



(10) 授权公告号 CN 114929205 B

(45) 授权公告日 2024.09.03

(21) 申请号 202080076963.3

(22) 申请日 2020.09.03

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114929205 A

(43) 申请公布日 2022.08.19

(30) 优先权数据
62/896,980 2019.09.06 US
62/910,720 2019.10.04 US
62/940,104 2019.11.25 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.05.05

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/049266 2020.09.03

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/046265 EN 2021.03.11

(73) 专利权人 世代生物公司
地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 苏杰 P·Y·T·李 D·克拉特
L·Y·刘 M·J·基科
M·G·斯坦顿 J·莫菲特
J·E·查特顿

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
专利代理师 孟凡宏 谢燕军

(51) Int.Cl.
A61K 9/51 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2009023673 A1, 2009.01.22
W0 2019051289 A1, 2019.03.14

审查员 白雪

权利要求书6页 说明书90页
序列表1页 附图45页

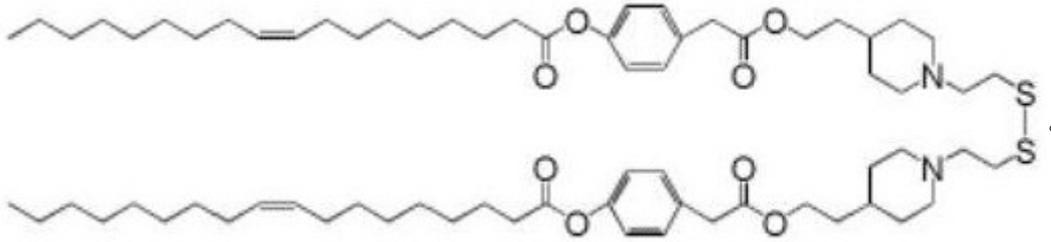
(54) 发明名称

包括末端封闭式DNA和可切割脂质的脂质纳
米颗粒组合物及其使用方法

(57) 摘要

本文提供了包括脂质和无衣壳非病毒载体
(例如, ceDNA) 的脂质调配物。本发明的脂质颗粒
(例如, 脂质纳米颗粒) 包含脂质调配物, 其可用
于将无衣壳非病毒DNA载体递送至所关注的目标
位点(例如, 细胞、组织、器官等)。

1. 一种包括脂质纳米颗粒(LNP)的药物组合物,其中所述LNP包括SS-可切割脂质、甾醇和末端封闭式DNA(ceDNA),其中所述SS-可切割脂质包括式I的ss-OP脂质:



2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述甾醇是胆固醇或 β -谷甾醇。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP进一步包括聚乙二醇(PEG)或PEG-脂质缀合物。

4. 根据权利要求3所述的药物组合物,其中所述PEG是1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)或1,2-二硬脂酰-rac-甘油-3-甲基聚氧乙烯(DSG-PEG2000)。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP进一步包括非阳离子脂质,其中所述非阳离子脂质选自自由以下组成的组:二硬脂酰-sn-甘油-磷酸乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸盐(DOPE-ma1)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺、二甲基-磷脂酰乙醇胺、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、鸡蛋磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰磷脂酰甘油(POPG)、二月桂酰-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPhyPE);卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二十六烷基磷酸酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱或其混合物。

6. 根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述单甲基-磷脂酰乙醇胺是16-0-单甲基PE。

7. 根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述二甲基-磷脂酰乙醇胺是16-0-二甲基PE。

8. 根据权利要求5所述的药物组合物,其中所述非阳离子脂质选自自由以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中所述PEG或PEG-脂质缀合物以1.5%到3%存在。

10. 根据权利要求2所述的药物组合物,其中所述胆固醇以20%到40%或30%到50%的摩尔百分比存在,并且其中所述SS-可切割脂质以80%到60%的摩尔百分比存在。

11. 根据权利要求2所述的药物组合物,其中所述胆固醇以40%的摩尔百分比存在,并且

其中所述SS-可切割脂质以50%的摩尔百分比存在。

12. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包括胆固醇、PEG或PEG-脂质缀合物和非阳离子脂质。

13. 根据权利要求12所述的药物组合物,其中所述PEG或PEG-脂质缀合物以1.5%到3%存在。

14. 根据权利要求12或权利要求13所述的药物组合物,其中所述胆固醇以30%到50%的摩尔百分比存在。

15. 根据权利要求12到14中任一项所述的药物组合物,其中所述SS-可切割脂质以42.5%到62.5%的摩尔百分比存在。

16. 根据权利要求12到14中任一项所述的药物组合物,其中所述非阳离子脂质以2.5%到12.5%的摩尔百分比存在。

17. 根据权利要求12到14中任一项所述的药物组合物,其中所述胆固醇以40%的摩尔百分比存在,所述SS-可切割脂质以52.5%的摩尔百分比存在,所述非阳离子脂质以7.5%的摩尔百分比存在,并且其中所述PEG或PEG-脂质缀合物以3%的摩尔百分比存在。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包括地塞米松棕榈酸酯。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP的直径尺寸在50 nm到110 nm的范围内。

20. 根据权利要求1到18中任一项所述的药物组合物,其中所述LNP的尺寸小于100 nm。

21. 根据权利要求20所述的药物组合物,其中所述LNP的尺寸小于70 nm。

22. 根据权利要求21所述的药物组合物,其中所述LNP的尺寸小于60 nm。

23. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物具有15:1的总脂质与ceDNA比率。

24. 根据权利要求1-22中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物具有30:1的总脂质与ceDNA比率。

25. 根据权利要求1-22中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物具有40:1的总脂质与ceDNA比率。

26. 根据权利要求1-22中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物具有50:1的总脂质与ceDNA比率。

27. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包括N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。

28. 根据权利要求27所述的药物组合物,其中所述GalNAc以总脂质的0.5%的摩尔百分比存在于所述LNP中。

29. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包括10 mM到30 mM的苹果酸。

30. 根据权利要求29所述的药物组合物,其中所述组合物包括20 mM苹果酸。

31. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包括30 mM到50 mM的NaCl。

32. 根据权利要求31所述的药物组合物,其中所述组合物包括40 mM NaCl。
33. 根据权利要求1到31中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物进一步包括20 mM到100 mM MgCl₂。
34. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述ceDNA是末端封闭式线性双螺旋DNA。
35. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述ceDNA包括表达盒,所述表达盒包括启动子序列和转基因。
36. 根据权利要求35所述的药物组合物,其中所述ceDNA包括表达盒,所述表达盒包括聚腺苷酸化序列。
37. 根据权利要求35到36中任一项所述的药物组合物,其中所述ceDNA包括至少一个反向末端重复(ITR),其侧接于表达盒的5'或3'端。
38. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述表达盒侧接有两个ITR,其中所述两个侧接ITR包括一个5' ITR和一个3' ITR。
39. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述表达盒在所述3'端连接至ITR(3' ITR)。
40. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述表达盒在所述5'端连接至ITR(5' ITR)。
41. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述5' ITR和3' ITR中的至少一个是野生型AAV ITR;和/或
所述5' ITR和3' ITR是对称ITR或非对称ITR。
42. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述5' ITR和3' ITR中的至少一个是经修饰的ITR。
43. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述ceDNA进一步包括5' ITR和所述表达盒之间的间隔子序列。
44. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述ceDNA进一步包括3' ITR和所述表达盒之间的间隔子序列。
45. 根据权利要求43或权利要求44所述的药物组合物,其中所述间隔子序列的长度为至少为5个碱基对。
46. 根据权利要求45所述的药物组合物,其中所述间隔子序列的长度为5个到100个碱基对。
47. 根据权利要求45所述的药物组合物,其中所述间隔子序列的长度为5个到500个碱基对。
48. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述ceDNA具有切口或间隙。
49. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中至少一个侧接ITR是源自AAV血清型的ITR、源自鹅病毒的ITR、源自B19病毒的ITR、或源自细小病毒的野生型ITR。
50. 根据权利要求49所述的药物组合物,其中所述AAV血清型选自由以下组成的组: AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。
51. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述侧接ITR是突变ITR。
52. 根据权利要求51所述的药物组合物,其中所述ceDNA包括不同于第一ITR的另外的

ITR。

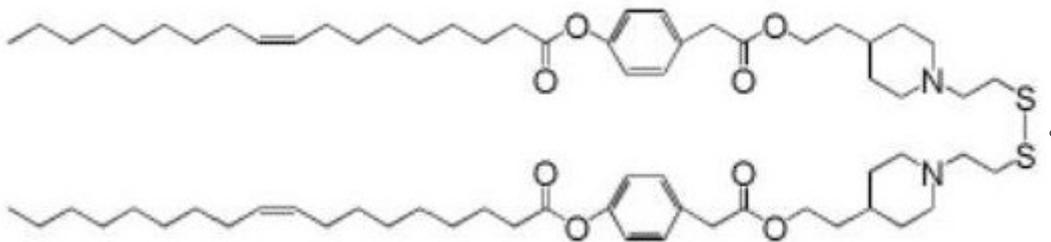
53. 根据权利要求37所述的药物组合物,其中所述ceDNA在所述表达盒的所述5'和3'端均包括两个突变侧接ITR。

54. 根据权利要求53所述的药物组合物,其中所述突变侧接ITR是对称突变体。

55. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其中所述ceDNA是CELiD、基于DNA的小环、MIDGE、迷你串DNA (ministring DNA)、哑铃形线性双螺旋末端封闭式DNA,其在表达盒的5'和3'端中包括两个ITR的发夹结构,或doggybone™ DNA。

56. 根据前述权利要求中任一项所述的药物组合物,其进一步包括药学上可接受的赋形剂。

57. 脂质纳米颗粒LNP在制备用于增加靶向有需要的受试者的肝脏的治疗性核酸的药物中的用途,所述脂质纳米颗粒LNP包括治疗性核酸、SS-可切割脂质、甾醇和聚乙二醇(PEG)以及N-乙酰半乳糖胺(Ga1NAc),其中所述SS-可切割脂质包括式I的ss-OP脂质:



58. 根据权利要求57所述的用途,其中所述PEG是1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)。

59. 根据权利要求57所述的用途,其中所述LNP进一步包括非阳离子脂质。

60. 根据权利要求59所述的用途,其中所述非阳离子脂质选自以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

61. 根据权利要求57所述的用途,其中所述Ga1NAc以总脂质的0.5%的摩尔百分比存在于所述LNP中。

62. 根据权利要求57所述的用途,其中所述受试者患有遗传病症。

63. 根据权利要求62所述的用途,其中所述遗传病症是血友病A(因子VIII缺乏症)。

64. 根据权利要求62所述的用途,其中所述遗传病症是血友病B(因子IX缺乏症)。

65. 根据权利要求62所述的用途,其中所述遗传病症是苯丙酮尿症(PKU)。

66. 根据权利要求57所述的用途,其中所述治疗性核酸选自以下组成的组:小基因、质粒、小环、小干扰RNA(siRNA)、微RNA(miRNA)、反义寡核苷酸(ASO)、核酶、ceDNA、迷你串(ministring)、doggybone™、原端粒末端封闭式DNA或哑铃形线性DNA、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、DNA病毒载体、病毒RNA载体、非病毒载体及其任何组合。

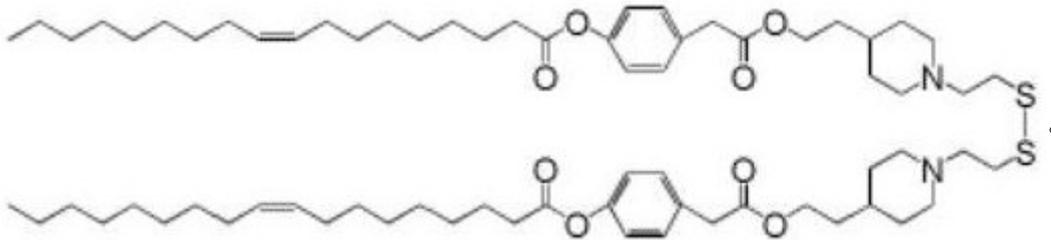
67. 根据权利要求57所述的用途,其中所述治疗性核酸是ceDNA。

68. 根据权利要求67所述的用途,其中所述ceDNA包括表达盒,所述表达盒包括启动子序列和转基因。

69. 根据权利要求68所述的用途,其中所述ceDNA包括至少一个反向末端重复(ITR),其侧接于所述表达盒的5'或3'端。

70. 根据权利要求67所述的用途,其中所述ceDNA选自由以下组成的组:CELiD、MIDGE、迷你串DNA、哑铃形线性双螺旋末端封闭式DNA,其在表达盒的5'和3'端中包括两个ITR的发夹结构,或doggybone™ DNA,其中所述ceDNA是无衣壳和线性双螺旋DNA。

71. 脂质纳米颗粒(LNP)在制备用于在需要用治疗性核酸(TNA)治疗的受试者中减轻补体反应的药物中的用途,所述脂质纳米颗粒包括所述TNA、SS-可切割脂质、甾醇、聚乙二醇(PEG)和N-乙酰半乳糖胺(GalNAc),其中所述SS-可切割脂质包括式I的ss-OP脂质:



72. 根据权利要求71所述的用途,其中所述受试者患有遗传病症。

73. 根据权利要求72所述的用途,其中所述遗传病症选自由以下组成的组:镰状细胞性贫血、黑色素瘤、血友病A(凝血因子VIII(FVIII)缺乏症)和血友病B(凝血因子IX(FIX)缺乏症)、囊性纤维化(CFTR)、家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷)、肝母细胞瘤、威尔逊氏病(Wilson's disease)、苯丙酮尿症(PKU)、先天性肝卟啉症、遗传性肝代谢障碍、Lesch Nyhan综合征、镰状细胞性贫血、地中海贫血、色素性干皮病、范可尼贫血(Fanconi's anemia)、色素性视网膜炎、共济失调毛细血管扩张症、布鲁姆综合征(Bloom's syndrome)、视网膜母细胞瘤、粘多糖贮积病、A/B型、C1型和C2型尼曼-匹克氏病(Niemann-Pick Disease)、法布里病(Fabry disease)、辛德勒病(Schindler disease)、II型GM2-神经节苷脂沉积(桑德霍夫病(Sandhoff Disease))、泰萨氏病(Tay-Sachs disease)、异染性脑白质营养不良、克拉伯病(Krabbe disease)、I型、II/III型和IV型粘脂沉积症、I型和II型唾液酸贮积症、I型和II型糖原贮积病(庞贝氏症(Pompe disease))、I型、II型和III型戈谢病(Gaucher disease)、法布里病、胱氨酸病、巴顿病(Batten disease)、天冬氨酰氨基葡萄糖尿症、萨拉病(Salla disease)、Danon病(LAMP-2缺乏症)、溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症(CLN1-8、INCL和LINCL)、鞘脂症、半乳糖唾液酸中毒、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩症、弗里德赖希氏共济失调(Friedreich's ataxia)、杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy)(DMD)、贝克尔肌营养不良症(Becker muscular dystrophies)(BMD)、营养不良性大疱性表皮松解症(DEB)、外核苷酸焦磷酸酶1缺乏症、婴儿全身性动脉钙化(GACI)、莱伯先天性黑蒙症(Leber Congenital Amaurosis)、斯特格氏黄斑营养不良(Stargardt macular dystrophy)(ABCA4)、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)缺乏症、Usher综合征、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症和组织蛋白酶A缺乏症。

74. 根据权利要求73所述的用途,其中所述粘多糖贮积病选自下组:赫勒氏综合征(Hurler syndrome)(MPS I型)、施艾氏综合征(Scheie syndrome)(MPS IS型)、赫勒-施艾氏综合征(Hurler-Scheie syndrome)(MPS I型H-S)、亨特氏综合征(Hunter syndrome)(MPS II型)、A型、B型、C型和D型Sanfilippo(MPS III型A、B、C和D)、A型和B型Morquio(MPS

IVA和MPS IVB)、马-拉综合征(Maroteaux-Lamy syndrome) (MPS VI型)、斯里综合征(Sly syndrome) (MPS VII型)和透明质酸酶缺乏症(MPS IX型)。

75. 根据权利要求71所述的用途,其中所述治疗性核酸选自由以下组成的组:小基因、质粒、小环、小干扰RNA (siRNA)、微RNA (miRNA)、反义寡核苷酸 (ASO)、核酶、ceDNA、迷你串、doggybone™、原端粒末端封闭式DNA或哑铃线性DNA、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、非对称干扰RNA (aiRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、DNA病毒载体、病毒RNA载体、非病毒载体及其任何组合。

76. 根据权利要求75所述的用途,其中所述ceDNA选自由以下组成的组:CELiD、MIDGE、迷你串DNA、哑铃形线性双螺旋末端封闭式DNA,其在表达盒的5'和3'端中包括两个ITR的发夹结构,或doggybone™ DNA,其中所述ceDNA是无衣壳和线性双螺旋DNA。

77. 根据权利要求71所述的用途,其中所述PEG是1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)。

78. 根据权利要求77所述的用途,其中所述PEG以2%到4%的分子百分比存在于所述LNP中。

79. 根据权利要求78所述的用途,其中所述PEG以3%的分子百分比存在于所述LNP中。

80. 根据权利要求71所述的用途,其中所述LNP进一步包括非阳离子脂质。

81. 根据权利要求80所述的用途,其中所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

82. 根据权利要求71所述的用途,其中所述GalNAc以总脂质的0.3%到1%的摩尔百分比存在于所述LNP中。

83. 根据权利要求82所述的用途,其中所述GalNAc以总脂质的0.5%的摩尔百分比存在于所述LNP中。

包括末端封闭式DNA和可切割脂质的脂质纳米颗粒组合物及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求于2019年9月6日提交的美国临时申请第62/896,980号、于2019年10月4日提交的美国临时申请第62/910,720号以及于2019年11月25日提交的美国临时申请第62/940,104号的优先权,所述美国临时申请中的每个美国临时申请的内容特此通过引用整体并入。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已经以ASCII格式电子提交的序列表。创建于2020年9月3日的所述ASCII副本命名为131698-07520_SL.txt,并且大小为556字节。

背景技术

[0005] 基因疗法旨在改善患有由畸变的基因表达谱引起的遗传病症或获得性疾病的患者的临床结果。迄今为止,已经开发出各种类型的基因疗法,它们将治疗性核酸作为治疗疾病的药物递送到患者的细胞中。一般而言,基因疗法涉及治疗或预防由可能导致病症、疾病或恶性肿瘤的缺陷基因或异常调控或表达(例如,表达不足或过度表达)所引起的医学病状。例如,由缺陷基因引起的疾病或病症可以通过以下方式进行治疗:向受试者递送矫正型遗传物质以补充缺陷基因并通过提供基因的野生型拷贝来改善基因的野生型拷贝。在一些情况下,通过递送治疗性核酸分子来实现治疗,所述治疗性核酸分子在翻译水平的转录上调控缺陷基因的表达,要么提供结合目标DNA或mRNA的反义核酸,从而降低缺陷基因的表达水平,要么通过转移野生型mRNA来增加基因的正确拷贝。

[0006] 具体地说,已通过将正常基因递送给靶细胞并表达来治疗人类单基因病症。矫正型基因在患者靶细胞中的递送和表达可以通过多种方法进行,包含使用工程化病毒基因递送载体,以及潜在的质粒、小基因、寡核苷酸、小环或各种末端封闭式DNA。在许多可用的病毒来源载体(例如,重组逆转录病毒、重组慢病毒、重组腺病毒等)当中,重组腺相关病毒(rAAV)作为基因疗法中通用且相对可靠的载体正在获得认可。然而,病毒载体,如腺相关载体,可能具有高度免疫原性并引发体液和细胞介导的免疫,这可能会影响功效,特别是在重新施用方面。

[0007] AAV病毒基因组/载体中编码的分子序列和结构特征已经进化成促进附加体(episomal)稳定性、病毒基因表达和与宿主免疫系统的相互作用。AAV载体包含在整个AAV家族中保守的发夹DNA结构,所述结构在AAV的基本功能中发挥着关键作用,能够接近宿主的基因组并进行自我复制,同时逃避宿主的监视系统。

[0008] 然而,其中一些基因疗法模态受到免疫相关不良事件的影响很大,这些不良事件与宿主自身对治疗性核酸的防御机制密切相关。例如,免疫系统有两种对抗传染病的一般机制,所述传染病与导致疗法接受者的不良事件有关。第一种被称为“先天”免疫反应,其通常在感染后几分钟内触发,用于限制病原体在体内的传播。宿主识别由多种传染性微生物表达但宿主中不存在的保守决定簇,并且这些决定簇刺激宿主先天免疫系统的元件产生免

疫调控细胞因子和多反应性IgM抗体。第二种和随后的机制被称为“适应性”或抗原特异性免疫反应,其通常针对病原体独特表达的决定簇产生。先天性和适应性免疫反应主要由一组I型干扰素(IFN)通过一组由特定类型的核酸活化的信号传导通路活化和调控。

[0009] 非病毒基因递送规避了与病毒转导相关的某些缺点,具体地说,由于对形成载体颗粒的病毒结构蛋白的体液和细胞免疫反应以及任何从头病毒基因表达造成的缺点。非病毒基因转移通常使用细菌质粒将外源DNA引入接受者的细胞。除了所关注的转基因外,此类DNA通常还含有在细菌中选择和扩增质粒DNA(pDNA)所需的外来序列元件,如抗生素抗性基因和原核复制起点。例如,在大肠杆菌(E.coli)中产生的质粒含有在原核生物中繁殖所需的元件,如DNA复制的原核起点和选择标志物,以及对DNA的独特原核修饰,这些修饰对于哺乳动物细胞中的转基因表达是不必要的,并且可能是有害的。

[0010] 尽管在概念上很优雅,但使用核酸分子进行基因疗法以治疗人类疾病的前景仍然不确定。这种不确定性的主要原因是与宿主对核酸治疗的先天免疫反应相关的明显不良事件,以及这些材料在免疫反应背景下调控其预期靶标的表达的方式。围绕可用于临床应用的核酸分子的产生、功能、行为和优化的当前技术水平特别关注:(1)直接调控翻译和基因表达的反义寡核苷酸和双螺旋RNA;(2)导致长期表观遗传修饰的转录基因沉默RNA;(3)与基因剪接模式相互作用并改变基因剪接模式的反义寡核苷酸;(4)模拟天然AAV或慢病毒基因组生理功能的合成或病毒载体的创建;以及(5)治疗性寡核苷酸的体内递送。然而,尽管在最近的临床成就中明显地在核酸治疗剂的开发中取得了进展,但基因疗法领域仍然受到治疗性核酸本身触发的接受者中不期望的不良事件的严重限制。

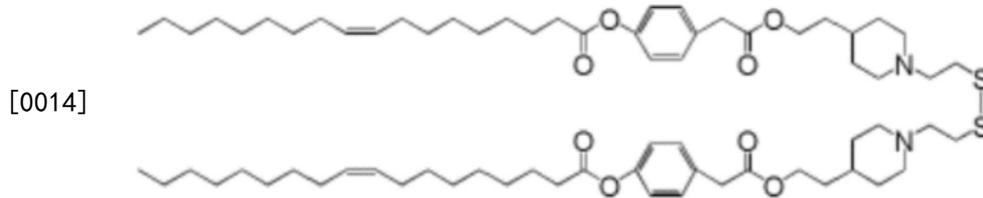
[0011] 因此,该领域强烈需要一种能够有效减少、改善、减轻、预防或维持由核酸治疗触发的免疫反应系统的新技术。

发明内容

[0012] 本文提供了药物组合物,其包括阳离子脂质,例如可离子化的阳离子脂质,例如SS-可切割脂质,和可用于将无衣壳非病毒DNA载体递送到所关注的目标位点(例如,细胞、组织、器官等)的无衣壳非病毒载体(例如,ceDNA),以及其使用和制造方法。出人意料地并且如本文所证明的,包括可切割脂质的脂质纳米颗粒(LNP)提供了治疗性核酸(例如ceDNA)到靶细胞(包含例如肝细胞)的更有效递送。具体地说,与其它脂质(例如,MC3)相比,包括ceDNA和可切割脂质的ceDNA颗粒在具有相等蛋白质表达的肝组织样品中导致更少的ceDNA拷贝。尽管该机制尚未确定,并且不受理论的约束,但认为与非实质细胞相比,包括SS-可切割脂质的含有ceDNA的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)提供了到肝细胞的改进递送和到核心的更有效运输。与其它脂质(例如,其它可离子化的阳离子脂质,例如MC3)相比,本文所述的包括可切割脂质的ceDNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的另一个优点是更好的耐受性,表现为体重减轻减少和细胞因子释放减少。通过将免疫抑制剂缀合物(例如,地塞米松棕榈酸酯)或组织特异性配体(例如,N-乙酰半乳糖胺(GalNAc))添加到本公开的LNP,可以进一步增强对耐受性的有益效果。令人惊讶的是,据发现,与配制在其它脂质(例如MC3)中的ceDNA相比,配制在本文所述的SS-可切割脂质中的ceDNA成功地避免了免疫细胞的吞噬作用(参见例如图13-15),并且可能导致靶细胞或器官(例如,肝脏)中每个拷贝数的更高的表达。实际上,与仅在SS-可切割脂质(例如,ss-OP4)中配制的ceDNA相比,在SS-可切割脂质

(ss-OP4) 和GalNAc中配制的ceDNA之间可以发生协同效应,使得包括SS-可切割脂质和GalNAc的ceDNA-LNP可以表现出大约高达4,000倍的肝细胞靶向性(图18A和18B),而在具有GalNAc的典型阳离子脂质中配制的ceDNA仅显示出大约10倍的肝细胞靶向性。此外,据发现,在具有GalNAc的SS可切割脂质(ss-OP4)中配制的ceDNA在补体和细胞因子反应方面显示出改进的安全性。

[0013] 在一方面,本文公开了一种包括脂质纳米颗粒(LNP)的药物组合物,其中所述LNP包括SS-可切割脂质和治疗性核酸(TNA)。在另一方面,本文公开了一种包括脂质纳米颗粒(LNP)的药物组合物,其中所述LNP包括SS-可切割脂质和mRNA。在一方面,本文公开了一种包括脂质纳米颗粒(LNP)的药物组合物,其中所述LNP包括SS-可切割脂质和末端封闭式DNA(ceDNA)。根据一些实施例,所述SS-可切割脂质包括二硫键和叔胺。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述SS-可切割脂质包括式I的ss-OP脂质:



[0015] 根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述LNP进一步包括甾醇。根据一些实施例,所述甾醇是胆固醇。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述LNP进一步包括聚乙二醇(PEG)。根据一些实施例,PEG是1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG)。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述LNP进一步包括非阳离子脂质。根据一些实施例,所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二硬脂酰-sn-甘油-磷酸乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸盐(DOPE-ma1)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷脂酰乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺(如16-0-单甲基PE)、二甲基-磷脂酰乙醇胺(如16-0-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、鸡蛋磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰磷脂酰甘油(POPG)、二月桂酰-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPHyPE);卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二十六烷基磷酸酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱或其混合物。根据一些实施例,所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。

[0016] 根据一些实施例,所述PEG或PEG-脂质缀合物以约1.5%到约3%、例如约1.5%到约2.75%、约1.5%到约2.5%、约1.5%到约2.25%、约1.5%到约2%、约1.5%到约1.75%、约2%到约3%、约2%到约2.75%、约2%到约2.5%、约2%到约2.25%存在。根据一些实施

例,所述PEG或PEG-脂质缀合物以约1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%或约3%存在。根据一些实施例,所述胆固醇以约20%到约40%、例如约20%到约35%、约20%到约30%、约20%到约25%、约25%到约35%、约25%到约30%或约30%到约35%的摩尔百分比存在,并且所述SS-可切割脂质以约80%到约60%、例如约80%到约65%、约80%到约70%、约80%到约75%、约75%到约60%、约75%到约65%、约75%到约70%、约70%到约60%或约70%到约60%的摩尔百分比存在。根据一些实施例,所述胆固醇以约20%到约40%,例如约20%、约21%、约22%、约23%、约24%、约25%、约26%、约27%、约28%、约29%、约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%或约40%的摩尔百分比存在,并且其中所述SS-可切割脂质以约80%到约60%,例如约80%、约79%、约78%、约77%、约76%、约75%、约74%、约73%、约72%、约71%、约70%、约69%、约68%、约67%、约66%、约65%、约64%、约63%、约62%、约61%或约60%的摩尔百分比存在。根据一些实施例,所述胆固醇以约40%的摩尔百分比存在,并且其中所述SS-可切割脂质以约50%的摩尔百分比存在。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物进一步包括胆固醇、PEG或PEG-脂质缀合物和非阳离子脂质。根据一些实施例,所述PEG或PEG-脂质缀合物以约1.5%到约3%、例如约1.5%到约2.75%、约1.5%到约2.5%、约1.5%到约2.25%、约1.5%到约2%、约2%到约3%、约2%到约2.75%、约2%到约2.5%、约2%到约2.25%、约2.25%到约3%、约2.25%到约2.75%或约2.25%到约2.5%存在。根据一些实施例,所述PEG或PEG-脂质缀合物以约1.5%、约1.6%、约1.7%、约1.8%、约1.9%、约2%、约2.1%、约2.2%、约2.3%、约2.4%、约2.5%、约2.6%、约2.7%、约2.8%、约2.9%或约3%存在。根据一些实施例,所述胆固醇以约30%到约50%、例如约30%到约45%、约30%到约40%、约30%到约35%、约35%到约50%、约35%到约45%、约35%到约40%、约40%到约50%或约45%到约50%的摩尔百分比存在。根据一些实施例,所述胆固醇以约30%、约31%、约32%、约33%、约34%、约35%、约36%、约37%、约38%、约39%、约40%、约41%、约42%、约43%、约44%、约45%、约46%、约47%、约48%、约49%或约50%的摩尔百分比存在。根据一些实施例,所述SS-可切割脂质以约42.5%到约62.5%的摩尔百分比存在。根据一些实施例,所述SS-可切割脂质以约42.5%、约43%、约43.5%、约44%、约44.5%、约45%、约45.5%、约46%、约46.5%、约47%、约47.5%、约48%、约48.5%、约49%、约49.5%、约50%、约50.5%、约51%、约51.5%、约52%、约52.5%、约53%、约53.5%、约54%、约54.5%、约55%、约55.5%、约56%、约56.5%、约57%、约57.5%、约58%、约58.5%、约59%、约59.5%、约60%、约60.5%、约61%、约61.5%、约62%或约62.5%的摩尔百分比存在。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述非阳离子脂质以约2.5%到约12.5%的摩尔百分比存在。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述胆固醇以约40%的摩尔百分比存在,所述SS-可切割脂质以约52.5%的摩尔百分比存在,所述非阳离子脂质以约7.5%的摩尔百分比存在,并且其中所述PEG以约3%的摩尔百分比存在。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物进一步包括地塞米松棕榈酸酯。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述LNP的直径尺寸在约50nm到约110nm,例如约50nm到约100nm、约50nm到约95nm、约50nm到约90nm、约50nm到约85nm、约50nm到约80nm、约50nm到约75nm、约50nm到约70nm、约50nm到约65nm、约50nm到约60nm、约50nm到约55nm、约60nm到约110nm、约60nm到约100nm、约60nm到

约95nm、约60nm到约90nm、约60nm到约85nm、约60nm到约80nm、约60nm到约75nm、约60nm到约70nm、约60nm到约65nm、约70nm到约110nm、约70nm到约100nm、约70nm到约95nm、约70nm到约90nm、约70nm到约85nm、约70nm到约80nm、约70nm到约75nm、约80nm到约110nm、约80nm到约100nm、约80nm到约95nm、约80nm到约90nm、约80nm到约85nm、约90nm到约110nm或约90nm到约100nm的范围内。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述LNP的尺寸小于约100nm,例如尺寸小于约105nm、小于约100nm、小于约95nm、小于约90nm、小于约85nm、小于约80nm、小于约75nm、小于约70nm、小于约65nm、小于约60nm、小于约55nm、小于约50nm、小于约45nm、小于约40nm、小于约35nm、小于约30nm、小于约25nm、小于约20nm、小于约15nm或小于约10nm。根据一些实施例,所述LNP的尺寸小于约70nm,例如尺寸小于约65nm、小于约60nm、小于约55nm、小于约50nm、小于约45nm、小于约40nm、小于约35nm、小于约30nm、小于约25nm、小于约20nm、小于约15nm或小于约10nm。根据一些实施例,所述LNP的尺寸小于约60nm,例如尺寸小于约55nm、小于约50nm、小于约45nm、小于约40nm、小于约35nm、小于约30nm、小于约25nm、小于约20nm、小于约15nm或小于约10nm。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物具有约15:1的总脂质与ceDNA比率。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物具有约30:1的总脂质与ceDNA比率。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物具有约40:1的总脂质与ceDNA比率。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物具有约50:1的总脂质与ceDNA比率。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物进一步包括N-乙酰半乳糖胺(Ga1NAc)。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的0.2%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的0.3%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的0.4%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的0.5%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的0.6%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的0.7%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的0.8%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的0.9%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的1.0%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的约1.5%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述Ga1NAc以总脂质的2.0%的摩尔百分比存在于所述LNP中。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物进一步包括约10mM到约30mM苹果酸,例如约10mM到约25mM、约10mM到约20mM、约10mM到约15mM、约15mM到约25mM、约15mM到约20mM、约20mM到约25mM。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物进一步包括约10mM苹果酸、约11mM苹果酸、约12mM苹果酸、约13mM苹果酸、约14mM苹果酸、约15mM苹果酸、约16mM苹果酸、约17mM苹果酸、约18mM苹果酸、约19mM苹果酸、约20mM苹果酸、约21mM苹果酸、约22mM苹果酸、约23mM苹果酸、约24mM苹果酸、约25mM苹果酸、约26mM苹果酸、约27mM苹果酸、约28mM苹果酸、约29mM苹果酸或约30mM苹果酸。根据一些实施例,所述组合物包括约20mM苹果酸。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物进一步包括约30mM到约50mM NaCl,例如约30mM到约45mM NaCl、约30mM到约40mM NaCl、约30mM到约35mM NaCl、约35mM到约45mM NaCl、约35mM到约40mM NaCl或约40mM到约45mM NaCl。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述组合物进一步包括约30mM NaCl、约35mM NaCl、约40mM NaCl或约45mM NaCl。根据一些实施例,所述组合物包括

约40mM NaCl。根据一些实施例,所述组合物进一步包括约20mM到约100mM $MgCl_2$,例如约20mM到约90mM $MgCl_2$ 、约20mM到约80mM $MgCl_2$ 、约20mM到约70mM $MgCl_2$ 、约20mM到约60mM $MgCl_2$ 、约20mM到约50mM $MgCl_2$ 、约20mM到约40mM $MgCl_2$ 、约20mM到约30mM $MgCl_2$ 、约320mM到约90mM $MgCl_2$ 、约30mM到约80mM $MgCl_2$ 、约30mM到约70mM $MgCl_2$ 、约30mM到约60mM $MgCl_2$ 、约30mM到约50mM $MgCl_2$ 、约30mM到约40mM $MgCl_2$ 、约40mM到约90mM $MgCl_2$ 、约40mM到约80mM $MgCl_2$ 、约40mM到约70mM $MgCl_2$ 、约40mM到约60mM $MgCl_2$ 、约40mM到约50mM $MgCl_2$ 、约50mM到约90mM $MgCl_2$ 、约50mM到约80mM $MgCl_2$ 、约50mM到约70mM $MgCl_2$ 、约50mM到约60mM $MgCl_2$ 、约60mM到约90mM $MgCl_2$ 、约60mM到约80mM $MgCl_2$ 、约60mM到约70mM $MgCl_2$ 、约70mM到约90mM $MgCl_2$ 、约70mM到约80mM $MgCl_2$ 或约80mM到约90mM $MgCl_2$ 。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述ceDNA是末端封闭式线性双螺旋DNA。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述ceDNA包括表达盒,所述表达盒包括启动子序列和转基因。根据一些实施例,所述ceDNA包括表达盒,所述表达盒包括聚腺苷酸化序列。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述ceDNA包括至少一个反向末端重复(ITR),其侧接于所述表达盒的5'或3'端。根据一些实施例,所述表达盒侧接有两个ITR,其中所述两个ITR包括一个5' ITR和一个3' ITR。根据一些实施例,所述表达盒在3'端连接至ITR(3' ITR)。根据一些实施例,所述表达盒在5'端连接至ITR(5' ITR)。根据一些实施例,5' ITR和3' ITR中的至少一个是野生型AAV ITR。根据一些实施例,5' ITR和3' ITR中的至少一个是经修饰的ITR。根据一些实施例,所述ceDNA进一步包括5' ITR和所述表达盒之间的间隔子序列。根据一些实施例,所述ceDNA进一步包括3' ITR和所述表达盒之间的间隔子序列。根据一些实施例,所述间隔子序列的长度为至少为5个碱基对。根据一些实施例,所述间隔子序列的长度为5个到100个碱基对。根据一些实施例,所述间隔子序列的长度为5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个或100个碱基对。根据一些实施例,所述间隔子序列的长度为5个到500个碱基对。根据一些实施例,所述间隔子序列的长度为5个、10个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、75个、80个、85个、90个、95个、100个、105个、110个、115个、120个、125个、130个、135个、140个、145个、150个、155个、160个、165个、170个、175个、180个、185个、190个、195个、200个、205个、210个、215个、220个、225个、230个、235个、240个、245个、250个、255个、260个、265个、270个、275个、280个、285个、290个、295个、300个、305个、310个、315个、320个、325个、330个、335个、340个、345个、350个、355个、360个、365个、370个、375个、380个、385个、390个、395个、400个、405个、410个、415个、420个、425个、430个、435个、440个、445个、450个、455个、460个、465个、470个、475个、480个、485个、490个或495个碱基对。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述ceDNA具有切口或间隙。根据一些实施例,所述ITR是源自AAV血清型的ITR、源自鹅病毒的ITR、源自B19病毒的ITR、源自细小病毒的野生型ITR。根据一些实施例,所述AAV血清型选自由以下组成的组:AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11和AAV12。根据一些实施例,所述ITR是突变ITR,并且所述ceDNA任选地包括不同于第一ITR的另外的ITR。根据一些实施例,所述ceDNA在所述表达盒的5'和3'端均包括两个突变ITR,任选地其中所述两个突变ITR是对称突变体。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述ceDNA是CELiD、基于DNA的小环、MIDGE、辅助DNA、哑铃形线性双螺旋末端封闭式DNA,其在表达盒的5'和3'端中包括两个ITR的发夹结构,或doggyboneTM DNA。根据本文

任何方面或实施例的一些实施例,所述药物组合物进一步包括药学上可接受的赋形剂。

[0017] 根据一些方面,本公开提供了一种治疗受试者的遗传病症的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的根据本文任何方面或实施例所述的药物组合物。根据一些实施例,所述受试者是人。根据一些实施例,所述遗传病症选自自由以下组成的组:镰状细胞性贫血、黑色素瘤、血友病A(凝血因子VIII(FVIII)缺乏症)和血友病B(凝血因子IX(FIX)缺乏症)、囊性纤维化(CFTR)、家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷)、肝母细胞瘤、威尔逊氏病(Wilson's disease)、苯丙酮尿症(PKU)、先天性肝卟啉症、遗传性肝代谢障碍、Lesch Nyhan综合征、镰状细胞性贫血、地中海贫血、色素性干皮病、范可尼贫血(Fanconi's anemia)、色素性视网膜炎、共济失调毛细血管扩张症、布鲁姆综合征(Bloom's syndrome)、视网膜母细胞瘤、粘多糖贮积病(例如,赫勒氏综合征(Hurler syndrome)(MPS I型)、施艾氏综合征(Scheie syndrome)(MPS IS型)、赫勒-施艾氏综合征(Hurler-Scheie syndrome)(MPS I型H-S)、亨特氏综合征(Hunter syndrome)(MPS II型)、A型、B型、C型和D型Sanfilippo(MPS III型A、B、C和D)、A型和B型Morquio(MPS IVA和MPS IVB)、马-拉综合征(Maroteaux-Lamy syndrome)(MPS VI型)、斯里综合征(Sly syndrome)(MPS VII型)、透明质酸酶缺乏症(MPS IX型)、A/B型、C1型和C2型尼曼-匹克氏病(Niemann-Pick Disease)、法布里病(Fabry disease)、辛德勒病(Schindler disease)、II型GM2-神经节苷脂沉积(桑德霍夫病(Sandhoff Disease))、泰萨氏病(Tay-Sachs disease)、异染性脑白质营养不良、克拉伯病(Krabbe disease)、I型、II/III型和IV型粘脂沉积症、I型和II型唾液酸贮积症、I型和II型糖原贮积病(庞贝氏症(Pompe disease))、I型、II型和III型戈谢病(Gaucher disease)、法布里病、胱氨酸病、巴顿病(Batten disease)、天冬酰胺氨基葡萄糖尿症、萨拉病(Salla disease)、Danon病(LAMP-2缺乏症)、溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症(CLN1-8、INCL和LINCL)、鞘脂症、半乳糖唾液酸中毒、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、脊髓小脑共济失调、脊髓性肌萎缩症、弗里德赖希氏共济失调(Friedreich's ataxia)、杜氏肌营养不良症(Duchenne muscular dystrophy)(DMD)、贝克尔肌营养不良症(Becker muscular dystrophies)(BMD)、营养不良性大疱性表皮松解症(DEB)、外核苷酸焦磷酸酶1缺乏症、婴儿全身性动脉钙化(GACI)、莱伯先天性黑蒙症(Leber Congenital Amaurosis)、斯特格氏黄斑营养不良(Stargardt macular dystrophy)(ABCA4)、鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)缺乏症、Usher综合征、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症和组织蛋白酶A缺乏症。根据一些实施例,所述遗传病症是莱伯先天性黑蒙症(LCA)。根据一些实施例,所述LCA是LCA10。根据一些实施例,所述遗传病症是尼曼-匹克氏病。根据一些实施例,所述遗传病症是斯特格氏黄斑营养不良。根据一些实施例,所述遗传病症是葡萄糖-6-磷酸酶(G6Pase)缺乏症(I型糖原贮积病)或庞贝氏症(II型糖原贮积病)。根据一些实施例,所述遗传病症是血友病A(因子VIII缺乏症)。根据一些实施例,所述遗传病症是血友病B(因子IX缺乏症)。根据一些实施例,所述遗传病症是亨特氏综合征(粘多糖贮积症II)。根据一些实施例,所述遗传病症是囊性纤维化。根据一些实施例,所述遗传病症是营养不良性大疱性表皮松解症(DEB)。根据一些实施例,所述遗传病症是苯丙酮尿症(PKU)。根据一些实施例,所述遗传病症是透明质酸酶缺乏症。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,所述方法进一步包括施用免疫抑制剂。根据一些实施例,所述免疫抑制剂是地塞米松

(dexamethasone)。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,与用包括MC3作为主要阳离子脂质的LNP观察到的免疫反应水平相比,所述受试者表现出针对所述药物组合物的免疫反应水平降低,其中针对所述药物组合物的所述免疫反应水平比用包括MC3的LNP观察到的水平低至少50%。根据一些实施例,通过检测促炎细胞因子或趋化因子的水平来测量所述免疫反应。根据一些实施例,所述促炎细胞因子或趋化因子选自以下组成的组:IL-6、IFN α 、IFN γ 、IL-18、TNF α 、IP-10、MCP-1、MIP1 α 、MIP1 β 和RANTES。根据一些实施例,在施用所述药物组合物后6小时,至少一种促炎细胞因子在所述受试者的血清中低于可检测水平。根据本文任何方面或实施例的一些实施例,包括所述SS-可切割脂质和所述末端封闭式DNA (ceDNA)的所述LNP未被吞噬;或与在相似条件下施用的包括MC3作为主要阳离子脂质的LNP的吞噬水平相比,表现出至少50%的吞噬水平降低。根据一些实施例,所述SS-可切割脂质是式I的ss-OP。根据一些实施例,所述LNP进一步包括胆固醇和PEG-脂质缀合物。根据一些实施例,所述LNP进一步包括非阳离子脂质。根据一些实施例,所述非阳离子脂质选自以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)和二油酰-磷脂酰乙醇胺(DOPE)。根据一些实施例,所述LNP进一步包括N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。根据一些实施例,所述GalNAc以总脂质的0.5%的摩尔百分比存在于所述LNP中。

[0018] 根据另一方面,本公开提供了一种在需要用治疗性核酸治疗的受试者中减轻补体反应的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的脂质纳米颗粒LNP,所述脂质纳米颗粒LNP包括治疗性核酸、ss-可切割脂质、甾醇和聚乙二醇(PEG)以及N-乙酰半乳糖胺(GalNAc)。根据一些实施例,所述受试者患有遗传病症。根据一些实施例,所述遗传病症选自以下组成的组:镰状细胞性贫血、黑色素瘤、血友病A(凝血因子VIII(FVIII)缺乏症)和血友病B(凝血因子IX(FIX)缺乏症)、囊性纤维化(CFTR)、家族性高胆固醇血症(LDL受体缺陷)、肝母细胞瘤、威尔逊氏病(Wilson's disease)、苯丙酮尿症(PKU)、先天性肝叶淋症、遗传性肝代谢障碍、Lesch Nyhan综合征、镰状细胞性贫血、地中海贫血、色素性干皮病、范可尼贫血(Fanconi's anemia)、色素性视网膜炎、共济失调毛细血管扩张症、布鲁姆综合征(Bloom's syndrome)、视网膜母细胞瘤、粘多糖贮积病(例如,赫勒氏综合征(Hurler syndrome)(MPS I型)、施艾氏综合征(Scheie syndrome)(MPS IS型)、赫勒-施艾氏综合征(Hurler-Scheie syndrome)(MPS I型H-S)、亨特氏综合征(Hunter syndrome)(MPS II型)、A型、B型、C型和D型Sanfilippo(MPS III型A、B、C和D)、A型和B型Morquio(MPS IVA和MPS IVB)、马-拉综合征(Maroteaux-Lamy syndrome)(MPS VI型)、斯里综合征(Sly syndrome)(MPS VII型)、透明质酸酶缺乏症(MPS IX型))、A/B型、C1型和C2型尼曼-匹克氏病(Niemann-Pick Disease)、法布里病(Fabry disease)、辛德勒病(Schindler disease)、II型GM2-神经节苷脂沉积(桑德霍夫病(Sandhoff Disease))、泰萨氏病(Tay-Sachs disease)、异染性脑白质营养不良、克拉伯病(Krabbe disease)、I型、II/III型和IV型粘脂沉积症、I型和II型唾液酸贮积症、I型和II型糖原贮积病(庞贝氏症(Pompe disease))、I型、II型和III型戈谢病(Gaucher disease)、法布里病、胱氨酸病、巴顿病(Batten disease)、天冬氨酰氨基葡萄糖尿症、萨拉病(Salla disease)、Danon病(LAMP-2缺乏症)、溶酶体酸性脂肪酶(LAL)缺乏症、神经元蜡样脂褐质沉积症(CLN1-8、INCL和LINCL)、鞘脂症、半乳糖唾液酸中毒、肌萎缩侧索硬化症(ALS)、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)、亨廷顿氏病(Huntington's disease)、脊髓小脑共

济失调、脊髓性肌萎缩症、弗里德赖希氏共济失调 (Friedreich's ataxia)、杜氏肌营养不良症 (Duchenne muscular dystrophy) (DMD)、贝克尔肌营养不良症 (Becker muscular dystrophies) (BMD)、营养不良性大疱性表皮松解症 (DEB)、外核苷酸焦磷酸酶1缺乏症、婴儿全身性动脉钙化 (GACI)、莱伯先天性黑蒙症 (Leber Congenital Amaurosis)、斯特格氏黄斑营养不良 (Stargardt macular dystrophy) (ABCA4)、鸟氨酸转氨甲酰酶 (OTC) 缺乏症、Usher综合征、 α -1抗胰蛋白酶缺乏症和组织蛋白酶A缺乏症。根据一些实施例,所述治疗性核酸选自由以下组成的组:小基因、质粒、小环、小干扰RNA (siRNA)、微RNA (miRNA)、反义寡核苷酸 (ASO)、核酶、ceDNA、迷你串 (ministring)、doggyboneTM、原端粒末端封闭式DNA或哑铃线性DNA、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、非对称干扰RNA (aiRNA)、微RNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA、DNA病毒载体、病毒RNA载体、非病毒载体及其任何组合。根据一些实施例,ceDNA选自由以下组成的组:CELiD、MIDGE、辅助DNA、哑铃形线性双螺旋末端封闭式DNA,其在表达盒的5'和3'端中包括两个ITR的发夹结构,或doggyboneTM DNA,其中所述ceDNA是无衣壳和线性双螺旋DNA。根据一些实施例,PEG是1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油 (PEG-DMG)。根据一些实施例,所述PEG以约2%到约4%、例如约2%到约3.5%、约2%到约3%、约2%到约2.5%、约2.5%到约4%、约2.5%到约3.5%、约2.5%到约3%、约3%到约4%、约3.5%到约4%或约2%、约2.25%、约2.5%、约2.75%、约3%、约3.25%、约3.5%、约3.75%或约4%的分子百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述PEG以约3%的分子百分比存在于所述LNP中。根据一些实施例,所述LNP进一步包括非阳离子脂质。根据一些实施例,所述非阳离子脂质选自由以下组成的组:二油酰磷脂酰胆碱 (DOPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱 (DSPC) 和二油酰-磷脂酰乙醇胺 (DOPE)。根据一些实施例,所述GalNAc以总脂质的约0.3%到约1%的摩尔百分比存在于所述LNP中,例如总脂质的约0.3%到约0.9%、约0.3%到约0.8%、约0.3%到约0.7%、约0.3%到约0.6%、约0.3%到约0.5%、约0.3%到约0.4%、约0.4%到约0.9%、约0.4%到约0.8%、约0.4%到约0.7%、约0.4%到约0.6%、约0.4%到约0.5%、约0.5%到约0.9%、约0.5%到约0.8%、约0.5%到约0.7%、约0.5%到约0.6%、约0.6%到约0.9%、约0.6%到约0.8%、约0.6%到约0.7%、约0.7%到约0.9%、约0.7%到约0.8%、约0.8%到约0.9%或总脂质的约0.3%、约0.4%、约0.5%、约0.6%、约0.7%、约0.8%、约0.9%或约1%。根据一些实施例,所述GalNAc以总脂质的约0.5%的摩尔百分比存在于所述LNP中。

附图说明

[0019] 可以通过参考在附图中描绘的本公开的说明性实施例来理解上文简要概括并在下文更详细讨论的本公开的实施例。然而,附图仅展示了本公开的典型实施例并且因此不应被视为对范围的限制,因为本公开可以承认其它同等有效的实施例。

[0020] 图1A展示了用于表达如本文所公开的转基因的ceDNA载体的示例性结构,其包括非对称ITR。在此实施例中,示例性ceDNA载体包括含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码转基因的开放阅读框 (ORF) 能够插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点 (R3/R4) 中。表达盒侧接有两个反向末端重复序列 (ITR) -表达盒上游 (5'端) 的野生型AAV2 ITR和下游 (3'端) 的经修饰ITR,因此侧接于表达盒的两个ITR彼此非对称。

[0021] 图1B展示了用于表达如本文所公开的转基因的ceDNA载体的示例性结构,其包括

非对称ITR,以及含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码转基因的开放阅读框(ORF)能够插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接有两个反向末端重复(ITR)-表达盒上游(5'端)的经修饰的ITR和下游(3'端)的野生型ITR。

[0022] 图1C展示了用于表达如本文所公开的转基因的ceDNA载体的示例性结构,其包括非对称ITR,以及含有增强子/启动子、转基因、转录后元件(WPRE)和polyA信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许编码所关注的蛋白质或治疗性核酸的转基因插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接有两个彼此非对称的反向末端重复(ITR);在表达盒上游(5'端)的经修饰的ITR和在下游(3'端)的经修饰的ITR,其中5'ITR和3'ITR都是经修饰的ITR,但是具有不同的修饰(即,它们不具有相同的修饰)。

[0023] 图1D展示了用于表达如本文所公开的转基因的ceDNA载体的示例性结构,其包括如本文所定义的对称的经修饰ITR或基本上对称的经修饰ITR,以及含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码转基因的开放阅读框(ORF)插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接有两个经修饰的反向末端重复序列(ITR),其中5'经修饰ITR和3'经修饰ITR是对称的或基本上对称的。

[0024] 图1E展示了用于表达如本文所公开的转基因的ceDNA载体的示例性结构,其包括如本文所定义的对称的经修饰ITR或基本上对称的经修饰ITR,以及含有增强子/启动子、转基因、转录后元件(WPRE)和polyA信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许转基因插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接有两个经修饰的反向末端重复序列(ITR),其中5'经修饰ITR和3'经修饰ITR是对称的或基本上对称的。

[0025] 图1F展示了用于表达如本文所公开的转基因的ceDNA载体的示例性结构,其包括如本文所定义的对称的WT-ITR或基本上对称的WT-ITR,以及含有CAG启动子、WPRE和BGHpA的表达盒。编码转基因的开放阅读框(ORF)插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接有两个野生型反向末端重复序列(WT-ITR),其中5'WT-ITR和3'WT-ITR是对称的或基本上对称的。

[0026] 图1G展示了用于表达如本文所公开的转基因的ceDNA载体的示例性结构,其包括如本文所定义的对称的经修饰ITR或基本上对称的经修饰ITR,以及含有增强子/启动子、转基因、转录后元件(WPRE)和polyA信号的表达盒。开放阅读框(ORF)允许转基因插入介于CAG启动子与WPRE之间的克隆位点中。表达盒侧接有两个野生型反向末端重复序列(WT-ITR),其中5'WT-ITR和3'WT-ITR是对称的或基本上对称的。

[0027] 图2A提供了野生型左ITR的T形茎环结构,并鉴定了A-A'臂、B-B'臂、C-C'臂、两个Rep结合位点(RBE和RBE'),并且还示出了末端解链位点(trs)。RBE含有一连串4个双螺旋四聚体,其被认为与Rep 78或Rep 68相互作用。另外,RBE'也被认为与在所述构建体中的野生型ITR或突变的ITR上组装的Rep复合物相互作用。D和D'区含有转录因子结合位点和其它保守结构。图2B示出了野生型左ITR中提出的Rep催化的切口产生和接合活性,所述野生型左ITR包含AAV2的野生型左ITR的T形茎环结构,并鉴定了A-A'臂、B-B'臂、C-C'臂、两个Rep结合位点(RBE和RBE'),并且还示出了末端解链位点(trs),以及包括几个转录因子结合位点和其它保守结构的D和D'区域。

[0028] 图3A提供了野生型左AAV2 ITR的A-A'臂的含RBE部分以及C-C'臂和B-B'臂的一级结构(多核苷酸序列)(左)和二级结构(右)。图3B示出了左ITR的示例性突变ITR(也称为修

饰ITR)序列。示出的是示例性突变左ITR(ITR-1,左)的A-A'臂的RBE部分、C臂和B-B'臂的一级结构(左)和预测的二级结构(右)。图3C示出了野生型右AAV2 ITR的A-A'环的含RBE部分以及B-B'和C-C'臂的一级结构(左)和二级结构(右)。图3D示出了示例性右修饰ITR。示出的是示例性突变右ITR(ITR-1,右)的A-A'臂的含RBE部分、B-B'和C臂的一级结构(左)和预测的二级结构(右)。可以如本文所教导,使用左ITR和右ITR的任何组合(例如,AAV2 ITR或其它病毒血清型ITR或合成ITR)。图3A-3D的多核苷酸序列中的每一个多核苷酸序列是指在用于产生如本文所述的ceDNA的质粒或杆粒/杆状病毒基因组中所用的序列。图3A-3D每一个中还包含从质粒或杆粒/杆状病毒基因组中的ceDNA载体构型推断出的相应ceDNA二级结构以及预测的吉布斯自由能(Gibbs free energy)值。

[0029] 图4A是示出了用于制备杆状病毒感染的昆虫细胞(BIIC)的上游过程的示意图,所述细胞可用于在图4B的示意图中所述的过程中产生用于表达本文所公开的转基因的ceDNA载体。图4B是ceDNA生产的示例性方法的示意图,并且图4C展示了确认ceDNA载体产生的生化方法和过程。图4D和图4E是描述了用于鉴定从在图4B的ceDNA产生过程期间获得的细胞团粒收获的DNA中ceDNA的存在的过程的示意性展示。图4D示出了未经切割或用限制性核酸内切酶消化并然后在天然凝胶或变性凝胶上进行电泳的示例性ceDNA的示意性预期色带。最左边的示意图是天然凝胶,并示出了多个色带,表明以其双螺旋和未经切割形式的ceDNA以至至少单体和二聚体状态存在,可看到呈迁移较快的较小单体和迁移较慢的二聚体,二聚体的大小是单体的两倍。左起第二个示意图显示,当用限制性核酸内切酶切割ceDNA时,原始色带消失并出现了迁移较快(例如较小)的色带,与切割后剩余的预期片段大小相对应。在变性条件下,原始双螺旋DNA是单链的,并且因为互补链是共价连接的,所以作为两倍于天然凝胶上观察到的大小的物种进行迁移。因此,在右起第二个示意图中,经过消化的ceDNA展示出与在天然凝胶上观察到的相似的色带分布,但所述色带作为其天然凝胶对应物大小的两倍的片段进行迁移。最右边的示意图展示,在变性条件下未经切割的ceDNA作为单链开环进行迁移,并且因此观察到的色带是在不开环的天然条件下观察到的色带大小的两倍。在此图中,“kb”用于指示核苷酸分子的相对大小,取决于背景,其基于核苷酸链长(例如,对于在变性条件下观察到的单链分子)或碱基对数量(例如,对于在天然条件下观察到的双链分子)。图4E示出了具有不连续结构的DNA。ceDNA可以通过在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制性核酸内切酶切割,并在中性和变性两种条件下产生两个大小不同(1kb和2kb)的DNA片段。图4E还示出了具有线性且连续结构的ceDNA。所述ceDNA载体可以被限制性核酸内切酶切割,并产生两个DNA片段,所述片段在中性条件下以1kb和2kb迁移,但在变性条件下,链保持连接并产生以2kb和4kb迁移的单链。

[0030] 图5是示出包封效率的图,所述包封效率是通过确定未包封的ceDNA含量(通过在将PicoGreen(赛默飞世尔科技)添加到LNP浆液时测量荧光(C_{free}))并将该值与通过1% Triton X-100裂解LNP时获得的总ceDNA含量(C_{total})进行比较来测量的,其中包封百分比= $(C_{total} - C_{free}) / (C_{total} \times 100)$ 。

[0031] 图6A和图6B示出了通过如上文图5所示确定未包封的ceDNA含量而测量的包封效率。评估了pH和盐条件对粒度和包封速率的影响。图6A示出了在pH 4下对粒度和包封速率的影响。图6B示出了在pH 3下对粒度和包封速率的影响。如图6A和图6B所示,脂质粒度在直径约70nm到120nm之间变化。在这些条件下实现了80%到90%的包封速率。

[0032] 图7是描绘实例7中描述的示例性ceDNA LNP对体重的影响的图。

[0033] 图8是示出每个ceDNA LNP组中荧光素酶活性(每秒总通量/光子)随时间变化的图(MC3:PolyC;MC3:ceDNA-luc;ss-Paz3:PolyC;ss-Paz3:ceDNA-luc;ss-Paz3:ceDNA-luc+dexPalm;ss-Paz4:PolyC;ss-Paz4:ceDNA-luc;ss-OP3:PolyC;ss-OP3:ceDNA-luc;ss-OP4:PolyC;ss-OP4:ceDNA-luc)。

[0034] 图9是描绘在用MC3 LNP、ss-Paz3、ss-Paz4、ss-OP3或ss-OP4 LNP处理的小鼠中,在肝脏qPCR中检测到的ceDNA表达(每个二倍体基因组的ceDNA拷贝)的图。

[0035] 图10A和图10B示出了实例7中描述的ceDNA LNP中的ss-可切割脂质对小鼠血清中细胞因子和趋化因子水平(pg/ml)的影响。

[0036] 图11是示出每个ceDNA LNP组中荧光素酶活性(每秒总通量/光子)随时间变化的图(MC3:PolyC;MC3:ceDNA-luc;ss-OP4:PolyC;ss-OP4:ceDNA-luc)。

[0037] 图12A是描绘对用以0.5mg/kg或2.0mg/kg给药的示例性ceDNA LNP(ss-OP4±0.5%GalNAc,以脂质摩尔百分比计)处理的小鼠的体重的影响的图。图12B示出了ss-OP4-ceDNA调配物中GalNAc的存在(如在ss-OP4:G中,GalNAc以总脂质重量的0.5%摩尔百分比存在)对ceDNA-luc表达水平的影响。

[0038] 图13示出了实例8中描述的ceDNA LNP中的ss-可切割脂质对用ss-OP4或具有GalNAc的ss-OP4处理的小鼠血清中细胞因子和趋化因子水平(pg/ml)的影响。

[0039] 图14示出了用0.1%DiD(DiIC18(5);1,1'-二十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚二羧花青,4-氯苯磺酸盐)亲脂性羧花青染料处理的ceDNA LNP的吞噬作用测定的示意图,其中在存在或不存在10%人血清(+血清)的情况下,在MC3、MC3-5DSG或ss-OP4 LNP中使用了不同浓度的ceDNA(200ng、500ng、1μg和2μg)。

[0040] 图15示出了用0.1%DiD(DiIC18(5);1,1'-二十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚二羧花青,4-氯苯磺酸盐)亲脂性羧花青染料处理的ceDNA LNP的图像,其中MC3、MC3-5DSG或ss-OP4脂质用作LNP。吞噬细胞呈红色,其可以看作是图像中较暗的区域。

[0041] 图16示出了用0.1%DiD(DiIC18(5);1,1'-二十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚二羧花青,4-氯苯磺酸盐)亲脂性羧花青染料处理的ceDNA LNP的图像。吞噬细胞呈红色,其可以看作是图像中较暗的区域。

[0042] 图17是示出对ss-OP4、MC3-5DSG和MC3 LNP的吞噬作用的量化(通过红色物体计数/汇合百分比)的图。

[0043] 图18A是示出ceDNA-ss-OP4 LNP在pH 7.4和pH 6.0下的内体释放或逃逸的图。图18B描绘了肝脏中ceDNA-luc的量化,如通过肝脏中的拷贝数超过脾中的拷贝数所测量的。

[0044] 图19示出了在ss-OP4+GalNAc LNP中配制的ceDNA对测试猴血清中补体级联蛋白C3a和C5b9(pg/ml)的影响。

[0045] 图20示出了在ss-OP4+GalNAc LNP中配制的ceDNA对测试猴血清中INF α 和INF β 细胞因子水平(pg/ml)的影响。

[0046] 图21示出了在ss-OP4+GalNAc LNP中配制的ceDNA对测试猴血清中INF γ 和IL-1 β 细胞因子水平(pg/ml)的影响。

[0047] 图22示出了在ss-OP4+GalNAc LNP中配制的ceDNA对测试猴血清中IL-6和IL-18细胞因子水平(pg/ml)的影响。

[0048] 图23示出了在ss-OP4+GalNAc LNP中配制的ceDNA对测试猴血清中TNF α 细胞因子水平 (pg/ml) 的影响。

[0049] 图24示出在大鼠中视网膜下注射ss-OP4/fLuc mRNA和ss-OP4/ceDNA-CpG使萤光素酶 (ceDNA-luc) 最小化的效果。

[0050] 图25示出在大鼠右眼 (OD) 和左眼 (OS) 中视网膜下注射ssOP4/fLuc mRNA和ssOP4/ceDNA-CpG使萤光素酶 (eDNA-luc) 最小化的效果的代表性IVIS图像。

[0051] 图26示出了ss-OP4-ceDNA调配物的静脉内 (IV) 或皮下 (SC) 施用对ceDNA-luc表达水平的影响。

[0052] 图27示出了ss-OP4-ceDNA调配物的静脉内 (IV) 或皮下 (SC) 施用对小鼠血清中细胞因子和趋化因子水平 (平均浓度, pg/ml) 的影响。

具体实施方式

[0053] 本公开提供了一种基于脂质的平台,其用于递送核酸,例如治疗性核酸 (TNA),例如末端封闭式DNA (ceDNA),所述核酸可以在没有病毒衣壳组分的情况下从细胞的细胞质移动到细胞核中。由于预先存在的背景免疫,与基于病毒载体的基因疗法相关的免疫原性显著限制了患者的数量,并阻止了患者的重新给药。由于缺乏预先存在的免疫力,目前描述的含有治疗性核酸的脂质颗粒 (例如,脂质纳米颗粒) 必要时允许额外剂量的治疗性核酸,并进一步扩大患者的可及性,包含在成长时可能需要后续剂量的儿科人群。此外,本公开的发现是,包括具有一个或多个叔氨基和二硫键的可切割脂质的含有治疗性核酸的脂质颗粒 (例如,脂质纳米颗粒) 提供治疗性核酸的有效递送,并具有改善的耐受性和安全性。因为目前描述的含有治疗性核酸的脂质颗粒 (例如,脂质纳米颗粒) 没有病毒衣壳内的空间所施加的包装限制,所以理论上,含有治疗性核酸的脂质颗粒 (例如,脂质纳米颗粒) 的唯一大小限制在于宿主细胞的DNA复制效率。

[0054] 如本文所述和举例说明的,所述治疗性核酸可以是末端封闭式DNA (ceDNA)。根据一些实施例,所述治疗性核酸可以是mRNA。

[0055] I. 定义

[0056] 除非本文另有定义,否则结合本申请使用的科学和技术术语应具有本公开本领域的普通技术人员通常所了解的含义。应理解,本发明不限于本文所描述的特定方法、方案和试剂等,并且因此可以变化。本文中所用的术语仅仅是为了描述具体实施例,而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅仅由权利要求书限定。免疫学和分子生物学中常用术语的定义能够在下列文献中找到:《默克诊疗手册 (The Merck Manual of Diagnosis and Therapy)》,第19版,默沙东公司 (Merck Sharp&Dohme Corp.) 出版,2011 (ISBN 978-0-911910-19-3); Robert S. Porter等人 (编辑),《病毒学领域 (Fields Virology)》,第6版,利平科特威廉姆斯威尔金斯公司 (Lippincott Williams&Wilkins) 出版,美国宾夕法尼亚州费城 (Philadelphia, PA, USA) (2013); Knipe, D.M. 和Howley, P.M. (编辑),《分子细胞生物学与分子医学百科全书 (The Encyclopedia of Molecular Cell Biology and Molecular Medicine)》,布莱克威尔科学有限公司 (Blackwell Science Ltd.) 出版,1999-2012 (ISBN 9783527600908); 以及Robert A. Meyers (编辑),《分子生物学与生物技术:综合案头参考 (Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference)》,VCH出版

社有限公司(VCH Publishers, Inc.) 出版,1995 (ISBN 1-56081-569-8); Werner Luttmann 的《免疫学(Immunology)》,爱思唯尔(Elsevier) 出版,2006;《詹韦氏免疫生物学(Janeway's Immunobiology)》,Kenneth Murphy, Allan Mowat, Casey Weaver (编辑), 泰勒弗朗西斯有限公司(Taylor&Francis Limited) 出版,2014 (ISBN 0815345305、9780815345305);《勒温基因XI(Lewin's Genes XI)》,琼斯和巴特利特出版社(Jones&Bartlett Publishers) 出版,2014 (ISBN-1449659055); Michael Richard Green和Joseph Sambrook,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第4版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),美国纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor, N.Y., USA) (2012) (ISBN 1936113414); Davis等人,《分子生物学的基本方法(Basic Methods in Molecular Biology)》,爱思唯尔科学出版有限公司(Elsevier Science Publishing, Inc.), 美国纽约(2012) (ISBN 044460149X);《酶学实验室方法:DNA (Laboratory Methods in Enzymology:DNA)》,Jon Lorsch (编辑),爱思唯尔,2013 (ISBN 0124199542);《分子生物学现代方法(Current Protocols in Molecular Biology, CPMB)》,Frederick M. Ausubel (编辑),约翰威利父子出版社(John Wiley and Sons),2014 (ISBN047150338X、9780471503385),《蛋白质科学现代方法(Current Protocols in Protein Science, CPPS)》,John E. Coligan (编辑),约翰威利父子出版公司(John Wiley and Sons, Inc.),2005;以及《免疫学现代方法(Current Protocols in Immunology, CPI)》(John E. Coligan, ADA M Kruisbeek, David H Margulies, Ethan M Shevach, Warren Strobe (编辑),约翰威利父子出版公司,2003 (ISBN 0471142735、9780471142737),所述文献的内容通过引用整体并入本文。

[0057] 如在本说明书和所附权利要求书中所使用的,除非上下文另外明确指明,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述(the)”包含复数指示物。

[0058] 缩写“例如(e.g.)”源自于拉丁文*exempli gratia*,并且在本文中用于指示非限制性实例。因此,缩写“例如(e.g.)”与术语“例如(for example)”同义。

[0059] 替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。

[0060] 如本文所使用的,当提及如量、持续时间等可测量的值时,术语“约”旨在涵盖与指定值的 $\pm 20\%$ 或 $\pm 10\%$ (更优选地 $\pm 5\%$,甚至更优选地 $\pm 1\%$,以及还更优选地 $\pm 0.1\%$)的偏差,因为此类偏差适合于执行所公开的方法。

[0061] 如本文所使用的,除非另外说明,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应被理解为包含所述范围内的任何整数的值,以及在适当时包含其分数(如,整数的十分之一和百分之一)。

[0062] 如本文所使用的,“包括(comprise、comprising和comprises)”以及“由...组成(comprised of)”旨在与“包含(include、including、includes)”或“含有(contain、containing、contains)”同义并且是包容性或开放式术语,用于指定以下内容的存在,例如组分,并且不排除或排除本领域已知或其中公开的附加的、未列举的组分、特征、元件、构件、步骤的存在。

[0063] 术语“由...组成”是指如本文所述的组合物、方法、过程和其相应组分,其排除在所述实施例的描述中未叙述的任何要素。

[0064] 如本文所使用的,术语“基本上由……组成”是指给定实施例所需要的那些要素。所述术语允许存在不实质影响本发明的那个实施例的基本和新颖特性或功能特性的额外要素。

[0065] 如本文所使用的,术语“如”、“例如”等意图指代示例性实施例,而不限制本公开的范围。

[0066] 除非另外定义,否则本文使用的所有技术和科学术语均具有与本发明本领域的普通技术人员通常所理解的含义相同的含义。尽管与本文所描述的任何方法和材料相似或等效的那些方法和材料可以用于实施以测试本发明,但在本文中描述优选的材料和方法。

[0067] 如本文所使用的,术语“施用(administration/administering)”和其变化形式是指将组合物或药剂(例如,核酸,具体地说,ceDNA)引入个体中并且包含同时和依序引入一种或多种组合物或药剂。“施用”可以指代例如治疗、药代动力学、诊断、研究、安慰剂以及实验方法。“施用”还涵盖体外和离体治疗。通过任何合适的途径将组合物或药剂引入个体中,所述途径包含经口、经肺、经鼻、肠胃外(静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下)、经直肠、淋巴内、瘤内或局部。施用包含自我施用和由另一个人施用。可以通过任何合适的途径进行施用。合适的施用途径允许组合物或药剂执行其预期功能。例如,如果合适的途径是静脉内,则通过将组合物或药剂引入个体的静脉中来施用组合物。

[0068] 如本文所使用的,短语“抗治疗性核酸免疫反应”、“抗转移载体免疫反应”、“针对治疗性核酸的免疫反应”、“针对转移载体的免疫反应”等意指“免疫反应”意指针对治疗性核酸、病毒或非病毒来源的任何不期望的免疫反应。在一些实施例中,不期望的免疫反应是针对病毒转移载体自身的抗原特异性免疫反应。在一些实施例中,免疫反应对转移载体具有特异性,所述转移载体可以是双链DNA、单链RNA或双链RNA。在其它实施例中,免疫反应对转移载体的序列具有特异性。在其它实施例中,免疫反应对转移载体的CpG含量具有特异性。

[0069] 如本文所使用的,术语“水溶液”意指包括全部或部分水的组合物。

[0070] 如本文所使用的,术语“碱基”包含嘌呤和嘧啶,其进一步包含天然化合物腺嘌呤、胸腺嘧啶、鸟嘌呤、胞嘧啶、尿嘧啶、肌苷和天然类似物,以及嘌呤和嘧啶的合成衍生物,包含但不限于,放置新反应性基团(如但不限于胺、醇、硫醇、羧酸盐和卤代烷)的修饰。

[0071] 如本文所使用的,术语“载体”旨在包含任何和所有溶剂、分散介质、媒剂、涂层、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲液、载体溶液、悬浮液、胶质物等。此类介质和药剂用于药学上活性物质的用途是本领域公知的。补充性活性成分也可以并入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用于宿主时不会产生毒性、过敏性或类似的不良反应的分子实体和组合物。

[0072] 如本文所使用的,术语“ceDNA”意指用于非病毒基因转移、合成或其它形式的无衣壳末端封闭式线性双链(ds)双螺旋DNA。根据一些实施例,ceDNA是末端封闭式线性双螺旋(CELiD)CELiD DNA。根据一些实施例,ceDNA是基于DNA的小环。根据一些实施例,ceDNA是简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体。根据一些实施例,ceDNA是辅助DNA。根据一些实施例,ceDNA是哑铃形线性双螺旋末端封闭式DNA,其在表达盒的5'和3'端中包括ITR的两个发夹结构。根据一些实施例,ceDNA是doggybone™ DNA。ceDNA的详细描述描述于2017年3月3日提交的PCT/US2017/020828的国际申请中,所述申请的全部内容以引用的方式明确地并

入本文中。使用基于细胞的方法产生包括各种反向末端重复 (ITR) 序列和构型的ceDNA的某些方法描述于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US18/49996和2018年12月6日提交的PCT/US2018/064242的实例1中,所述申请中的每一个以全文引用的方式并入本文中。用于产生包括各种ITR序列和构型的合成ceDNA载体的某些方法描述于例如2019年1月18日提交的国际申请PCT/US2019/14122中,所述国际申请的全部内容以引用的方式并入本文中。

[0073] 如本文所使用的,术语“末端封闭式DNA载体”是指具有至少一个共价封闭端的无衣壳DNA载体,其中所述载体的至少一部分具有分子内双螺旋结构。

[0074] 如本文所使用的,术语“ceDNA载体”与“ceDNA”可互换地使用并且指包括至少一个末端回文结构的末端封闭式DNA载体。在一些实施例中,ceDNA包括两个共价封闭端。

[0075] 如本文所使用的,术语“ceDNA-杆粒”意指一种包括作为分子间双螺旋的ceDNA基因组的感染性杆状病毒基因组,其能够作为质粒在大肠杆菌中增殖,因此可以作为杆状病毒的穿梭载体操作。

[0076] 如本文所使用的,术语“ceDNA-杆状病毒”意指一种在杆状病毒基因组内包括作为分子间双螺旋的ceDNA基因组的杆状病毒。

[0077] 如本文所使用的,术语“ceDNA-杆状病毒感染的昆虫细胞”和“ceDNA-BIIC”可互换使用,并且意指被ceDNA-杆状病毒感染的无脊椎动物宿主细胞(包括但不限于昆虫细胞(例如Sf9细胞))。

[0078] 如本文所使用的,术语“ceDNA基因组”意指还并入了至少一个反向末端重复区域的表达盒。ceDNA基因组还可以包括一个或多个间隔区。在一些实施例中,ceDNA基因组作为DNA的分子间双螺旋多核苷酸并入质粒或病毒基因组中。

[0079] 如本文所使用的,术语“DNA调控序列”、“控制元件”和“调控元件”在本文中可互换使用,并且意指提供和/或调控非编码序列(例如,靶向DNA的RNA)或编码序列(例如,定点修饰多肽,或Cas9/Csn1多肽)的转录和/或调控编码多肽的翻译的转录和翻译控制序列,如启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、终止子、蛋白质降解信号等。

[0080] 如本文所使用的,短语活性剂或治疗剂(如治疗性核酸)的“有效量”或“治疗有效量”是足以产生期望效果(例如,相比于在不存在治疗性核酸的情况下检测到的表达水平抑制目标序列的表达)的量。用于测量目标基因或目标序列的表达的合适的测定法包含例如使用本领域的技术人员已知的技术(如斑点印迹法、Northern印迹法、原位杂交、ELISA、免疫沉淀、酶功能)以及本领域的技术人员已知的表型测定法检查蛋白质或RNA水平。

[0081] 如本文所使用的,术语“外源”意指存在于除其天然来源以外的细胞中的物质。当在本文中使用时,术语“外源”可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体等生物系统中的核酸(例如编码多肽的核酸)或多肽,通常在所述细胞或生物体中未发现所述核酸或多肽,并且希望将核酸或多肽引入此类细胞或生物体中。可替代地,“外源”可以指已经通过涉及人手的过程被引入如细胞或生物体等生物系统中的核酸或多肽,在所述细胞或生物体中发现核酸或多肽的量相对较低,并且希望增加细胞或生物体中核酸或多肽的量,例如以产生异位表达或水平。与此相反,如本文所使用的,术语“内源性的”是指对生物系统或细胞天然物质。

[0082] 如本文所使用的,术语“表达”意指参与产生RNA和蛋白质以及适当分泌蛋白质的细胞过程,在适用时,其包含但不限于例如转录、转录物处理、翻译和蛋白质折叠、修饰和

处理。如本文所使用的,短语“表达产物”包含从基因(例如转基因)转录的RNA,以及通过翻译从基因转录的mRNA获得的多肽。

[0083] 如本文所使用的,术语“表达载体”意指指导来自与载体上的转录调控序列连接的序列的RNA或多肽的表达的载体。表达的序列通常但不一定对宿主细胞是异源的。表达载体可以包括另外的元件,例如,表达载体可以具有两个复制系统,从而允许其维持在两种生物体中,例如在人类细胞中进行表达并在原核宿主中进行克隆和扩增。表达载体可以是重组载体。

[0084] 如本文所使用的,术语“表达盒”和“表达单元”可互换使用,并且意指可操作地连接至启动子或足以指导DNA载体(例如合成的AAV载体)的转基因转录的其它DNA调控序列的异源DNA序列。合适的启动子包含例如组织特异性启动子。启动子也可以是AAV起源的。

[0085] 如本文所使用的,术语“末端重复”或“TR”包含任何包括至少一个最低需要的复制起点和包括回文发夹结构的区域的病毒或非病毒末端重复或合成序列。Rep结合序列(“RBS”或也被称为Rep结合元件(RBE))和末端解链位点(“TRS”)共同构成AAV的“最低需要的复制起点”,并且因此TR包括至少一个RBS和至少一个TRS。在给定的一段多核苷酸序列内彼此反向互补的TR通常各自被称为“反向末端重复”或“ITR”。在病毒背景下,ITR在介导复制、病毒颗粒和DNA包装、DNA整合以及基因组和前病毒拯救方面发挥着关键作用。在全长上并非反向互补(回文)的TR仍然可以执行ITR的传统功能,因此术语ITR用于指病毒或非病毒AAV载体中能够介导宿主细胞中的复制的TR。本领域普通技术人员将理解,在复杂的AAV载体构型中,可能存在两个以上ITR或非对称ITR对。

[0086] “ITR”可以使用包括一个或多个所需功能序列(例如回文序列,RBS)的一组寡核苷酸人工合成。ITR序列可以是AAV ITR、人工非AAV ITR或从病毒AAV ITR物理衍生的ITR(例如,从病毒基因组中去除的ITR片段)。例如,ITR可以源自细小病毒科,其涵盖细小病毒和依赖病毒(例如犬细小病毒、牛细小病毒、小鼠细小病毒、猪细小病毒、人细小病毒B-19),或者可以将充当SV40复制起点的SV40发夹用作ITR,其可以通过截断、取代、缺失、插入和/或添加而被进一步修饰。细小病毒科病毒由两个亚科组成:感染脊椎动物的细小病毒亚科(Parvovirinae)以及感染无脊椎动物的浓病毒亚科(Densovirinae)。依赖病毒属包含腺相关病毒(AAV)的病毒家族,其能够在脊椎动物宿主中复制,所述宿主包含但不限于人、灵长类、牛、犬、马和羊物种。一般而言,ITR序列不仅可以源自AAV,还可以源自细小病毒、慢病毒、鹅病毒、B19,呈野生型、“狗骨”和“哑铃形”、对称或甚至非对称ITR取向的构型。虽然ITR通常存在于AAV载体的5'端和3'端,但ITR只能存在于线性载体的一端。例如,ITR只能出现在5'端。在一些其它情况下,ITR只能出现在合成AAV载体的3'端。本文中为方便起见,将位于合成AAV载体中的表达盒的5' (“上游”)的ITR称为“5' ITR”或“左ITR”,并将位于载体或合成AAV中的表达盒的3' (“下游”)的ITR称为“3' ITR”或“右ITR”。

[0087] 如本文所使用的,“野生型ITR”或“WT-ITR”是指AAV基因组或其它依赖病毒中天然存在的ITR序列的序列,其保留例如Rep结合活性和Rep切口产生能力。由于遗传密码的简并性或漂移,来自任何AAV血清型的WT-ITR的核苷酸序列可能与典型的天然存在的序列略有不同,并且因此,本文涵盖使用的WT-ITR序列包含由于天然存在的变化(例如复制错误)而产生的WT-ITR序列。

[0088] 如本文所使用的,术语“基本上对称的WT-ITR”或“基本上对称的WT-ITR对”是指合

成AAV载体内的一对WT-ITR,它们都是野生型ITR,在其整个长度上具有反向互补序列。例如,即使ITR具有一个或多个偏离规范的天然存在的规范序列的核苷酸,只要这些变化不影响所述序列的物理和功能性质以及整体三维结构(二级和三级结构),所述ITR也可以被认为是野生型序列。在一些方面,偏离的核苷酸代表保守的序列变化。作为一个非限制性实例,序列与典型序列具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(如使用默认设置下的BLAST测量),并且还与其同源WT-ITR具有对称的三维空间组构,使得其3D结构在几何空间中具有相同的形状。基本上对称的WT-ITR在3D空间中具有相同的A-C-C'和B-B'环。通过确定基本上对称的WT-ITR具有与适当的Rep蛋白配对的可操作的Rep结合位点(RBE或RBE')和末端解链位点(trs),可以在功能上将其确认为WT。可以选择测试其它功能,包含在许可条件下的转基因表达。

[0089] 如本文所使用的,短语“经修饰的ITR”或“mod-ITR”或“突变ITR”可互换使用,并且是指与来自相同血清型的WT-ITR相比在至少一个或多个核苷酸中具有突变的ITR。所述突变可以引起ITR中的A、C、C'、B、B'区中的一个或多个发生变化,并且可以使得三维空间组构(即,其几何空间中的3D结构)相较于相同血清型的WT-ITR的3D空间组构发生变化。

[0090] 如本文所使用的,术语“非对称ITR”,也被称为“非对称ITR对”,是指单个合成AAV基因组内的一对ITR,它们在其全长上不是反向互补的。作为一个非限制性实例,非对称ITR与其同源ITR不具有对称的三维空间组构,使得其3D结构在几何空间中具有不同的形状。换句话说,非对称ITR对具有不同的整体几何结构,即它们在3D空间中具有不同的A-C-C'和B-B'环组构(例如,一个ITR与同源ITR相比可能具有短的C-C'臂和/或短的B-B'臂)。两个ITR之间的序列差异可能是由于一个或多个核苷酸添加、缺失、截断或点突变引起的。在一个实施例中,非对称ITR对中的一个ITR可以是野生型AAV ITR序列,并且另一个ITR是如本文定义的修饰ITR(例如,非野生型或合成ITR序列)。在另一个实施例中,非对称ITR对中的ITR皆不是野生型AAV序列,并且两个ITR是在几何空间中具有不同形状的经修饰的ITR(即,不同的整体几何结构)。在一些实施例中,非对称ITR对中的一个mod-ITR可以具有短C-C'臂,并且另一个ITR可以具有不同修饰(例如,单臂或短B-B'臂等),使得它们具有不同于同源非对称mod-ITR的三维空间组构。

[0091] 如本文所使用的,术语“对称ITR”是指单链AAV基因组内的一对ITR,它们是野生型或突变的(例如,相对于野生型修饰)依赖病毒ITR序列并且在其全长上是反向互补的。在一个非限制性实例中,两个ITR都是来自AAV2的野生型ITR序列。在另一个实例中,这两个ITR都不是野生型ITRAAV2序列(即,它们是经修饰的ITR,也被称为突变ITR),并且由于核苷酸的添加、缺失、取代、截断或点突变而在序列上与野生型ITR不同。本文中为方便起见,将位于合成AAV载体中表达盒的5'(上游)的ITR称为“5' ITR”或“左ITR”,并将位于合成AAV载体中表达盒的3'(下游)的ITR称为“3' ITR”或“右ITR”。

[0092] 如本文所使用的,术语“基本上对称的经修饰ITR”或“基本上对称的mod-ITR对”是指合成AAV内的一对经修饰的ITR,它们在其整个长度上都具有反向互补序列。例如,即使经修饰的ITR具有一些偏离反向互补序列的核苷酸序列,只要这些变化不影响性质和整体形状,其也可以认为是基本上对称的。作为一个非限制性实例,序列与典型序列具有至少85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性(如使用默认设置下的BLAST测量),并且还与其同源经修饰的ITR具有对称的三维空间组构,使得其3D结构在几何空间中具有

相同的形状。换句话说,基本上对称的经修饰的ITR对具有在3D空间中组织的相同的A、C-C'和B-B'环。在一些实施例中,来自mod-ITR对的ITR可以具有不同的反向互补核苷酸序列,但仍具有相同的对称三维空间组构,即两个ITR都具有产生相同的整体3D形状的突变。例如,mod-ITR对中的一个ITR(例如5'ITR)可以来自一种血清型,而另一个ITR(例如3'ITR)可以来自不同的血清型,但是,两种都可以具有相同的对应突变(例如,如果5'ITR在C区中具有缺失,那么来自不同血清型的同源修饰的3'ITR在C'区的对应位置处也具有缺失),以使得经修饰的ITR对具有相同的对称三维空间组构。在此类实施例中,经修饰的ITR对中的每个ITR可以来自不同血清型(例如,AAV1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11和12),如AAV2与AAV6的组合,其中一个ITR中的修饰反映在来自不同血清型的同源ITR中的对应位置中。在一个实施例中,基本上对称的经修饰的ITR对是指一对经修饰的ITR(mod-ITR),只要ITR之间的核苷酸序列的差异不影响特性或整体形状并且其在3D空间中具有基本上相同的形状即可。作为非限制性实例,如通过本领域中公知的标准方法,如默认设置下的BLAST(基本局部比对搜索工具)或BLASTN测定,mod-ITR与典型的mod-ITR具有至少95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,并且还具具有对称的三维空间组构,以使其3D结构在几何空间中的形状相同。基本上对称的mod-ITR对在3D空间中具有相同的A、C-C'和B-B'环,例如,如果基本上对称的mod-ITR对中的经修饰的ITR缺失C-C'臂,那么同源mod-ITR对应缺失C-C'环,并且还具具有在其同源mod-ITR的几何空间中呈相同形状的剩余A和B-B'环的类似3D结构。

[0093] 如本文所使用的,术语“侧接”意指一个核酸序列相对于另一核酸序列的相对位置。一般而言,在序列ABC中,B侧接有A和C。对于AxBxC排列,情况也是如此。因此,侧接序列在被侧接的序列之前或之后,但不必与被侧接的序列相邻或紧邻。在一个实施例中,术语侧接是指在线性单链合成AAV载体的每个末端处的末端重复序列。

[0094] 如本文所使用的,术语“间隙”意指本发明的合成DNA载体的中断部分,其在另外的双链ceDNA中产生单链DNA部分的一段。在双螺旋DNA的一个链中,间隙的长度可以是1个碱基对到100个碱基对。由本文所描述的方法以及由所述方法产生的合成载体设计和产生的典型间隙的长度可以是例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60bp。本公开中的示例性间隙的长度可以是1bp到10bp、1bp到20bp、1bp到30bp。

[0095] 如本文所使用的,术语“切口”是指双链DNA分子中的不连续性,其中通常通过损伤或酶作用在一条链的相邻核苷酸之间不存在磷酸二酯键。应当理解,一个或多个切口允许在DNA复制期间释放链中的扭转,并且切口也被认为在促进转录机制结合方面发挥作用。

[0096] 如本文所使用的,术语“neDNA”、“带切口的ceDNA”是指在开放阅读框(例如,待表达的启动子和转基因)上游的茎区或间隔区中具有1-100个碱基对的切口或间隙的末端封闭式DNA。

[0097] 如本文所使用的,术语“基因”广泛用于指与给定RNA或蛋白质的表达相关的任何核酸节段,体外或体内。因此,基因包含编码所表达的RNA的区域(其通常包含多肽编码序列),并且通常包含其表达所需的调控序列。基因可以从多种来源获得,包含从所关注的来源克隆或从已知或预测的序列信息合成,并且可以包含被设计成具有期望的参数的序列。

[0098] 如本文所使用的,术语“基因递送”意指将外来DNA转移到宿主细胞中以施加基因

疗的过程。

[0099] 如本文所使用的,短语“遗传疾病”或“遗传病症”意指部分或完全、直接或间接地由基因组中的一种或多种异常引起的疾病,包含并且尤其是从出生起出现的病状。异常可以是基因中的突变、插入或缺失。异常可能影响基因的编码序列或其调控序列。

[0100] 如本文所使用的,术语“异源核苷酸序列”和“转基因”可互换使用,并且是指并入如本文公开的载体(如cDNA载体)中并可以由所述载体递送和表达的所关注的核酸(除编码衣壳多肽的核酸外)。异源核酸序列可以与天然存在的核酸序列(或其变体)连接(例如通过基因工程)以产生编码嵌合多肽的嵌合核苷酸序列。异源核酸序列可以与变体多肽连接(例如,通过基因工程)以产生编码融合变体多肽的核苷酸序列。

[0101] 如本文所使用的,术语“同源性”或“同源”意指在比对序列并在需要时为实现最大的序列同一性百分比而引入间隙后,同源臂中与目标染色体上的对应序列中的核苷酸残基相同的核苷酸残基的百分比。可以用本领域技术内的多种方式来实现出于确定核苷酸序列同源性百分比的目的而进行的比对,例如使用公开可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ClustalW2或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当的参数,包含在被比较的序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。在一些实施例中,当例如修复模板的同源臂的核酸序列(例如,DNA序列)与宿主细胞的对应的天然或未编辑的核酸序列(例如,基因组序列)具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或更多同一性时,所述序列被视为“同源”。

[0102] 如本文所使用的,术语“宿主细胞”意指易于被本公开的核酸治疗剂转化、转染、转导等的任何细胞类型。作为非限制性实例,宿主细胞可以是分离的原代细胞、多能干细胞、CD34⁺细胞、诱导的多能干细胞或许多永生化细胞系(例如,HepG2细胞)中的任一种。可替代地,宿主细胞可以是组织、器官或生物体中的原位或体内细胞。此外,宿主细胞可以是例如哺乳动物个体(例如,需要基因疗法的人类患者)的靶细胞。

[0103] 如本文所使用的,“诱导型启动子”意指特征在于当存在诱导物或诱导剂或受其影响或被其接触时,启动或增强转录活性的启动子。如本文所使用的,“诱导物”或“诱导剂”可以是内源性的,或是以能够从诱导型启动子诱导转录活性的方式施用的通常外源的化合物或蛋白质。在一些实施例中,诱导物或诱导剂,即化学物质、化合物或蛋白质,本身可以是核酸序列转录或表达的结果(即,诱导物可以是由另一组分或模块表达的诱导蛋白),转录或表达本身可以在诱导型启动子的控制下。在一些实施例中,诱导型启动子是在不存在某些药剂,如阻遏子的情况下被诱导的。诱导型启动子的实例包含(但不限于):四环素、金属硫蛋白、蜕皮激素、哺乳动物病毒(例如,腺病毒晚期启动子;以及小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复序列(MMTV-LTR))和其它类固醇反应启动子、雷帕霉反应启动子等。

[0104] 如本文所使用的,术语“体外”意指不需要存在具有完整膜的细胞(如细胞提取物)的测定和方法,并且可以指在非细胞系统(如不包括细胞或细胞系统的介质,如细胞提取物)中引入可编程的合成生物回路。

[0105] 如本文所使用的,术语“体内”意指发生在生物体(如多细胞动物)中或生物体内的测定或过程。在本文所描述的一些方面中,当使用如细菌等单细胞生物体时,可以说方法或用途是在“体内”发生的。术语“离体”是指使用具有完整膜的活细胞进行的方法和用途,所

述活细胞在多细胞动物或植物体之外,例如外植体、培养细胞,包含原代细胞和细胞系、转化的细胞系,以及提取的组织或细胞,包含血细胞等。

[0106] 如本文所使用的,术语“脂质”意指一组有机化合物,包含但不限于脂肪酸酯,其特征在于不溶于水,但可溶于许多有机溶剂。它们通常分为至少三类:(1)“简单脂质”,包含脂肪和油以及蜡;(2)“化合物脂质”,包含磷脂和糖脂;以及(3)“衍生脂质”,如类固醇。

[0107] 磷脂的代表性实例包含但不限于磷脂酰胆碱、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、磷脂酸、棕榈酰基油酰基磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰胆碱、溶血磷脂酰乙醇胺、二棕榈酰基磷脂酰胆碱、二油酰基磷脂酰胆碱、二硬脂酰基磷脂酰胆碱和二亚油酰基磷脂酰胆碱。缺少磷的其它化合物,如鞘脂、鞘糖脂家族、二酰基甘油和 β -酰氧基酸,也在被称为两亲性脂质的组内。此外,上述两亲性脂质可与其它脂质(包含甘油三酸酯和固醇)混合。

[0108] 在一个实施例中,脂质组合物包括一个或多个叔氨基、一个或多个苯基酯键和二硫键。

[0109] 如本文所使用的,术语“脂质缀合物”意指抑制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)聚集的缀合脂质。此类脂质缀合物包含但不限于PEG-脂质缀合物,如例如,偶联至二烷氧基丙基的PEG(例如,PEG-DAA缀合物)、偶联至二酰基甘油的PEG(例如,PEG-DAG缀合物)、偶联至胆固醇的PEG、偶联至磷脂酰乙醇胺的PEG和偶联至神经酰胺的PEG(参见例如,美国专利第5,885,613号)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如,POZ-DAA缀合物;参见例如,于2010年1月13日提交的美国临时申请第61/294,828号和于2010年1月14日提交的美国临时申请第61/295,140号)、聚酰胺寡聚物(例如,ATA-脂质缀合物)及其混合物。POZ-脂质缀合物的另外的实例在PCT公开号WO 2010/006282中描述。PEG或POZ可以直接与脂质缀合,或者可以通过接头部分与脂质连接。可以使用适合于将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分,包含例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施例中,使用不含酯的接头部分,如酰胺或氨基甲酸酯。出于所有目的,将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0110] 如本文所使用的,术语“脂质包封”意指提供具有完全包封、部分包封或两者的活性剂或治疗剂,如核酸(例如,ceDNA)的脂质颗粒。在优选的实施例中,核酸被完全包封在脂质颗粒中(例如,以形成含有核酸的脂质颗粒)。

[0111] 如本文所使用的,术语“脂质颗粒”或“脂质纳米颗粒”意指可用于将治疗剂(如核酸治疗剂)递送至所关注的目标位点(例如,细胞、组织、器官等)的脂质调配物。在一个实施例中,本发明的脂质颗粒是含有核酸的脂质颗粒,其通常由阳离子脂质、非阳离子脂质和任选的防止颗粒聚集的缀合脂质形成。在其它优选的实施例中,如治疗性核酸等治疗剂可以包封在颗粒的脂质部分中,从而保护其免于酶促降解。在一个实施例中,脂质颗粒包括核酸(例如,ceDNA)和包括一个或多个叔氨基、一个或多个苯基酯键和二硫键的脂质。

[0112] 本发明的脂质颗粒通常具有约20nm到约120nm、约30nm到约150nm、约40nm到约150nm、约50nm到约150nm、约60nm到约130nm、约70nm到约110nm、约70nm到约100nm、约80nm到约100nm、约90nm到约100nm、约70到约90nm、约80nm到约90nm、约70nm到约80nm或约30nm、约35nm、约40nm、约45nm、约50nm、约55nm、约60nm、约65nm、约70nm、约75nm、约80nm、约85nm、约90nm、约95nm、约100nm、约105nm、约110nm、约115nm、约120nm、约125nm、约130nm、约135nm、约140nm、约145nm或约150nm的平均直径。

[0113] 如本文所使用的,术语“阳离子脂质”是指在生理pH下带正电荷的任何脂质。脂质颗粒中的阳离子脂质可以包括例如一种或多种阳离子脂质,如1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLinDMA)、1,2-二亚油酰氧基-N,N-二甲氨基丙烷(DLenDMA)、1,2-二- γ -亚麻氧基-N,N-二甲氨基丙烷(γ -DLenDMA)、2,2-二亚油基-4-(2-二甲基氨基乙基)-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-C2-DMA)、2,2-二亚油基-4-二甲氨基甲基-[1,3]-二氧戊环(DLin-K-DMA)、“SS-可切割脂质”或其混合物。在一些实施例中,阳离子脂质也是可离子化的脂质,即可离子化的阳离子脂质。

[0114] 如本文所使用的,术语“阴离子脂质”是指在生理pH下带负电荷的任何脂质。这些脂质包含但不限于磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二烷酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰基磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰基磷脂酰乙醇胺、赖氨酰基磷脂酰甘油、棕榈酰基油酰基磷脂酰甘油(POPG)和加入其它阴离子改性基团的中性脂质。

[0115] 如本文所使用的,术语“疏水性脂质”是指具有非极性基团的化合物,所述非极性基团包含但不限于长链饱和和不饱和脂肪族烃基以及任选地被一个或多个芳香族、环脂族或杂环基取代的此类基团。合适的实例包含但不限于二酰基甘油、二烷基甘油、N-N-二烷基氨基、1,2-二酰氧基-3-氨基丙烷和1,2-二烷基-3-氨基丙烷。

[0116] 如本文所使用的,术语“可离子化的脂质”意指具有至少一个可质子化或可去质子化基团的脂质,例如阳离子脂质,使得脂质在等于或低于生理pH(例如,pH 7.4)的pH下带正电荷,并且在第二pH下为中性,所述第二pH优选地等于或高于生理pH。本领域普通技术人员将理解,作为pH的函数的质子的添加或去除是一种平衡过程,并且对带电或中性脂质的提及是指占优势物种的性质,而不要求所有的脂质都以带电或中性形式存在。一般而言,可离子化的脂质的可质子化基团的pKa在约4到约7的范围内。在一些实施例中,可离子化的脂质可以包含“可切割脂质”或“SS-可切割脂质”。

[0117] 如本文所使用的,术语“中性脂质”意指在选定的pH下以不带电或中性两性离子形式存在的多种脂质物种中的任何一种。在生理pH下,此类脂质包含例如二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油。

[0118] 如本文所使用的,术语“非阳离子脂质”意指任何两亲性脂质以及任何其它中性脂质或阴离子脂质。

[0119] 如本文所使用的,术语“可切割脂质”或“SS-可切割脂质”是指包括二硫键可切割单元的脂质。可切割脂质可以包含可切割的二硫键(“ss”),其含有类脂材料,所述类脂材料包括pH敏感性叔胺和可自降解的苯基酯。例如,SS-可切割脂质可以是ss-0P脂质(COATSOME®SS-0P)、ss-M脂质(COATSOME®SS-M)、ss-E脂质(COATSOME®SS-E)、ss-EC脂质(COATSOME®SS-EC)、ss-LC脂质(COATSOME®SS-LC)、ss-0C脂质(COATSOME®SS-0C)和ss-PalmE脂质(参见例如,式I-IV),或以下文献中描述的脂质:Togashi等人,(2018),《控释杂志(Journal of Controlled Release)》,“一种基于细胞内环境敏感性维生素E支架类脂材料并辅以抗炎药的肝脏pDNA递送系统(A hepatic pDNA delivery system based on an intracellular environment sensitive vitamin E-scaffold lipid-like material with the aid of an anti-inflammatory drug)”,279:262-270。美国专利第9,708,628号和美国专利第10,385,030号中描述了可切割脂质的另外的实例,所述美国专利的全部内容通过引用并入本文。在一个实施例中,可切割脂质包括叔

胺,其响应酸性区室,例如,用于膜去稳定化的内体或溶酶体和可在还原环境(如细胞质)中切割的二硫键。在一个实施例中,可切割脂质是阳离子脂质。在一个实施例中,可切割脂质是可离子化的阳离子脂质。本文更详细地描述了可切割脂质。

[0120] 如本文所使用的,术语“有机脂质溶液”意指完全或部分包括具有脂质的有机溶剂的组合物。

[0121] 如本文所使用的,术语“脂质体”意指组装成球形构型的脂质分子,所述球形构型包封与水性外部隔离的内部水性体积。脂质体是具有至少一个脂质双层的囊泡。在医药研发的背景下,脂质体通常用作药物/治疗剂递送的载体。脂质体通过与细胞膜融合并重新定位其脂质结构以递送药物或活性药物成分来起作用。用于此类递送的脂质体组合物由常由磷脂(具体地说,具有磷脂酰胆碱基团的化合物)构成,然而这些组合物还可以包含其它脂质。

[0122] 如本文所使用的,术语“局部递送”意指将如干扰RNA(例如,siRNA)等活性剂直接递送至生物体内的目标位点。例如,药剂可以通过直接注射到疾病位点(如肿瘤或其它目标位点,如发炎位点或目标器官,如肝脏、心脏、胰腺、肾脏等)中来局部递送。

[0123] 在本文中可互换使用的术语“多核苷酸”和“核酸”是指任何长度的核苷酸(核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)的聚合物形式。因此,这个术语包含单链、双链或多链DNA或RNA、基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交物、或包含嘌呤和嘧啶碱基或其它天然、化学或生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。“寡核苷酸”通常是指单链或双链DNA的约5至约100个核苷酸之间的多核苷酸。然而,出于本公开的目的,寡核苷酸的长度没有上限。寡核苷酸也称为“寡聚物(oligomer)”或“寡聚物(oligo)”,并且可以从基因中分离出来,或通过本领域已知的方法化学合成。应了解术语“多核苷酸”和“核酸”包含单链(例如有义或反义)和双链多核苷酸(如果所描述的实施例适用的话)。DNA可以呈例如反义分子、质粒DNA、DNA-DNA双螺旋、预缩合DNA、PCR产物、载体(P1、PAC、BAC、YAC、人工染色体)、表达盒、嵌合序列、染色体DNA或这些组的衍生物和组合的形式。DNA可以呈小环、质粒、杆粒、小基因、迷你串DNA(线性共价闭合DNA载体)、末端封闭式线性双螺旋DNA(CELiD或ceDNA)、doggyboneTM DNA、哑铃形DNA、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、病毒载体或非病毒载体的形式。RNA可以呈小干扰RNA(siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、mRNA、rRNA、tRNA、病毒RNA(vRNA)和其组合的形式。核酸包含含有已知核苷酸类似物或经修饰的主链残基或键联的核酸,其是合成的、天然存在的以及非天然存在的,并且其具有与参考研酸类似的结合性质。此类类似物和/或经修饰的残基的实例包含(但不限于):硫代磷酸酯、二氨基磷酸酯吗啉代寡聚物(吗啉基)、氨基磷酸酯、甲基膦酸酯、手性甲基膦酸酯、2'-O-甲基核糖核苷酸、锁核酸(LNATM)和肽核酸(PNA)。除非特别限制,否则所述术语涵盖含有与参考研酸具有类似结合特性的天然核苷酸的已知类似物的核酸。除非另外指出,否则特定核酸序列还隐含地涵盖其保守修饰的变体(例如,简并密码子取代)、等位基因、直系同源物、SNP和互补序列以及明确指出的序列。

[0124] 如本文所使用的,短语“核酸治疗性”、“治疗性核酸”和“TNA”可互换地使用,并且是指使用核酸作为治疗疾病或病症的治疗剂的活性组分的治疗的任何模态。如本文所使用的,这些短语是指基于RNA的治疗剂和基于DNA的治疗剂。基于RNA的治疗剂的非限制性实例包含mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA

(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)。基于DNA的治疗剂的非限制性实例包含小环DNA、小基因、病毒DNA(例如,慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、末端封闭式线性双螺旋DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggybone™ DNA载体、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒迷你串DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)或哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。

[0125] 如本文所使用的,“抑制性多核苷酸”是指减少或阻止第二(靶标)多核苷酸的表达(转录或翻译)的DNA或RNA分子。抑制性多核苷酸包含反义多核苷酸、核酶和外部指导序列。术语“抑制性多核苷酸”进一步包含DNA和RNA分子,例如,编码实际抑制性物种的RNAi,如编码核酶的DNA分子。

[0126] 如本文所使用的,关于RNAi分子(例如siRNA或miRNA)的活性提及的“基因沉默(gene silencing或gene silenced)”是指在不存在miRNA或RNA干扰分子的情况下,与细胞中发现的mRNA水平相比,细胞中目标基因的mRNA水平降低了至少约5%、约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、约100。在一个优选的实施例中,mRNA水平降低了至少约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、约100%。

[0127] 如本文所使用的,术语“干扰RNA”或“RNAi”或“干扰RNA序列”包含当干扰RNA在与目标基因或序列相同的细胞中时能够减少或抑制目标基因或序列的表达(例如,通过介导与干扰RNA序列互补的mRNA的降解或抑制与干扰RNA序列互补的mRNA的翻译)的单链RNA(例如,成熟的miRNA、ssRNAi寡核苷酸、ssDNAi寡核苷酸)、双链RNA(即,双螺旋RNA,如siRNA)、切丁酶-底物dsRNA、shRNA、aiRNA或前-miRNA)、DNA-RNA杂交物(参见例如,PCT公开号WO 2004/078941)或DNA-DNA杂交物(参见例如,PCT公开号WO 2004/104199)。因此,干扰RNA是指与目标mRNA序列或与由两条互补链或由一条单一自身互补链形成的双链RNA互补的单链RNA。干扰RNA可能与目标基因或序列具有实质或完全同一性,或可能包括错配区域(即,错配基序)。干扰RNA的序列可对应于全长目标基因或其子序列。优选地,干扰RNA分子是化学合成的。出于所有目的,将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。术语“RNAi”可以既包含基因沉默RNAi分子,又包含活化基因表达的RNAi效应子分子。在一些实施例中,用于抑制或基因沉默的RNAi药剂可用于本文公开的方法、试剂盒和组合物,例如,以抑制免疫反应。

[0128] 干扰RNA包含“小干扰RNA”或“siRNA”,例如,长度为约15-60个、15-50个或15-40个(双螺旋)核苷酸,更通常地长度为约15-30个、15-25个或19-25个(双螺旋)核苷酸的干扰RNA,并且优选地长度为约20-24个、21-22个或21-23个(双螺旋)核苷酸(例如,双链siRNA的每个互补序列的长度为15-60个、15-50个、15-40个、15-30个、15-25个或19-25个核苷酸,优选地长度为约20-24个、21-22个或21-23个核苷酸,并且双链siRNA的长度为约15-60个、15-50个、15-40个、15-30个、15-25个或19-25个碱基对,优选地长度为约18-22个、19-20个或19-21个碱基对)。siRNA双螺旋可以包括约1个到约4个核苷酸或约2个到约3个核苷酸的3'突出端和5'磷酸末端。siRNA的实施例包含但不限于由两条单独的链分子组装的双链多核苷酸分子,其中一条链是有义链,而另一条链是互补的反义链;由单链分子组装的双链多核苷酸分子,其中有义区和反义区通过基于核酸的接头或基于非核酸的接头连接;含有自身互补的有义区和反义区的具有发夹二级结构的双链多核苷酸分子;以及具有两个或更多个环结构和含有自身互补的有义区和反义区的茎的环状单链多核苷酸分子,其中所述环状多

核苷酸可以在体内或在体外被处理以产生活性双链siRNA分子。如本文所使用的,术语“siRNA”包含RNA-RNA双螺旋以及DNA-RNA杂交物(参见,例如,PCT公开号WO 2004/078941)。

[0129] 如本文所使用的,术语“核酸构建体”是指单链或双链的核酸分子,其是从天然基因中分离的,或者以自然界中不另外存在或合成的方式进行修饰以含有核酸的节段。当核酸构建体包含表达本公开的编码序列所需的控制序列时,术语核酸构建体与术语“表达盒”同义。“表达盒”包含可操作地连接至启动子的DNA编码序列。

[0130] “可杂交的”或“互补的”或“基本上互补的”意指核酸(例如,RNA)包含使其能够在体外和/或体内适当的温度和溶液离子强度的条件下以序列特异性的反向平行方式(即,核酸特异性地结合至互补核酸)与另一核酸非共价结合(即形成沃森-克里克碱基对(Watson-Crick base pair)和/或G/U碱基对)、“退火”或“杂交”的核苷酸序列。如本领域已知的,标准的沃森-克里克碱基对包含:腺嘌呤(A)与胸苷(T)配对,腺嘌呤(A)与尿嘧啶(U)配对,以及鸟嘌呤(G)与胞嘧啶(C)配对。另外,在本领域中还已知,对于两个RNA分子(例如,dsRNA)之间的杂交,鸟嘌呤(G)碱基与尿嘧啶(U)配对。例如,在与mRNA中的密码子进行tRNA反密码子碱基配对的情况下,G/U碱基配对部分负责遗传密码的简并性(即,冗余)。在本公开的上下文中,靶向主题DNA的RNA分子的蛋白质结合节段(dsRNA双螺旋)的鸟嘌呤(G)被认为与尿嘧啶(U)互补,反之亦然。这样,当可以在靶向主题DNA的RNA分子的蛋白质结合节段(dsRNA双螺旋)的给定核苷酸位置形成G/U碱基对时,该位置不被认为是非互补的,而是被认为是互补的。

[0131] 如本文所使用的,“核苷酸”含有糖脱氧核苷(DNA)或核糖(RNA)、碱基和磷酸酯基。核苷酸通过磷酸酯基连接在一起。

[0132] 如本文所使用的,“可操作地连接”意指一种并置,其中如此描述的组分处于允许其以预期方式起作用的关系中。例如,如果启动子影响编码序列的转录或表达,那么所述启动子可操作地连接到所述编码序列。启动子可以被说成驱动其调控的核酸序列的表达或驱动其转录。短语“可操作地连接”、“操作性地定位”、“操作性地连接”,“在控制下”和“在转录控制下”指示启动子相对于其调控的核酸序列处于正确的功能位置和/或取向,以控制该序列的转录启动和/或表达。如本文所使用的,“反向启动子”是指核酸序列处于相反的取向,使得编码链现在成为非编码链的启动子,并且反之亦然。反向启动子序列可以在各种实施例中用于调控开关的状态。另外,在各种实施例中,启动子可以与增强子结合使用。

[0133] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”在本文可互换使用,是指任何长度的氨基酸的聚合物形式,其可以包含编码和非编码的氨基酸、经过化学或生物化学修饰或衍生的氨基酸和具有修饰的肽主链的多肽。

[0134] 如本文所使用的,术语“药学上可接受的载体”包含任何标准药学载体,如磷酸盐缓冲盐溶液、水、乳液(如油/水或水/油)以及各种类型的润湿剂。该术语还涵盖美国联邦政府监管机构批准的或美国药典中列出的用于动物(包含人类)的任何药剂,以及不会对受试者造成显著刺激并且不会消除所施用化合物的生物活性和性质的任何载体或稀释剂。

[0135] 如本文所使用的,术语“启动子”意指通过驱动核酸序列的转录来调控另一核酸序列表达的任何核酸序列,其可以是编码蛋白质或RNA的异源目标基因。启动子可以是组成型的、诱导型的、阻遏型的、组织特异性的或其任何组合。启动子是核酸序列的控制区域,在所述核酸序列的其余部分的引发和转录速率是受控的。启动子还可以含有可以结合调控蛋白

和分子的遗传元件,如RNA聚合酶和其它转录因子。在启动子序列内将发现转录起始位点,以及负责RNA聚合酶结合的蛋白质结合结构域。真核启动子将经常但并非总是含有“TATA”框和“CAT”框。各种启动子,包含诱导型启动子,可以用于驱动本文公开的合成AAV载体中转基因的表达。启动子序列可以在其3'端处由转录起始位点界定并且向上游(5'方向)延伸以包含在高于背景时可检测的水平下启动转录所必需的最小数量的碱基或元件。

[0136] 启动子可以是与基因或序列天然结合的启动子,如可以通过分离位于编码节段上游的5'非编码序列和/或给定基因或序列的外显子来获得。此类启动子可以被称为“内源性的”。类似地,在一些实施例中,增强子可以是与核酸序列天然相关的增强子,位于所述序列的下游或上游。在一些实施例中,编码核酸节段在“重组启动子”或“异源启动子”的控制下定位,所述启动子均指在其天然环境中通常不与其可操作地连接的编码核酸序列关联的启动子。类似地,“重组或异源增强子”是指在其天然环境中通常不与给定核酸序列关联的增强子。此类启动子或增强子可以包含其它基因的启动子或增强子;从任何其它原核、病毒或真核细胞分离的启动子或增强子;以及非“天然存在”的合成启动子或增强子,即包括不同转录调控区的不同元件和/或通过本领域已知的基因工程方法来改变表达的突变。除了通过合成产生启动子和增强子的核酸序列以外,还可以结合本文公开的合成生物回路和模块,使用重组克隆和/或核酸扩增技术,包含PCR,来产生启动子序列(参见例如美国专利第4,683,202号、美国专利第5,928,906号,各自通过引用整体并入本文)。此外,经考虑也可以采用指导序列在例如线粒体、叶绿体等非核细胞器内的转录和/或表达的控制序列。

[0137] 如本文所使用的,术语“增强子”是指顺式作用调控序列(例如,50-1,500个碱基对),其结合一种或多种蛋白质(例如,活化剂蛋白质或转录因子)以增加核酸序列的转录活化。增强子可以位于其调控的基因起始位点上游或基因起始位点下游最多1,000,000个碱基对处。增强子可以位于内含子区域内,或无关基因的外显子区中。

[0138] 如本文所使用的,术语“Rep结合位点”(“RBS”)和“Rep结合元件”(“RBE”)可互换使用并且意指Rep蛋白(例如AAV Rep 78或AAV Rep 68)的结合位点,其在与Rep蛋白结合时允许Rep蛋白在并入了所述RBS的序列上发挥其位点特异性核酸内切酶活性。RBS序列和其反向互补序列一起形成单个RBS。RBS序列是本领域公知的,并且包含例如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:1),这是在AAV2中鉴定的RBS序列。在本发明的实施例中可以使用任何已知的RBS序列,包含其它已知的AAV RBS序列和其它天然已知的或合成的RBS序列。不受理论的束缚,认为Rep蛋白的核酸酶结构域与双螺旋核苷酸序列GCTC结合,因此所述两个已知的AAV Rep蛋白直接结合并稳定地组装在双螺旋寡核苷酸5'-(GCGC)(GCTC)(GCTC)(GCTC)-3'(SEQ ID NO:1)上。另外,可溶性聚集性构象异构体(即,数目未定的相互缔合的Rep蛋白)解离并结合到含有Rep结合位点的寡核苷酸。每个Rep蛋白都与每个链上的含氮碱基和磷酸二酯主链相互作用。与含氮碱基的相互作用提供序列特异性,而与磷酸二酯主链的相互作用是非序列特异性的或较少序列特异性的,并稳定了蛋白质-DNA复合物。

[0139] 如本文所使用的,短语“重组载体”意指包含能够在体内表达的异源核酸序列或“转基因”的载体。应当理解,在一些实施例中,本文所描述的载体可以与其它合适的组合物和疗法进行组合。在一些实施例中,载体是游离型的。合适的游离型载体的用途提供了一种在高拷贝数的染色体外DNA中维持受试者所关注的核苷酸,从而消除染色体融合的潜在影

响的方法。

[0140] 如本文所使用的,术语“报告蛋白”意指可以用于提供可检测读数的蛋白质。报告蛋白通常产生可测量的信号,例如荧光、颜色或发光。报告蛋白编码序列编码在细胞或生物体中的存在易于观察到的蛋白质。例如,荧光蛋白当被特定波长的光激发时会导致细胞发光,荧光素酶引起细胞催化产生光的反应,以及如 β -半乳糖苷酶的酶将底物转化为有色产物。可用于实验或诊断目的的示例性报告多肽包含但不限于 β -内酰胺酶、 β -半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶(AP)、胸苷激酶(TK)、绿色荧光蛋白(GFP)和其它荧光蛋白、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和其它在本领域中公知的报告多肽。

[0141] 如本文所使用的,术语“效应子蛋白”是指一种提供可检测的读数的多肽,例如作为报告多肽,或更适当地,作为杀灭细胞的多肽,例如毒素,或致使细胞易用所选药剂或因缺乏所选药剂而被杀灭的药剂。效应子蛋白包含直接靶向或损害宿主细胞的DNA和/或RNA的任何蛋白质或肽。例如,效应子蛋白可以包含但不限于:靶向宿主细胞DNA序列(无论是基因组的还是在染色体外元件上的)的限制性核酸内切酶;降解细胞存活所必需的多肽目标的蛋白酶;DNA旋转酶抑制剂;以及核糖核酸酶型毒素。在一些实施例中,由如本文所描述的合成生物回路控制的效应子蛋白表达可作为一个因子参与另一个合成生物回路,从而扩大了生物回路系统反应性的范围和复杂度。

[0142] 转录调控因子是指活化或阻遏所关注基因转录的转录活化子和阻遏子。启动子为引发特定基因转录的核酸区域。转录活化子通常结合至转录启动子附近并且募集RNA聚合酶以直接引发转录。阻遏子与转录启动子结合,并在空间上阻碍RNA聚合酶启动转录。其它转录调控因子可取决于它们的结合位置以及细胞和环境条件来充当活化子或阻遏子。转录调控因子类别的非限制性实例包含但不限于同源域蛋白、锌指蛋白、翼状螺旋(叉头)蛋白和亮氨酸拉链蛋白。

[0143] 如本文所使用的,“阻遏蛋白”或“诱导蛋白”是与调控序列元件结合并分别阻遏或活化与调控序列元件操作性地连接的序列的转录的蛋白质。如本文所描述的优选阻遏和诱导蛋白对至少一种输入剂或环境输入物的存在或不敏感。如本文所描述的优选蛋白质是模块的形式,包括例如可分离的DNA结合和输入剂结合或反应元件或结构域。

[0144] 如本文所使用的,“输入剂反应结构域”是转录因子的一个结构域,其以致使连接的DNA结合融合结构域对条件或输入剂的存在作出反应的方式与所述条件或输入剂结合或以其它方式作出反应。在一个实施例中,条件或输入剂的存在导致输入剂反应结构域或其融合的蛋白质发生构象变化,从而改变转录因子的转录调制活性。

[0145] 如本文所使用的,术语“有义”和“反义”意指多核苷酸上结构元件的取向。元件的有义和反义版本彼此反向互补。

[0146] 如本文所使用的,术语“序列同一性”意指两个核苷酸序列之间的相关性。出于本公开的目的,使用尼德曼-翁施算法(Needleman和Wunsch,1970)来确定两个脱氧核糖核酸序列之间的序列同一性程度,该算法是如在EMBOSS软件包(EMBOSS:欧洲分子生物学开放软件套件,Rice等人,2000,同上)(优选3.0.0版或更新版本)等Needle程序中所实施的。所使用的任选参数是空位开放罚分10、空位延伸罚分0.5以及EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)取代矩阵。将标记为“最长同一性”的Needle的输出(使用-nobrief选项获得)用作同一性百分比,并按以下计算:(相同的脱氧核糖核苷酸乘以100)/(比对的长度-比对中的空

位总数)。比对的长度优选为至少10个核苷酸、优选为至少25个核苷酸、更优选为至少50个核苷酸并且最优选为至少100个核苷酸。

[0147] 如本文所使用的,术语“间隔区”意指分离载体或基因组中的功能元件的中间序列。在一些实施例中,AAV间隔区将两个功能元件保持在对于最佳功能性来说所期望的距离上。在一些实施例中,间隔区提供或增加了载体或基因组的基因稳定性。在一些实施例中,间隔区通过提供克隆位点的适宜位置和设计数目的碱基对的间隙而促进基因组的就绪基因操作。例如,在某些方面,含有若干限制性核酸内切酶位点的寡核苷酸“多酶切点接头”或“聚克隆位点”,或设计成不具有已知蛋白质(例如转录因子)结合位点的非开放阅读框序列可以位于载体或基因组中以分离顺式作用因子,例如插入6聚体、12聚体、18聚体、24聚体、48聚体、86聚体、176聚体等。

[0148] 如本文所使用的,术语“受试者”意指人或动物,向其提供了用根据本发明的治疗性核酸进行的治疗,包含防治性治疗。一般而言,动物是脊椎动物,如但不限于灵长类动物、啮齿动物、家养动物或野生动物。灵长类动物包含但不限于黑猩猩、食蟹猴、蜘蛛猴和猕猴,例如恒河猴。啮齿动物包含小鼠、大鼠、土拨鼠、雪貂、兔和仓鼠。家养和野味动物包含但不限于牛、马、猪、鹿、野牛、水牛、猫科物种(例如家猫)、犬科物种(例如狗、狐狸、狼)、禽类物种(例如鸡、鹌鹑、鸵鸟)以及鱼(例如鳟鱼、鲑鱼和鲑鱼)。在本文所描述方面的某些实施例中,受试者是哺乳动物,例如灵长类动物或人。受试者可以是雄性或雌性。另外,受试者可以是婴儿或儿童。在一些实施例中,受试者可以是新生儿或未出生受试者,例如,受试者还在子宫内。优选地,受试者是哺乳动物。哺乳动物可以是人、非人灵长类动物、小鼠、大鼠、狗、猫、马或牛,但不限于这些实例。人以外的哺乳动物可以有利地用作代表疾病和病症的动物模型的受试者。另外,本文所描述的方法和组合物可以用于家养动物和/或宠物。人受试者可以具有任何年龄、性别、种族或族群,例如,高加索人(白人)、亚洲人、非洲人、非裔美洲人、非裔欧洲人、西班牙人、中东人等。在一些实施例中,受试者可以是临床环境中的患者或其它受试者。在一些实施例中,受试者已进行治疗。在一些实施例中,受试者是胚胎、胎儿、新生儿、婴儿、儿童、青少年或成人。在一些实施例中,受试者是人类胎儿、人类新生儿、人类婴儿、人类儿童、人类青少年或人类成人。在一些实施例中,受试者是动物胚胎,或非人类胚胎或非人类灵长类动物胚胎。在一些实施例中,受试者是人胚胎。

[0149] 如本文所使用的,短语“有需要的受试者”是指这样的受试者,其(i)将被施用根据所述发明的ceDNA脂质颗粒(或包括ceDNA脂质颗粒的药物组合物)、(ii)正在接受根据所述发明的ceDNA脂质颗粒(或包括ceDNA脂质颗粒的药物组合物);或(iii)已经接受根据所述发明的ceDNA脂质颗粒(或包括ceDNA脂质颗粒的药物组合物),除非该短语的上下文和用法另有说明。

[0150] 如本文所使用的,术语“遏制”、“减少”、“干扰”、“抑制”和/或“降低”(以及类似术语)通常是指直接或间接地降低相对于自然条件、预期条件或平均条件,或相对于对照条件的浓度、水平、功能、活动或行为的行为。

[0151] 如本文所使用的,术语“合成AAV载体”和“AAV载体的合成产生”意指在完全无细胞环境中的AAV载体和其合成产生方法。

[0152] 如本文所使用的,术语“全身递送”意指脂质颗粒的递送,其导致如干扰RNA(例如, siRNA)等活性剂在生物体内的广泛生物分布。一些施用技术可导致某些药剂而非其它药剂

的全身递送。全身递送意指使有用量(优选地,治疗量)的药剂暴露于身体的大部分部位。为了获得广泛的生物分布,通常需要血液寿命,以使药剂在到达施用位点远端的疾病位点之前不会迅速地降解或清除(如通过首过器官(肝、肺等)或通过快速、非特异性细胞结合)。脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的全身递送可以通过本领域已知的任何方式进行,包含例如静脉内、皮下和腹膜内。在优选的实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的全身递送是通过静脉内递送。

[0153] 如本文所使用的,术语“末端解链位点”和“trs”在本文中可互换使用,并且意指一个区域,在此区域中Rep与5'胸苷形成酪氨酸-磷酸二酯键,从而产生3'-OH,充当通过DNA聚合酶(例如,DNA pol δ 或DNA pol ϵ)进行DNA延伸的底物。可替代地,Rep-胸苷复合物可以参与配位接合反应。在一些实施例中,TRS最低限度地涵盖非碱基配对的胸苷。在一些实施例中,TRS的切口产生效率可以至少部分地由其在同一分子内距RBS的距离来控制。当受体底物是互补ITR时,所产生的产物是分子内双螺旋。TRS序列是本领域已知的,并包含例如5'-GGTTGA-3',其是在AAV2中鉴定的六核苷酸序列。本发明的实施例中可以使用任何已知的TRS序列,包含其它已知的AAV TRS序列和其它天然已知的或合成的TRS序列,如AGTT、GGTTGG、AGTTGG、AGTTGA和其它基序,如RRTTTRR。

[0154] 如本文所使用的,术语活性剂(例如,如本文所描述的ceDNA脂质颗粒)的“治疗量”、“治疗有效量”、“有效量”或“药学上有效量”可互换地使用以指代足以提供治疗的预期益处的量。然而,剂量水平基于多种因素,包含损伤类型、年龄、体重、性别、患者的医学病状、病状的严重程度、施用途径和所采用的特定活性剂。因此,给药方案可以在很大范围内变化,但可以由医生使用标准方法常规确定。另外,术语“治疗量”、“治疗有效量”和“药学上有效量”包含所描述的本发明的组合物的防治或预防量。在所描述的本发明的防治性或预防性应用中,以足以消除或降低疾病、病症或病状的风险、减轻严重程度或延迟发病的量向易患有疾病、病症或病状或以其它方式处于疾病、病症或病状风险下的患者施用药物组合物或药剂,所述疾病、病症或病状包含疾病、病症或病状的生物化学、组织学和/或行为症状,其并发症和在疾病、病症或病状的发展期间呈现的中间病理学表型。通常优选使用最大剂量,即,根据一些医学判断的最高安全剂量。术语“剂量(dose/dosage)”在本文中可互换地使用。

[0155] 如本文所使用的,术语“治疗效果”是指治疗的结果,其结果被判定为合乎需要并且有益的。治疗效果可以直接或间接地包含疾病表现的遏制、减少或消除。治疗效果还可以直接或间接地包含疾病表现的进展的遏制减少或消除。

[0156] 对于本文所描述的任何治疗剂,治疗有效量可以初始地根据初步的体外研究和/或动物模型来确定。治疗有效剂量也可以根据人数据来确定。可以基于相对生物利用度和施用的化合物的效力调节施用的剂量。基于上述方法和其它公知的方法调节剂量以实现最大功效在普通技术人员的能力内。下文总结了用于测定治疗有效性的一般原理,其可以在《古德曼和吉尔曼的治疗学的药理学基础(Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,第10版,麦格劳-希尔专业出版公司(McGraw-Hill)(纽约)(2001)的第1章中找到,所述文献以引用的方式并入本文中。

[0157] 药代动力学原理为修改剂量方案以获得期望程度的治疗功效并且具有最小的不可接受的副作用提供了基础。在可以测量药物的血浆浓度并且与治疗窗口有关的情况下,

可以获得针对剂量修改的另外的指导。

[0158] 如本文所使用的,术语“治疗(treat/treating和/或treatment)”包含减轻、基本上抑制、减缓或逆转病状的进展,基本上改善病状的临床症状或基本上预防病状的临床症状的出现、获得有益或期望的临床结果。治疗进一步指代实现以下中的一个或多个:(a)降低病症的严重程度;(b)限制所治疗的一种或多种病症特有的症状的发展;(c)限制所治疗的一种或多种病症特有的症状的恶化;(d)限制先前患有病症的患者中的一种或多种病症的复发;以及(e)限制先前对于一种或多种病症无症状的患者中的症状的复发。

[0159] 有益或期望的临床结果,如药理学和/或生理学作用,包括但不限于:预防可能易患有疾病、病症或病状但尚未经历或展现疾病的症状的个体出现所述疾病、病症或病状(防治性治疗);缓解所述疾病、病症或病状的症状;减轻所述疾病、病症或病状的程度;稳定所述疾病、病症或病状(即,不恶化);预防所述疾病、病症或病状的扩散;延迟或减缓所述疾病、病症或病状进展;改善或缓和所述疾病、病症或病状;以及其组合,以及与如果不接受治疗所预期的存活期相比,延长存活期。

[0160] 如本文所使用的,术语“载体”或“表达载体”意指复制子,如质粒、杆粒、噬菌体、病毒、病毒粒子或粘粒,其可以与另一个DNA节段,即“插入物”“转基因”或“表达盒”连接,以引起连接的节段(“表达盒”)在细胞中的表达或复制。载体可以是设计用于递送到宿主细胞或用于在不同宿主细胞之间转移的核酸构建体。如本文所使用的,载体可以以最终形式起源于病毒或非病毒。然而,出于本公开的目的,“载体”通常是指合成AAV载体或带切口的ceDNA载体。因此,术语“载体”涵盖与适当的控制元件缔合时能够复制并且可以将基因序列转移到细胞的任何遗传元件。在一些实施例中,载体可以是重组载体或表达载体。

[0161] 本文公开的本发明的替代要素或实施例的分组不应解释为限制。每个组成员可以被单独地或者与所述组中的其它成员或本文发现的其它要素以任何组合的方式被引用和保护。出于便利性和/或可专利性的原因,一个组中的一个或多个成员可以包含在一个组中或从中删除。当发生任何这种包含或删除时,在本文中所述说明书被认为含有修改的组,从而满足所附权利要求书中使用的所有马库什群组(Markush group)的书面描述。

[0162] 在任何方面的一些实施例中,本文描述的公开内容不涉及用于克隆人类的工艺、用于修饰人类的种系基因身份的工艺、用于工业或商业目的的人胚胎的用途、或用于修饰动物的基因身份,从而可能导致其遭受痛苦而对人或动物没有任何实质性医学益处的工艺,以及由这类工艺产生的动物。

[0163] 本文在本发明的各个方面的描述内定义了其它术语。

[0164] 出于描述和公开的目的,整个申请中引用的所有专利和其它出版物;包含参考文献、已发布的专利、已出版的专利申请和共同未决的专利申请;均通过引用明确并入本文,例如,在此类出版物中描述的方法可能与本文所描述的技术结合使用。仅提供这些出版物在本申请的提交日期之前的公开内容。这方面的任何事物都不应被解释为承认发明人有权借助于先前发明或出于任何其它原因而先于这些公开内容。关于这些文件的日期或内容的所有陈述均基于申请人可获得的信息,并且不构成对这些文件的日期或内容的正确性的承认。

[0165] 对本公开的实施例的描述不旨在是详尽的或将本公开限制为所公开的精确形式。尽管本文出于说明性目的描述了本公开的特定实施例和实例,但是如相关领域的技术人员

将认识到的,在本公开的范围内可以进行各种等效修改。例如,虽然以给定的顺序呈现了方法步骤或功能,但是替代性实施例可以以不同的顺序执行功能,或者可以基本上同时执行功能。本文提供的本公开的教导可以适当地应用于其它过程或方法。可以将本文所描述的各个实施例进行组合以提供另外的实施例。如有必要,可以对本公开的各方面进行修改,以利用上述参考文献和申请中的组合物、功能及概念来提供本公开的又一实施例。此外,由于生物功能等效性的考虑,可以在不影响生物作用的种类或量的情况下在蛋白质结构中进行一些改变。可以根据详细描述对本公开做出这些和其它改变。所有这种修改旨在包含在所附权利要求书的范围内。

[0166] 前述实施例中任一个的特定元件可以与其它实施例中的元件组合或替代其它实施例中的元件。此外,尽管已经在这些实施例的上下文中描述了与本公开的某些实施例相关联的优点,但是其它实施例也可以展现出此些优点并且并非所有的实施例都必需展现出此些优点才能落入本公开的范围内。

[0167] 通过以下实例进一步说明了本文所描述的技术,但是这些实例决不应被解释为进一步的限制。应理解,本发明不以任何方式限制于本文所描述的特定方法、方案和试剂等,并且因此可以变化。本文中所用的术语仅是出于描述特定实施例的目的,而无意于限制本发明的范围,本发明的范围仅仅由权利要求限定。

[0168] II. 可切割脂质

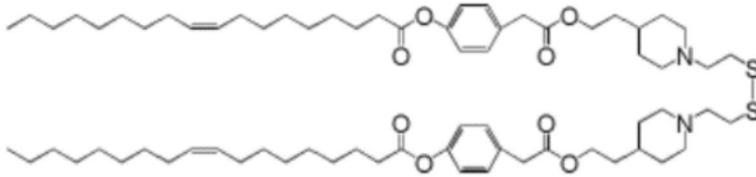
[0169] 本文提供了药物组合物,其包括可切割脂质和可用于将无衣壳非病毒DNA载体递送到所关注的目标位点(例如,细胞、组织、器官等)的无衣壳非病毒载体(例如,ceDNA)。如本文所使用的,术语“可切割脂质”是指包括二硫键(“SS”)可切割单元的阳离子脂质。在一个实施例中,SS-可切割脂质包括叔胺,其响应用于膜去稳定化的酸性区室(例如,内体或溶酶体)和可在还原环境(例如,细胞质)中切割的二硫键。SS-可切割脂质可以包含SS-可切割的和pH活化的类脂材料,如ss-OP脂质、ssPalM脂质、ss-M脂质、ss-E脂质、ss-EC脂质、ss-LC脂质和ss-OC脂质等。如本文所证明的,包括可切割脂质的ceDNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)提供ceDNA到靶细胞(包含例如肝细胞)的更有效递送。如本公开所报道的,与其它脂质(例如,MC3)相比,包括ceDNA和可切割脂质的ceDNA颗粒在具有相等荧光素酶表达的肝脏中导致更少的ceDNA拷贝。实际上,观察到ceDNA和可切割脂质之间的协同效应,所述协同效应使吞噬效应最小化(参见例如图14-17),同时与其它脂质(例如,MC3)相比,ceDNA表达增加高达4,000倍。还如本公开所报道的,在大鼠视网膜下注射后至多3天,与媒介剂对照相比,包括mRNA和可切割脂质的脂质调配物导致转基因表达增加(图24和图25)。因此,与具有最少吞噬细胞或没有吞噬细胞的其它常规脂质相比,本文所述的脂质颗粒(例如,ceDNA脂质颗粒或mRNA脂质颗粒)可以有利地用于增加核酸(例如,ceDNA或mRNA)向靶细胞/组织的递送。因此,与本领域已知的常规脂质纳米颗粒相比,本文所述的脂质颗粒(例如,ceDNA脂质颗粒或mRNA脂质颗粒)提供了增强的核酸递送。尽管该机制尚未确定,并且不受理论的束缚,但认为包括可切割脂质的脂质颗粒(例如,ceDNA脂质颗粒或mRNA脂质颗粒)提供到逃避吞噬作用的肝细胞的改进递送。包括本文所述的可切割脂质的含有ceDNA的脂质颗粒的另一个优点是它们与其它脂质纳米颗粒(例如MC3)相比在体内表现出优异的耐受性。

[0170] 在一个实施例中,可切割脂质可以包括三种组分:胺端基、接头基团和疏水尾。在一个实施例中,可切割脂质包括一个或多个苯基酯键、多个叔氨基中的一个和二硫键。叔胺

基提供pH响应性并诱导内体逃逸,苯基酯键增强结构的可降解性(自降解性),并且二硫键在还原环境中切割。

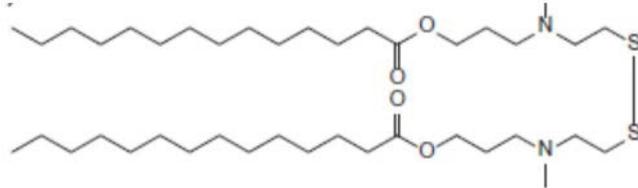
[0171] 在一个实施例中,可切割脂质是ss-OP脂质。在一个实施例中,ss-OP脂质包括以下式I中所示的结构:

[0172] 式I



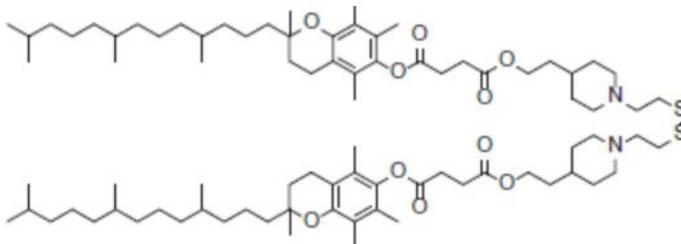
[0174] 在一个实施例中,SS-可切割脂质是SS-可切割的和pH活化的类脂材料(ssPalm)。ssPalm脂质在本领域中公知的。例如,参见Togashi等人,《控释期刊(Journal of Controlled Release)》,279(2018)262-270,其全部内容通过引用并入本文。在一个实施例中,ssPalm是包括式II结构的ssPalmM脂质。

[0175] 式II



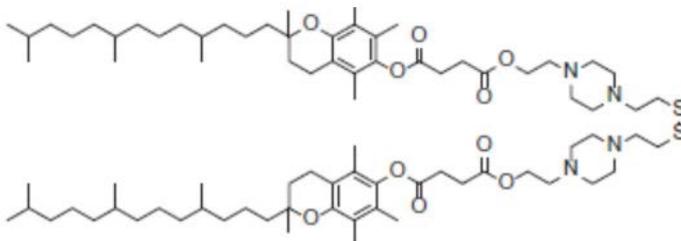
[0177] 在一个实施例中,ssPalmE脂质是ssPalmE-P4-C2脂质,其包括式III的结构。

[0178] 式III



[0180] 在一个实施例中,ssPalmE脂质是ssPalmE-Paz4-C2脂质,其包括式IV的结构。

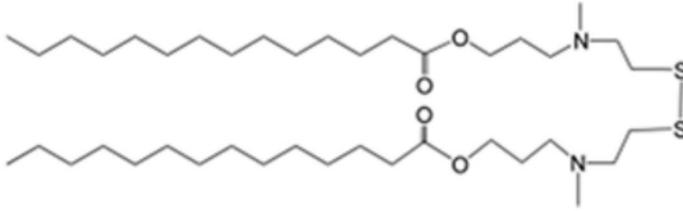
[0181] 式IV



[0183] 在一个实施例中,可切割脂质是ss-M脂质。在一个实施例中,ss-M脂质包括以下式V中所示的结构:

[0184] 式V

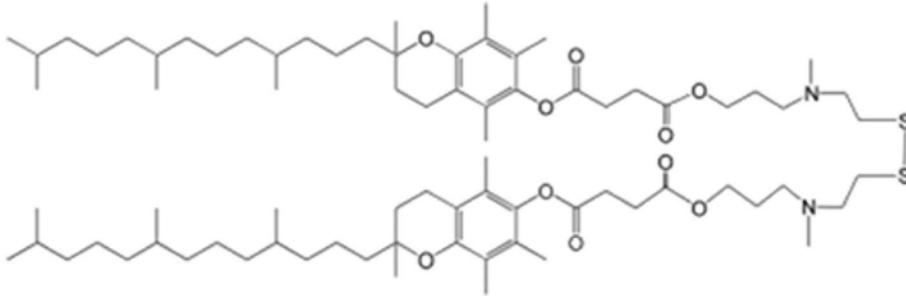
[0185]



[0186] 在一个实施例中,可切割脂质是ss-E脂质。在一个实施例中,ss-E脂质包括以下式VI中所示的结构:

[0187] 式VI

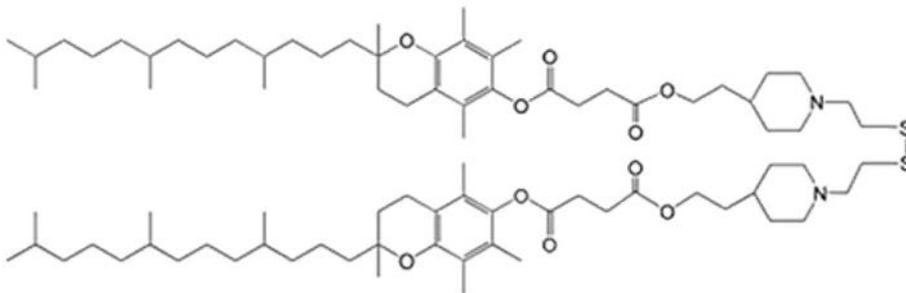
[0188]



[0189] 在一个实施例中,可切割脂质是ss-EC脂质。在一个实施例中,ss-EC脂质包括以下式VII中所示的结构:

[0190] 式VII

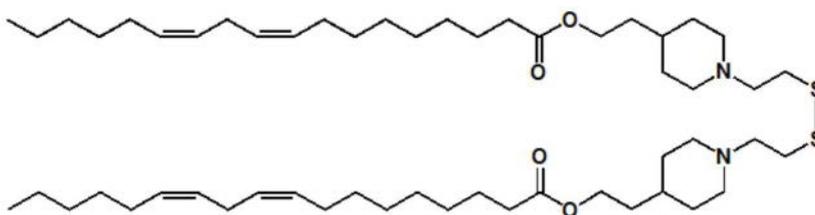
[0191]



[0192] 在一个实施例中,可切割脂质是ss-LC脂质。在一个实施例中,ss-LC脂质包括以下式VIII中所示的结构:

[0193] 式VIII

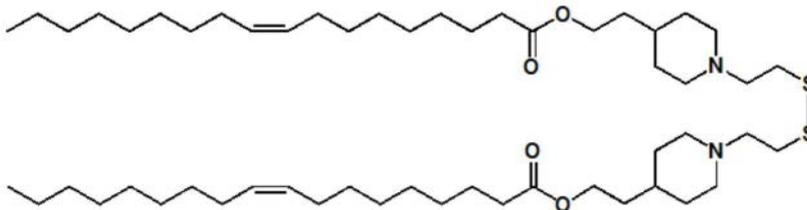
[0194]



[0195] 在一个实施例中,可切割脂质是ss-OC脂质。在一个实施例中,ss-OC脂质包括以下式IX中所示的结构:

[0196] 式IX

[0197]



[0198] 在一个实施例中,制备脂质颗粒(例如脂质纳米颗粒)调配物并用通过如2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042中公开的工艺获得的ceDNA装载,所述申请通过引用整体并入本文。这可以通过在低pH下将乙醇脂质与水性ceDNA进行高能混合来实现,这使脂质质子化并为ceDNA/脂质缔合和颗粒的成核提供有利的能量。通过水稀释和去除有机溶剂可以进一步稳定颗粒。颗粒可以浓缩到期望的水平。在一个实施例中,本公开提供了一种ceDNA脂质颗粒,其包括通过实例6中描述的工艺制备的式I脂质。

[0199] 一般而言,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)以约10:1到60:1的总脂质与ceDNA(质量或重量)比率制备。在一些实施例中,脂质与ceDNA的比率(质量/质量比率;w/w比率)可以在约1:1到约60:1、约1:1到约55:1、约1:1到约50:1、约1:1到约45:1、约1:1到约40:1、约1:1到约35:1、约1:1到约30:1、约1:1到约25:1、约10:1到约14:1、约3:1到约15:1、约4:1到约10:1、约5:1到约9:1、约6:1到约9:1;约30:1到约60:1的范围内。根据一些实施例,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)以约60:1的ceDNA(质量或重量)与总脂质比率制备。根据一些实施例,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)以约30:1的ceDNA(质量或重量)与总脂质比率制备。可以调节脂质和ceDNA的量以提供期望的N/P比,例如3、4、5、6、7、8、9、10或更高的N/P比。一般而言,脂质颗粒调配物的总脂质含量可以在约5mg/ml到约30mg/mL的范围内。

[0200] 在一些实施例中,脂质纳米颗粒包括用于缔合和/或包封核酸货物(如ceDNA)的药剂。这种药剂在本文中也称为缔合剂或包封剂。不受限制地,可以使用本领域已知的用于缔合和/或包封核酸的任何化合物,只要它是非融合的。换言之,能够缔合和/或包封核酸货物(如ceDNA)但具有很少融合活性或没有融合活性的药剂。不希望受理论束缚,缔合剂在不缔合/包封核酸(如ceDNA)时可能具有一些融合活性,但是用所述缔合剂形成的包封脂质纳米颗粒的核酸可以是非融合的。

[0201] 一般而言,阳离子脂质通常用于在低pH条件下缔合核酸货物,如ceDNA,并驱动膜缔合和融合性。一般而言,阳离子脂质是包括至少一个氨基的脂质,所述氨基带正电或在酸性条件下(例如在6.5或更低的pH下)质子化。阳离子脂质也可以是可离子化的脂质,例如,可离子化的阳离子脂质。“非融合阳离子脂质”是指可以缔合和/或包封核酸货物(如ceDNA)但不具有融合活性或具有非常小的融合活性的阳离子脂质。

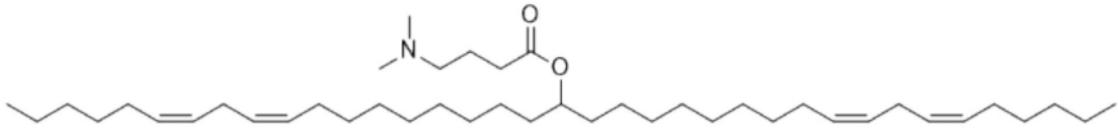
[0202] 在一个实施例中,阳离子脂质可以占存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的20-90%(mol)。例如,阳离子脂质摩尔含量可以是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的20-70%(mol)、30-60%(mol)、40-60%(mol)、40-55%(mol)或45-55%(mol)。在一些实施例中,阳离子脂质占存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约50mol%到约90mol%。

[0203] 在一个实施例中,SS-可切割脂质不是MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烯-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3)。DLin-MC3-DMA描述于以下文献中:Jayaraman等人,《化学应用英文国际版(Angew.Chem.Int.Ed Engl.)》(2012),51

(34):8529-8533,其内容通过引用整体并入本文。D-Lin-MC3-DMA (MC3) 的结构如下式X所示:

[0204] 式X

[0205]



[0206] 在一个实施例中,可切割脂质不是脂质ATX-002。脂质ATX-002描述于W02015/074085中,其内容通过引用整体并入本文。在一个实施例中,可切割脂质不是(13Z,16Z)-/V,/V-二甲基-3-壬基二十二碳-13,16-二烯-1-胺(化合物32)。化合物32描述于W02012/040184中,其内容通过引用整体并入本文。在一个实施例中,可切割脂质不是化合物6或化合物22。化合物6和22描述于W02015/199952中,其内容通过引用整体并入本文。

[0207] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以进一步包括非阳离子脂质。非阳离子脂质可以用于增加融合性并且还可以增加LNP在形成过程中的稳定性。非阳离子脂质包含两亲性脂质、中性脂质和阴离子脂质。因此,非阳离子脂质可以是中性不带电、两性离子或阴离子脂质。非阳离子脂质通常用于增强融合性。

[0208] 示例性非阳离子脂质包含但不限于二硬脂酰-sn-甘油-磷酸乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸盐(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺(如16-0-单甲基PE)、二甲基-磷脂酰乙醇胺(如16-0-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、鸡蛋磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰磷脂酰甘油(DSPG)、二芥酰磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰磷脂酰甘油(POPG)、二月桂酰-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、1,2-二月桂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DLPE);1,2-二植烷酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DPhyPE);卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、二十六烷基磷酸酯、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰磷脂酰胆碱或其混合物。应当理解,也可以使用其它二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基优选地为源自具有C₁₀-C₂₄碳链的脂肪酸的酰基,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。

[0209] 适用于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的非阳离子脂质的其它实例包含非磷脂质,如例如硬脂胺、十二烷胺、十六烷胺、乙酰棕榈酸酯、甘油蓖麻酸酯、硬脂酸十六烷酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸盐、烷基-芳基硫酸盐聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基二甲基溴化铵、神经酰胺、鞘磷脂等。

[0210] 在一个实施例中,非阳离子脂质是磷脂。在一个实施例中,非阳离子脂质选自自由DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE和SM组成的组。在一些实施例中,非阳离子脂质是DSPC。在其它实施例中,非阳离子脂质是DOPC。在其它实施例中,非阳离子脂质是DOPE。

[0211] 在一些实施例中,非阳离子脂质可以占存在于脂质纳米颗粒中的总脂质的0-20%

(mol)。在一些实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的0.5-15% (mol)。在一些实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的5-12% (mol)。在一些实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的5-10% (mol)。在一个实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约6% (mol)。在一个实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约7.0% (mol)。在一个实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约7.5% (mol)。在一个实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约8.0% (mol)。在一个实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约9.0% (mol)。在一些实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约10% (mol)。在一个实施例中,非阳离子脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约11% (mol)。

[0212] 示例性非阳离子脂质描述于PCT公开W02017/099823和美国专利公开US2018/0028664中,两者的内容通过引用整体并入本文。

[0213] 阳离子脂质的非限制性实例包含SS-可切割的和pH活化的类脂材料-OP(ss-OP;式I)、SS-可切割的和pH活化的类脂材料-M(SS-M;式V)、SS-可切割的和pH活化的类脂材料-E(SS-E;式VI)、SS-可切割的和pH活化的类脂材料-EC(SS-EC;式VII)、SS-可切割的和pH活化的类脂材料-LC(SS-LC;式VIII)、SS-可切割的和pH活化的类脂材料-OC(SS-OC;式IX)、聚乙烯亚胺、聚酰胺基胺(PAMAM)星放射状树枝状分子、Lipofectin(DOTMA和DOPE的组合)、Lipofectase、LIPOFECTAMINE™(例如,LIPOFECTAMINE™ 2000)、DOPE、Cytfectin(加利福尼亚州福斯特城的吉利德科学公司(Gilead Sciences,Foster City,CA))和Eufectins(加利福尼亚州圣路易斯奥比斯波的JBL公司(JBL,San Luis Obispo,CA))。示例性阳离子脂质体可以由以下制成:N-[1-(2,3-二油醇氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基氯化铵(DOTMA)、N-[1-(2,3-二油醇氧基)-丙基]-N,N,N-三甲基甲基硫酸铵(DOTAP)、3b-[N-(N',N'-二甲基氨基乙烷)氨基甲酰基]胆固醇(DC-Chol)、2,3,-二油酰氧基-N-[2(精胺甲酰胺基)乙基]-N,N-二甲基-1-三氟乙酸丙胺(DOSPA)、1,2-二肉豆蔻氧基丙基-3-二甲基-羟乙基溴化铵;以及二甲基二(十八烷基)溴化铵(DDAB)。核酸(例如ceDNA或CELiD)也可以与例如聚(L-赖氨酸)或亲和素形成复合物,并且脂质可以或可以不包含在这一混合物中,例如甾基-聚(L-赖氨酸)。

[0214] 在一个实施例中,阳离子脂质是式I的ss-OP。在另一个实施例中,阳离子脂质是式II的SS-PAZ。

[0215] 在一些实施例中,如本文公开的ceDNA载体使用美国专利第8,158,601号中所描述的阳离子脂质或如美国专利第8,034,376号中所描述的多元胺化合物或脂质进行递送。

[0216] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以进一步包括一种组分,如甾醇,以提供脂质颗粒的膜完整性和稳定性。在一个实施例中,可用于脂质颗粒的示例性甾醇是胆固醇或其衍生物。胆固醇衍生物的非限制性实例包含:极性类似物,如5 α -胆甾醇、5 β -粪甾醇、胆固醇-(2'-羟基)-乙醚、胆固醇-(4'-羟基)-丁醚和6-酮胆甾醇;非极性类似物,如5 α -胆甾烷、胆甾酮、5 α -胆甾烷酮、5 β -胆甾烷酮和胆固醇癸酸酯;及其混合物。在一些实施例中,胆固醇衍生物是极性类似物,如胆固醇-(4'-羟基)-丁醚。在一些实施例中,胆固醇

衍生物是半琥珀酸胆甾醇酯 (CHEMS)。

[0217] 示例性胆固醇衍生物描述于PCT公开W02009/127060和美国专利公开US2010/0130588中,两者的内容通过引用整体并入本文。

[0218] 在一个实施例中,如甾醇等提供膜完整性的组分可以占存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的0-50% (mol)。在一些实施例中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的总脂质含量的20-50% (mol)。在一些实施例中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的总脂质含量的30-40% (mol)。在一些实施例中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的总脂质含量的35-45% (mol)。在一些实施例中,此类组分是脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的总脂质含量的38-42% (mol)。

[0219] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以进一步包括聚乙二醇(PEG)或缀合的脂质分子。一般而言,这些用于抑制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的聚集和/或提供空间稳定性。示例性缀合脂质包含但不限于PEG-脂质缀合物、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(如ATTA-脂质缀合物)、阳离子聚合物脂质(CPL)缀合物及其混合物。在一些实施例中,缀合的脂质分子是PEG-脂质缀合物,例如,(甲氧基聚乙二醇)-缀合的脂质。在一些其它实施例中,缀合的脂质分子是PEG-脂质缀合物,例如,PEG₂₀₀₀-DMG(二肉豆蔻酰基甘油)。

[0220] 示例性PEG-脂质缀合物包含但不限于PEG-二酰基甘油(DAG)(如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸二酰基甘油(PEGS-DAG)(如4-0-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-0-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐,或其混合物。另外的示例性PEG-脂质缀合物描述于例如US5,885,613、US6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US2016/0376224和US2017/0119904中,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0221] 在一个实施例中,PEG-DAA缀合物可以是例如PEG-二月桂氧基丙基、PEG-二肉豆蔻氧基丙基、PEG-二棕榈氧基丙基或PEG-二硬脂氧基丙基。PEG-脂质可以是以下中的一种或多种:PEG-DMG、PEG-二月桂酰甘油、PEG-二棕榈酰甘油、PEG-二叔酰甘油、PEG-二月桂酰甘油酰胺、PEG-二肉豆蔻酰甘油酰胺、PEG-二棕榈酰甘油酰胺、PEG-二甘油二酯、PEG-胆固醇(1-[8'-(胆甾-5-烯-3[β]-氧基)甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氨基甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇))、PEG-DMB(3,4-二十四氧基苄基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚)和1,2-二肉豆蔻酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一个实施例中,PEG-脂质可以自由以下组成的组:PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。

[0222] 在一个实施例中,与除PEG之外的分子缀合的脂质也可用于代替PEG-脂质。例如,聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(如ATTA-脂质缀合物)和阳离子-聚合物脂质(CPL)缀合物可用于代替或补充PEG-脂质。示例性缀合脂质,即PEG-脂质、(POZ)-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物和阳离子聚合物-脂质描述于PCT专利申请公开W01996/010392、W01998/051278、W02002/087541、W02005/026372、W02008/147438、W02009/086558、W02012/

000104、W02017/117528、W02017/099823、W02015/199952、W02017/004143、W02015/095346、W02012/000104、W02012/000104和W02010/006282,美国专利申请出版物US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2013/0303587、US2018/0028664、US2015/0376115、US2016/0376224、US2016/0317458、US2013/0303587、US2013/0303587和US20110123453以及美国专利US5,885,613、US6,287,591、US6,320,017和US6,586,559,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0223] 在一些实施例中,PEG或缀合的脂质可以占存在于脂质纳米颗粒中的总脂质的0-20% (mol)。在一些实施例中,PEG或缀合的脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的2-10% (mol)。在一些实施例中,PEG或缀合的脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的2-5% (mol)。在一些实施例中,PEG或缀合的脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的2-3% (mol)。在一个实施例中,PEG或缀合的脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约2.5% (mol)。在一些实施例中,PEG或缀合的脂质含量是存在于脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的总脂质的约3% (mol)。

[0224] 应当理解,阳离子脂质(例如,可离子化的阳离子脂质)与非阳离子脂质、甾醇和PEG/缀合脂质的摩尔比可以根据需要而变化。例如,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以包括按摩尔或按组合物总重量计30-70%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计0-60%的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计0-30%的非阳离子脂质以及按摩尔或按组合物总重量计1-10%的PEG或缀合脂质。在一个实施例中,组合物包括按摩尔或按组合物总重量计40-60%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计30-50%的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计5-15%的非阳离子脂质以及按摩尔或按组合物总重量计1-5%的PEG或缀合脂质。在一个实施例中,组合物是按摩尔或按组合物总重量计40-60%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计30-40%的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计5-10%的非阳离子脂质以及按摩尔或按组合物总重量计1-5%的PEG或缀合脂质。组合物可以含有按摩尔或按组合物总重量计60-70%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计25-35%的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计5-10%的非阳离子脂质以及按摩尔或按组合物总重量计0-5%的PEG或缀合脂质。组合物还可以含有按摩尔或按组合物总重量计至多45-55%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计35-45%的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计2到15%的非阳离子脂质以及按摩尔或按组合物总重量计1-5%的PEG或缀合脂质。所述调配物还可以是脂质纳米颗粒调配物,例如包括按摩尔或按组合物总重量计8-30%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计5-15%的非阳离子脂质以及按摩尔或按组合物总重量计0-40%的胆固醇;按摩尔或按组合物总重量计4-25%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计4-25%的非阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计2到25%的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计10到35%的缀合物脂质以及按摩尔或按组合物总重量计5%的胆固醇;或按摩尔或按组合物总重量计2-30%的阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计2-30%的非阳离子脂质、按摩尔或按组合物总重量计1-15%的胆固醇、按摩尔或按组合物总重量计2到35%的PEG或缀合物脂质以及按摩尔或按组合物总重量计1-20%的胆固醇;或甚至按摩尔或按组合物总重量计至多90%的阳离子脂质和按摩尔或按组合物总重量计2-10%的非阳离子脂质,或甚至按摩尔或按组合物总重量计100%的阳离子脂质。在一些实施例中,脂质颗粒调配物包括摩尔比

为约50:10:38.5:1.5的阳离子脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。

[0225] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)调配物包括摩尔比为约50:7:40:3的阳离子脂质、非阳离子磷脂、胆固醇和PEG化脂质(缀合脂质)。

[0226] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括阳离子脂质、非阳离子脂质(例如磷脂)、甾醇(例如,胆固醇)和PEG化脂质(缀合脂质),其中,对于阳离子脂质,脂质的摩尔比范围为20到70摩尔百分比,目标为30-60,非阳离子脂质的摩尔百分比范围为0到30,目标为0到15,甾醇的摩尔百分比范围为20-70,目标为30-50,并且聚乙二醇化脂质(缀合脂质)的摩尔百分比为1-6,目标为2-5。

[0227] 包括ceDNA的脂质纳米颗粒(LNP)公开于2018年9月7日提交的国际申请PCT/US2018/050042中,其全部内容并入本文并设想用于本文公开的方法和组合物。

[0228] 配制的阳离子脂质的pKa可以与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman等人,《化学应用国际版》(2012),51(34),8529-8533;Semple等人,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》28,172-176(2010),两者均通过引用整体并入)。在一个实施例中,使用基于2-(对甲苯胺)-6-萘磺酸(TNS)的荧光的测定法在脂质纳米颗粒中测定每种阳离子脂质的pKa。可以使用如本文和别处所述的在线过程制备在PBS中包括浓度为0.4mM总脂质的阳离子脂质/DSPC/胆固醇/PEG-脂质(50/10/38.5/1.5mol%)的脂质纳米颗粒。TNS可以在蒸馏水中制备为100mM储备溶液。囊泡可以在2mL含有10mM HEPES、10mM MES、10mM乙酸铵、130mM NaCl的缓冲溶液中稀释至24mM脂质,其中pH范围为2.5到11。可以将TNS溶液的等分试样添加至最终浓度为1mM,然后涡旋混合后,在SLM Aminco系列2发光分光光度计中使用321nm和445nm的激发和发射波长在室温下测量荧光强度。可以将S型最佳拟合分析应用于荧光数据,并测量pKa作为产生半最大荧光强度的pH。

[0229] 在一个实施例中,可以通过在通过尾静脉注射施用后4小时测量肝脏中的荧光素酶表达来确定相对活性。在0.3和1.0mg ceDNA/kg的剂量下比较活性,并表示为施用后4小时测量的ng荧光素酶/g肝脏。

[0230] 不受限制地,本公开的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包含脂质调配物,其可用于将无衣壳非病毒DNA载体递送至所关注的目标位点(例如,细胞、组织、器官等)。一般而言,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括无衣壳非病毒DNA载体和阳离子脂质或其盐。

[0231] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括摩尔比为50:10:38.5:1.5的阳离子脂质/非阳离子脂质/甾醇/缀合脂质。在另一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)包括摩尔比为50:10:37.5:2.5的阳离子脂质/非阳离子脂质/甾醇/缀合脂质。在一个实施例中,本公开提供了一种脂质颗粒调配物,其包括磷脂、卵磷脂、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺。

[0232] III. 治疗性核酸

[0233] 核酸是大的、带高电荷的、快速降解并从体内清除,并且通常具有较差的药理学性质,因为它们被认为是身体的异物并成为先天免疫反应的靶标。因此,某些治疗性核酸(“TNA”) (例如,反义寡核苷酸或病毒载体)通常可以在体内触发免疫反应。本公开提供了药物组合物和方法,其可以通过使治疗性核酸在受试者接受者中处于降低的免疫反应状态下的持久性最大化来增加表达水平,从而改善、减少或消除此类免疫反应并增强治疗性核酸的功效。这也可以最大限度地减少基因疗法过程中可能导致器官损伤或其它毒性的任何潜

在不良事件。

[0234] 本公开的说明性治疗性核酸可以包含但不限于小基因、质粒、小环、小干扰RNA (siRNA)、微RNA (miRNA)、反义寡核苷酸 (ASO)、核酶、末端封闭式双链DNA (例如, ceDNA、CELiD、线性共价闭合DNA (“迷你串”)、doggyboneTM、原端粒末端封闭式DNA或哑铃线性DNA、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA (shRNA)、非对称干扰RNA (aiRNA)、微RNA (miRNA)、mRNA、tRNA、rRNA和DNA病毒载体、病毒RNA载体及其任何组合。

[0235] 可以通过被称为RNA干扰 (RNAi) 的过程下调特定蛋白质的细胞内水平的siRNA或miRNA也被本发明考虑为核酸治疗剂。在将siRNA或miRNA引入宿主细胞的细胞质后,这些双链RNA构建体可以与被称为RISC的蛋白质结合。通过RISC复合物去除siRNA或miRNA的有义链。RISC复合物与互补mRNA结合时,会切割mRNA并释放切割链。RNAi是通过诱导mRNA的特异性破坏,从而导致相应蛋白质的下调。

[0236] 抑制mRNA翻译成蛋白质的反义寡核苷酸 (ASO) 和核酶可以作为核酸治疗剂。对于反义构建体,这些单链脱氧核酸具有与目标蛋白mRNA序列互补的序列,并且能够通过沃森-克里克碱基配对与mRNA结合。这种结合防止目标mRNA的翻译,和/或触发mRNA转录物的RNaseH降解。因此,反义寡核苷酸具有增加的作用特异性 (即,特定疾病相关蛋白的下调)。

[0237] 在本文提供的任何方法中,治疗性核酸可以是治疗性RNA。所述治疗性RNA可以是mRNA翻译抑制剂、RNA干扰剂 (RNAi)、催化活性RNA分子 (核酶)、转移RNA (tRNA) 或结合mRNA转录物 (ASO)、蛋白质或其它分子配体 (适体) 的RNA。在本文提供的任何方法中, RNAi 药剂可以是双链RNA、单链RNA、微RNA、短干扰RNA、短发夹RNA或形成三链体的寡核苷酸。

[0238] 根据一些实施例,治疗性核酸是末端封闭式双链DNA,例如, ceDNA。根据一些实施例,细胞中治疗性蛋白质的表达和/或产生来自非病毒DNA载体,例如, ceDNA载体。与传统AAV载体甚至慢病毒载体相比, ceDNA载体用于治疗性蛋白质表达的一个明显优势是编码期望蛋白质的异源核酸序列没有大小限制。因此,即使是大的治疗性蛋白质也可以从单个ceDNA载体中表达出来。因此, ceDNA载体可用于在有需要的受试者中表达治疗性蛋白质。

[0239] 一般而言,用于表达本文公开的治疗性蛋白质的ceDNA载体在5'到3'方向上包括:第一腺相关病毒 (AAV) 反向末端重复 (ITR)、所关注的核苷酸序列 (例如,如本文所述的表达盒) 和第二AAV ITR。ITR序列选自以下任一项: (i) 至少一个WT ITR和至少一个经修饰的AAV反向末端重复 (mod-ITR) (例如,非对称的经修饰ITR); (ii) 两个经修饰的ITR,其中mod-ITR对相对于彼此具有不同的三维空间组构 (例如,非对称的经修饰ITR); 或 (iii) 对称或基本上对称的WT-WT ITR对,其中每个WT-ITR具有相同的三维空间组构; 或 (iv) 对称或基本上对称的经修饰ITR对,其中每个mod-ITR具有相同的三维空间组构。

[0240] IV. 末端封闭式DNA (ceDNA) 载体

[0241] 本公开的方面通常提供脂质颗粒 (例如,脂质纳米颗粒),其包括无衣壳的非病毒末端封闭式DNA载体和脂质。

[0242] 本公开的实施例基于包括可表达转基因 (例如治疗性核酸) 的末端封闭式线性双螺旋 (ceDNA) 载体的方法和组合物。如本文所述的ceDNA载体没有由病毒衣壳内的有限空间所强加的包装局限。与囊封的AAV基因组相反, ceDNA载体代表了一种可行的真核生物生产的替代原核生物生产的质粒DNA载体。这允许插入控制元件,例如,如本文所公开的调控开关、大的转基因、多个转基因等。

[0243] ceDNA载体有许多不同于基于质粒的表达载体的结构特征。ceDNA载体可能具有以下一个或多个特征:缺少原始(即没有插入)的细菌DNA;缺少原核复制起点;是自给的,即其不需要除两个ITR以外的任何序列,包含Rep结合位点和末端解链位点(RBS和TRS)以及ITR之间的外源序列;存在形成发夹的ITR序列;具有真核来源(即其在真核细胞中产生);以及不存在细菌型DNA甲基化或实际上被哺乳动物宿主认为异常的任何其它甲基化。一般来说,本发明载体优选不含有任何原核DNA,但作为非限制性实例,经考虑可以将一些原核DNA作为外源序列插入启动子或增强子区域中。区别ceDNA载体与质粒表达载体的另一个重要特征是,ceDNA载体是具有封闭端的单链线性DNA,而质粒始终是双链DNA。

[0244] 与基于质粒的表达载体相比,使用如本文所述的ceDNA载体有几个优点,这些优点包含但不限于:1) 质粒含有细菌DNA序列并经受原核特异性甲基化,例如6-甲基腺苷和5-甲基胞嘧啶甲基化,而无衣壳的AAV载体序列是真核来源的,并且不经历原核特异性甲基化;因此,与质粒相比,无衣壳的AAV载体不太可能诱导炎症和免疫反应;2) 虽然质粒在生产过程中需要存在抗性基因,但ceDNA载体不需要;3) 虽然环状质粒在引入细胞后不会被递送到细胞核,并且需要超载以绕过细胞核酸酶的降解,但ceDNA载体含有病毒顺式元件,即ITR,其赋予对核酸酶的抗性并且可以被设计成被靶向并递送到细胞核。假设ITR功能必不可少s的最小定义元件是Rep结合位点(RBS; AAV2的5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3'(SEQ ID NO:1))和末端解链位点(TRS; AAV2的5'-AGTTGG-3')加上允许发夹形成的可变回文序列;和4), ceDNA载体没有通常在原核生物来源的质粒中发现的CpG二核苷酸的过度表现,据报道所述质粒结合Toll样受体家族的成员,从而引发T细胞介导的免疫反应。相比之下,用本文公开的无衣壳AAV载体进行的转导可以有效地靶向难以使用各种递送试剂用常规AAV病毒粒子转导的细胞和组织类型。

[0245] ceDNA载体优选地具有线性和连续结构而不是非连续结构。相信线性和连续结构在受到细胞核酸内切酶攻击时更稳定,并且不太可能重组并引起诱变。因此,线性和连续结构的ceDNA载体是优选的实施例。连续、线性、单链的分子内双螺旋ceDNA载体可以具有共价结合的末端,而不具有编码AAV衣壳蛋白的序列。这些ceDNA载体在结构上不同于质粒(包含本文所描述的ceDNA质粒),所述质粒是细菌来源的环状双螺旋核酸分子。质粒的互补链在变性后可以分离,从而产生两个核酸分子,而与此相反,ceDNA载体虽具有互补链,却是单个DNA分子,并且因此即使变性,也仍保持是单个分子。在一些实施例中,与质粒不同,可以在没有原核类型的DNA碱基甲基化的情况下产生ceDNA载体。因此,在结构方面(具体地说,线性对比环状)以及还根据用于产生和纯化这些不同物体的方法方面,以及还根据它们的DNA甲基化方面,ceDNA载体和ceDNA质粒是不同的,即ceDNA-质粒属于原核类型而ceDNA载体属于真核类型。

[0246] 本文提供了具有共价封闭端的非病毒、无衣壳的ceDNA分子(ceDNA)。这些非病毒的无衣壳ceDNA分子可以在许可宿主细胞中由含有定位在两个不同的反向末端重复(ITR)序列之间的异源基因(例如,转基因,具体地说,治疗性转基因)的表达构建体(例如,ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒、ceDNA-杆状病毒或整合细胞系)产生,其中ITR彼此不同。在一些实施例中,与野生型ITR序列(例如,AAV ITR)相比,通过缺失、插入和/或取代来修饰ITR之一;并且至少一个ITR包括功能末端解链位点(trs)和Rep结合位点。ceDNA载体优选地在分子的至少一部分(如表达盒)上是双螺旋,例如是自互补的(例如,ceDNA不是双螺旋环状分子)。ceDNA

载体具有共价封闭端,并且因此抵抗核酸外切酶(例如,核酸外切酶I或核酸外切酶III)消化,例如在37°C下维持超过一个小时。

[0247] 在一方面,ceDNA载体在5'到3'方向上包括:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如,如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR。在一个实施例中,第一ITR(5' ITR)和第二ITR(3' ITR)相对于彼此非对称,也就是说,其彼此具有不同的3D空间构型。作为示例性实施例,第一ITR可以是野生型ITR,并且第二ITR可以是经突变或修饰的ITR,或反过来,其中第一ITR可以是经突变或修饰的ITR,并且第二ITR可以是野生型ITR。在一个实施例中,第一ITR和第二ITR都被修饰,但是序列不同,或者具有不同的修饰,或者不是相同的经修饰的ITR并且具有不同的3D空间构型。换句话说,具有非对称ITR的ceDNA载体具有ITR,其中一个ITR相对于WT-ITR的任何变化都不会反映在另一个ITR中;或者可替代地,在非对称ITR具有经修改的非对称ITR对的情况下,可以相对于彼此具有不同的序列和不同的三维形状。

[0248] 在一个实施例中,ceDNA载体在5'到3'方向上包括:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如,如本文所述的表达盒)和第二AAV ITR,其中第一ITR(5' ITR)和第二ITR(3' ITR)是对称的,或彼此基本上对称-也就是说,ceDNA载体可以包括具有对称三维空间组构的ITR序列,使得它们的结构在几何空间中具有相同的形状,或者具有3D空间中的相同A、C-C'和B-B'环。在此类实施例中,对称的ITR对或基本上对称的ITR对可以是经修饰的ITR(例如,mod-ITR),其并非野生型ITR。mod-ITR对可以具有相同的相对于野生型ITR具有一个或多个修饰的序列,并且彼此反向互补(反向)。在一个实施例中,如本文所定义的,经修饰的ITR对是基本上对称的,也就是说,经修饰的ITR对可以具有不同的序列,但具有对应或相同的对称三维形状。在一些实施例中,对称的ITR或基本上对称的ITR可以是如本文所述的野生型(WT-ITR)。也就是说,两个ITR都具有野生型序列,但不一定必须是来自同一AAV血清型的WT-ITR。在一个实施例中,一个WT-ITR可以来自一种AAV血清型,而另一个WT-ITR可以来自不同的AAV血清型。在此类实施例中,如本文所定义的,WT-ITR对是基本上对称的,也就是说,它们可以具有一个或多个保守核苷酸修饰,同时仍然保留对称的三维空间组构。

[0249] 本文提供的野生型或突变的或以其它方式经修饰的ITR序列表示用于产生ceDNA载体的表达构建体(例如,ceDNA-质粒、ceDNA杆粒、ceDNA-杆状病毒)中包含的DNA序列。因此,从ceDNA-质粒或其它表达构建体产生的ceDNA载体中实际含有的ITR序列与由于在产生过程期间发生天然发生的变化(例如,复制误差)而产生的本文中提供的ITR序列可能相同或可能不同。

[0250] 在一个实施例中,本文所述的包括具有作为治疗性核酸序列的转基因的表达盒的ceDNA载体可以操作性地连接至允许或控制转基因表达的一个或多个调控序列。在一个实施例中,多核苷酸包括第一ITR序列和第二ITR序列,其中所关注的核苷酸序列侧接有第一和第二ITR序列,并且第一和第二ITR序列彼此非对称,或彼此对称。

[0251] 在一个实施例中,表达盒位于两个ITR之间,所述两个ITR按以下顺序包括其中一个或多个:可操作地连接到转基因的启动子、转录后调控元件以及聚腺苷酸化和终止信号。在一个实施例中,启动子是可调控的-可诱导的或可抑制的。启动子可以是促进转基因转录的任何序列。在一个实施例中,启动子是CAG启动子或其变体。转录后调控元件是调控转基

因表达的序列,作为非限制性实例,是产生增强作为治疗性核酸序列的转基因的表达的三级结构的任何序列。

[0252] 在一个实施例中,转录后调控元件包括WPRE。在一个实施例中,聚腺苷酸化和终止信号包括BGHpolyA。可以另外使用本领域已知的任何顺式调控元件或其组合,例如SV40晚期polyA信号上游增强子序列(UES)或其它转录后处理元件,包括但不限于单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因,或乙型肝炎病毒(HBV)。在一个实施例中,表达盒在5'到3'方向上的长度大于已知在AAV病毒粒子中被衣壳化的最大长度。在一个实施例中,长度大于4.6kb、或大于5kb、或大于6kb、或大于7kb。本文中举例说明了各种表达盒。

[0253] 在一个实施例中,表达盒可以包括超过4000个核苷酸、5000个核苷酸、10,000个核苷酸或20,000个核苷酸、或30,000个核苷酸、或40,000个核苷酸或50,000个核苷酸,或约4000-10,000个核苷酸或10,000-50,000个核苷酸之间的任何范围,或超过50,000个核苷酸。在一些实施例中,表达盒可以包括转基因,所述转基因是长度在500到50,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。在一些实施例中,表达盒可以包括转基因,所述转基因是长度在500到75,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。在一些实施例中,表达盒可以包括转基因,所述转基因是长度在500到10,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。在一些实施例中,表达盒可以包括转基因,所述转基因是长度在1000到10,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。在一些实施例中,表达盒可以包括转基因,所述转基因是长度在500到5,000个核苷酸范围内的治疗性核酸序列。ceDNA载体不具有衣壳化AAV载体大小限制,因此能够将大尺寸的表达盒递送给宿主。在一个实施例中,ceDNA载体缺乏原核生物特异性甲基化。

[0254] 在一个实施例中,表达盒还可以包括内部核糖体进入位点(IRES)和/或2A元件。顺式调控元件包括但不限于启动子、核糖开关、隔离子、mir可调控元件、转录后调控元件、组织和细胞类型特异性启动子以及增强子。在一些实施例中,ITR可以充当转基因的启动子。在一些实施例中,ceDNA载体包括调控转基因的表达的另外的组分,例如调控开关,用于控制和调控转基因的表达,并且如果需要的话,可以包含调控开关(其是杀灭开关)以启用包括ceDNA载体的细胞的受控细胞死亡。

[0255] 在一个实施例中,ceDNA载体是无衣壳的,并且可以从按以下顺序编码的质粒中获得:第一ITR、可表达转基因盒和第二ITR,其中第一和/或第二ITR序列中的至少一个相对于相应的野生型AAV2 ITR序列发生突变。

[0256] 在一个实施例中,本文公开的ceDNA载体用于治疗目的(例如,用于医学、诊断或兽医用途)或免疫原性多肽。

[0257] 表达盒可以包括作为治疗性核酸序列的任何转基因。在某些实施例中,ceDNA载体包括受试者中任何所关注的基因,其包含一种或多种多肽、肽、核酶、肽核酸、siRNA、RNAi、反义寡核苷酸、反义多核苷酸、抗体、抗原结合片段或其任何组合。

[0258] 在一个实施例中,ceDNA表达盒可以包含例如可表达的外源序列(例如,开放阅读框),其编码在接受者受试者中不存在、无活性或活性不足的蛋白质或编码具有期望的生物学或治疗作用的蛋白质的基因。在一个实施例中,如供体序列等外源序列可以编码一种基因产物,所述基因产物可以起到校正缺陷基因或转录物表达的作用。在一个实施例中,表达盒还可以编码矫正型DNA链、编码多肽、有义或反义寡核苷酸或RNA(编码或非编码;例如,siRNA、shRNA、微RNA和它们的反义对应物(例如antagoMiR(安够塔妙))。在一个实施例中,

表达盒可以包含编码用于实验或诊断目的的报告蛋白的外源序列,如b-内酰胺酶、b-半乳糖苷酶(LacZ)、碱性磷酸酶、胸苷激酶、绿色荧光蛋白(GFP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、荧光素酶和本领域中公知的其它报告蛋白。

[0259] 因此,表达盒可以包含编码蛋白质、多肽或RNA的任何基因,所述蛋白质、多肽或RNA由于突变而减少或缺失,或者当过表达时传递治疗益处被认为在本公开的范围。ceDNA载体可以包括模板或供体核苷酸序列,其用作在核酸酶提供的双链断裂(或切口)后插入的矫正DNA链。ceDNA载体可以包含模板核苷酸序列,其用作在由指导RNA核酸酶、大范围核酸酶或锌指核酸酶提供的双链断裂(或切口)后插入的矫正DNA链。

[0260] 优选地,在本文提供的ceDNA组合中不存在未插入的细菌DNA,并且优选地不存在细菌DNA。在一些情况下,蛋白质可以在无切口的情况下改变密码子。

[0261] 在一些实施例中,本文所述的ceDNA载体的表达盒、表达构建体或供体序列中提供的序列可以针对宿主细胞进行密码子优化。如本文所使用的,术语“进行密码子优化”或“密码子优化”是指通过用所关注脊椎动物(例如,小鼠或人)的基因中使用频率较高或最高的密码子替换天然序列(例如,原核序列)的至少一个、超过一个或大量密码子来修饰核酸序列以增强其在所述脊椎动物的细胞中的表达的过程。各种物种对特定氨基酸的某些密码子表现出特定的偏好。

[0262] 一般而言,密码子优化不会改变原始翻译蛋白质的氨基酸序列。优化的密码子可以使用例如Aptagen的Gene Forge®密码子优化和定制基因合成平台(Aptagen, Inc., 2190 Fox Mill Rd. Suite 300, Herndon, Va. 20171)或其它公开可用的数据库来确定。

[0263] 许多生物体偏向于使用特定密码子编码以便特定氨基酸插入生长的肽链中。密码子偏好或密码子偏向(密码子使用在生物体之间的差异)是由遗传密码的简并性提供的,并且在许多生物体中都有据可查。密码子偏向通常与信使RNA(mRNA)的翻译效率相关,据信翻译效率进而又取决于所翻译的密码子的性质和特定转移RNA(tRNA)分子的可利用率。所选tRNA在细胞中的优势大体上反映了在肽合成中最常使用的密码子。因此,能够基于密码子优化来定制基因以使指定生物体中的基因表达最优。

[0264] 考虑到可用于多种动物、植物和微生物物种的基因序列数量庞大,因此能计算出密码子使用的相对频率(Nakamura, Y. 等人,“来自国际DNA序列数据库的密码子使用表:2000年状况(Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000)”《核酸研究(Nucl. Acids Res.)》28:292(2000))。

[0265] ceDNA载体有许多不同于基于质粒的表达载体的结构特征。ceDNA载体可能具有以下一个或多个特征:缺少原始(即没有插入)的细菌DNA;缺少原核复制起点;是自给的,即其不需要除两个ITR以外的任何序列,包含Rep结合位点和末端解链位点(RBS和TRS)以及ITR之间的外源序列;存在形成发夹的ITR序列;具有真核来源(即其在真核细胞中产生);以及不存在细菌型DNA甲基化或实际上被哺乳动物宿主认为异常的任何其它甲基化。一般来说,本发明载体优选不含有任何原核DNA,但作为非限制性实例,经考虑可以将一些原核DNA作为外源序列插入启动子或增强子区域中。区别ceDNA载体与质粒表达载体的另一个重要特征是,ceDNA载体是具有封闭端的单链线性DNA,而质粒始终是双链DNA。

[0266] 在一个实施例中,通过本文提供的方法产生的ceDNA载体优选地具有线性和连续结构而不是非连续结构。相信线性和连续结构在受到细胞核酸内切酶攻击时更稳定,并且

不太可能重组并引起诱变。因此,线性和连续结构的ceDNA载体是优选的实施例。连续、线性、单链的分子内双螺旋ceDNA载体可以具有共价结合的末端,而不具有编码AAV衣壳蛋白的序列。这些ceDNA载体在结构上不同于质粒(包含本文所描述的ceDNA质粒),所述质粒是细菌来源的环状双螺旋核酸分子。质粒的互补链在变性后可以分离,从而产生两个核酸分子,而与此相反,ceDNA载体虽具有互补链,却是单个DNA分子,并且因此即使变性,也仍保持是单个分子。在一些实施例中,与质粒不同,如本文所描述的ceDNA载体的产生可以没有原核类型的DNA碱基甲基化。因此,在结构方面(具体地说,线性对比环状)以及还根据用于产生和纯化这些不同物体的方法方面,以及还根据它们的DNA甲基化方面,ceDNA载体和ceDNA质粒是不同的,即ceDNA-质粒属于原核类型而ceDNA载体属于真核类型。

[0267] 实例1.

[0268] 根据一些实施例,合成ceDNA通过从双链DNA分子切除而产生。ceDNA载体的合成产生描述于2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122的实例2-6中,所述国际申请通过引用整体并入本文。使用合成方法产生ceDNA载体的一种示例性方法涉及切除双链DNA分子。简而言之,可以使用双链DNA构建体产生ceDNA载体,例如,参见PCT/US19/14122的图7A-8E。在一些实施例中,双链DNA构建体是ceDNA质粒,例如,参见于2018年12月6日提交的国际专利申请PCT/US2018/064242中的图6)。

[0269] 在一些实施例中,制备ceDNA载体(例如,合成AAV载体)的构建体包括调控转基因表达的另外的组分,例如调控转基因表达的调控开关,或可以杀灭包括载体的细胞的杀灭开关。

[0270] 分子调控开关是一种响应信号而产生可测量的状态变化的开关。此类调控开关可以与本文所述的ceDNA载体有用地组合以控制转基因表达的输出。在一些实施例中,ceDNA载体包括用以微调转基因的表达的调控开关。例如,其可以发挥ceDNA载体的生物封存功能。在一些实施例中,开关是“ON/OFF”型开关,其被设计成以可控和可调控方式来启动或终止(即,关闭)所关注基因在ceDNA载体中的表达。在一些实施例中,开关可以包含“杀灭开关”,一旦所述开关被活化,其就可以指示包括合成ceDNA载体的细胞经历细胞程序性死亡。涵盖在ceDNA载体中使用的示例性调控开关可用于调控转基因的表达,并且在国际申请PCT/US18/49996中更充分地讨论,所述国际申请通过引用整体并入本文并在本文中描述。

[0271] 使用涉及组装不同寡核苷酸的合成方法产生ceDNA载体的另一种示例性方法提供于PCT/US19/14122的实例3中,其中ceDNA载体是通过合成5'寡核苷酸和3' ITR寡核苷酸并且将ITR寡核苷酸与包括表达盒的双链多核苷酸接合来产生的。PCT/US19/14122(通过引用整体并入本文)的图11B示出了将5' ITR寡核苷酸和3' ITR寡核苷酸与包括表达盒的双链多核苷酸接合的示例性方法。

[0272] PCT/US19/14122(通过引用整体并入本文)的实例4中提供了使用合成方法产生ceDNA载体的示例性方法,所述方法使用包括两个有义ITR的单链线性DNA,所述有义ITR侧接于有义表达盒序列并共价连接到两个反义ITR,所述反义ITR位于反义表达盒的两侧,然后将其单链线性DNA的末端接合,以形成末端封闭式单链分子。一个非限制性实例包括合成和/或产生单链DNA分子,将该分子的各部分退火以形成具有一个或多个二级结构碱基配对区域的单一线性DNA分子,然后使游离的5'和3'端彼此接合,以形成封闭的单链分子。

[0273] 在又一方面,本发明提供了宿主细胞系,所述宿主细胞系已将本文所述的DNA载体

多核苷酸表达模板 (ceDNA模板) 稳定整合到其自身的基因组中,用于生产非病毒DNA载体。产生这种细胞系的方法描述于以下文献中:Lee,L.等人(2013)《公共科学图书馆综合(Plos One)》8(8):e69879,所述文献通过引用整体并入本文。优选地,Rep蛋白(例如,如实例1中所述)以3的MOI添加到宿主细胞中。在一个实施例中,宿主细胞系是无脊椎动物细胞系,优选地,昆虫Sf9细胞。当宿主细胞系是哺乳动物细胞系(优选地,293细胞)时,所述细胞系可以具有稳定整合的多核苷酸载体模板,并且可以使用第二载体(如疱疹病毒)将Rep蛋白引入细胞中,从而允许在存在Rep的情况下切除和扩增ceDNA。

[0274] 任何启动子都可以与载体多核苷酸的异源核酸(例如报告核酸或治疗性转基因)可操作地连接。表达盒可以含有合成调控元件,如CAG启动子。CAG启动子包括(i)巨细胞病毒(CMV)早期增强子元件,(ii)鸡 β -肌动蛋白基因的启动子、第一外显子和第一内含子,以及(ii)兔 β 珠蛋白基因的剪接受体。可替代地,表达盒可以含有 α -1-抗胰蛋白酶(AAT)启动子、肝脏特异性(LP1)启动子或人延长因子-1 α (EF1- α)启动子。在一些实施例中,表达盒包含一种或多种组成型启动子,例如,逆转录病毒劳氏肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地带有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)即刻早期启动子(任选地带有CMV增强子)。可替代地,可以使用诱导型或抑制型启动子、转基因的天然启动子、组织特异性启动子或本领域已知的各种启动子。用于基因疗法的合适转基因对于本领域技术人员是公知的。

[0275] 无衣壳的ceDNA载体也可以由载体多核苷酸表达构建体产生,所述载体多核苷酸表达构建体进一步包括顺式调控元件或顺式调控元件的组合,非限制性实例包含土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)和BGH polyA,或者例如 β -珠蛋白polyA。其它转录后处理元件包含例如单纯疱疹病毒或乙型肝炎病毒(HBV)的胸苷激酶基因。表达盒可以包含本领域已知的任何聚腺苷酸化序列或其变体,如从牛BGHpA或病毒SV40pA分离的天然存在的,或合成的。一些表达盒还可以包含SV40晚期polyA信号上游增强子(USE)序列。USE可以与SV40pA或异源poly-A信号组合使用。

[0276] 可以选择和优化从细胞中收获和收集本文所述的DNA载体的时间,以实现ceDNA载体的高产率生产。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收获时间。在一个实施例中,细胞在足够的条件下生长,并在杆状病毒感染后足以产生DNA载体但在大多数细胞因病毒毒性而开始死亡之前的时间进行收获。可以使用质粒纯化试剂盒(如Qiagen Endo-Free Plasmid试剂盒)分离DNA载体。为分离质粒而开发的其它方法也可适用于DNA载体。一般而言,可以采用任何核酸纯化方法。

[0277] DNA载体可以通过本领域的技术人员已知用于纯化DNA的任何手段来纯化。在一个实施例中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施例中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0278] 在一个实施例中,无衣壳非病毒DNA载体包括含有多核苷酸模板的质粒或从包括多核苷酸模板的质粒获得,所述多核苷酸模板按顺序包括:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、所关注的核苷酸序列(例如,外源DNA的表达盒)和经修饰的AAV ITR,其中所述模板核酸分子缺乏AAV衣壳蛋白编码。在另外的实施例中,本发明的核酸模板缺乏病毒衣壳蛋白编码序列(即,其缺乏AAV衣壳基因,也缺乏其它病毒的衣壳基因)。另外,在特定的实施例中,核酸分子还缺乏AAV Rep蛋白编码序列。因此,在优选的实施例中,本发明的核酸分子缺乏功能性AAV cap和AAV rep基因。

[0279] 在一个实施例中, ceDNA可以包含这样一种ITR结构, 其相对于本文公开的野生型AAV2ITR发生突变, 但仍保留可操作的RBE、TRS和RBE'部分。

[0280] 反向末端重复 (ITR)

[0281] 如本文所述, 在一个实施例中, ceDNA载体是无衣壳的线性双螺旋DNA分子, 其由具有共价封闭端的互补DNA (线性、连续和非衣壳化结构) 的连续链形成, 其包括不同的或相对于彼此非对称的5'反向末端重复 (ITR) 序列和3' ITR序列。所述ITR中的至少一个ITR包括功能性末端解链位点和复制蛋白结合位点 (RPS) (有时被称为复制蛋白结合位点), 例如Rep结合位点。一般而言, ceDNA载体含有至少一个经修饰的AAV反向末端重复序列 (ITR), 即相对于另一个ITR的缺失、插入和/或替换, 以及可表达的转基因。

[0282] 在一个实施例中, 所述ITR中的至少一个ITR是AAV ITR, 例如野生型AAV ITR。在一个实施例中, 所述ITR中的至少一个ITR相对于另一个ITR是经修饰的ITR-也就是说, ceDNA包括相对于彼此非对称的ITR。在一个实施例中, 所述ITR中的至少一个ITR是非功能性ITR。

[0283] 在一个实施例中, ceDNA载体包括: (1) 表达盒, 其包括顺式调控元件、启动子和至少一种转基因; 或 (2) 启动子, 其与至少一种转基因可操作地连接; 以及 (3) 侧接于所述表达盒的两个自互补序列, 例如ITR, 其中ceDNA载体不与衣壳蛋白缔合。在一些实施例中, ceDNA载体包括在AAV基因组中发现的两个自互补序列, 其中至少一个包括AAV的操作性Rep结合元件 (RBE) 和末端解链位点 (trs) 或RBE的功能性变体, 以及与转基因操作性地连接的一个或多个顺式调控元件。在一些实施例中, ceDNA载体包括调控转基因的表达的另外的组分, 例如调控开关, 用于控制和调控转基因的表达, 并且可以包含调控开关 (其是杀灭开关) 以启用包括ceDNA载体的细胞的受控细胞死亡。

[0284] 在一个实施例中, 两个自互补序列可以是来自任何已知的细小病毒, 例如依赖病毒, 如AAV (例如, AAV1-AAV12) 的ITR序列。可以使用任何AAV血清型, 包含但不限于经修饰的AAV2 ITR序列, 除了允许发夹二级结构形成的可变回文序列外, 其还保留了Rep结合位点 (RBS), 如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO:1), 和末端解链位点 (trs)。在一些实施例中, ITR可以是合成的。在一个实施例中, 合成ITR是基于来自一种以上AAV血清型的ITR序列。在另一个实施例中, 合成ITR不包含基于AAV的序列。在又一个实施例中, 合成ITR尽管仅具有一些或不具有源自AAV的序列, 但仍保留了上文所描述的ITR结构。在一些方面, 合成ITR可以优先与野生型Rep或特定血清型的Rep相互作用, 或者在一些情况下, 其将不会被野生型Rep识别, 并且仅由突变的Rep识别。在一些实施例中, ITR是合成的ITR序列, 除了允许发夹二级结构形成的可变回文序列之外, 其还保留了功能性Rep结合位点 (RBS), 如5'-GCGCGCTCGCTCGCTC-3' (SEQ ID NO:1), 和末端解链位点 (TRS)。在一些实例中, 经修饰的ITR序列从野生型AAV2 ITR的对应序列中保留RBS、trs的序列以及Rep结合元件的结构和位置, 形成ITR发夹二级结构中的一个的末端环部分。用于ceDNA载体的示例性ITR序列公开于表2-9、10A和10B、SEQ ID NO:2、52、101-449和545-547, 以及于2018年9月7日提交的PCT申请号PCT/US 18/49996的图26A-26B中所示的部分ITR序列中, 其中每一个的内容均通过引用整体并入本文。在一些实施例中, ceDNA载体可以包括ITR, 其具有对应于2018年9月7日提交的PCT申请号PCT/US 18/49996的表2、3、4、5、6、7、8、9、10A和10B中的一个或多个中所示的ITR序列或ITR部分序列中的修饰中的任一个的ITR中的修饰。

[0285] 在一个实施例中, ceDNA载体可以由进一步包括顺式调控元件的特定组合的表达

构建体产生。顺式调控元件包含但不限于启动子、核糖开关、隔离子、mir可调控元件、转录后调控元件、组织和细胞类型特异性启动子以及增强子。在一些实施例中, ITR可以充当转基因的启动子。在一些实施例中, ceDNA载体包括调控转基因表达的另外的组分, 例如, 如2018年9月7日提交的PCT申请号PCT/US 18/49996中所述的调控转基因表达的调控开关, 或可以杀灭包括ceDNA载体的细胞的杀灭开关。

[0286] 在一个实施例中, 表达盒还可以包含转录后元件以增加转基因的表达。在一个实施例中, 使用土拨鼠肝炎病毒 (WHP) 转录后调控元件 (WPRE) 来增加转基因的表达。可以使用其它转录后处理元件, 如来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶基因或乙型肝炎病毒 (HBV) 的转录后元件。分泌序列可以与转基因, 例如VH-02和VK-A26序列连接。表达盒可以包含本领域已知的聚腺苷酸化序列或其变体, 如从牛BGHpA或病毒SV40pA分离的天然存在的序列, 或合成序列。一些表达盒还可以包含SV40晚期polyA信号上游增强子 (USE) 序列。USE可以与SV40pA或异源poly-A信号组合使用。

[0287] 于2018年9月7日提交并通过引用整体并入本文的国际申请号PCT/US2018/050042的图1A-1C示出了非限制性示例性ceDNA载体或ceDNA质粒的对应序列的示意图。ceDNA载体是无衣壳的, 并且可以从按以下顺序编码的质粒中获得: 第一ITR、可表达转基因盒和第二ITR, 其中第一和/或第二ITR序列中的至少一个相对于相应的野生型AAV2 ITR序列发生突变。可表达的转基因盒优选按顺序包含以下中的一个或多个: 增强子/启动子、ORF报告子(转基因)、转录后调控元件(例如WPRE)以及聚腺苷酸化和终止信号(例如BGH polyA)。

[0288] 启动子

[0289] 合适的启动子, 包含上文所描述的那些启动子, 可以源自病毒并因此可以称为病毒启动子, 或其可以源自任何生物体, 包含原核或真核生物体。合适的启动子可以用于通过任何RNA聚合酶(例如, pol I、pol II、pol III)来驱动表达。示例性启动子包含但不限于SV40早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒长末端重复(LTR)启动子; 腺病毒主要晚期启动子(Ad MLP); 单纯疱疹病毒(HSV)启动子; 巨细胞病毒(CMV)启动子, 如CMV即刻早期启动子区域(CMVTE); 劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子; 人U6小核启动子(U6, 例如(Miyagishi等人,《自然生物技术》20, 497-500(2002)); 增强的U6启动子(例如Xia等人,《核酸研究》2003年9月1日; 31(17))、人H1启动子(H1)、CAG启动子、人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(HAAT)启动子(例如, 等。在一个实施例中, 这些启动子在其下游的含内含子的末端处被更改成包含一个或多个核酸酶切割位点。在一个实施例中, 含有核酸酶切割位点的DNA对于启动子DNA是外源的。

[0290] 在一个实施例中, 启动子可以包括一个或多个特异性转录调控序列以进一步增强表达和/或改变其空间表达和/或时间表达。启动子还可以包括末端增强子或阻遏子元件, 其可以位于来自转录起始位点的多达几千个碱基对。启动子可以源自包含病毒、细菌、真菌、植物、昆虫和动物的来源。启动子可以相对于发生表达的细胞、组织或器官或相对于发生表达的发育阶段, 或响应于外部刺激(如生理学压力、病原体、金属离子或诱发剂)组成性或差异地调控基因组分的表达。启动子的代表性实例包含噬菌体T7启动子、噬菌体T3启动子、SP6启动子、lac操纵子-启动子、tac启动子、SV40晚期启动子、SV40早期启动子、RSV-LTR启动子、CMV IE启动子、SV40早期启动子或SV40晚期启动子和CMV Ie启动子, 以及下文所列的启动子。此类启动子和/或增强子可以用于表达任何所关注的基因, 例如治疗性蛋白质。例如, 载体可以包括可操作地连接到编码治疗蛋白的核酸序列的启动子。在一个实施例

中,可操作地连接到编码序列的治疗性蛋白质的启动子可以是来自猴病毒40(SV40)的启动子、来自小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、来自人免疫缺陷病毒(HIV)启动子(如牛免疫缺陷病毒(BIV)长末端重复(LTR)启动子)、莫洛尼病毒(Moloney virus)启动子、禽白血病病毒(ALV)启动子、巨细胞病毒(CMV)启动子(如CMV即刻早期启动子)、埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus;EBV)启动子或劳氏肉瘤病毒(RSV)启动子。在一个实施例中,启动子还可以是来自人基因的启动子,如人泛素C(hUbC)、人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸或人金属硫蛋白。启动子还可以是组织特异性启动子,如肝脏特异性启动子,如天然或合成的人 $\alpha 1$ -抗胰蛋白酶(HAAT)。在一个实施例中,使用内源性ApoE、通过存在于肝细胞表面上的低密度脂蛋白(LDL)受体将包括ceDNA载体的组合物特异性靶向肝细胞能够实现向肝脏的递送。

[0291] 在一个实施例中,所用的启动子是编码治疗蛋白的基因的天然启动子。编码治疗蛋白的相应基因的启动子和其它调控序列是已知的并且已被表征。所使用的启动子区域可以进一步包含一个或多个另外的调控序列(例如,天然的),例如增强子。

[0292] 根据本发明使用的合适启动子的非限制性实例包含例如HAAT启动子、人EF1- α 启动子或EF1 α 启动子和大鼠EF1- α 启动子的片段的CAG启动子。

[0293] 聚腺苷酸化序列

[0294] 可以在ceDNA载体中包含编码聚腺苷酸化序列的序列,以稳定从ceDNA载体表达的mRNA,并有助于核输出和翻译。在一个实施例中,ceDNA载体不包含聚腺苷酸化序列。在其它实施例中,所述载体包含至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个、至少30个、至少40个、至少45个、至少50个或更多个腺嘌呤二核苷酸。在一些实施例中,聚腺苷酸化序列包括约43个核苷酸、约40-50个核苷酸、约40-55个核苷酸、约45-50个核苷酸、约35-50个核苷酸或它们之间的任何范围。

[0295] 在一个实施例中,ceDNA可以从载体多核苷酸获得,所述载体多核苷酸编码操作性地定位在两个不同的反向末端重复序列(ITR)(例如AAV ITR)之间的异源核酸,其中至少一个ITR包括末端解链位点和复制蛋白结合位点(RPS),例如Rep结合位点(例如wt AAV ITR),并且其中一个ITR包括相对于另一个ITR(例如,功能性ITR)的缺失、插入和/或替换。

[0296] 在一个实施例中,宿主细胞并不表达病毒衣壳蛋白并且多核苷酸载体模板不含任何病毒衣壳编码序列。在一个实施例中,多核苷酸载体模板不含AAV衣壳基因,而且不含其它病毒的衣壳基因)。在一个实施例中,核酸分子还不含AAV Rep蛋白编码序列。因此,在一些实施例中,本发明的核酸分子不含功能性AAV cap和AAV rep基因二者。

[0297] 在一个实施例中,ceDNA载体不具有经修饰的ITR。

[0298] 在一个实施例中,ceDNA载体包括如本文所公开的调控开关(或在2018年9月7日提交的PCT申请号PCT/US 18/49996中)。

[0299] V. ceDNA载体的生产

[0300] 用于产生如本文所述的包括本文定义的非对称ITR对或对称ITR对的ceDNA载体的方法描述于2018年9月7日提交的PCT/US 18/49996的第IV部分中,所述文献通过引用整体并入本文。如本文所述,可以例如通过包括以下的步骤的过程获得ceDNA载体:a)在存在单个Rep蛋白的情况下在有效条件下温育携带所述载体多核苷酸表达构建体模板(例如,ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒和/或ceDNA-杆状病毒)的宿主细胞(例如,昆虫细胞)群体,并且持

续足以诱导所述ceDNA在所述宿主细胞内产生的时间,所述宿主细胞群缺乏病毒衣壳编码序列,并且其中所述宿主细胞不包括病毒衣壳编码序列;以及b)从宿主细胞中收获并分离ceDNA载体。Rep蛋白的存在诱导具有经修饰的ITR的载体多核苷酸复制,从而在宿主细胞中产生ceDNA载体。

[0301] 然而,没有表达病毒颗粒(例如,AAV病毒粒子)。因此,没有大小限制,如在AAV或其它基于病毒的载体中天然强加的大小限制。

[0302] 可以通过以下方法来确认从宿主细胞分离的ceDNA载体的存在:用在ceDNA载体上具有单个识别位点的限制酶来消化从宿主细胞分离的DNA,并在非变性凝胶上分析消化的DNA材料,从而相较于线性和非连续DNA来确认线性和连续DNA的特性色带的存在。

[0303] 在一个实施例中,本发明提供了将DNA载体多核苷酸表达模板(ceDNA模板)稳定地整合至其自身基因组中的宿主细胞系用于产生非病毒DNA载体的用途,例如,如以下文献中所述:Lee,L.等人(2013)《公共科学图书馆综合》8(8):e69879。优选地,Rep以约3的MOI加入宿主细胞中。当宿主细胞系是哺乳动物细胞系,例如HEK293细胞时,所述细胞系可以具有稳定整合的多核苷酸载体模板,并且可以使用第二载体,如疱疹病毒将Rep蛋白引入细胞中,使得在Rep和辅助病毒存在下切除和扩增ceDNA。

[0304] 在一个实施例中,用于制备本文所描述的ceDNA载体的宿主细胞是昆虫细胞,并使用杆状病毒递送对Rep蛋白进行编码的多核苷酸和用于ceDNA的非病毒DNA载体多核苷酸表达构建体模板。在一些实施例中,宿主细胞被工程化为表达Rep蛋白。

[0305] 然后从宿主细胞中收获和分离ceDNA载体。从细胞收获和收集本文所描述的ceDNA载体的时间可以进行选择和优化,以实现高产率地产生ceDNA载体。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收获时间。在一个实施例中,细胞在足够的条件下生长,并在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体但在大多数细胞因杆状病毒毒性而开始死亡之前的时间进行收获。可以使用质粒纯化试剂盒,例如Qiagen Endo-Free Plasmid试剂盒分离DNA载体。为分离质粒而开发的其它方法也适用于DNA载体。一般而言,可以采用任何核酸纯化方法。

[0306] DNA载体可以通过本领域的技术人员已知用于纯化DNA的任何手段来纯化。在一个实施例中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在一个实施例中,ceDNA载体被纯化为外泌体或微粒。可以通过以下方法来确认ceDNA载体的存在:使用对DNA载体具有单个识别位点的限制酶消化从细胞中分离出的载体DNA,并且使用凝胶电泳术分析已消化和未消化的DNA材料,从而相较于线性和非连续DNA来确认线性和连续DNA的特性色带的存在。

[0307] ceDNA质粒

[0308] ceDNA-质粒是用于后来产生的ceDNA载体的质粒。在一个实施例中,ceDNA-质粒可以使用已知的技术构建,以在转录方向上提供以下至少一项作为操作性连接的组分:(1)经修饰的5' ITR序列;(2)含有例如启动子、诱导型启动子、调控开关、增强子等顺式调控元件的表达盒;以及(3)经修饰的3' ITR序列,其中3' ITR序列相对于5' ITR序列是对称的。在一些实施例中,侧接有ITR的表达盒包括用于引入外源序列的克隆位点。表达盒替换了AAV基因组的rep和cap编码区。

[0309] 在一个实施例中,ceDNA载体是从质粒获得,该质粒在本文中被称为“ceDNA-质粒”,其按顺序编码:第一腺相关病毒(AAV)反向末端重复序列(ITR)、包括转基因的表达盒、

以及突变的或经修饰的AAV ITR,其中所述ceDNA-质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列。在替代性实施例中,ceDNA-质粒按顺序编码:第一(或5')经修饰的或突变的AAV ITR、包括转基因的表达盒、以及第二(或3')经修饰的AAV ITR,其中所述ceDNA-质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列,并且其中5'和3' ITR彼此对称。在替代性实施例中,ceDNA-质粒按顺序编码:第一(或5')经修饰的或突变AAV ITR、包括转基因的表达盒、以及第二(或3')突变的或经修饰的AAV ITR,其中所述ceDNA-质粒缺乏AAV衣壳蛋白编码序列,并且其中5'和3'经修饰的ITR具有相同的修饰(即,它们是反向互补或相对于彼此对称)。

[0310] 在一个实施例中,ceDNA-质粒系统缺乏病毒衣壳蛋白编码序列(即,其缺乏AAV衣壳基因,也缺乏其它病毒的衣壳基因)。另外,在特定实施例中,ceDNA-质粒还不含AAV Rep蛋白编码序列。因此,在优选实施例中,ceDNA-质粒缺乏AAV2的功能性AAV cap和AAV rep基因GG-3'加上允许发夹形成的可变回文序列。在一个实施例中,可以使用本领域公知的任何AAV血清型的基因组的天然核苷酸序列来产生本公开的ceDNA-质粒。在一个实施例中,ceDNA-质粒主链源自于AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV 5、AAV7、AAV8、AAV9、AAV 10、AAV 11、AAV 12、AAVrh8、AAVrh10、AAV-DJ和AAV-DJ8基因组,例如NCBI:NC 002077;NC 001401;NC001729;NC001829;NC006152;NC 006260;NC 006261;Kotin和Smith,《病毒的斯普林格指数(Springer Index of Viruses)》,可从Springer维护的URL获得。在一个实施例中,ceDNA-质粒主链源自AAV2基因组。在一个实施例中,ceDNA-质粒主链是合成的主链,其被基因工程化为在其5'和3' ITR处包含源自于这些AAV基因组之一。

[0311] 在一个实施例中,ceDNA-质粒可以任选地包含用于建立产生ceDNA载体的细胞系的选择性或选择标志物。在一个实施例中,选择标志物可以插入3' ITR序列的下游(即,3')。在另一个实施例中,选择标志物可以插入5' ITR序列的上游(即,5')。适当的选择标志物包含例如赋予耐药性的那些标志物。选择标志物可以是例如杀稻瘟菌素S抗性基因、卡那霉素(kanamycin)、遗传霉素(geneticin)等。在优选的实施例中,药物选择标志物是杀稻瘟菌素S抗性基因。

[0312] 在一个实施例中,示例性ceDNA(例如,rAAV0)是从rAAV质粒产生的。一种用于产生rAAV载体的方法可以包括:(a)为宿主细胞提供如上文所描述的rAAV质粒,其中宿主细胞和质粒均不含衣壳蛋白编码基因,(b)在允许产生ceDNA基因组的条件下培养宿主细胞;以及(c)收获细胞并分离从所述细胞产生的AAV基因组。

[0313] 从ceDNA质粒制备ceDNA载体的示例性方法

[0314] 在一个实施例中,本文还提供了用于制备无衣壳的ceDNA载体的方法,特别是具有足够高的产率以提供足够的载体用于体内实验的方法。

[0315] 在一个实施例中,用于产生ceDNA载体的方法包括以下步骤:(1)将包括表达盒和两个对称ITR序列的核酸构建体引入宿主细胞(例如,Sf9细胞)中;(2)任选地,例如通过使用质粒上存在的选择标志物建立克隆细胞系;(3)将Rep编码基因引入(通过用携带所述基因的杆状病毒转染或感染)所述昆虫细胞中;以及(4)收获细胞并纯化ceDNA载体。上述用于产生ceDNA载体的包括表达盒和两个ITR序列的核酸构建体可以呈ceDNA-质粒的形式,或如下所述用ceDNA-质粒产生的杆粒或杆状病毒的形式。可以通过转染、病毒转导、稳定整合或本领域中已知的其它方法将核酸构建体引入宿主细胞中。

[0316] 细胞系

[0317] 在一个实施例中,用于产生ceDNA载体的宿主细胞系可以包含源自草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的昆虫细胞系,如Sf9Sf21,或粉纹夜蛾(*Trichoplusia ni*)细胞,或其它无脊椎动物、脊椎动物或其它真核细胞系,包含哺乳动物细胞。还可以使用普通技术人员已知的其它细胞系,如HEK293、Huh-7、HeLa、HepG2、Hep1A、911、CHO、COS、MeWo、NIH3T3、A549、HT1180、单核细胞以及成熟和未成熟的树突细胞。可以转染宿主细胞系以稳定表达ceDNA-质粒,从而高产率地产生ceDNA载体。

[0318] 在一个实施例中,可以使用本领域已知的试剂(例如,脂质体、磷酸钙)或物理手段(例如,电穿孔),通过瞬时转染将ceDNA-质粒引入Sf9细胞中。可替代地,可以建立将ceDNA-质粒稳定整合到基因组中的稳定Sf9细胞系。此类稳定细胞系可以通过如上文所描述将选择标志物并入ceDNA-质粒中来建立。如果用于转染细胞系的ceDNA-质粒包含选择标志物,如抗生素,那么可以通过向细胞生长培养基中加入抗生素来选择已用ceDNA-质粒转染并将ceDNA-质粒DNA整合到基因组中的细胞。然后通过单细胞稀释或集落转移技术来分离细胞的抗性克隆并增殖。

[0319] 分离和纯化ceDNA载体

[0320] 获得和分离ceDNA载体(例如,用于基因编辑)的过程的实例在2018年12月6日提交的国际申请号PCT/US2018/064242的图4A-4E中进行了描述,所述国际申请的内容通过引用整体并入本文。在一个实施例中,ceDNA-载体可以从表达AAV Rep蛋白的生产细胞获得,进一步用ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒或ceDNA-杆状病毒转化。可用于生产ceDNA载体的质粒包含国际申请号PCT/US2018/064242的图6A(用于产生Rep BIIC)、图6B(用于获得ceDNA载体的质粒)中所示的质粒。

[0321] 在一个实施例中,多核苷酸对在质粒(Rep-质粒)、杆粒(Rep-杆粒)或杆状病毒(Rep-杆状病毒)中递送到生产细胞的AAV Rep蛋白(Rep 78或68)进行编码。Rep-质粒、Rep-杆粒和Rep-杆状病毒可以通过上文所描述的方法产生。

[0322] 本文描述了ceDNA-载体作为示例性ceDNA载体产生的方法。用于生成本发明的ceDNA载体的表达构建体可以是质粒(例如ceDNA-质粒)、杆粒(例如ceDNA-杆粒)和/或杆状病毒(例如ceDNA-杆状病毒)。仅举例来说,ceDNA-载体可以由用ceDNA-杆状病毒和Rep-杆状病毒共同感染的细胞产生。由Rep-杆状病毒产生的Rep蛋白可以复制ceDNA-杆状病毒以产生ceDNA-载体。可替代地,可以从用包括编码AAV Rep蛋白(Rep78/52)的序列的构建体稳定转染的细胞产生ceDNA载体,所述蛋白在Rep-质粒、Rep-杆粒或Rep-杆状病毒中递送。CeDNA-杆状病毒可以瞬时转染到细胞中,通过Rep蛋白复制并产生ceDNA载体。

[0323] 杆粒(例如,ceDNA-杆粒)可以转染到许可昆虫细胞中,如Sf9、Sf21、Tni(粉纹夜蛾)细胞、High Five细胞,并且生成ceDNA-杆状病毒,所述杆状病毒是重组杆状病毒,其包含序列,所述序列包括对称ITR和表达盒。ceDNA-杆状病毒可以再次感染到昆虫细胞中以获得下一代重组杆状病毒。任选地,所述步骤可以重复一次或多次以产生更大量的重组杆状病毒。

[0324] 从细胞收获和收集本文所描述的ceDNA载体的时间可以进行选择和优化,以实现高产率地产生ceDNA载体。例如,可以根据细胞活力、细胞形态、细胞生长等选择收获时间。一般而言,细胞可以在杆状病毒感染后足以产生ceDNA载体(例如,ceDNA载体)但在大多数细胞因病毒毒性而开始死亡之前的时间后进行收获。使用质粒纯化试剂盒,如Qiagen

ENDO-FREE PLASMID®试剂盒,可以从Sf9细胞中分离出ceDNA-载体。为了分离质粒而开发的其它方法也可以适合于ceDNA载体。一般而言,可以采用本领域中已知的任何核酸纯化方法,以及可商购的DNA提取试剂盒。

[0325] 可替代地,可以通过对细胞团粒进行碱溶解工艺、离心所得溶解液并进行色谱分离来实施纯化。作为一个非限制性实例,所述工艺可以如下进行:将上清液装载于保留核酸的离子交换柱(例如,SARTOBIND Q®)上,然后洗脱(例如使用1.2M NaCl溶液)并且在凝胶过滤柱上进一步进行色谱提纯(例如,6个快速流动GE)。然后通过例如沉淀来回收无衣壳的AAV载体。

[0326] 在一个实施例中,ceDNA载体也可以以外泌体或微粒形式纯化。本领域中已知,许多细胞类型不仅释放出可溶性蛋白质,而且通过膜微囊泡脱落释放出复杂的蛋白质/核酸货物(Cocucci等人,2009;EP 10306226.1)。此类囊泡包含微囊泡(也称为微粒)和外泌体(也称为纳米囊泡),两者均包括蛋白质和RNA作为货物。微囊泡由质膜的直接出芽产生,而外泌体在多囊泡内体与质膜融合后释放到细胞外的环境中。因此,可以从已经用ceDNA-质粒转导的细胞或用ceDNA-质粒产生的杆粒或杆状病毒中分离出含有ceDNA载体的微囊泡和/或外泌体。

[0327] 在一个实施例中,微囊泡可以通过对培养基进行过滤或以20,000x g超速离心来分离,而对外泌体则以100,000x g超速离心。超速离心的最佳持续时间可以通过实验确定,并将取决于从中分离出囊泡的特定细胞类型。优选地,首先利用低速离心(例如在2000x g下进行5-20分钟)清除培养基并且使用例如AMICON®离心柱(英国赫特福德郡的密理博(Millipore, Watford, UK))进行离心浓缩。微囊泡和外泌体可以通过使用识别存在于微囊泡和外泌体上的特定表面抗原的特异性抗体,通过FACS或MACS进一步纯化。其它微囊泡和外泌体纯化方法包含(但不限于):免疫沉淀、亲和色谱、过滤和涂有特异性抗体或适体的磁珠。纯化后,用例如磷酸盐缓冲盐水洗涤囊泡。使用微囊泡或外泌体递送含ceDNA的囊泡的一个优点是,这些囊泡可通过在它们的膜上包含被相应细胞类型上的特异性受体识别的蛋白质而靶向各种细胞类型。(还参见EP 10306226),其通过引用整体并入本文。

[0328] 本发明的另一方面涉及从已将ceDNA构建体稳定整合到自身基因组中的宿主细胞系中纯化ceDNA载体的方法。在一个实施例中,ceDNA载体被纯化为DNA分子。在另一个实施例中,将ceDNA载体作为外泌体或微粒进行纯化。

[0329] PCT/US 18/49996的图5示出了使用实例中所描述的方法确认由多种ceDNA-质粒构建体产生ceDNA的凝胶。

[0330] VI. 脂质颗粒的制备

[0331] 脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以在将ceDNA与脂质混合时自发形成。取决于期望的粒度分布,可以使用例如热桶挤出机,如Lipex挤出机(Northern Lipids, Inc),经膜(例如,100nm截止值)挤出所得的纳米颗粒混合物。在一些情况下,可以省略挤出步骤。可以通过例如透析或切向流过滤实现乙醇去除和同时缓冲液交换。在一个实施例中,脂质纳米颗粒如本文实例6中所述形成。

[0332] 一般而言,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过本领域已知的任何方法形成。例如,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过例如US2013/0037977、US2010/0015218、US2013/0156845、US2013/0164400、US2012/0225129和US2010/0130588中描述的方法制备,

其中每一个的内容均通过引用整体并入本文。在一些实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以使用连续混合方法、直接稀释工艺或在线稀释工艺来制备。用于使用直接稀释和在线稀释工艺制备脂质纳米颗粒的设备的工艺和设备描述于US2007/0042031中,所述文献的内容通过引用整体并入本文。用于使用逐步稀释工艺制备脂质纳米颗粒的工艺和设备描述于US2004/0142025中,所述文献的内容通过引用整体并入本文。

[0333] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以通过冲击喷射工艺制备。一般而言,通过将溶解在醇(例如,乙醇)中的脂质与溶解在缓冲液(例如,柠檬酸盐缓冲液、乙酸钠缓冲液、乙酸钠和氯化镁缓冲液、苹果酸缓冲液、苹果酸和氯化钠缓冲液或柠檬酸钠和氯化钠缓冲液)中的ceDNA混合来形成颗粒。脂质与ceDNA的混合比率可以是约45-55%的脂质和约65-45%的ceDNA。

[0334] 脂质溶液可以含有阳离子脂质(例如可离子化的阳离子脂质)、非阳离子脂质(例如,磷脂,如DSPC、DOPE和DOPC)、PEG或PEG缀合分子(例如,PEG-脂质)以及甾醇(例如,胆固醇),其在醇(例如,乙醇)中的总脂质浓度为5-30mg/mL、更可能为5-15mg/mL、最可能为9-12mg/mL。在脂质溶液中,脂质的摩尔比范围可以为:对于阳离子脂质,约25-98%,优选地约35-65%;对于非离子脂质,约0-15%,优选地约0-12%;对于PEG或PEG缀合的脂质分子,约0-15%,优选地约1-6%;以及对于甾醇,约0-75%,优选地约30-50%。

[0335] ceDNA溶液可以包括在缓冲溶液中浓度范围为0.3-1.0mg/mL,优选地0.3-0.9mg/mL的ceDNA,pH范围为3.5-5。

[0336] 为了形成LNP,在一个示例性但非限制性的实施例中,将两种液体加热至约15-40°C,优选地约30-40°C的温度,然后例如在冲击式喷射混合器中混合,从而立即形成LNP。混合流速范围为10-600毫升/分钟。管ID的范围为0.25到1.0mm,并且总流速为10-600毫升/分钟。流速和管道ID的组合可以将LNP的粒度控制在30到200nm之间。然后将溶液与较高pH的缓冲溶液混合,混合比在1:1到1:3vol:vol的范围内,优选地约1:2vol:vol。如果需要,这种缓冲溶液的温度可以在15-40°C或30-40°C的范围内。然后可以对混合的LNP进行阴离子交换过滤步骤。在阴离子交换之前,可以将混合的LNP温育一段时间,例如30分钟到2小时。温育期间的温度可以在15-40°C或30-40°C的范围内。温育后,将溶液通过过滤器过滤,如0.8 μ m过滤器,其含有阴离子交换分离步骤。这个过程可以使用1mm ID到5mm ID的管道ID和10到2000毫升/分钟的流速。

[0337] 在形成之后,可以通过超滤工艺浓缩和渗滤LNP,在所述工艺中,去除醇并将缓冲液更换为最终缓冲溶液,例如,约pH 7(例如,约pH 6.9、约pH 7.0、约pH 7.1、约pH 7.2、约pH 7.3或约pH 7.4)的磷酸盐缓冲盐水(PBS)。

[0338] 超滤工艺可以使用切向流过滤形式(TFF),所述形式使用30-500kD的膜标称分子量截止范围。膜形式是中空纤维或平板盒。具有适当截止分子量的TFF工艺可以将LNP保留在渗余液中,而滤液或渗透液中含有醇;柠檬酸盐缓冲液和最终缓冲液废弃物。TFF工艺是一个多步骤工艺,从初始浓度到1-3mg/mL的ceDNA浓度。浓缩后,针对最终缓冲液,对LNP溶液进行10-20体积的渗滤,以去除醇并进行缓冲液交换。然后将材料再浓缩1-3倍。浓缩的LNP溶液可以无菌过滤。

[0339] VII. 药物组合物和调配物

[0340] 本文还提供了一种药物组合物,其包括ceDNA脂质颗粒和药学上可接受的载体或

赋形剂。

[0341] 在一个实施例中, ceDNA脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 被提供有治疗性核酸的完全包封、部分包封。在一个实施例中, 核酸治疗剂完全包封在脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 中以形成含有核酸的脂质颗粒。在一个实施例中, 核酸可以包封在颗粒的脂质部分内, 从而保护其免于酶促降解。

[0342] 在一个实施例中, 脂质颗粒具有约20nm到约100nm、30nm到约150nm、约40nm到约150nm、约50nm到约150nm、约60nm到约130nm、约70nm到约110nm、约70nm到约100nm、约80nm到约100nm、约90nm到约100nm、约70到约90nm、约80nm到约90nm、约70nm到约80nm或约75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm的平均直径, 以确保有效递送。含有核酸的脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 及其制备方法公开于例如PCT/US18/50042、美国专利公开号20040142025和20070042031中, 所述文献的公开内容出于所有目的通过引用整体并入本文。在一个实施例中, 脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 的大小可以通过准弹性光散射使用例如Malvern Zetasizer Nano ZS(英国马尔文公司(Malvern, UK)) 系统来确定。

[0343] 一般而言, 本发明的脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 具有被选择以提供预期治疗效果的平均直径。

[0344] 根据脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 的预期用途, 可以改变组分的比例, 并且可以使用例如内体释放参数(ERP) 测定法来测量特定调配物的递送效率。

[0345] 在一个实施例中, 脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 可以与其它部分缀合以防止聚集。此类脂质缀合物包含但不限于PEG-脂质缀合物, 如例如, 偶联至二烷氧基丙基的PEG(例如, PEG-DAA缀合物)、偶联至二酰基甘油的PEG(例如, PEG-DAG缀合物)、偶联至胆固醇的PEG、偶联至磷脂酰乙醇胺的PEG和偶联至神经酰胺的PEG(参见例如, 美国专利第5, 885, 613号)、阳离子PEG脂质、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物(例如, POZ-DAA缀合物; 参见例如, 于2010年1月13日提交的美国临时申请第61/294, 828号和于2010年1月14日提交的美国临时申请第61/295, 140号)、聚酰胺寡聚物(例如, ATTA-脂质缀合物) 及其混合物。POZ-脂质缀合物的另外的实例在PCT公开号WO 2010/006282中描述。PEG或POZ可以直接与脂质缀合, 或者可以通过接头部分与脂质连接。可以使用适合于将PEG或POZ与脂质偶联的任何接头部分, 包含例如不含酯的接头部分和含酯的接头部分。在某些优选的实施例中, 使用不含酯的接头部分, 如酰胺或氨基甲酸酯。出于所有目的, 将每个上述专利文件的公开内容以全文引用的方式并入本文。

[0346] 在一个实施例中, ceDNA可以与颗粒的脂质部分复合或包封在脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 的脂质位置中。在一个实施例中, ceDNA可以完全包封在脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 的脂质位置中, 从而保护其免于被核酸酶降解, 例如在水溶液中。在一个实施例中, 在脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 暴露于37°C的核酸酶至少约20分钟、30分钟、45分钟或60分钟后, 脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 中的ceDNA基本上没有降解。在一些实施例中, 在将颗粒在血清中于37°C下温育至少约30分钟、45分钟或60分钟或至少约2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、12小时、14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时、26小时、28小时、30小时、32小时、34小时或36小时后, 脂质颗粒(例如, 脂质纳米颗粒) 中的ceDNA基本上没有降解。

[0347] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)对受试者,例如对哺乳动物(如人)基本上是无毒的。

[0348] 在一个实施例中,包括本公开的治疗性核酸的药物组合物可以配制在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中。在一些实施例中,包括治疗性核酸的脂质颗粒可以由阳离子脂质形成。在一些其它实施例中,包括治疗性核酸的脂质颗粒可以由非阳离子脂质形成。在优选的实施例中,本发明的脂质颗粒是含有核酸的脂质颗粒,其由阳离子脂质形成,所述阳离子脂质包括选自以下组成的组的治疗性核酸:mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)、小环DNA、小基因、病毒DNA(例如,慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、末端封闭式线性双螺旋DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggybone™ DNA载体、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒迷你串DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)或哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。

[0349] 在另一个优选的实施例中,本发明的脂质颗粒是含有核酸的脂质颗粒,其由非阳离子脂质和任选的防止颗粒聚集的缀合脂质形成。

[0350] 在一个实施例中,脂质颗粒调配物是水溶液。在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)调配物是冻干粉末。

[0351] 根据一些方面,本公开提供了一种脂质颗粒调配物,其进一步包括一种或多种药物赋形剂。在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)调配物进一步包括蔗糖、tris、海藻糖和/或甘氨酸。

[0352] 在一个实施例中,本文公开的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以并入适合施用于受试者的药物组合物中,以体内递送至受试者的细胞、组织或器官。一般而言,药物组合物包括如本文公开的ceDNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)和药学上可接受的载体。在一个实施例中,本公开的ceDNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以并入适合于期望的治疗性施用途径(例如,肠胃外施用)的药物组合物中。还涵盖通过高压静脉内或动脉内输注以及如核内显微注射或胞质内注射的细胞内注射进行的被动组织转导。用于治疗目的的药物组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合于高ceDNA载体浓度的有序结构。无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据需要进行与上文列举的成分中的一种或组合一起并入适当的缓冲液中,接着进行过滤灭菌来制备。

[0353] 如本文所公开的脂质颗粒可以并入适合于局部、全身、羊膜内、鞘内、颅内、动脉内、静脉内、淋巴内、腹膜内、皮下、气管、组织内(例如肌肉内、心内、肝内、肾内、脑内)、鞘内、膀胱内、结膜(例如眼眶外、眼眶内、眼眶后、视网膜内、视网膜下、脉络膜、脉络膜下、基质内、前房内和玻璃体内)、耳蜗内和粘膜(例如口腔、直肠、鼻)施用的药物组合物。还涵盖通过高压静脉内或动脉内输注以及如核内显微注射或胞质内注射的细胞内注射进行的被动组织转导。

[0354] 包括ceDNA脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的药物活性组合物可以被配制成将核酸中的转基因递送到接受者的细胞,从而引起转基因在其中发生治疗性表达。组合物还可以包含药学上可接受的载体。

[0355] 用于治疗目的的药物组合物通常必须在制造和存储条件下是无菌的和稳定的。组合物可以配制成溶液、微乳液、分散液、脂质体或其它适合于高ceDNA载体浓度的有序结构。

无菌注射溶液可以通过将所需量的ceDNA载体化合物根据与上文列举的成分中的一种或组合一起并入适当的缓冲液中,接着进行过滤灭菌来制备。

[0356] 在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)是具有至少一个脂质双层的实心核心颗粒。在一个实施例中,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)具有非双层结构,即非层状(即,非双层)形态。不受限制地,非双层形态可以包含,例如,三维管、棒、立方对称等。可以使用本领域技术人员已知和使用的分析技术来确定脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)的非层状形态(即,非双层结构)。此类技术包含但不限于低温透射电子显微镜(“Cryo-TEM”)、差示扫描量热法(“DSC”)、X射线衍射等。例如,可以使用例如US2010/0130588中描述的Cryo-TEM分析容易地评估和表征脂质颗粒的形态(层状与非层状),所述文献的内容通过引用整体并入本文。

[0357] 在一个实施例中,具有非层状形态的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)是电子致密的。

[0358] 在一个实施例中,本公开提供了一种脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒),其结构为单层或多层。在一些方面,本公开提供了一种包括多囊泡颗粒和/或泡沫基颗粒的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)调配物。通过控制脂质组分的组成和浓度,可以控制脂质缀合物交换出脂质颗粒的速率,进而控制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)融合的速率。此外,包含例如pH、温度或离子强度的其它变量可用于改变和/或控制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)融合的速率。基于本公开,可用于控制脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)变得融合的速率的其它方法对于本领域普通技术人员将是显而易见的。同样显而易见的是,通过控制脂质缀合物的组成和浓度,可以控制脂质颗粒的大小。

[0359] 在一个实施例中,配制的阳离子脂质的pKa可以与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman等人,《化学应用国际版》(2012),51(34),8529-8533;Semple等人,《自然生物技术》28,172-176(2010),两者均通过引用整体并入)。在一个实施例中,pKa的优选范围为~5到~7。在一个实施例中,可以使用基于2-(p-甲苯胺)-6-萘磺酸(TNS)的荧光的测定法在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中测定阳离子脂质的pKa。

[0360] 在一个实施例中,ceDNA在脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中的包封可以通过进行膜不可渗透的荧光染料排除测定法来确定,所述测定法使用在与核酸相关时具有增强的荧光的染料,例如,Oligreen®测定法或PicoGreen®测定法。一般而言,通过将染料添加到脂质颗粒调配物中,测量所得的荧光,并与添加少量非离子清洁剂后观察到的荧光进行比较来确定包封。清洁剂介导的对脂质双层的破坏释放了包封的ceDNA,使其与不可渗透膜的染料相互作用。ceDNA的包封可以计算为 $E = (I_o - I) / I_o$,其中I和I_o是指添加清洁剂前后的荧光强度。

[0361] 单位剂量

[0362] 在一些实施例中,药物组合物可以以单位剂型呈现。单位剂型通常将适于药物组合物的一种或多种特定施用途径。在一些实施例中,单位剂型适合于通过吸入施用。在一些实施例中,单位剂型适合于通过汽化器施用。在一些实施例中,单位剂型适合于通过喷雾器施用。在一些实施例中,单位剂型适合于通过气雾器施用。在一些实施例中,单位剂型适合于口服施用、经颊施用或舌下施用。在一些实施例中,单位剂型适合于静脉内、肌肉内或皮下施用。在一些实施例中,单位剂型适合于鞘内或脑室内施用。在一些实施例中,配制药物

组合物以供局部施用。可以与载体材料组合以产生单个剂型的活性成分的量将通常是化合物产生治疗效果的数量。

[0363] VIII. 治疗方法

[0364] ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)和本文所述的组合物可用于将核酸序列(例如,治疗性核酸序列)引入宿主细胞。在一个实施例中,可以用来治疗患者的适当生物标志物监测使用ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)将核酸序列引入宿主细胞,以评估基因表达。

[0365] 本文提供的组合物和载体可用于递送转基因(核酸序列)用于各种目的。在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以以多种方式使用,包含,例如,异位、体外和体内应用、方法、诊断程序和/或基因疗法方案。

[0366] 本文提供了治疗受试者的疾病或病症的方法,所述方法包括将治疗有效量的ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)任选地与药学上可接受的载体一起引入受试者的有需要的靶细胞(例如,肌肉细胞或组织,或其它受影响的细胞类型)中。虽然可以在存在载体的情况下引入ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒),但此类载体不是必需的。所实施的ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)包括可用于治疗疾病的所关注的核苷酸序列。具体地说,ceDNA载体可以包括与控制元件可操作地连接的期望的外源DNA序列,当引入受试者中时,所述控制元件能够指导由外源DNA序列编码的期望的多肽、蛋白质或寡核苷酸的转录。ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可通过本文所述和本领域已知的任何合适途径施用。在一个实施例中,靶细胞在人类受试者中。

[0367] 本文提供了用于为有需要的受试者提供诊断或治疗有效量的ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)的方法,所述方法包括向有需要的受试者的细胞、组织或器官提供一定量的ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒);并且持续有效地使转基因从ceDNA载体表达,从而为受试者提供诊断或治疗有效量的由ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)表达的蛋白质、肽、核酸的时间。在一个实施例中,所述受试者是人类。

[0368] 本文提供了用于诊断、预防、治疗或改善受试者的疾病、病症、功能障碍、损伤、异常状况或创伤的至少一种或多种症状的方法。一般而言,所述方法至少包含以下步骤:向有需要的受试者施用一种或多种ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒),施用的量和时间足以诊断、预防、治疗或改善受试者的疾病、病症、功能障碍、损伤、异常病状或创伤的一种或多种症状。在一个实施例中,所述受试者是人类。

[0369] 本文提供了包括使用ceDNA载体作为治疗或减轻疾病或疾病状态的一种或多种症状的工具的方法。有许多遗传性疾病中的缺陷基因是已知的,并且通常分为两类:缺陷状态,通常是酶,一般以隐性方式遗传;和不平衡状态,其可以涉及调控蛋白或结构蛋白,并且通常但不总是以显性方式遗传。对于缺陷状态疾病来说,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以用于递送转基因以将正常基因引入受影响的组织中进行替代疗法,以及在一些实施例中,使用反义突变确立疾病的动物模型。对于不平衡的疾病状态来说,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以用于在模型系统中确立疾病状态,然后可将所述模型系统用于对抗疾病状态的努力。因此,本文公开的ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)和方法允许治疗遗传疾病。如本文所使用的,通过部分或

完全拯救导致疾病或使其更严重的缺陷或不平衡,可以治疗疾病状态。

[0370] 通过,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可用于根据上文的描述递送任何转基因,以治疗、预防或改善与任何与基因表达相关的病症相关的症状。说明性疾病状态包含但不限于:囊性纤维化(和其它肺部疾病)、A型血友病、B型血友病、地中海贫血、贫血和其它血液病症、AIDS、阿尔茨海默氏病、帕金森氏病、亨廷顿氏病、肌萎缩侧索硬化、癫痫和其它神经系统病症、癌症、糖尿病、肌营养不良症(例如,杜氏、贝克尔)、赫勒氏病(Hurler's disease)、腺苷脱氨酶缺乏症、代谢缺陷、视网膜退行性疾病(和其它眼部疾病)、线粒体病(例如,莱伯氏遗传性视神经病(LHON)、Leigh综合征和亚急性硬化性脑病)、肌病(例如,面肩胛肌病(FSHD)和心肌病)、实体器官疾病(例如,脑、肝、肾、心脏)等。在一些实施例中,本文公开的ceDNA载体可以有利地用于治疗患有代谢紊乱(例如,鸟氨酸转氨甲酰酶缺乏症)的个体。

[0371] 在一个实施例中,本文所述的ceDNA载体可用于治疗、改善和/或预防由基因或基因产物中的突变引起的疾病或病症。可以用ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))治疗的示例性疾病或病症包含但不限于代谢疾病或病症(例如,法布里病、戈谢病、苯丙酮尿症(PKU)、糖原贮积病);尿素循环疾病或病症(例如,鸟氨酸转氨甲酰酶(OTC)缺乏症);溶酶体贮积病或病症(例如,异染性脑白质营养不良(MLD)、II型粘多糖贮积症(MPSII;亨特氏综合征));肝脏疾病或病症(例如,进行性家族性肝内胆汁淤积症(PFIC));血液疾病或病症(例如,血友病(A和B)、地中海贫血和贫血);癌症和肿瘤,以及遗传疾病或病症(例如,囊性纤维化)。

[0372] 在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可用于在需要调控转基因表达水平(例如,编码激素或生长因子的转基因,如本文所述)的情况下递送异源核苷酸序列。

[0373] 在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可用于矫正导致疾病或病症的异常基因产物的水平和/或功能(例如蛋白质缺乏或缺陷)。ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以产生功能性蛋白质和/或调控蛋白质的水平,以减轻或减少由所述蛋白质的缺乏或缺陷引起的特定疾病或病症所产生的症状或为所述疾病或病症带来益处。例如,可以通过产生功能性OTC酶来实现OTC缺乏症的治疗;可以通过调控因子VIII、因子IX和因子X的水平来实现A型和B型血友病的治疗;可以通过调控苯丙氨酸羟化酶的水平来实现PKU的治疗;可以分别通过产生功能性 α 半乳糖苷酶或 β 葡萄糖苷脂酶来实现法布里病或戈谢病的治疗;可以分别通过产生功能性芳基硫酸酯酶A或艾杜糖醛酸-2-硫酸酯酶来实现MFD或MPSII的治疗;可以通过产生功能性囊性纤维化跨膜传导调控因子来实现囊性纤维化的治疗;可以通过恢复功能性G6Pase酶功能来实现糖原贮积病的治疗;并且可以通过产生功能性ATP8B1、ABCB11、ABCB4或TJP2基因来实现PFIC的治疗。

[0374] 在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可用于在体外或体内向细胞提供基于RNA的治疗剂。基于RNA的治疗剂的实例包含但不限于mRNA、反义RNA和寡核苷酸、核酶、适体、干扰RNA(RNAi)、切丁酶-底物dsRNA、小发夹RNA(shRNA)、非对称干扰RNA(aiRNA)、微RNA(miRNA)。例如,在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可用于在体外或体内向细胞提供反义核酸。例如,在转基因是RNAi分子的情况下,靶细胞中反义核酸或RNAi的表达会削弱细胞对特定蛋白质的表达。因此,为了

减少特定蛋白质在有需要的受试者中的表达,可以施用作为RNAi分子或反义核酸的转基因。还可以将反义核酸体外施用于细胞以调控细胞生理,例如优化细胞或组织培养系统。

[0375] 在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可用于在体外或体内向细胞提供基于DNA的治疗剂。基于DNA的治疗剂的实例包含但不限于小环DNA、小基因、病毒DNA(例如,慢病毒或AAV基因组)或非病毒合成DNA载体、末端封闭式线性双螺旋DNA(ceDNA/CELiD)、质粒、杆粒、doggybone™ DNA载体、简约的免疫学定义的基因表达(MIDGE)-载体、非病毒迷你串DNA载体(线性-共价封闭的DNA载体)或哑铃形DNA最小载体(“哑铃DNA”)。例如,在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可用于在体外或体内向细胞提供小环。例如,在转基因是小环DNA的情况下,靶细胞中小环DNA的表达会削弱细胞对特定蛋白质的表达。因此,为了减少特定蛋白质在有需要的受试者中的表达,可以施用作为小环DNA的转基因。还可以将小环DNA体外施用于细胞以调控细胞生理,例如优化细胞或组织培养系统。

[0376] 在一个实施例中,由ceDNA载体编码的示例性转基因包含但不限于:X、溶酶体酶(例如与泰-萨氏病(Tay-Sachs disease)相关的己糖胺酶A或与亨特综合征/MPS II相关的艾杜糖醛酸硫酸酯酶)、促红细胞生成素、血管抑素、内皮抑素、超氧化物歧化酶、球蛋白、瘦蛋白、过氧化氢酶、酪氨酸羟化酶以及细胞因子(例如干扰素、b-干扰素、干扰素-g、白介素-2、白介素-4、白介素12、粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子、淋巴毒素等)、肽生长因子和激素(例如生长激素、胰岛素、胰岛素样生长因子1和2、血小板衍生生长因子(PDGF)、表皮生长因子(EGF)、成纤维细胞生长因子(FGF)、神经生长因子(NGF)、神经营养因子-3和4、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质衍生生长因子(GDNF)、转化生长因子-a和-b等)、受体(例如肿瘤坏死因子受体)。在一些示例性实施例中,转基因编码对一个或多个期望的目标具有特异性的单克隆抗体。在一些示例性实施例中,ceDNA载体编码超过一种转基因。在一些示例性实施例中,转基因编码包括两种不同的所关注多肽的融合蛋白。在一些实施例中,转基因编码如本文定义的抗体,包含全长抗体或抗体片段。在一些实施例中,抗体是如本文所定义的抗原结合结构域或免疫球蛋白可变结构域序列。其它说明性的转基因序列编码自杀基因产物(胸苷激酶、胞嘧啶脱氨酶、白喉毒素、细胞色素P450、脱氧胞苷激酶和肿瘤坏死因子)、将抗性赋予癌症疗法中所用的药物的蛋白质,以及肿瘤抑制基因产物。

[0377] 施用

[0378] 在一个实施例中,可以将ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)施用于生物体,用于体内转导细胞。在一个实施例中,可以将ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)施用于生物体,用于离体转导细胞。

[0379] 一般而言,通过通常用于将分子引入最终与血液或组织细胞接触的任何途径进行施用。合适的施用此类核酸的方法是可获得的并且是本领域的技术人员公知的,并且虽然可以使用超过一种途径来施用特定的组合物,但特定的途径通常可以提供比另一途径更直接和更有效的反应。ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)的示例性施用方式包含口服、经直肠、经粘膜、鼻内、吸入(例如通过气雾剂)、经颊(例如舌下)、经阴道、鞘内、眼内、经皮、内皮内、子宫内(或卵内)、肠胃外(例如静脉内、皮下、皮内、颅内、肌肉内(包含施用骨骼肌、隔膜肌和/或心肌)、胸膜内、大脑内和关节内)、局部(例如皮肤和粘膜表面二者,包含气道表面和经皮施用)、淋巴管内等,以及直接组织或器官注射(例如对肝脏、眼睛、

骨骼肌、心肌、隔膜肌或脑)。

[0380] 可以向受试者的任何位点施用ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒),包含但不限于选自由以下组成的组的位点:脑、骨骼肌、平滑肌、心脏、隔膜、气道上皮、肝脏、肾脏、脾脏、胰腺、皮肤和眼睛。在一个实施例中,也可以对肿瘤(例如,在肿瘤或淋巴结内或附近)施用ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)。在任何给定情况下,最合适的途径将取决于所治疗、改善和/或预防的病状的性质和严重程度,以及所使用的特定ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)的性质。另外,ceDNA允许通过单个载体或多个ceDNA载体(例如ceDNA混合物)施用超过一种转基因。

[0381] 在一个实施例中,向骨骼肌施用ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)包含但不限于向四肢(例如,上臂、下臂、大腿和/或小腿)、背部、颈部、头部(例如舌头)、胸部、腹部、骨盆/会阴和/或手指中的骨骼肌施用。ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以通过静脉内施用、动脉内施用、腹膜内施用、肢体灌注(任选地,腿和/或手臂的分离肢体灌注;参见例如Arruda等人,(2005)《血液学(Blood)》105:3458-3464),和/或直接肌内注射而被递送到骨骼肌。在特定实施例中,通过肢体灌注,任选地,分离肢体灌注(例如,通过静脉内或关节内施用)将ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)施用至受试者(例如,患有如DMD等肌营养不良症的受试者)的肢体(手臂和/或腿)。在一个实施例中,可以在不采用“流体动力学”技术的情况下施用ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)。

[0382] 将ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)施用于心肌包含施用于左心房、右心房、左心室、右心室和/或隔膜。ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以通过静脉内施用、动脉内施用(如主动脉内施用)、直接心脏注射(例如,注入左心房、右心房、左心室、右心室),和/或冠状动脉灌注而被递送到心肌。可以通过任何合适的方法施用于隔膜肌,包含静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。可以通过任何合适的方法施用于平滑肌,包含静脉内施用、动脉内施用和/或腹膜内施用。在一个实施例中,可以施用于存在于平滑肌内、平滑肌附近和/或平滑肌上的内皮细胞。

[0383] 在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)被施用至骨骼肌、隔膜肌和/或心肌(例如,以治疗、改善和/或预防肌营养不良或心脏病(例如,PAD或充血性心力衰竭))。

[0384] ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以施用于CNS(例如,施用于脑或眼睛)。ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以被引入脊髓、脑干(延髓、脑桥)、中脑(下丘脑、丘脑、上丘脑、垂体、黑质、松果体)、小脑、端脑(纹状体、大脑,包含枕叶、颞叶、顶叶和额叶、皮质、基底神经节、海马和杏仁核)、边缘系统、新皮质、纹状体、大脑和下丘。ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))也可以施用于眼睛的不同区域,如视网膜、角膜和/或视神经。ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可以被递送到脑脊液中(例如,通过腰椎穿刺)。在血脑屏障受到干扰的情况下(例如,脑肿瘤或脑梗塞),ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒))可以进一步被血管内施用至CNS。

[0385] 在一个实施例中,可以通过本领域已知的任何途径将ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)施用至CNS的期望区域,包含但不限于鞘内、眼内、脑内、心室内、静

脉内(例如,在存在甘露醇等糖的情况下)、鼻内、耳内、眼内(例如,玻璃体内、视网膜下、前房)和眼周(例如,眼球筋膜囊下区域(sub-Tenon's region))递送以及逆行递送至运动神经元的肌肉内递送。

[0386] 根据一些实施例,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)通过直接注射(例如,立体定向注射)以液体调配物形式施用至CNS中的期望区域或区室。根据其它实施例,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可通过局部施用至期望区域或通过气溶胶调配物的鼻内施用来提供。可以通过局部施加液滴来施用于眼睛。作为进一步的替代方案,ceDNA载体可以作为固体缓释调配物施用(参见例如美国专利第7,201,898号,其通过引用整体并入本文)。在一个实施例中,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可用于逆行运输以治疗、改善和/或预防涉及运动神经元的疾病和病症(例如,肌萎缩侧索硬化症(ALS);脊髓性肌萎缩症(SMA)等)。例如,ceDNA载体(例如,本文所述的ceDNA载体脂质颗粒)可以被递送至肌肉组织,其可以从所述肌肉组织迁移到神经元中。

[0387] 在一个实施例中,可以重复施用治疗性产品直到达到适当的表达水平。因此,在一个实施例中,可以多次施用和重新给药治疗性核酸。例如,可以在第0天施用治疗性核酸。在第0天进行初始治疗后,可以在用治疗性核酸进行初始治疗后约1周、约2周、约3周、约4周、约5周、约6周、约7周、约8周或约3个月、约4个月、约5个月、约6个月、约7个月、约8个月、约9个月、约10个月、约11个月或约1年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年、约11年、约12年、约13年、约14年、约15年、约16年、约17年、约18年、约19年、约20年、约21年、约22年、约23年、约24年、约25年、约26年、约27年、约28年、约29年、约30年、约31年、约32年、约33年、约34年、约35年、约36年、约37年、约38年、约39年、约40年、约41年、约42年、约43年、约44年、约45年、约46年、约47年、约48年、约49年或约50内进行第二次给药(重新给药)。

[0388] 在一个实施例中,还可以包含一种或多种另外的化合物。那些化合物可以单独施用,或者所述另外的化合物可以包含在本发明的脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)中。换言之,脂质颗粒(例如,脂质纳米颗粒)可以含有除了ceDNA或至少第二ceDNA之外的其它化合物,其不同于第一种化合物。不受限制地,其它另外的化合物可以选自由以下组成的组:有机或无机的小分子或大分子、单糖、二糖、三糖、寡糖、多糖、肽、蛋白质、肽类似物及其衍生物、拟肽、核酸、核酸类似物和衍生物、由生物材料制成的提取物或其任何组合。

[0389] 在一个实施例中,一种或多种另外的化合物可以是治疗剂。治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。因此,治疗剂可以选自适合于治疗目的的任何类别。治疗剂可以根据治疗目的和期望的生物作用进行选择。例如,在一个实施例中,如果LNP内的ceDNA可用于治疗癌症,则另外的化合物可以是抗癌剂(例如,化疗剂、靶向癌症疗法(包含但不限于小分子、抗体或抗体-药物缀合物)。在一个实施例中,如果含有ceDNA的LNP可用于治疗感染,则另外的化合物可以是抗微生物剂(例如,抗生素或抗病毒化合物)。在一个实施例中,如果含有ceDNA的LNP可用于治疗免疫疾病或病症,则另外的化合物可以是调控免疫反应的化合物(例如,免疫抑制剂、免疫刺激化合物或调控一种或多种特异性免疫通路的化合物)。在一个实施例中,含有不同化合物的不同脂质颗粒的不同混合物,如编码不同蛋白质或不同化合物的ceDNA,如治疗剂,可用于本发明的组合物和方法。在一个实施例中,另外的化合物是免疫调控剂。例如,另外的化合物是免疫抑制剂。在一些实施例中,另外的化合物是免疫刺激

性的。

[0390] 实例

[0391] 通过说明而非限制的方式提供了以下实例。本领域普通技术人员将理解, ceDNA载体可以由本文所述的任何野生型或经修饰的ITR构建, 并且以下示例性方法可用于构建和评估此类ceDNA载体的活性。虽然这些方法以某些ceDNA载体为例, 但它们适用于符合描述的任何ceDNA载体。

[0392] 实例1: 使用基于昆虫细胞的方法构建ceDNA载体

[0393] 使用多核苷酸构建体模板生产ceDNA载体描述于PCT/US18/49996的实例1中, 其通过引用整体并入本文。例如, 用于生成本发明的ceDNA载体的多核苷酸构建体模板可以是ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒和/或ceDNA-杆状病毒。不受理论的限制, 在许可宿主细胞中, 在例如存在Rep的情况下, 具有两个对称ITR和表达构建体的多核苷酸构建体模板进行复制以产生ceDNA载体, 其中所述ITR中的至少一个ITR相对于野生型ITR序列被修饰。ceDNA载体产生经历两个步骤: 首先, 通过Rep蛋白从模板主链(例如, ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒、ceDNA-杆状病毒基因组等)中切除(“拯救”)模板; 以及其次, 切除的ceDNA载体的Rep介导的复制。

[0394] 产生ceDNA载体的一种示例性方法是从如本文所描述的ceDNA-质粒产生。参考图1A和1B, ceDNA-质粒中的每个ceDNA-质粒的多核苷酸构建体模板均包含左侧修饰的ITR和右侧修饰的ITR, 在ITR序列之间具有以下内容: (i) 增强子/启动子; (ii) 转基因的克隆位点; (iii) 转录后反应元件(例如, 土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)); 以及(iv) 聚腺苷酸化信号(例如, 来自牛生长激素基因(BGHpA))。在每个组分之间还引入了独特的限制性核酸内切酶识别位点(R1-R6)(图1A和图1B中所示), 以促进将新的遗传组分引入构建体中的特定位点。将R3(PmeI) 5'-GTTTAAAC-3'和R4(PacI) 5'-TTAATTAA-3'酶位点工程化到克隆位点中, 以引入转基因的开放阅读框。将这些序列克隆到从赛默飞世尔科技公司获得的pFastBac HT B质粒中。

[0395] ceDNA-杆粒的产生:

[0396] 根据制造商的说明, 按照方案, 用测试或对照质粒转化DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY®DH10Bac™感受态细胞, 赛默飞世尔)。诱导DH10Bac细胞中质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组, 以产生重组ceDNA-杆粒。通过以下方法来选择重组杆粒: 在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上利用抗生素基于大肠杆菌中的蓝白筛选来筛选阳性选择(Φ 80dlacZ Δ M15标志物提供了来自杆粒载体的 β -半乳糖苷酶基因的 α -互补), 以选择转化体并维持杆粒和转座酶质粒。挑选出由破坏 β -半乳糖苷指示基因的转座所造成的白色菌落, 并在10mL培养基中进行培养。

[0397] 从大肠杆菌中分离重组ceDNA-杆粒, 并使用FugeneHD将其转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中以产生感染性杆状病毒。将附着性Sf9或Sf21昆虫细胞在25°C下在T25烧瓶内的50ml培养基中进行培养。四天后, 从细胞去除培养基(含有P0病毒), 将培养基通过0.45 μ m过滤器过滤, 从细胞或细胞碎片中分离出感染性杆状病毒颗粒。

[0398] 任选地, 通过在50到500ml培养基中感染原初Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增第一代杆状病毒(P0)。将细胞在回转式振荡温育箱的悬浮培养液中、在130rpm下、在25°C下维持, 监测细胞直径和存活率, 直到细胞达到18-19nm直径(从14-15nm的原初直径)和 $\sim 4.0E+6$ 个细胞/mL的密度。感染后第3天到第8天, 利用离心去除细胞和残骸、然后通过0.45 μ m过滤器过

滤来收集培养基中的P1杆状病毒颗粒。

[0399] 收集包括测试构建体的ceDNA-杆状病毒,并测定杆状病毒的感染活性或滴度。具体地说,用P1杆状病毒按下列稀释度处理 $4 \times 20\text{ml}$ 2.5×10^6 个细胞/ml的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并且在25-27°C下温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0400] PCT/US18/49996(其通过引用整体并入本文)的图8A中公开的“Rep-质粒”是在pFASTBACTM-Dual表达载体(赛默飞世尔)中产生的,所述载体包括Rep78和Rep52或Rep68和Rep40。按照制造商提供的方案,将Rep-质粒转化到DH10Bac感受态细胞(MAXEFFICIENCY® DH10BacTM感受态细胞(赛默飞世尔))中。诱导DH10Bac细胞中Rep-质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组杆粒(“Rep-杆粒”)。通过阳性选择来选择重组杆粒,所述阳性选择包含在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上在大肠杆菌中进行蓝白筛选($\Phi 80\text{dlacZ} \Delta \text{M15}$ 标志物提供了来自杆粒载体的 β -半乳糖苷酶基因的 α -互补)。挑选分离的白色菌落,并接种到10mL选择培养基(含卡那霉素、庆大霉素、四环素的LB培养液)中。从大肠杆菌中分离出重组杆粒(Rep-杆粒),并将Rep-杆粒转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中,以产生感染性杆状病毒。

[0401] 将Sf9或Sf21昆虫细胞在50mL培养基中培养4天,并从培养物中分离感染性重组杆状病毒(“Rep-杆状病毒”)。任选地,第一代Rep-杆状病毒(P0)通过感染未处理的原初Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增,并且在50到500ml培养基中进行培养。在感染后3天和8天之间,通过离心或过滤或其它分级分离工艺分离细胞来收集培养基中的P1杆状病毒颗粒。收集Rep-杆状病毒并测定杆状病毒的感染活性。具体地说,用P1杆状病毒按下列稀释度处理四个20mL的 2.5×10^6 个细胞/mL的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0402] ceDNA载体产生和表征

[0403] 参考图4B,然后将含有(1)含有ceDNA-杆粒或ceDNA-杆状病毒的样品和(2)上文所描述的Rep杆状病毒二者之一的Sf9昆虫细胞培养基分别以1:1000和1:10,000的比率添加到新鲜的Sf9细胞培养物(2.5×10^6 个细胞/ml,20ml)中。然后将细胞在25°C下以130rpm培养。共同感染4-5天后,检测细胞直径和活力。当细胞直径达到18-20nm并且活力为约70%-80%时,将细胞培养物离心,去除培养基,并收集细胞团粒。首先将细胞团粒悬浮于适量的水性介质,即水或缓冲液中。使用凯杰(Qiagen)MIDI PLUSTM纯化方案(凯杰,每个柱处理0.2mg细胞团粒质量)从细胞中分离并纯化ceDNA载体。

[0404] 初始基于260nm下的UV吸光度,测定从Sf9昆虫细胞产生和纯化的ceDNA载体的产率。

[0405] 可以通过如图4D所展示在天然或变性条件下的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定来评估ceDNA载体,其中(a)在限制性核酸内切酶切割和凝胶电泳分析后,对比天然凝胶,变性凝胶上存在以两倍大小迁移的特性色带;以及(b)在未切割材料的变性凝胶上存在单体和二聚体(2x)色带是ceDNA载体存在的特性。

[0406] 通过用限制性核酸内切酶消化从共同感染的Sf9细胞(如本文所描述)获得的DNA,进一步分析分离的ceDNA载体的结构,其中限制性核酸内切酶是针对以下条件选择的:a)在ceDNA载体内仅存在单个切割位点;和b)所得片段足够大,以便在0.8%变性琼脂糖凝胶上

进行分级分离时被清楚看到(>800bp)。如图4D和4E所展示的,具有非连续结构的线性DNA载体以及具有线性和连续结构的ceDNA载体可以通过其反应产物的大小来区分-例如,预期具有非连续结构的DNA载体将产生1kb和2kb片段,而具有连续结构的非衣壳化载体预期产生2kb和4kb片段。

[0407] 因此,为了以定性方式证明分离的ceDNA载体是根据定义所要求那样共价末端封闭式的,将样品用在特定DNA载体序列的背景下被鉴定为具有单个限制位点的限制性核酸内切酶消化,优选产生两个大小不等的切割产物(例如,1000bp和2000bp)。在变性凝胶(其将两条互补的DNA链分开)上进行消化和电泳后,线性、非共价封闭的DNA将以1000bp和2000bp大小分解,而共价封闭的DNA(即,ceDNA载体)将以2倍大小分解(2000bp和4000bp),这是因为两条DNA链是连接的并且现在未折叠,并且长度翻倍(尽管是单链)。此外,由于多聚体DNA载体的端对端连接,对单体、二聚体和n聚体形式的DNA载体的消化都将分解为相同大小的片段(参见图4D)。

[0408] 如本文所使用的,短语“通过在天然凝胶和变性条件下的琼脂糖凝胶电泳鉴定DNA载体的测定”是指通过进行限制性核酸内切酶消化,然后对消化产物进行电泳评估来评估ceDNA封闭端的测定。后面是一种此类示例性测定法,尽管本领域的普通技术人员将了解,对这个实例可以进行许多本领域已知的变化。选择限制性核酸内切酶作为所关注的ceDNA载体的单切酶,其将产生DNA载体长度的大致1/3x和2/3x的产物。由此使天然凝胶和变性凝胶上的色带解析。变性之前,重要的是从样品中去除缓冲液。凯杰PCR清洁试剂盒或脱盐“离心柱”,例如GE HEALTHCARE ILLUSTRATE™ MICROSPIN™ G-25柱,是核酸内切酶消化的一些本领域已知的选项。测定包含例如:i)用适当的限制性核酸内切酶消化DNA;ii)应用于例如凯杰PCR清洁试剂盒,用蒸馏水洗脱;iii)添加10x变性溶液(10x=0.5M NaOH、10mM EDTA),添加10X染料,不缓冲,并分析,以及通过在预先用1mM EDTA和200mM NaOH温育的0.8%-1.0%凝胶上添加10x变性溶液直到4x来制备DNA梯,以确保凝胶和凝胶盒中的NaOH浓度均一;以及在存在1x变性溶液(50mM NaOH、1mM EDTA)的情况下运行凝胶。本领域的普通技术人员将了解基于所得物的大小和期望的计时使用什么电压来运行电泳。电泳后,将凝胶排出并在1x TBE或TAE中中和,并转移到蒸馏水或含1x SYBR金的1x TBE/TAE中。然后使用例如赛默飞世尔SYBR®金核酸凝胶染色剂(DMSO中的10,000X浓缩液)和落射荧光(蓝色)或UV(312nm)使色带可视化。

[0409] 产生的ceDNA载体的纯度可以使用任何本领域已知的方法来评估。作为一种示例性和非限制性方法,可以通过将ceDNA载体的荧光强度与标准品进行比较来估算ceDNA-质粒对样品总体UV吸光度的贡献。例如,如果基于UV吸光度,将4μg ceDNA载体装载到凝胶上,并且ceDNA载体荧光强度等同于已知为1μg的2kb色带,那么就有1μg的ceDNA载体,并且ceDNA载体为总UV吸收材料的25%。然后将凝胶上的色带强度相对于色带表示的计算输入作图-例如,如果总ceDNA载体是8kb,而切下的比较色带为2kb,那么色带强度将按总输入的25%绘制,在这种情况下,对于1.0μg输入,将为0.25μg。使用ceDNA载体质粒滴定来绘制标准曲线,然后使用回归线方程计算ceDNA载体色带的量,然后可以用于测定ceDNA载体所表示的总输入的百分比或纯度百分比。

[0410] 出于比较的目的,实例1描述了使用基于昆虫细胞的方法和多核苷酸构建体模板生产ceDNA载体,并且还描述在PCT/US18/49996的实例1中,其通过引用整体并入本文。例

如,根据实例1的用于生成本发明的ceDNA载体的多核苷酸构建体模板可以是ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒和/或ceDNA-杆状病毒。不受理论的限制,在许可宿主细胞中,在例如存在Rep的情况下,具有两个对称ITR和表达构建体的多核苷酸构建体模板进行复制以产生ceDNA载体,其中所述ITR中的至少一个ITR相对于野生型ITR序列被修饰。ceDNA载体产生经历两个步骤:首先,通过Rep蛋白从模板主链(例如,ceDNA-质粒、ceDNA-杆粒、ceDNA-杆状病毒基因组等)中切除(“拯救”)模板;以及其次,切除的ceDNA载体的Rep介导的复制。

[0411] ceDNA-杆粒的产生:

[0412] 根据制造商的说明,按照方案,用测试或对照质粒转化DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY®DH10Bac™感受态细胞,赛默飞世尔)。诱导DH10Bac细胞中质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组ceDNA-杆粒。通过以下方法来选择重组杆粒:在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上利用抗生素基于大肠杆菌中的蓝白筛选来筛选阳性选择(Φ 80dlacZ Δ M15标志物提供了来自杆粒载体的 β -半乳糖苷酶基因的 α -互补),以选择转化体并维持杆粒和转座酶质粒。挑选出由破坏 β -半乳糖苷指示基因的转座所造成的白色菌落,并在10mL培养基中进行培养。

[0413] 从大肠杆菌中分离重组ceDNA-杆粒,并使用FugeneHD将其转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中以产生感染性杆状病毒。将附着性Sf9或Sf21昆虫细胞在25°C下在T25烧瓶内的50mL培养基中进行培养。四天后,从细胞去除培养基(含有P0病毒),将培养基通过0.45 μ m过滤器过滤,从细胞或细胞碎片中分离出感染性杆状病毒颗粒。

[0414] 任选地,通过在50到500mL培养基中感染原初Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增第一代杆状病毒(P0)。将细胞在回转式振荡温育箱的悬浮培养液中、在130rpm下、在25°C下维持,监测细胞直径和存活率,直到细胞达到18-19nm直径(从14-15nm的原初直径)和 $\sim 4.0E+6$ 个细胞/mL的密度。感染后第3天到第8天,利用离心去除细胞和残骸、然后通过0.45 μ m过滤器过滤来收集培养基中的P1杆状病毒颗粒。

[0415] 收集包括测试构建体的ceDNA-杆状病毒,并测定杆状病毒的感染活性或滴度。具体地说,用P1杆状病毒按下列稀释度处理4x20ml $2.5E+6$ 个细胞/ml的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并且在25-27°C下温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0416] 在包括Rep78或Rep68和Rep52或Rep40的pFASTBACTM-Dual1表达载体(赛默飞世尔)中产生“Rep-质粒”。按照制造商提供的方案,将Rep-质粒转化到DH10Bac感受态细胞(MAX EFFICIENCY®DH10Bac™感受态细胞(赛默飞世尔))中。诱导DH10Bac细胞中Rep-质粒与杆状病毒穿梭载体之间的重组,以产生重组杆粒(“Rep-杆粒”)。通过阳性选择来选择重组杆粒,所述阳性选择包含在含有X-gal和IPTG的细菌琼脂平板上在大肠杆菌中进行蓝白筛选(Φ 80dlacZ Δ M15标志物提供了来自杆粒载体的 β -半乳糖苷酶基因的 α -互补)。挑选分离的白色菌落,并接种到10ml选择培养基(含卡那霉素、庆大霉素、四环素的LB培养液)中。从大肠杆菌中分离出重组杆粒(Rep-杆粒),并将Rep-杆粒转染到Sf9或Sf21昆虫细胞中,以产生感染性杆状病毒。

[0417] 将Sf9或Sf21昆虫细胞在50mL培养基中培养4天,并从培养物中分离感染性重组杆状病毒(“Rep-杆状病毒”)。任选地,第一代Rep-杆状病毒(P0)通过感染未处理的原初Sf9或Sf21昆虫细胞来扩增并且在50ml到500mL培养基中培养。在感染后3天与8天之间,通过离心

或过滤或其它分级分离工艺分离细胞来收集培养基中的P1杆状病毒颗粒。收集Rep-杆状病毒并测定杆状病毒的感染活性。具体地说,用P1杆状病毒按下列稀释度处理四个20mL的 2.5×10^6 个细胞/mL的Sf9细胞培养物:1/1000、1/10,000、1/50,000、1/100,000,并温育。通过细胞直径增加和细胞周期停滞的速率以及4到5天中每天细胞活力的变化来确定感染性。

[0418] 实例2:通过从双链DNA分子切除而产生合成ceDNA

[0419] ceDNA载体的合成产生描述于2019年1月18日提交的国际申请PCT/US19/14122的实例2-6中,所述国际申请通过引用整体并入本文。使用合成方法产生ceDNA载体的一种示例性方法涉及切除双链DNA分子。简而言之,可以使用双链DNA构建体产生ceDNA载体,例如,参见PCT/US19/14122的图7A-8E。在一些实施例中,双链DNA构建体是ceDNA质粒,例如,参见于2018年12月6日提交的国际专利申请PCT/US2018/064242中的图6)。

[0420] 在一些实施例中,制备ceDNA载体的构建体包括如本文所述的调控开关。

[0421] 出于说明的目的,实例1描述了生产ceDNA载体作为使用该方法产生的示例性末端封闭式DNA载体。然而,虽然在本实例中举例说明了ceDNA载体以说明通过切除包括ITR和表达盒(例如异源核酸序列)的双链多核苷酸,然后如本文所述接合游离的3'和5'端来产生末端封闭式DNA载体的体外合成生产方法,但本领域普通技术人员了解,如上所示,可以修饰双链DNA多核苷酸分子以产生任何期望的末端封闭式DNA载体,包含但不限于迷你串DNA、doggybone™ DNA、哑铃DNA等。用于生产转基因和治疗性蛋白质的示例性ceDNA载体可以通过实例2中描述的合成生产方法生产。

[0422] 所述方法涉及(i)从双链DNA构建体中切除编码表达盒的序列;和(ii)在一个或多个ITR处形成发夹结构;以及(iii)通过接合(例如,通过T4DNA连接酶)连接游离的5'和3'端。

[0423] 双链DNA构建体按5'到3'的顺序包括:第一限制性核酸内切酶位点;上游ITR;表达盒;下游ITR;和第二限制性核酸内切酶位点。然后使双链DNA构建体与一种或多种限制性核酸内切酶接触以在两个限制性核酸内切酶位点处产生双链断裂。一种核酸内切酶可以靶向两个位点,或者每个位点可以被不同的核酸内切酶靶向,只要限制性位点不存在于ceDNA载体模板中。这从双链DNA构建体的其余部分切除了限制性核酸内切酶位点之间的序列(参见PCT/US19/14122的图9)。接合后形成末端封闭式DNA载体。

[0424] 所述方法中使用的一种或两种ITR可以是野生型ITR。也可以使用经修饰的ITR,其中修饰可以包含在形成B和B'臂和/或C和C'臂的序列中从野生型ITR中删除、插入或替换一个或多个核苷酸(参见,例如PCT/US19/14122的图6-8和10图11B),并且可以具有两个或更多个发夹环(参见例如PCT/US19/14122的图6-8图11B)或单个发夹环(参见例如PCT/US19/14122的图10A-10B图11B)。发夹环修饰的ITR可以通过现有寡核苷酸的遗传修饰或从头生物学和/或化学合成产生。

[0425] 实例3:通过寡核苷酸构建产生ceDNA

[0426] 使用涉及组装不同寡核苷酸的合成方法产生ceDNA载体的另一种示例性方法提供于PCT/US19/14122的实例3中,其中ceDNA载体是通过合成5'寡核苷酸和3'ITR寡核苷酸并且将ITR寡核苷酸与包括表达盒的双链多核苷酸接合来产生的。PCT/US19/14122的图11B示出了将5'ITR寡核苷酸和3'ITR寡核苷酸与包括表达盒的双链多核苷酸接合的示例性方法。

[0427] ITR寡核苷酸可以包括WT-ITR(参见例如PCT/US19/14122的图6A、6B、7A和7B,其整

体并入本文)。示例性ITR寡核苷酸包含但不限于PCT/US19/14122的表7中描述的寡核苷酸。经修饰的ITR可以包含形成B和B'臂和/或C和C'臂的序列中相对于野生型ITR的一个或多个核苷酸的缺失、插入或取代。用于无细胞合成的包括如本文所述的WT-ITR或mod-ITR的ITR寡核苷酸可通过遗传修饰或生物学和/或化学合成产生。如本文所讨论的,实例2和3中的ITR寡核苷酸可以包括如本文所讨论的对称或非对称构型的WT-ITR或经修饰的ITR(mod-ITR)。

[0428] 实例4:通过单链DNA分子产生ceDNA

[0429] PCT/US19/14122的实例4中提供了使用合成方法产生ceDNA载体的另一个示例性方法,所述方法使用包括两个有义ITR的单链线性DNA,所述有义ITR侧接于有义表达盒序列并共价连接到两个反义ITR,所述反义ITR侧接于反义表达盒,然后将其单链线性DNA的末端接合,以形成末端封闭式单链分子。一个非限制性实例包括合成和/或产生单链DNA分子,将该分子的各部分退火以形成具有一个或多个二级结构碱基配对区域的单一线性DNA分子,然后使游离的5'和3'端彼此接合,以形成封闭的单链分子。

[0430] 用于生产ceDNA载体的示例性单链DNA分子从5'到3'包括:有义第一ITR;有义表达盒序列;有义第二ITR;反义第二ITR;反义表达盒序列;和反义第一ITR。

[0431] 用于实例4的示例性方法的单链DNA分子可以通过本文所述的任何DNA合成方法形成,例如体外DNA合成,或通过用核酸酶切割DNA构建体(例如,质粒)并对得到的dsDNA片段进行熔解以提供ssDNA片段来提供。

[0432] 退火可以通过将温度降低到计算的有义和反义序列对的熔解温度以下来完成。熔解温度取决于特定的核苷酸碱基含量和所用溶液的特性,例如,盐浓度。任何给定序列和溶液组合的熔解温度很容易由本领域普通技术人员计算。

[0433] 退火分子的游离5'和3'端可以彼此接合,或接合到发夹分子上以形成ceDNA载体。实例2和3中描述了合适的示例性接合方法和发夹分子。

[0434] 实例5:纯化和/或确认ceDNA的生产

[0435] 通过本文所述的方法(例如,包含实例1中描述的基于昆虫细胞的生产方法,或实例2-4中描述的合成生产方法)产生的任何DNA载体产物可以使用本领域技术人员通常已知的方法进行纯化,例如以去除杂质、未使用的组分或副产物;和/或可以进行分析以确认所产生的DNA载体(在这种情况下为ceDNA载体)是期望的分子。用于纯化DNA载体(例如,ceDNA)的示例性方法是使用Qiagen Midi Plus纯化方案(凯杰)和/或通过凝胶纯化,

[0436] 以下是用于确认ceDNA载体身份的示例性方法。

[0437] 可以通过如图4D所展示在天然或变性条件下的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定来评估ceDNA载体,其中(a)在限制性核酸内切酶切割和凝胶电泳分析后,对比天然凝胶,变性凝胶上存在以两倍大小迁移的特性色带;以及(b)在未切割材料的变性凝胶上存在单体和二聚体(2x)色带是ceDNA载体存在的特性。

[0438] 通过用限制性核酸内切酶消化经纯化的DNA,进一步分析分离的ceDNA载体的结构,所述限制性核酸内切酶是针对以下条件选择的:a)在ceDNA载体内仅存在单个切割位点;和b)所得片段足够大,以便在0.8%变性琼脂糖凝胶上进行分级分离时被清楚看到(>800bp)。如图4E所展示的,具有非连续结构的线性DNA载体以及具有线性和连续结构的ceDNA载体可以通过其反应产物的大小来区分-例如,预期具有非连续结构的DNA载体将产

生1kb和2kb片段,而具有连续结构的ceDNA载体预期产生2kb和4kb片段。

[0439] 因此,为了以定性方式证明分离的ceDNA载体是根据定义所要求那样共价末端封闭式的,将样品用在特定DNA载体序列的背景下被鉴定为具有单个限制位点的限制性核酸内切酶消化,优选产生两个大小不等的切割产物(例如,1000bp和2000bp)。在变性凝胶(其将两条互补的DNA链分开)上进行消化和电泳后,线性、非共价封闭的DNA将以1000bp和2000bp大小分解,而共价封闭的DNA(即,ceDNA载体)将以2倍大小分解(2000bp和4000bp),这是因为两条DNA链是连接的并且现在未折叠,并且长度翻倍(尽管是单链)。此外,由于多聚体DNA载体的端对端连接,对单体、二聚体和n聚体形式的DNA载体的消化都将分解为相同大小的片段(参见图4E)。

[0440] 产生的ceDNA载体的纯度可以使用任何本领域已知的方法来评估。作为一种示例性和非限制性方法,可以通过将ceDNA载体的荧光强度与标准品进行比较来估算ceDNA-质粒对样品总体UV吸光度的贡献。

[0441] 实例6:脂质纳米颗粒调配物的制备

[0442] 如下制备包括ss-OP的ceDNA脂质纳米颗粒(LNP)调配物。简而言之,将两相快速混合以形成中间LNP,其中ceDNA溶液和脂质溶液在NanoAssemblr上以3:1的流速比混合,总流速为12毫升/分钟。将中间体LNP用1-3vol的DPBS稀释以降低乙醇浓度从而稳定中间体LNP。然后去除乙醇,并通过在4°C下透析过夜,用DPBS替换外部缓冲液,无论是在透析管中还是在浮动裂解器中(用于小规模)。接下来,进行浓缩步骤。将中间体LNP用Amicon Ultra-15(10KD MWC0)管在2000xg4°C下浓缩20分钟,进行三次。最后,通过0.2 μ m孔径无菌过滤器过滤LNP。可以通过使用Malvern Zetasizer Nano ZS(英国马尔文公司)的准弹性光散射来确定LNP的粒度,并且可以通过Quant-iT PicoGreen dsDNA测定试剂盒(赛默飞世尔科技)测量ceDNA包封。

[0443] 以大约10:1到60:1的总脂质与ceDNA重量比制备脂质纳米颗粒(LNP)。优选地,以15:1到40:1的总脂质与ceDNA重量比制备LNP。简而言之,将缩合剂(例如,阳离子脂质,如ss-OP或ss-Paz)、非阳离子脂质(例如,DSPC、DOPE或DOPC)、提供膜完整性的组分(如甾醇、例如,胆固醇)和缀合的脂质分子(如PEG-脂质,例如,1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油,具有2000的平均PEG分子量(“PEG2000-DMG”))以预定的摩尔比(例如,每种组分约51:7:40:2 \pm 1)溶解在醇(例如,乙醇)中。在某些实例中,LNP是在没有任何非阳离子脂质(例如,DSPC、DOPE或DOPC)的情况下制备的,并且被称为例如“ss-Paz3”或“ss-OP3”,因为它们含有三种不同的脂质组分(如表1,第3和第5号LNP所示)。第6-19号LNP是ss-OP4的变体,其中第6号LNP用于动物研究中,在图7-18中被称为“ss-OP4”。

[0444] 在缓冲溶液(1x杜氏磷酸盐缓冲盐水,DPBS)中将ceDNA稀释至期望浓度。例如,将ceDNA在包括乙酸钠、乙酸钠和氯化镁、柠檬酸盐、苹果酸或苹果酸和氯化钠的缓冲溶液中稀释至0.1mg/mL到0.25mg/mL的浓度。在一个实例中,将ceDNA在10到50mM柠檬酸盐缓冲液(pH 4.0)中稀释至0.2mg/mL。使用例如注射泵或冲击喷射混合器以约1:5到1:3(vol/vol)的比率将醇类脂质溶液与ceDNA水溶液混合,总流速高于10毫升/分钟。在一些实施例中,将醇类脂质溶液与ceDNA水溶液以约1:3(vol/vol)的比率混合,流速为12毫升/分钟。去除醇并通过透析将缓冲液替换为PBS。可替代地,使用离心管将缓冲液替换为DPBS。通过例如透析或切向流过滤实现醇去除和同时交换缓冲液。将获得的脂质纳米颗粒通过0.2 μ m孔径无

菌过滤器过滤。

[0445] 在一项研究中,使用包括ss-OP(式I)、DOPC、胆固醇和DMG-PEG₂₀₀₀(摩尔比为51:7:40:2,每种组分±1)或MC3、DSPC、胆固醇和DMG-PEG₂₀₀₀(摩尔比为50:10:38.5:1.5)的脂质溶液制备包括示例性ceDNA的脂质纳米颗粒。制备缓冲溶液中的ceDNA水溶液。使用NanoAssembler将脂质溶液和ceDNA溶液混合,总流速为12毫升/分钟,脂质与ceDNA的比率为3:2(vol/vol)。表1示出了本研究中制备的示例性LNP。

[0446] 表1:示例性LNP

LNP 编号	脂质混合物*	脂质摩尔比	脂质进料[mg/mL]	ceDNA
1	ss-EC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	68.0 : 29.1 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
2	ss-EC : DOPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
3	ss-Paz : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	68.0 : 29.1 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
4	ss-Paz : DOPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
[0447] 5	ss-OP : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	68.0 : 29.1 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
6	ss-OP : DOPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
7	ss-OP : DOPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	50 : 10 : 38.5 : 1.5	2.6	ceDNA-荧光素酶
8	ss-OP : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	50 : 10 : 38.5 : 1.5	2.6	ceDNA-荧光素酶
9	ss-OP : DOPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	51.7 : 7.4 : 39.4 : 1.5	2.6	ceDNA-荧光素酶
10	ss-OP : DSPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶

11	ss-OP : DSPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	51.7 : 7.4 : 39.4 : 1.5	2.6	ceDNA-荧光素酶
12	ss-OP : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	51.0 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
13	ss-OP : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	51.7 : 7.4 : 39.4 : 1.5	2.6	ceDNA-荧光素酶
14	ss-OP : DOPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	47.5 : 10.0 : 40.7 : 1.8	2.6	ceDNA-荧光素酶
15	ss-OP : DSPC : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	47.5 : 10.0 : 40.7 : 1.8	2.6	ceDNA-荧光素酶
16	ss-OP : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	47.5 : 10.0 : 40.7 : 1.8	2.6	ceDNA-荧光素酶
[0448] 17	ss-OP : DOPE : Chol : C ₁₈ -PEG ₂₀₀₀	51.7 : 7.4 : 39.4 : 1.5	2.6	ceDNA-荧光素酶
18	ss-OP : DOPE : Chol : C ₁₈ -PEG ₂₀₀₀	51.0 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
19	ss-OP : DOPE : Chol : C ₁₈ -PEG ₂₀₀₀	50.0 : 7.1 : 38.1 : 4.8	2.6	ceDNA-荧光素酶
20	ss-OP : MC3 : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	25.5 : 25.5 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
21	ss-OP : MC3 : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	34.0 : 17.0 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
22	ss-OP : MC3 : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	40.8 : 10.2 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
23	ss-OP : MC3 : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	45.9 : 5.1 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶
24	ss-OP : MC3 : DOPE : Chol : DMG-PEG ₂₀₀₀	48.4 : 2.5 : 7.3 : 38.8 : 2.9	2.6	ceDNA-荧光素酶

[0449] *DOPC = 二油酰基磷脂酰胆碱; DOPE = 二油酰磷脂酰乙醇胺;

[0450] DSPC = 二硬脂酰基磷脂酰胆碱; MC3 = 三十七烯-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯; Chol = 胆固醇; PEG = 1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰基甘油(DMG-PEG₂₀₀₀); ss-OP = COATSOME[®] ss-OP 并且 ss-EC = COATSOME[®] ss-33/4PE-15。

[0451] 脂质颗粒调配物的分析

[0452] 测定脂质纳米颗粒大小和 δ 电位,以及ceDNA在脂质纳米颗粒中的包封。通过动态光散射测定粒度,并通过电泳光散射(Zetasizer Nano ZS,马尔文仪器公司(Malvern Instruments))测量 δ 电位。结果示于图15-17中。

[0453] 通过Oligreen[®] (英杰公司(Invitrogen Corporation));加利福尼亚州卡尔斯巴德)或PicoGreen[®] (赛默飞世尔科技)试剂盒测定ceDNA在脂质颗粒中的包封。Oligreen[®]或PicoGreen[®]是一种超灵敏的荧光核酸染料,用于定量溶液中的寡核苷酸和单链DNA或RNA。简而言之,通过进行膜不可渗透的荧光染料排除测定法来确定包封。将染料添加到脂质颗粒调配物中。测量荧光强度并与将其添加少量非离子清洁剂后观察到的荧光进行比较。清洁剂介导的对脂质双层的破坏释放了包封的ceDNA,使其与不可渗透膜的染料相互作用。将ceDNA的包封计算为 $E = (I_0 - I) / I_0$,其中 I_0 是指添加清洁剂的荧光强度,并且 I 是指不添加清洁剂的荧光强度。

[0454] 接下来,确定ceDNA从LNP中的释放。通过混合氯仿中的DOPS:DOPC:DOPE(摩尔比为

1:1:2) 制备内体模拟阴离子脂质体,然后在真空下蒸发溶剂。将干燥的脂质膜重新悬浮在DPBS中并进行短暂的超声处理,然后通过0.45 μ m注射器过滤器过滤以形成阴离子脂质体。

[0455] 将血清以1:1 (vol/vol) 添加到LNP溶液中,并在37 $^{\circ}$ C下温育20分钟。然后将混合物与阴离子脂质体一起以期望的阴离子/阳离子脂质摩尔比在DPBS中在pH 7.4或6.0在37 $^{\circ}$ C下再温育15分钟。通过以下方式计算pH 7.4或pH 6.0下的游离ceDNA:通过在将PicoGreen (赛默飞世尔科技) 添加到LNP浆液时测量荧光(C_{free}) 并将该值与通过1% Triton X-100裂解LNP时获得的总ceDNA含量(C_{total}) 进行比较来确定未包封的ceDNA含量,其中游离百分比 = $C_{free}/C_{total} \times 100$ 。与阴离子脂质体一起温育后释放的ceDNA百分比基于以下等式计算:

[0456] 释放的ceDNA百分比 = 游离ceDNA百分比_{与阴离子脂质体混合} - 游离ceDNA百分比_{与DPBS混合}

[0457] 配制的阳离子脂质的pKa可以与LNP递送核酸的有效性相关(参见Jayaraman等人,《化学应用国际版》(2012), 51 (34), 8529-8533; Semple等人,《自然生物技术》28, 172-176 (2010), 两者均通过引用整体并入)。pKa的优选范围为~5到~7。使用基于2-(对甲苯胺)-6-萘磺酸(TNS)的荧光的测定法在脂质纳米颗粒中测定每种阳离子脂质的pKa。可以使用如本文和别处所述的在线过程制备在DPBS中包括浓度为0.4mM总脂质的阳离子脂质/DOPC/胆固醇/PEG-脂质(50/10/38.5/1.5mol%)的脂质纳米颗粒。TNS可以在蒸馏水中制备为100 μ M储备溶液。囊泡可以在2mL含有10mM HEPES、10mM MES、10mM乙酸铵、130mM NaCl的缓冲溶液中稀释至24 μ M脂质,其中pH范围为2.5到11。可以将TNS溶液的等分试样添加至最终浓度为1 μ M然后涡旋混合后,在SLM Aminco系列2发光分光光度计中使用321nm和445nm的激发和发射波长在室温下测量荧光强度。可以将S型最佳拟合分析应用于荧光数据,并测量pKa作为产生半最大荧光强度的pH。

[0458] 如下测定脂质纳米颗粒与ApoE的结合。将LNP(10 μ g/mL ceDNA)与等体积的重组ApoE3(500 μ g/mL)一起在DPBS中在37 $^{\circ}$ C下温育20分钟。温育后,使用DPBS将LNP样品稀释10倍,并根据以下条件在AKTA pure 150(GE Healthcare)上通过肝素琼脂糖色谱进行分析:

[0459] HiTrap色谱条件

	柱	HiTrap 肝素琼脂糖 HP 1mL		
	平衡缓冲液	DPBS		
	洗涤缓冲液	DPBS		
	洗脱缓冲液	1 M NaCl, 于 10 mM 磷酸钠缓冲液中, pH 7.0		
	流速	1 毫升/分钟		
[0460]	注射体积	500 μ L		
	检测	260 nm		
		CV	A (%)	B (%)
	平衡	1	100	0
	柱洗涤	4	100	0
	洗脱 (线性)	10	0	100
	平衡	3	100	0

[0461] 体外表达

[0462] 如下测定包封在脂质纳米颗粒中的ceDNA的表达。将HEK293细胞在补充有10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM+GlutaMAXTM培养基(赛默飞世尔科技)中维持在5%CO₂, 37°C下。在转染前一天,将细胞以30,000个细胞/孔的密度接种在96孔板中。根据制造商的方案,使用LipofectamineTM 3000(赛默飞世尔科技)转染试剂转染100ng/孔的对照ceDNA-luc。将对照ceDNA在Opti-MEMTM(赛默飞世尔科技)中稀释,并添加P3000TM试剂。随后,将LipofectamineTM 3000在Opti-MEMTM中稀释至最终浓度为3%。将稀释的LipofectamineTM 3000以1:1的比率添加到稀释的ceDNA中,并在室温下温育15分钟。然后将期望量的ceDNA-脂质复合物或LNP直接添加到每个含有细胞的孔中。将细胞在37°C和5%CO₂下温育72小时。

[0463] 实例7:ceDNA的LNP调配物在CD-1小鼠中的评估

[0464] 进行了以下研究以评估小鼠体内含有SS-可切割脂质的LNP。如本文所述,SS-系列脂质含有可响应细胞内环境的双重传感基序:叔胺响应酸性区室(内体/溶酶体)以使膜不稳定,以及可在还原环境(细胞质)中切割的二硫键。根据实例6制备示例性脂质纳米颗粒调配物并进行体内测试。

[0465] 简而言之,将ceDNA-luc配制在含有SS-可切割脂质和MC3的LNP中,如上所述,并以0.5mg/kg静脉内(IV)给药于雄性CD-1小鼠。在一个LNP中,包含了地塞米松棕榈酸酯,并且其与ceDNA-luc共同配制在ss-Paz3(ssPalmE-Paz4-C2;也被称为SS-33/1PZ-21)LNP中。如上所述,数字3和4,在ss-OP3和ss-OP4中;或在ss-Paz3和ss-Paz4中,代表LNP调配物中的总脂质组分。例如,ss-OP3 LNP含有三种不同的脂质组分:ss-OP、胆固醇和PEG-DMG。同样,ss-OP4 LNP具有四种不同的脂质组分:ss-OP、DOPC、胆固醇和PEG-DMG。地塞米松棕榈酸酯(DexPalm)是一种抗炎剂,可抑制白细胞和组织巨噬细胞,并减少炎症反应。终点包含体重、细胞因子、肝/脾生物分布(qPCR)和荧光素酶活性(IVIS)。研究设计概述于下表2中。

[0466] 表2.

组编号	每组动物	测试材料	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	治疗方案, ROA	终末时间点
1	6	MC3: Poly C	0.5	5	一次, IV 第 0 天 ^a	第 0 天, 每组 N = 2 直到第 28 天, 每组 N = 4
2	6	MC3: ceDNA-luc	0.5			
3	6	ss-Paz3: PolyC	0.5			
4	6	ss-Paz3: ceDNA-luc	0.5			
5	6	ss-Paz3: ceDNA-luc + DexPalm	0.5			
6	6	ss-Paz4: PolyC	0.5			
7	6	ss-Paz4: ceDNA-luc	0.5			
8	4	ss-OP3: PolyC	0.5			
9	6	ss-OP3: ceDNA-luc	0.5			直到第 28 天
10	4	ss-OP4: PolyC	0.5			第 0 天, 每组 N = 2 直到第 28 天, 每组 N = 4
11	6	ss-OP4: ceDNA-luc	0.5			直到第 28 天
12	2	MC3: ceDNA-luc	0.5			第 0 天, 每组 N = 2 直到第 28 天, 每组 N = 4
13	2	ss-OP4: ceDNA-luc	0.5			第 1 天
壳体: 组被安置在透明的聚碳酸酯笼中, 在手术室的通风架上放置接触式寝具。			食物/水: 随意向动物仔猪 (<i>ad libitum</i> .) 提供小鼠饮食 5058 和用 1N HCl 酸化至目标 pH 2.5-3.0 的过滤自来水。			
^a 根据日程安排的需要, 可以将动物纳入 2 个队列 (每组 n = 2 和 n = 4)。						

[0468] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径。

[0469] ss-PAZ (ssPalmE-Paz4-C2); PolyC: 聚胞苷酸

[0470] 在中间时间点和研究结束时 (终末) 收集血液样品, 如下所述。

[0471] 表3: 血液收集:

组编号	样品收集时间	
	全血 (尾、隐静脉或眼眶)	
	血清 ^a	
1-7、9、11 每组 4 只	第 0 天 测试材料给药后 6 小时 (±5%)	
12 + 13	第 0 天 测试材料给药后 6 小时 (±5%)	
体积/部分	~150 μL 全血	
处理/储存	1 个等分试样在标称 -70°C 下冷冻	

[0473] ^a 将全血收集到带有凝块活化剂的血清分离管中;

[0474] MOV = 最大可获得体积

[0475] 表4: 血液收集 (终末)

组编号	样品收集时间	
	终末	
	血清 ^a	EDTA 全血
[0476] 1-7、9 和 11 (每组 2 只)	第 0 天 测试材料给药后 6 小时 (±5%)	第 0 天 测试材料给药后 6 小时 (±5%)
12 和 13		第 1 天 测试材料给药后 24 小时 (±5%)
部分	½ MOV	½ MOV 或~400 µL
处理/储存	1 个等分试样在标称-70°C下冷冻	1 个等分试样 在 4°C下储存

[0477] ^a将全血收集到带有凝块活化剂的血清分离管中;

[0478] MOV = 最大可获得体积

[0479] 如下所述,在研究结束时(终末)收集组织。

[0480] 表5:终末组织收集

组编号	样品收集时间	
	肝脏	脾脏
[0481] 1-7、9 和 11 (每组 2 只)	第 0 天 测试材料给药后 5-6 小时	
12 和 13	第 1 天 测试材料给药后 24 小时 (±5%)	
体积/部分	整个器官, 称重 然后划分	整个器官, 称重 然后划分

[0482] 处理	左肝叶储存在 10% NBF 中 (EPL) 称重 4 x 25-50 mg 切块 单独快速冷冻	称重 4 x 15-25 mg 切块并且 单独快速冷冻
储存	将固定样品冷藏储存 将冷冻样品在标称-70°C下储存	

[0483] No. = 编号, MOV = 最大可获得体积; NBF = 中性缓冲福尔马林; TBD = 待定

[0484] 研究细节如下所述。到达时约4周龄的CD-1小鼠获自Charles River (N=62)。如本文所述,在脂质纳米颗粒中提供含有荧光素酶表达盒的ceDNA。每天进行笼侧观察。在给药后~1小时、~5-6小时和~24小时(每组剩余动物)进行临床观察。每个例外都进行了额外的观察。在第0天、第1天、第2天、第3天、第7天、第14天、第21天和第28天(安乐死前)记录所有动物的体重。根据需要记录额外的体重。ceDNA以浓缩原液(0.5mg/mL)的形式提供。将原液温热至室温并在使用前即刻用提供的PBS稀释。如果不立即给药,则将制备好的材料储存在~4°C下。在第0天通过尾侧静脉IV施用以5mL/kg给药组1-13的ceDNA。根据日程安排的需要,将动物纳入2个或更多队列。在第3天、第7天、第14天(任选地,第21天和第28天),通过腹腔内(IP)注射以2.5mL/kg向第1-11组中的剩余动物给药150mg/kg(60mg/mL)的荧光素。每次荧光素给药后≤15分钟。如下所述,通过使用体内成像系统(IVIS)成像获得发光。在第0天对来自第1组到第7组、第9组和第11组的四只(n=4)动物和来自第12组和第13组的两只(n=2)动物进行了临时血液收集。每次采血后,动物在皮下接受0.5-1.0mL乳酸林格氏液。通过尾静脉切口、大隐静脉或眶窦穿刺(每个设施SOP在吸入异氟醚下)收集用于血清的全血。将全血收集到带有凝块活化剂管的血清分离器中,并处理成每个设施SOP—(1)份血清。

将所有样品在标称-70℃下储存,直到在干冰上转移或装运以进行分析。

[0485] 在第0天,给药后5-6小时,对于来自第1组到第7组、第9组和第11组(不是第8组和第10组)的每组n=2只动物,通过CO₂窒息实施安乐死并随后进行开胸和放血。

[0486] 通过心脏穿刺收集最大可获得的血液体积,并划分为:1/2收集到带有凝块活化剂管的血清分离器中,并处理成每个设施SOP—(1)份血清;1/2收集到涂有EDTA的试管中,所述涂层管储存在4℃下,直至装运。

[0487] 在第1天,给药后24小时,对于来自每个第12组和第13组的n=2只动物,通过CO₂窒息实施安乐死并随后进行开胸和放血。通过心脏穿刺收集最大可获得的血液体积,并划分为:~400收集到涂有EDTA的试管中,所述涂层管储存在4℃下;丢弃任何剩余的全血。

[0488] 在第28天,将每组的剩余动物(n=4)通过CO₂窒息实施安乐死,然后进行开胸手术或颈椎脱位。

[0489] 放血后,将所有动物用盐水进行心脏灌注。简而言之,通过将连接到含有盐水的10mL注射器的23/21号针头插入左心室腔进行灌注来进行全身心内灌注。切开右心房,为灌注液提供引流口。在将针头定位在心脏后,对柱塞施加温和而稳定的压力以灌注动物。确保冲洗溶液的充分流动,直到流出的灌注液清澈(没有可见的血液),这表明冲洗溶液已经使身体饱和并且程序完成。

[0490] 从在预定时间点之前被安乐死的垂死动物收集终末组织。在可能的情况下,从被发现死亡的动物身上收集和储存组织。在安乐死和灌注之后,收获肝脏和脾脏并记录整个器官的重量。

[0491] 将左肝叶置于组织盒中并固定在10%中性缓冲液中,冷藏(~4℃)。10%NBF中的组织保持冷藏(~4℃),直到装运在冰袋上的密封容器中。

[0492] 在剩余的肝脏中,收集并称重4x~25-50mg切片(≤50mg)。将切片单独快速冷冻,在标称-70℃下储存,直到装运。丢弃所有剩余的肝脏。

[0493] 从脾脏中收集4x~15-25mg切片(≤25mg)并称重。将切片单独快速冷冻,在标称-70℃下储存,直到装运。丢弃所有剩余的脾脏。

[0494] 接下来,使用RNAscope LS ISH测定法评估10个小鼠肝脏FFPE样品中ceDNA表达的萤光素酶-04-有义,这是一种原位杂交(ISH)测定方法,用于可视化样品中每个细胞的单个RNA分子。

[0495] 在四个治疗组和一个媒介对照中提供了10个小鼠肝脏FFPE样品,每组2只小鼠)。使用了以下探针:Mm-PPIB(阳性对照);dapB(阴性对照);萤光素酶-04-有义。

[0496] 首先进行阳性和阴性对照测定以评估组织和RNA质量并优化样品集合的测定条件,然后对通过质量控制(QC)的样品进行目标测定。

[0497] 体内IVIS成像方案

[0498] 使用以下材料和方法进行体内成像。

[0499] 材料:用于荧光素施用的适当注射器、用于荧光素施用的适当装置和/或注射器、萤火虫荧光素、PBS、pH计或等效物、5-M NaOH、

[0500] 5-M HCl、K/X麻醉剂或异氟醚。

[0501] 程序

[0502] 荧光素制备:

- [0503] • 荧光素原粉通常储存在-20℃下。
- [0504] • 将配制的荧光素于2-8℃下避光储存在1mL等分试样中。
- [0505] • 配制的荧光素在2-8℃下避光可稳定长达3周,并且在室温(RT)下可稳定约12小时。
- [0506] • 将荧光素溶解在PBS中,以达到60mg/mL的目标浓度,并根据需要用5-M NaOH(~0.5μl/mg荧光素)和HCl(~0.5μL/mg荧光素)将其调节至pH=7.4。
- [0507] • 根据方案制备适当的量,包含至少约50%的过量。
- [0508] 注射和成像(注意:一次最多可对3只动物进行成像)
- [0509] • 剃掉动物的毛发(根据需要)。
- [0510] • 根据方案,通过IP以60mg/mL在PBS中注射150mg/kg荧光素。
- [0511] • 可以在给药后即刻或至多15分钟进行成像。
- [0512] • 将异氟醚蒸发器设置为1-3%(通常为@2.5%),以便在成像期间麻醉动物。
- [0513] • 用于成像会话的异氟醚麻醉:
- [0514] ○将动物放入异氟醚室,等待异氟醚生效,大约2-3分钟。
- [0515] ○确保IVIS机器侧面的麻醉级别位于“开启”位置。
- [0516] ○将动物放入IVIS机器并关上门
- [0517] • 登录IVIS计算机并打开期望的采集方案。最高灵敏度的推荐采集设置为:D级别的相机高度、f1的F/Stop、中等分辨率的分档和自动的曝光时间。
- [0518] • 按下相机控制面板界面中的“获取”。
- [0519] • 在所有获取的图像上插入标签。保存图像。
- [0520] 结果
- [0521] 在所有剂量组的小鼠中均观察到对体重的最小影响,如图7所示。图8是示出每个ceDNA LNP组中荧光素酶活性的图(MC3:PolyC;MC3:ceDNA-luc;ss-Paz3:PolyC;ss-Paz3:ceDNA-luc;ss-Paz3:ceDNA-luc+dexPalm;ss-Paz4:PolyC;ss-Paz4:ceDNA-luc;ss-OP3:PolyC;ss-OP3:ceDNA-luc;ss-OP4:PolyC;ss-OP4:ceDNA-luc)。ss-OP3:ceDNA-luc和ss-OP4:ceDNA-luc剂量组中的荧光素酶表达与MC3剂量组相似或优于MC3剂量组,但在ss-PAZ3:ceDNA-luc和ss-PAZ4:ceDNA-luc剂量组中未检测到,如图8所示。尽管相对比率不同,但所有剂量组在施用后6小时通过qPCR在血液、肝脏和脾脏中均检测到ceDNA,如图9所示。
- [0522] 在第0天给药后6小时,LNP中的SS-系列脂质对小鼠血清中细胞因子和趋化因子水平(pg/mL)的影响如图10A和图10B所示。测定了干扰素α(IFNα)、干扰素γ(IFNγ)、白细胞介素(IL)-18、IL-6、肿瘤坏死因子α(TNFα)、干扰素γ诱导蛋白10(IP-10;也被称为CXCL10)、单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1/CCL2)、巨噬细胞炎症蛋白(MIP)1α和MIP1β以及活化正常T细胞表达和分泌的调控蛋白(RANTES)的水平。如图10A和图10B所示,与MC3:ceDNA-luc剂量组相比,SS-系列:ceDNA-luc剂量组中的细胞因子水平显著降低,但仍高于对应的阴性对照PolyC剂量组。地塞米松棕榈酸酯(DexPalm)进一步减少了一些细胞因子。
- [0523] 与MC3组相比,用ss-OP4 LNP处理的小鼠在24小时处肝脏中的拷贝数减少了100倍(图9),同时实现了相等或更高的荧光素酶表达(图11)和更低的细胞因子释放(图10A和10B)。进一步地,这些研究还揭示了当与ceDNA ss-脂质结合使用时,LNP调配物中的地塞米松棕榈酸酯对细胞因子反应的有益作用。

[0524] 总之,结果表明ss-OP4优于MC3,其中与MC3 LNP调配物相比,ss-OP4 LNP调配物递送的ceDNA拷贝数较少,同时保持相等水平的ceDNA表达。进一步地,与MC3 LNP相比,ss-OP4 LNP表现出显著减少的细胞因子释放,这表明ceDNA-ss-OP4 LNP对减轻促炎免疫反应具有积极影响。

[0525] 实例8:ceDNA的LNP调配物在CD-1小鼠中的评估

[0526] 进行了以下研究以评估小鼠体内含有与GalNAc结合使用的SS-可切割脂质的LNP。

[0527] 根据实例6制备示例性脂质纳米颗粒调配物并进行体内测试。简而言之,用ss-OP4(式I)、DOPC、胆固醇和DMG-PEG₂₀₀₀以及GalNAc制备ss-OP4,摩尔比分别为50%:10%:38%:1.5%:0.5%。研究设计概述于下表6-7中。

[0528] 表6:测试材料施用队列A

组编号	每组动物	治疗	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	治疗方案	终末时间点
1	4	PBS	不适用	5	一次, 第0天, IV	第21天
2	4	ss-OP4: ceDNA-luc	0.5			
3	4	ss-OP4: ceDNA-luc	2.0			
4	4	ss-OP4/GalNAc: ceDNA-luc	0.5			
5	4	ss-OP4/GalNAc: ceDNA-luc	2.0			

[0530] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径

[0531] 表7:测试材料施用队列B

组编号	每组动物	治疗	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	治疗方案	终末时间点
1b	2	PBS	不适用	5	一次, 第0天, IV	第1天
2b	2	ss-OP4: ceDNA-luc	0.5			
3b	2	ss-OP4: ceDNA-luc	2.0			
4b	2	ss-OP4/GalNAc: ceDNA-luc	0.5			
5b	2	ss-OP4/GalNAc: ceDNA-luc	2.0			

[0533] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径

[0534] 研究细节如下所述。

[0535] 物种(数量、性别、年龄): CD-1小鼠(N=62,并且4只备用,雄性,到达时约4周龄)获自Charles River实验室。

[0536] 化合物类别: ceDNA如本文所述在脂质纳米颗粒中提供。

[0537] 笼侧观察: 每天进行笼侧观察。

[0538] 临床观察: 在第0天测试材料给药后~1小时、~5-6小时和~24小时进行临床观察。每个例外都进行了额外的观察。

[0539] 体重: 如适用,在第0天、第1天、第2天、第3天、第4天、第7天、第14天和第21天(安乐死前)记录所有动物的体重。根据需要记录额外的体重。

[0540] 预处理和测试材料剂量调配物: 预处理和测试物品以浓缩原液形式提供。将原液温热至室温并在使用前即刻用提供的PBS稀释。如果不立即给药,则将制备好的材料储存在

~4℃下。

[0541] 剂量施用:通过尾侧静脉内施用,在第0天向第1-5组以5mL/kg给药测试物品。队列A和B可能有不同的第0天日期。

[0542] 存活期成像:在第4天、第7天、第14天和第21天,通过腹膜内(IP)注射以2.5mL/kg向第1-5组中的动物(仅队列A)给药150mg/kg (60mg/mL)的荧光素。每次荧光素给药后≤15分钟。通过使用体内成像系统(IVIS)成像获得发光。

[0543] 麻醉恢复:在麻醉下、恢复期间并且直到移动时连续监测动物。

[0544] 临时血液收集:在第0天对第1-5组中的所有动物(仅队列A)进行临时血液收集;测试材料给药后6小时(±5%)。采血后,动物接受0.5-1.0mL乳酸林格氏液;在皮下。通过尾静脉切口、大隐静脉或眶窦穿刺(在吸入异氟醚下)收集用于血清的全血。将全血收集到带有凝块活化剂管的血清分离器中,并处理成(1)份血清。将所有样品在标称-70℃下储存,直到装运以进行分析。

[0545] 安乐死和终末收集:在第1天,给药后24小时(±5%),对于来自每个第1-7组队列B的n=2只动物,通过CO₂窒息实施安乐死并随后进行开胸和放血。将血液放入涂有EDTA的试管中,将全血(处理过的或未经处理的)冷藏储存,直到装运。

[0546] 灌注:放血后,将所有动物用盐水进行心脏灌注。简而言之,通过将连接到含有盐水的10mL注射器的23/21号针头插入左心室腔进行灌注来进行全身心内灌注。切开右心房,为灌注液提供引流口。在将针头定位在心脏后,对柱塞施加温和而稳定的压力以灌注动物。确保冲洗溶液的充分流动,直到流出的灌注液清澈(没有可见的血液),这表明冲洗溶液已经使身体饱和并且程序完成。

[0547] 组织收集:从在预定时间点之前被安乐死的队列B中的垂死动物收集终末组织。如果可能,从被发现死亡的动物身上收集和储存组织。在安乐死和灌注之后,收获肝脏、脾脏、肾脏和双肺并记录整个器官的重量。

[0548] 将左肝叶置于组织盒中并固定在10%中性缓冲液中,冷藏(~4℃)。10%NBF中的组织保持冷藏(~4℃),直到装运在冰袋上的密封容器中。

[0549] 在剩余的肝脏中,收集并称量4x~25-50mg切片(≤50mg)。将切片单独快速冷冻,在标称-70℃下储存,直到装运。丢弃所有剩余的肝脏。

[0550] 从左肾中收集4x~15-25mg切片(≤25mg)并称量。将切片单独快速冷冻,在标称-70℃下储存,直到装运。丢弃所有剩余的肾脏。

[0551] 从脾脏中收集4x~15-25mg切片(≤25mg)并称量。将切片单独快速冷冻,在标称-70℃下储存,直到装运。丢弃所有剩余的脾脏。

[0552] 从肺中收集4x~15-25mg切片(≤25mg)(每个肺2个切块)并称量。将切片单独快速冷冻,在标称-70℃下储存,直到装运。丢弃所有剩余的肺。

[0553] 在第21天,将队列A中的动物通过CO₂窒息实施安乐死,然后进行开胸手术或颈椎脱位。没有收集组织。

[0554] 结果:ss-OP4-ceDNA处理的小鼠(剂量为0.5和2.0mg/kg)表现出延长的显著荧光,因此荧光素酶转基因表达没有表现出任何不良反应。在整个研究过程中,小鼠继续表现出体重增加,如图12A所示。如图12B和13所示,ss-OP4-ceDNA调配物中GalNAc的存在(如在ss-OP4:G中,GalNAc与LNP总重量的摩尔比为0.5%)增加了ceDNA-luc的表达水平,同时通过减

少IFN α 、IFN γ 、IL-18、IL-6、IP-10和/或TNF- α 的释放来减轻促炎反应。该数据表明,将用ss-OP4配制的ceDNA靶向表达GalNAc受体的特定组织(例如,肝脏)提高了靶向效率,从而导致ceDNA表达增强,同时减轻促炎反应。

[0555] 实例9:ceDNA的LNP调配物在CD-1小鼠中的评估

[0556] 进行了以下研究以评估小鼠体内含有SS-可切割脂质的LNP。如本文所述,SS-系列脂质含有可响应细胞内环境的双重传感基序:叔胺响应酸性区室(内体/溶酶体)以使膜不稳定,以及可在还原环境(细胞质)中切割的二硫键。根据实例6制备示例性脂质纳米颗粒调配物并进行体内测试。

[0557] 研究设计概述于下表8中。

[0558] 表8

组编号	#动物/组	测试材料	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	治疗方案, ROA	终末时间点
1	4	MC3: ceDNA-luc	0.5	5, 一次, IV	一次, IV 第0天	第56天
2	4	ss-OP4	0.5			
3	4	ss-OP4: ceDNA-luc	0.1			
4	4	ss-OP4: ceDNA-luc	0.5			
5	4	ss-OP4: ceDNA-luc +DexP	0.1			
6	4	ss-OP4: ceDNA-luc +DexP	0.5			
7	4	ss-OP4: ceDNA-luc +DexP	1.0			
8	4	ss-OP4: ceDNA-luc +DexP	2.0 或 0.75		第1天	
测试制品储存(原液调配物): 试验品由赞助商以浓缩原液(0.5 mg/mL)的形式提供,并在标称4°C下储存直至使用。			剩余的测试制品在标称4°C下储存。			
住所: 组被安置在透明的聚碳酸酯笼中,在手术室的通风架上放置接触式寝具。			食物/水: 随意向动物仔猪(<i>ad libitum.</i>)提供小鼠饮食5058和用1N HCl酸化至目标pH 2.5-3.0的过滤自来水。			

[0560] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径。

[0561] 如下表9和10中所述收集血液样品(包含临时血液样品)。

[0562] 表9

组编号	样品收集时间	
	全血 (尾、隐静脉或眼眶)	
	血清	
1-7	第0天 测试材料给药后6小时(±5%)	第1天 测试材料给药后24小时(±5%)
8	第1天 测试材料给药后6小时(±5%)	第2天 测试材料给药后24小时±5%)
体积/部分	150 μ l 全血	50 μ l 全血(体外)
处理/储存	1个等分试样在标称-70°C下冷冻	

[0564] 表10

	样品目的地	DO/1 (6 小时)	DI/2 (24 小时)
[0565] 体积 (mL) 全血	细胞因子	0.15 mL	
	ALT/AST		0.05 mL
	总量/天 (mL)	0.15 mL	0.05 mL

[0566] 研究细节如下所述。

[0567] 物种(数量、性别、年龄):CD-1小鼠(N=62,并且4只备用,雄性,到达时约4周龄)获自Charles River实验室。

[0568] 化合物类别:ceDNA如本文所述在脂质纳米颗粒中提供。

[0569] 笼侧观察:每天进行笼侧观察。

[0570] 临床观察:在第0天测试材料给药后~1小时、~5-6小时和~24小时进行临床观察。每个例外都进行了额外的观察。

[0571] 体重:如适用,在第0天、第1天、第2天、第3天、第4天、第7天、第14天、第21天、第28天、第35天、第42天、第49天和第56天(安乐死前)记录所有动物的体重。根据需要记录额外的体重。

[0572] 测试材料剂量调配物:测试制品以浓度原液(0.5mg/mL)的形式提供。将原液温热至室温并在使用前即刻用提供的PBS稀释。如果不立即给药,则将制备好的材料储存在-4℃下。

[0573] 剂量施用:在第0天通过尾侧静脉IV施用以5mL/kg给药第1-7组的测试制品。在第1天通过尾侧静脉IV施用以5mL/kg给药第8组的测试制品。在第7组的6小时和24小时临床观察后确定2.0mg/kg或0.75mg/kg的剂量水平。如果观察到任何不良反应,则施用较低剂量。

[0574] 存活期成像:在第7天、第14天、第21天、第28天、第35天、第42天、第49天和第56天,通过腹膜内(IP)注射以2.5mL/kg向第1-8组中的动物给药150mg/kg(60mg/mL)的荧光素。每次荧光素给药后<15分钟。如实例7中所述,通过使用体内成像系统(IVIS)成像获得发光。

[0575] 麻醉恢复:在麻醉下、恢复期间并且直到移动时连续监测动物。

[0576] 血液收集:所有动物在第0天和第1天以及第1天和第2天根据上面的样品收集表进行血液收集。每次采血后,动物在皮下接受0.5-1.0mL乳酸林格氏液。

[0577] 通过尾静脉切口、大隐静脉或眶窦穿刺(每个设施SOP在吸入异氟醚下)收集用于血清的全血。将全血收集到带有凝块活化剂管的血清分离器中,并处理成每个设施SOP—(1)份血清。将所有样品在标称-70℃下储存。

[0578] 将第1/2天的样品通过ELISA的ALT/AST测试设施进行分析。

[0579] 安乐死:在第56天,将动物通过CO2窒息实施安乐死,然后进行开胸手术或颈椎脱位。没有收集组织。

[0580] 报告:为这项研究发布了一份数据报告。项目包含IVIS数据、个体和组平均值(如适用)体重、每只动物施用的TA体积、剂量施用时间、样品收集和安乐死、临床观察(如适用)和死亡率(如适用)。

[0581] 结果:在所有剂量组的小鼠中均观察到对体重的最小影响(数据未示出)。与MC3 LNP相比,ss-OP4 LNP表现出减少的细胞因子释放,这表明ceDNA-ss-OP4 LNP对减轻促炎免疫反应具有积极影响(数据未示出)。地塞米松棕榈酸酯(DexPal1m)进一步减少了使用DexPal1m测试的所有组的一些细胞因子。ss-OP4:ceDNA-luc剂量组中的荧光素酶表达与MC3

剂量组的荧光素酶表达相似或优于MC3剂量组的荧光素酶表达(数据未示出)。

[0582] 实例10:在雄性CD-1小鼠中通过施用途径评估ceDNALNP调配物

[0583] 进行了以下研究以评估小鼠体内含有SS-可切割脂质的LNP,其通过静脉内(IV)或皮下(SC)注射施用。

[0584] 简而言之,ceDNA-luc配制在含有ss-OP4可切割脂质或MC3的LNP中。如上所述,ss-OP4LNP具有四种不同的脂质组分:ss-OP、DOPC、胆固醇和PEG-DMG。制备并测试了下表11中所示的调配物。

[0585] 表11.

LNP	组成	摩尔比				
		50.0	10.0	38.5	1.5	
MC3	MC3 : DSPC : Chol : DMG-PEG2000	50.0	10.0	38.5	1.5	
[0586] ss-OP4/G_第1代	SS-OP : DOPC : Chol : DMG-PEG2000 : DSPE-PEG-GalNAc ₄	50.7	7.3	38.6	2.9	0.5
ss-OP4/G_N/P-10+β-sito+苹果酸	SS-OP : DOPC : β-谷甾醇: DMG-PEG2000 : DSPE-PEG-GalNAc ₄	50.7	7.3	38.6	2.9	0.5

[0587] N/P-10是来自SS-OP的氨基与来自ceDNA的磷酸基团的比率。β-谷甾醇(sito)是一种胆固醇类似物。在与乙醇中的脂质溶液混合之前,苹果酸是ceDNA的缓冲液。ss-OP4是ss-OP4数字,并且G代表GalNAc。

[0588] 研究设计概述于下表12中。

[0589] 表12.

组编号	每组动物	治疗	剂量水平 (mg/kg)	剂量体积 (mL/kg)	治疗方案	终末时 间点
1	6	MC3	0.5	5	一次, 第0天, IV	第1天 *或第 28天
2	6	ss-OP4/GalNAc_第1代				
3	6	ss-OP4/GalNAc_N/P-10+ β-sito+苹果酸				
[0590] 4	6	ss-OP4/GalNAc_第1代			一次, 第0天, 缓 慢 IV	
5	6	空			一次, 第0 天, SC	
6	6	MC3				
7	6	ss-OP4/GalNAc_第1代				
8	6	ssOP4/GalNAc_N/P-10+ β-sito+苹果酸(第2代)				

[0591] No. = 编号; IV = 静脉内; ROA = 施用途径

[0592] *每组n=2, 在给药后24小时

[0593] ss-OP4 = ssOP4(数字)

[0594] G = GalNAc

[0595] 血液样品的收集如下表13(临时血液收集)和表14(终末血液收集)中所述。

[0596] 表13.

[0597]	组 编 号	样品收集时间	
		全血 (尾、隐静脉或眼眶)	
		血清 ^a	
1-8 每组仅 n=4	第0天 测试材料给药后6小时(±5%)		
[0598]	体积/部分	~150 µL 全血	
	处理/储存	1个等分试样在 标称-70°C下冷冻	

[0599] ^a将全血收集到带有凝块活化剂的血清分离管中
[0600] 表14.

[0601]	组 编 号	样品收集时间	
		终末 全血	
		第1天 测试材料给药后24小时(±5%)	
每组 N=2	第28天		
每组 N=4	部分		
	MOV		
	EDTA 不处理/不冷冻 5°C ± 3°C		

[0602] MOV=最大可获得体积
[0603] 终末组织的收集概述于下表15中。
[0604] 表15.

[0605]	组 编 号	样品收集时间					
		肝脏	肾脏 (两者)	脾脏	肺 (两者)	注射位点 第5-8组	原初皮肤 第5-8组
每组 N=2	第1天 测试材料给药后24小时(±5%)						
每组 N=4	第28天						
体积/部分	整个器官, 称重 然后划分				肩胛内皮肤 的经标记切 片, 剃毛	背部臀部皮 肤的等量部 分, 剃毛	
处理	左肝叶储存 在10% NBF (EPL)中		1/3 脾脏储存 在10% NBF (EPL)中		用10% NBF (EPL) 中的海 绵平放在盒中		
	称重 4 x 25-50 mg 切块 单独快速冷冻 (Lake Pharma)		称重 4 x 15-25 mg 切块并 且 单独快速冷冻 (Lake Pharma)				
储存	将固定样品冷藏储存 将冷冻样品在标称-70°C下储存				将固定样品冷藏储存		

[0606] No. = 编号
[0607] 研究细节如下所述。
[0608] 物种(数量、性别、年龄): CD-1小鼠 (N=48, 并且4只备用, 雄性, 到达时约4周龄) 获

自Charles River实验室。

[0609] 化合物类别:ceDNA如本文所述在脂质纳米颗粒中提供。

[0610] 笼侧观察:每天进行笼侧观察。

[0611] 临床观察:在第0天测试材料给药后~1小时、~5-6小时和~24小时进行临床观察。每个例外都进行了额外的观察。

[0612] 体重:如适用,在第0天、第1天、第2天、第3天、第4天、第7天、第14天、第21天、第28天、第35天、第42天、第49天和第56天(安乐死前)记录所有动物的体重。根据需要记录额外的体重。

[0613] 测试材料剂量调配物:测试制品以浓度原液(0.5mg/mL)的形式提供。将原液温热至室温并在使用前即刻用提供的PBS稀释。如果不立即给药,则将制备好的材料储存在-4℃下。

[0614] 剂量施用IV:在第0天,针对第1-4组、第1-3组通过侧尾静脉静脉内团注施用以及针对第4组通过注射泵缓慢施用,以5mL/kg给药测试制品,超过45秒;经侧尾静脉。

[0615] SC注射位点准备:在第0天施用之前,用吸入异氟烷麻醉第5-8组的动物以发挥作用,并剃去肩胛内区域的毛发。每周至少一次对该位点进行重新剃毛,同时对动物进行麻醉以进行IVIS成像。

[0616] 剂量施用SC:在麻醉时,在第0天通过肩胛内区域皮下施用对第5-8组以5mL/kg给药测试制品。

[0617] 使用不褪色的墨水,将在注射材料区域周围标记皮肤。该位点将根据需要进行标记,直到尸检。

[0618] 存活期成像:在第3天、第7天、第14天、第21天和第28天,通过腹膜内(IP)注射以2.5mL/kg向第1-8组中的剩余动物给药150mg/kg(60mg/mL)的荧光素。每次荧光素给药后≤15分钟。如实例7中所述,通过使用体内成像系统(IVIS)成像获得发光。

[0619] 麻醉恢复:在麻醉下、恢复期间并且直到移动时连续监测动物。

[0620] 血液收集:第1-8组中每组只有4只动物在第0天进行临时血液收集;测试材料给药后6小时(±5%)。采血后,动物接受0.5-1.0mL乳酸林格氏液;在皮下。

[0621] 通过尾静脉切口、大隐静脉或眶窦穿刺(每个设施SOP在吸入异氟醚下)收集用于血清的全血。将全血收集到带有凝块活化剂管的血清分离器中,并处理成每个设施SOP—(1)份血清。将所有样品在标称-70℃下储存。

[0622] 结果:如图26所示,用MC3或ss-0P4-ceDNA静脉内(IV)施用的小鼠表现出延长的显著荧光,因此表现出荧光素酶转基因表达。进一步地,ss-0P4:ceDNA-luc剂量组中的荧光素酶表达与MC3IV剂量组的荧光素酶表达相似或优于MC3IV剂量组的荧光素酶表达。相比之下,用皮下(SC)施用的MC3或ss-0P4-ceDNA处理的小鼠并未显示出显著的荧光。此外,如图27所示,静脉内或皮下施用的ss-0P4-ceDNA调配物通过减少IFN α 、IFN γ 、IL-18、IL-6、IP-10和/或TNF- α 释放来减轻促炎反应。

[0623] 实例11:非人类灵长类动物中ceDNALNP调配物的评估

[0624] 进行以下研究以评估在对雄性食蟹猴进行70分钟静脉输注后,含有SS-可切割脂质的ceDNA LNP与GalNAc联合使用的耐受性。根据实例6制备包括携带因子IX的ceDNA的示例性脂质纳米颗粒(LNP)调配物并进行体内测试。LNP调配物编号1和2是标准的不可切割的

阳离子脂质。LNP调配物#3是ss-OP4+GalNac。如上所述,ss-OP4中的数字4代表LNP调配物中的总脂质组分。例如,ss-OP4 LNP具有四种不同的脂质组分:ss-OP、DOPC、胆固醇和PEG-DMG,其摩尔比分别为约51:7:39:3,如在表1的脂质纳米颗粒编号6中。

[0625] 在开始给药前,向所有组中的所有动物施用苯海拉明和地塞米松。在大约70分钟的时间内通过IV输注施用LNP调配物#1、2或3。终点包含细胞因子分析、补体分析、肝酶分析(AST、ALT)、凝血和抗PEG IgG/IgM。研究设计概述于下表16中。

[0626] 表16.

组编号	动物的编号	预处理	测试材料	剂量水平 (mg/kg/ 剂)	浓度 (mg/mL)	剂量体积 (mL/kg)	给药途径/ 方案	活检和采样 时间点
[0627]	1		LNP 调配物#1 不可切割的 LNP: ceDNA- 人 FIX	0.01	0.002	5	70 分钟 IV 输 注, 第 0 天 前 15 分钟 的输注速率: 0.415 mL/kg 剩余 55 分钟 的输注速率: 4.585 mL/kg	血液收集: 给药前, 15 分钟, 输注 结束后 6 小 时和 24 小 时
	2	DPH 和 Dex, 给 药前 30 分钟	LNP 调配物#1 不可切割的 LNP: ceDNA- hFIX	0.05	0.01			
	3		LNP 调配物#1 不可切割的 LNP: ceDNA - hFIX	0.1	0.02			肝脏和脾脏 Bx: 24 小时
[0628]	4	DPH 和 Dex, 给 药前 30 分钟	LNP 调配物#2 不可切割的 LNP: ceDNA- hFIX	0.1	0.02			血液收集: 给药前, 15 分钟, 给药 后 6 小时和 24 小时
	5	DPH 和 Dex, 给 药前 30 分钟	LNP 调配物#3 ss-OP4-GalNac: ceDNA- hFIX	0.05	0.01			

[0629] Gr. = 组; No. = 编号; An. = 动物; Conc. = 浓度; DPH = 苯海拉明; Dex = 地塞米松; LNP = 脂质纳米颗粒

[0630] 给药调配物

[0631] 地塞米松和苯海拉明以原液浓度使用。在施用前混合调配物(移液或搅拌)以分布经口管饲混悬液的颗粒。如下提供的测试物品:LNP调配物#1作为0.5mg/mL无菌储备溶液提供;LNP调配物#2作为1mg/mL无菌储备溶液提供;LNP调配物#3作为1mg/mL无菌储备溶液提供。在给药当天,将测试制品从冰箱中取出并使其达到室温。在给药前稀释储备溶液以达到测试浓度。

[0632] 动物

[0633] 使用了八只雄性食蟹猴(中国原产),年龄为2到4岁,体重为约2.0到3.5kg。猴子都是非原初的。所有动物均按照IACUC检测机构指南和SOP进行隔离和驯化,并在解除隔离后的适当时间分配到研究。在研究期间,在64°F到84°F的温度、30%到70%的湿度和12小时光照和12小时黑暗的光照循环下成对或单独饲养动物(指定程序期间除外)。

[0634] 每天向研究动物提供猴子饮食5038(实验室饮食)。为了丰富心理/环境,除了在研究程序/活动期间,为动物提供了栖木、觅食装置和/或悬挂装置等物品。还提供了额外的丰

富内容,如音乐。除禁食外,向每只动物提供食品补充剂(如经过认证的零食、新鲜水果和/或Prima Foraging Crumbles®)。如下文所述将动物麻醉用于肝脏和脾脏活检程序。在研究结束时,将所有动物送回群落。

[0635] 施用途径和剂量水平

[0636] 施用途径是根据预期在人体中的暴露来选择的。根据之前的非人灵长类动物研究和小鼠中的对应剂量水平选择剂量水平。0.01mg/kg的初始剂量水平比先前施用的剂量低50倍。根据第1组、第2组和第3组的结果,以递增设计分配,测试制品和剂量水平最高剂量为0.1mg/kg,这比之前施用的剂量低5倍。

[0637] 预处理:在给药开始前30分钟(±3分钟),向所有组中的所有动物施用苯海拉明(5mg/kg, IV或IM)和地塞米松(1mg/kg, IV或IM)。

[0638] 测试制品输注:在大约70分钟的时间内通过IV输注将测试制品施用于受约束的动物。使用临时IV导管通过大隐静脉或头静脉施用剂量。在给药结束时用0.5mL盐水冲洗导管。根据最近的体重计算剂量体积,并四舍五入到最接近的0.1mL。IV剂量输注的结束时间用于确定血液样品和活检收集时间点的目标时间。将注射位点、给药开始和结束时间记录在原始数据中。

[0639] 存活期的观察和测量

[0640] 每天至少进行两次动物健康检查,其中检查所有动物的一般健康状况、行为和外表。在第-1天或第0天,在给药前记录体重。重量四舍五入到最接近的0.1kg。第0天在给药开始前记录临床观察,在给药期间至少记录一次,并在给药完成后以及在第1天的肝脏和脾脏活检之前记录一次。根据需要记录额外的观察。

[0641] 样品收集:从适当的外周静脉(不是用于给药的静脉)收集血液样品。

[0642] 用于细胞因子分析的全血:通过直接针刺入将全血样品从外周静脉收集到SST管中,并根据测试设施SOP进行血清处理。将血清样品在-80℃下储存,直到装运以进行分析。补充分析:通过直接针刺将全血样品从外周静脉收集到K2EDTA管中,并根据测试设施SOP进行血浆处理。将血浆样品在-80℃下储存,直到装运以进行分析。

[0643] 抗PEG IgG/IgM分析:通过直接针刺入将全血样品从外周静脉收集到SST管中,并根据测试设施SOP进行血清处理。将血清样品在-80℃下储存,直到装运以进行分析。

[0644] 肝酶分析:通过直接针刺入将全血样品从外周静脉收集到SST管中,并根据测试设施SOP进行血清处理。测试设施实验室使用IDEXX Catalyst分析仪分析血清样品的ALT和AST。

[0645] 凝血分析:通过直接针刺入将全血样品从外周静脉收集到柠檬酸钠管中,并根据测试设施SOP进行血浆处理。将样品在-80℃下储存,直到转移以用于PTT、aPTT和纤维蛋白原的分析。

[0646] 肝脏和脾脏活检

[0647] 肝脏和脾脏活检仅从给药最后阶段的最高剂量收集。

[0648] 活检样品处理:将肝脏和脾脏活检保持完整,放入含有10%中性缓冲液的标记管中并冷藏(~4℃)。将10%NBF中的组织冷藏(~4℃),直到装运在冰袋上的密封容器中进行处理。

[0649] 结果

[0650] 将含有ceDNA-h因子IX (hFIX)的LNP中的ss-OP4脂质(例如,ss-OP、DOPC、胆固醇和PEG-DMG,摩尔比分别为约51:7:39:3)与GalNAc对补体通路的影响与其它携带类似ceDNA-hFIX的标准不可切割脂质进行比较。在用标准不可切割LNP(调配物#1和#2)给药的猴子和用包括ss-OP4脂质、GalNAc和ceDNA-hFIX的靶向LNP(调配物#3)给药的猴子中评估C3a水平(pg/ml)以及C5b9水平(pg/ml),所述C3a是一种由补体组分3切割形成的蛋白质,所述C5b9是补体活化终端产物。在第0天,在给药前、给药后6小时和给药后24小时获取用于分析的样品。如图19所示,与用标准LNP处理的动物相比,用ss-OP4-GalNacc LNP处理的动物的C3a和C5b9水平显著降低。在LNP给药后24小时观察到显著差异,其中用标准LNP处理的动物的C3a和C5b9水平远高于用靶向LNP治疗的动物。如图19所示,在用标准LNP处理的动物中,24小时后C5b9的水平高于定量上限。该数据表明,包括ss-OP、DOPC、胆固醇和PEG-DMG(摩尔比分别为约51:7:39:3)的靶向LNP以及LNP中的GalNAc在与ceDNA结合使用时,在补体反应方面具有改进的安全性。

[0651] 图20-23示出了在第0天,在给药前、给药后6小时和给药后24小时,与LNP中的GalNAc组合使用的ss-OP4脂质对猴子血清中的细胞因子水平(pg/mL)的影响。在一系列剂量(0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg)上测定干扰素 α (IFN α)和干扰素 α (IFN α) (图20)、干扰素 γ (IFN γ)和白介素-1 β (IL-1 β) (图21)、IL-6和IL-18 (图22)以及肿瘤坏死因子 α (TNF α) (图23)的水平。如图20-23所示,与标准LNP:ceDNA-hFIX剂量组相比,ss-OP4+GalNac:ceDNA-hFIX剂量组中的细胞因子水平显著降低。

[0652] 总之,结果表明,在ss-OP4中与GalNAc一起配制的携带外源DNA(例如,因子IX)的ceDNA在补体和促炎细胞因子反应方面在非人灵长类动物模型中显示出显著改善的安全性。

[0653] 实例12:在大鼠模型中视网膜下注射ceDNALNP调配物的安全性和转基因表达的评估

[0654] 使用包括ssOP4配制的萤火虫荧光素酶(fLuc)mRNA或ssOP4配制的ceDNA表达性荧光素酶(CpG最小化;)作为阳离子脂质组分的ceDNA脂质纳米颗粒(LNP)调配物,进行了一项体内研究以确定在双眼视网膜下注射后视网膜中转基因表达的安全性和量。

[0655] 根据实例6制备示例性脂质纳米颗粒调配物并大鼠模型中进行体内测试。将雄性Sprague Dawley大鼠划分为6个研究组,每组5只小鼠。根据动力研究标准操作程序(SOP),将所有动物分配到研究组。所有动物均通过腹膜内(IP)施用途预先给药0.5mg/kg甲基强的松龙。通过双眼视网膜下注射进行施用(OD=右眼并且OS=左眼)。

[0656] 研究设计概述于下表17中。

[0657] 表17.

[0658]

组	OS Tx	OS 剂量(ug或vg)	体积 (ul)	OD Tx	OD 剂量(ug或vg)	体积 (ul)
1	未经处理	0	不适用	媒剂	0	2.5
2	ss-OP4/Luc mRNA	0.6	2.5	ss-OP4/Luc mRNA	0.6	2.5
3	ss-OP4/Luc mRNA	0.2	2.5	ss-OP4/Luc mRNA	0.2	2.5
4	ss-OP4/ceDNA-luc	0.6	2.5	ss-OP4/ceDNA-luc	0.6	2.5
5	ss-OP4/Me ceDNA-luc	0.6	2.5	ss-OP4/Me ceDNA-luc	0.6	2.5

[0659] 研究细节如下所述。

[0660] 从Charles River实验室获得Sprague Dawley大鼠 (N=30, 并且2只备用, 雄性, 约7-8周龄, 第一次给药时体重为150-200g)。每天观察动物的死亡率和发病率。在基线 (给药前) 和尸检时记录所有动物的体重。

[0661] 处理: 雄性Sprague Dawley大鼠接受0.6ugss-OP4配制的萤火虫荧光素酶 (fLuc) mRNA (N1-甲基-假尿苷修饰的)、ss-OP4配制的ceDNA-luc (ADVM-Luc ceDNA; 编码CAG-fLuc表达盒的ceDNA) 的视网膜下 (subR) 注射-在右眼和左眼中。未处理组充当对照。

[0662] 外科手术: 在外科手术当天, 给大鼠皮下 (SQ) 注射0.01-0.05mg/kg丁丙诺啡。还向动物局部施用托吡卡胺 (1.0%) 和苯肾上腺素 (2.5%) 的混合物以扩张和突出眼睛。然后用氯胺酮/甲苯噻嗪混合物使动物镇静以进行外科手术, 并将一滴0.5% 盐酸丙美卡因施用到双眼。眼睛已准备好进行无菌手术。可替代地, 用吸入的异氟醚使大鼠镇静。使用局部洗眼液保持角膜湿润, 并根据需要使用热垫保持体温。通过结膜和眼球筋膜囊切开一个2毫米长的切口, 以暴露巩膜。使用30号针头的尖端在后巩膜中制作一个小导向孔, 用于使用32-34号针头和Hamilton注射器进行视网膜下注射。手术后, 将1滴氧氟沙星滴眼液和眼部润滑剂局部施用到眼表, 让动物从手术中恢复。如果在外科手术期间的任何时候, 外科医生确定注射效果不佳或不成功, 则将动物安乐死并更换。

[0663] 眼部检查: 使用裂隙灯生物显微镜进行眼部检查, 以在如下表18所示的时间点评估眼表形态。在处死前24小时选择所有指定用于IHC的眼。

[0664] 表18.

日期	n	程序
[0665] 3	1	收集整个眼球/组并进行 IHC/cryo 染色 (OS) 或快速冷冻用于 ceDNA 的 ddPCR 分析 (OD) **
[0666] 7	1	收集整个眼球/组并进行 IHC/cryo 染色 (OS) 或快速冷冻用于 ceDNA 的 ddPCR 分析 (OD) **
28	2 或 4	收集剩余的整个眼球用于 IHC/cryo (n=2/组) 或快速冷冻用于 ddPCR (n=4/组)

[0667] 下面示出的表19显示了用于评估眼前节炎症的评分方法。

[0668] 表19.

大鼠眼前节炎症的临床分级	
级别 ^a	标准
0	无疾病; 眼睛是半透明的并且反射光 (红色反射)
0.5 (微量)	虹膜血管扩张
[0669] 1	虹膜血管充血; 瞳孔收缩异常
2	前房朦胧; 红色回流减少
3	前房适度不透明, 但瞳孔仍可见; 红光反射迟钝
4	前房不透明和瞳孔模糊; 红色反射消失; 突眼
^a 每个更高的级别都包含前一个级别的标准。	

[0670] 终点: 评估了以下终点:

[0671] • 体重、死亡率、临床观察

[0672] • 全面眼科检查 (OE) 基线, 第8天和第21天

[0673] • 大体临床观察: 出院、眯眼、结膜水肿、用前部照片进行范围分析

[0674] • 光学相干断层扫描 (OCT): 基线 (注射后), 第7天和第21天

- [0675] • IVIS成像:第1天、第3天和第14天
- [0676] • 针对IHC(Iba1、Rho、DAPI)和ddPCR(Luc mRNA)收集的组织(整个眼球)如下:
- [0677] 第3天-N=1,OS免疫组织化学(IHC),OD PCR
- [0678] 第7天-N=1,OS IHC,OD PCR
- [0679] 第28天-N=1,OU(双眼)IHC;休息PCR
- [0680] 存活期成像:在如上所述的日期里,所有动物都接受了眼睛的IVIS成像程序,以量化和确定荧光素酶的表达。腹膜内注射底物荧光素(0.15mg/g),注射后约5-10分钟对大鼠进行成像。在单独的数据报告中提供来自每只眼睛周围的椭球ROI的总通量(光子/秒)和平均辐射度(光子/秒/cm/sr)测量值,以及所有相关的实时图像文件。对于所有动物,每只眼睛都单独成像。动物在其身侧成像。
- [0681] 光学相干断层扫描(OCT):在如上所述的日期里,所有动物都接受了眼睛后部的OCT成像程序,以确定视网膜下注射的成功和随时间的变化。在检查前15分钟使用1%托吡卡胺HCL和2.5%盐酸去氧肾上腺素的混合物扩张眼睛以进行OCT。通过两次OCT扫描在三个位置(左、右和中心)测量视网膜总厚度和ONL厚度:一个穿过注射位点(泡),一个不穿过。在单独的数据报告(电子表格)中提供所有数值厚度值,以及所有相关/注释的OCT图像。
- [0682] 组织收集:每组一只动物在第3天和第7天实施安乐死。剩余动物在注射后第28天实施安乐死。安乐死后,眼睛被摘除。将眼睛在液氮中快速冷冻并储存在-80°C下,直至解剖。将神经感觉视网膜与RPE/脉络膜/巩膜分离。将来自每只眼睛的神经感觉视网膜和RPE/脉络膜/巩膜样品收集到单独的预先称重的管中,并获得组织重量。
- [0683] 组织病理学:将指定用于冷冻切片的眼睛在室温下在单独标记的小瓶中的4%多聚甲醛中固定4小时。然后将眼睛转移到1x磷酸盐缓冲盐水(PBS)中,或者立即嵌入3%琼脂糖/5%蔗糖中,然后在4°C下在30%蔗糖中浸泡过夜,或者储存在1xPBS中直到第二天嵌入。将切片并处理用于免疫组织化学或苏木精和伊红染色。将指定用于免疫组织化学的载玻片用抗视紫红质(hodopsin)和Iba-1的抗体以及用于核定位的DAPI进行染色。将剩余的载玻片用苏木精和伊红染色。
- [0684] 结果:在第1天、第3天和第14天,使用IVIS Lumina S5体内成像系统(Perkin Elmer)通过总通量(光子/秒)确定荧光素酶表达。图24显示,在第1天和第3天,与媒介剂对照相比,ss-OP4:Luc mRNA组中的荧光素酶表达增加,这表明与对照相比,Luc mRNA组中的荧光素酶表达。到第14天,ss-OP4:Luc mRNA组中的荧光素酶表达降低至与对照相似的水平。如图24所示,在第1天、第3天和第14天,与媒介剂对照相比,ss-OP4:ceDNA-luc(编码CAG-fLuc表达盒的ceDNA)组中的荧光素酶表达增加,这表明ceDNACAG-fLuc调配物组中的荧光素酶转基因表达延长。图25示出了代表性的IVIS图像。值得注意的是,这些结果表明另一种核酸(mRNA)可以与本文所述的可切割脂质一起递送,具体地说,本文所述的ss-OP4调配物中的mRNA。
- [0685] 实例13:用于调配物功能评估的体外吞噬作用测定
- [0686] 使用包括MC3、MC3-5%DSG-PEG2000(1,2-二硬脂酰-rac-甘油-3-甲基聚氧乙烯)(缩写为“5DSG”)和ss-OP4作为阳离子脂质组分的ceDNA脂质纳米颗粒(LNP)调配物进行体外吞噬作用测定。
- [0687] 图14示出了用0.1%DiD(DiIC18(5));1,1'-二十八烷基-3,3,3',3'-四甲基吲哚二

羰花青,4-氯苯磺酸盐)亲脂性羰花青染料处理的ceDNALNP的吞噬作用测定的示意图,其中在存在或不存在10%人血清(+血清)的情况下,在MC3、MC3-5DSG或ss-OP4 LNP中使用了不同浓度的ceDNA(200ng、500ng、1 μ g和2 μ g)并将其引入由THP-1细胞分化而来的巨噬细胞。

[0688] 在图15和图16中,内化ceDNA的吞噬细胞出现红色荧光。如图15和图16所示,包括ceDNA的ss-OP4 LNP与最低数量的荧光吞噬细胞高度相关。因此,不受理论束缚,认为与MC3-5DSG和MC3 LNP相比,ss-OP4 LNP能够更好地避免免疫细胞的吞噬作用。图17是示出对ss-OP4、MC3-5DSG和MC3 LNP的吞噬作用的量化(通过红色物体计数/汇合百分比)的图。值得注意的是,使用0.1%DiD是因为在0.1%条件下,吞噬细胞根据细胞数量以剂量依赖性方式表现出红色荧光强度。

[0689] 实际上,与仅在SS-可切割脂质(例如,ss-OP4)中配制的ceDNA相比,在SS-可切割脂质(ss-OP4)和GalNAc中配制的ceDNA之间发生协同效应,使得包括本发明的SS-可切割脂质和GalNAc的ceDNA-LNP表现出大约4,000倍的肝细胞靶向性(图18B),而在具有GalNAc的其它阳离子脂质中配制的ceDNA仅显示出10倍到100倍的肝细胞靶向性(数据未示出)。ss-OP4和其它阳离子脂质LNP均显示出相似水平的内体逃逸(图18A)。这些数据表明,在ceDNA中配制的SS-可切割脂质不仅改善表达并在减轻促炎免疫反应方面发挥积极作用,而且还证明了将ceDNALNP靶向特定器官(如肝脏)与组织特异性配体(例如,肝脏特异性配体, GalNAc)的协同效应。

[0690] 参考文献

[0691] 在本说明书和本文的实例中引用的所有出版物和参考文献,包括但不限于专利和专利申请,均通过引用整体并入本文,如同每个单独的出版物或参考文献被明确且单独地指出像充分阐述的那样以引用的方式并入本文中一般。本申请要求优先权的任何专利申请也以上述针对出版物和参考文献的方式通过引用并入本文中。

序列表

<110> GENERATION 生物公司 (GENERATION BIO CO.)

<120> 包括末端封闭式 DNA 和可切割脂质的脂质纳米颗粒组合物及其使用方法

<130> 131698-07520

<140>

<141>

<150> 62/940,104

<151> 2019-11-25

[0001] <150> 62/910,720

<151> 2019-10-04

<150> 62/896,980

<151> 2019-09-06

<160> 1

<170> PatentIn 3.5 版

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> 腺相关病毒-2

<400> 1

gcgcgctcgc tcgctc

16

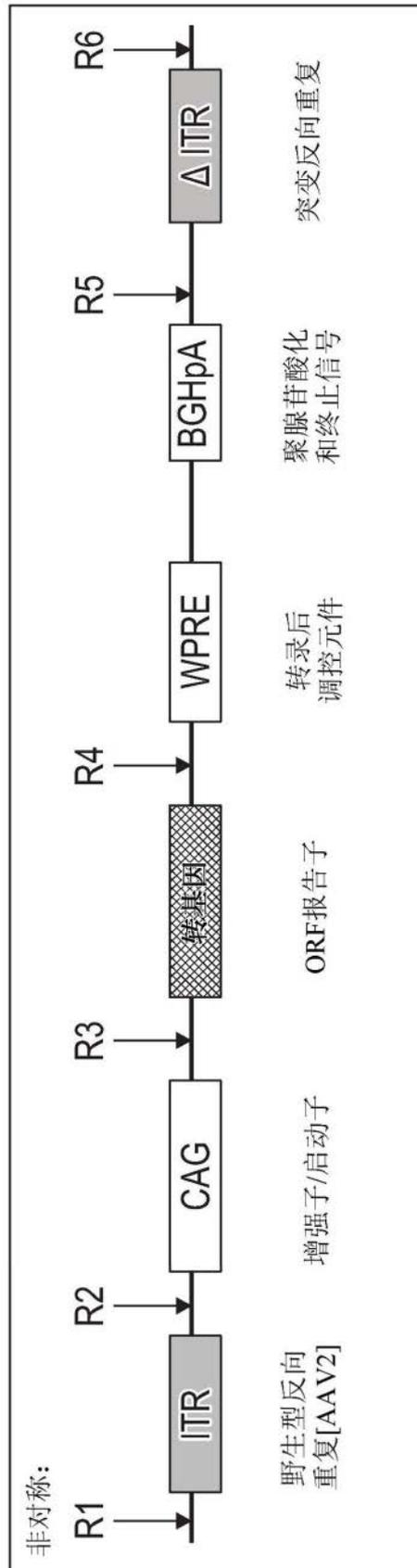


图1A

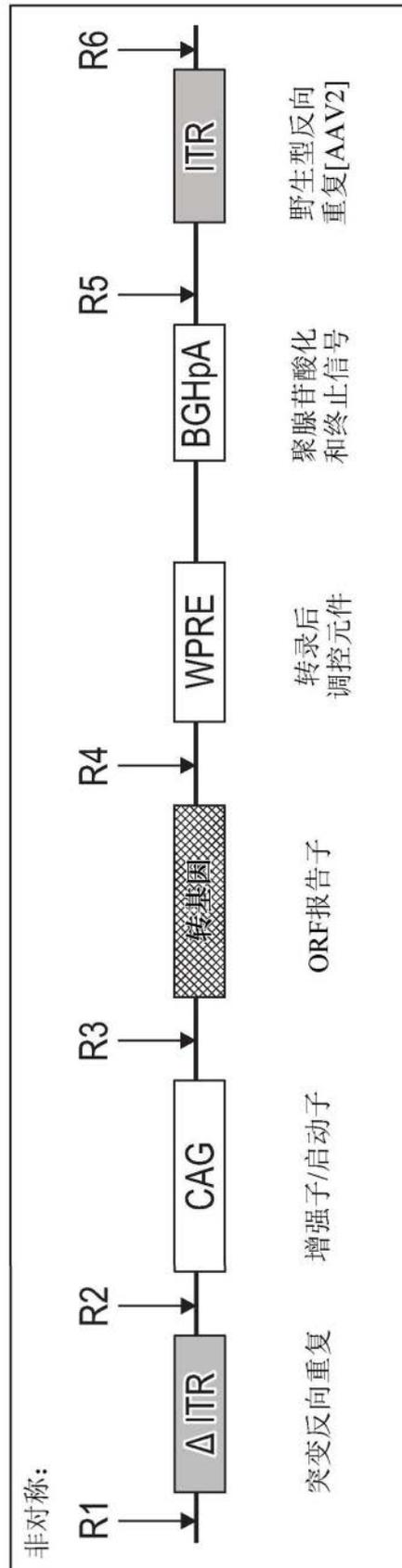


图1B

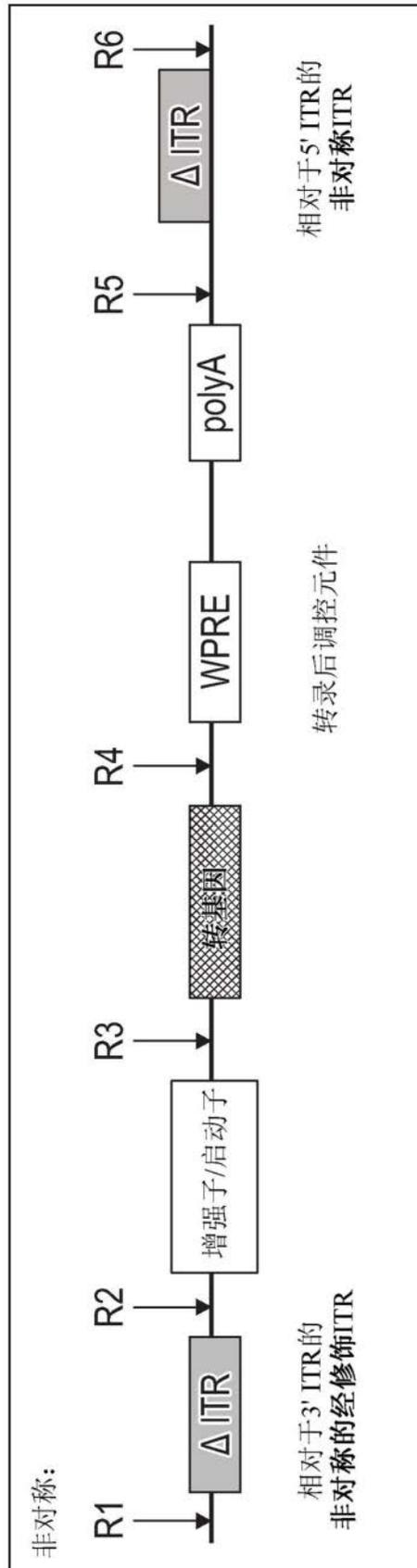


图1C

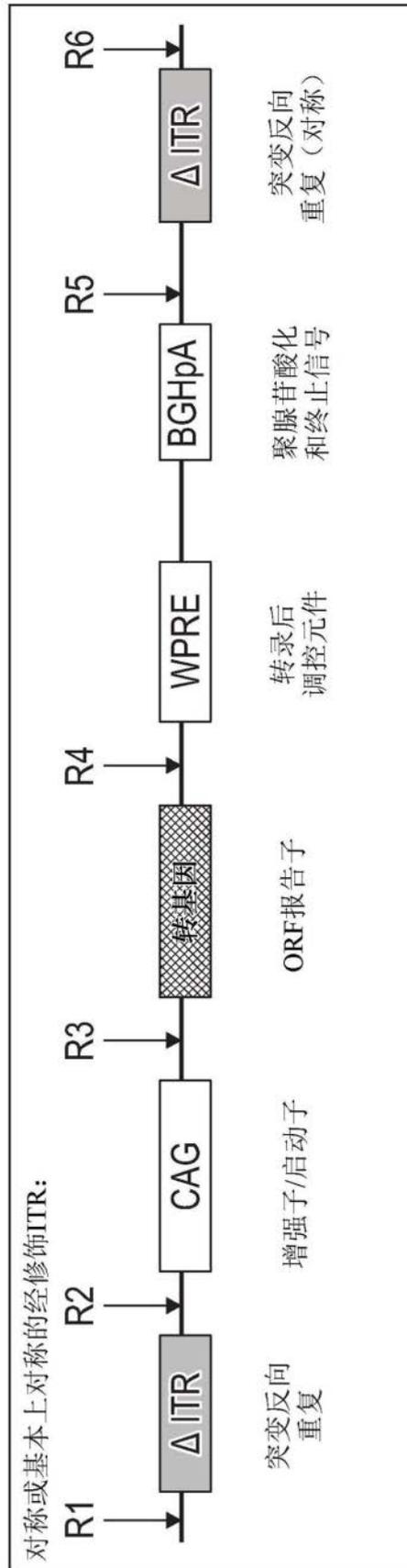


图1D

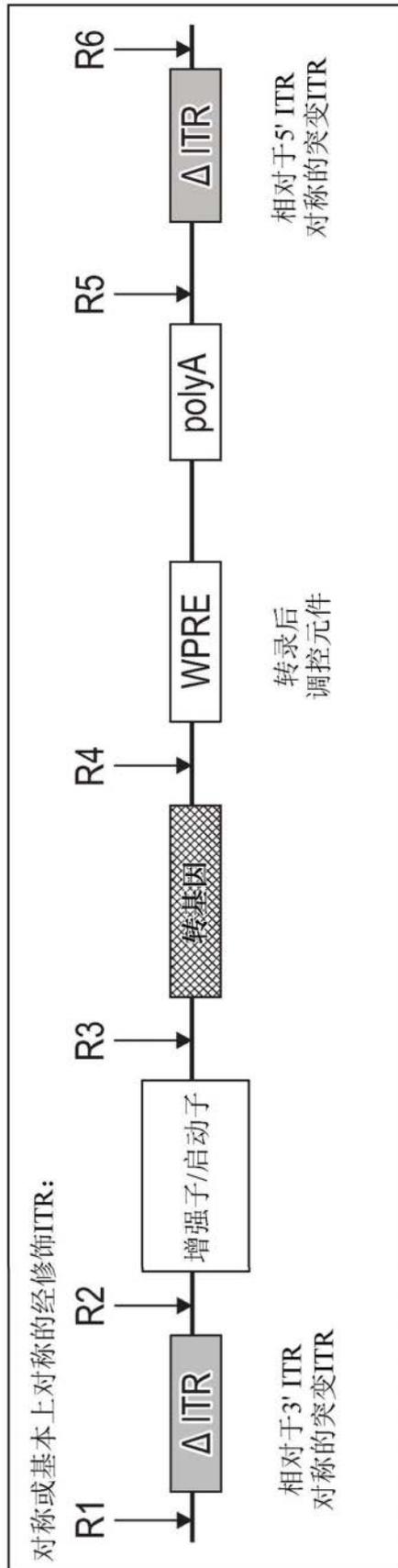


图1E

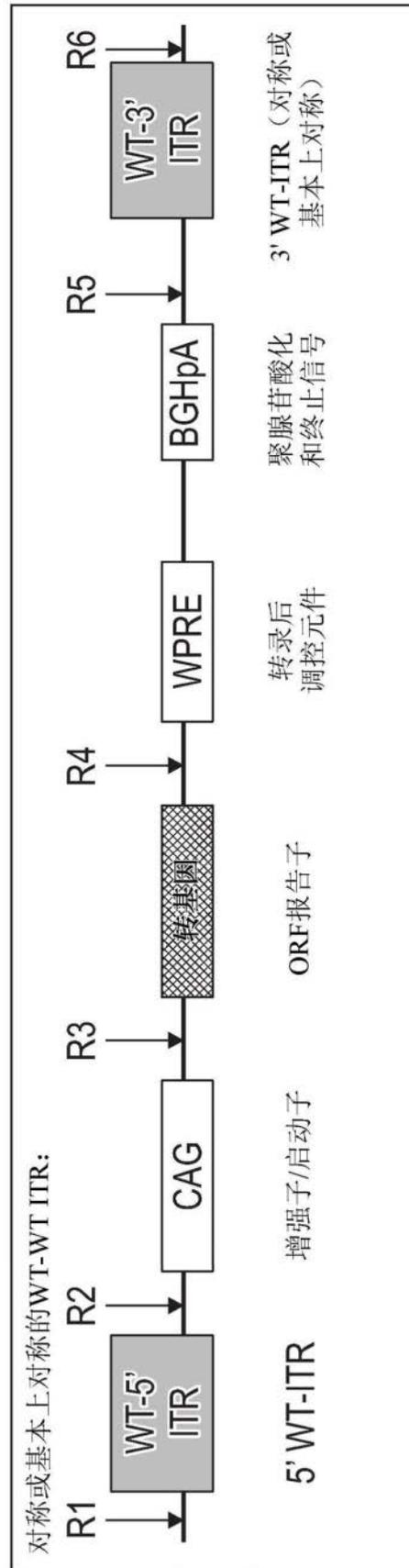


图1F

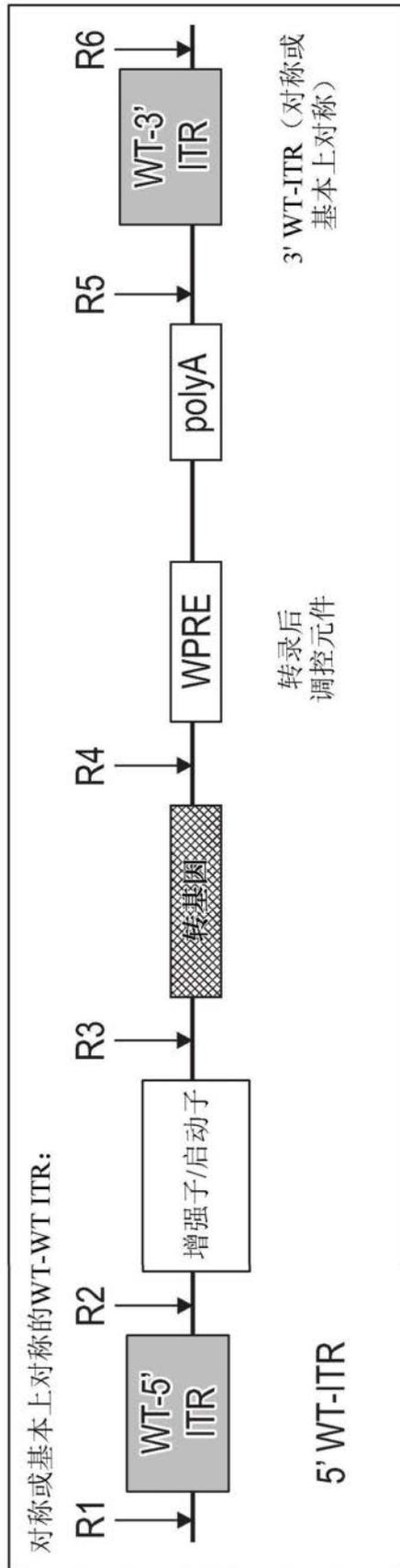


图1G

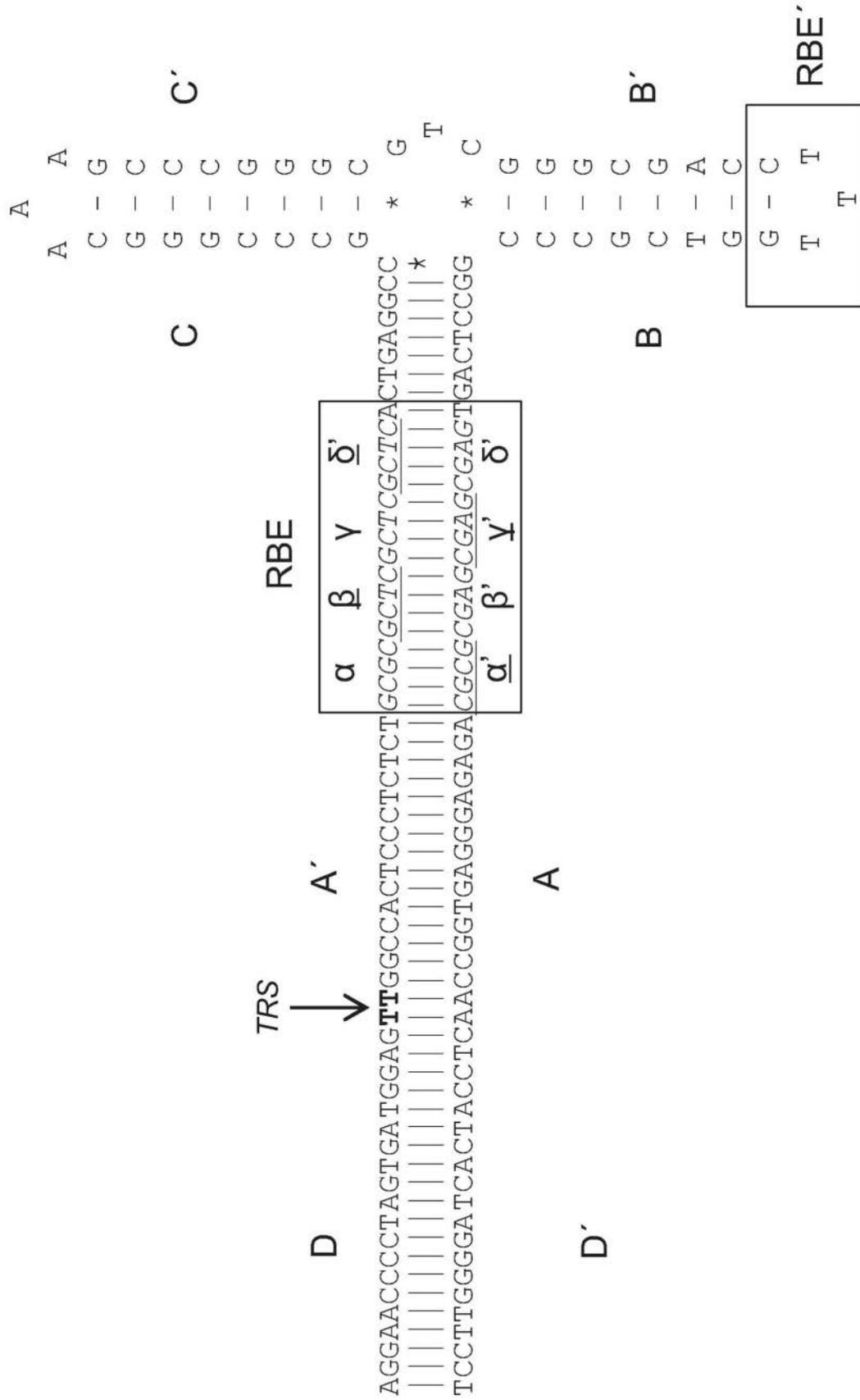


图2A

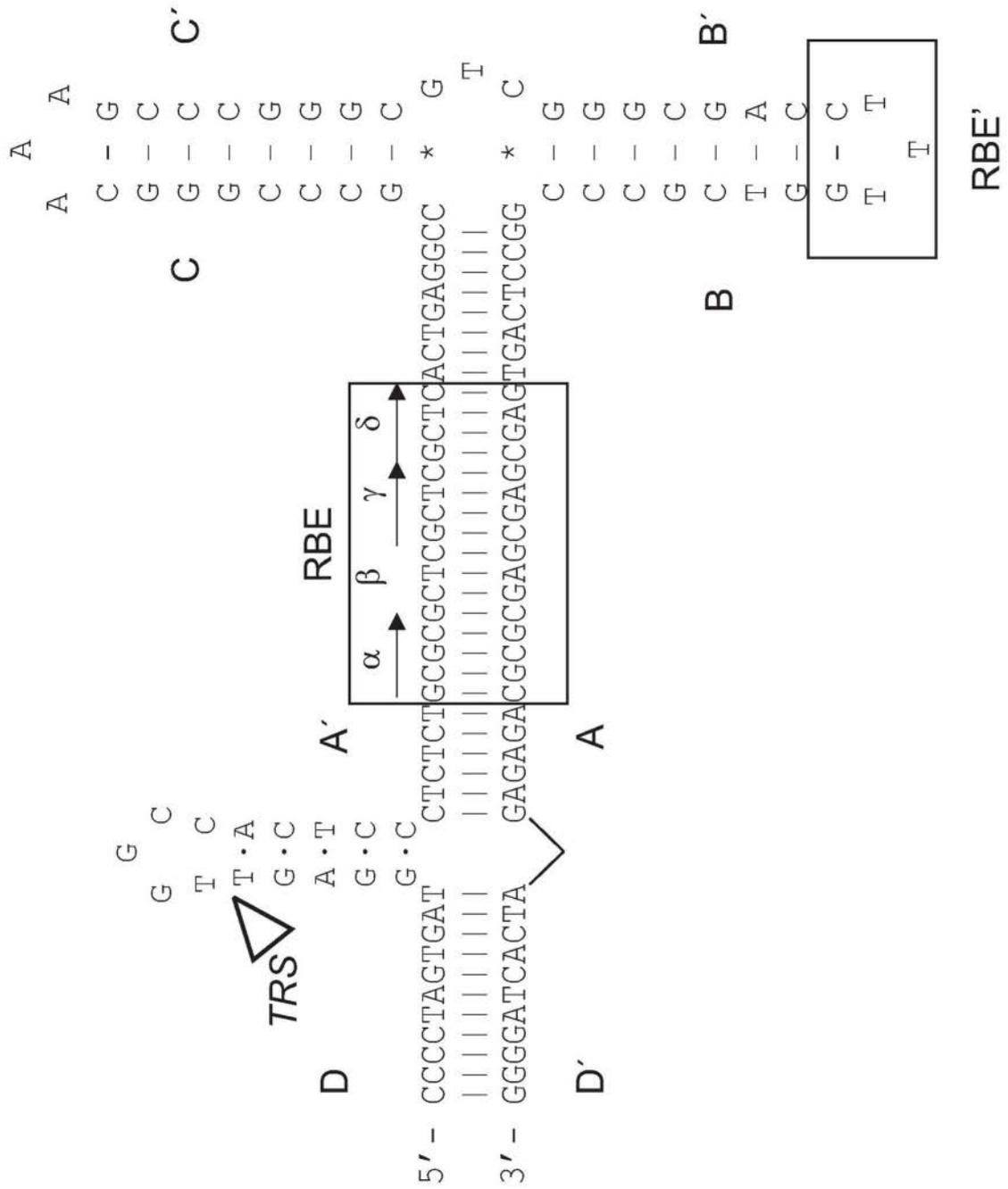


图2B

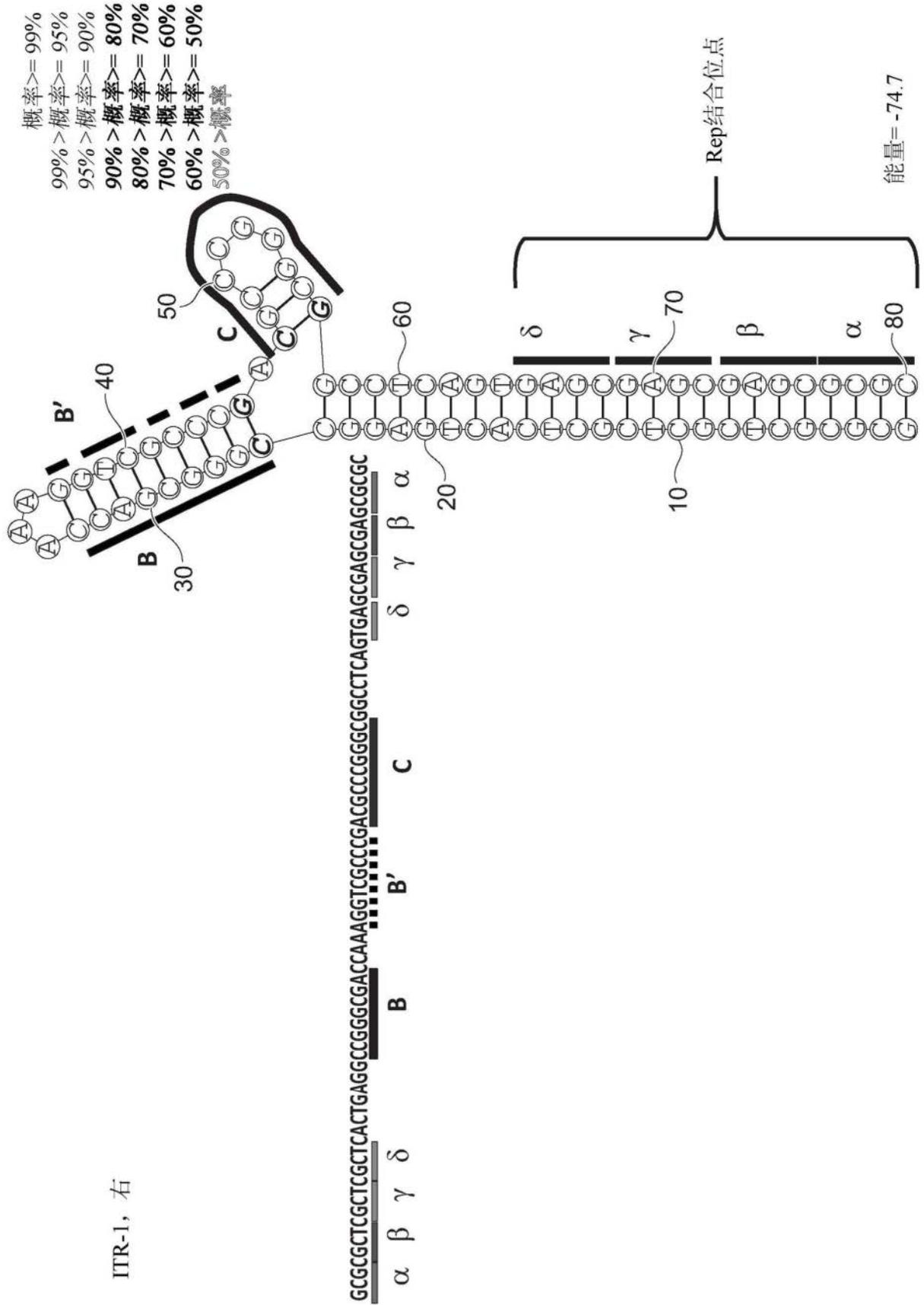


图3D

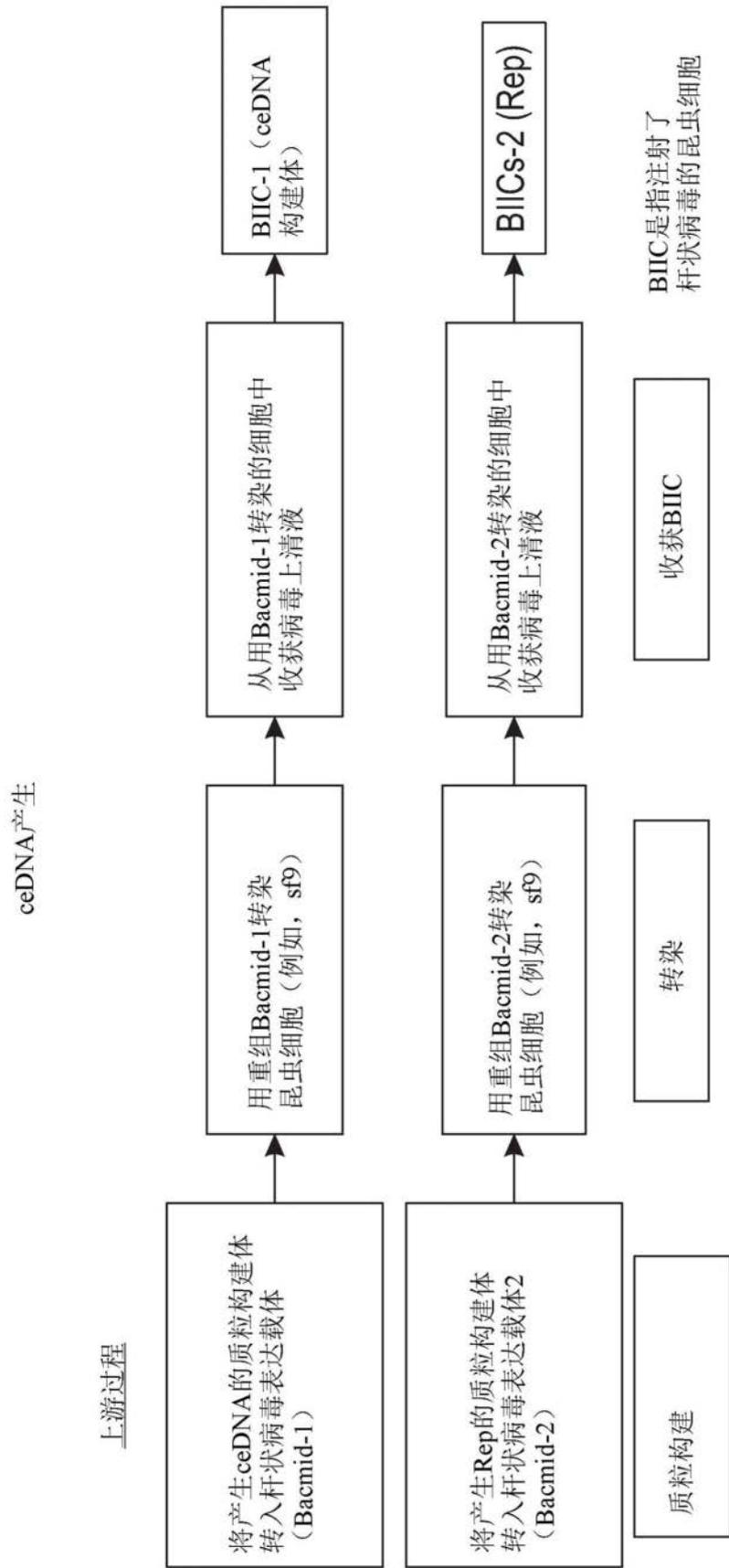


图4A

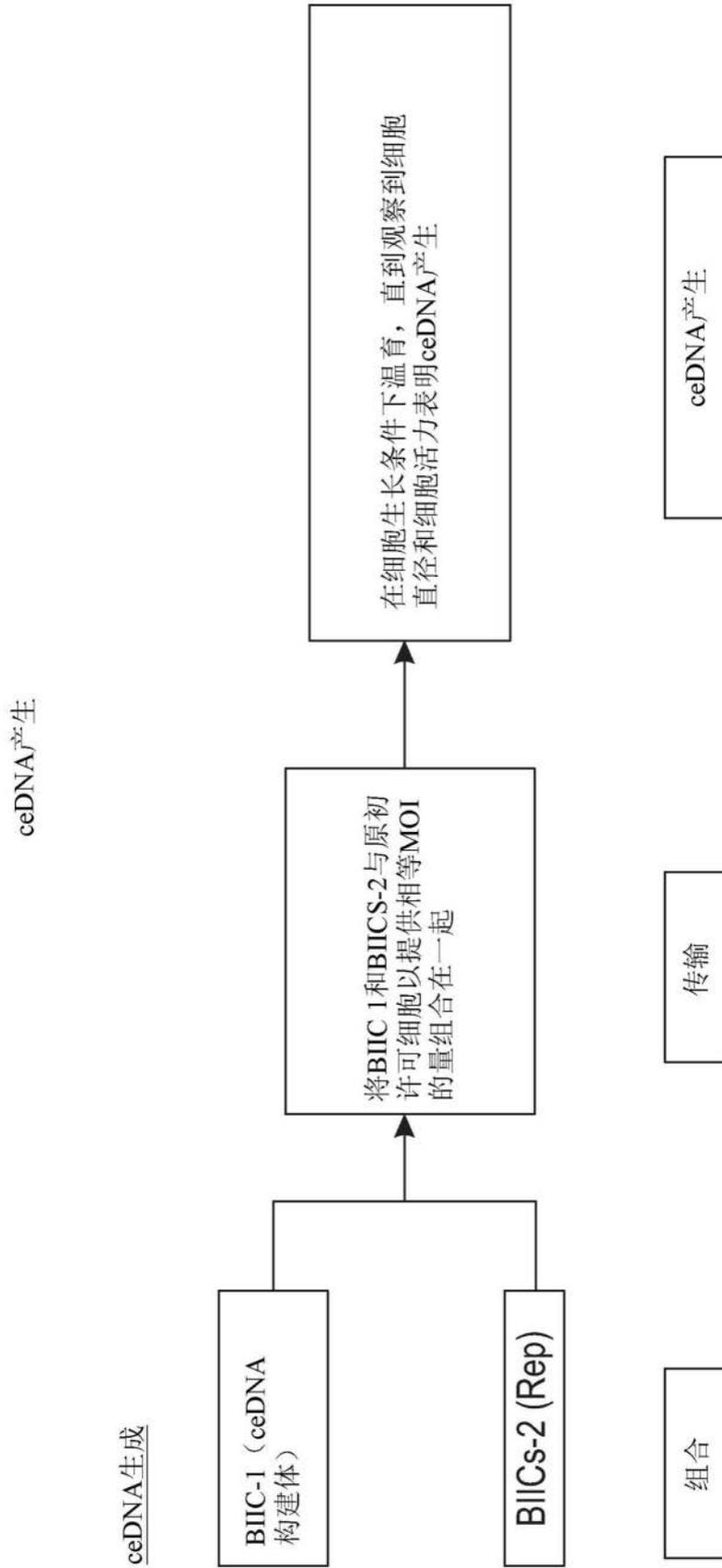


图4B

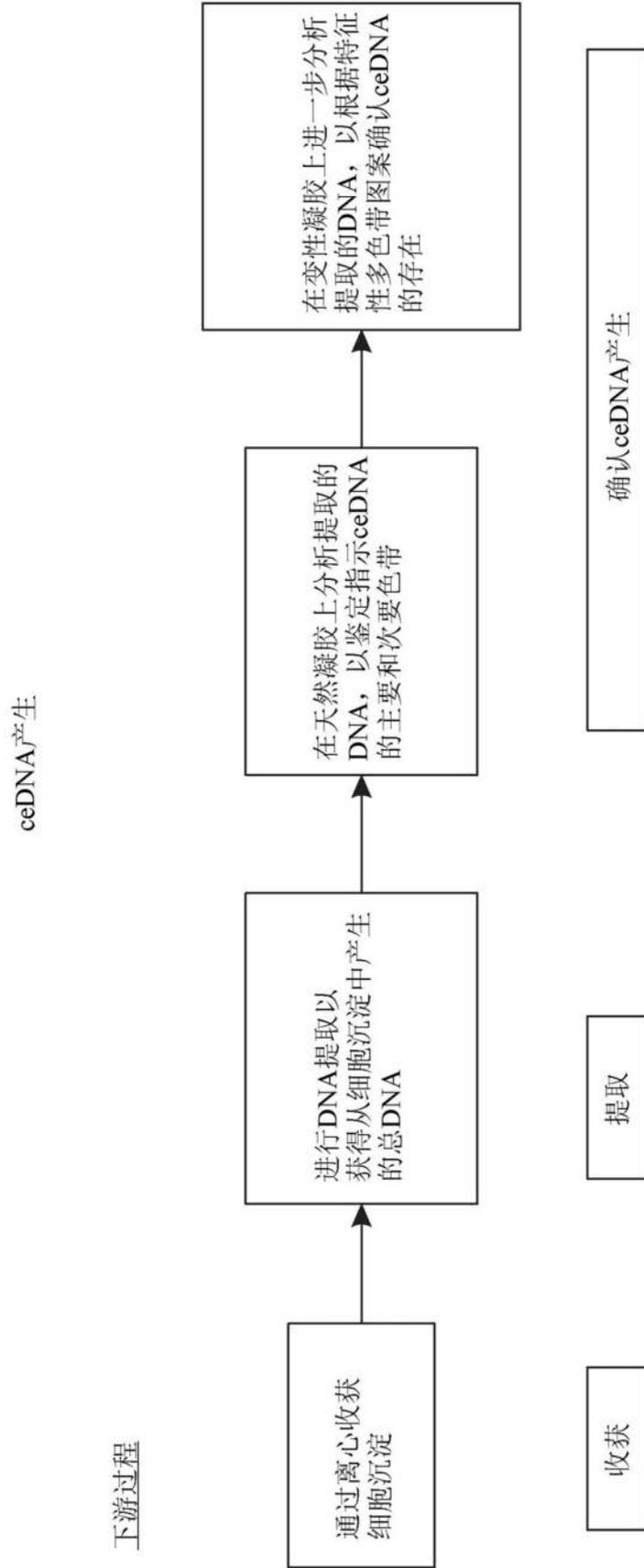


图4C

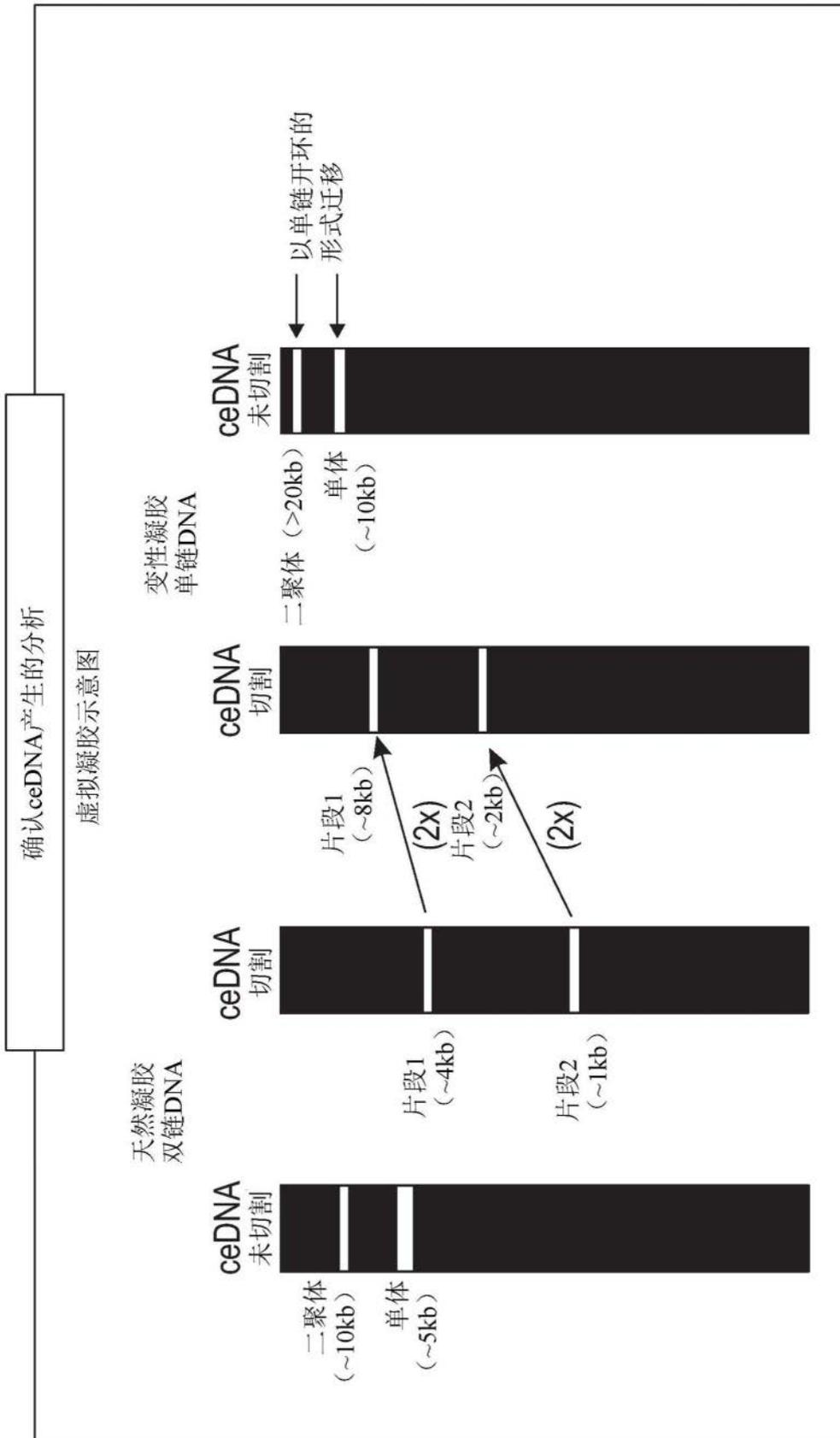


图4D

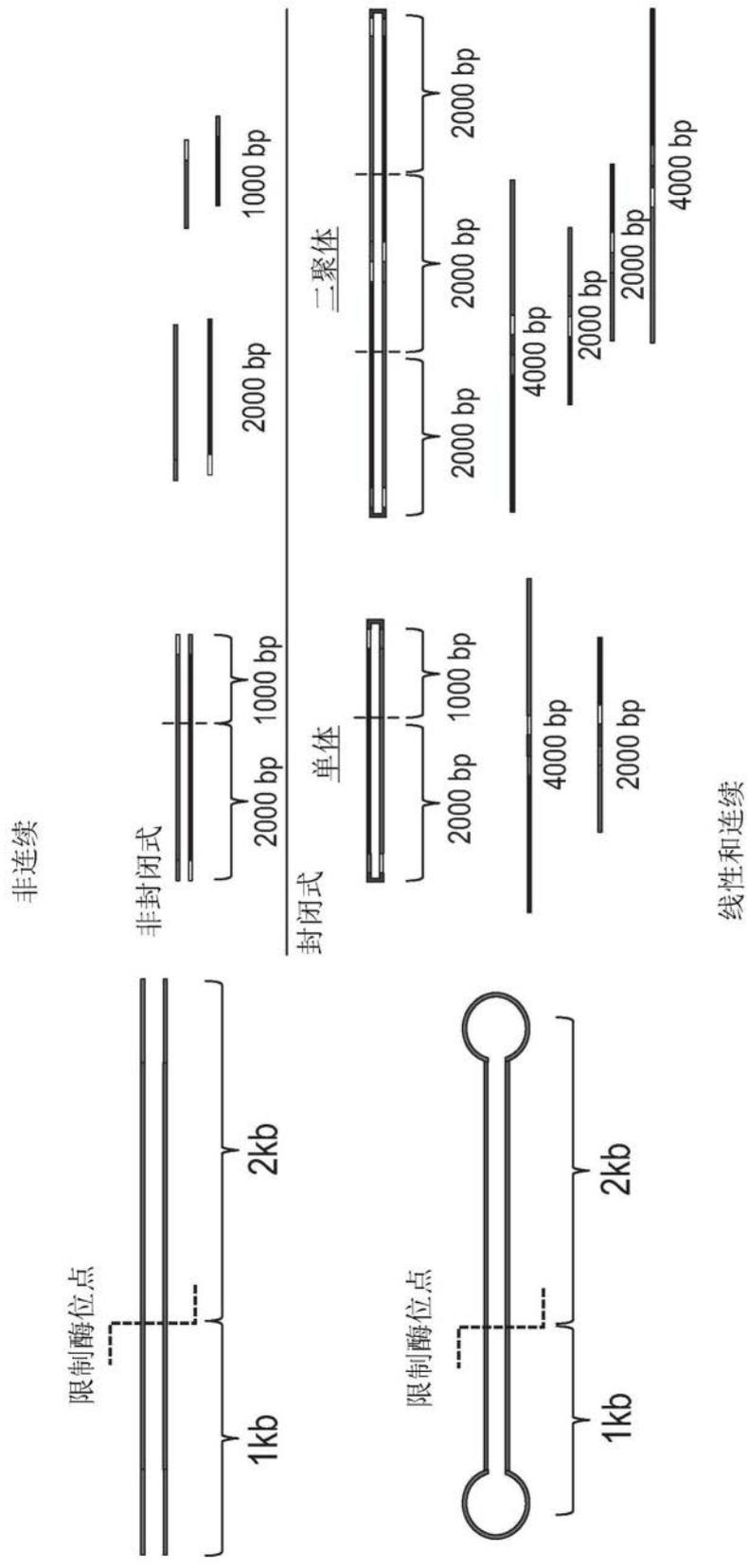
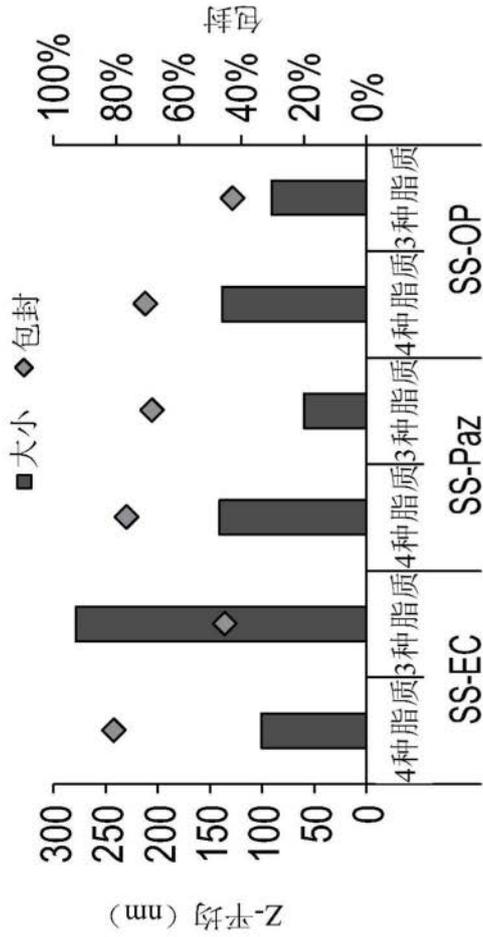


图4E



	ssPaz3	ssPaz4	ssOP3	ssOP4
1PZ-21	70	52.5	70	52.5
DOPC	0	7.5	0	7.5
胆固醇	30	40	30	40
DMG-PEG ₂₀₀₀	3	3	3	3

非阳离子脂质的影响

图5

	ssOP4	ssOP4a	ssOP4b	ssOP4c	ssOP4d
SS-OP	52.5	52.5	50	50	50
DOPC	7.5	7.5	10		
DSPC				10	
DOPE					10
胆固醇	40	40	38.5	38.5	38.5
PEG ₂₀₀₀ -DMG	3	3	1.5	1.5	1.5

调配物参数	调配物A	调配物B
TFR (mL/min)	12	12
缓冲液	25 mM NaAc (pH 4.0)	20 mM 苹果酸, 40 mM NaCl (pH 4.0)
ceDNA:脂质的注射比率	3:1	3:2
用于注射的 ceDNA 浓度	0.115 mg/mL	0.100 mg/mL
N/P	8	6

pH (pH 4) 的影响

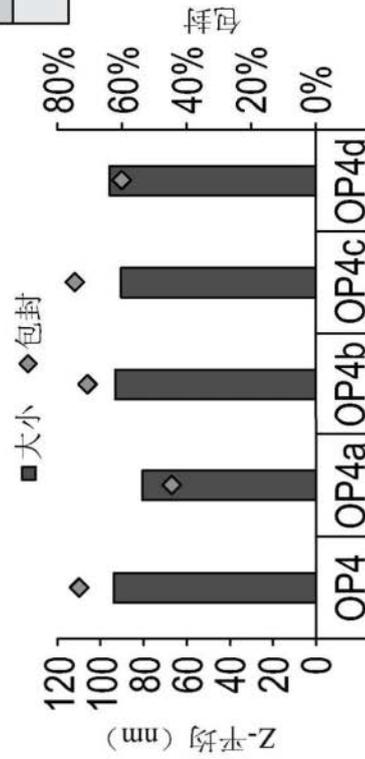
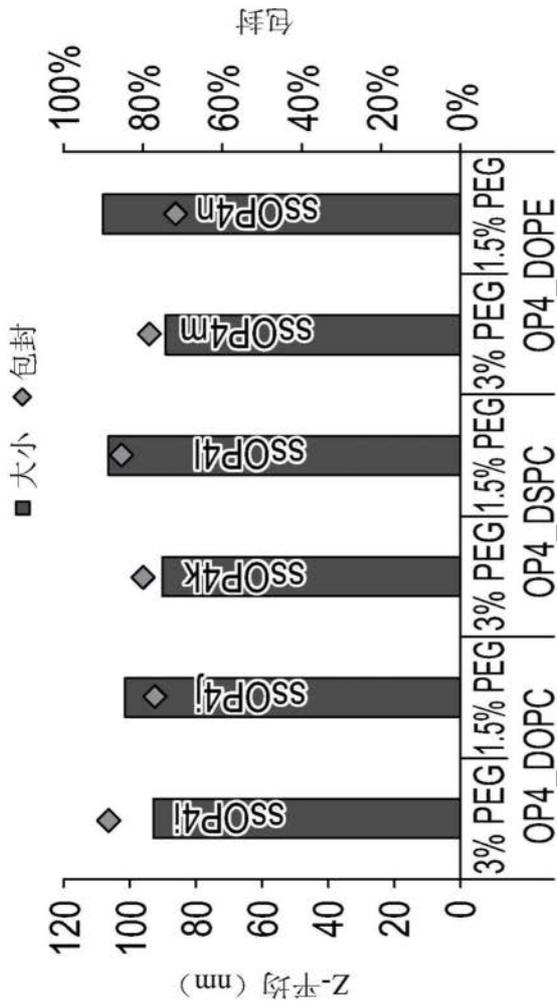


图6A

pH (pH 3) 的影响



	ssOP4i	ssOP4j	ssOP4k	ssOP4l	ssOP4m	ssOP4n
SS-OP	52.5	52.5	50	50		
DOPC	7.5	7.5				
DSPC			7.5	7.5		
DOPE					7.5	7.5
胆固醇	40	40	40	40	40	40
PEG ₂₀₀₀ -DMG	3	1.5	3	1.5	3	1.5

图6B

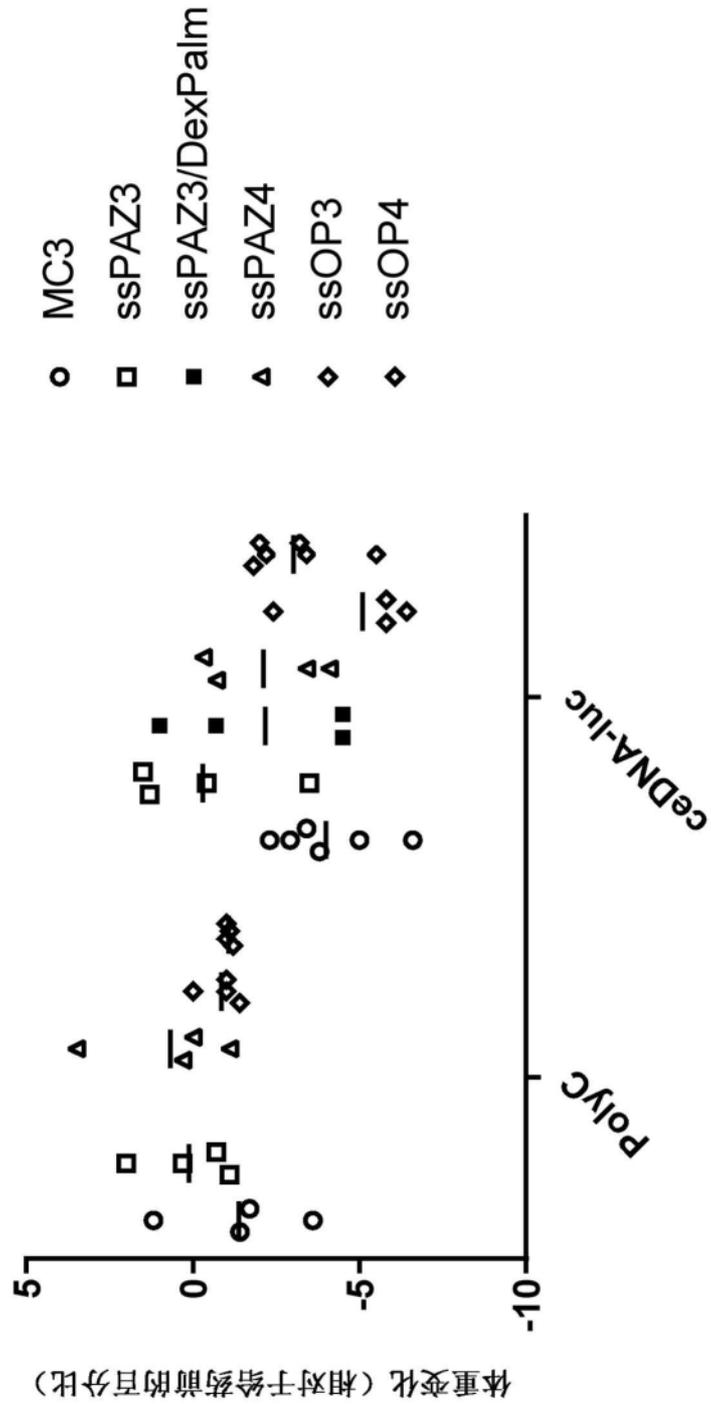


图7

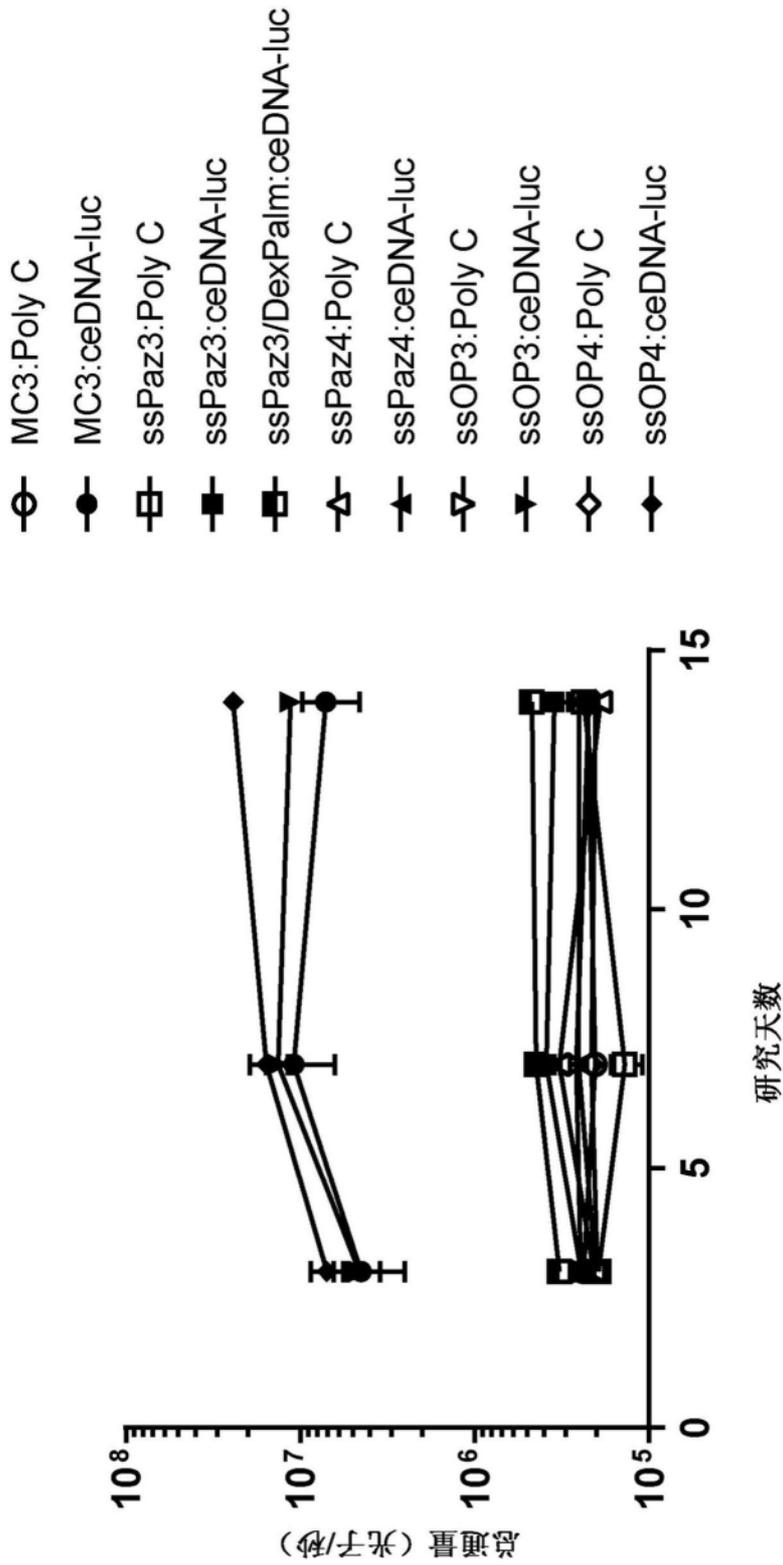


图8

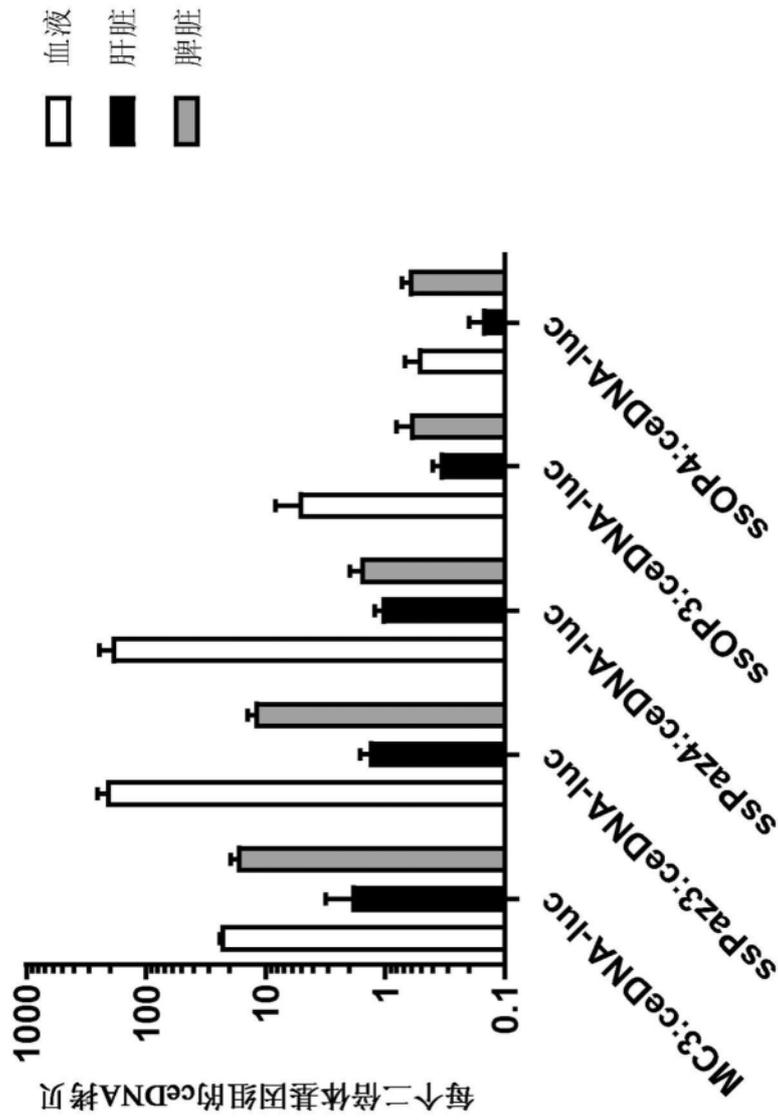


图9

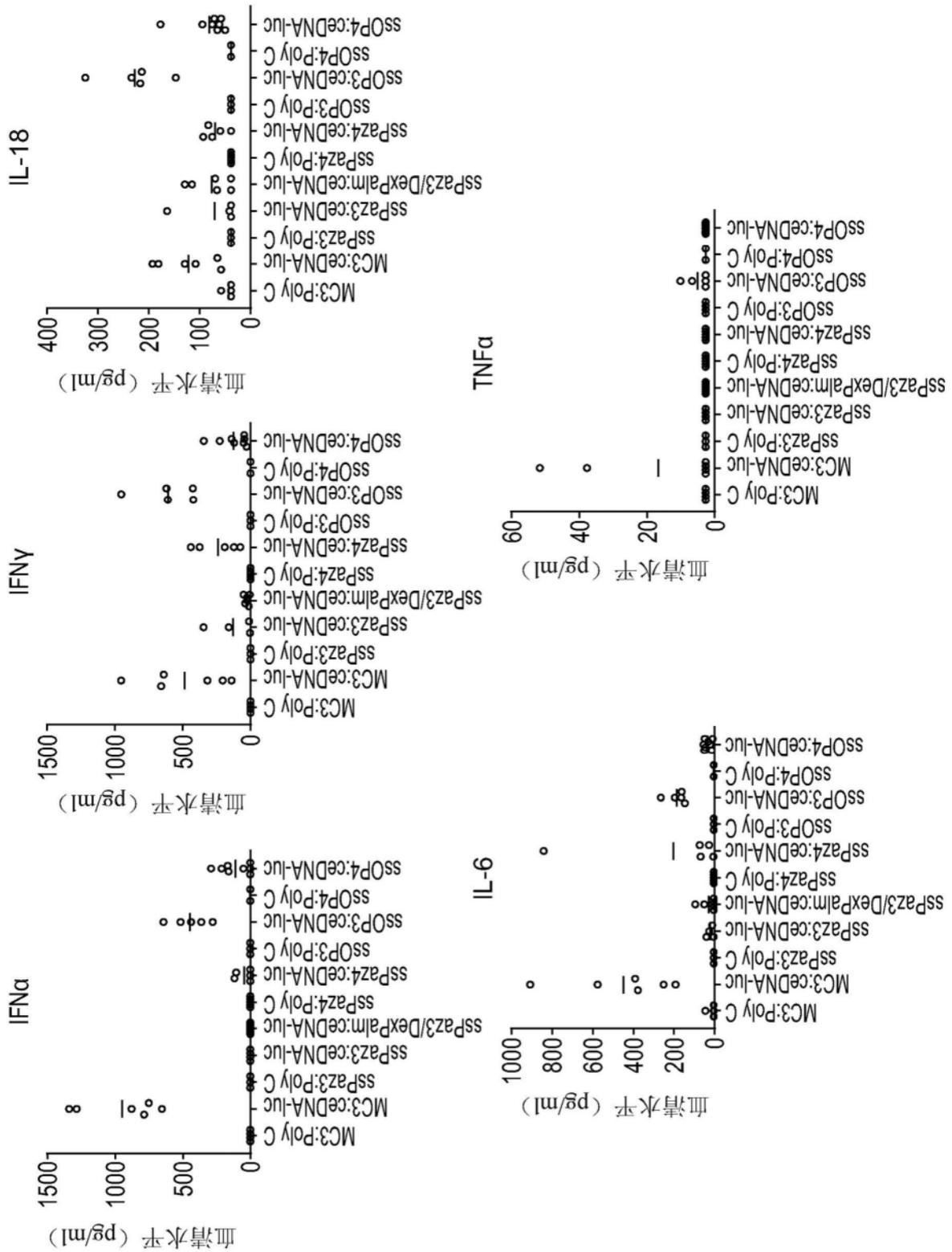


图10A

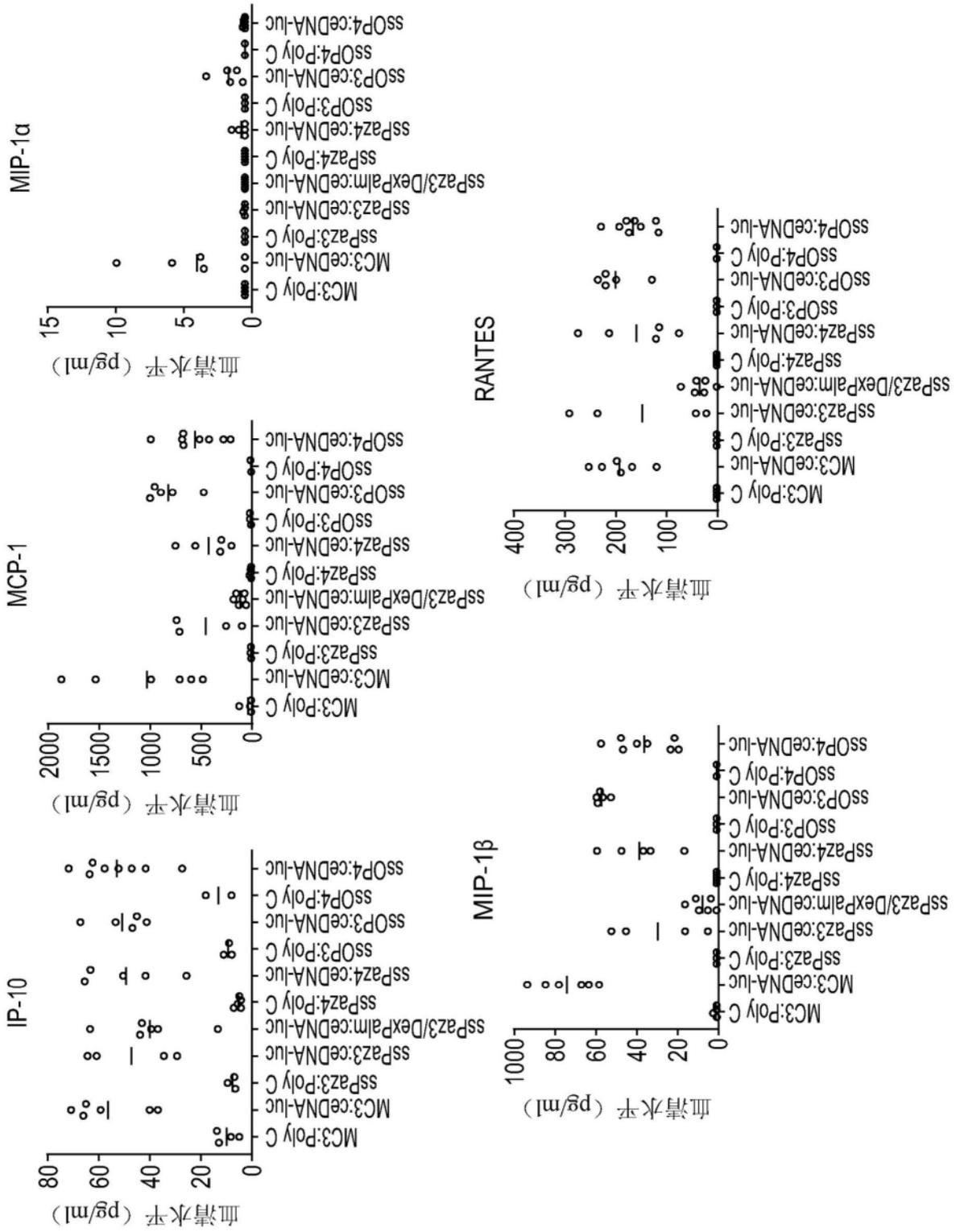


图10B

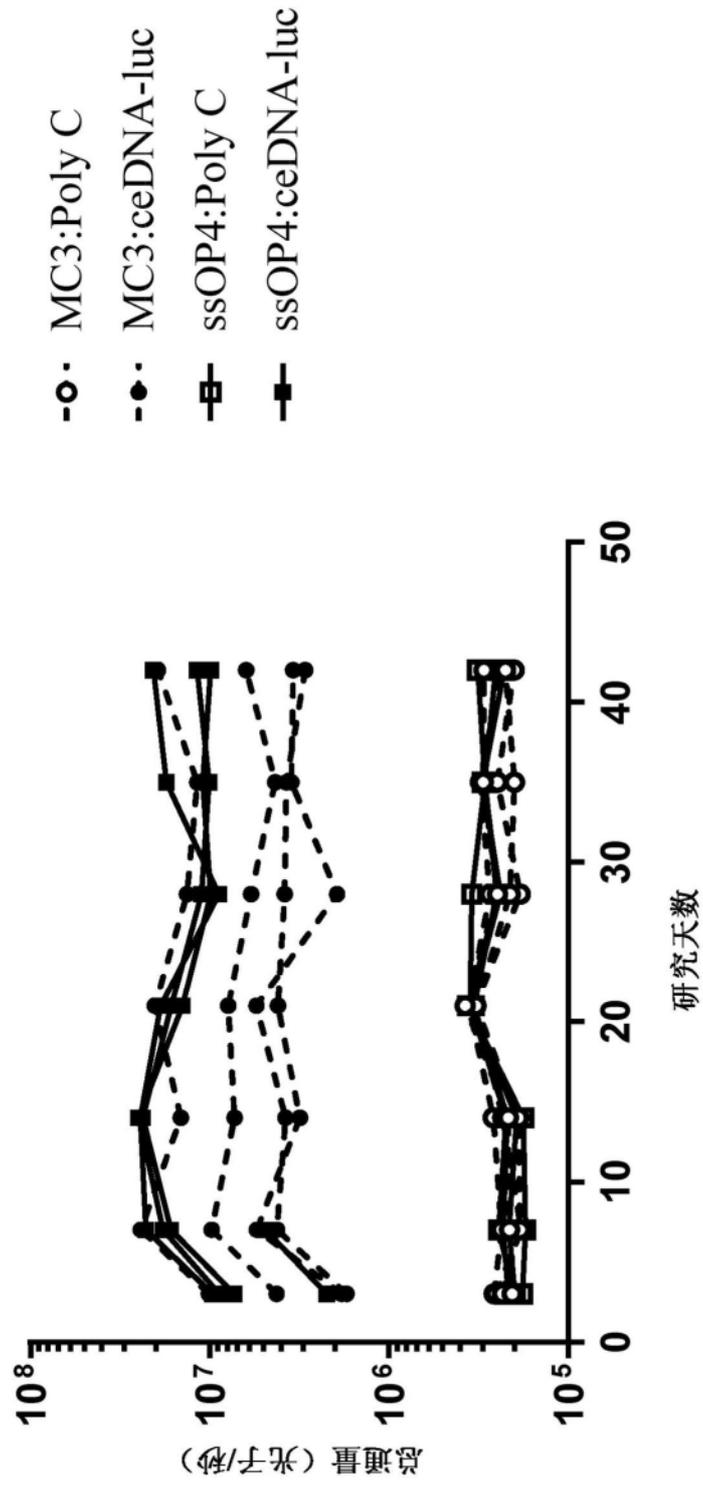


图11

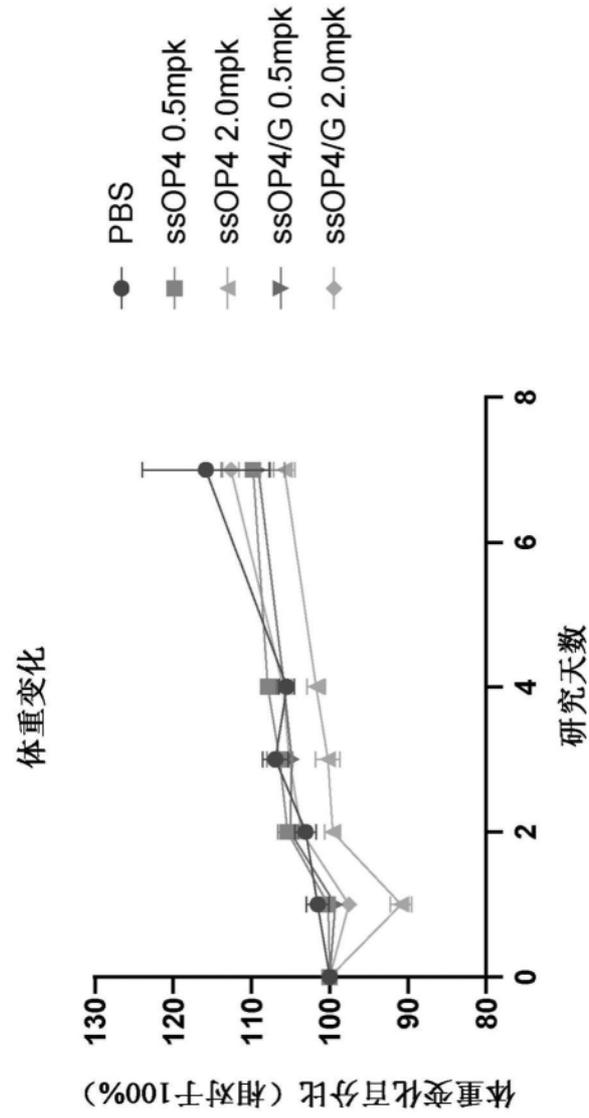


图12A

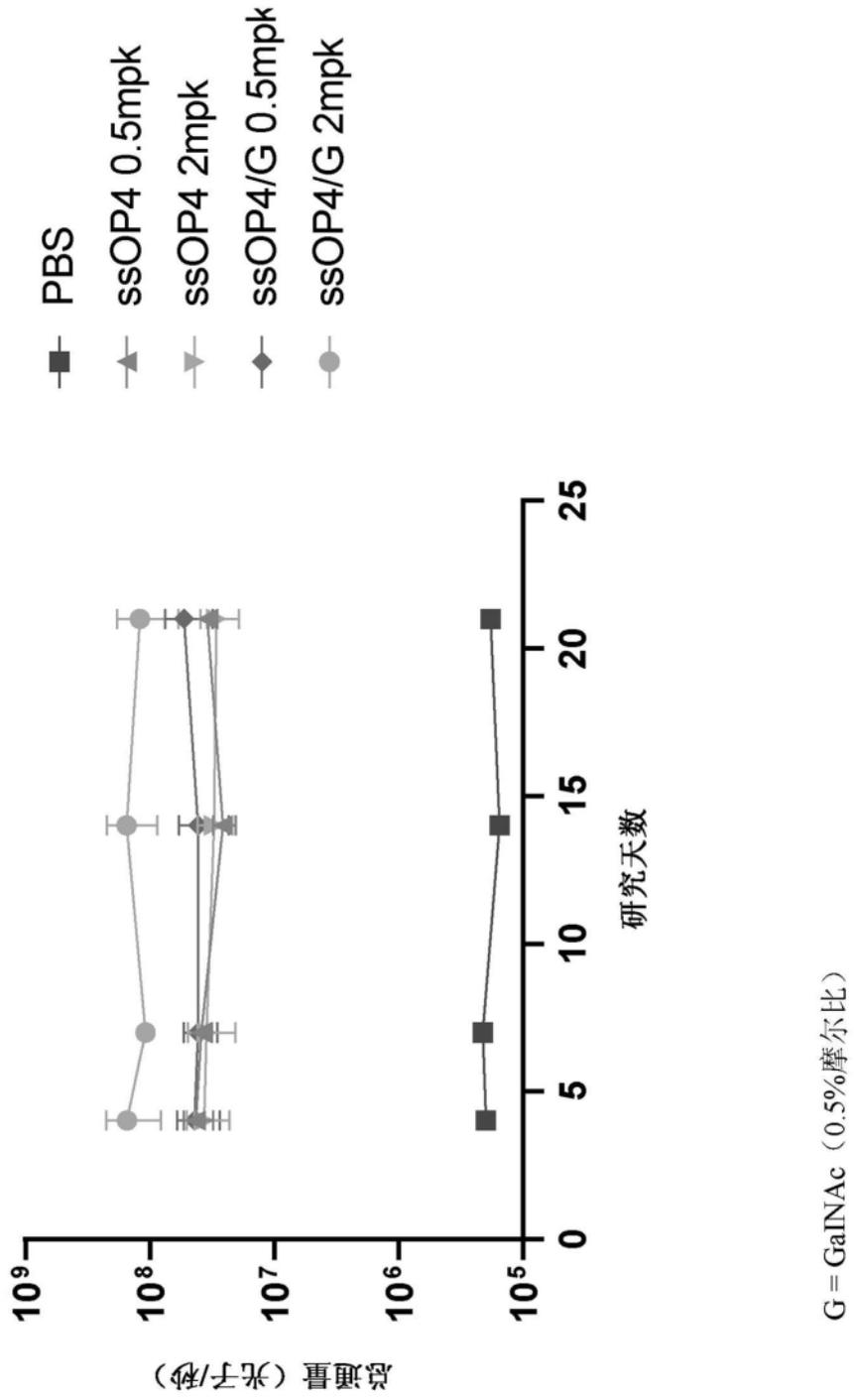


图12B

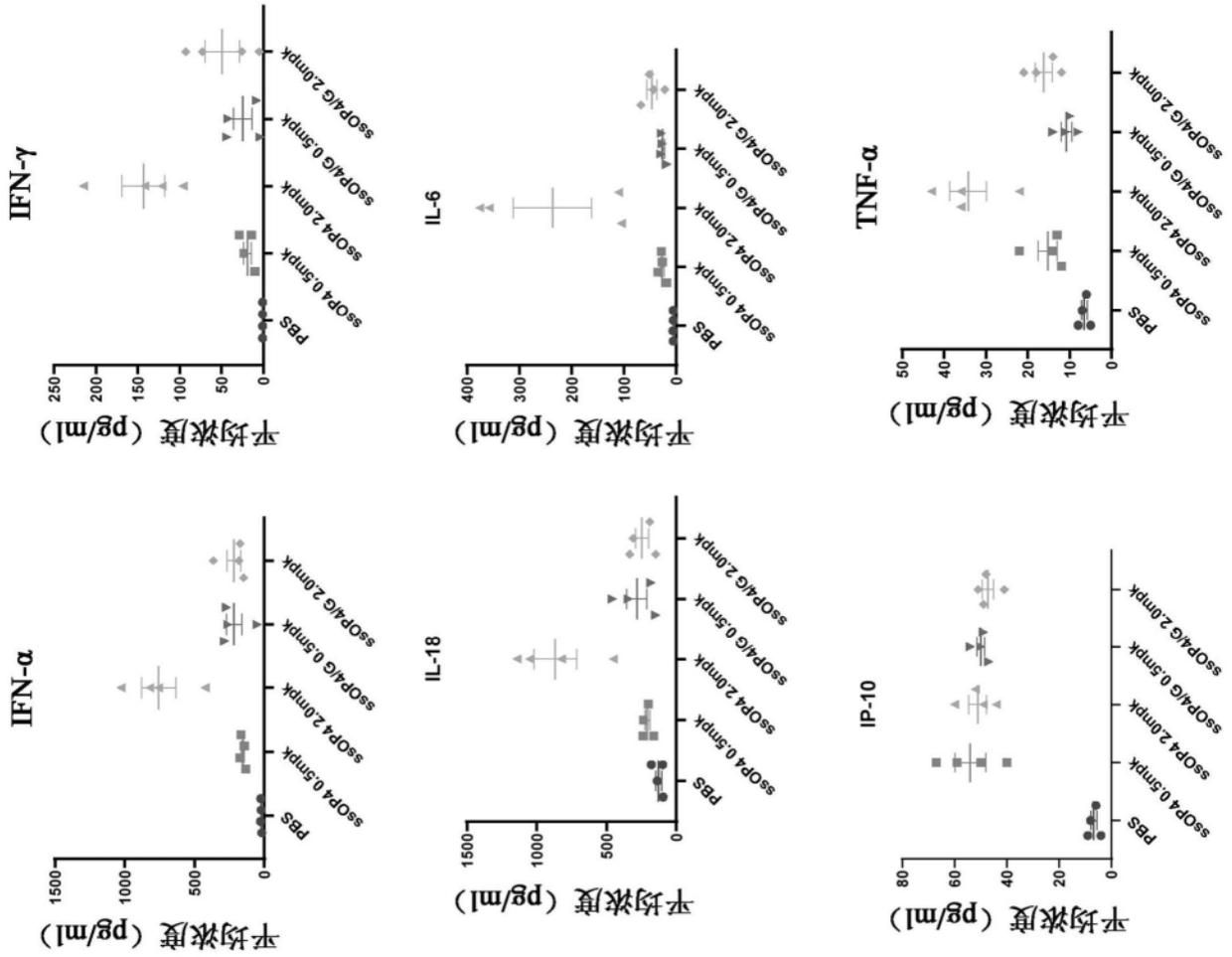


图13

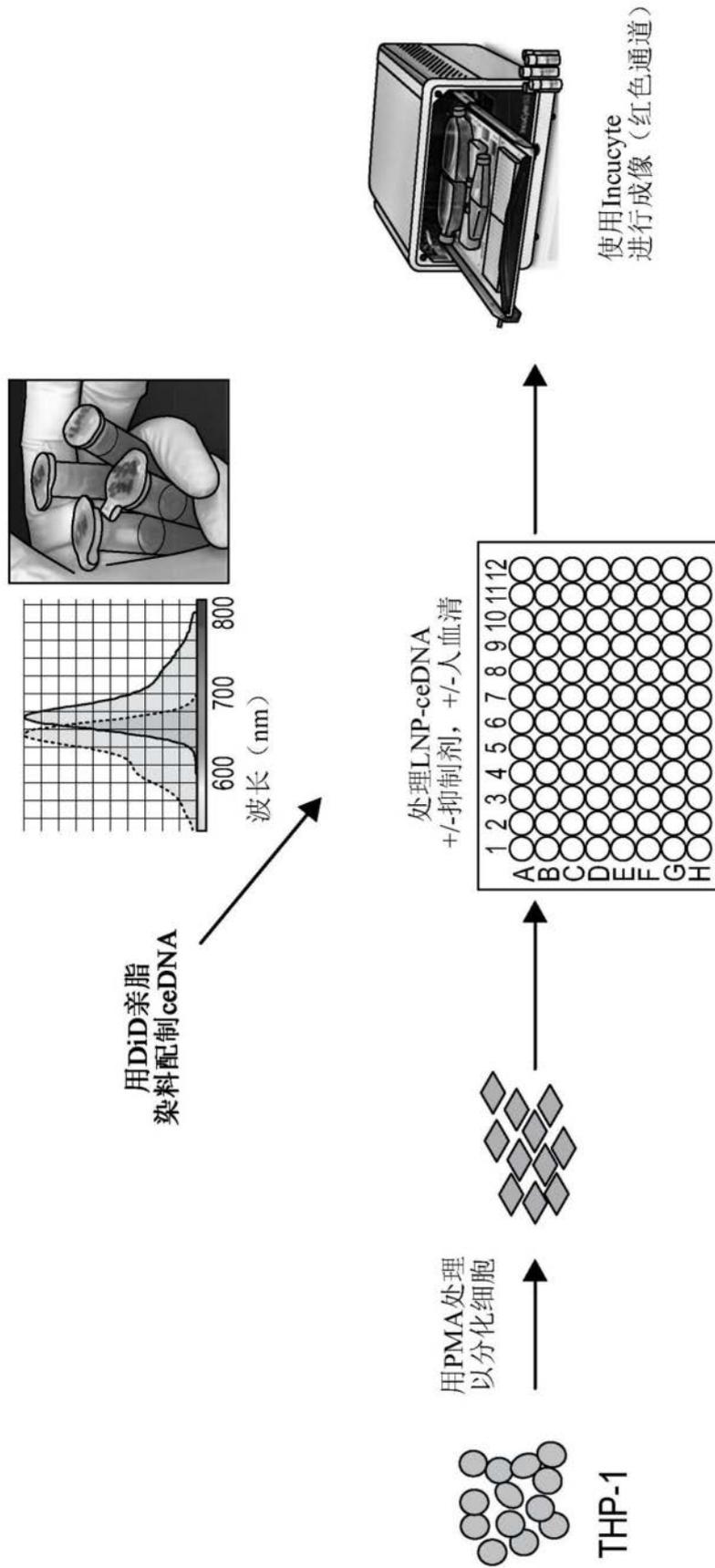


图14

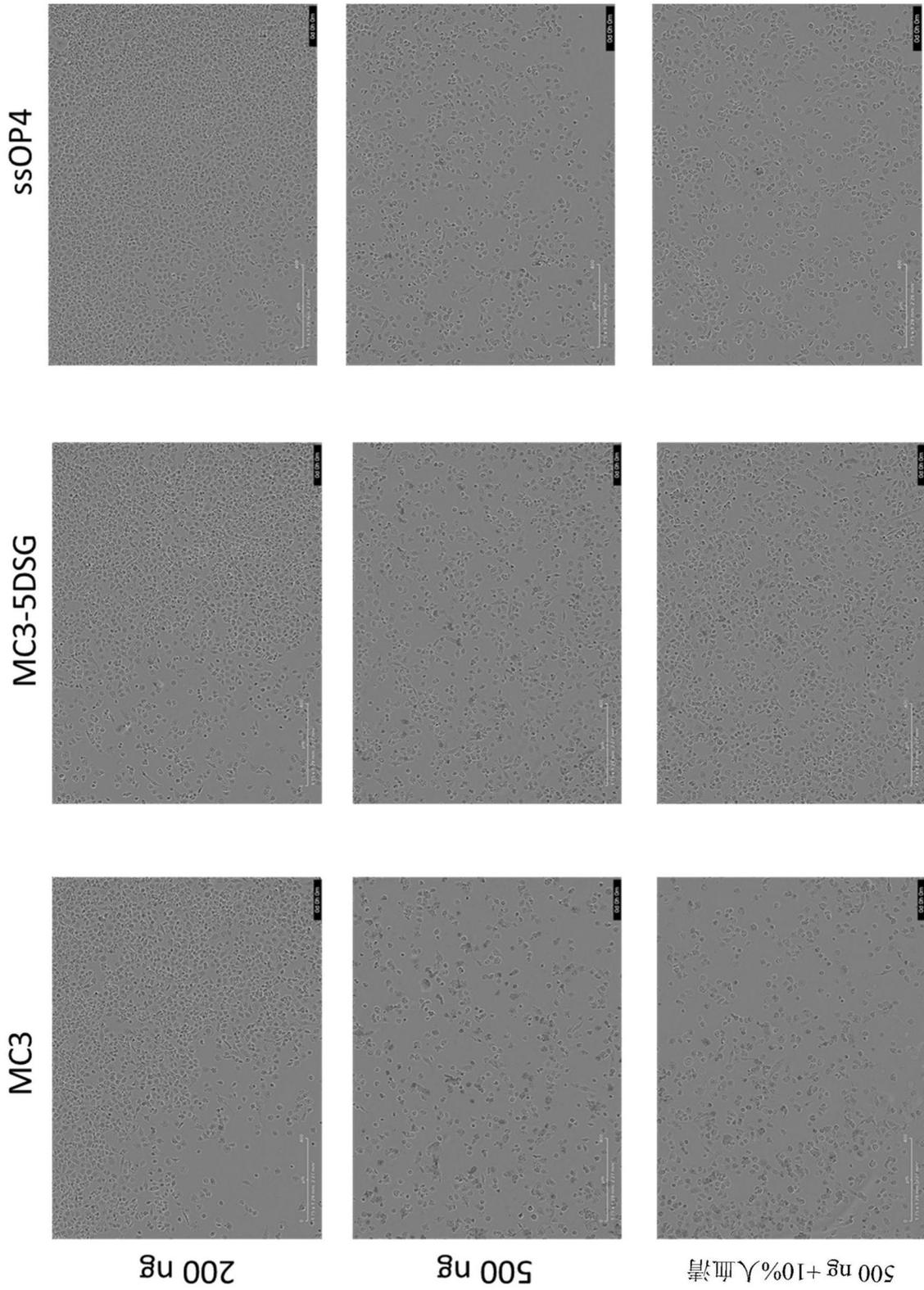


图15

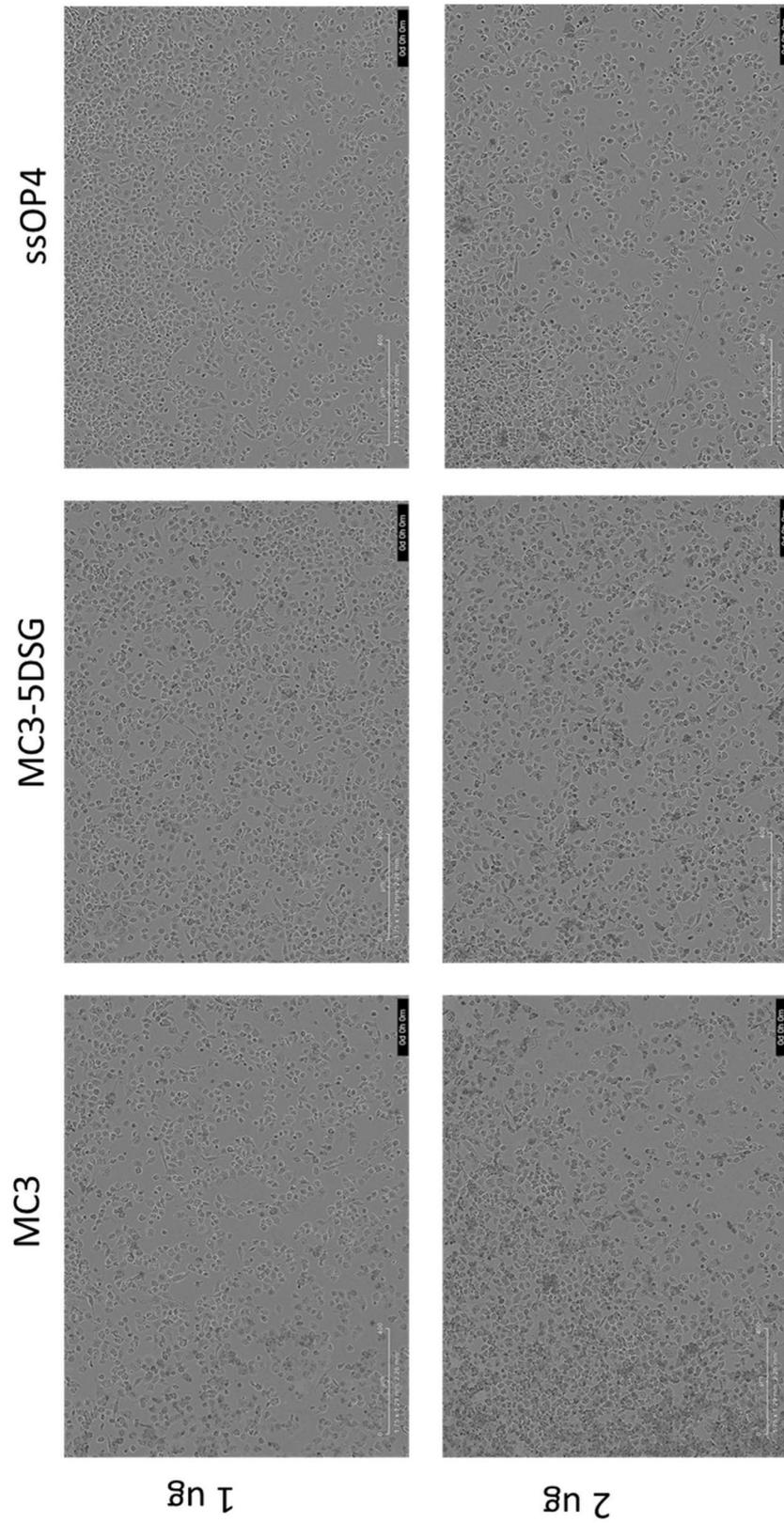


图16

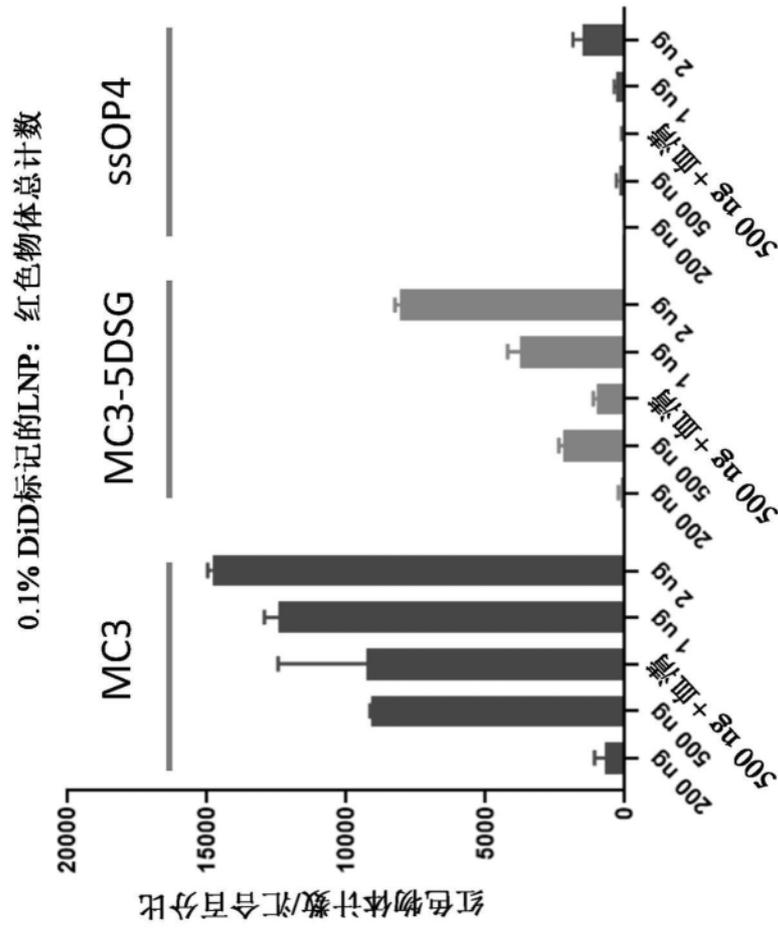


图17

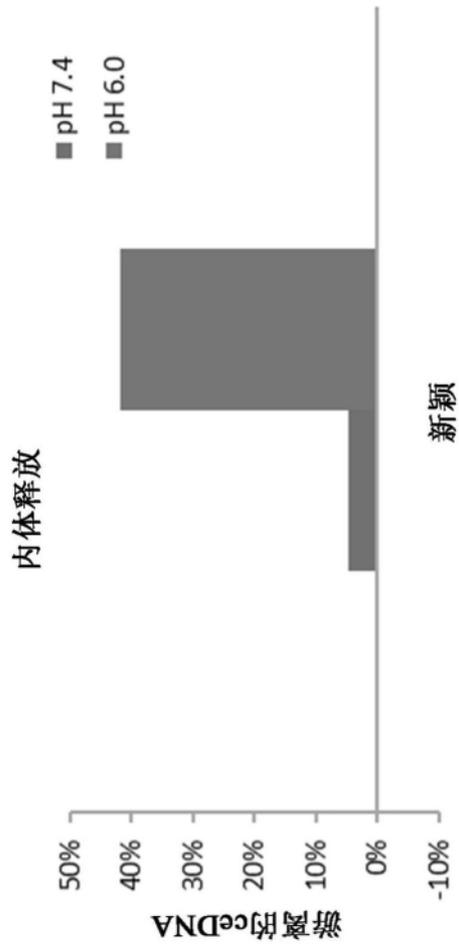


图18A

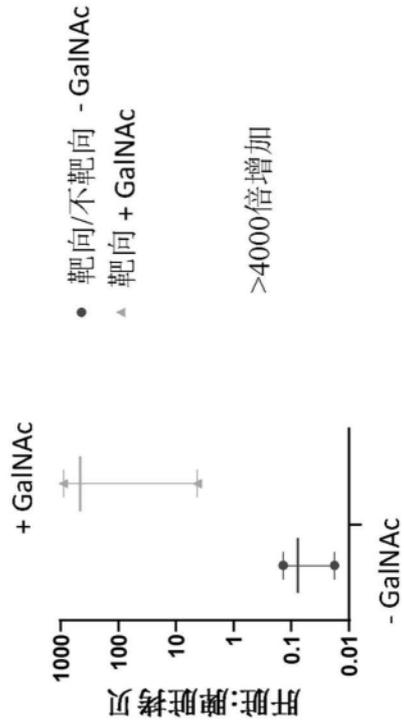


图18B

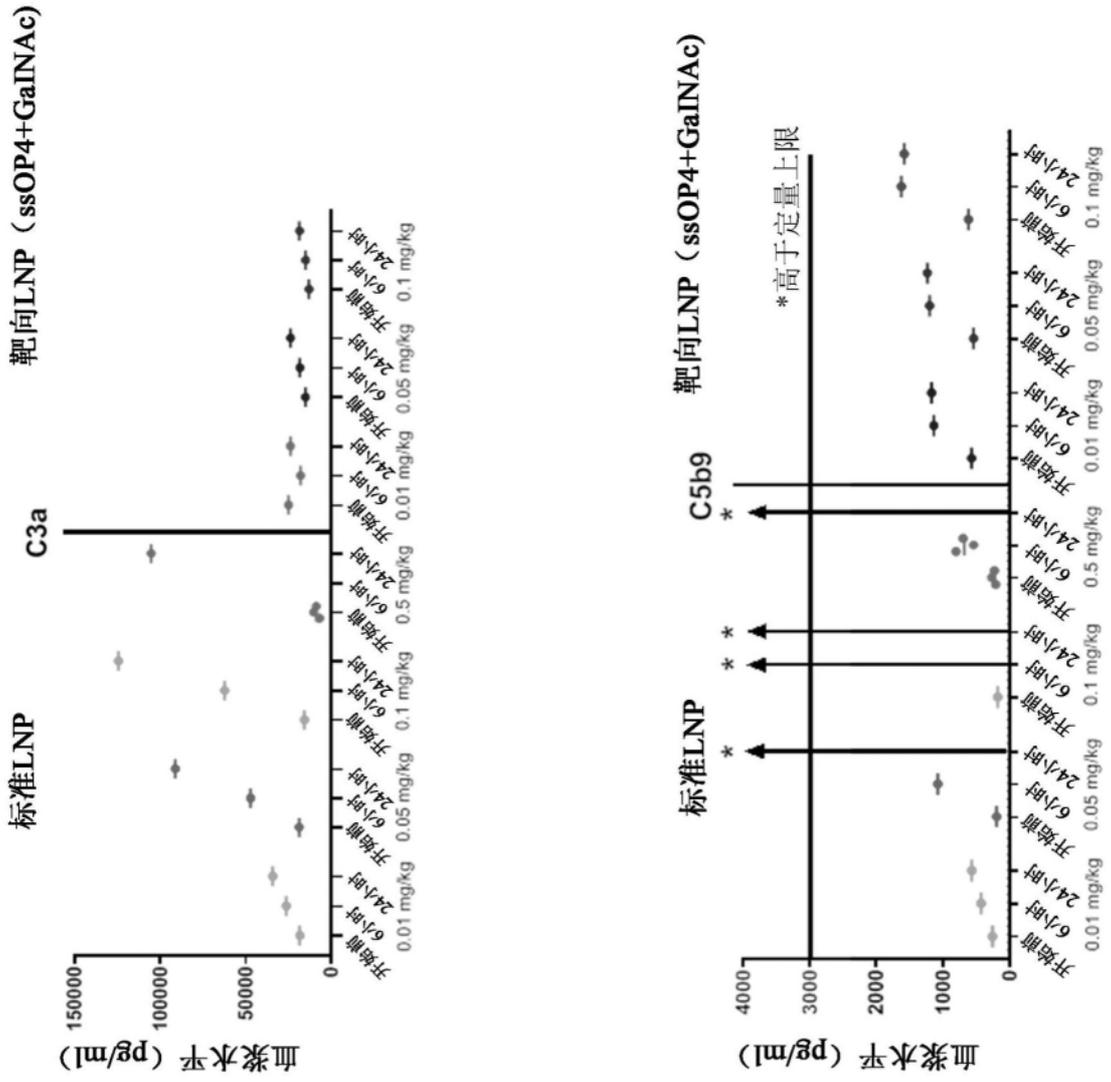


图19

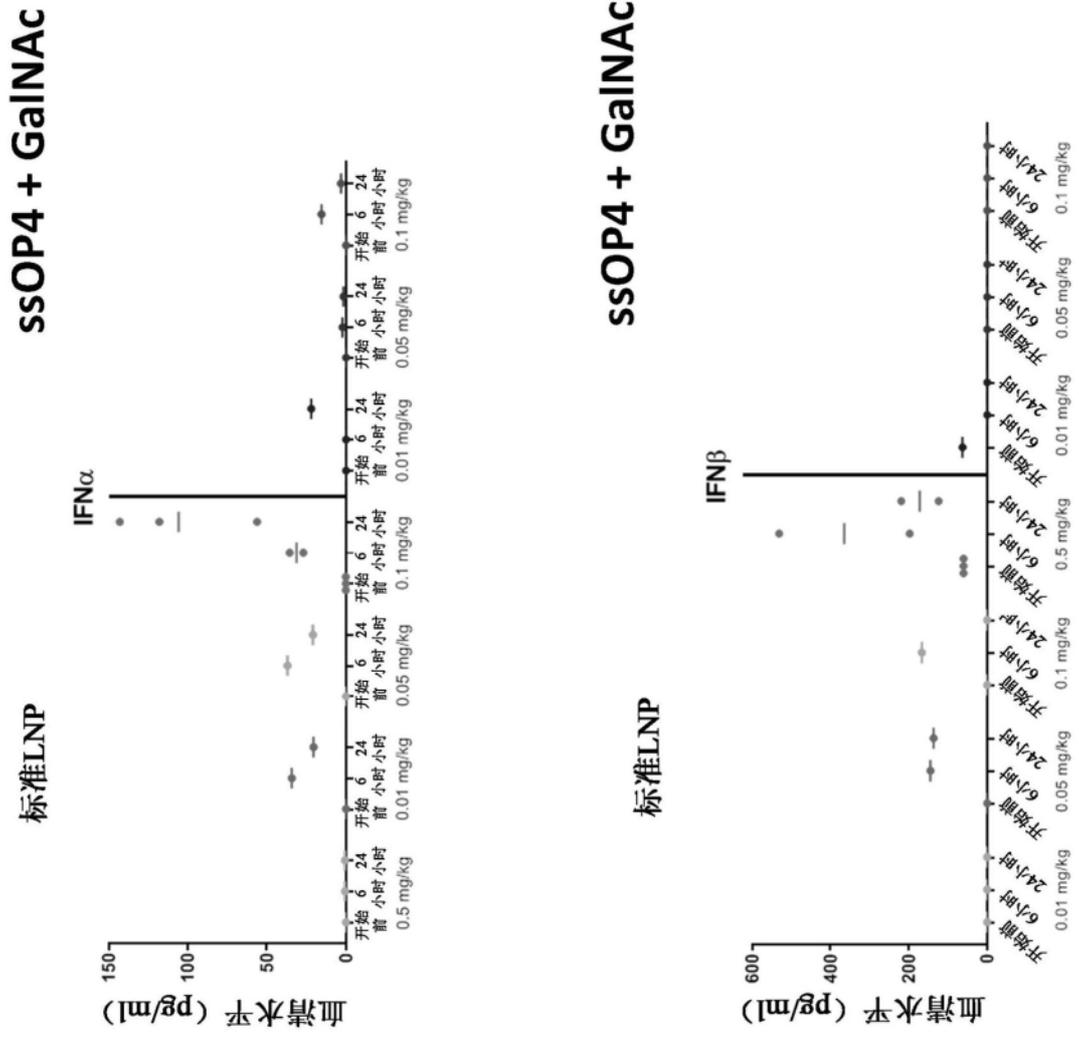


图20

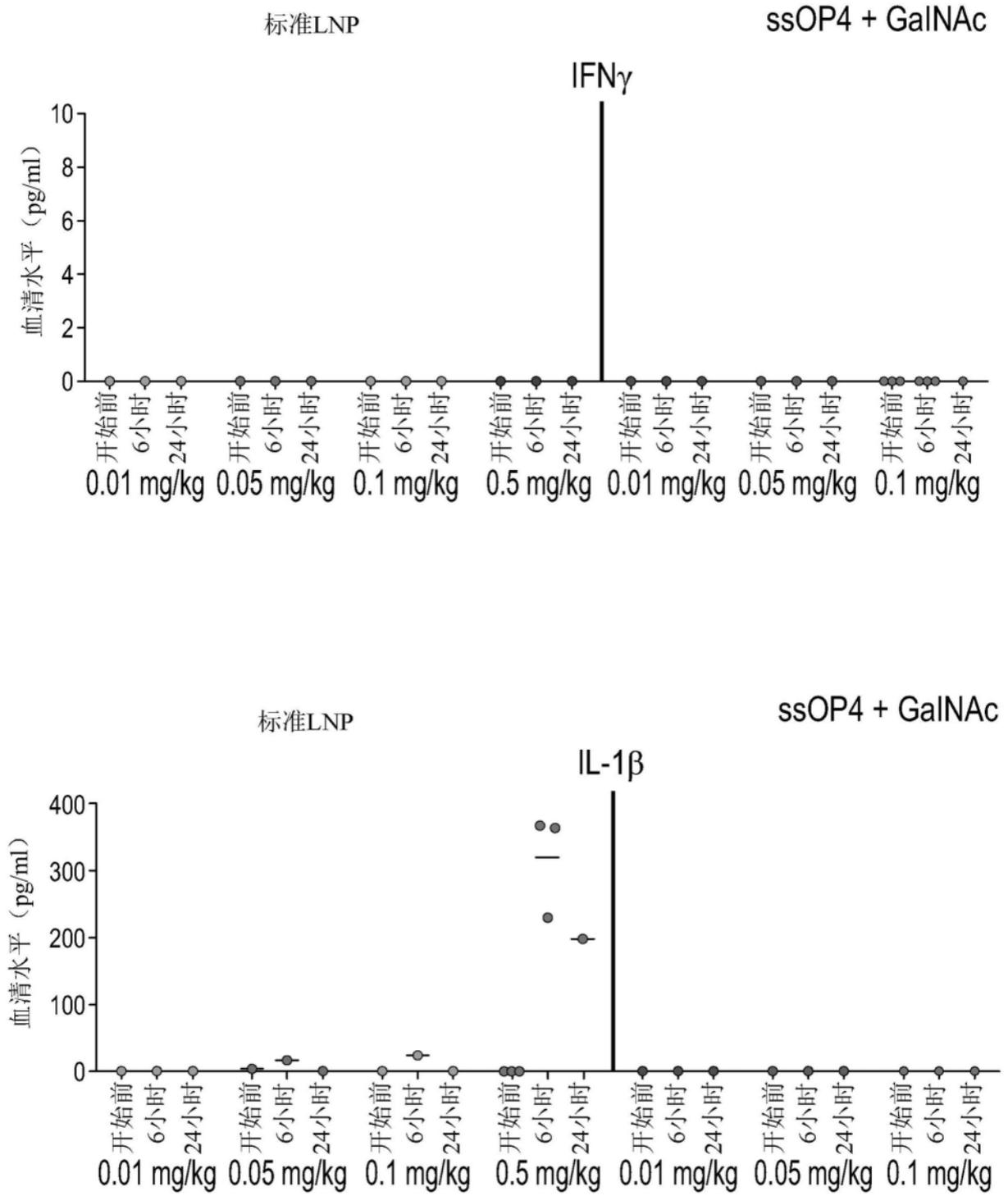


图21

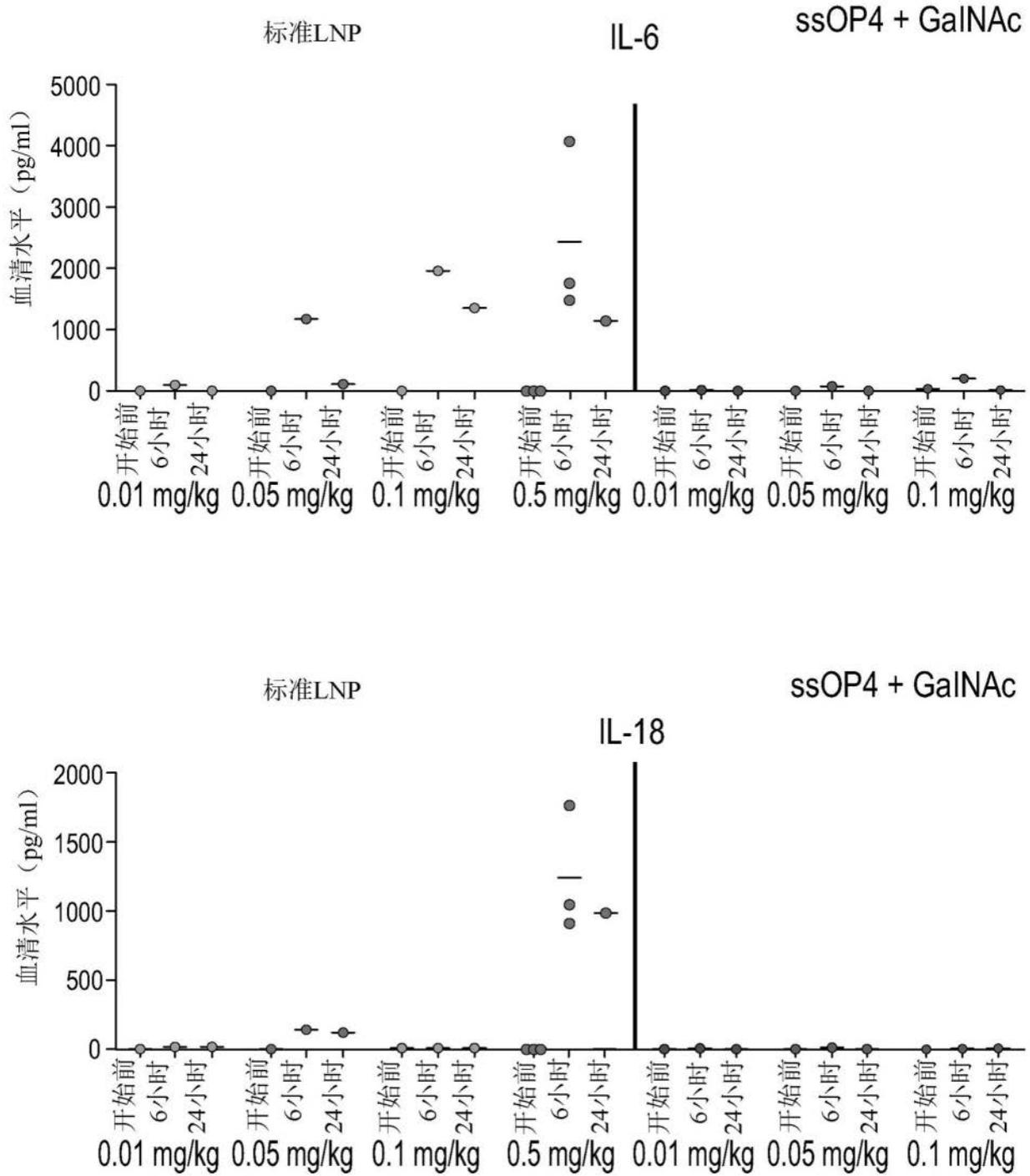


图22

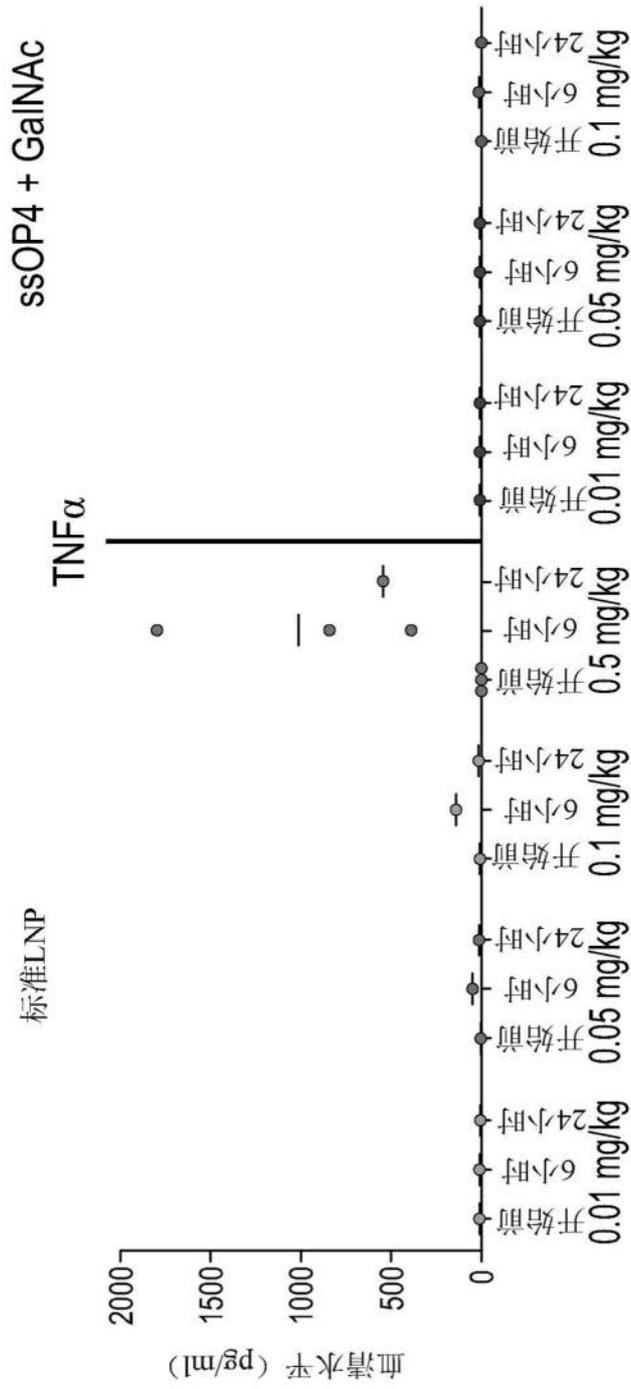


图23

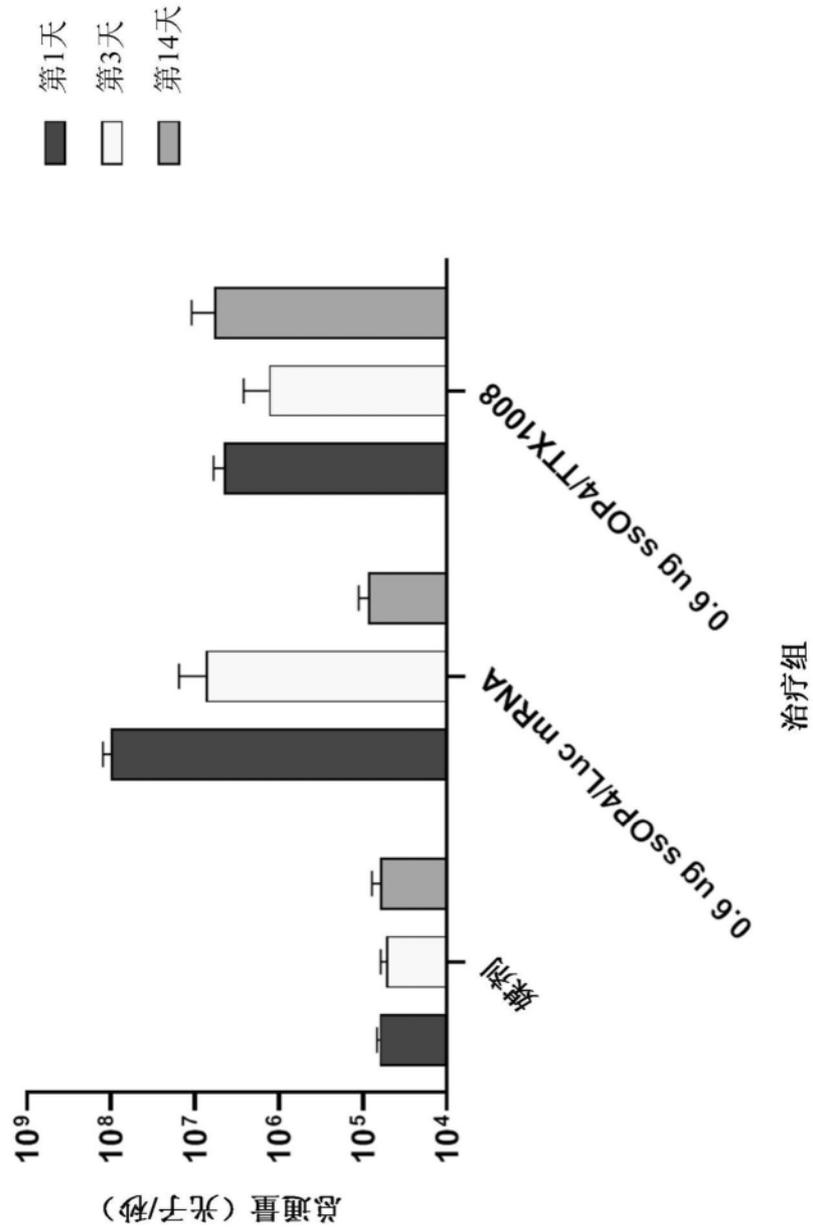


图24

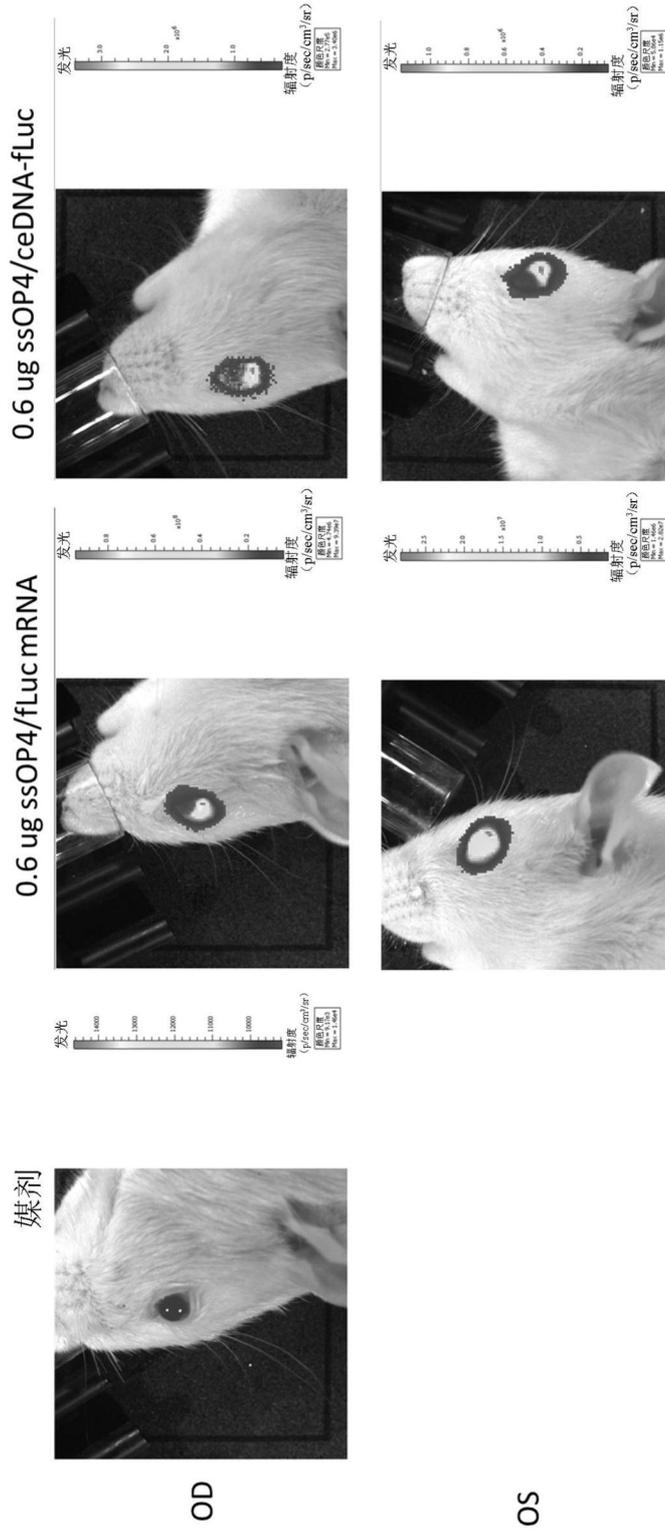


图25

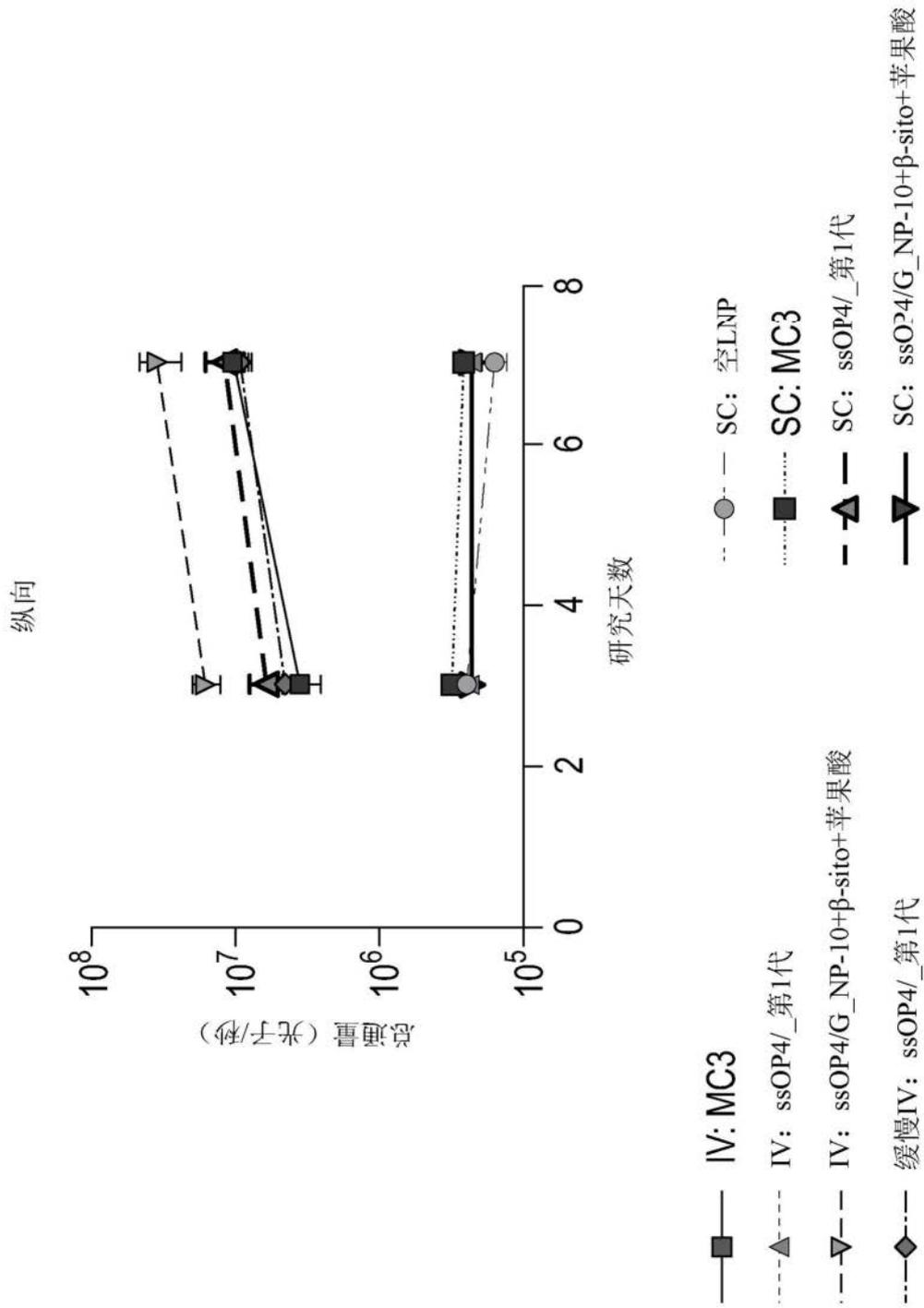


图26

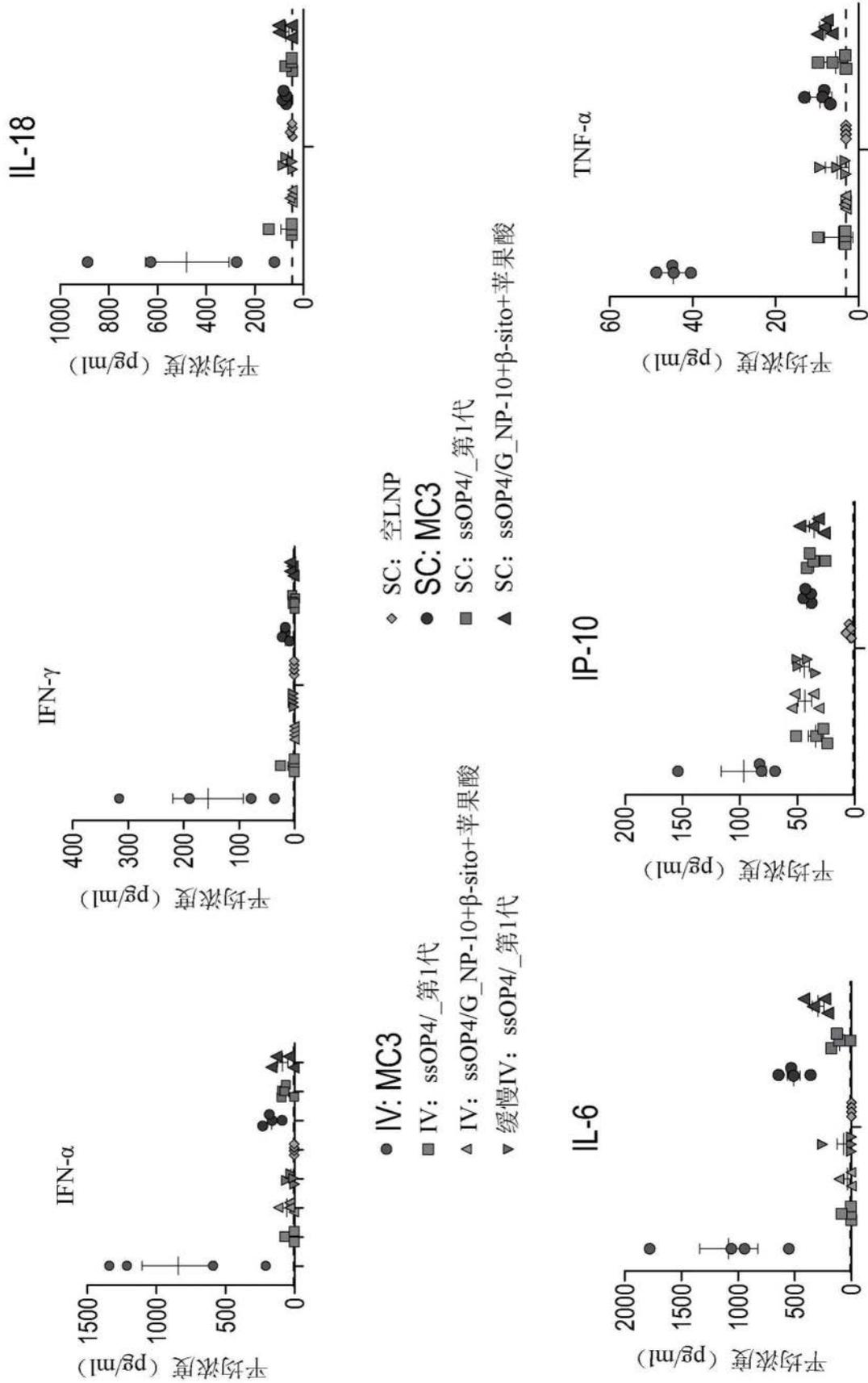


图27