

Könyvtárként az NLM hozzáférést biztosít a tudományos irodalomhoz. Az NLM-adatbázisba való felvétel nem jelenti a tartalomnak az NLM vagy a National Institutes of Health általi jóváhagyását vagy egyetértését.

További információ: [PMC Jogi nyilatkozat](#) | [PMC szerzői jogi megjegyzés](#)



[Mol Ther Methods Clin Dev](#). 2017. szeptember 15.; 6: 124–134.

PMCID: PMC5537168

Közzétéve online: 2017. július 5. doi: [10.1016/j.omtm.2017.06.007](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.06.007)

PMID: [28791314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28791314/)

Vero-alapú csomagoló sejtvonala generálása SV40 génszállító vektorok előállítására klinikai génterápiás vizsgálatokban

[Miguel G. Toscano](#) , ^{1,*} [Jeroen van der Velden](#) , ² [Sybrand van der Werf](#) , ² [Machteld Odijk](#) , ² [Ana Roque](#) , ² [Rafael J. Camacho-Garcia](#) , ^{1,3} [Irene G. Herrera-Gomez](#) , [Mancini](#) , ^{1,3} , ² és [Peter de Haan](#) , ²

Absztrakt

A replikációhibás (RD) rekombináns majomvírus 40 (SV40) alapú génszállító vektorok nagy potenciállal rendelkeznek a klinikai alkalmazásokban, mivel feltételezhetően nem immunogenitást okoznak, és képesek immuntoleranciát kiváltani a transzgéntermékekkel szemben emberekben. Az SV40 vektorok klinikai alkalmazását azonban hátráltatta, hogy nincs olyan csomagoló sejtvonala, amely replikáció-kompetens (RC) szabad SV40 részecskéket termel a vektortermelési folyamatban. A probléma megoldására adaptáltuk a jelenlegi SV40 vektor genomot, amelyet vektorrészecskék előállítására használnak, és létrehoztunk egy új Vero-alapú csomagoló sejtvonala, a SuperVero nevet, amely kizárólag az SV40 nagy T antigént expresszálja. A SuperVero sejtek hasonló számú SV40 vektorrészecskét termelnek a jelenleg használt csomagoló sejtvonalaéhoz képest, jóllehet szennyező RC SV40 részecskék hiányában. Egyedülálló SV40 vektorplatformunk, az SV *ac* megnyitja az utat az SV40-alapú terápiák egy teljesen új generációjának klinikai teszteléséhez a fontos betegségek széles körében.

Kulcsszavak: SV40 vírusvektorok, SuperVero, SV *ac* , csomagoló sejtek

Bevezetés

A kis molekulák és a terápiás fehérjék után a génterápia lesz a gyógyszerek következő hulláma, amely potenciálisan képes gyógyítani napjaink főbb betegségeit. A génterápia sikerének kulcsa a terápiás gének biztonságos és hatékony bejuttatása a beteg szervezetének érintett szöveteibe vagy szerveibe. A vírusok úgy fejlődnek, hogy génjeiket hatékonyan vigyék át és expresszálják a gazdasejtekbe. Ez a képesség ideálissá teszi őket génszállító vektorként való használatra. A jelenleg génterápiára használt vírusvektor rendszerek közül a lentivírus (LV) és az adeno-asszociált virális (AAV) vektorok a legnépszerűbbek, mivel állatoknak beadva sokféle szövetet transz-

dukálnak, és hosszú távú expressziót közvetítenek. [1](#), [2](#), [3](#) Mindkét vektor esetében kimutatták, hogy az ilyen replikációhibás (RD) vírusvektorok nem immunogének vagy tolerogének olyan gazdaszervezetekben, amelyek naivak a rokon vírussal szemben. [4](#), [5](#), [6](#), [7](#), [8](#) Sikeres preklinikai és klinikai kísérletek után az első LV és AAV vektor alapú terápiák piacra kerültek. [9](#) Mindazonáltal mind az LV, mind az AAV vektorrendszernek vannak olyan hiányosságai, amelyek korlátozzák alkalmazásukat.

Az LV vektorok véletlenszerűen integrálódnak a gazda genomjába, és így növelik az inszerciós mutagenézis kockázatát. [10](#) Ezen túlmenően az LV vektor részecskék nagyon instabilak, in vivo beadáskor gyorsan lebomlanak, és a stabil csomagoló sejtvonala fejlesztése továbbra is kihívást jelent. [11](#) Ezen okok miatt az LV vektorokat főként leukociták és/vagy progenitoraik ex vivo transzdukciójára használják vérrel kapcsolatos genetikai rendellenességek, lizoszómális raktározási betegségek vagy rák kezelésére. Az AAV vektorokat főként in vivo génterápiákra használják. Az emberi populáció többsége azonban találkozott a vad típusú AAV-vel és segítő vírusával (megfázást okozó adenovírus) együtt, és erős humorális és celluláris immunmemória alakult ki az AAV kapszid fehérjékhez. A rekombináns AAV-vektorokkal végzett klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a vektorrészecskék beadása veleszületett és adaptív immunválaszokat vált ki a vírus és a transzgén által kódolt fehérjék ellen a kezelt betegek túlnyomó többségében, ami a terápiás transzgenek expressziós szintjének idővel csökkenéséhez és a transzdukált sejtek eliminációjához vezet. sejteket a szervezetből, ami veszélyezteti a vektor újbóli beadását. Az a néhány kezelt beteg, aki hosszú távú transzgenexpressziót mutatott, nagy valószínűséggel soha nem volt fertőzött AAV-vel, és így immunológiailag naiv volt a vizsgálatban használt RD vektorral szemben. Ezen okok miatt az AAV vektor alapú in vivo génterápiák hatékonysága korlátozott. [12](#), [13](#)

Az RD majomvírus 40 (SV40) vektorok vonzó alternatívát jelenthetnek az AAV vektorokkal szemben a klinikai génterápiában. [A14](#) SV40 egy 45 nm méretű ikozaéderes kapszidokkal rendelkező poliomavírus, amely 5,25 kb hosszú, cirkuláris, kettős szálú DNS-t tartalmaz. A vírus szigorúan szaporodik természetes gazdájában, a makákókban, ahol krónikus tünetmentes fertőzéseket okoz. Az SV40 részecskék caveoláris-endoszómális úton jutnak be a fertőzött sejtekbe, de más vírusokkal ellentétben képesek elkerülni a lizoszómális lebomlást, ezáltal elkerülik a gazdaszervezet immunrendszerének való kitétséget. [A15](#), [16](#), [17](#), [18](#), [19](#), [20](#), [21](#) RD SV40 vektorokat a két korai nem-strukturális fehérje, a nagy T-antigén (LTag) és a kis T-antigén (STAg) kódoló régiójának törlésével hozták létre, így 2,7 kb-t kaptak a terápiás fehérjét vagy RNS-t kódoló transzgén klónozására szolgáló hely. Az SV40 vektorok sejt típusok széles skáláját transzdukálják in vivo, és terápiás potenciáljukat humán betegségek állatmodelljeiben bizonyították. [22](#), [23](#), [24](#), [25](#), [26](#) Mivel az emberek naivnak tekinthetők az SV40-re, [27](#), [28](#)-ra, várható, hogy az RD SV40 vektorok nem immunogének vagy tolerogének klinikai körülmények között alkalmazva. Az emberekben tapasztalható nem immunogenitás és a transzgén fehérjékkel szembeni immuntoleranciát kiváltó képessége az SV40 vektorokat rendkívül vonzóvá teszi a génpótlásban és immunterápiákban való felhasználásra.

Az SV40-vektorok klinikára történő transzlációját azonban hátráltatta egy olyan csomagoló sejtvonala hiánya, amely nem halmoz fel kimutatható mennyiségű replikáció-kompetens (RC) SV40-részecskét a vektortermelés során. [29](#), [30](#), [31](#), [32](#) Eddig két sejtvonalaat használtak főleg az SV40 vektorok előállítására: a COS-1-et és a COS-7-et. COS-sejtvonalaat állítottunk elő majom CV1-sejtek SV40 DNS-sel történő transzformálásával. [29](#) Az SV40 vektorok COS sejtekben történő passzálása azonban vad típusú SV40 részecskék megjelenését eredményezi. Ez nagy va-

lőszínűséggel a kromoszómáisan inszertált SV40-specifikus DNS-szekvenciák és az episzomálisan replikálódó vektor-specifikus DNS-szekvenciák közötti szekvencia-homológia-függő rekombinációval következik be. [33](#)

Az SV40 T antigéneket transzban expresszáló egyéb sejtvonalak a COT18 és a CMT4. Mindkét CV1-eredetű sejtvonala SV40 DNS felhasználásával állítottuk elő, amelyben a T-antigéneket az egér metalotionein promoter transzkripció szabályozása mellett expresszálták. Mivel az SV40 genomiális DNS teljes korai régiója jelen van a kromoszómális DNS-ben, megmaradt az a képesség, hogy az RC vírus szennyeződései megjelenjenek a vektortermelési folyamat során. Ezenkívül mindkét csomagoló sejtvonala vektorhozama nem nőtt a COS-sejtekéhez képest. [33](#), [34](#), [35](#)

Polyomavirus-alapú vírusszerű részecske (VLP) vektorrendszereket fejlesztettek ki, hogy megakadályozzák az RC vírusrészecskék előfordulását a vektorkészítményekben. Az in vitro előállított VLP-kben, amelyek cirkuláris, VP1 poliomavírussal burkolt, kettős szálú DNS-ből állnak, hiányzik a VP2 és VP3 a kapszidokban és a beágyazott DNS-molekulákat borító hisztonokban. Bár ezek a részecskék nagyobb csomagolóképeséget mutatnak, a VP2/VP3 hiánya a VLP-kben negatív hatással van a sejtmagba való bejutásra. [36](#)

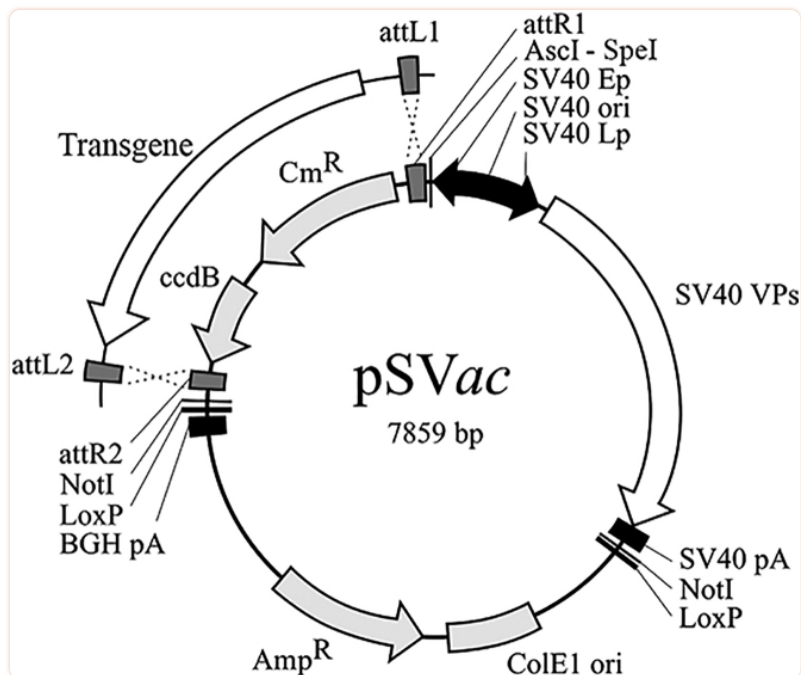
A vad típusú vírusszennyeződések keletkezésének leküzdése érdekében optimalizáltuk a vektorrészecskék termelésének elindításához használt SV40 vektor genomot, és létrehoztunk egy biztonságos és hatékony Vero-alapú SV40 vektorcsomagoló sejtvonala, a SuperVero nevet. A SuperVero sejtek kizárólag a vírus LTag-ot expresszálják, és magas titereken halmozzák fel a vektorrészecskéket, amelyek összehasonlíthatók a hagyományos COS-1 és COS-7 csomagoló sejtvonalaakkal. Mivel az RD SV40 vektorok biztonságosak, rendkívül hatékonyak a génszállításban, és nem immunogének/tolerogének emberekben, az SV ac nevű továbbfejlesztett SV40 vektorplatformunk ígéretes tulajdonságokkal rendelkezik korunk főbb betegségei elleni hatékony kezelések kifejlesztésében. [37](#)

Eredmények

SV40 Vector Destination pSV ac és származékos vektor expressziós plazmidok felépítése

Az SV40 vektorrendszer hatékonyságának és sokoldalúságának javítása érdekében lépések sorozatával módosítottuk a pSL-PL [38](#) vektorplazmidot, és így megkaptuk az SV40 célplazmidot, a pSV ac ([1.ábra](#)), amelyet a rekombináns SV40 részecskék termelésének elindítására használnak. A pSL-PL alacsony kópiaszámú bakteriális gerincét (pBR322) nagy kópiaszámú gerinccel (pBluescript SK-) cseréltük ki. A pSL-PL-ben jelen lévő maradék 3'-terminális LTag kódoló szekvenciákat eltávolítottuk, és a pEF5/FRT/V5-DEST-ből származó Gateway génkazettát bevezettük az SV40 vektor DNS korai régiójába, amely sokoldalú módszert biztosít a transzgének bejuttatására. terápiás fehérjéket vagy RNS-eket kódolnak a vektor rendeltetési plazmidjába a pSV ac DNS és a transzgént hordozó beléptető plazmid LR klonáz által közvetített rekombinációjával, amely vektor expressziós plazmidokat eredményez. A pEF5/FRT/V5-DEST-ből származó szarvasmarha növekedési hormon (BGH) poliadenilációs (pA) szignált a Gateway kazettától lefelé klónozták, hogy megkönnyítsék a tranziens expressziós vizsgálatokat úgy, hogy a célsejteket vektor expressziós plazmidokból származó DNS-sel transzfektálják. Egyedi *Ascl* és *SpeI* restriktációs helyeket vezettek be az SV40 korai promoter és a Gateway kazetta közé, hogy megkönnyítsék a szövetspecifikus promoterek bejutását. Különböző transzgéneket tartalmazó SV40 expressziós plazmidok sorozatát hoztuk létre Gateway rekombinációval. A kapott expressziós plaz-

midok a medúza zöld fluoreszcens fehérjét (pSV GFP), a humán aktivált VII-es véralvadási faktort (pSV FVIIa) és a szentjánosbogár luciferázra specifikus rövid hajtú RNS-t (pSV shLuc) kódolják



1.ábra

Az SV40 vektor rendeltetési hely plazmidjának sematikus ábrázolása pSV ac

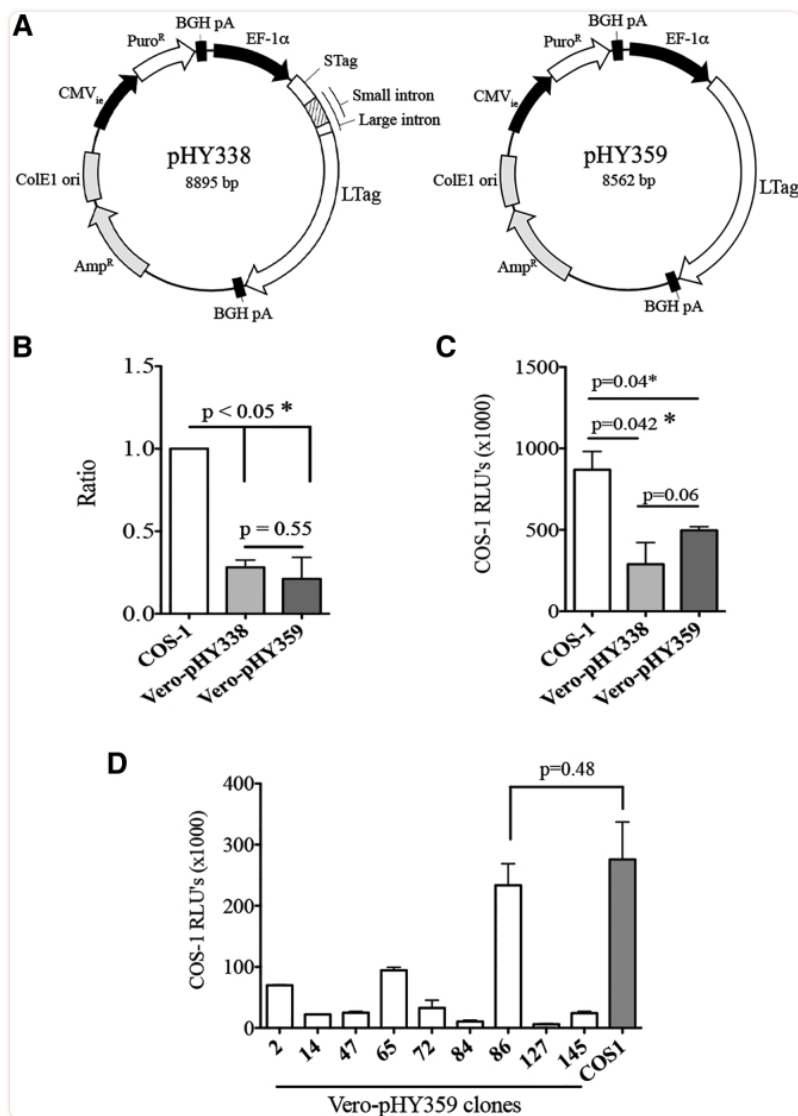
A pSV ac -ben jelenlévő ccdB-t és a kloramfenikol-rezisztencia (CmR) géneket tartalmazó Gateway génkazettát Gateway - rekombináció alkalmazásával helyettesítjük a transzgénnel, így SV40 vektor expressziós plazmidot kapunk.

Az SV40 vektor részecskék előállításához a pSV ac prokarióta gerincét el kell távolítani az SV40 vektor szekvenciákból. Ebből a célból *NotI* restriktions helyeket és loxP rekombinációs helyeket vezetünk be a Gateway kazetta és a BGH pA jel, valamint az SV40 pA jel és a pBluescript SK- bakterialis gerinc közé. Cirkuláris vektor-DNS-t, amelyet kiindulási anyagként használtunk az SV40 vektorrészecskék előállításához csomagoló sejtekben, úgy állítottuk elő, hogy egy vektor-expressziós plazmidot *NotI*- enzimmel emésztettünk, majd a vektor-DNS-t T4 DNS-ligázzal recirkularizáltuk. Alternatív megoldásként cirkuláris vektor-DNS előállítható homológ rekombinációval a loxP helyeken Cre-rekombináz segítségével.

Új SV40 vektorcsomagoló sejt vonal generálása

Az SV40 T antigének szükségesek a vírus DNS replikációjához és a vírus kapszid fehérjét kódoló késői gén expressziójához. Annak ellenőrzésére, hogy az LTag önmagában elegendő-e az SV40 vektor részecskék előállításához, létrehoztuk a pHY338 és pHY359 expressziós plazmidokat az [Anyagok és módszerek](#) részben leírtak szerint. A pHY338 expressziós plazmid mind az STag-ot, mind az LTag-ot kódolja; A pHY359 plazmid kizárólag az LTag-t kódolja ([2. ábra](#)). A Vero sejteket választottuk ki akceptor sejttekként mindkét expressziós plazmidhoz, mivel ezek a

sejtek megengedik az SV40-et, és mivel a Vero egy elfogadott sejtenyészítő platform a vakcina előállításához. A szérumentes sejtenyészítő tápközegben tenyésztett [39 Vero sejtet pHY338 vagy pHY359 DNS-sel transzfektáltak, és a sejteket 1 hónapig tenyésztették puromicinnel kiegészített szérumentes tápközegben.](#) A puromicin-rezisztens sejtklónokat ezt követően a [31.](#) számú COS-1 sejtekben termelt SV *Luc* részecskékkel transzdukáltak 100 MOI mellett. Pozitív kontrollként COS-1 sejteket transzdukáltak SV *Luc* részecskékkel ugyanazon MOI mellett. Három nappal a transzdukció után kvantitatív valós idejű PCR-rel meghatároztuk a transzdukált sejtek tápközegében jelen lévő SV *Luc* részecskék mennyiségét. A qPCR vizsgálatot úgy fejlesztették ki, hogy csak a csomagolt vektor genomokat méri (2. ábraB). Mind a pHY338, mind a pHY359 transzfektált Vero sejtek a COS-1 sejtekben termelt vektorrészecskék mennyiségének körülbelül 30%-ában termeltek vektorrészecskéket. Annak ellenőrzésére, hogy a transzfektált Vero sejtekben termelődő vektorrészecskék biológiailag aktívak-e, ezt követően az SV *Luc* -transzdukált Vero és COS-1 sejtekből származó táptalajt használtuk a friss COS-1 sejtek transzdukálására. Három nappal a transzdukció után nyers sejt-lizátumokat készítettünk, és ezekben a lizátumokban luciferázaktivitást lumineszcenciával határoztunk meg. 2. ábraA C azt mutatja, hogy a transzfektált Vero-sejtek olyan vektorrészecskéket termeltek, amelyek luciferáz-expressziót indukáltak, amikor COS-1-sejtekbe vitték át. Ezek a kísérletek kimutatták, hogy az SV40 LTag jelenléte a Vero sejtekben elegendő az SV40 vektor részecskék előállításához.



2. ábra

A pHY359-cel stabilan transzfektált Vero sejtek támogatják az SV Luc Vector részecskék termelését

(A) A pHY338 és pHY359 expressziós plazmidok sematikus ábrázolása. A pHY338 plazmid tartalmazza az SV40 genomiális T antigén szekvenciáját, amely mind az LTag-ot, mind az STag-ot kódolja. A pHY359 plazmid csak az LTag-ot kódoló LTag cDNS-szekvenciát tartalmazza. Mindkét plazmidban a transzgén expresszióját az EF-1α promóter hajtja. Mindkét plazmid tartalmazza a puromicin rezisztencia (Puro^R) gént a CMV transzkripció szabályozása alatt, azaz a promóter és a BGH pA szignál. (B) A pHY338 és pHY359 plazmid DNS-sel transzfektált Vero sejtekben termelt SV Luc részecskék száma és az SV Luc részecskékkel transzdukált COS-1 sejtekben termelődő SV Luc részecskék száma közötti arány. (C) A transzfektált Vero vagy COS-1 sejtekben termelt SV Luc részecskékkel transzdukált COS-1 sejtek lumineszcenciája. (D) A stabilan transzfektált Vero sejtklónokban termelt SV Luc részecskékkel transzdukált COS-1 sejtek lumineszcenciája. Pozitív kontrollként COS-1 sejteket használtunk.

Annak érdekében, hogy egy új Vero-alapú csomagoló sejtvonala hozzuk létre SV40 vektor részecskék előállítására, pHY359 DNS-sel transzfektált sejteket tenyésztettünk puromicin jelenlétében 1 hónapig. Az egyes puromicin-rezisztens sejttelepeket kiválogattuk, és puromicint tartalmazó tápközegben továbbtenyésztettük. Több mint 100 puromicin-rezisztens telepet kaptunk, és ezt követően megvizsgáltuk, hogy képesek-e SV40 vektorrészecskéket termelni a fent leírt

vizsgálati eljárással. Egy sejt kolónia hasonló mennyiségű SV *Luc*- részecskét termelt, mint a COS-1 sejt. [2. ábra D](#)). Ezt követően ebből a sejt kolóniából hat szubklónt állítottunk elő a puromicin-rezisztens sejtek korlátozott hígításával, és ugyanazzal a vizsgálattal teszteltük vektor részecskéket termelő képességüket. A legnagyobb mennyiségű vektor részecskét produkáló sejt klónt, a SuperVero-t, szérummentes, puromicint nem tartalmazó tápközegben szaporítottuk, és egy 50 fiolából álló kutatósejt bankot hoztak létre, amelyet -150°C -on tárolnak. Minden további vizsgálathoz a kutatósejt bank fioláit felengedtük, a sejteket szérummentes, glutaminnal kiegészített OptiPRO tápközegben tenyésztettük és szaporítottuk.

A SuperVero csomagoló sejt vonal molekuláris elemzése

A SuperVero sejtek kromoszómális DNS-ében egy funkcionális LTag-kódoló gén jelenlétének igazolására és annak vizsgálatára, hogy a sejtekben vannak-e szennyező vírusok, a SuperVero sejtek transzkriptumát Massive Parallel Sequencing (MP-Seq) módszerrel elemeztük. ⁴⁰ Több mint 1,6 millió különböző cDNS-szekvenciát hoztak létre SuperVero poli-A-pozitív RNS-ekből. Ezzel párhuzamosan több mint 800 000 különböző cDNS szekvenciát állítottak elő a Vero ATCC CCL-81 referencia sejt vonalból izolált poli-A-pozitív RNS-ekből.

A SuperVero cDNS szekvenciák közül 202 cDNS leolvasott a sejtek genomiális DNS-ében jelen lévő LTag génre (lásd [Asztal 1](#)). Az SV40 genom más részeire specifikus SV40 cDNS szekvenciák hiányoztak a SuperVero sejtekből. Ahogy az várható volt, a Vero sejtek nem tartalmaznak SV40-specifikus mRNS-eket ([Asztal 1](#)).

Asztal 1

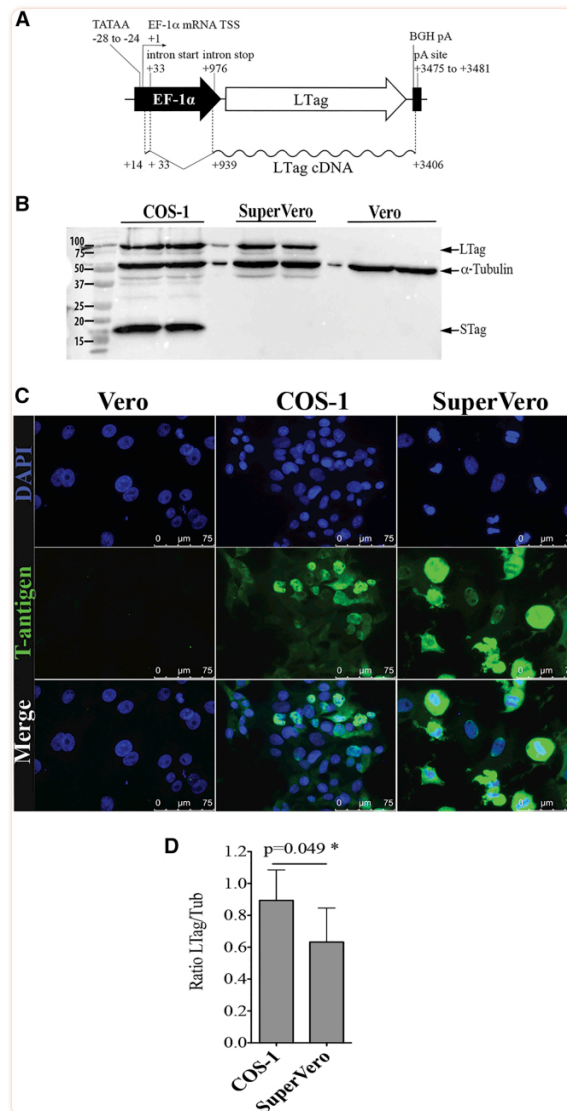
A SuperVero és Vero sejtek cDNS-olvasásának összehasonlítása egy vírusszekvencia adatbázissal

Az eredeti nyilvántartási szám azonosítva	SuperVero (1 673 145 teljes olvasás)		Vero ATCC CCL-81 (806 262 teljes olvasás)		Referencia genom hozzáférési szám	Taxonómia
	A ViralDB-nyerések teljes száma	A Refseq-hez leképezett teljes olvasások teljes száma ^a	A ViralDB-nyerések teljes száma	A Refseq-hez leképezett teljes olvasások teljes száma ^a		
NC_001669.1	202 ^b	238 ^b	0	0	NC_001669	majomvírus 40, teljes genom
AC146999.1	63	97	0	14	NC_006273	humán herpeszvírus 5
EU410304.1	23	21	13	3	NC_006998	vaccinia vírus GLV-1h68
X03922.1	17	97	0	14	NC_006273	humán herpeszvírus 5
HM143845.1	12	0	6	0	M11841	majom retrovírus 1
U85506.1	9	18	10	14	U85505	majom endogén retrovírus
Z54175.1	7	10	5	5	NC_001461	szarvasmarha vírusos hasmenés vírusa 1
AF104029.1	6	1	6	0	NC_002032	szarvasmarha vírusos hasmenés vírusa 2
FM212572.1	4	5,330	1	2,926	AB047240	humán endogén retrovírus
JN134185.1	3	87	7	18	JN134185	majom endogén retrovírus

^a Egyetlen leolvasás a referenciaszekvencia több pozíciójára is leképezhető, és minden egyes leképezést függetlenül számol a rendszer.

^b 202 cDNS leolvasások a sejtek genomiális DNS-ében jelenlévő LTag génre térképezve.

A SuperVero sejtek 202 LTag-specifikus cDNS-leolvasott adatait egymáshoz igazítottuk, és homológok a sejt vonal létrehozásához használt PHY359 DNS-szekvenciájával. Szekvenciaváltozatok nem voltak jelen a 202 szekvenált cDNS között (3. ábraA).



3. ábra

A SuperVero sejtek PHY359 DNS-t és Express SV40 LTag-ot tartalmaznak

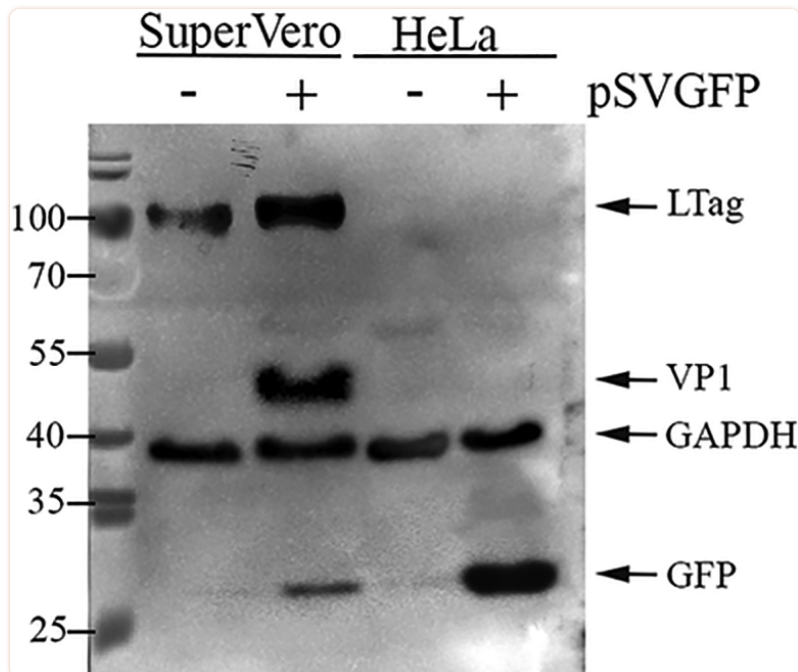
(A) A cDNS sematikus ábrázolása az MP-seq analízisből, amely megfelel a SuperVero sejtekben expresszált SV40 LTag mRNS-nek. (B és C) Az LTag fehérje kimutatása SuperVero sejtekben (B) Western blot és (C) immunocitokémiai módszerrel, az LTag és STag aminoterminális régiójára specifikus egér monoklonális antitest alkalmazásával. A Vero sejteket negatív kontrollként használjuk. A COS-1 sejteket pozitív kontrollként használjuk, amely mind az LTag-ot, mind az STag-ot expresszálja. (D) A (B)-ben bemutatott Western blot sávok denzitometriás analízise. A grafikon az LTag és az α -tubulin sűrűségűségei közötti arányt mutatja, amelyet belső terhelési kontrollként használnak.

A SuperVero sejtekből MP-Seq módszerrel kapott fennmaradó cDNS-leolvasásokat egy virális szekvencia adatbázissal (ViralDB) hasonlítottuk össze, amely 964 619 szekvenciát tartalmaz a teljes GenBank nukleotid szekvencia adatbázisból.⁴⁰ Az összehasonlítás során talált legjelentősebb homológiákat a [Asztal 1](#). A SuperVero mintában olyan cDNS-eket találtak, amelyek homológiát mutatnak a humán herpeszvírus 5 DNS-ével. Ez a homológia a citomegalovírus azonnali korai (CMV, azaz) promoterében található rövid átírt régióknak felel meg, amely a pac puromicin-rezisztencia gén transzkripcióját irányítja.

A SuperVero sejtekből és a ViralDB-ből származó cDNS-ek között talált összes többi szekvencia-homológia is megtalálható, amikor a Vero ATCC CCL-81 sejtekből származó cDNS-eket összehasonlítottuk az adatbázisban lévő szekvenciákkal. Az MP-Seq tanulmány kimutatta, hogy a SuperVero sejt vonal nem szennyezett ismert vírusokkal a Vero ATCC CCL-81 sejtekből történő generálása során.

Az LTag fehérje jelenlétét a SuperVero sejtekben ezt követően Western blot analízissel igazoltuk. Mind az LTag, mind az STag fehérjék kimutathatók az LTag fehérje N-terminális részére specifikus antitesttel. Ahogy az várható volt, a COS-1 sejtek LTag-ot és STag-ot is felhalmoznak, míg a SuperVero sejtek csak LTag-ot expresszálnak ([3. ábraB](#)). A SuperVero és COS-1 sejtek immunocitokémiája tovább igazolta az LTag jelenlétét a sejtek sejtmagjában ([3. ábraC](#)). A Western-blot sávok denzitometriás elemzése kimutatta, hogy a SuperVero sejtekben az LTag relatív mennyisége valamivel alacsonyabb volt, mint a COS-1 sejtekben ([3. ábraD](#)).

A kapszidfehérjéket kódoló SV40 késői gén kizárólag azokban a sejtekben expresszálódik, amelyek megengedik az SV40-et, amelyek felhalmozzák a virális LTag-ot. Ez azt jelenti, hogy a víruskapszid fehérjék csak a csomagolósejtekben termelődnek a vektorgyártás során, de a transzdukció után hiányoznak a (humán) célsejtekben. Az SV40 késői gén transzkripció elnémítását a virális LTag-t nem tartalmazó sejtekben SuperVero és HeLa sejtek pSV GFP DNS -sel történő transzfektálásával igazoltuk. 3 nap elteltével a GFP, LTag és a fő virális kapszidfehérje, a VP1 jelenlétét mindkét sejt típusban Western blot segítségével ellenőriztük GFP-re, LTag-ra és VP1-re specifikus monoklonális antitestek felhasználásával. A GAPDH-ra specifikus monoklonális antitestet fehérjeterhelési kontrollként alkalmaztunk. Csak a SuperVero sejtek termelnek SV40 LTag-ot. Mind a pSV GFP-vel transzfektált SuperVero, mind a HeLa sejtekben GFP-t detektáltunk. A VP1 azonban csak a pSV GFP-vel transzfektált SuperVero sejtekben halmozódott fel, ami azt mutatja, hogy az SV40 késői gén nem expresszálódik azokban a célsejtekben, amelyekben hiányzik az SV40 LTag ([4. ábra](#)).



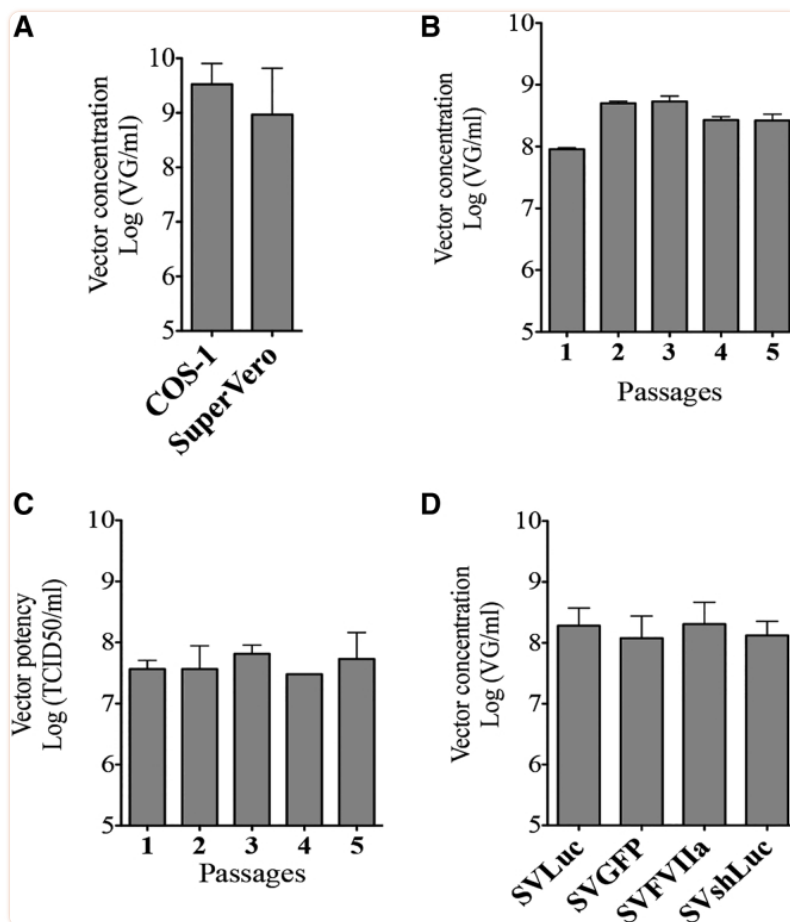
[4. ábra](#)

Az SV40 késői gén csak a SuperVero sejtekben expresszálódik a vektorrészecskék termelése során, és nem az emberi célsejtekben

GFP, SV40 LTag és VP1 fő kapszidfehérje kimutatása pSV GFP DNS -sel transzfektált SuperVero és HeLa sejtekből származó sejtizátumokban Western blot analízissel, GFP-re, LTag-ra és VP1-re specifikus antitestek felhasználásával. Egy anti-GAPDH antitestet használtunk terhelési kontrollként.

SV40 vektor részecskék előállítása SuperVero sejtekben

Amikor a szarvasmarha magzatsérumot tartalmazó tápközegben tenyésztett COS-1 sejteket és a sérummentes tápközegben tenyésztett SuperVero sejteket SV40 vektorrészecskékkel transzdukálják sejtenként 400 vektorrészecskék MOI mellett, mindkét sejt vonal összehasonlítható számú vektorrészecskét szekretált a táptalajban. ([5. ábraA](#)). A SuperVero sejtek azon képességét, hogy konzisztens mennyiségű SV40 részecskét termeljenek, tovább vizsgálták úgy, hogy vektorrészecskéket friss SuperVero sejtekben passzáltak, és minden egyes átoltás után megmérték a vektorrészecskék számát. A következő passzálások során kapott SV Luc részecskékkel transzdukált SuperVero sejtekben a sejtenyésző tápközegben következetesen 10^{8-10^9} vektorrészecske található milliliterenként. ([5. ábraB](#)). Ezen túlmenően, megközelítőleg ugyanannyi vektorrészecske marad a sejtek belsejében, és nem gyűjtik be őket az előállítás után (az adatokat nem mutatjuk be). Az előállított vektorrészecskék transzdukációs hatékonyságát (potenciáját) minden egyes átoltás után módosított szövettenyésztet fertőző dózis 50 ($TCID_{50}$) vizsgálattal határoztuk meg. Mivel az SV40 vektor részecskék nem lizálják a transzdukált sejteket, az SV Luc-ot használtuk riporter vektorként, és lumineszcenciát használtunk kiolvasásként ebben a korlátozott hígítású vizsgálatban. Ezek a kísérletek feltárták, hogy a qPCR-rel számszerűsített vektorrészecskék ([5. ábraB](#)) a $TCID_{50}$ által meghatározott SuperVero cellákba való áthaladás után is teljesen működőképesek maradnak ([5. ábraC](#)). Ezenkívül a hibás zavaró vektorrészecskék nem halmozódnak fel a vektortermelési folyamat során, amint azt a $TCID_{50}$ titer stabilitása mutatja a következő passzálás során ([5. ábraC](#)).



[5. ábra](#)

A SuperVero sejtek következetesen nagy mennyiségű funkcionális SV40 vektorrészcskét halmoznak fel

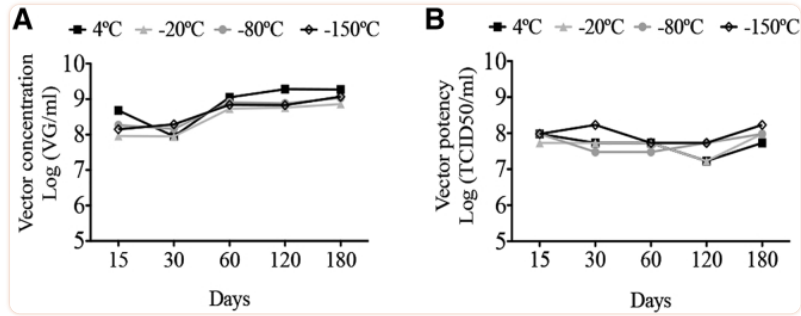
(A) A COS-1 és SuperVero sejtekben termelődő SV *Luc* részecskék számának meghatározása qPCR segítségével.

(B) Az SV *Luc* részecskék számának meghatározása SuperVero sejtekben való áthaladás után. (C) Az SV *Luc* részecskék hatékonyságának meghatározása SuperVero sejtekben való áthaladás után. (D) A SuperVero sejtekben termelt, különböző transzgéneket expresszáló SV40 vektor részecskék számának meghatározása. A hibásávok az SD-t jelentik, n = 3.

sávok az SD-t jelentik, n = 3.

Ezután SV *Luc*, SV *GFP*, SV *FVIIa* és SV *shLuc* vektor kötegeket állítottunk elő SuperVero sejtekben. A három passzálást követően kapott vektorhozamok következetesen 10^8 és 10^9 részecske/ml között mozogtak, ami a vektortermelési folyamat robusztusságát mutatja (5. ábra D).

A SuperVero sejtekben előállított SV *Luc* részecskéket különböző ideig tároltuk különböző hőmérsékleteken. A vektor részecskék számát qPCR-rel határoztuk meg (6. ábra A), míg a részecskék hatékonyságát a TCID₅₀ assay segítségével határoztuk meg (6. ábra B). A tárolási hőmérséklettől függetlenül a vektorszemcsék mennyisége nem csökkent szignifikánsan 6 hónap után. Ezek a kísérletek azt mutatják, hogy a 4 °C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten tárolt SV40 vektor részecskék legalább 6 hónapig teljesen működőképesek maradnak.



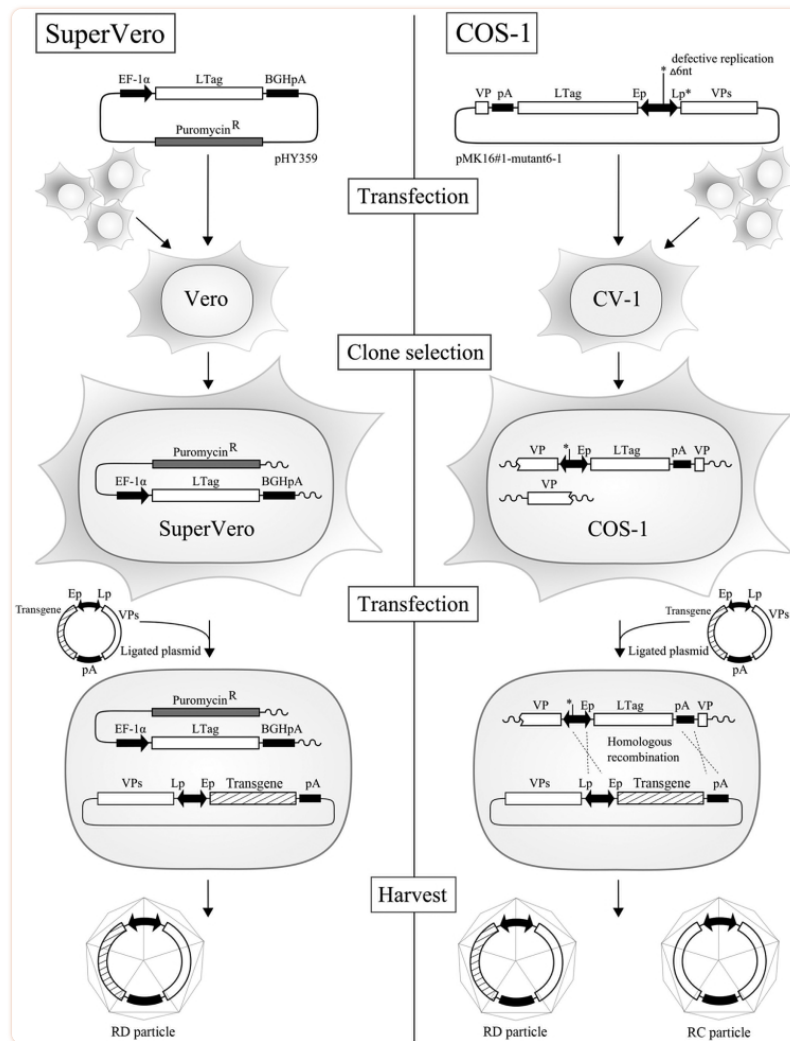
[6. ábra](#)

Az SV40 vektor részecskék működőképesek maradnak 6 hónapig 4°C-on vagy alacsonyabb hőmérsékleten történő tárolás után

Az SV *Luc* részecskéket +4°C, -20°C, -80°C és -150°C hőmérsékleten tároltuk. (A) A vektorrészecskék számát qPCR-rel határoztuk meg. (B) A vektorrészecskék hatásosságát TCID50 analízissel határoztuk meg.

RC SV40 részecskék kimutatása

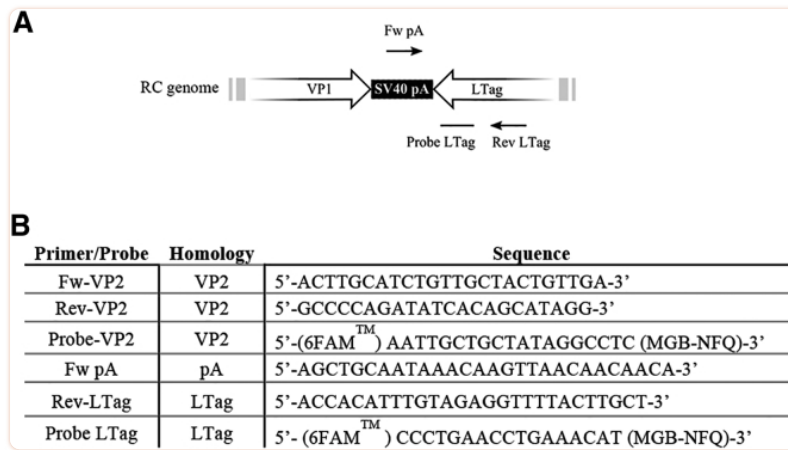
Azt találták, hogy az SV40 vektorok termelése COS sejtekben RC SV40 részecskék megjelenését eredményezi. ³³ Annak eldöntésére, hogy a vírusfertőzési probléma megoldódott-e a Super-Vero sejt vonal használatával ([7. ábra](#)), létrehoztunk egy primerkészletet az RC SV40 részecskék qPCR-rel történő kimutatására ([8. ábra](#)).



7. ábra

SV40 vektorok gyártása SuperVero és COS-1 cellákban

Az SV40 részecskék termelése a COS-1 sejtekben (jobb oldalon) RC SV40 részecskék megjelenését eredményezi a kromoszómálisan inszertált SV40 szekvenciák és az episzómálisan replikálódó SV40 DNS szekvenciák közötti homológ rekombináció miatt. Az RC-változatok képződése megakadályozható azokban a SuperVero sejtekben (bal oldal), amelyek kromoszómálisan inszertált SV40 LTag DNS-szekvenciákat tartalmaznak anélkül, hogy a szekvencia átfedés lenne az episzómálisan replikálódó SV40 vektor-DNS-szekvenciákkal.



8. ábra

A qPCR elemzéshez használt primerek és szondák az RC és RD SV40 vektorrészecskék kimutatására

(A) Az SV40 genom sematikus ábrázolása, amely bemutatja az RC SV40 részecskék kimutatására szolgáló primerek és szonda helyzetét. (B) A qPCR elemzésben használt primerek és próbák szekvenciái.

Az ezekkel a primerekkel eddig tesztelt összes mintában, beleértve az erősen koncentrált vektorpreparátumokból származó mintákat és a következő vektor passzálásokból származó mintákat (legfeljebb 10), az RC SV40 részecskék száma a vizsgálat kimutatási határa alatt maradt. Ez azt jelenti, hogy a SuperVero sejtekben a vektorrészecskék átjutása után az RC SV40 részecskék biztosan nem nőnek túl az RD vektor részecskéken.

Vita

Az SV40 génbejuttató vektorok számos preklinikai vizsgálatban bizonyították terápiás hatékonyságukat, [22](#), [23](#), [24](#), [25](#), [41](#), és a megjósolt nem immunogén/tolerogén potenciáljuk miatt emberekben ezek a vektorok vonzó alternatívát jelentenek a jelenleg használt vektorrendszerekkel szemben a biztonságos fejlesztéshez, és hatékony génterápiák. A mai napig azonban az SV40 vektorokat nem tesztelték klinikai vizsgálatokban, mert hiányzik egy hatékony csomagoló sejtvonala, amely nem halmaz fel RC SV40 részecskéket a vektor előállításának folyamata során. Itt egy SV40-alapú génbejuttató platform kifejlesztéséről számolunk be, amelyet *SV ac-nek* neveztünk el, és amely kiválóan alkalmas RD SV40 vektorrészecskék előállítására szennyező RC revertánsoktól mentes, így alkalmas klinikai génterápiás vizsgálatokban való felhasználásra.

Kifejlesztettünk egy sokoldalú SV40 vektor rendeltetési plazmidot (pSV *ac*), amely lehetővé teszi a promóterek, transzgének és egyéb szabályozó elemek értékelését az állatok és az emberek biztonsága és hatékonysága érdekében. A Vero sejteket azért választották ki egy új csomagoló sejtvonala létrehozásához, mert ez a sejtvonala megengedi az SV40-et, és az Egészségügyi Világszervezet emberi felhasználásra szánt vakcinagyártásra ajánlja. [42](#)

Az RD SV40 vektor genomjaiból hiányzik a T antigén régió. Az SV40 vektor részecskék előállításához a T-antigént a csomagoló sejtvonálnak kell biztosítani. Az SV40 korai gén az LTag-et és az STag-ot kódolja. Az LTag egy replikázhoz kapcsolódó fehérje, amely a vírus DNS-replikációjához és a vírus késői promoterének aktiválásához szükséges. [43](#) STag gátolja a celluláris fehér-

jesztintézist a capped messenger RNS-ekből (ezt a folyamatot gazda shutoffnak jelölik), ezáltal elősegíti a vírus kapszid fehérjék szintézisét. ⁴⁴ Az LTag és az STag egyidejű expressziója az elsődleges emlőssejtek halhatatlanná válását, a kialakult emlős sejtvonala transzformációját és daganatok indukálását eredményezi immunhiányos fiatal születésű hörcsögökben. Kimutatták azonban, hogy az egyes T-antigének expressziója emlőssejtekben nem vezet halhatatlanná váláshoz, transzformációhoz vagy tumorindukcióhoz. ⁴⁵ Itt mutatjuk be először, hogy az LTag expressziója STag hiányában Vero sejtekben elegendő az SV40 vektor részecskék replikációjához és csomagolásához. Vero-alapú SV40 csomagoló sejtvonala hoztak létre, amelyet SuperVero-nak neveztek, és amely expresszálja a vírus LTag-jét, és így hiányzik belőle a vírus onkogén és onkoproteinek. Mivel a kromoszómáisan inszertált SV40 LTag kódoló szekvenciák és az episzó-málisan replikálódó SV40 vektorszekvenciák között nincs átfedés, az RC részecskék megjelenése a vektortermelési folyamat során nagyon valószínűtlen.

Kimutattuk, hogy a SuperVero sejtekben az LTag aktiválja a vírus késői promóterének transzkripcióját, ami a kapszid fehérjék felhalmozódását eredményezi a vektortermelési folyamat során. Az RD SV40 vektorral transzdukált SV40 LTag hiányzó célsejtekben azonban csak a transz-gén expresszálódik a vírus korai promóteréből.

Az SV40 vektort csomagoló sejtvonala létrehozására tett korábbi kísérletekből azt találtuk, hogy az LTag mennyisége közvetlenül korrelál az SV40 vektor részecskék számával ([33](#) , [34](#)), de fordítottan korrelál a sejt életképességével. ³³ Ez lehet az oka annak, hogy több mint száz független puromicin-rezisztens klónt kellett szűrniünk, hogy azonosítsunk egy olyan sejtklónt, amely a COS-sejtekéhez hasonló szinten képes vektorrészecskéket termelni. Figyelemre méltó, hogy ez a sejtklón a COS-1 sejtekhez hasonló szintre halmoz fel LT-tagot. Nyilvánvalóan van egy szűk határ az LTag expressziójában, amelyet a Vero sejtek tolerálnak, és amely támogatja az SV40 vektor replikációját. Kísérleteket indítottunk az LTag mennyiségének további növelésére a csomagolósejtekben a gyártási folyamat során, hogy még javítsuk a vektorhozamokat.

Az SV40 vektorrészecskék teljesen működőképesekek maradnak a SuperVero sejtekben való áthaladás után is, ami azt jelzi, hogy a hibás, zavaró részecskék nem halmozódnak fel a gyártási folyamat során. Ezenkívül az előállított vektorrészecskék nagyon stabilak 4 °C-on vagy ennél alacsonyabb hőmérsékleten történő tároláskor. A SuperVero csomagolósejtek fő előnye a COS sejtekkel szemben az RD SV40 vektorrészecskék előállításához az, hogy a vektorgyártási folyamat során nincsenek szennyező RC SV40 részecskék. ³²

A SuperVero sejtekben az SV40 vektorrészecskék termelésének elindításához vizsgálatainkban használt cirkuláris vektor DNS-molekulák hasonlóak, ugyanazokkal a genetikai elemekkel, mint a korábbi vizsgálatokban használt vektorrészecskék COS-sejtekben történő előállítására. *Mivel mind a Vero, mind a CV1 sejtvonala afrikai zöld majmoktól (Cercopithecus aethiops)* ⁴⁶ nyert veszővetből származik , feltételezzük, hogy a Vero-eredetű csomagoló sejtvonala termelt SV40 vektorrészecskék in vivo transzdukciós hatékonysága hasonló Valójában a SuperVero sejtekben termelt SV GFP és SV Luc részecskékkel jelenleg is folyó in vivo vizsgálatok azt mutatják, hogy a különböző szervek és/vagy szövetek nagy transzdukciós sebességet és transz-génexpressziós szintet mutatnak a fertőzés módjától függően ügyintézés (nem publikált adatok).

Összességében elmondható, hogy az RD SV40 vektorok hatékonyak, nem immunogének/tolerogének emberekben, rendkívül stabilak, biztonságosan használhatók, és nagy mennyiségben előállíthatók SuperVero csomagolósejtekben. Az SV ac platform itt leírt generációja megnyitja az utat a gyógyszerek következő hullámának kifejlesztéséhez. A funkcionális

géntermékeket expresszázó SV40 vektorok felhasználhatók génpótló terápiákban olyan genetikai rendellenességek kezelésére, mint például az alacsony sűrűségű lipoprotein receptor hiány, az 1-es típusú primer hiperoxaluria vagy a hemofilia. Ezenkívül a T-sejt-receptorokat (TCR-eket) vagy kiméra antigén-receptorokat (CAR-okat) expresszázó SV40-vektorok vakcinaként használhatók a rák kezelésére. Végül, de nem utolsósorban, mivel képesek immuntoleranciát indukálni a transzgéntermékekkel szemben az emberekben, a degeneratív/autoimmun betegségek elsődleges saját antigénjeit expresszázó SV40 vektorok fordított vakcinaként használhatók korunk főbb betegségeinek, például a neurodegeneratív betegségek kezelésére, és pszichiátriai betegségek, ³⁷ atheroscleroticus szív- és érrendszeri betegség, diabetes mellitus, ízületi gyulladás és krónikus obstruktív tüdőbetegség (COPD).

Anyagok és metódusok

Plazmid konstrukció

A pHY338 expressziós plazmidot pBluescript SK- (Stratagene; Agilent Technologies) gerinccel állítottuk elő egy génkazetta hozzáadásával, amely tartalmazza az SV40 T antigént kódoló szekvenciát (NCBI referenciaszekvencia [NC 001669.1](#)), amelyet az EF-1 α p-promoter és az EF-1 α p-promoter szegélyezett. EF-1 α -T antigén-BGH pA) és egy génkazetta, amely a pac puromicin rezisztencia gént tartalmazza, amelyet a humán CMV _{azaz} promoter és a BGH pA (CMVie-pac-BGH pA) szegélyez.

A kizárólag az SV40 LTag-ot expresszázó pHY359 expressziós plazmidot a nagy intron deléciójával hoztuk létre a T antigént kódoló szekvenciából a pHY338 plazmidból származó fúziós PCR-rel az alábbiak szerint. Először is, az LTag kódoló szekvencia 5' végével homológ 5'-GC-AGGCTACCATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAG-3' előremenő primerrel és az 5'-CCCATTCA-TCAGTTCATAGGTTGGAATCTCAGTTGCATCCCAGAAGCCTCCAAG-helyet generáló reverz lánccindítóval először a PCR-komplikátor-3-komplikált. felemelkedik az 5' végén az LTag szekvencia. Másodszor, az intron illesztési helyet lefedő 5'-CTTTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGAGATTCCA-ACCTATGGAAGTGAATGGG-3' és az 5'-AGGAATGTTGTACACCATGCATTTTAAAAAGTC-3'-ban reverz P primerrel, az LTag NCD-tagja generálta a második helyet, amely *lefedti a 3'-3si-t.* Harmadszor, a két PCR-fragmenst egy fúziós PCR végrehajtására használták fel a két külső primer használatával. *Az előállított PCR-fragmenst, amely az LTag kódoló szekvencia 5'-végét tartalmazza a nagy intron nélkül, a pHY338 expressziós plazmid NcoI-NsiI helyeire klónoztuk, így a pHY359 expressziós plazmidot kaptuk.*

Sejtvonala generálása

A Vero sejteket (ATTC, CCL-81) szérumentes OptiPRO (GIBCO, Thermo Fisher Scientific) tápközegben tenyésztettük 4 mM glutaminnal (GIBCO, Thermo Fisher Scientific) kiegészítve. A pBluescript SK- gerincet eltávolítottuk a pHY359 DNS-ből, és a Vero sejteket a pac és LTag génkzettákat tartalmazó DNS-fragmenssel ExGen 500 in vitro transzfecció reagens (BIOMOL) segítségével transzfeccióztuk a gyártó utasításait követve. Két nappal a transzfecció után a sejteket 2 μ g/ml puromicint (Sigma-Aldrich) tartalmazó táptalajra osztottuk, és 1 hónapig antibiotikum nyomás alatt tartottuk.

SV40 rendeltetési vektor plazmid pSV ac

A pSL-PL DNS-ét PCR-nek vetettük alá az 5'-CGGGATCCAGACATGATAAGATACATTG-3' és 5'-ATAGTTTTCAGCGGCCGCAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTG-3' primerek használatával. Az eredményül kapott, az SV40-pA jelet tartalmazó PCR-fragmenst pBluescript SK- plazmidba klónoztuk, így pAM002-t kaptunk. A pEF5/FRT/5-DEST (Invitrogen) plazmid DNS-t PCR-nek vetettük alá az 5'-CCGCTCGAGTTGCGGCCGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC-3' és 5'-GGTACCATAGAGCC-CACCGCATCCCAGCATGCC-3' primerek használatával. Az eredményül kapott, BGH pA-t tartalmazó PCR-fragmenst pAM002-be klónoztuk, ami a pAM003-at eredményezte. A két komplementer oligonukleotidot, az 5'-GGCCGCTTTATTAATTAAGCCCT GCAGGTTGTTAA-
ACTTGGCGCGCCTTAT-3' és 5'-CGATAAGGCGGCCAAGTTTAAACAACCTGCAGGGCTTAATTAATAA-
AGC-3'-be, emésztjük, emésztjük és 3' - 3' -ba emésztjük. pAM004-et eredményezve. Az SV40 ori-
gót és késői régiót tartalmazó pSL-PL plazmid DNS-t *ClaI*-gyel és BamHI-gyel emésztettük, és
pAM004-be klónoztuk, így pAM005-öt kaptunk. A pEF5/FRT/5-DEST plazmid DNS-t PCR-nek
vetettük alá az 5'-TGGCGCGCCTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAG-3' és 5'-CAATCATACCGTTTAAAC-
GAACCGCGGCCCTTAGAC-3' primerekkel. Az eredményül kapott PCR-fragmenst, amely a ccdB
Gateway-t és a kloramfenikol-rezisztencia (CmR) génkasszétát tartalmazza, ^{AttR1} és AttR2 re-
kombinációs helyekkel szegélyezve, pAM005-be klónoztuk, így az SV40 célvektor-plazmidot, a
pSVac-t kaptuk.

SV40 vektorgyártás

A vektor tételeket Vera és munkatársai szerint állítottuk elő. ³¹ Röviden, az SV40 expressziós plazmid DNS-ének *NotI*-vel történő emésztése után a bakteriális gerinc eltávolítása érdekében a vektor DNS-t izoláltuk agaróz gélekből, majd T4 ligázzal (NEB) újra körbeforgattuk. Görgős palackokban (növekedési terület: 850 cm²; Greiner Bio One) 20-70%-os összefolyásig 4 mM L-glutamint (5% szén-dioxid, 37°C) tartalmazó OptiPRO szérumentes tápközegben szaporodó SuperVero sejteket transzfektáltunk a recirkularizált vektor DNS. Három nappal a transzfecció után a vektorrészcskéket tartalmazó tápközegét összegyűjtöttük, és friss táptalajra cseréltük. A vektorrészcské számának további növelése érdekében az összevont vektorgyűjtéseket legalább két egymást követő transzdukciós körben felhasználtuk. Mindegyik transzdukciós körben a SuperVero sejteket sejtenként 400 SV40 vektor genommal transzdukáltuk. Három nappal a transzdukció után a vektorrészcskéket tartalmazó táptalajt összegyűjtöttük, és friss tápközeggel helyettesítettük. A begyűjtött vektorokat ultracentrifugálással tisztítottuk és betöményítettük, és 4 °C-on vagy más, a jelzett hőmérsékleten tároltuk.

SV40 vektor számszerűsítés

A vektorrészcské koncentrációját az előállított vektortételekben kvantitatív valós idejű PCR-rel határoztuk meg. A mintákat DNáz I-gyel (Sigma-Aldrich) kezeltük a csupasz DNS eltávolítására. A vektor-DNS-t a részecskékből izoláltuk úgy, hogy a mintákat 37 °C-on 1 óráig proteínáz K (Sigma-Aldrich) munkaoldatban (2,75 mg/ml, 8,6 mM Tris-HCl-ben, 86 mM NaCl-ban, 0,43 tömeg/térf.%) inkubáltuk. SDS, pH 8). Mágneses gyöngyöket (MagneSil Blue; Promega) használtunk a vektor DNS szelektív megkötésére. Izolált DNS-t használtunk templátként a VP2 gén régió amplifikálásához AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific) polimeráz és primerek és próbák felhasználásával. [8. ábra](#)B. A qPCR-t a gyártó ajánlása szerint (7300 Real-Time PCR System; Applied Biosystems) állítottuk be 2 perces 50 °C-on és 10 perces 95 °C-os hőciklus körülményei között, 40 denaturációs ciklussal 95 °C-on 15 másodpercig, és lágyítás vagy meghosszabbítás 60 °C-on 1 percig. Az adatok elemzését Applied Biosystems szoftverrel végeztük.

Az SV *Luc* részecskék hatásosságát az előállított vektortételekben módosított TCID₅₀ vizsgálattal határoztuk meg. Ez a korlátozott hígítású vizsgálat számszerűsíti a célsejtek 50%-ának transzdukálásához szükséges vektorrészecskék számát. Ebben a vizsgálatban SV *Luc* részecskéket használtunk riporter vektorként, és lumineszcenciát használtunk leolvasásként. A vizsgálandó SV *Luc* minták tízszeres sorozathígításait négy párhuzamosban adtuk egy 96 lyukú sejtenyésző lemezre, amely 2×10^3 SuperVero sejtet tartalmazott 100 μ l szérumentes OptiPRO tápközegben. A sejteket a sorozathígítású vektorral kezeltük, és 5%-os szén-dioxidban 37 °C-on 4 napig inkubáltuk. Egy standard SV *Luc* sarzs hígítási sorozatát adtuk a lemezekhez kontrollként. Az intracelluláris luciferázt ezt követően lumineszcenciával mértük. A becsült vektortiter az a végponthígítás, amelynél a sejtenyészetek (lyukak) 50%-a transzdukálódik SV *Luc*-val, és luciferáz expressziót mutat. A vektortiteret Spearman-Kärber módszerrel számítottuk ki, és TCID₅₀ per milliliter SuperVero sejtenyészetben (TCID₅₀ /ml) fejeztük ki.

RC SV40 részecskék kimutatása

Az RC SV40 revertánsok hiányát az előállított SV40 vektor kötegekben qPCR igazolta. A vektor-DNS-t vektorpreparátumokból a PureLink RNS/DNA Mini Kit (Invitrogen) segítségével izoláltuk. Izolált DNS-t használtunk templátként az SV40 pA szekvenciát és LTag kódoló régiót tartalmazó 108 bp-os fragmentum amplifikálására, a 3. fejezetben bemutatott primerek és próbák felhasználásával. [8. ábra](#). Pozitív kontrollként a vad típusú SV40 genomot tartalmazó pAM271 plazmid DNS-t használtuk. A qPCR-t a gyártó szerint (7300 Real-Time PCR System; Applied Biosystems) állítottuk be 2 perces 50 °C-on és 10 perces 95 °C-os hőciklus körülményei között, 40 denaturációs ciklussal 95 °C-on. 15 másodpercig, majd 60 °C-on 1 percig lágyítás vagy meghosszabbítás. Az adatok elemzését az Applied Biosystems-en végeztük. A nem templát kontroll mintákkal kapott jel alapján az assay kimutatási határát 60 RC SV40 részecske/ml-ben határoztuk meg.

Luciferáz aktivitás mérések

A luciferáz aktivitást az SV *Luc*-cel transzdukált sejtekből a Luciferase Assay System (Promega) segítségével mértük. 200 μ l vektor törzsanyagot használtunk 1×10^4 sejt transzdukálására 24 lyukú lemez formátumban. Minden transzdukciót három párhuzamosban végeztünk. Három nappal a transzdukció után a sejteket összegyűjtöttük, és a luciferáz aktivitást GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega) készülékkel elemeztük a gyártó ajánlásai szerint.

Western Blot analízis

A sejteket proteáz inhibitor koktélt (SIGMA FAST Protease Inhibitor Tablets; Sigma-Aldrich) tartalmazó SAM pufferrel (50 mM Tris-HCl, pH 6,8, 3% SDS, 5% β -merkapto-etanol) lizáltuk, SDS-rezolválással. PAGE (10% poliakrilamid gél redukáló körülmények között) és elektrotranszferrel nitrocellulóz membránokra (Bio-Rad Laboratories). A membránokat 5%-os zsírmentes tejjel blokkoltuk, és különböző primer antitestekkel vizsgáltuk 1 órán át szobahőmérsékleten: (1) egér anti-SV40 LTag 0,5 mg/ml (BD Biosciences), 1:200 hígítás; (2) nyúl anti-VP1 (Abcam), hígítás 1:5000; (2) egér anti-GFP (Sigma-Aldrich), hígítás 1:1000; egér anti- α -tubulin antitest (Sigma-Aldrich), hígítás 1:5000; egér anti-GAPDH (Millipore), hígítás 1:5000. Végül a membránt torma-peroxidázzal (HRP) (Sigma-Aldrich) konjugált kecske anti-egér vagy kecske anti-nyúl antitesttel hibridizáltuk, 1:5000 hígítással. A blot kemilumineszcenciával (Chemidoc MP Imaging

System; Bio-Rad Laboratories) készült. A fehérje mennyiségének meghatározásához denzitometriával szkenneltük le a blotokat az Image Lab szoftver 5.2.1-es verziójával (Bio-Rad Laboratories).

Immuncitokémia

SuperVero, Vero ATCC CCL-81 és COS-1 sejteket fedőlemezekben tenyésztettünk, és 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, és 2%-os szarvasmarha szérumalbuminnal blokkoltuk 1 órán át szobahőmérsékleten. A sejteket egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk az SV40 LTag elleni 2,5 µg/ml egérantitestet PBS-sel, 0,2% Triton X-100-zal hígított oldatával. A másodlagos antitestet (Alexa Fluor 488 számár anti-kecske; Life Technologies, Invitrogen) 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk, 0,2% Triton X-100-at tartalmazó PBS-ben 1:800 arányban hígítva. A magfestést 5 µg/ml DAPI (Life Technologies, Invitrogen) oldattal végeztük, végül a tárgylemezeket fluoreszcens rögzítő közeggel (DAKO, Agilent Technologies) rögzítettük. A fluoreszcens mikroszkópos képeket Leica DM6000B mikroszkóppal (Leica Microsystem) készítettük.

Statisztikai analízis

Minden kísérletet minimum $n = 3$ értékkel végeztünk. Az összes statisztikai elemzést a GraphPad Prism 5 szoftverrel végeztük. Alkalmaztuk a kétoldali párosítatlan Student t tesztet.

Szerzői hozzájárulások

Koncepció, PdH, IM és MGT; Módszertan, PdH, IM és SvdW; Investigation, JvdV, MO, AR, RJC-G. és IGH-G.; Írás – eredeti piszkozat, MGT, IM és PdH; Írás – áttekintés és szerkesztés, MGT, IM és PdH; Finanszírozásszerzés, PdH; Erőforrások, PdH és MGT; Felügyelet, PdH, IM és MGT

Összeférhetetlenség

Az SL-t és a BV-t az Amarna Therapeutics alkalmazza vagy szponzorálja. A cég a poliomavirális vektor részecskék előállítására és felhasználására vonatkozó szabadalmak és szabadalmi bejelentések tulajdonosa.

Köszönetnyilvánítás

Miguel G. Toscanót a spanyol Gazdasági, Ipari és Versenyképességi Minisztérium Torres Quevedo programja, a PTQ-13-06051 társfinanszírozza. Köszönjük Dr. Katherine High-nak és Dr. Paris Margaritisnek (Philadelphia Gyermekekórház), hogy kedvesen biztosítottak számunkra az ember által aktivált VII-es faktor cDNS-t, valamint Dr. Piter Bosmának (Akadémiai Orvosi Központ) és Dr. Benoit Gauthier-nek (Molekuláris Biológiai és Regeneratív Központ) Medicine) a kézirat kritikus olvasásához. Köszönjük Dr. David Pozo (Molekuláris Biológiai és Regeneratív Medicina Központ) segítségét is.

Hivatkozások

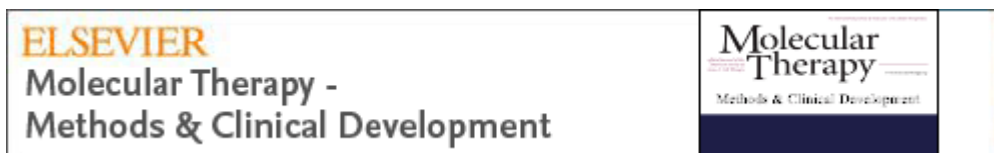
1. Jiang H., Lilicrap D., Patarroyo-White S., Liu T., Qian X., Scallan CD, Powell S., Keller T., McMurray M., Labelle A. Az AAV serotypes 2 többéves terápiás előnyei, 6. és 8. faktor VIII-as faktort szállítanak hemofília A egereknek és kutyáknak. *Vér.* 2006; 108 , 107–115. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage FH, Verma IM, Trono D. Nem osztódó sejtek in vivo génszállítása és stabil transzdukciója lentivírus vektorral. *Tudomány.* 1996; 272 , 263–267. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Herzog RW, Hagstrom JN, Kung SH, Tai SJ, Wilson JM, Fisher KJ, High KA Stabil géntranszfer és humán véralvadási faktor IX expressziója rekombináns adeno-asszociált vírus intramuszkuláris injekciója után. *Proc. Natl. Acad. Sci. EGYESÜLT ÁLLAMOK.* 1997; 94 , 5804–5809. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Perrin GQ, Zolotukhin I., Sherman A., Biswas M., de Jong YP, Terhorst C., Davidoff AM, Herzog RW Az antigén bemutatásának dinamikája transzgéntermék-specifikus CD4(+) T-sejtekben és a Treg-indukció után máj AAV géntranszfer. *Mol. Ott. Methods Clin. Dev.* 2016; 3 , 16083–16088. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Dobrzynski E., Herzog RW Tolerancia indukció vírusos in vivo géntranszferrel. *Clin. Med. Res.* 2005; 3 , 234–240. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Zhang P., Sun B., Osada T., Rodriguiz R., Yang XY, Luo X., Kemper AR, Clay TM, Koeberl DD Az immundomináns máj-specifikus expresszió elnyomja a transzgén által irányított immunválaszokat egérpompe-kórban. *Zümmögés. Gene Ther.* 2012; 23 , 460–472. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Sack BK, Herzog RW, Terhorst C., Markusic DM Géntranszfer fejlesztése antigén-specifikus tolerancia kiváltására. *Mol. Ott. Methods Clin. Dev.* 2014; 1 , 14013–14019. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Boisgerault F., Mingozzi F. A vázizom környezet és szerepe az immunitásban és az AAV vektor által közvetített géntranszferrel szembeni toleranciában. *Curr. Gene Ther.* 2015; 15 , 381–394. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Touchot N., Flume M. Korai betekintések a génterápiák európai kereskedelmi forgalomba hozatalából. *Gének (Bázel)* 2017; 8:78 . [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Montini E., Cesana D., Schmidt M., Sanvito F., Ponzoni M., Bartholomae C., Sergi Sergi L., Benedicenti F., Ambrosi A., Di Serio C. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumorra hajlamos egérmódel a lentivírus-vektor integrációjának alacsony genotoxicitását tárja fel. *Nat. Biotechnol.* 2006; 24 , 687–696. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Tomás, HA, Rodrigues, AF, Alves, PM és Coroadinha, AS (2013). Lentivirális génterápiás vektorok: kihívások és jövőbeli irányok. In *Gene Therapy: Tools and Potential Applications*, F. Martin, szerk. (InTech), <https://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/lentiviral-gene-therapy-vectors-challenges-and-future-directions> .
12. Hareendran S., Balakrishnan B., Sen D., Kumar S., Srivastava A., Jayandharan GR Adeno-asszociált vírus (AAV) vektorok a génterápiában: immun kihívások és stratégiák azok megkerülésére. *Rev. Med. Virol.* 2013; 23 , 399–413. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Tse LV, Moller-Tank S., Asokan A. Stratégiák az adeno-asszociált vírusvektorokkal szembeni humorális immunitás megkerülésére. *Szakértői vélemény. Biol. Ott.* 2015; 15 , 845–855. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Strayer DS, Lamothe M., Wei D., Milano J., Kondo R. Rekombináns SV40 vektorok generálása géntranszferhez. *Módszerek Mol. Biol.* 2001; 165 , 103–117. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Byun H., Gou Y., Zook A., Lozano MM, Dudley JP ERAD és a vírusok kihasználása. *Elülső. Microbiol.* 2014; 5 :330. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

16. Schelhaas M., Malmström J., Pelkmans L., Haugstetter J., Ellgaard L., Grünewald K., Helenius A. A Simian Virus 40 az ER protein foldingtól és a gazdaszövetekbe való bejutás minőség-ellenőrzési tényezőitől függ. *Sejt.* 2007; 131 , 516–529. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Marsh M., Helenius A. Vírusbelépés: nyitott szezámmal. *Sejt.* 2006; 124 , 729–740. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Qian M., Cai D., Verhey KJ, Tsai B. A lipidreceptor szétválogatja a poliomavírust az endolizoszómától az endoplazmatikus retikulumig, hogy fertőzést okozzon. *PLoS Pathog.* 2009; 5 :e1000465. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Engel S., Heger T., Mancini R., Herzog F., Kartenbeck J., Hayer A., Helenius A. Role of endosomes in simian virus 40 entry and fertőzés. *J. Virol.* 2011; 85 , 4198–4211. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Norkin LC, Anderson HA, Wolfrom SA, Oppenheim A. A majomvírus 40 caveoláris endocitózist követően A-érzékeny transzport követi az endoplazmatikus retikulumba, ahol a vírus szétesik. *J. Virol.* 2002; 76 , 5156–5166. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Pelkmans L., Püntener D., Helenius A. Helyi aktin polimerizáció és dinamin toborzás SV40 által kiváltott caveolák internalizációjában. *Tudomány.* 2002; 296 , 535–539. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Sauter BV, Parashar B., Chowdhury NR, Kadakol A., Ilan Y., Singh H., Milano J., Strayer DS, Chowdhury JR A replikáció-deficiens rSV40 máj-irányított géntranszfert és hosszú távú javulást közvetít sárgaságban patkányokban. *Gaszterológia.* 2000; 119 , 1348–1357. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Vera M., Sobrevals L., Zaratigui M., Martinez L., Palencia B., Rodríguez CM, Prieto J., Fortes P. Liver transduction with a majomvírus 40 vektor, kódoló inzulin-szerű növekedési faktor I, csökkenti a májkárosodást és a májcirrhosis kialakulását. *Gene Ther.* 2007; 14 , 203–210. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Sobrevals L., Rodriguez C., Romero-Trejejo JL, Gondi G., Monreal I., Pañeda A., Juanarena N., Arcelus S., Razquin N., Guembe L. Inzulin-szerű növekedési faktor I géntranszfer A cirrhotikus májra való gyulladás fibrolízist indukál és csökkenti a fibrogenezist, ami patkányokban a cirrhosis reverziójához vezet. *Hepatológia.* 2010; 51 , 912–921. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Sobrevals L., Enguita M., Quiroga J., Prieto J., Fortes P. Az AAV1 vektorból expresszált inzulin-szerű növekedési faktor I (IGF-I) patkányokban a májcirrhosis teljes kiújulásához vezet. *PLoS ONE.* 2016; 11 :e0162955. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Louboutin J.-P., Chekmasova AA, Marusich E., Chowdhury JR, Strayer DS Hatékony központi idegrendszeri génbejuttatás intravénás injekcióval. *Nat. Mód.* 2010; 7 , 905–907. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Barbanti-Brodano G., Sabbioni S., Martini F., Negrini M., Corallini A., Tognon M. Simian virus 40 fertőzés emberben és kapcsolat humán betegségekkel: eredmények és hipotézisek. *Virologia.* 2004; 318 :1–9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Garcea RL, Imperiale MJ Simian virus 40 emberek fertőzése. *J. Virol.* 2003; 77 , 5039–5045. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Gluzman Y. Az SV40-nel transzformált majomsejtek támogatják a korai SV40 mutánsok replikációját. *Sejt.* 1981; 23 , 175–182. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Oppenheim A., Peleg A. Segítők az SV40 pszeudovírusok hatékony beágyazásához. *Gén.* 1989; 77 , 79–86. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Vera M., Prieto J., Strayer DS, Fortes P. A rekombináns SV40 vektorok termelését befolyásoló tényezők. *Mol. Ott.* 2004; 10 , 780–791. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

32. Jasin M., de Villiers J., Weber F., Schaffner W. Homológ rekombináció magas gyakorisága emlőssejtekben endogén és bevitt SV40 genomok között. *Sejt.* 1985; 43 , 695–703. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
33. Gerard RD, Gluzman Y. Új gazdasejtrendszer a szabályozott majomvírus 40 DNS replikációjához. *Mol. Sejt. Biol.* 1985; 5 , 3231–3240. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Arad U., Ben-Nun-Shaul O., El-Latif MA, Nissim O., Oppenheim A. Egy új csomagoló sejtvonala SV40 vektorokhoz, amely kiküszöböli a T-antigén-pozitív, replikáció-kompetens rekombinánsok képződését. *Virologia.* 2002; 304 , 155–159. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Kimchi-Sarfaty C., Ben-Nun-Shaul O., Rund D., Oppenheim A., Gottesman MM In vitro csomagolt SV40 pszeudovírusok, mint rendkívül hatékony vektorok a génátvitelhez. *Zümmögés. Gene Ther.* 2002; 13 , 299–310. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Nakanishi A., Shum D., Morioka H., Otsuka E., Kasamatsu H. Interaction of the Vp3 nukleáris lokalizációs jel az importin alfa 2/béta heterodimerrel irányítja a fertőző majomvírus nukleáris bejutását. *J. Virol.* 2002; 76 , 9368–9377. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
37. de Haan P, Klein HC, 't Hart BA A neurodegeneratív és pszichiátriai betegségek autoimmun vonatkozásai: az innovatív terápia sablonja. *Elülső. Pszichiátria.* 2017; 8:46 . [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
38. de la Luna S., Martín J., Portela A., Ortín J. Az influenzavírus csupasz RNS-e expresszálnak a polimeráz három alegységét és a nukleoproteint együttesen expresszálnak sejtekbe történő transzfektálással a majomvírus 40 rekombináns vírusaiból. *J. Gen. Virol.* 1993; 74 , 535–539. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Barrett PN, Mundt W., Kistner O., Howard MK Vero sejtplatform a vakcinagyártásban: elmozdulás a sejt kultúrán alapuló vírusvakcinák felé. *Expert Rev. Vaccines.* 2009; 8 , 607–618. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Kolman JL Masszívan párhuzamos szekvenálás a járulékos vírusok kimutatására. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2011; 65 , 663–667. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Louboutin J.-P., Marusich E., Fisher-Perkins J., Dufour JP, Bunnell BA, Strayer DS A génátvitel a rhesus majom agyába SV40-eredetű vektorok használatával tartós és biztonságos. *Gene Ther.* 2011; 18 , 682–691. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Christian P, Deschamps M., Dhéré R., Hutchens C., Lebron J., Knezevic I., Lambert S., Lewis A., Mallet L., Nandapalan P. Egészségügyi Világszervezet; 2011. Javaslatok az állati sejt kultúrák, mint biológiai gyógyszerkészítmények előállításának szubsztrátjainak értékeléséhez és a sejtbankok jellemzéséhez. [[Google ösztöndíjas](#)]
43. Cole CN Polyomaviridae: a vírusok és replikációjuk. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, szerkesztők. *Fields Virology: 1997–2025.* Lippincott-Raven Kiadó; 1996. [[Google Scholar](#)]
44. Yu Y, Kudchodkar SB, Alwine JC A majomvírus 40 nagy és kis daganatantigénjének hatásai a rapamicin jelátvitel emlős célpontjára: a kis tumorantigén az eIF4E-kötő fehérje 1 hipofoszforylációját közvetíti a fertőzés késői szakaszában. *J. Virol.* 2005; 79 , 6882–6889. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
45. Fahrbach KM, Katzman RB, Rundell K. Az SV40 ST antigén szerepe a mesothel sejtek tartós fertőzésében. *Virologia.* 2008; 370 , 255–263. [[PMC ingyenes cikk](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
46. Hronovský V., Plaisner V., Benda R. CV-1 majomvese sejtvonala – nagyon érzékeny szubsztrát az arbovírusok diagnosztizálására és tanulmányozására. *Acta Virol.* 1978; 22 , 123–129. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

As a library, NLM provides access to scientific literature. Inclusion in an NLM database does not imply endorsement of, or agreement with, the contents by NLM or the National Institutes of Health.

Learn more: [PMC Disclaimer](#) | [PMC Copyright Notice](#)



[Mol Ther Methods Clin Dev](#). 2017 Sep 15; 6: 124–134.

PMCID: PMC5537168

Published online 2017 Jul 5. doi: [10.1016/j.omtm.2017.06.007](https://doi.org/10.1016/j.omtm.2017.06.007)

PMID: [28791314](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28791314/)

Generation of a Vero-Based Packaging Cell Line to Produce SV40 Gene Delivery Vectors for Use in Clinical Gene Therapy Studies

[Miguel G. Toscano](#),^{1,*} [Jeroen van der Velden](#),² [Sybrand van der Werf](#),² [Machteld Odijk](#),² [Ana Roque](#),² [Rafael J. Camacho-Garcia](#),^{1,3} [Irene G. Herrera-Gomez](#),^{1,3} [Irene Mancini](#),² and [Peter de Haan](#)²

Abstract

Replication-defective (RD) recombinant simian virus 40 (SV40)-based gene delivery vectors hold a great potential for clinical applications because of their presumed non-immunogenicity and capacity to induce immune tolerance to the transgene products in humans. However, the clinical use of SV40 vectors has been hampered by the lack of a packaging cell line that produces replication-competent (RC) free SV40 particles in the vector production process. To solve this problem, we have adapted the current SV40 vector genome used for the production of vector particles and generated a novel Vero-based packaging cell line named SuperVero that exclusively expresses the SV40 large T antigen. SuperVero cells produce similar numbers of SV40 vector particles compared to the currently used packaging cell lines, albeit in the absence of contaminating RC SV40 particles. Our unique SV40 vector platform named SVac paves the way to clinically test a whole new generation of SV40-based therapeutics for a broad range of important diseases.

Keywords: SV40 viral vectors, SuperVero, SVac, packaging cells

Introduction

After small molecules and therapeutic proteins, gene therapy will be the next wave of medicines potentially capable of curing today's major diseases. Key to the success of gene therapy will be the safe and efficient delivery of the therapeutic genes into cells of the affected tissue or organ target cells of a patient's body. Viruses evolve to efficiently transfer and express their genes into host cells. This ability renders them ideally suited for use as gene delivery vectors. Among the viral vector systems currently used for gene therapy, lentiviral (LV) and adeno-associated viral (AAV) vectors are the most popular because they transduce a wide variety of

tissues and mediate long-term expression when administered to animals.[1](#), [2](#), [3](#) For both vectors it has been shown that such replication-defective (RD) viral vectors are non-immunogenic or tolerogenic in hosts that are naive to the cognate virus.[4](#), [5](#), [6](#), [7](#), [8](#) After successful preclinical and clinical trials, the first LV and AAV vector-based therapeutics have now reached the market.[9](#) However, both LV and AAV vector systems have shortcomings that limit their application.

LV vectors integrate randomly in the host genome, and thus increase the risk of insertional mutagenesis.[10](#) Moreover, LV vector particles are highly unstable, rapidly degraded when administered *in vivo*, and the development of stable packaging cell lines has remained challenging.[11](#) For these reasons, LV vectors are mainly used for the *ex vivo* transduction of leukocytes and/or their progenitors to treat blood-related genetic disorders, lysosomal storage diseases, or cancer. AAV vectors are mainly used for *in vivo* gene therapies. However, the majority of the human population encountered wild-type AAV together with its helper virus (adenovirus, causing the common cold) and developed a strong humoral and cellular immune memory for the AAV capsid proteins. Clinical studies using recombinant AAV vectors revealed that administration of vector particles elicits innate and adaptive immune responses against the viral and transgene-encoded proteins in the vast majority of treated patients, leading to decreasing expression levels of the therapeutic transgenes over time and elimination of the transduced cells from the body, compromising re-administration of the vector. The few treated patients who showed long-term transgene expression most likely have never been infected with AAV, and thus were immunologically naive to the RD vector used in the study. For these reasons, the efficacy of AAV vector-based *in vivo* gene therapies is limited.[12](#), [13](#)

RD simian virus 40 (SV40) vectors could be an attractive alternative to AAV vectors for clinical gene therapy.[14](#) SV40 is a polyomavirus with icosahedral capsids of 45 nm in size containing a 5.25 kb-long circular double-stranded DNA. The virus strictly replicates in its natural host, macaques, where it causes chronic asymptomatic infections. SV40 particles enter infected cells via the caveolar-endosomal route, but in contrast with other viruses are able to avoid the lysosomal degradation, thereby evading exposure to the host immune system.[15](#), [16](#), [17](#), [18](#), [19](#), [20](#), [21](#) RD SV40 vectors have been generated by deleting the coding region of the two early non-structural proteins named large T antigen (LTag) and small T antigen (STag), giving 2.7 kb of space for cloning the transgene encoding the therapeutic protein or RNA. SV40 vectors transduce a wide range of cell types *in vivo*, and their therapeutic potential has been demonstrated in animal models of human disease.[22](#), [23](#), [24](#), [25](#), [26](#) Because humans can be considered naive to SV40,[27](#), [28](#) it is expected that RD SV40 vectors are non-immunogenic or tolerogenic when applied in clinical settings. The non-immunogenicity in humans and capacity to induce immune tolerance to transgene proteins render SV40 vectors highly attractive for use in gene replacement and immunotherapies.

However, the translation of SV40 vectors to the clinic has been hampered by the lack of a packaging cell line that does not accumulate detectable amounts of replication-competent (RC) SV40 particles during vector production.[29](#), [30](#), [31](#), [32](#) To date, two cell lines have been mainly used for the production of SV40 vectors: COS-1 and COS-7. COS cell lines were generated by transformation of monkey CV1 cells with SV40 DNA.[29](#) Passaging of SV40 vectors in COS cells, however, results in the appearance of wild-type SV40 particles. This most likely occurs by sequence homology-dependent recombination between the chromosomally inserted SV40-specific DNA sequences and episomally replicating vector-specific DNA sequences.[33](#)

Other cell lines that express the SV40 T antigens in *trans* are COT18 and CMT4. Both CV1-derived cell lines were generated using SV40 DNA in which the T antigens were expressed under transcriptional control of the mouse metallothionein promoter. Because the complete early region of the SV40 genomic DNA is present in the chromosomal DNA, the ability that RC virus contaminants emerge during the vector production process has remained. Moreover, the vector yields of both packaging cell lines are not increased compared with those of COS cells.[33](#), [34](#), [35](#)

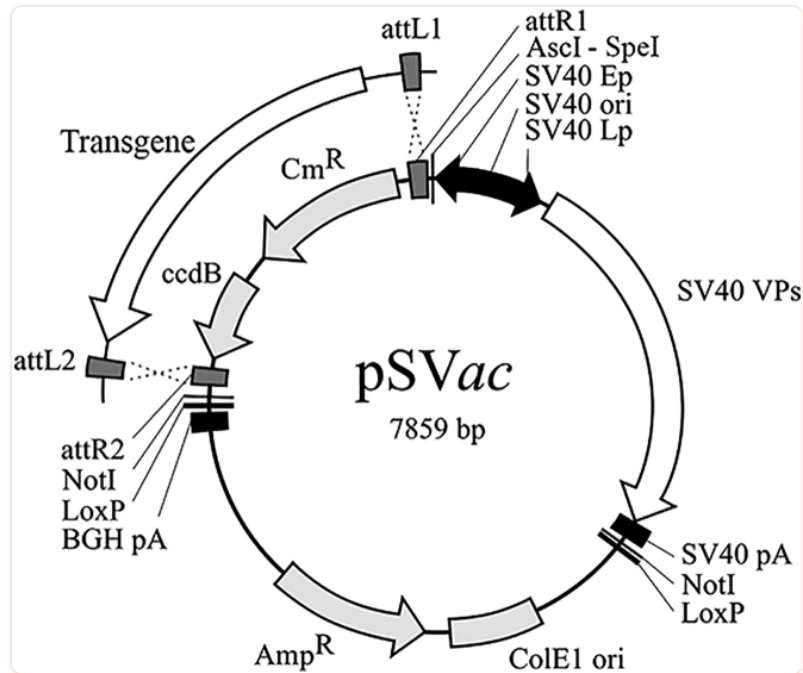
Polyomavirus-based virus-like particle (VLP) vector systems have been developed to prevent the occurrence of RC virus particles in the vector preparations. In vitro-generated VLPs consisting of circular double-stranded DNA encapsidated with polyomavirus VP1 lack VP2 and VP3 in the capsids and histones covering the encapsidated DNA molecules. Although these particles display a higher packaging capacity, the absence of VP2/VP3 in the VLPs has a negative impact on their entry in the nucleus.[36](#)

In order to overcome the generation of wild-type virus contaminants, we optimized the SV40 vector genome used to initiate the production of vector particles and generated a safe and efficient Vero-based SV40 vector packaging cell line named SuperVero. The SuperVero cells solely express the viral LTag and accumulate vector particles at high titers, comparable with those obtained in the conventional packaging cell lines COS-1 and COS-7. Because RD SV40 vectors are safe, highly efficient for gene delivery, and non-immunogenic/tolerogenic in humans, our improved SV40 vector platform named SVac holds promising qualities for developing effective treatments for the major diseases of our time.[37](#)

Results

Construction of SV40 Vector Destination pSVac and Derivative Vector Expression Plasmids

In order to improve the efficacy and versatility of the SV40 vector system, we modified vector plasmid pSL-PL³⁸ in a series of steps yielding SV40 destination plasmid pSVac ([Figure 1](#)) that is used to initiate the production of recombinant SV40 particles. The low copy number bacterial backbone of pSL-PL (pBR322) was replaced with a high copy number backbone (pBluescript SK-). The residual 3'-terminal LTag coding sequences present in pSL-PL were removed, and a Gateway gene cassette derived from pEF5/FRT/V5-DEST was introduced in the early region of the SV40 vector DNA, providing a versatile method to introduce transgenes encoding therapeutic proteins or RNAs into the vector destination plasmid by LR clonase-mediated recombination between pSVac DNA and that of an entry plasmid harboring a transgene resulting in vector expression plasmids. The bovine growth hormone (BGH) polyadenylation (pA) signal originating from pEF5/FRT/V5-DEST was cloned downstream of the Gateway cassette to facilitate transient expression studies by transfecting target cells with DNA from vector expression plasmids. Unique *Ascl* and *SpeI* restriction sites were introduced between the SV40 early promoter and the Gateway cassette to facilitate the introduction of tissue-specific promoters. We generated a series of SV40 expression plasmids containing different transgenes by Gateway recombination. The resulting expression plasmids encode the jellyfish green fluorescent protein (pSVGFP), the human activated blood clotting factor VII (pSVFVIIa), and a short hairpin RNA specific for the firefly luciferase (pSVshLuc).



[Figure 1](#)

Schematic Representation of the SV40 Vector Destination Plasmid pSVac

The Gateway gene cassette comprising the *ccdB* and the chloramphenicol resistance (Cm^R) genes present in pSVac is substituted by the transgene using Gateway recombination yielding an SV40 vector expression plasmid.

For the generation of SV40 vector particles, the prokaryotic backbone of pSVac needs to be removed from the SV40 vector sequences. For this purpose, *NotI* restriction sites and loxP recombination sites were introduced between the Gateway cassette and BGH pA signal and between the SV40 pA signal and the pBluescript SK- bacterial backbone. Circular vector DNA used as starting material for the production of SV40 vector particles in packaging cells was generated by digesting a vector expression plasmid with *NotI* followed by re-circularization of the vector DNA using T4 DNA ligase. Alternatively, circular vector DNA can be generated by homologous recombination at the loxP sites using Cre recombinase.

Generation of a New SV40 Vector Packaging Cell Line

The SV40 T antigens are required for virus DNA replication and expression of the late gene encoding the viral capsid proteins. In order to verify whether the LTag by itself is sufficient for the generation of SV40 vector particles, we generated the expression plasmids pHY338 and pHY359 as described under [Materials and Methods](#). Expression plasmid pHY338 encodes both STag and LTag; plasmid pHY359 exclusively encodes LTag ([Figure 2A](#)). Vero cells were selected as acceptor cells for both expression plasmids because these cells are permissive for SV40 and because Vero constitutes an accepted cell culture platform for vaccine production.³⁹ Vero cells grown in serum-free cell culture medium were transfected with either pHY338 or pHY359 DNA, and cells were cultured for 1 month in serum-free culture medium supplemented with puromycin. Puromycin-resistant cell clones were subsequently transduced with SVLuc particles

produced in COS-1 cells³¹ at an MOI of 100. As a positive control, COS-1 cells were transduced with *SVLuc* particles at the same MOI. Three days after transduction, the amount of *SVLuc* particles present in the culture medium of the transduced cells was determined by quantitative real-time PCR. The qPCR assay has been developed in such a way that only packaged vector genomes are measured ([Figure 2B](#)). Both the pHY338 and pHY359-transfected Vero cells produced vector particles at approximately 30% of the amount of vector particles produced in COS-1 cells. To verify that the vector particles produced in the transfected Vero cells are biologically active, we subsequently used the culture media from the *SVLuc*-transduced Vero and COS-1 cells for transducing fresh COS-1 cells. Three days after transduction, crude cell lysates were prepared and the luciferase activity was determined in these lysates by luminescence. [Figure 2C](#) shows that the transfected Vero cells produced vector particles that induced luciferase expression when transferred to COS-1 cells. These experiments demonstrated that the presence of SV40 LTag in Vero cells is sufficient for producing SV40 vector particles.

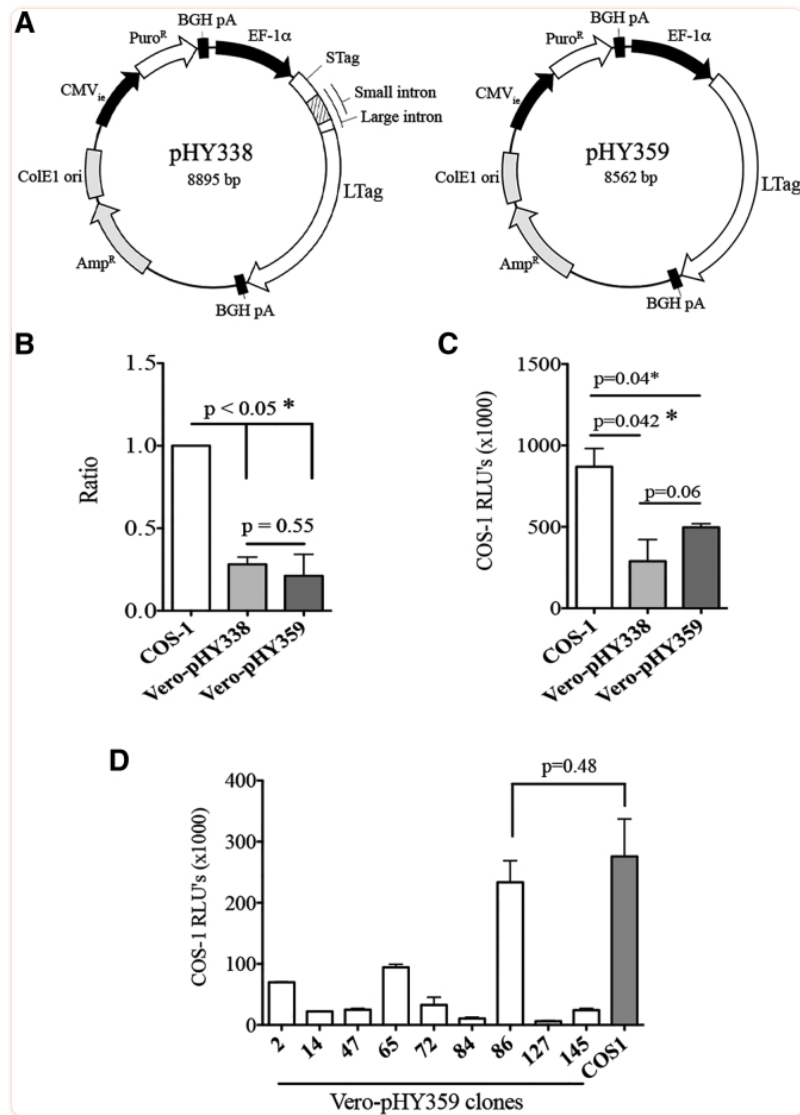


Figure 2

Vero Cells Stably Transfected with pHY359 Support the Production of SVLuc Vector Particles

(A) Schematic representation of the expression plasmids pHY338 and pHY359. Plasmid pHY338 contains the SV40 genomic T antigen sequence encoding both LTag and STag. Plasmid pHY359 contains the LTag cDNA sequence encoding LTag only. In both plasmids, transgene expression is driven by the EF-1 α promoter. Both plasmids contain the puromycin resistance (Puro^R) gene under transcriptional control of the CMV_{ie} promoter and BGH pA signal. (B) Ratio between the number of SVLuc particles produced in Vero cells transfected with pHY338 and pHY359 plasmid DNA and those produced in COS-1 cells transduced with SVLuc particles. (C) Luminescence of COS-1 cells transduced with SVLuc particles produced in transfected Vero or COS-1 cells. (D) Luminescence of COS-1 cells transduced with SVLuc particles produced in stably transfected Vero cell clones. COS-1 cells were used as positive control.

In order to generate a new Vero-based packaging cell line for the production of SV40 vector particles, we cultured cells transfected with pHY359 DNA in the presence of puromycin for 1 month. Individual puromycin-resistant cell colonies were picked and sub-cultured in culture medium with puromycin. More than 100 puromycin-resistant colonies were obtained and subsequently tested for their capacity to produce SV40 vector particles using the same assay as described above. One cell colony produced comparable amounts of SVLuc particles to COS-1

cells ([Figure 2D](#)). Subsequently, six subclones of this cell colony were generated by limited dilution of the puromycin-resistant cells and tested for their capacity to produce vector particles using the same assay. The cell clone that produced the largest amount of vector particles, denoted SuperVero, was expanded in serum-free culture medium without puromycin and used for generating a research cell bank of 50 vials that is stored at -150°C . For all further studies, vials of the research cell bank were thawed and the cells were cultured and expanded in serum-free glutamine-supplemented OptiPRO medium.

Molecular Analysis of the SuperVero Packaging Cell Line

In order to confirm the presence of a functional LTag-encoding gene in the chromosomal DNA of SuperVero cells and to investigate whether the cells harbor contaminating viruses, the transcriptome of SuperVero cells was analyzed by Massive Parallel Sequencing (MP-Seq).⁴⁰ More than 1.6 million different cDNA sequences from SuperVero poly-A-positive RNAs were generated. In parallel, more than 800,000 different cDNA sequences were generated from poly-A-positive RNAs isolated from reference cell line Vero ATCC CCL-81.

Among the SuperVero cDNA sequences, 202 cDNA reads mapped to the LTag gene present in the genomic DNA of the cells (see [Table 1](#)). SV40 cDNA sequences specific for other parts of the SV40 genome were absent in SuperVero cells. As expected, Vero cells do not contain SV40-specific mRNAs ([Table 1](#)).

Table 1

Comparison of the cDNA Reads of SuperVero and Vero Cells to a Viral Sequence Database

Original Accession No. Identified	SuperVero (1,673,145 Total Reads)		Vero ATCC CCL-81 (806,262 Total Reads)		Reference Genome Accession No.	Taxonomy
	Total No. of ViralDB Wins	Total No. of Reads Mapped to Refseq ^a	Total No. of ViralDB Wins	Total No. of Reads Mapped to Refseq ^a		
NC_001669.1	202 ^b	238 ^b	0	0	NC_001669	simian virus 40, complete genome
AC146999.1	63	97	0	14	NC_006273	human herpesvirus 5
EU410304.1	23	21	13	3	NC_006998	vaccinia virus GLV-1h68
X03922.1	17	97	0	14	NC_006273	human herpesvirus 5
HM143845.1	12	0	6	0	M11841	simian retrovirus 1
U85506.1	9	18	10	14	U85505	simian endogenous retrovirus
Z54175.1	7	10	5	5	NC_001461	bovine viral diarrhea virus 1
AF104029.1	6	1	6	0	NC_002032	bovine viral diarrhea virus 2
FM212572.1	4	5,330	1	2,926	AB047240	human endogenous retrovirus
JN134185.1	3	87	7	18	JN134185	simian endogenous retrovirus SRVcae
AF290913.1	1	0	0	1	U13766	murine leukemia virus
M15805.1	1	64	0	21	M15805	feline sarcoma

^aA single read may map to multiple positions of the reference sequence and each mapping is counted independently.

^b202 cDNA reads mapped to the LTag gene present in the genomic DNA of the cells.

The 202 LTag-specific cDNA reads of SuperVero cells were aligned and are homologous to the DNA sequence of pHY359 used to generate the cell line. Sequence variants were not present among the 202 sequenced cDNAs (Figure 3A).

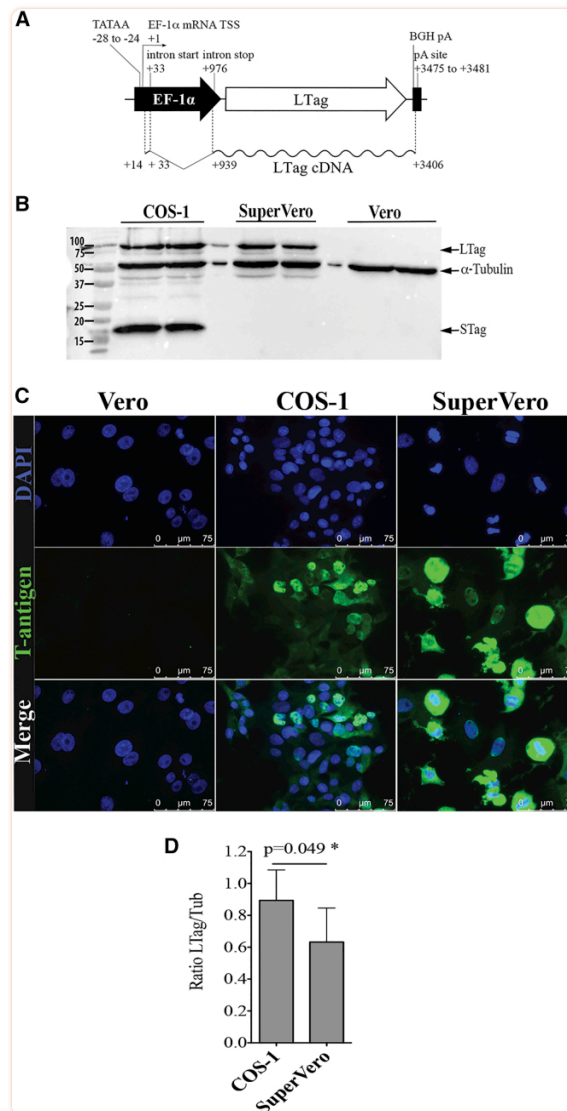


Figure 3

SuperVero Cells Contain pHY359 DNA and Express SV40 LTag

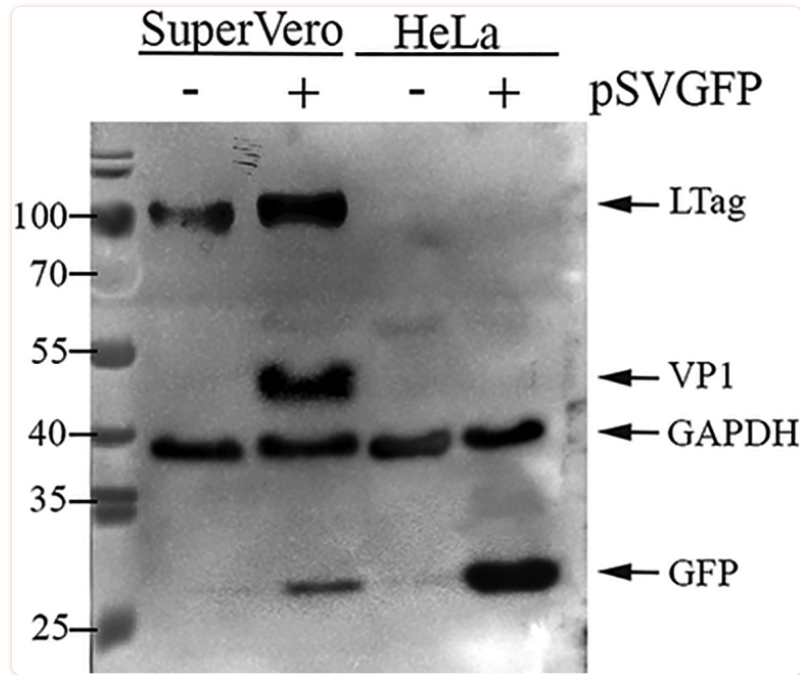
(A) Schematic representation of the cDNA reads from the MP-seq analysis corresponding with the SV40 LTag mRNA expressed in SuperVero cells. (B and C) Detection of the LTag protein in SuperVero cells (B) by western blot and (C) by immunocytochemistry using a mouse monoclonal antibody specific to the amino-terminal region of the LTag and STag. Vero cells are used as a negative control. COS-1 cells are used as a positive control expressing both LTag and STag. (D) Densitometric analysis of the western blot bands shown in (B). The graph represents the ratio between the density units of LTag and α -tubulin, used as an internal loading control.

The remaining cDNA reads obtained from the SuperVero cells with the MP-Seq method were compared with a viral sequence database (ViralDB) that contains 964,619 sequences extracted from the complete GenBank nucleotide sequence database.⁴⁰ The most significant homologies found in the comparison are shown in [Table 1](#). In the SuperVero sample, cDNAs were found that show homology to human herpesvirus 5 DNA. This homology corresponds with a short transcribed region in the cytomegalovirus immediate early (CMV_{ie}) promoter that drives transcription of the pac puromycin-resistance gene.

All other sequence homologies found between cDNAs from the SuperVero cells and the ViralDB are also found when the cDNAs from the Vero ATCC CCL-81 cells were compared with the sequences in the database. The MP-Seq study has shown that the SuperVero cell line is not contaminated with known viruses during its generation from Vero ATCC CCL-81 cells.

The presence of the LTag protein in SuperVero cells was subsequently confirmed by western blot analysis. Both LTag and STag proteins can be detected using an antibody specific for the N-terminal part of the LTag protein. As expected, COS-1 cells accumulate both LTag and STag, whereas SuperVero cells express only LTag ([Figure 3B](#)). Immunocytochemistry of the SuperVero and COS-1 cells further confirmed the presence of the LTag in the nucleus of the cells ([Figure 3C](#)). A densitometric analysis of the bands on the western blots revealed that the relative amount of LTag in SuperVero cells was slightly lower than that in COS-1 cells ([Figure 3D](#)).

The SV40 late gene encoding the capsid proteins is exclusively expressed in cells permissive for SV40 that accumulate the viral LTag. This implies that the viral capsid proteins are produced only in the packaging cells during vector manufacturing, but absent in (human) target cells after transduction. The transcriptional silencing of the SV40 late gene in cells lacking the viral LTag was verified by transfecting SuperVero and HeLa cells with pSVGFP DNA. After 3 days, the presence of GFP, LTag, and the major viral capsid protein VP1 in both cell types was checked on western blots using monoclonal antibodies specific for GFP, LTag, and VP1, respectively. A monoclonal antibody specific for GAPDH was included as a protein loading control. Only SuperVero cells constitutively produce SV40 LTag. In both pSVGFP-transfected SuperVero and HeLa cells, GFP was detected. However, VP1 accumulated only in pSVGFP-transfected SuperVero cells, demonstrating that the SV40 late gene is not expressed in target cells lacking SV40 LTag ([Figure 4](#)).



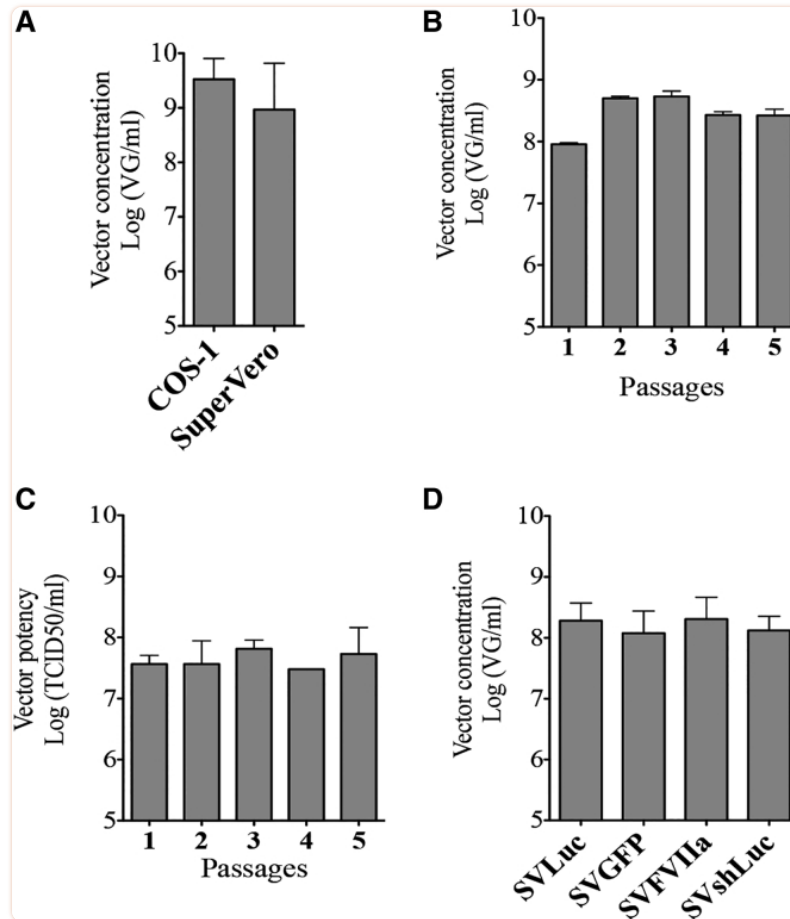
[Figure 4](#)

The SV40 Late Gene Is Only Expressed in SuperVero Cells during the Production of Vector Particles and Not in Human Target Cells

Detection of GFP, SV40 LTag, and major capsid protein VP1 in cell lysates from SuperVero and HeLa cells transfected with pSVGFP DNA by western blot analysis using antibodies specific for GFP, LTag, and VP1. An anti-GAPDH antibody was used as a loading control.

Production of SV40 Vector Particles in SuperVero Cells

When COS-1 cells cultured in medium with fetal bovine serum and SuperVero cells cultured in serum-free medium are transduced with SV40 vector particles at an MOI of 400 vector particles per cell, both cell lines secreted comparable numbers of vector particles in the culture medium ([Figure 5A](#)). The capacity of SuperVero cells to produce consistent amounts of SV40 particles was further tested by passaging vector particles in fresh SuperVero cells and measuring the number of vector particles after each passage. In SuperVero cells transduced with SVLuc particles obtained at subsequent passages, consistently 10^8 – 10^9 vector particles per milliliter cell culture are found in the cell culture medium ([Figure 5B](#)). Moreover, approximately the same numbers of vector particles remain inside the cells and are not harvested after production (data not shown). The transduction efficacy (potency) of the produced vector particles after each passage was determined using a modified tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) assay. Because SV40 vector particles do not lyse transduced cells, we used SVLuc as a reporter vector and used luminescence as a readout in this limited dilution assay. These experiments revealed that the vector particles quantified by qPCR ([Figure 5B](#)) remain fully functional after passaging them in SuperVero cells as determined by TCID₅₀ ([Figure 5C](#)). Furthermore, defective interfering vector particles do not accumulate during the vector production process as demonstrated by the stability of the TCID₅₀ titer over subsequent passaging ([Figure 5C](#)).



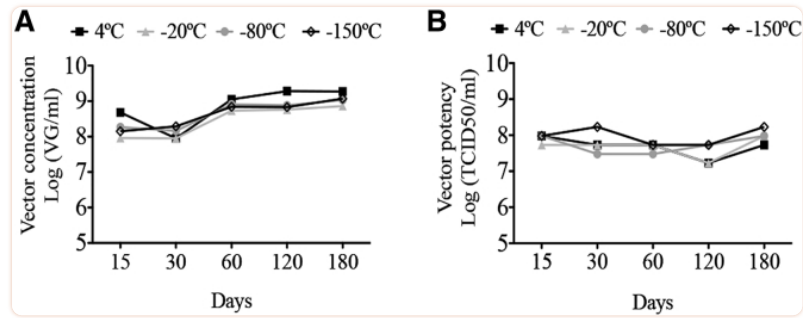
[Figure 5](#)

SuperVero Cells Consistently Accumulate Large Amounts of Functional SV40 Vector Particles

(A) Determination of the number of *SVLuc* particles produced in COS-1 and SuperVero cells using qPCR. (B) Determination of the number of *SVLuc* particles after passaging in SuperVero cells. (C) Determination of the potency of *SVLuc* particles after passaging in SuperVero cells. (D) Determination of the number of SV40 vector particles expressing different transgenes produced in SuperVero cells. Error bars represent SD, n = 3.

We next produced *SVLuc*, *SVGFP*, *SVFVIIa*, and *SVshLuc* vector batches in SuperVero cells. The vector yields obtained after three passages consistently ranged between 10^8 and 10^9 particles per milliliter cell culture, demonstrating the robustness of the vector production process ([Figure 5D](#)).

SVLuc particles produced in SuperVero cells were stored for different periods of time at different temperatures. The numbers of vector particles were determined by qPCR ([Figure 6A](#)), whereas the potency of the particles was determined using the TCID₅₀ assay ([Figure 6B](#)). Independent of the storage temperature, the amounts of vector particles did not significantly decrease after 6 months. These experiments demonstrate that SV40 vector particles stored at 4°C or at lower temperatures remain fully functional for at least 6 months.



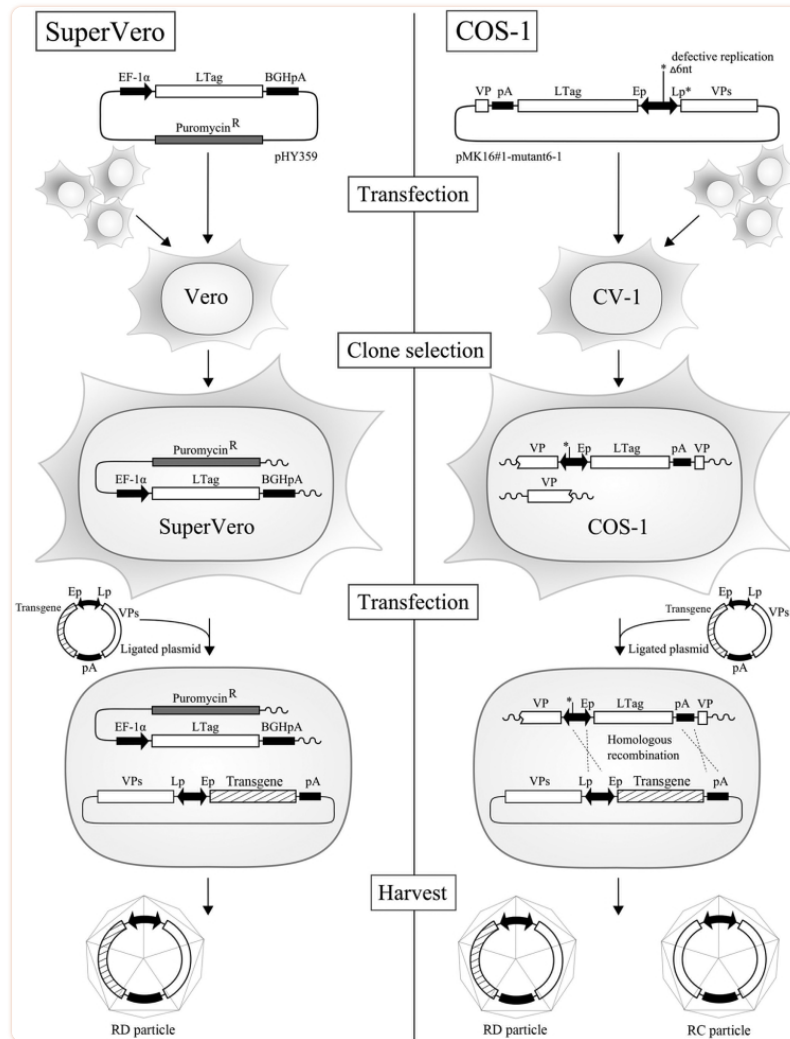
[Figure 6](#)

SV40 Vector Particles Remain Functional after Storage for 6 Months at 4°C or Lower Temperatures

SVLuc particles were stored at +4°C, -20°C, -80°C, and -150°C. (A) The number of vector particles was determined by qPCR. (B) The potency of the vector particles was determined by the TCID₅₀ analysis.

Detection of RC SV40 Particles

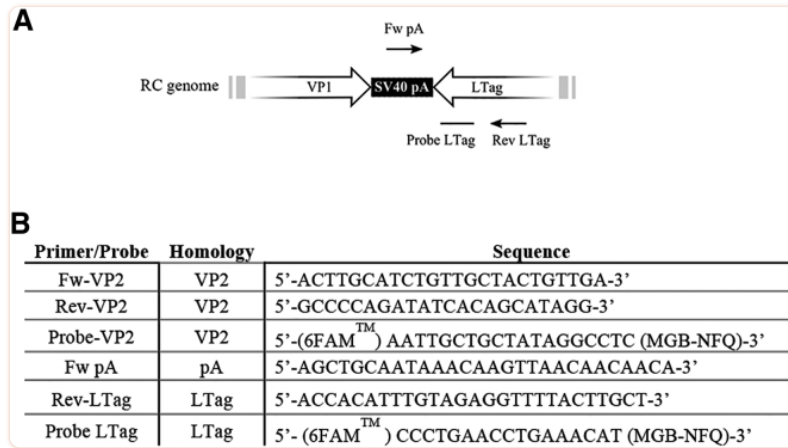
It has been found that the production of SV40 vectors in COS cells results in the emergence of RC SV40 particles.³³ In order to sort out whether the virus contamination problem is solved by using the SuperVero cell line ([Figure 7](#)), we designed a set of primers to detect RC SV40 particles by qPCR ([Figure 8](#)).



[Figure 7](#)

Production of SV40 Vectors in SuperVero and COS-1 Cells

The production of SV40 particles in COS-1 cells (right side) results in the emergence of RC SV40 particles because of homologous recombination between chromosomally inserted SV40 sequences and episomally replicating SV40 DNA sequences. The generation of RC variants is prevented in SuperVero cells (left side) harboring chromosomally inserted SV40 LTag DNA sequences without sequence overlap to the episomally replicating SV40 vector DNA sequences.



[Figure 8](#)

Primers and Probes Used for the qPCR Analysis to Detect RC and RD SV40 Vector Particles

(A) Schematic representation of the SV40 genome showing the position of the primers and probe for the detection of RC SV40 particles. (B) The sequences of primers and probes used in the qPCR analysis.

In all the samples tested so far using these primers, including samples from highly concentrated vector preparations and samples from subsequent vector passages (up to 10), the number of RC SV40 particles remained below the detection limit of the assay. This means that after passaging the vector particles in SuperVero cells, RC SV40 particles certainly do not overgrow the RD vector particles.

Discussion

SV40 gene delivery vectors have shown therapeutic efficacy in numerous preclinical studies,[22](#), [23](#), [24](#), [25](#), [41](#) and because of their predicted non-immunogenic/tolerogenic potential in humans these vectors are an attractive alternative to the currently used vector systems for developing safe and efficient gene therapies. To date, however, SV40 vectors have not been tested in clinical trials because an efficient packaging cell line that does not accumulate RC SV40 particles during the vector production process is lacking. Here we report on the development of an SV40-based gene delivery platform, which we named *SVac*, that is well suited for producing RD SV40 vector particles free of contaminating RC revertants, and thus eligible for use in clinical gene therapy studies.

We developed a versatile SV40 vector destination plasmid (*pSVac*) that allows the evaluation of promoters, transgenes, and other regulatory elements for safety and efficacy in animals and humans. Vero cells were selected for the generation of a new packaging cell line because this cell line is permissive to SV40 and is recommended by the World Health Organization for vaccine production for human use.[42](#)

RD SV40 vector genomes lack the T antigen region. In order to produce SV40 vector particles, T antigen must be provided by the packaging cell line. The SV40 early gene encodes LTag and STag. LTag is a replicase-associated protein required for viral DNA replication and for activation of the viral late promoter.[43](#) STag inhibits cellular protein synthesis from capped messenger

RNAs (a process denoted host shutoff), thereby promoting the synthesis of viral capsid proteins.⁴⁴ Simultaneous expression of LTag and STag results in immortalization of primary mammalian cells, transformation of established mammalian cell lines, and induction of tumors in immuno-compromised young-born hamsters. However, it has been shown that expression of the individual T antigens in mammalian cells does not lead to immortalization, transformation, or tumor induction.⁴⁵ We here show for the first time that expression of the LTag in the absence of STag in Vero cells is sufficient for the replication and packaging of SV40 vector particles. A Vero-based SV40 packaging cell line denoted SuperVero was generated that expresses the viral LTag, and thus lacks the viral oncogene and oncoproteins. Because sequence overlap between chromosomally inserted SV40 LTag coding sequences and episomally replicating SV40 vector sequences is lacking, the emergence of RC particles during the vector production process is highly unlikely.

We demonstrate that the LTag in SuperVero cells activates transcription from the viral late promoter, resulting in the accumulation of capsid proteins during the vector production process. However, in target cells lacking SV40 LTag transduced with an RD SV40 vector, only the transgene is expressed from the viral early promoter.

From the previous attempts to generate an SV40 vector packaging cell line it was found that the amount of the LTag is directly correlated with the number of SV40 vector particles,^{33, 34} but inversely correlated with cell viability.³³ This could be the reason why we had to screen more than a hundred independent puromycin-resistant clones to identify one cell clone that is capable of producing vector particles to levels comparable with those in COS cells. Remarkably, this cell clone accumulates LTag to levels similar to COS-1 cells. Apparently there is a narrow margin of LTag expression tolerated by Vero cells that supports SV40 vector replication. We initiated experiments to further increase the amount of LTag in the packaging cells during the production process to even improve the vector yields.

The SV40 vector particles remain fully functional after passaging them in SuperVero cells, indicating that defective interfering particles do not accumulate during the production process. Furthermore, the produced vector particles are highly stable upon storage at 4°C or lower temperatures. The major advantage of SuperVero packaging cells above COS cells for producing RD SV40 vector particles is the absence of contaminating RC SV40 particles during the vector production process.³²

The circular vector DNA molecules used in our studies to start the production of SV40 vector particles in SuperVero cells are similar, with the same genetic elements, to those used in previous studies to produce vector particles in COS cells. Because both Vero and CV1 cell lines are derived from kidney tissue obtained from African green monkeys (*Cercopithecus aethiops*),⁴⁶ it is assumed that the in vivo transduction efficacy of SV40 vector particles produced in a Vero-derived packaging cell line is similar to that of particles produced in CV1-derived packaging cell lines such as COS. Indeed, ongoing in vivo studies with *SVGFP* and *SVLuc* particles produced in SuperVero cells show high transduction rates and transgene expression levels of different organs and/or tissues depending on the mode of administration (unpublished data).

Overall, RD SV40 vectors are efficient, non-immunogenic/tolerogenic in humans, highly stable, safe to use, and can be produced in large quantities in SuperVero packaging cells. The generation of the SVac platform described here paves the way for developing the next wave of medicines. SV40 vectors expressing functional gene products can be used in gene replacement

therapies to treat genetic disorders such as, for example, low-density lipoprotein receptor deficiency, primary hyperoxaluria type 1, or hemophilia. In addition, SV40 vectors expressing T cell receptors (TCRs) or chimeric antigen receptors (CARs) can be used as vaccines to treat cancer. Last but not least, because of their capacity to induce immune tolerance to the transgene products in humans, SV40 vectors expressing primary self-antigens of degenerative/autoimmune diseases can be used as reverse vaccines to treat the major diseases of our time, such as neurodegenerative and psychiatric diseases,³⁷ atherosclerotic cardiovascular disease, diabetes mellitus, arthritis, and chronic obstructive pulmonary disease (COPD).

Materials and Methods

Plasmid Construction

Expression plasmid pHY338 was constructed using a pBluescript SK- (Stratagene; Agilent Technologies) backbone by adding a gene cassette comprising the SV40 T antigen coding sequence (NCBI reference sequence [NC_001669.1](#)) flanked by the EF-1 α promoter and the BGH pA signal (EF-1 α -T antigen-BGH pA) and a gene cassette comprising the pac puromycin resistance gene flanked by the human CMV_{ie} promoter and the BGH pA (CMV_{ie}-pac-BGH pA).

Expression plasmid pHY359 exclusively expressing the SV40 LTag was generated by deletion of the large intron from the T antigen coding sequence by fusion PCR from plasmid pHY338 as follows. First, with forward primer 5'-GCAGGCTACCATGGATAAAGTTTTAAACAGAGAG-3' homologous to the 5' end of the LTag coding sequence and reverse primer 5'-CCCATTCATCAGTTCCATAGGTTGGAATCTCAGTTGCATCCCAGAAGCCTCCAAAG-3' covering the intron splice site, a first PCR fragment was generated comprising the 5' end of the LTag sequence. Second, with forward primer 5'-CTTTGGAGGCTTCTGGGATGCAACTGAGATTCCAACCTATGGAAGTGAATGGG-3' covering the intron splice site and reverse primer 5'-AGGAATGTTGTACACCATGCATTTTAAAAAGTC-3' covering the *NsiI* site in the center of the LTag coding domain, a second PCR fragment was generated. Third, the two PCR fragments were used to perform a fusion PCR using the two external primers. The generated PCR fragment comprising the 5' end of the LTag coding sequence without the large intron was cloned into the *NcoI-NsiI* sites of expression plasmid pHY338 yielding expression plasmid pHY359.

Cell Line Generation

Vero cells (ATTC, CCL-81) were cultured in serum-free OptiPRO (GIBCO, Thermo Fisher Scientific) medium supplemented with 4 mM glutamine (GIBCO, Thermo Fisher Scientific). The pBluescript SK- backbone was removed from the pHY359 DNA, and Vero cells were transfected with the DNA fragment containing the pac and LTag gene cassettes using ExGen 500 in vitro Transfection Reagent (BIOMOL) following the manufacturer's instructions. Two days after transfection, the cells were divided into culture medium containing 2 μ g/mL puromycin (Sigma-Aldrich) and kept under the antibiotic pressure for 1 month.

Construction of SV40 Destination Vector Plasmid pSVac

DNA of pSL-PL was subjected to PCR using primers 5'-CGGGATCCAGACATGATAAGATACATTG-3' and 5'-ATAGTTTTCAGCGGCCGCAATGAATGCAATTGTTGTTGTTAACTTG-3'. The resulting PCR fragment comprising the SV40-pA signal was cloned into pBluescript SK- yielding pAM002. Plasmid pEF5/FRT/5-DEST (Invitrogen) DNA was subjected to PCR using primers 5'-CCGCTCGAGTTGCGGCCGCTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATC-3' and 5'-GGTACCATAGAGCCCACCGCATCCCCAGCATGCC-3'. The resulting PCR fragment comprising the BGH pA was cloned into pAM002, resulting in pAM003. The two complementary oligonucleotides 5'-GGCCGCTTTATTAATTAAGCCCT GCAGGTTGTTAACTTGGCGGCCTTAT-3' and 5'-CGATAAGGCGGCCAAGTTTAAACAACCTGCAGGGCTTAATTAATAAAGC-3' were annealed, digested with *NotI* and *ClaI*, and cloned into pAM003, yielding pAM004. Plasmid pSL-PL DNA containing the SV40 origin and late region was digested with *ClaI* and BamHI, and cloned into pAM004, resulting in pAM005. Plasmid pEF5/FRT/5-DEST DNA was subjected to PCR using primers 5'-TGGCGGCCTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAG-3' and 5'-CAATCATACCGTTTAAACGAACCGCGGCCCTCTAGAC-3'. The resulting PCR fragment comprising the ccdB Gateway and the chloramphenicol resistance (Cm^R) gene cassettes flanked by AttR1 and AttR2 recombination sites was cloned into pAM005, resulting in SV40 destination vector plasmid pSVac.

SV40 Vector Production

Vector batches were produced according to Vera et al.³¹ In brief, after digestion of SV40 expression plasmid DNA with *NotI* to remove the bacterial backbone, vector DNA was isolated from agarose gels and subsequently re-circularized using T4 ligase (NEB). SuperVero cells growing in roller bottles (growth area: 850 cm²; Greiner Bio One) to 20%–70% confluence in OptiPRO serum-free media containing 4 mM L-glutamine (5% carbon dioxide, 37°C) were transfected with the re-circularized vector DNA. Three days posttransfection, the culture medium containing the vector particles was collected and replaced by fresh medium. In order to further increase the number of vector particles, we used the pooled vector harvests for at least two subsequent transduction rounds. In each transduction round, SuperVero cells were transduced with 400 SV40 vector genomes per cell. Three days posttransduction, the vector particle-containing culture medium was collected and replaced by fresh media. Vector harvests were clarified and concentrated by ultracentrifugation, and stored at 4°C or other temperatures as indicated.

SV40 Vector Quantification

The concentration of the vector particles in the produced vector batches was determined by quantitative real-time PCR. Samples were treated with DNase I (Sigma-Aldrich) to remove naked DNA. The vector DNA was isolated from particles by incubating the samples at 37°C for 1 hr in a proteinase K (Sigma-Aldrich) working solution (2.75 mg/mL in 8.6 mM Tris-HCl, 86 mM NaCl, 0.43% w/v SDS, pH 8). Magnetic beads (MagneSil Blue; Promega) were used to selectively bind vector DNA. Isolated DNA was used as a template for amplification of the VP2 gene region using AmpliTaq Gold (Thermo Fisher Scientific) polymerase and primers and probes shown in [Figure 8B](#). The qPCR was set up according to the manufacturer's recommendations (7300 Real-Time PCR System; Applied Biosystems) under the thermal cycling conditions of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, proceeding with 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing or extension at 60°C for 1 min. Data analyses were performed on the Applied Biosystems software.

The potency of *SVLuc* particles in the produced vector batches was determined using a modified TCID₅₀ assay. This limited dilution assay quantifies the number of vector particles needed to transduce 50% of the target cells. In this assay, *SVLuc* particles were used as a reporter vector, and luminescence was used as a readout. Ten-fold serial dilutions of the *SVLuc* samples to be tested were added in quadruplicates to a 96-well cell culture plate containing 2×10^3 SuperVero cells in 100 μ L of serum-free OptiPRO medium. Cells were exposed to the serial diluted vector and incubated in 5% carbon dioxide and at 37°C for 4 days. A dilution series of a standard *SVLuc* batch was added to the plates as a control. Intracellular luciferase was subsequently measured by luminescence. The estimated vector titer is the endpoint dilution at which 50% of the cell cultures (wells) are transduced by *SVLuc* and show luciferase expression. Vector titers were calculated according to the Spearman-Kärber method and expressed as TCID₅₀ per milliliter SuperVero cell culture (TCID₅₀/mL).

Detection of RC SV40 Particles

The absence of RC SV40 revertants in the produced SV40 vector batches was confirmed by qPCR. Vector DNA was isolated from vector preparations using the PureLink RNA/DNA Mini Kit (Invitrogen). Isolated DNA was used as a template to amplify a fragment of 108 bp comprising the SV40 pA sequence and LTag coding region using the primers and probes shown in [Figure 8](#). Plasmid pAM271 DNA harboring the wild-type SV40 genome was used as a positive control. The qPCR was set up according to the manufacturer (7300 Real-Time PCR System; Applied Biosystems) under the thermal cycling conditions of 2 min at 50°C and 10 min at 95°C, proceeding with 40 cycles of denaturation at 95°C for 15 s and annealing or extension at 60°C for 1 min. Data analyses were performed on the Applied Biosystems. Based on the signal obtained with the non-template control samples, we defined the limit of detection of the assay to be 60 RC SV40 particles per milliliter.

Luciferase Activity Measurements

Luciferase activity was measured from cells transduced with *SVLuc* by using the Luciferase Assay System (Promega). 200 μ L of vector stock was used to transduce 1×10^4 cells in a 24-well plate format. All transductions were performed in triplicate. Three days after transduction, cells were harvested and luciferase activity was analyzed in a GloMax 96 Microplate Luminometer (Promega) according to the manufacturer's recommendations.

Western Blot Analysis

Cells were lysed with SAM buffer (50 mM Tris-HCl, pH 6.8, 3% of SDS, 5% of β -mercaptoethanol) containing protease inhibitor cocktail (SIGMAFAST Protease Inhibitor Tablets; Sigma-Aldrich), resolved by SDS-PAGE (10% polyacrylamide gels under reducing conditions) and electro-transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad Laboratories). Membranes were blocked with 5% nonfat milk and probed with different primary antibodies for 1 hr at room temperature: (1) mouse anti-SV40 LTag 0.5 mg/mL (BD Biosciences), dilution 1:200; (2) rabbit anti-VP1 (Abcam), dilution 1:5,000; (2) mouse anti-GFP (Sigma-Aldrich), dilution 1:1,000; mouse anti- α -tubulin antibody (Sigma-Aldrich), dilution 1:5,000; mouse anti-GAPDH (Millipore), dilution 1:5,000. Finally, the membrane was hybridized with a goat anti-mouse or a goat anti-rabbit antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Sigma-Aldrich), dilution 1:5,000. The

blot was developed by chemiluminescence (Chemidoc MP Imaging System; Bio-Rad Laboratories). To quantify the amounts of protein, we scanned the blots by densitometry using the Image Lab software version 5.2.1 (Bio-Rad Laboratories).

Immunocytochemistry

SuperVero, Vero ATCC CCL-81, and COS-1 cells were cultured on coverslips and were fixed with 4% paraformaldehyde and blocked with 2% bovine serum albumin for 1 hr at room temperature. We incubated the cells overnight at 4°C with a solution of 2.5 µg/mL mouse antibody to the SV40 LTag diluted in PBS, 0.2% of Triton X-100. The secondary antibody (Alexa Fluor 488 donkey anti-goat; Life Technologies, Invitrogen) was incubated for 1 hr at room temperature diluted at 1:800 in PBS, 0.2% Triton X-100. Nuclear staining was performed with a solution of 5 µg/mL DAPI (Life Technologies, Invitrogen), and the slides were finally mounted using fluorescent mounting medium (DAKO, Agilent Technologies). Fluorescence microscopy images were acquired using a Leica DM6000B microscope (Leica Microsystem).

Statistical Analysis

All experiments were performed with a minimum of $n = 3$. All the statistical analyses were performed with the GraphPad Prism 5 software. We applied the two-tailed unpaired Student *t* test.

Author Contributions

Conceptualization, P.d.H., I.M., and M.G.T.; Methodology, P.d.H., I.M., and S.v.d.W.; Investigation, J.v.d.V., M.O., A.R., R.J.C.-G., and I.G.H.-G.; Writing – Original Draft, M.G.T., I.M., and P.d.H.; Writing – Review & Editing, M.G.T., I.M., and P.d.H.; Funding Acquisition, P.d.H.; Resources, P.d.H. and M.G.T.; Supervision, P.d.H., I.M., and M.G.T.

Conflicts of Interest

S.L. and B.V. are employed or sponsored by Amarna Therapeutics. The company is the owner of patents and patent applications on the production and use of polyomaviral vector particles.

Acknowledgments

Miguel G. Toscano is co-funded by the Torres Quevedo program PTQ-13-06051 from the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness. We thank Dr. Katherine High and Dr. Paris Margaritis (Children's Hospital of Philadelphia) for kindly providing us with the human activated factor VII cDNA and Dr. Piter Bosma (Academic Medical Center) and Dr. Benoit Gauthier (Center of Molecular Biology and Regenerative Medicine) for critically reading the manuscript. We also thank Dr. David Pozo (Center of Molecular Biology and Regenerative Medicine) for his help.

References

1. Jiang H., Lillicrap D., Patarroyo-White S., Liu T., Qian X., Scallan C.D., Powell S., Keller T., McMurray M., Labelle A. Multiyear therapeutic benefit of AAV serotypes 2, 6, and 8 delivering factor VIII to hemophilia A mice and dogs. *Blood*. 2006;108:107–115. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
2. Naldini L., Blömer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D. In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*. 1996;272:263–267. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
3. Herzog R.W., Hagstrom J.N., Kung S.H., Tai S.J., Wilson J.M., Fisher K.J., High K.A. Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997;94:5804–5809. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
4. Perrin G.Q., Zolotukhin I., Sherman A., Biswas M., de Jong Y.P., Terhorst C., Davidoff A.M., Herzog R.W. Dynamics of antigen presentation to transgene product-specific CD4(+) T cells and of Treg induction upon hepatic AAV gene transfer. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2016;3:16083–16088. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
5. Dobrzynski E., Herzog R.W. Tolerance induction by viral in vivo gene transfer. *Clin. Med. Res.* 2005;3:234–240. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
6. Zhang P., Sun B., Osada T., Rodriguiz R., Yang X.Y., Luo X., Kemper A.R., Clay T.M., Koeberl D.D. Immunodominant liver-specific expression suppresses transgene-directed immune responses in murine pompe disease. *Hum. Gene Ther.* 2012;23:460–472. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
7. Sack B.K., Herzog R.W., Terhorst C., Markusic D.M. Development of gene transfer for induction of antigen-specific tolerance. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2014;1:14013–14019. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
8. Boisgerault F., Mingozzi F. The skeletal muscle environment and its role in immunity and tolerance to AAV vector-mediated gene transfer. *Curr. Gene Ther.* 2015;15:381–394. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
9. Touchot N., Flume M. Early insights from commercialization of gene therapies in Europe. *Genes (Basel)* 2017;8:78. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
10. Montini E., Cesana D., Schmidt M., Sanvito F., Ponzoni M., Bartholomae C., Sergi Sergi L., Benedicenti F., Ambrosi A., Di Serio C. Hematopoietic stem cell gene transfer in a tumor-prone mouse model uncovers low genotoxicity of lentiviral vector integration. *Nat. Biotechnol.* 2006;24:687–696. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
11. Tomás, H.A., Rodrigues, A.F., Alves, P.M., and Coroadinha, A.S. (2013). Lentiviral gene therapy vectors: challenges and future directions. In *Gene Therapy: Tools and Potential Applications*, F. Martin, eds. (InTech), <https://www.intechopen.com/books/gene-therapy-tools-and-potential-applications/lentiviral-gene-therapy-vectors-challenges-and-future-directions>.
12. Hareendran S., Balakrishnan B., Sen D., Kumar S., Srivastava A., Jayandharan G.R. Adeno-associated virus (AAV) vectors in gene therapy: immune challenges and strategies to circumvent them. *Rev. Med. Virol.* 2013;23:399–413. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
13. Tse L.V., Moller-Tank S., Asokan A. Strategies to circumvent humoral immunity to adeno-associated viral vectors. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2015;15:845–855. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
14. Strayer D.S., Lamothe M., Wei D., Milano J., Kondo R. Generation of recombinant SV40 vectors for gene transfer. *Methods Mol. Biol.* 2001;165:103–117. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
15. Byun H., Gou Y., Zook A., Lozano M.M., Dudley J.P. ERAD and how viruses exploit it. *Front. Microbiol.* 2014;5:330. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

16. Schelhaas M., Malmström J., Pelkmans L., Haugstetter J., Ellgaard L., Grünewald K., Helenius A. Simian Virus 40 depends on ER protein folding and quality control factors for entry into host cells. *Cell*. 2007;131:516–529. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
17. Marsh M., Helenius A. Virus entry: open sesame. *Cell*. 2006;124:729–740. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
18. Qian M., Cai D., Verhey K.J., Tsai B. A lipid receptor sorts polyomavirus from the endolysosome to the endoplasmic reticulum to cause infection. *PLoS Pathog*. 2009;5:e1000465. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
19. Engel S., Heger T., Mancini R., Herzog F., Kartenbeck J., Hayer A., Helenius A. Role of endosomes in simian virus 40 entry and infection. *J. Virol*. 2011;85:4198–4211. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
20. Norkin L.C., Anderson H.A., Wolfrom S.A., Oppenheim A. Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J. Virol*. 2002;76:5156–5166. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
21. Pelkmans L., Püntener D., Helenius A. Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science*. 2002;296:535–539. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
22. Sauter B.V., Parashar B., Chowdhury N.R., Kadakol A., Ilan Y., Singh H., Milano J., Strayer D.S., Chowdhury J.R. A replication-deficient rSV40 mediates liver-directed gene transfer and a long-term amelioration of jaundice in Gunn rats. *Gastroenterology*. 2000;119:1348–1357. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
23. Vera M., Sobrevals L., Zaratigui M., Martinez L., Palencia B., Rodríguez C.M., Prieto J., Fortes P. Liver transduction with a simian virus 40 vector encoding insulin-like growth factor I reduces hepatic damage and the development of liver cirrhosis. *Gene Ther*. 2007;14:203–210. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
24. Sobrevals L., Rodriguez C., Romero-Trejejo J.L., Gondi G., Monreal I., Pañeda A., Juanarena N., Arcelus S., Razquin N., Guembe L. Insulin-like growth factor I gene transfer to cirrhotic liver induces fibrolysis and reduces fibrogenesis leading to cirrhosis reversion in rats. *Hepatology*. 2010;51:912–921. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
25. Sobrevals L., Enguita M., Quiroga J., Prieto J., Fortes P. Insulin-like growth factor I (IGF-I) expressed from an AAV1 vector leads to a complete reversion of liver cirrhosis in rats. *PLoS ONE*. 2016;11:e0162955. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
26. Louboutin J.-P., Chekmasova A.A., Marusich E., Chowdhury J.R., Strayer D.S. Efficient CNS gene delivery by intravenous injection. *Nat. Methods*. 2010;7:905–907. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
27. Barbanti-Brodano G., Sabbioni S., Martini F., Negrini M., Corallini A., Tognon M. Simian virus 40 infection in humans and association with human diseases: results and hypotheses. *Virology*. 2004;318:1–9. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
28. Garcea R.L., Imperiale M.J. Simian virus 40 infection of humans. *J. Virol*. 2003;77:5039–5045. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
29. Gluzman Y. SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell*. 1981;23:175–182. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
30. Oppenheim A., Peleg A. Helpers for efficient encapsidation of SV40 pseudovirions. *Gene*. 1989;77:79–86. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
31. Vera M., Prieto J., Strayer D.S., Fortes P. Factors influencing the production of recombinant SV40 vectors. *Mol. Ther*. 2004;10:780–791. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
32. Jasin M., de Villiers J., Weber F., Schaffner W. High frequency of homologous recombination in mammalian cells between endogenous and introduced SV40 genomes. *Cell*. 1985;43:695–703. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]

33. Gerard R.D., Gluzman Y. New host cell system for regulated simian virus 40 DNA replication. *Mol. Cell. Biol.* 1985;5:3231–3240. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
34. Arad U., Ben-Nun-Shaul O., El-Latif M.A., Nissim O., Oppenheim A. A new packaging cell line for SV40 vectors that eliminates the generation of T-antigen-positive, replication-competent recombinants. *Virology.* 2002;304:155–159. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
35. Kimchi-Sarfaty C., Ben-Nun-Shaul O., Rund D., Oppenheim A., Gottesman M.M. In vitro-packaged SV40 pseudovirions as highly efficient vectors for gene transfer. *Hum. Gene Ther.* 2002;13:299–310. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
36. Nakanishi A., Shum D., Morioka H., Otsuka E., Kasamatsu H. Interaction of the Vp3 nuclear localization signal with the importin alpha 2/beta heterodimer directs nuclear entry of infecting simian virus 40. *J. Virol.* 2002;76:9368–9377. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
37. de Haan P., Klein H.C., 't Hart B.A. Autoimmune aspects of neurodegenerative and psychiatric diseases: a template for innovative therapy. *Front. Psychiatry.* 2017;8:46. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
38. de la Luna S., Martín J., Portela A., Ortín J. Influenza virus naked RNA can be expressed upon transfection into cells co-expressing the three subunits of the polymerase and the nucleoprotein from simian virus 40 recombinant viruses. *J. Gen. Virol.* 1993;74:535–539. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
39. Barrett P.N., Mundt W., Kistner O., Howard M.K. Vero cell platform in vaccine production: moving towards cell culture-based viral vaccines. *Expert Rev. Vaccines.* 2009;8:607–618. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
40. Kolman J.L. Massively parallel sequencing for the detection of adventitious viruses. *PDA J. Pharm. Sci. Technol.* 2011;65:663–667. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
41. Louboutin J.-P., Marusich E., Fisher-Perkins J., Dufour J.P., Bunnell B.A., Strayer D.S. Gene transfer to the rhesus monkey brain using SV40-derived vectors is durable and safe. *Gene Ther.* 2011;18:682–691. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
42. Christian P., Deschamps M., Dhere R., Hutchens C., Lebron J., Knezevic I., Lambert S., Lewis A., Mallet L., Nandapalan P. World Health Organization; 2011. Recommendations for the Evaluation of Animal Cell Cultures as Substrates for the Manufacture of Biological Medicinal Products and for the Characterization of Cell Banks. [[Google Scholar](#)]
43. Cole C.N. Polyomaviridae: the viruses and their replication. In: Fields B.N., Knipe D.M., Howley P.M., editors. *Fields Virology: 1997–2025*. Lippincott-Raven Publishers; 1996. [[Google Scholar](#)]
44. Yu Y., Kudchodkar S.B., Alwine J.C. Effects of simian virus 40 large and small tumor antigens on mammalian target of rapamycin signaling: small tumor antigen mediates hypophosphorylation of eIF4E-binding protein 1 late in infection. *J. Virol.* 2005;79:6882–6889. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
45. Fahrback K.M., Katzman R.B., Rundell K. Role of SV40 ST antigen in the persistent infection of mesothelial cells. *Virology.* 2008;370:255–263. [[PMC free article](#)] [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]
46. Hronovský V., Plaisner V., Benda R. CV-1 monkey kidney cell line—a highly susceptible substrate for diagnosis and study of arboviruses. *Acta Virol.* 1978;22:123–129. [[PubMed](#)] [[Google Scholar](#)]