(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108291211 A
(43)申请公布日 2018.07.17

(21)申请号 201680068697.3
(22)申请日 2016.11.21
(30)优先权数据
1520764.0 2015.11.24 GB
1609354.4 2016.05.26 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.24
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2016/078334 2016.11.21
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/089307 EN 2017.06.01
(71)申请人 葛兰素史密斯克莱知识产权发展有限公司
地址 英国米德尔塞克斯
(72)发明人 S.约翰逊 C.帕尔兰特 E.范瓦C.文克
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 曹立莉
(51)Int.Cl.
C12N 7/00(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)
C12N 15/86(2006.01)

权利要求书2页 说明书14页 附图3页

(54)发明名称

用于产生逆转录病毒的瞬时转染方法

(57)摘要

本发明涉及包含非哺乳动物复制起点且能够保持至少25千碱基(kb)DNA的核酸载体，其特征在于所述核酸载体包含编码以下的逆转录病毒核酸序列：gag和pol蛋白；和env蛋白或其功能性替代物。本发明还涉及使用所述核酸载体的瞬时转染的用途和方法。

CN 108291211 A

1.一种包含非哺乳动物复制起点且能够保持至少25千碱基(kb)DNA的核酸载体,其特征在于所述核酸载体包含编码以下的逆转录病毒核酸序列:

gag和pol蛋白,和

env蛋白或其功能性替代物,

其中每种逆转录病毒核酸序列以核酸载体内的单独表达构建体排列。

2.如权利要求1所述的核酸载体,还包含编码逆转录病毒载体颗粒的RNA基因组的核酸序列。

3.如权利要求1或2所述的核酸载体,还包含辅助基因rev或其类似基因或功能类似系统。

4.如权利要求1至3中任一项所述的核酸载体,其中载体选自:细菌人工染色体、酵母人工染色体、P1-衍生的人造染色体、福斯黏粒或黏粒。

5.如权利要求4所述的核酸载体,其中载体是细菌人工染色体。

6.如权利要求1至5中任一项所述的核酸载体,其中逆转录病毒核酸序列源自选自以下的逆转录病毒:慢病毒,α-逆转录病毒,γ-逆转录病毒或泡沫-逆转录病毒。

7.如权利要求6所述的核酸载体,其中逆转录病毒核酸序列源自选自以下的慢病毒:HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、EIAV和Visna。

8.如权利要求7所述的核酸载体,其中逆转录病毒核酸序列源自HIV-1。

9.如权利要求1至8中任一项所述的核酸载体,其中env蛋白或其功能性替代物源自水泡性口膜炎病毒。

10.如权利要求1至9中任一项所述的核酸载体,其还包含转录调控元件。

11.如权利要求10所述的核酸载体,其中转录调控元件为CMV启动子。

12.如权利要求1至11中任一项所述的核酸载体,其还包含绝缘子。

13.如权利要求12所述的核酸载体,其中绝缘子存在于各逆转录病毒核酸序列之间。

14.如权利要求1至13中任一项所述的核酸载体,其还包含一个或多个转基因。

15.如权利要求1至14中任一项所述的核酸载体,其还包含内部核糖体进入位点(IRES)。

16.如权利要求1至15中任一项所述的核酸载体,其还包含polyA信号。

17.如权利要求1至16中任一项所述的核酸载体,其还包含内含子序列。

18.如权利要求1至17中任一项所述的核酸载体,其还包含多克隆位点(MCS)。

19.如权利要求1至18中任一项所述的核酸载体,其用于生产逆转录病毒载体颗粒的方法中。

20.一种生产复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒的方法,包括:

(a)将权利要求1至18中任一项所述的核酸载体引入哺乳动物宿主细胞的培养物中;和

(b)在生产复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒的条件下培养所述哺乳动物宿主细胞。

21.如权利要求20所述的方法,其中哺乳动物宿主细胞是HEK 293细胞。

22.如权利要求20或21所述的方法,其中引入步骤(a)使用脂质转染、电穿孔或基于化学的转染方法进行,诸如磷酸钙处理。

23.如权利要求20至22中任一项所述的方法,其中培养步骤(b)通过在潮湿条件下温育哺乳动物宿主细胞来进行。

24.如权利要求20至23中任一项所述的方法，还包括分离复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒。

25.如权利要求24所述的方法，其中通过使用过滤器进行分离，诸如低蛋白结合膜。

26.如权利要求24或25所述的方法，其中复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒在引入步骤(a)后72小时内分离。

27.如权利要求26所述的方法，其中复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒在引入步骤(a)后48至72小时之间分离。

28.一种通过权利要求20至27中任一项所述的方法获得的复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒。

用于产生逆转录病毒的瞬时转染方法

技术领域

[0001] 本发明涉及包含产生逆转录病毒所需基因的核酸载体及其用途。还提供了制备包含如本文所述的核酸载体的复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒的方法。

背景技术

[0002] 在基因治疗中，将遗传物质递送至需要治疗的受试者中的内源性细胞。遗传物质可将新基因引入受试者，或引入预先存在的基因的附加拷贝，或引入存在于受试者中的基因的不同等位基因或变体。已经提出病毒载体系统作为用于基因治疗的有效基因递送方法(Verma和Somia(1997)Nature 389:239-242)。

[0003] 特别是，这些病毒载体是基于逆转录病毒家族成员的，因为它们能够将其基因载荷整合到宿主的基因组中。逆转录病毒载体被设计用于保留包装和递送逆转录病毒基因组所需的必需蛋白，但是除去了任何非必需辅助蛋白，包括引起疾病概况的那些。逆转录病毒载体的实例包括慢病毒载体，诸如基于人免疫缺陷病毒1型(HIV-1)的那些，由于它们能够整合到非增殖细胞中而被广泛使用。

[0004] 目前，大多数病毒载体是通过将病毒基因瞬时共转染到宿主细胞系中产生的。使用存在于宿主细胞中的细菌质粒仅在有限的时间段内导入病毒基因，因为病毒基因保留在质粒上并且不整合到基因组中。因此，瞬时转染的遗传物质在细胞分裂过程中不会传递给后代。

[0005] 然而，存在与目前使用的瞬时转染方法相关的几个问题，诸如批次间差异性、转染试剂的高成本和难以维持质量控制(参见Segura等，(2013)Expert Opin.Biol.Ther.13(7):987-1011)。转染过程本身也是劳动密集型的并且难以扩大规模。除去载体制备过程中遗留的质粒杂质也是困难的任务(参见Pichlmair等，(2007)J.Virol.81(2):539-47)。

[0006]

[0007] 因此，本发明的目的是提供一种瞬时转染的改进方法，其克服了与现有方法相关的一个或多个缺点。

发明内容

[0008] 本发明人开发了一种生产逆转录病毒载体的新方法，其涉及使用包含非哺乳动物复制起点并且能够保持至少25千碱基(kb)DNA的核酸载体，诸如包含逆转录病毒载体生产所必需的所有逆转录病毒基因的细菌人工染色体。瞬时转染的现有方法要求使用携带产生逆转录病毒所需的不同成分的3-4个独立质粒，将其引入宿主细胞中，这是费时的并导致与选择压力相关的问题。本发明人提出的方法将所有必需的逆转录病毒基因并入到单一构建体上，然后将其导入宿主细胞中，这减少了转导用于病毒载体生产的宿主细胞所需的材料的量。因此，这降低了成本，因为只使用单一载体，而不是使用多个质粒载体的先前方法。

[0009] 使用包含非哺乳动物复制起点并且能够保持至少25kb DNA(即，大型构建体DNA)的核酸载体具有几个优点。首先，可以先在非哺乳动物细胞(例如，微生物细胞，诸如细菌细

胞)而不是哺乳动物宿主细胞中操作载体,这使得它们更易于使用(例如,细菌人工染色体可以首先在大肠杆菌中操作)。一旦制备了核酸载体,就可以将其引入宿主细胞中,诸如哺乳动物宿主细胞,以用于产生逆转录病毒载体。

[0010] 因此,使用本发明的核酸载体在生成逆转录病毒载体方面提供了优势。

[0011] 因此,根据本发明的第一方面,提供了一种包含非哺乳动物复制起点和能够保持至少25千碱基(kb)DNA的核酸载体,其特征在于所述核酸载体包含编码以下的逆转录病毒核酸序列:

[0012] gag和pol蛋白,和

[0013] env蛋白或其功能性替代物。

[0014] 根据本发明的另一方面,提供了本文所定义的核酸载体在生产逆转录病毒载体颗粒的方法中的用途。

[0015] 根据本发明的另一方面,提供了一种生产复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒的方法,包括:

[0016] (a)将如本文所定义的核酸载体引入哺乳动物宿主细胞的培养物中;和

[0017] (b)在生产复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒的条件下培养哺乳动物宿主细胞。

[0018] 根据本发明的另一方面,提供了一种通过如本文所定义方法获得的复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒。

附图说明

[0019] 图1:构建BACpack-WTGP-277delU5和BACpack-SYNGP-277delU5的分步指南。

[0020] 图2:实施例2中获得的病毒滴度的比较。将10^6个HEK293T细胞接种在6孔板中。第二天,根据生产商说明书,将贴壁的细胞用PEI转染。细胞用总共4μg野生型(WT)慢病毒包装构建体(由pMDL.gp(GagPol)、pMD.G(VSVg)、pK-Rev(Rev)和pCCL.277(GFP转移载体)组成)转染,或用单独质粒上的2μg的BACpack(含有GagPol、VSVg和Rev的单一BAC构建体)加上2μg的eGFP转移载体转染。

[0021] 转染后48小时,收集上清液,通过0.22μm过滤器过滤并在-80℃下存储至少4小时。将HEK293T细胞以每孔10^5个细胞接种在24孔板中,以用于转导。第二天,将病毒上清液用聚凝胺进行系列稀释以8μg/ml的终浓度施加给细胞。转导后3天,通过胰蛋白酶处理收获细胞并通过FACS分析GFP。使用以下等式计算转导单位(TU)/mL的病毒滴度:

[0022] (GFP阳性细胞/100)×稀释因子×转导的细胞数量。

[0023] 在条形图上比较病毒滴度。所有温育在37℃和5%CO_2下进行。使用的培养基是补充有10%FBS和1μg/ml多西环素的DMEM,其在BACpack+转移样品中。

[0024] 图3:贴壁HEK293T细胞中BACpack的瞬时转染。使用磷酸钙法,用BACpackWTGP-277delU5、BACpackSYN-277delU5或标准4质粒系统瞬时转染HEK293T细胞。转染后16小时,所述+Dox条件用1μg/ml多西环素诱导24小时。转染后48小时收获病毒上清液,通过0.22μm过滤器过滤并通过转导HEK293T细胞进行滴定。GGF阳性转导的细胞用于计算转导单元/ml(TU/ml)。

具体实施方式

[0025] 定义

[0026] 除非另外定义，否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。本文提到的所有专利和出版物都通过引用整体并入。

[0027] 术语“包含(comprising)”涵盖了“包括(including)”或“由……组成(consisting)”，例如，“包含(comprising)”X的组合物可以仅由X组成或可以包括附加的某物，例如X+Y。

[0028] 术语“基本上由...组成”将特征的范围限制为具体的材料或步骤以及不会实质影响所要求保护的特征的基本特性的那些。

[0029] 术语“由.....组成”排除任何附加成分的存在。

[0030] 关于数值x的术语“约”是指例如x±10％、5％、2％或1％。

[0031] 术语“载体”或“核酸载体”是指能够将外来(即外源)遗传物质人工携带到另一个细胞中的媒介物，它可以在细胞中被复制和/或表达。载体的实例包括非哺乳动物核酸载体，诸如细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)、P1-衍生的人工染色体(PAC)、黏粒或福斯黏粒(fosmid)。

[0032] 载体的其他实例包括病毒载体，诸如逆转录病毒载体和慢病毒载体，其在本申请中特别感兴趣。慢病毒载体，诸如基于人类免疫缺陷病毒1型(HIV-1)的那些被广泛使用，因为它们能够整合到非增殖细胞中。通过将病毒基因组分开成分离的部分，例如通过置于不同的质粒上，可以使病毒载体复制缺陷。例如，由萨尔克生物研究所(Salk Institute for Biological Studies)开发的所谓的第一代慢病毒载体被构建为由安装表达盒、包膜(envelope)表达盒和载体表达盒组成的三质粒表达系统。“包装质粒”含有完整的gag-pol序列，调控(tat和rev)和辅助(vif、vpr、vpu、nef)序列。“包膜质粒”在巨细胞病毒(CMV)启动子的控制下保持用水泡性口膜炎病毒糖蛋白(VSVg)代替天然HIV-1包膜蛋白。第三个质粒(“转移质粒”)携带长末端重复序列(LTR)、包封序列(ψ)、Rev响应元件(RRE)序列和CMV启动子以在宿主细胞内表达转基因。

[0033] 第二代慢病毒载体的特征在于缺失了毒性序列vpr、vif、vpu和nef。包装载体被减少到gag、pol、tat和rev基因，因此增加了系统的安全性。

[0034] 为改进慢病毒系统，设计了第三代载体，即从包装构建体中去除tat基因并从载体盒中对LTR尽兴灭活，从而减少与插入诱变效应有关的问题。

[0035] 以下参考文献描述了各种慢病毒世代：第一代：Naldini等，(1996)Science272(5259):263-7；第二代：Zufferey等，(1997)Nat.Biotechnol.15(9):871-5；第三代：Dull等，(1998)J.Virol.72(11):8463-7，所有这些通过引用整体并入本文。关于慢病毒载体发展的综述可见于Sakuma等，(2012)Biochem.J.443(3):603-18和Picanço-Castro等，(2008)Exp.Opin.Therap.Patents18(5):525-539。

[0036] 术语“非哺乳动物复制起点”是指引发复制并源自非哺乳动物源的核酸序列。这使得本发明的核酸载体能够在合适的宿主细胞(例如，微生物细胞，诸如细菌或酵母细胞)中与内源染色体一起稳定复制和分离，从而使其可以传递给宿主细胞后代(除了当宿主细胞是哺乳动物宿主细胞时)。在哺乳动物宿主细胞中，具有非哺乳动物复制起点的核酸载体将整合到哺乳动物宿主细胞的内源染色体中或在哺乳动物宿主细胞复制时丢失。例如，具有非哺乳动物复制起点的核酸载体诸如细菌人工染色体(BAC)、P1-衍生的人工染色体(PAC)、

黏粒或福斯黏粒能够在细菌细胞(诸如大肠杆菌)中与内源染色体一起稳定复制和分离,但是如果将它们引入哺乳动物宿主细胞,BAC、PAC、黏粒或福斯黏粒将整合或在哺乳动物宿主细胞复制时丢失。酵母人工染色体(YAC)能够在酵母细胞中与内源染色体一起稳定复制和分离,然而如果它们被引入哺乳动物宿主细胞,YAC将整合或在哺乳动物宿主细胞复制时丢失。因此,在本文中,本发明的核酸载体作为DNA存储库(即,对于产生逆转录病毒所必需的基因),其可容易地转移到哺乳动物细胞中以产生逆转录病毒载体颗粒。非哺乳动物复制起点的实例包括:细菌的复制起点,诸如oriC、oriV或oriS;病毒的复制起点,诸如SV40的复制起点;或酵母的复制起点,也称为自主复制序列(ARS元件)。

[0037] 本发明的核酸载体包含非哺乳动物的复制起点并且能够保持至少25千碱基(kb)的DNA。在一个实施方案中,核酸载体能够保持至少30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340或350kb的DNA。应该理解的是,提及"保持能力"具有其通常的含义,并且暗示核酸载体的插入片段大小的上限不小于要求保护的大小(即不小于25kb的DNA)。

[0038] 本发明的目的是在单一构建体(即核酸载体)中包含逆转录病毒包装所必需的基因。因此,本发明的核酸载体必须能够保持大的DNA插入片段。为避免疑义,应理解的是,提及"核酸载体"或"人工染色体"不是指天然细菌质粒(例如,诸如目前在瞬时转染方法中使用的质粒),因为它们不能够保持至少25kb的DNA。质粒可包含的最大尺寸插入片段约为15kb。此类核酸载体也不是指通常仅保留5-11kb的最大插入片段的噬菌体。因此,在一个实施方案中,本发明的核酸载体不是质粒、噬菌体或附加体。

[0039] 术语"内源染色体"是指在产生或引入外源核酸载体诸如细菌人工染色体之前在宿主细胞中发现的基因组染色体。

[0040] 如本文所用,术语"转染(transfection)"、"转化(transformation)"和"转导(transduction)"可用于描述将非哺乳动物或病毒的载体插入靶细胞。插入载体通常称为细菌细胞转化和真核细胞转染,尽管插入病毒载体也可称为转导。本领域技术人员将了解通常使用的不同的非病毒转染方法,其包括但不限于使用物理方法(例如,电穿孔、细胞挤压(cell squeezing)、声致穿孔、光学转染、原生质体融合、撞击转染(impalefection)、磁转染、基因枪或颗粒轰击)、化学试剂(例如,磷酸钙、高度支化的有机化合物或阳离子聚合物)或阳离子脂质(例如,脂质转染)。许多转染方法需要使质粒DNA溶液接触细胞,然后使其生长并选择用于标记基因表达。

[0041] 术语"启动子"是指驱动基因表达的序列。为了驱动高水平表达,使用高效启动子诸如非逆转录病毒高效启动子可以是有益的。合适的启动子的实例可以包括诸如人巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、脾病灶形成病毒(SFFV)启动子、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子或人延伸因子1-α(pEF)启动子。

[0042] 术语"polyA信号"是指聚腺苷酸化信号序列,例如置于转基因的3',其使得宿主因子能够在转录期间将聚腺苷(polyA)尾部添加至新生mRNA的末端。polyA尾部是一段多达300个腺苷核糖核苷酸的序列,其保护mRNA免于酶促降解并且还有助于翻译。因此,本发明的核酸载体可以包括polyA信号序列,诸如人β珠蛋白或兔β珠蛋白polyA信号、猿病毒40(SV40)早期或晚期polyA信号、人胰岛素polyA信号或牛生长激素polyA信号。在一个实施方

案中，polyA信号序列是人β珠蛋白polyA信号。

[0043] 术语“内含子序列”是指通过RNA剪接从最终基因产物中除去的核苷酸序列。已经显示在增强子/启动子区域的下游和cDNA插入片段的上游使用内含子可以增加基因表达的水平。表达的增加取决于特定的cDNA插入片段。因此，本发明的核酸载体可以包括内含子，例如人β珠蛋白内含子、兔β珠蛋白内含子II或嵌合人β珠蛋白-免疫球蛋白内含子。在一个实施方案中，内含子是人β珠蛋白内含子和/或兔β珠蛋白内含子II。

[0044] 术语“包装细胞系”是指能够表达gag和pol蛋白和包膜糖蛋白基因的细胞系。或者，术语“生产细胞系”是指能够表达含有感兴趣的转基因的转移载体的包装细胞系。

[0045] 术语“瞬时转染的”是指其中靶核酸(即逆转录病毒基因)不是永久地并入细胞基因组中的转染的细胞。因此，核酸在细胞中的效应仅持续少量的时间。

[0046] 核酸载体

[0047] 根据本发明的一个方面，提供了包含非哺乳动物复制起点和能够保持至少25千碱基(kb)DNA的核酸载体，其特征在于所述核酸载体包含编码以下的逆转录病毒核酸序列：

[0048] gag和pol蛋白，和

[0049] env蛋白或其功能性替代物。

[0050] 具体而言，每种逆转录病毒核酸序列可作为核酸载体内的单独表达构建体排列。

[0051] 本发明人已经发现，本文描述的核酸载体可用于产生逆转录病毒载体颗粒，其改善了先前与逆转录病毒载体生产方法有关的困难。例如，通过在核酸载体中包含所有必需的逆转录病毒基因，然后可以在一个单一步骤中将逆转录病毒基因引入哺乳动物宿主细胞中。因此，如本文所提出的，使用核酸载体允许快速生产载体并减少逆转录病毒载体生产所需的材料的量。

[0052] 在一个实施方案中，核酸载体另外包含编码逆转录病毒载体颗粒的RNA基因组的核酸序列。应该理解，逆转录病毒载体颗粒的RNA基因组通常被包括在用于瞬时转染方法的“转移载体”上。转移载体质粒通常含有启动子(诸如CMV)、3’LTR(可以是或不是自失活的(即SIN)3’-LTR)、5’LTR(可以包含或不包含U5区域)、壳体化序列(ψ)和与启动子连接的潜在的转基因。

[0053] 在一个实施方案中，逆转录病毒载体颗粒(即转移载体)的RNA基因组的多个拷贝被包含在核酸载体中。预期转移载体的多个拷贝会导致更高的病毒载体滴度。例如，核酸载体可以包括逆转录病毒载体颗粒(即转移载体)的RNA基因组的两个或更多个，诸如三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个或更多个拷贝。

[0054] 在一个实施方式中，核酸载体含有一个或多个重组位点。重组酶在两个重组位点之间催化重组反应。

[0055] 本领域已知许多类型的位点特异性重组系统，并且可以在本发明中使用任何合适的重组系统。例如，在一个实施方案中，重组位点选自或源自λ噬菌体的int/att系统、噬菌体P1的Cre/lox系统、酵母的FLP/FRT系统、噬菌体Mu的Gin/gix重组酶系统、Cin重组酶系统、大肠杆菌的Pin重组酶系统和pSR1质粒的R/RS系统或其任何组合。在另一个实施方案中，重组位点是att位点(例如来自λ噬菌体)，其中att位点允许在λ整合酶存在下的定点整合。应该理解的是，对“λ整合酶”的引用包括对仍与int/att系统相容的突变体整合酶的引用，例如在WO 2002/097059中描述的经修饰的λ整合酶。

[0056] 在一个实施方案中，核酸载体选自：细菌人工染色体(BAC)、酵母人工染色体(YAC)、P1-衍生人工染色体(PAC)、福斯黏粒或黏粒。在另一个实施方案中，核酸载体是细菌人工染色体(BAC)。

[0057] 细菌人工染色体

[0058] 术语“细菌人工染色体”或“BAC”是指源自细菌质粒的DNA构建体，该细菌质粒能够保持大型的外源DNA插入片段。它们通常可以保持约350kb的最大DNA插入片段。BAC是从被充分表征的细菌功能性致育质粒(F-质粒)发展来的，F-质粒含有促进质粒在细菌细胞分裂后均匀分布的分配基因。这使得BAC可以与内源细菌基因组(诸如大肠杆菌)一起被稳定复制和分离。BAC通常含有至少一个复制起点拷贝(诸如oriS或oriV基因)、repE基因(用于质粒复制和拷贝数调控)和分配基因(诸如sopA、sopB、parA、parB和/或parC)这确保了BAC在细菌细胞中的稳定维持。BAC是天然圆形的和超螺旋的，这使得它们比线性人工染色体诸如YAC更容易恢复。它们也可以使用简单的方法诸如电穿孔相对容易地被导入细菌宿主细胞。

[0059] 在一个实施方案中，细菌人工染色体包含oriS基因。在一个实施方案中，细菌人工染色体包含repE基因。在一个实施方案中，细菌人工染色体包含分配基因。在另一个实施方案中，分配基因选自sopA、sopB、parA、parB和/或parC。在又一个实施方案中，细菌人工染色体包含sopA和sopB基因。

[0060] 用于本发明的BAC可以从商业来源获得，例如来自LUCIGEN™的pSMART BAC(完整骨架序列参见Genome登录号EU101022.1)。该BAC含有L-阿拉伯糖“拷贝”系统，其也含有oriV中等拷贝复制起点，其仅在TrfA复制蛋白存在下才有活性。TrfA的基因可以在阿拉伯糖诱导型启动子araC-P_{BAD}的控制下整合到细菌宿主细胞的基因组(参见Wild等，(2002)Genome Res.12(9):1434-1444)。L-阿拉伯糖的添加诱导TrfA的表达，TrfA激活oriV，导致质粒复制多达每个细胞50个拷贝。

[0061] 酵母人工染色体

[0062] 术语“酵母人工染色体”或“YAC”是指其中酵母DNA被整合到细菌质粒中的染色体。它们含有自主复制序列(ARS)(即复制起点)、着丝粒和端粒。与BAC不同，YAC是线性的，因此在染色体的每个末端含有酵母端粒，以在它传递到宿主细胞后代时保护末端免于降解。YAC可以保持一定范围的DNA插入片段大小；从100-2000kb的任何大小。

[0063] P1-衍生人工染色体

[0064] 术语“P1-衍生人工染色体”或“PAC”是指来源于P1-噬菌体和细菌F-质粒的DNA的DNA构建体。它们通常可以保持大约100-300kb的最大DNA插入片段，并用作大肠杆菌中的克隆载体。PAC具有与BAC类似的优点，例如易于纯化并引入细菌宿主细胞。

[0065] 黏粒和福斯黏粒

[0066] 术语“黏粒”是指源自细菌质粒的DNA构建体，其另外含有源自噬菌体λ的cos位点。黏粒通常含有细菌复制起点(诸如oriV)、选择标记、克隆位点和至少一个cos位点。黏粒通常可以接受40-45kb的最大DNA插入片段。已证明黏粒在传染大肠杆菌细胞方面比标准细菌质粒更有效。术语“福斯黏粒”是指与黏粒类似的非哺乳动物核酸载体，除了其基于细菌F-质粒之外。特别是，他们使用F-质粒的复制起点和分配机制来允许克隆大的DNA片段。福斯黏粒通常可以接受40kb的最大DNA插入片段。

[0067] 逆转录病毒

[0068] 逆转录病毒是含有假二倍体单链RNA基因组的病毒家族。他们编码逆转录酶，其从RNA基因组产生DNA，然后该DNA可插入宿主细胞DNA。本文所述的发明可用于产生复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒。本发明的逆转录病毒载体颗粒可以选自或源自任何合适的逆转录病毒。

[0069] 在一个实施方案中，逆转录病毒载体颗粒源自或选自慢病毒，α-逆转录病毒，γ-逆转录病毒或泡沫-逆转录病毒，诸如慢病毒或γ-逆转录病毒，特别是慢病毒。在另一个实施方案中，逆转录病毒载体颗粒是选自HIV-1、HIV-2、SIV、FIV、EIAV和Visna的慢病毒。慢病毒能够传染不分裂(即静止)的细胞，这使得它们成为用于基因治疗的有吸引力的逆转录病毒载体。在又一个实施方案中，逆转录病毒载体颗粒是HIV-1或源自HIV-1。某些逆转录病毒的基因组结构可以在本领域中找到。例如，关于HIV-1的细节可以从NCBI Genbank(Genome登录号AF033819)中找到。HIV-1是最好理解的逆转录病毒之一，因此经常用作逆转录病毒载体。

[0070] 逆转录病毒基因

[0071] 所有逆转录病毒共有的核酸序列可以更详细地解释如下：

[0072] 长末端重复序列(LTR)：逆转录病毒基因组的基本结构包含5'-LTR和3'-LTR，产生逆转录病毒所需的基因位于其间或其中。LTR是逆转录病毒整合和转录所必需的。它们也可以作为启动子序列来控制逆转录病毒基因的表达(即，它们是顺式作用基因)。LTR由三个划分为U3、R、U5的亚区组成：U3来源于RNA3'末端特有的序列；R来源于在RNA两端重复的序列；U5来源于RNA5'末端特有的序列。因此，在一个实施方案中，核酸载体另外包含5'-和3'-LTR。在另一个实施方案中，可以删除5'LTR的U5区并用非HIV-1polyA尾部替换(参见Hanawa等，(2002)Mol.Ther.5(3):242-51)。

[0073] 为了解决与生成具有复制能力的病毒有关的安全性问题，已经通过删除3'LTR的U3区中的一个区段开发了一种自身失活型(SIN)载体，所述U3区包括TATA盒和转录因子Sp1和NF-κB的结合位点(参见Miyoshi等，(1998)J.Virol.72(10):8150-7)。在逆转录并整合到传染的细胞中后，该缺失被转移到5'LTR中，导致LTR的转录失活。这被称为基于自身失活型慢病毒的载体系统，其可以包括在本发明中。

[0074] ψ：借助位于逆转录病毒基因组5'末端的ψ(psi)序列发生逆转录病毒RNA的壳体化。本领域中众所周知的是，psi序列下游并延伸到gag编码区中的序列涉及有效的逆转录病毒载体产生(参见Cui等，(1999)J.Virol.73(7):6171-6176)。在一个实施方案中，核酸载体另外包含Ψ(psi)序列。

[0075] 引物结合位点(PBS)：逆转录病毒基因组含有在5'-LTR的U5区之后存在的PBS。该位点结合启动逆转录所需的tRNA引物。在一个实施方案中，核酸载体另外包含PBS序列。

[0076] PPT：逆转录病毒基因组在逆转录病毒基因组的3'末端附近包含称为多嘌呤片段(PPT)的短延伸嘌呤。这些PPT在逆转录过程中起到用于正链DNA合成的RNA引物的作用。复杂的逆转录病毒(诸如HIV-1)含有第二个更位于中心的PPT(即，中心聚嘌呤区(cPPT))，其提供了用于启动DNA合成的第二个位点。已显示编码cPPT的逆转录病毒载体具有增强的转导和转基因表达(参见Barry等，(2001)Hum.Gene Ther.12(9):1103-8)。在一个实施方案中，核酸载体另外包含3'-PPT序列和/或cPPT序列。

[0077] 上述非编码区的基因组结构是本领域技术人员所熟知的。例如，关于HIV-1中非编

码区的基因组结构的细节可以从NCBI Genbank的Genome登录号AF033819中找到，或对于HIV-1HXB2(常用的HIV-1参考菌株)为Genome登录号K03455。在一个实施方案中，非编码区来源于Genome登录号K03455处的序列，例如来自碱基对454-1126(对于R-U5-PBS-Gag)，7622-8479(对于RRE)或7769-8146(对于RRE)，4781-4898(对于cPPT)，9015-9120和9521-9719(对于dNEF-PPT-sinU3-R-U5)。

[0078] Gag/pol:gag和pol基因的表达依赖于gag和gagpol之间的翻译移码。两者都是在成熟过程中被切割的多蛋白。逆转录病毒载体的主要结构基质、衣壳和核衣壳蛋白由gag编码。pol基因编码逆转录病毒酶:i)逆转录酶，逆转录酶对逆转录病毒RNA基因组向双链DNA的逆转录至关重要;ii)整合酶，其使逆转录病毒DNA基因组整合至宿主细胞染色体;以及iii)蛋白酶，其裂解合成的多蛋白以产生逆转录病毒的成熟和功能性蛋白。在一个实施方案中，编码gag和pol蛋白的逆转录病毒核酸序列来源于HIV-1HXB2序列，其可从Genome登录号K03455获得，例如从碱基对790-5105获得。

[0079] Env:env(“包膜”)基因编码逆转录病毒包膜的表面和跨膜成分(例如HIV-1的糖蛋白gp120和gp41)并参与逆转录病毒-细胞膜融合。为了拓宽逆转录病毒载体的组织嗜性，本文所述的逆转录病毒载体可以用来自另一种病毒的包膜蛋白假型化。假型化是指通过改变逆转录病毒载体颗粒上的糖蛋白(GP)，逆转录病毒载体(包括慢病毒载体)的宿主细胞范围可以被扩展或改变的过程(例如，通过使用从其他包膜病毒获得或来源自其他包膜病毒的GP或使用合成/人工GP)。由于其广泛的嗜性和高载体颗粒稳定性，用于假型化逆转录病毒载体的最常用的糖蛋白是水泡性口膜炎病毒GP(VSVg)。然而，本领域技术人员应该理解，其他糖蛋白可以用于假型化(参见Cronin等，(2005)Curr.Gene Ther.5(4):387-398，其全部内容通过引用并入本文)。用于假型化的病毒的选择还可取决于待靶向的细胞和/或器官的类型，因为已经显示一些假型具有组织类型偏好。

[0080] 在一个实施方案中，env蛋白或其功能替代物是从选自以下的病毒获得或来源自选自以下的病毒:水泡病毒属(例如水泡性口膜炎病毒)，狂犬病病毒属(例如，狂犬病病毒、莫克拉病毒(Mokola virus))，沙粒病毒(例如，淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV))，甲病毒属(例如，罗斯河病毒(RRV)、辛德毕斯病毒、塞姆利基森林病毒(SFV)、委内瑞拉马脑炎病毒)，线状病毒(例如，埃博拉病毒雷斯顿株、埃博拉病毒扎伊尔株、拉沙病毒)，α逆转录病毒属(例如，禽白血病病毒(ALV))，β逆转录病毒属(例如，绵羊肺腺瘤逆转录病毒(JSRV))，γ逆转录病毒(例如，莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)，长臂猿白血病病毒(GALV)、猫内源性逆转录病毒(RD114))，δ-逆转录病毒(例如人嗜T淋巴细胞病毒1型(HTLV-1))，泡沫病毒属(例如人泡沫病毒)，慢病毒(例如梅迪-维斯纳病毒(MVV))，冠状病毒(例如SARS-CoV)，呼吸道病毒(例如，仙台病毒、呼吸道合胞体病毒(RSV))，丙型肝炎病毒属(例如丙型肝炎病毒(HCV))，流感病毒(例如A型流感病毒)和核型多角体病毒(例如苜蓿银纹夜蛾多核多角体病毒(AcMNPV))。在另一个实施方案中，env蛋白或其功能性替代物得自或来自水泡性口膜炎病毒。在该实施方案中，可以使用水泡性口膜炎病毒糖蛋白(VSVg)的蛋白，其使逆转录病毒颗粒传染更广泛的宿主细胞范围并消除重组产生野生型包膜蛋白的机会。在另一个实施方案中，编码env蛋白或其功能性替代物的逆转录病毒核酸序列来自Genome登录号J02428.1处的序列，例如来自碱基对3071至4720。

[0081] 本文所述的结构基因对于所有逆转录病毒都是共同的。其他辅助基因可存在于不

同类型的逆转录病毒中。例如，慢病毒，诸如HIV-1，含有另外六种称为rev、vif、vpu、vpr、nef和tat的辅助基因。其他逆转录病毒可能具有与本文描述的基因类似的辅助基因，然而它们可能并不总是被赋予与文献中相同的名称。诸如Tomonaga和Mikami(1996)J.Gen.Virol.77(Pt8):1611-1621描述了各种逆转录病毒辅助基因。

[0082] Rev:辅助基因rev("病毒粒子的调节子")编码与Rev应答元件(RRE)结合并促进逆转录病毒转录物输出的辅助蛋白。该基因的蛋白产物允许含有Rev应答元件(RRE)的逆转录病毒mRNA片段从细胞核输出到细胞质中。预测RRE序列以形成复杂的折叠结构。rev的这一特殊作用反映了拼接和核输出步骤的紧密结合。在一个实施方案中，核酸载体包含RRE序列。在另一个实施方案中，RRE序列来自HIV-1HXB2序列，其可从Genome登录号K03455处获得，例如从碱基对7622至8479或7769至8146，特别是碱基对7622至8479。

[0083] Rev与RRE结合并促进单一剪接(env、vif、vpr和vpu)或非剪接(gag、pol和基因组RNA)病毒转录物的输出，从而导致下游事件如基因翻译和包装(参见Suhasini和Reddy(2009)Curr.HIV Res.7(1):91-100)。在一个实施方案中，核酸载体另外包含辅助基因rev或类似它的基因(即，来自其它逆转录病毒或功能类似系统)。包含rev基因确保了逆转录病毒载体基因组的RNA转录物从细胞核有效地输出到细胞质，特别是如果RRE元件也包含在待转运的转录物中。在另一个实施方案中，rev基因与Genome登录号M11840(即HIV-1克隆12cDNA，HIVPCV12基因座)的碱基对970至1320具有至少60％序列同一性，诸如至少70％序列同一性。在可选的实施方案中，rev基因与Genome登录号K03455.1(即人类免疫缺陷病毒1型，HXB2)的碱基对5970至6040和8379至8653具有至少60％序列同一性，诸如至少70％、80％、90％或100％序列同一性。

[0084] 辅助基因被认为在逆转录病毒复制和发病机制中起作用，因此许多当前的病毒载体生产系统不包括这些基因中的一些。通常存在的rev是一个例外，或者可使用类似于rev/RRE系统的系统。因此，在一个实施方案中，编码一种或多种辅助基因vpr、vif、vpu、tat和nef或类似辅助基因的核酸序列被破坏，使得所述辅助基因从逆转录病毒载体颗粒的RNA基因组中被去除或不能编码功能辅助蛋白。在另一个实施方案中，至少两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种或全部辅助基因vpr、vif、vpu、tat和nef或类似辅助基因被破坏，使得所述辅助基因从逆转录病毒载体颗粒的RNA基因组中被去除或不能编码功能辅助蛋白。去除功能辅助基因可不需要去除整个基因;除去部分基因或破坏基因就足够了。

[0085] 应该理解，编码复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒的核酸序列可以与逆转录病毒载体颗粒所基于的逆转录病毒的野生型基因相同或来源于该逆转录病毒的野生型基因，即，序列可以是包含在野生型病毒中的遗传上或其他方式改变版本的序列。因此，引入核酸载体或宿主细胞基因组中的逆转录病毒基因也可以指野生型基因的密码子优化版本。

[0086] 附加成分

[0087] 本发明的核酸载体可以包含另外的附加成分。例如，可以使用这些附加特征例如来帮助稳定转录物进行翻译，增加基因表达水平并打开/关闭基因转录。

[0088] 本发明产生的逆转录病毒载体颗粒可用于基因治疗的方法中。因此，在一个实施方案中，核酸载体另外包含一种或多种转基因。该转基因可以是治疗活性基因，其编码可用于治疗或改善靶疾病的基因产物。转基因可编码例如反义RNA、核酶、蛋白(例如肿瘤抑制蛋白)、毒素、抗原(其可用于诱导抗体或辅助性T细胞或细胞毒性T细胞)或抗体(诸如单链抗

体)。在一个实施方案中,转基因编码β珠蛋白。

[0089] 预期含有转基因的转移载体的多个拷贝导致更高的逆转录病毒载体滴度,因此在一个实施方案中,核酸载体包含转基因的多个拷贝,例如两个或更多个,特别是三个或更多个转基因的拷贝。在一些情况下,需要多于一种的基因产物来治疗疾病,因此在另一个实施方案中,核酸载体附加地包含两种或更多种,诸如三种或更多种或四种或更多种不同的转基因。

[0090] 本文中提到的"转基因"是指异源或外源DNA,其在其被导入的哺乳动物宿主细胞中不存在或未充分表达。这可包括,例如,当靶基因在哺乳动物宿主细胞中没有正确表达时,因此导入了靶基因的修正版本作为转基因。因此,转基因可以是具有潜在治疗意义的基因。转基因可已经从另一种细胞类型或其他物种获得,或合成制备。或者,转基因可已从宿主细胞获得,但可操作地连接至与天然基因中存在的那些不同的调控区。或者,转基因可以是存在于宿主细胞中的基因的不同等位基因或变体。

[0091] 基因治疗的目的是为了治疗目的而修饰活细胞的遗传物质,并且它涉及将功能基因插入细胞中以达到治疗效果。使用本文所述的核酸载体和宿主细胞产生的逆转录病毒载体可以用于转染靶细胞并诱导具有潜在治疗意义的基因的表达。因此逆转录病毒载体可用于治疗患有包括但不限于遗传性疾病、癌症和某些病毒感染的病症的哺乳动物受试者,诸如人受试者。

[0092] 在一个实施方案中,核酸载体另外包含转录调控元件。例如,本文描述的任何元件可以可操作地连接至启动子,以便可以控制表达。本文提及的启动子可以包括已知的启动子(完整的或一部分),其可以是持续性活化的或可诱导的,例如,在调控蛋白存在的情况下。在一个实施方案中,核酸载体另外包含高效启动子,诸如CMV启动子。该启动子具有促进在非哺乳动物核酸载体上编码的元件的高水平表达的优点。在另一个实施方案中,CMV启动子包含源自人巨细胞病毒株AD169的序列。该序列可从Genome登录号X17403处获得,例如从碱基对173731至174404。

[0093] 在一个实施方案中,核酸载体另外包含绝缘子,诸如染色质绝缘子。术语"绝缘子"是指阻断启动子和增强子之间相互作用的基因序列。在另一个实施方案中,绝缘子(诸如染色质绝缘子)存在于每个逆转录病毒核酸序列之间。这有助于防止相邻逆转录病毒核酸序列之间的启动子干扰(即,来自一个转录单元的启动子削弱相邻转录单元的表达)。将理解的是,如果绝缘子存在于各逆转录病毒核酸序列之间的核酸载体中,那么它们可以作为核酸载体内的单独表达构建体排列。例如,编码逆转录病毒核酸序列的每个序列都具有其自身的启动子和/或内含子和/或polyA信号。在一个实施方案中,染色质绝缘子与鸡(Gallus gallus)HS4绝缘子序列(例如参见Genome登录号U78775.2,碱基对1至1205)具有至少90%的序列同一性,例如至少95%的序列同一性。

[0094] 在一个实施方案中,核酸载体另外包含polyA信号。polyA信号的使用具有保护mRNA免于酶促降解并帮助翻译的优点。在另一个实施方案中,polyA信号得自或源自SV40、牛生长激素和/或人β珠蛋白40。在一个实施方案中,polyA信号源自SV40早期polyA信号(例如参见Genome登录号EF579804.1,来自负链的碱基对2668至2538)。在一个实施方案中,polyA信号源自人β珠蛋白polyA信号(例如,参见Genome登录号GU324922.1,碱基对3394至4162)。

[0095] 在一个实施方案中，核酸载体另外包含内含子序列。已知在增强子/启动子区下游和cDNA插入片段(即转基因)上游使用内含子增加了插入片段的表达水平。在另一个实施方案中，内含子序列是人β珠蛋白内含子或兔β珠蛋白内含子II序列。在一个实施方案中，人β珠蛋白内含子源自Genome登录号KM504957.1处的序列(例如来自碱基对476至1393)。在一个实施方案中，兔β珠蛋白内含子II源自Genome登录号V00882.1处的序列(例如，来自碱基对718至1290)。

[0096] 在一个实施方案中，核酸载体另外包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。WPRE的存在已经显示出增强表达，因此可有利于获得高水平的表达。在另一个实施方案中，WPRE源自Genome登录号J04514.1处可获得的序列(例如，来自碱基对1093至1684)。

[0097] 在一个实施方案中，核酸载体另外包含内部核糖体进入位点(IRES)。IRES是结构化的RNA元件，其通常存在于5'-帽下游的5'-非翻译区(其是装配起始复合物所需的)。IRES被翻译起始因子所识别，并允许不依赖帽翻译。在另一个实施方案中，IRES源生自脑心肌炎病毒(EMCV)基因组(例如，参见Genome登录号KF836387.1，碱基对151至724)。

[0098] 在一个实施方案中，核酸载体另外包含多克隆位点(MCS)。MCS是含有多个限制性位点(例如10、15或20个位点)的核酸载体内的DNA短片段。这些位点通常在核酸载体内仅出现一次，以确保核酸内切酶仅在一个位点处切割。这允许使用合适的核酸内切酶(即限制酶)容易地插入逆转录病毒基因。

[0099] 本领域技术人员将理解，构建体可以在核酸载体内以任何顺序排列。在一个示例性实施方式中，核酸载体包含以下插入片段：编码gag和pol蛋白的逆转录病毒核酸序列，编码env蛋白或其功能性替代物(诸如VSVg)的逆转录病毒核酸序列，编码辅助基因rev(例如密码子优化的rev序列)或其类似基因或功能类似系统(即，GagPol-Env-Rev-剩余的BAC序列(“BAC骨架”)；诸如：GagPol-(野生型)VSVg-(密码子优化的)Rev-pSMARTBAC)的逆转录病毒核酸序列。在另一个实施方式中，绝缘子(诸例如染色质绝缘子)存在于每个gagpol、env和rev序列之间。在另一个实施方式中，启动子存在于每个gagpol、env和rev序列之前。在又一个实施方式中，转移载体序列的至少一个拷贝(即，包含编码逆转录病毒载体颗粒的RNA基因组的核酸序列)存在于gagpol序列之前。

[0100] 在一个实施方式中，核酸载体包含以下插入片段：绝缘体(诸如染色质绝缘子)，启动子(诸如CMV启动子)，内含子(诸如人β珠蛋白内含子)，编码gag和pol蛋白的逆转录病毒核酸序列，编码RRE的逆转录病毒核酸，polyA信号(例如人β珠蛋白polyA信号)，绝缘子(诸如染色质绝缘子)，启动子(诸如CMV启动子)，内含子(诸如人β珠蛋白内含子)，编码env蛋白或其功能性替代物的逆转录病毒核酸序列(诸如VSVg)，polyA信号(诸如人β珠蛋白polyA信号)，绝缘子(诸如染色质绝缘子)，启动子(诸如CMV启动子)，编码辅助基因rev或其类似基因或功能性相似系统的逆转录病毒核酸序列，polyA信号(诸如人β珠蛋白polyA信号)，绝缘体(诸如染色质绝缘子)，启动子(诸如CMV启动子)，内含子(诸如兔β珠蛋白内含子)，polyA信号和多克隆位点。应该理解，其他序列也与该插入片段一起包含和/或包含在该插入片段内。

[0101] 可以将核酸序列依次引入核酸载体中。这允许在每次整合后进行选择，以确保所有需要的核酸序列均成功整合到核酸载体中。或者，将至少两个或更多个核酸序列同时引入核酸载体中。

[0102] 应该理解，可以通过本领域已知的标准分子克隆技术，例如使用限制性核酸内切酶和连接技术，将本文所述的附加基因引入核酸载体中。此外，可以通过标准技术(诸如，电穿孔)将核酸载体，特别是BAC、PAC、福斯黏粒和/或黏粒引入细菌宿主细胞(诸如大肠杆菌细胞，特别是大肠杆菌菌株DH10B)。

[0103] 用途

[0104] 根据本发明的另一方面，提供了如本文所定义的核酸载体在产生逆转录病毒载体颗粒的方法中的用途。如本文所述，本发明提供了在瞬时转染方法中使用所述的核酸载体的多个优点，主要通过将4质粒转染系统减少成单个核酸载体，从而减少所用材料的量。

[0105] 方法

[0106] 根据本发明的另一方面，提供了生产复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒的方法，包括：

[0107] (a)将如本文所定义的核酸载体引入哺乳动物宿主细胞的培养物中；和

[0108] (b)在生产复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒的条件下培养哺乳动物宿主细胞。

[0109] 将所有逆转录病毒基因包括在大核酸载体上的优点是它们可以首先在微生物细胞(诸如细菌或酵母细胞)中制备，这更容易处理和操纵，然后在单一步骤中将其引入哺乳动物细胞。

[0110] 在一个实施方式中，宿主细胞是哺乳动物细胞。在另一个实施方式中，哺乳动物细胞选自HEK 293细胞、HEK 6E细胞、CHO细胞、Jurkat细胞、KS62细胞、PerC6细胞、HeLa细胞、HOS细胞、H9细胞或其衍生物或功能等同物。在另一个实施方式中，哺乳动物宿主细胞是HEK 293细胞，或源自HEK 293细胞。这样的细胞可以是贴壁细胞系(即它们在附着于表面的单层中生长)或悬浮适应/非贴壁细胞系(即它们在培养基中悬浮生长)。在又一个实施方式中，HEK 293细胞是HEK 293T细胞或HEK 6E细胞。术语“HEK 293细胞”是指通常用于生物技术的人胚肾293细胞系。具体而言，HEK 293T细胞通常用于生产各种逆转录病毒载体。合适的市售细胞系的其他实例包括T-REX™(Life Technologies)细胞系。

[0111] 使用本文所定义的方法转导的宿主细胞可用于生产高滴度的逆转录病毒载体。

[0112] 本文中对术语“高滴度”的引用是指能够转导靶细胞诸如患者细胞的有效量的逆转录病毒载体或颗粒。在一个实施方式中，高滴度为超过10^6TU/ml而没有浓缩(TU＝转导单位)。

[0113] 本领域技术人员将意识到，可以使用本领域已知的合适方法，例如脂质介导的转染(脂质转染)、显微注射、细胞(如微细胞)融合、电穿孔、基于化学的转染方法或微粒轰击，从而将核酸载体引入宿主细胞。应该理解，用于引入核酸载体的方法可以根据使用的哺乳动物宿主细胞的类型来选择。在一个实施方案中，引入步骤(a)使用脂质转染、电穿孔或基于化学的转染方法进行。在另一个实施方案中，通过脂质转染将核酸载体引入宿主细胞。在一个替代实施方式中，通过基于化学的转染方法如磷酸钙处理将核酸载体引入宿主细胞。磷酸钙处理剂是可商购的，例如来自Promega。

[0114] 本领域技术人员将理解，在此描述的方法中使用的条件将取决于所使用的宿主细胞。典型的条件，例如要使用的培养基或温度，是本领域众所周知的(参见Kutner等，(2009) Nature Protocols 4(4)；495-505)。在一个实施方案中，培养步骤(b)通过在潮湿条件下温育哺乳动物宿主细胞来进行。在另一个实施方案中，潮湿条件包括在37℃、5％CO_2下温育被

转染的细胞。在一个实施方案中，培养步骤(b)使用选自以下的培养基进行：包含10％(vol/vol)胎牛血清(FBS)的Dulbecco改良伊格尔培养基(DMEM)、或无血清UltraCULTURE™培养基(Lonza，目录号12-725F)或FreeStyle™表达培养基(Thermo fisher，目录号12338 018)。

[0115] 在一个实施方案中，该方法还包括分离复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒。例如，在一个实施方式中，通过使用过滤器来进行分离。在另一个实施方式中，过滤器是低蛋白结合膜(例如，0.22μm低蛋白结合膜或0.45μm低蛋白结合膜)，诸如聚偏二氟乙烯(PVDF)或聚醚砜(PES)人造膜。

[0116] 在一个实施方式中，复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒在引入步骤(a)后不超过72小时分离。在另一个实施方式中，复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒在引入步骤(a)后48-72小时分离，例如在48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71或72小时。

[0117] 一旦分离，逆转录病毒载体颗粒可以浓缩用于体内应用。浓缩方法包括例如超速离心、沉淀或阴离子交换色谱。超速离心作为小规模逆转录病毒载体浓缩的快速方法是有用的。或者，阴离子交换色谱(例如使用Mustang Q阴离子交换膜盒)或沉淀(例如使用PEG 6000)对于处理大体积的慢病毒载体上清液特别有用。

[0118] 根据本发明的另一方面，提供了通过本文定义的方法获得的复制缺陷型逆转录病毒载体颗粒。

[0119] 现在将参考以下非限制性实施例更详细地描述本发明。

[0120] 实施例

[0121] 实施例1：构建指南

[0122] 图1显示了构建BACpack-WTGP-277delU5和BACpack-SYNGP-277delU5的分步指南。由于XbaI和NheI消化物的相容末端，慢病毒包装基因逐渐被加载到pSmart BAC载体中。在添加GagPol时，制备了含有野生型GagPol(WTGP)或密码子优化的GagPol(SYNGP)的2种构建体。这些被分别命名为BACpack-WTGP和BACpack-SYNGP。然后将转移盒加载到这两种构建体上，并因此生成BACpackWTGP-277delU5和BACpackSYNGP-277delU5。

[0123] 实施例2：使用BAC构建体的原理实验的证明

[0124] 将10^6个HEK293T细胞接种在6孔板中。第二天，根据制造商的说明书使用PEI转染贴壁的细胞。细胞用总共4μg野生型(WT)慢病毒包装构建体(由pMDL.gp(GagPol)、pMD.G(VSVg)、pK-Rev(Rev)和pCCL.277(GFP转移载体)组成)转染或用单独质粒上的2μg的BACpack(含有GagPol、VSVg和Rev的单一BAC构建体)加上2μg的eGFP转移载体转染。

[0125] 转染后48小时，收集上清液，通过0.22μm过滤器过滤并在-80℃下存储至少4小时。将HEK293T细胞以每孔10^5个细胞接种在24孔板中以用于转导。第二天，将病毒上清液用聚凝胺进行系列稀释，以8μg/ml的终浓度施加给细胞。转导后3天，通过胰蛋白酶处理收获细胞并通过FACS分析GFP。使用以下等式计算转导单位(TU)/mL的病毒滴度：

[0126] (GFP阳性细胞/100)×稀释因子×转导的细胞数量。

[0127] 在条形图(图2)上比较病毒滴度。所有温育在37℃和5％CO_2下进行。使用的培养基是补充有10％FBS和1μg/ml多西环素的DMEM，其在BACpack+转移样品中。

[0128] 观察：

[0129] 在这个实施例中，将由GagPol、VSVg和Rev表达盒组成的BACpack构建体的能力与

其中分别递送GagPol、VSVg和Rev的标准3质粒包装系统进行比较。在这两种情况下，转移载体在单独的质粒中一起递送以完成病毒载体的必要成分。

[0130] 在这种情况下，与使用4个单独的质粒慢病毒系统时的5×10^{7}TU/ml的滴度相比，BACpack加转移载体能够获得2.2×10^{7}TU/ml的非浓缩上清液病毒滴度。尽管使用BACpack观察到滴度较低，但是该试验是在优化前进行的，并且可以在优化后实现更高的滴度。

[0131] 根据该主要测定的证明，可以得出结论：BACpack能够以与瞬时转染中单独包装质粒系统相当的病毒滴度包装转移载体。

[0132] 实施例3：在贴壁HEK293T细胞中BACpack的瞬时转染

[0133] 为了证实两种BACpack-277delU5构建体在瞬时转染系统中产生慢病毒载体的能力，通过瞬时转染常规用于产生慢病毒载体的贴壁细胞系HEK293T用目前的4包装质粒系统、BACpackWTGP-277delU5或BACpackSYNGP-277delU5转染。两种BACpack-277delU5构建体或者被诱导以评估基因表达是否可导致慢病毒载体产生或者未被诱导来测试Tet阻遏蛋白系统的效率。

[0134] 图3中的结果显示了从每种转染条件收获的慢病毒载体上清液的滴度，单位为转导单位(TU)/mL。从滴定结果可以看出，用BACpackWTGP-277delU5或BACpackSYNGP-277delU5转染并用1μg/ml多西环素(+Dox)诱导的细胞产生与当前4质粒系统相当的慢病毒载体浓度。此外，与诱导相比，未诱导的条件显示出产生慢病毒载体的能力大大降低，并且尽管该产量大于未转染的对照背景，但这在瞬时系统中并不被认为是缺点。

[0135] 这些结果表明含有产生慢病毒所需的所有包装基因的单一BAC载体可以代替当前的4质粒系统。

[0136] 应该理解，这里描述的实施方式可以应用于本发明的所有方面。此外，在本说明书中引用的所有出版物，包括但不限于专利和专利申请，通过引用并入本文，如同完全阐述一样。

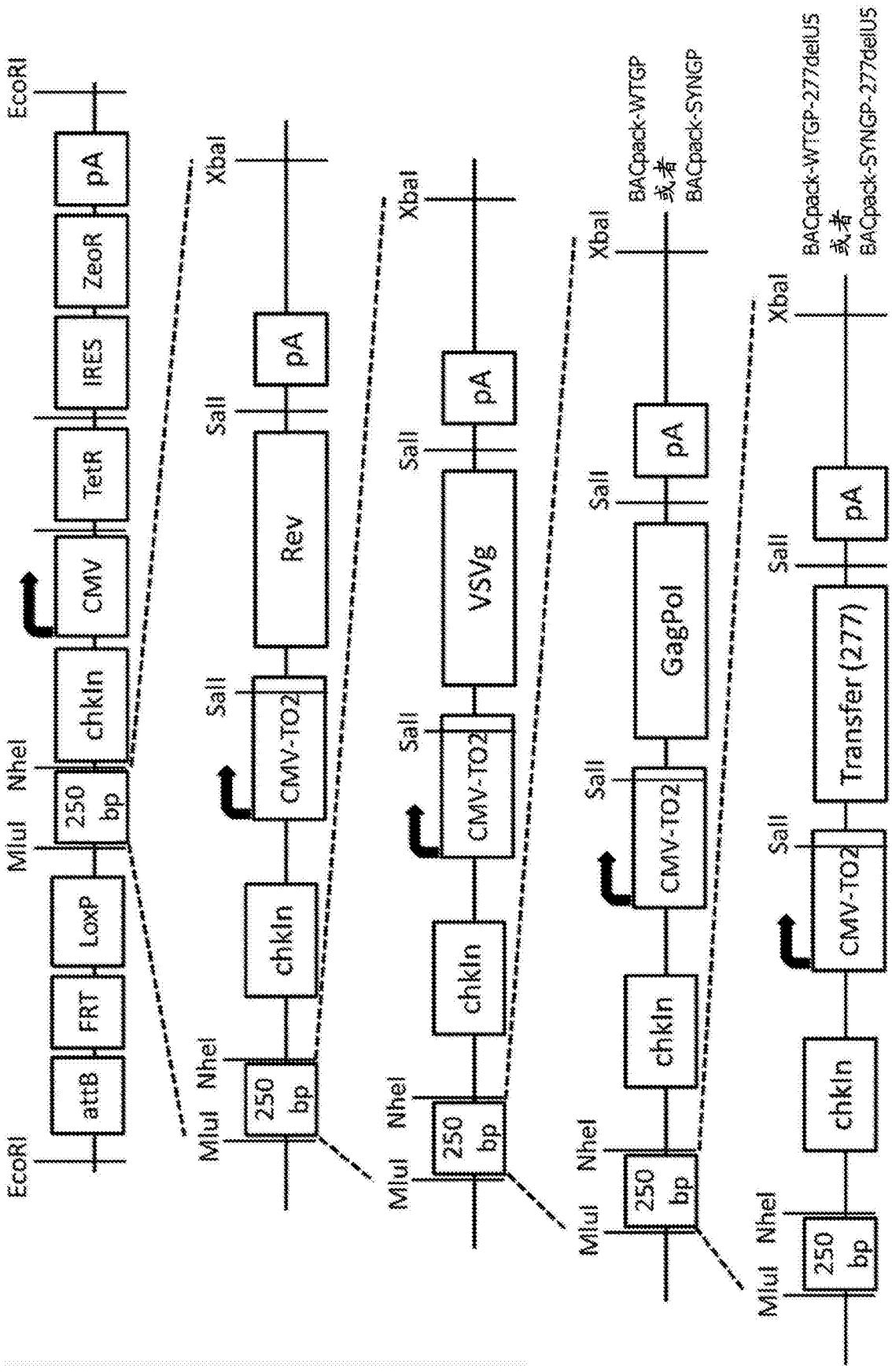

EcoRI
attB
FRT
LoxP
MluI
NheI
250 bp
chkIn
CMV
TetR
IRES
ZeoR
pA
EcoRI
MluI
NheI
250 bp
chkIn
SalI
CMV-TO2
Rev
SalI
pA
XbaI
MluI
NheI
250 bp
chkIn
SalI
CMV-TO2
VSVg
SalI
pA
XbaI
MluI
NheI
250 bp
chkIn
SalI
CMV-TO2
GagPol
SalI
pA
XbaI
BACpack-WTGP
或者
BACpack-SYNGP
MluI
NheI
250 bp
chkIn
SalI
CMV-TO2
Transfer (277)
SalI
pA
XbaI
BACpack-WTGP-277delU5
或者
BACpack-SYNGP-277delU5

图1

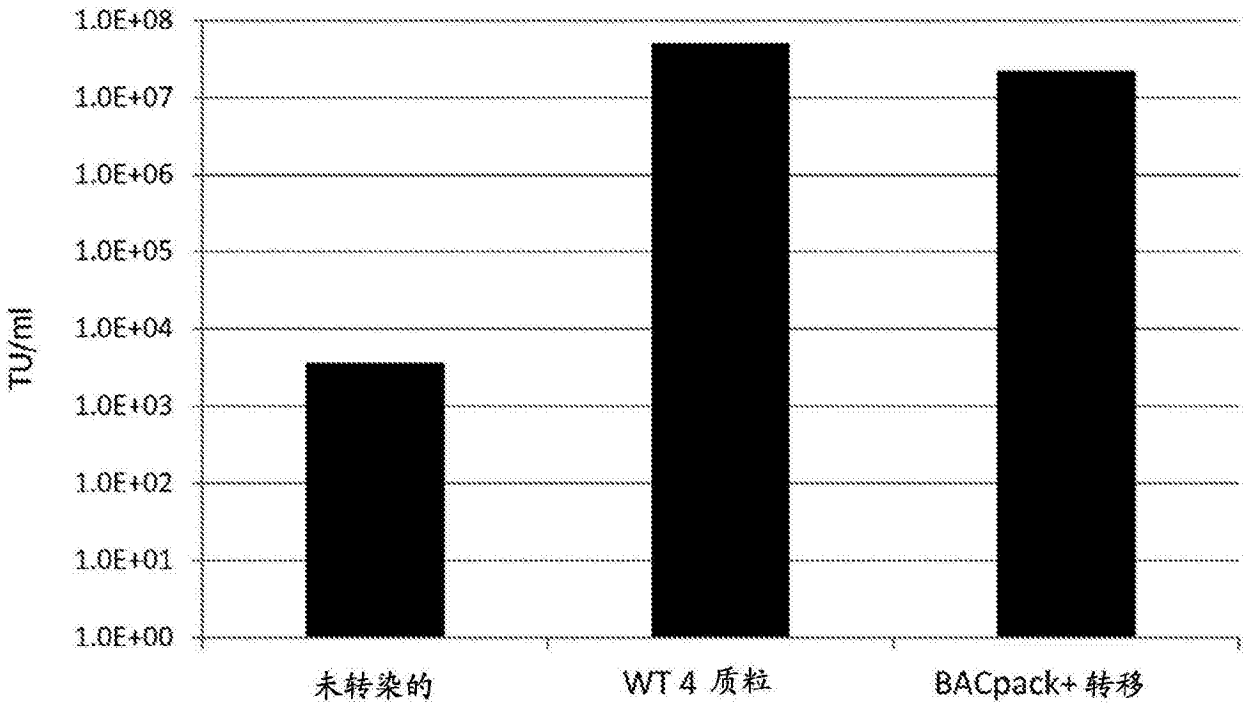

1.0E+08
1.0E+07
1.0E+06
1.0E+05
1.0E+04
1.0E+03
1.0E+02
1.0E+01
1.0E+00
TU/ml
未转染的
WT 4 质粒
BACpack+ 转移

图2

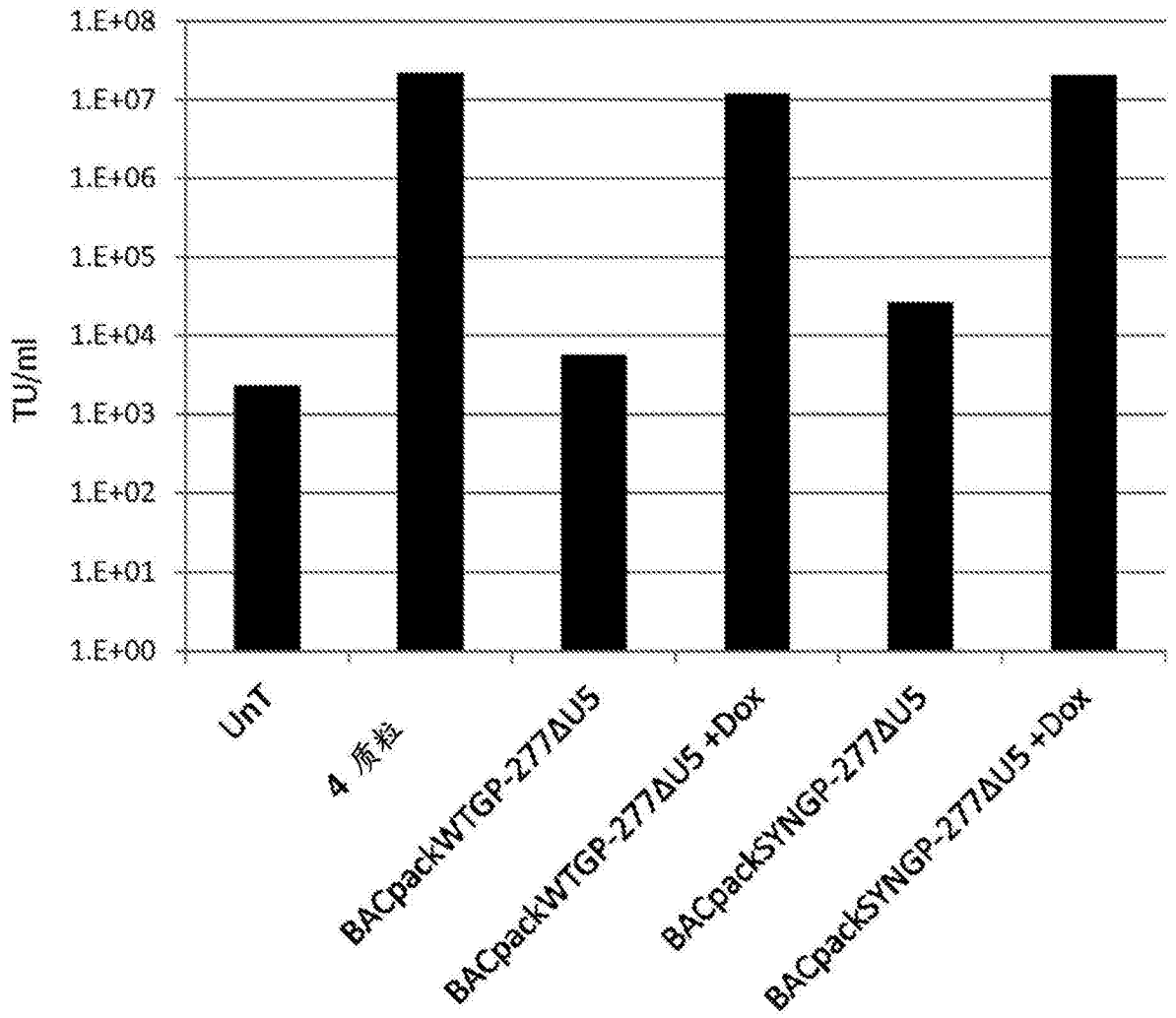

1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
1.E+04
1.E+03
1.E+02
1.E+01
1.E+00
TU/ml
UnT
4 质粒
BACpackWTGP-277ΔU5
BACpackWTGP-277ΔU5 +Dox
BACpackSYNGP-277ΔU5
BACpackSYNGP-277ΔU5 +Dox

图3