



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114173762 A

(43) 申请公布日 2022.03.11

(21) 申请号 202080054813.2

(22) 申请日 2020.06.04

(30) 优先权数据

62/857111 2019.06.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.01.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/036085 2020.06.04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/247604 EN 2020.12.10

(71) 申请人 塔夫茨大学信托人

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 Q·徐 M·王

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001

代理人 罗文锋 李唐

(51) Int.Cl.

A61K 9/127 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

G12N 15/113 (2006.01)

G12N 15/86 (2006.01)

权利要求书6页 说明书34页 附图27页

(54) 发明名称

用于mRNA递送的合成脂质

(57) 摘要

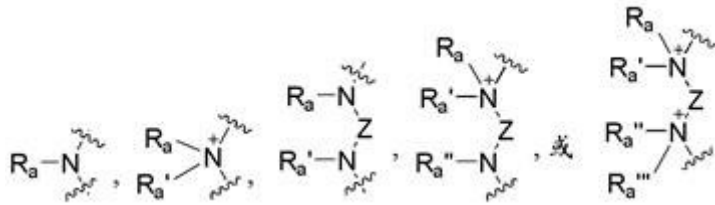
提供了治疗人类脂蛋白代谢障碍或心血管疾病的方法,其包括给予需要它的受试者包含脂质、CRISPR/Cas9 mRNA和单引导RNA (sgRNA) 的类脂纳米颗粒。

1. 一种治疗人类脂蛋白代谢障碍或心血管疾病的方法,其包括给予需要它的受试者类脂纳米颗粒,所述类脂纳米颗粒包含脂质、CRISPR/Cas9 mRNA和单引导RNA (sgRNA),其中所述sgRNA为单引导血管生成素样3 (sgANGPTL3)或单引导前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型 (sgPCSK9);

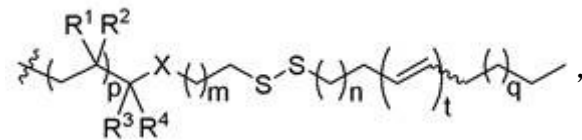
脂质由以下式I或其药学上可接受的盐表示:



其中 $R^{\text{头部}}$ 为



R^a 、 $R^{a'}$ 、 $R^{a''}$ 和 $R^{a'''}$ 各自独立地为 $R^{\text{脂质}}$ 、H、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基、 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_1 - C_{20} 杂烷基、 C_1 - C_{20} 杂环烷基、芳基或杂芳基,其中 R^a 和 $R^{a'}$ 或 $R^{a''}$ 和 $R^{a'''}$ 两者不同时为 $R^{\text{脂质}}$; Z为 C_1 - C_{20} 二价脂肪族基团、 C_1 - C_{20} 二价杂脂肪族基团、二价芳基或二价杂芳基;和 $R^{\text{脂质}}$ 各自独立地为



其中:

R^1 和 R^2 为H、OH、 NHR^{30} 或SH;

R^3 和 R^4 两者为H;或者 R^3 和 R^4 一起形成氧代(=O)基团;

X为 CH_2 、O、 NR^{30} 或S;

R^{30} 为H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基或 C_{1-6} 炔基;

m为选自1-3的整数;

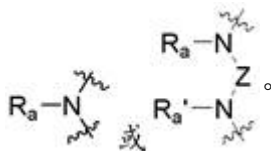
n为选自1-14的整数;

p为0或1;

q为选自1-10的整数;和

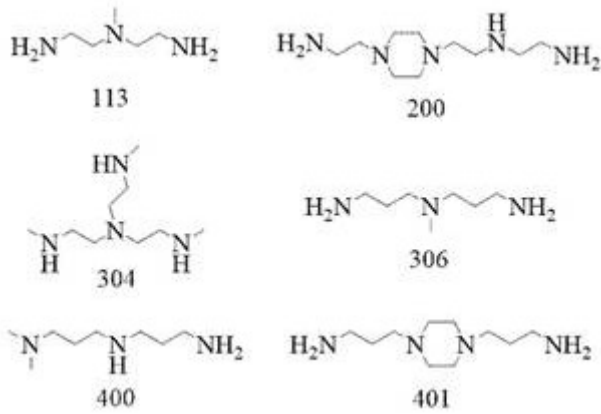
t为0、1或2。

2. 权利要求1的方法,其中 $R^{\text{头部}}$ 为

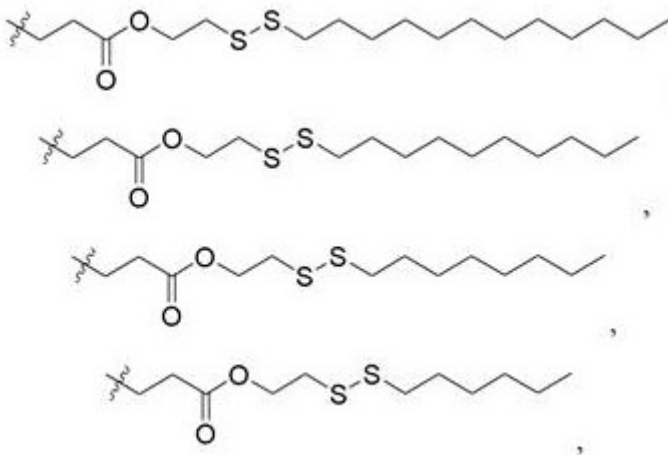


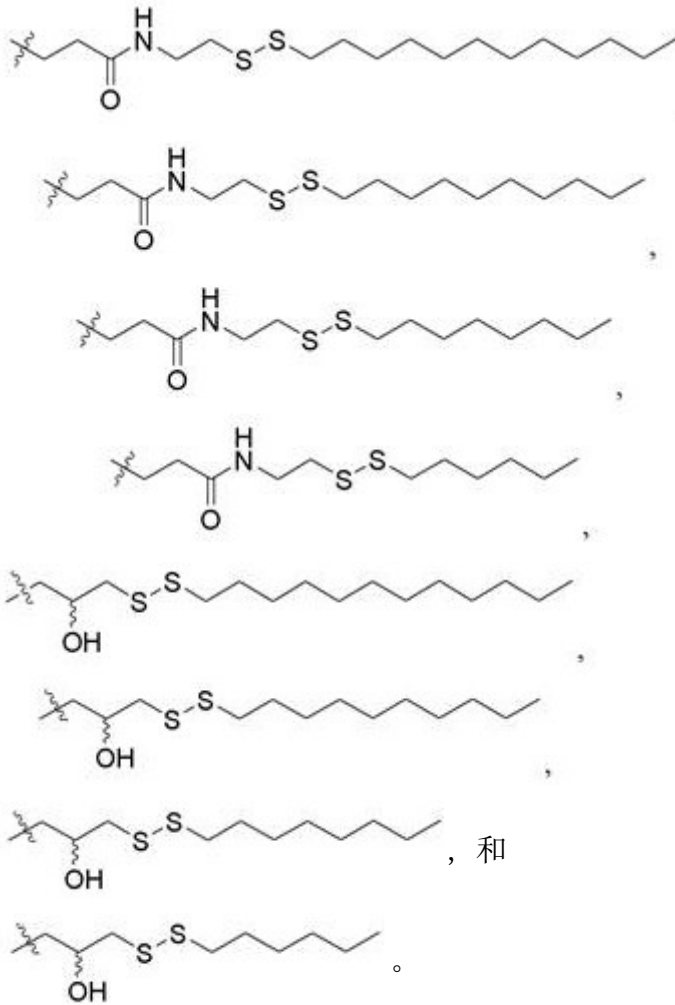
3. 权利要求2的方法,其中 R^a 和 $R^{a'}$ 为 $R^{\text{脂质}}$ 、H或 C_1 - C_{20} 烷基。

4. 权利要求2的方法,其中 $R^{\text{头部}}$ 衍生自选自以下的化合物:

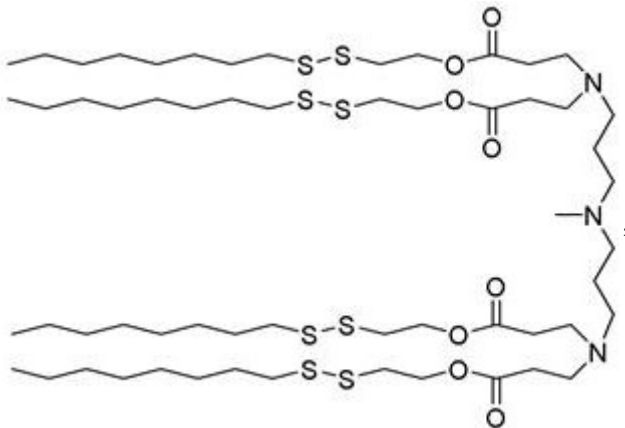


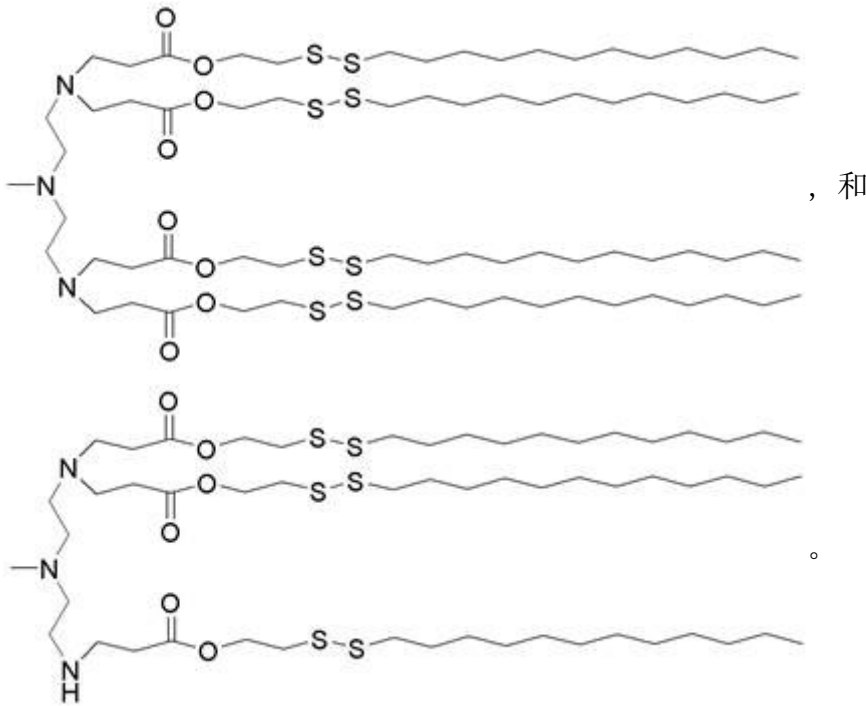
5. 权利要求1-4中任何一项的方法,其中 R^1 和 R^2 为H。
6. 权利要求1-4中任何一项的方法,其中 R^1 为H;和 R^2 为OH。
7. 权利要求1-6中任何一项的方法,其中 R^3 和 R^4 为H。
8. 权利要求1-6中任何一项的方法,其中 R^3 和 R^4 一起形成氧代(=O)基团。
9. 权利要求1-8中任何一项的方法,其中Z为 CH_2 、O或 NR^{30} 。
10. 权利要求1-8中任何一项的方法,其中Z为 CH_2 。
11. 权利要求1-8中任何一项的方法,其中Z为O。
12. 权利要求1-8中任何一项的方法,其中Z为 NR^{30} 。
13. 权利要求1-12中任何一项的方法,其中m为1或2。
14. 权利要求1-13中任何一项的方法,其中n为选自4-12的整数。
15. 权利要求1-13中任何一项的方法,其中n为选自6-10的整数。
16. 权利要求1-15中任何一项的方法,其中p为0。
17. 权利要求1-15中任何一项的方法,其中p为1。
18. 权利要求1-17中任何一项的方法,其中q为选自2-8的整数。
19. 权利要求1-17中任何一项的方法,其中q为选自4-8的整数。
20. 权利要求1-19中任何一项的方法,其中t为0。
21. 权利要求1-19中任何一项的方法,其中t为1。
22. 权利要求1-21中任何一项的方法,其中 $R^{脂膜}$ 各自独立地选自:





23. 权利要求1-22中任何一项的方法,其中所述脂质选自:





24. 权利要求1-23中任何一项的方法,其中所述脂质与所述CRISPR/Cas9 mRNA的比率为约3:1-约15:1。

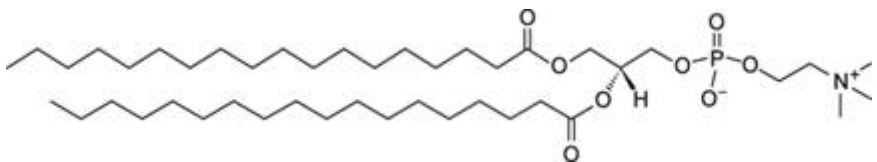
25. 权利要求1-23中任何一项的方法,其中所述脂质与所述CRISPR/Cas9 mRNA的比率为约7.5:1。

26. 权利要求1-25中任何一项的方法,其中所述类脂纳米颗粒进一步包含胆固醇。

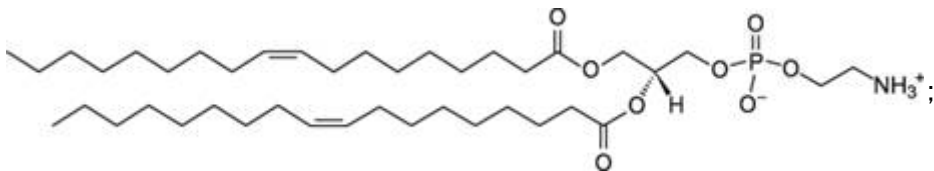
27. 权利要求26的方法,其中所述脂质与所述胆固醇的比率为约1:1-约2:1。

28. 权利要求1-27中任何一项的方法,其中所述类脂纳米颗粒进一步包含DOPE、DSPC或DOPC,和DMG-PEG2K,其中

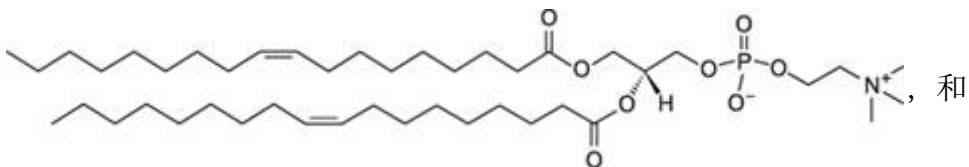
DSPC具有以下结构:



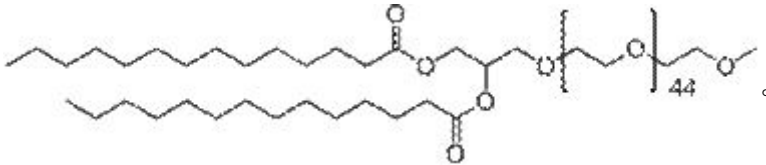
DOPE具有以下结构:



DOPC具有以下结构:



DMG-PEG2K具有以下结构:



29. 权利要求28的方法,其中所述类脂纳米颗粒包含DOPC和DMG-PEG2K。

30. 权利要求29的方法,其中所述脂质与DOPC的比率为约4:1-约6:1和所述脂质与DMG-PEG2K的比率为约4:1-约100:1至约4:1-约20:1。

31. 权利要求1-30中任何一项的方法,其中所述类脂纳米颗粒具有约25 nm-约1000 nm的粒度。

32. 权利要求1-30中任何一项的方法,其中所述类脂纳米颗粒具有约50 nm-约500 nm的粒度。

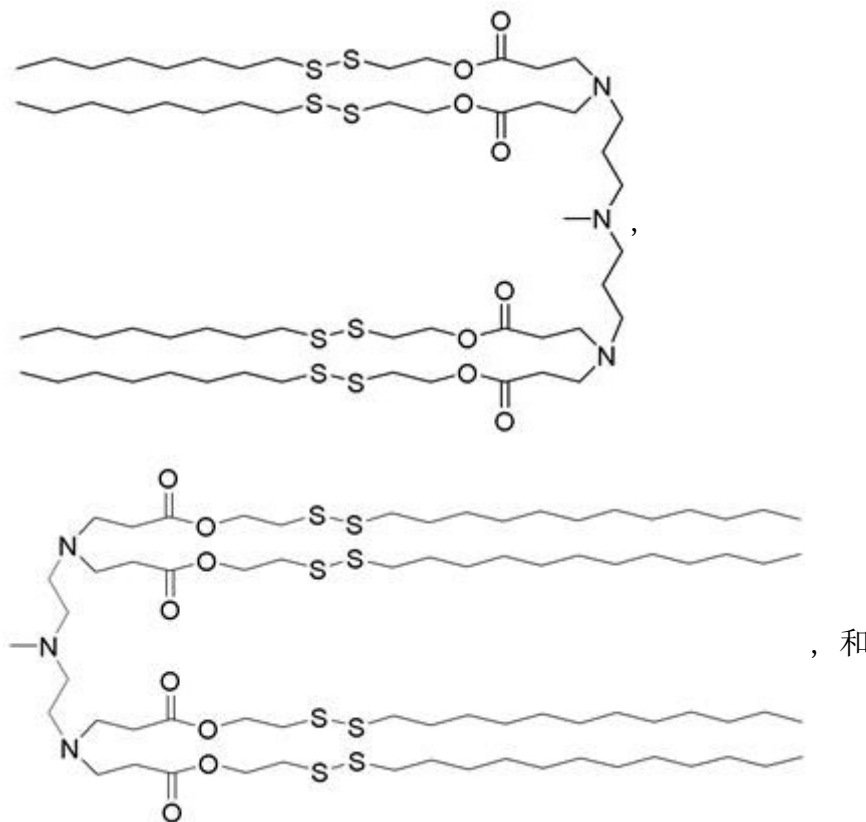
33. 权利要求1-32中任何一项的方法,其中所述人类脂蛋白代谢障碍与ANGPTL3基因中的功能丧失突变相关。

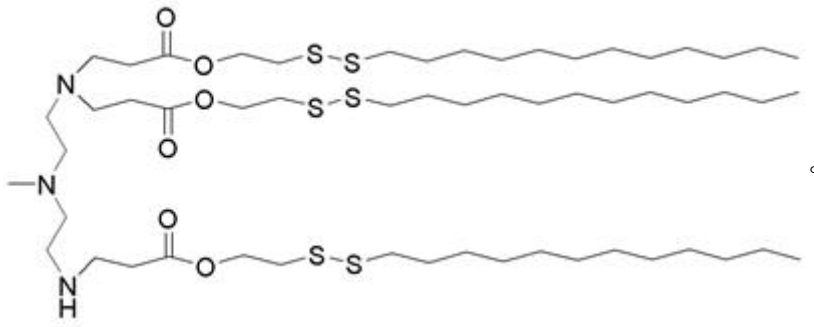
34. 权利要求1-32中任何一项的方法,其中所述心血管疾病与前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型基因(PCSK9)相关。

35. 权利要求1-32中任何一项的方法,其中所述人类脂蛋白代谢障碍与低水平的血浆高密度脂蛋白胆固醇、高水平的血清低密度脂蛋白胆固醇或高水平的甘油三酯相关。

36. 权利要求1-32中任何一项的方法,其中所述心血管疾病选自纯合性家族性高胆固醇血症和高胆固醇血症。

37. 一种选自以下的脂质:





用于mRNA递送的合成脂质

[0001] 相关申请

本申请要求2019年6月4日提交的美国临时申请序列号62/857,111的权益,其内容通过参考以其全部结合至本文中。

[0002] 政府支持

本发明为在美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)授予的资助号EB024041和TR002636下在政府支持下完成的。政府对本发明享有一定权利。

[0003] 背景

血管生成素样3 (ANGPTL3) 为一种用于调控血浆脂蛋白水平的酶。有些人患有ANGPTL3缺陷,这是由ANGPTL3基因中自然发生的功能丧失突变引起的。这些患者显示出血液甘油三酯(TG)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)降低,没有任何明显的因这种丧失引起的临床风险或并发症。最近的遗传和药理学研究证实了这一发现,并且表明ANGPTL3敲低可赋予一些保护性益处,使ANGPTL3成为用于治疗人类脂蛋白代谢障碍的有吸引力的治疗靶标。最近已经验证了针对ANGPTL3的两种不同的治疗抑制策略。在一项临床试验中,一种ANGPTL3靶向单克隆抗体依维苏单抗(evinacumab)已证明可有效降低健康人类志愿者的LDL-C和TG水平。这些结果与一项研究一致,该研究发现给予靶向ANGPTL3信使RNA (mRNA)的反义寡核苷酸(ASO)可在小鼠中实现降低脂质水平以及减缓动脉粥样硬化的进展。此外,还观察到人类致动脉粥样硬化脂蛋白的水平降低,并且在其I期随机临床试验中没有记录到严重的不良事件。这些观察结果有力地证明了ANGPTL3的治疗性拮抗作用在降低脂质水平和动脉粥样硬化心血管疾病的发病率方面为有效和安全的。

[0004] CRISPR/Cas9 (成簇的规律间隔的短回文重复序列[CRISPR]/CRISPR相关蛋白9)系统为最具革命性的基因组编辑工具之一。CRISPR/Cas9以靶向(即序列特异性)方式引入DNA双链断裂(DSB),然后通过非同源末端连接(NHEJ)或同源定向修复(HDR)修复DSB。与短暂的常规ASO或抗体疗法相比较,CRISPR/Cas9系统可诱导永久性功能丧失的靶基因突变,在编辑的细胞中产生长期治疗效果,使CRISPR/Cas9成为用于治疗人类疾病有希望的候选者。然而,CRISPR/Cas9机构的安全、有效和特异性递送仍为一个巨大的技术挑战,这限制了该技术的临床应用。病毒载体(比如腺病毒或腺相关病毒)的使用通常提供非常高的编辑效率,但也带来与不期望的插入诱变和潜在的生物安全问题相关的重大安全风险,这限制了其应用。相比之下,非病毒纳米颗粒(比如脂质纳米颗粒(LNP)、金纳米颗粒和聚合物纳米颗粒)具有更好的安全性特征,已被开发用于CRISPR质粒DNA、信使RNA (mRNA)和核糖核蛋白(RNP)的递送,一般地以降低递送效率为代价。尽管CRISPR以DNA、mRNA和RNP形式中的每一种递送均有潜在优势,但mRNA递送对于体内基因组编辑应用可能特别有希望。

[0005] 概述

一方面,本公开提供治疗人类脂蛋白代谢障碍或心血管疾病的方法,其包括给予需要它的受试者包含脂质、CRISPR/Cas9 mRNA和单引导RNA (sgRNA)的类脂(lipidoid)纳米颗粒,其中

sgRNA为单引导血管生成素样3 (sgANGPTL3)或单引导前蛋白转化酶枯草杆菌蛋

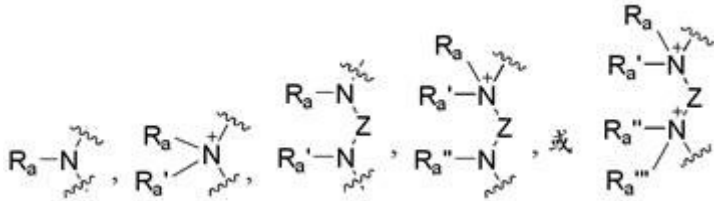
白酶/kexin 9型 (sgPCSK9) ;

脂质由以下式I或其药学上可接受的盐表示:



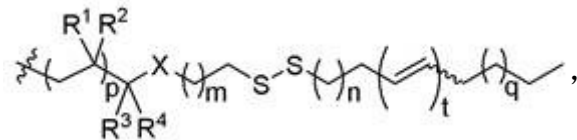
其中

$R^{\text{头部}}$ 为



$R^a, R^{a'}, R^{a''}$ 和 $R^{a'''}$ 各自独立地为 $R^{\text{脂质}}$ 、H、 C_1-C_{20} 烷基、 C_2-C_{20} 烯基、 C_2-C_{20} 炔基、 C_3-C_{20} 环烷基、 C_1-C_{20} 杂烷基、 C_1-C_{20} 杂环烷基、芳基或杂芳基, 其中 R^a 和 $R^{a'}$ 或 $R^{a''}$ 和 $R^{a'''}$ 两者不同时为 $R^{\text{脂质}}$;

Z 为 C_1-C_{20} 二价脂肪族基团、 C_1-C_{20} 二价杂脂肪族基团、二价芳基或二价杂芳基; 和 $R^{\text{脂质}}$ 各自独立地为



其中:

R^1 和 R^2 为 H、OH、 NHR^{30} 或 SH;

R^3 和 R^4 两者为 H; 或者 R^3 和 R^4 一起形成氧代 (=O) 基团;

X 为 CH_2 、O、 NR^{30} 或 S;

R^{30} 为 H、 C_{1-6} 烷基、 C_{1-6} 烯基或 C_{1-6} 炔基;

m 为选自 1-3 的整数;

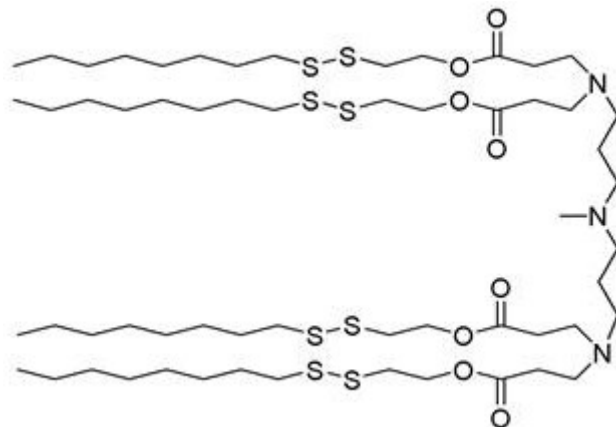
n 为选自 1-14 的整数;

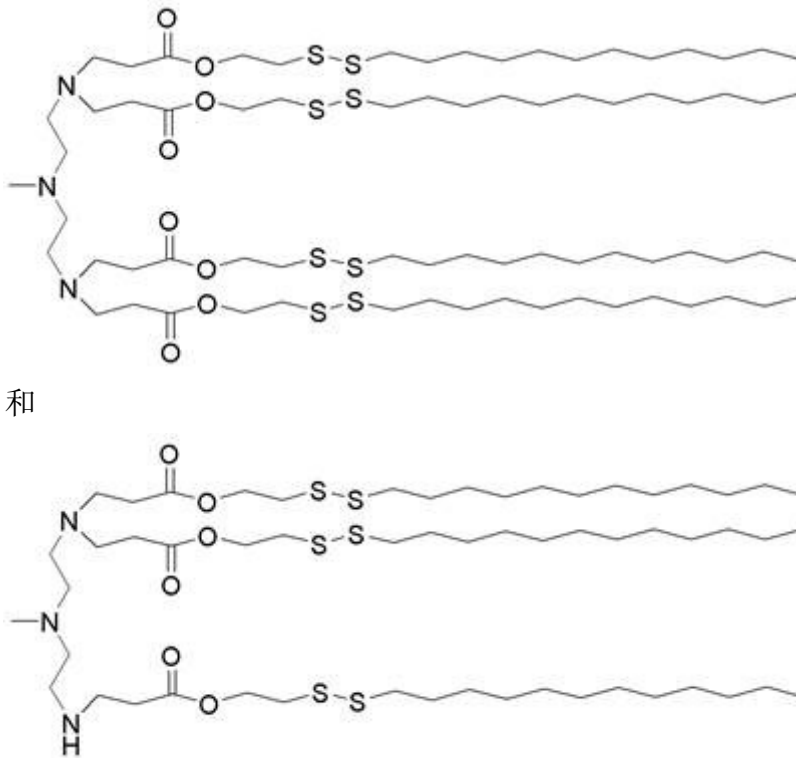
p 为 0 或 1;

q 为选自 1-10 的整数; 和

t 为 0、1 或 2。

[0006] 在另一方面, 本公开提供选自以下的脂质:





[0007] 附图简述

图1A为说明配制用于体外和体内CRISPR/Cas9基因组编辑递送的生物还原性脂质/Cas9 mRNA/sgRNA纳米颗粒的体外和体内Cas9 mRNA递送的示意图。

[0008] 图1B为描绘用于脂质合成的胺的合成路线、脂质命名和化学结构的示意图。

[0009] 图2A为描绘用单独的萤光素酶mRNA (160 ng/mL) 或以不同脂质纳米颗粒的纳米复合物形式处理的A375细胞的萤光素酶表达的条形图。

[0010] 图2B为描绘用单独的RFP mRNA (320 ng/mL) 或以 BAMEA-016B/RFP mRNA纳米颗粒形式转染的HeLa细胞的CLSM图像。比例尺:20 μm 。

[0011] 图2C为描绘用增加浓度的BAMEA-016B/RFP mRNA处理的HeLa细胞的mRNA剂量依赖性RFP表达的条形图。RFP 表达谱在mRNA递送之后24小时量化。

[0012] 图3A显示BAMEA-016B和BAMEA-016的化学结构。

[0013] 图3B为描绘BAMEA-016B/RNA纳米颗粒的细胞摄取效率的条形图。

[0014] 图3C为用BAMEA-016B/Cy3-RNA或BAMEA-016/Cy3-RNA纳米颗粒处理的HeLa细胞的CLSM图像,HeLa细胞用以指定比率与脂质复合用于递送的10 nM Cy3-RNA进行递送,内体使用LysoTracker@Green进行共染色(比例尺:20 μm)。

[0015] 图3D为描绘BAMEA-016B/mRNA递送的图表,显示HeLa细胞中的RFP表达比BAMEA-016纳米颗粒增强。

[0016] 图4A为用单独的Cas9 mRNA/sgGFP或BAMEA/Cas9 mRNA/sgGFP纳米颗粒处理的HEK-GFP细胞的CLSM 图像。比例尺:20 μm 。

[0017] 图4B为描绘用于快速和有效的基因组编辑的BAMEA/Cas9 mRNA/sgGFP纳米颗粒递送的条形图。HEK-GFP细胞用不同剂量的Cas9 mRNA和sgGFP (13 nM) 处理,在递送之后的不同时间点量化GFP表达。

[0018] 图4C为描绘使用BAMEA/Cas9 mRNA/sgGFP纳米颗粒进行sgRNA序列特异性基因组编辑和GFP敲除的图表。GFP-HEK细胞用BAMEA/Cas9 mRNA/sgGFP或BAMEA/Cas9 mRNA/乱序sgRNA纳米颗粒处理,并在mRNA递送后48小时测定GFP敲除效率。

[0019] 图4D为描绘BAMEA/Cas9 mRNA/sgHPV18纳米颗粒的递送有效和选择性地抑制HeLa细胞生长的图表。

[0020] 图5A为注射BAMEA-016B/Cas9 mRNA/Cy3-RNA纳米颗粒(右)或Cas9 mRNA/Cy3-RNA(游离)的小鼠组织的生物发光图像。

[0021] 图5B为注射BAMEA-016B/RFP mRNA纳米颗粒的表明mRNA有效地递送到肝细胞中的小鼠肝脏的荧光图像;比例尺:20 μm 。

[0022] 图5C为描绘BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgPCSK9纳米颗粒治疗有效地降低小鼠血清PCSK9的条形图。Cas9 mRNA纳米颗粒治疗的血清PCSK9水平针对注射DPBS对照的水平进行标准化。

[0023] 图6A为描绘BAMEA-016B、PPPDA-N16B、LPF2K或其mRNA纳米复合物在递送后24小时使用Alamar Blue测定的细胞毒性测定的条形图。

[0024] 图6B为描绘BAMEA-016B、PPPDA-N16B、LPF2K或其mRNA纳米复合物在递送后24小时使用磺基罗丹明B (SRB)测定的细胞毒性测定的条形图。

[0025] 图7为描绘GSH触发的从BAMEA-016B/mRNA复合物释放的mRNA的琼脂糖凝胶电泳图像。

[0026] 图8为描绘在HEK-GFP细胞用Cas9 mRNA (160 ng/mL)和sgGFP (13 nM)、不同脂质纳米颗粒的纳米复合物处理之后GFP沉默的条形图,GFP表达在mRNA递送后48小时量化。

[0027] 图9为BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgRNA纳米颗粒的扫描电子显微镜图像。比例尺:200 nm。

[0028] 图10为描绘BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgRNA纳米颗粒对HEK细胞的细胞毒性测定的条形图。HEK细胞用由5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 脂质和增加浓度的Cas9 mRNA/sgRNA组成的纳米复合物处理10小时,然后使用Alamar Blue测定进行细胞生存力测量。

[0029] 图11为注射BAMEA-016B/Luci mRNA纳米颗粒(右)或游离mRNA(左)的小鼠组织的生物发光成像。

[0030] 图12描绘在注射后两天通过苏木精和曙红染色对肝脏的组织学分析。比例尺,20 μm 。

[0031] 图13为描绘BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgPCSK9注射的小鼠的肝功能测试的条形图。

[0032] 图14为非病毒脂质纳米颗粒(LNP)介导的体内基于CRISPR/Cas9的基因组编辑以诱导ANGPTL3功能丧失突变来降低血脂水平的示意图。Cas9 mRNA和ANGPTL3特异性单引导RNA (sgAngptl3)被包封于LNP中并递送至肝脏肝细胞以在ANGPTL3靶基因座处进行基因组编辑,并随后降低低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG)水平。

[0033] 图15A为尾部分支的生物还原性类脂的化学结构。

[0034] 图15B为描绘在以0.5 mg/kg的萤火虫萤光素酶(fLuc) mRNA剂量给予后6小时在Balb/c小鼠(n=3)中测量的生物还原性LNP相对于MC3 LNP的全身萤光素酶生物发光强度的条形图。制剂:脂质/胆固醇/DSPC/DMG-PEG = 50/38.5/10/1.5 (摩尔比),脂质/mRNA = 12.5/1 (重量比)。

[0035] 图15C为用fLuc mRNA配制的306-012B LNP的大小和分布的动态光散射图。

[0036] 图16A为3种不同磷脂的化学结构。

[0037] 图16B为描绘用胆固醇、DMG-PEG和不同磷脂DSPC或DOPE或DOPC配制的fLuc mRNA LNP的功效的条形图。

[0038] 图16C为描绘用胆固醇、DMG-PEG和不同磷脂DSPC或DOPE或DOPC配制的fLuc mRNA LNP的生物分布的图像。

[0039] 图16D为描绘用胆固醇、DOPC、DMG-PEG以7种不同摩尔比配制的LNP的配制参数的图表。

[0040] 图16E为描绘在以0.5 mg/kg的fLuc mRNA剂量注射后6小时在Balb/c小鼠中不同制剂的全身萤光素酶生物发光强度的条形图。

[0041] 图16F为描绘用具有不同306-012B/mRNA重量比的摩尔比为50/38.5/10/1.5的胆固醇、DOPC、DMG-PEG配制的LNP在注射0.5 mg/kg fLuc mRNA后6小时全身萤光素酶生物发光强度的条形图。(n = 3)

图17A为使用306-012B LNP将Cas9 mRNA和LoxP靶向的单引导RNA (sgLoxP) 共递送至基因工程tdTomato报告物Ai14小鼠的示意图。

[0042] 图17B为从以1.65 mg/kg的总RNA剂量给予包封Cas9 mRNA/sgLoxP (1/1.2, wt) 的LNP的Ai14小鼠收集的器官的离体图像,td Tomato荧光通过IVIS成像系统检测。

[0043] 图17C为显示主要在肝脏肝细胞中表达td Tomato信号的肝脏切片的共聚焦荧光显微图像。(比例尺:20 μ m)

图18A为描绘注射用Cas9 mRNA和sgAngpt13以2:1、1:1.2和1:2的质量比配制的306-012B LNP后的插入缺失百分比的图表。(n = 5)。

[0044] 图18B为描绘注射用Cas9 mRNA和sgAngpt13以2:1、1:1.2和1:2的质量比配制的306-012B LNP后的血清ANGPTL3水平的图表。(n = 5)

图19A为描绘在以3.0 mg/kg的总RNA剂量给予Cas9 mRNA和sgAngpt12共载的306-012B LNP后第7天小鼠的肝脏中插入缺失的下一代序列分析及ANGPTL3蛋白、甘油三酯和LDL-C水平的血清分析的图表。MC-3 LNP用作阳性对照。(n = 5或6)。*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[0045] 图19B描绘每个治疗组中编辑最多的小鼠中特定编辑等位基因的编辑频率。

[0046] 图19C描绘前9个预测的脱靶位点的编辑频率。

[0047] 图20A为用fLuc mRNA配制之前306-012B LNP的代表性TEM图像。(比例尺:500 nm)

图20B为用fLuc mRNA配制之后306-012B LNP的代表性TEM图像。(比例尺:500 nm)

图21为注射fLuc mRNA负载的306-012B LNP和MC-3 LNP的小鼠的体内成像。图像由IVIS成像系统在注射后6小时拍摄。

[0048] 图22为描绘306-012B LNP对fLuc mRNA的包封效率的条形图。

[0049] 图23A为从以0.75 mg/kg的剂量给予包封sgLoxP的306-012B LNP的Ai14/Cas9小鼠收集的器官的离体图像,tdTomato荧光通过IVIS成像系统检测。

[0050] 图23B为显示主要在肝脏肝细胞中表达td Tomato信号的肝脏切片的共聚焦荧光显微术。(比例尺:20 μ m)

图24为描绘Cas9 mRNA/sgAngpt13共载的306-012B LNP的大小分布的动态光散射

图。

[0051] 图25为用在接受Cas9 mRNA/sgAngptl3共载的306-012B LNP和MC-3 LNP之后7天从小鼠采集的肝脏样品的基因组DNA进行的T7E1测定的凝胶电泳图像。箭头显示由T7E1测定产生的切割产物。

[0052] 图26为显示在注射后第2天测量的AST、ALT和TNF- α 的血清水平的图表。(n = 5)。

[0053] 详述

公开了通过将Cas9 mRNA和sgRNA同时包封到生物还原性脂质纳米颗粒中来进行CRISPR/Cas9系统递送用于在体外和体内进行有效和非常快速的基因组编辑的新方法。还公开了用于mRNA递送和CRISPR/Cas9基因组编辑的由含有二硫键的疏水性尾部组成的生物还原性脂质纳米颗粒(图1A和图1B)。

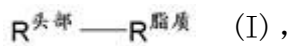
[0054] 在本公开中,经筛选和优化方法鉴定了生物还原性脂质以在体外和体内两者递送报告物mRNA和Cas9 mRNA/sgRNA复合物。生物还原性脂质可经静电相互作用包封mRNA以组装纳米颗粒,同时通过二硫键交换机制响应还原性化学信号在细胞内释放mRNA(图1A)。

[0055] Cas9 mRNA/sgRNA的同时递送高效地敲除人类胚肾(HEK)细胞的GFP表达,并且甚至在Cas9 mRNA递送后也快速观察到有效的基因敲除,这与Cas9/sgRNA RNP递送相比较在体外基因组编辑效率方面显著增强。

[0056] 与非治疗的小鼠相比较,静脉内注射生物还原性脂质纳米颗粒将小鼠血清前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型(PCSK9)有效地敲低到非常低的水平。生物还原性脂质代表迄今为止报道的最有效的非病毒CRISPR/Cas9基因组编辑递送之一。

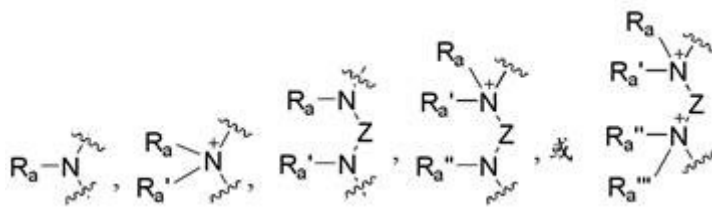
[0057] 一方面,本公开提供治疗人类脂蛋白代谢障碍或心血管疾病的方法,其包括给予需要它的受试者包含脂质、CRISPR/Cas9 mRNA和单引导RNA (sgRNA) 的类脂纳米颗粒,其中sgRNA为单引导血管生成素样3 (sgANGPTL3) 或单引导前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型 (sgPCSK9);

脂质由以下式I或其药学上可接受的盐表示:



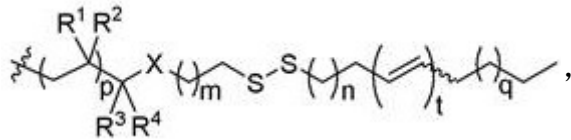
其中

$R^{\text{头部}}$ 为



R^a 、 $R^{a'}$ 、 $R^{a''}$ 和 $R^{a'''}$ 各自独立地为 $R^{\text{脂质}}$ 、H、 C_1 - C_{20} 烷基、 C_2 - C_{20} 烯基、 C_2 - C_{20} 炔基、 C_3 - C_{20} 环烷基、 C_1 - C_{20} 杂烷基、 C_1 - C_{20} 杂环烷基、芳基或杂芳基,其中 R^a 和 $R^{a'}$ 或 $R^{a''}$ 和 $R^{a'''}$ 两者不同时为 $R^{\text{脂质}}$;

Z为 C_1 - C_{20} 二价脂肪族基团、 C_1 - C_{20} 二价杂脂肪族基团、二价芳基或二价杂芳基;和 $R^{\text{脂质}}$ 各自独立地为



其中：

R^1 和 R^2 为H、OH、NHR³⁰或SH；

R^3 和 R^4 两者为H；或者 R^3 和 R^4 一起形成氧代(=O)基团；

X为CH₂、O、NR³⁰或S；

R³⁰为H、C₁₋₆烷基、C₁₋₆烯基或C₁₋₆炔基；

m为选自1-3的整数；

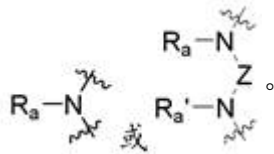
n为选自1-14的整数；

p为0或1；

q为选自1-10的整数；和

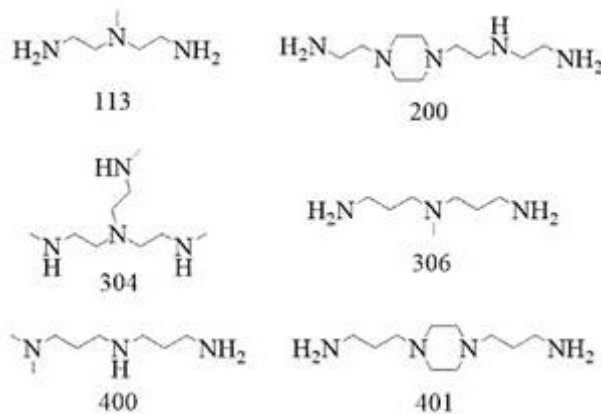
t为0、1或2。

[0058] 在某些实施方案中，R^{头部}为



[0059] 在某些实施方案中，R^a和R^{a'}为R^{脂族}、H或C₁-C₂₀烷基。

[0060] 在某些实施方案中，R^{头部}源自选自以下的化合物：



在某些实施方案中， R^1 和 R^2 为H。在某些实施方案中， R^1 为H；和 R^2 为OH。

[0061] 在某些实施方案中， R^3 和 R^4 为H。在某些实施方案中， R^3 和 R^4 一起形成氧代(=O)基团。

[0062] 在某些实施方案中，Z为CH₂、O或NR³⁰。在某些实施方案中，Z为CH₂。在某些实施方案中，Z为O。在某些实施方案中，Z为NR³⁰。

[0063] 在某些实施方案中，m为1或2。

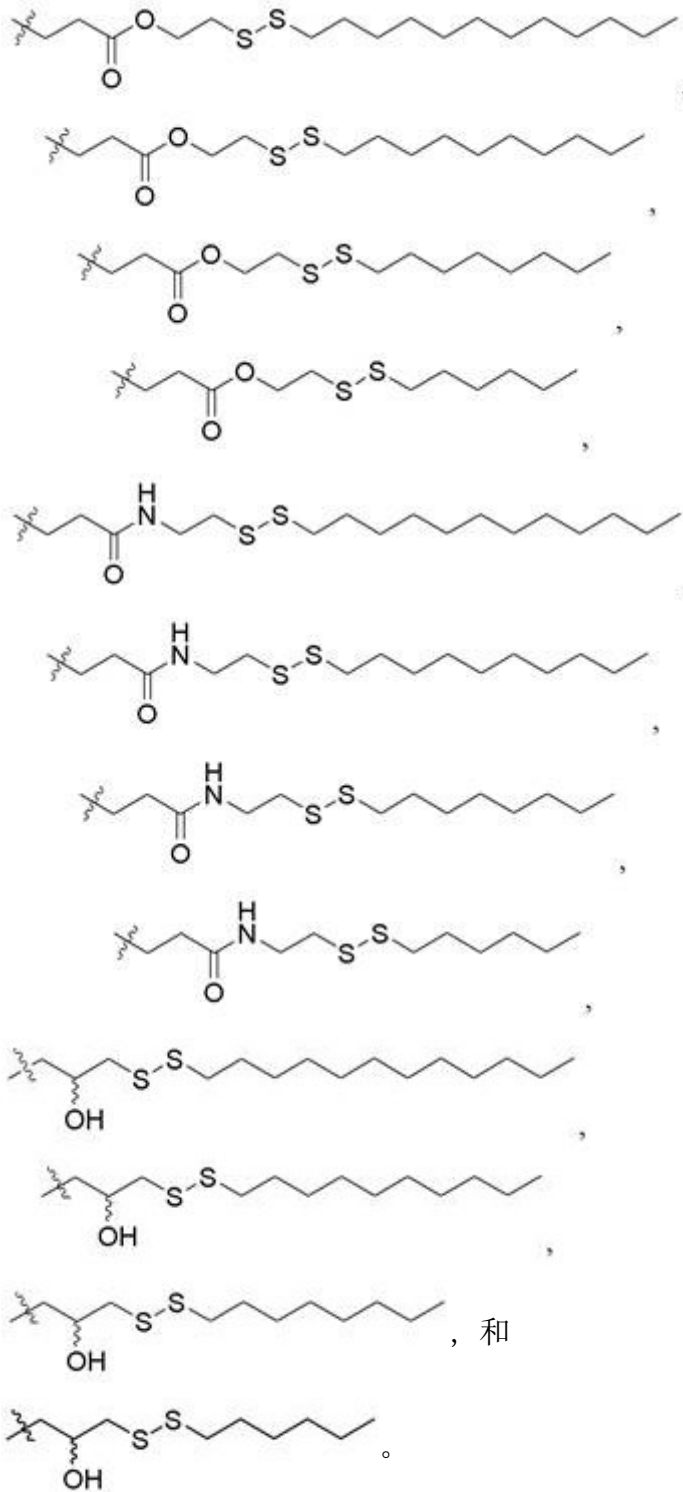
[0064] 在某些实施方案中，n为选自4-12的整数。在某些实施方案中，n为选自6-10的整数。

[0065] 在某些实施方案中，p为0。在某些实施方案中，p为1。

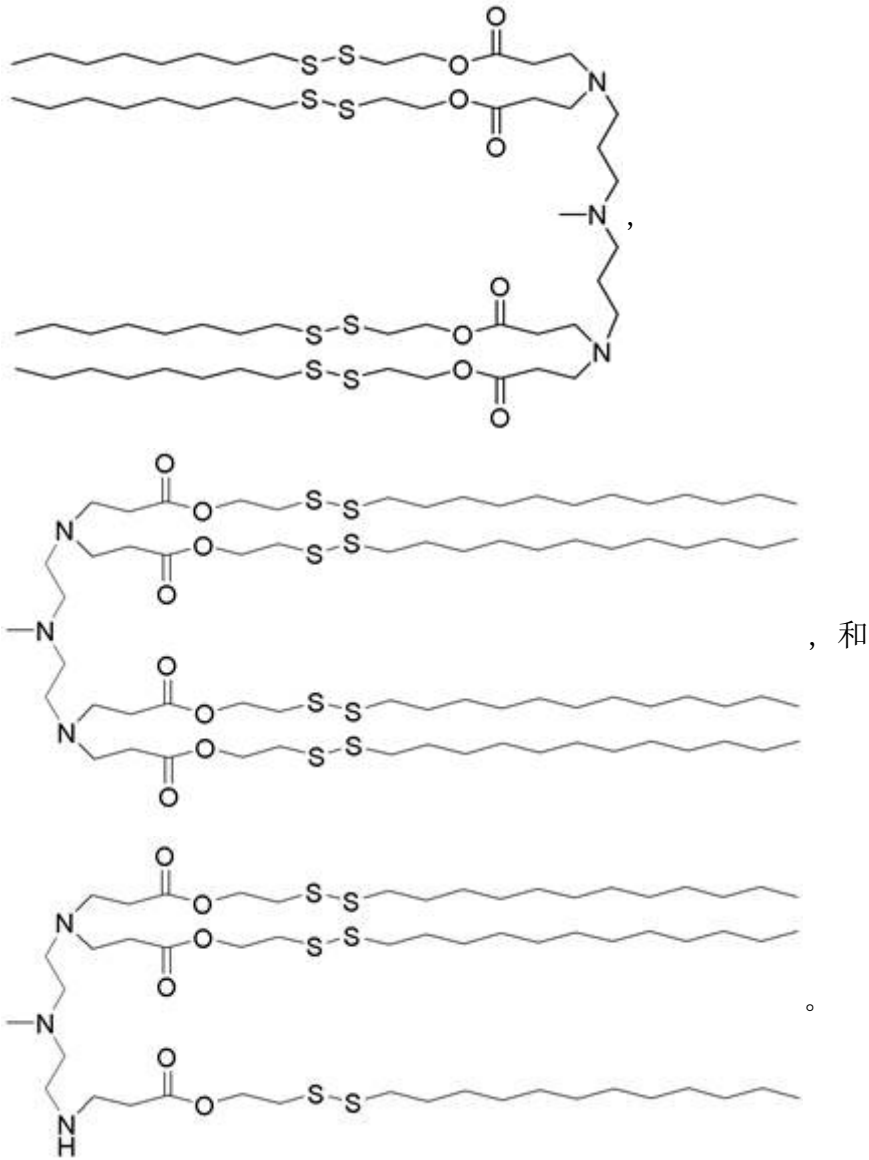
[0066] 在某些实施方案中，q为选自2-8的整数。在某些实施方案中，q为选自4-8的整数。

[0067] 在某些实施方案中,t为0。在某些实施方案中,t为1。

[0068] 在某些实施方案中,R^{脂质}各自独立地选自:



[0069] 在某些实施方案中,脂质选自:



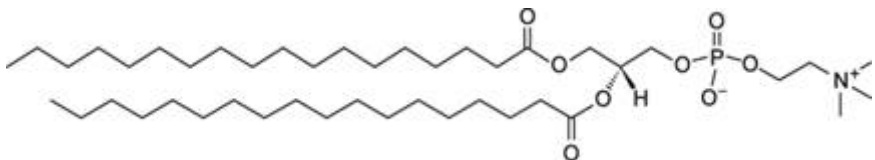
[0070] 在某些实施方案中,脂质与CRISPR/Cas9 mRNA的比率为约3:1-约15:1。在某些实施方案中,脂质与CRISPR/Cas9 mRNA的比率为约7.5:1。

[0071] 在某些实施方案中,类脂纳米颗粒进一步包含胆固醇。

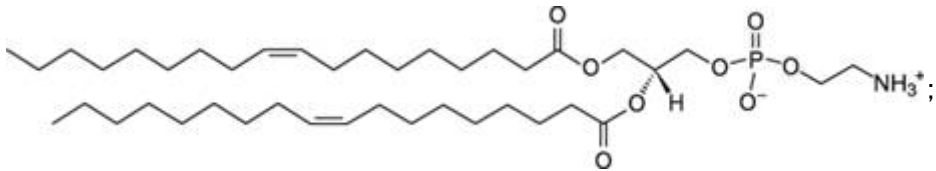
[0072] 在某些实施方案中,脂质与胆固醇的比率为约1:1-约2:1。

[0073] 在某些实施方案中,类脂纳米颗粒进一步包含DOPE、DSPC或DOPC,和DMG-PEG2K,其中

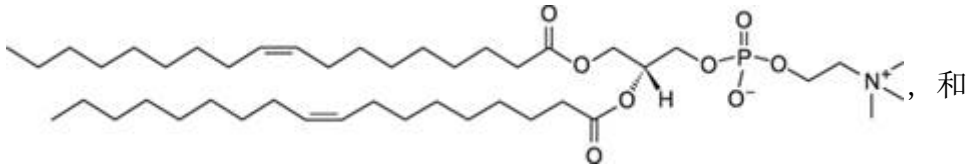
DSPC具有以下结构:



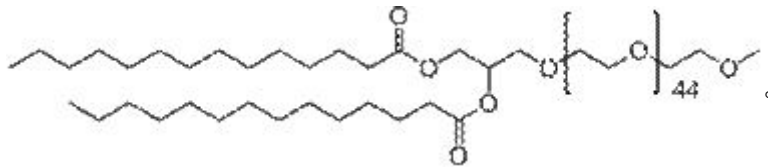
DOPE具有以下结构:



DOPC具有以下结构：



DMG-PEG2K具有以下结构：



[0074] 在某些实施方案中，类脂纳米颗粒进一步包含DOPC和DMG-PEG2K。

[0075] 在某些实施方案中，脂质与DOPC的比率为约4:1-约6:1和脂质与DMG-PEG2K的比率为约4:1-约100:1至约4:1-约20:1。

[0076] 在某些实施方案中，类脂纳米颗粒具有约25 nm-约1000 nm的粒度。在某些实施方案中，类脂纳米颗粒具有约50 nm-约500 nm的粒度。

[0077] 在某些实施方案中，人类脂蛋白代谢障碍与ANGPTL3基因中的功能丧失突变相关。

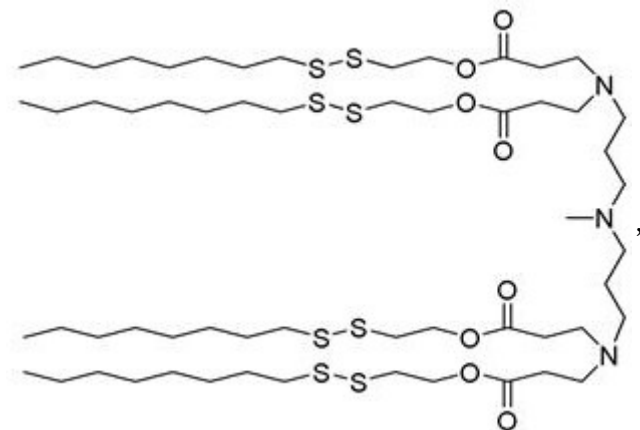
[0078] 在某些实施方案中，心血管疾病与前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型基因(PCSK9)相关。

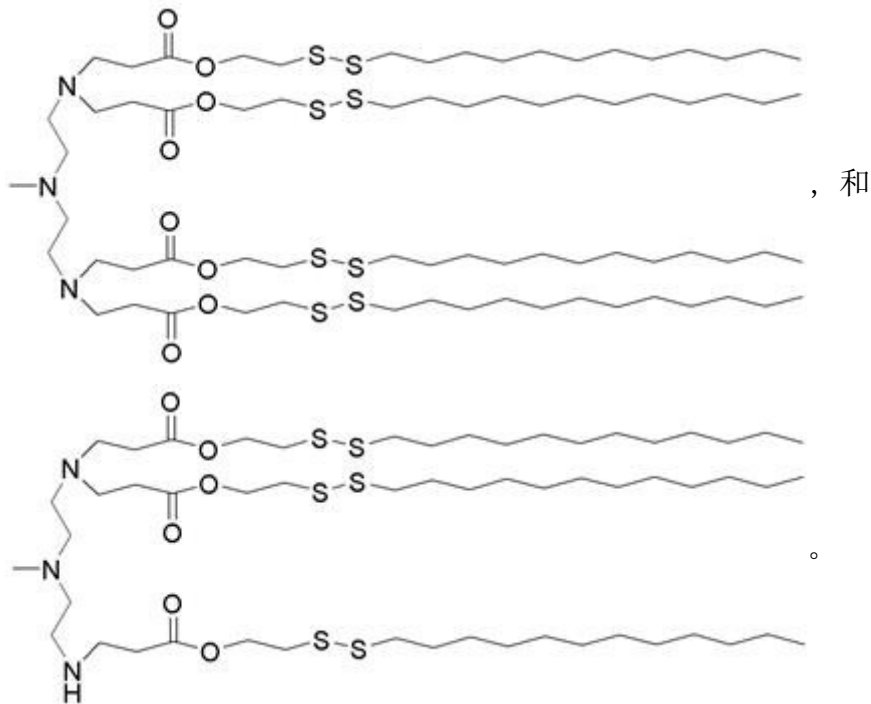
[0079] 在某些实施方案中，人类脂蛋白代谢障碍与降低血浆高密度脂蛋白胆固醇、血清低密度脂蛋白胆固醇或甘油三酯水平相关。

[0080] 在某些实施方案中，人类脂蛋白代谢障碍与低水平的血浆高密度脂蛋白胆固醇、高水平的血清低密度脂蛋白胆固醇或高水平的甘油三酯相关。

[0081] 在某些实施方案中，心血管疾病选自纯合性家族性高胆固醇血症和高胆固醇血症。

[0082] 在另一方面，本公开提供选自以下的脂质：





[0083] 定义

除非本文另外定义,否则本申请中使用的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。通常,与本文描述的化学、细胞和组织培养、分子生物学、细胞和癌症生物学、神经生物学、神经化学、病毒学、免疫学、微生物学、药理学、遗传学及蛋白和核酸化学相关使用的命名和技术,为本领域众所周知和常用的那些。

[0084] 除非另外指明,否则本公开的方法和技术通常根据本领域众所周知以及如在本说明书通篇引用和讨论的各种一般性和更具体参考文献中所描述的常规方法进行。参见例如“Principles of Neural Science”, McGraw-Hill Medical, New York, N.Y. (2000); Motulsky, “Intuitive Biostatistics”, Oxford University Press, Inc. (1995); Lodish等人, “Molecular Cell Biology, 4th ed.”, W. H. Freeman & Co., New York (2000); Griffiths等人, “Introduction to Genetic Analysis, 7th ed.”, W. H. Freeman & Co., N.Y. (1999);和Gilbert等人, “Developmental Biology, 6th ed.”, Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (2000)。

[0085] 除非本文另外定义,否则本文使用的化学术语根据本领域的常规用法使用,如“The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms”, Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco, C.A. (1985)所例示的。

[0086] 如本文使用的术语“任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情况可能发生或可能不发生,并且该描述包括其中事件或情况发生的情形以及其中不发生的情形。例如,“任选取代的烷基”是指烷基可被取代以及其中烷基未被取代。

[0087] 应当理解,本发明化合物上的取代基和取代模式可由本领域的普通技术人员之一选择以产生化学稳定的化合物,其可从易于获得的起始材料通过本领域已知的技术以及以下阐述的那些方法易于合成。如果取代基本身被多于一个基团取代,则应当理解这些多个基团可位于相同碳上或不同碳上,只要产生稳定的结构即可。

[0088] 如本文使用的术语“任选取代的”是指用特定取代基的基团替换给定结构中的1-6

个氢基团,所述特定取代基包括(但不限于):羟基、羟基烷基、烷氧基、卤素、烷基、硝基、甲基硅烷基、酰基、酰氧基、芳基、环烷基、杂环基、氨基、氨基烷基、氰基、卤代烷基、卤代烷氧基、 $-\text{OCO}-\text{CH}_2-\text{O}-$ 烷基、 $-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{烷基})_2$ 或 $-\text{CH}_2-\text{OP}(\text{O})(\text{O}-\text{烷基})_2$ 。优选地,“任选取代的”是指用上述取代基替换给定结构中的1-4个氢基团。更优选地,1-3个氢基团被如上所述的取代基替换。应当理解,取代基可进一步被取代。

[0089] 冠词比如“一(a)”、“一个(an)”和“该(the)”可意指一个或多个,除非表明相反或者以其他方式从上下文中明显看出。如果组成员的一个、多于一个或所有成员存在于、用于给定的产物或过程或者以其他方式与之相关,则认为满足在该组的一个或多个成员之间包括“或”的权利要求或描述,除非表明相反或者以其他方式从上下文中明显看出。本发明包括这样的实施方案,其中该组的恰好一个成员存在于、用于给定的产物或过程或者以其他方式与之相关。本发明包括这样的实施方案,其中该组成员的多于一个或所有成员存在于、用于给定的产物或过程或者以其他方式与之相关。

[0090] 如本文使用的术语“烷基”是指饱和脂肪族基团,包括(但不限于) C_1-C_{10} 直链烷基或 C_1-C_{10} 支链烷基。优选地,“烷基”是指 C_1-C_6 直链烷基或 C_1-C_6 支链烷基。最优选地,“烷基”是指 C_1-C_4 直链烷基或 C_1-C_4 支链烷基。“烷基”的实例包括(但不限于)甲基、乙基、1-丙基、2-丙基、正丁基、仲丁基、叔丁基、1-戊基、2-戊基、3-戊基、新戊基、1-己基、2-己基、3-己基、1-庚基、2-庚基、3-庚基、4-庚基、1-辛基、2-辛基、3-辛基或4-辛基等。“烷基”可任选地被取代。

[0091] 术语“酰基”为领域公认的并且是指由通式烃基 $\text{C}(\text{O})-$,优选地烷基 $\text{C}(\text{O})-$ 表示的基团。

[0092] 术语“酰氨基”为领域公认的并且是指被酰基取代的氨基并且可例如由式烃基 $\text{C}(\text{O})\text{NH}-$ 表示。

[0093] 术语“酰氧基”为领域公认的并且是指由通式烃基 $\text{C}(\text{O})\text{O}-$,优选地烷基 $\text{C}(\text{O})\text{O}-$ 表示的基团。

[0094] 术语“烷氧基”是指具有与之连接的氧的烷基。代表性的烷氧基包括甲氧基、乙氧基、丙氧基、叔丁氧基等。

[0095] 术语“烷氧基烷基”是指被烷氧基取代的烷基并且可由通式烷基- $\text{O}-$ 烷基表示。

[0096] 术语“烷基”是指饱和脂肪族基团,包括直链烷基、支链烷基、环烷基(脂环族)基团、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。在优选的实施方案中,直链或支链烷基在其骨架中具有30个或更少的碳原子(例如对于直链为 C_{1-30} ,对于支链为 C_{3-30}),并且更优选地为20个或更少。

[0097] 此外,如说明书、实施例和权利要求通篇使用的术语“烷基”旨在包括未取代的和取代的烷基两者,其后者是指具有替换烃骨架的一个或多个碳上的氢的取代基的烷基部分,包括卤代烷基,比如三氟甲基和2,2,2-三氟乙基等。

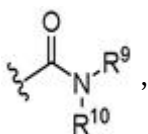
[0098] 术语“ C_{x-y} ”或“ C_x-C_y ”在连同化学部分比如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基一起使用时意指包括链中含有 $x-y$ 个碳的基团。 C_0 烷基当该基团位于末端位置时表示氢,如果是内部则为键。例如, C_{1-6} 烷基在链中含有1-6个碳原子。

[0099] 如本文使用的术语“烷基氨基”是指被至少一个烷基取代的氨基。

[0100] 如本文使用的术语“烷硫基”是指被烷基取代的硫醇基团并且可由通式烷基 $\text{S}-$ 表

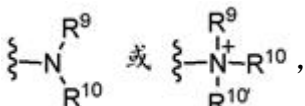
示。

[0101] 如本文使用的术语“酰胺”是指以下基团



其中 R^9 和 R^{10} 各自独立地代表氢或烃基,或者 R^9 和 R^{10} 与它们连接的N原子一起构成在环结构中具有4-8个原子的杂环。

[0102] 术语“胺”和“氨基”为领域公认的并且是指未取代的和取代的胺及其盐两者,例如可由以下表示的部分



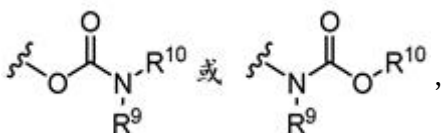
其中 R^9 、 R^{10} 和 $R^{10'}$ 各自独立地代表氢或烃基,或者 R^9 和 R^{10} 与它们连接的N原子一起构成在环结构中具有4-8个原子的杂环。

[0103] 如本文使用的术语“氨基烷基”是指被氨基取代的烷基。

[0104] 如本文使用的术语“芳烷基”是指被芳基取代的烷基。

[0105] 如本文使用的术语“芳基”包括其中环的每个原子为碳的取代或未取代的单环芳族基团。优选地,环为5-7元环,更优选地为6元环。术语“芳基”还包括具有两个或更多个环的多环系统,其中两个或更多个碳为两个相邻环共有的,其中至少一个环为芳族的,例如其他环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。芳基包括苯、萘、菲、苯酚、苯胺等。

[0106] 术语“氨基甲酸酯”为领域公认的并且是指以下基团



其中 R^9 和 R^{10} 独立地代表氢或烃基。

[0107] 如本文使用的术语“碳环基烷基”是指被碳环基团取代的烷基。

[0108] 术语“碳环”包括5-7元单环和8-12元双环。双环碳环的每个环可选自饱和、不饱和和芳族环。碳环包括其中在两个环之间共享一、二或三或更多个原子的双环分子。术语“稠合碳环”是指其中每个环与另一个环共享两个相邻原子的双环碳环。稠合碳环的每个环可选自饱和、不饱和和芳族环。在一个示例性实施方案中,芳族环例如苯基可稠合于饱和或不饱和环例如环己烷、环戊烷或环己烯。在化合价允许的情况下,饱和、不饱和和芳族双环的任何组合均包括在碳环的定义中。示例性的“碳环”包括环戊烷、环己烷、双环[2.2.1]庚烷、1,5-环辛二烯、1,2,3,4-四氢化萘、双环[4.2.0]辛-3-烯、萘和金刚烷。示例性的稠合碳环包括萘烷、萘、1,2,3,4-四氢化萘、双环[4.2.0]辛烷、4,5,6,7-四氢-1H-茚和双环[4.1.0]庚-3-烯。“碳环”可在任何一个或多个能够带有氢原子的位置处被取代。

[0109] 如本文使用的术语“碳环基烷基”是指被碳环基团取代的烷基。

[0110] 术语“碳酸酯”为领域公认的并且是指基团 $-OCO_2^-$ 。

[0111] 如本文使用的术语“羧基”是指由式 $-CO_2H$ 表示的基团。

[0112] 如本文使用的术语“酯”是指基团-C(O)OR⁹,其中R⁹代表烃基。

[0113] 如本文使用的术语“醚”是指通过氧连接于另一个烃基的烃基。因此,烃基的醚取代基可为烃基-O-。醚可为对称或不对称的。醚的实例包括(但不限于)杂环-O-杂环和芳基-O-杂环。醚包括“烷氧基烷基”,其可由通式烷基-O-烷基表示。

[0114] 如本文使用的术语“卤代”和“卤素”意指卤素并且包括氯、氟、溴和碘。

[0115] 如本文使用的术语“杂芳烷基(hetaralkyl)”和“杂芳烷基(heteroaralkyl)”是指被杂芳基取代的烷基。

[0116] 术语“杂芳基(heteroaryl)”和“杂芳基(hetaryl)”包括取代或未取代的芳族单环结构,优选地为5-7元环,更优选地为5-6元环,其环结构包括至少一个杂原子,优选地1-4个杂原子,更优选地一或两个杂原子。术语“杂芳基”和“杂芳基”还包括具有两个或更多个环的多环系统,其中两个或更多个碳为两个相邻环共有的,其中至少一个环为杂芳族的,例如其他环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。杂芳基包括例如吡咯、咪唑、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、吡嗪、哒嗪和嘧啶等。

[0117] 如本文使用的术语“杂原子”意指除碳或氢以外任何元素的原子。优选的杂原子为氮、氧和硫。

[0118] 如本文使用的术语“杂环基烷基”是指被杂环基团取代的烷基。

[0119] 术语“杂环基”、“杂环”和“杂环的”是指取代或未取代的非芳族环结构,优选地为3-10元环,更优选地为3-7元环,其环结构包括至少一个杂原子,优选地1-4个杂原子,更优选地一或两个杂原子。术语“杂环基”和“杂环的”还包括具有两个或更多个环的多环系统,其中两个或更多个碳为两个相邻环共有的,其中至少一个环为杂环,例如其他环可为环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基。杂环基包括例如哌啶、哌嗪、吡咯烷、吗啉、内酯、内酰胺等。

[0120] 如本文使用的术语“烃基”是指通过不具有=O或=S取代基的碳原子键合的基团,并且一般地具有至少一个碳-氢键和主要为碳的骨架,但可任选地包括杂原子。因此,出于本申请的目的,基团如甲基、乙氧基乙基、2-吡啶基并且甚至三氟甲基认为是烃基,但取代基比如乙酰基(在连接碳上具有=O取代基)和乙氧基(通过氧而不是碳连接)则不是。烃基包括(但不限于)芳基、杂芳基、碳环、杂环、烷基、烯基、炔基及其组合。

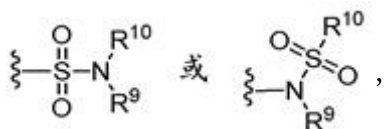
[0121] 如本文使用的术语“羟基烷基”是指被羟基取代的烷基。

[0122] 当连同化学部分比如酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基一起使用时,术语“低级”意指包括其中在取代基中存在10个或更少原子,优选地6个或更少原子的基团。例如,“低级烷基”是指含有10个或更少,优选地6个或更少碳原子的烷基。在某些实施方案中,本文定义的酰基、酰氧基、烷基、烯基、炔基或烷氧基取代基分别为低级酰基、低级酰氧基、低级烷基、低级烯基、低级炔基或低级烷氧基,无论它们单独还是与其他取代基组合出现,比如在叙述中的羟基烷基和芳烷基(在这种情况下,例如在计数烷基取代基中的碳原子时,芳基内的原子不计数在内)。

[0123] 术语“多环基”、“多环”和“多环的”是指其中两个或更多个原子为两个相邻环共有的两个或更多个环(例如环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基和/或杂环基),例如这些环为“稠环”。多环的每个环可为取代或未被取代的。在某些实施方案中,多环的每个环在环中含有3-10个原子,优选地5-7个。

[0124] 术语“硫酸酯”为领域公认的并且是指基团 $-\text{OSO}_3\text{H}$ 或其药学上可接受的盐。

[0125] 术语“磺胺”为领域公认的并且是指由以下通式表示的基团



其中 R^9 和 R^{10} 独立地代表氢或烃基。

[0126] 术语“亚砷”为领域公认的并且是指基团 $-\text{S}(0)-$ 。

[0127] 术语“磺酸盐”为领域公认的并且是指基团 SO_3H 或其药学上可接受的盐。

[0128] 术语“砷”为领域公认的并且是指基团 $-\text{S}(0)_2-$ 。

[0129] 术语“取代的”是指具有替换骨架的一个或多个碳上的氢的取代基的部分。应当理解“取代”或“被...取代”包括这样的隐含条件,即这种取代符合被取代原子和取代基的允许化合价,并且取代产生稳定的化合物,例如其不会自发地比如通过重排、环化、消除等经历转化。如本文使用的术语“取代的”考虑包括有机化合物所有允许的取代基。在一个广泛方面,允许的取代基包括有机化合物的无环和环状、分支和未分支、碳环和杂环、芳族和非芳族取代基。对于适当的有机化合物,允许的取代基可为一个或多个并且相同或不同。出于本发明的目的,杂原子比如氮可具有氢取代基和/或满足杂原子化合价的本文所述的有机化合物的任何允许的取代基。取代基可包括本文所述的任何取代基,例如卤素、羟基、羰基(比如羧基、烷氧基羰基、甲酰基或酰基)、硫代羰基(例如硫代酸酯、硫代乙酸酯或硫代甲酸酯)、烷氧基、磷酰基、磷酸酯、膦酸酯、次膦酸酯、氨基、酰氨基、脘、亚胺、氰基、硝基、叠氮基、巯基、烷硫基、硫酸酯、磺酸酯、氨磺酰基、磺酰氨基、磺酰基、杂环基、芳烷基或者芳族或杂芳族部分。本领域的技术人员应当理解,如果适当的话,烃链上被取代的部分本身可被取代。

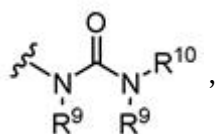
[0130] 如本文使用的术语“硫代烷基”是指被硫醇基团取代的烷基。

[0131] 如本文使用的术语“硫代酸酯”是指基团 $-\text{C}(0)\text{SR}^9$ 或 $-\text{SC}(0)\text{R}^9$

其中 R^9 代表烃基。

[0132] 如本文使用的术语“硫醚”等同于醚,其中氧被硫替换。

[0133] 术语“脲”为领域公认的并且可由以下通式表示



其中 R^9 和 R^{10} 独立地代表氢或烃基。

[0134] 如本文使用的术语“调节”包括抑制或阻抑功能或活性(比如细胞增殖)以及增强功能或活性。

[0135] 短语“药学上可接受的”为领域公认的。在某些实施方案中,该术语包括组合物、赋形剂、佐剂、聚合物和其他材料和/或剂型,其在合理的医学判断范围内适合用于与人和动物的组织接触而没有过度毒性、刺激、过敏反应或其他问题或并发症,与合理的益处/风险比相称。

[0136] “盐”在本文中用于指酸加成盐或碱加成盐。

[0137] 可用于本公开的方法和组合物中的许多化合物在其结构中具有至少一个立体异构源中心。该立体异构源中心可以R或S构型存在,所述R和S符号的使用与Pure Appl. Chem. (1976), 45, 11-30中描述的规则一致。本公开考虑化合物、其盐、前药或混合物(包括立体异构体的所有可能混合物)的所有立体异构形式,比如对映体和非对映异构形式。参见例如WO 01/062726。

[0138] 此外,某些含有烯基的化合物可作为Z (同侧)或E (异侧)异构体存在。在每种情况下,本公开包括混合物和单独的单个异构体两者。

[0139] 一些化合物也可以互变异构形式存在。这种形式,尽管在本文所述的式中未明确指出,但旨在包括在本公开的范围之内。

[0140] “药学上可接受的”意指被联邦或州政府的监管机构或除美国以外国家的相应机构批准或可批准的,或在美國药典或其他普遍公认的药典中列出用于动物,并且更特别的是用于人类。

[0141] “药学上可接受的盐”是指本发明化合物的药学上可接受的并且具有母体化合物期望的药理活性的盐。特别地,这种盐为非毒性的,可为无机或有机酸加成盐和碱加成盐。具体地讲,这种盐包括:(1) 酸加成盐,用无机酸比如盐酸、氢溴酸、硫酸、硝酸、磷酸等形成;或用有机酸比如乙酸、丙酸、己酸、环戊烷丙酸、乙醇酸、丙酮酸、乳酸、丙二酸、琥珀酸、苹果酸、马来酸、富马酸、酒石酸、枸橼酸、苯甲酸、3-(4-羟基苯甲酰基)苯甲酸、肉桂酸、扁桃酸、甲磺酸、乙磺酸、1,2-乙二磺酸、2-羟基乙磺酸、苯磺酸、氯苯磺酸、2-萘磺酸、4-甲苯磺酸、樟脑磺酸、4-甲基双环[2.2.2]-辛-2-烯-1-甲酸、葡庚糖酸、3-苯基丙酸、三甲基乙酸、叔丁基乙酸、月桂基硫酸、葡萄糖酸、谷氨酸、羟基萘甲酸、水杨酸、硬脂酸、粘康酸等形成;或者(2)当母体化合物中存在的酸性质子被金属离子(例如碱金属离子、碱土离子或铝离子)替换,或用有机碱比如乙醇胺、二乙醇胺、三乙醇胺、N-甲基葡糖胺等配位时形成的盐。盐进一步包括,仅作为示例,钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵等;并且当化合物含有碱性官能团时,包括非毒性有机或无机酸的盐,比如盐酸盐、氢溴酸盐、酒石酸盐、甲磺酸盐、乙酸盐、马来酸盐、草酸盐等。

[0142] 术语“药学上可接受的阳离子”是指酸性官能团的可接受的阳离子抗衡离子。这种阳离子由以下例示:钠、钾、钙、镁、铵、四烷基铵阳离子等(参见例如Berge,等人, J. Pharm. Sci. 66 (1):1-79 (1月 77))。

[0143] “药学上可接受的媒介物”是指与本发明化合物一起给予的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。

[0144] “药学上可接受的代谢可裂解基团”是指在体内裂解以产生本文所示结构式的母体分子的基团。代谢可裂解基团的实例包括-COR、-COOR、-CONRR和-CH₂OR基团,其中R在每种情况下独立地选自烷基、三烷基甲硅烷基、碳环芳基或被烷基、卤素、羟基或烷氧基中的一种或多种取代的碳环芳基。代表性代谢可裂解基团的具体实例包括乙酰基、甲氧基羰基、苯甲酰基、甲氧基甲基和三甲基甲硅烷基。

[0145] “前药”是指化合物,包括本发明化合物的衍生物,其具有可裂解基团并且通过溶剂分解或在生理条件下变成在体内具有药用活性的本发明化合物。这种实例包括(但不限于)胆碱酯衍生物等、N-烷基吗啉酯等。本发明化合物的其他衍生物在其酸和酸衍生物形式两者方面均具有活性,但在酸敏感形式方面通常提供在哺乳动物生物体中的溶解性、组织

相容性或延迟释放的优点(参见Bundgard, H., Design of Prodrugs, pp. 7-9, 21-24, Elsevier, Amsterdam 1985)。前药包括本领域专业人员众所周知的酸衍生物,比如通过母体酸与合适的醇反应制备的酯或者通过母体酸化合物与取代或未取代的胺反应制备的酰胺或者酸酐或者混合酸酐。衍生自悬挂于本发明化合物上的酸性基团的简单脂肪族或芳族酯、酰胺和酸酐为特定前药。在某些情况下,期望制备双酯型前药,比如(酰氧基)烷基酯或((烷氧基羰基)氧基)烷基酯。特别是本发明化合物的C₁-C₈烷基、C₂-C₈烯基、C₂-C₈炔基、芳基、C₇-C₁₂取代的芳基和C₇-C₁₂芳基烷基酯。

[0146] “溶剂合物”是指通常通过溶剂分解反应与溶剂或水(也称为“水合物”)缔合的化合物形式。这种物理缔合包括氢键合。常规溶剂包括水、乙醇、乙酸等。本发明的化合物可例如以结晶形式制备并且可被溶剂化或水合。合适的溶剂合物包括药学上可接受的溶剂合物,比如水合物,并且进一步包括化学计量的溶剂合物和非化学计量的溶剂合物两者。在某些情况下,溶剂合物将能够分离,例如当一个或多个溶剂分子掺入结晶固体的晶格中时。“溶剂合物”包括溶液相和可分离的溶剂合物两者。代表性的溶剂合物包括水合物、乙醇合物和甲醇合物。

[0147] 考虑给予的“受试者”包括(但不限于)人类(即任何年龄组的男性或女性,例如儿科受试者(例如婴儿、儿童、青少年)或成人受试者(例如年轻人、中年人或老年人))和/或非人类动物(例如哺乳动物,比如灵长类动物(例如食蟹猴、恒河猴)、牛、猪、马、绵羊、山羊、啮齿动物、猫和/或狗)。在某些实施方案中,受试者为人类。在某些实施方案中,受试者为非人类动物。术语“人类”、“患者”和“受试者”在本文中可互换使用。

[0148] “有效量”意指当给予受试者用于治疗或预防疾病时足以实现这种治疗或预防的化合物的量。“有效量”可根据化合物、疾病及其严重性以及待治疗受试者的年龄、体重等而变化。“治疗有效量”是指用于治疗性治疗的有效量。“预防有效量”是指预防性治疗的有效量。

[0149] “预防”或“防止”或“预防性治疗”是指降低获得或发展疾病或障碍的风险(即在疾病发作之前导致尚未暴露于致病因子或易患疾病的受试者不发展疾病的至少一种临床症状)。

[0150] 术语“防止”与“预防”相关,并且是指以预防而非治疗或治愈疾病为目的的措施或程序。预防措施的非限制性实例可包括给予疫苗;给予由于例如固定所致而处于血栓形成风险下的住院患者低分子量肝素以及在访问疟疾流行或感染疟疾风险高的地理区域之前给予抗疟药比如氯喹。

[0151] 在一个实施方案中,任何疾病或障碍的“治疗(Treating)”或“治疗(treatment)”或“治疗性治疗”是指改善疾病或障碍(即阻止疾病或减少其至少一种临床症状的表现、程度或严重性)。在另一个实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指改善受试者可能无法辨别的至少一个身体参数。在仍然另一个实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”是指在身体上(例如可辨别症状的稳定)、在生理上(例如身体参数的稳定)或两者调节疾病或障碍。在进一步的实施方案中,“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”涉及减缓疾病的进展。

[0152] 如本文使用的术语“同位素变体”是指在构成这种化合物的一个或多个原子处含有非天然比例的同位素的化合物。例如,化合物的“同位素变体”可含有一种或多种非放射

性同位素,比如氘(^2H 或D)、碳-13 (^{13}C)、氮-15 (^{15}N)等。应当理解,在其中进行这种同位素取代的化合物中,以下原子(如果存在的话)可以变化,使得例如任何氢可为 $^2\text{H}/\text{D}$,任何碳可为 ^{13}C ,或者任何氮可为 ^{15}N ,并且这种原子的存在和位置可在本领域技术范围内确定。同样,本发明可包括制备具有放射性同位素的同位素变体,例如,在其中所得化合物可用于药物和/或底物组织分布研究的情况下。放射性同位素氚(即 ^3H)和碳-14(即 ^{14}C)鉴于其易于掺入和易于检测而特别可用于该目的。进一步地,可制备被正电子发射同位素比如 ^{11}C 、 ^{18}F 、 ^{15}O 和 ^{13}N 取代的化合物,并且该化合物可用于正电子发射断层扫描(PET)研究以检查底物受体占有率。本文提供的化合物的所有同位素变体,无论是否具有放射性,均旨在包括在本发明的范围内。

[0153] 还应当理解,具有相同分子式但其原子的性质或键合顺序或者其原子的空间排列不同的化合物称为“异构体”。其原子的空间排列不同的异构体称为“立体异构体”。

[0154] 彼此不为镜像的立体异构体称为“非对映异构体”,和彼此为非重叠镜像的那些称为“对映体”。当化合物具有不对称中心,例如其与4个不同的基团键合时,一对对映体是可能的。对映体可特征在于其不对称中心的绝对构型,并且由Cahn和Prelog的R-和S-测序规则描述或者通过其中分子旋转偏振光平面的方式描述,并指定为右旋或左旋(即分别作为(+)-或(-)-异构体)。手性化合物可作为单个对映体或作为其混合物存在。含有等比例对映体的混合物称为“外消旋混合物”。

[0155] “互变异构体”是指以下化合物,其为特定化合物结构的可互换形式,并且在氢原子和电子的置换方面有所不同。因此,通过其电子和原子(通常为H)的运动,两种结构可能处于平衡状态。例如,烯醇和酮为互变异构体,因为它们通过用酸或碱处理会快速相互转化。互变异构的另一个实例为苯基硝基甲烷的酸(acid)和硝基形式,它们同样通过用酸或碱处理形成。互变异构形式可能与获得目标化合物的最佳化学反应性和生物活性相关。

[0156] 如本文使用的纯对映体化合物基本上不含该化合物的其他对映体或立体异构体(即对映体过量)。换言之,化合物的“S”形式基本上不含化合物的“R”形式,并且因此为“R”形式的对映体过量。术语“对映体纯的”或“纯的对映体”表示化合物包含按重量计大于95%、按重量计大于96%、按重量计大于97%、按重量计大于98%、按重量计大于98.5%、按重量计大于99%、按重量计大于99.2%、按重量计大于99.5%、按重量计大于99.6%、按重量计大于99.7%、按重量计大于99.8%或按重量计大于99.9%的对映体。在某些实施方案中,重量为基于化合物的所有对映体或立体异构体的总重量。

[0157] 如本文使用的且除非另外指明,术语“对映体纯的R-化合物”是指按重量计至少约95%的R-化合物和按重量计至多约5%的S-化合物、按重量计至少约99%的R-化合物和按重量计至多约1%的S-化合物或按重量计至少约99.9%的R-化合物和按重量计至多约0.1%的S-化合物。在某些实施方案中,重量为基于化合物的总重量。

[0158] 如本文使用的且除非另外指明,术语“对映体纯的S-化合物”或“S-化合物”是指按重量计至少约95%的S-化合物和按重量计至多约5%的R-化合物、按重量计至少约99%的S-化合物和按重量计至多约1%的R-化合物或按重量计至少约99.9%的S-化合物和按重量计至多约0.1%的R-化合物。在某些实施方案中,重量为基于化合物的总重量。

[0159] 在本文提供的组合物中,对映体纯的化合物或其药学上可接受的盐、溶剂合物、水合物或前药可与其他活性或非活性成分一起存在。例如,包含对映体纯的R-化合物的药用

组合物可包含例如约90%的赋形剂和约10%的对映体纯的R-化合物。在某些实施方案中,按化合物的总重量计,这种组合物中对映异构纯的R-化合物可例如包含按重量计至少约95%的R-化合物和按重量计至多约5%的S-化合物。例如,包含对映体纯的S-化合物的药用组合物可包含例如约90%的赋形剂和约10%的对映体纯的S-化合物。在某些实施方案中,按化合物的总重量计,这种组合物中对映体纯的S-化合物可例如包含按重量计至少约95%的S-化合物和按重量计至多约5%的R-化合物。在某些实施方案中,活性成分可与很少或没有赋形剂或载体一起配制。

[0160] 本发明的化合物可具有一个或多个不对称中心;因此,这种化合物可作为单个(R)-或(S)-立体异构体或作为其混合物产生。

[0161] 除非另外指明,否则说明书和权利要求中对特定化合物的描述或命名旨在包括其单个对映体和混合物,外消旋的或其他的。测定立体化学和分离立体异构体的方法为本领域众所周知的。

[0162] 有机合成领域的普通技术人员将认识到,稳定的、化学上可行的杂环(无论是芳族还是非芳族)中的最大杂原子数,取决于环的大小、不饱和度和杂原子的化合价。一般而言,杂环可具有1-4个杂原子,只要杂芳族环在化学上可行且稳定。

实施例

[0163] 为了更充分地理解本文所述的发明,阐述以下实施例。提供本申请中描述的实施例以说明本文提供的化合物、组合物、材料、装置和方法,并且所述实施例不应以任何方式解释为限制其范围。

[0164] I. 由生物还原性脂质和信使RNA纳米颗粒实现的体内CRISPR/Cas9基因组编辑材料和方法

用于脂质合成的所有化学品均购自Aladdin、TCI或Sigma-Aldrich,并按原样使用。萤火虫萤光素酶(L-7602)和Cas9信使RNA(mRNA)(L-7606)购自Tri-Link Biotechnologies。使用PCSK9 ELISA试剂盒(Sino Biological, China)测定小鼠血清PCSK9。使用Alamar Blue测定或SRB细胞增殖和细胞毒性测定试剂盒(Yeasen Biotech Co., Ltd. China)测定细胞生存力。Cy3-RNA(43 nt)购自Biosyntech(Suzhou, China)。根据我们先前的报道制备靶向GFP的gRNA,根据报道的方法使用体外转录制备靶向小鼠PCSK9和人类HPV18的sgRNA。使用RiboMAX™大规模RNA生产系统(Promega, USA),以pcDNA3.1-RFP(Yingrun, Changsha, China)作为模板,使用体外转录方法制备RFP编码mRNA。流式细胞术在Beckman Coulter CytoFLEX上进行。HeLa、A375和HEK-GFP细胞保持在补充有10% FBS(Sigma-Aldrich)和1%青霉素-链霉素(Life Technologies)的DMEM(Sigma-Aldrich)中。所有动物护理和实验程序均经中国国家纳米科学中心(National Center for Nanoscience and Technology of China)(NCNTC)的机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committees)(IUCAC)批准。

[0165] 表1. sgRNA序列信息

SgRNA	序列 (5'-3')
sgGFP	GGGCACGGGCAGCUUGCCGG
sgScr	GAUAAAUAACGCGCCCAACAC
sgHPV18	GGGCGCUUUGAGGAUCCAACA
sgPCSK9	CCCAUGUGGAGUACAUUGGUU

脂质纳米颗粒制剂

脂质使用我们先前的报道 (9) 中描述的方法通过加热胺和丙烯酸酯或丙烯酰胺合成, 并使用硅胶上的快速层析法纯化。为了制备用于 mRNA 递送的脂质纳米颗粒, 将纯化的脂质与胆固醇、DOPE 和 DSPE-PEG2000 以 16:8:4:1 的重量/重量比率在 2 mL 小瓶中的氯仿中混合, 在真空下蒸发有机溶剂, 所得混合物进一步干燥过夜以形成薄层膜。使用乙醇/乙酸铵缓冲液 (200 mM, pH = 5.2) 的混合溶液使脂质膜水合, 并逐滴添加到 DSPE-PEG2000 的水溶液中。将所得纳米颗粒对磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 进行透析以去除过量的乙醇。

[0166] 荧光素酶和 RFP mRNA 的细胞内递送

为了筛选用于荧光素酶 mRNA 递送的有效脂质纳米颗粒, 在实验前一天, 将 A375 细胞以 50 K/孔的密度接种于 24 孔板中。在实验当天, 将 160 ng/mL 荧光素酶 mRNA 与 3 μg/mL 不同脂质纳米颗粒 (所有浓度均指添加到细胞中的最终 RNA 和脂质浓度) 在乙酸钠缓冲液 (25 mM, pH = 5.2) 中混合, 然后在室温下温育 15 分钟。然后将所得 mRNA 脂质复合物 (lipoplex) 添加到细胞中, 并在更新细胞培养基之前与细胞一起温育另外 6 小时。根据制造商 (Promega, USA) 的说明, 使用萤火虫荧光素酶活性测定试剂盒测定荧光素酶活性。

[0167] 对于 BAMEA-016B/荧光素酶 mRNA 纳米颗粒的细胞毒性测定, 类似于基因组编辑效率研究, 用 160 ng/mL 荧光素酶 mRNA 纳米颗粒或不同脂质纳米颗粒处理 HEK 细胞。使用 Alamar Blue 或 SRB 细胞增殖和细胞毒性测定在递送后 24 小时测定细胞生存力。

[0168] 对于 RFP mRNA 递送, 在更换新鲜细胞培养基之前, 将接种于 48 孔板 (25 K 细胞/孔) 中的 HeLa 细胞在优化条件下用 BAMEA-016B/RFP mRNA 纳米颗粒处理 8 小时。RFP 表达谱在 Olympus FV-IX81 共聚焦系统上使用 CLSM 成像, 或在 mRNA 递送后 24 小时通过 Beckman Coulter CytoFLEX 上的流式细胞术量化。

[0169] BAMEA-016B/RNA 纳米颗粒的细胞摄取和内体逃逸研究

为了证实设计生物还原性脂质纳米颗粒以促进响应还原性细胞内环境的 RNA 释放的有效性, BAMEA-016B 或 BAMEA-016 以 15:1 的重量比在乙酸钠缓冲液 (25 mM, pH = 5.2) 中与 RFP mRNA 复合, 然后在室温下温育 15 分钟。所得纳米复合物用 5 mM GSH 在 37°C 下处理 4 小时, 然后进行琼脂糖凝胶电泳, 并与未经 GSH 处理的 mRNA 纳米复合物进行比较。

[0170] 对于 RNA 纳米颗粒的细胞摄取研究, 将用 Cy3 标记的 43-核苷酸 RNA 与 BAMEA-016B 或 BAMEA-016 纳米颗粒以 30:1 的重量比混合, 之后添加到 HeLa 细胞中。对于 CLSM 成像研究, 将 HeLa 细胞用 Cy3-RNA 纳米颗粒处理 8 小时, 并使用 LysoTracker Green (ThermoFisher Scientific, USA) 对内体进行共染色。为了比较 BAMEA-016B 或 BAMEA-016/RNA 纳米颗粒的细胞摄取效率, 使用流式细胞术分析用不同浓度的以上 RNA 纳米颗粒处理的细胞并量化 Cy3 阳性细胞。

[0171] 体外 Cas9 mRNA/sgRNA 递送和基因组编辑

将 GFP 稳定表达的 HEK 细胞在实验前一天以 25 K/孔的密度接种于 48 孔板中。在实

验当天,将13 nM GFP靶向sgRNA与不同剂量的Cas9 mRNA和5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BAMEA-016B (所有浓度均指添加到细胞中的最终RNA和脂质浓度)在乙酸钠缓冲液(25 mM, pH = 5.2)中混合,然后在室温下温育15分钟。然后将BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgGFP纳米颗粒添加到细胞中并在更换新鲜细胞培养基之前温育10小时。GFP表达谱在Cas9 mRNA递送后的不同时间点使用CLSM成像或使用流式细胞术分析进行量化,并针对没有Cas9 mRNA/sgGFP递送的细胞标准化以确定基因组编辑效率。为了进一步证实Cas9 mRNA/sgGFP递送的序列特异性基因组编辑,将sgGFP替换为乱序sgRNA,并与Cas9 mRNA/sgGFP递送类似递送到HEK-GFP细胞中。

[0172] 对于BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgGFP纳米颗粒的细胞毒性测定,类似于基因组编辑效率研究,用不同浓度的Cas9 mRNA纳米颗粒处理HEK细胞。使用Alamar Blue在Cas9 mRNA递送后48小时测定细胞生存力。

[0173] 为了证实BAMEA-016B/Cas9 mRNA递送以编辑内源性基因进行潜在基因疗法的有效性,类似于GFP敲除研究,将接种于48孔板中的HeLa细胞用单独的BAMEA-016B/Cas9 mRNA和sgHPV18或乱序RNA序列处理,使用Alamar Blue测定在Cas9 mRNA递送后48小时测定细胞生存力。

[0174] 体内Cas9 mRNA/sgRNA递送和基因组编辑

对于体内萤光素酶mRNA递送,将雌性无胸腺裸鼠经尾静脉注射0.6 mg/kg的mRNA剂量的BAMEA-016B/Luci-mRNA纳米颗粒或相同剂量的游离mRNA。注射纳米颗粒或游离mRNA后24小时,处死小鼠以收获不同组织用于在IVIS光谱体内成像系统(Perkin Elmer, USA)上进行生物发光成像。为了研究mRNA向肝细胞的递送,类似于萤光素酶mRNA的递送,将BAMEA-016B/RFP mRNA纳米颗粒注射到C57BL/6小鼠中。纳米颗粒递送后24小时,处死小鼠以收获肝脏用于荧光成像研究。

[0175] 对于体内Cas9 mRNA/Cy3-RNA递送,将雌性无胸腺裸鼠经尾静脉注射9 mg/kg BAMEA-016B、0.6 mg/kg Cas9 mRNA和0.8 mg/kg Cy3-RNA的剂量的BAMEA-016B/Cas9 mRNA/Cy3-RNA纳米颗粒或相同剂量的游离mRNA。注射纳米颗粒或游离mRNA后6小时,处死小鼠以收获不同组织用于在IVIS光谱体内成像系统(Perkin Elmer, USA)上进行生物发光成像。

[0176] 对于体内Cas9 mRNA递送和PCSK9基因编辑,将C57BL/6小鼠以9 mg/kg BAMEA-016B、0.6 mg/kg Cas9 mRNA和0.8 mg/kg sgRNA的剂量经尾静脉注射BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgPCSK9或BAMEA-016B/Cas9 mRNA/具有乱序sgRNA序列的sgRNA。注射纳米颗粒之后两天,处死小鼠以提取小鼠血清用于PCSK9和肝毒性测定。同时,收集肝组织用于H&E染色以研究纳米颗粒注射可能造成的肝损伤。

[0177] 实施例1. 用于mRNA递送的有效脂质的合成和筛选

图2A-2C为描绘萤光素酶和RFP mRNA的细胞内递送的图表和图像。

[0178] 根据我们先前的报道,生物还原性脂质通过加热胺和特征为二硫键的丙烯酸酯或丙烯酰胺来合成(图1A)。脂质按胺编号或名称命名,后跟O16B或N16B,以分别区分使用丙烯酸酯或丙烯酰胺(图1B)。纯化后的脂质与胆固醇、1,2-二油酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)和DSPE-PEG₂₀₀₀一起配制,用于本研究中的所有细胞递送实验(详见材料和方法)。为了便于筛选用于mRNA递送的有效脂质,将编码萤光素酶的mRNA与不同脂质以1:15的重量比组装,以转染A375人类黑色素瘤细胞。测量转染的A375细胞的萤光素酶表达,并将其与用单

单独的萤光素酶mRNA或同商业转染脂质Lipofectamine 2000 (LPF2K) 复合的萤光素酶mRNA处理的细胞进行比较。如图2A所示,用单独的mRNA处理的细胞没有显示出可检测的萤光素酶表达,表明单独的mRNA不能进入细胞,而用mRNA和脂质的复合物处理的细胞显示出不同的萤光素酶表达,这取决于脂质的胺和尾部结构。两种生物还原性脂质BAMEA-O16B (胺11)和PPPDA-N16B (胺13) 以与LPF2K类似的效率递送萤光素酶mRNA。对两种脂质生物相容性的进一步研究表明,BAMEA-O16B和PPPDA-N16B的mRNA脂质复合物显示出比LPF2K更低的细胞毒性(图6A和图6B),突出了设计组合脂质纳米颗粒以发现有效而具有生物相容性的纳米载体用于mRNA递送的优势和必要性。选择代表性脂质 BAMEA-O16B用于详细的mRNA递送和CRISPR/Cas9基因组编辑研究。

[0179] 代表性脂质BAMEA-O16B为用于mRNA递送的通用纳米载体,正如其将红色荧光蛋白(RFP) 编码mRNA递送到HeLa细胞中的能力和高效率所证明的那样。用BAMEA-O16B/RFP mRNA纳米颗粒处理人类宫颈癌细胞(HeLa) 导致有效的RFP表达(图2B)。流式细胞术分析(图2C)表明RFP阳性细胞依赖于mRNA剂量,并且当将160 ng/mL的RFP mRNA递送到HeLa细胞中时,转染效率可高达90%。总而言之,萤光素酶和RFP mRNA递送两者均证明了BAMEA-O16B纳米颗粒对于有效而安全的mRNA递送的有效性。

[0180] 实施例2. 使用BAMEA-O16B或BAMEA-O16的mRNA递送

图3A-3D为描绘BAMEA-O16B/RNA纳米颗粒的细胞摄取和内体逃逸研究的图表和图像。

[0181] 图4A-4D培养细胞中的CRISPR/Cas9 mRNA递送和基因组编辑。

[0182] 为了进一步阐述将二硫键整合到BAMEA-O16B中促进细胞内mRNA释放以提高mRNA转染效率,我们合成了一种化学结构与 BAMEA-O16B相似但缺少二硫键的对照脂质,命名为BAMEA-O16 (图3A)。琼脂糖凝胶电泳研究表明BAMEA-O16B和BAMEA-O16显示出类似的mRNA包封效率(图7)。有趣的是,谷胱甘肽(GSH) 处理(5 mM) 导致mRNA从BAMEA-O16B/mRNA复合物,但不能从BAMEA-O16/mRNA复合物中有效释放。如动态光散射(DLS) 分析所示,两种mRNA复合物的类似大小和 ζ 电位进一步证实了相似的mRNA包封能力(表2)。

[0183] 表2. 代表性脂质和脂质/mRNA纳米颗粒的大小和 ζ 电位

样品	大小(nm)	ζ 电位(mV)
BAMEA-O16	93.3 ± 2.3	26.4 ± 1.3
BAMEA-O16/RFP mRNA	138.5 ± 1.0	18.7 ± 0.8
BAMEA-O16B	108.7 ± 0.5	25.3 ± 0.9
BAMEA-O16B/RFP mRNA	154.4 ± 0.3	18.9 ± 3.8
BAMEA-O16B/Cas9 mRNA/sgRNA	233.6 ± 2.3	10.4 ± 0.6

还值得注意的是BAMEA-O16B或BAMEA-O16显示出类似的RNA递送效率。用BAMEA-O16B或BAMEA-O16的荧光标记RNA复合物(10 nM) 处理HeLa细胞导致在所有不同的脂质和RNA比率下RNA内化效率均高于90% (图3B)。然而,HeLa细胞的共聚焦激光扫描显微术(CLSM) 成像表明,BAMEA-O16B/RNA处理的细胞显示出比 BAMEA-O16/RNA处理更高的内体逃逸效率(图3C),这主要是由于BAMEA-O16B的生物还原性,其有助于响应还原性细胞内环境更有效地释放RNA。此外,使用BAMEA-O16B纳米颗粒的RFP mRNA递送导致HeLa细胞中的RFP表达高于BAMEA-O16促进的mRNA递送。例如,使用BAMEA-O16B递送160 ng/mL RFP mRNA导致

RFP表达为使用BAMEA-016 纳米颗粒的4倍高(图3D)。

[0184] 在证明使用BAMEA-016B进行报告物mRNA递送的有效性之后,接下来检查了BAMEA-016B同时递送Cas9 mRNA和sgRNA进行基因组编辑的能力。Cas9 mRNA的大小为约4500个核苷酸,其比萤光素酶或RFP mRNA (~1000 nt)长得多,并因此细胞内递送困难得多。为了进一步阐述生物还原性文库对Cas9 mRNA递送和基因组编辑的功效,用包封Cas9 mRNA和GFP靶向sgRNA的脂质纳米颗粒处理GFP稳定表达的HEK细胞,并监测mRNA递送前后的GFP表达变化。在靶GFP基因组编辑可诱导GFP基因阅读框的移动,并从而阻止GFP表达。如图8所示,32种脂质中有7种可有效地递送Cas9 mRNA和sgRNA以敲低HEK细胞的GFP表达,其中脂质BAMEA-016B显示出最高的基因组编辑和GFP敲除效率。发现BAMEA-016B和Cas9 mRNA/sgRNA的静电相互作用组装了大小为约230 nm的分散良好的纳米颗粒(表2,图9)。同时,BAMEA-016B/Cas9 mRNA纳米复合物对于基因组编辑递送具有高度生物相容性。用不同浓度的BAMEA-016B/Cas9 mRNA纳米复合物处理的HEK细胞均保持大于90%的生存力,这也高于用LPF2K/Cas9 mRNA/sgRNA纳米复合物处理的HEK细胞(图10)。

[0185] CLSM成像表明BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgGFP纳米颗粒处理导致HEK-GFP细胞的GFP荧光完全丧失,而游离Cas9 mRNA和sgRNA处理没有显示出类似的GFP敲除效果(图4A)。HEK-GFP细胞的GFP表达定量分析表明,随着递送至细胞的Cas9 mRNA浓度从20 ng/mL增加到160 ng/mL,GFP敲除效率相应地从35%增加到高于90% (图4B)。同时,当sgGFP被乱序sgRNA替换时,没有观察到有效的基因组编辑和细胞GFP丧失(图4C)。值得注意的是,BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgRNA处理在蛋白水平上非常快速地敲除GFP表达(图4B)。早在Cas9 mRNA递送后24小时就观察到40% GFP敲除,并且该比率在Cas9 mRNA递送后36小时增加到高达90%,尽管进一步延长递送时间并没有提高基因组编辑效率。

[0186] 实施例3. BAMEA-016B介导的Cas9 mRNA递送能够调控内源性基因表达

图5A-5C为描绘体内Cas9 mRNA/sgRNA递送和基因组编辑的图表和图像。

[0187] 进一步地,表明BAMEA-016B介导的Cas9 mRNA递送能够调控内源性基因表达,并因此具有用于开发新基因疗法的巨大潜力。将一种促进人类宫颈癌进展的必需基因人类乳头状瘤病毒18型(HPV18)选为研究的靶标。使用BAMEA-016B将靶向HPV18的sgRNA与Cas9 mRNA一起递送至HeLa细胞中,测量处理后HeLa细胞的生存力,并将其与乱序sgRNA和Cas9 mRNA处理进行比较。如图4D所示,与乱序sgRNA和Cas9 mRNA递送相比较,BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgHPV18处理显著抑制HeLa生长(图4D)。例如,320 ng/mL Cas9 mRNA和26 nM sgHPV18的递送将HeLa细胞生存力降低至30%,而用乱序sgRNA替换sgHPV18并没有显示出类似的抑制HeLa细胞生长的效果。

[0188] 为了进一步证明BAMEA-016B纳米颗粒对体内mRNA递送和CRISPR/Cas9基因组编辑的潜力,将一种从肝细胞分泌并涉及胆固醇稳态的酶前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型(sgPCSK9)选为研究的靶标。PCSK9通过调节肝脏中低密度脂蛋白胆固醇受体(LDL-R)的密度在脂质代谢中发挥重要作用,遗传研究表明,PCSK9的缺失与心血管疾病的风险降低相关。

[0189] 首先研究了BAMEA-016B纳米颗粒对体内mRNA递送的生物分布。为此,配制BAMEA-016B/萤光素酶mRNA纳米颗粒或荧光标记的BAMEA-016B/Cas9 mRNA/Cy3-RNA纳米颗粒并以0.6 mg/kg或0.8 mg/kg sgRNA的mRNA剂量经尾静脉静脉内注射给小鼠,然后对组织器官进

行生物发光或荧光成像以研究纳米颗粒的生物分布。如图11和图5A所示, BAMEA-016B/萤光素酶mRNA纳米颗粒的注射导致萤光素酶在小鼠肝脏中的有效表达, 而BAMEA-016B/Cas9 mRNA/Cy3-RNA纳米颗粒给予显示出荧光信号在小鼠肝脏中的有效积累。通过递送BAMEA-016B/RFP mRNA纳米颗粒进行的详细细胞定位研究表明, BAMEA-016B/RFP mRNA纳米颗粒主要在肝细胞中积累(图5B), 可用于肝细胞中的PCSK9基因组编辑, 如下所述。

[0190] 通过将BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgPCSK9纳米颗粒注射到C57BL/6小鼠体内, 然后进行血清PCSK9水平量化以评估体内基因组编辑功效, 研究了BAMEA-016B纳米颗粒用于体内基因组编辑的潜力和功效。如图5C所示, BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgPCSK9纳米颗粒的静脉内注射使小鼠血清PCSK9降低至DPBS注射或BAMEA-016B/Cas9 mRNA/乱序sgRNA纳米颗粒注射的20% (图5C)。同时, BAMEA-016B/Cas9 mRNA/sgRNA纳米颗粒治疗之后使用苏木精和曙红(H&E)染色对小鼠肝脏进行组织学检查没有显示出炎症迹象(图12)。此外, 纳米颗粒注射没有引起明显的肝细胞损伤, 正如所有注射小鼠的血清天冬氨酸转氨酶(AST)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和总胆红素的最小变化所示(图13)。总而言之, 以上结果清楚地证明了BAMEA-016B纳米颗粒对体内基因组编辑的高功效和生物相容性。

[0191] II. 脂质纳米颗粒介导CRISPR/Cas9 mRNA的递送用于ANGPTL3的体内基因组编辑材料和方法

LNP制剂

根据我们先前的报道合成类脂。使用NanoAssemblr微流体系统(Precision Nanosystems)制备LNP。简而言之, 将类脂、胆固醇(Sigma)、磷脂(DSPC、DOPE和DOPC, Avanti Polar Lipids)和DMG-PEG (Avanti Polar Lipids)以50/38.5/10/1.5的摩尔比溶解于100%乙醇中, 使最终类脂浓度为10 mg/mL。Cas9 mRNA和sgRNA (sgANGPTL3或sgLoxP)以适当的重量比在乙酸钠缓冲液(25 mM, pH 5.2)中混合。将mRNA溶液和脂质溶液各自以3:1的比率注入到NanoAssemblr微流体装置中, 并且该装置导致两种成分快速混合, 从而实现LNP的自组装。制剂在透析盒中于4°C下对PBS (10 mM, pH 7.4)进一步透析过夜。制剂的粒度通过动态光散射(DLS)使用ZetaPALS DLS机器(Brookhaven Instruments)测量。RNA封装效率通过Ribogreen测定表征。

[0192] 体内LNP递送

用于动物实验的所有程序均经塔夫茨大学机构动物护理和使用委员会(Tufts University Institutional Animal Care and Use Committee) (IACUC)批准, 并按照美国国立卫生研究院(National Institutes of Health) (NIH)的实验动物护理和使用指南进行。所有动物均为从Charles River订购。雌性Balb/c小鼠(6-8周)用于体内萤火虫萤光素酶mRNA (fLuc mRNA, TriLink Biotechnologies)封装的LNP筛选和制剂优化。简而言之, 将fLuc mRNA LNP以0.5 mg/kg mRNA的剂量静脉内注射到小鼠体内。在预定时间点, 小鼠注射100 μ L D-萤光素钾盐(Goldbio)溶液(15 mg/mL在PBS中), 在异氟烷麻醉下麻醉, 并通过IVIS成像系统(Caliper Life Sciences)测量。

[0193] 体内Cas9 mRNA/sgLoxP递送

将Cas9 mRNA (TriLink Biotechnologies)和LoxP靶向的单引导RNA (sgLoxP, 序列: 5' -AAGTAAAACCTCTACAAATG, Synthego)共载到306-012B LNP中, 并以1.65 mg/kg总RNA的剂量静脉内注射到雌性Ai14小鼠中。在注射后第7天, 收集小鼠器官并通过IVIS成像以检

测tdTomato表达。肝组织进一步切片。

[0194] 免疫染色

组织样品用OCT包埋,在液氮中完全冷冻,并储存于-80℃下直至准备切片。使用低温切片机将冷冻的组织块切片成期望的厚度(10 μm)并置于适合于免疫荧光染色的载玻片上。组织切片用预冷的丙酮(-20℃)固定10分钟,并然后用PBS洗涤2次,每次5分钟。固定的组织切片在10% BSA封闭缓冲液中于室温(r.t.)下温育1小时,并然后用PBS洗涤。将肝细胞特异性一抗(在1% BSA缓冲液中1:100 稀释,抗肝细胞特异性抗原(HepPar1),Novus)涂覆于载玻片上的切片上,并在4℃的加湿室中温育过夜。将载玻片用PBS冲洗2次,每次5分钟,并然后用eFlour660缀合的F(ab')₂-山羊抗小鼠二抗(1:50, Invitrogen)染色,并在避光的加湿室中于室温下温育1小时,且然后用PBS洗涤3次。含有DAPI (Sigma)的荧光封固剂用于盖玻片。使用Leica SP8共聚焦显微镜分析切片。

[0195] ANGPTL3的体内基因组编辑

使用Benchling软件设计靶向ANGPTL3基因的引导RNA序列。雌性野生型C57BL/6小鼠以1.0、2.0和3.0 mg/kg的总RNA剂量静脉内给予Cas9 mRNA和ANGPTL3靶向的单引导RNA (sgAngptl3,序列:5' -AGCCCTTCAACACAAGGTCA, Synthego) 共载的306-012B LNP。给予PBS的小鼠作为阴性对照进行治疗。在注射后第7天,处死小鼠,收集血液以通过ELISA进行循环ANGPTL3蛋白和血脂定量,并从中叶和左侧叶收集肝组织用于DNA提取和下一代序列(NGS)分析。另外,为了评估体内毒性和免疫反应,在注射之后2天从小鼠中收集血液并提取血清。根据制造商的方案,使用AST (G-Biosciences)、ALT (G-Biosciences)和TNF-α (R&D Systems)的测定试剂盒测量天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)以及肿瘤坏死因子α (TNF-α)。

[0196] NGS测序分析

使用商业提取试剂盒(Qiagen DNEasy Blood & Tissue)从肝脏的中叶和左侧叶提取DNA。PCR引物被设计为扩增Angptl3基因中靶位点周围的区域,或预测的脱靶位点周围的区域(表S1)。使用Cas Off Finder软件(rgenome.net/cas-offfinder/)预测脱靶位点。PCR扩增子经制备用于在Illumina MiSeq (Tufts Genomics Core Facility)上测序。使用OutKnocker 2软件(outknocker.org/outknocker2.htm)分析测序数据。

[0197] 血清ANGPTL3蛋白、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)和甘油三酯(TG)分析

在不使用抗凝剂的情况下收集小鼠血液,并使得能够在室温下凝固2小时,且在室温下以2000 × g离心15-20分钟以收集小鼠血清。分别根据制造商的方案,使用小鼠血管生成素样3 Quantikine ELISA试剂盒(R&D systems)、小鼠LDL胆固醇试剂盒(Crystal Chem)和甘油三酯比色测定试剂盒(Cayman Chemical)测定ANGPTL3蛋白、LDL-C和TG的血清水平。

[0198] T7E1裂解测定

使用提取的基因组DNA模板、Platinum SuperFi Green DNA聚合酶(Invitrogen)和特异性引物(表3)扩增在靶位点侧翼的基因组区域。

[0199] 表3:用于这些实验的PCR引物

ID	正向	反向
Angptl3 NGS	CTCCAAAGCCCTGACCTTGT	TCTGCACCTTCAGAGCCAAA
Angptl3 T7E1	TTCTGCACCTTCAGAGCCAA	GCAAAGCAAACCCTGAACTGA
Off1	ACCTTGGTTAGGATGCCTGC	TTGCATTCTGTCAGAGTGAT
Off2	ACATAGCCATCCCCAACAA	GCTGCAACTTGGTGCTACCT
Off3	TGACATGACTCATTGCCACCA	GTGAACCATATCTTAATAGCACCAT
Off4	TCTAAATGCCAGGGTTCTGACT	CATGCCATGTGGGGTGATACAA
Off5	TACCCAGCCATATTGTGCAG	AGAAGACCAGATAGAAGTCAGGATG
Off6	CGGATGTTTGCATGAGGGGA	GGTTAGCTGCTGGACACTGA
Off7	GGTGTCCACTTGTTAAATGTCA	ACAACAACATGGAAAACCTCTA
Off8	GCCAGCCACAGTTTTTCATCG	GGGAGTCACAGTCATGGGTC
Off9	GCAGTCATCAGACAGGAGGG	GCAGCTCTCCAATCCAGACA

运行以下循环:98℃下30 s,然后是33个循环的在98℃下10 s、65℃下15 s和72℃下30 s,然后是72℃下10 分钟。使用GeneJET PCR纯化试剂盒(Thermo Scientific)纯化PCR产物。将400 ng纯化的PCR产物在NEBuffer 2 (New England Biolabs)中通过加热至95℃持续5分钟,然后在AppliedBiosystems PCR系统(Thermo Fisher Scientific)上以2℃/秒的速率下降至85℃和以0.1℃/秒的速率下降至25℃进行杂交。将退火的样品用 T7核酸内切酶I (New England Biolabs)在37℃下消化15分钟,然后在65℃下温育5分钟以停止反应。将产物进一步纯化并在4-20% Novex TBE凝胶(Invitrogen)上运行。

[0200] 统计分析

数据表示为平均值±SD。所有数据均使用Graphpad Prism软件进行分析。* $p < 0.05$ 认为是显著的,** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ 认为是高度显著的。

[0201] 实施例4. 用于mRNA递送的脂质纳米颗粒的体内筛选。

[0202] 图15A-15C描绘类脂纳米颗粒的合成。

[0203] 尾部分支的生物还原性类脂为经掺入二硫键的丙烯酸酯脂质尾部和含有胺的头部之间的组合无溶剂迈克尔加成反应制备(图15A)。这些脂质的体内mRNA递送功效首先通过将萤火虫萤光素酶mRNA (fLuc mRNA)包封到LNP中并将这些LNP静脉内递送给雌性野生型Ba1b/c小鼠来评估。这些LNP用我们合成的可电离脂质以及赋形剂化合物胆固醇、DSPC和DMG-PEG配制而成。空白(未负载)和负载fLuc mRNA的LNP的代表性透射电子显微图像如图20A和图20B所示。金标准MC-3 LNP作为阳性对照包括在内。mRNA递送之后6小时,小鼠腹膜内注射萤光素底物,并使用IVIS体内成像系统(PerkinElmer)测量全身fLuc活性。如图15B所示,与MC-3 LNP递送相比较,用306-012B、113-012B和306-010B LNP进行mRNA递送导致类似或者甚至更高的萤光素酶生物发光强度。小鼠的体内图像清楚地表明萤光素酶蛋白主要在肝脏中表达(图21)。306-012B用作进一步实验的代表性脂质。fLuc mRNA可有效地包封到306-012B LNP中,包封效率为~98% (图22)。在包封fLuc mRNA后,306-012B LNP的平均直径

为112 nm (图15C)。

[0204] 实施例5. 306-012B LNP制剂的优化。

[0205] 图16A-16F描绘fLuc mRNA 306-012B LNP制剂的优化。

[0206] 为了进一步提高体内萤光素酶的表达,我们优化了用于组装这些LNP的各种制剂参数,包括赋形剂磷脂的身份、LNP制剂4种组分的摩尔组成比以及fLuc mRNA包封的306-012B LNP的脂质/mRNA重量比。

[0207] 首先,选择与初始DSPC磷脂相比较具有相似结构但不同头部基团和尾部饱和度的两种另外的磷脂DOPE和DOPC (图16A)来评估磷脂赋形剂对体内萤光素酶表达功效的影响。DOPC和DOPE各自在碳尾中含有一个不饱和度,而DSPC为完全饱和的。此外,DSPC和DOPE各自含有季胺头部基团,而DOPE含有伯胺头部基团。文献中报道这些特征中的每一个均会影响LNP递送效率。据报道,季铵化胺头部基团显示出比伯胺头部更强的质子海绵效应,这可促进货物mRNA内体逃逸到细胞质中,从而增加mRNA翻译为蛋白。此外,脂质尾部的饱和程度已显示出会影响膜流动性,这也可能影响内体逃逸。不饱和的脂质尾部可能导致更高的膜流动性,这也可能有助于经在LNP与膜融合时使内体膜不稳定来改善内体逃逸。综上所述,我们假设用含有季胺和不饱和尾部的DOPC形成的LNP将显示出最有效的fLuc递送。如图16B和图16C所示,用DOPC配制的fLuc mRNA LNP确实导致肝脏中的萤光素酶表达显著高于具有DOPE和初始DSPC磷脂的制剂。用含有DOPC的LNP递送的fLuc mRNA产生为初始含有DSPC的LNP约4倍高的发光信号。

[0208] 在初始筛选中,活性脂质和赋形剂成分以[脂质:胆固醇: DSPC: DMG-PEG]为[50: 38.5: 10: 1.5]的摩尔比配制。在确定最佳磷脂为DOPC并相应地调整制剂之后,测试以各种摩尔比配制的LNP以确定最佳参数(图16D)。如图16E所示,初始制剂0 (306-012B:胆固醇: DOPC: DMG-PEG的摩尔比为50: 38.5: 10: 1.5)显示出最高的萤光素酶生物发光强度;没有一个新的制剂参数可以超过初始的。

[0209] 为了进一步提高体内功效,用在5:1-25:1范围内的不同重量比的活性脂质306-012B: mRNA配制具有这种最佳4种组分比率的LNP。有趣的是,发现当重量比为7.5:1时达到最高功效。似乎增加脂质的量超过该点并没有有益于体内递送功效(图16F)。总的来说,这些结果表明306-012B LNP的优化制剂具有50% 306-012B、38.5%胆固醇、10% DOPC和1.5% DMG-PEG摩尔组成,306-012B/mRNA的重量比为7.5/1。

[0210] 实施例6. 使用mRNA优化的LNP进行的Cas9 mRNA和sgRNA的体内肝细胞特异性共递送。

[0211] 图17A-17C描绘306-012B LNP在Ai14小鼠中实现Cas9/sgLoxP介导的基因组编辑。

[0212] 图23A-23B为描绘306-012B LNP在Ai14/Cas9杂交小鼠中实现sgLoxP介导的基因组编辑的图像。

[0213] 识别由Cas9 mRNA/sgRNA LNP编辑的特定细胞类型对于预测CRISPR递送系统的潜在应用至关重要。使用用控制tdTomato表达的侧翼为LoxP的终止盒基因工程改造的Ai14报告物小鼠品系。尽管该小鼠品系经常与Cre重组酶一起使用,但成功的CRISPR介导的侧翼为LoxP的终止密码子切除也将诱导tdTomato的表达。通过检查具有tdTomato表达的细胞,可确定我们的LNP递送系统可成功地靶向的细胞类型。

[0214] 为了验证这种方法,我们首先使用306-012B LNP将LoxP靶向的sgRNA (sgLoxP)递

送至经工程改造以表达Ai14构建体和组成型表达的Cas9构建体两者的小鼠 (Ai14+/Cas9+小鼠模型)。如图23A和图23B所示,用我们的LNP系统递送sgLoxP导致在肝脏中特异性地检测到红色荧光。有趣的是,进一步的组织学分析表明,tdTomato信号主要在肝脏肝细胞中观察到,表明306-012B LNP也可将sgRNA特异性地递送至这种治疗相关的细胞类型。

[0215] 接下来,将Cas9 mRNA和sgLoxP共同配制成一种单一的LNP,并以1.65 mg/kg的总RNA剂量经尾静脉注射到Ai14小鼠中(图17A)。递送之后7天,收获器官并使用IVIS系统离体成像。由IVIS系统分析的小鼠器官的离体图像表明该系统确实可诱导红色荧光,表明mRNA和sgRNA组分两者的成功的功能性共递送,并且主要在肝脏中检测到tdTomato信号(图17B)。进一步用肝细胞特异性生物标志物进行免疫荧光染色,并且共聚焦图像证明大部分tdTomato蛋白在肝细胞中表达(图17C)。这些发现有力地表明,306-012B LNP可将CRISPR机构特异性地转运至肝脏肝细胞。

[0216] 实施例7. ANGPTL3的体内基因组编辑.

图18A-18B描绘野生型C57BL/6小鼠中306-012B LNP介导的ANGPTL3体内基因组编辑的显著水平。

[0217] 图19A-19C表明306-012B LNP在通过基于CRISPR/Cas9的基因组编辑诱导ANGPTL3中的功能丧失突变方面比MC-3 LNP更有效。

[0218] 接下来,验证306-012B LNP递送CRISPR/Cas9 mRNA以操纵功能性内源性基因表达的能力。将编码血管生成素样3 (sgANGPTL3) (一种抑制脂蛋白脂肪酶和内皮脂肪酶活性两者的脂蛋白代谢的中枢调控因子)的ANGPTL3基因选为研究的靶标。使用野生型C57BL/6小鼠研究非病毒性Cas9 mRNA/sgAngpt13 LNP介导的ANGPTL3体内基因组编辑。将Cas9 mRNA和sgAngpt13同时包封到306-012B LNP中。鉴于CRISPR/Cas9系统含有Cas9 mRNA和sgRNA两种元件,这两种组分的比率可能会影响体内基因组编辑功效。为此,将小鼠以3.0 mg/kg的总RNA剂量注射以2:1、1:1.2和1:2的不同Cas9 mRNA与sgAngpt13质量比共配制的306-012B LNP。注射之后第7天,采集血清进行血清ANGPTL3蛋白水平的ELISA分析,和采集肝组织样品进行DNA提取和NGS测序以确定靶向的Cas9介导的基因组编辑。在所有Cas9 mRNA/sgAngpt13比率下,观察到在小鼠肝脏中的基因组编辑和血清ANGPTL3蛋白水平的降低,然而,在这些组之间没有观察到显著差异(图18A和图18B)。将1:1.2 Cas9 mRNA/sgAngpt13比率用于以下实验。Cas9 mRNA/sgAngpt13包封的306-012B LNP具有与fLuc mRNA LNP相似的特征,平均大小为110 nm (图24)。

[0219] 鉴于编辑的显著水平,设计并进行了更详细的体内编辑实验。作为金标准,我们将我们的306-012B LNP (包封RNA组分)与由FDA批准的肝脏递送脂质MC-3组成的LNP (包封完全相同的RNA组分) (MC3-LNP)进行了比较。应当注意的是,306-012B LNP和MC3-LNP两者中使用了相同比率的赋形剂脂质,并且这种特定的赋形剂制剂先前已发表用于MC3-LNP。以3.0 mg/kg的总RNA剂量给予小鼠306-012B LNP或MC-3-LNP。在给予之后第7天,使用T7E1测定观察到肝脏中期望位点处的编辑(图25)。肝脏样品中ANGPTL3靶位点的下一代测序(NGS)进一步证明,306-012B-LNP介导的递送导致中位编辑率为38.5%,显著高于MC-3介导的递送(14.6%) (图19A)。更重要的是,血清分析表明,306-012B LNP治疗组的血清ANGPTL3蛋白、LDL-C和TG水平(分别降低65.2%、56.8%、29.4%)显著低于MC-3 LNP治疗的小鼠(分别降低25%、15.7%、16.3%) (图19A)。对NGS测序结果的详细分析表明,最频繁的编辑事件为在预测

的Cas9切割位点处精确地发生1-nt缺失,然后在同一位置发生1-nt插入(图19B)。正如预期的那样,在MC3 LNP和306-012B LNP治疗的肝脏两者中均观察到相同的编辑事件,主要区别在于这些事件的频率。这表明观察到的血清成分减少确实是Cas9介导的基因组编辑的结果,并意味着两种脂质之间观察到的结果差异仅为Cas9 mRNA的递送效率而非先天活性的一些变化所致。

[0220] 对于任何CRISPR递送系统,都必须小心避免脱靶编辑事件或递送引起的毒性。前9个最可能的脱靶基因组诱变位点为通过计算预测的,并且这些基因座经从肝脏中提取的DNA的NGS测序进行查询。没有观察到在前9个预测的脱靶诱变位点中的任何一个处进行编辑的证据(图19C)。为了评估体内毒性和潜在的免疫炎症反应,测量了肝功能标志物天冬氨酸氨基转移酶(AST)和丙氨酸氨基转移酶(ALT)以及促炎性细胞因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)的血清水平(图26)。在用CRISPR/Cas9 LNP治疗之后,没有检测到这些参数的显著变化,进一步证明全身毒性可以忽略不计。

[0221] 引用的参考文献

1. P. D. Hsu, E. S. Lander, F. Zhang, *Cell* 2014, 157, 1262.
2. M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J. A. Doudna, E. Charpentier, *Science* 2012, 337, 816.
3. L. Cong, F. A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P. D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. A. Marraffini, F. Zhang, *Science* 2013, 339, 819.
4. G. J. Knott, J. A. Doudna, *Science* 2018, 361, 866.
5. H. X. Wang, M. Li, C. M. Lee, S. Chakraborty, H. W. Kim, G. Bao, K. W. Leong, *Chem. Rev.* 2017, 117, 9874.
6. H. Yin, K. J. Kauffman, D. G. Anderson, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017, 16, 387.
7. Z. Glass, M. Lee, Y. Li, Q. Xu, *Trends in Biotechnol.* 2018, 36, 173.
8. H. Yin, C. Q. Song, J. R. Dorkin, L. J. Zhu, Y. Li, Q. Wu, A. Park, J. Yang, S. Suresh, A. Bizhanova, A. Gupta, M. F. Bolukbasi, S. Walsh, R. L. Bogorad, G. Gao, Z. Weng, Y. Dong, V. Koteliansky, S. A. Wolfe, R. Langer, W. Xue, D. G. Anderson, *Nat. Biotechnol.* 2016, 34, 328.
9. M. Wang, J. A. Zuris, F. Meng, H. Rees, S. Sun, P. Deng, Y. Han, X. Gao, D. Pouli, Q. Wu, I. Georgakoudi, D. R. Liu, Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, 113, 2868.
10. L. Li, L. Song, X. Liu, X. Yang, X. Li, T. He, N. Wang, S. Yang, C. Yu, T. Yin, Y. Wen, Z. He, X. Wei, W. Su, Q. Wu, S. Yao, C. Gong, Y. Wei, *ACS Nano* 2017, 11, 95.
11. W. Sun, W. Ji, J. M. Hall, Q. Hu, C. Wang, C. L. Beisel, Z. Gu, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2015, 54, 12029.
12. Q. Liu, K. Zhao, C. Wang, Z. Zhang, C. Zheng, Y. Zhao, Y. Zheng, C. Liu, Y. An, L. Shi, C. Kang, Y. Liu, *Adv. Sci.* 2019, 6, 1801423.

13. W. Zhou, H. Cui, L. Ying, X. F. Yu, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2018, *57*, 10268.
14. P. Wang, L. Zhang, W. Zheng, L. Cong, Z. Guo, Y. Xie, L. Wang, R. Tang, Q. Feng, Y. Hamada, K. Gonda, Z. Hu, X. Wu, X. Jiang, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2018, *57*, 1491.
15. K. Lee, M. Conboy, H. M. Park, F. Jiang, H. J. Kim, M. A. Dewitt, V. A. Mackley, K. Chang, A. Rao, C. Skinner, T. Shobha, M. Mehdipour, H. Liu, W. Huang, F. Lan, N. L. Bray, S. Li, J. E. Corn, K. Kataoka, J. A. Doudna, I. Conboy, N. Murthy, *Nat. Biomed. Eng.* 2017, *1*, 889.
16. C. D. Sago, M. P. Lokugamage, K. Paunovska, D. A. Vanover, C. M. Monaco, N. N. Shah, M. G. Castro, S. E. Anderson, T. G. Rudoltz, G. N. Lando, P. M. Tiwari, J. L. Kirschman, N. Willett, Y. C. Jang, P. J. Santangelo, A. V. Bryksin, J. E. Dahlman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, *115*, E9944.
17. C. Xu, Z. Lu, Y. Luo, Y. Liu, Z. Cao, S. Shen, H. Li, J. Liu, K. Chen, Z. Chen, X. Yang, Z. Gu, J. Wang, *Nat. Commun.* 2018, *9*, 1.
18. U. Sahin, K. Kariko, O. Tureci, *Nat. Rev. Drug Discov.* 2014, *13*, 759.
19. X. Liang, J. Potter, S. Kumar, Y. Zou, R. Quintanilla, M. Sridharan, J. Carte, W. Chen, N. Roark, S. Ranganathan, N. Ravinder, J. D. Chesnut, *J. Biotechnol.* 2015, *208*, 44.
20. C. J. McKinlay, J. R. Vargas, T. R. Blake, J. W. Hardy, M. Kanada, C. H. Contag, P. A. Wender, R. M. Waymouth, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017, *114*, E448.
21. C. J. McKinlay, N. L. Benner, O. A. Haabeth, R. M. Waymouth, P. A. Wender, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2018, *115*, E5859.
22. Y. Li, J. Bolinger, Y. Yu, Z. Glass, N. Shi, L. Yang, M. Wang, Q. Xu, *Biomater. Sci.* 2019, *7*, 596.
22. X. Yang, Q. Tang, Y. Jiang, M. Zhang, M. Wang, L. Mao, *J. Am. Chem. Soc.* 2019, *141*, 3782.
23. M. Wang, K. Alberti, S. Sun, C. L. Arellano, Q. Xu, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2014, *53*, 2893.
24. M. Wang, S. Sun, C. I. Neufeld, B. Perez-Ramirez, Q. Xu, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2014, *53*, 13444.
25. M. Wang, J. A. Zuris, F. Meng, H. Rees, S. Sun, P. Deng, Y. Han, X. Gao, D. Pouli, Q. Wu, I. Georgakoudi, D. R. Liu, Q. Xu, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, *113*, 2868.
26. J. Chang, X. Chen, Z. Glass, F. Gao, L. Mao, M. Wang, Q. Xu, *Acc. Chem. Res.* 2019, *52*, 665.
27. J. B. Miller, S. Zhang, P. Kos, H. Xiong, K. Zhou, S. S.

Perelman, H. Zhu, D. J. Siegwart, *Angew. Chem., Int. Ed.* 2017, 56, 1059.

28. E. M. Kennedy, A. V. Kornepati, M. Goldstein, H. P. Bogerd, B. C. Poling, A. W. Whisnant, M. B. Kastan, B. R. Cullen, *J. Virol.* 2014, 88, 11965.

29. C. Jiang, M. Mei, B. Li, X. Zhu, W. Zu, Y. Tian, Q. Wang, Y. Guo, Y. Dong, X. Tan, *Cell Res.* 2017, 27, 440.

30. M. Abifadel, M. Varret, J. Rabes, D. Allard, K. Ouguerram, M. Devillers, C. Cruaud, S. Benjannet, L. Wickham, D. Erilich, A. Derre, L. Villegier, M. Farnier, I. Beucler, E. Bruckert, J. Chambaz, B. Chanu, J. M. Lecerf, G. Luc, P. Moulin, J. Weissenbach, A. Part, M. Krempf, C. Junien, N. G. Seidah, C. Boileau, *Nat. Genet.* 2003, 34, 154.

31. F. A. Ran, L. Cong, W. X. Yan, D. A. Scott, J. S. Gootenberg, A. J. Kriz, B. Zetsche, O. Shalem, X. Wu, K. S. Makarova, E. V. Koonin, P. A. Sharp, F. Zhang, *Nature* 2015, 520, 186.

32. Raal, F. J.等人 Inclisiran for the Treatment of Heterozygous Familial Hypercholesterolemia. *N. Engl. J. Med.* 382, 1520-1530, (2020).

33. Ray, K. K.等人 Two Phase 3 Trials of Inclisiran in Patients with Elevated LDL Cholesterol. *N. Engl. J. Med.* 382, 1507-1519, (2020).

34. Koishi, R.等人 Angptl3 regulates lipid metabolism in mice. *Nature Genet.* 30, 151-157, (2002).

35. Romeo, S.等人 Rare loss-of-function mutations in ANGPTL family members contribute to plasma triglyceride levels in humans. *J. Clin. Invest.* 119, 70-79, (2009).

36. Tarugi, P., Bertolini, S. & Calandra, S. Angiotensin-like protein 3 (ANGPTL3) deficiency and familial combined hypolipidemia. *J. Biomed. Res.* 33, 73-81, (2019).

37. Stitzziel, N. O.等人 ANGPTL3 Deficiency and Protection Against Coronary Artery Disease. *J. Am. Coll. Cardiol.* 69, 2054-2063, (2017).

38. Musunuru, K. & Kathiresan, S. CARDIOVASCULAR ENDOCRINOLOGY Is ANGPTL3 the next PCSK9? *Nat. Rev. Endocrinol.* 13, 502-503, (2017).

39. Dewey, F. E.等人 Genetic and Pharmacologic Inactivation of ANGPTL3 and Cardiovascular Disease. *N. Engl. J. Med.* 377, 211-221, (2017).

40. Ahmad, Z.等人 Inhibition of Angiotensin-Like Protein 3 With a Monoclonal Antibody Reduces Triglycerides in Hypertriglyceridemia. *Circulation* 140, 470-486, (2019).

41. Graham, M. J.等人 Cardiovascular and Metabolic Effects of ANGPTL3 Antisense Oligonucleotides. *N. Engl. J. Med.* 377, 222-232, (2017).

42. Hsu, P. D., Lander, E. S. & Zhang, F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering. *Cell* 157, 1262-1278, (2014).

43. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346, 1077-+, (2014).
44. Chen, X. & Goncalves, M. Engineered Viruses as Genome Editing Devices. *Mol. Ther.*24, 447-457, (2016).
45. Yin, H., Kauffman, K. J. & Anderson, D. G. Delivery technologies for genome editing. *Nat. Rev. Drug Discov.*16, 387-399, (2017).
46. Glass, Z., Lee, M., Li, Y. M. & Xu, Q. B. Engineering the Delivery System for CRISPR-Based Genome Editing. *Trends Biotechnol.*36, 173-185, (2018).
47. Yin, H.等人 Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nat. Rev. Genet.*15, 541-555, (2014).
48. Wang, M., Glass, Z. A. & Xu, Q. Non-viral delivery of genome-editing nucleases for gene therapy. *Gene Ther.*24, 144-150, (2017).
49. Qiu, M., Glass, Z. & Xu, Q. B. Nonviral Nanoparticles for CRISPR-Based Genome Editing: Is It Just a Simple Adaption of What Have Been Developed for Nucleic Acid Delivery? *Biomacromolecules* 20, 3333-3339, (2019).
50. Wang, M.等人 Efficient delivery of genome-editing proteins using bioreducible lipid nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*113, 2868-2873, (2016).
51. Finn, J. D.等人 A Single Administration of CRISPR/Cas9 Lipid Nanoparticles Achieves Robust and Persistent In Vivo Genome Editing. *Cell Reports* 22, 2227-2235, (2018).
52. Miller, J. B.等人 Non-Viral CRISPR/Cas Gene Editing In Vitro and In Vivo Enabled by Synthetic Nanoparticle Co-Delivery of Cas9 mRNA and sgRNA. *Angew. Chem.-Int. Edit.*56, 1059-1063, (2017).
53. Jiang, C.等人 A non-viral CRISPR/Cas9 delivery system for therapeutically targeting HBV DNA and pcsk9 in vivo. *Cell Res.*27, 440-443, (2017).
54. Liu, J.等人 Fast and Efficient CRISPR/Cas9 Genome Editing In Vivo Enabled by Bioreducible Lipid and Messenger RNA Nanoparticles. *Adv. Mater.*31, 7, (2019).
55. Chadwick, A. C., Evitt, N. H., Lv, W. J. & Musunuru, K. Reduced Blood Lipid Levels With In Vivo CRISPR-Cas9 Base Editing of ANGPTL3. *Circulation* 137, 975-977, (2018).
56. Akinc, A.等人 The Onpattro story and the clinical translation of nanomedicines containing nucleic acid-based drugs. *Nat. Nanotechnol.*14, 1084-1087, (2019).
57. Wang, M.等人 Enhanced Intracellular siRNA Delivery using Bioreducible Lipid-Like Nanoparticles. *Adv. Healthc. Mater.*3, 1398-1403,

(2014).

58. Zhi, D. F.等人 Transfection Efficiency of Cationic Lipids with Different Hydrophobic Domains in Gene Delivery. *Bioconjugate Chem.*21, 563-577, (2010).

59. Wang, M., Sun, S., Alberti, K. A. & Xu, Q. B. A Combinatorial Library of Unsaturated Lipidoids for Efficient Intracellular Gene Delivery. *ACS Synth. Biol.*1, 403-407, (2012).

60. Kauffman, K. J.等人 Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs. *Nano Lett.*15, 7300-7306, (2015).

61. Sedic, M.等人 Safety Evaluation of Lipid Nanoparticle-Formulated Modified mRNA in the Sprague-Dawley Rat and Cynomolgus Monkey. *Vet. Pathol.*55, 341-354, (2018).

62. Madisen, L.等人 A robust and high-throughput Cre reporting and characterization system for the whole mouse brain. *Nat. Neurosci.* 13, 133-U311, (2010).

63. Tabebordbar, M.等人 In vivo gene editing in dystrophic mouse muscle and muscle stem cells. *Science* 351, 407-411, (2016).

64. Platt, R. J.等人 CRISPR-Cas9 Knockin Mice for Genome Editing and Cancer Modeling. *Cell* 159, 440-455, (2014).

65. Mout, R., Ray, M., Lee, Y. W., Scaletti, F. & Rotello, V. M. In Vivo Delivery of CRISPR/Cas9 for Therapeutic Gene Editing: Progress and Challenges. *Bioconjugate Chem.*28, 880-884, (2017).

66. Tong, S., Moyo, B., Lee, C. M., Leong, K. & Bao, G. Engineered materials for in vivo delivery of genome-editing machinery. *Nat. Rev. Mater.*4, 726-737, (2019).

67. Komor, A. C., Badran, A. H. & Liu, D. R. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell* 168, 20-36, (2017).

68. Liang, X. Q.等人 Rapid and highly efficient mammalian cell engineering via Cas9 protein transfection. *J. Biotechnol.*208, 44-53, (2015).

69. Ramaswamy, S.等人 Systemic delivery of factor IX messenger RNA for protein replacement therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*114, E1941-E1950, (2017).

70. Sabnis, S.等人 A Novel Amino Lipid Series for mRNA Delivery: Improved Endosomal Escape and Sustained Pharmacology and Safety in Non-human Primates. *Mol. Ther.*26, 1509-1519, (2018).

71. Hou, X. C.等人 Vitamin lipid nanoparticles enable adoptive macrophage transfer for the treatment of multidrug-resistant bacterial

sepsis. *Nat. Nanotechnol.*15, 41-+, (2020).

72. Fenton, O. S.等人 Bioinspired Alkenyl Amino Alcohol Ionizable Lipid Materials for Highly Potent In Vivo mRNA Delivery. *Adv. Mater.*28, 2939-2943, (2016).

73. Bae, S., Park, J. & Kim, J. S. Cas-OFFinder: a fast and versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* 30, 1473-1475, (2014).

74. Schmid-Burgk, J. L.等人 Out Knockor: a web tool for rapid and simple genotyping of designer nuclease edited cell lines. *Genome Res.*24, 1719-1723, (2014)。

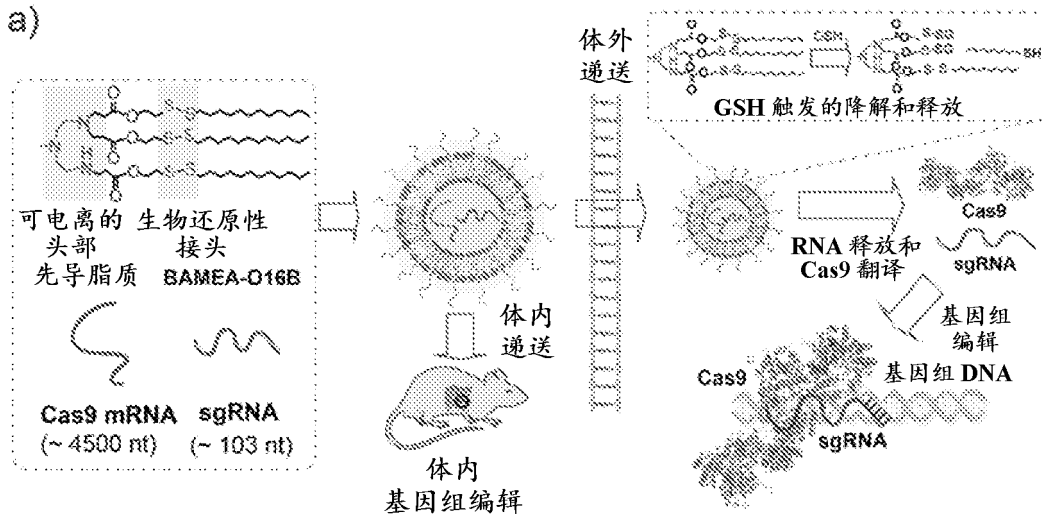


图 1A

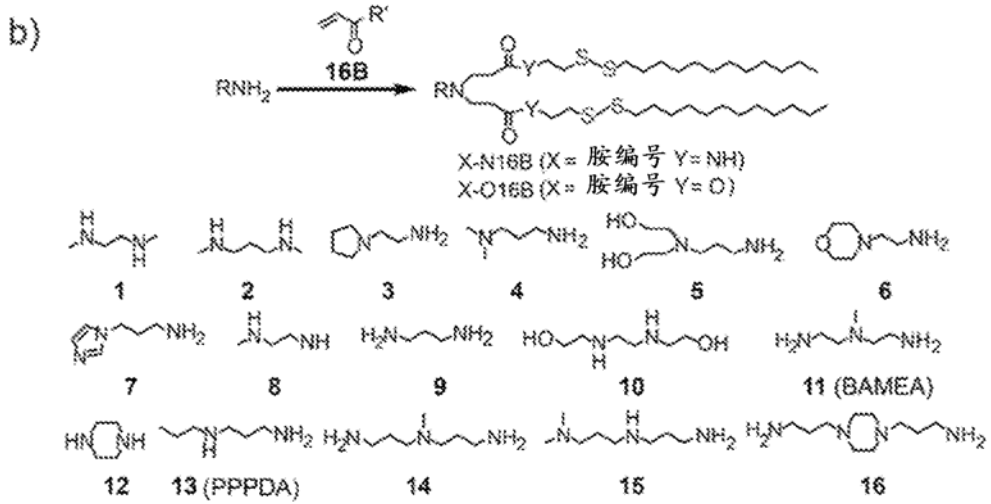


图 1B

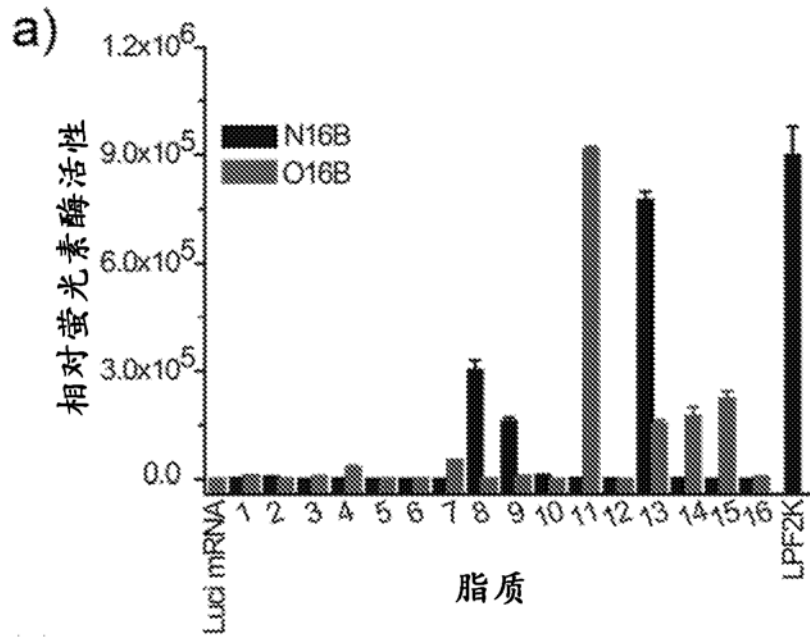


图 2A

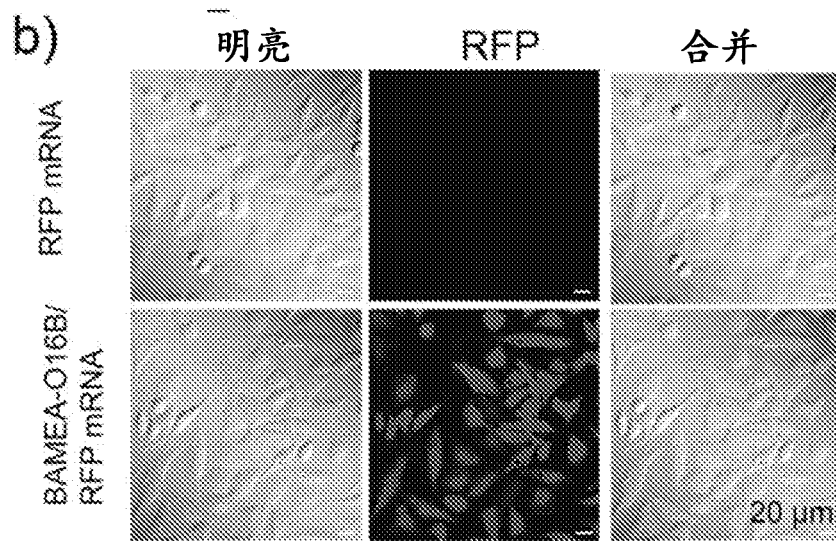


图 2B

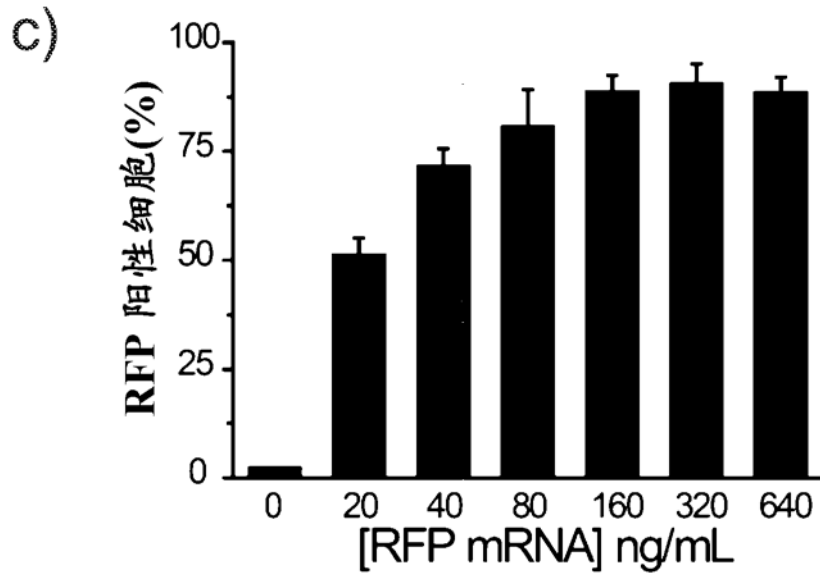


图 2C

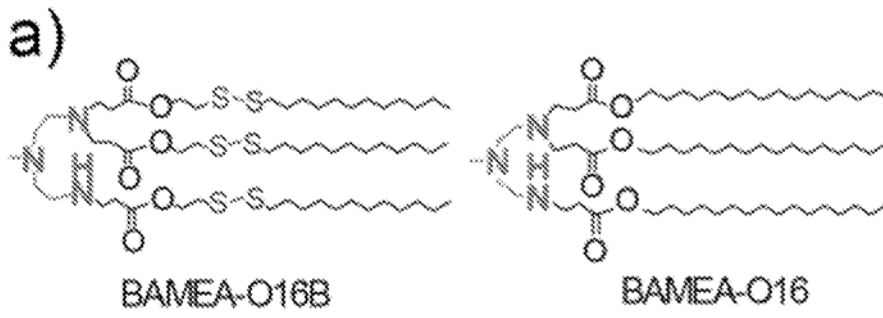


图 3A

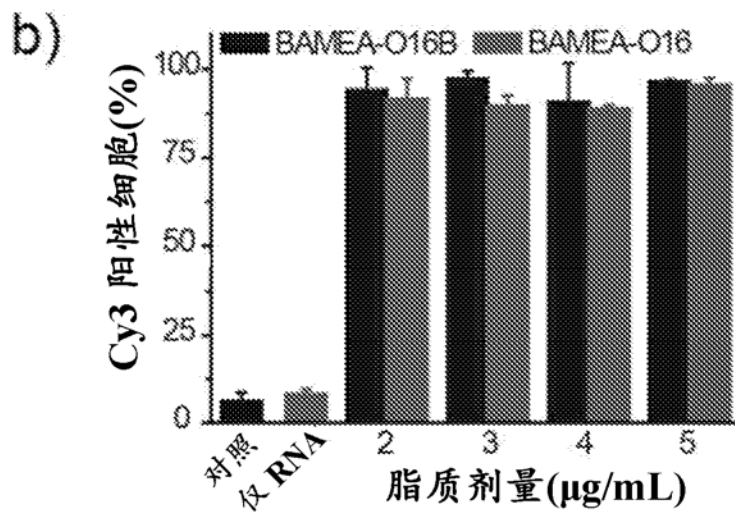


图 3B

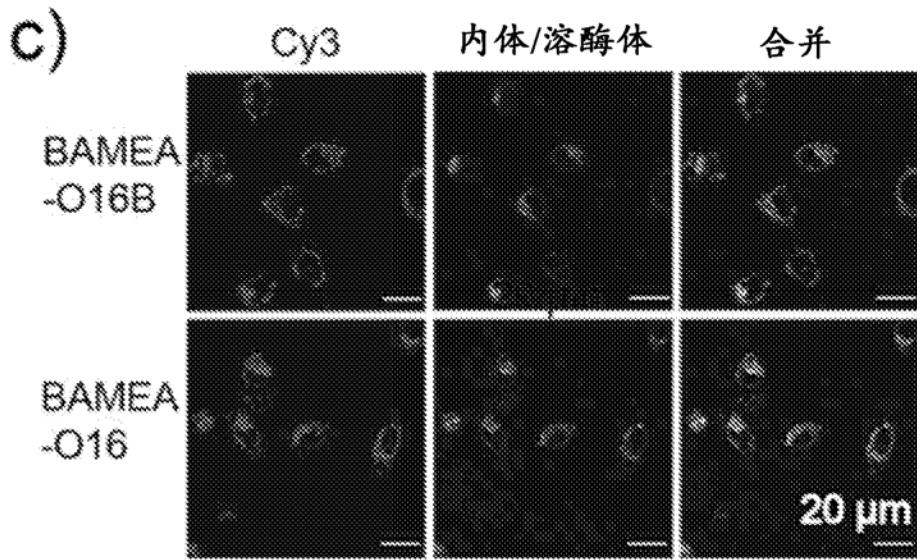


图 3C

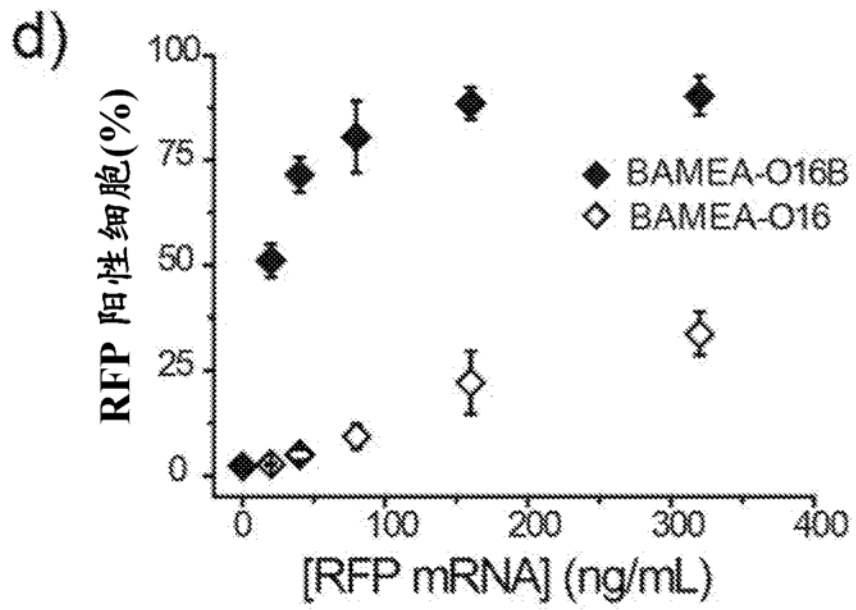


图 3D

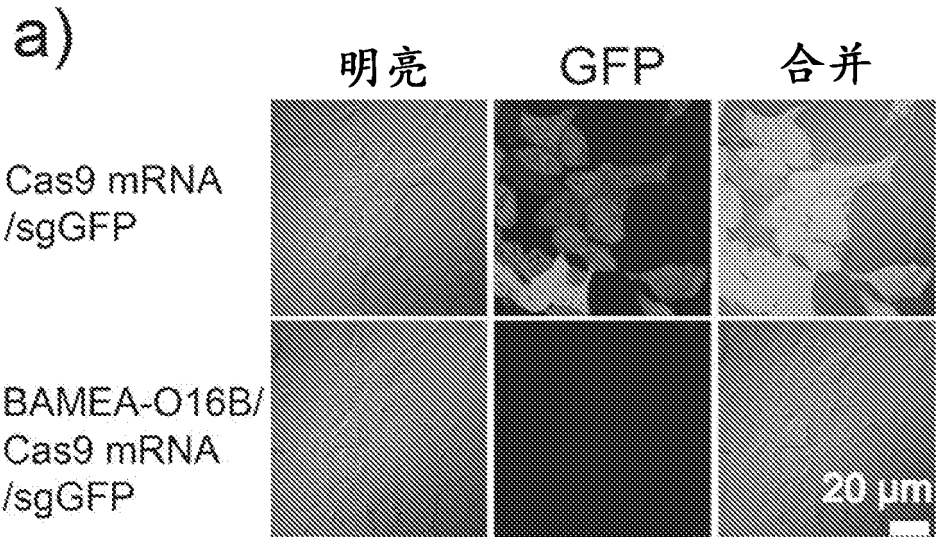
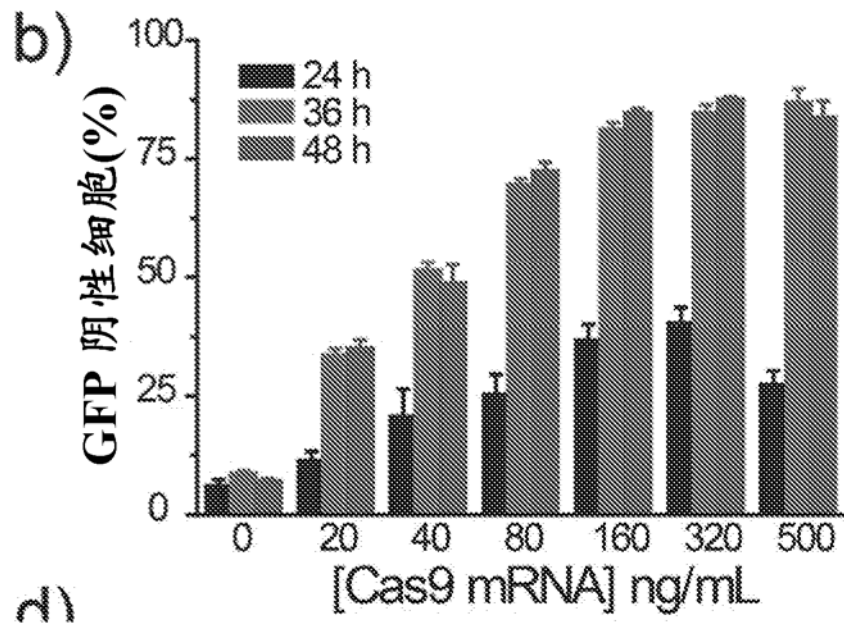


图 4A



c)

图 4B

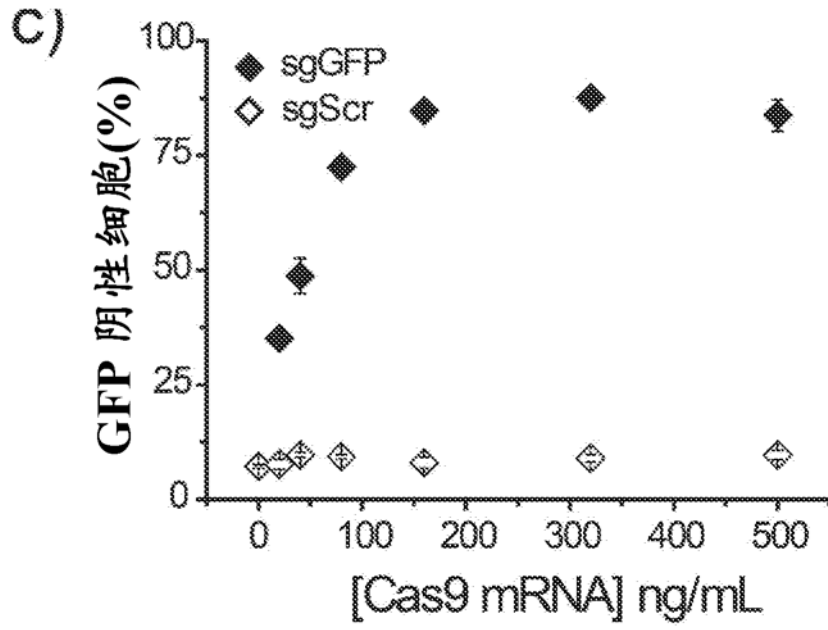


图 4C

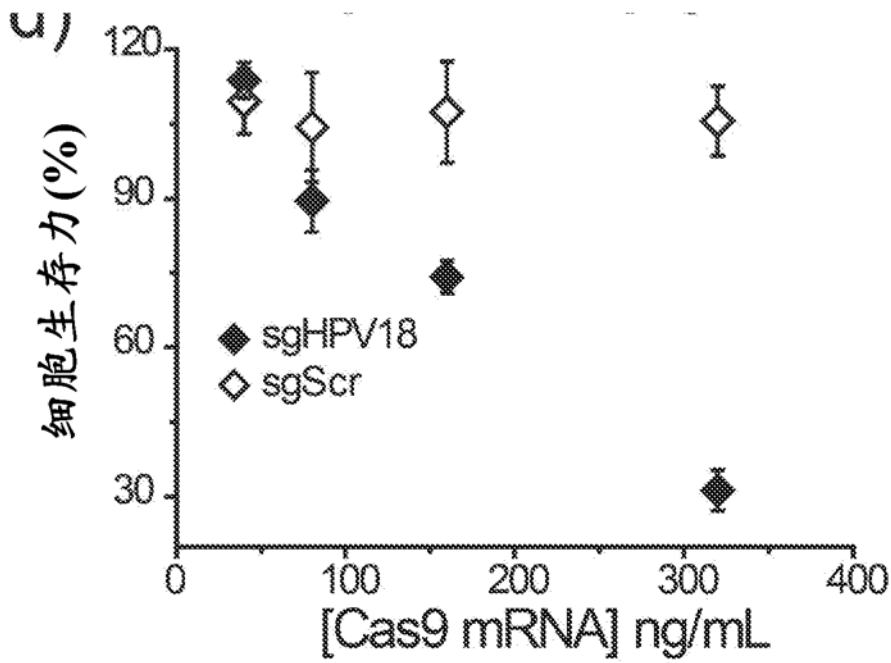


图 4D

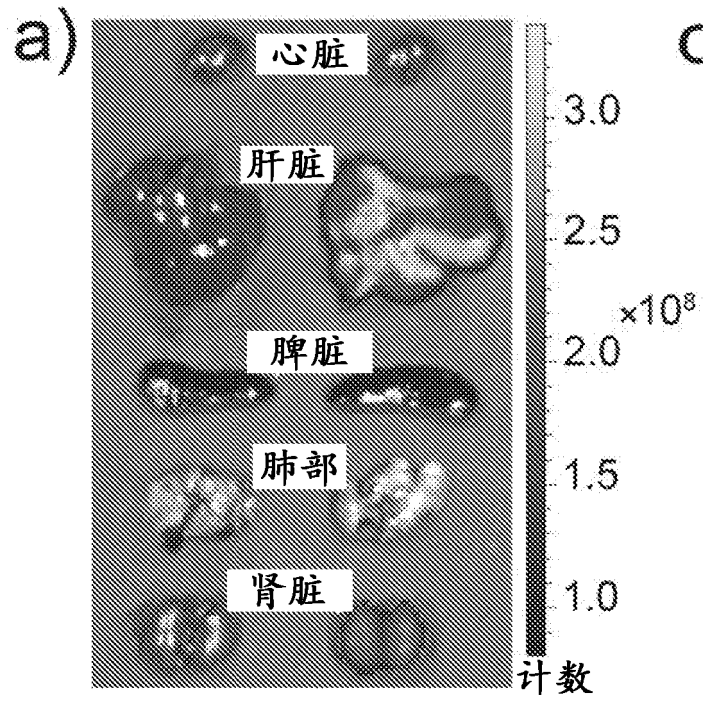


图 5A

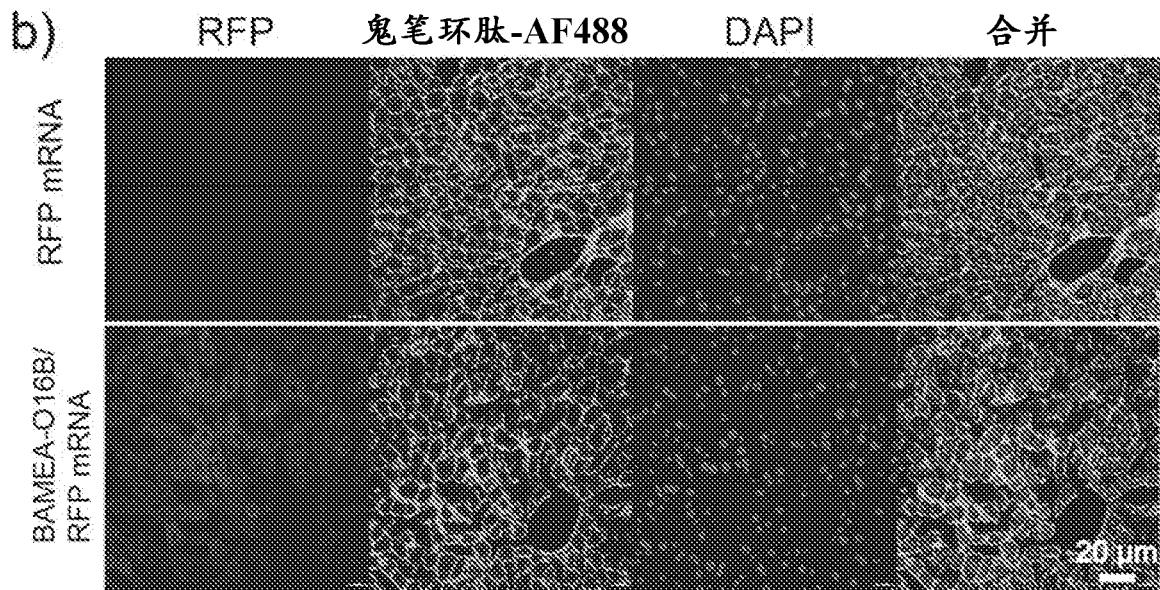


图 5B

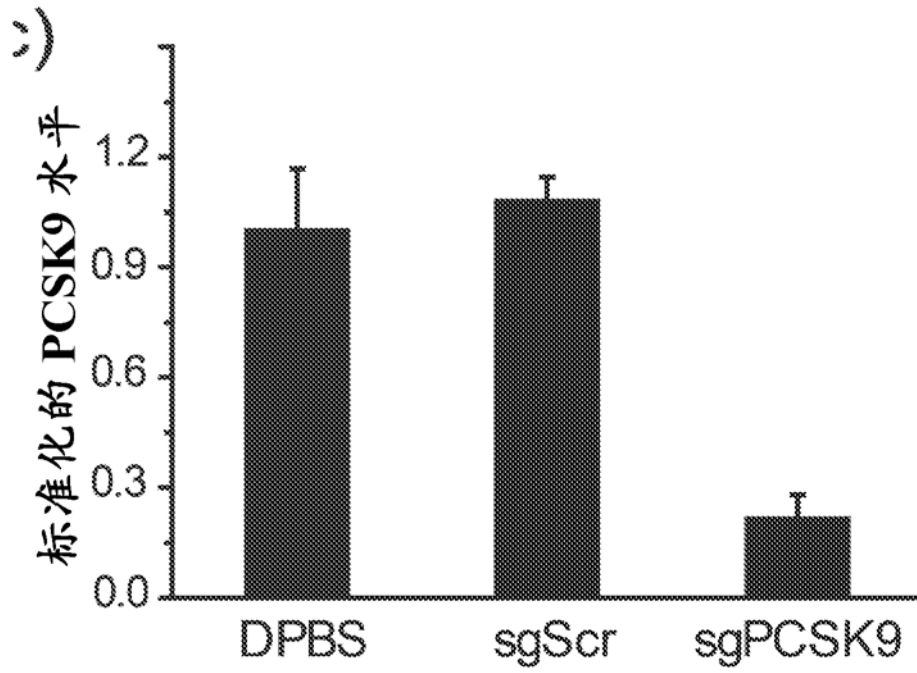


图 5C

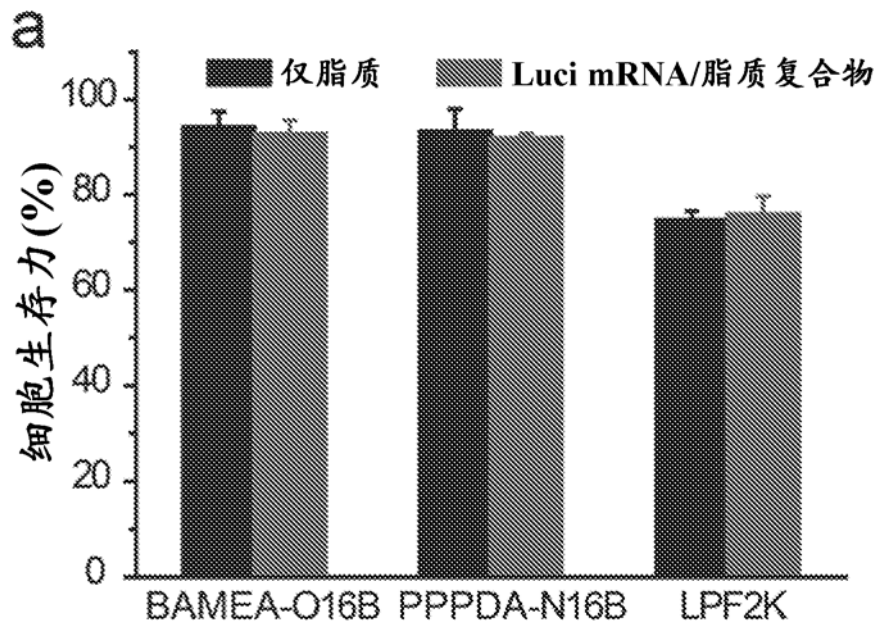


图 6A

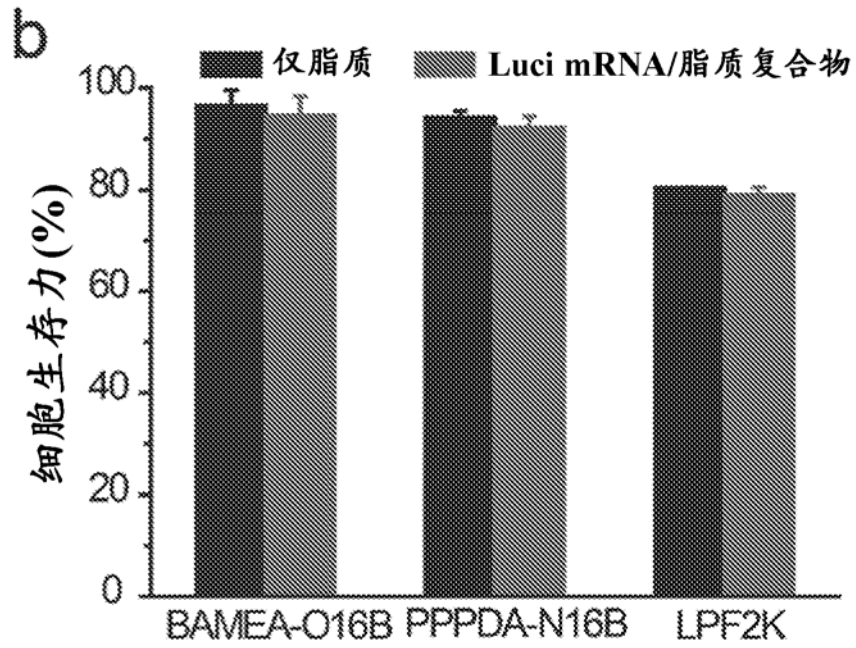


图 6B



图 7

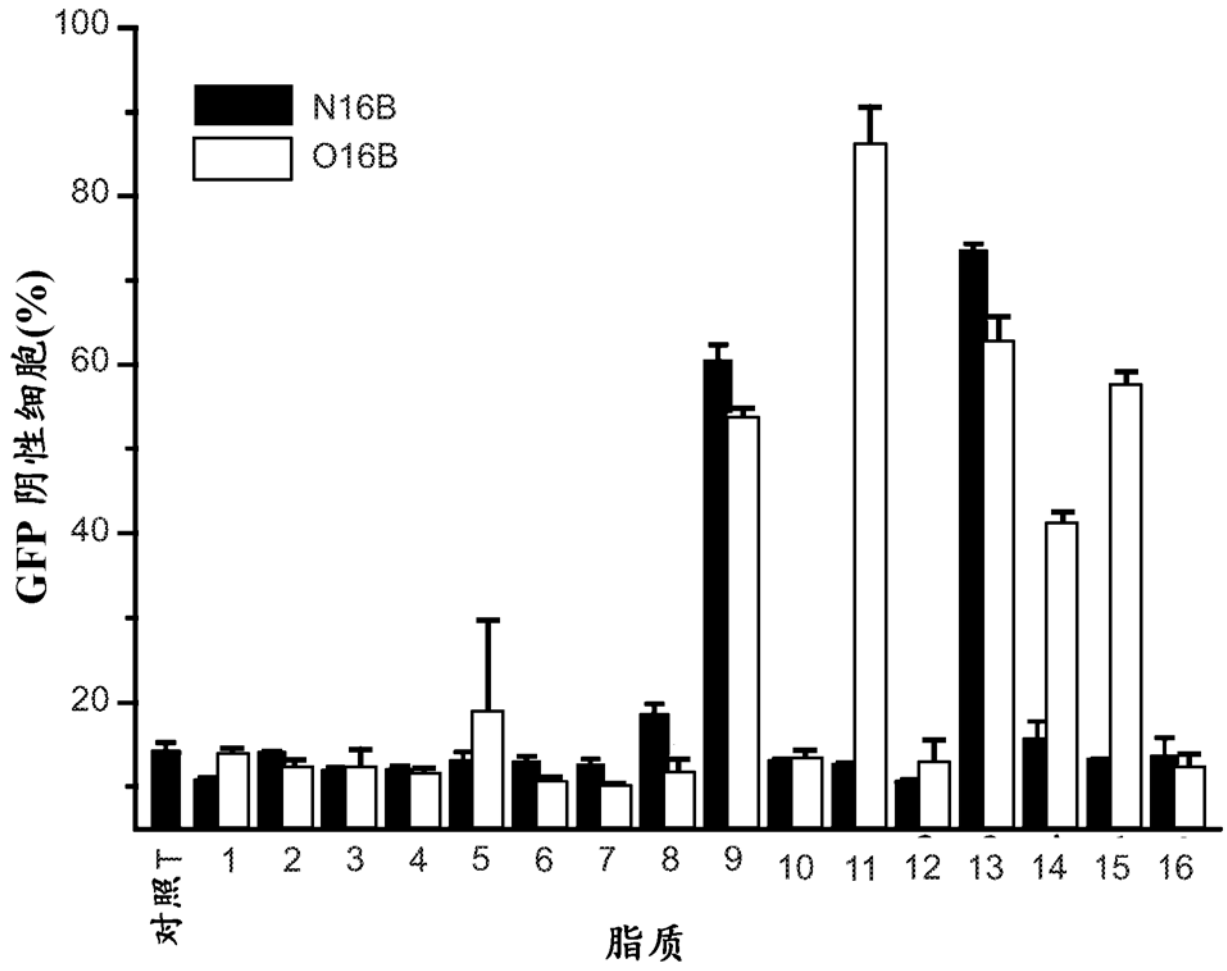


图 8

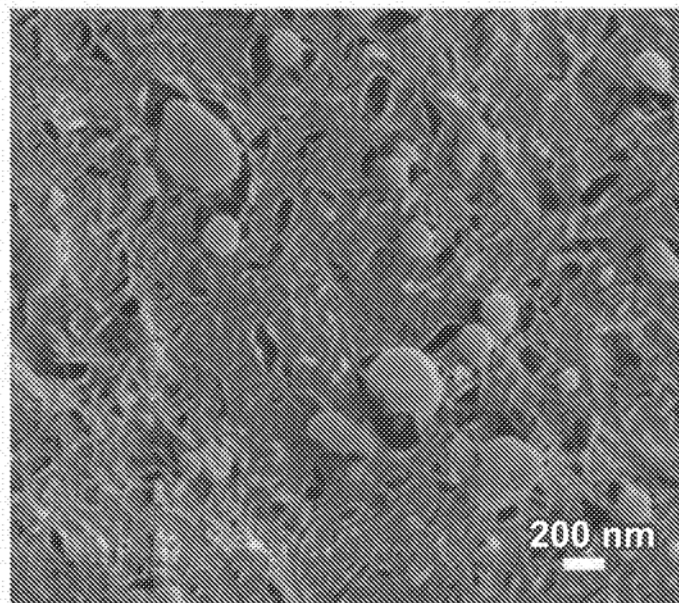


图 9

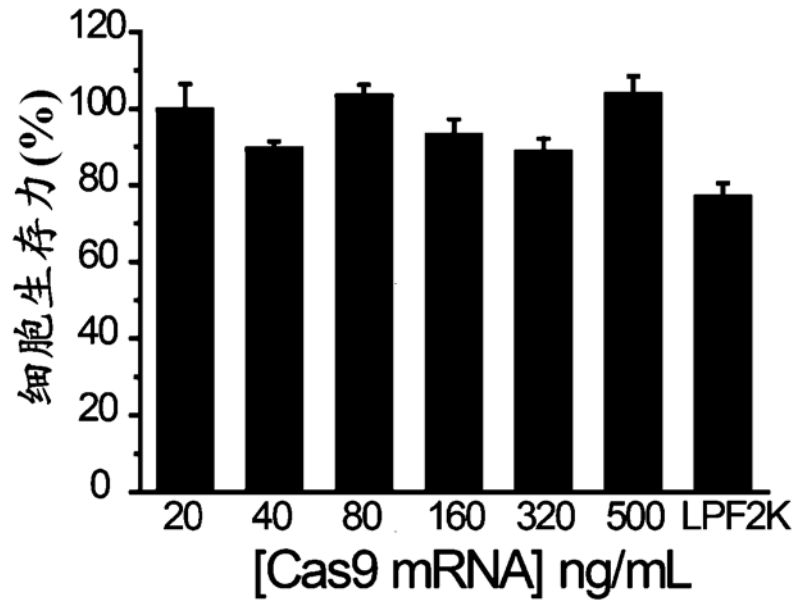


图 10

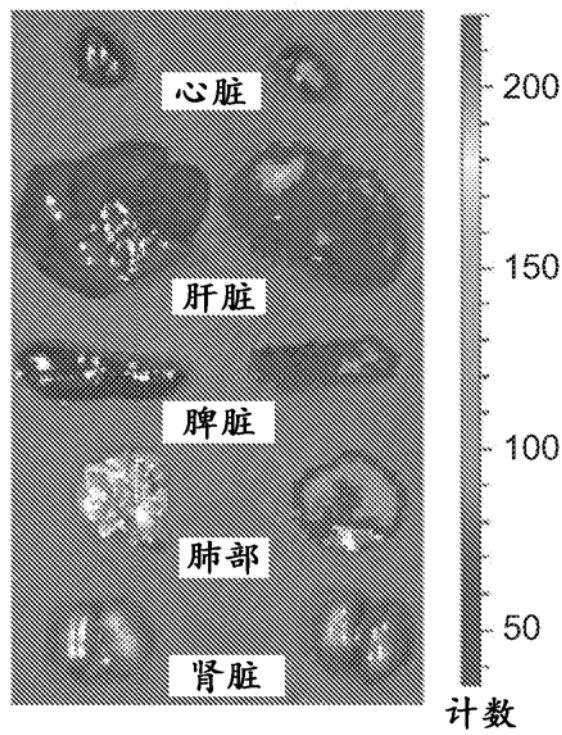


图 11

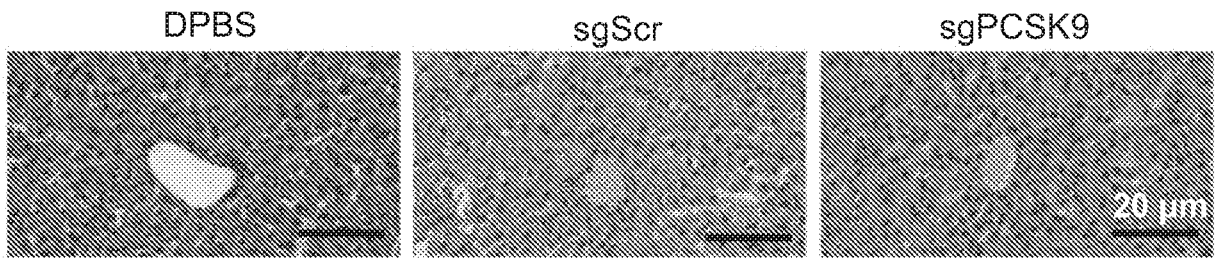


图 12

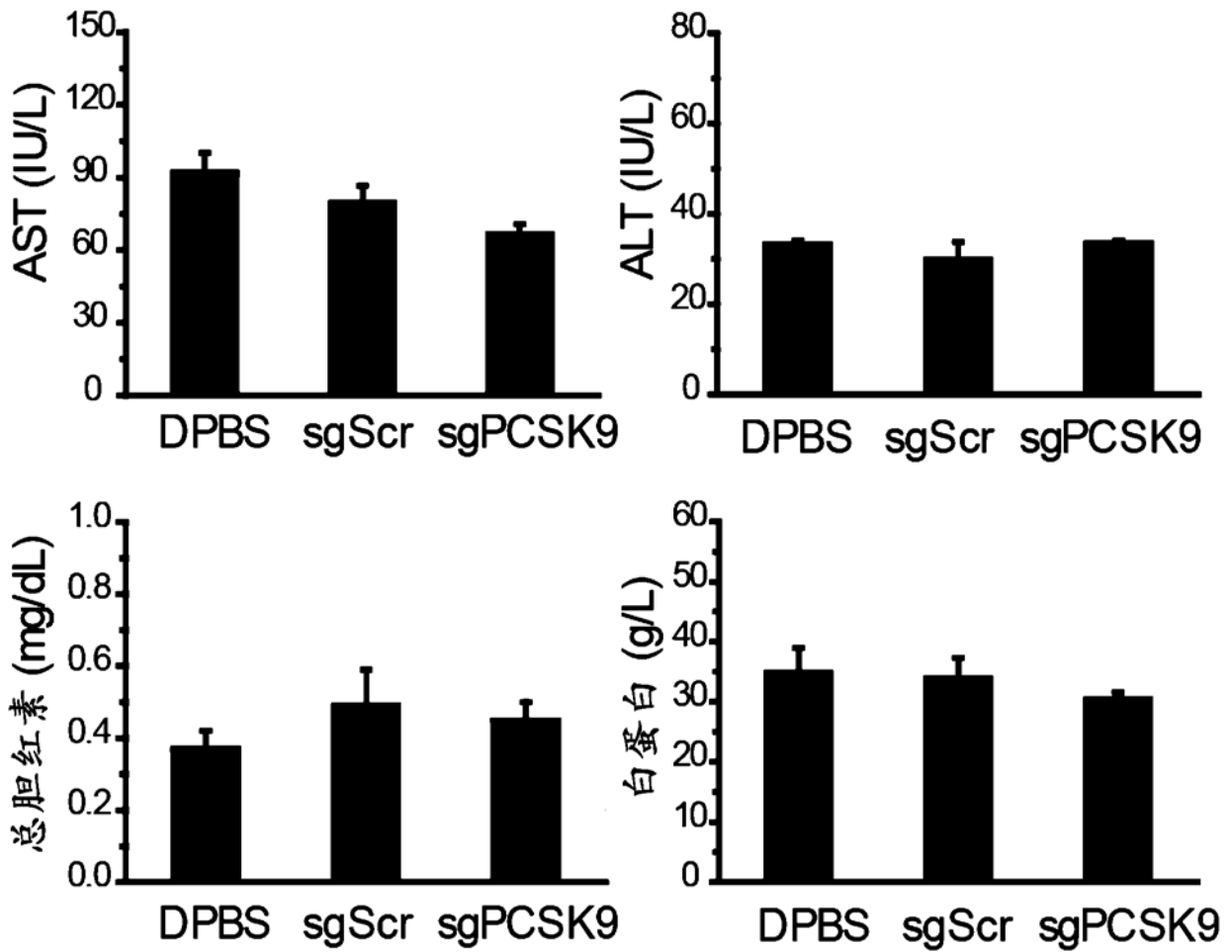


图 13

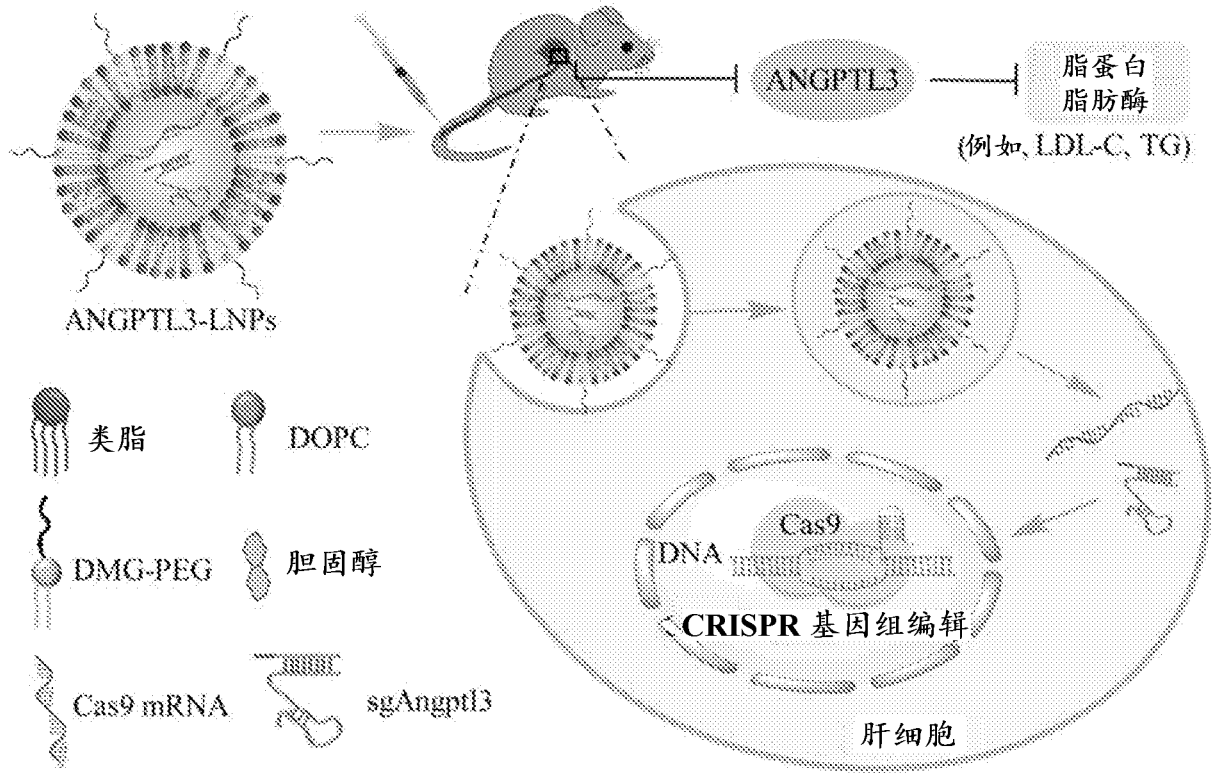


图 14

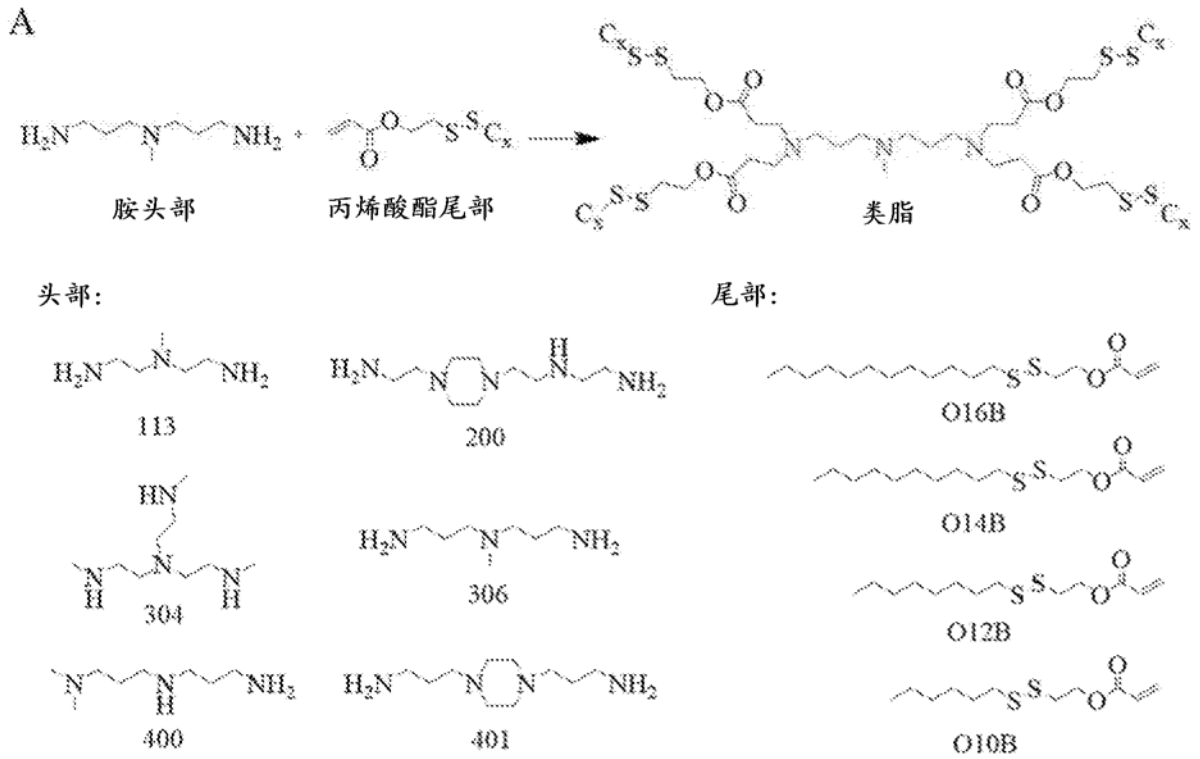


图 15A

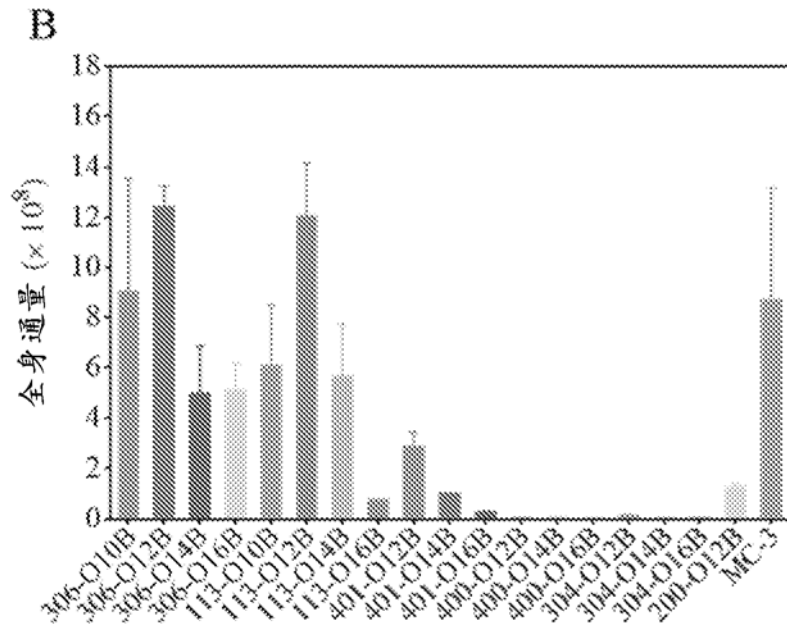


图 15B

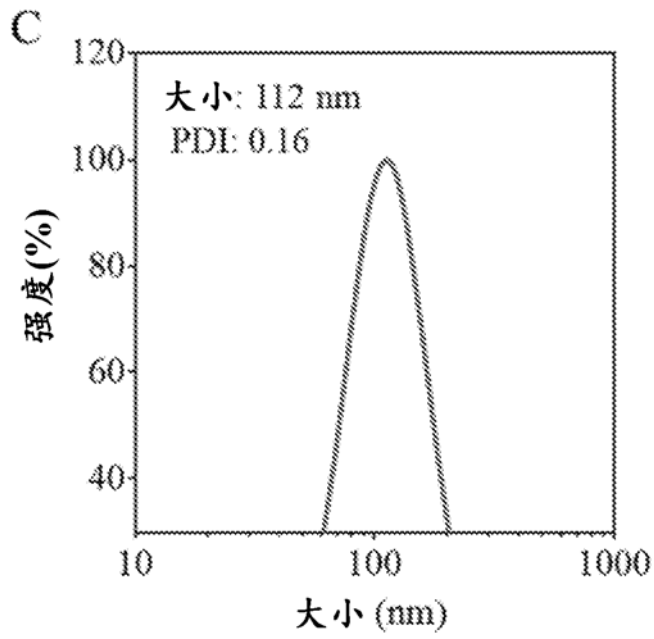


图 15C

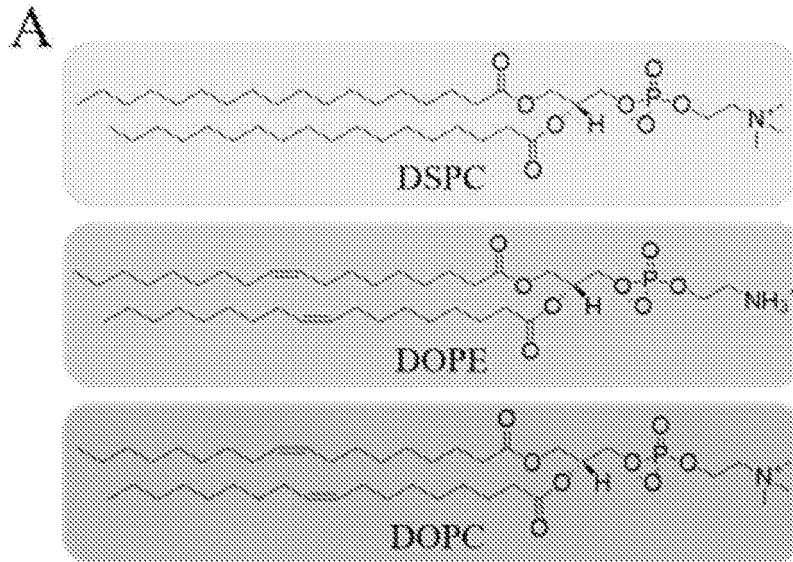


图 16A

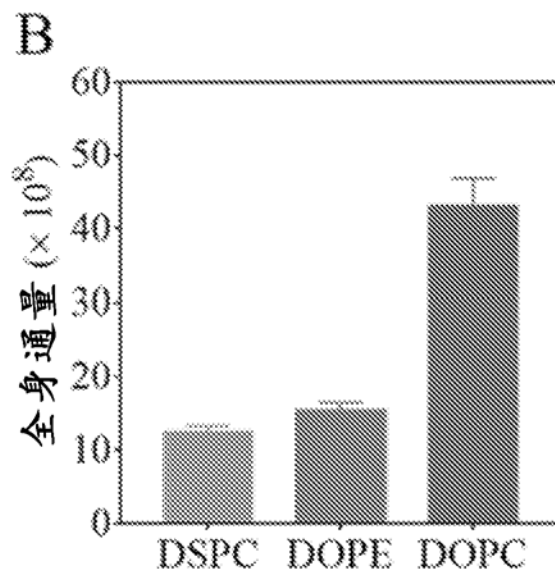


图 16B

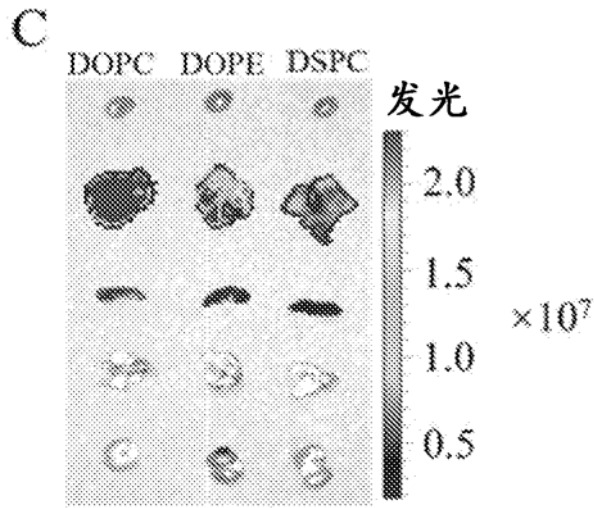


图 16C

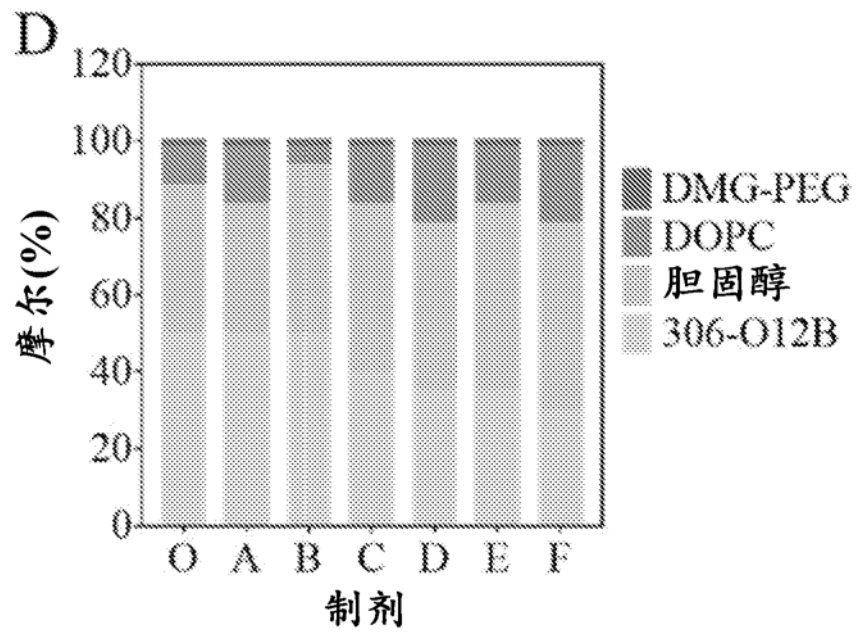


图 16D

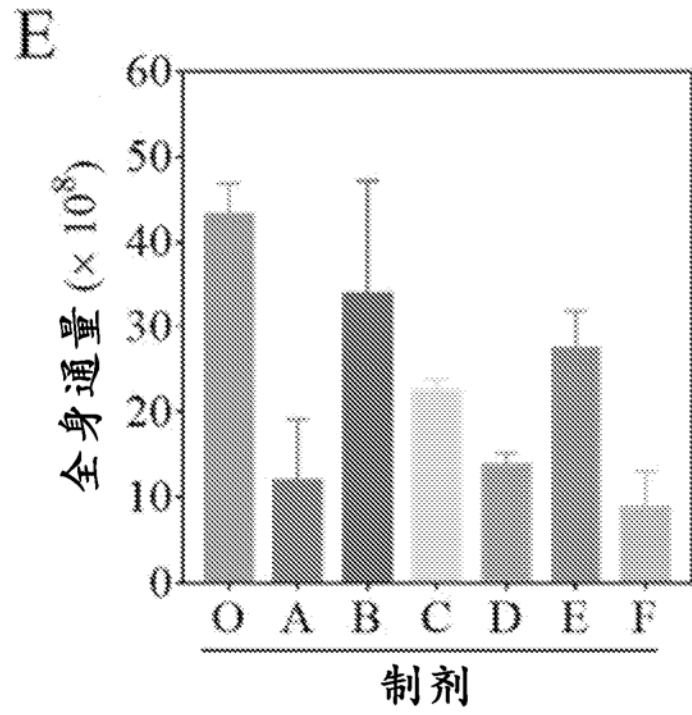


图 16E

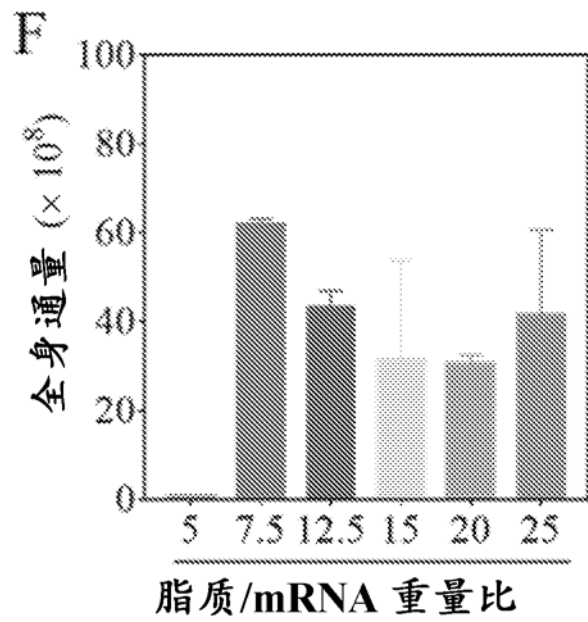


图 16F

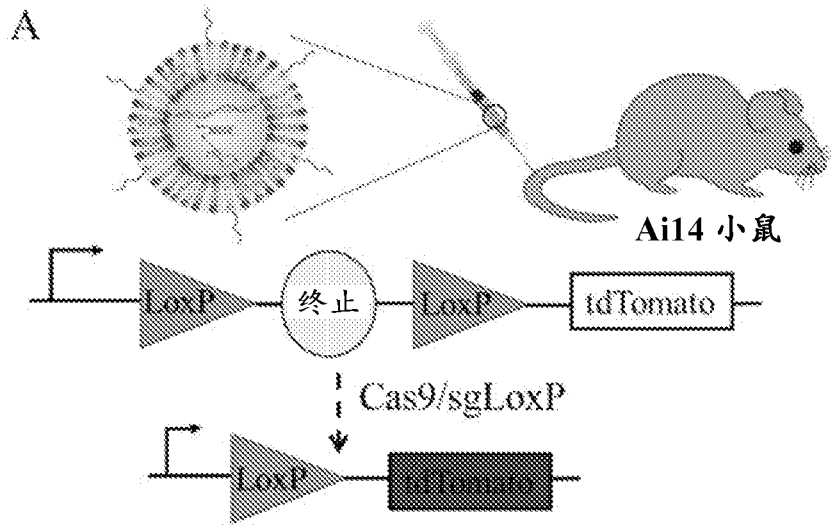


图 17A

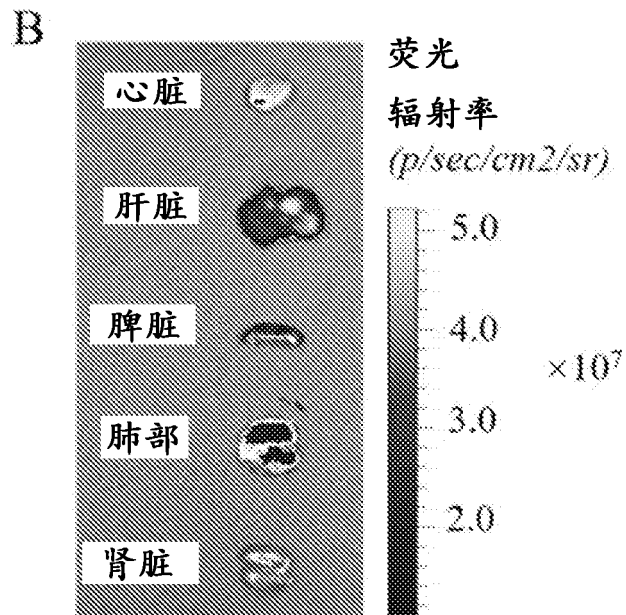


图 17B

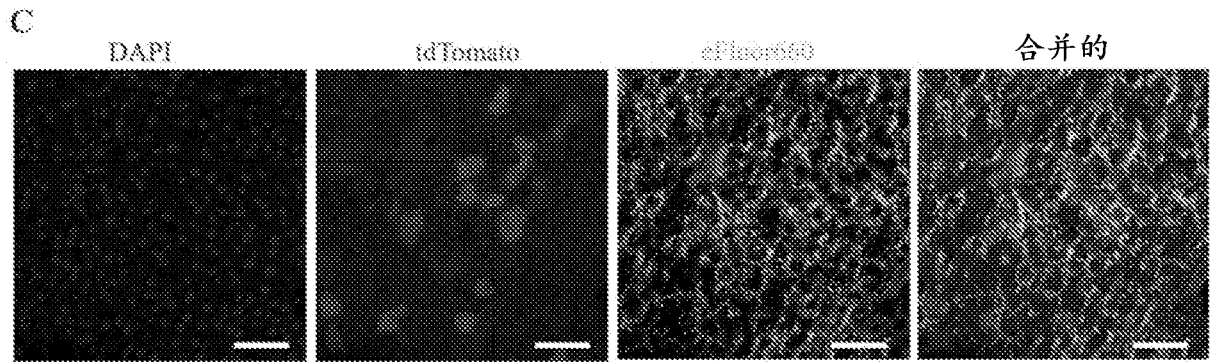


图 17C

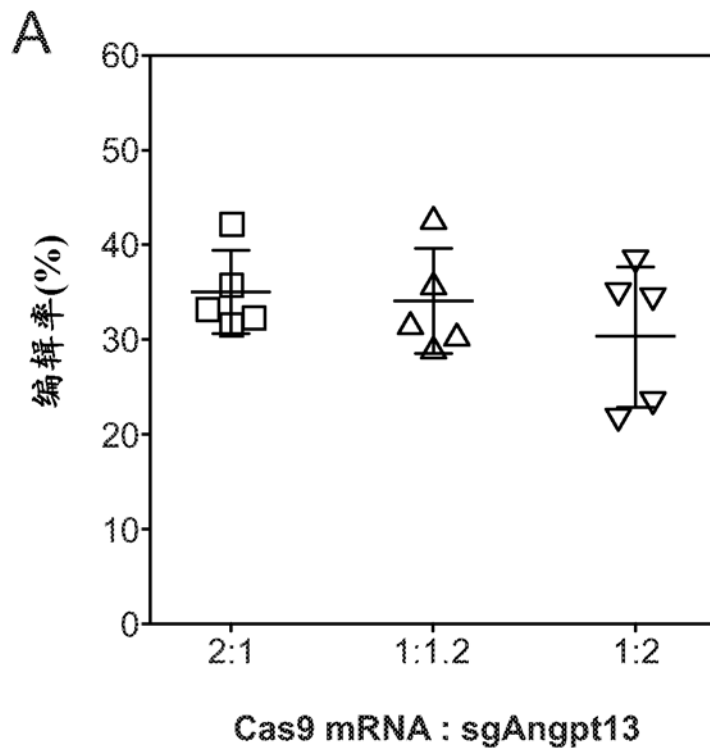


图 18A

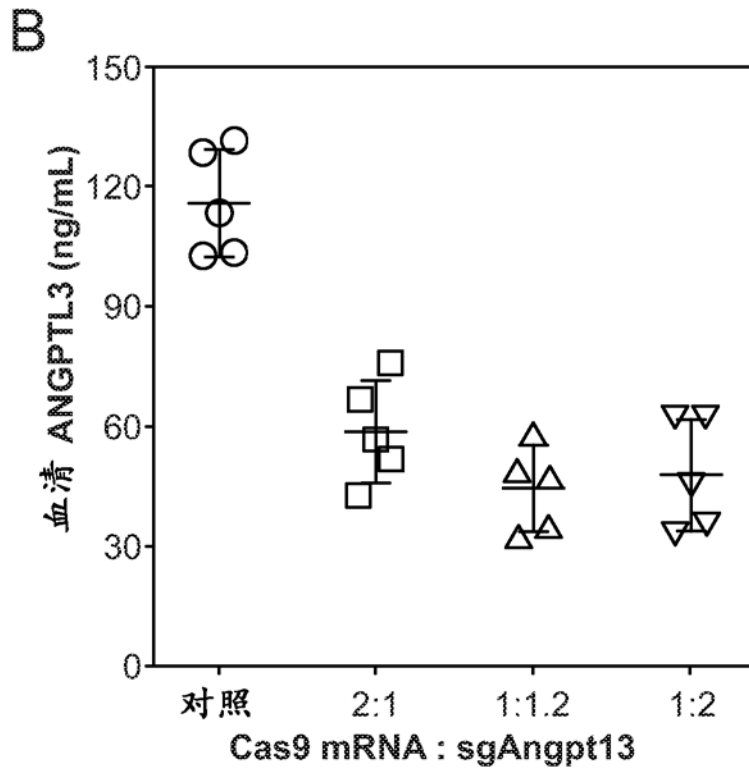


图 18B

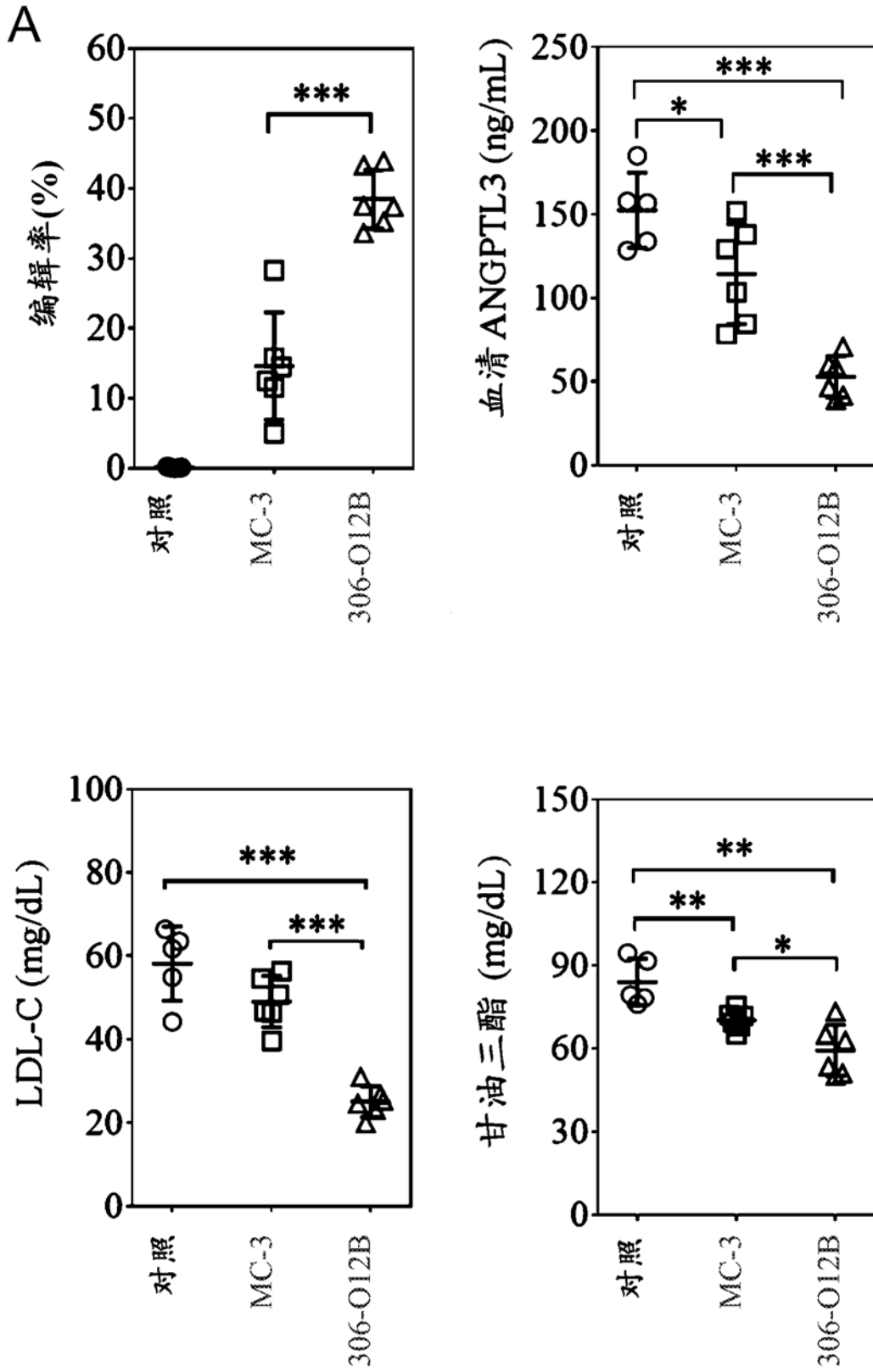


图 19A

B

编辑的 ANGPTL3 序列	突变类型	最佳 306-O12B 小鼠中的频率 (%)	最佳 MC-3 小鼠中的频率 (%)	对照小鼠中的频率 (%)
CGTTTTAACTTGTAGTGTA	野生型			
CGTTTT_AACTTGTAGTGTA	1nt 缺失	31.0	20.0	0.19
CGTTTTT AACTTGTAGTGTA	1nt 插入	12.0	8.0	0
	T			
CGTTT__AACTTGTAGTGTA	2nt 缺失	2.0	1.0	0
其他编辑		3.4	0.9	0.11
总编辑的等位基因		48.4	29.9	0.3

图 19B

C	潜在的脱靶位点	位置	最佳 306-O12B 小鼠中的频率 (%)	最佳 MC-3 小鼠中的 频率(%)	对照小鼠中 的频率(%)
	aACACTACAA-TTAAAAACGTGG	chr17: 67139471	0.06	0.04	0.06
	TACACTAaAA-TTAAAAACGTGG	chr10: 96372376	0.03	0.05	0.05
	TtCACTACAAGTTAGAAAACaGGG	chr3: 96010269	0.03	0.03	0.03
	TACACTACGAaTTAAAAcCGAGG	chr14: 113652925	0.04	0.04	0.02
	TACACTACAAGTTCAAAtACaTGG	chr9: 20240345	0.02	0.04	0.02
	TACACTA-AAGaTAAAAACaTGG	chr8: 57778609	0.04	0.04	0.04
	TACAgT-CAAGTTAAAAACcAGG	chr12: 53110237	0.09	0.09	0.09
	T-CACTACTaGatAAAAACGTGG	chr3: 65249939	0.04	0.04	0.03
	cACACTACAAG-TAAAAACaGGG	chr3: 38440103	0.04	0.05	0.04

图 19C

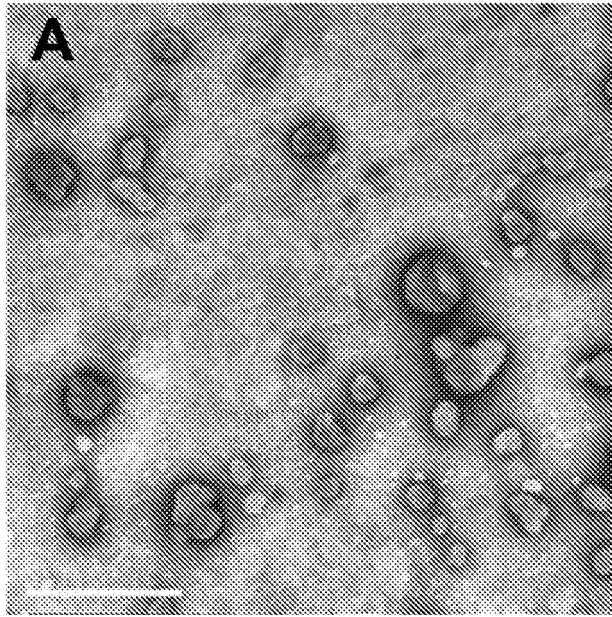


图 20A

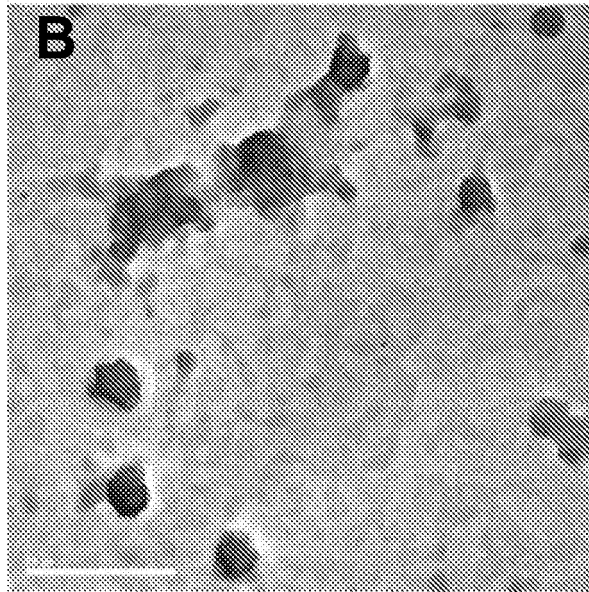


图 20B

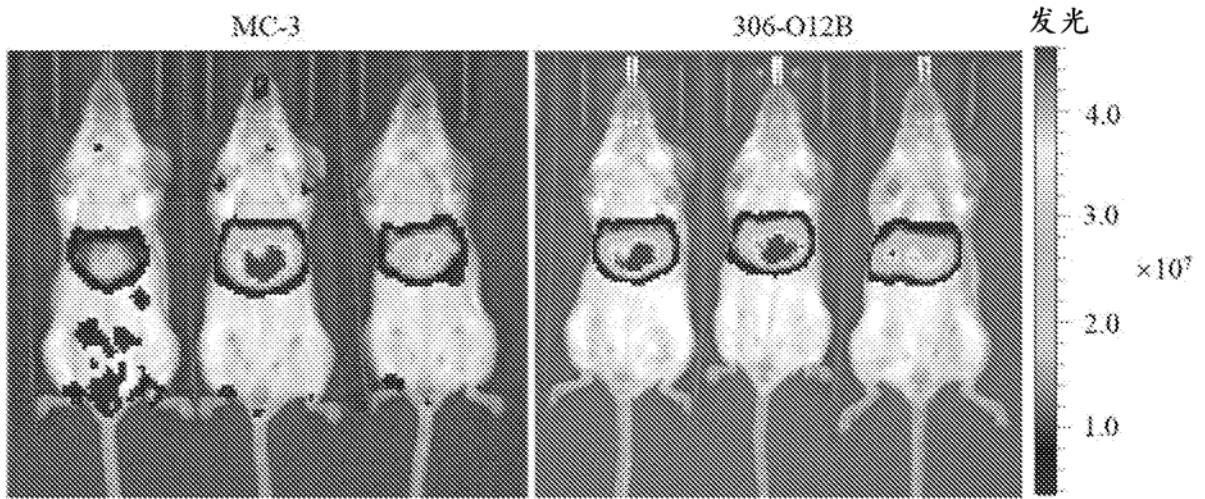


图 21

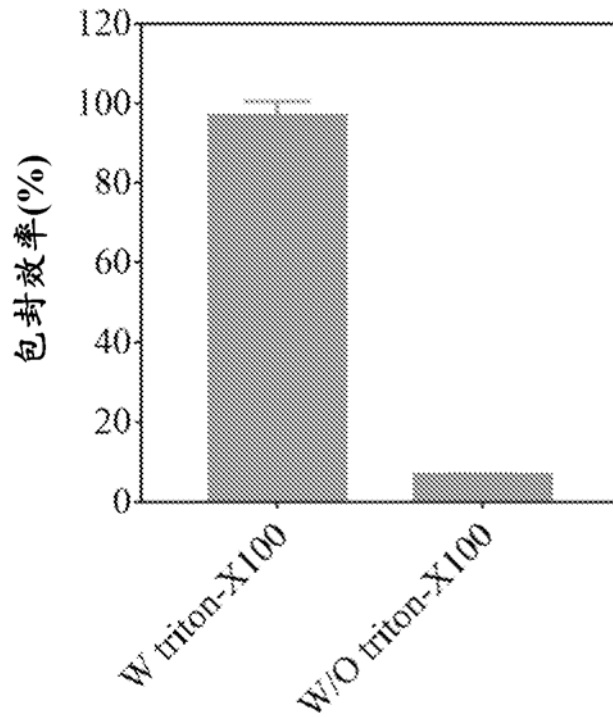


图 22

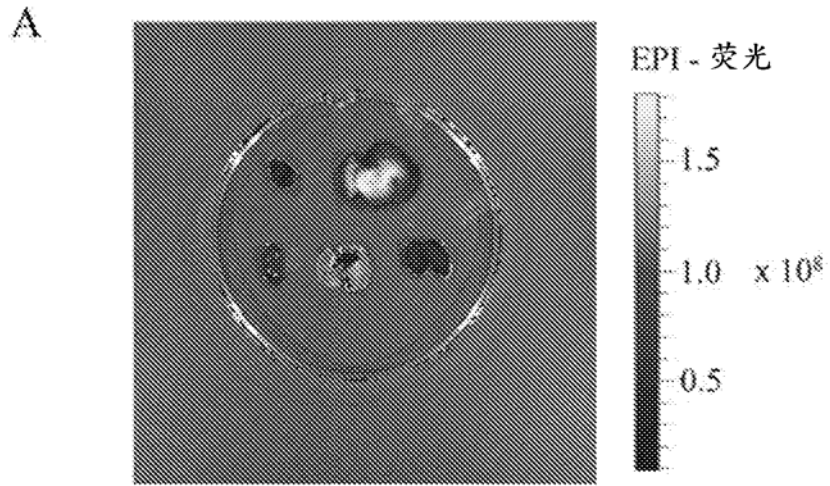


图 23A

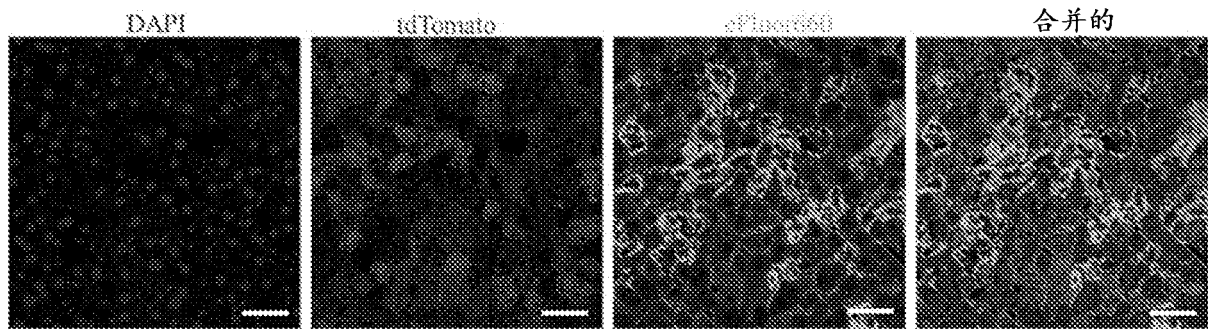


图 23B

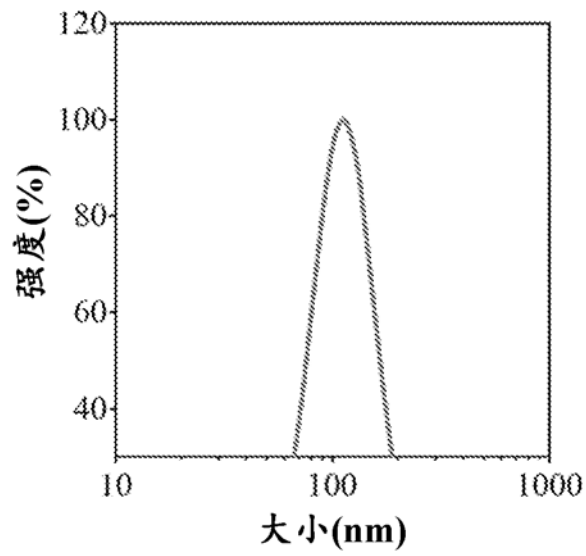


图 24

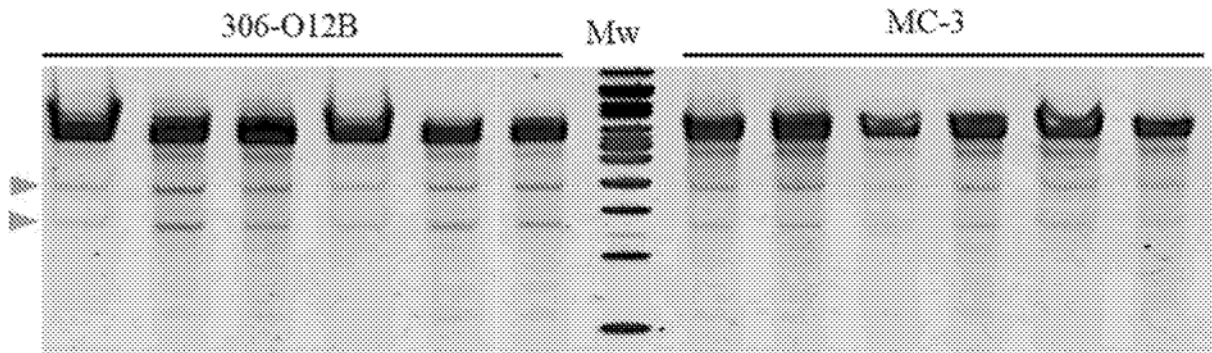


图 25

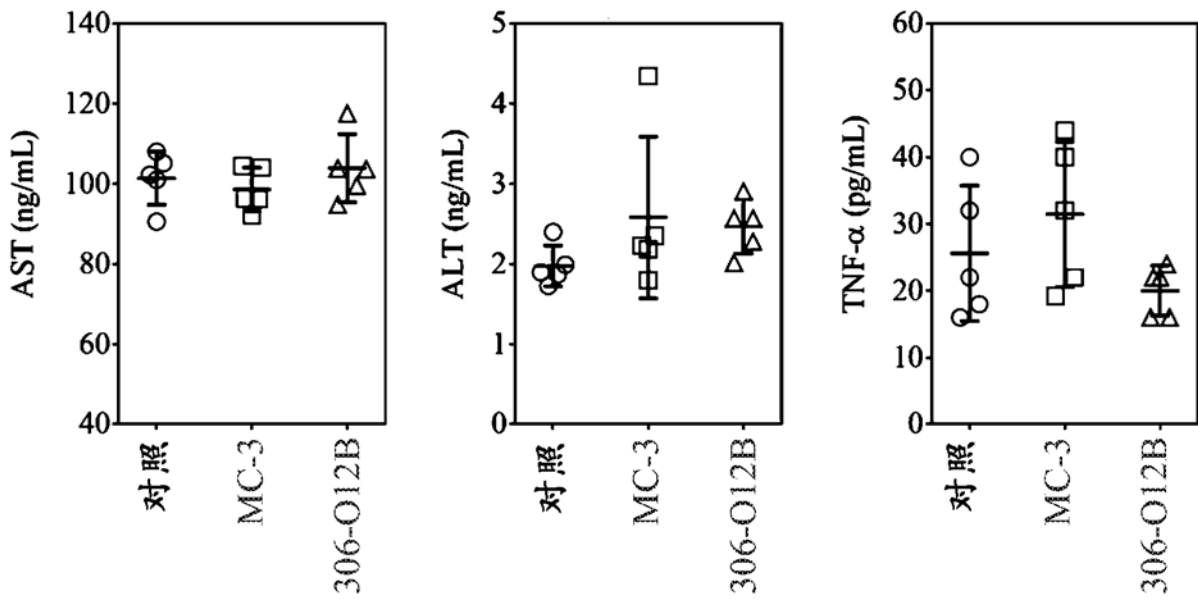


图 26