



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117264929 A

(43) 申请公布日 2023. 12. 22

(21) 申请号 202311029425.0

(22) 申请日 2018.04.20

(30) 优先权数据

62/488,403 2017.04.21 US

62/516,966 2017.06.08 US

(62) 分案原申请数据

201880038349.0 2018.04.20

(71) 申请人 精密生物科学公司

地址 美国北卡罗来纳州

(72) 发明人 V·巴尔特斯维克 D·扬茨

J·J·史密斯 J·莱普

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

专利代理人 陈文平 徐志明

(51) Int.Cl.

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/864 (2006.01)

A61K 38/46 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61P 3/06 (2006.01)

权利要求书4页 说明书39页

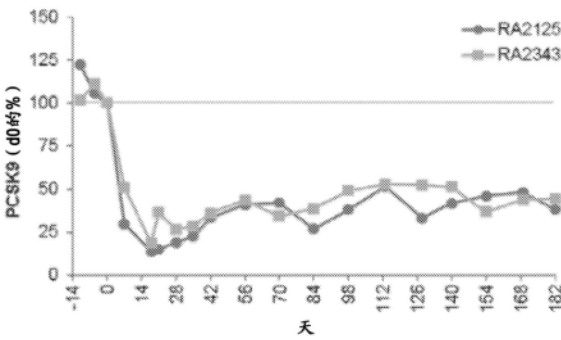
序列表(电子公布) 附图17页

(54) 发明名称

对PCSK9基因中的识别序列具有特异性的工程化大范围核酸酶

(57) 摘要

本发明包括工程化大范围核酸酶,其识别和切割人PCSK9基因内的识别序列。本发明还包含用于在药物组合物中和在用于治疗或减轻胆固醇相关障碍(例如高胆固醇血症)的症状的方法中使用这种工程化大范围核酸酶的方法。此外,本发明包括包含工程化大范围核酸酶蛋白、编码工程化大范围核酸酶的核酸的药物组合物以及这种组合物用于治疗与胆固醇相关障碍例如高胆固醇血症的用途。



1. 一种工程化大范围核酸酶,其识别和切割PCSK9基因内的识别序列,其中所述工程化大范围核酸酶包含第一亚基和第二亚基,其中所述第一亚基结合所述识别序列的第一识别半位点并包含第一超变(HVR1)区,并且其中所述第二亚基结合所述识别序列的第二识别半位点并包含第二超变(HVR2)区。

2. 如权利要求1的工程化大范围核酸酶,其中所述识别序列包含SEQ ID NO:4。

3. 如权利要求1或权利要求2的工程化大范围核酸酶,其中所述HVR1区包含与对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基24-79的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

4. 如权利要求1-3中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述HVR1区包含对应于SEQ ID NO:6-14中任一项的残基24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75和77的残基。

5. 如权利要求1-4中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述HVR1区进一步包含对应于SEQ ID NO:8的残基48、50、71和73的残基。

6. 如权利要求1-5中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述HVR1区包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基24-79。

7. 如权利要求1-6中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述HVR2区包含与对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基215-270的氨基酸序列具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

8. 如权利要求1-7中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述HVR2区包含对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266和268的残基。

9. 如权利要求7或权利要求8的工程化大范围核酸酶,其中所述HVR2区进一步包含对应于SEQ ID NO:12的残基258的残基。

10. 如权利要求1-9中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述HVR2区包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基215-270。

11. 如权利要求1-10中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述第一亚基包含与SEQ ID NO:6-14中任一个的残基7-153具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,并且其中所述第二亚基包含与SEQ ID NO:6-14中任一个的残基198-344具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

12. 如权利要求1-11中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述第一亚基包含对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基80的残基。

13. 如权利要求1-12中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述第二亚基包含对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基271的残基。

14. 如权利要求1-13中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述第一亚基包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基7-153。

15. 如权利要求1-14中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述第二亚基包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基198-344。

16. 如权利要求1-15中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述工程化大范围核酸酶包含接头,其中所述接头共价连接所述第一亚基和所述第二亚基。

17. 如权利要求1-16中任一项的工程化大范围核酸酶,其中所述工程化大范围核酸酶

包含SEQ ID NO:6-14中任一个的氨基酸序列。

18.一种多核苷酸,其包含编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶的核酸序列。

19.如权利要求18的多核苷酸,其中所述多核苷酸是mRNA。

20.如权利要求19的多核苷酸,其中所述mRNA是编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶和至少一种另外的多肽的多顺反子mRNA。

21.一种重组DNA构建体,其包含编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶的核酸序列。

22.如权利要求21的重组DNA构建体,其中所述重组DNA构建体包含含有启动子及编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶和至少一种另外的多肽的多顺反子核酸序列的盒,其中所述启动子驱动所述多顺反子核酸序列的表达以在靶细胞中产生多顺反子mRNA。

23.如权利要求21的重组DNA构建体,其中所述重组DNA构建体编码病毒载体,所述病毒载体包含编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶的所述核酸序列。

24.如权利要求23的重组DNA构建体,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体或重组腺相关病毒(AAV)载体。

25.如权利要求23或权利要求24所述的重组DNA构建体,其中所述病毒载体是重组AAV载体。

26.一种病毒载体,其包含编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶的核酸序列。

27.如权利要求26的病毒载体,其中所述病毒载体是逆转录病毒载体、腺病毒载体、慢病毒载体或AAV载体。

28.如权利要求26或27所述的病毒载体,其中所述病毒载体是重组AAV载体。

29.如权利要求26-28中任一项的病毒载体,其中所述病毒载体包含含有启动子及编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶和至少一种另外的多肽的多顺反子核酸序列的盒,其中所述启动子驱动所述多顺反子核酸序列的表达以在靶细胞中产生多顺反子mRNA。

30.一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体及:

(a) 编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶的核酸;或

(b) 权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶。

31.如权利要求30的药物组合物,其中编码所述工程化大范围核酸酶的所述核酸是权利要求19或权利要求20的所述mRNA。

32.如权利要求30的药物组合物,其中所述药物组合物包含权利要求21-25中任一项的所述重组DNA构建体。

33.如权利要求30的药物组合物,其中所述药物组合物包含权利要求26-29中任一项的所述病毒载体。

34.如权利要求30的药物组合物,其中所述药物组合物包含权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶。

35.如权利要求30或权利要求31的药物组合物,其中所述药物组合物包含包封在脂质

纳米颗粒内的权利要求19或权利要求20的所述mRNA。

36. 一种用于减少受试者中的PCSK9表达的方法,所述方法包括向所述受试者中的靶细胞递送:

(a) 有效量的编码权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶的核酸,其中所述工程化大范围核酸酶在所述靶细胞中表达;或

(b) 有效量的权利要求1-17中任一项的所述工程化大范围核酸酶;

其中所述工程化大范围核酸酶在所述靶细胞中识别和切割包含SEQ ID NO:4的识别序列,并与对照细胞相比,减少PCSK9的表达。

37. 如权利要求36的方法,其中所述受试者患有高胆固醇血症。

38. 如权利要求36或权利要求37的方法,其中所述受试者患有家族性高胆固醇血症。

39. 如权利要求36-38中任一项的方法,其中所述受试者患有常染色体显性家族性高胆固醇血症。

40. 如权利要求36-39中任一项的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用权利要求30-35中任一项的所述药物组合物。

41. 如权利要求40的方法,其中所述药物组合物包含权利要求28的所述重组AAV载体。

42. 如权利要求40的方法,其中所述药物组合物包含包封在脂质纳米颗粒内的权利要求19或权利要求20的所述mRNA。

43. 如权利要求36-42中任一项的方法,其中所述靶细胞是肝脏细胞。

44. 如权利要求43的方法,其中所述肝脏细胞是肝细胞。

45. 如权利要求36-44中任一项的方法,其中所述受试者是人类或非人类灵长动物。

46. 如权利要求36-45中任一项的方法,其中当与基线LDL受体水平相比时,肝细胞中LDL受体在细胞表面上的展示增加。

47. 如权利要求46的方法,其中当与肝脏细胞的基线LDL受体水平相比时,所述肝细胞的细胞表面上LDL受体的展示增加至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或高达100%。

48. 如权利要求36-47中任一项的方法,其中在PCSK9的表达减少后,所述受试者中总血清胆固醇水平降低。

49. 如权利要求48的方法,其中当与基线血清总胆固醇水平相比时,总血清胆固醇水平降低:

(a) 至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或高达100%;或者

(b) 5-15mg/dL、10-20mg/dL、10-30mg/dL、15-30mg/dL、20-30mg/dL、25-35mg/dL、25-40mg/dL、25-50mg/dL、40-60mg/dL、50-70mg/dL、60-80mg/dL或70-100mg/dL。

50. 如权利要求36-49中任一项的方法,其中在治疗后所述受试者中血清LDL胆固醇水平降低。

51. 如权利要求50的方法,其中当与基线血清LDL胆固醇水平相比时,血清LDL胆固醇水平降低:

(a) 至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或高达100%;或者

(b) 5-15mg/dL、10-20mg/dL、10-30mg/dL、15-30mg/dL、20-30mg/dL、25-35mg/dL、25-40mg/dL、25-50mg/dL、40-60mg/dL、50-70mg/dL或60-80mg/dL。

## 对PCSK9基因中的识别序列具有特异性的工程化大范围核酸酶

[0001] 本申请是申请日为2018年4月20日和发明名称为“对PCSK9基因中的识别序列具有特异性的工程化大范围核酸酶”的201880038349.0号中国发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及分子生物学和重组核酸技术领域。特别地,本发明涉及对PCSK9基因内的识别序列具有特异性的工程化大范围核酸酶。这种工程化大范围核酸酶可用于治疗心血管疾病和高胆固醇血症(包括常染色体显性家族性高胆固醇血症)的方法中。

[0003] 通过EFS-WEB作为文本文件提交的序列表的引用

[0004] 本申请包含序列表,其已经通过EFS-Web以ASCII格式提交,并且将其全部内容按引用并入本文中。2018年4月20日创建的所述ASCII拷贝命名为P109070022W000-SEQTXT-MJT,并且大小为89,660字节。

### 背景技术

[0005] 与高水平的低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)相关的心血管疾病是发达国家中的主要死亡原因,而LDL-C水平升高是冠状动脉疾病(CHD)和动脉粥样硬化斑块形成的主要危险因素。例如,家族性高胆固醇血症(FH)是特征在于高胆固醇水平,尤其是高LDL-C水平,以及发生早发性CHD的遗传障碍。杂合型FH患者通常用降血脂药(如他汀类药物)治疗,这些药物降低总胆固醇水平和特别是LDL-C水平。事实上,他汀类药物的使用已大大降低了某些患者人群中的心血管疾病的风险。但是,某些患者人群,特别是具有纯合形式FH的那些人群,无法响应于药物治疗(包括高剂量他汀类药物)而实现正常的LDL-C水平。

[0006] 降脂领域的重大进步是靶向原蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin9型(PCSK9)的疗法的开发。人PCSK9基因位于染色体1p32.3上,长度为25,378bps。它包含编码692个氨基酸的12个外显子。PCSK9蛋白包含信号肽、前结构域、催化结构域和C末端富含半胱氨酸-组氨酸的结构域,其由3个模块(M1、M2和M3)组成。

[0007] 尽管PCSK9在胃肠道、肾脏和中枢神经系统(CNS)中的表达水平较低,PCSK9的合成、分泌和表达主要在肝脏中发生。PCSK9前体蛋白的分子量为75kDa。在内质网(ER)中自动催化裂解后,PCSK9前结构域与62kDa的成熟PCSK9蛋白分离。分离的前结构域仍与成熟的PCSK9蛋白保持非共价结合,形成前片段(prosegment)-PCSK9复合物,其迫使PCSK9催化结构域变为非活性构象。然后切割的复合物从ER转运至高尔基器并释放。在肝脏细胞中,分泌的PCSK9与肝细胞膜上的LDL受体结合。这种结合通过PCSK9催化结构域和前结构域分别与LDL受体的表皮生长因子样重复同源结构域A(EGF-A)和 $\beta$ -推进器结构域(propeller domain)的相互作用介导。

[0008] LDL受体通常将细胞外液中的脂肪分子(包括胆固醇)转运到细胞中,从而降低循环LDL浓度。在不存在PCSK9的情况下,LDL受体-配体复合物发生构象变化,其允许LDL的细胞内传递以及LDL受体重循环回到细胞表面。但是,PCSK9与LDL受体的结合阻止了复合物的

这种构象变化,并将该受体引导至溶酶体进行降解。结果,较少的LDL受体存在于细胞表面上,这随之增加血流中的循环LDL胆固醇水平。除LDL受体外,PCSK9还显示介导相同家族中的其他脂质受体的降解,包括极低密度的脂蛋白(VLDL)受体、载脂蛋白E受体2和LDL受体相关蛋白1。

[0009] 连同编码LDL受体和载脂蛋白B的基因,PCSK9是与常染色体显性形式的FH相关的第三个基因。在常染色体显性FH中,PCSK9基因中的功能获得性突变进一步降低LDL受体在细胞表面的定位,并已与LDL胆固醇水平升高相关。有趣的是,已观察到在具有低LDL胆固醇水平和显著降低的心血管事件发生率的受试者中发现了PCSK9中的功能丧失性突变。此外,PCSK9功能丧失的患者显示出对他汀类治疗的反应升高。

[0010] 因此,靶向PCSK9是用于治疗心血管疾病和高胆固醇血症(包括常染色体显性FH)的有希望的治疗途径。该领域的研究主要集中在使用多种疗法抑制PCSK9与LDL受体的相互作用。这些阻断方法包括使用抗PCSK9的单克隆抗体,其包括阿利库单抗(alirocumab)(REGN727/SAR236553)、依伏库单抗(evolocumab)(AMG 145)和bococizumab(RN316)。然而,抗体方法经历了神经认知的不良反应以及对于抗体疗法典型的问题,包括超敏反应和免疫原性。还使用adnectins和模拟肽探索了阻断途径。迄今为止,使用PCSK9的小分子抑制剂(从治疗的观点来看是理想的)大多是不成功的。

[0011] 已经采用的其他途径包括抑制PCSK9表达。此类策略包括使用反义寡核苷酸或siRNA来下调基因表达。值得注意的是,还寻求基因编辑方法来永久地改变PCSK9基因和敲除蛋白质表达。例如,Ding等人使用腺病毒CRISPR/Cas9系统以靶向小鼠肝中的PCSK9,发现小鼠肝中PCSK9的诱变率在第3至第4天大于50%,PCSK9水平降低,肝LDL受体水平升高,以及血浆胆固醇水平降低35%-40%(Ding等,(2014),Circ Res 115(5):488-492)。在Wang等人的进一步研究中使用具有嵌合的、人源化肝脏的Fah<sup>-/-</sup>Rag2<sup>-/-</sup>Il2rg<sup>-/-</sup>(FRG KO)小鼠,使用靶向人PCSK9基因的CRISPR-Cas9进行的治疗诱导了PCSK9的高水平靶向诱变,导致血液中人PCSK9蛋白水平降低52%(Wang等,(2016),Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol 36:783-786)。然而,目前在本领域中明显缺乏证据以表明CRISPR/Cas系统可以成功地用于特异性地修饰和/或敲除灵长类动物肝脏(包括人类肝脏)中基因,这对于聚焦于PCSK9的人基因治疗是必需的。

[0012] I-CreI(SEQ ID NO:1)是归巢核酸内切酶的LAGLIDADG(SEQ ID NO:2)家族的成员,其识别和切割莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)的叶绿体染色体中的22碱基对的识别序列。遗传选择技术已被用于改变野生型I-CreI切割位点偏好(Sussman等(2004),J.Mol.Biol.342:31-41;Chames等(2005),Nucleic Acids Res.33:e178;Seligman等(2002),Nucleic Acids Res.30:3870-9,Arnould等(2006),J.Mol.Biol.355:443-58)。描述了合理设计单-LAGLIDADG(SEQ ID NO:2)归巢核酸内切酶的方法,其能够全面重新设计I-CreI和其他归巢核酸内切酶以靶向广泛多样的DNA位点,包括哺乳动物、酵母、植物、细菌和病毒基因组中的位点(WO 2007/047859)。

[0013] 如首先在WO2009/059195中描述的,I-CreI及其工程化衍生物通常是二聚的,但可以使用短肽接头融合成单个多肽,所述短肽接头将第一亚基的C-末端与第二亚基的N-末端接合(Li等(2009),Nucleic Acids Res.37:1650-62;Grizot等(2009),Nucleic Acids Res.37:5405-19)。因此,功能性“单链”大范围核酸酶可以从单一转录物表达。

[0014] 使用工程化大范围核酸酶可能是用于靶向PCSK9基因并降低PCSK9表达,从而降低胆固醇相关疾病患者的循环LDL和总胆固醇水平的有希望的途径。

## 发明内容

[0015] 本发明部分地依赖于位点特异性的、稀切(rare-cutting)核酸内切酶的开发,所述核酸内切酶被工程化以识别PCSK9基因内的DNA序列。本发明人已经在PCSK9基因中鉴定出可以降低PCSK9的表达和/或活性,并随后降低灵长类动物(例如,人类)中的总胆固醇和LDL胆固醇水平的特定识别序列。

[0016] 因此,本文公开的方法和组合物可用于治疗或减轻受试者中的胆固醇相关障碍例如高胆固醇血症(包括常染色体显性FH)的症状。因此,本发明满足了本领域中对灵长动物的与胆固醇相关障碍的进一步基因治疗途径的需求。

[0017] 本发明提供了可用于治疗受试者中与胆固醇相关障碍,例如高胆固醇血症(包括常染色体显性FH)的工程化大范围核酸酶。本发明的工程化大范围核酸酶识别和切割PCSK9基因(SEQ ID NO:3)内的识别序列。由于在切割位点处的非同源末端连接(NHEJ),本文公开的工程化大范围核酸酶在这种识别序列处的切割可破坏PCSK9的表达和/或活性。NHEJ可导致插入、缺失,或者导致可能干扰基因表达的移码突变。因此,通过中断正常基因表达,根据本文公开的方法可以降低或消除PCSK9表达和/或活性。本发明还提供了用于治疗胆固醇相关障碍的药物组合物和方法,其利用对位于PCSK9基因内的识别序列具有特异性的工程化大范围核酸酶。本发明进一步提供了用于向患有胆固醇相关障碍的受试者递送本文公开的工程化大范围核酸酶以降低总胆固醇和/或LDL胆固醇水平和/或减轻与胆固醇相关障碍有关的症状的方法。

[0018] 因此,在一个方面中,本发明提供了识别和切割PCSK9内的识别序列的工程化大范围核酸酶。所述工程化大范围核酸酶包含第一亚基和第二亚基,其中第一亚基结合识别序列的第一识别半位点并包含第一超变(HVR1)区,并且其中第二亚基结合识别序列的第二识别半位点并包含第二超变(HVR2)区。

[0019] 在一些实施方式中,识别序列可以包含SEQ ID NO:4(即,PCS 7-8识别序列)。在一些实施方式中,其中识别序列包含SEQ ID NO:4,HVR1区可以包含与对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基24-79的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些这样的实施方式中,HVR1区可以包含对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75和77的残基。在某些实施方式中,HVR1区可以进一步包含对应于SEQ ID NO:8的残基48、50、71和73的残基。在特别的实施方式中,HVR1区可以包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基24-79。

[0020] 在其中识别序列包含SEQ ID NO:4的一些这样的实施方式中,HVR2区可以包含与对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基215-270的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更高序列同一性的氨基酸序列。在一些这样的实施方式中,HVR2区可以包含对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基215、217、219、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266和268的残基。在这样的实施方式中,HVR2区可进一步包含对应于SEQ ID NO:12的残基258的残基。在特别的实施方式中,HVR2区可以包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基215-270。



[0021] 在其中识别序列包含SEQ ID NO:4的这样的实施方式中,第一亚基可以包含与SEQ ID NO:6-14中任一个的残基7-153具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更高序列同一性的氨基酸序列,并且第二亚基可以包含与SEQ ID NO:6-14中任一个的残基198-344具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更高序列同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,第一亚基在对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基80的位置处包含D、E、Q、N、K、R和S残基。在某些实施方式中,第二亚基在对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基271的位置处包含D、E、Q、N、K、R和S残基。在某些实施方式中,第一亚基包含对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基80的残基。在某些实施方式中,第二亚基包含对应于SEQ ID NO:6-14中任一个的残基271的残基。在一些实施方式中,第一亚基可包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基7-153。同样,在一些实施方式中,第二亚基可包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基198-344。

[0022] 在其中识别序列包含SEQ ID NO:4的某些这样的实施方式中,工程化大范围核酸酶可以包含接头,其中接头将第一亚基和第二亚基共价接合。在特定实施方式中,工程化大范围核酸酶可以包含SEQ ID NO:6-14中任一个的氨基酸序列。

[0023] 在另一个方面中,本发明提供了包含编码本文公开的任一个工程化大范围核酸酶的核酸序列的多核苷酸。在特别的实施方式中,多核苷酸可以是mRNA。

[0024] 在进一步的实施方式中,mRNA可以是编码一种或多种本文所述的工程化大范围核酸酶的多顺反子mRNA。在进一步的实施方式中,本发明的多顺反子mRNA可以编码一种或多种本文所述的工程化大范围核酸酶以及在患有胆固醇相关障碍的受试者中诱导治疗有益效果的一种或多种另外的蛋白质。

[0025] 在另一个方面中,本发明提供了包含编码本发明的任何工程化大范围核酸酶的核酸序列的重组DNA构建体。在一些实施方式中,重组DNA构建体包含含有启动子和编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸序列的盒。

[0026] 在其他实施方式中,重组DNA构建体包含含有启动子和多顺反子核酸序列的盒,其中该启动子驱动多顺反子核酸序列的表达以在靶细胞中产生本文所述的多顺反子mRNA。

[0027] 在特别的实施方式中,重组DNA构建体编码病毒载体,所述病毒载体包含编码本文公开的任何工程化大范围核酸酶的核酸序列。在这样的实施方式中,病毒载体可以是逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或腺相关病毒(AAV)载体。在特别的实施方式中,病毒载体可以是重组AAV载体。

[0028] 在一些实施方式中,病毒载体包含含有启动子和编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸序列的盒。在其他实施方式中,病毒载体包含两个或更多个盒,其中每个盒包含启动子和编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸序列。

[0029] 在其他实施方式中,病毒载体包含含有启动子和多顺反子核酸序列的一个盒,其中启动子驱动多顺反子核酸序列的表达以在靶细胞中产生本文所述的多顺反子mRNA。

[0030] 在另一个方面中,本发明提供了病毒载体,其包含编码本发明的任何工程化大范围核酸酶的核酸序列。在一些实施方式中,病毒载体可以是逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或腺相关病毒(AAV)载体。在特别的实施方式中,病毒载体可以是重组AAV载体。在一些实施方式中,病毒载体包含含有启动子和编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸序列的盒。

[0031] 在进一步的实施方式中,病毒载体包含含有启动子和多顺反子核酸序列的一个

盒,其中启动子驱动多顺反子核酸序列表达以在靶细胞中产生本文所述的多顺反子mRNA。

[0032] 在另一个方面中,本发明提供了一种药物组合物,其包含药学上可接受的载体及:(a) 编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸;或(b) 本文所述的工程化大范围核酸酶蛋白;其中工程化大范围核酸酶对PCSK9中的识别序列(例如SEQ ID NO:4)具有特异性。

[0033] 在一个实施方式中,编码本文公开的工程化大范围核酸酶的药物组合物的核酸序列可以是本文所述的mRNA。在一些这样的实施方式中,mRNA可以是本文所述的多顺反子mRNA,使得两种或更多种本文所述的工程化大范围核酸酶在体内靶细胞中表达。

[0034] 在另一个实施方式中,药物组合物包含本文所述的重组DNA构建体,所述构建体包含编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸序列。在一些这样的实施方式中,重组DNA构建体包含含有启动子和编码本发明的工程化大范围核酸酶的核酸序列的盒。

[0035] 在其他实施方式中,药物组合物的重组DNA构建体包含含有启动子和多顺反子核酸序列的盒,其中启动子驱动多顺反子核酸序列的表达以在体内靶细胞中产生本文所述的多顺反子mRNA,使得两种或更多种本文所述的工程化大范围核酸酶在靶细胞中表达。

[0036] 在另一个实施方式中,药物组合物包含病毒载体,所述病毒载体包含编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸序列。在一个这样的实施方式中,病毒载体可以是逆转录病毒、慢病毒、腺病毒或AAV。在特别的实施方式中,病毒载体可以是重组AAV载体。

[0037] 在一些这样的实施方式中,病毒载体包含含有启动子和编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸序列的盒。

[0038] 在其他这样的实施方式中,病毒载体包含含有启动子和多顺反子核酸序列的一个盒,其中启动子驱动多顺反子核酸序列的表达以在体内靶细胞中产生本文所述的多顺反子mRNA,使得两种或更多种本文所述的工程化大范围核酸酶在靶细胞中表达。

[0039] 在一个实施方式中,药物组合物可以包含本文公开的工程化大范围核酸酶,其识别和切割SEQ ID NO:4。在特别的实施方式中,工程化大范围核酸酶可以包含SEQ ID NO:6-14中任一个的氨基酸序列。

[0040] 在一些实施方式中,药物组合物可以包含包封在脂质纳米颗粒内的一个或多个本文所述的mRNA。在特别的实施方式中,药物组合物的脂质纳米颗粒可以包含两种或更多种本文所述的mRNA,其中各自编码本发明的工程化大范围核酸酶。在一些实施方式中,脂质纳米颗粒具有增强肝脏中(尤其是在肝细胞内)的递送和摄取的组成。

[0041] 在另一方面,本发明提供了用于降低受试者中PCSK9的表达或活性的治疗方法。同样地,本文提供了一种用于治疗胆固醇相关障碍例如高胆固醇血症(包括常染色体显性FH)或减轻与胆固醇相关障碍有关的症状的方法。该方法包括向受试者的靶细胞递送:(a) 有效量的编码工程化大范围核酸酶的核酸,其中工程化大范围核酸酶在靶细胞中表达;(b) 有效量的工程化大范围核酸酶蛋白;其中工程化大范围核酸酶对PCSK9中的识别序列(例如SEQ ID NO:4)具有特异性。

[0042] 在该方法的一些实施方式中,受试者患有胆固醇相关障碍。在具体的实施方式中,受试者患有高胆固醇血症。在一些实施方式中,受试者的高胆固醇血症是家族性高胆固醇血症或常染色体显性家族性高胆固醇血症。在特别的实施方式中,受试者是人类或非人类灵长动物。

[0043] 在该方法的特定实施方式中,向受试者施用本文公开的药物组合物。药物组合物

可以包含本文公开的重组AAV载体。在某些实施方式中,药物组合物可以包含本文公开的编码工程化大范围核酸酶的mRNA。在特别的实施方式中,mRNA可以被包封在脂质纳米颗粒内。

[0044] 在该方法的一些实施方式中,工程化大范围核酸酶或编码工程化大范围核酸酶的核酸可以被递送至靶肝脏细胞。该靶肝脏细胞可以是肝细胞,例如原代肝细胞。

[0045] 在该方法的一些实施方式中,当与基线LDL受体水平相比时,受试者中肝脏细胞的细胞表面上LDL受体的展示通过治疗增加。与基线LDL受体水平相比,LDL受体在细胞表面的展示可以增加约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、150%、250%、500%、1000%或更多。

[0046] 在该方法的某些实施方式中,通过治疗降低受试者中的总血清胆固醇水平。与基线总血清胆固醇水平相比,总血清胆固醇水平可降低:(a)至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或高达100%,或者(b)5-15mg/dL、10-20mg/dL、10-30mg/dL、15-30mg/dL、20-30mg/dL、25-35mg/dL、25-40mg/dL、25-50mg/dL、40-60mg/dL、50-70mg/dL、60-80mg/dL或70-100mg/dL。

[0047] 在某些实施方式中,通过治疗降低了受试者的血清LDL胆固醇水平。与基线血清LDL胆固醇水平比较时,血清LDL胆固醇水平可降低:(a)至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或高达100%,或者(b)5-15mg/dL、10-20mg/dL、10-30mg/dL、15-30mg/dL、20-30mg/dL、25-35mg/dL、25-40mg/dL、25-50mg/dL、40-60mg/dL、50-70mg/dL或60-80mg/dL。

[0048] 在所述方法的特定实施方式中,第一识别序列可包含SEQ ID NO:4。在一些这样的实施方式中,工程化大范围核酸酶可以是识别和切割SEQ ID NO:4的本发明的任何工程化大范围核酸酶。在特定实施方式中,工程化大范围核酸酶可包含SEQ ID NO:6-14中任一个的氨基酸序列。

[0049] 在另一方面,本发明提供了本文所述的工程化大范围核酸酶,其用作药物。本发明进一步提供了本文所述的工程化大范围核酸酶作为药物用于治疗胆固醇相关障碍,例如高胆固醇血症(包括常染色体显性FH),用于降低PCSK9的活性或表达,或者用于减轻与胆固醇相关障碍有关的症状的用途。在特别的实施方式中,本发明提供了本文所述的工程化大范围核酸酶作为用于降低受试者的总胆固醇水平和/或LDL胆固醇水平的药物的用途。

[0050] 在另一方面,本发明提供了用作药物的分离的多核苷酸,其中所述分离的多核苷酸包含编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸序列。本发明进一步提供了分离的多核苷酸作为药物用于治疗胆固醇相关障碍例如高胆固醇血症(包括常染色体显性FH),用于降低PCSK9的活性或表达,或者用于减轻与胆固醇相关障碍有关的症状的用途,其中分离的多核苷酸编码本文公开的工程化大范围核酸酶。在特别的实施方式中,本发明提供了编码本文所述的工程化大范围核酸酶的分离的多核苷酸作为用于降低受试者中总胆固醇水平和/或LDL胆固醇水平的药物的用途。

[0051] 在另一个方面中,本发明提供了用作药物的重组AAV载体,其中重组AAV载体包含分离的多核苷酸,并且其中分离的多核苷酸包含编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸序列。本发明还提供了重组AAV载体作为药物用于治疗胆固醇相关障碍(例如高胆固醇血症,包括常染色体显性FH),用于降低PCSK9的活性或表达,或者用于减轻与胆固醇相关障碍有关的症状的用途,其中重组AAV载体包含分离的多核苷酸,并且其中分离的多核苷酸包含

编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸序列。本发明进一步提供了重组AAV载体作为用于降低受试者的总胆固醇水平和/或LDL胆固醇水平的药物的用途,其中重组AAV载体包含分离的多核苷酸,并且其中分离的多核苷酸包含编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸序列。

[0052] 通过参考以下的详述和权利要求可以更全面地理解本发明之前的和其他的方面和实施方式。为了清楚起见在单独的实施方式的情况中描述的本发明的某些特征也可以在单一实施方式中组合地提供。本发明特别地包括实施方式的所有组合,并且其在本文中公开,如同每个组合被单独和明确公开一样。相反,为了简洁起见在单个实施方式的情况中描述的本发明的各种特征也可以单独地提供或以任何合适的子组合提供。实施方式中列出的特征的所有子组合也特别地包含在本发明中并且在本文中公开,如同每个这样的子组合在本文中单独和明确地公开。本文公开的本发明每个方面的实施方式在作出必要的改变的情况下适用于本发明的每个其他方面。

## 附图说明

[0053] 图1.人PCSK9基因中的工程化大范围核酸酶识别序列。本发明的工程化大范围核酸酶靶向的识别序列包含两个识别半位点。各个识别半位点包含9个碱基对,并且两个半位点由4个碱基对的中心序列隔开。PCS 7-8识别序列(SEQ ID NO:4)包含两个识别半位点,称为PCS7和PCS8。

[0054] 图2.本发明的工程化大范围核酸酶包含两个亚基,其中包含HVR1区的第一亚基结合第一识别半位点(例如,PCS7),而包含HVR2区的第二亚基结合第二识别半站点(例如PCS8)。在其中工程化大范围核酸酶是单链大范围核酸酶的实施方式中,可以将包含HVR1区的第一亚基定位为N-末端或C-末端亚基。同样,可以将包含HVR2区的第二亚基定位为N-末端或C-末端亚基。

[0055] 图3.用于评估靶向PCS 7-8识别序列的工程化大范围核酸酶的CHO(中国仓鼠卵巢)细胞中报告体分析的示意图。对于本文所述的工程化大范围核酸酶,产生其中报告基因盒稳定地整合至细胞基因组中的CHO细胞系。报告基因盒以5'至3'顺序包含:SV40早期启动子;GFP基因的5'2/3;本发明的工程化大范围核酸酶的识别序列(例如,PCS 7-8识别序列);CHO-23/24大范围核酸酶的识别序列(WO 2012/167192);和GFP基因的3'2/3。用该盒稳定转染的细胞在不存在DNA断裂诱导剂的情况下不表达GFP。大范围核酸酶通过转导编码每种大范围核酸酶的质粒DNA或mRNA引入。当在任一大范围核酸酶识别序列处诱导DNA断裂时,GFP基因的重复区域彼此重组以产生功能性GFP基因。然后可以通过流式细胞术测定表达GFP的细胞的百分比作为大范围核酸酶的基因组切割频率的间接测量。

[0056] 图4.在CHO细胞报告体分析中工程化大范围核酸酶识别和切割PCSK9基因中的识别序列的效率。SEQ ID NO:6-14中所示的工程化大范围核酸酶经工程化以靶向PCS 7-8识别序列(SEQ ID NO:4),并在CHO细胞报告体分析中进行效力筛选。显示的结果提供了在每个测定中观察到的表达GFP细胞的百分比,其表明每种大范围核酸酶切割靶识别序列或CHO-23/24识别序列的效力。每个测定中还包括阴性对照(bs)。图4A-4C显示了靶向PCS 7-8识别序列的大范围核酸酶。图4A显示了PCS 7-8x.88和PCS 7-8x.66。图4B显示了PCS 7-8L.197、PCS 7-8L.204、PCS 7-8L.209、PCS 7-8L.261、PCS 7-8L.262和PCS 7-8L.268。图4C

显示了PCS 7-8L.197和PCS 7-8L.367。

[0057] 图5.在CHO细胞报告体分析中工程化大范围核酸酶识别和切割人PCSK9基因中识别序列的效率。SEQ ID NO:6-14中所示的工程化大范围核酸酶经工程化以靶向PCS 7-8识别序列(SEQ ID NO:4),并在核转染后11天内的多个时间点CHO细胞报告体分析中进行效力筛选。显示的结果提供了在11天分析期间在每个测定中观察到的表达GFP细胞的百分比,其表明随时间变化的每种大范围核酸酶切割靶识别序列或CHO-23/24识别序列的效力。图5A显示了靶向PCS 7-8识别序列的PCS 7-8x.88和PCS 7-8x.66大范围核酸酶。图5B显示了靶向PCS 7-8识别序列的PCS 7-8x.88和PCS 7-8L.197大范围核酸酶。图5C显示了靶向PCS 7-8识别序列的PCS 7-8L.367大范围核酸酶。

[0058] 图6.T7核酸内切酶I(T7E)分析。进行T7E分析以确定PCS 7-8大范围核酸酶是否在HEK 293细胞中其识别位点处产生插入缺失(indel)。在T7E分析中,使用位于PCS 7-8识别序列侧翼的引物通过PCR扩增PCS 7-8基因座。如果在PCS 7-8基因座内存在插入缺失(随机插入或缺失),则所得的PCR产物由野生型等位基因和突变等位基因的混合物组成。使PCR产物变性并使其缓慢地再退火。缓慢的再退火允许形成由野生型和突变等位基因组成的异双链体,导致错配的碱基和/或凸起。T7E1酶在错配位点处切割,产生可通过凝胶电泳可视化的切割产物。在核转染后第2天和第5天评估PCS 7-8x.88和PCS 7-8x.66大范围核酸酶。

[0059] 图7.非人类灵长动物中的血清PCSK9蛋白水平。制备了称为AAV8.TBG.PI.PCS7-8x.88.WPRE.bGH的AAV载体,并以三种不同的剂量施用于三只雄性和1只雌性恒河猴。动物RA1866(雄性)接受单剂量 $3 \times 10^{13}$ 基因组拷贝(GC)/kg。动物RA1857(雄性)接受单剂量的 $6 \times 10^{12}$ GC/kg。动物RA1829(雌性)和RA2334(雄性)每只接受单剂量的 $2 \times 10^{12}$ GC/kg。在第-3天、第0天和施用后第168天(低剂量动物)或第280天(中和高剂量动物)的多个时间点采集血样以通过ELISA分析血清PCSK9蛋白水平。

[0060] 图8.在第-3天、第0天和施用编码PCS 7-8x.88大范围核酸酶的AAV后的多个时间点测量总胆固醇、LDL、HDL和甘油三酯的水平。图8A示出了在每个受试者中随时间测量的LDL水平。图8B显示受试者RA1866中的总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯水平。图8C显示受试者RA1857中的总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯水平。图8D显示受试者RA1829中的总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯水平。图8E显示受试者RA2334中的总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯水平。

[0061] 图9.第-3天、第0天和施用编码PCS 7-8x.88大范围核酸酶的AAV后的多个时间点,在每个受试者中测量丙氨酸转氨酶(ALT)的水平。

[0062] 图10.在体内肝脏细胞中在PCS 7-8识别序列处观察到的插入和缺失(indels)的频率。在施用AAV8.TBG.PI.PCS7-8x.88.WPRE.bGH载体后第17天进行肝脏活检,并检查PCS 7-8识别序列处是否存在插入缺失。通过使用侧接识别序列的PCR引物、基因组插入区域的扩增以及所得PCR产物的测序来检测插入缺失。

[0063] 图11.原位杂交以检测体内肝脏细胞中的PCS 7-8大范围核酸酶mRNA。通过原位杂交(ISH)检查在施用AAV8.TBG.PI.PCS7-8x.88.WPRE.bGH载体后第17天和第129天获得的肝脏活检样品。设计了荧光标记的寡核苷酸探针,并与来自各个受试者的活检肝脏细胞中的PCS 7-8x.88mRNA结合。图11A显示了来自另一受试者M11657的活检细胞的模拟处理,其作为无寡核苷酸探针的对照进行。图11B显示了来自受试者RA1866的活检样品。图11C示出了来自受试者RA1857的活检样品。图11D显示了来自受试者RA1829的活检样品。图11E示出了

来自受试者RA2334的活检样品。

[0064] 图12. 非人类灵长动物的血清PCSK9蛋白水平和血清LDL。制备了称为AAV8.TBG.PI.PCS7-8L.197.WPRE.bGH的AAV载体,并以 $6 \times 10^{12}$ 基因拷贝/kg的剂量施用于一只雄性和一只雌性恒河猴(受试者RA2125和RA2343)。在施用前和在施用后的多个时间采集血样用于通过ELISA分析血清PCSK9蛋白水平。

[0065] 图13.在施用编码PCS 7-8L.197大范围核酸酶的AAV前和施用后的多个时间点测定总胆固醇、LDL、HDL和甘油三酯的水平。图13A示出了在各个受试者中随时间测量的LDL水平。图13B显示受试者RA2125中的总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯水平。图13C显示受试者RA2343中的总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯水平。

[0066] 图14.在施用编码PCS 7-8L.197大范围核酸酶的AAV之前以及在施用后的多个时间点,在各个受试者中测量丙氨酸转氨酶(ALT)的水平。

[0067] 图15.原位杂交以检测体内肝脏细胞中的PCS 7-8大范围核酸酶mRNA。通过原位杂交(ISH)检查在施用AAV8.TBG.PI.PCS7-8L.197.WPRE.bGH载体后第18天和第128天获得的肝脏活检。设计了荧光标记的寡核苷酸探针,并与来自各个受试者的活检肝脏细胞中的PCS 7-8L.197mRNA结合。图15A显示了来自受试者RA2125的活检样品。图15B显示了来自受试者RA2343的活检样品。

[0068] 图16.通过锚定多重PCR(AMP-seq)对每个受试者中rhPCSK9靶向基因座的插入缺失分析。

#### [0069] 序列简述

[0070] SEQ ID NO:1列出了野生型I-CreI大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:2列出了LAGLIDADG的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:3列出了人PCSK9基因的核酸序列。

[0073] SEQ ID NO:4列出了PCS 7-8识别序列(有义)的核酸序列。

[0074] SEQ ID NO:5列出了PCS 7-8识别序列(反义)的核酸序列。

[0075] SEQ ID NO:6列出了PCS 7-8L.197大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0076] SEQ ID NO:7列出了PCS 7-8x.88大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0077] SEQ ID NO:8列出了PCS 7-8L.367大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0078] SEQ ID NO:9列出了PCS 7-8L.204大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0079] SEQ ID NO:10列出了PCS 7-8L.209大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0080] SEQ ID NO:11列出了PCS 7-8L.261大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO:12列出了PCS 7-8L.262大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0082] SEQ ID NO:13列出了PCS 7-8L.268大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0083] SEQ ID NO:14列出了PCS 7-8x.66大范围核酸酶的氨基酸序列。

[0084] SEQ ID NO:15列出了PCS 7-8L.197大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。

[0085] SEQ ID NO:16列出了PCS 7-8x.88大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。

[0086] SEQ ID NO:17列出了PCS 7-8L.367大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。

[0087] SEQ ID NO:18列出了PCS 7-8L.204大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。

[0088] SEQ ID NO:19列出了PCS 7-8L.209大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。

[0089] SEQ ID NO:20列出了PCS 7-8L.261大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。

- [0090] SEQ ID NO:21列出了PCS 7-8L.262大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。
- [0091] SEQ ID NO:22列出了PCS 7-8L.268大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。
- [0092] SEQ ID NO:23列出了PCS 7-8x.66大范围核酸酶PCS7-结合亚基的氨基酸序列。
- [0093] SEQ ID NO:24列出了PCS 7-8L.197大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0094] SEQ ID NO:25列出了PCS 7-8x.88大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0095] SEQ ID NO:26列出了PCS 7-8L.367大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0096] SEQ ID NO:27列出了PCS 7-8L.204大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0097] SEQ ID NO:28列出了PCS 7-8L.209大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0098] SEQ ID NO:29列出了PCS 7-8L.261大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0099] SEQ ID NO:30列出了PCS 7-8L.262大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0100] SEQ ID NO:31列出了PCS 7-8L.268大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0101] SEQ ID NO:32列出了PCS 7-8x.66大范围核酸酶PCS8-结合亚基的氨基酸序列。
- [0102] SEQ ID NO:33列出了用PCS 7-8x.88处理后在体内观察到的插入缺失的核酸序列。
- [0103] SEQ ID NO:34列出了用PCS 7-8x.88处理后在体内观察到的插入缺失的核酸序列。
- [0104] SEQ ID NO:35列出了用PCS 7-8x.88处理后在体内观察到的插入缺失的核酸序列。
- [0105] SEQ ID NO:36列出了用PCS 7-8x.88处理后在体内观察到的插入缺失的核酸序列。
- [0106] SEQ ID NO:37列出了用PCS 7-8x.88处理后在体内观察到的插入缺失的核酸序列。
- [0107] SEQ ID NO:38列出了用PCS 7-8x.88处理后在体内观察到的插入缺失的核酸序列。
- [0108] SEQ ID NO:39列出了用PCS 7-8x.88处理后在体内观察到的插入缺失的核酸序列。
- [0109] SEQ ID NO:40列出了用PCS 7-8x.88处理后在体内观察到的插入缺失的核酸序列。

## 具体实施方式

### [0110] 1.1引用和定义

[0111] 本文提及的专利和科学文献建立了本领域技术人员可利用的知识。本文引用的已授权的美国专利、允许的申請、公开的外國申請和参考文献,包括GenBank数据库序列,在此按引用并入,其程度如同每篇文献具体和单独地表示按引用并入。

[0112] 本发明可以以不同的形式实施,并且不应当被解释为限于本文所列的实施方式。相反,提供这些实施方式以使本公开彻底和完整,并且向本领域技术人员充分传达本发明的范围。例如,关于一个实施方式说明的特征可以结合到其他实施方式中,并且可以从该实施方式中删除关于特定实施方式说明的特征。另外,根据本公开内容,本领域技术人员将清楚本文提出的实施方式的许多变化和添加,其没有脱离本发明。

[0113] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。本文中本发明的描述中使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,而不是要限制本发明。

[0114] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文献以其整体按引用并入本文中。

[0115] 如本文中使用的,“一(a)”、“一个(an)”或“该(the)”可以表示一个或超过一个。例如,“一(a)”细胞可以表示单一细胞或多个细胞。

[0116] 如本文中使用的,除非另外特意指出,词语“或”以包含的含义“和/或”来使用,而不是排他性含义的“任一/或”。

[0117] 如本文中使用的,术语“核酸酶”和“核酸内切酶”可互换使用,来指切割多核苷酸链内的磷酸二酯键的天然产生的或工程化的酶。

[0118] 如本文中使用的,术语“大范围核酸酶”是指在大于12个碱基对的识别序列处结合双链DNA的核酸内切酶。优选地,本发明的大范围核酸酶的识别序列为22个碱基对。大范围核酸酶可以是源自I-CreI的核酸内切酶,并且可以是指已经关于例如DNA结合特异性、DNA切割活性、DNA结合亲和性或二聚化特性相对于天然I-CreI进行修饰的I-CreI的工程化变体。用于产生这样的I-CreI的修饰变体的方法是本领域已知的(例如,WO 2007/047859)。本文使用的大范围核酸酶结合作为异二聚体的双链DNA。大范围核酸酶还可以是“单链大范围核酸酶”,其中使用肽接头将一对DNA结合结构域连接成单个多肽。术语“归巢核酸内切酶”与术语“大范围核酸酶”同义。本发明的大范围核酸酶在细胞中表达时基本上是非毒性的,当使用本文所述的方法测量时,没有观察到对细胞存活力的有害作用或大范围核酸酶切割活性的显著降低。

[0119] 如本文使用的,术语“单链大范围核酸酶”是指包含通过接头连接的一对核酸酶亚基的多肽。单链大范围核酸酶具有以下组织:N-末端亚基-接头-C-末端亚基。两个大范围核酸酶亚基的氨基酸序列通常是不同的,并且将识别不同的DNA序列。因此,单链大范围核酸酶通常切割假-回文或非-回文识别序列。单链大范围核酸酶可以称为“单链异二聚体”或“单链异二聚大范围核酸酶”,尽管其实际上不是二聚的。为了清楚起见,除非另外指出,术语“大范围核酸酶”可以是指二聚或单链的大范围核酸酶。

[0120] 如本文使用的,术语“接头”是指用于将两个大范围核酸酶亚基连接成单个多肽的外源肽序列。接头可以具有在天然蛋白质中发现的序列,或可以是未在任何天然蛋白质中发现的人工序列。接头可以是柔性的并且缺乏二级结构或者可以具有在生理条件下形成特定三维结构的倾向。接头可以包括,但不限于,美国专利No.8,445,251和美国专利No.9,434,931中涵盖的那些。在一些实施方式中,接头可以具有包含SEQ ID NO:6-14中任一个的残基154-195的氨基酸序列。

[0121] 如本文使用的,关于蛋白质,术语“重组”或“工程化”表示由于将遗传工程技术应用于编码蛋白质的核酸和表达蛋白质的细胞或生物体而具有改变的氨基酸序列。关于核酸,术语“重组”或“工程化”表示由于应用遗传工程技术而具有改变的核酸序列。遗传工程技术包括但不限于PCR和DNA克隆技术;转染、转化和其他基因转移技术;同源重组;定点诱变;和基因融合。根据该定义,具有与天然存在的蛋白质相同的氨基酸序列但通过在异源宿主中克隆和表达来产生的蛋白质不被认为是重组的。



[0122] 如本文使用的,术语“野生型”是指相同类型基因的等位基因群体中最常见的天然存在的等位基因(即,多核苷酸序列),其中由野生型等位基因编码的多肽具有其原始功能。术语“野生型”也指由野生型等位基因编码的多肽。野生型等位基因(即,多核苷酸)和多肽与突变体或变体等位基因和多肽(其包含相对于野生型序列的一个或多个突变和/或置换)是可区分的。野生型等位基因或多肽可以在生物体中赋予正常表型,而在某些情况下,突变体或变体等位基因或多肽可赋予改变的表型。野生型核酸酶与重组或非天然产生的核酸酶是可区分的。术语“野生型”还可以指具有特定基因的野生型等位基因的细胞、生物体和/或受试者,或者用于比较目的的细胞、生物体和/或受试者。

[0123] 如本文使用的,术语“遗传修饰的”是指其中或在其祖先中基因组DNA序列已经通过重组技术有意地修饰的细胞或生物体。如本文使用的,术语“遗传修饰的”包括术语“转基因的”。

[0124] 如本文中关于重组蛋白使用的,术语“修饰”表示相对于参考序列(例如,野生型或天然序列),重组序列中的氨基酸残基的任何插入、缺失或置换。

[0125] 如本文使用的,术语“识别序列”或“识别位点”是指被核酸内切酶结合并切割的DNA序列。在大范围核酸酶的情况中,识别序列包含一对倒置的9个碱基对的“半位点”,它们由四个碱基对分隔开。在单链大范围核酸酶的情况下,蛋白质的N-末端结构域接触第一半位点,而蛋白质的C-末端结构域接触第二半位点。通过大范围核酸酶的切割产生四个碱基对的3'“突出端”。“突出端”或“粘性末端”是短的单链DNA区段,其可以通过双链DNA序列的核酸内切酶切割产生。在源自I-CreI的大范围核酸酶和单链大范围核酸酶的情况下,突出端包含22碱基对识别序列的碱基10-13。

[0126] 如本文使用的,术语“靶位点”或“靶序列”是指包含核酸酶的识别序列的细胞染色体DNA的区域。

[0127] 如本文使用的,术语“DNA结合亲和力”或“结合亲和力”表示大范围核酸酶与参考DNA分子(例如,识别序列或任意序列)非共价缔合的趋势。通过解离常数 $K_d$ 测量结合亲和力。如本文使用的,如果核酸酶对于参考识别序列的 $K_d$ 相对于参考核酸酶以统计学显著( $p < 0.05$ )的量增大或减小时,则核酸酶具有“改变的”结合亲和力。

[0128] 如本文使用的,术语“特异性”表示大范围核酸酶仅在被称为识别序列的特定碱基对序列处或仅在特定的一组识别序列处识别和切割双链DNA分子的能力。该组识别序列将共有某些保守的位置或序列基序,但可以在一个或多个位置处简并。高度特异性的大范围核酸酶能够仅切割一个或极少数识别序列。特异性可以通过本领域已知的任何方法确定。如本文使用的,如果大范围核酸酶在生理条件下结合并切割未被参考大范围核酸酶(例如,野生型)结合和切割的识别序列,或者如果识别序列的切割速率相对于参考大范围核酸酶提高或降低生物学显著的量(例如,至少 $2\times$ ,或 $2\times-10\times$ ),则其具有“改变的”特异性。

[0129] 如本文使用的,术语“同源重组”或“HR”是指其中使用同源DNA序列作为修复模板来修复双链DNA断裂的天然细胞过程(参见,例如,Cahill等,(2006),Front.Biosci.11:1958-1976)。同源DNA序列可以是内源染色体序列或递送至细胞的外源核酸。

[0130] 如本文使用的,术语“非同源末端连接”或“NHEJ”是指其中通过直接接合两个非同源DNA区段来修复双链DNA断裂的天然细胞过程(参见,例如,Cahill等,(2006),Front.Biosci.11:1958-1976)。通过非同源末端连接的DNA修复是易错的,并且经常导致在

修复位点处DNA序列的无模板添加或删除。在一些情况下,靶识别序列处的切割导致靶识别位点处的NHEJ。基因编码序列中核酸酶诱导的靶位点的切割和之后通过NHEJ的DNA修复可以将突变(如移码突变,其破坏基因功能)引入编码序列中。因此,工程化大范围核酸酶可以用于有效地敲除细胞群体中的基因。

[0131] 如本文所用,术语“减少”是指胆固醇相关疾病的症状或严重程度的任何减轻,或PCSK9的蛋白质表达或活性的任何减少。在任何情况下,这种减少可能高达5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或最高100%。因此,术语“减少”涵盖疾病状态、蛋白质表达、蛋白质活性或PCSK9与LDL受体的结合的部分减少和完全减少。

[0132] 如本文所用,术语“增加”指LDL受体在细胞表面上的展示的任何增加。这样的增加可能高达5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、150%、250%、500%、1000%或更高。可以使用任何方法来测量LDL受体的表面展示的增加。

[0133] 如本文所用,术语“高胆固醇血症”是指其中胆固醇水平升高至高于期望水平的病症。在某些实施方式中,LDL-胆固醇水平升高至高于期望水平。在某些实施方式中,血清LDL-胆固醇水平升高至高于期望水平。如本文所用,术语“家族性高胆固醇血症”或“FH”是指特征在于血浆中与低密度脂蛋白(LDL)相关的胆固醇水平升高的遗传病。与正常患者的LDL胆固醇水平(例如,<130mg/dL)相比,杂合和纯合FH患者的水平通常分别升至350-550mg/dL和>600mg/dL。患有FH的患者或受试者中LDL胆固醇水平升高导致胆固醇在组织内沉积,并在年轻时增加患心血管疾病的风险。

[0134] 如本文中关于氨基酸序列和核酸序列使用的,术语“百分同一性”、“序列同一性”、“百分相似性”、“序列相似性”等是指基于序列比对的两个序列的相似性程度的度量(所述比对使比对的氨基酸残基或核苷酸之间的相似性最大化),并且是序列比对中相同或相似残基或核苷酸的数量、总残基或核苷酸的数量以及缺口的存在和长度的函数。存在多种算法和计算机程序可以用于使用标准参数确定序列相似性。如本文使用的,使用针对氨基酸序列的BLASTp程序和针对核酸序列的BLASTn程序测量序列相似性,两者均可通过National Center for Biotechnology Information([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/))获得,并且描述于,例如Altschul等,(1990),*J.Mol.Biol.*215:403-410;Gish和States(1993),*Nature Genet.*3:266-272;Madden等(1996),*Meth.Enzymol.*266:131-141;Altschul等,(1997),*Nucleic Acids Res.*25:33 89-3402;Zhang等(2000),*J.Comput.Biol.*7(1-2):203-14中。如本文使用的,两个氨基酸序列的百分相似性是基于BLASTp算法的以下参数的评分:字长=3;缺口开放罚分=-11;缺口延伸罚分=-1;和评分矩阵=BLOSUM62。如本文使用的,两个核酸序列的百分相似性是基于BLASTn算法的以下参数的评分:字长=11;缺口开放罚分=-5;缺口延伸罚分=-2;匹配奖励=1;和不匹配罚分=-3。

[0135] 如本文中关于两个蛋白质或氨基酸序列的修饰使用的,术语“对应于”用于表示第一蛋白质中的指定修饰是与第二蛋白质中的修饰相同的氨基酸残基的置换,并且当两种蛋白质进行标准序列比对(例如,使用BLASTp程序)时,第一蛋白质中修饰的氨基酸的位置对应于第二蛋白质中修饰的氨基酸位置或与之对齐。因此,如果残基X和Y在序列比对中相互对应,则第一蛋白质中的残基“X”至氨基酸“A”的修饰对应于第二蛋白质中残基“Y”至氨基酸“A”的修饰,尽管事实上X和Y可能是不同的编号。

[0136] 如本文使用的,术语“识别半位点”、“识别序列半位点”或简称“半位点”表示双链

DNA分子中的核酸序列,其被同二聚或异二聚的大范围核酸酶的单体识别,或者被单链大范围核酸酶的一个亚基识别。

[0137] 如本文使用的,术语“超变区”是指大范围核酸酶单体或亚基内的局部序列,其包含具有相对高的变异性的氨基酸。超变区可以包含约50-60个连续残基,约53-57个连续残基,或优选约56个残基。在一些实施方式中,超变区的残基可以对应于SEQ ID NO:6-14任一个的位置24-79或位置215-270。超变区可以包含一个或多个接触识别序列中的DNA碱基的残基,并且可以进行修饰以改变单体或亚基的碱基偏好。超变区还可以包含一个或多个在大范围核酸酶与双链DNA识别序列结合时与DNA骨架结合的残基。可以修饰这些残基以改变大范围核酸酶对DNA骨架和靶识别序列的结合亲和力。在本发明的不同实施方式中,超变区可以包含1-20个残基,其表现出变异性并且可以被修饰以影响碱基偏好和/或DNA结合亲和力。在一些实施方式中,超变区内的可变残基对应于SEQ ID NO:6-14任一个的位置24、26、28、30、32、33、38、40、42、44、46、68、70、75和77中的一个或多个。在某些实施方式中,超变区内的可变残基也对应于SEQ ID NO:8的位置48、50、71和73中的一个或多个。在其他实施方式中,超变区内的可变残基对应于SEQ ID NO:6-14任一个的位置215、217、219、221、223、224、229、231、233、235、237、259、261、266和268中的一个或多个。在进一步的实施方式中,超变区内的可变残基也可以对应于SEQ ID NO:12的残基258。

[0138] 术语“重组DNA构建体”、“重组构建体”、“表达盒”、“表达构建体”、“嵌合构建体”、“构建体”和“重组DNA片段”在本文中可互换使用,并且是核酸片段。重组构建体包含核酸片段的人工组合,包括,但不限于,在自然界中不一起发现的调控和编码序列。例如,重组DNA构建体可以包含源自不同来源的调控序列和编码序列,或源自相同来源且以不同于天然存在的方式排列的调控序列和编码序列。这样的构建体可以本身单独使用,或可以与载体结合使用。

[0139] 如本文使用的,“载体”或“重组DNA载体”可以是包括复制系统和能够在给定的宿主细胞中转录和翻译多肽编码序列的序列的构建体。如果使用载体,那么载体的选择取决于将用于转化宿主细胞的方法,如本领域技术人员公知的。载体可以包括,但不限于,质粒载体和重组AAV载体,或本领域已知的适用于将编码本发明的大范围核酸酶的基因递送至靶细胞的任何其他载体。本领域技术人员很清楚必须存在于载体上以成功地转化、选择和增殖包含本发明的任何分离的核苷酸或核酸序列的宿主细胞的遗传元件。

[0140] 如本文使用的,“载体”还可以指病毒载体。病毒载体可以包括,但不限于,逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒载体(AAV)。

[0141] 如本文使用的,“多顺反子”mRNA是指包含两个或更多个编码序列(即,顺反子)并编码超过一种蛋白质的单个信使RNA。多顺反子mRNA可以包含本领域已知的允许从同一mRNA分子翻译两个或多个基因的任何元件,包括,但不限于,IRES元件、T2A元件、P2A元件、E2A元件和F2A元件。

[0142] 如本文使用的,“对照”或“对照细胞”是指提供用于测量遗传修饰细胞的基因型或表型变化的基准点的细胞。对照细胞可以包括,例如:(a)野生型细胞,即,与用于产生遗传修饰细胞的遗传改变的起始材料具有相同基因型的细胞;(b)与遗传修饰细胞具有相同基因型但已经用无效构建体(即,对目标性状不具有已知影响的构建体)转化的细胞;或(c)与遗传修饰细胞遗传上相同但不暴露于诱导改变的基因型或表型的表达的条件或刺激或者

进一步遗传修饰的细胞。

[0143] 如本文中关于两个蛋白质或氨基酸序列的修饰使用的,术语“对应于”用于表示当两个蛋白质进行标准序列比对(例如,使用BLASTp程序)时,第一蛋白质中的指定修饰是与第二蛋白质中的修饰的相同氨基酸残基的置换,并且第一蛋白质中的修饰的氨基酸位置对应于第二蛋白质中的修饰的氨基酸位置或与其对齐。因此,如果残基X和Y在序列比对中彼此对应,则第一蛋白质中的残基“X”至氨基酸“A”的修饰对应于第二蛋白质中残基“Y”至氨基酸“A”的修饰,尽管事实上X和Y可能是不同的编号。

[0144] 如本文所用,术语“治疗”或“治疗受试者”是指将本发明的工程化大范围核酸酶或编码本发明的工程化大范围核酸酶的核酸施用于患有特征在于血液中循环的脂肪和/或胆固醇水平升高的疾病(例如胆固醇相关障碍)的受试者。例如,受试者可能患有心血管疾病、高胆固醇血症(包括常染色体显性FH)、高甘油三酯血症和其他胆固醇相关障碍。理想的治疗效果包含但不限于,预防疾病的发生或复发、减轻症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、降低疾病的发展速度、改善或减轻疾病状态及缓解或改善预后。因此,治疗疾病和/或障碍是指改变(例如减慢)疾病和/或病症的进程、降低总胆固醇和/或低密度脂蛋白(LDL)胆固醇水平、改善Crigler-Najjar综合征、恢复肝杀菌肽(hepcidin)和/或2型血色素沉着病功能以调节铁的摄入、恢复胆汁酸代谢、降低家族性高胆固醇血症的冠心病风险以及防止过度角化斑块和角膜混浊,这可以治愈手和/或脚上的过度角化斑块。在一些方面,本发明的工程化大范围核酸酶或编码其的核酸在治疗期间以本发明的药物组合物的形式施用。

[0145] 如本文所用,“胆固醇相关障碍”包括以下任何一种或多种:高胆固醇血症、心脏病、代谢综合征、糖尿病、冠心病、中风、心血管疾病、阿尔茨海默氏病和通常的血脂异常,其可以表现为,例如,血清总胆固醇升高、LDL升高、甘油三酯升高、VLDL升高和/或低HDL。可以单独使用或与一种或多种其他药剂组合使用本文公开的工程化大范围核酸酶治疗的原发性和继发性血脂异常的一些非限制性实例包括代谢综合征、糖尿病、家族性合并高脂血症、家族性高甘油三酯血症、家族性高胆固醇血症,包括杂合性高胆固醇血症、纯合性高胆固醇血症、家族性缺陷载脂蛋白B-100;多基因高胆固醇血症;残粒移去病(remnant removal disease)、肝脂肪酶缺乏症;继发于以下任何原因的血脂异常:饮食失调(dietary indiscretion)、甲状腺功能低下、包含雌激素和孕激素疗法的药物、 $\beta$ -阻滞剂和噻嗪类利尿剂;肾病综合征、慢性肾衰竭、库欣综合征、原发性胆汁性肝硬化、糖原贮积病、肝细胞瘤、胆汁淤积、肢端肥大症、胰岛素瘤、孤立的生长激素缺乏症和酒精引起的高甘油三酯血症。本文公开的工程化大范围核酸酶也可用于预防或治疗动脉粥样硬化性疾病,例如,冠状动脉心脏病、冠状动脉疾病、外周动脉疾病、中风(缺血性和出血性)、心绞痛或脑血管病和急性冠状动脉综合征、心肌梗塞。

[0146] 术语“前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶kexin 9型”或“PCSK9”是指由PCSK9基因编码的多肽,例如SEQ ID NO:3所示的人PCSK9基因(及其编码活性PCSK9多肽的变体)或其片段以及相关多肽,其包括但不限于等位基因变体、剪接变体、衍生变体、置换变体、缺失变体和/或插入变体,包括添加N-端甲硫氨酸、融合多肽和种间同源物。在某些实施方式中,PCSK9多肽包含末端残基,例如但不限于前导序列残基、靶向残基、氨基末端甲硫氨酸残基、赖氨酸残基、标签残基和/或融合蛋白残基。“PCSK9”也被称为FH3、NARC1、HCHOLA3、前蛋白转化酶枯草杆菌蛋白酶/kexin 9型和神经细胞凋亡调节转化酶1。PCSK9基因编码属于分泌

性枯草杆菌酶家族的蛋白酶K亚家族的前蛋白转化酶蛋白。术语“PCSK9”表示前蛋白和前蛋白自催化后产生的产物两者。当仅提及自催化的产物时,该蛋白可以称为“成熟的”、“切割的”、“加工的”或“活性的”PCSK9。当仅提及无活性形式时,该蛋白可以称为PCSK9的“无活性”、“前-形式”或“未加工”形式。本文使用的术语PCSK9还包括天然存在的等位基因,例如突变D374Y、S127R和F216L。术语PCSK9还涵盖包括PCSK9氨基酸序列的翻译后修饰的PCSK9分子,例如糖基化、PEG化的PCSK9序列,其信号序列被切割的PCSK9序列,其前结构域从其催化结构域切割但未与催化结构域分离的PCSK9序列。

[0147] 术语“PCSK9活性”包括PCSK9的任何生物学作用。在某些实施方式中,PCSK9活性包括PCSK9与底物或受体相互作用或结合的能力。在一些实施方式中,PCSK9活性由PCSK9结合LDL受体(LDLR)的能力表示。在一些实施方式中,PCSK9结合并催化涉及LDLR的反应。例如,PCSK9活性包括PCSK9改变(例如,降低)LDLR的可用性的能力。因此,在一些实施方式中,PCSK9活性包括PCSK9增加受试者中的LDL量的能力。在特别的实施方式中,PCSK9活性包括PCSK9减少可用于结合LDL的LDLR量的能力。因此,通过降低PCSK9活性,增加了在表面上展示并且能够在受试者中找到LDL的LDLR的量。在一些实施方式中,“PCSK9活性”包括由PCSK9信号传导导致的任何生物学活性。示例性活性包括但不限于PCSK9与LDLR的结合、切割LDLR或其他蛋白质的PCSK9酶活性、PCSK9与促进PCSK9作用的LDLR以外的蛋白质的结合、PCSK9改变APOB分泌(Sun等(2005), *Human Molecular Genetics* 14:1161-1169, 和Ouguerram等(2004), *Arterioscler thromb Vasc Biol.* 24:1448-1453)、PCSK9在肝再生和神经元细胞分化中的作用(Seidah等, *PNAS* 100:928-933, 2003)以及PCSK9在肝葡萄糖代谢中的作用(Costet等(2006), *J. Biol. Chem.* 281(10):6211-18)。

[0148] 术语“有效量”或“治疗有效量”是指足以实现有益或期望的生物学和/或临床结果的量。治疗有效量将根据大范围核酸酶制剂或组合物、疾病及其严重程度和待治疗受试者的年龄、体重、身体状况和反应性而变化。在具体的实施方式中,有效量的本文公开的工程化大范围核酸酶或药物组合物通过降低受试者体内的总胆固醇或LDL胆固醇(即血清LDL)的水平而治疗或预防高胆固醇血症或其他胆固醇相关障碍和/或血脂异常、动脉粥样硬化、心血管疾病(CVD)或冠心病的至少一种症状。

[0149] 术语“脂质纳米颗粒”是指具有通常具有球形结构的脂质组合物,其平均直径为10至1000纳米。在一些制剂中,脂质纳米颗粒可以包含至少一种阳离子脂质、至少一种非阳离子脂质和至少一种共轭脂质(conjugated lipid)。本领域已知的适用于包封核酸(如mRNA)的脂质纳米颗粒设想用于本发明中。

[0150] 如本文使用的,对变量的数值范围的叙述旨在传达本发明可以用等于该范围内的任何值的变量来实施。因此,对于固有离散的变量,变量可以等于数值范围内的任何整数值,包括范围的端点。类似地,对于固有连续的变量,变量可以等于数值范围内的任何实数值,包括范围的端点。作为示例,如果变量是固有离散的,则描述为具有0到2之间的值的变量可以取值0、1或2,并且如果变量固有是连续的,可以取值0.0、0.1、0.01、0.001或任何其他 $\geq 0$ 且 $\leq 2$ 的实数值,但不限于此。

[0151] 2.1发明原理

[0152] 本发明部分地基于以下假设:工程化大范围核酸酶可用于减少PCSK9的表达,和由此增加从血液中去脂和/或胆固醇。减少PCSK9的表达可以增加LDL受体在细胞表面的

展示,且由此增加从血流中脂质清除。因此,通过递送对PCSK9基因中的识别序列特异性的工程化大范围核酸酶,可以减少PCSK9的表达,其随后降低受试者血液中的总胆固醇(例如血清LDL)。因此,本文公开的方法和组合物特别地用于治疗由与适当对照中的PCSK9表达水平相比的PCSK9表达增加引起的胆固醇相关障碍。

[0153] 因此,本发明涵盖识别和切割PCSK9基因内的识别序列的工程化大范围核酸酶。本发明还包括在药物组合物中以及在治疗胆固醇相关障碍例如高胆固醇血症的方法中使用这种工程化大范围核酸酶的方法。此外,本发明涵盖包含工程化大范围核酸酶蛋白或编码工程化大范围核酸酶的核酸的药物组合物,以及此类组合物在治疗胆固醇相关障碍如高胆固醇血症中的用途。

[0154] 2.2用于识别和切割PCSK9基因内的识别序列的大范围核酸酶

[0155] 位点特异性核酸酶可用于在PCSK9基因中引入断裂,并且这种断裂的修复可通过NHEJ导致基因的永久修饰,从而不再表达活性PCSK9基因。因此,在一个实施方式中,本发明可以使用工程化重组大范围核酸酶来实施。

[0156] 在优选实施方式中,用于实施本发明的核酸酶是单链大范围核酸酶。单链大范围核酸酶包含通过接头肽连接的N-末端亚基和C-末端亚基。两个结构域中的每一个识别一半的识别序列(即,识别半位点),并且DNA切割位点在接近两个亚基的界面的识别序列的中间。DNA链断裂偏离四个碱基对,使得通过大范围核酸酶的DNA切割产生一对四碱基对的、3'单链突出端。

[0157] 在一些实例中,对本发明的工程化大范围核酸酶进行工程化以识别和切割PCS 7-8识别序列(SEQ ID NO:4)。PCS 7-8识别序列位于SEQ ID NO:3所示的PCSK9基因内。此类工程化大范围核酸酶在本文中统称为“PCS 7-8大范围核酸酶”。SEQ ID NO:6-14中提供了示例性的PCS 7-8大范围核酸酶。

[0158] 本发明的工程化大范围核酸酶包含第一亚基和第二亚基,第一亚基包含第一超变(HVR1)区,而第二亚基包含第二超变(HVR2)区。此外,第一亚基结合识别序列中的第一识别半位点(例如,PCS7半位点)和第二亚基结合识别序列中的第二识别半位点(例如,PCS7半位点)。在其中工程化大范围核酸酶是单链大范围核酸酶的实施方式中,第一和第二亚基可以定向以使得包含HVR1区并结合第一半位点的第一亚基定位为N-末端亚基,而包含HVR2区并结合第二半位点的第二亚基定位为C-末端亚基。在可替代的实施方式中,第一和第二亚基可以定向以使得包含HVR1区并结合第一半位点的第一亚基定位为C-末端亚基,而包含HVR2区并结合第二半位点的第二亚基定位为N-末端亚基。表1提供了本发明的示例性PCS 7-8大范围核酸酶。

[0159] 表1.经工程化以识别和切割PCS 7-8识别序列(SEQ ID NO:4)的示例性工程化大范围核酸酶

	大范围核酸酶	AA SEQ ID	PCS7 亚 基残基	PCS7 亚基 SEQ ID	*PCS7 亚基%	PCS8 亚 基残基	PCS8 亚基 SEQ ID	*PCS8 亚基%
[0160]	PCS 7-8L.197	6	7-153	15	100	198-344	24	100
	PCS 7-8x.88	7	7-153	16	98.64	198-344	25	99.32
	PCS 7-8L.367	8	7-153	17	95.92	198-344	26	100
	PCS	9	7-153	18	98.64	198-344	27	99.32
[0161]	7-8L.204							
	PCS 7-8L.209	10	7-153	19	99.32	198-344	28	100
	PCS 7-8L.261	11	7-153	20	98.64	198-344	29	98.64
	PCS 7-8L.262	12	7-153	21	98.64	198-344	30	98.64
	PCS 7-8L.268	13	7-153	22	99.32	198-344	31	100
	PCS 7-8x.66	14	7-153	23	93.2	198-344	32	99.32

[0162] \*“PCS7亚基%”和“PCS8亚基%”表示每个大范围核酸酶的PCS7-结合和PCS8-结合亚基区分别与PCS 7-8L.197大范围核酸酶的PCS7-结合和PCS8-结合亚基区之间的氨基酸序列同一性。

[0163] 2.3递送和表达核酸内切酶的方法

[0164] 本文公开了用于治疗受试者中的高胆固醇血症和心血管疾病的方法。同样地,提供了用于减少受试者中高胆固醇血症和心血管疾病的症状的方法,包括施用包含药物学上可接受的载体和本文公开的工程化大范围核酸酶(或编码工程化大范围核酸酶的核酸)的药物组合物。还提供了用于降低受试者中PCSK9的表达和/或活性的方法,其包括将本文公开的工程化大范围核酸酶递送至受试者中的靶细胞。在本发明的方法中,可以将本文公开的工程化大范围核酸酶递送至靶细胞和/或从靶细胞中的DNA/RNA表达。

[0165] 本文公开的工程化大范围核酸酶可以以蛋白质的形式或优选作为编码工程化大范围核酸酶的核酸递送到细胞中。这种核酸可以是DNA(例如,环状或线性化的质粒DNA或PCR产物)或RNA(例如,mRNA)。对于其中工程化大范围核酸酶编码序列以DNA形式递送的实施方式,其应与启动子可操作地连接以促进核酸酶基因的转录。适用于本发明的哺乳动物启动子包括组成型启动子,如巨细胞病毒早期(CMV)启动子(Thomsen等人(1984),Proc Natl Acad Sci USA.81(3):659-63)或SV40早期启动子(Benoist和Chambon(1981),Nature.290(5804):304-10),以及诱导型启动子,如四环素诱导启动子(Dingermann等(1992),Mol Cell Biol.12(9):4038-45)。本发明的工程化大范围核酸酶也可以与合成启动子可操作地连接。合成启动子可以包括,但不限于,JeT启动子(WO 2002/012514)。在具体的实施方式中,编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸序列可以与肝特异性启动子或肝细胞特异性启动子可操作地连接。肝特异性启动子的实例包括但不限于人 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶启动子、杂合肝特异性启动子(来自ApoE基因的肝基因座控制区(ApoE-HCR)和肝特异性 $\alpha$

1-抗胰蛋白酶启动子)、人甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子和载脂蛋白A-II启动子。

[0166] 在具体的实施方式中,编码至少一种工程化大范围核酸酶的核酸序列在重组DNA构建体或表达盒上递送。例如,重组DNA构建体可以包含表达盒(即,“盒”),其包含启动子和编码本文所述工程化大范围核酸酶的核酸序列。在其他实施方式中,重组DNA构建体包含两个或更多个盒,其中每个盒包含启动子和编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸序列。在特定实施方式中,重组DNA构建体可以包含两个盒、三个盒、四个盒或更多个盒。

[0167] 在其他实施方式中,重组DNA构建体包含含有启动子和多顺反子核酸序列的盒,其中启动子驱动多顺反子核酸序列的表达以在靶细胞中产生本文所述的多顺反子mRNA。

[0168] 在一些实施方式中,编码工程化大范围核酸酶的mRNA递送至细胞,因为这降低了编码工程化大范围核酸酶的基因整合至细胞基因组中的可能性。可以使用本领域已知的方法,如体外转录,来产生这样的编码工程化大范围核酸酶的mRNA。在一些实施方式中,mRNA使用7-甲基-鸟苷、ARCA、CleanCap加帽,或使用牛痘封闭酶或类似物酶促加帽。在一些实施方式中,mRNA可以聚腺苷酸化。mRNA可包含各种5'和3'非翻译序列元件以增强编码的工程化大范围核酸酶的表达和/或mRNA本身的稳定性。mRNA可以包含核苷类似物,例如假尿苷、5-甲基胞苷、N6-甲基腺苷、5-甲基尿苷或2-硫尿苷。

[0169] 在特别的实施方式中,编码本发明的工程化核酸酶的mRNA可以是编码在细胞中同时表达的两种或更多种核酸酶的多顺反子mRNA。在一些实施方式中,多顺反子mRNA可以编码两种或更多种本文所述的大范围核酸酶和至少一个另外的蛋白质(其在细胞中诱导治疗有益效果)。本发明的多顺反子mRNA可以包含本领域已知允许从同一mRNA分子翻译两个或更多个基因的任何元件,包括,但不限于,IRES元件、T2A元件、P2A元件、E2A元件和F2A元件。在特别的实施方式中,多顺反子mRNA是编码本文所述的两种大范围核酸酶的双顺反子mRNA、编码本文所述的三种大范围核酸酶的三顺反子mRNA。

[0170] 在另一个特别的实施方式中,可以将编码本发明的核酸内切酶的核酸作为单链DNA模板递送至靶细胞中。单链DNA可以在编码工程化大范围核酸酶的序列的上游和/或下游进一步包含5'和/或3' AAV反向末端重复序列(ITR)。在其他实施方式中,单链DNA可以在编码工程化大范围核酸酶的序列的上游和/或下游进一步包含5'和/或3'同源臂。

[0171] 在另一个特别的实施方式中,可以将编码本发明的核酸内切酶的基因作为线性化DNA模板递送至靶细胞中。在一些实例中,可以通过一种或多种限制酶消化编码核酸内切酶的质粒DNA以使得环状质粒DNA在递送至靶细胞之前线性化。

[0172] 可以通过本领域已知的各种不同机制,包括下文中进一步详述的那些,将纯化的核酸酶蛋白递送至细胞以切割基因组DNA。

[0173] 用于递送本发明的工程化大范围核酸酶的靶组织包括,但不限于,肝脏的细胞,如肝细胞或优选原代肝细胞,更优选人肝细胞或人原代肝细胞、HepG2.2.15或HepG2-hNTCP细胞。在特别的实施方式中,细胞是灵长动物肝细胞的细胞,例如灵长动物原代肝细胞。如所讨论的,本发明的大范围核酸酶可以作为纯化的蛋白质或作为编码大范围核酸酶的RNA或DNA来递送。在一个实施方式中,通过直接注射到靶组织将大范围核酸酶蛋白或mRNA或编码核酸内切酶的DNA载体提供给靶细胞(例如,肝脏中的细胞)。或者,大范围核酸酶蛋白、mRNA或DNA可以通过循环系统全身递送。

[0174] 在一些实施方式中,根据已知技术,将核酸内切酶蛋白或编码大范围核酸酶的



DNA/mRNA在药物学上可接受的载体中配制用于全身施用或施用于靶组织。参见,例如, Remington, The Science And Practice of Pharmacy (第21版, 2005)。在根据本发明的药物制剂的制备中, 蛋白质/RNA/mRNA通常与药物学上可接受的载体混合。当然, 在与制剂中的任何其他成分相容的意义上, 载体必须是可接受的, 并且必须不对患者有害。载体可以是固体或液体或两者, 并且可以与化合物一起配制成单位剂量制剂。

[0175] 在一些实施方式中, 大范围核酸酶蛋白或编码大范围核酸酶的DNA/mRNA与细胞穿透肽或靶向配体偶联以促进细胞摄取。本领域已知的细胞穿透肽的实例包括聚精氨酸 (Jearawiriyapaisarn等 (2008), Mol Ther. 16:1624-9)、来自HIV病毒的TAT肽 (Hudecz等 (2005), Med. Res. Rev. 25:679-736)、MPG (Simeoni等 (2003), Nucleic Acids Res. 31:2717-2724)、Pep-1 (Deshayes等 (2004), Biochemistry 43:7698-7706) 和HSV-1VP-22 (Deshayes等 (2005), Cell Mol Life Sci. 62:1839-49)。在可替代的实施方式中, 大范围核酸酶蛋白或编码大范围核酸酶的DNA/mRNA与识别靶细胞上表达的特定细胞表面受体的抗体共价或非共价偶联, 使得大范围核酸酶蛋白/DNA/mRNA与靶细胞结合并内化。或者, 大范围核酸酶蛋白/DNA/mRNA可以与这种细胞表面受体的天然配体 (或天然配体的一部分) 共价或非共价偶联 (McCall等 (2014), Tissue Barriers 2 (4):e944449; Dinda等, (2013), Curr Pharm Biotechnol. 14:1264-74; Kang等, (2014), Curr Pharm Biotechnol. 15 (3):220-30; Qian等, (2014), Expert Opin Drug Metab Toxicol. 10 (11):1491-508)。

[0176] 在一些实施方式中, 大范围核酸酶蛋白或编码大范围核酸酶的DNA/mRNA被包封在可生物降解的水凝胶内用于注射或植入到肝脏的所需区域内。水凝胶可以将治疗有效负载持续且可调节地释放到期望的靶组织区域而不需要频繁的注射, 并且可以设计刺激响应材料 (例如, 温度和pH反应性水凝胶) 以响应于环境或外部施加的提示而释放有效负载 (Kang Derwent等人 (2008), Trans Am Ophthalmol Soc. 106:206-214)。

[0177] 在一些实施方式中, 使用本领域已知的方法将大范围核酸酶蛋白或编码大范围核酸酶的DNA/mRNA与纳米颗粒共价或优选非共价偶联或包封在此类纳米颗粒内 (Sharma等 (2014), Biomed Res Int. 2014:327950)。纳米颗粒是纳米级递送系统, 其长度尺度 $<1\mu\text{m}$ , 优选 $<100\text{nm}$ 。可以使用由金属、脂质、聚合物或生物大分子组成的核心来设计这样的纳米颗粒, 并且多个拷贝的大范围核酸酶蛋白、mRNA或DNA可以附接于纳米颗粒核心或用纳米颗粒核心包封。这增加了递送至每个细胞的蛋白质/mRNA/DNA的拷贝数, 且因此增加了每种大范围核酸酶的细胞内表达而最大化靶识别序列被切割的可能性。可以用聚合物或脂质 (例如, 壳聚糖、阳离子聚合物或阳离子脂质) 进一步修饰这类纳米颗粒的表面以形成核-壳纳米颗粒, 其表面赋予额外的功能性以增强细胞递送和有效负载的摄取 (Jian等 (2012), Biomaterials 33 (30):7621-30)。纳米颗粒可以另外有利地与靶向分子偶联以将纳米颗粒引导至合适的细胞类型和/或增加细胞摄取的可能性。这类靶向分子的实例包括对细胞表面受体特异性的抗体和细胞表面受体的天然配体 (或天然配体的部分)。

[0178] 在一些实施方式中, 大范围核酸酶蛋白或编码大范围核酸酶的DNA/mRNA包封在脂质体内或使用阳离子脂质复合 (参见, 例如, LIPOFECTAMINE转染试剂, Life Technologies Corp., Carlsbad, CA; Zuris等 (2015), Nat Biotechnol 33:73-80; Mishra等, (2011), J Drug Deliv. 2011:863734)。脂质体和脂质复合物 (lipoplex) 制剂可以保护有效负载免于降解, 增强靶位点处的积聚和保留, 并通过与靶细胞的细胞膜融合和/或破坏靶细胞的细胞

膜来促进细胞摄取和递送效率。

[0179] 在一些实施方式中,大范围核酸酶蛋白或编码大范围核酸酶的DNA/mRNA包封在聚合物支架(例如,PLGA)内或使用阳离子聚合物(例如,PEI、PLL)复合(Tamboi等,(2011), *Ther Deliv* 2(4):523-536)。可以设计聚合物载体以通过控制聚合物侵蚀和药物扩散来提供可调节的药物释放速率,并且高药物包封效率可以提供对治疗有效负载的保护直到细胞内递送至所需的靶细胞群体。

[0180] 在一些实施方式中,大范围核酸酶蛋白或编码工程化大范围核酸酶的DNA/mRNA与自组装成胶束的两亲分子组合(Tong等(2007), *J Gene Med* 9(11):956-66)。聚合物胶束可以包括由亲水性聚合物(例如,聚乙二醇)形成的胶束壳,其可以防止聚集、掩蔽电荷相互作用和减少非特异性相互作用。

[0181] 在一些实施方式中,大范围核酸酶蛋白或编码大范围核酸酶的DNA/mRNA配制成乳液或纳米乳液(即,具有<1nm的平均粒径)用于施用和/或递送至靶细胞。术语“乳液”是指,但不限于,任何水包油、油包水、水包油包水或油包水包油分散体或液滴,包括在水不混溶相与水相混合时可由于疏水性力的作用而形成的脂质结构,所述疏水性力可以驱使非极性残基(例如,长烃链)远离水和极性头部基团朝向水。这些其他脂质结构包括,但不限于,单层、寡层(paucilamellar)和多层脂质囊泡、胶束和层状相。乳液由水相和亲脂相(通常含有油和有机溶剂)组成。乳液还经常含有一种或多种表面活性剂。纳米乳液制剂是公知的,例如,描述于美国专利申请No.2002/0045667和2004/0043041以及美国专利No.6,015,832,6,506,803,6,635,676和6,559,189中,其各自通过引用整体并入本文。

[0182] 在一些实施方式中,大范围核酸酶蛋白或编码大范围核酸酶蛋白的DNA/mRNA与多功能聚合物缀合物、DNA树状聚合物和聚合树状聚合物共价连接或非共价缔合(Mastorakos等(2015), *Nanoscale* 7(9):3845-56;Cheng等,(2008), *J Pharm Sci* 97(1):123-43)。树状聚合物可以控制有效负载容量和大小,并且可以提供高药物有效负载容量。此外,可以利用多个表面基团的展示来改善稳定性,减少非特异性相互作用,并增强细胞特异性靶向和药物释放。

[0183] 在一些实施方式中,使用病毒载体递送编码大范围核酸酶的基因。此类载体是本领域已知的,并且包括逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体和腺相关病毒(AAV)载体(综述于Vannucci等人(2013), *New Microbiol* 36:1-22中)。在一些实施方式中,病毒载体直接注射到靶组织(例如,肝脏组织)中。在可替代的实施方式中,病毒载体通过循环系统全身递送。本领域已知不同的AAV载体倾向于定位在不同的组织。在肝脏靶组织中,已经证明例如用AAV血清型2、8和9的有效肝细胞转导(Sands(2011), *Methods Mol Biol* 1807:141-157;国际申请公开号WO 2003/052051)。AAV载体也可以是自身互补的,使得它们不需要宿主细胞中第二链DNA的合成(McCarty等(2001), *Gene Ther* 8:1248-54)。

[0184] 在一个实施方式中,用于核酸内切酶基因递送的病毒载体是自限性病毒载体。由于载体内存在工程化大范围核酸酶的识别序列,自限性病毒载体在细胞或生物体中可以具有有限的持续时间。因此,可以将自限性病毒载体工程化以用于编码启动子、本文所述的核酸内切酶和ITR内的核酸内切酶识别位点。自限性病毒载体将核酸内切酶基因递送至细胞、组织或生物体,使得核酸内切酶被表达并且能够在基因组内的内源识别序列处切割细胞的基因组。递送的核酸内切酶还将在自限性病毒载体本身内找到其靶位点,并在该靶位点处

切割载体。一旦切割,病毒基因组的5'和3'末端将暴露并被核酸外切酶降解,从而杀死病毒并停止核酸内切酶的产生。

[0185] 如果核酸内切酶基因以DNA形式(例如,质粒)和/或通过病毒载体(例如,AAV)递送,它们可以与启动子可操作地连接。在一些实施方式中,这可以是病毒启动子,如来自病毒载体的内源启动子(例如,慢病毒载体的LTR)或公知的巨细胞病毒-或SV40病毒-早期启动子。在优选的实施方式中,大范围核酸酶基因与优先在靶细胞中驱动基因表达的启动子可操作地连接。肝特异性启动子的实例包括,但不限于,人 $\alpha$ -1抗胰蛋白酶启动子、杂合肝特异性启动子(来自ApoE基因的肝基因座控制区(ApoE-HCR)和肝特异性 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶启动子)、人甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子和载脂蛋白A-II启动子。

[0186] 在特别的实施方式中,病毒载体包含含有启动子和编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸序列的盒。病毒载体还可以包含两个或更多个盒,其中每个盒包含启动子和编码本文所述的工程化大范围核酸酶的核酸序列。在一些实施方式中,病毒载体包含含有启动子和多顺反子核酸序列的一个盒,其中启动子驱动多顺反子核酸序列的表达以在靶细胞中产生本文所述的多顺反子mRNA,如编码工程化大范围核酸酶的多顺反子mRNA。

[0187] 提供了用于将本文公开的大范围核酸酶递送至患有胆固醇相关障碍(例如高胆固醇血症,包括常染色体显性FH)的受试者的肝脏的方法和组合物。在一个实施方式中,从哺乳动物中取出的原始肝细胞可以用编码工程化大范围核酸酶的载体转导。或者,可以用腺病毒载体离体转导受试者的原始肝细胞,所述腺病毒载体编码工程化大范围核酸酶和/或刺激肝再生的分子,如肝毒素。优选地,肝毒素是uPA,并且已经被修饰以在其由病毒载体表达时抑制其从肝细胞分泌。在另一个实施方式中,载体编码tPA,其可以刺激肝细胞从头再生。然后可以将从哺乳动物取出的转导的肝细胞返回到哺乳动物,其中提供有利于工程化大范围核酸酶表达的条件。通常,转导的肝细胞可以通过经脾或门静脉血管系统的输注返回到患者,并且施用可以在1至5天或更多天内进行单次或多次。

[0188] 在本发明方法的体内方面,构建逆转录病毒、假型或腺病毒相关载体(其编码工程化大范围核酸酶)并将其施用于受试者。编码工程化大范围核酸酶的载体的施用可以与编码分泌受损的(secretion-impaired)肝毒素或编码tPA(其刺激肝细胞再生而不充当肝毒素)的腺病毒载体的施用一起进行。

[0189] 除其他因素外,适当的剂量特别地取决于所使用的脂质体制剂、所选择的任何AAV载体的特性(例如,血清型等)、施用途径、待治疗的受试者(即,受试者的年龄、体重、性别和一般状况)及施用方式。因此,适当的剂量可以因患者而异。本领域技术人员可以容易地确定合适的有效量。剂量处理可以是单剂量方案或多剂量方案。此外,受试者可以按照需要施用多个剂量。本领域技术人员可以容易地确定适当的剂量数。可能需要调整剂量以考虑替代的施用途径,或平衡治疗益处与任何副作用。

[0190] 向受试者递送本文公开的工程化大范围核酸酶或编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸可以治疗或减轻胆固醇相关障碍(例如,高胆固醇血症,包括常染色体显性FH)的严重程度。在特别的实施方式中,向受试者递送本文公开的工程化大范围核酸酶或编码工程化大范围核酸酶的核酸可以减轻胆固醇相关障碍(例如,高胆固醇血症,包括常染色体显性FH)的至少一种症状。在一些实施方式中,工程化大范围核酸酶或编码工程化大范围核酸酶的核酸以有效量递送至受试者。本文所公开的工程化大范围核酸酶或编码本文所公

开的工程化大范围核酸酶的核酸所递送的受试者可以是任何哺乳动物。在特别的实施方式中,受试者是驯化的动物(例如,奶牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人和非人类的灵长动物,例如猴子)、兔子和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方式中,所述受试者是非人类灵长动物或人类。在一些实施方式中,所述受试者患有胆固醇相关障碍。例如,受试者可以患有高胆固醇血症、家族性高胆固醇血症或常染色体显性家族性高胆固醇血症。在特别的实施方式中,受试者的总胆固醇水平超过170mg/dL或200mg/dL,例如170-200mg/dL或200-250mg/dL、200-300mg/dL、200-350mg/dL、200-400mg/dL、200-450mg/dL、200-500mg/dL或200-600mg/dL。在一些实施方式中,受试者所具有的LDL胆固醇水平超过110mg/dL或超过130mg/dL,例如110-120mg/dL、110-130mg/dL、130-150mg/dL、130-180mg/dL、130-200mg/dL、130-250mg/dL、130-300mg/dL、130-350mg/dL、130-400mg/dL、130-450mg/dL、130-500mg/dL或130-600mg/dL。

[0191] 在特别的实施方式中,本文公开的大范围核酸酶或编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸递送至受试者可以减少PCSK9表达和/或降低PCSK9活性。例如,当与对照细胞或基线PCSK9活性相比时,PCSK9的表达或活性可以降低至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或高达100%。在一些实施方式中,当与对照细胞或基线PCSK9活性相比时,PCSK9的表达和/或活性降低约5-10%、5-20%、10-30%、20-40%、30-50%、40-60%、50-70%、60-80%、70-90%或80-100%。如本文其他地方公开的,可以通过本领域已知的任何方法来测量PCSK9活性。如本文所用,对照细胞可以是任何合适的对照,例如在递送本文公开的药物组合物、工程化大范围核酸酶或编码工程化大范围核酸酶的核酸之前来自受试者的细胞。在具体的实施方式中,对照细胞是未递送本文公开的药物组合物、工程化大范围核酸酶或编码工程化大范围核酸酶的核酸的受试者的肝细胞或原代肝细胞。如本文所用,受试者中的“基线”水平(例如PCSK9表达或活性或者总或LDL胆固醇水平的基线水平)是指向个体施用本文所述的药物组合物之前的水平。在某些实施方式中,基线可以是在施用本文所述的药物组合物之前获得的两次或更多次测量的平均数或平均值。

[0192] 在一些实施方式中,本文公开的大范围核酸酶或编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸递送至受试者中的靶细胞可以增加LDL受体在细胞表面上的展示或提高LDL受体的水平。LDL受体的水平可以通过本领域已知的方法来测量,例如测量受试者肝脏中的LDL受体或载脂蛋白B(APOB)受体的水平。例如,与对照细胞或在细胞表面上的LDL受体的基线水平相比,在本文公开的大范围核酸酶或编码本文公开的工程化大范围核酸酶的核酸递送至靶细胞后,LDL受体的展示或水平可以增加至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%、150%、250%、500%、1000%或更多。

[0193] 当与递送之前受试者中的总胆固醇水平相比时,向受试者中的靶细胞递送本文公开的药物组合物、工程化大范围核酸酶或编码工程化大范围核酸酶的核酸可以降低受试者中的总胆固醇水平。例如,当与治疗前的受试者相比时,总胆固醇水平可以降低至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或高达100%。在特别的实施方式中,递送本文公开的药物组合物的受试者中的总胆固醇水平与递送药物组合物之前的总胆固醇水平相比的降低在最后一次给药后维持至少两周、至少一个月、至少两个月或三个月。

[0194] 在特别的实施方式中,与本文公开的药物组合物递送给受试者之前的胆固醇水平相比,总胆固醇水平降低约5mg/dL、10mg/dL、15mg/dL、20mg/dL、25mg/dL、30mg/dL、40mg/dL

dL、50mg/dL、60mg/dL、70mg/dL、80mg/dL、90mg/dL、100mg/dL、110mg/dL、5-15mg/dL、10-20mg/dL、10-30mg/dL、15-30mg/dL、20-30mg/dL、25-35mg/dL、25-40mg/dL、25-50mg/dL、40-60mg/dL、50-70mg/dL、60-80mg/dL、70-100mg/dL或更多。在特别的实施方式中,所述受试者的基线总胆固醇水平为140mg/dL、150mg/dL、160mg/dL、170mg/dL、175mg/dL、180mg/dL、185mg/dL、190mg/dL、195mg/dL、200mg/dL、205mg/dL、210mg/dL、215mg/dL、220mg/dL、225mg/dL、230mg/dL、235mg/dL、240mg/dL、250mg/dL、260mg/dL、270mg/dL、280mg/dL、290mg/dL、300mg/dL或更高。在一些实施方式中,总胆固醇水平是血清胆固醇水平或总胆固醇水平。

[0195] 与递送之前受试者中的LDL胆固醇水平相比,本文公开的药物组合物、工程化大范围核酸酶或编码工程化大范围核酸酶的核酸递送至受试者中的靶细胞可以降低受试者的LDL胆固醇水平。例如,与治疗前的受试者相比,LDL胆固醇水平可以降低至少约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或多达100%。在特别的实施方式中,递送本文公开的药物组合物的受试者中的LDL胆固醇水平与递送药物组合物之前的总胆固醇水平相比的降低在最后一次给药后维持至少两周、至少一个月、至少两个月或三个月。

[0196] 在特别的实施方式中,与本文公开的药物组合物递送给受试者之前的LDL胆固醇水平相比,LDL胆固醇水平降低约5mg/dL、10mg/dL、15mg/dL、20mg/dL、25mg/dL、30mg/dL、40mg/dL、50mg/dL、60mg/dL、70mg/dL、80mg/dL、90mg/dL、5-15mg/dL、10-20mg/dL、10-30mg/dL、15-30mg/dL、20-30mg/dL、25-35mg/dL、25-40mg/dL、25-50mg/dL、40-60mg/dL、50-70mg/dL、60-80mg/dL、70-100mg/dL或更多。在特别的实施方式中,受试者的基线LDL胆固醇水平为100mg/dL、110mg/dL、115mg/dL、120mg/dL、125mg/dL、130mg/dL、135mg/dL、140mg/dL、145mg/dL、150mg/dL、155mg/dL、160mg/dL、165mg/dL、170mg/dL、175mg/dL、180mg/dL、185mg/dL、190mg/dL、195mg/dL、200mg/dL或更高。在一些实施方式中,LDL胆固醇水平是血清LDL胆固醇水平或全身LDL胆固醇水平。

[0197] 在一些实施方式中,与本文公开的药物组合物递送给受试者之前的动脉粥样硬化斑块的初始大小相比,本文所述的组合物和方法可以有效地将受试者中的动脉粥样硬化斑块大小减少至少约1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、40%、41%、42%、43%、44%、45%、46%、47%、48%、49%、50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59%或60%或甚至更多。动脉粥样硬化斑块大小可减少约19%-24%、14%-29%、12%-35%、10-40%、8%-45%、5%-50%、2%-60%或1%-70%。

#### [0198] 2.4药物组合物

[0199] 在一些实施方式中,本发明提供药物组合物,其包含药物学上可接受的载体和本发明的工程化大范围核酸酶,或药物学上可接受的载体和包含编码本发明的工程化大范围核酸酶的核酸的多核苷酸。在其他实施方式中,本发明提供药物组合物,其包含药物学上可接受的载体和可以递送至靶组织的本发明的细胞,其表达如本文公开的工程化大范围核酸酶。本发明的药物组合物可以用于治疗患有心血管疾病和高胆固醇血症(包括常染色体显性FH)的受试者或用于降低PCSK9的表达和/或活性。

[0200] 这些药物组合物可以根据已知技术制备。参见,例如,Remington, The Science

And Practice of Pharmacy (第21版, 2005)。在根据本发明的药物制剂的制备中, 通常将大范围核酸酶多肽(或编码其的DNA/RNA)与药学上可接受的载体混合, 并将所得到的组合物流用于受试者。当然, 在与制剂中的任何其他成分相容的意义上, 载体必须是可接受的, 并且必须不对受试者有害。在一些实施方式中, 本发明的药物组合物可以进一步包含一种或多种可在受试者疾病治疗中有用的另外的药剂或生物分子。同样地, 另外的药剂和/或生物分子可以作为单独的组合物共同施用。

[0201] 在本发明的特别实施方式中, 药物组合物可以包含一种或多种包封在脂质纳米颗粒(其在本文其他地方描述)内的本文所述的mRNA。在特别的实施方式中, 脂质纳米颗粒可以包含一种或多种本文所述的多顺反子mRNA, 其中每个多顺反子mRNA编码两种或更多种本发明的工程化大范围核酸酶。在特定实施方式中, 脂质纳米颗粒可以包含编码本文所述的两种、三种或四种工程化大范围核酸酶的多顺反子mRNA。在其他特别的实施方式中, 脂质纳米颗粒可以包含两种或更多种本文所述的多顺反子mRNA, 其各自编码两种或更多种本发明的工程化大范围核酸酶。

[0202] 预期用于本发明的一些脂质纳米颗粒包含至少一种阳离子脂质、至少一种非阳离子脂质和至少一种共轭脂质。在更特别的实例中, 脂质纳米颗粒可以包含约40mol%至约85mol%的阳离子脂质, 约13mol%至约49.5mol%的非阳离子脂质和约0.5mol%至约10mol%的脂质共轭物, 并且以具有非层状(即, 非双层)形态的方式产生。

[0203] 阳离子脂质可以包括, 例如, 以下的一种或多种: 棕榈酰基-油酰基-去甲精氨酸(PONA)、MC3、LenMC3、CP-LenMC3、 $\gamma$ -LenMC3、CP- $\gamma$ -LenMC3、MC3MC、MC2MC、MC3醚、MC4醚、MC3酰胺、Pan-MC3、Pan-MC4和Pan-MC5、1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DLenDMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA; “XTC2”)、2,2-二亚油基-4-(3-二甲基氨基丙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C3-DMA)、2,2-二亚油基-4-(4-二甲基氨基丁基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C4-DMA)、2,2-二亚油基-5-二甲基氨基甲基-[1,3]-二噁烷(DLin-K6-DMA)、2,2-二亚油基-4-N-甲基哌嗪并(methylpepiazino)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-MPZ)、2,2-二亚油基-4-二甲基氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、1,2-二亚油基氨基甲酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-C-DAP)、1,2-二亚油酰氧基-3-(二甲基氨基)乙酰氧基丙烷(DLin-DAC)、1,2-二亚油酰氧基-3-吗啉代丙烷(DLin-MA)、1,2-二亚油酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLinDAP)、1,2-二亚油烯基硫代-3-二甲基氨基丙烷(DLin-S-DMA)、1-亚油酰基-2-亚油酰氧基-3-二甲基氨基丙烷(DLin-2-DMA)、1,2-二亚油酰氧基-3-三甲基氨基丙烷盐酸盐(DLin-TMA.Cl)、1,2-二亚油酰基-3-三甲基氨基丙烷盐酸盐(DLin-TAP.Cl)、1,2-二亚油酰氧基-3-(N-甲基哌嗪基)丙烷(DLin-MPZ)、3-(N,N-二亚油基氨基)-1,2-丙二醇(DLinAP)、3-(N,N-二油烯基氨基)-1,2-丙二醇(DOAP)、1,2-二亚油基氧代-3-(2-N,N-二甲基氨基)乙氧基丙烷(DLin-EG-DMA)、N,N-二油基-N,N-二甲基氯化铵(DODAC)、1,2-二油烯基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DODMA)、1,2-二硬脂基氧基-N,N-二甲基氨基丙烷(DSDMA)、N-(1-(2,3-二油烯基氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N,N-二硬脂基-N,N-二甲基溴化铵(DDAB)、N-(1-(2,3-二油酰氧基)丙基)-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTAP)、3-(N-(N', N'-二甲基氨基乙基)-氨基甲酰基)胆固醇(DC-Chol)、N-(1,2-二肉豆蔻酰氧基丙-3-基)-N,N-二甲基-N-羟乙基溴化铵(DMRIE)、2,3-二油烯基氧基-N-[2(精胺-甲酰胺基)乙基]-N,

N-二甲基-1-丙胺三氟乙酸盐(DOSPA)、二-十八烷基酰胺基甘氨酸基精胺(DOGS)、3-二甲氨基-2-(胆甾-5-烯-3- $\beta$ -氧基)-1-(顺,顺-9,12)-十八碳二烯氧基)丙烷(CLInDMA)、2-[5'-(胆甾-5-烯-3- $\beta$ -氧基)-3'-氧杂戊氧基]-3-二甲基-1-(顺,顺-9',1'-2'-十八碳二烯氧基)丙烷(CpLinDMA)、N,N-二甲基-3,4-二油酰氧基苄胺(DMOBA)、1,2-N,N'-二油烯基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DOcarbDAP)、1,2-N,N'-二亚油基氨基甲酰基-3-二甲基氨基丙烷(DLincarbDAP)或其混合物。阳离子脂质也可以是DLInDMA、DLin-K-C2-DMA("XTC2")、MC3、LenMC3、CP-LenMC3、 $\gamma$ -LenMC3、CP- $\gamma$ -LenMC3、MC3MC、MC2MC、MC3醚、MC4醚、MC3酰胺、Pan-MC3、Pan-MC4、PanMC5或其混合物。

[0204] 在各种实施方式中,阳离子脂质可以占颗粒中存在的总脂质的约40mol%至约90mol%、约40mol%至约85mol%、约40mol%至约80mol%、约40mol%至约75mol%、约40mol%至约70mol%、约40mol%至约65mol%或约40mol%至约60mol%。

[0205] 非阳离子脂质可以包含例如一种或多种阴离子脂质和/或中性脂质。在优选的实施方式中,非阳离子脂质包括以下中性脂质组分中的一种:(1)胆固醇或其衍生物;(2)磷脂;或(3)磷脂和胆固醇或其衍生物的混合物。胆固醇衍生物的实例包括,但不限于,胆甾烷醇、胆甾烷酮、胆甾烯酮、粪甾醇、胆固醇基-2'-羟乙基醚、胆固醇基-4'-羟基丁基醚及其混合物。磷脂可以是中性脂质,包括但不限于,二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰基-磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰基-磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰基-磷脂酰甘油(POPG)、二棕榈酰基-磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰基-磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰基-磷脂酰乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、二反油酰基(dielaidoyl)-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、硬脂酰油酰基-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、卵磷脂酰胆碱(EPC)及其混合物。在某些优选的实施方式中,磷脂是DPPC、DSPC或其混合物。

[0206] 在一些实施方式中,非阳离子脂质(例如,一种或多种磷脂和/或胆甾醇)可以占颗粒中存在的总脂质的约10mol%至约60mol%、约15mol%至约60mol%、约20mol%至约60mol%、约25mol%至约60mol%、约30mol%至约60mol%、约10mol%至约55mol%、约15mol%至约55mol%、约20mol%至约55mol%、约25mol%至约55mol%、约30mol%至约55mol%、约13mol%至约50mol%、约15mol%至约50mol%或约20mol%至约50mol%。当非阳离子脂质是磷脂和胆固醇或胆固醇衍生物的混合物时,混合物可以占颗粒中存在的总脂质的高达约40、50或60mol%。

[0207] 抑制颗粒聚集的共轭脂质可以包括例如以下的一种或多种:聚乙二醇(PEG)-脂质共轭物、聚酰胺(ATA)-脂质共轭物、阳离子聚合物-脂质共轭物(CPL)或其混合物。在一个优选的实施方式中,核酸-脂质颗粒包含PEG-脂质共轭物或ATA-脂质共轭物。在某些实施方式中,PEG-脂质共轭物或ATA-脂质共轭物与CPL一起使用。抑制颗粒聚集的共轭脂质可以包含PEG-脂质,包括例如,PEG-二酰基甘油(DAG)、PEG二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)或其混合物。PEG-DAA共轭物可以是PEG-二月桂酰氧基丙基(C12)、PEG-二肉豆蔻酰氧基丙基(C14)、PEG-二棕榈酰氧基丙基(C16)、PEG-二硬脂酰氧基丙基(C18)或其混合物。

[0208] 适用于本发明的其他PEG-脂质共轭物包括,但不限于,mPEG2000-1,2-二-O-烷基-sn3-氨基甲酰基甘油酯(PEG-C-DMG)。PCT申请No. PCT/US08/88676中描述了PEG-C-DMG的

合成。适用于本发明的再其他的PEG-脂质共轭物包括,但不限于1-[8'-(1,2-二肉豆蔻酰基-3-丙氧基)-甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛烷基]氨基甲酰基- $\omega$ -甲基-聚(乙二醇)(2KPEG-DMG)。2KPEG-DMG的合成描述于美国专利No.7,404,969中。

[0209] 在一些情况中,抑制颗粒聚集的共轭脂质(例如,PEG-脂质共轭物)可以构成颗粒中存在的总脂质的约0.1mol%至约2mol%,约0.5mol%至约2mol%,约1mol%至约2mol%,约0.6mol%至约1.9mol%,约0.7mol%至约1.8mol%,约0.8mol%至约1.7mol%,约1mol%至约1.8mol%,约1.2mol%至约1.8mol%,约1.2mol%至约1.7mol%,约1.3mol%至约1.6mol%,约1.4mol%至约1.5mol%,或约1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2mol%(或其任何分数或其中的范围)。通常,在这样的情况中,PEG部分具有约2,000道尔顿的平均分子量。在其他情况中,抑制颗粒聚集的共轭脂质(例如,PEG-脂质共轭物)可以构成颗粒中存在的总脂质的约5.0mol%至约10mol%,约5mol%至约9mol%,约5mol%至约8mol%,约6mol%至约9mol%,约6mol%至约8mol%,或约5mol%、6mol%、7mol%、8mol%、9mol%或10mol%(或其任何分数或其中的范围)。通常,在这样的情况中,PEG部分具有约750道尔顿的平均分子量。

[0210] 在一些实施方式中,脂质纳米颗粒具有特别地增强肝脏(特别是肝细胞内)的递送和摄取的组成。

[0211] 在一些实施方式中,药物组合物包含药学上可接受的载体和本文所述的重组DNA构建体,其包含编码本发明的工程化大范围核酸酶的核酸序列。在特别的实施方式中,此类重组DNA构建体可被包封在脂质纳米颗粒内,或包装在本领域已知的其他递送介质中,其适于递送至靶细胞(例如,肝脏细胞,特别是肝细胞)。

[0212] 在某些实施方式中,药物组合物包含药学上可接受的载体和本文所述的病毒载体,其包含编码本发明的工程化大范围核酸酶的核酸序列。在特别的实施方式中,病毒载体可以是适合于递送至靶细胞(特别是肝脏细胞,例如,肝细胞)的AAV载体。这样的AAV载体可以具有例如AAV8、AAV2、AAV9的衣壳或本领域已知的其他肝靶向衣壳。在某些实施方式中,AAV衣壳是AAV8衣壳,其包含的盒含有5'反向末端重复序列、肝特异性人甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、内含子、本发明的工程化大范围核酸酶的编码序列、土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件和3'反向末端重复序列。

[0213] 在某些实施方式中,提供了治疗胆固醇相关病症(例如高胆固醇血症)的方法,包括与另一种治疗剂一起施用治疗有效量的本文公开的药物组合物。在特别的实施方式中,单独施用本文公开的药物组合物。

[0214] 可以在联合疗法中,即与其他药剂组合施用本发明的药物组合物。在一些实施方式中,在施用至少一种其他治疗剂之前递送本文公开的药物组合物。本文公开的药物组合物可以与至少一种其他治疗剂的施用同时递送,或者可以在至少一种其他治疗剂的施用之后递送本文公开的药物组合物。在某些实施方式中,联合疗法包括本文公开的药物组合物与至少一种抗胆固醇剂组合。药剂包含但不限于体外合成制备的化学组合物、抗体、抗原结合区及其组合和缀合物。在某些实施方式中,药剂可以充当激动剂、拮抗剂、变构调节剂或毒素。在某些实施方式中,药剂可以起到抑制或刺激其靶标(例如,受体或酶的激活或抑制)的作用,从而促进LDLR表达的增加或者降低PCSK9表达或血清胆固醇水平。

[0215] 治疗剂(除本文公开的药物组合物外)包括但不限于,至少一种其他的降胆固醇



(血清和/或全身胆固醇)剂或药剂。在一些实施方式中,该药剂增加LDLR的表达,已经观察到提高血清HDL水平,降低LDL水平或降低甘油三酯水平。示例性药剂包括但不限于他汀类药物(阿托伐他汀、西立伐他汀、氟伐他汀、洛伐他汀、美伐他汀、匹伐他汀、普伐他汀、瑞舒伐他汀、辛伐他汀)、烟酸(Niacin)(NIACOR、NIASPAN(缓释烟酸)、SLO-NIACIN(缓释烟酸))、苯氧芳酸(LOPID)(吉非贝齐)、TRICOR(非诺贝特)、胆汁酸螯合剂(QUESTRAN(消胆胺)、考来维仑(colesevelam)(WELCHOL)、COLESTID(考来替泊(colestipol)))、胆固醇吸收抑制剂(ZETIA(依泽替米贝(ezetimibe)))、烟酸与他汀类(ADVICOR(LOVASTATIN和NIASPAN)组合、斯达汀与吸收抑制剂组合(VYTORIN(ZOCOR和ZETIA)和/或脂质变性剂)。在一些实施方式中,本文公开的药物组合物与PPAR $\gamma$ 激动剂、PPAR $\alpha/\gamma$ 激动剂、角鲨烯合酶抑制剂、CETP抑制剂、抗高血压药、抗糖尿病药(例如磺酰脲、胰岛素、GLP-1类似物、DDP-IV抑制剂)、ApoB调节剂、MTP抑制剂和/或闭塞性动脉硬化治疗组合。在一些实施方式中,本文公开的药物组合物与增加受试者中LDLR蛋白水平的药剂如他汀类、某些细胞因子如制瘤素M、雌激素和/或某些草药成分如黄连素组合。在一些实施方式中,本文公开的药物组合物与提高受试者中的血清胆固醇水平的药剂(例如某些抗精神病药剂、某些HIV蛋白酶抑制剂、饮食因素例如高果糖、蔗糖、胆固醇或某些脂肪酸以及RXR、RAR、LXR、FXR的某些核受体激动剂和拮抗剂)组合。在一些实施方式中,本文公开的药物组合物与增加受试者中PCSK9水平的药剂(如他汀类和/或胰岛素)组合。两者的组合可以使得通过本文公开的药物组合物减轻其他药剂的不良副作用。

[0216] 在某些实施方式中,本文公开的药物组合物可以在降胆固醇(血清和/或总胆固醇)剂治疗之前、同时和之后施用。在某些实施方式中,本文公开的药物组合物可以预防性地施用以预防或减轻高胆固醇血症、心脏病、糖尿病和/或任何胆固醇相关障碍的发作。在某些实施方式中,可以施用本文公开的药物组合物以治疗现有的高胆固醇血症病症。在一些实施方式中,本文公开的药物组合物延迟与胆固醇相关障碍有关的疾病和/或症状的发作。在一些实施方式中,本文公开的药物组合物提供给缺乏任何一种胆固醇相关病症的任何症状的受试者。

#### [0217] 2.5用于产生重组AAV载体的方法

[0218] 在一些实施方式中,本发明提供了用于本发明方法中的重组AAV载体。重组AAV载体通常在哺乳动物细胞系(如HEK-293)中产生。因为从载体除去病毒cap和rep基因以防止其自我复制而为待递送的治疗基因(例如,大范围核酸酶基因)提供空间,所以有必要在包装细胞系中反式(in trans)提供这些。另外,必须提供支持复制所必需的“辅助”(例如,腺病毒)组分(Cots D, Bosch A, Chillon M(2013) Curr. Gene Ther. 13(5):370-81)。通常,使用三重转染产生重组AAV载体,其中细胞系用编码“辅助”组分的第一质粒、包含cap和rep基因的第二质粒和包含有待包装至病毒中的干预DNA序列的病毒ITR的第三质粒转染。然后通过冻-融循环、超声处理、去污剂或本领域已知的其他方法从细胞中分离包含包裹在衣壳中的基因组(ITR和插入目标基因)的病毒颗粒。然后使用氯化铯密度梯度离心或亲和色谱法纯化颗粒,并随后将其递送至细胞、组织或生物体(例如人类患者)的目标基因。

[0219] 因为重组AAV颗粒通常在细胞中产生(制造),所以在实施本发明时必须采取预防措施以确保位点特异性大范围核酸酶不在包装细胞中表达。因为本发明的病毒基因组包含大范围核酸酶的识别序列,所以在包装细胞系中表达的任何大范围核酸酶在包装到病毒颗

粒中之前能够切割病毒基因组。这将导致降低的包装效率和/或片段化基因组的包装。可以使用几种方法来防止大范围核酸酶在包装细胞中表达,包括:

[0220] 1. 可以将大范围核酸酶置于在包装细胞中无活性的组织特异性启动子的控制下。例如,如果病毒载体开发用于将大范围核酸酶基因递送至肌肉组织,则可以使用肌肉特异性启动子。肌肉特异性启动子的实例包括C5-12 (Liu等 (2004), Hum Gene Ther 15:783-92)、肌肉特异性肌酸激酶 (MCK) 启动子 (Yuasa等, (2002), Gene Ther 9:1576-88) 或平滑肌 22 (SM22) 启动子 (Haase等, (2013), BMC Biotechnol 13:49-54)。CNS (神经元) 特异性启动子的实例包括NSE、突触蛋白和MeCP2启动子 (Lentz等, (2012), Neurobiol Dis 48:179-88)。肝特异性启动子的实例包括白蛋白启动子 (如Palb)、人 $\alpha$ 1-抗胰蛋白酶 (如Pa1AT) 和血红素结合蛋白 (如Phpx) (Kramer等, (2003), Mol Therapy 7:375-85)。眼特异性启动子的实例包括视蛋白和角膜上皮特异性K12启动子 (Martin等, (2002), Methods 28: (2):267-75) (Tong等, (2007), J Gene Med 9:956-66)。这些启动子或本领域已知的其他组织特异性启动子在HEK-293细胞中不具有高活性,并且因此在整合至本发明的病毒载体中时,预期不会在包装细胞中产生显著水平的大范围核酸酶基因表达。类似地,本发明的病毒载体考虑使用其他细胞系及使用不相容的组织特异性启动子 (即,公知的HeLa细胞系 (人上皮细胞) 和使用肝特异性血红素结合蛋白启动子)。组织特异性启动子的其他实例包括:滑膜肉瘤PDZD4 (小脑)、C6 (肝)、ASB5 (肌肉)、PPP1R12B (心脏)、SLC5A12 (肾)、胆固醇调节APOM (肝脏)、ADPRHL1 (心脏) 和单基因畸形综合征TP73L (肌肉) (Jacox等, (2010), PLoS One 5(8):e12274)。

[0221] 2. 或者,载体可以包装来自不同物种的在其中不可能表达大范围核酸酶的细胞中。例如,可以使用在非哺乳动物包装细胞中无活性的哺乳动物启动子 (如公知的巨细胞病毒-或SV40病毒-早期启动子) 在微生物、昆虫或植物细胞中产生病毒颗粒。在优选实施方式中,使用如Gao等 (Gao等, (2007), J Biotechnol 131(2):138-43) 描述的杆状病毒系统在昆虫细胞中产生病毒颗粒。在哺乳动物启动子控制下的大范围核酸酶不太可能在这些细胞中表达 (Airenne等, (2013), Mol Ther 21(4):739-49)。此外,昆虫细胞利用不同于哺乳动物细胞的mRNA剪接基序。因此,有可能将哺乳动物内含子 (如人生长激素 (HGH) 内含子或SV40大T抗原内含子) 并入大范围核酸酶的编码序列中。因为这些内含子在昆虫细胞中不能有效地从前mRNA转录产物剪接,所以昆虫细胞不表达功能性大范围核酸酶,因而包装全长基因组。相反,对其递送所得重组AAV颗粒的哺乳动物细胞正确地剪接前mRNA并表达功能性大范围核酸酶蛋白。Haifeng Chen报道了使用HGH和SV40大T抗原内含子来减弱昆虫包装细胞中毒性蛋白芽孢杆菌RNA酶 (barnase) 和白喉毒素片段A的表达,从而使得能够产生携带这些毒素基因的重组AAV载体 (Chen (2012), Mol Ther Nucleic Acids 1(11):e57)。

[0222] 3. 大范围核酸酶基因可以与诱导型启动子可操作地连接,使得大范围核酸酶的表达需要小分子诱导物。诱导型启动子的实例包括Tet-On系统 (Clontech; Chen等, (2015), BMC Biotechnol 15(1):4) 和RheoSwitch系统 (Intrexon; Sowa等, (2011), Spine 36(10):E623-8)。两种系统以及本领域中已知的类似系统依赖于配体诱导的转录因子 (分别为Tet阻遏物和蜕皮激素受体的变体), 其响应于小分子激活剂 (分别为强力霉素或蜕皮激素) 而激活转录。使用这种配体诱导的转录激活剂实施本发明包括: 1) 将大范围核酸酶基因置于响应相应转录因子的启动子的控制下, 该大范围核酸酶基因具有转录因子的结合位点; 和 2) 在包装的病毒基因组中包括编码转录因子的基因。后一步骤是必要的, 因为如果转录激

活剂也未提供给相同的细胞,则在重组AAV递送后大范围核酸酶不会在靶细胞或组织中表达。然后转录激活剂仅在用同源小分子激活剂处理的细胞或组织中诱导大范围核酸酶基因表达。该方法是有利的,因为它使得大范围核酸酶基因表达能够通过选择何时和对何种组织递送小分子诱导剂而以时间-空间方式进行调节。然而,要求将诱导子包括在病毒基因组中(这显著地限制承载能力)形成了该方法的缺点。

[0223] 4. 在另一个优选实施方式中,重组AAV颗粒在表达防止大范围核酸酶表达的转录阻遏物的哺乳动物细胞系中产生。转录阻遏物是本领域已知的,并且包括Tet-阻遏物、Lac-阻遏物、Cro阻遏物和Lambda阻遏物。许多核激素受体(如蜕皮激素受体)在缺乏其同源激素配体的情况下也充当转录阻遏物。为了实施本发明,用编码转录阻遏物的载体转染/转导包装细胞,并将病毒基因组(包装载体)中的大范围核酸酶基因与经修饰以包含阻遏物的结合位点的启动子可操作地连接,使得阻遏物使启动子沉默。编码转录阻遏物的基因可以置于多个位置。它可以在单独的载体上编码;它可以在ITR序列外并入包装载体中;它可以并入cap/rep载体或腺病毒辅助载体中;或者最优选地,它可以稳定地整合到包装细胞的基因组中使其组成型地表达。修饰常见哺乳动物启动子以并入转录阻遏物位点的方法是本领域已知的。例如,Chang和Roninson修饰强组成型CMV和RSV启动子以包含Lac阻遏物的操纵基因,并且证明从修饰启动子的基因表达在表达阻遏物的细胞中大大减弱(Chang和Roninson (1996), Gene 183:137-42)。非人转录阻遏物的使用确保大范围核酸酶基因的转录仅在表达阻遏物的包装细胞中被阻遏,而在用所得重组AAV载体转导的靶细胞或组织中不被阻遏。

#### [0224] 2.6 工程化大范围核酸酶变体

[0225] 本发明的实施方式包括本文所述的工程化大范围核酸酶及其变体。本发明的更多实施方式包括多核苷酸(其包含编码本文所述的大范围核酸酶的核酸序列)以及这样的多核苷酸的变体。

[0226] 如本文所述的,“变体”旨在表示基本相似的序列。“变体”多肽意指通过在天然蛋白质的一个或多个内部位点处删除或添加一个或多个氨基酸和/或在天然多肽中的一个或多个位点处置换一个或多个氨基酸而自“天然”多肽衍生的多肽。如本文使用的,“天然”多核苷酸或多肽包含变体从其衍生的亲本序列。该实施方式包括的变体多肽是生物学活性的。也就是说,它们继续具有天然蛋白所需的生物学活性;即,识别和切割PCSK9基因内的识别序列(例如,PCS 7-8识别序列(SEQ ID NO:4))的能力。例如,这些变体可能由人为操纵得到。该实施方式的天然多肽的生物活性变体(例如,SEQ ID NO:6-14),或本文所述的识别半位点结合亚基的生物活性变体,与天然多肽或天然亚基的氨基酸序列具有至少约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%序列同一性,如通过本文其他地方描述的序列比对程序和参数所确定的。该实施方式的多肽或亚基的生物学活性变体可以与该多肽或亚基相差少至约1-40个氨基酸残基,少至约1-20个,少至约1-10个,少至约5个,少至4、3、2或甚至1个氨基酸残基。

[0227] 可以以各种方式改变该实施方式的多肽,包括氨基酸置换、删除、截短和插入。用于这类操作的方法一般是本领域已知的。例如,氨基酸序列变体可以通过DNA中的突变来制备。用于诱变和多核苷酸改变的方法是本领域熟知的。参见,例如,Kunkel (1985), Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-492;Kunkel等(1987), Methods in Enzymol154:367-

382;美国专利No.4,873,192;Walker和Gaastra编辑(1983)Techniques in Molecular Biology(MacMillan Publishing Company,New York)和其中引用的参考文献。关于不影响目的蛋白的生物学活性的合适氨基酸置换的指导可以在Dayhoff等(1978)Atlas of Protein Sequence and Structure(Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,D.C.)的模型中找到,其在此引入作为参考。保守置换,例如将一种氨基酸与具有相似性质的另一种氨基酸交换,可能是最佳的。

[0228] 在一些实施方式中,本发明的工程化大范围核酸酶可以包含本文公开的HVR1和HVR2区的变体。亲本HVR区可以包含例如示例性工程化大范围核酸酶的残基24-79或残基215-270。因此,变体HVR可以包含与对应于本文示例的工程化大范围核酸酶的残基24-79或残基215-270的氨基酸序列具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更高序列同一性的氨基酸序列,使得变体HVR区维持工程化大范围核酸酶的生物学活性(即,结合并切割识别序列)。此外,在本发明的一些实施方式中,变体HVR1区或变体HVR2区可以包含对应于在亲本HVR内的特定位置发现的氨基酸残基的残基。在这个情况中,“对应于”意指变体HVR中的氨基酸残基是亲本HVR序列中存在于相同的相对位置(即,相对于亲本序列中其余的氨基酸)的相同氨基酸残基(即,单独的相同残基)。例如,如果亲本HVR序列在26位包含丝氨酸残基,则“包含对应于”残基26的残基的变体HVR也在相对于亲本位置26的位置处包含丝氨酸。

[0229] 先前已经鉴定了野生型I-CreI大范围核酸酶的DNA识别结构域的大量氨基酸修饰(例如,US 8,021,867),其单独或组合地产生具有在DNA识别序列半位点内的单个碱基处改变的特异性的工程化大范围核酸酶,使得所得的合理设计的大范围核酸酶具有不同于野生型酶的半位点特异性。表2提供了可以在工程化大范围核酸酶单体或亚基中进行的潜在置换,以基于存在于识别半位点的每个半位点位置(-1至-9)处的碱基来增强特异性。

[0230] 表2.

位置	有利的有义链碱基										
	A	C	G	T	A/T	A/C	A/G	C/T	G/T	A/G/T	A/C/G/T
[0231]	-1	Y75	<b>R70*</b>	K70	Q70*			<b>T46*</b>			G70
		L75*	H75*	E70*	C70						A70
		C75*	R75*	E75*	L70						S70
		Y139*	H46*	E46*	Y75*						G46*
		C46*	K46*	D46*	Q75*						
		A46*	R46*		H75*						

[0232]

				H139 Q46* H46*							
-2	Q70 T44* A44* V44* I44* L44* N44*	E70 D70 K44* R44*	H70 D44* E44*	<b>Q44*</b>	C44*						
-3	Q68 C24* <b>I24*</b>	E68 F68 K24* R24*	<b>R68</b>	M68 C68 L68 F68		H68		Y68	K68		
-4	A26* Q77	E77 K26*	R77 E26*					S77 <b>Q26*</b>			S26*
-5		E42	R42			<b>K28*</b>	C28* Q42				M66 K66
-6	Q40 C28*	E40 R28*	R40	C40 I40 V40 C79 I79 V79 Q28*	A40 A79 A28* H28*						<b>S40</b> S28*
-7	<b>N30*</b> <b>Q38</b>	E38 K30* R30*	K38 R38 E30*	I38 L38			C38				H38 N38 Q30*
-8	F33 <b>Y33</b>	E33 D33	F33 H33	L33 V33 I33 F33 C33		R32*	R33				
-9		E32	R32 K32	L32 V32 A32 C32				D32 I32			<b>S32</b> N32 H32 Q32 T32

[0233] 粗体项目是野生型接触残基,且不构成本文中所用的“修饰”。星号表示该残基与反义链上的碱基接触。

[0234] 对于多核苷酸,“变体”包含在天然多核苷酸内的一个或多个位点处的一个或多个核苷酸的缺失和/或添加。本领域技术人员将认识到,构建该实施方式的核酸变体以使得开放阅读框得到保持。对于多核苷酸,保守变体包括由于遗传密码的简并性而编码该实施方

式的多肽之一的氨基酸序列的那些序列。变体多核苷酸包括合成衍生的多核苷酸,如通过使用定点诱变产生但仍编码该实施方式的工程化大范围核酸酶的多核苷酸。通常,该实施方式的特定多核苷酸的变体与该特定的多核苷酸具有至少约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高的序列同一性,如通过本文其他地方描述的序列比对程序和参数确定的。还可以通过比较变体多核苷酸编码的多肽与参考多核苷酸编码的多肽之间的百分序列同一性来评估该实施方式的特定多核苷酸(即参考多核苷酸)的变体。

[0235] 预期本文包括的蛋白质序列的缺失、插入和置换不产生多肽特征的根本变化。然而,在事先难以预测置换、缺失或插入的确切效果时,本领域技术人员将理解,通过筛选多肽优先识别和切割人PCSK9基因内的识别序列的能力来评估其效果。

#### [0236] 实施例

[0237] 通过以下实施例进一步说明本发明,这些实施例不应解释为限制。本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验确定本文所述的特定物质和程序的许多等同物。这些等同物旨在包括在以下实施例之后的权利要求的范围内。

#### [0238] 实施例1

#### [0239] 识别和切割PCSK9识别序列的大范围核酸酶的特征

#### [0240] 1. 识别和切割PCS 7-8识别序列的大范围核酸酶

[0241] 工程化大范围核酸酶(SEQ ID NO:6-14),在本文中总称为“PCS 7-8大范围核酸酶”,被工程化以识别和切割PCS1-2识别序列(SEQ ID NO:4),其位于PCSK9基因内。每个PCS 7-8工程化大范围核酸酶包含源自SV40的N-末端核酸酶定位信号、第一大范围核酸酶亚基、接头序列和第二大范围核酸酶亚基。每个PCS 7-8大范围核酸酶中的第一亚基与SEQ ID NO:4的PCS7识别半位点结合,而第二亚基与PCS8识别半位点结合(参见图2)。

[0242] PCS7结合亚基和PCS8结合亚基各自包含56个碱基对的超变区,分别称为HVR1和HVR2。PCS7结合亚基在HVR1区外是高度保守的。类似地,PCS8结合亚基在HVR2区外是高度保守的。SEQ ID NO:6-14的PCS7结合区分别作为SEQ ID NO:15-23来提供。SEQ ID NO:15-23中的每一个与SEQ ID NO:15具有至少90%的序列同一性,SEQ ID NO:15是大范围核酸酶PCS 7-8L.197(SEQ ID NO:6)的PCS7结合区。SEQ ID NO:6-14的PCS8结合区分别作为SEQ ID NO:24-32来提供。SEQ ID NO:24-32中的每一个与SEQ ID NO:24具有至少90%的序列同一性,SEQ ID NO:24是大范围核酸酶PCS 7-8L.197(SEQ ID NO:6)的PCS8-结合区。

#### [0243] 2. CHO细胞报告体分析中PCSK9识别序列的切割

[0244] 为了确定PCS 7-8大范围核酸酶是否可以识别和切割它们各自的识别序列(分别为SEQ ID NO:4),使用先前描述的CHO细胞报告体分析(参见W02012/167192和图3)评估每种工程化大范围核酸酶。为了进行测定,产生携带整合至细胞基因组中的非功能性绿色荧光蛋白(GFP)基因表达盒的CHO报告细胞系。每个细胞系中的GFP基因被一对识别序列中断,使得通过大范围核酸酶对识别序列的细胞内切割将刺激同源重组事件,从而产生功能性GFP基因。

[0245] 在为该研究开发的CHO报告细胞系中,插入到GFP基因中的一个识别序列是PCS 7-8识别序列(SEQ ID NO:4)。插入GFP基因中的第二识别序列是CHO-23/24识别序列,其被称

为“CHO-23/24”的对照大范围核酸酶识别和切割。包含PCS 7-8识别序列和CHO-23/24识别序列的CHO报告细胞称为“PCS 7-8细胞”。

[0246] 用编码其相应的工程化大范围核酸酶(例如,用编码PCS 7-8大范围核酸酶的质粒DNA转染PCS 7-8细胞)或编码CHO-23/34大范围核酸酶的质粒DNA转染CHO报告细胞。在每次测定中,根据制造商的说明书,使用Lipofectamine 2000 (ThermoFisher) 在96孔板中用50ng质粒DNA转染 $4 \times 10^5$  CHO报告细胞。在转染后48小时,通过流式细胞术评估细胞以确定与未转染的阴性对照(PCS bs)相比的GFP阳性细胞的百分比。如图4A-4C中显示的,发现所有PCS 7-8大范围核酸酶在包含相应识别序列的细胞系中以显著超过阴性对照的频率产生GFP阳性细胞。

[0247] PCS 7-8大范围核酸酶的效率也在大范围核酸酶引入CHO报告细胞后以时间依赖性的方式测定。在该研究中,根据制造商的说明书使用BioRad Gene Pulser Xcell,PCS 7-8细胞( $1.0 \times 10^6$ )用每细胞 $1 \times 10^6$ 拷贝的大范围核酸酶mRNA电穿孔。在转染后的指定时间点,通过流式细胞术评估细胞以确定GFP阳性细胞的百分比。在每个时间点还包括CHO-23/24大范围核酸酶作为阳性对照。

[0248] 如图5A-5C所示,在研究的整个时间过程中,由不同的PCS 7-8大范围核酸酶产生的%GFP是一致的,表明持续的切割活性和在细胞中没有任何实质性的毒性。

### [0249] 3. 结论

[0250] 这些研究证明,本发明包括的PCS 7-8大范围核酸酶可以在细胞中有效地靶向和切割它们各自的识别序列,该效应随时间保持一致,并且核酸酶对细胞是非毒性的。

### [0251] 实施例2

#### [0252] HEK293细胞中PCS7-8识别序列的切割

##### [0253] 1. 实验方案和T7E分析

[0254] 该研究证明,本发明包括的PCS 7-8大范围核酸酶可以切割HEK293细胞中的PCS 7-8识别序列。

[0255] 根据制造商的说明使用BioRad Gene Pulser Xcell, $2 \times 10^6$  293细胞用2.7ug的给定PCS大范围核酸酶mRNA电穿孔。在转染后2和5天,从细胞收获基因组DNA(gDNA),并进行T7核酸内切酶I(T7E)分析以估算内源PCS 7-8识别序列处的遗传修饰(图6)。在T7E分析中,使用位于PCS 7-8识别序列侧翼的引物通过PCR扩增PCS 7-8基因座。如果在PCS 7-8位点内存在插入缺失突变(随机插入或缺失),则所得的PCR产物由野生型等位基因和突变型等位基因的混合物组成。使PCR产物变性并使其缓慢地再退火。缓慢再退火允许形成由野生型和突变等位基因组成的异源双链体,导致错配的碱基和/或凸起。T7E1酶在错配位点裂解,从而产生裂解产物,其可通过凝胶电泳可视化。

### [0256] 2. 结果

[0257] 在转染后第2天和第5天,在接受PCS 7-8x.66和PCS 7-8x.88的细胞中观察到较低分子量的DNA片段,而模拟转染的或转染编码GFP对照的mRNA的细胞仅显示全长PCR产物(图6)。这些较低分子量的DNA片段是T7核酸内切酶I在PCS识别位点上的由大范围核酸酶活性引起的错配DNA处的切割产生的。

### [0258] 3. 结论

[0259] T7核酸内切酶I分析检测了用PCS 7-8大范围核酸酶处理的HEK293细胞中PCS 7-8

大范围核酸酶识别位点周围插入缺失突变的存在,其表明,靶位点被切割和该位点被非-同源末端连接(NHEJ)的易错修复。

[0260] 实施例3

[0261] 深度测序以观察PCS 7-8识别序列的插入缺失突变

[0262] 1.深度测序方案

[0263] 为了直接观察在预期的PCS 7-8大范围核酸酶靶位点处的插入或缺失,使用了深度测序方案。根据制造商的说明使用BioRad Gene Pulser Xcell,  $2 \times 10^6$  HEK 293细胞用5 $\mu$ g PCS 7-8大范围核酸酶mRNA电穿孔。还进行了无mRNA的模拟电穿孔。转染后48小时,从细胞收获基因组DNA (gDNA)。使用位于PCS 7-8识别序列侧翼的引物通过PCR扩增PCS 7-8基因座。在琼脂糖凝胶上电泳该扩增子以进行视觉确认,使用Macherey-Nagel Nucleospin凝胶和PCR纯化试剂盒进行提取,并使用来自New England Biolabs的Illumina的NEBNext Ultra II DNA库试剂盒制备测序文库。配对末端测序文库在Illumina Miseq DNA测序仪上读取。使用自定义脚本分析测序数据。起点或终点不在全长扩增子的25bp内的阅读片段被除去。通过将具有并了识别序列的中间8bp中至少一个的插入缺失突变的全长阅读片段的数目除以全长阅读片段的总数来计算具有插入缺失突变的阅读片段的百分比。

[0264] 2.结果

[0265] 如表3所示,与模拟处理相比,通过深度测序评估的各个PCS 7-8大范围核酸酶在其预期的识别位点处的插入缺失突变百分比增加至少100倍。

[0266] 表3.

[0267]	大范围核酸酶	%插入缺失
	模拟	0.40%
	PCS 7-8x.88	53.98%
	PCS 7-8L.209	53.16%
	PCS 7-8L.268	52.51%
	PCS 7-8L.261	55.35%
	PCS 7-8L.204	58.36%
	PCS 7-8L.197	56.53%
	PCS 7-8L.262	53.45%

[0268] 3.结论

[0269] 这些实验清楚地证明了本发明的PCS 7-8大范围核酸酶在HEK 293细胞中切割其预期的靶位点(即,PCS 7-8识别序列)并通过非同源末端连接的易错修复而诱导插入缺失突变的出现。

[0270] 实施例4

[0271] 使用PCS 7-8大范围核酸酶的体内灵长动物肝脏的基因编辑

[0272] 1.方法与材料

[0273] 进行实验来评估PCS 7-8大范围核酸酶在非人灵长动物模型中体内编辑肝细胞中的PCS 7-8识别位点的能力,和测定这种编辑对受试者中PCSK9的血清水平的影响。

[0274] 通过重组AAV载体引入PCS 7-8x.88大范围核酸酶。AAV载体具有AAV8衣壳,并且从5'至3'包含5'反向末端重复序列、肝特异性人甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、内含子、



PCS 7-8x.88大范围核酸酶的编码序列、土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件和3'末端反向重复序列。该载体被称为AAV8.TBG.PI.PCS7-8x.88.WPRE.bGH。

[0275] AAV载体制备成药物组合物,并在第0天以单次输注的形式施用于四只不同的恒河猴,每只约重6.5kg。动物(雄性)RA1866接受单剂量的 $3 \times 10^{13}$ GC/kg,代表了这些研究中评估的最高剂量。动物RA1857(雄性)接受单剂量的 $6 \times 10^{12}$ 基因组拷贝(GC)/kg。动物RA1829(雌性)和动物RA2334(雄性)各自接受单剂量的 $2 \times 10^{12}$ 基因组拷贝(GC)/kg。在第-3天和第0天以及在给药后168天(低剂量动物)或280天(高剂量和中剂量动物)的多个时间点采集血样用于通过ELISA分析血清PCSK9蛋白水平,分析总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯,以及分析丙氨酸转氨酶(ALT)水平。另外,在给药后第17天获得肝活检样品用于PCR分析在PCS 7-8识别序列处的插入和缺失(插入缺失突变),并用于通过原位杂交(ISH)分析肝脏细胞中PCS 7-8x.88大范围核酸酶的表达。

#### [0276] 2. 血清PCSK9蛋白水平的变化

[0277] 在施用AAV载体的第-3天、第0天和在施用AAV载体后的多个时间点通过ELISA测定血清PCSK9蛋白水平。给药后,对高剂量和中剂量动物进行280天的跟踪,而对低剂量动物进行168天的跟踪。

[0278] 如图7所示,在第0天单次施用大范围核酸酶AAV在受试者RA1866、RA1857和RA1829中到第7天时,且在所有组中到第14天时诱导血清PCSK9水平急剧的、剂量依赖性的降低。接受较高剂量的 $3 \times 10^{13}$ GC/kg的受试者RA1866到第7天显示降低约84%,和到第20天降低约91%。接受 $6 \times 10^{12}$ GC/kg剂量的受试者RA1857到第7天时显示降低约46%,和到第20天时约77%。接受 $2 \times 10^{12}$ GC/kg剂量的受试者RA1829到第7天时显示降低约35%,和到第20天时降低约70%。同样接受剂量 $2 \times 10^{12}$ GC/kg的受试者RA2334到第14天显示出降低约35%,其到第20天又回到接近基线的水平,其中观察到降低约10%。

[0279] 评估其他的时间点以测定整个研究过程中蛋白质抑制的持久性。持续观察到血清PCSK9水平的剂量依赖性降低直到所测量的最后时间点。在两个低剂量动物(RA1829和RA2334)中,在第168天连续观察到约25%的降低。在中剂量动物(RA1857)中,在第280天连续观察到约50%的降低。在高剂量动物(RA1866)中,在第280天连续观察到约85%的降低。

[0280] 总体而言,在整个观察过程中血清PCSK9水平的降低似乎是剂量依赖性的,直到每个受试者的研究结束,降低一直持续。

#### [0281] 3. 血清胆固醇、LDL、HDL和甘油三酯水平的变化

[0282] 也在第-3天,第0天和施用AAV载体后的多个时间点测定了PCS 7-8大范围核酸酶治疗对血清胆固醇、LDL、HDL和甘油三酯水平的影响。

[0283] 显著地,所有四只动物的总LDL水平通过PCS 7-8大范围核酸酶的治疗降低(图8A)。到第20天,所有四只动物显示出血清LDL的显著降低,并且在整个研究过程中降低以剂量依赖的方式持续。在第168天,动物RA2334表现出约25%的降低,而在同一时间点,另一低剂量动物RA1829表现出约35%的较大降低。当在研究的第268天测量时,动物RA1857(中剂量)和RA1866(最高剂量)各自表现出约70%的降低。

[0284] 值得注意的是,在研究的第28天至第42天之间,在每只动物中观察到LDL水平的短暂升高。这与在同一时间点观察到的ALT水平变化是一致的(图9),并且可能是针对大范围核酸酶或AAV衣壳的T细胞活化所导致的。

[0285] 图8B-8E对于每只动物显示了研究过程中总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯的变化。如图所示,在高剂量(RA1866)和中剂量(RA1857)动物中的总胆固醇水平明显降低,而在较低剂量动物中观察到较小的影响。高剂量动物的HDL也有所降低,而其他三个则相对稳定。对于每只动物,在研究过程中观察到甘油三酯水平的瞬时变化,但在最后测量时间点保持在近似基线水平。

#### [0286] 4. 体内肝脏细胞的大范围核酸酶表达和基因编辑

[0287] 在第17天获取肝活检样品,并检查在PCS 7-8识别序列处插入或缺失(插入缺失突变)的存在。通过使用识别序列侧翼的PCR引物,基因组中间区域的扩增以及所得PCR产物的测序来检测插入缺失突变。在PCS 7-8识别序列处以不同的频率检测到多种插入缺失突变(不同长度的插入和缺失)。图10提供了受试者RA1857和RA1866中八个最常观察到的插入缺失突变及其各自的频率。这八个插入缺失突变占到在受试者RA1857中观察到的插入缺失突变的73%和在受试者RA1866中观察到的插入缺失突变的66%。

[0288] 为了确认PCS 7-8x.88大范围核酸酶确实在体内肝脏细胞中表达,通过原位杂交(ISH)检查在第17天和第129天获得的肝活检样品。设计了荧光标记的寡核苷酸探针,并与来自每个受试者的活检肝脏细胞中的PCS7-8x.88mRNA结合。在没有寡聚探针的情况下对来自另一受试者M11657的活检细胞进行模拟处理作为对照。如图11所示,在模拟处理的细胞中未观察到荧光信号(图11A)。但是,在第17天,在治疗的受试者的肝脏细胞中观察到了明显的荧光(图11B-E)。因此,很明显,在观察到插入缺失突变形成并且检测到血清PCSK9和血清脂质降低的早期时间点,治疗的受试者中PCS 7-8x.88大范围核酸酶mRNA强烈表达。图11进一步显示,当进行第二次肝活检时,在研究的第129天不再观察到大范围核酸酶mRNA的表达。

#### [0289] 5. PCS 7-8L.197大范围核酸酶的治疗

[0290] 进行进一步的研究以确定优化的、第二代PCS 7-8L.197大范围核酸酶的有效性。研究方案与先前描述的相似。经由重组AAV载体引入PCS 7-8L.197大范围核酸酶。该AAV载体具有AAV8衣壳,并从5'至3'包含5'反向末端重复序列、肝特异性人甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、内含子、PCS 7-8L.197大范围核酸酶的编码序列、土拨鼠肝炎病毒(WHP)转录后调控元件和3'反向末端重复序列。将AAV载体制备成药物组合物,并在第0天以单次输注的形式以 $6 \times 10^{12}$ 基因组拷贝(GC)/kg的单剂量施用于一只雄性和一只雌性恒河猴,各自体重约6.5kg。在给药后第0天和第7天收集初始血样用于通过ELISA分析血清PCSK9蛋白水平和分析总LDL水平。

[0291] 如图12所示,到研究的第7天,PCSK9血清水平在两个受试者中迅速和急剧降低。在受试者RA2125中,PCSK9水平从第0天的约180ng/mL降低至第7天的约55ng/mL(下降约70%)。在受试者RA2343中,PCSK9水平从第0天的约245ng/mL降低至第7天的约125ng/mL(下降约49%)。到施用大范围核酸酶AAV后的182天PCSK9水平的降低持续,每个受试者继续表现出约60%的降低。

[0292] 图13A显示在治疗的7天内,血清PCSK9水平的降低伴随着血清LDL水平的显著降低。在受试者RA2125中,血清LDL水平从第0天的约40mg/dL降低到第7天的约25mg/dL(降低约38%)。在受试者RA2343中,血清LDL水平从第0天的约75mg/dL降低到第7天的约55mg/dL(降低约27%)。血清LDL水平到第21天和第28天持续下降,与基线相比下降了约65%。血清

LDL的降低持续到研究的第168天,此时受试者RA2125和RA2343分别表现出约35%和50%的大致稳定的降低。

[0293] 图13B和13C中显示了对于每只动物在研究过程中总胆固醇、HDL、LDL和甘油三酯的变化。如图所示,在整个研究中,每个受试者的总胆固醇水平适度降低,受试者RA2343中更是如此。在整个研究过程中,每个受试者的HDL和甘油三酯水平基本不变。与施用PCS 7-8x.88AAV类似,在第28天至第42天之间,在受试者RA2125中观察到血清脂质的短暂增加,这与ALT的升高相一致(图14),并且可能是由于针对大范围核酸酶或AAV衣壳的T细胞活化引起的。

[0294] 为了确认PCS 7-8L.197大范围核酸酶在体内肝脏细胞中的表达,通过原位杂交(ISH)检查在第18天和第129天获得的肝活检样品。设计了荧光标记的寡核苷酸探针,并与来自每个受试者的活检肝脏细胞中的PCS 7-8L.197mRNA结合。如图15所示,在第18天,在治疗受试者的肝脏细胞中观察到明显的荧光。因此很明显,在检测到血清PCSK9和血清脂质降低的早期时间点,PCS7-8L.197大范围核酸酶mRNA在治疗受试者中强表达。图15进一步显示,当进行第二次肝活检时,在研究的第128天不再观察到大范围核酸酶mRNA的表达。

#### [0295] 6. 中靶基因组编辑的分子评估

[0296] 通过锚定多重PCR测序(AMP-seq)产生的扩增子的深度测序,表征从肝活检样品分离的DNA在指定的rhPCSK9外显子7靶位点上的中靶编辑(on-target editing)。AMP扩增子使用嵌套的、基因座特异性引物生成,其中正向引物与靶向的大范围核酸酶切割位点上游50bp的固定位置杂交,和扩增子的3'端由扩增前基因组DNA的随机剪切后的DNA片段长度确定。

[0297] 在所有肝脏样品中,发现通过AMP测序观察到的短插入和缺失的频率高于在阴性对照(即,来自天然动物的PBMC样品)中观察到的频率(图16)。对于PCS 7-8x.88大范围核酸酶, d129通过AMP-seq检测的插入缺失突变的频率在高剂量下为46%,在低剂量下与剂量成比例地降低至13%(平均, n=2)。考虑到由于使用AAV8血清型和TBG启动子而仅对原代肝细胞选择性编辑,由于肝活检样品中存在未编辑的污染性非实质细胞,AMP-seq可能低估了中靶基因组编辑的总频率。除高剂量(其中存在升高)外,所有动物在两个时间点(即d17和d129)之间的编辑事件总数略有下降。每个样本中插入的总数超过了缺失的总数,尽管随着时间出现不同程度的变化。对于高剂量和中剂量动物,发现缺失的频率随时间增加,而在低剂量动物中随时间降低,而对于每个分析的样品,插入的频率随时间不断降低。从用PCS 7-8L.197AAV治疗的受试者获得的样品的相似中靶分子分析显示与接受中等剂量AAV的受试者RA1857观察到的相似的插入缺失突变谱和频率。

#### [0298] 7. 结论

[0299] 从这些研究中清楚的是,如通过ISH观察到的,PCS 7-8大范围核酸酶在体内灵长动物肝脏细胞中成功表达,并随后在PCS 7-8识别序列处产生了切割位点。然后在切割位点处的易错、非同源的末端连接导致许多插入缺失突变,如通过该位点的PCR分析和AMP-seq分析所观察到的,这抑制了PCSK9蛋白的表达,如通过ELISA所观察到的。这些研究是发明人已知在灵长动物肝脏中首次报道的基因编辑的观察结果。此外,这是在灵长动物中PCSK9基因的基因编辑的首次观察,其伴随着血清PCSK9蛋白水平、血清LDL水平和总胆固醇水平的显著且持续的降低。发明人认识到,在这些实验中施用的AAV的剂量是相对高的,并且将进

一步以显著较低的剂量和另外的PCS 7-8大范围核酸酶进行实验以确定功效和安全性特征。为了用于降低胆固醇的这种方法的临床前验证,还将进行总血清胆固醇水平、血清LDL水平和肝细胞LDL水平的进一步分析。

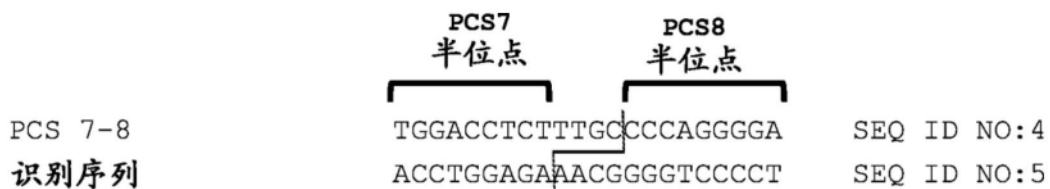


图1

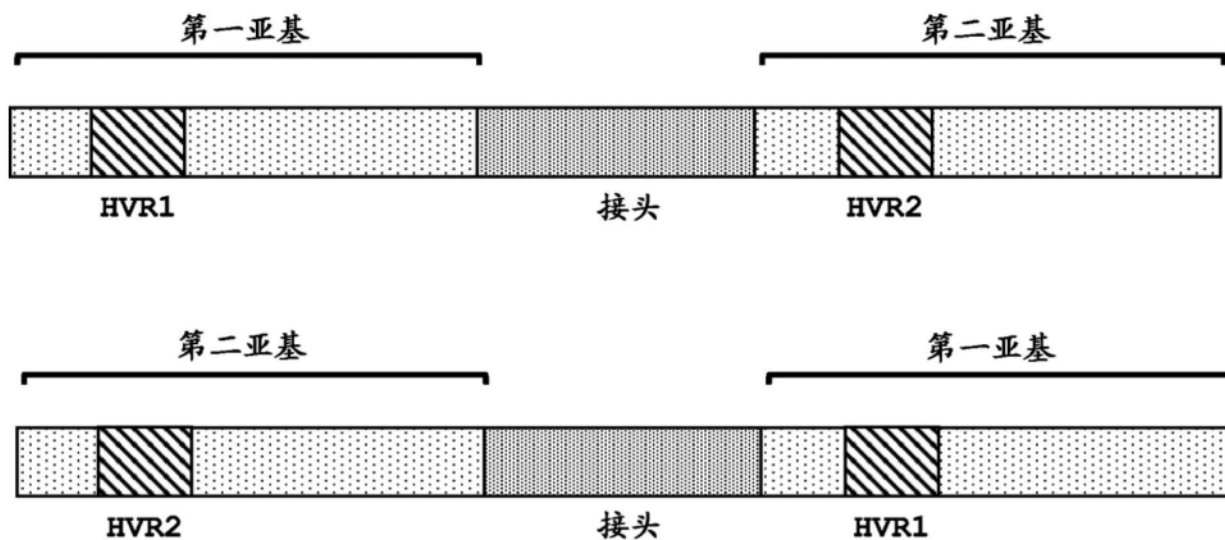


图2

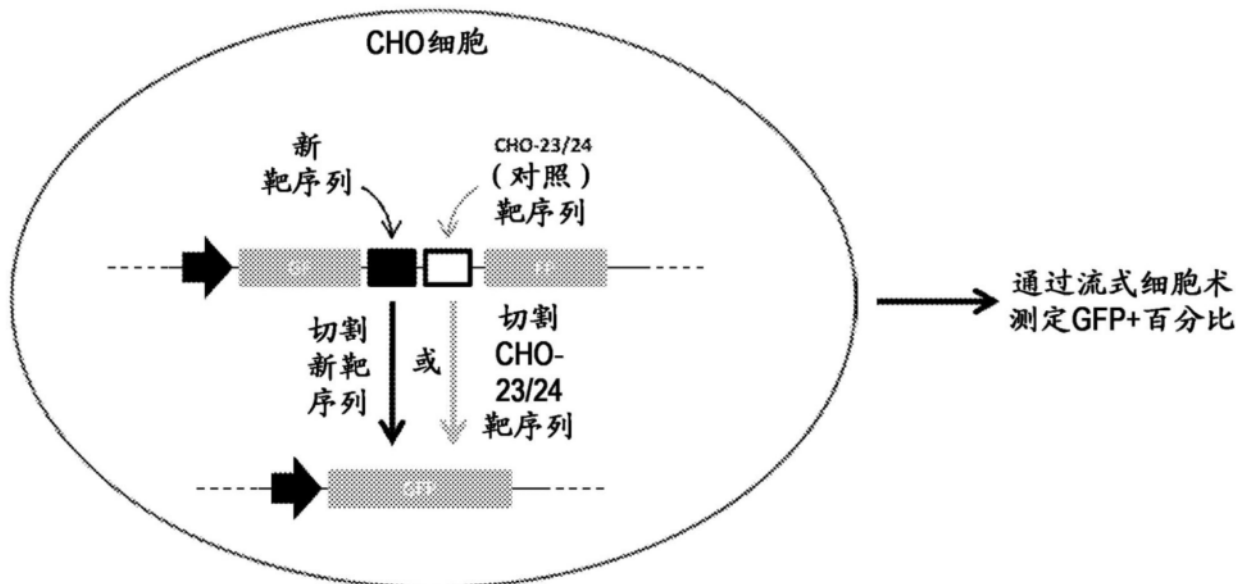


图3

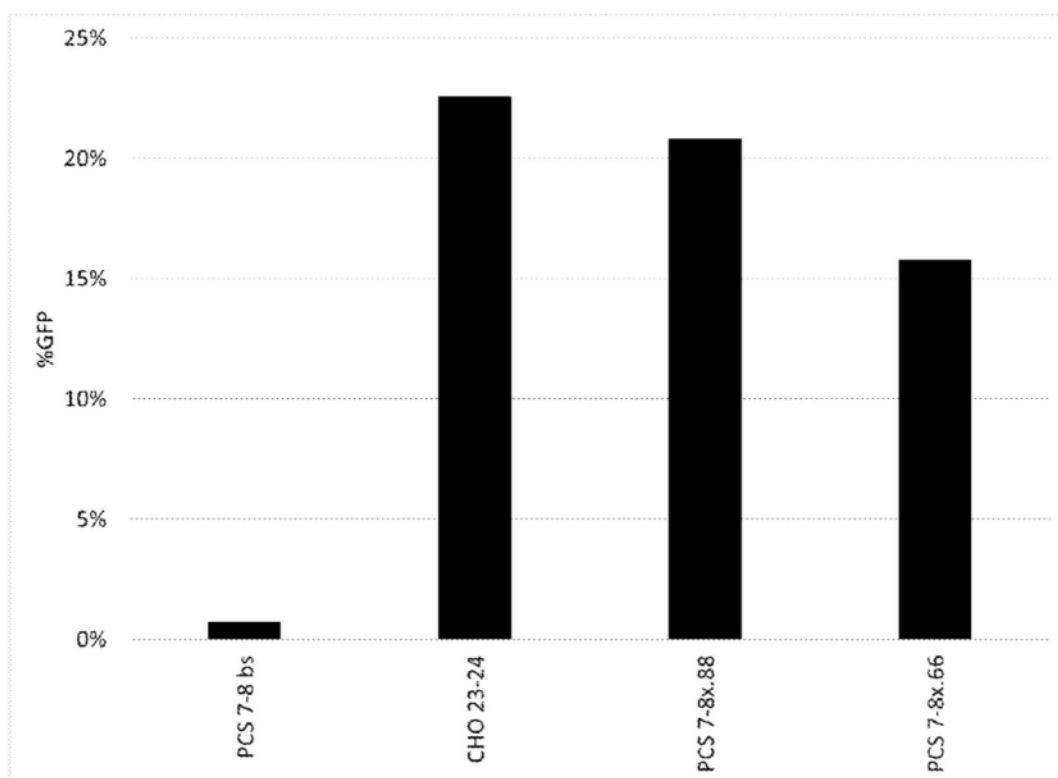
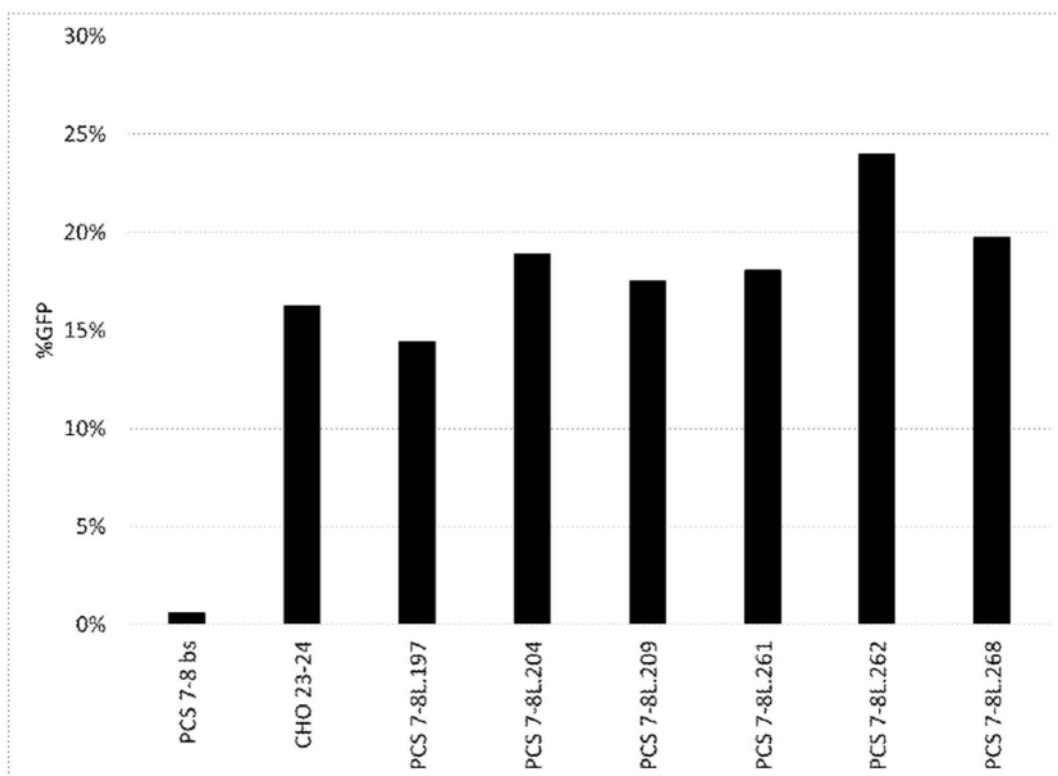
**A.****B.**

图4

C.

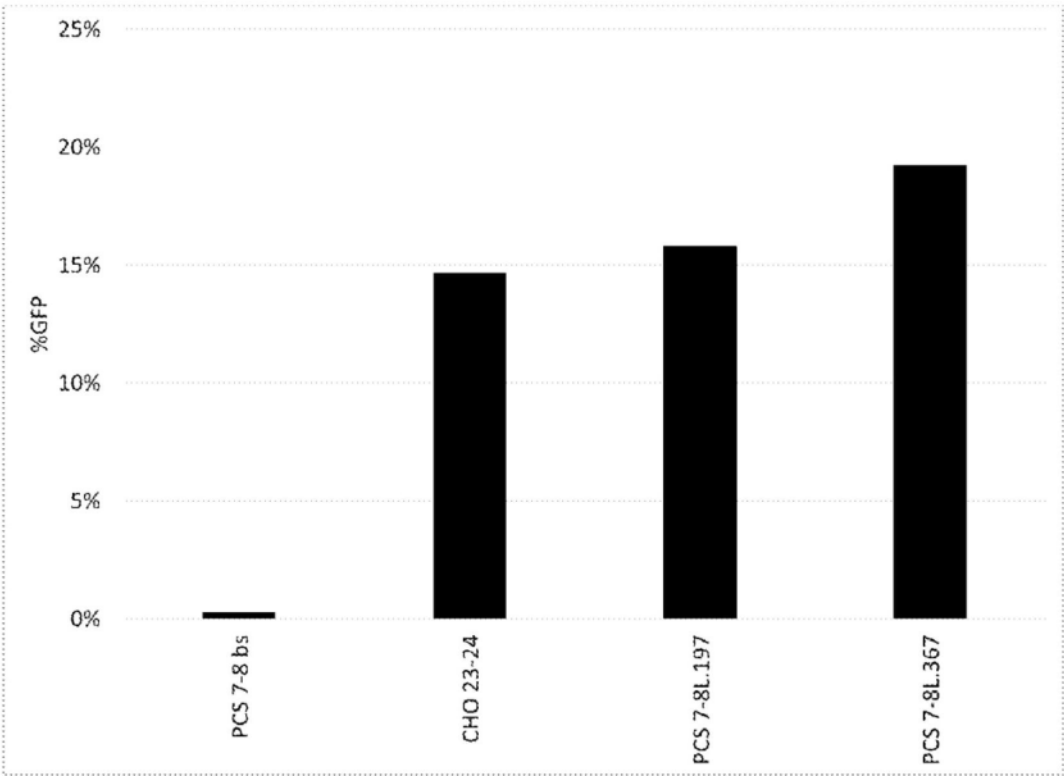


图4 (续)

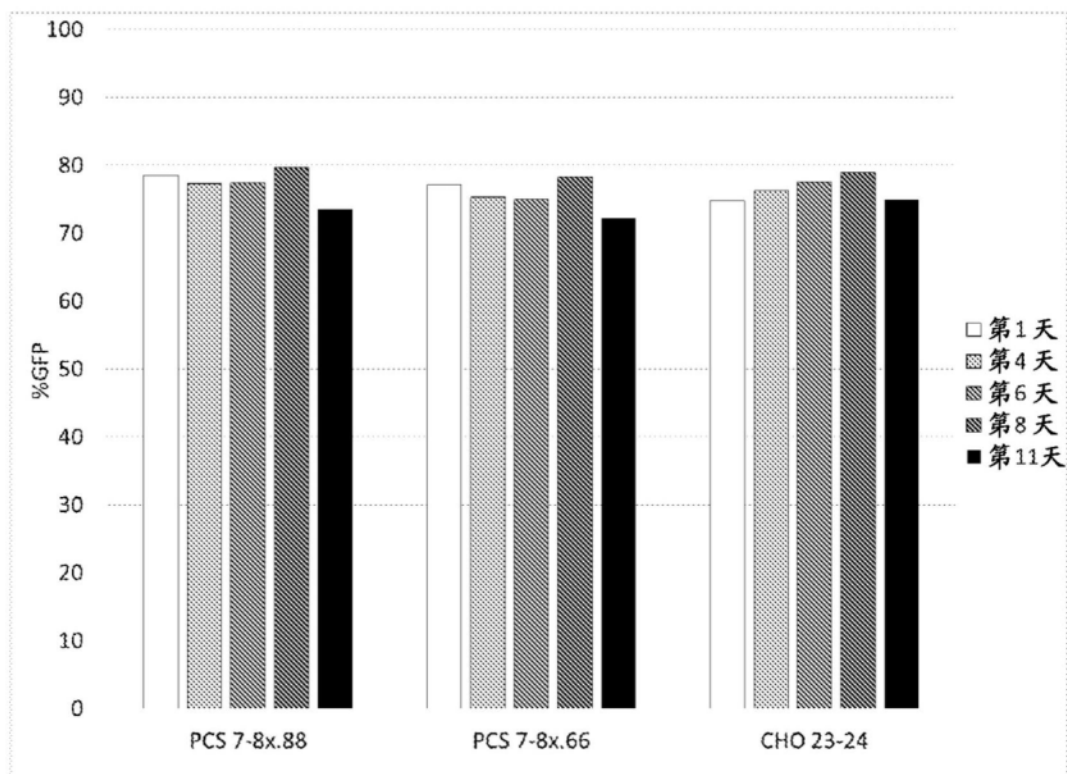
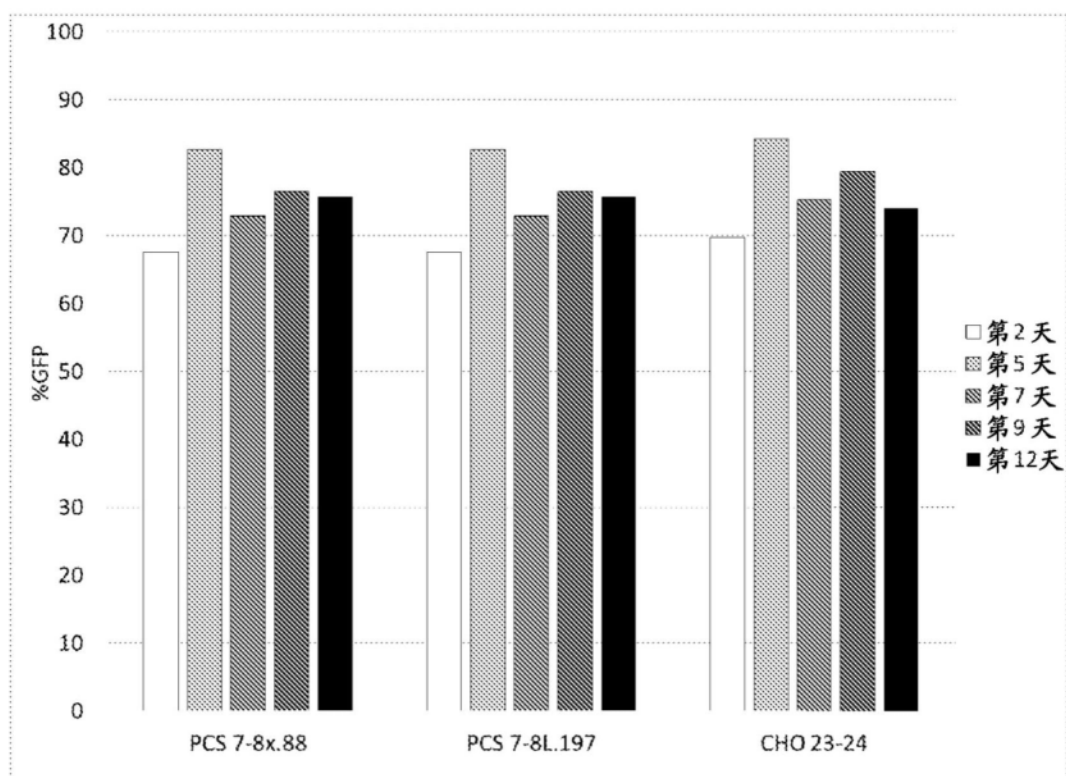
**A.****B.**

图5



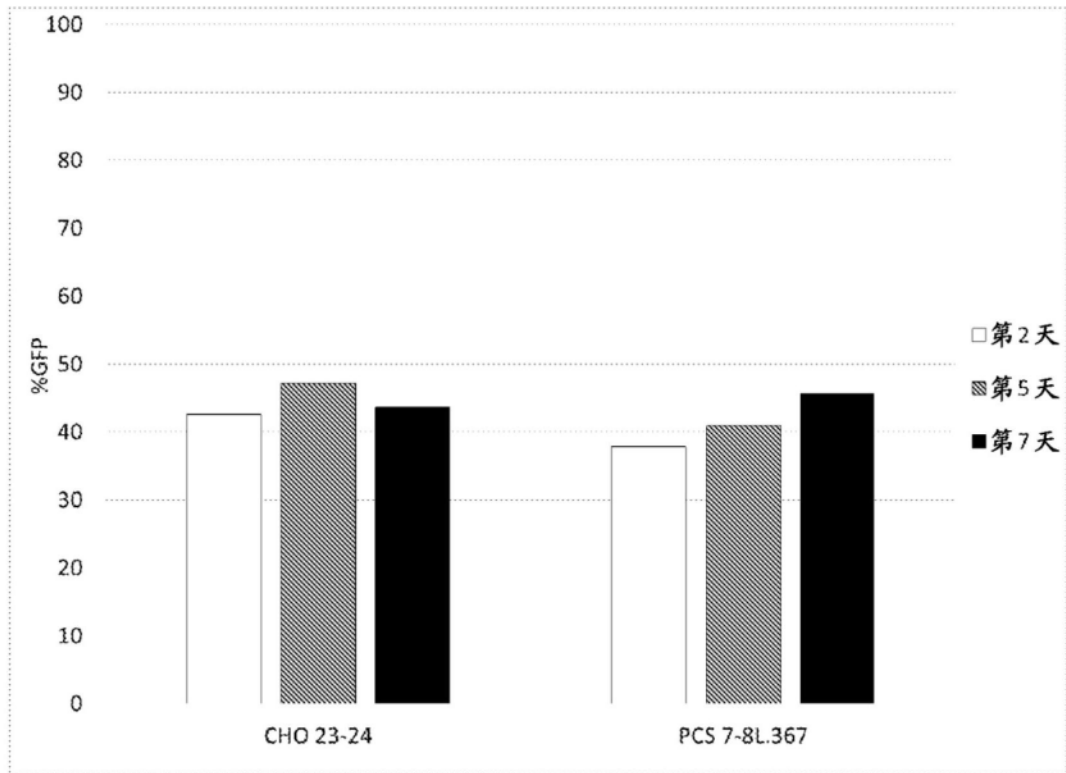
**C.**

图5 (续)

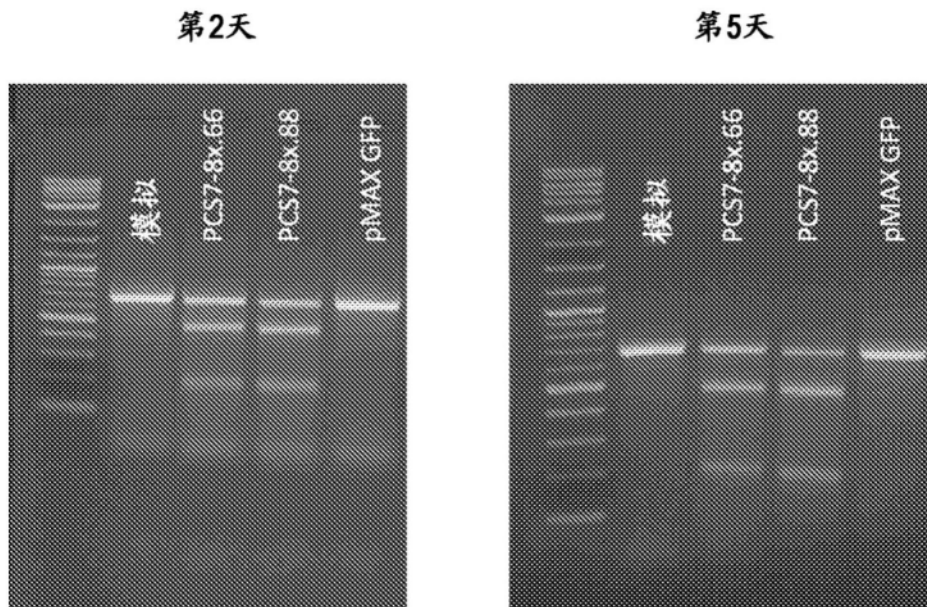


图6

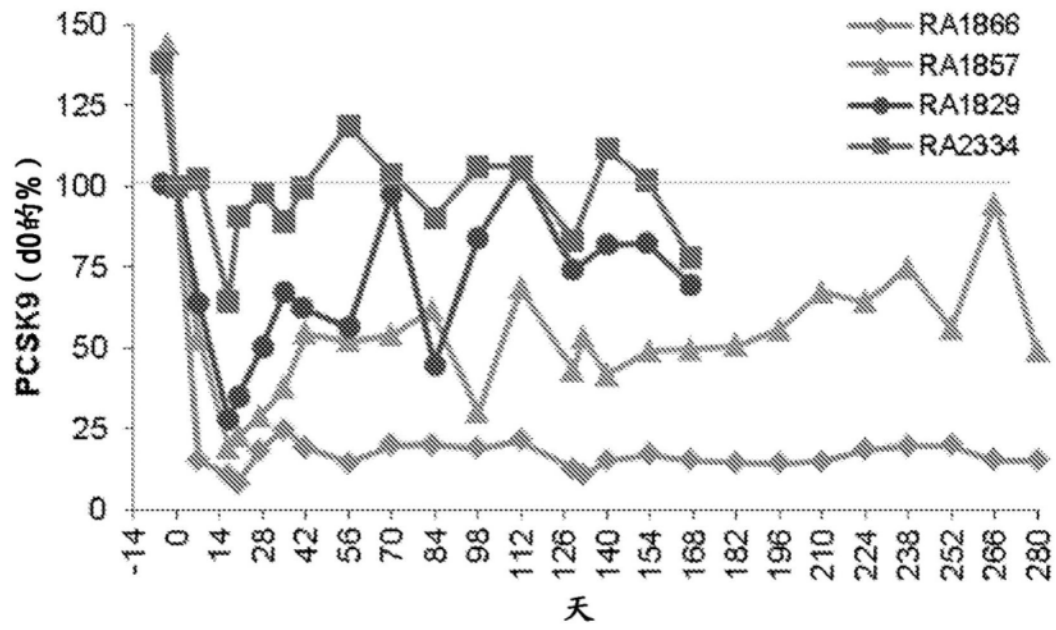


图7

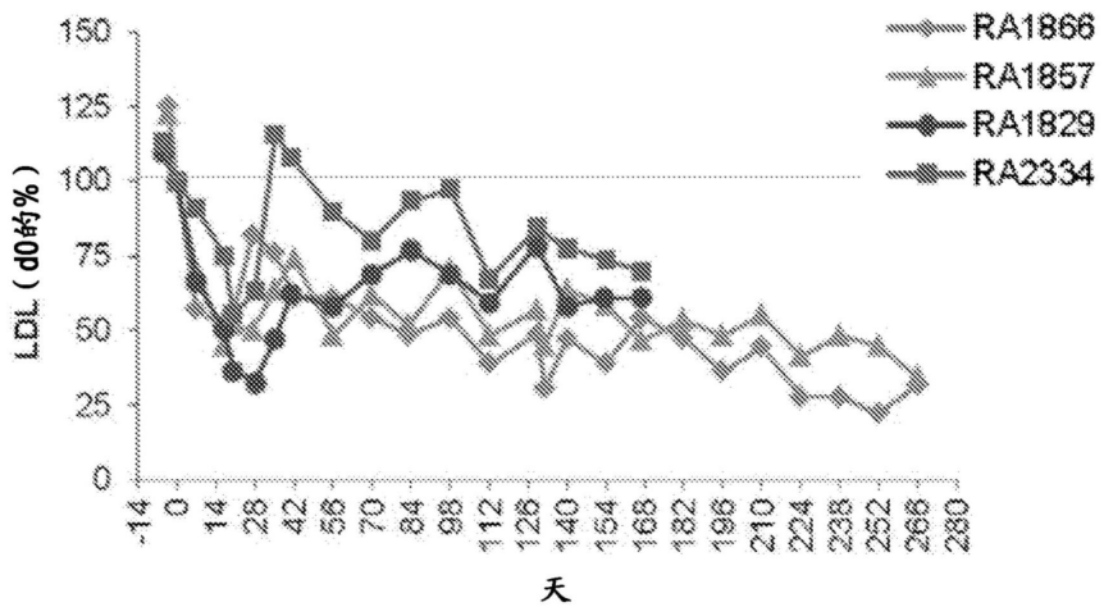
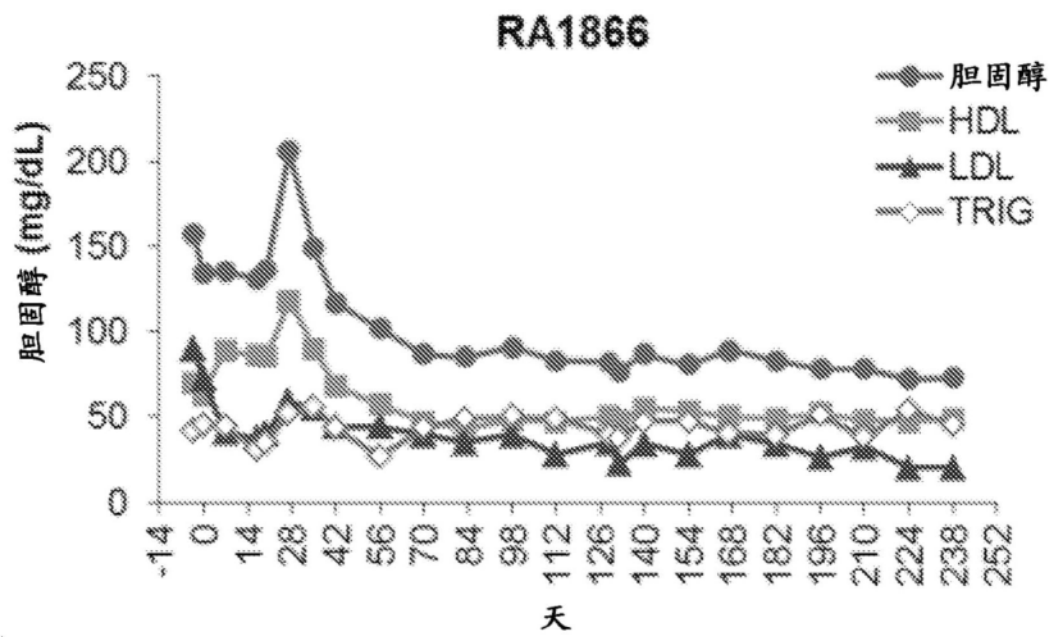
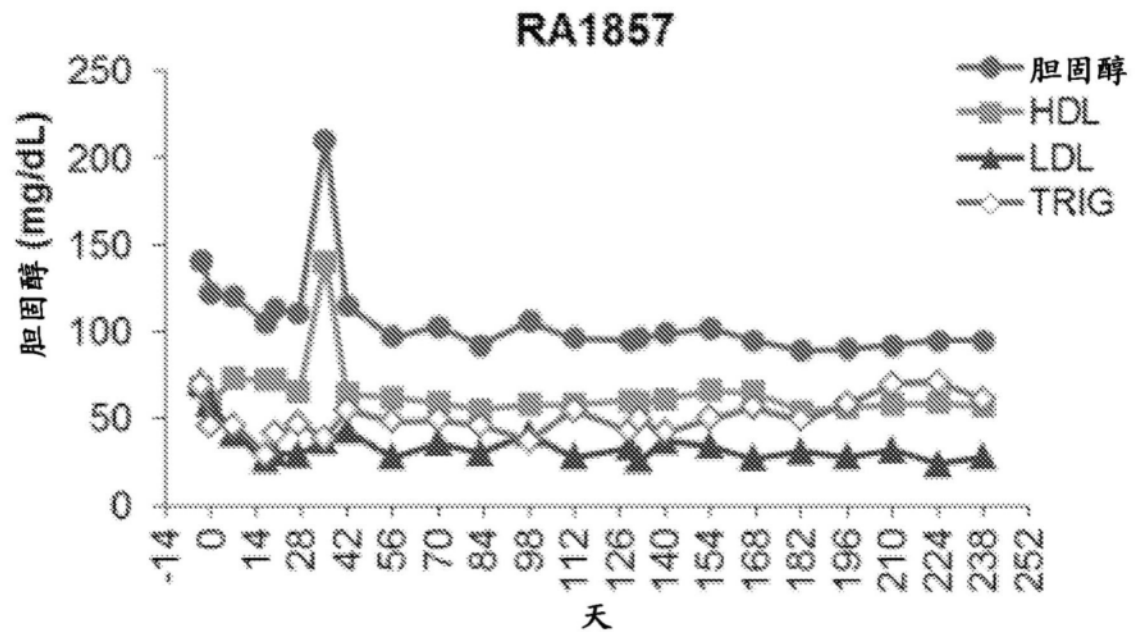
**A.****B.**

图8

C.



D.

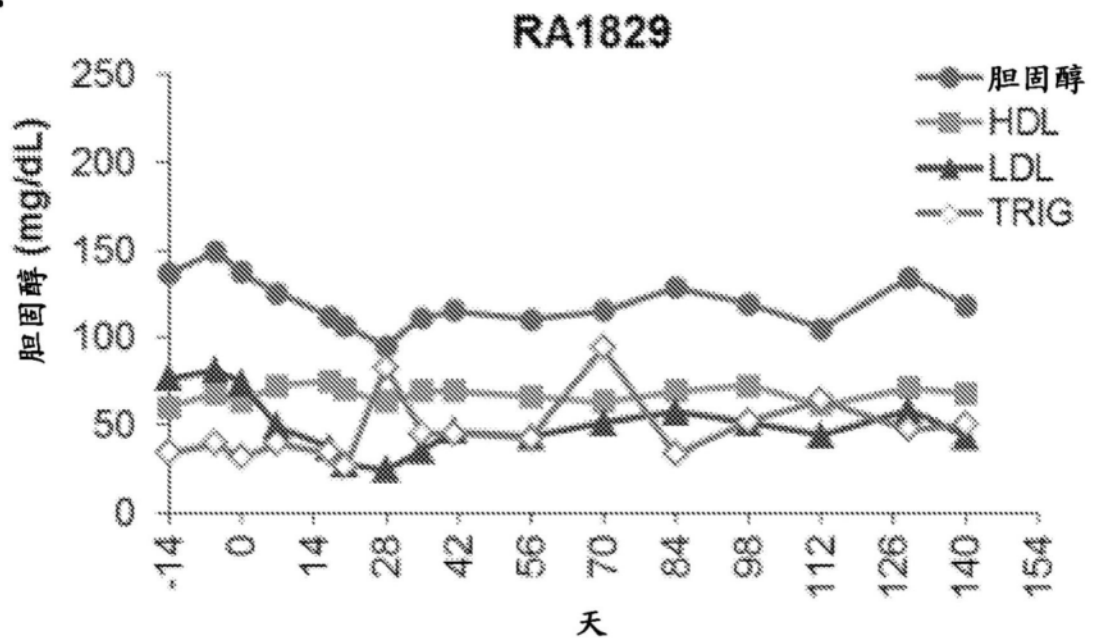


图8(续)

E.

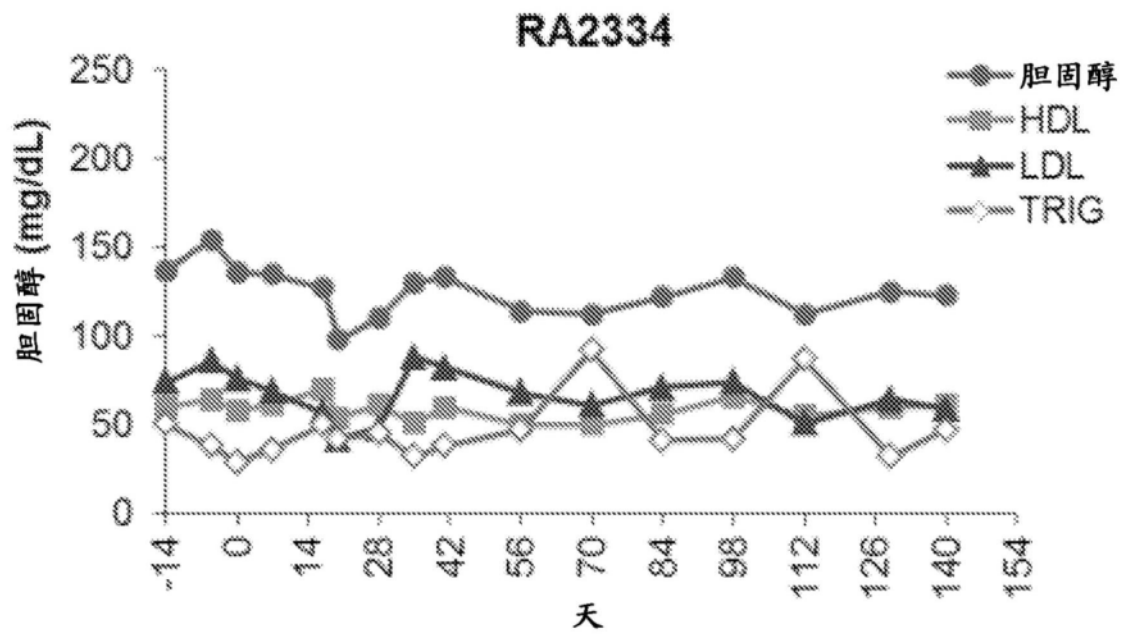


图8(续)

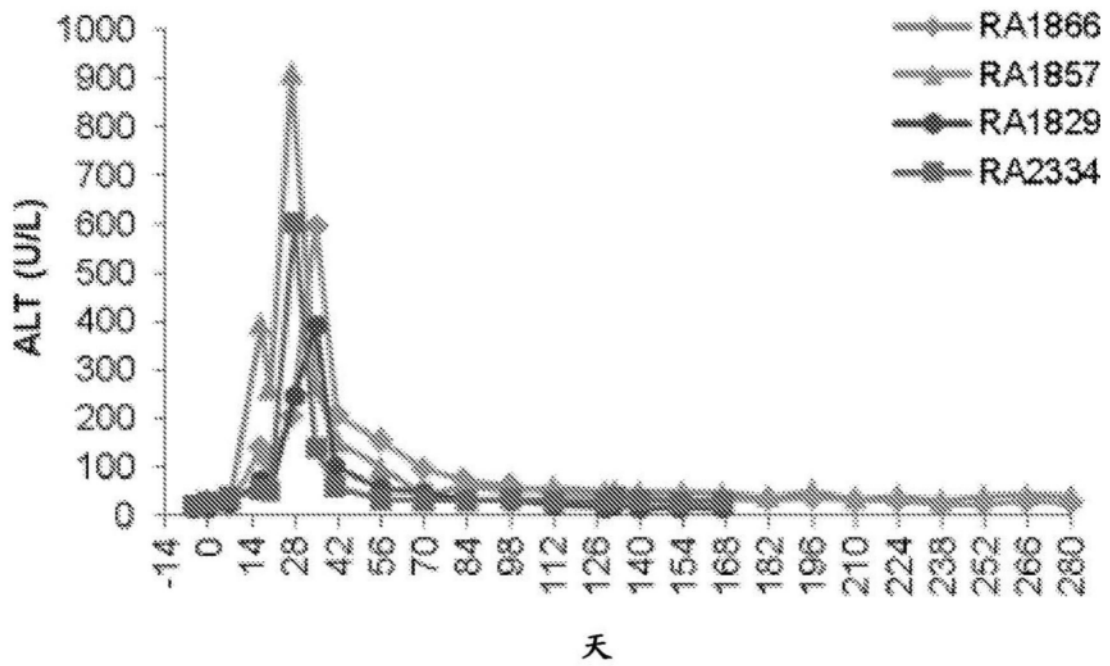
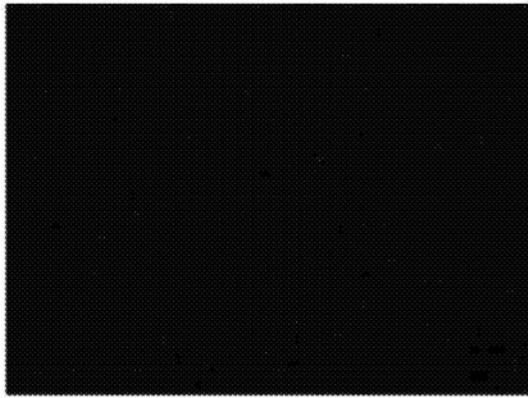


图9

	野生型或Indel序列	SEQ ID NO:	Indel频率	
			RA1857	RA1866
野生型	TGGACCTCTTT-GCCCCAGGGGA	4	-	-
前8个最高频率的 Indel序列	TGGACCTCTTT-G---CAGGGGA	33	3.41	1.88
	TGGACC-CTTT-GCCCCAGGGGA	34	1.83	1.45
	TGGACCTCTTT-GC-CCAGGGGA	35	1.73	1.03
	TGGACCTCTTTTGCCCCAGGGGA	36	1.46	0.84
	TGGACCTCTTT-GC--CAGGGGA	37	1.1	0.71
	TGGACCTCTT----CCCAGGGGA	38	0.98	0.64
	TGGACCTCTTT----CCAGGGGA	39	0.49	0.32
	TGGACCTCTT-----CCAGGGGA	40	0.4	0.29

图10

**A.**

M11657 (对照)

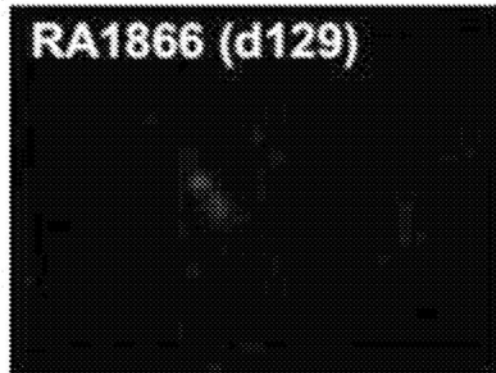
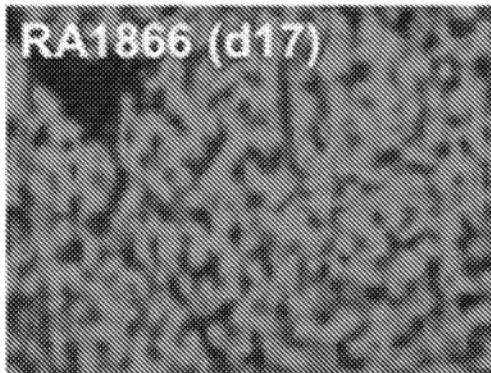
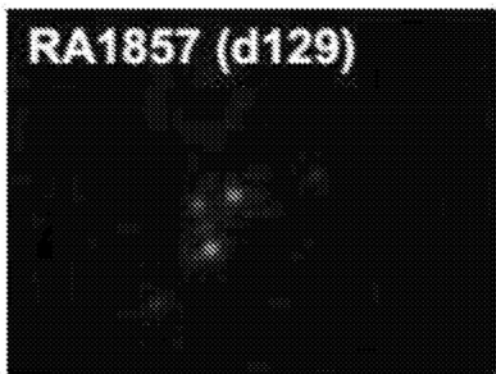
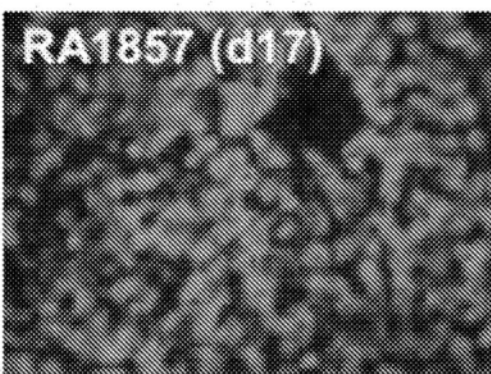
**B.****C.**

图11

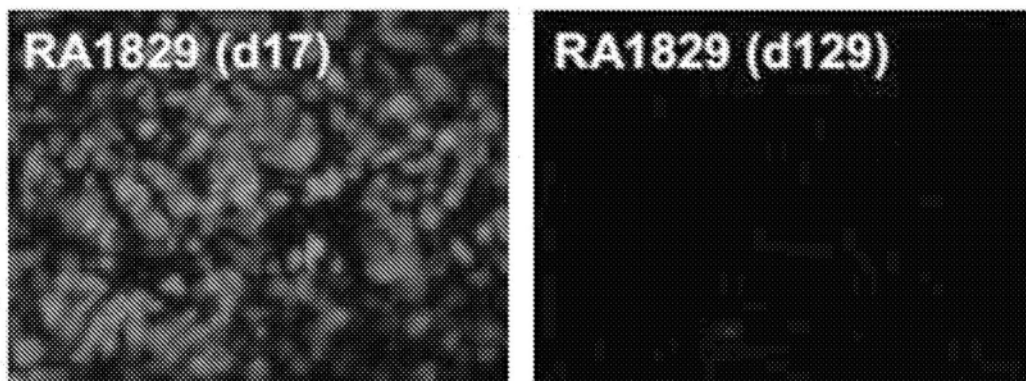
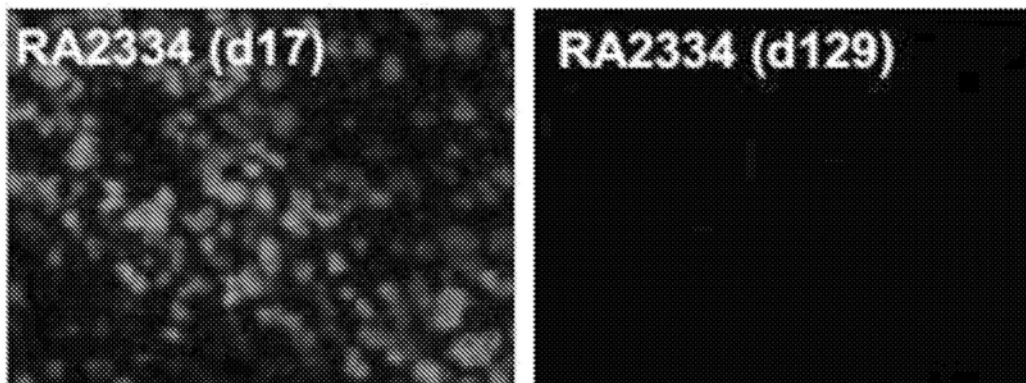
**D.****E.**

图11 (续)



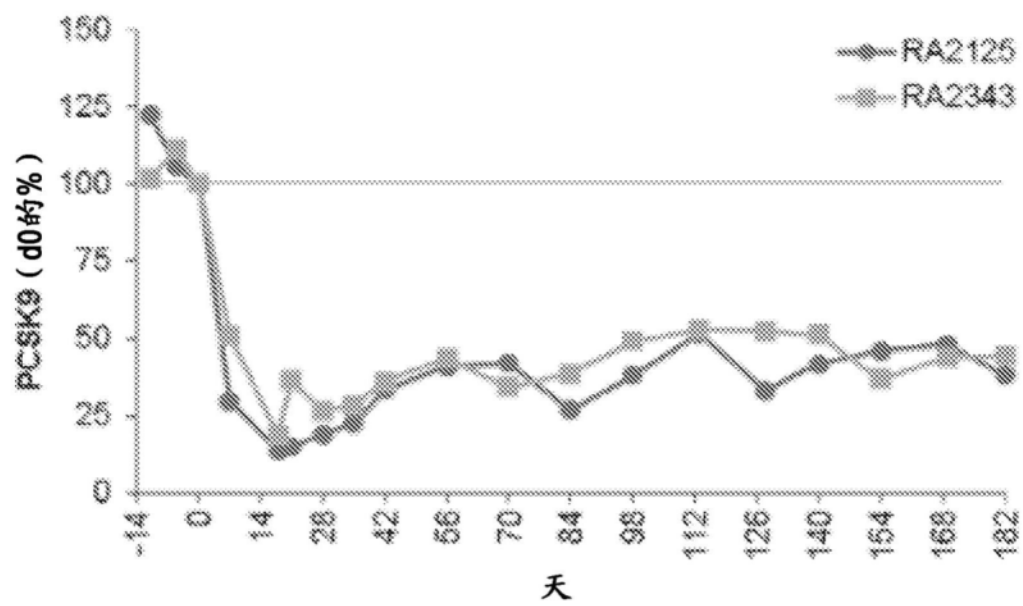


图12

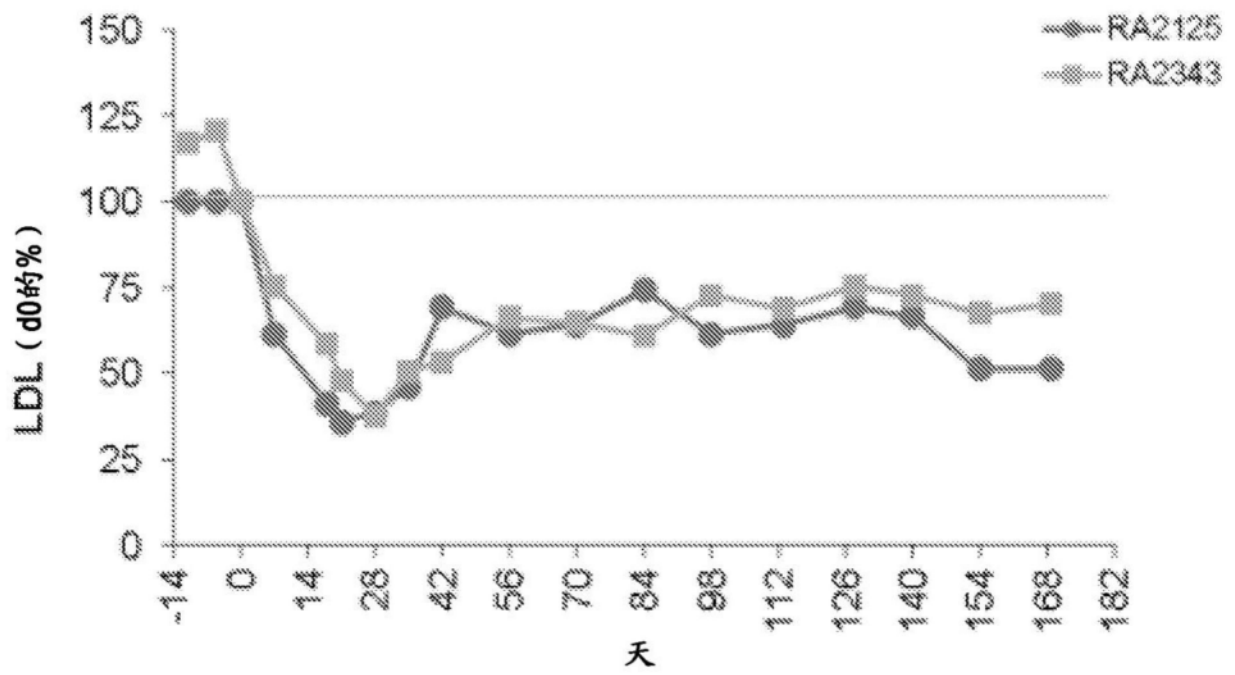
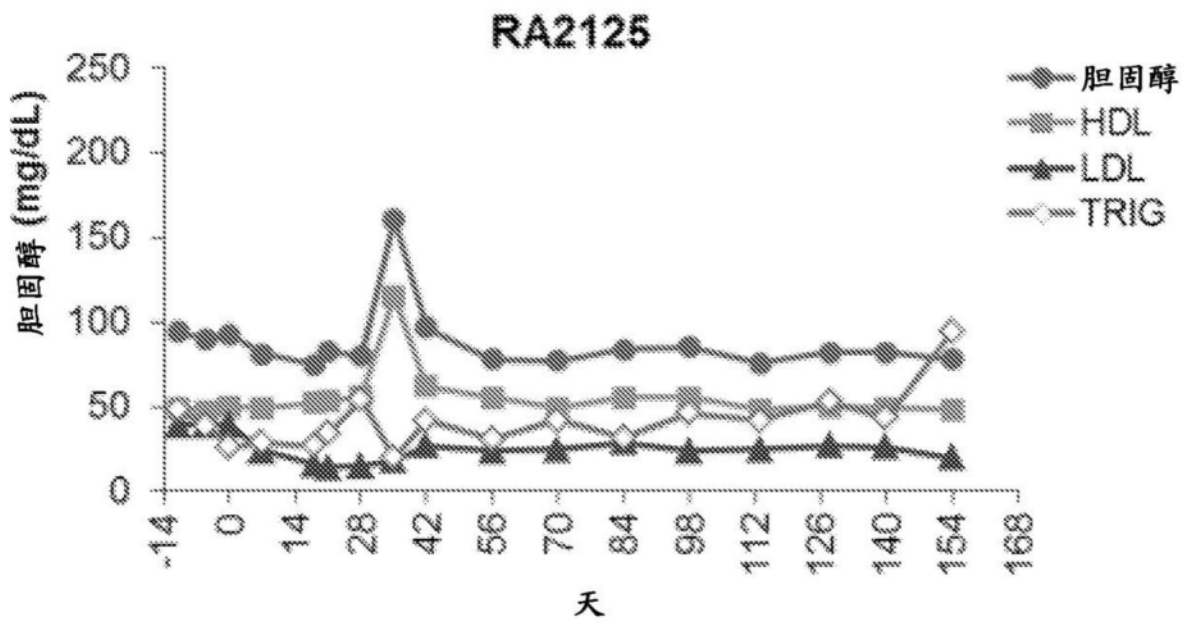
**A.****B.**

图13

C.

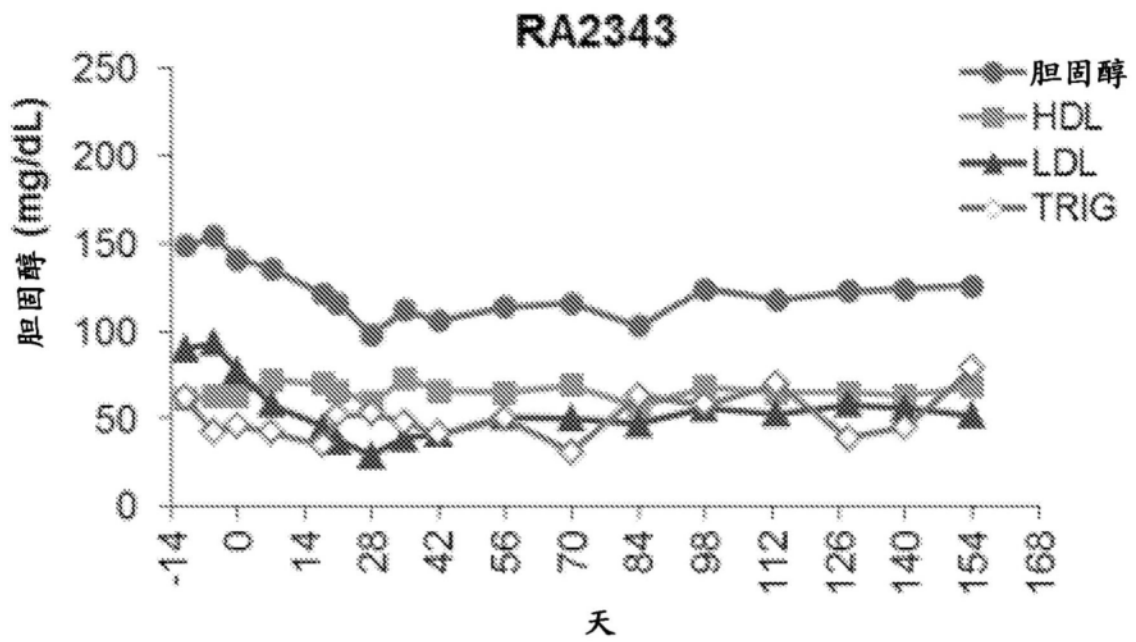


图13(续)

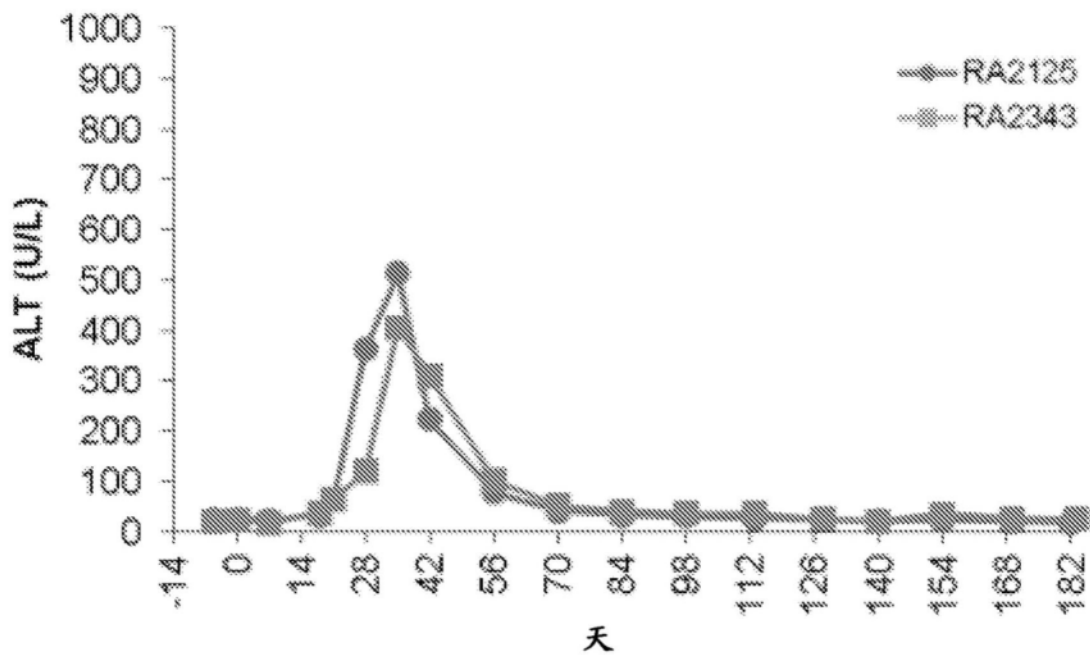


图14

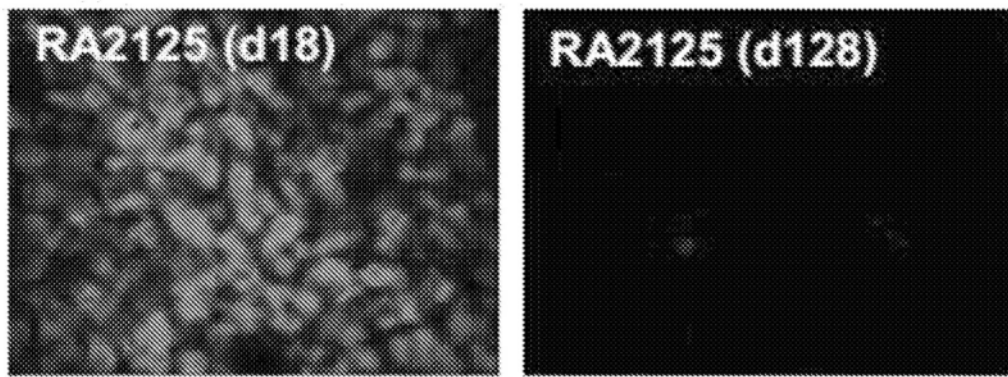
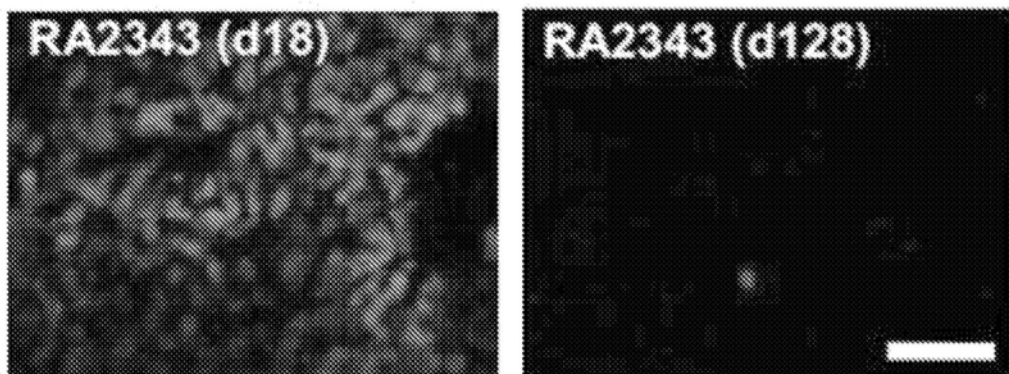
**A.****B.**

图15

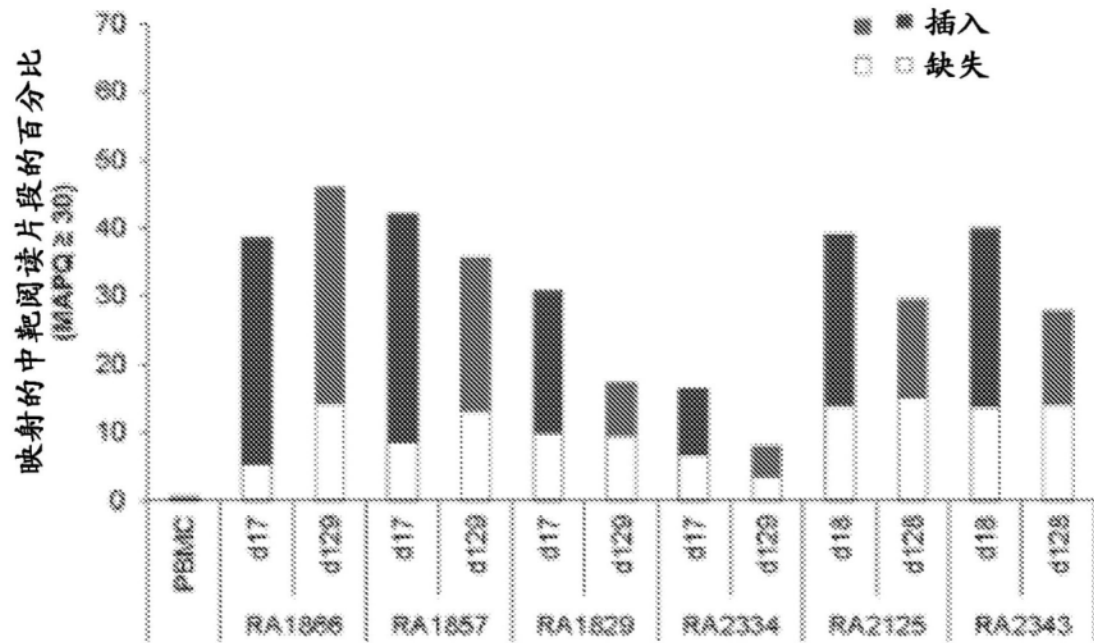


图16