



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109069560 A

(43)申请公布日 2018.12.21

(21)申请号 201780025855.1

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

(22)申请日 2017.06.01

代理人 康艳青 姚开丽

(30)优先权数据

62/344,063 2016.06.01 US

62/346,839 2016.06.07 US

62/360,540 2016.07.11 US

(51)Int.Cl.

A61K 35/76(2015.01)

C12N 15/11(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

A61P 31/12(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.10.25

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/035361 2017.06.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/210380 EN 2017.12.07

(71)申请人 切除生物治疗公司

地址 美国新泽西州

(72)发明人 托马斯·马尔科姆

权利要求书4页 说明书20页 附图1页

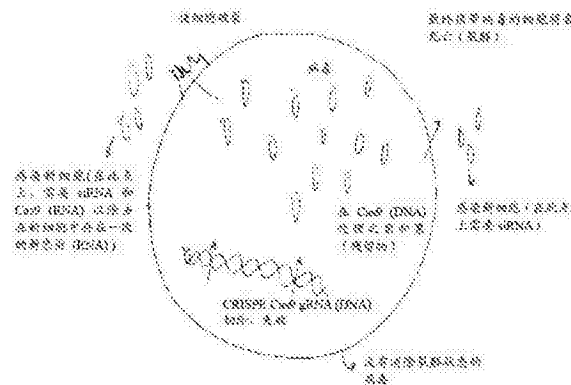
(54)发明名称

用于裂解性病毒和溶原性病毒的组合物和治疗方法

或裂解性病毒的方法。

(57)摘要

披露了一种用于治疗溶原性病毒的组合，该组合包括编码两种或更多种基因编辑器的分离的核酸，所述基因编辑器选自靶向病毒DNA的基因编辑器、靶向病毒RNA的基因编辑器、及其组合。一种用于治疗裂解性病毒的组合，该组合包括分离的核酸，所述分离的核酸编码至少一种靶向病毒DNA的基因编辑器以及一种靶向病毒RNA的成分。一种用于治疗溶原性病毒和裂解性病毒两者的组合，该组合包括编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器的分离的核酸，所述基因编辑器选自CRISPR相关核酸酶、Argonaute内切核酸酶gDNA、C2c2、RNA酶P RNA及其组合。一种用于治疗裂解性病毒的组合，该组合包括分离的核酸，所述分离的核酸编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器以及一种靶向病毒RNA的成分。通过向具有病毒的个体施用上述组合并灭活该病毒来治疗溶原性病毒



1. 一种用于治疗溶原性病毒的组合物,该组合物包含编码两种或更多种基因编辑器的分离的核酸,所述基因编辑器选自下组,该组由以下组成:靶向病毒DNA的基因编辑器、靶向病毒RNA的基因编辑器、及其组合。

2. 如权利要求1所述的组合物,其中所述靶向病毒DNA的基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶和Argonaute内切核酸酶gDNA。

3. 如权利要求2所述的组合物,其中所述CRISPR相关核酸酶选自下组,该组由以下组成:Cas9 gRNA和Cpf1 gRNA。

4. 如权利要求1所述的组合物,其中所述靶向病毒RNA的基因编辑器选自下组,该组由以下组成:C2c2和RNA酶P RNA。

5. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物清除病毒DNA或RNA的复制关键区段。

6. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物从宿主细胞切除所述溶原性病毒的整个病毒基因组。

7. 如权利要求1所述的组合物,其中所述组合物被包括在载体中。

8. 如权利要求1所述的组合物,其中所述溶原性病毒选自下组,该组由以下组成:甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、HPV病毒、黄热病病毒、寨卡病毒、登革热病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、狂犬病病毒、水泡性病毒、细胞质弹状病毒、汉坦病毒、裂谷热病毒、布尼奥罗病毒、拉沙病毒、胡宁病毒、马邱波病毒、萨比亚病毒、塔卡里伯病毒、弗莱克索病毒、怀特沃特阿罗约病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、JC病毒、以及BK病毒。

9. 一种用于治疗裂解性病毒的组合物,该组合物包含分离的核酸,所述分离的核酸编码至少一种靶向病毒DNA的基因编辑器以及一种靶向病毒RNA的成分。

10. 如权利要求9所述的组合物,其中所述靶向病毒DNA的基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶和Argonaute内切核酸酶gDNA。

11. 如权利要求10所述的组合物,其中所述CRISPR相关核酸酶选自下组,该组由以下组成:Cas9 gRNA和Cpf1 gRNA。

12. 如权利要求9所述的组合物,其中所述靶向病毒RNA的成分选自下组,该组由以下组成:siRNA、miRNA、shRNA、RNAi、CRISPR相关核酸酶、Argonaute内切核酸酶gDNA、C2c2和RNA酶P RNA。

13. 如权利要求9所述的组合物,其中所述组合物清除病毒DNA或RNA的复制关键区段。

14. 如权利要求9所述的组合物,其中所述组合物从宿主细胞切除所述裂解性病毒的整个病毒基因组。

15. 如权利要求9所述的组合物,其中所述组合物被包括在载体中。

16. 如权利要求9所述的组合物,其中所述裂解性病毒选自下组,该组由以下组成:甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、柯萨奇病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、轮状病毒、东南亚十二RNA病毒、科州蜱传热病毒、JC病毒和BK病毒。

17. 一种用于治疗溶原性病毒和裂解性病毒两者的组合物,该组合物包含编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器的分离的核酸,所述基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶、Argonaute内切核酸酶gDNA、C2c2、RNA酶P RNA及其组合。

18. 如权利要求17所述的组合物,其中所述CRISPR相关核酸酶选自下组,该组由以下组成:Cas9 gRNA和Cpf1 gRNA。

19. 如权利要求17所述的组合物,其中所述组合物清除病毒RNA的复制关键区段。

20. 如权利要求17所述的组合物,其中所述组合物从宿主细胞切除所述溶原性病毒和裂解性病毒的整个病毒基因组。

21. 如权利要求17所述的组合物,其中所述组合物被包括在载体中。

22. 如权利要求17所述的组合物,其中所述溶原性病毒和裂解性病毒选自下组,该组由以下组成:甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、JC病毒和BK病毒。

23. 一种用于治疗裂解性病毒的组合物,该组合物包含分离的核酸,所述分离的核酸编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器以及一种靶向病毒RNA的成分。

24. 如权利要求23所述的组合物,其中所述靶向病毒RNA的基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶和Argonaute内切核酸酶gDNA。

25. 如权利要求23所述的组合物,其中所述CRISPR相关核酸酶选自下组,该组由以下组成:Cas9 gRNA和Cpf1 gRNA。

26. 如权利要求23所述的组合物,其中所述靶向病毒RNA的成分选自下组,该组由以下组成:siRNA、miRNA、shRNA、RNAi、C2c2和RNA酶P RNA。

27. 如权利要求23所述的组合物,其中所述组合物清除病毒RNA的复制关键区段。

28. 如权利要求23所述的组合物,其中所述组合物从宿主细胞切除所述裂解性病毒的整个病毒基因组。

29. 如权利要求23所述的组合物,其中所述组合物被包括在载体中。

30. 如权利要求23所述的组合物,其中所述裂解性病毒选自下组,该组由以下组成:甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、柯萨奇病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、轮状病毒、东南亚十二RNA病毒、科州蜱传热病毒、JC病毒和BK病毒。

31. 一种治疗溶原性病毒的方法,该方法包括以下步骤:

向具有溶原性病毒的个体施用如下组合物,该组合物包含编码两种或更多种基因编辑器的分离的核酸,所述基因编辑器选自下组,该组由以下组成:靶向病毒DNA的基因编辑器、靶向病毒RNA的基因编辑器及其组合;以及灭活该溶原性病毒。

32. 如权利要求31所述的方法,其中所述靶向病毒DNA的基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶和Argonaute内切核酸酶gDNA。

33. 如权利要求32所述的方法,其中所述CRISPR相关核酸酶选自下组,该组由以下组成:Cas9 gRNA和Cpf1 gRNA。

34. 如权利要求31所述的方法,其中所述靶向病毒RNA的基因编辑器选自下组,该组由以下组成:C2c2和RNA酶P RNA。

35. 如权利要求31所述的方法,其中所述灭活步骤包括清除病毒DNA或RNA的复制关键区段。

36. 如权利要求31所述的方法,其中所述灭活步骤包括从宿主细胞切除所述溶原性病毒的整个病毒基因组。

37. 如权利要求31所述的方法,其中所述组合物被包括在载体中。

38. 如权利要求31所述的方法,其中该溶原性病毒选自下组,该组由以下组成:甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、HPV病毒、黄热病病毒、寨卡病毒、登革热病毒、西尼罗河病毒、日本脑炎病毒、狂犬病病毒、水泡性病毒、细胞质弹状病毒、汉坦病毒、裂谷热病毒、布尼奥罗病毒、拉沙病毒、胡宁病毒、马邱波病毒、萨比亚病毒、塔卡里伯病毒、弗莱克索病毒、怀特沃特阿罗约病毒、埃博拉病毒、马尔堡病毒、JC病毒、以及BK病毒。

39. 一种用于治疗裂解性病毒的方法,该方法包括以下步骤:

向具有裂解性病毒的个体施用如下组合物,该组合物包含分离的核酸,所述分离的核酸编码至少一种靶向病毒DNA的基因编辑器以及一种靶向病毒RNA的成分;以及

灭活该裂解性病毒。

40. 如权利要求39所述的方法,其中所述靶向病毒DNA的基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶和Argonaute内切核酸酶gDNA。

41. 如权利要求40所述的方法,其中所述CRISPR相关核酸酶选自下组,该组由以下组成:Cas9 gRNA和Cpf1 gRNA。

42. 如权利要求39所述的方法,其中所述靶向病毒RNA的成分选自下组,该组由以下组成:siRNA、miRNA、shRNA、RNAi、CRISPR相关核酸酶、Argonaute内切核酸酶gDNA、C2c2和RNA酶P RNA。

43. 如权利要求39所述的方法,其中所述灭活步骤包括清除病毒DNA或RNA的复制关键区段。

44. 如权利要求39所述的方法,其中所述灭活步骤包括从宿主细胞切除所述裂解性病毒的整个病毒基因组。

45. 如权利要求39所述的方法,其中所述组合物被包括在载体中。

46. 如权利要求39所述的方法,其中所述裂解性病毒选自下组,该组由以下组成:甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、柯萨奇病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、轮状病毒、东南亚十二RNA病毒、科州蜚传热病毒、JC病毒和BK病毒。

47. 一种用于治疗溶原性病毒和裂解性病毒两者的方法,该方法包括以下步骤:

向具有溶原性病毒和裂解性病毒的个体施用如下组合物,该组合物包含编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器的分离的核酸,所述基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶、Argonaute内切核酸酶gDNA、C2c2、RNA酶P RNA及其组合;以及

灭活该溶原性病毒和裂解性病毒。

48. 如权利要求47所述的方法,其中所述CRISPR相关核酸酶选自下组,该组由以下组成:Cas9 gRNA和Cpf1 gRNA。

49. 如权利要求47所述的方法,其中所述灭活步骤包括清除病毒RNA的复制关键区段。

50. 如权利要求47所述的方法,其中所述灭活步骤包括从宿主细胞切除所述溶原性病毒和裂解性病毒的整个病毒基因组。

51. 如权利要求47所述的方法,其中所述组合物被包括在载体中。

52. 如权利要求47所述的方法,其中所述溶原性病毒和裂解性病毒选自下组,该组由以

下组成:甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、JC病毒和BK病毒。

53. 一种用于治疗裂解性病毒的方法,该方法包括以下步骤:

向具有裂解性病毒的个体施用如下组合物,该组合物包含分离的核酸,所述分离的核酸编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器以及靶向病毒RNA的成分;以及灭活该裂解性病毒。

54. 如权利要求53所述的方法,其中所述靶向病毒RNA的基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶和Argonaute内切核酸酶gDNA。

55. 如权利要求54所述的方法,其中所述CRISPR相关核酸酶选自下组,该组由以下组成:Cas9 gRNA和Cpf1 gRNA。

56. 如权利要求53所述的方法,其中该靶向病毒RNA的成分选自下组,该组由以下组成:sirRNA、miRNA、shRNA、RNAi、C2c2和RNA酶P RNA。

57. 如权利要求53所述的方法,其中所述灭活步骤包括清除病毒RNA的复制关键区段。

58. 如权利要求53所述的方法,其中所述灭活步骤包括从宿主细胞切除所述裂解性病毒的整个病毒基因组。

59. 如权利要求53所述的方法,其中所述组合物被包括在载体中。

60. 如权利要求53所述的方法,其中所述裂解性病毒选自下组,该组由以下组成:甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、柯萨奇病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、轮状病毒、东南亚十二RNA病毒、科州蜚传热病毒、JC病毒和BK病毒。

用于裂解性病毒和溶原性病毒的组合物和治疗方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于病毒的组合物和治疗方法。更具体地,本发明涉及用于从感染的宿主细胞切除病毒并灭活病毒的组合物和疗法。

背景技术

[0002] 病毒通过两个周期之一:裂解周期或溶原周期来复制。在裂解周期中,首先病毒穿透宿主细胞并释放其自身的核酸。接下来,宿主细胞的代谢机制用于复制病毒核酸并在宿主细胞内积聚该病毒。一旦在宿主细胞内产生足够的病毒粒子,则宿主细胞破裂(裂解)并且病毒粒子继续感染另外的细胞。裂解性病毒可以将病毒DNA整合到宿主基因组中并且是非整合型的,其中在细胞感染期间不发生裂解。

[0003] 裂解性病毒包括JC病毒(John Cunningham virus)(JCV)、甲型肝炎以及各种疱疹病毒。在溶原周期中,病毒粒子DNA被整合到宿主细胞中,并且当宿主细胞繁殖时,病毒粒子DNA被复制到从细胞分裂所得的细胞中。在溶原周期中,宿主细胞不会破裂。溶原性病毒包括乙型肝炎、寨卡病毒以及HIV。例如 λ 噬菌体等病毒可以在裂解周期和溶原周期之间切换。

[0004] Khalili等人的美国专利申请序列号14/838,057公开了一种通过如下方式使整合到被逆转录病毒潜伏感染的宿主细胞基因组中的前病毒DNA失活的方法:用包含规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR)相关内切核酸酶和两种或更多种不同指导RNA(gRNA)的组合物处理该宿主细胞(其中所述至少两种gRNA中的每一种与所述前病毒DNA的长末端重复序列(LTR)中的不同靶核酸序列互补);并且使该前病毒DNA失活。还提供了用于灭活前病毒DNA的组合物。虽然该方法和组合物可用于治疗已整合到宿主细胞基因组中的溶原性病毒,但基因编辑系统不能有效地治疗裂解性病毒。如果仅使用该系统,则治疗裂解性病毒将导致该病毒的低效率清除,除非抑制剂药物可用于抑制病毒表达,如在HIV的情况中。大多数病毒目前缺乏靶向性抑制剂药物。特别地,CRISPR相关核酸酶不能接近病毒粒子中含有的病毒核酸(即,被例如衣壳蛋白或包膜蛋白保护)。

[0005] 来自哈佛大学-麻省理工学院博德研究所(Broad Institute of MIT and Harvard)、麻省理工学院(Massachusetts Institute of Technology)、美国国立卫生研究院(National Institutes of Health)、罗格斯大学新布朗斯维克校区(Rutgers University-New Brunswick)和斯科尔科沃科学技术研究院(Skolkovo Institute of Science and Technology)的研究人员已经表征出了一种新的CRISPR系统,其靶向RNA而不是DNA。该方法有可能在与编辑RNA有关的细胞操作中开辟另外的途径。尽管DNA编辑对细胞基因组进行永久性改变,但基于CRISPR的RNA靶向方法可以允许可上调或下调的临时改变,并且具有比现有RNA干扰方法更高的特异性和功能性。具体而言,它可以解决RNA嵌入的病毒感染和导致的疾病。该研究报告了C2c2的鉴定和功能表征,C2c2是一种能够靶向和降解RNA的RNA指导酶。

[0006] 这些发现揭示,C2c2-这一于2015年10月被该协作小组发现的首个已被鉴定为仅靶向RNA的天然存在的CRISPR系统-有助于保护细菌免受病毒感染。他们证明C2c2可以被编

程以切割细菌细胞中的特定RNA序列,这将使其成为分子生物学工具箱的重要补充。C2c2的聚焦RNA的行动补充了CRISPR-Cas9系统,该系统靶向DNA,即细胞身份和功能的基因组蓝图。仅靶向RNA的能力(其有助于执行基因组指令)提供了以高通量方式特异性操纵RNA-并且更广泛地操纵基因功能的能力。这有可能加快了解、治疗和预防疾病的进程。

[0007] 因此,仍然需要一种能够靶向裂解性病毒以及溶原性病毒的治疗法。

发明内容

[0008] 本发明提供了一种用于治疗溶原性病毒的组合物,该组合物包括编码两种或更多种基因编辑器的分离的核酸,所述基因编辑器选自下组,该组由以下组成:靶向病毒DNA的基因编辑器、靶向病毒RNA的基因编辑器、及其组合。

[0009] 本发明还提供了一种用于治疗裂解性病毒的组合物,该组合物包括分离的核酸,所述分离的核酸编码至少一种靶向病毒DNA的基因编辑器以及靶向病毒RNA的成分。

[0010] 本发明还提供了一种用于治疗溶原性病毒和裂解性病毒两者的组合物,该组合物包括编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器的分离的核酸,所述基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶、Argonaute内切核酸酶gDNA、C2c2、RNA酶P RNA及其组合。

[0011] 本发明提供了一种用于治疗裂解性病毒的组合物,该组合物包括分离的核酸,所述分离的核酸编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器以及靶向RNA的成分。

[0012] 本发明提供了一种治疗溶原性病毒的方法,该方法通过以下步骤进行:向具有溶原性病毒的个体施用如下组合物,该组合物包含编码两种或更多种基因编辑器的分离的核酸,所述基因编辑器选自下组,该组由以下组成:靶向病毒DNA的基因编辑器、靶向病毒RNA的基因编辑器及其组合;以及灭活该溶原性病毒。

[0013] 本发明还提供了一种用于治疗裂解性病毒的方法,该方法包括向具有裂解性病毒的个体施用如下组合物,该组合物包含分离的核酸,所述分离的核酸编码至少一种靶向病毒DNA的基因编辑器以及靶向病毒RNA的成分;以及灭活该裂解性病毒。

[0014] 本发明还提供了一种用于治疗溶原性病毒和裂解性病毒两者的方法,该方法通过以下步骤进行:向具有溶原性病毒和裂解性病毒的个体施用如下组合物,该组合物包含编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器的分离的核酸,所述基因编辑器选自下组,该组由以下组成:CRISPR相关核酸酶、Argonaute内切核酸酶gDNA、C2c2、RNA酶P RNA及其组合;以及灭活该溶原性病毒和裂解性病毒。

[0015] 本发明提供了一种用于治疗裂解性病毒的方法,该方法通过以下步骤进行:向具有裂解性病毒的个体施用如下组合物,该组合物包含分离的核酸,所述分离的核酸编码两种或更多种靶向病毒RNA的基因编辑器以及靶向病毒RNA的成分;以及灭活该裂解性病毒。

附图说明

[0016] 在与以下附图结合考虑时,参照以下详细描述,会容易认识到也将更好地理解本发明的其他优点:

[0017] 图1是细胞内裂解性病毒和溶原性病毒,以及可以使用CRISPR Cas9的点和可以使用RNA靶向系统的点的图片。

具体实施方式

[0018] 本发明总体上涉及用于治疗溶原性病毒和裂解性病毒的组合物和方法。这些组合物可以治疗溶原性病毒和裂解性病毒,或任选地使用这两种复制方法的病毒。

[0019] 如本文所使用的,“溶原性病毒”是指通过溶原周期复制的病毒(即,不导致宿主细胞破裂并将病毒核酸整合到宿主细胞DNA中)。溶原性病毒能够主要通过溶原周期复制,但有时通过裂解周期复制。

[0020] 如本文所使用的,“裂解性病毒”是指通过裂解周期复制的病毒(即,在细胞内病毒积累后导致宿主细胞破裂)。裂解性病毒能够主要通过裂解周期复制,但有时通过溶原周期复制。

[0021] 如本文所使用的“gRNA”是指导RNA。本文CRISPR Cas9系统中的gRNA用于切除病毒基因组区段,并因此严重破坏病毒复制/产生蛋白质的能力。这通过使用两种或更多种特异性设计的gRNA来实现,以避免使用单个gRNA所见的问题,如病毒逃逸或突变。该gRNA可以是与编码序列或非编码序列互补的序列,并且可以针对靶向的特定病毒进行定制。该gRNA可以是与蛋白质编码序列互补的序列,例如编码一种或多种病毒结构蛋白(例如gag、pol、env和tat)的序列。该gRNA序列可以是正义或反义序列。

[0022] 如本文所使用的,“Argonaute蛋白”是指PIWI蛋白超家族的蛋白,其含有PIWI(P元件诱导的无用睾丸)结构域、MID(中间)结构域、PAZ(Piwi-Argonaute-Zwille)结构域和N末端结构域。Argonaute蛋白能够结合小RNA,如微小RNA、小干扰RNA(siRNA)和Piwi相互作用RNA。可以将Argonaute蛋白引导至具有这些RNA的靶序列以切割mRNA、抑制翻译或诱导靶序列中的mRNA降解。有几种不同的人类Argonaute蛋白,包括与小RNA相关的AGO1、AGO2、AGO3和AGO4。AGO2具有切片能力,即充当内切核酸酶。Argonaute蛋白可以用于基因编辑。来自Argonaute蛋白家族的内切核酸酶(来自格氏嗜盐碱杆菌(*Natronobacterium gregoryi*) Argonaute)也使用寡核苷酸作为降解侵入性基因组的指导。Gao等人的工作显示,格氏嗜盐碱杆菌Argonaute(NgAgo)是一种适用于人类细胞基因组编辑的DNA指导的内切核酸酶。NgAgo与约24个核苷酸的5'磷酸化单链指导DNA(gDNA)结合,当装载gDNA时有效地产生位点特异性DNA双链断裂。与Cas9一样,NgAgo-gDNA系统不需要原型间隔子邻近基序(PAM),并且初步表征表明指导靶标错配的低耐受性和对编辑(G+C)丰富的基因组靶标的高效性。本发明中使用的Argonaute蛋白内切核酸酶也可以是类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*) Argonaute(RsArgo)。RsArgo可以提供与靶DNA链和指导RNA的稳定相互作用,因为它能够在N末端和PIWI结构域之间在指导RNA的3'区中保持碱基配对。RsArgo还能够特异性识别指导RNA的5'碱基-U,并且PAZ结构域与指导RNA的双链体识别环在DNA沉默活性中可能是重要的。其他原核Argonaute蛋白(pAgos)也可用于DNA干扰和切割。Argonaute蛋白可以源自拟南芥、果蝇、嗜热菌(*Aquifex aeolicus*)、极端嗜热菌(*Thermus thermophilus*)、强烈火球菌(*Pyrococcus furiosus*)、极端嗜热菌JL-18、极端嗜热菌菌株HB27、嗜热菌菌株VF5、闪烁古生球菌(*Archaeoglobus fulgidus*)、好热黄无氧芽孢菌(*Anoxybacillus flavithermus*)、伯林盐几何菌(*Halogeometricum borinquense*)、铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)、巴氏梭菌(*Clostridium bartlettii*)、嗜冷嗜盐菌(*Halorubrum lacusprofundi*)、细长嗜热聚球藻(*Thermosynechococcus elongatus*)、和细

长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*)。还可以使用Argonaute蛋白,它们在内切核酸溶解方面无活性,但是可以对保守的催化残基进行翻译后修饰以将它们作为内切核酸酶进行激活。

[0023] 人WRN是由维尔纳综合征基因编码的RecQ解旋酶。它涉及基因组维护,包括复制、重组、切除修复和DNA损伤应答。这些遗传过程和WRN的表达在许多类型的癌症中同时上调。因此,有人提出,该解旋酶的靶向破坏可用于消除癌细胞。报告已经应用外部指导序列(EGS)方法指导RNA酶P RNA有效切割培养的人细胞系中的WRN mRNA,从而消除了这种独特的3'-5'DNA解旋酶-核酸酶的翻译和活性。RNA酶P RNA是用于本发明的另一种潜在的内切核酸酶。

[0024] 如本文所使用的,“C2c2”是指揭示RNA指导的RNA酶功能的2类VI-A型CRISPR-Cas效应子。C2c2是第一个仅靶向RNA的天然存在的CRISPR系统。C2c2来自细菌沙氏纤毛菌(*Leptotrichia shahii*),并提供对RNA噬菌体的干扰。体外生化分析显示C2c2由单个crRNA指导,并且可以被编程以切割携带互补原型间隔子的ssRNA靶标。在细菌中,C2c2可以被编程以敲低特定的mRNA。切割由两个保守的HEPN结构域中的催化残基介导,其中的突变产生催化失活的RNA结合蛋白。这些结果证明了C2c2作为新的RNA靶向工具的能力。C2c2的聚焦RNA的行动补充了CRISPR-Cas9系统,该系统靶向DNA,即细胞身份和功能的基因组蓝图。仅靶向RNA的能力(其有助于执行基因组指令)提供了以高通量方式特异性操纵RNA-并且更广泛地操纵基因功能的能力。因此,C2c2可用于本文所述的组合物中。

[0025] 如本文所使用的“核酸”是指RNA和DNA二者,包括cDNA、基因组DNA、合成DNA和含有核酸类似物的DNA(或RNA),以上中的任何一种可以编码本发明的多肽,并且以上所有都包含在本发明中。多核苷酸可以具有基本上任何三维结构。核酸可以是双链或单链的(即,正义链或反义链)。多核苷酸的非限制性实例包括基因、基因片段、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)及其部分、转移RNA、核糖体RNA、siRNA、微小RNA、短发夹RNA(shRNA)、干扰RNA(RNAi)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、支化型多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物,以及核酸类似物。在本发明的上下文中,核酸可以编码天然存在的Cas9的片段或其生物活性变体和至少两种gRNA,其中这些gRNA与病毒中的序列互补。

[0026] “分离的”核酸可以是例如天然存在的DNA分子或其片段,其条件是通常发现在天然存在的基因组中紧密侧接该DNA分子的核酸序列中的至少一个被去除或不存在。因此,分离的核酸包括但不限于作为单独的分子存在的DNA分子,不依赖于其他序列(例如化学合成的核酸,或由聚合酶链式反应(PCR)或限制性内切核酸酶处理产生的cDNA或基因组DNA片段)。分离的核酸还指被整合到载体、自主复制性质粒、病毒中或者原核生物或真核生物的基因组DNA中的DNA分子。另外,分离的核酸可以包括工程化的核酸,例如作为杂交体或融合核酸的一部分的DNA分子。存在于例如cDNA文库或基因组文库中的或含有基因组DNA限制性消化的凝胶切片中的许多(例如数十或数百至数百万)其他核酸不是分离的核酸。

[0027] 分离的核酸分子可以通过标准技术生产。例如,聚合酶链式反应(PCR)技术可用于获得含有本文所述核苷酸序列(包括编码本文所述多肽的核苷酸序列)的分离的核酸。PCR可用于扩增来自DNA以及RNA的特定序列,包括来自总基因组DNA或总细胞RNA的序列。各种PCR方法描述于例如PCR Primer:A Laboratory Manual[PCR引物:实验室手册],

Dieffenbach和Dveksler编辑,Cold Spring Harbor Laboratory press[冷泉港实验室出版社],1995中。通常,来自目的区域的末端或更远端的序列信息被用来设计与待扩增的模板的相反链的序列相同或相似的寡核苷酸引物。各种PCR策略也可用于将位点特异性核苷酸序列修饰引入模板核酸中。

[0028] 分离的核酸也可以是化学合成的,作为单个核酸分子(例如,使用亚磷酰胺技术在3'至5'方向使用自动化DNA合成)或作为一系列寡核苷酸。例如,可以合成含有所需序列的一对或多对长寡核苷酸(例如,>50-100个核苷酸),其中每对含有具有互补性的短区段(例如约15个核苷酸),使得寡核苷酸对退火时形成双链体。使用DNA聚合酶来延伸寡核苷酸,产生单个双链核酸分子/寡核苷酸对,然后可以将其连接到载体中。本发明的分离的核酸也可以通过诱变例如编码Cas9的DNA的天然存在部分(根据例如上式)而获得。

[0029] 如本文所使用的“CRISPR Cas9”是指规律间隔成簇短回文重复序列(CRISPR)相关内切核酸酶Cas9。在细菌中,CRISPR/Cas基因座编码针对移动遗传元件(病毒、转座元件和接合质粒)的RNA指导的适应性免疫系统。已经鉴定了三种类型(I-III)的CRISPR系统。CRISPR簇包含间隔子,即与先前的移动元件互补的序列。CRISPR簇被转录并加工成成熟的CRISPR(成簇规则间隔短回文重复序列)RNA(crRNA)。CRISPR相关内切核酸酶Cas9属于II型CRISPR/Cas系统,并具有强的切割靶DNA的内切核酸酶活性。Cas9由成熟的crRNA(其包含约20个碱基对(bp)的独特靶序列(称为间隔子))和反式激活的小RNA(tracrRNA)(其可用作前crRNA的核糖核酸酶III辅助的加工的指导)指导。crRNA:tracrRNA双链体通过crRNA上的间隔子和靶DNA上的互补序列(称为原型间隔子)之间的互补碱基配对,指导Cas9靶向DNA。Cas9识别三核苷酸(NGG)原型间隔子相邻基序(PAM)以指定切割位点(来自PAM的第3核苷酸)。crRNA和tracrRNA可以单独表达或通过合成的茎环(AGAAAU)工程化到人工融合小指导RNA(sgRNA)中以模拟天然crRNA/tracrRNA双链体。这种sgRNA,如shRNA,可被合成或体外转录用于直接RNA转染或者从U6或H1促进的RNA表达载体表达,尽管人工sgRNA的切割效率低于具有单独表达的crRNA和tracrRNA的系统的切割效率。可用于本发明中的几种cas9变体示于下表1中。

[0030] 表1

[0031]

变体 编号	四个丙氨酸取代突变体 (与 WT Cas9 相比)	测试的 *
1	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A	是
2	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + D1135E	是
3	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + L169A	是
4	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + Y450A	是
5	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + M495A	预测的
6	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + M694A	预测的
7	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + H698A	预测的
8	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + D1135E + L169A	预测的
9	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + D1135E + Y450A	预测的
10	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + D1135E + M495A	预测的

[0032]

11	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + D1135E + M694A	预测的
12	SpCas9 N497A, R661A, Q695A, Q926A + D1135E + M698A	预测的
	三个丙氨酸取代突变体 (与 WT Cas9 相比)	测试的 *
13	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A	否 (仅中靶)
14	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + D1135E	预测的
15	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + L169A	预测的
16	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + Y450A	预测的
17	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + M495A	预测的
18	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + M694A	预测的
19	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + H698A	预测的
20	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + D1135E + L169A	预测的
21	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + D1135E + Y450A	预测的
22	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + D1135E + M495A	预测的
23	SpCas9 R661A, Q695A, Q926A + D1135E + M694A	预测的

[0033] CRISPR/Cpf1是一种类似于CRISPR/Cas9系统的DNA编辑技术,由博德研究所和麻省理工学院的张锋(Feng Zhang)小组于2015年表征。Cpf1是II类CRISPR/Cas系统的RNA指导型内切核酸酶。这种获得性免疫机制见于普雷沃菌属(*Prevotella*)和弗朗西丝氏菌属(*Francisella*)细菌中。它可以防止病毒对基因的伤害。Cpf1基因与CRISPR基因座相关联,编码使用指导RNA来发现和切割病毒DNA的内切核酸酶。Cpf1是一种比Cas9更小更简单的内切核酸酶,克服了CRISPR/Cas9系统的一些局限性。CRISPR/Cpf1可以具有多种应用,包括遗传性疾病和退行性病症的治疗。

[0034] Cas9核酸酶可以具有与野生型酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)序列相同的核苷酸序列。在一些实施例中,CRISPR相关内切核酸酶可以是来自其他物种的序列,例如其他链球菌属(*Streptococcus*)物种,例如嗜热链球菌;铜绿假单胞菌(*Pseudomonas*)

aeruginosa), 大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 或其他经测序的细菌基因组和古细菌, 或其他原核微生物。可替代地, 可以修饰野生型酿脓链球菌Cas9序列。可以对核酸序列进行密码子优化以在哺乳动物细胞中有效表达, 即“人源化”。人源化Cas9核酸酶序列可以是例如由Genbank登录号KM099231.1GI:669193757; KM099232.1GI:669193761; 或KM099233.1GI:669193765中列出的任何表达载体编码的Cas9核酸酶序列。可替代地, Cas9核酸酶序列可以是例如包含在可商购载体例如来自Addgene公司(剑桥, 马萨诸塞州)的PX330或PX260内的序列。在一些实施例中, Cas9内切核酸酶可以具有氨基酸序列, 所述的氨基酸序列是Genbank登录号KM099231.1GI:669193757; KM099232.1GI:669193761; 或KM099233.1GI:669193765的任何Cas9内切核酸酶序列的变体或片段, 或是PX330或PX260 (Addgene公司, 剑桥, 马萨诸塞州)的Cas9氨基酸序列。可以修饰Cas9核苷酸序列以编码Cas9的生物活性变体, 并且这些变体可以具有或可以包含例如由于含有一个或多个突变(例如, 添加、缺失或取代突变、或这些突变的组合)而不同于野生型Cas9的氨基酸序列。这些取代突变中的一个或多个可以是取代(例如, 保守的氨基酸取代)。例如, Cas9多肽的生物活性变体可以具有与野生型Cas9多肽具有至少或约50%序列同一性(例如, 至少或约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%或99%序列同一性)的氨基酸序列。保守性氨基酸取代典型地包括在下组内的取代: 甘氨酸和丙氨酸; 缬氨酸、异亮氨酸和亮氨酸; 天冬氨酸和谷氨酸; 天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸和苏氨酸; 赖氨酸、组氨酸和精氨酸; 以及苯丙氨酸和酪氨酸。Cas9氨基酸序列中的氨基酸残基可以是非天然存在的氨基酸残基。天然存在的氨基酸残基包括由遗传密码天然编码的氨基酸残基以及非标准氨基酸(例如具有D-构型而不是L-构型的氨基酸)。本发明的肽还可以包括是标准残基的修饰版本的氨基酸残基(例如吡咯赖氨酸可以用来代替赖氨酸, 以及硒代半胱氨酸可以用来代替半胱氨酸)。非天然存在的氨基酸残基是那些在自然界中未被发现, 但符合氨基酸的基本化学式并可以掺入肽中的氨基酸残基。这些包括D-别异亮氨酸(2R, 3S)-2-氨基-3-甲基戊酸和L-环戊基甘氨酸(S)-2-氨基-2-环戊基乙酸。对于其他实例, 可以查阅教科书或浏览万维网(该网站目前由加利福尼亚理工学院维护并显示已经成功掺入功能性蛋白质中的非天然氨基酸的结构)。

[0035] 尽管RNA指导的内切核酸酶Cas9已经成为一种通用的基因组编辑平台, 但有些人已经报道, 常用的来自酿脓链球菌 (*SpCas9*) 的Cas9的大小限制了其用于基础研究和高度通用的腺相关病毒 (AAV) 递送媒介物的治疗应用的效用。因此, 已经使用了六个较小的Cas9直系同源物, 并且报道已显示来自金黄色葡萄球菌的Cas9 (*SaCas9*) 可以编辑基因组, 其效率类似于*SpCas9*, 但是比它短了多于1千碱基。

[0036] Cas9核酸酶序列可以是突变序列。例如, Cas9核酸酶可以在保守的HNH和RuvC结构域中突变, 所述结构域参与链特异性切割。例如, RuvC催化结构域中的天冬氨酸-丙氨酸(D10A)突变允许Cas9切口酶突变体(Cas9n)使DNA产生缺口而不是切割DNA, 以产生单链断裂, 并且随后通过HDR进行的优先修复可以潜在地减少不希望的来自脱靶双链断裂的indel突变的频率。

[0037] 本发明提供了一种用于治疗溶原性病毒(出芽性病毒)的组合物, 该组合物包括两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA以及其他的靶向病毒DNA的基因编辑器和靶向病毒RNA的基因编辑器(例如C2c2或RNA酶P RNA)。优

选地,该组合物包括编码CRISPR相关内切核酸酶(Cas9)的分离的核酸和与溶原性病毒中的靶序列互补的两种或更多种gRNA。每个gRNA可以与溶原性病毒内的不同序列互补。该组合物通过清除在基因组本身内的病毒基因组(DNA)的复制关键区段(或使用RNA编辑器如C2c2清除RNA)和使用RNA编辑器如C2c2清除翻译产物来灭活病毒。最优选地,可以从感染病毒的宿主细胞中切除整个病毒基因组来灭活病毒。可替代地,可以在病毒的基因组中进行添加、缺失或突变。该组合物可任选地包括靶向DNA的其他CRISPR或基因编辑系统。gRNA设计为安全性最佳,不会产生脱靶效应,并且也不会导致病毒逃逸。该组合物可以治疗下表中表明具有溶原复制周期的任何病毒,并且对逆转录病毒(甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB(Epstein-Barr)病毒、水痘带状疱疹病毒(Varicella Zoster virus)、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒(Rous Sarcoma virus)、HPV病毒、黄热病病毒、寨卡病毒(zika)、登革热病毒(dengue)、西尼罗河病毒(West Nile)、日本脑炎病毒(Japanese encephalitis)、狂犬病病毒、水泡性病毒、细胞质弹状病毒(cytorhabdovirus)、汉坦病毒(Hantaan virus)、裂谷热病毒(Rift Valley virus)、布尼奥罗病毒(Bunyamwera virus)、拉沙病毒(Lassa virus)、胡宁病毒(Junin virus)、马邱波病毒(Machupo virus)、萨比亚病毒(Sabia virus)、塔卡里伯病毒(Tacaribe virus)、弗莱克索病毒(Flexal virus)、怀特沃特阿罗约病毒(Whitewater Arroyo virus)、埃博拉病毒、马尔堡病毒(Marburg virus)、JC病毒、以及BK病毒)特别有用。该组合物可通过载体或如下所述的任何其他方法递送。

[0038] 本发明还提供了一种用于治疗裂解性病毒的组合物,该组合物包括两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA和靶向病毒DNA基因组的其他基因编辑器(用于切除溶原性病毒中的病毒基因)以及靶向病毒RNA的成分,其是1)靶向关键RNA(病毒mRNA)的小干扰RNA(siRNA)/微小RNA(miRNA)、短发夹RNA、或干扰RNA(RNAi)(用于RNA干扰),这些关键RNA翻译涉及病毒蛋白和/或病毒粒子的形成的(非编码或编码)病毒蛋白,或2)CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA或靶向RNA(病毒mRNA)的其他的基因编辑器,例如C2c2,所述病毒mRNA翻译涉及病毒粒子的形成的(非编码或编码)病毒蛋白。优选地,该组合物包括编码CRISPR相关内切核酸酶(Cas9)的分离的核酸、与病毒中的靶DNA序列互补的两种或更多种gRNA、以及siRNA/miRNA/shRNA/RNAi或CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA和与病毒中的靶RNA序列互补的其他基因编辑器。每个gRNA可以与病毒内的不同序列互补。该组合物可另外地包括靶向病毒DNA基因组并切除那些基因组的区段的任何其他CRISPR或基因编辑系统。该共同治疗剂可用于治疗单独Cas9系统不能治疗的裂解性病毒感染的个体。如图1所示,需要以不同方式治疗裂解性病毒和溶原性病毒。虽然CRISPR Cas9通常用于靶向DNA,但是该基因编辑系统可以设计为靶向病毒内的RNA从而靶向裂解性病毒。例如,Nelles等人(Cell[细胞],第165卷,第2期,第488页-第496页,2016年4月7日)示出靶向RNA的Cas9能够结合mRNA。这种组合物可以靶向下表中列出的任何裂解性病毒(甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、柯萨奇病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、轮状病毒、东南亚十二RNA病毒(seadornavirus)、科州蜚传热病毒(coltivirus)、JC病毒和BK病毒)。该组合物可通过载体或如下所述的任何其他方法递送。

[0039] 本文组合物中的siRNA和C2c2靶向病毒或基因mRNA中的特定基因。siRNA可以具有与病毒基因或基因mRNA序列的一部分的核苷酸序列基本相同的双链体的第一条链。siRNA双链体的第二条链与siRNA双链体的第一条链和病毒基因mRNA的相同部分互补。分离的siRNA可包括长度为约17个核苷酸至约29个核苷酸,优选地长度为约19个至约25个核苷酸的短双链RNA,其靶向靶mRNA。该siRNA包含通过标准沃森-克里克碱基配对相互作用一起退火的有义RNA链和互补反义RNA链。有义链包含与靶mRNA中含有的靶序列基本相同的核酸序列。可以使用本领域技术人员已知的许多技术获得本发明的siRNA。例如,可以使用本领域已知的方法化学合成或重组产生siRNA,例如Tuschl等人的美国公开申请2002/0086356中描述的果蝇体外系统,将该公开申请的全部公开内容通过引用并入本文。优选地,使用适当保护的核糖核苷亚磷酸胺和常规DNA/RNA合成仪化学合成本发明的siRNA。siRNA可以合成为两个独立的互补RNA分子、或具有两个互补区域的单个RNA分子。合成的RNA分子或合成试剂的商业供应商包括Proligo公司(汉堡,德国)、Dharmacon研究公司(Dharmacon Research)(拉斐特,科罗拉多州,美国)、皮尔斯化学公司(Pierce Chemical)(Perbio科学公司(Perbio Science)的一部分,罗克福德,伊利诺伊州,每个)、格伦研究公司(Glen Research)(斯特林,弗吉尼亚州,美国)、ChemGenes公司(阿什兰,马萨诸塞州,美国)和Cruachem公司(格拉斯哥,英国)。可替代地,也可以使用任何合适的启动子从重组环状或线状DNA质粒表达siRNA。用于由质粒表达本发明的siRNA的合适启动子包括例如U6或H1RNA pol III启动子序列和巨细胞病毒启动子。在本领域技术范围内选择其他合适的启动子。本发明的重组质粒还可以包含可诱导的或可调节的启动子,用于在特定组织或特定细胞内环境中表达siRNA。由重组质粒表达的siRNA可以通过标准技术从培养的细胞表达系统中分离,或者可以在细胞内表达。本发明的siRNA可以作为两个单独的互补RNA分子,或者作为具有两个互补区域的单个RNA分子由重组质粒表达。可以如本文所述使用各种载体或质粒。例如,siRNA可用于靶向JC病毒、BKV或SV40多瘤病毒(美国专利申请公开号2007/0249552, Khalili等人),其中使用靶向JCV agnoprotein基因或大T抗原基因mRNA的siRNA,并且其中有义RNA链包含与agnoprotein基因或大T抗原基因mRNA中约19个至约25个连续核苷酸的靶序列基本相同的核苷酸序列。

[0040] 本发明还提供了一种用于治疗溶原性病毒和裂解性病毒两者的组合物,该组合物包括两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonate内切核酸酶gDNA、C2c2和靶向病毒RNA的其他基因编辑器(C2c2或RNA酶P RNA)。优选地,该组合物包括编码CRISPR相关内切核酸酶(Cas9)的分离的核酸和与病毒中的靶RNA序列互补的两种或更多种gRNA。每个gRNA可以与病毒内的不同序列互补。该组合物可另外地包括靶向病毒RNA基因组并切除那些基因组的区段的任何其他CRISPR或基因编辑系统。该组合物可以靶向具有溶原复制和裂解复制的病毒,如以下各表中所列(甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、丁型肝炎病毒、HSV-1、HSV-2、巨细胞病毒、EB病毒、水痘带状疱疹病毒、HIV1、HIV2、HTLV1、HTLV2、劳斯氏肉瘤病毒、JC病毒和BK病毒)。该组合物可通过载体或如下所述的任何其他方法递送。

[0041] 本发明提供了一种用于治疗裂解性病毒的组合物,该组合物包括两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonate内切核酸酶gDNA和其他基因编辑器以及靶向关键RNA(病毒mRNA)的siRNA/miRNA/shRNA/RNAi(RNA干扰),这些关键RNA翻译涉及病毒蛋白和/或病毒粒子的形成的(非编码或编码)病毒蛋白。优选地,该组合物包括编码

CRISPR相关内切核酸酶(Cas9)的分离的核酸和与裂解性病毒中的靶RNA序列互补的两种或更多种gRNA。每个gRNA可以与裂解性病毒内的不同序列互补。该组合物可任选地包括靶向病毒RNA基因组并切除那些基因组的区段的其他CRISPR或基因编辑系统用于破坏裂解性病毒。该组合物可通过载体或如下所述的任何其他方法递送。

[0042] 本发明的组合物和方法可以靶向各种病毒。可以适当地使用不同的组合物和方法,这取决于这些病毒是裂解性的还是溶原性的。

[0043] 表2列出了小核糖核酸病毒科/肝炎病毒科/黄病毒科的病毒以及它们的复制方法。

[0044] 表2

[0045]

甲型肝炎	+ssRNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
乙型肝炎	dsDNA-RT病毒基因组	溶原复制周期
丙型肝炎	+ssRNA病毒基因组	裂解复制周期
丁型肝炎	-ssRNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
戊型肝炎	+ssRNA病毒基因组	
柯萨奇病毒		裂解复制周期

[0046] 应该注意的是,丁型肝炎病毒仅在乙型肝炎病毒存在下繁殖,因此,特别有用于治疗丁型肝炎的组合物是也靶向乙型肝炎的那种,例如两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA和治疗溶原性病毒的其他基因编辑器以及治疗裂解性病毒的siRNA/miRNA/shRNA/RNAi。

[0047] 表3列出了疱疹病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0048] 表3

[0049]

HSV-1 (HHV1)	dsDNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
HSV-2 (HHV2)	dsDNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
巨细胞病毒 (HHV5)	dsDNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
EB病毒 (HHV4)	dsDNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
水痘带状疱疹病毒 (HHV3)	dsDNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
玫瑰疱疹病毒 (HHV6A/B)		
HHV7		
HHV8		

[0050] 表4列出了正粘病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0051] 表4

[0052]

甲、乙、丙、丁型流感	-ssRNA病毒基因组	
------------	-------------	--

[0053] 表5列出了逆转录病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0054] 表5

[0055]

HIV1和HIV2	+ssRNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
-----------	-------------	-----------

HTLV1和HTLV2	+ssRNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期
劳斯氏肉瘤病毒	+ssRNA病毒基因组	裂解/溶原复制周期

[0056] 表6列出了乳头瘤病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0057] 表6

[0058]

HPV家族	dsDNA病毒基因组	从脱落细胞出芽(半溶原性的)
-------	------------	----------------

[0059] 表7列出了黄病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0060] 表7

[0061]

黄热病	+ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
寨卡病毒	+ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
登革热病毒	+ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
西尼罗河病毒	+ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
日本脑炎病毒	+ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制

[0062] 表8列出了呼肠孤病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0063] 表8

[0064]

轮状病毒	dsRNA 病毒基因组	裂解复制周期
东南亚十二 RNA 病毒 (Seadornavirus)	dsRNA 病毒基因组	裂解复制周期
科州婢传热病毒 (Coltivirus)	dsRNA 病毒基因组	裂解复制周期

[0065] 表9列出了弹状病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0066] 表9

[0067]

狂犬病病毒(狂犬病)	-ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
水泡性病毒	-ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
细胞质弹状病毒	-ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制

[0068] 表10列出了布尼亚病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0069] 表10

[0070]

汉坦病毒	三联的-ssRNA 病毒基因组	出芽复制/溶原复制
裂谷热病毒	三联的-ssRNA 病毒基因组	出芽复制/溶原复制

[0071]

布尼奥罗病毒	三联的-ssRNA 病毒基因组	出芽复制/溶原复制
--------	-----------------	-----------

[0072] 表11列出了砂粒病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0073] 表11

[0074]

拉沙病毒	ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
胡宁病毒	ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
马邱波病毒	ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
萨比亚病毒	ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
塔卡里伯病毒	ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
弗莱克索病毒	ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
怀特沃特阿罗约病毒	ssRNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制

[0075] 表12列出了丝状病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0076] 表12

[0077]

埃博拉病毒	RNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制
马尔堡病毒	RNA病毒基因组	出芽复制/溶原复制

[0078] 表13列出了多瘤病毒科中的病毒以及它们的复制方法。

[0079] 表13

[0080]

JC病毒	dsDNA环状病毒基因组	裂解/溶原复制周期
BK病毒	dsDNA环状病毒基因组	裂解/溶原复制周期

[0081] 本发明的组合物可用于治疗活性或潜伏性病毒。本发明的组合物可用于治疗其中存在潜伏病毒但个体尚未表现出病毒症状的个体。这些组合物可以在个体的任何细胞中靶向病毒，例如但不限于：CD4+淋巴细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、单核细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、自然杀伤细胞、树突细胞（如朗格汉斯细胞和滤泡树突状细胞）、造血干细胞、内皮细胞、脑小胶质细胞和胃肠上皮细胞。

[0082] 在本发明中，当这些组合物中的任一个作为核酸施用或包含在表达载体内时，CRISPR内切核酸酶可以由与gRNA序列相同的核酸或载体编码。可替代地或另外地，CRISPR内切核酸酶可以在来自gRNA序列的物理分离的核酸中或在单独的载体中编码。

[0083] 还提供了含有例如本文所述的那些核酸的载体。“载体”是复制子，例如质粒、噬菌体或粘粒，向其中可插入另一个DNA片段以引起插入片段的复制。通常，载体在与适当控制元件缔合时能够复制。合适的载体骨架包括例如本领域常规使用的那些，例如质粒、病毒、人造染色体、BAC、YAC或PAC。术语“载体”包括克隆和表达载体，以及病毒载体和整合载体。“表达载体”是包含调控区域的载体。多种宿主/表达载体组合可用于表达本文所述的核酸序列。合适的表达载体包括但不限于衍生自例如噬菌体、杆状病毒和逆转录病毒的质粒和病毒载体。许多载体和表达系统可从诺瓦根公司 (Novagen) (麦迪逊, 威斯康辛州)、克隆科技公司 (Clontech) (帕洛阿尔托, 加利福尼亚州)、斯图特基因公司 (Stratagene) (拉荷亚,

加利福尼亚州)和英杰公司/生命技术公司(卡尔斯巴德,加利福尼亚州)等公司商购。

[0084] 本文提供的载体还可以包括例如复制起点、支架附着区(SAR)和/或标记。标记基因可赋予宿主细胞可选择的表型。例如,标记可赋予杀生物剂抗性,例如对抗生素(例如卡那霉素、G418、博来霉素或潮霉素)的抗性。如上所指出,表达载体可以包括标签序列,该标签序列被设计成促进表达的多肽的操作或检测(例如纯化或定位)。标签序列,例如绿色荧光蛋白(GFP)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)、多组氨酸、c-myc、血凝素或Flag™标签(柯达公司,纽黑文,康涅狄格州)序列通常表达为与编码的多肽的融合体。这样的标签可以插入多肽内的任何位置,包括羧基或氨基末端处。

[0085] 另外的表达载体也可以包括例如染色体的、非染色体的和合成的DNA序列的区段。合适的载体包括SV40的衍生物和已知细菌质粒,例如大肠杆菌质粒co1 E1、pCR1、pBR322、pMa1-C2、pET、pGEX、pMB9及其衍生物,质粒例如RP4;噬菌体DNA,例如噬菌体1的众多衍生物,例如NM989,以及其他噬菌体DNA,例如M13和丝状单链噬菌体DNA;酵母质粒例如2μ质粒或其衍生物;在真核细胞中有用的载体,例如在昆虫或哺乳动物细胞中有用的载体;衍生自质粒和噬菌体DNA组合的载体,例如已修饰为采用噬菌体DNA或其他表达控制序列的质粒。

[0086] 还可以使用酵母表达系统。根据本发明可以采用例如,非融合pYES2载体(XbaI、SphI、ShoI、NotI、GstXI、EcoRI、BstXI、BamHI、SacI、KpnI、和HindIII克隆位点;英杰公司)或融合pYESHisA、B、C(XbaI、SphI、ShoI、NotI、BstXI、EcoRI、BamHI、SacI、KpnI、和HindIII克隆位点,用ProBond树脂纯化的并用肠激酶切割的N-末端肽;英杰公司),仅提及两种。根据本发明也可以制备酵母双杂交表达系统。

[0087] 该载体还可以包括调控区域。术语“调控区域”是指影响转录或翻译起始和速率以及转录或翻译产物的稳定性和/或移动性的核苷酸序列。调控区域包括但不限于启动子序列、增强子序列、应答元件、蛋白质识别位点、诱导型元件、蛋白质结合序列、5'和3'非翻译区(UTR)、转录起始位点、终止序列、聚腺苷酸化序列、核定位信号和内含子。

[0088] 如本文所使用的,术语“有效地连接”是指将调控区域和待转录的序列定位在核酸中以影响这种序列的转录或翻译。例如,为了使编码序列处于启动子的控制之下,多肽的翻译阅读框的翻译起始位点通常位于启动子下游一个至约五十个核苷酸之间。然而,启动子可位于翻译起始位点上游约5,000个核苷酸处或转录起始位点上游约2,000个核苷酸处。启动子通常包含至少一个核心(基础)启动子。启动子还可以包括至少一个控制元件,例如增强子序列、上游元件或上游活化区域(UAR)。待包括的启动子的选择取决于几个因素,包括但不限于效率、可选择性、可诱导性、期望的表达水平以及细胞或组织优先表达。本领域技术人员通过适当选择和定位相对于编码序列的启动子和其他调控区域来调节编码序列的表达是常规问题。

[0089] 载体包括例如病毒载体(例如腺病毒(“Ad”)、腺相关病毒(AAV)、以及水泡性口炎病毒(VSV)和逆转录病毒)、脂质体和其他含脂质的复合物,以及其他能够介导多核苷酸到宿主细胞的递送的大分子复合物。载体还可以包含进一步调节基因递送和/或基因表达或者以其他方式对靶细胞提供有益特性的其他组分或功能性。如以下所述以及更详细所示,这样的其他组分包括,例如,影响与细胞结合或靶向的组分(包括介导细胞型或组织特异性结合的组分);影响细胞吸收载体核酸的组分;影响吸收后多核苷酸在细胞内的定位的组分(例如介导核定位的试剂);和影响多核苷酸表达的组分。此种组分还可能包括标记物,例如

可以用来检测或选择细胞的可检测和/或可选择的标记物,这些细胞已经摄取并且正在表达由该载体递送的核酸。此类组分可以作为载体(例如使用某些具有或介导结合以及摄取的组分或功能性的病毒载体)的自然特征而提供,或者载体可以被改性为提供此种功能性。其他载体包括例如由Chen等人,BioTechniques[生物技术],34:167-171(2003)描述的那些。大量的不同的此类载体是在本领域中已知的,并且总体上是可得的。

[0090] “重组病毒载体”是指包含一种或多种异源基因产物或序列的病毒载体。由于许多病毒载体表现出与包装(packaging)相关的尺寸限制,所以这些异源基因产物或序列典型地通过替代该病毒基因组的一个或多个部分而引入。此种病毒可能变成复制缺陷型的,从而要求在病毒的复制和包封过程中以反式提供一种或多种删除功能(通过使用,例如一种带复制和/或包封所必须的基因产物的辅助病毒或包装细胞系)。已经对其中在病毒颗粒外面上携带有待递送的多核苷酸的改性病毒载体进行了描述(参见,例如Curiel,D T等人,PNAS 88:8850-8854,1991)。

[0091] 适合的核酸递送系统包括重组病毒载体,典型地是来自腺病毒、腺病毒相关病毒(AAV)、依赖辅助病毒的腺病毒、逆转录病毒、或日本脂质体(HVJ)复合物的血凝病毒中至少一种的序列。在这样的情况中,该病毒载体包含有效地连接到该多核苷酸上的强真核启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子。重组病毒载体可以在其中包含一个或多个多核苷酸,优选约一个多核苷酸。在一些实施例中,在本发明的方法中所使用的病毒载体具有从约 10^8 至约 5×10^{10} pfu的pfu(斑形成单位)。在其中多核苷酸与一种非病毒载体一起施用的实施例中,使用从约0.1纳克至约4000微克经常是有用的,例如约1纳克至约100微克。

[0092] 另外的载体包括病毒载体、融合蛋白和化学缀合物。逆转录病毒载体包括莫洛尼鼠白血病病毒以及基于HIV的病毒。一种基于HIV的病毒载体包括至少两种载体,其中gag和pol基因来自HIV基因组并且env基因来自另一种病毒。DNA病毒载体包括痘病毒载体,例如正痘病毒或禽痘病毒载体;疱疹病毒载体,例如单纯疱疹病毒I(HSV)载体[Geller,A.I.等人,J.Neurochem[神经化学杂志],64:487(1995);Lim,F.等人,DNA Cloning:Mammalian Systems[DNA克隆:哺乳动物系统],D.Glover编辑(Oxford Univ.Press,Oxford England[牛津大学出版社,英格兰牛津])(1995);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci.:U.S.A.[美国国家科学院院刊]:90 7603(1993);Geller,A.I.等人,Proc Natl.Acad.Sci USA[美国国家科学院院刊]:87:1149(1990)];腺病毒载体[LeGal LaSalle等人,Science[科学],259:988(1993);Davidson等人,Nat.Genet.[自然基因学]3:219(1993);Yang等人,J.Virol.[病毒学杂志]69:2004(1995)];以及腺相关病毒载体[Kaplitt,M.G.等人,Nat.Genet.[自然遗传学]8:148(1994)]。

[0093] 痘病毒载体可将基因导入到细胞质内。禽痘病毒载体只产生核酸的短期表达。腺病毒载体、腺相关病毒载体以及单纯疱疹病毒(HSV)载体可以是一些发明实施例的指示。腺病毒载体导致了比腺相关病毒更短期的表达(例如,小于约一个月),在一些实施例中可以显示远远更长的表达。所选择的具体载体将取决于靶细胞以及正在治疗的病况。适当的启动子的选择可以很容易地完成。适合的启动子的一个实例是763-碱基对巨细胞病毒(CMV)启动子。可用于基因表达的其他合适的启动子包括但不限于劳斯氏肉瘤病毒(RSV)(Davis等人,Hum Gene Ther[人类基因治疗]4:151(1993))、SV40早期启动子区域、疱疹胸苷激酶启动子、金属硫蛋白(MMT)基因的调控序列、原核表达载体(如 β -内酰胺酶启动子)、tac启动

子、来自酵母或其他真菌的启动子元件(如Gal 4启动子)、ADC(醇脱氢酶)启动子、PGK(磷酸甘油激酶)启动子、碱性磷酸酶启动子;以及表现组织特异性且已用于转基因动物中的动物转录控制区:在胰腺腺泡细胞中有活性的弹性蛋白酶I基因控制区,在胰岛β细胞中有活性的胰岛素基因控制区,在淋巴细胞中有活性的免疫球蛋白基因控制区,在睾丸、乳腺、淋巴和肥大细胞中有活性的小鼠乳腺肿瘤病毒控制区,在肝中有活性的白蛋白基因控制区,在肝中有活性的甲胎蛋白基因控制区,在肝中有活性的α1-抗胰蛋白酶基因控制区,在髓样细胞中有活性的β-球蛋白基因控制区,在脑中的少突胶质细胞中有活性的髓磷脂碱性蛋白基因控制区,在骨骼肌中有活性的肌球蛋白轻链-2基因控制区,和在下丘脑中有活性的促性腺激素释放激素基因控制区。某些蛋白可以使用其天然启动子表达。还可以包括其他的增强表达的元件,例如导致高水平表达的增强子或系统,例如tat基因和tar元件。这种盒然后可以插入到载体中,例如质粒载体,如pUC19、pUC118、pBR322或其他已知的质粒载体,该盒包括例如大肠杆菌复制起点。参见,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual[分子克隆:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory press[冷泉港实验室出版社],(1989)。这种质粒载体还可以包括一种可选择的标记物,例如用于氨苄青霉素耐药性的β-内酰胺酶基因,条件是这种标记物多肽不会不利地影响正在治疗的有机体的新陈代谢。该盒还可以与合成递送系统(例如在WO 95/22618中公开的系统)中的核酸结合部分进行结合。

[0094] 如果需要,本发明的多核苷酸还可以与微量递送媒介物例如阳离子脂质体和腺病毒载体一起使用。对于脂质体制备、内容物的靶向和递送程序的综述,参见Mannino和Gould-Fogerite,BioTechniques[生物技术公司],6:682(1988)。还参见Felgner和Holm,Bethesda Res.Lab.Focus[贝塞斯达研究实验室焦点杂志],11(2):21(1989)和Maurer,R.A.,Bethesda Res.Lab.Focus[贝塞斯达研究实验室焦点杂志],11(2):25(1989)。

[0095] 复制缺陷型重组腺病毒载体可以根据已知技术生产。参见Quantin等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],89:2581-2584(1992);Stratford-Perricadet等人,J.Clin.Invest.[临床调查杂志],90:626-630(1992);以及Rosenfeld等人,Cell[细胞],68:143-155(1992)。

[0096] 另一种递送方法是使用产生单链DNA的载体,这些载体可以在细胞内产生表达产物。参见,例如Chen等人,BioTechniques[生物技术],34:167-171(2003),将其通过引用以其全文并入本文。

[0097] 如上所述,本发明的组合物能以本领域普通技术人员已知的各种方式制备。无论其原始来源或获得其的方式如何,本发明的组合物都可以根据它们的用途来配制。例如,可将上述核酸和载体配制在组合物中以施用于组织培养中的细胞或施用患者或受试者。可以配制本发明的任何药物组合物用于制备药物,并且具体用途在治疗的上下文中如下所示,例如治疗具有病毒或处于感染病毒的风险中的受试者。当用作药物时,任何核酸和载体能以药物组合物的形式施用。这些组合物可以按制药领域中熟知的方式制备,并且可以通过多种途径施用,取决于希望局部治疗还是全身性治疗并且取决于有待治疗的部位。施用可以是局部的(包括眼的和至粘膜,包括鼻内、阴道和直肠递送)、肺部的(例如,通过吸入或吹入粉末或气溶胶,包括通过喷雾器;气管内、鼻内、表皮和经皮肤)、眼部的、口腔的或肠胃外的。用于眼部递送的方法可以包括局部施用(滴眼剂),结膜下、眼周或玻璃体内注射或者通

过用手术方法放置在结膜囊中的气囊式导管或眼科插入件引入。肠胃外施用包括静脉内的、动脉内的、皮下的、腹膜内的或肌内的注射或输注；或颅内的，例如鞘内的或心室内的施用。肠胃外施用可以处于单次推注剂量的形式，或者可以例如通过连续灌注泵。用于局部施用的药物组合物和配制品可以包括透皮贴剂、软膏剂、洗剂、乳膏剂、凝胶剂、滴剂、栓剂、喷雾剂、液体、粉剂等。常规的药物载体、水性基质、粉末或油性基质、增稠剂等可以是必要的或希望的。

[0098] 本发明还包括药物组合物，其含有与一种或多种药学上可接受的载体组合的作为活性成分的本文所述的核酸和载体。术语“药学上可接受的”（或者“药理学上可接受的”）是指当施用于适当的动物或人类时，不产生不利的、过敏的或者其他不良反应的分子实体和组合物。本文公开的方法和组合物可以应用于广泛范围的物种，例如人类、非人类灵长类动物（例如猴子）、马或其他家畜；作为宠物饲养的狗、猫、雪貂或其它哺乳动物；大鼠，小鼠或其他实验室用动物。如本文所使用的，“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、赋形剂、黏合剂、润滑剂、凝胶、表面活性剂等，其可以用作用于药学上可接受的物质的介质。在制备本发明的组合物中，典型地将活性成分与赋形剂混合，用赋形剂稀释或封装在这样一种载体之内，该载体呈例如胶囊、片剂、药袋 (sachet)、纸或其他容器的形式。当赋形剂用作稀释剂时，其可以是固体、半固体、或液体材料（例如，生理盐水），用作活性成分的媒介、载体或介质。因此，这些组合物可以呈片剂、丸剂、粉剂、锭剂、药袋、扁囊剂、酏剂、悬浮液、乳液、溶液、糖浆剂、气溶胶（作为固体或在液体介质中）、洗剂、乳膏、软膏、凝胶剂、软和硬明胶胶囊剂、栓剂、无菌可注射溶液以及无菌包装粉剂的形式。如本领域已知的，稀释剂的类型可以根据预期的施用途径而变化。所得组合物可包括另外的试剂，例如防腐剂。在一些实施例中，载体可以是或可以包括基于脂质或基于聚合物的胶体。在一些实施例中，载体材料可以是配制成脂质体、水凝胶、微粒、纳米颗粒或嵌段共聚物胶束的胶体。如指出的，载体材料可以形成胶囊，并且该材料可以是基于聚合物的胶体。

[0099] 本发明的核酸序列可以被递送至受试者的合适的细胞。这可以通过例如使用聚合的、生物可降解的微粒或微胶囊递送媒介物来实现，其尺寸被设计成通过吞噬细胞如巨噬细胞优化吞噬作用。例如，可以使用直径约1-10 μm 的PLGA（聚-乳酸-共-乙交酯）微粒。将多核苷酸包封在这些微粒中，这些微粒被巨噬细胞吸收并在细胞内逐渐生物降解，由此释放多核苷酸。一旦释放，DNA在细胞内表达。第二种类型的微粒意图不被细胞直接吸收，而是主要起核酸的缓释储库的作用，其仅在通过生物降解从微粒释放时才被细胞吸收。因此这些聚合物颗粒应该足够大以排除吞噬作用（即大于5 μm 并且优选地大于20 μm ）。实现核酸吸收的另一种方式是使用通过标准方法制备的脂质体。核酸可以单独掺入这些递送媒介物中或与组织特异性抗体共同掺入，例如靶向HIV感染常见的潜伏感染储库（例如脑巨噬细胞、小胶质细胞、星形胶质细胞和肠相关淋巴细胞）的细胞类型的抗体。可替代地，可以通过静电或共价力制备由质粒或附接至聚-L-赖氨酸的其他载体构成的分子复合物。聚-L-赖氨酸结合可结合靶细胞受体的配体。将“裸DNA”（即不含递送媒介物）递送到肌内、皮内或皮下位点是实现体内表达的另一种方式。在相关多核苷酸（例如表达载体）中，对包含CRISPR相关内切核酸酶编码序列的分离的核酸序列和指导RNA进行编码的核酸序列与启动子或增强子-启动子组合有效连接。上面描述了启动子和增强子。

[0100] 在一些实施例中,本发明的组合物可以被配制成为纳米颗粒,例如纳米颗粒由与DNA复合的高分子量直链聚乙烯亚胺(LPEI)的核心构成,并被聚乙二醇修饰的(聚乙二醇化的)低分子量LPEI的壳包围。

[0101] 核酸和载体也可以应用于装置(例如导管)的表面或包含在泵、贴片或其他药物递送装置内。本发明的核酸和载体可以是在药学上可接受的赋形剂或载体(例如生理盐水)的存在下单独或以混合物的形式施用。根据施用方式和途径选择赋形剂或载体。用于药物配制品的合适的药物载体以及药物必需品描述于本领域公知的参考文献雷明顿的药学科学(E.W.Martin),以及USP/NF(美国药典和国家处方集)中。

[0102] 本发明提供了一种用于治疗溶原性病毒的方法,该方法通过以下步骤进行:向具有溶原性病毒的个体施用一种组合物,该组合物包括两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA和靶向病毒DNA的其他基因编辑器;并且灭活该溶原性病毒。将该溶原性病毒整合到宿主细胞的基因组中,并且该组合物通过从宿主细胞切除病毒DNA来灭活该溶原性病毒。该组合物可包括如上所述的任何性质,例如在分离的核酸中、包装在载体递送系统中,或包括靶向DNA的其他CRISPR或基因编辑系统。该溶原性病毒可以是以上各表中列出的任何一种。

[0103] 在本文所述的任何方法中,可以在体内(直接施用该组合物)或离体(例如,一个细胞或多个细胞、或组织外植体,可以从具有病毒感染的受试者中取出并置于培养中,并且然后用该组合物处理)进行治疗。以上描述了有用的载体系统和配制品。在一些实施例中,载体可以将组合物递送至特定的细胞类型。然而,本发明不限于此,还设想其他DNA递送方法,例如使用如磷酸钙、DEAE葡聚糖、脂质体、脂质复合物、表面活性剂和全氟化学液体的化学转染,物理递送方法,如电穿孔、微量注射、弹道颗粒和“基因枪”系统也是如此。在本文所述的任何方法中,施用的组合物的量足以灭活个体中存在的所有病毒。每当有临床有效的结果发生,个体就得到有效治疗。例如,这可能意味着完全消除疾病症状、降低疾病症状的严重程度或减缓疾病进展。本方法还可以包括监测步骤以帮助优化给药和安排以及预测结果。

[0104] 本文所述的任何组合物可以向宿主身体的任何部位施用以用于随后递送至靶细胞。组合物可递送至但不限于哺乳动物的脑、脑脊髓液、关节、鼻粘膜、血液、肺、肠、肌肉组织、皮肤或腹膜腔。就递送途径而言,可以通过以下方式施用组合物:静脉内、颅内、腹膜内、肌肉内、皮下、肌内、直肠内、阴道内、鞘内、气管内、皮内或经皮注射;通过口服或鼻腔施用;或通过随时间逐渐灌注。在另外的实例中,组合物的气溶胶制剂可通过吸入给予宿主。

[0105] 所需剂量将取决于施用途径,配制品的性质,患者疾病的性质,患者的身高、体重、表面积、年龄和性别,所施用的其他药物以及主治医师的判断。鉴于细胞靶标的多样性和各种施用途径的不同效率,预期所需剂量有广泛变化。正如本领域完全领会的,可使用标准经验性路径来调整这些剂量水平的变化以进行优化。施用可以是单次或多次(例如2或3、4、6、8、10、20、50、100、150或更多倍)。将化合物包封在合适的递送载体(例如聚合物微粒或可植入装置)中以增加递送效率。

[0106] 用本文提供的任何组合物的治疗的持续时间可以是从短至一天至长至宿主寿命(例如多年)的任何时间长度。例如,化合物可以每周施用一次(例如,持续4周至几个月或几年);每月一次(例如,持续三到十二个月或多年);或者每年一次,为期5年、十年或更长时间。

间。还应注意的是治疗的频率可以变化。例如,本发明化合物可以每天、每周、每月或每年施用一次(或两次、三次等)。

[0107] 有效量的本文提供的任何组合物可以施用于需要治疗的个体。如本文所使用的,术语“有效的”是指诱导希望的应答而不诱导患者显著毒性的任何量。这种量可以通过在施用已知量的特定的组合物后评估患者的应答来确定。此外,毒性水平(如果有的话)可以通过在施用已知量的特定组合物之前和之后评估患者的临床症状来确定。应当指出,可以根据希望的结果以及患者的应答和毒性水平来调整施用于患者的特定组合物的有效量。对每个特定患者的显著毒性可能不同,且取决于多种因素,包括但不限于患者的疾病状态、年龄和对副作用的耐受性。

[0108] 本发明还提供了一种用于治疗裂解性病毒的方法,该方法包括向具有裂解性病毒的个体施用两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA和靶向病毒DNA的其他基因编辑器以及一种组合物,该组合物选自siRNA/miRNA/shRNA/RNAi和CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA和靶向病毒RNA的其他基因编辑器;并且灭活该裂解性病毒。该组合物通过从宿主细胞切除病毒DNA和RNA来灭活该裂解性病毒。该组合物可包括如上所述的任何性质,例如在分离的核酸中、包装在载体递送系统中,或包括靶向DNA的其他CRISPR或基因编辑系统。该裂解性病毒可以是以上各表中列出的任何一种。

[0109] 本发明还提供了一种用于治疗溶原性病毒和裂解性病毒两者的方法,该方法通过以下步骤进行:向具有溶原性病毒和裂解性病毒的个体施用一种组合物,该组合物包括两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA和靶向病毒RNA的其他基因编辑器;并且灭活该溶原性病毒和裂解性病毒。该组合物通过从宿主细胞切除病毒RNA来灭活这些病毒。该组合物可包括如上所述的任何性质,例如在分离的核酸中、包装在载体递送系统中,或包括靶向RNA的其他CRISPR或基因编辑系统。该溶原性病毒和裂解性病毒可以是以上各表中列出的任何一种。

[0110] 在感染时或病毒进入细胞质时,它可含有非整合的基于RNA的基因组(未转化为DNA),但有助于溶原型复制周期。在该上游点,可以消除病毒基因组。在另一方面,该方法也可用于靶向在下游出现的病毒mRNA(当基因组被翻译时)。尽管Argonaute在整个领域中被引用,但迄今为止尚未对其进行修饰以识别RNA分子。

[0111] 本发明提供了一种用于治疗裂解性病毒的方法,该方法通过以下步骤进行:向具有裂解性病毒的个体施用一种组合物,该组合物包括两种或更多种CRISPR相关核酸酶(例如Cas9和Cpf1 gRNA)、Argonaute内切核酸酶gDNA和靶向病毒RNA的其他基因编辑器以及靶向病毒RNA的siRNA/miRNA/shRNA/RNAi;并且灭活该裂解性病毒。该组合物通过从宿主细胞切除病毒RNA来灭活该裂解性病毒。该组合物可包括如上所述的任何性质,例如在分离的核酸中、包装在载体递送系统中,或包括靶向RNA的其他CRISPR或基因编辑系统。将使用两种或更多种基因编辑器,其可以靶向RNA以切除基于RNA的病毒基因组和/或在下游出现的病毒mRNA。在不使用基于核酸酶的机制的siRNA/miRNA/shRNA/RNAi的情况下,将它们中的一种或多种用于对病毒RNA转录物(非编码或编码)进行降解性沉默。该裂解性病毒可以是以上各表中列出的任何一种。

[0112] 在整个申请中,将包括美国专利在内的各种出版物均通过作者和年份以及专利号

进行引用。下面列出了这些出版物的完整引文。这些出版物和专利的公开内容以其全文通过引用特此并入本申请中,以便更全面地描述本发明所属领域的现状。

[0113] 已经以示例性的方式描述了本发明,并且应理解,已经使用的术语的目的是处于说明性词语的性质,而非限制性的。

[0114] 显而易见地,能够根据以上教导进行本发明的很多修改和变化。因此,应当理解,在所附权利要求的范围内可以用不同于具体描述的方式来实践本发明。

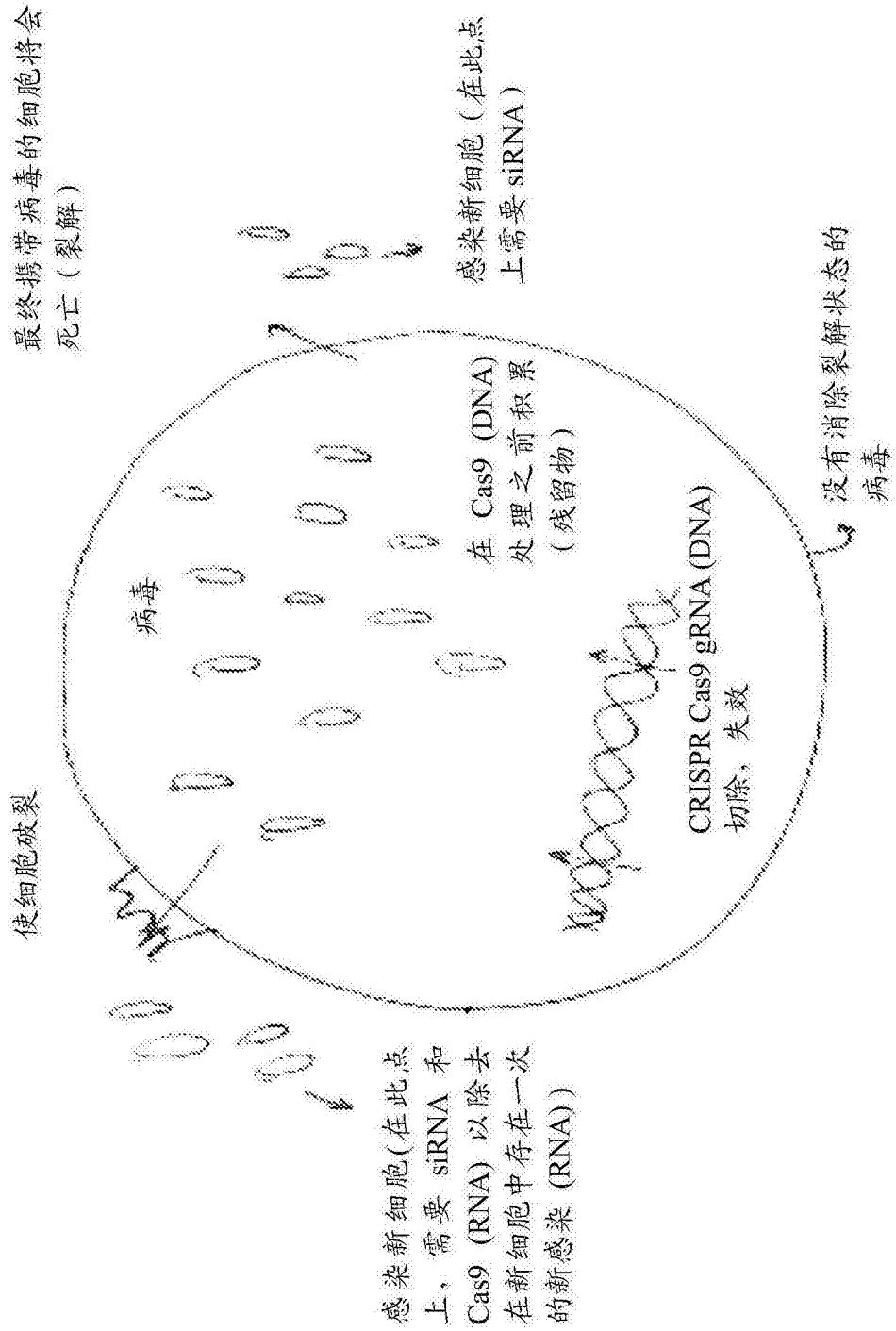


图1