(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108699563 A
(43)申请公布日 2018.10.23

(21)申请号 201680050998.3

(22)申请日 2016.07.01

(30)优先权数据
62/187,942 2015.07.02 US
62/322,346 2016.04.14 US
15/199,021 2016.06.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.03.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/040673 2016.07.01

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/004509 EN 2017.01.05

(71)申请人 波赛伊达治疗学股份有限公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 P·P·高洛夫奇安 J·N·约尔

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100
代理人 钱文宇 陶启长

(51)Int.Cl.
C12N 15/63(2006.01)
C12N 9/22(2006.01)
A61K 48/00(2006.01)

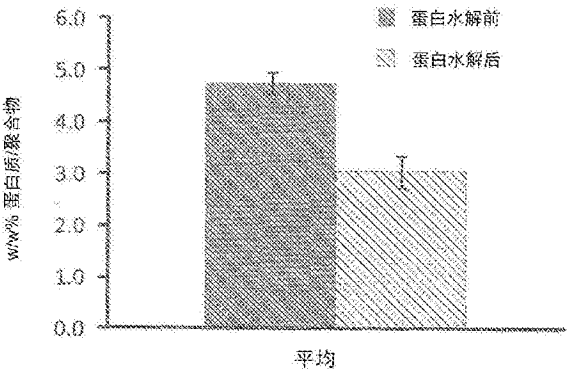
权利要求书2页 说明书15页 附图12页

(54)发明名称

用于采用聚合物囊泡递送基因编辑工具的组合物和方法

(57)摘要

一种用于遗传修饰的组合物和形成所述组合物的方法，所述组合物可包括合成聚合物囊泡，和包封在所述合成聚合物囊泡中的基因编辑系统。所述基因编辑系统可包括蛋白质组分和核酸组分，所述核酸组分经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用。



CN 108699563 A

1.用于遗传修饰的组合物,包含:

合成聚合物囊泡;和

包封在所述合成聚合物囊泡中的基因编辑系统,所述基因编辑系统包含核酸组分,该核酸组分经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用。

2.如权利要求1所述的组合物,其中,所述基因编辑系统还包含蛋白质组分。

3.如权利要求2所述的组合物,其中:

所述蛋白质组分包含核糖核酸(RNA)导向的核酸酶;和

所述核酸组分包含与所述靶序列互补的引导RNA。

4.如权利要求3所述的组合物,其中:

所述核酸组分还包含外源脱氧核糖核酸(DNA)修复模板;

所述RNA导向的核酸酶经设置以在所述宿主细胞基因组中于所述靶序列附近产生双链断裂;和

在所述宿主细胞基因组的再连接过程中,所述宿主细胞中的修复过程触发基于外源DNA修复模板的对所述宿主细胞基因组的修饰。

5.如权利要求4所述的组合物,其中,所述DNA修复模板包含端部区域,其与所述宿主细胞基因组的侧接双链断裂的区域同源,所述双链断裂由所述RNA导向的核酸酶诱导。

6.如权利要求1所述的组合物,其中,所述基因编辑系统以相对于组合物总重量至少3重量%的量包括在所述合成聚合物囊泡中。

7.如权利要求1所述的组合物,其中,所述蛋白质组分包含如下形式的酶:天然形式,或经设置以在递送进入宿主细胞之后被翻译成酶的信使RNA(mRNA)分子。

8.如权利要求2所述的组合物,其中,所述蛋白质组分以包含编码酶的脱氧核糖核酸(DNA)序列的表达载体的形式被递送。

9.如权利要求8所述的组合物,其中,所述核酸组分包含编码引导核糖核酸(RNA)的DNA序列。

10.如权利要求9所述的组合物,其中,编码所述酶的所述DNA序列和所述引导RNA在单一表达载体上提供。

11.如权利要求2所述的组合物,其中,所述蛋白质组分包含酶,该酶经设置以基于所述核酸组分与所述宿主基因组的互补区段的结合而切割宿主基因组。

12.如权利要求11所述的组合物,其中,所述酶包含规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)。

13.如权利要求2所述的组合物,其中:

所述核酸组分包含含有转座子的表达载体;和

所述蛋白质组分包含转座酶。

14.如权利要求13所述的组合物,其中,所述转座酶是如下之一:

天然酶;

经设置以在递送进入宿主细胞之后被翻译成所述酶的信使核糖核酸(mRNA)分子;和

编码所述酶的脱氧核糖核酸(DNA)序列。

15.如权利要求14所述的组合物,其中,所述DNA序列在包含所述转座子的表达载体上提供。

16.如权利要求1所述的组合物，其中，所述合成聚合物囊泡由至少一种嵌段共聚物产生，其包含：

包括聚(环氧乙烷)的亲水嵌段；和

疏水嵌段。

17.如权利要求15所述的组合物，其中，所述疏水嵌段选自，脂族聚酸酐、多聚核酸、聚酯、聚原酸酯、多肽、聚磷腈和多糖。

18.如权利要求15所述的组合物，其中，所述疏水嵌段包含如下一种或多种：聚交酯(PLA)、聚乙交酯(PLGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(e-己内酯)(PCL)或聚三亚甲基碳酸酯(PTMC)。

19.一种修饰宿主细胞基因组的方法，所述方法包括：

在聚合物囊泡中包括基因编辑系统，所述基因编辑系统包含：蛋白质组分；和

核酸组分，其经设置以与所述宿主细胞中的靶核酸序列相互作用；和

将该经包封的基因编辑系统递送至所述宿主细胞，

其中，所述聚合物囊泡经设置以在所述宿主细胞中选择性地释放所述基因编辑系统。

20.如权利要求19所述的方法，其中，将该经包封的基因编辑系统递送至所述宿主细胞包括，给予对象有效量的包含该经包封的基因编辑系统的组合物。

21.如权利要求19所述的方法，其中，所述经包封的基因编辑系统采用渐进饱和方案制备。

22.一种制造经包封的基因编辑组合物的悬浮液的方法，所述方法包括：

热混合一定量的嵌段共聚物与一定量的低分子量聚乙二醇(PEG)以产生PEG/聚合物制剂；向包含所述PEG/聚合物制剂的样品添加所述基因编辑组合物的溶液等分物；和，进行至少一个稀释步骤，从而使产生的聚合物囊泡被所述基因编辑组合物渐进饱和，

其中，所述基因编辑组合物包含：

蛋白质组分；和

核酸组分，其经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用。

23.如权利要求22所述的方法，其中，所述嵌段共聚物包含两亲二嵌段共聚物。

24.如权利要求23所述的方法，其中，所述两亲型二嵌段共聚物包含聚(环氧乙烷)-嵌段-聚(丁二烯)(PEO-b-PBD)。

25.如权利要求22所述的方法，其中，产生的聚合物囊泡具有关于所述基因编辑组合物的至少50％的包封率。

26.一种试剂盒，包括：

药物组合物，其包含包封在合成聚合物囊泡中的基因编辑系统，所述基因编辑系统包含：蛋白质组分；和

核酸组分，其经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用；和

用于静脉内、经吸入、局部、经直肠、经阴道、经皮、皮下、腹腔内、鞘内、肌内，或经口给予所述药物组合物的器具。

用于采用聚合物囊泡递送基因编辑工具的组合物和方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年7月2日提交的美国临时专利申请系列号62/187,942,2016年4月14日提交的美国临时专利申请号62/322,346,和2016年6月30日提交的美国非临时专利申请系列号15/199,021的优先权,其均通过引用其全文纳入本文。

背景技术

[0003] 基于序列特异性核酸酶的开发,基因组编辑技术的新时代现已到来。具体而言,这类核酸酶可用以在准确的基因组位置产生DNA双链断裂(DSB),然后利用细胞修复机制来对核苷酸和/或基因进行沉默或替代。核酸序列的靶向编辑是用于基因功能研究的具有广阔前景的途径,并且有潜力提供针对人类遗传疾病的新疗法。

[0004] 现有的基因编辑工具包括,例如,RNA引导的DNA核酸内切酶Cas9,其在基因组中进行序列特异性DNA切割。通过提供特定的引导RNA来将Cas9和其它酶导向任何序列,并引入受控的DNA断裂的可能性提供了用于以多种方式对基因组进行体内潜在修饰的强力工具。具体而言,DNA中的断裂可通过非同源端接合(NHEJ)导致切割位点处的DNA突变,或通过同源性导向的修复(HDR)导致切割位点周围的DNA的替代(采用DNA模板)。HDR模板可被设计以使由核酸酶靶向的DNA序列具有所需的遗传变化。

[0005] 因此,这些工具提供,例如,去除、替代或添加核苷酸碱基至天然DNA以更正或诱导点突变,以及改变核苷酸碱基以更正或诱导移码突变的可能性。此外,此类工具可实现移除、插入或修饰包含作为一个或多个基因的部分的多个密码子的多段DNA。

[0006] 当前,将核酸递送至靶细胞的机制包括采用病毒载体。然而,基于病毒的基因递送具有一些限制,包括毒性、DNA或RNA聚积、荷载尺寸限制,以及大规模生产(包括成本和时间)的困难。

[0007] 在功能性DNA和RNA的递送方面已有进展,其采用病毒载体(例如,逆转录病毒,腺病毒等)和非病毒载体。例如,野生型AAV已引起基因治疗研究者的强烈兴趣,这归因于许多特征,例如病毒明显缺乏致病性。其还可感染非分裂细胞并能够在人染色体19的特定位点处(命名为AAVS1)稳定整合至宿主细胞基因组中。该特征使其与逆转录病毒相比更具可预测性,所述逆转录病毒代表了随机插入和诱变的威胁,这之后有时会发生癌症。基于AAV的基因治疗载体在宿主细胞核中形成附加型多联体。在非分裂细胞中,这些多联体在宿主细胞生命期间维持完整。在分裂细胞中,AAV DNA通过细胞分裂而丢失,因为附加型DNA不会随宿主细胞DNA复制。AAV DNA向宿主基因组中的随机整合是可检测的,但以非常低的频率发生。AAV还具有非常低的免疫原性,似乎限于生成中和抗体,而其不诱导清楚界定的细胞毒性应答。这些特征,以及感染静止细胞的能力,显示AAV在用于人类基因治疗的载体方面优于腺病毒。然而,病毒载体(包括AAV)的应用也与一些缺点相关联,具体而言是病毒基因组的受限尺寸。例如,AAV基因组仅为4.8千碱基(kb),因此无法用于不同实施方式的多种基因编辑工具的单一载剂递送。

[0008] 采用病毒递送基因编辑工具的其它缺点可包括,仅靶向分裂中的细胞、随机插入

宿主基因组、具有复制风险、和可能的宿主免疫反应、以及由病毒衣壳强加的对荷载大小的限制，具体而言，其阻止实现位点特异性基因修复(gene correction)所需的众多不同基因编辑工具的纳入。

[0009] 一般而言，相比病毒载体，非病毒载体通常容易制造，产生免疫反应的可能性较小，并且不产生复制反应；现有方法通常无法有效将遗传物质体内引入细胞并且导致了相对低的基因表达。具体而言，近期人们已将许多现有非病毒系统拓展用于将蛋白质和/或核酸形式的基因编辑工具递送至细胞。此类系统可宽泛地归类为："纳米胶囊"，其中，游离DNA/RNA/蛋白质的浆料用聚合物肽包裹；"基于脂质的载剂"(例如，脂质体，基于脂质的纳米颗粒等)，用阳离子两亲性聚合物修饰以基于电荷与核酸自组装；和"生物偶联物"(例如，脂质，合成大分子等)，其靶向核酸，包括通过结合至由靶细胞表达的特定蛋白质以允许细胞内化来进行。相对于在单一递送载剂中包封单一或多种基因编辑工具而言，这些非病毒系统均各自具有其自身的一些问题。例如，在纳米胶囊系统中，其结构高度不稳定，并且可能会在静脉内给予之后将其内含物泄漏至脉管系统中。由此，无法实现有效基因编辑所需的足量的物质组分的胞内递送和释放。在基于脂质的载剂中，带电递送系统显示了不佳的负荷能力且难以释放经包封的荷载物。在生物偶联系统中，具有足够尺寸的载体的应用将使核酸直接暴露至血流/胞液中的核酸酶，而这将造成对荷载物的片段化和破坏，消除了实现有效基因编辑的能力。

[0010] 因此，需要有效载剂用于递送核酸如小引导RNA，核酸如mRNA，和/或大DNA质粒至靶细胞，以及蛋白质如Cas9。

[0011] 概述

[0012] 系统和方法允许通过包含合成聚合物囊泡和包封在所述合成聚合物囊泡中的基因编辑系统的组合物进行遗传修饰。在一些实施方式中，所述基因编辑系统可包括这样的核酸组分，其经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用。在一些实施方式中，所述基因编辑系统还可包括蛋白质组分。在一些实施方式中，所述蛋白质组分可包括RNA导向的核酸酶，并且所述核酸组分可包括对靶序列具有特异性的引导核糖核酸(RNA)。在一些实施方式中，所述核酸组分还可包括脱氧核糖核酸(DNA)修复模板。在一些实施方式中，RNA导向的核酸酶可在宿主细胞基因组中产生至少一个断裂，并且，宿主细胞中的修复过程可触发基于外源DNA修复模板的宿主细胞基因组中的至少一个核苷酸的修饰，其中，所述至少一个核苷酸被纳入宿主细胞基因组的再连接中。

[0013] 在一些实施方式中，DNA修复过程可基于DNA修复模板上的区域来起始，所述区域与由RNA导向的核酸酶诱导的靶序列中的双链断裂的任一侧的区域同源。在一些实施方式中，基因编辑系统可以相对于组合物总重量至少3重量%的量包括在合成聚合物囊泡中。

[0014] 在一些实施方式中，蛋白质组分可包括天然形式的酶。在一些实施方式中，蛋白质组分可包括信使RNA(mRNA)分子，其在递送进入宿主细胞之后被翻译成酶。在一些实施方式中，蛋白质组分可以是表达载体的形式，所述表达载体包含编码一个或多个基因以表达酶的脱氧核糖核酸(DNA)序列。在一些实施方式中，所述核酸组分可以是编码一个或多个基因以表达引导核糖核酸(RNA)的DNA序列。

[0015] 在一些实施方式中，所述DNA序列编码所述基因以表达所述酶，并且所述引导RNA可在单一表达载体上提供。在一些实施方式中，所述蛋白质组分可包括酶，该酶经设置以基

于核酸组分与宿主基因组的区段的结合来切割宿主基因组。在一些实施方式中，所述酶是规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)。在一些实施方式中，所述核酸组分包括包含至少一个转座子的表达载体，并且所述蛋白质组分包含转座酶试剂。在一些实施方式中，所述转座酶物质可以是以下之一：天然酶，信使核糖核酸(mRNA)分子，其在递送进入宿主细胞之后被翻译成所述酶，和编码一个或多个基因以表达所述酶的脱氧核糖核酸(DNA)序列。在一些实施方式中，编码所述基因以表达所述酶的所述DNA序列可在包含转座子的表达载体上提供。

[0016] 在一些实施方式中，所述合成聚合物囊泡可由包括疏水嵌段和含聚(环氧乙烷)的亲水嵌段的至少一种嵌段共聚物产生。在一些实施方式中，所述疏水嵌段可选自脂族聚酸酐、多聚核酸、聚酯、聚原酸酯、多肽、聚磷腈和多糖。在一些实施方式中，疏水嵌段可包括以下的一种或多种：聚交酯(PLA)、聚乙交酯(PLGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(e-己内酯)(PCL)或聚三亚甲基碳酸酯(PTMC)。

[0017] 用于修饰宿主细胞基因组的系统和方法在不同的实施方式中可包括，在聚合物囊泡中包封基因编辑系统，该基因编辑系统包括蛋白质组分和核酸组分，和，将该经包封的基因编辑系统递送至宿主细胞。在一些实施方式中，核酸组分可经设置以与所述宿主细胞中的靶核酸序列相互作用。在一些实施方式中，聚合物囊泡经设置以在所述宿主细胞中选择性地释放所述基因编辑系统。

[0018] 实施方式方法还可包括，通过给予对象有效量的包含经包封的基因编辑系统的组合物，将经包封的基因编辑系统递送至宿主细胞。在一些实施方式中，经包封的基因编辑系统可采用渐进饱和方案制备。

[0019] 制造经包封的基因编辑组合物的悬浮液的系统和方法在不同的实施方式中可包括，热混合一定量的嵌段共聚物与一定量的低分子量聚乙二醇(PEG)以产生PEG/聚合物制剂，向包含PEG/聚合物制剂的样品添加基因编辑组合物的溶液等分物，和，进行至少一个稀释步骤，从而使产生的聚合物囊泡被所述基因编辑组合物渐进饱和。在一些实施方式中，基因编辑组合物可包括蛋白质组分和核酸组分，其经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用。

[0020] 在一些实施方案中，嵌段共聚物可包括两亲型二嵌段共聚物。在一些实施例中，两亲型二嵌段共聚物可包括聚(环氧乙烷)-嵌段-聚(丁二烯)(PEO-b-PBD)。在一些实施方式中，产生的聚合物囊泡可具有至少50％的基因编辑组合物包封率。

[0021] 在不同的实施方式中，系统可以试剂盒方式应用，所述试剂盒包括具有包封在合成聚合物囊泡中的基因编辑系统的药物组合物，和用于静脉内、经吸入、局部、经直肠、经阴道、经皮、皮下、腹腔内、鞘内、肌内，或经口给予所述药物组合物的器具。在一些实施方式中，基因编辑系统可包括蛋白质组分和核酸组分，其经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用。

[0022] 附图的简要说明

[0023] 纳入本文并构成本说明书一部分的附图示出了示例性实施方式，并且与各种实施方式的描述一起用于解释本文中的特征。

[0024] 图1是用于不同纳米颗粒包封的两种聚(环氧乙烷)-嵌段-聚(丁二烯)(即，PEO-b-PBD)二嵌段共聚物及其聚合物囊泡(polymersome)制剂的性质的表格。

[0025] 图2A和2B的图表显示，模型蛋白(肌球素)或编码哺乳动物DNA载体的质粒DNA共同包封入由应用渐进饱和方案所得的特定PEO-b-PBD制剂形成的聚合物囊泡中，所述哺乳动物DNA载体用于表达绿色荧光蛋白(GFP)(采用延长因子1α(EF1a)启动子)(即，pEF-GFP DNA)。

[0026] 图2C-2E的图表显示，模型蛋白(肌球素)和编码哺乳动物表达载体的质粒DNA共同包封入由应用渐进饱和方案所得的特定PEO-b-PBD制剂形成的相同聚合物囊泡构建体中，所述哺乳动物表达载体用于表达绿色荧光蛋白(GFP)(采用延长因子1α(EF1a)启动子)(即，pEF-GFP DNA)。

[0027] 图3A-3E的图表显示，模型蛋白(肌球素)和pEF-GFP DNA共同包封入由应用薄膜水合方案所得的特定PEO-b-PBD制剂形成的相同聚合物囊泡构建体中。

[0028] 图4A-4E的图表显示，模型蛋白牛血清白蛋白(BSA)和pEF-GFP DNA共同包封入由应用渐进饱和方案所得的PEO-b-PBD制剂形成的相同聚合物囊泡构建体中。

[0029] 图5A-5C的图表显示，来自酿脓链球菌(Streptococcus pyogene)的功能性Cas9蛋白包封入由应用渐进饱和方案所得的特定PEO-b-PBD制剂形成的聚合物囊泡中。

[0030] 图6A-6E的图表显示，来自酿脓链球菌(Streptococcus pyogene)的功能性Cas9蛋白和pEF-GFP DNA共同包封入由应用渐进饱和方案所得的特定PEO-b-PBD制剂形成的相同聚合物囊泡构建体中。

[0031] 发明详述

[0032] 用于遗传修饰的实施方式组合物可经制备以包括合成聚合物囊泡，和包封在所述合成聚合物囊泡中的基因编辑系统，其中，所述基因编辑系统包括经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用的核酸组分。在一个实施方式中，基因编辑系统还可包括蛋白质组分。在一个实施方式中，蛋白质组分可以是核糖核酸(RNA)导向的核酸酶，且核酸组分可以是与所述靶序列互补的引导RNA。在一个实施方式中，核酸组分还可包括外源脱氧核糖核酸(DNA)修复模板，并且，RNA导向的核酸酶可经设置以在靶序列附近的宿主细胞基因组中产生双链断裂。在一个实施方式中，在宿主细胞基因组的再连接过程中，宿主细胞中的修复过程可触发基于外源DNA修复模板的对宿主细胞基因组的修饰。在一个实施方式中，DNA修复模板可具有端部区域，其与宿主细胞基因组的侧接由RNA导向的核酸酶诱导的双链断裂的区域同源。在一个实施方式中，基因编辑系统可以相对于组合物总重量至少3重量%的量包括在合成聚合物囊泡中。在一个实施方式中，蛋白质组分可以是天然形式的酶，或信使RNA(mRNA)分子，其经设置以在递送进入宿主细胞之后被翻译成酶。在一个实施方式中，蛋白质组分可以作为包含编码酶的脱氧核糖核酸(DNA)序列的表达载体形式递送。在一个实施方式中，核酸组分可以是编码引导核糖核酸(RNA)的DNA序列。在一个实施方式中，编码所述酶的DNA序列和所述引导RNA可在单一表达载体上提供。在一个实施方式中，所述蛋白质组分可以是酶，该酶经设置以基于核酸组分与宿主基因组的互补区段的结合来切割宿主基因组。在一个实施方式中，所述酶可以是规律成簇的间隔短回文重复(CRISPR)相关蛋白9(Cas9)。在一个实施方式中，核酸组分可以是包括转座子的表达载体，且蛋白质组分可以是转座酶。在一个实施方式中，转座酶可以是如下之一：天然酶，信使核糖核酸(mRNA)分子，其经设置以在递送进入宿主细胞之后被翻译成所述酶，和编码所述酶的DNA序列。在一个实施方式中，DNA序列可在包括转座子的表达载体上提供。在一个实施方式中，所述合成聚合物

囊泡可由包括具有聚(环氧乙烷)的亲水嵌段和疏水嵌段的至少一种嵌段共聚物产生。在一个实施方式中，所述疏水嵌段可选自脂族聚酸酐、多聚核酸、聚酯、聚原酸酯、多肽、聚磷腈和多糖。在一个实施方式中，疏水嵌段可包括以下的一种或多种：聚交酯(PLA)、聚乙交酯(PLGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(e-己内酯)(PCL)或聚三亚甲基碳酸酯(PTMC)。

[0033] 在一个实施方式中，修饰宿主细胞基因组的方法可包括，在聚合物囊泡中包封基因编辑系统，和，将该经包封的基因编辑系统递送至宿主细胞，其中，所述聚合物囊泡经设置以在所述宿主细胞中选择性地释放所述基因编辑系统。在一个实施方式中，所述基因编辑系统可包括蛋白质组分，和核酸组分，其经设置以与所述宿主细胞中的靶核酸序列相互作用。在一个实施方式中，将经包封的基因编辑系统递送至宿主细胞可通过给予对象有效量的包含经包封的基因编辑系统的组合物来进行。在一个实施方式中，经包封的基因编辑系统可采用渐进饱和方案制备。在一个实施方式中，对于经包封的基因编辑组合物的悬浮液的制造可包括，热混合一定量的嵌段共聚物与一定量的低分子量聚乙二醇(PEG)以产生PEG/聚合物制剂，向包含PEG/聚合物制剂的样品添加基因编辑组合物的溶液等分物，和，进行至少一个稀释步骤，从而使产生的聚合物囊泡被所述基因编辑组合物渐进饱和。在一个实施方式中，基因编辑组合物可包括蛋白质组分和核酸组分，其经设置以与宿主细胞基因组中的靶序列相互作用。在一个实施方案中，嵌段共聚物可以是两亲型二嵌段共聚物。在一个实施例中，两亲型二嵌段共聚物可以是聚(环氧乙烷)-嵌段-聚(丁二烯)(PEO-b-PBD)。在一个实施方式中，产生的聚合物囊泡具有关于基因编辑组合物的至少50％的包封率。

[0034] 将参考附图详细描述各实施方式。只要可能，在所有附图中使用相同的附图标记来表示相同或类似的部分。对特定示例和实现方式的参考是用于说明目的，并不意图限制权利要求的范围。

[0035] 应理解，为清楚起见，在本文中，在单独的各实施方式的内容中描述的一些特征还可以合并在单一的实施方式中提供。反之，在单一实施方式的内容中简短描述的各特征也可以单独提供或以任何子组合的形式提供。此外，关于在各范围中列出的值则包括在所述范围之内的每一个值。

[0036] 在本说明书和所附权利要求书中所用的单数形式“一个”，“一种”和“该”、“所述”包含复数指示物，除非上下文中有明确的另外说明。

[0037] 词语“多个/多种(复数)”在本文中用于指多于一个/一种。当表述这样的值时，另一个实施方式包括自所述一个具体值始和/或至所述另一具体值止。类似地，用先行词“约”将数值表示为近似值时，应理解该具体值构成了另一个实施方式。所有范围包括端值且可相互重组。

[0038] 术语“对象”和“患者”在本文中可互换使用以指人患者，而术语“对象”还可指任何动物。应理解，在不同实施方式中，对象可以是哺乳动物、非人动物、犬类和/或脊椎动物。

[0039] 术语“单体单元”在本文中用于指聚合物分子的单元，其包含相同或相似数量的原子作为一种单体。本说明书中所用的单体单元，可以是单一类型(同质)或多种类型(异质)。

[0040] 术语“聚合物”具有其大分子的原始含义，所述大分子包含连接的单体分子。

[0041] 术语“两亲性”在本文中用于指同时包含极性(水溶性)和疏水性(水不溶性)基团的物质。

[0042] 术语“有效量”在本文中用以指一定量的化合物、物质或组合物，其有效于获得特

定的生物学结果，例如但不限于，本文中公开、描述或示例的生物学结果。此类结果可包括但不限于，由本领域中任何合适手段测定的，与本文提及的任何疾病状态相关的症状的有效减少。本领域普通技术人员应理解，物质(例如，核酸酶，整合酶，转座酶，重组酶，杂合体蛋白质，融合蛋白质，蛋白质二聚体，蛋白质复合物(或蛋白质二聚体)和多核苷酸，或多核苷酸)的有效量可根据不同因素(例如，所需的生物学响应、特定等位基因、基因组、靶位点、细胞，或被靶向的组织，以及所用的物质)而不同。

[0043] 术语“膜”在本文中用于指在三维空间中界定二维表面的分子的空间不同集合，由此在至少局部意义上将一个空间与另一个空间彼此分隔。

[0044] 术语“活性物质”在本文中用以指能够适当改变或影响其所引入的生物系统的任何蛋白质、肽、糖、糖类、核苷、无机化合物、脂质、核酸、小合成化合物或有机化合物。

[0045] 术语“载剂”在本文中用以指这样的物质，其本身不具有治疗益处，但在与活性物质组合用于递送进入细胞时造成对该活性物质的性质的修饰，包括但不限于其机制或体内递送模式、其浓度、生物可利用度、吸收、分布和消除，以利于改善产品功效和安全性，以及患者方便度和依从性。

[0046] 术语“运载体”在本文中用于描述用于纳入药物活性物质以供于药物递送的递送载剂。

[0047] 术语“均聚物”在本文中用以指源自一种单体聚合物物质的聚合物。

[0048] 术语“共聚物”在本文中用以指源自两种(或更多种)单体聚合物物质的聚合物，与其中仅使用一种单体的均聚物不同。鉴于共聚物由至少两种类型的组成单元(也称为结构单元)组成，因此共聚物可按这些单元如何沿链排列来归类。

[0049] 术语“嵌段共聚物”在本文中用以指这样的共聚物，其包括由共价键连接的两种或更多种均聚物亚基，其中，均聚物亚基的联合可能需要中间非重复亚基，称为连接嵌段(junction block)。具有两种或三种不同嵌段的嵌段共聚物在本文中分别称作“二嵌段共聚物”和“三嵌段共聚物”。

[0050] 术语“负荷能力”在本文中用以指特定化合物在运载体中的重量除以运载体的总重量。术语“包封率”和“负荷率”在本文中可互换使用以指经包封的和/或被纳入运载体悬浮液的特定化合物的重量除以包封前溶液中的原始化合物的重量(以％表达)。

[0051] 术语“核酸”和“核酸组分”在本文中可互换使用以指具有核碱基和酸性部分的化合物，例如核苷、核苷酸或核苷酸的聚合物。通常，聚合核酸，例如，包含三个或更多个核苷酸的核酸组分是线性分子，其中，邻近的核苷酸通过磷酸二酯或硫代磷酸酯连接彼此连接。在一些实施方式中，“核酸”是指单个核酸残基(例如，核苷酸和/或核苷)。在一些实施方式中，“核酸”是指包含三个或更多个单个核苷酸残基的寡核苷酸链。本文中所用术语“寡核苷酸”和“多核苷酸”可互换使用以指核苷酸的聚合物(例如，一串至少三个核苷酸)。在一些实施方式中，“核酸”包括RNA以及单链和/或双链DNA。核酸可以是天然产生的，例如，在基因组、转录本、mRNA、tRNA、rRNA、siRNA、snRNA、质粒、粘粒、染色体、染色单体，或其它天然产生的核酸组分的情况中。另一方面，核酸组分可以是非天然产生的分子，例如，重组DNA或RNA，人工染色体，工程改造的基因组，或其片段，或合成DNA，RNA，DNA/RNA杂合体，或包括非天然产生的核苷酸或核苷。此外，术语“核酸”、“DNA”、“RNA”和/或类似术语包括核酸类似物，即，具有不同于磷酸二酯主链包括硫代磷酸酯连接的类似物。

[0052] 可从天然来源纯化核酸，使用重组表达系统产生核酸、和任选的纯化核酸、化学合成核酸等。在合适的情况下，例如在化学合成的分子的情况中，核酸可包括核苷类似物，如具有化学修饰的碱基或糖和主链修饰的类似物。除非另外说明，以5'至3'方向表示核酸序列。在一些实施方式中，核酸是或包含天然核苷(例如，腺苷、胸苷、鸟苷、胞苷、尿苷、脱氧腺苷、脱氧胸苷、脱氧鸟苷和脱氧胞苷)；核苷类似物(例如，2-氨基腺苷、2-硫胸苷、肌苷、吡咯并-嘧啶、3-甲基腺苷、5-甲基胞苷、C5-丙炔基-尿苷、C5-丙炔基-胞苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、C5-溴尿苷、C5-氟尿苷、C5-碘尿苷、C5-甲基胞苷、2-氨基腺苷、7-脱氮腺苷、7-脱氮鸟苷、8-氧代腺苷、8-氧代鸟苷、O(6)-甲基鸟嘌呤、和2-硫胞苷)；化学修饰的碱基；生物修饰的碱基(例如，甲基化的碱基)；插入的碱基；修饰的糖(例如，2'-氟化核糖、核糖、2'-脱氧核糖、阿拉伯糖、和己糖)；和/或修饰的磷酸基团(例如，硫代磷酸酯和5'-N-亚磷酰胺键)。

[0053] 术语“RNA引导的核酸酶”和“RNA引导的核酸内切酶”在本文中可互换使用并且指这样的核酸酶，其与不作为切割的靶标的一种或多种RNA(例如，结合或联合)形成复合物。RNA引导的核酸酶的一个示例是RNA引导的核酸酶是(CRISPR-相关联的系统)Cas9核酸内切酶。在一些实施方式中，RNA引导的核酸酶，在与RNA的复合物形式中，可被称作核酸酶:RNA复合物。结合的RNA通常被称作引导RNA。引导RNA可以两种或更多种RNA的复合物形式或以单一RNA分子的形式存在。尽管以单一RNA分子形式存在的引导RNA可被称为单一引导RNA(sgRNA)，术语"引导RNA"和"gRNA"在本文中可互换使用以指以单一分子形式或两种或更多种分子的复合物形式存在的引导RNA。以单一RNA物质形式存在的引导RNA通常包含两种结构域：(1)与靶核酸具有同源性的结构域(例如，并且引导Cas9复合物与靶标的结合)；和(2)结合Cas9蛋白的结构域。在一些实施方式中，结构域(2)对应于称为tracrRNA的序列，并且包含茎-环结构。例如，在一些实施方式中，结构域(2)与tracrRNA同源。引导RNA包含与靶位点互补的核苷酸序列，其介导核酸酶/RNA复合物与靶位点的结合，提供核酸酶:RNA复合物的序列特异性。

[0054] 因为RNA引导的核酸酶(例如，Cas9)利用RNA:DNA杂交来靶向DNA切割位点，因此，原则上，这些蛋白质能够被靶向至对引导RNA具有特异性的任何序列。

[0055] 术语“治疗”和“处理”指意图逆转、减轻、延缓疾病或紊乱或其一种或多种症状的发作或抑制其进展的临床介入，如本文所述。本文中所用术语“治疗”和“处理”指意图逆转、减轻、延缓疾病或紊乱或其一种或多种症状的发作或抑制其进展的临床介入，如本文所述。在一些实施方式中，治疗可在已发展一种或多种症状和/或疾病已被诊断之后给予。在其它实施方式中，治疗可在不存在症状的情况下被给予，例如，以预防或延缓症状的发作或抑制疾病的发作或进展。例如，治疗可在症状发作之前给予易感个体(例如，鉴于症状史和/或鉴于遗传或其它易感性因素)。治疗还可在症状已消解之后持续，例如，以预防或延缓其复发。

[0056] DNA中双链断裂(DSB)的正确且有效的修复对于维持细胞中的基因组稳定性而言是至关重要的。DNA的结构破坏可以随机且预测不到的方式出现于基因组中，这归因于多种胞内因素(例如，核酸酶，反应氧物质等)以及外部作用(例如，电离辐照、紫外(UV)辐照等)中的任一种。具体而言，DNA中双链断裂(DSB)的正确且有效的修复对于维持基因组稳定性而言是至关重要的。因此，细胞天然具有许多DNA修复机制，其可被利用以通过受控的DSB在特定位点改变DNA序列。因此，遗传修饰工具可包括可编程的、序列-特异性DNA-结合模块，其与非特异性DNA核酸酶相关联，由此将DSB引入基因组。例如，CRISPR，主要存在于细菌中，

其为包含短正向重复序列的基因座，并且是获得性原核免疫系统的部分，提供针对外源序列例如质粒和噬菌体的抗性。RNA引导的核酸内切酶是可编程的遗传工程改造工具，其修改自CRISPR/CRISPR-相关联的蛋白质9(Cas9)系统，其是原核先天免疫的组分。

[0057] 在真核细胞中，DSB的机械性修复主要通过两种途径发生：非同源性末端接合(NHEJ)和同源介导的修复(HDR)。NHEJ是同源性-非依赖性途径，其需要仅一个或少数几个互补碱基在两个末端的再连接处的比对。HDR，其通常是DSB修复的更准确的机制，利用较长延伸的序列同源性来修复DNA断裂。具体而言，多种HDR途径的特征是利用同源供体(例如，姐妹染色单体、质粒、寡核苷酸(即，寡-DNA)等)。在HDR中，DSB修复涉及在断裂处切除5'末端DNA链以产生3'突出。随后，3'单链DNA(即，3'突出)可侵入同源DNA双链体，置换一条链并与另一条链配对以产生置换环(D-环)结构，其由异源双链体DNA的区域和DNA的置换单链组成。最后，分解重组中间体以完成DNA修复。

[0058] 提供不同分解以完成修复的两种具体的HDR途径包括双链断裂修复(DSBR)和合成依赖性链-退火(SDSA)。在DSBR途径中，3'突出侵入完整同源模板并作为DNA修复合成的引物，D-环可通过从侵入链的3'端的新DNA合成起始或通过解旋酶的作用而延伸，从而DSB的相对侧的3'突出可退火，因此形成双"霍利迪连结体"(dHJ)中间体。

[0059] 或者，从两个DSB末端的两种非依赖性链侵入，然后同时DNA合成和退火，也可能导致dHJ中间体。关于重组是基于一端还是两端均经历链侵入的实验证据不明。这些dHJ可被数种HJ解离酶之一切割，并且，根据哪条链被切割，可产生非交叉体(即，全部新合成的序列均在同一分子上)或交叉体(各个分子上新旧序列的组合)结果。作为切割的替代方式，dHJ可被"溶解"以产生独有的非交叉体结果。

[0060] SDSA途径是保守的，并且独有地导致非交叉体事件。在SDSA途径中，在链侵入和SDSA中D-环形成之后，新合成的侵入性链的部分从模板置换，并且回到另一DSB末端处的非侵入链的加工端。非侵入性链的3'端经延长并连接以填充缺口，由此完成SDSA。

[0061] 聚合物囊泡是合成聚合物囊泡，其以纳米级维度(50-300nm直径)形成并显示作为细胞氧运载体的数种有利性质。例如，聚合物囊泡属于双层和多层囊泡的类别，其可通过自组装产生并且可在它们的水性核心中包封亲水化合物例如血红素(Hb)和肌球素(Mb)。并且，聚合物囊泡提供由完全生物可降解FDA-批准组分设计且显示无体外或急性体内毒性的数种选择。

[0062] 聚合物囊泡显示优于脂质体和基于其它纳米颗粒的递送载剂的数种优越性质，这使它们成为用于多种分子的有效运载体。例如，根据它们的组分共聚物嵌段的结构，聚合物囊泡膜可显著地厚(约9-22nm)于脂质体膜(3-4nm)，这使它们相比脂质体而言具有5-50倍更强的机械坚韧度和至少10倍更低的水透过性。具有1.2-3.7kDa的聚(环氧乙烷)(PEO)的聚合物囊泡的循环半衰期与具有相似尺寸的基于聚乙二醇的脂质体(PEG-脂质体)类似(约24-48小时)，并且能通过采用多种共聚物作为复合构建嵌段经进一步具体调整。已显示聚合物囊泡能原位稳定数月，并且能在充分混合的拟生理条件下于血浆中稳定数日而不发生囊泡尺寸和形态的任何变化。它们不显示内部-表面热传递直至60℃。此外，对于包封阿霉素的基于PEO-b-PCL和聚(环氧乙烷)-嵌段-聚(丁二烯)-(PEO-b-PBD-)的聚合物囊泡制剂的早期动物研究已显示无急性或亚急性毒性。最后，聚合物囊泡的生产和贮存是经济的。聚合物囊泡可容易地被大规模生产和贮存，无需高成本的制造后纯化处理。

[0063] 具有前景的生物可降解聚合物囊泡-包封的蛋白质制剂可包含由如下部分组成的嵌段共聚物:亲水生物相容的聚(环氧乙烷)(PEO),其与PEG化学同义(并且在本文中可互换使用)、多聚核酸、聚酯、聚原酸酯、多肽,聚磷腈和多糖,包括但不限于聚交酯(PLA)、聚乙交酯(PLGA)、聚(乳酸-共-乙醇酸)(PLGA)、聚(e-己内酯)(PCL),和聚三亚甲基碳酸酯(PTMC)。包含100%PEG化的表面的聚合物囊泡具有改善的体外化学稳定性,增强的体内生物利用度,和延长的血液循环半衰期。例如,脂族聚酯,构成聚合物囊泡的膜部分,通过它们的酯连接在生理条件下(例如人体中)的水解而被降解。由于其生物可降解性质,人们已对脂族聚酯用作药物递送装置中的可植入生物材料、生物可吸收缝线、粘黏阻隔薄膜和用于通过组织工程进行损伤修复的支架给予了大量关注。

[0064] 在不同的实施方式中,基因编辑(即,基因编辑工具)所需的分子可采用单一聚合物囊泡运载体递送至细胞。本文所用的术语"基因编辑"指基因组DNA中的核酸的插入、缺失或替代,以添加、破坏或修饰由基因编码的产物的功能。多种基因编辑系统至少需要引入切割酶(例如,核酸酶或重组酶),该切割酶能够切割基因组DNA以破坏或活化基因功能。此外,在涉及插入新的或现存核苷酸/核酸的基因编辑系统中,除了切割酶(例如核酸酶、重组酶、整合酶或转座酶)以外,还需将插入工具(例如DNA模板载体,转座子或逆转录转座子)递送至细胞。对于重组酶,该插入工具的示例可包括DNA载体。对于核酸酶,插入工具的示例可包括用于HDR(以插入新合成的核苷酸)的模板DNA;其它基因编辑系统需要随插入载体一同递送整合酶,随转座子/逆转录转座子等一同递送转座酶。在一些实施方式中,可用作切割酶的示例重组酶是CRE重组酶。在不同的实施方式中,可用于插入工具中的示例整合酶包括来自许多中病毒(例如,AAV、γ逆转录病毒、慢病毒等)中任何一种的基于病毒的酶。可用于插入工具的示例转座子/逆转录转座子包括PiggyBac、睡美人(Sleeping Beauty)、L1等。

[0065] 在不同的实施方式中,可用作切割酶的核酸酶包括但不限于,Cas9、转录活化子样效应物核酸酶(TALEN),和锌指核酸酶。其中Cas9是切割酶的实施方式也需要引导RNA,其可以RNA或DNA载体的部分(其随后在细胞内转录)的形式被递送至细胞。如此,利用核酸酶和DNA模板用于HDR的示例基因编辑系统需要递送至少两种基因编辑工具至同一细胞(即,核酸酶和DNA模板),而对于特定核酸酶Cas9需要三种工具(即,Cas9、引导RNA和DNA模板)。在另一个示例中,采用核酸酶和转座子连同转座酶的基因编辑系统需要递送至少三种基因编辑工具至同一细胞(即,核酸酶、转座子和转座酶),而对于特定核酸酶Cas9需要四种工具(即,Cas9、引导RNA、转座子和转座酶)。

[0066] 在不同的实施方式中,本文所述的基因编辑系统,包括需要两种或更多种基因编辑工具的那些,可被包封在单一纳米颗粒运载体中。具体而言,对于一组基因编辑工具的聚合物囊泡包封可允许将进行希望的基因修饰所需的全部分子有效递送至细胞。

[0067] 基于聚合物囊泡的递送系统提供就材料而言的足够的柔性,以及大荷载能力、体内稳定性,和纳米颗粒荷载物的靶向释放。例如,聚合物囊泡可经设置以根据pH变化(例如在细胞核内体中存在的pH)释放其内容物。

[0068] 在一个示例中,双链DNA的位点特异性切割可通过采用多种聚合物囊泡递送RNA导向的核酸酶和引导RNA来实现。在不同的实施方式中,RNA分子可由两种非编码RNA元件构成:CRISPR RNA(crRNA),其包含与天然DNA中的靶序列互补且异源二聚化的20bp的独特序列(间隔物序列);和(2)反式活化crRNA(tracrRNA)。通过crRNA上的间隔物和靶DNA上的互

补序列(前间隔序列)之间的互补碱基配对,crRNA:tracrRNA双链体将Cas9引导至基因组中的靶DNA,产生DNA/RNA复合物。Cas9蛋白的靶特异性依赖于相对于DNA/RNA复合物方向的DNA相反链中特定核苷酸碱基的存在,称作前间隔区序列邻近基序(PAM)。例如,来自酿脓链球菌(Streptococcus pyogene)的Cas9RNA引导的核酸酶,spCas9,需要5'-NGG-3'PAM。

[0069] RNA导向的核酸酶识别RNA/DNA复合物并在靶序列中产生DSB。DSB位于来自相对于DNA/RNA复合物的相反链上的PAM序列的三个碱基。即,以3'方向,PAM序列(例如,NGG)跟随与前间隔序列互补的相反链上的区域。

[0070] 在一些实施方式中,聚合物囊泡可用于包封RNA导向的核酸酶可以是天然蛋白质形式。在一些实施方式中,编码RNA导向的核酸酶的mRNA可换而被包封,一旦处于细胞中,即被翻译成形成酶的氨基酸。

[0071] 不同实施方式可以是基于DNA的系统,其被包封进入聚合物囊泡。在一些实施方式中,表达RNA导向的核酸酶的表达载体可被包封在聚合物囊泡中。表达载体可以是,例如,质粒构建的,以包含编码RNA导向的核酸酶的DNA以及启动子区域。一旦处于靶细胞中,编码RNA导向的核酸酶的DNA可被转录并翻译以产生所述酶。在一些实施方式中,表达载体可经构建以表达引导RNA以及RNA导向的核酸酶。在不同的实施方式中,通过同时包封外源DNA以用作HDR模板,HDR可用于基因编辑。即,在一些实施方式中,除RNA引导的核酸酶和引导RNA以外,聚合物囊泡还可包封DNA修复模板。修复模板可包含所需的序列以供基因编辑,以及靶标上游和下游紧接的其它同源序列(称为左和右同源性臂)。各同源性臂的长度和结合位置取决于被引入的变化的大小。根据具体应用,修复模板可以是单链寡脱氧核苷酸(ssODN)、双链寡脱氧核苷酸(dsODN)或双链DNA(dsDNA)质粒。例如,ssDNA模板(例如,ssODN或dsODN)可用于引入小修饰(例如,至多约50bp或单点突变)。在不同的实施方式中,ssODN和dsODN还可在意图的突变的一侧上的同源性臂处包括至少40碱基对。对于较大插入,可采用包括各800bp或更大的同源性臂的dsDNA(例如,在已经线性化或是转座子形式的质粒的情况中)。

[0072] 因此,采用与高度特异性的DNA修复模板偶联的Cas9,可将多种引导RNA分子设计为突变、活化或抑制几乎任何基因。

[0073] 在不同的实施方式中,多重基因编辑应用采用RNA导向的核酸酶(例如,Cas9)和多重引导RNA来完成。此类应用包括采用Cas9以产生大基因组缺失,和/或一次数个基因(例如,2-7个基因座)的修饰。在一些系统中,2-7个遗传基因座可通过克隆多重gRNA而被靶向。

[0074] 多种实施方式系统还可设计以采用载体(例如人工构建的质粒)上提供的转座子,将DNA整合进入靶细胞的基因组。所述系统的应用可包括通过插入的DNA引入(即,"敲入")新基因以行使具体功能,或通过在靶DNA中形成干扰以失活(即,"敲出")错误行使功能的突变基因。

[0075] 在一些实施方式中,DNA可以是通过"剪贴(cut and paste)"机制在载体和染色体之间直接移置的转座子。在一些实施方式中,转座子可以是逆转录转座子-即,DNA先转录成RNA中间体,然后逆转录成经移置的DNA。

[0076] 在不同的实施方式中,聚合物囊泡可包封载体,该载体包括转座子,以及催化转座子整合进入靶基因组中的特定位点的转座酶。所用的转座酶对于所选的具体转座子具有特异性,其各自可具有用于不同的实施方式中所需的特定性质。一个示例转座子是PiggyBac

转座子，其通过PiggyBac转座酶移置进入靶基因组。具体而言，PiggyBac转座酶识别转座子末端上的转座子特异性反向末端重复序列(ITR)，并将ITR之间的内容移动进入TTAA染色体位点。PiggyBac转座子系统对于可能包括在ITR之间的感兴趣的基因无荷载限制。另一种示例转座子系统是睡美人转座子，其由睡美人转座酶移置进入靶基因组，该睡美人转座酶识别ITR，并将ITR之间的内容移入TA染色体位点。在不同的实施方式中，SB转座子介导的基因转移，或采用多种相似转座子中任一种的基因转移，可用于治疗性基因的长期表达。

[0077] 与本文所述的RNA导向的核酸酶类似，聚合物囊泡可包封处于天然蛋白质形式的转座酶，作为随后在靶细胞中被转录成蛋白质的mRNA，或作为包含DNA以表达转座酶蛋白质的表达载体。例如，编码所述转座酶的基因可提供在与转座子本身相同的载体中，或在不同载体上。

[0078] 不同实施方式还能将RNA导向的核酸酶、一种或多种引导RNA和转座子系统包封于聚合物囊泡中，以供递送至靶细胞。例如，所述聚合物囊泡可用于将致病性的突变基因用该基因的健康拷贝替代，其被插入在由核酸酶的活性决定的特定位点。具体而言，可产生这样的转座子，其包括待插入的一个或多个基因，其由ITR环绕以供转座酶识别。转座子和ITR可在载体上提供，所述载体在ITR的各端上包含同源性臂。转座子系统(即，转座子载体和对应的转座酶)，当与RNA导向的核酸酶和引导RNA递送时，可行使HDR中所用的DNA修复模板的功能。即，在通过RNA引导的核酸酶产生一个或多个DSB之后，作为通过HDR或NHEJ修复的替代，转座子可基于同源性臂而被插入靶DNA。在一些实施方式中，转座子插入可在由DSB产生的两个末端之间发生。在其它实施方式中，转座子可插入在靶DNA中的第一DSB的一个臂和第二DSB的另一臂之间(即，替代两个DSB之间的序列)。

[0079] 尽管包封蛋白质和/或核酸的多种聚合物囊泡制剂可被设计用于不同应用，但各包封系统可包括共同的特点以确保有效。例如，核酸可以至少50％的包封率被聚合物囊泡包封，并且可占最终纳米颗粒制剂的至少10-20重量％。该最小重量百分比和功效确保递送足够核酸以实现有效DNA切割，并且产品能以低成本被可重复地生产。在另一个示例中，聚合物囊泡可被设计为稳定的，而一旦聚合物囊泡被摄取至胞内即容易地释放经包封的荷载物，由此避免内涵体重新运输并确保核酸的释放。并且，在多种基因治疗系统中，载体(即，转座子)可被设计以提供稳定表达。

[0080] 本文所述的聚合物囊泡包封中提供的基因编辑工具可有利于许多体内应用。例如，实施方式材料可被递送至多种细胞类型以切割或修复基因缺陷。此类细胞包括但不限于，肝细胞、肝脏内皮细胞、免疫细胞、神经元等。还可将实施方式聚合物囊泡递送至多种细胞类型以沉默致病的缺陷型基因(例如，递送至视网膜细胞以沉默伯氏先天性黑内障潜在突变)。

[0081] 可采用多种方法来产生本文所述的蛋白质和/或核酸的聚合物囊泡包封和/或共同包封。在一些实施方式中，常规包封技术例如薄膜再水合、直接水合和电-形成可用于将具有独特生物功能的核酸和/或蛋白质包封和/或共同包封进入多种可降解的和不可降解的聚合物囊泡。在其它实施方式中，渐进饱和方案可用于制备蛋白质和/或核酸的此类聚合物囊泡包封和/或共同包封。

[0082] 具体而言，渐进饱和方案涉及使等量的聚合物(例如10mg)和PEG(例如10mg)在约95℃加热约1小时。样品混合物可离心并冷却至室温。可制备待包封的(例如，基因编辑系

统/组合物包含蛋白质和/或核酸)产品溶液,例如在聚丁二酸丁二醇酯(PBS)中,于7.4pH的pH下。首先可将小量的溶液添加至样品混合物(例如10μl),彻底混合,随后在室温超声约30分钟。样品可进一步用多个稀释步骤稀释。具体而言,各稀释步骤可涉及添加一定体积的包含所述蛋白质和/或核酸的溶液,随后彻底混合,并在室温超声约30分钟。稀释步骤之后,所得样品可在等渗PBS中于约4℃透析至少30小时,采用至少1000kDa分子量截止值膜。表面附连产物可通过如下方式去除:蛋白质水解,通过采用0.4重量%链霉蛋白酶溶液进行处理。

[0083] 在不同的实施方式中,可在蛋白质水解之前和之后检测所得聚合物囊泡悬浮液的包封。具体而言,蛋白质和/或核酸的浓度可采用电感耦合等离子体光学发射光谱(ICP-OES)、电感藕合等离子体质谱(ICP-MS)、基质辅助吸收质谱飞行时间法(MALDI-TOF)、原子吸收光谱(AAS)和/或UV-Vis吸收光谱检测。

[0084] 渐进饱和步骤可为在聚合物囊泡中包封蛋白质和/或核酸作为基因编辑系统提供良好结果。即,相较于采用其他技术(例如,直接水合等)的聚合物囊泡包封,基因编辑组合物的负荷能力可显著改善。不意受具体理论限制,此类改善表明聚合物囊泡形成过程在初始稀释步骤过程中未完全,并且随蛋白质溶液的各后续添加而完成进一步包封。可通过最优化并组合来自多重脂质体形成方法的多种步骤,开发特定的渐进饱和方案用于特定基因编辑组合物(例如,蛋白质和/或核酸)和聚合物囊泡类型。可系统地评价影响基因编辑系统的最终浓度的因素、聚合物囊泡运载体中可实现的相对负荷水平(即,w/w%组合物/聚合物),和基因编辑组合物包封功效。多种因素,例如聚合物的分子量、基因编辑组合物的性质、缓冲溶液的pH和性质、确切聚合物水合条件(即,时间、温度和掺混技术)、超声步骤的数量和持续时间,以及冻融循环的添加和避免,均可影响最终聚合物囊泡-包封的基因编辑系统的浓度和保真度。

[0085] 在一些实施方式中,基于用于各稀释步骤的基因编辑组合物的浓度可实现的包封率和最终负荷能力(即,组合物相对聚合物的重量百分比)之间可能存在直接折衷。对于表面-相关联的组合物,蛋白质和/或核酸的水性包封是优选的,以确保最终产物满足使用聚合物囊泡递送载剂的目标—即,改善生物化学稳定性、增加循环半衰期、使不良副作用最小化,和实现相关蛋白质的控释。可采用利用具有较大范围的分子量和尺寸的不同基因编辑组合物的多种实施方式技术。

[0086] 模型蛋白和模型核酸的多种聚合物囊泡包封的产生,以及此类蛋白质和核酸的共同包封,可采用常规技术以及渐进饱和法产生。例如,当用作模型蛋白时,肌球素(Mb;Mw=约17kDa),其尺寸和热稳定性(即,60℃之上的变性)与具有治疗潜力的其它小蛋白质相当。肌球素还具有强紫外(UV)吸光度,这允许容易地鉴定其功能性状态,如通过其含铁血红素基团(iron-containing heme group)氧化还原态的测定。可用于此类包封的其它模型蛋白是牛血清白蛋白(BSA;Mw=约66kDa)和过氧化氢酶(Mw=约250kDa)。具有多种尺寸的模型蛋白的包封和共同包封提供了一定范围大小的功能性蛋白质,其可用于不同的实施方式中。此外,多种DNA质粒可用作用于聚合物囊泡包封的模型核酸,例如编码哺乳动物表达载体的质粒DNA,该哺乳动物表达载体用于表达绿色荧光蛋白(GFP)(采用延长因子1α(EF1a)启动子)(即,pEF-GFP DNA)。pEF-GFP DNA约5000个碱基对,并且分子量是约3283kDa。

[0087] 可采用包含PEG和疏水嵌段的多种两亲性聚合物中的任一种来制备不同实施方式,所述两亲性聚合物为生物可降解聚合物(例如,生物可降解聚酯、聚酰胺、多肽、多聚核

酸等)。可形成疏水嵌段的生物可降解聚合物的示例包括但不限于聚(乳酸),聚(乙醇酸),聚(乳酸-共-乙醇酸),聚(己内酯),聚(甲基己内酯),聚(羟基丁酸酯),聚(羟基戊酸酯),聚(羟基己酸酯),聚(羟基辛酸酯)和聚(三亚甲基碳酸酯)。

[0088] 实验部分

[0089] 可以使用不同的聚合物囊泡制剂来比较所得颗粒与用于形成的技术之间的包封性质。例如,使用PEO-b-PBD二嵌段共聚物来形成具有完全PEG化表面的聚合物囊泡。这些表面不带电且不可降解;提供了理想的系统来确保囊泡的完整性并最小化不需要的蛋白质相互作用或修饰。使用两种不同分子量的PEO-b-PBD二嵌段共聚物,"OB18"和"OB29"来确定结果的普遍性,因为它们涉及不同最小尺寸、PEG长度和膜芯厚度的聚合物囊泡。图1提供了一张表格,显示了OB18和OB29的各种属性的比较。

[0090] 比较和定量研究如下进行。

[0091] 材料

[0092] PEO(3900)-b-PBD(6500)(OB18)和PEO(1300)-b-PBD(2500)(OB29)购自聚合物源公司(Polymer Source)(加拿大魁北克省多瓦尔)。马骨骼肌Mb,牛血清白蛋白(BSA),过氧化氢酶(C),连二硫酸钠,聚乙二醇二甲醚(PEG;Mn=~500),灰色链霉菌(Streptomyces griseus)的蛋白酶("链霉蛋白酶")和二氯甲烷(DCM)购自西格玛-奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)(美国圣路易斯)。透析管和小瓶购自光谱实验室公司(Spectrum Laboratories)(美国多明格斯牧场)。常规使用的其他化学品购自飞世尔科技公司(Fisher Scientific)(美国萨瓦尼)。除非另有说明,所有化学品均为试剂级。

[0093] 使用Delsa Nano,一种动态光散射(DLS)仪器(贝克曼库尔特(Beckman Coulter),美国印第安纳波利斯)测量粒度。通过使用Genes 10S UV-Vis分光光度计(赛默科学公司(Thermo Scientific),美国萨瓦尼)通过光学吸收光谱法测定肌球素浓度。使用微二喹啉甲酸(Micro BCA)蛋白质分析试剂盒,利用UV-Vis分光光度测定法并遵循制造商的方案(皮尔斯生物技术公司(Pierce Biotechnology);美国伊利诺州洛克福德)测量聚合物囊泡包封的悬浮液中BSA的浓度。使用Vista-PRO CCD ICP-OES(美国瓦里安)测定聚合物囊泡包封的悬浮液中的DNA浓度。

[0094] 具体而言,为了定量DNA包封,首先将DNA样品与基于铂(II)的试剂顺铂进行反应,并且生成标准曲线,显示DNA浓度与悬浮液中DNA-结合的铂的量是如何相关的。通过在连续稀释DNA样品后,使用NanoDrop™分光光度计(即UV-vis分光光度测定法)测量DNA浓度并通过ICP-OES测定铂的浓度,形成该标准曲线。在该方式中,通过加入表面活性剂吐温80破坏形成的聚合物囊泡,随后通过ICP-MS测量铂浓度(以及因此在悬浮液中的DNA浓度),计算聚合物囊泡包封的DNA悬浮液的定量研究中的DNA量。该过程避免了对蛋白质和DNA使用相同的测量技术(即UV-vis分光光度测定法),否则这会干扰准确测量。

实施例

[0095] 在第一个比较模型中,使用渐进饱和法将肌球素(Mb)和pEF-GFP DNA共同包封在OB29中。图2A显示了在蛋白水解18小时之前和之后的Mb的包封量(μg/mL),蛋白水解是一种用于从聚合物囊泡悬浮液中除去任何非特异性结合(即表面相关)蛋白质的技术。使用UV-Vis吸收光谱法(也称为分光光度法)定量最终聚合物囊泡中包封的Mb的量。

[0096] 图2B显示了在蛋白质分解之前和之后，作为第一比较模型中蛋白质与聚合物的平均最终重量百分比(即，w/w％Mb/聚合物)的平均负载容量。图2C显示在蛋白水解之前和之后，使用第一比较模型产生的纳米级聚合物囊泡中DNA的平均包封量(μg/mL)。图2C中的包封量使用ICP-OES定量，以在用吐温80破坏囊泡后测量溶液中的DNA结合的铂。图2D显示了在蛋白水解之前和之后，作为所得聚合物囊泡中DNA与聚合物的平均最终重量百分比(即，w/w％DNA/聚合物)的平均负载容量。图2E显示了在其水性腔内含有Mb和DNA两者并在第一比较模型中产生的聚合物囊泡的平均尺寸(即流体动力学直径)。如所示，使用第一比较模型实现Mb的约1-1.5mg/mL的包封量(全部包含在聚合物囊泡的水性腔体内)，相当于最终聚合物囊泡组合物的约3-4重量％。此外，使用第一比较模型实现对DNA的分析，相当于最终聚合物囊泡组合物的约0.15重量％，其显示出直径为约200nm的尺寸。

[0097] 在第二比较模型中，使用薄膜水合法将Mb和pEF-GFP DNA共同包封在基于OB29的聚合物囊泡中。薄膜水合和直接水合是将水溶性物质包封在聚合物囊泡的水性腔内的常规方法，并且已经在各种出版物中描述(例如，O'Neil等人，“通过直接水合将生物分子包封入聚合物囊泡的新方法(A Novel Method for the Encapsulation of Biomolecules into Polymersomes via Direct Hydration)”，Langmuir 2009 25(16)，9025-9029)。

[0098] 图3A显示在蛋白水解18小时之前和之后，使用第二比较模型产生的纳米颗粒中的Mb的包封量(μg/mL)。使用UV-Vis吸收光谱法定量包封量。

[0099] 图3B显示了蛋白水解前后的平均负载容量，所述平均负载容量作为聚合物囊泡的蛋白质与聚合物的平均最终重量百分比(即w/w％Mb/聚合物)，所述聚合物囊泡将Mb和DNA两者包封在相同纳米级囊泡构建体中并且在第二比较模型中产生。图3C显示了在蛋白水解之前和之后，聚合物囊泡中DNA(μg/mL)的平均包封量。图3C中的包封量使用DNA结合的铂的ICP-OES进行定量。图3D显示了在蛋白水解之前和之后，作为在第二比较模型中产生的聚合物囊泡中DNA-聚合物的平均最终重量百分比(即，w/w％DNA/聚合物)的平均负载容量。图3E显示在相同的纳米级囊泡构建体中包封Mb和DNA的聚合物囊泡的平均大小(即直径)。如所示，使用第二比较模型实现Mb的约80μg/mL的包封，相当于最终聚合物囊泡制剂中约10重量％的蛋白质。此外，使用第二比较模型实现了约12μg/mL的DNA包封，相当于最终聚合物囊泡制剂的约0.18重量％。发现使用第二比较模型产生并且将Mb和DNA包封在相同纳米囊泡构建体内的最终聚合物囊泡制剂具有直径约730nm的平均粒径。

[0100] 在第三个比较模型中，使用渐进饱和技术将BSA和pEF-GFP DNA共包封在基于OB29的聚合物囊泡中。图4A显示了在蛋白水解18小时之前和之后，所得到的聚合物囊泡中的BSA的平均包封量(μg/mL)。使用微BCA试验定量包封的蛋白质的量。

[0101] 图4B显示了蛋白质水解之前和之后，作为在第三比较模型中生成的聚合物囊泡中蛋白质与聚合物的平均最终重量百分比(即，w/w％BSA/聚合物)的平均负载容量。图4C显示了在蛋白水解之前和之后，聚合物囊泡中DNA(μg/mL)的平均包封量。图4C中的包封量使用DNA-结合的铂的ICP-OES定量。图4D显示了在蛋白水解之前和之后，作为在第三比较模型中产生的聚合物囊泡中的DNA与聚合物的最终重量百分比(即，w/w％DNA/聚合物)的平均负载容量。图4E显示了在相同纳米级囊泡构建体中包封BSA和DNA两者的聚合物囊泡的平均大小(即直径)。如所示，使用第三比较模型实现了BSA约1-1.5mg/mL的包封，相当于最终聚合物囊泡制剂的约3-4重量％。此外，使用第三比较模型实现了约50μg/mL的DNA包封，相当于最

终聚合物囊泡制剂的约0.15重量%。当在第三比较模型中产生时，在相同纳米囊泡构建体中包封BSA和DNA的聚合物囊泡的直径大小为约200nm。

[0102] 通过比较图2E，3E和4E所示的结果与图1的纳米颗粒尺寸可知，使用渐进饱和技术通过蛋白质(Mb或BSA)与核酸(pEF-GFP DNA)的共同包封，得到的最终聚合物囊泡并没有显著更大。然而，当使用薄膜水合产生时，在相同纳米级囊泡构建体中包封蛋白质和核酸的最终聚合物囊泡的尺寸要大得多。

[0103] 使用由其它不可降解聚合物(例如OB18)制成的聚合物囊泡以及由各种可降解聚合物制成的聚合物囊泡，已经并将继续开发使用相同方案的其他聚合物囊泡包封作为比较模型。这种可降解聚合物的例子包括但不限于：PEO(5000)-b-PCL(16300)(“P2350-EOCL”)；PEO(2000)-b-PMCL(11900)(“OCL”)；PEO(2000)-b-PMCL(8300)(“OMCL”)；PEO(1100)-b-PTMC(5100)(“OTMC”)和PEO(2000)-b-PTMC/PCL(1200)(“OTCL”)。

[0104] 使用来源于酿脓链球菌(Streptococcus pyogenes)的Cas9蛋白制备了聚合物囊泡包封的RNA导向的核酸酶的示例性实施方式。具体而言，4-羟基苯甲酸酯的不可降解聚合物

[0105] 使用渐进饱和方案使用聚(丁二烯2500-b-环氧乙烷1300)(“OB29-Bz”)包封Cas9蛋白(粉末，250μg/瓶)，其中将样品室温透析(MW截止值＝100kDa)30小时。图5A显示了在蛋白水解之前和之后，所得聚合物囊泡中Cas9蛋白的平均包封量(μg/mL)。使用微BCA试验定量包封。图5B显示了在蛋白水解之前和之后，所得聚合物囊泡中Cas9蛋白的平均包封率(%EE)。图5C显示了蛋白质分解之前和之后，作为在本实施例中生成的聚合物囊泡中蛋白质与聚合物的平均最终重量百分比(即，w/w%Cas9蛋白质/聚合物)的平均负载容量。如所示，在本实施例中实现了对Cas9蛋白质约3mg/mL的包封，相当于最终聚合物囊泡制剂的约3-4重量%。Cas9蛋白的包封率约为65%。

[0106] 在第四个比较模型中，使用渐进饱和技术将Cas9蛋白和pEF-GFP DNA共包封在OB29-Bz中。图6A显示了在第四个比较模型中生成的聚合物囊泡中包封的Cas9蛋白的平均量(μg/mL)。包封量通过微BCA试验来定量。图6B显示了蛋白质水解之前和之后，作为聚合物囊泡中蛋白质与聚合物的平均最终重量百分比(即，w/w%Cas9蛋白质/聚合物)的平均负载容量。

[0107] 图6C显示了在蛋白水解之前和之后，在第四比较模型中产生的纳米颗粒中包封的DNA的平均量(μg/mL)。图6C中的包封量使用DNA结合的铂的ICP-OES进行定量。图6D显示了即在蛋白水解之前和之后，作为所得聚合物囊泡中DNA与聚合物的平均最终重量百分比(即，w/w%DNA/聚合物)的平均负载容量。图6E显示了在第四比较模型中产生的最终聚合物囊泡的平均尺寸(即直径)。如所示，使用第四比较模型实现Cas9蛋白质的约1mg/mL的包封，相当于最终聚合物囊泡制剂的约3重量%。此外，使用第四比较模型实现DNA的约50μg/mL的包封，相当于在相同纳米级囊泡构建体中包封Cas9蛋白和DNA两者的最终聚合物囊泡制剂的约0.15重量%。这些聚合物囊泡的直径约为220纳米。

共聚物	M_n × 10^3	M_w/M_n	折射率	流体力学
	PEG-b-PBD	(kg/mol)	(nm)	(nm)
O818	3.9-b-6.5	10400	1.10	14.8	205
O829	1.3-b-2.5	3800	1.04	9.6	132

图1

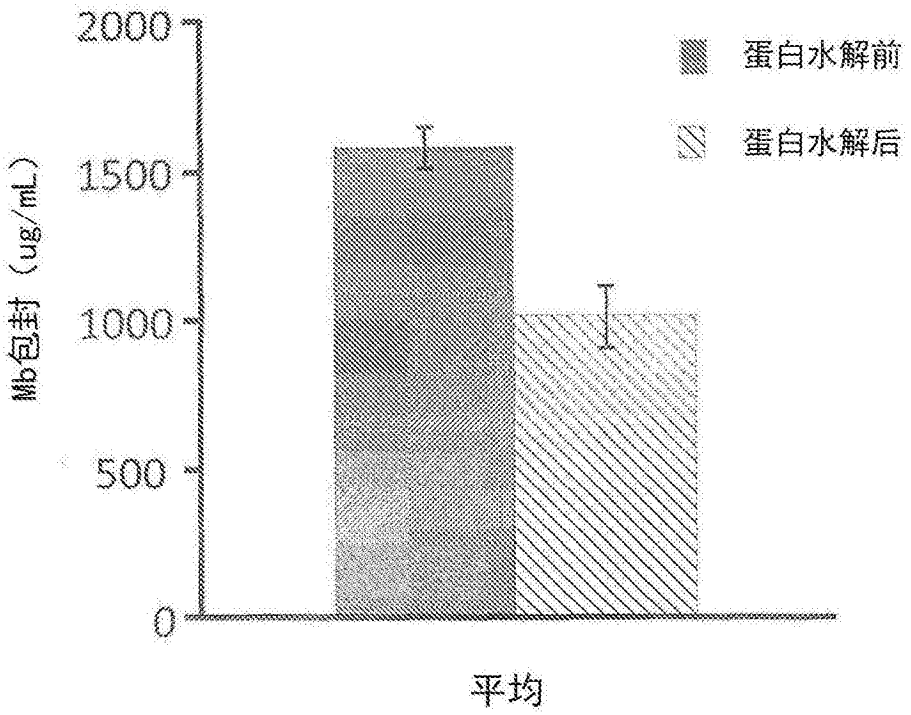


图2A

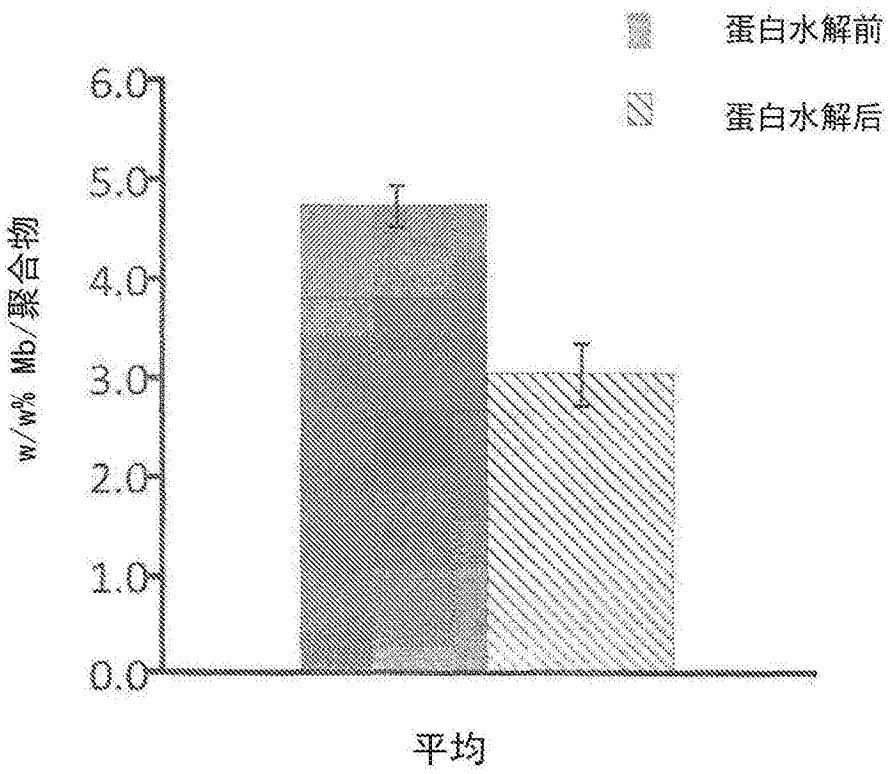

蛋白水解前
蛋白水解后
w/w% Mb/聚合物
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
平均

图2B

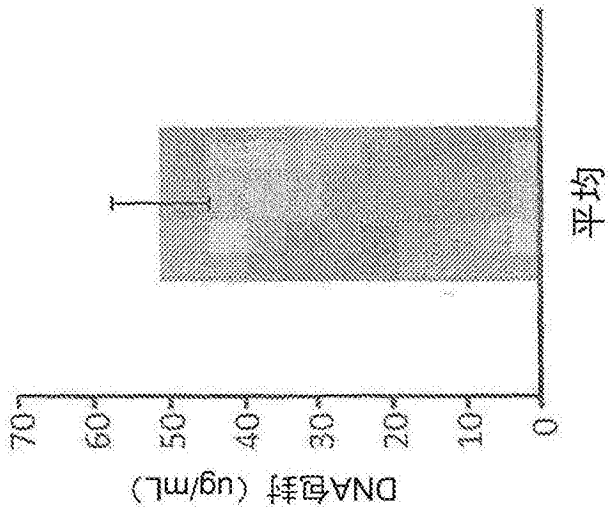

平均
70
60
50
40
30
20
10
0
DNA包封 (ug/mL)

图2C

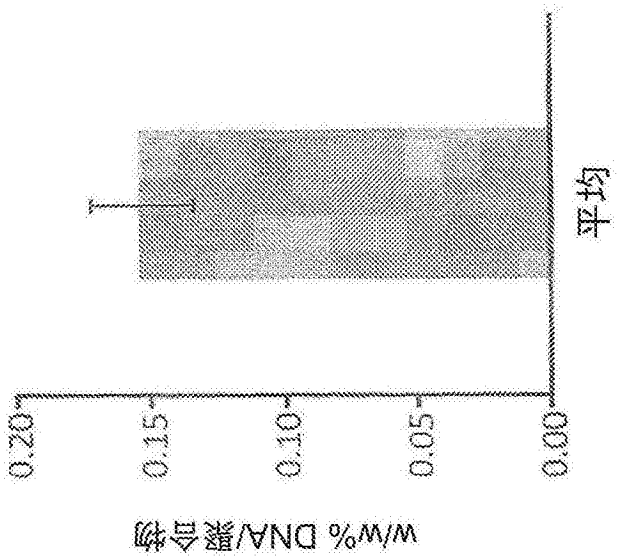

均值
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
w/w% DNA/聚合物

图2D

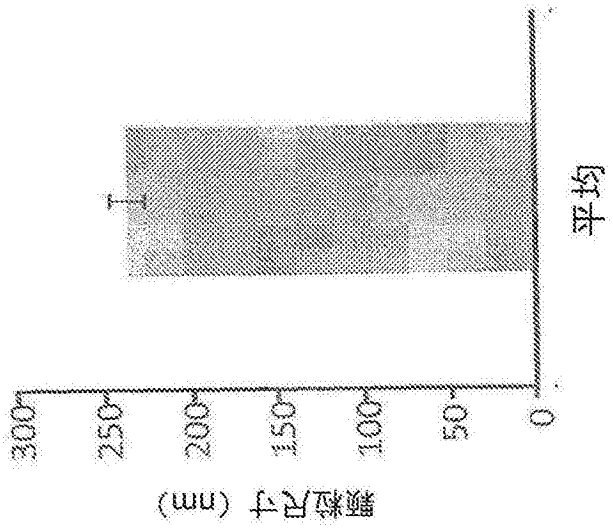

均值
300
250
200
150
100
50
0
颗粒尺寸 (nm)

图2E

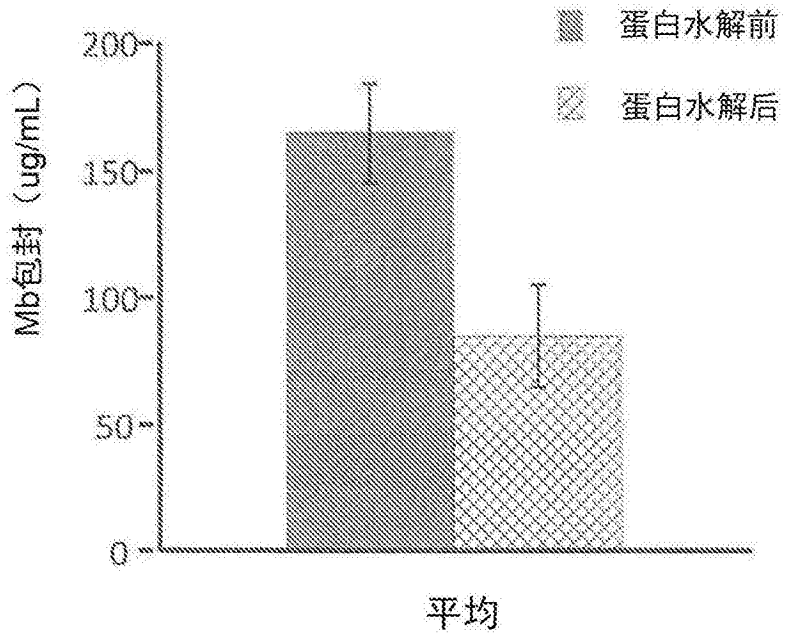

蛋白水解前
蛋白水解后
Mb包封（ug/mL）
200
150
100
50
0
平均

图3A

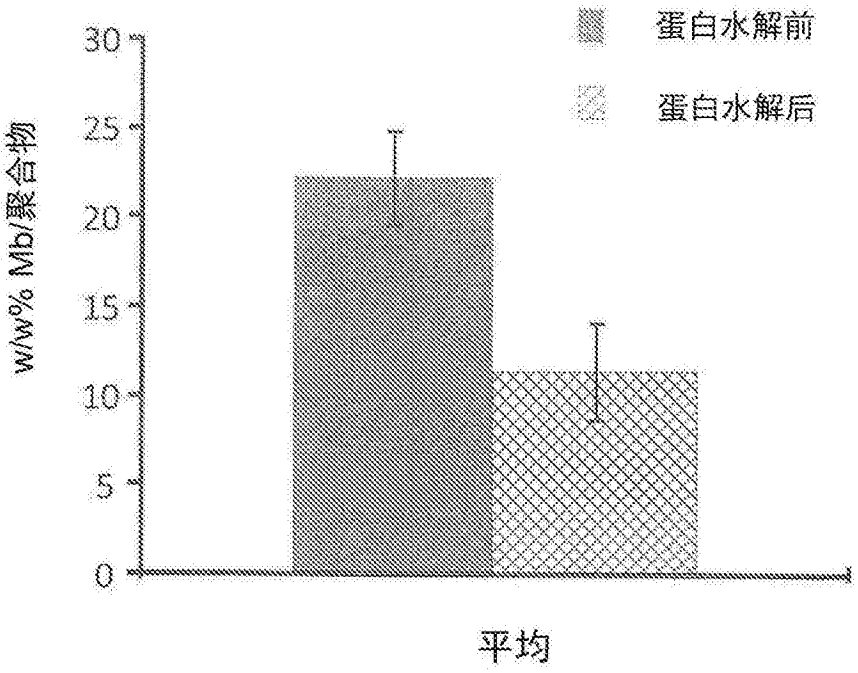

蛋白水解前
蛋白水解后
w/w% Mb/聚合物
30
25
20
15
10
5
0
平均

图3B

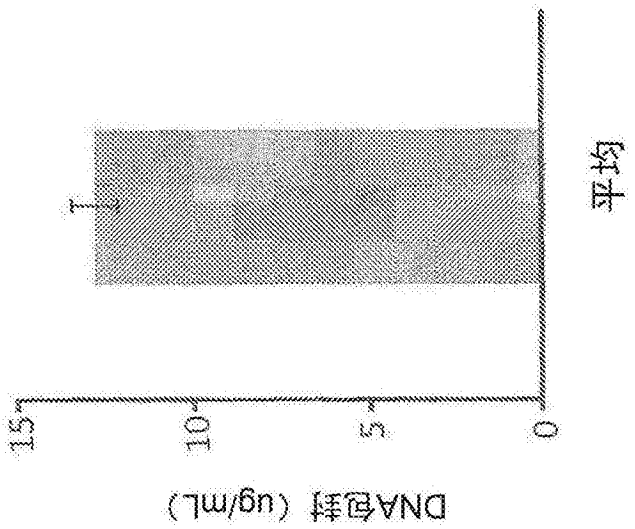


图3C

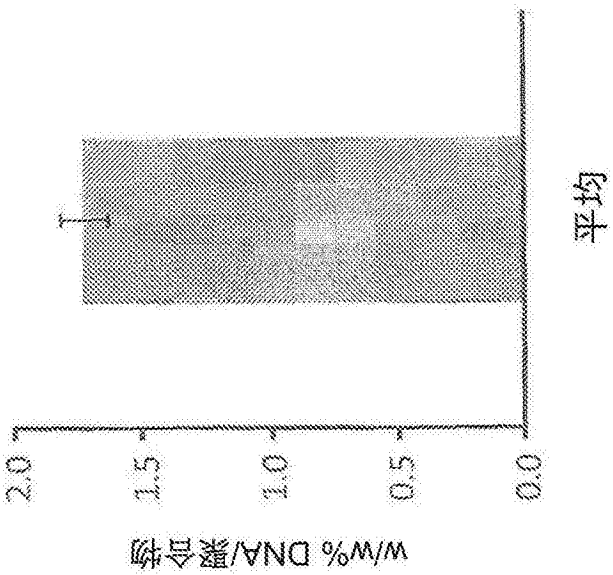


图3D

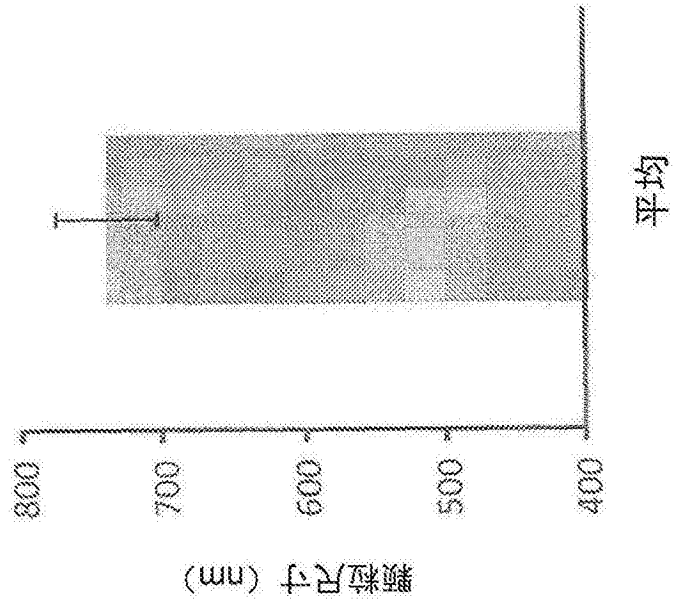

平均
800
700
600
500
400
颗粒尺寸（nm）

图3E

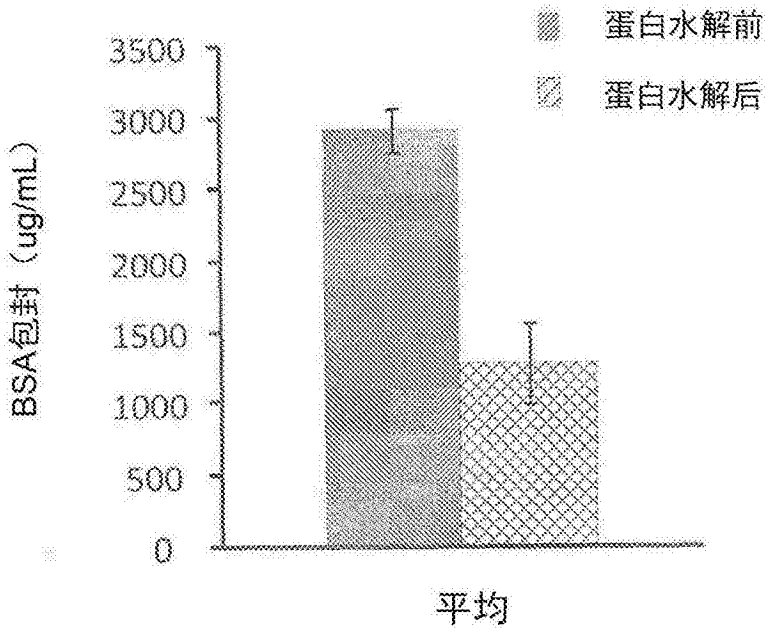

蛋白水解前
蛋白水解后
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
BSA包封（ug/mL）
平均

图4A

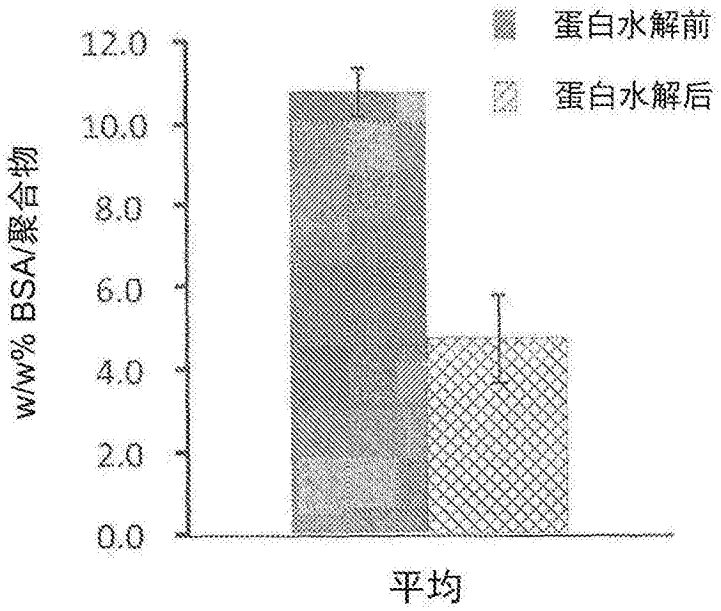

蛋白水解前
蛋白水解后
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
w/w% BSA/聚合物
平均

图4B

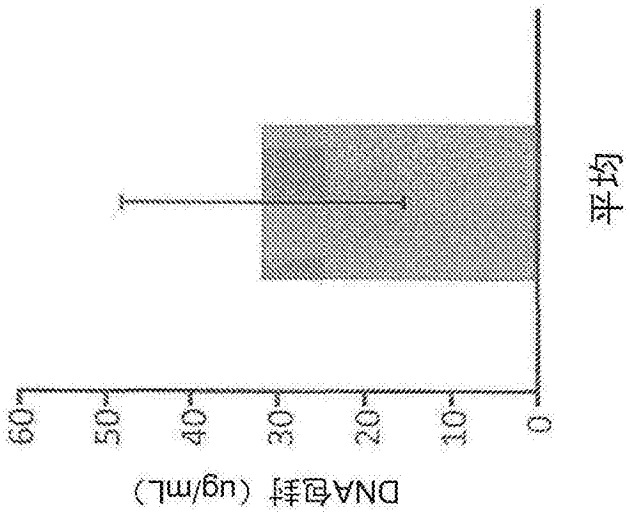

平均
60
50
40
30
20
10
0
DNA包封 (ug/mL)

图4C

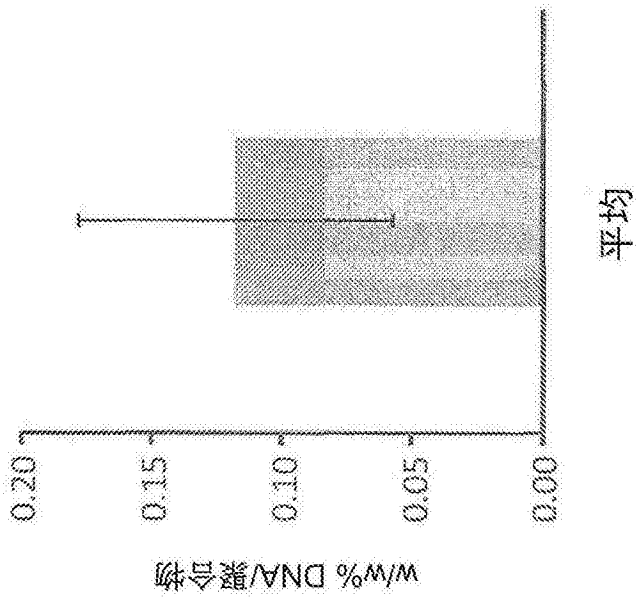

平均
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
w/w% DNA/聚合物

图4D

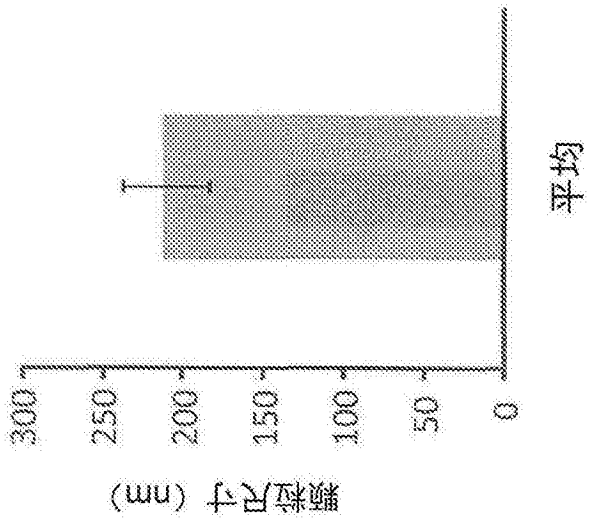

平均
300
250
200
150
100
50
0
颗粒尺寸（nm）

图4E

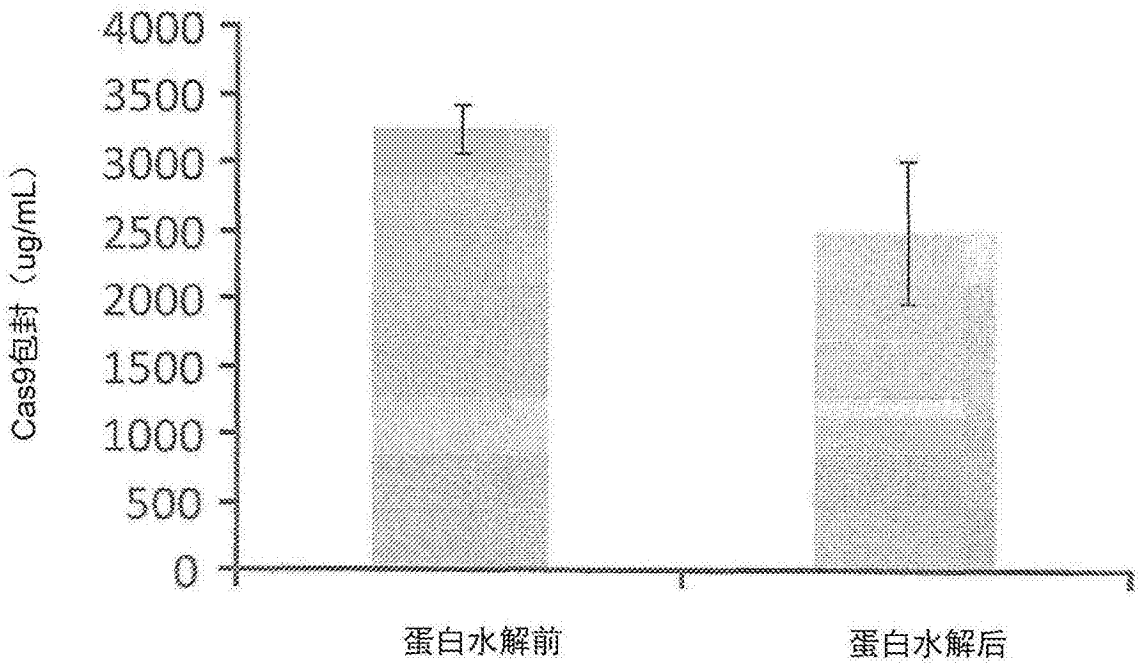

4000
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Cas9包封（ug/mL）
蛋白水解前
蛋白水解后

图5A

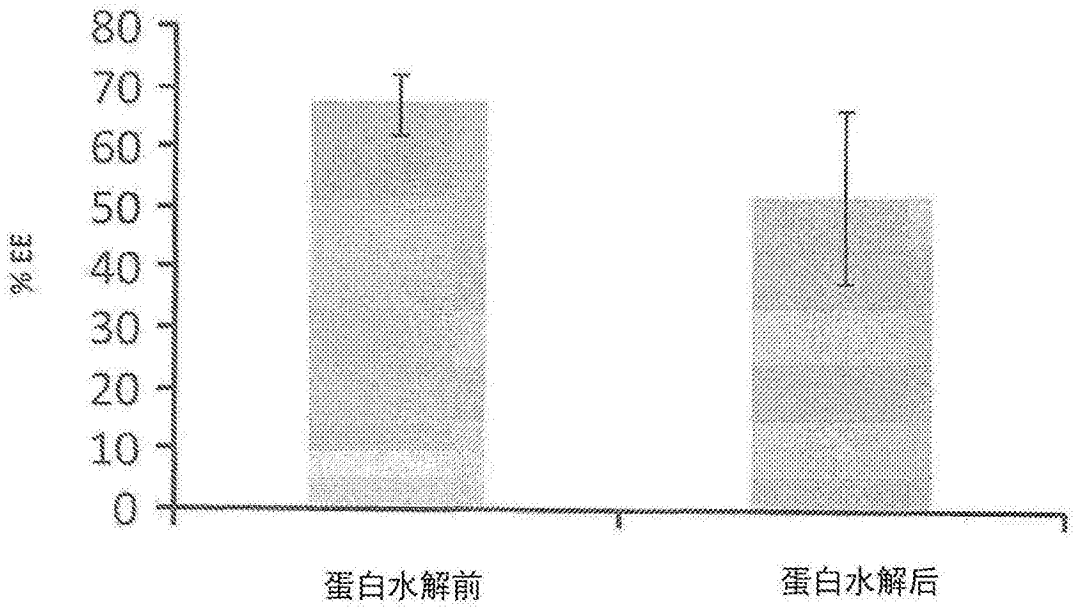

80
70
60
50
40
30
20
10
0
%
蛋白水解前
蛋白水解后

图5B

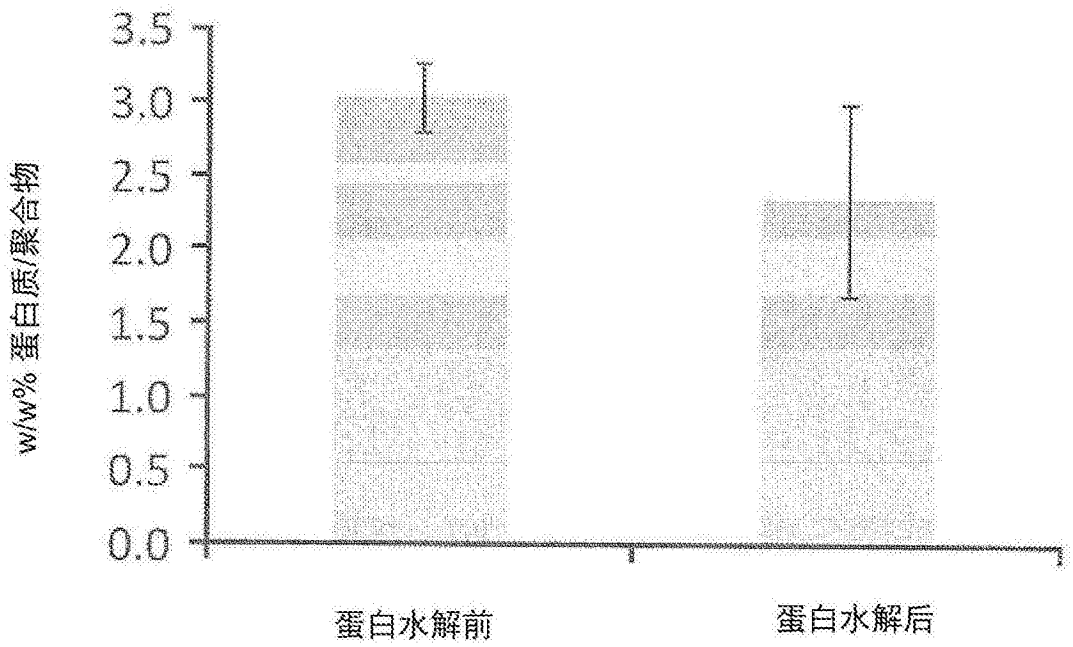

3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
w/w% 蛋白质/聚合物
蛋白水解前
蛋白水解后

图5C

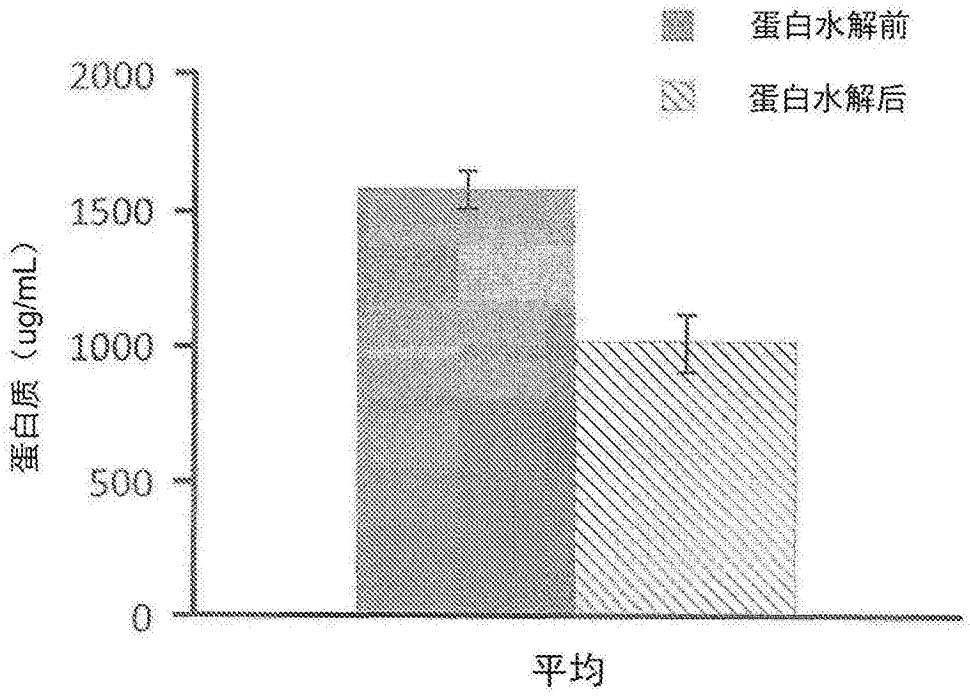

蛋白水解前
蛋白水解后
2000
1500
1000
500
0
蛋白质（ug/mL）
平均

图6A

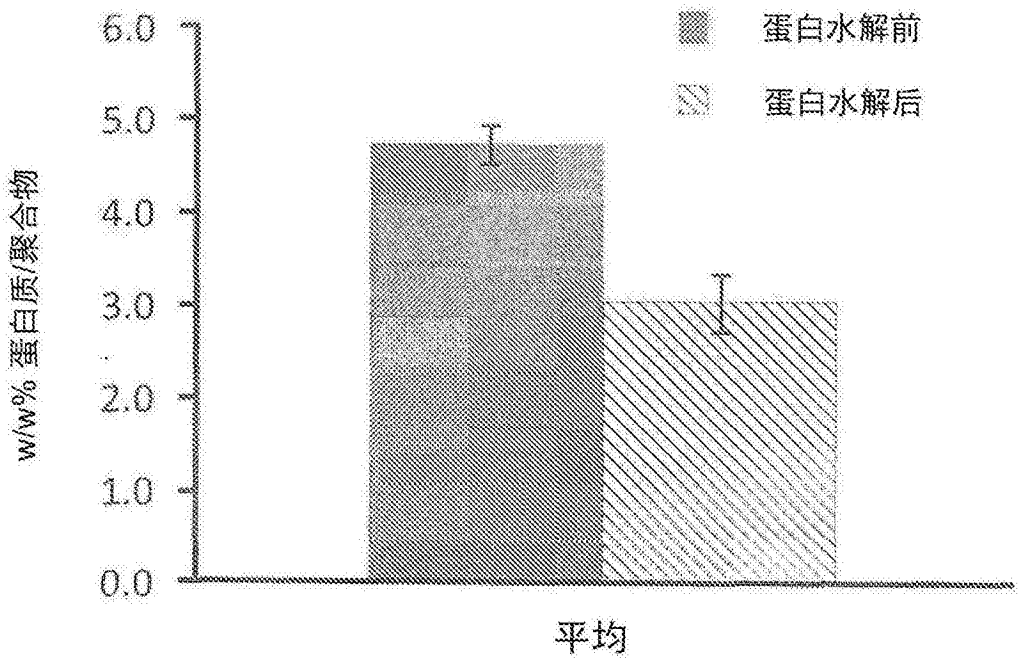

6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
w/w% 蛋白质/聚合物
蛋白水解前
蛋白水解后
平均

图6B

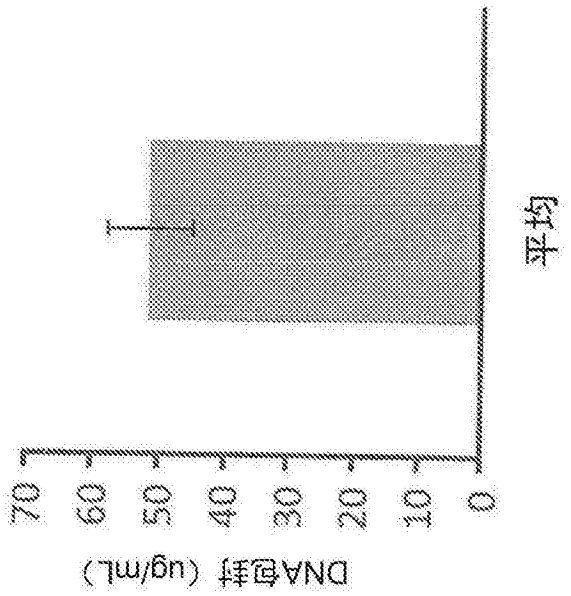

平均
0
10
20
30
40
50
60
70
DNA包封 (ug/mL)

图6C

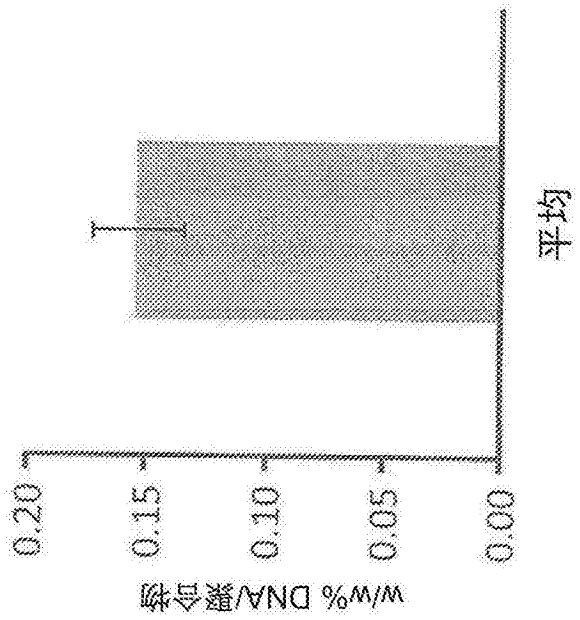

平均
1
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
w/w% DNA/聚合物

图6D

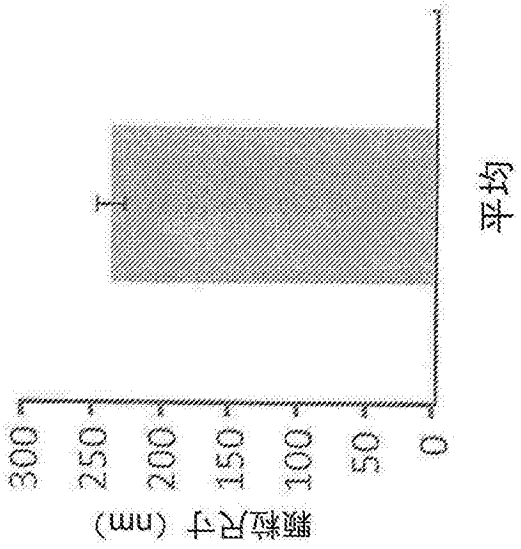

平均
1
300
250
200
150
100
50
0
颗粒尺寸 (nm)

图6E