



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116064534 A

(43) 申请公布日 2023.05.05

(21) 申请号 202211117939.7

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(22) 申请日 2017.06.02

专利代理人 孟凡宏 谢燕军

(30) 优先权数据

EP16172964 2016.06.03 EP

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

(62) 分案原申请数据

C12N 15/55 (2006.01)

201780045274.4 2017.06.02

C12N 15/63 (2006.01)

(71) 申请人 国家医疗保健研究所

A61K 48/00 (2006.01)

地址 法国巴黎

A61P 35/00 (2006.01)

申请人 大脑与脊髓研究所

A61P 35/02 (2006.01)

国家科学研究中心 索邦大学

A61P 31/00 (2006.01)

法国原子能及替代能源委员会

巴黎公共救济院

(72) 发明人 P·拉瓦萨德 J·马莱特

C·瑟格拉

权利要求书1页 说明书26页

序列表(电子公布) 附图5页

(54) 发明名称

编码Cas9核酸酶的核酸的饮食控制的表达  
及其用途

(57) 摘要

本发明涉及通过Cas核酸酶的基因组编辑。发明人发现Cas核酸酶的表达可以通过使用包含最小启动子和至少一种氨基酸响应元件(AARE)核酸的调节性元件来精细控制，所述调节性元件对缺乏至少一种必需氨基酸的饮食或衣霉素具有响应性。例如，FLAG-Cas9-GFP融合体和Cas9-FLAG-RFP融合体可以在293T细胞中表达。另外，在携带嘌呤霉素抗性基因的供体质粒存在下，可以在293T细胞基因组上的安全港基因座AAVS1的位点处整合所述嘌呤霉素抗性基因。因此，本发明涉及用于在个体中编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸，其包含(i)包含最小启动子和1-20个AARE核酸的调节性多核苷酸，和(ii)编码Cas核酸酶的核酸，其置于所述调节性多核苷酸的控制下。

1. 用于在个体的至少一个靶细胞中编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸,其包含:
  - 包含最小启动子和1-20个AARE(氨基酸响应元件)核酸的调节性多核苷酸,一旦消费缺乏至少一种必需氨基酸的饮食,所述调节性多核苷酸在个体中被激活;和
  - 编码Cas核酸酶的核酸,其置于所述调节性多核苷酸的控制下。
2. 根据权利要求1所述的核酸,其中所述Cas核酸酶是Cas9核酸酶。
3. 根据权利要求1或2所述的核酸,其中所述氨基酸响应元件(AARE)核酸选自下组:序列SEQ ID No:1、SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4和SEQ ID No:5的核酸。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的核酸,其中所述调节性多核苷酸包含2-10个AARE核酸。
5. 根据权利要求1-4任一项所述的核酸,其中所述调节性多核苷酸包含2-6个AARE核酸。
6. 用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸载体,其包含权利要求1-5任一项所述的核酸。
7. 递送颗粒,其包含权利要求1-5任一项所述的核酸或权利要求6所述的核酸载体。
8. 根据权利要求7所述的递送颗粒,在其表面包含一种或多种适于结合暴露于靶细胞膜的靶受体的配体。
9. 药物组合物,其包含(i)权利要求1-4任一项所述的核酸或权利要求6所述的核酸载体或权利要求7或8所述的递送颗粒,和(ii)药学上可接受的载体。
10. 宿主细胞,其包含权利要求1-5任一项所述的核酸或权利要求6所述的核酸载体。
11. 根据权利要求9所述的药物组合物用作药物的用途。
12. 根据权利要求9所述的药物组合物用作将基因组编辑入至少一个靶细胞的活性剂的用途。
13. 根据权利要求12所述的药物组合物的用途,其中所述靶细胞具有至少一个基因突变。
14. 将基因组编辑入至少一个靶细胞的方法,包括至少向有需要的个体施用权利要求9所述的药物组合物的步骤。
15. 根据权利要求9所述的药物组合物用作预防和/或治疗疾病的活性剂的用途。
16. 预防和/或治疗疾病的方法,包括至少向有需要的个体施用根据权利要求9所述的药物组合物的步骤。
17. 治疗和/或预防疾病的试剂盒,包含:
  - 权利要求9所述的药物组合物,和
  - 药学活性化合物。

## 编码Cas9核酸酶的核酸的饮食控制的表达及其用途

[0001] 本申请是申请日为2017年6月2日、申请号为201780045274.4、发明名称为“编码Cas9核酸酶的核酸的饮食控制的表达及其用途”的发明专利申请的分案申请。

### 技术领域

[0002] 本发明涉及用于在个体中编码Cas9核酸酶的核酸的受控表达的核酸。

[0003] 尤其是，可以在消费缺乏至少一种必需氨基酸的饮食时控制核酸的表达。

### 背景技术

[0004] 使用可靶向的核酸酶进行基因组编辑是一种用于从细菌到植物和动物(包括人类)的生物体的精确基因组修饰的新兴技术。它的吸引力在于它可以用于用其他种类的方法无法进行靶向基因组修饰的几乎所有生物体。

[0005] 最近的靶向基因组修饰方法，采用例如锌指核酸酶(ZFN)、类转录激活因子效应物核酸酶(TALEN)和大范围核酸酶，通过引入双链断裂以激活修复途径，使科学界能够产生永久性突变。

[0006] 设计的核酸酶(如ZFN和TALEN)在基因组中的期望位置产生DNA双链断裂的能力为基因座定向基因组工程的治疗性翻译创造了乐观。然而，这些方法的工程化成本高且耗时，限制了它们的广泛使用，特别是用于大规模的高通量研究。

[0007] 最近，基于完全不同和特异性系统的新工具，即来自化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)的细菌CRISPR相关蛋白-9核酸酶(Cas9)引起了相当大的兴趣。

[0008] 与其他基因编辑方法不同，它廉价、快速且易于使用，并迅速席卷全世界实验室。该系统的功能是进行基因组序列和基因表达的靶向且高效的改造，这无疑将改变生物技术的所有分支，并促进人类疾病的新分子疗法的发展。

[0009] 继2012年其最初证实后，CRISPR/Cas9系统已被广泛采用。该系统已成功用于靶向许多细胞系和生物体中的重要基因，所述生物体包括人(Mali等,2013,Science,Vol.339:823-826)、细菌(Fabre等,2014,PLoS Negl.Trop.Dis.,Vol.8:e2671)、斑马鱼(Hwang等,2013,PLoS One,Vol.8:e68708)、秀丽隐杆线虫(*C.elegans*,Hai等,2014Cell Res.doi:10.1038/cr.2014.11)、植物(Mali等,2013,Science,Vol.339:823-826),非洲爪蟾(*Xenopus tropicalis*,Guo等,2014,Development,Vol.141:707-714)、酵母(DiCarlo等,2013,Nucleic Acids Res.,Vol.41:4336-4343)、果蝇(Gratz等,2014Genetics,doi:10.1534/genetics.113.160713)、猴(Niu等,2014,Cell,Vol.156:836-843)、兔(Yang等,2014,J.Mol.Cell Biol.,Vol.6:97-99)、猪(Hai等,2014,Cell Res.doi:10.1038/cr.2014.11)、大鼠(Ma等,2014,Cell Res.,Vol.24:122-125)和小鼠(Mashiko等,2014,Dev.Growth Differ.Vol.56:122-129)。

[0010] 此外，基因组编辑已成功应用于临床前水平以及I期临床试验的多种疾病(参见Cox等的综述,Nat Med.2015Feb;21(2):121-31)。在评估基于基因组编辑的治疗的可行性时，首先应明确建立所需遗传改变的治疗效果。随后，给定策略的成功将取决于实现治疗性

修饰“阈值”的容易程度(这是由经编辑细胞的适合性控制的标准)、用于编辑基因组的DSB修复途径以及将基因组编辑分子递送至靶细胞类型的效率。

[0011] 然而,不管其所有潜力,CRISPR-Cas9技术目前受到以下严重限制:与编辑过程相关的脱靶效应(即,在不需要的基因组位置中的基因组编辑)以及细菌核酸酶Cas9的免疫原性。

[0012] 迄今为止,脱靶问题似乎是控制核酸酶活性的机制特征所固有的,如Porteus所强调的(Genome Biology, 2015, 16: 286)。Porteus认为“确定适当的递送策略的重要考虑是,与基因增强策略相反,基因组编辑是一种命中和运行的方法”。此外,Porteus认为“核酸酶的持续表达不仅不需要,而且应该避免:核酸酶的持续表达增加了有害的基因组不稳定的可能性,并且可能损害编辑细胞的适合性或使暴露的细胞易于转化”。最后,Porteus总结:“对于需要体内编辑细胞的治疗应用,挑战更大,并且尚未确定解决方案”。

[0013] 减轻在一些应用中可能有害的脱靶的简单方法是鉴定/设计具有更高特异性的新型核酸酶。

[0014] 因此,本领域需要提供用于在个体中表达编码Cas核酸酶,特别是Cas9核酸酶的核酸的新型微调控制的表达系统,尤其是用于安全的基因治疗方法。

[0015] 发明简述

[0016] 本发明的一个方面涉及用于在个体中编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸,其包含:

[0017] -包含最小启动子和至少一种AARE(氨基酸响应元件)核酸的调节性多核苷酸,一旦消费缺乏至少一种必需氨基酸的饮食,所述调节性多核苷酸在个体中被激活;和

[0018] -编码Cas核酸酶的核酸,其置于所述调节性多核苷酸的控制下。

[0019] 本发明的另一方面涉及用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸载体,其包含如本文所定义的核酸。

[0020] 本发明的又一方面涉及包含如本文所定义的核酸或核酸载体的递送颗粒。

[0021] 另一方面,本发明还涉及药物组合物,其包含(i)如本文所定义的核酸或核酸载体或递送颗粒,和(ii)药学上可接受的载体。

[0022] 在进一步的方面,本发明涉及包含如本文所定义的核酸或核酸载体的宿主细胞。

[0023] 本发明的另一方面涉及如本文所定义的药物组合物用作药物的用途。

[0024] 在进一步的方面,本发明还涉及如本文所定义的药物组合物用作将基因组编辑入至少一个靶细胞的活性剂的用途。

[0025] 在一个方面,本发明涉及将基因组编辑入至少一个靶细胞的方法,包括至少向有需要的个体施用如本文所定义的药物组合物的步骤。

[0026] 另一方面,本发明涉及如本文所定义的药物组合物用作预防和/或治疗疾病的活性剂的用途。

[0027] 本发明的一个方面还涉及用于预防和/或治疗疾病的方法,包括至少向有需要的个体施用如本文所定义的药物组合物的步骤。

[0028] 最后,在进一步的方面,本发明涉及用于治疗和/或预防疾病的试剂盒,包含:

[0029] -如本文所定义的药物组合物,和

[0030] -药物活性化合物。

## 附图说明

[0031] 图1:说明GCN2-eIF2 $\alpha$ -ATF4信号通路的图示。为响应EAA饥饿,活化的GCN2使eIF2 $\alpha$ 磷酸化,导致转录因子ATF4的上调及其向AARE序列的募集以诱导靶基因表达。

[0032] 图2:说明AARE-Cas核酸酶构建体的描述的图示:来自Trb3启动子的六个拷贝的AARE(黑点)和Tk最小启动子构成该构建体。

[0033] 图3:说明pTrip-2XAARE-NLS-FLAG-CAS9质粒的图示。pTK表示最小TK启动子的位置;2X AARE表示AARE核酸的位置;箭头“NLS-FLAG-CAS9”表示编码Cas9核酸酶的核酸的位置;箭头“AmpR”代表编码氨苄青霉素抗性的核酸。

[0034] 图4:说明pTRIP blast\_U6 AAVS1\_2xAARE-Cas9-Flag-RFP质粒的图示。下图与上图连续。上图右端的EcoR1限制位点是指下图左端的EcoR1限制位点。

[0035] 图5:说明在T0用缺少亮氨酸的培养基(293T-C9 Leu-;实线曲线)或包含衣霉素的培养基(293T-C9 TU;虚线曲线)诱导时293T细胞中Cas9表达的图。诱导在T0进行并在24h时去除。在去除诱导后24h和48h,即分别在T0+48h和T0+72h监测表达。横坐标轴表示时间线(以小时计),纵坐标轴表示Cas9核酸酶的条带强度,因此代表Cas9表达。诱导24h后观察到Cas9的最大表达,其任意地代表100%的表达。

[0036] 图6:说明供体DNA(Do)在293T细胞基因组的AAVS1位点的整合的图。用质粒‘pTRIP blast\_U6AAVS1\_2xAARE-Cas9-flag-RFP’(C9)以及用包含盒‘AAVS1切割位点-GFP-p2a-嘌呤霉素\_AAVS1切割位点’(Do)的供体质粒转染293T细胞。在衣霉素(293+Do+C9i Tu)存在下或缺少亮氨酸的培养基(293+Do+C9i Leu-)的情况下诱导后,计数嘌呤霉素抗性细胞的数目(纵坐标轴)。作为对照,在不存在诱导(293+Do+C9 ni)的情况下测定用两种质粒(Do和C9)转染的293T细胞。最后,用供体质粒(Do)转染没有任何C9质粒拷贝的293T细胞,并进一步计数嘌呤霉素抗性细胞的数目。

[0037] 图7:类似于图6,说明供体DNA(Do)在包含一个C9质粒拷贝的293T细胞(293-C9细胞)基因组的AAVS1位点的整合的图。用包含盒‘AAVS1切割位点-GFP-p2a-嘌呤霉素\_AAVS1切割位点’(Do)的供体质粒转染293-C9细胞。在衣霉素(293\_C9+Doi Tu)存在下或缺少亮氨酸的培养基(293\_C9+Doi Leu-)的情况下诱导后,计数嘌呤霉素抗性细胞的数目(纵坐标轴)。作为对照,在不存在诱导(293\_C9+Do ni)的情况下测定用质粒Do转染的293-C9细胞。最后,进一步计数在不存在诱导的情况下用供体质粒(Do)转染的嘌呤霉素抗性293-C9细胞的数目。

[0038] 发明详述

[0039] 本文提及的任何引用均通过引用并入。

[0040] 本发明人评估了营养适应途径对于缺乏一种必需氨基酸的饮食的显著特征,以实现理想地适合于基因治疗的调节系统。发明人发现,基于饮食特异性氨基酸饥饿的这种系统既不需要表达合成的转录因子或调控蛋白,也不需要施用药理诱导剂。它是生理学无毒的且适合临床应用。这种新型的基于营养的调节系统是一种能够解决人类基因治疗中的主要剩余障碍之一的生理学方法。

[0041] 不希望受理论束缚,本发明人认为本文公开的控制表达系统是特别适合用于Cas核酸酶(CRISPR(规律成簇的间隔短回文重复序列)相关蛋白)的微调表达的系统。

[0042] 应注意,W02013/068096公开了用于几种蛋白质的这种控制表达系统,并且用荧光

素酶蛋白质的表达进行概念验证。Chaveroux等(Science Signaling, 2015, vol.8(374), 1-10)利用该系统来表征eIF2 $\alpha$ -ATF4信号通路。

[0043] 然而,由于在靶宿主细胞中表达Cas核酸酶的限制,例如缺乏渗漏,因此不能预期W02013/068096和Chaveroux等公开的基于营养的调节系统将为Cas核酸酶的受控表达提供合适的工具。

[0044] 如本文所公开的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸允许限制或避免脱靶,其通常由于缺乏有效的控制表达系统而观察到(表达“渗漏”)。

[0045] • 用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸

[0046] 本发明的第一个方面涉及用于在个体中编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸,其包含:

[0047] - 包含最小启动子和至少一种AARE(氨基酸响应元件)核酸的调节性多核苷酸,一旦消费缺乏至少一种必需氨基酸的饮食,所述调节性多核苷酸在个体中被激活;和

[0048] - 编码Cas核酸酶的核酸,其置于所述调节性多核苷酸的控制下。

[0049] 另一方面,本发明还涉及用于在个体的至少一个靶细胞中控制编码Cas核酸酶的核酸表达的核酸,其包含:

[0050] - 包含最小启动子和至少一种AARE(氨基酸响应元件)核酸的调节性多核苷酸,一旦消费缺乏至少一种必需氨基酸的饮食,所述调节性多核苷酸在个体中被激活;和

[0051] - 编码Cas核酸酶的核酸,其置于所述调节性多核苷酸的控制下。

[0052] 在本发明的范围内,表述“受控表达”意指在诱导时刻、诱导的持续时间方面以精确方式诱导或“打开”并停止或“关闭”表达。

[0053] 在一些实施方案中,Cas核酸酶选自下组:I类Cas核酸酶、II类Cas核酸酶和III类Cas核酸酶。

[0054] 对于I类、II类和III类Cas核酸酶,本领域技术人员可参考Chylinski等(2014, Nucleic Acids Research, Vol.42(10):6091-6105);Sinkunas等(2011, The EMBO Journal, Vol.30(7):1335-1342);Aliyari等(2009, Immunological Reviews, Vol.227(1):176-188);Cass等(Biosci Rep, doi:10.1042/BSR20150043),Makarova等(2011, Biology Direct, Vol.6:38);Gasiunas等(2012, Proc Natl Acad Sci USA, Vol.109(39):E2579-E2586);Heler等(2015, Nature, Vol.519(7542):199-202);Esvelt等(2013, Nat Methods, Vol.10(11):doi:10.138/nmeth.2681),Zetsche等(Cell. 2015 Oct 22;163(3):759-71),或Chylinski等(2013, Biology, Vol.10(5):726-737)。

[0055] 在一些实施方案中,I类Cas核酸酶选自Cas3、Cas8a、Cas8b、Cas8c、Cas10d、Cse1和Csy1。

[0056] 在一些实施方案中,II类Cas核酸酶选自Cas9、Cpf1、Csn2和Cas4。

[0057] 在一些实施方案中,III类Cas核酸酶选自Cas10、Csm2和Cmr5。

[0058] 在一些实施方案中,Cas核酸酶是Cas9核酸酶。

[0059] 在一些实施方案中,Cas9核酸酶可以源自细菌来源,特别是选自以下的细菌:Acaryochloris marina、内氏放线菌(Actinomyces naeslundii)、柴油食烷菌(Alcanivorax dieselolei)、Belliella baltica、空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae)、球团科里氏杆菌

(*Coriobacterium glomerans*)、溃疡棒状杆菌(*Corynebacterium ulcerans*)、蒂氏脱硫念珠菌(*Desulfomonile tiedjei*)、达旦提狄克氏菌(*Dickeya dadantii*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*)、开菲尔基质乳杆菌(*Lactobacillus kefirancifaciens*)、无害李斯特氏菌(*Listeria innocua*)、扭脱甲基杆菌(*Methyllobacterium extorquens*)、藤黄微球菌(*Micrococcus luteus*)、橙色粘球菌(*Myxococcus fulvus*)、脑膜炎奈瑟菌(*Neisseria meningitidis*)、多杀性巴氏杆菌(*Pasteurella multocida*)、中间普氏菌(*Prevotella intermedia*)、海洋原绿球藻(*Prochlorococcus marinus*)、扭曲冷弯曲菌(*Psychroflexus torquis*)、嗜热球杆菌(*Sphaerobacter thermophilus*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingobacterium sp.*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、变形链球菌(*Streptococcus mutans*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、化脓性链球菌(*Streptococcus pyogenes*)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和链霉菌(*Streptomyces bingchengensis*)。

[0060] 在一些实施方案中,Cas9核酸酶可以源自古细菌来源,例如布雷斯甲烷袋状菌(*Methanoculleus bourgensis*)。

[0061] 没有任何限制,本文公开的Cas9核酸酶涵盖天然存在的Cas9核酸酶的同源物、旁系同源物和直系同源物和变体。

[0062] 在某些实施方案中,Cas9变体可包括SpCas9-HF1 (Kleinstiver et al.; Nature. 2016 Jan 28; 529(7587): 490-5); fCas9, 其是催化失活的Cas9与FokI核酸酶的融合物(Guilinger et al.; Nat. Biotechnol. 2014; 32(6): 577-582); 以及Slaymaker等公开的具有改进的特异性的任何合理工程化的Cas9核酸酶(Science. 2016 Jan 1; 351(6268): 84-8)。

[0063] 在一些实施方案中,编码Cas9核酸酶的核酸和/或编码Cas9核酸酶的载体可以例如商购自**SIGMA-ALDRICH®**。

[0064] 在一些其他实施方案中,可以通过用于定向进化蛋白质Packer和Liu的方法鉴定Cas核酸酶(Nat Rev Genet. 2015 Jul; 16(7): 379-94)。

[0065] 在一些实施方案中,Cas核酸酶是DNA或RNA引导的Cas核酸酶。

[0066] 在本发明的范围内,“DNA或RNA引导的”意指在向导DNA或RNA存在下,Cas核酸酶靶向其序列与向导DNA和RNA互补的核酸。在某些实施方案中,编码Cas核酸酶的核酸的表达可以通过现有技术中可获得的任何合适的方法测量,包括测量由编码Cas核酸酶的核酸转录产生的mRNA表达、和/或测量Cas核酸酶表达。

[0067] 在一些实施方案中,测量Cas核酸酶表达可以通过用特异性结合所述Cas核酸酶的抗体测量Cas核酸酶的表达来进行。

[0068] 在本发明的范围内,与基础的非诱导表达相比,诱导表达可以表达为倍数表达。

[0069] 在一些实施方案中,与基础表达相比,诱导表达可以为2倍-10,000倍,优选4倍-500倍,更优选8倍-250倍,最优选10倍-100倍。

[0070] 在本发明的范围内,2倍-10,000倍包括3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、550倍、600倍、750倍、800倍、850倍、900倍、950倍、1,000倍、2,000倍、3,000倍、4,000倍、5,000倍、6,000倍、7,000倍、8,000倍和9,000倍。

[0071] 在本发明的范围内，表述“最小启动子”意指包括适当地启动位于下游的目标基因的转录的所有需要元件的启动子。在本发明的范围内，“最小启动子”和“核心启动子”被认为是等同的表达。技术人员理解“最小启动子”包括至少一个转录起始位点、RNA聚合酶结合位点和一般转录因子的结合位点(TATA盒)。

[0072] 合适的最小启动子是本领域技术人员已知的。

[0073] 在一些实施方案中，适于实施本发明的最小启动子可选自下组：胸苷激酶的启动子、 $\beta$ -珠蛋白的启动子、巨细胞病毒(CMV)的启动子、SV40启动子等。

[0074] 在一些实施方案中，个体是人或非人哺乳动物，优选人。

[0075] 在一些实施方案中，非人哺乳动物选自下组：宠物，如狗、猫、家养猪、兔、雪貂、仓鼠、小鼠、大鼠等；灵长类动物，如黑猩猩、猴等；经济上重要的动物，如牛、猪、兔、马、绵羊、山羊、小鼠、大鼠。

[0076] 在本发明的范围内，“靶细胞”意指来自所述个体的细胞，对于该细胞Cas核酸酶的表达将是有益的。

[0077] 在本发明的范围内，表述“必需氨基酸”包括组氨酸(His,H)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、赖氨酸(Lys,K)、蛋氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、苏氨酸(Thr,T)、色氨酸(Trp,W)和缬氨酸(Val,V)。

[0078] 在本发明的范围内，表述“至少一种必需氨基酸”意指1、2、3、4、5、6、7、8或9种必需氨基酸。

[0079] 在一些实施方案中，可以向个体施用缺乏至少一种必需氨基酸的饮食5min-12h的一段时间，其包括10min、15min、20min、25min、30min、45min、1h、1h 30min、2h、2h 30min、3h、3h 30min、4h、4h 30min、5h、5h 30min、6h、6h 30min、7h、7h 30min、8h、8h 30min、9h、9h 30min、10h、10h 30min、11h、11h 30min。

[0080] 在一些实施方案中，可以向个体施用缺乏至少一种必需氨基酸的饮食一次、两次、三次、四次、五次、六次或更多次。

[0081] 在某些实施方案中，可以每天向个体施用缺乏至少一种必需氨基酸的饮食一次或两次。

[0082] 在一些实施方案中，可以在清晨例如早餐向个体施用缺乏至少一种必需氨基酸的饮食，然后可以在午餐和晚餐向个体施用正常饮食。

[0083] 在本发明的范围内，表述“正常饮食”意指不缺乏任何必需氨基酸的饮食。

[0084] 在一些实施方案中，可以每天、每隔一天、每周一次、每周两次、每周三次向个体施用缺乏至少一种必需氨基酸的饮食。

[0085] 在一些实施方案中，可以向个体施用缺乏至少一种必需氨基酸的饮食半天、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天或更多天的时间。

[0086] 在一些实施方案中，可以每周、每隔一周、每月、每月或更长重复缺乏至少一种必需氨基酸的饮食。

[0087] 在一些实施方案中，缺乏至少一种必需氨基酸的饮食可以由以商品名MILUPA®商购自NUTRICA METABOLICS®的不含异亮氨酸、不含亮氨酸和不含缬氨酸的粉末食品提供。这种饮食适用于患有枫糖尿病的个体，该疾病似乎影响支链氨基

酸代谢。

[0088] 在某些实施方案中,可以通过将不含异亮氨酸、不含亮氨酸和不含缬氨酸的粉末与外部来源的其余2种氨基酸混合来获得不含亮氨酸、不含异亮氨酸或不含缬氨酸的饮食。

[0089] 在某些实施方案中,可以由商购自MEAD JOHNSON®的不含苯丙氨酸的粉末提供不含苯丙氨酸的饮食。该饮食适合于患有苯丙酮尿症的个体。

[0090] 在实践中,将粉末与不含期望的必需氨基酸的适合的液体或半固体食物混合。

[0091] 在某些实施方案中,氨基酸饥饿可以通过施用卤夫酮,或者以对应于分子“4(3H)-喹唑啉酮、7-溴-6-氯-3-[3-(3-羟基-2-哌啶基)-2-氧代丙基]-,反式-(±)-,或商品化为例如Halocur、Stenorol、Flavomycin、Lincomix、Stafac的任何其他名称来模拟。

[0092] 在一个实施方案中,氨基酸响应元件(AARE)核酸选自下组:序列SEQ ID No:1、SEQ ID No:2、SEQ ID No:3、SEQ ID No:4和SEQ ID No:5的核酸。

[0093] 在本发明的范围内,表述“至少一种AARE核酸”包括至少2种、至少3种、至少4种和至少5种AARE核酸。因此,表述“至少一种AARE核酸”包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20种AARE核酸。

[0094] 在某些实施方案中,调节性多核苷酸包含至少两种AARE核酸。

[0095] 在一些其他实施方案中,调节性多核苷酸包含1-20种AARE核酸,优选2-10种AARE核酸。

[0096] 在某些实施方案中,调节性多核苷酸包含2-6种AARE核酸。

[0097] 在一些实施方案中,调节性多核苷酸包含选自序列SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:4的核酸的两种AARE核酸。

[0098] 在一些实施方案中,调节性多核苷酸包含序列SEQ ID NO:1的六种AARE核酸。

[0099] 在某些实施方案中,所述两种AARE核酸,或者,所述至少两种AARE核酸可以相同或不同。

[0100] 在一些实施方案中,用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸中包含的调节性多核苷酸也可以在向个体施用卤夫酮、衣霉素等(即已知具有AARE核酸的活化性质的化合物)时被活化。

[0101] • 核酸载体

[0102] 另一方面,本发明还涉及用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸载体,其包含如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸。

[0103] 在一些实施方案中,将根据本发明的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸引入适合于基因治疗的载体中。

[0104] 在本发明的范围内,表述“适合于基因治疗的载体”意指所述载体包含用于实现在靶细胞中表达编码Cas核酸酶的核酸的必需元件。

[0105] 在某些实施方案中,载体是病毒载体。

[0106] 在一些实施方案中,病毒载体选自下组:腺病毒、腺相关病毒(AAV)、甲病毒、痘病毒、慢病毒、非整合型慢病毒、逆转录病毒、痘苗病毒和杆状病毒。

[0107] • 递送颗粒

[0108] 在一些实施方案中,如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸或核酸载体可以包含在颗粒中,特别是与其他化合物例如脂质、蛋白质、多肽或聚合物结

合。

[0109] 在本发明的范围内,所述颗粒或“递送颗粒”旨在向靶细胞提供或“递送”编码Cas核酸酶的核酸或包含编码Cas核酸酶的所述核酸的核酸载体。

[0110] 在另一方面,本发明还涉及包含如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的受控表达的核酸或核酸载体的递送颗粒。

[0111] 在某些实施方案中,递送颗粒可以是包含阳离子脂质的脂质体复合物的形式;脂质纳米乳剂;固体脂质纳米颗粒;基于肽的颗粒;基于聚合物的颗粒,特别是包含天然和/或合成聚合物。

[0112] 在一些实施方案中,基于聚合物的颗粒可包含蛋白质;肽;多糖,特别是壳聚糖。

[0113] 在一些实施方案中,基于聚合物的颗粒可包含合成聚合物,特别是聚乙烯亚胺(PEI)、树状大分子、聚(DL-丙交酯)(PLA)、聚(DL-乳酸-羟基乙酸)共聚物(PLGA)、聚甲基丙烯酸酯和聚磷酸酯。

[0114] 在一些实施方案中,递送颗粒还在其表面包含一种或多种适于结合暴露于靶细胞膜的靶受体的配体。

[0115] • 药物组合物

[0116] 本发明的另一方面涉及药物组合物,其包含(i)如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体或递送颗粒,和(ii)药学上可接受的载体。

[0117] 根据本发明的药物组合物的配制是本领域技术人员公知的。

[0118] 如本文所述,如本公开所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体或递送颗粒,可代表活性剂。

[0119] 在一些实施方案中,药物组合物可包含如本公开所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体或递送颗粒作为唯一的活性剂。

[0120] 在一些实施方案中,根据本发明的合适的药学上可接受的载体包括任何和所有常规溶剂、分散介质、填充剂、固体载体、水溶液、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。

[0121] 在某些实施方案中,合适的药学上可接受的载体可包括水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇及其混合物。

[0122] 在一些实施方案中,药学上可接受的载体可以进一步包含少量辅助物质,如润湿剂或乳化剂、防腐剂或缓冲剂,其增强细胞的保质期或有效性。药学上可接受的载体的制备和使用是本领域熟知的。

[0123] 除非任何常规介质或试剂与活性成分不相容,否则考虑将其用于本发明的药物组合物中。

[0124] 在一些实施方案中,药物组合物可以通过任何途径向有需要的个体施用,即通过口服施用、局部施用或肠胃外施用,例如通过注射,包括皮下施用、静脉施用、动脉施用、肌内施用、眼内施用和耳内施用。

[0125] 在某些实施方案中,通过注射施用药物组合物可以直接在目标靶组织中进行,特别是为了避免所述药物组合物中包含的核酸或核酸载体的扩散。

[0126] 发明人认为,当脑组织是靶标时,这尤其重要。可以在脑组织的特定部位中非常精确地进行核酸载体输注,例如,通过利用磁共振扫描仪的方式,特别是使用无框立体定向瞄

准装置。目前MRI引导和新型立体定向瞄准装置的使用已为神经基因治疗成为介入神经病学中可接受的程序奠定了坚实的基础。

[0127] 其他施用方式采用肺部制剂、栓剂和透皮应用。

[0128] 在一些实施方案中,根据本发明的口服制剂包括常用的赋形剂,例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0129] 在一些实施方案中,向有需要的所述个体施用有效量的所述化合物。

[0130] 在本发明的范围内,“有效量”是指单独刺激期望结果(即减轻或消除所涵盖的疾病,特别是遗传性疾病的症状)的所述化合物的量。

[0131] 本领域技术人员已知确定用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体或递送颗粒的有效量以观察期望结果。

[0132] 在本发明的范围内,待施用的化合物的有效量可以由医师或本领域授权的技术人员确定,并且可以在治疗进程中适当地调整。

[0133] 在某些实施方案中,待施用的有效量可取决于各种参数,包括选择用于施用的材料、施用是单剂量还是多剂量、以及个体的参数,包括年龄、身体条件、尺寸、体重、性别、以及待治疗疾病的严重程度。

[0134] 在某些实施方案中,活性剂的有效量可包含每剂量单位约0.001mg-约3000mg,优选每剂量单位约0.05mg-约100mg。

[0135] 在本发明的范围内,约0.001mg-约3000mg包括每剂量单位约0.002mg、0.003mg、0.004mg、0.005mg、0.006mg、0.007mg、0.008mg、0.009mg、0.01mg、0.02mg、0.03mg、0.04mg、0.05mg、0.06mg、0.07mg、0.08mg、0.09mg、0.1mg、0.2mg、0.3mg、0.4mg、0.5mg、0.6mg、0.7mg、0.8mg、0.9mg、1mg、2mg、3mg、4mg、5mg、6mg、7mg、8mg、9mg、10mg、20mg、30mg、40mg、50mg、60mg、70mg、80mg、90mg、100mg、150mg、200mg、250mg、300mg、350mg、400mg、450mg、500mg、550mg、600mg、650mg、700mg、750mg、800mg、850mg、900mg、950mg、1000mg、1100mg、1150mg、1200mg、1250mg、1300mg、1350mg、1400mg、1450mg、1500mg、1550mg、1600mg、1650mg、1700mg、1750mg、1800mg、1850mg、1900mg、1950mg、2000mg、2100mg、2150mg、2200mg、2250mg、2300mg、2350mg、2400mg、2450mg、2500mg、2550mg、2600mg、2650mg、2700mg、2750mg、2800mg、2850mg、2900mg和2950mg。

[0136] 在某些实施方案中,活性剂可以是足以每天递送约0.001mg/kg-约100mg/kg、约0.01mg/kg-约50mg/kg、优选约0.1mg/kg-约40mg/kg、优选约0.5mg/kg-约30mg/kg、约0.01mg/kg-约10mg/kg、约0.1mg/kg-约10mg/kg、和更优选约1mg/kg-约25mg/kg受试者体重的剂量水平。

[0137] 在一些特定的实施方案中,活性剂的有效量可以每剂量单位包含约 $1 \times 10^5$ -约 $1 \times 10^{15}$ 个拷贝的本公开所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体或递送颗粒。

[0138] 在本发明的范围内,约 $1 \times 10^5$ -约 $1 \times 10^{15}$ 个拷贝包括每剂量单位 $2 \times 10^5$ 、 $3 \times 10^5$ 、 $4 \times 10^5$ 、 $5 \times 10^5$ 、 $6 \times 10^5$ 、 $7 \times 10^5$ 、 $8 \times 10^5$ 、 $9 \times 10^5$ 、 $1 \times 10^6$ 、 $2 \times 10^6$ 、 $3 \times 10^6$ 、 $4 \times 10^6$ 、 $5 \times 10^6$ 、 $6 \times 10^6$ 、 $7 \times 10^6$ 、 $8 \times 10^6$ 、 $9 \times 10^6$ 、 $1 \times 10^7$ 、 $2 \times 10^7$ 、 $3 \times 10^7$ 、 $4 \times 10^7$ 、 $5 \times 10^7$ 、 $6 \times 10^7$ 、 $7 \times 10^7$ 、 $8 \times 10^7$ 、 $9 \times 10^7$ 、 $1 \times 10^8$ 、 $2 \times 10^8$ 、 $3 \times 10^8$ 、 $4 \times 10^8$ 、 $5 \times 10^8$ 、 $6 \times 10^8$ 、 $7 \times 10^8$ 、 $8 \times 10^8$ 、 $9 \times 10^8$ 、 $1 \times 10^9$ 、 $2 \times 10^9$ 、 $3 \times 10^9$ 、 $4 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $6 \times 10^9$ 、 $7 \times 10^9$ 、 $8 \times 10^9$ 、 $9 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $2 \times 10^{10}$ 、 $3 \times 10^{10}$ 、 $4 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $6 \times 10^{10}$ 、 $7 \times 10^{10}$ 、 $8 \times 10^{10}$ 、 $9 \times 10^{10}$ 、 $1 \times 10^{11}$ 、

$2 \times 10^{11}$ 、 $3 \times 10^{11}$ 、 $4 \times 10^{11}$ 、 $5 \times 10^{11}$ 、 $6 \times 10^{11}$ 、 $7 \times 10^{11}$ 、 $8 \times 10^{11}$ 、 $9 \times 10^{11}$ 、 $1 \times 10^{12}$ 、 $2 \times 10^{12}$ 、 $3 \times 10^{12}$ 、 $4 \times 10^{12}$ 、 $5 \times 10^{12}$ 、 $6 \times 10^{12}$ 、 $7 \times 10^{12}$ 、 $8 \times 10^{12}$ 、 $9 \times 10^{12}$ 、 $1 \times 10^{13}$ 、 $2 \times 10^{13}$ 、 $3 \times 10^{13}$ 、 $4 \times 10^{13}$ 、 $5 \times 10^{13}$ 、 $6 \times 10^{13}$ 、 $7 \times 10^{13}$ 、 $8 \times 10^{13}$ 、 $9 \times 10^{13}$ 、 $1 \times 10^{14}$ 、 $2 \times 10^{14}$ 、 $3 \times 10^{14}$ 、 $4 \times 10^{14}$ 、 $5 \times 10^{14}$ 、 $6 \times 10^{14}$ 、 $7 \times 10^{14}$ 、 $8 \times 10^{14}$ 、 $9 \times 10^{14}$ 个拷贝。

[0139] • 靶细胞和宿主细胞

[0140] 在进一步的方面,本发明涉及宿主细胞,其包含如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸或核酸载体。

[0141] 靶细胞和/或宿主细胞可以选自原核细胞或真核细胞。

[0142] 在本发明的范围内,“原核细胞”包括细菌细胞和古细菌细胞。

[0143] 在一些实施方案中,靶细胞和/或宿主细胞是真核细胞。

[0144] 在本发明的范围内,“真核细胞”包括酵母、藻类细胞、植物细胞、动物细胞,优选哺乳动物细胞,更优选人细胞。

[0145] 在一些优选的实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞,优选人细胞。

[0146] 在某些实施方案中,根据本发明的靶细胞和/或宿主细胞可以包括但不限于中枢神经系统的细胞、上皮细胞、肌细胞、胚胎细胞、生殖细胞、干细胞、祖细胞、造血干细胞、造血祖细胞、诱导多能干细胞(iPSC)。

[0147] 在一些特定的实施方案中,靶细胞和/或宿主细胞不是干细胞、祖细胞、生殖细胞或胚胎细胞。

[0148] 在一些实施方案中,靶细胞和/或宿主细胞可以属于选自肌肉组织、神经组织、结缔组织和上皮组织的组织。

[0149] 在一些实施方案中,靶细胞和/或宿主细胞可属于选自膀胱、骨、脑、乳房、中枢神经系统、子宫颈、结肠、子宫内膜、肾、喉、肝、肺、食道、卵巢、胰腺、胸膜、前列腺、直肠、视网膜、唾液腺、皮肤、小肠、软组织、胃、睾丸、甲状腺、子宫、阴道的器官。

[0150] • 用途

[0151] 本发明的另一方面涉及药物组合物,其包含如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体、或递送颗粒和药学上可接受的载体用作药物的用途。

[0152] 一方面,本发明还涉及如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸用于制备或制造药物的用途。

[0153] 另一方面,本发明涉及包含如本文所定义的表达编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体、或递送颗粒和药学上可接受的载体的药物组合物用作将基因组编辑入至少一个靶细胞的活性剂的用途。

[0154] 本发明的另一方面还涉及如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达核酸作为用于将基因组编辑入至少一个靶细胞的活性剂的用途。

[0155] 在某些实施方案中,基因组的编辑可以在体内、体外或离体进行。

[0156] 在一些实施方案中,基因组的编辑可以如Komor等Nature;2016Apr 20;533(7603):420-4的方式进行。

[0157] 在一个实施方案中,靶细胞具有至少一个基因突变。

[0158] 在一些实施方案中,基因突变存在于选自下组的基因中:MTTP;CNGB3;SLC39A4;TRMU;ACOX1;ADA;ABCD1;SAMHD1;MAN2B1;HBA;ATRX;COL4A3;COL4A4;COL4A5;ALMS1;

SLC12A6; ASL; CYP19A1; SLC35A3; ASNS; AGA; TPPA; ATM; SACS; BBS10; BBS1; BBS2, BBS12; CIITA; BSND; GP1BA; HSD3B2; ACAT1; GPR56; BTD; BLM; ASPA; CPS1; CPT1A; CPT2; RAB23; RMRP; SLC6A8; GAMT; CYP27A1; NDRG1; PRPS1; GJB1; VPS13A; CHM; CYBA; CYBB; SLC25A13; ASS1; VPS13B; ACSF3; GFM1; TSFM; PROP1; LHX3; PSAP; CYP17A1; MPL; PMM2; MPI; ALG6; NTRK1; CHRNE; RAPSN; HAX1; VPS45; SLC4A11; CYP11B2; CFTR; CTNS; HSD17B4; LOXHD1; DMD; RTEL1; COL7A1; ADAMTS2; EVC; EMD; NR2E3; ETHE1; GLA; F9; F11; IKBKAP; LDLR; LDLRAP1; ABCC8; KCNJ11; MEFV; FANCA; FANCC; FANCG; FMR1; FH; GALK1; GALT; GBA; SLC12A3; GCDH; ETFA; ETFDH; AMT; GLDC; G6PC; SLC37A4; GAA; AGL; GBE1; PYGM; PFKM; BCS1L; HFE2; TFR2; ALDOB; TECPR2; HPS1; HPS3; HMGCL; HLCS; CBS; MTHFR; MTRR; HYLS1; SLC25A15; EDA; ALPL; GNE; MED17; IVD; TMEM216; RGPPRIP1L; LAMA3; LAMB3; LAMC2; GALC; TGM1; CEP290; RDH12; RPE65; LCA5; CRB1; LRPPRC; GLE1; EIF2B5; CAPN3; DYSF; SGCG; SGCA; SGCB; FKRP; DLD; STAR; LPL; HADHA; SLC7A7; BCKDHA; BCKDHB; MKS1; ACADM; MLC1; ATP7A; ARSA; MCCC1; MCCC2; OPA3; MMAA; MMAB; MUT; MMACHC; VSX2; ACAD9; NDUFAF5; NDUFS6; MPV17; PUS1; GNPTAG; MCOLN1; IDUA; IDS; NAGLU; HGSNAT; GNS; GLB1; HYAL1; ARSB; SUMF1; POMGNT1; TYMP; MTM1; NAGS; NEB; AQP2; NPHS1; NPHS2; CLN3; CLN5; CLN6; CLN8; MFSD8; PPT1; TPP1; SMPD1; NPC1; NPC2; NBN; GJB2; WNT10A; RAG2; DCLRE1C; OAT; OTC; TCIRG1; SLC26A4; PAH; PHGDH; PKHD1; AIRE; VRK1; RARS2; SLC22A5; DNAI1; DNAH5; DNAI2; AGXT; GRHPR; HOGA1; SEPSECS; ABCB11; PCCA; PCCB; CTSK; PDHA1; PDHB; PTS; ATP6V1B1; EYS; CERKL; FAM161A; DHDDS; PEX7; AGPS; ESCO2; SLC17A5; HEXB; SMARCAL1; TH; ALDH3A2; DHCR7; SMN1; MESP2; COL27A1; LIFR; SLC26A2; HEXA; FAH; MY07A; USH1C; CDH23; PCDH15; USH2A; CLRN1; ACADVL; FKTN; ATP7B; LIPA; RS1; IL2RG; PEX1; PEX2; PEX6和PEX10。

[0159] 一方面,本发明涉及包含如本文所定义的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体、或递送颗粒,和药学上可接受的载体的药物组合物用作治疗和/或预防疾病的活性剂的用途。

[0160] 在一些实施方案中,所述疾病选自遗传性疾病、感染性疾病和癌症。

[0161] 在一些实施方案中,所述疾病是遗传性疾病。

[0162] 在某些实施方案中,遗传病症选自非限制性下组:无β脂蛋白血症;色盲;肠病性肢端皮炎;急性婴儿肝功能衰竭;酰基辅酶A氧化酶I缺乏症;腺苷脱氨酶缺乏症;X-连锁肾上腺脑白质营养不良;Aicardi-Goutières综合征;α-甘露糖苷病;α-地中海贫血;α-地中海贫血智力低下综合征;Alport综合征;Alstrom综合征;Andermann综合征;精氨酸琥珀酸尿症;芳香酶缺乏症;关节挛缩、智力低下和癫痫发作;天冬酰胺合成酶缺乏症;天冬氨酰氨基葡萄糖尿症;共济失调伴孤立的维生素E缺乏症;共济失调-毛细血管扩张症;Charlevoix-Saguenay的常染色体隐性痉挛性共济失调;Bardet-Biedl综合征;Bardet-Biedl综合征;II型裸露淋巴细胞综合征;4A型Bartter综合征;A1型Bernard-Soulier综合征;β-珠蛋白相关的血红蛋白病;3-β-羟基类固醇脱氢酶II型缺乏症;β-酮硫磷脂酶缺乏症;双侧额顶多小脑回畸形;生物素酶缺乏症;布卢姆综合征;Canavan病;氨基甲酰磷酸合成酶I缺乏症;肉碱棕榈酰转移酶IA缺乏症;肉碱棕榈酰转移酶II缺乏症;Carpenter综合征;软骨-头发发育不全;脑肌酸缺乏症1;脑肌酸缺乏症2;脑膜黄瘤病;4D型Charcot-Marie-Tooth病;5型Charcot-Marie-Tooth病/Arts综合征;X连锁Charcot-Marie-Tooth病;舞蹈性棘红细胞症;无脉络膜症;慢性肉芽肿病;慢性肉芽肿病;Citrin缺乏症;1型瓜氨酸血症;Cohen综合征;

丙二酸联合甲基丙二酸尿症;联合氧化磷酸化缺陷1型;联合氧化磷酸化缺陷3型;联合垂体激素缺乏症2型;联合垂体激素缺乏症3型;联合SAP缺乏症;17- $\alpha$ -羟化酶缺乏引起的先天性肾上腺皮质增生症;先天性巨核细胞性血小板减少症;Ia型先天性糖基化失调;Ib型先天性糖基化失调;Ic型先天性糖基化失调;先天性无痛无汗症;先天性肌无力综合征;先天性肌无力综合征;先天性中性粒细胞减少症;先天性中性粒细胞减少症;角膜营养不良和感知性耳聋;皮质酮甲氧肟酶缺乏症;囊性纤维化;胱氨酸病;D-双功能蛋白质缺乏症;77型常染色体隐性耳聋;Duchenne肌营养不良/Becker肌营养不良;先天性角化不良;营养不良性大疱性表皮松解症;VIIC型Ehlers-Danlos综合征;Ellis-van Creveld综合征;Emery-Dreifuss肌病1型;增强的S-Cone综合征;乙基丙二酸脑病;法布里病;第IX因子缺乏症;第XI因子缺乏症;家族性自主神经病;家族性高胆固醇血症;常染色体隐性遗传的家族性高胆固醇血症;家族性高胰岛素血症;家族性地中海热;A类范可尼贫血;C类范可尼贫血;G类范可尼贫血;脆性X综合征;富马酸缺乏症;半乳糖激酶缺乏症;半乳糖血症;戈谢病;吉特曼综合征;I型戊二酸血症;IIa型谷氨酸血症;IIc型谷氨酸血症;甘氨酸脑病;甘氨酸脑病;Ia型糖原贮积病;Ib型糖原贮积病;II型糖原贮积病;III型糖原贮积病;IV型糖原贮积病/成人聚葡萄糖体病;V型糖原贮积病;VII型糖原贮积病;GRACILE综合征和其他BCS1L相关疾病;2A型血色素沉着症;3型血色素沉着症;遗传性果糖不耐受;遗传性痉挛性截瘫49型;1型Hermansky-Pudlak综合征;3型Hermansky-Pudlak综合征;HMG-CoA裂解酶缺乏症;全羧化酶合成酶缺乏症;高胱氨酸尿症;MTHFR缺乏引起的高胱氨酸尿症;cb1E型高胱氨酸尿症;Hydrocephalus综合征;高鸟氨酸血症-高氨血症-同型瓜氨酸尿症综合征;低氧性外胚层发育不良1型;低磷酸酯酶症;包涵体肌病2型;婴儿脑和小脑萎缩;异戊酸血症;Joubert综合征2;Joubert综合征7/Meckel综合征5/COACH综合征;交界性大疱性表皮松解症;交界性大疱性表皮松解症;交界性大疱性表皮松解症;Krabbe病;1型层状鱼鳞癣;Leber先天性黑蒙10及其他CEP290相关纤毛虫病;Leber先天性黑蒙13;Leber先天性黑蒙2/视网膜色素变性20;Leber先天性黑蒙5;Leber先天性黑蒙8/视网膜色素变性12/色素性静脉曲张性脉络膜视网膜萎缩症;法国-加拿大型Leigh综合征;致死性先天性挛缩综合征1/致死性关节炎伴前角细胞病;白质脑病伴白质消失;2A型肢带型肌营养不良症;2B型肢带型肌营养不良症;2C型肢带型肌营养不良症;2D型肢带型肌营养不良症;2E型肢带型肌营养不良症;2I型肢带型肌营养不良症;硫辛酰胺脱氢酶缺乏症;脂质肾上腺增生;脂蛋白脂肪酶缺乏症;长链3-羟基酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;赖氨酸尿性蛋白质不耐受;1a型枫糖尿病;1b型枫糖尿病;Meckel综合征1/Bardet-Biedl综合征13;中链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;伴皮质下囊肿的巨脑白质脑病;Menkes病;异染性脑白质营养不良;3-甲基巴豆酰辅酶A羧化酶缺乏症;3-甲基巴豆酰辅酶A羧化酶缺乏症;III型3-戊二酸尿症/视神经萎缩3伴白内障;甲基丙二酸血症;甲基丙二酸血症;钴胺素C型甲基丙二酸尿症和高胱氨酸尿症;眼球营养不良/无眼畸形;线粒体复合物I缺乏症;线粒体复合物I缺乏症;线粒体复合物I缺乏症;线粒体DNA消费综合征6/Navajo神经性肝病;线粒体肌病和铁粒细胞性贫血1;黏脂贮积症II/IIIA;黏脂贮积症III $\gamma$ ;黏脂贮积症IV;I型粘多糖贮积症;II型粘多糖贮积症;IIIB型粘多糖贮积症;IIIC型粘多糖贮积症;IIID型粘多糖贮积症;IVb型粘多糖贮积症/GM1型神经节苷脂病;IX型粘多糖贮积症;VI型粘多糖贮积症;多重硫酸酯酶缺乏症;肌肉-眼-脑疾病和其他POMGNT1相关的先天性肌营养不良症-肌肉萎缩症;肌肉萎缩性脑病;肌管肌病1;N-乙

酰谷氨酸合成酶缺乏症;Nemaline肌病2;II型肾性尿崩症;肾病综合征/先天性芬兰肾病;肾病综合征/类固醇抗性肾病综合征;神经元蜡样脂褐质沉积症;神经元蜡样脂褐质沉积症;A/B型Niemann-Pick病;C型Niemann-Pick病;Nijmegen断裂综合征;非综合征性听力丧失;牙-甲-皮肤发育不良综合征/Schopf-Schulz-Passarge综合征;Omenn综合征;Omenn综合征/Athabaskan型严重联合免疫缺陷病;鸟氨酸氨基转移酶缺乏症;鸟氨酸转铁蛋白酶缺乏症;骨质疏松症1;Pendred综合征;苯丙氨酸羟化酶缺乏症;3-磷酸甘油酸脱氢酶缺乏症;常染色体隐性多囊肾病;1型多腺体自身免疫综合征;1A型脑桥小脑发育不良;6型脑桥小脑发育不良;原发性肉碱缺乏症;原发性睫状运动障碍;1型原发性高草酸尿症;2型原发性高草酸尿症;3型原发性高草酸尿症;进行性小脑-大脑萎缩;2型进行性家族性肝内胆汁淤积症;丙酸血症;丙酸血症;致密性成骨不全症;丙酮酸脱氢酶E1- $\alpha$ 缺乏症;丙酮酸脱氢酶E1- $\beta$ 缺乏症;6-丙酮酰-四氢蝶呤合成酶缺乏症;肾小管酸中毒和耳聋;色素性视网膜炎25;色素性视网膜炎26;色素性视网膜炎28;色素性视网膜炎59;1型点状根状软骨发育不良;3型点状根状软骨发育不良;Roberts综合征;Salla病;Sandhoff病;Schimke型免疫-骨发育不良;Segawa综合征;Sjogren-Larsson综合征;Smith-Lemli-Opitz综合征;脊髓性肌萎缩症;脊柱胸椎骨发育不全;Steel综合征;Stuve-Wiedemann综合征;硫酸盐转运蛋白相关的骨软骨发育不良;Tay-Sachs病;I型酪氨酸血症;IB型Usher综合征;IC型Usher综合征;ID型Usher综合征;IF型Usher综合征;IIA型Usher综合征;III型Usher综合征;非常长链酰基辅酶A脱氢酶缺乏症;Walker-Warburg综合征和其他FKTN相关的营养不良症;威尔森病;Wolman/胆固醇酯贮积病;X-连锁青年性视网膜劈裂症;X连锁严重联合免疫缺陷和Zellweger综合征谱。

[0163] 在一些实施方式中,所述疾病是感染性疾病。

[0164] 在某些实施方案中,所述感染性疾病选自非限制性的下组:边虫病;炭疽病;巴贝斯虫病;肉毒杆菌中毒;布氏杆菌病;鼻疽伯克霍尔德氏菌感染(鼻疽病);类鼻疽伯克霍尔德菌感染(类鼻疽病);弯曲菌病;耐碳青霉烯的肠杆菌科感染(CRE);软下疳;基孔肯雅热感染;衣原体感染;鱼肉毒;艰难梭菌感染;产气荚膜梭菌感染( $\epsilon$ 毒素);球孢子菌病真菌感染(谷热);Creutzfeldt-Jacob病,传染性海绵体(CJD);隐孢子虫病;环孢子虫病;登革热;白喉;大肠杆菌感染;东部马脑炎(EEE);埃博拉出血热(埃博拉病毒);埃立克体病;虫媒病毒或副神经性脑炎;非脊髓灰质炎肠道病毒感染;D68肠道病毒感染(EV-D68);贾第虫病;淋球菌感染(淋病);肉芽肿;B型流感嗜血杆菌病(Hib或H-flu);汉坦病毒肺综合征(HPS);溶血性尿毒症综合征(HUS);甲肝(Hep A);乙肝(Hep B);丙肝(Hep C);丁肝(Hep D);戊肝(Hep E);疱疹;带状疱疹,带状疱疹VZV(带状疱疹);组织胞浆菌病;人体免疫缺陷病毒/艾滋病(HIV/AIDS);人乳头瘤病毒(HPV);流感(Flu);铅中毒;军团病(军团菌病);麻风病(汉森病);钩端螺旋体病;李氏杆菌病;莱姆病;性病淋巴肉芽肿(LVG);疟疾;麻疹;病毒性脑膜炎;脑膜炎球菌病;中东呼吸综合征冠状病毒(MERS-CoV);腮腺炎;诺如病毒;麻痹性贝类中毒;虱病(虱子、头虱和体虱);盆腔炎(PID);百日咳;淋巴腺鼠疫、败血性鼠疫或肺炎鼠疫;肺炎球菌病;脊髓灰质炎(Polio);鹦鹉热;虱病(蟹;阴虱感染);脓疱性皮疹病(小痘、猴痘、牛痘);Q-发热;狂犬病;蓖麻毒素中毒;立克次体病(落基山斑疹热);风疹,包括先天性风疹(德国麻疹);沙门氏菌病胃肠炎感染;疥疮感染;鲭鱼毒素;严重急性呼吸道综合征(SARS);志贺氏菌胃肠炎感染;天花;耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染(MRSA);葡萄球菌食物中毒;

万古霉素中间体葡萄球菌感染(VISA)；万古霉素耐药金黄色葡萄球菌感染(VRSA)；A类链球菌病；B类链球菌病；链球菌中毒性休克综合征(STSS)；原发性、继发性、早期潜伏性、晚期潜伏性或先天性梅毒；破伤风感染(Lock Jaw)；毛发病；结核病(TB)；潜伏性结核病(LTBI)；兔热症(兔热)；D类伤寒；斑疹伤寒；阴道病；水痘(水痘)；霍乱弧菌感染(霍乱)；弧菌病(弧菌)；病毒性出血热(埃博拉、拉萨、马尔堡)；西尼罗河病毒感染；黄热病；耶尔森氏菌感染和寨卡病毒感染。

[0165] 在一些实施方式中，所述疾病是癌症。

[0166] 在一些实施方案中，癌症选自非限制性的下组：膀胱癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、中枢神经系统癌、宫颈癌、上消化道癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、生殖细胞癌、胶质母细胞瘤、霍奇金淋巴瘤、肾癌、喉癌、白血病、肝癌、肺癌、骨髓瘤、肾母细胞瘤(Wilms肿瘤)、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、胸膜癌、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、皮肤癌(包括黑色素瘤)、小肠癌、软组织肉瘤、胃癌、睾丸癌和甲状腺癌。

[0167] 在一些实施方案中，本领域技术人员可以理解，离体操作和/或治疗可以包括在本发明的范围内，其包括来自不同物种的干细胞和祖细胞、造血干细胞和祖细胞、诱导的多能干细胞(iPSC)和成人细胞。不希望受理论束缚，发明人认为当技术人员进行再生医学时，这是特别感兴趣的。

[0168] 在某些实施方案中，本发明包括的核酸和核酸载体可用于工程化动物或植物模型，例如，用于临床前研究的动物模型，但要牢记基本的道德原则。

[0169] • 方法

[0170] 本文公开的方法可以体外、体内或离体实现。

[0171] 本发明的另一方面涉及将基因组编辑入至少一个靶细胞的方法，所述方法至少包括向有需要的个体施用如本文所定义的药物组合物的步骤。

[0172] 在一个方面，本发明涉及预防和/或治疗疾病的方法，其包括至少向有需要的个体施用如本文所定义的药物组合物的步骤。

[0173] 在一些实施方案中，上述方法进一步包括向个体提供缺乏至少一种必需氨基酸的饮食的步骤，所述必需氨基酸是尤其选自以下氨基酸：组氨酸(His,H)、异亮氨酸(Ile,I)、亮氨酸(Leu,L)、赖氨酸(Lys,K)、甲硫氨酸(Met,M)、苯丙氨酸(Phe,F)、苏氨酸(Thr,T)、色氨酸(Trp,W)和缬氨酸(Val,V)。

[0174] 在某些实施方案中，上述方法可选地包括施用已知激活调节性多核苷酸所包含的AARE核酸的化合物的步骤，特别是选自卤夫酮、衣霉素等的化合物。

[0175] 在一些实施方案中，所述疾病选自遗传性疾病、感染性疾病和癌症。

[0176] 在一些实施方案中，药物组合物可以通过任何途径向有需要的个体施用，即通过口服施用、局部施用或肠胃外施用，例如通过注射，包括皮下施用、静脉施用、动脉施用、肌内施用、眼内施用和耳内施用。

[0177] 其他施用方式采用肺部制剂、栓剂和透皮应用。

[0178] 在一些实施方案中，根据本发明的口服制剂包括常用的赋形剂，例如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。

[0179] 在一些实施方案中，向有需要的所述个体施用有效量的所述化合物。

[0180] 在本发明的范围内，“有效量”是指单独刺激期望结果(即减轻或消除所涵盖的疾

病,特别是遗传性疾病的症状)的所述化合物的量。

[0181] 本领域技术人员已知确定如本文所定义的药物组合物中所包含的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸、或核酸载体或递送颗粒的有效量以观察期望结果。

[0182] 在本发明的范围内,待施用的化合物的有效量可以由医师或本领域授权的技术人员确定,并且可以在治疗进程中适当地调整。

[0183] 在某些实施方案中,待施用的有效量可取决于各种参数,包括选择用于施用的材料、施用是单剂量还是多剂量、以及个体的参数,包括年龄、身体条件、尺寸、体重、性别、以及待治疗疾病的严重程度。

[0184] 本发明的另一方面还涉及将基因组编辑入至少一个靶细胞的方法,包括以下步骤:

[0185] -向靶细胞提供

[0186] o如本文所公开的用于编码Cas核酸酶的核酸的受控表达的核酸;

[0187] o向导DNA或RNA,其对于待编辑的基因组靶核酸具有特异性;

[0188] o供体核酸,包含旨在取代靶基因组核酸的核酸;

[0189] -诱导Cas核酸酶的表达。

[0190] 一旦诱导Cas核酸酶,Cas核酸酶将在向导DNA或RNA的帮助下并在供体核酸上促进基因组靶核酸中的单链或双链断裂。随后,来自供体核酸的核酸可以整合到基因组中以代替基因组靶核酸。

[0191] 在一些实施方案中,可以通过向靶细胞提供缺乏至少一种必需氨基酸的培养基或包含卤夫酮和/或衣霉素的培养基来诱导Cas核酸酶的表达。

[0192] 在一些实施方案中,靶核酸具有基因突变。

[0193] • 试剂盒

[0194] 在进一步的方面,本发明涉及用于治疗和/或预防疾病的试剂盒,其包括:

[0195] -如本文所定义的药物组合物,和

[0196] -药学活性化合物。

[0197] 在一些实施方案中,所述疾病选自遗传性疾病、感染性疾病和癌症。

[0198] 在本发明的范围内,表述“药学活性化合物”意指具有预防和/或治疗给定疾病的益处的化合物。

[0199] 技术人员理解术语“益处”是指具有减轻或缓解与给定疾病相关的至少一种症状的积极效果。本领域技术人员还理解“益处”可以减慢或停止给定疾病的进展。

[0200] 在一些实施方案中,药学活性化合物是抗微生物化合物,其可由本领域技术人员从通常用于对抗传染性疾病,特别是细菌、真菌或病毒感染的化合物中适当选择。

[0201] 在某些实施方案中,抗微生物化合物是选自下组的抗生素:青霉素,特别是青霉素和阿莫西林;碳青霉烯,特别是亚胺培南;头孢菌素,特别是头孢氨苄;氨基糖苷,特别是庆大霉素和妥布霉素;四环素,特别是四环素和强力霉素;大环内酯,特别是红霉素和克拉霉素;喹诺酮,特别是环丙沙星和左氧氟沙星;和磺酰胺,特别是磺胺甲噁唑和磺胺甲恶唑。

[0202] 在某些实施方案中,抗微生物化合物是选自非限制性下组的抗病毒剂:神经氨酸酶抑制剂;鸟嘌呤的核苷类似物;胸苷的核苷类似物;核苷酸逆转录酶抑制剂;和蛋白酶抑制剂。

[0203] 在一些实施方案中,药学活性化合物是抗癌化合物,其可由本领域技术人员从化疗常用的化合物中适当选择。

[0204] 在某些实施方案中,抗癌化合物可选自下组:烷化剂、嘌呤类似物、嘧啶类似物、蒽环霉素、博来霉素、丝裂霉素、拓扑异构酶1抑制剂、拓扑异构酶2抑制剂、taxan、单克隆抗体、细胞因子、蛋白激酶抑制剂等。

## 具体实施方案

[0205] 实施例1:通过必需氨基酸饥饿诱导CAS9表达

[0206] 图1说明GCN2-eIF2 $\alpha$ -ATF4信号通路。为响应EAA饥饿,活化的GCN2使eIF2 $\alpha$ 磷酸化,导致转录因子ATF4的上调及其向AARE序列的募集以诱导靶基因表达。

[0207] 图2说明在Tk最小启动子调节下构建编码Cas核酸酶的核酸和来自Trb3的六个拷贝的AARE核酸(黑点)的总体策略。

[0208] 为了说明CAS9d活性,使用衍生自携带单拷贝GFP转基因的HEK 293T细胞的细胞模型(293T<sup>GFP</sup>细胞系)。

[0209] 该细胞系与2种不同的慢病毒载体共转导。

[0210] 第一个载体表达置于2X AARE-TK调节启动子(SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7)控制下的FLAG标记的CAS9形式(Shen等Cell Res.2013 Apr 2.doi:10.1038/cr.2013.46;SEQ ID NO:8)。

[0211] 第二个载体表达在U6启动子(一种RNA聚合酶III启动子)控制下特异性靶向GFP报告基因(gRNA<sup>GFP</sup>)的向导RNA(Ma,H等.Mol Ther Nucleic Acids 2014 doi:10.1038/mtna.2014.12)。

[0212] 两种慢病毒载体均已在pTRIP慢病毒骨架中构建(Zennou等,2000;Cell 101,173-185)。

[0213] pTrip-2XAARE-NLS-FLAG-CAS9质粒的核酸(SEQ ID NO:9)如图3所示。

[0214] 作为对照,制备在EF1a遍在性启动子控制下表达FLAG-CAS9的第三个慢病毒载体。

[0215] 在培养基中扩增转导的细胞。在不存在诱导的情况下,裂解2XAARE-CAS9细胞和EF1a-CAS9细胞,并通过定量RT PCR来监测CAS9的表达,然后通过Western印迹检测FLAG标签来监测CAS9蛋白表达的量。在这种情况下,仅检测并定量遍在表达的CA9。

[0216] 接下来,将转导的细胞置于耗尽Leu或Thr的特定培养基中培养。在mRNA和蛋白质水平上随时间监测2XAARE-CAS9细胞中CAS9表达的诱导。由此确定最佳处理期。

[0217] 最后,当293T<sup>GFP</sup>细胞同时表达CAS9和gRNA<sup>GFP</sup>时,这些细胞中GFP的表达降低,因此通过流式细胞术测量的GFP阳性细胞的百分比是说明CAS9敲除GFP表达的效率的准确手段。

[0218] 因此,在没有氨基酸饥饿的情况下,FLAG-CAS9转导的293T<sup>GFP</sup>细胞中GFP阳性细胞的百分比在培养物中保持恒定。在用缺少AA的培养基在培养中最佳诱导后,GFP细胞的百分比显著降低。将总体功效与用EF1a-CAS9转导的细胞中CAS9的连续表达进行比较。

[0219] 实施例2:通过必需氨基酸饥饿诱导CAS9表达

[0220] 启动子2xAARE包含转录因子ATF4的6个结合序列,其在必需氨基酸(EAA)饥饿,或其他细胞应激如通过衣霉素(Tu)诱导内质网的应激的条件下快速诱导。

[0221] 为了评估细菌核酸酶Cas9的表达是否可以由启动子2xAARE调节,将与flag标签、

自动催化P2A肽和红色荧光蛋白(RFP)融合的化脓性链球菌的Cas9基因(spCas9)克隆到包含4个ATF4结合位点的2xAARE增强子和源自单纯疱疹病毒(HSV;图4)的胸苷激酶基因(TKm)的最小启动子的控制下。

[0222] 这种HIV衍生的慢病毒载体允许抗性基因杀稻瘟素的稳定表达,以选择载体的整合事件。第二个盒包含U6启动子和向导RNA AAVS1 (SEQ ID NO:10) 和CRISPR相关的RNA支架,允许在人基因PPP1R12C的ATG下切割。第三表达盒包含在启动子2xAARE-TKm控制下的基因spCas9-flag-RFP。

[0223] 根据293T细胞中载体质粒、+编码VSV包膜的质粒(pVSV)、+编码HIV Rev基因的质粒(pRev)、+编码HIV的Gag和Pol基因的质粒(p8.9)的共转染的标准方案,用该质粒产生慢病毒颗粒。48小时后,收获细胞上清液,超离心浓缩并储存在-80℃直至使用。用实时定量PCR滴定载体储液以测量病毒RNA的基因组拷贝/ml (Saeed等; Mol Ther Nucleic Acids. 2014 Dec 2;3:e213)。

[0224] 为了评估spCas9-flag-RFP的表达是否可以通过EAA饥饿(不含亮氨酸Leu-的培养基)或衣霉素(Sigma-Aldrich®)来调节,将293T细胞用100vRNAc/细胞转导,然后用2μg/ml杀稻瘟素(Sigma-Aldrich®)选择。未转导的293T细胞全部死亡,而转导细胞正常生长,表明它们都包含至少一个拷贝的载体pTRIP blast\_U6 AAVS1\_2xAARE-Cas9-flag-RFP。

[0225] 将称为293-C9的该群体扩增并用于进一步的实验。将细胞铺板于24孔板(105个细胞/孔)中,用含有10%血清且不含亮氨酸的培养基(DMEM Leu-)、含有0.5μg/ml衣霉素的培养基(DMEM完全+Tu)或对照培养基(DMEM完全)诱导Cas9-flag-RFP基因的表达。

[0226] 在诱导之后的几个时间(4h、8h、24h)以及在去除诱导培养基并用完全培养基替换它之后24h(即诱导后48h)和48h(即诱导后72h)之后,收集细胞。将在不同时间点收集的细胞沉淀并裂解用于蛋白质纯化(Tris-HCl 0.05M; SDS 0.5%; 1mM DTT; pH 8.0, 含有抗蛋白酶)。

[0227] 使用Bradford测试测量蛋白质浓度,并将30μg裂解物与上样缓冲液和β-巯基乙醇混合,在95℃下加热5分钟,然后将其上样到变性SDS 10%聚丙烯酰胺凝胶上。用电泳分离蛋白质。用有色梯子监测迁移。

[0228] 通过半干转移将凝胶上的蛋白质转移到硝酸纤维素膜上,并使用抗-FLAG M2 MAB (Sigma-Aldrich®)对膜进行免疫印迹,然后用偶联HRP的二抗小鼠抗体检测。用化学发光HRP底物(Luminata crescendo-Millipore®)显示过氧化物酶活性,并用化学发光检测器Fusion FX7( Vilber®)拍照。

[0229] 使用Fusion FX7检测器(Vilber®)的软件定量检测到的193kDa的SPCas9-Flag-RFP条带的密度。还以相同方式但使用抗-β肌动蛋白一抗测量每个样品中β-肌动蛋白的水平。将对应于Cas9-flag-RFP的条带的密度用β-肌动蛋白的密度标准化。由于这些实验在不同的凝胶上进行并且为了使数据均匀化,认为最高密度的条带(在两种情况下均是诱导24h后)是100%的表达,而较低密度的其他条带的值比较为每种凝胶中最强烈参考的百分比。

[0230] 从图5中可以看出,在2xAARE-Tkm的非诱导基础表达水平下,Cas9-flag-RFP融合

体仍然不可检测。然而,在将Leu-培养基加入细胞(实线)或加入含有Tu的完全培养基(虚线)后,迅速诱导融合体的表达。去除诱导培养基(24h)并用完全培养基替换后,蛋白质Cas9-flag-RFP的表达逐渐降低(参见48h和72h)。这表明启动子2xAARE-Tkm允许通过EAA饥饿或通过诱导ER应激来控制Cas9表达。为了评估蛋白质Cas9-flag-RFP的诱导是否允许在基因组中的AAVS1基因组位置切割(即,进行双链断裂),将293-C9细胞用DMEM完全培养基或DMEM Leu-培养24h。24h后将细胞收获、沉淀并使用DNA easy试剂盒(Quiagen)纯化基因组DNA。用在AAVS1切割位点的5'(SEQ ID N0:11)和3'(SEQ ID N0:12)上杂交的引物进行PCR。纯化并测序540bp的PCR产物,确认其为目标产物。

[0231] 为了进一步评估Cas9是否已经切割,我们进行了T7核酸酶测试(New England Biolabs®)。将从未经诱导和诱导的293-C9的纯化基因组DNA扩增AAVS1条带的PCR变性并按照提供者的指南缓慢再杂交(<https://www.neb.com/protocols/2014/08/11/determining-genome-targeting-efficiency-using-t7-endonuclease-i>)。

[0232] Cas9诱导的双链断裂由细胞机制修复并在切割位点产生插入和缺失(indel),因此从含有不同indel混合物的细胞群获得的PCR条带的再杂交产生包含错配的DNA片段。这些被T7核酸酶切割,释放较小的DNA带。

[0233] 可以观察到,在293-C9细胞中用DMEM Leu-诱导Cas9-flag-RFP表达24h产生250bp的较小条带,其对应于位于PCR条带中心的切割位点AAVS1(占总DNA的约20%)。在非诱导的293-C9细胞中,这样的条带不明显,表明AAVS1位点保持未切割直至基因Cas9-flag-RFP被诱导。

[0234] 因此,如本文所公开的,在模式ON/OFF上用于Cas9受控表达的系统提供了用于安全编辑基因组的工具。实际上,在不存在诱导的情况下,没有表达系统的任何可检测的渗漏提供了用于防止任何不需要的基因组编辑的安全特征。

[0235] 相反,在存在诱导的情况下,一旦诱导的去除有效,就可以关闭快速表达。

[0236] 然后进行两个功能测试以将供体DNA(Do)整合入AAVS1位点。

[0237] 在第一个测试中,用质粒‘pTRIP blast\_U6 AAVS1\_2xAARE-Cas9-flag-RFP’以及含有盒‘AAVS1 cut site-GFP-p2a-嘌呤霉素\_AAVS1切割位点’的供体质粒转染293T细胞(Ca<sup>2+</sup>磷酸盐法),接受在GFP-p2a-嘌呤霉素基因的5'和3'上用Cas9+gRNA AAVS1切割。

[0238] 在293T细胞的基因组中由向导RNA靶向的所选AAVS1位点包括基因PPP1R12C的ATG起始密码子。当靶向时,它将允许释放的GFP-p2a-嘌呤霉素盒插入PPP1R12C的外显子1的位置,随后通过PPP1R12C启动子表达。在这种情况下,重组细胞表达GFP并对嘌呤霉素产生抗性,允许选择它们并计数对应于整合事件的克隆。

[0239] 如图6所示,仅在质粒‘pTRIP blast\_U6 AAVS1\_2xAARE-Cas9-flag-RFP’(C9)和供体‘pAAVS1 cut site-GFP-p2a-嘌呤霉素\_AAVS1切割位点’(Do)两者与2xAARE一起提供时,供体构建体才产生嘌呤霉素抗性克隆,所述2xAARE(i)用缺乏亮氨酸的培养基(i Leu-)或含有衣霉素的培养基(i Tu)诱导,但不用完全培养基(ni)诱导。这表明用于靶向整合的Cas9活性需要诱导启动子2xAARE。

[0240] 在用含有侧翼为2个AAVS1切割位点(Do)的-GFP-p2a-嘌呤霉素的供体质粒转染的293-C9细胞中重复该实验。在这种质粒中,pAAVS1引导的Cas9活性将释放GFP-p2a-嘌呤霉素序列。

[0241] 从图5可以看出,当用供体质粒(Do)转染293-C9细胞时,在不存在诱导(ni)的情况下没有产生嘌呤霉素抗性克隆。相反,当用供体质粒(Do)转染293-C9细胞并在衣霉素或缺乏亮氨酸的培养基存在下诱导时,这些细胞在两种条件下都产生嘌呤霉素抗性克隆。

[0242] 这进一步证实,当诱导Cas9表达时,当被引导至AAVS1切割位点时,Cas9核酸酶在以下两种情况下均有效产生双链断裂:(1)在供体质粒中产生双链断裂,导致释放供体盒,和(2)在基因组DNA的AAVS1位点中产生双链断裂,导致整合供体盒。

[0243] 上述实施例提供了令人信服的实验数据,表明可以通过诱导条件精细调节用于Cas9核酸酶受控表达的系统,该表达基于AARE。

[0244] 实际上,在没有诱导的情况下,没有观察到可检测的表达,这表明没有观察到渗漏。

[0245] 另外,基因组编辑仅在诱导时可以观察到,并且可以在去除诱导条件后快速关闭。

[0246] 因此,由于该系统可以非常精确地打开和关闭,因此该系统提供了一种用于在有需要的个体中提供基因组编辑并因此提供基因治疗的安全工具。

[0247] 本发明中公开的核酸序列

[0248] 下表1公开了本文使用的核酸序列:

SEQ ID No:	类型	备注
1	核酸	来自 TRIB3 基因的 AARE 序列
2	核酸	来自 CHOP 基因的 AARE 序列
3	核酸	来自 ASNS 基因的 AARE 序列
4	核酸	来自 ATF3 基因的 AARE 序列
5	核酸	来自 SNAT2 基因的 AARE 序列
6	核酸	胸苷激酶最小启动子核酸
7	核酸	2XAARE 核酸
8	核酸	NLS-FLAG CAS9 核酸
9	核酸	pTRIP 2XAARE- NLS-FLAG CAS9 核酸
10	核酸	guide RNA AAVS1
11	核酸	5'引物
12	核酸	3'引物

[0251] 来自TRIB3基因的AARE序列:SEQ ID NO:1

[0252] cggttgcatcacccg

[0253] 来自CHOP基因的AARE序列:SEQ ID NO:2

[0254] aacattgcatcatccc

[0255] 来自ASNS基因的AARE序列:SEQ ID NO:3

[0256] gaagttcatcatgcc

[0257] 来自ATF3基因的AARE序列:SEQ ID NO:4

[0258] agcgttgcaccccc  
[0259] 来自SNAT2基因的AARE序列:SEQ ID NO:5  
[0260] gatattgcatacgattt  
[0261] 胸苷激酶最小启动子核酸:SEQ ID NO:6  
[0262] cgaggtccacttcgcataattaaggtaacgcgtgtggctcgaaacaccgagcgaccctgcagcgaccgg  
cttaacagcgtcaacagcgtgccgca  
[0263] 2XAARE核酸:SEQ ID NO:7  
[0264] gattagctccggtttgcatacccgaccggggccggcgtcttagcgatccggtttgcatacccgaccgggg  
ttagctccggtttgcatacccgaccggggccggcgtcttagcgatccggtttgcatacccgaccgggg  
cggggattagctccggtttgcatacccgaccggggattagctccggtttgcatacccgaccgggg  
[0265] NLS-FLAG CAS9核酸:SEQ ID NO:8  
[0266] atgggacctaagaaaaagaggaaggtgcctaagaaaaagaggaaggtgcctaagaaaaagaggaaggt  
ggcgccgctgactacaaggatgacgacgataatctagagacaagaataactctattggactggatatcgac  
aactccgttgctggccgtcataaccgacgactataagggtccaaagcaagaattcaaggtgctggtaatact  
accgcattcaatcaagaagaacctgatcggagcactcctttcgactccggtaaaaccgctgaagctactcg  
gaagcggaccgcaaggcggagatacaccggcaagaatcgatgttatctgaagagatcttagcaacgaa  
atggctaaggtggacgactcctttcaccgcgtggaaagagagatgttatctgaagagatcttagcaacgaa  
ggcacccatatattcgaaatatcgatgaggtggcttaccatgaaaagtatcctacaatctaccatctg  
gaagctggtgacagcaccgataaagcagacactgaggctcatctggccctggctcatatgataaagttag  
ggacactttctgatcgagggcgacactgaatcccataattccgatgtggataaactcttattcaact  
actggcagaatcgacgactggagaatctgatgtggccactgcccactgcccacttgcataactggc  
catataaccaactgtcgaggagaatcccataaacgcctctggatggatgccaaggctattctgc  
gtccaaagtacgcacactggagaatctgatgtggccactgcccacttgcataactggc  
atgccttgcgtggccctgacacacttcaagtcataacttgcataactggc  
tgctaagaatctccgacgccattctgctgagcgacataactccggtaacactg  
agcgcctccatgataaaacgctatgatgaacaccatcaagacactgactctg  
ctgccaaggccatgtggatgaggcaacttgcgtggatgaccaggatct  
tgccatgtggatgaccaggatcttgcgtggatgaccaggatct  
gacccatgtggatcccttattacgtcgccctctggcttagaggcaact  
gaggagacaattactcccttggaaacttgcataagaggctgtggata  
tgaccaatttcgataagaacactgcccacgcgagaaggccctg  
ctataacgagctgactaaagtgaagtgacgtgaccgaggcat  
aaggctatcgatctgttcaagactaatagaaggtaac  
agatcgaatgctttgactcagtgaaatcttgcgtggaggacc  
tctgctgaagataatcaaagacaatggcttgcataat  
accctgactctgtcgaggatagagagatgt  
tcatgaaacagctcaagcggccgctacactgggtgggtagact  
ctccaggaaactcataaacggcatccgcga

caaacagagcggaaagaccatcctggatttcctgaaatccgacggattcgctaacaggaacttcatgcaactgatt  
 cacatgactctctgacattaaagaggacatccagaaggcacaggtgagcggtaaggcgacagccctgcacgac  
 acatcgccaacctcgctggatcacccgcataaagaaggaaatactgcagacagtcaaggtcgacgaaactcg  
 caaagtatgggtcgacacaagccagagaatatcgttatcgaaatggcaagggagaaccaaaccaccagaaggc  
 cagaagaactctcggaacggatgaaaagaatcgaagaggaaattaaggagctggatctcagatactgaaggac  
 accctgtggagaatacacagctccagaacgagaaactctacctgtactaccctcagaacggcggacatgtacgt  
 tgaccaggaactcgacatcaaccggctgtccgattatgacgtggaccatattgttccacagtccctcaaagat  
 gactccattgacaacaagggtctgaccagatccgataagaatcgcggttaagtctgacaatgttccatcagaagagg  
 tggtaagaagatgaagaattactggcggcagctcctaacfccaaactgtatcaccacggaaatgttgcgaaacacgc  
 gactaaggcagaaagaggaggtctgagcgaactcgacaaggccggcttattaagaggcaactggtcgaaacacgc  
 cagattaccaaacacgtggcacaatcctcgactcttaggatgaacactaagtacgtgagaacgataagctgatca  
 gggaaagtgaaagtgataactctgaagagcaagctgggtctgacttccggaaggacttcaatttacaagttcg  
 cgaaataaacaattaccatcatgctcacgatgcctatctcaatgctgtcgaccgcctgatcaagaataac  
 cctaaactggagtctgagttcggtacggactataagtctacgatgtgaggaagatgatgacaaagtctgagc  
 aagagattggcaaagccaccgccaagtaacttctactctaatacatgatgaaattttaaagactgagataaccct  
 ggctaacggcgaatccggaagcggccactgatcgaaacaaacggagaaacaggagaatcgtgtggataaaggc  
 agggacttcgcaactgtcggtacggactgtccatgccacaagtcataatcgtgaaagaccgaaatgcgacaccg  
 gcggattctcaaaggagagcatcgtccaaagcggactctgacaagctgatgcgcaggaaagattggaccc  
 aaagaagtatggcggttcgattccctacagtggtttccgttccgttccgttccgttccgttccgttccgttcc  
 tccaaagaaactcaagtctgttaaggagctgctcgaaattactatttgagagatccagcttcgagaagaatccaa  
 tcgatttcctgaaagctaaaggctataaagaagtgaagaaagatctcatcatcaaactgccttcaagtactctt  
 ttagctggagaatggtaggaagcggatgctggctccgcccggagactgcagaaaggaaacggagctggctctgccc  
 tccaaatacgtgaacttcctgtatctggctccactacgagaaactcaaaggtagccctgaaagacaatgagcaga  
 agcaactcttggtagcaacataaacactacctggacgaaatcattgaaacagattagcgagttcagcaagcgggt  
 tattctggccatgcaaacctcgataaagtgtgagcgcataataagcacagggacaagccaattcgcaacaa  
 gcagagaatattatccacctttactctgactaatctggcgctctgctgcctcaagtattcgatacaacta  
 ttgacaggaagcggtacacctctaccaaagaagttctcgatgccaccctgatacaccgtcaattaccggactgta  
 cgagactcgcatcgacctgtctcagctcgccggcactag

[0267] pTrip-2XAARE-NLS-FLAG-CAS9质粒的核酸:SEQ ID NO:9

[0268] ccagatcctctacgccccgacgcacgtggccggcatcaccggccacaggtgcgggtgcggccct  
 atatcgccgacatcaccgtgggaagatcggtcgccacttcggctcatgagcgttgttgcgtgggttat  
 ggtggcaggccccgtggccggggactgttggcgccatctcctgcatgcaccattcctgcggccgggtgc  
 aacggcctcaacctactactgggtgtttccatgcaggactgcataaggagagcgtcaatggtcactctc  
 agtacaatctgtgtatgcgcatagttaagccagccccgacacccgcctgacgcgcctgacgg  
 ctgtgtgtccggcatccgtttacagacaagactgtgaccgtctccggagactgcattgtcagaggtttcacc  
 gtcatcaccgaaacgcgcgagacgaaaggccctgtgatacgcctattttaggttaatgtcatgataataatg  
 gtttcttagacgtcaggtggactttcgggaaatgtgcgcgaaacccttattgtttatccatcatt  
 caaatatgtatccgctcatgagacaataaccctgataatgttcaataatattgaaaaaggaagagtatgagta  
 tcaacattccgtgtcgcccttattccctttgcggcatttgccttcgtttgcaccagaaacgctg

gtgaaagtaaaagatgctgaagatcagttgggtgcacgagtgggtacatcgaaactggatctcaacagcgtaaga  
tcctttagatgtttcgccccgaagaacgtttccaatgatgaggcactttaaagtctgttatgtggcggtatt  
atcccgatttgcgcggcaagagcaactcggtcgccgatacactatttcagaatgacttggtttagtactca  
ccagtcacagaaaagcatcttacggatggcatgacagtaagagaattatgcagtgcgtccataaccatgagtgata  
acactcgcccaacttacttctgacaacgatcgaggaccgaaggagctaaccgctttgcacaacatgggga  
tcatgttaactcgcccttgcgttggaaaccggagctgaatgaagccataccaaacgacgacgacgatgcacaccatgat  
cctgttagcaatggcaacaacgttgcgcaaactattaacttgcgaactacttactctagcttccggcaacaattaa  
tagactggatggaggcggataaagttgcaggaccacttctgcgcgtccgcgtggctggatttattgctga  
taaatctggagccgtgagcgtggctcgcgttatattgcagcacttgcggccagatggtaagccctccgtatc  
gtatgttatctacacgacggggagtcaggcaactatggatgaacgaaatagacagatcgctgagataggtgcctcac  
tgatataaggcattggtaactgtcagaccaagttactcatataacttttagatttaaaacttcatttttaatt  
taaaaggatctaggtgaagatcctttgataatctcatgacaaaatccctaactgtgagtttcgttccactga  
gcgtcagacccgtagaaaagatcaaaggatcttgcgttgcgatcttgcgttgcgtaatctgctgcttgc  
caaaaaaaaccaccgcttaccagcggtggttttgcggatcaagagctaccaactcttccgaaggtaactgg  
cttcagcagagcgcagataccaaactgtccttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
gcaccgcctacatacctcgctgtcaatctgttaccagtggctgtccagtggcgataagtgcgttacc  
ggtgtggactcaagacgatgttaccggataaggcgcagcggcggctgaacgggggttcgtgc  
cttggagcgaacgacccgtacaccgaactgagatacctacagcgtgagcattgagaaagcgc  
agggacttccagggaaacgc  
cctggatctttatagtcctgtcggtttcgccacctctgacttgcgttgcgttgc  
gcggagcctatggaaaaacgccagcaacgcggccctttacggttgcgttgcgttgc  
ttcttcctcggttatcccctgattctgtggataaccgttaccgccttgc  
gcggccacgcgcagcgcagcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
gcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
gcagaagtatgcaaagcatgcatttcatttcatttcatttcatttcatt  
aagtatgcaaagcatgcatttcatttcatttcatttcatttcatttcatt  
ccggccagttccgcattctccgccttgcgttgcgttgcgttgc  
cctctgagctattccagaagtagtggaggctttggaggctaggcttt  
aggcttgcgagatgttggaaataccactttatccgcgtcaggagagg  
cgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
atgtgaaatactggtttagtgcgcagatctctataatctcg  
ccgttagataaacaggctggacacttcacatgagc  
gaaaatacatcgtaacccatggacatgttgc  
cacgtaaactcgcaagccactgtgc  
ccgggtgcgttactggcgcgtgaactgggtattcg  
tgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
accagcgcgagcttaagtgc  
tggaaacgcgcagaaggcgatggc  
gaaggcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
taccgggtggtaactgc  
gggttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
ggcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
tcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
caggcgggttacaatagttcc  
cagtaagtattctggaggctgc  
atccatgacacagg  
caaacctgagc  
gaaaccct  
gttcaaacc  
ccgc  
tttaaacatc  
ctgaaac  
ctcgac  
cgttgc  
ccgc  
ctttaatc  
acggc  
gcacaacc  
gcgttgc





tacactgggtgggtagactctccaggaaactcataaacggcatccgcgacaaacagagcggaaagaccatcctgg  
atttcctgaaatccgacggattcgctaacaggaacttcatgcaactgattcacatgactctctgacattaaaga  
ggacatccagaaggcacaggtgagcggtaaggcgacagcctgcacgacatcgccacacctcgatcaccc  
gccataaagaagggataactgcagacagtcaaggtcgacactcgtcaaagtgtatggtcggacaagccag  
agaatatcgttatcgaaatggcaagggagaaccaaaccaccagaagggccagaagaactctcgaaacggatgaa  
aagaatcgaagagggattaaggagctggatctcagatactgaaggagcaccctgtggagaatacacagctccag  
aacgagaaactctacctgtactacccagaacggcggacatgtacggtgaccaggaactcgacatcaaccggc  
tgtccgattatgacgtggaccatattgtccacagtcctcaaagatgactccattgacaacaagggtgctgac  
cagatccgataagaatcgcgtaagtctgacaatgtccatcagaagaggtggtaagaagatgaagaattactgg  
cgcgagctcccaacgccaactgtatcacccagcggagttgacaatctgactaaggcagaaagaggaggtctgaa  
gcgaactcgacaaaggccggctttattaagaggcaactggcgaaacacgcccagattaccaacacgtggacaaat  
cctcgactctaggatgaacactaagtacgatgagaacgataagctgatcagggagtgaaagtgataactctgaag  
agcaagctgggtctgacttccgaaaggacttcaatttacaaagttcgacaaataacaattaccatcatgctc  
acgatgcctatctcaatgtcggtggcaccgcctgatcaagaataccctaaactggagtcgatcgatcgatcgat  
cggtgactataaagtctacgatgtgaggaagatgatgatgacaaagtcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgat  
tacttcttctactctaataatcatgaatttcttaagactgagataaccctggctaacggcgaaatccggaaagcgcc  
cactgatcgaaaacaacggagaaacaggagaatcggtggataaaggcaggacttcgcaactgtcgacaaagg  
gctgtccatgccacaagtcaatatcgatgagaagaccgaagtgcagaccggcgattctcaaaaggagacatcctg  
ccaaagcggaactctgacaagctgatcgccaggaagaaagattggacccaaagaagtatggcggttcgattcc  
ctacagtggcttattccgttctggcgtggcaaaagtggagaaaggcaagtccaaactcaagtctgttaagga  
gctgtccatgcaacttattatggagagatccagcttcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgat  
aaagaagtgaagaaagatctcatcatcaaactgccaagtactctctttgagctggagaaatggtaggaagcgga  
tgctggcctccggagagctcgacaaaggaaacggagacttcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgat  
ggcctccactacgagaaactcaaaggtagccctgaaagacaatgagcagaactcttggtagcaacataaa  
cactacctggacaaatcattgaacagattagcgagttcagcaagcgggttattctggcgatgcaacactcgata  
aagtgcgtgacgcatataataagcacagggacaagccattcgcaacaagcagagaatattaccacccctttac  
tctgactaatctggcgctcgtgccttaagttcgatacaactattgacagggacgcgttacacccttacc  
aaagaagtctcgatgccaccctgatacaccagtcaattaccggactgtacgagactcgcatcgaccccttc  
tcggcggcgacttagtaaagcggccggctcgagtctagaaagggtggcgccgaccagcttgcataaag  
tggctcgacggtagctttaagaccaatgacttacgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgat  
ggacttggagggctaaattcactccaaacgaagacaaaatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgat  
ttgtacttggctctcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgatcgat  
cctcaataaagcttcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
tcagacccttttagtcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
tgcataaagaaatgaatatcagagagtgagagggcttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgcgttgc  
gcacacaggcaaagctcgagaagtacttggaaagaagccaccagagatactcacgattctgcacatcacctgg  
cccagatcctaaggattacattaatgtttactaacattatataatgatttatgtttaaagtataaacttatctaa  
tttactattctgacagatattaatcctcaaatacataagagatgattactattatccccatttaacacaag  
agggaaacttgagagggaaagatgttgaagtaatttccacaattacagcatccgttagttacgactctatgatctt

- [0269] 向导RNA AASV1:SEQ ID NO:10  
[0270] ggggcggcggtgcgtgcgt  
[0271] 5' 引物:SEQ ID NO:11  
[0272] agggccacttctgctaattgg  
[0273] 3' 引物:SEQ ID NO:12  
[0274] gataccgtcggcggttggtg

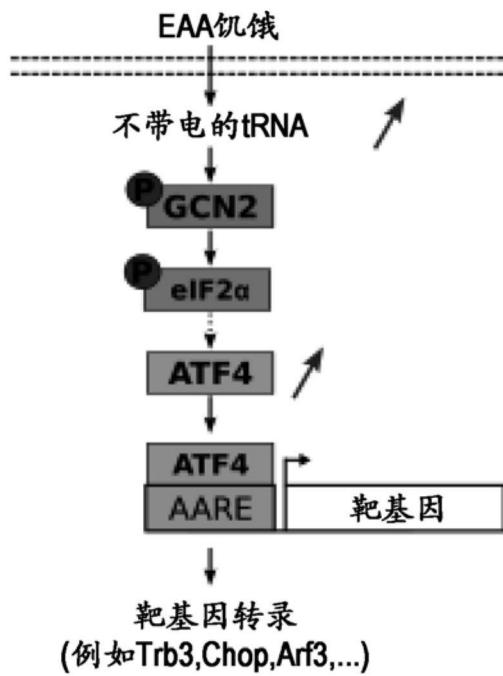


图1

### AARE驱动的Cas核酸酶的表达

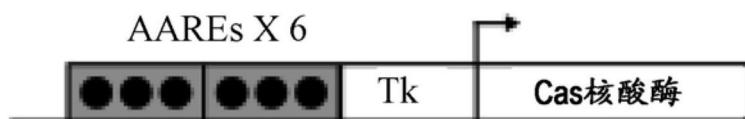


图2

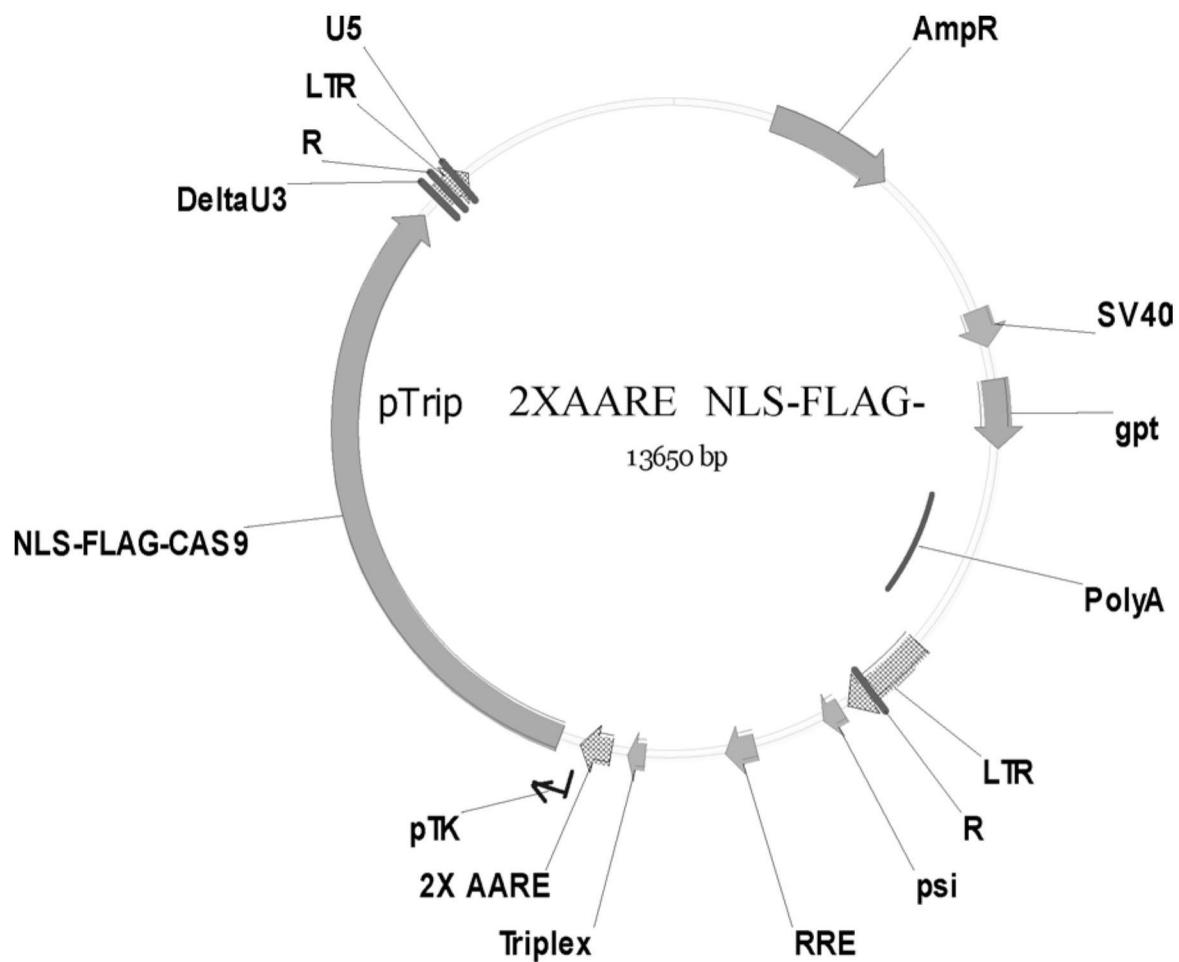


图3

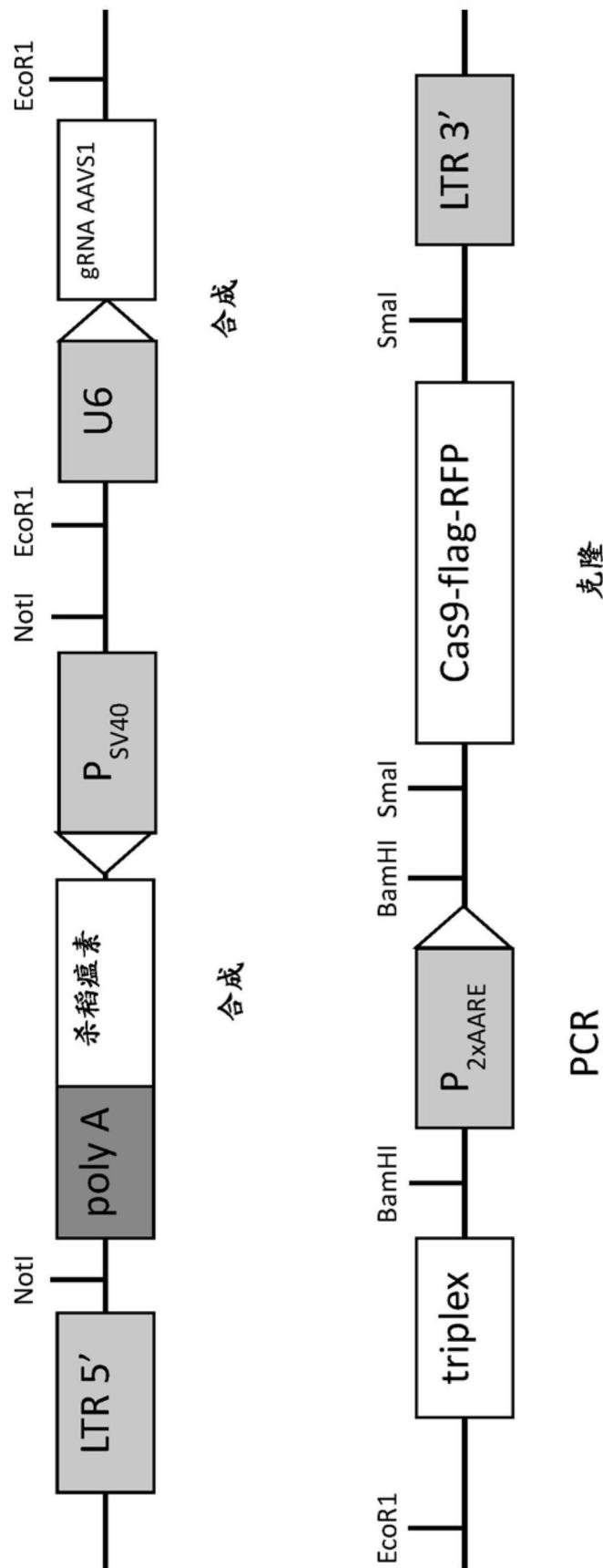


图4

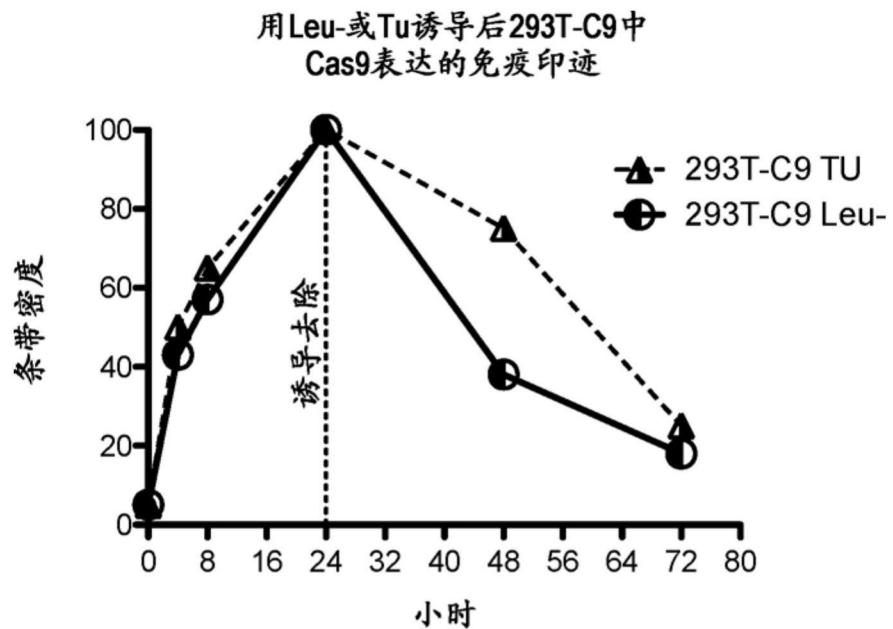


图5

## 293T细胞中供体DNA的靶向整合

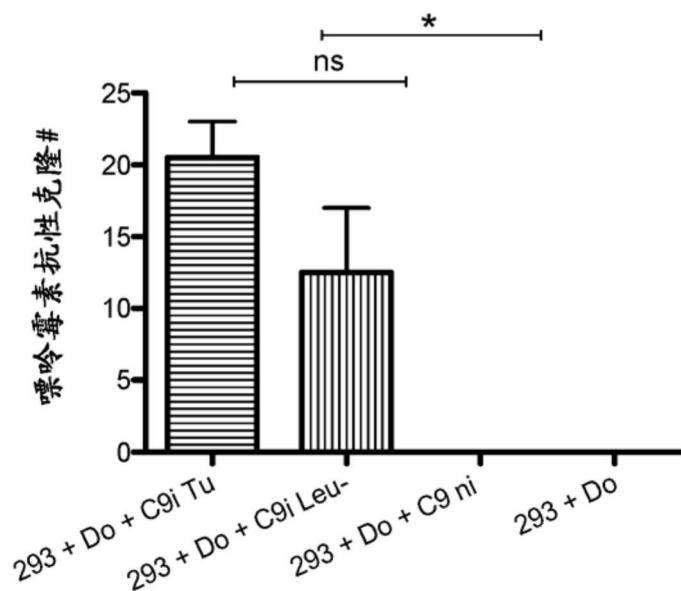


图6

## 293-C9细胞中供体DNA的靶向整合

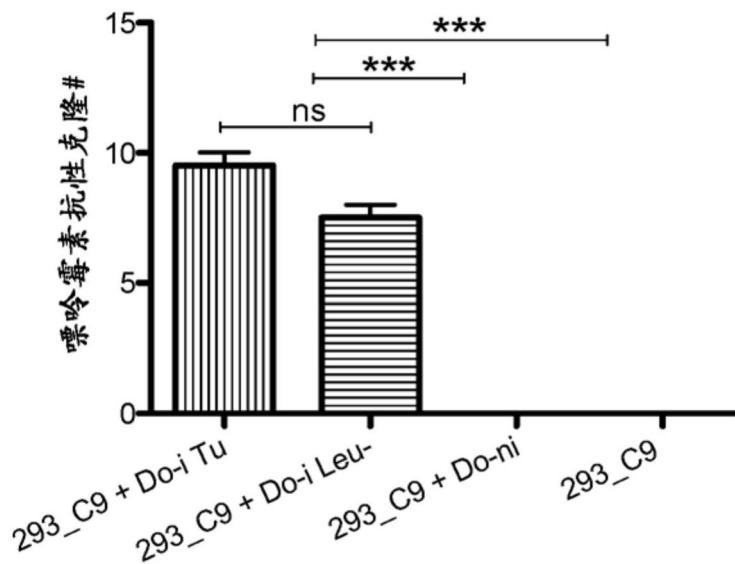


图7