



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113544270 A

(43) 申请公布日 2021. 10. 22

(21) 申请号 201980092149.8

(22) 申请日 2019.12.23

(30) 优先权数据

62/784,503 2018.12.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.08.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/068259 2019.12.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/139807 EN 2020.07.02

(71) 申请人 美国杰特贝林生物制品有限公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 M·严 J·S·巴特利特

(74) 专利代理机构 北京市奋迅律师事务所

11757

代理人 李斌馨 李翼

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2006.01)

C12N 9/22 (2006.01)

A61K 9/51 (2006.01)

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

权利要求书9页 说明书71页

序列表14页 附图30页

(54) 发明名称

用于递送细胞调节剂的纳米胶囊

(57) 摘要

本发明涉及包含核糖核蛋白复合物的聚合物纳米胶囊及其递送方法。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物，其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂。还公开聚合物纳米胶囊与一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分的缀合物。



1. 一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂。
2. 权利要求1的聚合物纳米胶囊,其中所述核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。
3. 权利要求2的聚合物,其中所述核酸内切酶是Cas蛋白。
4. 权利要求3的聚合物,其中所述Cas蛋白是2类Cas蛋白。
5. 权利要求4的聚合物,其中所述2类Cas蛋白是II型或V型Cas蛋白。
6. 权利要求3-5中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述Cas蛋白选自Cas9和Cas12a。
7. 权利要求2-6中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述向导RNA靶向HPRT基因座。
8. 权利要求7的聚合物纳米胶囊,其中所述靶向HPRT基因座的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。
9. 权利要求2-6中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述向导RNA靶向β珠蛋白基因座。
10. 权利要求9的聚合物纳米胶囊,其中所述靶向β珠蛋白基因座的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。
11. 权利要求2-6中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述向导RNA靶向CCR5基因座。
12. 权利要求11的聚合物纳米胶囊,其中所述靶向CCR5基因座的向导RNA包含与SEQ ID NO:1具有至少90%相同性的核酸序列。
13. 前述权利要求中任一项的聚合物纳米胶囊,其进一步包含至少一个靶向部分。
14. 权利要求13的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物纳米胶囊包含2至6个靶向部分。
15. 权利要求14的聚合物纳米胶囊,其中所述靶向部分包含两个或更多个不同的靶向部分。
16. 权利要求13的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个靶向部分是抗体,并且其中所述聚合物纳米胶囊包含1至3个抗体。
17. 前述权利要求中任一项的聚合物纳米胶囊,其进一步包含至少一个稳定化部分。
18. 权利要求17的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个稳定化部分包含至少一个聚乙二醇基团。
19. 前述权利要求中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物纳米胶囊包含至少一个靶向部分和至少一个稳定化部分。
20. 权利要求19的聚合物纳米胶囊,其中所述靶向部分是抗体,并且其中所述稳定化部分包含至少一个聚乙二醇基团。
21. 前述权利要求中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物壳包含至少两种带正电的单体。
22. 一种组合物,其包含权利要求1-21中任一项的聚合物纳米胶囊和药学上可接受的载剂或赋形剂。
23. 一种修饰的宿主细胞,其通过使未修饰的宿主细胞与权利要求1-21中任一项的聚合物纳米胶囊或权利要求22的组合物接触来制备。
24. 权利要求23的修饰的宿主细胞,其中所述未修饰的宿主细胞是造血干细胞,任选是CD34+造血干细胞。
25. 权利要求24的修饰的宿主细胞,其中所述造血干细胞是异基因造血干细胞。

26. 权利要求24的修饰的宿主细胞,其中所述造血干细胞是自体造血干细胞。

27. 权利要求24的修饰的宿主细胞,其中所述造血干细胞是同胞匹配的造血干细胞。

28. 一种缀合物,其根据包括以下的方法制备:

(a) 合成具有聚合物壳和核糖核蛋白复合物的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;

(b) 用靶向部分对聚合物纳米胶囊的表面官能化以提供纳米胶囊缀合物。

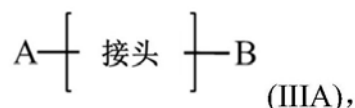
29. 一种缀合物,其根据包括以下的方法制备:

(c) 用能够参与点击化学反应的第一反应性官能团对聚合物纳米胶囊衍生化,所述聚合物纳米胶囊具有聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;

(d) 用能够与所述第一反应性官能团参与点击化学反应的第二反应性官能团对靶向部分衍生化;和

(e) 使衍生化的聚合物纳米胶囊与衍生化的靶向部分反应。

30. 权利要求29的缀合物,其中所述靶向部分通过使所述靶向部分与具有式 (IIIA) 的化合物的反应来衍生化:



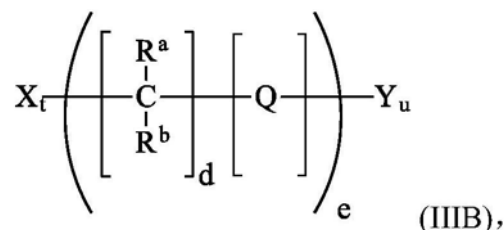
其中

A是马来酰亚胺-C(O)-;

“接头”是具有2至40个碳原子且任选具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的支链或非支链、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团;并且

B是第二反应性官能团,其选自二苯并环辛炔 (“DBCO”)、反式环辛烯 (“TCO”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺。

31. 权利要求30的缀合物,其中所述“接头”具有式 (IIIB) 的结构:



其中

d和e各自独立地是2至10的整数;

t和u独立地是0或1;

Q是键、O、S或N(R^c) (R^d);

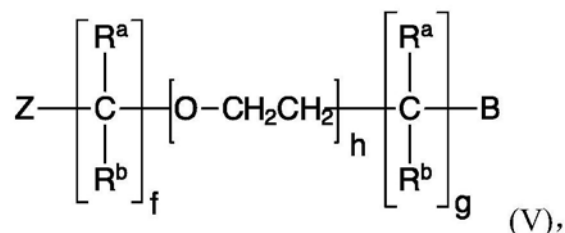
R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基或卤素;

R^c和R^d独立地是CH₃或H;并且

X和Y独立地是具有1至4个碳原子且任选具有一个或多个O、N或S杂原子的支链或非支链、饱和或不饱和的基团。

32. 权利要求29-31中任一项的缀合物,其中使所述衍生化的聚合物纳米胶囊进一步与

具有式 (V) 的稳定化部分反应:



其中B是第二反应性官能团,其选自二苯并环辛炔(“DBCO”)、反式环辛烯(“TCO”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺;

Z是羟基、支链或非支链的C₁-C₄烷基、-O-烷基、-NH₂;

f和g独立地是0、或者1-4的整数;并且

h是1-24的整数。

33. 权利要求29-32中任一项的缀合物,其中所述聚合物纳米胶囊用所述第一反应性官能团中的至少三个来衍生化。

34. 权利要求29-33中任一项的缀合物,其中所述第一反应性官能团选自DBCO、TCO、马来酰亚胺、醛、酮、叠氮化物、四嗪、硫醇、1,3-硝酮、肼和羟胺。

35. 权利要求29-34中任一项的缀合物,其中所述第一反应性官能团包含DBCO,并且其中所述第二反应性官能团包含叠氮基团。

36. 权利要求29-35中任一项的缀合物,其中所述靶向部分包含抗体。

37. 权利要求36的缀合物,其中所述抗体选自抗CD4抗体、抗CD8抗体和抗CD45抗体。

38. 权利要求29-37中任一项的缀合物,其中所述具有第一反应性官能团的聚合物纳米胶囊通过使所述聚合物纳米胶囊与包含二硫基团的化合物反应得到。

39. 权利要求29-38中任一项的缀合物,其中通过使所述聚合物纳米胶囊与具有式 (IVA) 的化合物反应,所述聚合物纳米胶囊用第一反应性官能团来衍生化:

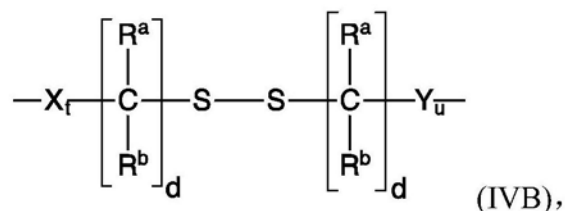


其中A是马来酰亚胺-C(O)-,

“间隔子”是具有2-20个碳原子并具有二硫键的支链或非支链、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团;并且

B选自二苯并环辛炔(“DBCO”)、反式环辛烯(“TCO”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺。

40. 权利要求39的缀合物,其中所述“间隔子”具有式 (IVB) 的结构:



其中

其中d为2-10的整数;

t和u独立地是0或1;

R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基或卤素;并且

X和Y独立地是具有1-8个碳原子且任选具有一个或多个O、N或S杂原子的支链或非支链、饱和或不饱和的基团。

41. 权利要求29-40中任一项的缀合物,其中所述缀合物靶向具有选自CD3、CD4、CD8和CD45的分化群标志物的细胞。

42. 权利要求29-41中任一项的缀合物,其中所述核糖核蛋白复合物包含Cas蛋白和向导RNA。

43. 权利要求42的缀合物,其中所述向导RNA靶向HPRT基因座。

44. 权利要求43的缀合物,其中所述靶向HPRT基因座的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。

45. 权利要求42的缀合物,其中所述向导RNA靶向β珠蛋白基因座。

46. 权利要求45的缀合物,其中所述靶向β珠蛋白基因座的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。

47. 权利要求42的缀合物,其中所述向导RNA靶向CCR5基因座。

48. 权利要求47的缀合物,其中所述靶向CCR5基因座的向导RNA包含与SEQ ID NO:1具有至少90%相同性的核酸序列。

49. 一种组合物,其包含权利要求29-48中任一项的缀合物和药学上可接受的载剂或赋形剂。

50. 一种修饰的宿主细胞,其通过使宿主细胞与权利要求29-48中任一项的缀合物或权利要求49的组合物接触来制备。

51. 权利要求50的修饰的宿主细胞,其中所述宿主细胞是造血干细胞。

52. 权利要求51的修饰的宿主细胞,其中所述造血干细胞是异基因造血干细胞。

53. 如权利要求51的修饰的宿主细胞,其中所述造血干细胞是自体造血干细胞。

54. 权利要求51的修饰的宿主细胞,其中所述造血干细胞是同胞匹配的造血干细胞。

55. 一种治疗人个体的遗传病症的方法,其包括向所述人个体给药治疗有效量的权利要求50-54中任一项的修饰的宿主细胞。

56. 一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中所述聚合物壳包含(i) N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺或2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯中的至少一种;(ii) 丙烯酰胺或其衍生物;和(iii) 交联剂。

57. 权利要求56的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物壳包含N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺和2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯。

58. 权利要求56-57中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述交联剂是丙烯酸酯。

59. 权利要求58的聚合物纳米胶囊,其中所述丙烯酸酯是2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯。

60. 权利要求56-59中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个靶向部分。

61. 权利要求60的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个靶向部分通过包含二硫键的间隔子偶联至所述聚合物纳米胶囊。

62. 权利要求60-61中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个靶向部分是抗体。

63. 权利要求60-62中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个靶向部分促进所述

聚合物纳米胶囊到特定细胞类型的递送,其中所述细胞类型选自包含以下的组:免疫细胞、血细胞、心肌细胞、肺细胞、视细胞、肝细胞、肾细胞、脑细胞、中枢神经系统的细胞、周围神经系统的细胞、癌细胞、感染病毒的细胞、干细胞、皮肤细胞、肠道细胞和/或听细胞。

64. 权利要求63的聚合物纳米胶囊,其中所述癌细胞选自包含以下的组:淋巴瘤细胞、实体瘤细胞、白血病细胞、膀胱癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、子宫内膜癌细胞、肾癌细胞、肺癌细胞、黑色素瘤细胞、胰腺癌细胞、前列腺癌细胞和甲状腺癌细胞。

65. 权利要求56-64中任一项的聚合物纳米胶囊,其进一步包含至少一个稳定化部分。

66. 权利要求65的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个稳定化部分包含至少一个选自聚乙二醇重复基团和聚丙二醇重复基团的重复基团。

67. 权利要求65的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个稳定化部分包含至少两个聚乙二醇重复基团。

68. 权利要求56-67中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT、 γ 珠蛋白启动子和/或 β 珠蛋白的向导RNA。

69. 权利要求56-68中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物纳米胶囊的直径为约50nm-约250nm。

70. 一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中所述聚合物纳米胶囊包含至少一个适于促进所述核糖核蛋白复合物向造血干细胞的递送的靶向部分,其中所述至少一个靶向部分通过二硫键偶联至所述聚合物纳米胶囊,并且其中所述聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个具有亲水基团的稳定化部分。

71. 权利要求70的聚合物纳米胶囊,其中所述核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT、 γ 珠蛋白启动子和/或 β 珠蛋白的向导RNA。

72. 权利要求70-71中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个靶向部分包含抗体。

73. 权利要求70-72中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个稳定化部分的亲水基团包含聚乙二醇基团。

74. 权利要求70-72中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述至少一个稳定化部分的亲水基团是聚丙二醇重复基团。

75. 权利要求70-74中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体,所述带正电的单体选自:N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺、N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺、N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺、N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺、N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺、N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺、N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺、N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺、N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺、N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺、N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐、2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯、甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯、(3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐和2-氨基乙基甲基丙烯酸酯。

76. 权利要求70-75中任一项的聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物壳进一步包含中性单体和交联剂。

77. 一种药物组合物,其包含权利要求56-76中任一项的所述聚合物纳米胶囊和药学上

可接受的载剂或赋形剂。

78. 一种修饰的造血干细胞,其通过使造血干细胞与权利要求77的药物组合物接触来制备。

79. 一种治疗人患者的方法,其包括向所述人患者给药治疗有效量的权利要求78的修饰的造血干细胞。

80. 一种缀合物,其根据包括以下的方法制备:

使衍生化的聚合物纳米胶囊与至少一个衍生化的靶向部分反应,

所述衍生化的聚合物纳米胶囊包含至少一个能够参与点击化学反应的第一反应性官能团,

所述聚合物纳米胶囊具有聚合物壳,所述聚合物壳具有至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂,并且

其中所述至少一个衍生化的靶向部分包含能够与所述第一反应性官能团参与点击化学反应的第二反应性官能团。

81. 权利要求80的缀合物,其进一步包括使衍生化的聚合物纳米胶囊与至少一个衍生化的稳定化部分反应,所述至少一个衍生化的稳定化部分包含能够与所述第一反应性官能团参与点击化学反应的第三反应性官能团。

82. 一种治疗人患者的遗传病症的方法,其包括:

(i) 通过使未修饰的人造血干细胞群体与聚合物纳米胶囊接触来产生修饰的人造血干细胞群体,所述聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;并且其中所述核糖核蛋白复合物包含Cas蛋白和靶向β珠蛋白的向导RNA;和

(ii) 向所述人患者给药所述修饰的人造血干细胞群体。

83. 权利要求82的方法,其中所述核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。

84. 权利要求83的方法,其中所述核酸内切酶是Cas蛋白。

85. 权利要求84的方法,其中所述Cas蛋白选自Cas9和Cas12a。

86. 一种缀合物,其包含:

(i) 聚合物纳米胶囊,其中所述聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;和

(ii) (a) 或 (b) 中的至少一个:

(a) 靶向部分,

(b) 偶联至所述聚合物纳米胶囊的稳定化部分。

87. 权利要求86的缀合物,其中所述靶向部分或稳定化部分中的至少一个通过至少一个接头偶联至所述聚合物纳米胶囊。

88. 权利要求87的缀合物,其中所述至少一个接头包含可切割部分。

89. 权利要求87的缀合物,其中所述至少一个接头包含一个或多个PEG基团。

90. 权利要求86的缀合物,其中所述缀合物包含1-16个靶向部分。

91. 权利要求90的缀合物,其中所述靶向部分选自抗体、多肽、凝集素、转铁蛋白、多糖、核酸和适配体。

92. 权利要求91的缀合物,其中所述靶向部分是转铁蛋白。

93. 权利要求91的缀合物,其中所述靶向部分是抗体。
94. 权利要求93的缀合物,其中所述抗体是抗-分化群标志物抗体。
95. 权利要求94的缀合物,其中所述抗-分化群标志物抗体选自抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD34抗体、抗CD45抗体、抗CD133抗体及其组合。
96. 权利要求86的缀合物,其中所述缀合物包含1-16个稳定化部分。
97. 权利要求96的缀合物,其中所述稳定化部分包含一个或多个PEG基团。
98. 权利要求96的缀合物,其中所述稳定化部分包含一个或多个PPG基团。
99. 权利要求86的缀合物,其中所述缀合物包含一个或多个靶向部分和一个或多个稳定化部分。
100. 权利要求86的缀合物,其中所述核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。
101. 权利要求100的缀合物,其中所述核酸内切酶是Cas蛋白。
102. 权利要求101的缀合物,其中所述Cas蛋白选自Cas9和Cas12a。
103. 权利要求100的缀合物,其中所述向导RNA靶向HPRT基因座。
104. 权利要求103的缀合物,其中所述靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。
105. 权利要求100的缀合物,其中所述向导RNA靶向所述β珠蛋白基因座。
106. 权利要求105的缀合物,其中所述靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。
107. 权利要求86的缀合物,其中所述至少一种带正电的单体选自:
- N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,
- N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,
- N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,
- N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,
- N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,
- N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,
- N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,
- N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,
- N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,
- N-(2-(双(2-甲基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,
- N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,
- 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,
- 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,
- (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,
- 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,
- 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,
- N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,
- 及其任意组合。
108. 权利要求86的缀合物,其中所述中性单体选自N-(1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基)丙烯酰胺、丙烯酰胺、N-(羟甲基)丙烯酰胺、2-羟基乙基丙烯酸酯和2-羟基乙基甲基丙

烯酸酯。

109. 权利要求86的缀合物, 其中所述聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

110. 一种缀合物, 其包含:

(i) 聚合物纳米胶囊, 其中所述聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和负载, 其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂; 并且其中所述负载选自核糖核蛋白复合物、siRNA分子、shRNA分子、表达载体、多核苷酸(如具有50-500个碱基对的多核苷酸)、肽、酶、抗体和抗体片段; 和

(ii) (a) 或 (b) 中的至少一个:

(a) 靶向部分,

(b) 偶联至所述聚合物纳米胶囊的稳定化部分。

111. 权利要求110的缀合物, 其中所述至少一种带正电的单体选自:

N- (3- ((4- ((3- 氨基丙基) 氨基) 丁基) 氨基) 丙基) 丙烯酰胺,

N- (3- ((4- ((3- 氨基丙基) 氨基) 丁基) 氨基) 丙基) 甲基丙烯酰胺,

N- (3- ((4- 氨基丁基) 氨基) 丙基) 丙烯酰胺,

N- (3- ((4- 氨基丁基) 氨基) 丙基) 甲基丙烯酰胺,

N- (2- ((2- 氨基乙基) (甲基) 氨基) 乙基) 丙烯酰胺,

N- (2- ((2- 氨基乙基) (甲基) 氨基) 乙基) 甲基丙烯酰胺,

N- (哌嗪-1-基甲基) 丙烯酰胺,

N- (哌嗪-1-基甲基) 甲基丙烯酰胺,

N- (2- (双 (2- 氨基乙基) 氨基) 乙基) 丙烯酰胺,

N- (2- (双 (2- 氨基乙基) 氨基) 乙基) 甲基丙烯酰胺,

N- (3- 氨基丙基) 甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

2- (二甲基氨基) 乙基丙烯酸酯,

甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

(3- 丙烯酰胺丙基) 三甲基铵盐酸盐,

2- 氨基乙基甲基丙烯酸酯,

3- (二甲基氨基) 丙基丙烯酸酯,

N- [3- (二甲基氨基) 丙基] 甲基丙烯酰胺,

及其任意组合。

112. 权利要求110的缀合物, 其中所述中性单体选自N- (1, 3- 二羟基-2- (羟甲基) 丙-2-基) 丙烯酰胺、丙烯酰胺、N- (羟甲基) 丙烯酰胺、2- 羟基乙基丙烯酸酯和2- 羟基乙基甲基丙烯酸酯。

113. 权利要求110的缀合物, 其中所述缀合物包含1-16个选自抗体、多肽、凝集素、转铁蛋白、多糖、核酸和适配体的靶向部分。

114. 权利要求110的缀合物, 其中所述缀合物包含1-16个选自抗体和转铁蛋白的靶向部分。

115. 一种聚合物纳米胶囊, 其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物, 其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂, 其中所述核糖核蛋白复合物包含至少一种gRNA, 其中所述至少一种gRNA与SEQ ID NO:1-22和39-54中的任一个具有至少

90%序列相同性。

116. 权利要求115的聚合物纳米胶囊,其中所述gRNA与SEQ ID NO:1-22和39-54中的任一个具有至少95%序列相同性。

117. 一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂,其中所述核糖核蛋白复合物包含至少一种gRNA,其中所述至少一种gRNA包含SEQ ID NO:1-22和39-54中的任一个。

118. 一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中所述聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂,其中所述核糖核蛋白复合物包含至少一种gRNA,其中所述至少一种gRNA靶向与SEQ ID NO:24-37中的任一个具有至少90%相同性的核酸序列。

用于递送细胞调节剂的纳米胶囊

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本发明要求2018年12月23日提交的美国临时申请第62/784,503号的申请日的权益,该申请的公开内容整体援引加入本文。

技术领域

[0003] 本发明总体涉及基因治疗。更具体来说,本发明涉及包含核糖核蛋白复合物的纳米胶囊及其在基因治疗的应用。特别地,本发明涉及包含核糖核蛋白复合物的纳米胶囊,其在体内和/或体外的应用,包括在造血干细胞中的应用。

背景技术

[0004] 能够精确修饰活细胞内DNA序列的技术对基础和应用研究都很有价值。成簇的规律间隔的短回文重复 (CRISPR) 是Ishino在大肠杆菌中首次发现的原核生物免疫系统 (Ishino, et al., Journal of Bacteriology 169 (12) :5429-5433 (1987))。这些系统通过以序列特异性方式靶向病毒和质粒的核酸,在细菌和古细菌中提供针对病毒和质粒的免疫力。

[0005] 据认为,提供上述免疫力涉及两个主要阶段,即获取阶段和干扰阶段。获取阶段涉及切割入侵病毒和质粒的基因组,并将其片段整合到细菌和古细菌的CRISPR基因座中。整合到基因组中的片段称为原间隔子,有助于保护生物体免受同一病毒或质粒的后续攻击。干扰阶段包括攻击入侵的病毒或质粒。据认为,这一特殊阶段依赖于整合序列 (称为间隔子) 转录成RNA,随后经过一些处理,RNA然后与入侵的多核苷酸 (如病毒或质粒) 的DNA或RNA中的互补序列杂交,同时还与能有效结合和/或切割DNA或RNA的蛋白或蛋白复合物缔合。

[0006] 有几种不同的CRISPR-Cas系统。在2类II型系统中,有两股RNA是CRISPR-Cas系统的一部分:CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活CRISPR RNA (tracrRNA)。TracrRNA与pre-crRNA的互补区域杂交,促进pre-crRNA在RNase III酶的作用下成熟为crRNA。由tracrRNA和crRNA形成的双链被蛋白识别并与之缔合,例如Cas9,Cas9通过crRNA的序列引导到靶核酸,所述序列与靶核酸中的序列互补并缔合。据认为,这些基于RNA的免疫系统的最小组成部分可以通过使用单一的蛋白和两个RNA引导多核苷酸或单一的RNA分子,以位点特异性的方式重新编码以靶向DNA。

[0007] 在2类V型CRISPR系统中,据认为,Cas蛋白Cpf1可以通过单一的crRNA序列以位点特异性的方式重新编码以靶向DNA。

[0008] 总之,细菌Cas9核酸酶的表达,以及含有基因组靶向信息 (例如,20bp序列) 的短段RNA和与Cas9本身相关的结构成分,允许在目标基因组内所需位置处精确布置双链或单链断裂 (DSB或SSB)。CRISPR-Cas系统被认为优于其他基因组编辑方法,如核酸内切酶、巨核酸酶、锌指核酸酶和转录激活因子样效应核酸酶 (TALENs),这些可能需要为每个新的靶向基因座从头进行蛋白工程。

[0009] 基因编辑技术,如CRISPR/Cas9系统,已显示出在各种细胞系以及生殖系基因组编

辑中效果良好(参见Doudna et al., Genome editing, The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9, Science 346 (6213):1258096)。慢病毒载体相当灵活,允许靶向基因组位点,并且其在筛选CRISPR系统的向导RNA(gRNA)方面显示出巨大的潜力,但Cas9的整合已显示出具有有限的潜在治疗用途(Hsu et al., Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering, Cell 157 (6):1262-1278)。

[0010] 由于其低免疫原性和宽泛的趋性,一些小组已经开发了用于体内基因编辑的腺相关病毒载体(AAV)。然而,包装容量和需要非常高的滴度来递送至原代细胞是主要的问题(参见Ran et al., "In vivo genome editing using Staphylococcus aureus Cas9," Nature. 2015 Apr 9; 520 (7546):186-91; Swiech et al., "In vivo interrogation of gene function in the mammalian brain using CRISPR-Cas9," Nat Biotechnol. 2015 Jan; 33 (1):102-6; 和 Cong et al., "Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems," Science, 2013 Feb 15; 339 (6121):819-23)。

[0011] Cas9和单向导RNA(sgRNA)的质粒递送已显示出在其他类型的细胞中是有效的,但在人初级T细胞和造血干细胞中只切除1-5%的靶向蛋白表达(参见Mandal et al., "Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9," Stem Cell 15 (5):643-652)。Cas9核糖核酸蛋白的电穿孔在T细胞和干细胞中表现出高效和特异的基因组编辑,但将电穿孔应用于体内研究存在技术障碍(参见Schumann et al., "Generation of knock-in primary human T cells using Cas9 ribonucleoproteins," Proc Natl Acad Sci, 2015 Aug 18; 112 (33):10437-42)。因此,到目前为止,基因编辑因子的体内递送仍是挑战。

发明内容

[0012] 本发明的第一方面是一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。

[0013] 在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。

[0014] 在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含一个与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0015] 在一些实施方案中,至少一种带正电的单体选自:

[0016] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0017] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0018] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0019] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0020] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0021] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0022] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,

[0023] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,

[0024] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0025] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0026] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

[0027] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,

[0028] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

[0029] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,

[0030] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0031] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,

[0032] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,

[0033] 及其任意组合。

[0034] 在一些实施方案中,中性单体选自N-(1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基)丙烯酰胺、丙烯酰胺、N-(羟甲基)丙烯酰胺、2-羟基乙基丙烯酸酯和2-羟基乙基甲基丙烯酸酯。在一些实施方案中,交联剂选自1,3-甘油二甲基丙烯酸酯、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和甘油1,3-二甘油醇酸二丙烯酸酯。

[0035] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个靶向部分。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含2-6个靶向部分。在一些实施方案中,至少一个靶向部分是抗体。在一些实施方案中,至少一个靶向部分是抗体并且其中纳米聚合物胶囊包含1-3个抗体。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含至少一个稳定化部分。在一些实施方案中,至少一个稳定化部分包含至少一个聚乙二醇基团。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含至少一个靶向部分和至少一个稳定化部分。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含2-6个靶向部分和至少2-6个稳定化部分。在一些实施方案中,至少一个靶向部分是抗体,并且稳定化部分包含至少一个聚乙二醇基团。

[0036] 在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰胺基单体。

[0037] 本发明的第二方面是一种组合物,其包含:(i)包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物聚合物纳米胶囊,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂,以及(ii)药学上可接受的载剂或赋形剂。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。

[0038] 在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0039] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0040] 在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0041] 本发明的第三方面是通过以下制备的修饰的宿主细胞:使宿主细胞与一个或多个聚合物纳米胶囊接触,其中一个或多个聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,宿主细胞是造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是异基因造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是自体造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是同胞匹配的造血干细胞。

[0042] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。

[0043] 在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0044] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊不含包含咪唑基团的单体或交联剂。

[0045] 在本发明的第四方面是一种缀合物,其根据包括以下的方法制备:(i)用能够参与点击化学反应的第一反应性官能团对聚合物纳米胶囊衍生化,所述聚合物纳米胶囊具有聚

合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;(ii)用能够与第一反应性官能团参与点击化学反应的第二反应性官能团对靶向部分衍生化;和(iii)使衍生化的聚合物纳米胶囊与衍生化的靶向部分反应。

[0046] 在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种不同的带正电的单体。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含Cas蛋白和向导RNA。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。

[0047] 在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0048] 在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0049] 在一些实施方案中,靶向部分衍生化自靶向部分与具有式(IIIA)的化合物的反应:



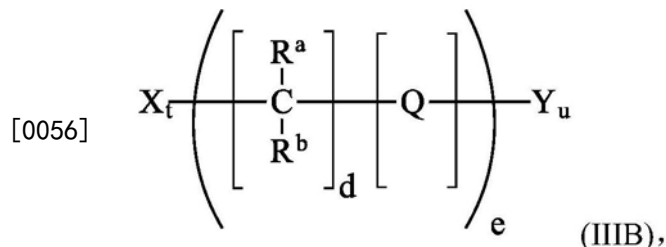
[0051] 其中

[0052] A是马来酰亚胺-C(O)-;

[0053] “接头”是具有2-40个碳原子且任选具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的支链或非支链、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团;并且

[0054] B是第二反应性官能团,其选自二苯并环辛炔(“DBC0”)、反式环辛烯(“TC0”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺。

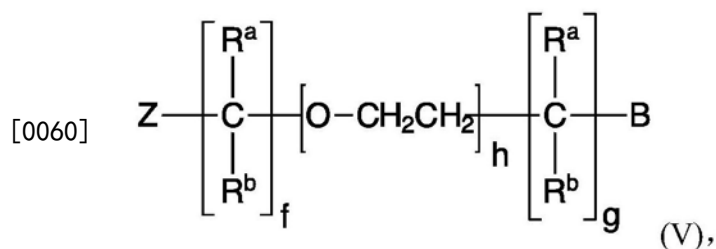
[0055] 在一些实施方案中,“接头”具有式(IIIB)的结构:



[0057] d和e各自独立地是2-10的整数;t和u独立地是0或1;Q是键、O、S或N(R^c)(R^d);

[0058] R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基或卤素;R^c和R^d独立地是CH₃或H;X和Y独立地是具有1-4个碳原子且任选具有一个或多个O、N或S杂原子的支链或非支链、饱和或不饱和的基团。

[0059] 在一些实施方案中,衍生化的聚合物纳米胶囊进一步与具有式(V)的稳定化部分反应:



[0061] 其中B是第二反应性官能团,其选自二苯并环辛炔(“DBC0”)、反式环辛烯(“TC0”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺;

[0062] Z是羟基、支链或非支链的 C_1 - C_4 烷基、-O-烷基、 $-\text{NH}_2$;

[0063] f和g独立地是0、或者1-4的整数;并且

[0064] h是1-24的整数。

[0065] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊与第一反应性官能团中的至少三个来衍生化。在一些实施方案中,第一反应性官能团是DBC0、TC0、马来酰亚胺、醛、酮、叠氮化物、四嗪、硫醇、1,3-硝酮、肼和羟胺中的一种。在一些实施方案中,第一反应性官能团是DBC0基团并且第二反应性官能团是叠氮基团。

[0066] 在一些实施方案中,靶向部分是抗体。在一些实施方案中,抗体选自抗CD4抗体、抗CD8抗体和抗CD45抗体。在一些实施方案中,缀合物靶向具有选自CD3、CD4、CD8和CD45的分化群标志物的细胞。

[0067] 在一些实施方案中,通过使聚合物纳米胶囊和具有二硫基团的化合物反应,聚合物纳米胶囊用第一反应性官能团衍生化。在一些实施方案中,通过聚合物纳米胶囊与具有式(IVA)的化合物反应,聚合物纳米胶囊用第一反应性官能团衍生化:

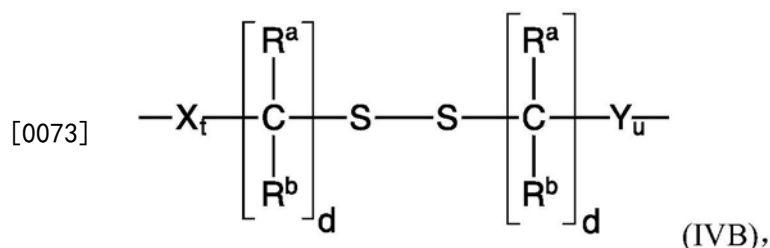
[0068] A-间隔子-B (IVA),

[0069] 其中A是马来酰亚胺-C(O)-,

[0070] “间隔子”是具有2-20个碳原子并具有二硫键的支链或非支链、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团;并且

[0071] B选自二苯并环辛炔(“DBC0”)、反式环辛烯(“TC0”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺。

[0072] 在一些实施方案中,“间隔子”具有式(IVB)的结构:



[0074] 其中

[0075] d为2-10的整数;t和u独立地是0或1; R^a 和 R^b 独立地是H、 C_1 - C_4 烷基或卤素;并且X和Y独立地是具有1-8个碳原子且任选具有一个或多个O、N或S杂原子的支链或非支链、饱和或不饱和的基团。

[0076] 本发明的第五方面是一种组合物,其包含:

[0077] (a) 缀合物,其中缀合物通过包括以下的方法制备:(i) 用能够参与点击化学反应

的第一反应性官能团对聚合物纳米胶囊衍生化,所述聚合物纳米胶囊具有聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂; (ii) 用能够与第一反应性官能团参与点击化学反应的第二反应性官能团对靶向部分衍生化;和 (iii) 使衍生化的聚合物纳米胶囊与衍生化的靶向部分反应;和

[0078] (b) 药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0079] 在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,缀合物包含2-6个靶向部分。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,所述聚合物壳不含咪唑基丙烯酸酯基单体。

[0080] 本发明的第六方面是一种修饰的宿主细胞,其通过使宿主细胞与以下任何一种接触来制备:

[0081] (i) 包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物的聚合物纳米胶囊,其中聚合物壳包含至少一种不同的带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;或

[0082] (ii) 聚合物纳米胶囊缀合物,其中缀合物包含: (a) 聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少两种不同的带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;和 (b) 一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分。

[0083] 在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,宿主细胞是造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是异基因造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是自体造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是同胞匹配的造血干细胞。

[0084] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0085] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0086] 在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酸酯基单体。

[0087] 本发明的第七方面是一种治疗需要治疗的人个体的遗传病症方法,其包括向所述人个体给药治疗有效量的修饰的宿主细胞,其中宿主细胞通过以下方式修饰:使宿主细胞与以下任何一种接触:

[0088] (i) 包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物的聚合物纳米胶囊,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;或

[0089] (ii) 聚合物纳米胶囊缀合物,其中所述缀合物包含:(a) 聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;和(b) 一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分。

[0090] 在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,宿主细胞是造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是异基因造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是自体造血干细胞。在一些实施方案中,造血干细胞是同胞匹配的造血干细胞。

[0091] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0092] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,所述向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0093] 在一些实施方案中,聚合物壳不含包有杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,所述聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,所述聚合物壳不含咪唑基丙烯酸酯基单体。

[0094] 本发明的第八方面是一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含:

[0095] (i) N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酸酯,和2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯中的至少一个;

[0096] (ii) 丙烯酸酯或其衍生物;以及

[0097] (iii) 交联剂。

[0098] 在一些实施方案中,聚合物壳包含N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酸酯和2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯。在一些实施方案中,交联剂是丙烯酸酯。在一些实施方案中,丙烯酸酯是2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊的直径为约50nm-约250nm。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊的直径为约100nm-

约200nm。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酸酯基单体。

[0099] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。

[0100] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT、 γ 珠蛋白启动子和/或 β 珠蛋白的向导RNA。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的核酸序列

[0101] 在一些实施方案中,向导RNA靶向 β 珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0102] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0103] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个靶向部分。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含二至六个靶向部分。在一些实施方案中,至少一个靶向部分通过包含二硫键的间隔子与聚合物纳米胶囊相连。在一些实施方案中,至少一个靶向部分是抗体。

[0104] 在一些实施方案中,至少一个靶向部分促进聚合物纳米胶囊到特定细胞类型的递送,其中细胞类型选自包含以下的组:免疫细胞、血细胞、心肌细胞、肺细胞、视细胞、肝细胞、肾细胞、脑细胞、中枢神经系统的细胞、周围神经系统的细胞、癌细胞、感染病毒的细胞、干细胞、皮肤细胞、肠道细胞和/或听细胞。在一些实施方案中,癌细胞选自包含以下的组:淋巴瘤细胞、实体瘤细胞、白血病细胞、膀胱癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、子宫内膜癌细胞、肾癌细胞、肺癌细胞、黑色素瘤细胞、胰腺癌细胞、前列腺癌细胞和甲状腺癌细胞。

[0105] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个稳定化部分。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含2-6个稳定化部分。在一些实施方案中,至少一个稳定化部分包含至少一个选自聚乙二醇重复基团和聚丙二醇重复基团的重复基团。在一些实施方案中,至少一个稳定化部分包含至少两个聚乙二醇重复基团。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含至少一个靶向部分和至少一个稳定化部分。

[0106] 本发明第九方面是一种聚合物纳米胶囊缀合物,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物纳米胶囊包含至少一个适于促进所述核糖核蛋白复合物向造血干细胞的递送的靶向部分。在一些实施方案中,靶向部分通过二硫键偶联至聚合物纳米胶囊缀合物。在一些实施方案中,至少一个靶向部分包含抗体。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物进一步包含至少一个具有亲水基团的稳定化部分。在一些实施方案中,至少一个稳定化

部分的亲水基团包含聚乙二醇基团。在一些实施方案中,至少一个稳定化部分的亲水基团是聚丙二醇重复基团。

[0107] 在一些实施方案中,聚合物壳包含至少一种带正电的单体。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,带正电的单体选自:

[0108] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0109] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0110] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0111] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0112] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0113] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0114] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,

[0115] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,

[0116] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0117] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0118] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

[0119] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,

[0120] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

[0121] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,

[0122] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0123] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,

[0124] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,及其任意组合。

[0125] 在一些实施方案中,聚合物壳进一步包含中性单体和交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰胺基单体。

[0126] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。

[0127] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT、 γ 珠蛋白启动子和/或 β 珠蛋白的向导RNA。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向 β 珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0128] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0129] 本发明第十方面是一种药物组合物,其包含:包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物的聚合物纳米胶囊缀合物,其中聚合物纳米胶囊包含至少一个适于促进核糖核蛋白复合物向造血干细胞的递送的靶向部分。在一些实施方案中,至少一个靶向部分通过二硫键偶联至聚合物纳米胶囊缀合物。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个具有亲水基团的稳定化部分和(ii)药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0130] 在一些实施方案中,聚合物壳包含至少一种带正电的单体。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,带正电的单体选自:

[0131] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0132] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0133] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0134] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0135] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0136] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0137] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,

[0138] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,

[0139] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0140] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0141] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

[0142] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,

[0143] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

[0144] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,

[0145] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0146] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,

[0147] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,及其任意组合。

[0148] 在一些实施方案中,聚合物壳进一步包含中性单体和交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0149] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。

[0150] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT、 γ 珠蛋白启动子和/或 β 珠蛋白的向导RNA。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向 β 珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0151] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与

SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0152] 在本发明的第十一方面是修饰的造血干细胞,其通过使造血干细胞与聚合物纳米胶囊缀合物接触来制备,所述聚合物纳米胶囊缀合物包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物纳米胶囊包含至少一个适于促进核糖核蛋白复合物向造血干细胞的递送的靶向部分。在一些实施方案中,其中靶向部分通过二硫键偶联至聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个具有亲水基团的稳定化部分。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少一种带正电的单体。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,带正电的单体选自:

[0153] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0154] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0155] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0156] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0157] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0158] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0159] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,

[0160] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,

[0161] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0162] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0163] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

[0164] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,

[0165] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

[0166] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,

[0167] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0168] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,

[0169] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,及其任意组合。

[0170] 在一些实施方案中,聚合物壳进一步包含中性单体和交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0171] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。

[0172] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT、 γ 珠蛋白启动子和/或 β 珠蛋白的向导RNA。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向 β 珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0173] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0174] 在本发明的第十二方面是一种治疗人患者的方法,所述方法包括:给药治疗有效量的修饰的造血干细胞,其中造血干细胞通过使造血干细胞与聚合物纳米胶囊缀合物接触来修饰,所述聚合物纳米胶囊缀合物包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物纳米胶囊包含至少一个适于促进核糖核蛋白复合物向造血干细胞的递送的靶向部分。在一些实施方案中,其中靶向部分通过二硫键偶联至聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个具有亲水基团的稳定化部分。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少一种带正电的单体。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,带正电的单体选自:

[0175] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0176] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0177] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0178] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0179] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0180] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0181] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,

[0182] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,

[0183] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0184] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0185] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

[0186] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,

[0187] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

[0188] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,

[0189] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0190] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,

[0191] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,及其任意组合。

[0192] 在一些实施方案中,聚合物壳进一步包含中性单体和交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰胺基单体。

[0193] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。

[0194] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT、 γ 珠蛋白启动子和/或 β 珠蛋白的向导RNA。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,

靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0195] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0196] 本发明的第十三方面是一种缀合物,其根据包括以下的方法制备:使衍生化的聚合物纳米胶囊与至少一个衍生化的靶向部分反应,所述衍生化的聚合物纳米胶囊包含至少一个能够参与点击化学反应的第一反应性官能团,所述聚合物纳米胶囊具有聚合物壳,所述聚合物壳具有至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;并且其中所述至少一个衍生化的靶向部分包含能够与第一反应性官能团参与点击化学反应的第二反应性官能团。在一些实施方案中,缀合物进一步包括使衍生化的聚合物纳米胶囊与至少一个衍生化的稳定化部分反应,所述至少一个衍生化的稳定化部分包含能够与第一反应性官能团参与点击化学反应的第三反应性官能团。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0197] 本发明的第十四方面是一种治疗人患者的遗传病症的方法,其包括:通过未修饰的人造血干细胞群体与聚合物纳米胶囊接触来产生修饰的人造血干细胞群体,所述聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;和向所述人患者给药治疗有效量的修饰的人造血干细胞群体。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a、Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含Cas蛋白和向导RNA。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座和β珠蛋白基因座中的一个。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0198] 在本发明的第十五方面是一种缀合物,其包含:(i) 聚合物纳米胶囊,其中聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;和(ii) (a) 或 (b) 中的至少一个:(a) 靶向部分,(b) 偶联至所述聚合物纳米胶囊的稳定化部分。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,靶向部分或稳定化部分中的至少一个通过至少一个接头偶联至聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,至少一个接头包含可切割部分。在一些实施方案中,至少一个接头包含一个或多个PEG基团。

[0199] 在一些实施方案中,缀合物包含1至16个靶向部分。在一些实施方案中,靶向部分选自抗体、多肽、凝集素、转铁蛋白、多糖、核酸和适配体。在一些实施方案中,靶向部分包括人转铁蛋白。在一些实施方案中,靶向部分是抗体。在一些实施方案中,抗体是抗-分化群标志物抗体。在一些实施方案中,抗-分化群标志物抗体选自抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD34抗体、抗CD45抗体、抗CD133抗体及其组合。

[0200] 在一些实施方案中,缀合物包含1至16个稳定化部分。在一些实施方案中,稳定化部分包含一个或多个PEG基团。在一些实施方案中,稳定化部分包含一个或多个PPG基团。在一些实施方案中,缀合物包含一个或多个靶向部分和一个或多个稳定化部分。

[0201] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,其中核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9和Cas12a。

[0202] 在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,所述向导RNA靶向β珠蛋白。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。

[0203] 在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:39-54中的任一个。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少90%相同性。在一些实施方案中,向导RNA与SEQ ID NO:1和4-23中的任一个具有至少95%相同性。在一些实施方案中,向导RNA包含SEQ ID NO:1和4-23中的任一个。

[0204] 在一些实施方案中,至少一种带正电的单体选自:

[0205] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0206] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0207] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0208] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0209] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0210] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0211] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,

[0212] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,

[0213] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0214] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0215] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

[0216] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,

[0217] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

[0218] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,

[0219] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0220] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,

[0221] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,

[0222] 及其任意组合。

[0223] 在一些实施方案中,中性单体选自N-(1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基)丙烯酰胺、丙烯酰胺、N-(羟甲基)丙烯酰胺、2-羟基乙基丙烯酸酯和2-羟基乙基甲基丙烯酸酯。在一些实施方案中,交联剂选自1,3-甘油二甲基丙烯酸酯、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和甘油1,3-二甘油醇酸二丙烯酸酯。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0224] 本发明的第十六方面是(i)聚合物纳米胶囊,其中聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和负载,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;并且其中负载选自核糖核蛋白复合物、siRNA分子、shRNA分子、表达载体、具有50-500个碱基对的多核苷酸、肽、酶、抗体和抗体片段;和(ii)(a)或(b)中的至少一个:(a)靶向部分,(b)偶联至所述聚合物纳米胶囊的稳定化部分。在一些实施方案中,聚合物壳包含至少两种带正电的单体。在一些实施方案中,至少一种带正电的单体选自:

[0225] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0226] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0227] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0228] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0229] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0230] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0231] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,

[0232] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,

[0233] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0234] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0235] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

[0236] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,

[0237] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

[0238] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,

[0239] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0240] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,

[0241] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,

[0242] 及其任意组合。

[0243] 在一些实施方案中,中性单体选自N-(1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基)丙烯酰胺、丙烯酰胺、N-(羟甲基)丙烯酰胺、2-羟基乙基丙烯酸酯和2-羟基乙基甲基丙烯酸酯。在一些实施方案中,交联剂选自1,3-甘油二甲基丙烯酸酯、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和甘油1,3-二甘油醇酸二丙烯酸酯。在一些实施方案中,缀合物包含1-16个选自抗体、多肽、凝集素、转铁蛋白、多糖、核酸和适配体的靶向部分。在一些实施方案中,缀合物包含1-16个选自抗体和人转铁蛋白的靶向部分。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0244] 在本发明第十七方面是一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合

物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂,其中核糖核蛋白复合物包含至少一种gRNA,其中至少一种gRNA与SEQ ID NO:1-22和39-54中的任一个具有至少90%序列相同性。在一些实施方案中,gRNA与SEQ ID NO:1-22和39-54中的任一个具有至少95%序列相同性。

[0245] 本发明第十八方面是一种聚合物纳米胶囊,包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂,其中核糖核蛋白复合物包含至少一种gRNA,其中至少一种gRNA包含SEQ ID NO:1-22和39-54中的任一个。

[0246] 本发明第十九方面是一种聚合物纳米胶囊,包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少一种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂,其中核糖核蛋白复合物包含至少一种gRNA,其中至少一种gRNA靶向的核酸序列与SEQ ID NO:24-37中的任一个具有至少90%相同性。

[0247] 申请人开发具有可调控化学和靶向能力的纳米胶囊技术,使其有可能特异性优化各种治疗剂的递送。申请人能够通过将靶向/激活部分缀合到纳米胶囊上,将纳米胶囊重定向到特异性靶向T淋巴细胞或CD34+造血干细胞,以实现递送的精确控制。申请人证明,CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合物配制成的这些纳米胶囊具有较少的脱靶效应和较高的上靶效率。申请人还证明,聚合物纳米胶囊可以被配制成包含激活试剂,既能加强递送,又能促进基因编辑过程,因为人们认为大多数T淋巴细胞或CD34+造血干细胞需要被激活以促进基因修饰。申请人进一步认为,通过将CRISPR/Cas9纳入所公开的聚合物纳米胶囊,可以同时实现高效率的基因修饰和靶向能力。

附图说明

[0248] 参考附图以对本公开的特征有整体的了解。在附图中,类似参考数字用于确定相同元素。

[0249] 图1说明制备带有一个或多个稳定化部分的靶向聚合物纳米胶囊的整体方法。

[0250] 图2说明通过不同类型的引入单体合成包含核糖核蛋白复合物的聚合物纳米胶囊。

[0251] 图3说明使用无铜的点击化学将靶向部分缀合至聚合物纳米胶囊。

[0252] 图4提供与人血清蛋白溶液(5mg/mL)孵化24和48小时的GFP mRNA纳米胶囊(未缀合—未缀合的纳米胶囊;TR1.1—与平均1.1个人转铁蛋白缀合的纳米胶囊;TR1.1PEG3.5—是与约1.1个人转铁蛋白和3.5个PEG缀合的纳米胶囊)。纳米胶囊的直径由动态光散射确定。

[0253] 图5A说明GFP mRNA纳米胶囊,其各自每颗粒与不同平均数量的PEG缀合,其中每个纳米胶囊在预刺激的PBMC中测试(nB-CD₃1.2—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个抗CD3抗体缀合;nB-CD₃1.2-PEG1.8—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个抗CD3缀合;nB-CD₃1.2-PEG3.4—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个CD₃抗体和每颗粒与平均约1.8个PEG缀合;或nB-CD₃1.2-PEG3.4—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个CD3抗体和每颗粒与平均约3.4个PEG缀合)。将纳米胶囊与预刺激的PBMC孵化4小时,然后在3天后收集流式数据。这代表GFP mRNA用于靶向CD3+PBMC细胞的模拟试验。这三个样本各自显示出相似的GFP表达水平,即在CD3+群体中约15%。这证明,平均约1.8以及约3.4个PEG的缀合不会影响由CD3+细胞亚群对纳米胶囊的吸

收。nB-CD₃1.2-PEG3.4和nB-CD₃1.2-PEG1.8纳米胶囊都显示由PBMC细胞的CD3-亚群的非特异性吸收明显减少(从14%到约4%和约1%),证明每颗粒与约1.8以及约3.4个PEG的平均缀合可以减少由PBMC细胞CD3亚群的非特异性吸收。

[0254] 图5B说明在293t细胞中测试三种各自有不同的表面Zeta电位的GFP mRNA纳米胶囊(nA-CD₃1.3、nB-CD₃1.2和nC-CD₃0.9)。与带几乎零电位的电中性的nB-CD₃1.2纳米胶囊和带负电的纳米胶囊nC-CD₃0.9相比,带正电的纳米胶囊nA-CD₃1.3显示出较高的GFP+亚群(百分比)。将纳米胶囊与293T细胞孵化约4小时,3天后收集流式数据。这些结果进一步证明,用本发明纳米胶囊(例如那些具有从带正电和中性单体的组合衍生化的聚合物壳)的基因编辑是有效的。此外,结果表明,用带净正电荷的纳米胶囊的基因编辑是有效的。

[0255] 图5C说明在预刺激的PBMC细胞中测试三种各自有不同的表面Zeta电位的GFP mRNA纳米胶囊(nA-CD₃1.3、nB-CD₃1.2和nC-CD₃0.9)。与带几乎为零电位的电中性的纳米胶囊nB-CD₃1.2的GFP+亚群百分比(约13%)相比,带正电的纳米胶囊nA-CD₃1.3具有较高的GFP+亚群百分比(约15%)。然而,带负电的纳米胶囊nC-CD₃0.9显示出远更低的GFP+亚群百分比(约6%)。这证明Zeta电位对纳米胶囊在预刺激的PBMC细胞中的吸收的影响。这些结果进一步证明,用本发明纳米胶囊(例如那些具有从带正电和中性单体的组合衍生化的聚合物壳)的基因编辑是有效的。此外,结果表明,用带净正电荷的纳米胶囊的基因编辑是有效的。

[0256] 图5D说明三种GFP mRNA纳米胶囊(nA-CD₃1.3、nB-CD₃1.2和nC-CD₃0.9)的表面Zeta电位,基于动态光散射,分别被测量为约+9mV、0mV和-5mV。每个GFP mRNA纳米胶囊都有不同的配方(即每个纳米胶囊的组成部分(如单体)是不同的)。但每个纳米胶囊的配方包含类似平均数量(1.3、1.2和0.9)每颗粒缀合的CD3靶向部分。

[0257] 图5E说明GFP mRNA纳米胶囊,各自与不同平均数量的PEGs缀合,并在预刺激的PBMC中测试(nB-CD₃1.2—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个抗CD3抗体缀合;nB-CD₃1.2-PEG1.8—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个CD3抗体和每颗粒与平均约1.8个PEG缀合;nB-CD₃1.2-PEG3.4—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个CD3抗体和每颗粒与平均约3.4个PEG缀合)。将纳米胶囊与预刺激的PBMC孵化约4小时,然后在3天后收集流式数据。这代表与GFP mRNA进行的模拟试验,用于确认通过CD3受体的内吞作用(也见图5F和5G)。在所有PBMC群体中,这三个样本各自显示类似的GFP表达水平,约为15%、约14%和约12%。

[0258] 图5F说明每颗粒与不同平均数量的PEG缀合的GFP mRNA纳米胶囊,其在293T细胞中作为CD3-细胞的模型进行测试(nB-CD₃1.2—纳米胶囊每颗粒与平均1.2个抗CD3抗体缀合;nB-CD₃1.2-PEG1.8—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个CD3抗体和每颗粒与平均约1.8个PEG缀合;nB-CD₃1.2-PEG3.4—纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个CD3抗体和每颗粒与平均约3.4个PEG缀合)。将纳米胶囊与293T细胞孵化约4小时,然后3天后收集流式数据。在CD3-293T细胞中,三个样品各自显示出类似的低GFP表达水平,分别为约4%、约2%和约0%。

[0259] 图5G说明每颗粒与不同平均数量的PEG缀合的GFP mRNA纳米胶囊,并在预刺激的PBMC中进行测试(nB-CD₃1.2-纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个抗CD3抗体缀合;nB-CD₃1.2-PEG1.8-纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个CD3抗体和每颗粒与平均约1.8个PEGs缀合;nB-CD₃1.2-PEG3.4-纳米胶囊每颗粒与平均约1.2个CD3抗体和每颗粒与平均约3.4个PEG缀合)。将纳米胶囊与预刺激的PBMC与0.1mg/mL的CD3抗体在培养基中孵化约4小时,然后在3天后收集流式数据。这代表与GFP mRNA进行的模拟试验,用于确认通过CD3受体的内吞作用

(也见图5E和5F)。与图5F(培养基中没有CD3抗体)相比,在所有PBMC群体中,三种纳米胶囊的GFP表达水平降低至约5%、约2%和约0%。这证实这三种纳米胶囊是通过CD3受体辅助的内吞途径被PBMC吸收的。

[0260] 图5H说明每颗粒与不同平均数量的PEG缀合的5H GFP mRNA纳米胶囊,并通过动态光散射测试其在约48小时时间段内的溶液稳定性(未缀合的纳米胶囊;每颗粒与平均约1.1个人转铁蛋白缀合的纳米胶囊;每颗粒与平均约1.1个人转铁蛋白和每颗粒与平均约3.5个PEG缀合的纳米胶囊)。未缀合的纳米胶囊和每颗粒与平均约1.1个人转铁蛋白缀合的纳米胶囊在约48小时的时间段内显示出颗粒尺寸增加和聚集。每颗粒与平均约1.1个人转铁蛋白和约3.5个PEG缀合的纳米胶囊尺寸稳定,并且没有观察到明显的聚集体形成。

[0261] 图6A(敲低)和6B(敲除)说明用6TG(体外)对K562细胞的阳性选择影响。如图6A所示,培养基中不包含6TG,用sh7-GFP载体在MOI=1、2和5转导的K562细胞从第3天到第14天显示出稳定的表达。第3天-第14天,培养基中有约300nM的6TG,用sh7-GFP载体在MOI=1、2和5转导的K562细胞的GFP+亚群显示出从约19%-约40%、约40%-约78%以及约78%-94%的稳定增长。如图6B所示,第3天-第14天,培养基中没有6TG,靶向HPRT1纳米胶囊的RNP转染的K562细胞显示出稳定的约23%HPRT敲除INDEL。在培养基中存在约300、约600和约900nM的6TG,K562细胞的HPRT敲除群体显示出稳定的增长,在第14天达到约78%、约95%和约97%。这证实了从第3天到第14天的阳性选择。

[0262] 图7A(敲低)和7B(敲除)说明用0、300、600和900nM的6TG(体外)对CEM细胞的阳性选择影响,CEM细胞是由sh7-GFP慢病毒载体转导的或由靶向HPRT1纳米胶囊的RNP转染的。

[0263] 图8A、8B和8C说明根据一些实施方案,PBMC的HPRT敲除和的6TG选择,所述PBMC具有CD3缀合的靶向HPRT1的纳米胶囊的CRISPR RNP(例如,见实施例11)。

[0264] 图8D和8E说明在6-TG处理的甲基纤维素板上,用sh734-rGbG/rGbG-sh734/sh734-GFP载体转导的CD34+细胞或HPRT-KO CD34+细胞的选择后的VCN和InDe1数据。

[0265] 图9A和9B说明用300nM的MTX对用sh7-GFP慢病毒载体转导的K562细胞或用RNP靶向HPRT1纳米胶囊转染的K562细胞的阴性选择效果。

[0266] 图10A和10B说明用300nM的MTX、1 μ M和10 μ M的MPA对用sh7-GFP慢病毒载体转导的CEM细胞或用靶向HPRT1纳米胶囊的RNP转染的CEM细胞的阴性选择效果。

[0267] 图11A说明基因编辑以敲除PBMC的CCR5。 1×10^5 PBMC与CD3缀合的Cas9-CCR5RNP纳米胶囊(150ng Cas9和100ng靶向CCR5基因座的gRNA)和C46纳米胶囊(100ng或200ng短EF1a-驱动的-C46-表达DNA盒)孵化4小时。然后,用PHA/IL-2刺激PBMC过夜。五天后,图11A显示流式结果。图11A的左上板显示,未染色的阴性对照组有>99%的CCR5亚群;中上板显示,CCR5染色的刺激的PBMC包含约41.2%的CCR5亚群;右上板显示用CCR5靶向RNP纳米胶囊处理的PBMC有75.8%的CCR5-亚群;左下板显示,用CCR5靶向RNP纳米胶囊和C46纳米胶囊(100ng)处理的PBMC有69.7%的CCR5亚群;中下板显示用CCR5靶向RNP纳米胶囊和C46纳米胶囊(200ng)处理的PBMC有63.7%的CCR5-亚群;右下板显示在MOI=5时用Ca1-1转导的PBMC有92.9%的CCR5亚群。进行T7E1分析(其结果显示在图11B)。

[0268] 图11B说明T7E1测定显示CCR5的敲除。从左到右:CD3缀合的CCR5靶向RNP纳米胶囊(150ng Cas9和100ng靶向CCR5基因座的gRNA);CD3缀合的CCR5靶向RNP纳米胶囊(150ngCas9和100ng靶向CCR5基因座的gRNA)和C46纳米胶囊(100ng短的EF1a-驱动的-C46-

表达的DNA盒);CD3缀合的CCR5靶向RNP纳米胶囊(150ng Cas9和100ng靶向CCR5基因座的gRNA)和C46纳米胶囊(200ng短的EF1a-驱动的-C46-表达的DNA盒);未修饰细胞的对照;DNA梯。

[0269] 图12提供说明通过设计为靶向CD3+PBMC的纳米胶囊递送gCCR5-Cas9 RNP的数据。 1×10^5 的未刺激的PBMC与抗体CD3缀合的Cas9 RNP纳米胶囊(1/2/4pmol)孵化4小时。然后,用PHA/IL-2刺激PBMC过夜,在染色前用IL-2培养4天。总的来说,当Cas9 RNP纳米胶囊的剂量从55.4%(对照组)减少到34.6%(1pmol靶向CCR5基因座的RNP纳米胶囊)、27.0%(2pmol靶向CCR5基因座的RNP纳米胶囊)和20.5%(5pmol靶向CD3+亚群的RNP纳米胶囊)时,刺激的PBMC的CCR5表达会显示下降。

[0270] 图13A和13B说明至少包含Cas9和gRNA的纳米胶囊的制备。

[0271] 图14说明对照组、nanoRNP和nanohdr DNA对敲除293T细胞的T7E1测定结果。

[0272] 图15提供流式细胞仪数据。A和B显示未经处理的Mocha(约95%的CCR5+)细胞和经处理的MOCHA的CCR5染色结果。C、D和E面板显示未经处理的Mocha、经处理的MOCHA的CCR5-亚群和C46-敲入的AW072细胞系的C46染色结果。

[0273] 图16板A、B和C显示未染色对照、未经6TG处理(44.9%的CCR5+) (图16,板B) 和经6TG处理(43.4%的CCR5+) (图16,面板C) 的CD34+细胞的CCR5染色结果。图16的板D显示经纳米胶囊处理的CD34+细胞的CCR5+染色结果,其中培养基中没有6TG(23.8%) 和培养基中有6TG(10.2%)。

[0274] 图17说明未染色对照,未经6TG处理(44.9%的CCR5+) 与经6TG处理(43.4%的CCR5+) 的CD34+细胞的CCR5染色结果。图17进一步说明纳米胶囊处理的CD34+细胞的CCR5+染色结果,其中培养基中没有6TG(23.8%) 和在培养基中有6TG(10.2%)。CCR5染色数据表明6-TG选择发生在批量培养的sh734-KI mPB CD34+细胞上。

[0275] 序列表

[0276] 利用如37C.F.R.1.822中定义的核苷酸碱基的标准字母缩写和氨基酸的三字母代码显示本文所附的核酸和氨基酸序列。序列表以ASCII文本文件的形式提交,文件名为“Calimmune-042W0_ST25.txt”,创建于2019年12月21日,12KB,其援引纳入本文。

具体实施方式

[0277] 还应理解,除非明确指出相反,在本文要求的包括一个以上的步骤或动作的任何方法中,方法的步骤或动作的顺序不必限于列举所述方法的步骤或动作的顺序。

[0278] 如本文所用,单数术语“一”、“一个”和“所述”包括复数指代,除非上下文另有明确指示。相似的,“或”的意思包括“和”,除非上下文另有明确指示。术语“包括”的定义是包含性的,如“包括A或B”是指包括A、B或A和B。

[0279] 如本文所用,术语“或”应理解为与上文定义的“和/或”具有相同的含义。例如,在分隔列表中的项目时,“或”或者“和/或”应解释为包含性的,即至少包括一个,但也包括一个以上的数字或列表中的元素,以及任选额外未列出的项目。只有明确指出相反的术语,如“仅其中一个”或“正好其中一个”,或者,当在权利要求书中使用时,“由...组成”,指在若干元素或元素列表中正好包含一个元素。一般来说,当前面是排他性的术语,如“任一”、“其中一个”、“仅其中一个”或“正好其中一个”,如本文使用的术语“或”应仅解释为表示排他性可

选物(即“一个或另一个但不是两个”)。在权利要求书中使用的“基本上由…组成”,应具有专利法领域中使用的普通含义。

[0280] 如本文所用,术语“包含(comprising)”、“包括(including)”、“具有(having)”等可互换使用,并具有相同的含义。相似地,“包含(comprises)”、“包括(includes)”、“具有(has)”等可互换使用,并具有相同的含义。具体来说,每个术语都被解释为开放性术语,意思是“至少以下”,并且还解释为不排除额外的特征、限制、方面等。因此,例如,“具有组件a、b和c的设备”表示该设备至少包括组件a、b和c。相似地,短语:“涉及步骤a、b和c的方法”表示该方法至少包括步骤a、b和c。此外,虽然本文中步骤和过程可以按特定的顺序概述,但本领域技术人员会认识到排序步骤和过程可以不同。

[0281] 如本文所用,关于一个或多个元素的列表,短语“至少一个”,应理解为表示选自元素列表中的任一个或多个元素的至少一个元素,但不必包括元素列表中具体列出的每个元素中的至少一个,并且也不排除元素列表中的任何元素组合。这个定义也允许除了短语“至少一个”所指的元素列表中具体标识的元素以外的元素可以任选地存在,无论与那些具体标识的元素有关还是无关。因此,作为非限制性实例,“A和B中的至少一个”(或者,等同于,“A或B中的至少一个”,或者,等同于“A和/或B中的至少一个”)在一个实施方案中可以指至少一个,任选地包括一个以上的A,而没有B存在(并任选地包括B以外的元素)。在另一个实施方案中,指的是至少一个,任选地包括一个以上的B,而没有A存在(并任选地包括A以外的元素);在另一个实施方案中,指的是至少一个,任选地包括一个以上的A,以及至少一个、任选地包括一个以上的B(并任选地包括其他元素);等等。

[0282] 如本文所用,术语“给药”是指口服、局部、静脉内、皮下、经皮、透皮、肌肉内、关节内、胃肠外、动脉内、皮内、静脉内、颅内、腹膜内、肠内、鼻内、直肠、阴道、吸入或通过植入的储存器的给药。术语“胃肠外”包括皮下、静脉内、肌肉内、关节内、滑膜内、胸骨内(intrasternal)、鞘内、肝内、神经内和颅内注射或输液技术。

[0283] 如本文所用,术语“烷基”是指包含完全饱和(无双键或三键)烃基团的直链或支链烃。术语“烷基”包括饱和脂肪族基团,包括直链烷基(例如,甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基等)、支链烷基(异丙基、叔丁基、异丁基等)、(脂环族)环烷基(环丙基、环戊基、环己基、环庚基、环辛基)、烷基取代的环烷基和环烷基取代的烷基。术语“烷基”进一步包括烷基,其中一个或多个杂原子,如氧、氮、硫或磷,取代烃骨架的一个或多个碳。在某些实施方案中,直链或支链烷基在其骨架上有30个或更少的碳原子(例如,直链为 C_1 - C_{30} ,支链为 C_1 - C_{30})。此外,术语“烷基”包括“未取代的烷基”和“取代的烷基”,后者是指在烃骨架的一个或多个碳上具有取代基取代氢的烷基部分。这样的取代基可以包括,例如,烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳基羰基氧基、羧酸盐、烷基羰基、芳基羰基、烷氧羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸根基、膦酸根基、次膦酸根基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基)、酰氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸根基、硫酸根基、烷基亚磺酰基、磺酸根基、氨磺酰基、磺酰胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮、杂环基、烷基芳基或芳香族或杂芳族分子。

[0284] 如本文所用,术语“烯烃”包含在长度上和可能的取代上与上述烷基类似的不饱和

脂肪族基团,但其至少含有一个双键。例如,术语“烯基”包括直链烯基(例如,乙烯基、丙烯基、丁烯基、戊烯基、己烯基、庚烯基、辛烯基、壬烯基、癸烯基等)、支链烯基、(脂环族)环烯基(环丙烯、环戊烯、环己烯、环庚烯、环辛烯),烷基或烯基取代的环烯基和环烷基或环烯基取代的烯基。术语烯基进一步包括烯基,其中包括取代烃骨架的一个或多个碳原子的氧、氮、硫或磷原子。在某些实施方案中,直链或支链烯基的骨架上有30个或更少的碳原子(例如,直链为 C_2-C_{30} ,支链为 C_3-C_{30})。此外,术语烯基包括“未取代的烯基”和“取代的烯基”,后者是指在烃骨架的一个或多个碳上具有取代氢的取代基的烯基分子。这种取代基可以包括,例如,烷基、烯基、炔基、卤素、羟基、烷基羰基氧基、芳基羰基氧基、烷氧基羰基氧基、芳基羰基氧基、羧基、烷基羰基、芳基羰基、烷氧羰基、氨基羰基、烷基氨基羰基、二烷基氨基羰基、烷基硫代羰基、烷氧基、磷酸根基、膦酸根基、次膦酸根基、氰基、氨基(包括烷基氨基、二烷基氨基、芳基氨基、二芳基氨基和烷基芳基氨基),酰氨基(包括烷基羰基氨基、芳基羰基氨基、氨基甲酰基和脲基)、脒基、亚氨基、巯基、烷硫基、芳硫基、硫代羧酸根基、硫酸根基、烷基亚磺酰基、磺酸根基、亚磺酰基、磺酰胺基、硝基、三氟甲基、氰基、叠氮、杂环基、烷基芳基或芳香族或杂芳族分子。烯基的其他实例包括但不限于:乙烯基、1-丙烯、2-丙烯、1-甲基乙烯基、1-丁烯基、2-丁烯基、3-丁烯基、1-甲基-1-丙烯、2-甲基-1-丙烯、1-甲基-2-丙烯、2-甲基-2-丙烯;1-戊烯基、2-戊烯基、3-戊烯基、4-戊烯基、1-甲基-1-丁烯基、2-甲基-1-丁烯基、3-甲基-1-丁烯基、1-甲基-2-丁烯基、2-甲基-2-丁烯基、3-甲基-2-丁烯基、1-甲基-3-丁烯基、2-甲基-3-丁烯基、3-甲基-3-丁烯基、1,1-二甲基-2-丙烯、1,2-二甲基-1-丙烯、1,2-二甲基-2-丙烯、1-乙基-1-丙烯、1-己烯、2-己烯、3-己烯、4-己烯、5-己烯、1-甲基-戊烯、2-甲基-戊烯、3-甲基-戊烯、4-甲基-戊烯、1-甲基-2-戊烯、2-甲基-2-戊烯、3-甲基-2-戊烯基、4-甲基-2-戊烯基、1-甲基-3-戊烯基、2-甲基-3-戊烯基、3-甲基-3-戊烯基、4-甲基-3-戊烯基、1-甲基-4-戊烯基、2-甲基-4-戊烯基、3-甲基-4-戊烯基、4-甲基-4-戊烯基、1,1-二甲基-2-丁烯基、1,1-二甲基-3-丁烯基、1,2-二甲基-1-丁烯基、1,2-二甲基-2-丁烯基、1,2-二甲基-3-丁烯基、1,3-二甲基-1-丁烯基、1,3-二甲基-2-丁烯基、1,3-二甲基-3-丁烯基、2,2-二甲基-3-丁烯基、2,3-二甲基-1-丁烯基、2,3-二甲基-3-丁烯基、3,3-二甲基-1-丁烯基、3,3-二甲基-2-丁烯基、1-乙基-1-丁烯基、1-乙基-2-丁烯基、1-乙基-3-丁烯基、2-乙基-1-丁烯基、2-乙基-2-丁烯基、1,1,2-三甲基-2-丙烯基、1-乙基-1-甲基-2-丙烯基和1-乙基-2-甲基-2-丙烯基。含有多个双键的基团可包括但不限于1,3-丁-二烯基、1,3-戊-二烯基或1,4-戊二烯基。

[0285] 如本文所用,除非另有说明,术语“环烷基”和“杂环烷基”其本身或与其他术语组合,分别表示“烷基”和“杂烷基”的环状形式。环烷基和杂环基非芳香性的。环烷基和杂环烷基可以进一步取代,例如,用本文所述的任何取代基取代。

[0286] 仅举例,烷基可以有1-20个碳原子(凡是在本文中出现的数字范围,如“1-20”是指给定范围内的每个整数;例如,“1-20个碳原子”意味着烷基可以由1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等,直到并包括20个碳原子组成,尽管本定义也包括没有指定数字范围的“烷基”一词的出现)。正如本文进一步指出的,化合物的烷基可以被指定为“ C_1-C_4 烷基”或类似的名称。仅举例,“ C_1-C_4 烷基”表示烷基链中有1-4个碳原子,即烷基链选自甲基、乙基、丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基和叔丁基。

[0287] 如本文所用,术语“抗体”是指免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子,实例包括但不限

于此: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 它们的组合, 以及在任何脊椎动物的免疫反应中产生的类似分子(例如, 哺乳动物如人、山羊、兔子和小鼠) 和抗体片段(如本领域已知的F(ab')₂片段、Fab' 片段、Fab'-SH片段和Fab片段、重组抗体片段(如sFv片段、dsFv片段、双特异性sFv片段、双特异性dsFv片段、F(ab)₂片段。单链Fv蛋白("scFv")、二硫稳定Fv蛋白("dsFv")、二抗体和三抗体(如本领域已知的) 和骆驼抗体(camelid antibody)), 它们与感兴趣的分子(或一组高度相似的感兴趣的分子) 特异性结合以基本上排除与其他分子的结合。抗体还指至少包含轻链或重链免疫球蛋白可变区的多肽配体, 它能特异性地识别和结合抗原的表位。抗体可以由重链和轻链组成, 每条链都有可变区, 称为重可变区(VH) 和轻可变区(VL)。VH区和VL区一起负责结合抗体所识别的抗原。术语“抗体”也包括完整的免疫球蛋白和本领域内众所周知的变体和部分。

[0288] 如本文所用, 术语“B细胞淋巴瘤/白血病11A”或“BCL11A”是通过其与小鼠Bcl11a/Evi9蛋白的相似性编码C2H2型锌指蛋白。相应的小鼠基因是骨髓性白血病中逆转录病毒整合的一个常见位点, 并可能部分地通过与BCL6的相互作用发挥白血病基因的功能。在造血细胞分化过程中, 所述基因被下调。它可能参与淋巴瘤的发病机制, 因为与B细胞恶性肿瘤相关的易位也会使其表达失调。已发现基因有多种转录变体, 编码几种不同的同种型。

[0289] 如本文所用, 术语“C9orf72”是指为制造在各种组织中发现的蛋白提供指令的基因。所述蛋白在大脑外层(大脑皮层) 的神经细胞(神经元) 以及大脑和脊髓中控制运动的特殊神经元(运动神经元) 中含量丰富。C9orf72蛋白被认为位于神经元顶端称为突触前终端的区域。这个区域对神经元之间发送和接收信号很重要。

[0290] 如本文所用, “C_a至C_b”或“C_a-C_b”中的“a”和“b”是整数, 指烷基、烯基或炔基中的碳原子数, 或环烷基、环烯基、环炔基或芳基的环中的碳原子数, 或杂烷基、杂环基、杂芳基或杂脂环基的碳原子和杂原子的总数。即, 烷基、烯基、炔基、环烷基的环、环烯基的环、环炔基的环、芳基的环、杂芳基的环或杂芳基的环可以包含从“a”到“b”(包括) 的碳原子。也就是说, 烷基、因此, 例如, “C₁-C₄烷基”是指具有1-4个碳原子的所有烷基, 即CH₃-、CH₃CH₂-、CH₃CH₂CH₂-、(CH₃)₂CH-、CH₃CH₂CH₂CH₂-、CH₃CH₂CH(CH₃)-和(CH₃)₃C-。如果没有指定“a”和“b”的烷基、烯基、炔基、环烷基、环炔基、芳基、杂芳基或杂脂环基, 应假定这些定义中描述的最广泛范围。

[0291] 如本文所用, 术语“Cas蛋白”是指RNA引导的核酸酶, 其包含Cas蛋白或其片段。Cas蛋白也可称为CRISPR(成簇的规律间隔的短回文重复) 相关核酸酶。CRISPR是一种适应性免疫系统, 提供对可动遗传因子(病毒、转座因子和接合质粒) 的保护。CRISPR簇包含间隔子、与先行可动因子互补的序列和靶侵入核酸。CRISPR簇被转录和加工成CRISPR RNA(crRNA)。CRISPR-Cas系统可以进一步表征为1类或2类系统。1类系统特征在多亚单位效应器; 即包含多个Cas蛋白。1类系统可进一步表征为I型、III型和IV型。2类系统的特征在具有多个结构域的单效应蛋白。1类系统可进一步表征为II型、V型和VI型。例如, 2类II型系统包括Cas9, 而2类V型系统包括Cpf1(Cas 12a)。Cas蛋白的进一步实例包括但不限于Cas9蛋白、Cas9直系同源物编码的Cas9类蛋白、Cas9样合成蛋白、Cpf1蛋白、Cpf1直系同源物编码的蛋白、Cpf1样合成蛋白、C2C₁蛋白、C2c2蛋白、C2c3蛋白, 以及其变体和其修饰。Cas蛋白的其他实例包括但不限于MAD7、MAD2、Cpf1、C2C₁、C2c3、Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas13a、Cas13b和Cas13c。Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也被

称为Csn1和Csx12)、Cas100、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、Cpf1、C2C₁、C2c3、Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e、Cas13a、Cas13b和Cas13c。

[0292] 在一些实施方案中,Cas蛋白是2类CRISPR相关蛋白。如上所述,本文定义的“2类CRISPR-Cas系统”是指以单一蛋白作为效应复合物(如Cas9)运作的CRISPR-Cas系统。如本文所定义的,“2类CRISPR-Cas系统”是指在其Cas基因中包含cas9基因的CRISPR-Cas系统。“2类II-A型CRISPR-Cas系统”是指包含Cas9和Csn2基因的CRISPR-Cas系统。“2类II-B型CRISPR-Cas系统”是指包含Cas9和Cas4基因的CRISPR-Cas系统。“2类II-C型CRISPR-Cas系统”是指包含Cas9基因但既不包含Csn2也不包含Cas4基因的CRISPR-Cas系统。“2类V型CRISPR-Cas系统”是指在其Cas基因中包含Cas12基因(Cas12a、Cas12b或Cas12c基因)的CRISPR-Cas系统。“2类VI型CRISPR-Cas系统”是指其Cas基因中包含cas13基因(cas13a、13b或13c基因)的CRISPR-Cas系统。每个野生型CRISPR-Cas蛋白与一个或多个同源多核苷酸(最典型的是RNA)相互作用以形成核蛋白复合物(最典型的是核糖核蛋白复合物)。Haft et.al.,“A Guild of 45CRISPR-Associated(Cas)Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes,PLoS Comput.Biol.,2005,Nov;1(6):e60描述额外的Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白是修饰的Cas蛋白,例如本文确定的任何Cas蛋白的修饰的变体。

[0293] 如本文所用,术语“Cas9”或“Cas9蛋白”是指在带有靶多核苷酸的互补序列的CRISPR RNA(crRNA)的引导下能够表现出核酸内切酶活性(例如,切割多核苷酸内的磷酸二酯键)的酶(野生型或重组)。Cas9多肽是本领域已知的,并包括来自各种生物来源中任一种的Cas9多肽,包括例如原核生物来源,如细菌和古细菌。细菌Cas9包括放线菌(如内氏放线菌)Cas9、产水菌(Aquificae)Cas9、拟杆菌Cas9、衣原体Cas9、绿弯菌Cas9、蓝细菌(Cyanobacteria)Cas9、迷踪菌(Elusimicrobia)Cas9、纤维杆菌Cas9、厚壁菌Cas9(如,化脓性链球菌Cas9、嗜热链球菌Cas9、无害李斯特菌Cas9、无乳链球菌Cas9、变形链球菌Cas9和粪肠球菌Cas9)、梭杆菌Cas9、变形菌(如脑膜炎奈瑟菌、空肠弯曲菌和红嘴鸥弯曲杆菌)Cas9、螺旋体(如齿垢密螺旋体)Cas9以及类似物。古细菌Cas9包括广古菌Cas9(例如,海沼甲烷球菌(Methanococcus maripaludis)Cas9)以及类似物。各种Cas9和相关的多肽都是已知的,并且在例如Makarova et al.(2011)Nature Reviews Microbiology 9:467-477, Makarova et al.(2011)Biology Direct 6:38,Haft et al.(2005)PLOS Computational Biology 1:e60 and Chylinski et al.(2013)RNA Biology 10:726-737;K.Makarova et al.,An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems.(2015)Nat.Rev.Microbio.13:722-736;和B.Zetsche et al.Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2CRISPR-Cas system.(2015)Cell.163(3):759-771中进行了综述。其他Cas9多肽可以是土拉弗朗西斯菌亚种(Francisella tularensis subsp.)novicida Cas9、多杀巴氏杆菌(Pasteurella multocida)Cas9、鸡败血支原体(myoplasma galliseptic str.F Cas9、Nitratifractor salsuginis str DSM 16511Cas9、Parvibaculum lavamentivorans Cas9、Roseburia intestinalis Cas9、Neisseria cinera Cas9、醋杆菌(Gluconacetobacter diazotrophicus)Cas9、固氮螺菌B510 Cas9、

Spaerochaeta globus str.Buddy cas9、柱状黄杆菌Cas9、Fluviicola taffensis Cas9、梯足类杆菌(Bacteroides coprophilus)Cas9、运动型支原体(mycoplasma mobile)Cas9、法氏乳酸杆菌(Lactobacillus falcipari)Cas9、巴氏链球菌Cas9、约氏乳酸杆菌Cas9、假间歇性葡萄球菌(Staphylococcus pseudintermedius)Cas9、filifactor alocis Cas9、齿垢密螺旋体Cas9、嗜肺军团菌str.Paris Cas9、华德萨特菌(Sutterella wadsworthensis)Cas9和白喉杆菌(Corynebacter diphtheriae)Cas9。术语“Cas9”包括任何Cas9家族的Cas9多肽,包括Cas9的任何同种型。超出本文具体陈述或提供的那些的各种Cas9同源物、直系同源物和变体的氨基酸序列在本领域中是已知的,并且是公开的,属于本领域技术人员的范围,因此属于本公开的精神和范围。

[0294] 如本文所用,术语“Cas12”或“Cas12蛋白”指任何Cas12蛋白,包括但不限于Cas12a、Cas12b、Cas12c、Cas12d、Cas12e。在一些实施方案中,Cas12蛋白具有与功能性Cas12蛋白的氨基酸序列至少85%(或至少90%、或至少95%、或至少96%、或至少97%、或至少98%、或至少99%)相同的氨基酸序列,特别是来自氨基酸球菌(Acidaminococcus sp.)菌株BV3L6(Uniprot Entry:U2UMQ6;Uniprot Entry Name:CS12A_ACISB)或来自土拉弗朗西斯菌的Cas12a/Cpf1蛋白(Uniprot Entry:A0Q7Q2;Uniprot Entry Name:CS12A_FRATN)。在一些实施方案中,Cas12蛋白可以是与自然界中发现的蛋白基本相同的Cas12多肽,或者是与自然界中发现的Cas12蛋白具有至少85%序列相同性(或至少90%序列相同性、或至少95%序列相同性、或至少96%序列相同性、或至少97%序列相同性、或至少98%序列相同性、或至少99%序列相同性)并具有基本相同生物学活性的Cas12多肽。Cas12a蛋白的实例包括但不限于FnCas12a、AsCas12a、LbCas12a、Lb5Cas12a、HkCas12a、OsCas12a、TsCas12a、BbCas12a、BoCas12a或Lb4Cas12a;Cas12a优选是LbCas12a。Cas12b蛋白的实例包括但不限于AacCas12b、Aac2Cas12b、AkCas12b、AmCas12b、AhCas12b、AcCas12b。

[0295] 如本文所用,术语“CCR5”是指C-C趋化因子受体5型,它是白细胞表面的一种蛋白,因为它充当趋化因子的受体参与到免疫系统。这是T细胞被吸引到特定组织和靶向器官的过程。许多形式的艾滋病毒,即导致艾滋病的病毒,最初使用CCR5进入和感染宿主细胞。某些个体在CCR5基因中携带一种称为CCR5- Δ 32的突变,保护他们免受这些HIV病毒株的影响。

[0296] 如本文所用,术语“缀合物”是指共价连接、结合或以其他方式偶联成更大的构造的两个或多个分子或部分(包括大分子或超分子分子)。

[0297] 如本文所用,术语“交联剂”是指在两个或多个分子链、结构域或其他分子之间提供链接(例如分子内链接或分子间链接)的键或分子。在一些实施方案中,交联剂是分子,它在分子链之间形成链接以形成连接的分子。

[0298] 如本文所用,术语“内吞作用”是指一种主动运输的形式,该过程中细胞通过在能量-使用的过程中吞噬分子(如蛋白)而将其运入细胞。内吞作用包括胞饮作用和吞噬作用。胞饮作用是一种内吞作用模式,其中小颗粒被带入细胞,形成一个内陷,然后悬浮在小泡中。这些胞饮小泡随后与溶酶体融合,以水解(分解)这些颗粒。吞噬作用是细胞吞噬固体颗粒形成称为吞噬体的内部隔室的过程。

[0299] 如本文所用,短语“有效量”是指本文所述的组合物或制剂的量,它会引起研究人员、兽医、医生或其他临床医生正在寻求的组织、系统、动物或人的诊断、生物或医学反应。

[0300] 如本文所用,术语“基因”广指与生物功能相关的任何DNA片段。基因包含的序列包括但不限于编码序列、启动子区域、顺式调控序列、调控蛋白的特定识别序列的非表达的DNA片段、促进基因表达的非表达的DNA片段、设计为具有期望参数的DNA片段或其组合。

[0301] 如本文所用,术语“向导多核苷酸”、“向导RNA”或“gRNA”可指任何与靶多核苷酸序列具有充分互补性的多核苷酸序列,以与靶序列杂交,并引导CRISPR复合物与靶序列的直接序列特异性结合。当使用适当的比对算法进行最佳比对时,向导多核苷酸和其相应的靶序列之间的互补程度可以是约或超过约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更多。在一些实施方案中,当使用适当的比对算法进行最佳比对时,向导多核苷酸和其相应的靶序列之间的互补程度可以低于约50%,如40%、30%、20%或更少。最佳排列可以通过使用任何合适的序列排列算法来确定,其中非限制性的实例包括Smith-Waterman算法、Needleman-Wunsch算法、基于Burrows-Wheeler变换的算法(如Burrows Wheeler Aligner)、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies、Eland (Illumina, San Diego, Calif.))、SOAP(可在soap.genomics.org.cn获得)和Maq(可在maq.sourceforge.net获得)。向导多核苷酸(在本文中也称为引导序列并且包括单引导序列(sgRNA))的长度可以是约或超过约5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75、90、100、110、112、115、120、130、140或更长的核苷酸。

[0302] 向导多核苷酸可以包含与靶DNA序列互补的核苷酸序列。引导序列的这一部分可以称为向导RNA的互补区。在某些情况下,这两者之间的区别是将其中一个称为互补区或靶区,将多核苷酸的其余部分称为引导序列或tracrRNA。引导序列还可以包括一个或多个偶联至引导序列的3'端的miRNA靶序列。引导序列可以包含一个或多个MS2RNA适配体,其并入引导链中不是互补部分的部分。如本文所用,术语引导序列可以包括任何特别修饰的引导序列,包括但不限于那些配置用于协同激活介质(SAM)实现的CRISPR(Nature 517,583-588 (29 January 2015))。向导多核苷酸的长度可以小于约150、约125、约75、约50、约45、约40、约35、约30、约25、约20、约15、约12,或更少的核苷酸。向导多核苷酸指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的能力可以通过任何合适的检测来评估。例如,足以形成CRISPR复合物的CRISPR系统的组件,包括待测的向导多核苷酸,可以提供给具有相应靶序列的宿主细胞,例如通过编码CRISPR序列组件的载体的转染,然后评估靶序列内的优先切割,或通过本文其他地方提供的任何递送系统。同样,目标多核苷酸序列的切割可以在试管中通过如下进行评估:提供靶序列、CRISPR复合物的成分(包含待测的向导多核苷酸和与测试向导多核苷酸不同的对照向导多核苷酸),并比较测试和对照向导多核苷酸反应之间在靶序列上的结合或切割率。其他检测方法也是可能的,本领域技术人员也会想到。

[0303] 如本文所用,术语“血红蛋白亚单位 β ”或“HBB”指的是为制造称为 β 珠蛋白的蛋白提供指令的基因。 β 珠蛋白是称为血红蛋白的更大的蛋白的组成部分(亚单位),血红蛋白位于红细胞内。在成年人中,血红蛋白通常由四个蛋白亚单位组成: β 珠蛋白的两个亚单位和称为 α 珠蛋白的另一种蛋白的两个亚单位, α 珠蛋白由另一个称为HBA的基因产生。这些蛋白亚单位中的每一个都与称为血红素的含铁分子相连(结合);每个血红素的中心含有铁分子,可以与一个氧分子结合。红细胞内的血红蛋白与肺部的氧分子结合。然后这些细胞通过血液流动,将氧气递送到全身组织。

[0304] 如本文所用,除非另有说明,术语“杂烷基”本身或与另一术语组合,是指由至少一个碳原子和至少一个选自O、N、P、Si和S的杂原子组成的稳定直链或支链或其组合,其中氮、磷和硫原子可以任选地被氧化,氮杂原子可以任选地是季铵盐。杂原子O、N、P、S和Si可以位于杂烷基的任何内部位置,或者位于烷基与分子其余部分相连的位置。杂烷基不是环化的。实例包括但不限于 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 和 $-\text{CN}$ 。最多两个杂原子可以是连续的,例如, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 。

[0305] 本文所用的术语“杂原子”是指碳和氢以外的原子。实例包括氮、氧、硫、磷、氯、溴和碘。

[0306] 如本文所用,术语“宿主细胞”或“靶细胞”是指将使用本公开的方法修饰的细胞。合适的哺乳动物宿主细胞包括但不限于人细胞、鼠类细胞、非人灵长类细胞(如恒河猴细胞)、人祖细胞或干细胞、293细胞、HeLa细胞、D17细胞、MDCK细胞、BHK细胞和Cf2Th细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是造血细胞,如造血祖细胞/干细胞(如CD34阳性造血祖细胞/干细胞)、单核细胞、巨噬细胞、外周血单核细胞、CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞或树突细胞。在一些实施方案中,造血细胞(如CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞和/或单核/巨噬细胞)被聚合物纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物转染,其中所述被转染的造血细胞可以是异体的、自体的,或来自匹配的同胞。在一些实施方案中,造血祖细胞/干细胞是CD34阳性的,并可以分离自患者的骨髓或外周血。在一些实施方案中,分离的CD34阳性的造血祖细胞/干细胞(和/或本文所述的其他造血细胞)是用本文所述的聚合物纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物进行转染。

[0307] 如本文所用,术语“透明质酸”是指能够结合细胞表面受体以实现主动靶向的聚合物。透明质酸是一种多糖,与胶原蛋白一起,是细胞外基质的主要组分之一。

[0308] 如本文所用,术语“次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核苷转移酶”或“HPRT”是指由HPRT1基因(见,例如SEQ ID NO:12)编码的参与嘌呤代谢的酶。HPRT1位于X染色体上,因此在男性中以单拷贝存在。HPRT1编码转移酶,通过将5-磷酸核糖基团从5-磷酸核糖基1-焦磷酸转移到嘌呤,催化次黄嘌呤转化为单磷酸肌苷和鸟嘌呤转化为单磷酸鸟苷。所述酶的主要功能是从降解的DNA中回收嘌呤,用于重新合成嘌呤。

[0309] 如本文所用,当提及RNAi对基因表达的影响时,术语“敲低(knock-out)”或“敲低(knockout)”意味着基因表达水平被抑制,或在基本相同的条件但在没有RNAi的情况下,减少到低于一般观察到的水平。

[0310] 如本文所用,术语“敲除(knock-out)”或“敲除(konckout)”是指部分或完全抑制内源基因的表达。这通常是通过缺失一部分基因或通过第二序列替代一部分来实现的,但还可以由对基因的其他修饰引起,如引入终止密码子、关键氨基酸的突变、去除内含子连接点(junction)等。因此,“敲除”构建体是核酸序列,如DNA构建体,当它被引入细胞时,会导致细胞中由内源DNA编码的多肽或蛋白的表达受到(部分或完全)抑制。在一些实施方案中,“基因敲除”包括突变,如点突变、插入、缺失、移码或错义突变。

[0311] 如本文所用,术语“感染复数”或“MOI”是指试剂(例如噬菌体或更一般的病毒、细菌)与感染靶标(例如细胞)的比例。例如,当提到用病毒颗粒接种的一组细胞时,感染复数

或MOI是指在规定的空间内存在的病毒颗粒数量与靶细胞数量的比例。

[0312] 如本文所用,术语“药学上可接受的载剂或赋形剂”是指可用于制备药物组合物或制剂的载剂或赋形剂,载剂或赋形剂通常是安全的、无毒的,并且既不是生物上的也不是其他方面的不良品,还包括兽医使用以及人药物使用可接受的载剂或赋形剂。

[0313] 如本文所用,术语“带正电的单体”或“阳离子单体”是指带净正电荷的单体,即,+1、+2、+3。在一些实施方案中,带正电的单体是包含带正电基团的单体。如本文所用,术语“带负电的单体”或“阴离子单体”是指具有净负电荷的单体,即-1、-2、-3。在一些实施方案中,负电荷单体是包含带负电基团的单体。如本文所用,术语“中性单体”是指具有净中性电荷的单体。

[0314] 如本文所用,术语“聚合物”被定义为包括均聚物、共聚物、互穿网络和低聚物。因此,术语聚合物在此可与术语均聚物、共聚物、互穿聚合物网络等互换使用。术语“均聚物”被定义为来自单一类型单体的聚合物。术语“共聚物”被定义为由超过一种类型的单体衍生化的聚合物,包括由两种单体种类共聚得到的共聚物,由三种单体种类得到的共聚物(“三元共聚物”),由四种单体种类得到的共聚物(“四元共聚物”),等等。术语“共聚物”被进一步定义为包括无规共聚物、交替共聚物、接枝共聚物和嵌段共聚物。共聚物,如该术语一般使用,包括相互渗透的聚合物网络。术语“无规共聚物”被定义为由大分子组成的共聚物,其中在链中的任何给定位置找到特定单体单元的概率与相邻单元的性质无关。在无规共聚物中,单体单元的序列分布遵循伯努利统计。术语“交替共聚物”被定义为由大分子组成的共聚物,其中包含交替排列的两个种类的单体单元。

[0315] 如本文所用,术语“靶向部分(targeting moiety)”或“靶向部分(targeting moieties)”及其衍生物,是指定位到或远离特定位置(例如,在个体内)的分子。例如,在一些实施方案中,靶向部分帮助将纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物引导到特定的组织或位置。在一些实施方案中,靶向部分帮助将纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物的负载(例如,核糖核酸蛋白复合物)递送至在体内的特定组织部位或者在体内或体外的特定细胞类型。非限制性的实例包括抗体、抗体片段、肽、蛋白、多糖、碳水化合物、核酸、维生素、适配体或小分子。

[0316] 如本文所用,术语“稳定化部分(stabilizing moiety)”或“稳定化部分(stabilizing moieties)”及其衍生物,是指帮助提高纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物的稳定性的部分。例如,在一些实施方案中,稳定化部分通过减少聚集、减少渗透、减少吞噬作用、延长系统性循环时间或其组合,帮助提高纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物的稳定性。在一些实施方案中,稳定化部分也可以帮助提高纳米胶囊聚合物纳米胶囊缀合物的负载(如核糖核蛋白复合物)的递送,但不希望受到理论的约束。

[0317] 如本文所用,“程序性细胞死亡蛋白1”或“PD-1”是指一种细胞表面受体,它在下调免疫系统和通过抑制T细胞炎症活动促进自我耐受方面发挥重要作用。PD-1是一个免疫检查点,通过促进淋巴结中抗原特异性T细胞的凋亡(程序性细胞死亡),同时减少调节性T细胞(抗炎、抑制性T细胞)的凋亡的双重机制来防范自身免疫。

[0318] 如本文所用,术语“反应性基团”是指能够与不同的部分的官能团化学缔合、相互作用、杂交、氢键作用或偶联的官能团。在一些实施方案中,两个反应性基团或两个反应性官能团之间的“反应”可以指两个反应性基团或两个反应性官能团之间形成共价连接;或可

能意味着两个反应性基团或两个反应性官能团相互缔合、相互作用、相互杂交、相互氢键作用,等等。

[0319] 如本文所用,术语“个体”是指哺乳动物,如人、老鼠或灵长类动物。通常情况下,哺乳动物是人(智人)。

[0320] 每当基团或分子被描述为“取代”或“任选取代”(或“任选具有”或“任选包含”)时,该基团可以是未取代的或被一个或多个所示的取代基取代的。同样,当基团被描述为“取代或未取代”时,如果取代,则取代基可选自一个或多个所述的取代基。如果没有标明取代基,则意味着标明“任选取代”或“取代”的基团可以被一个或多个基团单独取代并独立选自烷基、烯基、炔基、环烷基、环烯基、环炔基、芳基、杂芳基、杂脂环基、芳烷基、杂芳烷基、(杂脂环基)烷基、羟基、保护羟基、烷氧基、芳氧基、酰基、巯基、烷硫基、芳硫基、氰基、氰酸酯、卤素、硫代羰基、O-氨基甲酰基、N-氨基甲酰基、O-硫代氨基甲酰基、N-硫代氨基甲酰基、C-酰氨基、N-酰氨基、S-磺酰胺、N-磺酰胺、C-羧基、受保护的C-羧基、O-羧基、异氰酸根合、硫氰酸根合、异硫氰酸根合、硝基、甲硅烷基、次磺酰基(sulfenyl)、亚磺酰基(sulfinyl)、磺酰基、卤代烷基、卤代烷氧基、三卤甲磺酰基、三卤甲磺酰氨基、氨基、醚、氨基(例如单取代氨基或双取代氨基)及其受保护的衍生物。

[0321] 如本文所用,“TCR”指的是T细胞受体,它是在T细胞或T淋巴细胞的表面发现的分子,负责识别作为与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽的抗原片段。TCR和抗原肽之间的结合具有相对较低的亲和力,是退化的:即许多TCR识别同一抗原肽,许多抗原肽被同一TCR识别。

[0322] 如本文所用,术语“转铁蛋白(transferrin)”或“转铁蛋白(transferrins)”是指铁结合糖蛋白,据信其负责体内的铁运输。据认为,转移受体在特定组织和细胞中被高度表达。

[0323] 如本文所用,术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”或“治疗(treat)”,就特定条件而言,是指获得所需的药理学和/或生理学效果。这种效果可以是预防性的,即完全或部分预防疾病或其症状,和/或可以是治疗性的,即部分或完全治愈疾病和/或归因于疾病的不利影响。本文所用的“治疗”包括对个体,特别是对人的疾病或病症的任何治疗,并包括:(a)预防疾病或病症发生在可能对该疾病有倾向性但尚未被诊断为患有该疾病的个体身上;(b)抑制疾病或病症,即阻止其发展;和(c)缓解或减轻疾病或病症,即导致疾病或病症的消退和/或缓解一种或多种疾病或病症症状。“治疗”也可以包括递送药剂或治疗的给药,以提供药理效果,甚至在没有疾病、病症或疾病状况的情况下。在一些实施方案中,术语“治疗”是指给药本公开的化合物以减轻宿主,优选哺乳动物个体,更优选人的疾病或病症。因此,术语“治疗”可以包括:防止宿主发生病症,特别是当宿主有获得该疾病的倾向但尚未被诊断出患有该疾病时;抑制病症;和/或缓解或逆转病症。就本公开的方法是针对预防病症而言,可以理解的是,术语“预防”并不要求完全阻断疾病状态。相反,如本文所用,术语预防是指技术人员识别易受病症影响的人群的能力,从而使本公开的化合物的给药可以在疾病发作之前发生。该术语并不意味着必须完全避免疾病状态。

[0324] 如本文所用,术语“Zeta电位”是指浸在导电液体中的固体颗粒表面之间存在的电位差。

[0325] 聚合物纳米胶囊

[0326] 本文中提供的是聚合物纳米胶囊,例如包含负载的聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,“聚合物纳米胶囊”是包含聚合物壳和负载的物质组合物。在一些实施方案中,负载存在于聚合物壳的核中。在一些实施方案中,负载被封装在聚合物壳内。

[0327] 负载

[0328] 任何负载都可以包含在本公开的聚合物纳米胶囊中。负载的非限制性实例包括但不限于:核糖核蛋白或核糖核蛋白复合物、siRNA分子、shRNA分子、表达载体、多核苷酸,如具有约50-约500个碱基对的多核苷酸、多肽、酶、抗体、抗体片段、载体(如AAV载体,腺苷相关载体)等。虽然本公开内容可将核糖核蛋白复合物举例为负载,但本文公开的聚合物纳米胶囊(或聚合物纳米胶囊的缀合物)并不限于包含核糖核蛋白或核糖核蛋白复合物的那些。

[0329] 本文还提供递送由聚合物纳米胶囊携带和/或封装的负载的方法。在一些实施方案中,提供使用所公开的聚合物纳米胶囊和/或聚合物纳米胶囊缀合物将包含核糖核蛋白复合物(如Cas9/gRNA)的负载以高效率送入细胞(例如宿主细胞)的方法。申请人发现,所公开的聚合物纳米胶囊和/或聚合物纳米胶囊缀合物在将核糖核蛋白复合物递送进入宿主细胞(如多能干细胞)方面具有令人惊讶的效果。在一些实施方案中,本公开还提出自组装和原位聚合的新策略,以将核糖核蛋白复合物印记入聚合物纳米胶囊。本文提供的“核糖核酸复合物”是指包含核蛋白和核糖核酸的复合物或颗粒。本文提供的“核蛋白”是指能够结合核酸(例如, RNA、DNA)的蛋白。当核蛋白与核糖核酸结合时,它称为“核糖核蛋白”。核糖核酸和核糖核酸之间的相互作用被认为是直接的,例如通过共价键,或间接的,例如通过非共价键(如静电作用(如离子键、氢键、卤素键)、范德华作用(如偶极-偶极、偶极-诱导偶极、伦敦色散)、环堆积叠(π 效应)、疏水相互作用等)。在一些实施方案中,核糖核酸蛋白包含与核糖核酸非共价结合的RNA结合基序。例如, RNA结合基序中带正电荷的芳香族氨基酸残基(如赖氨酸残基)可与RNA的负核酸磷酸骨架形成静电相互作用,从而形成核糖核蛋白复合物。核糖核蛋白的非限制性实例包括核糖体、端粒酶、RNAseP、hnRNP、CRISPR相关蛋白9(Cas9)和小核RNPs(SnRNPs)。核糖核酸蛋白可能是酶。在实施方案中,核糖核酸蛋白是核酸内切酶。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9。在其他实施方案中,所述Cas蛋白是Cas12。在一些实施方案中,Cas12蛋白是Cas12a。在其他实施方案中,Cas12蛋白是Cas12b。

[0330] 在一些实施方案中,CRISPR相关蛋白被认为是与核糖核酸结合从而形成核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,核糖核酸是向导RNA。在一些实施方案中,向导RNA包含一个或多个RNA分子。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas9并且核糖核酸是向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas12a并且核糖核酸是向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas12b并且核糖核酸是向导RNA。

[0331] 在一些实施方案中,gRNA包含与靶位点互补的核苷酸序列。互补核苷酸序列可介导核糖核酸复合物与靶位点的结合,从而提供核糖核酸复合物的序列特异性。在一些实施方案中,向导RNA与靶核酸是互补的。在一些实施方案中,向导RNA与靶核酸序列结合。在一些实施方案中,向导RNA是与CRISPR核酸序列互补的。在一些实施方案中,向导RNA的补体与靶核酸的序列相同性为约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%。如本文提供的靶核酸序列是由细胞表达的核酸序列。在一些实施方案中,靶核酸序列是外源性核酸序列。在一些实施方案中,靶核

酸序列是内源性核酸序列。在一些实施方案中,靶核酸序列形成细胞基因的一部分。因此,在一些实施方案中,向导RNA是与细胞基因或其片段互补的。在一些实施方案中,向导RNA与靶核酸序列的比例为约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%。在一些实施方案中,向导RNA与细胞基因的序列的互补约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%。在一些实施方案中,向导RNA与细胞基因序列结合。

[0332] 在一些实施方案中,可以采用两种不同版本的Cas9 RNP复合物:(1) sgRNA和Cas9蛋白的组合,和(2) crRNA、tracrRNA(两条独立的链形成的完整的向导RNA)和Cas9蛋白的组合。在一些实施方案中,Cas9是两个版本的共同组分,被用作重组蛋白。在一些实施方案中,第一个版本的RNA组分(sgRNA)通常是用体外转录法合成的;而第二个版本的RNA组分(crRNA和tracrRNA)是用化学方法合成的。

[0333] 在一些实施方案中,Cas9蛋白是重组*S. pyogenes* Cas9核酸酶,如从表达密码子优化的Cas9的大肠杆菌菌株中纯化出来的,其中包含1个N端核定位序列(NLS),2个C端NLS和1个C端6-His标签。在一些实施方案中,向导RNA由两部分组成,即来自IDT(Cat#1072532)的tracrRNA(67nt),以及crRNA(36nt)。两者都进行化学修饰,以增加稳定性。

[0334] 在不希望受理论约束的情况下,关于基因疗法,一般认为,表达盒、转基因、基因片段或点突变的靶向整合(与随机整合相反)可能提供一种或多种优势。具体来说,人们认为靶向整合可以提供更好的治疗效果,可以减少插入性突变的风险和其组合。

[0335] 有鉴于此,已经描述靶向“安全港基因座(safe harbor loci)”作为整合点的潜在优势,即Papasavva,P.et al.(2019).Mol Diagn Ther.23(2):201-222,其公开的内容在此引援全部并入本文。安全港基因座被理解为指可以安全插入和/或表达转基因或其他遗传因子的基因座或位点。

[0336] 适合的安全港基因座的实例包括但不限于AAV整合点1(AAVS1)、HPRT基因座、白蛋白基因座、hROSA26基因座和化学因子(CC基序)受体5(CCR5)基因座。人们认识到,一些安全港基因座可优选能够插入自主表达盒,例如AAVS1和HPRT。其他安全港基因座可优选能使内源性控制元件的转基因表达,例如hROSA26和CCR5。

[0337] 在一些实施方案中,在纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物中存在的或由其封装的负载靶向安全港基因座。在一些实施方案中,存在于纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物中或由其封装的负载包含用于插入安全港基因座中的自主表达盒。在其他实施方案中,存在于纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物中或由其封装的负载包含一个或多个用于插入安全港基因座的转基因。在一些实施方案中,安全港位点选自AAV整合点1(AAVS1)、HPRT基因座、白蛋白基因座hROSA26基因座和CCR5基因座。在一些优选的实施方案中,安全港基因座是HPRT。在一些实施方案中,纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物包含靶向安全港基因座的负载。在一些实施方案中,纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物包含靶向HPRT基因座的负载。

[0338] 在一些实施方案中,负载包含核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,核蛋白复合物包含靶向CCR5基因座的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向CCR5基因座的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向CCR5基因座的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向CCR5基因的向导RNA座和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向CCR5基因座的向导RNA和

Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向CCR5基因座的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:1至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:1的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:1至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含SEQ ID NO:1的向导RNA和Cas蛋白。

[0339] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT基因座的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT基因座的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT基因座的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT基因座的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT基因座的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT基因座的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:2至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:2的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:2至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:2的向导RNA和Cas蛋白。

[0340] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HBB基因座的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HBB基因座的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HBB基因座的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HBB基因座的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HBB的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HBB的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:2至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:3的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:3至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:3的向导RNA和Cas蛋白。

[0341] 在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:39-54中任一个具有至少90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:39-54中任一个具有至少95%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含具有SEQ ID NO:39-54中任一个的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:39-54中的任一个具有至少95%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含具有SEQ ID NO:39-54中任一个的向导RNA和Cas蛋白。

[0342] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向TCR的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向TCR的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向TCR的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向TCR的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向TCR的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向TCR的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:4至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些

实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:4的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:4至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:4的向导RNA和Cas蛋白。

[0343] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向PD-1的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向PD-1的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向PD-1的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向PD-1的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向PD-1的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向PD-1的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:5至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:5的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:5至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:5的向导RNA和Cas蛋白。

[0344] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向BCL11a的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向BCL11a的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向BCL11a的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向BCL11a的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向BCL11a的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向BCL11a的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:6至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:6的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:6至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:6的向导RNA和Cas蛋白。

[0345] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向C9orf72的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向C9orf72的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向C9orf72的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向C9orf72的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向C9orf72的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向C9orf72的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:7至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:7的向导RNA。在一些实施方案中,糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:7至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:7的向导RNA和Cas蛋白。

[0346] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha1-full的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha1-full的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha1-full的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha1-full的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha1-full的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha1-full的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:8至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖

核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:8的向导RNA。在一些实施方案中,糖核酸复合物包含与SEQ ID NO:8至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:8的向导RNA和Cas蛋白。

[0347] 在一些实施方案中,负载包含核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha2-full1的向导RNA。一些实施方案中,所述核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha2-full1的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha2-full1的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha2-full1的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha2-full1的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gDrosha2-full1的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:9至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:9的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:9至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:9的向导RNA和Cas蛋白。

[0348] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT4-full1的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT4-full1的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向TCR的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT4-full1的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT4-full1的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT4-full1的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:10至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:10的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:10至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:10的向导RNA和Cas蛋白。

[0349] 在一些实施方案中,负载包含核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT3-full1的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT3-full1的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT3-full1的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT3-full1的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT3-full1的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT3-full1的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:11至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:11的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:11至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:11的向导RNA和Cas蛋白。

[0350] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gWas1的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gWas1的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gWas1的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gWas1的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gWas1的

向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gWas1的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:12至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:12的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:12至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:12的向导RNA和Cas蛋白。

[0351] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG1-117的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG1-117的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG1-117的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG1-117的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG1-117的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG1-117的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:13至少有90%序列相同性向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:13的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:13至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:13的向导RNA和Cas蛋白。

[0352] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG2-114的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向GHBG2-114的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG2-114的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG2-114的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG2-114的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG2-114的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:14至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:14的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:14至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:14的向导RNA和Cas蛋白。

[0353] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB2的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB2的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB2的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB2的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB2的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB2的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:15至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:15的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:15至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:15的向导RNA和Cas蛋白。

[0354] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a1的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向GHBG12a1的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a1的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核

蛋白复合物包含靶向gHBG12a1的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a1的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a1的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:16至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:16的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:16的至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:16的向导RNA和Cas蛋白。

[0355] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a2的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a2的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a2的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a2的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a2的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a2的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:17至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:17的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:17至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:17的向导RNA和Cas蛋白。

[0356] 在一些实施方案中,负载包含核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a3的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a3的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a3的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a3的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a3的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a3的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:18至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:18的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:18具有至少90%序列相同性的RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:18的向导RNA和Cas蛋白。

[0357] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a4的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a4的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a4的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a4的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a4的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBG12a4的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:19至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:19的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:19具有至少90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:19的向导RNA和Cas蛋白。

[0358] 在一些实施方案中,负载包含核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a1的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向

gHBB12a1的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a1的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a1的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a1的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a1的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:20至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:20的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:20具有至少90%序列相同性的RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:20的向导RNA和Cas蛋白。

[0359] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a2的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a2的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a2的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a2的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a2的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHBB12a2的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:21至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:21的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:21具有至少90%序列相同性的RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:21的向导RNA和Cas蛋白。

[0360] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a1的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a1的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a1的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a1的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a1的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a1的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:22至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:22的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:22具有至少90%序列相同性的RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:22的向导RNA和Cas蛋白。

[0361] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a2的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a2的向导RNA和核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a2的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a2的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a2的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向gHPRT12a2的向导RNA和Cas12b。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:23至少有90%序列相同性的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:23的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含与SEQ ID NO:23至少有90%序列相同性的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含具有SEQ ID NO:23的向导RNA和Cas蛋白。

[0362] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向 γ 珠蛋白启动子的向导RNA。在一

些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向 γ 珠蛋白启动子的向导RNA和an核酸内切酶。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向 γ 珠蛋白启动子的向导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向 γ 珠蛋白启动子的向导RNA和Cas9。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向 γ 珠蛋白启动子的向导RNA和Cas12a。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向 γ 珠蛋白启动子的向导RNA和Cas12b。

[0363] 可纳入任何核糖核蛋白复合物的向导RNA的非限制性实例如下所述:

靶基因	用于化学修饰的 RNA 的序列	SEQ ID NO:
CCR5	/AltR1/rGrC rUrGrU rGrUrU rUrGrC rGrUrC rUrCrU rCrCrC rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2/	1
HPRT	/AltR1/rGrCrU rGrUrG rUrUrU rGrCrG rUrCrU rCrUrC rCrCrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArU rGrCrU/AltR2/	2
HBB	/AltR1/rCrUrU rGrCrC rCrCrA rCrArG rGrGrC rArGrU rArArG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArU rGrCrU/AltR2/	3
TCR	/AltR1/rGrArG rArArU rCrArA rArArU rCrGrG rUrGrA rArUrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArU rGrCrU/AltR2/	4
PD-1	/AltR1/rUrG rArCrG rUrUrA rCrCrU rCrGrU rGrCrG rGrCrC rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2/	5
BCL11a	/AltR1/rGrA rUrArA rArCrA rArUrC rGrUrC rArUrC rCrUrC rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2/	6
C9orf72	/AltR1/rUrA rCrUrA rCrArA rCrGrG rArArC rArGrC rCrArC rGrUrU rUrUrA rGrArG rCrUrA rUrGrC rU/AltR2/	7
gDrosha1-full	mU*mG*mC* rUrGrC rGrGrC rArUrG rArCrU rGrGrA rGrGrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	8
gDrosha2-full	mU*mG*ma* rGrUrG rCrArU rCrGrA rArUrC rCrArC rArCrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	9
gHPRT4-full	mG*mC*mG* rGrGrU rCrGrC rCrArU rArArC rGrGrA rGrCrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	10
gHPRT3-full	mG*mG*mC* rUrUrA rUrArU rCrCrA rArCrA rCrUrU rCrGrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	11
gWas1	mC*mG*mC* rCrArU rGrGrG rUrCrA rUrUrU rCrArC rArGrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	12
gHBG1-117	mC*mU*mU* rGrUrC rArArG rGrCrU rArUrU rGrGrU rCrArG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	13

[0364]

[0365]	gHBG2-114	mG*mU*mU* rUrGrC rCrUrU rGrUrC rArArG rGrCrU rArUrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	14
	gHBB2	mG*mU*mA* rArCrG rGrCrA rGrArC rUrUrC rUrCrC rUrCrG rUrUrU rUrArG rArGrC rUrArG rArArA rUrArG rCrArA rGrUrU rArArA rArUrA rArGrG rCrUrA rGrUrC rCrGrU rUrArU rCrArA rCrUrU rGrArA rArArA rGrUrG rGrCrA rCrCrG rArGrU rCrGrG rUrGrC mU*mU*mU* rU	15

[0366] *=硫代磷酸酯连接

[0367] 可纳入任何核糖核蛋白复合物内的向导RNA的其他非限制性实例，例如包含Cas12a蛋白的向导RNA，如下所述：

靶基因	用于化学修饰的 RNA 的序列	SEQ ID NO:
[0368]	gHBG12a1 rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rCrCrU rUrGrU rCrArA rGrGrC rUrArU rUrGrG rUrCrA rArGrG	16
	gHBG12a2 rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rGrCrC rArGrG rGrArC rCrGrU rUrUrC rArGrA rCrArG rArUrA	17
	gHBG12a3 rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rArGrA rCrArG rArUrA rUrUrU rGrCrA rUrUrG rArGrA rUrArG	18
	gHBG12a4 rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rCrArU rUrGrA rGrArU rArGrU rGrUrG rGrGrG rArArG rGrGrG	19
	gHBB12a1 rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rCrUrU rCrUrG rArCrA rCrArA rCrUrG rUrGrU rUrCrA rCrUrA	20
	gHBB12a2 rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rArGrG rUrUrG rCrUrA rGrUrG rArArC rArCrA rGrUrU rGrUrG	21
	gHPRT12a1 rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rArGrA rUrCrU rUrArC rUrUrA rCrCrU rGrUrC rCrArU rArArU	22
	gHPRT12a2 rUrA rArUrU rUrCrU rArCrU rCrUrU rGrUrA rGrArU rGrCrA rUrArC rCrUrA rArUrC rArUrU rArUrG rCrUrG rArGrG	23

[0369] 另外，用于向导RNA的靶序列的其他非限制性实例如下所述：

靶基因	序列	SEQ ID NO:
[0370]	γ 珠蛋白启动子	CTTGTCAAGGCTATTGGTCAAGG
	γ 珠蛋白启动子	CAAGGCTATTGGTCAAGGCAAGG
	γ 珠蛋白启动子	GCTATTGGTCAAGGCAAGGCTGG
	γ 珠蛋白启动子	TGGTCAAGTTTGCCTTGTCAAGG
	γ 珠蛋白启动子	CTTGACCAATAGCCTTGACAAGG
	γ 珠蛋白启动子	TTTGCTTGTCAAGGCTATTGGTCAAGG
	HPRT	GTTATGGCGACCCGACGCC
	HPRT	GCGGGTCGCCATAACGGAGC
	HPRT	CGTGACGTAAAGCCGAACCC

HPRT	GGCACGGAAAGCGACCACCT	33
HPRT	CATGCGTATTTGACACACGA	34
HPRT	GCTAAGTGCTAGAGTTACGG	35
HPRT	GAGGCGCGGGATCCGCAGTG	36
HPRT	TTATTACTGTTCCCCGCCAG	37

[0371] 用于gRNA的其他靶基因可包含用于镰状细胞病的BCL11a、用于癌症治疗的PD-1和/或用于肌萎缩性侧索硬化症(ALS)的C9orf72。

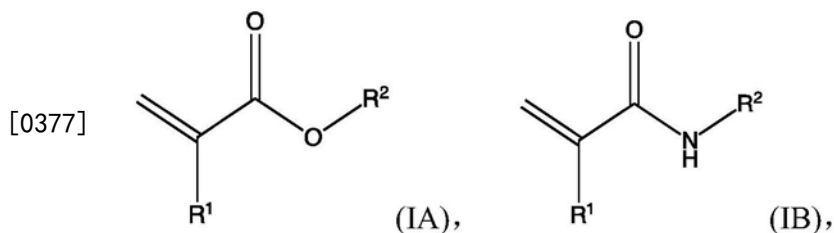
[0372] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊(或本文所述的缀合物)被用来敲除HPRT。例如,分离的细胞可以用HPRT靶向的CRISPR/Cas9 RNP处理,如本文所公开的聚合物纳米胶囊中包含的那些。在一些实施方案中,纳米胶囊包含核糖核酸蛋白复合物,所述核糖核酸蛋白复合物包含靶向人X染色体上位于约134460145-约134500668的序列的gRNA分子。在一些实施方案中,纳米胶囊包含核糖核酸蛋白复合物,所述核糖核酸蛋白复合物包含gRNA分子,其靶向人X染色体上位于约134460145-约134500668的序列。在一些实施方案中,在X染色体的约134460145-约134500668的位置范围内的靶序列的长度为约12-约28个连续碱基对。在一些实施方案中,在X染色体的约134460145-约134500668的位置内的靶序列的长度为约14-约26个连续碱基对。在一些实施方案中,在X染色体的约134460145-约134500668的位置的靶序列的长度为约16-约24个连续碱基对。在一些实施方案中,在X染色体的约134460145-约134500668的位置内的靶序列的长度为约18-约22个连续碱基对。

[0373] 在一些实施方案中,HPRT基因内合适的靶标包含与SEQ ID NO:30-37中的任一个有90%相同性的那些靶标。在其他实施方案中,HPRT基因内合适的靶标包含与SEQ ID NO:30-37中的任一个有95%相同性的那些靶标。在其他实施方案中,HPRT基因内合适的靶标包含与SEQ ID NO:30-37中的任一个有96%相同性的那些靶标。在其他实施方案中,HPRT基因内合适的靶标包含与SEQ ID NO:30-37中的任一个有97%相同性的那些靶标。在其他实施方案中,HPRT基因内合适的靶标包含与SEQ ID NO:30-37中的任一个有98%相同性的那些靶标。在其他实施方案中,HPRT基因内合适的靶标包含与SEQ ID NO:30-37中的任一个有99%相同性的那些靶标。在其他实施方案中,HPRT基因内合适的靶标包含具有SEQ ID NO:30-37中的任一个的那些靶标。

[0374] 聚合物壳

[0375] 单体和交联剂的不同组合可用于通过原位聚合形成聚合物壳,从而封装负载,例如核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,本公开的聚合物纳米胶囊包含至少一种带正电的单体、一个中性单体和交联剂(例如可降解或可侵蚀的交联剂)。在其他实施方案中,本公开的聚合物纳米胶囊包含两种带正电的单体、中性单体和交联剂。以下是合适的带正电单体、中性单体和交联剂的非限制性实例。

[0376] 在一些实施方案中,用于形成本公开的聚合物纳米胶囊的聚合物壳的合适的带正电的单体具有式(IA)和(IB)中的任何结构:



[0378] 其中

[0379] R^1 是 H 或者取代或未取代的 C_1-C_6 烷基；

[0380] R^2 是 $-(CH_2)_m-NR^3R^4R^5$ ，其中 m 是 1-5 的整数；

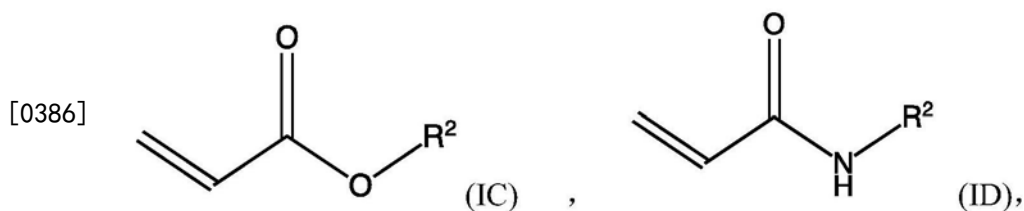
[0381] R^3 是 H、未取代的 C_1-C_6 烷基、或被 NR^6R^7 取代的 C_1-C_6 烷基，其中 R^6 和 R^7 是独立选自 H、或未取代的 C_1-C_6 烷基、或被氨基取代的 C_1-C_6 烷基、或被 NR^8R^9 取代的 C_1-C_6 烷基，其中 R^8 和 R^9 独立选自 H、未取代的 C_1-C_6 烷基或被氨基取代的 C_1-C_6 烷基；

[0382] R^4 是 H、未取代的 C_1-C_6 烷基、或被氨基取代的 C_1-C_6 烷基、或被 $NR^{10}R^{11}$ 取代的 C_1-C_6 烷基，其中 R^{10} 和 R^{11} 是独立选自 H、未取代的 C_1-C_6 烷基、被氨基取代的 C_1-C_6 烷基或被 $NR^{12}R^{13}$ 取代的 C_1-C_6 烷基，其中 R^{12} 和 R^{13} 是独立选自 H、未取代的 C_1-C_6 烷基或被氨基取代的 C_1-C_6 烷基；

[0383] 或者其中 R^3 和 R^4 可共同组成一个 5-7-成员的杂环烷基环；和

[0384] R^5 是孤对的电子或未取代的 C_1-C_6 烷基。

[0385] 在其他实施方案中，用于形成本公开的聚合物纳米胶囊的合适的带正电的单体具有式 (IC) 或 (ID) 中的任何结构：



[0387] 其中 R^2 如上所定义。

[0388] 在一些实施方案中，带正电的单体选自：

[0389] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺，

[0390] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺，

[0391] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺，

[0392] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺，

[0393] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺，

[0394] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺，

[0395] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺，

[0396] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺，

[0397] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺，

[0398] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺，

[0399] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺盐酸盐

[0400] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯，

[0401] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯，

[0402] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐，

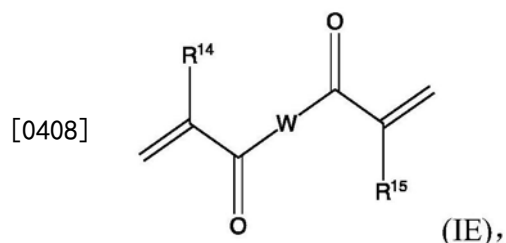
[0403] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0404] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯和

[0405] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺。

[0406] 在一些实施方案中,带正电单体选自N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺、2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯和及其任意组合。

[0407] 在一些实施方案中,用于形成本公开的聚合物纳米胶囊的合适交联剂具有式(IE)的结构:

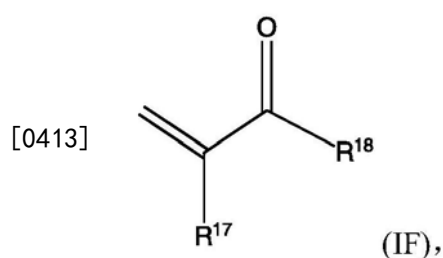


[0409] 其中 R^{14} 和 R^{15} 是独立的H,或取代或未取代的 C_1 - C_6 烷基,以及

[0410] W是-N(H)- R^{16} -N(H)-或-[O-CH₂-C(H)(OH)-CH₂]_n-O-,其中 R^{16} 是取代或未取代的 C_1 - C_6 亚烷基。

[0411] 在一些实施方案中,交联剂选自1,3-甘油二甲基丙烯酸酯、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和/或甘油1,3-二甘油醇酸二丙烯酸酯。

[0412] 在一些实施方案中,用于形成本公开的聚合物纳米胶囊的合适中性单体具有式(IF)的结构:



[0414] 其中 R^{17} 是H或未取代的 C_1 - C_6 烷基,以及

[0415] R^{18} 是氨基、或烷基(所述烷基被羟基取代)取代的氨基、或OR¹⁹,其中 R^{19} 是羟基烷基取代基。

[0416] 在一些实施方案中,中性单体选自N-(1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基)丙烯酰胺、丙烯酰胺、N-(羟甲基)丙烯酰胺、2-羟基乙基丙烯酸酯和/或2-羟基乙基甲基丙烯酸酯。

[0417] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊可通过原位聚合技术合成。在一些实施方案中,聚合可以从以下开始:至少一种带正电的单体(例如,N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺和/或2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯)、交联剂(例如,1,3-甘油二甲基丙烯酸酯)和中性单体(例如,丙烯酰胺)。然后,单体可以在负载的表面周围富集,例如,带负电的核糖核酸复合物,其通过静电相互作用和/或氢键。不希望受到任何特定理论的约束,相信不同的交联剂可以用来形成具有可调整成分、结构、表面特性和功能的共聚物涂层。还认为,由上述聚合提供的交联的聚合物壳为负载,例如核糖核蛋白复合物提供保护,使其免受例如酶降解、温度解离和血清失活的影响。

[0418] 通过另一个实例,聚合物纳米胶囊的合成利用存在于负载表面周围的静电相互作

用,例如,带负电的核糖核蛋白复合物。例如,单体可以通过静电相互作用和/或氢键沿着带负电的核糖核蛋白复合物的表面自组装。在最初的相互作用之后,随后在水溶液中可能会发生交联剂和带正电单体和中性单体的室温聚合。在室温聚合过程中,据信每个核糖核蛋白复合物被“包裹(wrapped)”在聚合物网络的薄壳中。据认为,这种交联的外壳(即聚合物壳)用于保护现存于聚合物纳米胶囊的核中的核糖核蛋白复合物免于水解等。额外的部分可以被添加到所形成的聚合物壳中,用于靶向和/或用于增加水溶性和/或电荷,如本文进一步描述。

[0419] 在一些实施方案中,使用封装缓冲液合成聚合物纳米胶囊,例如pH在约6和约7.5之间的缓冲液。在其他实施方案中,封装缓冲液的pH为约6-约7。在其他实施方案中,封装缓冲液的pH约为6.7。在一些实施方案中,封装缓冲液包含4-(2-羟乙基)-1-哌嗪乙磺酸(HEPES)、NaCl和/或MgCl₂。在一些实施方案中,HEPES以约10-约50mM的量存在。在其他实施方案中,HEPES以约20mM的量存在。在一些实施方案中,NaCl以约50-约150mM量的存在。在其他实施方案中,NaCl以约100mM的量存在。在一些实施方案中,MgCl₂以约1-约10mM的量存在。在其他实施方案中,MgCl₂以约5mM的量存在。

[0420] 在一些实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,带正电单体的量为约20%-约65%。在其他实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,带正电单体的量为约25%-约60%。在其他实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,带正电单体的量为约25%-约55%。在进一步的实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,带正电单体的量为约30%-约50%。

[0421] 在一些实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,中性单体的量为约40%-约70%。在其他实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,中性单体的量为约40%-约65%。在其他实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,中性单体的量为约45%-约65%。在进一步的实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,中性单体的量为约45%-约60%。

[0422] 在一些实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳总重量计,交联剂(例如,可侵蚀或可降解的交联剂)的量为约5%-约20%。在其他实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量计,交联剂的量为约5%-约15%。在其他实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳总重量计,交联剂的量为约5%-约12.5%。在其他实施方案中,按聚合物纳米胶囊的聚合物壳的总重量算,交联剂的量为约5%-约10%。

[0423] 在一些实施方案中,按包含其负载的聚合物纳米胶囊的总重量计,核糖核蛋白或核糖核蛋白复合物可占约10%-约50%。在其他实施方案中,按包含其负载的聚合物纳米胶囊的总重量计,核糖核蛋白或核糖核蛋白复合物可占约15%-约45%。在其他实施方案中,按包含其负载的聚合物纳米胶囊的总重量计,核糖核蛋白或核糖核蛋白复合物可占约20%-约40%。

[0424] 在一些实施方案中,带正电的单体与电中性单体的比例为约6:1-约1:6。在其他实施方案中,带正电的单体与电中性单体的比例为约5:1-约1:5。在其他实施方案中,带正电的单体与电中性单体的比例为约4:1-约1:4。在其他实施方案中,带正电的单体与电中性单体的比例为约3:1-约1:3。在其他实施方案中,带正电的单体与电中性单体的比例为约1:1-约1:5。在其他实施方案中,带正电的单体与电中性单体的比例为约1:1-约1:4。在另一些实

施方案中,带正电的单体与电中性单体的比例为约1:1-约1:3。在其他实施方案中,带正电的单体与电中性单体的比例为约1:1-约1:2。本领域技术人员将理解,随着相对于中性单体的量,带正电的单体的量的增加,由此形成的聚合物纳米胶囊的正表面电荷量增加(即所得聚合物纳米胶囊带净正电荷)。同样,如果相对于带正电的单体的量,中性单体的量增加,那么由其形成的聚合物纳米胶囊可能具有中性电荷或略带负电荷。

[0425] 在一些实施方案中,单体(带正电的和电中性的单体)与交联剂的比例为约1:2-约1:10。在其他实施方案中,单体(带正电的和电中性的单体)与交联剂的比例为约1:2-约1:9。在其他实施方案中,单体(带正电和电中性的单体)与交联剂的比例为约1:2-约1:8。在一些实施方案中,单体(带正电和电中性)与交联剂的比例为约1:3-约1:8。

[0426]

成分名称	配方1	配方2	配方3	配方4
带正电单体1	10%	5%	10%	20%
带正电单体2	30%	20%	20%	30%
交联剂	10%	10%	10%	5%
中性单体	50%	65%	60%	45%

[0427] 在一些实施方案中,并且参照下面的表格,正(“单体1”)、中性亲水单体(“单体2”)和交联剂与不同负载的摩尔比可以根据所形成的纳米胶囊中包含的货物的分子量和净电荷来估计,其中负载例如辣根过氧化物酶、siRNA双链、sh5 DNA盒、抗体、Cas9蛋白、RNP (Cas9和gRNA复合物)和腺病毒。

[0428]

负载	分子量 (kDa)	净电荷	单体 1 (-1/+1/+2/+3)	单体 2 (0)	可降解交联剂 (0)
辣根过氧化物酶	44	-3	浓缩因子 x 负载的净电荷/单体 1 的净电荷	3-10 x 单体 1	10-30%的(单体 1+单体 2)
siRNA 双链	13.3	-42			
Sh5 DNA 盒 (400 bps)	264	-800			
抗体	160	-10			
Cas9 (化脓性链球菌)	160	22			
RNP (Cas9 sp + gRNA)	194	-81			
5 型腺病毒	157000	-12000			

[0429] 在一些实施方案中,纳米胶囊表面的整体净电荷为正。例如,在一些实施方案中,纳米胶囊的表面可以有约1-约15毫伏 (mV) 的电荷(如在标准磷酸盐溶液中测量)。在其他实施方案中,纳米胶囊的表面可以有约1-约10mV的电荷。在其他实施方案中,纳米胶囊的表面可以有约5-约10mV的电荷。在进一步的实施中,纳米胶囊的表面可以有约1-约5mV的电荷。在更进一步的实施方案中,纳米胶囊的表面可以有约3-约5mV的电荷。所有提到的电荷都是用Zetasizer-NanoZS(可从Malvern Panalytical Ltd.获得)在约7.4的pH下测量的。本公开的纳米胶囊的净正表面电荷被认为对获得纳米胶囊和生物表面之间的相互作用很重要,特别是在纳米胶囊和细胞膜之间。

[0430] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊的平均直径小于或等于约200纳米 (nm),例如,约1-200nm、或约5-约200nm、或约10-约150nm、或15-100nm、或约15-约150nm、或约20-约

125nm、或约50-约100nm、或约50-约75nm。在其他实施方案中,所述聚合物纳米胶囊的平均直径为约10nm-约20nm、约20-约25nm、约25nm-约30nm、约30nm-约35nm、约35nm-约40nm、约40nm-约45nm、约45nm-约50nm、约50nm-约55nm、约55nm-约60nm、约60nm-约65nm、约70-约75nm、约75nm-约80nm、约80nm-约85nm、约85nm-约90nm、约90nm-约95nm、约95nm-约100nm或约100nm-约110nm。在其他实施方案中,聚合物纳米胶囊的平均直径为约120nm-约130nm、约130nm-约140nm、约140nm-约150nm、约150nm-约160nm、约160nm-约170nm、约170nm-约180nm、约180nm-约190nm、约190nm-约200nm、约200nm-约210nm、约220nm-约230nm、约230nm-约240nm、约240nm-约250nm或大于约250nm的直径。据信,本文所述聚合物纳米胶囊的尺寸可基于本文所述聚合物:交联剂的比例来确定。

[0431] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊设计为在约1小时、或约2小时、或约3小时、或约4小时、或约5小时、或约6或、约12小时、或约1天、或约2天、或约1周或约1月内降解。在其他实施方案中,聚合物纳米胶囊设计成在生理pH以上述任何速率降解。在具体的实施方案中,聚合物纳米胶囊设计为在给有需要的个体给药后以上述的任何速度降解。

[0432] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含Cas蛋白,所述Cas蛋白包含一个或多个核定位信号融合肽(NLSs)。在一些实施方案中,每个Cas核酸内切酶(例如Cas9核酸内切酶)包含1、2、3或更多个NLS。在一些实施方案中,一个或多个NLS的存在促进核糖核蛋白复合物的核运输。

[0433] 聚合物纳米胶囊缀合物

[0434] 本文还公开聚合物纳米胶囊(包含任何负载)和其他分子实体的缀合物(本文以下称“缀合物”或“聚合物纳米胶囊缀合物”)。在一些实施方案中,与聚合物纳米胶囊缀合的分子实体包含靶向部分和/或稳定化部分。在一些实施方案中,靶向部分和/或稳定化部分偶联至聚合物纳米胶囊的聚合物壳的表面。据信,一种或多种靶向部分和/或一种或多种稳定化部分与聚合物纳米胶囊的缀合提供以下一种或多种:(i)将聚合物纳米胶囊特异性地靶向特定细胞类型的表面,从而提供核糖核蛋白复合物至特定细胞类型的定向递送。(ii)增强缀合物的水溶性,(iii)增强聚合物纳米胶囊/缀合物对血清蛋白的稳定性和/或(iv)减少对于靶向的递送的非特异性

[0435] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分。在其他实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个稳定化部分。在其他实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和一个或多个稳定化部分。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含至少一个靶向部分和至少两个稳定化部分。在其他实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含至少两个靶向部分和至少一个稳定化部分。

[0436] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约1-约24。在其他实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约1-约16。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约1-约12。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳

米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约2-约12。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约2-约9。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约2-约8。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约2-约6。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约2-约4。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分和/或一个或多个稳定化部分,并且其中偶联至聚合物纳米胶囊的一个或多个靶向部分和/或稳定化部分的总数为约3-约6。本领域技术人员将理解,与分别较小的聚合物纳米胶囊相比,较大的聚合物纳米胶囊(例如具有较大总表面积的那些)将能够促进更多靶向部分和/或稳定化部分的结合。

[0437] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物有式(II)的一般结构:



[0439] 其中

[0440] “聚合物纳米胶囊”是包含负载的聚合物纳米胶囊(如本文所述的任何聚合物纳米胶囊和/或负载);

[0441] U是靶向部分或稳定化部分,以及

[0442] s是1-24的整数。

[0443] 在一些实施方案中,s是1-16的整数。在一些实施方案中,s是1-12的整数。在一些实施方案中,s是2-12的整数。在一些实施方案中,s是2-9的整数。在一些实施方案中,s是2-8的整数。在一些实施方案中,s是2-6的整数。在一些实施方案中,s是2-4的整数。在一些实施方案中,s是1-12的整数。在一些实施方案中,s是3-9的整数。在一些实施方案中,s是3-6的整数。在一些实施方案中,式(II)的缀合物包含至少一个靶向部分和至少一个稳定化部分。仅作为示例,式(II)的聚合物纳米胶囊缀合物可包含一个或多个靶向部分,所述靶向部分包含抗CD4抗体、抗CD8抗体和抗CD45抗体中的一个或多个,从而使聚合物纳米胶囊缀合物靶向细胞(例如宿主细胞),所述细胞具有选自CD4、CD8、CD45及其任何组合的分化群标志物。

[0444] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物通过内吞过程在细胞中内化。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物不包含靶向部分(例如,包含一个或多个稳定化部分的靶向部分)并且通过胞膜窖介导的内吞途径(caveolae-mediated endocytosis pathway)内化。(也参另Yan et.al."A Novel Intracellular Protein Delivery Platform Based on Single-Protein Nanocapsules,Nature Nano 2010,5,48-53,and Yan et.al."Single siRNA nanocapsules for enhanced RNAi delivery,JACS,2012,134,33,13542-5,其披露

的内容通过引援全部纳入本文)。在一些实施方案中,对于不包含一个或多个靶向部分的纳米胶囊,内吞过程的启动取决于纳米胶囊的电荷。在一些实施方案中,在聚合物纳米胶囊上需要正电荷来启动胞膜窖介导的内吞途径。在其他实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物包含一个或多个靶向部分并且通过受体介导的内吞作用或整合素介导的内吞作用内化,如本文进一步描述。如图5E-5G所示,即使在聚合物纳米胶囊缀合物的聚合物壳中不存在咪唑基,本公开的聚合物纳米胶囊缀合物的内吞作用也能发生。

[0445] 在一些实施方案中,据认为,内吞作用的过程是按照以下过程进行的:聚合物纳米胶囊(或聚合物纳米胶囊缀合物)通过静电作用、抗体-受体相互作用和/或RGD-整合素相互作用附着在细胞膜表面,然后纳米胶囊在该处被内吞,即在内体中内化进细胞内,内体是一个与膜结合的隔间。一旦在内体中,质子被泵入内体并且内体中的pH会降低,即变得更加酸性。据认为,纳米胶囊随后会逐渐膨胀和降解,并且核糖核蛋白复合物会从膨胀的内体中“逃脱”。在一些实施方案中,据认为,如果核定位信号融合肽存在于Cas蛋白上,会帮助RNP的核运输,即帮助将RNP负载运过核膜。

[0446] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物在中性pH下是稳定的(例如,pH为7-7.6)。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物在酸性pH(例如,pH为约5-约6)下降解,使RNP复合物负载释放到细胞质中。

[0447] 靶向部分和包含靶向部分的纳米聚合物胶囊缀合物

[0448] 本公开提供包含本文所述的一个或多个靶向部分和任何聚合物纳米胶囊的缀合物。在一些实施方案中,一个或多个靶向部分与聚合物纳米胶囊的缀合,允许聚合物纳米胶囊缀合物(例如核糖核酸复合物)的负载递送到体内特定的组织部位或递送到体内或体外的特定细胞类型。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊缀合物的靶向部分可以增强聚合物纳米胶囊在感兴趣的细胞或组织中的积累。例如,聚合物纳米胶囊缀合物的靶向部分的一部分可与细胞特异性的细胞表面受体结合或以其他方式与之缔合,从而使聚合物纳米胶囊直接接近靶细胞。

[0449] 在一些实施方案中,靶向部分选自能够将聚合物纳米胶囊缀合物递送到具有特定类型受体或标记物的特定细胞类型。在一些实施方案中,靶向部分包含抗体(例如抗CD3抗体、抗CD4抗体、抗CD8抗体、抗CD45抗体)、抗体片段、肽(例如细胞穿透肽、精氨酸甘氨酸(RGD)、IL4RPep-1)、蛋白(例如凝集素、转铁蛋白)、多糖(例如透明质酸)、碳水化合物、核酸、维生素(例如维生素D)、适配体(例如AS-1411、GBI-10)或小分子化合物(叶酸、茴香酰胺、苯硼酸)等。在其他实施方案中,所述靶向部分包含环糊精、金刚烷、HLA或N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。在一些实施方案中,靶向部分包含抗CD34抗体。在一些实施方案中,靶向部分包含抗CD49f抗体。在一些实施方案中,靶向部分包含抗CD133抗体。在一些实施方案中,靶向部分包含含有精氨酸-甘氨酸-天冬氨酸(RGD)的肽。在一些实施方案中,靶向部分包含转铁蛋白或其循环变体。在一些实施方案中,靶向部分包含IL-3。

[0450] 在一些实施方案中,靶向部分是抗体并且其中约1-约5个抗体偶联至聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,靶向部分是抗体并且其中约1-约4个抗体偶联至聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,靶向部分是抗体并且其中约1-约3个抗体偶联至聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,靶向部分是抗体并且其中约1-约2个抗体偶联至聚合物纳米胶囊。

[0451] 在一些实施方案中,靶向部分可能会靶向特定的细胞表面报告(report),具体为

免疫细胞、血细胞、心肌细胞、肺细胞、视细胞、肝细胞、肾细胞、脑细胞、中枢神经系统的细胞、周围神经系统的细胞、癌细胞、感染病毒的细胞、干细胞、皮肤细胞、肠道细胞和/或听细胞。在一些实施方案中,癌细胞选自包含以下的组:淋巴瘤细胞、实体瘤细胞、白血病细胞、膀胱癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、子宫内膜癌细胞、肾癌细胞、肺癌细胞、黑色素瘤细胞、胰腺癌细胞、前列腺癌细胞和甲状腺癌细胞。举例来说,表达CD3标记物的T细胞可以被偶联至聚合物纳米胶囊抗CD3抗体所靶向。按照这个实例,同样的偶联至抗CD3抗体的聚合物纳米胶囊,不会靶向表达CD19标记物的B细胞。

[0452] 在一些实施方案中,靶向部分靶向分化群标志物(“CD标志物”)。在一些实施方案中,靶向部分是抗CD标志物抗体。分化群(CD)指定是指细胞表面蛋白。每个独特的分子都被分配不同的编号,从而可以识别细胞表型。特定的CD分子的表面表达可能不只针对一个细胞,甚至是一个细胞系;然而,许多对细胞表型的表征是有用的。在一些实施方案中,靶向部分靶向由干细胞表达的CD标记物。在一些实施方案中,靶向部分靶向CD117(例如,抗CD117抗体)、CD10(例如,抗CD10的抗体)、CD34(例如,抗CD34的抗体)、CD38(例如,抗CD38的抗体)、CD45(例如,抗CD45抗体)、CD123(例如,抗CD123抗体)、CD127(例如,抗CD127抗体)、CD135(例如,抗CD135抗体)、CD44(例如,抗CD44抗体)、CD47(例如,抗CD47抗体)、CD96(例如,抗CD96抗体)、CD2(例如,抗CD2抗体)、CD4(例如,抗CD4抗体)、CD3(例如,抗CD3抗体)和CD9(例如,抗CD9抗体)、标志物中的任一个。在一些实施方案中,靶向部分靶向人间充质干细胞CD标志物中的任一个,其包括CD29(例如,抗CD29抗体)、CD44(例如,抗CD44抗体)、CD90(例如,抗CD90抗体)、CD49a-f(例如,抗CD49a-f抗体)、CD51(例如,抗CD117抗体)、CD73(SH3)、CD105(SH2)、CD106(例如,抗CD106抗体)、CD166(例如,抗CD166抗体)和Stro-1标志物。在一些实施方案中,靶向部分靶向人造血干细胞标志物中的任何一种,其包括CD34(例如,抗CD34抗体)、CD38(例如,抗CD38的抗体)、CD45RA(例如,抗CD45A抗体)、CD90(例如,抗CD90抗体)和CD49(例如,抗CD49抗体)。

[0453] 在其他实施方案中,用于实现聚合物纳米胶囊的特异性靶向的缀合物包含以下一种或多种:AFP、 β -连环蛋白、BMI-1、BMP-4、c-kit、CXCL12、SDF-1、CXCR4、核蛋白聚糖、E-钙粘蛋白、钙粘蛋白1、EGFR、ErbB1、内皮糖蛋白、EpCAM、TROP-1、Fc epsilon RI A、FCER1A、L1CAM、LM02、Nodal、Notch-1、PDGFRB、平足蛋白、PTEN、音猬因子、STAT3、多配体蛋白聚糖M、LM02、Nodal、Notch-1、PDGFRB、平足蛋白、PTEN、音猬因子、STAT3、多配体蛋白聚糖-1、铁转蛋白受体和波形蛋白。

[0454] 在其他实施方案中,用于实现聚合物纳米胶囊特定靶向的缀合物包含以下任何一种或多种:ALK、AFP、B2M、Beta-hCG、BCR-ABL、BRAF、CA15-3、CA19-9、CA-125、降钙素、CEA(癌胚抗原)、CD20、嗜铬粒蛋白A(Chromagranin A)、细胞角蛋白或其片段、EGFR、雌激素受体、孕酮受体、纤维蛋白、纤维蛋白原、E4、HER2/neu、IgG变体、KIT、乳酸脱氢酶、核基质蛋白22、PSA、甲状腺球蛋白、uPA、PAI-1和Oval。在一些实施方案中,靶向部分可以通过“点击化学”偶联至纳米聚合物胶囊。“点击化学”是一种化学理念,由Sharpless和Meldal的小组独立定义,描述通过将小单元连接在一起而快速和可靠地定制生成物质的化学。“点击化学”已被应用于一系列可靠和自导向的有机反应(Kolb, H.; Finn, M.G.; Sharpless, K.B. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2001, 40, 2004-2021)。例如,铜催化叠氮化物-炔[3+2]环化反应作为一种高度可靠的水中分子连接方式,其鉴定(Rostovtsev, V.V.; et al. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002,

41, 2596-2599) 已被用于加强对生物分子相互作用的几种类型的研究 (Wang, Q.; et.al. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 3192-3193; Speers, A. E.; et.al. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 4686-4687; Link, A. J.; Tirrell, D. A. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 11164-11165; Deiters, A.; et.al. J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 11782-11783)。此外, 应用于有机合成 (Lee, L. V.; et.al., J. Am. Chem. Soc. 2003, 125, 9588-9589)、药物发现 (Kolb, H. C.; Sharpless, K. B. Drug Disc. Today 2003, 8, 1128-1137; Lewis, W. G.; et.al. Angew. Chem. Int. Ed. 2002, 41, 1053-1057) 和表面的官能化 (Meng, J.-C.; et al. Angew. Chem. Int. Ed. 2004, 43, 1255-1260; Fazio, F.; et al. J. Am. Chem. Soc. 2002, 124, 14397-14402; Collman, J. P.; et al. Langmuir 2004, ASAP, in press; Lummerstorfer, T.; Hoffmann, H. J. Phys. Chem. B 2004, in press) 也已经出现。

[0455] 在一些实施方案中, 在细胞特异性表面受体与靶向部分缔合后, 整个纳米胶囊, 或只是RNP负载, 可能通过内吞过程被内化。在一些实施方案中, 靶向部分可与相关的细胞或组织的受体结合, 并且靶向部分可增强受体介导的或整合素辅助的由相关的细胞或组织对纳米胶囊的内吞作用。

[0456] 在一些实施方案中, 靶向部分通过接头和/或间隔子偶联至聚合物纳米胶囊, 其中接头和/或间隔子包含至少一个可切割的基团, 如在内吞过程中可被切割的基团。在一些实施方案中, 可切割基团为二硫基团, 如本文所述。在一些实施方案中, 可切割基团为光可切割基团 (例如, DBCO-PHC-NHS, 如本文所述)。在其他实施方案中, 光可切割基团可以是能够进行Norris II型反应的基于硝基苄基的基团。在其他实施方案中, 可光解的基团是苯甲酰基。

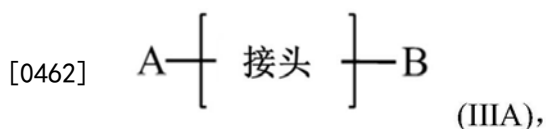
[0457] 本领域技术人员应当理解, 靶向部分可以通过化学合成的适当方法偶联至聚合物纳米胶囊。例如, 在一个或多个实施方案中, 可以设想使用包括自身偶联或交叉偶联、烷基化、缩合、酯化、醚化或酰胺形成的偶联反应, 将一个或多个靶向部分偶联至聚合物纳米胶囊。

[0458] 在一些实施方案中, “点击化学”用来将一个或多个靶向部分偶联至聚合物纳米胶囊。一般来说, 点击化学鼓励那些具有模块化应用的反应, 这些反应范围广泛, 化学产率高, 产生无害的副产品, 具有化学特异性, 需要简单的反应条件、使用容易获得的起始材料和试剂, 无溶剂或使用良性溶剂 (如水), 容易分离产品, 具有较大的热力学驱动力, 有利于与单一反应产物的反应和/或具有高原子经济性。虽然某些一般标准可能具有主观性, 但并非所有标准都需要满足。

[0459] 本领域技术人员将理解, 包含适当的反应性基团 (例如, DBCO基团) 的聚合物纳米胶囊可以与适合的官能化的靶向部分 (例如, 由叠氮基团官能化的靶向部分) 形成点击加合物, 以经历“点击”反应。事实上, 本领域技术人员会认识到, 为了使一对点击缀合物的一个成员与该对点击缀合物的另一个成员发生反应并由此形成共价键, 该对点击缀合物的两个成员必须有能够相互反应的反应性官能团。例如, 靶向部分必须包含第一反应性官能团 (例如, 叠氮基团), 其能够与具有适当第二反应性官能团 (例如, DBCO基团) 的聚合物纳米胶囊参与点击化学反应。虽然上述实例举例说明一对点击缀合物中包含DBCO基团的第一个成员和一对点击缀合物中包含叠氮基团的第二个成员之间的反应, 下表列出不同的反应性官能团对, 它们将通过“点击化学”的方式相互反应形成共价键。

[0460]	一对点击缀合物的第一个成员上的反应性官能团	一对点击缀合物的第二个成员上的反应性官能团
	DBCO	叠氮化物
	烯基	四嗪
	TCO	四嗪
	马来酰亚胺	硫醇
	DBCO	1,3-硝酮
	醛或酮	肼
	醛或酮	羟胺
	叠氮化物	DBCO
	四嗪	TCO
	硫醇	马来酰亚胺
	1,3-硝酮	DBCO
	肼	醛或酮
	羟胺	醛或酮
	四嗪	烯基

[0461] 在一些实施方案中,靶向部分必须首先被衍生化,然后才能与聚合物纳米胶囊缀合。在一些实施方案中,靶向部分(例如,具有自由反应性基团的抗体)可与式(IIIA)化合物反应,以提供衍生化的靶向部分,即具有能够与适当的官能化的聚合物纳米胶囊进行点击化学反应的反应性官能团的靶向部分。



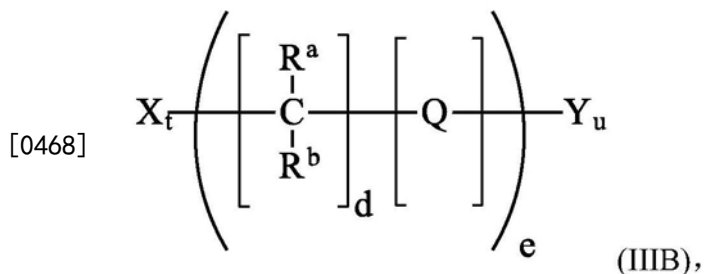
[0463] 其中A是马来酰亚胺-C(0)-,

[0464] “接头”是具有2-40个碳原子且任选具有一个或多个选自O、N或S的杂原子的支链或非支链、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团,以及

[0465] B选自二苯并环辛炔(“DBCO”)、反式环辛烯(“TCO”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺。

[0466] 在一些实施方案中,基团A偶联至靶分子上的赖氨酸基团或胺基,例如偶联至蛋白(例如Cas9蛋白)的N端基团上。

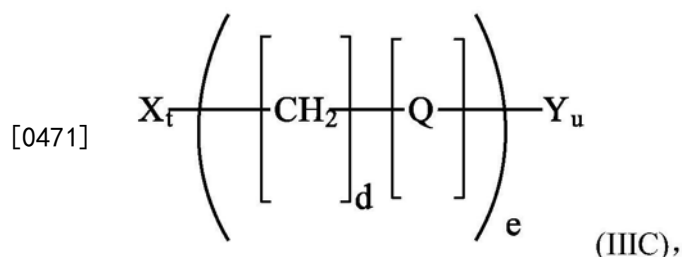
[0467] 在一些实施方案中,“接头”具有式(IIIB)中描述的结构:



[0469] 其中d和e各自独立地是2-10的整数;t和u独立地是0或1;Q是键、O、S或N(R^c) (R^d); R^a和R^b独立地是H、C₁-C₄烷基或卤素;R^c和R^d独立地是CH₃或H;以及X和Y独立地是具有1-4个碳原子且任选具有一个或多个O、N或S杂原子的支链或非支链、饱和或不饱和的基团。在一些实施方案中,X和Y包含羰基、酰胺基、酯基、酯类、取代的或未取代的芳基或其任意组合。

在其他实施方案中,d和e是2-6的整数。

[0470] 在一些实施方案中,“接头”具有式(IIIC)中描述的结构:



[0472] 其中

[0473] d和e是各自独立的从2-10的整数;

[0474] t和u独立地是0或1;

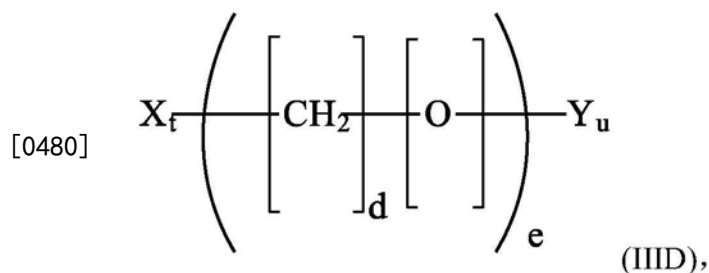
[0475] Q是键、O、S或N(R^c)(R^d);

[0476] R^c和R^d独立地是CH₃或H;和

[0477] X和Y独立地是具有1-4个碳原子的支链或非支链、饱和或不饱和的基团,并可选择具有一个或多个O、N或S杂原子。

[0478] 在其他实施方案中,d和e是2-6的整数。

[0479] 在一些实施方案中,“接头”具有式(IIID)中描述的结构:



[0481] 其中

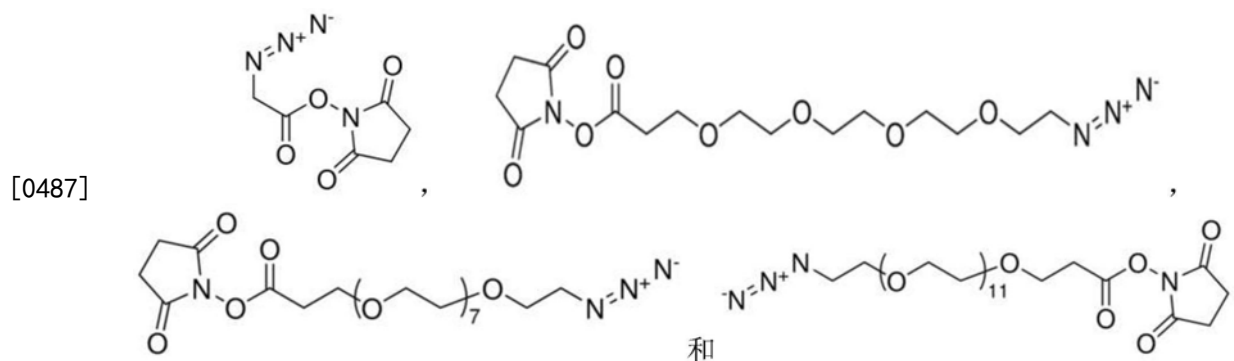
[0482] d和e各自独立地是2-10的整数;

[0483] t和u独立地是0或1;和

[0484] X和Y独立地是具有1-4个碳原子且任选具有一个或多个O、N或S杂原子的支链或非支链、饱和或不饱和的基团。

[0485] 在其他实施方案中,d和e是2-6的整数。

[0486] 式(IIIA)化合物的具体非限制性实例包括:



[0488] 虽然上述确认的化合物分别包含4、8或12个聚乙二醇(“PEG”)基团,但本领域技术

人员应当理解,式 (IIIA) 化合物可包含任何数量的PEG基团,例如约2-约20个PEG基团、或约2-约16个PEG基团、或约4-约12个PEG基团。本领域技术人员也会明白,聚丙二醇(“PPG”)基团可以取代任何PEG基团,并且式 (IIIA) 化合物可以包含任何数量的PPG基团,例如约2-约20个PPG基团、或约2-约16个PPG基团、或约4-约12个PPG基团。

[0489] 在靶向部分是抗体的实施方案中,可以首先在二硫苏糖醇(“DTT”)存在下还原存在于抗体上的官能团,从而提供具有一个或多个硫醇基团的抗体,并且其对式 (IIIA) 化合物的NHS-酯基团具有反应性。

[0490] 本公开的聚合物纳米胶囊同样可以被衍生化以包含能够参与点击化学反应的官能团。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊可与式 (IVA) 化合物反应,以提供具有反应性官能团的聚合物纳米胶囊,所述反应性官能团能够与适当的官能化的靶向部分参与点击化学反应。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含可与式 (IVA) 化合物反应的胺基,从而使聚合物纳米胶囊被能够参与点击化学反应的官能团所官能团化。

[0491] A-间隔子-B (IVA),

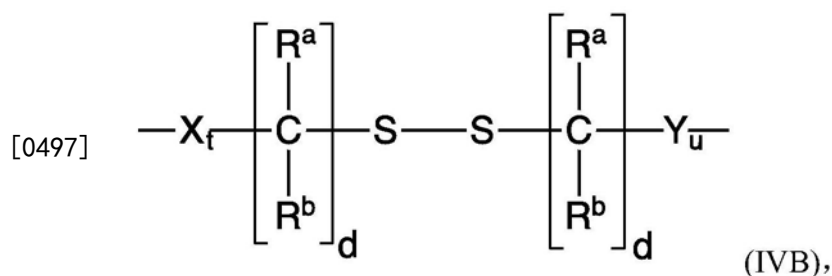
[0492] 其中A是马来酰亚胺-C(O)-,

[0493] “间隔子”是具有2和20个碳原子并且具有可切割的基团或键的支链或非支链、线性或环状、取代或未取代、饱和或不饱和的基团;以及

[0494] B选自二苯并环辛炔(“DBCO”)、反式环辛烯(“TCO”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺。

[0495] 在一些实施方案中,可切割的基团包含二硫基团。

[0496] 在一些实施方案中,“间隔子”基团具有式 (IVB) 的结构:



[0498] 其中

[0499] d是2-10的整数;

[0500] t和u独立地是0或1;

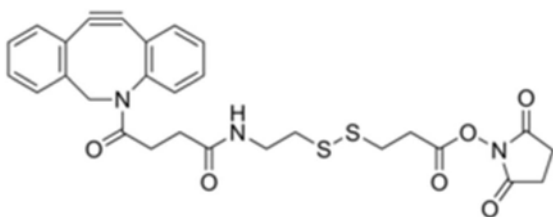
[0501] R^a 和 R^b 独立地是H、 $\text{C}_1\text{--C}_4$ 烷基或卤素;以及

[0502] X和Y独立地是具有1-8个碳原子且任选具有一个或多个O、N或S杂原子的支链或非支链、饱和或不饱和基团。

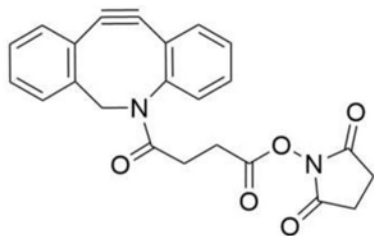
[0503] 在一些实施方案中,X和Y独立地包含一个或多个羰基、酰胺基、酯基、酯基、取代的或未取代的芳基或其任意组合。在其他实施方案中,d和e是2-6的整数。

[0504] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊(如那些具有1和10个游离胺基的聚合物纳米胶囊)可与二苯并环辛炔-S-S-N-羟基琥珀酰亚胺酯(如下图所示)反应,以提供带有反应性DBCO基团的聚合物纳米胶囊,从而提供衍生化的聚合物纳米胶囊。

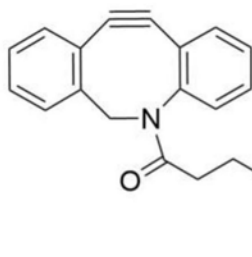
[0505]



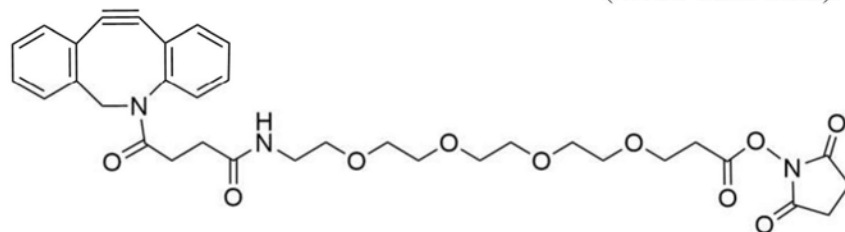
[0506] 在其他实施方案中, 聚合物纳米胶囊可与DBCO-NHS、DBCO-Sulfo-NHS、DBCO-PEG4-NHS、DBCO-PEG5-NHS、DBCO-C6-NHS或DBCO-PHC-NHS中的一个或多个反应。



(DBCO-NHS),

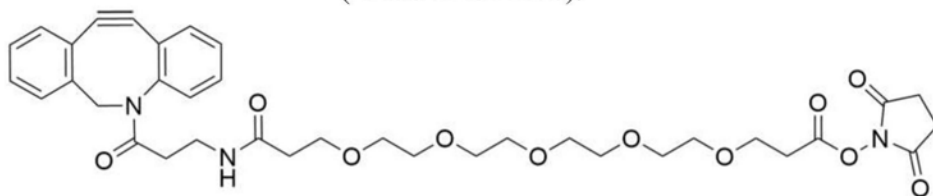


(DBCO-Sulfo-NHS),

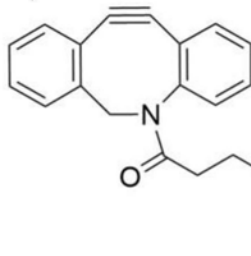
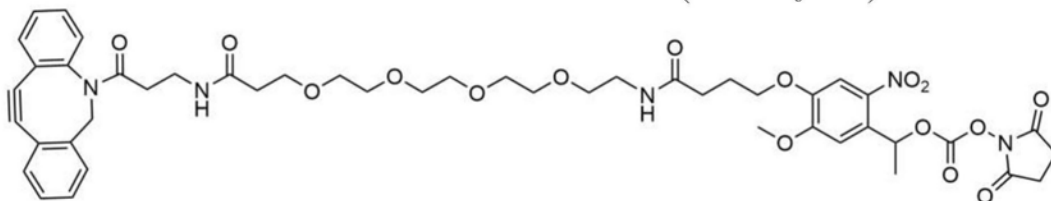


(DBCO-PEG4-NHS),

[0507]



(DBCO-PEG5-NHS),

(DBCO-C₆-NHS),

(DBCO-PHC-NHS)。

[0508] 在不希望受任何特定理论约束的情况下,相信通过利用包含二硫键的间隔子,二硫键可在内吞作用中被切割,允许聚合物纳米胶囊或其内容物在没有靶向部分的情况下进入细胞。

[0509] 稳定化部分和包含稳定化部分的缀合物

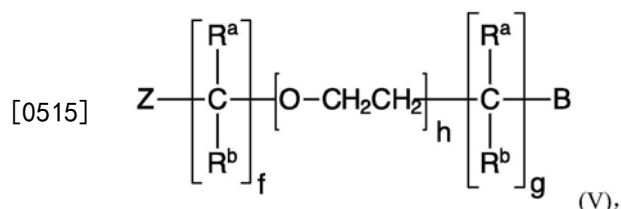
[0510] 本公开提供包含本文所述的一个或多个稳定化部分和任何聚合物纳米胶囊的缀合物。在一些实施方案中,约1-约16个稳定化部分偶联至聚合物纳米胶囊。在其他实施方案中,约12-约12个稳定化部分偶联至聚合物纳米胶囊。在其他实施方案中,约1-约9个稳定化部分偶联至聚合物纳米胶囊。在进一步的实施方案中,约2-约8个稳定化部分偶联至聚合物纳米胶囊。当然,这些缀合物可以进一步包含一个或多个靶向部分。

[0511] 本领域技术人员应当理解,稳定化部分可以通过化学合成的适当方法偶联至聚合物纳米胶囊。例如,在一个或多个实施方案中,可以设想使用包括自身偶联或交叉偶联、烷基化、缩合、酯化、醚化或酰胺形成的偶联反应,将一个或多个稳定化部分偶联至聚合物纳米胶囊。

[0512] 在一些实施方案中,稳定化部分可使用如上所述的“点击化学”偶联至聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,并且如上所述,聚合物纳米胶囊可以用能够参与点击化学反应的反应性官能团进行官能化。例如,如上文所述,聚合物纳米胶囊可以通过使聚合物纳米胶囊与二苯并环辛炔-S-S-N-羟基琥珀酰亚胺酯反应,而与DBC0基团进行官能化。

[0513] 然后,带有能够参与点击化学反应的官能团的稳定化部分可以与官能化聚合物纳米胶囊(即衍生化的聚合物纳米胶囊)反应。在一些实施方案中,稳定化部分包含一个或多个聚乙二醇(PEG)基团和/或聚丙二醇(PPG)基团。在一些实施方案中,基于-PEG的稳定化部分或基于-PPG的稳定化部分的平均分子量为约150Da-约3000Da。在一些实施方案中,基于-PEG的稳定化部分或基于-PPG的稳定化部分的平均分子量为约200Da-约2500Da。在一些实施方案中,基于-PEG的稳定化部分或基于-PPG的稳定化部分的平均分子量为约250Da-约2000Da。在一些实施方案中,基于-PEG的稳定化部分或基于-PPG的稳定化部分的平均分子量为约250Da-约1500Da。在一些实施方案中,基于-PEG的稳定化部分或基于-PPG的稳定化部分的平均分子量为约250Da-约1250Da。在一些实施方案中,基于-PEG的稳定化部分或基于-PPG的稳定化部分的平均分子量为约250Da-约1000Da。在一些实施方案中,基于-PEG的稳定化部分或基于-PPG的稳定化部分的平均分子量为约250Da-约750Da。在一些实施方案中,基于-PEG的稳定化部分或基于-PPG的稳定化部分的平均分子量为约250Da-约500Da。

[0514] 其他合适的稳定化部分包含那些具有式(V)的稳定化部分:



[0516] 其中B选自二苯并环辛炔(“DBC0”)、反式环辛烯(“TC0”)、叠氮化物、四嗪、马来酰亚胺、硫醇、1,3-硝酮、醛、酮、肼和羟胺;

[0517] Z是羟基、支链或非支链的C₁-C₄烷基、-O-烷基、-NH₂;

[0518] f和g独立地是0或者1-4的整数;以及

[0519] h是1-24的整数。

[0520] 具有式(V)的稳定化部分的具体非限制性实例包括但不限于：

[0521] 0-(2-氨基乙基)-0'-(2-叠氮乙基)庚乙二醇，

[0522] 0-(2-氨基乙基)-0'-(2-叠氮乙基)壬乙二醇，

[0523] 0-(2-氨基乙基)-0'-(2-叠氮乙基)戊乙二醇，

[0524] 2-[2-(2-叠氮乙氧基)乙氧基]乙醇，

[0525] 0-(2-叠氮乙基)庚乙二醇，

[0526] 0-(2-叠氮乙基)-0'-甲基-三甘醇乙二醇，

[0527] 0-(2-叠氮乙基)-0'-甲基-十一乙二醇，

[0528] 11-叠氮-3,6,9-三氧杂十一烷-1-胺,和

[0529] 甲氧基聚乙二醇叠氮化物。

[0530] 在一些实施方案中,具有式(V)的稳定化部分包含(或衍生化自)叠氮-PEG-胺,其中PEG基团的数量为1-24。叠氮-PEG-胺的适当非限制性实例包括:叠氮-PEG1-胺、叠氮-PEG2-胺、叠氮-PEG3-胺、叠氮-PEG4-胺、叠氮-PEG5-胺、叠氮-PEG6-胺、叠氮-PEG7-胺、叠氮-PEG8-胺、叠氮-PEG10-胺、叠氮-PEG11-胺、叠氮-PEG20-胺和叠氮-PEG24-胺。

[0531] 在一些实施方案中,具有式(V)的稳定化部分包含(或衍生化自)叠氮-PEG-醇,其中PEG基团的数量为1-24。叠氮-PEG-醇的适当非限制性实例的包括:叠氮-PEG2-醇、叠氮-PEG3-醇、叠氮-PEG4-醇、叠氮-PEG5-醇、叠氮-PEG6-醇、叠氮-PEG7-醇、叠氮-PEG8-醇、叠氮-PEG9-醇、叠氮-PEG10-醇、叠氮-PEG11-醇、叠氮-PEG12-醇、叠氮-PEG16-醇、叠氮-PEG20-醇和叠氮-PEG24-醇。

[0532] 在一些实施方案中,具有式(V)的稳定化部分包含叠氮-PEG-甲基,其中PEG基团的数量为1-24。叠氮-PEG-甲基的适当非限制性实例包括:叠氮-PEG1-甲基、叠氮-PEG2-甲基、叠氮-PEG3-甲基、叠氮-PEG4-甲基、叠氮-PEG5-甲基、叠氮-PEG6-甲基、叠氮-PEG7-甲基、叠氮-PEG8-甲基、叠氮-PEG9-甲基、叠氮-PEG10-甲基、叠氮-PEG11-甲基、叠氮-PEG12-甲基、叠氮-PEG16-甲基、叠氮-PEG20-甲基和叠氮-PEG24-甲基。

[0533] 在一些实施方案中,具有式(V)的稳定化部分包括叠氮-PEG-(CH₂)₃OH,其中PEG基团的数量为1-24。这种叠氮-PEG-(CH₂)₃OH化合物的合适的实例包括叠氮-PEG3-(CH₂)₃OH和叠氮-PEG4-(CH₂)₃OH。

[0534] 递送核糖核蛋白复合物的方法

[0535] 本公开的另一个方面是一种将负载(例如核糖核蛋白复合物)递送到细胞的方法。在一些实施方案中,所述方法包括将本文所述的任何聚合物纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物(包括那些具有含核糖核蛋白的核的缀合物)与细胞(例如宿主细胞)接触。在一些实施方案中,所述方法促进将负载(例如核糖核蛋白复合物)递送至细胞的核中。在一些实施方案中,细胞可以是哺乳动物细胞,例如人细胞。在一些实施方案中,细胞可以是神经细胞、T细胞、成纤维细胞、上皮细胞、肿瘤细胞、肌肉细胞、皮肤细胞或免疫系统细胞。

[0536] 在一些实施方案中,当聚合物纳米胶囊与细胞接触时,负载(例如核糖核蛋白复合物)从聚合物纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物中释放。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊在与细胞接触时运输穿过细胞膜。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊通过内吞过程内化到细胞中。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊通过受体介导的内吞过程内化。在一些实

施方案中,聚合物纳米胶囊包含一个或多个靶向部分,其中靶向部分结合至细胞的表面膜蛋白受体,导致内吞作用。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含靶向特定类型受体(例如CD标志物)的抗体,并且在纳米胶囊结合的靶向抗体与细胞受体结合后,纳米胶囊(或其负载)通过内吞过程内化。在一些实施方案中,在内吞过程中,与聚合物纳米胶囊缀合的部分或全部靶向抗体和/或增溶部分被切割。

[0537] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物在穿过细胞膜后从聚合物纳米胶囊中释放。在一些实施方案中,至少50%的核糖核蛋白复合物从纳米胶囊中释放(基于聚合物纳米胶囊中核糖核蛋白复合物的总量)。在其他实施方案中,至少60%的核糖核蛋白复合物从纳米胶囊中释放(基于聚合物纳米胶囊中核糖核蛋白复合物的总量)。在其他实施方案中,至少75%的所述的核糖核蛋白复合物从纳米胶囊中释放(基于聚合物纳米胶囊中的核糖核蛋白复合物总量)。在进一步的实施方案中,至少90%的核糖核蛋白复合物从纳米胶囊中释放(基于聚合物纳米胶囊中的核糖核蛋白复合物总量)。在更进一步的实施方案中,至少95%的核糖核蛋白复合物从纳米胶囊中释放(基于聚合物纳米胶囊中的核糖核蛋白复合物总量)。

[0538] 在一些实施方案中,细胞与聚合物纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物的接触在体外进行。在一些实施方案中,细胞与聚合物纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物的接触在体内进行,例如在个体或患者的体内,例如人(智人)或其他动物。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物以有效的量存在于细胞中,以在核糖核酸复合物的释放期间或之后在个体中提供可检测的效果,例如治疗效果。在一些实施方案中,观察到的或可检测到的效果来自于聚合物纳米胶囊的细胞渗透和核糖核蛋白复合物从纳米胶囊的释放。在一些实施方案中,对于干细胞的体内制备,由于CD34+细胞在骨髓中的频率较低(低于约1%-约2%),包含一种或多种抗CD34抗体的聚合物纳米胶囊缀合物被用于靶向CD34+干细胞。在一些实施方案中,CD34+细胞在与纳米胶囊配制前被细胞因子预刺激,即患者在接受聚合物纳米胶囊缀合物的输注前先用细胞因子治疗。

[0539] 另一方面,对于干细胞的体外制备,在一些实施方案中,收集的干细胞(例如,CD34+干细胞)可以用FLT3-L(Fms相关酪氨酸激酶3配体)、血小板生成素(TPO)和/或干细胞因子(SCF)预刺激,如过夜。然后可将预刺激的干细胞与本公开的聚合物纳米胶囊或聚合物纳米胶囊缀合物孵化一段时间,时间范围为约3-约10小时、或约4小时-约8小时、或约4小时-约6小时。在这个初始孵化之后,干细胞可以在冷冻保存之前在新鲜的培养基中孵化约24-约48小时。可将治疗有效量的冷冻保存的基因编辑的干细胞输注到需要干细胞治疗的患者。

[0540] 使用纳米胶囊的治疗方法

[0541] 本文所述的纳米胶囊和其药物制剂可用于诊断、治疗或预防疾病、病症、综合症或其症状。本文所述的聚合物纳米胶囊和其药物制剂的量可以每天、每周、每月或每年给需要的个体给药一次或多次。

[0542] 在一些实施方案中,疾病或病症是单基因疾病或病症。单基因疾病或病症的非限制性实例包括地中海贫血症、镰状细胞贫血症、血友病、囊性纤维化、泰萨(Tay Sachs)病、脆性X综合症和亨廷顿氏病。

[0543] 在一些实施方案中,给药的量可以是聚合物纳米胶囊或其药物制剂的有效量。例如,所述纳米胶囊或其药物制剂可按每日剂量给药。量可在每天的单一剂量中给药。在其他

实施方案中,每日剂量可以每天分多次给药,其中每次都包含每天要给的总剂量的一部分(亚剂量)。在一些实施方案中,每天递送的剂量数为2、3、4、5或6。在进一步的实施中,所述化合物、制剂或其盐每周给药一次或多次,如每周1、2、3、4、5或6次。在其他实施方案中,纳米胶囊或其药物制剂每月给药一次或多次,如每月1-5次。在更进一步的实施方案中,纳米胶囊或其药物制剂每年给药一次或多次,如每年1-11次。

[0544] 在依次给药一种以上的聚合物纳米胶囊、其药物制剂和/或辅助剂的实施方案中;依次给药可在时间上接近或在时间上遥远。例如,第二种纳米胶囊、其药物制剂和/或辅助剂的给药可在第一种药剂给药后数秒或数分钟(最多约1小时)内发生(时间上接近)。在其他实施方案中,第二种纳米胶囊、其药物制剂和/或辅助剂的给药发生在给药第一种纳米胶囊或其药物制剂后一小时以上的其他时间。

[0545] 本文所述的聚合物纳米胶囊、其药物制剂和/或辅助剂的给药量可为每天约0.01毫克-约1克,按其作为游离或无盐的药物制剂来计算。本文所述的纳米胶囊、其药物制剂和/或辅助剂的给药量可以是每天约0.01 μ M-约100 μ M。

[0546] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊用于促进基因组编辑分子的递送。在进一步的实施方案中,细胞或细胞群可与本文所述的一种或多种聚合物纳米胶囊或其制剂孵化一段时间。在一些实施方案中,纳米胶囊包含Cas9:sgRNA复合物。孵化时间可以从约1小时到约10天或更长时间。孵化之后,可以使用本领域已知的技术和/或本文所述的技术来培养细胞或细胞(cells)。也可以使用本领域已知的或如本文所述的技术和方法,对细胞或细胞(cells)进行基因组修饰分析。

[0547] 聚合物纳米胶囊制剂

[0548] 本文所述的聚合物纳米胶囊可以单独提供给个体、或与细胞接触(体内或体外)、或作为药物制剂或其他组合物中的成分,如活性成分。因此,本文还描述含有一种或多种本文所述的纳米胶囊的药物制剂。在一些实施方案中,药物制剂中含有有效量的本文所述的聚合物纳米胶囊。这些药物制剂可以给药至有需要的个体。

[0549] 药物制剂可包含聚合物纳米胶囊的同质群体。在这些实施方案中,药物制剂中包含的所有聚合物纳米胶囊都是相同的。在其他实施方案中,药物制剂可以包含聚合物纳米胶囊的异质群体。在这些实施方案中,聚合物纳米胶囊群体包含至少两种彼此不同的聚合物纳米胶囊,例如,每个群体包含不同的核糖核蛋白复合物,例如包含不同gRNA的不同的核糖核蛋白复合物。两种不同的聚合物纳米胶囊在靶向部分的类型、偶联靶向部分的数量、稳定化部分的类型和/或数量、和/或构成聚合物纳米胶囊外壳的组分(或组分的比例)的类型和/或数量方面可以彼此不同。

[0550] 本公开的另一个方面包括包含多纳米胶囊的组合物。如本文所用,“多纳米胶囊”是指包含一个以上的纳米胶囊(例如10个以上的)纳米胶囊的组合物。所述聚合物纳米胶囊可以包含具有上述结构和组分的聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,组合物包含分散在水溶液中的多纳米胶囊。

[0551] 水溶液可以包括水、去离子水、缓冲液(例如,磷酸盐缓冲盐水、磷酸盐缓冲液和类似物)和类似物或其组合。在一些实施方案中,基于组合物的总体积,组合物包含1-50体积百分比(vol.%)的纳米胶囊,例如1-20体积百分比,例如5-15体积百分比。因此,在一些实施方案中,基于组合物的总体积,组合物包含50-99体积百分比、或80-99体积百分比、或85-

95体积百分比的水溶液。

[0552] 药学上可接受的载剂以及辅助成分和试剂

[0553] 含有有效量的本文所述的聚合物纳米胶囊的药物制剂可进一步包含药学上可接受的载剂。合适的药学上可接受的载剂包括但不限于水、盐溶液、醇类、阿拉伯胶、植物油、苯甲醇、聚乙二醇、明胶、碳水化合物如乳糖、直链淀粉或淀粉、硬脂酸镁、滑石粉、硅酸、粘性石蜡、香水油、脂肪酸酯、羟甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮、这些都不会与活性成分发生有害反应。

[0554] 药物制剂可以灭菌，并且如果需要，可以与辅助剂混合，例如润滑剂、防腐剂、稳定剂、润湿剂、乳化剂、用于影响渗透压的盐、缓冲剂、着色剂、调味剂和/或芳香物质等，它们不会与活性成分发生有害反应。除了有效量的纳米胶囊外，药物制剂还可以包含有效量的辅助活性剂，包括但不限于DNA、RNA、氨基酸、肽、多肽、抗体、适配体、核酶、抑制基本肿瘤蛋白和基因的翻译或转录的核酶的向导多核苷酸、激素、免疫调节剂、解热剂、抗焦虑剂、抗精神病剂、镇痛剂、解痉剂、抗炎剂、抗组胺剂、抗感染剂和化学治疗剂。用于辅助活性剂的合适的化合物已在此以前与纳米胶囊有关的部分进行描述。

[0555] 纳米胶囊和辅助剂的有效量

[0556] 药物制剂可以包含有效量的聚合物纳米胶囊和/或有效量的辅助剂。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊的有效量为约0.001pg-约10,000μg。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊的有效量为约0.1pg-约5000μg。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊的有效量为约1pg-约1000μg。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊的有效量为约1pg-约500μg。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊的有效量为约100pg-约500μg。

[0557] 在药物制剂中除了聚合物纳米胶囊外还含有辅助活性剂的实施方案中，辅助活性剂的有效量将根据辅助活性剂而变化。在一些实施方案中，辅助活性剂的有效量为0.001微克-约1毫克。在其他实施方案中，辅助活性剂的有效量为约0.01IU-约1000IU。在进一步的实施方案中，辅助活性剂的有效量为0.001mL-约1mL。在另一实施方案中，辅助活性剂的有效量为总药物制剂的约1%w/w-约50%w/w。在其他实施方案中，辅助活性剂的有效量为总药物制剂的约1%v/v-约50%v/v。在另一实施方案中，辅助活性剂的有效量为总药物制剂的约1%w/v-约50%w/v。

[0558] 剂型

[0559] 在一些实施方案中，本文所述的药物制剂(如包含任何聚合物纳米胶囊和/或聚合物纳米胶囊缀合物的制剂)可以以适合于给药的剂型提供。在一些实施方案中，剂型可适用于任何适当的给药途径。适当的途径包括但不限于：口服(包括口腔或舌下)、直肠、眼内、吸入、鼻内、局部(包括口腔、舌下或透皮)、阴道、胃肠外、皮下、肌肉注射、静脉内和皮内。这样的制剂可以通过本领域已知的任何方法来制备。

[0560] 适于口服给药的剂型可以是离散的剂量单位，如胶囊、丸剂或片剂、粉末或颗粒、溶液、或者水或非含水液体的悬浮液；可食用的泡沫或鞭(whip)、或水包油的液体乳剂、或油包水的液体乳剂。在一些实施方案中，适于口服的药物制剂还包括一种或多种用于调味、保存、着色或帮助分散药物制剂的试剂。制备用于口服的剂型也可以是液体溶液的形式，可以以泡沫、喷雾或液体溶液的形式递送。所述口服剂型可以给药至需要的个体。在一些实施方案中，其为患有癌症的个体。在一些实施方案中，癌症是叶酸阳性的癌症。

[0561] 在适当情况下,本文所述的剂型可以微胶囊化。剂型也可制备以延长或维持任何成分的释放。在一些实施方案中,纳米胶囊可以是延迟释放的成分。在其他实施方案中,辅助成分的释放被延迟。用于延迟释放成分的合适的方法包括但不限于将成分涂覆或包埋于聚合物、蜡、凝胶等材料。延迟释放剂型可以按照标准参考文献中的描述进行制备,例如“Pharmaceutical dosage form tablets,”eds.Liberman et.al.(New York,Marcel Dekker,Inc.,1989),“Remington-The science and practice of pharmacy”,20th ed.,Lippincott Williams&Wilkins,Baltimore,MD,2000,和“Pharmaceutical dosage forms and drug delivery systems”,6th Edition,Ansel et al.,(Media,PA:Williams and Wilkins,1995)。这些参考文献提供关于制备片剂、胶囊以及片剂、丸剂、胶囊和颗粒的延缓释放剂型的辅料、材料、设备和方法的信息。延迟释放的时间可以从约一个小时到约三个月或更长时间。

[0562] 合适的包衣材料的实例包括但不限于:纤维素聚合物,例如乙酸邻苯二甲酸纤维素、羟丙基纤维素、羟丙基甲基纤维素、邻苯二甲酸羟丙基甲基纤维素和乙酸琥珀酸羟丙基甲基纤维素;聚醋酸乙烯邻苯二甲酸酯、丙烯酸聚合物和共聚物、以及可商购的商品名为 EUDRAGIT® (Roth Pharma,Westerstadt,Germany) 的甲基丙烯酸树脂、玉米醇溶蛋白、虫胶和多糖。

[0563] 可以用不同比例的水溶性聚合物、非水溶性聚合物和/或与pH依赖型聚合物,有或没有非水溶性/水溶性非聚合物赋形剂,来形成包衣,以产生所需的释放曲线。可以在剂型(基质或简单(simple))上进行包衣,包括但不限于片剂(有或没有包衣珠粒压缩)、胶囊(有或没有包衣珠粒)、珠粒、颗粒组合物,“成分是以...”以但不限于悬浮液形式或喷洒剂型来配制。适于局部给药的剂型可以配制成软膏、乳剂、悬浮液、洗剂、粉末、溶液、糊剂、凝胶、喷雾剂、气雾剂或油。在一些实施方案中,对于眼睛或其他外部组织(例如口腔或皮肤)的治疗,药物制剂可作为外用软膏或乳剂施用。当配制成软膏时,纳米胶囊、辅助活性成分和/或其药学上可接受的盐可与石蜡或水混和的软膏基质配制。在其他实施方案中,活性成分可以配制成具有水包油膏基或油包水基的乳剂。适用于口腔局部给药的剂型包括锭剂、糖果锭剂和漱口水。

[0564] 适于鼻腔或吸入给药的剂型包括气雾剂、溶液、悬浮滴剂、凝胶剂或干粉剂。在一些实施方案中,在适于吸入的剂型中,纳米胶囊、其衍生物、辅助活性成分和/或其药学上可接受的盐是颗粒尺寸减少的形式(particle-size-reduced form),其通过微粉化获得或可获得。在一些实施方案中,尺寸缩小的(例如,微米化的)化合物或其盐或溶解物的颗粒尺寸由约0.5-约10微米的D50值所确定该值用本领域已知的适当方法测量。适于通过吸入给药的剂型还包括颗粒粉尘或喷雾。对于其中载剂或赋形剂是包含活性成分的水溶液或油溶液/悬浮液的可作为鼻腔喷雾剂或滴剂使用的液体,这样的合适的剂型可由各种类型的计量加压气雾剂、雾化器或吹入器产生。

[0565] 在一些实施方案中,剂型是适于通过吸入给药的气雾剂制剂。在其中一些实施方案中,气雾剂制剂含有纳米胶囊、辅助活性成分和/或其药学上可接受的盐的溶液或细悬浮液、以及药学上可接受的水溶液或非水溶液溶剂。气雾剂制剂可以在密封的容器中以无菌形式以单剂量或多剂量存在。对于其中一些实施方案中,密封容器是单剂量或多剂量的鼻腔或装有计量阀的气雾剂分配器(例如,计量剂量吸入器),一旦容器的内容物已消耗完,则

对其进行处理。

[0566] 其中气雾剂剂型包含在气雾剂分配器中,这样的分配器包含合适的加压推进剂,例如压缩空气、二氧化碳或有机推进剂,有机推进剂包括但不限于氢氟碳化合物。在其他实施方案中,气雾剂剂型包含于泵式雾化器。加压气雾剂制剂还可以包含纳米胶囊、其衍生物、辅助活性成分和/或其药学上可接受的盐的溶液或悬浮液。在进一步的实施方案中,气雾剂制剂还含有辅助溶剂和/或修饰剂,其被纳入以改善例如制剂的稳定性和/或味道和/或细颗粒质量特征(量和/或分布)。气雾剂制剂给药可以是一次、每天一次、或每天几次,例如每天2、3、4或8次,其中每次递送1、2或3剂量。

[0567] 对于一些适合和/或适于吸入给药的剂型,药物制剂是干粉吸入制剂。除了纳米胶囊、辅助活性成分和/或其药学上可接受的盐之外,这种剂型还可以包含粉末基质,如乳糖、葡萄糖、海藻糖、甘露醇和/或淀粉。在其中一些实施方案中,缀合化合物、其衍生物、辅助活性成分和/或其药学上可接受的盐为颗粒尺寸减小的形式。在进一步的实施方案中,性能调节剂,如L-亮氨酸或其他氨基酸、八乙酸纤维素和/或硬脂酸的金属盐,如硬脂酸镁或硬脂酸钙。

[0568] 在一些实施方案中,气雾剂制剂被布置成使得气雾剂的每个计量剂量包含预定量的活性成分,例如本文所述的一种或多种化合物。

[0569] 适于阴道给药的剂型可以存在为阴道栓剂、棉条、乳剂、凝胶、糊剂、泡沫或喷雾剂。适用于直肠给药的剂型包括栓剂或灌肠剂。

[0570] 适于胃肠外给药和/或适于注射(i.v.,s.q.,i.c.v.,i.m.等)的剂型可以包含水性和/或非水性无菌注射液(其中可以包含抗氧化剂、缓冲剂、杀菌剂、使组合物与受试者的血液等渗的溶质)以及水性和非水性无菌悬浮液(其中可以包含悬浮剂和增稠剂)。适于胃肠外给药的剂型可以存在于单-单位剂量或多-单位剂量的容器中,包括但不限于密封安瓿或小瓶。剂量可以冻干并重悬于无菌载剂中,以在给药前重组剂量。在一些实施方案中,可以从无菌粉剂、颗粒和片剂制备临时注射溶液和悬浮剂。

[0571] 对于一些实施方案,剂型在每单位剂量中含有预定量的本文提供的纳米胶囊。在一个实施方案中,本文提供的预定量的纳米胶囊是用于诊断、治疗、预防或减轻癌症症状的有效量的纳米胶囊。在其他实施方案中,预定量的纳米胶囊是有效量的活性成分的适当部分。因此,这种单位剂量可以每天给药一次或一次以上。这样的药物制剂可以通过本领域内众所周知的任何方法来制备。

[0572] 辅助活性剂可以包含在药物制剂中,或者可以作为独立的化合物或药物制剂存在,与本文提供的纳米胶囊、其衍生物或其药物制剂同时或依次给药。在辅助活性剂是独立的化合物或药物制剂的实施方案中,辅助活性剂的有效量可以根据所使用的辅助活性剂而变化。在其中一些实施方案中,辅助活性剂的有效量为0.001微克-约1000克。在其他实施方案中,辅助活性剂的有效量为约0.01IU-约1000IU。在进一步的实施方案中,辅助活性剂的有效量为0.001mL-约1mL。在另一实施方案中,辅助活性剂的有效量为总辅助活性剂药物制剂的约1%w/w-约50%w/w。在其他实施方案中,辅助活性剂的有效量为总药物制剂的约1%v/v-约50%v/v。在另一实施方案中,辅助活性剂的有效量为总辅助剂药物制剂的约1%w/v-约50%w/v。

[0573] 实施例

[0574] 实施例1

[0575] 将Cas9蛋白储备液(67 μ M)和gRNA储备液(100 μ M)加入到50mM pH=6.4的50mM HEPES缓冲液和150 μ M NaCl中,至最终浓度为1 μ M。由Cas9和gRNA形成的RNP复合物是带负电的。配制不同的聚合物纳米胶囊,每种不同的聚合物纳米胶囊都包含具有SEQ ID NO:8-15中任一项的gRNA。

[0576] 然后,将(i) N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,(ii) 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,(iii) 1,3-甘油二甲基丙烯酸酯和(iv) 丙烯酰胺的化学混合物溶于脱氧无RNA酶水,并加入到Cas9-gRNA复合物管中。各种单体的比例为250:500:1000:4000(单体(i):(ii):(iii):(iv))。通过加入0.02mg溶解在2 μ L脱氧去离子水和0.4 μ L N,N,N',N'-四甲基乙二胺中的过硫酸铵进行自由基聚合。反应在氮气气氛中于4 $^{\circ}$ C进行180分钟。聚合完成后,用透析或超滤来去除过量的单体。

[0577] 然后,将纳米胶囊纯化并与靶向部分和PEG缀合。具体地,用相对于形成的纳米胶囊,约30-约50倍过量的二苯并环辛炔-S-S-N-羟基琥珀酰亚胺酯,来修饰纳米胶囊的表面,以达到每纳米胶囊与约3-约10个酯的最终共轭。然后,约5-约10倍过量的叠氮官能化的PEG(分子量约为2000道尔顿),和,约5-约10倍过量的叠氮官能化的abCD3或abCD34,被用于将靶向部分和稳定化部分引入所形成的聚合物纳米胶囊的表面。接下来,将缀合的纳米胶囊与未反应的靶向分子和PEG分离,并使用尺寸排阻柱色谱法富集最终产品。生成的聚合物纳米胶囊缀合物具有中性电荷,并且尺寸为约50nm-约100nm。

[0578] 实施例2-作为疾病靶标的HIV

[0579] 将纳米胶囊配制成含有编码sh5或C46的DNA分子或配制成含有和CRISPR/Cas9核糖核蛋白复合物(RNP)。纳米胶囊还与抗CD3、抗CD4或抗CD34抗体缀合,以靶向T淋巴细胞或CD34+干/祖细胞。然后将它们注射到人源化小鼠的骨髓中的一些特定位置;例如,骨内龕(endosteal niche)(骨内导入)。由此产生的含有细胞的构建体通过如下一种或组合来刺激以复制和分化:1) 构建体应答生长/分化剂,2) 特定的细胞因子和抗体,3) α 9 β 1/ α 4 β 1抑制剂。检查外周血,然后处死小鼠以确定构建体的表达程度,包括在sh5/C46引入CCR5下调的情况下,C46的表达;以及在CRISPR/CAS的情况下,敲除CCR5和敲入C46。

[0580] 实施例3-作为疾病靶标的球蛋白病(Globioopathy)

[0581] 纳米胶囊被配制成含有靶向BCL11A红细胞增强子(erythroid enhancer)的CRISPR/CAS。将这些配制的纳米胶囊引入人源化小鼠的骨髓中的一些特定位置;例如,骨内龕。这将起到敲除BCL11A红细胞增强子活性的作用,这会抑制BCL11A的活性,从而激活胎儿血红蛋白,以挽救镰状细胞病或 β -地中海贫血。

[0582] 实施例4-以HPRT为靶标

[0583] 据信,通过使用二氢叶酸还原酶抑制剂来抑制嘌呤从头合成途径中的二氢叶酸还原酶(DHFR),可以对HPRT缺陷的细胞(即那些对嘌呤类似物(例如6TG)敏感的细胞,如那些具有20%或更少的残留HPRT基因表达的细胞)进行阴性选择。这已被开发为一种安全规程,以在观察到意外不良作用时消除基因修饰的HSC。如果出现任何不良的副作用,患者可以用甲氨蝶呤("MTX")或霉酚酸("MPA")治疗。不良副作用包括,例如,异常血细胞计数/克隆扩增,其表明特定细胞克隆或细胞因子风暴中的插入突变。

[0584] 据信,MTX或MPA会竞争性抑制二氢叶酸还原酶(DHFR),这是一种参与四氢叶酸

(THF)合成的酶。DHFR催化二氢叶酸转化为活性四氢叶酸。叶酸是DNA合成所需核苷胸苷的从头合成所需要的。另外,叶酸对嘌呤和嘧啶碱生物合成至关重要,所以合成会受到抑制。因此,MTX或MPA会抑制DNA、RNA、胸苷酸和蛋白的合成。MTX或MPA通过抑制DHFR阻断从头途径。在HPRT^{-/-}细胞中,没有补救或从头功能性途径,导致没有嘌呤合成,因此细胞死亡。然而,HPRT野生型细胞有功能性的补救途径,它们的嘌呤合成得以进行,细胞得以生存。在一些实施方案中,MTX或MPA的类似物或衍生物可替代MTX或MPA。MTX的衍生物在美国专利号5,958,928和PCT公开号W0/2007/098089中有所描述,其披露的内容在此全部纳入参考。

[0585] 鉴于根据本公开内容生产的修饰的HSC的敏感性,MTX或MPA可用于选择性地消除HPRT缺陷的细胞。在一些实施方案中,MTX或MPA以单剂量给药。在一些实施方案中,MTX或MPA以多剂量给药。

[0586] 纳米胶囊被配制成含有靶向HPRT基因座的CRISPR/CAS。这些配制的纳米胶囊被引入人初始CD4⁺或CD8⁺T细胞。这将起到敲除HPRT活性的作用,会抑制HPRT的活性,导致对6-硫鸟嘌呤(6-TG)的抵抗性和对甲氨蝶呤(MTX)的敏感性。这些6-TG抵抗的T细胞可以为接受6-TG化疗的白血病患者提供临时的免疫支持。这些MTX敏感的T细胞可以在患者完成6-TG化疗后通过输注MTX来消除。

[0587] 实施例5-6TG选择的HPRT的敲除与敲低的比较

[0588] 6TG是一种嘌呤类似物,具有抗癌和免疫抑制的活性。硫鸟嘌呤与次黄嘌呤和鸟嘌呤竞争次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRTase),并且自身转化为6-硫鸟苷酸(TGMP)。这种核苷酸在治疗剂量达到高细胞内浓度。TGMP干扰鸟嘌呤核苷酸的合成的几个点。它通过谷氨酰胺-5-磷酸核糖焦磷酸酰胺转移酶的假反馈抑制来抑制从头嘌呤生物合成,转移酶是嘌呤核糖核苷酸从头途径中特有的第一种酶。TGMP还通过与IMP脱氢酶竞争来抑制肌苷酸(IMP)向黄苷酸(XMP)转化。曾一度认为TGMP是一种重要的ATP抑制剂:GMP磷酸转移酶(鸟苷酸激酶),但最近的结果表明并非如此。硫鸟苷酸通过代谢鸟嘌呤核苷酸的相同酶进一步转化为二磷酸和三磷酸、硫鸟苷二磷酸盐(TGDP)和硫鸟苷三磷酸盐(TGTP)(以及其2'-脱氧核糖类似物)。

[0589] 在第0天(0),用包含旨在敲除HPRT的核酸序列和编码绿色荧光蛋白(GFP)的核酸序列的载体转导K562细胞(MOI=1/2/5);或用包含CRISPR/Cas9和到HPRT的sgRNA的纳米胶囊转染K562细胞(100ng/5x10⁴细胞)。第3天-第14天,将6-TG添加到培养基中。每3-4天更新一次培养基。GFP在流式仪上分析,Indel%如用T7E1测定分析("Indel"是分子生物学术语,用于生物体基因组中碱基的插入或缺失)。图6A表明,第3天-第14天,在6TG处理下,转导的K562细胞的GFP⁺群体增加;而在没有6TG处理的情况下,GFP⁺群体几乎稳定。图6B表明,第3天-第14天,在6TG处理下,K562细胞的HPRT敲除群体增加,与300/600nM的6TG剂量相比,较高剂量(900nM)的6TG导致更快的选择。应该指出的是,第3天-第14天,在相同浓度的3006TG下,与HPRT敲低细胞(MOI=1)相比,6TG选择过程在HPRT敲除细胞上发生得更快。敲低和敲除之间的差异可以解释为,与通过敲除方法完全消除HPRT相比,通过RNAi敲低方法有一定程度的残留HPRT。因此,根据本公开的内容,认为HPRT-敲除的细胞对6TG有更高的耐受性,并且认为与HPRT-敲低的细胞相比,其在更高剂量的6TG(900nM)下生长得更快。

[0590] 在第0天,用包括旨在敲低HPRT的核酸序列和编码绿色荧光蛋白的核酸序列的载体转导CEM细胞,或用包含CRISPR/Cas9和到HPRT的sgRNA的纳米胶囊转染CEM细胞。第3天-

第17天,将6-TG添加到培养基中。每3-4天更新一次培养基。GFP在流式仪上进行分析,InDe1%通过T7E1测定进行分析。图7A表明,第3天-第17天,在6TG处理下,转导的K562细胞的GFP+群体增加,而不使用6TG时GFP+群体几乎稳定。图7B比较性地显示,第3天-第17天,在6TG处理下,CEM细胞的HPRT敲除群体增加,并且与300/600nM的6TG剂量相比,6TG的高剂量(900nM)导致更快的选择。应该注意的是,第3天-第17天,在相同浓度的6TG下,6TG选择过程在HPRT敲除细胞上发生得更快,而不是HPRT敲低细胞(MOI=1)上。

[0591] 实施例6-CD3缀合的CRISPR纳米胶囊的PBMC的HPRT敲除和6-TG选择

[0592] 在转导前2天用PHA/IL2刺激PBMC细胞(见图8A)。在第0天,刺激的PBMC细胞用LV rsh7-GFP(MOI=0.5)转导或用nanoRNP-HPRT1转染(见图8A)。第3天-第14天,将6-TG加入培养基中(见图8A)。每3-4天更新一次培养基。GFP在流式仪上进行分析。图8B说明在两种不同的MOI(2和10)下,Rsh7-GFP转导的PBMC的GFP+群体,其中两种MOI在100nM 6TG下都会增加。图8C说明,第3天-第14天,在300nM 6TG下,PBMC的HPRT敲除群体增加。

[0593] 实施例7-MTX或MPA的阴性选择

[0594] 第0天-第14天,用或不用MTX培养转导或转染的K562细胞(例如来自实施例5的细胞)。每3-4天更新一次培养基。GFP在流式仪上进行分析,InDe1%用T7E1测定进行分析。图9A显示,在0.3 μ M MTX处理下,转导的K562细胞的GFP-群体减少。没有MTX的情况下,细胞群体稳定。图9B说明,在0.3 μ M的MTX处理下,与HPRT-KD群体相比,转染的K562细胞以更快的速度被消除。

[0595] 第0天-第14天,用或不用MTX培养转导或转染的CEM细胞(例如来自实施例6的细胞)。每3-4天更新一次培养基。GFP在流式仪上进行分析,InDe1%用T7E1测定进行分析。图10A显示在1 μ M MPA或0.3 μ M MTX或10 μ M MPA处理下,转导的K562的GFP-群体减少,而未处理组的细胞群体稳定。图10B说明在1 μ M MPA或0.3 μ M MTX或10 μ M MPA处理下,HPRT敲除的CEM细胞群体以更快的速度被消除。

[0596] 实施例8-gRNA-Cas9-hdrDNA纳米胶囊制备gRNA和HBBhdrDNA-敲除和HDR

[0597] 方法

[0598] 293T细胞在转导前一天进行接种。将1.5pmol的i) RNP(对照)、ii) RNP-hdrDNA复合物、或iii) RNP和带有HBB的RNP的hdrDNA纳米胶囊,加入到孔中,并培养4小时,然后更新培养基。3天后进行T7E1测定(另见图13A、13B和14)。

[0599] 靶序列如下:TTACTGCCCTGTGGGGCAAG(SEQ ID NO:38)。

[0600] Hdr DNA(HBB-SCD)的序列是:

[0601] CACTAGCAACCTCAAACAGACACCATGGTGCATCTGACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTGGATGAAGTTGGTG(SEQ ID NO:56)。

[0602] nanon(RNP-hdrDNA)复合物-gRNA序列在以下表格中提供:

SEQ ID NO:	序列
39	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
40	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTATGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
41	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTAGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
[0603] 42	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
43	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTACCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
44	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTGGGGCAAGGTGAACGTG
45	GACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
46	GACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
47	GACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG

[0604] INDEL% = 8/23 (35%对33%, 来自T7E1)

[0605] HDR% = 3/8 (38%)

[0606] nanoRNP和nanohdrDNA-gRNA的序列在下面的表格中提供:

SEQ ID NO:	序列
48	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
49	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTACCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
[0607] 50	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
51	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
52	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
53	GACTCCTGAGGAGAAGTCTGCCGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG
54	GACTCCTGTGGAGAAGTCTGCCGTTACTGCCCTGTGGGGCAAGGTGAACGTG

[0608] INDEL% = 6/21 (29%对26%, 来自T7E1)

[0609] HDR% = 1/6 (17%)

[0610] 实施例9-转导/转染

[0611] 除非另有说明, 转导/转染是按标准方法进行的。例如, 参考Yan, M. et al. (2015); PloS One.; 10 (6): e0127986; Yan, M. et al. (2012). Journal of the American Chemical Society, 134, pp. 13542-13545; Zhang, J. et al. (2011). Biomacromolecules, 12 (4), pp. 1006-1014。

[0612] 实施例10-3合1CRISPR纳米机器在MOCHA中敲除CCR5和敲入C46

[0613] MOCHA (即转铁蛋白缀合的Cas9-CCR5-gRNA-EF1a-C46 (3合1)) 纳米胶囊中CCR5的敲除和C46的敲入。

[0614] 配制纳米胶囊以包含CRISPR/Cas9/C46 HDR模板CRISPR机械复合物。纳米胶囊还与转铁蛋白缀合, 以促进向MOCHA细胞系的递送。加入500ng的Cas9-CCR5-gRNA-EF1a-C46纳米胶囊, 3天后进行流式分析。图15板A和B显示未经处理的Mocha (约95%的CCR5+) 细胞和经

处理的MOCHA的CCR5染色结果。图15的C、D和E板显示未经处理的Mocha、经处理的Mocha的CCR5-亚群和C46-敲入的AW072细胞系的C46染色结果。

[0615] 方法:

[0616] 将Cas9蛋白储备液(67 μ M)、CCR5靶向gRNA储备液(100 μ M)和C46表达的DNA盒双链DNA HDR模板(100 μ M)加入到50mM pH=6.4的50mM HEPES缓冲液和150 μ M NaCl中,至最终浓度为1 μ M。由Cas9/gRNA/HDR模板形成的3合1CRISPR机械复合物(machinery complex)带负电。配制不同的聚合物纳米胶囊,每种不同的聚合物纳米胶囊都包含具有SEQ ID NO:55的gRNA。

[0617] 然后,将(i)N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,(ii)2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯(iii)1,3-甘油二甲基丙烯酸酯和(iv)丙烯酰胺的化学混合物溶于脱氧无RNA酶水,并加入到Cas9-gRNA复合物管中。各种单体的比例为750:500:1000:4000(单体(i):(ii):(iii):(iv))。通过加入0.02mg溶解在2 μ L脱氧去离子水和0.4 μ L N,N,N',N'-四甲基乙二胺中的过硫酸铵来进行自由基聚合。反应在氮气气氛中于4 $^{\circ}$ C进行180分钟。聚合完成后,用透析或超滤来去除过量的单体。

[0618] 然后,将纳米胶囊纯化并与靶向部分和PEG缀合。具体地,用相对于形成的纳米胶囊,约30-约50倍过量的二苯并环辛炔-S-S-N-羟基琥珀酰亚胺酯,来修饰纳米胶囊的表面,以达到每纳米胶囊与约3-约10个酯的最终共轭。然后,约5-10倍过量的叠氮官能化的PEG(分子量约为2000道尔顿),和,约5-约10倍过量的叠氮官能化的转铁蛋白或abCD3或abCD34,被用于将靶向部分和稳定化部分引入所形成的聚合物纳米胶囊的表面。接下来,将缀合的纳米胶囊与未反应的靶向分子和PEG分离,并使用尺寸排阻柱色谱法富集最终产品。生成的聚合物纳米胶囊缀合物具有中性电荷,并且尺寸在约50nm-约100nm。

[0619] 实施例11-3合1CRISPR机器进行6-TG选择

[0620] 在sh734-KI mPB CD34+细胞(即用TP0/SCF/FLT3/IL3培养的动员CD34+细胞和在CD34+细胞中敲除CCR5和敲入sh734)中用6-TG选择进行CCR5染色的检测方案和结果。

[0621] 配制纳米胶囊以包含CRISPR/Cas9/gRNA,其靶向CCR5/mi-sh734表达盒HDR模板CRISPR机械复合物(见方法)。将CD34+细胞解冻,用100ng/mL的TP0/SCF/FLT4/IL3在x-vivo 10进行预刺激过夜。然后将500ng的Cas9-CCR5-gRNA-3G-mi-sh734纳米胶囊加入每孔 5×10^4 个细胞中,并在第4-14天向培养基中加入100nM的6TG。流式分析在第14天进行。图16板A、B和C显示未染色对照、未经6TG处理(44.9%的CCR5+) (图16,板B) 和经6TG处理(43.4%的CCR5+) (图16,板C) 的CD34+细胞的CCR5染色结果。图16的板D显示经纳米胶囊处理的CD34+细胞的CCR5+染色结果,其中培养基中没有6TG(23.8%)和培养基中有6TG(10.2%)。

[0622] CCR5染色数据表明,6-TG选择发生在批量培养的sh734-KI mPB CD34+细胞上。

[0623] 方法

[0624] 将Cas9蛋白储备液(67 μ M)、CCR5靶向gRNA储备液(100 μ M)和7SK-sh734表达的DNA盒双链DNA HDR模板(100 μ M)加入到50mM pH=6.4的50mM HEPES缓冲液和150 μ M NaCl中,至最终浓度为1 μ M。由Cas9/gRNA/HDR模板形成的3合1CRISPR机械复合物带负电。

[0625] 然后,将(i)N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,(ii)2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯(iii)1,3-甘油二甲基丙烯酸酯和(iv)丙烯酰胺的化学混合物溶于脱氧无RNA酶水,并加入到Cas9-gRNA复合物管中。各种单体的比例为850:500:1000:

4000(单体(i):(ii):(iii):(iv))。通过加入0.02mg溶解在2 μ L脱氧去离子水和0.4 μ L N,N,N',N'-四甲基乙二胺中的过硫酸铵来进行自由基聚合。让反应在氮气气氛中于4℃的进行180分钟。聚合完成后,用透析或超滤来去除过量的单体。

[0626] 然后,将纳米胶囊纯化并与靶向部分和PEG缀合。具体地,用相对于形成的纳米胶囊,约30-约50倍过量的二苯并环辛炔-S-S-N-羟基琥珀酰亚胺酯,来修饰纳米胶囊的表面,以达到每纳米胶囊与约3-约10个酯的最终共轭。然后,约5-约10倍过量的叠氮官能化的PEG(分子量约为2000道尔顿),和,约5-10倍过量的叠氮官能化的转铁蛋白或abCD3或abCD34,被用于将靶向部分和稳定化部分引入所形成的聚合物纳米胶囊的表面。接下来,将缀合的纳米胶囊与未反应的靶向分子和PEG分离,并使用尺寸排阻柱色谱法富集最终产品。生成的聚合物纳米胶囊共轭物具有中性电荷,并且尺寸在约50nm-约100nm(见图16)。

[0627] 实施例12-CRISPR纳米胶囊的6TG选择

[0628] 使用VCN/InDel数据检查6-TG选择。如图8A所示,mPB CD34+被转染/转导,纳米胶囊被配制成含有CRISPR/Cas9/gRNAR,其靶向CCR5/mi-sh734表达盒HDR模板CRISPR机械复合物(见方法)。将Cd34+细胞解冻并在X-vivo 10中用100ng/mL的TPO/SCF/FLT4/IL3进行预刺激过夜。然后将500ng的Cas9-CCR5-gRNA-3G-mi-sh734纳米胶囊加入每孔 5×10^4 个细胞中,并在第4-14天向培养基中加入100nM的6TG。流式分析在第14天进行。图17显示未染色对照、未经6TG处理(44.9%CCR5+)与经6TG处理(43.4%CCR5+)的CD34+细胞的CCR5染色结果。图17进一步显示纳米胶囊处理的CD34+细胞在培养基中没有6TG(23.8%)和在培养基中有6TG(10.2%)时的CCR5+染色结果。CCR5染色数据表明6-TG选择发生在批量培养的sh734-KI mPB CD34+细胞上。

[0629] 在6-TG处理的甲基纤维素板上,检查用sh734-rGbG/rGbG-sh734/sh734-GFP载体转导的mPB CD34+细胞或HPRT-KO CD34+细胞的6-TG选择。VCN/InDel数据表明,在6-TG处理的甲基纤维素板上,6-TG选择发生于用sh734-rGbG/rGbG-sh734/sh734-GFP载体转导的mPB CD34+细胞或HPRT-KO CD34+细胞(见图8D和8E)。

[0630] 其他实施方案

[0631] 一个额外的实施方案中,聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和负载,其中聚合物壳包含至少两种不同的带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;其中负载选自核糖核蛋白复合物、siRNA分子、shRNA分子、表达载体、多核苷酸,如50和500个碱基对的多核苷酸、肽、酶、抗体和抗体片段。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向 β 珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向 β 珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0632] 在一些实施方案中,带正电的单体选自:

[0633] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0634] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

- [0635] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺，
[0636] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺，
[0637] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺，
[0638] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺，
[0639] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺，
[0640] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺，
[0641] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺，
[0642] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺，
[0643] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐，
[0644] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯，
[0645] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯，
[0646] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐，
[0647] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯，
[0648] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯，
[0649] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺，及其任意组合。

[0650] 在一些实施方案中，中性单体选自N-(1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基)丙烯酰胺、丙烯酰胺、N-(羟甲基)丙烯酰胺、2-羟基乙基丙烯酸酯和2-羟基乙基甲基丙烯酸酯。在一些实施方案中，交联剂选自1,3-甘油二甲基丙烯酸酯、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和甘油1,3-二甘油醇酸二丙烯酸酯。

[0651] 在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个靶向部分。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊包含2-6个靶向部分。在一些实施方案中，至少一个靶向部分是抗体。在一些实施方案中，至少一个靶向部分是抗体，并且其中纳米聚合物胶囊包含1-3个抗体。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊包含至少一个稳定化部分。在一些实施方案中，至少一个稳定化部分包含至少一个聚乙二醇基团。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊包含至少一个靶向部分和至少一个稳定化部分。在一些实施方案中，聚合物纳米胶囊包含2-6个靶向部分和2-6个稳定化部分。在一些实施方案中，至少一个靶向部分是抗体并且稳定化部分包含至少一个聚乙二醇基团。

[0652] 在一些实施方案中，聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中，聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中，聚合物壳不含咪唑基丙烯酰基单体。

[0653] 第二个额外的实施方案中，是一种在宿主细胞内修饰靶核酸序列的方法，其包括：使宿主细胞与一个或多个聚合物纳米胶囊接触。其中一个或多个聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和负载，并且其中聚合物壳包含至少两种不同的带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂；其中负载选自核糖核蛋白复合物、siRNA分子、shRNA分子、表达载体、多核苷酸(如50和500个碱基对的多核苷酸)、肽、酶、抗体和抗体片段。在一些实施方案中，宿主细胞是造血干细胞。在一些实施方案中，造血干细胞是异基因造血干细胞。在一些实施方案中，造血干细胞是自体造血干细胞。在一些实施方案中，造血干细胞是同胞匹配的造血干细胞。

[0654] 在一些实施方案中，核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中，核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中，Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。在一

些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊不含包含咪唑基团的单体或交联剂。

[0655] 第三个额外的实施方案中,是一种向需要其治疗的患者提供淋巴细胞输注益处同时减轻副作用的方法,其包括:从供体样本中产生HPRT缺陷的淋巴细胞,其中HPRT缺陷的淋巴细胞是通过用纳米胶囊转染供体样品中的淋巴细胞而产生的,其中纳米胶囊包含适合敲除HPRT的组分(例如Cas9或Cas12a蛋白,和靶向HPRT基因的一部分的gRNA);对HPRT缺陷的淋巴细胞进行体外阳性选择,以提供修饰的淋巴细胞群体;向患者提供HSC移植;在给药造血干细胞移植后,向患者给药修饰的淋巴细胞群体;和如果出现副作用,可任选给药二氢叶酸还原酶抑制剂。在一些实施方案中,双氢叶酸还原酶抑制剂选自甲氨蝶呤(MTX)或霉酚酸(MPA)。在一些实施方案中,阳性选择包括用嘌呤类似物接触产生的HPRT缺陷的淋巴细胞。在一些实施方案中,嘌呤类似物是6TG。在一些实施方案中,6TG的量为约1-约15μg/mL。在一些实施方案中,阳性选择包括用嘌呤类似物和阿洛普利诺接触产生的HPRT缺陷的淋巴细胞。在一些实施方案中,修饰的淋巴细胞以单次注射的方式给药。在一些实施方案中,向患者给药多剂量的修饰的淋巴细胞。在一些实施方案中,每个剂量的修饰的淋巴细胞包含约 0.1×10^6 个细胞/公斤-约 240×10^6 个细胞/公斤。在一些实施方案中,修饰的淋巴细胞的总剂量包含约 0.1×10^6 个细胞/公斤-约 730×10^6 个细胞/公斤。

[0656] 第四个额外的实验方案中,是一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物。在一些实施方案中,核糖核蛋白包括核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9。在一些实施方案中,Cas蛋白是Cas12。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因中的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向γ珠蛋白启动子调节区中的BCL11A结合点。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个靶向部分,以促进核糖核蛋白复合物向特定类型的细胞递送(例如,与聚合物纳米胶囊表面缀合的靶向部分)。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊是可侵蚀或可生物降解的。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包括pH敏感交联剂。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊的尺寸为约50纳米-约250纳米。在一些实施方案中,聚合物壳包含一种带正电的单体。在一些实施方案中,聚合物壳包含两种带正电的单体。

[0657] 在一些实施方案中,是一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含:(i) N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺或2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯中的至少一种;(ii) 丙烯酰胺或其衍生物;和(iii) 交联剂(例如,pH可降解交联剂)。在一些实施方案中,聚合物壳包含N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺和2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯。在一些实施方案中,交联剂是丙烯酸酯。在一些实施方案中,丙烯酸酯是2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯。

[0658] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个靶向部分。在一些实施

方案中,靶向部分通过包含可切割基团(例如二硫键)的间隔子偶联至聚合物纳米胶囊。在一些实施方案中,靶向部分是抗体。在一些实施方案中,靶向部分促进将纳米聚合物胶囊递送到特定的细胞类型,其中细胞类型选自包含以下的组:免疫细胞、血细胞、心肌细胞、肺细胞、视细胞、肝细胞、肾细胞、脑细胞、中枢神经系统的细胞、周围神经系统的细胞、癌细胞、感染病毒的细胞、干细胞、皮肤细胞、肠道细胞和/或听细胞。在一些实施方案中,癌细胞选自包含以下的组:淋巴瘤细胞、实体瘤细胞、白血病细胞、膀胱癌细胞、乳腺癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、子宫内膜癌细胞、肾癌细胞、肺癌细胞、黑色素瘤细胞、胰腺癌细胞、前列腺癌细胞和甲状腺癌细胞。

[0659] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个稳定化部分。在一些实施方案中,至少一个稳定化部分包含至少一个氧化烯基团,例如,聚乙二醇重复基团和/或聚丙二醇重复基团。在一些实施方案中,至少有四个聚乙二醇重复基团和/或聚乙二醇重复基团被包含在至少一个稳定化部分内。

[0660] 在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向HPRT基因的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含靶向β珠蛋白基因的向导RNA。在一些实施方案中,核糖核酸复合物包含靶向γ珠蛋白启动子调节区域中的BCL11A结合点的向导RNA。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊的直径为约50nm-约250nm。

[0661] 第五个额外的实施方案中,是一种聚合物纳米胶囊,其包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少两种不同的带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂。在一些实施方案中,核糖核蛋白复合物包含核酸内切酶和向导RNA。在一些实施方案中,核酸内切酶是Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白选自Cas9、Cas12a和Cas12b。在一些实施方案中,向导RNA靶向HPRT基因座。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向HPRT的向导RNA包含与SEQ ID NO:2具有至少95%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,向导RNA靶向β珠蛋白基因座。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少90%相同性的核酸序列。在一些实施方案中,靶向β珠蛋白的向导RNA包含与SEQ ID NO:3具有至少95%相同性的核酸序列。

[0662] 在一些实施方案中,带正电的单体选自:

[0663] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0664] N-(3-((4-((3-氨基丙基)氨基)丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0665] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)丙烯酰胺,

[0666] N-(3-((4-氨基丁基)氨基)丙基)甲基丙烯酰胺,

[0667] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0668] N-(2-((2-氨基乙基)(甲基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0669] N-(哌嗪-1-基甲基)丙烯酰胺,

[0670] N-(哌嗪-1-基甲基)甲基丙烯酰胺,

[0671] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)丙烯酰胺,

[0672] N-(2-(双(2-氨基乙基)氨基)乙基)甲基丙烯酰胺,

[0673] N-(3-氨基丙基)甲基丙烯酰胺的盐酸盐,

[0674] 2-(二甲基氨基)乙基丙烯酸酯,

[0675] 甲基丙烯酸二甲基氨基乙酯,

[0676] (3-丙烯酰胺丙基)三甲基铵盐酸盐,

[0677] 2-氨基乙基甲基丙烯酸酯,

[0678] 3-(二甲基氨基)丙基丙烯酸酯,

[0679] N-[3-(二甲基氨基)丙基]甲基丙烯酰胺,及其任意组合。

[0680] 在一些实施方案中,中性单体选自N-(1,3-二羟基-2-(羟甲基)丙-2-基)丙烯酰胺、丙烯酰胺、N-(羟甲基)丙烯酰胺、2-羟基乙基丙烯酸酯和2-羟基乙基甲基丙烯酸酯。在一些实施方案中,交联剂选自1,3-甘油二甲基丙烯酸酯、N,N'-亚甲基双丙烯酰胺和甘油1,3-二甘油醇酸二丙烯酸酯。

[0681] 在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊进一步包含至少一个靶向部分。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含2-6个靶向部分。在一些实施方案中,至少一个靶向部分是抗体。在一些实施方案中,至少一个靶向部分是抗体并且其中纳米聚合物胶囊包含1-3个抗体。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含至少一个稳定化部分。在一些实施方案中,至少一个稳定化部分包含至少一个聚乙二醇基团。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含至少一个靶向部分和至少一个稳定化部分。在一些实施方案中,聚合物纳米胶囊包含2-6个靶向部分和2-6个稳定化部分。在一些实施方案中,至少一个靶向部分是抗体并且稳定化部分包含至少一个聚乙二醇基团。

[0682] 在一些实施方案中,聚合物壳不含包含杂环基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含包含咪唑基团的单体或交联剂。在一些实施方案中,聚合物壳不含咪唑基丙烯酸酯单体。

[0683] 第六个额外的实施方案中,是一种缀合物,其包含:(i) 聚合物纳米胶囊,其中聚合物纳米胶囊包含聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少两种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;和(ii) (a) 或 (b) 中的至少一个:(a) 靶向部分,(b) 稳定化部分,偶联至聚合物纳米胶囊。

[0684] 第七个额外的实施方案中,是一种治疗人患者的遗传病的方法,其包括:通过使未修饰的人造血干细胞群体与聚合物纳米胶囊接触,产生修饰的人造血干细胞群体,聚合物纳米胶囊包括聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包括至少两种带正电的单体,至少一种中性单体和交联剂;和向人患者给药治疗有效量的修饰的人造血干细胞群体。

[0685] 第八个额外实施方案中,是根据包括以下的方法制备的缀合物:用能够参与点击化学反应的第一反应性官能团对聚合物纳米胶囊衍生化,聚合物纳米胶囊具有聚合物壳和核糖核蛋白复合物,其中聚合物壳包含至少两种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;用能够与第一反应性官能团参与点击化学反应的第二反应性官能团对靶向部分衍生化;和使衍生化的聚合物纳米胶囊与衍生化的靶向部分反应。

[0686] 第九个额外的实施方案中,是根据包括以下的方法制备的缀合物:使衍生化的聚合物纳米胶囊与至少一个衍生化的靶向部分反应,衍生化的聚合物纳米胶囊包含至少一个能够参与点击化学反应的第一反应性官能团,聚合物纳米胶囊的聚合物壳具有至少两种带正电的单体、至少一种中性单体和交联剂;其中至少一个衍生化的靶向部分包含能够与第一反应性官能团参与点击化学反应的第二反应性官能团。

[0687] 本说明书中提到的和/或应用数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版

物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物在此通过引用全部纳入。如有必要,可对本实施方案的各个方面进行修饰,以采用各种专利、申请和出版物的概念,提供进一步的实施方案。

[0688] 尽管本公开的内容已经参照一些说明性的实施方案进行了描述,但应该理解,本领域技术人员可以设计出许多其他的修改和实施方案,这些修改和实施方案将落在本公开的原则的精神和范围之内。更特别的是,在前述公开内容、附图和所附权利要求书的范围内,主题组合安排的组成部分和/或安排可以进行合理的变化和修饰,而不偏离公开的精神。除了部件和/或排列上的变化和修饰,对于本领域技术人员来说,其他用途也是显而易见的。

序列表

<110> YAN, Ming

BARTLETT, Jeffrey

<120> 用于递送细胞调节剂的纳米胶囊

<130> Calimmune-042W0

<140> US 62/784,503

<141> 2018-12-23

<160> 56

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: CCR5

<220>

<221> misc_feature

<223> AltR

<400> 1

gcuguguuug cgucucuccc guuuuagagc uaugcu 36

<210> 2

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: HPRT

<220>

<221> misc_feature

<223> AltR

<400> 2

gcuguguuug cgucucuccc guuuuagagc uaugcu 36

<210> 3

<211> 36

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic: HBB

<220>

<221> misc_feature
<223> AltR
<400> 3
cuugcccccac agggcaguaa guuuuagagc uaugcu 36
<210> 4
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: TCR
<220>
<221> misc_feature
<223> AltR
<400> 4
gagaaucaaa aucggugaau guuuuagagc uaugcu 36
<210> 5
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: PD-1
<220>
<221> misc_feature
<223> AltR
<400> 5
ugacguuacc ucgugcggcc guuuuagagc uaugcu 36
<210> 6
<211> 36
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: BCL11a
<220>
<221> misc_feature
<223> AltR
<400> 6
gauaaacaau cgucauccuc guuuuagagc uaugcu 36
<210> 7
<211> 36

<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: C9orf72
<220>
<221> misc_feature
<223> AltR
<400> 7
uacuacaacg gaacagccac guuuuagagc uaugcu 36
<210> 8
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gDrosha1-full
<220>
<221> misc_feature
<223> contains 2-O-Me and PS bonds
<400> 8
ugcugcggca ugacuggagg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210> 9
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gDrosha2-full
<220>
<221> misc_feature
<223> contains 2-O-Me and PS bonds
<400> 9
ugagugcauc gaauccacac guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210> 10
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHPRT4-full

<220>
<221> misc_feature
<223> contains 2-0-Me and PS bonds
<400> 10
gcgggucgcc auaacggagc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210> 11
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHPRT3-full
<220>
<221> misc_feature
<223> contains 2-0-Me and PS bonds
<400> 11
ggcuuauauc caacacuucg guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210> 12
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gWas1
<220>
<221> misc_feature
<223> contains 2-0-Me and PS bonds
<400> 12
cgccaugggu cauucacag guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100
<210> 13
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHBG1-117
<220>
<221> misc_feature
<223> contains 2-0-Me and PS bonds

<400> 13
cuugucaagg cuauugguca guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 14
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHBG2-114
<220>
<221> misc_feature
<223> contains 2-0-Me and PS bonds

<400> 14
guuugccuug ucaaggcuau guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 15
<211> 100
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHBB2
<220>
<221> misc_feature
<223> contains 2-0-Me and PS bonds

<400> 15
guaacggcag acuucuccuc guuuuagagc uagaaauagc aaguuaaaau aaggcuaguc 60
cguaaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu 100

<210> 16
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHBG12a1

<400> 16
uaauuucuac ucuuguagau ccuugucaag gcuaugguc aagg 44

<210> 17
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Synthetic: gHBG12a2
<400> 17
uaauuucuac ucuuguagau gccagggacc guuucagaca gaua 44
<210> 18
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHBG12a3
<400> 18
uaauuucuac ucuuguagau agacagauau uugcaugag auag 44
<210> 19
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHBG12a4
<400> 19
uaauuucuac ucuuguagau cauugagaua guguggggaa gggg 44
<210> 20
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHBB12a1
<400> 20
uaauuucuac ucuuguagau cuucugacac aacuguguuc acua 44
<210> 21
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHBB12a2
<400> 21
uaauuucuac ucuuguagau agguugcuag ugaacacagu ugug 44
<210> 22
<211> 44
<212> RNA

<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHPRT12a1
<400> 22
uaauuucuac ucuuguagau agaucuuacu uaccugucca uaau 44
<210> 23
<211> 44
<212> RNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: gHPRT12a2
<400> 23
uaauuucuac ucuuguagau gcuaaccuaa ucauuugcu gagg 44
<210> 24
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Gamma-globin promoter
<400> 24
cttgtcaagg ctattggtca agg 23
<210> 25
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Gamma-globin promoter
<400> 25
caaggctatt ggtcaaggca agg 23
<210> 26
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Gamma-globin promoter
<400> 26
gctattggtc aaggcaaggc tgg 23
<210> 27
<211> 23

<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Gamma-globin promoter
<400> 27
tgggtcaagtt tgccttgtca agg 23
<210> 28
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Gamma-globin promoter
<400> 28
cttgaccaat agccttgaca agg 23
<210> 29
<211> 28
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: Gamma-globin promoter
<400> 29
tttgccttgt caaggctatt ggtcaagg 28
<210> 30
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: HPRT
<400> 30
gttatggcga cccgcagccc 20
<210> 31
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: HPRT
<400> 31
gcgggtcgcc ataacggagc 20
<210> 32

<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: HPRT
<400> 32
cgtgacgtaa agccgaaccc 20
<210> 33
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: HPRT
<400> 33
ggcacggaaa gcgaccacct 20
<210> 34
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: HPRT
<400> 34
catgcgtatt tgacacacga 20
<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: HPRT
<400> 35
gctaagtgct agagttacgg 20
<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: HPRT
<400> 36
gaggcgcggg atccgcagtg 20

<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic: HPRT
<400> 37
ttattactgt tccccgccag 20
<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 38
ttactgccct gtggggcaag 20
<210> 39
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 39
gactcctgag gagaagtctg ccgttactgc cctgtggggc aaggtgaacg tg 52
<210> 40
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 40
gactcctgag gagaagtctg ccgttatgcc cttggggcaa ggtgaacgtg 50
<210> 41
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 41

gactcctgag gagaagtctg ccgtagccc tgtggggcaa ggtgaacgtg 50

<210> 42

<211> 49

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 42

gactcctgag gagaagtctg ccgttaccct gtggggcaag gtgaacgtg 49

<210> 43

<211> 47

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 43

gactcctgag gagaagtctg ccgtacctgt ggggcaaggt gaacgtg 47

<210> 44

<211> 42

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 44

gactcctgag gagaagtctg ccgttggggc aaggtgaacg tg 42

<210> 45

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 45

gactcctgtg gagaagtctg ccgttactgc cctgtggggc aaggtgaacg tg 52

<210> 46

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 46
gactcctgtg gagaagtctg ccgttactgc cctgtggggc aaggtgaacg tg 52
<210> 47
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 47
gactcctgtg gagaagtctg ccgttactgc cctgtggggc aaggtgaacg tg 52
<210> 48
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 48
gactcctgag gagaagtctg ccgttactgc cctgtggggc aaggtgaacg tg 52
<210> 49
<211> 50
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 49
gactcctgag gagaagtctg ccgttaccct tgtggggcaa ggtgaacgtg 50
<210> 50
<211> 49
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 50
gactcctgag gagaagtctg ccgttgccct gtggggcaag gtgaacgtg 49
<210> 51
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>

<223> Synthetic
<400> 51
gactcctgag gagaagtctg ccgtgccctg tggggcaagg tgaacgtg 48
<210> 52
<211> 48
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 52
gactcctgag gagaagtctg ccgtgccctg tggggcaagg tgaacgtg 48
<210> 53
<211> 46
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 53
gactcctgag gagaagtctg ccgccctgtg gggcaagggtg aacgtg 46
<210> 54
<211> 52
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 54
gactcctgtg gagaagtctg ccgttactgc cctgtggggc aaggtgaacg tg 52
<210> 55
<211> 630
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Synthetic
<400> 55
gctttaaaag ccaggacggt cacctttggg gtggtgacaa gtgtgatcac ttgggtggtg 60
gctgtgtttg cgtctggatc cggagctact aatttctcct tgcttaagca agctggtgat 120
gttgaagaaa atcctggtcc tatgggagca ggagcaaccg gaagggaat ggacggacca 180
agattgttac ttctgctcct gctaggcgtg agcctgggag gagcaaggag ctggatggag 240
tgggacaggg agatcaacaa ctacaccagc ctgatccaca gcctgatcga ggagagccag 300

aaccagcagg agaagaacga gcaggagctg ctggagctgg acaagtgggc cagcctgtgg 360
aactggttcc ggagcgagcg gaagtgctgc gtggagtgcc caccatgccc agcaccacca 420
gtggcaggac ccctgatcgc actggtgacc agcggagccc tgctggccgt gctgggcatc 480
acaggctact tcctgatgaa caggaggagc tggagcccaa ccggagagcg gctggagctg 540
gagccatgaa agcttaggaa tcatctttac cagatctcaa aaagaaggtc ttcattacac 600
ctgcagctct cattttccat acagtcagta 630

<210> 56

<211> 100

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic

<400> 56

cactagcaac ctcaaacaga caccatggtg catctgactc ctgtggagaa gtctgccgtt 60
actgccctgt ggggcaaggt gaacgtggat gaagttggtg 100

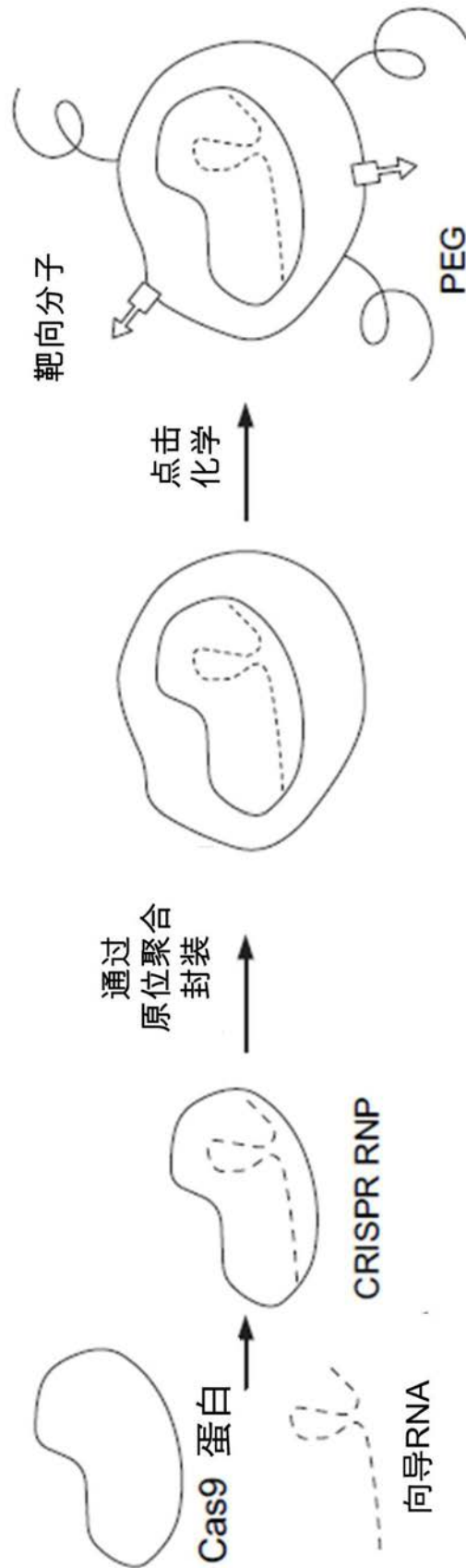


图1

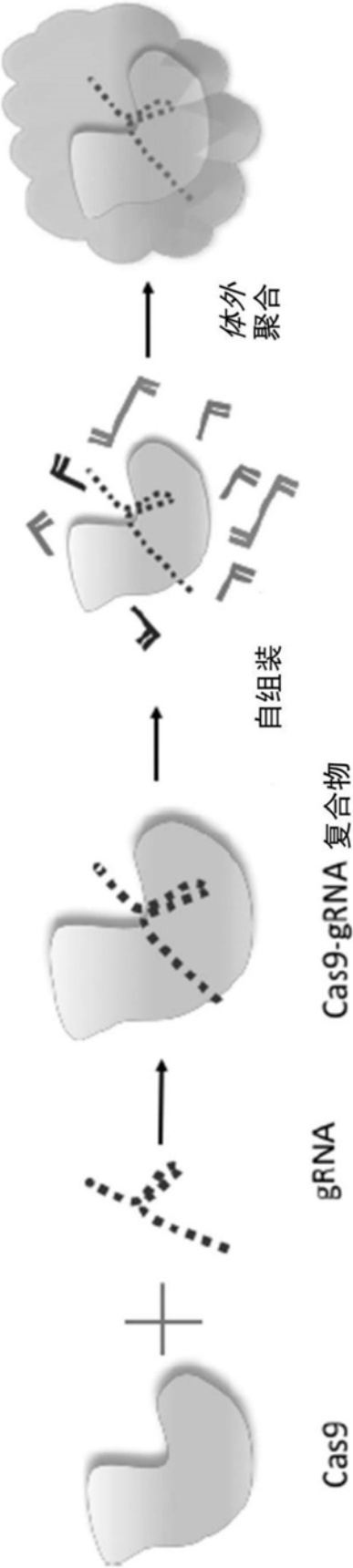


图2

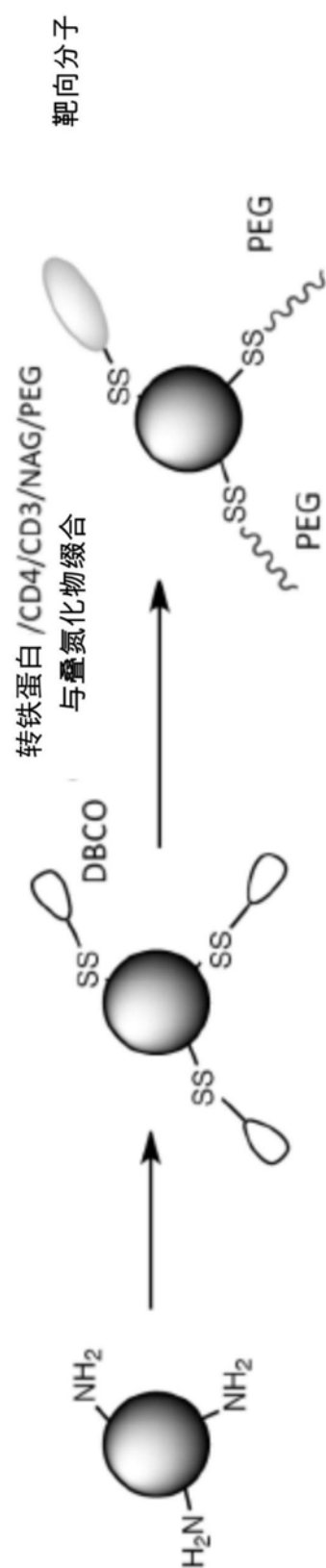


图3

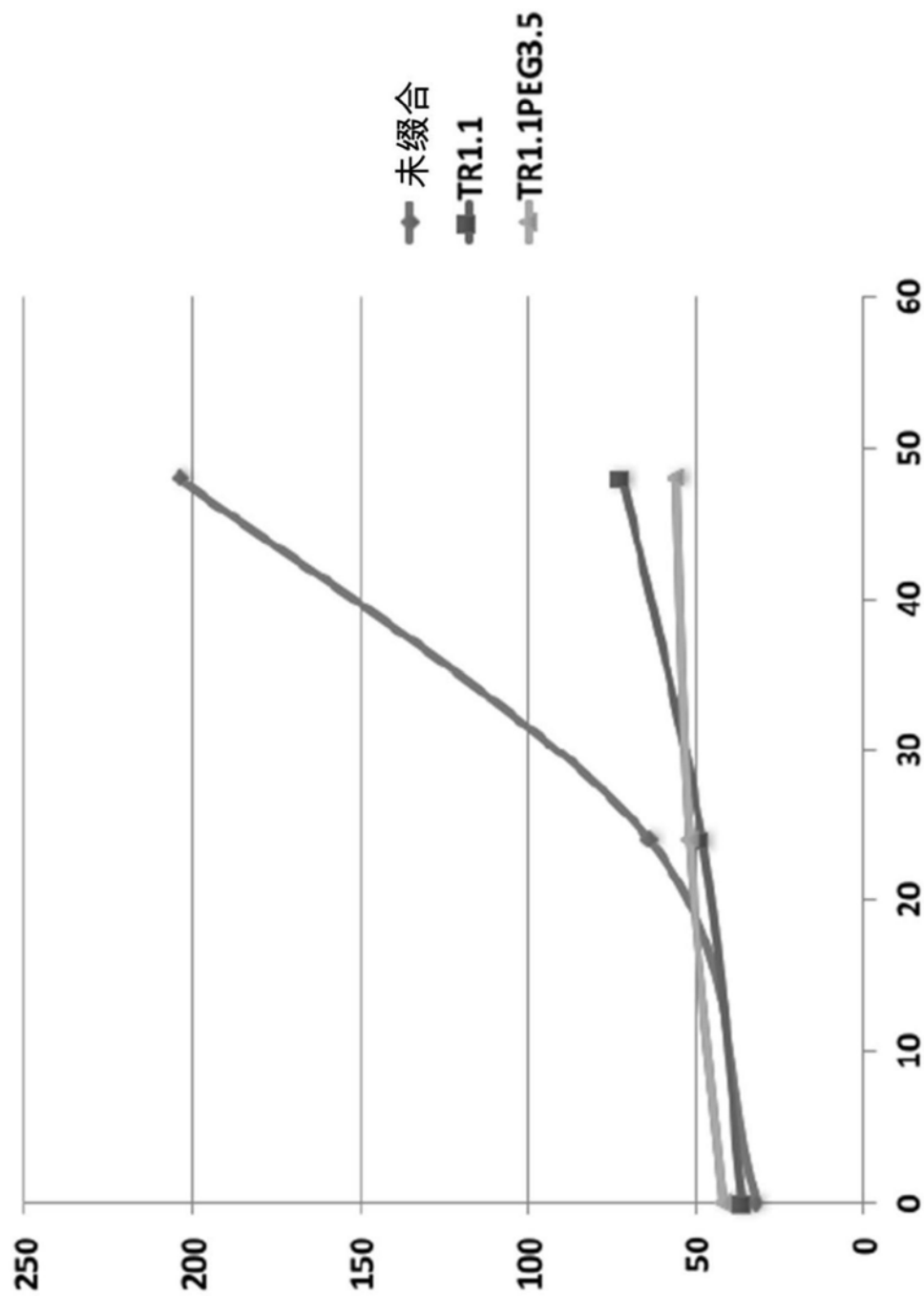


图4

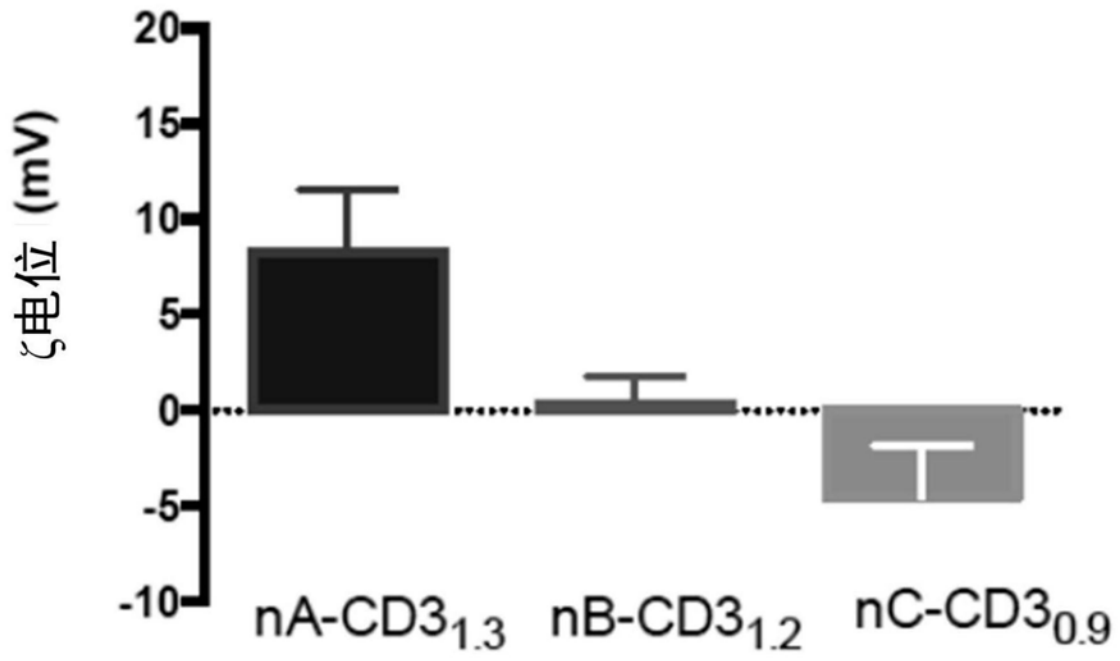


图5A

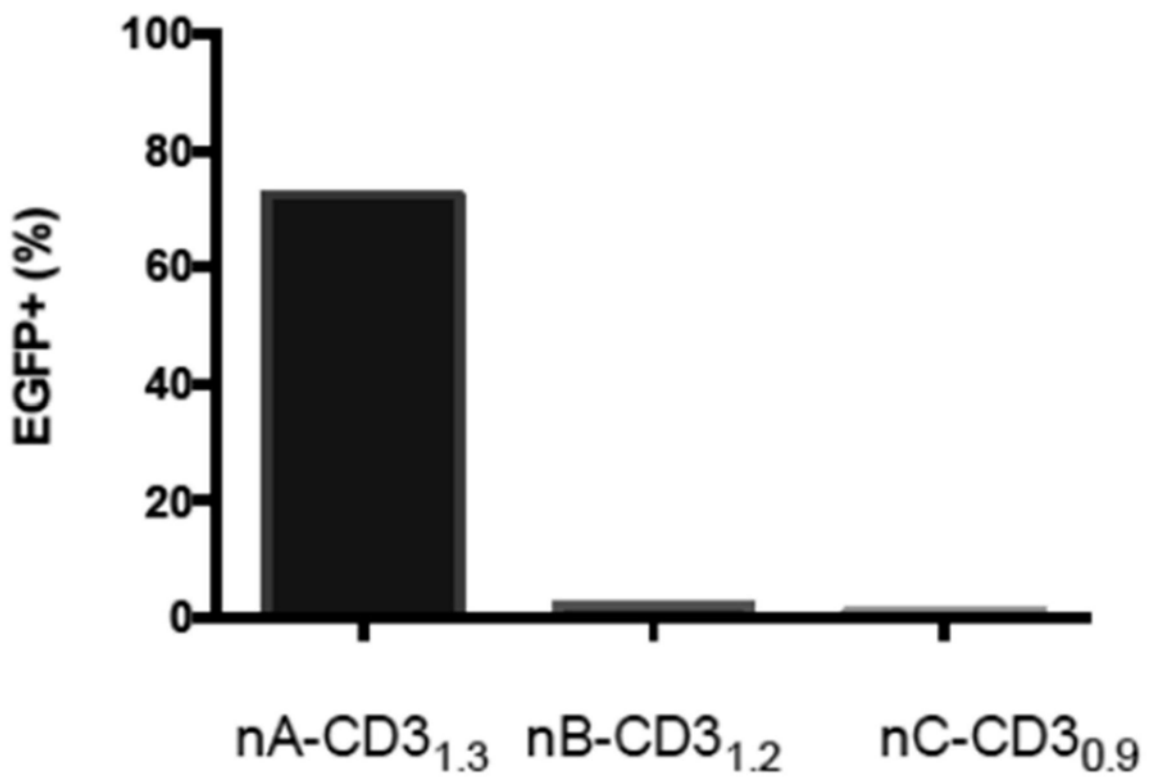


图5B

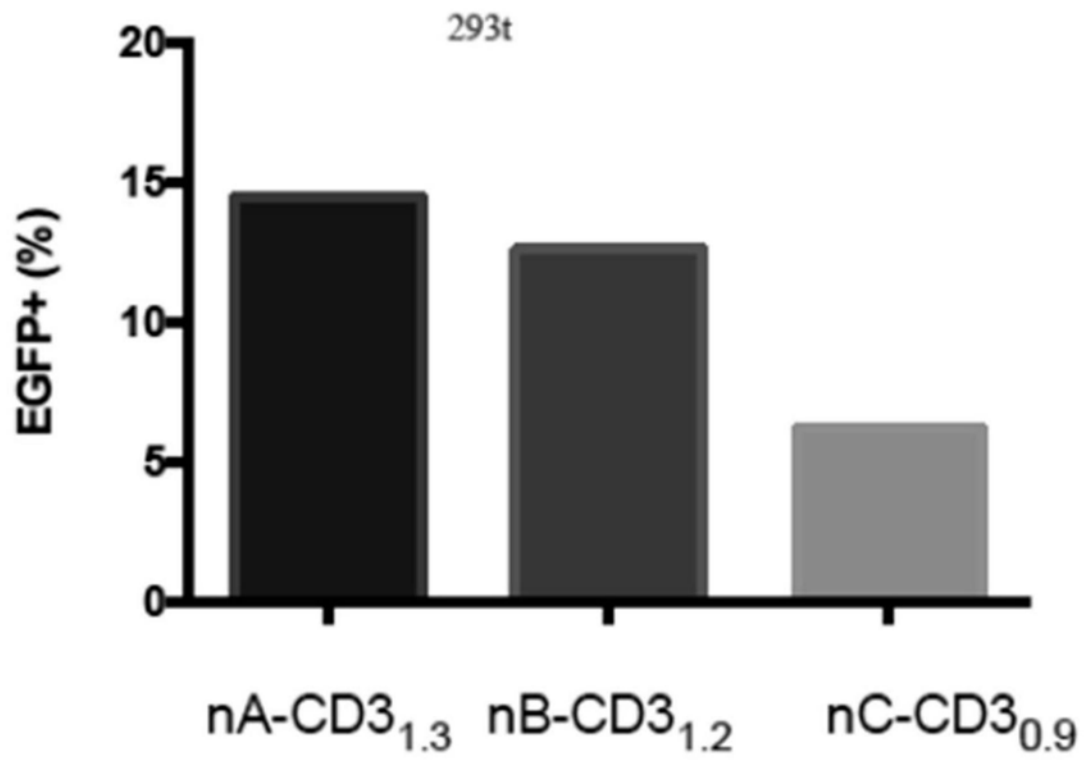


图5C

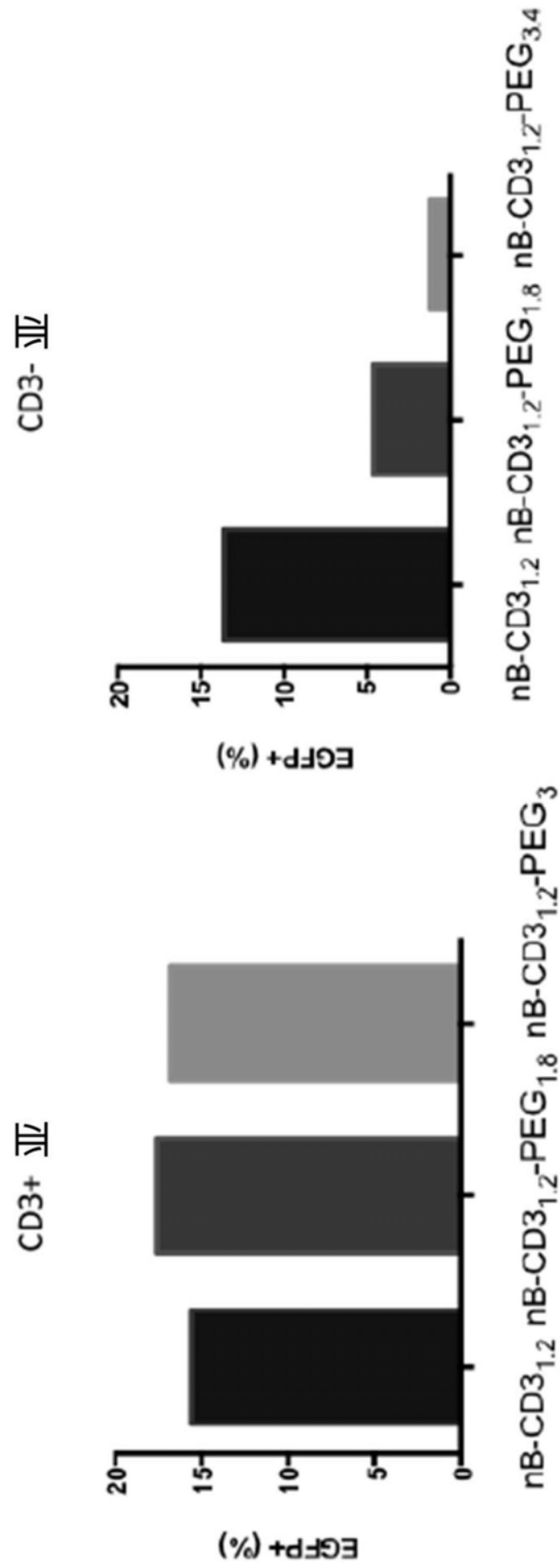


图5D

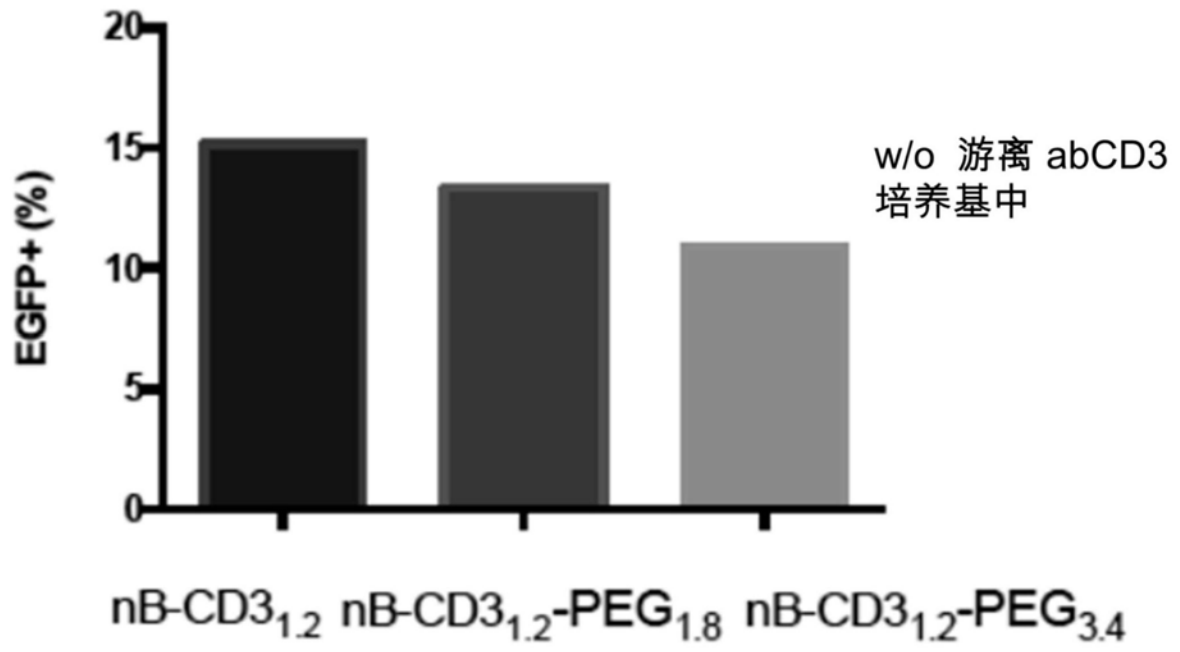


图5E

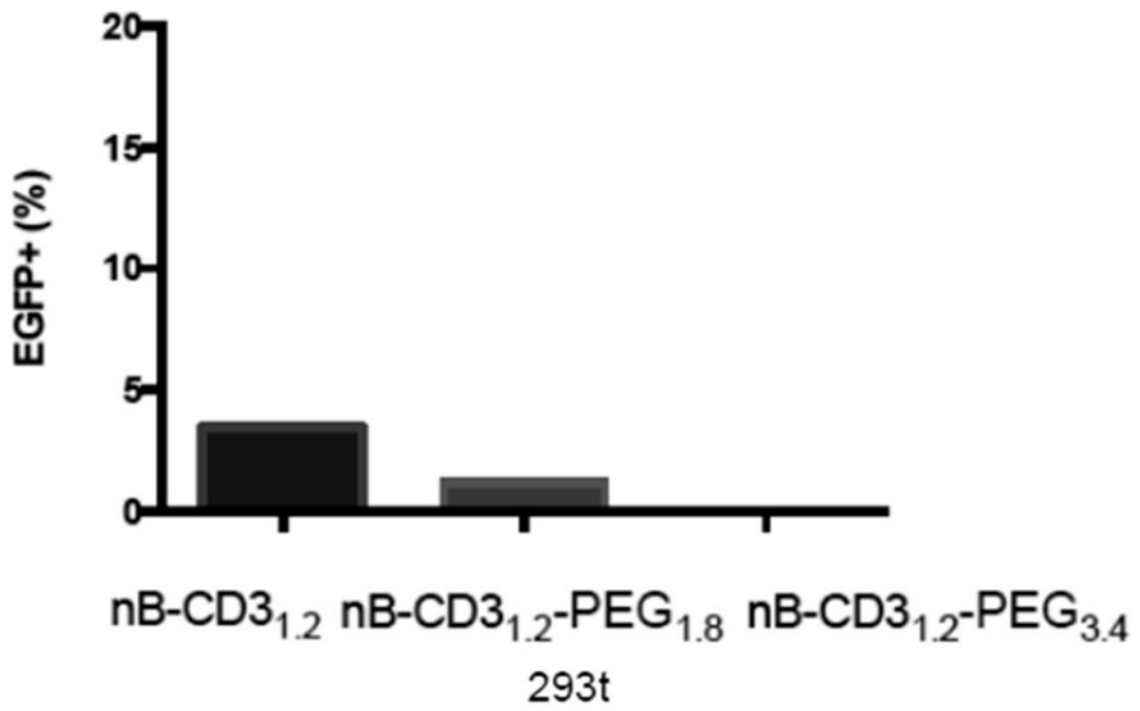


图5F

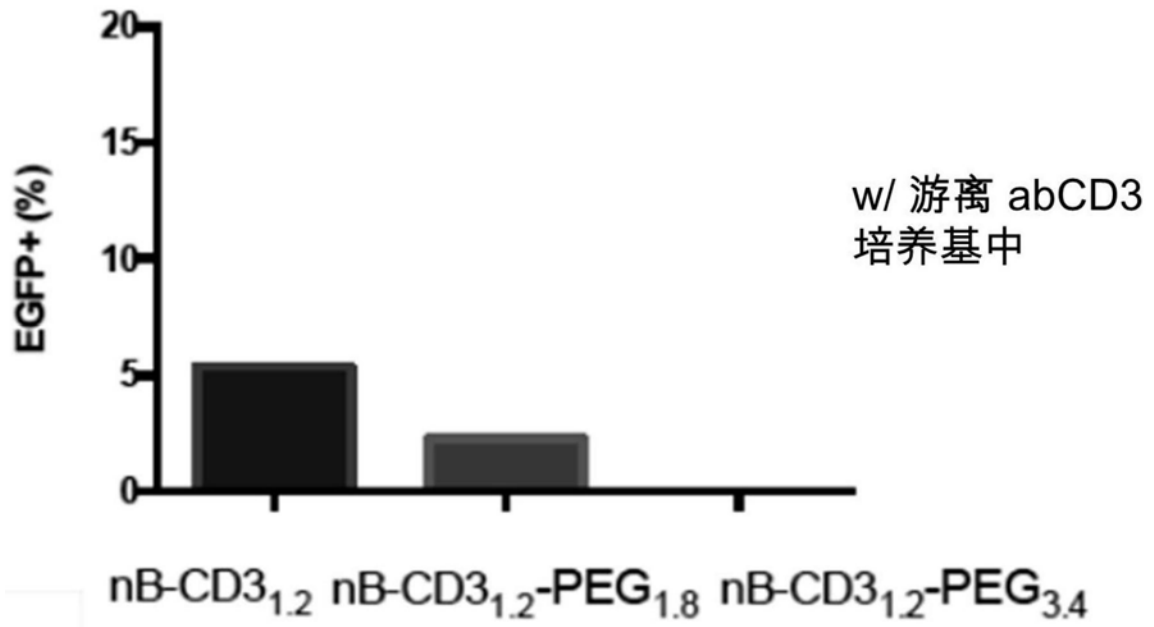


图5G

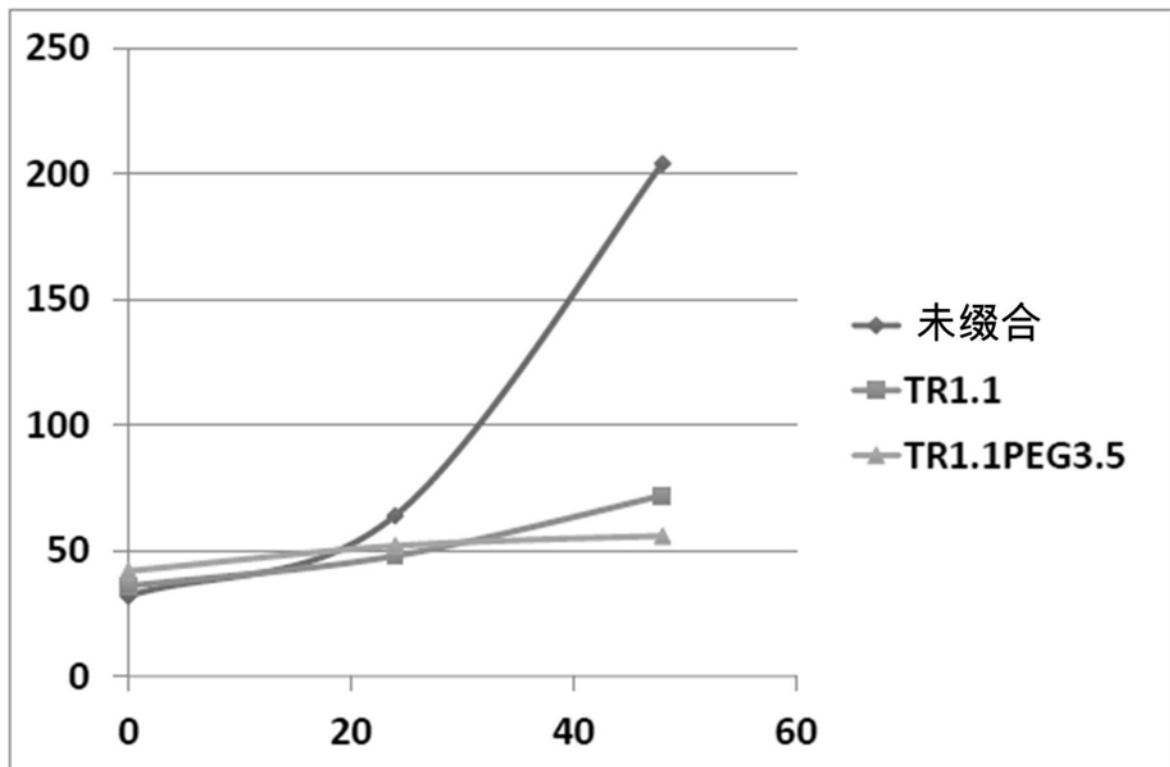


图5H

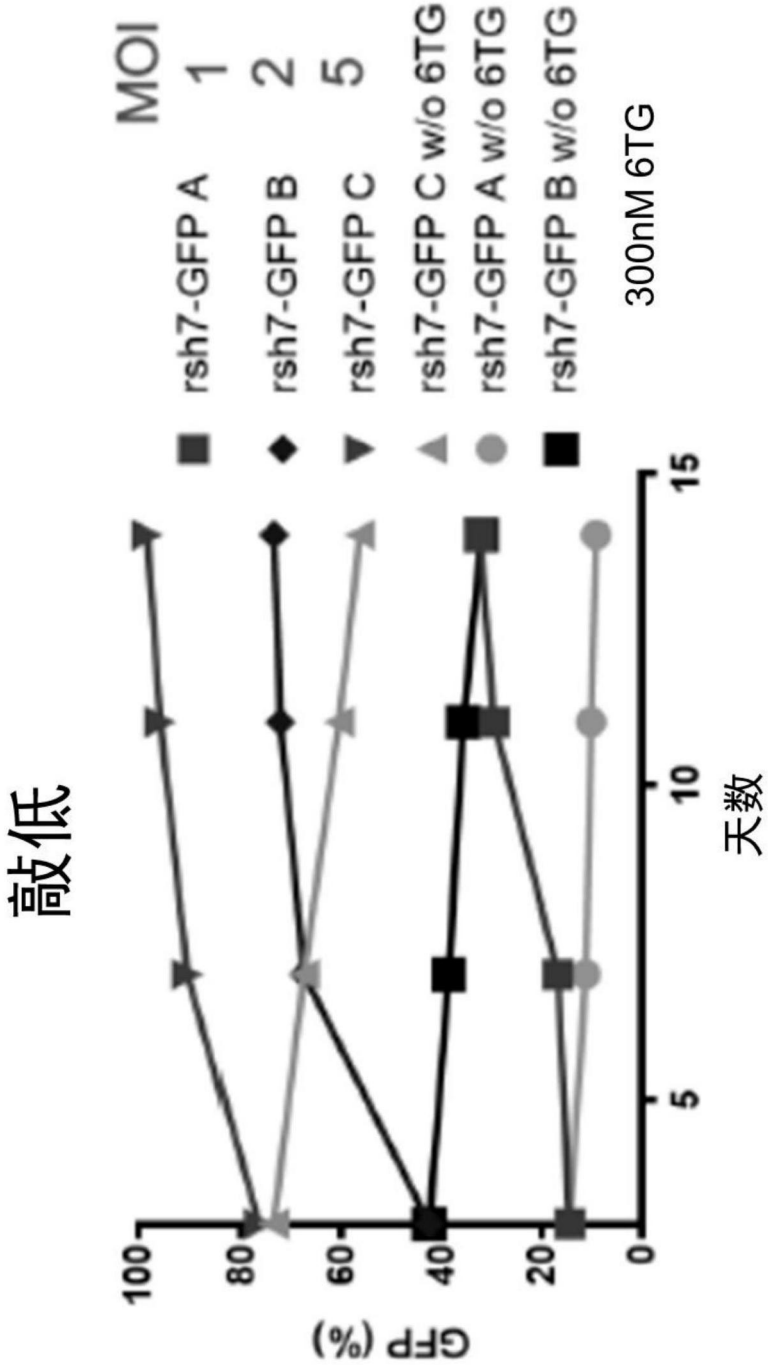


图6A

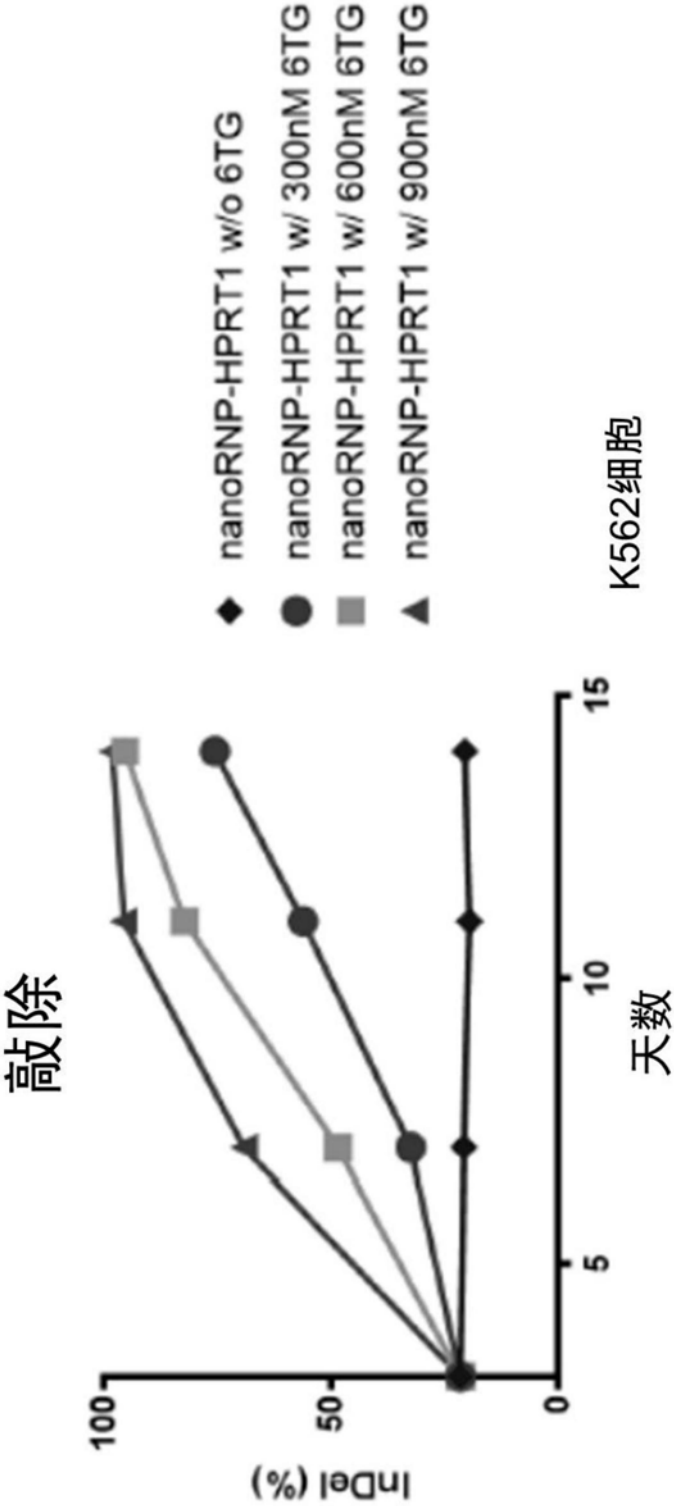


图6B

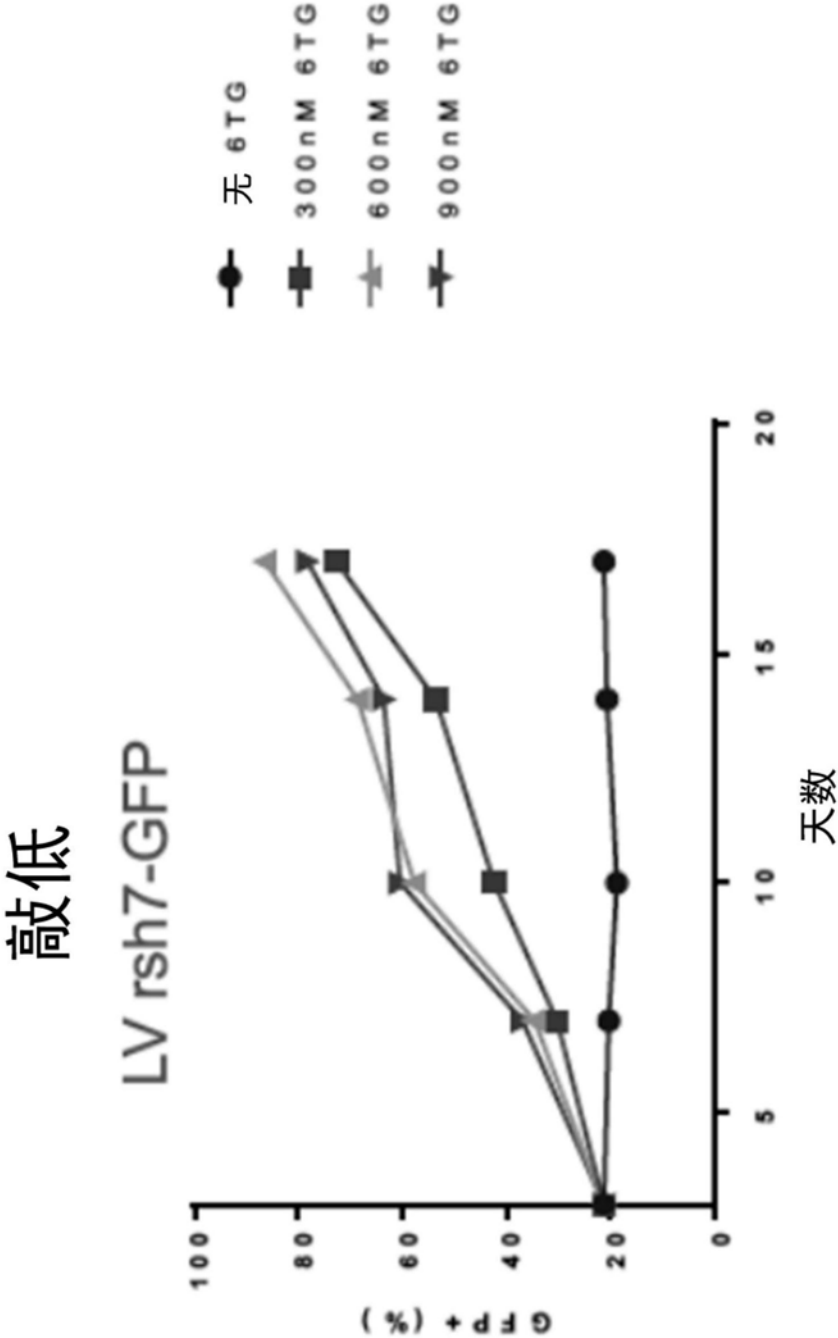


图7A

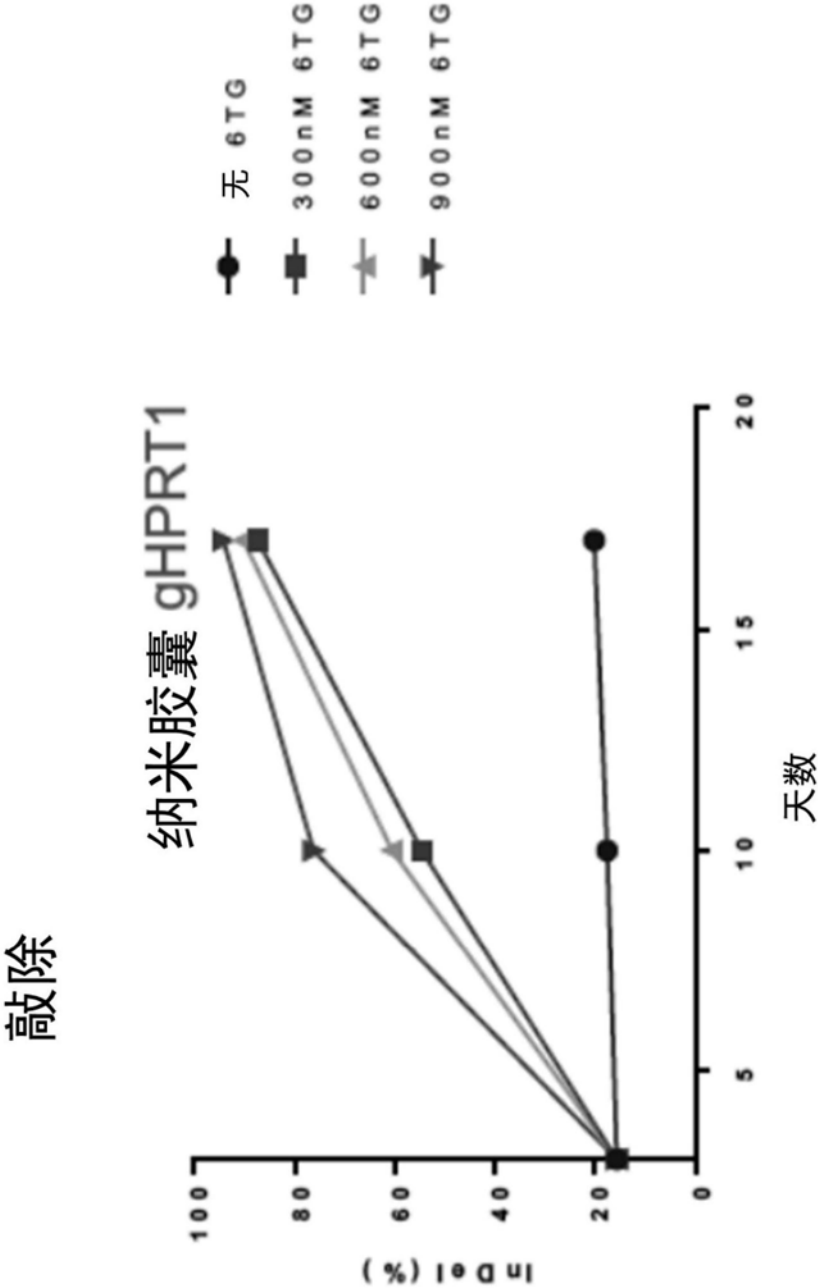


图7B

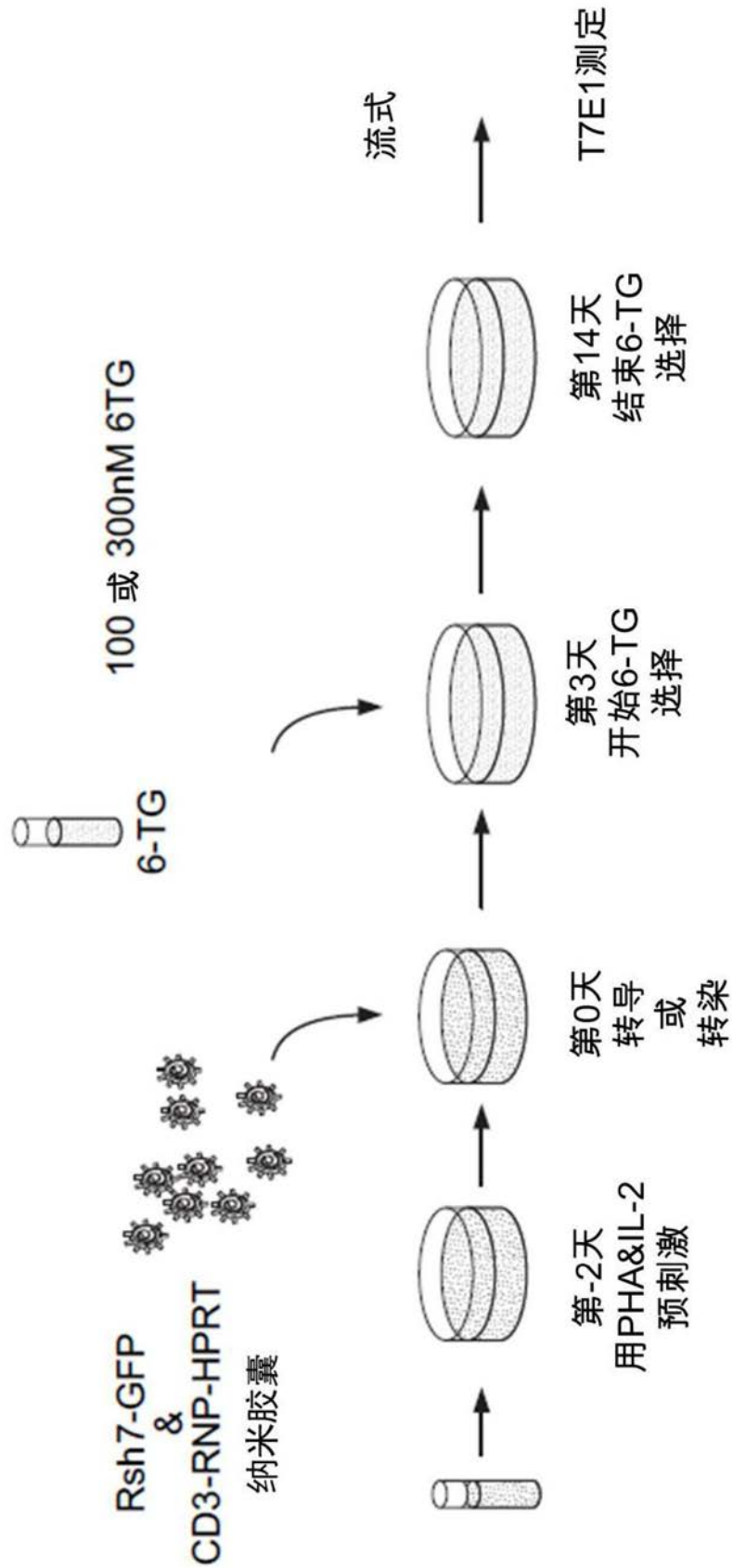


图8A

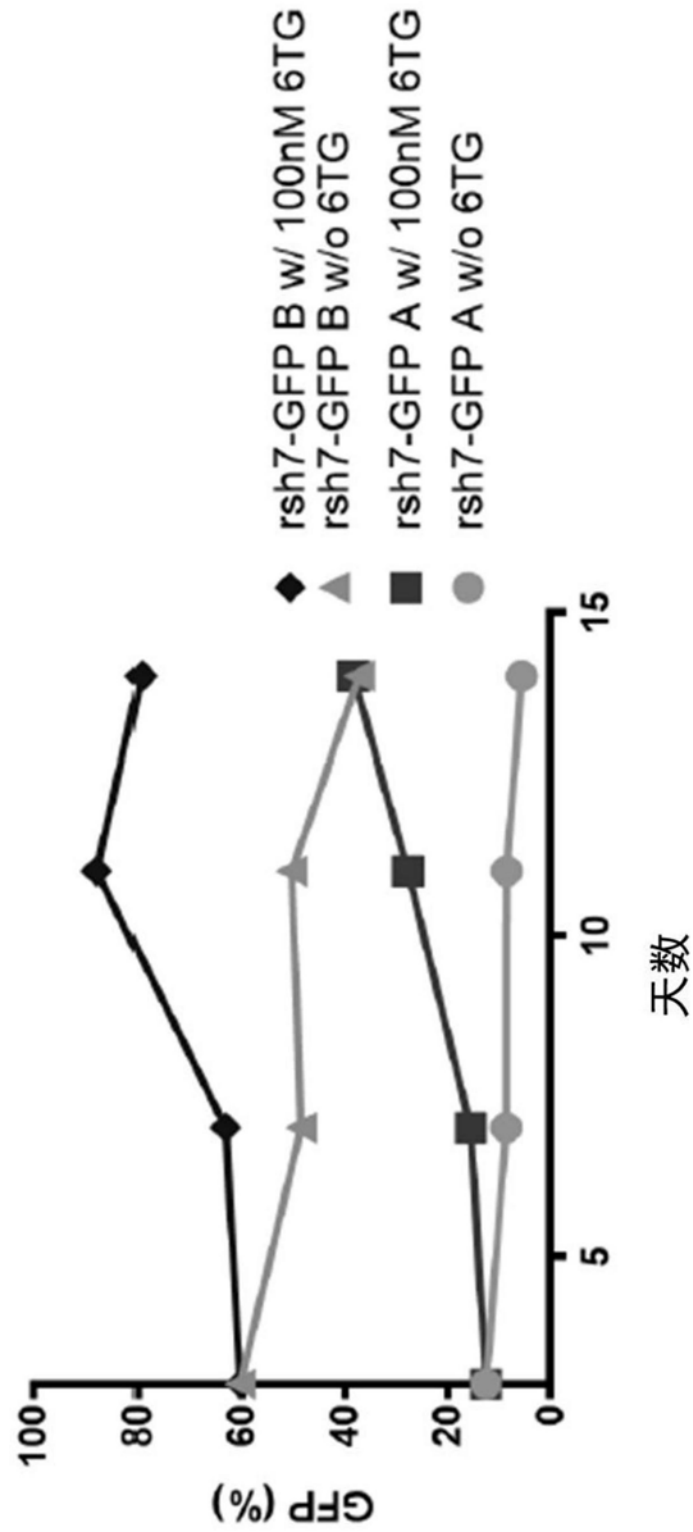


图8B

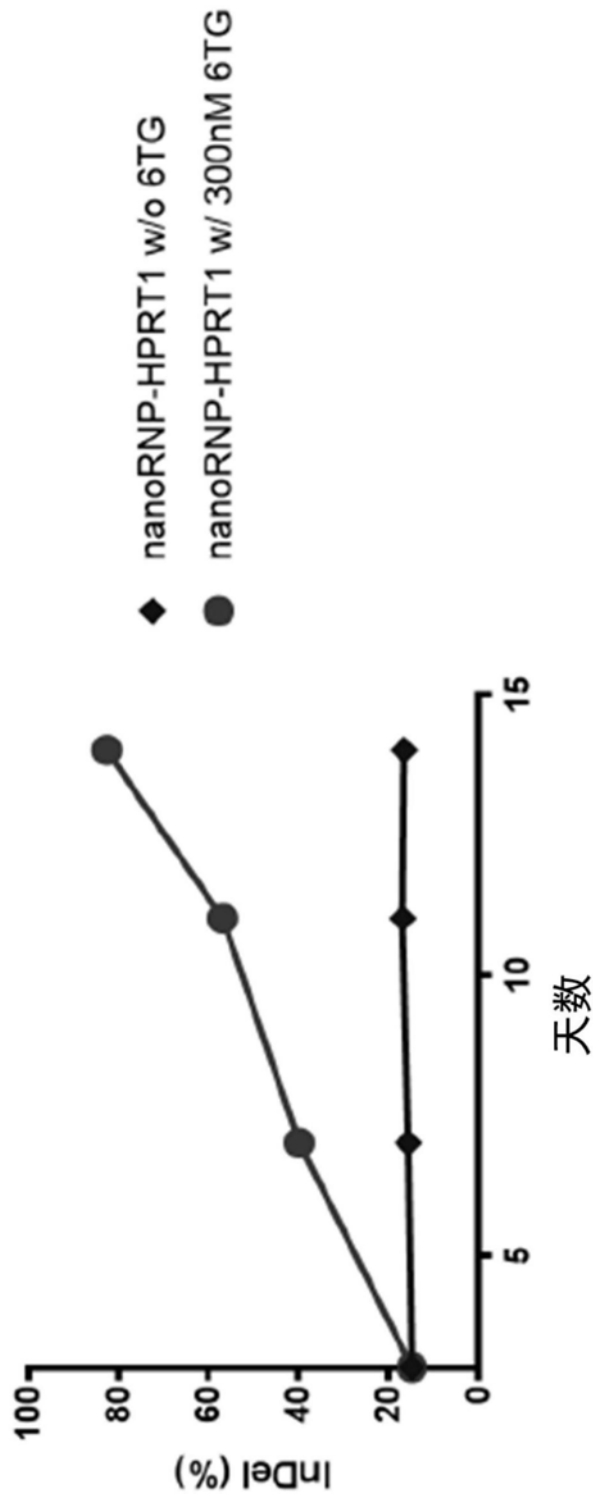


图8C

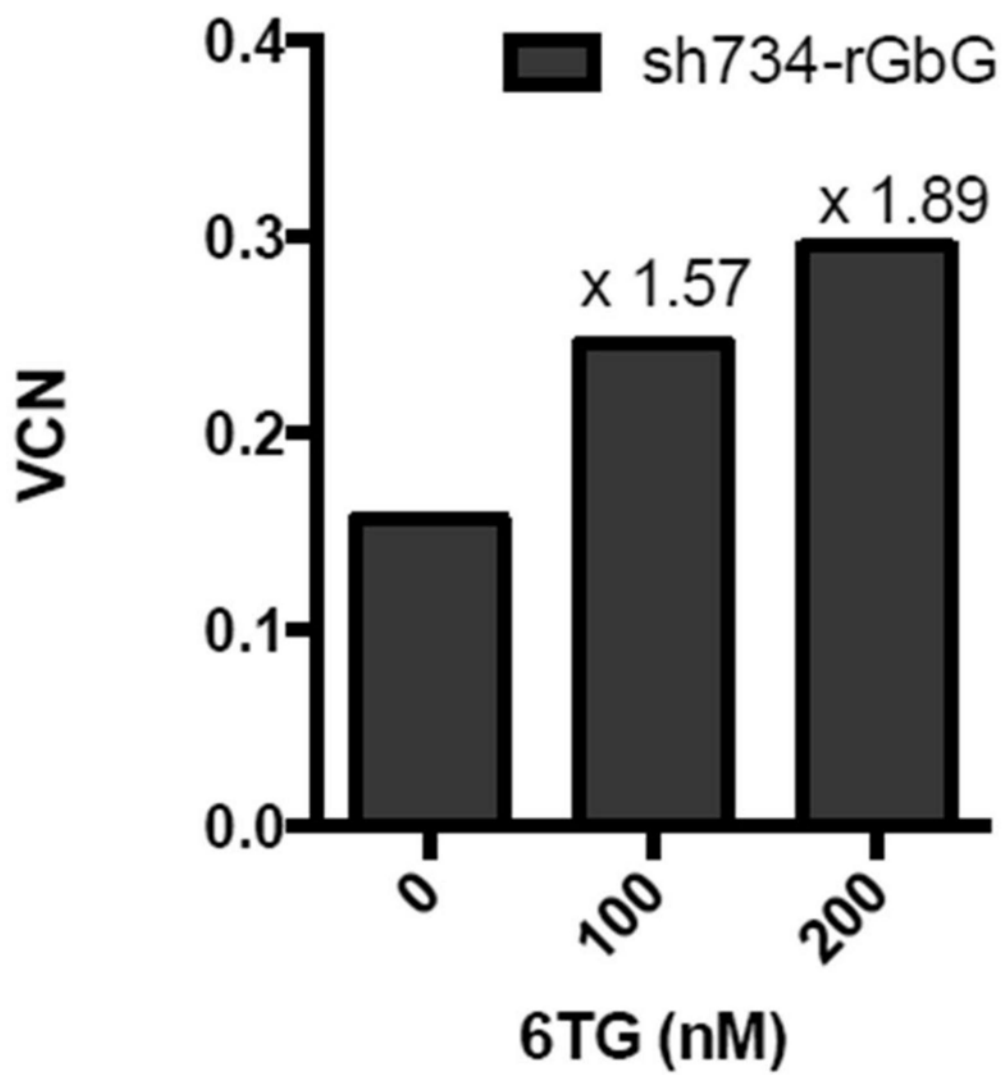


图8D

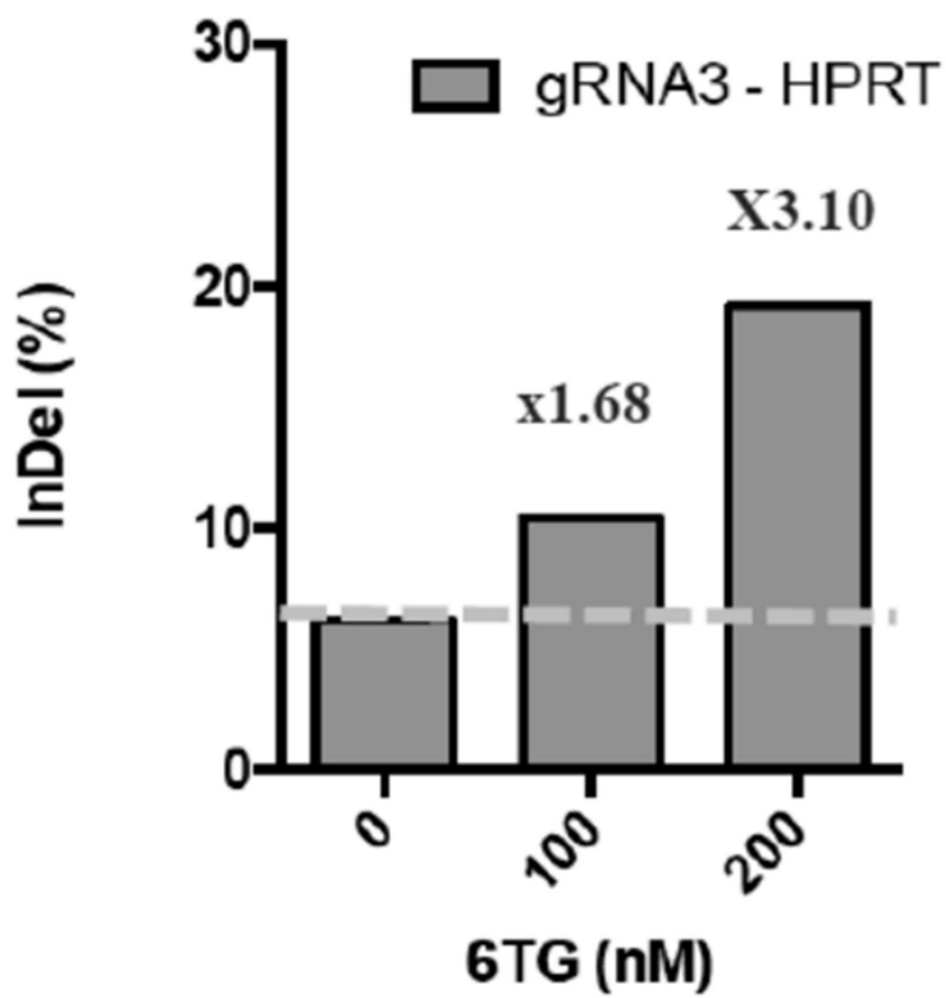


图8E

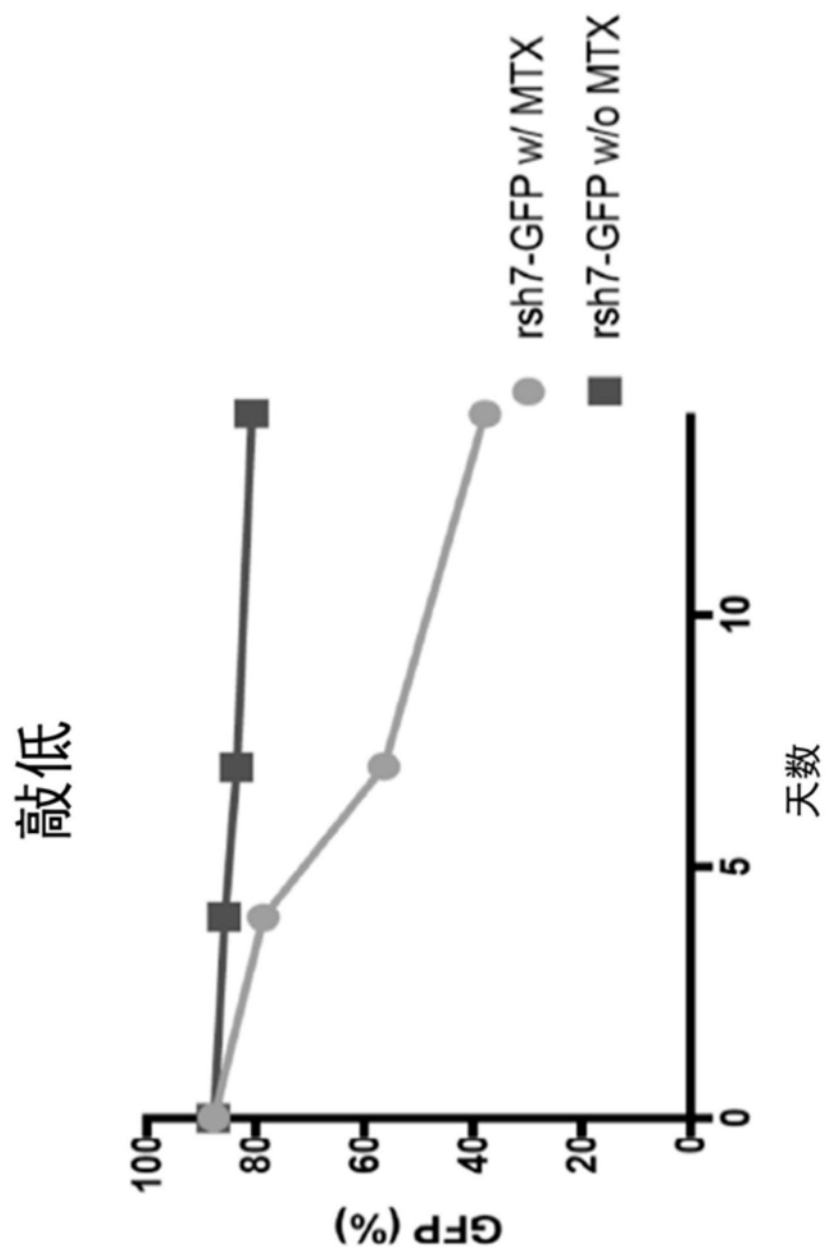


图9A

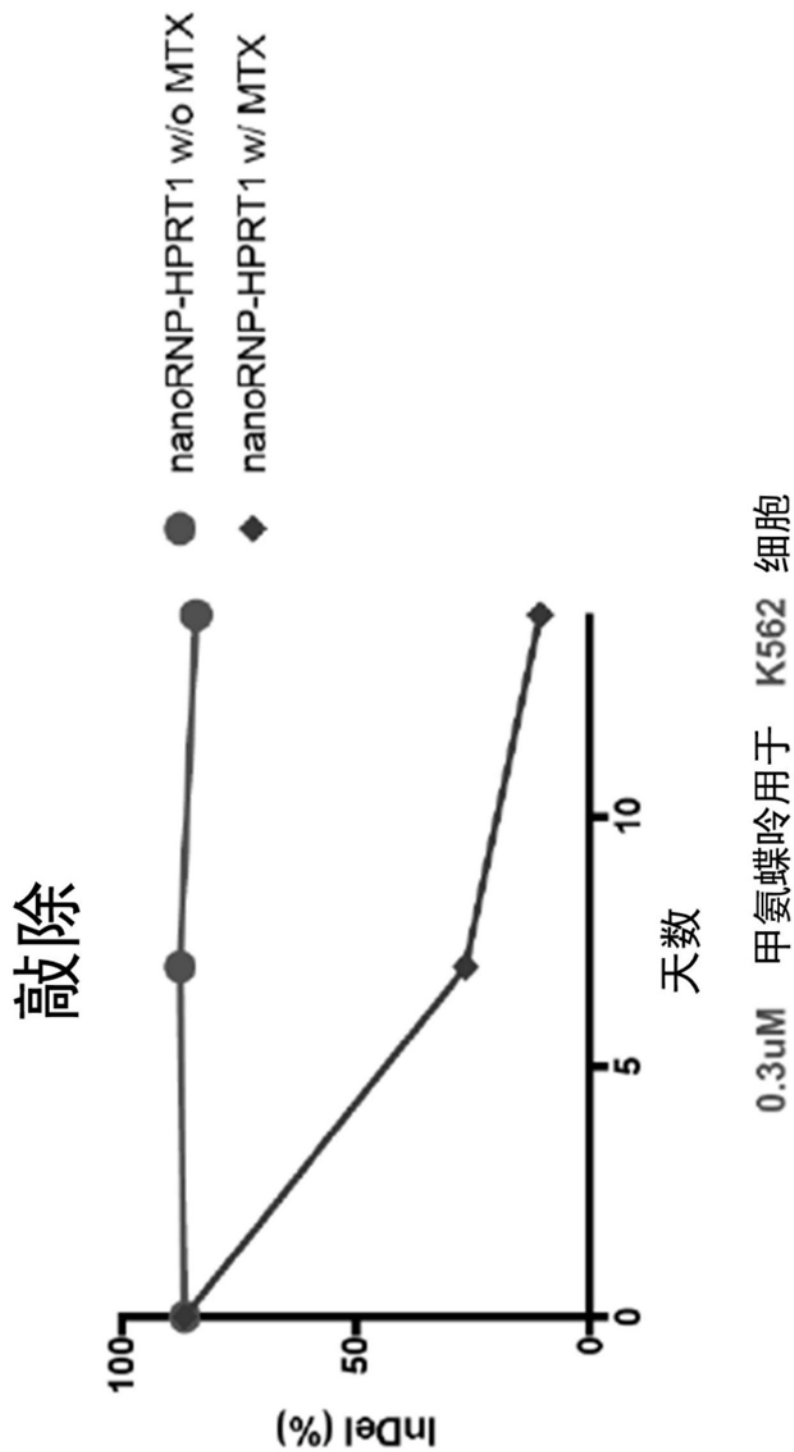


图9B

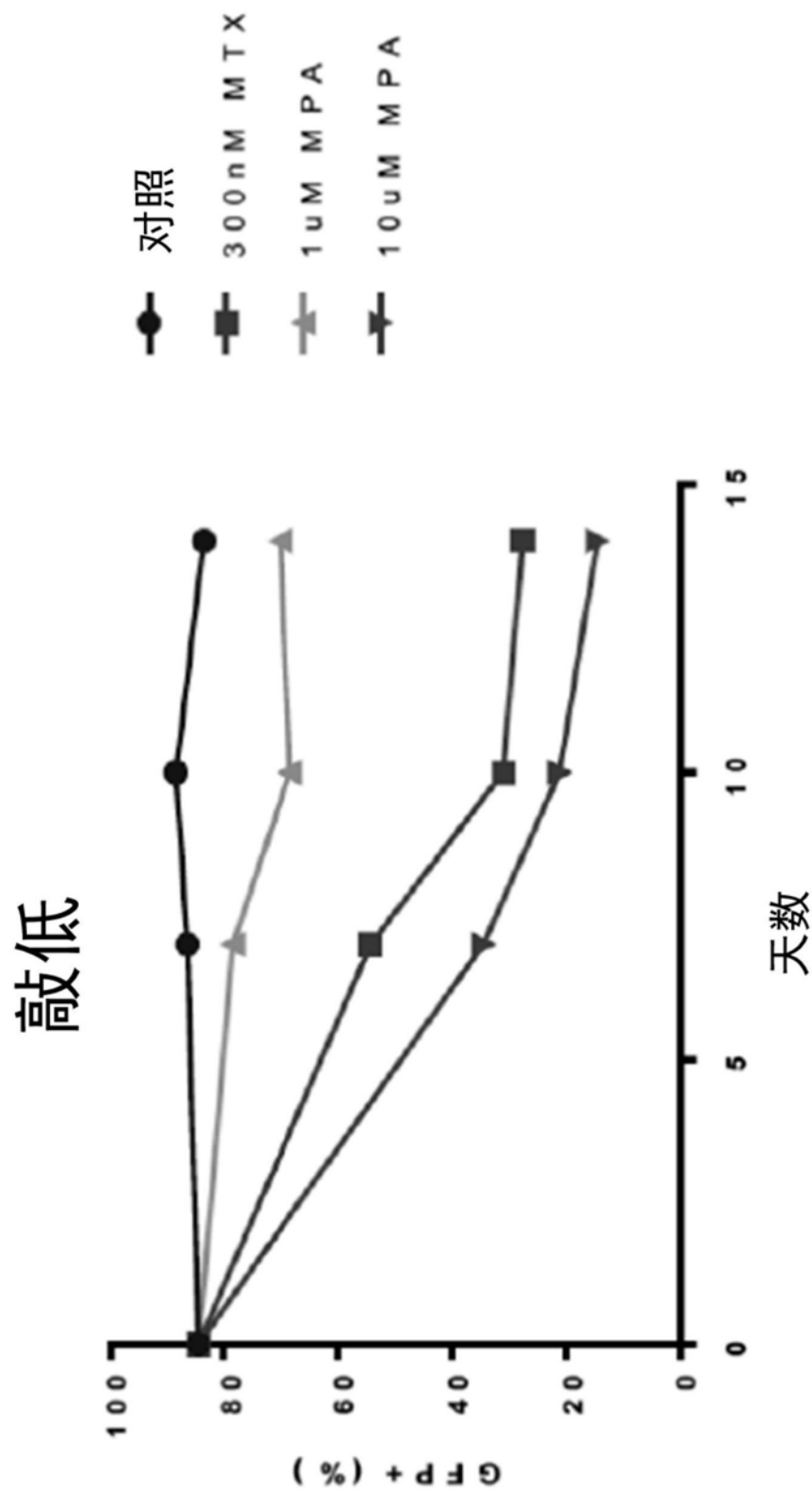


图10A

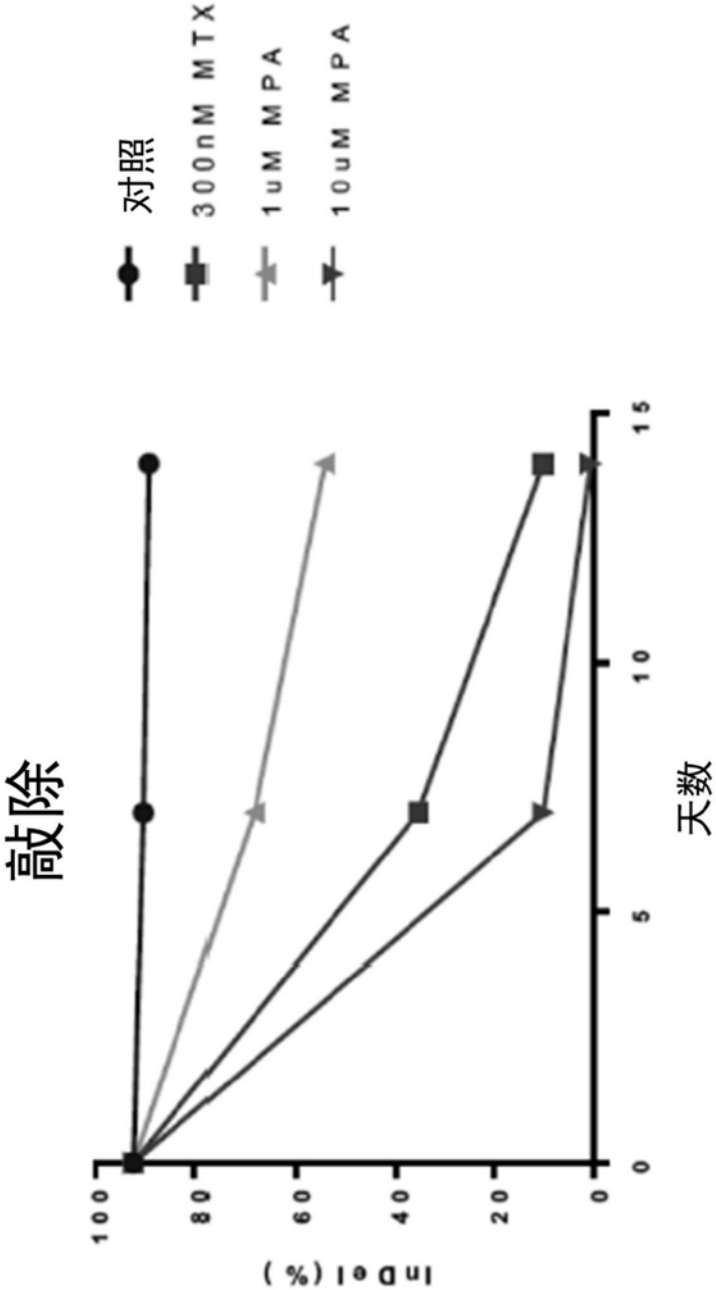


图10B

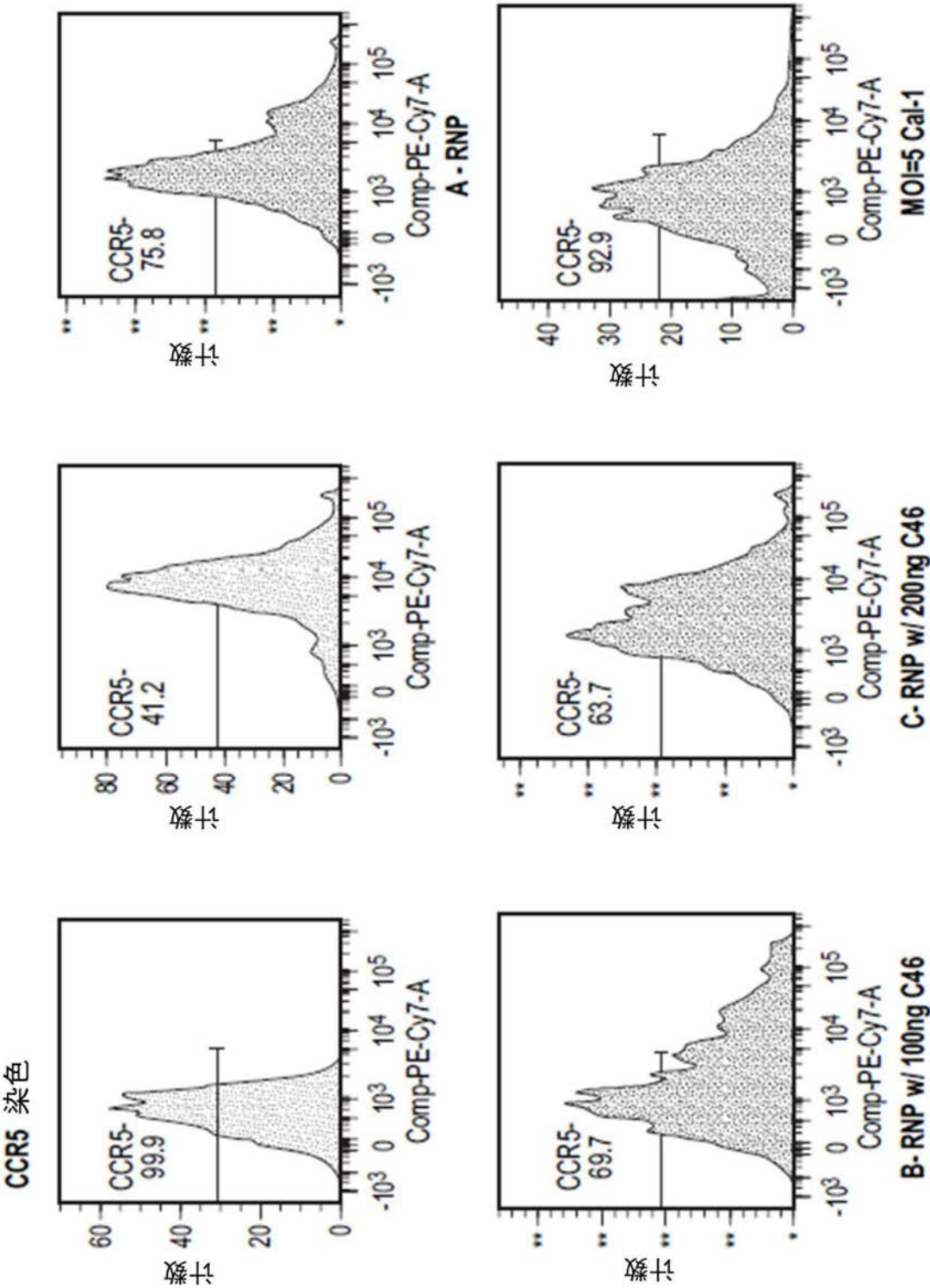


图11A

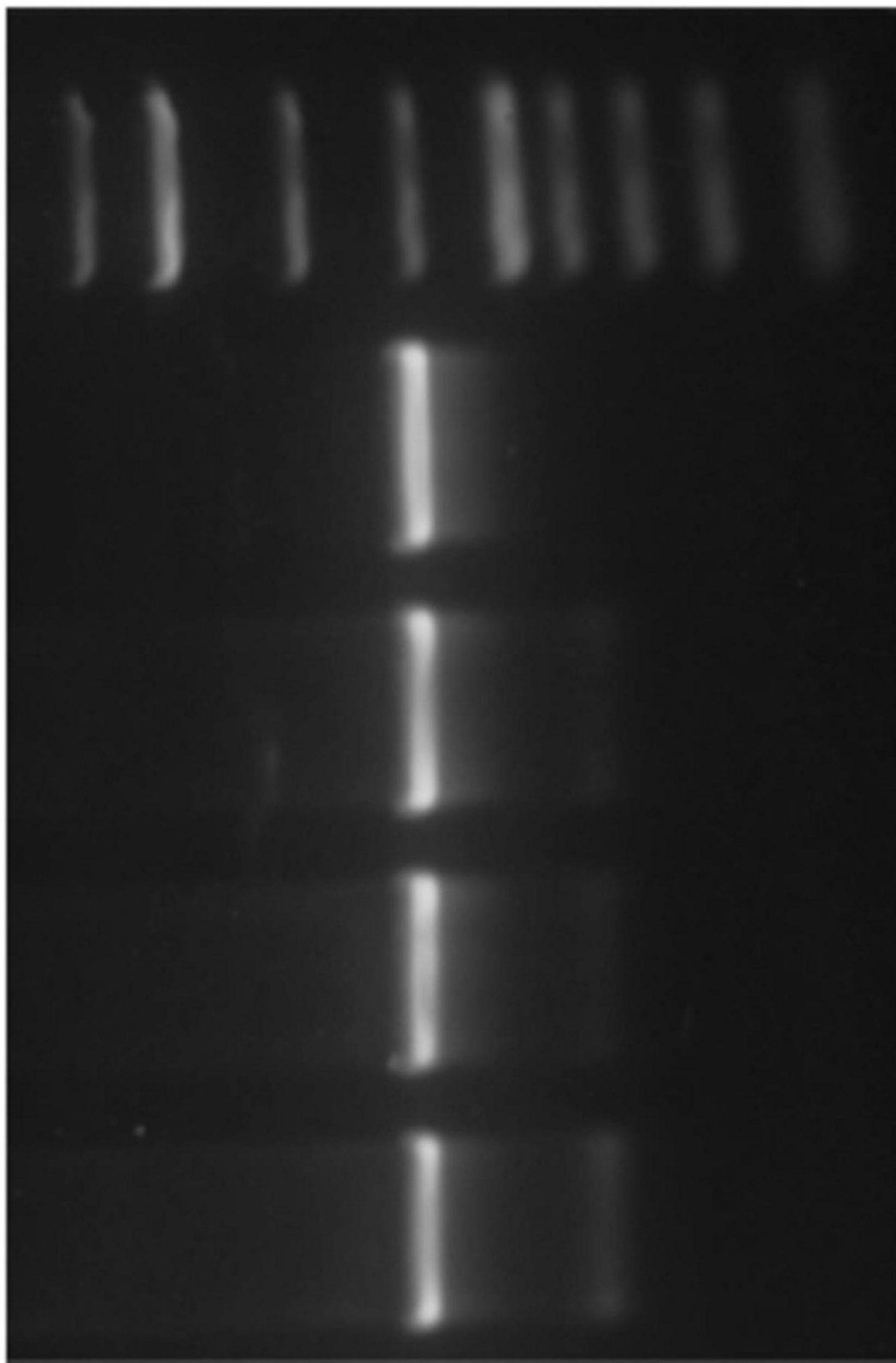


图11B

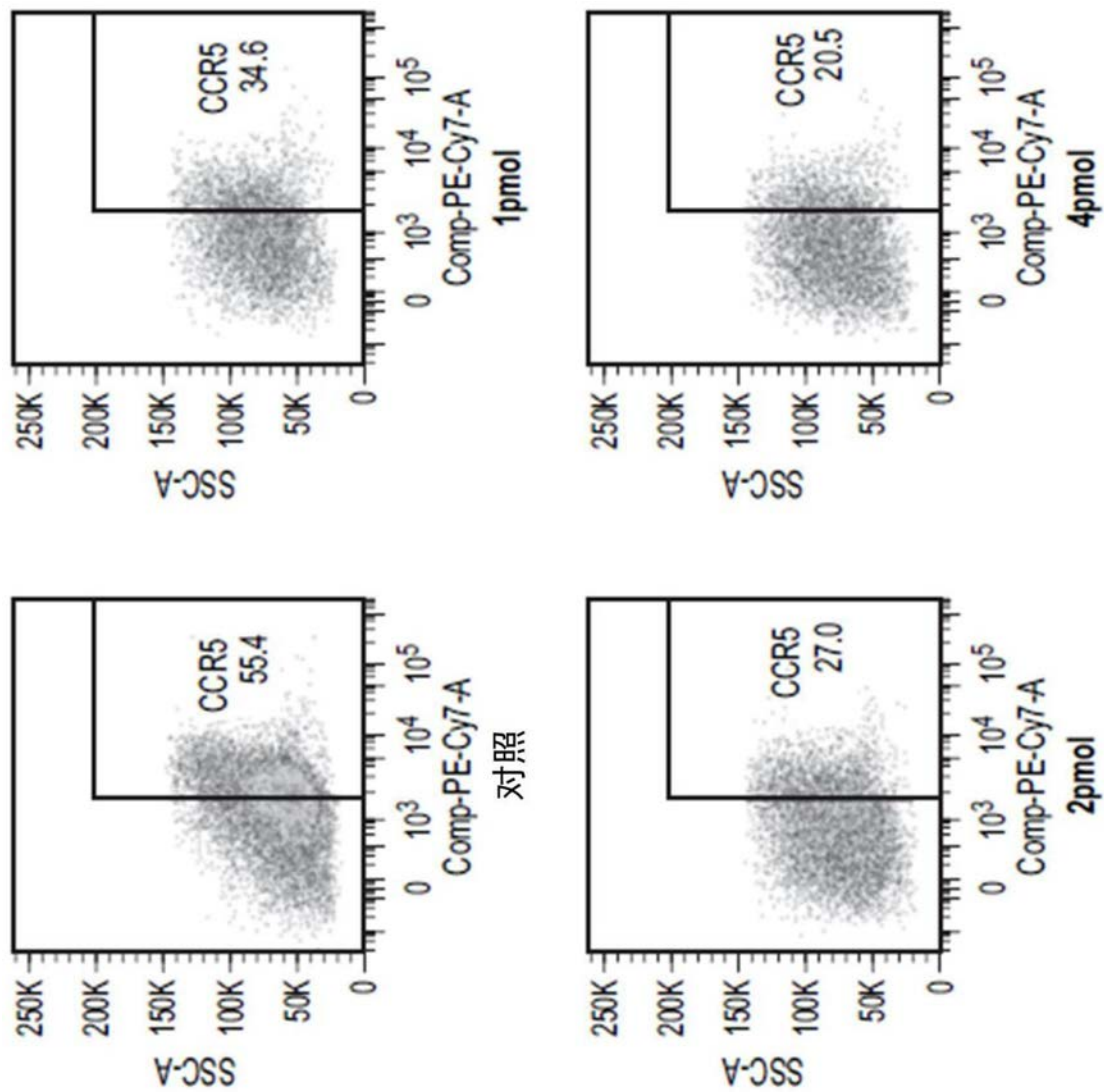


图12

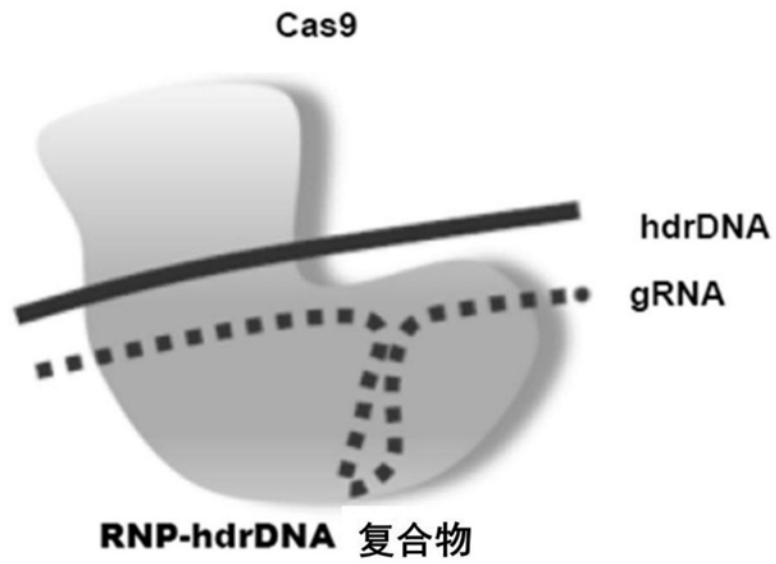


图13A

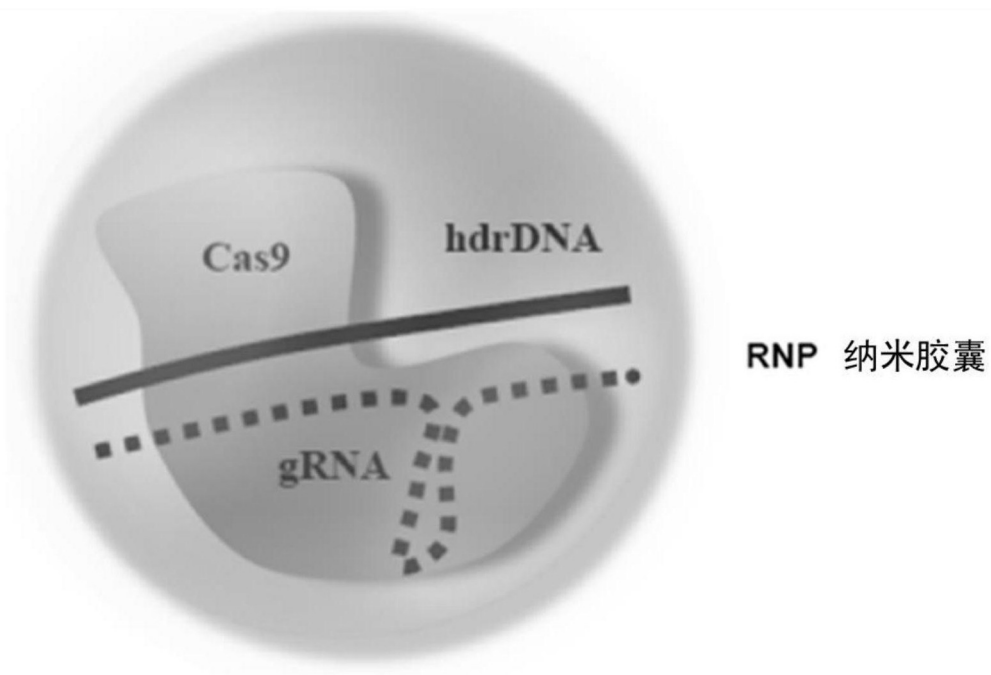


图13B

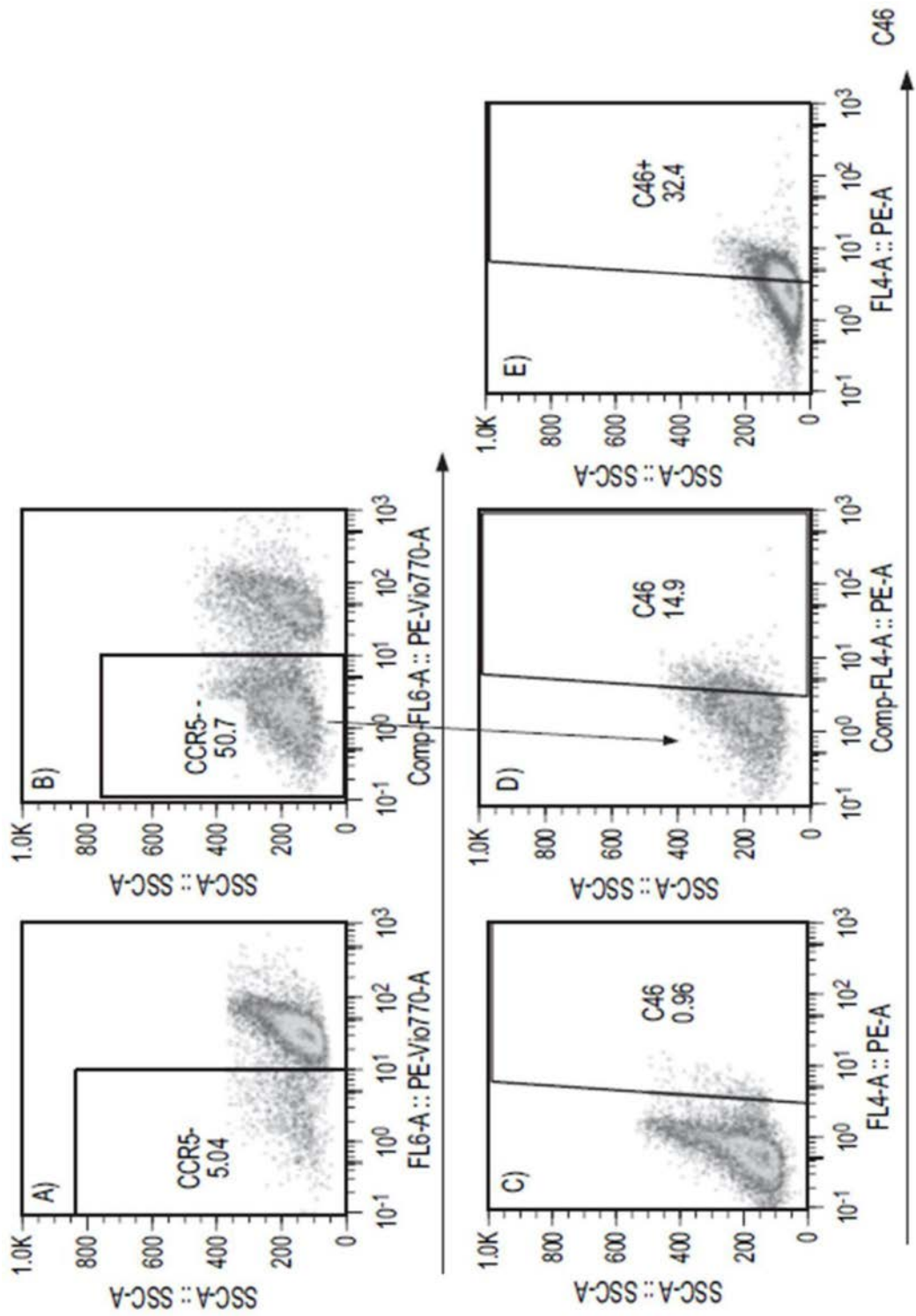


图15

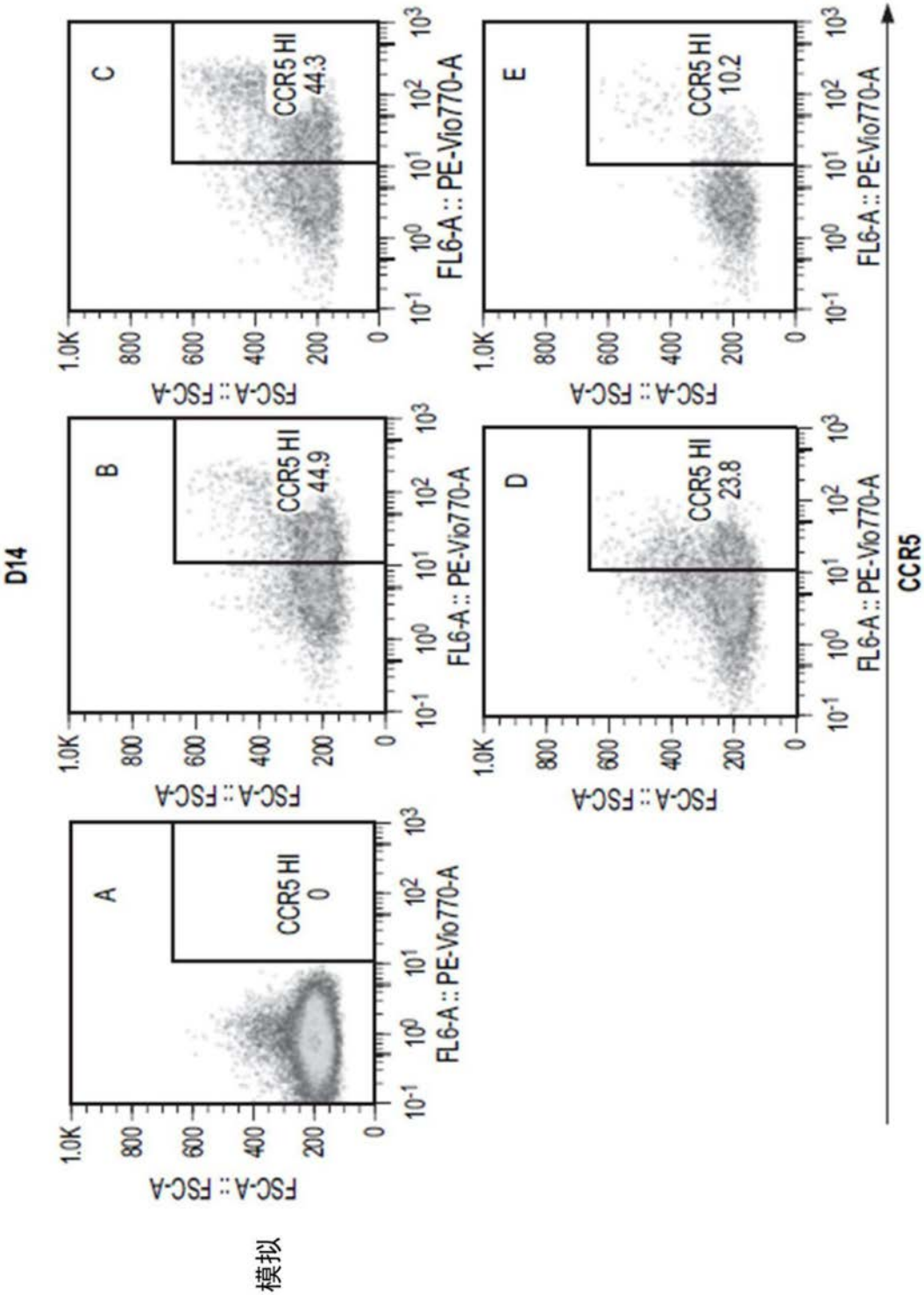


图16

