

一种适用地中海贫血症和镰刀形贫血基因治疗的慢病毒载体

技术领域

本发明属于基因工程技术领域，涉及一种慢病毒载体，尤其涉及一种适用地中海贫血症和镰刀形贫血基因治疗的慢病毒载体。

背景技术

迄今为止，人类共发现有 7000 余种罕见病，但仅 5% 的罕见病有药可用。目前，几乎所有的罕见病药物都需要终身使用。基因治疗则为罕见病提供了一次性治愈的可能。地中海贫血(地贫)是一种全球分布最广、累积患病人群最多的单基因遗传性血红蛋白病，是罕见病中最常见的人类遗传性疾病。

基因治疗具备良好的安全性是其能够成为常规疗法，使更多患者受益的前提。慢病毒载体以不可控的方式插入到基因组(约 75% 整合至转录活跃的基因编码区域)，伴随有较高的激活癌基因和失活抑癌基因的风险。事实上，慢病毒载体曾在基因治疗地中海贫血的过程中激活 HMGA2 基因，导致转导的造血干细胞克隆大量扩增。该克隆的异常扩增是由于慢病毒基因治疗载体中使用的绝缘子元件，也即鸡 beta 珠蛋白脱氧核糖核酸酶 I 超敏感部位 4 核心部位(core chicken hypersensitivity site 4, cHS4)造成的(Cavazzana-Calvo, M. et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. Nature 467, 318-22 (2010).)。

绝缘子元件是具有阻止基因沉默或者防止所在区域基因激活功能的基因元件。cHS4 绝缘子含有隐秘的 RNA 剪接信号，造成克隆扩增，影响基因治疗的安全性，并且使得慢病毒的滴度大幅下降(Cavazzana-Calvo, M. et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. Nature 467, 318-22 (2010). Negre, O. et al. Preclinical evaluation of efficacy and safety of an improved lentiviral vector for the treatment of beta-thalassemia and sickle cell disease. Curr Gene Ther 15, 64-81 (2015).)。本发明所包含的绝缘子元件来自泡沫病毒(Foamy virus)，仅 36bp 的绝缘子序列，不含有隐秘的 RNA 剪接信号，并具有维持基因表达和防止所在区域的癌基因激活的功能。

Beta 珠蛋白基因 (HBB) 在发育过程中的特异性表达由一段位于其上游的基因座控制区 (LCR) 调控 (Kim, A. & Dean, A. Chromatin loop formation in the beta-globin locus and its role in globin gene transcription. Mol Cells 34, 1-5 (2012).). 该段序列长达 16kb, 远远超出了慢病毒载体的运载能力。为了构建用于基因治疗的 beta 珠蛋白基因表达盒, 必须从 LCR 区域中挑选出具有调控 beta 珠蛋白基因表达功能的、大小合适的核心元件。LCR 由 HS2、HS3、HS4 等脱氧核糖核酸酶 I (DNase I) 超敏感位点 (hypersensitive sites) 组成。这些超敏感位点长度依然太大, 必须对其进行进一步缩减才能包装进慢病毒载体。由于这些超敏感位点功能不同, 必须相互配合才能发挥精准的调控功能, 因此, 必须找到有利 beta 珠蛋白基因高效和特异表达的组。例如, 由 HS4、HS3、HS2 脱氧核糖核酸酶 I 超敏感位点的核心元件组成的微基因座 (miniLCR) 导致病毒效价显著降低 (Weber, L. et al. An Optimized Lentiviral Vector Efficiently Corrects the Human Sickle Cell Disease Phenotype. Mol Ther Methods Clin Dev 10, 268-280 (2018)。本发明的筛选的微基因座不会导致病毒效价的显著降低。

目前, 基于慢病毒载体治疗地中海贫血技术仍未真正实现临床使用及商业化的原因有二: 一, 现有技术生产出的治疗用病毒载体滴度过低, 导致生产规模和生产成本过大, 难以生产出足量的病毒载体供应临床使用和商业化的; 二, 现有技术生产出的治疗用病毒载体进行治疗后, 其 beta 珠蛋白的表达量十分有限, 难以起到有效的治疗效果。本发明对载体结构进行了优化, 发现对 Beta 珠蛋白基因 (HBB) 的 2 号内含子优化后, 既可以在一定程度提高基因的表达, 又可以大幅度提高病毒包装产量, 使其临床使用和产业化成为可能。

发明内容

现有技术中将慢病毒载体用于地中海贫血与镰刀型贫血基因治疗存在安全隐患, 也并不十分高效; 本发明的目的在于针对现有技术载体滴度过低, 无法达到临床应用水平; 基因表达量不足, 无法起到治疗效果; 以及载体缺乏绝缘子序列, 容易激活临近基因表达, 存在较大安全性风险等缺陷, 提供一种适用地中海贫血症和镰刀形贫血基因治疗的慢病毒载体。

本发明的目的是通过以下技术方案实现的:

本发明其中一个或多个实施例涉及一种包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体, 所述表达盒包含:

a、微基因座控制区, 为一段从 beta 珠蛋白 16kb 的基因座控制区中筛选出来的不

含 HS1 区的微型调控元件；

b、beta 珠蛋白的基因序列；beta 珠蛋白基因的 2 号内含子经优化，所述基因 beta 珠蛋白的基因序列如 SEQ ID NO. 2 所示；

c、beta 珠蛋白的基因序列上游侧翼的启动子序列；

d、beta 珠蛋白的基因序列下游的侧翼序列；

e、来自泡沫病毒（Foamy virus）的绝缘子序列。

作为本发明的一个实施方案，所述微型基因座控制区是由 HS2、HS3、HS4 脱氧核糖核酸酶 I 超敏感位点序列经过筛选后，组合而成；或是由 HS3、HS2 脱氧核糖核酸酶 I 超敏感位点序列经过筛选后，组合而成。

作为本发明的一个实施方案，所述微基因座控制区是从 beta 珠蛋白的基因座控制区 LCR 的 HS4、HS3、HS2 区域分别截取的脱氧核糖核苷酸序列组成的微型基因座调控元件。

作为本发明的一个实施方案，所述微型基因座调控元件的序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

作为本发明的一个实施方案，所述启动子序列如 SEQ ID NO. 4 所示。

作为本发明的一个实施方案，所述侧翼序列如 SEQ ID NO. 5 所示。

作为本发明的一个实施方案，所述绝缘子序列如 SEQ ID NO. 6 所示。

本发明涉及一种包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体在制备地中海贫血和镰刀型贫血的基因治疗药物中的应用。

附图说明

通过阅读参照以下附图对非限制性实施例所作的详细描述，本发明的其它特征、目的和优点将会变得更明显：

图 1 为载体设计示意图；其中，a 为 LG04 载体设计示意图，b 为 LG02 载体设计示意图；

图 2 为各载体血红蛋白^{T87Q}相对表达示意图；

图 3 为各载体滴度对比示意图；

图 4 为不同载体感染干细胞后，形成 BFU-E (爆式红细胞集落形成单位) 的数量示意图。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明进行详细说明。以下实施例将有助于本领域的技术人员进

一步理解本发明，但不以任何形式限制本发明。应当指出的是，对本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干调整和改进。这些都属于本发明的保护范围。

实施例

本实施例涉及一种人源 beta 珠蛋白的表达盒，进而获得含该表达盒的用于基因治疗的慢病毒载体 LG04。LG04 载体设计如图 1 (a) 所示，该表达盒包含以下几种元件：

(1) 微基因座控制区 (miniLCR)，为一段从 beta 珠蛋白 16kb 的基因座控制区中筛选出来的不含 HS1 区的微型调控元件，具体为从 beta 珠蛋白 16kb 的基因座控制区 LCR 的 HS4、HS3、HS2 区域分别截取长度约 380bp、1900bp、720bp 的脱氧核糖核苷酸序列组成总长 3kb (序列如 SEQ ID NO. 1 所示) 的微型基因座调控元件；(2) beta 珠蛋白的基因序列。其中外显子 2 含 T87Q 突变，2 号内含子序列经优化；该 beta 珠蛋白的基因序列如 SEQ ID NO. 2 所示；LG02 载体的设计图如图 1 (b)，其选用的 beta 珠蛋白的基因序列如 SEQ ID NO. 3 所示；(3) 265-bp 的 beta 珠蛋白的基因序列上游侧翼的启动子序列 (序列如 SEQ ID NO. 4 所示)；(4) beta 珠蛋白的基因序列下游侧翼 300-bp 序列 (序列如 SEQ ID NO. 5 所示)；(5) 将该表达盒置于慢病毒载体；在慢病毒载体的 LTR U3 区域添加一段来自泡沫病毒 (Foamy virus) 的仅 36bp 的绝缘子序列 (序列如 SEQ ID NO. 6 所示：aaggagacatctagtgatataagtgtgaactacac)。该绝缘子序列具有维持基因长期表达和阻止整合位点附近基因激活的功能，且不会降低慢病毒载体的滴度。含 3kb 微基因座控制区的慢病毒载体的序列如 SEQ ID NO. 7 所示。将本发明载体质粒 (13 μg) 与表达膜蛋白的质粒 (如 3.75 μg pMD2G (序列如 SEQ ID NO. 8 所示))、表达 GagPol 长链蛋白的质粒 (通常为 13 μg pMD1g/pRRE (序列如 SEQ ID NO. 9 所示))、表达 REV 蛋白 (通常为 3 μg pRSV-REV (序列如 SEQ ID NO. 10 所示)) 的质粒共转染病毒 4X10⁶ 生产细胞 (如 293T)，生产出表达 beta 珠蛋白的慢病毒 LG04。LG02 载体设计如图 1 (a) 所示，其他步骤基本同上 (参照 CN201910824134)，获得表达 beta 珠蛋白的慢病毒 LG02。使用表达绿色荧光蛋白的载体质粒 (pLV/Pgk-EGFP，引用文献 DOI: 10.1093/nar/gkt1163) 替换本发明载体质粒，其它步骤同上，获得对照病毒载体。慢病毒通过超速离心或者柱层析的方法的富集或者纯化。

在体外使用相同量的各个病毒载体感染人造血干细胞，感染完成后诱导干细胞向红系分化，在第 14 天提取各组细胞 RNA，使用荧光定量 PCR 进行 RT-Q-PCR 分析整合的血红蛋白^{T87Q} mRNA 的表达水平，反应了血红蛋白^{T87Q} 的相对表达量 (图 2)，LG04 号载体表

达量最高。

使用 293T 细胞包装 LG02 和 LG04 载体，纯化后，感染 293T，检测病毒感染滴度（图 3），结果显示，优化后的内含子可以提高病毒包装滴度。

使用相同量的各个病毒载体感染造血干细胞后，将干细胞接种在含有特点细胞因子的固体培养基内，培养 14 天后，显微镜下统计爆式红细胞集落形成单位，集落数量代表干细胞分化能力，如图 4，可以看出，LG04 号载体感染对造血干细胞分化能力基本无影响。

与现有技术相比，本发明具有如下有益效果：

- 1) 获得一种安全、高效的地中海贫血和镰刀型贫血的基因治疗方法；
- 2) 提高了 beta 珠蛋白的基因的表达；
- 3) 提高了病毒包装效率，增加了病毒滴度；
- 4) 提高了病毒载体的安全性，降低了临床使用的安全风险；
- 5) 本发明所使用的来自来自泡沫病毒的绝缘子序列，可以维持基因表达的同时防止所在区域基因激活。

以上对本发明的具体实施例进行了描述。需要理解的是，本发明并不局限于上述特定实施方式，本领域技术人员可以在权利要求的范围内做出各种变形或修改，这并不影响本发明的实质内容。

权利要求书

- 1、一种包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体，所述表达盒包含：
 - a、微基因座控制区，为一段从 beta 珠蛋白 16kb 的基因座控制区中筛选出来的不含 HS1 区的微型调控元件；
 - b、beta 珠蛋白的基因序列，所述基因 beta 珠蛋白的基因序列如 SEQ ID NO. 2 所示；
 - c、beta 珠蛋白的基因序列上游侧翼的启动子序列；
 - d、beta 珠蛋白的基因序列下游的侧翼序列；
 - e、来自泡沫病毒 Foamy virus 的绝缘子序列。
- 2、根据权利要求 1 所述的包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体，其特征在于，所述微型基因座控制区是由 HS2、HS3、HS4 脱氧核糖核酸酶 I 超敏感位点序列经过筛选后，组合而成。
- 3、根据权利要求 2 所述的包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体，其特征在于，所述微型基因座调控元件的序列如 SEQ ID NO. 1 所示。
- 4、根据权利要求 1 所述的包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体，其特征在于，所述启动子序列如 SEQ ID NO. 4 所示。
- 5、根据权利要求 1 所述的包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体，其特征在于，所述侧翼序列如 SEQ ID NO. 5 所示。
- 6、根据权利要求 1 所述的包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体，其特征在于，所述绝缘子序列如 SEQ ID NO. 6 所示。
- 7、一种如权利要求 1 所述的包含 beta 珠蛋白表达盒的慢病毒载体在制备地中海贫血和镰刀型贫血的基因治疗药物中的应用。