



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107002094 A

(43)申请公布日 2017. 08. 01

(21)申请号 201580028992.1

(22)申请日 2015.05.29

(30)优先权数据

62/005,395 2014.05.30 US

62/029,072 2014.07.25 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.11.30

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/033180 2015.05.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/184259 EN 2015.12.03

(71)申请人 斯坦福大学托管董事会

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·R·奎克 王建斌

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 马思敏 陆凤

(51)Int.Cl.

C12N 15/86(2006.01)

C12N 15/90(2006.01)

C12N 9/16(2006.01)

C12N 9/22(2006.01)

C12N 15/10(2006.01)

C12N 15/113(2010.01)

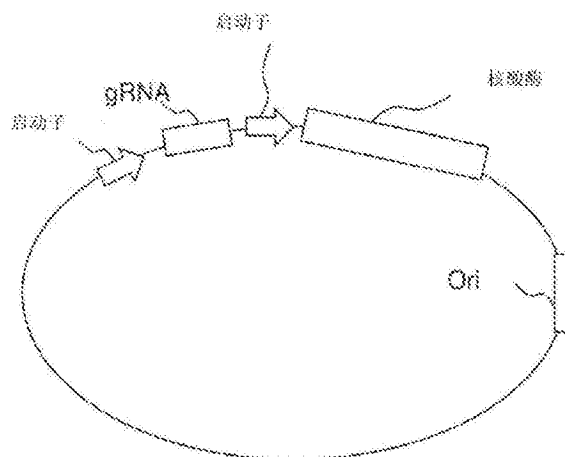
权利要求书2页 说明书22页 附图22页

(54)发明名称

用于治疗潜伏病毒感染的组合物和方法

(57)摘要

病毒感染是持续的人类疾病诱因。引导的核酸酶系统靶向病毒感染的基因组,使得病毒丧失能力。



1. 一种治疗病毒感染的方法,所述方法包括:
将核酸酶和序列特异性靶向部分引入细胞;
通过序列特异性靶向部分将核酸酶靶向病毒核酸:和
用核酸酶切割病毒核酸而不干扰宿主基因组。
2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的核酸酶选自下组:锌指核酸酶,转录激活因子样效应物核酸酶,和大范围核酸酶。
3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的核酸酶包括Cas9内切核酸酶,并且序列特异性靶向部分包含引导RNA。
4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的病毒感染是潜伏的,并且病毒核酸整合到宿主基因组中。
5. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的切割包括在病毒核酸中产生双链断裂。
6. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的宿主是活的人类对象,并且所述步骤在体内进行。
7. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,还包括将多核苷酸插入病毒核酸中。
8. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,所述的病毒核酸源于选自下组的病毒:腺病毒,单纯疱疹,1型,单纯疱疹,2型,水痘带状疱疹病毒,爱泼斯坦-巴尔 (Epstein-barr) 病毒,人巨细胞病毒,人疱疹病毒,8型,人乳头瘤病毒,BK病毒,JC病毒,天花,乙型肝炎病毒,人博卡病毒,细小病毒B19,人星状病毒,诺沃克病毒,柯萨奇病毒,甲型肝炎病毒,脊髓灰质炎病毒,鼻病毒,严重急性呼吸综合征病毒,丙型肝炎病毒,黄热病毒,登革热病毒,西尼罗病毒,风疹病毒,戊型肝炎病毒,人免疫缺陷病毒 (HIV),流感病毒,瓜纳瑞托 (Guanarito) 病毒,胡宁 (Junin) 病毒,拉沙热病毒,马丘波 (Machupo) 病毒,萨比亚 (Sabia) 病毒,克里米亚-刚果出血热病毒,埃博拉病毒,马尔堡病毒,麻疹病毒,腮腺炎病毒,副流感病毒,呼吸道合胞病毒,人偏肺病毒,亨德拉病毒,尼帕病毒,狂犬病病毒,丁型肝炎病毒,轮状病毒,环状病毒,科婢病毒和班纳 (Banna) 病毒。
9. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,引入核酸酶和序列特异性靶向部分包括将编码核酸酶和序列特异性靶向部分的病毒载体导入细胞。
10. 如权利要求9所述的方法,其特征在于,所述病毒载体选自下组:逆转录病毒,慢病毒,腺病毒,疱疹病毒,痘病毒,甲病毒,牛痘病毒和腺相关病毒。
11. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,引入核酸酶和序列特异性靶向部分包括将非病毒载体引入细胞。
12. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述的非病毒载体选自下组:纳米颗粒,阳离子脂质,阳离子聚合物,金属纳米颗粒,纳米棒,脂质体,微泡,细胞穿透肽,和脂质球 (liposphere)。
13. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述的非病毒载体包括聚乙二醇 (PEG)。
14. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,还包括对载体施加能量。
15. 如权利要求11所述的方法,其特征在于,所述的能量通过超声或电穿孔引入。
16. 一种治疗病毒感染的组合物,所述组合物包括:
核酸酶;和

序列特异性靶向部分,其在宿主细胞内将核酸酶靶向体内的病毒核酸,由此使核酸酶切割病毒核酸而不干扰宿主核酸。

17.如权利要求16所述的组合物,其特征在于,所述的核酸酶是Cas9核酸内切酶,并且序列特异性结合模块包含特异性靶向病毒基因组的一部分的引导RNA。

18.如权利要求17所述的组合物,其特征在于,所述的Cas9核酸内切酶和引导RNA在被病毒感染的宿主细胞中共表达。

19.如权利要求16所述的组合物,其特征在于,所述的核酸酶选自下组:锌指核酸酶,转录激活因子样效应物核酸酶,和大范围核酸酶。

20.如权利要求16所述的组合物,其特征在于,所述的病毒核酸是来源于选自下组的病毒:单纯疱疹病毒(HSV)-1,HSV-2,水痘带状疱疹病毒(VZV),巨细胞病毒(CMV),人疱疹病毒(HHV)-6,HHV-7,卡波西肉瘤相关的疱疹病毒(KSHV),JC病毒,BK病毒,细小病毒b19,腺相关病毒(AAV)和腺病毒。

21.一种治疗病毒感染的组合物,所述组合物包括:

核酸,所述的核酸编码:

核酸酶;和

序列特异性靶向部分,其将核酸酶靶向病毒核酸,由此使核酸酶切割病毒核酸而不干扰宿主核酸。

22.如权利要求21所述的组合物,其特征在于,所述的序列特异性靶向部分包含引导RNA。

23.如权利要求22所述的组合物,其特征在于,所述的引导RNA与病毒基因组的一部分互补。

24.如权利要求23所述的组合物,其特征在于,所述的引导RNA设计成在病毒功能所必需的特征内使核酸酶切割病毒基因组。

25.如权利要求24所述的组合物,其特征在于,所述的特征选自下组:病毒复制起点,末端重复序列,复制因子结合位点,启动子,编码序列,和重复区。

26.如权利要求21所述的组合物,其特征在于,所述的核酸在运送载体中提供。

27.如权利要求26所述的组合物,其特征在于,所述的运送载体包括腺相关病毒。

28.如权利要求27所述的组合物,其特征在于,所述的运送载体包括选自下组的运送载体:逆转录病毒,慢病毒,腺病毒,疱疹病毒,痘病毒,甲病毒,牛痘病毒,纳米颗粒,阳离子脂质,阳离子聚合物,金属纳米颗粒,纳米棒,脂质体,微泡,细胞穿透肽,脂质球,和聚乙二醇(PEG)。

29.如权利要求21所述的组合物,其特征在于,所述的核酸酶为Cas9核酸内切酶。

用于治疗潜伏病毒感染的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2014年5月30日提交的美国临时申请申请号62/005,395,以及2014年7月25日提交的美国临时申请申请号62/029,072的优先权和权益,其全部内容通过引用并入本文。

发明领域

[0003] 本发明一般涉及使用引导核酸酶系统选择性治疗病毒感染的组合物和方法。

背景技术

[0004] 病毒感染是一种严重的医疗问题。有各种抗病毒治疗,但它们通常牵涉到中断病毒的复制周期。因此,一个特别困难的问题是潜伏病毒感染,因为没有有效的能够从宿主细胞中根除病毒的治疗。由于潜伏感染可以逃避免疫监视并且在任何时间重新激活裂解周期,所以在整个生命中存在持续的风险。大多数抗病毒药物开发着重在蛋白质靶标上,且这些方法没有成功地根除病毒。

[0005] 尤其成问题的潜伏性病毒感染的一个实例是疱疹病毒科病毒家族。疱疹是最普遍的人类病原体之一,超过90%的成年人已经感染了疱疹病毒八种亚型中的至少一种。潜伏感染在大多数人中仍然存在;而14岁至49岁的美国人中约有16%感染了生殖器疱疹,使其成为最常见的性传播疾病之一。由于潜伏,生殖器疱疹或2-型单纯疱疹病毒(HSV-2)无法治愈。一旦感染,宿主无限期地携带疱疹病毒,即使不表现症状。类似地,人乳头瘤病毒或HPV是人类中的常见病毒,其中超过75%的女性和男性在其生命的一个时间将具有这种类型的感染。高风险致癌HPV类型能够整合到细胞的DNA中,其可以导致癌症,特别是宫颈癌。与疱疹病毒科病毒家族类似,HPV可能保持潜伏。

[0006] 爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV),也称为人类疱疹病毒4(HHV-4)是人类的另一种常见病毒。已知爱泼斯坦-巴尔是传染性单核细胞增多症(腺发热)的原因,并且还与特定形式的癌症如霍奇金淋巴瘤,伯基特氏淋巴瘤,鼻咽癌和与人免疫缺陷病毒(HIV)相关的病症如毛发白斑和中枢神经系统淋巴瘤有关。有证据表明,该病毒的感染与某些自身免疫疾病,特别是皮炎,系统性红斑狼疮,类风湿性关节炎,干燥综合征和多发性硬化的较高风险有关。在潜伏期间,EBV基因组环化并作为附加体驻留在细胞核中。然而,迄今为止,不存在EBV疫苗或治疗。

[0007] 病毒,例如疱疹病毒科,包括EBV和HPV具有无限期地在细胞内休眠的能力,即使治疗后也不能完全根除。结果是在宿主不被任何新的外部病毒感染情况下,病毒可以重新激活并开始产生大量的病毒后代。在潜伏状态下,病毒基因组作为附加体存在于宿主细胞内;稳定并漂浮在细胞质或细胞核中。对于这些潜伏病毒,目前还没有找到完全根除这种感染的治疗方法。

发明内容

[0008] 本发明提供了使用引导核酸酶系统选择性治疗病毒感染的组合物和方法。本发明的方法可以用于从宿主生物体去除病毒或其他外源遗传物质,而不干扰宿主遗传物质的完整性。核酸酶可用于靶向病毒核酸,从而干扰病毒复制或转录或甚至从宿主基因组切除病毒遗传物质。当病毒核酸作为细胞内的颗粒存在时或当其整合到宿主基因组中时,核酸酶可以被特异性靶向以仅移除病毒核酸而不作用于宿主材料。靶向病毒核酸可以使用序列特异性部分进行,所述序列特异性部分例如靶向病毒基因组材料从而进行核酸酶破坏并且不靶向宿主细胞基因组的引导RNA。在一些实施方案中,使用同时靶向和选择性编辑或破坏病毒基因组材料的CRISPR/Cas9核酸酶和引导RNA(gRNA)。CRISPR(成簇的规律间隔的短回文重复)是细菌免疫系统的天然存在的元素,其保护细菌免于噬菌体感染。引导RNA将CRISPR/Cas9复合物定位于病毒靶序列。复合物的结合将Cas9内切核酸酶定位于病毒基因组靶序列上,引起病毒基因组的断裂。可以使用其他核酸酶系统,包括例如锌指核酸酶,转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN),大范围核酸酶(meganucleases)或可用于降解或干扰病毒核酸而不干扰宿主遗传物质的通常功能的任何其他系统。

[0009] 在某些方面,本发明提供了治疗病毒感染的方法。该方法包括将核酸酶和序列特异性靶向部分引入细胞。核酸酶通过序列特异性靶向部分靶向病毒核酸,并且核酸酶切割病毒核酸而不干扰宿主基因组。核酸酶可以是例如锌指核酸酶,转录激活因子样效应物核酸酶和大范围核酸酶。在优选的实施方案中,核酸酶是Cas9内切核酸酶,并且序列特异性靶向部分包含引导RNA。切割步骤可以在病毒核酸中产生一个或多个单链或双链断裂。所述方法可以进一步包括插入多核苷酸或将切割末端与一段去除的病毒核酸重新连接。宿主可以是活的受试者,例如人类患者,并且所述(多个)步骤可以在体内进行。

[0010] 该方法可用于靶向任何形式或在病毒生命周期的任何阶段的病毒核酸。例如,该方法可用于消化病毒RNA或DNA。靶向的病毒核酸可以作为独立的颗粒存在于宿主细胞中。在优选的实施方案中,病毒感染是潜伏的,并且病毒核酸整合到宿主基因组中。任何合适的病毒核酸均可以被靶向进行切割和消化。在某些实施方案中,靶向的病毒包括以下一种或多种:单纯疱疹病毒(HSV)-1,HSV-2,水痘带状疱疹病毒(VZV),巨细胞病毒(CMV),人疱疹病毒(HHV)-6,HHV-7,卡波西肉瘤相关的疱疹病毒(KSHV),JC病毒,BK病毒,细小病毒b19,腺相关病毒(AAV)和腺病毒。在一些实施方案中,靶向的(一种或多种)病毒包括以下一种或多种:腺病毒,单纯疱疹,1型,单纯疱疹,2型,水痘带状疱疹病毒,爱泼斯坦-巴尔(Epstein-barr)病毒,人巨细胞病毒,人疱疹病毒,8型,人乳头瘤病毒,BK病毒,JC病毒,天花,乙型肝炎病毒,人博卡病毒,细小病毒B19,人星状病毒,诺沃克病毒,柯萨奇病毒,甲型肝炎病毒,脊髓灰质炎病毒,鼻病毒,严重急性呼吸综合征病毒,丙型肝炎病毒,黄热病毒,登革热病毒,西尼罗病毒,风疹病毒,戊型肝炎病毒,人免疫缺陷病毒(HIV),流感病毒,瓜纳瑞托(Guanarito)病毒,胡宁(Juin)病毒,拉沙热病毒,马丘波(Machupo)病毒,萨比亚(Sabiá)病毒,克里米亚-刚果出血热病毒,埃博拉病毒,马尔堡病毒,麻疹病毒,腮腺炎病毒,副流感病毒,呼吸道合胞病毒,人偏肺病毒,亨德拉病毒,尼帕病毒,狂犬病病毒,丁型肝炎病毒,轮状病毒,环状病毒,科婢病毒和班纳(Banna)病毒。

[0011] 可以使用载体将核酸酶和序列特异性靶向部分引入细胞。例如,可以使用编码核酸酶和序列特异性靶向部分的病毒载体。病毒载体可以是逆转录病毒,慢病毒,腺病毒,疱疹病毒,痘病毒,甲病毒,牛痘病毒或腺相关病毒。在一些实施方案中,使用非病毒载体。合

适的非病毒载体可包括例如纳米颗粒,阳离子脂质,阳离子聚合物,金属纳米颗粒,纳米棒,脂质体,微泡,细胞穿透肽,脂质球(liposphere),聚乙二醇(PEG)。可以通过例如超声或电穿孔引起细胞摄取载体。

[0012] 本发明的一些方面提供了用于治疗病毒感染的组合物。所述组合物包括核酸酶和序列特异性靶向部分,所述序列特异性靶向部分在宿主细胞内将核酸酶靶向体内的病毒核酸,由此使核酸酶切割病毒核酸而不干扰宿主核酸。在某些实施方案中,核酸酶是Cas9核酸内切酶,并且序列特异性结合模块包含特异性靶向病毒基因组的一部分的引导RNA。Cas9核酸内切酶和引导RNA可以在被病毒感染的宿主细胞中共表达。在一些实施方案中,核酸酶是选自锌指核酸酶、转录激活因子样效应物核酸酶和大范围核酸酶的核酸酶。

[0013] 待切割的病毒核酸可包括例如以下的一种或多种:单纯疱疹病毒(HSV)-1,HSV-2,水痘带状疱疹病毒(VZV),巨细胞病毒(CMV),人疱疹病毒(HHV)-6,HHV-7,卡波西肉瘤相关的疱疹病毒(KSHV),JC病毒,BK病毒,细小病毒b19,腺相关病毒(AAV)和腺病毒,或其他。

[0014] 本发明的一些方面,提供了用于治疗病毒感染的组合物。所述组合物包括编码核酸酶和序列特异性靶向部分的核酸,所述序列特异性靶向部分使核酸酶靶向病毒核酸从而使核酸酶切割病毒核酸而不干扰宿主核酸。在一些实施方案中,序列特异性靶向部分使用引导RNA,其可以与病毒基因组的一部分互补。引导RNA可以设计成使核酸酶在病毒功能所必需的特征内切割病毒基因组。该特征可以是例如病毒复制起点,末端重复,复制因子结合位点,启动子,编码序列,或重复区域。核酸在递送载体内提供,递送载体可以是病毒载体,例如腺相关病毒。载体可以包括以下的任意:逆转录病毒,慢病毒,腺病毒,疱疹病毒,痘病毒,甲病毒,牛痘病毒,纳米颗粒,阳离子脂质,阳离子聚合物,金属纳米颗粒,纳米棒,脂质体,微泡,细胞穿透肽,脂质球(liposphere),或聚乙二醇(PEG)。

[0015] 本发明的方法和组合物可用于将CRISPR/gRNA/Cas9复合物递送至被病毒感染的细胞(包括整个组织)。可以设计引导RNA以使其靶向病毒基因组上的多个位点,以便破坏病毒核酸并降低其功能性重组的机会。本发明的CRISPR/gRNA/Cas9复合物可以通过病毒,非病毒或其他方法递送以实现转染。CRISPR/gRNA/Cas9复合物优选设计成靶向病毒基因组材料而不靶向宿主的基因组材料。在一些实施方案中,靶向的病毒核酸与引起潜伏感染的病毒相关。潜伏病毒可以是例如人免疫缺陷病毒,人类T细胞白血病病毒,爱泼斯坦-巴尔病毒,人巨细胞病毒,人类疱疹病毒6和7,单纯疱疹病毒1型和2型,水痘带状疱疹病毒,麻疹病毒或人乳头多瘤空泡病毒。本发明的多个方面允许将CRISPR/gRNA/Cas9复合物设计为靶向任何潜伏或活性的病毒。

[0016] 所提出的方法允许病毒基因组编辑或破坏,其导致病毒不能在感染的细胞中增殖和/或在感染的细胞中诱导凋亡,没有观察到对未感染细胞的细胞毒性。CRISPR/gRNA/Cas9复合物被设计以选择性靶向病毒基因组材料(DNA或RNA),将CRISPR/gRNA/Cas9复合物递送至含有病毒基因组的细胞,并切割病毒基因组以使病毒丧失能力。因此,病毒感染可以通过病毒基因组功能的靶向破坏或通过由病毒基因组中用于核酸内切酶作用的靶向位点引起的一个或多个断裂来消化病毒核酸来治疗。在一些实施方案中,本发明的方法可用于用CRISPR/gRNA/Cas9转染宿主细胞以完全抑制细胞增殖和/或在感染的细胞中诱导凋亡。

[0017] 附图简要说明

[0018] 图1A-1C显示了EBV-靶向CRISPR/Cas9的设计。(图1A) CRISPR/Cas质粒方案,改编

自Cong L et al. (2013) Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. Science 339:819-823. (图1B) oriP对Raji细胞中转染效率的影响。Cas9和Cas9-oriP质粒都具有乱序的 (scrambled) 引导RNA。(图1C) CRISPR引导RNA沿着EBV参考基因组的靶标。绿色,红色和蓝色表示三种不同的靶序列类别。

[0019] 图2A-2F代表CRISPR/Cas9诱导的大缺失。(图2A) 引导RNA sgEBV2和PCR引物位置周围的基因组背景。(图2B) 由sgEBV2诱导的大缺失。泳道1-3分别是在sgEBV2处理之前,sgEBV2处理后5天和7天。(图2C) 引导RNA sgEBV3/4/5和PCR引物位置周围的基因组背景。(图2D) 由sgEBV3/5和sgEBV4/5诱导的大缺失。泳道1和2是在sgEBV3/5处理之前和处理后8天的3F/5R PCR扩增子。泳道3和4是在sgEBV4/5处理之前和处理后8天的4F/5R PCR扩增子。(图2E和F) Sanger测序证实了sgEBV3/5 (图2E) 和sgEBV4/5 (2F) 处理后8天的基因组切割和修复连接。蓝色和白色背景标出了修复连接前的两端。

[0020] 图3A-3M代表EBV基因组破坏的细胞增殖停滞。(图3A) 不同CRISPR处理后的细胞增殖曲线。这里显示了五个独立的sgEBV1-7处理。(图3B-D) 流式细胞仪散射信号,sgEBV1-7处理之前 (图3B),处理后5天 (图3C) 和8天 (图3D)。(图3E-G) 膜联蛋白VAl exa647和DAPI染色结果,sgEBV1-7处理之前 (图3E),处理后5天 (图3F) 和8天 (图3G)。其中蓝色和红色对应于亚群P3和P4 (图3B-D)。(图3H和I) 显微镜显示sgEBV1-7处理后的凋亡细胞形态。(图3J-M) 核形态学,sgEBV1-7处理之前 (图3J) 和之后 (图3K-M)。

[0021] 图4A-4E表示CRISPR处理后的EBV负载定量。(图4A) 在不同CRISPR处理后的EBV载量,通过数字PCR。Cas9和Cas9-oriP具有两个复制子,sgEBV1-7具有5个复制子。(图4B和C) 用于全基因组扩增的捕获的单细胞的显微镜检查。(图4D) 处理前单个细胞的EBV定量PCR Ct值的直方图。(图4E) sgEBV1-7治疗后7天单个活细胞的EBV定量PCR Ct值的直方图。红色虚线 (图4D和图4E) 表示每个细胞一个EBV基因组的Ct值。

[0022] 图5表示EBV CRISPR的SURVEYOR测定。泳道1:NEB 100bp梯度;泳道2:sgEBV1对照;泳道3:sgEBV1;泳道4:sgEBV5对照;泳道5:sgEBV5;泳道6:sgEBV7对照;泳道7:sgEBV7;泳道8:sgEBV4。

[0023] 图6显示了用EBV阴性伯基特氏淋巴瘤DG-75的CRISPR细胞毒性试验。

[0024] 图7显示了使用原代人肺成纤维细胞IMR-90的CRISPR细胞毒性试验。

[0025] 图8显示了ZFN的使用。

[0026] 图9示出了本发明的一种方法。

[0027] 图10是HBV基因组的图谱。

[0028] 图11显示了进行病毒治疗的结果。

[0029] 图12显示用于治疗病毒感染的组合物。

具体实施方式

[0030] 本发明一般涉及使用引导核酸酶系统选择性治疗病毒感染的组合物和方法。本发明的方法用于通过核酸酶活性,例如单链或双链断裂,切割,消化或编辑,使细胞内的病毒核酸功能丧失或破坏。本发明的方法可以用于系统地在基因组中引起大的或重复的缺失,降低了重建完整基因组的可能性。

[0031] i. 治疗感染的细胞

[0032] 图9描述了治疗感染了病毒的细胞的方法。本发明的方法适用于患者的体内治疗,并且可用于除去任何病毒遗传物质,例如与潜伏性病毒感染相关的病毒基因。方法可以在体外使用,例如,用于制备或处理细胞培养物或细胞样品。当在体内使用时,细胞可以是任何合适的生殖细胞系或体细胞,并且本发明的组合物可以递送至患者身体的特定部分或全身递送。如果全身性递送,优选地在本发明的组合物中包含组织特异性启动子。例如,如果患者具有局限于肝脏的潜伏性病毒感染,则肝组织特异性启动子可以包括在编码靶向核酸酶的质粒或病毒载体中。

[0033] 图12显示特定实施方案中用于治疗病毒感染的组合物。组合物优选包括编码核酸酶和靶向部分(例如gRNA)的载体(其可以是质粒,线性DNA或病毒载体),所述的靶向部分靶向核酸酶至病毒核酸。组合物可任选地包括如本文进一步描述的启动子、复制起点、其他元素或其组合中的一种或多种。

[0034] ii. 核酸酶

[0035] 本发明的方法包括使用可编程的(programmable)或可靶向的核酸酶来特异性靶向待破坏的病毒核酸。可以使用任何合适的靶向核酸酶,包括例如锌指核酸酶(ZFN),转录激活子样效应物核酸酶(TALEN),成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)核酸酶,大范围核酸酶,其他内切核酸酶或外切核酸酶,或其组合。参见Schiffer, 2012, Targeted DNA mutagenesis for the cure of chronic viral infections, J Virol 88(17):8920-8936, 通过引用并入本文。

[0036] CRISPR方法使用与作为引导的小RNA(gRNA)复合的核酸酶,CRISPR相关的(Cas9),以序列特异性方式在任何基因组位置中的前间区序列相邻基序(PAM)上游切割DNA。CRISPR可以使用称为crRNA和tracrRNA的单独的引导RNA。这两个单独的RNA已经被组合成单个RNA,以通过设计短引导RNA来实现位点特异性哺乳动物基因组切割。Cas9和引导RNA(gRNA)可以通过已知的方法合成。Cas9/引导RNA(gRNA)使用非特异性DNA裂解蛋白Cas9和RNA寡核苷酸杂交以靶向和聚集Cas9/gRNA复合物。见Chang等, 2013, Genome editing with RNA-guided Cas9 nuclease in zebrafish embryos, Cell Res 23:465-472; Hwang等, 2013, Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system, Nat. Biotechnol 31:227-229; Xiao等, 2013, Chromosomal deletions and inversions mediated by TALENS and CRISPR/Cas in zebrafish, Nucl Acids Res 1-11.

[0037] 在细菌中发现的CRISPR(成簇的规律间隔的短回文重复序列, Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)被认为是保护细菌免于噬菌体感染。它最近已被用作改变真核DNA中基因表达的手段,但尚未被提议作为抗病毒治疗,或更广泛地,作为破坏基因组材料的方式。相反,其已经被用于引入插入或缺失,作为增加或减少靶细胞或细胞群体的DNA转录的方式。见例如, Horvath等, Science (2010) 327:167-170; Terns等, Current Opinion in Microbiology (2011) 14:321-327; Bhaya等 Annu Rev Genet (2011) 45:273-297; Wiedenheft等 Nature (2012) 482:331-338; Jinek M等 Science (2012) 337:816-821; Cong L等 Science (2013) 339:819-823; Jinek M等 (2013) eLife 2:e00471; Mali P等 (2013) Science 339:823-826; Qi LS等 (2013) Cell 152:1173-1183; Gilbert LA等 (2013) Cell 154:442-451; Yang H等 (2013) Cell 154:1370-1379; 和 Wang H等 (2013) Cell 153:910-918)。

[0038] 在本发明的一个方面,Cas9内切核酸酶在基因组中的至少两个位置引起双链断裂。这两个双链断裂导致基因组的片段被删除。即使病毒修复途径使两个末端退火,在基因组中仍然存在缺失。通过该机制导致的一个或多个缺失将使病毒基因组丧失能力。结果是宿主细胞将没有病毒感染。

[0039] 在本发明的实施方案中,核酸酶切割靶病毒的基因组。核酸酶是能够切割核酸的核苷酸亚基之间的磷酸二酯键的酶。核酸内切酶是切割多核苷酸链内的磷酸二酯键的酶。一些,例如脱氧核糖核酸酶I,相对非特异性地(不考虑序列)切割DNA,而许多,通常称为限制性内切核酸酶或限制酶,仅在非常特异的核苷酸序列处切割。在本发明的优选实施方案中,Cas9核酸酶包括于本发明的组合物和方法中,然而,应当理解,可以使用任何核酸酶。

[0040] 在本发明的优选实施方案中,Cas9核酸酶用于切割基因组。Cas9核酸酶能够在基因组中产生双链断裂。Cas9核酸酶具有两个功能结构域:RuvC和HNH,每个切割不同的链。当这两个结构域都有活性时,Cas9在基因组中引起双链断裂。

[0041] 在本发明的一些实施方案中,可以设计基因组中的插入以导致丧失功能或基因组表达的改变。另外,插入/缺失还用于引入提前终止密码子,这是通过在双链断裂处产生提前终止密码子,或通过移动阅读框以在双链断裂的下游产生提前终止密码子。可以利用NHEJ修复途径的这些效果中的任一种来破坏靶基因。通过使用CRISPR/gRNA/Cas9系统引入的变化对于基因组是永久的。

[0042] 在本发明的一些实施方案中,至少一个插入由CRISPR/gRNA/Cas9复合物引起。在优选的实施方案中,在基因组中引起许多插入,从而使病毒丧失能力。在本发明的一个方面,插入数目降低基因组被修复的可能性。

[0043] 在本发明的一些实施方案中,至少一个缺失由CRISPR/gRNA/Cas9复合物引起。在优选的实施方案中,在基因组中引起许多缺失,从而使病毒丧失能力。在本发明的一个方面,缺失数目降低基因组被修复的可能性。在高度优选的实施方案中,本发明的CRISPR/gRNA/Cas9系统引起显著的基因组破坏,导致病毒基因组的有效破坏,同时保持宿主基因组完整。

[0044] TALEN使用与DNA结合结构域融合的非特异性DNA切割核酸酶,其基本上可以靶向任何序列。对于TALEN技术,进行了靶位点鉴定并制备了表达载体。线性化表达载体(例如,通过NotI)可以用作mRNA合成的模板。可以使用市售的试剂盒,例如来自Life Technologies(Carlsbad,CA)的mMESSAGE mMACHINE SP6转录试剂盒。参见Joung和Sander,2013,TALENs:a widely applicable technology for targeted genome editing,Nat Rev Mol Cell Bio 14:49-55。

[0045] TALENs和CRISPR方法提供与靶位点的一对一关系,即在TALE结构域中的串联重复的一个单位识别靶位点中的一个核苷酸,并且CRISPR/Cas系统的crRNA,gRNA或sgRNA与DNA靶中的互补序列杂交。方法可以包括使用一对TALEN或(一种)Cas9蛋白与一种gRNA在靶中产生双链断裂。然后通过非同源末端连接或同源重组(HR)修复断裂。

[0046] 图8显示了用于切割病毒核酸的ZFN。简言之,ZFN方法包括将至少一种编码靶向ZFN 305的载体(例如,RNA分子)和任选的至少一种附加的多核苷酸引入感染的宿主细胞中。见,例如,US公开2011/0023144,Weinstein,通过引用并入本文。所述的细胞包括目标序列311。孵育细胞以使得ZFN 305表达,其中通过ZFN 305将双链断裂317引入到靶向染色体

序列311中。在一些实施方案中,引入供体多核苷酸或交换多核苷酸321。用不相关序列交换一部分病毒核酸可以完全干扰病毒核酸的转录或复制。靶DNA 311以及交换多核苷酸321可以通过易错的非同源末端连接DNA修复过程或同源定向DNA修复过程来修复。

[0047] 通常,ZFN包含DNA结合结构域(即锌指)和切割结构域(即核酸酶),并且该基因可以作为mRNA(例如,5'加帽,聚腺苷酸化或两者)引入。锌指结合结构域可以被工程化以识别和结合所选择的任何核酸序列。参见例如Qu等人,2013,Zinc-finger-nucleases mediate specific and efficient excision of HIV-1 proviral DNA from infected and latently infected human T cells,Nucl Ac Res 41(16):7771-7782,通过引用并入本文。与天然存在的锌指蛋白相比,改造的锌指结合结构域可具有新的结合特异性。改造方法包括但不限于合理设计和各种类型的选择。锌指结合结构域可以设计为经由锌指识别区(即锌指)识别靶DNA序列。见例如,美国专利6,607,882;6,534,261和6,453,242,通过引用并入本文。选择锌指识别区的示例性方法可以包括噬菌体展示和双杂交系统,且在美国专利5,789,538;美国专利5,925,523;美国专利6,007,988;美国专利6,013,453;美国专利6,410,248;美国专利6,140,466;美国专利6,200,759;和美国专利6,242,568中被公开,上述各项通过引用并入本文。

[0048] ZFN还包括切割结构域。ZFN的切割结构域部分可以从任何合适的内切核酸酶或外切核酸酶获得,例如限制性内切核酸酶和归巢内切核酸酶。参见例如,Belfort和Roberts,1997,Homing endonucleases:keeping the house in order,Nucleic Acids Res 25(17):3379-3388。切割结构域可以衍生自需要二聚化用于切割活性的酶。切割可能需要两个ZFN,因为每个核酸酶包含活性酶二聚体的单体。或者,单个ZFN可以包含两种单体以产生活性酶二聚体。存在的限制性内切核酸酶可能能够在结合位点处或附近进行序列特异性结合和DNA切割。某些限制酶(例如IIS型)在与识别位点相距较远的位点切割DNA,并具有可分离的结合和切割结构域。例如,二聚体具有活性的IIS型酶FokI催化DNA的双链切割,在其一条链上距其识别位点9个核苷酸处,在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处。在ZFN中使用的FokI酶可以被认为是切割单体。因此,对于使用FokI切割结构域的靶向双链切割,两个ZFN(各自包含FokI切割单体)可用于重构活性酶二聚体。见Wah等,1998,Structure of FokI has implications for DNA cleavage,PNAS 95:10564-10569;美国专利5,356,802;美国专利5,436,150;美国专利5,487,994;美国公开2005/0064474;美国公开2006/0188987;和美国公开2008/0131962,各自通过引用并入本文。

[0049] 使用ZFN的病毒靶向可以包括将包含序列的至少一个供体多核苷酸导入细胞。供体多核苷酸优选包括侧接上游和下游序列的待导入序列,所述的上游和下游序列与染色体中整合位点的任一侧具有序列相似性。选择供体多核苷酸中的上游和下游序列以促进感兴趣的染色体序列和供体多核苷酸之间的重组。通常,供体多核苷酸将是DNA。供体多核苷酸可以是DNA质粒,细菌人工染色体(BAC),酵母人工染色体(YAC),病毒载体,线性DNA片段,PCR片段,裸核酸,并且可以使用递送载体例如脂质体。供体多核苷酸的序列可以包括外显子,内含子,调节序列或其组合。通过与供体多核苷酸的同源重组修复双链断裂,使得所需序列整合到染色体中。在ZFN介导的过程中,通过与交换多核苷酸的同源重组修复通过ZFN引入靶序列的双链断裂,使得交换多核苷酸中的序列可以与靶序列的一部分交换。双链断裂的存在有利于同源重组和断裂修复。交换多核苷酸可以物理整合,或者,交换多核苷酸可

以用作断裂修复的模板,导致交换多核苷酸中的序列信息与靶序列部分中的序列信息交换。因此,病毒核酸的一部分可以转化为交换多核苷酸的序列。ZFN方法可以包括使用载体将编码ZFN的核酸分子和任选的至少一种交换多核苷酸或至少一种供体多核苷酸递送至感染的细胞。

[0050] 大范围核酸酶是以大的识别位点(12至40个碱基对的双链DNA序列)为特征的脱氧核糖核酸内切酶;因此该位点通常在任何给定的基因组中仅发生一次。例如,由I-SceI大范围核酸酶识别的18-碱基对序列平均需要人类基因组大小的二十倍的基因组大小才能偶然发现一次(尽管具有单个错配的序列需要三个单个人基因组大小)。因此,大范围核酸酶被认为是最特异的天然存在的限制性酶。基于序列和结构基序,大范围核酸酶可以分为5个家族:LAGLIDADG,GIY-YIG,HNH,His-Cys盒和PD-(D/E)XK。研究得最充分的家族是LAGLIDADG蛋白的家族,其已经在所有生物界中发现,通常编码在内含子或内含肽中,尽管也存在独立成员。序列基序LAGLIDADG代表酶活性的基本要素。一些蛋白只含有一个这样的基序,而其他蛋白含有两个;在这两种情况下,基序后面均为约75-200个氨基酸残基,与其他家族成员具有很少至没有序列相似性。晶体结构说明了LAGLIDADG家族的序列特异性和切割机制的模式:(i) 特异性接触源自延伸的 β -链埋入DNA的大沟,DNA结合鞍具有模仿DNA的螺旋扭曲的螺距和轮廓;(ii) 蛋白质和DNA之间的全氢键键合电势从未完全实现;(iii) 裂解以产生特征性4-nt 3'-OH悬突跨越小沟发生,其中通过中心“4-碱基”区域中DNA的变形使易切断的磷酸盐键更靠近蛋白质催化核心;(iv) 通过提出的双金属机制发生裂解,有时涉及独特的“金属共享”模式;(v) 并且最后,在核心 α/β 折叠之外的区域中,从“适应的”支架可以产生另外的亲和力和/或特异性接触。见Silva等,2011,Meganucleases and other tools for targeted genome engineering,Curr Gene Ther 11(1):11-27,通过引用并入本文。

[0051] 在本发明的一些实施方案中,将模板序列插入基因组中。为了将核苷酸修饰引入基因组DNA,在同源定向修复(HDR)期间必须存在含有所需序列的DNA修复模板。DNA模板通常与gRNA/Cas9一起转染到细胞中。每个同源臂的长度和结合位置取决于引入的变化的大小。在合适的模板存在下,HDR可以在Cas9诱导的双链断裂处引入显著的变化。

[0052] 本发明的一些实施方案可以利用核酸酶的修饰形式。含有单个无活性催化结构域(RuvC-或HNH-)的Cas9酶的修饰形式被称为“切口酶”。因为只有一个活性核酸酶结构域,Cas9切口酶仅切割靶DNA的一条链,产生单链断裂或“切口”。与无活性的dCas9(RuvC-和HNH-)类似,Cas9切口酶仍然能够基于gRNA的特异性而结合DNA,尽管切口酶将仅切割一条DNA链。大多数CRISPR质粒源自化脓性链球菌,并且RuvC结构域可以通过D10A突变失活,HNH结构域可以通过H840A突变失活。

[0053] 单链断裂或切口通常通过HDR途径快速修复,使用完整的互补DNA链作为模板。然而,由Cas9切口酶引入的两个邻近、相对的链切口被按照双链断裂处理,通常称为“双切口”或“双切口酶”CRISPR系统。根据对基因靶标的期望效应,双切口诱导的双应变(strain)断裂可以通过NHEJ或HDR修复。在这些双应变断裂处,插入和缺失是由CRISPR/Cas9复合物引起的。在本发明的一个方面,通过将两个双链断裂靠近彼此定位而导致缺失,从而导致基因组的片段被删除。

[0054] iii. 靶向部分

[0055] 核酸酶可以使用引导RNA(gRNA)的靶向特异性。如下所述,引导RNA或单引导RNA被

特异性设计为靶向病毒基因组。

[0056] 本发明的CRISPR/Cas9基因编辑复合物最佳地与靶向病毒基因组的引导RNA共同作用。引导RNA (gRNA) (其包括单引导RNA (sgRNA), crisprRNA (crRNA), 反式激活RNA (tracrRNA), 任何其它靶向寡核苷酸, 或其任何组合) 将CRISPR/Cas9复合物导向病毒基因组从而导致病毒基因组破坏。在本发明的一个方面, CRISPR/Cas9/gRNA复合物被设计成靶向细胞内的特定病毒。应当理解, 可以使用本发明的组合物靶向任何病毒。病毒基因组的特定区域的鉴定有助于CRISPR/Cas9/gRNA复合物的开发和设计。

[0057] 在本发明的一个方面, CRISPR/Cas9/gRNA复合物被设计成靶向细胞内的潜伏病毒。一旦在细胞内转染, CRISPR/Cas9/gRNA复合物引起重复插入或缺失以使基因组丧失能力, 或由于插入或缺失的数目, 修复的概率显著降低。

[0058] 作为实例, 通过本发明的CRISPR/Cas9/gRNA复合物, 爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV), 也称为人疱疹病毒4 (HHV-4) 在细胞中失活。EBV是疱疹家族的病毒, 是人类最常见的病毒之一。病毒的直径约为122nm至180nm, 由包裹在蛋白衣壳中的DNA双螺旋组成。在该实例中, Raji细胞系用作合适的体外模型。Raji细胞系是来自造血起源的第一个连续的人细胞系, 并且细胞系产生爱泼斯坦-巴尔病毒的异常菌株, 同时是最广泛研究的EBV模型之一。为了靶向Raji细胞中的EBV基因组, 需要对EBV具有特异性的CRISPR/Cas9复合物。由U6启动子驱动的嵌合引导RNA (sgRNA) 和泛素启动子驱动的Cas9组成的EBV靶向CRISPR/Cas9质粒的设计从Addgene公司获得。市售的引导RNA和Cas9核酸酶可以在本发明中使用。融合于Cas9蛋白后面的EGFP标记物可以对Cas9阳性细胞进行选择 (图1A)。

[0059] 在本发明的一个方面, 设计了引导RNA (无论是否通过商业购买) 以靶向特定病毒基因组。鉴定病毒基因组, 并制备靶向病毒基因组的选定部分的引导RNA, 将其引入本发明的组合物中。在本发明的一个方面, 选择病毒的特定病毒株的参考基因组用于引导RNA的设计。

[0060] 例如, 靶向EBV基因组的引导RNA是本实例中的系统的组成部分。与EBV相关的, 例如, 使用来自菌株B95-8的参考基因组作为设计指南。在感兴趣的基因组内, 例如EBV, 选择的区域或基因被靶向。例如, 可以用用于不同基因组编辑目的的七种引导RNA设计来靶向六个区域 (图1C和表S1)。关于EBV, EBNA1是唯一的在潜伏和溶解模式的感染中均表达的核爱泼斯坦-巴尔病毒 (EBV) 蛋白。EBNA1已知在潜伏感染中发挥几个重要的作用, EBNA1是许多EBV功能包括基因调控和潜在的基因组复制的关键。因此, 选择引导RNA sgEBV4和sgEBV5以靶向EBNA1编码区的两端, 以便切除基因组的这一整个区域。这些“结构性”靶使得能够将EBV基因组系统性的消化成更小的片段。EBNA3C和LMP1对于宿主细胞转化是必需的, 并且引导RNA sgEBV3和sgEBV7被设计用于分别靶向这两种蛋白的5' 外显子。

[0061] iv. 引入细胞

[0062] 本发明的方法包括将核酸酶和序列特异性靶向部分引入细胞。核酸酶通过序列特异性靶向部分被靶向病毒核酸, 然后核酸酶在靶点处切割病毒核酸而不干扰宿主基因组。可以使用任何合适的方法将核酸酶递送至受感染的细胞或组织。例如, 核酸酶或编码核酸酶的基因可以通过注射, 口服或通过流体动力递送来递送。核酸酶或编码核酸酶的基因可以递送至系统循环或可以递送或定位至特定组织类型。编码核酸酶的核酸酶或基因可以被修饰或编程为仅在某些条件下具有活性, 例如通过使用组织特异性启动子, 使得编码的核

酸酶优先或仅在某些组织类型中转录。

[0063] 在一些实施方案中,特异性CRISPR/Cas9/gRNA复合物被引入细胞中。引导RNA被设计为靶向病毒基因组的至少一类序列。除了潜伏感染之外,本发明还可以用于通过靶向病毒基因组(在组装之前或在放出之后)来控制活跃地复制的病毒。

[0064] 在一些实施方案中,可将引导RNA的混合物(cocktail)引入细胞中。引导RNA被设计为靶向病毒基因组的多种类别的序列。通过靶向基因组的几个区域,在多个位置的双链断裂使基因组破碎,降低修复的可能性。即使有修复机制,大缺失使得病毒丧失能力。

[0065] 在一些实施方案中,加入几种引导RNA以产生靶向不同类别序列的混合物。例如,两种,五种,七种或十一种引导RNA可存在于靶向三种不同类别的序列的CRISPR混合物中。然而,可以将任何数量的gRNA引入到混合物中以靶向不同类别的序列。在优选的实施方案中,序列类别分别对于基因组结构、宿主细胞转化和感染潜伏期都是重要的。

[0066] 在本发明的一些方面,体外实验使得能够测定病毒基因组中最必要的靶标。例如,为了理解使基因组有效丧失能力的最必要的靶标,将引导RNA的子集转染到模型细胞中。分析可以确定哪种引导RNA或哪种混合物在靶向必要类别的序列方面是最有效的。

[0067] 例如,在EBV基因组靶向的情况下,CRISPR混合物中的7个引导RNA靶向三种不同类别的序列,其被鉴定为分别对EBV基因组结构、宿主细胞转化和感染潜伏期是重要的。为了理解对有效EBV治疗而言最必要的靶标,用引导RNA的子集转染了Raji细胞。尽管sgEBV4/5将EBV基因组减少了85%,但它们不能像完全混合物(full cocktail)那样有效地抑制细胞增殖(图3A)。针对结构序列的引导RNA(sgEBV1/2/6)可以完全停止细胞增殖,尽管没有消除完全的EBV负荷(26%减少)。考虑到基因组编辑和增殖停滞的高效率(图2),怀疑sgEBV1/2/6中的残留EBV基因组标签不是由于完整的基因组,而是由于已被消化到EBV基因组外的自由浮动的DNA,即为假阳性。

[0068] 一旦构建CRISPR/Cas9/gRNA复合物,将复合物引入细胞。应当理解,复合物可以在体外模型或体内模型中引入细胞内。在本发明的一个方面,CRISPR/Cas9/gRNA复合物被设计为在转染后不留下病毒的完整基因组,并且复合物被设计用于高效转染。

[0069] 本发明的多个方面允许通过多种方法将CRISPR/Cas9/gRNA转染到细胞中,包括病毒载体和非病毒载体。病毒载体可包括逆转录病毒,慢病毒,腺病毒和腺相关病毒。应当理解,任何病毒载体可以被引入本发明以实现CRISPR/Cas9/gRNA复合体向细胞中的递送。一些病毒载体可能比其他的更有效,这取决于设计用于消化或丧失功能的CRISPR/Cas9/gRNA复合物。在本发明的一个方面,载体含有必需组分,例如复制起点,所述必需组分对于载体在宿主细胞中的复制和维持是必需的。

[0070] 在本发明的一个方面,病毒载体用作递送载体以将复合物递送到细胞中。使用病毒载体作为递送载体是本领域已知的。参见例如美国专利公开2009/0017543,Wilkes等人,其内容通过引用并入本文。

[0071] 逆转录病毒是一种单链RNA病毒,其以mRNA基因组(包括5'帽和3'聚腺苷酸尾)形式存储其核酸并作为专性寄生物靶向宿主细胞。在本领域的一些方法中,已经使用逆转录病毒将核酸引入细胞中。一旦在宿主细胞细胞质内,病毒即使用其自身的逆转录酶从其RNA基因组产生DNA,其与通常模式相反,因此是逆向的(反向)。然后通过整合酶将该新DNA掺入宿主细胞基因组中,此时逆转录病毒DNA被称为前病毒。例如,重组逆转录病毒如莫洛尼鼠

白血病毒具有以稳定方式整合入宿主基因组的能力。它们含有允许整合入宿主基因组的逆转录酶。逆转录病毒载体可以是复制能力型或复制缺陷型。在本发明的一些实施方案中,利用逆转录病毒以实现转染进入细胞,然而CRISPR/Cas9/gRNA复合物被设计成靶向病毒基因组。

[0072] 在本发明的一些实施方案中,慢病毒(其为逆转录病毒的亚类)被用作病毒载体。慢病毒可以适应作为递送载体(载体),因为其能够整合到并非正在分裂的细胞的基因组中,这是慢病毒的独特特征,而其他逆转录病毒仅可以感染正在分裂的细胞。当病毒进入细胞以产生DNA时,RNA形式的病毒基因组被逆转录,然后通过病毒整合酶将其插入到基因组的随机位置中。载体,现在称为前病毒,保留在基因组中,并且在其分裂时传给细胞的后代。

[0073] 与慢病毒相反,腺病毒DNA不整合到基因组中并且在细胞分裂期间不复制。腺病毒和相关的AAV将是作为递送载体的潜在方法,因为它们不整合到宿主的基因组中。在本发明的一些方面,仅待靶向的病毒基因组受CRISPR/Cas9/gRNA复合体影响,而宿主细胞不受。腺相关病毒(AAV)是感染人和其它一些灵长类物种的小病毒。AAV可以感染分裂和非分裂细胞,并且可以将其基因组并入宿主细胞的基因组中。例如,由于其作为基因治疗载体的潜在用途,研究人员已经创造出被称为自身补充性腺相关病毒(scAAV)的改变的AAV。AAV包装单链DNA且需要第二链合成,而scAAV包装两条一起退火形成双链DNA的链。通过跳过第二链合成,scAAV允许在细胞中快速表达。但除此之外,scAAV携带其AAV对应物的许多特征。本发明的方法可以采用疱疹病毒,痘病毒,甲病毒或牛痘病毒作为递送载体的手段。

[0074] 在本发明的某些实施方案中,非病毒载体可用于完成转染。核酸的非病毒递送方法包括脂质转染,核转染,显微注射,基因枪,病毒体,脂质体,免疫脂质体,聚阳离子或脂质:核酸缀合物,裸DNA,人工病毒粒子和药剂增强的DNA吸收。脂质转染描述于例如美国专利No.5,049,386,美国专利4,946,787;和4,897,355中,而脂质转染试剂是商业上销售的(例如,Transfectam和Lipofectin)。适用于多核苷酸的有效受体识别脂质转染的阳离子和中性脂质包括描述于授予Jessee的美国专利7,166,298,授予Jesse的美国专利6,890,554,其内容通过引用并入本文。递送可以至细胞(例如体外或离体施用)或靶组织(例如体内施用)。

[0075] 合成载体通常基于阳离子脂质体或聚合物,其可与带负电荷的核酸复合以形成直径为约100nm级别的颗粒。该复合物保护核酸免于被核酸酶降解。此外,细胞和局部递送策略必须做到在合适的亚细胞区室中的内化、释放和分布的需要。系统递送策略遇到额外的障碍,例如阳离子递送载体与血液成分的强相互作用,网状内皮系统的摄取,肾脏过滤,毒性和载体对目标细胞的靶向能力。修饰阳离子非病毒的表面可以使它们与血液成分的相互作用最小化,减少网状内皮系统摄取,降低它们的毒性和增加它们与靶细胞的结合亲和力。血浆蛋白的结合(也称为调理素作用)是RES识别循环纳米颗粒的主要机制。例如,巨噬细胞,诸如肝脏中的可扑弗氏(Kupffer)细胞,通过清道夫受体识别调理素作用的纳米颗粒。

[0076] 在本发明的一些实施方案中,非病毒载体被修饰以实现靶向递送和转染。聚乙二醇化(即用聚乙二醇修饰表面)是用于减少非病毒载体的调理素作用和聚集并使网状内皮系统的清除最小化的主要方法,导致静脉内(i.v.)施用后的循环寿命延长。因此,聚乙二醇化的纳米颗粒通常称为“隐形”纳米颗粒。不被从循环中快速清除的纳米颗粒将有机会遇到感染的细胞。

[0077] 然而,表面上的PEG可以减少靶细胞的摄取并降低生物活性。因此,将靶向配体连接到聚乙二醇化组分的远端是必要的;使配体突出以超过PEG“屏蔽”从而允许结合靶细胞表面上的受体。当阳离子脂质体用作基因载体时,除了促进六方相形成以使内体逃逸之外,中性辅助脂质的应用还有助于核酸的释放。在本发明的一些实施方案中,中性或阴离子脂质体被制备用于核酸的全身递送并在实验动物模型中获得治疗效果。设计和合成新的阳离子脂质体和聚合物,以及共价或非共价结合基因与肽、靶向配体、聚合物或环境敏感部分,对于解决非病毒载体遇到的问题而言也吸引了许多的关注。无机纳米颗粒(例如,金属纳米颗粒,氧化铁,磷酸钙,磷酸镁,磷酸锰,双氢氧化物,碳纳米管和量子点)在递送载体中的应用可以以许多不同的方式制备和表面功能化。

[0078] 在本发明的一些实施方案中,采用响应组织和外部刺激的独特环境的靶向控释系统。金纳米棒在近红外区具有强吸收带,然后被吸收的光能通过金纳米棒转化为热,即所谓的“光热效应”。因为近红外光可以深入穿透到组织中,金纳米棒的表面可以用核酸修饰从而控制释放。当用近红外光照射改性的金纳米棒时,由于光热效应诱导的热变性,核酸被释放。释放的核酸的量取决于光照射的功率和暴露时间。

[0079] 在本发明的一些实施方案中,脂质体用于实现转染进入细胞或组织。核酸的脂质体制剂的药理学主要由核酸包封在脂质体双层内的程度决定。包封的核酸被保护免于被核酸酶降解,而那些仅与脂质体表面缔合的核酸不被保护。包封的核酸享有完整脂质体的延长的循环寿命和生物分布,而表面缔合的那些核酸,一旦与脂质体分离,则具有裸核酸的药理学。

[0080] 在一些实施方案中,本发明的复合物被包封在脂质体中。与小分子药物不同,核酸不能跨越完整的脂质双层,主要是由于核酸的大尺寸和亲水性质。因此,核酸可以用常规的被动加载技术,如乙醇滴法(如在SALP中),反相蒸发法和乙醇稀释法(如在SNALP中)包埋在脂质体内。

[0081] 在一些实施方案中,线性聚乙烯亚胺(L-PEI)由于其多功能性和相对高的转染效率而用作非病毒载体。L-PEI已经用于有效地将基因体内递送到广泛的器官例如肺,脑,胰腺,视网膜,膀胱以及肿瘤中。L-PEI能够在体外和体内有效地凝聚、稳定和递送核酸。

[0082] 低强度超声与微泡的组合近来作为基因递送的安全方法获得了许多关注。超声显示组织透化效应。它是非侵入性的和位点特异性的,并且可以使得在系统性递送后破坏肿瘤细胞,而使非靶向器官不受影响。超声介导的微泡破坏已被提出作为用于非侵入性地将药物和核酸递送到不同组织的新方法。微泡用于携带药物或基因,直到达到特定的目标区域,然后使用超声波破裂微泡,引起生物活性材料的位点特异性递送。此外,白蛋白包被的微泡粘附到具有细胞衣损伤或内皮功能障碍的血管区域的能力是另一种可能的药物递送机制,即使在没有超声的条件下。参见Tsutsui等人,2004,The use of microbubbles to target drug delivery,Cardiovasc Ultrasound 2:23,其内容通过引用并入本文。在超声触发的药物递送中,组织透化效应可以通过使用超声造影剂(充气微泡)来加强。微泡用于递送核酸的用途是基于这样的假设:在微血管转运通过靶区域期间,通过聚焦超声波束破坏负载了DNA的微泡将导致在微泡壳破裂时的局部转导,同时又不影响非靶向的区域。

[0083] 除了超声介导的递送之外,磁性靶向递送也可以用于递送。磁性纳米颗粒通常包埋在基因载体中用于核酸递送的成像。核酸载体可以对超声和磁场均有响应,即磁性和声

学活性脂质球(MAAL)。基本前提是治疗剂附着或包封在磁性微米或纳米颗粒内。这些颗粒可以具有带有可以官能化的聚合物或金属涂层的磁芯,或者可以由含有在孔内沉淀的磁性纳米颗粒的多孔聚合物组成。通过官能化聚合物或金属涂层,可以附着例如用于靶向化疗的细胞毒性药物或治疗性DNA以校正遗传缺损。一旦附着,将颗粒/治疗剂复合物注射到血流中,通常使用导管将注射部位定位在靶附近。磁场(通常来自高磁场、高梯度的稀土磁体)聚焦在目标位置上,并且当粒子进入磁场时,粒子上的力允许它们在靶点处被捕获并渗出。

[0084] 已经开发了合成的基于阳离子聚合物的纳米颗粒(~100nm直径),其与传统脂质体相比提供增强的转染效率,同时具有降低的细胞毒性。由具有不同物理和化学特性的脂质分子组成的不同层结合到聚合物纳米颗粒制剂中,通过与细胞膜更好的融合和进入细胞、细胞内分子释放的增强、和纳米颗粒复合物的细胞内降解的降低,从而提高了效率。

[0085] 在一些实施方案中,复合物缀合到纳米系统用于全身治疗,例如脂质体,基于白蛋白的颗粒,聚乙二醇化蛋白质,可生物降解的聚合物-药物复合物,聚合物胶束,树枝状聚合物等。参见Davis等人,2008,Nanotherapeutic particles:an emerging treatment modality for cancer,Nat Rev Drug Discov.7(9):771-782,通过引用并入本文。长循环大分子载体如脂质体,由于增强的渗透性和保留效应而优先从肿瘤血管外渗。在某些实施方案中,本发明的复合物缀合至或包封于脂质体或聚合物体中以递送至细胞。例如,脂质体蒽环类药物实现了高效包封,并且包括具有大大延长的循环的形式,例如脂质体柔红霉素和聚乙二醇化脂质体多柔比星。参见Krishna等人,Carboxymethylcellulose-sodium based transdermal drug delivery system for propranolol,J Pharm Pharmacol.1996年4月;48(4):367-70。

[0086] 脂质体递送系统提供稳定的制剂,提供改善的药代动力学,以及一定程度的“被动”或“生理”靶向组织。亲水和疏水材料(例如潜在的化疗剂)的包封是已知的。参见例如Schneider的美国专利,美国专利号5,466,468,其公开了包含合成脂质的肠胃外可施用的脂质体制剂;Hostetler等人的美国专利,美国专利号5,580,571,其公开了与磷脂缀合的核苷类似物;Nyqvist的美国专利,美国专利号5,626,869,其公开了药物组合物,其中药学活性化合物是包含在限定的脂质系统中的肝素或其片段,所述脂质系统包含至少一种两亲性和极性脂质组分和至少一种非极性脂质组分。

[0087] 脂质体和聚合物囊泡可以含有多种溶液和化合物。在某些实施方案中,本发明的复合物偶联于或包封在聚合物囊泡中。作为一类人造囊泡,聚合物囊泡是包住了溶液的微小空心球体,使用两亲性合成嵌段共聚物形成囊泡膜以制备。常见的聚合物囊泡在其核心中含有水溶液,并且可用于包封和保护敏感分子,例如药物,酶,其他蛋白和肽,以及DNA和RNA片段。聚合物囊泡膜提供了将包封的材料与外部材料(例如在生物系统中发现的材料)隔离的物理屏障。聚合物囊泡可以通过已知技术从双重乳液产生,参见Lorenceanu等人,2005,Generation of Polymerosomes from Double-Emulsions,Langmuir 21(20):9183-6,通过引用并入本文。

[0088] 本发明的一些实施方案提供基因枪或生物射弹颗粒递送系统(biolistic particle delivery system)。基因枪是用于向细胞注射遗传信息的装置,其中有效载荷可以用质粒DNA包被的重金属的元素颗粒。这种技术也可以称为生物弹道学或基因枪技术。基因枪也已用于递送DNA疫苗。基因枪能够用各种有机和非有机物质(例如DNA质粒,荧光蛋

白,染料等)转染细胞。

[0089] 本发明的多个方面提供了递送载体的多种用途。递送载体的选择基于被靶向的细胞或组织以及CRISPR/Cas9/gRNA的具体组成。例如,在上述讨论的EBV实例中,由于已知淋巴细胞对脂质转染有抗性,需要用核转染(通过称为核转染仪(Nucleofector)的装置产生的电参数与细胞类型特异性试剂的组合将底物直接转移到细胞核以及细胞质中)将DNA递送到Raji细胞。Lonza pmax启动子驱动Cas9表达,因为其在Raji细胞内提供强表达。核转染后24小时,通过荧光显微镜观察到来自一小部分细胞的明显的EGFP信号。EGFP阳性细胞群显著减少,然而,测量到核转染后48小时的转染效率<10%(图1B)。包括EBV复制序列起点的CRISPR质粒oriP产生转染效率>60%(图1B)。

[0090] 本发明的多个方面利用CRISPR/Cas9/gRNA复合物用于靶向递送。常见的已知途径包括经皮,经粘膜,鼻,眼和肺途径。药物递送系统可以包括脂质体,脂质体前体,微球体,凝胶,前药,环糊精等。本发明的多个方面利用由可生物降解的聚合物组成的纳米颗粒转移到气雾剂中,用于靶向肺中的特定部位或细胞群体,以预定方式释放药物并在可接受的时间长度内降解。控制释放技术(CRT),例如透皮和透粘膜控制释放递送系统,鼻和口腔气溶胶喷雾剂,药物浸渍的锭剂,包封的单元剂,口腔软胶囊,通过皮肤施用药物的离子电渗疗法装置,以及各种可编程的、植入的药物递送装置,与用于完成靶向和受控递送的本发明的复合物联合使用。

[0091] v. 切割病毒核酸

[0092] 一旦在细胞内,CRISPR/Cas9/gRNA复合物靶向病毒基因组。在本发明的一个方面,所述复合物靶向病毒基因组。除了潜伏感染之外,本发明还可以用于通过靶向病毒基因组(在组装之前或在放出之后)来控制活跃地复制的病毒。在一些实施例中,本发明的方法和组合物使用核酸酶例如Cas9靶向潜伏的病毒基因组,从而降低增殖的机会。核酸酶可与gRNA(例如,crRNA+tracrRNA或sgRNA)形成复合物。复合物以靶向方式切割病毒核酸以使病毒基因组丧失能力。如上所述,Cas9内切核酸酶在病毒基因组中引起双链断裂。通过沿着病毒基因组靶向几个位置并且不引起单链断裂但引起双链断裂,基因组被有效地切割沿着基因组的几个位置。在一个优选的实施方案中,双链断裂被设计为引起小的缺失,或从基因组中除去小片段,使得即使天然修复机制将基因组连接在一起,基因组也失去能力。

[0093] 在引入细胞后,CRISPR/Cas9/gRNA复合物作用于病毒基因组,基因,转录物或其他病毒核酸。由CRISPR产生的双链DNA断裂被通过小缺失修复。这些缺失将破坏蛋白质编码,从而产生敲除效应。

[0094] 核酸酶或编码核酸酶的基因可以通过转染递送到感染的细胞中。例如,感染的细胞可以用编码Cas9和gRNA的DNA(在单个片段或分别的片段上)转染。gRNA被设计为将Cas9内切核酸酶定位在沿着病毒基因组的一个或几个位置。Cas9核酸内切酶在基因组中引起双链断裂,导致小片段从病毒基因组中删除。即使有修复机制,所述删除也将使病毒基因组丧失能力。

[0095] vi. 宿主基因

[0096] 应当理解,本发明的方法和组合物可用于靶向病毒核酸而不干扰宿主遗传物质。本发明的方法和组合物使用靶向部分,例如具有与病毒序列内的靶杂交的序列的引导RNA。本发明的方法和组合物可以进一步使用靶向核酸酶例如cas9酶,或编码这种核酸酶的载

体,其使用gRNA仅与病毒基因组结合并进行双链切割,从而从宿主中去除病毒序列。

[0097] 当靶向部分包括引导RNA时,可以通过检查病毒序列从而寻找与前间区序列相邻基序(PAM)相邻并且不同时出现在邻近前间区序列基序的宿主基因组中的约20个核苷酸的区域,从而确定gRNA的序列或引导序列。

[0098] 优选地,满足某些相似性标准(例如,至少60%相同,同一性偏向于与PAM更近的区域)的引导序列,使得根据引导序列制备的gRNA/cas9复合物结合并消化病毒序列的特定的特征或靶标,而不干扰宿主基因组。优选地,引导RNA对应于病毒序列中与前间区序列相邻基序(PAM)(例如,NGG,其中N是任何核苷酸)相邻的核苷酸链。优选地,宿主基因组缺乏满足下述的任何区域:(1)根据预定相似性标准与核苷酸链相匹配和(2)也与PAM相邻。预定相似性标准可以包括例如在PAM的5'端20个核苷酸内需要至少12个匹配核苷酸,且还可以包括在PAM 5'端10个核苷酸内需要至少7个匹配核苷酸。注释的病毒基因组(例如,来自GenBank)可以用于鉴定病毒序列的特征,并在病毒序列的所选特征(例如,病毒复制起点,末端重复,复制因子结合位点,启动子,编码序列或重复区)内的病毒序列中找到毗邻前间区序列相邻基序(PAM)的核酸链。病毒序列和注释可以从基因组数据库中获得。

[0099] 当在病毒基因组中发现多个候选gRNA靶,选择用于作为引导RNA的模板的序列时,可倾向于与靶向特征最接近或在其最5端的候选靶作为引导序列。所述选择可优先倾向于具有中性GC含量(例如40%至60%)的序列。关于核酸内切酶的RNA定向靶向的另外的背景在美国公开2015/0050699;美国公开20140356958;美国公开2014/0349400;美国公开2014/0342457;美国公开2014/0295556;和美国公开2014/0273037中进行了讨论,上述各篇的内容以所有目的通过引用并入本文。由于在感染细胞中存在人基因组背景,提供了一组步骤以确保针对病毒基因组的高效率和对人类基因组的低脱靶效应。这些步骤可以包括(1)在病毒基因组内选择靶,(2)在宿主基因组中避免PAM+靶序列,(3)方法学上选择跨菌株保守的病毒靶,(4)选择具有适当GC含量的靶,(5)控制细胞中核酸酶的表达,(6)载体设计,(7)验证测定,其他,和其各种组合。靶向部分(例如引导RNA)优选结合某些类别内的靶标,例如(i)潜伏相关靶标,(ii)感染和症状相关靶标,和(iii)结构相关靶标。

[0100] gRNA的第一类靶标包括潜伏相关的靶标。病毒基因组需要某些特征以保持潜伏。这些特征包括但不限于主转录调节子,潜伏特异性启动子,与宿主细胞沟通的信号蛋白等。如果宿主细胞在潜伏期分裂,则病毒基因组需要一个复制系统以维持基因组拷贝水平。病毒复制起点,末端重复序列和与复制起点结合的复制因子是大的靶标。一旦这些特征的功能被破坏,病毒可以重新激活,其可以通过常规抗病毒疗法来治疗。

[0101] gRNA的第二类靶标包括感染相关和症状相关靶标。病毒产生各种分子以促进感染。一旦进入宿主细胞,病毒可能开始裂解周期,这可导致细胞死亡和组织损伤(HBV)。在某些情况下,例如HPV16,细胞产物(E6和E7蛋白)可以转化宿主细胞并引起癌症。破坏产生这些分子的关键基因组序列(启动子,编码序列等)可以防止进一步感染和/或缓解症状,如果不能治愈疾病的话。

[0102] gRNA的第三类靶标包括结构相关靶标。病毒基因组可以包含重复区域以支持基因组整合,复制,或其他功能。靶向重复区域可以将病毒基因组打破成多个片段,这会物理上破坏基因组。

[0103] 当核酸酶是cas蛋白时,靶向部分是引导RNA。每个cas蛋白需要毗邻靶序列的特异

性PAM(不在引导RNA中)。这与人类基因组编辑相同。目前了解引导RNA/核酸酶复合物首先结合PAM,然后搜索引导RNA和靶基因组之间的同源性。Sternberg等人,2014,DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9,Nature 507 (7490):62-67。一旦识别,DNA就在PAM上游3-nt处被消化。这些结果表明脱靶消化需要在宿主DNA中的PAM,以及在引导RNA和刚好位于PAM之前的宿主基因组之间的高亲和力。

[0104] 可优选使用靶向高度保守的病毒基因组部分的靶向部分。病毒基因组比人类基因组更可变。为了靶向不同的菌株,引导RNA优选靶向保守区。由于PAM对于初始序列识别非常重要,在保守区域中具有PAM也是必要的。

[0105] 在优选的实施方案中,本发明的方法用于将核酸递送至细胞。递送至细胞的核酸可以包括具有确定的引导序列的gRNA,或者核酸可以包括编码将作用于靶遗传物质的酶的载体,例如质粒。该酶的表达允许其降解或以其它方式干扰靶遗传物质。酶可以是核酸酶例如Cas9内切核酸酶,并且核酸也可以编码具有确定的引导序列的一种或多种gRNA。

[0106] gRNA将核酸酶靶向靶遗传物质。当靶遗传物质包括病毒的基因组时,与该基因组的部分互补的gRNA可以引导核酸酶降解该基因组,从而防止任何进一步的复制,或者甚至完全从细胞中除去任何完整的病毒基因组。通过这些手段,潜伏性病毒感染可以被靶向以根除。

[0107] 基于特定的细胞类型,宿主细胞可以以不同的速率生长。高核酸酶表达对于快速复制的细胞是必需的,而低表达有助于避免在非感染细胞中的脱靶切割。核酸酶表达的控制可以通过几个方面实现。如果核酸酶从载体中表达,在载体中具有病毒复制起点可以仅在感染的细胞中显著地增加载体拷贝数。每个启动子在不同组织中具有不同的活性。可以通过选择不同的启动子来调节基因转录。还可以通过将稳定化或去稳定化基序(泛素靶向序列等)掺入序列中来调节转录物和蛋白稳定性。

[0108] 特异性启动子可用于gRNA序列,核酸酶(例如cas9),其他元件,或其组合。例如,在一些实施方案中,gRNA由U6启动子驱动。可以设计包括用于蛋白质表达的启动子的载体(例如,使用如由Lonza Group Ltd (Basel, Switzerland)以商标PMAXCLONING出售的载体中描述的启动子)。载体可以是质粒(例如,通过合成仪器255和重组DNA实验室设备产生)。在某些实施方案中,质粒包括U6启动子驱动的gRNA或嵌合引导RNA (sgRNA) 和泛素启动子驱动的cas9。任选地,载体可以包括在cas9蛋白后融合的标记,例如EGFP,以允许随后对cas9+细胞进行选择。认识到cas9可以使用具有互补的反式激活性crRNA (tracrRNA) 的gRNA(类似于原始细菌系统的CRISPR RNA (crRNA)) 靶向与gRNA互补的病毒序列。还已经显示可以用单个RNA分子、或gRNA和tracrRNA的嵌合体对cas9进行编程。单引导RNA (sgRNA) 可以在质粒中编码,并且sgRNA的转录可以提供cas9的编程和tracrRNA的功能。参见Jinek,2012,A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, Science 337:816-821,特别参照其中的图5A作为背景。

[0109] 使用上述原理,本发明的方法和组合物可用于在感染的宿主中靶向病毒核酸而不负面影响宿主基因组。

[0110] 对于其他背景,参见Hsu,2013,DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases,Nature Biotechnology 31 (9):827-832;和Jinek,2012,A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity,Science 337:

816-821,其内容通过引用并入本文。由于靶向位置选择在某些类别中,例如(i)潜伏相关靶标,(ii)感染和症状相关靶标,或(iii)结构相关靶标,那些序列的切割使病毒失活并将其从宿主中去除。由于靶向RNA(gRNA或sgRNA)被设计为根据与病毒基因序列中的靶标匹配的相似性标准,而没有与宿主基因组匹配的任何脱靶,潜伏病毒遗传物质从宿主中移除而未对宿主基因组有任何干扰。

[0111] 通过引用并入

[0112] 在整个本公开中已经参考和引用的其他文献,例如专利,专利申请,专利出版物,期刊,书籍,论文,网络内容。所有这些文献为了所有目的通过引用整体并入本文。

[0113] 等同形式

[0114] 根据本文件的全部内容,包括对本文引用的科学和专利文献的参考,除了本文所示和所述的那些之外,本发明的各种修饰和其许多进一步的实施方案对于本领域技术人员将是显而易见的。本文的主题包含适用于实施本发明的各种实施方案及其等同形式的重要信息、示例和指导。

[0115] 实施例

[0116] 实施例1:靶向EBV

[0117] 从ATCC获得伯基特氏淋巴瘤细胞系Raji,Namalwa和DG-75,并按照ATCC建议在补充有10%FBS和PSA的RPMI 1640中培养。人原发性肺成纤维细胞IMR-90获自Coriell并在补充有10%FBS和PSA的Advanced DMEM/F-12中培养。

[0118] 如由Cong L等人(2013)Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems,Science 339:819-823所描述的,由Addgene获得由U6启动子驱动的嵌合引导RNA(sgRNA)和泛素启动子驱动的Cas9组成的质粒。在Cas9蛋白后融合的EGFP标记允许选择Cas9阳性细胞(图1A)。我们采用了修饰的嵌合引导RNA设计用于更有效的Pol-III转录和更稳定的茎-环结构(Chen B等人(2013)Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System.Cell 155:1479-1491)。

[0119] 我们从Addgene,Inc.获得pX458。具有合成内含子(pmax)的修饰的CMV启动子从Lonza对照质粒pmax-GFP进行PCR扩增。修饰的引导RNA sgRNA(F+E)从IDT订购。EBV复制起点oriP从B95-8转化的淋巴母细胞细胞系GM12891进行PCR扩增。我们使用标准克隆方案克隆pmax,sgRNA(F+E)和oriP到pX458,以替换原始的CAG启动子,sgRNA和f1起点。我们基于B95-8参考物设计了EBV sgRNA,并从IDT订购了DNA寡聚物。pX458中原始的sgRNA占位物用作阴性对照。

[0120] 淋巴细胞已知对脂质转染有抗性,因此我们使用核转染来将DNA递送到Raji细胞中。我们选择Lonza pmax启动子驱动Cas9表达,因为其在Raji细胞内提供强表达。我们使用Lonza Nucleofector II进行DNA递送。在每个100μl反应中用5μg质粒转染5百万Raji或DG-75细胞。根据Lonza的推荐,使用Cell line Kit V和程序M-013。对于IMR-90,通过程序T-030或X-005,用5ug质粒转染1百万个细胞在100ul溶液V中。核转染24小时后,我们通过荧光显微镜观察到来自一小部分细胞的明显的EGFP信号。然而,在此之后,EGFP阳性细胞群显著减少,在核转染后48小时,我们检测到转染效率<10%(图1B)。我们将这种转染效率的降低归因于细胞分裂的质粒稀释。为了主动维持宿主细胞内的质粒水平,我们重新设计了CRISPR质粒以包括复制序列的EBV起点,oriP。使用在细胞内的活性质粒复制后,转染效率

提高至>60% (图1B)。

[0121] 我们依靠来自菌株B95-8的EBV参考基因组设计了靶向EBV基因组的引导RNA。我们用具有用于不同基因组编辑目的的七个引导RNA靶向了六个区域 (图1C和表S1)。

[0122] 表S1. 引导RNA靶序列

[0123] sgEBV1 GCCCTGGACCAACCCGGCCC (SEQ ID NO:1)

[0124] sgEBV2 GGCCGCTGCCCCGCTCCGGG (SEQ ID NO:2)

[0125] sgEBB3 GGAAGACAATGTGCCGCCA (SEQ ID NO:3)

[0126] sgEBV4 TCTGGACCAGAAGGCTCCGG (SEQ ID NO:4)

[0127] sgEBV5 GCTGCCGCGGAGGGTGATGA (SEQ ID NO:5)

[0128] sgEBV6 GGTGGCCCACCGGTCCGCT (SEQ ID NO:6)

[0129] sgEBV7 GTCCTCGAGGGGGCCGTCGC (SEQ ID NO:7)

[0130] EBNA1对许多EBV功能至关重要,包括基因调控和潜在的基因组复制。我们靶向引导RNA sgEBV4和sgEBV5到EBNA1编码区的两端,以便切除基因组的这一整个区域。引导RNAs sgEBV1、2和6落入重复区域,使得至少一种CRISPR切割的成功率增加。这些“结构”靶使得能够将EBV基因组系统性消化成更小的片段。EBNA3C和LMP1对于宿主细胞转化是必需的,并且我们设计了引导RNA sgEBV3和sgEBV7分别靶向这两种蛋白的5' 外显子。

[0131] EBV基因组编辑。由CRISPR产生的双链DNA断裂用小缺失修复。这些缺失将破坏蛋白质编码,因此产生敲除效应。SURVEYOR测定证实了各个位点的有效编辑 (图5)。除了每个引导RNA诱导的独立的小缺失,靶向位点之间的大缺失可以系统性地破坏EBV基因组。引导RNA sgEBV2靶向具有十二个125-bp重复单元的区域 (图2A)。整个重复区域的PCR扩增子给出~1.8-kb的条带 (图2B)。在sgEBV2转染5或7天后,我们从相同的PCR扩增中获得~0.4-kb条带 (图2B)。这~1.4kb的缺失是在第一个和最后一个重复单元的切割之间修复连接的预期产物 (图2A)。

[0132] 使用Phusion DNA聚合酶PCR扩增sgRNA靶标侧翼的DNA序列。根据制造商的说明书进行SURVEYOR测定。将具有大缺失的DNA扩增子进行TOPO克隆,并将单个克隆用于Sanger测序。使用Fluidigm BioMark上的Taqman数字PCR测量EBV负载。使用靶向保守的人基因座的Taqman测定法用于人DNA标准化。来自Fluidigm C1的1ng的单细胞全基因组扩增产物用于EBV定量PCR。

[0133] 我们进一步证明可以删除独特靶标之间的区域 (图2C)。在sgEBV4-5转染6天后,整个侧翼区域的PCR扩增 (使用引物EBV4F和5R) 返回较短的扩增子,以及预期的2kb的更为模糊的条带 (图2D)。扩增子克隆的Sanger测序证实了两个预期切割位点的直接连接 (图2F)。使用sgEBV3-5的类似实验也返回了甚至更大的缺失,从EBNA3C到EBNA1 (图2D-E)。

[0134] 其它信息如引物设计显示于在线发表于PNAS网站的,Wang和Quake,2014,RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection,PNAS 111 (36):13157-13162和该文章的支持信息中,且上述两个文件的内容通过引用并入本文用于所有目的。

[0135] EBV基因组破坏导致细胞增殖停滞。在CRISPR转染后两天,我们流动分选了EGFP阳性细胞用于进一步培养,并每天计数活细胞。如预期,用缺乏oriP或sgEBV的Cas9质粒处理的细胞在几天内缺失了EGFP表达,并以与未处理的对照组相似的速率增殖 (图3A)。具有

Cas9-oriP和乱序引导RNA的质粒在8天后维持EGFP表达,但不降低细胞增殖速率。用混合的混合物sgEBV1-7产生无法检测到的细胞增殖,并且总细胞计数保持恒定或降低(图3A)。流式细胞仪散射信号清楚地显示在sgEBV1-7处理后细胞形态的改变,大多数细胞尺寸收缩但成粒增加(图3B-D,P4群移位至P3)。P3群中的细胞也通过DAPI染色证明了膜通透性降低(图3E-G)。为了排除CRISPR细胞毒性的可能性,特别是对于多重引导RNA,我们对两个其他样品进行了相同的处理:EBV阴性伯基特氏淋巴瘤细胞系DG-75(图6)和原代人肺成纤维细胞IMR90(图7)。转染后8天和9天,细胞增殖速率相较于未处理的对照组没有改变,表明细胞毒性可以忽略。

[0136] 以前的研究已将EBV致癌能力归因于其中断宿主细胞凋亡(Ruf IK等(1999) Epstein-Barr Virus Regulates c-MYC, Apoptosis, and Tumorigenicity in Burkitt Lymphoma. *Molecular and Cellular Biology* 19:1651-1660)。因此,抑制EBV活性可以恢复凋亡过程,这可以解释在我们的实验中观察到的细胞死亡。膜联蛋白V染色显示了一个具有完整细胞膜但磷脂酰丝氨酸暴露的不同的细胞亚群,表明通过凋亡的细胞死亡(图3E-G)。明视野显微镜显示明显的凋亡细胞形态(图3H-I),而荧光染色显示出剧烈的DNA断裂(图3J-M)。总的来说,该证据表明EBV基因组破坏后正常的宿主细胞凋亡途径的恢复。

[0137] EBV在亚群中的完全清除。为了研究细胞增殖停滞和EBV基因组编辑之间的潜在联系,我们使用靶向EBNA1的数字PCR定量了不同样品中的EBV负荷。靶向保守的人体细胞基因座的另一种Taqman测定法用作内部对照以进行DNA的归一化。平均而言,每个未处理的Raji细胞具有42个EBV基因组拷贝(图4A)。用缺乏oriP或sgEBV的Cas9质粒处理的细胞与未处理的对照相比,EBV负荷差异中没有明显的差别。用具有oriP但没有sgEBV的Cas9-质粒处理的细胞具有降低~50%的EBV负荷。结合先前的观察,来自该实验的细胞在增殖速率中没有显示任何差异,我们将其解释为可能由于在质粒复制期间与EBNA1结合相竞争。向转染中添加引导RNA混合物sgEBV1-7显著降低EBV了负荷。与未处理的对照组相比,活细胞和死细胞均具有>60%的EBV降低。

[0138] 尽管我们以相同的摩尔比提供了7种引导RNA,但是质粒转染和复制过程可能是相当随机的。一些细胞不可避免地将接收不同的亚型或引导RNA的混合物,这可能影响处理效率。为了控制这样的效应,我们通过使用具有自动化微流体系统的单细胞全基因组扩增在单细胞水平测量EBV负荷。将新鲜培养的Raji细胞装载到微流体芯片上并捕获81个单细胞(图4B)。对于sgEBV1-7处理的细胞,我们在转染后8天对活细胞进行流式分选并捕获91个单细胞(图4C)。根据制造商的说明,我们从每个单细胞反应室获得~150ng扩增的DNA。为了质量控制的目的,我们对每个单细胞扩增产物进行4个基因座的人体细胞DNA定量PCR(Wang J, Fan HC, Behr B, Quake SR (2012) Genome-wide single-cell analysis of recombination activity and de novo mutation rates in human sperm. *Cell* 150: 402-412),并且需要来自至少一个基因座的阳性扩增。69个未处理的单细胞产物通过了质量控制并显示EBV负荷的对数正态分布(图4D),几乎每个细胞都显示了显著量的EBV基因组DNA。我们用含有单个整合的EBV基因组的Namalwa Burkitt淋巴瘤细胞的亚克隆校准定量PCR测定。单拷贝EBV测量给出29.8的Ct,这使得我们能够确定69个Raji单细胞样品的平均Ct对应于每个细胞42个EBV拷贝,与大量(bulk)数字PCR测量一致。对于sgEBV1-7处理的样品,71个单细胞产物通过质量控制,并且EBV负载分布显著更宽(图4E)。尽管22个细胞具有

与未处理细胞相同的EBV负荷,但是19个细胞没有可检测的EBV并且剩余的30个细胞显示出相对于未处理样品的显著的EBV负荷降低。

[0139] EBV治疗的必要靶标。我们的CRISPR混合物中的七个引导RNA分别靶向三个不同类别的序列,这些序列对于EBV基因组结构,宿主细胞转化和感染潜伏期是重要的。为了理解对于有效的EBV治疗而言最必要的靶标,我们用引导RNA的子集转染了Raji细胞。尽管sgEBV4/5使EBV基因组减少了85%,但它们不能像完全混合物一样有效地抑制细胞增殖(图3A)。靶向结构序列的引导RNA(sgEBV1/2/6)可以完全停止细胞增殖,尽管没有消除完全的EBV负荷(26%减少)。由于基因组编辑和增殖停滞的高效率(图2),我们怀疑在sgEBV1/2/6中的残留EBV基因组标签不是由于完整的基因组,而是由于已经从EBV基因组中消化出来的自由浮动的DNA,即为假阳性。我们得出结论:对于EBV治疗而言,系统性破坏EBV基因组结构似乎比靶向特定的关键蛋白更有效。

[0140] 实施例2:靶向乙型肝炎病毒(HBV)

[0141] 本发明的方法和材料可用于将靶向核酸内切酶应用于特定的遗传物质,例如潜伏性病毒基因组如乙型肝炎病毒(HBV)。本发明还提供了核酸(例如,DNA质粒)向靶细胞(例如,肝细胞)中的高效安全递送。在一个实施方案中,本发明的方法使用流体动力学基因递送以靶向HBV。

[0142] 图10示出了HBV基因组。优选获得HBV基因组的注释(即,识别基因组的重要特征),并选择通过酶促降解进行靶向的候选物,所述候选物位于其中一个特征中,例如病毒复制起点,末端重复序列,复制因子结合位点,启动子,编码序列和重复区。

[0143] HBV是嗜肝DNA病毒家族的原型成员,是42nm部分双链DNA病毒,由27nm核衣壳核心(HBcAg)组成,被含有表面抗原(HBsAg)的外部脂蛋白衣壳(也称为包膜)包围。该病毒包括含有3至3.3kb松弛环状、部分双链体DNA和病毒体相关DNA依赖性聚合酶(其可修复病毒体DNA模板中的缺口并具有逆转录酶活性)的包膜病毒体。HBV是约3200bp的环状、部分双链DNA病毒,具有编码聚合酶(P),核心(C),表面(S)和X蛋白的四个重叠的ORF。在感染中,病毒核衣壳进入细胞并到达核,在这里病毒基因组被递送。在核中,完成第二链DNA合成,并修复两条链中的缺口以产生共价闭合的环状DNA分子,其用作四种病毒RNA(分别为3.5,2.4,2.1和0.7kb长度)的转录模板。这些转录物被多聚腺苷酸化并转运到细胞质,在那里它们被翻译成病毒核衣壳和前核抗原(C,pre-C),聚合酶(P),包膜L(大),M(中),小(L),和转录反式激活蛋白(X)。包膜蛋白本身作为内在膜蛋白插入内质网(ER)的脂质膜。跨越整个基因组,且被称为前基因组RNA(pgRNA)的3.5kb种类与HBV聚合酶和蛋白激酶一起包装在核心颗粒中,其中其用作负链DNA的逆转录的模板。RNA至DNA的转化发生在颗粒内部。

[0144] HBV基因组上碱基对的编号是基于限制酶EcoR1的切割位点或同源位点(如果EcoR1位点不存在)。然而,也使用了基于核心蛋白的起始密码子,或基于RNA前体基因组的第一个碱基的其它编号方法。在HBV基因组中的每个碱基对参与编码至少一种HBV蛋白。然而,基因组还包含调节转录水平、确定多聚腺苷酸化位点、甚至标记特定转录本用于衣壳化成核衣壳的遗传元件。四个ORF通过使用不同的框内起始密码子导致七种不同HBV蛋白的转录和翻译。例如,当核糖体在adw基因组的位置155处的ATG开始翻译时产生小的乙型肝炎表面蛋白。当核糖体在位置3211的上游ATG开始时产生中间的乙型肝炎表面蛋白,导致在蛋白的5'末端55个氨基酸的添加。

[0145] ORF P占据大部分基因组并编码乙型肝炎聚合酶蛋白。ORF S编码三种表面蛋白。ORF C编码戊型肝炎和核心蛋白。ORF X编码乙型肝炎X蛋白。HBV基因组含有许多对于发生病毒复制所必需的重要的启动子和信号区域。四个ORF转录由四个启动子元件(preS1, preS2, 核心和X)和两个增强子元件(Enh I和Enh II)控制。所有HBV转录物共享位于基因组中跨越1916-1921的区域中的共同腺苷酸化信号。获得的转录物的长度范围从3.5个核苷酸至0.9个核苷酸。由于核心/前基因组启动子的位置,多聚腺苷酸化位点被差异利用。聚腺苷酸化位点是六核苷酸序列(TATAAA),与典型的真核多腺苷酸化信号序列(AATAAA)不同。已知TATAAA工作效率低下(9),适合于HBV的差异使用。

[0146] 存在由该基因组编码的四个已知基因,称为C,X,P和S。核心蛋白由基因C(HBcAg)编码,并且其起始密码子之前有上游框内AUG起始密码子,其产生前核心蛋白。HBcAg通过前核心蛋白的蛋白水解加工产生。DNA聚合酶由基因P编码。基因S是编码表面抗原(HBsAg)的基因。HBsAg基因是一个长的开放阅读框,但含有三个框内起始(ATG)密码子,其将基因分成三个部分,pre-S1,pre-S2和S。由于多个起始密码子,产生三个大小不同,分别被称为大,中和小(pre-S1+pre-S2+S,pre-S2+S或S)的多肽。基因X编码的蛋白的功能尚未完全了解,但其与肝癌的发展有关。它刺激促进细胞生长的基因,并灭活生长调节分子。

[0147] 参考图10,HBV通过用Pre S1结合宿主细胞开始其感染周期。针对PreS 1的引导RNA位于编码序列的5'端。核酸内切酶消化将引入插入/缺失,其导致PreS1翻译的读框移位。HBV通过长RNA形式复制其基因组,在两个末端具有相同的重复序列DR1和DR2,以及在5'末端的RNA衣壳化信号 ϵ 。聚合酶基因的逆转录酶结构域(RT)将RNA转化为DNA。Hbx蛋白是病毒复制以及宿主细胞功能的关键调节物。由针对RT的RNA引导的消化将引入插入/缺失,其导致RT翻译的读框移位。引导RNA sgHbx和sgCore不仅可导致在Hbx和HBV核心蛋白编码的读框移位,也导致含有DR2-DR1-Epsilon的整个区域的删除。四种的sgRNA组合也可导致HBV基因组被系统性破坏成小片段。

[0148] HBV通过RNA中间体的逆转录复制其基因组。首先将RNA模板转化为单链DNA物质(负链DNA),然后将其用作正链DNA合成的模板。在HBV中的DNA合成使用RNA引物用于正链DNA的合成,其主要起始于单链DNA上的内部位置。引物通过RNA酶H切割产生,所述RNA酶H切割是自RNA模板的5'端独立于序列的量度(a sequence independent measurement from the 5' end of the RNA template)。将该18nt的RNA引物退火至负链DNA的3'末端,引物的3'末端位于12nt直接重复序列DR1内。大部分正链DNA合成从12nt直接重复序列DR2(作为引物移位的结果,位于负链DNA的另一端附近)开始。正链启动的位点产生了后果。原位引发产生双链线性(DL)DNA基因组,而从DR2引发可导致在完成称为环化的第二模板开关之后合成松弛环状(RC)的DNA基因组。尚不清楚为什么嗜肝DNA病毒具有引发正链DNA合成的这一增加的复杂性,但是引物易位的机制是潜在的治疗靶标。由于病毒复制对于嗜肝DNA病毒(包括人类病原体,乙型肝炎病毒)慢性携带者状态的维持是必需的,理解复制和揭示治疗靶是限制携带者的疾病的关键。

[0149] 在一些实施方案中,本发明的系统和方法通过在诸如PreS1的特征内发现核苷酸链来靶向HBV基因组。

[0150] 针对PreS1的引导RNA位于编码序列的5'末端。因此它是靶向的良好候选物,因为它代表编码序列中最5'端的靶之一。核酸内切酶消化将引入插入/缺失,这导致PreS1翻译

的读框移位。HBV通过长RNA的形式复制其基因组,在两个末端具有相同的重复序列DR1和DR2,且在5'末端具有RNA衣壳化信号 ϵ 。

[0151] 聚合酶基因的逆转录酶结构域(RT)将RNA转化为DNA。Hbx蛋白是病毒复制以及宿主细胞功能的关键调节物。由针对RT的RNA引导的消化将导致插入/缺失,其导致RT翻译的读框移位。

[0152] 引导RNA sgHbx和sgCore不仅可导致在Hbx和HBV核心蛋白编码的读框移位,也导致含有DR2-DR1-Epsilon的整个区域的删除。四种的sgRNA组合也可导致HBV基因组被系统性破坏成小片段。在一些实施方案中,本发明的方法包括产生针对基因组(例如图10所示的HBV基因组)内关键特征的一个或多个引导RNA。

[0153] 图10显示了由CRISPR引导RNA靶向的HBV基因组中的关键部分。为了在细胞中实现CRISPR活性,将编码cas9和引导RNA的表达质粒递送至感兴趣的细胞(例如携带HBV DNA的细胞)。为在体外测定中进行说明,可以通过监测细胞增殖、生长和形态以及分析细胞中的DNA完整性和HBV DNA负荷来评估抗HBV效应。

[0154] 所述方法可以使用体外测定来验证。为了证明,用靶区域侧翼的cas9蛋白和DNA扩增子进行体外测定。此处,扩增靶并将扩增子与cas9和gRNA(具有选择的用于靶向的核苷酸序列)进行孵育。如图11所示,DNA电泳显示在靶位点有强消化。

[0155] 图11显示了针对HBV的体外CRISPR测定得到的凝胶。泳道1,3和6:HBV基因组侧翼RT,Hbx-Core和PreS1的PCR扩增结果。泳道2,4,5和7:用sgHBV-RT,sgHBV-Hbx,sgHBV-Core,sgHBV-PreS1处理的PCR扩增结果。在泳道5和7中特别可见的多个片段的存在显示sgHBV-Core和sgHBV-PreS1在HBV的背景下提供特别有吸引力的靶,本发明的系统和方法的使用可以通过体外验证测定显示是有效的。

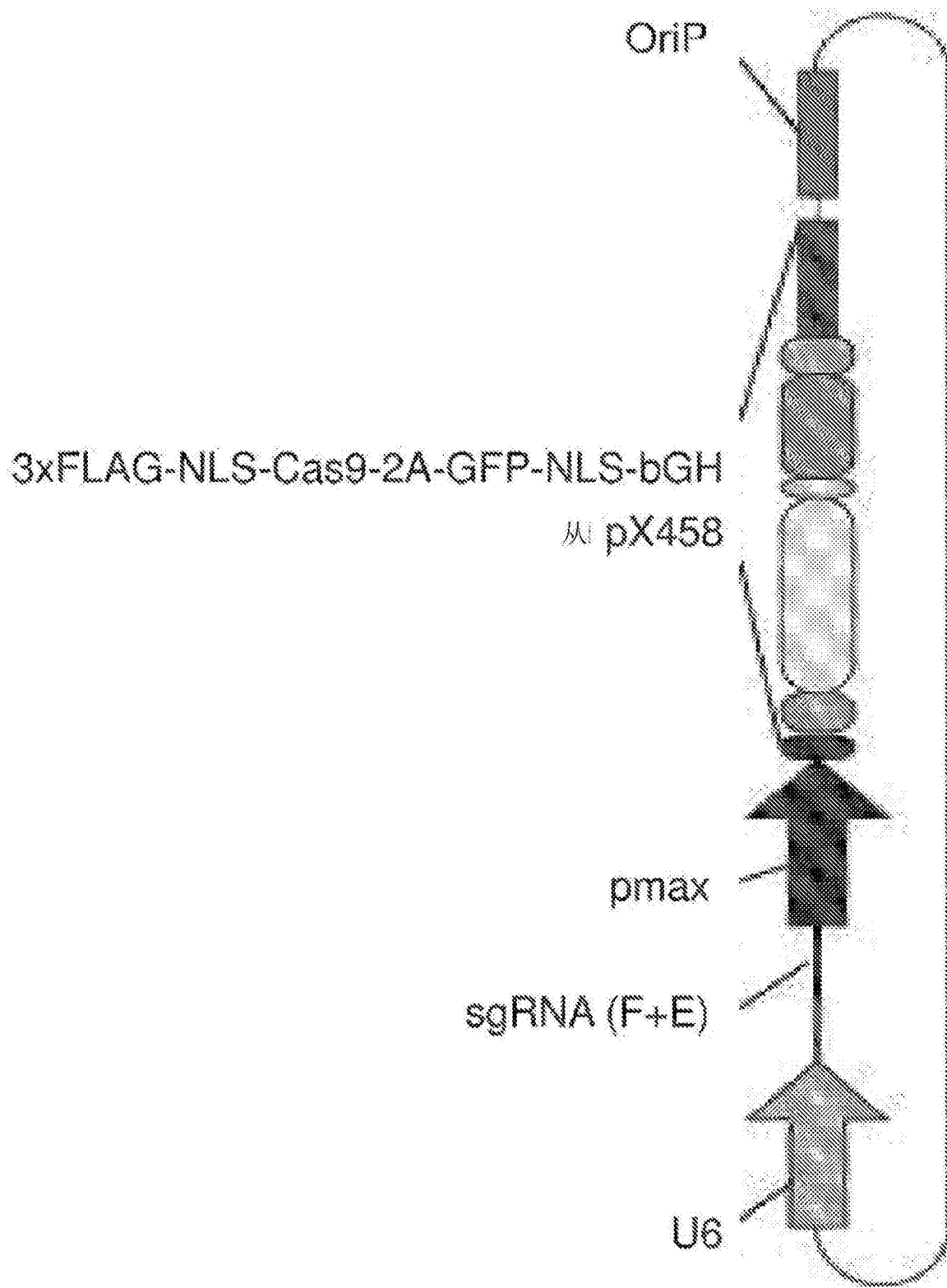


图1A

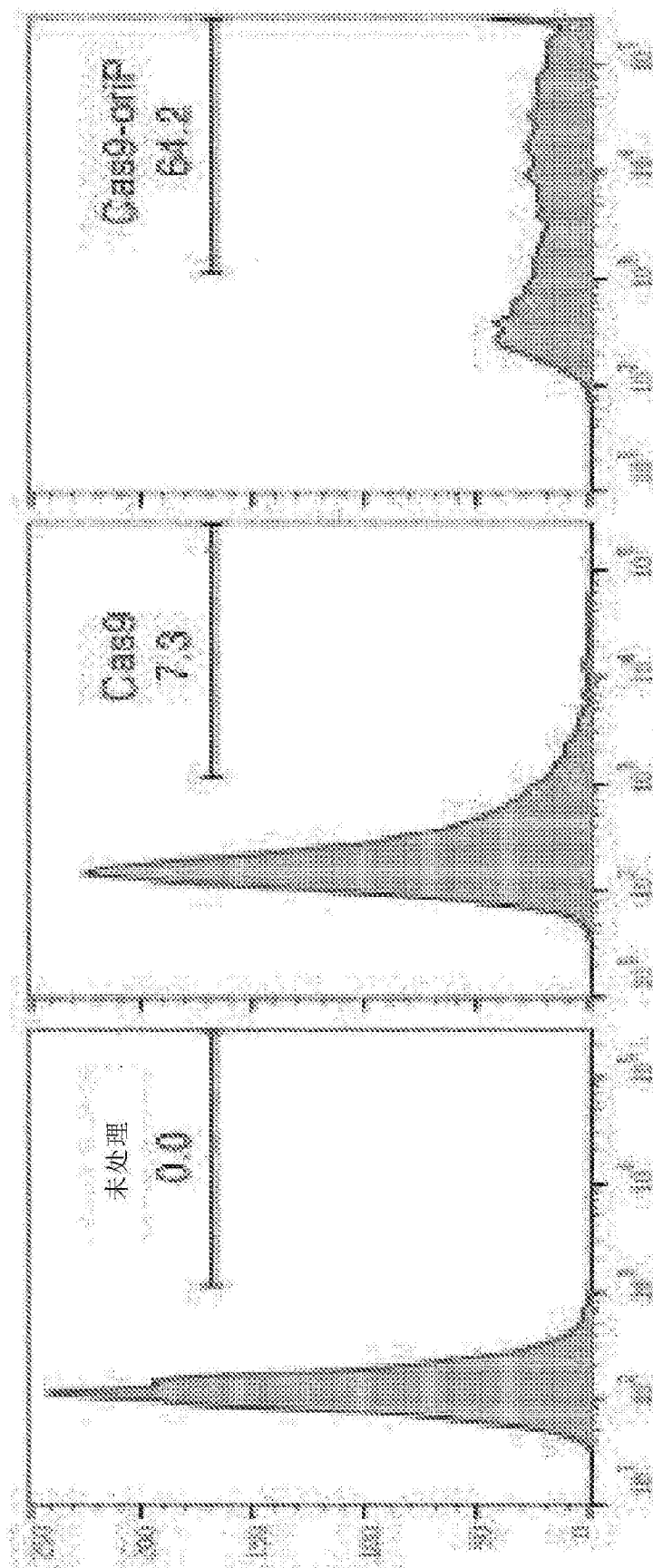


图1B

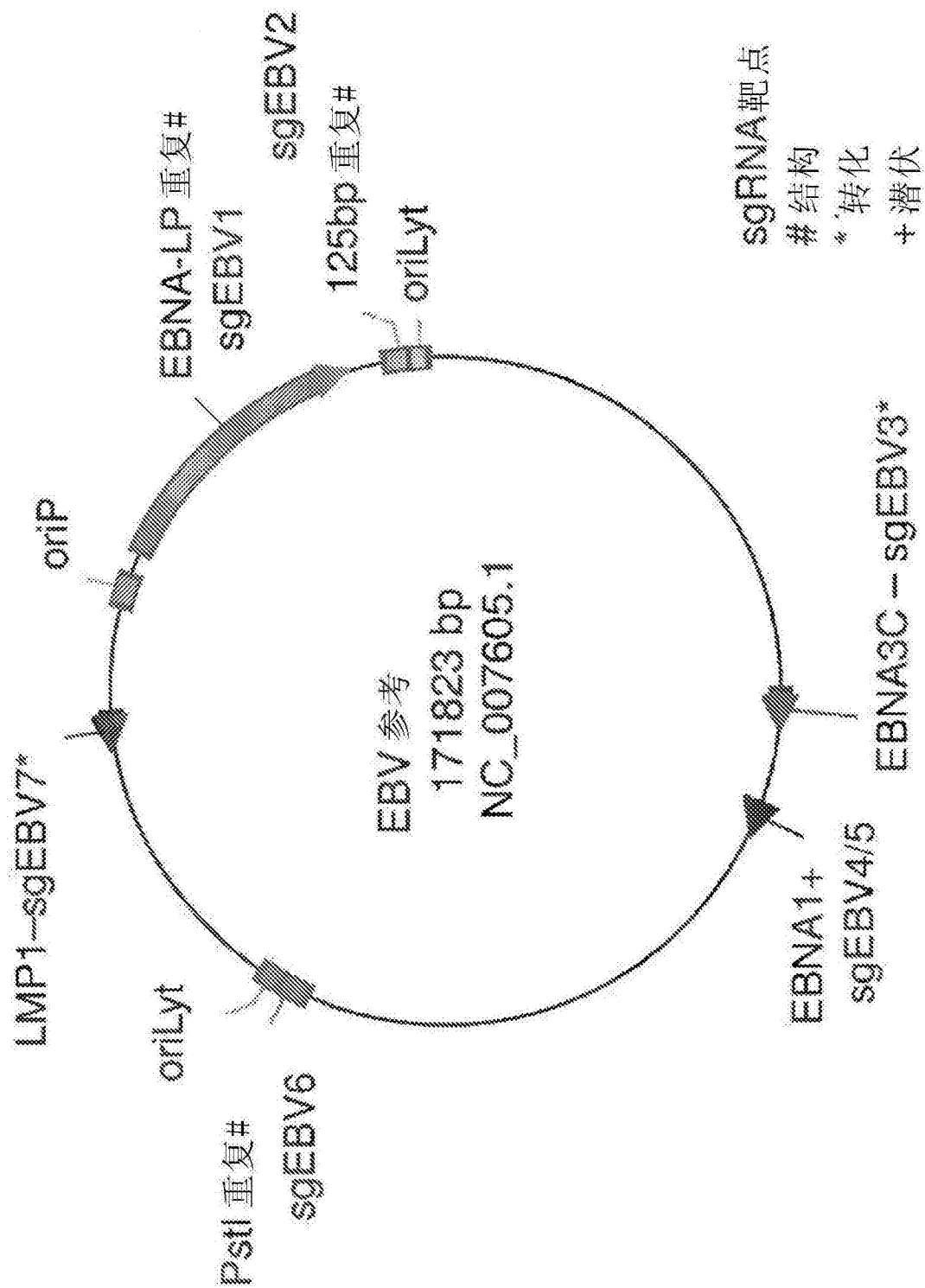


图1C

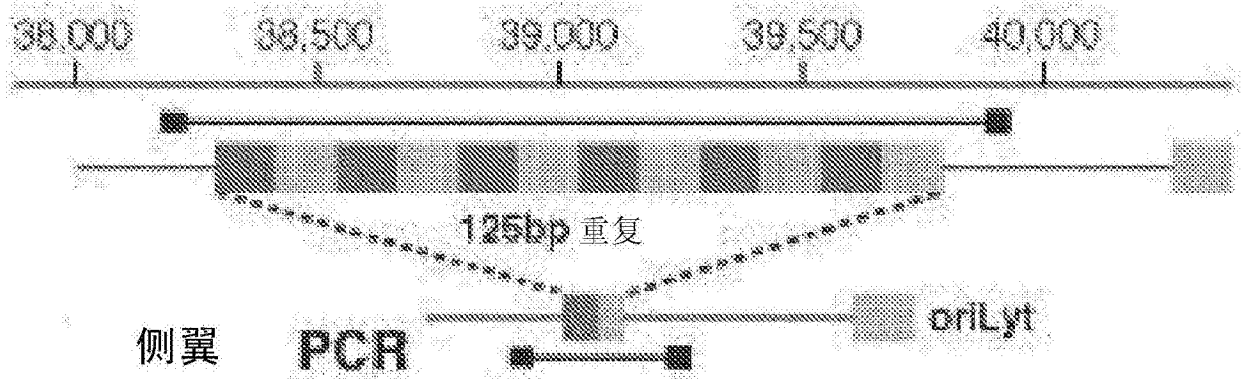


图2A

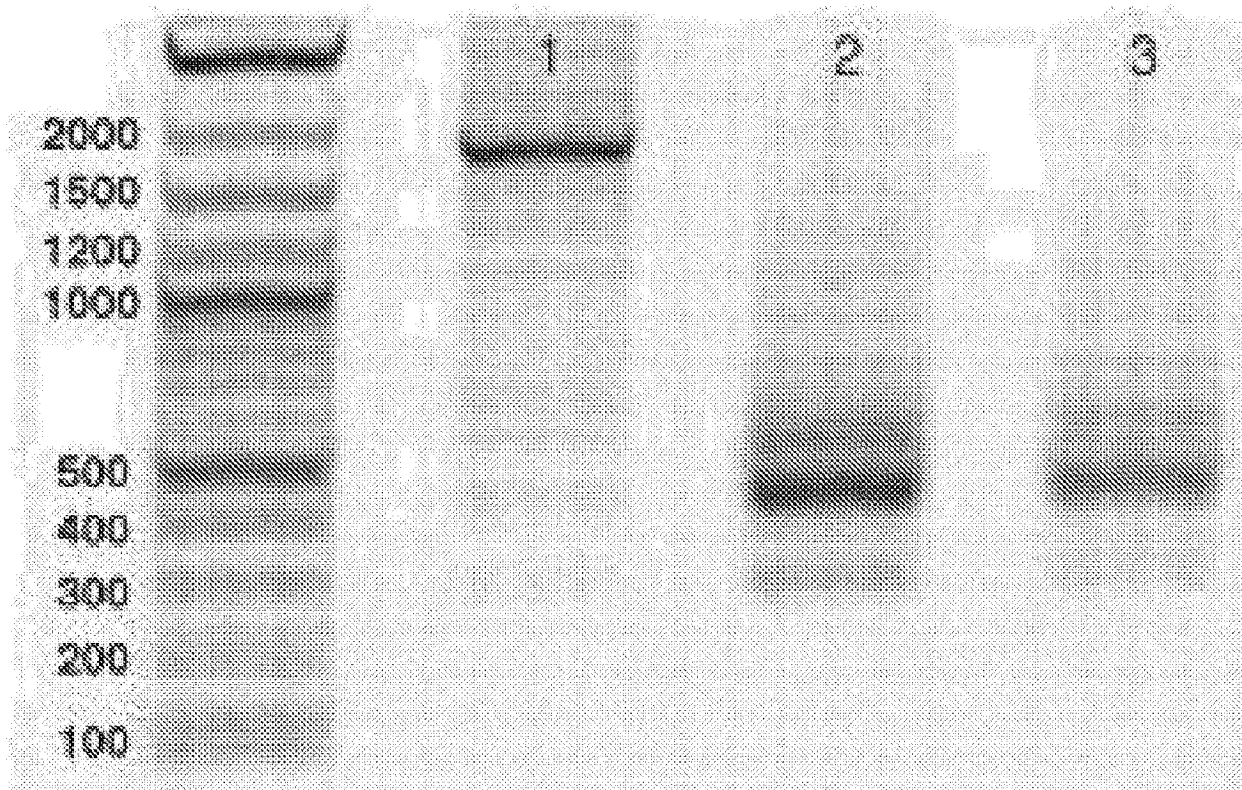


图2B

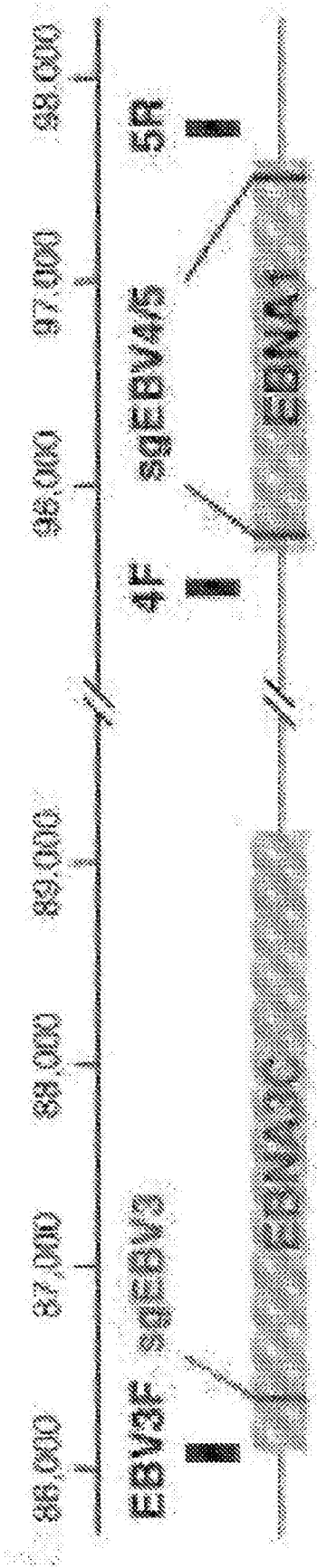


图2C

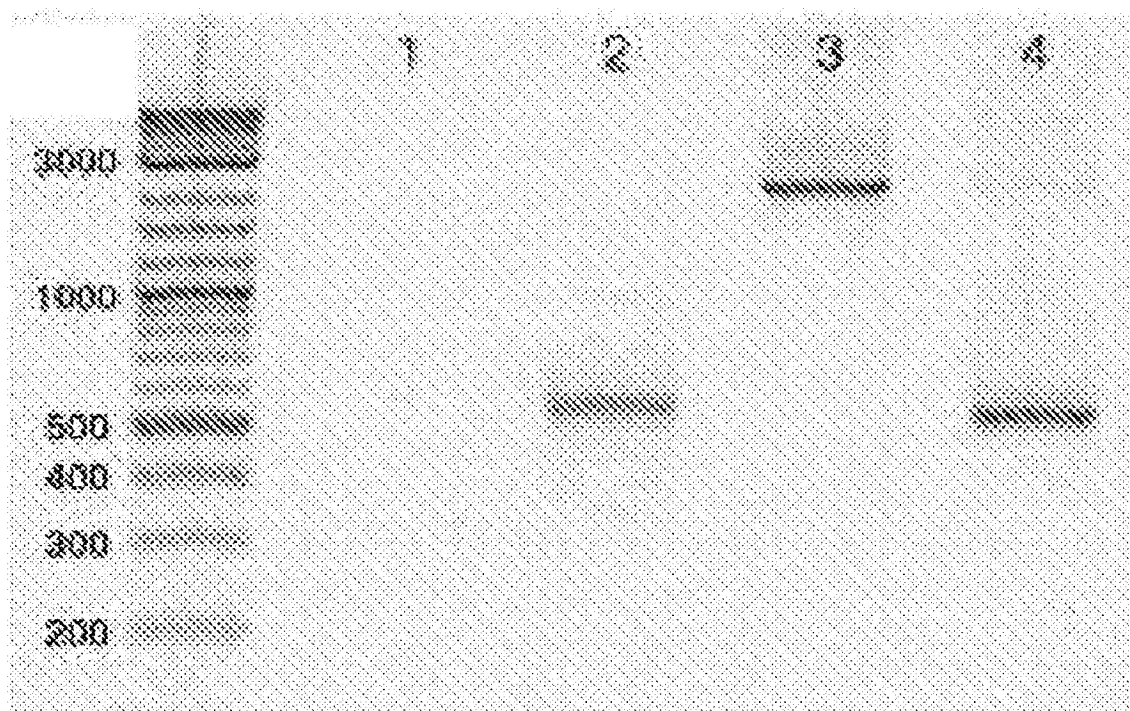


图2D

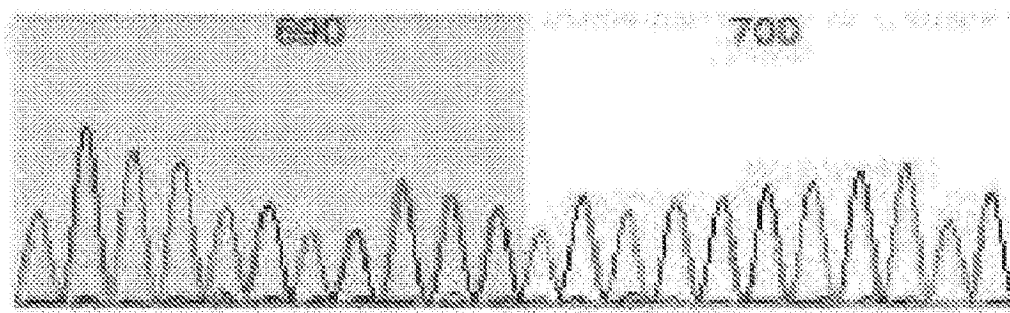


图2E

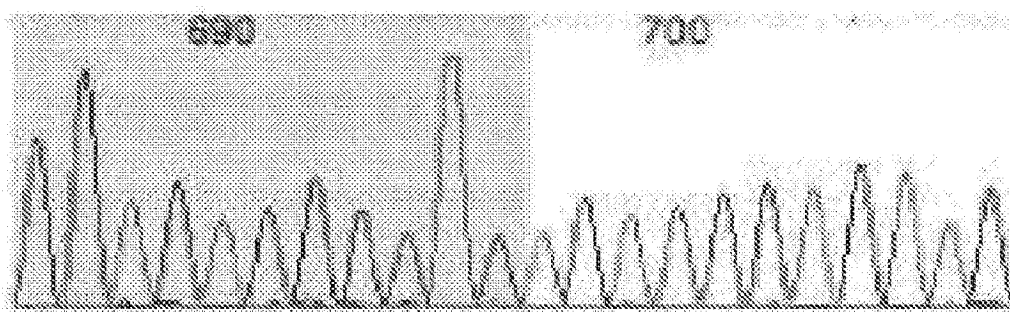


图2F

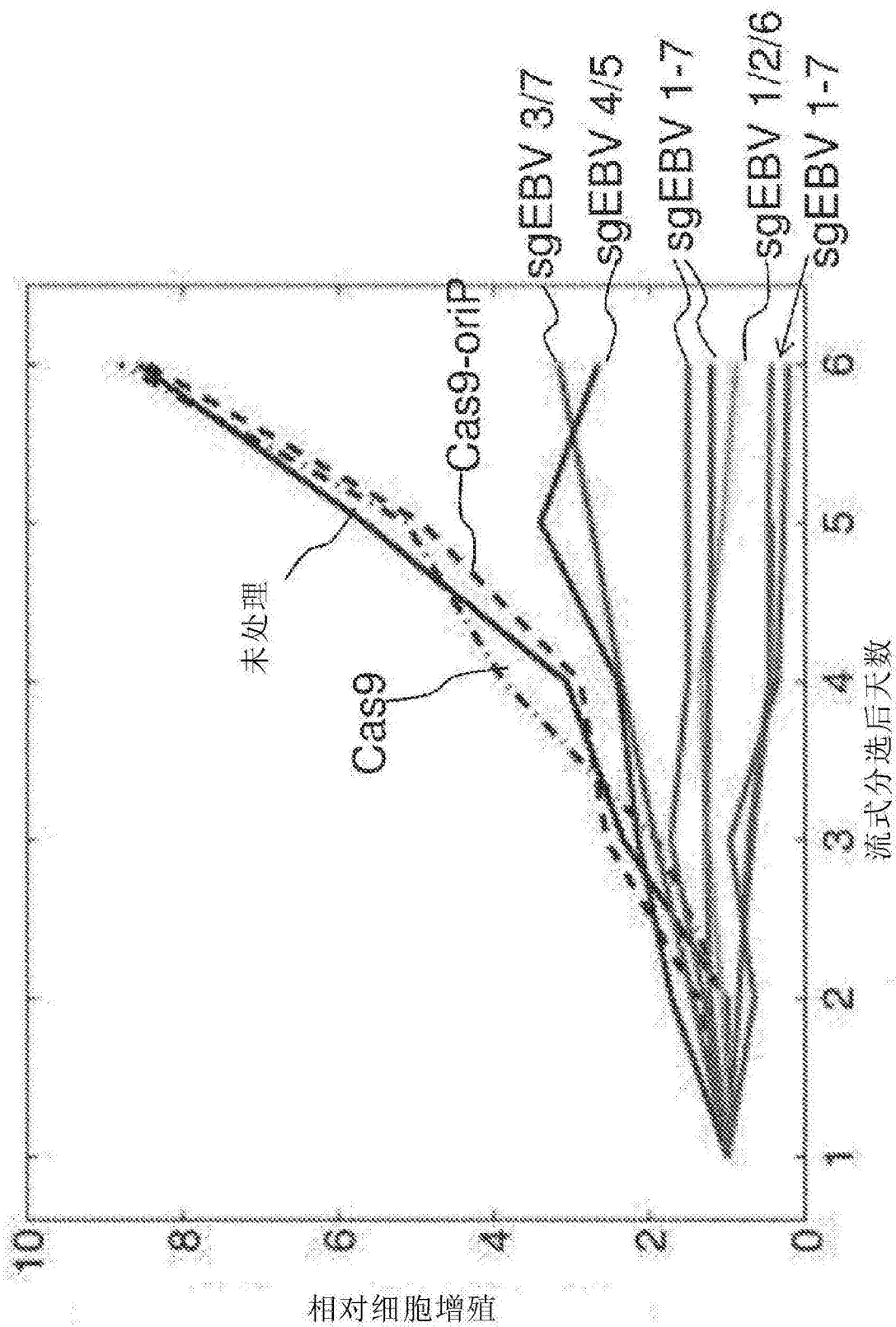


图3A

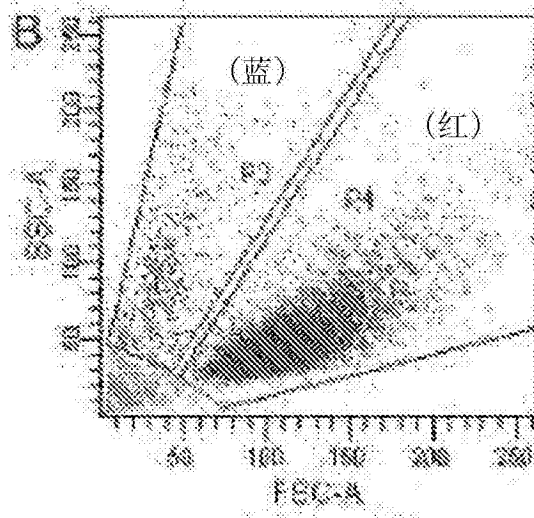


图3B

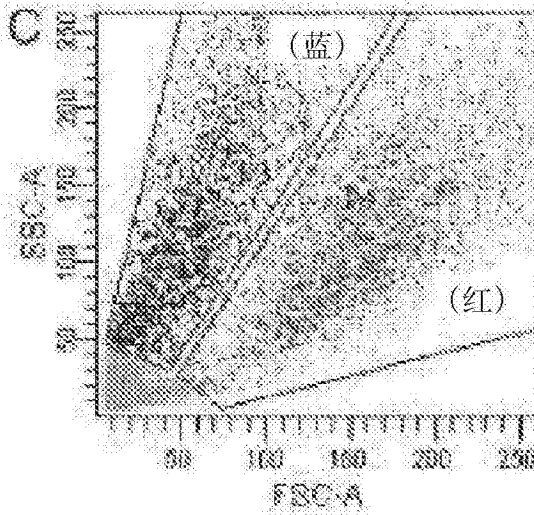


图3C

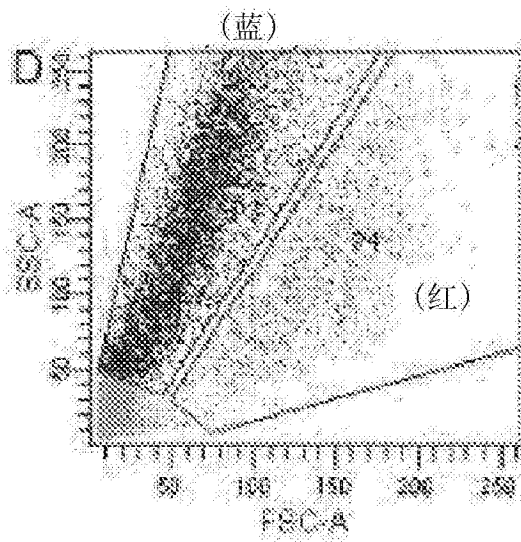


图3D

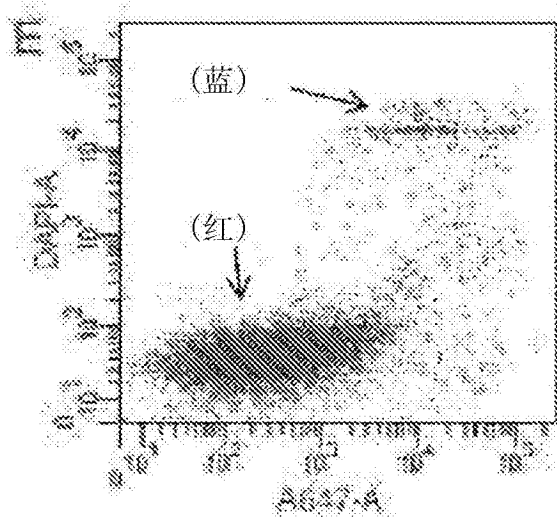


图3E

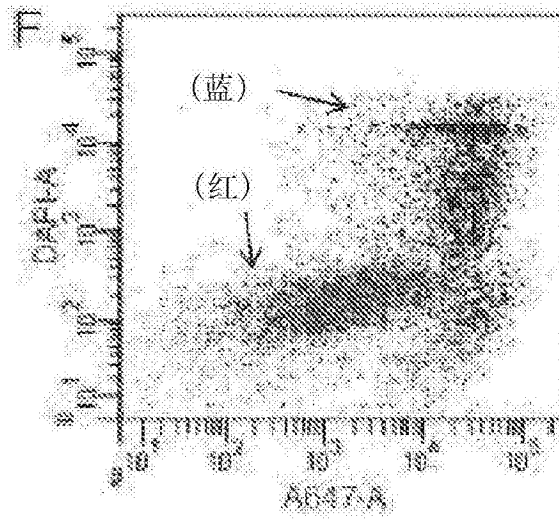


图3F

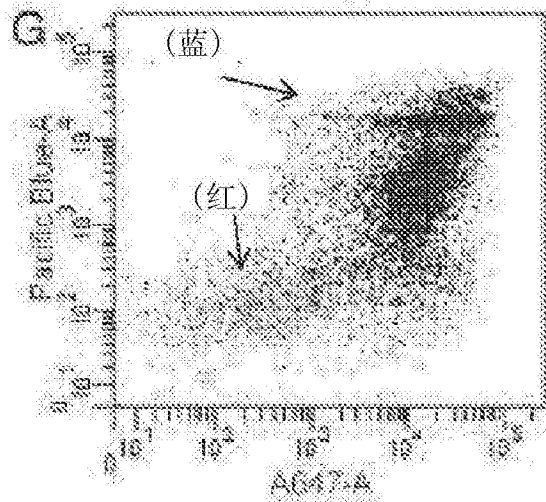


图3G

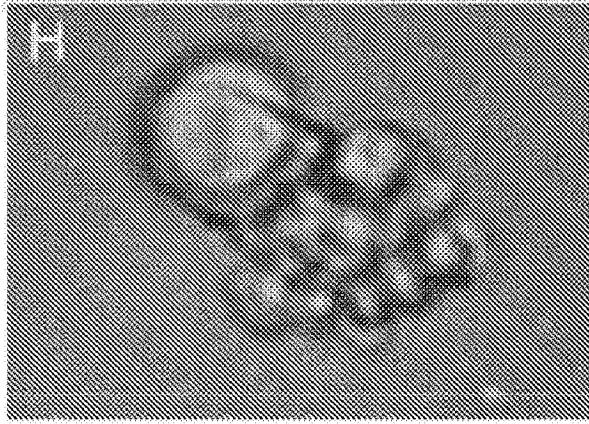


图3H

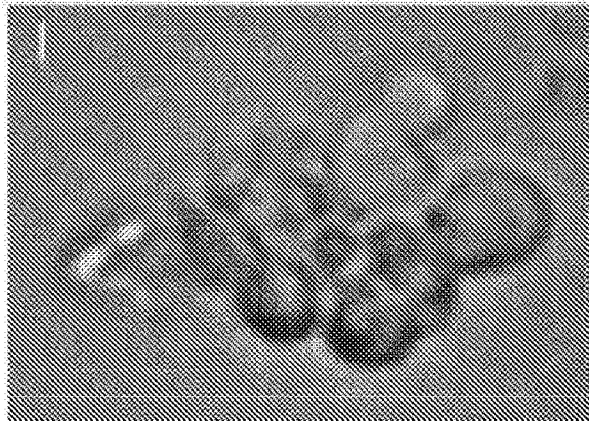


图3I

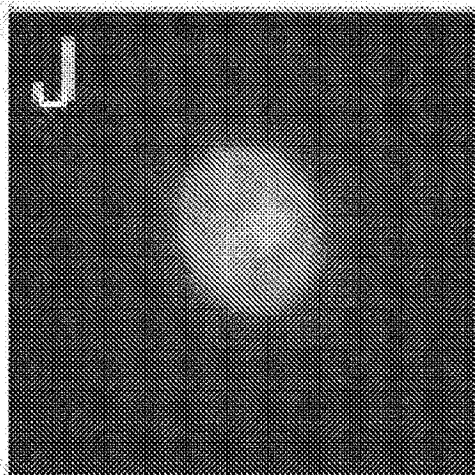


图3J

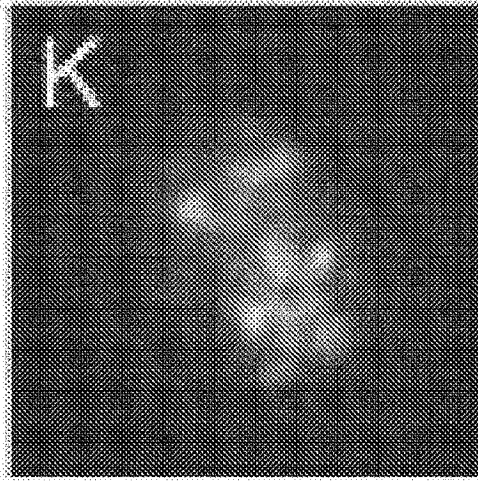


图3K

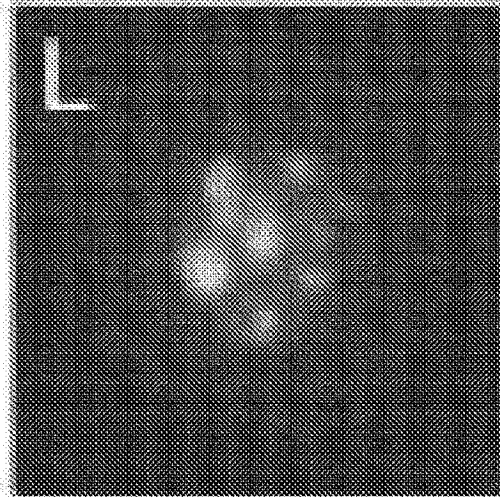


图3L

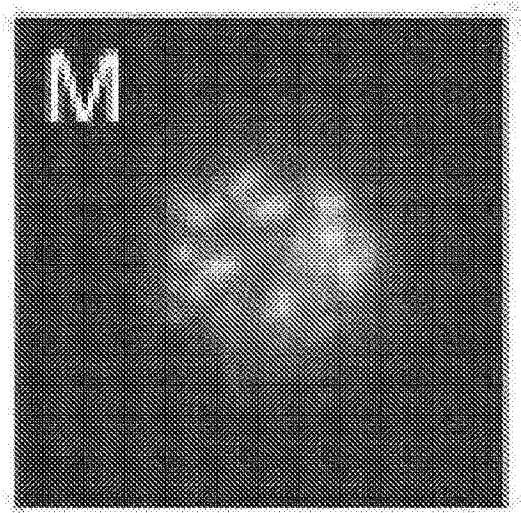


图3M

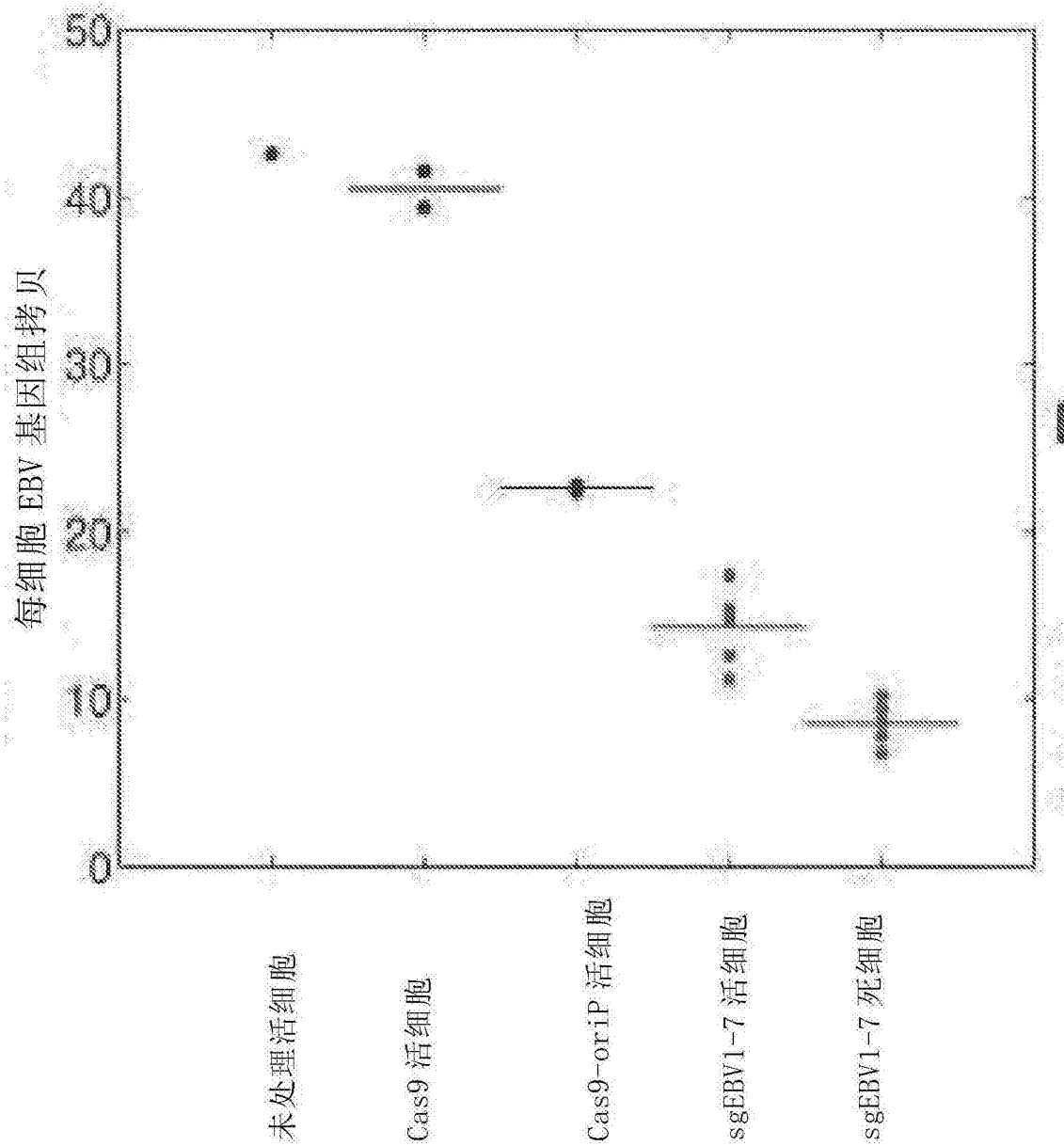


图4A

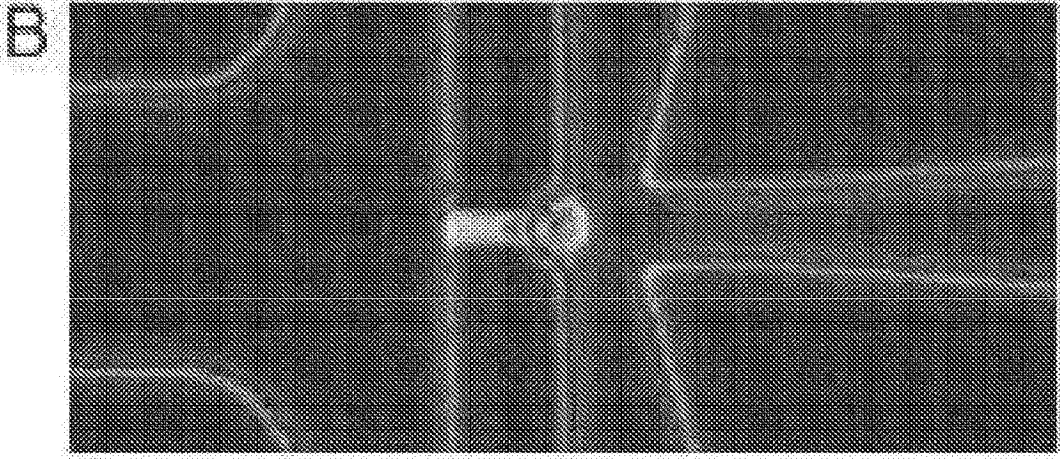


图4B

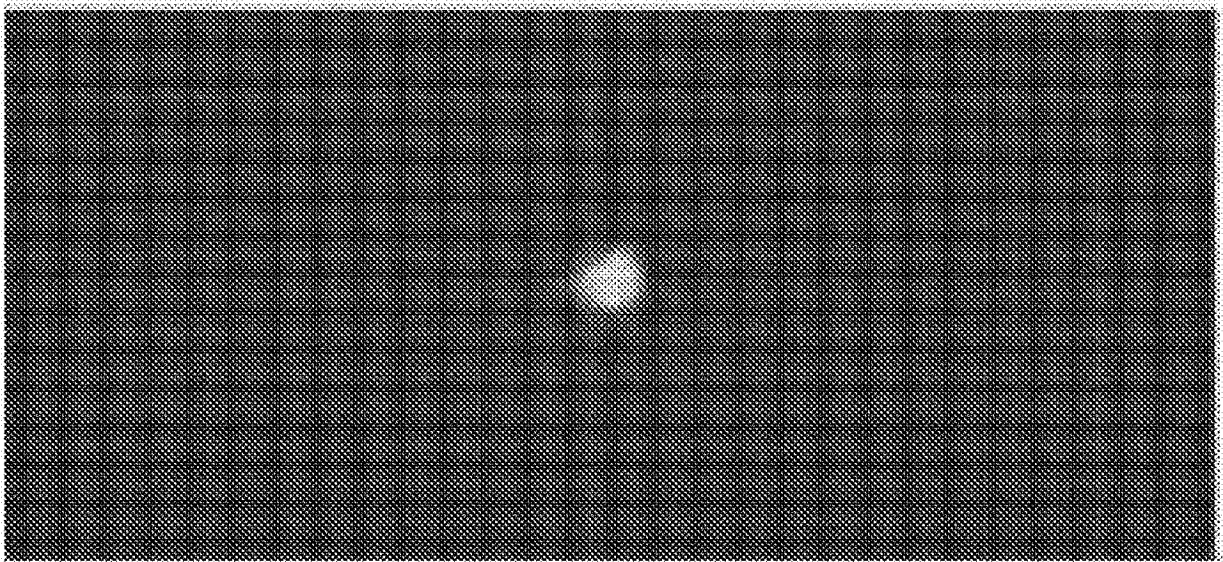


图4C

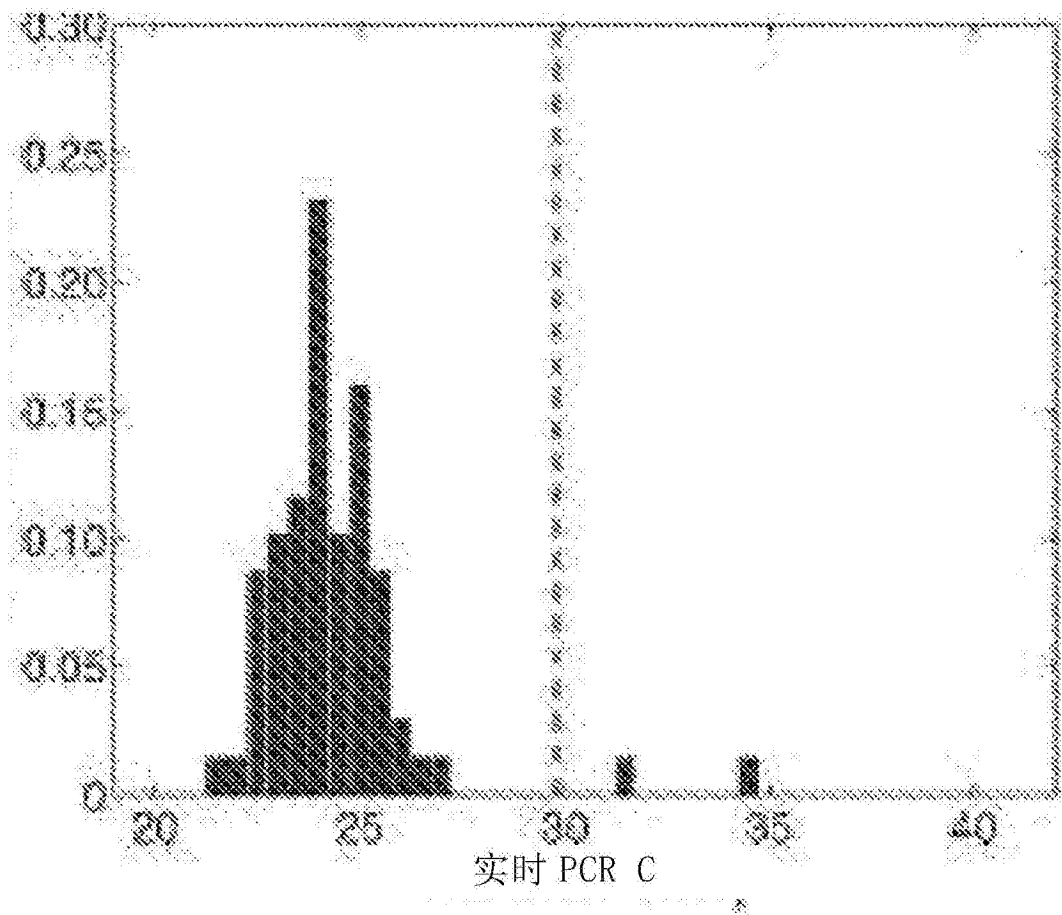


图4D

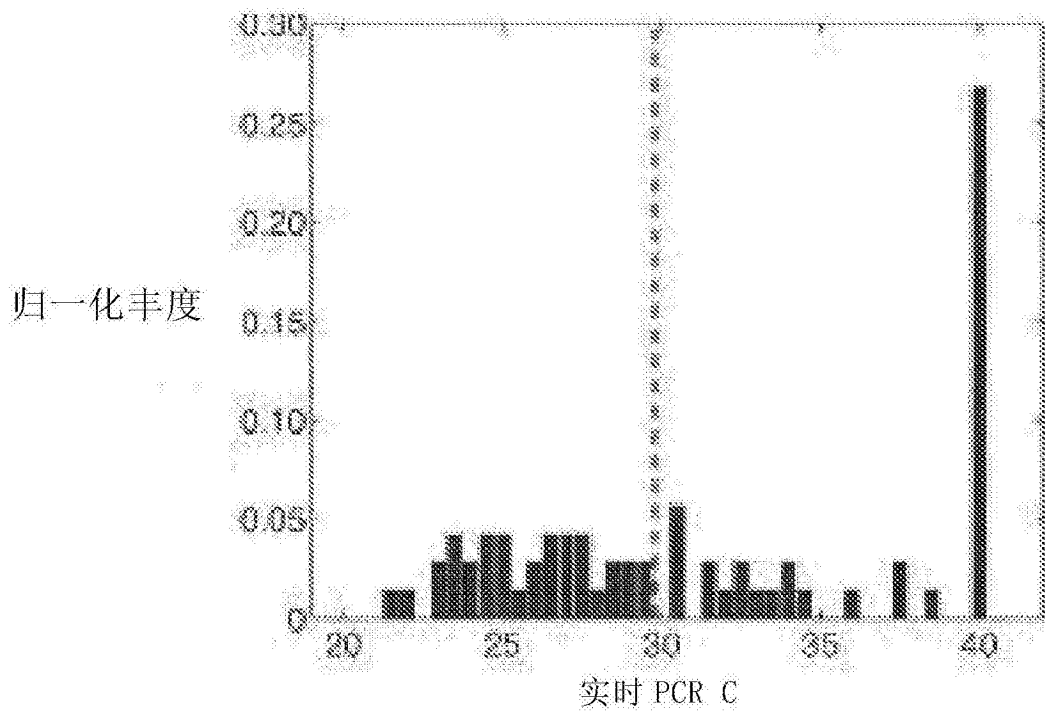


图4E

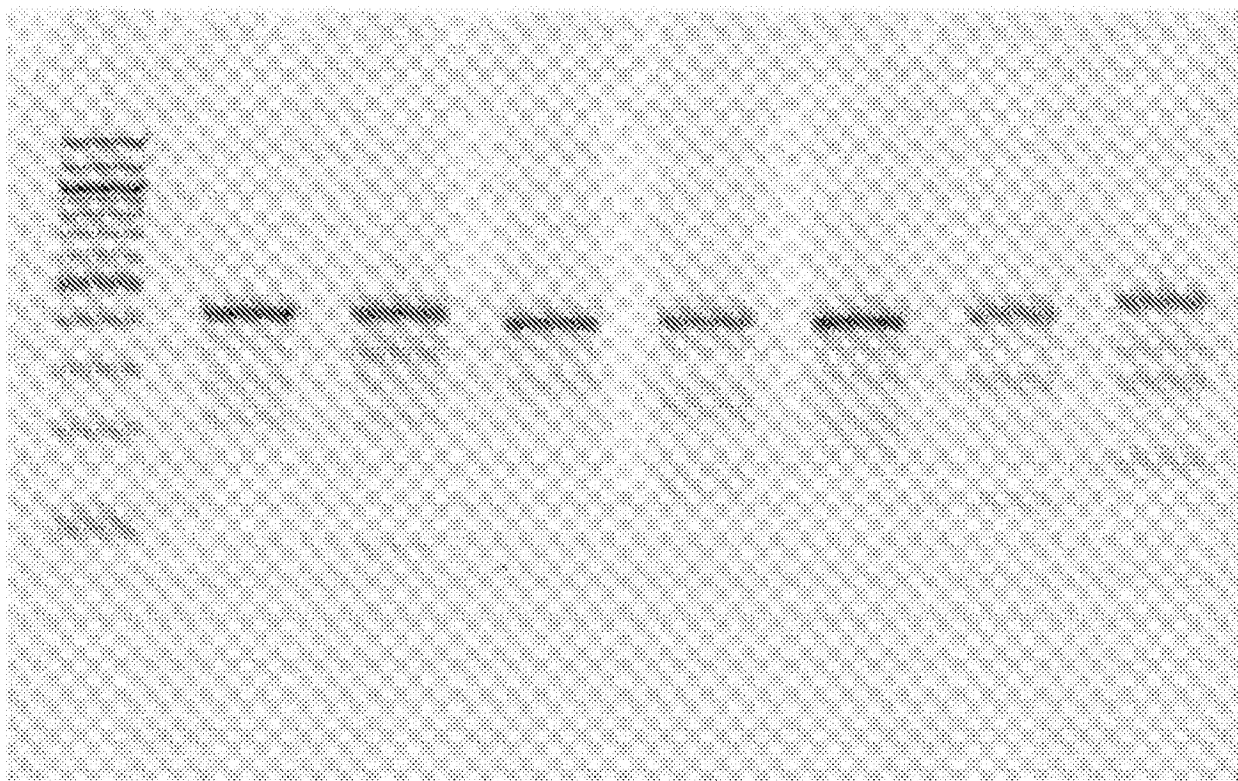


图5

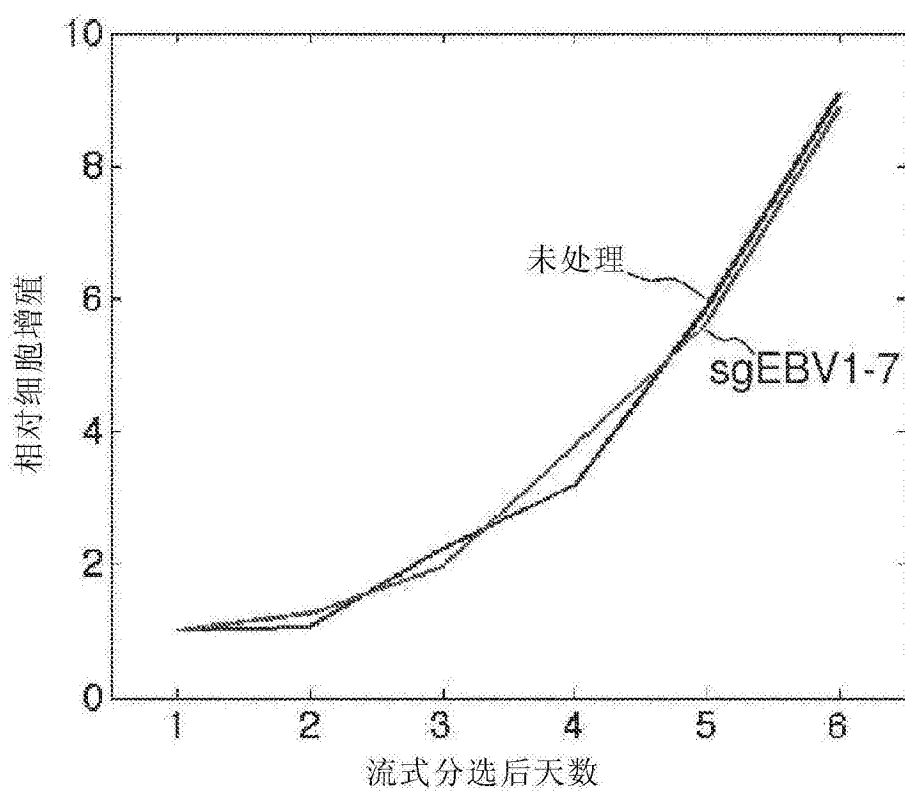


图6

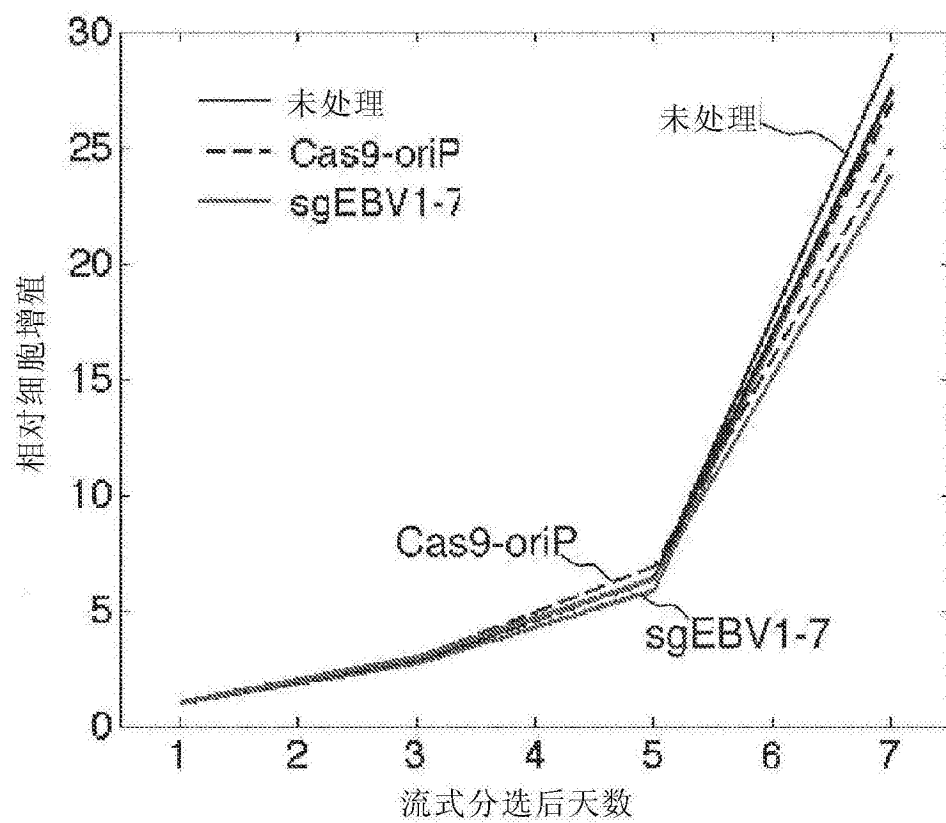


图7

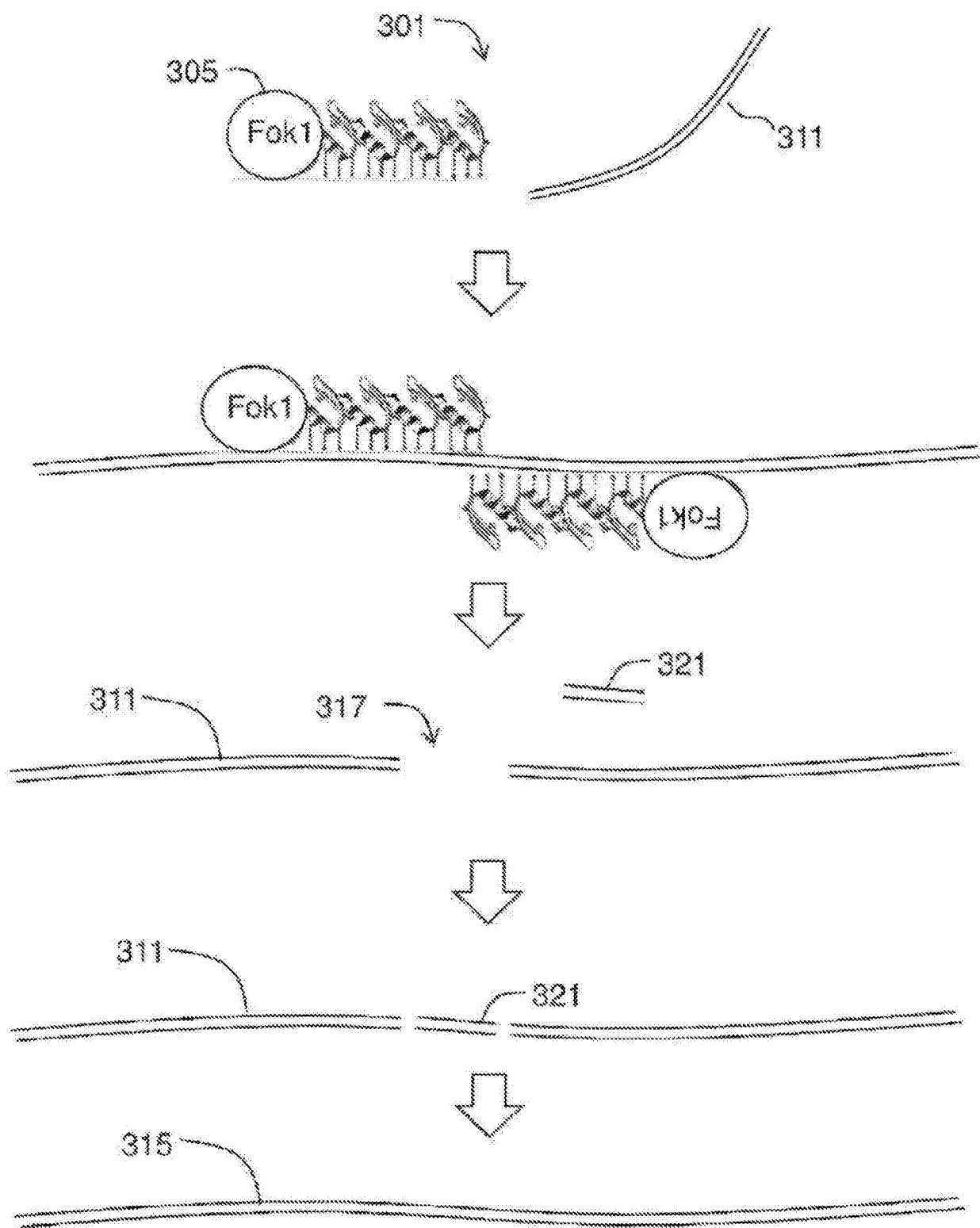


图8

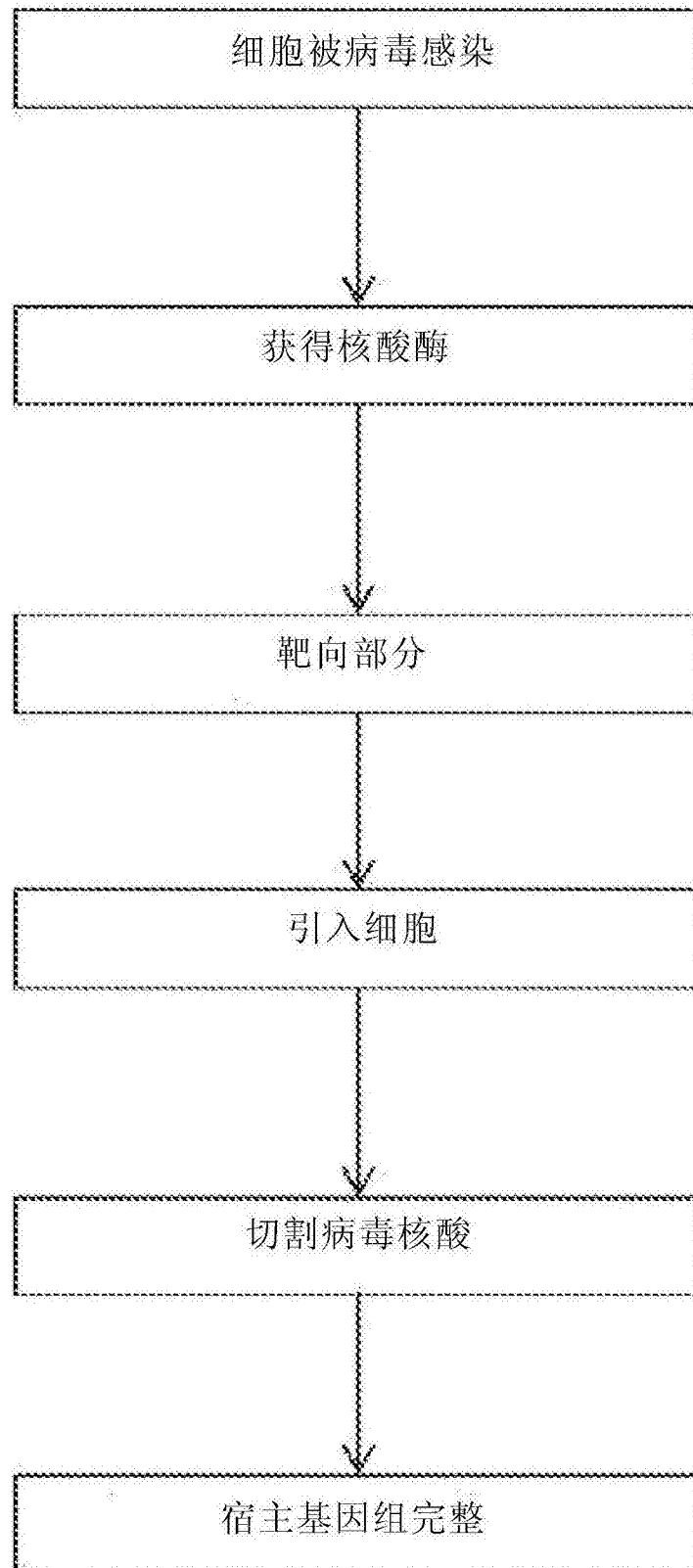


图9

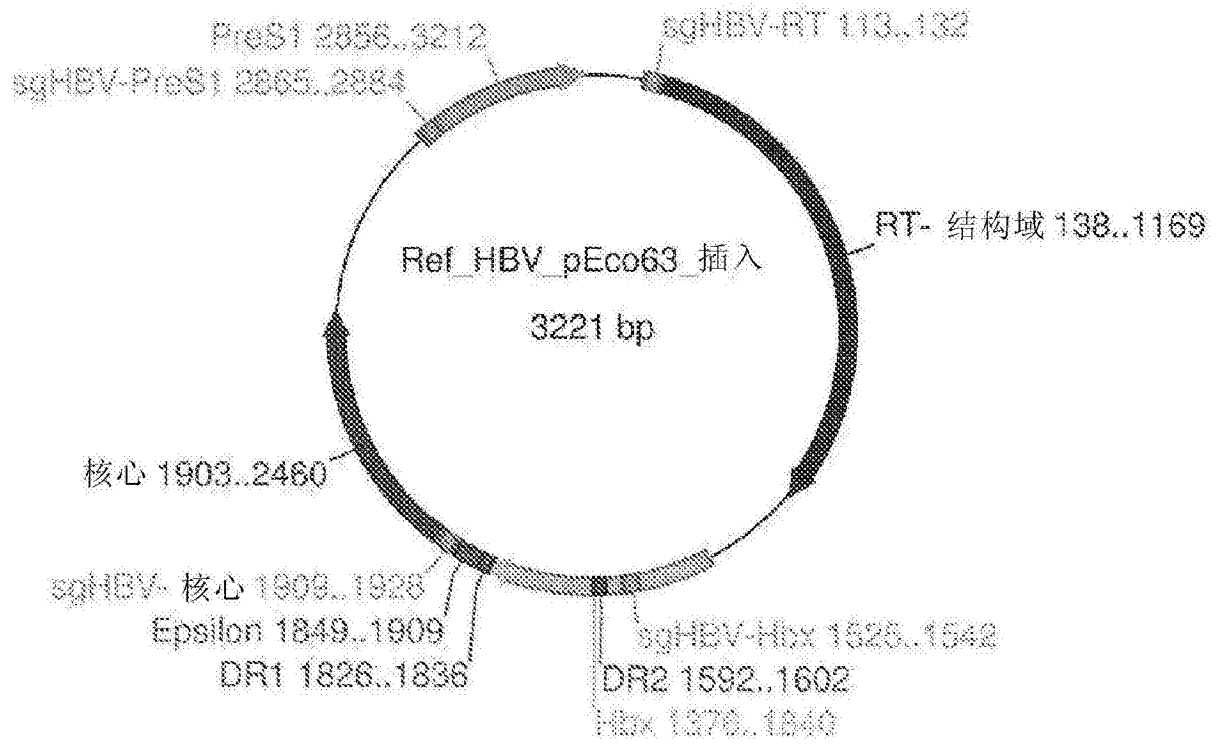


图10

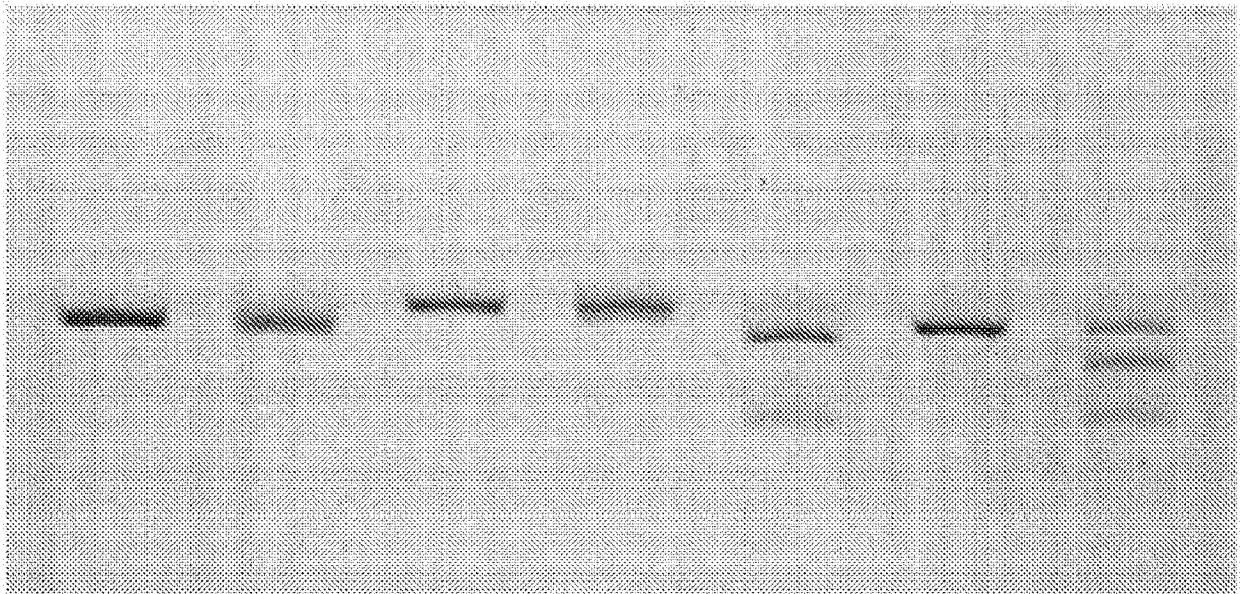


图11

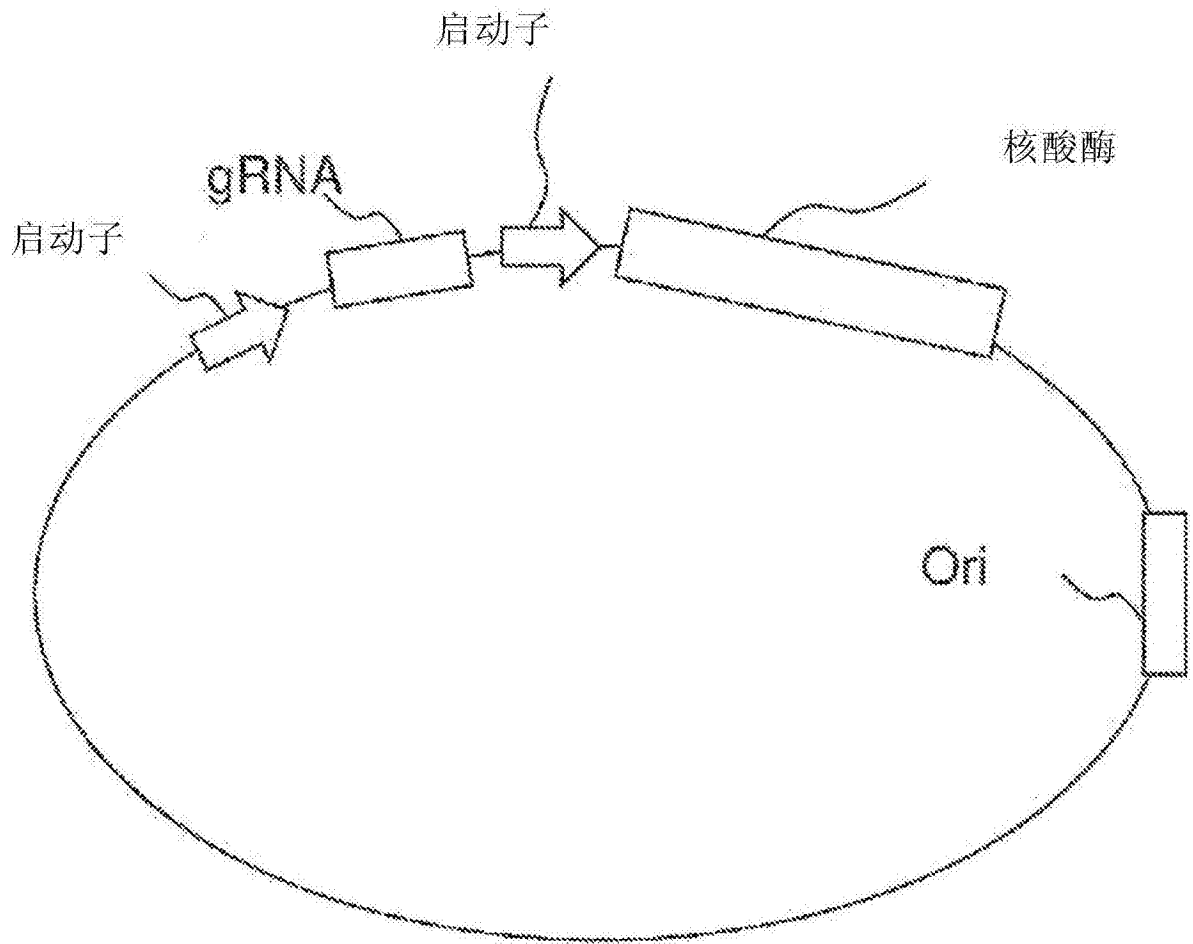


图12