



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108601883 A

(43)申请公布日 2018.09.28

(21)申请号 201680068693.5

(22)申请日 2016.09.27

(30)优先权数据

62/234,340 2015.09.29 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.24

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/053960 2016.09.27

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/058793 EN 2017.04.06

(71)申请人 埃吉诺维亚公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 S·R·奎克

(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

代理人 赵昊 顾云峰

(51)Int.Cl.

A61M 5/00(2006.01)

A61K 9/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书17页 附图21页

(54)发明名称

递送方法和组合物

(57)摘要

本申请提供了通过递送降解靶标遗传物质的酶从受试者中去除靶标遗传物质的方法和组合物。所述方法包括将核酸组合物与各种类型的能量一起递送至受试者的组织(例如,皮肤),以增强所述组织的渗透性并使所述核酸进入所述组织的细胞,其中所述核酸包含一种切割靶标遗传物质的酶的基因。所述核酸可以是质粒,其包含cas9基因和至少一个短链向导RNA(sgRNA)的基因的质粒,并且所述靶标遗传物质可以是病毒基因组,即所述sgRNA与病毒基因组的一部分互补。

1. 一种用于从受试者中破坏靶标遗传物质的方法,所述方法包括:
通过向组织施加能量以增加所述组织的渗透性,来将包含核酸的组合物递送至所述组织,从而使得所述核酸进入所述组织的细胞,其中所述核酸编码可编程核酸酶。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述可编程核酸酶是Cas9。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述能量通过电穿孔施加。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述施加的能量是超声波。
5. 根据权利要求2所述的方法,其中所述核酸是质粒,其包含cas9基因和至少一个短链向导RNA (sgRNA) 的基因。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述靶标遗传物质是病毒。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述sgRNA与病毒基因组的一部分互补并且在人类基因组中没有匹配。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述病毒基因组是乙型肝炎基因组,并且所述质粒含有靶向乙型肝炎基因组中的位置的一种或多种sgRNA的基因。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述一种或多种sgRNA靶向选自下组的所述乙型肝炎基因组中的位置:Pre S1、DR1、DR2、聚合酶的逆转录酶 (RT) 结构域、Hbx和核心ORF。
10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述一种或多种sgRNA包含选自sgHBV-核心和sgHBV-PreS1的一种。
11. 根据权利要求1所述的方法,其中所述靶标遗传物质是病毒的基因组,并且其中所述核酸是质粒,其包含cas9基因和靶向所述病毒的基因组的至少一种sgRNA。
12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述质粒还包含病毒复制起点。
13. 根据权利要求11所述的方法,其中所述病毒是乙型肝炎病毒,并且所述至少一种sgRNA选自由sgHBV-RT、sgHBV-Hbx、sgHBV-核心和sg-HBV-PerS1组成的组。
14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述核酸包含含有5' 帽的mRNA。
15. 根据权利要求1所述的方法,其中所述酶是转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 。
16. 一种治疗受试者的方法,所述方法包括:
通过向组织施加能量以增加组织的渗透性,来将包含可编程核酸酶的组合物递送至所述组织,以使所述可编程核酸酶进入所述组织的细胞。
17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述可编程核酸酶是作为核糖核蛋白 (RNP) 的与向导RNA复合的RNA引导性核酸酶。
18. 根据权利要求17所述的方法,其中所述可编程核酸酶是Cas9。
19. 根据权利要求17所述的方法,其中施加所述能量包括所述组织的电穿孔。
20. 根据权利要求16所述的方法,其中所施加的能量包括超声能量。
21. 一种用于递送抗病毒疗法的试剂盒,所述试剂盒包括:
能够可操作地向组织施加能量的装置;和
编码可编程核酸酶的核酸,所述可编程核酸酶已被编程成用于切割病毒的遗传物质中的靶标。
22. 根据权利要求21所述的试剂盒,其中所述装置是电穿孔装置,所述电穿孔装置包括电穿孔发生器和至少一个电极。
23. 根据权利要求22所述的试剂盒,其中所述可编程核酸酶是RNA引导性核酸酶。

24. 根据权利要求23所述的试剂盒,还包括具有内腔的细长构件,其中所述内腔被构造用于将所述核酸递送至受试者体内的治疗部位。

25. 根据权利要求23所述的试剂盒,其中所述至少一个电极涂覆有所述核酸。

26. 根据权利要求23所述的试剂盒,其中编码所述可编程核酸酶的所述核酸是编码所述可编程核酸酶的mRNA并且被包封在纳米颗粒中。

27. 根据权利要求26所述的试剂盒,其中所述纳米颗粒包含脂质。

28. 根据权利要求27所述的试剂盒,其中所述RNA引导性核酸酶是Cas9。

29. 根据权利要求21所述的试剂盒,其中所述装置包括超声波换能器。

30. 根据权利要求29所述的试剂盒,其中所述核酸是编码所述可编程核酸酶的mRNA。

31. 根据权利要求30所述的试剂盒,还包括具有内腔的细长构件,其中所述内腔被构造用于将所述核酸递送至受试者体内的治疗部位。

32. 根据权利要求31所述的试剂盒,其中所述核酸在所述细长构件内的微泡内提供。

33. 根据权利要求32所述的试剂盒,其中所述可编程核酸酶是Cas9并且所述微泡还包含一种或多种向导RNA。

34. 根据权利要求33所述的试剂盒,其中所述细长构件是针。

35. 根据权利要求34所述的试剂盒,其中所述超声波换能器运行以提供低强度非空化超声。

36. 一种用于递送抗病毒疗法的试剂盒,所述试剂盒包括:

能够可操作地向组织施加能量的装置;和

已被编程成用于切割病毒的遗传物质中的靶标的可编程核酸酶。

37. 根据权利要求36所述的试剂盒,其中所述装置是电穿孔装置,所述电穿孔装置包括电穿孔发生器和至少一个电极。

38. 根据权利要求37所述的试剂盒,其中所述可编程核酸酶是作为活性核糖核蛋白(RNP)的与向导RNA复合的RNA引导性核酸酶,其中所述向导RNA与病毒遗传物质内的靶标互补并且不与在人类基因组内的任何靶标互补。

39. 根据权利要求38所述的试剂盒,还包括具有内腔的细长构件,其中所述内腔被构造用于将所述RNP递送至受试者体内的治疗部位。

40. 根据权利要求39所述的试剂盒,其中所述RNP被包封在纳米颗粒中。

41. 根据权利要求40所述的试剂盒,其中所述纳米颗粒包含脂质。

42. 根据权利要求41所述的试剂盒,其中所述RNA引导性核酸酶是Cas9。

43. 根据权利要求36所述的试剂盒,其中所述装置包括超声波换能器。

44. 根据权利要求43所述的试剂盒,其中所述可编程核酸酶是作为活性核糖核蛋白(RNP)的与向导RNA复合的RNA引导性核酸酶,其中所述向导RNA与病毒遗传物质内的靶标互补并且不与人类基因组内的任何靶标互补。

45. 根据权利要求44所述的试剂盒,还包括具有内腔的细长构件,其中所述内腔被构造用于将所述核酸递送至受试者体内的治疗部位。

46. 根据权利要求45所述的试剂盒,其中所述RNP在所述细长构件内的微泡内提供。

47. 根据权利要求45所述的试剂盒,其中所述可编程核酸酶是Cas9。

48. 根据权利要求47所述的试剂盒,其中所述细长构件是针。

49. 根据权利要求48所述的试剂盒,其中所述超声波换能器运行以提供低强度非空化超声。

递送方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年9月29日提交的美国临时专利申请序列号62/234,340的优先权,其通过引用并入。

发明领域

[0003] 本发明总体上涉及治疗传递的方法。

背景技术

[0004] 病毒感染(如,肝炎、HIV和疱疹病毒科(herpesviridae))可以以从社交尴尬涵盖至死亡的方式影响受感染的个体。这些病毒可以在所谓的病毒潜伏期建立长时间潜伏在受试者中的潜伏感染。潜伏期是病毒生命周期中的一个时期,在该时期中病毒增殖在最初的感染后停止。但是,病毒基因组没有完全根除。因此,病毒可以重新激活,导致急性感染并且在没有任何新的感染的情况下产生大量的后代并且使上述病毒的治疗复杂化。

[0005] 某些有前途的病毒治疗方法包括使用基因编辑系统从被感染的细胞中靶向并去除病毒基因组材料。基因编辑系统包括使用成簇的规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)相关的核酸内切酶和与病毒特异性靶序列互补的向导RNA。这些基因编辑系统目前通过皮下注射、吸入或透粘膜或经口递送等方法进行施用。这些其他方法通常是痛苦的和侵入性的,并且可能提供更迂回的路线到达靶细胞,这可能导致胃肠症状或其他副作用,以及治疗组合物在到达靶细胞之前的修饰和降解。将足够量的治疗性基因编辑系统引入靶组织然后进入靶细胞本身仍然是一个挑战。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明提供了用于靶向的基因组改变的方法和系统。本发明应对了如下挑战:产生组合物,如能够特异性降解靶基因材料(例如病毒基因组),而不影响宿主自身的遗传物质或宿主细胞的生存力的可编程核酸酶,并将该组合物递送到宿主细胞中。本发明的方法包括通过将能量共同施加至靶细胞或组织,增强组合物转运进入组织和转运通过单个细胞膜的技术。

[0008] 与其他递送方法相比,经皮或经粘膜递送提供了许多优点。具体而言,经皮或经粘膜给药可以更直接、相对无痛的进入身体细胞并且通常比其他给药方法产生更少的副作用。此类递送还可以提供其他益处,例如使家庭应用和化合物的定时释放成为可能。

[0009] 经皮递送是药物应用的一个有前途的途径,但它也带来了自己的一系列挑战。皮肤组织的一个功能是在身体和外部环境之间提供屏障。因此,皮肤含有阻挡层,例如角质层,这可能使治疗化合物难以通过皮肤进入体内。本发明涉及几种能量介导的递送方法,其中将能量施加于皮肤、肝脏或其他组织以增加组织的渗透性并控制组织对治疗化合物的摄取。这些递送方法可以包括下组中的一种或多种:超声介导递送(高频和低频或空化或无空化)、离子电渗透皮递送、电穿孔、化学介导的递送、角质层的热消融、磁泳、光机械波,以及机械方法,如微晶磨皮术、基因枪和微针。不同于细胞间递送方法,特别感兴趣的是跨细胞

递送方法,因为跨细胞方法包括穿过细胞膜并可用于转染。在某些实施方式中,遗传物质可以通过工程化蛋白质跨细胞膜转运,所述工程化蛋白质自身通过本申请所述的经皮方法引入体内。

[0010] 使用上述或其他递送方法,诸如可编程核酸酶的组合物或编码其的载体被递送至细胞。当载体是核酸,如编码可编程核酸酶的质粒时,核酸酶的表达允许其降解或以其他方式干扰靶标遗传物质。

[0011] 在某些方面,本发明提供了用于递送抗病毒疗法的试剂盒。所述试剂盒包括能够可操作地向组织施加能量的装置;和编码可编程核酸酶的核酸,所述可编程核酸酶已被编程成用于切割病毒的遗传物质中的靶标。

[0012] 在某些实施方式中,所述装置是包含电穿孔发生器和至少一个电极的电穿孔装置。可编程的核酸酶是RNA引导性核酸酶。所述试剂盒可以包括具有内腔的细长构件,其中所述内腔被构造成用于将所述核酸递送至受试者体内的治疗部位。所述至少一个电极涂覆有所述核酸。任选地,编码所述可编程核酸酶的所述核酸是编码所述可编程核酸酶的mRNA并被包封在纳米颗粒(例如,脂质)中。所述RNA引导性核酸酶可以是Cas0。

[0013] 在一些实施方式中,所述装置包括超声波换能器;所述核酸是编码所述可编程核酸酶的mRNA;所述试剂盒包括具有内腔的细长构件(例如,针),其中所述内腔被构造成用于将所述核酸递送至受试者体内的治疗部位,或其组合。优选地,所述核酸在所述细长构件内的微泡内提供。可选地,所述可编程核酸酶是Cas,并且所述微泡还包括一个或多个向导RNA。所述超声波换能器运行以提供低强度非空化超声。

[0014] 本发明的各方面提供了用于递送抗病毒疗法的试剂盒。所述试剂盒包括能够可操作地向组织施加能量的装置;和已被编程成用于切割病毒的遗传物质中的靶标的可编程核酸酶。

[0015] 在某些实施方式中,所述装置是包含电穿孔发生器和至少一个电极的电穿孔装置。所述可编程核酸酶是作为活性核糖核蛋白(RNP)的与向导RNA复合的RNA引导性核酸酶(例如,Cas9),其中所述向导RNA与病毒遗传物质内的靶标互补并且不与人体基因组内的任何靶标互补。所述试剂盒可以包括具有内腔的细长构件,其中所述内腔被构造成用于将RNP输送到受试者体内的治疗部位。优选地,所述RNP被包封在纳米颗粒中。

[0016] 在一些实施方式中,所述试剂盒包括超声波换能器。可编程的核酸酶可以是作为活性核糖核蛋白(RNP)与向导RNA复合的RNA引导性核酸酶,其中所述向导RNA与病毒遗传物质内的靶标互补并且不与人类基因组内的任何靶标互补。所述试剂盒可以包括具有内腔的细长构件,其中所述内腔被构造成用于将所述核酸递送至受试者体内的治疗部位。可选地,所述RNP在所述细长构件内的微泡内提供。优选地,超声波换能器运行以提供低强度非空化超声。

[0017] 任何合适的可编程核酸酶可以使用本发明的任意试剂盒或方法递送,并且可以以活性形式(例如,作为蛋白质或核糖核蛋白(RNP))、编码在信使RNA中或编码为基因,例如编码在核酸载体(如,质粒或病毒载体)上递送。可编程核酸酶可以是例如RNA引导性核酸酶(例如,CRISPR相关核酸酶,如Cas9或修饰的Cas9,或Cpf1或修饰的Cpf1)。可编程核酸酶可以是TALEN或修饰的TALEN或锌指核酸酶(ZFN)。在某些实施方式中,可编程核酸酶可以是DNA引导性核酸酶(例如,强烈炽热球菌(*Pyrococcus furiosus*) AGO蛋白质(PfAgo)或格氏

嗜盐碱杆菌 (*Natronobacterium gregoryi*) AGO蛋白质 (NgAgo))。可编程核酸酶可以是高保真Cas9 (hi-fi Cas9), 例如, 如Kleinstiver等, 2016, High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects, Nature 529:490-495中所述, 其通过引用并入。当可编程核酸酶是例如RNA引导性核酸酶并通过核酸载体递送时, 核酸可以含有将核酸酶靶向靶标遗传物质的向导RNA。当靶标遗传物质包括病毒的基因组时, 与该基因组的一部分互补的向导RNA可以引导核酸酶降解该基因组, 从而阻止任何进一步的复制, 或者甚至从细胞中完全去除任何完整的病毒基因组。通过这些方法, 潜伏的病毒感染可以被靶向并根除。由于提供了具有特异于潜伏病毒基因组的活性的核酸酶的基因递送方法, 本发明的方法可用于应对潜伏的病毒感染。因此, 本发明的方法和组合物可以缓解如HBV、Epstein-Barr或其他病毒的不良后果。

[0018] 在某些方面, 本发明提供了用于从受试者中去除靶标遗传物质的方法。该方法包括将组合物递送至组织并向所述组织施加能量以增加所述组织的渗透性, 并促进所述组合物进入所述组织或甚至进入所述组织的细胞。所述组合物包含可编程核酸酶或编码其的核酸。例如, 所述组合物可以包含活性Cas9RNP或质粒或编码Cas9的mRNA。

[0019] 施加的能量可以是高强度聚焦超声波。所施加的能量还可以是低频超声波。在某些实施方式中, 能量可以通过电穿孔施加。能量可以通过离子电渗疗法施加。在一些实施方式中, 施加的能量可以是热的。能量可以通过无线电波施加。能量可以通过微针或微晶磨皮术机械地施加, 或者通过使用基因枪轰击细胞施加。在某些实施式中, 能量可以通过磁场施加。能量可以通过光机械波施加。在各种实施方式中, 该溶液可以经皮递送。

[0020] 所述核酸可以是质粒, 其包含cas9基因和至少一个短链向导RNA (sgRNA) 的基因, 并且所述靶标遗传物质可以是病毒基因组, 即, 所述sgRNA与所述病毒基因组的一部分互补。在一些实施方式中, 所述病毒基因组是乙型肝炎病毒基因组, 并且所述质粒含有一个或多个sgRNA的基因, 所述sgRNA靶向乙型肝炎基因组中的位置, 如PreS1、DR1、DR2、聚合酶的逆转录酶 (RT) 结构域、Hbx、核心ORF或其组合。

[0021] 在某些实施方式中, 所述靶标遗传物质是病毒的基因组, 并且所述核酸是质粒, 其包含cas9基因和靶向所述病毒的基因组的至少一种sgRNA。所述质粒进一步包括起源于病毒的复制 (即, 使得潜伏病毒的预期复制导致靶向该病毒的质粒基因的复制)。在一个示例性的实施方案中, 病毒是乙型肝炎病毒, 并且sgRNA包括sgHBV-RT、sgHBV-Hbx、sgHBV-核心和sg-HBV-PreS1中的一种或多种。

[0022] 在某些实施方式中, 所述核酸可以包括含有5' 帽的mRNA。在各种实施方式中, 酶可以是转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN)。

[0023] 在某些方面, 本发明提供了用于从受试者中破坏靶标遗传物质的方法。所述方法包括通过向组织施加能量以增加所述组织的渗透性, 来将包含核糖核蛋白的组合物递送至所述组织, 并允许核酸进入所述组织的细胞, 其中所述核糖核蛋白包含切割靶标遗传物质的酶和至少一个短向导RNA (sgRNA)。所述酶可以是Cas9或TALEN。能量可以通过电穿孔施加, 或者可以是超声波。施加的能量可以是低频超声或高强度聚焦超声。能量可以通过离子电渗疗法施加。在一些实施方式中, 所施加的能量可以是热的。能量可以通过无线电波施加。能量可以通过微针或微晶磨皮术机械地施加, 或者使用基因枪轰击细胞施加。在某些实施式中, 能量可以通过磁场施加。能量可以通过光机械波施加。在各种实施方式中, 该溶液

可以经皮递送。

[0024] 所述靶标遗传物质可以是病毒的,即,所述sgRNA与所述病毒基因组的一部分互补。在一些实施方式中,病毒基因组是乙型肝炎病毒基因组,并且所述一种或多种sgRNA靶向乙型肝炎基因组中的位置,如Pre S1、DR1、DR2、聚合酶的逆转录酶(RT)结构域、Hbx、核心ORF或其组合。

[0025] 附图简述

[0026] 图1图解了从受试者中去除靶标遗传物质的方法。

[0027] 图2示出了CRISPR向导RNA靶向的HBV基因组中的关键部分。

[0028] 图3示出了由针对HBV的体外CRISPR检测得到的凝胶。

[0029] 图4图解了根据某些实施方式的质粒。

[0030] 图5示出了一种系统,其包括根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的超声波换能器。

[0031] 图6示出了一种系统,其包括根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的电穿孔装置。

[0032] 图7示出了一种系统,其包括根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的基因枪。

[0033] 图8示出了一种系统,其包括根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的离子电渗装置。

[0034] 图9示出了一种系统,其包括根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的微针贴片。

[0035] 图10示出了一种系统,其包括根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的微型磨皮器。

[0036] 图11示出了一种系统,其包括根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的热消融装置。

[0037] 图12示出了一种系统,其包含根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的磁性药物递送系统。

[0038] 图13示出了一种系统,其包括根据某些实施方式用于从受试者中移除靶标遗传物质的激光器。

[0039] 图14示出了评估Cas9/HPV16特异性sgRNA核糖核酸蛋白(RNP)对HPV-16+细胞的作用的过程。

[0040] 图15示出了HPV-16的E6和E7基因上的各种sgRNA的靶标位置。

[0041] 图16显示了通过用具有在HPV-16的E6和E7基因上的靶标的各种sgRNA进行电穿孔引入RNP后的HPV-16+细胞计数。

[0042] 图17显示了HPV-16的E6和E7基因上的靶标位置和定量PCR(qPCR)引物位置。

[0043] 图18示出了在用各种HPV 16特异性RNP处理1天和2天后,聚焦于E6和E7基因的qPCR结果。

[0044] 图19示出了用各种HPV16特异性RNP处理1天和6天后的活细胞计数。

[0045] 图20示出了评估HPV16特异性sgRNA和编码Cas9蛋白的mRNA对HPV-16+细胞的作用的过程。

[0046] 图21示出了用各种Cas9mRNA和sgRNA的组合核转染后1、3和6天后的归一化细胞计数。

[0047] 图22示出了用各种sgRNA和各种Cas9mRNA处理的细胞6天后的计数。

[0048] 图23示出了评估Cas9/HPV18特异性sgRNA核糖核蛋白 (RNP) 对HPV-18+细胞的作用的过程。

[0049] 图24示出了HPV-18的E6基因上的各种sgRNA的靶标位置。

[0050] 图25显示了通过用靶向HPV-18的E6基因的各种sgRNA进行电穿孔引入RNP后的细胞计数。

[0051] 图26示出了用RNP形式或mRNA/sgrNA形式的sgHPV18E6-2/Cas9进行电穿孔5天后, HPV-18+癌细胞的活细胞计数比较。

[0052] 图27示出了mRNA和RNP处理的细胞中随 μg Cas9mRNA或蛋白质剂量变化的活细胞计数的比较。

[0053] 图28显示了HBV游离DNA细胞模型。

[0054] 图29示出了各种sgRNA在HBV基因组上的靶标位置。

[0055] 图30示出了凝胶电泳分离的结果,其表明用sgRT RNA、sgHBx RNA、sg核心RNA和sgPreS 1RNA转导的细胞中HBV DNA的切割。

[0056] 图31示出了在未处理的细胞和用HBV特异性sgRNA和Cas9处理的细胞中,通过qPCR测定的HBV的DNA量。

[0057] 发明详述

[0058] 图1图解了从受试者中去除靶标遗传物质的方法。所述方法包括将能量和组合物共同施加至组织,以使组合物进入所述组织的细胞。所述组合物包含可编程核酸酶或编码其的核酸,如质粒或mRNA。所述可编程核酸酶是一种已被编程成用于靶向和切割遗传物质的酶。

[0059] 可以使用任何合适的可编程核酸酶。可编程核酸酶包括锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 和RNA引导性核酸酶,如细菌成簇的规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR)-Cas (CRISPR相关) 核酸酶或Cpf1。可编程核酸酶还包括DNA引导性核酸酶 (例如,强烈炽热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) AGO蛋白质 (PfAgo) 或格氏嗜盐碱杆菌 (*Natronobacterium gregoryi*) AGO蛋白质 (NgAgo))。可编程核酸酶可以是高保真Cas9 (hi-fi Cas9), 例如,如Kleinstiver等,2016,High-fidelity CRISPR-Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects, Nature 529:490-495中所述,其通过引用并入。

[0060] 锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶 (TALEN) 和成簇的规律间隔的短回文重复序列 (CRISPR), 为基因治疗提供了很大的希望 (Cell Stem Cell. 2013, 13 (6): 653-8)。通过靶向病毒DNA, 最近的研究展示了用CRISPR治疗人类细胞中的潜伏病毒感染。参见Wang&Quake, 2014, RNA-guided endonuclease provides a therapeutic strategy to cure latent herpesviridae infection, PNAS 111 (36): 13157-13162和Hu等, 2014, RNA-directed gene editing specifically eradicates latent and prevents new HIV-1 infection, PNAS 111 (31): 11461-6, 两者均通过引用并入。本发明的方法和材料可以用于将靶向的内切核酸酶应用于特定的遗传物质, 如潜伏病毒基因组 (如HBV)。本发明还为

将核酸(如DNA质粒)有效且安全地递送到靶细胞(例如肝细胞)中提供了支持。

[0061] 在一个示例性实施方式中,本发明提供了一种或多种本文所述的基因递送方法和靶向的内切核酸酶的组合作以治疗病毒感染。

[0062] 图2图解了HBV基因组。在一些实施方式中,本发明使用针对基因组(如图2所示的HBV基因组)内的关键特征的一种或多种向导RNA。参照图2,HBV通过用Pre S1结合宿主细胞开始其感染周期。针对PreS1的向导RNA位于编码序列的5'末端。内切酶消化将引入插入/缺失,这导致PreS 1翻译的移码。HBV通过长RNA形式复制其基因组,在两端具有相同的重复序列DR1和DR2,并在5'末端具有RNA衣壳化信号 ϵ 。聚合酶基因的逆转录酶结构域(RT)将RNA转化成DNA。Hbx蛋白是病毒复制以及宿主细胞功能的关键调控因子。由RNA引导的对RT的消化将引入插入/缺失,这导致RT翻译的移码。向导RNA sgHbx和sg核心不仅可导致Hbx和HBV核心蛋白编码发生移码,而且还会导致含有DR2-DR1- ϵ 的整个区域缺失。四种sgRNA的结合也可导致HBV基因组被系统性地破坏成小块。

[0063] 图2示出了CRISPR向导RNA靶向的HBV基因组中的关键部分。

[0064] 图3示出了由针对HBV的体外CRISPR检测得到的凝胶。泳道1、3、6:在RT、Hbx-核心和PreS1侧翼的HBV基因组的PCR扩增子。泳道2、4、5和7:用sgHBV-RT、sgHBV-Hbx、sgHBV-核心、sgHBV-PreS1处理的PCR扩增子。

[0065] 本发明提供了上述的向导RNA。为了证明,用cas9蛋白和位于靶区域侧翼的DNA扩增子进行体外检测。如图2所示,DNA电泳显示靶标位置处的强烈的消化。

[0066] 为了获得细胞中的CRISPR活性,将编码cas9和向导RNA的表达质粒递送至感兴趣的细胞(例如携带HBV DNA的细胞)。为了在体外检测中证明,可以通过监测细胞增殖、生长和形态以及分析细胞中DNA完整性和HBV DNA载量来评估抗HBV效应。

[0067] 为了递送Cas9和sgRNA,本发明为使用各种方法来增加靶标组织的通透性和控制治疗性化合物摄取提供了支持。这些递送方法可以包括以下的一种或多种:超声介导递送(高频和低频或空化的或非空化的)、离子电渗透皮递送、电穿孔、化学介导的递送、角质层的热消融、磁电泳、光机械波和机械方法(如微晶磨皮术和微针)。参见Prausnitz&Langer, Transdermal drug delivery, Nature Biotechnology 26,1261-1268 (2008),为所有的目的,其内容整体并入本申请。上述方法中的许多包括在跨角质层经皮递送中,以及通过诱导细胞膜流动性并允许本发明的核酸组合物进入细胞的跨细胞内递送的递送中的应用。

[0068] 在各种实施方式中,能量可以通过超声波递送到细胞或组织。参见Smith, Perspectives on transdermal ultrasound mediated drug delivery, Int J Nanomedicine. 2007Dec; 2(4):585-594,为所有的目的,其内容整体并入本申请。这些方法有时是指超声促渗或超声透入疗法。超声介导的经皮药物递送可以用一定范围的超声频率使用,并且通常被归类为高频(例如,大约1-3MHz)或低频(例如,大约20kHz)。超声介导的经皮药物递送有时分为空化和非空化方法。一般而言,低频超声在增强通过空化诱导的双层角质层失调的经皮药物转运方面更有效(参考文献同上)。通过低频超声在角质层中产生的空化泡的渗透性效应可持续数小时(Prausnitz, 2008)。

[0069] 超声可以用于促进化合物在任何组织中以包封的超声微泡的形式穿过细胞膜。参见Nozaki等, Enhancement of ultrasound-mediated gene transfection by membrane modification, The Journal of Gene Medicine, Vol.5, Issue 12, pp.1046-1055,

December 2003;Liu等,Encapsulated ultrasound microbubbles:Therapeutic application in drug/gene delivery,Journal of Controlled Release,Vol.114,Issue 1,10August 2006,pp.89-99;为所有的目的,其内容各自整体并入本申请。作为一种安全的基因递送方法,低强度超声波与微泡结合最近受到了很多关注。超声显示出组织透化作用。它是非侵入性的和位点特异的。超声介导的微泡已被作为一种创新方法提出,用于将药物和核酸无创递送至不同组织。在超声引发的药物递送中,可以使用超声造影剂、充气微泡来增强组织透化作用。使用微泡来递送核酸是基于以下假设:在微血管运送载有DNA的微泡通过靶标区域期间,通过聚焦超声波束将其破坏将在微泡外壳破裂时导致局部转导,同时非靶向的区域不受影响。参见Tsutsui等,2004,The use of microbubbles to target drug delivery,Cardiovasc Ultrasound 2:23,其内容通过引用并入本申请。

[0070] 非空化超声可以用于递送小分子亲脂性化合物,但是用于其他较大化合物时成功的几率有限。已经显示热量增强一些化合物的经皮递送,并且超声介导递送的一个方面是通过超声波在组织中产生热量。

[0071] 可以使用单个元件或其他已知类型的换能器施加超声波,例如可获取自Biatek公司(宾西法尼亚州立大学)的那些换能器。因此,在一些实施方式中,本发明提供了用于治疗病毒感染的系统,其包括超声换能器301,编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,和靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图5所示。

[0072] 图5显示了用于递送抗病毒疗法的试剂盒500。试剂盒500具有包括超声换能器301并且能够可操作性地向组织施加能量的装置;以及:具有基因103的核酸501,所述基因103编码可编程核酸酶,所述可编程核酸酶已被编程成用于切割病毒的遗传物质中的靶标;或者已被编程成用于切割病毒的遗传物质中的靶标的可编程核酸酶。在某些实施方式中,核酸501是编码所述可编程核酸酶的mRNA。

[0073] 任选地,试剂盒500可以包含一种或多种向导RNA105,其优选与病毒基因组中的靶标杂交,不与人类基因组互补。该试剂盒可以包括具有内腔的细长构件502,其中所述内腔被构造成用于将所述核酸递送到受试者体内的治疗部位。所述核酸可以在所述细长构件内的微泡内提供。

[0074] 在某些实施方式中,所述可编程核酸酶是Cas9并且所述微泡还包含一种或多种向导RNA。所述细长构件可以是针。优选地,超声换能器301运行以提供低强度、非空化超声。

[0075] 在可选的实施方式中,所述可编程核酸酶是作为活性核糖核蛋白(RNP) 505的与向导RNA复合的RNA引导性核酸酶,其中所述向导RNA与病毒遗传物质内的靶标互补并且不与人类基因组内的任何靶标互补。所述试剂盒可以包括具有内腔的细长构件502,其中所述内腔被构造成用于将RNP 505递送到受试者体内的治疗部位。任选地,RNP 505被包封在纳米颗粒中,所述纳米颗粒可以包括例如脂质。优选地,所述RNA引导性核酸酶是Cas9。

[0076] 在某些实施方式中,可以通过对皮肤组织电穿孔来增强经皮递送。参见Prausnitz等,Electroporation of mammalian skin:A mechanism to enhance transdermal drug delivery,Proc.Natl.Acad.Sci.USA Vol.90,pp.10504-10508,November 1993,用于所有的目的,其内容整体并入本申请。

[0077] 图6显示了用于递送抗病毒疗法的试剂盒600。试剂盒600包括能够可操作地向组织施加能量的电穿孔装置401;和(i) 编码可编程核酸酶的核酸,所述可编程核酸酶已被编

程成用于切割病毒的遗传物质中的靶标;或(ii)已被编程成用于切割病毒遗传物质中的靶标的可编程核酸酶。

[0078] 优选地,电穿孔装置401包含电穿孔发生器403和至少一个电极405。可编程核酸酶可以是RNA引导性核酸酶。

[0079] 试剂盒600可以包括具有内腔的细长构件606(例如,针),其中所述内腔被构造成用于将所述核酸递送至受试者体内的治疗部位。任选地,至少一个电极405涂覆有所述核酸。编码所述可编程核酸酶的核酸可以是mRNA 601,其具有编码所述可编程核酸酶的基因103。所述mRNA可以被包封在纳米颗粒中,如脂质纳米颗粒。优选地,所述RNA引导性核酸酶是Cas9。

[0080] 在某些实施方式中,所述可编程核酸酶是作为活性核糖核蛋白(RNP)505的与向导RNA 105复合的RNA引导性核酸酶,其中所述向导RNA与病毒遗传物质内的靶标互补并且不与人类基因组的任何靶标互补。

[0081] 电穿孔包括使用短高压脉冲电来可逆地破坏细胞膜。电穿孔,如空化超声,破坏皮肤中的脂质双层结构,使渗透性得以增加并且因此使药物递送得以增强。通过电穿孔产生的电孔隙可以在治疗后存留数小时,并且小分子药物、肽、疫苗和DNA的经皮运送可以成数量级地增加。电穿孔的副作用,如来自角质层下的神经的疼痛和肌肉刺激,可以通过使用紧密间隔的微电极来限制角质层内的电场而被最小化(Prausnitz,2008)。

[0082] 细胞膜的电穿孔可用于增加细胞膜流动性并允许化合物进入单个细胞。参见Ho等,Electroporation of Cell Membranes:A Review,Critical Reviews in Biotechnology,Vol.16,Issue 4,1996;Zhang等,Development of an Efficient Electroporation Method for Iturin A-Producing Bacillus subtilis ZK,Int.J.Mol.Sci.2015,16,7334-7351;用于所有的目的,其内容整体并入本申请。细胞膜的电穿孔使用与上述关于经皮应用相同的原理(参考文献同上)。由于细胞存活对于本发明的方法是必要的,所以在施加短高压脉冲时必须小心。

[0083] 电穿孔可以使用电穿孔装置401进行,其包括例如电穿孔发生器403和电极405,如可获取自哈佛仪器公司(马萨诸塞州霍利斯顿)的Gemini X2系统。因此,在一些实施方式中,本发明提供了用于治疗病毒感染的系统,所述系统包括电穿孔装置401,其包含电穿孔发生器403和电极405,编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图6所示。

[0084] 在各种实施方式中,可以使用例如基因枪,通过基因枪转化或粒子轰击将本发明的核酸组合物引入宿主细胞。参见Gao等,Nonviral Gene Delivery:What We Know and What Is Next,AAPS J.2007Mar;9(1):E92-E104;Yang等,In vivo and in vitro gene transfer to mammalian somatic cells by particle bombardment,Proc Natl Acad Sci USA,1990;87:9568-9572;用于所有的目的,其内容各自整体并入本申请。通过基因枪进行的粒子轰击可以用于例如将本发明的组合物引入到皮肤、粘膜或限定区域内手术暴露的组织的细胞中。在粒子轰击方法中,核酸沉积在金颗粒的表面上,然后通过例如加压气体将其加速到细胞或组织中,使得金颗粒的动量携带核酸进入细胞(参考文献同上)。

[0085] 粒子轰击可以使用例如基因枪进行,如可获取自Bio-Rad Laboratories公司(加利福尼亚州Hercules)的Helios基因枪系统。因此,在一些实施方式中,本发明提供了用于

治疗病毒感染的系统,其包括基因枪501,编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图7所示。

[0086] 在各种实施方式中,经皮递送可以通过离子电渗疗法增强。参见Rawat等, Transdermal Delivery by Iontophoresis, Indian J Pharm Sci. 2008 Jan-Feb; 70 (1): 5-10, 用于所有的目的,其内容整体并入本文。离子电渗疗法包括向皮肤施加持续的低电压电流以提供用于跨角质层运输的电驱动力 (Prausnitz, 2008)。可以通过产生跨角质层的电势并施加上述电流,将具有电荷的治疗性化合物驱入角质层。离子电渗递送的一个优点是可以通过改变电流水平来控制药物递送速率的能力。通过移动阳离子(例如, Na⁺) 而不是固定阴离子(例如, 角蛋白)在角质层中移动而产生的水的电渗流,可以使没有显著电荷的化合物移动穿过角质层(参考文献同上)。

[0087] 离子电渗疗法可以使用离子电渗疗法装置601进行,其包括例如离子电渗疗法控制器603、引线605和导电垫607,如可获取自Moor Instruments (英国德文郡)的MIC2离子导入控制器和附件。因此,在一些实施方式中,本发明提供了用于治疗病毒感染的系统,其包括离子电渗疗法装置601,其包括离子电渗疗法控制器603、引线605和导电垫607,编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图8所示。

[0088] 在某些实施方式中,可以使用增强化合物递送到组织中的机械手段,如微晶磨皮术或微针。微针通过用非常短的针刺破角质层来选择性地渗透角质层(参见Pausternitz, 2008)。已显示微针增加皮肤对各种小分子、蛋白质和纳米颗粒的渗透性,并且可用于缓释贴片以控制化合物释放进入皮肤(参考文献同上)。由于微针不刺到皮肤组织内的神经深度,所以目前是增强经皮给药的相对无痛的手段。化合物也可以被涂覆在微针上或包封在微针内,并且也可以使用中空微针(参考文献同上)。微针通过在皮肤内形成微米级通路来增强经皮药物给药,并且当微针本身用化合物涂覆或包封化合物时也可以将化合物驱入皮肤(参考文献同上)。

[0089] 微针贴片701,如可获取自3M(明尼苏达州圣保罗)的固体微针贴片,可以用于递送本发明的组合物。在某些实施方式中,可以使用如可获取自3M(明尼苏达州圣保罗)的中空微结构经皮系统的中空微针递送系统来递送本发明的组合物。因此,在一些实施方式中,本发明提供了用于治疗病毒感染的系统,其包括微针贴片701,编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图9所示。

[0090] 本发明所设想的另一种经皮施用的机械方法是微晶磨皮术。微晶磨皮术由通过使用研磨剂来消融角质层组成。通过物理去除对皮肤渗透性的屏障,增强了化合物的经皮递送(参见Prausnitz, 2008)。

[0091] 微晶磨皮术可以使用微型磨皮器801进行,例如可获取自Mattioli Engineering Corporation(弗吉尼亚州McLean)的Ultrapeel Crystal。因此,在一些实施方式中,本发明提供了一种用于治疗病毒感染的系统,其包括微型磨皮器801,编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图10所示。

[0092] 在某些实施方式中,将热能施加至组织以增强核酸向组织的递送(参见Parusnitz

2008)。在一种这样的方法中,热消融,皮肤表面被选择性地加热以在角质层中产生微米级穿孔(参考文献同上)。热量可以以短暂的高强度爆发施加,以将组织表面加热到几百度,持续仅几微秒或几毫秒(参考文献同上)。这些短暂的爆发防止热量传播到较深的组织,从而保持组织存活并防止患者疼痛(参考文献同上)。热量用于蒸发角质层中的水分,使膨胀的水在角质层中形成微米级的凹陷(参考文献同上)。在各种实施方式中,可以通过激光或其他光学装置、无线电波(RF)、超声波或使用电流来产生热量。

[0093] 可以使用例如热消融装置将热能施加到组织,如美国专利公开号2009/0318846或Lee等,Microsecond Thermal Ablation of Skin for Transdermal Drug Delivery, J Control Release. 2011 Aug 25; 154(1): 58-68(其内容各出于所有目的整体并入本申请)中所描述的装置。因此,在一些实施方式中,本发明提供了用于治疗病毒感染的系统,其包括热消融装置901,编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图11所示。

[0094] 在本发明的方法中用到的其他能量增强的药物递送的方法包括磁电泳和光机械波的使用。磁电泳或使用磁场增强经皮药物递送似乎不会改变角质层的通透性,而是通过磁运动,其类似于离子电渗疗法中电流的使用,将化合物驱入组织中(参见Murthy等, Magnetophoresis for enhancing transdermal drug delivery: Mechanistic studies and patch design, Journal of Controlled Release, Volume 148, Issue 2, 1 December 2010, Pages 197-203; 美国专利公开号2002/0147424; 用于所有目的,其内容各自整体并入本申请)。磁性纳米颗粒也可以用于跨细胞膜递送本发明的核酸。核酸载体对超声波和磁场(即,磁性和声学活性脂质球(MAAL))均可以响应。基本前提是治疗剂附着于磁性微米或纳米颗粒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被官能化的聚合物或金属涂层的磁芯,或者可以由包含沉淀在孔内的磁性纳米颗粒的多孔聚合物组成。通过将聚合物或金属涂层官能化,可以将例如本发明的治疗性核酸附着到宿主细胞内的病毒基因组上。可以通过本文提到的任何经皮方法或通过注射入血流或其他已知方法,将颗粒/治疗剂复合物引入体内。然后通常由高场、高梯度的稀土磁体引入磁场,并且将磁场聚集于靶标位置之上,并且当粒子进入场时作用于粒子的力允许它们在靶标处被捕获并外渗(参见Guo等, Recent Advances in Non-viral Vectors for Gene Delivery, Acc Chem Res. 2012 Jul 17; 45(7): 971-979, 用于所有目的,其内容整体并入本申请)。

[0095] 可以使用磁性药物递送系统进行磁电泳,如在美国专利公开号2002/0147424中所述的。因此,在一些实施方式中,本发明提供了用于治疗病毒感染的系统,其包括磁性药物递送系统1001,编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图12所示。

[0096] 可以使用激光直接消融角质层以提供与之相关的并且在上文中讨论的经皮药物递送的益处。另外,已经显示激光产生的光机械波通过受限消融仅仅短暂地改变角质层,从而增加组织渗透性并增强药物递送(参见Lee等, Photomechanical Transdermal Delivery: The Effect of Laser Confinement, Lasers in Surgery and Medicine 28: 344+347 (2001), 用于所有目的,其内容整体并入本申请)。如Lee所描述的,激光可以对准溶液储存器上方的靶标,继而对准组织表面上方,以便将光机械波传播进入组织(参考文献同上)。激光器可获取自例如Newport Corporation(加利福尼亚州Irvine)。因此,在一些实施

方式中,本发明提供了用于治疗病毒感染的系统,其包括激光器1001,靶标1103和溶液,所述溶液包含编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,如图13所示。

[0097] 在各种实施方式中,化学渗透增强剂可以单独使用或与一种或多种上述增强的经皮药物递送的方法组合使用(参见Mitragotri, Synergistic Effect of Enhancers for Transdermal Drug Delivery, Pharm. Res. 17, 1354-1359, 用于所有目的,其内容整体并入本申请)。化学渗透增强剂可以包括例如丙二醇、油酸、二甲基亚砷、乙醇、亚油酸、氮酮、柠檬烯、月桂基硫酸钠、聚乙二醇、肉豆蔻酸异丙酯、甘油三油酸酯和磷酸盐缓冲盐水。

[0098] 可以用任何合适的方法递送本发明所述组合物,包括皮下递送、透皮递送、通过流体动力学基因递送地、局部递送或任何其他合适的方法。在一些实施方式中,组合物101以运载体形式提供,并且适用于局部施加于人体皮肤。组合物可通过递送至宿主中的组织而原位引入细胞内。将所述组合物引入所述宿主细胞的过程可以包括例如,以局部的方式,将所述组合物非全身性地递送到所述宿主中的病毒感染局部储库中

[0099] 可以使用可接受的局部用运载体(例如,能被施用于皮肤表面以用于药物的局部递送、皮肤递送、皮内递送或透皮递送的任何可接受的剂型)中将本发明所述组合物递送到受影响的皮肤区域。可接受的局部用运载体与本申请所述的组合物的组合称为本发明的局部用制剂。通过根据本领域熟知的方法,例如标准参考文献,如REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY 1577-1591, 1672-1673, 866-885 (Alfonso R. Gennaro编); Ghosh, T.K.等, TRANSDERMAL AND TOPICAL DRUG DELIVERY SYSTEMS (1997)所提供的方法,通过将组合物与局部用运载体混合来制备本发明的局部用制剂。

[0100] 可用于局部递送本文所述化合物的局部用运载体可以是本领域已知用于局部施用药物的任何运载体,例如但不限于可接受的溶剂,如多元醇或水;乳剂(水包油或油包水乳剂),如乳膏或乳液;微乳剂;凝胶;软膏;脂质体;粉末;以及水溶液或悬浮液,如标准眼用制剂。

[0101] 在某些实施方式中,用于递送本申请所述组合物的局部用运载体是乳剂、凝胶或软膏。乳剂(如乳膏和乳液)适用于根据本发明所述的局部用制剂。乳剂是包含至少两个不混溶相的分散体系,一个相以直径范围为0.1 μ m至100 μ m的小滴分散在另一个相中。通常包括乳化剂以改善稳定性。

[0102] 在另一个实施方式中,所述局部用运载体是凝胶,例如,两相凝胶或单相凝胶。凝胶是半固体体系,由液体穿插于其间的无机小颗粒或有机大分子的悬浮液组成。当凝胶块包含小离散无机颗粒的网络时,其被归类为两相凝胶。单相凝胶由均匀分布于整个液体中的有机大分子组成,使得分散的大分子和液体之间不存在明显的界限。REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY 1517-1518 (Alfonso R. Gennaro编,第19版,1995)中公开了适用于本发明的凝胶。其它适用于本发明的凝胶公开于美国专利号6,387,383 (2002年5月14日授权); 6,517,847 (2003年2月11日授权)和6,468,989 (2002年10月22日授权)中。可以使用的聚合物增稠剂(成胶剂)包括本领域技术人员已知的那些,例如在化妆品和制药工业中经常使用的亲水性和水醇性成凝剂。优选地,成凝剂占组合物重量的约0.2%至约4%。该试剂可以是交联的丙烯酸聚合物,其被赋予通用名称卡波姆。这些聚合物在用苛性物质(如氢氧化钠、氢氧化钾或其它胺碱)中和后溶于水并形成澄清的或轻微混浊的凝胶。

[0103] 在另一个优选的实施方式中,所述局部用运载体是软膏。软膏是含有少量水或不含水的含油半固体。优选地,所述软膏具有烃类基质,例如蜡、凡士林或成胶的矿物油。

[0104] 在另一个实施方式中,本发明局部用制剂中使用的局部用运载体是水溶液或悬浮液,优选水溶液。众所周知的眼用溶液和悬浮液是适用于本发明的局部用运载体。本发明的水性局部用制剂的pH优选在约6至约8的范围内。为了稳定pH,优选包含有效量的缓冲剂。在一个实施方式中,所述缓冲剂以水性局部用制剂重量的约0.05%至约1%的量存在于所述制剂中。本发明的水性局部用制剂中可以包含张力调节剂。合适的张力调节剂的实例包括,但不限于,氯化钠、氯化钾、甘露醇、右旋糖、甘油和丙二醇。张力剂的量可以根据制剂的期望性质而大范围变化。在一个实施方式中,所述张力调节剂以水性局部用制剂重量的约0.5%至约0.9%的量存在于所述制剂中。优选地,本发明的水性局部用制剂具有0.015至0.025Pa.s (约15cps至约25cps) 范围内的粘度。可以通过加入粘度调节剂(例如,但不限于,聚乙烯醇、聚维酮、羟丙基甲基纤维素、泊洛沙姆、羧甲基纤维素或羟乙基纤维素)来调节本发明所述水溶液的粘度。

[0105] 本发明的局部用制剂可以包括可接受的赋形剂,如保护剂、吸附剂、缓和剂、润滑剂、防腐剂、抗氧化剂、保湿剂、缓冲剂、增溶剂、皮肤渗透剂和表面活性剂。合适的保护剂和吸附剂包括,但不限于,除尘粉、硬脂酸锌、火棉胶、二甲聚硅氧烷、硅酮、碳酸锌、芦荟凝胶和其它芦荟产品、维生素E油、尿囊素、甘油、凡士林和氧化锌。合适的缓和剂包括,但不限于,安息香、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯醇。合适的润滑剂包括,但不限于,动物和植物脂肪和油、肉豆蔻醇、明矾和醋酸铝。合适的防腐剂包括,但不限于,季铵化合物,例如苯扎氯铵、苄索氯铵、西曲溴铵、地喹氯铵和西吡氯铵;汞剂,例如硝酸苯汞、乙酸苯汞和硫柳汞;醇类试剂,例如氯丁醇、苯乙醇和苯甲醇;抗菌酯,例如对羟基苯甲酸酯;以及其他抗微生物试剂,如氯己定、氯甲酚、苯甲酸和多粘菌素。二氧化氯(C102) (优选稳定的二氧化氯) 是用于本发明局部用制剂的优选防腐剂。合适的抗氧化剂包括,但不限于,抗坏血酸及其酯、亚硫酸氢钠、丁基羟基甲苯、丁基羟基茴香醚、生育酚和螯合剂,如EDTA和柠檬酸。合适的保湿剂包括,但不限于,甘油、山梨糖醇、聚乙二醇、尿素和丙二醇。适用于本发明的缓冲剂包括,但不限于,乙酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、乳酸缓冲液和硼酸盐缓冲液。合适的增溶剂包括,但不限于,季铵氯化物、环糊精、苯甲酸苄酯、卵磷脂和聚山梨醇酯。合适的皮肤渗透剂包括,但不限于,乙醇、异丙醇、辛基苯基聚乙二醇、油酸、聚乙二醇400、丙二醇、N-癸基甲基亚砷、脂肪酸酯(例如,肉豆蔻酸异丙酯、月桂酸甲酯、甘油单油酸酯和丙二醇单油酸酯);以及N-甲基吡咯烷酮。

[0106] 在一些实施方式中,本发明提供了一种系统,其编码切割靶标遗传物质的酶的基因(如Cas9 103)的载体,以及靶向潜伏病毒并且在人类基因组中没有匹配的gRNA,局部用运载体,以及诸如图5-13中所示的装置,所述装置被配置为用于辅助将局部用运载体输送到皮肤或其他组织中。

[0107] 在某些实施方式中,本发明的化合物与用于全身治疗的纳米系统缀合,例如脂质体、白蛋白基颗粒、PEG化蛋白质、生物可降解聚合物-药物复合物、聚合物胶束、树状聚合物等(参见Davis等,2008,Nanotherapeutic particles:an emerging treatment modality for cancer,Nat Rev Drug Discov.7 (9):771-782,其通过引用并入本文)。长循环大分子载体(如脂质体)可以利用增强的通透性和驻留效应来优先从肿瘤血管中外渗。在某些实施

方式中,本发明的复合物与脂质体或聚合物囊泡缀合或包封在脂质体或聚合物囊泡中,用于递送至细胞。例如,脂质体蒽环类药物已实现高效封装,并且包括循环极大延长的类型,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, Carboxymethylcellulose-sodium based transdermal drug delivery system for propranolol, J Pharm Pharmacol. 1996 Apr; 48 (4): 367-70)。这些细胞递送系统可以通过本文所述的方法经皮地引入体内。

[0108] 为了递送Cas9和sgRNA,本发明还可以提供流体动力学基因递送的应用。该技术控制毛细血管中的流体动力学压力以增强内皮和实质细胞的渗透性(Hydrodynamic Gene Delivery: Its Principles and Applications, Molecular Therapy (2007) 15 12, 2063-2069)。在美国基因疗法协会第9届年度会议(关于流体动力学基因递送进入人体肝细胞的临床研究)中报道了人体内首次流体动力学基因递送的临床试验。流体动力学基因递送避免了见于AAV递送中的潜在的宿主免疫应答(靶向肝脏的腺相关载体针对抗体介导的中和的长期易感性)。

[0109] 流体动力学基因递送也可应用于肝移植(肝移植中的流体动力学质粒DNA基因治疗模型)。发现注射量为肝重量的40-70%在基因递送中是有效的。流体动力学基因递送与靶向核酸内切酶的组合物可潜在地从肝脏移植中消除HBV,并提供更为合格的器官。

[0110] 靶向内切核酸酶(例如Cas9+sgRNA)的递送可以与常规抗病毒药物(如拉米夫定和替比夫定)组合。以这种方式,可以在核酸内切酶治疗之前大大降低病毒载量以提高治疗效力。

[0111] 对于流体动力学基因递送,以足以在血管近端的细胞中产生孔隙的压力递送组合物。使用流体力学或能量增强的经皮基因递送来递送核酸(优选地,如编码内切核酸酶的质粒)。在一个优选的实施方式中,所述酶是Cas9。

[0112] Cas9(CRISPR相关蛋白9)是RNA引导的DNA内切酶。研究发现Cas9是酿脓链球菌免疫系统的一部分,在那里它会记住外来DNA并随后通过解开外来DNA来寻找与向导RNA的20个碱基对间隔区互补的区域,然后在所述区域切割所述外来DNA。Cas9可用于在DNA中产生定点双链断裂,这会导致基因失活或通过非同源末端连接和同源重组引入异源基因。其他用于基因编辑的示例性工具包括锌指核酸酶和TALEN蛋白。

[0113] Cas9可以切割几乎任何与向导RNA互补的序列。天然Cas9使用由两个完全不同的RNA组成的向导RNA,这两个RNA联合产生向导-CRISPR RNA(crRNA)和反式激活RNA(tracrRNA)。另外或可选地,可以通过嵌合单向导RNA的工程化来简化Cas9靶向。

[0114] 研究表明Cas9含有RNase H和HNH核酸内切酶同源结构域,其分别负责两条靶DNA链的切割。类似于RNase H的序列具有RuvC折叠(RNase H家族的一员),并且HNH区折叠为T4Endo VII(HNH内切核酸酶家族的一员)。以前对Cas9的研究表明HNH结构域负责靶DNA的互补序列切割,而RuvC负责非互补序列切割。本发明的方法和材料使用包含cas9基因和至少一个短导向RNA(sgRNA)基因的质粒。ssRNA与病毒基因组的一部分互补。

[0115] 图4图解了根据某些实施方式的质粒。

[0116] 在病毒基因组是乙型肝炎病毒基因组的情况下,所述质粒可能含有一种或多种sgRNA的基因靶向乙肝基因组中的位置,例如PreS1、DR1、DR2、聚合酶的逆转录酶(RT)结构域、Hbx和核心ORF。在一个优选的实施方式中,所述一种或多种sgRNA包含选自sgHBV-核心

和sgHBV-PreS1的中一种。

[0117] 对于流体动力学基因递送,组合物可以经由血管内递送导管递送,例如,通过使气囊导管通过受试者中靶标位置处的血管,使气囊膨胀,并且经由气囊导管中的内腔递送组合物。

[0118] 参考并入

[0119] 在本公开的全部内容中已经参考和引用了其他文件,例如专利、专利申请、专利公开物、期刊、书籍、论文、网页内容。用于所有目的,所有这些文件在此都通过引用整体并入本文。

[0120] 等效内容

[0121] 从本文的全部内容(包括对本文中引用的科学文献和专利文献的参考)来看,本领域技术人员应当理解除了本文所示和所述的实施方案以外的本发明各种修改及其许多其他实施方案是显而易见的。本文的主题包含了重要的信息,范例和指导,其可用于调整用于本发明的各种实施例及其等同物的实施。

实施例

[0122] 实施例1

[0123] 在一个实施方式中,本发明的方法使用上述基因递送方法来靶向乙型肝炎病毒(HBV)。超过40%的人口感染了HBV,带来了2.4亿慢性乙肝病毒携带者,以及每年约620,000例HBV相关死亡。作为嗜肝DNA病毒家族原型成员的人乙型肝炎病毒(HBV)是42nm的具有部分双链DNA病毒,其由含有表面抗原(HBsAg)的外部脂蛋白外壳(也称为包膜)包围27nm的核衣壳核心(HBcAg)组成。该病毒包含包膜病毒粒子,其中含有3至3.3kb的松弛环状的部分双链DNA和病毒粒子相关的DNA依赖性聚合酶,该酶可修复病毒粒子DNA模板中的缺口并具有逆转录酶活性。HBV是一种约3200bp的环状的部分双链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ORF。在感染的过程中,病毒核衣壳进入细胞并到达细胞核,将病毒基因组递送到细胞核。在细胞核中,完成第二链DNA的合成并且修复两条链中的缺口以产生共价闭合的环状DNA分子,其充当四种病毒RNA的转录模板,所述四种病毒RNA长度为3.5、2.4、2.1和0.7kb。这些转录物被多聚腺苷酸化并转运至细胞质,在细胞质中其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)、S(小)和转录反式激活蛋白(X)。包膜蛋白将其自身作为整合膜蛋白插入内质网(ER)的脂质膜中。跨越整个基因组且称为前基因组RNA(pgRNA)的3.5kb类型与HBV聚合酶和蛋白激酶一起被包装到核心颗粒中,在核心颗粒中其充当负链DNA的逆转录模板。RNA向DNA的转换发生在颗粒内部。

[0124] 在HBV基因组上碱基对的编号基于限制酶EcoRI的切割位点或同源位点处(如果EcoRI位点不存在)。然而,也使用其他编号方法,这些方法基于核心蛋白的起始密码子或RNA前基因组的第一个碱基。HBV基因组中的每个碱基对都参与编码至少一种HBV蛋白。然而,基因组还含有调节转录水平、确定聚腺苷酸化位点甚至标记核衣壳包封的特定转录物的遗传元件。四个ORF通过使用不同的框内起始密码子引起七种不同HBV蛋白的转录和翻译。例如,当核糖体在adw基因组155位的ATG处开始翻译时,产生乙型肝炎病毒表面小蛋白。当核糖体在第3211位的上游ATG开始时,会产生乙型肝炎病毒表面中蛋白,导致在蛋白质的5'端添加55个氨基酸。

[0125] 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编码肝炎e蛋白和核心蛋白。ORF X编码乙型肝炎X蛋白。HBV基因组含有病毒复制发生所必需的许多重要的启动子和信号区域。四种ORF的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转录物都有一个共同的腺苷酸化信号,其位于基因组中跨越1916-1921的区域。所得的转录物长度范围为从3.5个核苷酸到0.9个核苷酸。鉴于核心/前基因组启动子的位置,可以以不同的方式利用聚腺苷酸化位点。不同于经典真核生物聚腺苷酸化信号序列 (AATAAA),聚腺苷酸化位点是六核苷酸序列 (TATAAA)。已知TATAAA效率低下,适合被HBV进行差异使用。

[0126] 基因组编码四种已知的基因,称为C、X、P和S。核心蛋白由基因C (HBcAg) 编码,并且其起始密码前存在上游框内AUG起始密码子,前核心蛋白就是从所述框内AUG起始密码子产生的。HBeAg由前核心蛋白的蛋白水解加工而产生的。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基因是一个长开放阅读框,但含有将基因分成pre-S1、pre-S2和S三部分的三个框内起始 (ATG) 密码子。由于有多个起始密码子,因此产生了具有三种不同大小的多肽,称为大多肽,中多肽和小多肽 (pre-S1+pre-S2+S, pre-S2+S, 或S)。虽然由基因X编码的蛋白质的功能尚未完全了解,但是其与肝癌的发展有关。它刺激促进细胞生长的基因并使生长调节分子失活。

[0127] HBV通过逆转录RNA中间体来复制其基因组。首先将RNA模板转化为单链DNA类型 (负链DNA),随后将其用作合成正链DNA的模板。HBV中的DNA合成使用寡核糖核苷酸引物来进行正链DNA的合成,其主要起始于单链DNA的内部位置。通过RNase H切割生成引物,该切割是从RNA模板的5'末端开始的不依赖序列的长度测量。这个18nt的RNA引物退火至负链DNA的3'末端,并且引物的3'末端位于12nt的直接重复序列DR1内。由于引物易位,大部分正链DNA合成起始于位于负链DNA另一端附近的12nt的直接重复序列DR2。正链启动的位置会产生影响。原位启动产生双链线性 (DL) DNA基因组,而自DR2启动会导致在第二次模板转换完成后合成松弛环状 (RC) DNA基因组,称为环化。虽然目前仍不清楚为何嗜肝DNA病毒在引发正链DNA合成方面具有这种增加的复杂性,但是引物易位的机制是潜在的治疗靶点。由于病毒复制对于维持嗜肝病毒 (包括人类病原体乙型肝炎病毒) 的慢性携带状态是必需的,因此理解复制过程和揭示治疗靶点对于在携带者中限制疾病来说是至关重要的。

[0128] 针对PreS1的向导RNA位于编码序列的5'末端。内切酶消化将引入插入/缺失,这导致PreS1翻译的移码。HBV通过长RNA形式复制其基因组,在两端具有相同的重复序列DR1和DR2,并且在5'末端具有RNA衣壳化信号 ϵ 。聚合酶基因的逆转录酶结构域 (RT) 将RNA转化成DNA。Hbx蛋白是病毒复制以及宿主细胞功能的关键调控因子。由RNA引导的对RT的消化将引入插入/缺失,这导致RT翻译的移码。向导RNA sgHbx和sg核心不仅可导致Hbx和HBV核心蛋白编码发生移码,而且还会导致含有DR2-DR1- ϵ 的整个区域缺失。四种sgRNA的结合也可导致HBV基因组系统性破坏成小块。

[0129] 图2示出了CRISPR向导RNA靶向的HBV基因组中的关键部分。

[0130] 图3示出了由针对HBV的体外CRISPR测定得到的凝胶。泳道1、3、6: 侧接RT、Hbx-核心和PreS1的HBV基因组的PCR扩增子。泳道2、4、5和7: 用sgHBV-RT、sgHBV-Hbx、sgHBV-核心、sgHBV-PreS1处理的PCR扩增子。

[0131] 因此,本发明的材料显示为HBV病毒基因组的片段化。

[0132] 实施例2

[0133] 电穿孔可用于将核糖核蛋白 (RNP) 引入细胞。用HPV 16特异性CRISPR-Cas9核糖核蛋白 (RNP) 处理HPV 16+癌细胞并发现杀死了HPV 16+癌细胞。如图14所示,通过电穿孔将包含Cas9蛋白和sgRNA的RNP引入SiHa HPV-16+细胞。然后培养细胞并使用荧光激活细胞分选技术 (FACS) 获取活细胞计数。

[0134] 图15显示了在HPV-16的E6和E7基因上的各种sgRNA的靶标位置。图16显示了通过用具有图15所示的在HPV-16E6和E7基因上的靶标的各种sgRNA进行电穿孔引入RNP后的细胞计数。将细胞计数归一化至sgHPV18对照,并对其随含有Cas9的RNP剂量(μg)的变化作图。与如图16所示的对照相比,用包含sgHPV16E6-1、sgHPV16E7-2和sgHPV16E7-3的RNP进行电穿孔均导致细胞计数降低。

[0135] 图17显示了HPV-16的E6和E7基因上的靶标位置和定量PCR (qPCR) 引物位置。图18示出了用各种HPV16特异性RNP处理后1天和2天,聚焦于E6和E7基因的归一化至sgHPV18RNP对照的qPCR结果。包含sgHPV16E6-1、sgHPV16E7-2和sgHPV16E7-3向导RNA的RNP全部在E6或E7基因处显示HPV16DNA的切割。处理后1天和6天的归一化至sgHPV18RNP对照的活细胞计数如图19所示。同样,三种靶向HPV16E6和E7的RNP显示了在HPV16+癌细胞电穿孔后降低HPV16细胞计数的能力。

[0136] 实施例3

[0137] 电穿孔可用于将编码内切核酸酶的mRNA与向导RNA一起引入。通过使用电穿孔来用HPV 16特异性sgRNA和Cas9mRNA处理HPV 16+癌细胞,并发现杀死了HPV16+癌细胞。如图20所示,通过电穿孔将编码Cas9蛋白的mRNA和sgRNA引入SiHa HPV-16+细胞。然后培养细胞并使用荧光激活细胞分选技术 (FACS) 获取活细胞计数。

[0138] 图21示出了用各种Cas9mRNA和sgRNA的组合核转染后1、3和6天的归一化细胞计数,全部均一化至sgHPV18对照。图22显示用6 μg 各种sgRNA和各种Cas9mRNA处理6天后的细胞的计数,归一化至sgHPV18对照。图21和图22均示出了用HPV 16特异性sgRNA和Cas9mRNA核转染的细胞中减少的细胞计数。

[0139] 实施例4

[0140] 用HPV 18特异性CRISPR-Cas9核糖核蛋白 (RNP) 处理HPV 18+癌细胞并发现杀死HPV 18+癌细胞。如图23所示,通过电穿孔将包含Cas9蛋白的RNP和sgRNA引入SiHa HPV-18+细胞。然后培养细胞并使用荧光激活细胞分选技术 (FACS) 获取活细胞计数。

[0141] 图24显示了HPV-18的E6基因上的各种sgRNA的靶标位置。图25显示了通过用靶向图24所示的HPV-18E6基因的各种sgRNA进行电穿孔引入RNP后的细胞计数。将细胞计数归一化至sgEBV对照。与图25所示的对照相比,用包含HPV18特异性RNP的RNP进行电穿孔均导致细胞计数降低。图26示出了用RNP形式或mRNA/sgRNA形式的sgHPV18E6-2/Cas9进行电穿孔5天后,HPV-18+癌细胞的活细胞计数比较。两种方法都明显导致细胞数量减少

[0142] 图27示出了mRNA和RNP处理的细胞中随Cas9mRNA或蛋白质剂量(μg)变化的活细胞计数的比较。在较低剂量时,mRNA处理比RNP处理减少程度大,剂量增加时两种处理方法产生相似的结果。

[0143] 实施例5

[0144] 本发明的实施方式可用于引入编码靶向各种病毒 (例如HBV) DNA的引导核酸内切

酶的核酸。已显示Cas9与各种HBV特异性向导RNA协同能通过病毒基因组中某些位点处的靶向切割,来减少细胞中的病毒DNA载量。图28显示了HBV染色体DNA细胞模型。如图所示,用HBV基因组质粒转染Cas9+GFP+HED293细胞。然后通过使用慢病毒载体转导引入HBV特异性sgRNA。然后收集细胞,通过T7E1测定法测量HBV DNA的切割,并通过qPCR测量HBV DNA。

[0145] 图29示出了模型中使用的各种sgRNA的HBV基因组上的靶标位置,以及用于评估HBV DNA切割的引物组靶标的位置。图30示出了凝胶电泳的结果,其表明用sgRT RNA、sgHBx RNA、sg核心RNA和sgPreS 1RNA转导的细胞中HBV DNA的切割。图31示出了在未处理的细胞和用HBV特异性sgRNA和Cas9处理的细胞中,通过qPCR测定的HBV DNA量。与未处理的细胞相比,四种测试的sgRNA各显示出减少的HBV DNA量。图30和31所示的结果来自治疗2天后的未分选的细胞。

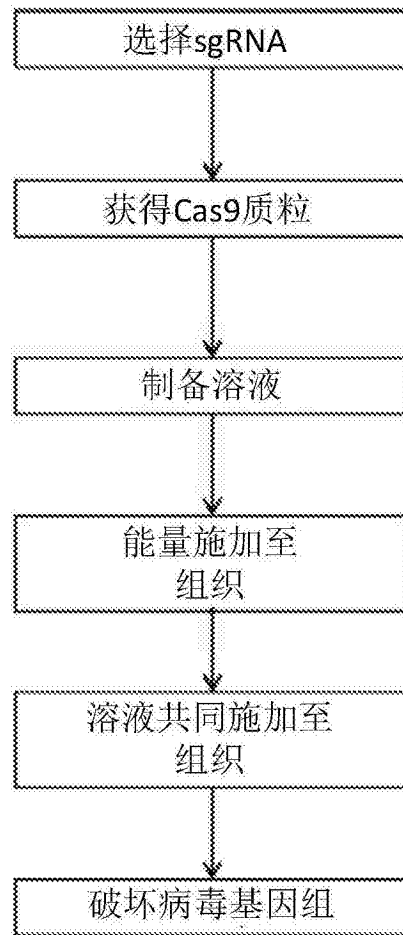


图1

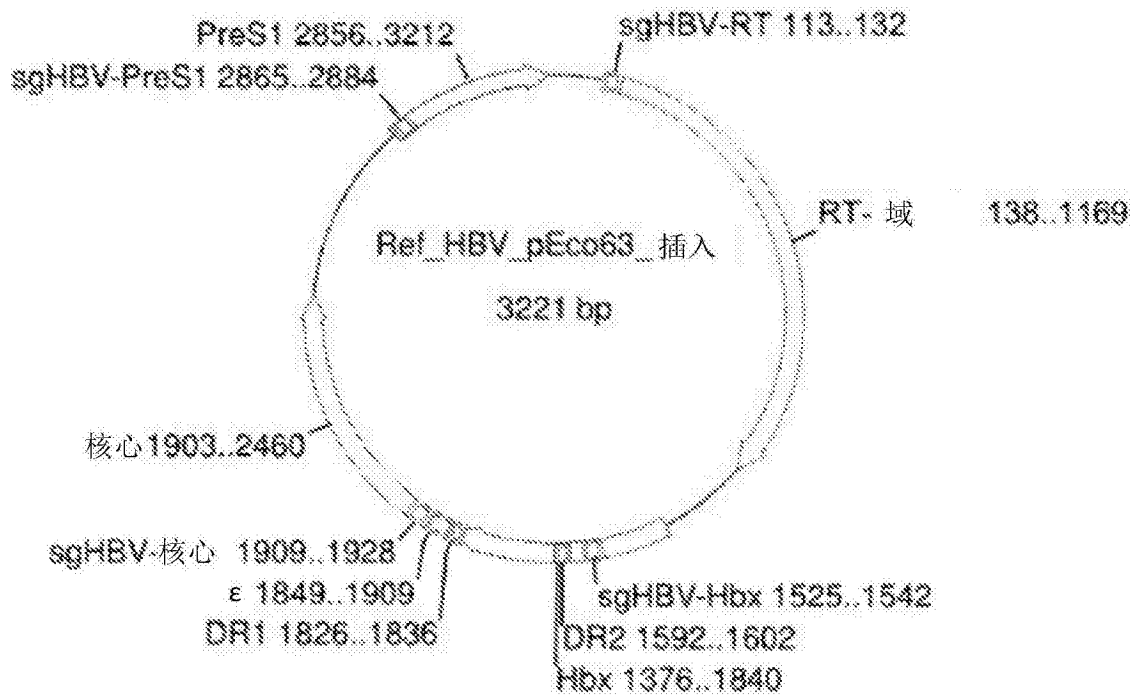


图2



图3

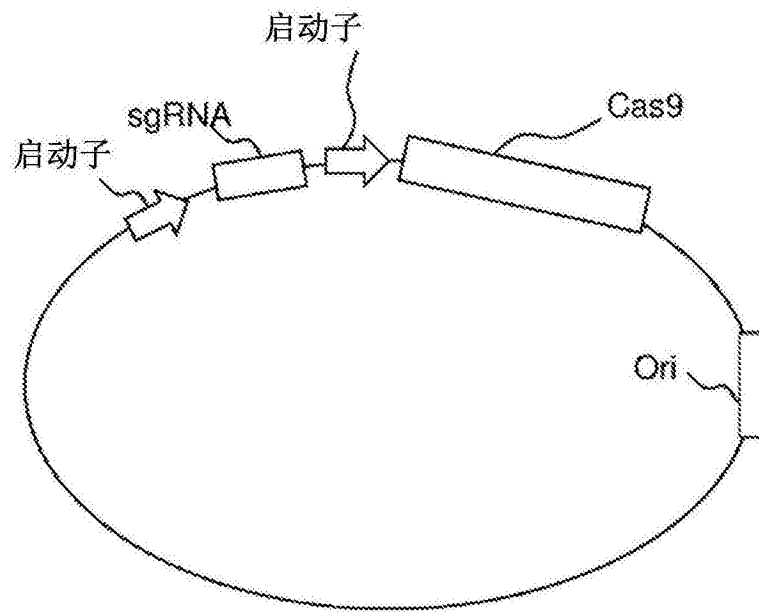


图4

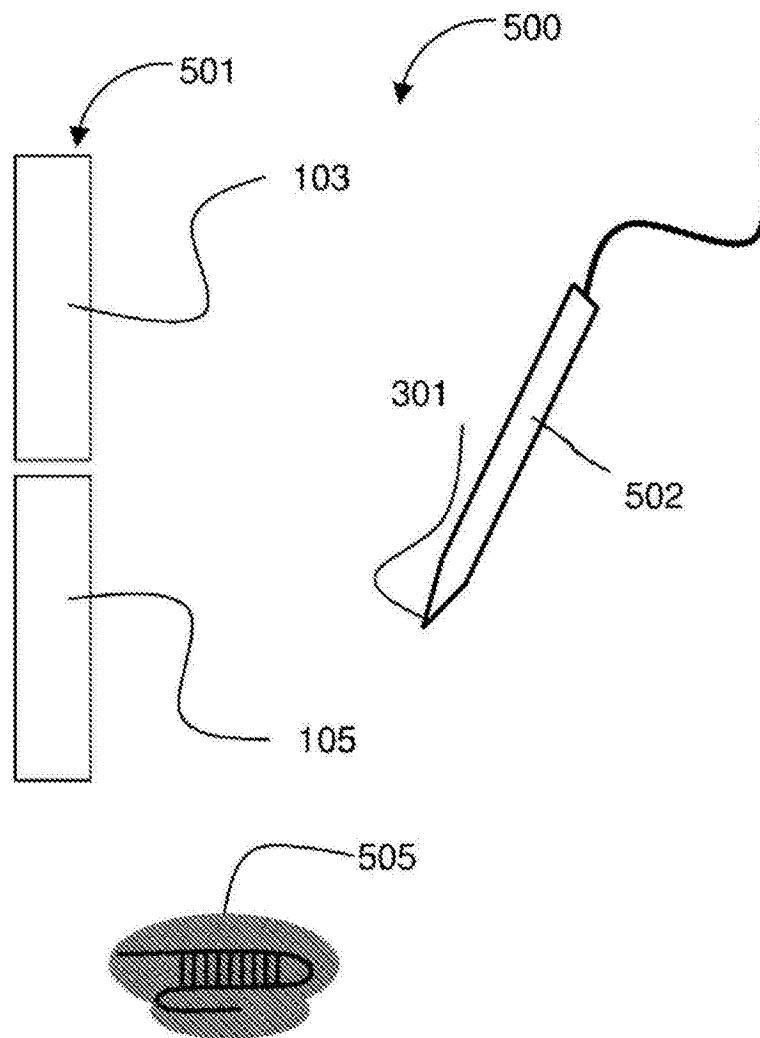


图5

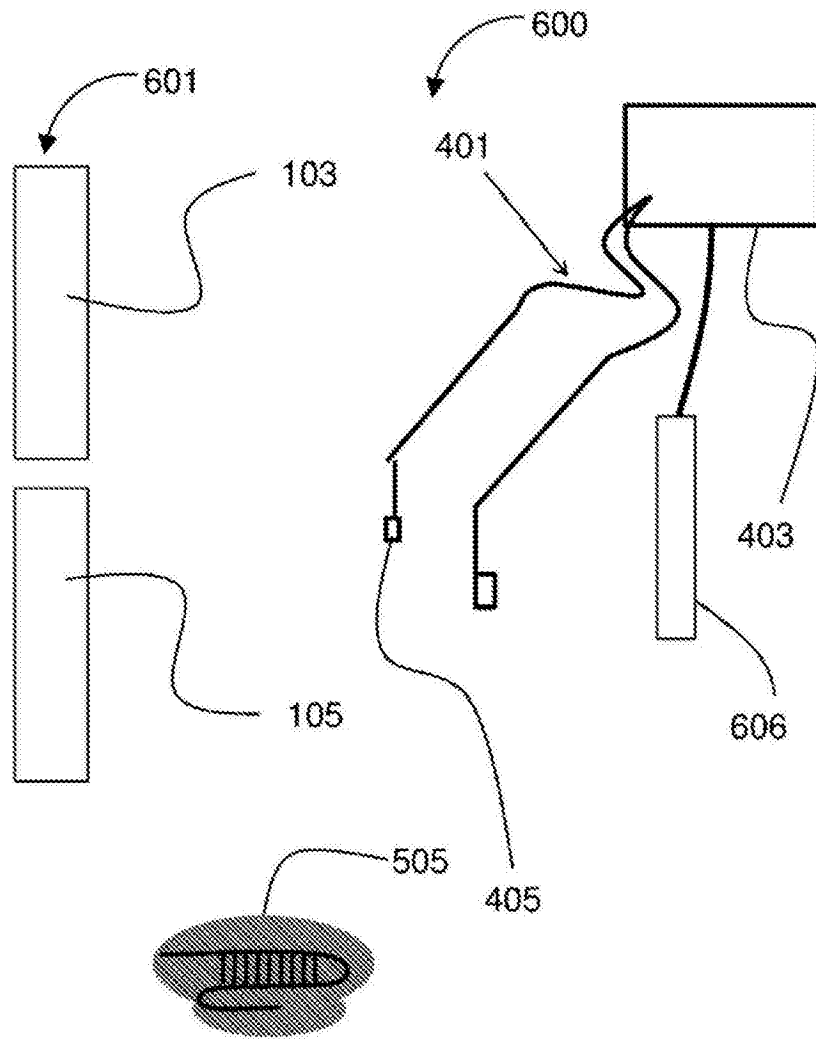


图6

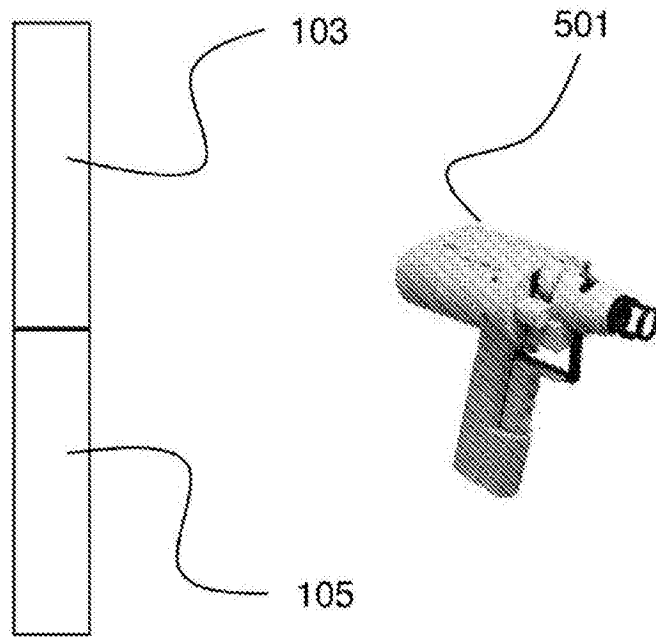


图7

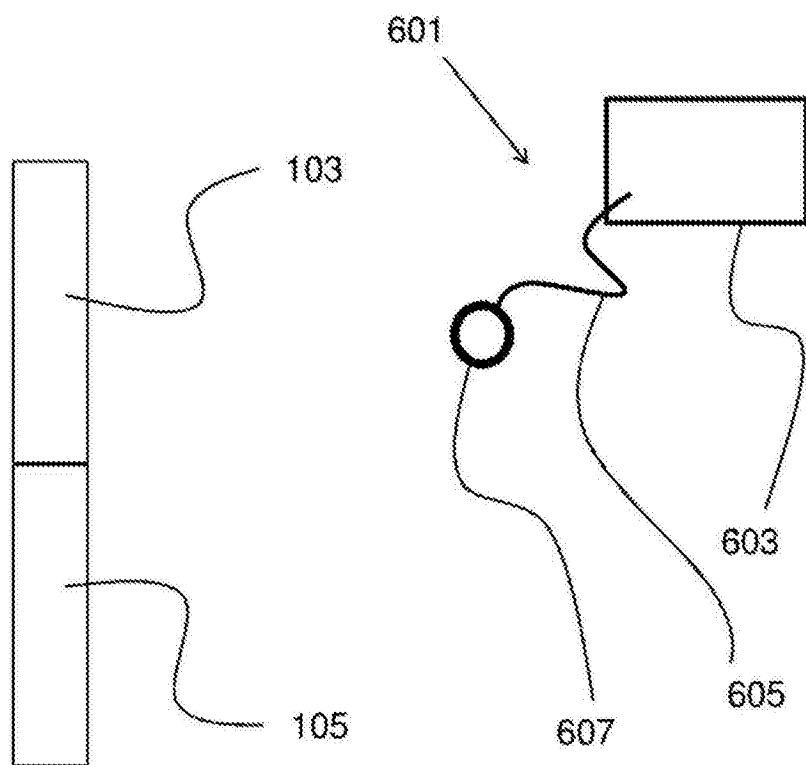


图8

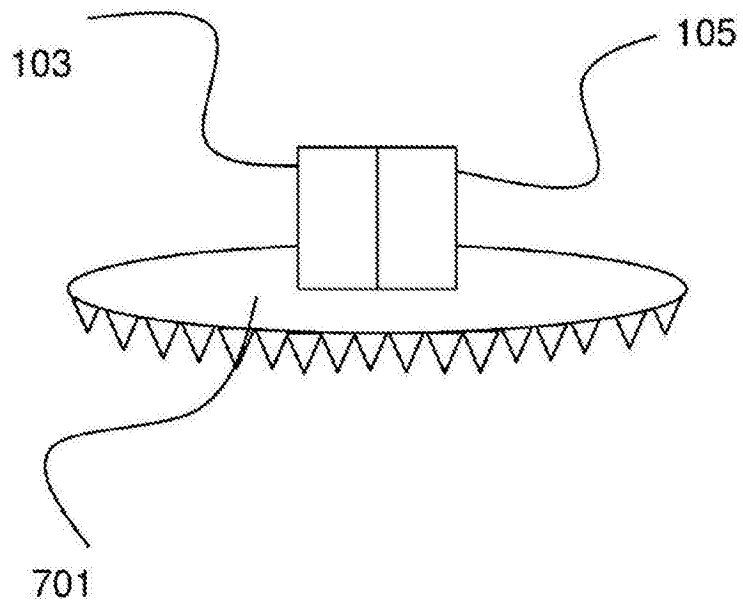


图9

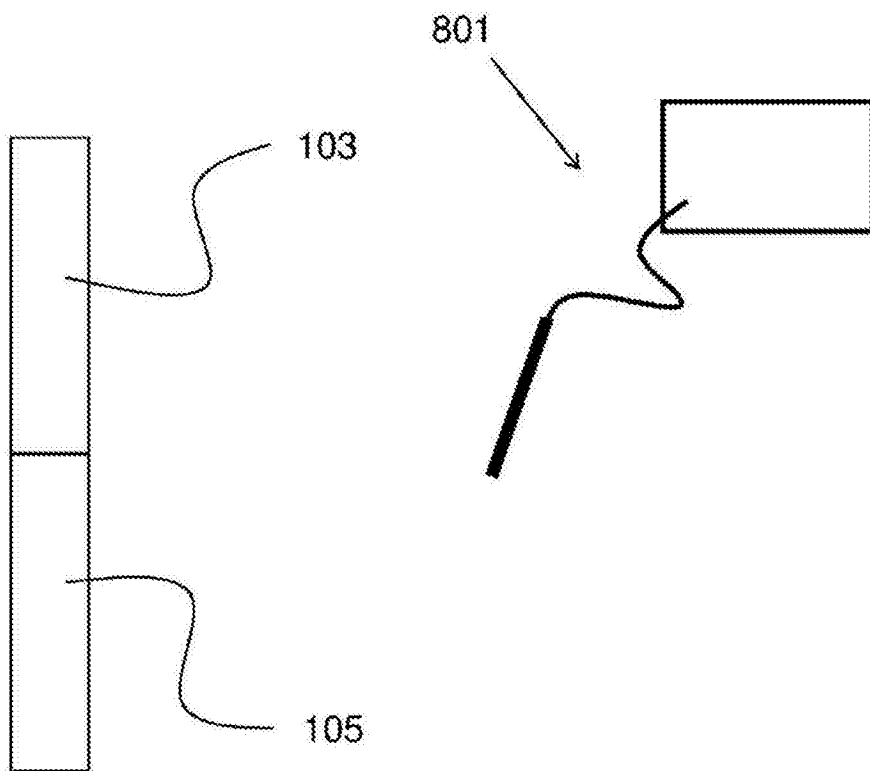


图10

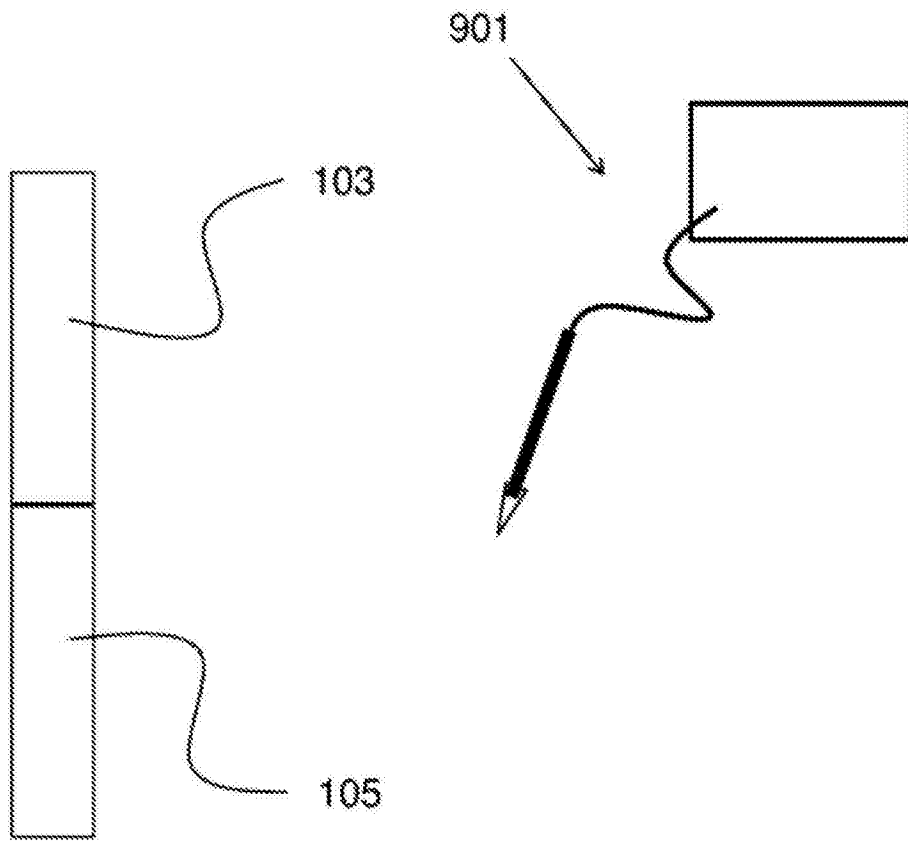


图11

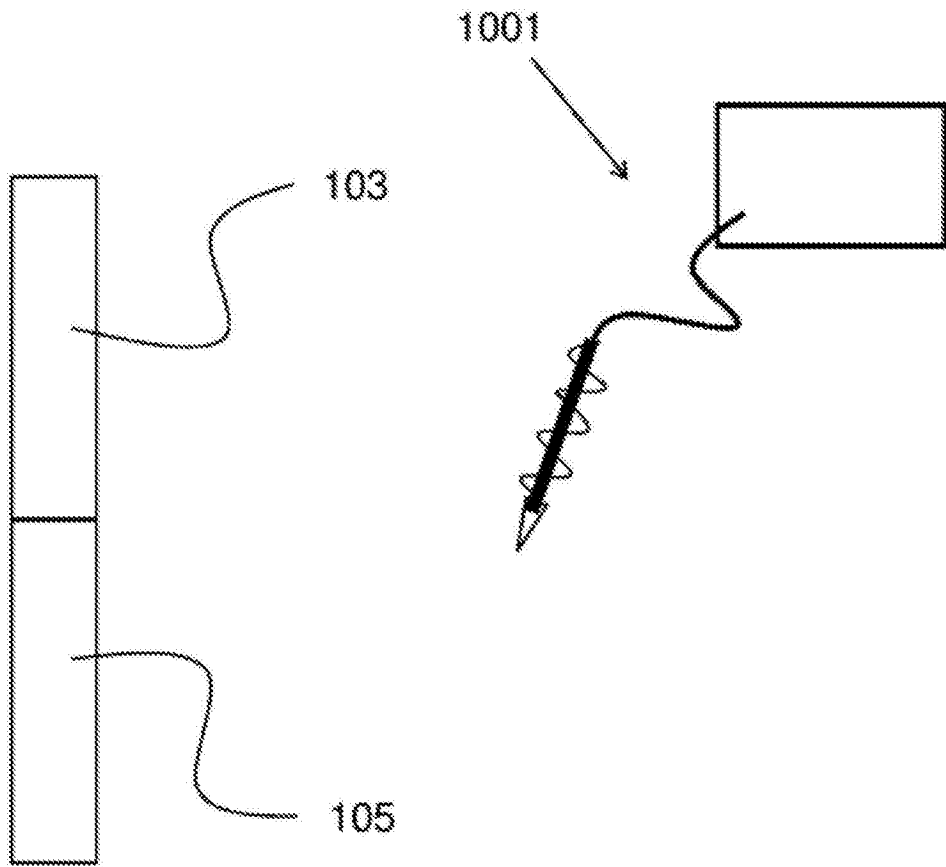


图12

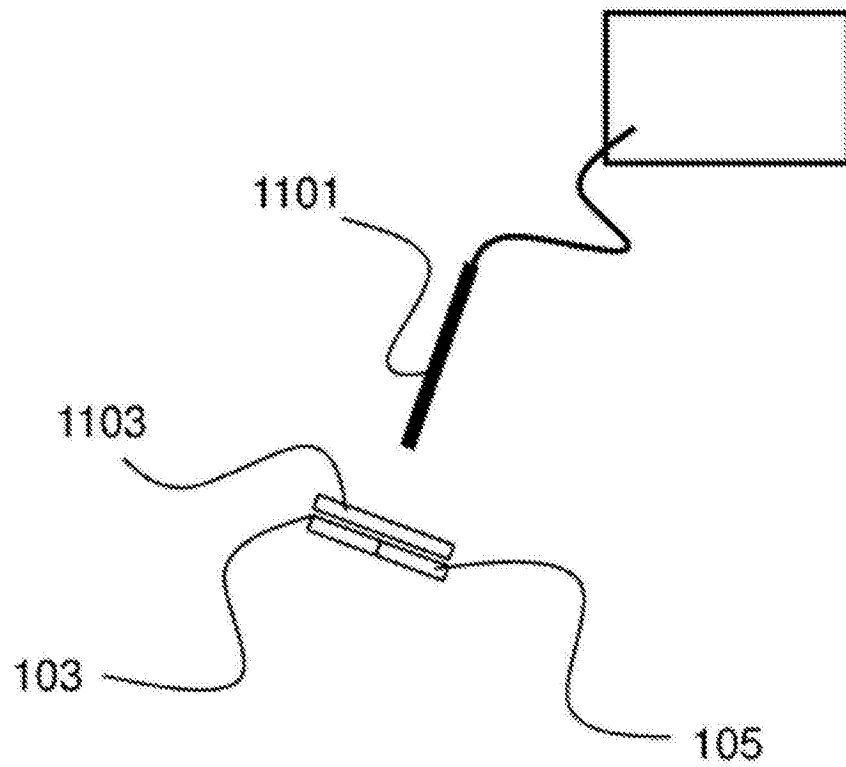


图13

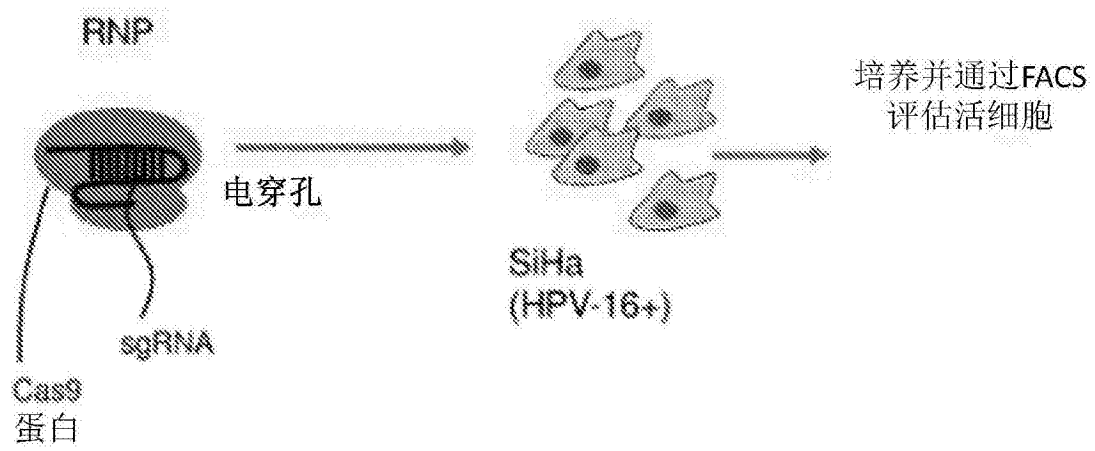


图14

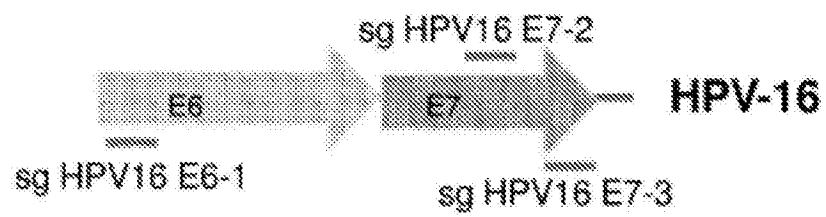


图15

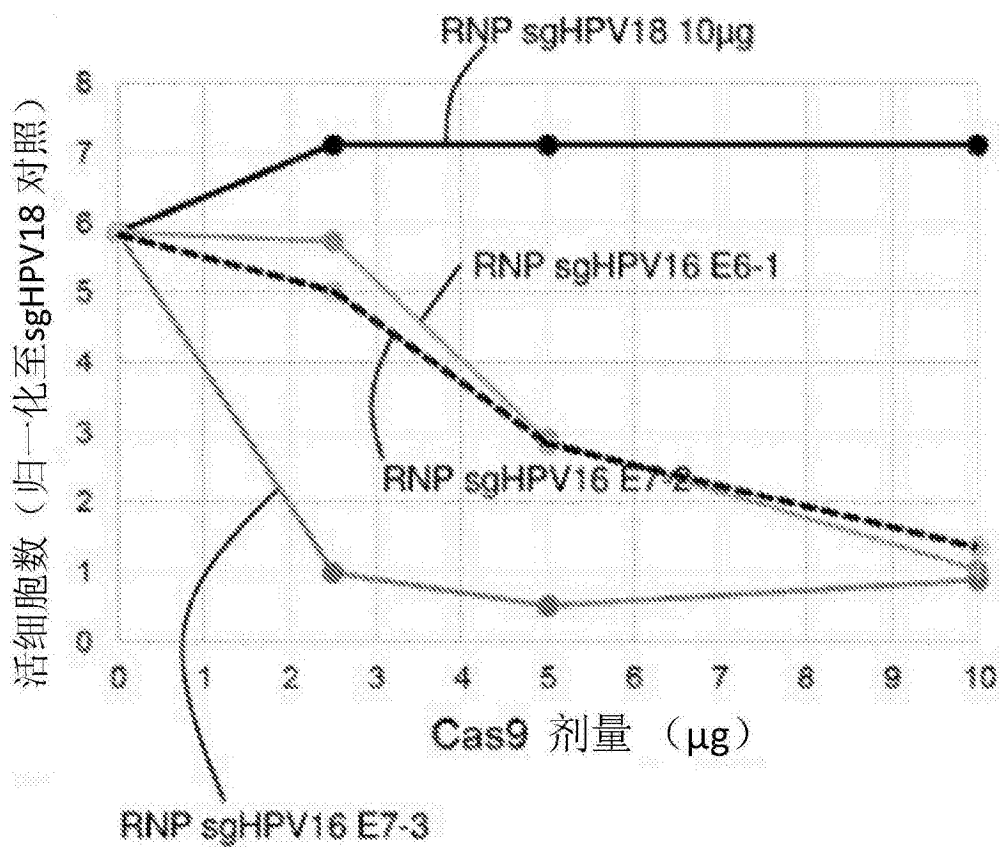


图16

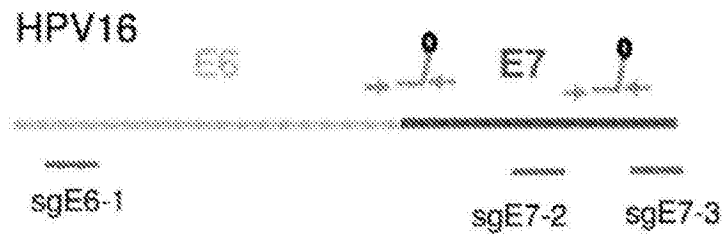


图17

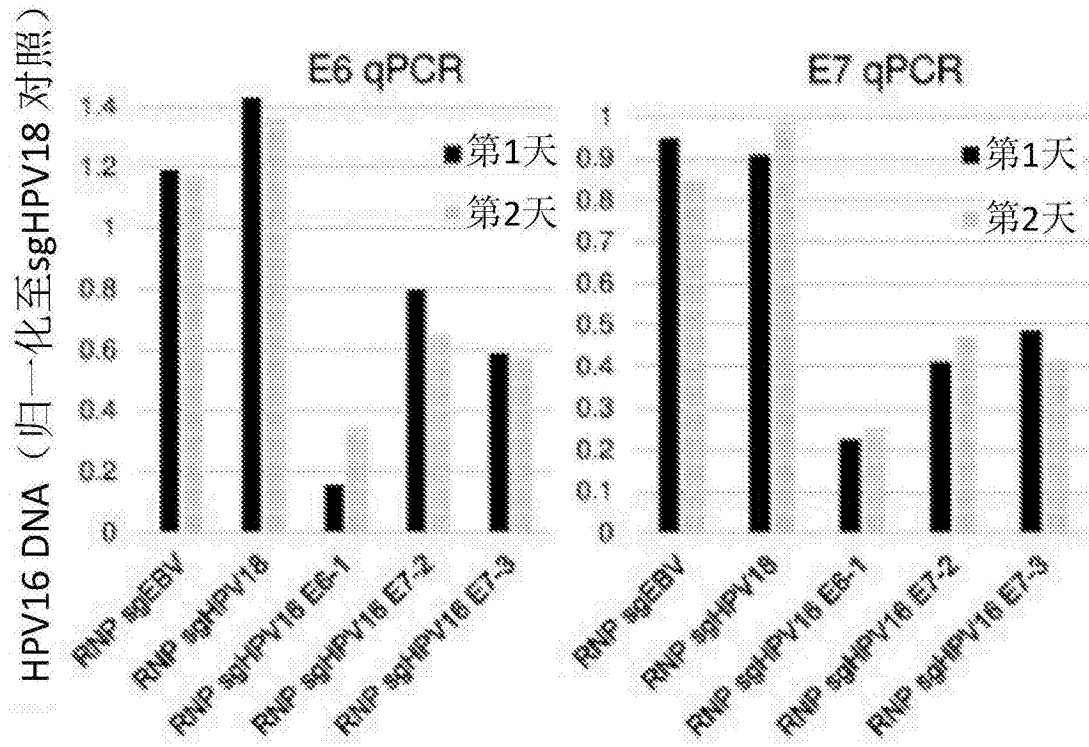


图18

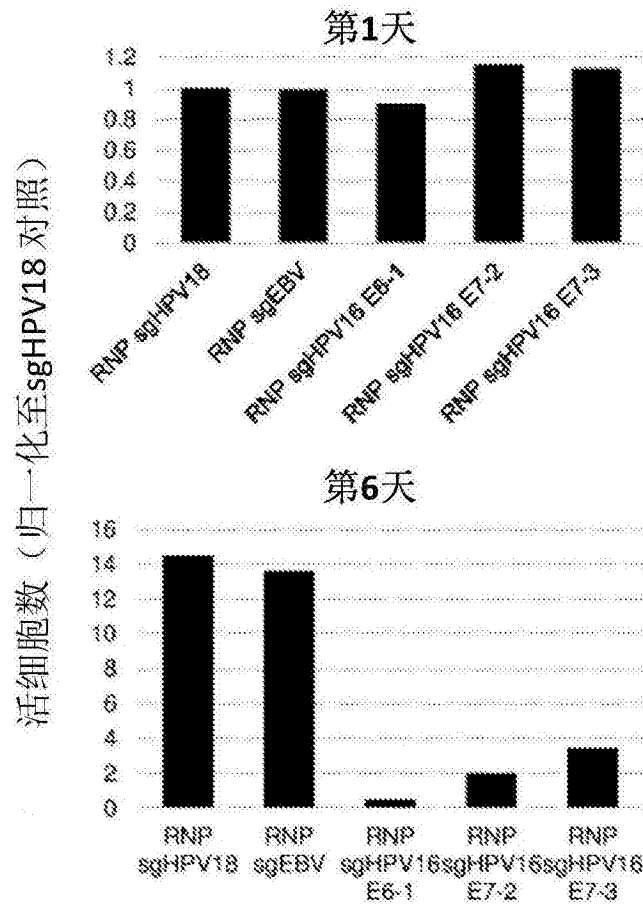


图19

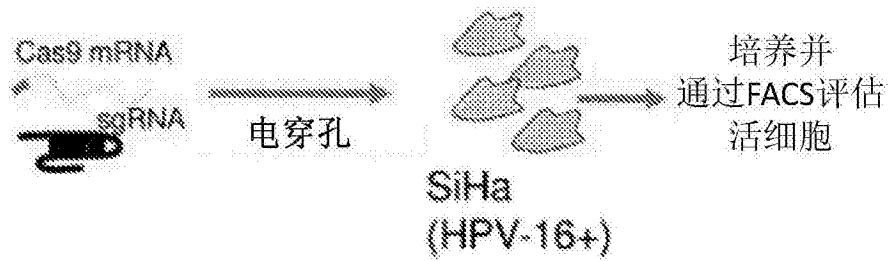


图20

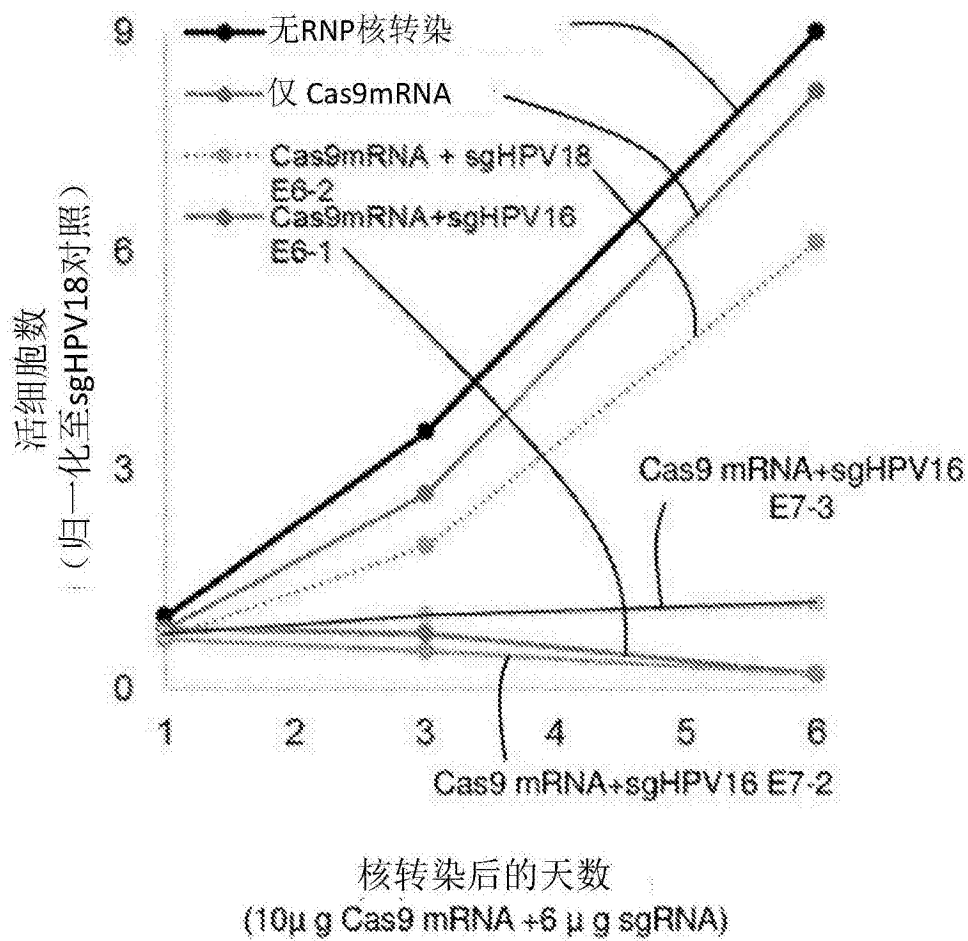


图21

电穿孔后的第6天

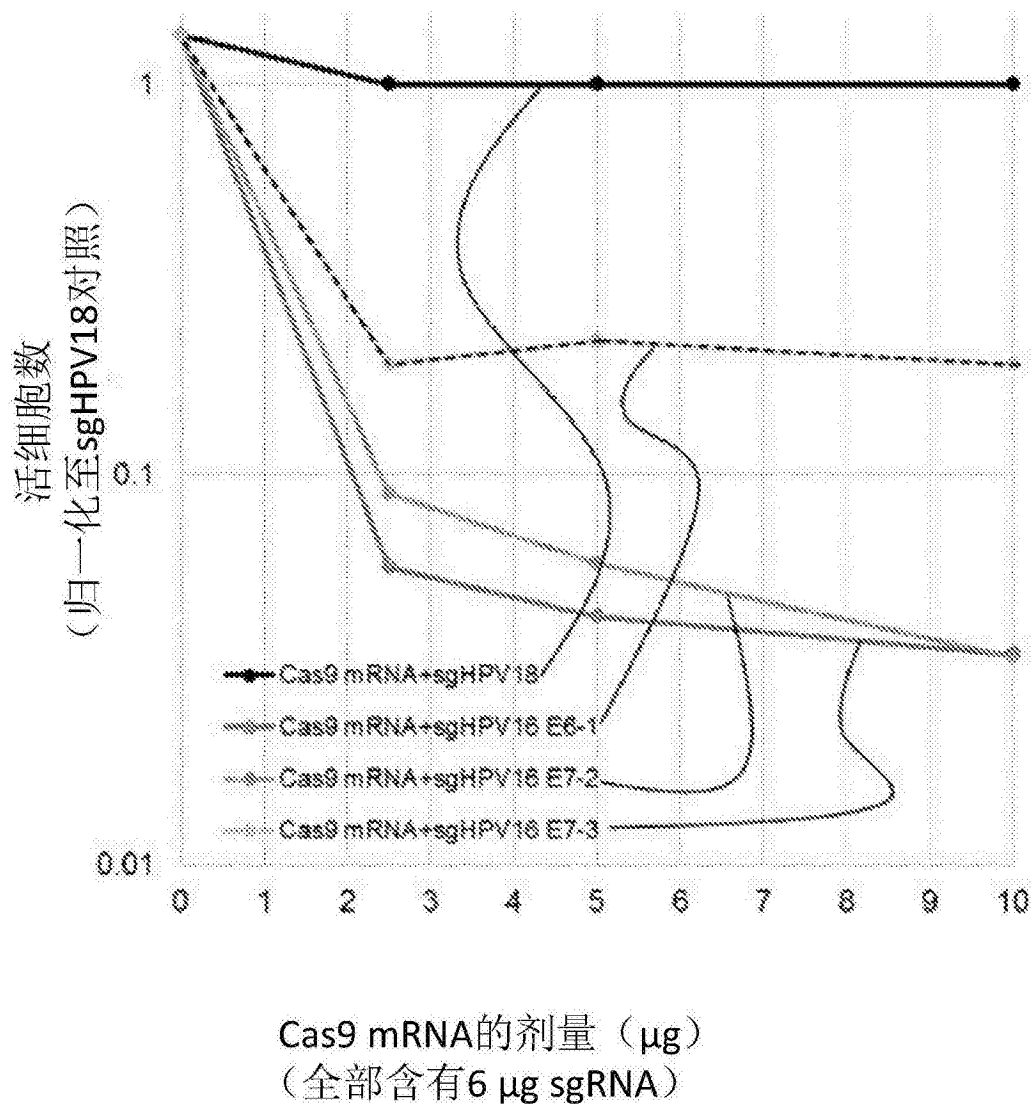


图22

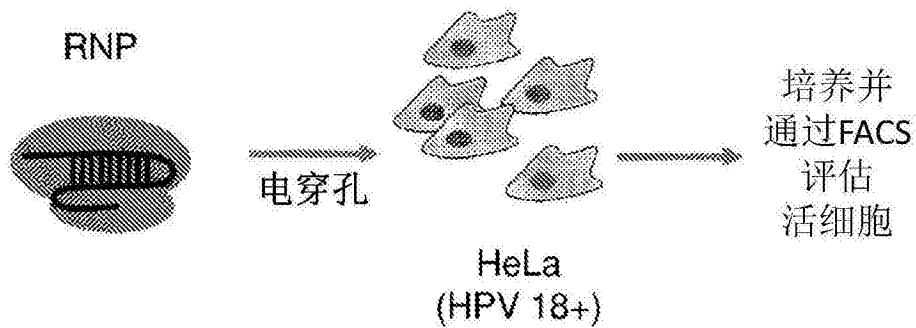


图23

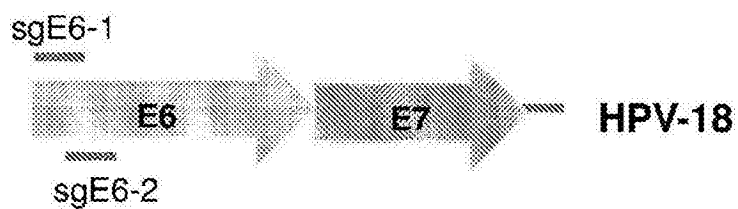


图24

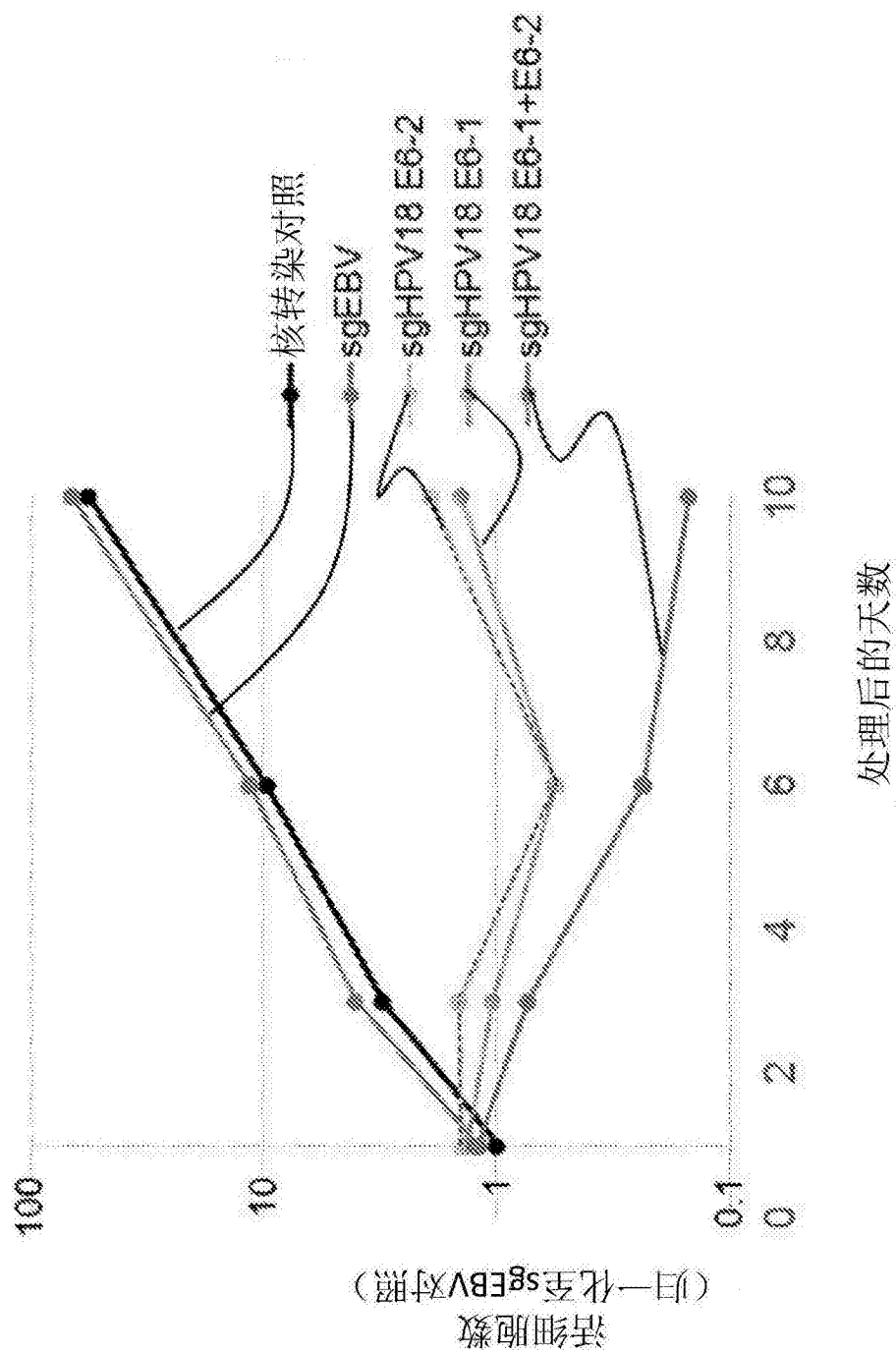


图25

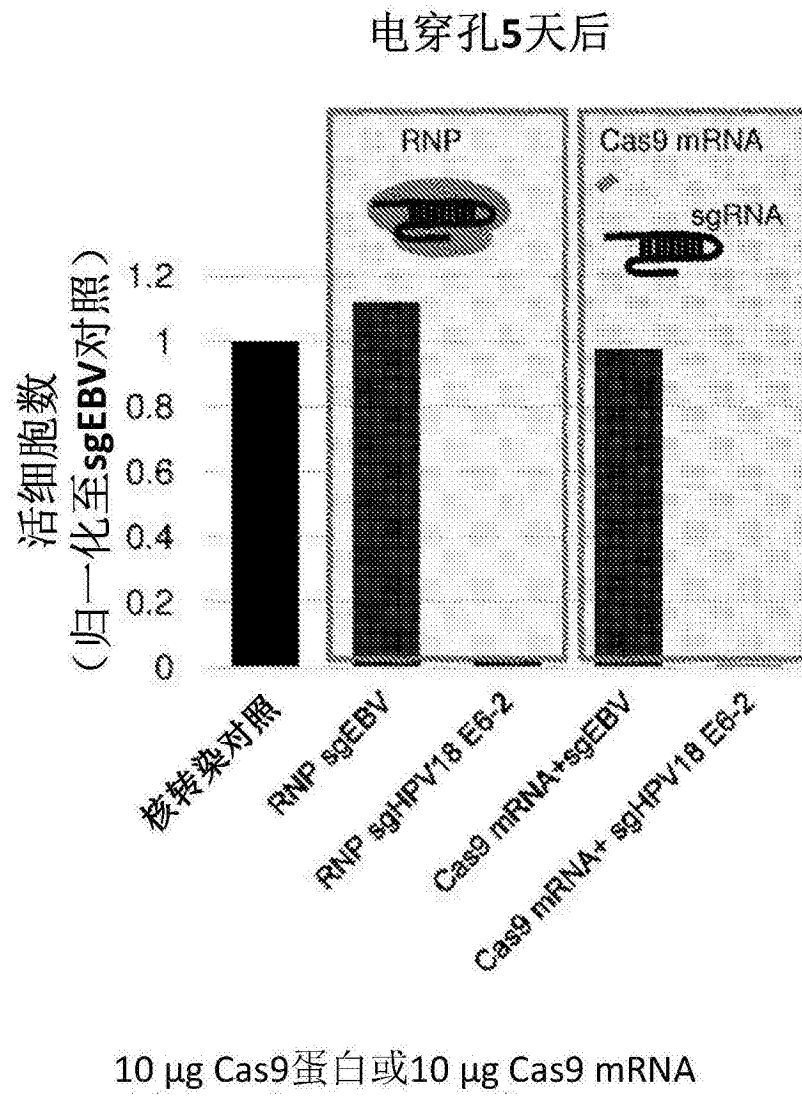


图26

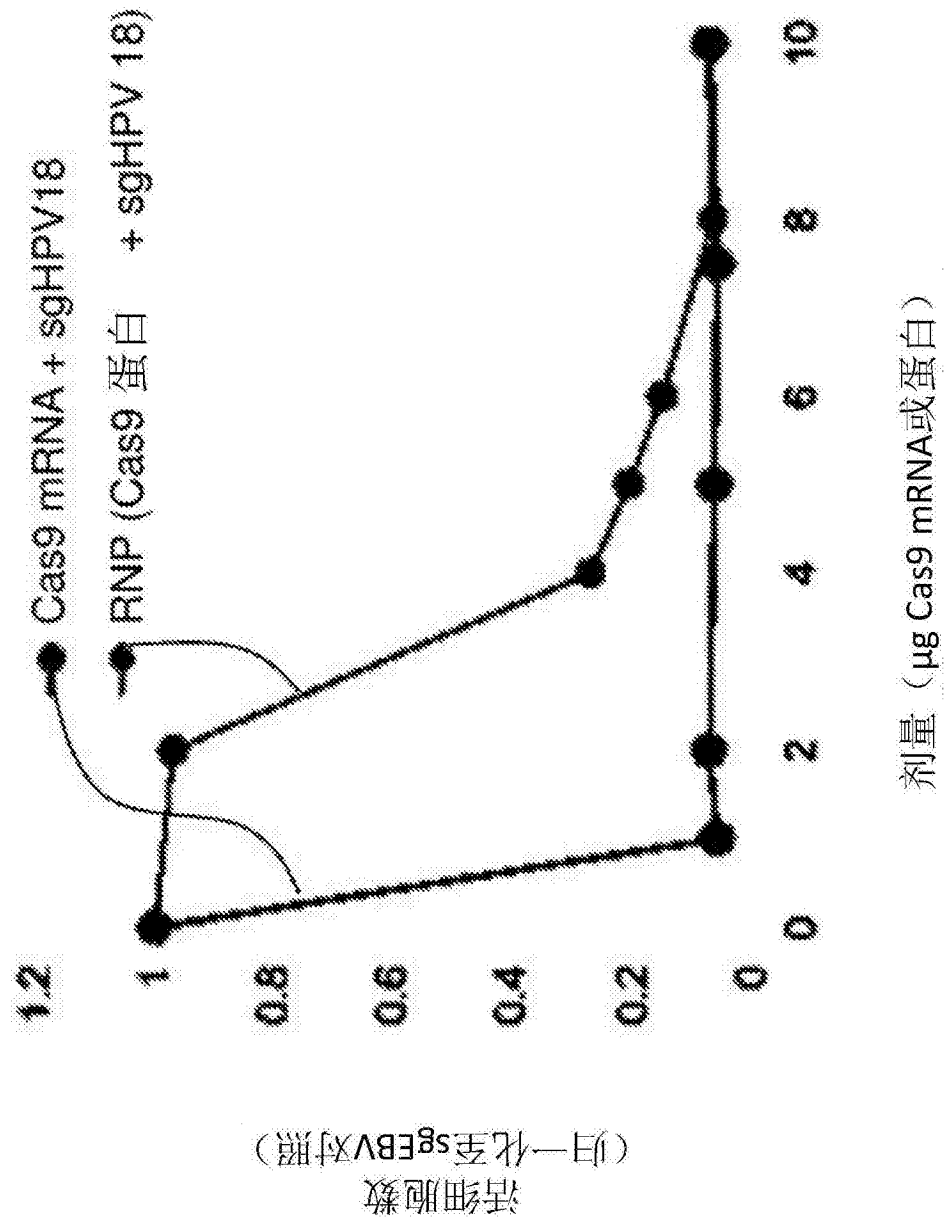


图27

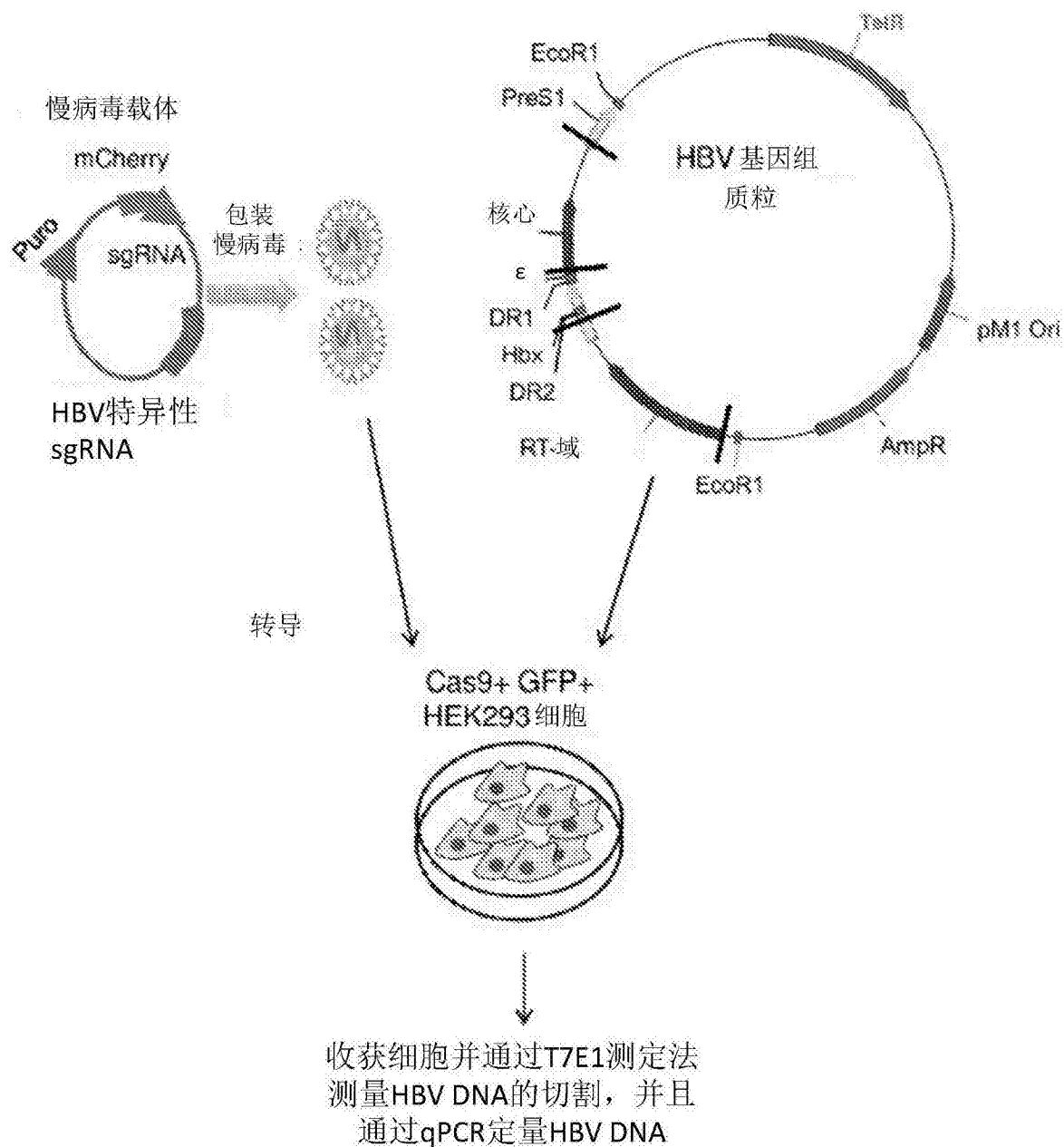


图28

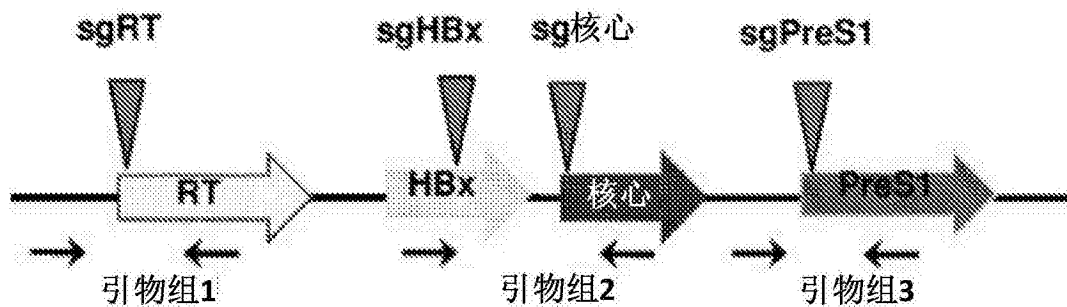


图29

A: Cas9-GFP质粒+U6-sgRNA质粒

B: Cas9-GFP-U6-sgRNA质粒

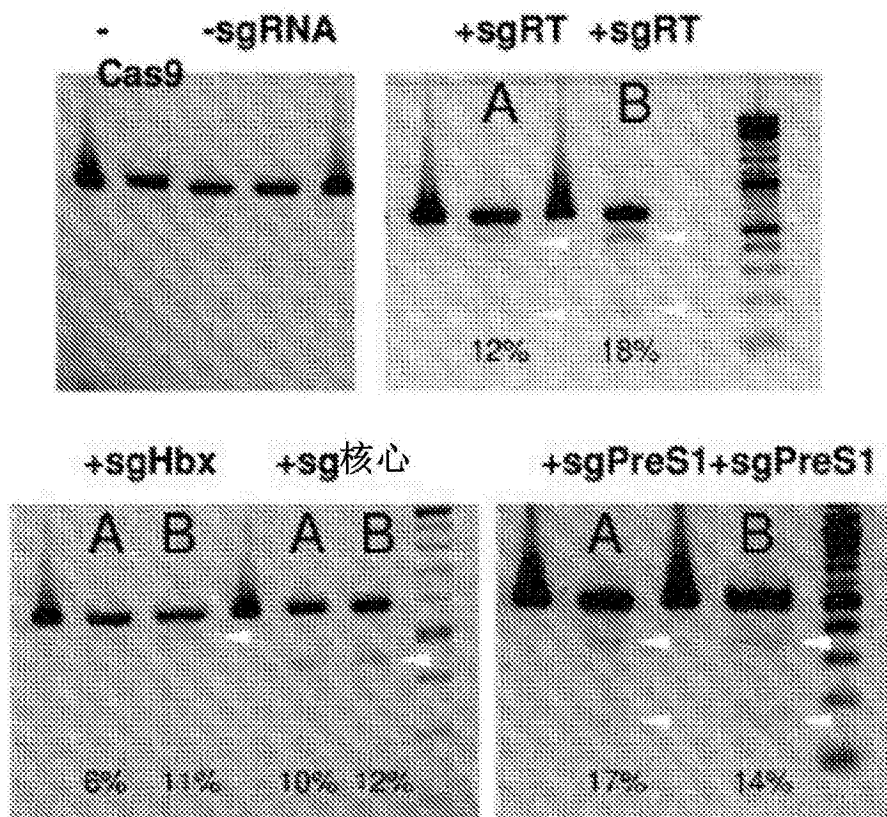


图30

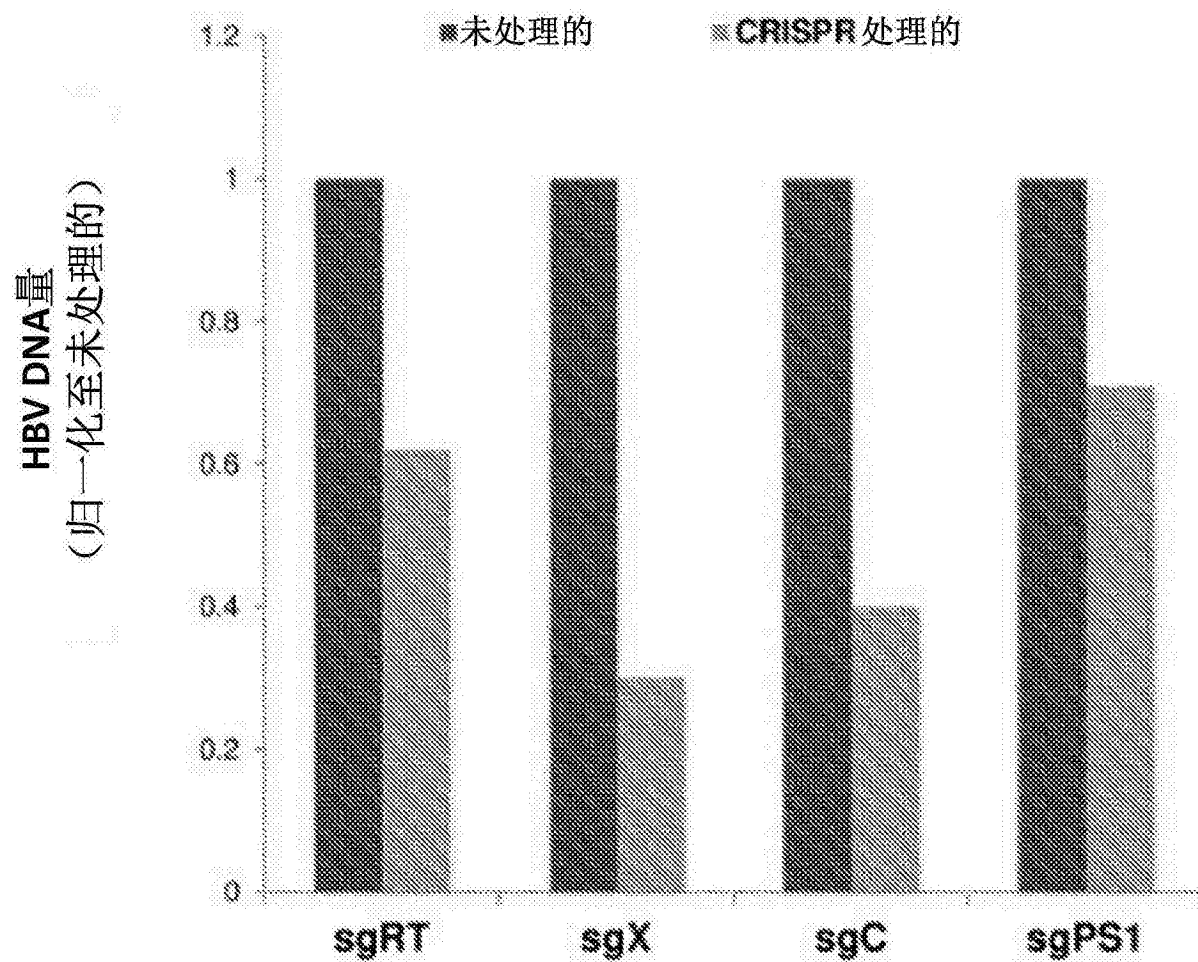


图31