shRNA 表达框、携带其的多核苷酸序列及其应用

相关申请的交叉引用

本申请主张在 2017 年 3 月 31 日在中国提交的中国专利申请号 No. 201710210863.5 的优先权，其全部内容通过引用包含于此。

技术领域

本公开涉及 shRNA 表达框、携带其的多核苷酸序列及其应用，属于生物技术和基因治疗领域。

背景技术

小干扰 RNA（Small interfering RNA；siRNA）有时称为短干扰 RNA（short interfering RNA）或沉默 RNA（silencing RNA），是一个长 20 到 25 个核苷酸的双股 RNA，在生物学上有许多不同的用途。将针对靶基因的 siRNA 设计成发夹结构送入体内时，该发夹结构表达形成 shRNA，shRNA 是 short hairpin RNA 的缩写，翻译为“短发夹 RNA”，shRNA 包括两个短反向重复序列。目前已知 shRNA 主要参与 RNA 干扰（RNAi）现象，以带有专一性的方式调节基因的表达。此外，也参与一些与 RNAi 相关的反应途径，例如抗病毒机制或是染色质结构的改变。shRNA 进入细胞后，被宿主细胞内 RNA 解旋酶解旋为正义 RNA 链与反义 RNA 链，反义 RNA 链与体内的一些酶结合成沉默复合物 RISC，识别含有其互补序列的 mRNA，并与之结合。此时的 RISC 具有核酸酶的功能，能够切割降解 mRNA，从而抑制相应基因表达的现象称为 RNA 干扰（RNA interference, RNAi）。

shRNA 特点包括基因序列特异性、高效性和可遗传性。体外合成 shRNA 进入细胞后容易降解，半衰期短。很难穿透细胞膜及血管内皮，转染效率有限。且进入细胞 shRNA 的量不受控制，容易在脾脏堆积。需要有效的媒介或递送途径将外源 shRNA 递送到生物体内。一种方法是利用化学修饰的方法直接递送，如脂质体转染、PEG 修饰，无需克隆到载体即可将 shRNA 直接导入细胞抑制特定基因的表达。与直接使用 shRNA 表达框相比，质粒或病毒类载

体介导的 shRNA 体内表达的方法显示了其优势。将 shRNA 对应的 dsRNA 序列克隆到含有适合启动子的质粒载体或病毒载体中，再用质粒转染细胞或用病毒感染细胞，在启动子的操纵下转录生成所需的 shRNA，在体内法可持续产生 siRNA 作用。

腺相关病毒（AAV）属微小病毒（parvovirus）家族的成员，为无包膜的单链线状 DNA 病毒，作为基因治疗载体，具有非常多的优势。如感染效率高，感染范围广，长期表达的高安全性等。临床中用于治疗肿瘤、视网膜疾病、关节炎、艾滋病、心力衰竭、肌营养不良症、神经系统疾病及其它一系列基因缺陷疾病。但因本公开中涉及的 shRNA 长度很短，只有几十个 bp，当使用 AAV 病毒载体表达时，包装效率和表达量均为难题之一。

发明内容

本公开的部分实施例是提供一种 shRNA 表达框、携带该 shRNA 表达框的多核苷酸序列、携带该多核苷酸序列的重组载体质粒、shRNA、宿主、病毒颗粒、分离的改造的细胞、药物组合物、它们在制备预防和治疗乙型肝炎、获得性免疫缺陷综合征、治疗 Duchenne 型肌营养不良症（DMD）、治疗高胆固醇血症等的药物中的应用、以及重组载体质粒的载体制备系统。

本公开的表达框采用填充序列进行扩充且使得表达框序列长度接近野生型 AAV 基因组长度，该表达框或携带其的多核苷酸序列在使用 AAV 病毒载体进行表达时，能保证病毒包装产量，并且经过大量实验摸索发现，当填充序列位于 shRNA 序列 3’端时，该表达框或携带其的多核苷酸序列在使用 AAV 病毒载体进行表达时，不仅病毒包装产量能得到保证，还能大大提高目的基因 shRNA 的表达量，提高药物治疗效果。

根据本公开的一个方面，本公开提供一种 shRNA 表达框，按照 5’-3’的顺序，所述 shRNA 表达框依次含表达 shRNA 的 DNA 序列及填充序列，所述 shRNA 表达框序列长度接近野生型 AAV 基因组长度。所述填充序列可选为人非编码序列。

可选地，所述人非编码序列是惰性或无害的，没有功能和活性。在各种特别的方面，人非编码序列不是编码蛋白或多肽的序列，不同于任何以下物

质：shRNA、AAV 末端反向重复（ITR）序列、启动子、复制点、多腺苷酸序列等。

所述人非编码序列为人因子 IX 的内含子（intron）序列（GenBank: K02402.1）、人因子 IX 的内含子 I 片段、人粘粒 C346 的序列或 HPRT-intron 序列 1704-14779（GenBank:M26434.1）的一段序列或多段序列组合形式；甚至可选为 HPRT-intron 序列 1704-14779（GenBank:M26434.1）的一段序列。人非编码序列长度可根据不同血清型 AAV 包装容量或其他需求进行调整，不局限于固定长度。

可选地，该表达框在使用单链 AAV 病毒载体进行表达或直接使用时，所述序列长度为 3.2kb-5.2kb，可选为 3.8kb-5.1kb，甚至可选为 3.8kb-4.6kb、4.6kb-5.1kb，尤其可选为 4.6kb。

甚至可选地，该表达框在使用双链 AAV 病毒载体进行表达时，所述 shRNA 表达框序列长度为使用单链 AAV 病毒载体进行表达或直接使用时所述 shRNA 表达框序列长度的一半。可选为 3.2kb-5.2kb 的一半，可选为 3.8kb-5.1kb 的一半，甚至可选为 3.8kb-4.6kb 或 4.6kb-5.1kb 的一半，尤其可选为 4.6kb 的一半，即 2.3kb。

本公开所述的 shRNA 表达框中，表达 shRNA 的 DNA 序列 5’端含有启动子，所述启动子可为任意来源启动子，所述启动子包含选自 RNA 聚合酶 II 启动子和 RNA 聚合酶 III 启动子中的一种或多种。RNA 聚合酶 II 启动子为通常所采用的启动子，例如 CAG、CMV、SV40、EF1、Ub。针对不同发病组织或细胞，可根据具体病理特征选择组织或细胞特异性启动子，如 LP1、CK1、DC172、DC190、ApoE/hAAT、ApoA-I、TBG、LSP1、HD-IFN 等，为了保证目的基因 shRNA 高效表达，启动子可为一个或多个的组合；启动子可为根据实际情况改造的突变体或嵌合体。进一步地，所述启动子选自 RNA 聚合酶 III 启动子中的至少一个，所述 RNA 聚合酶 III 启动子是 U6 启动子、H1 启动子、7SK 启动子，尤其可选的启动子为 H1。

表达 shRNA 的 DNA 序列为表达任意可用于治疗疾病的 shRNA 的 DNA 序列。可选地，所述表达任意可用于治疗疾病的 shRNA 的 DNA 序列为序列表 SEQ ID No:1 至序列表 SEQ ID No:3 中的任一个或多个。例如表达治疗 HBV

疾病的 shRNA 的 DNA 序列、表达治疗 HIV 疾病的 shRNA 的 DNA 序列，可选地表达治疗 Duchenne 型肌营养不良症（DMD）的 DNA 序列、用于表达治疗高胆固醇血症的 DNA 序列等。

如 1）用于表达治疗 HBV 疾病的任意 shRNA 的 DNA 序列，其中所述 shRNA 的靶序列可由下述 DNA 序列中的 19-23nt 的片段组成，如:

（1）catcctgctgctatgcctcat（SEQ ID No:7）

（2）aaggtatgttgcccgtttgtcc（SEQ ID No:8）

（3）cctattgattggaaagtatgtcaaa（SEQ ID No:9）

（4）tcgccaacttacaaggcctttct（SEQ ID No:10）

（5）tgtgctgccaactggatcct（SEQ ID No:11）

（6）ccgtgtgcacttcgcttcacct（SEQ ID No:12）

（7）ggaggctgtaggcataaattggtctgt（SEQ ID No:13）

（8）ggagtgtggattcgcactcct（SEQ ID No:14）

2）用于表达治疗 HIV 疾病的 DNA 序列，所述 shRNA 的靶序列可由下述 RNA 序列中的 19-23nt 的片段组成，如:

（1）aucaaugaggaagcugcagaaugg（SEQ ID No:15）

（2）gggaagugacauagcaggaacuacuag（SEQ ID No:16）

（3）uaaauaaaauaguaagaauguauagcccu（SEQ ID No:17）

（4）uauggggguaccugugugga（SEQ ID No:18）

（5）gccaauucccauacauuauugugc（SEQ ID No:19）

（6）uuaaauggcagucuagcagaa（SEQ ID No:20）

（7）accacacacaaggcuacuucccugau（SEQ ID No:21）

（8）acagccgccuagcauuucaucac（SEQ ID No:22）

（9）ggauggugcuucaagcuaguaccaguu（SEQ ID No:23）

3）用于表达治疗 Duchenne 型肌营养不良症（DMD）的 DNA 序列，其中所述 shRNA 的靶序列可由下述 RNA 序列中的 19-23nt 的片段组成，如:

（1）ugaguaucaucgugugaaag（SEQ ID No:24）

（2）uccuuucaucucugggcuc（SEQ ID No:25）

（3）aacuuccucuuuaacagaaaagcauac（SEQ ID No:26）

（4）aacuuccucuuuaacagaaaagcauac（SEQ ID No:27）

（5）caaggaaguuggcauuucaa（SEQ ID No:28）

4）用于表达治疗高胆固醇血症的 DNA 序列，其中所述 shRNA 的靶序列可由下述 RNA 序列中的 19-23nt 的片段组成，如:

（1）uuccgaauaaacuccaggc（SEQ ID No:29）

（2）aaccgcaguucuuuguagg（SEQ ID No:30）

（3）uugguauucagugugauga（SEQ ID No:31）

（4）ucaucacacugaauaccaa（SEQ ID No:32）

所述表达 shRNA 的 DNA 序列可以是同时表达两个或两个以上 shRNA 的 DNA 序列的组合形式，组合形式可以是 2 条表达 shRNA 的 DNA 序列的组合，也可以是 3 条表达 shRNA 的 DNA 序列的组合，但不仅限于 2 条或 3 条；2 条相邻表达 shRNA 的 DNA 序列可以直接相连或通过接头相连；所述表达的 shRNA 针对治疗靶点可以是单靶点，也可以是多靶点。

本公开提供了一种携带 shRNA 表达框的多核苷酸序列，其中在所述 shRNA 表达框的两端分别为 AAV 末端反向重复序列。

所述 AAV 末端反向重复序列选自不同血清型的 AAV，可选地所述 AAV 末端反向重复序列选自进化支 A-F 中的任意血清型的 AAV 或 AAV1 型、AAV2 型、AAV3 型、AAV4 型、AAV5 型、AAV6 型、AAV7 型、AAV8 型、AAV9 型或其杂交/嵌合型中的任意一个，可选地所述 AAV 末端反向重复序列来源于 AAV2 血清型的末端反向重复序列。其中末端反向重复序列可在相应位点进行改造、或缺失、或截短，以上方法可合并使用。

本公开所述的多核苷酸序列中，两个末端反向重复序列间的序列长度为 3.2kb-5.2kb，可选为 3.8kb-5.1kb，甚至可选为 3.8kb-4.6kb、4.6kb-5.1kb，尤其可选为 4.6kb；当其中一个末端反向重复序列中的 trs 被改造，通过插入、缺失、或替代等方式导致 Rep 蛋白切割位点突变不能进行有效切割时，两个末端反向重复序列间的序列长度可选为 3.2kb-5.2kb 的一半，可选为 3.8kb-5.1kb 的一半，甚至可选为 3.8kb-4.6kb 或 4.6kb-5.1kb 的一半，尤其可选为 4.6kb 的一半，即 2.3kb。

可选地，所述多核苷酸序列中 5’末端反向重复序列缺失 D 序列，所述

多核苷酸序列两个 ITR 间的序列长度可选为 4.6kb-5.1kb 的一半，甚至可选为 4.6kb 的一半。

本公开提供了一种携带上述 shRNA 表达框或多核苷酸序列的重组载体质粒。

本公开所述的多核苷酸序列可以是商品化合成，可采用分子克隆的方法构建到重组载体质粒中。

所述重组载体质粒选自腺相关病毒载体。

可选地，所述腺相关病毒载体为各种血清型，如 AAV 进化支 A-F 中的任一型（参见公开号 WO200533321 的专利），具体地为 AAV1 型（GenBank:AF063497.1）、AAV2 型（GenBank:AF043303.1）、AAV3 型（GenBank:U48704.1）、AAV4 型（GenBank:NC_001829）、AAV5 型（GenBank:NC_006152）、AAV6 型（GenBank:AF028704）、AAV7 型（GenBank:AF513851）、AAV8 型（GenBank:AF513852）、AAV9 型（GenBank:AY530579）或其杂交/嵌合型。

甚至可选地，所述腺相关病毒载体为 AAV2/8 型，即所述腺相关病毒载体外壳蛋白为血清型 VIII 型、所述腺相关病毒载体基因组末端反向重复序列为血清型 II 型的 AAV2/8 载体。所述两端末端反向重复序列间插入与 HBV 基因组靶点碱基序列完全匹配的本公开的核苷酸序列形成的靶向肝脏细胞分布、表达产物高效特异抑制 HBV 复制的基因治疗药物。

所述腺相关病毒载体最后包装为病毒，在所述多核苷酸序列两侧的 ITR 选自正常 AAV 血清型 ITR 时，包装入病毒的序列为单链，所述病毒称为单链 AAV；当其中任意一个 ITR 通过插入、缺失、或替代等方式导致 Rep 蛋白切割位点突变不能进行有效切割时，包装入病毒的序列为双链，所述病毒称为双链 AAV。

本公开还提供了一种 shRNA，其中，所述 shRNA 是由上述的 shRNA 表达框或多核苷酸序列或重组载体质粒表达得到的。

本公开还提供了一种宿主，其中，所述宿主含有本公开所述的重组载体质粒。所述宿主为选自大肠杆菌、HEK293 细胞系、HEK293T 细胞系、HEK293A 细胞系、HEK293S 细胞系、HEK293FT 细胞系、HEK293F 细胞系、

HEK293H 细胞系、HeLa 细胞系、SF9 细胞系、SF21 细胞系、SF900 细胞系、BHK 细胞系的一种或几种。

本公开还提供了一种病毒颗粒，其包括上述的重组载体质粒或宿主中的重组载体质粒的载体基因组。所述病毒颗粒非选择性或选择性地在肝组织或肝癌细胞中表达。

本公开还涉及一种分离的改造的细胞，所述细胞表达或包含上述 shRNA 表达框、多核苷酸序列、重组载体质粒、病毒颗粒。该细胞为导入了本公开提供的重组载体质粒或宿主中的重组载体质粒的载体基因组的改造的细胞，包括原核细胞和真核细胞（如真菌细胞，昆虫细胞，植物细胞，动物细胞），可选为哺乳动物细胞，可选为人的细胞，可选为人肝细胞和干细胞。

本公开还涉及包含上述细胞的组织和生物，如动物。

本公开还涉及包含上述细胞的药物组合物。

本公开还提供了一种药物组合物，其中，所述药物组合物含有活性成分和药学上可接受的赋形剂，其中活性成分为选自本公开所述的 shRNA 表达框、携带 shRNA 表达框的多核苷酸序列、shRNA、重组载体质粒、病毒颗粒或分离的改造的细胞中的一种或几种。

所述药物组合物为注射液，所述注射液包括药学上可接受的赋形剂以及上述的活性成分。

本公开还提供了上述 shRNA 表达框、携带 shRNA 表达框的多核苷酸序列或重组载体质粒或 shRNA、宿主、病毒颗粒或分离的改造的细胞在制备预防和治疗乙型肝炎、获得性免疫缺陷综合征、治疗 Duchenne 型肌营养不良症（DMD）、治疗高胆固醇血症等的药物中的应用。

常规 AAV 载体制备系统均可用于本公开重组载体质粒的包装。如两质粒包装系统、三质粒包装系统、杆状病毒包装系统和以 Ad 或 HSV 为辅助病毒的 AAV 包装系统等。其中所述三质粒包装系统包括质粒 pscAAV-H1-shRNA-Stuffer、质粒 pHelper 和质粒 pAAV-R2CX，其中：

所述质粒 pHelper 提供腺病毒的 E2A、E4 和 VA 区域；

所述质粒 pAAV-R2CX 提供含 rep 和 cap 基因序列；

所述质粒 pscAAV-H1-shRNA-Stuffer 含上述多核苷酸序列。

其中，X 指代构成 pAAV-R2CX 重组载体质粒的 Cap 基因来源所对应的 AAV 血清型名称。

本公开还提供了一种使用上述制备系统制备本公开所述病毒载体的方法。

本公开具有如下有益效果：

1、本公开的 shRNA 表达框采用 AAV 病毒为载体进行递送的方式，使 shRNA 能够发挥长效性；相比裸 shRNA 或其他化学修饰的 shRNA，选择 AAV 作为运载体具有更低的免疫反应原性，安全无致病性；裸 shRNA 在生物体内无明显组织细胞偏好，但是 AAV 不同血清型具有明显的组织靶向性，可大大提高 shRNA 药物疗效。

2、本公开提供的 shRNA 表达框，选择合适的填充序列进行使得其长度接近 AAV 野生型基因组长度，使得选择 AAV 病毒载体携带时，保证了包装效率最高；当填充序列位于 shRNA 序列 3’端时，该表达框或携带其的多核苷酸序列在使用 AAV 病毒载体进行表达时，不仅病毒包装产量能得到保证，还能大大提高目的基因 shRNA 的表达量，提高药物治疗效果。

下面结合附图和具体实施方式对本公开做进一步说明，并非对本公开的限制。凡是依照本专利申请公开内容所进行的任何本领域等同替换，均属于本专利的保护范围。

附图说明

图 1 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒图谱。

图 2 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron 质粒图谱。

图 3 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron1 质粒图谱。

图 4 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron2 质粒图谱。

图 5 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron3 质粒图谱。

图 6 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron4 质粒图谱。

图 7 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron5 质粒图谱。

图 8 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron6 质粒图谱。

图 9 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron7 质粒图谱。

图 10 为 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron8 质粒图谱。

图 11 为 pSC-H1-shRNA2 质粒图谱。

图 12 为 pSC-H1-shRNA2-intron'质粒图谱。

图 13 为 pSC-H1-shRNA2-intron1'质粒图谱。

图 14 为 pSC-H1-shRNA2-intron2' 质粒图谱。

图 15 为 pSC-H1-shRNA2-intron3'质粒图谱。

图 16 为 pSC-H1-shRNA2-intron4'质粒图谱。

图 17 为 pSC-H1-shRNA2-intron5'质粒图谱。

图 18 为 pSC-H1-shRNA2-intron6'质粒图谱。

图 19 为 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3 质粒图谱。

图 20 为 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron1"质粒图谱。

图 21 为 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron2"质粒图谱。

图 22 为 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron3"质粒图谱。

图 23 为实施例 2 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 1。

图 24 为实施例 2 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 2。

图 25 为实施例 2 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 3。

图 26 为实施例 4 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 1。

图 27 为实施例 4 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 2。

图 28 为实施例 4 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 3。

图 29 为实施例 5 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 1。

图 30 为实施例 5 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 2。

图 31 为实施例 5 中 HBV 的荧光 PCR 检测结果 3。

图 32 为实施例 6 中检测结果 1。

图 33 为实施例 6 中检测结果 2。

图 34 为实施例 6 中检测结果 3。

图 35 为实施例 6 中检测结果 4。

图 36 为实施例 6 中检测结果 5。

图 37 为实施例 6 中检测结果 6。

图 38 为实施例 6 中检测结果 7。

图 39 为实施例 6 中检测结果 8。

图 40 为实施例 8 中 HBsAg 检测结果。

图 41 为实施例 8 中 HBV DNA 检测结果。

具体实施方式

实施例一：单链 AAV 包装容量对产量的影响

1、包装质粒构建：

参照《分子克隆》进行质粒载体构建，pSNAV2.0-CMV-EGFP（购自本元正阳基因技术有限公司，北京）为单链 AAV 包装所使用穿梭质粒，该质粒只保留来源于 AAV2 的 ITR。利用 XhoI 和 SalI 为酶切位点，合成 H1 启动子(GenBank:X16612)及表达 shRNA1 的 DNA 序列(SEQ ID No:1，后续在描述质粒时简写为 shRNA1)，替换 pSNAV2.0-CMV-EGFP 的 CMV-EGFP 序列。通过定点突变，引入 EcoRV 酶切位点，形成质粒 pSNAV2.0-H1-shRNA1，质粒图谱见图 1。质粒构建方法为本领域常规方法（Xiao Xiao, Juan Li, and Richard Jude Samulski. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J. Virol. 1998, 72(3): 2224.）。

以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron，利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron 质粒，intron 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161-3860 位（1.7kb），质粒图谱见图 2；

以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron1，利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron1 质粒，intron1 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161-5360 位（3.2kb），质粒图谱见图 3；

以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron2，利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron2 质粒，intron2 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161-6160 位（4.0kb），质粒图谱见图 4；

以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron3，利用

酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron3 质粒，intron3 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161-6660 位（4.5kb），质粒图谱见图 5；

以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron4，利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron4 质粒，intron4 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161-7560 位（5.4kb），质粒图谱见图 6；

其它包装质粒还包括 pR2C8 及 AAV helper，编码来源于 AAV2 的 Rep 蛋白和来源于 AAV8 的 Cap 蛋白；Ad Helper 提供 AAV 复制所需的最小化的 Ad 部分元件。质粒构建方法为本领域常规方法。（参见 Gao GP, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, Wilson JM. Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene theraph. Proc Natl Acad Sci USA, 2002 Sep 3; 99(18): 11854-9）。

2、病毒包装及纯化

本公开采用 HEK293 细胞（购于 ATCC）作为生产细胞系，常规三质粒包装系统生产 AAV 病毒载体。所使用实验方法均为本领域常规方法。（参见 Xiao Xiao, Juan Li, and Richard Jude Samulski. Production of high-titer recombinant adeno-associated virus vectors in the absence of helper adenovirus. J. Virol. 1998, 72(3): 2224；）

3、基因组滴度检测

取适量纯化 AAV 样品，按下表（表 1-1）配制 DNase I 消化反应混合液，37℃孵育 30min，75℃孵育 10min，失活 DNase I。

表 1-1

AAV 样品	5ul
10×Dnasel 缓冲液	5ul
DnaseI	1ul
无 RNA 酶水（Rnase-free water）	39ul
合计	50ul

处理后的 AAV 纯化样品稀释适当的倍数后，参照下表（表 1-2）配置

Q-PCR 反应体系，并按照下列程序进行检测。

表 1-2

反应体系		反应程序	
标准品/样品	5ul	50℃ 2min	1 个循环
上游引物（10uM）	0.5ul	95℃ 10min	
下游引物（10uM）	0.5ul	95℃ 15sec	40 个循环
探针（10uM）	0.5ul	60℃ 30sec	
Taqman PCR Mix(2×)	10ul	37℃ 1sec	1 个循环
ddH_2O	3.5ul		

其中使用的启动子 H1 引物探针列表如下：

表 1-3

上游引物	ATCAACCCGCTCCAAGGAAT	序列表 SEQ ID No:4
下游引物	AACACATAGCGACATGCAAATATTG	序列表 SEQ ID No:5
Taqman 探针	CCCAGTGTCACTAGGCGGGAACACC	序列表 SEQ ID No:6

包装产量结果见下表 2-1：

表 2-1

质粒名称	病毒载体名称	包装长度（kb）	基因组滴度(vg/ml)
pSNAV2.0-H1-shRNA1	ssAAV2/8-H1-shRNA1	0.6	6.90E+10
pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron	2.3	7.20E+11
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron1	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1	3.8	5.05E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron2	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	4.6	7.13E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron3	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3	5.1	7.02E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron4	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4	6.0	9.41E+9

由上述表 2-1 显示，在相同包装条件、同等包装规模以及相同终产品体积条件下，当包装长度为 3.2~5.2kb 范围时，包装产量能满足需求，具体地说，当包装序列长度越接近野生型 AAV 长度（4.6kb）时，即包装长度为 4.6kb、5.1kb 时，包装产量最高；当包装序列长度逐渐低于 3.8kb 时，包装产量开始

下降但基本能满足需求；当包装序列长度为野生型长度的 1.5 倍时，包装产量明显降低。

实施例二：填充序列插入位置对目的基因表达影响，以单链 AAV 载体为例

1、包装质粒构建

实施例一结果说明单链 AAV 病毒载体包装长度接近野生型时，可保证病毒载体产量。所以在保证有填充序列插入时，AAV 包装长度始终为 4.6kb。调整填充序列长度及位置，并与无填充序列的药物结构进行药效比较。ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2 对应质粒载体构建参见实施例一。

以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒为骨架质粒，合成填充序列，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-6160 位（4.0kb），利用酶切位点 EcoRV 和 XhoI 为插入位点，构建到 H1 启动子序列 5’端，形成 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron5 质粒，质粒图谱见图 7；

以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒为骨架质粒，分段合成填充序列，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-4160（2.0kb）段序列利用酶切位点 EcoRV 和 XhoI 为插入位点，构建到 H1 启动子序列 5’端。源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 4161-6160（2.0kb）段序列利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron6 质粒，质粒图谱见图 8；

以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 质粒为骨架质粒，分段合成填充序列，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-2660（0.5kb）段序列利用酶切位点 EcoRV 和 XhoI 为插入位点，构建到 H1 启动子序列 5’端。源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2961-5960（3.5kb）段序列利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron7 质粒，质粒图谱见图 9；

以 pSNAV2.0-H1-shRNA 质粒为骨架质粒，分段合成填充序列，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-5660（3.5kb）段序列利用酶切位点 EcoRV 和 XhoI 为插入位点，构建到 H1 启动子序列 5’端。源于 HPRT-intron

（GenBank:M26434.1）第 5661-6160（0.5kb）段序列利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron8 质粒，质粒图谱见图 10。其它包装质粒还包括 pR2C8 和 Helper 构建方法参见实施例一。

2、病毒包装及纯化

参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

3、基因组滴度检测

参见实施例一“3、基因组滴度检测”，实验结果参见表 2-2。

表 2-2

质粒名称	病毒载体名称	包装长度（kb）	基因组滴度(vg/ml)
pSNAV2.0-H1-shRNA1	ssAAV2/8-H1-shRNA1	0.6	3.23E+11
pSNAV2.0- H1-shRNA1-intron2	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	4.6	7.50E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron5	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron5	4.6	7.85E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron6	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron6	4.6	7.64E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron7	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron7	4.6	7.90E+12
pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron8	ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron8	4.6	7.12E+12

实验结果显示，5 组 AAV 病毒载体产量相当，只要保证包装序列长度接近野生型 AAV 基因组全长时，填充序列插入位置对包装效率没有影响。

4、目的基因 shRNA 表达及检测

用以上 5 组病毒样品以相同 MOI 进行 HepG2.2.15 细胞感染实验，病毒感染为本领域常规方法。（具体实验方法参见；Grieger JC, Choi VW, Samulski RJ. Production and characterization of adneo-associated viral vectors. Nat Protoc. 2006; 1(3): 1412-28.）感染 24h 后开始，每 24h 收获一次细胞培养上清液。连续取样 4 次后，进行药效相关指标检测。本实施例检测指标为感染后细胞培养上清液中 HbsAg、HbeAg、HBV DNA，依据三项指标表达情况与未经感染的 HepG2.2.15 细胞培养上清液三项指标进行对比分析。抗体检测方法为双抗体夹心法（具体参见北京万泰生物药业试剂盒说明书）。HBV DNA 检测方法为荧光实时定量 PCR 法，为常规操作方法（具体参见 QIAGEN 检测试剂盒

说明书)。结果如图 23 至图 25 和表 2-3 所示。

结果显示当填充序列全部位于表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端时，其药物结构对 HBV 抑制效果最强。从表中数据结果来看，ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2 相对于其他实施例具有统计学意义，P<0.01。

表 2-3

HBsAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-H1-shRNA1	1	0.786521	0.652158	0.56321	0.42153
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	1	0.48058	0.102326	0.037761	0.017355
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron5	1	0.752658	0.58173	0.409618	0.3049
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron6	1	0.553575	0.299765	0.106104	0.072074
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron7	1	0.437662	0.285195	0.142352	0.074649
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron8	1	0.496668	0.39661	0.239312	0.124853
HBeAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-H1-shRNA1	1	0.919418	0.88009	0.831681	0.769969
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	1	0.744395	0.609283	0.316461	0.211221
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron5	1	0.919418	0.86009	0.731681	0.729969
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron6	1	0.889595	0.803174	0.524138	0.487348
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron7	1	0.892424	0.823163	0.45785	0.361416
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron8	1	0.857871	0.766679	0.431736	0.249484
HBV DNA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-H1-shRNA1	1	1.024779	0.89806	0.816933	0.434332
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	1	0.601239	0.533708	0.290499	0.054281
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron5	1	0.924779	0.709806	0.616933	0.334332
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron6	1	0.819469	0.631767	0.337065	0.158961
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron7	1	0.794513	0.663432	0.368956	0.1379
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron8	1	0.904425	0.556691	0.406397	0.282021

实施例三：双链 AAV 包装容量对产量的影响

1、包装质粒构建：

参照《分子克隆》进行质粒载体构建，pSC-CMV-EGFP 为双链 AAV 包装所使用穿梭质粒，该质粒只保留来源于 AAV2 的 ITR。利用 BglII 和 XhoI 为酶切位点，合成 H1 启动子及表达 shRNA2 的 DNA 序列（SEQ ID No:2，后续在描述质粒时简写为 shRNA2），替换 pSC-CMV-EGFP 的 CMV-EGFP 序列。通过定点突变，引入 EcoRV 酶切位点，形成质粒 pSC-H1-shRNA，质粒图谱见图 11。pSC-CMV-EGFP 质粒构建方法为本领域常规方法（参见 Wu, J, Zhao, W, Zhong, L, Han, Z, Li, B, Ma, W et al. (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. Hum Gene Ther. 2007, 18: 171 - 182.中对应 pAAV-hrGFP 载体构建）。

以 pSC-H1-shRNA2 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron'，利用酶切位点 BglII 和 HindIII 为插入位点，构建到表达 shRNA2 的 DNA 序列的 3'端，形成 pSC-H1-shRNA2-intron' 质粒，intron' 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161- 3060(0.9kb)，质粒图谱见图 12 ；

以 pSC-H1-shRNA2 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron1'，利用酶切位点 BglII 和 HindIII 为插入位点，构建到表达 shRNA2 的 DNA 序列的 3'端，形成 pSC-H1-shRNA2-intron1' 质粒，intron1' 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161- 3460(1.3kb)，质粒图谱见图 13 ；

以 pSC-H1-shRNA2 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron2'，利用酶切位点 BglII 和 HindIII 为插入位点，构建到表达 shRNA2 的 DNA 序列的 3'端，形成 pSC-H1-shRNA2-intron2' 质粒，intron2' 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161- 3860(1.7kb)，质粒图谱见图 14 ；

以 pSC-H1-shRNA2 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron6'，利用酶切位点 BglII 和 HindIII 为插入位点，构建到 shRNA2 表达框的 3' 端，形成 pSC-H1-shRNA2-intron3' 质粒，intron6' 来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161- 4160(2.0kb)，质粒图谱见图 15 ；

以 pSC-H1-shRNA2 质粒为骨架质粒，合成填充序列 intron3'，利用酶切

位点 BglII 和 HindIII 为插入位点，构建到表达 shRNA2 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSC-H1-shRNA2-intron4’质粒，intron4’来源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）2161- 4860(2.7kb)，质粒图谱见图 16；

其它包装质粒还包括 pR2C8 和 Helper 构建方法参见实施例一。

2、参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

3、基因组滴度检测

实验方法具体参见实施例一“3、基因组滴度检测”。包装产量结果见表 2-4。

表 2-4

质粒名称	病毒载体名称	包装长度（kb）	基因组滴度 (vg/ml)
pSC-H1-shRNA2	scAAV2/8-H1-shRNA2	0.6	5.20E+10
pSC-H1-shRNA2-intron’	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron’	1.5	5.62E+11
pSC-H1-shRNA2-intron1’	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron1’	1.9	4.56E+12
pSC-H1-shRNA2-intron2’	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2’	2.3	4.32E+12
pSC-H1-shRNA2-intron3’	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron3’	2.6	4.66E+12
pSC-H1-shRNA2-intron4’	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron4’	3.3	3.82E+10

结果显示，当包装序列长度接近野生型 AAV 基因组长度一半时，即包装长度为 1.9kb、2.3kb 和 2.6kb 时，包装产量最高；包装序列长度接近野生型长度四分之一或更短时，包装产量开始明显下降；当包装序列长度接近野生型长度一半的 1.5 倍时，包装产量也非常低。

实施例四：填充序列插入位置对目的基因表达影响，以双链 AAV 载体为例

1、包装质粒构建：

实施例三结果说明双链 AAV 病毒载体包装长度接近野生型 AAV 基因组长度一半时，可保证病毒载体产量。所以在保证有填充序列插入时，AAV 包装长度始终为 2.3kb。调整填充序列长度及位置，并与无填充的药物结构进行药效比较。scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2’对应质粒载体构建参见实施例三。

以 pSC-H1-shRNA2 质粒为骨架质粒，合成填充序列，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-3860（1.7kb）位，利用酶切位点 EcoRV 和 XhoI 为插入位点，构建到 H1 启动子序列 5'端，形成 pSC-H1-shRNA2-intron5' 质粒，质粒图谱见图 17；

以 pSC-H1-shRNA2 质粒为骨架质粒，分段合成填充序列，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-3010（0.85kb）段序列利用酶切位点 EcoRV 和 XhoI 为插入位点，构建到 H1 启动子序列 5'端。源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 3011-3860（0.85kb）段序列利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA2 的 DNA 序列的 3' 端，形成 pSC-H1-shRNA2-intron6' 质粒，质粒图谱见图 18；

其它包装质粒还包括 pR2C8 和 Helper 构建方法参见实施例一。

2、参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

3、基因组滴度检测

实验方法具体参见实施例一“3、基因组滴度检测”。实验结果参见表 2-5。

表 2-5

质粒名称	病毒载体名称	包装长度（kb）	基因组滴度 (vg/ml)
pSC-H1-shRNA2	scAAV2/8-H1-shRNA2	0.6	5.61E+12
pSC-H1-shRNA2-intron2'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	2.3	5.50E+12
pSC-H1-shRNA2-intron5'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5'	2.3	5.85E+12
pSC-H1-shRNA2-intron6'	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron6'	2.3	5.64E+12

实验结果显示，3 组 AAV 病毒载体产量相当，只要保证包装序列长度接近野生型 AAV 基因组全长时，填充序列插入位置对包装效率没有影响。

4、目的基因表达及检测

实验方法参见实施例二“4、目的基因表达及检测”。

检测结果见图 26 至图 28 和表 2-6 所示。

表 2-6

HbsAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1

scAAV2/8-H1-shRNA2	1	0.616521	0.542158	0.50321	0.42243
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	1	0.32058	0.122326	0.037761	0.0163
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5'	1	0.552658	0.45173	0.409618	0.304
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron6'	1	0.453575	0.299765	0.106104	0.06134
HbeAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
scAAV2/8-H1-shRNA2	1	0.719418	0.68019	0.631681	0.6009
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	1	0.604395	0.5192	0.32046	0.198625
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5'	1	0.709418	0.66029	0.631681	0.529969
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron6'	1	0.689595	0.54031	0.524128	0.48704
HBV DNA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
scAAV2/8-H1-shRNA2	1	0.824634	0.70801	0.516223	0.434332
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2'	1	0.501239	0.4387	0.240419	0.054281
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5'	1	0.724701	0.58982	0.51671	0.334332
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron6'	1	0.61941	0.591701	0.327015	0.158961

结果显示当填充序列全部位于表达 shRNA2 的 DNA 序列的 3’端时，其药物结构对 HBV 抑制效果最强。从表中数据结果来看，ssAAV2/8-H1-shRNA2-intron2 相对于其他实施例具有统计学意义，$P<0.01$。

实施例五：填充序列插入位置对双表达盒的目的基因表达影响，以单链 AAV 载体为例

1、包装质粒构建：

本实施例以 pSNAV2.0-H1-shRNA1 为骨架质粒，合成 U6 启动子及表达 shRNA3 的 DNA 序列(SEQ ID No:3，后续在描述质粒时简写为 shRNA3)序列，插入表达 shRNA3 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3 质粒，质粒图谱见图 19。填充序列来源 HPRT-intron 序列 2161-5880（GenBank:M26434.1），调整填充序列长度及位置，并保证 AAV 包装长度始终为 4.6kb。

以 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3 质粒为骨架质粒，合成填充序列，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-5880 位（3.8kb），利用酶切位点 EcoRV 和 XhoI 为插入位点，构建到 H1 启动子序列 5’端，形成 pSNAV2.0-shRNA1- shRNA3-intron1”质粒，质粒图谱见图 20；

以 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3 质粒为骨架质粒，合成填充序列，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-5880（3.8kb）位，利用酶切位点 BglII 和 SalI 为酶切位点，构建到表达 shRNA3 的 DNA 序列 3’端，形成 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron2”质粒，质粒图谱见图 21；

以 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3 质粒为骨架质粒，分段合成填充序列，，源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 2161-4020（1.9kb）段序列利用酶切位点 EcoRV 和 XhoI 为插入位点，构建到 H1 启动子序列 5’端。源于 HPRT-intron（GenBank:M26434.1）第 4021-5880（1.9kb）段序列利用酶切位点 BglII 和 SalI 为插入位点，构建到表达 shRNA3 的 DNA 序列的 3’端，形成 pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron3”质粒，质粒图谱见图 22；

其它包装质粒还包括 pR2C8 和 Helper 构建方法参见实施例一。

2、参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

3、基因组滴度检测

实验方法具体参见实施例一“3、基因组滴度检测”。 实验结果参见表 2-7。

表 2-7

质粒名称	病毒载体名称	包装长度（kb）	基因组滴度(vg/ml)
pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron1”	ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron1”	4.6	6.53E+12
pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron2”	ssAAV2/8-shRNA1- shRNA3 -intron2”	4.6	6.82E+12
pSNAV2.0-shRNA1-shRNA3-intron3”	ssAAV2/8-shRNA1- shRNA3intron3”	4.6	6.64E+12

实验结果显示，3 组 AAV 病毒载体产量相当，只要保证包装序列长度接近野生型 AAV 基因组全长时，填充序列插入位置对包装效率没有影响。

4、目的基因表达及检测

参见实施例二“4、目的基因表达及检测”。

检测结果见图 29 至图 31 和表 2-8 所示。

表 2-8

HbsAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron1”	1	0.730654	0.51113	0.302461	0.211049
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2”	1	0.45057	0.10112	0.027862	0.015342
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron3”	1	0.503505	0.227565	0.102107	0.062175
HbeAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron1”	1	0.81041	0.76119	0.630601	0.529762
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2”	1	0.64039	0.53528	0.30606	0.111025
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron3”	1	0.709091	0.623104	0.42453	0.384341
HBV DNA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron1”	1	0.724712	0.6097	0.51153	0.300382
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2”	1	0.501215	0.433711	0.270494	0.043271
ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron3”	1	0.709407	0.581564	0.307165	0.152945

结果显示当填充序列全部位于表达 shRNA3 的 DNA 序列的 3’端时，其药物结构对 HBV 抑制效果最强。从表中数据结果来看，ssAAV2/8-shRNA1-shRNA3-intron2”相对于其他实施例具有统计学意义，P＜0.01。

实施例六：多血清型 AAV 载体中，填充序列插入位置对目的基因表达影响

1、包装质粒构建：

穿梭质粒 pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron5（对应 ssAAV-H1-shRNA1-intron5 病毒包装）、pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron2（对应 ssAAV-H1-shRNA1-intron2

病毒包装)、pSNAV2.0-H1-shRNA1-intron6（对应 ssAAV-H1-shRNA1-intron6 病毒包装）已构建，具体参见实施例二“包装质粒构建”。结构质粒为 pR2C2，或为 pR2C3，或为 pR2C5，或为 pR2C7，或为 pR2MH31，或为 pR2MH39，或为 pR2MH43，或为 pR2MH47，或为 pR2MH31，不同血清型来源 cap 基因为合成产品，替换掉 pR2C8 质粒 cap 基因(其中 MH31、MH39、MH43、MH47 来自 US9186419)。其它包装质粒还包括 Helper 构建方法参见实施例一。

2、参见实施例一“2、病毒包装及纯化”。

3、基因组滴度检测

实验方法具体参见实施例一“3、基因组滴度检测”。实验结果参见表 2-9。

表 2-9

病毒载体名称	包装长度（kb）	基因组滴度(vg/ml)
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.50E+12
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.85E+12
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.64E+12
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.95E+12
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.10E+12
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.94E+12
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.40E+12
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.30E+12
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.60E+12
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.43E+12
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.11E+12
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.17E+12
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.51E+12
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.75E+12
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.44E+12
ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.55E+12
ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.18E+12
ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.24E+12
ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron5	4.6	6.43E+12

ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.39E+12
ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.67E+12
ssAAV2/MH47-H1-shRNA-intron5	4.6	6.34E+12
ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron2	4.6	6.81E+12
ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron6	4.6	6.67E+12

实验结果显示，同血清型 3 组 AAV 病毒载体产量相当，只要保证包装序列长度接近野生型 AAV 基因组全长时，填充序列插入位置对包装效率没有影响。

4、目的基因表达及检测

参见实施例二“4、目的基因表达及检测”。

检测结果见图 31 至图 38 和表 2-10 所示。

表 2-10

HbsAg-ELISA 检测结果	D0	D1	D2	D3	D4
NC（空白细胞）	1	1	1	1	1
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron5	1	0.930675	0.610601	0.333202	0.203432
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron2	1	0.730533	0.259904	0.178197	0.084962
ssAAV2/2-H1-shRNA1-intron6	1	0.862387	0.380989	0.20192	0.15791
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron5	1	0.88453	0.535058	0.442984	0.188561
ssAAV2/3-H1-shRNA1-intron2	1	0.852413	0.345115	0.116186	0.033372
ssAAV2/3-H1-shRNA-intron6	1	0.817118	0.43886	0.207146	0.124495
ssAAV2/5-H1-shRNA-intron5	1	0.909219	0.75665	0.468068	0.434745
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron2	1	0.893479	0.499484	0.332277	0.211844
ssAAV2/5-H1-shRNA1-intron6	1	0.829574	0.676569	0.311333	0.272052
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron5	1	0.88453	0.735058	0.542984	0.338561
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron2	1	0.700769	0.57327	0.411992	0.212092
ssAAV2/7-H1-shRNA1-intron6	1	0.742381	0.680966	0.50184	0.482693
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron5	1	0.83067	0.412621	0.233202	0.213435
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron2	1	0.730531	0.25152	0.078197	0.054962
ssAAV2/MH31-H1-shRNA1-intron6	1	0.722307	0.36095	0.10195	0.082791

ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron5	1	0.78453	0.235058	0.142984	0.108561
ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron2	1	0.752401	0.145115	0.017156	0.030071
ssAAV2/MH39-H1-shRNA1-intron6	1	0.81711	0.33886	0.247142	0.12175
ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron5	1	0.699219	0.55665	0.268068	0.189474
ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron2	1	0.693479	0.299484	0.132277	0.011844
ssAAV2/MH43-H1-shRNA1-intron6	1	0.729574	0.376569	0.171333	0.053205
ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron5	1	0.88453	0.53515	0.442984	0.238501
ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron2	1	0.740769	0.37121	0.111992	0.012152
ssAAV2/MH47-H1-shRNA1-intron6	1	0.742381	0.58191	0.30184	0.182623

结果显示同血清型 3 种结构 AAV 病毒载体比较时，当填充序列全部位于表达 shRNA1 的 DNA 序列的 3’端时，其药物结构对 HBV 抑制效果最强。从数据结果来看，填充序列全部位于 shRNA 的 3’端的药物结构相对于其他实施例具有统计学意义，$P<0.01$。

实施例七：两种病毒载体制备方法

本公开还提供了另外两种病毒包装方法，AAV 病毒载体包装时不局限于上述包装方法。

1、Ad 辅助包装方法：所述包装体系须包括 pSNAV2.0-H1-shRNA1、pAAV2/8，及 Ad5 病毒液。所述包装方法所使用的细胞系为 HeLa 细胞。细胞经过两质粒转染后 24h，用 Ad5 进行辅助感染，获得 ssAAV2/8-H1-shRNA1。（具体参见 JY Dong, PD Fan, Raymond A, Frizzell. Quantitative analysis of the packaging capacity of recombinant adeno-associated virus. Human Gene Therapy, 1996, 7:2101-2112. 及实施例一）。依照同样的方法依次合成 ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4、ssAAV2/8-H1-shRNA1。后续病毒纯化及检测方法参见实施例一。

2、杆状病毒包装系统：本方法需分别构建 pFBD-cap8、pFBD-rep2、pFB-shRNA1（pFB-shRNA1 原始载体 pFB-EGFP，根据《分子克隆》改造而

成）三质粒，转化 DH10Bac 感受态细胞，形成 Bac-cap8、Bac-rep2、Bac-GFP 三杆粒，分别感染 SF9 细胞后，获得含有三种基因表达盒的杆状病毒。再用三种杆状病毒同时感染 SF9 细胞，生产 ssAAV2/8-H1-shRNA1。（具体方法参见 Haifeng Chen. Intron splicing-mediated expression of AAV rep and cap genes and production of AAV vectors in insect cells. Mol Ther. 2008 May; 16(5): 924-30. 及实施例一）。依照同样的方法依次合成 ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3、ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4、ssAAV2/8-H1-shRNA1。后续病毒纯化及检测方法参见实施例一。

此方法也可通过改造，将 cap 及 rep 构建到同一个杆状病毒中，最终形成两种杆状病毒共感染，来达到生产 AAV 的目的。

表 2-11

病毒载体名称	包装方法	包装长度 kb	基因组滴度 vg/ml
ssAAV2/8-H1-shRNA1	Ad 辅助两质粒包装	0.6	6.6E+9
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron	Ad 辅助两质粒包装	2.3	6.03E+10
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1	Ad 辅助两质粒包装	3.8	6.25E+11
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	Ad 辅助两质粒包装	4.6	6.78E+11
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3	Ad 辅助两质粒包装	5.1	6.62E+11
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4	Ad 辅助两质粒包装	6.0	5.99E+8
ssAAV2/8-H1-shRNA1	杆状病毒包装	0.6	7.12E+11
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron	杆状病毒包装	2.3	7.65E+12
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron1	杆状病毒包装	3.8	7.44E+13
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron2	杆状病毒包装	4.6	7.32E+13
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron3	杆状病毒包装	5.1	7.58E+13
ssAAV2/8-H1-shRNA1-intron4	杆状病毒包装	6.0	6.95E+10

上述实验结果说明，无论选用何种病毒包装系统，选择合适长度的填充序列使得包装序列长度接近 AAV 野生型基因组长度，即 3.8kb-5.1kb 时，均可以保证较高的包装效率。

实施例八：体内药效实验

利用 scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2 和 scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5 两种结构药物与商品化药物拉米夫定及恩替卡韦进行体内药效比较。给药方式为静脉注射，14 天为一个采血周期，分离血清样品后，进行 HBsAg 及 HBV DNA 检测。动物实验分组情况如下：

组别	给予药物	剂量（vg/只）	HBV 转基因 BALB/c 动物数（n）
1	DPBS	0.2ml/只	6
2	拉米夫定（LAM）	150mg/kg	6
3	恩替卡韦（ETV）	3.2mg/kg	6
4	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2	3×10^{10}	6
5	scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5	1.5×10^{11}	6

本实验共进行 266 天（38 周）。实验方法参见实施例二“4、目的基因表达及检测”。检测结果见图 40 和表 2-12（HBsAg 检测）、及图 41 和表 2-13（HBV DNA 检测）。

表 2-12

样品分组 / 采血时间	D0	D14	D28	D35	D49	D70	D98	D126	D154	D182	D210	D238	D266
DPBS	1	0.87	0.84	1.09	0.89	1.07	0.97	1.02	0.36	0.5	0.61	0.27	0.44
LAM	1	0.98	0.96	1.23	1.21	1.01	1.19	1.46	0.66	0.76	1.16	0.5	0.54
ETV	1	1.51	1.55	1.8	1.4	1.33	1.34	1.48	0.75	0.81	1.57	0.83	0.94
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2	1	0.04	0.07	0.09	0.1	0.07	0.11	0.14	0.11	0.14	0.13	0.07	0.05
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5	1	0.07	0.03	0.04	0.04	0.17	0.12	0.17	0.15	0.18	0.09	0.03	0.05

表 2-13

	D0	D14	D28	D35	D49	D70	D98	D126	D154	D182	D210	D238	D266
DPBS	1	1.13	2.85	2	2.18	2.1	2.72	1.02	1.68	3.23	3.27	4.77	4.02
LAM	1	0.69	0.87	0.72	0.68	1.26	0.41	0.24	0.56	0.8	0.28	0.26	0.07
ETV	1	8.68	1.24	1.08	1.25	3.93	1.05	0.72	1.06	3.33	5.5	2.96	1.55
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2	1	1.17	1.58	0.8	0.57	1.71	0.51	0.32	0.42	0.8	1.11	0.88	1.04
scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5	1	0.7	1.02	0.96	1.21	2.9	0.63	0.56	0.55	1.63	2.87	2.36	1.2

由上可知，当 scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5 的使用剂量是 scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2 使用剂量的 5 倍时，两种药物对模型动物血清中 HBsAg 抑制水平相当，在给药后 D14 时抑制效果达到最强，且抑制作用持续到 D266 天，两种结构药物药效均强于商品化药物所使用剂量药效；其中 scAAV2/8-H1-shRNA2-intron2 结构药物对模型动物血清中 HBV DNA 抑制

水平与拉米夫定所使用剂量药效相当，scAAV2/8-H1-shRNA2-intron5 结构药物对模型动物血清中 HBV DNA 抑制水平略差。