



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119053705 A

(43) 申请公布日 2024. 11. 29

(21) 申请号 202380037582.8 乔纳森·泰瑞特 约翰·库尔曼

(22) 申请日 2023.03.20 (74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30) 优先权数据 专利代理师 王玮玮 郑霞

63/322,078 2022.03.21 US

63/351,542 2022.06.13 US

63/385,093 2022.11.28 US

(51) Int.Cl.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日 C12N 15/113 (2006.01)

2024.10.30

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/IB2023/052720 2023.03.20

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/180904 EN 2023.09.28

(71) 申请人 克里斯珀医疗股份公司

地址 瑞士楚格

(72) 发明人 桑杰·迪索萨 劳拉·瑟维

权利要求书3页 说明书35页

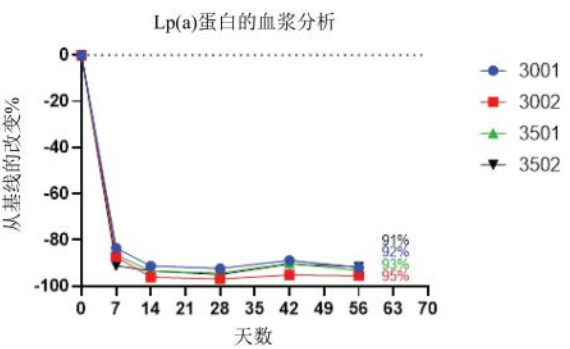
序列表（电子公布） 附图21页

(54) 发明名称

用于治疗脂蛋白相关疾病的方法和组合物

(57) 摘要

本公开内容涉及用于通过基因编辑在受试者中调节LPA基因的表达和用于治疗脂蛋白相关疾病例如心血管疾病的方法、组合物和试剂盒。



1. 一种用于治疗有相应需要的受试者的脂蛋白相关疾病的方法,包括向所述受试者施用与以下复合的多于一个纳米颗粒:

(a) 靶向LPA基因的指导RNA (gRNA) (LPA gRNA) 或编码LPA gRNA的核酸;和

(b) 编码RNA指导的内切核酸酶的核酸,

从而治疗所述受试者的脂蛋白相关疾病。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中向所述受试者施用所述多于一个纳米颗粒两次或更多次。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的方法,其中所述两次或更多次施用中的每两次间隔约两周至约四周。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中所述两次或更多次施用中的每两次间隔至少三个月。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法包括向所述受试者单次施用所述多于一个纳米颗粒。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述受试者的血浆中的LPA表达在所述施用之后被降低至少20%、至少40%、至少70%或至少90%。

7. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述受试者的血浆中的LPA蛋白的浓度在所述施用之后被降低至少20%、至少40%、至少70%或至少90%。

8. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其中所述降低在所述施用之后持续三周、四周、五周、两个月、三个月或更长时间。

9. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法,其中所述降低在所述施用之后一个月是65%。

10. 根据权利要求5-9中任一项所述的方法,其中所述降低是相对于 (a) 所述受试者在施用所述多于一个纳米颗粒之前的血浆中的LPA表达或LPA蛋白的浓度; (b) 一个或更多个未治疗的受试者中的LPA表达或LPA蛋白的浓度;和/或 (c) 健康受试者的LPA表达或LPA蛋白的浓度的参考水平。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述有相应需要的受试者具有大于50 mg/dl的Lp(a) 水平。

12. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述有相应需要的受试者具有大于100 mg/dL的Lp(a) 水平。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述有相应需要的受试者具有增加的与确定的心血管疾病 (CVD) 风险因素无关的心肌梗塞 (MI) 风险,或增加的动脉粥样硬化性心血管疾病 (ASCVD) 的终生风险。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,包括在所述施用之前、期间和/或之后测量所述受试者中Lp(a) 的血液或血清水平。

15. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,包括鉴定需要所述治疗的受试者。

16. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述脂蛋白相关疾病是代谢疾病、心血管疾病、脂质代谢疾病或其组合。

17. 根据权利要求1-15中任一项所述的方法,其中所述脂蛋白相关疾病是钙化性主动脉瓣疾病、心肌梗塞、冠心病、动脉粥样硬化、血栓形成、中风、冠状动脉疾病、家族性高脂血

症、心肌梗塞、外周动脉疾病、钙化性主动脉瓣狭窄或其组合。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述受试者的所述脂蛋白相关疾病的一种或更多种症状被减轻或缓解。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用复合的多于一个纳米颗粒降低心血管风险、与心血管事件相关的死亡可能性或其组合。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的方法,其中编码RNA指导的内切核酸酶的核酸是所述RNA指导的内切核酸酶的mRNA。

21. 根据权利要求1-20中任一项所述的方法,其中所述RNA指导的内切核酸酶是Cas9内切核酸酶。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述Cas9内切核酸酶是化脓性链球菌(*S. Pyogenes*) Cas9、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) Cas9、脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitides*) Cas9、嗜热链球菌(*S. thermophilus*) Cas9、嗜热链球菌3 Cas9、齿垢密螺旋体(*T. denticola*) Cas9或其变体。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的方法,其中所述gRNA是单指导RNA (sgRNA)。

24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法,其中所述gRNA靶向LPA基因的外显子3。

25. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述gRNA包含SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列。

26. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述LPA gRNA包含SEQ ID NO: 18的间隔区序列。

27. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述LPA gRNA是包含SEQ ID NO: 32的序列的单指导RNA (sgRNA)。

28. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法,其中所述LPA gRNA是包含SEQ ID NO: 11的序列的单指导RNA (sgRNA)。

29. 根据权利要求1-28中任一项所述的方法,其中所述LPA gRNA或编码所述LPA gRNA的核酸和所述RNA指导的核酸酶被包封在所述多于一个纳米颗粒中。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述纳米颗粒是脂质纳米颗粒。

31. 根据权利要求1-30中任一项所述的方法,其中所述受试者是灵长类受试者。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的方法,其中所述受试者是人类。

33. 根据权利要求1-32中任一项所述的方法,其中所述方法包括向所述受试者单次施用所述多于一个纳米颗粒。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述多于一个纳米颗粒以以下剂量或约以下剂量以所述单次施用向所述受试者施用:0.1 mg/kg、0.3 mg/kg、0.6 mg/kg或1 mg/kg的总核酸(a)和(b)。

35. 根据权利要求1-34中任一项所述的方法,其中所述多于一个纳米颗粒是脂质纳米颗粒。

36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒包含一种或更多种中性脂质、带电荷的脂质、可电离脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。

37. 根据权利要求35所述的方法,其中所述脂质纳米颗粒包含胆固醇、聚乙二醇(PEG)脂质或两者。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述的方法,还包括在所述施用之前、所述施用之后或两者确定所述受试者中的(i)丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、 $\gamma$ -谷氨酰转氨酶(GGT)、胆红素、碱性磷酸酶(Alk Phos)和白蛋白中的一种或更多种的水平;(ii)凝血酶原时间(PT)和/或(iii)部分促凝血酶原激酶时间(PTT)。

39. 根据权利要求1-38中任一项所述的方法,其中向所述受试者施用另外的治疗,其中所述另外的治疗包括施用皮质类固醇、抗H1抗组胺药、抗H2抗组胺药或其任何组合。

40. 根据权利要求39所述的方法,其中在向所述受试者施用所述多于一个纳米颗粒之前1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周或更长时间向所述受试者施用所述另外的治疗。

41. 根据权利要求39-40中任一项所述的方法,其中所述另外的治疗和所述多于一个纳米颗粒被同时施用。

42. 一种组合物,包含与(a)靶向LPA基因的指导RNA (gRNA) (LPA gRNA)和(b)编码Cas9内切核酸酶的mRNA复合的多于一个纳米颗粒,其中所述gRNA包含SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列。

43. 一种组合物,所述组合物用于在治疗脂蛋白相关疾病中使用,包含与(a)靶向LPA基因的指导RNA (gRNA) (LPA gRNA)和(b)编码Cas9内切核酸酶的mRNA复合的多于一个纳米颗粒,其中所述gRNA包含SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列。

44. 根据权利要求43所述的组合物,其中所述脂蛋白相关疾病是代谢疾病、心血管疾病、脂质代谢疾病或其组合。

45. 根据权利要求43所述的组合物,其中所述脂蛋白相关疾病是钙化性主动脉瓣疾病、心肌梗塞、冠心病、动脉粥样硬化、血栓形成、中风、冠状动脉疾病、家族性高脂血症、心肌梗塞、外周动脉疾病、钙化性主动脉瓣狭窄或其组合。

46. 根据权利要求42-45中任一项所述的组合物,其中所述gRNA包含SEQ ID NO: 18的间隔区序列。

47. 根据权利要求42-45中任一项所述的组合物,其中所述gRNA包含SEQ ID NO: 32的序列。

48. 根据权利要求42-45中任一项所述的组合物,其中所述gRNA包含SEQ ID NO: 11的序列。

49. 根据权利要求42-48中任一项所述的组合物,其中所述Cas9内切核酸酶是化脓性链球菌Cas9内切核酸酶。

50. 根据权利要求42-49中任一项所述的组合物,其中所述多于一个纳米颗粒是脂质纳米颗粒。

51. 根据权利要求50所述的组合物,其中所述脂质纳米颗粒包含一种或更多种中性脂质、带电荷的脂质、可电离脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。

52. 根据权利要求50所述的组合物,其中所述脂质纳米颗粒包含胆固醇、聚乙二醇(PEG)脂质或两者。

53. 根据权利要求42-52中任一项所述的组合物,其中所述组合物是包含一种或更多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

## 用于治疗脂蛋白相关疾病的方法和组合物

### 相关申请的交叉引用

[0001] 本申请根据35 U.S.C. §119(e) 要求2022年3月21日提交的美国临时专利申请第63/322,078号、2022年6月13日提交的美国临时专利申请第63/351,542号和2022年11月28日提交的美国临时专利申请第63/385,093号的权益。出于所有目的,这些相关申请的内容通过引用以其整体并入本文。

### 对序列表的引用

[0002] 本申请连同电子格式的序列表一起提交。序列表作为题为80EM-341712-WO\_SeqList的文件提供,该文件创建于2023年3月15日,大小是35.9千字节。电子格式的序列表的信息通过引用以其整体并入本文。

## 背景

### [0003] 领域

本公开内容总体上涉及分子生物学和生物技术(包括基因编辑)领域。

### 对现有技术的描述

[0004] 脂蛋白(a) (Lp(a)) 是一种致动脉粥样硬化的脂蛋白,由共价结合至低密度脂蛋白(LDL)颗粒的载脂蛋白B-100 (apoB) 组分的蛋白载脂蛋白(a) [apo(a)] 组成。高水平的Lp(a) 与心血管疾病的风险增加相关,所述心血管疾病包括例如钙化性主动脉瓣疾病(高水平的Lp(a) 引起疾病的更高发病率和更快进展)、心肌梗塞(MI)、冠心病、动脉粥样硬化、血栓形成和中风。目前尚不存在经批准的直接靶向Lp(a) 的药物。

[0005] 使用CRISPR (成簇规则间隔短回文重复序列) -Cas (CRISPR相关) 系统的RNA指导的DNA靶向原理来靶向DNA已经被广泛使用。CRISPR-Cas系统可以分为两类,其中1类系统利用多个Cas蛋白的复合物(诸如I型、III型和IV型CRISPR-Cas系统),并且2类系统利用单个Cas蛋白(诸如II型、V型和VI型CRISPR-Cas系统)。基于II型CRISPR-Cas的系统已经用于基因组编辑,并且需要由可定制的指导RNA (gRNA) 指导的Cas多肽或其变体用于可编程DNA靶向。

[0006] 对于通过降低Lp(a) 水平来治疗脂蛋白相关疾病诸如心血管疾病和钙化性主动脉瓣疾病的安全且有效的基因编辑策略存在需求。

## 概述

[0007] 本文公开的内容包括用于治疗脂蛋白相关疾病的方法、组合物和试剂盒。一些实施方案提供了一种用于治疗有相应需要的受试者的脂蛋白相关疾病的方法,所述方法包括向所述受试者施用与(a) 靶向LPA基因的指导RNA (gRNA) (LPA gRNA) 或编码LPA gRNA的核酸;和(b) 编码RNA指导的内切核酸酶的核酸复合的多于一个纳米颗粒,从而治疗受试者的脂蛋白相关疾病。可以向受试者施用多于一个纳米颗粒两次或更多次。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的每两次间隔约两周至约四周。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的每两次间隔至少三个月。在一些实施方案中,该方法包括向受试者单次施用多于一

个纳米颗粒。

[0008] 在一些实施方案中,受试者的血浆中的LPA表达在施用之后被降低至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%。在一些实施方案中,受试者的血浆中LPA蛋白的浓度在施用之后被降低至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%或至少90%。在一些实施方案中,降低在施用之后持续三周、四周、五周、两个月、三个月、六个月、一年、两年、三年、五年、十年、十五年或更长时间。在一些实施方案中,降低在施用之后一个月是65%。在一些实施方案中,降低在施用之后三个月是75%。在一些实施方案中,降低是相对于(a)受试者在施用多于一个纳米颗粒之前的血浆中的LPA表达或LPA蛋白的浓度;(b)一个或更多个未治疗的受试者中的LPA表达或LPA蛋白的浓度;和/或(c)健康受试者的LPA表达或LPA蛋白的浓度的参考水平。

[0009] 有需要的受试者可以具有大于50 mg/dl,例如60 mg/dl、70 mg/dl、80 mg/dl、90 mg/dl、100 mg/dl、110 mg/dl、120 mg/dl、130 mg/dl、140 mg/dl、150 mg/dl、200 mg/dl、250 mg/dl、300 mg/dl或更多的Lp(a)水平。在一些实施方案中,有需要的受试者具有大于100 mg/dL的Lp(a)水平。在一些实施方案中,有需要的受试者具有增加的与确定的心血管疾病(CVD)风险因素无关的心肌梗塞(MI)风险,或增加的动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)的终生风险。

[0010] 本文描述的方法可以包括在施用之前、期间和/或之后测量受试者中Lp(a)的血液或血清水平。在一些实施方案中,该方法包括鉴定需要治疗的受试者。

[0011] 脂蛋白相关疾病可以是代谢疾病、心血管疾病、脂质代谢疾病或其组合。在一些实施方案中,脂蛋白相关疾病是钙化性主动脉瓣疾病、心肌梗塞、冠心病、动脉粥样硬化、血栓形成、中风、冠状动脉疾病、家族性高脂血症、心肌梗塞、外周动脉疾病、钙化性主动脉瓣狭窄或其组合。在一些实施方案中,受试者的脂蛋白相关疾病的一种或更多种症状被减轻或缓解。在一些实施方案中,向受试者施用复合的多于一个纳米颗粒降低心血管风险、与心血管事件相关的死亡可能性或其组合。

[0012] 在一些实施方案中,编码RNA指导的内切核酸酶的核酸是RNA指导的内切核酸酶(例如Cas9内切核酸酶)的mRNA。Cas9内切核酸酶的非限制性实例包括化脓性链球菌(*S. Pyogenes*) Cas9、金黄色葡萄球菌(*S. aureus*) Cas9、脑膜炎奈瑟菌(*N. meningitides*) Cas9、嗜热链球菌(*S. thermophilus*) Cas9、嗜热链球菌3 Cas9、齿垢密螺旋体(*T. denticola*) Cas9及其变体。gRNA可以是单指导RNA (sgRNA)。在一些实施方案中,gRNA靶向LPA基因的外显子3。在一些实施方案中,LPA gRNA包含SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列。在一些实施方案中,LPA gRNA包含SEQ ID NO: 18的间隔区序列。在一些实施方案中,LPA gRNA是包含SEQ ID NO: 32的序列的单指导RNA (sgRNA)。在一些实施方案中,LPA gRNA是包含SEQ ID NO: 11的序列的单指导RNA (sgRNA)。

[0013] LPA gRNA或编码该LPA gRNA的核酸和RNA指导的核酸酶可以被包封在多于一个纳米颗粒中。在一些实施方案中,纳米颗粒是脂质纳米颗粒。受试者可以是灵长类受试者,例如人类。

[0014] 在一些实施方案中,该方法包括向受试者单次施用多于一个纳米颗粒。例如,多于一个纳米颗粒可以以以下剂量或约以下剂量以单次施用向受试者施用:0.1 mg/kg、0.3

mg/kg、0.6 mg/kg或1 mg/kg的总核酸(a)和(b)。

[0015] 在一些实施方案中,多于一个纳米颗粒是脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含一种或更多种中性脂质、带电荷的脂质、可电离脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含胆固醇、聚乙二醇(PEG)脂质或两者。

[0016] 该方法还可以包括在施用之前、施用之后或两者确定受试者中的(i)丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶(GGT)、胆红素、碱性磷酸酶(Alk Phos)和白蛋白中的一种或更多种的水平;(ii)凝血酶原时间(PT)和/或(iii)部分促凝血酶原激酶时间(PTT)。在一些实施方案中,向受试者施用另外的治疗,其中另外的治疗包括施用皮质类固醇、抗H1抗组胺药、抗H2抗组胺药或其任何组合。可以在向受试者施用多于一个纳米颗粒之前1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、1周或更长时间向受试者施用另外的治疗。在一些实施方案中,另外的治疗和多于一个纳米颗粒被同时施用。

[0017] 本文公开的内容包括一种组合物,包含与(a)靶向LPA基因的指导RNA(gRNA)(LPA gRNA)和(b)编码Cas9内切核酸酶的mRNA复合的多于一个纳米颗粒,其中gRNA包含SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列。本文公开的内容还包括一种用于在治疗脂蛋白相关疾病中使用的组合物,包含与(a)靶向LPA基因的指导RNA(gRNA)(LPA gRNA)和(b)编码Cas9内切核酸酶的mRNA复合的多于一个纳米颗粒,其中gRNA包含SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列。脂蛋白相关疾病可以是代谢疾病、心血管疾病、脂质代谢疾病或其组合。在一些实施方案中,脂蛋白相关疾病是钙化性主动脉瓣疾病、心肌梗塞、冠心病、动脉粥样硬化、血栓形成、中风、冠状动脉疾病、家族性高脂血症、心肌梗塞、外周动脉疾病、钙化性主动脉瓣狭窄或其组合。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 18的间隔区序列。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 32的序列。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 11的序列。Cas9内切核酸酶可以是化脓性链球菌Cas9内切核酸酶。在一些实施方案中,多于一个纳米颗粒是脂质纳米颗粒。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含一种或更多种中性脂质、带电荷的脂质、可电离脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒包含胆固醇、聚乙二醇(PEG)脂质或两者。在一些实施方案中,组合物是包含一种或更多种药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

## 附图简述

[0018] 图1描绘了示例性脂蛋白(a)(Lp(a))结构。

[0019] 图2描绘了非限制性示例性非人灵长类动物(NHP)研究设计。

[0020] 图3A-图3B描绘了显示第4组NHP(图3A)和第5组NHP(图3B)的血浆Lp(a)水平的图。

[0021] 图4A-图4B描绘了显示第4组NHP(图4A)和第5组NHP(图4B)的血浆Lp(a)水平从基线的改变百分比的图。

[0022] 图5描绘了非限制性示例性实验设计。终点包括但不限于:血液学:d-14(即,第-14天)、d-7(即,第-7天)、d7(即,第7天)、d15、d29、d43、d57、d71和/或d84;血清化学:d-14、d-7、d2、d4、d7、d10、d15、d29、d43、d57、d71和/或d84;凝血:d-14、d-7、d15、d29、d43、

d57、d71和/或d84; ECG: d-12、d2、d22和/或d84; 生物分析: d-7、d1、d2、d4、d8、d15、d29、d43、d57、d71和/或d84; 生物标志物: d-14、d-7、d8、d15、d29、d43、d57、d71和/或d84; 以及组织中的编辑: 组织列表包括生殖组织。

[0023] 图6是示出治疗之前14天(第-14天) NHP血浆中的基线Lp(a)水平的图。

[0024] 图7描绘了非限制性示例性NHP研究设计。

[0025] 图8A是示出与对照组相比在用三种不同剂量的CTX320治疗之后NHP的血浆Lp(a)蛋白水平从基线的改变百分比的图: 0.5 mg/kg、1.5 mg/kg和3 mg/kg。图8B是示出与对照组相比在用三种不同剂量的CTX320治疗之后NHP的血清Lp(a)蛋白水平从基线的改变百分比的图: 0.5 mg/kg、1.5 mg/kg和3 mg/kg。

[0026] 图9A-图9C是示出用三种不同剂量的CTX320治疗之前和之后NHP的血浆Lp(a)蛋白水平的图: 0.5 mg/kg (图9A)、1.5 mg/kg (图9B)和3.0 mg/kg (图9C)。图9D是示出CTX320治疗后第29天NHP的血浆Lp(a)水平从基线的改变百分比的图。

[0027] 图10A是示出与对照组相比在用三种不同剂量的CTX320治疗之后NHP的血清Lp(a)蛋白水平从基线的改变百分比的图: 0.5 mg/kg、1.5 mg/kg和3 mg/kg。图10B示出了在约3个月的CTX320治疗之后NHP的血浆Lp(a)水平从基线的改变百分比。

[0028] 图11是示出肝和其他器官组织(包括脾、肾上腺、脑、肾、肺、附睾、睾丸和卵巢)中LPA基因编辑的百分比的图。

[0029] 图12A-图12C是示出用CTX320给药后生殖组织编辑的图。

[0030] 图13A-图13B是示出治疗后LNP组分A的血浆水平的图。

[0031] 图14A-图14B是示出治疗后LNP组分B的血浆水平的图。

[0032] 图15示出了本文描述的LPA基因编辑纳米颗粒(例如CTX320)中的一个或多个的1期安全性和耐受性临床研究的非限制性示例性设计。

[0033] 图16是示出CTX320治疗之后患者的血清Lp(a)蛋白水平从基线的改变百分比的图。患者用类固醇和抗组胺药物预治疗。

[0034] 图17提供了比较在CTX320施用(2.0 mg/kg)之前用类固醇和抗组胺药物预治疗的患者中和未预治疗且用1.5 mg/kg和3 mg/kg CTX320的患者中天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)和总胆红素水平的图。

## 详述

[0035] 以下详述中参考了形成本文的一部分的附图。在附图中,除非上下文另外指示,否则类似的符号通常标识类似的组成部分。在详述、附图和权利要求书中描述的说明性实施方案不意味着是限制性的。在不脱离本文呈现的主题的精神或范围的情况下,可以利用其他实施方案,并且可以做出其他改变。将容易理解的是,如本文一般描述的以及附图中图示的本公开内容的方面能够以各种不同的配置来布置、替换、组合、分离和设计,所有这些都在本文中明确设想并且构成本公开内容的一部分。

[0036] 本文提及的所有专利、公开的专利申请、其他出版物和来自GenBank以及其他数据库的序列关于相关技术通过引用以其整体并入。

[0037] 高水平的Lp(a)与心血管疾病风险增加相关。大于50 mg/dL的Lp(a)水平(例如,>125 nmol/L)可以引起钙化性主动脉瓣疾病(CAVD)和心血管疾病(CVD)。与低密度脂蛋白不

同,Lp(a)水平不能被环境、饮食、运动或现有的降脂药物诸如他汀类药物调节,使其成为遗传驱动的疾病风险因素。目前尚不存在经批准的直接靶向Lp(a)的药物。本公开内容提供了用于调节(例如减少)有相应需要的受试者中Lp(a)水平以降低心血管疾病的风险和/或治疗心血管疾病的方法、组合物、系统和试剂盒。

[0038] 本文公开的内容包括用于治疗受试者(例如灵长类受试者)的心血管疾病或紊乱的方法、组合物和试剂盒。在一些实施方案中,该方法包括向有相应需要的受试者施用与(a)靶向LPA基因的引导RNA(gRNA)或编码靶向LPA基因的gRNA的核酸和(b)编码RNA指导的内切核酸酶的核酸(例如,mRNA)复合的多于一个纳米颗粒,从而治疗受试者的心血管疾病或紊乱。

[0039] 定义

如本文使用的,术语“约”意指提供的值的加或减5%。

[0040] 如本文使用的,术语“RNA指导的内切核酸酶”是指能够结合RNA(例如,gRNA)以形成靶向特定DNA序列(例如,在靶DNA中)的复合物的多肽。RNA指导的内切核酸酶的非限制性实例是Cas多肽(例如,Cas内切核酸酶,诸如Cas9内切核酸酶)。在一些实施方案中,如本文描述的RNA指导的内切核酸酶通过其结合的RNA分子靶向靶DNA中的特定DNA序列。RNA分子可以包括与靶DNA内的靶序列互补并且能够与靶序列杂交的序列,从而允许将结合的多肽靶向靶DNA内的特定位置。

[0041] 如本文使用的,术语“指导RNA”或“gRNA”是指可以结合RNA指导的内切核酸酶以形成复合物并且将结合的RNA指导的内切核酸酶(诸如Cas内切核酸酶)的活性引导至靶核酸内的特定靶序列的位点特异性靶向RNA。指导RNA可以包括一个或更多个RNA分子。

[0042] 如本文使用的,核酸分子(例如,RNA片段或gRNA)的“二级结构”是指核酸分子内的碱基配对相互作用。

[0043] 如本文使用的,术语“靶DNA”是指包括“靶位点”或“靶序列”的DNA。术语“靶序列”在本文中用于指只要存在足够的杂交条件,gRNA的DNA靶向序列或区段(在本文中也称为“间隔区”)可以与其杂交的存在于靶DNA中的核酸序列。例如,靶DNA内的靶序列5'-GAGCATATC-3'被RNA序列5'-GAUAUGCUC-3'靶向(或能够与之杂交或互补)。gRNA的DNA靶向序列或区段与靶序列之间的杂交可以例如基于Watson-Crick碱基配对规则,这使得DNA靶向序列或区段中的可编程性成为可能。gRNA的DNA靶向序列或区段可以被设计为例如与任何靶序列杂交。

[0044] 如本文使用的,术语“Cas内切核酸酶”或“Cas核酸酶”是指与CRISPR适应性免疫系统相关的RNA指导的DNA内切核酸酶。

[0045] 除非另外指示,否则“核酸酶”和“内切核酸酶”在本文中可互换使用,是指具有用于多核苷酸裂解的内切核酸分解催化活性的酶。

[0046] 如本文使用的,术语gRNA的“不变区”是指gRNA的与RNA指导的内切核酸酶缔合的核苷酸序列。在一些实施方案中,gRNA包含crRNA和反式激活crRNA(tracrRNA),其中crRNA和tracrRNA彼此杂交以形成双链体。在一些实施方案中,crRNA包含5'至3':间隔区序列和最小CRISPR重复序列(本文也称为“crRNA重复序列”);并且tracrRNA包含与最小CRISPR重复序列互补的最小tracrRNA序列(本文也称为“tracrRNA反义重复序列”)和3' tracrRNA序列。在一些实施方案中,gRNA的不变区是指crRNA的为最小CRISPR重复序列的部分和

tracrRNA。

[0047] 如本文使用的,术语“供体模板”是指含有外源遗传物质的核酸链,该外源遗传物质可以被引入到基因组(例如,通过同源定向修复)中以导致该外源遗传物质的靶向整合。在一些实施方案中,供体模板可以不具有与DNA中的靶向位置同源的区域,而是可以在靶位点处裂解后通过NHEJ依赖性末端连接整合。供体模板可以是单链或双链的DNA或RNA,并且可以以线性或环状形式引入到细胞中。

[0048] 术语“多核苷酸”和“核酸”在本文中可互换使用,并且是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合形式。多核苷酸可以是单链、双链或多链的DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂合体/三螺旋、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。

[0049] 如本文使用的,术语“结合”是指大分子之间(例如,蛋白与核酸之间)的非共价相互作用。当处于非共价相互作用状态时,大分子被称为“缔合”或“相互作用”或“结合”(例如,当分子X被称为与分子Y相互作用时,这意味着分子X以非共价方式与分子Y结合)。结合相互作用可以通过解离常数(Kd)来表征,例如以下的Kd或小于以下的Kd: $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M、 $10^{-12}$  M、 $10^{-13}$  M、 $10^{-14}$  M、 $10^{-15}$  M或者这些值中的任何两个之间的数字或范围。Kd可以取决于环境条件,例如pH和温度。“亲和力”是指结合强度,并且增加的结合亲和力与较低的Kd相关。

[0050] 如本文使用的,术语“杂交(hybridizing)”或“杂交(hybridize)”是指两个不同分子内基本上互补或互补的核酸序列的配对。配对可以通过核酸序列与基本上互补或完全互补的序列通过碱基配对接合以形成杂交复合物的任何过程来实现。“杂交(hybridizing)”或“杂交(hybridize)”可以包括使分子变性以破坏分子中的一个或多个分子内结构(例如一个或多个二级结构)。在一些实施方案中,使分子变性包括将包含分子的溶液加热至足以破坏分子的分子内结构的温度。在一些情况下,使分子变性包括将包含分子的溶液的pH调整至足以破坏分子的分子内结构的pH。出于杂交的目的,如果两个核酸序列或序列区段的至少80%的单独碱基彼此互补,则它们是“基本上互补的”。在一些实施方案中,夹板寡核苷酸序列与被设计为与其互补的两个多核苷酸(例如RNA片段)中的一个不多于约50%相同。每个序列的互补部分在本文中可以称为“区段”,并且如果区段具有80%或更高的同一性,则这些区段是基本上互补的。

[0051] 术语“互补”和“互补的”指的是核酸可以基于传统的Watson-Crick碱基配对规则与另一个核酸形成氢键,即腺嘌呤(A)与胸腺嘧啶(U)配对,并且鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对。互补性可以是完全的(例如完全互补性),也可以是不完全的(例如部分互补性)。完全或完全互补性表明,一条链的每个和所有核苷酸碱基都能够根据Watson-Crick标准碱基配对与另一个反向平行核酸序列中的相应碱基形成氢键。部分互补性表示,一个核酸序列中只有一定百分比的连续残基可以与另一个反向平行核酸序列中相同数量的连续残基形成Watson-Crick碱基配对。在一些实施方案中,互补性可以是至少70%、80%、90%、100%或者这些值中的任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,互补性是完全的,即100%。例如,互补候选序列区段与候选序列区段完全互补,候选序列区段的序列可以使用Watson-Crick碱基配对规则从候选序列区段中推导出来。

[0052] 如本文使用的,术语“载体”是指用于将遗传物质传递至宿主细胞的多核苷酸构建

体,通常是质粒或病毒。载体可以是例如病毒、质粒、黏粒或噬菌体。如本文使用的载体可以包括DNA或RNA。在一些实施方案中,载体包括DNA。“表达载体”是当其存在于适当环境中时能够指导由载体携带的一个或更多个基因编码的蛋白的表达的载体。载体优选地能够自主复制。通常,表达载体包含转录启动子、基因和转录终止子。基因表达通常置于启动子的控制下,并且基因被称为与启动子“可操作地连接”。

[0053] 如本文使用的,术语“核酸”和“多核苷酸”是可互换的,并且指任何核酸,无论是包括磷酸二酯连接或修饰的连接,诸如磷酸三酯、磷酰胺、硅氧烷、碳酸酯、羧甲基酯、乙酰胺、氨基甲酸酯、硫醚、桥接的磷酰胺、桥接的亚甲基膦酸酯、桥接的磷酰胺、桥接的磷酰胺、桥接的亚甲基膦酸酯、硫代磷酸酯、甲基膦酸酯、二硫代磷酸酯、桥接的硫代磷酸酯或磺内酯(sultone)连接,以及这样的连接的组合。术语“核酸”和“多核苷酸”还具体包括由除了五种生物存在的碱基(腺嘌呤、鸟嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶和尿嘧啶)以外的碱基构成的核酸。

[0054] 如本文使用的,术语“转染”或“感染”是指将核酸引入到宿主细胞中,诸如通过使细胞与如本文描述的重组MVA病毒或无病毒基因(gutless)微小核糖核酸病毒(picornaviral)颗粒接触。

[0055] 如本文使用的,术语“转基因”是指通过人类干预整合到靶细胞的一条或更多条染色体中的任何核苷酸或DNA序列。在一些实施方案中,转基因包含编码感兴趣蛋白的多核苷酸。编码蛋白的多核苷酸通常与可用于获得感兴趣基因的期望的表达的其他序列,诸如转录调节序列可操作地连接。在一些实施方案中,转基因可以另外地包含用于标记其已整合的染色体的核酸或一个或更多个其他分子。

[0056] 如本文使用的,“治疗”是指针对患者表现出的或患者可能易感的疾病、紊乱或生理状况而进行的临床干预。治疗的目的包括但不限于,减轻或预防症状,减缓或终止疾病、紊乱或状况的进展或恶化,和/或缓解疾病、紊乱或状况。“治疗”是指治疗性治疗和预防性(prophylactic)措施或防备性(preventive)措施中的一种或两种。需要治疗的受试者包括已经受疾病或紊乱或不期望的生理状况影响的那些,以及待预防疾病或紊乱或不期望的生理状况的那些。

[0057] 如本文使用的,术语“有效量”或“药学有效量”或“治疗有效量”是指足以产生有益或合意的生物学和/或临床结果的量。

[0058] 如本文使用的术语“药学上可接受的赋形剂”是指为向受试者施用感兴趣的化合物提供药学上可接受的载体、添加剂或稀释剂的任何合适的物质。药学上可接受的赋形剂可以包括被称为药学上可接受的稀释剂、药学上可接受的添加剂和药学上可接受的载体的物质。

[0059] 如本文使用的,“受试者”是指需要诊断、治疗或疗法的动物。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。如本文使用的“哺乳动物”是指属于哺乳动物纲(Mammalia)的个体,并且包括但不限于人类、家畜和农场动物、动物园动物、运动动物和宠物。哺乳动物的非限制性实例包括小鼠;大鼠;兔;豚鼠;狗;猫;绵羊;山羊;牛;马;灵长类动物,诸如猴、黑猩猩和猿,并且特别是人类。在一些实施方案中,哺乳动物是灵长类动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人类。在一些实施方案中,哺乳动物不是人类。在一些方面,受试者可以患有或疑似患有心血管疾病和/或具有心血管疾病的一种或更多种症状。在一些方面,受试者是在诊断时或之后被诊断为具有心血管疾病风险的人类。在一些情况下,具有心血管疾病风险的诊

断可以基于基因组中内源载脂蛋白(a) (LPA) 基因或LPA基因附近的基因组序列中可能影响apo(a) 蛋白表达的一个或更多个突变的存在来确定。

[0060] 本文在分子的上下文中使用的术语“血浆水平”是指分子的浓度或量,例如存在于给定体积的血浆中的分子的摩尔数或重量。

[0061] 高水平的Lp(a) 与心血管疾病风险增加相关。大于50 mg/dL的Lp(a) 水平可以引起钙化性主动脉瓣疾病(CAVD) 和心血管疾病(CVD)。与低密度脂蛋白不同,Lp(a) 水平不能被环境、饮食、运动或现有的降脂药物诸如他汀类药物调节,使其成为遗传驱动的疾病风险因素。对于可以在延长的时间段内稳定地降低Lp(a) 水平或永久地降低Lp(a) 水平的新的基因疗法存在需求。本公开内容提供了一种直接靶向LPA基因或其变体以从基因组中永久地敲除LPA基因从而永久地降低受试者血液(例如血浆) 中的Lp(a) 水平的高度有效的基因编辑方法以及相关的组合物和试剂盒。在一些实施方案中,本文描述的方法、组合物和试剂盒可以将血浆Lp(a) 水平降低至少20%、至少30%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%或更高。在一些实施方案中,实施该方法后,受试者中的血浆Lp(a) 水平被降低至以下或降低至约以下:60 mg/dL、55 mg/dL、50 mg/dL、45 mg/dL、40 mg/dL、35 mg/dL、30 mg/dL或更低。本文描述的gRNA序列还可以使脱靶效应的数目和频率显著最小化,从而降低遗传毒性的风险。本文描述的方法、组合物和试剂盒可以用于治疗受试者的心血管疾病和/或降低心血管疾病的风险。

#### [0062] 脂蛋白(a) (Lp(a))

本文提供的内容包括用于编辑细胞基因组中编码脂蛋白(a) (Lp(a)) 的载脂蛋白(a) 蛋白的LPA基因(包括例如与心血管疾病风险增加和/或Lp(a) 表达增加相关的LPA基因变体) 以调节(例如减少) 细胞中Lp(a) 的表达、功能或活性的载体、组合物、方法、系统和试剂盒。如本文使用的,术语“LPA基因”包括涵盖LPA调节启动子和增强子序列以及LPA编码序列的基因组区域。

[0063] Lp(a) 是由与低密度脂蛋白(LDL) 颗粒的载脂蛋白B-100 (apoB) 组分共价结合的蛋白载脂蛋白(a) (apo(a)) 组成的致动脉粥样硬化脂蛋白(参见例如图1)。apo(a) 蛋白由LPA基因编码,在肝细胞中产生并分泌到循环中。然而,虽然已知apo(a) 与LDL对接并与apoB形成共价二硫键以成为Lp(a),但Lp(a) 组装的精确位点是未知的。apo(a) 与apoB的这种结合阻断apoB的LDL受体结合位点,并且因此阻止通过LDL受体途径的清除。apo(a) 从纤溶酶原基因演化而来,并且含有相关的蛋白结构域。apo(a) 蛋白包括一个kringle V (KV) 结构域、多个拷贝的kringle IV (KIV) 结构域和无活性蛋白酶样结构域,所有这些结构域都来源于纤溶酶原。KIV被分解成10个亚型,KIVi和KIV3-10以1个拷贝存在,并且KIV2以1至大于40个拷贝存在。apo(a) 的大小在个体人类之间是不同的,并且与KIV2的拷贝数成比例,这是由遗传决定的。Lp(a) 的血浆水平与apo(a) 蛋白的大小呈负相关,并且这被认为随着较大同种型的较慢分泌变化。高血浆水平的Lp(a) 是许多心血管疾病的独立风险因素,心血管疾病包括钙化性主动脉瓣疾病、冠心病、动脉粥样硬化、血栓形成和中风(综述于以下中:Kronenberg, F. (2016). *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 30(1):87-100)。

[0064] Lp(a) 的致病机制是通过其促动脉粥样硬化、促炎和促血栓形成特性介导的。apo(a) 和Lp(a) 的LDL组分的组合导致对心血管系统的复合作用。单独的LDL可以通过LDL进入血管壁,在该处磷脂变得氧化,引起免疫和炎症响应,这表征动脉粥样硬化。Lp(a) 循环并与

血浆中的氧化磷脂结合,从而引起促炎反应。apo (a) 本身含有可以与受损血管壁上的暴露表面结合的位点,介导其在这些位置处的进入和累积。apo (a) 的小同种型已被显示通过抑制纤维蛋白溶解促进血栓形成。

[0065] 已经广泛检查血浆Lp(a)水平与心血管疾病的关系,并且多项研究已经将高Lp(a)水平与心血管疾病的更高风险正相关(综述于以下中:Kronenberg, F. (2016). *Cardiovasc. Drugs Ther.*, 30(1):87-100)。人类血浆Lp(a)水平的范围可以在个体之间变化1000倍(例如,从0.1 mg/dL至>300 mg/dL或从<30 nmol/L至>400 nmol/L)。可变血清水平通过例如Apo(a)等位基因大小(KIV-2重复序列的数目)、5'五核苷酸重复序列多态性、LPA基因的5'和其他区域中的SNP来遗传确定。血清中的Lp(a)水平可以使用ELISA测定或免疫浊度(immunoturbidometric)分析来检测,如本领域技术人员将理解的。

[0066] LPA基因(也称为LP、AK38和APOA)具有6q25.3-q26的细胞遗传学位置,并且基因组坐标在6号染色体反向链上的位置160531482-160664275处。LPA的核苷酸序列可以见于NCBI网站,NCBI参考序列为:NC\_000006.12。LPA的NCBI基因ID为4018,Uniprot ID为P08519,并且Ensembl基因ID为ENSG00000198670。

#### [0067] 基因编辑

本文提供的内容包括用于编辑LPA基因或其变体从而降低受试者中Lp(a)的表达水平(例如,Lp(a)的血浆浓度)的方法、组合物和试剂盒。基因编辑(包括基因组编辑)是遗传工程的一个类型,其中一个或多个核苷酸/一个或多个核酸在DNA序列中(诸如在靶细胞的基因组中)被插入、缺失和/或取代。靶向基因编辑使得能够实现在靶细胞的基因组中(例如,在靶向的基因或靶向的DNA序列中)的预选位点处的插入、缺失和/或取代。当内源基因的序列,例如通过一个或多个核苷酸/一个或多个核酸的缺失、插入或取代被编辑时,包含受影响序列的内源基因可以由于序列改变而被敲除或敲低。因此,靶向编辑可以用于破坏内源基因表达。“靶向整合”是指涉及一个或多个外源序列的插入的过程,伴有或不伴有插入位点处内源序列的缺失。当存在含有外源序列的供体模板时,靶向整合可以由靶向的基因编辑产生。

[0068] 靶向编辑可以通过核酸酶非依赖性方法或通过核酸酶依赖性方法实现。在核酸酶非依赖性靶向编辑方法中,同源重组由位于外源多核苷酸侧翼的同源序列指导,以通过宿主细胞的酶促机制引入内源序列。外源多核苷酸可以在内源序列中引入核苷酸的缺失、插入或置换。

[0069] 可选地,核酸酶依赖性方法可以通过特异性罕见切割核酸酶(例如,内切核酸酶)特异性引入双链断裂(DSB)以更高频率实现靶向编辑。这样的核酸酶依赖性靶向编辑还利用DNA修复机制,例如响应于DSB而发生的非同源末端连接(NHEJ)。通过NHEJ的DNA修复通常导致少量内源核苷酸的随机插入或缺失(插入/缺失(indel))。与NHEJ介导的修复相比,修复也可以通过同源定向修复(HDR)发生。当存在含有侧翼为一对同源臂的外源遗传物质的供体模板时,可以通过HDR将外源遗传物质引入到基因组中,这导致外源遗传物质的靶向整合。

[0070] 能够引入特异性和靶向DSB的可用内切核酸酶包括但不限于锌指核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)和RNA指导的CRISPR-Cas9核酸酶(CRISPR/Cas9;成簇规则间隔短回文重复序列相关9)。另外地,利用phiC31和Bxb1整合酶的DICE(双重整合酶

盒交换)系统也可以用于靶向整合。

[0071] ZFN是包含与锌指DNA结合结构域(ZFBD)融合的核酸酶的靶向核酸酶,所述锌指DNA结合结构域(ZFBD)是通过一个或多个锌指以序列特异性方式结合DNA的多肽结构域。锌指是锌指结合结构域内其结构通过锌离子的配位而稳定的约30个氨基酸的结构域。锌指的实例包括但不限于C2H2锌指、C3H锌指和C4锌指。设计的锌指结构域是自然界中不存在的结构域,其设计/组成主要来自合理标准,例如,应用替换规则和计算机化算法来处理存储现有ZFP设计和结合数据的信息的数据库中的信息。参见例如美国专利第6,140,081号;第6,453,242号;和第6,534,261号;还参见WO 98/53058;WO 98/53059;WO 98/53060;WO 02/016536和WO 03/016496。选择的锌指结构域是自然界中不存在的结构域,其产生主要来自经验过程,诸如噬菌体展示、相互作用陷阱或杂交选择。ZFN更详细描述于美国专利第7,888,121号和美国专利号第7,972,854号中。ZFN的最公认的实例是FokI核酸酶与锌指DNA结合结构域的融合物。

[0072] TALEN是一种靶向核酸酶,该靶向核酸酶包含与TAL效应物DNA结合结构域融合的核酸酶。“转录激活因子样效应物DNA结合结构域”、“TAL效应物DNA结合结构域”或“TALE DNA结合结构域”是TAL效应物蛋白负责该TAL效应物蛋白与DNA的结合的多肽结构域。TAL效应物蛋白由黄单胞菌(Xanthomonas)属植物病原体在感染期间分泌。这些蛋白进入植物细胞的细胞核,经由其DNA结合结构域结合效应物特异性DNA序列,并经由其反式激活结构域激活这些序列的基因转录。TAL效应物DNA结合结构域特异性取决于不完全34个氨基酸重复序列(imperfect 34 amino acid repeats)的效应物可变数目(effector-variable number),所述不完全34个氨基酸重复序列在称为重复序列可变双残基(RVD)的选择重复序列位置处包含多态性。TALEN更详细描述于美国专利申请第2011/0145940号中。本领域中最公认的TALEN实例是FokI核酸酶与TAL效应物DNA结合结构域的融合多肽。

[0073] 适于如本文提供的使用的靶向核酸酶的另外的实例包括但不限于Bxb1、phiC31、R4、PhiBT1和Wβ/SPBc/TP901-1,无论是单独使用还是组合使用。

[0074] 靶向核酸酶的其他非限制性实例包括天然存在的和重组的核酸酶,例如CRISPR/Cas9、限制性内切核酸酶、兆核酸酶、归巢内切核酸酶等。

[0075] CRISPR-Cas基因编辑系统和RNA指导的核酸酶

在一些实施方案中,本文描述的载体、组合物、方法和试剂盒可以用于基因编辑系统,诸如CRISPR-Cas基因编辑系统中,以遗传编辑LPA基因。例如,CRISPR-Cas9系统是原核生物中天然存在的防御机制,已被重新用于作用于基因编辑的RNA指导的DNA靶向平台。该CRISPR-Cas9系统依赖于DNA核酸酶Cas9和两个非编码RNA-crisprRNA (crRNA)和反式激活RNA (tracrRNA)来靶向DNA的裂解。crRNA通过通常与靶DNA中的20个核苷酸(nt)序列的Watson-Crick碱基配对来驱动CRISPR-Cas9复合物的序列识别和特异性。如果靶序列之后是被称为原间隔区相邻基序(PAM)的特定短DNA基序(具有序列NGG),则CRISPR-Cas9复合物仅结合含有与crRNA、单指导RNA (sgRNA)的前20 nt匹配的序列的DNA序列。tracrRNA与crRNA的3'末端杂交形成RNA双链体结构,该结构被Cas9内切核酸酶结合形成催化活性CRISPR-Cas9复合物,该复合物然后可以裂解靶DNA。在CRISPR-Cas9复合物在靶位点处与DNA结合后,Cas9酶内的两个独立的核酸酶结构域各自在PAM位点上游裂解DNA链中的一条,留下双链断裂(DSB),在这里DNA的两条链终止于碱基对(平端)。在CRISPR-Cas9复合物在特

定靶位点处与DNA结合并形成位点特异性DSB之后,下一个关键步骤是DSB的修复。细胞使用两种主要的DNA修复途径来修复DSB:非同源末端连接(NHEJ)和同源定向修复(HDR)。在一些实施方案中,CRISPR-Cas9基因编辑系统包含RNA指导的核酸酶和靶向一个或更多个靶基因的一个或更多个指导RNA。

[0076] 如本文描述的,RNA指导的内切核酸酶可以是天然存在的或非天然存在的。RNA指导的内切核酸酶的非限制性实例包括Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas100、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cpf1内切核酸酶及其功能性衍生物。在一些情况下,RNA指导的内切核酸酶是Cas9内切核酸酶。Cas9内切核酸酶可以是例如化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*) (SpyCas9)、路邓葡萄球菌(*Staphylococcus lugdunensis*) (SluCas9)、侵肺巴斯德菌(*P. Pneumotropica*) Cas9 (PpCas9)、耳葡萄球菌(*Staphylococcus auricularis*) Cas9 (SauriCas9)、路邓葡萄球菌 Cas9 (SlugCas9)、*Staphylococcus lutrae* Cas9 (SlutrCas9)、溶血葡萄球菌(*Staphylococcus haemolyticus*) Cas9 (ShaCas9)、空肠弯曲杆菌(*Campylobacter jejuni*) (CjCas9)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) (SaCas9)或其变体。在一些实施方案中,RNA指导的内切核酸酶是Cas9的变体,包括但不限于小Cas9、死Cas9(dCas9)和Cas9切口酶。在一些实施方案中,Cas核酸酶可以包含RuvC或RuvC样核酸酶结构域(例如,Cpf1)和/或HNH或HNH样核酸酶结构域(例如,Cas9)。在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶是化脓性链球菌Cas9、金黄色葡萄球菌Cas9、脑膜炎奈瑟菌Cas9、嗜热链球菌Cas9、嗜热链球菌3 Cas9、齿垢密螺旋体Cas9或其变体。

[0077] RNA指导的内切核酸酶可以是小RNA指导的内切核酸酶。小RNA指导的内切核酸酶可以来源于本文描述和本领域已知的任何RNA指导的内切核酸酶的RNA指导的内切核酸酶的部分工程化。小RNA指导的内切核酸酶可以是例如小Cas内切核酸酶。在一些情况下,小RNA指导的核酸酶的长度短于约1,100个氨基酸。

[0078] RNA指导的内切核酸酶可以是突变的RNA指导的内切核酸酶(mutant RNA-guided endonuclease)。例如,RNA指导的内切核酸酶可以是天然存在的RNA指导的内切核酸酶的突变体。突变的RNA指导的内切核酸酶也可以是与天然存在的RNA指导的内切核酸酶相比具有改变的活性的突变的RNA指导的内切核酸酶,诸如改变的内切核酸酶活性(例如,改变或消除的DNA内切核酸酶活性,而对DNA的结合亲和力基本上没有减弱)。这样的修饰可以允许突变的RNA指导的内切核酸酶的序列特异性DNA靶向,用于以下目的:转录调节(例如,激活或阻遏);通过甲基化、去甲基化、乙酰化或去乙酰化的表观遗传修饰或染色质修饰,或本领域已知的DNA结合和/或DNA修饰蛋白的任何其他修饰。在一些实施方案中,突变的RNA指导的内切核酸酶不具有DNA内切核酸酶活性。

[0079] RNA指导的内切核酸酶可以是裂解靶DNA的互补链但具有降低的裂解靶DNA的非互补链的能力的切口酶,或裂解靶DNA的非互补链但具有降低的裂解靶DNA的互补链的能力的切口酶。在一些实施方案中,RNA指导的内切核酸酶具有降低的裂解靶DNA的互补链和非互补链两者的能力。

[0080] 在一些实施方案中,向受试者施用编码RNA指导的内切核酸酶的核酸。在一些实施

方案中,核酸可以通过体外转录反应产生。在一些实施方案中,产生体外转录的RNA包括在允许(进行(run-off)) RNA体外转录的条件下将线性DNA模板与RNA聚合酶和核苷酸混合物孵育。核苷酸混合物可以是体外转录混合物(IVT-mix)的一部分。在一些实施方案中,RNA聚合酶是T7 RNA聚合酶。用于RNA体外转录的核苷酸混合物可以另外地含有如下定义的修饰的核苷酸。在一些实施方案中,可以针对给定RNA序列优化用于RNA体外转录反应的核苷酸混合物(例如,混合物中每个核苷酸的比例)(优化的NTP混合物)。这样的方法描述于例如W02015/188933中。在一些实施方案中,通过使用优化的NTP混合物的方法获得的RNA的特征在于降低的免疫刺激特性。

[0081] 在一些实施方案中,核苷酸混合物包含未修饰的核糖核苷三磷酸(NTP) GTP、ATP、CTP和UTP。在一些实施方案中,体外转录可以包括至少一个帽类似物的存在,例如帽1(cap1)三核苷酸帽类似物,m7G(5')ppp(5')(2' OMeA)pG或m7G(5')ppp(5')(2' OMeG)pG、m7G(5')ppp(5')(2' OMeA)pG或rn7(3' OMeG)(5')ppp(5')(2' OMeA)pG。在一些实施方案中,经由使用加帽酶(例如痘苗病毒加帽酶和/或帽依赖性2'-O-甲基转移酶)的酶促加帽形成5'-帽结构以产生帽0或帽1或帽2结构。还可以使用W02016/193226中公开的方法和手段,使用固定的加帽酶和/或帽依赖性2'-O-甲基转移酶添加5'-帽结构(帽0或帽1)。在一些实施方案中,至少一种(核糖)核苷三磷酸的一部分或全部被修饰的核苷三磷酸置换。在一些实施方案中,修饰的核苷三磷酸包括假尿苷( $\psi$ )、N1-甲基假尿苷(m1  $\psi$ )、5-甲基胞嘧啶或5-甲氧基尿苷。在一些实施方案中,核苷酸混合物中的尿嘧啶核苷酸被假尿苷( $\psi$ )和/或N1-甲基假尿苷(m1  $\psi$ )置换(部分或完全)以获得修饰的RNA。在一些实施方案中,化学修饰的核苷酸是假尿苷( $\psi$ )。在一些实施方案中,化学修饰的核苷酸是N1-甲基假尿苷(m1 $\psi$ )。在一些实施方案中,核苷酸混合物包含至少一个修饰的核苷酸和/或至少一个用于掺入RNA的核苷酸类似物或核苷酸衍生物。例如,如本文定义的修饰的核苷酸可以包括核苷酸类似物/修饰,例如主链修饰、糖修饰或碱基修饰。主链修饰可以包括其中核苷酸主链的磷酸被化学修饰的修饰。糖修饰可以包括核苷酸的糖的化学修饰。此外,碱基修饰可以包括核苷酸的碱基部分的化学修饰。在该上下文中,核苷酸类似物或修饰可以包括适于转录和/或翻译的核苷酸类似物。在一些实施方案中,核苷酸混合物包含至少一个修饰的核苷酸和/或至少一个选自主链修饰的核苷酸、糖修饰的核苷酸和/或碱基修饰的核苷酸或其任何组合的核苷酸类似物。

[0082] 可以包含在核苷酸混合物中并掺入到RNA中的修饰的核苷和核苷酸可以在糖部分中被修饰。例如,2' 羟基基团(OH)可以被许多不同的“氧基”或“脱氧基”取代基修饰或置换。“氧基”-2' 羟基基团修饰的实例包括但不限于烷氧基或芳氧基(-OR,例如R = H、烷基、环烷基、芳基、芳烷基、杂芳基或糖);聚乙二醇(PEG), -O(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>n</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OR;其中2' 羟基例如通过亚甲基桥连接至同一核糖的4' 碳的“锁”核酸(LNA);和氨基基团(-O-氨基,其中氨基基团可以是烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基或二杂芳基氨基、乙二胺、聚氨基)或氨基烷氧基。“脱氧”修饰包括氢、氨基(例如NH<sub>2</sub>、烷基氨基、二烷基氨基、杂环基、芳基氨基、二芳基氨基、杂芳基氨基、二杂芳基氨基或氨基酸);或者氨基基团可以通过接头连接至糖,其中接头包含原子C、N和O中的一个或多个。糖基基团还可以含有一个或多个具有与核糖中对应碳相对的立体化学构型的碳。因此,修饰的RNA分子可以包括含有例如阿拉伯糖作为糖的核苷酸。

[0083] 磷酸主链可以在修饰的核苷和核苷酸中进一步修饰,这可以被包括在核苷酸混合

物中并掺入到修饰的体外转录的RNA中。主链的磷酸基团可以通过用不同的取代基置换一个或更多个氧原子来修饰。此外,修饰的核苷和核苷酸可以包括用如本文描述的修饰的磷酸完全置换未修饰的磷酸部分。修饰的磷酸基团的实例包括但不限于硫代磷酸酯、硒代磷酸酯(phosphoroselenates)、硼烷磷酸酯(borano phosphates)、硼烷磷酸酯(borano phosphate esters)、氢磷酸酯、氨基磷酸酯、烷基或芳基磷酸酯和磷酸三酯。二硫代磷酸酯的两个非连接氧被硫置换。磷酸酯接头还可以通过用氮(桥接的氨基磷酸酯)、硫(桥接的硫代磷酸酯)和碳(桥接的亚甲基-磷酸酯)置换连接氧来修饰。

[0084] 如本文描述的核苷酸可以在核碱基部分中被修饰。存在于RNA中的核碱基的实例包括但不限于腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和尿嘧啶。例如,本文描述的核苷和核苷酸可以在大沟面上进行化学修饰。在一些实施方案中,大沟化学修饰包括氨基基团、硫醇基团、烷基基团或卤素基团。

[0085] 核苷酸类似物/修饰可以包括2-氨基-6-氯嘌呤核糖苷-5'-三磷酸、2-氨基嘌呤-核糖-5'-三磷酸;2-氨基腺苷-5'-三磷酸、2'-氨基-2'-脱氧胞苷-三磷酸、2-硫代胞苷-5'-三磷酸、2-硫代尿苷-5'-三磷酸、2'-氟胸苷-5'-三磷酸、2'-O-甲基-肌苷-5'-三磷酸、4-硫代尿苷-5'-三磷酸、5-氨基烯丙基胞苷-5'-三磷酸、5-氨基烯丙基尿苷-5'-三磷酸、5-溴胞苷-5'-三磷酸、5-溴尿苷-5'-三磷酸、5-溴-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-溴-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、5-碘胞苷-5'-三磷酸、5-碘-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-碘尿苷-5'-三磷酸、5-碘-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、5-甲基胞苷-5'-三磷酸、5-甲基尿苷-5'-三磷酸、5-丙炔基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-丙炔基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、6-氮杂胞苷-5'-三磷酸、6-氮杂尿苷-5'-三磷酸、6-氯嘌呤核糖苷-5'-三磷酸、7-脱氮腺苷-5'-三磷酸、7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸、8-氮杂腺苷-5'-三磷酸、8-叠氮基腺苷-5'-三磷酸、苯并咪唑-核糖苷-5'-三磷酸、N1-甲基腺苷-5'-三磷酸、N1-甲基鸟苷-5'-三磷酸、N6-甲基腺苷-5'-三磷酸、O6-甲基鸟苷-5'-三磷酸、假尿苷-5'-三磷酸、嘌呤霉素-5'-三磷酸、黄苷-5'-三磷酸。碱基修饰的核苷酸可以包括5-甲基胞苷-5'-三磷酸、7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸、5-溴胞苷-5'-三磷酸和假尿苷-5'-三磷酸、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟基甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、zebularine、5-氮杂-zebularine、5-甲基-zebularine、5-氮杂-2-硫代-zebularine、2-硫代-zebularine、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷和4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺式-羟基异戊

烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘氨酸基氨基甲酰基腺苷、N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤和2-甲氧基-腺嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、怀俄苷(wyosine)、怀丁苷(wybutosine)、7-脱氮-鸟苷、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷和N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-腺苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-胞苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-鸟苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-尿苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-假尿苷、6-氮杂-胞苷、2-硫代-胞苷、 $\alpha$ -硫代-胞苷、假-异-胞苷、5-氨基烯丙基-尿苷、5-碘-尿苷、N1-甲基-假尿苷、5,6-二氢尿苷、 $\alpha$ -硫代-尿苷、4-硫代-尿苷、6-氮杂-尿苷、5-羟基-尿苷、脱氧-胸苷、5-甲基-尿苷、吡咯并-胞苷、肌苷、 $\alpha$ -硫代-鸟苷、6-甲基-鸟苷、5-甲基-胞苷、8-氧代-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、N1-甲基-腺苷、2-氨基-6-氯-嘌呤、N6-甲基-2-氨基-嘌呤、假-异-胞苷、6-氯-嘌呤、N6-甲基-腺苷、 $\alpha$ -硫代-腺苷、8-叠氮基-腺苷或7-脱氮-腺苷。

[0086] 本文描述的至少一个修饰的核苷酸和/或至少一个核苷酸类似物可以包括1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、2'-0-甲基腺苷、2-甲硫基-N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷、N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、N6-甲基-N6-苏氨酸基氨基甲酰基腺苷、N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酸基氨基甲酰基腺苷、肌苷、3-甲基胞苷、2-0-甲基胞苷、2-硫代胞苷、N4-乙酰基胞苷、赖氨酸、1-甲基鸟苷、7-甲基鸟苷、2'-0-甲基鸟苷、薈苷、环氧薈苷、7-氰基-7-脱氮鸟苷、7-氨基甲基-7-脱氮鸟苷、假尿苷、二氢尿苷、5-甲基尿苷、2'-0-甲基尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷、3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷、5'-羟基尿苷、5-甲氧基尿苷、尿苷5-氧基乙酸、尿苷5-氧基乙酸甲酯、5-氨基甲基-2-硫代尿苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿苷、5-羧甲基氨基甲基-2'-0-甲基尿苷、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-(异戊烯氨基甲基)尿苷、5-(异戊烯氨基甲基)-2-硫代尿苷或5-(异戊烯氨基甲基)-2'-0-甲基尿苷。

[0087] 在一些实施方案中,化学修饰包括假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷、2'-0-甲基尿苷或其组合。

[0088] 在一些实施方案中,编码序列中100%的尿嘧啶可以具有化学修饰。在一些实施方案中,化学修饰在尿嘧啶的5'位置中。在一些实施方案中,RNA的编码序列(cds)中100%的尿嘧啶可以具有化学修饰,例如在尿嘧啶的5'位置中的化学修饰。在一些实施方案中,cds中至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或90%的尿嘧啶核苷酸具有化学修饰,例如在所述尿嘧啶核苷酸的5'位置中的化学修饰。这样的修饰可以降低对先天免疫系统的刺激(在体内施用包含这样的修饰的核苷酸的RNA之后)。

[0089] 如本文使用的术语“cds”或“编码序列”或“编码区”将被本领域普通技术人员认识

和理解,并且例如可以指几个核苷酸三联体的序列,其可以被翻译为肽或蛋白。RNA的cds可以包含至少一个修饰的核苷酸,其中所述至少一个修饰的核苷酸可以选自假尿苷( $\psi$ )、N1-甲基假尿苷(m1  $\psi$ )、5-甲基胞嘧啶和5-甲氧基尿苷。

[0090] 如本文使用的,术语“修饰的核苷酸”或“化学修饰的核苷酸”可以指RNA的结构单元(即核糖核苷酸A、G、C和U)的所有潜在的天然和非天然的化学修饰。

[0091] 在一些实施方案中,体外转录反应中的核苷酸混合物包含帽类似物。因此,在一些实施方案中,帽类似物是如下描述的帽0、帽1、帽2、修饰的帽0或修饰的帽1类似物或帽1类似物。本文使用的术语“帽类似物”或“5'-帽结构”可以指RNA的5'结构,特别是位于RNA(例如mRNA)的5'末端处的鸟嘌呤核苷酸。在一些实施方案中,5'-帽结构经由5'-5'-三磷酸键连接至RNA。在一些实施方案中,“5'-帽结构”或“帽类似物”不被认为是“修饰的核苷酸”或“化学修饰的核苷酸”。可能合适的5'-帽结构包括帽0(第一核碱基的甲基化,例如m7GpppN)、帽1(m7GpppN的相邻核苷酸的核糖的另外的甲基化)、帽2(m7GpppN下游的第2核苷酸的核糖的另外的甲基化)、帽3(m7GpppN下游的第3核苷酸的核糖的另外的甲基化)、帽4(m7GpppN下游的第4核苷酸的核糖的另外的甲基化)、ARCA(反义反向帽类似物)、modARCA(例如硫代磷酸酯modARCA)、肌苷、N1-甲基-鸟苷、2'-氟-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、8-氧代-鸟苷、2-氨基-鸟苷、LNA-鸟苷和2-叠氮基-鸟苷。

[0092] 5'-帽(帽0或帽1)结构可以在化学RNA合成中使用加帽酶形成,或在RNA体外转录(共转录加帽)中使用帽类似物形成。如本文使用的,术语“帽类似物”可以指具有帽官能团的不可聚合的二核苷酸或三核苷酸,因为当被掺入在RNA的5'末端处时,所述帽类似物促进RNA的翻译或定位和/或防止RNA的降解。不可聚合意指帽类似物将仅被掺入在5'末端处,因为它不具有5'三磷酸,并且因此不能通过模板依赖性聚合酶(例如,DNA依赖性RNA聚合酶)在3'方向上延伸。帽类似物的实例包括m7GpppG、m7GpppA、m7GpppC;未甲基化的帽类似物(例如,GpppG);二甲基化帽类似物(例如,m2,7GpppG)、三甲基化帽类似物(例如,m2,2,7GpppG)、二甲基化对称帽类似物(例如,m7Gpppm7G)或反义反向帽类似物(例如,ARCA;m7,2' OmeGpppG、m7,2' dGpppG、m7,3' OmeGpppG、m7,3' dGpppG及其四磷酸衍生物)。先前,例如W02008/016473、W02008/157688、W02009/149253、W02011/015347和W02013/059475,已经描述了另外的帽类似物。在该上下文中另外的合适的帽类似物在例如W02017/066793、W02017/066781、W02017/066791、W02017/066789、W02017/053297、W02017/066782、W02018/075827和W02017/066797中描述,其中涉及帽类似物的公开内容通过引用并入本文。

[0093] 在一些实施方案中,帽1结构使用如W02017/053297、W02017/066793、W02017/066781、W02017/066791、W02017/066789、W02017/066782、W02018/075827和W02017/066797中公开的三核苷酸帽类似物来产生。例如,可来源于W02017/053297的权利要求1-5中公开的结构任何帽类似物可以合适地用于共转录产生帽1结构。在一些实施方案中,可来源于描述于W02018/075827中的结构的任何帽类似物可以合适地用于共转录产生帽1结构。在一些实施方案中,帽1类似物是帽1三核苷酸帽类似物。在一些实施方案中,体外转录的RNA的帽1结构使用三核苷酸帽类似物m7G(5')ppp(5')(2' OMeA)pG或m7G(5')ppp(5')(2' OMeG)pG使用共转录加帽来形成。在一些实施方案中,帽1类似物是m7G(5')ppp(5')(2' OMeA)pG。

[0094] 在一些实施方案中,RNA(例如,mRNA)包含5'-帽结构,例如帽1结构。在一些实施方案中,5'帽结构可以改进mRNA的稳定性和/或表达。包含mRNA(通过例如体外转录产生)

的帽1结构具有几个有利特征,包括增加的翻译效率和降低的对先天免疫系统的刺激。在一些实施方案中,体外转录的RNA包含编码至少一种肽或蛋白的至少一种编码序列。在一些实施方案中,蛋白是RNA指导的内切核酸酶。在一些实施方案中,RNA指导的内切核酸酶是Cas9或其衍生物。

[0095] 本公开内容提供了编码化脓性链球菌Cas9内切核酸酶的优化的mRNA (“SpCas9 mRNA”),并且其任选地包括化学修饰的核苷酸,当与一种或更多种gRNA一起施用,该优化的mRNA提供靶细胞群体的有效基因组编辑。在一些实施方案中,本公开内容提供了一种mRNA,该mRNA包含(i) 5'非翻译区(UTR);(ii) 包含编码定点内切核酸酶(site-directed endonuclease)的核苷酸序列的开放阅读框(ORF);和(iii) 3'非翻译区(UTR)。在一些实施方案中,定点内切核酸酶是Cas核酸酶。在一些实施方案中,Cas核酸酶是Cas9多肽。在一些实施方案中,Cas9多肽是化脓性链球菌来源的Cas9 (SpCas9) 多肽。在一些实施方案中,ORF还包含编码核定位信号的一个或更多个核苷酸序列,诸如本文描述的核苷酸序列。在一些实施方案中,ORF包含编码定点内切核酸酶(诸如SpCas9多肽)的核苷酸序列和至少一个NLS,所述NLS是核质蛋白和/或SV40 NLS。在一些实施方案中,ORF包含编码与定点内切核酸酶(诸如SpCas9多肽)可操作地连接的N末端和/或C末端NLS的核苷酸序列。在一些实施方案中,ORF包含编码与定点内切核酸酶(诸如SpCas9多肽)可操作地连接的N末端SV40 NLS和与定点内切核酸酶(诸如SpCas9多肽)可操作地连接的C末端核质蛋白NLS的核苷酸序列。

[0096] 在一些实施方案中,mRNA可以包含至少一个化学修饰的核苷和/或核苷酸。在一些实施方案中,化学修饰的核苷选自假尿苷、N1-甲基假尿苷和5-甲氧基尿苷。在一些实施方案中,化学修饰的核苷是N1-甲基假尿苷(例如,1-甲基假尿苷)。在一些实施方案中,mRNA中至少约80%或更多(例如,约85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%)的尿苷被N1-甲基假尿苷修饰或置换。在一些实施方案中,mRNA中100%的尿苷(例如尿嘧啶)被N1-甲基假尿苷修饰或置换。在一些实施方案中,mRNA中尿苷或尿嘧啶残基中的两个或更多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、200、300、400、500、600、700、800个或更多个)是N1-甲基假尿苷。

#### [0097] 指导RNA (gRNA)

在一些实施方案中,用于遗传编辑LPA基因的CRISPR/Cas介导的基因编辑系统包含基因组靶向核酸(例如,指导RNA),该基因组靶向核酸(例如,指导RNA)可以将RNA指导的内切核酸酶的活性引导至LPA基因内的特定靶序列。指导RNA至少包含与感兴趣的靶核酸序列杂交的间隔区序列和CRISPR重复序列。gRNA可以是单分子指导RNA或双分子指导RNA。RNA指导的内切核酸酶可以是例如Cas内切核酸酶,包括Cas9内切核酸酶。Cas9内切核酸酶可以是例如SpyCas9、SaCas9或SluCas9内切核酸酶。在一些实施方案中,RNA指导的内切核酸酶是Cas9变体。在一些实施方案中,RNA指导的内切核酸酶是小RNA指导的内切核酸酶。在一些实施方案中,RNA指导的内切核酸酶是小Cas内切核酸酶。

[0098] 在一些实施方案中,gRNA包含5'至3':crRNA和tracrRNA,其中crRNA和tracrRNA杂交以形成双链体。在一些实施方案中,crRNA包含能够靶向靶核酸(例如,基因组DNA分子)中

的靶序列的间隔区序列和crRNA重复序列。在一些实施方案中, tracrRNA包含tracrRNA反义重复序列和3' tracrRNA序列。在一些实施方案中, crRNA重复序列的3' 末端例如通过四环与tracrRNA反义重复序列的5' 末端连接, 其中crRNA重复序列和tracrRNA反义重复序列杂交以形成sgRNA。在一些实施方案中, sgRNA包含5' 至3' : 间隔区序列、crRNA重复序列、四环、tracrRNA反义重复序列和3' tracrRNA序列。在一些实施方案中, sgRNA包含5' 间隔区延伸序列。在一些实施方案中, sgRNA包含3' tracrRNA延伸序列。3' tracrRNA可以包含以下或由以下组成: 一个或更多个茎环, 例如一个、两个、三个或更多个茎环。

[0099] 在一些实施方案中, sgRNA的不变序列包含GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAUUUUAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGUGCUUUU (SEQ ID NO:1)的核苷酸序列, 或相对于SEQ ID NO: 1具有多达1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个核苷酸缺失、插入或取代的核苷酸序列。在一些实施方案中, sgRNA与SpCa9或SpyCas9内切核酸酶一起使用。

[0100] 本文公开的指导RNA可以经由crRNA中的间隔区序列靶向任何感兴趣的序列。gRNA中的间隔区序列是定义感兴趣的靶基因(例如, LPA基因)的靶序列(例如, DNA靶序列, 诸如基因组靶序列)的序列(例如, 20个核苷酸序列)。在一些实施方案中, 间隔区序列的范围为15至30个核苷酸。例如, 间隔区序列的长度可以是以下、可以是约以下、可以是至少以下或可以是至多以下: 10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、40、50个或这些值中的任何两个之间的数字或范围的核苷酸。在一些实施方案中, 间隔区序列含有20个核苷酸。在一些实施方案中, gRNA能够与靶dsDNA的正向链杂交。在一些实施方案中, gRNA能够与靶dsDNA的反向链杂交。

[0101] “靶序列”在与PAM序列相邻的靶基因中, 并且是待被RNA指导的核酸酶(例如, Cas9)修饰的序列。“靶序列”在“靶核酸”中的所谓PAM-链上, 所述靶核酸是含有PAM-链和互补的非PAM链的双链分子。本领域技术人员认识到, gRNA间隔区序列与位于感兴趣的靶核酸的非PAM链中的互补序列杂交。因此, gRNA间隔区序列是靶序列的RNA等同物。gRNA的间隔区经由杂交(即, 碱基配对)以序列特异性方式与感兴趣的靶核酸相互作用。因此, 间隔区的核苷酸序列根据感兴趣的靶核酸的靶序列而变化。在一些实施方案中, LPA基因的靶序列在LPA基因的外显子3内。

[0102] 在本文使用的CRISPR/Cas系统中, 间隔区序列被设计为与靶核酸的位于可被系统中使用的Cas9酶识别的PAM的5' 的区域杂交。间隔区可以完全匹配靶序列或可以具有错配。每种Cas9酶具有其在靶DNA中识别的特定PAM序列。例如, 化脓性链球菌Cas9识别靶核酸中包含序列5' -NRG-3' 的PAM, 其中R包含A或G, 其中N是任何核苷酸, 并且N紧邻间隔区序列靶向的靶核酸序列的3' 。

[0103] 在一些实施方案中, 靶核酸序列的长度为20个核苷酸。在一些实施方案中, 靶核酸的长度小于20个核苷酸。在一些实施方案中, 靶核酸的长度多于20个核苷酸。在一些实施方案中, 靶核酸的长度为至少: 5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。在一些实施方案中, 靶核酸的长度为至多: 5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。在一些实施方案中, 靶核酸序列具有紧邻PAM第一个核苷酸5' 的20个碱基。例如, 在包含5' -NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3' (SEQ ID NO: 2)的序列中, 靶核酸可以是对应于N的序列, 其中N可以是任何核苷酸, 并且加下划线的NRG序列(R是G或A)是化脓性链球菌PAM。在一些实施方案中, 在本公开内容的组合物和方法中用作被SpCas9识别

的序列的PAM序列是NGG,其中N可以是A、T、C或G。

[0104] 间隔区序列与靶核酸之间的互补性百分比可以是约以下、至少以下、至少约以下、至多以下或至多约以下:30%、40%、50%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,指导RNA的间隔区序列和靶基因中的靶核酸是100%互补的。在一些实施方案中,在靶核酸互补链的靶序列的六个连续的最5'核苷酸上,间隔区序列与靶核酸之间的互补性百分比是100%。在一些实施方案中,间隔区序列与靶核酸之间的互补性百分比在约20个连续核苷酸上为至少60%。在其他实施方案中,指导RNA的间隔区序列和靶基因中的靶序列可以含有多达10个错配,例如多达9个、多达8个、多达7个、多达6个、多达5个、多达4个、多达3个、多达2个或多达1个错配。

[0105] LPA gRNA可以靶向LPA基因的外显子3内的靶序列。在一些实施方案中,LPA gRNA包含对应于表1中列出的SEQ ID NO: 3-10中列出的靶序列中的任何一个的间隔区序列。在一些实施方案中,LPA gRNA包含选自表1中列出的SEQ ID NO: 18-25的间隔区序列。

| 表 1: 示例性靶/间隔区序列 |                            |     |           |
|-----------------|----------------------------|-----|-----------|
| 指导              | 靶/间隔区序列                    | PAM | SEQ ID NO |
| T4              | GATTAATGACATACGCATT (靶)    | GGG | 3 (靶)     |
|                 | GAUUAUGACAUACGCAUU (间隔区)   |     | 18 (间隔区)  |
| T1 (T5513)      | TGGACCACATGGCTTTGCTC (靶)   | AGG | 4 (靶)     |
|                 | UGGACCACAUGGCUUUGCUC (间隔区) |     | 19 (间隔区)  |
| T2 (T13789)     | TGAGCAAAGCCATGTGGTCC (靶)   | AGG | 5 (靶)     |
|                 | UGAGCAAAGCCAUGTGGUCC (间隔区) |     | 20 (间隔区)  |
| T10762          | GTGGTCCTATTATGTTGATG (靶)   | TGG | 6 (靶)     |
|                 | GUGGUCCUAUUAUGUUGAUG (间隔区) |     | 21 (间隔区)  |
| T3893           | CATAGATGACCAAGCTTGGC (靶)   | AGG | 7 (靶)     |
|                 | CAUAGAUGACCAAGCUUGGC (间隔区) |     | 22 (间隔区)  |
| T3894           | CATAGATGACCAAGCTTGGC (靶)   | AGG | 8 (靶)     |
|                 | CAUAGAUGACCAAGCUUGGC (间隔区) |     | 23 (间隔区)  |
| T14467          | AGCACCTGAGCAAAGCCATG (靶)   | TGG | 9 (靶)     |
|                 | AGCACCUGAGCAAAGCCAUG (间隔区) |     | 24 (间隔区)  |
| T5 (T1530)      | AGATTAATGACATACGCATT (靶)   | TGG | 10 (靶)    |
|                 | AGAUAUGACAUACGCAUU (间隔区)   |     | 25 (间隔区)  |

[0106] 在一些实施方案中,gRNA包含对应于SEQ ID NO: 3-10中列出的靶序列中的任何一个的间隔区序列或其变体。在一些实施方案中,gRNA包含对应于SEQ ID NO: 3-10中列出的靶序列中的任何一个的间隔区序列。在一些实施方案中,gRNA包含与对应于SEQ ID NO: 3-10中列出的靶序列中的任何一个的RNA序列具有一个、两个或三个错配的间隔区序列。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 18-25中列出的间隔区序列或其变体。在一些实施方案中,gRNA包含选自SEQ ID NO: 18-25的间隔区序列。在一些实施方案中,gRNA包含与选自SEQ ID NO: 18-25的序列具有一个、两个或三个错配的间隔区序列。在一些实施方案中,gRNA是sgRNA。

[0107] 在一些实施方案中,将包含与LPA基因的靶序列互补的间隔区的两个gRNA提供给细胞。在一些实施方案中,gRNA是包含对应于SEQ ID NO: 3-10中列出的靶序列中的任何一个的间隔区或其变体的任何两个gRNA。在一些实施方案中,两个gRNA中的一个或两个包含对应于SEQ ID NO: 3-10中列出的靶序列中的任何一个的间隔区序列。在一些实施方案中,两个gRNA中的一个或两个包含与对应于SEQ ID NO: 3-10中列出的靶序列中的任何一个的RNA序列具有一个、两个或三个错配的间隔区序列。在一些实施方案中,两个gRNA中的一个

或两个包含SEQ ID NO: 18-25中列出的间隔区序列或其变体。在一些实施方案中,两个gRNA中的一个或两个包含选自SEQ ID NO: 18-25的间隔区序列。在一些实施方案中,两个gRNA中的一个或两个包含与选自SEQ ID NO: 18-25的序列具有一个、两个或三个错配的间隔区序列。

[0109] 在一些实施方案中,gRNA包含第一gRNA和第二gRNA,所述第一gRNA包含具有SEQ ID NO: 18的序列或与SEQ ID NO: 18具有至少85% (例如,至少90%或至少95%)同源性的序列的间隔区,所述第二gRNA包含具有SEQ ID NO: 19-25中任何一个的序列或与SEQ ID NO: 19-25中任何一个具有至少85% (例如,至少90%或至少95%)同源性的序列的间隔区。在一些实施方案中,gRNA包含含有具有SEQ ID NO: 18的序列的间隔区的第一gRNA和含有具有SEQ ID NO: 19-25中任何一个的序列的间隔区的第二gRNA。

[0110] 在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 18中列出的间隔区序列或与SEQ ID NO: 18具有约以下、至少以下、至少约以下同源性的序列:80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,gRNA包含相对于SEQ ID NO: 18具有不多于3个错配(例如,1或2个错配)的间隔区序列。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 18的间隔区序列。

[0111] 在一些实施方案中,LPA gRNA包含对应于下文表2中列出的SEQ ID NO: 12-17中列出的靶序列中的任何一个的间隔区序列。在一些实施方案中,LPA gRNA包含选自表2中列出的SEQ ID NO: 26-31的间隔区序列。

[0112]

| 表 2: 示例性指导 RNA 靶/间隔区序列 |        |                               |           |
|------------------------|--------|-------------------------------|-----------|
| 基因区域                   | 指导     | 指导 RNA 靶/间隔区序列                | SEQ ID NO |
| Kringle IV外显子4         | T146   | GGATCCCTCGTATAACAATA (靶)      | 12 (靶)    |
|                        |        | GGAUCCUCGUUAACAAUA (间隔区)      | 26 (间隔区)  |
| Kringle IV外显子18        | T146   | GGATCCCTCGTATAACAATA (靶)      | 12 (靶)    |
|                        |        | GGAUCCUCGUUAACAAUA (间隔区)      | 26 (间隔区)  |
| 调节                     | T4110  | TGGACTACATAGTTGTGTGA (靶)      | 13 (靶)    |
|                        |        | UGGACUACAUAGUUGUGUGA (间隔区)    | 27 (间隔区)  |
| 调节                     | T7918  | TTCAATCCTCTTGTACACCTG (靶)     | 14 (靶)    |
|                        |        | UUCAAUCCUCUUGUCACCUG (间隔区)    | 28 (间隔区)  |
| 调节                     | T14868 | CTGCCAGACTCTCTGAACCC (靶)      | 15 (靶)    |
|                        |        | CUGCCAGACUCUCUGAACCC (间隔区)    | 29 (间隔区)  |
| 调节                     | T524   | AAAACCTACCGCAAGTTGCC (靶)      | 16 (靶)    |
|                        |        | AAAACCUACCGCAAGUUGCC (间隔区)    | 30 (间隔区)  |
| 调节                     | T221   | GACATCTCTATGTCGCCAC (靶)       | 17 (靶)    |
|                        |        | GACAUCUCUAUGUCGCCAC (间隔区/间隔区) | 31 (间隔区)  |

[0113] 在一些实施方案中,gRNA是化学修饰的gRNA。可以将各种类型的RNA修饰引入至gRNA中以增强稳定性、降低先天免疫应答的可能性或程度和/或增强本领域描述的其他属性。本文描述的gRNA可以包含一个或更多个修饰,包括核苷间键、嘌呤或嘧啶碱基或糖。在一些实施方案中,用化学合成或用聚合酶在gRNA的末端处引入修饰。修饰的核酸及其合成的实例公开于W02013/052523中。修饰的多核苷酸的合成也描述于Verma和Eckstein, Annual Review of Biochemistry, 第76卷, 99-134 (1998)中。

[0114] 化学修饰的gRNA可以在gRNA的3'末端和/或5'末端处包含一个或更多个硫代磷酸化的2'-O-甲基核苷酸。在一些实施方案中,化学修饰的gRNA在gRNA的3'末端处包含硫代磷酸化的2'-O-甲基核苷酸。在一些实施方案中,化学修饰的gRNA在gRNA的5'末端处包含硫代磷酸化的2'-O-甲基核苷酸。在一些实施方案中,化学修饰的gRNA在gRNA的3'末端处包含三个或四个硫代磷酸化的2'-O-甲基核苷酸和/或在5'末端处包含三个或四个硫代磷酸化的2'-O-甲基核苷酸。在一些实施方案中,SEQ ID NO: 18-25和26-31中的任何一个可以被化

学修饰以在gRNA的3'末端处具有一个、两个、三个或四个硫代磷酸化的2'-O-甲基核苷酸；在gRNA的5'末端处具有一个、两个或三个硫代磷酸化的2'-O-甲基核苷酸,或其组合。硫代磷酸酯键的数目和位置可以变化。在一些实施方案中,键可以在gRNA的5'末端的第一与第二、第二与第三、第三与第四位置、第四与第五、第五与第六、第六与第七、第七与第八、第八与第九、第九与第十或另外的位置之间。在一些实施方案中,键可以在gRNA的3'末端的第一与第二、第二与第三、第三与第四位置、第四与第五、第五与第六、第六与第七、第七与第八、第八与第九、第九与第十或另外的位置之间。在一些实施方案中,化学修饰的gRNA具有本文描述的gRNA中的任何一个的序列(例如,SEQ ID NO: 32),并且具有一个或更多个本文描述的化学修饰的核苷酸和/或一个或更多个硫代磷酸酯键。作为实例,化学修饰的gRNA是SEQ ID NO: 11。

[0115] 在一些实施方案中,核苷酸类似物/修饰可以包括2-氨基-6-氯嘌呤核糖苷-5'-三磷酸、2-氨基嘌呤-核糖苷-5'-三磷酸;2-氨基腺苷-5'-三磷酸、2'-氨基-2'-脱氧胞苷-三磷酸、2-硫代胞苷-5'-三磷酸、2-硫代尿苷-5'-三磷酸、2'-氟胸苷-5'-三磷酸、2'-O-甲基-肌苷-5'-三磷酸、4-硫代尿苷-5'-三磷酸、5-氨基烯丙基胞苷-5'-三磷酸、5-氨基烯丙基尿苷-5'-三磷酸、5-溴胞苷-5'-三磷酸、5-溴尿苷-5'-三磷酸、5-溴-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-溴-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、5-碘胞苷-5'-三磷酸、5-碘-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-碘尿苷-5'-三磷酸、5-碘-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、5-甲基胞苷-5'-三磷酸、5-甲基尿苷-5'-三磷酸、5-丙炔基-2'-脱氧胞苷-5'-三磷酸、5-丙炔基-2'-脱氧尿苷-5'-三磷酸、6-氮杂胞苷-5'-三磷酸、6-氮杂尿苷-5'-三磷酸、6-氯嘌呤核糖苷-5'-三磷酸、7-脱氮腺苷-5'-三磷酸、7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸、8-氮杂腺苷-5'-三磷酸、8-叠氮基腺苷-5'-三磷酸、苯并咪唑-核糖苷-5'-三磷酸、N1-甲基腺苷-5'-三磷酸、N1-甲基鸟苷-5'-三磷酸、N6-甲基腺苷-5'-三磷酸、O6-甲基鸟苷-5'-三磷酸、假尿苷-5'-三磷酸、嘌呤霉素-5'-三磷酸或黄苷-5'-三磷酸。碱基修饰的核苷酸可以包括5-甲基胞苷-5'-三磷酸、7-脱氮鸟苷-5'-三磷酸、5-溴胞苷-5'-三磷酸和假尿苷-5'-三磷酸、吡啶-4-酮核糖核苷、5-氮杂-尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代-假尿苷、2-硫代-假尿苷、5-羟基尿苷、3-甲基尿苷、5-羧甲基-尿苷、1-羧甲基-假尿苷、5-丙炔基-尿苷、1-丙炔基-假尿苷、5-牛磺酸甲基尿苷、1-牛磺酸甲基-假尿苷、5-牛磺酸甲基-2-硫代-尿苷、1-牛磺酸甲基-4-硫代-尿苷、5-甲基-尿苷、1-甲基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、二氢尿苷、二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代二氢假尿苷、2-甲氧基尿苷、2-甲氧基-4-硫代-尿苷、4-甲氧基-假尿苷和4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、5-氮杂-胞苷、假异胞苷、3-甲基-胞苷、N4-乙酰基胞苷、5-甲酰基胞苷、N4-甲基胞苷、5-羟基甲基胞苷、1-甲基-假异胞苷、吡咯并-胞苷、吡咯并-假异胞苷、2-硫代-胞苷、2-硫代-5-甲基-胞苷、4-硫代-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-假异胞苷、4-硫代-1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、1-甲基-1-脱氮-假异胞苷、zebularine、5-氮杂-zebularine、5-甲基-zebularine、5-氮杂-2-硫代-zebularine、2-硫代-zebularine、2-甲氧基-胞苷、2-甲氧基-5-甲基-胞苷、4-甲氧基-假异胞苷、4-甲氧基-1-甲基-假异胞苷、2-氨基嘌呤、2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-腺嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-腺嘌呤、7-脱氮-2-氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2-氨基嘌呤、7-脱氮-2,6-二氨基嘌呤、7-脱氮-8-氮杂-2,6-二氨基嘌呤、1-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、2-甲硫基-N6-(顺式-羟基异戊烯基)腺苷、N6-甘

氨酰基氨基甲酰基腺苷、N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、N6,N6-二甲基腺苷、7-甲基腺嘌呤、2-甲硫基-腺嘌呤和2-甲氧基-腺嘌呤、肌苷、1-甲基-肌苷、怀俄苷、怀丁苷、7-脱氮-鸟苷、7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、6-硫代-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-鸟苷、6-硫代-7-脱氮-8-氮杂-鸟苷、7-甲基-鸟苷、6-硫代-7-甲基-鸟苷、7-甲基肌苷、6-甲氧基-鸟苷、1-甲基鸟苷、N2-甲基鸟苷、N2,N2-二甲基鸟苷、8-氧代-鸟苷、7-甲基-8-氧代-鸟苷、1-甲基-6-硫代-鸟苷、N2-甲基-6-硫代-鸟苷和N2,N2-二甲基-6-硫代-鸟苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-腺苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-胞苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-鸟苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-尿苷、5'-0-(1-硫代磷酸酯)-假尿苷、6-氮杂-胞苷、2-硫代-胞苷、 $\alpha$ -硫代-胞苷、假-异-胞苷、5-氨基烯丙基-尿苷、5-碘-尿苷、N1-甲基-假尿苷、5,6-二氢尿苷、 $\alpha$ -硫代-尿苷、4-硫代-尿苷、6-氮杂-尿苷、5-羟基-尿苷、脱氧-胸苷、5-甲基-尿苷、吡咯并-胞苷、肌苷、 $\alpha$ -硫代-鸟苷、6-甲基-鸟苷、5-甲基-胞苷、8-氧代-鸟苷、7-脱氮-鸟苷、N1-甲基-腺苷、2-氨基-6-氯-嘌呤、N6-甲基-2-氨基-嘌呤、假-异-胞苷、6-氯-嘌呤、N6-甲基-腺苷、 $\alpha$ -硫代-腺苷、8-叠氮基-腺苷或7-脱氮-腺苷。

[0116] 至少一个修饰的核苷酸和/或至少一个核苷酸类似物可以包括1-甲基腺苷、2-甲基腺苷、N6-甲基腺苷、2'-0-甲基腺苷、2-甲硫基-N6-甲基腺苷、N6-异戊烯基腺苷、2-甲硫基-N6-异戊烯基腺苷、N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、N6-甲基-N6-苏氨酰基氨基甲酰基腺苷、N6-羟基正缬氨酰基氨基甲酰基腺苷、2-甲硫基-N6-羟基正缬氨酰基氨基甲酰基腺苷、肌苷、3-甲基胞苷、2-0-甲基胞苷、2-硫代胞苷、N4-乙酰基胞苷、赖氨酸、1-甲基鸟苷、7-甲基鸟苷、2'-0-甲基鸟苷、嘌呤、环氧嘌呤、7-氰基-7-脱氮鸟苷、7-氨基甲基-7-脱氮鸟苷、假尿苷、二氢尿苷、5-甲基尿苷、2'-0-甲基尿苷、2-硫代尿苷、4-硫代尿苷、5-甲基-2-硫代尿苷、3-(3-氨基-3-羧丙基)尿苷、5'-羟基尿苷、5-甲氧基尿苷、尿苷5-氧基乙酸、尿苷5-氧基乙酸甲酯、5-氨基甲基-2-硫代尿苷、5-甲基氨基甲基尿苷、5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿苷、5-羧甲基氨基甲基-2'-0-甲基尿苷、5-羧甲基氨基甲基-2-硫代尿苷、5-(异戊烯氨基甲基)尿苷、5-(异戊烯氨基甲基)-2-硫代尿苷或5-(异戊烯氨基甲基)-2'-0-甲基尿苷。

[0117] 在一些实施方案中,化学修饰包括假尿苷、N1-甲基假尿苷、N1-乙基假尿苷、2-硫代尿苷、4'-硫代尿苷、5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿苷、2-硫代-1-甲基-1-脱氮-假尿苷、2-硫代-1-甲基-假尿苷、2-硫代-5-氮杂-尿苷、2-硫代-二氢假尿苷、2-硫代-二氢尿苷、2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-2-硫代-假尿苷、4-甲氧基-假尿苷、4-硫代-1-甲基-假尿苷、4-硫代-假尿苷、5-氮杂-尿苷、二氢假尿苷、5-甲氧基尿苷或2'-0-甲基尿苷。在一些实施方案中,修饰包括2'-0-甲基尿苷(2' OMe-rU)、2-0-甲基胞苷(2' OMe-rC)、2'-0-甲基腺苷(2' OMe-rA)或2'-0-甲基鸟苷(2' OMe-rG)。

[0118] gRNA可以包含任何数目的修饰的核苷酸。例如,gRNA分子中被修饰的核苷酸的百分比可以是以下、可以是至少以下、可以是约以下或可以是至少约以下:1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%或75%。

[0119] 作为实例,SEQ ID NO: 3可以被化学修饰为:“g\*a\*u\* UAA UGA CAU ACG CAU UU”

(T被转化为U),其中u = 2' OMe-rU;a = 2' OMe-rA;g = 2' OMe-rG;\* = 硫醇化磷酸酯。在一些实施方案中,LPA gRNA包含化学修饰的SEQ ID NO: 18,例如“g\*a\*u\* UAA UGA CAU ACG CAU UU”,其中u = 2' OMe-rU;a = 2' OMe-rA;g=2' OMe-rG;\* = 硫醇化磷酸酯。

[0120] 在一些实施方案中,gRNA包含以下或由以下组成:GAUUAAGACAUACGCAUUUGUUUUA GAGCUAGAAAUAGCAAGUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU (SEQ ID NO: 32)。gRNA (例如,SEQ ID NO: 32)的一个或多个核苷酸可以是一个或多个修饰的核苷酸,例如gRNA (例如,SEQ ID NO: 32)的一个或多个U可以是2' OMe-rU,gRNA (例如,SEQ ID NO: 32)的一个或多个A可以是2' OMe-rA,gRNA (例如,SEQ ID NO: 32)的一个或多个C可以是2' OMe-rC,并且gRNA (例如,SEQ ID NO: 32)的一个或多个G可以是2' OMe-rG。在gRNA (例如,SEQ ID NO: 32)的一个或多个位置可以被修饰,例如硫醇化磷酸酯。在一些实施方案中,gRNA包含以下或由以下组成:SEQ ID NO: 11的序列:5' - g\*a\*u\* UAA UGA CAU ACG CAU UUG UUU UAG Agc uag aaa uag cAA GUU AAA AUA AGG CUA GUC CGU UAU Caa cuu gaa aaa gug gca ccg agu cgg ugc u\*u\*u-3',其中,u = 2' OMe-rU;a = 2' OMe-rA;c = 2' OMe-rC;g = 2' OMe-rG;\* = 硫醇化磷酸酯。加下划线的序列对应于间隔区。

[0121] 在一些实施方案中,多于一个指导RNA可以与CRISPR/Cas核酸酶系统一起使用。每个指导RNA可以含有不同的靶向序列,使得CRISPR/Cas系统裂解多于一种靶核酸。在一些实施方案中,一个或多个指导RNA可以在Cas9 RNP复合物内具有相同或不同的特性,诸如活性或稳定性。当使用多于一个指导RNA时,每个指导RNA可以在相同或不同的载体上编码。

[0122] 本文描述的gRNA可以体外转录 (IVT)、合成和/或化学合成方法或其组合产生。利用酶促 (IVT)、固相、液相、组合合成方法、小区域合成和连接方法。在一种实施方案中,使用IVT酶促合成方法制备gRNA。通过IVT制备多核苷酸的方法是本领域已知的,并且描述于W02013/151666中。多核苷酸构建体和载体可以用于体外转录本文描述的gRNA。

#### [0123] 编辑LPA的方法

本文提供的内容包括一种使用基因组编辑来通过功能性敲除或降低细胞基因组中LPA基因的表达来编辑LPA的方法。该方法可以用于治疗患有脂蛋白相关疾病或紊乱的受试者,例如患有心血管疾病的患者。在一些实施方案中,该方法包括向受试者(例如,灵长类受试者)施用与(a)指导RNA (gRNA)或编码靶向LPA基因的gRNA的核酸和(b)编码RNA指导的内切核酸酶的核酸复合的多于一个纳米颗粒,从而治疗灵长类受试者的心血管疾病。

[0124] 可以向受试者施用多于一个纳米颗粒两次或更多次,例如两次,用于治疗。纳米颗粒向受试者的两次施用可以间隔合适的时间段,例如一周、两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周、三个月、四个月、五个月、六个月、一年、十八个月、两年、三年、五年、十年、十五年或更长时间。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的两次间隔约两周至约两个月,例如约三周。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的每两次间隔约两周至约两个月,例如约三周。两次施用之间的合适的时间段可以与另两次施用之间的合适的时间段相同或不同。在一些实施方案中,本文描述的方法包括在提供的时间段内,例如一年、两年、三年、五年、六年、八年、十年、十五年、二十年或更长时间向受试者施用单剂量的多于一个纳米颗粒。在一些实施方案中,本文描述的方法包括在受试者的一生中向受试者施用单剂量的多于一个纳米颗粒。在一些实施方案中,本文描述的方法包括向受试者施用单剂量的多于一个纳米

颗粒。在一些实施方案中,多于一个纳米颗粒以每次施用约0.01-5 mg/kg,例如0.05-2 mg/kg、0.5-3 mg/kg或0.1-1 mg/kg gRNA的剂量向受试者施用。在一些实施方案中,多于一个纳米颗粒以每次施用约0.01-5 mg/kg,例如0.05-2 mg/kg、0.5-3 mg/kg或0.1-1 mg/kg总核酸(即,LPA gRNA和编码RNA指导的内切核酸酶的RNA(例如Cas9 mRNA)的总和)的剂量向受试者施用。

[0125] 在一些实施方案中,gRNA靶向LPA基因中的编码序列内或附近。在一些实施方案中,gRNA靶向LPA基因的外显子中的任何一个。在一些实施方案中,gRNA靶向LPA基因的外显子3内的序列。gRNA可以包含与LPA基因的外显子3内的靶序列互补的间隔区序列。在一些实施方案中,一个或多个间隔区与LPA基因的外显子3内或附近(例如,在距离外显子3以下距离中的任何一个内:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多个碱基)的序列互补。gRNA的间隔区与LPA基因中的靶序列之间的互补性可以是完全的或不完全的。在一些实施方案中,互补性可以是至少70%、80%、90%、100%或者这些值中的任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,互补性是完全的,即100%。

[0126] 在一些实施方案中,gRNA包含来自SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列或与SEQ ID NO: 18-25中任何一个具有至少以下或至少约以下同源性的序列:80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,gRNA包含来自SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列或相对于SEQ ID NO: 18-25中任何一个具有一个、两个或三个错配的序列。

[0127] 在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 11的序列或与SEQ ID NO: 11具有约以下、至少以下或至少约以下序列同源性的序列:80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 11的序列。

[0128] 本文使用的gRNA可以增强中靶活性,同时显著降低潜在的脱靶效应(即,在LPA基因以外的不期望位置处裂解基因组DNA)。在一些实施方案中,脱靶结合被降低约以下、至少以下或至少约以下:80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%。

[0129] RNA指导的内切核酸酶可以是本文描述或本领域已知的Cas内切核酸酶。Cas内切核酸酶可以是天然存在的或非天然存在的(例如,重组的或具有突变的)。在一些实施方案中,Cas内切核酸酶是Cas9内切核酸酶或其变体。在一些实施方案中,DNA内切核酸酶选自自由以下组成的组:Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas100、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4或Cpf1内切核酸酶或其功能衍生物。在一些实施方案中,DNA内切核酸酶是Cas9内切核酸酶或其变体。在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶来自化脓性链球菌(SpyCas9)。在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶来自路邓葡萄球菌(SluCas9)。

[0130] 在一些实施方案中,LPA基因的遗传修饰导致受试者(例如哺乳动物、NHP、人类受试者)中血液或血浆Lp(a)水平显著降低。在一些实施方案中,血浆Lp(a)水平被降低20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、

78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或这些值中的任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,血浆Lp(a)水平的降低是约以下、至少以下或至少约以下:50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%、99%、100%或这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0131] 在一些实施方案中,与对应的未修饰的哺乳动物相比,遗传修饰的受试者(例如哺乳动物、NHP、人类受试者)中的血浆Lp(a)水平是约以下、小于以下或小于约以下:20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%、60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、100%或这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0132] 在一些实施方案中,降低是相对于施用多于一个纳米颗粒之前受试者(例如,哺乳动物、NHP、人类受试者)的血浆中的LPA表达或LPA蛋白的浓度。在一些实施方案中,降低是相对于一个或更多个未治疗的受试者中的LPA表达或LPA蛋白的浓度。在一些实施方案中,降低是相对于健康和/或未修饰的受试者的LPA表达或LPA蛋白的浓度的参考水平。

[0133] 在一些实施方案中,实施该方法后的血浆Lp(a)水平被降低至约50 mg/dL或更低(例如,约以下、至多以下或至多约以下:40 mg/dL、30 mg/dL、20 mg/dL或更低)。在一些实施方案中,实施该方法后的血浆Lp(a)水平被降低至约40 mg/dL或更低。在一些实施方案中,实施该方法后的血浆Lp(a)水平被降低至约30 mg/dL或更低。在一些实施方案中,实施该方法后的血浆Lp(a)水平被降低至约20 mg/dL或更低。

#### [0134] 药物组合物和治疗应用

本文提供的内容还包括用于实施本文公开的方法的药物组合物。组合物可以包含本文描述的一个或更多个gRNA、RNA指导的内切核酸酶或编码RNA指导的内切核酸酶的核苷酸序列。在一些实施方案中,组合物还可以包含待插入的多核苷酸(例如,供体模板)以实现本文公开的期望的遗传修饰方法。

[0135] 在一些实施方案中,一个或更多个gRNA各自包含与LPA基因的外显子3内或附近(例如,在距离LPA基因的外显子3以下距离中的任何一个内:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100个或更多个碱基)的基因组序列互补的间隔区。gRNA可以包含与LPA基因的外显子3内的靶序列互补的间隔区序列。在一些实施方案中,本文方法中使用的gRNA包含SEQ ID NO: 18-25中任何一个的间隔区序列。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 18的间隔区序列或与SEQ ID NO: 18的序列具有至少85%同源性的序列。在一些实施方案中,gRNA包含SEQ ID NO: 11的序列或与SEQ ID NO: 11的序列具有至少85%同源性的序列。

[0136] 在一些实施方案中,RNA指导的内切核酸酶选自Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas100、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4和Cpf1内切核酸酶或其功能衍生物。在一些实施方案中,DNA内切核酸酶是Cas9。在一些实施方案中,Cas9内切核酸酶来自化脓性链球菌(SpyCas9)。在一些实施方案中,Cas9内切核酸

酶来自路邓葡萄球菌 (SluCas9)。在一些实施方案中,转录为编码DNA内切核酸酶的核酸的DNA序列是密码子优化的。在一些实施方案中,编码DNA内切核酸酶的核酸包含5'帽结构和3'多(A)尾。在一些实施方案中,编码DNA内切核酸酶的核酸经由共价键与gRNA连接。

[0137] 在一些实施方案中,核酸序列和/或多肽中的一个或多个可以经由基于病毒或基于非病毒的递送系统在体外或体内递送至细胞,所述递送系统包括腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、疱疹病毒载体、纳米颗粒、脂质体、脂质纳米颗粒、痘病毒、裸DNA施用、质粒、黏粒、噬菌体、包封细胞技术等。

[0138] 在一些实施方案中,本文公开的组合物中的化合物(例如,LPA gRNA和编码RNA指导的内切核酸酶的核酸)可以配制在脂质体或脂质纳米颗粒中。在一些实施方案中,组合物中的化合物被配制在脂质纳米颗粒(LNP)中。术语“脂质纳米颗粒”是指由具有以纳米(例如,1-5,000 nm)测量的尺寸的脂质构成的纳米级颗粒。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒中包含的脂质包括阳离子脂质和/或可电离脂质。本领域已知的任何合适的阳离子脂质和/或可电离脂质可以用于配制用于将gRNA和Cas内切核酸酶递送至细胞的LNP。示例性阳离子脂质包括一个或多个带正电荷的胺基团。在一些实施方案中,阳离子脂质是可电离的,使得它们可以根据pH以带正电荷或中性形式存在。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒的阳离子脂质包含在低pH显示正电荷的可质子化叔胺头基基团。脂质纳米颗粒还可以包含一种或更多种中性脂质、带电荷的脂质、类固醇和聚合物缀合的脂质。

[0139] 在一些实施方案中,脂质纳米颗粒可以具有约以下、至少以下、至少约以下、至多以下或至多约以下的平均直径:30 nm、40 nm、50 nm、60 nm、70 nm、80 nm、90 nm、100 nm、110 nm、120 nm、130 nm、140 nm、150 nm或这些值中的任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,脂质纳米颗粒粒度是直径约50至约100 nm、或直径约70至约90 nm、或直径约55至约95 nm。在一些实施方案中,多于一个纳米颗粒以每次施用约0.1-5 mg/kg(通过总核酸(例如,LPA gRNA和Cas9 mRNA的总和)确定)的剂量向受试者施用,包括0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg、1.6 mg/kg、1.7 mg/kg、1.8 mg/kg、1.9 mg/kg、2 mg/kg、2.1 mg/kg、2.2 mg/kg、2.3 mg/kg、2.4 mg/kg、2.5 mg/kg、2.6 mg/kg、2.7 mg/kg、2.8 mg/kg、2.9 mg/kg、3 mg/kg、3.5 mg/kg、4 mg/kg、4.5 mg/kg或5 mg/kg或者这些值中的任何两个之间的数字或范围。在一些实施方案中,将多于一个纳米颗粒以以下剂量或约以下剂量向受试者施用:0.1 mg/kg、0.2 mg/kg、0.3 mg/kg、0.4 mg/kg、0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、0.7 mg/kg、0.8 mg/kg、0.9 mg/kg、1 mg/kg、1.1 mg/kg、1.2 mg/kg、1.3 mg/kg、1.4 mg/kg、1.5 mg/kg、2 mg/kg、2.5 mg/kg或3.0 mg/kg(在一些实施方案中,通过LPA gRNA和SpCas9 mRNA的总和确定)。

[0140] 在一些实施方案中,本文描述的组合物中的化合物被包封在脂质纳米颗粒的脂质部分或被脂质纳米颗粒的脂质部分的一些或全部包封的水性空间中。包封可以是完全包封、部分包封或两者。在一些实施方案中,核酸和/或多肽被完全包封在脂质纳米颗粒中。

[0141] 在一些实施方案中,本文描述的一种或更多种化合物经由共价键或非共价键与脂质体或脂质纳米颗粒缔合。在一些实施方案中,组合物中的任何化合物可以单独或一起包含在脂质体或脂质纳米颗粒中。

[0142] 在一些实施方案中,以上描述的组合物还可以具有一种或更多种另外的试剂,其

中这样的另外的试剂选自缓冲液、用于将多肽或多核苷酸引入到细胞中的缓冲液、洗涤缓冲液、对照试剂、对照载体、对照RNA多核苷酸、用于从DNA体外产生多肽的试剂、用于测序的衔接子等。缓冲液可以是稳定缓冲液、重构缓冲液、稀释缓冲液等。在一些实施方案中,组合物还可以包含可以用于促进或增强内切核酸酶对DNA的中靶结合或裂解或者改进靶向的特异性的一种或更多种组分。

[0143] 在一些实施方案中,组合物的任何组分与药学上可接受的赋形剂诸如载体、溶剂、稳定剂、辅剂、稀释剂等一起配制,这取决于具体的施用模式和剂型。在实施方案中,通常配制指导RNA组合物以实现生理上相容的pH,并且范围为约3的pH至约11的pH、约3的pH至约7的pH,这取决于制剂和施用途径。在一些实施方案中,将pH调整至约pH 5.0至约pH 8的范围。

[0144] 合适的赋形剂可以包括例如载体分子,所述载体分子包括大的、缓慢代谢的大分子,诸如蛋白、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氨基酸、氨基酸共聚物和无活性病毒颗粒。其他示例性赋形剂包括抗氧化剂(例如但不限于抗坏血酸)、螯合剂(例如但不限于EDTA)、糖类(例如但不限于糊精、羟烷基纤维素和羟烷基甲基纤维素)、硬脂酸、液体(例如但不限于油、水、盐水、甘油和乙醇)、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。

[0145] 生理上可耐受的载体是本领域熟知的。示例性液体载体是除了活性成分和水之外不含任何物质的无菌水性溶液,或含有缓冲液诸如在生理pH值的磷酸钠、生理盐水或两者,诸如磷酸盐缓冲盐水。水性载体可以包含多于一种缓冲盐,以及盐(诸如氯化钠和氯化钾)、右旋糖、聚乙二醇和其他溶质。液体组合物还可以除水之外包含液相以及不包含水而包含液相。这样的另外液相的实例是甘油、植物油诸如棉籽油和水-油乳液。在有效治疗特定紊乱或状况的细胞组合物中使用的活性化合物的量将取决于紊乱或状况的性质,并且可以通过标准临床技术来确定。

[0146] 在一些实施方案中,组合物的本文描述的化合物(例如,RNA指导的内切核酸酶或编码RNA指导的内切核酸酶和/或gRNA的核酸)可以经由转染递送,诸如磷酸钙转染、DEAE-右旋糖酐介导的转染、阳离子脂质介导的转染、电穿孔、电核转运、化学转导、电转导、Lipofectamine介导的转染、Effectene介导的转染、脂质纳米颗粒(LNP)介导的转染或其任何组合。在一些实施方案中,使用脂质纳米颗粒经由脂质介导的转染将组合物引入至细胞。

[0147] 本文描述的组合物可以向有相应需要的受试者施用以治疗心血管疾病或降低发展心血管疾病的风险。因此,本公开内容还提供了用于通过编辑受试者的LPA基因来治疗患者的心血管疾病或降低受试者发展心血管疾病的风险的基因疗法方法。在一些实施方案中,基因疗法方法在患者中的相关细胞类型的基因组中功能性敲除LPA基因。受试者中相关细胞(例如肝细胞)的LPA基因使用本文描述的材料和方法来编辑,所述材料和方法使用RNA指导的内切核酸酶(诸如Cas9)从基因组中永久地缺失、插入、编辑、校正或置换靶序列或插入外源序列,从而功能性敲除LPA基因。这可以通过永久地降低血液中的Lp(a)水平来提供对心血管疾病的永久治愈。

[0148] 在一些实施方案中,公开了一种用于治疗有相应需要的受试者(例如灵长类受试者)的心血管疾病或紊乱的方法。该方法可以包括向灵长类受试者施用与(a)指导RNA(gRNA)或编码靶向LPA基因的gRNA的核酸和(b)编码RNA指导的内切核酸酶的核酸复合的多于一个纳米颗粒,从而缓解灵长类受试者的心血管疾病或紊乱。可以向受试者施用多于一

个纳米颗粒两次或更多次,例如两次,用于治疗。纳米颗粒向受试者的两次施用可以间隔合适的时间段。在一些实施方案中,合适的时间段是以下或是约以下:一周、两周、三周、四周、五周、六周、七周、八周、三个月、四个月、五个月、六个月、一年、两年、三年或更长时间。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的两次间隔约两周至约两个月,例如约三周。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的每两次间隔约两周至约两个月,例如约三周。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的两次间隔约一个月至约四个月,例如约两个月或三个月,或更长时间。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的每两次间隔约一个月至约四个月,例如约两个月或三个月。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的两次间隔至少两个月或三个月。在一些实施方案中,两次或更多次施用中的每两次间隔至少两个月或三个月。在一些实施方案中,接受本文描述组合物的单次施用的受试者中的Lp(a)水平可以被显著降低(例如,降低至少20%、30%、40%、50%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高),并且在施用之后保持在降低的水平持续至少两个月、三个月、四个月、六个月、十个月、一年、十八个月、两年、三年、四年、五年、十年、十五年、二十年或更长时间。两次施用之间的合适的时间段可以与另两次施用之间的合适的时间段相同或不同。在一些实施方案中,将多于一个纳米颗粒以每次施用约0.1-5 mg/kg的总RNA(例如,LPA gRNA和Cas9 mRNA),例如0.5-3 mg/kg的总RNA的剂量向受试者施用。在一些实施方案中,LPA gRNA或编码LPA gRNA的核酸以每次施用以下的剂量或约以下的剂量向受试者施用:0.1-5 mg/kg、例如0.1 mg/kg至5 mg/kg gRNA。在一些实施方案中,编码RNA指导的内切核酸酶的核酸以每次施用以下的剂量或约以下的剂量向受试者施用:0.1-5 mg/kg gRNA,例如0.5-3 mg/kg gRNA。对于向受试者的每次施用,剂量可以相同或不同。在一些实施方案中,将多于一个纳米颗粒以每次施用约0.02至约1 mg/mL的总RNA(例如,LPA gRNA和Cas9 mRNA的总和),例如约0.1至0.6 mg/mL的总RNA的剂量向受试者施用。在一些实施方案中,本文公开的方法包括向受试者单次施用多于一个纳米颗粒。例如,多于一个纳米颗粒可以以单次施用约0.5 mg/kg、0.6 mg/kg、1 mg/kg、1.5 mg/kg、2.0 mg/kg、2.5 mg/kg或3.0 mg/kg RNA含量的(a) LPA gRNA或编码LPA gRNA的核酸和(b) 编码RNA指导的内切核酸酶的核酸的剂量向受试者施用。如本文所述,单次施用治疗可以对受试者有效,并且因此受试者不需要任何另外的随后治疗。例如,在一些实施方案中,受试者在三个月、四个月、五个月、六个月、一年、两年、三年、四年、五年、六年、七年、八年、九年、十年、十五年、二十年、二十五年、三十年、三十五年、四十年、五十年、六十年或更长时间或这些值中的任何两个之间的数字或范围的时间段内接受一次多于一个纳米颗粒的单次施用。

[0149] 在一些实施方案中,用于本文描述的组合物和方法的靶组织是肝组织。在一些实施方案中,用于本文描述的组合物和方法的靶细胞是肝细胞。

[0150] 在一些实施方案中,药物组合物可以通过以下施用:气雾剂递送、鼻递送、阴道递送、直肠递送、含服递送、眼部递送、局部递送、表面递送、脑池内递送、腹膜内递送、口服递送、肌肉注射、静脉内注射、皮下注射、结节内注射、肿瘤内注射、腹膜内注射和/或皮内注射或其任何组合。施用可以是局部的或全身的。全身施用包括肠内和肠胃外施用。在一些实施方案中,可以采用多于一次施用以在各种间隔(例如,每天、每周、每月或每年)的时间段内实现期望的基因表达水平。

[0151] 药物组合物可以以药学有效量向有相应需要的受试者施用。如本文使用的,术语

“药学有效量”意指将引起组织、系统、动物或人类的期望的治疗效果和/或生物学或医学响应的药物组合物的量。施用可以导致Lp(a)基因表达的期望的降低,诸如Lp(a)的血浆水平的期望的降低。

[0152] 如本文使用的,术语“心血管疾病”是指心脏和血管的紊乱,并且包括动脉、静脉、小动脉、小静脉和毛细血管的紊乱。在一些实施方案中,心血管疾病是中风、心肌梗塞、动脉粥样硬化、家族性高胆固醇血症、动脉粥样硬化、血栓形成、钙化性主动脉瓣疾病、冠状动脉疾病、外周动脉疾病、脑血管疾病、肾动脉狭窄、主动脉瘤、心肌病、高血压性心脏病、心力衰竭、肺心病、先天性心脏病或风湿性心脏病。在一些实施方案中,本文描述的方法和组合物可以用于治疗钙化性主动脉瓣疾病、心肌梗塞、冠心病、动脉粥样硬化、血栓形成、中风或其组合。

[0153] 在一些实施方案中,受试者具有影响心脏、脑、一条或两条腿、骨盆、一个或两个手臂和/或肩部的心血管紊乱症状中的一种或更多种。影响心脏的心血管紊乱的症状包括但不限于胸痛、胸部不适和一个或两个手臂、一个或两个肩膀、颈部、下颌或背部的疼痛、呼吸急促、头晕、心跳加快、恶心、心跳异常、疲劳和/或心肌梗塞。影响脑的心血管紊乱的症状包括但不限于面部、一个或两个手臂或一条或两条腿的突然麻木或无力、突然的错乱或语言或理解言语的困难、单眼或双眼突然难以视物、突然头晕,走路困难或失去平衡或协调和/或无已知原因的突然剧烈头痛。影响一条或两条腿、骨盆、一个或两个手臂和/或肩部的心血管疾病的症状包括但不限于肌肉疼痛、肌肉痉挛、一只或两只脚和/或脚趾、一只或两只手和/或手指的冷感和/或一只或两只脚和/或脚趾、一只或两只手和/或手指的麻木或无力。

[0154] 在一些实施方案中,需要治疗的受试者可以具有异常水平(高于或低于健康个体中的水平)的总胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白、低密度脂蛋白、具有差异的全血细胞计数、Lp(a)、载脂蛋白B、高半胱氨酸、血红蛋白A1c、空腹葡萄糖、胰岛素、肌酸激酶、丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸转氨酶、血纤蛋白原(fibrinogen)、甲状腺刺激激素、超灵敏的C反应蛋白、尿白蛋白肌酐比值、MPO、维生素D、三甲胺N-氧化物、氨基末端、前脑利钠肽(pro-brain natriuretic peptide)、血清肌酐、全局风险评分或其组合。

[0155] 在一些实施方案中,受试者可能已经用类固醇和/或抗组胺药物预处理。例如,受试者可能已经用地塞米松、法莫替丁、苯海拉明或其组合预处理。预处理可以在施用之前约以下、至少以下、至少约以下、至多以下或至多约以下进行:30分钟、1小时、2小时、4小时、8小时、16小时、1天、2天、5天、10天。

[0156] 在一些实施方案中,该方法还包括鉴定需要治疗的受试者。在一些实施方案中,该方法还包括在施用之前、期间和/或之后测量灵长类受试者中Lp(a)的血液水平。

[0157] 在一些实施方案中,受试者在施用之前具有高水平的Lp(a)(例如,血浆Lp(a))。具有高水平Lp(a)的受试者可以包括例如具有Lp(a)水平大于90%的人类群体的受试者。在一些实施方案中,受试者具有心血管疾病的症状。在一些实施方案中,受试者不具有心血管疾病的症状。在一些实施方案中,受试者处于发展心血管疾病的风险中。在一些实施方案中,受试者疑似患有或发展心血管疾病。

[0158] 在一些实施方案中,受试者在施用之前具有超过约30 mg/dL的血浆Lp(a)水平(诸如超过约以下的任何一个:40 mg/dL、50 mg/dL、60 mg/dL、70 mg/dL、80 mg/dL、100 mg/

dL、125 mg/dL、150 mg/dL、175 mg/dL、200 mg/dL、225 mg/dL、250 mg/dL、275 mg/dL、300 mg/dL或更大)。在一些实施方案中,需要治疗的受试者具有大于50 mg/dL的血浆Lp(a)水平。在一些实施方案中,受试者在施用之前具有超过约30 mg/dL的血浆Lp(a)水平(诸如超过约以下的任何一个:100 nmol/L、125 nmol/L、150 nmol/L、175 nmol/L、200 nmol/L、225 nmol/L、250 nmol/L、275 nmol/L、300 nmol/L、350 nmol/L、400 nmol/L或更大)。在一些实施方案中,受试者在内源LPA基因或其调节序列中具有一个或更多个遗传标志物(例如,缺失、插入和/或突变),使得与正常健康受试者相比,apo(a)蛋白的活性(包括表达水平或功能)显著增加。

[0159] 在一些实施方案中,需要治疗的受试者是具有高水平Lp(a)(如定义为Lp(a)水平高于90%的人群(例如,高于60 mg/dL))和脂蛋白相关疾病(例如,心血管疾病)症状的患者。在一些实施方案中,受试者可以是疑似患有脂蛋白相关疾病的人类。可选地,受试者可以是由于存在超过60 mg/dL或70 mg/dL或80 mg/dL或100 mg/dL或200 mg/dL或300 mg/dL的Lp(a)水平而被诊断为具有脂蛋白相关疾病风险的人类。在一些实施方案中,需要治疗的受试者可以具有与脂蛋白相关疾病风险增加和/或Lp(a)表达增加相关的LPA基因变体。在一些实施方案中,受试者是哺乳动物。在一些实施方案中,受试者是灵长类动物。在一些实施方案中,受试者是人类。

[0160] 本文描述的方法和组合物可以降低血浆低密度脂蛋白(LDL)水平,诸如血浆Lp(a)水平,因此降低心血管疾病的风险,诸如心脏病发作、中风、血凝块、静脉中的脂肪堆积和其他冠状动脉疾病的风险,与心血管事件相关的死亡可能性,或其组合。在一些实施方案中,本文描述的方法和组合物可以减轻或缓解心血管疾病的一种或更多种症状。

[0161] 在一些实施方案中,实施该方法后,受试者中的血浆Lp(a)水平被降低至约50 mg/dL或更低(例如,约以下、至多以下或至多约以下:40 mg/dL、30 mg/dL、20 mg/dL或更低)。在一些实施方案中,实施该方法后,受试者中的血浆Lp(a)水平被降低至约40 mg/dL或更低。在一些实施方案中,实施该方法后,受试者中的血浆Lp(a)水平被降低至约30 mg/dL或更低。在一些实施方案中,实施该方法后,受试者中的血浆Lp(a)水平被降低至约20 mg/dL或更低。

[0162] 在一些实施方案中,实施该方法后,受试者中的血浆Lp(a)水平被降低约以下、至少以下或至少约以下:50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0163] 在一些实施方案中,实施该方法后,受试者中的血浆LDL水平被降低约以下、至少以下或至少约以下:25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或这些值中的任何两个之间的数字或范围。

[0164] 本文提供的内容还包括用于实施本文描述方法的试剂盒。试剂盒可以包括靶向基因组的核酸(例如,靶向LPA基因的gRNA)和RNA指导的内切核酸酶(例如,Cas9)或编码RNA指导的内切核酸酶的核酸。在任何以上试剂盒中,试剂盒还可以包括待插入以实现期望的遗传修饰的多核苷酸(例如,供体模板)。试剂盒的组分可以在单独的容器中,或组合在单个容器中。

[0165] 以上描述的任何试剂盒还可以包括一种或更多种选自以下的另外的试剂:缓冲液、用于将多肽或多核苷酸引入到细胞中的缓冲液、洗涤缓冲液、对照试剂、对照载体、对照

RNA多核苷酸、用于从DNA体外产生多肽的试剂、用于测序的衔接子等。缓冲液可以是稳定缓冲液、重构缓冲液、稀释缓冲液等。试剂盒还可以包括可以用于促进或增强内切核酸酶对DNA的中靶结合或裂解或者改进靶向的特异性的一种或更多种组分。

[0166] 在一些实施方案中,试剂盒还可以包括用于使用试剂盒的组分实施本文描述方法的使用说明。用于实施方法的使用说明通常记录在合适的记录介质上。例如,使用说明可以被印刷在基底上,诸如纸或塑料等。使用说明可以作为包装插入物存在于试剂盒中,存在于试剂盒或其组分的容器的标签中(即,与包装或子包装相关联)等。使用说明可以作为存在于合适的计算机可读存储介质(例如CD-ROM、软盘、闪存驱动器等)上的电子存储数据文件存在。在一些情况下,试剂盒中不存在实际的使用说明,但是可以提供用于从远程资源(例如,经由互联网)获得使用说明的手段。该实施方案的实例是包括网址的试剂盒,在该网址处可以查看使用说明和/或从该网址处可以下载使用说明。与使用说明一样,用于获得使用说明的这种手段可以被记录在合适的基底上。

#### [0167] 实施例

上文讨论的实施方案的一些方面在以下实施例中进一步详细公开,这些实施例并不以任何方式意图限制本公开内容的范围。

#### [0168] 实施例1

##### 靶向LPA的gRNA间隔区的体外验证

评价gRNA影响靶向裂解的能力。本文表1中描述的间隔区序列通过体外转录合成(IVT gRNA),并且在使用转染到工程化为组成型表达SpCas9核酸酶的人类胚胎肾(HEK)细胞系的系统中进行评价。对于每个gRNA的中靶位点处的裂解效率,使用TIDES方案(Brinkman, E. K.等人(2014). *Nucleic Acids Research*, 42(22):e168)测量,其中使用位于预测的裂解位点侧翼的PCR引物从处理的细胞扩增基因组DNA,随后对PCR产物进行Sanger测序。当在细胞的基因组中产生双链断裂时,细胞尝试修复双链断裂。该修复过程易错,这可以导致双链断裂位点处核苷酸的缺失或插入。因为完全修复的断裂被Cas9核酸酶重新裂解,而核苷酸的插入或缺失将阻止Cas9裂解,所以将存在代表切割效率的插入和缺失的累积。然后使用计算机算法分析测序色谱数据,所述计算机算法计算在预测的裂解位点处插入或缺失碱基的频率。使用插入或缺失碱基(插入/缺失(INDEL))的频率来计算总裂解频率。然而,由于一些kringle IV区的重复性质,PCR扩增是不可能的。对于这些指导RNA靶,不能使用该方法测定插入/缺失。来自HEK细胞中IVT gRNA实验的结果显示在表3中,其中根据其观察到的切割效率对gRNA进行排序。在表3中,Y = 100%与食蟹猴(*Macaca fascicularis*)匹配。

[0169]

| 表 3: 靶向 LPA 基因的指导 RNA 分子在 HEK 细胞中的裂解效率 |       |        |            |
|----------------------------------------|-------|--------|------------|
| 指导                                     | 基因区域  | NHP 匹配 | 插入/缺失频率(%) |
| T4                                     | 外显子 3 | Y      | 1.7        |
| T1 (T5513)                             | 外显子 3 | Y      | 6.1        |
| T2 (T13789)                            | 外显子 3 | Y      | 2.4        |
| T10762                                 | 外显子 3 | -      | 1.9        |
| T3893                                  | 外显子 3 | -      | 2.2        |
| T3894                                  | 外显子 3 | -      | 1.9        |
| T14467                                 | 外显子 3 | -      | 1.5        |
| T5 (T1530)                             | 外显子 3 | Y      | 0.9        |

#### [0170] 实施例2

### 非人灵长类动物 (NHP) 中LPA基因编辑效率的评价

本实施例通过测量治疗之前和之后的血浆Lp(a)水平来评价NHP中的LPA基因编辑效率。

[0171] 针对LPA基因中的SNP预筛选NHP,并测量Lp(a)血浆基础水平。选择T4 gRNA (SEQ ID NO: 3)以匹配NHP的LPA基因。使用脂质纳米颗粒(LNP)递送媒介物将Cas9 mRNA和T4 gRNA分子递送至NHP。根据图2中示出的研究设计,将包封gRNA分子和Cas9 mRNA的LNP注射到NHP中。具体地,向每个NHP注射2剂量的包封在Gen3 LNP中的RNA097 Cas9 mRNA(假尿苷修饰的)和T4 gRNA(第4组)或1剂量的包封在Gen3 LNP中的RNA010 Cas9 mRNA(N-甲基假尿苷修饰的)和T4 gRNA(第5组)。在治疗之前和之后收集血浆样品并监测血浆Lp(a)水平。使用夹心酶联免疫吸附测定(ELISA)检测收集的血浆中Lp(a)蛋白的浓度。观察到有效的编辑,包括以2 mg/kg剂量的约50%的肝编辑。

[0172] 图3A-图3B是示出第4组NHP(图3A)和第5组NHP(图3B)的血浆Lp(a)水平的两个图。图4A-图4B是示出第4组NHP(图4A)和第5组NHP(图4B)的血浆Lp(a)从基线的改变百分比的两个图。

[0173] 结果显示,使用T4 gRNA和Cas9 mRNA显著减少NHP血浆Lp(a)水平。在第4组中观察到从基线减少66%和87%,并且在第5组中观察到75%和86%。

#### [0174] 实施例3

##### LPA gRNA制剂的毒性研究

在本实施例中,在NHP中实施毒性研究。将包封SEQ ID NO: 3的gRNA分子(T4 gRNA)和Cas9 mRNA的脂质纳米颗粒配制为LPA gRNA制剂,称为“CTX320”。将CTX320制剂分别以0.5 mg/kg、1.5 mg/kg和3.0 mg/kg的剂量水平以单剂量施用到三组NHP(例如食蟹猴)中。血浆Lp(a)蛋白水平使用Mercodia ELISA测定来测量。图5描绘了非限制性示例性实验设计。

[0175] 图6是示出治疗之前14天(第-14天)NHP血浆中的基线Lp(a)水平的图。由于Kringl IV-2重复序列的数目,单独NHP之间的基线值不同。

[0176] 图7描绘了非限制性示例性NHP研究设计。在治疗之前7天和治疗之后8天、15天和29天测量血浆Lp(a)蛋白水平。

[0177] 图8A是示出与对照组相比在用三种不同剂量的CTX320治疗之后NHP的血浆Lp(a)蛋白水平从基线的改变百分比的图:0.5 mg/kg、1.5 mg/kg和3 mg/kg。图8B是示出与对照组相比在用三种不同剂量的CTX320治疗之后NHP的血清Lp(a)蛋白水平从基线的改变百分比的图:0.5 mg/kg、1.5 mg/kg和3 mg/kg。数据显示CTX320给药之后血浆和血清Lp(a)蛋白的剂量依赖性降低。在用1.5 mg/kg CTX320治疗的NHP中观察到Lp(a)蛋白从基线的约66%降低,并且在用3.0 mg/kg CTX320治疗的NHP中观察到Lp(a)蛋白的约92%降低。用0.5 mg/kg CTX320给药未观察到血浆Lp(a)蛋白显著降低。

[0178] 图9A-图9C是示出用三种不同剂量的CTX320治疗之前和之后NHP的血浆Lp(a)蛋白水平的图:0.5 mg/kg(图9A)、1.5 mg/kg(图9B)和3.0 mg/kg(图9C)。图9D示出了CTX320治疗之后第29天NHP的血浆Lp(a)水平从基线的改变百分比。在用1.5 mg/kg和3 mg/kg CTX320制剂治疗的NHP中观察到血浆Lp(a)水平从基线的平均50%降低或更多。

[0179] 在CTX320治疗后,还对NHP实施血清测试,包括肝功能测试、血浆脂质水平(例如甘

油三酯、HDL、LDL和总胆固醇)、肾功能测试(例如血尿素氮、肌酐、葡萄糖和钙)、损伤的标志物(例如乳酸脱氢酶(LDH)、 $\gamma$ 谷氨酰转移酶和c反应蛋白(CRP))、白细胞、电解质组、红细胞指数、凝血谱和尿液测试。数据(未示出)显示,肝酶和总胆红素的瞬时剂量依赖性增加在治疗后约2-4天时达到峰值,并到第15天恢复至基线。LDH和CRP的瞬时升高在第2天时达到峰值,并到第7天恢复至基线。在CTX320治疗后,NHP的体重也保持稳定。数据还表明,3 mg/kg CTX320制剂不改变胆固醇水平,并诱导甘油三酯和LDL水平在治疗后第2-4天时达到峰值的瞬时增加,以及在治疗后第4天HDL水平急剧下降。此外,发现用CTX320治疗不改变肾标志物(包括血尿素氮和肌酐)的功能。

#### [0180] 实施例4

##### LPA gRNA制剂的功效评价和毒性研究

本实施例报告了实施例3的CTX320制剂的另一个非限制性示例性功效和毒性评价。

[0181] 根据图5的实验设计,将CTX320制剂分别以0.5 mg/kg、1.5 mg/kg和3.0 mg/kg的剂量水平以单剂量施用到三组NHP(例如食蟹猴)中。在整个研究中,血浆Lp(a)蛋白水平使用Mercodia ELISA测定测量。将动物在治疗后第85天处死。

[0182] 图10A是示出与对照组相比在用三种不同剂量的CTX320治疗之后NHP的血清Lp(a)蛋白水平从基线的改变百分比的图:0.5 mg/kg、1.5 mg/kg和3 mg/kg。数据显示CTX320给药之后血浆和血清Lp(a)蛋白的剂量依赖性降低。在用1.5 mg/kg CTX320治疗的NHP中观察到Lp(a)蛋白从基线的约78%降低,并且在用3.0 mg/kg CTX320治疗的NHP中观察到Lp(a)蛋白的约90%降低。用0.5 mg/kg CTX320给药观察到血浆Lp(a)蛋白的约19%降低。如图10A中示出的,CTX320的单剂量导致Lp(a)的持续降低,并且Lp(a)水平的显著降低以中等剂量和高剂量在研究持续期间持续。

[0183] 图10B示出了在约3个月的CTX320治疗之后NHP的血浆Lp(a)水平从基线的改变百分比。在用1.5 mg/kg和3 mg/kg CTX320制剂治疗的NHP中观察到Lp(a)水平从基线的显著降低。结果显示,即使以中等剂量和高剂量治疗后3个月之后,单剂量的CTX320也可以导致Lp(a)从基线的持续降低。

[0184] 图11是示出肝和其他器官组织(包括脾、肾上腺、脑、肾、肺、附睾、睾丸和卵巢)中LPA基因编辑的百分比的图。结果显示,肝是LPA基因编辑的主要器官,而在CTX320治疗约3个月之后,在脾中仅观察到约0.1%-5%的LPA基因编辑。另外地,在治疗后85天在肝中也观察到剂量依赖性编辑。分别用1.5 mg/kg CTX320和3 mg/kg CTX320治疗后观察到约40% LPA和65%基因编辑。组织中LPA靶编辑的一些结果显示在表4中。

[0185] 表4:组织中LPA靶编辑的3个月(%插入/缺失)数据

| 组织  | 对照   |      | 0.5 mg/kg |      | 1.5 mg/kg |       | 3.0 mg/kg |      |
|-----|------|------|-----------|------|-----------|-------|-----------|------|
|     | 平均值  | SD   | 平均值       | SD   | 平均值       | SD    | 平均值       | SD   |
| 肝   | 0.22 | 0.15 | 9.96      | 8.55 | 43.34     | 11.87 | 64.80     | 5.77 |
| 脾   | 0.10 | 0.01 | 0.13      | 0.05 | 0.44      | 0.32  | 3.10      | 1.87 |
| 肾上腺 | 0.25 | 0.29 | 0.20      | 0.11 | 0.14      | 0.12  | 2.72      | 2.68 |
| 脑   | 0.12 | 0.05 | 0.08      | 0.04 | 0.10      | 0.06  | 0.20      | 0.07 |
| 肾   | 0.14 | 0.00 | 0.10      | 0.07 | 0.10      | 0.03  | 0.30      | 0.12 |
| 肺   | 0.12 | 0.04 | 0.13      | 0.06 | 0.22      | 0.12  | 0.24      | 0.11 |
| 附睾  | 0.12 | N/A  | 0.08      | 0.01 | 0.10      | 0.02  | 0.15      | 0.19 |
| 睾丸  | 0.06 | N/A  | 0.18      | 0.01 | 0.18      | 0.12  | 0.27      | 0.17 |
| 卵巢  | 0.15 | N/A  | 0.12      | 0.09 | 0.14      | 0.01  | 0.23      | 0.20 |

[0186] 另外的数据(图12A-图12C)还显示了睾丸、附睾和卵巢的生殖组织中的剂量依赖性编辑,在用3 mg/kg CTX320治疗后85天编辑少于0.5%,并且用0.5 mg/kg和1.5 mg/kg CTX320治疗后编辑甚至更低。

[0187] 图13A-图13B是示出治疗后LNP组分A的血浆水平的图。图14A-图14B是示出治疗后LNP组分B的血浆水平的图。毒代动力学分析表明,用CTX320治疗后一周,大部分LNP组分A和B从血浆中清除。LNP组分A和B两者均在注射后168小时之前排出。

[0188] 数据(未示出)指示,CTX320引起肝功能测试(例如丙氨酸氨基转移酶、天冬氨酸氨基转移酶、碱性磷酸酶和胆红素)的瞬时剂量依赖性升高。治疗之后(例如,施用之后85天)未检测到肝功能损害或损伤。

[0189] 另外的终点分析,包括体重、临床体征(例如天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素)、尿分析、血液学和凝血、心电图和组织病理学(总体和显微评价两者),揭示在整个研究持续期间无CTX320相关改变。

#### [0190] 实施例5

##### 1期研究设计

本文描述的LPA基因编辑纳米颗粒中的一个或多个(例如CTX320)的1期安全性和耐受性临床研究的非限制性示例性设计显示在图15中。

[0191] 在一些情况下,CTX320的1期临床研究在具有Lp(a)水平升高的患者中进行。例如,患者可以具有 $\geq 50$  mg/dL或 $\geq 100$  nmol/L的Lp(a),伴随增加的心肌梗塞(MI)的风险,而与确定的CVD风险因素无关。在一些情况下,患者可以具有 $\geq 50$  mg/dL或 $\geq 125$  nmol/L的Lp(a)。在一些情况下,患者可以具有 $>180$  mg/dL ( $>430$  nmol/L)的Lp(a)水平,伴随增加的动脉粥样硬化性心血管疾病(ASCVD)的终生风险。患者年龄可以在18与75岁之间。在一些情况下,对患者约每3个月进行一次HBA1C测试。

[0192] 在一些情况下,患有晚期肝病的受试者被排除在研究之外。晚期肝病可以包括:(a)天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)  $>3 \times$  正常上限(ULN)或直接胆红素值 $>2 \times$  ULN,和/或(b)基线凝血酶原时间(国际标准化比率[INR])  $>1.5 \times$  ULN,和/或(c)Fibroscan或MRE读数 $\geq 7.5$  kPa,和/或(d)肝硬化史,和/或(e)酒精或药物滥用史,和/或(f)急性监测ALT、AST、GGT、Bili.、Alk. Phos.、白蛋白、INR、PT和PTT至D30。监测将持续至研究结束(12个月)。

#### [0193] 实施例6

##### LPA gRNA制剂的持久性研究

本实施例报告了实施例3的CTX320制剂的非限制性示例性持久性试验研究。具体地,本实施例使用ELISA评价血浆中LPA蛋白敲低的持久性,并评价肝组织中的LPA破坏。持久性研究还评价了类固醇和/或抗组胺药预处理是否降低肝功能测试升高。表5示出了本实施例中使用的持久性研究设计。

[0194]

| 表 5: 示例性持久性研究设计 |                  |           |                                                 |                        |                                                            |
|-----------------|------------------|-----------|-------------------------------------------------|------------------------|------------------------------------------------------------|
| 制剂              | 组大小              | 剂量水平      | LPA ELISA                                       | LPA 编辑                 | 终点                                                         |
| CTX320 与预处理     | 4 名(2 名男性+2 名女性) | 2.0 mg/kg | 7d、14d、21d、28d、6wk、8wk、10wk、12wk、每月(4 个月-24 个月) | 12 个月、18 个月、24 个月 - 仅肝 | 尸检: 2 年<br>活检: 12 个月和 18 个月<br>血清化学<br>PD 样品<br>生物分析/TK 样品 |

[0195] 选择的患者具有大于100 mg/dL的升高的LP(a)水平。可以用类固醇和/或抗组胺药物对患者进行预处理。例如,患者可以在LNP施用之前一天用1 mg/kg地塞米松、0.5 mg/kg法莫替丁和5 mg/kg苯海拉明预处理,并且然后在LNP施用之前30-60 min再次预处理。

[0196] 图16是示出CTX320治疗之后患者的血清Lp(a)蛋白水平从基线的改变百分比的图。施用之后56天,在用CTX320治疗的患者中仍观察到Lp(a)蛋白从基线的至少90%降低。

[0197] 还对CTX320治疗后的患者进行血清测试,包括肝功能测试(LFT)和血浆脂质水平(例如甘油三酯、HDL、LDL和总胆固醇)。

[0198] 图17比较了用预处理和2.0 mg/kg CTX320制剂的患者以及未预处理和用1.5 mg/kg和3 mg/kg CTX320制剂的患者中的天冬氨酸氨基转移酶(AST)、丙氨酸转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)和总胆红素水平。数据表明,用预治疗的CTX320制剂诱导LFT升高,类似于在先前没有预处理的研究中观察到的那些,并且用抗组胺药的预处理不抑制患者的LFT响应。

[0199] 还观察到CTX320还诱导总胆固醇和LDL的减少。未发现CTX320制剂诱导的其他血清化学标志物的明显差异。

#### [0200] 术语

在至少一些先前描述的实施方案中,一种实施方案中使用的一个或更多个要素可以互换地用于另一种实施方案中,除非这种替换在技术上不可行。本领域技术人员将理解,在不脱离所要求保护的的主题的范围的情况下,可以对上述方法和结构进行各种其他的省略、添加和修改。所有这样的修改和改变都旨在落在由所附权利要求书限定的主题的范围内。

[0201] 关于本文中基本上任何复数和/或单数术语的使用,在对于上下文和/或应用适当的情况下,本领域技术人员可以从复数转换为单数和/或从单数转换为复数。为了清楚起见,可以在本文明确阐述各种单数/复数排列。如本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述/该(the)”包括复数指代物,除非上下文另外明确指示。除非另外说明,否则在本文中对“或”的任何提及旨在涵盖“和/或”。

[0202] 本领域技术人员将理解,一般来说,本文使用的术语,并且尤其是所附权利要求(例如,所附权利要求的主体)中的术语,通常意在作为“开放式”术语(例如,术语“包括(including)”应解释为“包括但不限于(including but not limited to)”,术语“具有(having)”应解释为“具有至少(having at least)”,术语“包括(includes)”应解释为“包括但不限于(includes but is not limited to)”等)。本领域技术人员将进一步理解,如果意图所介绍的权利要求陈述的特定数字,则这样的意图将明确地陈述于权利要求中,并且在这种陈述不存在的情况下,不存在这种意图。例如,作为对理解的帮助,以下所附权利要求书可以包含介绍性措辞“至少一种”和“一种或更多种”的使用,以介绍权利要求陈述。然而,这样的措辞的使用不应解读为意味着由不定冠词“一(a)”或“一(an)”介绍权利要求陈述会将任何包含这样的介绍的权利要求陈述的具体权利要求限制为包含仅一种这样的陈述的实施方案,甚至当同一权利要求包括介绍性措辞“一种或更多种”或“至少一种”以及不定冠词诸如“一(a)”或“一(an)”时也是如此(例如,“一(a)”和/或“一(an)”应解释为意指“至少一种”或“一种或更多种”);这对于使用定冠词来介绍权利要求陈述同样适用。此外,即使明确地陈述了介绍的权利要求陈述的特定数字,本领域技术人员将认识到,这样的陈述应解释为意指至少所陈述的数字(例如仅陈述“两种陈述”而没有其他修饰词意指至少两

种陈述或两种或更多种陈述)。此外,在使用类似于“A、B和C等中的至少一种”的惯例的那些情况下,通常这种句法结构意在为本领域技术人员将理解该惯例的意义(例如,“具有A、B和C中的至少一种的系统”将包括但不限于具有单独的A,具有单独的B,具有单独的C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,和/或A、B和C一起等的系统)。在使用类似于“A、B或C等中的至少一种”的惯例的那些情况下,通常这种句法结构意在为本领域技术人员将理解该惯例的意义(例如,“具有A、B或C中的至少一种的系统”将包括但不限于具有单独的A,具有单独的B,具有单独的C,A和B一起,A和C一起,B和C一起,和/或A、B和C一起等的系统)。本领域技术人员将进一步理解,实际上,无论在说明书、权利要求书还是在附图中,呈现两个或更多个替代术语的任何分离性词语和/或措辞应被理解为考虑到包括术语之一、任一术语或两个术语的可能性。例如,短语“A或B”应被理解为包括“A”或“B”或“A和B”的可能性。

[0203] 此外,当本公开内容的特征或方面以马库什组(Markush group)描述时,本领域技术人员将意识到,本公开内容还由此以马库什组的任何个体成员或成员子组描述。

[0204] 如本领域技术人员将理解的,为了任何和所有目的,诸如在提供书面描述方面,本文公开的所有范围还包括该范围的任何和所有可能的子范围和子范围的组合。任何列出的范围都可以很容易地被识别为充分描述并使相同的范围能被分解为至少相等的一半、三分之一、四分之一、五分之一、十分之一等。作为非限制性实例,本文讨论的每个范围可以容易地分解为下三分之一、中三分之一和上三分之一等。如本领域技术人员还将理解的,所有语言,诸如“多达”、“至少”、“大于”、“小于”等包括所陈述的数字,并且指可以随后分解为如上文讨论的子范围的范围。最后,如本领域技术人员将理解的,范围包括每个个体的成员。因此,例如,具有1-3个物品的组是指具有1个、2个或3个物品的组。类似地,具有1-5个物品的组是指具有1个、2个、3个、4个或5个物品的组,等等。

[0205] 尽管本文已经公开了各种方面和实施方案,但其他方面和实施方案对本领域技术人员将是明显的。本文公开的各种方面和实施方案用于说明的目的而并不意在限制,实际范围和精神由以下权利要求指出。

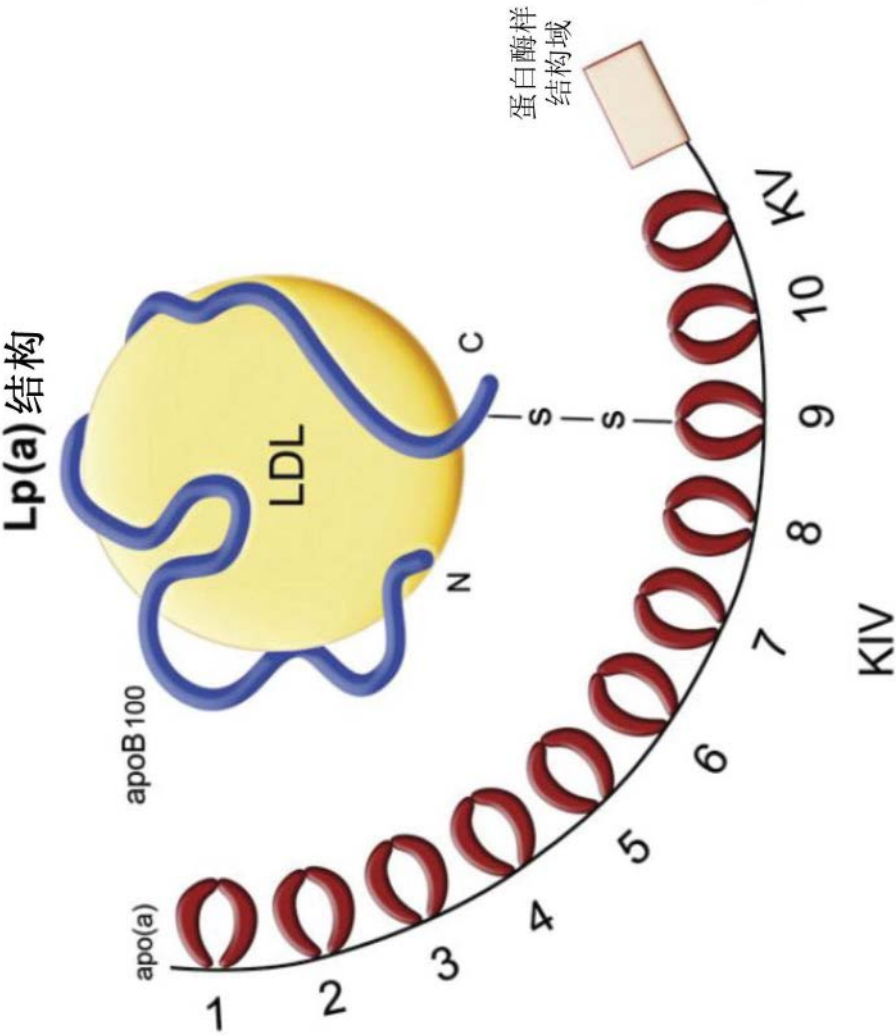


图1

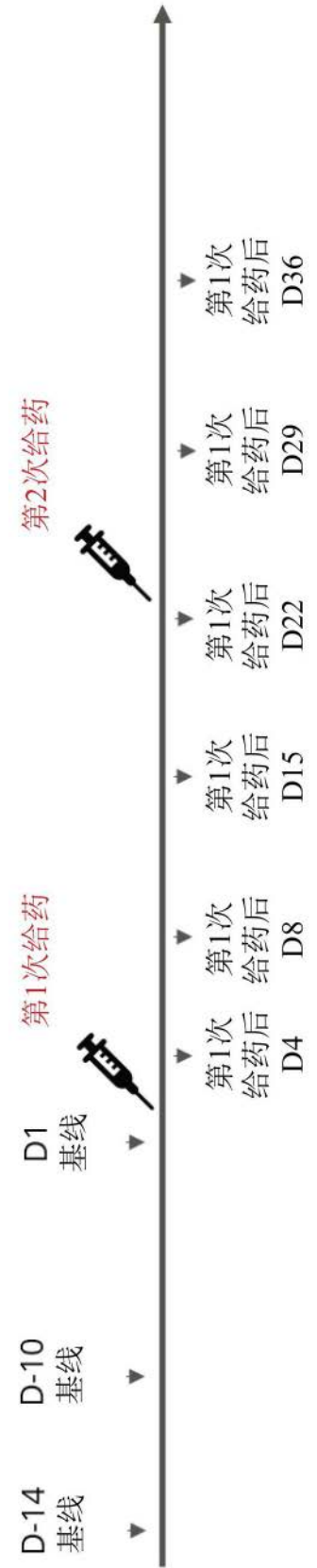


图2

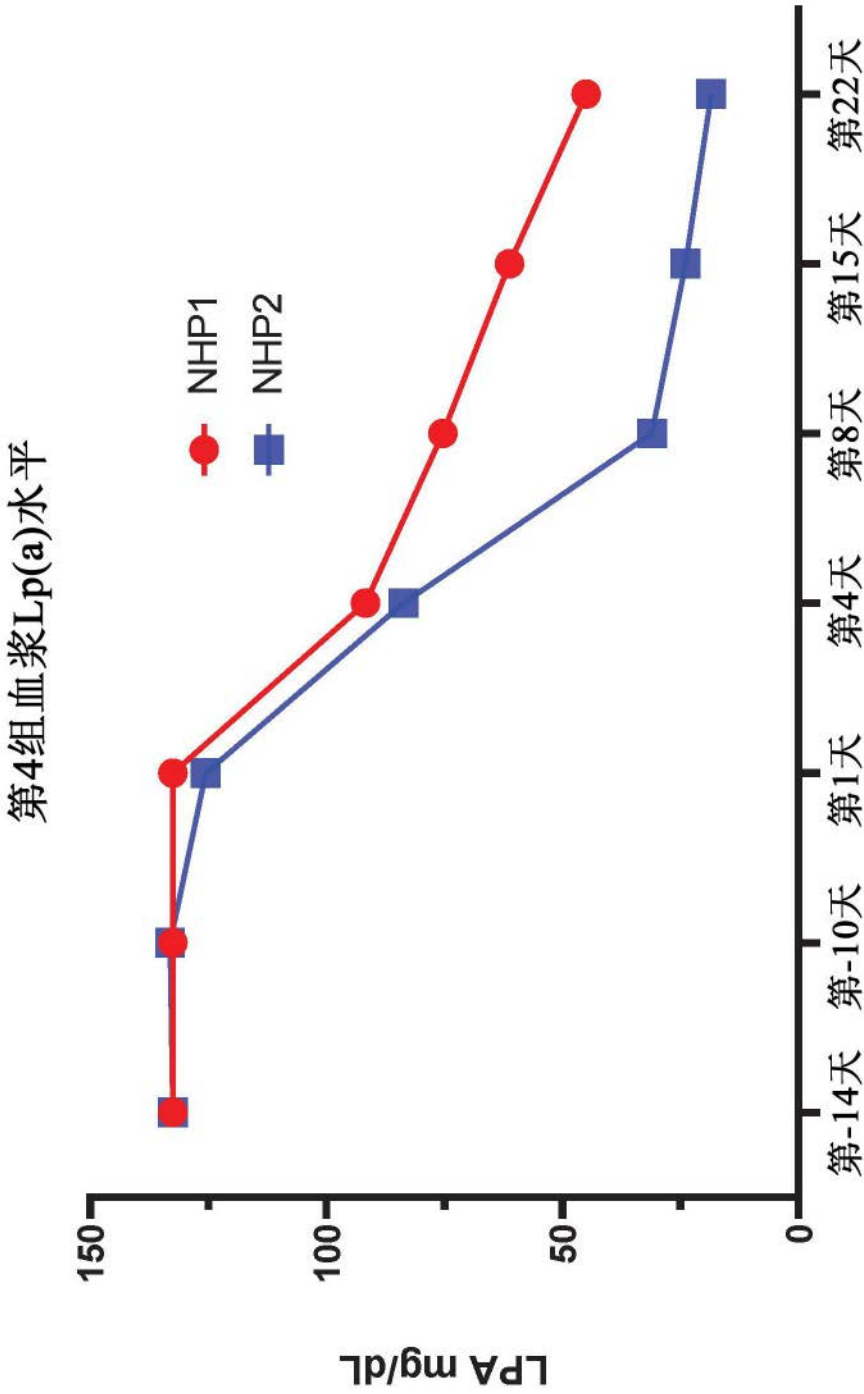


图3A

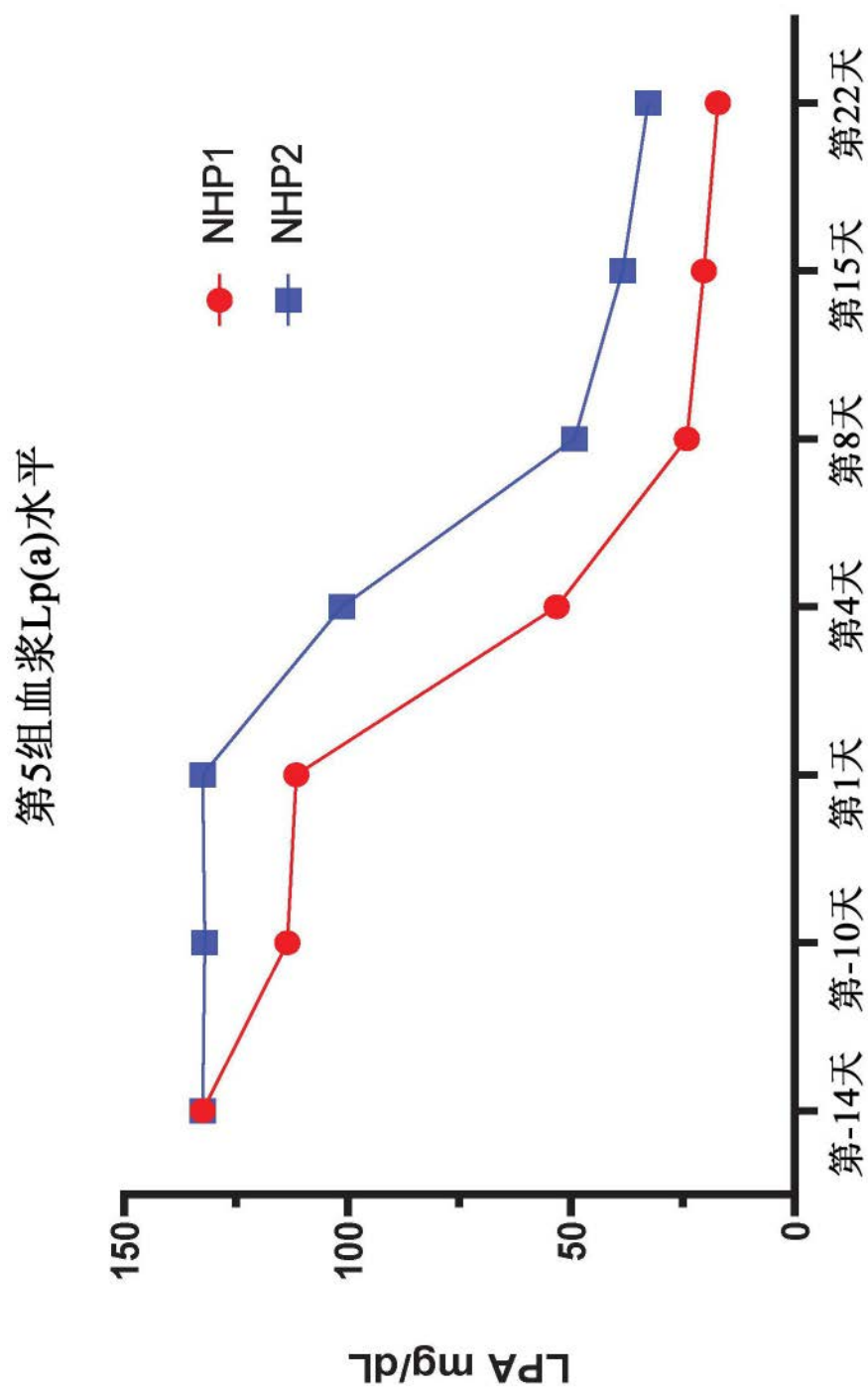


图3B

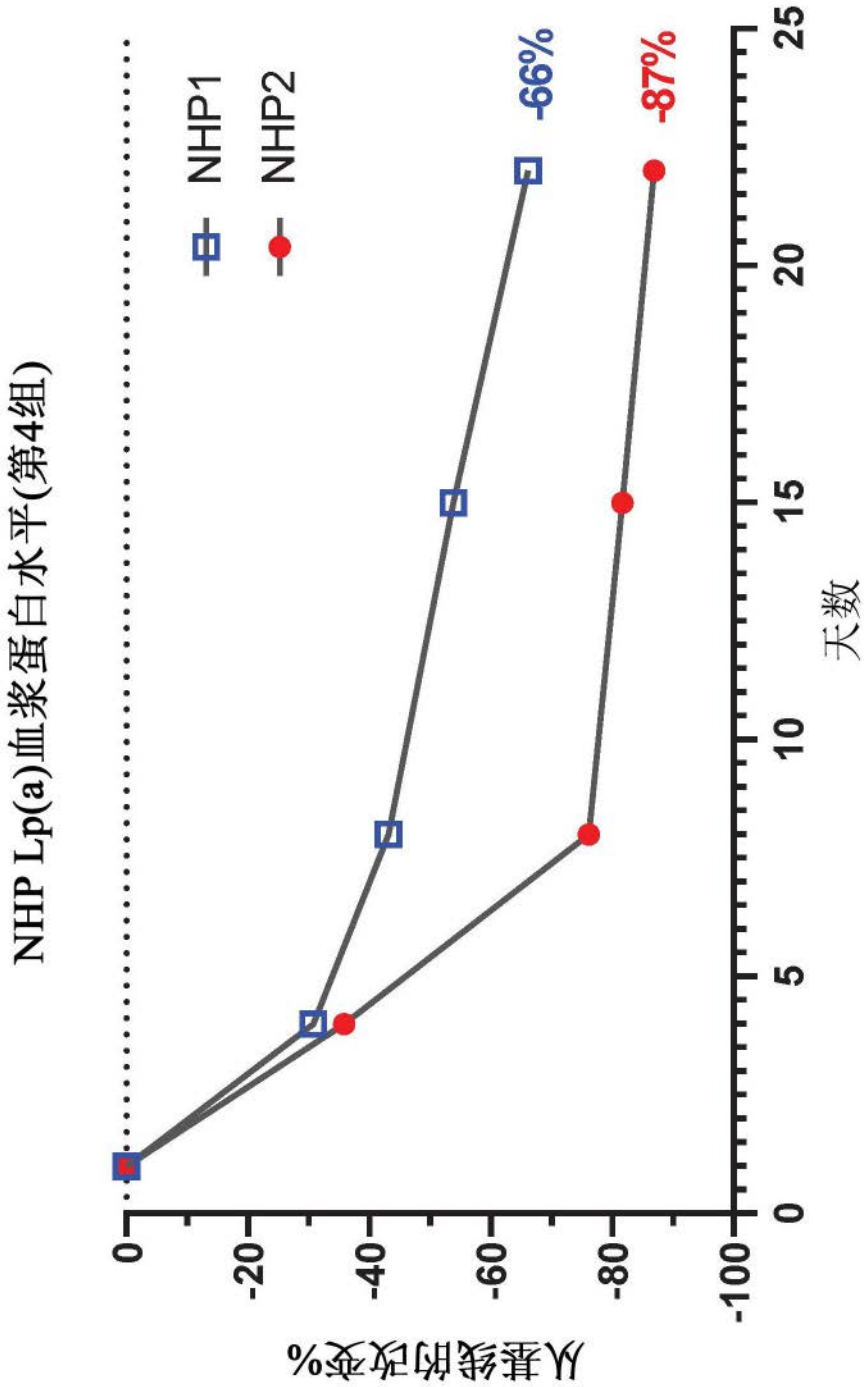


图4A

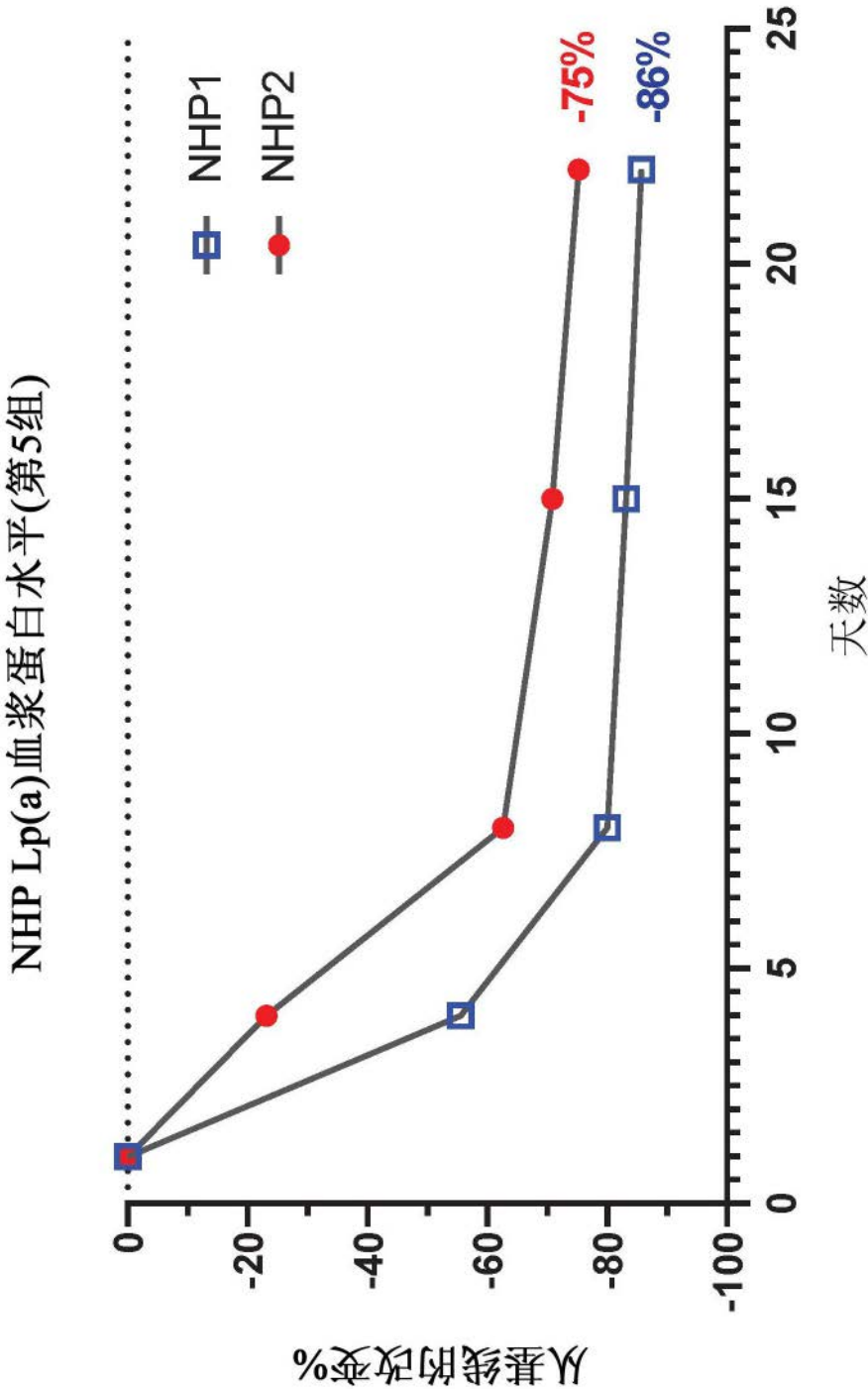


图4B

实验设计

| 组号 | 测试物品 | 剂量水平<br>(mg/kg) <sup>a</sup> | 剂量体积<br>(mL/kg) | 剂量浓度<br>(mg/mL) | 动物数 <sup>b</sup> |    |
|----|------|------------------------------|-----------------|-----------------|------------------|----|
| 1  | 对照   | 0                            | 5               | 0               | 雄性               | 雌性 |
| 2  |      | 0.5                          |                 | 0.1             | 1                | 1  |
| 3  |      | 1.5                          |                 | 0.3             | 2                | 2  |
| 4  |      | 3                            |                 | 0.6             | 2                | 2  |

<sup>a</sup> 基于最近体重测量值。  
<sup>b</sup> 动物将在第85天处死。

图5

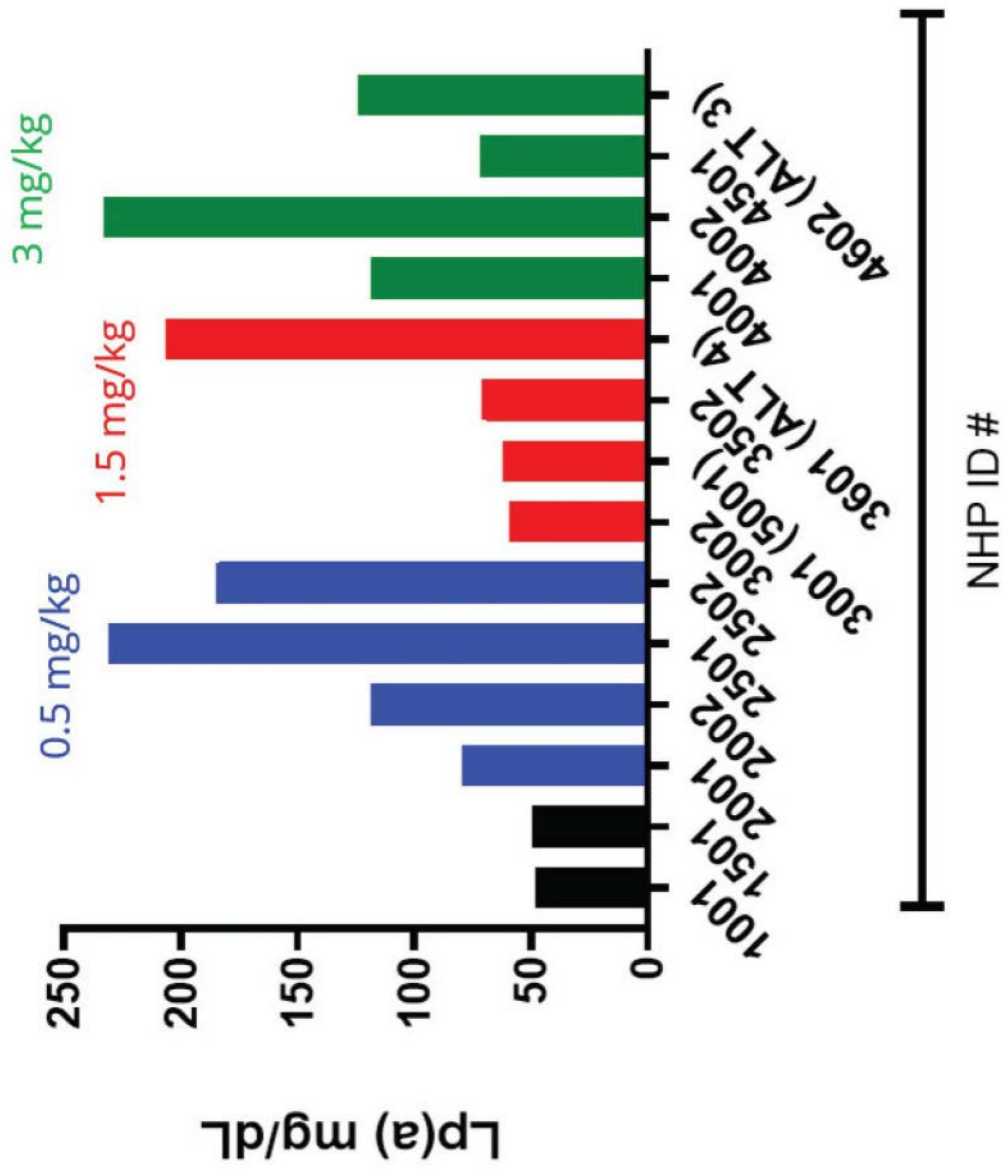


图6

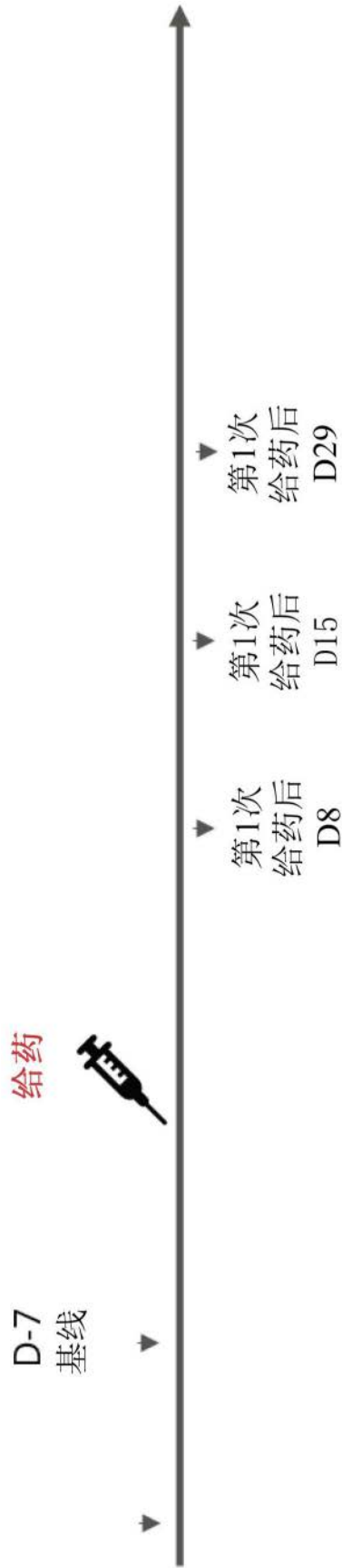


图7

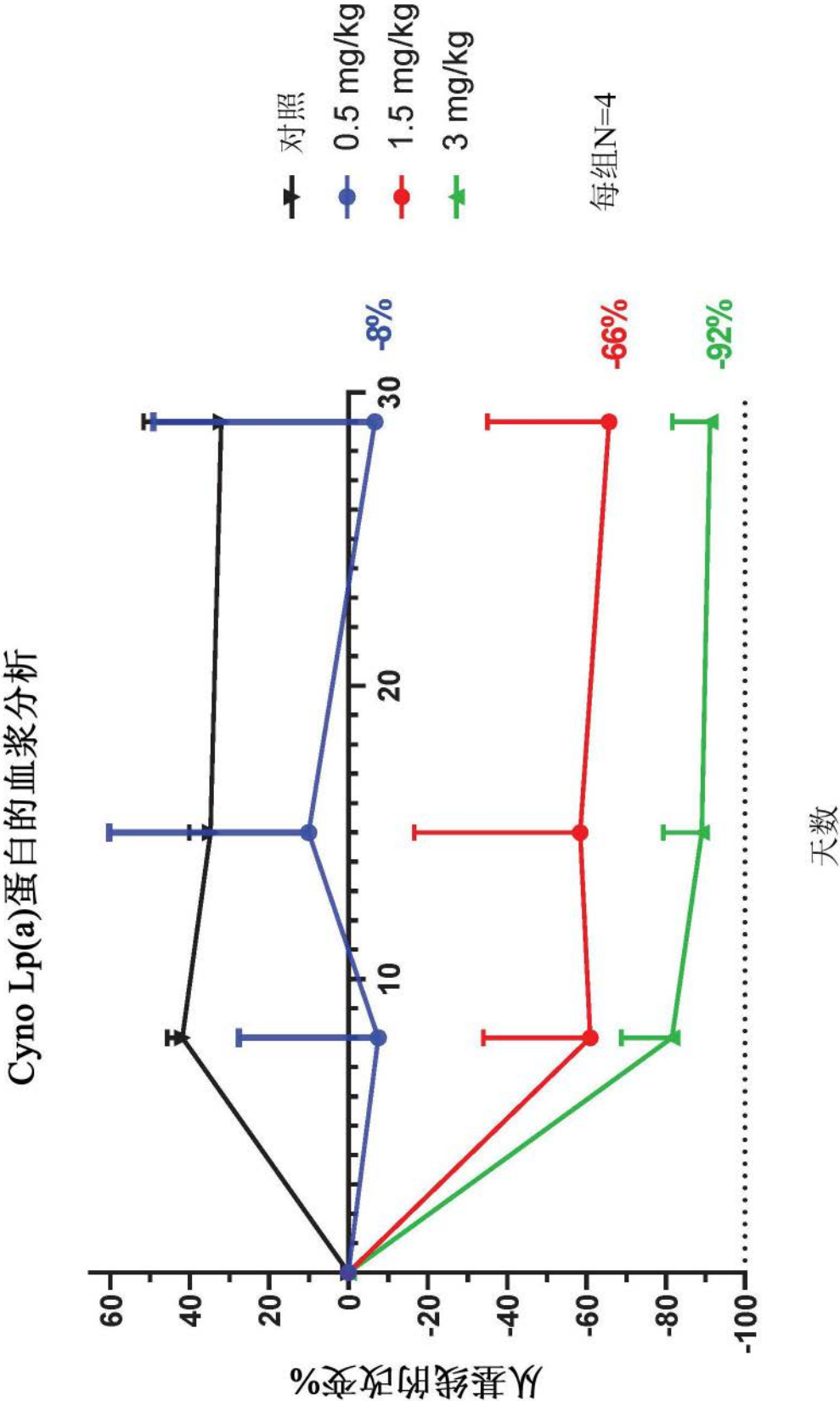


图8A

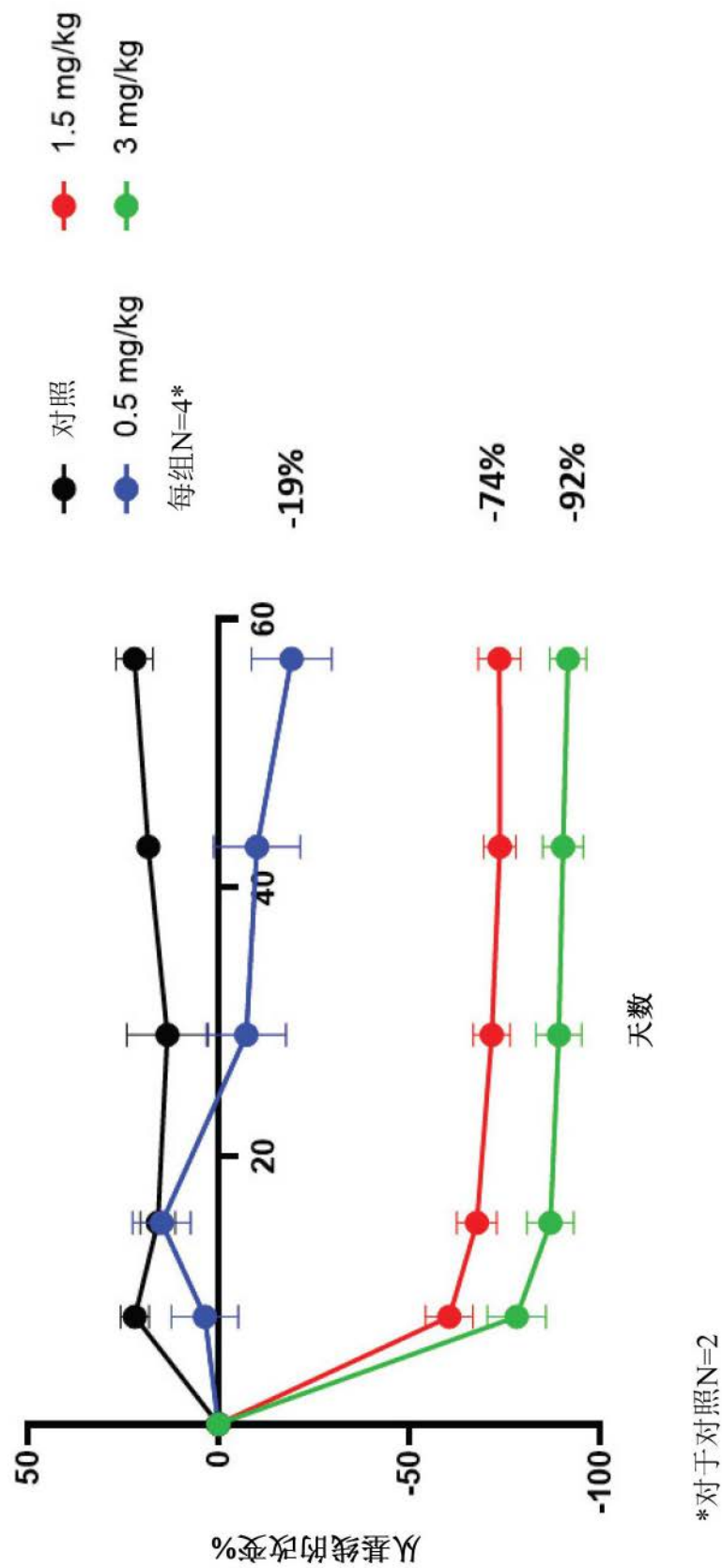


图8B

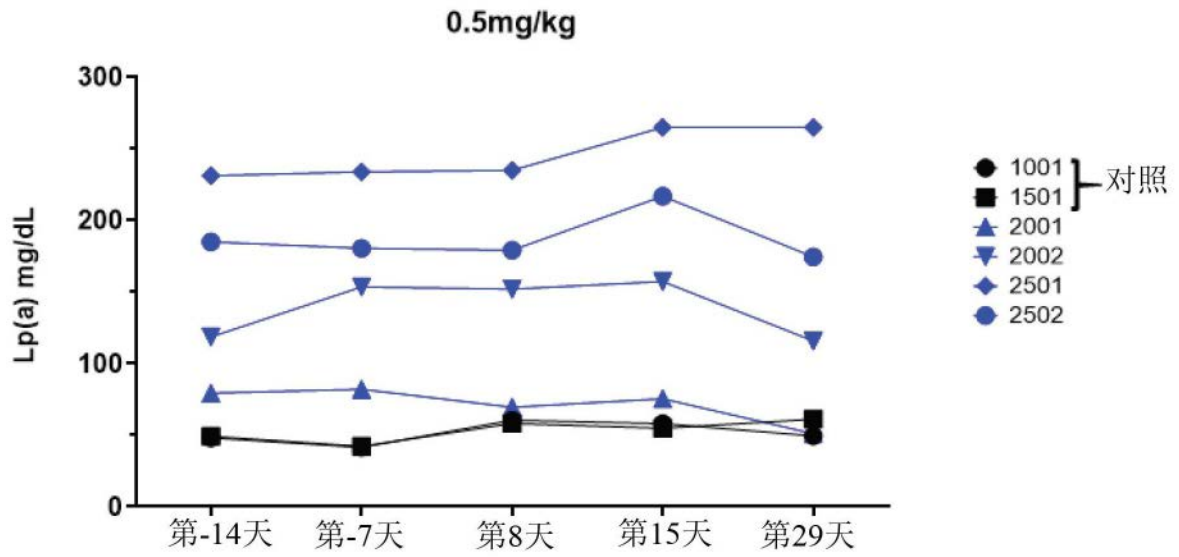


图9A

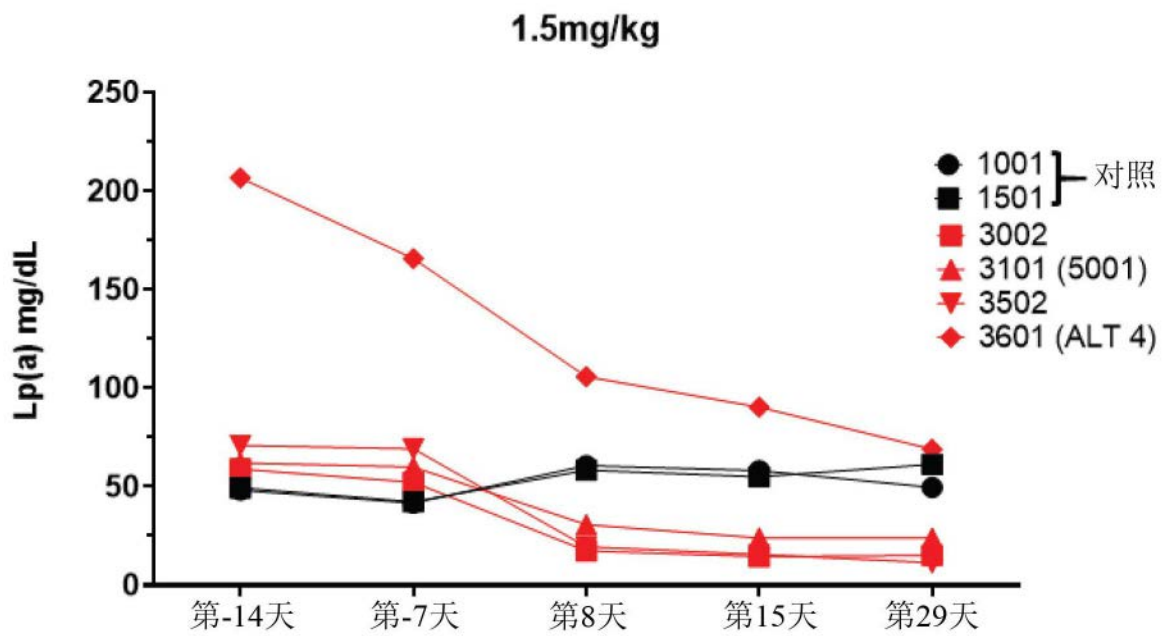


图9B

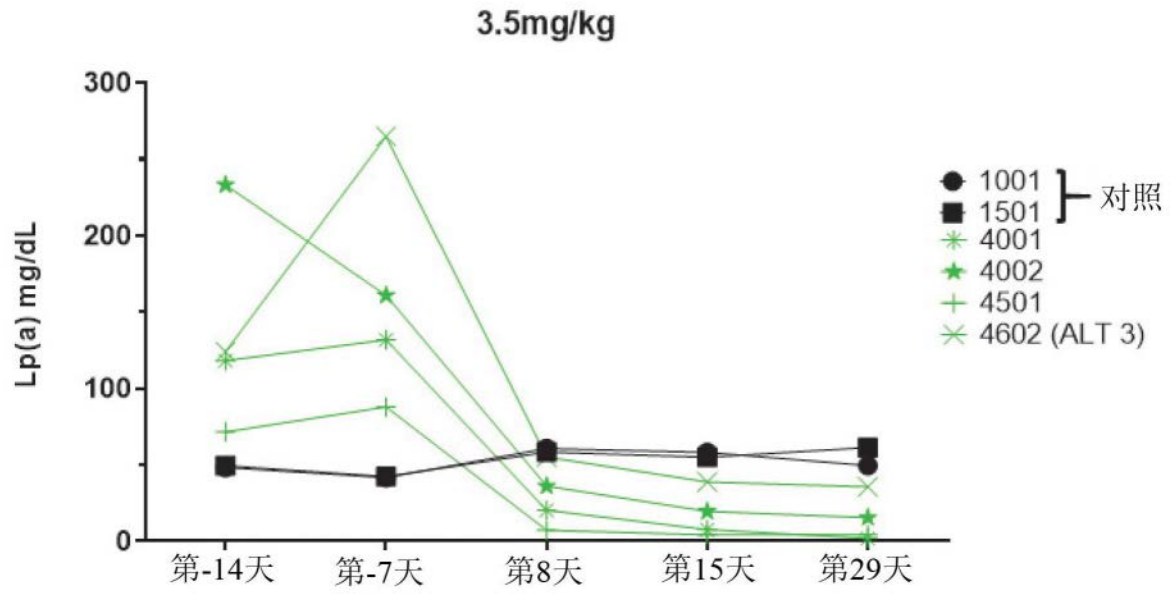


图9C

**第29天 Cyno Lp(a)的血浆分析**

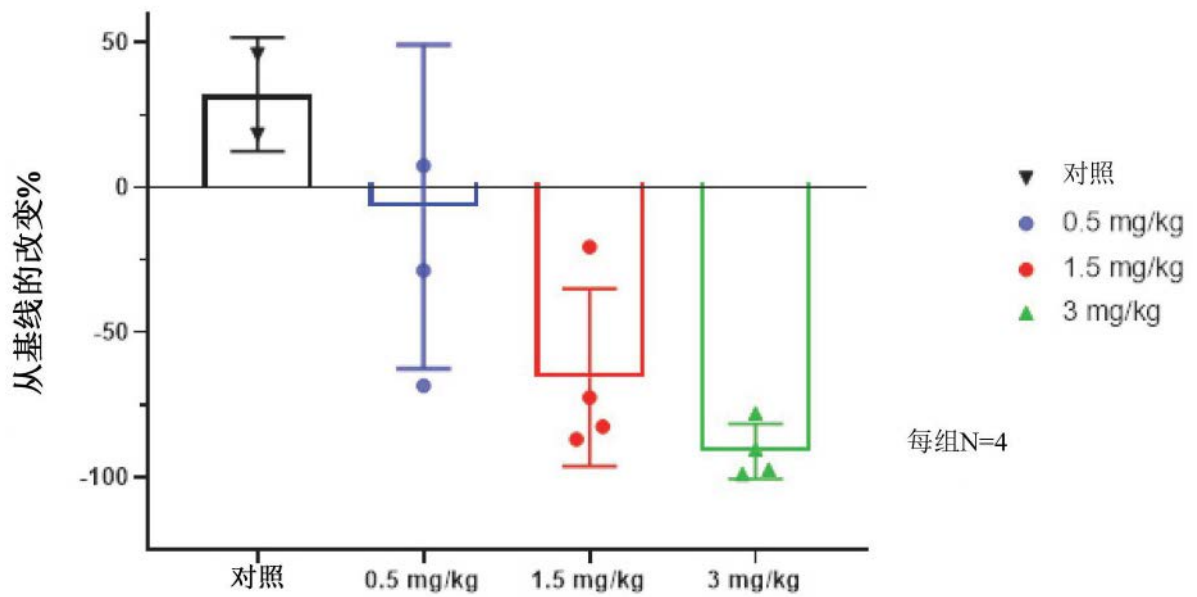


图9D

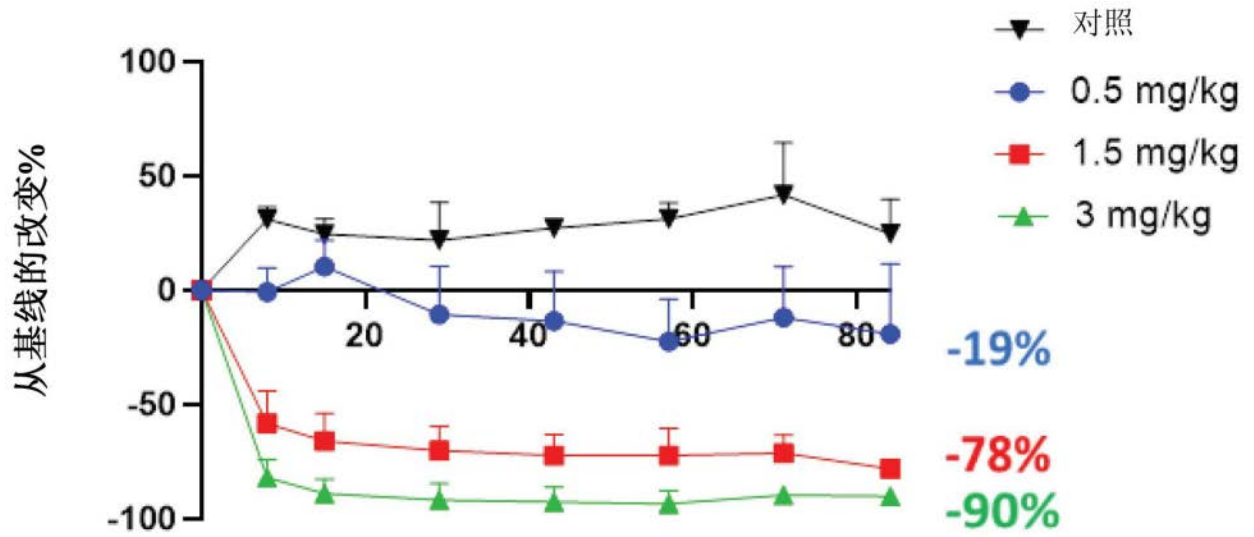


图10A

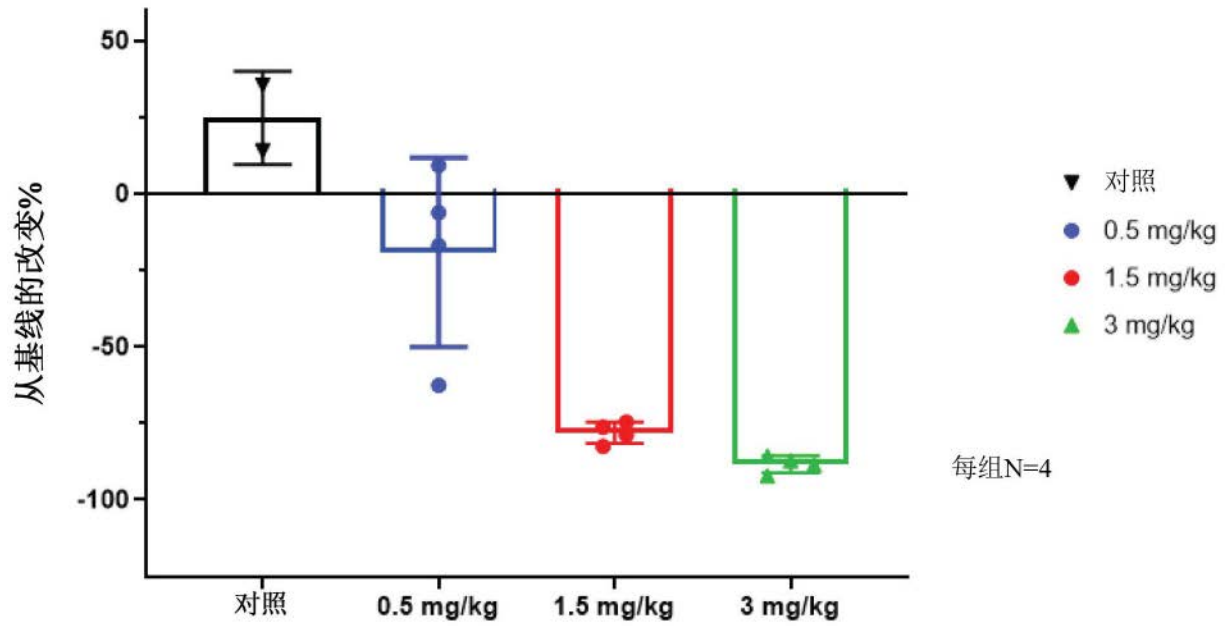


图10B

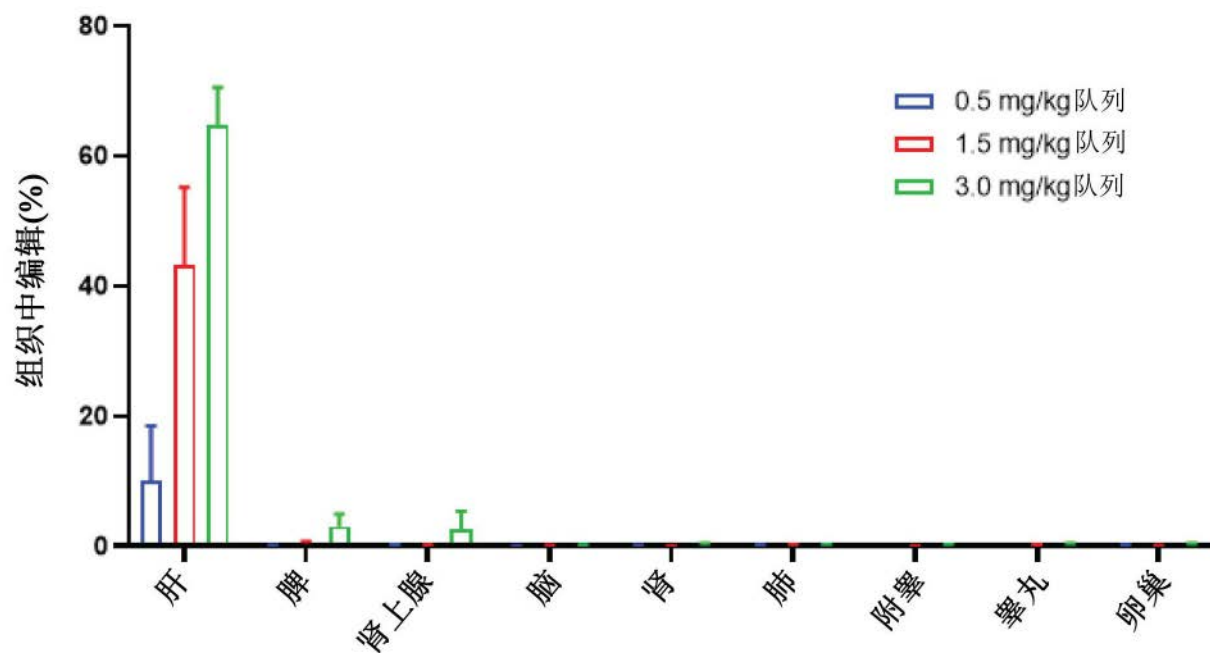


图11

睾丸

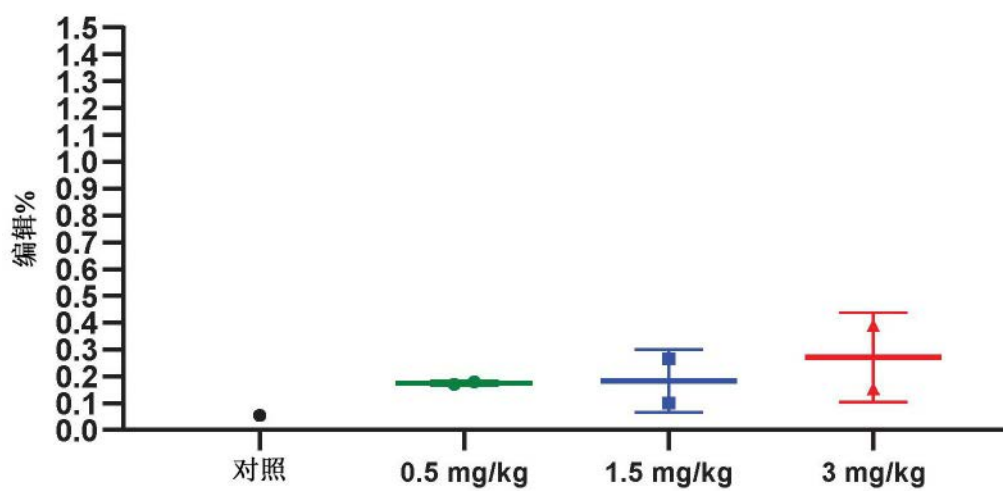


图12A

## 附睾

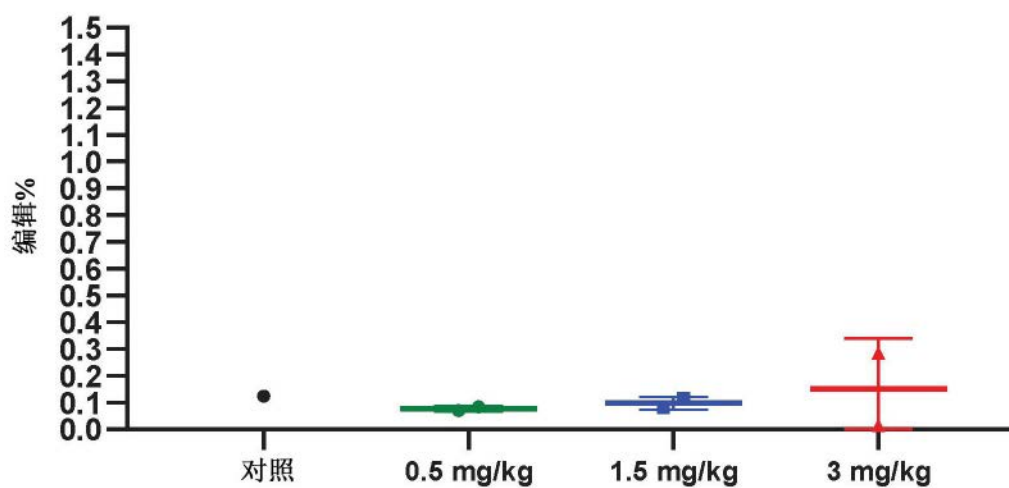


图12B

## 卵巢

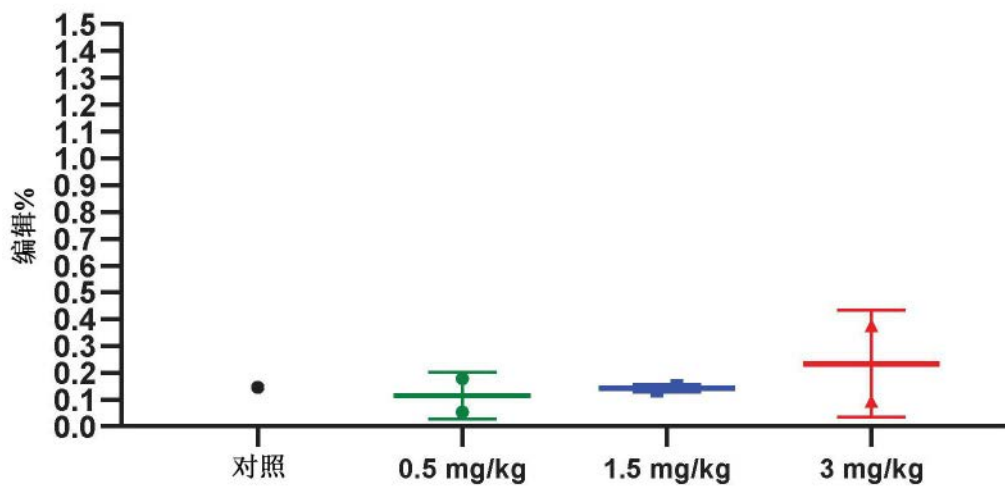


图12C

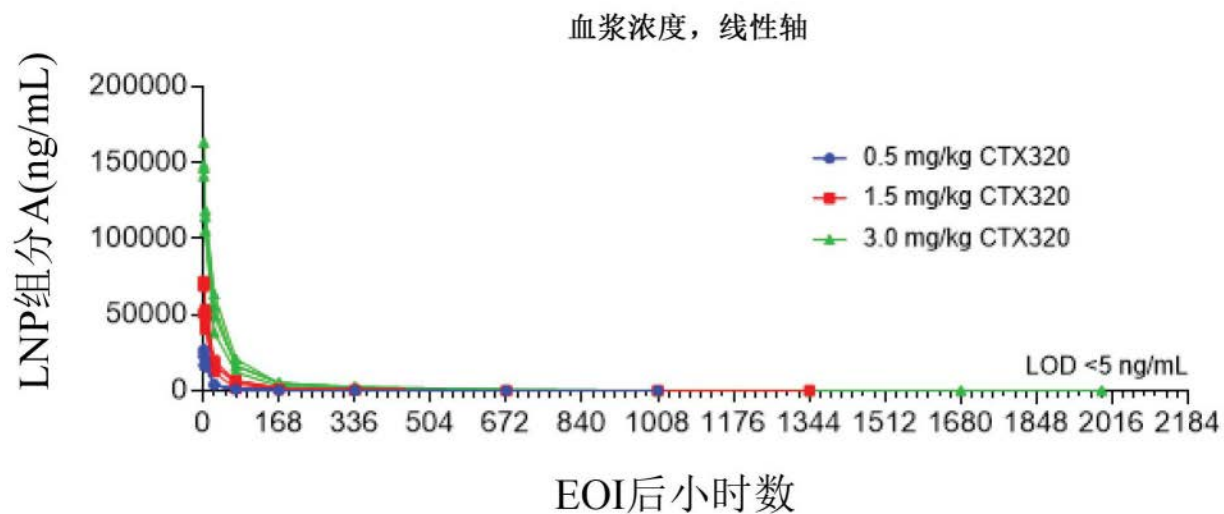


图13A

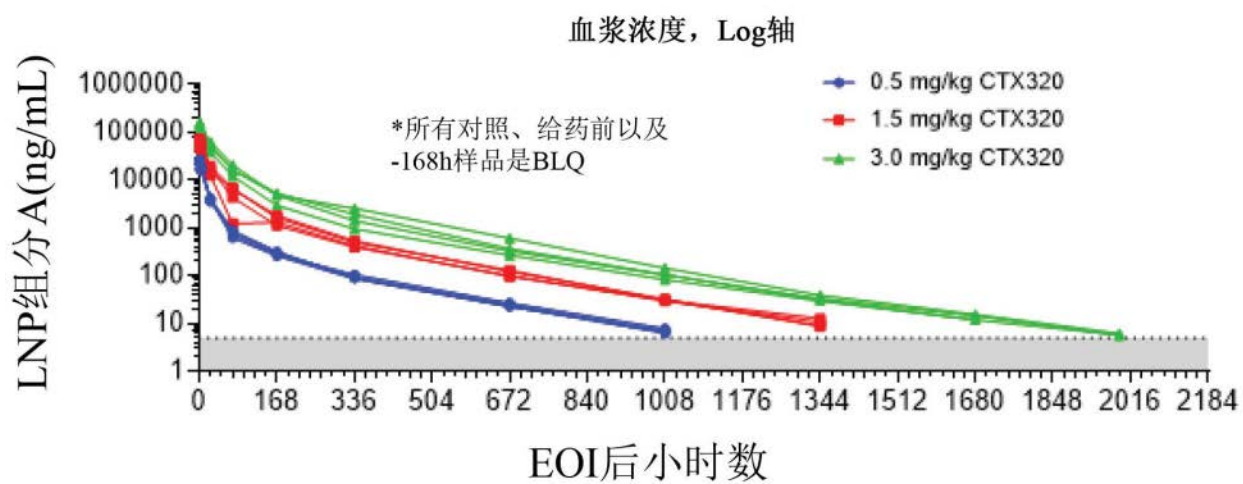


图13B

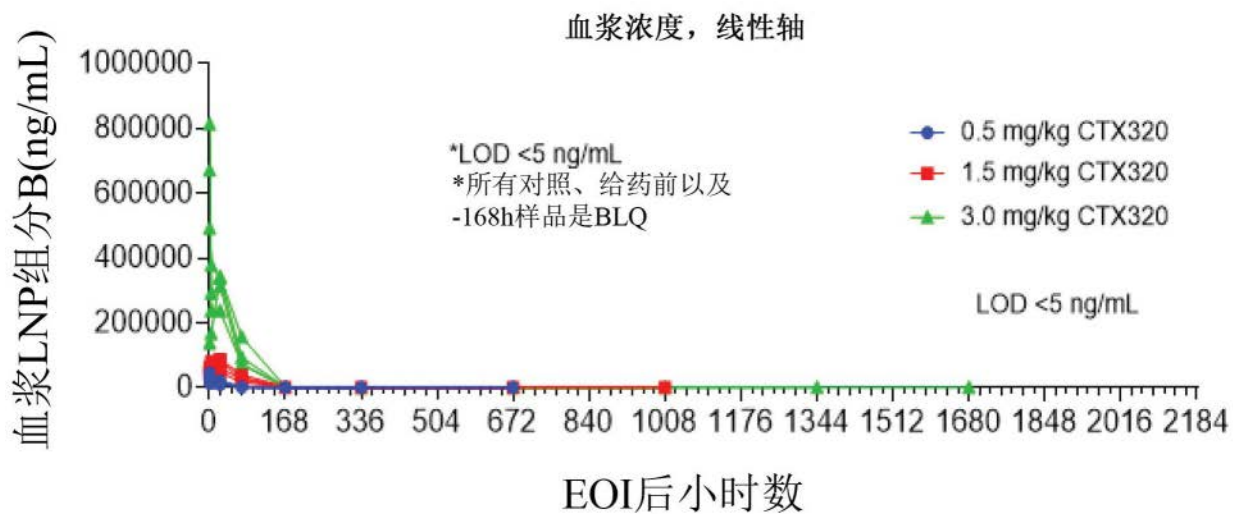


图14A

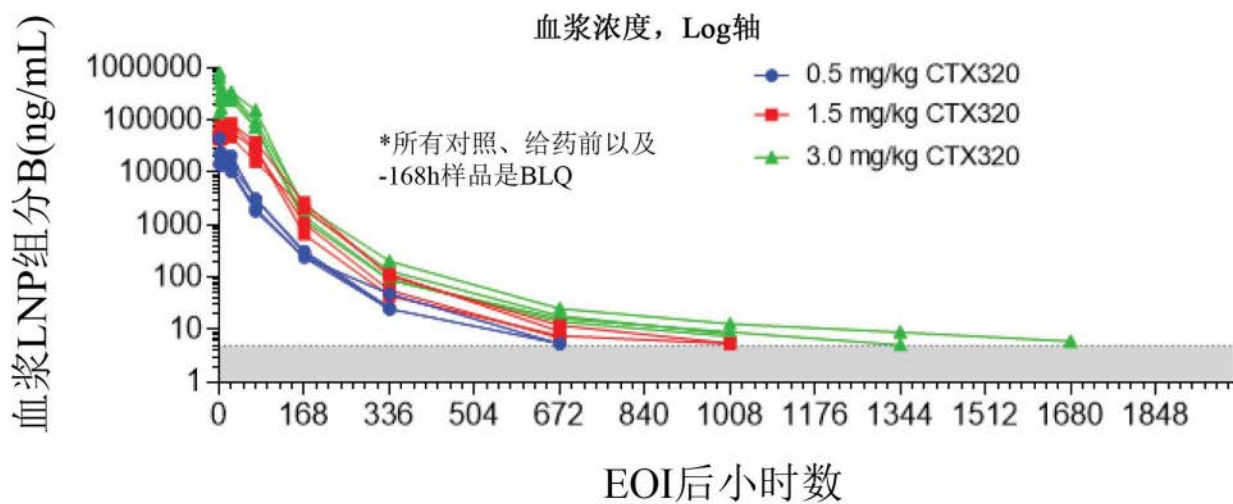


图14B

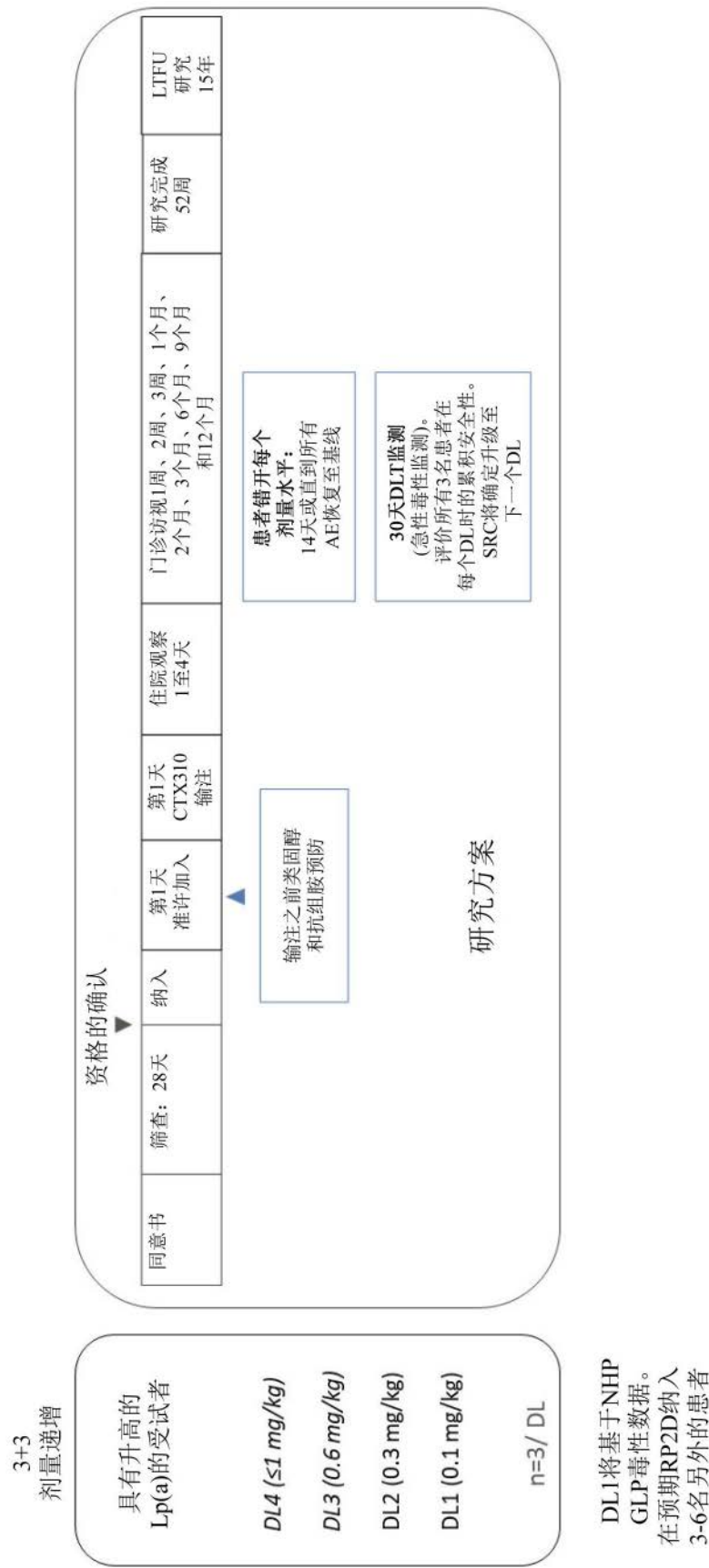


图15

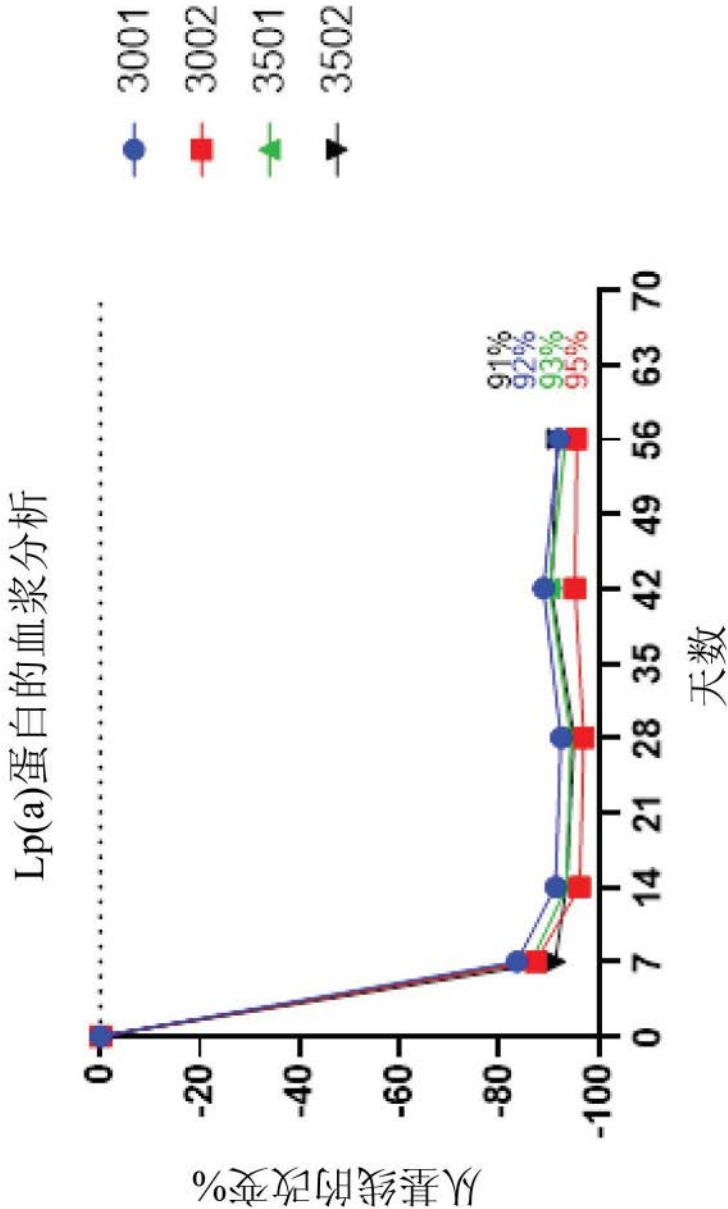


图16

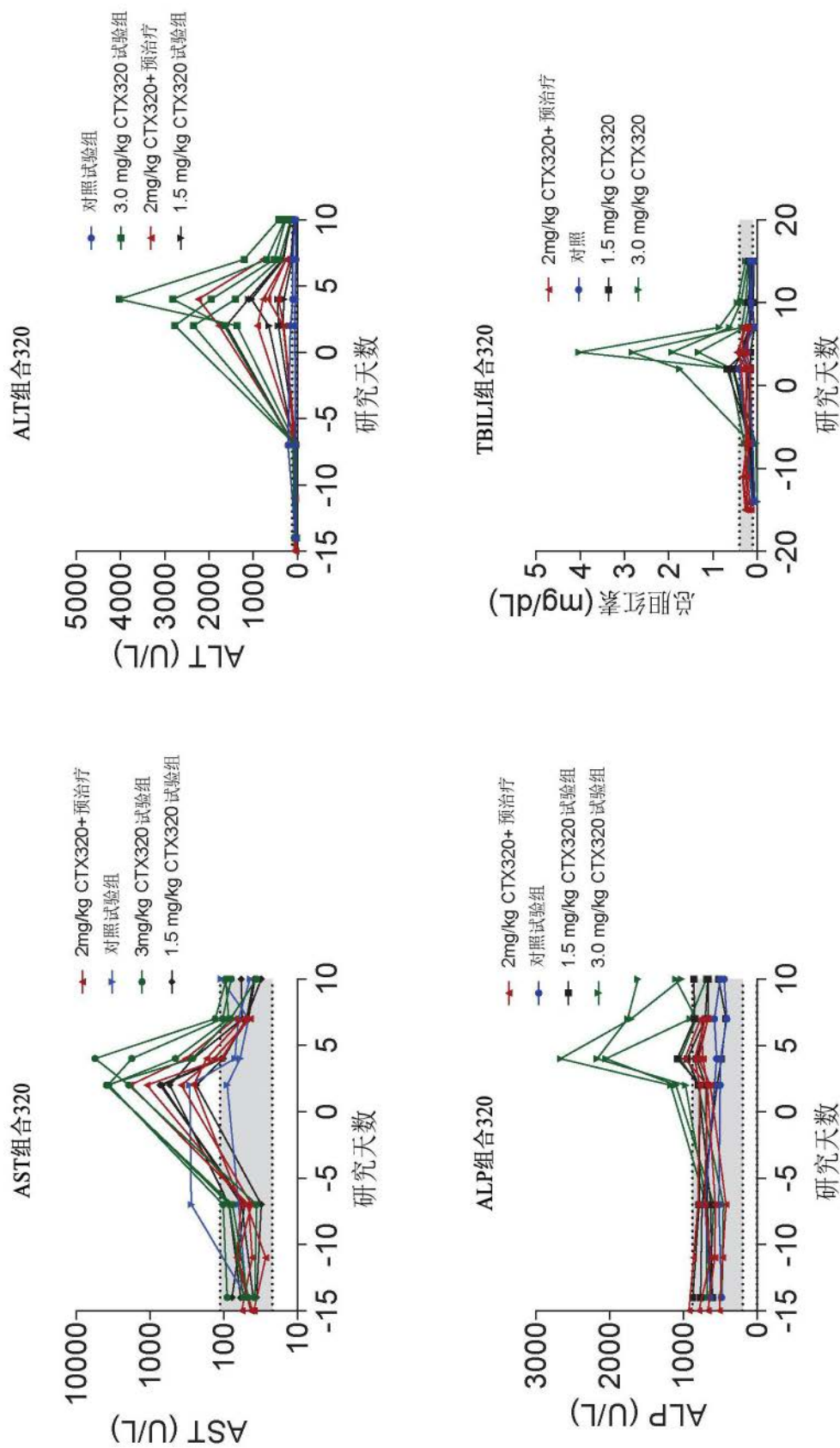


图17