,分支3

[0577] 登录号 AJ620231.1

[0578] 蛋白质登录号 CAF05750.1

[0579] 全序列:743AA

1 10 20 30 40 50

| | | | |

MAWGWWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSAARRRPRRRRVRRRRRWRRGR

RKTRTYRRRRRFRRRGRKAKLI IKLWQPAVIKRCRIKGYIPLIISGNGTF

ATNFTSHINDRIMKGPFGGGHSTMRFSLYILFEEHLRHMNFWTRSNDNLE

[0580]

LTRYLGASVKIYRHPDQDFIVIYNRRTPLGGNIIYTAPSLHPGNAILAKHK

IILVPSLQTRPKGRKAIRLRIAPPTLFTDKWYFQKDIADLTTFNIMAVEAD

LRFPFCSPQTDNTCISFQVLSSVYNNYLSINTFNNDNSDSKLKEFLNKAF

PTTGTKGTSLNALNTFRTEGCISHPQLKKPNPQINKPLESQYFAPLDALW

GDPIYYNDLNNENKSLNDIIEKILIKNMITYHAKLREFPNSYQGKAFCHL

TGIYSPPYLNQGRISPEIFGLYTEIIYNPYTDKGTGNKVWMDPLTKENNI

YKEGQSKCLLTDMPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRLVLICPYTFP

KLYNEKVVDYGYIPYSYKFGAGQMPDGSNYIPFQFRAKWYPTVLHQQQVM

EDISRSGPFAPKVEKPSTQLVMKYCFNFWGGNPIIEQIVKDPSFQPTYE

[0581]

IPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYSFWSWDMRRHTFSRASIKRVSEQQETS

DLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESHSLQRESRPWETEESETEALSQESQ

EVPFQQQLQQQYQEQLKLRQGIKVLFEQLIRTQQGVHVNPCLR

(SEQ ID NO: 185)

[0582] 注释:

[0583] 推定的结构域 AA范围

[0584] Arg富集区 1-68

[0585] 胶冻卷结构域 69-280

[0586] 高变区 281-413

[0587] N22 414-579

[0588] C-末端结构域 580-743

[0589] 表0. 示例性指环病毒ORF1氨基酸子序列 (甲型细环病毒, 分支3)

[0590]	Ring1 ORF1 (甲型细环病毒分支3)	
	Arg 富集区	MAWGWKRRRRWWFRKRWTRGRLRRRWPRSARRRPRRRRVRRRR RWRRGRRKTRTYRRRRRFRRRGRK (SEQ ID NO: 186)
	胶冻卷结构域	AKLIKLWQPAVIKRCRIKGYIPLIISGNGTFATNFTSHINDRIMKGPFGG GHSTMRFSLYILFEEHLRHMNFWTRSDNLELTRYLGASVKIYRHPDQ DFIVIYNRRTPLGNIYTAPSLHPGNAILAKHKILVPSLQTRPKGRKAIRL RIAPPTLFTDKWYFQKDIADLTFLNIMAVEADLRFPCSPQTDNTCISFQ VLSSVYNNYLSI (SEQ ID NO: 187)
	高变结构域	NTFNNDNSDSLKEFLNKAFTTGTGKGTSLNALNTRTEGCISHPQLKK PNPQINKPLESQYFAPLDALWGDPIYYNDLNENKSLNDIIEKILIKNMIT YHAKLREFPNSYQGKNAFCHLTGIYSPPYLNQGR (SEQ ID NO: 188)
	N22	ISPEIFGLYTEIYNPYTDKGTGNKVWMDPLTKENNIYKEGQSKCLLTD MPLWTLLFGYTDWCKKDTNNWDLPLNYRLVLICPYTFPKLYNEKVKD YGYIPYSYKFGAGQMPDGSNIYPFQFRAKWYPTVLHQQQVMEDISRS GFAPKVEKPSTQLVMKYCFNFN (SEQ ID NO: 189)
	C-末端结构域	WGGNPIIEQIVKDPSFQPTYEIPGTGNIPRRIQVIDPRVLGPHYFSRSD MRRHTFSRASIKRVSEQQETSDLVFSGPKKPRVDIPKQETQEESHSLQR ESRPWETEESETEALSQESQEVFPQQQLQQQYQEQQLKLQGIKVLFEQ LIRTQQGVHVNPCLR (SEQ ID NO: 190)

[0591] 表P. 示例性指环病毒ORF1氨基酸子序列 (乙型细环病毒)

[0592] 名称 Ring2

[0593] 属/分支 乙型细环病毒

[0594] 登录号 JX134045.1

[0595] 蛋白质登录号 AGG91484.1

[0596] 全序列:666AA

1	10	20	30	40	50
MPYYRRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVRPTYTTIPLKQWQ					
PPYKRTCYIKGQDCLIIYSNLRLGMNSTMYEKSIVPVHWPGGGSFSVSML					
TLDALYDIHKLCRNWWTSTNQDLPLVRYKGCKITFYQSTFTDYIVRIHTE					
LPANSNKLTYPNTHPLMMMSKYKHIIPSRQTRRKKKPYTKIFVKPPPQF					
ENKWYFATDLYKIPLLQIHCTACNLQNPVFKPKLSNNVTLWSLNTISIQ					
[0597]	NRNMSVDQGSWPFKILGTQSFYFYFYTGANLPGDTTQIPVADLLPLTNP				
RINRPGQSLNEAKITDHITFTEYKNKFTNYWGNPFNKHIQEHLDMILYSL					
KSPEAIKNEWTTENMKWNQLNNAAGTMALTPFNEPIFTQIQYNPDRDTGED					
TQLYLLSNATGTGWDPPGIPELILEGFPLWLIYWGFADFQKNLKKVTNID					
TNYMLVAKTKFTQKPGTFYLVILNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKWYPQV					
QYQLEAQNKLLQTGPFTPNIQGQLSDNISMFYKFYFKWGGSPPKAINVEN					
PAHQIQYPIPRNEHETSLQSPGEAPESILYSFDYRHGNYTTTALSRIQ					
DWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEETQEKKEKEVQQLISNLRQ					
QQQLYRERIISLLKDQ (SEQ ID NO: 215)					

[0598] 注释:

[0599]	推定的结构域	AA范围
[0600]	Arg富集区	1-38
[0601]	胶冻卷结构域	39-246
[0602]	高变区	247-374
[0603]	N22	375-537
[0604]	C-末端结构域	538-666
[0605]	表Q. 示例性指环病毒ORF1氨基酸子序列(乙型细环病毒)	

Ring2 ORF1 (乙型细环病毒)	
Arg 富集区	MPYYYRRRRYNYRRPRWYGRGWIRRPFRRRFRRKRRVR (SEQ ID NO: 216)
胶冻卷结构域	PTYTTIPLKQWQPPYKRTCYIKGQDCLIIYYSNLRLGMNSTMYEKSIVPV HWPGGGSFSVSMMLTDALYDIHKLCRNWWTSTNQDLPLVRYKGCKIT FYQSTFTDYIVRIHTELPANSNKLTYPNTHPLMMMMSKYKHIIPSRQTR RKKKPYTKIFVKPPPQFENKWYFATDLYKIPLLQIHCTACNLQNPVFKP DKLSNNVTLWSLNT (SEQ ID NO: 217)
[0606] 高变结构域	ISIQNRNMSVDQGQSWPFKILGTQSFYFYFYTGANLPGDITQIPVADLL PLTNPRINRPGQSLNEAKITDHTFTEYKNKFTNYWGNPFNKHIQEHLD MILYSLKSPEAIKNEWTTENMKWNQLNAG (SEQ ID NO: 218)
N22	TMALTPFNEPIFTQIQYNPDRDTGEDTQLYLLSNATGTGWDPPIPELIL EGFPLWLIYWGFADFQKNLKKVTNIDTNYMLVAKTKFTQKPGTFYLV LNDTFVEGNSPYEKQPLPEDNIKWYPQVQYQLEAQNKLLQTGPFTPN QGQLSDNISMFYKFYFK (SEQ ID NO: 219)
C-末端结构域	WGSPPKAINVENPAHQIQYPIPRNEHETSLQSPGEAPESILYSFDYRH GNYTTTALSRSQDWALKDTVSKITEPDRQQLLKQALECLQISEETQEK KEKEVQQLISNLRQQQQLYRERIISLLKDQ (SEQ ID NO: 220)

[0607] 表R. 示例性指环病毒ORF1氨基酸子序列 (丙型细环病毒)

[0608] 名称 Ring4

[0609] 属/分支 丙型细环病毒

[0610] 登录号

[0611] 蛋白质登录号

[0612] 全序列:662AA

[0613]

1	10	20	30	40	50
MPFWRRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWPRRRRRRPPYRRPVRRRRKL					
RKVKRKKKSLIVRQWQPD	SIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVNKLIN				
VPPKTPYGGGFGVDQYTLKYLYEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYINVKLI					
FYRDNKTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILSQMTKP					
NGRLTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALDLRHSYLGCCN					
ENPQVFFYYLNLHGYYTITNWGAQSSTAYRPNKSVTDTTYRYKNDRKNIN					
IKSHEYEKSSISYENGYFQSSFLQTQCIYTSEERGEACIAEKPLGIAIYNPV					
KDNGDGNMIYLVSTLANTWDPKDSAILIQGVPIWLGLFGYLDYCRQIK					
ADKTWLDShVLVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQSFINGNGPFNPPTL					
LQKAKWFPQIQYQQEIINSFVESGPFVPKYANQTESNWELKYKYVFTFKW					
GGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDFTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDYRR					
GFIKERSLKRMSYTFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKEEET					
LSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQQLLLKRNLQLIHKLKEN					
QQMLQLHTGMLP					

(SEQ ID NO: 925)

[0615] 注释:

[0616] 推定的结构域 AA范围

- [0617] Arg富集区 1-58
 [0618] 胶冻卷结构域 59-260
 [0619] 高变区 261-339
 [0620] N22 340-499
 [0621] C-末端结构域 500-662
 [0622] 表S. 示例性指环病毒ORF1氨基酸子序列 (丙型细环病毒)

Ring4 (丙型细环病毒)	
Arg 富集区	MPFWWRRRRKFWTNNRFNYTKRRRYRKRWP RRRRRRRPYRRPVRRR RRKLRKVKRKKK (SEQ ID NO: 926)
胶冻卷结构域	SLIVRQWQPDSIRTCKIIGQSAIVVGAEGKQMYCYTVNKLINVPPKTPY GGGFGVDQYTLKYL YEEYRFAQNIWTQSNVLKDLCRYINVKLIFYRDN KTDFVLSYDRNPPFQLTKFTYPGAHPQQIMLQKHHKFILSQMTKPNGR LTKKLKIKPPKQMLSKWFFSKQFCKYPLLSLKASALDLRHSYLGCCNE NPQVFFYYL (SEQ ID NO: 927)
[0623] 高变结构域	NHGYTITNWGAQSSTAYRPNSKVTDTTYRYKNDRKNINIKSHEYEK SISYENGYFQSSFLQTQCIYTSERGEACIAE (SEQ ID NO: 928)
N22	KPLGIAIYNPVKDNGDGNMIYLVSTLANTWDQPPKDSAILIQGVPIWLG LFGYLDYCRQIKADKTWLD SHVLVIQSPAIFTYPNPGAGKWYCPLSQS FINGNGPFNQPTLLQKAKWFPQIQYQQEIINSFVESGPFVPKYANQTES NWELKYKYVFTFK (SEQ ID NO: 929)
C-末端结构域	WGGPQFHEPEIADPSKQEQYDVPDFTFYQTIQIEDPEGQDPRSLIHDWDY RRGFIKERSLKRMSTYFSTHTDQQATSEEDIPKKKKRIGPQLTVPQQKE EETLSCLLSLCKKDTFQETETQEDLQQLIKQQQEQLLLKRNILQLIHKL KENQQMLQLHTGMLP (SEQ ID NO: 930)

[0624] 在一些实施例中,第一区域可以结合核酸分子(例如,DNA)。在一些实施例中,碱性残基选自精氨酸、组氨酸或赖氨酸,或其组合。在一些实施例中,第一区域包含至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%的精氨酸残基(例如,60%-90%、60%-80%、70%-90%或70%-80%精氨酸残基)。在一些实施例中,第一区域包含约30-120个氨基酸(例如,约40-120、40-100、40-90、40-80、40-70、50-100、50-90、50-80、50-70、60-100、60-90或60-80个氨基酸)。在一些实施例中,第一区域包含病毒ORF1精氨酸富集区(例如,来自指环病毒ORF1蛋白的精氨酸富集区,例如,如本文所述)的结构或活性。在一些实施例中,第一区域包含核定位信号。

[0625] 在一些实施例中,第二区域包含胶冻卷结构域,例如,病毒ORF1胶冻卷结构域的结构或活性(例如,来自指环病毒ORF1蛋白的胶冻卷结构域,例如,如本文所述)。在一些实施例中,第二区域能够与另一ORF1分子的第二区域结合,例如,以形成蛋白质外壳(例如,衣壳)或其部分。

[0626] 在一些实施例中,第四区域暴露在蛋白质外壳(例如,包含ORF1分子的多聚体的蛋

白质外壳,例如,如本文所述)的表面上。

[0627] 在一些实施例中,第一区域、第二区域、第三区域、第四区域和/或HVR各自包含少于四个(例如,0、1、2或3个)个 β 折叠。

[0628] 在一些实施例中,第一区域、第二区域、第三区域、第四区域和/或HVR中的一个或多个可以由异源氨基酸序列(例如,来自异源ORF1分子的相应区域)替换。在一些实施例中,异源氨基酸序列具有所期望的功能,例如,如本文所述的。

[0629] 在一些实施例中,ORF1分子包含多个保守基序(例如,包含约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100个或更多个氨基酸的基序)(例如,如PCT/US19/65995的图34所示)。在一些实施例中,保守基序可以显示出与一种或多种野生型指环病毒分支(例如,甲型细环病毒,分支1;甲型细环病毒,分支2;甲型细环病毒,分支3;甲型细环病毒,分支4;甲型细环病毒,分支5;甲型细环病毒,分支6;甲型细环病毒,分支7;乙型细环病毒;和/或丙型细环病毒)的ORF1蛋白存在60%、70%、80%、85%、90%、95%或100%序列同一性。在实施例中,每个保守基序的长度为1-1000个(例如,5-10、5-15、5-20、10-15、10-20、15-20、5-50、5-100、10-50、10-100、10-1000、50-100、50-1000或100-1000个)氨基酸。在某些实施例中,保守基序由约2%-4%(例如,约1%-8%、1%-6%、1%-5%、1%-4%、2%-8%、2%-6%、2%-5%或2%-4%)的ORF1分子序列组成,并且每个都显示出与野生型指环病毒分支的ORF1蛋白中相应基序存在100%序列同一性。在某些实施例中,保守基序由约5%-10%(例如,约1%-20%、1%-10%、5%-20%或5%-10%)的ORF1分子序列组成,并且每个都显示出与野生型指环病毒分支的ORF1蛋白中相应基序存在80%序列同一性。在某些实施例中,保守基序由约10%-50%(例如,约10%-20%、10%-30%、10%-40%、10%-50%、20%-40%、20%-50%或30%-50%)的ORF1分子序列组成,并且每个都显示出与野生型指环病毒分支的ORF1蛋白中相应基序存在60%序列同一性。在一些实施例中,保守基序包含一个或多个如表19中所列的氨基酸序列。

[0630] 在一些实施例中,ORF1分子或编码其的核酸分子包含相对于野生型ORF1蛋白(例如,如本文所述)的至少一个差异(例如,突变、化学修饰或表观遗传改变)。

[0631] N22结构域中的保守ORF1基序

[0632] 在一些实施例中,本文所述的多肽(例如,ORF1分子)包含氨基酸序列YNPX²DXGX²N (SEQ ID NO:829),其中Xⁿ是任何n个氨基酸的连续序列。例如,X²表示任何两个氨基酸的连续序列。在一些实施例中,YNPX²DXGX²N (SEQ ID NO:829)包含在ORF1分子的N22结构域(例如,如本文所述)内。在一些实施例中,本文所述的遗传元件包含编码氨基酸序列YNPX²DXGX²N (SEQ ID NO:829)的核酸序列(例如,编码ORF1分子的核酸序列,例如,如本文所述),其中Xⁿ是任何n个氨基酸的连续序列。

[0633] 在一些实施例中,多肽(例如,ORF1分子)包含保守的二级结构,例如,侧接和/或包含YNPX²DXGX²N (SEQ ID NO:829)基序的一部分,例如,在N22结构域中。在一些实施例中,保守二级结构包含第一 β 链和/或第二 β 链。在一些实施例中,第一 β 链的长度为约5-6个(例如,3、4、5、6、7或8个)氨基酸。在一些实施例中,第一 β 链包含位于YNPX²DXGX²N (SEQ ID NO:829)基序的N-末端的酪氨酸(Y)残基。在一些实施例中,YNPX²DXGX²N (SEQ ID NO:829)基序包含无规则卷曲(例如,约8-9个氨基酸的无规则卷曲)。在一些实施例中,第二 β 链的长度为约7-8个(例如,5、6、7、8、9或10个)氨基酸。在一些实施例中,第二 β 链包含位于YNPX²DXGX²N (SEQ

ID NO:829) 基序的C-末端的天冬酰胺(N) 残基。

[0634] 在PCT/US19/65995的实例47和图48中描述了示例性YNPX²DXGX²N (SEQ ID NO:829) 基序侧翼二级结构;其通过引用以其全文并入本文。在一些实施例中,ORF1分子包含如下区域,该区域包含PCT/US19/65995的图48中所示的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或全部) 二级结构元件(例如, β 链)。在一些实施例中,ORF1分子包含如下区域,该区域包含PCT/US19/65995的图48中所示的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或全部) 二级结构元件(例如, β 链),位于YNPX²DXGX²N (SEQ ID NO:829) 基序(例如,如本文所述) 的侧翼。

[0635] ORF1胶冻卷结构域中的保守二级结构基序

[0636] 在一些实施例中,本文所述的多肽(例如,ORF1分子) 包含一个或多个由指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述) 所包含的二级结构元件。在一些实施例中,ORF1分子包含一个或多个由指环病毒ORF1蛋白(例如,如本文所述) 的胶冻卷结构域所包含的二级结构元件。一般而言,ORF1胶冻卷结构域包含二级结构,该二级结构按照从N-末端到C-末端的方向依次包含第一 β 链、第二 β 链、第一 α 螺旋、第三 β 链、第四 β 链、第五 β 链、第二 α 螺旋、第六 β 链、第七 β 链、第八 β 链和第九 β 链。在一些实施例中,ORF1分子包含二级结构,该二级结构按照从N-末端到C-末端的方向依次包含第一 β 链、第二 β 链、第一 α 螺旋、第三 β 链、第四 β 链、第五 β 链、第二 α 螺旋、第六 β 链、第七 β 链、第八 β 链和/或第九 β 链。

[0637] 在一些实施例中,一对保守的二级结构元件(即, β 链和/或 α 螺旋) 由间隙氨基酸序列隔开,例如,包含无规则卷曲序列、 β 链或 α 螺旋,或其组合。保守二级结构元件之间的间隙氨基酸序列可包含例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个氨基酸。在一些实施例中,ORF1分子可进一步包含一个或多个另外的 β 链和/或 α 螺旋(例如,在胶冻卷结构域中)。在一些实施例中,可以组合连续的 β 链或连续的 α 螺旋。在一些实施例中,第一 β 链和第二 β 链包含在更大的 β 链中。在一些实施例中,第三 β 链和第四 β 链包含在更大的 β 链中。在一些实施例中,第四 β 链和第五 β 链包含在更大的 β 链中。在一些实施例中,第六 β 链和第七 β 链包含在更大的 β 链中。在一些实施例中,第七 β 链和第八 β 链包含在更大的 β 链中。在一些实施例中,第八 β 链和第九 β 链包含在更大的 β 链中。

[0638] 在一些实施例中,第一 β 链的长度为约5-7个(例如,3、4、5、6、7、8、9或10个) 氨基酸。在一些实施例中,第二 β 链的长度为约15-16个(例如,13、14、15、16、17、18或19个) 氨基酸。在一些实施例中,第一 α 螺旋的长度为约15-17个(例如,13、14、15、16、17、18、19或20个) 氨基酸。在一些实施例中,第三 β 链的长度为约3-4个(例如,1、2、3、4、5或6个) 氨基酸。在一些实施例中,第四 β 链的长度为约10-11个(例如,8、9、10、11、12或13个) 氨基酸。在一些实施例中,第五 β 链的长度为约6-7个(例如,4、5、6、7、8、9或10个) 氨基酸。在一些实施例中,第二 α 螺旋的长度为约8-14个(例如,5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16或17个) 氨基酸。在一些实施例中,第二 α 螺旋可以分解成两个较小的 α 螺旋(例如,由无规则卷曲序列隔开)。在一些实施例中,两个较小的 α 螺旋中的每一个的长度为约4-6个(例如,2、3、4、5、6、7或8个) 氨基酸。在一些实施例中,第六 β 链的长度为约4-5个(例如,2、3、4、5、6或7个) 氨基酸。在一些实施例中,第七 β 链的长度为约5-6个(例如,3、4、5、6、7、8或9个) 氨基酸。在一些实施例中,第八 β 链的长度为约7-9个(例如,5、6、7、8、9、10、11、12或13个) 氨基酸。在一些实施例中,第九

β 链的长度为约5-7个(例如,3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸。

[0639] 在PCT/US19/65995的实例47和图47中描述了示例性胶冻卷结构域二级结构。在一些实施例中,ORF1分子包含如下区域,该区域包含PCT/US19/65995的图47中所示的任何胶冻卷结构域二级结构的一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或全部)二级结构元件(例如, β 链和/或 α 螺旋)。

[0640] 共有ORF1结构域序列

[0641] 在一些实施例中,ORF1分子(例如,如本文所述)包含胶冻卷结构域、N22结构域和/或C-末端结构域(CTD)中的一个或多个。在一些实施例中,胶冻卷结构域包含具有如本文所述的胶冻卷结构域共有序列的氨基酸序列(例如,如表37A-37C中任一个所列)。在一些实施例中,N22结构域包含具有如本文所述的N22结构域共有序列的氨基酸序列(例如,如表37A-37C中任一个所列)。在一些实施例中,CTD结构域包含具有如本文所述的CTD结构域共有序列的氨基酸序列(例如,如表37A-37C中任一个所列)。在一些实施例中,表37A-37C的任一中以“(X_{a-b})”格式列出的氨基酸包含一系列连续氨基酸,其中该系列包含至少a个和至多b个氨基酸。在某些实施例中,该系列中的所有氨基酸都是相同的。在其他实施例中,该系列包括至少两个(例如,至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或21个)不同的氨基酸。

[0642] 表37A. 甲型细环病毒ORF1结构域共有序列

[0643]

结构域	序列	SEQ ID NO:
胶冻卷	LVLTQWQPNTVRRCYIRGYLPLIICGEN(X ₀₋₃)TTSRNYATHS DDTIQKGPFGGGMSTTTFSLRVLYDEYQRFMNRWTYSNED LDLARYLGCKFTFYRHPDXDFIVQYNTNPPFKDTKLTAPSIH P(X ₁₋₅)GMLMLSKRKILIPSLKTRPKGKHVYKVRIGPPKLFED KWYTQSDLCDVPLVXLYATAADLQHPFGSPQTDNPCVTFQ VLGSXYNKHLSISP; 其中 X = 任何氨基酸。	227
N22	SNFEFPGAYTDITYNPLTDKGVGNMVWIIQYLTKPDTIXDKT QS(X ₀₋₃)KCLIEDLPLWAALYGYVDFCEKETGDSAIIXNXGRV LIRCPYTKPPLYDKT(X ₀₋₄)NKGFPYSTNFGNGKMPGGSGY VPIYWRARWYPTLFHQKEVLEDIVQSGPFAYKDEKPSTQLV MKYCFNFN; 其中 X = 任何氨基酸。	228
CTD	WGGNPISQQVVRNPCKDSG(X ₀₋₃)SGXGRQPRSVQVVDPKY MGPEYTFHSWDWRRGLFGEKAIKRMSEQPTDDEIFTGGXPK RPRRDPPTXQXPPEE(X ₁₋₄)QKESSSFR(X ₂₋₁₄)PWESSSQEXESES QEEEE(X ₀₋₃₀)EQT VQQQLRQQLREQRRLRVQLQLLFQQLLKT (X ₀₋₄)QAGLHINPLLLSQA(X ₀₋₄₀)*; 其中 X = 任何氨基酸。	229

[0644] 表37B.乙型细环病毒ORF1结构域共有序列

[0645]

结构域	序列	SEQ ID NO:
胶冻卷	LKQWQPSTIRKCKIKGYLPLFQCGKGRISNNYTQYKESIVPH HEPGGGGWSIQQFTLGALYEEHLKLRNWWTKSNDGLPLVR YLGCTIKLYRSED TDYIVTYQRCYPMTATKLTYLSTQPSRM LMNKHKIIVPSKXT(X ₁₋₄)NKKKKPYKKIFIKPPSQMQNKWYF QQDIANTPLLQLTXTACSLDRMYLSSDSISNNITFTSLNTNFF QNPNFQ; 其中 X = 任何氨基酸。	230
N22	(X ₄₋₁₀)TPLYFECRYNPFDKGTGNKVYLVSN(X ₁₋₈)TGWDPP TDPDLIIIEGFPLWLLLWGWLDWQKKLGKIQNIDTDYILVIQS XYYIPP(X ₁₋₃)KLPYVPLDXD(X ₀₋₂)FLHGRSPY(X ₃₋₁₆)PSDKQH WHPKVRFQXETINNIALTGPGTPKLPNQKSIQAHMKYKFYF K; 其中 X = 任何氨基酸。	231
CTD	WGGCPAPMETITDPCKQPKYPIPNLLQTTSLQXPTTPIETYL YKFDERRGLLTKAAKRIKKDXTTETTLFTDTGXSTTLPT XXQTETTQEEXTSEEE(X ₀₋₅)ETLLQQLQQLRRKQKQLRXRIL QLLQLLXLL(X ₀₋₂₆)*; 其中 X = 任何氨基酸。	232

[0646] 表37C. 丙型肝炎病毒ORF1结构域共有序列

[0647]

结构域	序列	SEQ ID NO:
胶冻卷	TIPLKQWPESIRKCKIKGYGTLVLGAEGRQFYCYTNEKDE YTPPKAPGGGGFGVELFSLEYLYEQWKARNNIWTKSNXYK DLCRYTGCKITFYRHPTTDFIVXYSRQPPFEIDKXTYMXXHP QXLLLRKHKKIILSKATNPKGKLKKKIKIKPPKQMLNKWFF QKQFAXYGLVQLQAAACBLRYPRLGCCNENRLITLYYLN; 其中 X = 任何氨基酸。	233
N22	LPIVVARYNPAXDTGKGNKXWLXSTLNGSXWAPPTTDKDL	234

	IIEGLPLWLALYGYWSYJKKVKKDKGILQSHMFVVKSPAIQP LXTATTQXTFYXPXIDNSFIQGKXPYDEPJTXNQKKLWYPTLE HQQETINAIVESGPYVPKLDNQKNSTWELXYXYTFYFK; 其中 X = 任何氨基酸。	
[0648]	CTD WGGPQIPDQPVDPKXQGTYPVPDXTXQQTIQIXNPLKQKPE TMFHDWDYRRGIITSTALKRMQENLETSSFXSDSEETP(X ₀₋₂)KKKKRLTXELPXPQEETEEIQSCLLSLCEESTCQEE(X ₁₋₆)ENL QQLIHQQQQQQQLKHNILKLLSDLKZKQRLQLQTGILE(X 1-10)*; 其中 X = 任何氨基酸。	235

[0649] 在一些实施例中,胶冻卷结构域包含如表21、23、25、27、29、31、33、35、D2、D4、D6、D8、D10、或37A-37C中任一个所列的胶冻卷结构域氨基酸序列,或与其具有至少70%、75%、80%、8%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,N22结构域包含如表21、23、25、27、29、31、33、35、D2、D4、D6、D8、D10、或37A-37C中任一个所列的N22结构域氨基酸序列,或与其具有至少70%、75%、80%、8%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,CTD结构域包含如表21、23、25、27、29、31、33、35、D2、D4、D6、D8、D10、或37A-37C中任一个所列的CTD结构域氨基酸序列,或与其具有至少70%、75%、80%、8%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0650] ORF1蛋白序列的鉴定

[0651] 在一些实施例中,可以从指环病毒的基因组中鉴定指环病毒ORF1蛋白序列或编码ORF1蛋白的核酸序列(例如,推定的指环病毒基因组,例如,通过核酸测序技术如深度测序技术来鉴定)。在一些实施例中,通过以下一种或多种(例如,1、2或全部3种)选择标准来鉴定ORF1蛋白序列:

[0652] (i) 长度选择:针对大于约600个氨基酸残基的那些序列,可以对蛋白序列(例如,符合下文(ii)或(iii)中描述的标准推定的指环病毒ORF1序列)进行大小选择,以鉴定推定的指环病毒ORF1蛋白。在一些实施例中,指环病毒ORF1蛋白序列的长度为至少约600、650、700、750、800、850、900、950或1000个氨基酸残基。在一些实施例中,甲型细环病毒ORF1蛋白序列的长度为至少约700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、900或1000个氨基酸残基。在一些实施例中,乙型细环病毒ORF1蛋白序列的长度为至少约650、660、670、680、690、700、750、800、900或1000个氨基酸残基。在一些实施例中,丙型细环病毒ORF1蛋白序列的长度为至少约650、660、670、680、690、700、750、800、900或1000个氨基酸残基。在一些实施例中,编码指环病毒ORF1蛋白的核酸序列的长度为至少约1800、1900、2000、2100、2200、2300、2400或2500个核苷酸。在一些实施例中,编码甲型细环病毒ORF1蛋白序列的核酸序列的长度为至少约2100、2150、2200、2250、2300、2400或2500个核苷酸。在一些实施例中,编码乙型细环病毒ORF1蛋白序列的核酸序列的长度为至少约1900、1950、2000、2500、

2100、2150、2200、2250、2300、2400或2500或1000个核苷酸。在一些实施例中，编码丙型肝炎病毒ORF1蛋白序列的核酸序列的长度为至少约1900、1950、2000、2500、2100、2150、2200、2250、2300、2400或2500或1000个核苷酸。

[0653] (ii) 存在ORF1基序：可以对蛋白序列（例如，符合上文(i)或下文(iii)中描述的标准）的推定的指环病毒ORF1序列）进行过滤，以鉴定在上述N22结构域中含有保守ORF1基序的那些序列。在一些实施例中，推定的指环病毒ORF1序列包含序列YNPXXDXGXXN。在一些实施例中，推定的指环病毒ORF1序列包含序列Y[NCS]PXXDX[GASKR]XX[NTSVAK]。

[0654] (iii) 存在精氨酸富集区：针对包括精氨酸富集区（例如，如本文所述）的那些序列，可以对蛋白序列（例如，符合上文(i)和/或(ii)中描述的标准）的推定的指环病毒ORF1序列）进行过滤。在一些实施例中，推定的指环病毒ORF1序列包含至少约30、35、40、45、50、55、60、65或70个氨基酸的连续序列，其包含至少30%（例如，至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%）的精氨酸残基。在一些实施例中，推定的指环病毒ORF1序列包含约35-40、40-45、45-50、50-55、55-60、60-65或65-70个氨基酸的连续序列，其包含至少30%（例如，至少约20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%）的精氨酸残基。在一些实施例中，精氨酸富集区位于推定的指环病毒ORF1蛋白起始密码子下游至少约30、40、50、60、70或80个氨基酸处。在一些实施例中，精氨酸富集区位于推定的指环病毒ORF1蛋白起始密码子下游至少约50个氨基酸处。

[0655] ORF2分子

[0656] 在一些实施例中，指环载体包含ORF2分子和/或编码ORF2分子的核酸。一般而言，ORF2分子包括具有指环病毒ORF2蛋白（例如，如本文所述的指环病毒ORF2蛋白，例如，如表A2、A4、A6、A8、A10、A12、C1-C5、2、4、6、8、10、12、14、16或18中的任一个所列的）的结构特征和/或活性的多肽，或其功能性片段。在一些实施例中，ORF2分子包含与如表A2、A4、A6、A8、A10、A12、C1-C5、2、4、6、8、10、12、14、16或18中任一个所示的指环病毒ORF2蛋白序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列。

[0657] 在一些实施例中，ORF2分子包含与甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒或丙型肝炎病毒ORF2蛋白具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施例中，ORF2分子（例如，与甲型肝炎病毒ORF2蛋白具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的ORF2分子）的长度为250个或更少个氨基酸（例如，约150-200个氨基酸）。在一些实施例中，ORF2分子（例如，与乙型肝炎病毒ORF2蛋白具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的ORF2分子）的长度约为50-150个氨基酸。在一些实施例中，ORF2分子（例如，与丙型肝炎病毒ORF2蛋白具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的ORF2分子）的长度为约100-200个氨基酸（例如，约100-150个氨基酸）。在一些实施例中，ORF2分子包含螺旋-转角-螺旋基序（例如，包含位于转角区侧翼的两个 α 螺旋的螺旋-转角-螺旋基序）。在一些实施例中，ORF2分子不包含TTV分离株TA278或TTV分离株SANBAN的ORF2蛋白的氨基酸序列。在一些实施例中，ORF2分子具有蛋白磷酸酶活性。在一些实施例中，ORF2分子或编码其的核酸分子包含相对于例如如本文所述的野生型ORF2蛋白（例如，如表A2、A4、A6、A8、A10、A12、C1-C5、2、4、6、8、10、12、14、16或18中的任一个中所示）的至少一个差异（例如，

突变、化学修饰或表观遗传改变)。

[0658] 保守的ORF2基序

[0659] 在一些实施例中,本文所述的多肽(例如,ORF2分子)包含氨基酸序列[W/F] $X^7HX^3CX^1CX^5H$ (SEQ ID NO:949),其中 X^n 是任何n个氨基酸的连续序列。在实施例中, X^7 表示任何七个氨基酸的连续序列。在实施例中, X^3 表示任何三个氨基酸的连续序列。在实施例中, X^1 表示任何单个氨基酸。在实施例中, X^5 表示任何五个氨基酸的连续序列。在一些实施例中,[W/F]可以是色氨酸或苯丙氨酸。在一些实施例中,[W/F] $X^7HX^3CX^1CX^5H$ (SEQ ID NO:949)包含在ORF2分子的N22结构域(例如,如本文所述)内。在一些实施例中,本文所述的遗传元件包含编码氨基酸序列[W/F] $X^7HX^3CX^1CX^5H$ (SEQ ID NO:949)的核酸序列(例如,编码ORF2分子的核酸序列,例如,如本文所述),其中 X^n 是任何n个氨基酸的连续序列。

[0660] 遗传元件

[0661] 在一些实施例中,指环载体包含遗传元件。在一些实施例中,遗传元件具有以下特征中的一种或多种:基本上不与宿主细胞的基因组整合,是附加型核酸,是单链DNA,是环状的,为约1至10kb,存在于细胞核内,可以由内源性蛋白质结合,产生效应物,例如靶向宿主或靶细胞的基因、或活动或功能的多肽或核酸(例如,RNA、iRNA、微RNA)。在一个实施例中,遗传元件是基本上非整合的DNA。在一些实施例中,遗传元件包含包装信号,例如,结合衣壳蛋白的序列。在一些实施例中,在包装或衣壳结合序列之外,遗传元件与野生型指环病毒核酸序列具有小于70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%序列同一性,例如,与指环病毒核酸序列,例如,如本文所述的指环病毒核酸序列具有小于70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、5%序列同一性。在一些实施例中,在包装或衣壳结合序列之外,遗传元件具有与指环病毒核酸序列至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%同一性的少于500、450、400、350、300、250、200、150或100个连续核苷酸。在某些实施例中,遗传元件是包含启动子序列、编码治疗性效应物和衣壳结合蛋白的序列的环状单链DNA。

[0662] 在一些实施例中,遗传元件的长度小于20kb(例如,小于约19kb、18kb、17kb、16kb、15kb、14kb、13kb、12kb、11kb、10kb、9kb、8kb、7kb、6kb、5kb、4kb、3kb、2kb、1kb或更小)。在一些实施例中,独立地或附加地,遗传元件的长度大于1000b(例如,至少约1.1kb、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4kb、4.1kb、4.2kb、4.3kb、4.4kb、4.5kb、4.6kb、4.7kb、4.8kb、4.9kb、5kb或更大)。在一些实施例中,遗传元件的长度为约2.5kb-4.6kb、2.8kb-4.0kb、3.0kb-3.8kb或3.2kb-3.7kb。在一些实施例中,遗传元件的长度为约1.5kb-2.0kb、1.5kb-2.5kb、1.5kb-3.0kb、1.5kb-3.5kb、1.5kb-3.8kb、1.5kb-3.9kb、1.5kb-4.0kb、1.5kb-4.5kb或1.5kb-5.0kb。在一些实施例中,遗传元件的长度为约2.0kb-2.5kb、2.0kb-3.0kb、2.0kb-3.5kb、2.0kb-3.8kb、2.0kb-3.9kb、2.0kb-4.0kb、2.0kb-4.5kb或2.0kb-5.0kb。在一些实施例中,遗传元件的长度为约2.5kb-3.0kb、2.5kb-3.5kb、2.5kb-3.8kb、2.5kb-3.9kb、2.5kb-4.0kb、2.5kb-4.5kb或2.5kb-5.0kb。在一些实施例中,遗传元件的长度为约3.0kb-5.0kb、3.5kb-5.0kb、4.0kb-5.0kb或4.5kb-5.0kb。在一些实施例中,遗传元件的长度为约1.5kb-2.0kb、2.0kb-2.5kb、2.5kb-3.0kb、3.0kb-3.5kb、3.1kb-3.6kb、3.2kb-3.7kb、3.3kb-3.8kb、3.4kb-3.9kb、3.5kb-4.0kb、4.0kb-4.5kb或4.5kb-5.0kb。在一些实施例中,遗传元件的长度为约3.6-

3.9kb。在一些实施例中，遗传元件的长度为约2.8-2.9kb。在一些实施例中，遗传元件的长度为约2.0-3.2kb。

[0663] 在一些实施例中，遗传元件包含本文所述的一种或多种特征，例如，编码基本上非致病性蛋白的序列、蛋白结合序列、编码调节性核酸的一个或多个序列、一个或多个调节性序列、编码复制蛋白的一个或多个序列，以及其他序列。

[0664] 在实施例中，遗传元件是由双链环状DNA产生的（例如，通过体外环化产生）。在一些实施例中，遗传元件是由双链环状DNA通过滚环式复制产生的。在实施例中，滚环式复制发生在细胞（例如，宿主细胞，例如哺乳动物细胞，例如人类细胞，如HEK293T细胞、A549细胞或Jurkat细胞）中。在实施例中，遗传元件可以在细胞中通过滚环式复制进行指数扩增。在实施例中，遗传元件可以在细胞中通过滚环式复制进行线性扩增。在实施例中，双链环状DNA或遗传元件能够在细胞中通过滚环式复制产生原始数量的至少2、4、8、16、32、64、128、256、518、1024倍或更多倍。在实施例中，将双链环状DNA引入细胞，例如，如本文所述的细胞中。

[0665] 在一些实施例中，双链环状DNA和/或遗传元件不包含一种或多种细菌质粒元件（例如，细菌复制起点或选择性标志，如细菌抗性基因）。在一些实施例中，双链环状DNA和/或遗传元件不包含细菌质粒骨架。

[0666] 在一个实施例中，本发明包括遗传元件，该遗传元件包含编码(i)基本上非致病性外壳蛋白，(ii)使该遗传元件结合至该基本上非致病性外壳蛋白的外壳蛋白结合序列，以及(iii)调节性核酸的核酸序列（例如，DNA序列）。在这样的实施例中，遗传元件可包含一个或多个与天然病毒序列（例如，天然指环病毒序列，例如，如本文所述）的任一个核苷酸序列具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%核苷酸序列同一性的序列。

[0667] 蛋白结合序列

[0668] 许多病毒采用的策略是病毒衣壳蛋白识别其基因组中的特定蛋白结合序列。例如，在具有不分节段基因组的病毒（例如酵母的L-A病毒）中，在基因组的5'端存在二级结构（茎环）和特异性序列，它们都用于结合病毒衣壳蛋白。然而，具有分节段基因组的病毒，如呼肠孤病毒科(Reoviridae)、正粘病毒科(Orthomyxoviridae)（流感病毒）、布尼亚病毒(Bunyaviruses)和沙粒病毒(Arenaviruses)，需要包装每个基因组节段。一些病毒利用节段的互补区来协助病毒包括每个基因组分子中的一个。其他病毒对于每个不同的节段都具有特定的结合位点。例如，参见Curr Opin Struct Biol.[当代结构生物学观点]2010年2月;20(1):114-120;和Journal of Virology[病毒学杂志](2003),77(24),13036-13041。

[0669] 在一些实施例中，遗传元件编码与基本上非致病性蛋白质结合的蛋白结合序列。在一些实施例中，蛋白结合序列有助于将遗传元件包装到蛋白质外壳中。在一些实施例中，蛋白结合序列特异性结合基本上非致病性蛋白质的精氨酸富集区。在一些实施例中，遗传元件包含如PCT/US19/65995的实例8中所述的蛋白结合序列。

[0670] 在一些实施例中，遗传元件包含与指环病毒序列的5' UTR保守结构域或GC富集结构域（例如，如本文所述）具有至少70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的蛋白结合序列。

[0671] 在实施例中，蛋白结合序列与指环病毒5' UTR保守结构域核苷酸序列（例如，如本

文所述)具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

[0672] 5' UTR区域

[0673] 在一些实施例中,如本文所述的核酸分子(例如,遗传元件、遗传元件构建体或遗传元件区域)包含5' UTR序列,例如,如本文所述的5' UTR保守结构域序列(例如,在表A1、表B1或表C1的任一中)或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0674] 在一些实施例中,5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGGGX₁CAGTCT,或与其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGGGX₁CAGTCT,或者相对于其具有不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸差异(例如,置换、缺失或添加)的核酸序列。在实施例中,X₁是A。在实施例中,X₁不存在。

[0675] 在一些实施例中,5' UTR序列包含甲型细环病毒(例如,Ring1)5' UTR的核酸序列,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在实施例中,5' UTR序列包含表A1中列出的5' UTR保守结构域的核酸序列,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表A1中列出的5' UTR保守结构域具有至少95%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表A1中列出的5' UTR保守结构域具有至少95.775%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表A1中列出的5' UTR保守结构域具有至少97%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表A1中列出的5' UTR保守结构域具有至少97.183%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGC,或与其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTTTACACACCGCAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGC,或者相对于其具有不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸差异(例如,置换、缺失或添加)的核酸序列。

[0676] 在一些实施例中,5' UTR序列包含乙型细环病毒(例如,Ring2)5' UTR的核酸序列,或与其具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在实施例中,5' UTR序列包含表B1中列出的5' UTR保守结构域的核酸序列,或与其具有至少75%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少85%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少87%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少87.324%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少88%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少88.732%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少91%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少91.549%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少

92%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少92.958%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少94%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少94.366%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少95%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少95.775%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少97%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表B1中列出的5' UTR保守结构域具有至少97.183%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGATCAGTCT,或与其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAAGTCAAGGGGCAATTCGGGCTAGATCAGTCT,或者相对于其具有不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸差异(例如,置换、缺失或添加)的核酸序列。

[0677] 在一些实施例中,5' UTR序列包含丙型肝炎病毒(例如,Ring4) 5' UTR的核酸序列,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在实施例中,5' UTR序列包含表C1中列出的5' UTR保守结构域的核酸序列,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表C1中列出的5' UTR保守结构域具有至少97%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸分子包含与表C1中列出的5' UTR保守结构域具有至少97.183%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAGGTCTAGGGGCAATTCGGGCTAGGGCAGTCT,或与其具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。在一些实施例中,5' UTR序列包含核酸序列AGGTGAGTGAAACCACCGAGGTCTAGGGGCAATTCGGGCTAGGGCAGTCT,或者相对于其具有不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸差异(例如,置换、缺失或添加)的核酸序列。

[0678] 在一些实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与指环病毒5' UTR序列,例如表38中所示的核酸序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在一些实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含表38所示的共有5' UTR序列的核酸序列,其中 X_1 、 X_2 、 X_3 、 X_4 和 X_5 各自独立地是任何核苷酸,例如其中 X_1 =G或T, X_2 =C或A, X_3 =G或A, X_4 =T或C,并且 X_5 =A、C或T。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的共有5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的示例性TTV 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的TTV-CT30F 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的TTV-HD23a 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、

98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的TTV-JA20 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的TTV-TJN02 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的TTV-tth8 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。

[0679] 在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的甲型细环病毒共有5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的甲型细环病毒分支1 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的甲型细环病毒分支2 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的甲型细环病毒分支3 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的甲型细环病毒分支4 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的甲型细环病毒分支5 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的甲型细环病毒分支6 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表38中所示的甲型细环病毒分支7 5' UTR序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。

[0680] 表38. 来自指环病毒的示例性5' UTR序列

[0681]

来源	序列	SEQ ID NO:
共有	CGGGTGCCGX ₁ AGGTGAGTTTACACACCGX ₂ AGT CAAGGGGCAATTCGGGCTCX ₃ GGA CTGGCCGGG CX ₄ X ₅ TGGG X ₁ = G 或 T X ₂ = C 或 A X ₃ = G 或 A X ₄ = T 或 C X ₅ = A、C 或 T	105
示例性 TTV 序列	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT WTGGG	106
TTV-CT30F	CGGGTGCCGTAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	107
TTV-HD23a	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCC CTGGG	108
TTV-JA20	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT TTGGG	109
TTV-TJN02	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT	110

[0682]

	ATGGG	
TTV-tth8	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGAAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCT TTGGG	111
甲型细环病毒 共有 5' UTR	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGC X ₁ X ₂ TGGG; 其中 X ₁ 包括 T 或 C, 并且其中 X ₂ 包括 A、 C 或 T。	112
甲型细环病毒 分支 1 5' UTR (例如, TTV-CT30F)	CGGGTGCCGTAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	113
甲型细环病毒 分支 2 5' UTR (例如, TTV-P13-1)	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCC CGGG	114
甲型细环病毒 分支 3 5' UTR (例如, TTV-tth8)	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGAAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCAGGACTGGCCGGGCT TTGGG	115
甲型细环病毒 分支 4 5' UTR (例如, TTV-HD20a)	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGAGGCCGGGCCAT GGG	116
甲型细环病毒 分支 5 5' UTR (例如, TTV-16)	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCC CCGGG	117
甲型细环病毒 分支 6 5' UTR (例如, TTV-TJN02)	CGGGTGCCGAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	118
甲型细环病毒 分支 7 5' UTR (例如, TTV-HD16d)	CGGGTGCCGAAGGTGAGTTTACACACCGCAGTC AAGGGGCAATTCGGGCTCGGGACTGGCCGGGCT ATGGG	119

[0683] 鉴定5' UTR序列

[0684] 在一些实施例中,可以在指环病毒基因组内鉴别指环病毒5' UTR序列(例如,推定的指环病毒基因组,例如,通过核酸测序技术如深度测序技术来鉴定)。在一些实施例中,通过以下步骤之一或二者鉴定指环病毒5' UTR序列:

[0685] (i) 鉴定环化接合点:在一些实施例中,5' UTR将位于全长、环化指环病毒基因组的环化接合点附近。例如,可以通过鉴定序列的重叠区域来鉴定环化接合点。在一些实施例中,可以从序列中剪切掉序列的重叠区域以产生已环化的全长指环病毒基因组序列。在一

些实施例中,使用软件以这种方式环化基因组序列。不希望受到理论的束缚,在计算上环化基因组可能导致序列的起始位置以非生物性方式定向。序列内的标记可用于将序列重新定向到正确的方向。例如,标记序列可以包括与如本文所述的指环病毒基因组内一个或多个元件(例如,指环病毒,例如,如本文所述的指环病毒的TATA盒、加帽位点、起始元件、转录起始位点、5' UTR保守结构域、ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3、ORF2t/3、三个开放阅读框区域、多(A)信号或GC富集区中一种或多种)具有基本同源性的序列。

[0686] (ii) 鉴定5' UTR序列:一旦获得推定的指环病毒基因组序列,就可以将该序列(或其位置,例如,其长度为约40-50、50-60、60-70、70-80、80-90或90-100个核苷酸)与一个或多个指环病毒5' UTR序列(例如,如本文所述)进行比较,以鉴定与其具有实质同源性的序列。在一些实施例中,推定的指环病毒5' UTR区域与如本文所述的指环病毒5' UTR序列具有至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性。

[0687] GC富集区

[0688] 在一些实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的核酸序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的GC富集序列具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。

[0689] 在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与如表39中所示的36个核苷酸的GC富集序列(例如,36个核苷酸的共有GC富集区序列1、36个核苷酸的共有GC富集区序列2、TTV分支1 36个核苷酸的区域、TTV分支3 36个核苷酸的区域、TTV分支3分离株GH1 36个核苷酸的区域、TTV分支3s1e1932 36个核苷酸的区域、TTV分支4ctdc002 36个核苷酸的区域、TTV分支5 36个核苷酸的区域、TTV分支6 36个核苷酸的区域或TTV分支7 36个核苷酸的区域)具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含核酸序列,该核酸序列包含如表39中所示的36个核苷酸的GC富集序列(例如,36个核苷酸的共有GC富集区序列1、36个核苷酸的共有GC富集区序列2、TTV分支1 36个核苷酸的区域、TTV分支3 36个核苷酸的区域、TTV分支3分离株GH1 36个核苷酸的区域、TTV分支3s1e1932 36个核苷酸的区域、TTV分支4ctdc002 36个核苷酸的区域、TTV分支5 36个核苷酸区域、TTV分支6 36个核苷酸区域或TTV分支7 36个核苷酸的区域)的至少10、15、20、25、30、31、32、33、34、35或36个连续核苷酸。

[0690] 在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与甲型细环病毒GC富集区序列(例如,选自TTV-CT30F、TTV-P13-1、TTV-tth8、TTV-HD20a、TTV-16、TTV-TJN02或TTV-HD16d,例如,如表39中所列的)具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含核酸序列,该核酸序列包含甲型细环病毒GC富集区序列(例如,选自TTV-CT30F、TTV-P13-1、TTV-tth8、TTV-HD20a、TTV-16、TTV-TJN02或TTV-HD16d,例如,如表39中所列的)的至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、104、105、108、110、111、115、120、122、130、140、145、150、155或156个连续核苷酸。

[0691] 在实施例中,36个核苷酸的GC富集序列选自:

[0692] (i) CGCGCTGCGCGCGCCGCCAGTAGGGGAGCCATGC (SEQ ID NO:160);

[0693] (ii) GCGCTX₁CGCGCGCGCGCGGGGGGCTGCGCCCCCCC (SEQ ID NO:164), 其中X₁选自T、G或A;

[0694] (iii) GCGCTTCGCGCGCGCCGCCACTAGGGGCGTTGCGCG (SEQ ID NO:165);

[0695] (iv) GCGCTGCGCGCGCGCCGCCAGTAGGGGCGCAATGCG (SEQ ID NO:166);

[0696] (v) GCGCTGCGCGCGCGCGCCCCGGGGGAGGCATTGCCT (SEQ ID NO:167);

[0697] (vi) GCGCTGCGCGCGCGCGCGGGGGGGCGCCAGCGCCC (SEQ ID NO:168);

[0698] (vii) GCGCTTCGCGCGCGCGCGGGGGGCTCCGCCCCCCC (SEQ ID NO:169);

[0699] (viii) GCGCTTCGCGCGCGCGCGGGGGGCTGCGCCCCCCC (SEQ ID NO:170);

[0700] (ix) GCGCTACGCGCGCGCGCGGGGGGCTGCGCCCCCCC (SEQ ID NO:171); 或

[0701] (x) GCGCTACGCGCGCGCGCGGGGGGCTCTGCCCCCCC (SEQ ID NO:172)。

[0702] 在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含核酸序列CGCGCTGCGCGCGCCGCCAGTAGGGGAGCCATGC (SEQ ID NO:160)。

[0703] 在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含表39中所示的共有GC富集序列的核酸序列,其中X₁、X₄、X₅、X₆、X₇、X₁₂、X₁₃、X₁₄、X₁₅、X₂₀、X₂₁、X₂₂、X₂₆、X₂₉、X₃₀和X₃₃各自独立地是任何核苷酸,并且其中X₂、X₃、X₈、X₉、X₁₀、X₁₁、X₁₆、X₁₇、X₁₈、X₁₉、X₂₃、X₂₄、X₂₅、X₂₇、X₂₈、X₃₁、X₃₂和X₃₄各自独立地是不存在的或任何核苷酸。在一些实施例中,X₁至X₃₄中的一个或多个(例如,全部)各自独立地是表39中指定的核苷酸(或不存在)。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的示例性TTV GC富集序列(例如,全序列、片段1、片段2、片段3、或其任何组合,例如按顺序排列的片段1-3)具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的TTV-CT30F GC富集序列(例如,全序列、片段1、片段2、片段3、片段4、片段5、片段6、片段7、片段8、或其任何组合,例如按顺序排列的片段1-7)具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的TTV-HD23a GC富集序列(例如,全序列、片段1、片段2、片段3、片段4、片段5、片段6、或其任何组合,例如按顺序排列的片段1-6)具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的TTV-JA20 GC富集序列(例如,全序列、片段1、片段2、或其任何组合,例如按顺序排列的片段1和2)具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的TTV-TJN02GC富集序列(例如,全序列、片段1、片段2、片段3、片段4、片段5、片段6、片段7、片段8、或其任何组合,例如按顺序排列的片段1-8)具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的TTV-tth8 GC富集序列(例如,全序列、片段1、片段2、片段3、片段4、片段5、片段6、片段7、片段8、片段9、或其任何组合,例如按顺序排列的片段1-6)具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、

97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的片段7具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的片段8具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。在实施例中,遗传元件(例如,遗传元件的蛋白结合序列)包含与表39中所示的片段9具有至少约75%(例如,至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性的核酸序列。

[0704] 表39. 来自指环病毒的示例性GC富集序列

	来源	序列	SEQ ID NO:
[0705]	共有	CGGCGGX ₁ GGX ₂ GX ₃ X ₄ X ₅ CGCGCTX ₆ CGCGC GCX ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ CX ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X ₁₄ GGGGX ₁₅ X ₁₆ X ₁₇ X ₁₈	120

[0706]

$X_{19}X_{20}X_{21}GCX_{22}X_{23}X_{24}X_{25}CCCCCCCX_{26}CGCGC$
 $ATX_{27}X_{28}GCX_{29}CGGGX_{30}CCCCCCCCCX_{31}X_{32}X$
 $_{33}GGGGGGCTCCGX_{34}CCCCCGGCCCCCCC$

$X_1 = G$ 或 C

$X_2 = G、C$ 或不存在

$X_3 = C$ 或不存在

$X_4 = G$ 或 C

$X_5 = G$ 或 C

$X_6 = T、G$ 或 A

$X_7 = G$ 或 C

$X_8 = G$ 或不存在

$X_9 = C$ 或不存在

$X_{10} = C$ 或不存在

$X_{11} = G、A$ 或不存在

$X_{12} = G$ 或 C

$X_{13} = C$ 或 T

$X_{14} = G$ 或 A

$X_{15} = G$ 或 A

$X_{16} = A、G、T$ 或不存在

$X_{17} = G、C$ 或不存在

$X_{18} = G、C$ 或不存在

$X_{19} = C、A$ 或不存在

$X_{20} = C$ 或 A

$X_{21} = T$ 或 A

$X_{22} = G$ 或 C

$X_{23} = G、T$ 或不存在

$X_{24} = C$ 或不存在

$X_{25} = G、C$ 或不存在

$X_{26} = G$ 或 C

$X_{27} = G$ 或不存在

[0707]

		$X_{28} = C$ 或不存在 $X_{29} = G$ 或 A $X_{30} = G$ 或 T $X_{31} = C、T$ 或不存在 $X_{32} = G、C、A$ 或不存在 $X_{33} = G$ 或 C $X_{34} = C$ 或不存在	
示例性 TTV 序列	全序列	GCCGCCGCGGCGGCGGSGGNGNSGCGCGCT DCGCGCGCSNNNCRCRGGGGGNNNNCWG CSNCNCCCCCCCCCGCGCATGCGCGGGKCC CCCCCCNNCGGGGGGCTCCGCCCCCGGC CCCCCCCCGTGCTAAACCCACCGCGCATGC GCGACCACGCCCCGCGCC	121
	片段 1	GCCGCCGCGGCGGCGGSGGNGNSGCGCGCT DCGCGCGCSNNNCRCRGGGGGNNNNCWG CSNCNCCCCCCCCCGCGCAT	122
	片段 2	GCGCGGGKCCCCCCCCNCGGGGGGCTC CG	123
	片段 3	CCCCCGGCCCCCCCCCGTGCTAAACCCAC CGCGCATGCGCGACCACGCCCCGCGCC	124
TTV-CT30F	全序列	GCGGCGG-GGGGGCG-GCCGCG- TTCGCGCGCCGCCACCAGGGGGTG-- CTGCG-CGCCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGCCCCCCCC-- GGGGGGGCTCCGCCCCCGGCCCCCCCC GTGCTAAACCCACCGCGCATGCGCGACCAC GCCCCGCGCC	125
	片段 1	GCGGCGG	126
	片段 2	GGGGGCG	127
	片段 3	GCCGCG	128
	片段 4	TTCGCGCGCCGCCACCAGGGGGTG	129

[0708]

	片段 5	CTGCG	130
	片段 6	CGCCCCCCCCCGCGCAT	131
	片段 7	GCGCGGGGCCCCCCCC	132
	片段 8	GGGGGGGCTCCGCCCCCGGCCCCCCCC GTGCTAAACCCACCGCGCATGCGCGACCAC GCCCCGCGGCC	133
TTV-HD23a	全序列	CGGCGGCGGCGGCG- CGCGCGCTGCGCGCGCG--- CGCCGGGGGGGCGCCAGCG- CCCCCCCCCGCGCAT GCACGGGTCCCCCCCCACGGGGGGCTCC G CCCCCGGCCCCCCCC	134
	片段 1	CGGCGGCGGCGGCG	135
	片段 2	CGCGCGCTGCGCGCGCG	136
	片段 3	CGCCGGGGGGGCGCCAGCG	137
	片段 4	CCCCCCCCCGCGCAT	138
	片段 5	GCACGGGTCCCCCCCCACGGGGGGCTCC G	139
	片段 6	CCCCCGGCCCCCCCC	140
TTV-JA20	全序列	CCGTCGGCGGGGGGCGCGCTGCGCG CGCGGCCC- CCGGGGGAGGCACAGCCTCCCCCCCCCGCG CGCATGCGCGGGTCCCCCCCCCTCCGGG GGGCTCCGCCCCCGGCCCCCCCC	141
	片段 1	CCGTCGGCGGGGGGCGCGCTGCGCG CGCGGCCC	142
	片段 2	CCGGGGGAGGCACAGCCTCCCCCCCCCGCG CGCATGCGCGGGTCCCCCCCCCTCCGGG GGGCTCCGCCCCCGGCCCCCCCC	143
TTV-TJN02	全序列	CGGCGGCGGCG-CGCGCGCTACGCGCGCG-- -CGCCGGGGG---CTGCCGC-	144

[0709]

		CCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGGCCCCCCCCC- GCGGGGGGCTCCG CCCCCCGGCCCCC	
	片段 1	CGGCGGCGGCG	145
	片段 2	CGCGCGCTACGCGGCG	146
	片段 3	CGCCGGGGG	147
	片段 4	CTGCCGC	148
	片段 5	CCCCCCCCCGCGCAT	149
	片段 6	GCGCGGGGGCCCCCCCCC	150
	片段 7	GCGGGGGGCTCCG	151
	片段 8	CCCCCGGCCCCC	152
TTV-tth8	全序列	GCCGCCGCGGCGGCGGGG- GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCAGTAGG GGGAGCCATGCG---CCCCCCCCCGCGCAT GCGCGGGGGCCCCCCCCC- GCGGGGGGCTCCG CCCCCGGCCCCCCCCG	153
	片段 1	GCCGCCGCGGCGGCGGGG	154
	片段 2	GCGGCGCGCTGCGCGCGCCGCCAGTAGG GGGAGCCATGCG	155
	片段 3	CCCCCCCCCGCGCAT	156
	片段 4	GCGCGGGGGCCCCCCCCC	157
	片段 5	GCGGGGGGCTCCG	158
	片段 6	CCCCCGGCCCCCCCCG	159
	片段 7	CGCGCTGCGCGCGCCGCCAGTAGGGGA GCCATGC	160
	片段 8	CCGCCATCTTAAGTAGTTGAGGCGGACGGT GGCGTGAGTTCAAAGGTCACCATCAGCCAC ACCTACTCAAAATGGTGG	161
	片段 9	CTTAAGTAGTTGAGGCGGACGGTGCGTGA	162

[0710]

		GTTCAAAGGTCACCATCAGCCACACCTACT CAAAATGGTGGACAATTTCTTCCGGGTCAA AGGTTACAGCCGCCATGTTAAACACGTGA CGTATGACGTCACGGCCGCCATTTTGTGAC ACAAGATGGCCGACTTCCTTCC	
其他 GC 富集 序列	36 个核苷酸的 共有 GC 富集区 序列 1	CGCGCTGCGCGCGCCGCCAGTAGGGGGA GCCATGC	163
	36 个核苷酸的 区域共有序列 2	GCGCTX ₁ GCGCGCGCGCCGGGGGGCTGCG CCCCCCC, 其中 X ₁ 选自 T、G 或 A	164
	TTV 分支 1 36 个核苷酸的区 域	GCGCTTCGCGCGCCGCCACTAGGGGGCGT TGCGCG	165
	TTV 分支 3 36 个核苷酸的区 域	GCGCTGCGCGCGCCGCCAGTAGGGGGCG CAATGCG	166
	TTV 分支 3 分 离株 GH1 36 个 核苷酸的区域	GCGCTGCGCGCGCGGCCCGGGGGAGGC ATTGCCT	167
	TTV 分支 3 sle1932 36 个核 苷酸的区域	GCGCTGCGCGCGCGCGCCGGGGGGGCGCC AGCGCCC	168
	TTV 分支 4 ctdc002 36 个核 苷酸的区域	GCGCTTCGCGCGCGCGCCGGGGGGCTCCGC CCCCC	169
	TTV 分支 5 36 个核苷酸的区 域	GCGCTTCGCGCGCGCGCCGGGGGGCTGCGC CCCCC	170
	TTV 分支 6 36 个核苷酸的区 域	GCGCTACGCGCGCGCGCCGGGGGGCTGCG CCCCC	171

[0711]

	TTV 分支 7 36 个核苷酸的区 域	GCGCTACGCGCGCGCGCCGGGGGGCTCTGC CCCCC	172
其他甲型细环 病毒 GC 富集 区序列	TTV-CT30F	GCGGCGGGGGGGCGGCCGCGTTCGCGCGC CGCCACCAAGGGGGTGCTGCGCGCCCCC CCGCGCATGCGCGGGGCCCCCCCCCGGGG GGGCTCCGCCCCCGGCCCCCCCCGTGC TAAACCCACCGCGCATGCGCGACCACGCCC CCGCCGCC	801
	TTV-P13-1	CCGAGCGTTAGCGAGGAGTGCGACCCTACC CCCTGGGCCCCACTTCTTCGGAGCCGCGCGC TACGCCTTCGGCTGCGCGCGGCACCTCAGA CCCCGCTCGTGCTGACACGCTTGCGCGTG TCAGACCACTTCGGGCTCGCGGGGGTTCGGG	802
	TTV-tth8	GCCGCCGCGGCGGGCGGGGGCGGCGCGCT GCGCGCGCCGCCAGTAGGGGAGCCATG CGCCCCCCCCCGCGCATGCGCGGGGCCCC CCCCGCGGGGGGCTCCGCCCCCGGCCCC CCCG	803
	TTV-HD20a	CGGCCAGCGGCGGCGCGCGCTTCGCGC GCGCGCCGGGGGGCTCCGCCCCCCCCCGCG CATGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCT CCGCCCCCGGTCCCCCCCCG	804
	TTV-16	CGGCCGTGCGGCGGCGCGCGCTTCGCGC GCGCGCCGGGGGGTGCCGCCCCCCCCCGCG CATGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGG GCTCCGCCCCCGGCCCCCCCCCG	805
	TTV-TJN02	CGGCGGCGGCGCGCGCTACGCGCGCGC GCCGGGGGGCTGCCGCCCCCCCCCGCGCA TGCGCGGGGCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCC GCCCCCGGCCCCC	806

[0712]	TTV-HD16d	GGCGGCGGCGCGCGCGCTACGCGCGCGCG CCGGGGAGCTCTGCCCCCCCCCGCGCATGC GCGCGGGTCCCCCCCCCGCGGGGGGCTCCG CCCCCGGTCCCCCCCCCG	807
--------	-----------	---	-----

[0713] 效应物

[0714] 在一些实施例中,遗传元件可包括一个或多个编码效应物的序列,这些效应物是例如,功能性效应物,例如内源性效应物或外源性效应物,例如治疗性多肽或核酸,例如细胞毒性或细胞溶解性RNA或蛋白质。在一些实施例中,功能性核酸是非编码RNA。在一些实施例中,功能性核酸是编码RNA。效应物可以调节生物活性,例如增加或降低酶活性、基因表达、细胞信号传导以及细胞或器官功能。效应物活性还可包括结合调节性蛋白以调节调节子的活性,例如转录或翻译。效应物活性还可以包括激活或抑制功能。例如,效应物可通过触发酶中底物亲和力的增加来诱导酶活性,例如,果糖2,6-二磷酸激活磷酸果糖激酶1并增加糖酵解响应于胰岛素的速率。在另一实例中,效应物可以抑制底物与受体的结合并抑制其激活,例如,纳曲酮和纳洛酮结合阿片受体而不激活它们,并阻断受体结合阿片类物质的能力。效应物活性还可以包括调节蛋白质的稳定性/降解和/或转录本的稳定性/降解。例如,多肽辅因子(即泛素)可以将蛋白质定向到蛋白质上用于降解,从而标志它们进行降解。在另一实例中,效应物通过阻断酶的活性位点来抑制酶活性,例如,甲氨蝶呤是四氢叶酸(一种二氢叶酸还原酶的辅酶)的结构类似物,其与二氢叶酸还原酶的结合力比天然底物高1000倍,并抑制核苷酸碱基合成。

[0715] 在一些实施例中,编码效应物的序列是遗传元件的一部分,例如,它可以在如本文所述的插入位点处插入。在实施例中,在非编码区处将编码效应物的序列插入遗传元件中,例如,位于开放阅读框的3'和遗传元件的GC富集区的5'的非编码区,在TATA盒上游的5'非编码区中,在5' UTR中,在多A信号下游或GC富集区上游的3'非编码区中。在实施例中,在例如本文所述的TTV-tth8质粒的约核苷酸3588处或在例如本文所述的TTMV-LY2质粒的约核苷酸2843处将编码效应物的序列插入遗传元件中。在实施例中,在例如本文所述的TTV-tth8质粒的核苷酸336-3015处或之内或在例如本文所述的TTV-LY2质粒的核苷酸242-2812处或之内将编码效应物的序列插入遗传元件中。在一些实施例中,编码效应物的序列替换了部分或全部开放阅读框(例如,如本文所述的ORF,例如,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3和/或ORF2t/3)。

[0716] 在一些实施例中,编码效应物的序列包括100-2000、100-1000、100-500、100-200、200-2000、200-1000、200-500、500-1000、500-2000或1000-2000个核苷酸。在一些实施例中,效应物是核酸或蛋白有效载荷,例如,如本文所述的核酸或蛋白有效载荷。

[0717] 调节性核酸

[0718] 在一些实施例中,效应物是调节性核酸。调节性核酸修饰内源性基因和/或外源性基因的表达。在一个实施例中,调节性核酸靶向宿主基因。调节性核酸可包括但不限于与内源性基因杂交的核酸(例如,如本文别处所述的miRNA、siRNA、mRNA、lncRNA、RNA、DNA、反义RNA、gRNA)、与外源性核酸(例如病毒DNA或RNA)杂交的核酸、与RNA杂交的核酸、干扰基因转录的核酸、干扰RNA翻译的核酸、稳定RNA或去稳定RNA的核酸(例如通过靶向降解的方式),

以及调节DNA或RNA结合因子的核酸。在实施例1中,调节性核酸编码miRNA。在一些实施例中,针对野生型指环病毒而言,调节性核酸是内源性的。在一些实施例中,针对野生型指环病毒而言,调节性核酸是外源性的。

[0719] 在一些实施例中,调节性核酸包含通常含有5-500个碱基对的RNA或RNA样结构(取决于特定的RNA结构,例如miRNA5-30bp、lncRNA200-500bp)并且可以具有与细胞内表达的靶基因中的编码序列或编码细胞内表达的靶基因的序列相同(或互补)或几乎相同(或基本上互补)的核碱基序列。

[0720] 在一些实施例中,调节性核酸包含核酸序列,例如,引导RNA(gRNA)。在一些实施例中,DNA靶向部分包含引导RNA或编码引导RNA的核酸。gRNA,即一种短的合成RNA,可以由结合不完整效应部分所必需的“支架”序列和用户定义的用于基因组靶标的约20个核苷酸靶向序列组成。在实践中,通常将引导RNA序列设计为具有17-24个核苷酸(例如,19、20或21个核苷酸)的长度,并且与靶核酸序列互补。定制gRNA生成器和算法可通过商业途径获得,用于设计有效的引导RNA。使用嵌合性“单引导RNA”(“sgRNA”)也可以实现基因编辑,这是一种工程化(合成)的单一RNA分子,模拟天然存在的crRNA-tracrRNA复合物,并同时含有tracrRNA(用于结合核酸酶)和至少一个crRNA(以将核酸酶引导至被靶向序列进行编辑)。人们也已证明,在基因组编辑中,经化学修饰的sgRNA是有效的;参见,例如,Hendel等人(2015)Nature Biotechnol.[自然-生物技术],985-991。

[0721] 调节性核酸包含识别特定DNA序列(例如,与基因的启动子、增强子、沉默子或阻遏子相邻或在其内的序列)的gRNA。

[0722] 某些调节性核酸可以通过RNA干扰(RNAi)的生物学过程抑制基因表达。RNAi分子包含RNA或RNA样结构,其通常含有15-50个碱基对(如约18-25个碱基对)并且具有与细胞内表达的靶基因中的编码序列相同(互补)或几乎相同(基本上互补)的核碱基序列。RNAi分子包括但不限于:短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、局部双链体(meroduplex)和dicer底物(美国专利号8,084,599、8,349,809和8,513,207)。

[0723] 长非编码RNA(lncRNA)被定义为长于100个核苷酸的非蛋白质编码转录物。这种有些武断的限制将lncRNA与小型调节性RNA(例如微RNA(miRNA)、短干扰RNA(siRNA)及其他短RNA)区分开来。通常,大多数(约78%)的lncRNA的特征为组织特异性的。以与附近蛋白质编码基因相反的方向转录的发散lncRNA(占哺乳动物基因组中总lncRNA的约20%大比例)可能会调节附近基因的转录。

[0724] 遗传元件可以编码具有与内源基因或基因产物(例如,mRNA)的全部或片段基本上互补或完全互补的序列的调节性核酸。调节性核酸可以与内含子和外显子之间的边界处的序列互补,从而防止特异性基因的新生成的核RNA转录物成熟为用于转录的mRNA。与特定基因互补的调节性核酸可与该基因的mRNA杂交并阻止其翻译。反义调节性核酸可以是DNA、RNA或其衍生物或杂合体。

[0725] 与感兴趣的转录物杂交的调节性核酸的长度可以在5至30个核苷酸之间,在约10至30个核苷酸之间,或约11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个核苷酸。调节性核酸与靶向转录物的同一性程度应为至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。

[0726] 遗传元件可以编码调节性核酸,例如与靶基因的约5至约25个连续核苷酸相同的

微小RNA (miRNA) 分子。在一些实施例中,miRNA序列靶向mRNA并从二核苷酸AA开始,其GC含量为约30%-70%(约30%-60%、约40%-60%或约45%-55%),并且例如,如通过标准BLAST搜索所确定的,与要引入其中的哺乳动物基因组中的靶标以外的任何核苷酸序列不具有高百分比同一性。

[0727] siRNA和shRNA类似于内源性微RNA(miRNA)基因的处理途径中的中间体(Bartel, Cell[细胞]116:281-297,2004)。在一些实施例中,siRNA可以用作miRNA,反之亦然(Zeng等人,Mol Cell[分子细胞学]9:1327-1333,2002;Doench等人,Genes Dev[基因与发育]17:438-442,2003)。像siRNA一样,微RNA使用RISC来下调靶基因,但与siRNA不同,大多数动物性miRNA都不切割mRNA。相反,miRNA通过翻译抑制或多A(多腺苷酸)去除和mRNA降解降低蛋白质输出(Wu等人,Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]103:4034-4039,2006)。已知的miRNA结合位点位于mRNA3' UTR内;miRNA似乎靶向与miRNA5'端的2-8个核苷酸几乎完全互补的位点(Rajewsky,Nat Genet[自然-遗传学]38增刊:S8-13,2006;Lim等人,Nature[自然]433:769-773,2005)。此区被称为种子区。由于siRNA和miRNA是可互换的,因此外源性siRNA下调与siRNA具有种子互补性的mRNA(Birmingham等人,Nat Methods[自然-方法]3:199-204,2006。3'UTR内的多个靶位点会产生更强的下调(Doench等人,Genes Dev[基因与发育]17:438-442,2003)。

[0728] 已知miRNA序列的列表可在研究组织维护的数据库中找到,这些组织如维康信托基金会桑格研究院(Wellcome Trust Sanger Institute)、宾夕法尼亚生物信息学中心(Penn Center for Bioinformatics)、斯隆凯特灵癌症中心(Memorial Sloan Kettering Cancer Center)和欧洲分子生物学实验室(European Molecule Biology Laboratory)等。已知的有效的siRNA序列和同源结合位点也很好地在相关文献中。通过本领域已知的技术,RNAi分子易于设计及产生。另外,有一些计算工具可以增加找到有效和特异性序列基序的机会(Lagana等人,Methods Mol.Bio.[分子生物学方法],2015,1269:393-412)。

[0729] 调节性核酸可以调节基因编码的RNA的表达。因为多个基因可以彼此共有一定程度的序列同源性,所以在一些实施例中,可以将调节性核酸设计为靶向具有足够序列同源性的一类基因。在一些实施例中,调节性核酸可含有与在不同基因靶之间共享的序列互补的或特定基因靶所特有的序列。在一些实施例中,可以将调节性核酸设计为靶向在几个基因之间具有同源性的RNA序列的保守区,从而靶向基因家族中的几个基因(例如,不同的基因同工型、剪接变体、突变基因等)。在一些实施例中,可以将调节性核酸设计为靶向单一基因的特定RNA序列所特有的序列。

[0730] 在一些实施例中,遗传元件可以包括一个或多个编码调节一个或多个基因表达的调节性核酸的序列。

[0731] 在一个实施例中,将本文别处描述的gRNA用作CRISPR系统的一部分,用于基因编辑。出于基因编辑的目的,可以将指环载体设计为包括一个或多个与所期望的靶DNA序列相对应的引导RNA序列;参见,例如,Cong等人(2013)Science[科学],339:819-823;Ran等人(2013)Nature Protocols[自然-实验室指南],8:2281-2308。gRNA序列的至少约16或17个核苷酸通常允许Cas9介导的DNA裂解发生;对于Cpf1,需要gRNA序列的至少约16个核苷酸来实现可检测的DNA裂解。

[0732] 治疗性效应物(例如,肽或多肽)

[0733] 在一些实施例中,遗传元件包含治疗性表达序列,例如,编码治疗性肽或多肽的序列,该肽或多肽是例如细胞内肽或细胞内多肽、分泌型多肽或蛋白质替代治疗剂。在一些实施例中,遗传元件包括编码蛋白质,例如治疗性蛋白质的序列。治疗性蛋白质的一些实例可以包括但不限于激素、细胞因子、酶、抗体(例如,一种或多种编码至少重链或轻链的多肽)、转录因子、受体(例如,膜受体)、配体、膜转运蛋白、分泌型蛋白质、肽、载体蛋白、结构蛋白、核酸酶或其组分。

[0734] 在一些实施例中,遗传元件包括编码肽,例如治疗性肽的序列。肽可以是直链或支链的。该肽的长度为约5至约500个氨基酸、约15至约400个氨基酸、约20至约325个氨基酸、约25至约250个氨基酸、约50至约200个氨基酸或其间的任何范围。

[0735] 在一些实施例中,由治疗性表达序列编码的多肽可以是上述任一种的功能性变体或其片段,例如,与本文表中通过参考其UniProt ID披露的蛋白序列具有至少80%、85%、90%、95%、967%、98%、99%同一性的蛋白质。

[0736] 在一些实施例中,治疗性表达序列可以编码结合上述任一种的抗体或抗体片段,例如,针对蛋白质的抗体,该蛋白质与本文表中通过参考其UniProt ID披露的蛋白序列具有至少80%、85%、90%、95%、967%、98%、99%同一性。本文中的术语“抗体”在最广义上使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要它们表现出所期望的抗原结合活性。“抗体片段”是指包含至少一条重链或轻链并结合抗原的分子。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0737] 示例性细胞内多肽效应物

[0738] 在一些实施例中,效应物包含胞质多肽或胞质肽。在一些实施例中,包含胞质肽的效应物是DPP-4抑制剂、GLP-1信号传导激活剂或中性粒细胞弹性蛋白酶抑制剂。在一些实施例中,效应物提高生长因子或其受体(例如FGF受体,例如FGFR3)的水平或活性。在一些实施例中,效应物包括n-myc相互作用蛋白活性的抑制剂(例如,n-myc相互作用蛋白抑制剂);EGFR活性的抑制剂(例如,EGFR抑制剂);IDH1和/或IDH2活性的抑制剂(例如,IDH1抑制剂和/或IDH2抑制剂);LRP5和/或DKK2活性的抑制剂(例如,LRP5和/或DKK2抑制剂);KRAS活性的抑制剂;HTT活性的激活剂;或DPP-4活性的抑制剂(例如DPP-4抑制剂)。

[0739] 在一些实施例中,效应物包含调节性细胞内多肽。在一些实施例中,调节性细胞内多肽结合对靶细胞而言具有内源性的一种或多种分子(例如,蛋白质或核酸)。在一些实施例中,调节性细胞内多肽提高对靶细胞而言具有内源性的一种或多种分子(例如,蛋白质或核酸)的水平或活性。在一些实施例中,调节性细胞内多肽降低对靶细胞而言具有内源性的一种或多种分子(例如,蛋白质或核酸)的水平或活性。

[0740] 示例性分泌型多肽效应物

[0741] 示例性的分泌型治疗剂在本文中描述,例如在下表中。

[0742] 表50. 示例性细胞因子和细胞因子受体

[0743]

细胞因子	一个或多个细胞因子受体	Entrez 基因 ID	UniProt ID
IL-1 α 、IL-1 β 或其异二聚体	IL-1 1 型受体、IL-1 2 型受体	3552、3553	P01583、P01584
IL-1Ra	IL-1 1 型受体、IL-1 2 型受体	3454、3455	P17181, P48551

[0744]

IL-2	IL-2R	3558	P60568
IL-3	IL-3 受体 $\alpha + \beta c$ (CD131)	3562	P08700
IL-4	IL-4R I 型、IL-4R II 型	3565	P05112
IL-5	IL-5R	3567	P05113
IL-6	IL-6R (sIL-6R) gp130	3569	P05231
IL-7	IL-7R 和 sIL-7R	3574	P13232
IL-8	CXCR1 和 CXCR2	3576	P10145
IL-9	IL-9R	3578	P15248
IL-10	IL-10R1/IL-10R2 复合物	3586	P22301
IL-11	IL-11R α 1 gp130	3589	P20809
IL-12 (例如, p35、p40 或其异二聚体)	IL-12R β 1 和 IL-12R β 2	3593、3592	P29459、P29460
IL-13	IL-13R1 α 1 和 IL-13R1 α 2	3596	P35225
IL-14	IL-14R	30685	P40222
IL-15	IL-15R	3600	P40933
IL-16	CD4	3603	Q14005
IL-17A	IL-17RA	3605	Q16552
IL-17B	IL-17RB	27190	Q9UHF5
IL-17C	IL-17RA 至 IL-17RE	27189	Q9P0M4
e	SEF	53342	Q8TAD2
IL-17F	IL-17RA、IL-17RC	112744	Q96PD4
IL-18	IL-18 受体	3606	Q14116
IL-19	IL-20R1/IL-20R2	29949	Q9UHD0
IL-20	IL-20R1/IL-20R2 和 IL-22R1/IL-20R2	50604	Q9NYY1
IL-21	IL-21R	59067	Q9HBE4
IL-22	IL-22R	50616	Q9GZX6
IL-23 (例如, p19、p40 或其异二聚体)	IL-23R	51561	Q9NPF7
IL-24	IL-20R1/IL-20R2 和	11009	Q13007

[0745]		IL-22R1/IL-20R2		
	IL-25	IL-17RA 和 IL-17RB	64806	Q9H293
	IL-26	IL-10R2 链和 IL-20R1 链	55801	Q9NPH9
	IL-27(例如, p28、EBI3 或其异二聚体)	WSX-1 和 gp130	246778	Q8NEV9
	IL-28A、IL-28B 和 IL29	IL-28R1/IL-10R2	282617、282618	Q8IZI9、Q8IU54
	IL-30	IL6R/gp130	246778	Q8NEV9
	IL-31	IL-31RA/OSMR β	386653	Q6EBC2
	IL-32		9235	P24001
	IL-33	ST2	90865	O95760
	IL-34	集落刺激因子 1 受体	146433	Q6ZMJ4
	IL-35(例如, p35、EBI3 或其异二聚体)	IL-12R β 2/gp130; IL-12R β 2/IL-12R β 2; gp130/gp130	10148	Q14213
	IL-36	IL-36Ra	27179	Q9UHA7
	IL-37	IL-18R α 和 IL-18BP	27178	Q9NZH6
	IL-38	IL-1R1、IL-36R	84639	Q8WWZ1
	IFN- α	IFNAR	3454	P17181
	IFN- β	IFNAR	3454	P17181
	IFN- γ	IFNGR1/IFNGR2	3459	P15260
	TGF- β	T β R-I 和 T β R-II	7046、7048	P36897、P37173
	TNF- α	TNFR1、TNFR2	7132、7133	P19438、P20333

[0746] 在一些实施例中,本文所述的效应物包括表50的细胞因子或其功能性变体,例如,其同源物(例如,直系同源物或旁系同源物)或片段。在一些实施例中,本文所述的效应物包括与表50中通过参考其UniProt ID列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、967%、98%、99%序列同一性的蛋白质。在一些实施例中,功能性变体与相应细胞因子受体结合,在相同条件下,对于相同受体,其Kd比相应野生型细胞因子的Kd高或低不超过10%、20%、30%、40%或50%。在一些实施例中,效应物包括融合蛋白,该融合蛋白包含第一区域(例如,表50的细胞因子多肽或者其功能性变体或片段)和第二异源区域。在一些实施例中,第一区域是表50的第一细胞因子多肽。在一些实施例中,第二区域是表50的第二细胞因子多肽,其中该第一和第二细胞因子多肽在野生型细胞中彼此形成细胞因子异二聚体。在一些实施例中,表50的多肽或其功能性变体包含信号序列,例如,对于效应物而言具有内源性的信号序列,或异源信号序列。在一些实施例中,编码表50的细胞因子或其功能性变体的指环载体用于治疗本文所述的疾病或障碍。

[0747] 在一些实施例中,本文所述的效应物包含与表50的细胞因子结合的抗体分子(例如,scFv)。在一些实施例中,本文所述的效应物包含与表50的细胞因子受体结合的抗体分子(例如,scFv)。在一些实施例中,抗体分子包含信号序列。

[0748] 例如,在以下文献中描述了示例性细胞因子和细胞因子受体: Akdis等人, “Interleukins (from IL-1 to IL-38), interferons, transforming growth factor β , and TNF- α : Receptors, functions, and roles in diseases [白细胞介素 (从IL-1到IL-38)、干扰素、转化生长因子 β 和TNF- α : 受体、功能和在疾病中的作用]” 2016年10月第138卷,第4期,第984-1010页,其通过引用以其全文并入本文,包括其中的表I。

[0749] 表51. 示例性多肽激素和受体

	激素	受体	Entrez 基因 ID	UniProt ID
[0750]	利尿钠肽, 例如心房利尿钠肽 (ANP)	NPRA、NPRB、NPRC	4878	P01160
	脑利尿钠肽 (BNP)	NPRA、NPRB	4879	P16860
	C 型利尿钠肽 (CNP)	NPRB	4880	P23582
	生长激素 (GH)	GHR	2690	P10912
	人生长激素 (hGH)	hGH 受体 (人 GHR)	2690	P10912
	催乳素 (PRL)	PRLR	5617	P01236
	促甲状腺激素 (TSH)	TSH 受体	7253	P16473
	促肾上腺皮质激素 (ACTH)	ACTH 受体	5443	P01189
	促卵泡激素 (FSH)	FSHR	2492	P23945
[0751]	黄体化激素 (LH)	LHR	3973	P22888
	抗利尿激素 (ADH)	血管加压素受体, 例如 V2; AVPR1A; AVPR1B; AVPR3; AVPR2	554	P30518
	催产素	OXTR	5020	P01178
	降钙素	降钙素受体 (CT)	796	P01258
	甲状旁腺激素 (PTH)	PTH1R 和 PTH2R	5741	P01270
	胰岛素	胰岛素受体 (IR)	3630	P01308
	胰高血糖素	胰高血糖素受体	2641	P01275

[0752] 在一些实施例中,本文所述的效应物包括表51的激素或其功能性变体,例如,其同源物(例如,直系同源物或旁系同源物)或片段。在一些实施例中,本文所述的效应物包括与表51中通过参考其UniProt ID列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%序列同一性的蛋白质。在一些实施例中,功能性变体与相应受体结合,在相同条件下,对于相同受体,其Kd比相应野生型激素的Kd高不超过10%、20%、30%、40%或50%。

在一些实施例中,表51的多肽或其功能性变体包含信号序列,例如,对于效应物而言具有内源性的信号序列,或异源信号序列。在一些实施例中,编码表51的激素或其功能性变体的指环载体用于治疗本文所述的疾病或障碍。

[0753] 在一些实施例中,本文所述的效应物包含与表51的激素结合的抗体分子(例如,scFv)。在一些实施例中,本文所述的效应物包含与表51的激素受体结合的抗体分子(例如,scFv)。在一些实施例中,抗体分子包含信号序列。

[0754] 表52. 示例性生长因子

	生长因子		Entrez 基因 ID	UniProt ID
	PDGF 家族			
[0755]	PDGF (例如, PDGF-1、PDGF-2 或其异二聚体)	PDGF 受体, 例如 PDGFR α 、PDGFR β	5156	P16234

[0756]

CSF-1	CSF1R	1435	P09603
SCF	CD117	3815	P10721
VEGF 家族			
VEGF (例如, 同工型 VEGF 121、VEGF 165、VEGF 189 和 VEGF 206)	VEGFR-1、VEGFR-2	2321	P17948
VEGF-B	VEGFR-1	2321	P17949
VEGF-C	VEGFR-2 和 VEGFR-3	2324	P35916
PlGF	VEGFR-1	5281	Q07326
EGF 家族			
EGF	EGFR	1950	P01133
TGF- α	EGFR	7039	P01135
双调蛋白	EGFR	374	P15514
HB-EGF	EGFR	1839	Q99075
β 细胞素蛋白	EGFR、ErbB-4	685	P35070
上皮调节蛋白	EGFR、ErbB-4	2069	O14944
调蛋白	EGFR、ErbB-4	3084	Q02297
FGF 家族			
FGF-1、FGF-2、FGF-3、FGF-4、FGF-5、FGF-6、FGF-7、FGF-8、FGF-9	FGFR1、FGFR2、FGFR3 和 FGFR4	2246、2247、2248、2249、2250、2251、2252、2253、2254	P05230、P09038、P11487、P08620、P12034、P10767、P21781、P55075、P31371
胰岛素家族			
胰岛素	IR	3630	P01308
IGF-I	IGF-I 受体、IGF-II 受体	3479	P05019
IGF-II	IGF-II 受体	3481	P01344

[0757]

HGF 家族			
HGF	MET 受体	3082	P14210
MSP	RON	4485	P26927
神经营养因子家族			
NGF	LNGFR、trkA	4803	P01138
BDNF	trkB	627	P23560
NT-3	trkA、trkB、trkC	4908	P20783
NT-4	trkA、trkB	4909	P34130
NT-5	trkA、trkB	4909	P34130
血管生成素家族			
ANGPT1	HPK-6/TEK	284	Q15389
ANGPT2	HPK-6/TEK	285	O15123
ANGPT3	HPK-6/TEK	9068	O95841
ANGPT4	HPK-6/TEK	51378	Q9Y264

[0758] 在一些实施例中,本文所述的效应物包括表52的生长因子或其功能性变体,例如,其同源物(例如,直系同源物或旁系同源物)或片段。在一些实施例中,本文所述的效应物包括与表52中通过参考其UniProt ID列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、967%、98%、99%序列同一性的蛋白质。在一些实施例中,功能性变体与相应受体结合,在相同条件下,对于相同受体,其Kd比相应野生型生长因子的Kd高不超过10%、20%、30%、40%或50%。在一些实施例中,表52的多肽或其功能性变体包含信号序列,例如,对于效应物而言具有内源性的信号序列,或异源信号序列。在一些实施例中,编码表52的生长因子或其功能性变体的指环载体用于治疗本文所述的疾病或障碍。

[0759] 在一些实施例中,本文所述的效应物包含与表52的生长因子结合的抗体分子(例如,scFv)。在一些实施例中,本文所述的效应物包含与表52的生长因子受体结合的抗体分子(例如,scFv)。在一些实施例中,抗体分子包含信号序列。

[0760] 在以下文献中描述了示例性的生长因子和生长因子受体:例如,Bafico等人,“Classification of Growth Factors and Their Receptors[生长因子及其受体的分类]”Holland-Frei Cancer Medicine.[荷兰弗雷癌症医学]第6版,其通过引用以其全文并入本文。

[0761] 表53.凝血相关因子

[0762]

效应物	适应症	Entrez 基因 ID	UniProt ID
凝血因子 I (纤维蛋白原)	无纤维蛋白原血症	2243、2266、2244	P02671、P02679、P02675
凝血因子 II	凝血因子 II 缺乏症	2147	P00734
凝血因子 IX	B 型血友病	2158	P00740
凝血因子 V	欧伦氏病 (Owren's disease)	2153	P12259
凝血因子 VIII	A 型血友病	2157	P00451
凝血因子 X	斯图亚特因子缺乏症	2159	P00742
凝血因子 XI	C 型血友病	2160	P03951
凝血因子 XIII	纤维蛋白稳定因子缺乏症	2162、2165	P00488、P05160
vWF	血管性血友病	7450	P04275

[0763] 在一些实施例中,本文所述的效应物包括表53的多肽或其功能性变体,例如其同源物(例如,直系同源物或旁系同源物)或片段。在一些实施例中,本文所述的效应物包括与表53中通过参考其UniProt ID列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、967%、98%、99%序列同一性的蛋白质。在一些实施例中,功能性变体催化与相应野生型蛋白质相同的反应,例如,催化速率比野生型蛋白低不少于10%、20%、30%、40%或50%。在一些实施例中,表53的多肽或其功能性变体包含信号序列,例如,对于效应物而言具有内源性的信号序列,或异源信号序列。在一些实施例中,编码表53的多肽或其功能性变体的指环载体用于治疗表53的疾病或障碍。

[0764] 示例性蛋白质替代治疗剂

[0765] 本文例如在下表中描述了示例性蛋白质替代治疗剂。

[0766] 表54. 示例性酶促效应物和相应适应症

[0767]

效应物	缺乏症	Entrez 基因 ID	UniProt ID
3-甲基巴豆酰-辅酶 A	3-甲基巴豆酰-辅酶 A 羧化	56922、64087	Q96RQ3、

[0768]

羧化酶	酶缺乏症		Q9HCC0
乙酰辅酶 A-氨基葡萄糖 苷 N-乙酰基转移酶	粘多糖贮积症 MPS III (沙 费利波 (Sanfilippo) 综合 征) III-C 型	138050	Q68CP4
ADAMTS13	血栓性血小板减少性紫癜	11093	Q76LX8
腺嘌呤磷酸核糖基转 移酶	腺嘌呤磷酸核糖基转移酶 缺乏症	353	P07741
腺苷脱氨酶	腺苷脱氨酶缺乏症	100	P00813
ADP-核糖蛋白水解 酶	谷酰基核糖-5-磷酸贮积病	26119、54936	Q5SW96、 Q9NX46
α 葡萄糖苷酶	糖原贮积病 2 型 (庞贝病)	2548	P10253
精氨酸酶	家族性高精氨酸血症	383、384	P05089、P78540
芳基硫酸酯酶 A	异染性脑白质营养不良	410	P15289
组织蛋白酶 K	致密成骨不全症	1513	P43235
神经酰胺酶	法伯氏病 (脂肪肉芽肿病)	125981、340485、 55331	Q8TDN7、 Q5QJU3、 Q9NUN7
胱硫醚 B 合酶	同型胱氨酸尿症	875	P35520
多萜醇-P-甘露糖合酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG Ic 型	8813、54344	O60762、 Q9P2X0
Dolicho-P-Glc: Man9GlcNAc2-PP-多 萜醇葡萄糖基转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG Ic 型	84920	Q5BKT4
Dolicho-P-Man: Man5GlcNAc2-PP-多 萜醇甘露糖基转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG Id 型	10195	Q92685
多萜基-P-葡萄糖: Glc-1-Man-9-GlcNAc -2-PP-多萜基- α -3-葡 糖基转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG Ih 型	79053	Q9BVK2

[0769]

多萜基-P-甘露糖： Man-7-GlcNAc-2-PP- 多萜基- α -6-甘露糖基 转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG Ig 型	79087	Q9BV10
凝血因子 II	凝血因子 II 缺乏症	2147	P00734
凝血因子 IX	B 型血友病	2158	P00740
凝血因子 V	欧伦氏病 (Owren's disease)	2153	P12259
凝血因子 VIII	A 型血友病	2157	P00451
凝血因子 X	斯图亚特因子缺乏症	2159	P00742
凝血因子 XI	C 型血友病	2160	P03951
凝血因子 XIII	纤维蛋白稳定因子缺乏症	2162、2165	P00488、P05160
半乳糖胺-6-硫酸酯硫 酸酯酶	粘多糖贮积症 MPS IV (莫 奎奥综合征 (Morquio's syndrome)) IV-A 型	2588	P34059
半乳糖基神经酰胺 β - 半乳糖苷酶	克拉布病 (Krabbe's disease)	2581	P54803
神经节苷脂 β -半乳糖 苷酶	GM1 神经节苷脂沉积症, 全身性	2720	P16278
神经节苷脂 β -半乳糖 苷酶	GM2 神经节苷脂沉积症	2720	P16278
神经节苷脂 β -半乳糖 苷酶	神经鞘脂病 I 型	2720	P16278
神经节苷脂 β -半乳糖 苷酶	神经鞘脂病 II 型 (幼年型)	2720	P16278
神经节苷脂 β -半乳糖 苷酶	神经鞘脂病 III 型 (成人 型)	2720	P16278
葡萄糖苷酶 I	先天性 N-糖基化障碍 CDG IIb 型	2548	P10253
葡萄糖神经酰胺 β -葡	戈谢病 (Gaucher's disease)	2629	P04062

[0770]

葡萄糖苷酶			
乙酰肝素-S-硫酸酯磺酰胺酶	粘多糖贮积症 MPS III (沙费利波综合征) III-A 型	6448	P51688
黑尿酸氧化酶	黑酸尿症	3081	Q93099
透明质酸酶	粘多糖贮积症 MPS IX (透明质酸酶缺乏症)	3373、8692、8372、23553	Q12794、Q12891、O43820、Q2M3T9
硫酸艾杜糖酸硫酸酯酶	粘多糖贮积症 MPS II (亨特综合征 (Hunter's syndrome))	3423	P22304
卵磷脂-胆固醇酰基转移酶 (LCAT)	完全 LCAT 缺乏症、鱼眼病、动脉粥样硬化、高胆固醇血症	3931	606967
赖氨酸氧化酶	戊二酸血症 I 型	4015	P28300
溶酶体酸性脂肪酶	胆固醇酯贮积病 (CESD)	3988	P38571
溶酶体酸性脂肪酶	溶酶体酸性脂肪酶缺乏症	3988	P38571
溶酶体酸性脂肪酶	沃耳曼氏病 (Wolman's disease)	3988	P38571
溶酶体胃酶抑素不敏感肽酶	蜡样脂褐质沉积症晚期婴儿型 (CLN2, 比-詹二氏病 (Jansky-Bielschowsky disease))	1200	O14773
甘露糖 (Man) 磷酸 (P) 异构酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG Ib 型	4351	P34949
甘露糖基- α -1,6-糖蛋白- β -1,2-N-乙酰基氨基葡萄糖转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG IIa 型	4247	Q10469
金属蛋白酶-2	温彻斯特综合征 (Winchester syndrome)	4313	P08253
甲基丙二酰辅酶 A 变	甲基丙二酸血症 (维生素	4594	P22033

[0771]

位酶	b12 无应答)		
N-乙酰半乳糖胺 α -4-硫酸硫酸酯酶 (芳基硫酸酯酶 B)	粘多糖贮积症 MPS VI (拉-米氏综合征 (Maroteaux-Lamy syndrome))	411	P15848
N-乙酰-D-氨基葡萄糖苷酶	粘多糖贮积症 MPS III (沙费利波综合征) III-B 型	4669	P54802
N-乙酰基-氨基半乳糖苷酶	辛德勒病 (Schindler's disease) I 型 (婴儿重症型)	4668	P17050
N-乙酰基-氨基半乳糖苷酶	辛德勒病 II 型 (神崎病, 成人发病型)	4668	P17050
N-乙酰基-氨基半乳糖苷酶	辛德勒病 III 型 (中间型)	4668	P17050
N-乙酰基-氨基葡萄糖-6-硫酸硫酸酯酶	粘多糖贮积症 MPS III (沙费利波综合征) III-D 型	2799	P15586
N-乙酰基氨基葡萄糖基-1-磷酸转移酶	黏脂贮积症 ML III (假性贺勒氏多营养不良 (pseudo-Hurler's polydystrophy))	79158	Q3T906
N-乙酰基氨基葡萄糖基-1-磷酸转移酶催化亚基	黏脂贮积症 ML II (I 细胞病)	79158	Q3T906
N-乙酰基氨基葡萄糖基-1-磷酸转移酶, 底物识别亚基	黏脂贮积症 ML III (假性贺勒氏多营养不良) III-C 型	84572	Q9UJJ9
N-天冬氨酰基氨基葡萄糖苷酶	天冬氨酰基葡萄糖胺尿	175	P20933
神经氨酸酶 I (唾液酸酶)	唾液酸沉积症	4758	Q99519
棕榈酰基-蛋白硫酯	蜡样脂褐质沉积症成人型	5538	P50897

[0772]

酶-1	(CLN4, 库夫斯病 (Kufs' disease))		
棕榈酰基-蛋白硫酯酶-1	蜡样脂褐质沉积症婴儿型 (CLN1, 桑塔沃里-哈尔蒂亚病 (Santavuori-Haltia disease))	5538	P50897
苯丙氨酸羟化酶	苯丙酮尿症	5053	P00439
磷酸甘露糖变位酶-2	先天性 N-糖基化障碍 CDG Ia 型 (仅神经系统和神经系统-多脏器形式)	5373	O15305
胆色素原脱氨酶	急性间歇性卟啉症	3145	P08397
嘌呤核苷磷酸化酶	嘌呤核苷磷酸化酶缺乏症	4860	P00491
嘧啶 5'核苷酸酶	溶血性贫血和/或嘧啶 5'核苷酸酶缺乏症	51251	Q9H0P0
鞘磷脂酶	尼曼-匹克病 (Niemann-Pick disease) A 型	6609	P17405
鞘磷脂酶	尼曼-匹克病 B 型	6609	P17405
甾醇 27-羟化酶	脑腱黄瘤病 (胆甾烷醇脂质沉积症)	1593	Q02318
胸苷磷酸化酶	线粒体神经胃肠脑肌病 (MNGIE)	1890	P19971
三己糖基神经酰胺 α -半乳糖苷酶	法布里病 (Fabry's disease)	2717	P06280
酪氨酸酶, 例如 OCA1	白化病, 例如眼白化病	7299	P14679
UDP-GlcNAc: 多萜基-P NAcGlc 磷酸转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG Ij 型	1798	Q9H3H5
UDP-N-乙酰基氨基葡萄糖-2-差向异构酶 /N-乙酰基甘露糖胺	法国型唾液酸尿症	10020	Q9Y223

[0773]

激酶，唾液酸转运蛋白			
尿酸酶	莱施-奈恩综合征 (Lesch-Nyhan syndrome)，痛风	391051	无蛋白
尿苷二磷酸葡萄糖醛酸基转移酶（例如，UGT1A1）	克里格勒-纳贾尔综合征 (Crigler-Najjar syndrome)	54658	P22309
α -1,2-甘露糖基转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG II 型 (608776)	79796	Q9H6U8
α -1,2-甘露糖基转移酶	先天性 N-糖基化障碍 I 型 (前高尔基体糖基化缺陷)	79796	Q9H6U8
α -1,3-甘露糖基转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG II 型	440138	Q2TAA5
α -D-甘露糖苷酶	α -甘露糖苷贮积症 I 型(严重) 或 II 型(轻度)	10195	Q92685
α -L-岩藻糖苷酶	岩藻糖苷贮积症	4123	Q9NTJ4
α -L-艾杜糖苷酶	粘多糖贮积症 MPS I H/S (贺勒-施艾综合征 (Hurler-Scheie syndrome))	2517	P04066
α -L-艾杜糖苷酶	粘多糖贮积症 MPS I-H (贺勒综合征 (Hurler's syndrome))	3425	P35475
α -L-艾杜糖苷酶	粘多糖贮积症 MPS I-S(施艾综合征 (Scheie's syndrome))	3425	P35475
β -1,4-半乳糖基转移酶	先天性 N-糖基化障碍 CDG II d 型	3425	P35475
β -1,4-甘露糖基转移	先天性 N-糖基化障碍	2683	P15291

[0774]	酶	CDG Ik 型		
	β -D-甘露糖苷酶	β -甘露糖苷贮积症	56052	Q9BT22
	β -半乳糖苷酶	粘多糖贮积症 MPS IV (莫奎奥综合征) IV-B 型	4126	O00462
	β -葡萄糖醛酸酶	粘多糖贮积症 MPS VII (斯里综合征 (Sly's syndrome))	2720	P16278
	β -己糖胺酶 A	泰-萨克斯病	2990	P08236
	β -己糖胺酶 B	桑德霍夫病 (Sandhoff's disease)	3073	P06865

[0775] 在一些实施例中,本文所述的效应物包括表54的酶或其功能性变体,例如其同源物(例如,直系同源物或旁系同源物)或片段。在一些实施例中,本文所述的效应物包括与表54中通过参考其UniProt ID列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、967%、98%、99%序列同一性的蛋白质。在一些实施例中,功能性变体催化与相应野生型蛋白质相同的反应,例如,催化速率比野生型蛋白低不少于10%、20%、30%、40%或50%。在一些实施例中,编码表54的酶或其功能性变体的指环载体用于治疗表54的疾病或障碍。在一些实施例中,指环载体用于将尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶或其功能性变体递送至靶细胞,例如肝细胞。在一些实施例中,指环载体用于将OCA1或其功能性变体递送至靶细胞,例如视网膜细胞。

[0776] 表55. 示例性非酶效应物和相应适应症

[0777]	效应物	适应症	Entrez 基因 ID	UniProt ID
	运动神经元存活蛋白 (SMN)	脊髓性肌萎缩症	6606	Q16637
	抗肌萎缩蛋白或微小抗肌萎缩蛋白	肌肉萎缩症(例如,杜兴氏肌肉萎缩症 (Duchenne muscular dystrophy) 或贝克型肌肉萎缩症 (Becker muscular dystrophy))	1756	P11532

[0778]

补体蛋白质, 例如补体因子 C1	补体因子 I 缺乏症	3426	P05156
补体因子 H	非典型溶血性尿毒症综合征	3075	P08603
胱氨酸蛋白(溶酶体胱氨酸转运蛋白)	胱氨酸病	1497	O60931
附睾分泌蛋白质 1 (HE1; NPC2 蛋白质)	尼曼-匹克病 C2 型	10577	P61916
GDP-岩藻糖转运蛋白-1	先天性 N-糖基化障碍 CDG IIc 型 (兰巴姆-哈沙伦 (Rambam-Hasharon) 综合征)	55343	Q96A29
GM2 激活蛋白质	GM2 激活蛋白质缺乏症 (泰-萨克斯病 AB 变体, GM2A)	2760	Q17900
溶酶体跨膜 CLN3 蛋白质	蜡样脂褐质沉积症幼年型 (CLN3、贝敦氏病 (Batten disease)、伏-施二氏病 (Vogt-Spielmeyer disease))	1207	Q13286
溶酶体跨膜 CLN5 蛋白质	蜡样脂褐质沉积症变体晚期婴儿型, 芬兰型 (CLN5)	1203	O75503
钠磷协同转运蛋白、硝酸盐转运蛋白	婴儿唾液酸贮积障碍	26503	Q9NRA2
钠磷协同转运蛋白、硝酸盐转运蛋白	芬兰型唾液酸尿症 (唾液酸沉积症)	26503	Q9NRA2
NPC1 蛋白质	尼曼-匹克病 C1 型/D	4864	O15118

[0779]

	型		
寡聚高尔基复合物-7	先天性 N-糖基化障碍 CDG IIe 型	91949	P83436
鞘脂激活蛋白原 (Prosaposin)	鞘脂激活蛋白原缺乏症	5660	P07602
保护性蛋白质/组织蛋白酶 A (PPCA)	半乳糖唾液酸贮积症 (戈德堡综合征 (Goldberg's syndrome), 神经氨酸酶和 β -半乳糖苷酶的联合缺陷)	5476	P10619
参与甘露糖-P-多萜醇利用的蛋白	先天性 N-糖基化障碍 CDG If 型	9526	O75352
皂素 B	皂素 B 缺乏症 (硫苷脂激活剂缺乏症)	5660	P07602
皂素 C	皂素 C 缺乏症 (戈谢激活剂 (Gaucher's activator) 缺乏症)	5660	P07602
硫酸酯酶修饰因子-1	粘液脑硫脂病 (多硫酸酯酶缺乏症)	285362	Q8NBK3
跨膜 CLN6 蛋白质	蜡样脂褐质沉积症变异晚期婴儿型 (CLN6)	54982	Q9NWW5
跨膜 CLN8 蛋白质	蜡样脂褐质沉积症进行性癫痫伴智力残疾	2055	Q9UBY8
vWF	血管性血友病	7450	P04275
凝血因子 I (纤维蛋白原)	无纤维蛋白原血症	2243、2244、2266	P02671、P02675、P02679
促红细胞生成素 (hEPO)			

[0780] 在一些实施例中,本文所述的效应物包括促红细胞生成素 (EPO),例如人促红细胞生成素 (hEPO) 或其功能性变体。在一些实施例中,编码促红细胞生成素或其功能性变体的指环载体用于刺激红细胞生成。在一些实施例中,编码促红细胞生成素或其功能性变体的

指环载体用于治疗疾病或障碍,例如贫血。在一些实施例中,使用指环载体将EPO或其功能性变体递送至靶细胞,例如红细胞。

[0781] 在一些实施例中,本文所述的效应物包括表55的多肽或其功能性变体,例如其同源物(例如,直系同源物或旁系同源物)或片段。在一些实施例中,本文所述的效应物包括与表55中通过参考其UniProt ID列出的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%序列同一性的蛋白质。在一些实施例中,编码表55的多肽或其功能性变体的指环载体用于治疗表55的疾病或障碍。在一些实施例中,指环载体用于将SMN或其功能性变体递送至靶细胞,例如,脊髓和/或运动神经元的细胞。在一些实施例中,使用指环载体将微小抗肌萎缩蛋白递送至靶细胞,例如,肌细胞。

[0782] 在以下文献中描述了示例性微小抗肌萎缩蛋白:Duan,“Systemic AAV Microdystrophin Gene Therapy for Duchenne Muscular Dystrophy[杜兴氏肌肉萎缩症的全身性AAV微小抗肌萎缩蛋白基因治疗]”Mol Ther.[分子治疗]2018年10月3日;26(10):2337-2356.doi:10.1016/j.ymthe.2018.07.011.电子出版于2018年7月17日。

[0783] 在一些实施例中,本文所述的效应物包含凝血因子,例如本文表54或表55中所列的凝血因子。在一些实施例中,本文所述的效应物包括蛋白质,该蛋白质在发生突变时会导致溶酶体贮积症,例如本文表54或表55中列出的蛋白质。在一些实施例中,本文所述的效应物包括转运蛋白,例如本文表55中所列的转运蛋白。

[0784] 在一些实施例中,野生型蛋白的功能性变体包括具有野生型蛋白的一种或多种活性的蛋白质,例如,功能性变体催化与相应野生型蛋白相同的反应,例如,其催化速率比野生型蛋白低不少于10%、20%、30%、40%或50%。在一些实施例中,功能性变体与野生型蛋白结合的相同结合配偶体结合,例如,在相同条件下,对于相同的结合配偶体,其Kd比相应野生型蛋白的Kd高不超过10%、20%、30%、40%或50%。在一些实施例中,功能性变体具有与野生型多肽的多肽序列存在至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的多肽序列。在一些实施例中,功能性变体包括相应野生型蛋白的同源物(例如直系同源物或旁系同源物)。在一些实施例中,功能性变体是融合蛋白。在一些实施例中,融合体包含与相应野生型蛋白具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的第一区域,和第二异源区域。在一些实施例中,功能性变体包含相应野生型蛋白的片段或由其组成。

[0785] 再生因子、修复因子和纤维化因子

[0786] 本文所述的治疗性多肽还包括生长因子(例如,如在表56中所披露的)或者其功能性变体,例如,与表56中通过参考其UniProt ID所披露的蛋白序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的蛋白质。还包括针对这样的生长因子的抗体或其片段,或者促进再生及修复的miRNA。

[0787] 表56. 示例性再生因子、修复因子和纤维化因子

[0788]

靶标	基因登录号	蛋白质登录号
VEGF-A	NG_008732	NP_001165094
NRG-1	NG_012005	NP_001153471
FGF2	NG_029067	NP_001348594
FGF1	基因 ID: 2246	NP_001341882
miR-199-3p	MIMAT0000232	
miR-590-3p	MIMAT0004801	
mi-17-92	MI0000071	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2732113/figure/F1/
miR-222	MI0000299	
miR-302-367	MIR302A 和 MIR367	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4400607/

[0789] 转化因子

[0790] 本文所述的治疗性多肽还包括转化因子,例如,将成纤维细胞转化为分化细胞的蛋白质因子,例如,表57中披露的因子或其功能性变体,例如,与表57中通过参考其UniProt ID所披露的蛋白序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、98%、99%同一性的蛋白质。

[0791] 表57. 示例性转化因子

[0792]

靶标	适应症	基因登录号	蛋白质登录号
MESP1	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 55897	EAX02066
ETS2	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 2114	NP_005230
HAND2	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 9464	NP_068808
心肌素	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 93649	NP_001139784
ESRRA	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 2101	AAH92470
miR-1	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	MI0000651	n/a
miR-133	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	MI0000450	n/a
TGFb	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 7040	NP_000651.3
WNT	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 7471	NP_005421
JAK	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 3716	NP_001308784
NOTCH	通过转化成纤维细胞来进行器官修复	基因 ID: 4851	XP_011517019

[0793] 刺激细胞再生的蛋白质

[0794] 本文所述的治疗性多肽还包括刺激细胞再生的蛋白质,例如,表58中披露的蛋白质或其功能性变体,例如,与表58中通过参考其UniProt ID所披露的蛋白序列具有至少80%、85%、90%、95%、967%、98%、99%同一性的蛋白质。

[0795] 表58. 示例性的刺激细胞再生的蛋白质

[0796]

靶标	基因登录号	蛋白质登录号
MST1	NG_016454	NP_066278
STK30	基因ID:26448	NP_036103
MST2	基因ID:6788	NP_006272
SAV1	基因ID:60485	NP_068590
LATS1	基因ID:9113	NP_004681

LATS2	基因ID:26524	NP_055387
YAP1	NG_029530	NP_001123617
CDKN2b	NG_023297	NP_004927
CDKN2a	NG_007485	NP_478102

[0797] STING调节效应物

[0798] 在一些实施例中,本文所述的分泌型效应物调节STING/cGAS信号传导。在一些实施例中,STING调节剂是多肽,例如病毒多肽或其功能性变体。例如,效应物可以包括在以下文献中描述的STING调节剂(例如,抑制剂):Maringer等人,“Message in a bottle: lessons learned from antagonism of STING signalling during RNAvirus infection [瓶中的信息:从RNA病毒感染期间STING信号传导的拮抗作用中吸取的教训]”Cytokine& Growth Factor Reviews[细胞因子与生长因子综述]第25卷,第6期,2014年12月,第669-679页,其通过引用以其全文并入本文。在以下文献中描述了其他STING调节剂(例如,激活剂):例如,Wang等人“STING activator c-di-GMP enhances the anti-tumor effects of peptide vaccines in melanoma-bearing mice[STING激活剂c-di-GMP在荷黑色素瘤小鼠中增强肽疫苗的抗肿瘤作用]”Cancer Immunol Immunother.[癌症免疫学与免疫治疗]2015年8月;64(8):1057-66.doi:10.1007/s00262-015-1713-5.电子出版于2015年5月19日;Bose“cGAS/STING Pathway in Cancer:Jekyll and Hyde Story of Cancer Immune Response[癌症中的cGAS/STING通路:癌症免疫应答的双重人格故事]”Int J Mol Sci.[国际分子科学杂志]2017年11月;18(11):2456;和Fu等人“STING agonist formulated cancer vaccines can cure established tumors resistant to PD-1blockade[STING激动剂配制的癌症疫苗可治愈对PD-1阻断有抗性的既定肿瘤]”Sci Transl Med.[科学转化医学]2015年4月15日;7(283):283ra52,其各自通过引用以其全文并入本文。

[0799] 肽的一些实例包括但不限于荧光标签或标志、抗原、肽治疗剂、天然生物活性肽的合成肽或肽类似物、激动肽或拮抗肽、抗微生物肽、靶向肽或细胞毒性肽、降解肽或自毁肽、以及多种降解肽或自毁肽。本文所述的可用于本发明的肽还包括抗原结合肽,例如抗原结合抗体或抗体样片段,例如单链抗体、纳米抗体(参见,例如,Steeland等人2016.Nanobodies as therapeutics:big opportunities for small antibodies.[作为治疗剂的纳米抗体:小分子抗体的巨大机会]Drug Discov Today[当代药物发现]:21(7):1076-113)。这样的抗原结合肽可以结合细胞质抗原、核抗原或细胞器内抗原。

[0800] 在一些实施例中,遗传元件包含编码小肽、肽模拟物(例如类肽)、氨基酸和氨基酸类似物的序列。这样的治疗剂通常具有小于约5,000克/摩尔的分子量、小于约2,000克/摩尔的分子量、小于约1,000克/摩尔的分子量、小于约500克/摩尔的分子量以及这样的化合物的盐类、酯类和其他药学上可接受的形式。这样的治疗剂可以包括但不限于神经递质、激素、药物、毒素、病毒或微生物颗粒、合成分子及其激动剂或拮抗剂。

[0801] 在一些实施例中,本文所述的组合物或指环载体包括与能够靶向特定位置、组织或细胞的配体连接的多肽。

[0802] 基因编辑组分

[0803] 指环载体的遗传元件可以包括一个或多个编码基因编辑系统的组分的基因。示例性的基因编辑系统包括成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)系统、锌指核酸酶(ZFN)和

转录激活子样效应物核酸酶 (TALEN)。在以下文献中描述了基于ZFN、TALEN和CRISPR的方法:例如,Gaj等人Trends Biotechnol.[生物技术趋势]31.7(2013):397-405;在以下文献中描述了基因编辑的CRISPR方法,例如,Guan等人,Application of CRISPR-Cas system in gene therapy:Pre-clinical progress in animal model.[CRISPR-Cas系统在基因治疗中的应用:动物模型的临床前进展]DNARepair[DNA修复]2016年10月;46:1-8.doi:10.1016/j.dnarep.2016.07.004;Zheng等人,Precise gene deletion and replacement using the CRISPR/Cas9 system in human cells.[在人类细胞中使用CRISPR/Cas9系统进行精确的基因缺失和替换]BioTechniques[生物技术],第57卷,第3期,2014年9月,第115-124页。

[0804] CRISPR系统是最初在细菌和古细菌中发现的自适应防御系统。CRISPR系统使用称为CRISPR相关或“Cas”核酸内切酶的RNA引导性核酸酶(例如,Cas9或Cpf1)来切割外来DNA。在典型的CRISPR/Cas系统中,核酸内切酶通过靶向单链或双链DNA序列的序列特异性、非编码“引导RNA”定向到靶核苷酸序列(例如,基因组中要进行序列编辑的位点)。已经鉴定了三类(I-III)CRISPR系统。II类CRISPR系统使用单个Cas核酸内切酶(而不是多个Cas蛋白)。一种II类CRISPR系统包括II型Cas核酸内切酶,例如Cas9、CRISPR RNA(“crRNA”)和反式激活crRNA(“tracrRNA”)。crRNA含有“引导RNA”,即通常对应于靶DNA序列的约20个核苷酸的RNA序列。crRNA还含有与tracrRNA结合的区域,以形成被RNA酶III切割的部分双链结构,产生crRNA/tracrRNA杂合体。然后,crRNA/tracrRNA杂合体指导Cas9核酸内切酶识别并切割靶DNA序列。靶DNA序列通常必须邻近针对给定Cas核酸内切酶而言具有特异性的“前间隔序列邻近基序”(“PAM”);然而,PAM序列似乎遍布整个给定基因组。

[0805] 在一些实施例中,指环载体包括CRISPR核酸内切酶的基因。例如,从不同原核物种鉴定的一些CRISPR核酸内切酶具有独特的PAM序列要求;PAM序列的实例包括5'-NGG(酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*))、5'-NNAGAA(嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) CRISPR1)、5'-NGGNG(嗜热链球菌CRISPR3)、和5'-NNNGATT(奈瑟氏脑膜炎双球菌(*Neisseria meningitidis*))。一些核酸内切酶例如Cas9核酸内切酶与富含G的PAM位点例如5'-NGG有关,并在距PAM位点上游(5')3个核苷酸处对靶DNA进行平末端切割。另一个II类CRISPR系统包括V型核酸内切酶Cpf1,它比Cas9小;实例包括AsCpf1(来自氨基酸球菌属物种(*Acidaminococcus* sp.))和LbCpf1(来自毛螺旋菌属物种(*Lachnospiraceae* sp.))。Cpf1核酸内切酶与富含T的PAM位点例如5'-TTN相关。Cpf1也可以识别5'-CTA PAM基序。Cpf1通过引入具有4或5个核苷酸的5'突出端的错位或交错的双链断裂来切割靶DNA,例如切割如下靶DNA,该靶DNA中的5个核苷酸的错位或交错的切割位于距离编码链上的PAM位点下游(3')18个核苷酸的位置处和距离互补链上的PAM位点下游23个核苷酸的位置处;由这样的错位裂解产生的5个核苷酸突出端使得通过同源重组的DNA插入比在平末端切割的DNA的插入更精确地进行基因组编辑。参见例如,Zetsche等人(2015)Cell[细胞],163:759-771。

[0806] 在指环载体中可以包括多种CRISPR相关(Cas)基因。基因的具体实例是那些编码来自II类系统的Cas蛋白(包括Cas1、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9、Cas10、Cpf1、C2C1或C2C3)的基因。在一些实施例中,指环载体包括编码Cas蛋白例如Cas9蛋白的基因,该Cas蛋白可以来自多种原核物种中的任一种。在一些实施例中,指环载体包括编码特

定Cas蛋白例如特定Cas9蛋白的基因,选择该Cas蛋白以识别特定的前间隔序列邻近基序(PAM)序列。在一些实施例中,指环载体包括编码两种或更多种不同Cas蛋白的核酸,或者可以将两种或更多种Cas蛋白引入细胞、受精卵、胚胎或动物中,例如,以允许识别和修饰包含相同、相似或不同PAM基序的位点。在一些实施例中,指环载体包括编码具有失活核酸酶(例如,核酸酶缺损型Cas9)的修饰型Cas蛋白的基因。

[0807] 尽管野生型Cas9蛋白在由gRNA靶向的特定DNA序列处产生双链断裂(DSB),但已知许多具有改进功能的CRISPR核酸内切酶,例如:“切口酶”形式的Cas核酸内切酶(例如,Cas9)仅产生单链断裂;无催化活性的Cas核酸内切酶(例如,Cas9(“dCas9”))不切割靶DNA。可以将编码dCas9的基因与编码效应物结构域的基因融合,以抑制(CRISPRi)或激活(CRISPRa)靶基因的表达。例如,该基因可以编码Cas9与转录沉默子(例如KRAB结构域)或转录激活子的融合体(例如dCas9-VP64融合体)。可以包括编码与FokI核酸酶(“dCas9-FokI”)融合的无催化活性的Cas9(dCas9)的基因,以在与两个gRNA同源的靶序列处产生DSB。参见,例如,许多CRISPR/Cas9质粒在阿德基因资源库(Addgene repository)中披露并可公开获得(阿德基因组织,美国马萨诸塞州剑桥市西德尼大街75号550A室,邮政编码02139(Addgene,75Sidney St.,Suite 550A,Cambridge,MA02139);addgene.org/crispr/)。Ran等人(2013)Cell[细胞],154:1380-1389将引入两个独立的双链断裂(每个断裂被独立的引导RNA来指导)的“双切口酶”Cas9描述为实现了更准确的基因组编辑。

[0808] 在美国专利申请公开2016/0138008A1和US 2015/0344912 A1以及美国专利8,697,359、8,771,945、8,945,839、8,999,641、8,993,233、8,895,308、8,865,406、8,889,418、8,871,445、8,889,356、8,932,814、8,795,965和8,906,616中披露了用于编辑真核生物基因的CRISPR技术。在美国专利申请公开2016/0208243A1中披露了Cpf1核酸内切酶和相应的引导RNA和PAM位点。

[0809] 在一些实施例中,指环载体包含编码本文所述多肽(例如,靶向核酸酶,例如,Cas9,例如,野生型Cas9、切口酶型Cas9(例如Cas9 D10A)、催化失活Cas9(dCas9)、eSpCas9、Cpf1、C2C1或C2C3)和gRNA的基因。编码核酸酶和一种或多种gRNA的基因的选择取决于靶向突变是否是核苷酸的缺失、置换或添加,例如,对靶向序列的核苷酸的缺失、置换或添加。编码与(一个或多个)效应物结构域(例如VP64)的全部或一部分(例如,其具有生物活性部分)相连的无催化活性的核酸内切酶(例如,催化失活Cas9(dCas9,例如D10A;H840A))的基因会产生可调节一个或多个靶核酸序列的活性和/或表达的嵌合蛋白。

[0810] 在一些实施例中,指环载体包括编码dCas9与一个或多个效应物结构域的全部或一部分(例如,全长野生型效应物结构域,或者其片段或变体,例如,其具有生物活性部分)的融合体的基因,以产生可用于本文所述方法的嵌合蛋白。因此,在一些实施例中,指环载体包括编码dCas9-甲基化酶融合体的基因。在其他一些实施例中,指环载体包括编码dCas9酶与位点特异性gRNA的融合体的基因,以靶向内源基因。

[0811] 在其他方面,指环载体包括编码1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个与dCas9融合的效应物结构域(全部或具有生物活性部分)的基因。

[0812] 调节性序列

[0813] 在一些实施例中,遗传元件包含与编码效应物的序列可操作地连接的调节性序列,例如启动子或增强子。

[0814] 在一些实施例中,启动子包括与编码表达产物的DNA序列相邻的DNA序列。启动子可以可操作地连接至相邻的DNA序列。与不存在启动子时表达的产物的量相比,启动子通常增加DNA序列表达的产物的量。来自一种生物体的启动子可用于增强来自另一生物体的DNA序列的产物表达。例如,脊椎动物启动子可用于在脊椎动物中表达水母GFP。因此,一种启动子元件可以增强一种或多种产物的表达。多个启动子元件是本领域普通技术人员众所周知的。

[0815] 在一个实施例中,期望高水平的组成型表达。这样的启动子的实例包括但不限于逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV)长末端重复(LTR)启动子/增强子、巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子/增强子(参见,例如,Boshart等人,Cell[细胞],41:521-530(1985))、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、细胞质 β -肌动蛋白启动子和磷酸甘油激酶(PGK)启动子。

[0816] 在另一个实施例中,可能期望诱导型启动子。诱导型启动子是由外源添加的化合物调节的启动子,例如,以顺式或反式提供的启动子,包括但不限于锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子;地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)启动子;T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);四环素阻遏系统(Gossen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院报],89:5547-5551(1992));四环素诱导系统(Gossen等人,Science[科学],268:1766-1769(1995));还参见Harvey等人,Curr.Opin.Chem.Biol.[当代化学生物学观点],2:512-518(1998));RU486诱导系统(Wang等人,Nat.Biotech.[自然-生物技术],15:239-243(1997)和Wang等人,Gene Ther.[基因治疗],4:432-441(1997));和雷帕霉素诱导系统(Magari等人,J.Clin.Invest.[临床研究杂志],100:2865-2872(1997);Rivera等人,Nat.Medicine.[自然-医学]2:1028-1032(1996))。可在这种情况下使用的其他类型的诱导型启动子是那些由特定的生理状态(例如温度、急性期或仅在复制细胞中)调节的启动子。

[0817] 在一些实施例中,使用感兴趣基因或核酸序列的天然启动子。当期望基因或核酸序列的表达应模拟天然表达时,可以使用天然启动子。当基因或其他核酸序列的表达必须在时间或发育上,或者以组织特异性方式或响应于特定转录刺激而受到调节时,可以使用天然启动子。在另一个实施例中,也可以使用其他天然表达控制元件,例如增强子元件、多腺苷酸化位点或Kozak共有序列来模拟天然表达。

[0818] 在一些实施例中,遗传元件包含可操作地连接至组织特异性启动子的基因。例如,如果需要在骨骼肌中表达,则可以使用在肌肉中有活性的启动子。这些包括来自编码骨骼肌 α -肌动蛋白、肌球蛋白轻链2A、抗肌萎缩蛋白、肌肉型肌酸激酶的基因的启动子,以及活性高于天然存在启动子的合成肌肉启动子。参见Li等人,Nat.Biotech.[自然-生物技术],17:241-245(1999)。已知的具有组织特异性的启动子的实例如下所示:肝白蛋白,Miyatake等人J.Virol.[病毒学杂志],71:5124-32(1997);乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig等人,Gene Ther.[基因治疗]3:1002-9(1996);甲胎蛋白(AFP),Arbuthnot等人,Hum.Gene Ther.[人类基因治疗],7:1503-14(1996),骨骼(骨钙素,Stein等人,Mol.Biol.Rep.[分子生物学报告],24:185-96(1997);骨唾液酸蛋白,Chen等人,J.Bone Miner.Res.[骨与矿物质研究杂志]11:654-64(1996)),淋巴细胞(CD2,Hansal等人,J.Immunol.[免疫学杂志],161:1063-8(1998);免疫球蛋白重链;T细胞受体 α 链),神经元(神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子,Andersen等人Cell.Mol.Neurobiol.[细胞与分子神经生物学],13:503-15(1993);神经丝蛋白轻链基因,Piccioli等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国科学院院报],88:5611-

5 (1991); 神经元特异性vgf基因, Piccioli等人, Neuron[神经元], 15:373-84 (1995)]; 等。

[0819] 遗传元件可包括增强子, 例如与编码基因的DNA序列相邻的DNA序列。增强子元件通常位于启动子元件的上游, 或者可以位于编码DNA序列 (例如, 转录或翻译成一种或多种产物的DNA序列) 的下游或之内。因此, 增强子元件可位于编码产物的DNA序列上游或下游的100个碱基对、200个碱基对或300个或更多个碱基对。增强子元件可以增加DNA序列表达的重组产物的量, 超出由启动子元件提供的增加的表达。对于本领域普通技术人员而言, 多个增强子元件是容易获得的。

[0820] 在一些实施例中, 遗传元件包括位于编码本文所述的表达产物的序列侧翼的一个或多个反向末端重复序列 (ITR)。在一些实施例中, 遗传元件包含位于编码本文所述的表达产物的序列侧翼的一个或多个长末端重复序列 (LTR)。可以使用的启动子序列的实例包括但不限于猿猴病毒40 (SV40) 早期启动子、小鼠乳腺瘤病毒 (MMTV)、人类免疫缺陷病毒 (HIV) 长末端重复序列 (LTR) 启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、EB病毒 (Epstein-Barr virus) 立即早期启动子和劳斯肉瘤病毒启动子。

[0821] 复制蛋白

[0822] 在一些实施例中, 指环载体, 例如合成指环载体的遗传元件可包括编码一种或多种复制蛋白的序列。在一些实施例中, 指环载体可以通过滚环式复制法进行复制, 例如, 前导链和后随链的合成是非偶联的。在这样的实施例中, 指环载体包含三个另外元件: i) 编码起始蛋白的基因, ii) 双链起点, 和iii) 单链起点。包含复制蛋白的滚环式复制 (RCR) 蛋白复合物与前导链结合并使复制起点去稳定。RCR复合物切割基因组以产生游离的3'OH末端。细胞DNA聚合酶从游离的3'OH末端开始病毒DNA复制。复制基因组后, RCR复合物共价地闭合环。这导致释放出正的环境单链亲本DNA分子和由负的亲本链和新合成的正链组成的环状双链DNA分子。单链DNA分子可以被衣壳化或参与第二轮复制。参见例如Virology Journal [病毒学杂志] 2009, 6:60doi:10.1186/1743-422X-6-60。

[0823] 遗传元件可包含编码聚合酶, 例如RNA聚合酶或DNA聚合酶的序列。

[0824] 其他序列

[0825] 在一些实施例中, 遗传元件还包括编码产物 (例如核酶、编码蛋白质的治疗性mRNA、外源性基因) 的核酸。

[0826] 在一些实施例中, 遗传元件包括一个或多个影响指环载体在宿主或宿主细胞中以下功能的序列: 物种和/或组织和/或细胞嗜性 (例如, 衣壳蛋白序列)、感染性 (例如, 衣壳蛋白序列)、免疫抑制/激活 (例如, 调节性核酸)、病毒基因组结合和/或包装、免疫逃逸 (非免疫原性和/或耐受性)、药代动力学、胞吞作用和/或细胞附着、核进入、细胞内调节和定位、胞吐作用调节、增殖和核酸保护。

[0827] 在一些实施例中, 遗传元件可以包含其他序列, 其包括DNA、RNA或人工核酸。其他序列可包括但不限于基因组DNA, cDNA或编码tRNA、mRNA、rRNA、miRNA、gRNA、siRNA或其他RNAi分子的序列。在一个实施例中, 遗传元件包括编码siRNA的序列, 以靶向与调节性核酸相同的基因表达产物的不同基因座。在一个实施例中, 遗传元件包括编码siRNA的序列, 以靶向与调节性核酸不同的基因表达产物。

[0828] 在一些实施例中, 遗传元件进一步包含以下序列中的一个或多个: 编码一个或多个miRNA的序列、编码一种或多种复制蛋白的序列、编码外源性基因的序列、编码治疗剂的

序列、调节性序列(例如,启动子、增强子)、编码一个或多个靶向内源性基因(siRNA、lncRNA、shRNA)的调节性序列的序列和编码治疗性mRNA或蛋白的序列。

[0829] 其他序列的长度可为约2nt至约5000nt、约10nt至约100nt、约50nt至约150nt、约100nt至约200nt、约150nt至约250nt、约200至约300nt、约250nt至约350nt、约300nt至约500nt、约10nt至约1000nt、约50nt至约1000nt、约100nt至约1000nt、约1000nt至约2000nt、约2000nt至约3000nt、约3000nt至约4000nt、约4000nt至约5000nt或其间的任何范围。

[0830] 编码的基因

[0831] 例如,遗传元件可以包括与信号传导生化通路相关的基因,例如与信号传导生化通路相关的基因或多核苷酸。实例包括与疾病相关的基因或多核苷酸。“与疾病相关的”基因或多核苷酸是指与非疾病对照的组织或细胞相比,在患病组织衍生的细胞中以异常水平或异常形式产生转录或翻译产物的任何基因或多核苷酸。它可能是会以异常高水平表达的基因;它可能是会以异常低水平表达的基因,其中表达的改变与疾病的发生和/或进展相关。疾病相关基因也指具有一个或多个突变或遗传变异的基因,这些突变或遗传变异直接导致疾病病因或与导致疾病病因的一个或多个基因连锁不平衡。

[0832] 与疾病相关的基因和多核苷酸的实例可得自约翰·霍普金斯大学的麦考斯克-纳森斯遗传医学研究所(马里兰州巴尔的摩)(McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.)) 和国家医学图书馆的国家生物技术信息中心(马里兰州贝塞斯达)(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.))。与疾病相关的基因和多核苷酸的实例列于美国专利号:8,697,359的表A-C中,其通过引用以其全文并入本文。特定疾病信息可获自约翰·霍普金斯大学的麦考斯克-纳森斯遗传医学研究所(马里兰州巴尔的摩)(McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, Md.)) 和国家医学图书馆的国家生物技术信息中心(马里兰州贝塞斯达)(National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, Md.))。与信号传导生化途径相关的基因和多核苷酸的实例列于美国专利号:8,697,359的表A-C中,其通过引用以其全文并入本文。

[0833] 此外,如本文其他地方所述,遗传元件可以编码靶向部分。这可以例如通过插入编码糖、糖脂或蛋白质例如抗体的多核苷酸来实现。本领域技术人员知道用于生成靶向部分的其他方法。

[0834] 病毒序列

[0835] 在一些实施例中,遗传元件包含至少一个病毒序列。在一些实施例中,该序列与来自单链DNA病毒,例如指环病毒、杆状DNA病毒(Bidnavirus)、圆环病毒(Circovirus)、双生病毒、基诺病毒(Genomovirus)、丝状病毒、微小病毒、矮化病毒、细小病毒和斯派拉病毒(Spiravirus)的一个或多个序列具有同源性或同一性。在一些实施例中,该序列与来自双链DNA病毒,例如腺病毒、瓶状病毒、囊泡病毒、非洲猪瘟病毒、杆状病毒、微小纺锤形噬菌体、球状病毒、滴状病毒、唾液腺肥大病毒、疱疹病毒、虹彩病毒、脂毛病毒、线头病毒和痘病毒的一个或多个序列具有同源性或同一性。在一些实施例中,序列与来自RNA病毒,例如甲病毒、真菌传杆状病毒、肝炎病毒、大麦病毒、烟草花叶病毒、烟草脆裂病毒、三角病毒(Tricornavirus)、风疹病毒、双RNA病毒、囊状病毒、分体病毒和呼肠病毒的一个或多个序

列具有同源性或同一性。

[0836] 在一些实施例中,遗传元件可包含来自非致病性病毒,例如共生病毒(symbiotic virus),例如共栖病毒(commensal virus),例如天然病毒,例如指环病毒的一个或多个序列。最近命名法的变化已将三种能够感染人类细胞的指环病毒划分为指环病毒科病毒的甲型细环病毒(TT)、乙型细环病毒(TTM)和丙型细环病毒(TTMD)属。迄今为止,指环病毒尚未与任何人疾病相关联。在一些实施例中,遗传元件可以包含与细环病毒(TT)具有同源性或同一性的序列,该细环病毒(TT)是具有环状反义基因组的非包膜单链DNA病毒。在一些实施例中,遗传元件可包含与SEN病毒、岗哨病毒(Sentinel virus)、小TTV样病毒和TT病毒具有同源性或同一性的序列。已经描述了不同类型的TT病毒,包括TT病毒基因型6、TT病毒群、TTV样病毒DXL1和TTV样病毒DXL2。在一些实施例中,遗传元件可包含与较小病毒,即小细环样病毒(TTM)或基因组大小在TTV和TTMV之间的第三病毒(称为中细环样病毒(TTMD))具有同源性或同一性的序列。在一些实施例中,遗传元件可包含与本文所述核苷酸序列中任一个具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%核苷酸序列同一性的来自非致病性病毒的一个或多个序列或序列的片段。

[0837] 在一些实施例中,遗传元件可包含与本文所述例如表41中核苷酸序列中任一个具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%核苷酸序列同一性的来自基本上非致病性病毒的一个或多个序列或序列的片段。

[0838] 表41:指环病毒及其序列的实例。登录号和相关序列信息可在www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/上获得,以2018年12月11日作为参考。

[0839]

登录号	描述
AB017613.1	细环病毒 16 DNA, 全基因组, 分离株: TUS01
AB026345.1	ORF1 和 ORF2 的 TT 病毒基因, 全 cds, 分离株: TRM1
AB026346.1	ORF1 和 ORF2 的 TT 病毒基因, 全 cds, 分离株: TK16
AB026347.1	ORF1 和 ORF2 的 TT 病毒基因, 全 cds, 分离株: TP1-3
AB028669.1	ORF1 和 ORF2 的 TT 病毒基因, 全基因组, 分离株: TJN02
AB030487.1	pORF2a、pORF2b、pORF1 的 TT 病毒基因, 全 cds, 克隆: JaCHCTC19
AB030488.1	pORF2a、pORF2b、pORF1 的 TT 病毒基因, 全 cds, 克隆: JaBD89
AB030489.1	pORF2a、pORF2b、pORF1 的 TT 病毒基因, 全 cds, 克隆: JaBD98
AB038340.1	ORF2s、ORF1、ORF3 的 TT 病毒基因, 全 cds
AB038622.1	ORF2、ORF1、ORF3 的 TT 病毒基因, 全 cds, 分离株: TTVyon-LC011
AB038623.1	ORF2、ORF1、ORF3 的 TT 病毒基因, 全 cds, 分离株: TTVyon-KC186
AB038624.1	ORF2、ORF1、ORF3 的 TT 病毒基因, 全 cds, 分离株: TTVyon-KC197
AB041821.1	VP1 的 TT 病毒 mRNA, 全 cds
AB050448.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 的细环病毒基因, 全 cds, 分离株: TYM9
AB060592.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 的细环病毒基因, 克隆: SAa-39
AB060593.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 的细环病毒基因, 全 cds, 克隆: SAa-38
AB060595.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 的 TT 病毒基因, 全 cds, 克隆: SAj-30
AB060596.1	ORF1、ORF2、ORF3、ORF4 的 TT 病毒基因, 全 cds, 克隆: SAf-09
AB064596.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: CT25F
AB064597.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: CT30F
AB064599.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: JT03F
AB064600.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: JT05F
AB064601.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: JT14F
AB064602.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: JT19F
AB064603.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: JT41F

[0840]

AB064604.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: CT39F
AB064606.1	细环病毒 DNA, 全基因组, 分离株: JT33F
AB290918.1	中细环病毒 1 DNA, 全基因组, 分离株: MD1-073
AF079173.1	TT 病毒株 TTVCHN1, 全基因组
AF116842.1	TT 病毒株 BDH1, 全基因组
AF122914.3	TT 病毒分离株 JA20, 全基因组
AF122917.1	TT 病毒分离株 JA4, 全基因组
AF122919.1	TT 病毒分离株 JA10 未知基因
AF129887.1	TT 病毒 TTVCHN2, 全基因组
AF247137.1	TT 病毒分离株 TUPB, 全基因组
AF254410.1	TT 病毒 ORF2 蛋白和 ORF1 蛋白基因, 全 cds
AF298585.1	TT 病毒波兰分离株 P/1C1, 全基因组
AF315076.1	TTV 样病毒 DXL1 未知基因
AF315077.1	TTV 样病毒 DXL2 未知基因
AF345521.1	TT 病毒分离株 TCHN-G1 Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
AF345522.1	TT 病毒分离株 TCHN-E Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
AF345525.1	TT 病毒分离株 TCHN-D2 Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
AF345527.1	TT 病毒分离株 TCHN-C2 Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
AF345528.1	TT 病毒分离株 TCHN-F Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
AF345529.1	TT 病毒分离株 TCHN-G2 Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
AF371370.1	TT 病毒 ORF1、ORF3、和 ORF2 基因, 全 cds
AJ620212.1	细环病毒, 分离株 tth6, 全基因组
AJ620213.1	细环病毒, 分离株 tth10, 全基因组
AJ620214.1	细环病毒, 分离株 tth11g2, 全基因组
AJ620215.1	细环病毒, 分离株 tth18, 全基因组
AJ620216.1	细环病毒, 分离株 tth20, 全基因组
AJ620217.1	细环病毒, 分离株 tth21, 全基因组
AJ620218.1	细环病毒, 分离株 tth3, 全基因组
AJ620219.1	细环病毒, 分离株 tth9, 全基因组
AJ620220.1	细环病毒, 分离株 tth16, 全基因组

[0841]

AJ620221.1	细环病毒, 分离株 tth17, 全基因组
AJ620222.1	细环病毒, 分离株 tth25, 全基因组
AJ620223.1	细环病毒, 分离株 tth26, 全基因组
AJ620224.1	细环病毒, 分离株 tth27, 全基因组
AJ620225.1	细环病毒, 分离株 tth31, 全基因组
AJ620226.1	细环病毒, 分离株 tth4, 全基因组
AJ620227.1	细环病毒, 分离株 tth5, 全基因组
AJ620228.1	细环病毒, 分离株 tth14, 全基因组
AJ620229.1	细环病毒, 分离株 tth29, 全基因组
AJ620230.1	细环病毒, 分离株 tth7, 全基因组
AJ620231.1	细环病毒, 分离株 tth8, 全基因组
AJ620232.1	细环病毒, 分离株 tth13, 全基因组
AJ620233.1	细环病毒, 分离株 tth19, 全基因组
AJ620234.1	细环病毒, 分离株 tth22g4, 全基因组
AJ620235.1	细环病毒, 分离株 tth23, 全基因组
AM711976.1	TT 病毒 sle1957 全基因组
AM712003.1	TT 病毒 sle1931 全基因组
AM712004.1	TT 病毒 sle1932 全基因组
AM712030.1	TT 病毒 sle2057 全基因组
AM712031.1	TT 病毒 sle2058 全基因组
AM712032.1	TT 病毒 sle2072 全基因组
AM712033.1	TT 病毒 sle2061 全基因组
AM712034.1	TT 病毒 sle2065 全基因组
AY026465.1	TT 病毒分离株 L01 ORF2 和 ORF1 基因, 全 cds
AY026466.1	TT 病毒分离株 L02 ORF2 和 ORF1 基因, 全 cds
DQ003341.1	细环病毒克隆 P2-9-02 ORF2 (ORF2)、ORF1A (ORF1A) 和 ORF1B (ORF1B) 基因, 全 cds
DQ003342.1	细环病毒克隆 P2-9-07 ORF2 (ORF2)、ORF1A (ORF1A) 和 ORF1B (ORF1B) 基因, 全 cds
DQ003343.1	细环病毒克隆 P2-9-08 ORF2 (ORF2)、ORF1A (ORF1A) 和 ORF1B

[0842]

	(ORF1B) 基因, 全 cds
DQ003344.1	细环病毒克隆 P2-9-16 ORF2 (ORF2)、ORF1A (ORF1A) 和 ORF1B (ORF1B) 基因, 全 cds
DQ186994.1	细环病毒克隆 P601 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ186995.1	细环病毒克隆 P605 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ186996.1	细环病毒克隆 BM1A-02 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ186997.1	细环病毒克隆 BM1A-09 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ186998.1	细环病毒克隆 BM1A-13 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ186999.1	细环病毒克隆 BM1B-05 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ187000.1	细环病毒克隆 BM1B-07 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ187001.1	细环病毒克隆 BM1B-11 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ187002.1	细环病毒克隆 BM1B-14 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ187003.1	细环病毒克隆 BM1B-08 ORF2(ORF2)基因, 全 cds; 和非功能性 ORF1 (ORF1) 基因, 全序列
DQ187004.1	细环病毒克隆 BM1C-16 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ187005.1	细环病毒克隆 BM1C-10 ORF2 (ORF2) 和 ORF1 (ORF1) 基因, 全 cds
DQ187007.1	细环病毒克隆 BM2C-25 ORF2(ORF2)基因, 全 cds; 和非功能性 ORF1 (ORF1) 基因, 全序列
DQ361268.1	细环病毒分离株 ViPi04 ORF1 基因, 全 cds
EF538879.1	细环病毒分离株 CSC5 ORF2 和 ORF1 基因, 全 cds
EU305675.1	细环病毒分离株 LTT7 ORF1 基因, 全 cds

[0843]

EU305676.1	细环病毒分离株 LTT10 ORF1 基因, 全 cds
EU889253.1	细环病毒分离株 ViPi08 非功能性 ORF1 基因, 全序列
FJ392105.1	细环病毒分离株 TW53A25 ORF2 基因, 部分 cds; 和 ORF1 基因, 全 cds
FJ392107.1	细环病毒分离株 TW53A27 ORF2 基因, 部分 cds; 和 ORF1 基因, 全 cds
FJ392108.1	细环病毒分离株 TW53A29 ORF2 基因, 部分 cds; 和 ORF1 基因, 全 cds
FJ392111.1	细环病毒分离株 TW53A35 ORF2 基因, 部分 cds; 和 ORF1 基因, 全 cds
FJ392112.1	细环病毒分离株 TW53A39 ORF2 基因, 部分 cds; 和 ORF1 基因, 全 cds
FJ392113.1	细环病毒分离株 TW53A26 ORF2 基因, 全 cds; 和无功能性 ORF1 基因, 全序列
FJ392114.1	细环病毒分离株 TW53A30 ORF2 和 ORF1 基因, 全 cds
FJ392115.1	细环病毒分离株 TW53A31 ORF2 和 ORF1 基因, 全 cds
FJ392117.1	细环病毒分离株 TW53A37 ORF1 基因, 全 cds
FJ426280.1	细环病毒株 SIA109, 全基因组
FR751500.1	细环病毒全基因组, 分离株 TTV-HD23a (rheu215)
GU797360.1	细环病毒克隆 8-17, 全基因组
HC742700.1	来自专利 WO 2010044889 的序列 7
HC742710.1	来自专利 WO 2010044889 的序列 17
JX134044.1	小 TTV 样病毒分离株 TTMV_LY1, 全基因组
JX134045.1	小 TTV 样病毒分离株 TTMV_LY2, 全基因组
KU243129.1	小 TTV 样病毒分离株 TTMV-204, 全基因组
KY856742.1	小 TTV 样病毒镇江 (zhenjiang) 分离株, 全基因组
LC381845.1	细环病毒人/日本/KS025/2016 DNA, 全基因组
MH648892.1	指环病毒科物种分离株 ctdc048, 全基因组
MH648893.1	指环病毒科物种分离株 ctdh007, 全基因组
MH648897.1	指环病毒科物种分离株 ctcb038, 全基因组

[0844]

MH648900.1	指环病毒科物种分离株 ctfc019, 全基因组
MH648901.1	指环病毒科物种分离株 ctbb022, 全基因组
MH648907.1	指环病毒科物种分离株 ctcf040, 全基因组
MH648911.1	指环病毒科物种分离株 cthi018, 全基因组
MH648912.1	指环病毒科物种分离株 ctea38, 全基因组
MH648913.1	指环病毒科物种分离株 ctbg006, 全基因组
MH648916.1	指环病毒科物种分离株 ctbg020, 全基因组
MH648925.1	指环病毒科物种分离株 ctc019, 全基因组
MH648932.1	指环病毒科物种分离株 ctid031, 全基因组
MH648946.1	指环病毒科物种分离株 ctdb017, 全基因组
MH648957.1	指环病毒科物种分离株 ctch017, 全基因组
MH648958.1	指环病毒科物种分离株 ctbh011, 全基因组
MH648959.1	指环病毒科物种分离株 ctbc020, 全基因组
MH648962.1	指环病毒科物种分离株 ctif015, 全基因组
MH648966.1	指环病毒科物种分离株 ctei055, 全基因组
MH648969.1	指环病毒科物种分离株 ctjg000, 全基因组
MH648976.1	指环病毒科物种分离株 ctcj064, 全基因组
MH648977.1	指环病毒科物种分离株 ctbj022, 全基因组
MH648982.1	指环病毒科物种分离株 ctbf014, 全基因组
MH648983.1	指环病毒科物种分离株 ctbd027, 全基因组
MH648985.1	指环病毒科物种分离株 ctch016, 全基因组
MH648986.1	指环病毒科物种分离株 ctbd020, 全基因组
MH648989.1	指环病毒科物种分离株 ctga035, 全基因组
MH648990.1	指环病毒科物种分离株 cthf001, 全基因组
MH648995.1	指环病毒科物种分离株 ctbd067, 全基因组
MH648997.1	指环病毒科物种分离株 ctce026, 全基因组
MH648999.1	指环病毒科物种分离株 ctfb058, 全基因组
MH649002.1	指环病毒科物种分离株 ctjj046, 全基因组
MH649006.1	指环病毒科物种分离株 ctcf030, 全基因组
MH649008.1	指环病毒科物种分离株 ctbg025, 全基因组

[0845]

MH649011.1	指环病毒科物种分离株 ctbh052, 全基因组
MH649014.1	指环病毒科物种分离株 ctba003, 全基因组
MH649017.1	指环病毒科物种分离株 ctbb016, 全基因组
MH649022.1	指环病毒科物种分离株 ctch023, 全基因组
MH649023.1	指环病毒科物种分离株 ctbd051, 全基因组
MH649028.1	指环病毒科物种分离株 ctbf9, 全基因组
MH649038.1	指环病毒科物种分离株 ctbi030, 全基因组
MH649039.1	指环病毒科物种分离株 ctca057, 全基因组
MH649040.1	指环病毒科物种分离株 ctch033, 全基因组
MH649042.1	指环病毒科物种分离株 ctjd005, 全基因组
MH649045.1	指环病毒科物种分离株 ctdc021, 全基因组
MH649051.1	指环病毒科物种分离株 ctdg044, 全基因组
MH649056.1	指环病毒科物种分离株 ctcc062, 全基因组
MH649061.1	指环病毒科物种分离株 ctid009, 全基因组
MH649062.1	指环病毒科物种分离株 ctdc018, 全基因组
MH649063.1	指环病毒科物种分离株 ctbf012, 全基因组
MH649068.1	指环病毒科物种分离株 ctcc066, 全基因组
MH649070.1	指环病毒科物种分离株 ctda011, 全基因组
MH649077.1	指环病毒科物种分离株 ctbh034, 全基因组
MH649083.1	指环病毒科物种分离株 ctdg028, 全基因组
MH649084.1	指环病毒科物种分离株 ctii061, 全基因组
MH649085.1	指环病毒科物种分离株 cteh021, 全基因组
MH649092.1	指环病毒科物种分离株 ctbg012, 全基因组
MH649101.1	指环病毒科物种分离株 ctif053, 全基因组
MH649104.1	指环病毒科物种分离株 ctei657, 全基因组
MH649106.1	指环病毒科物种分离株 ctca015, 全基因组
MH649114.1	指环病毒科物种分离株 ctbf050, 全基因组
MH649122.1	指环病毒科物种分离株 ctdc002, 全基因组
MH649125.1	指环病毒科物种分离株 ctbb15, 全基因组
MH649127.1	指环病毒科物种分离株 ctba013, 全基因组

[0846]

MH649137.1	指环病毒科物种分离株 ctbb000, 全基因组
MH649141.1	指环病毒科物种分离株 ctbc019, 全基因组
MH649142.1	指环病毒科物种分离株 ctid026, 全基因组
MH649144.1	指环病毒科物种分离株 ctj004, 全基因组
MH649152.1	指环病毒科物种分离株 ctcl13, 全基因组
MH649156.1	指环病毒科物种分离株 ctci006, 全基因组
MH649157.1	指环病毒科物种分离株 ctbd025, 全基因组
MH649158.1	指环病毒科物种分离株 ctbf005, 全基因组
MH649161.1	指环病毒科物种分离株 ctcf045, 全基因组
MH649165.1	指环病毒科物种分离株 ctcc29, 全基因组
MH649169.1	指环病毒科物种分离株 ctib021, 全基因组
MH649172.1	指环病毒科物种分离株 ctbh857, 全基因组
MH649174.1	指环病毒科物种分离株 ctbj049, 全基因组
MH649178.1	指环病毒科物种分离株 ctfc006, 全基因组
MH649179.1	指环病毒科物种分离株 ctbe000, 全基因组
MH649183.1	指环病毒科物种分离株 ctbb031, 全基因组
MH649186.1	指环病毒科物种分离株 ctcb33, 全基因组
MH649189.1	指环病毒科物种分离株 ctcc12, 全基因组
MH649196.1	指环病毒科物种分离株 ctci060, 全基因组
MH649199.1	指环病毒科物种分离株 ctbb017, 全基因组
MH649203.1	指环病毒科物种分离株 cthc018, 全基因组
MH649204.1	指环病毒科物种分离株 ctbj003, 全基因组
MH649206.1	指环病毒科物种分离株 ctbg010, 全基因组
MH649208.1	指环病毒科物种分离株 ctid008, 全基因组
MH649209.1	指环病毒科物种分离株 ctbg056, 全基因组
MH649210.1	指环病毒科物种分离株 ctca001, 全基因组
MH649212.1	指环病毒科物种分离株 ctcf004, 全基因组
MH649217.1	指环病毒科物种分离株 ctbe029, 全基因组
MH649223.1	指环病毒科物种分离株 ctci016, 全基因组
MH649224.1	指环病毒科物种分离株 ctce11, 全基因组

[0847]

MH649228.1	指环病毒科物种分离株 ctcf013, 全基因组
MH649229.1	指环病毒科物种分离株 ctcb036, 全基因组
MH649241.1	指环病毒科物种分离株 ctda027, 全基因组
MH649242.1	指环病毒科物种分离株 ctbf003, 全基因组
MH649254.1	指环病毒科物种分离株 ctjb007, 全基因组
MH649255.1	指环病毒科物种分离株 ctbb023, 全基因组
MH649256.1	指环病毒科物种分离株 ctca002, 全基因组
MH649258.1	指环病毒科物种分离株 ctcg010, 全基因组
MH649263.1	指环病毒科物种分离株 ctgh3, 全基因组
MK012439.1	指环病毒科物种分离株 ctthe000, 全基因组
MK012440.1	指环病毒科物种分离株 ctjd008, 全基因组
MK012448.1	指环病毒科物种分离株 ctch012, 全基因组
MK012457.1	指环病毒科物种分离株 ctda009, 全基因组
MK012458.1	指环病毒科物种分离株 ctcd015, 全基因组
MK012485.1	指环病毒科物种分离株 ctf011, 全基因组
MK012489.1	指环病毒科物种分离株 ctba003, 全基因组
MK012492.1	指环病毒科物种分离株 ctbb005, 全基因组
MK012493.1	指环病毒科物种分离株 ctcj014, 全基因组
MK012500.1	指环病毒科物种分离株 ctcb001, 全基因组
MK012504.1	指环病毒科物种分离株 ctcj010, 全基因组
MK012516.1	指环病毒科物种分离株 ctcf003, 全基因组
NC_038336.1	细环病毒 5 型分离株 TCHN-C1 Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
NC_038338.1	细环病毒 11 型分离株 TCHN-D1 Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
NC_038339.1	细环病毒 13 型分离株 TCHN-A Orf2 和 Orf1 基因, 全 cds
NC_038340.1	细环病毒 20 型 ORF4、ORF3、ORF2、ORF1 基因, 全 cds, 克隆: SAa-10
NC_038341.1	细环病毒 21 型分离株 TCHN-B ORF2 和 ORF1 基因, 全 cds
NC_038342.1	细环病毒 23 型 ORF2、ORF1 基因, 全 cds, 分离株: s-TTV CH65-2
NC_038343.1	细环病毒 24 型 ORF4、ORF3、ORF2、ORF1 基因, 全 cds, 克隆: SAa-01
NC_038344.1	细环病毒 29 型 ORF2、ORF1、ORF3 基因, 全 cds, 分离株: TTVyon-KC009

[0848]	NC_038345.1	小细环病毒 10 型分离株 LIL-y1 ORF2、ORF1、ORF3 和 ORF4 基因，全 cds
	NC_038346.1	小细环病毒 11 型分离株 LIL-y2 ORF2、ORF1 和 ORF3 基因，全 cds
	NC_038347.1	小细环病毒 12 型分离株 LIL-y3 ORF2、ORF1、ORF3 和 ORF4 基因，全 cds
	NC_038350.1	中细环病毒 3 型分离株 2PoSMA ORF2 和 ORF1 基因，全 cds
	NC_038351.1	中细环病毒 4 型分离株 6PoSMA ORF2、ORF1 和 ORF3 基因，全 cds
	NC_038352.1	中细环病毒 5 型 DNA，全基因组，分离株：MDJHem2
	NC_038353.1	中细环病毒 6 型 DNA，全基因组，分离株：MDJHem3-1
	NC_038354.1	中细环病毒 7 型 DNA，全基因组，分离株：MDJHem3-2
	NC_038355.1	中细环病毒 8 型 DNA，全基因组，分离株：MDJN1
	NC_038356.1	中细环病毒 9 型 DNA，全基因组，分离株：MDJN2
	NC_038357.1	中细环病毒 10 型 DNA，全基因组，分离株：MDJN14
	NC_038358.1	中细环病毒 11 型 DNA，全基因组，分离株：MDJN47
	NC_038359.1	中细环病毒 12 型 DNA，全基因组，分离株：MDJN51
	NC_038360.1	中细环病毒 13 型 DNA，全基因组，分离株：MDJN69
	NC_038361.1	中细环病毒 14 型 DNA，全基因组，分离株：MDJN97
	NC_038362.1	中细环病毒 15 型 DNA，全基因组，分离株：Pt-TTMDV210

[0849] 在一些实施例中，遗传元件包含与来自一种或多种非指环病毒，例如腺病毒、疱疹病毒、pox病毒、痘苗病毒、SV40、乳头瘤病毒、RNA病毒（例如逆转录病毒、例如慢病毒）、单链RNA病毒（例如肝炎病毒）或双链RNA病毒（例如轮状病毒）的一个或多个序列具有同源性或同一性的一个或多个序列。在一些实施例中，由于重组逆转录病毒是有缺陷的，因此可以提供协助以产生感染性颗粒。可以提供这样的协助，例如，通过使用含有质粒的辅助细胞系，这些质粒编码在LTR内调节性序列的控制下的逆转录病毒的所有结构基因。用于复制本文所述的指环载体的合适细胞系包括本领域已知的细胞系，例如A549细胞，其可以如本文所述进行修饰。所述遗传元件可以另外含有编码选择性标志的基因，以便可以鉴定所期望的遗传元件。

[0850] 在一些实施例中，遗传元件包括非沉默突变，例如导致编码的多肽中氨基酸差异的碱基置换、缺失或添加，只要序列与由第一核苷酸序列编码的多肽保持至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性或以其他方式可用于实施本发明。在这方面，可以进行某些保守性氨基酸置换，通常认为这些置换不会使蛋白质的整体功能失活：例如对于带正电的氨基酸（反之亦然），赖氨酸、精氨酸和组氨酸；对于带负电的氨基酸（反之亦然），天冬氨酸和谷氨酸；对于某些电中性氨基酸的组（在所有情况下，反之亦然），(1) 丙氨酸和丝氨酸，(2) 天冬酰胺、谷氨酰胺和组氨酸，(3) 半胱氨酸和丝氨酸，(4) 甘氨酸和脯氨酸，(5) 异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸，(6) 蛋氨酸、亮氨酸和异亮氨酸，(7) 苯丙氨酸。

酸、蛋氨酸、亮氨酸和酪氨酸, (8) 丝氨酸和苏氨酸, (9) 色氨酸和酪氨酸, (10) 以及例如酪氨酸、色氨酸和苯丙氨酸。氨基酸可以根据物理特性以及对二级和三级蛋白质结构的贡献进行分类。保守性置换在本领域中被认为是一个氨基酸被具有相似特性的另一氨基酸置换。

[0851] 具有相同或指定百分比的相同核苷酸或氨基酸残基的两个或更多个核酸或多肽序列的同一性(例如, 当在比较窗口或指定区域内进行最大对应性比较和对齐时, 在具体区域内约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高同一性) 可使用带有以下所述默认参数的BLAST或BLAST 2.0序列比较算法, 或通过人工比对和目视检查(例如, 参见NCBI网站www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/或类似网站) 进行测量。同一性也可以指或可以应用于测试序列的互补序列。同一性还包括具有缺失和/或添加的序列以及具有置换的序列。如本文所述, 算法考虑了空位和类似情况。同一性可以在长度为至少约10个氨基酸或核苷酸、长度为约15个氨基酸或核苷酸、长度为约20个氨基酸或核苷酸、长度为约25个氨基酸或核苷酸、长度为约30个氨基酸或核苷酸、长度为约35个氨基酸或核苷酸、长度为约40个氨基酸或核苷酸、长度为约45个氨基酸或核苷酸、长度为约50个氨基酸或核苷酸、或更多的区域中存在。由于遗传密码是简并的, 因此同源核苷酸序列可包括任何数目的“沉默”碱基改变, 即仍然编码相同氨基酸的核苷酸置换。

[0852] 蛋白质外壳

[0853] 在一些实施例中, 指环载体, 例如合成指环载体包含包封遗传元件的蛋白质外壳。蛋白质外壳可以包含基本上非致病性外壳蛋白, 其不能在哺乳动物中引发不必要的免疫应答。指环载体的蛋白质外壳通常包含基本上非致病性蛋白质, 其可自组装成构成蛋白质外壳的二十面体构造。

[0854] 在一些实施例中, 蛋白质外壳蛋白质由指环载体的遗传元件的序列编码(例如, 与遗传元件顺式)。在其他实施例中, 蛋白质外壳蛋白质由独立于指环载体的遗传元件的核酸编码(例如, 与遗传元件反式)(例如, 如本文所述的杆粒)。

[0855] 在一些实施例中, 蛋白质(例如基本上非致病性蛋白质和/或蛋白质外壳蛋白质) 包含一个或多个糖基化氨基酸, 例如2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个糖基化氨基酸。

[0856] 在一些实施例中, 蛋白质(例如基本上非致病性蛋白质和/或蛋白质外壳蛋白质) 包含至少一个亲水性DNA结合区、精氨酸富集区、苏氨酸富集区、谷氨酰胺富集区、N-末端聚精氨酸序列、可变区、C-末端聚谷氨酰胺/谷氨酸序列和一个或多个二硫键。

[0857] 在一些实施例中, 蛋白质是衣壳蛋白, 例如, 具有与由编码本文所述的衣壳蛋白(例如, 指环病毒ORF1分子和/或衣壳蛋白序列, 例如, 如本文所述) 的任一核苷酸序列编码的蛋白质存在至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列。在一些实施例中, 蛋白质或衣壳蛋白的功能性片段由与指环病毒ORF1核酸(例如, 如本文所述) 具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核苷酸序列编码。

[0858] 在一些实施例中, 指环载体包含编码衣壳蛋白或衣壳蛋白的功能性片段或与如本文所述的指环病毒ORF1分子具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的序列的核苷酸序列。

[0859] 在一些实施例中, 序列同一性较低的氨基酸范围可以提供一种或多种本文所述的特性以及细胞/组织/物种特异性(例如, 嗜性) 的差异。

[0860] 在一些实施例中,指环载体在蛋白质外壳中缺乏脂质。在一些实施例中,指环载体缺少脂质双层,例如病毒包膜。在一些实施例中,指环载体的内部完全由蛋白质外壳所覆盖(例如,100%覆盖率)。在一些实施例中,指环载体的内部低于100%由蛋白质外壳所覆盖,例如,95%、90%、85%、80%、70%、60%、50%或更低的覆盖率。在一些实施例中,蛋白质外壳包含缺口或间断,例如,允许对水、离子、肽或小分子具有渗透性,只要遗传元件还保留在指环载体中。

[0861] 在一些实施例中,蛋白质外壳包含特异性识别和/或结合宿主细胞例如互补蛋白或多肽以介导遗传元件进入宿主细胞的一种或多种蛋白质或多肽。

[0862] 在一些实施例中,蛋白质外壳包含以下中的一种或多种:例如ORF1分子(例如,如本文所述)的精氨酸富集区、胶冻卷区域、N22结构域、高变区和/或C-末端结构域。在一些实施例中,蛋白质外壳包含以下中的一种或多种:一种或多种糖基化蛋白、亲水性DNA结合区、精氨酸富集区、苏氨酸富集区、谷氨酰胺富集区、N-末端聚精氨酸序列、可变区、C-末端聚谷氨酰胺/谷氨酸序列、以及一个或多个二硫键。例如,蛋白质外壳包含由指环病毒ORF1核酸(例如,如本文所述)编码的蛋白质。

[0863] 在一些实施例中,蛋白质外壳包含以下特征中的一种或多种:二十面体对称、识别和/或结合与一种或多种宿主细胞分子相互作用以介导进入宿主细胞的分子、缺乏脂质分子、缺乏碳水化合物、具有pH和温度稳定性、耐去垢剂、以及在宿主中基本上具有非免疫原性或非致病性。

[0864] III. 核酸构建体

[0865] 本文所述的遗传元件可以包含在核酸构建体(例如,杆粒或供体载体,例如,如本文所述)中。

[0866] 在一个方面中,本发明包括核酸遗传元件构建体(例如,杆粒或供体载体),该构建体包含遗传元件,该遗传元件包含(i)编码非致病性外壳蛋白(例如,指环病毒ORF1分子或者其剪接变体或功能性片段)的序列、(ii)使该遗传元件与非致病性外壳蛋白结合的外壳蛋白结合序列和(iii)编码效应物的序列。在一些实施例中,核酸遗传元件构建体包含一个或多个杆状病毒元件(例如,杆状病毒基因组)。在实施例中,核酸遗传元件构建体在被引入合适的宿主细胞(例如,昆虫细胞,例如,Sf9细胞)时包含足以驱动杆状病毒(例如,包含核酸构建体,例如,杆粒)在宿主细胞中的产生的元件。

[0867] 遗传元件或遗传元件内的任何序列可以使用任何合适的方法获得。多种重组方法是本领域已知的,例如,使用标准技术,从含有病毒序列的细胞中筛选文库、从已知含有相同序列的核酸构建体中获得该序列、或者直接从含有相同序列的细胞和组织中分离出该序列。可替代地或组合地,遗传元件的部分或全部可以以合成方式产生,而不是进行克隆。

[0868] 在一些实施例中,核酸构建体包括调节性元件、与靶基因同源的核酸序列、和/或各种报告构建体,用于在活细胞内和/或当细胞内分子存在于靶细胞内时引起报告分子的表达。

[0869] 报告基因用于鉴定可能转染的细胞和评估调节性序列的功能。通常,报告基因是如下基因,该基因不存在于受体生物体或组织中或由其表达并且编码多肽,该多肽的表达通过一些可易于检测的特性(例如,酶活性)表现出来。在将DNA引入受体细胞后,在适当的时间测定报告基因的表达。合适的报告基因可包括编码萤光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙

酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如,Ui-Tei等人,2000FEBS Letters[欧洲生化学会联合会快报]479:79-82)。合适的表达系统是熟知的,可以使用已知技术制备或商业获得。通常,将具有显示报告基因最高表达水平的最少5'侧翼区的构建体鉴定为启动子。这样的启动子区可以连接至报告基因,并且用于评估药剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0870] 在一些实施例中,核酸构建体在宿主细胞中是基本上非致病性的和/或基本上非整合的,或者在宿主中是基本上非免疫原性的。

[0871] 在一些实施例中,核酸构建体的量足以调节表型、病毒水平、基因表达、与其他病毒竞争、疾病状态等中的一种或多种至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更高。

[0872] IV. 组合物

[0873] 本文所述的指环载体也可与药用赋形剂(例如,如本文所述的药用赋形剂)一起包含在药物组合物中。在一些实施例中,药物组合物包含至少 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 10^{14} 或 10^{15} 个指环载体。在一些实施例中,药物组合物包含约 10^5 - 10^{15} 、 10^5 - 10^{10} 或 10^{10} - 10^{15} 个指环载体。在一些实施例中,药物组合物包含约 10^8 (例如,约 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 或 10^{10})个基因组当量/mL的指环载体。在一些实施例中,药物组合物包含 10^5 - 10^{10} 、 10^6 - 10^{10} 、 10^7 - 10^{10} 、 10^8 - 10^{10} 、 10^9 - 10^{10} 、 10^5 - 10^6 、 10^5 - 10^7 、 10^5 - 10^8 、 10^5 - 10^9 、 10^5 - 10^{11} 、 10^5 - 10^{12} 、 10^5 - 10^{13} 、 10^5 - 10^{14} 、 10^5 - 10^{15} 或 10^{10} - 10^{15} 个基因组当量/mL的指环载体,例如,如根据PCT/US19/65995的实例18的方法所确定的。在一些实施例中,药物组合物包含足够的指环载体,以将包含在指环载体中的遗传元件的至少1、2、5或10、100、500、1000、2000、5000、8,000、 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 个或更多个拷贝/细胞递送至真核细胞群。在一些实施例中,药物组合物包含足够的指环载体,以将包含在指环载体中的遗传元件的至少约 1×10^4 、 1×10^5 、 1×10^6 、 1×10^7 、或约 1×10^4 - 1×10^5 、 1×10^4 - 1×10^6 、 1×10^4 - 1×10^7 、 1×10^5 - 1×10^6 、 1×10^5 - 1×10^7 、或 1×10^6 - 1×10^7 个拷贝/细胞递送至真核细胞群。

[0874] 在一些实施例中,药物组合物具有以下特征中的一种或多种:该药物组合物满足药物或良好生产规范(GMP)标准;该药物组合物是根据良好生产规范(GMP)制成的;该药物组合物具有低于预定参考值的病原体水平,例如基本上不含病原体;该药物组合物具有低于预定参考值的污染物水平,例如,基本上不含污染物;或该药物组合物具有低免疫原性或基本上是非免疫原性的,例如,如本文所述。

[0875] 在一些实施例中,药物组合物包含低于阈值量的一种或多种污染物。在药物组合物中希望排除或降到最低限度的示例性污染物包括但不限于宿主细胞核酸(例如,宿主细胞DNA和/或宿主细胞RNA)、动物来源的组分(例如,血清白蛋白或胰蛋白酶)、可复制型病毒、非感染性颗粒、游离病毒衣壳蛋白、外源因子和聚集体。在实施例中,污染物是宿主细胞DNA。在实施例中,该组合物每剂包含低于约10ng的宿主细胞DNA。在实施例中,通过对宿主细胞DNA进行过滤和/或酶促降解来降低组合物中宿主细胞DNA的水平。在实施例中,按重量计,该药物组合物含有低于10%(例如,低于约10%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%或0.1%)的污染物。

[0876] 在一个方面中,本文所述的本发明包括药物组合物,其包含:

[0877] a) 包含遗传元件的指环载体,该遗传元件包含(i)编码非致病性外壳蛋白的序列,

(ii) 使该遗传元件与该非致病性外壳蛋白结合的外壳蛋白结合序列,和(iii) 编码调节性核酸的序列;和蛋白质外壳,其与该遗传元件相关联,例如,包裹或包封该遗传元件;以及

[0878] b) 药用赋形剂。

[0879] 囊泡

[0880] 在一些实施例中,组合物进一步包含载剂组分,例如微粒、脂质体、囊泡或外泌体。在一些实施例中,脂质体包含球形囊泡结构,该球形囊泡结构由围绕内部水性隔室的单层或多层的脂质双层和相对不可渗透的外部亲脂性磷脂双层组成。脂质体可以是阴离子型、中性的或阳离子型。脂质体通常具有生物相容性、无毒,可以递送亲水性和亲脂性药物分子,保护其货物免受血浆酶类的降解,并跨生物膜运输其载荷(对于综述,参见,例如,Spuch和Navarro,Journal of Drug Delivery[药物递送杂志],第2011卷,文章编号469679,共12页,2011,doi:10.1155/2011/469679)。

[0881] 囊泡可以由若干种不同类型的脂质制成;然而,磷脂最常用于生成作为药物载剂的脂质体。囊泡可包括但不限于DOTMA、DOTAP、DOTIM、DDAB,单独使用或与胆固醇一起产生DOTMA和胆固醇、DOTAP和胆固醇、DOTIM和胆固醇以及DDAB和胆固醇。用于制备多层囊泡脂质的方法是本领域已知的(参见,例如美国专利号6,693,086,其中涉及多层囊泡脂质制备的教导通过引用并入本文)。尽管当脂质膜与水溶液混合时,囊泡的形成是自发的,但也可以通过使用均质器、超声仪或挤压装置以振荡的形式施加力来加快囊泡的形成(对于综述,参见例如,Spuch和Navarro,Journal of Drug Delivery[药物递送杂志],第2011卷,文章编号469679,共12页,2011,doi:10.1155/2011/469679)。可以通过挤出通过具有减小尺寸的过滤器来制备挤出的脂质,如Templeton等人,Nature Biotech[自然生物技术],15:647-652,1997中所述,该文献关于挤出脂质制备的传授内容通过引用并入本文。

[0882] 如本文所述,可将添加剂添加至囊泡以改变其结构和/或特性。例如,可以将胆固醇或鞘磷脂加入混合物中,以帮助稳定结构并防止内部货物泄漏。此外,可以由氢化的卵磷脂酰胆碱或卵磷脂酰胆碱、胆固醇和磷酸二鲸蜡酯制备囊泡。(对于综述,参见,例如,Spuch和Navarro,Journal of Drug Delivery[药物递送杂志],第2011卷,文章编号469679,共12页,2011,doi:10.1155/2011/469679)。同样,囊泡可以在合成期间或之后进行表面修饰以包括与受体细胞上的反应性基团互补的反应性基团。这样的反应性基团包括但不限于马来酰亚胺基团。例如,可以合成囊泡以包括马来酰亚胺缀合的磷脂,例如但不限于DSPE-MaL-PEG2000。

[0883] 囊泡配制品可以主要由天然磷脂和脂质(例如1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷脂酰胆碱(DSPC)、鞘磷脂、卵磷脂酰胆碱和单唾液酸神经节苷脂)构成。仅由磷脂组成的配制品在血浆中不太稳定。然而,用胆固醇操纵脂质膜降低了包封的货物的快速释放,或者1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)增加了稳定性(对于综述,参见,例如,Spuch和Navarro,Journal of Drug Delivery[药物递送杂志],第2011卷,文章ID 469679,第12页,2011,doi:10.1155/2011/469679)。

[0884] 在实施例中,脂质可用于形成脂质微粒。脂质包括但不限于DLin-KC2-DMA4、C12-200和可使用自发囊泡形成程序配制的共脂质二硬脂酰磷脂酰胆碱、胆固醇和PEG-DMG(参见例如Novobrantseva,Molecular Therapy-Nucleic Acids[分子治疗-核酸](2012)1,e4;doi:10.1038/mtna.2011.3)。组分摩尔比可以为约50/10/38.5/1.5(DLin-KC2-DMA或C12-

200/二硬脂酰磷脂酰胆碱/胆固醇/PEG-DMG)。Tekmira在美国和国外拥有一系列约95项同族专利,它们涉及脂质微粒和脂质微粒配制品的各个方面(参见,例如,美国专利号7,982,027;7,799,565;8,058,069;8,283,333;7,901,708;7,745,651;7,803,397;8,101,741;8,188,263;7,915,399;8,236,943和7,838,658以及欧洲专利号1766035;1519714;1781593和1664316),所有这些都可以用于和/或适用于本发明。

[0885] 在一些实施例中,微粒包含以随机方式排列的一种或多种固化聚合物。微粒可以是生物可降解型。生物可降解型微粒可以例如使用本领域已知的方法合成,包括但不限于溶剂蒸发、热熔微囊化、溶剂去除和喷雾干燥。Bershteyn等人,Soft Matter[软物质]4:1787-1787,2008和US 2008/0014144 A1中描述了用于合成微粒的示例性方法,其关于微粒合成的具体教导通过引用并入本文。

[0886] 可用于形成生物可降解型微粒的示例性合成聚合物包括但不限于脂肪族聚酯、聚(乳酸)(PLA)、聚(乙醇酸)(PGA)、乳酸和乙醇酸的共聚物(PLGA)、聚己内酯(PCL)、聚酐、聚(原)酸酯、聚氨酯、聚(丁酸)、聚(丙酸)和聚(丙交酯-己内酯)以及天然聚合物,例如白蛋白、藻酸盐和其他多糖,包括葡聚糖和纤维素、胶原蛋白、其化学衍生物,包括化学基团的取代、添加,例如烷基、亚烷基、羟基化、氧化和本领域技术人员常规进行的其他修饰)、白蛋白和其他亲水蛋白、玉米蛋白和其他醇溶蛋白和疏水性蛋白质、共聚物及其混合物。通常,这些材料通过酶水解或暴露于水、通过表面或整体腐蚀而降解。

[0887] 微粒的直径范围为0.1-1000微米(μm)。在一些实施例中,它们的直径的尺寸范围为1 μm -750 μm 、或50 μm -500 μm 、或100 μm -250 μm 。在一些实施例中,它们的直径的尺寸范围为50 μm -1000 μm 、50 μm -750 μm 、50 μm -500 μm 或50 μm -250 μm 。在一些实施例中,它们的直径的尺寸范围是.05 μm -1000 μm 、10 μm -1000 μm 、100 μm -1000 μm 或500 μm -1000 μm 。在一些实施例中,它们的直径为约0.5 μm 、约10 μm 、约50 μm 、约100 μm 、约200 μm 、约300 μm 、约350 μm 、约400 μm 、约450 μm 、约500 μm 、约550 μm 、约600 μm 、约650 μm 、约700 μm 、约750 μm 、约800 μm 、约850 μm 、约900 μm 、约950 μm 或约1000 μm 。如微粒直径的上下文中所用,术语“约”是指所述绝对值的 $\pm 5\%$ 。

[0888] 在一些实施例中,配体经由存在于颗粒表面上并存在于待连接的配体上的官能化学基团(羧酸、醛、胺、巯基和羟基)与微粒表面缀合。可以通过例如在微粒的乳液制备期间,并入具有官能化学基团的稳定剂来将官能度引入微粒中。

[0889] 将官能团引入微粒的另一实例是在微粒制备后,通过用均双官能或异双官能交联剂直接交联颗粒和配体。该程序可以使用合适的化学物质和一类交联剂(CDI、EDAC、戊二醛等,如下文更详细论述的)或在制备后经由对颗粒表面进行化学修饰将配体偶联至颗粒表面的任何其他交联剂。这还包括如下过程,通过该过程可以将两亲性分子(例如脂肪酸、脂质或功能性稳定剂)被动吸附并粘附到颗粒表面,从而引入官能性端基用于连接到配体上。

[0890] 在一些实施例中,可以合成微粒以在其外表面上包含一个或多个靶向基团以靶向特定的细胞或组织类型(例如,心肌细胞)。这些靶向基团包括但不限于受体、配体、抗体等。这些靶向基团将其配偶体结合在细胞表面上。在一些实施例中,微粒将整合到构成细胞表面的脂质双层中,并且将线粒体递送至细胞中。

[0891] 微粒还可在其最外表面上包含脂质双层。该双层可以由一个或多个相同或不同类型的脂质组成。实例包括但不限于磷脂,例如磷酸胆碱和磷酸肌醇。具体实例包括但不限于DMPC、DOPC、DSPC和各种其他脂质,例如本文针对脂质体所述的那些。

[0892] 在一些实施例中,载剂包含例如本文所述的纳米颗粒。

[0893] 在一些实施例中,本文所述的囊泡或微粒用诊断剂进行官能化。诊断剂的实例包括但不限于用于正电子发射断层扫描(PET)、计算机辅助断层扫描(CAT)、单光子发射计算机化断层扫描、X射线、荧光检查和磁共振成像(MRI)的市售成像剂;和造影剂。在MRI中用作造影剂的合适材料的实例包括钆螯合物,以及铁、镁、锰、铜和铬。

[0894] 载剂

[0895] 本文所述的组合物(例如,药物组合物)可包含载剂、与载剂一起配制和/或在载剂中递送。在一个方面中,本发明包括组合物,例如药物组合物,其包含载剂(例如,囊泡、脂质体、脂质纳米颗粒、外泌体、红细胞、外泌体(例如哺乳动物或植物外泌体)、融合体),该载剂包含(例如,封装)本文所述的组合物(例如,本文所述的指环载体、指环病毒或遗传元件)。

[0896] 在一些实施例中,本文所述的组合物和系统可以配制在脂质体或其他类似的囊泡中。一般而言,脂质体是球形囊泡结构,这些球形囊泡结构由围绕内部水性隔室的单层或多层的脂质双层和相对不可渗透的外部亲脂性磷脂双层构成。脂质体可以是阴离子型、中性的或阳离子型。脂质体通常具有以下特征中的一种或多种(例如,全部):生物相容性、无毒性、可以递送亲水性和亲脂性药物分子、保护其货物免受血浆酶类的降解,并可以跨生物膜和血脑屏障(BBB)运输其载荷(参见,例如,Spuch和Navarro,Journal of Drug Delivery [药物递送杂志],第2011卷,文章编号469679,共12页,2011.doi:10.1155/2011/469679;以及Zylberberg和Matosevic.2016.Drug Delivery [药物递送],23:9,3319-3329,doi:10.1080/10717544.2016.1177136)。

[0897] 囊泡可以由若干种不同类型的脂质制成;然而,磷脂最常用于生成作为药物载剂的脂质体。制备多层囊泡脂质的方法是已知的(参见例如美国专利号6,693,086,其关于多层囊泡脂质制备的教导通过引用并入本文)。尽管当脂质膜与水溶液混合时,囊泡的形成是自发的,但也可以通过使用均质器、超声仪或挤压装置以振荡的形式施加力来加快囊泡的形成(对于综述,参见,例如,Spuch和Navarro,Journal of Drug Delivery [药物递送杂志],第2011卷,文章ID 469679,第12页,2011.doi:10.1155/2011/469679)。如empleton等人,Nature Biotech [自然生物技术],15:647-652,1997中所述,挤出的脂质可以通过例如通过用于减小尺寸的过滤器挤出来制备。

[0898] 脂质纳米颗粒(LNP)是为本文所述的药物组合物提供生物相容性和可生物降解的递送系统的载剂的另一实例。参见,例如,Gordillo-Galeano等人European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics. [欧洲制药学与生物制药学杂志]第133卷,2018年12月,第285-308页。纳米结构化的脂质载剂(NLC)是经修饰的固体脂质纳米颗粒(SLN),这些经修饰的固体脂质纳米颗粒保留了SLN的特征、改善了药物稳定性和负载能力、并且防止了药物泄漏。聚合物纳米颗粒(PNP)是药物递送的重要部分。这些纳米颗粒可以有效地指导药物递送至特定靶标并且提高药物稳定性和药物可控释放。也可以采用脂质-聚合物纳米颗粒(PLN),即一种组合了脂质体和聚合物的新型载剂。这些纳米颗粒具有PNP和脂质体的互补优势。PLN由核壳结构构成;聚合物核提供了稳定的结构,而磷脂壳提供了良好的生物相容性。因此,这两种组分增加了药物包封率、促进了表面修饰、并且防止了水溶性药物的泄漏。对于综述,参见,例如,Li等人2017,Nanomaterials [纳米材料]7,122;doi:10.3390/

nano7060122。

[0899] 外泌体也可用作本文所述的组合物和系统的药物递送媒介物。对于综述,参见Ha等人2016年7月.*Acta Pharmaceutica Sinica B*[药理学报英文版]第6卷,第4期,第287-296页;doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001。

[0900] 离体分化的红细胞也可用作本文所述组合物的载剂。参见,例如,WO 2015073587;WO 2017123646;WO 2017123644;WO 2018102740;WO 2016183482;WO 2015153102;WO 2018151829;WO 2018009838;Shi等人2014.*Proc Natl Acad Sci USA*.[美国国家科学院院刊]111(28):10131-10136;美国专利9,644,180;Huang等人2017.*Nature Communications*[自然-通讯]8:423;Shi等人2014.*Proc Natl Acad Sci USA*.[美国国家科学院院刊]111(28):10131-10136。

[0901] 融合体组合物,例如,如WO 2018208728中所述,也可用作载剂以递送本文所述的组合物。

[0902] 穿膜多肽

[0903] 在一些实施例中,组合物进一步包含穿膜多肽(MPP),以将组分带入细胞中或跨过膜,例如细胞或核膜。能够促进物质跨膜运输的穿膜多肽包括但不限于细胞穿透肽(CPP)(参见,例如,美国专利号:8,603,966)、用于植物细胞内递送的融合肽(参见,例如,Ng等人,*PLoS One*[公共科学图书馆-综合],2016,11:e0154081)、蛋白质转导结构域、木马肽和膜转位信号(MTS)(参见,例如,Tung等人,*Advanced Drug Delivery Reviews*[高级药物递送综述]55:281-294(2003))。一些MPP富含氨基酸,例如精氨酸,带有带正电的侧链。

[0904] 穿膜多肽具有诱导组分穿膜的能力,并且在全身性施用后允许大分子在体内多个组织的细胞内转位。穿膜多肽还可以指在适当条件下与细胞接触时,从外部环境移动到细胞内环境(包括细胞质,细胞器如线粒体或细胞核)中的肽,其量明显超过被动扩散所能达到的量。

[0905] 跨膜运输的组分可以可逆地或不可逆地连接至穿膜多肽。接头可以是化学键,例如一个或多个共价键或非共价键。在一些实施例中,接头是肽接头。此种接头可介于2-30个氨基酸之间,或者更长。接头包括柔性、刚性或可切割的接头。

[0906] 组合

[0907] 在一个方面中,本文所述的指环载体或包含指环载体的组合物还可包括一个或多个异源部分。在一个方面中,本文所述的指环载体或包含指环载体的组合物还可以以融合方式包含一个或多个异源部分。在一些实施例中,异源部分可以与遗传元件连接。在一些实施例中,异源部分可以作为指环载体的一部分包封在蛋白质外壳中。在一些实施例中,异源部分可以与指环载体一起施用。

[0908] 在一个方面中,本发明包括细胞或组织,其包含本文所述的任一种指环载体和异源部分。

[0909] 在另一方面,本发明包括药物组合物,其包含本文所述的指环载体和异源部分。

[0910] 在一些实施例中,异源部分可以是病毒(例如,效应物(例如,药物、小分子)、靶向剂(例如,DNA靶向剂、抗体、受体配体)、标签(例如,荧光团、光敏剂例如KillerRed)或本文所述的编辑或靶向部分。在一些实施例中,本文所述的膜移位多肽与一个或多个异源部分连接。在一个实施例中,异源部分是小分子(例如,肽模拟物或分子量小于2000道尔顿的有

机小分子)、肽或多肽(例如,抗体或其抗原结合片段)、纳米颗粒、适体或药剂。

[0911] 病毒

[0912] 在一些实施例中,指环载体或组合物(例如,如本文所述)可进一步包含来自除指环病毒以外的病毒的一种或多种组分或元件(例如,核酸或多肽),例如,作为异源部分,例如单链DNA病毒,例如杆状DNA病毒、圆环病毒、双生病毒、基诺病毒、丝状病毒、微小病毒、矮化病毒、细小病毒和斯派拉病毒(Spiravirus)。在一些实施例中,组合物可进一步包含双链DNA病毒,例如腺病毒、瓶状病毒、囊泡病毒、非洲猪瘟病毒、杆状病毒、微小纺锤形噬菌体、球状病毒、滴状病毒、唾液腺肥大病毒、疱疹病毒、虹彩病毒、脂毛病毒、线头病毒和痘病毒。在一些实施例中,组合物可以进一步包含RNA病毒,例如甲病毒、真菌传杆状病毒、肝炎病毒、大麦病毒、烟草花叶病毒、烟草脆裂病毒、三角病毒、风疹病毒、双RNA病毒、囊状病毒、分体病毒和呼肠病毒。在一些实施例中,将指环载体与作为异源部分的病毒一起施用。

[0913] 在一些实施例中,异源部分可以包含非致病性病毒,例如,共生病毒、共栖的病毒、天然病毒。在一些实施例中,非致病性病毒是一种或多种指环病毒,例如,甲型细环病毒(TT)、乙型细环病毒(TTM)和丙型细环病毒(TTMD)。在一些实施例中,指环病毒可以包括细环病毒(TT)、SEN病毒、岗哨病毒、小TTV样病毒、TT病毒、TT病毒基因型6、TT病毒群、TTV样病毒DXL1、TTV样病毒DXL2、小细环样病毒(TTM)或中细环样病毒(TTMD)。在一些实施例中,非致病性病毒包含一个或多个与本文所述的任一个核苷酸序列具有至少约60%、70%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%核苷酸序列同一性的序列。

[0914] 在一些实施例中,异源部分可包含一种或多种被鉴定为受试者中缺乏的病毒。例如,可以向鉴定为患有异常病毒性疾病的受试者施用包含指环载体和一种或多种病毒组分或病毒的组合物,这些组分或病毒在受试者中失衡或者具有不同于参考值,例如健康受试者的比率。

[0915] 在一些实施例中,异源部分可以包含一种或多种非指环病毒,例如腺病毒、疱疹病毒、pox病毒、痘苗病毒、SV40、乳头瘤病毒、RNA病毒(例如逆转录病毒、例如慢病毒)、单链RNA病毒(例如肝炎病毒)或双链RNA病毒(例如轮状病毒)。在一些实施例中,指环载体或病毒是有缺陷的,或需要协助才能产生感染性颗粒。可以提供这样的协助,例如,通过使用含有核酸的辅助细胞系,这样的核酸编码在LTR内调节性序列的控制下的复制缺陷型指环载体或病毒的结构基因中一种或多种(例如,全部),例如,整合到基因组中的质粒或DNA。用于复制本文所述的指环载体的合适细胞系包括本领域已知的细胞系,例如A549细胞,其可以如本文所述进行修饰。

[0916] 靶向部分

[0917] 在一些实施例中,本文所述的组合物或指环载体可以进一步包含靶向部分,例如,特异性结合靶细胞上存在的感兴趣分子的靶向部分。靶向部分可以调节感兴趣分子或细胞的特定功能,调节特定分子(例如,酶、蛋白质或核酸),例如通路中感兴趣分子下游的特定分子,或者特异性结合靶标以定位指环载体或遗传元件。例如,靶向部分可以包括与感兴趣的特定分子相互作用以提高、降低或以其他方式调节其功能的治疗剂。

[0918] 标签部分或监测部分

[0919] 在一些实施例中,本文所述的组合物或指环载体可以进一步包含标记或监测本文所述指环载体或遗传元件的标签。标签部分或监测部分可以通过化学剂或酶促裂解,例如

蛋白水解或蛋白质内含子剪接而去除。亲和标签可用于使用亲和技术纯化标记的多肽。一些实例包括几丁质结合蛋白 (CBP)、麦芽糖结合蛋白 (MBP)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 和多聚His标签。增溶标签可能有助于在分子伴侣缺陷型物种 (例如大肠杆菌) 中表达的重组蛋白, 以协助蛋白质正确折叠并防止它们沉淀。一些实例包括硫氧还蛋白 (TRX) 和多聚NANP。标签部分或监测部分可以包括光敏标签, 例如荧光。荧光标签可用于可视化。GFP及其变体是常用作荧光标签的一些实例。蛋白质标签可允许发生特定的酶促修饰 (例如通过生物素连接酶进行生物素化) 或化学修饰 (例如与FlAsH-EDT2反应进行荧光成像)。通常将标签部分或监测部分组合, 以便将蛋白质连接到多个其他组分。标签部分或监测部分也可以通过特异性蛋白水解或酶促裂解 (例如通过TEV蛋白酶、凝血酶、凝血因子Xa或肠肽酶) 而去除。

[0920] 纳米颗粒

[0921] 在一些实施例中, 本文所述的组合物或指环载体可以进一步包含纳米颗粒。纳米颗粒包括无机材料, 这些无机材料的尺寸为约1至约1000纳米、约1至约500纳米、约1至约100nm、约50nm至约300nm、约75nm至约200nm、约100nm至约200nm, 以及其间的任何范围。纳米颗粒通常具有纳米级尺寸的复合结构。在一些实施例中, 纳米颗粒通常是球形的, 尽管根据纳米颗粒的组成可能有不同的形态。纳米颗粒与纳米颗粒外部环境接触的部分通常被确定为纳米颗粒的表面。在本文所述的纳米颗粒中, 尺寸限制可以限制在两个维度上, 因此纳米颗粒包括直径为约1至约1000nm的复合结构, 其中特定直径取决于纳米颗粒的组成和根据实验设计的纳米颗粒的预期用途。例如, 用于治疗应用的纳米颗粒通常具有约200nm或更小的尺寸。

[0922] 纳米颗粒的其他理想的特性, 如表面电荷和空间稳定性, 也可以根据感兴趣的具體应用而变化。在以下文献中描述了临床应用, 如癌症治疗中可能需要的示例性特性: Davis等人, Nature[自然]2008第7卷, 第771-782页; Duncan, Nature[自然]2006第6卷, 第688-701页; 和Allen, Nature[自然]2002第2卷第750-763页, 每个文献均通过引用以其全文并入本文。技术人员在阅读本披露内容后可识别出其他特性。纳米颗粒的尺寸和特性可以通过本领域已知的技术来检测。检测颗粒尺寸的示例性技术包括但不限于动态光散射 (DLS) 和各种显微术, 例如透射电子显微术 (TEM) 和原子力显微术 (AFM)。检测颗粒形态的示例性技术包括但不限于TEM和AFM。检测纳米颗粒表面电荷的示例性技术包括但不限于 ζ 电位方法。适用于检测其他化学特性的其他技术包括通过 ^1H 、 ^{11}B 、和 ^{13}C 和 ^{19}F NMR、UV/Vis和红外/拉曼光谱和荧光光谱 (当纳米颗粒与荧光标志组合使用时) 和技术人员可以鉴定的其他技术。

[0923] 小分子

[0924] 在一些实施例中, 本文所述的组合物或指环载体可以进一步包含小分子。小分子部分包括但不限于小肽、拟肽 (例如类肽)、氨基酸、氨基酸类似物、合成多核苷酸、多核苷酸类似物、核苷酸、核苷酸类似物、通常具有小于约5,000克/摩尔的分子量的有机和无机化合物 (包括杂有机和有机金属化合物), 例如, 具有小于约2,000克/摩尔的分子量的有机或无机化合物, 例如, 具有小于约1,000克/摩尔的分子量的有机或无机化合物, 例如, 具有小于约500克/摩尔的分子量的有机或无机化合物, 以及这样的化合物的盐、酯和其他药学上可接受的形式。小分子可以包括但不限于神经递质、激素、药物、毒素、病毒或微生物颗粒、合成分子以及激动剂或拮抗剂。

[0925] 合适的小分子的实例包括在以下中描述的那些:“The Pharmacological Basis of Therapeutics[治疗学的药理基础],”Goodman和Gilman,McGraw-Hill,纽约州纽约,(1996),第九版,在以下章节:Drugs Acting at Synaptic and Neuroeffector Junctional Sites[药物作用于突触和神经效应连接点];Drugs Acting on the Central Nervous System[药物作用于中枢神经系统];Autacoids:Drug Therapy of Inflammation[自体活性物质:炎症的药物疗法];Water,Salts and Ions[水,盐和离子];Drugs Affecting Renal Function and Electrolyte Metabolism[药物影响肾功能和电解质代谢];Cardiovascular Drugs[心血管药物];Drugs Affecting Gastrointestinal Function[药物影响胃肠功能];Drugs Affecting Uterine Motility[药物影响子宫动力];Chemotherapy of Parasitic Infections[寄生虫感染的化学疗法];Chemotherapy of Microbial Diseases[微生物疾病的化学疗法];Chemotherapy of Neoplastic Diseases[肿瘤性疾病的化学疗法];Drugs Used for Immunosuppression[药物用于免疫抑制];Drugs Acting on Blood-Forming organs[药物作用于造血器官];Hormones and Hormone Antagonists[激素和激素拮抗剂];Vitamins,Dermatology[维生素,皮肤病学];和Toxicology[毒理学],均通过引用并入本文。小分子的一些实例包括但不限于朊病毒药物,例如他克莫司、泛素连接酶或HECT连接酶抑制剂例如heclin、组蛋白修饰药物例如丁酸钠、酶抑制剂例如5-氮杂胞苷、蒽环类药物例如阿霉素、 β -内酰胺类例如青霉素、抗菌剂、化学治疗剂、抗病毒剂、来自其他生物体的调节剂例如VP64、以及生物利用度不足的药物、例如药代动力学不足的化学治疗药。

[0926] 在一些实施例中,小分子是表观遗传修饰剂,例如,如de Groote等人Nuc.Acids Res.[核酸研究](2012):1-18中描述。示例性的小分子表观遗传修饰剂描述于例如Lu等人J.Biomolecular Screening[生物分子筛选杂志]17.5(2012):555-71(例如表1或2)中,其通过引用并入本文。在一些实施例中,表观遗传修饰剂包括伏立诺他或罗米地辛。在一些实施例中,表观遗传修饰剂包含I、II、III和/或IV类组蛋白脱乙酰酶(HDAC)的抑制剂。在一些实施例中,表观遗传修饰剂包含SirTI的激活剂。在一些实施例中,表观遗传修饰剂包括山竹子素,Lys-CoA、C646、(+)-JQI、I-BET、BICI、MS120、DZNep、UNC0321、EPZ004777、AZ505、AMI-I、吡唑酰胺7b、苯并[d]咪唑17b、酰化氨苯砒衍生物(例如PRMTI)、methylstat、4,4'-二羧基-2,2'-联吡啶、SID 85736331、异羟肟酸酯类似物8、tanlylcypromie、双胍和双胍多胺类似物、UNC669、维达扎、地西他滨、苯丁酸钠(SDB)、硫辛酸(LA)、槲皮素、丙戊酸、胍苯哒嗪、新诺明、绿茶提取物(例如表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG))、姜黄素、萝卜硫素和/或大蒜素/二烯丙基二硫化物。在一些实施例中,表观遗传修饰剂抑制DNA甲基化,例如DNA甲基转移酶的抑制剂(例如5-氮杂胞苷和/或地西他滨)。在一些实施例中,表观遗传修饰剂修饰组蛋白修饰,例如组蛋白乙酰化、组蛋白甲基化、组蛋白类泛素化和/或组蛋白磷酸化。在一些实施例中,表观遗传修饰剂是组蛋白脱乙酰酶的抑制剂(例如伏立诺他和/或曲古抑菌素A)。

[0927] 在一些实施例中,小分子是药物活性剂。在一个实施例中,小分子是代谢活性或组分的抑制剂。有用的药物活性剂类别包括但不限于抗生素、抗炎药、血管生成剂或血管活性剂、生长因子和化学治疗(抗肿瘤)剂(例如肿瘤抑制剂)。可以使用来自本文所述的类别和实例或来自(Orme-Johnson 2007,Methods Cell Biol.[细胞生物学方法]2007;80:813-

26) 的分子的一种或组合。在一个实施例中,本发明包括组合物,该组合物包含抗生素、抗炎药物、血管生成剂或血管活性剂、生长因子或化学治疗剂。

[0928] 肽或蛋白质

[0929] 在一些实施例中,本文所述的组合物或指环载体可以进一步包含肽或蛋白质。肽部分可包括但不限于肽配体或抗体片段(例如,结合受体如细胞外受体的抗体片段)、神经肽、激素肽、肽药物、毒性肽、病毒或微生物肽、合成肽、以及激动肽或拮抗肽。

[0930] 肽部分可以是直链或支链的。肽的长度为约5至约200个氨基酸、约15至约150个氨基酸、约20至约125个氨基酸、约25至约100个氨基酸或其间的任何范围。

[0931] 肽的一些实例包括但不限于荧光标签或标志、抗原、抗体、抗体片段如单域抗体、配体和受体如胰高血糖素样肽-1 (GLP-1)、GLP-2受体2、胆囊收缩素B (CCKB) 和生长抑素受体、肽治疗剂如与特定细胞表面受体如G蛋白偶联受体 (GPCR) 或离子通道结合的那些肽、天然生物活性肽的合成肽或肽类似物、抗微生物肽、成孔肽、肿瘤靶向肽或细胞毒性肽、以及降解肽或自毁肽如凋亡诱导肽信号或光敏肽。

[0932] 本文所述的可用于本发明的肽还包括小型抗原结合肽,例如,抗原结合抗体或抗体样片段,如单链抗体、纳米抗体(参见,例如,Steeland等人2016.Nanobodies as therapeutics:big opportunities for small antibodies.[作为治疗剂的纳米抗体:小分子抗体的巨大机会]Drug Discov Today[当代药物发现]:21(7):1076-113)。这样的小型抗原结合肽可以结合细胞质抗原、核抗原、细胞器内抗原。

[0933] 在一些实施例中,本文所述的组合物或指环载体包括与能够靶向特定位置、组织或细胞的配体连接的多肽。

[0934] 寡核苷酸适体

[0935] 在一些实施例中,本文所述的组合物或指环载体可以进一步包含寡核苷酸适体。适体部分是寡核苷酸适体或肽适体。寡核苷酸适体是单链DNA或RNA (ssDNA或ssRNA) 分子,其可以以高亲和力和特异性结合预先选择的靶标(包括蛋白质和肽)。

[0936] 寡核苷酸适体是可以通过多轮重复的体外选择或等效地通过SELEX(指数富集的配体系统进化技术)进行工程化以结合到各种分子靶标(例如,小分子、蛋白质、核酸,甚至细胞、组织和生物体)的核酸种类。适体提供有分辨能力的分子识别,并且可以通过化学合成来产生。另外,适体可能具有理想的储存特性,并且在治疗应用中很少或不会引发免疫原性。

[0937] DNA和RNA适体均可显示出对各种靶标的稳健结合亲和力。例如,已经选择了DNA和RNA适体用于溶菌酶、凝血酶、人类免疫缺陷病毒反式作用应答元件(HIV TAR)(参见en.wikipedia.org/wiki/Aptamer-cite_note-10)、氯高铁血红蛋白、干扰素 γ 、血管内皮生长因子(VEGF)、前列腺特异性抗原(PSA)、多巴胺和非经典癌基因、热休克因子1(HSF1)。

[0938] 肽适体

[0939] 在一些实施例中,本文所述的组合物或指环载体可以进一步包含肽适体。肽适体具有一个(或多个)短可变肽结构域,包括具有低分子量12kDa-14kDa的肽。可以将肽适体设计为特异性结合并干扰细胞内部的蛋白质-蛋白质相互作用。

[0940] 肽适体是经过选择或工程化以结合特定靶分子的人工蛋白质。这些蛋白质包括一个或多个可变序列的肽环。它们通常是从组合文库中分离出来的,并且常常随后通过定向

突变或多轮的可变区诱变和选择而得到改进。在体内,肽适体可以结合细胞蛋白靶标并发挥生物学作用,包括干扰其靶向分子与其他蛋白的正常蛋白相互作用。特别地,针对附着于转录因子激活结构域的靶蛋白筛选附着于转录因子结合结构域的可变肽适体环。将肽适体经由该选择策略与其靶标的体内结合检测为下游酵母标志基因的表达。这样的实验鉴定了与适体结合的特定蛋白质,以及适体破坏的蛋白质相互作用以引起表型。另外,用适当的功能性部分衍生的肽适体可引起其靶蛋白的特异性翻译后修饰,或改变靶标的亚细胞定位。

[0941] 肽适体还可以在体外识别靶标。已发现它们可代替生物传感器中的抗体,并用于从含有无活性和活性蛋白形式的群体中检测活性蛋白同工型。其中肽适体“头部”与独特的序列双链DNA“尾部”共价连接的称为蝌蚪的衍生物可通过其DNA尾部的PCR(例如,使用定量实时聚合酶链反应)定量混合物中的稀缺靶分子。

[0942] 可以使用不同的系统进行肽适体选择,但目前使用最多的是酵母双杂交系统。肽适体还可以选自通过噬菌体展示和其他表面展示技术(例如mRNA展示、核糖体展示、细菌展示和酵母展示)构建的组合肽文库。这些实验程序也称为生物淘选。在从生物淘选获得的肽中,模拟表位可被认为是肽适体。从组合肽文库淘选的所有肽已存储在名为MimoDB的特殊数据库中。

[0943] V. 宿主细胞

[0944] 本发明进一步涉及包含例如本文所述的指环载体、杆粒或供体载体的宿主或宿主细胞。在一些实施例中,宿主或宿主细胞是昆虫细胞(例如,Sf9细胞、Sf21细胞或Hi5细胞)。在一些实施例中,昆虫细胞来源于家蚕、甘蓝夜蛾(*Mamestra brassicae*)、草地贪夜蛾、粉纹夜蛾或黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)。在一些实施例中,宿主或宿主细胞是细菌细胞(例如,大肠杆菌细胞,例如,DH 10Bac细胞)。在某些实施例中,如本文所证实的,提供的指环载体感染多种不同的靶宿主细胞(例如,植物细胞、昆虫细胞、细菌细胞、真菌细胞或动物细胞,例如,哺乳动物细胞,例如,人类细胞)。靶宿主细胞包括中胚层、内胚层或外胚层来源的细胞。靶宿主细胞包括例如上皮细胞、肌肉细胞、白细胞(例如,淋巴细胞)、肾组织细胞、肺组织细胞。

[0945] 在一些实施例中,指环载体在宿主中是基本上非免疫原性的。指环载体或遗传元件无法通过宿主的免疫系统产生不希望的实质性应答。一些免疫应答包括但不限于体液免疫应答(例如,抗原特异性抗体的产生)和细胞介导的免疫应答(例如,淋巴细胞增殖)。

[0946] 在一些实施例中,用指环载体接触(例如,感染)宿主或宿主细胞。在一些实施例中,宿主是哺乳动物,例如人类。在一些实施例中,宿主细胞是哺乳动物细胞,例如,人类细胞。宿主中指环载体的量可以在施用后任何时间测量。在某些实施例中,确定了培养物中指环载体生长的时间曲线。

[0947] 在一些实施例中,指环载体,例如,如本文所述的指环载体是可遗传的。在一些实施例中,指环载体在体液和/或细胞中从母亲直线传递给孩子。在一些实施例中,来自原始宿主细胞的子细胞包含指环载体。在一些实施例中,母亲将指环载体传递给孩子的效率为至少25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%,或者从宿主细胞到子细胞的传递效率为至少25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,宿主细胞中的指环载体在减数分裂期间的传递效率为至少25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,宿主细胞中的指环载体在有丝分裂期间的传递效率为

至少25%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施例中,细胞中指环载体的传递效率为约10%-20%、20%-30%、30%-40%、40%-50%、50%-60%、60%-70%、70%-75%、75%-80%、80%-85%、85%-90%、90%-95%、95%-99%或其间的任何百分比。

[0948] 在一些实施例中,指环载体,例如,指环载体在宿主细胞内复制。在实施例中,宿主细胞是昆虫细胞(例如,Sf9细胞、Sf21细胞或Hi5细胞)。在一个实施例中,指环载体能够在哺乳动物细胞,例如人类细胞中复制。在其他实施例中,指环载体为复制缺损型或非复制型。

[0949] 虽然在一些实施例中,指环载体在宿主细胞中复制,但指环载体不整合到宿主的基因组中,例如,与宿主的染色体整合。在一些实施例中,指环载体的重组频率(例如,与宿主染色体的重组频率)可以忽略不计。在一些实施例中,指环载体的重组频率(例如,与宿主染色体)例如低于约1.0cM/Mb、0.9cM/Mb、0.8cM/Mb、0.7cM/Mb、0.6cM/Mb、0.5cM/Mb、0.4cM/Mb、0.3cM/Mb、0.2cM/Mb、0.1cM/Mb或更低。

[0950] VI. 使用方法

[0951] 本文所述的指环载体和包含指环载体的组合物可用于例如在有需要的受试者(例如,哺乳动物受试者,例如,人类受试者)中治疗疾病、障碍或病症的方法中。本文所述的药物组合物的施用可以例如通过肠胃外(包括静脉内、肿瘤内、腹膜内、肌内、腔内和皮下)施用。指环载体可以单独施用或配制成药物组合物。

[0952] 指环载体可以以单位剂量组合物,例如单位剂量肠胃外组合物的形式施用。这样的组合物通常通过混合来制备,并且可以适于肠胃外施用。这样的组合物可以是例如可注射和可输注的溶液剂或混悬剂或栓剂或气雾剂的形式。

[0953] 在一些实施例中,施用指环载体或包含其的组合物,例如,如本文所述的指环载体或组合物可导致将指环载体所包含的遗传元件递送至(例如,受试者中的)靶细胞。

[0954] 本文所述的指环载体或其组合物,例如,包含效应物(例如,内源性效应物或外源性效应物),可用于将效应物递送至细胞、组织或受试者。在一些实施例中,指环载体或其组合物用于将效应物递送至骨髓、血液、心脏、GI或皮肤。通过施用本文所述的指环载体组合物来递送效应物可以调节(例如,提高或降低)细胞、组织或受试者中非编码RNA或多肽的表达水平。以这种方式调节表达水平可能导致效应物所递送到的细胞中功能性活动的改变。在一些实施例中,调节的功能性活动本质上可以是酶促性、结构性或调节性。

[0955] 在一些实施例中,在递送到细胞中后24小时(例如,1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周、2周、3周、4周、30天或1个月),指环载体或其拷贝可在细胞中检测到。在实施例中,指环载体或其组合物介导对靶细胞的作用,并且该作用持续至少1、2、3、4、5、6或7天,2、3或4周,或者1、2、3、6或12个月。在一些实施例中(例如,其中指环载体或其组合物包含编码外源性蛋白的遗传元件),该作用持续少于1、2、3、4、5、6或7天,2、3或4周,或者1、2、3、6或12个月。

[0956] 可以用本文所述的指环载体或包含该指环载体的组合物治疗的疾病、障碍和病症的实例包括但不限于:免疫障碍、干扰素病(例如,I型干扰素病)、传染病、炎症障碍、自身免疫性病症、癌症(例如实体瘤,例如肺癌、非小细胞肺癌,例如,表达对mIR-625作出响应的基因(例如,胱天蛋白酶-3)的肿瘤)和胃肠道障碍。在一些实施例中,指环载体调节(例如,提高或降低)与指环载体接触的细胞中的活动或功能。在一些实施例中,指环载体调节(例如,

提高或降低)与指环载体接触的细胞中分子(例如,核酸或蛋白质)的水平或活性。在一些实施例中,指环载体降低了与指环载体接触的细胞(例如,癌细胞)的活力,例如,降低了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多。在一些实施例中,指环载体包含效应物,例如miRNA,如miR-625,其降低了与指环载体接触的细胞(例如癌细胞)的活力,例如,降低了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多。在一些实施例中,指环载体例如通过提高胱天蛋白酶-3的活性增加与指环载体接触的细胞(例如,癌细胞)的凋亡,例如,增加了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多。在一些实施例中,指环载体包含效应物,例如,miRNA,如miR-625,其例如通过提高胱天蛋白酶-3活性增加了与指环载体接触的细胞(例如癌细胞)的凋亡,例如,增加了至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、99%或更多。

[0957] VII. 施用/递送

[0958] 可以将组合物(例如,包含如本文所述的指环载体的药物组合物)配制成包括药学上可接受的赋形剂。药物组合物可任选地包含一种或多种另外的活性物质,例如治疗性和/或预防性活性物质。本发明的药物组合物可以是无菌的和/或无热原的。可在以下文献中找到药剂的配制和/或生产中的总体考虑:例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药物科学与实践]第21版,Lippincott Williams&Wilkins[利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司],2005(通过引用并入本文)。

[0959] 尽管本文提供的药物组合物的描述主要针对适合于施用至人的药物组合物,但是本领域技术人员应理解,这样的组合物通常适合于施用至任何其他动物,例如非人动物,例如非人哺乳动物。为了使组合物适合于施用于各种动物而对适合于施用于人的药物组合物的修饰是熟知的,并且普通兽医药理师可仅通过普通实验(如果有的话)来设计和/或进行此种修饰。我们设想向其施用药物组合物的受试者包括但不限于人类和/或其他灵长类动物;哺乳动物,包括商业相关的哺乳动物,如牛、猪、马、绵羊、猫、狗、小鼠和/或大鼠;和/或鸟类,包括商业相关的鸟类,如家禽、鸡、鸭、鹅和/或火鸡。

[0960] 本文所述的药物组合物的配制品可通过药理学领域中已知的或以后开发的任何方法来制备。通常,这样的制备方法包括以下步骤:使活性成分与赋形剂和/或一种或多种其他辅助成分结合,并且然后,如果必要和/或期望的话,将产品分开、成形和/或包装。

[0961] 在一个方面中,本发明的特征在于向受试者递送指环载体的方法。该方法包括向受试者施用包含如本文所述指环载体的药物组合物。在一些实施例中,所施用的指环载体在受试者中复制(例如,成为受试者病毒组的一部分)。

[0962] 药物组合物可以包含野生型或天然病毒元件和/或修饰的病毒元件。指环载体可以包括一个或多个指环病毒序列(例如,核酸序列或编码其氨基酸序列的核酸序列)或与其具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%核苷酸序列同一性的序列。指环载体可包含核酸分子,该核酸分子包含与一种或多种指环病毒序列(例如,指环病毒ORF1核酸序列)具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%序列同一性的核酸序列。指环载体可以包含编码氨基酸序列的核酸分子,该氨基酸序列与指环病毒氨基酸序列(例如,指环病毒ORF1分子的氨基酸序列)具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%序列

同一性。指环载体可以包含多肽,该多肽包含与指环病毒氨基酸序列(例如,指环病毒ORF1分子的氨基酸序列)具有至少约60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%和99%序列同一性的氨基酸序列。

[0963] 在一些实施例中,指环载体足以增加(刺激)内源性基因和蛋白的表达,例如,与参考(例如健康对照)相比,增加(刺激)了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。在某些实施例中,指环载体足以减少(抑制)内源性基因和蛋白的表达,例如,与参考(例如健康对照)相比,减少(抑制)了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。

[0964] 在一些实施例中,指环载体在宿主或宿主细胞中抑制/增强一种或多种病毒特性,例如,嗜性、感染性、免疫抑制/激活,例如,与参考(例如健康对照)相比,抑制/增强了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。

[0965] 在一些实施例中,向受试者施用的药物组合物,该药物组合物进一步包含一种或多种在病毒遗传信息中未表示的病毒株。

[0966] 在一些实施例中,以足以调节病毒感染的剂量和时间施用包含本文所述的指环载体的药物组合物。病毒感染的一些非限制性实例包括腺相关病毒、爱知病毒(Aichi virus)、澳大利亚蝙蝠狂犬病病毒、BK多瘤病毒、版纳病毒(Banna virus)、巴马森林病毒(Barmah forest virus)、布尼亚韦拉病毒(Bunyamwera virus)、布尼亚病毒属拉克罗斯病毒(Bunyavirus La Crosse)、布尼亚病毒属雪鞋野兔病毒(Bunyavirus snowshoe hare)、猕猴疱疹病毒(Cercopithecine herpesvirus)、钱迪普拉病毒(Chandipura virus)、基孔肯雅病毒(Chikungunya virus)、库赛病毒(Cosavirus) A种、牛痘病毒、柯萨奇病毒(Coxsackievirus)、克里米亚-刚果出血热病毒、登革热病毒、多里病毒(Dhori virus)、杜贝病毒(Dugbe virus)、杜文海病毒(Duvenhage virus)、东部马脑炎病毒(Eastern equine encephalitis virus)、伊波拉病毒(Ebolavirus)、埃可病毒(Echovirus)、脑心肌炎病毒、EB病毒(Epstein-Barr virus)、欧洲蝙蝠狂犬病病毒、GB病毒C型/庚型肝炎病毒、汉坦病毒(Hantaan virus)、亨德拉病毒(Hendra virus)、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、马痘病毒、人腺病毒、人星状病毒、人冠状病毒、人巨细胞病毒、人肠病毒68型、人肠病毒70型、人疱疹病毒1型、人疱疹病毒2型、人疱疹病毒6型、人疱疹病毒7型、人疱疹病毒8型、人类免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒1型、人乳头瘤病毒2型、人乳头瘤病毒16型、人乳头瘤病毒18型、人副流感病毒、人细小病毒B19型、人呼吸道合胞病毒、人鼻病毒、人SARS冠状病毒、人泡沫逆转录病毒(spumaretrovirus)、人嗜T淋巴细胞病毒、人环曲病毒(torovirus)、甲型流感病毒、乙型流感病毒、丙型流感病毒、伊斯法罕病毒(Isfahan virus)、JC多瘤病毒、日本脑炎病毒、呼宁砂粒病毒(Junin arenavirus)、KI多瘤病毒、昆津病毒(Kunjin virus)、拉各斯蝙蝠病毒、维多利亚湖马尔堡病毒(Lake Victoria marburgvirus)、兰加特病毒(Langat virus)、拉沙病毒(Lassa virus)、洛兹达雷病毒(Lordsdale virus)、跳跃病病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、马秋波病毒(Machupo virus)、马亚罗病毒(Mayaro virus)、MERS冠状病毒、麻疹病毒、门戈脑心肌炎病毒(Mengo encephalomyocarditis virus)、默克尔细胞多瘤病毒、莫科拉病毒(Mokola virus)、传染性软疣病毒(Molluscum contagiosum virus)、猴痘病毒、腮腺炎病毒、墨累谷脑炎病毒(Murray valley encephalitis virus)、纽约病毒、尼帕病毒(Nipah virus)、诺瓦克病毒

(Norwalk virus)、阿尼昂-尼昂病毒(O'nyong-nyong virus)、羊口疮病毒(Orf virus)、奥罗普切病毒(Oropouche virus)、皮钦德病毒(Pichinde virus)、脊髓灰质炎病毒、庞塔托鲁静脉病毒(Punta toro phlebovirus)、普马拉病毒(Puumala virus)、狂犬病病毒、裂谷热病毒、玫瑰病毒(Rosavirus) A种、罗斯河病毒、轮状病毒A种、轮状病毒B种、轮状病毒C种、风疹病毒、鹭山病毒(Sagiyama virus)、萨里病毒(Salivirus) A种、白蛉热西西里病毒、札幌病毒、塞姆利基森林病毒(Semliki forest virus)、汉城病毒、猴泡沫病毒、猿猴病毒5型、辛德毕斯病毒(Sindbis virus)、南安普顿病毒、圣路易斯脑炎病毒、蜱传波瓦桑病毒(Tick-borne powassan virus)、细环病毒、托斯卡纳病毒(Toscana virus)、乌库涅米病毒(Uukuniemi virus)、痘苗病毒、水痘-带状疱疹病毒、天花病毒、委内瑞拉马脑炎病毒、水疱性口炎病毒、西部马脑炎病毒、WU多瘤病毒、西尼罗河病毒、亚巴猴肿瘤病毒、亚巴样病病毒、黄热病毒和寨卡病毒(Zika Virus)。在某些实施例中,指环载体足以胜过和/或替换已经存在于受试者中的病毒,例如,与参考相比,胜过和/或替换了至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多。在某些实施例中,指环载体足以与慢性或急性病毒感染竞争。在某些实施例中,可预防性施用指环载体以保护免受病毒感染(例如,益生病毒(provirotic))。在一些实施例中,指环载体的量足以调节(例如,表型、病毒水平、基因表达、与其他病毒竞争、疾病状态等至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更高)。在一些实施例中,治疗(treatment)、进行治疗(treating)及其同源词包括对受试者的医疗管理(例如,通过施用指环载体,例如,如本文所述制备的指环载体),例如,旨在改善、缓解、稳定、预防或治愈疾病、病理状况或障碍。在一些实施例中,治疗包括积极治疗(旨在改善疾病、病理状况或障碍的治疗)、因果治疗(针对相关疾病、病理状况或障碍的原因的治疗)、姑息治疗(旨在缓解症状的治疗)、预防性治疗(旨在预防、最小化或者部分或完全抑制相关疾病、病理状况或障碍的發生的治疗)和/或支持性治疗(用来补充另一种疗法的治疗)。

[0967] 本文引用的所有参考文献和出版物都特此通过引用并入。

[0968] 提供以下实例以进一步说明本发明的一些实施例,但并非意在限制本发明的范围;通过它们的示例性性质将理解,可以替换地使用本领域技术人员已知的其他程序、方法或技术。

[0969] 实例

[0970] 目录

[0971] 实例1:在杆状病毒表达系统中产生指环病毒蛋白

[0972] 实例2:在Sf9细胞中表达Ring1 ORF

[0973] 实例3:在Sf9细胞中表达Ring2 ORF

[0974] 实例4:同时在Sf9细胞中表达所有Ring2 ORF

[0975] 实例5:在Sf9细胞中共同递送和独立表达指环病毒基因组和重组指环病毒ORF

[0976] 实例6:指环病毒ORF1与Sf9细胞中的DNA缔合形成通过等密度离心分离的复合物

[0977] 实例7:使用杆状病毒从指环病毒的不同阵列表达ORF1蛋白

[0978] 实例8:体外组装杆状病毒构建体

[0979] 实例9:制备合成指环载体构建体

[0980] 实例10:指环载体的组装和感染

- [0981] 实例11:指环载体的选择性
- [0982] 实例12:复制缺损型指环载体和辅助病毒
- [0983] 实例13:可复制型指环载体的生产过程
- [0984] 实例14:复制缺损型指环载体的生产过程
- [0985] 实例15:使用悬浮细胞产生指环载体
- [0986] 实例16:利用指环载体在小鼠中表达外源性蛋白
- [0987] 实例17:表达外源性微RNA序列的指环载体的功能效应
- [0988] 实例18:表达外源性非编码RNA的指环载体的制备和产生
- [0989] 实例19:从指环载体表达内源性miRNA和内源性miRNA的缺失
- [0990] 实例20:外源性蛋白的指环载体体内递送
- [0991] 实例21:体外环化的指环病毒基因组
- [0992] 实例22:含有具有来自不同细环病毒株的高变结构域的嵌合ORF1的指环载体的产生
- [0993] 实例23:含有非TTV蛋白/肽代替高变结构域的嵌合ORF1的产生
- [0994] 实例24:基于tth8和LY2的指环载体分别成功地将EPO基因转导到肺癌细胞中
- [0995] 实例25:静脉内(i.v.)施用后,可以在体内检测到带有治疗性转基因的指环载体
- [0996] 实例26:体外环化的基因组作为体外产生指环载体的输入材料
- [0997] 实例1:在杆状病毒表达系统中产生指环病毒蛋白
- [0998] 在本实例中,将来自赛默飞世尔科技公司(Thermofisher Scientific)的杆状病毒表达系统(目录号A38841)用于表达指环病毒蛋白。简而言之,将感兴趣的基因(例如,如本文所述的编码指环病毒ORF的基因)克隆到pFastBac质粒中,然后将该质粒转化到携带杆状病毒基因组的DH10Bac大肠杆菌细胞中。根据生产商的使用说明,使转化物在指示板上生长,并且选择白色集落用于液体培养和提取杆粒DNA。通过PCR验证指环病毒ORF重组到杆粒中。
- [0999] 然后将经验证显示指环病毒ORF基因成功重组的杆粒构建体转染到ExpiSf9昆虫细胞中。将细胞在27℃非加湿、非CO₂气氛孵育器中在设为125rpm的轨道摇床上孵育。在转染后72小时后,从上清液收获第0代储备(P0)重组杆状病毒。
- [1000] 将ExpiSf9细胞使用25-100μL P0杆状病毒储备感染以制备用于蛋白质产生的第1代(P1)杆状病毒。在感染后96小时(约4天)后,收集上清液以获得P1杆状病毒。
- [1001] 通过以下方式滴定P1重组杆状病毒:制备五个测试病毒在总体积为1200μL的新鲜ExpiSf CD培养基中的10倍连续稀释液。将800μL 1.25×10^6 个活细胞/mL的Expisf9细胞接种到深孔板中,并且向每个孔中添加1000μL不同的测试病毒稀释液。将一个孔设为阴性对照。随后将板于27℃在非加湿孵育器中在225±5rpm的摇动平台上孵育。在孵育约14-16小时后,将板从孵育器取出并且将所有物质转移到微量离心管中,以300x g旋转5分钟。吸出上清液,将每个细胞沉淀重悬浮于100μL含有终浓度为0.15μg/mL的抗杆状病毒包膜gp64 APC抗体的稀释缓冲液(PBS+2%胎牛血清)中。将管于室温孵育30分钟。然后将样品用1mL PBS洗涤,随后以300x g进行10分钟离心旋转。吸出上清液,将细胞沉淀重悬浮于1mL稀释缓冲液中。将样品在流式细胞仪上使用以下参数进行分析:红色激光激发:633-647nm;发射:660nm。标注具有不同的表达阳性gp64百分比的病毒稀释度的样品并将其用于计算病毒效

价。

[1002] 对于本实例和后面的实例,使用上文所述方法产生了一系列用于表达的重组杆粒和杆状病毒载体。如下表X所示,将来自LY2、tth8和其他指环病毒株的各种ORF克隆到杆粒中。将ORF用带有或不带有人鼻病毒3C (HRV3C) 溶蛋白性切割位点的N-末端His标签、C-末端His标签进行标记或保持未标记,如所示。

[1003] 表X.产生的重组杆粒构建体。“FullORF”=含有全ORF的区域,其中非编码区被移除;ORF2/3被标记。

[1004]

构建体#/名称	菌株	Ring #	ORF	标签类型	标签位置	pFastBac	杆粒	杆状病毒	制备
tth8 ORF1	tth8	Ring1	ORF1	无标签	不适用	是	是	否	内部
tth8 ORF1 N-His	tth8	Ring1	ORF1	6xHis	N-末端	是	是	是	内部
tth8 ORF1 C-His	tth8	Ring1	ORF1	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
tth8 ORF2	tth8	Ring1	ORF2	无标签	不适用	是	是	是	内部
tth8 ORF2 C-His	tth8	Ring1	ORF2	6xHis	C-末端	是	是	是	内部

[1005]

tth8 ORF1/1	tth8	Ring1	ORF1/1	无标签	不适用	是	是	是	内部
tth8 ORF1/1 C-His	tth8	Ring1	ORF1/1	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
tth8 ORF1/2	tth8	Ring1	ORF1/2	无标签	不适用	是	是	是	内部
tth8 ORF1/2 C-His	tth8	Ring1	ORF1/2	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
tth8 ORF2/2	tth8	Ring1	ORF2/2	无标签	不适用	是	是	是	内部
tth8 ORF2/2 C-His	tth8	Ring1	ORF2/2	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
tth8 ORF2/3	tth8	Ring1	ORF2/3	无标签	不适用	是	是	是	内部
tth8 ORF2/3 C-His	tth8	Ring1	ORF2/3	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
tth8 FullORF	tth8	Ring1	FullORF	无标签	不适用	是	是	是	内部
tth8 FullORF C-His	tth8	Ring1	FullORF	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
tth8 ORF2 C-His	tth8	Ring1	ORF2/ORF1	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
Ring 3.1 ORF1	6B.CD8 .contig3	Ring3. 1	ORF1	无标签	不适用	否	否	否	内部
Ring 3.1 ORF1 C-His	6B.CD8 .contig3	Ring3. 1	ORF1	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
Ring 3.1 ORF2	6B.CD8 .contig3	Ring3. 1	ORF2	无标签	不适用	否	否	否	内部
Ring 3.1 ORF2 C-His	6B.CD8 .contig3	Ring3. 1	ORF2	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
Ring 3.1 ORF2/ORF1 C-His	6B.CD8 .contig3	Ring3. 1	ORF2/ORF1	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 FullORF	LY2	Ring2	FullORF	无标签	不适用	是	是	否	内部
LY2 FullORF N-His	LY2	Ring2	FullORF	6xHis	N-末端	是	是	是	内部

[1006]

LY2 FullORF C-His	LY2	Ring2	FullORF	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1	LY2	Ring2	ORF1	无标签	不适用	是	是	否	内部
LY2 ORF1 N-His	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	N-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1 C-His	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1(dR)	LY2	Ring2	ORF1 (δ-精 氨酸富集 区)	无标签	不适用	是	否	否	内部
LY2 ORF1(dR) N-His	LY2	Ring2	ORF1 (δ-精 氨酸富集 区)	6xHis	N-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1(dR) C-His	LY2	Ring2	ORF1 (δ-精 氨酸富集 区)	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1/1	LY2	Ring2	ORF1/1	无标签	不适用	是	是	否	内部
LY2 ORF1/1 N-His	LY2	Ring2	ORF1/1	6xHis	N-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1/1 C-His	LY2	Ring2	ORF1/1	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1/2	LY2	Ring2	ORF1/2	无标签	不适用	是	是	否	内部
LY2 ORF1/2 N-His	LY2	Ring2	ORF1/2	6xHis	N-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1/2 C-His	LY2	Ring2	ORF1/2	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF2	LY2	Ring2	ORF2	无标签	不适用	是	是	否	内部
LY2 ORF2 N-His	LY2	Ring2	ORF2	6xHis	N-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF2 C-His	LY2	Ring2	ORF2	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF2/2	LY2	Ring2	ORF2/2	无标签	不适用	是	是	否	内部
LY2 ORF2/2 N-His	LY2	Ring2	ORF2/2	6xHis	N-末端	是	是	是	内部

[1007]

LY2 ORF2/2 C-His	LY2	Ring2	ORF2/2	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF2/3	LY2	Ring2	ORF2/3	无标签	不适用	是	是	否	内部
LY2 ORF2/3 N-His	LY2	Ring2	ORF2/3	6xHis	N-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF2/3 C-His	LY2	Ring2	ORF2/3	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF2/ORF1 C-His	LY2	Ring2	ORF2/ORF1	6xHis	C-末端	是	是	是	内部
LY2 ORF1 HisE354	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	在 E354 之 后	是	是	否	内部
LY2 ORF1 HisN299	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	在 N299 之 后	是	是	否	内部
LY2 ORF1 HisL267	LY2	Ring2	ORF1	6xHis	在 L267 之 后	是	是	否	内部
tth8 ORF1 (JA20 HVR)	tth8	Ring1	ORF1 (具有 JA20 高变 区)	6xHis	C-末端	是	否	否	内部
tth8 ORF1 (TJN02 HVR)	tth8	Ring1	ORF1 (具有 TJN02 高变 区)	6xHis	C-末端	是	否	否	内部
tth8 ORF1 (TTV16 HVR)	tth8	Ring1	ORF1 (具有 TTV16 高变 区)	6xHis	C-末端	是	否	否	内部
Ring2 ORF1 (密 码子优化)	LY2	Ring2	ORF1 (密码 子优化)	无标签	不适用	是	是	是	Medigen
Ring2 ORF1 (密 码子优化) HRV3C-6His	LY2	Ring2	ORF1 (密码 子优化)	6xHis	C-末端	是	是	是	Medigen
Ring4 ORF1 (密 码子优化)	6B.CD8	Ring4	ORF1 (密码 子优化)	无标签	不适用	是	是	是	Medigen

[1008]

码子优化)	.contig2		子优化)						
RIng4 ORF1 (密码子优化)	6B.CD8 .contig2	Ring4	ORF1 (密码子优化)	6xHis	C-末端	是	是	是	Medigen
HRV3C-6His									
RIng5.2 ORF1 (密码子优化)	CT30F	Ring5.2	ORF1 (密码子优化)	无标签	不适用	是	是	是	Medigen
Ring5.2 ORF1 (密码子优化)	CT30F	Ring5.2	ORF1 (密码子优化)	6xHis	C-末端	是	是	是	Medigen
HRV3C-6His									
Ring6 ORF1 (密码子优化)	190783.3	Ring6	ORF1 (密码子优化)	无标签	不适用	是	是	是	Medigen
Ring6 ORF1 (密码子优化)	190783.3	Ring6	ORF1 (密码子优化)	6xHis	C-末端	是	是	是	Medigen
HRV3C-6His									
Ring1 ORF1 (密码子优化) His	tth8	Ring1	ORF1 (密码子优化)	6xHis	C-末端	是	是	是	Medigen
Rig3.1 ORF1 (密码子优化) His	6B.CD8 .contig3	Ring3.1	ORF1 (密码子优化)	6xHis	C-末端	是	是	是	Medigen
Ring7 ORF1 (密码子优化) His	190783.4	Ring7	ORF1 (密码子优化)	6xHis	C-末端	是	是	是	Medigen
Ring2 (密码子优化) N-His	LY2	Ring2	ORF1 (密码子优化)	6xHis	N-末端	是	是	是	Medigen
Ring2 (密码子优化) N-His (PS)	LY2	Ring2	ORF1 (密码子优化)	6xHis-PreScision 蛋白酶识别序列	N-末端	是	是	是	Medigen
Ring2 串联	LY2	Ring2	2x 全基因组 (没有多角体蛋白启动子)	无标签	不适用	是	是	是	Medigen
WTLY2	LY2	Ring2	全基因组	无标签	不适用	是	是	是	内部

[1009]	WTtth8	tth8	Ring1	全基因组	无标签	不适用	是	是	是	内部
	WTtth8 (反向)	tth8	Ring1	全基因组 (具有反向 5'多角体蛋白 启动子)	无标签	不适用	是	是	是	内部
	LoxPWTLY2	LY2	Ring2	LoxP-全基 因组-LoxP	无标签	不适用	是	是	是	内部
	Cre-R	不适用	不适用	Cre 重组酶	无标签	不适用	是	是	是	内部

[1010] 在感染前一天,将ExpiSf9细胞以 5×10^6 个细胞/ml接种到25ml室温ExpiSf9 CD培养基中,该培养基在125ml乐基因(Nalgene)单用途PETG锥形平底烧瓶[赛默飞世尔科技公司目录号:4115-0125]中。监测细胞活力以确保保持在95%或以上。将100 μ L ExpiSf增强剂溶液逐滴添加到细胞中。将细胞在27℃非加湿、空气调节、非CO₂气氛孵育器中使用设为125 $\pm$ 5rpm的轨道摇床摇动孵育过夜。第1天,在添加ExpiSf增强剂之后约18-24小时,将细胞用所示的杆状病毒感染,感染复数(MOI)为5,并且在相同条件下孵育。在感染后72小时收获细胞,发现活力在60%至80%之间。为分析样品,通过以下方式裂解细胞:添加1X Bolt LDS样品缓冲液[英杰公司(Invitrogen)目录号:B0007]和1X Bolt还原剂[英杰公司目录号:B0009],并且超声处理2.5分钟。如图1所示,如使用抗多组氨酸抗体通过免疫印迹所确定的,在感染后第2天,在感染的ExpiSf9细胞中成功表达了C-His标记的LY2 ORF1。此外,通过考马斯(Coomassie)染色检测到杆状病毒蛋白,表明成功感染。

[1011] 如图2所示,在感染后第2天,在感染的ExpiSf9细胞中成功表达了C-His标记的tth8 ORF1和ORF1/1。

[1012] 在感染的ExpiSf9细胞中也检测到了N-末端His标记的LY2 ORF1表达(图3)。在这里,构建体或者包含紧接着野生型ORF1序列(第1、2、9、10或14道)的N-末端His标签,或者包含着鼻病毒3C切割序列(第3、11道)的N-末端His标签。第1道至第7道中的样品是直接负载到凝胶上的裂解物,而第9-15道中的样品是通过首先经由超速离心使蛋白质从条件培养基中形成沉淀随后将沉淀以小100倍体积重悬浮来制备的。第1-3道和第9-11道中显示的样品是小规模(5mL)生长的。第6道和第14道中的样品是从10L培养物中获得的。因此,本实例示出了从具有N-或C-末端多组氨酸标签的多个株产生ORF1可以在从5mL至10L范围内的规模上成功进行,并且ORF1可以在Sf9裂解物或培养上清液(条件培养基)中发现。

[1013] 实例2:在Sf9细胞中表达Ring1 ORF

[1014] 在本实例中,产生了一系列具有tth8 ORF(每个都用C-末端多组氨酸标记)的交替排列的重组杆状病毒(图4)。重组杆状病毒设计包括一个针对每个tth8 ORF剪接变体(即,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2和ORF2/3)的杆状病毒构建体以及由杆状病毒多角体蛋白启动子驱动的含有来自tth8的全ORF区域的“FullORF”构建体。这些杆状病毒如实例1中所述产生。

[1015] 然后通过免疫印迹使用抗多组氨酸抗体检测蛋白表达。如图4所示,检测到了His标记的tth8 ORF ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2和ORF2/3。

[1016] 实例3:在Sf9细胞中表达Ring2 ORF

[1017] 在一个实例中,产生了一系列具有Ring2 ORF(每个都在C-末端用多组氨酸标签标记)的交替排列的重组杆状病毒,(图5)。重组杆状病毒设计包括一个针对每个Ring2 ORF剪接变体(即,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2和ORF2/3)的杆状病毒构建体、其中N-末端精氨酸富集区(RRR)缺失的变体(ORF1 Δ RRR)以及由杆状病毒多角体蛋白启动子驱动的含有来自Ring2的全ORF区域的“FullORF”构建体。针对每种实验条件,将ExpiSf9细胞用表达各种Ring2变体的重组杆状病毒以MOI为5进行感染。用于此项的实验条件如实例1和2中所述。

[1018] 然后通过免疫印迹使用抗His检测蛋白表达。如图5所示,His标记的Ring2 ORF ORF1、ORF1 Δ RRR、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2和ORF2/3全都被检测到了。

[1019] 在作为本实例一部分的进一步实验中,使用包含Ring2 ORF1编码序列和/或Ring2 ORF2剪接变体编码序列的重组杆状病毒来感染Sf9细胞。测试的表达条件包括单独的ORF1或ORF1+“FullORF”、ORF1+ORF2、ORF1+ORF2/2和ORF1+ORF2/3的共同感染,以及标记为“Neg”的阴性对照。针对每种条件,将ExpiSf9细胞用杆状病毒以MOI为5共同感染。实验条件如实例1和2中所述。然后针对每种条件通过免疫印迹使用抗His或抗Ring2N22评估ORF1、ORF2、ORF2/2和ORF2/3的蛋白表达。后者是单克隆抗体,该单克隆抗体通过用大肠杆菌产生的Ring2 ORF1的N22片段对小鼠进行免疫并且随后生成杂交瘤来获得。

[1020] 如图6所示,在每种ORF1感染的条件下,两种免疫印迹都检测到约81kD的条带的ORF1。在抗N22免疫印迹中,ORF1条带由虚线框突出显示,并且在阴性对照(Neg)样品中不可见。两种抗体检测到的较低分子量(约10kD)条带被认为是ORF1的C-末端片段。在相应样品(抗His印迹)中也检测到了ORF2、ORF2/2和ORF2/3。因此,本实例说明ORF1以及ORF2的各种剪接变体可以在昆虫细胞中共表达。

[1021] 实例4:同时在Sf9细胞中表达所有Ring2 ORF

[1022] 在一个实例中,产生了一系列六种重组杆状病毒,这些病毒各自设计以表达特定的各自用His标签标记的Ring2 ORF(即,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2和ORF2/3)(图7),如实例3中所述。将Sf9细胞用Ring2 ORF杆状病毒的各种组合感染-具体而言,每种条件都涉及用除一个ORF构建体之外的所有构建体感染细胞,如图7所示。然后通过全细胞悬浮液的免疫印迹使用抗His检测蛋白表达。如图7所示,在预期的模式中检测到His标记的Ring2 ORF。要么检测到所有的ORF,要么检测到除了ORF之外的其他。

[1023] 实例5:在Sf9细胞中共同递送和独立表达指环病毒基因组和重组指环病毒ORF

[1024] 在本实例中,通过以下方式在Sf9细胞中共同递送指环病毒ORF和基因组:对体外环化(IVC)的指环病毒基因组进行转染,并且用在C-末端用六聚组氨酸标记的编码ORF1的杆状病毒来感染细胞(图8)。然后使用靶向N22片段的抗His、抗ORF2和抗ORF1单克隆抗体通过免疫印迹检测蛋白表达。如所示(图8,第1点),在该制剂中检测到His标记的ORF1,表明重组ORF1从杆状病毒载体中成功表达。与此结果相符的是,使用抗ORF1抗体检测到了相同的ORF1蛋白(图8,下方分图,最右道)。

[1025] 在相同的处理细胞样品中,天然指环病毒启动子在Sf9细胞中显示出转录活性,因为检测到了ORF2表达(图8,第3点),并且该表达只能由转染到细胞中的IVC基因组产生。

[1026] 此外,使用体外环化(IVC)构建体和FullORF杆状病毒将指环病毒ORF在Sf9细胞供

共同递送和表达。然后使用抗His、抗Ring2 ORF2和抗Ring2ORF1 N22通过免疫印迹检测蛋白表达。在细胞中检测到了ORF1蛋白(图8,第4点),其可以是IVC或FullORF杆状病毒构建体的产物。出乎意料地,容易地检测到了ORF2蛋白,其强度显示表达是来源于FullORF杆状病毒构建体(图8,第2点)。

[1027] 作为指环病毒基因组在昆虫细胞中表达其基因的能力的进一步测试,将tth8指环病毒编码区从两个方向上克隆到pFastBac载体中。这得到了‘FullORF’ tth8杆状病毒构建体,其中多角体蛋白启动子位于编码区的有义或反义方向的上游。后一构型非常不可能启动指环病毒基因的转录。与我们在Ring2中出乎意料的观察结果相符,tth8 ORF2的表达与编码区相对于杆状病毒多角体蛋白启动子的取向无关,表明表达受指环病毒启动子驱动(图9,约15kDa和20kDa的条带)。

[1028] 本实例示出了IVC转染和杆状病毒感染可以将功能性指环病毒基因共同递送至Sf9昆虫细胞中,并且天然指环病毒启动子在这些细胞中具有活性。

[1029] 实例6:指环病毒ORF1与Sf9细胞中的DNA缔合形成通过等密度离心分离的复合物

[1030] 在本实例中,将Sf9细胞用IVC指环病毒基因组LY2转染,用带有C-末端多组氨酸标签的编码杆状病毒的LY2 ORF1感染,然后分级以确定使用杆状病毒表达系统表达的ORF1是否形成了可以在体外分离的蛋白质-DNA复合物。

[1031] 通过将8ml 1.2g/ml CsCl溶液(在TN缓冲液中;20mM Tris pH 8.0,140mM NaCl)添加到用于SW32.1 Ti转子的超速离心管(Ultra-Clear 17ml-贝克曼公司(Beckman)#344061)中来制备CsCl梯度。用8ml 40% CsCl(在TN缓冲液中)作为管的底层,然后盖上盖子并且在Gradient Master程序5%至50%上运行13分钟,以制备线性梯度。取下盖子,在每个管中用0.5ml至2ml Sf9裂解物覆盖梯度,并用含有0.001%泊洛沙姆-188的TN缓冲液加满至接近顶部。超速离心以22,500x RPM进行18.5小时。通过刺穿管底部并且使约600ul级分流入深孔区块的孔中,从梯度中收集级分。测量每个样品的折射率以确定其密度。

[1032] 然后通过首先将DNA从级分中提取出来、然后进行qPCR来确定级分中的指环病毒DNA含量。使用Pure Link病毒DNA提取试剂盒[赛默飞世尔科技公司目录号12280050]从50uL级分中纯化病毒DNA。将样品用蛋白酶K处理并且通过于56℃孵育15分钟来使用裂解缓冲液裂解,用99%乙醇洗涤,并且转移到病毒旋转柱(Viral Spin Column)。将样品以6800x g离心,用随试剂盒提供的500uL洗涤缓冲液洗涤两次,并且再次离心。将100uL无RNA酶的水添加到柱中以洗脱DNA。

[1033] 对于qPCR,针对每个反应,将2X TaqMan基因表达主混合物(Gene Expression Master Mix)、100uM LY2正向引物(AGCAACAGGTAATGGAGGAC)、100uM LY2反相引物(TGAAGCTGGGGTCTTTAAC)以及100uM LY2探针(TCTACCTAGGTGCAAAGGGCC)在5.83uL无核酸酶水中稀释。对于每个qPCR循环,使用以下条件:在美国应用生物系统公司(Applied Biosystems)Quant Studio 3实时PCR仪上进行50℃保持2分钟、95℃保持10分钟、随后95℃保持15秒和60℃保持1分钟的40个循环。每个样品一式三份运行,并且整个测定重复三次并用于绘制图表。

[1034] 如图10所示,将等密度级分通过免疫印迹、定量PCR和透射电子显微术表征。在密度为1.32g/mL和1.21g/mL的级分中,梯度级分的抗his免疫印迹显示出LY2 ORF1的预期分子量的清晰条带。此外,范围在1.25g/mL到1.29g/mL的级分相比于预期具有更高和更低分

子量的清晰条带。同样,qPCR表明在某些级分中存在LY2基因组DNA,峰在约1.21g/mL、1.29g/mL和1.32g/mL处。

[1035] 对1.32g/mL和1.21g/mL级分以及范围在1.25g/mL至1.29g/mL的级分池进行负染色透射电子显微术。池中示出了大量颗粒,包括若干具有蛋白酶体外观的颗粒。蛋白酶体的存在可能解释了低分子量和高分子量的免疫印迹条带。前者可能归因于蛋白质降解,而后者归因于降解过程中与蛋白酶体蛋白质共价缔合的泛素化ORF1或ORF1片段。1.21g/mL级分示出了不同尺寸的颗粒,包括若干显示与基于脂质的颗粒相符的颗粒。1.32g/mL级分示出了显著的DNA样结构,其染色不同于裸DNA,表明与例如蛋白质等大分子缔合。

[1036] 为确定LY2 ORF1是否与电子显微照片中观察到的结构相关,使用抗多组氨酸抗体进行免疫金检测。图11示出了在1.32g/mL和1.21g/mL级分中观察到的结构上累积的金标记,这与在1.32g/mL级分中和在1.21g/mL级分的颗粒中观察到的与DNA缔合的ORF1-His的存在相符。

[1037] 综上所述,这些结果表明在Sf9细胞中表达的ORF1可以与DNA缔合以形成复合物,该复合物的密度与指环病毒颗粒相符。

[1038] 实例7:使用杆状病毒从指环病毒的不同阵列表达ORF1蛋白

[1039] 在本实例中,将Sf9细胞用杆状病毒感染,这些杆状病毒经工程化以表达C-末端His标记的ORF1蛋白,这些蛋白来自指环病毒株Ring3.1、Ring4、Ring5.2、Ring6以及Ring1和Ring2。如图12所示,来源于每一个指环病毒株的ORF1蛋白均在Sf9细胞中成功表达。如表Y所示,对来自代表所有三个属(甲型细环病毒、乙型细环病毒和丙型细环病毒)的株的指环病毒ORF1进行测试,其表达水平可见于图1、2、3和12。通常,我们发现,在此系统中,对于ORF1,乙型细环病毒的表达水平是最高的,丙型细环病毒的表达水平中等,甲型细环病毒的表达水平最低。

[1040] 表Y.成功进行重组ORF1表达的株

[1041]

名称	属
Ring1	甲型
Ring2	乙型
Ring3.1	丙型
Ring4	丙型
Ring5.2	甲型
Ring6	甲型
HLH	乙型
ctgh3	乙型
LY1	乙型

[1042] 实例8:体外组装杆状病毒构建体

[1043] 在本实例中,通过体外组装产生适于表达指环病毒蛋白(例如,ORF1)的杆状病毒构建体。

[1044] 在昆虫细胞系(Sf9和/或HighFive)中表达编码指环病毒ORF1(野生型蛋白、嵌合蛋白或其片段)的DNA,该指环病毒ORF1可以是未标记的或者含有N-末端、C-融合的标签,或者在ORF1蛋白自身内携带突变以引入标签,从而帮助纯化和/或通过免疫染色测定(例如但

不限于ELISA或免疫印迹) 鉴定身份。指环病毒ORF1可以单独表达或与任何数量的辅助蛋白一起表达, 这些辅助蛋白包括但不限于指环病毒ORF2和/或ORF3蛋白。

[1045] 使用开发的纯化技术纯化蛋白质, 这些技术潜在地包括但不限于螯合纯化、肝素纯化、梯度沉降纯化和/或尺寸排阻纯化。评价ORF1形成壳粒或VLP的能力, 并将其用于后续的核酸衣壳化步骤。

[1046] 在一个实例中, 将编码与N-末端HIS₆标签融合的Ring2 ORF1 (HIS-ORF1) 的DNA针对昆虫表达进行密码子优化, 并且使用Bac-to-BAC表达系统根据生产商的方法(赛默飞世尔科技公司) 克隆至杆状病毒表达载体pFASTbac系统中以生成表达Ring2 ORF-HIS重组蛋白的杆状病毒。将10升昆虫细胞(Sf9) 用Ring2 HIS-ORF1杆状病毒感染, 并且在感染后3天通过离心收获细胞。将细胞裂解, 并且将裂解物使用螯合树脂柱使用本领域标准技术进行纯化。对含有HIS-ORF1的洗脱级分进行透析, 并且用DNA酶处理以酶切宿主细胞DNA。将所得材料使用螯合树脂柱再次纯化, 并且保留含有ORF1的级分以进行核酸衣壳化和病毒载体纯化。

[1047] 核酸衣壳化和病毒载体纯化: 将Ring ORF1(野生型蛋白、嵌合蛋白或其片段) 用足以使VLP或病毒衣壳解离的条件处理以便能够与核酸货物重组。核酸货物(nucleic acid cargo) 可以被定义为编码人们想要将其作为治疗剂递送的感兴趣的基因的双链DNA、单链DNA或RNA。潜在的足以解离VLP或病毒衣壳的条件可以是但不限于: 不同pH的缓冲液、确定的电导率条件(盐含量)、含有去垢剂(例如SDS、Tween、Triton) 的条件、含有离液剂(例如脲) 的条件、或涉及确定的温度和时间(重退火温度) 的条件。将确定浓度的核酸货物与确定浓度的Ring ORF1组合并且以足以允许核酸衣壳化的条件处理。随后将所得颗粒(定义为病毒载体) 纯化, 例如, 使用开发的标准病毒纯化程序来纯化。

[1048] 在一个实例中, 将GFP表达质粒的单链环状DNA添加到Ring2HIS-ORF1的溶液中, 并且将所得样品用在50mM Tris pH 8缓冲液中的0.1% SDS于37°C处理30分钟。将所得溶液使用肝素柱进一步纯化, 并且将病毒载体使用递增的NaCl浓度梯度从柱上洗脱。通过以下方式测试病毒载体的完整性: 转导细胞系EKVX和HEK293, 并通过荧光显微镜观察至少一个细胞系中的GFP产生, 证明核酸货物被ORF1蛋白衣壳化以形成病毒载体。

[1049] 实例9: 制备合成指环载体构建体

[1050] 本实例展示了合成指环载体构建体的体外产生。

[1051] 将在EcoRV限制性酶位点之间来自TTMiniV的LY1和LY2株的DNA序列(Eur Respir J. [欧洲呼吸杂志] 2013年8月; 42(2): 470-9) 克隆到卡那霉素载体中(集成DNA技术公司(Integrated DNA Technologies))。基于来自TTMiniV的LY1和LY2株的DNA序列得到的遗传元件构建体在实例6和7中分别称为指环载体1(指环1) 和指环载体2(指环2)。将克隆的构建体转化入10-β感受态大肠杆菌中(新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs Inc.)), 随后按照生产商的方案, 进行质粒纯化(凯杰公司(Qiagen))。

[1052] 将DNA构建体(图13和图14) 在37°C下用EcoRV限制性酶切工具(新英格兰生物实验室公司) 线性化6小时, 产生含有TTMiniV基因组的双链线性DNA片段, 但不包括细菌骨架元件(例如复制起点和选择性标志)。随后进行琼脂糖凝胶电泳, 切离正确大小的TTMiniV基因组片段(2.9千碱基对) 的DNA条带, 并根据生产商的方案使用凝胶提取试剂盒(凯杰公司(Qiagen)) 从切离的琼脂糖条带中凝胶纯化DNA。

[1053] 在一些实施例中,可以进行根据本实例的方法,其中DNA构建体可以包含一个或多个杆状病毒元件。在一些实施例中,DNA构建体可以为杆粒,例如,适于转染到昆虫细胞(例如,Sf9细胞)用于例如产生如本文所述的指环载体的杆粒。

[1054] 实例10:指环载体的组装和感染

[1055] 本实例证明了使用如实例5中所述的合成DNA序列成功地在体外产生感染性指环载体。

[1056] 用脂质转染试剂(赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))以完整质粒或线性化形式将双链线性化经凝胶纯化的指环病毒基因组DNA(在实例5中获得)转染到HEK293T细胞(人胚肾细胞系)或A549细胞(人肺癌细胞系)中。将6 μ g质粒或1.5 μ g线性化的指环病毒基因组DNA用于在T25烧瓶中转染70%汇合细胞。将缺少包括在指环载体中的病毒序列的空载体骨架用作阴性对照。转染后六小时,将细胞用PBS洗涤两次,并使其在37℃和5%二氧化碳条件下在新鲜生长培养基中生长。从IDT合成了编码人Ef1 α 启动子后接YFP基因的DNA序列。将该DNA序列平末端连接到克隆载体(赛默飞世尔科技公司)中。将所得载体用作评估转染效率的对照。转染后72小时,使用细胞成像系统(赛默飞世尔科技公司)检测YFP。经计算,HEK293T和A549细胞的转染效率分别为85%和40%(图15)。在一些实施例中,可替代地,可以通过将指环病毒基因组DNA插入到杆粒骨架中并且将所得杆粒引入昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中来制备指环载体。在另外的实施例中,可以将指环病毒基因组DNA引入昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中,例如,这些细胞包含杆粒,该杆粒包含一个或多个编码指环病毒ORF分子(例如,ORF1分子)或其功能性片段的序列。

[1057] 转染后96小时,收获转染有指环载体的293T和A549细胞的上清液。将收获的上清液在4℃下以2000rpm离心10分钟,以去除任何细胞碎片。将每种收获的上清液分别用于感染新的293T和A549细胞,它们在24孔板的孔中为70%汇合。在37℃和5%二氧化碳条件下孵育24小时后,将上清液洗掉,随后用PBS洗涤两次,并更换为新鲜的生长培养基。将这些细胞在37℃和5%二氧化碳条件下再孵育48小时后,分别收获细胞用于基因组DNA提取。根据生产商的方案,使用基因组DNA提取试剂盒(赛默飞世尔科技公司)收获每个样品的基因组DNA。

[1058] 为了证实体外产生的指环载体成功感染了293T和A549细胞,使用针对乙型细环病毒或LY2特异性序列而言具有特异性的引物,将100ng如本文所述收获的基因组DNA用于进行定量聚合酶链式反应(qPCR)。根据生产商的方案,使用SYBR绿试剂(赛默飞世尔科技公司)进行qPCR。对GAPDH的基因组DNA序列而言具有特异性的引物的qPCR用于归一化。表42列出了所有使用的引物的序列。

[1059] 表42:

	引物序列 (5' > 3')	
	正向	反向
[1060]	乙型细环病毒 ATTCTGAATGGCTGAGTTTATGC (SEQ ID NO: 690)	CCTTGACTACGGTGGTTTCAC (SEQ ID NO: 693)
	LY2 TTMiniV 株 CACGAATTAGCCAAGACTGGGCAC (SEQ ID NO: 691)	TGCAGGCATTCGAGGGCTTGTT (SEQ ID NO: 694)
	GAPDH GCTCCCACTCCTGATTTCTG (SEQ ID NO: 692)	TTTAACCCCCTAGTCCCAGG (SEQ ID NO: 695)

[1061] 如图16A、16B、17A和17B中描绘的qPCR结果所示,体外产生的并如本实例中所述的指环载体具有感染性。

[1062] 实例11:指环载体的选择性

[1063] 本实例证明了体外产生的合成指环载体感染多种组织来源的细胞系的能力。

[1064] 在37℃和5%二氧化碳条件下,将具有感染性TTMiniV指环载体(如实例5中所述)的上清液与70%汇合的293T、A549、Jurkat(急性T细胞白血病细胞系)、Raji(伯基特氏B细胞淋巴瘤细胞系)和Chang细胞系在24孔板的孔中孵育。感染后24小时,用PBS洗涤细胞两次,之后更换为新鲜生长培养基。然后将细胞在37℃和5%二氧化碳条件下再孵育48小时,随后收获细胞用于基因组DNA提取。根据生产商的方案,使用基因组DNA提取试剂盒(赛默飞世尔科技公司)收获每个样品的基因组DNA。

[1065] 为了证实在前述实例中产生的指环载体成功感染了这些细胞系,使用针对乙型细环病毒或LY2特异性序列而言具有特异性的引物,将100ng的如本文所述收获的基因组DNA用于进行定量聚合酶链式反应(qPCR)。根据生产商的方案,使用SYBR绿试剂(赛默飞世尔科技公司)进行qPCR。对GAPDH的基因组DNA序列而言具有特异性的引物的qPCR用于归一化。表42列出了所有使用的引物的序列。

[1066] 如图16A-20B中描绘的qPCR结果所示,在体外产生的指环载体不仅具有感染性,它们还能够感染多种细胞系,包括上皮细胞、肺组织细胞、肝细胞、癌细胞、淋巴细胞、淋巴瘤细胞、T细胞、B细胞和肾细胞的实例。还观察到合成指环载体能够感染HepG2细胞(一种肝细胞系),结果是相对于对照增加了超过100倍。

[1067] 可替代地,本实例的方法可以使用指环载体进行,该指环载体是使用杆粒/昆虫细胞系统产生的,例如,如本文所述。

[1068] 实例12:复制缺损型指环载体和辅助病毒

[1069] 为了复制和包装指环载体,可以以反式提供一些元件。这些包括指导或支持DNA复制或包装的蛋白质或非编码RNA。在一些情况下,反式元件可由指环载体的备选来源提供,如由杆粒、辅助病毒、质粒或细胞基因组提供。在一些实施例中,元件以反式在单独的构建体中(例如,在单独的杆粒中)提供。在一些实施例中,反式元件和遗传元件被包含在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中。

[1070] 通常以顺式提供其他元件。例如,这些元件可以是指环载体DNA中的序列或结构,它们充当复制起点(例如,以允许指环载体DNA的扩增)或包装信号(例如,与蛋白质结合,

将基因组装入衣壳中)。一般而言,复制缺损型病毒或指环载体将缺失这些元件中的一个或多个,从而使得即使以反式提供了其他元件,DNA也无法包装到感染性病毒体或指环载体中。在一些实施例中,顺式元件被包含在遗传元件构建体(例如,杆粒或非杆粒构建体)中,例如,如本文所述。

[1071] 复制缺损型病毒可以用作辅助病毒,例如,用于控制同一细胞中指环载体(例如,复制缺损型或包装缺损型指环载体)的复制。在一些情况下,辅助病毒将缺少顺式复制或包装元件,但会表达反式元件,例如蛋白质和非编码RNA。一般而言,治疗性指环载体将缺少部分或全部这些反式元件,因此无法自行复制,但会保留顺式元件。当共转染/感染到细胞中时,复制缺损型辅助病毒将驱动指环载体的扩增和包装。因此,收集的包装颗粒将仅由治疗性指环载体组成,而不会受到辅助病毒污染。

[1072] 为了开发复制缺损型指环载体,将去除指环病毒非编码区中的保守元件。特别地,将分别或一起测试保守的5' UTR结构域和GC富集结构域的缺失。我们设想这两种元件对于病毒复制或包装都很重要。此外,将在整个非编码区中进行一系列缺失,以鉴定以前未知的感兴趣区域。

[1073] 复制元件的成功缺失将导致细胞内指环载体DNA扩增的减少,例如,如通过qPCR所测量的,但会支持一些感染性指环载体的产生,例如,如通过对受感染细胞的测定所监测到的,这些测定可以包括qPCR、免疫印迹、荧光测定或发光测定中的任一种或全部。包装元件的成功缺失不会破坏指环载体DNA的扩增,因此通过qPCR在转染的细胞中会观察到指环载体DNA的增加。然而,不会封装指环载体基因组,因此不会观察到感染性指环载体的产生。

[1074] 实例13:可复制型指环载体的生产过程

[1075] 本实例描述了用于回收可复制型指环载体和提高其产量的方法。当指环载体在其基因组中编码在细胞中复制所需的所有必需遗传元件和ORF时,这些指环载体具有复制能力。由于这些指环载体在复制方面没有缺陷,因此它们不需要以反式提供的补充活性。但是,它们可能需要辅助活性,如转录增强子(例如丁酸钠)或病毒转录因子(例如腺病毒E1、E2、E4、VA;HSV Vp16和立即早期蛋白)。在一些实施例中,在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中产生可复制型指环载体,例如,使用如本文所述的杆粒。

[1076] 在本实例中,将编码合成指环载体全序列的双链DNA以其线性或环状形式通过化学转染引入T75烧瓶中的5E+05个贴壁哺乳动物细胞中,或者通过电穿孔引入5E+05个悬浮细胞中。经过一段最佳时间后(例如,转染后3-7天),通过将细胞刮入上清培养基中来收集细胞和上清液。加入温和去垢剂(如胆盐)至最终浓度为0.5%,并在37℃下孵育30分钟。加入氯化钙和氯化镁至最终浓度分别为0.5mM和2.5mM。加入内切核酸酶(例如,DNA酶I,全能核酸酶(Benzonase)),并在25℃至37℃下孵育0.5小时至4小时。将指环载体悬浮液在4℃下以1000xg离心10分钟。将澄清的上清液转移到新试管中,并用冷冻保护缓冲液(也称为稳定缓冲液)按1:1稀释,根据需要储存在-80℃下。这产生了第0代指环载体(P0)。为了使去垢剂的浓度低于用于培养细胞的安全限度,将这种接种物在无血清培养基(SFM)中稀释至少100倍或更多倍,这取决于指环载体效价。

[1077] 用足以覆盖培养表面的最小体积覆盖T225烧瓶中的新鲜单层哺乳动物细胞,并在37℃和5%二氧化碳条件下孵育90分钟,同时轻轻摇动。用于该步骤的哺乳动物细胞可以与用于P0回收的细胞类型相同或不同。这次孵育后,将接种物替换为40ml无血清、无动物源性

培养基。将细胞在37℃和5%二氧化碳条件下孵育3-7天。加入4ml先前使用的相同温和去垢剂的10X溶液,以使最终去垢剂浓度达到0.5%,然后将混合物在37℃下孵育30分钟,并轻轻搅拌。加入核酸内切酶并在25℃-37℃下孵育0.5-4小时。然后收集培养基,并在4℃下以1000xg离心10分钟。将澄清的上清液与40ml稳定缓冲液混合并储存在-80℃下。这产生了种子储备物(seed stock),或第1代指环载体(P1)。

[1078] 根据储备物的效价,将其在SFM中稀释不少于100倍,并添加到在所需大小的多层烧瓶中生长的细胞中。在较小的规模下,对感染复数(MOI)和孵育时间进行优化,以确保最大的指环载体产量。收获后,可以再根据需要纯化和浓缩指环载体。图21中提供了示出工作流程,例如,如本实例中所述的工作流程的示意图。

[1079] 实例14:复制缺损型指环载体的生产过程

[1080] 本实例描述了用于回收复制缺损型指环载体和提高其产量的方法。

[1081] 可以通过缺失一种或多种参与复制的ORF(例如,ORF1、ORF1/1、ORF1/2、ORF2、ORF2/2、ORF2/3和/或ORF2t/3)使指环载体出现复制缺损。复制缺损型指环载体可以在补充细胞系中生长。这样的细胞系组成型表达促进指环载体生长但在指环载体的基因组中缺失或无功能的组分。在一些实施例中,复制缺损型指环载体在昆虫细胞系(例如,Sf9细胞)中生长,该细胞系例如包含如本文所述的杆粒。

[1082] 在一个实例中,将参与指环载体增殖的任一种或多种ORF的一个或多个序列克隆到适于产生编码选择标志的稳定细胞系的慢病毒表达系统中,并且如本文所述产生慢病毒载体。用这种慢病毒载体感染能够支持指环载体增殖的哺乳动物细胞系,并使其接受选择标志(例如,嘌呤霉素或任何其他抗生素)的选择压力,以选择已经稳定整合了克隆的ORF的细胞群。一旦对这种细胞系进行了表征并证明可以补充工程化指环载体中的缺陷,从而支持这样的指环载体的生长和繁殖,就将其扩增并储存在低温储存器中。在这些细胞的扩增和维持期间,将选择抗生素添加到培养基中以维持选择压力。一旦将指环载体引入这些细胞中,就可以抑制选择抗生素。

[1083] 一旦建立了该细胞系,就可以进行复制缺损型指环载体的生长和产生,例如,如实例15中所述。

[1084] 实例15:使用悬浮细胞产生指环载体

[1085] 本实例描述了在悬浮细胞中产生指环载体。

[1086] 在本实例中,在37℃和5%二氧化碳条件下,使适于在悬浮条件下生长的A549或293T生产细胞系在WAVE生物反应袋中的无动物组分和无抗生素悬浮培养基(赛默飞世尔科技公司)中生长。按照现行生产质量管理规范(cGMP),使用lipofectamine 2000(赛默飞世尔科技公司)将这些细胞(接种密度为 1×10^6 个活细胞/mL)用含有指环载体序列的质粒以及适于包装指环载体或包装指环载体所需的任何补充质粒(例如,在复制缺损型指环载体的情况下,例如,如实例16中所述)进行转染。在一些情况下,补充质粒可以编码已从指环载体基因组(例如,基于病毒基因组的指环载体基因组,例如,指环病毒基因组,例如,如本文所述)中缺失但对指环载体的复制和包装有用或必需的病毒蛋白。转染的细胞在WAVE生物反应袋中生长,并在以下时间点收获上清液:转染后48小时、72小时和96小时。使用离心将每个样品的上清液与细胞沉淀分离。然后使用离子交换层析从收获的上清液和裂解的细胞沉淀中纯化包装的指环载体颗粒。

[1087] 例如,可以通过使用一小份纯化制备物以利用病毒基因组提取试剂盒(凯杰公司)来收获指环载体基因组,随后使用针对指环载体DNA序列的引物和探针(例如,如实例18中所述)进行qPCR,来确定指环载体的纯化制剂中的基因组当量。

[1088] 可通过对纯化制备物进行连续稀释以感染新的A549细胞来定量纯化制备物中指环载体的感染性。转染后72小时,收获这些细胞,随后使用针对指环载体DNA序列而言具有特异性的引物和探针对基因组DNA进行qPCR测定。

[1089] 在一些实施例中,指环载体在悬浮液中在昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中产生,这些细胞例如包含如本文所述的杆粒。

[1090] 实例16:利用指环载体在小鼠中表达外源性蛋白

[1091] 本实例描述了指环载体的用法,其中将小细环病毒(TTMV)基因组进行工程化以在小鼠中表达萤火虫萤光素酶蛋白。

[1092] 将编码工程化TTMV的DNA序列的质粒通过化学转染引入A549细胞(人肺癌细胞系)中,该工程化TTMV编码萤火虫萤光素酶基因。将18ug质粒DNA用于转染10cm组织培养板中70%汇合的细胞。将缺少TTMV序列的空载体骨架用作阴性对照。转染后五小时,将细胞用PBS洗涤两次,并使其在37℃和5%二氧化碳条件下于新鲜生长培养基中生长。

[1093] 转染后96小时,收获转染后的A549细胞及其上清液。将收获的材料在37℃下用0.5%脱氧胆酸盐(重量体积比)处理1小时,随后进行核酸内切酶处理。使用离子交换层析从该裂解物中纯化指环载体颗粒。为了测定指环载体浓度,将指环载体储备物运行通过病毒DNA纯化试剂盒,并使用针对指环载体DNA序列的引物和探针通过qPCR测量每ml的基因组当量。

[1094] 在1x磷酸盐缓冲盐水中指环载体基因组当量的剂量范围经由多种注射途径(例如,静脉内、腹膜内、皮下、肌内)在8-10周龄的小鼠中进行。在注射后3、7、10和15天时,对每只动物进行腹侧和背侧生物发光成像。根据生产商的方案,在指定的时间点通过向每只动物腹膜内添加萤光素酶底物(珀金埃尔默公司(Perkin-Elmer)),随后进行活体内成像来进行成像。

[1095] 在一些实施例中,指环载体使用杆粒和昆虫细胞产生,例如,如本文所述。

[1096] 实例17:表达外源性微RNA序列的指环载体的功能效应

[1097] 本实例展示了使用天然启动子从指环载体基因组中成功表达外源性miRNA(miR-625)。

[1098] 将500ng以下质粒DNA转染到24孔板中HEK293T细胞的60%汇合孔中:

[1099] i) 空质粒骨架

[1100] ii) 含有TTV-tth8基因组的质粒,其中内源性miRNA被敲除(KO)

[1101] iii) TTV-tth8,其中内源性miRNA替换为非靶向乱序miRNA

[1102] iv) TTV-tth8,其中内源性miRNA序列替换为编码miR-625的miRNA

[1103] 转染后72小时,使用凯杰公司的miRNeasy试剂盒从转染的细胞中收获总miRNA,随后使用miRNA Script RT II试剂盒进行逆转录。使用应特异性检测miRNA-625或RNU6小RNA的引物对逆转录的DNA进行定量PCR。RNU6小RNA用作管家基因,并将数据绘制在图22中,作为相对于空载体的倍数变化。如图22所示,miR-625指环载体导致miR-625表达增加了约100倍,而空载体、miR敲除(KO)和乱序miR未检测到信号。

[1104] 在一些实施例中,相反地,可以用使用杆粒和昆虫细胞产生的指环载体感染细胞,例如,如本文所述。

[1105] 实例18:表达外源性非编码RNA的指环载体的制备和产生

[1106] 本实例描述了表达外源性非编码小RNA的指环载体的合成和产生。

[1107] 合成了来自TTV的tth8株的DNA序列(Jelcic等人,Journal of Virology[病毒学杂志],2004),并将其克隆到含有细菌复制起点和细菌抗生素抗性基因的载体中。在该载体中,将编码TTV miRNA发夹的DNA序列替换为编码外源性非编码小RNA(例如miRNA或shRNA)的DNA序列。然后,将工程化构建体转化到电感受态细菌中,之后根据生产商的方案使用质粒纯化试剂盒进行质粒分离。在一些实施例中,载体是杆粒或供体载体,例如,如本文所述。

[1108] 将编码外源性非编码小RNA的指环载体DNA转染到真核生产细胞系(例如,昆虫细胞)中,以生产指环载体颗粒。在转染后的不同时间点,收获含有指环载体颗粒的转染的细胞的上清液。将来自过滤的上清液或纯化后上清液的指环载体颗粒用于下游应用,例如,如本文所述的应用。

[1109] 实例19:从指环载体表达内源性miRNA和内源性miRNA的缺失

[1110] 在一个实例中,使用包含经修饰的TTV-tth8基因组的指环载体来感染培养的Raji B细胞,其中将该TTV-tth8基因组用GC富集区缺失进行修饰,如实例27中所述。这些指环载体包含编码TTV-tth8指环病毒内源性有效载荷的序列并通过将包含指环病毒基因组的质粒引入宿主细胞中而产生,该有效载荷是靶向编码n-myc相互作用蛋白(NMI)的mRNA的miRNA。NMI在JAK/STAT通路的下游发挥作用,以调节多种细胞内信号的转录,包括干扰素刺激基因、增殖和生长基因以及炎症反应的介质。如图23所示,在靶Raji B细胞中检测到病毒基因组。与对照细胞相比,在靶Raji B细胞中也观察到了NMI的成功敲减(图24)。与对照细胞相比,包含针对NMI的miRNA的指环载体诱导NMI蛋白水平降低超过75%。本实例表明,带有天然指环病毒miRNA的指环载体可以敲减宿主细胞中的靶分子。

[1111] 在另一实例中,缺失了基于指环病毒的指环载体的内源性miRNA。然后,将由由此产生的指环载体(Δ miR)与宿主细胞一起孵育。然后将 Δ miR指环载体遗传元件的基因组当量与保留了内源性miRNA的相应指环载体的基因组当量进行比较。如图25所示,在细胞中检测到缺失了内源性miRNA的指环载体基因组的水平与内源性miRNA仍然存在的指环载体基因组中所观察到的水平相当。该实例表明,基于指环病毒的指环载体的内源性miRNA可以发生突变或完全缺失,并且仍然可以在靶细胞中检测到该指环载体基因组。

[1112] 在一些实施例中,相反地,可以用使用杆粒和昆虫细胞产生的指环载体感染细胞,例如,如本文所述。

[1113] 实例20:外源性蛋白的指环载体体内递送

[1114] 本实例展示了指环载体在施用后的体内效应功能(例如,表达蛋白质)。

[1115] 制备了包含编码纳米萤光素酶(nLuc)的转基因的指环载体(图26A-26B)。简而言之,将含有TTMV-LY2非编码区和nLuc表达盒的双链DNA质粒与编码全TTMV-LY2基因组的双链DNA质粒一起转染到HEK293T细胞中,作为反式复制和包装因子。转染后,孵育细胞以允许产生指环载体,并经由核酸酶处理、超滤/渗滤和过滤除菌收获和富集指环载体材料。使用非复制型DNA质粒转染另外的HEK293T细胞:该质粒含有nLuc表达盒和TTMV-LY2 ORF转染盒,但缺乏复制和包装所必需的非编码结构域,以作为“非病毒”阴性对照。按照与指环载体

材料相同的方案制备非病毒样品。

[1116] 将指环载体制剂肌内施用于一组三只健康小鼠,并在九天的时间内通过IVIS Lumina成像系统(布鲁克公司(Bruker))进行监测(图27A)。作为非病毒对照,将非复制型制剂施用于另外三只小鼠(图27B)。在第0天时,将25 μ L指环载体或非病毒制剂的注射液施用至左后肢,并在第4天时再次施用至右后肢(参见图27A和27B中的箭头)。在IVIS成像9天后,与非病毒制剂(图27B)相比,在注射了指环载体制剂(图27A)的小鼠中观察到更多的nLuc发光信号出现,这与体内指环载体转导后的反式基因表达一致。

[1117] 在一些实施例中,相反地,可以向小鼠施用使用杆粒和昆虫细胞产生的指环载体,例如,如本文所述。

[1118] 实例21:体外环化的指环病毒基因组

[1119] 本实例描述了包含环状双链指环病毒基因组DNA和最少非病毒DNA的构建体。这些环状病毒基因组与野生型指环病毒复制期间发现的双链DNA中间体更加匹配。例如,当引入细胞中时,这样的具有最少非病毒DNA的环状双链指环病毒基因组DNA可以进行滚环式复制以产生如本文所述的遗传元件。

[1120] 在一个实例中,用识别基因组DNA侧翼位点的限制性核酸内切酶来酶切携带TTV-tth8变体和TTMV-LY2的质粒。然后将所得线性化基因组连接起来形成环状DNA。这些连接反应在不同的DNA浓度下进行,以优化分子内连接。将连接后的环直接转染到哺乳动物细胞中,或者通过用限制性核酸内切酶酶切以切割质粒骨架和用核酸外切酶降解线性DNA来进一步处理以去除非环状基因组DNA。对于TTV-tth8,XmaI核酸内切酶用于使DNA线性化;连接后的环在GC富集区和5'非编码区之间含有53bp的非病毒DNA。对于TTMV-LY2,使用IIS型限制性酶Esp3I,产生不含非病毒DNA的病毒基因组DNA环。根据先前公布的TTV-tth8环化(Kincaid等人,2013,PLoS Pathogens[公共科学图书馆-病原体]9(12):e1003818),对该方案进行了改进。为了证明指环病毒产量的提高,将环化的TTV-tth8和TTMV-LY2转染到HEK293T细胞中。孵育7天后,裂解细胞,并进行qPCR以比较环化的和基于质粒的指环病毒基因组之间的指环病毒基因组水平。指环病毒基因组水平的增加表明病毒DNA的环化是增加指环病毒产量的有用策略。

[1121] 在另一实例中,TTMV-LY2质粒(pVL46-240)和TTMV-LY2-nLuc分别用Esp3I或EcoRV-HF线性化。酶切后的质粒在1%琼脂糖凝胶上纯化,然后进行电洗脱或凯杰公司的柱纯化,并用T4 DNA连接酶连接。转染前将环化的DNA在100kDa UF/DF膜上浓缩。通过凝胶电泳来确认环化,如图28A所示。在用Lipofectamine 2000进行脂质转染前一天,将HEK293T以 3×10^4 个细胞/ cm^2 的密度接种到T-225烧瓶中。在烧瓶接种后一天,共转染九微克环化的TTMV-LY2 DNA和50 μ g环化的TTMV-LY2-nLuc。作为比较,另外的T-225烧瓶用50 μ g线性化的TTMV-LY2和50 μ g线性化的TTMV-LY2-nLuc共转染。

[1122] 指环载体产生进行了八天,然后在Triton X-100收获缓冲液中收获细胞。一般而言,可以通过例如宿主细胞的裂解、裂解物的澄清、过滤和层析来富集指环载体。在本实例中,对收获的细胞进行核酸酶处理,然后进行氯化钠调整和1.2 μ m/0.45 μ m常规过滤。在750kDa MWCO mPES中空纤维膜上浓缩澄清的收获物并将缓冲液交换为PBS。将TFF渗余物用0.45 μ m过滤器过滤,然后加载到在PBS中预平衡的Sephacryl S-500HR SEC柱上。指环载体以30cm/hr的速度通过SEC柱进行处理。如图28B所示,收集各个级分,并通过qPCR测定病毒

基因组拷贝数和转基因拷贝数。从SEC色谱图的空隙体积,即级分7处,开始观察到病毒基因组和转基因拷贝。在级分15处观察到残留质粒峰。TTMV-LY2基因组和TTMV-LY2-nLuc转基因的拷贝数与使用环化的输入DNA在级分7-级分10处产生的指环载体非常一致,表明包装的指环载体含有nLuc转基因。将SEC级分合并,并使用100kDa MWC0 PVDF膜浓缩,然后在体内施用之前进行0.2μm过滤。

[1123] 与线性化的指环载体DNA相比,输入指环载体DNA的环化使在整个纯化过程中核酸酶保护性基因组的回收百分比增加了三倍,表明使用环化的输入指环载体DNA提高了生产效率,如表46所示。

[1124] 在一些实施例中,可以将IVC指环载体基因组引入昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中,并且将其包封在由杆粒表达的蛋白质外壳蛋白质内,例如,如本文所述。

[1125] 表46.纯化工艺产率

[1126]	步骤	线性化的 TTMV-LY2		环化的 TTMV-LY2	
		病毒基因组	nLuc 转基因基	病毒基因组	nLuc 转基因基
		总拷贝数	因组总拷贝数	总拷贝数	因组总拷贝数
	核酸酶处理	2.78E+12	2.17E+12	1.04E+11	4.39E+11
[1127]	前收获物				
	澄清的收获物	9.96E+09	5.48E+09	6.55E+08	9.81E+08
	TFF	1.01E+10	7.66E+09	2.58E+08	3.56E+08
	SEC	3.18E+07	8.73E+06	9.16E+06	7.75E+06
	UF/DF	8.82E+06	3.25E+06	1.78E+06	2.73E+06
	过滤除菌	5.60E+06	2.64E+06	8.66E+05	1.63E+06
	纯化工艺产率(%)	0.0002%	0.0001%	0.0006%	0.0004%

[1128] 实例22:含有具有来自不同细环病毒株的高变结构域的嵌合ORF1的指环载体的产生

[1129] 本实例描述了ORF1高变区的结构域交换,以产生含有以下部分的嵌合指环载体:一个TTV株的ORF1精氨酸富集区、胶冻卷结构域、N22和C-末端结构域,以及来自不同TTV株的ORF1蛋白的高变结构域。

[1130] 已将乙型细环病毒的全长基因组LY2株克隆到表达载体中,用于在哺乳动物细胞中表达。该基因组经过突变,以去除LY2的高变结构域并将其替换为远缘性乙型细环病毒的高变结构域(图28C)。然后使用先前公布的方法(Kincaid等人,PLoS Pathogens[公共科学图书馆-病原体]2013)将含有LY2基因组和交换型高变结构域的质粒(pTTMV-LY2-HVRa-z)进行线性化和环化。HEK293T细胞用环化的基因组转染并孵育5-7天,以允许指环载体产生。

孵育期结束后,通过梯度超速离心从转染的细胞的上清液和细胞沉淀中纯化出指环载体。

[1131] 为了确定嵌合指环载体是否仍然具有感染性,将分离的病毒颗粒添加到未感染的细胞中。将细胞孵育5-7天以允许病毒复制。孵育后,嵌合指环载体建立感染的能力将通过免疫荧光、免疫印迹和qPCR进行监测。嵌合病毒的结构完整性通过负染色和冷冻电子显微术进行评估。可以进一步测试嵌合指环载体在体内感染细胞的能力。通过高变结构域交换来建立产生功能性嵌合指环载体的能力可以允许对病毒进行工程化以改变嗜性并有可能逃避免疫检测。

[1132] 在一些实施例中,可以将嵌合指环载体和/或嵌合ORF1引入昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中,并且将其包封在由杆粒表达的蛋白质外壳蛋白质内,例如,如本文所述。

[1133] 实例23:含有非TTV蛋白/肽代替高变结构域的嵌合ORF1的产生

[1134] 本实例描述了用其他感兴趣蛋白质或肽替换ORF1的高变区,以产生嵌合ORF1蛋白,其含有一个TTV株的精氨酸富集区、胶冻卷结构域、N22和C-末端结构域,以及替代高变结构域的非TTV蛋白/肽。

[1135] 如实例B所示,从基因组中缺失LY2的高变结构域,并且可以将感兴趣的蛋白质或肽插入该区域(图28D)。可以引入该区域的序列类型的实例包括但不限于亲和标签、抗体的单链可变区(scFv)和抗原肽。质粒(pTTMV-LY2-ΔHVR-POI)中的突变型基因组如实例B中所述进行线性化和环化。将环化的基因组转染到HEK293T细胞中并孵育5-7天。孵育后,在合适的情况下,经由超速离心和/或亲和层析法从上清液和细胞沉淀中纯化出含有POI的嵌合指环载体。

[1136] 使用多种技术评估产生含有POI的功能性嵌合指环载体的能力。首先,将纯化的病毒添加到未感染的细胞中,以确定嵌合指环载体是否可以复制和/或将有效载荷递送至初始细胞。此外,使用电子显微术评估嵌合指环载体的结构完整性。对于在体外具有功能的嵌合指环载体,还评估了体内复制/递送有效载荷的能力。

[1137] 在一些实施例中,可以将嵌合指环载体和/或嵌合ORF1引入昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中,并且将其包封在由杆粒表达的蛋白质外壳蛋白质内,例如,如本文所述。

[1138] 实例24:基于tth8和LY2的指环载体分别成功地将EP0基因转导到肺癌细胞中

[1139] 在本实例中,使用携带促红细胞生成素基因(EP0)的两种不同指环载体转导非小细胞肺癌细胞系(EKVX)。如本文所述,通过体外环化产生指环载体,并且包括基于LY2或tth8骨架的两种类型的指环载体。LY2-EP0和tth8-EP0指环载体中的每一种都包括遗传元件,该遗传元件分别包括EP0编码盒和LY2或tth8基因组的非编码区(5' UTR、GC富集区),但不包括指环病毒ORF,例如,如实例39中所述。用纯化的指环载体或阳性对照(高剂量或与指环载体相同剂量的AAV2-EP0)接种细胞并孵育7天。在单独的体外环化DNA中以反式提供指环病毒ORF。在接种后3、5.5和7天时,对培养上清液进行取样,并使用市售ELISA试剂盒进行测定以检测EP0。LY2-EP0和tth8-EP0指环载体均成功转导细胞,与未处理(阴性)对照细胞相比,显示出明显更高的EP0效价(在所有时间点 $P<0.013$) (图29)。

[1140] 在一些实施例中,相反地,可以用使用杆粒和昆虫细胞产生的指环载体感染细胞,例如,如本文所述。

[1141] 实例25:静脉内(i.v.)施用后,可以在体内检测到带有治疗性转基因的指环载体

[1142] 在本实例中,静脉内(i.v.)施用后,在体内检测到编码人生长激素(hGH)的指环载

体。基于LY2骨架并编码外源性hGH的复制缺损型指环载体 (LY2-hGH) 是通过如本文所述的体外环化产生的。LY2-hGH指环载体的遗传元件包括LY2非编码区 (5'UTR、GC富集区) 和hGH编码盒,但不包括指环病毒ORF,例如,如实例39中所述。将LY2-hGH指环载体静脉内施用于小鼠。在单独的体外环化DNA中以反式提供指环病毒ORF。简而言之,在第0天时,静脉内注射指环载体 (LY2-hGH) 或PBS (n=4只小鼠/组)。以每只小鼠 $4.66\text{E}+07$ 个指环载体基因组将指环载体施用于独立的动物组。

[1143] 在第一实例中,检测到指环载体病毒基因组DNA拷贝。在第7天时,收集血液和血浆并通过qPCR分析hGH DNA扩增子。体内感染7天后,LY2-hGH指环载体出现在全血的细胞级分中(图30A)。此外,血浆中不存在指环载体,表明这些指环载体无法在体内复制(图30B)。

[1144] 在第二实例中,在体内转导后检测到hGH mRNA转录物。在第7天时,收集血液并通过qRT-PCR分析hGH mRNA转录扩增子。将GAPDH用作对照管家基因。在全血的细胞级分中测量到hGH mRNA转录物。在体内检测到来自指环载体编码的转基因的mRNA (图31)。

[1145] 在一些实施例中,相反地,可以向小鼠施用使用杆粒和昆虫细胞产生的指环载体,例如,如本文所述。

[1146] 实例26:体外环化的基因组作为体外产生指环载体的输入材料

[1147] 本实例表明,体外环化 (IVC) 双链指环病毒DNA作为如本文所述指环载体遗传元件的原材料,比质粒中的指环病毒基因组DNA更稳健,以产生预期密度的包装的指环载体基因组。

[1148] T75烧瓶中的 $1.2\text{E}+07$ 个HEK293T细胞(人胚肾细胞系)用 $11.25\mu\text{g}$ 的以下任一种转染:(i) 体外环化的双链TTV-tth8基因组 (IVC TTV-tth8), (ii) 在质粒骨架中的TTV-tth8基因组,或 (iii) 仅含有TTV-tth8的ORF1序列的质粒(非复制型TTV-tth8)。转染后7天收获细胞,用0.1% Triton裂解,并用100单位/ml的全能核酸酶处理。将裂解物用于氯化铯密度分析;测量密度,并对氯化铯线性梯度的每个级分进行TTV-tth8拷贝定量。如图32所示,与TTV-tth8质粒相比,IVC TTV-tth8在1.33的预期密度下产生了显著更多的病毒基因组拷贝。

[1149] $1\text{E}+07$ 个Jurkat细胞(人T淋巴细胞细胞系)用体外环化LY2基因组 (LY2IVC) 或质粒中的LY2基因组进行核转染。转染后4天时,收获细胞并使用含有0.5% Triton和300mM氯化钠的缓冲液裂解,随后进行两轮急速冷冻解冻。用100单位/ml的全能核酸酶对裂解物进行处理,随后进行氯化铯密度分析。对氯化铯线性梯度的每个级分进行密度测量和LY2基因组定量。如图33所示,与含有LY2基因组的质粒转染(其在图33中未显示可检测的峰)相比,体外环化LY2基因组在Jurkat细胞中的转染导致在预期密度处出席尖峰。

[1150] 在一些实施例中,可以将IVC指环载体遗传元件构建体引入昆虫细胞(例如,Sf9细胞)中,并且将其包封在由杆粒表达的蛋白质外壳蛋白质内,例如,如本文所述。

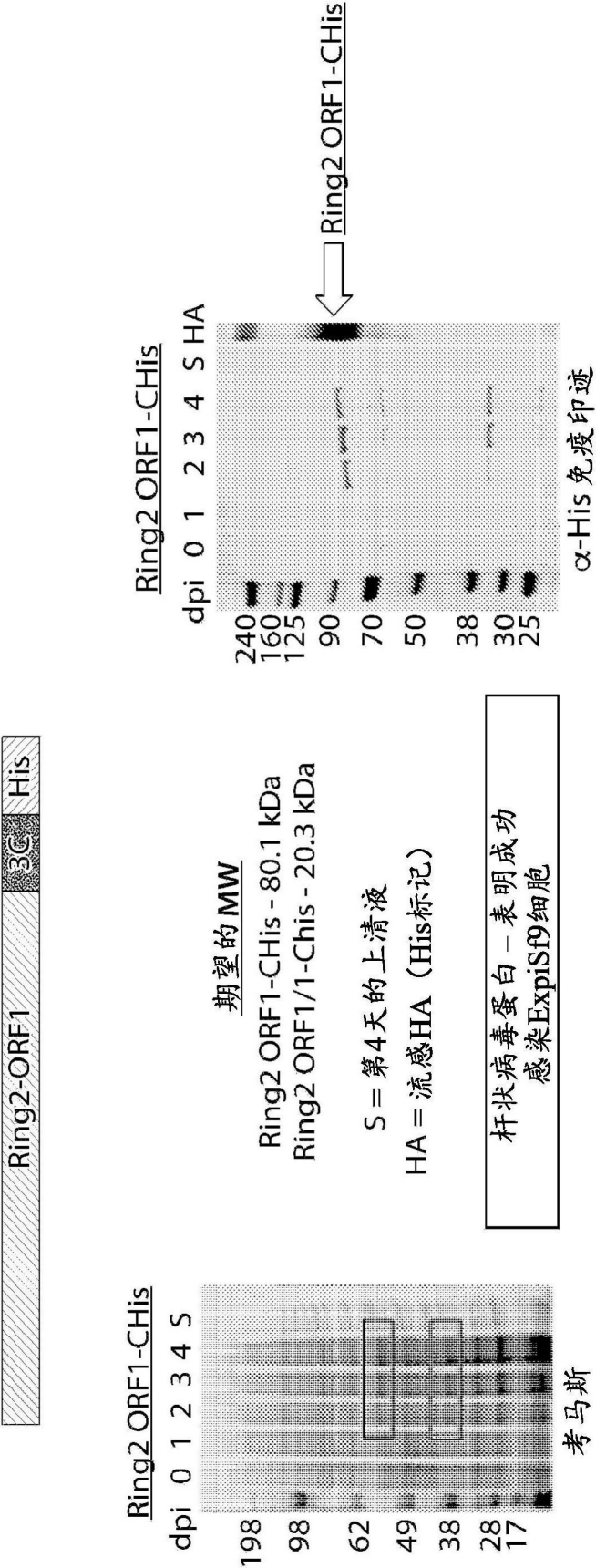


图1

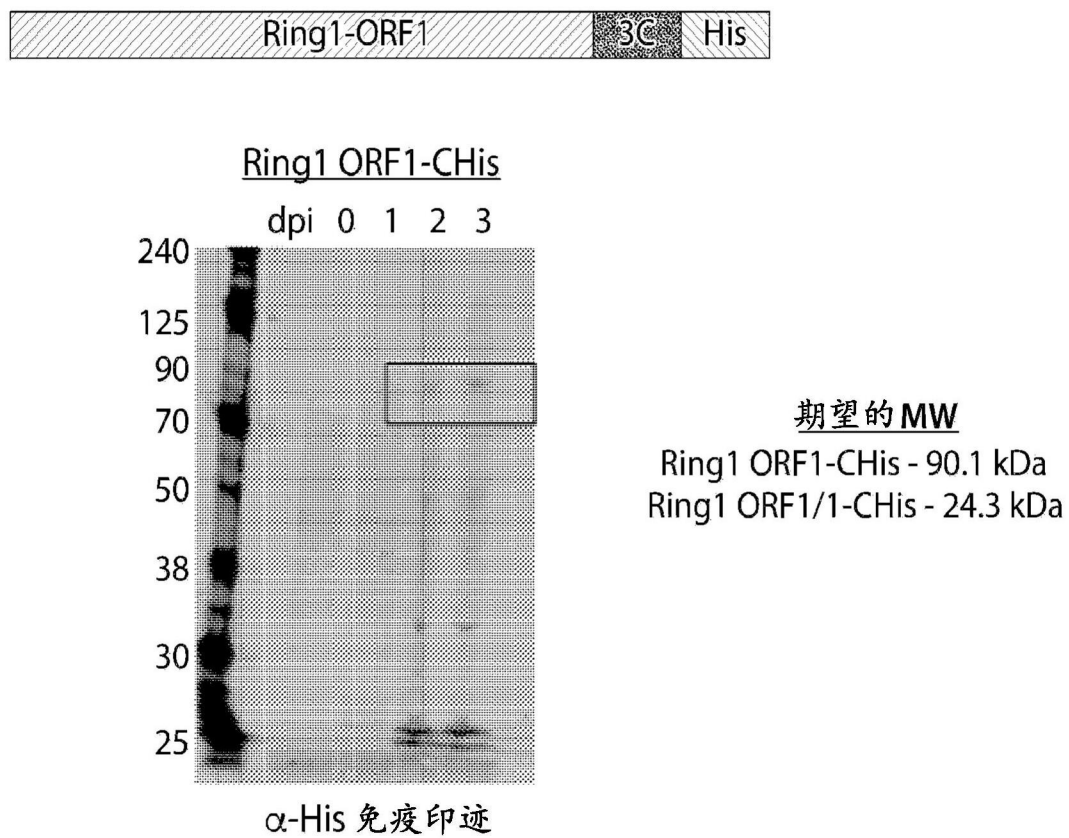


图2

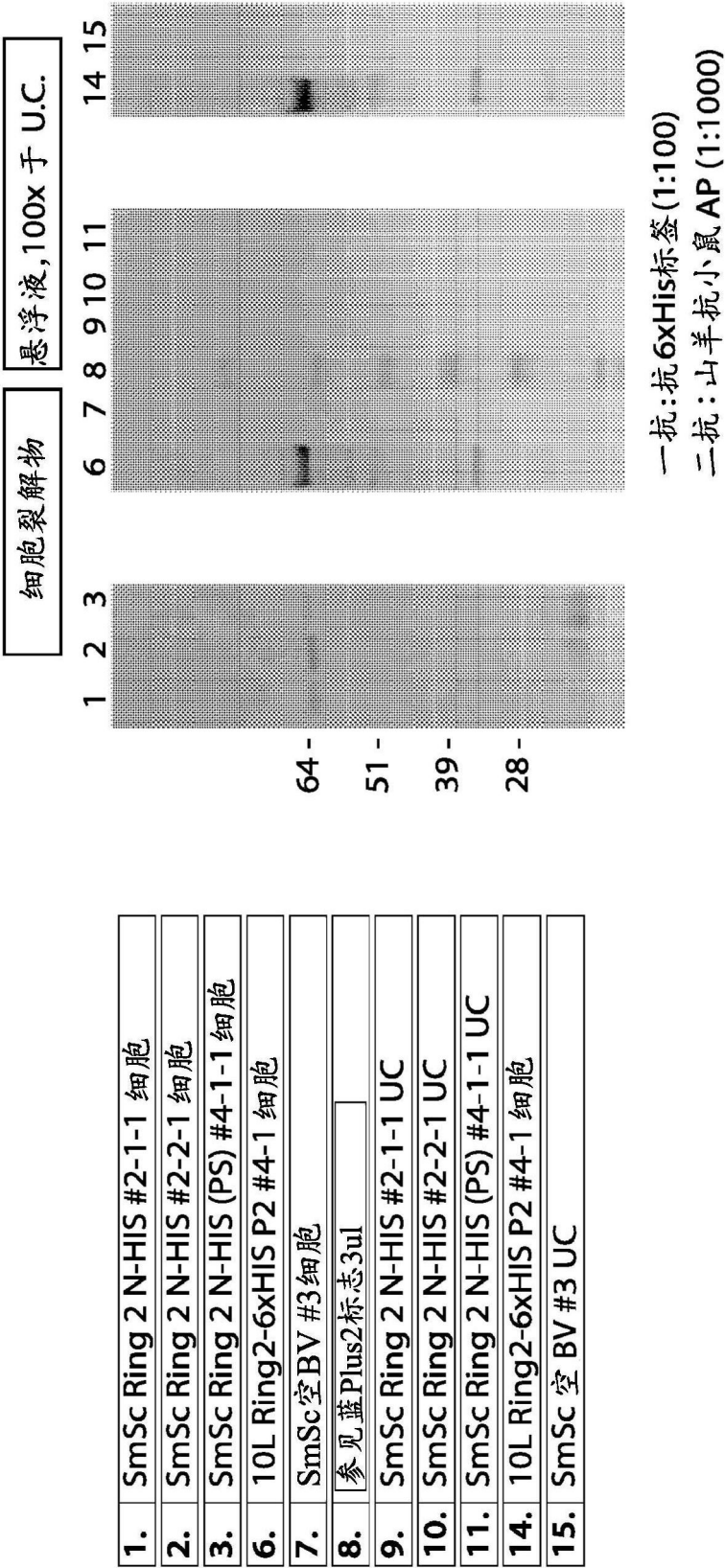


图3

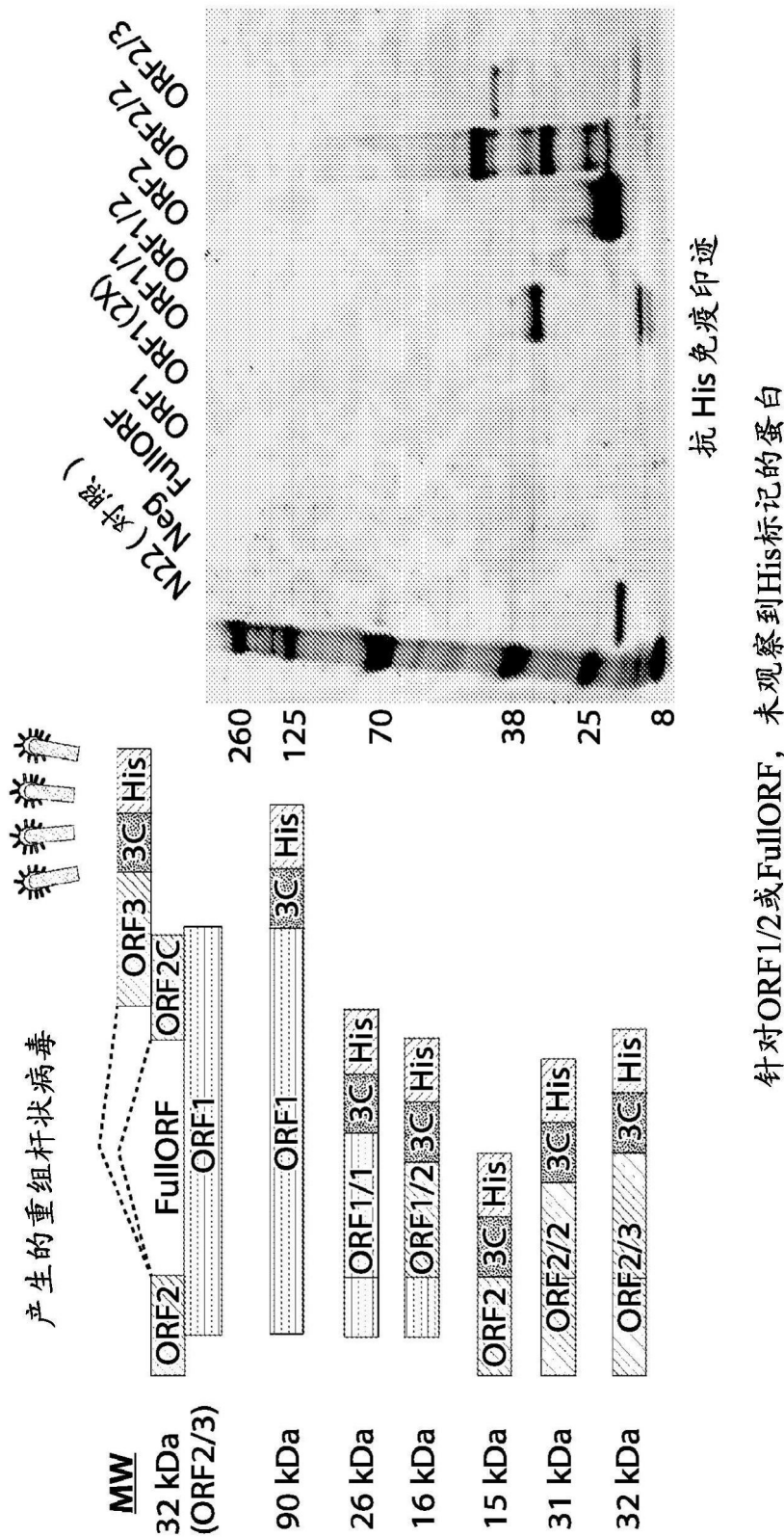


图4

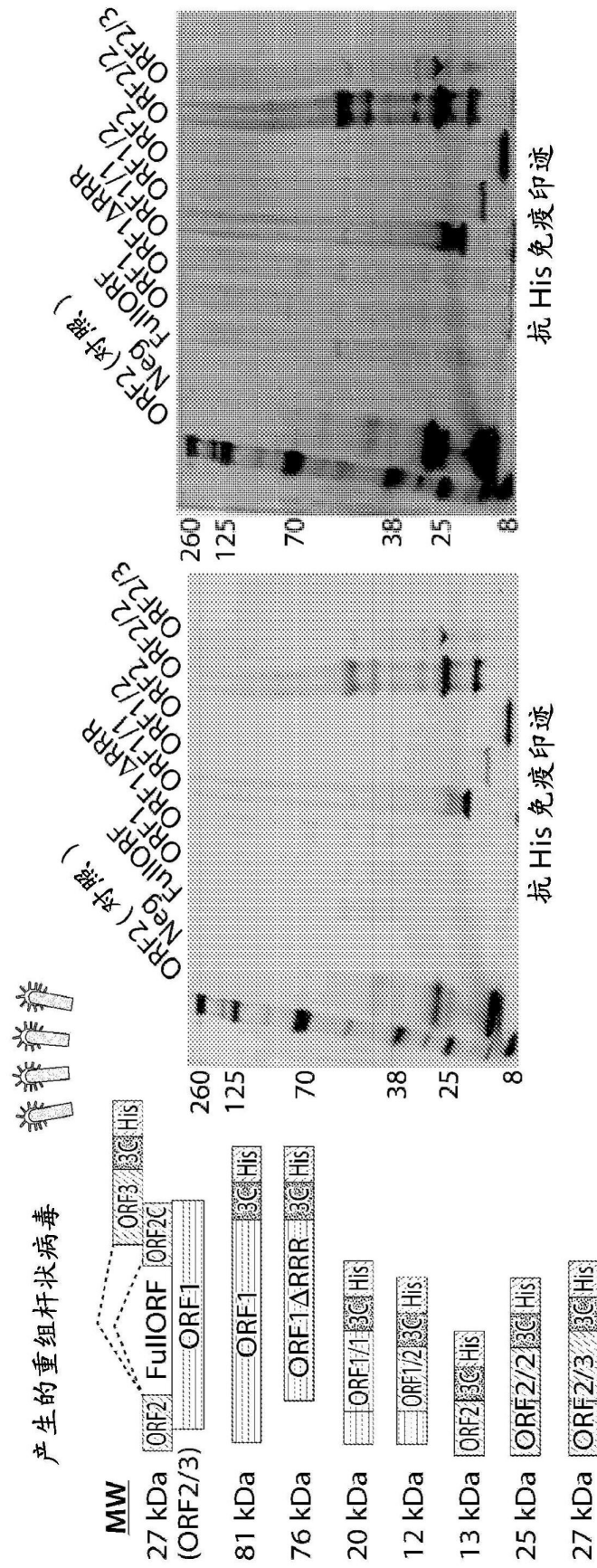


图5

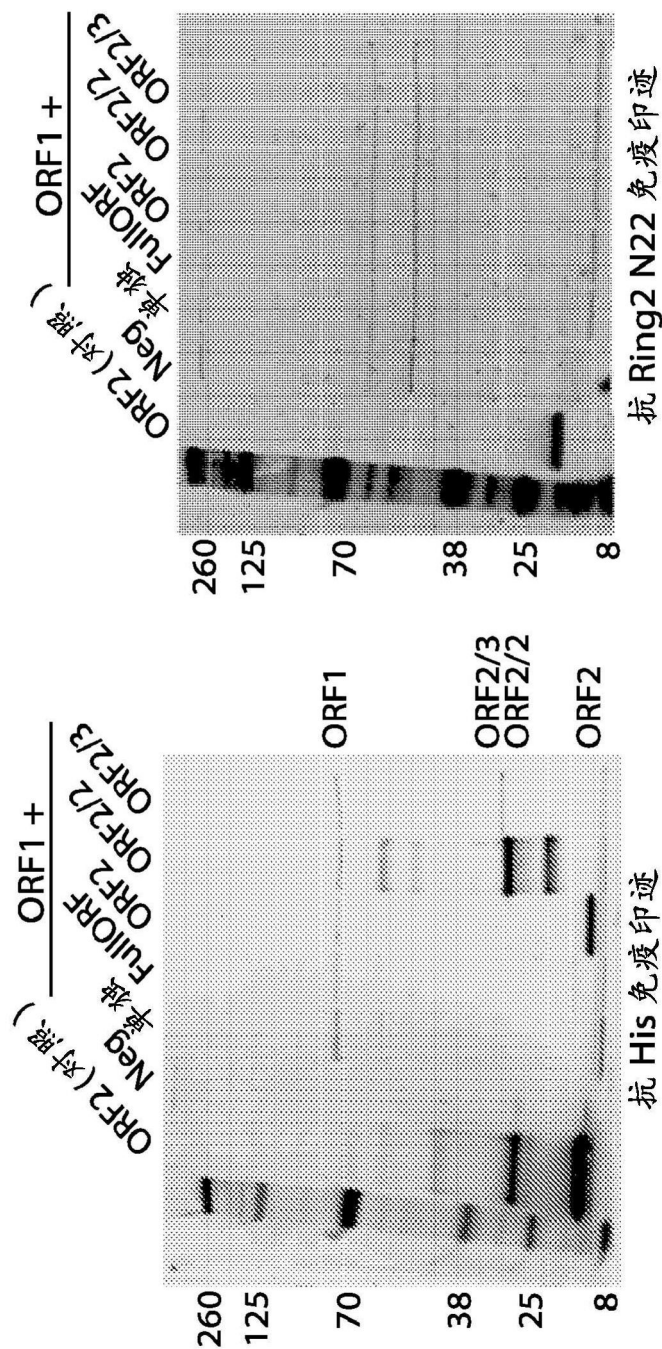


图6

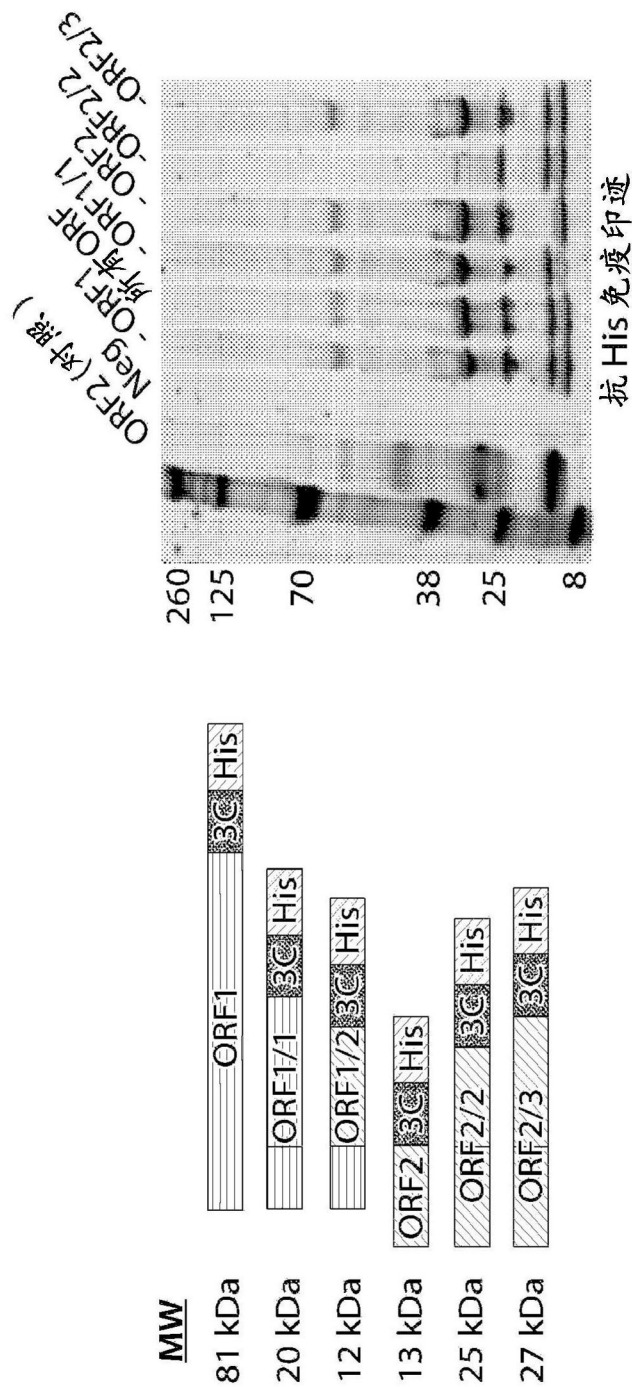


图7

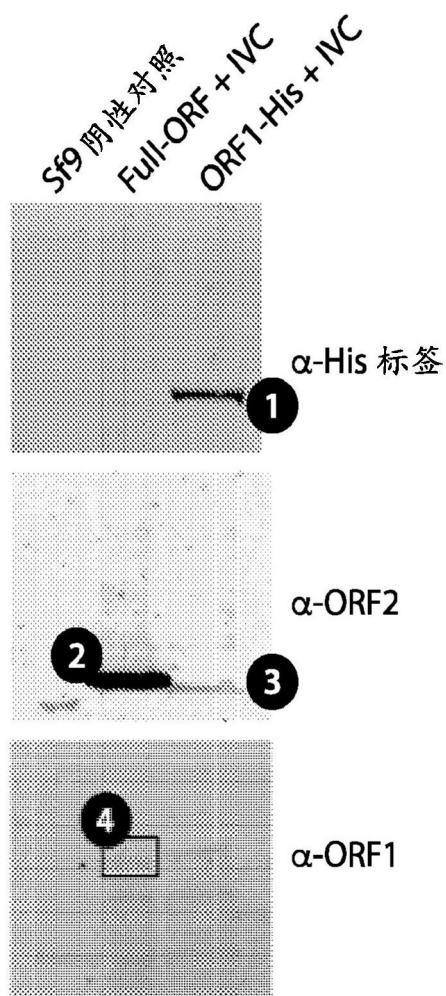


图8

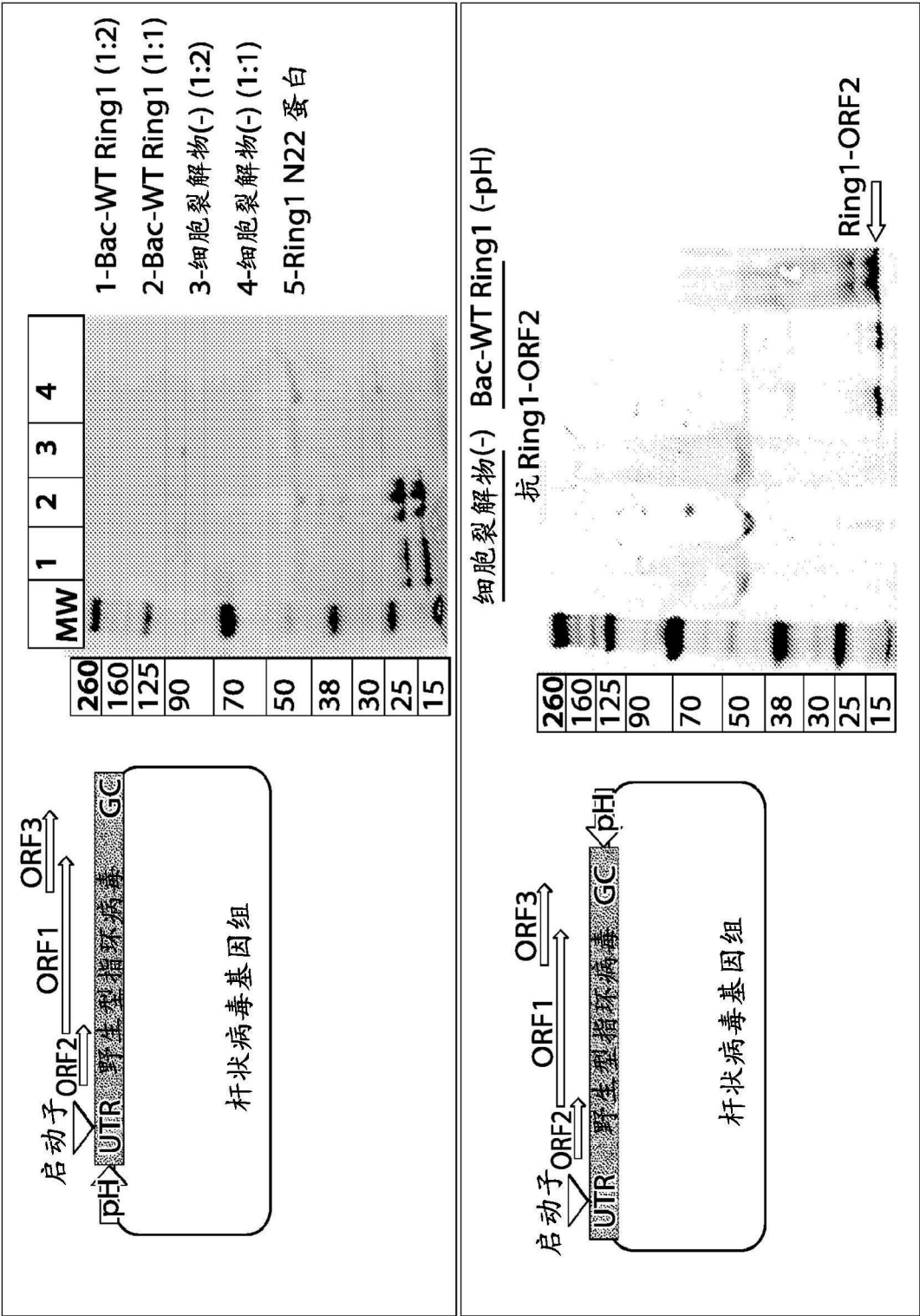


图9

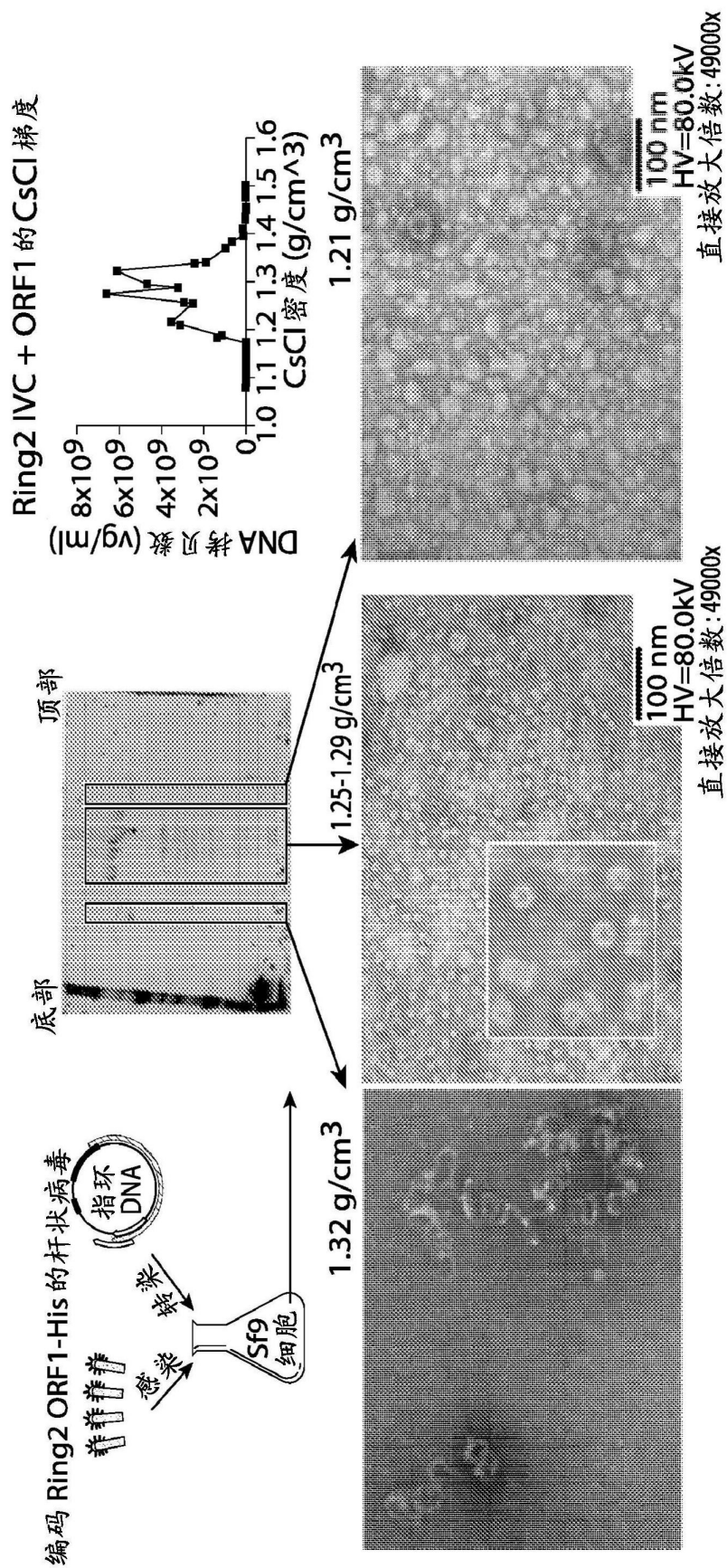


图10

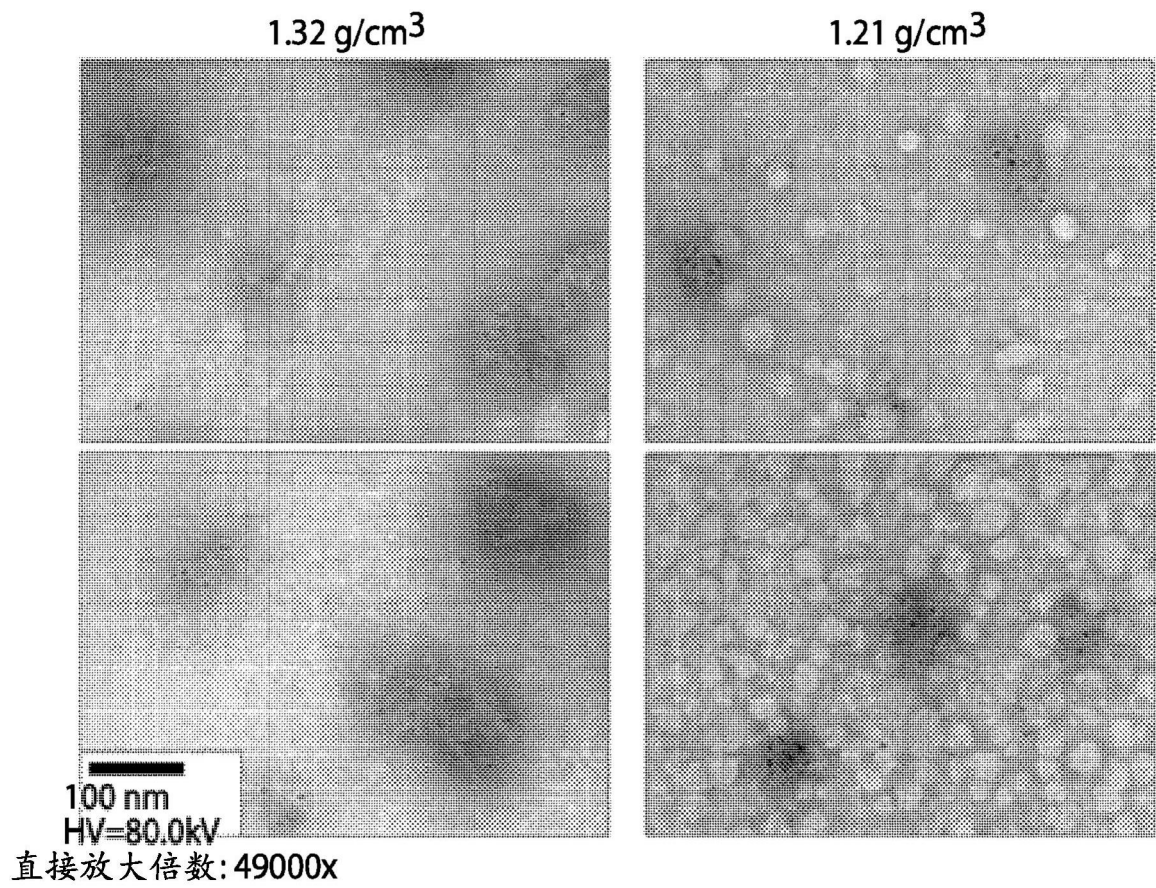


图11

几种 ORF1 在昆虫细胞中的表达

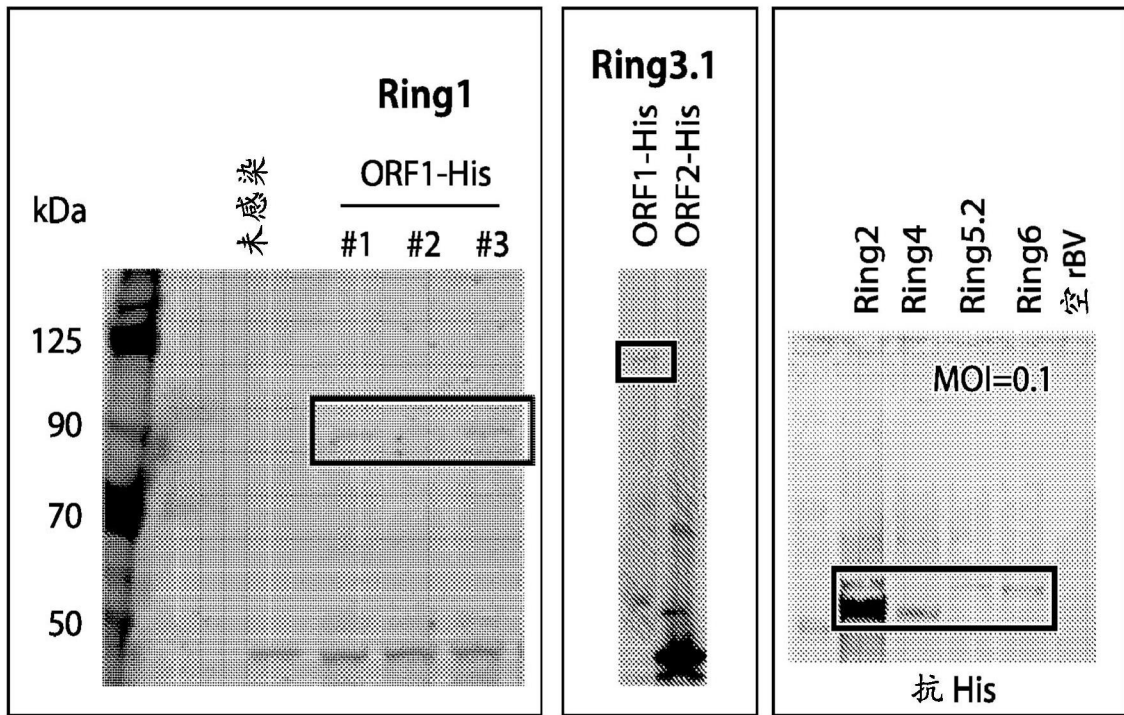
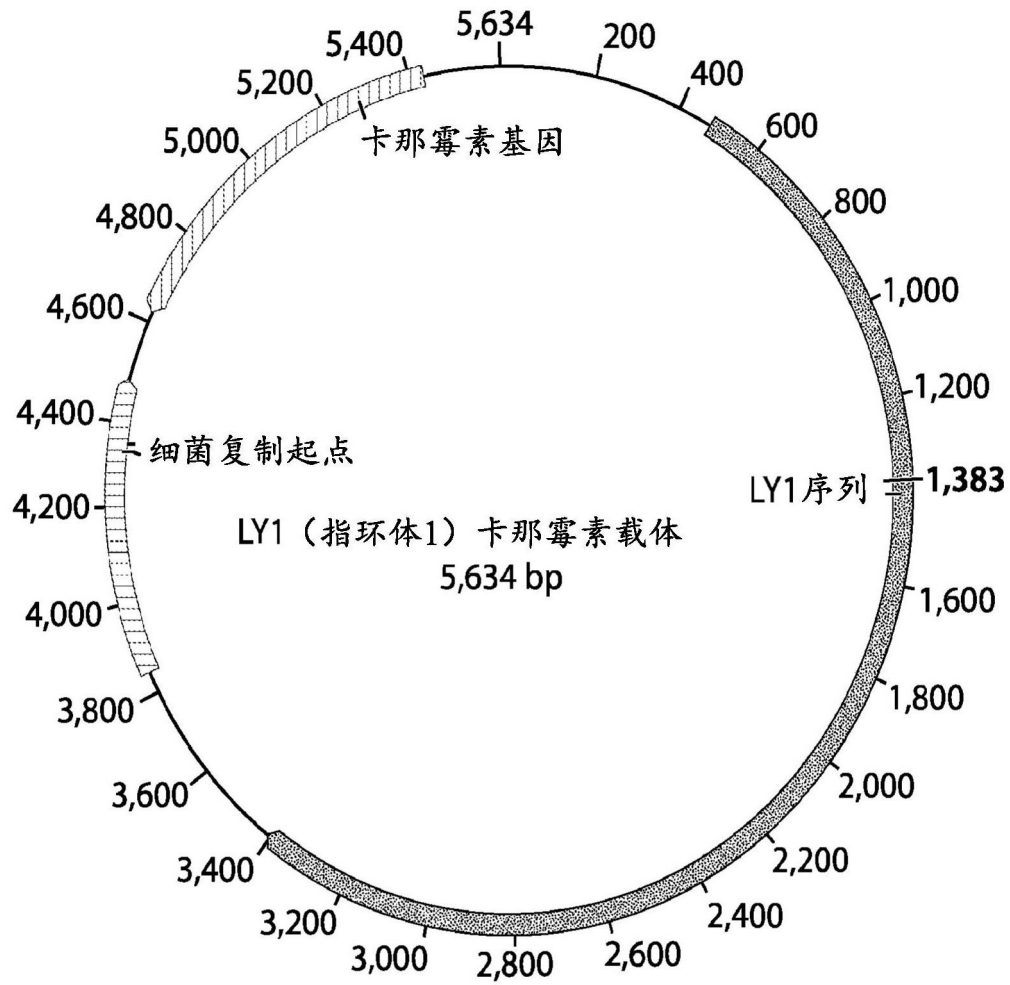
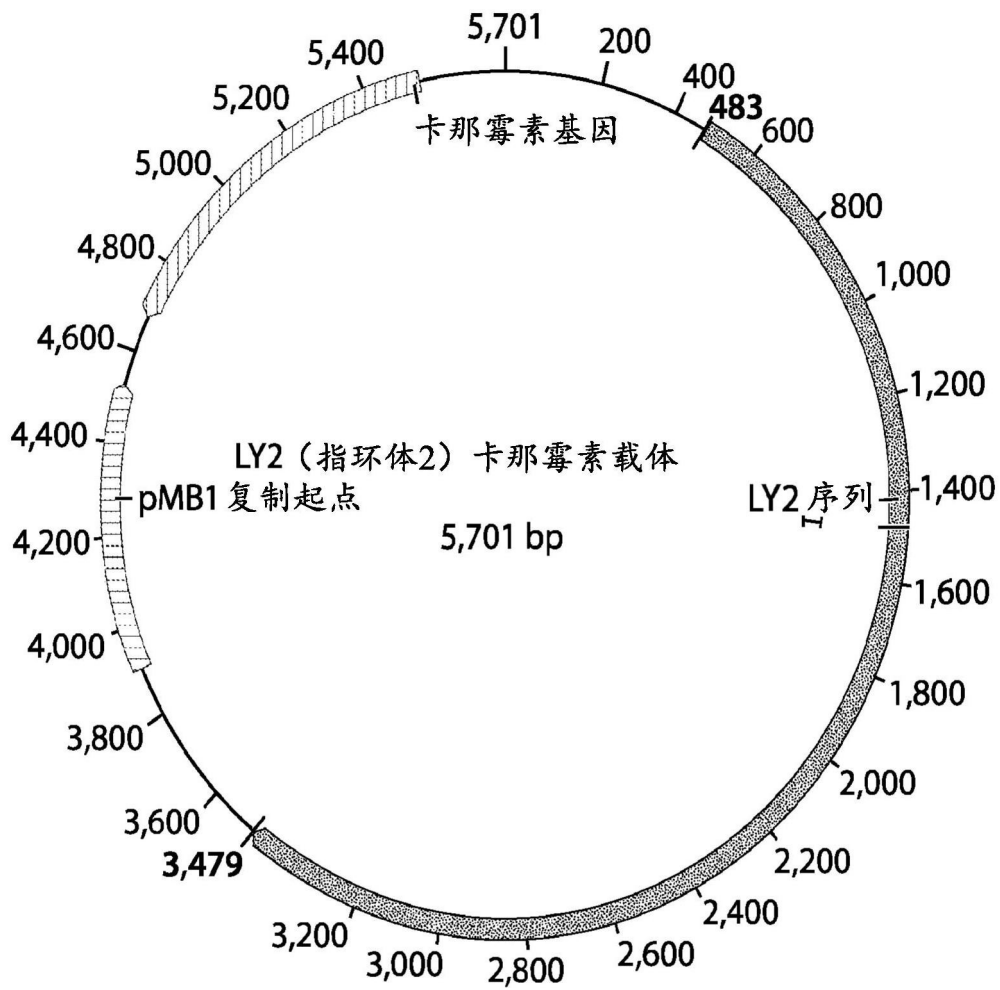


图12



编码TTMiniV的LY1株（指环体1）的卡那霉素载体的示意图

图13



编码TTMiniV的LY2株（指环体2）的卡那霉素载体的示意图

图14

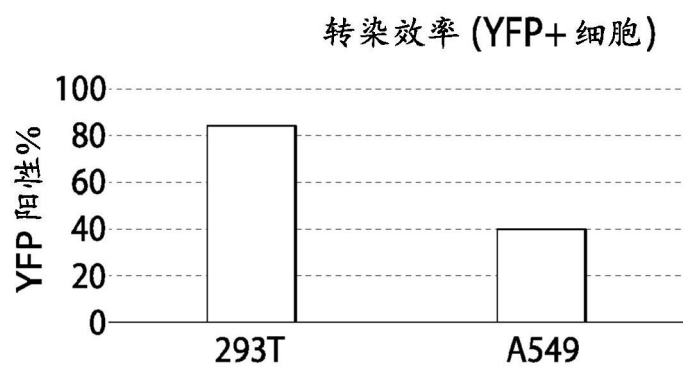


图15

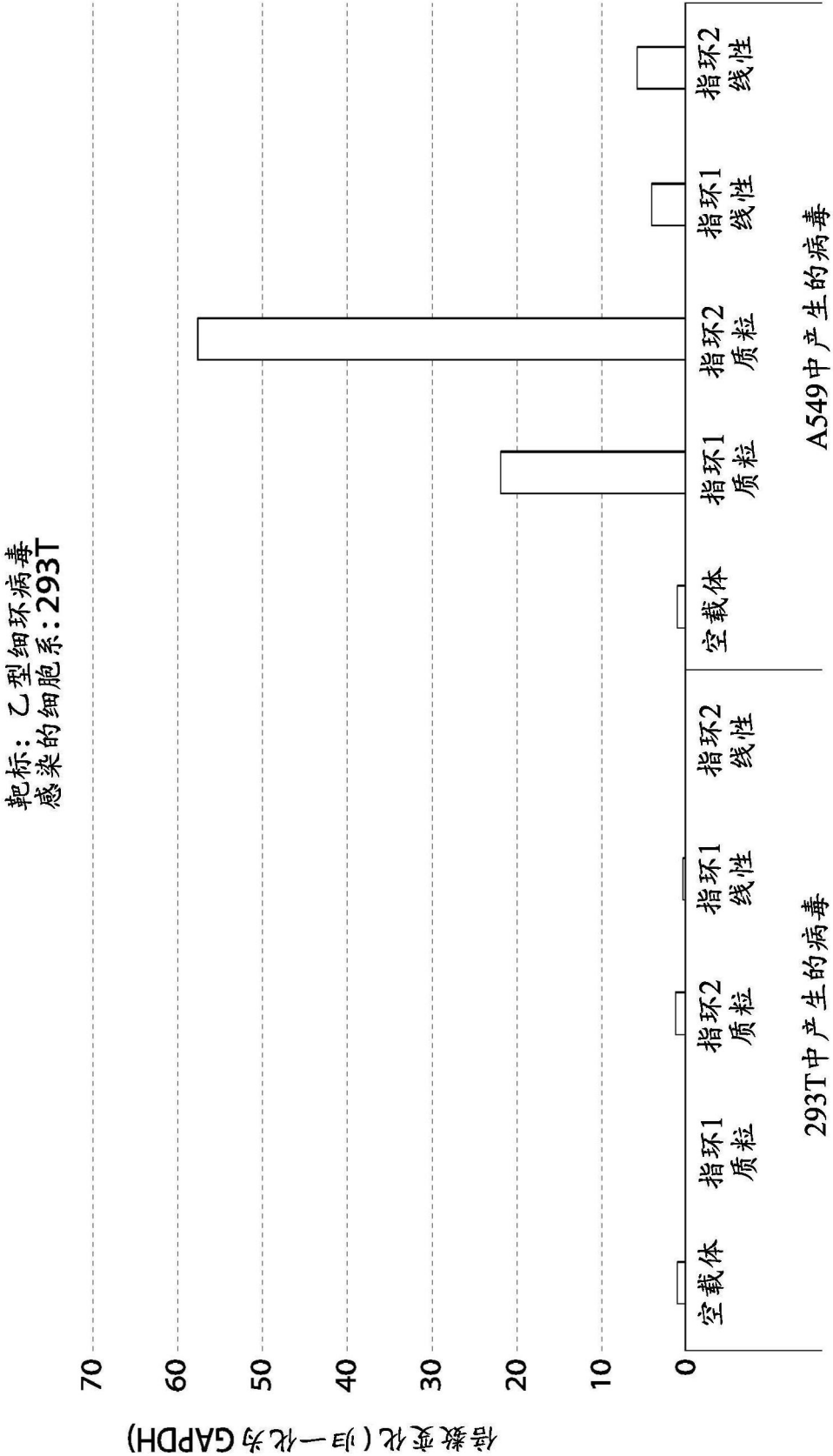


图16A

靶标：LY2 TTMV
感染的细胞系：293T

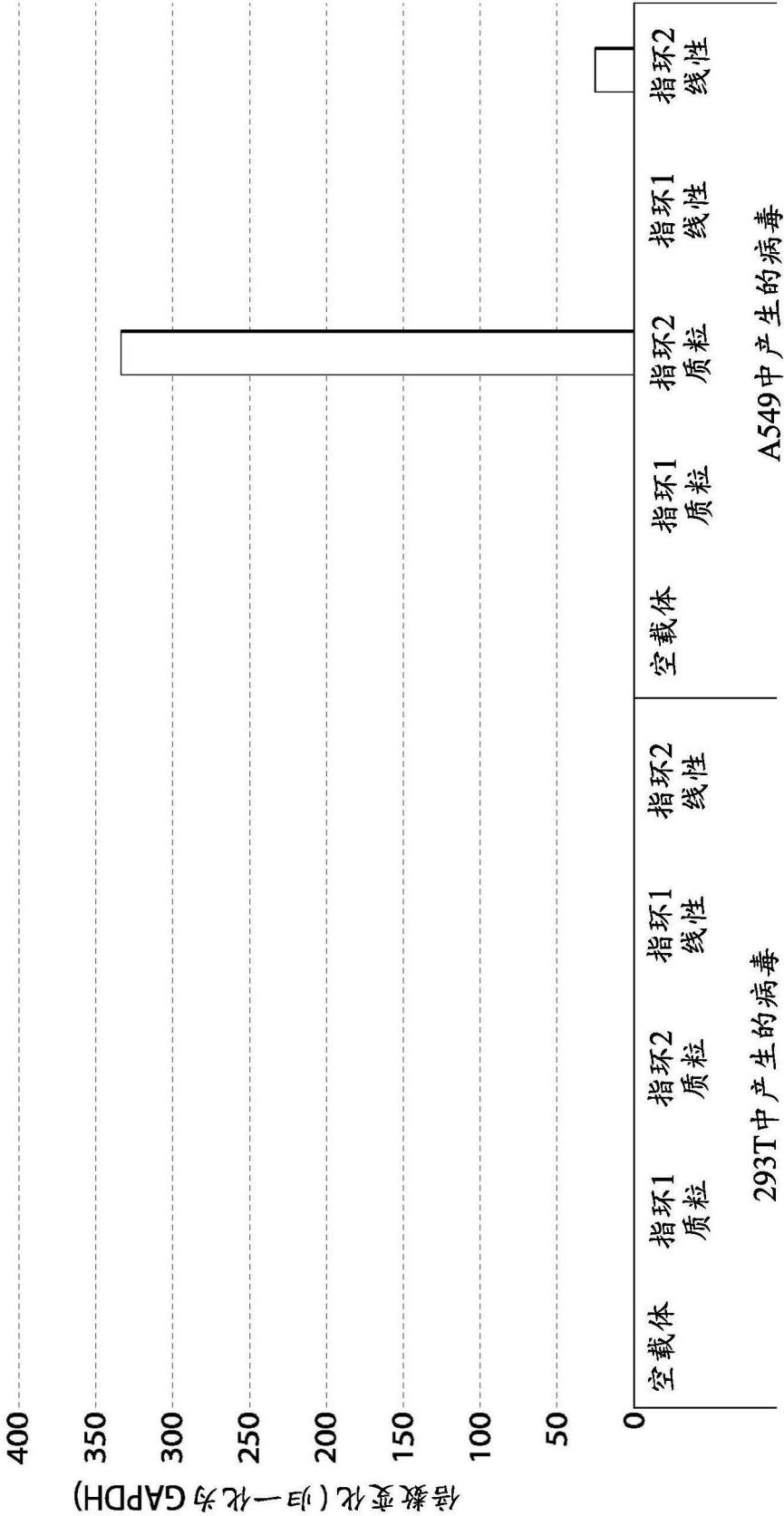


图16B

靶标: 乙型肝炎病毒
感染的细胞系: A549

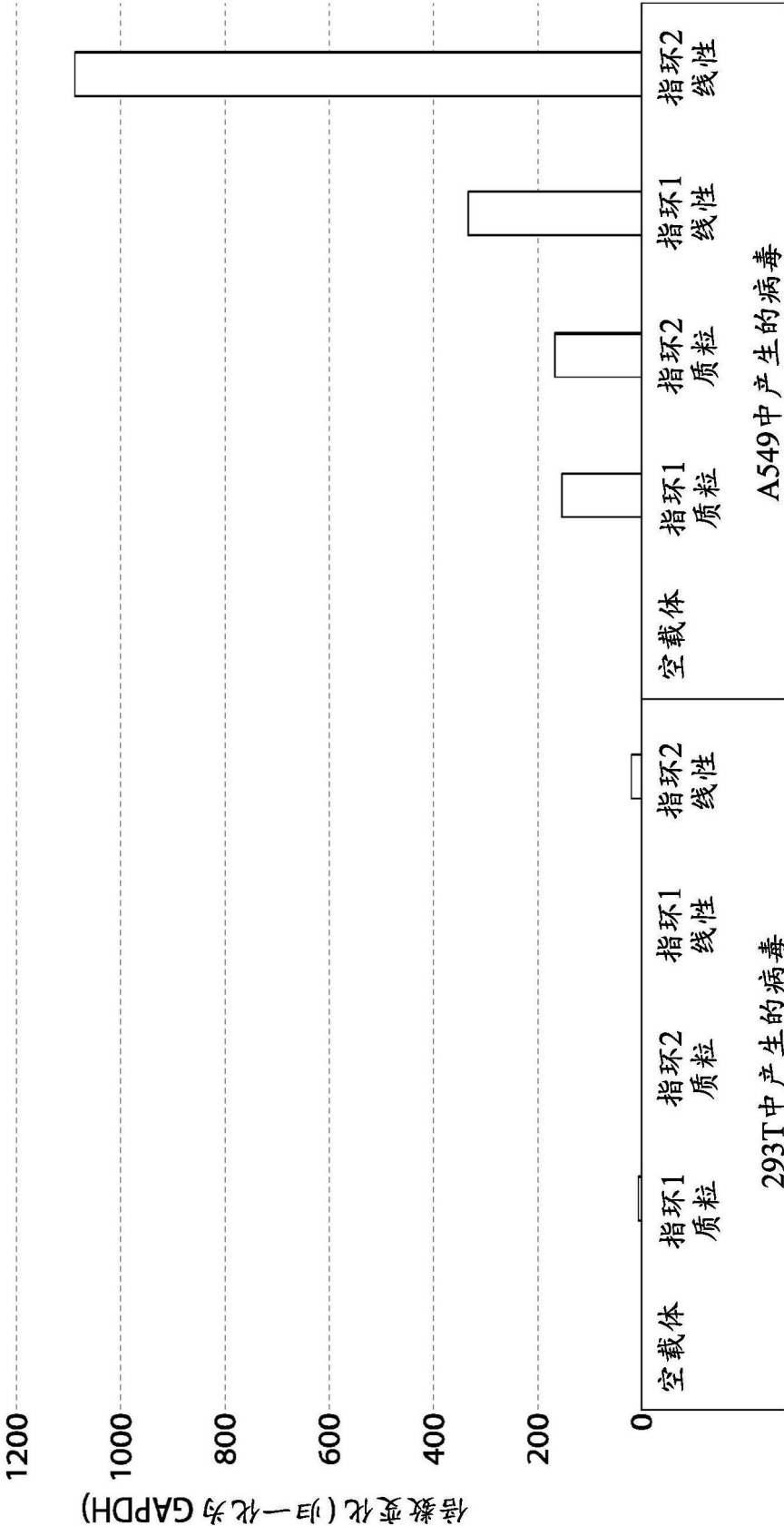


图17A

靶标: TTMV LY2
感染的细胞系: A549

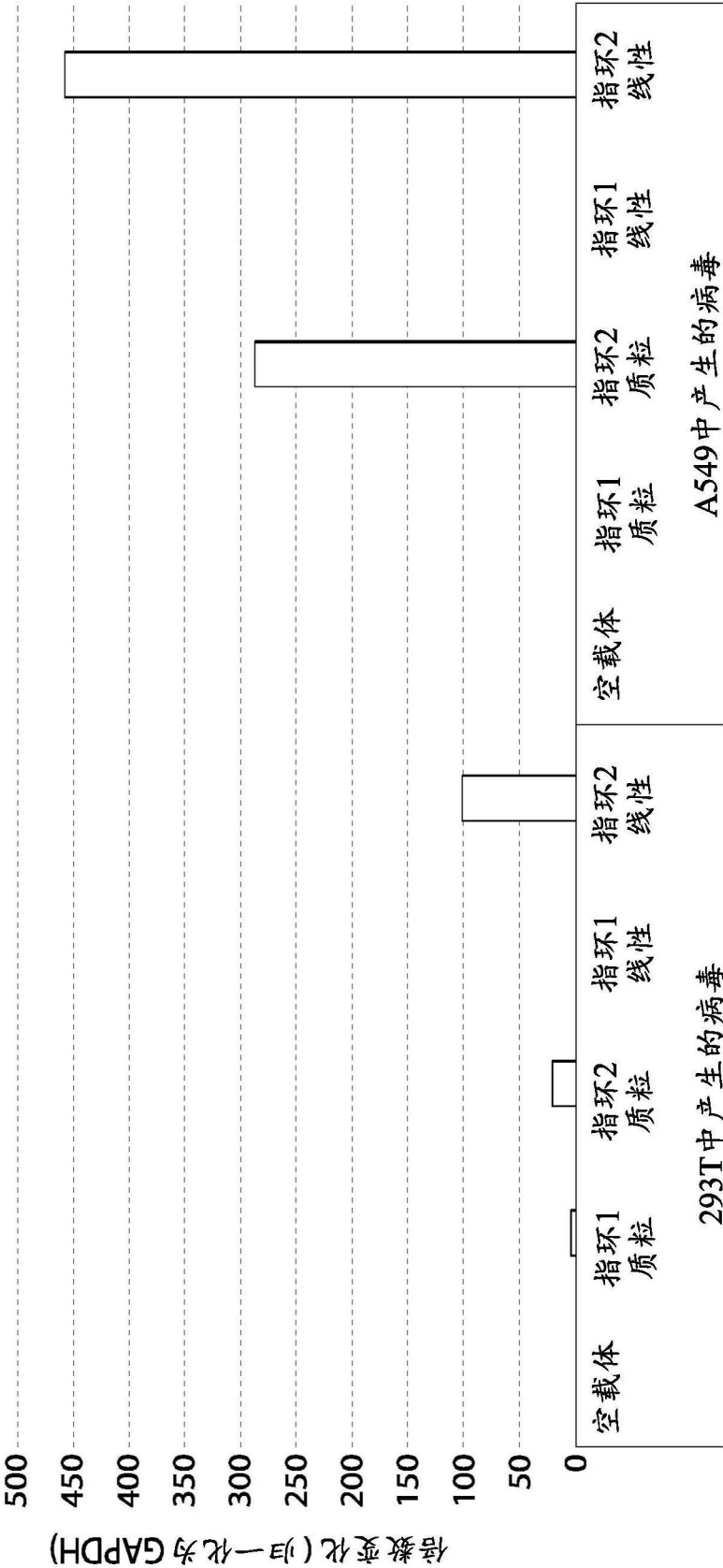


图17B

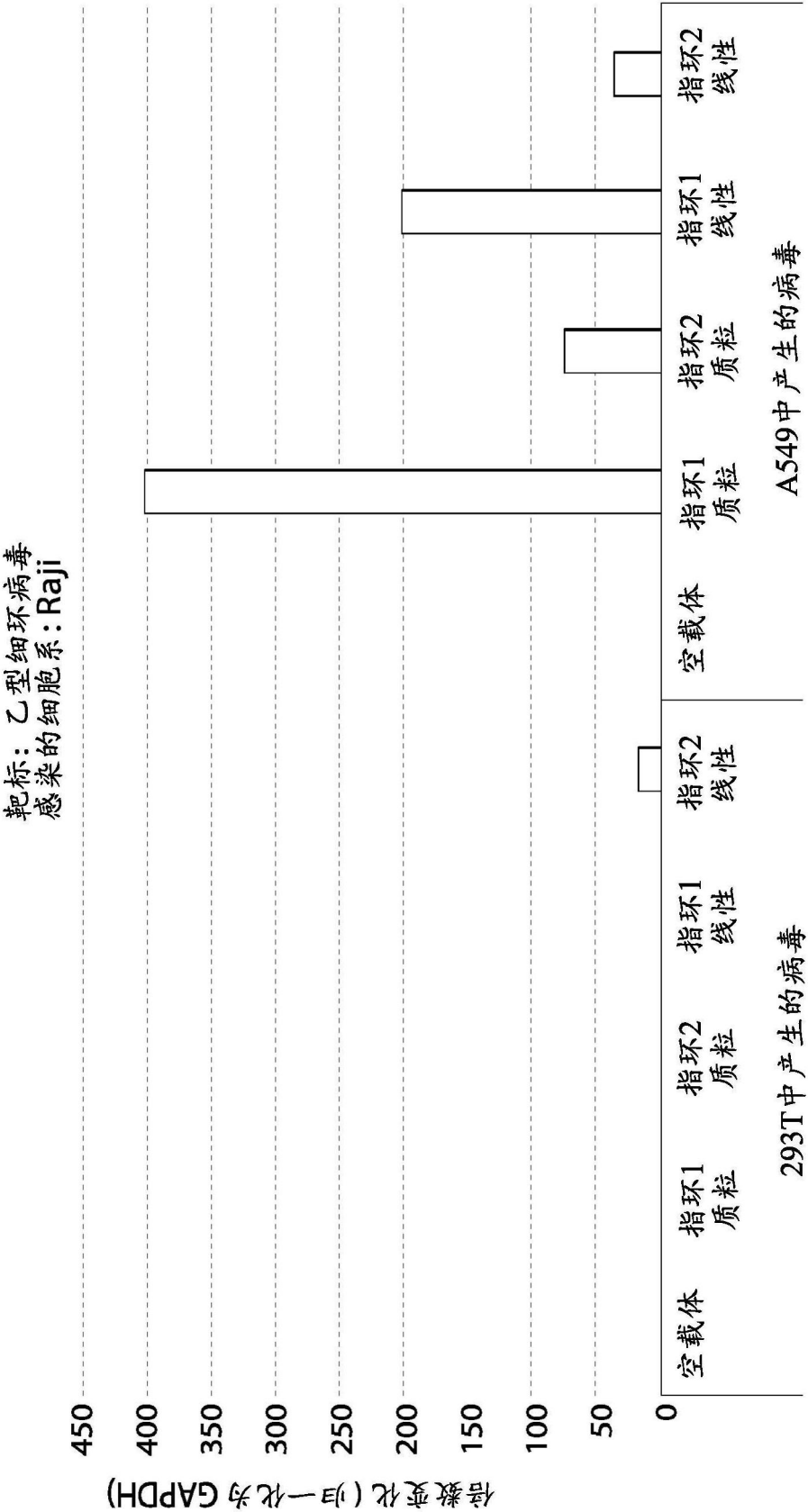


图18A

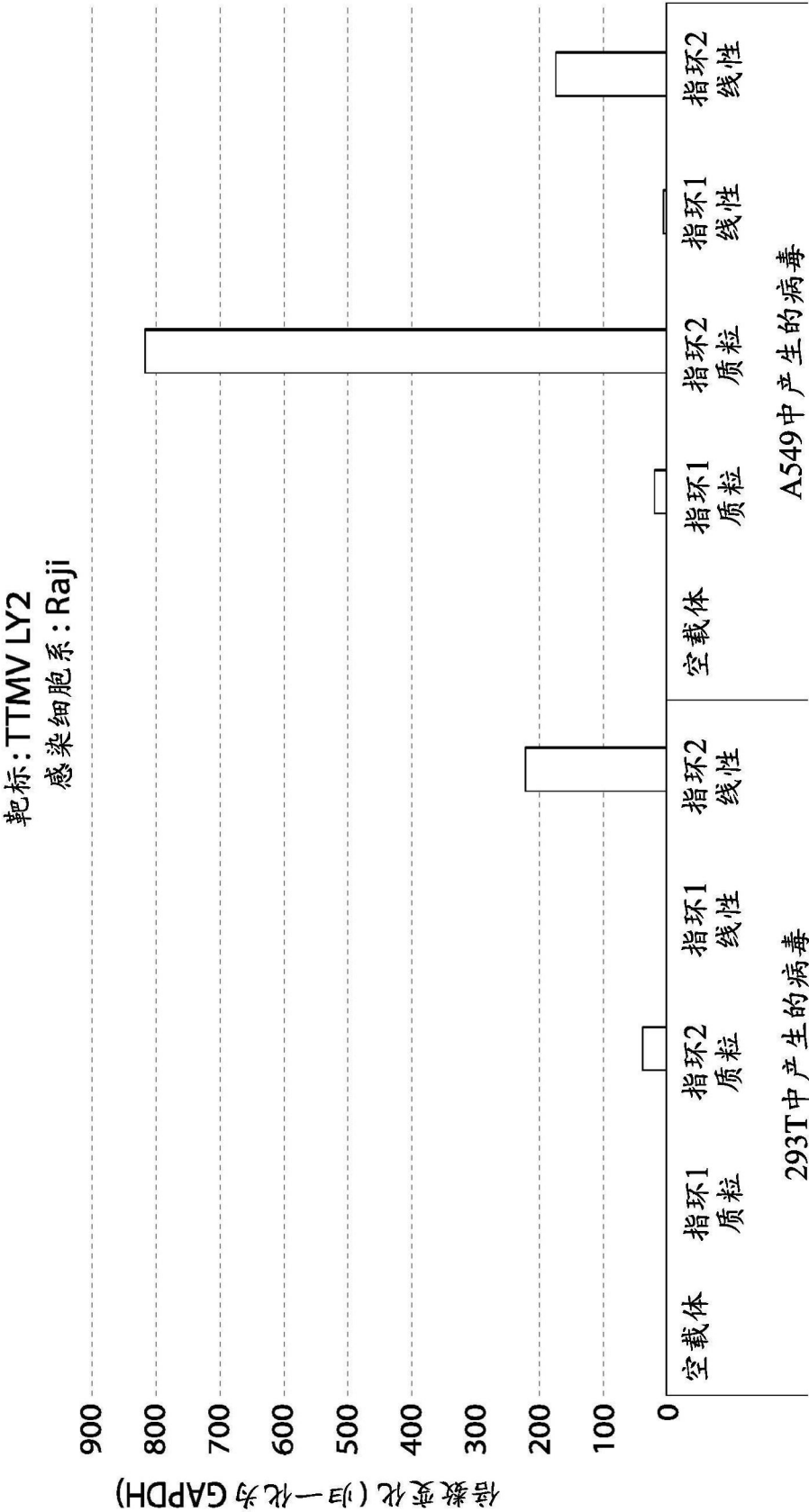


图18B

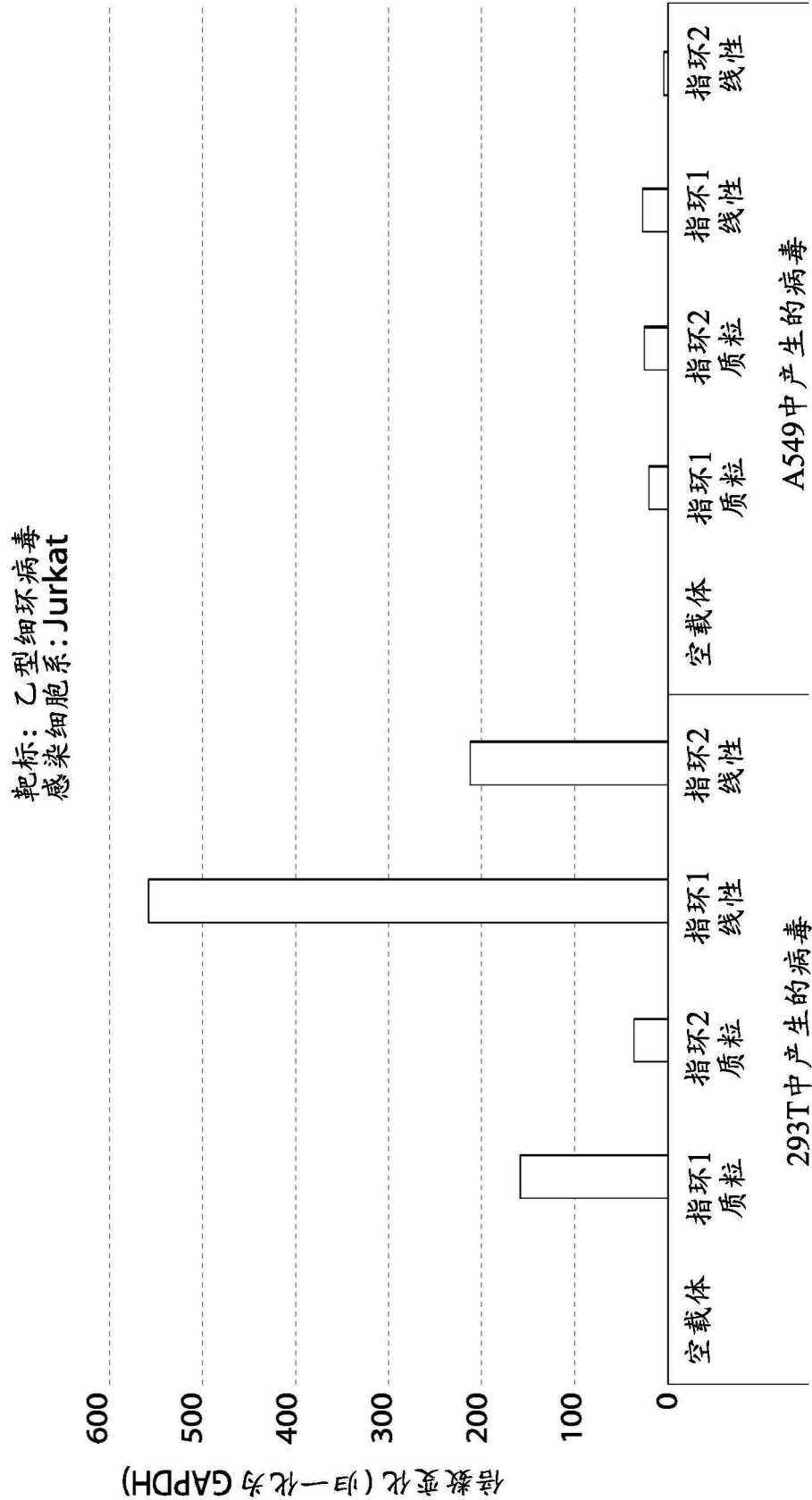


图19A

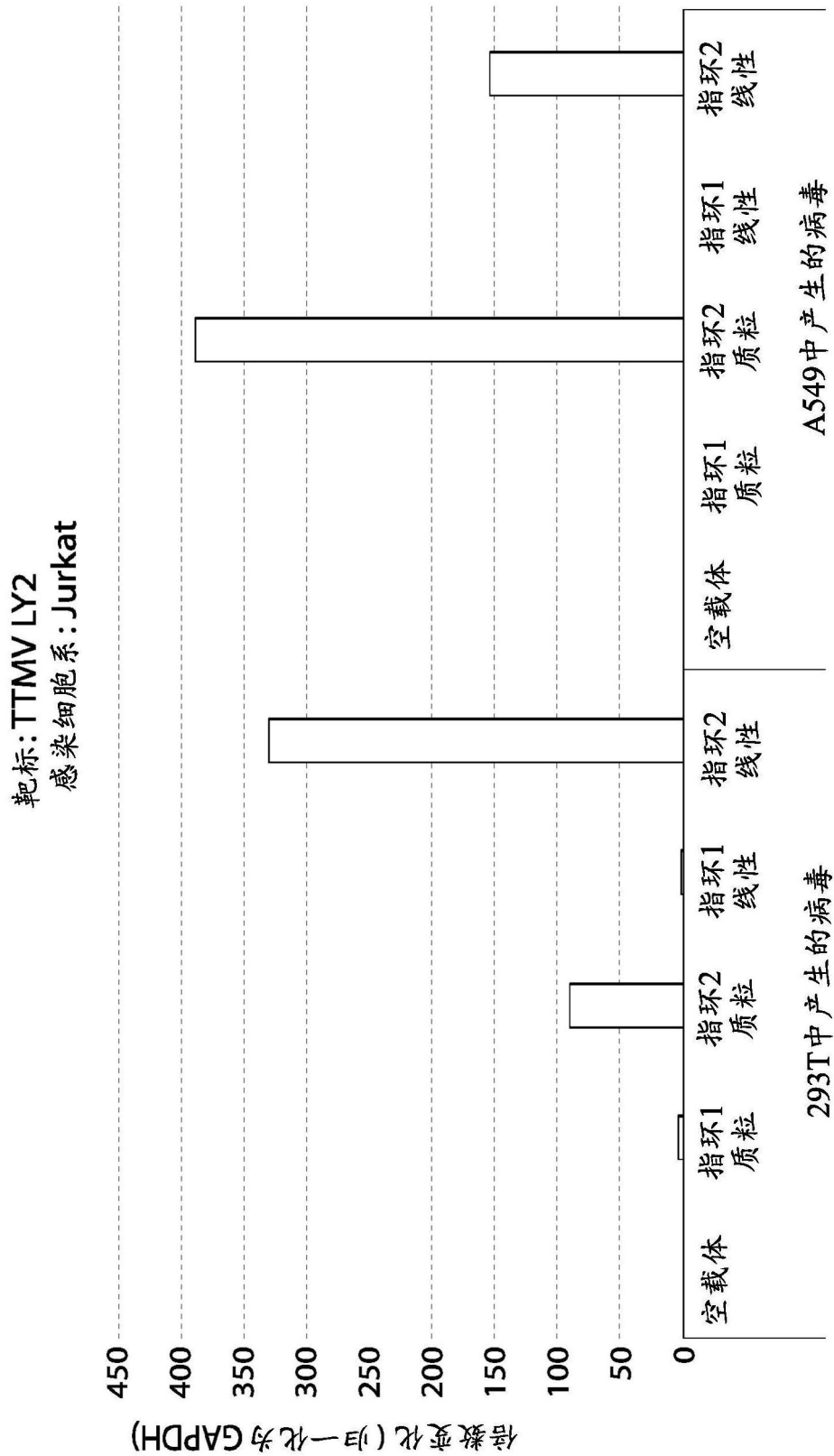


图19B

靶标: 乙型肝炎病毒
感染细胞系: Chang

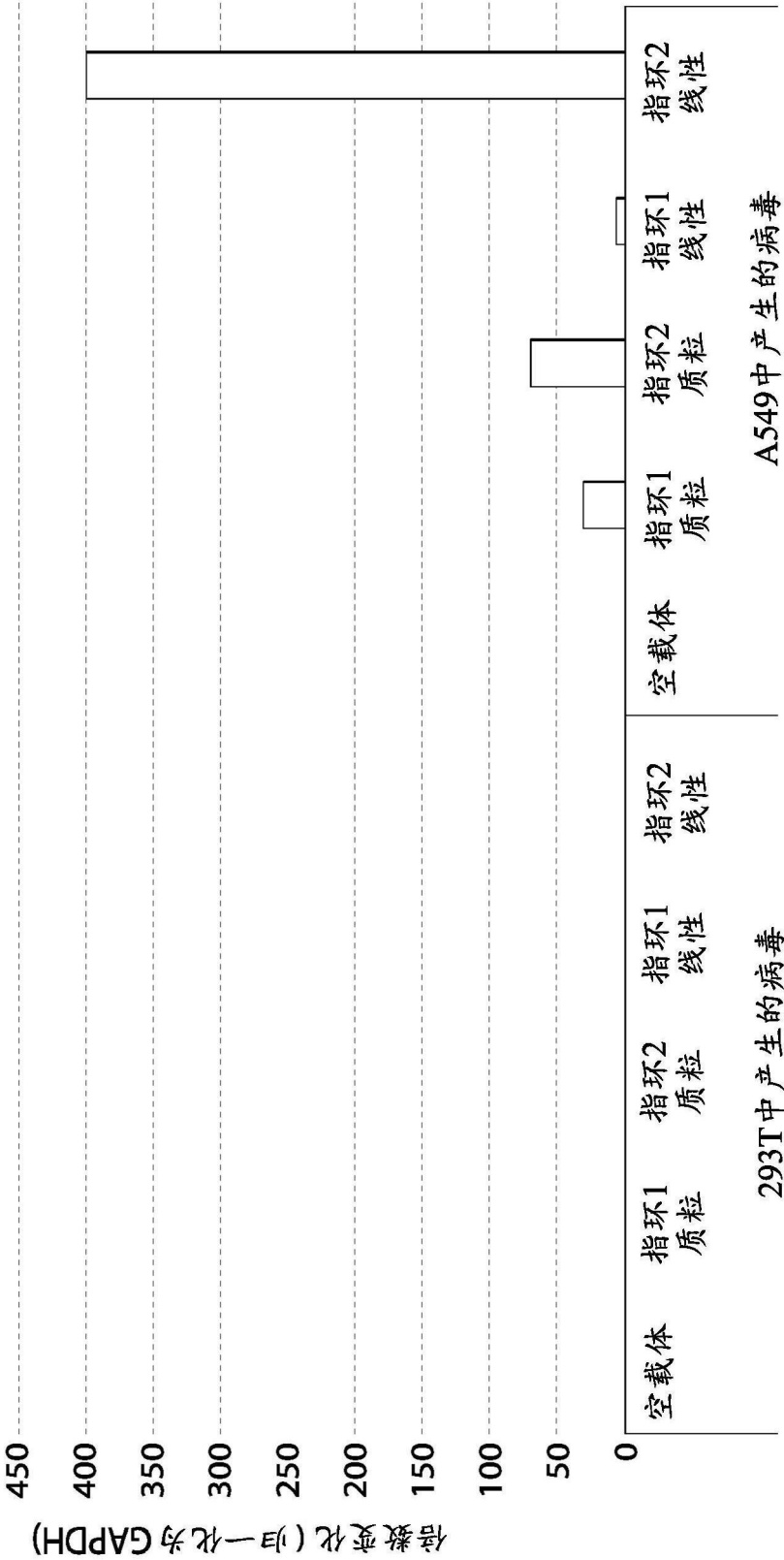


图20A

靶标: TTMV LY2
感染细胞系: Chang

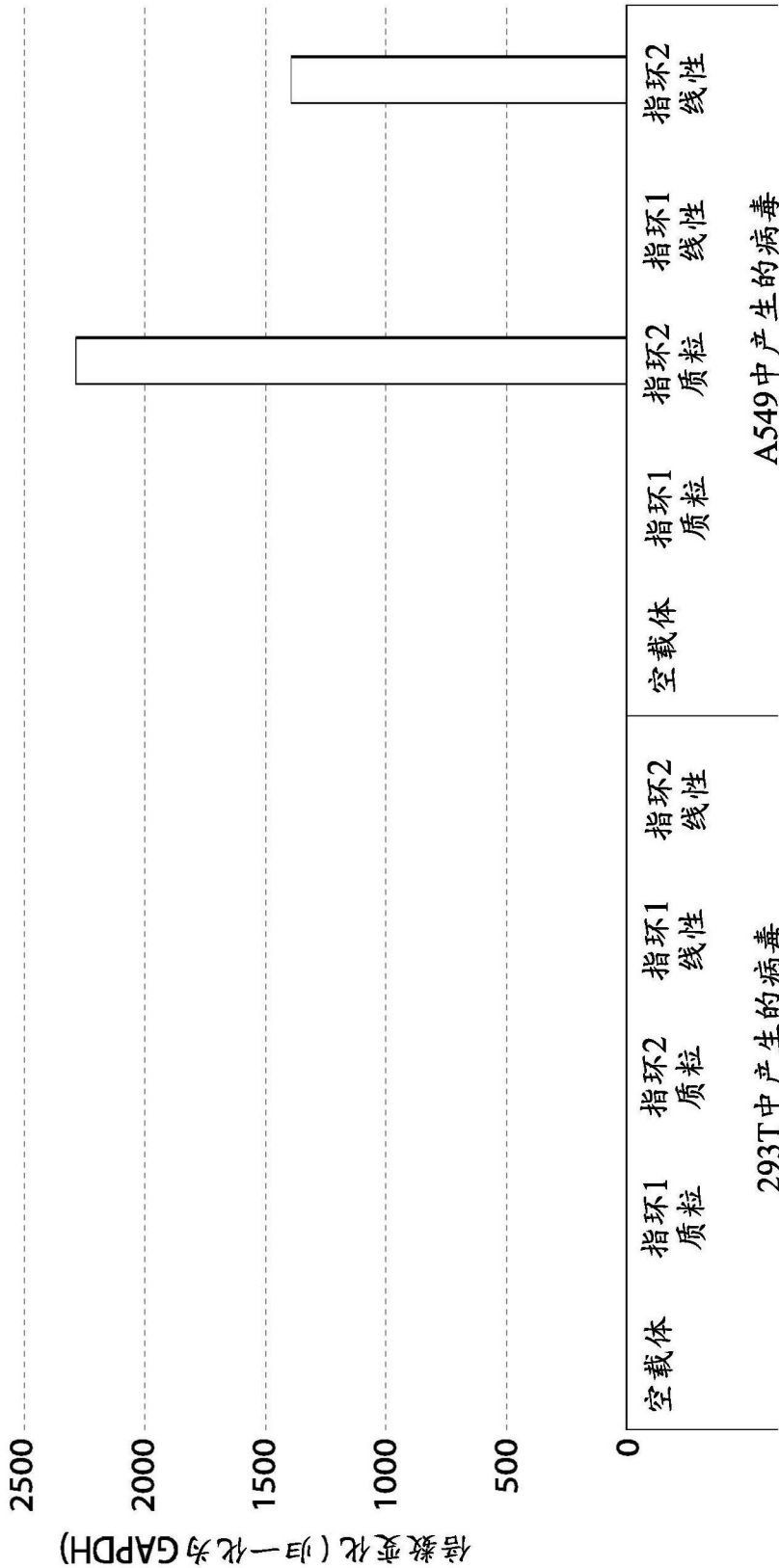


图20B

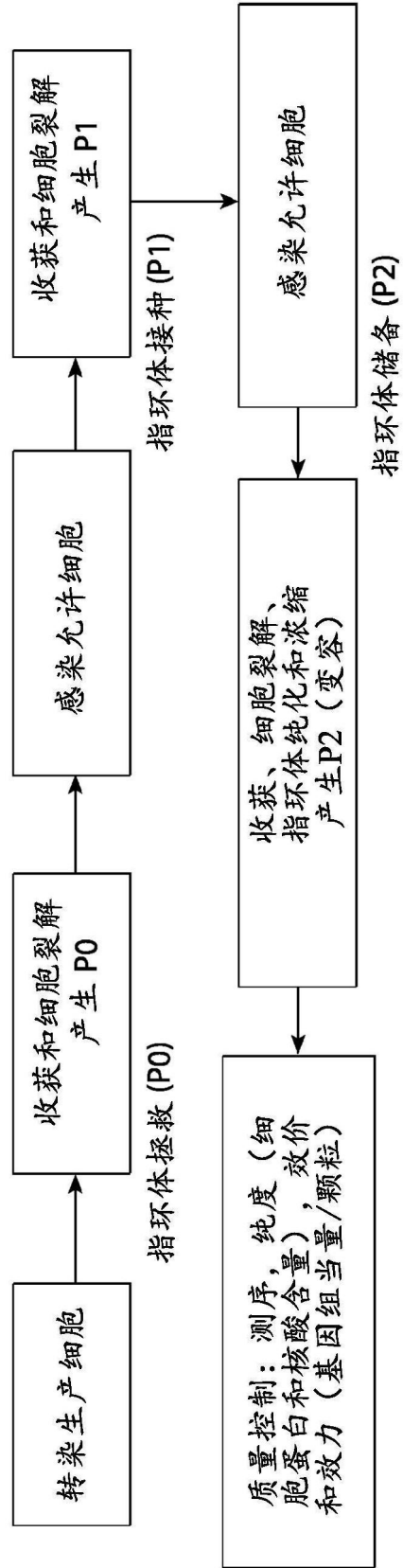


图21

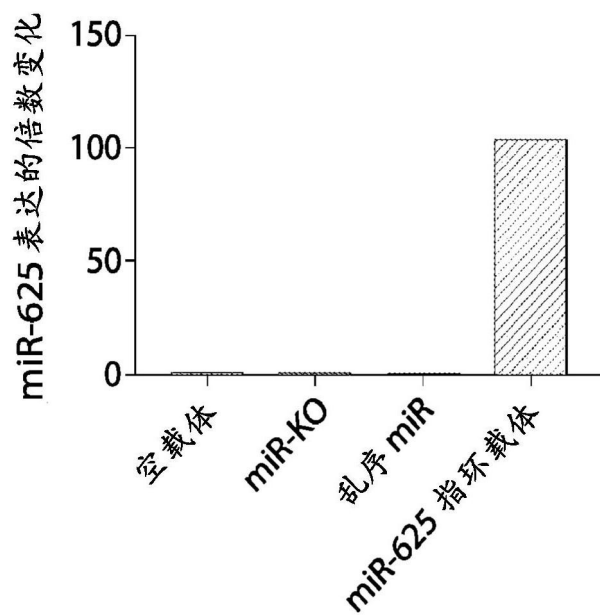


图22

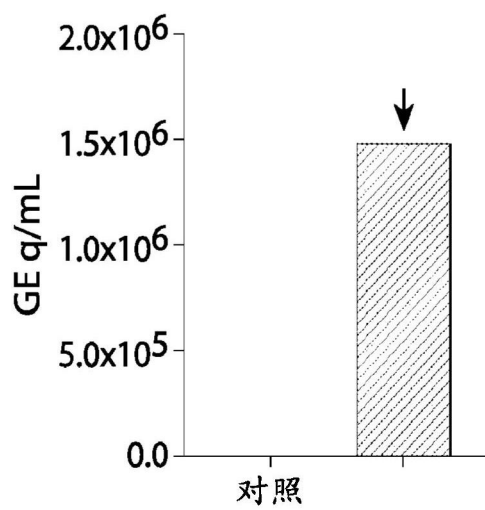


图23

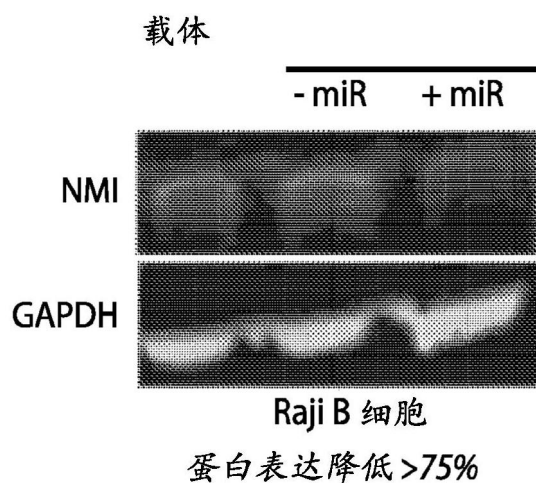


图24

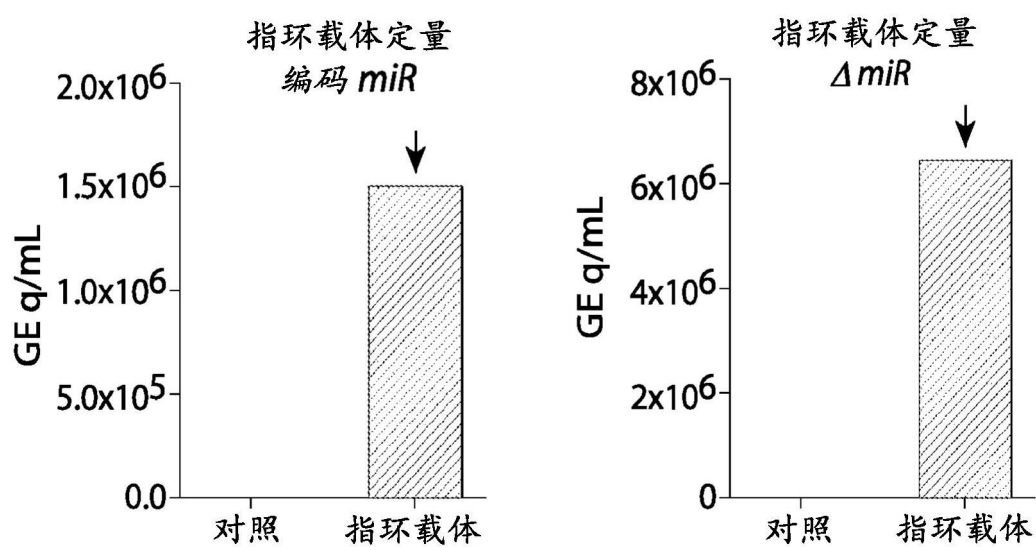


图25

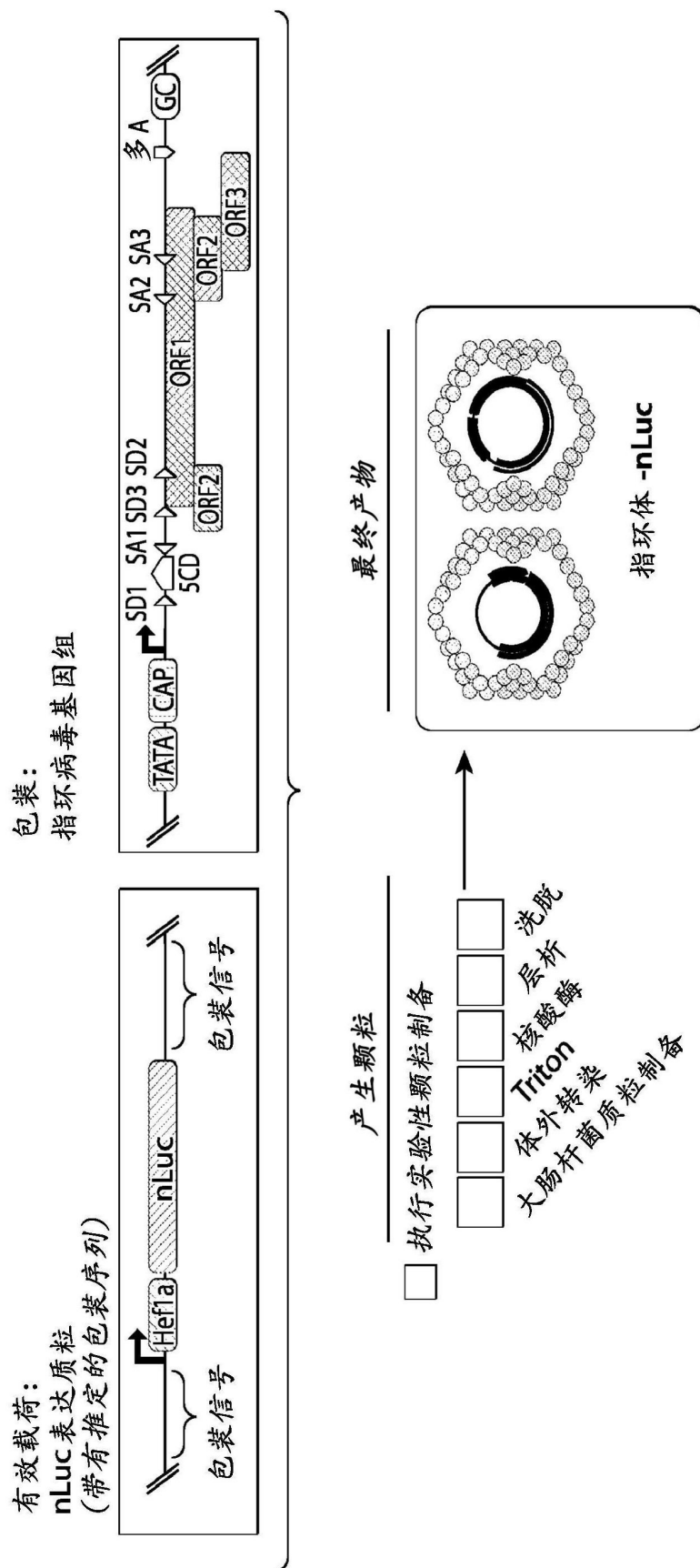


图26A

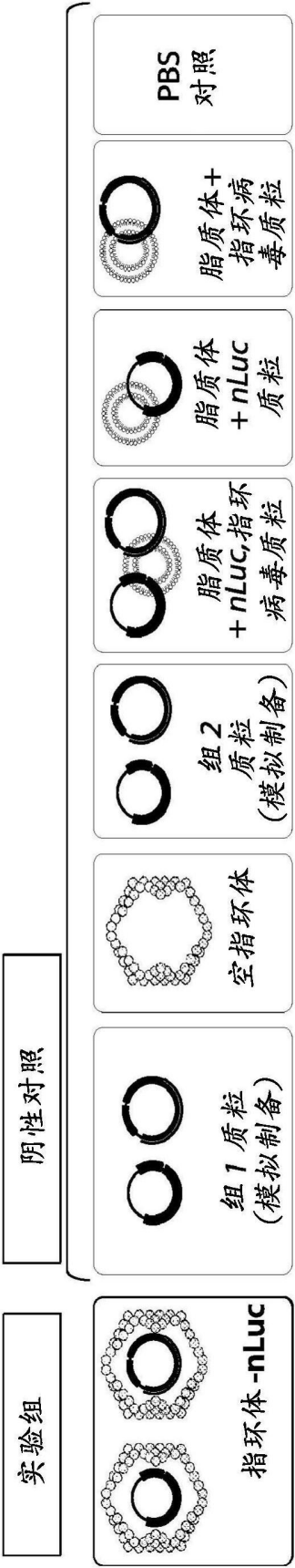


图26B

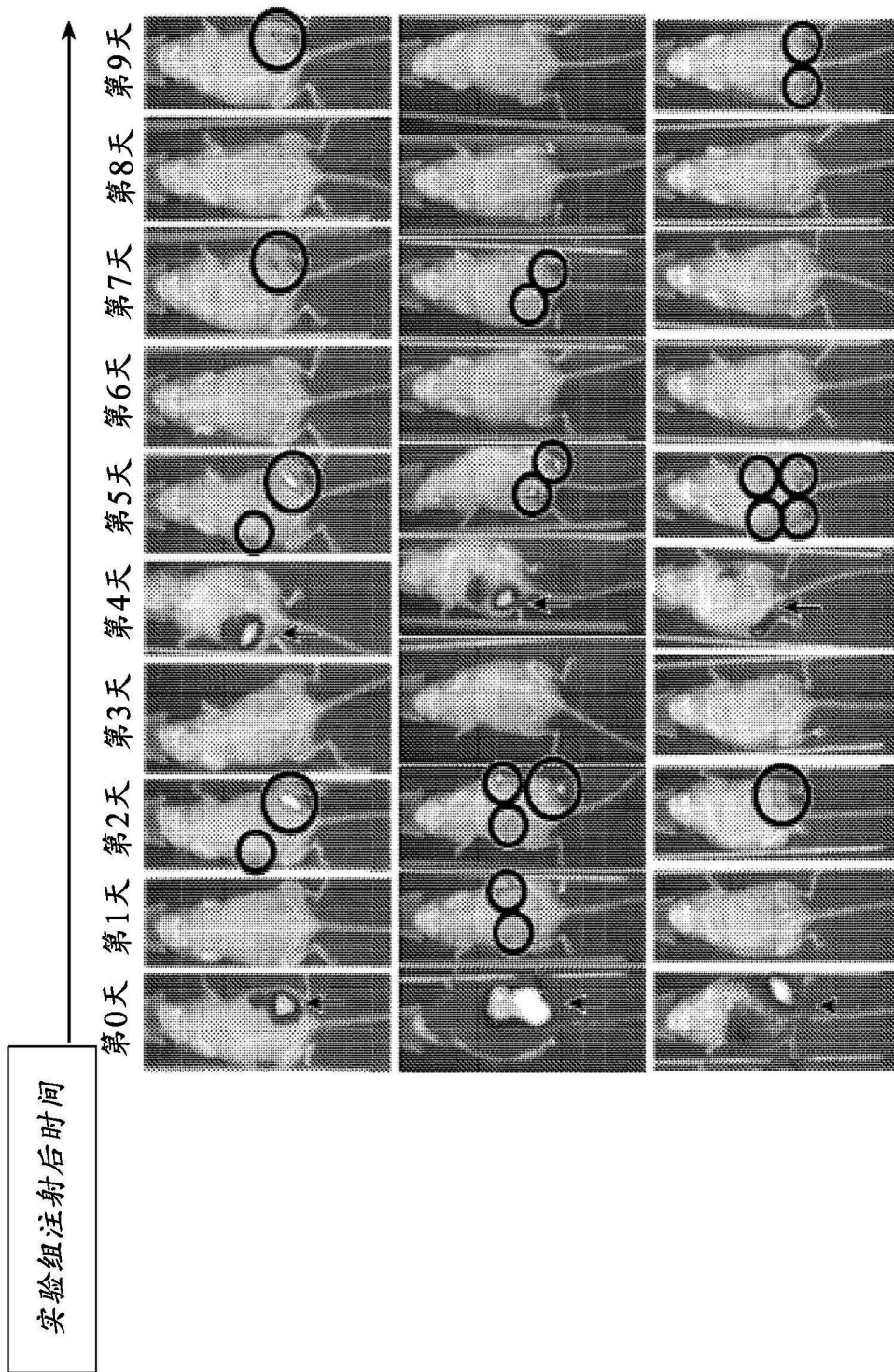


图27A

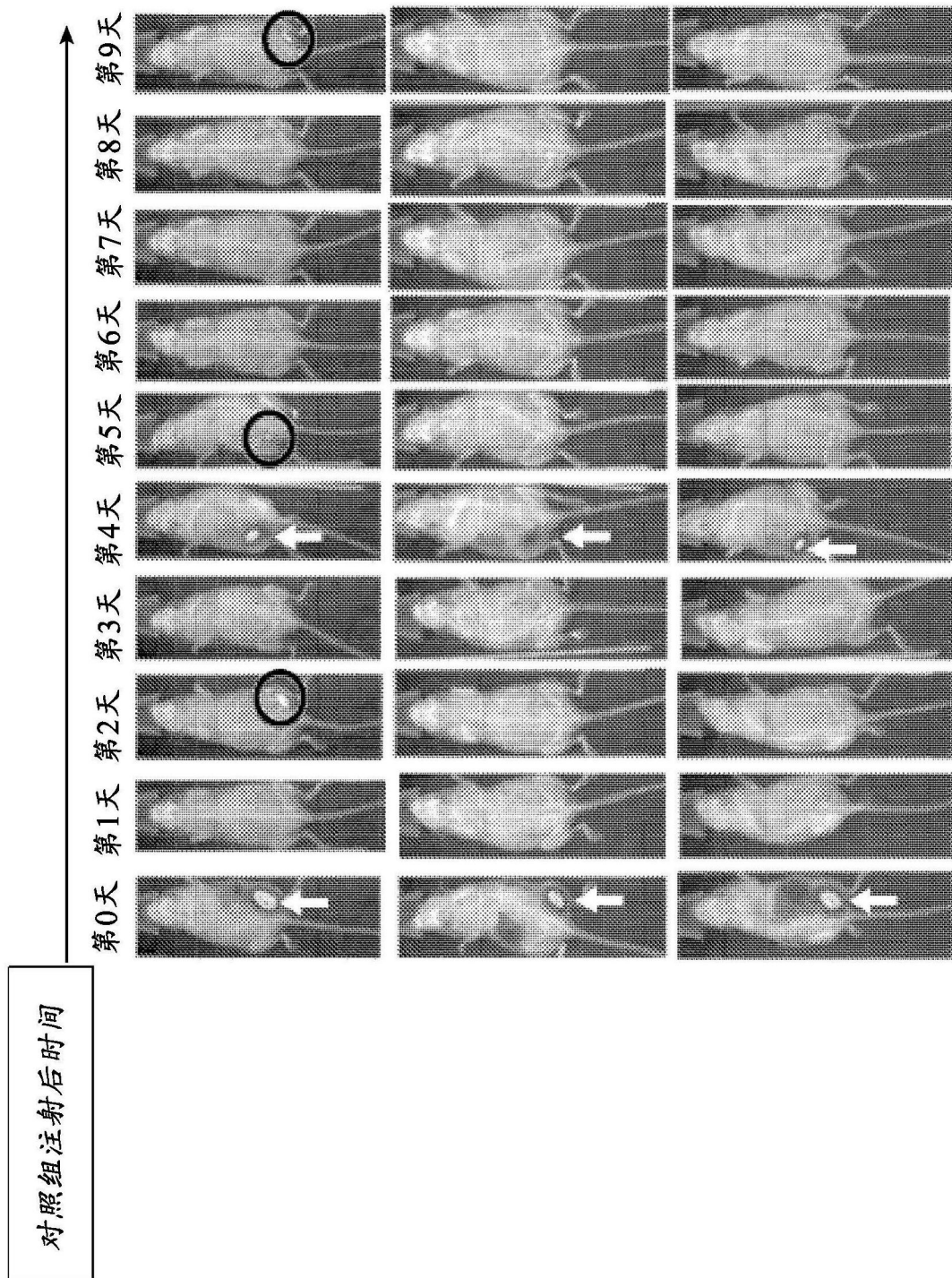


图27B

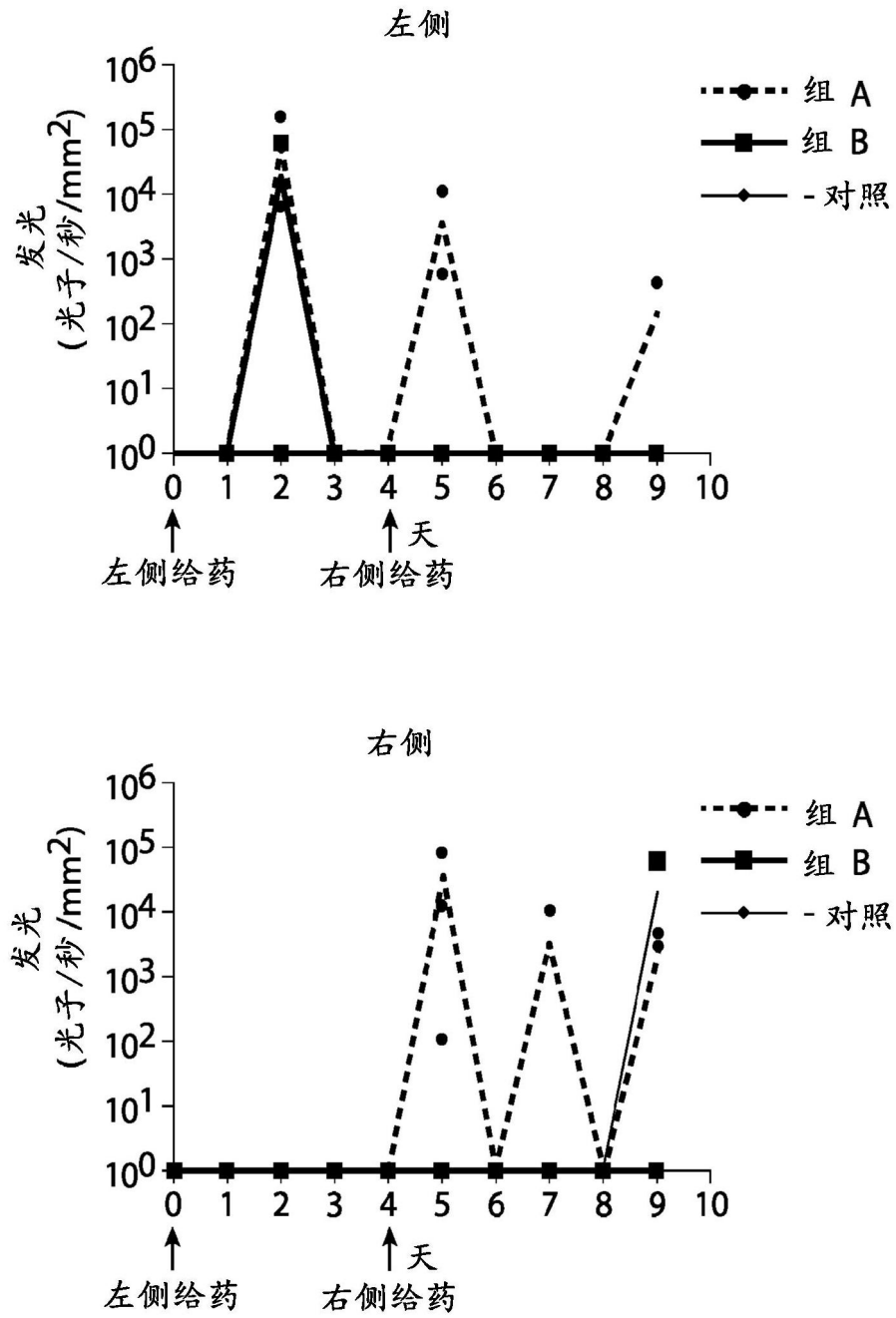


图27C

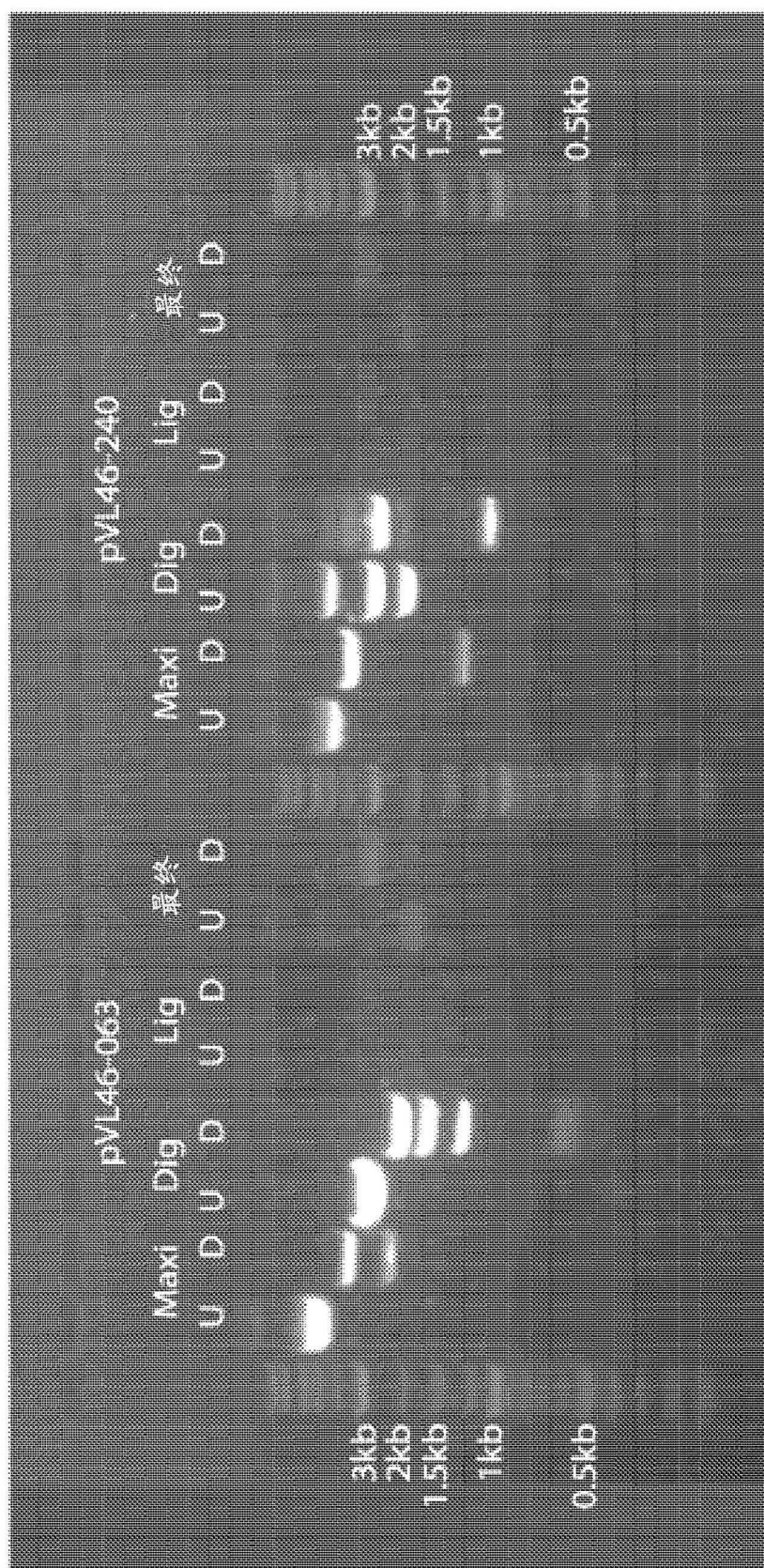


图28A

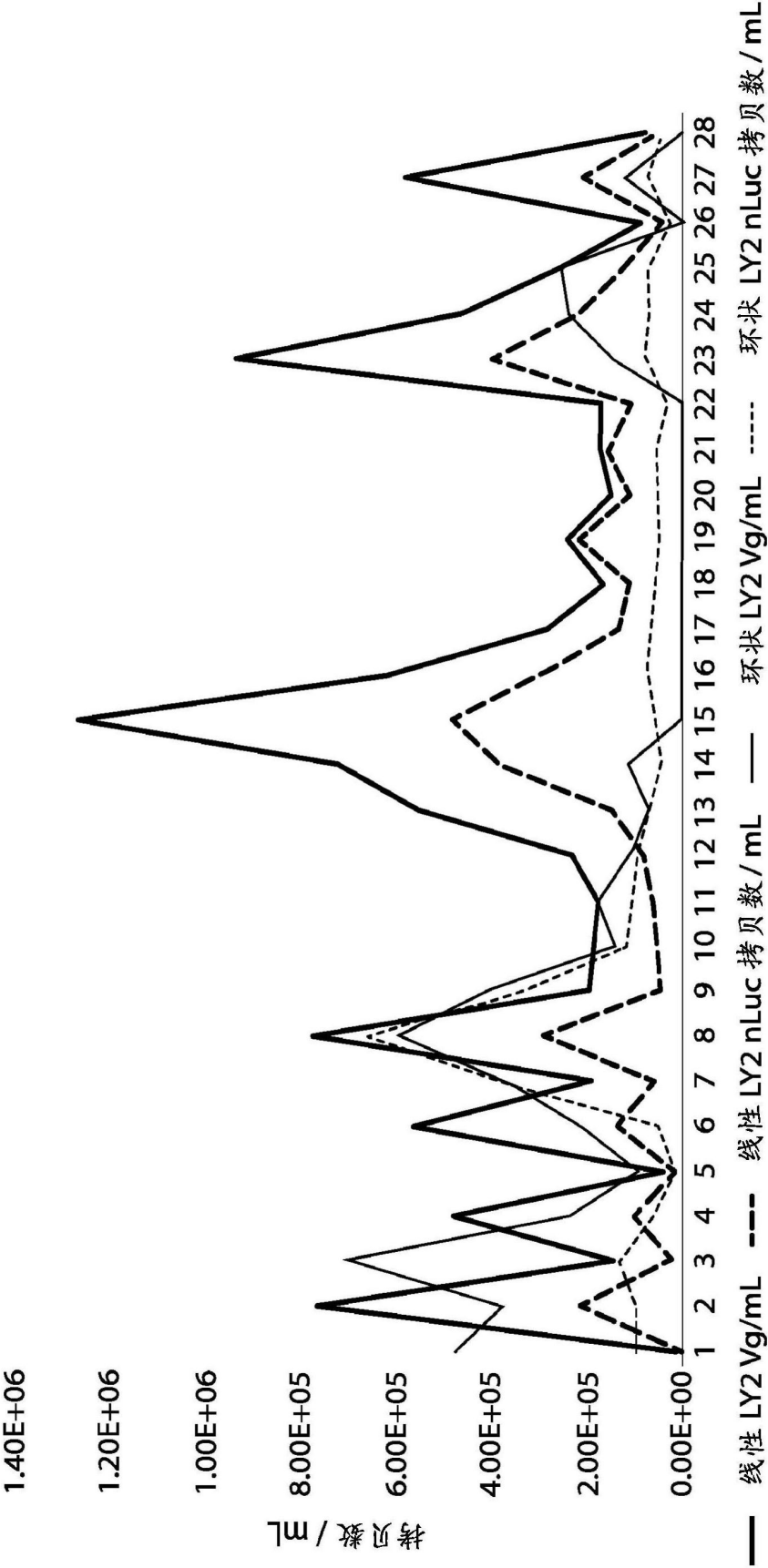


图28B

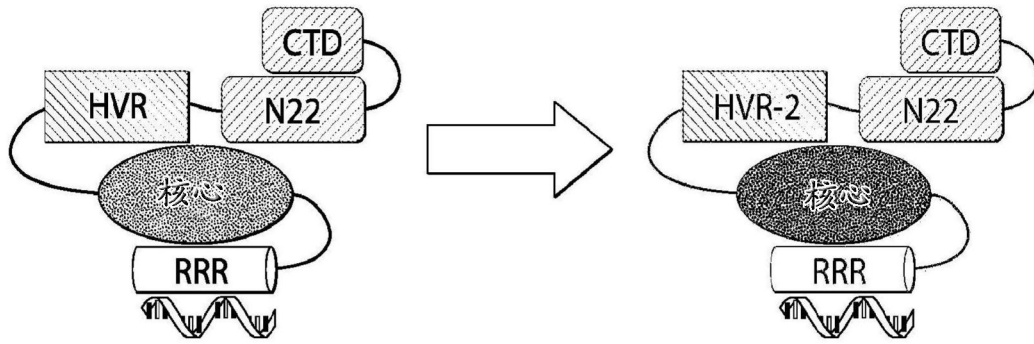


图28C

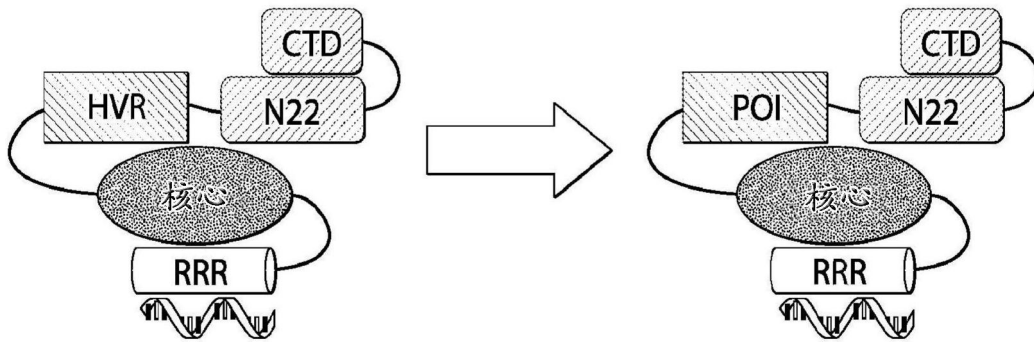


图28D

hEpo

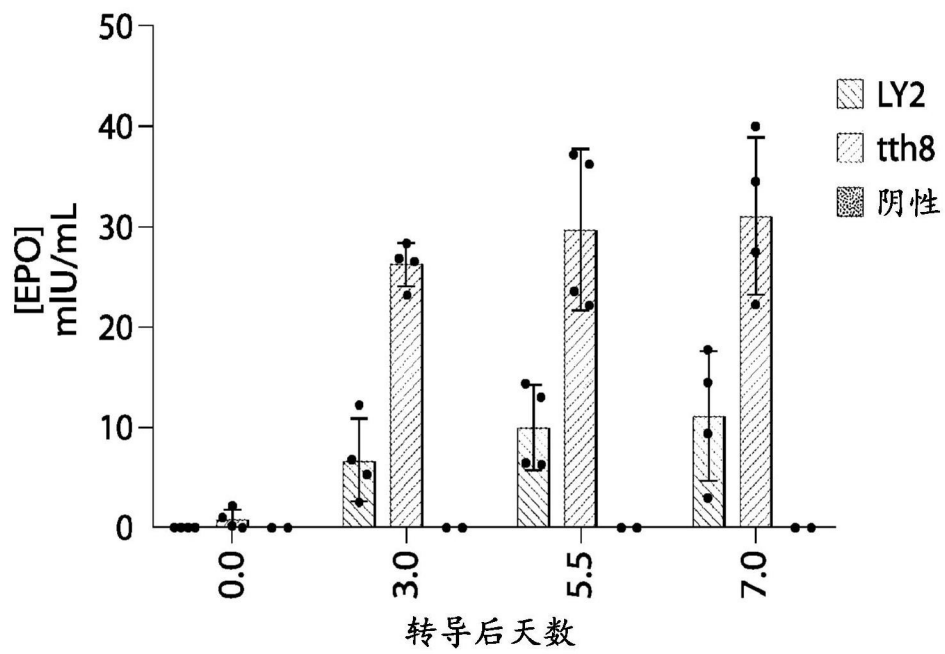


图29

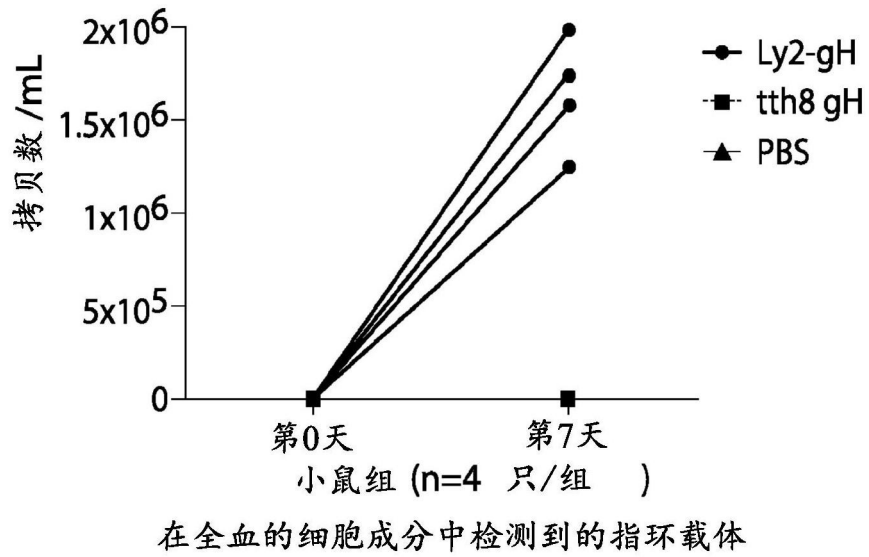


图30A

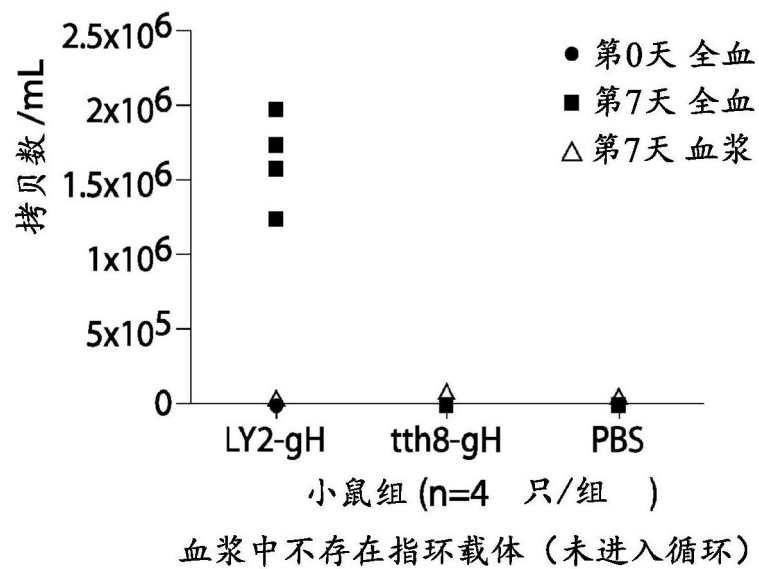


图30B

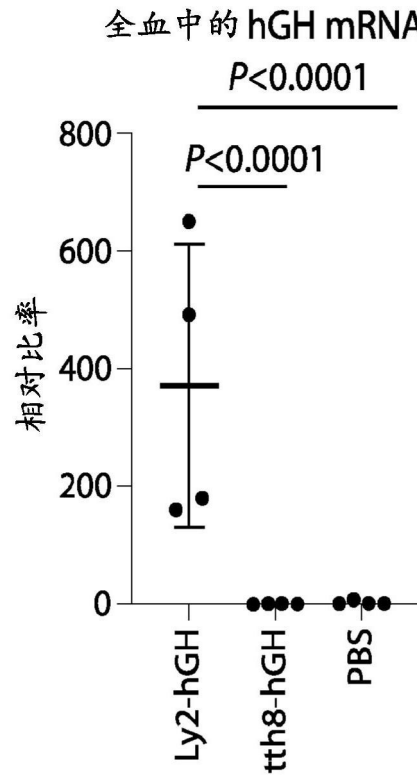


图31

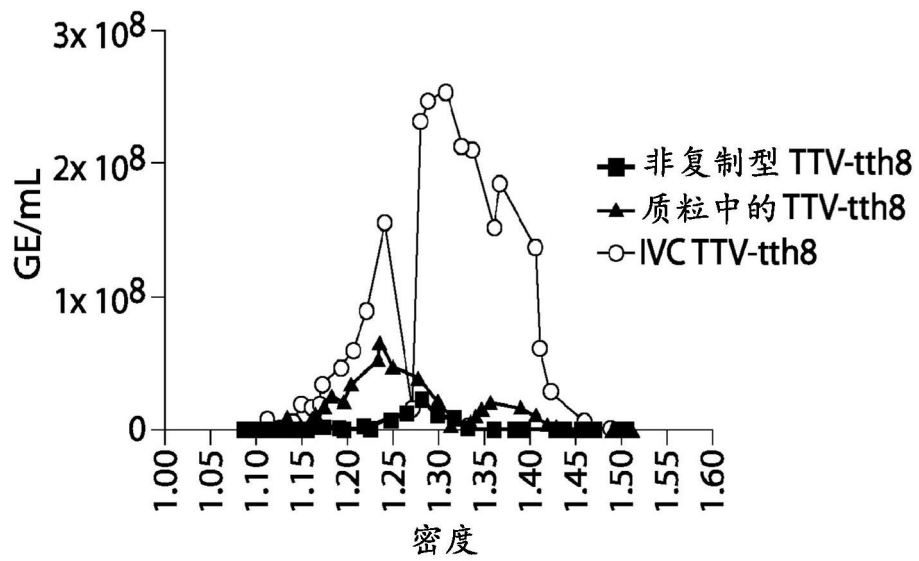


图32

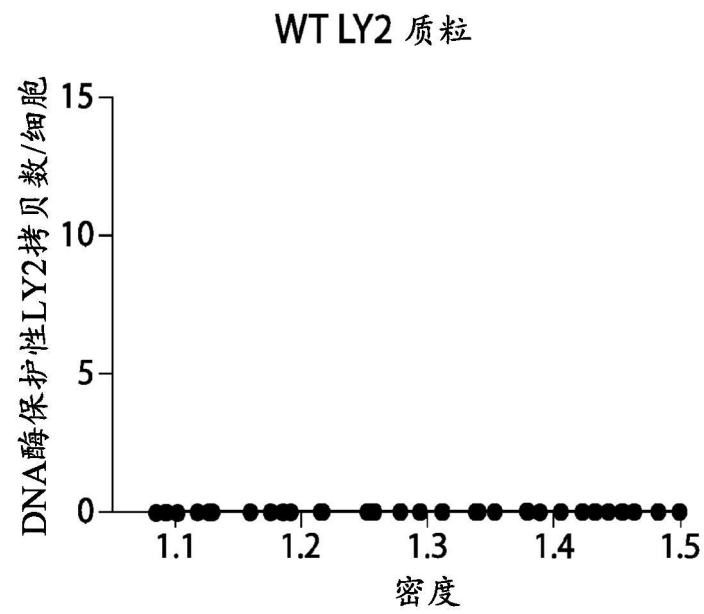
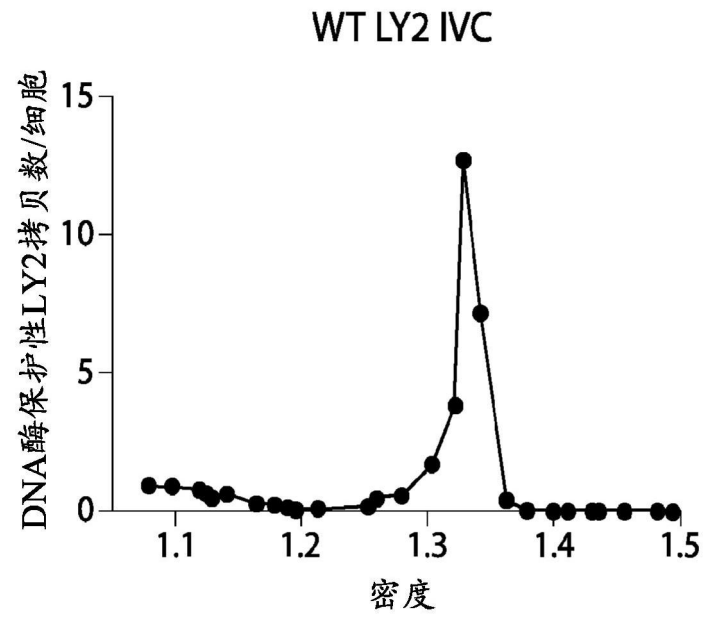


图33