(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119095954 A
(43)申请公布日 2024.12.06

(21)申请号 202380027953.4

(22)申请日 2023.03.14

(30)优先权数据
63/319,725 2022.03.14 US
63/335,542 2022.04.27 US
63/392,814 2022.07.27 US
63/482,294 2023.01.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.14

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/064351 2023.03.14

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/178115 EN 2023.09.21

(71)申请人 宏基因组学公司
地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 布莱恩·C·托马斯
亚伦·布鲁克斯
克利斯多佛·布朗
克里斯蒂娜·诺埃尔·布特弗尔德
丹妮拉·S·A·戈尔茨曼 林俊良
伊莎贝尔·诺塞达尔
莫拉伊玛·M·特莫彻-迪亚兹

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 王玮玮 郑霞

(51)Int.Cl.
C12N 9/00(2006.01)

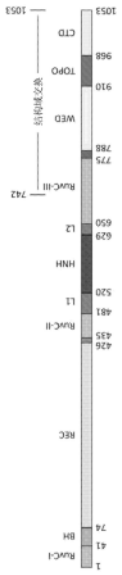
权利要求书10页 说明书186页
序列表（电子公布） 附图62页

(54)发明名称

工程化和嵌合核酸酶

(57)摘要

本文公开了工程化核酸酶和核酸酶系统,所述工程化核酸酶和核酸酶系统包含嵌合核酸酶和嵌合核酸酶系统。本文所公开的工程化和嵌合核酸酶包含核酸引导的核酸酶。本文另外公开了产生工程化核酸酶的方法以及使用所述工程化核酸酶的方法。



CN 119095954 A

1.一种工程化核酸内切酶,其包括:

a)N末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)C末端部分,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少80%序列同一性的序列。

2.根据权利要求1所述的工程化核酸内切酶,其中所述N末端部分和所述C末端部分彼此直接融合。

3.根据权利要求1所述的工程化核酸内切酶,其中所述N末端部分和所述C末端部分通过接头接合。

4.根据权利要求3所述的工程化核酸内切酶,其中所述接头是富含甘氨酸和/或丝氨酸的接头、大蛋白质结构域、长螺旋结构或短螺旋结构。

5.根据权利要求3至4中任一项所述的工程化核酸内切酶,其中所述接头是(GGGGS)n,并且其中n是1至20的整数。

6.根据权利要求3至4中任一项所述的工程化核酸内切酶,其中所述接头是GGGGS(SEQ ID NO:2864)。

7.根据权利要求1至6中任一项所述的工程化核酸内切酶,其中所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少90%序列同一性的序列。

8.根据权利要求1至6中任一项所述的工程化核酸内切酶,其中所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有100%序列同一性的序列。

9.根据权利要求1至8中任一项所述的工程化核酸内切酶,其中所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

10.根据权利要求1至8中任一项所述的工程化核酸内切酶,其中所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有100%序列同一性的序列。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的工程化核酸内切酶,其中所述工程化核酸内切酶被配置成与PAM结合,所述PAM包括SEQ ID NO:60-66、117、865-919和2855-2863中的任一者。

12.一种工程化核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列。

13.根据权利要求12所述的工程化核酸内切酶,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

14.根据权利要求12所述的工程化核酸内切酶,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有100%序列同一性的序列。

15.一种工程化核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性的序列。

16.根据权利要求15所述的工程化核酸内切酶,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10具有至少90%序列同一性的序列。

17.根据权利要求15所述的工程化核酸内切酶,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10具有100%序列同一性的序列。

18.一种工程化核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少80%序列同一性的序列。

19.根据权利要求18所述的工程化核酸内切酶,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

20.根据权利要求18所述的工程化核酸内切酶,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有100%序列同一性的序列。

21.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且与靶核酸序列杂交。

22.根据权利要求21所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

23.根据权利要求21所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有100%序列同一性的序列。

24.根据权利要求21至23中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸是单向导核酸。

25.根据权利要求21至23中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸是双向导核酸。

26.根据权利要求21至23中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸是RNA。

27.根据权利要求21至26中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸非共价地结合。

28.根据权利要求21至26中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸共价地连接。

29.根据权利要求21至26中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸融合。

30.根据权利要求21至29中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:28-45、605-610、646-695、863和1789-1826中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

31.根据权利要求21至29中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:28-45、605-610、646-695、863和1789-1826中的任一者具有100%序列同一性的序列。

32.根据权利要求21至31中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化核酸内切酶被配置成与PAM结合,所述PAM包括SEQ ID NO:60-66、865-919和2863中的任一者。

33.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且与靶核酸序列杂交。

34.根据权利要求33所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ

ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

35.根据权利要求33所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有100％序列同一性的序列。

36.根据权利要求33至35中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸是单向导核酸。

37.根据权利要求33至35中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸是双向导核酸。

38.根据权利要求33至35中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸是RNA。

39.根据权利要求33至38中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸非共价地结合。

40.根据权利要求33至38中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸共价地连接。

41.根据权利要求33至38中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸融合。

42.根据权利要求33至41中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:111-113中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

43.根据权利要求33至41中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:111-113中的任一者具有100％序列同一性的序列。

44.根据权利要求33至43中任一项所述的工程化核酸酶系统,其中所述工程化核酸内切酶被配置成与PAM结合,所述PAM包括SEQ ID NO:117和2855-2862中的任一者。

45.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

46.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

47.根据权利要求46所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

48.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

49.根据权利要求48所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

50.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

51.根据权利要求50所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

52.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

53.根据权利要求52所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

54.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

55.根据权利要求54所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

56.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的

任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

57.根据权利要求56所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

58.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

59.根据权利要求58所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

60.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

61.根据权利要求60所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

62.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

63.根据权利要求62所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

64.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内

含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

65.根据权利要求64所述的工程化核酸酶系统,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

66.一种工程化核酸酶系统,其包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

67.一种用于修饰靶核酸序列的方法,所述方法包括使用根据权利要求1至32中任一项所述的核酸内切酶或根据权利要求33至66中任一项所述的工程化核酸酶系统接触所述靶核酸序列。

68.根据权利要求67所述的方法,其中修饰所述靶核酸序列包括与所述靶核酸序列结合、切刻所述靶核酸序列或切割所述靶核酸序列。

69.根据权利要求67至68中任一项所述的方法,其中所述靶核酸序列包括基因组DNA、病毒DNA、病毒RNA或细菌DNA。

70.根据权利要求67至69中任一项所述的方法,其中所述修饰是体外的。

71.根据权利要求67至69中任一项所述的方法,其中所述修饰是体内的。

72.根据权利要求67至69中任一项所述的方法,其中所述修饰是离体的。

73.根据权利要求67至72中任一项所述的方法,其中gRNA由具有SEQ ID NO:251-260、271-274和279-290中的任一者的序列编码。

74.根据权利要求67至72中任一项所述的方法,其中所述靶核酸序列包括具有SEQ ID NO:261-270、275-278和291-302中的任一者的序列。

75.一种修饰哺乳动物细胞中的靶核酸序列的方法,所述方法包括使用根据权利要求1至32中任一项所述的核酸内切酶或根据权利要求33至66中任一项所述的工程化核酸酶系统接触所述哺乳动物细胞。

76.根据权利要求75所述的方法,其进一步包括选择包括所述修饰的细胞。

77.一种修饰白蛋白基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述白蛋白基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

78.一种修饰TRAC基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述TRAC基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

79.根据权利要求78所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

80.一种修饰B2M基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述B2M基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

81.根据权利要求80所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

82.一种修饰TRBC1基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述TRBC1基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

83.根据权利要求82所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

84.一种修饰TRBC2基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述TRBC2基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:

293-337中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

85.根据权利要求84所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

86.一种修饰ANGPTL3基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述ANGPTL3基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

87.根据权利要求86所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

88.一种修饰PCSK9基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述PCSK9基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

89.根据权利要求88所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

90.一种修饰VCP基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述VCP基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

91.根据权利要求90所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

92.一种修饰AAVS1基因座的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述AAVS1基因座,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复

合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

93.根据权利要求92所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

94.一种修饰GPR146基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述GPR146基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

95.根据权利要求94所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

96.一种修饰APOA1基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述APOA1基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

97.根据权利要求96所述的方法,其中所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

98.一种修饰TRAC基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述TRAC基因,所述工程化核酸酶系统包括:

a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及

b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

99.一种细胞,其包括根据权利要求1至32中任一项所述的核酸内切酶或根据权利要求33至66中任一项所述的工程化核酸酶系统。

100.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是真核细胞。

101.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

102.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是永生化细胞。

103.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是昆虫细胞。

104.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是酵母细胞。

105.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是植物细胞。

106.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是真菌细胞。

107.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是原核细胞。

108.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是A549、HEK-293、HEK-293T、BHK、CHO、HeLa、MRC5、Sf9、Cos-1、Cos-7、Vero、BSC 1、BSC 40、BMT 10、WI38、HeLa、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、HepG2、Huh7、K562、原代细胞或其衍生物。

109.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是工程化细胞。

110.根据权利要求99所述的细胞,其中所述细胞是稳定细胞。

工程化和嵌合核酸酶

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 本申请要求2022年3月14日提交的美国临时专利申请第63/319,725号、2022年4月27日提交的美国临时专利申请第63/335,542号、2022年7月27日提交的美国临时专利申请第63/392,814号和2023年1月30日提交的美国临时专利申请第63/482,294号的权益和优先权,所述美国临时专利申请中的每一个通过引用整体并入本文。

技术领域

[0003] Cas酶以及其相关的成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)向导核糖核酸(RNA)似乎是原核免疫系统的普遍(约45%的细菌,约84%的古细菌)组分,用于通过CRISPR-RNA向导的核酸切割来保护此类微生物免受非自身核酸的侵害,如传染性病毒和质粒。虽然编码CRISPR RNA元件的脱氧核糖核酸(DNA)元件在结构和长度上可能相对保守,但其CRISPR相关(Cas)蛋白是高度多样化的,含有多种核酸相互作用结构域。虽然早在1987年就观察到CRISPR DNA元件,但CRISPR/Cas复合物的可编程核酸内切酶切割能力直到最近才被认识到,从而引起重组CRISPR/Cas系统在各种DNA操纵和基因编辑应用中的使用。

[0004] 序列表

[0005] 本申请含有已经以XML格式电子提交的序列表,并且特此通过引用以其整体并入。创建于2023年3月14日的所述XML副本命名为MTG-010WO_SL.xml并且大小为4,575,581字节。

发明内容

[0006] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的VCP基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)2类II型Cas核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述VCP基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:739-754或763-770具有至少80%同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:723-738或755-762中的任一者具有至少80%同一性的序列。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55%同一性的融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863的非简并核苷酸至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA和与SEQ ID NO:743-745、749-752、754或769中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列互补或包括所述序列。在一些

实施例中,所述工程化向导RNA包括来自表22B的向导RNA中的任一者的核苷酸序列,所述核苷酸序列包括表22B中所述的化学修饰。

[0007] 在一些情况下,本公开提供了一种融合核酸内切酶,其包括:(a)N末端序列,所述N末端序列包括与SEQ ID NO:696或其变体具有至少55%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的核酸内切酶的RuvC-I结构域、REC结构域、RuvC-II结构域、HNH结构域或RuvC-III结构域的至少一部分;以及(b)C末端序列,所述C末端序列包括与MG3-1、MG3-2、MG3-3、MG3-4、MG3-5、MG3-6、MG3-7、MG3-8、MG3-18、MG3-22、MG3-24、MG3-30、MG3-42、MG3-78、MG3-89、MG3-90、MG3-91、MG3-92、MG3-93、MG3-94、MG3-95、MG3-96、MG3-101、MG3-103、MG3-104、MG150-1、MG150-2、MG150-3、MG150-4、MG150-5、MG150-6、MG150-7、MG150-8、MG150-9、MG150-10、MG15-1、MG15-54、MG15-66、MG15-94、MG15-115、MG15-135、MG15-146、MG15-164、MG15-166、MG15-171、MG15-172、MG15-174、MG15-177、MG15-184、MG15-187、MG15-191、MG15-193、MG15-195、MG15-217、MG15-218或MG15-219或其变体具有至少55%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的核酸内切酶的WED或PI结构域,其中所述N末端序列和所述C末端序列未天然地一起出现在同一阅读框中。在一些实施例中,所述N末端序列和所述C末端序列源自不同的生物体。在一些实施例中,所述融合核酸内切酶包括与SEQ ID NO:771-862中的任一者或其变体具有至少55%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述融合核酸内切酶被配置成对不是nnRGGnT的PAM具有选择性。在一些实施例中,所述融合核酸内切酶被配置成对包括SEQ ID NO:865-919中的任一者的PAM具有选择性。在一些实施例中,所述融合核酸内切酶包括WED结构域和PI结构域,所述WED结构域来自与MG3-8具有至少55%序列同一性的核酸内切酶,所述PI结构域来自与MG3-1、MG3-2、MG3-3、MG3-4、MG3-5、MG3-6、MG3-7、MG3-8、MG3-18、MG3-22、MG3-24、MG3-30、MG3-42、MG3-78、MG3-89、MG3-90、MG3-91、MG3-92、MG3-93、MG3-94、MG3-95、MG3-96、MG3-101、MG3-103、MG3-104、MG150-1、MG150-2、MG150-3、MG150-4、MG150-5、MG150-6、MG150-7、MG150-8、MG150-9、MG150-10、MG15-1、MG15-54、MG15-66、MG15-94、MG15-115、MG15-135、MG15-146、MG15-164、MG15-166、MG15-171、MG15-172、MG15-174、MG15-177、MG15-184、MG15-187、MG15-191、MG15-193、MG15-195、MG15-217、MG15-218或MG15-219中的至少一者或其变体具有至少55%序列同一性的核酸内切酶。

[0008] 在一些方面,本公开提供了一种核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:771-862中的任一者或其变体具有至少55%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的工程化氨基酸序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:809-823、827、829-830、832、834或838-839中的任一者具有至少55%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少

84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的工程化氨基酸序列。

[0009] 在一些方面,本公开提供了一种工程化核酸酶系统,其包括:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导核糖核酸结构,所述工程化向导核糖核酸结构被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,所述工程化向导核糖核酸结构包括:向导核糖核酸,所述向导核糖核酸被配置成与靶脱氧核糖核酸序列杂交;其中所述向导核糖核酸序列被配置成与所述核酸内切酶结合。在一些实施例中,所述向导核糖核酸进一步包括被配置成与所述核酸内切酶结合的tracr核糖核酸序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶源自未经培养的微生物。在一些实施例中,所述核酸内切酶不是Cas9核酸内切酶、Cas14核酸内切酶、Cas12a核酸内切酶、Cas12b核酸内切酶、Cas 12c核酸内切酶、Cas12d核酸内切酶、Cas12e核酸内切酶、Cas13a核酸内切酶、Cas13b核酸内切酶、Cas13c核酸内切酶或Cas13d核酸内切酶。在一些实施例中,所述核酸内切酶与SpyCas9核酸内切酶具有小于86%同一性。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:771-862中的任一者或其变体具有至少55%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述向导核糖核酸序列包括与SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。

[0010] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的TRAC基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)2类II型Cas核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述TRAC基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:925-927、992-1011、1184-1279或1321-1361具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:922-924、972-991、1088-1183或1280-1320中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶或包括与SEQ ID NO:771具有至少至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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％或至少99％序列同一性的序列。

[0011] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的AAVS1基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)2类II型Cas核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述AAVS1基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:950-971或1050-1087具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:928-949或1012-1049中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶或包括与SEQ ID NO:771具有至少至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863的非简并核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。

[0012] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的PCSK9基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)2类II型Cas核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述PCSK9基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:1377-1391具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:1362-1376中的任一者具有至少80％同一性的序列。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括融合核酸内切酶,所述融合核酸内切酶与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863的非简并核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。

[0013] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的ANGPTL3基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)2类II型Cas核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程

化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述ANGPTL3基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:1490-1587具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:1392-1489中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括融合核酸内切酶,所述融合核酸内切酶与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。

[0014] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的GPR146基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)2类II型Cas核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述GPR146基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:1657-1725具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。

[0015] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的APOA1基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)2类II型Cas核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述APOA1基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:1745-1763或1775-1785具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少

85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:1726-1744或1764-1774中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。

[0016] 在一些方面,本公开提供了一种脂质纳米颗粒,其包括:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;(b)本文所描述的工程化向导RNA中的任何工程化向导RNA:(c)阳离子脂质;(d)固醇;(e)中性脂质;以及(f)经PEG修饰的脂质。在一些实施例中,所述阳离子脂质包括C12-200,所述固醇包括胆固醇,所述中性脂质包括DOPE,或所述经PEG修饰的脂质包括DMG-PEG2000。在一些实施例中,所述阳离子脂质包括图45所描绘的阳离子脂质中的任何阳离子脂质。

[0017] 在一些方面,本公开提供了一种融合核酸内切酶,其包括:(a)N末端序列,所述N末端序列包括与SEQ ID NO:696或其变体具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的核酸内切酶的RuvC结构域、REC结构域或HNH结构域的至少一部分;以及(b)C末端序列,所述C末端序列包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者或其变体具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的核酸内切酶的WED、TOPO或CTD结构域,其中所述N末端序列和所述C末端序列未天然地一起出现在同一阅读框中。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类V型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述N末端序列和所述C末端序列源自不同的生物体。在一些实施例中,所述N末端序列进一步包括RuvC-I、BH和RuvC-II结构域。在一些实施例中,所述C末端序列进一步包括PAM相互作用结构域。在一些实施例中,所述融合核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27或108中的任一者具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述融合核酸内切酶被配置成与不是nnRGGnT的PAM结合。

[0018] 在一些方面,本公开提供了一种核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:1-27或108中的任一者或其变体具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少

81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的工程化氨基酸序列。

[0019] 在一些方面,本公开提供了一种核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:109-110中的任一者或其变体具有至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的工程化氨基酸序列。

[0020] 在一些方面,本公开提供了一种核酸,其包括编码本文所描述的核酸内切酶、融合核酸内切酶或Cas酶中的任何一种的序列。在一些方面,所述序列被密码子优化以在宿主细胞中表达。在一些实施例中,所述宿主细胞是原核、真核、哺乳动物或人的。

[0021] 在一些方面,本公开提供了一种载体,所述载体包括本文所描述的核酸序列中的任何核酸序列。

[0022] 在一些方面,本公开提供了一种宿主细胞,其包括本文所描述的载体、系统或核酸中的任何一种。在一些实施例中,所述宿主细胞是原核、真核、哺乳动物或人的。

[0023] 在一些方面,本公开提供了一种工程化核酸酶系统,其包括:(a)本文所描述的核酸酶、Cas酶或融合核酸内切酶中的任一种;以及(b)工程化向导核糖核酸结构,所述工程化向导核糖核酸结构被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,所述工程化向导核糖核酸结构包括:向导核糖核酸,所述向导核糖核酸被配置成与靶脱氧核糖核酸序列杂交;其中所述向导核糖核酸序列被配置成与所述核酸内切酶结合。在一些实施例中,所述向导核糖核酸进一步包括被配置成与所述核酸内切酶结合的tracr核糖核酸序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶源自未经培养的微生物。在一些实施例中,所述核酸内切酶不是Cas9核酸内切酶、Cas14核酸内切酶、Cas12a核酸内切酶、Cas12b核酸内切酶、Cas 12c核酸内切酶、Cas12d核酸内切酶、Cas12e核酸内切酶、Cas13a核酸内切酶、Cas13b核酸内切酶、Cas13c核酸内切酶或Cas13d核酸内切酶。在一些实施例中,所述核酸内切酶与SpyCas9核酸内切酶具有小于86％同一性。在一些实施例中,所述系统进一步包括Mg^{2+}的来源。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:8-12、26-27或108中的任一者或其变体具有至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述向导核糖核酸序列包括与SEQ ID NO:33、34、44、45、78、84或87中的任一者的非简并核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。

[0024] 在一些方面,本公开提供了一种工程化核酸酶,其包括:(a)2类II型Cas酶RuvC或HNH结构域,其与SEQ ID NO:1-27、108或109-110中的任一者或其变体的RuvC或HNH结构域具有至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％

序列同一性;以及(b)2类II型Cas酶PAM相互作用(PI)结构域,其与SEQ ID NO:1-27、108或109-110中的任一者或其变体的PAM相互作用(PI)结构域具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性。在一些实施例中,(a)和(b)并非天然地一起存在。在一些实施例中,所述2类II型Cas酶源自未经培养的微生物。在一些实施例中,所述核酸内切酶与SpyCas9核酸内切酶具有小于86%同一性。在一些实施例中,所述工程化核酸酶包括与SEQ ID NO:1-27中的任一者或其变体具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。

[0025] 在一些方面,本公开提供了一种工程化核酸酶系统,其包括:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导核糖核酸结构,所述工程化向导核糖核酸结构被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,所述工程化向导核糖核酸结构包括:向导核糖核酸序列,所述向导核糖核酸序列被配置成与靶脱氧核糖核酸序列杂交并且被配置成与所述核酸内切酶结合。在一些实施例中,所述向导核糖核酸进一步包括被配置成与所述核酸内切酶结合的tracr核糖核酸序列。在一些实施例中,所述向导核糖核酸序列包括与SEQ ID NO:28-32或33-44中的任一者或其变体的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述系统进一步包括邻近所述靶核酸位点的与所述核酸酶相容的PAM序列。在一些实施例中,所述PAM序列位于所述靶脱氧核糖核酸序列的3'。在一些实施例中,所述PAM序列位于所述靶脱氧核糖核酸序列的5'。

[0026] 在一些方面,本公开提供了一种靶向白蛋白基因的方法,所述方法包括将本文所描述的系统中的任何系统引入细胞,其中所述向导核糖核酸序列被配置成和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列杂交。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0027] 在一些方面,本公开提供了一种靶向HAO1基因或基因座的方法,所述方法包括将本文所描述的系统中的任何系统引入细胞,其中所述向导核糖核酸序列被配置成和与SEQ ID NO:611-633中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列杂交。在

一些实施例中,所述向导核糖核酸序列被配置成和与SEQ ID NO:615、618、620、624或626中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列杂交。在一些实施例中,所述向导核糖核酸包括与SEQ ID NO:605-610或1789-1865中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述向导核糖核酸包括与SEQ ID NO:1812-1824、1835、1849、1858或1861中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列,或与SEQ ID NO:1812-1824、1835、1849、1858或1861中的任一者的靶向序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0028] 在一些实施例中,本公开提供了一种破坏细胞中的HAO-1基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述HAO-1基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:611-633具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:618、620、624或626中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、

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％或至少99％序列同一性的序列,或与SEQ ID NO:618、620、624或626中的任一者的靶向序列具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括来自表9A-9E、表12、表18、表20或表23的向导RNA中的任一者的核苷酸序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括来自表9A-9E的向导RNA中的任一者的核苷酸序列,所述核苷酸序列包括表9A-9E中所述的化学修饰。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括来自表12的向导RNA中的任一者的核苷酸序列,所述核苷酸序列包括表12中所述的化学修饰。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括来自表18的向导RNA中的任一者的核苷酸序列,所述核苷酸序列包括表18中所述的化学修饰。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括来自表20的向导RNA中的任一者的核苷酸序列,所述核苷酸序列包括表20中所述的化学修饰。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括来自表23的向导RNA中的任一者的核苷酸序列,所述核苷酸序列包括表23中所述的化学修饰。在一些实施例中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0029] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的TRAC基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述TRAC基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:139-158具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:119-138中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶中的任何融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55％同一性的融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722的非简并核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ

ID NO:121、132、136、130、134、135或137中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列,或与SEQ ID NO:121、132、136、130、134、135或137中的任一者的靶向序列具有至少80％同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括表9A的向导RNA中的任一者的核苷酸序列。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0030] 在一些实施例中,本公开提供了一种破坏细胞中的B2M基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述B2M基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:185-210具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶中的任何融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括融合核酸内切酶,所述融合核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722的非简并核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:159、165、168、174或184中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列,或与SEQ ID NO:159、165、168、174或184中的任一者的靶向序列具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括表9B的向导RNA中的任一者的核苷酸序列。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0031] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的TRBC1基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述TRBC1基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:252-292具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶中的任何融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括融合核酸内切酶,所述融合核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722的非简并核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:211、212、215、241或242中的任一者具有至少80％同一性的序列,或包括与SEQ ID NO:211、212、215、241或242中的任一者的靶向序列具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的靶向序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括表9C的向导RNA中的任一者的核苷酸序列。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0032] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的TRBC2基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述TRBC2基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:338-382具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶本文所描述的融合核酸内切酶中的任何融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括融合核酸内切酶,所述融合核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:296、306或332中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列,或包括与SEQ ID NO:296、306或332中的任一者的靶向序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的靶向序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括表9C的向导RNA中的任一者的核苷酸序列。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0033] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的ANGPTL3基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述ANGPTL3基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导

RNA被配置成和与SEQ ID NO:478-572具有80%同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:383-477中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶中的任何融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括融合核酸内切酶,所述融合核酸内切酶与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722的非简并核苷酸具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:419、425、431、439、447、453、461、467、471或473中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列,或与SEQ ID NO:419、425、431、439、447、453、461、467、471或473中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括表9D的向导RNA中的任一者的核苷酸序列。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0034] 在一些方面,本公开提供了一种破坏细胞中的PCSK9基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述PCSK9基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA被配置成和与SEQ ID NO:588-602具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%同一性的靶向序列杂交或包括所述靶向序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:573-587中的任一者具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合核酸内切酶中的任何融合核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括融合核酸内切酶,所述融合核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722的非简并核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导包括与SEQ ID NO:574、578、581或585中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括表9E的向导RNA中的任一者的核苷酸序列。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0035] 在一些实施例中,本公开提供了一种破坏细胞中的白蛋白基因座的方法,所述方法包括向所述细胞中引入:(a)本文所描述的核酸内切酶中的任何核酸内切酶;以及(b)工程化向导RNA,其中所述工程化向导RNA被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,并且所述工程化向导RNA包括被配置成与所述白蛋白基因座的区杂交的靶向序列,其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:67-86或646-695中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列;或其中所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:67-86或646-695中的任一者的靶向序列具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的靶向序列。在一些实施例中,所述核酸内切酶是2类II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述核酸内切酶包括本文所描述的融合或工程化核酸内切酶中的任一种。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括本文所描述的II型Cas核酸内切酶中的任何II型Cas核酸内切酶。在一些实施例中,所述2类II型Cas核酸内切酶包括融合核酸内切酶,所述融合核酸内切酶与SEQ ID NO:10或其变体具有至少55％、至少60％、至少65％、至少70％、至少75％、至少80％、至

少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括与SEQ ID NO:722的非简并核苷酸具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA和与SEQ ID NO:67、68、70、71、72、76、79、80、647、648、649、653、654、655、656、673、680、681或682中的任一者具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％同一性的序列互补或包括所述序列。在一些实施例中,所述工程化向导RNA包括表6的向导RNA中的任一者的核苷酸序列。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与编码所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核酸或载体接触,或包括使所述细胞与包括所述载体或核酸的脂质纳米颗粒(LNP)接触。在一些实施例中,向所述细胞引入进一步包括使所述细胞与包括所述融合蛋白或所述向导多核苷酸的核糖核蛋白复合物(RNP)接触,或包括使所述细胞与包括所述RNP的脂质纳米颗粒(LNP)接触。

[0036] 在一些方面,本公开提供了一种核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:1-27、108或109-110中的任一者或其变体具有至少55％序列同一性的工程化氨基酸序列。

[0037] 在一些方面,本公开提供了一种工程化核酸酶系统,其包括本文所描述的核酸内切酶以及工程化向导核糖核酸结构,所述工程化向导核糖核酸结构被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,所述工程化向导核糖核酸结构包括:向导核糖核酸序列,所述向导核糖核酸序列被配置成与靶脱氧核糖核酸序列杂交;以及tracr核糖核酸序列,所述tracr核糖核酸序列被配置成与所述核酸内切酶结合。在一些实施例中,所述核酸内切酶源自未经培养的微生物。在一些实施例中,所述核酸内切酶不是Cas9核酸内切酶、Cas14核酸内切酶、Cas12a核酸内切酶、Cas12b核酸内切酶、Cas 12c核酸内切酶、Cas12d核酸内切酶、Cas12e核酸内切酶、Cas13a核酸内切酶、Cas13b核酸内切酶、Cas13c核酸内切酶或Cas13d核酸内切酶。在一些实施例中,所述核酸内切酶与SpyCas9核酸内切酶具有小于86％同一性。在一些实施例中,所述系统进一步包括MG^{2+}的来源。

[0038] 在一些方面,本公开提供了一种工程化核酸酶,其包括:(a)2类II型Cas酶RuvC和HNH结构域,其与SEQ ID NO:1-27、108或109-110中的任一者的RuvC和HNH结构域具有至少55％序列同一性;以及(b)2类II型Cas酶PAM相互作用(PI)结构域,其与SEQ ID NO:1-27、108或109-110中的任一者的PAM相互作用(PI)结构域具有至少55％序列同一性。在一些实施例中,(a)和(b)并非天然地一起存在。在一些实施例中,所述2类II型Cas酶源自未经培养的微生物。在一些实施例中,所述核酸内切酶与SpyCas9核酸内切酶具有小于86％同一性。在一些实施例中,所述工程化核酸酶包括与SEQ ID NO:1-27中的任一者具有至少55％序列同一性的序列。

[0039] 在一些方面,本公开提供了一种工程化核酸酶系统,其包括:根据本文所描述的方面或实施例中的任何一个的核酸内切酶;以及工程化向导核糖核酸结构,所述工程化向导核糖核酸结构被配置成与所述核酸内切酶形成复合物,所述工程化向导核糖核酸结构包

括:向导核糖核酸序列,所述向导核糖核酸序列被配置成与靶脱氧核糖核酸序列杂交;以及tracr核糖核酸序列,所述tracr核糖核酸序列被配置成与所述核酸内切酶结合。在一些实施例中,所述向导核糖核酸序列包括与SEQ ID NO:28-32或33-44中的任一者或其变体的非简并核苷酸具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述系统进一步包括邻近所述靶核酸位点的与所述核酸酶相容的PAM序列。在一些实施例中,所述PAM序列位于所述靶脱氧核糖核酸序列的3'。

[0040] 在一些实施例中,本公开提供了一种工程化单分子异源性向导多核苷酸,其与根据本文所描述的方面或实施例中的任何一个的2类II型酶相容,其中所述异源性向导多核苷酸包括根据SEQ ID NO:605-610或1789-1865中的任何一个的化学修饰。

[0041] 在一些方面,本公开提供了一种靶向白蛋白基因的方法,所述方法包括将根据本文所描述的方面或实施例中的任何一个的系统引入细胞,其中所述向导核糖核酸序列被配置成与包括SEQ ID NO:67-86中的任何一个的序列杂交。

[0042] 在一些方面,本公开提供了一种靶向HAO1基因的方法,所述方法包括将根据本文所描述的方面或实施例中的任何一个的系统引入细胞,其中所述向导核糖核酸序列被配置成与SEQ ID NO:611-633中的任一者杂交。在一些实施例中,所述向导核糖核酸序列被配置成与SEQ ID NO:615、618、620、624或626中的任一者杂交。在一些实施例中,所述向导核糖核酸包括根据SEQ ID NO:605-610或1789-1865中的任一者的序列。在一些实施例中,所述向导核糖核酸包括根据SEQ ID NO:1812-1824、1835、1849、1858或1861中的任一者的序列。

[0043] 在一些方面,本公开提供了细胞,其包括本文所描述的核酸内切酶。在一些方面,本公开提供了细胞,其包括本文所描述的任何核酸分子。在一些方面,本公开提供了细胞,其包括本文所描述的工程化核酸酶系统。

[0044] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸内切酶,其包括:a)N末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少80%序列同一性的序列;以及b)C末端部分,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述N末端部分和所述C末端部分彼此直接融合。在一些实施例中,所述N末端部分和所述C末端部分通过接头接合。在一些实施例中,所述接头是富含甘氨酸和/或丝氨酸的接头、大蛋白质结构域、长螺旋结构或短螺旋结构。在一些实施例中,所述接头是(GGGGS)n,并且其中n是1至20的整数。在一些实施例中,所述接头是GGGGS(SEQ ID NO:2864)。在一些实施例中,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有100%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有100%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶被配置成与PAM结合,所述PAM包括SEQ ID NO:60-66、117、865-919和2855-2863中的任一者。

[0045] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有100%序列同一性的序列。

[0046] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:10具有100%序列同一性的序列。

[0047] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸内切酶,其包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少80%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有100%序列同一性的序列。

[0048] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且与靶核酸序列杂交。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有100%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是单向导核酸。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是双向导核酸。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是RNA。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸非共价地结合。在一些实施例中,所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸共价地连接。在一些实施例中,所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸融合。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:28-45、605-610、646-695、863和1789-1826中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:28-45、605-610、646-695、863和1789-1826中的任一者具有100%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶被配置成与PAM结合,所述PAM包括SEQ ID NO:60-66、865-919和2863中的任一者。

[0049] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且与靶核酸序列杂交。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有100%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是单向导核酸。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是双向导核酸。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是RNA。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸非共价地结合。在一些实施例中,所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸共价地连接。在一些实施例中,所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸融合。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:111-113中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:111-113中的任一者具有100%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶被配置成与PAM结合,所

述PAM包括SEQ ID NO:117和2855-2862中的任一者。

[0050] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0051] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0052] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0053] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0054] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0055] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同

一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0056] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0057] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0058] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0059] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0060] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同

一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0061] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0062] 在某些实施例中,本文描述了用于修饰靶核酸序列的方法,所述方法包括使用本文所描述的核酸内切酶或本文所描述的工程化核酸酶系统接触所述靶核酸序列。在一些实施例中,所述修饰所述靶核酸序列包括与所述靶核酸序列结合、切刻所述靶核酸序列或切割所述靶核酸序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括基因组DNA、病毒DNA、病毒RNA或细菌DNA。在一些实施例中,所述修饰是体外的。在一些实施例中,所述修饰是体内的。在一些实施例中,所述修饰是离体的。在一些实施例中,gRNA由具有SEQ ID NO:251-260、271-274和279-290中的任一者的序列编码。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括具有SEQ ID NO:261-270、275-278和291-302中的任一者的序列。

[0063] 在某些实施例中,本文描述了修饰哺乳动物细胞中的靶核酸序列的方法,所述方法包括使用本文所描述的核酸内切酶或本文所描述的工程化核酸酶系统接触所述哺乳动物细胞。在一些实施例中,所述方法进一步包括选择包括所述修饰的细胞。

[0064] 在某些实施例中,本文描述了修饰白蛋白基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述白蛋白基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0065] 在某些实施例中,本文描述了修饰TRAC基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述TRAC基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具

有至少90％序列同一性的序列。

[0066] 在某些实施例中,本文描述了修饰B2M基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述B2M基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

[0067] 在某些实施例中,本文描述了修饰TRBC1基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述TRBC1基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

[0068] 在某些实施例中,本文描述了修饰TRBC2基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述TRBC2基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

[0069] 在某些实施例中,本文描述了修饰ANGPTL3基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述ANGPTL3基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

[0070] 在某些实施例中,本文描述了修饰PCSK9基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述PCSK9基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80％序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述PCSK9基因内或在内源

性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0071] 在某些实施例中,本文描述了修饰VCP基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述VCP基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0072] 在某些实施例中,本文描述了修饰AAVS1基因座的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述AAVS1基因座,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0073] 在某些实施例中,本文描述了修饰GPR146基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述GPR146基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0074] 在某些实施例中,本文描述了修饰APOA1基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述APOA1基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在所述APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0075] 在某些实施例中,本文描述了修饰TRAC基因的方法,所述方法包括使用工程化核酸酶系统接触所述TRAC基因,所述工程化核酸酶系统包括:a)工程化核酸内切酶,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少80%序列同一性的序列;以及b)工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0076] 在某些实施例中,本文描述了包括本文所描述的核酸内切酶或本文所描述的工程化核酸酶系统的细胞。在一些实施例中,所述细胞是真核细胞。在一些实施例中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施例中,所述细胞是永生化细胞。在一些实施例中,所述细胞是昆虫细胞。在一些实施例中,所述细胞是酵母细胞。在一些实施例中,所述细胞是植物细胞。在一些实施例中,所述细胞是真菌细胞。在一些实施例中,所述细胞是原核细胞。在一些实施例中,所述细胞是A549、HEK-293、HEK-293T、BHK、CHO、HeLa、MRC5、Sf9、Cos-1、Cos-7、Vero、BSC 1、BSC 40、BMT 10、WI38、HeLa、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、HepG2、Huh7、K562、原代细胞或其衍生物。在一些实施例中,所述细胞是工程化细胞。在一些实施例中,所述细胞是稳定细胞。

[0077] 对于本领域技术人员而言,通过以下具体实施方式,本公开的另外的方面和优点将变得显而易见,其中仅示出和描述了本公开的说明性实施例。如将认识到,本公开能够具有其它并且不同的实施例,并且其若干细节能够在各种明显的方面进行修改,所有这些都不脱离本公开。因此,附图和说明书本质上被视为是说明性的而非限制性的。

附图说明

[0078] 本公开的新颖特征在所附权利要求中具体阐述。通过参考对说明性实施例进行阐述的以下详细说明,将获得对本公开的特征和优点的更好理解,在这些实施例中利用了本公开的原理,并且在附图(在本文也被称为“图(Figure/FIG.)”)中:

[0079] 图1A-1B描绘了本文所描述的各种效应子的天然PAM特异性。图1A示出了本文所描述的各种效应子的系统发育树。图1B是天然RNA引导的CRISPR相关核酸内切酶的PAM特异性表。

[0080] 图2展示了RNA引导的CRISPR相关核酸酶之间的结构域交换的概念。

[0081] 图3A和3B描绘了多个序列的比对,以引导最佳断点的确定。图3A示出了与本文所描述的若干种蛋白质比对的SaCas9和SpCas9,并且这些序列的末端保守残基(丙氨酸残基)被鉴定为交换区段的拟定C末端。图3B描绘了作为RuvC-III、WED、TOPO和CTD结构域的交换跨度的SaCas9蛋白的C末端结构域。PAM交互结构域由TOPO结构域和CTD结构域构成。交换的C末端结构域中未包含活性位点残基(RuvC结构域的D10、E477和H701以及NHN结构域的D556、D557和N580)。

[0082] 图4描绘了当将MG3-6与来自密切和远处相关的核酸酶的各种C末端结构域重组时,通过体外PAM富集测定筛选嵌合体。来自N末端亲本结构域的sgRNA用于RNA引导的核酸酶活性。

[0083] 图5A-5B描绘了本文所描述的功能性嵌合体的PAM序列(图5A)和PAM序列的Seq

Logo描绘(图5B)。考虑到RuvC-III、WED、TOPO和CTD的预测C末端结构域的断点交换,如果与密切相关的核酸酶重组,则嵌合体是功能性的。即使天然蛋白质在同一实验中不是功能性的,工程化嵌合体倾向于保留天然蛋白质的PAM相互作用结构域的PAM特异性。

[0084] 图6示出了在嵌合体将MG3-6与来自密切和远处相关的核酸酶的各种c末端结构域重组的情况下,通过体外PAM富集测定筛选嵌合体。来自C末端亲本结构域的sgRNA用于RNA引导的核酸酶活性。括号中的数字指示sgRNA物种。使用来自C末端亲本结构域的sgRNA没有援救活性。

[0085] 图7示出了MG3-6和MG15-1的预测结构。将MG3-6的WED和PI结构域与MG15-1对应物的结构域交换,以产生嵌合体1(C1)。可替代地,将MG3-6的PI结构域与MG15-1的对应物交换,以产生嵌合体2(C2)。

[0086] 图8A-8B描绘了针对PAM特异性的体外PAM富集测定和桑格测序(Sanger sequencing)结果。C1:MG3-6+MG15-1(WP)和C2:MG3-6+MG15-1(P)。工程化嵌合体倾向于保留天然蛋白质的PAM相互作用结构域的PAM特异性。一式三份地执行PAM富集测定。(图8A)示出了表明序列在存在活性酶的情况下被切割的测定的琼脂糖凝胶描述,并且(图8B)示出了通过所述测定确定的PAM序列的SeqLogo描述。

[0087] 图9A-9B描绘了本文所描述的嵌合体在哺乳动物细胞中的活性。编码嵌合体的mRNA与20种不同的sgRNA共转染(参见例如,SEQ ID NO:67-86)到Hepa 1-6细胞中。通过桑格测序和CRISPR编辑推断(ICE)来评估编辑。图9A示出了测试的向导的编辑效率。示出了两个生物重复。图9B示出了由代表性向导创建的indel曲线。

[0088] 图10描绘了Hepa1-6细胞中向导筛选的结果;使用lipofectamine Messenger Max将向导作为mRNA和gRNA递送。

[0089] 图11A描绘了MG3-6/3-4向导的结构部分。

[0090] 图11B描绘了MG3-6向导的结构部分。

[0091] 图12描绘了当使用lipofectamine Messenger Max作为mRNA和gRNA递送时,经化学修饰的MG3-6/3-4向导在Hepa1-6细胞中的活性。

[0092] 图13描绘了经化学修饰的MG3-6/3-4向导在37℃下在9小时内的稳定性。

[0093] 图14描绘了经化学修饰的MG3-6/3-4向导在37℃下在21小时内的稳定性。

[0094] 图15A-15B描绘了V-A型嵌合体的体外筛选。图15A描绘了每个裂解反应的扩增的裂解产物的琼脂糖凝胶。通过MG29-1+MG29-5嵌合体观察到正富集,来自同一家族的结构域交换(括号中的数字指示sgRNA物种)。图15B描绘了针对亲本酶和源自其的嵌合体的PAM的Seqlogo描述。

[0095] 图16描绘了HEK293T细胞中TRAC在DNA水平下的基因编辑结果。

[0096] 图17描绘了HEK293T细胞中B2M在DNA水平下的基因编辑结果。

[0097] 图18描绘了T细胞中TRAC在DNA和表型水平下的基因编辑结果。

[0098] 图19描绘了T细胞中B2M在DNA水平下的基因编辑结果。

[0099] 图20描绘了T细胞中TRBC1和TRBC2在表型水平下的基因编辑结果。

[0100] 图21描绘了Hep3B细胞中ANGPTL3在DNA水平下的基因编辑结果。

[0101] 图22描绘了Hep3B细胞中PCSK9在DNA水平下的基因编辑结果。

[0102] 图23描绘了通过下一代测序分析的野生型小鼠中的MG3-6/3-4在HAO-1基因座处

的基因组编辑。

[0103] 图24描绘了用MG3-6/3-4mRNA和靶向HAO-1基因的向导RNA处理的小鼠的肝脏中的乙醇酸氧化酶蛋白水平。

[0104] 图25描绘了用MG3-6/3-4mRNA和靶向HAO-1的具有4种不同化学修饰的向导RNA 7(G7)处理的野生型小鼠中的HAO-1基因座处的基因组编辑。

[0105] 图26描绘了用封装MG3-6/3-4mRNA和具有4种不同化学修饰的sgRNA 7(G7)的LNP处理后第11天小鼠肝脏中乙醇酸氧化酶(GO)/HAO-1蛋白水平的蛋白质印迹分析,如实例19中所描述的。个体小鼠用数字表示。

[0106] 图27描绘了当使用脂质转染作为mRNA和gRNA递送以靶向HAO-1时,经化学修饰的向导在Hep3B细胞中的活性,如在实例20中。

[0107] 图28描绘了当使用脂质转染作为mRNA和gRNA递送以靶向HAO-1时,经化学修饰的向导在原代人肝细胞中的活性,如实例21所描述的。

[0108] 图29描绘了哺乳动物细胞编辑的证明和两种MG3-6嵌合酶的PAM序列的测定,如在实例22中评估的。

[0109] 图30描绘了在LNP中体内递送后MG3-6/3-4向导化学物质对小鼠肝脏中的编辑活性的评估,如在实例23中。

[0110] 图31描绘了K562细胞中VCP在DNA水平上的基因编辑结果,如在实例24中。

[0111] 图32描绘了K562细胞中DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向TRAC和AAVS1。MG3-6_3-3RWP是与MG3-3交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0112] 图33描绘了K562细胞中DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向TRAC和AAVS1。MG3-6_3-7RWP是与MG3-7交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0113] 图34描绘了K562细胞中DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向TRAC。MG3-6_3-8RWP是与MG3-8交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0114] 图35描绘了K562细胞中DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向TRAC。MG3-6_3-8RWP是与MG3-8交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0115] 图36描绘了人Hep3B细胞中DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向PCSK9。MG3-6_3-4RWP是与MG3-4交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0116] 图37描绘了人Hep3B细胞中DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向ANGPTL3。MG3-6_3-4RWP是与MG3-4交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0117] 图38描绘了人Hep3B细胞DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向APOA1。MG3-6_3-8RWP是与MG3-8交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0118] 图39描绘了小鼠Hepa1-6细胞中DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向GPR146。MG3-6_3-7RWP是与MG3-7RWP交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0119] 图40描绘了小鼠Hepa1-6细胞中DNA水平的基因编辑结果。向导被设计成靶向APOA1。MG3-6_3-4RWP是与MG3-4交换MG3-6的部分RuvC III、WED和PID的嵌合体。

[0120] 图41描绘了MG3-6嵌合体的设计策略。图41的小图(a)(左上)描绘了MG3-6的预测结构域边界和与MG3和MG150成员重组的断点。图41的小图(b)(左下)描绘了MG3-6的预测3-D结构和蛋白质重组的断点。结构通过Novafold预测。图41的小图(c)(右)描绘了MG3和MG150成员的多序列比对(MSA)。断点用箭头指示。

[0121] 图42A-42B描绘了MG3-6嵌合体的筛选和PAM特异性的表征。图42A(左)描绘了评估酶活性的DNA琼脂糖凝胶电泳分析。图42B(右)描绘了功能性嵌合体的系统发育树和Seqlogo。

[0122] 图43描绘了MG3-6_3-8嵌合体的设计策略。图43的小图(a)(左上)描绘了MG3-6_3-8的预测结构域边界和与MG3和MG150成员重组的断点。图43的小图(b)(左下)描绘了MG3-6的预测3-D结构和蛋白质重组的断点。结构通过Novafold预测。图43的小图(c)(中)描绘了MG3和MG150成员的多序列比对(MSA)。图43的小图(d)(右)描绘了MG15成员的多序列比对(MSA)。断点用箭头指示。

[0123] 图44A-44B描绘了MG3-6_3-8嵌合体的筛选和PAM特异性的表征。图44A(顶部)描绘了评估酶活性的DNA琼脂糖凝胶电泳分析。图44B(底部)描绘了功能性嵌合体的PAM序列的Seqlogo共有描绘。

[0124] 图45描绘了可以用于本文所描述的脂质纳米颗粒的示例性阳离子脂质的结构。

[0125] 图46描绘了在LNP中体内递送后MG3-6/3-4向导化学物质对小鼠肝脏中的HAO-1基因编辑和mRNA敲低活性的评估,如实例28中所描述的。

[0126] 图47描绘了Hepa1-6细胞中mApoa1在DNA水平下的基因编辑结果。

[0127] 图48描绘了Hepa1-6细胞中mAngptl3在DNA水平下的基因编辑结果。

[0128] 图49描绘了Hepa1-6细胞中mTrac在DNA水平下的基因编辑结果。

[0129] 图50描绘了通过下一代测序分析的野生型小鼠中的由MG3-6/3-8在APOA1和ANGPTL3基因座处进行的基因组编辑。

[0130] 图51A描绘了本文所描述的各种MG29效应子的系统发育树。图51B描绘了使用Alphafold2预测的MG29-1效应子的三维结构。形成R环的核酸通过与Cpf1的结构性比对(PDB ID:5XH7)来建模。REC、RuvC和NUC结构域分别以灰色、青色和粉红色着色。PAM相互作用结构域,即WED-II、WED-III和PID结构域分别以黄色和橙色着色。

[0131] 图52A描绘了V-A型核酸酶的系统发育分析。用来自MAFFT全局(g-ins-i)多序列比对的RAxML推断系统发育树。针对三个祖先节点(用封闭圆突出显示的节点:MG29-229、MG29-230和MG29-231)产生祖先WedII、PI和WedIII结构域。图52B描绘了来自MG29-28的祖先结构域的3D结构预测相对于MG29-1的预测结构。通过结构之间的重叠(顶部)以及序列比对中关键残基的保留(底部),观察到这些结构域的高度相似性。PAM结合中涉及的重要残基由比对上方的深色框以及3D比对中的棒状草图可视化指示。

[0132] 图53A、53B和53C描绘了用于确定用于嵌合体产生的最佳断点的MG29-1同源物的多个序列比对。图53A描绘了与本文所描述的若干种蛋白质比对的MG29-1和FnCas12a。对WED-II、PID和WED-III结构域进行注释以突出显示被交换的结构域。虚线描绘了用于交换这些酶结构域的切割位点。图53B:MG29-1蛋白及其同源物的C末端由REC结构域和WED-II结构域的边缘处的断点组成。图53C:MG29-1蛋白及其同源物的N末端由WED-III和RuvC结构域的边缘处的断点组成。总的来说,交换区域跨越WED-II、PID和WED-III结构域。

[0133] 图54描绘了V-A型嵌合体的体外筛选。琼脂糖凝胶描绘了每个切割反应的扩增切割产物。对于具有MG29-1及其若干同源物的嵌合体,即MG29-13、MG29-14、MG29-16、MG29-20和MG29-18,观察到阳性富集。

[0134] 图55描绘了用MG29-1体外筛选V-A型祖先序列及其对应的嵌合体。琼脂糖凝胶描

绘了每个切割反应的扩增切割产物。仅对于祖先重建的MG29-230和MG29-231观察到阳性富集。然而,发现所有对应的嵌合体都是活性的。

[0135] 图56描绘了与源自MG29-1及其嵌合体的嵌合体相关联的PAM。

[0136] 序列表简要说明

[0137] 随此提交的序列表提供了用于根据本公开的方法、组合物和系统的示例多核苷酸和多肽序列。下文是其中的序列的示例描述。

[0138] MG3-6嵌合体

[0139] SEQ ID NO:1-27和771-862示出了MG3-6嵌合核酸酶的全长肽序列。

[0140] SEQ ID NO:108示出了含有5'UTR、NLS、CDS、NLS、3'UTR和polyA尾的MG3-6/3-4核酸酶的核苷酸序列。

[0141] SEQ ID NO:722示出了MG3-6/3-4向导sgRNA支架的核苷酸序列。

[0142] SEQ ID NO:28-45、605-610、646-695、863和1789-1826示出了被工程化成与MG3-6嵌合核酸酶一起发挥作用的sgRNA的核苷酸序列。

[0143] SEQ ID NO:603示出了MG3-6/3-4的DNA编码序列。

[0144] SEQ ID NO:604示出了MG3-6/3-4盒编码序列的蛋白质序列。

[0145] MG29-1嵌合体

[0146] SEQ ID NO:109-110和2842-2854示出了MG29-1嵌合核酸酶的全长肽序列。

[0147] SEQ ID NO:111-113示出了被工程化成与MG29-1嵌合核酸酶一起发挥作用的sgRNA的核苷酸序列。

[0148] MG嵌合体

[0149] SEQ ID NO:696示出了MG3-6的N末端肽序列(1-742)。

[0150] SEQ ID NO:697-721示出了C末端肽序列。

[0151] 白蛋白靶向

[0152] SEQ ID NO:67-86示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向白蛋白的sgRNA的核苷酸序列。

[0153] TRAC靶向

[0154] SEQ ID NO:119-138示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向TRAC的sgRNA的核苷酸序列。

[0155] SEQ ID NO:139-158示出了TRAC靶位点的DNA序列。

[0156] SEQ ID NO:922-924示出了被工程化成与MG3-6/3-3核酸酶一起发挥作用以便靶向TRAC的sgRNA的核苷酸序列。

[0157] SEQ ID NO:925-927示出了TRAC靶位点的DNA序列。

[0158] SEQ ID NO:972-991示出了被工程化成与MG3-6/3-7核酸酶一起发挥作用以便靶向TRAC的sgRNA的核苷酸序列。

[0159] SEQ ID NO:992-1011示出了TRAC靶位点的DNA序列。

[0160] SEQ ID NO:1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617示出了被工程化成与MG3-6/3-8核酸酶一起发挥作用以便靶向TRAC的sgRNA的核苷酸序列。

[0161] SEQ ID NO:1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653示出了TRAC靶位点的DNA序列。

[0162] B2M靶向

[0163] SEQ ID NO:159-184示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起起作用以便靶向B2M的sgRNA的核苷酸序列。

[0164] SEQ ID NO:185-210示出了B2M靶位点的DNA序列。

[0165] TRBC1靶向

[0166] SEQ ID NO:211-251示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向TRBC1的sgRNA的核苷酸序列。

[0167] SEQ ID NO:252-292示出了TRBC1靶位点的DNA序列。

[0168] TRBC2靶向

[0169] SEQ ID NO:293-337示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向TRBC2的sgRNA的核苷酸序列。

[0170] SEQ ID NO:338-382示出了TRBC2靶位点的DNA序列。

[0171] ANGPTL3靶向

[0172] SEQ ID NO:383-477和1392-1489示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向ANGPTL3的sgRNA的核苷酸序列。

[0173] SEQ ID NO:478-572和1490-1587示出了ANGPTL3靶位点的DNA序列。

[0174] SEQ ID NO:2120-2215和2312-2350示出了被工程化成与MG3-6/3-8核酸酶一起发挥作用以便靶向ANGPTL3的sgRNA的核苷酸序列。

[0175] SEQ ID NO:2216-2311和2351-2389示出了ANGPTL3靶位点的DNA序列。

[0176] PCSK9靶向

[0177] SEQ ID NO:573-587和1362-1376示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向PCSK9的sgRNA的核苷酸序列。

[0178] SEQ ID NO:588-602和1377-1391示出了PCSK9靶位点的DNA序列。

[0179] VCP R155靶向

[0180] SEQ ID NO:723-738示出了被工程化成与MG3-6/3-8核酸酶一起发挥作用以便靶向VCP R155的sgRNA的核苷酸序列。

[0181] SEQ ID NO:739-754示出了VCPR155靶位点的DNA序列。

[0182] SEQ ID NO:755-762示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向VCP R155的sgRNA的核苷酸序列。

[0183] SEQ ID NO:763-770示出了VCPR155靶位点的DNA序列。

[0184] AAVS1靶向

[0185] SEQ ID NO:928-949示出了被工程化成与MG3-6/3-3核酸酶一起发挥作用以便靶向AAVS1的sgRNA的核苷酸序列。

[0186] SEQ ID NO:950-971示出了AAVS1靶位点的DNA序列。

[0187] SEQ ID NO:1012-1049示出了被工程化成与MG3-6/3-7核酸酶一起发挥作用以便靶向AAVS1的sgRNA的核苷酸序列。

[0188] SEQ ID NO:1050-1087示出了AAVS1靶位点的DNA序列。

[0189] GPR146靶向

[0190] SEQ ID NO:1588-1656示出了被工程化成与MG3-6/3-7核酸酶一起发挥作用以便

靶向小家鼠(M.musculus)GPR146的sgRNA的核苷酸序列。

[0191] SEQ ID NO:1657-1725示出了小家鼠GPR146靶位点的DNA序列。

[0192] APOA1靶向

[0193] SEQ ID NO:1726-1744示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向小家鼠APOA1的sgRNA的核苷酸序列。

[0194] SEQ ID NO:1745-1763示出了小家鼠APOA1靶位点的DNA序列。

[0195] SEQ ID NO:1764-1774示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向智人(H.sapiens)APOA1的sgRNA的核苷酸序列。

[0196] SEQ ID NO:1775-1785示出了智人APOA1靶位点的DNA序列。

[0197] SEQ ID NO:1866-1961和2058-2088示出了被工程化成与MG3-6/3-8核酸酶一起发挥作用以便靶向小鼠APOA1的sgRNA的核苷酸序列。

[0198] SEQ ID NO:1962-2057和2089-2119示出了小鼠APOA1靶位点的DNA序列。

[0199] HAO1靶向

[0200] SEQ ID NO:611-633和1789-1826示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向小家鼠HAO1的sgRNA的核苷酸序列。

[0201] SEQ ID NO:1827-1865示出了被工程化成与MG3-6/3-4核酸酶一起发挥作用以便靶向人HAO1的sgRNA的核苷酸序列。

[0202] 其它序列

[0203] SEQ ID NO:87-102、118、634-645和1786-1787示出了引物序列。

[0204] SEQ ID NO:103-107、920-921和1788示出了质粒序列。

具体实施方式

[0205] 虽然本文中已经示出并描述了本公开的各个实施例,但是对于本领域的技术人员显而易见的是,这些实施例仅通过举例的方式提供。在不背离本公开的情况下,本领域的技术人员可以想到各种变化、改变和取代。应当理解,可以采用本文所描述的本公开的实施例的各种替代方案。

[0206] 除非另有指示,否则本文所公开的一些方法的实践采用免疫学、生物化学、化学、分子生物学、微生物学、细胞生物学、基因组学和重组DNA的技术。参见例如,Sambrook和Green等人,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,第4版(2012);丛书《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》(F.M.Ausubel等人编辑);丛书《酶学方法(Methods In Enzymology)》(学术出版社公司(Academic Press,Inc.)),《PCR 2:实用方法(PCR 2:A Practical Approach)》(M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编辑(1995));Harlow和Lane编辑(1988)《抗体:实验室手册(Antibodies,A Laboratory Manual)》以及《动物细胞培养:基础技术和专门应用手册(Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications)》,第6版(R.I.Freshney编辑,(2010))。

[0207] 如本文所使用的,除非上下文另外清楚地指示,否则单数形式“一个/一种(a/an)”和“所述”也旨在包含复数形式。此外,在详细描述或权利要求中使用了术语“包含(including/includes)”、“具有(having/has/with)”或其变体的情况下,此类术语旨在以

类似于术语“包括(comprising)”的方式是包含性的。

[0208] 术语“约”或“大约”意指在本领域的普通技术人员确定的特定值的可接受误差范围内,这将部分取决于值是如何测量或确定的,例如,测量系统的局限性。例如,“约”可以意指按照本领域的实践在一个或多于一个标准差内。可替代地,“约”可以意指给定值的至多20%、至多15%、至多10%、至多5%或至多1%的范围。

[0209] 如本文所使用的,“细胞”是指生物细胞。细胞可以是活生物体的基本结构、功能或生物单位。细胞可以源自具有一个或多个细胞的任何生物体。一些非限制性实例包含:原核细胞、真核细胞、细菌细胞、古细菌细胞、单细胞真核生物的细胞、原生动物细胞、来自植物的细胞(例如,来自种植农作物、水果、蔬菜、谷物、大豆、玉米、玉蜀黍、小麦、种子、西红柿、大米、木薯、甘蔗、南瓜、干草、土豆、棉花、大麻、烟草、开花植物、针叶树、裸子植物、蕨类植物、石松、金鱼藻、地钱、苔藓的细胞)、藻细胞(例如,布朗葡萄藻(Botryococcus braunii)、莱茵衣藻(Chlamydomonas reinhardtii)、拟微球藻(Nannochloropsis gaditana)、蛋白核小球藻(Chlorella pyrenoidosa)、C.Agardh展枝马尾藻(Sargassum patens C.Agardh)等)、海藻(例如,海带)、真菌细胞(例如,酵母细胞、来自蘑菇的细胞)、动物细胞、来自无脊椎动物(例如,果蝇、刺胞动物、棘皮动物、线虫等)的细胞、来自脊椎动物(例如,鱼、两栖动物、爬行动物、鸟、哺乳动物)的细胞、来自哺乳动物(例如,猪、牛、山羊、绵羊、啮齿动物、大鼠、小鼠、非人灵长类动物、人等)的细胞等。有时,细胞并非源自天然生物体(例如,细胞可以是合成制造的,有时被称为人工细胞)。

[0210] 如本文所使用的,术语“核苷酸”是指碱基-糖-磷酸组合。核苷酸可以包括合成核苷酸。核苷酸可以包括合成核苷酸类似物。核苷酸可以是核酸序列(例如,脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA))的单体单元。术语核苷酸可以包含:核糖核苷三磷酸,腺苷三磷酸(ATP)、尿苷三磷酸(UTP)、胞嘧啶三磷酸(CTP)、鸟苷三磷酸(GTP);以及脱氧核糖核苷三磷酸,如dATP、dCTP、dITP、dUTP、dGTP、dTTP或其衍生物。此类衍生物可以包含例如[αS]dATP、7-脱氮-dGTP和7-脱氮-dATP,以及赋予含有它们的核酸分子核酸酶抗性的核苷酸衍生物。如本文所使用的,术语核苷酸可以是指双脱氧核糖核苷三磷酸(ddNTP)及其衍生物。双脱氧核糖核苷三磷酸的说明性实例可以包含但不限于:ddATP、ddCTP、ddGTP、ddITP和ddTTP。核苷酸可以是未经标记的或可检测标记的,如使用包括光学可检测部分(例如,荧光团)的部分。也可以用量子点进行标记。可检测标记可以包含例如放射性同位素、荧光标记、化学发光标记、生物发光标记和酶标记。核苷酸的荧光标记可以包含但不限于:荧光素、5-羧基荧光素(FAM)、2’7’-二甲氧基-4’5-二氯-6-羧基荧光素(JOE)、罗丹明、6-羧基罗丹明(R6G)、N,N,N’,N’-四甲基-6-羧基罗丹明(TAMRA)、6-羧基-X-罗丹明(ROX)、4-(4’二甲氨基苯偶氮基)苯甲酸(DABCYL)、瀑布蓝、俄勒冈绿、德克萨斯红、青色素和5-(2’-氨乙基)氨基萘-1-磺酸(EDANS)。经荧光标记的核苷酸的具体实例可以包含:可从加利福尼亚州福斯特市的铂金埃尔默公司(Perkin Elmer,Foster City,Calif)获得的[R6G]dUTP、[TAMRA]dUTP、[R110]dCTP、[R6G]dCTP、[TAMRA]dCTP、[JOE]ddATP、[R6G]ddATP、[FAM]ddCTP、[R110]ddCTP、[TAMRA]ddGTP、[ROX]ddTTP、[dR6G]ddATP、[dR110]ddCTP、[dTAMRA]ddGTP和[dROX]ddTTP;可从伊利诺伊州阿灵顿高地的安玛西亚公司(Amersham,Arlington Heights,IL.)获得的FluoroLink脱氧核苷酸、FluoroLink Cy3-dCTP、FluoroLink Cy5-dCTP、FluoroLink Fluor X-dCTP、FluoroLink Cy3-dUTP和FluoroLink Cy5-dUTP;可从印第安纳州印第安纳波利斯

的宝灵曼公司(Boehringer Mannheim,Indianapolis,Ind.)获得的荧光素-15-dATP、荧光素-12-dUTP、四甲基-罗丹明-6-dUTP、IR770-9-dATP、荧光素-12-ddUTP、荧光素-12-UTP和荧光素-15-2'-dATP;以及可从俄勒冈州尤金的分子探针公司(Molecular Probes,Eugene,Oreg)获得的经染色体标记的核苷酸、BODIPY-FL-14-UTP、BODIPY-FL-4-UTP、BODIPY-TMR-14-UTP、BODIPY-TMR-14-dUTP、BODIPY-TR-14-UTP、BODIPY-TR-14-dUTP、瀑布蓝-7-UTP、瀑布蓝-7-dUTP、荧光素-12-UTP、荧光素-12-dUTP、俄勒冈绿488-5-dUTP、罗丹明绿-5-UTP、罗丹明绿-5-dUTP、四甲基罗丹明-6-UTP、四甲基罗丹明-6-dUTP、德克萨斯红-5-UTP、德克萨斯红-5-dUTP和德克萨斯红-12-dUTP。核苷酸也可以通过化学修饰进行标记或标记。经化学修饰的单核苷酸可以是生物素-dNTP。生物素化dNTP的一些非限制性实例可以包含生物素-dATP(例如,bio-N6-ddATP、生物素-14-dATP)、生物素-dCTP(例如,生物素-11-dCTP、生物素-14-dCTP)和生物素-dUTP(例如,生物素-11-dUTP、生物素-16-dUTP、生物素-20-dUTP)。

[0211] 术语"多核苷酸"、"寡核苷酸"和"核酸"可互换使用以指代任何长度的核苷酸的聚合形式,脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物,呈单链、双链或多链形式。多核苷酸对于细胞可以是外源性的或内源性的。多核苷酸可以存在于无细胞的环境中。多核苷酸可以是基因或其片段。多核苷酸可以是DNA。多核苷酸可以是RNA。在多核苷酸中,当提及T时,T意指RNA中的U(尿嘧啶)和DNA中的T(胸腺嘧啶)。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以进行任何功能。多核苷酸可以包括一种或多种类似物(例如,改变的主链、糖或核碱基)。如果存在,则可以在组装聚合物之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。类似物的一些非限制性实例包含:5-溴尿嘧啶、肽核酸、异源核酸、吗啉代、锁核酸、甘油核酸、苏糖核酸、双脱氧核苷酸、虫草素、7-脱氮-GTP、荧光团(例如,与糖连接的罗丹明或荧光素)、含硫醇的核苷酸、生物素连接的核苷酸、荧光碱基类似物、CpG岛、甲基-7-鸟苷、甲基化核苷酸、肌苷、硫尿苷、假尿苷、二氢尿苷、辫苷和怀俄苷。多核苷酸的非限制性实例包含基因或基因片段的编码或非编码区域、根据连接分析定义的多个基因座(loci)(基因座(locus))、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹RNA(shRNA)、微RNA(miRNA)、核酶、cDNA、重组多核苷酸、分支多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离的DNA、任何序列的分离的RNA、包含无细胞DNA(cfDNA)和无细胞RNA(cfRNA)的无细胞多核苷酸、核酸探针和引物。核苷酸序列可以间杂有非核苷酸组分。

[0212] 术语"转染"或"转染的"是指通过非病毒或基于病毒的方法将核酸引入细胞中。核酸分子可以是编码完整蛋白或其功能部分的基因序列。参见例如,Sambrook等人,1989,《分子克隆:实验室手册》,18.1-18.88。

[0213] 术语"肽"、"多肽"和"蛋白质"在本文中可互换使用以指代至少两个通过肽键接合的氨基酸残基的聚合物。此术语不表示聚合物的具体长度,也不旨在暗示或区分肽是使用重组技术、化学或酶促合成产生的还是天然存在的。所述术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及包括至少一种经修饰的氨基酸的氨基酸聚合物。在一些情况下,聚合物可以间杂有非氨基酸。所述术语包含具有任何长度的氨基酸链,包含全长蛋白质以及具有或不具有二级或三级结构(例如,结构域)的蛋白质。术语还涵盖已被修饰的氨基酸聚合物;例如通过二硫键形成、糖基化、脂化、乙酰化、磷酸化、氧化和任何其它操作,如与标记组分缀合。如本文所使用的,术语"氨基酸(amino acid)"和"氨基酸(amino acids)"是指天然和非天然氨基酸,包含但不限于经修饰的氨基酸和氨基酸类似物。经修饰的氨基酸可以包含已被化学

修饰以包含非天然存在于氨基酸上的基团或化学部分的天然氨基酸和非天然氨基酸。氨基酸类似物可以指氨基酸衍生物。术语“氨基酸”包含D-氨基酸和L-氨基酸。

[0214] 如本文所使用的,“非天然”可以指在天然核酸或蛋白质中未发现的核酸或多肽序列。非天然可以指亲和标签。非天然可以指融合物。非天然可以指包括突变、插入或缺失的天然存在的核酸或多肽序列。非天然序列可以表现出或编码的活性(例如,酶活性、甲基转移酶活性、乙酰转移酶活性、激酶活性、泛素化活性等)也可以由非天然序列所融合的核酸或多肽序列表现出。非天然核酸或多肽序列可以通过基因工程化连接到天然存在的核酸或多肽序列(或其变体)以产生嵌合核酸或编码嵌合核酸或多肽的多肽序列。

[0215] 如本文所使用的,术语“启动子”是指控制多核苷酸(例如,基因)转录或表达并且可以位于与启动RNA转录的核苷酸或核苷酸区相邻或重叠的调控DNA区。启动子可以含有结合蛋白质因子(通常称为转录因子)的特定DNA序列,其促进RNA聚合酶与DNA的结合,从而导致基因转录。“基础启动子”,也称为“核心启动子”,可以指含有促进可操作连接的多核苷酸转录表达的所有基本必需元件的启动子。真核基础启动子通常(尽管不一定)含有TATA盒和/或CAAT盒。

[0216] 如本文所使用的,术语“表达”是指从DNA模板转录核酸序列或多核苷酸(如转录成mRNA或其它RNA转录本)的过程或随后将经转录的mRNA翻译为肽、多肽、或蛋白质的过程。转录物和经编码的多肽可以统称为“基因产物”。如果多核苷酸衍生自基因组DNA,则表达可以包含在真核细胞中的mRNA的剪接。

[0217] 如本文所使用的,“可操作地连接”、“可操作连接”、“操作性地连接”或其语法等效物是指遗传元件,例如启动子、增强子、聚腺苷酸化序列等的排列,其中第一遗传元件的操作(例如,移动或激活)对第二遗传元件具有一些影响。对第二遗传元件的影响可以是但不必是与第一遗传元件的操作相同的类型。例如,如果第一元件的移动导致第二元件的激活,则两个遗传元件可操作地连接。例如,如果调控元件有助于启动编码序列的转录,则可以包括启动子和/或增强子序列的调控元件可操作地连接到编码区。只要维持这种功能关系,调控元件与编码区之间就会存在插入残基。

[0218] 如本文所使用的,“载体”是指包括多核苷酸或与多核苷酸缔合并且可以用于介导多核苷酸到细胞的递送的大分子或大分子缔合物。载体的实例包含质粒、病毒载体、脂质体和其它基因递送媒剂。载体通常包括遗传元件(例如调控元件),所述遗传元件与基因其可操作地连接以促进基因在靶标中的表达。

[0219] 如本文所使用的,“表达盒”和“核酸盒”可互换使用以指代一起表达或可操作地连接用于表达的核酸序列或元件的组合。在一些情况下,表达盒是指调控元件和其可操作地连接用于表达的一个或多个基因的组合。

[0220] DNA或蛋白质序列的“功能片段”是指保留与全长DNA或蛋白质序列的生物活性基本上类似的生物活性(功能或结构)的片段。DNA序列的生物活性可能是其以归因于全长序列的方式影响表达的能力。

[0221] 术语“工程化的”、“合成的”和“人工的”在本文中可互换使用,指通过人类干预进行修饰的对象。例如,术语可以指非天然存在的多核苷酸或多肽。工程化肽可以具有但不需要与天然存在的人蛋白质的低序列同一性(例如,小于50%序列同一性、小于25%序列同一性、小于10%序列同一性、小于5%序列同一性、小于1%序列同一性)。例如,VPR和VP64结构

域是合成的反式激活结构域。例如,VPR和VP64结构域是合成的反式激活结构域。根据非限制性实例:核酸可以通过将其序列改变成自然界中不存在的序列来修饰;核酸可以通过将其连接到自然界中不与其缔合的核酸来修饰,使得连接产物具有原始核酸中不存在的功能;工程化核酸可以用自然界不存在的序列在体外合成;可以通过将蛋白质的氨基酸序列改变为自然界中不存在的序列来修饰蛋白质;工程化蛋白质可以获得新的功能或特性。"工程化"系统包括至少一个工程化组分。

[0222] 术语"tracrRNA"或"tracr序列"意指反式激活CRISPR RNA。tracrRNA与CRISPR(cr)RNA相互作用,以在II型和亚型V-B CRISPR-Cas系统中形成向导(g)RNA。如果tracrRNA是工程化的,则可以与野生型示例性tracrRNA序列(例如,来自化脓性链球菌(S.pyogenes)、金黄色葡萄球菌(S.aureus)的tracrRNA)具有约5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或100%的序列同一性和/或序列相似性。tracrRNA可以是指tracrRNA的经修饰的形式,其可以包括核苷酸变化,如缺失、插入或取代、变体、突变或嵌合体。tracrRNA可以是指在一段至少6个连续核苷酸上与野生型示例性tracrRNA序列(例如,来自化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌等的tracrRNA)至少约60%相同的核酸。例如,tracrRNA序列可以在一段至少6个连续核苷酸上与野生型示例性tracrRNA(例如,来自化脓性链球菌、金黄色葡萄球菌等的tracrRNA)序列至少约60%相同、至少约65%相同、至少约70%相同、至少约75%相同、至少约80%相同、至少约85%相同、至少约90%相同、至少约95%相同、至少约98%相同、至少约99%相同或100%相同。通过鉴定与相邻CRISPR阵列中部分重复序列互补的区域,可以在基因组序列上预测II型tracrRNA序列。

[0223] 如本文所使用的,"向导核酸"或"向导多核苷酸"是指可以与靶核酸杂交并由此将相关核酸酶引导至靶核酸的核酸。向导核酸可以是RNA(向导RNA或gRNA)。向导核酸可以是DNA。向导核酸可以是RNA和DNA的混合物。向导核酸可以包括crRNA或tracrRNA或两者的组合。向导核酸可以是工程化的。向导核酸可以被编程为与靶核酸特异性结合。靶核酸的一部分可以与向导核酸的一部分互补。与向导核酸互补并杂交的双链靶多核苷酸的链可以被称为互补链。与互补链互补,并且因此可以不与向导核酸互补的双链靶多核苷酸的链可以被称为非互补链。向导核酸可以包括多核苷酸链,并且可以被称为"单向导核酸"。向导核酸可以包括两条多核苷酸链,并且可以称为"双向导核酸"。如果没有另外说明,则术语"向导核酸"可以包含在内,指单向导核酸和双向导核酸两者。向导核酸可以包括可以被称为"核酸靶向区段"或"核酸靶向序列"或"间隔子"的区段。核酸靶向区段可以包括子区段,所述子区段可以被称为"蛋白质结合区段"或"蛋白质结合序列"或"Cas蛋白质结合区段"。

[0224] 如本文所使用的,术语"基因编辑"和"基因组编辑"可以可互换使用。基因编辑或基因组编辑意指改变基因或基因组的核酸序列。基因组编辑可以包含例如插入、缺失和突变。

[0225] 在两个或更多个核酸或多肽序列的上下文中,术语"序列同一性"或"百分比同一性"是指当在局部或全局比较窗内进行比较和比对以获得最大对应性时,两个(例如,在成对比对中)或更多个(例如,在多序列比对中)相同或具有相同特定百分比的氨基酸残基或核苷酸的序列,如使用序列比较算法测量的。用于多肽序列的合适的序列比较算法包含例如使用字长(W)为3、期望值(E)为10的参数以及BLOSUM62评分矩阵将空位罚分设置为存在11,扩展1并且使用长于30个残基的多肽序列的条件组成评分矩阵调整的BLASTP;使用字长

(W)为2、期望值(E)为1000000的参数以及PAM30评分矩阵(对于少于30个残基的序列,将空位罚分设置为9来打开空隙,并且设置为1来扩展空隙)(这些是BLAST套件中BLASTP的默认参数,可在https://blast.ncbi.nlm.nih.gov获得)的BLASTP;具有参数的CLUSTALW;具有以下参数的Smith-Waterman同源搜索算法:匹配为2、失配为-1并且空隙为-1;具有默认参数的MUSCLE;具有以下参数的MAFFT:retree为2并且maxiterations为1000;具有默认参数的Novafold;具有默认参数的HMMER hmmalign。

[0226] 如本文所使用的,术语“RuvC_III结构域”是指RuvC核酸内切酶结构域的第三不连续区段(RuvC核酸酶结构域包含三个不连续区段RuvC_I、RuvC_II和RuvC_III)。RuvC结构域或其区段通常可以通过与记录的结构域序列比对、与具有注释结构域的蛋白质的结构比对或通过与基于记录的结构域序列构建的隐马尔可夫模型(Hidden Markov Model,HMM)(例如,RuvC_III的Pfam HMM PF18541)进行比较来鉴定。

[0227] 如本文所使用的,术语“楔形”(WED)结构域是指主要与sgRNA和PAM双链体的重复:抗重复双链体相互作用的结构域(例如存在于Cas蛋白中)。WED结构域通常可以通过与记录的结构域序列比对、与具有注释结构域的蛋白质的结构比对或通过与基于记录的结构域序列构建的隐马尔可夫模型(HMM)进行比较来鉴定。

[0228] 如本文所使用的,术语“PAM相互作用结构域”或“PI结构域”是指与Cas蛋白靶向的区域中的种子序列外部的原间隔子邻近基序(PAM)相互作用的结构域。PAM相互作用结构域的实例包含但不限于存在于Cas蛋白中的拓扑异构酶同源性(TOPO)结构域和C末端结构域(CTD)。PAM相互作用结构域或其区段通常可以通过与记录的结构域序列比对、与具有注释结构域的蛋白质的结构比对或通过与基于记录的结构域序列构建的隐马尔可夫模型(HMM)进行比较来鉴定。

[0229] 如本文所使用的,术语“REC结构域”是指包括两个区段(REC1或REC2)中的至少一个区段的结构域(例如,存在于Cas蛋白中),所述两个区段是被认为接触向导RNA的α螺旋结构域。REC结构域或其区段通常可以通过与记录的结构域序列比对、与具有注释结构域的蛋白质的结构比对或通过与基于记录的结构域序列构建的隐马尔可夫模型(HMM)(例如,结构域REC1的Pfam PF19501)进行比较来鉴定。

[0230] 如本文所使用的,术语“BH结构域”是指作为II型Cas酶的NUC与REC叶之间的桥螺旋的结构域(例如,存在于Cas蛋白中)。BH结构域或其区段通常可以通过与记录的结构域序列比对、与具有注释结构域的蛋白质的结构比对或通过与基于记录的结构域序列构建的隐马尔可夫模型(HMM)(例如,结构域BH的Pfam PF16593)进行比较来鉴定。

[0231] 如本文所使用的,术语“HNH结构域”是指具有特征性组氨酸和天冬酰胺残基的核酸内切酶结构域。HNH结构域通常可以通过与记录的结构域序列比对、与具有注释结构域的蛋白质的结构比对或通过与基于记录的结构域序列构建的隐马尔可夫模型(HMM)(例如,结构域HNH的Pfam HMM PF01844)进行比较来鉴定。

[0232] 本公开包含本文所描述的具有一个或多个保守氨基酸取代的酶中的任何酶的变体。此类保守取代可以在多肽的氨基酸序列中进行,而不破坏多肽的三维结构或功能。保守取代可以通过具有类似疏水性、极性和R链长度的氨基酸彼此取代来完成。另外地或可替代地,通过比较来自不同物种的同源蛋白质的比对序列,可以通过在不改变经编码的蛋白质的基本功能的情况下定位物种(例如,非保守残基)之间突变的氨基酸残基来鉴定保守取

代。此类经保守取代的变体可以包含与本文所描述的系统中的任何系统具有至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性的变体。在一些实施例中,此类经保守取代的变体是功能变体。此类功能变体可以涵盖具有取代的序列,使得核酸内切酶的关键活性位点残基的活性不被破坏。在一些实施例中,本文所描述的系统中的任何系统的功能变体缺乏本文所描述的保守残基或功能残基中的至少一种的取代。在一些实施例中,本文所描述的系统中的任何系统的功能变体缺乏本文所描述的保守残基或功能残基中的全部的取代。

[0233] 提供功能类似氨基酸的保守取代表可从各种参考文献中获得(参见例如,Creighton,《蛋白质:结构与分子特性(Proteins:Structures and Molecular Properties)》(W H弗里曼出版社(W H Freeman&Co.);第2版(1993年12月)))。以下八个基团各自含有彼此保守取代的氨基酸:

[0234] 1)丙氨酸(A)、甘氨酸(G);

[0235] 2)天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);

[0236] 3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);

[0237] 4)精氨酸(R)、赖氨酸(K);

[0238] 5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);

[0239] 6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W);

[0240] 7)丝氨酸(S)、苏氨酸(T);以及

[0241] 8)半胱氨酸(C)、甲硫氨酸(M)。

[0242] 概述

[0243] 具有独特功能和结构的新Cas酶的发现可能会提供进一步破坏脱氧核糖核酸(DNA)编辑技术的可能性,从而提高速度、特异性、功能和易用性。相对于微生物中成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)系统的预测流行率和微生物物种的纯粹多样性,文献中存在功能表征的CRISPR/Cas酶相对较少。这部分地是因为大量的微生物物种可能不容易在实验室条件下培养。对表示大量微生物物种的自然环境生态位进行宏基因组测序可能会提供大幅增加记录的新CRISPR/Cas系统的数量,并且加速新寡核苷酸编辑功能的发现的可能性。这种方法富有成效的最近的实例通过2016年通过对天然微生物群落的宏基因组分析发现CasX/CasY CRISPR系统证明。

[0244] CRISPR/Cas系统是已被描述为在微生物中充当适应性免疫系统的RNA引导的核酸酶复合物。在其自然环境中,CRISPR/Cas系统在CRISPR(成簇规则间隔短回文重复序列)操作子或基因座中发生,所述系统通常包括两部分:(i)由同样短的间隔子序列分隔的短重复序列(30-40bp)的阵列,其编码基于RNA的靶向元件;以及(ii)编码编码由基于RNA的靶向元件以及辅助蛋白/酶引导的核酸酶多肽的Cas的ORF。特定靶核酸序列的高效核酸酶靶向可能涉及以下两者:(i)靶标(靶种子)的前6-8个核酸与crRNA向导之间的互补杂交;以及(ii)靶种子的定义附近内存在原间隔子邻近基序(PAM)序列(PAM通常是宿主基因组内不常表示的序列)。根据系统的确切功能和组织,CRISPR-Cas系统通常基于共享的功能特性和进化类似性被分为2种类别、5种类型和16种亚型。

[0245] 1类CRISPR-Cas系统具有大的多亚基效应子复合物,并且包括I、III和IV型。

[0246] I型CRISPR-Cas系统在组分方面被认为具有中等复杂性。在I型CRISPR-Cas系统中,RNA靶向元件的阵列被转录为长前体crRNA(crRNA前体),所述crRNA前体在重复元件处进行处理以释放出短的成熟crRNA,当其后跟随被称为原间隔子邻近基序(PAM)的合适的短共有序列时,所述短的成熟crRNA将核酸酶复合物引导到核酸靶标。这种处理是通过称为级联的大的核酸内切酶复合物的内切核糖核酸酶亚基(Cas6)进行的,所述核酸内切酶复合物还包括crRNA引导的核酸酶复合物的核酸酶(Cas3)蛋白组分。Cas I核酸酶主要充当DNA核酸酶。

[0247] III型CRISPR系统的特征可能在于存在称为Cas10的中心核酸酶以及包括Csm或Cmr蛋白亚基的重复相关神秘蛋白(RAMP)。与在I型系统中一样,使用Cas6样酶由crRNA前体处理成熟的crRNA。与I型和II型系统不同,III型系统似乎靶向并切割DNA-RNA双链体(如用作RNA聚合酶模板的DNA链)。

[0248] IV型CRISPR-Cas系统具有效应子复合物,其包括高度还原的大亚基核酸酶(csf1)、Cas5(csf3)和Cas7(csf2)组的RAMP蛋白的两个基因以及在一些情况下预测的小亚基的基因;此类系统通常可见于内源性质粒上。

[0249] 2类CRISPR-Cas系统通常具有单多肽多结构域核酸酶效应子,并且包括II型、V型和VI型。

[0250] II型CRISPR-Cas系统在组分方面被认为是最简单的。在II型CRISPR-Cas系统中,将CRISPR阵列处理成成熟的crRNA不需要存在特殊的核酸内切酶亚基,而是需要小的反式编码的crRNA(tracrRNA),其区与阵列重复序列互补;tracrRNA与其对应的效应子核酸酶(例如,Cas9)和重复序列相互作用以形成前体dsRNA结构,所述前体dsRNA结构被内源性RNA酶III切割,从而产生负载有tracrRNA和crRNA两者的成熟的效应子酶。Cas II核酸酶被记录为DNA核酸酶。2型效应子通常表现出包括RuvC样核酸内切酶结构域的结构,所述RuvC样核酸内切酶结构域采用RNA酶H折叠,其中RuvC样核酸酶结构域的所述折叠内插入有不相关的HNH核酸酶结构域。RuvC样结构域负责靶(例如,crRNA互补)DNA链的切割,而HNH结构域负责置换的DNA链的切割。

[0251] V型CRISPR-Cas系统的特征在于与包括RuvC样结构域的II型效应子的结构类似的核酸酶效应子(例如,Cas12)结构。类似于II型,大多数(但不是全部)V型CRISPR系统使用tracrRNA将crRNA前体处理成成熟的crRNA;然而,与需要RNA酶III将crRNA前体切割成多个crRNA的II型系统不同,V型系统能够使用效应子核酸酶本身来切割crRNA前体。与II型CRISPR-Cas系统一样,V型CRISPR-Cas系统再次被记录为DNA核酸酶。与II型CRISPR-Cas系统不同,一些V型酶(例如,Cas12a)似乎具有强大的由双链靶序列的第一个crRNA定向切割激活的单链非特异性脱氧核糖核酸酶活性。

[0252] VI型CRISPR-Cas系统具有RNA引导的RNA核酸内切酶。VI型系统(例如,Cas13)的单个多肽效应子包括两个HEPN核糖核酸酶结构域,而不是RuvC样结构域。与II型和V型系统不同,VI型系统在一些实施例中似乎也不需要tracrRNA来将crRNA前体处理成crRNA。然而,类似于V型系统,一些VI型系统(例如,C2C2)似乎具有强大的由靶RNA的第一个crRNA定向切割激活的单链非特异性核酸酶(核糖核酸酶)活性。

[0253] 由于2类CRISPR-Cas的架构更简单,其作为设计者核酸酶/基因组编辑应用已被最

广泛地应用于工程化和开发。

[0254] 这种系统用于体外使用的早期适应之一涉及(i)从化脓性链球菌SF370中分离出来的重组表达、纯化的全长Cas9(例如,2号类、II型Cas酶);(ii)纯化的成熟的约42nt crRNA,其携带与期望待切割的靶DNA序列互补的约20nt 5'序列,后跟3'tracr结合序列(整个crRNA从携带T7启动子序列的合成DNA模板体外转录);(iii)从携带T7启动子序列的合成DNA模板体外转录纯化的tracrRNA;以及(iv)Mg^{2+}。后来改进的工程化系统涉及(ii)的crRNA通过接头(例如,GAAA)接合到(iii)的5'端,以形成能够本身将Cas9引导至靶标的单个融合合成向导RNA(sgRNA)。

[0255] 此类工程化系统可以通过提供编码以下的DNA载体适用于哺乳动物细胞:(i)在具有C末端核定位序列(例如,SV40 NLS)的合适的哺乳动物启动子和合适的聚腺苷酸化信号(例如,TK pA信号)下编码密码子优化的Cas9(例如,2类II型Cas酶)的ORF;以及(ii)在合适的聚合酶III启动子(例如,U6启动子)下编码sgRNA(具有以G开始的5'序列,后跟与3'tracr结合序列、接头和tracrRNA序列接合的20nt互补靶向核酸序列)的ORF。

[0256] 工程化核酸内切酶

[0257] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸内切酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶是两种或更多种核酸内切酶的嵌合体。在一些实施例中,工程化核酸内切酶是两种或更多种核酸内切酶的融合。

[0258] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括核酸酶的一个或多个片段或结构域,如核酸引导的核酸酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括来自本文所描述的生物体、属、物种或其它系统发育组的直系同源物的核酸酶的一个或多个片段或结构域。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括来自不同物种的核酸酶直系同源物的一个或多个片段或结构域。

[0259] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括来自至少两种不同核酸酶的一个或多个片段或结构域。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括来自至少2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种不同核酸酶的一个或多个片段或结构域。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括来自来自不同物种的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种核酸酶的一个或多个片段或结构域。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括2个片段或结构域,每个片段或结构域来自不同的核酸酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括3个片段或结构域,每个片段或结构域来自不同的核酸酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括4个片段或结构域,每个片段或结构域来自不同的核酸酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括5个片段或结构域,每个片段或结构域来自不同的核酸酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括3个片段或结构域,其中至少一个片段或结构域来自不同的核酸酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括4个片段或结构域,其中至少一个片段或结构域来自不同的核酸酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括5个片段或结构域,其中至少一个片段或结构域来自不同的核酸酶。

[0260] 在一些实施例中,对于体外、体内或离体应用,工程化核酸内切酶在原核或真核细胞中是功能性的。

[0261] 在一些实施例中,所述核酸内切酶源自未经培养的微生物。在一些实施例中,工程化核酸内切酶不是Cas9核酸内切酶、Cas14核酸内切酶、Cas12a核酸内切酶、Cas12b核酸内

切酶、Cas 12c核酸内切酶、Cas12d核酸内切酶、Cas12e核酸内切酶、Cas13a核酸内切酶、Cas13b核酸内切酶、Cas13c核酸内切酶或Cas13d核酸内切酶。在一些实施例中,工程化核酸内切酶与SpyCas9核酸内切酶具有小于86%同一性。

[0262] 在一些实施例中,来自不同核酸酶或物种的片段或结构域之间的连接发生在多段非结构化区域中。多核苷酸中的非结构化区域包含例如没有预测的二级结构元件(如α螺旋或β链)的区域。非结构化区域可以包含例如暴露在蛋白质结构内的区域、环区域或如通过序列或结构性比对预测的在各种蛋白质直系同源物内不保守的区域。

[0263] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸内切酶(例如,嵌合核酸内切酶或融合核酸内切酶),其包括:N末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列;以及C末端部分,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约70%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约75%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约80%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约85%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约90%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约95%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约96%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约97%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有至少约98%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分

包括与SEQ ID NO:696具有至少约99%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括N末端部分和C末端部分,所述N末端部分包括与SEQ ID NO:696具有100%同一性的序列,所述C末端部分包括与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有100%同一性的序列。

[0264] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸内切酶(例如,嵌合核酸内切酶或融合核酸内切酶),其包括:N末端部分,所述N末端部分包括Cas核酸内切酶的RuvC、REC或HNH结构域并且与SEQ ID NO:696具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性;以及C末端部分,所述C末端部分包括Cas核酸内切酶的WED、TOPO或CTD结构域并且与SEQ ID NO:697-721中的任一者具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性。

[0265] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶的N末端部分包括RuvC结构域、REC结构域、HNH结构域、BH结构域或其组合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶的C末端部分包括WED结构域、TOPO结构域、CTD结构域、PAM相互作用结构域或其组合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶的N末端部分包括RuvC、REC和HNH结构域。在一些实施例中,工程化核酸内切酶的N末端部分包括RuvC和HNH结构域。在一些实施例中,工程化核酸内切酶的N末端部分进一步包括RuvC、REC、HNH、RuvC-I、BH和RuvC-II结构域。在一些实施例中,工程化核酸内切酶的C末端部分包括WED、TOPO和CTD结构域。在一些实施例中,工程化核酸内切酶的C末端部分包括PAM相互作用结构域。

[0266] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶的N末端部分和工程化核酸内切酶的C末端部分未在相同的阅读框中天然地一起出现。在一些实施例中,工程化核酸内切酶的N末端部分和工程化核酸内切酶的C末端部分源自不同的生物体。

[0267] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶的N末端部分和工程化核酸内切酶的C末端部分直接融合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶的N末端部分和工程化核酸内切酶的C末端部分通过接头接合。在一些实施例中,所述接头是富含甘氨酸和/或丝氨酸的接头、大蛋白质结构域、长螺旋结构或短螺旋结构。在一些实施例中,所述接头是(G4S)n,并且其中n是1至20的整数。在一些实施例中,所述接头是GGGGS(SEQ ID NO:2864)。在一些实施例中,所述接头包括选自由以下组成的组的序列:(GS)n、(G2S)n、(G3S)n、(G4S)n和(G)n,并且其中n是1至20的整数。在一些实施例中,一个或多个接头包括选自由以下组成的组的序列:(GGSGGD)n或(GGSGGE)n,并且其中n是1至6的整数。在一些实施例中,一个或多个接头包括选自由以下组成的组的序列:(GGGSGGG)n、(GGGSGSGGGGS)n和(GGGGGPGGGGP)n,并且其中n是1至3的整数。在一些实施例中,一个或多个接头包括选自由以下组成的组的序列:(GX)n、(GGX)n、(GGGX)n、(GGGGX)n和(GzX)n,其中z在1与20之间,并且其中n是至少8。在一些实施例中,X是丝氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、苏氨酸或脯氨酸。

[0268] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶(例如,嵌合核酸内切酶或融合核酸内切酶)包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少55%、至少60%、至少65%、至少

70％、至少75％、至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、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％或至少99％序列同一性序列同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有100％同一性的序列。

[0269] 在一些实施例中,本文所描述的工程化核酸内切酶具有天然PAM特异性(参见图1B)。在一些实施例中,本公开通过蛋白质工程化提供了PAM特异性的实现。在一些实施例中,PAM特异性的实现可以通过RNA引导的CRISPR相关核酸酶的结构域交换来达到(参见图2)。在一些实施例中,结构域交换和重组过程中存在最佳断点。在一些实施例中,最佳断点由本文所描述的多个序列的比对引导(参见图3A)。

[0270] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶被配置成与不是nnRGGnT的PAM结合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶被配置成与表1A中的PAM结合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶被配置成与PAM结合,所述PAM包括以下任一者的序列:nnRGGnT、nnnmtY、nnnCCCy、nnraww、nnRnYAY、nnnctC、nnRGGTY、nnRGGTY、nnnctC、nnRnYAY、nnnMWTY、nnrRTwy、nnRRTWY、nyrnwYY、nnrCyY、nnncMMc、nnrnYCC、nnncMMc、nnrRnCm、nnnYCMw、nnnmCmC、nnrnynnn、nnnmCm、nnRnYCYr、nnRAYAC、nnnmCm、nnnRMYT、nnTYCm、nnTMCy、nnrMTCr、nnnmCCY、nnrmww、nnrRkyY、nnRnYhy、nnnmwTY、nnnmyY、nnRnYhY、nnnmhTY、nnRMAC、nnrRtwy、nnrwwYY、nnrmyY、nnrwYCC、nnRGnCr、nnnMhYy、nnyCCMww、nnnMCMCw、nnRwYhWw、nnRrYCYr、nnrwyhh、ntrMCm、nnrwyhh、nnRRTWY、ntTYCM、nnTCCC、nnrnyhh、nnnCCCYR、nnRnYAYn、nnRRnnYn和nnRRnnYn。在一些实施例中,工程化核酸内切酶被配置成通过识别PAM序列来与PAM结合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶识别PAM序列并且与其结合。

[0271] 表1A:PAM序列

[0272]

类别	描述	类型	生物体	序列
MG3-6	MG3-6 PAM	核苷酸	人工序列	nnRGGnT
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-2 PAM	核苷酸	人工序列	nnnmtY
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-3 PAM	核苷酸	人工序列	nnnCCCy
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-3 PAM	核苷酸	人工序列	nnnCCCYR
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-4 PAM	核苷酸	人工序列	nnraww
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-7 PAM	核苷酸	人工序列	nnRnYAY
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-7 PAM	核苷酸	人工序列	nnRnYAYn
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-7 PAM	核苷酸	人工序列	nnnctC
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8 PAM	核苷酸	人工序列	nnRGGTY
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8 PAM	核苷酸	人工序列	nnRRnnYn
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-18 PAM	核苷酸	人工序列	nnRGGTY
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-22 PAM	核苷酸	人工序列	nnnctC
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-24 PAM	核苷酸	人工序列	nnRnYAY
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-38 PAM	核苷酸	人工序列	nnnMWTY
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-42 PAM	核苷酸	人工序列	nnrRTwy
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-78 PAM	核苷酸	人工序列	nnRRTWY
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-89 PAM	核苷酸	人工序列	nyrnwYY

类别	描述	类型	生物体	序列
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-90 PAM	核苷酸	人工序列	nnrCyY
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-91 PAM	核苷酸	人工序列	nnncMMc
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-91 PAM	核苷酸	人工序列	nnrnYCC
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-93 PAM	核苷酸	人工序列	nnncMMc
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-94 PAM	核苷酸	人工序列	nnrRnCm
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-94 PAM	核苷酸	人工序列	nnnYCMw
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-95 PAM	核苷酸	人工序列	nnnmCmC
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-96 PAM	核苷酸	人工序列	nnrnynnn
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-101 PAM	核苷酸	人工序列	nnnmCm
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-103 PAM	核苷酸	人工序列	nnRnYCYr
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-104 PAM	核苷酸	人工序列	nnRAYAC
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-150-1 PAM	核苷酸	人工序列	nnnmCm
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-150-6 PAM	核苷酸	人工序列	nnnRMYT
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-150-7 PAM	核苷酸	人工序列	nnTYCm
MG3-6 嵌合体 PAM	MG3-6_3-150-8 PAM	核苷酸	人工序列	nnTMCy
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-2 PAM	核苷酸	人工序列	nnrMTCr
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-3 PAM	核苷酸	人工序列	nnnmCCY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-4 PAM	核苷酸	人工序列	nnrmww
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-6 PAM	核苷酸	人工序列	nnrRkyY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-7 PAM	核苷酸	人工序列	nnRnYhy
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-18 PAM	核苷酸	人工序列	nnnmwTY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-22 PAM	核苷酸	人工序列	nnnmyY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-24 PAM	核苷酸	人工序列	nnRnYhY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-38 PAM	核苷酸	人工序列	nnnmhTY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-42 PAM	核苷酸	人工序列	nnRMAC
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-78 PAM	核苷酸	人工序列	nnrRtwy
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-89 PAM	核苷酸	人工序列	nnrwwYY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-90 PAM	核苷酸	人工序列	nnrmyY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-91 PAM	核苷酸	人工序列	nnrwYCC
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-92 PAM	核苷酸	人工序列	nnRGnCr
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-93 PAM	核苷酸	人工序列	nnnMhYy
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-94 PAM	核苷酸	人工序列	nnyCCMww
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-95 PAM	核苷酸	人工序列	nnnMCMCw
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-96 PAM	核苷酸	人工序列	nnRwYhWw
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-103 PAM	核苷酸	人工序列	nnRrYCYr
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-104 PAM	核苷酸	人工序列	nnrwyhh

[0273]

[0274]

类别	描述	类型	生物体	序列
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-150-1 PAM	核苷酸	人工序列	ntrMCm
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-150-2 PAM	核苷酸	人工序列	nnrwyhh
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-150-3 PAM	核苷酸	人工序列	nnRRTWY
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-150-7 PAM	核苷酸	人工序列	ntTYCM
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-150-8 PAM	核苷酸	人工序列	nnTCCC
MG3-6_3-8 嵌合体 PAM	MG3-6_3-8_3-150-9 PAM	核苷酸	人工序列	nnrnyhh
MG29-1 嵌合体 PAM 序列	MG29-1_29-13 PAM	核酸	人工序列	TTTn
MG29-1 嵌合体 PAM 序列	MG29-1_29-14 PAM	核酸	人工序列	TYYn
MG29-1 嵌合体 PAM 序列	MG29-1_29-16 PAM	核酸	人工序列	TTTn
MG29-1 嵌合体 PAM 序列	MG29-1_29-18 PAM	核酸	人工序列	nYTn
MG29-1 嵌合体 PAM 序列	MG29-1_29-20 PAM	核酸	人工序列	TTYn
MG29-1 嵌合体 PAM 序列	MG29-1_29-229 PAM	核酸	人工序列	nTTn
MG29-1 嵌合体 PAM 序列	MG29-1_29-230 PAM	核酸	人工序列	nYYn
MG29-1 嵌合体 PAM 序列	MG29-1_29-231 PAM	核酸	人工序列	nYYn
MG3-6 嵌合体 PAM 序列	MG3-6_3-8 PAM	核酸	人工序列	nnRRnnYn

[0275] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶(例如,嵌合核酸内切酶或融合核酸内切酶)包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、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%或至少99%序列同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854

中的任一者具有100%同一性的序列。

[0276] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶被配置成与不是nnRGGnT的PAM结合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶被配置成与表1A中的PAM结合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶被配置成与PAM结合,所述PAM包括以下中的任一者:TTTn、TYYn、TTTn、nYTn、TTYn、nTTn、nYYn和nYYn。在一些实施例中,工程化核酸内切酶被配置成通过识别PAM序列来与PAM结合。在一些实施例中,工程化核酸内切酶识别PAM序列并且与其结合。

[0277] 向导多核苷酸

[0278] 在某些实施例中,本文公开了核酸内切酶系统,其包括:(a)本文所公开的工程化核酸酶;以及(b)向导多核苷酸,例如,向导核糖核酸(gRNA)、单gRNA或双向导RNA。在多核苷酸中,当提及T时,T意指RNA中的U(尿嘧啶)和DNA中的T(胸腺嘧啶)。

[0279] 在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与工程化核酸内切酶形成复合物。在一些情况下,工程化向导多核苷酸包括间隔子序列。在一些情况下,所述间隔子序列被配置成与靶核酸序列杂交。在一些情况下,核酸内切酶被配置成与原间隔子邻近基序(PAM)序列结合。

[0280] 在一些实施例中,向导多核苷酸(例如,gRNA)靶向细胞中的基因或基因座。在一些实施例中,向导多核苷酸靶向哺乳动物细胞中的基因或基因座。在一些实施例中,哺乳动物细胞是猪、牛、山羊、绵羊、啮齿动物、大鼠、小鼠、非人灵长类动物或人细胞。在一些实施例中,靶基因或靶基因座是白蛋白、TRAC、B2M、TRBC1、TRBC2、ANGPTL3、PCSK9、VCP R155、AAVS1、GPR146、APOA1或HAO1。

[0281] 在一些实施例中,靶基因是白蛋白。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:67-86中的任一者或与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约80%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约85%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约90%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约95%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约96%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约97%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约98%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约99%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有100%同一性的序列编码。

[0282] 在一些实施例中,向导多核苷酸在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID

NO:67-86中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约80％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约85％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约90％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约95％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约96％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约97％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约98％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约99％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有100％同一性的序列互补的序列。

[0283] 在一些实施例中,靶基因是TRAC。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者或与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约80％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约85％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约90％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约95％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约96％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约97％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约98％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约99％同一性的序列编码。

在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有100%同一性的序列编码。

[0284] 在一些实施例中,向导多核苷酸在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约80%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约85%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约90%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约95%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约96%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约97%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约98%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约99%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有100%同一性的序列互补的序列。

[0285] 在一些实施例中,向导多核苷酸在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者的序列或与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-

2581和2618-2653中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少约99％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有100％同一性的序列。

[0286] 在一些实施例中,靶基因是B2M。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:159-184中的任一者或与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约80％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约85％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约90％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约95％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约96％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约97％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约98％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约99％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有100％同一性的序列编码。

[0287] 在一些实施例中,向导多核苷酸在B2M基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:159-184中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约80％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约85％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约90％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约95％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约96％同

一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约97%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约98%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约99%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有100%同一性的序列互补的序列。

[0288] 在一些实施例中,向导多核苷酸在B2M基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:185-210中的任一者的序列或与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有100%同一性的序列。

[0289] 在一些实施例中,靶基因是TRBC1。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:211-251中的任一者或与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约80%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约85%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约90%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约95%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约96%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约97%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约98%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约99%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有100%同一性的序列编码。

[0290] 在一些实施例中,向导多核苷酸在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:211-251中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约80%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约85%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约90%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约95%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约96%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约97%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约98%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约99%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有100%同一性的序列互补的序列。

[0291] 在一些实施例中,向导多核苷酸在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:252-292中的任一者的序列或与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有100%同一性的序列。

[0292] 在一些实施例中,靶基因是TRBC2。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:293-337中的任一者或与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者

具有至少约80％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约85％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约90％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约95％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约96％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约97％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约98％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约99％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有100％同一性的序列编码。

[0293] 在一些实施例中,向导多核苷酸在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:293-337中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约80％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约85％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约90％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约95％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约96％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约97％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约98％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约99％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有100％同一性的序列互补的序列。

[0294] 在一些实施例中,向导多核苷酸在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:338-382中的任一者的序列或与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少约80％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少约85％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少约99％同一性的序列。在一些

实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有100%同一性的序列。

[0295] 在一些实施例中,靶基因是ANGPTL3。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者或与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约80%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约85%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约90%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约95%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约96%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约97%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约98%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约99%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有100%同一性的序列编码。

[0296] 在一些实施例中,向导多核苷酸在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约80%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约85%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约90%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约95%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约96%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-

477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约97%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约98%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约99%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有100%同一性的序列互补的序列。

[0297] 在一些实施例中,向导多核苷酸在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者的序列或与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有100%同一性的序列。

[0298] 在一些实施例中,靶基因是PCSK9。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者或与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约80%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约85%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约90%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约95%同一性的序列编码。在一

些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约96%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约97%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约98%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约99%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有100%同一性的序列编码。

[0299] 在一些实施例中,向导多核苷酸在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约80%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约85%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约90%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约95%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约96%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约97%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约98%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约99%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有100%同一性的序列互补的序列。

[0300] 在一些实施例中,向导多核苷酸在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者的序列或与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任

一者具有至少约99％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有100％同一性的序列。

[0301] 在一些实施例中,靶基因是VCP(例如,VCP R155)。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者或与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约80％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约85％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约90％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约95％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约96％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约97％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约98％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约99％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有100％同一性的序列编码。

[0302] 在一些实施例中,向导多核苷酸在VCP基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约80％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约85％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约90％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约95％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约96％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约97％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约98％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约99％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有100％同一性的序列互补的

序列。

[0303] 在一些实施例中,向导多核苷酸在VCP基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者的序列或与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有100%同一性的序列。

[0304] 在一些实施例中,靶基因座是AAVS1。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者或与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约80%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约85%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约90%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约95%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约96%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约97%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约98%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约99%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有100%同一性的序列编码。

[0305] 在一些实施例中,向导多核苷酸在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID

NO:928-949和1012-1049中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约80％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约85％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约90％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约95％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约96％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约97％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约98％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约99％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有100％同一性的序列互补的序列。

[0306] 在一些实施例中,向导多核苷酸在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者的序列或与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少约80％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少约85％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少约99％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有100％同一性的序列。

[0307] 在一些实施例中,靶基因是GPR146。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:1588-1656中的任一者或与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少

约98％或至少约99％同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约80％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约85％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约90％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约95％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约96％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约97％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约98％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约99％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有100％同一性的序列编码。

[0308] 在一些实施例中,向导多核苷酸在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约80％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约85％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约90％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约95％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约96％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约97％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约98％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约99％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有100％同一性的序列互补的序列。

[0309] 在一些实施例中,向导多核苷酸在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:1657-1725中的任一者的序列或与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少约80％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少约85％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸

杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少约99％同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有100％同一性的序列。

[0310] 在一些实施例中,靶基因是APOA1。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者或与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约20％、至少约25％、至少约30％、至少约35％、至少约40％、至少约45％、至少约50％、至少约55％、至少约60％、至少约65％、至少约70％、至少约75％、至少约80％、至少约85％、至少约90％、至少约91％、至少约92％、至少约93％、至少约94％、至少约95％、至少约96％、至少约97％、至少约98％或至少约99％同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约80％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约85％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约90％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约95％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约96％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约97％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约98％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约99％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有100％同一性的序列编码。

[0311] 在一些实施例中,向导多核苷酸在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约80％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约85％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约90％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约95％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或

靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约96%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约97%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约98%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约99%同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有100%同一性的序列互补的序列。

[0312] 在一些实施例中,向导多核苷酸在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者的序列或与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有100%同一性的序列。

[0313] 在一些实施例中,靶基因是HAO1。在一些实施例中,向导多核苷酸由SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者或与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸包括包含至少约46-80个连续核苷酸的序列,所述序列与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约91%、至少约92%、至少约93%、至少约94%、至少约95%、至少约96%、至少约97%、至少约98%或至少约99%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约80%同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约85%同一性的序列编码。在一

些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约90％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约95％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约96％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约97％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约98％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约99％同一性的序列编码。在一些实施例中,向导多核苷酸由与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有100％同一性的序列编码。

[0314] 在一些实施例中,向导多核苷酸在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内杂交或靶向与靶核酸序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约80％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约85％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约90％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约95％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约96％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约97％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约98％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约99％同一性的序列互补的序列。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向和与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有100％同一性的序列互补的序列。

[0315] 在一些实施例中,向导多核苷酸(例如,向导RNA)包括各种结构元件,包含但不限于:与原间隔子序列(靶序列)结合的间隔子序列、crRNA和任选的tracrRNA。在一些实施例中,基因组编辑系统包括CRISPR向导RNA。在一些实施例中,向导RNA包括包含间隔子序列的crRNA。在一些实施例中,向导RNA另外包括tracrRNA或经修饰的tracrRNA。

[0316] 在一些实施例中,本文所提供的系统包括一个或多个向导RNA。在一些实施例中,向导RNA包括有义序列。在一些实施例中,向导RNA包括反义序列。在一些实施例中,向导RNA包括除与靶序列的区域互补或基本上互补的区域之外的核苷酸序列。例如,crRNA是或被视为向导RNA的一部分,或包括在向导RNA中,例如crRNA:tracrRNA嵌合体。

[0317] 在一些实施例中,向导RNA包括合成核苷酸或经修饰的核苷酸。在一些实施例中,

向导RNA包括由天然磷酸二酯修饰的一个或多个核苷间接头。在一些实施例中,向导RNA的所有核苷间接头或其连续核苷酸序列被修饰。例如,在一些实施例中,核苷间键包括硫(S),如硫代磷酸酯核苷间键。在一些实施例中,向导RNA包括大于约10%、25%、50%、75%或90%的经修饰的核苷间接头。在一些实施例中,向导RNA包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或多于10个经修饰的核苷间接头(例如,硫代磷酸酯核苷间键)。

[0318] 在一些实施例中,向导RNA包括对核糖糖或核碱基的修饰。在一些实施例中,向导RNA包括一个或多个核苷,所述核苷包括经修饰的糖部分,其中当与脱氧核糖核酸(DNA)和RNA中存在的核糖糖部分相比时,经修饰的葡萄糖部分是糖部分的修饰。在一些实施例中,修饰在核糖环结构内。示例性修饰包含但不限于用己糖环(HNA)、在核糖环上的C2碳与C4碳之间具有双自由基桥的双环(例如,锁定核酸(LNA))或通常在C2碳与C3碳之间缺乏键的未连接核糖环(例如,UNA)替换。在一些实施例中,糖修饰的核苷包括双环己糖核酸或三环核酸。在一些实施例中,经修饰的核苷包括其中糖部分被非糖部分替代的核苷,例如肽核酸(PNA)或吗啉基核酸。

[0319] 在一些实施例中,向导RNA包括一个或多个经修饰的糖。在一些实施例中,糖修饰包括通过由将核糖环上的取代基改变为除在DNA及RNA核苷中自然存在的氢或2'-OH基团以外的基团来进行的修饰。在一些实施例中,取代基在2'、3'、4'、5'位置或其组合处引入。在一些实施例中,具有经修饰的糖部分的核苷包括2'修饰的核苷,例如,2'取代的核苷。在一些实施例中,2'糖修饰的核苷是在2'位置处具有除H或-OH以外的取代基(2'取代的核苷)或包括2'连接的双自由基的核苷,并且包括2'取代的核苷和LNA(2'-4'双自由基桥接的)核苷。2'-取代的修饰的核苷的实例包括但不限于2'-O-烷基-RNA、2'-O-甲基-RNA、2'-烷氧基-RNA、2'-O-甲氧基乙基-RNA(MOE)、2'-氨基-DNA、2'-氟-RNA和2'-F-ANA核苷。在一些实施例中,核糖基团中的修饰包括在核糖基团的2'定位处的修饰。在一些实施例中,核糖基团的2'定位处的修饰选自由以下组成的组:2'-O-甲基、2'-氟、2'-脱氧和2'-O-(2-甲氧基乙基)。

[0320] 在一些实施例中,向导RNA包括一个或多个经修饰的糖。在一些实施例中,向导RNA仅包括经修饰的糖。在一些实施例中,向导RNA包括大于约10%、25%、50%、75%或90%的经修饰的糖。在一些实施例中,经修饰的糖是双环糖。在一些实施例中,经修饰的糖包括2'-O-甲基。在一些实施例中,经修饰的糖包括2'-氟。在一些实施例中,经修饰的糖包括2'-O-甲氧基乙基。在一些实施例中,向导RNA包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或多于10个经修饰的糖(例如,包括2'-O-甲基或2'-氟)。

[0321] 在一些实施例中,向导RNA包括核苷间接头修饰和核苷修饰两者。在一些实施例中,向导RNA包括大于约10%、25%、50%、75%或90%的经修饰的核苷间接头和大于约10%、25%、50%、75%或90%的经修饰的糖。在一些实施例中,向导RNA包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或多于10个经修饰的核苷间接头(例如,硫代磷酸酯核苷间键)以及1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或多于10个经修饰的糖(例如,包括2'-O-甲基或2'-氟)。

[0322] 在一些情况下,向导RNA包括与真核生物、真菌、植物、哺乳动物或人基因组多核苷酸序列互补的序列。在一些情况下,向导RNA包括与真核基因组多核苷酸序列互补的序列。在一些情况下,向导RNA包括与真菌基因组多核苷酸序列互补的序列。在一些情况下,向导RNA包括与植物基因组多核苷酸序列互补的序列。在一些情况下,向导RNA包括与哺乳动物

基因组多核苷酸序列互补的序列。在一些情况下,向导RNA包括与人基因组多核苷酸序列互补的序列。

[0323] 在一些实施例中,向导RNA的长度为30-250个核苷酸。在一些实施例中,向导RNA的长度多于90个核苷酸。在一些实施例中,向导RNA的长度少于245个核苷酸。在一些实施例中,向导RNA的长度为30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个、120个、140个、160个、180个、200个、220个、240个或多于240个核苷酸。在一些实施例中,向导RNA的长度为约30个至约40个、约30个至约50个、约30个至约60个、约30个至约70个、约30个至约80个、约30个至约90个、约30个至约100个、约30个至约120个、约30个至约140个、约30个至约160个、约30个至约180个、约30个至约200个、约30个至约220个、约30个至约240个、约50个至约60个、约50个至约70个、约50个至约80个、约50个至约90个、约50个至约100个、约50个至约120个、约50个至约140个、约50个至约160个、约50个至约180个、约50个至约200个、约50个至约220个、约50个至约240个、约100个至约120个、约100个至约140个、约100个至约160个、约100个至约180个、约100个至约200个、约100个至约220个、约100个至约240个、约160个至约180个、约160个至约200个、约160个至约220个或约160个至约240个核苷酸。

[0324] MG核酸内切酶系统

[0325] 在某些实施例中,本文描述了工程化核酸酶系统,其包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且与靶核酸序列杂交。

[0326] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例

中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性。

[0327] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述工程化核酸内切酶包括与SEQ ID NO:109-110和2842-2854中的任一者的100%同一性。

[0328] 在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是单向导核酸。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是双向导核酸。在一些实施例中,所述工程化向导多核苷酸是RNA。在一些实施例中,所述工程化核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸非共价地结合。在一些实施例中,所述核酸内切酶与所述工程化向导多核苷酸共价地连接。

[0329] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核

酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列,所述工程

化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:67-86中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0330] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中

的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少约99％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100％同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者的100％同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。

[0331] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者的序列或与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0332] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配

置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:159-184中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0333] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:185-210中的任一者的序列或与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0334] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的

任一者具有至少约75％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约80％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约85％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且

包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:211-251中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0335] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:252-292中的任一者的序列或与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0336] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷

酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少约99％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100％同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者的100％同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:293-337中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。

[0337] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:338-382中的任一者的序列或与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

[0338] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所

述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约70％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约75％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约80％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约85％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷

酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0339] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者的序列或与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0340] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内

含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统

包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0341] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者的序列或与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0342] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内

切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约96％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约97％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约98％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少约99％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100％同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者的100％同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。

[0343] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:739-754和763-770中

的任一者的序列或与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

[0344] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约70％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约75％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约80％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约85％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所

述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0345] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者的序列或与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0346] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中

的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述

核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0347] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:1657-1725中的任一者的序列或与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0348] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约70%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约75%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约80%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约85%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内

切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约90%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约95%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列

同一性的序列。

[0349] 在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向根据SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者的序列或与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少90％、95％、97％、98％或99％序列同一性的序列。在一些实施例中,所述靶核酸序列包括与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少90％序列同一性的序列。

[0350] 在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约70％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约70％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约75％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约75％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约80％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约80％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约85％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约85％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约90％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约90％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约95％同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约95％同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶

和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约96%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约96%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约97%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约97%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约98%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约98%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者具有至少约99%同一性的序列,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少约99%同一性的序列。在一些实施例中,工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸,所述核酸内切酶包括与SEQ ID NO:1-27和771-862中的任一者的100%同一性,所述工程化向导多核苷酸被配置成与所述核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者的100%同一性。在一些实施例中,向导多核苷酸杂交或靶向与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者互补的序列或与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0351] 细胞

[0352] 在某些实施例中,本文描述了一种包括本文所描述的工程化核酸内切酶系统的细胞。

[0353] 在一些实施例中,所述细胞是真核细胞(例如,植物细胞、动物细胞、原生生物细胞或真菌细胞)、哺乳动物细胞(中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞、小鼠骨髓瘤(NSO)细胞或人视网膜细胞)、永生化细胞(例如,HeLa细胞、COS细胞、HEK-293T细胞、MDCK细胞、3T3细胞、PC12细胞、Huh7细胞、HepG2细胞、K562细胞、N2a细胞或SY5Y细胞)、昆虫细胞(例如,草地贪夜蛾(Spodoptera frugiperda)细胞、粉纹夜蛾(Trichoplusia ni)细胞、黑腹果蝇(Drosophila melanogaster)细胞、S2细胞或烟芽夜蛾(Heliothis virescens)细胞)、酵母细胞(例如,酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)细

胞、隐球酵母(Cryptococcus)细胞或假丝酵母属(Candida)细胞)、植物细胞(例如,薄壁细胞、厚角细胞或厚壁细胞)、真菌细胞(例如,酿酒酵母)细胞、隐球菌细胞或假丝酵母属细胞);或原核细胞(例如,大肠杆菌(E.coli)细胞、链球菌(streptococcus bacterium)细胞、链霉菌属土壤细菌(streptomyces soil bacteria)细胞或古生菌细胞)。在一些实施例中,所述细胞是真核细胞。在一些实施例中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施例中,所述细胞是永生化细胞。在一些实施例中,所述细胞是昆虫细胞。在一些实施例中,所述细胞是酵母细胞。在一些实施例中,所述细胞是植物细胞。在一些实施例中,所述细胞是真菌细胞。在一些实施例中,所述细胞是原核细胞。

[0354] 在一些实施例中,所述细胞是A549、HEK-293、HEK-293T、BHK、CHO、HeLa、MRC5、Sf9、Cos-1、Cos-7、Vero、BSC 1、BSC 40、BMT 10、WI38、HeLa、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、HepG2、Huh7、K562、原代细胞或其衍生物。在一些实施例中,所述原代细胞是T细胞。在一些实施例中,所述原代细胞是造血干细胞(HSC)。

[0355] 递送和载体

[0356] 在一些实施例中,本文公开了编码工程化核酸酶系统、工程化核酸内切酶或向导多核苷酸的核酸序列,所述工程化核酸酶系统包括工程化核酸内切酶(例如,融合核酸内切酶或嵌合核酸酶)和向导多核苷酸。

[0357] 在一些实施例中,编码工程化核酸内切酶系统的核酸是DNA,例如线性DNA、质粒DNA或微环DNA。在一些实施例中,编码工程化核酸酶系统的核酸是RNA,例如mRNA。

[0358] 在一些实施例中,编码工程化核酸内切酶系统的核酸由基于核酸的载体递送。在一些实施例中,基于核酸的载体是质粒(例如,可以在细胞内自主复制的环状DNA分子)、粘粒(例如,pWE或sCos载体)、人工染色体、人人工染色体(HAC)、酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)、P1衍生的人工染色体(PAC)、噬菌粒、噬菌体衍生物、杆粒或病毒。在一些实施例中,基于核酸的载体选自由以下组成的列表:pSF-CMV-NEO-NH2-PPT-3XFLAG、pSF-CMV-NEO-COOH-3XFLAG、pSF-CMV-PURO-NH2-GST-TEV、pSF-OXB20-COOH-TEV-FLAG(R)-6His、pCEP4 pDEST27、pSF-CMV-Ub-KrYFP、pSF-CMV-FMDV-daGFP、pEF1a-mCherry-N1载体、pEF1a-tdTomato载体、pSF-CMV-FMDV-Hygro、pSF-CMV-PGK-Puro、pMCP标签(m)、pSF-CMV-PURO-NH2-CMYC、pSF-OXB20-BetaGal、pSF-OXB20-Fluc、pSF-OXB20、pSF-Tac、pRI 101-AN DNA、pCambia2301,pTYB21、pKLAC2、pAc5.1/V5-His A和pDEST8。

[0359] 在一些实施例中,基于核酸的载体包括启动子。在一些实施例中,启动子选自由以下组成的组:迷你启动子、诱导型启动子、组成型启动子和其衍生物。在一些实施例中,启动子选自由以下组成的组:CMV、CBA、EF1a、CAG、PGK、TRE、U6、UAS、T7、Sp6、lac、araBad、trp、Ptac、p5、p19、p40、突触蛋白、CaMKII、GRK1和其衍生物。在一些实施例中,启动子是U6启动子。在一些实施例中,启动子是CAG启动子。

[0360] 在一些实施例中,基于核酸的载体是病毒。在一些实施例中,病毒是α病毒、细小病毒、腺病毒、AAV、杆状病毒、登革热病毒(Dengue virus)、慢病毒、疱疹病毒、痘病毒、环病毒(anellovirus)、博卡病毒(bocavirus)、痘苗病毒或逆转录病毒。在一些实施例中,病毒是α病毒。在一些实施例中,病毒是细小病毒。在一些实施例中,病毒是腺病毒。在一些实施例中,病毒是AAV。在一些实施例中,病毒是杆状病毒。在一些实施例中,病毒是登革热病毒。在一些实施例中,病毒是慢病毒。在一些实施例中,病毒是疱疹病毒。在一些实施例中,病毒是

痘病毒。在一些实施例中,病毒是环病毒。在一些实施例中,病毒是博卡病毒。在一些实施例中,病毒是痘苗病毒。在一些实施例中,病毒是逆转录病毒。

[0361] 在一些实施例中,AAV是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAV9、AAV10、AAV11、AAV12、AAV13、AAV14、AAV15、AAV16、AAV-rh8、AAV-rh10、AAV-rh20、AAV-rh39、AAV-rh74、AAV-rhM4-1、AAV-hu37、AAV-Anc80、AAV-Anc80L65、AAV-7m8、AAV-PHP-B、AAV-PHP-EB、AAV-2.5、AAV-2tYF、AAV-3B、AAV-LK03、AAV-HSC1、AAV-HSC2、AAV-HSC3、AAV-HSC4、AAV-HSC5、AAV-HSC6、AAV-HSC7、AAV-HSC8、AAV-HSC9、AAV-HSC10、AAV-HSC11、AAV-HSC12、AAV-HSC13、AAV-HSC14、AAV-HSC15、AAV-TT、AAV-DJ/8、AAV-Myo、AAV-NP40、AAV-NP59、AAV-NP22、AAV-NP66、AAV-HSC16或其衍生物。在一些实施例中,疱疹病毒是HSV 1型、HSV-2型、VZV、EBV、CMV、HHV-6、HHV-7或HHV-8。

[0362] 在一些实施例中,病毒是AAV1或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV2或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV3或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV4或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV5或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV6或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV7或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV8或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV9或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV10或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV11或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV12或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV13或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV14或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV15或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV16或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-rh8或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-rh10或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-rh20或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-rh39或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-rh74或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-rhM4-1或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-hu37或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-Anc80或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-Anc80L65或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-7m8或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-PHP-B或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-PHP-EB或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-2.5或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-2tYF或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-3B或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-LK03或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC1或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC2或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC3或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC4或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC5或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC6或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC7或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC8或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC9或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC10或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC11或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC12或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC13或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC14或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC15或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-TT或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-DJ/8或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-Myo或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-NP40或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-NP59或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-NP22或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-NP66或其衍生物。在一些实施例中,病毒是AAV-HSC16或其衍生物。

[0363] 在一些实施例中,病毒是HSV-1或其衍生物。在一些实施例中,病毒是HSV-2或其衍生物。在一些实施例中,病毒是VZV或其衍生物。在一些实施例中,病毒是EBV或其衍生物。在一些实施例中,病毒是CMV或其衍生物。在一些实施例中,病毒是HHV-6或其衍生物。在一些实施例中,病毒是HHV-7或其衍生物。在一些实施例中,病毒是HHV-8或其衍生物。

[0364] 在一些实施例中,编码工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统的核酸由基于非核酸的递送系统(例如,非病毒递送系统)递送。在一些实施例中,非病毒递送系统是脂质体。在一些实施例中,核酸与脂质缔合。在一些实施例中,可以将与脂质缔合的核酸包封在脂质体的含水内部、散布在脂质体的脂质双层、经由与脂质体和核酸二者缔合的连接分子与脂质体连接、捕获在脂质体中、与脂质体复合、分散在含有脂质的溶液中、与脂质混合、与脂质合并、作为脂质中的悬浮液而含有、含有微团或与微团复合、或以其它方式与脂质缔合。在一些实施例中,核酸包括在脂质纳米颗粒(LNP)中。

[0365] 在一些实施例中,工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统以任何合适的方式稳定地或瞬时地引入到细胞中。在一些实施例中,工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统转染到细胞中。在一些实施例中,用编码工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统的核酸构建体转导或转染细胞。例如,用编码工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统或经翻译的工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统的核酸转导(例如,用编码工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统的病毒)或转染(例如,用编码工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统的质粒)细胞。在一些实施例中,转导是稳定的或瞬时的转导。在一些实施例中,例如当工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统包括CRISPR核酸酶时,用一个或多个gRNA分子转导或转染表达工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统或含有工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统的细胞。在一些实施例中,表达工程化核酸内切酶或工程化核酸内切酶系统的质粒通过电穿孔、瞬时(例如,脂质转染)和稳定的基因组整合(例如,piggybac)以及病毒转导(例如,慢病毒或AAV)或本领域技术人员已知的其它方法引入到细胞中。在一些实施例中,将基因编辑系统作为一个或多个多肽引入到细胞中。在一些实施例中,通过使用RNP复合物来实现递送。多肽和/或RNP到细胞的递送方法是本领域已知的,例如通过电穿孔或通过细胞挤压。

[0366] 核酸的示例性递送方法包含脂质转染、核转染、电穿孔、稳定的基因组整合(例如,piggybac)、微注射、基因枪(biolistics)、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质核酸缀合物、裸DNA、人工病毒粒子和药剂增强的DNA摄取。脂质转染例如在美国专利第5,049,386号;第4,946,787号;和第4,897,355号中描述,并且脂质转染试剂是商业销售的(例如,Transfectam™、Lipofectin™和SF细胞系4D-核转染体X Kit™(龙沙公司(Lonza)))。适于多核苷酸的高效受体识别脂质转染的阳离子和中性脂质包含WO 91/17424和WO 91/16024中的阳离子脂质和中性脂质。在一些实施例中,递送到细胞(例如,体外或离体施用)或靶组织(例如,体内施用)。在一些实施例中,核酸包括在特异性靶向宿主细胞的脂质体或纳米颗粒中。

[0367] 将核酸递送到细胞的另外的方法是本领域技术人员已知的。参见例如US2003/0087817。

[0368] 在一些实施例中,本公开提供了一种包括本文所描述的载体或核酸的细胞。在一些实施例中,细胞表达基因编辑系统或其部分。在一些实施例中,细胞是人细胞。在一些实

施例中,细胞是离体编辑的基因组。在一些实施例中,细胞在体内编辑的基因组。

[0369] 脂质纳米颗粒

[0370] 在某些实施例中,本文公开了包括本公开的工程化核酸内切酶系统的脂质纳米颗粒,所述脂质纳米颗粒用于将所述工程化核酸内切酶系统递送到细胞中。

[0371] 在一些实施例中,脂质纳米颗粒包括工程化核酸内切酶系统。在一些实施例中,脂质纳米颗粒包括工程化核酸内切酶或编码工程化核酸内切酶的核酸以及工程化向导多核苷酸。在一些实施例中,脂质纳米颗粒包括工程化核酸内切酶系统的一个或多个组分。在一些实施例中,脂质纳米颗粒包括工程化核酸内切酶或编码工程化核酸内切酶的核酸。在一些实施例中,脂质纳米颗粒包括工程化向导多核苷酸。

[0372] 在一些实施例中,脂质纳米颗粒拴系到工程化核酸内切酶系统。

[0373] 在一些实施例中,脂质纳米颗粒用于将工程化核酸内切酶系统或其组分递送到细胞。在一些实施例中,所述细胞是特异性细胞类型。在一些实施例中,所述细胞是真核细胞(例如,植物细胞、动物细胞、原生生物细胞或真菌细胞)、哺乳动物细胞(中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞、人胚胎肾(HEK)细胞、小鼠骨髓瘤(NSO)细胞或人视网膜细胞)、永生化细胞(例如,HeLa细胞、COS细胞、HEK-293T细胞、MDCK细胞、3T3细胞、PC12细胞、Huh7细胞、HepG2细胞、K562细胞、N2a细胞或SY5Y细胞)、昆虫细胞(例如,草地贪夜蛾细胞、粉纹夜蛾细胞、黑腹果蝇细胞、S2细胞或烟芽夜蛾细胞)、酵母细胞(例如,酿酒酵母细胞、隐球酵母细胞或假丝酵母属细胞)、植物细胞(例如,薄壁细胞、厚角细胞或厚壁细胞)、真菌细胞(例如,酿酒酵母)细胞、隐球菌细胞或假丝酵母属细胞);或原核细胞(例如,大肠杆菌细胞、链球菌细胞、链霉菌属土壤细菌细胞或古生菌细胞)。在一些实施例中,所述细胞是真核细胞。在一些实施例中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一些实施例中,所述细胞是永生化细胞。在一些实施例中,所述细胞是昆虫细胞。在一些实施例中,所述细胞是酵母细胞。在一些实施例中,所述细胞是植物细胞。在一些实施例中,所述细胞是真菌细胞。在一些实施例中,所述细胞是原核细胞。在一些实施例中,所述细胞是A549、HEK-293、HEK-293T、BHK、CHO、HeLa、MRC5、Sf9、Cos-1、Cos-7、Vero、BSC 1、BSC 40、BMT 10、WI38、HeLa、Saos、C2C12、L细胞、HT1080、HepG2、Huh7、K562、原代细胞或其衍生物。在一些实施例中,所述原代细胞是T细胞。在一些实施例中,所述原代细胞是造血干细胞(HSC)。

[0374] 如本文所描述的脂质纳米颗粒可以是4组分脂质纳米颗粒。此类纳米颗粒可以被配置成用于递送RNA或其它核酸(例如,合成RNA、mRNA或体外合成的mRNA),并且可以通常如WO2012135805A2中所描述的进行调配。此类纳米颗粒通常可以包括:(a)阳离子脂质(例如,图45所描述的脂质中的任一种);(b)中性脂质(例如,DSPC或DOPE);(c)固醇(例如,胆固醇或胆固醇类似物);或(d)经PEG修饰的脂质(例如,PEG-DMG)。

[0375] 本文称为"C12-200"的阳离子脂质由Love等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》.2010 107:1864-1869以及Liu和Huang,《分子疗法(Molecular Therapy)》.2010 669-670公开。除多核苷酸、初级构建体或RNA(例如,mRNA)之外,阳离子脂质制剂可以包含包括3或4个或更多个组分的颗粒。作为实例,含有某些阳离子脂质的制剂包含但不限于98N12-5(或图45中描述的其它结构中的任一者),并且可以含有42%的脂质、48%的胆固醇和10%的PEG(C14或更大的烷基链长)。作为另一个实例,具有某些类脂质的制剂包含但不限于C12-200,并且可以含有50%的阳离子脂质、10%的二硬脂酰磷脂酰胆

碱、38.5％的胆固醇和1.5％的PEG-DMG。

[0376] 在一些实施例中,如US10709779中所描述调配脂质纳米颗粒。在一些实施例中,阳离子脂质纳米颗粒包括阳离子脂质、经PEG修饰的脂质、固醇和非阳离子脂质。在一些实施例中,阳离子脂质选自由图45所描绘的阳离子脂质组成的组或包括其中的任一者。在一些实施例中,阳离子脂质纳米颗粒的摩尔比为约20-60％的阳离子脂质:约5-25％的非阳离子脂质:约25-55％的固醇;和约0.5-15％的经PEG修饰的脂质。在一些实施例中,阳离子脂质纳米颗粒包括约50％的阳离子脂质、约1.5％的经PEG修饰的脂质、约38.5％的胆固醇和约10％的非阳离子脂质的摩尔比。在一些实施例中,阳离子脂质纳米颗粒包括约55％的阳离子脂质、约2.5％的经PEG修饰的脂质、约32.5％的胆固醇和约10％的非阳离子脂质的摩尔比。在一些实施例中,阳离子脂质是可电离阳离子脂质,非阳离子脂质是中性脂质,并且固醇是胆固醇。在一些实施例中,阳离子脂质纳米颗粒的摩尔比为50:38.5:10:1.5的阳离子脂质:胆固醇:PEG2000-DMG:DSPC或DMG:DOPE。在一些实施例中,如本文所描述的脂质纳米颗粒可以包括摩尔比为47.5:16:35:1.5的胆固醇、1,2-二油酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺(DOPE)、1,1'-((2-(4-(2-((2-(双(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)(2-羟基十二烷基)氨基)乙基)哌嗪-1-基)乙基)氨叉基)双(十二烷-2-醇)(C12-200)和DMG-PEG-2000。

[0377] 使用方法

[0378] 本公开的基因编辑系统可以用于各种应用,例如核酸编辑(例如,基因编辑)或与核酸分子结合(例如,序列特异性结合)。此类系统可以用于例如补救(例如,去除或替换)可能引起受试者的疾病的遗传突变;使基因灭活以便确定其在细胞中的功能;作为检测致病遗传元件的诊断工具(例如,通过切割逆转录病毒RNA或编码致病突变的扩增DNA序列);作为灭活酶与探针结合以靶向和检测特定核苷酸序列(例如,编码细菌抗生素抗性的序列);通过靶向病毒基因组使病毒灭活或无法感染宿主细胞;添加基因或修改代谢途径来对生物体进行工程化以产生有价值的小分子、大分子或次级代谢物;建立用于进化选择的基因驱动元件和/或作为生物传感器检测外来小分子和核苷酸对细胞的干扰。

[0379] 在一些实施例中,本文描述了用于使用本文所描述的工程化核酸内切酶(例如,嵌合核酸酶或融合核酸内切酶)进行基因编辑的方法。在一些实施例中,工程化核酸酶是2类II型核酸内切酶。在一些实施例中,II型核酸内切酶具有与SEQ ID NO:10具有至少55％(例如,至少60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或99％)同一性的序列。

[0380] 在某些实施例中,本文描述了用于修饰靶核酸的方法,所述方法包括向细胞提供本文所公开的工程化核酸酶系统。在一些实施例中,所述工程化核酸酶系统包括核酸内切酶和工程化向导多核苷酸。在一些实施例中,靶核酸是双链的。在一些实施例中,靶核酸是双链DNA。在一些实施例中,靶核酸是单链的。

[0381] 在一些实施例中,所述方法用于在细胞的基因组中引入修饰。在一些实施例中,所述修饰是插入、缺失或突变。在一些实施例中,所述方法用于在细胞的基因组中引入定点插入、缺失和/或突变(例如插入和突变)。在一些实施例中,所述方法与核酸模板组合使用以促进定点插入到细胞的基因组中。

[0382] 在一些实施例中,细胞是人细胞。在一些实施例中,修饰细胞基因组或细胞中包括的载体。在一些实施例中,细胞基因组离体进行修饰。在一些实施例中,细胞基因组在体内进行修饰。在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰白蛋白基因。在一些实施例中,本

文所描述的方法用于靶向细胞中的白蛋白基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:67-86中的任一者或与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:67-86中的任一者的序列或与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在白蛋白基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:67-86中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0383] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰TRAC基因。在一些实施例中,本文所描述的方法用于靶向细胞中的TRAC基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者或与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者的序列或与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRAC基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:119-138、922-924、972-991、1088-1183、1280-1320、2390-2485和2582-2617中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者的序列或与SEQ ID NO:139-158、925-927、992-1011、1184-1279、1321-1361、2486-2581和2618-2653中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0384] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰B2M基因。在一些实施例中,本文所描述的方法用于靶向细胞中的B2M基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:159-184中的任一者或与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:159-184中的任一者的序列或与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在B2M基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:159-184中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:185-210中的任一者的序列或与SEQ ID NO:185-210中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0385] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰TRBC1基因。在一些实施例中,本文

所描述的方法用于靶向细胞中的TRBC1基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:211-251中的任一者或与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:211-251中的任一者的序列或与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:211-251中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:252-292中的任一者的序列或与SEQ ID NO:252-292中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0386] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰TRBC2基因。在一些实施例中,本文所描述的方法用于靶向细胞中的TRBC2基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:293-337中的任一者或与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:293-337中的任一者的序列或与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在TRBC2基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:293-337中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:338-382中的任一者的序列或与SEQ ID NO:338-382中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0387] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰ANGPTL3基因。在一些实施例中,本文所描述的方法用于靶向细胞中的ANGPTL3基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者或与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者的序列或与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在ANGPTL3基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:383-477、1392-1489、2120-2215和2312-2350中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者的序列或与SEQ ID NO:478-572、1490-1587、2216-2311和2351-2389中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0388] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰PCSK9基因。在一些实施例中,本文

所描述的方法用于靶向细胞中的PCSK9基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者或与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者的序列或与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在PCSK9基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:573-587和1362-1376中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者的序列或与SEQ ID NO:588-602和1377-1391中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0389] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰VCP基因。在一些实施例中,本文所描述的方法用于靶向细胞中的VCP基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者或与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者的序列或与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在VCP基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:723-738和755-762中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者的序列或与SEQ ID NO:739-754和763-770中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0390] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰AAVS1基因座。在一些实施例中,本文所描述的方法用于靶向细胞中的AAVS1基因座。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者或与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者的序列或与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在AAVS1基因座内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:928-949和1012-1049中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者的序列或与SEQ ID NO:950-971和1050-1087中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0391] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰GPR146基因。在一些实施例中,本文

所描述的方法用于靶向细胞中的GPR146基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:1588-1656中的任一者或与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:1588-1656中的任一者的序列或与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在GPR146基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1588-1656中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:1657-1725中的任一者的序列或与SEQ ID NO:1657-1725中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0392] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰APOA1基因。在一些实施例中,本文所描述的方法用于靶向细胞中的APOA1基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者或与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者的序列或与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在APOA1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:1726-1744、1764-1774、1866-1961和2058-2088中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施例中,gRNA杂交或靶向根据SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者的序列或与SEQ ID NO:1745-1763、1775-1785、1962-2057和2089-2119中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列。

[0393] 在一些实施例中,本文所描述的方法用于修饰HAO1基因。在一些实施例中,本文所描述的方法用于靶向细胞中的HAO1基因。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸(例如,向导核糖核酸)由SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者或与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列编码。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与序列杂交或靶向序列,所述序列与包括SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者的序列或与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列互补。在一些实施例中,工程化向导多核苷酸被配置成与核酸内切酶形成复合物并且包括间隔子序列,所述间隔子序列被配置成在HAO1基因内或在内源性基因的内含子内与靶核酸序列的至少一部分杂交,所述工程化向导多核苷酸包括与SEQ ID NO:611-633、1789-1826和1827-1865中的任一者具有至少90%序列同一性的序列。

[0394] 试剂盒

[0395] 在一些实施例中,本公开提供了包括编码本文所描述的嵌合核酸酶或基因编辑系

统的各种组分的一个或多个核酸构建体的试剂盒,例如,包括编码能够修饰靶DNA序列的嵌合核酸酶或基因编辑系统的组分的核苷酸序列。在一些实施例中,核苷酸序列包括驱动基因编辑系统组分的表达的异源启动子。

[0396] 在一些实施例中,本文所公开的嵌合核酸酶或基因编辑系统中的任一者被组装到药物试剂盒、诊断试剂盒或研究试剂盒中,以促进其在治疗、诊断或研究应用中的使用。试剂盒可以包含容纳本文所公开的任何载体和使用说明书的一个或多个容器。

[0397] 试剂盒可以被设计成有助于研究人员使用本文所描述的方法,并且可以采取许多形式。试剂盒的每种组合物,在适用的情况下,可以以液体形式(例如,以溶液形式)或以固体形式(例如,干粉)提供。在某些情况下,一些组合物可以是可构成的或以其它方式可加工的(例如,以形成活性形式),例如,通过添加合适的溶剂或其它物种(例如,水或细胞培养基),所述组合物可以与试剂盒一起提供,也可以不与试剂盒一起提供。如本文所使用的,“指令”可以定义指令和/或促进的组成,并且通常涉及本公开的包装上或与之相关的书面说明。指令还可以包含以任何方式提供的任何口头或电子指令,使得用户将清楚地认识到指令将与试剂盒相关,例如,视听(例如,录像带、DVD等)、互联网和/或基于网络的通信等。在一些实施例中,书面说明呈由监管药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式,所述说明也可以反映机构针对动物施用在制造、使用或销售方面的许可。

[0398] 实例

[0399] 以下实例出于展示本公开的各个实施例的目的而给出并且不意味着以任何方式限制本公开。本实例以及本文所述的方法目前代表优选的实施例,是示例性的,并且不旨在限制本公开的范围。本领域技术人员将想到其中的变化和涵盖在由权利要求的范围所限定的本公开的精神内的其它用途。

[0400] 实例1-质粒

[0401] 针对大肠杆菌表达,对嵌合体序列进行密码子优化,并且合成并克隆到pET21载体中。为了构建pET21-MG3-6+MG15-1(WP)和pET21-MG3-6+MG15-1(P),使用引物P441-P446从pMGX3-6和pMGX15-1扩增基因片段。将所得PCR产物纯化并且组装成pAL3(由ClaI和XhoI消化)。克隆的嵌合基因的DNA序列通过桑格测序进行确认。

[0402] 实例2-生物信息学分析

[0403] 基于推定的HNH和RuvC催化残基的存在,预测本文使用的CRISPR II型核酸内切酶具有核酸酶活性。另外,结构预测表明残基参与引导、靶向、识别和与PAM相互作用。基于重要残基的位置,预测的II型CRISPR核酸内切酶结构域包括三个RuvC结构域、HNH核酸内切酶结构域、识别结构域和PAM相互作用结构域等。对于编码紧邻CRISPR阵列的全长II型核酸内切酶的基因组序列,预测了被工程化成被核酸酶用作单向导RNA的tracrRNA序列。

[0404] 对所选RNA引导的CRISPR II型核酸内切酶序列进行多序列比对(参见图3A)。预测并且显示MG3-6和MG15-1的蛋白质结构。嵌合组合物的详细信息示出于表1B中。在预测的结构模型信息和向导RNA优化的引导下(参见图7),通过连接密切相关和远距离相关的II型CRISPR核酸内切酶的结构域来识别非规范PAM的蛋白质变体被工程化。

[0405] 表1B-嵌合组合物

[0406]

嵌合体	N 末端	C 末端	示例序列（SEQ ID NO:）
MG3-6+MG1-4	MG3-6 (1-742)	MG1-4 (750-1025)	1
MG3-6+MG1-5	MG3-6 (1-742)	MG1-5 (789-1077)	2
MG3-6+MG1-6	MG3-6 (1-742)	MG1-6 (773-1059)	3
MG3-6+MG1-7	MG3-6 (1-742)	MG1-7 (775-1061)	4
MG3-6+MG2-4	MG3-6 (1-742)	MG2-4 (876-1201)	5
MG3-6+MG2-7	MG3-6 (1-742)	MG2-7 (817-1080)	6
MG3-6+MG3-1	MG3-6 (1-742)	MG3-1 (684-1050)	7
MG3-6+MG3-2	MG3-6 (1-742)	MG3-2 (755-1134)	8
MG3-6+MG3-3	MG3-6 (1-742)	MG3-3 (750-1132)	9
MG3-6+MG3-4	MG3-6 (1-742)	MG3-4 (743-1134)	10
MG3-6+MG3-7	MG3-6 (1-742)	MG3-7 (751-1131)	11
MG3-6+MG3-8	MG3-6 (1-742)	MG3-8 (741-1132)	12
MG3-6+MG4-2	MG3-6 (1-742)	MG4-2 (747-1043)	13
MG3-6+MG4-5	MG3-6 (1-742)	MG4-5 (747-1055)	14
MG3-6+MG6-3	MG3-6 (1-742)	MG6-3 (709-1027)	15

[0407]

嵌合体	N 末端	C 末端	示例序列（SEQ ID NO:）
MG3-6+MG14-1	MG3-6 (1-742)	MG14-1 (756-1003)	16
MG3-6+MG15-1	MG3-6 (1-742)	MG15-1 (729-1082)	17
MG3-6+MG16-1	MG3-6 (1-742)	MG16-1 (787-1154)	18
MG3-6+MG16-2	MG3-6 (1-742)	MG16-2 (796-1227)	19
MG3-6+MG18-1	MG3-6 (1-742)	MG18-1 (997-1348)	20
MG3-6+MG21-1	MG3-6 (1-742)	MG21-1 (740-1098)	21
MG3-6+MG22-1	MG3-6 (1-742)	MG22-1 (1092-1521)	22
MG3-6+MG23-1	MG3-6 (1-742)	MG23-1 (1008-1377)	23
MG3-6+SaCas9	MG3-6 (1-742)	SaCas9 (706-1053)	24
MG3-6+SpCas9	MG3-6 (1-742)	SpCas9 (988-1368)	25
MG29-1+MG29-5 (WP)	MG29-1 (1-560)	MG29-5 (556-856)	109
MG3-6+MG15-1(WP)	MG3-6 (1-840)	MG15-1 (818-1082)	26
MG3-6+MG15-1(P)	MG3-6 (1-922)	MG15-1 (931-1082)	27
MG29-1+MG57-1 (WP)	MG29-1 (1-560)	MG57-1 (633-945)	110

[0408] 实例3-体外PAM富集测定

[0409] 本文使用的核酸酶的PAM序列通过在基于大肠杆菌裂解物的表达系统或重构体外翻译中的表达来确定。大肠杆菌密码子优化的蛋白质序列在T7启动子的控制下从PCR片段转录和翻译。将此混合物稀释到具有蛋白质特异性sgRNA和PAM质粒文库(PAM文库U67/U40)的反应缓冲液(10mM Tris pH 7.5,100mM NaCl,10mM $MgCl_2$)中。质粒文库含有与单个向导中的间隔子序列匹配的间隔子序列,后跟8N混合碱基,其中的一个子集被认为具有正确的PAM。在1-3小时之后,停止反应,并且通过DNA清洁试剂盒回收DNA。使DNA经受平末端连接反应,所述反应将衔接子序列添加到切割的文库质粒中,同时保持完整的环状质粒不变。使用对文库和衔接子序列具有特异性的引物(LA065和LA125)进行PCR,并且在凝胶上分解以鉴定活性蛋白复合物(参见图4和图6)。使用循环参数为8的高通量测序引物通过PCR进一步扩

增所得PCR产物。对经受NGS分析的样品进行定量并合并在一起。对NGS文库进行纯化和定量。对此文库(起始8N文库的子集)进行测序揭示了含有正确的PAM的序列(参见图5A和5B)。

[0410] 实例4-用于体内靶向的单向导设计

[0411] 本文使用的单向导(sgRNA)结构包括以下结构:5'--22nt原间隔子-重复序列-tracr--3'。设计了20个靶向小鼠白蛋白内含子1的单向导。在一些情况下,向导是化学合成的并且包含向导的化学修饰。

[0412] 实例5-mRNA的体外转录

[0413] 编码嵌合体的编码序列(CDS)(例如,MG3-6+MG3-4(SEQ ID NO:10))针对小鼠进行密码子优化并且化学合成。将CDS克隆到mRNA产生载体pMG010中。pMG010的架构包括一系列元件:T7启动子-5'UTR-起始密码子-核定位信号1-CDS-核定位信号2-终止密码子-3'UTR-107核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:108)。从200ml细菌培养物中纯化含有MG3-6+MG 3-4CDS的质粒pMG010。将载体用SapI消化过夜,以便使质粒在polyA尾下游线性化。使用酚/氯仿DNA提取纯化线性化载体。使用T7 RNA聚合酶在50℃下进行体外转录,持续1小时。将体外转录的mRNA在37℃下用DNA酶处理10分钟,并且纯化mRNA。通过260nm处的吸光度对mRNA进行定量,并且通过自动电泳评估其大小和纯度,并且证明其具有预期大小。

[0414] 实例6-Hepa1-6细胞转染和白蛋白靶向

[0415] 如下将SEQ ID NO:67-86的300ng mRNA和350ng每种单向导RNA(sgRNA)转染到Hepa1-6细胞中。在转染前一天,将Hepa1-6细胞以一定密度接种到24孔中,以在24小时后达到70%汇合。第二天,将MG3-6+MG3-4嵌合体mRNA和单向导转染到Hepa1-6细胞中。转染后两天,抽吸培养基,并且对基因组DNA进行纯化(参见图9A和9B)。结果指示性能最佳的sgRNA是指定为g87(SEQ ID NO:72)和g34(SEQ ID NO:70)的那些,对于gRNAs g45(SEQ ID NO:67)、g44(SEQ ID NO:71)、g59(SEQ ID NO:76)、g78(SEQ ID NO:68)、g84(SEQ ID NO:79)和g33(SEQ ID NO:80)也发生了明显的编辑。

[0416] 实例7-基因组编辑样品的桑格测序

[0417] 设计了侧接由单向导RNA(例如,白蛋白基因)靶向的基因组区域的引物。进行使用引物57F(SEQ ID NO:97)和1072R(SEQ ID NO:98)的PCR扩增,产生1016bp的PCR产物。对PCR产物进行纯化和浓缩,并且使用8pmol的单独测序引物(132F、282F、446R和460F,SEQ ID NO:99-102)使100ng PCR产物经受桑格测序。分析桑格测序结果并绘制数据(参见图9B)。

[0418] 实例8-使用mRNA转染对小鼠HAO-1基因进行MG3-6/3-4核酸酶向导筛选

[0419] 通过搜索PAM序列3'NNAAA(A/T)N 5',在计算机上鉴定了靶向小鼠HAO-1基因(编码乙醇酸氧化酶)外显子1至4的MG3-6/3-4核酸酶的向导RNA。将小鼠基因组中具有预测最少的脱靶位点的总共23个向导化学合成为单向导RNA。如下将300ng mRNA和120ng单向导RNA转染到Hepa1-6细胞中。在转染前一天,将已在DMEM、10% FBS、1xNEAA培养基中培养少于10天的Hepa1-6细胞,在无Pen/Strep的情况下接种到TC处理的24孔板中。对细胞进行计数,并且将相当于60,000个活细胞的体积添加到每个孔中。将另外的预平衡培养基添加到每个孔中,以使总体积达到500μL。在转染当天,将300ng编码MG3-6-MG-3-4的mRNA(SEQ ID NO:108)和120ng sgRNA(支架序列SEQ ID NO:34)混合在一起并且转染到Hepa1-6细胞中。转染后两天,从Hepa1-6细胞的每个孔中吸出培养基,并且通过自动磁珠纯化对基因组DNA进行纯化。表2和3中汇总了向导的活性,而表4中汇总了所使用的引物。

[0420] 表2:通过mRNA转染递送的小鼠HAO1处的MG3-6/3-4向导的平均活性

向导名称	PAM	SEQ ID NO:	间隔子序列	编辑活性（平均INDEL%）
mH364-1	GCAAATG	611	GTATGACTATTACAGGTCTGGG	0
mH364-2	GAAAATG	612	AAATAGCAAAGTTTCTTACCTA	0
mH364-3	AGAAAAT	613	TAAATAGCAAAGTTTCTTACCT	0
mH364-6	CTAAAAC	614	ATTGGCATGCTGACTCTCTGTC	0
mH364-7	AGAAAAG	615	GAGCTGGCCACTGTGCGAGGTA	45.7
mH364-9	ACAAATA	616	CAGGTAAGGGGTGTCCACAGTC	0
mH364-10	TGAAAAA	617	ATTCTATGTATCTATTCTAGGA	0
mH364-11	GAAAAAC	618	TTCTATGTATCTATTCTAGGAT	31
mH364-15	CCAAATC	619	AAATTTCCCTTAGGAGAAAATG	0
mH364-16	GAAAATG	620	GTCTCCAAAATTTCCCTTAGGA	10.7
mH364-17	AGAAAAT	621	TGTCTCCAAAATTTCCCTTAGG	0
mH364-18	GGAAATT	622	TGATTTGGCATTTTCTCCTAAG	0
mH364-19	CAAAATT	623	TCAGCAAGTCCACTGTTGTCTC	0
mH364-20	CCAAAAT	624	TTCAGCAAGTCCACTGTTGTCT	25.9
mH364-22	CAAAATG	625	AGTAGAGAAATGACAAACCTCT	0
mH364-23	TCAAAAT	626	AAGTAGAGAAATGACAAACCTC	20.7

[0421]

[0422] 表3:在通过mRNA转染递送的小鼠HAO1处以更宽松的PAM设计测试MG3-6/3-4向导的结果

向导名称	PAM	SEQ ID NO:	间隔子序列	编辑活性（INDEL%）	R^2
mH364-4	AGAAACT	627	ACATCCAAGCATTTTCTAGGTA	0	1
mH364-5	TAAAACA	628	TTGGCATGCTGACTCTCTGTCC	0	1
mH364-8	ACAAAGA	629	CGCTGGATGCAACTGTACATCT	0	0.99
mH364-12	AAAAACT	630	TCTATGTATCTATTCTAGGATG	0	0.99
mH364-13	TGAAACC	631	TCTATTCTAGGATGAAAAACTT	0	0.99
mH364-14	TCAAAGT	632	AGAAAATGCCAAATCATTGGTT	0	0.99
mH364-21	GTAAAGG	633	ATTGACATCACTGCCTATTGTT	0	1

[0423]

[0424] 表4:针对小鼠HAO1基因设计的引物,用于前四个外显子中的每一个处的PCR和桑格测序

[0425]

靶外显子	用途	引物名称	SEQ ID NO:	引物序列
小鼠HAO1外显子1	正向PCR	PCR_mHE1_F_+233	634	GTGACCAACCCTACCCGTTT
	反向PCR	PCR_mHE1_R_-553	635	GCAAGCACCTACTGTCTCGT
	测序	Seq_mHE1_F_+139	636	GTCTAGGCATACAATGTTTGCTCA
小鼠HAO1外显子2	正向PCR	HAO1_E2_F5721	637	CAACGAAGGTTCCCTCCAGG
	反向PCR	HAO1_E2_R6271	638	GGAAGGGTGTTCGAGAAGGA
	测序	5938F Seq_HAO1_E2	639	CTATGCAAGGAAAAGATTTGGCC
小鼠HAO1外显子3	正向PCR	HAO1_E3_F23198	640	TGCCCTAGACAAGCTGACAC
	反向PCR	HAO1_E3_R23879	641	CAGATTCTGGAAGTGGCCCA
	测序	HAO1_E3_F23198	642	与正向 PCR 引物相同
小鼠HAO1外显子4	正向PCR	PCR_mHE4_F_+300	643	GGCTGGCTGAAAATAGCATCC
	反向PCR	HAO1_E4_R31650	644	AGGTTTGGTTCCCCTCACCT
	测序	PCR_mHE4_R_-149	645	TCTGCCATGAAGGCATATGGAC

[0426] 实例9-MG3-6/3-4和MG3-6 II型核酸酶的向导化学物质优化

[0427] 设计了40个不同的经化学修饰的向导(命名为mAlb3634-34-0至mAlb3634-34-44),并且测试了这些向导中的39个向导的活性。一种向导,mH3634-34-32,RNA合成失败,因此未测试。选择作为插入各种化学修饰的模型的向导间隔子序列是mAlb3634-34(靶向白蛋白内含子1),因为它被证明是小鼠肝细胞细胞系Hepa1-6细胞的向导筛选中最活跃的向导(表5和图10)。

[0428] 表5:Hepa1-6细胞中经化学修饰的向导的活性

[0429]

向导	编辑活性（INDEL%）
mAlb3634-13	BLOD
mAlb3634-16	BLOD
mAlb3634-19	BLOD
mAlb3634-20	BLOD
mAlb3634-24	BLOD
mAlb3634-30	BLOD
mAlb3634-45	19.5
mAlb3634-44	16.5
mAlb3634-53	BLOD
mAlb3634-59	22
mAlb3634-64	BLOD
mAlb3634-72	BLOD
mAlb3634-73	BLOD
mAlb3634-74	BLOD
mAlb3634-78	9
mAlb3634-81	2
mAlb3634-84	15
mAlb3634-87	49
mAlb3634-34	62
mAlb3634-33	20.5

[0430] BLOD＝低于检测限

[0431] MG3-6/3-4的sgRNA包括位于5’端的间隔子,随后为CRISPR重复序列和反式激活CRISPRRNA(tracr)。CRISPR重复序列和tracr与MG3-6核酸酶的CRISPR重复序列和tracr相同(图11A、11B)。CRISPR重复序列和tracr形成包括3个茎环的结构化RNA(图11A)。通过用甲基替换核糖的2’羟基或通过硫代磷酸酯(PS)替换磷酸二酯主链来修饰茎环的不同区域。此外,用2’-O-甲基或2’-氟碱基和PS键的混合物修饰在向导的5’处的间隔子。设计的化学修饰的不同组合称为mAlb3634-34-0至mAlb3634-34-44,并且相应序列示出于表6中。

[0432] 通过编码MG3-6/3-4的mRNA和向导的共转染,在Hepa1-6细胞中评估了具有完全相同的碱基序列但不同的化学修饰的39个单向导的编辑活性;示出了相对于向导对照(AltR)的编辑活动的编辑活性。结果示出于表6和图12中。

[0433] 表6:当与MG3-6/3-4mRNA共转染时,经化学修饰的MG3-6/3-4向导的序列和其在Hepa1-6细胞中的活性

[0434]

向导	SEQ ID NO:	序列	活性 %
mAlb3634-34-0	646	rCrUrUrArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrUrUrU	71.8
mAlb3634-34-1	647	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	124.5
mAlb3634-34-2	648	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	121.7
mAlb3634-34-3	649	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	120.5
mAlb3634-34-4	650	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArG*mA*mA*mU*mC*mG*mA*mA*mA*mG*mA*mU*mUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	63.3
mAlb3634-34-5	651	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUmCmUmUmAmArUrArAr	0.8

[0435]

向导	SEQ ID NO:	序列	活性 %
		GrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	
mAlb3634-34-6	652	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*mGmAmUmUmCmUmUmAmArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-7	653	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	113.0
mAlb3634-34-8	654	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	115.6
mAlb3634-34-9	655	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCmGmAmAmArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCmCmUmUmCmCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCmAmAmUmArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	105.0
mAlb3634-34-10	656	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	101.6
mAlb3634-34-11	657	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrC*mA*mC*mC*mG*mU*mC*mC*mG*mU*mU*mU*mU*mC*mC*mC*mA*mA*mU*mArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	57.0
mAlb3634-34-12	658	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUr	0.0

[0436]

向导	SEQ ID NO:	序列	活性 %
		C*mA*mC*mC*mG*mU*mC*mC*mG*mU*mU*mU*mU*mC*mC*mA*mA*mU*mA*mG*mG*mA*mG*mC*mG*mG*mG*mC*mG*mG*mU*mA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	
mAlb3634-34-13	659	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUmGmAmGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUmCmUmUmAmArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-14	670	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUrGrArGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrC*mA*mC*mC*mG*mU*mC*mC*mG*mU*mU*mU*mU*mC*mC*mA*mA*mU*mA*mG*mG*mA*mG*mC*mG*mG*mG*mC*mG*mG*mU*mA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-15	671	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUrGrArGmAmAmUmCmGmAmAmAmGmAmUmUrCrUrUrArArUrArArGmGmCmAmUmCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCmUmCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCmAmAmUmAmGmGmAmGmCmGmGmCmGmGmUmAmUmGmU*mU*mU*mU	34.5
mAlb3634-34-19	672	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUrGrArGrArArUrC*mG*mA*mA*mArGrArUrUrCrUrUrArA*mU*mA*mArGrGrCrArUrC*mC*mU*mU*mC*mCrGrArUrGrCrU*mG*mA*mC*mU*mU*mC*mU*mCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrC*mA*mA*mU*mArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-17	673	mC*mU*mU*i2FAi2FGi2FGi2FUi2FCi2FAi2FGi2FUi2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU	147.7
mAlb3634-34-22	674	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUrGrArGrArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmGmCmGmGmU*mA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	44.2

[0437]

向导	SEQ ID NO:	序列	活性 %
mAlb3634-34-23	675	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrG*rA*rC*rU*rU*rC*rU*rC*mAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmGmCmGmGmU*mA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	60.0
mAlb3634-34-24	676	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmGmCmGmGmU*mA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	77.4
mAlb3634-34-25	677	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrG*rA*rC*rU*rU*rU*rC*rU*rC*mAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmGmCmGmGmU*mA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	50.5
mAlb3634-34-26	678	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	61.9
mAlb3634-34-27	679	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	67.4
mAlb3634-34-29	680	mC*i2FU*i2FU*i2FA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrGrArGrGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	114.4
mAlb3634-34-30	681	mC*i2FU*i2FU*i2FA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArAmGmGmCmAmUmCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCr	113.9

[0438]

向导	SEQ ID NO:	序列	活性 %
		ArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	
mAlb3634-34-31	682	mC*i2FU*i2FU*i2FA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArGrArArGrUrUrGrArGrGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU*mU	100.0
mAlb3634-34-32	683	mC*mU*mU*i2FA*i2FGi2FGi2FUi2FCi2FAi2FGi2FUi2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*mGmAmUmUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmGmCmGmGmUmA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	NT
mAlb3634-34-33	684	mC*mU*mU*i2FA*i2FGi2FGi2FUi2FCi2FAi2FGi2FUi2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*mGmAmUmUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-34	685	mC*mU*mU*mA*i2FGi2FGi2FUi2FCi2FAi2FGi2FUi2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	68.9
mAlb3634-34-35	686	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCmG*mA*mA*mA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCmC*mU*mU*mC*mC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCmA*mA*mU*mA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	65.0
mAlb3634-34-36	687	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0

[0439]

向导	SEQ ID NO:	序列	活性 %
mAlb3634-34-37	688	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-38	689	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArAmGmUmUmGmAmGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*mGmGmAmGmCmGmGmGmCmGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-39	690	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUrGrArGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrG*rA*rC*rU*rU*rU*rC*rU*rC*rArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	3.7
mAlb3634-34-40	691	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUrGrArGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*mGmAmUmUrCrUrUrArArUmAmAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*mGmAmUmGmCrU*rG*rA*mCmUmUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	0.0
mAlb3634-34-41	692	mC*mU*mU*mA*rGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUrGrArGmAmAmUmCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArAmGmGmCmAmUmCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	47.1
mAlb3634-34-42	693	mC*mU*mU*mA*i2FGi2FGi2FUi2FCi2FAi2FGi2FUi2FGi2FAi2FAi2FGi2FAi2FGi2FAi2FAi2FGi2FArArGrUrUrGrArGrArArUrCrG*rA*rA*rA*rGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrC*rU*rU*rC*rC*rGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrA*rA*rU*rA*rGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	66.7
mAlb3634-34-43	694	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrAmGmGmAmGmC	73.8

[0440]

向导	SEQ ID NO:	序列	活性 %
		mGmGmGmCmGmGmUmA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	
mAlb3634-34-44	695	mC*mU*mU*rArGrGrUrCrArGrUrGrArArGrArGrArArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCmAmCmCmGmUmCmCmGmUmUmUmUmCmCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	84.9
(r =天然核糖碱基，m = 2'-O 甲基修饰的碱基，F = 2'氟修饰的碱基，* =硫代磷酸酯键)			

[0441] 使用具有相同碱基序列和替代性化学修饰(AltR1/AltR2)的向导作为对照。这些向导中的间隔子序列靶向小鼠基因组的白蛋白内含子1中的22核苷酸区域。向导mAlb3634-34-0(无化学修饰)相对于AltR1/AltR2向导示出72％的活性。向导mAlb3634-34-1相对于AltR1/AltR2向导示出124％的活性,显示了用于编辑的向导稳定性的重要性:mAlb3634-34-1比mAlb3634-34-0更稳定(图13和图14)。重要的是,mAlb3634-34-17相对于AltR1/AltR2保留了147％的活性。间隔子中2'-O-氟的掺入大大增加了mAlb3634-34-35的稳定性,并且所述向导保留了65％的活性。mAlb3634-34-35在MG3-6/3-4向导的三个茎环的环中含有2'-O-甲基和PS键。重要的是,mAlb3634-34-42保留了66％的活性,并且此向导在间隔子中含有与mAlb3634-34-17一样多的氟,但它在gRNA中存在的所有环中也含有PS键。mAlb3634-34-27保留了67％的活性,并且mAlb3634-34-29保留了114％的活性。在所述修饰中,对于mAlb3634-34-27和mAlb3634-34-29,这些向导分别在第一茎环的环中含有PS键,并且在第一茎环的第一链中含有2'-O-甲基。当这2个修饰组合(第一茎环的第一链中的2'-O-甲基和第一茎环的环中的PS键)时,向导失去其活性(mAlb3634-34-33、mAlb3634-34-36、mAlb3634-34-38),显示了gRNA/蛋白质相互作用的复杂性,并且证明简单外推的结果难以预测。

[0442] 为了测试这些经化学修饰的向导与没有化学修饰的向导(天然RNA)相比的稳定性,使用粗细胞提取物进行稳定性测定。选择哺乳动物细胞的粗细胞提取物,因为其含有向导RNA在体外或体内递送到哺乳动物细胞时将暴露于的核酸酶混合物。通过每15cm培养皿的汇合细胞添加3mL的冷PBS并且使用细胞刮刀从培养皿的表面释放细胞来收集Hepa1-6细胞。将细胞以200g沉淀10分钟,并且在-80℃下冷冻以供将来使用。对于稳定性测定,将细胞重悬浮于4体积的冷PBS中(例如,对于100mg沉淀,将细胞重悬浮于400μL的冷PBS中)。将Triton X-100添加到浓度为0.2％(v/v),将细胞涡旋10秒,置于冰上10分钟,并且再次涡旋10秒。Triton X-100是一种温和的非离子洗涤剂,其破坏细胞膜,但在所用浓度下不会使蛋白质灭活或变性。在冰上建立稳定性反应,并且包括20μl细胞粗提取物,每个向导2pmol(2μM储备液中1μL)。每个向导建立六种反应,包括:输入、0.5小时、1小时、4小时、9小时,和在一些情况下21小时(时间以小时为单位,指每个样品温育的时间长度)。将样品在37℃下温育0.5小时至至多21小时,同时将输入对照置于冰上5分钟。在每个温育期之后,通过添加300μL的酚和硫氰酸胍(Tri试剂)的混合物来停止反应,这立即使所有蛋白质变性并且有效抑制核糖核酸酶并促进RNA的后续回收。添加Tri试剂后,将样品涡旋15秒,并且储存在-20℃下。

从样品中提取RNA,并在100μL无核酸酶水中洗脱。进行经修饰的向导的检测,并且引物和探针被设计成特异性检测mAlb3634-34 sgRNA中的序列,这对于所有向导都相同。将数据绘制为与输入样品相关的剩余sgRNA百分比的函数(表7和8;图13和图14)。

[0443] 表7:MG3-6/3-4化学修饰的向导在37℃下9小时内的稳定性

[0444]

	剩余向导的百分比（%）			
时间（小时）	mAlb3634-34-0	mAlb3634-34-1	mAlb3634-34-17	mAlb3634-34-29
0.5	48.6	71.6	84.9	91.3
1	45.5	111.3	69.2	79.8
4	8.3	84.3	46.6	58.2
9	1.2	41.3	36.6	16.5
时间（小时）	mAlb3634-34-30	mAlb3634-34-35	mAlb3634-34-36	mAlb3634-34-42
0.5	86.7	ND	91.7	91.7
1	90.1	146.4	57.8	72.1
4	53.5	128.3	61.9	72.1
9	21.9	100	62.6	47.3

[0445] 表8:MG3-6/3-4化学修饰的向导在37℃下21小时内的稳定性

[0446]

	剩余向导的百分比			
时间(小时)	mAlb3634-34-0	mAlb3634-34-1	mAlb3634-34-35	mAlb3634-34-42
0.5	68.3	61.9	104.6	80.9
1	51.0	59.6	84.0	73.2
4	9.6	51.0	52.6	70.7
9	1.7	40.4	51.2	45.3
21	0.03	1.4	24.8	15.6

[0447] 稳定性测定表明,在向导的5'和3'端引入三个2'-O-甲基和三个PS键会显著提高稳定性(图13和图14)。如在mAlb3634-17和mAlb3634-42中,向5'和3'修饰添加额外的2'-氟,在早期时间点(至多9小时)未示出明显优势,如图13所示出的,但当稳定性测定进行21小时时,稳定性的略微改善是显而易见的(图14)。在茎环的所有环中包含2-O-甲基和PS键(mAlb3634-35),与在5'和3'端(mAlb3634-1)上具有化学修饰的向导相比,在稳定性方面有明显更大的增加,如图13中可见。然而,当这些结果重复并且在较长的时间点时,这种增加在较早的时间点变得不那么明显,而在至多21小时的较长时间点变得明显,如图14。在不同茎环的第一链中包含2'-O-甲基提供至多9小时的稳定性优势,如通过比较mAlb3634-0以及mAlb3634-29和mAlb3634-30所示出的。具有所有茎环的第一链中的2'-O-甲基和所有茎环的环中的PS键的组合的mAlb3634-36,与端修饰的向导(mAlb3634-0)相比,在9小时时示出明显增加的稳定性。然而,当通过在Hepa1-6细胞中的mRNA转染进行测试时,此向导无活性。通常,向端修饰的向导添加额外修饰(例如,2'-O-甲基、2'-O-氟或PS键)并没有在较早时间点(至多9小时)的稳定性方面带来很大的优势(图13),但在较长的时间点的稳定性的小幅增加是显而易见的(图14)。这种gRNA的大尺寸(110nt)和高度结构化的性质可能使其本质上比较短或结构化较少的向导RNA更稳定,从而限制了化学修饰对稳定性的益处。修饰向导

的5'和3'端似乎提供了针对核酸酶的良好水平的保护。然而,在向导中添加额外修饰可能会在体内提供更多益处,因为这些类型的修饰可能会降低免疫原性。

[0448] 实例10-V-A型核酸酶的蛋白质重组

[0449] 为了将快速PAM交换的能力扩大到II型核酸酶之外,选择三种V-A型核酸酶用于蛋白质重组。基于预测的结构信息选择断点(表1B)。类似于II型酶重组体,当蛋白质从密切相关的家族重组时,V型嵌合体示出活性。体外PAM富集和NGS分析揭示了一致结果:嵌合体的PAM从C末端亲本遗传。通过利用断点优化可以避免来自远处相关的家族的蛋白质重组的潜在结构断裂(图15A-15B)。

[0450] 实例11-HEK293T细胞中TRAC在DNA水平下的基因编辑结果的分析

[0451] 通过电穿孔将包括下表9A和SEQ ID NO:119-158中描述的sgRNA的MG3-6/4RNP(104pmol蛋白质/300pmol向导)核转染到HEK293T细胞(200,000个细胞/孔)中。转染后三天,采集细胞并制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以确定基因编辑(图16)。结果显示,sgRNAC1、F2和B3在诱导indel方面最有效,其中对于sgRNAD2、H2、A3和C3也发生了明显的编辑。

[0452] 表9A:实例11中使用的gRNA和靶向序列

[0453]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	119	MG3-6/3-4 TRAC A1	mG*mC*mC*rGrUrGrUrArCrCrArGrCrUrGrArGrArG rArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUr CrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArU rGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrAr UrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	120	MG3-6/3-4 TRAC B1	mA*mU*mU*rCrArCrCrGrArUrUrUrUrGrArUrUrCr UrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	121	MG3-6/3-4 TRAC C1	mG*mA*mU*rUrCrUrGrArUrGrUrGrUrArUrArUrCr ArCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	122	MG3-6/3-4 TRAC D1	mA*mA*mC*rArGrUrGrCrUrGrUrGrGrCrCrUrGrGr ArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4	123	MG3-6/3-4 TRAC E1	mG*mG*mC*rUrGrGrGrGrArArGrArArGrGrUrGrUr CrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr

[0454]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
sgRNA			UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	124	MG3-6/3-4 TRAC F1	mG*mU*mU*rUrUrGrUrCrUrGrUrGrArUrArUrArCr ArCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	125	MG3-6/3-4 TRAC G1	mU*mU*mA*rCrUrUrUrGrUrGrArCrArCrArUrUrUr GrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	126	MG3-6/3-4 TRAC H1	mU*mU*mG*rUrGrArCrArCrArUrUrUrGrUrUrUrGr ArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	127	MG3-6/3-4 TRAC A2	mU*mG*mU*rGrArCrArCrArUrUrUrGrUrUrUrGrAr GrArArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	128	MG3-6/3-4 TRAC B2	mA*mU*mU*rUrGrUrUrUrGrArGrArArUrCrArArArAr ArUrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	129	MG3-6/3-4 TRAC C2	mU*mU*mC*rCrUrGrUrGrArUrGrUrCrArArGrCrUr GrGrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	130	MG3-6/3-4 TRAC D2	mU*mC*mC*rUrGrUrGrArUrGrUrCrArArGrCrUrGr GrUrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU

[0455]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	131	MG3-6/3-4 TRAC E2	mG*mU*mC*rArArGrCrUrGrGrUrCrGrArGrArArArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	132	MG3-6/3-4 TRAC F2	mA*mG*mC*rUrUrGrArCrArUrCrArCrArGrGrArArCrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	133	MG3-6/3-4 TRAC G2	mG*mA*mC*rArUrCrArCrArGrGrArArCrUrUrUrCrUrArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	134	MG3-6/3-4 TRAC H2	mU*mU*mA*rCrArGrArUrArCrGrArArCrCrUrArArArCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	135	MG3-6/3-4 TRAC A3	mA*mA*mA*rArCrCrUrGrUrCrArGrUrGrArUrUrGrGrGrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	136	MG3-6/3-4 TRAC B3	mG*mA*mU*rUrGrGrGrUrUrCrCrGrArArUrCrCrUrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	137	MG3-6/3-4 TRAC C3	mG*mG*mA*rArCrCrCrArArUrCrArCrUrGrArCrArGrGrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRAC 的 MG3-6/3-4 sgRNA	138	MG3-6/3-4 TRAC D3	mU*mU*mG*rArArArGrUrUrUrArGrGrUrUrCrGrUrArUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr

[0456]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
TRAC 靶位点的 DNA 序列	139	MG3-6/3-4 TRAC A1	GCCGTGTACCAGCTGAGAGACT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	140	MG3-6/3-4 TRAC B1	ATTCACCGATTTTGATTCTCAA
TRAC 靶位点的 DNA 序列	141	MG3-6/3-4 TRAC C1	GATTCTGATGTGTATATCACAG
TRAC 靶位点的 DNA 序列	142	MG3-6/3-4 TRAC D1	AACAGTGCTGTGGCCTGGAGCA
TRAC 靶位点的 DNA 序列	143	MG3-6/3-4 TRAC E1	GGCTGGGGAAGAAGGTGTCTTC
TRAC 靶位点的 DNA 序列	144	MG3-6/3-4 TRAC F1	GTTTTGTCTGTGATATACACAT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	145	MG3-6/3-4 TRAC G1	TTACTTTGTGACACATTTGTTT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	146	MG3-6/3-4 TRAC H1	TTGTGACACATTTGTTTGAGAA
TRAC 靶位点的 DNA 序列	147	MG3-6/3-4 TRAC A2	TGTGACACATTTGTTTGAGAAT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	148	MG3-6/3-4 TRAC B2	ATTTGTTTGAGAATCAAAATCG
TRAC 靶位点的 DNA 序列	149	MG3-6/3-4 TRAC C2	TTCCTGTGATGTCAAGCTGGTC
TRAC 靶位点的 DNA 序列	150	MG3-6/3-4 TRAC D2	TCCTGTGATGTCAAGCTGGTCG
TRAC 靶位点的 DNA 序列	151	MG3-6/3-4 TRAC E2	GTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	152	MG3-6/3-4 TRAC F2	AGCTTGACATCACAGGAACTTT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	153	MG3-6/3-4 TRAC G2	GACATCACAGGAACTTTCTAAA
TRAC 靶位点的 DNA 序列	154	MG3-6/3-4 TRAC H2	TTACAGATACGAACCTAAACTT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	155	MG3-6/3-4 TRAC A3	AAAACCTGTCAGTGATTGGGTT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	156	MG3-6/3-4 TRAC B3	GATTGGGTTCCGAATCCTCCTC

[0457]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
TRAC 靶位点的 DNA 序列	157	MG3-6/3-4 TRAC C3	GGAACCCAATCACTGACAGGTT
TRAC 靶位点的 DNA 序列	158	MG3-6/3-4 TRAC D3	TTGAAAGTTTAGGTTCGTATCT
(r =天然核糖碱基，m = 2'-O 甲基修饰的碱基，F = 2'氟修饰的碱基，* =硫代磷酸酯键)			

[0458] 实例12-HEK293T细胞中B2M在DNA水平下的基因编辑结果的分析

[0459] 使用电穿孔将包括下表9B和SEQ ID NO:159-210中描述的sgRNA的MG3-6/4RNP(104pmol蛋白质/300pmol向导)核转染到HEK293T细胞(200,000个细胞)中。采集细胞,并且在转染后三天制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以确定基因编辑(图17)。结果显示,sgRNAA1、G1、B2、H2和B4在诱导编辑方面最有效,其中对于sgRNAC1、D1、A2、H1、E2、F2、G2、A3、C3和D3也检测到明显的编辑。

[0460] 表9B:实例12中使用的gRNA和靶向序列

[0461]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	159	MG3-6/3-4 B2M A1	mU*mC*mA*rCrGrCrUrGrGrArUrArGrCrCrUrCrCrArGrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	160	MG3-6/3-4 B2M B1	mG*mG*mU*rUrUrArCrUrCrArCrGrUrCrArUrCrCrArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	161	MG3-6/3-4 B2M C1	mA*mC*mU*rCrArCrGrUrCrArUrCrCrArGrCrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的	162	MG3-6/3-4	mU*mC*mA*rUrCrCrArGrCrArGrArGrArArUrGrGr

[0462]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
MG3-6/3-4 sgRNA		B2M D1	ArArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	163	MG3-6/3-4 B2M E1	mA*mG*mA*rGrArArUrGrGrArArArGrUrCrArArAr UrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	164	MG3-6/3-4 B2M F1	mC*mG*mA*rCrArUrUrGrArArGrUrUrGrArCrUrUr ArCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	165	MG3-6/3-4 B2M G1	mU*mU*mG*rArCrUrUrArCrUrGrArArGrArArUrGr GrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	166	MG3-6/3-4 B2M H1	mU*mU*mA*rCrUrGrArArGrArArUrGrGrArGrArGr ArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	167	MG3-6/3-4 B2M A2	mU*mA*mC*rUrGrArArGrArArUrGrGrArGrArGrAr GrArArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	168	MG3-6/3-4 B2M B2	mA*mC*mU*rGrArArGrArArUrGrGrArGrArGrAr ArArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	169	MG3-6/3-4 B2M C2	mU*mC*mU*rUrUrCrUrArUrCrUrCrUrUrGrUrArCr UrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr

[0463]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	170	MG3-6/3-4 B2M D2	mU*mA*mC*rUrArCrArCrUrGrArArUrUrCrArCrCrC rCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUr CrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArU rGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrAr UrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	171	MG3-6/3-4 B2M E2	mA*mC*mU*rArCrArCrUrGrArArUrUrCrArCrCrCrC rCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUr CrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArU rGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrAr UrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	172	MG3-6/3-4 B2M F2	mC*mU*mA*rCrArCrUrGrArArUrUrCrArCrCrCrCrC rArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUr CrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArU rGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUr UrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrAr UrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	173	MG3-6/3-4 B2M G2	mA*mU*mA*rCrUrCrArUrCrUrUrUrUrUrCrArGrUr GrGrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	174	MG3-6/3-4 B2M H2	mG*mA*mA*rUrUrCrArGrUrGrUrArGrUrArCrArAr GrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	175	MG3-6/3-4 B2M A3	mG*mA*mG*rArUrArGrArArArGrArCrCrArGrUrCr CrUrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	176	MG3-6/3-4 B2M B3	mC*mA*mG*rUrCrCrUrUrGrCrUrGrArArArGrArCr ArArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4	177	MG3-6/3-4 B2M C3	mA*mG*mU*rCrArArCrUrUrCrArArUrGrUrCrGrGr ArUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr

[0464]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
sgRNA			UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	178	MG3-6/3-4 B2M D3	mA*mA*mA*rCrCrCrArGrArCrArCrArUrArGrCrAr ArUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	179	MG3-6/3-4 B2M E3	mA*mA*mC*rCrCrArGrArCrArCrArUrArGrCrArAr UrUrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	180	MG3-6/3-4 B2M F3	mC*mU*mG*rCrUrGrGrArUrGrArCrGrUrGrArGrUr ArArArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	181	MG3-6/3-4 B2M G3	mA*mC*mC*rUrGrArArUrCrUrUrUrGrGrArGrUrAr CrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	182	MG3-6/3-4 B2M H3	mU*mG*mC*rUrGrCrUrUrArCrArUrGrUrCrUrCrGr ArUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	183	MG3-6/3-4 B2M A4	mG*mC*mU*rGrCrUrUrArCrArUrGrUrCrUrCrGrAr UrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 B2M 的 MG3-6/3-4 sgRNA	184	MG3-6/3-4 B2M B4	mC*mU*mG*rCrUrUrArCrArUrGrUrCrUrCrGrArUr CrUrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrA rUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUr UrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUr ArUrGrU*mU*mU*mU

[0465]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
B2M 靶位点的 DNA 序列	185	MG3-6/3-4 B2M A1	TCACGCTGGATAGCCTCCAGGC
B2M 靶位点的 DNA 序列	186	MG3-6/3-4 B2M B1	GGTTTACTCACGTCATCCAGCA
B2M 靶位点的 DNA 序列	187	MG3-6/3-4 B2M C1	ACTCACGTCATCCAGCAGAGAA
B2M 靶位点的 DNA 序列	188	MG3-6/3-4 B2M D1	TCATCCAGCAGAGAATGGAAAG
B2M 靶位点的 DNA 序列	189	MG3-6/3-4 B2M E1	AGAGAATGGAAAGTCAAATTTC
B2M 靶位点的 DNA 序列	190	MG3-6/3-4 B2M F1	CGACATTGAAGTTGACTTACTG
B2M 靶位点的 DNA 序列	191	MG3-6/3-4 B2M G1	TTGACTTACTGAAGAATGGAGA
B2M 靶位点的 DNA 序列	192	MG3-6/3-4 B2M H1	TTACTGAAGAATGGAGAGAGAA
B2M 靶位点的 DNA 序列	193	MG3-6/3-4 B2M A2	TACTGAAGAATGGAGAGAGAAT
B2M 靶位点的 DNA 序列	194	MG3-6/3-4 B2M B2	ACTGAAGAATGGAGAGAGAATT
B2M 靶位点的 DNA 序列	195	MG3-6/3-4 B2M C2	TCTTTCTATCTCTTGTACTACA
B2M 靶位点的 DNA 序列	196	MG3-6/3-4 B2M D2	TACTACACTGAATTCACCCCCA
B2M 靶位点的 DNA 序列	197	MG3-6/3-4 B2M E2	ACTACACTGAATTCACCCCCAC
B2M 靶位点的 DNA 序列	198	MG3-6/3-4 B2M F2	CTACACTGAATTCACCCCCACT
B2M 靶位点的 DNA 序列	199	MG3-6/3-4 B2M G2	ATACTCATCTTTTTCAGTGGGG
B2M 靶位点的 DNA 序列	200	MG3-6/3-4 B2M H2	GAATTCAGTGTAGTACAAGAGA
B2M 靶位点的 DNA 序列	201	MG3-6/3-4 B2M A3	GAGATAGAAAGACCAGTCCTTG
B2M 靶位点的 DNA 序列	202	MG3-6/3-4 B2M B3	CAGTCCTTGCTGAAAGACAAGT
B2M 靶位点的 DNA 序列	203	MG3-6/3-4 B2M C3	AGTCAACTTCAATGTCGGATGG

[0466]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
B2M 靶位点的 DNA 序列	204	MG3-6/3-4 B2M D3	AAACCCAGACACATAGCAATTC
B2M 靶位点的 DNA 序列	205	MG3-6/3-4 B2M E3	AACCCAGACACATAGCAATTCA
B2M 靶位点的 DNA 序列	206	MG3-6/3-4 B2M F3	CTGCTGGATGACGTGAGTAAAC
B2M 靶位点的 DNA 序列	207	MG3-6/3-4 B2M G3	ACCTGAATCTTTGGAGTACCTG
B2M 靶位点的 DNA 序列	208	MG3-6/3-4 B2M H3	TGCTGCTTACATGTCTCGATCT
B2M 靶位点的 DNA 序列	209	MG3-6/3-4 B2M A4	GCTGCTTACATGTCTCGATCTA
B2M 靶位点的 DNA 序列	210	MG3-6/3-4 B2M B4	CTGCTTACATGTCTCGATCTAT
（r =天然核糖碱基，m = 2'-O 甲基修饰的碱基，F = 2'氟修饰的碱基，* =硫代磷酸酯键）			

[0467] 实例13-T细胞中TRAC在DNA和表型水平下的基因编辑结果的分析

[0468] 使用阴性选择从PMBC中纯化原代T细胞。使用电穿孔将包括下表9A和SEQ ID NO:119-158中描述的所选sgRNA的MG3-6/4RNP(104pmol蛋白质/120pmol向导)核转染到T细胞(200,000个)中。采集细胞,并且在转染后三天制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以确定基因编辑。为了通过流式细胞术进行分析,核转染后3天,将100,000个T细胞用抗CD3抗体在4℃下染色30分钟,并且通过流式细胞术进行分析(图18)。结果表明,sgRNA C1、D2、F2、H2、A3、B3、C3和D3示出明显的编辑,其中sgRNAC1和B3进行的编辑最多。

[0469] 实例14-T细胞中B2M在DNA水平下的基因编辑结果的分析

[0470] 使用阴性选择从PMBC中纯化原代T细胞。使用电穿孔将包括下表9B和SEQ ID NO:159-210中描述的所选sgRNA的MG3-6/4RNP(104pmol蛋白质/120pmol向导)核转染到T细胞(200,000个)中。采集细胞,并且在转染后三天制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以确定基因编辑(图19)。

[0471] 实例15-T细胞中TRBC1和TRBC2在表型水平下的基因编辑结果的分析

[0472] 使用阴性选择从PBMC中纯化原代T细胞。使用电穿孔将包括下表9C和SEQ ID NO:211-382中描述的sgRNA的MG3-6/4RNP(104pmol蛋白质/120pmol向导)核转染到T细胞(200,000个)中。为了通过流式细胞术进行分析,核转染后3天,将100,000个T细胞用抗CD3抗体在4℃下染色30分钟,并且通过流式细胞术进行分析(图20)。结果显示,对于TRBC1,性能最高的sgRNA是A1、B1、E1、G4、H4和B5(图20)。类似地,针对TRBC2,性能最高的sgRNA是D1、H1和A5。

[0473] 表9C:实例15中使用的gRNA和靶向序列

[0474]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	211	MG3-6/3-4 TRBC1 A1	mC*mA*mG*rArArGrCrArGrArGrArUrCrUrCrCrCrArCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	212	MG3-6/3-4 TRBC1 B1	mC*mC*mA*rCrGrUrGrGrArGrCrUrGrArGrCrUrGrGrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	213	MG3-6/3-4 TRBC1 C1	mA*mG*mU*rCrCrArGrUrUrCrUrArCrGrGrGrCrUrCrUrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	214	MG3-6/3-4 TRBC1 D1	mG*mA*mU*rUrArGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	215	MG3-6/3-4 TRBC1 E1	mA*mU*mU*rArGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的	216	MG3-6/3-4	mU*mU*mA*rGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrAr

[0475]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
MG3-6/3-4 sgRNA		TRBC1 F1	CrCrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	217	MG3-6/3-4 TRBC1 G1	mU*mG*mA*rGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArGrGrGrArArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	218	MG3-6/3-4 TRBC1 H1	mC*mA*mG*rGrUrArGrCrArGrArCrArArGrArCrUrArGrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	219	MG3-6/3-4 TRBC1 A2	mA*mG*mG*rUrArGrCrArGrArCrArArGrArCrUrArGrArUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	220	MG3-6/3-4 TRBC1 B2	mA*mG*mC*rArGrArCrArArGrArCrUrArGrArUrCrCrArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	221	MG3-6/3-4 TRBC1 C2	mG*mG*mA*rArCrCrArGrCrGrCrArCrArCrCrArUrGrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	222	MG3-6/3-4 TRBC1 D2	mG*mU*mG*rGrCrUrGrArCrArUrCrUrGrCrArUrGrGrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	223	MG3-6/3-4 TRBC1 E2	mG*mG*mC*rCrUrGrGrGrArGrUrCrUrGrUrGrCrCrArArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

[0476]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	224	MG3-6/3-4 TRBC1 F2	mC*mU*mG*rArCrUrUrUrArCrUrUrUrUrArArUrUrGrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	225	MG3-6/3-4 TRBC1 G2	mU*mG*mA*rCrUrUrUrArCrUrUrUrUrArArUrUrGrCrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	226	MG3-6/3-4 TRBC1 H2	mG*mA*mC*rUrUrUrArCrUrUrUrUrArArUrUrGrCrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	227	MG3-6/3-4 TRBC1 A3	mG*mG*mG*rArArGrGrArGrArArGrCrUrGrGrArGrUrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	228	MG3-6/3-4 TRBC1 B3	mG*mG*mA*rArGrGrArGrArArGrCrUrGrGrArGrUrCrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	229	MG3-6/3-4 TRBC1 C3	mA*mA*mC*rUrCrCrUrGrGrCrUrCrUrUrArArUrArArCrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	230	MG3-6/3-4 TRBC1 D3	mA*mA*mC*rUrUrUrCrUrCrUrUrCrUrGrCrArGrGrUrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	231	MG3-6/3-4 TRBC1 E3	mA*mC*mU*rCrCrArCrUrUrCrCrArGrGrGrCrUrGrCrCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrGrCrGrGr

[0477]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	232	MG3-6/3-4 TRBC1 F3	mC*mU*mC*rCrArCrUrUrCrCrArGrGrGrCrUrGrCrCrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	233	MG3-6/3-4 TRBC1 G3	mU*mC*mC*rUrUrUrCrUrCrUrUrGrArCrCrUrGrCrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	234	MG3-6/3-4 TRBC1 H3	mA*mG*mC*rCrArGrGrArGrUrUrGrUrGrArGrGrArUrUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	235	MG3-6/3-4 TRBC1 A4	mA*mG*mU*rArGrUrArGrGrGrCrCrCrArUrUrGrArCrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	236	MG3-6/3-4 TRBC1 B4	mU*mG*mC*rArArGrUrUrArUrCrUrUrCrUrGrArGrGrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	237	MG3-6/3-4 TRBC1 C4	mA*mG*mU*rUrArUrCrUrUrCrUrGrArGrGrCrArCrCrUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	238	MG3-6/3-4 TRBC1 D4	mG*mU*mU*rArUrCrUrUrCrUrGrArGrGrCrArCrCrUrGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	239	MG3-6/3-4 TRBC1 E4	mU*mC*mA*rArGrArArCrCrArUrGrArGrArGrArGrGrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr

[0478]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	240	MG3-6/3-4 TRBC1 F4	mC*mA*mA*rGrArArCrCrArUrGrArGrArGrArGr GrGrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	241	MG3-6/3-4 TRBC1 G4	mU*mU*mA*rCrCrCrGrArGrGrUrArArArGrCrCr ArCrArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	242	MG3-6/3-4 TRBC1 H4	mC*mC*mG*rArGrGrUrArArArGrCrCrArCrArGr UrCrUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	243	MG3-6/3-4 TRBC1 A5	mC*mA*mG*rUrCrUrGrArArArGrArArArGrCrAr GrGrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	244	MG3-6/3-4 TRBC1 B5	mA*mG*mU*rCrUrGrArArArGrArArArGrCrArGr GrGrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	245	MG3-6/3-4 TRBC1 C5	mG*mU*mC*rUrGrArArArGrArArArGrCrArGrGr GrArGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	246	MG3-6/3-4 TRBC1 D5	mG*mA*mA*rArGrArArArGrCrArGrGrGrArGrAr GrGrArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的	247	MG3-6/3-4	mG*mA*mG*rArCrCrUrUrArUrUrUrUrCrArUrAr

[0479]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
MG3-6/3-4 sgRNA		TRBC1 E5	GrGrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	248	MG3-6/3-4 TRBC1 F5	mG*mA*mU*rGrArGrArGrUrUrArCrArCrArGrGr CrCrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	249	MG3-6/3-4 TRBC1 G5	mA*mG*mC*rUrGrCrUrUrGrGrCrUrCrUrGrUrUr GrGrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	250	MG3-6/3-4 TRBC1 H5	mU*mG*mU*rUrGrGrGrCrUrGrArGrArArUrCrUr GrGrGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC1 的 MG3-6/3-4 sgRNA	251	MG3-6/3-4 TRBC1 A6	mG*mG*mA*rArCrArCrCrUrUrGrUrUrCrArGrGr UrCrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	252	MG3-6/3-4 TRBC1 A1	CAGAAGCAGAGATCTCCCACAC
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	253	MG3-6/3-4 TRBC1 B1	CCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	254	MG3-6/3-4 TRBC1 C1	AGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	255	MG3-6/3-4 TRBC1 D1	GATTAGGTGAGACCAGCTACCA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	256	MG3-6/3-4 TRBC1 E1	ATTAGGTGAGACCAGCTACCAG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	257	MG3-6/3-4 TRBC1 F1	TTAGGTGAGACCAGCTACCAGG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	258	MG3-6/3-4 TRBC1 G1	TGAGACCAGCTACCAGGGAAAA
TRBC1 靶位点	259	MG3-6/3-4	CAGGTAGCAGACAAGACTAGAT

[0480]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
的 DNA 序列		TRBC1 H1	
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	260	MG3-6/3-4 TRBC1 A2	AGGTAGCAGACAAGACTAGATC
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	261	MG3-6/3-4 TRBC1 B2	AGCAGACAAGACTAGATCCAAA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	262	MG3-6/3-4 TRBC1 C2	GGAACCAGCGCACACCATGAAG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	263	MG3-6/3-4 TRBC1 D2	GTGGCTGACATCTGCATGGCAG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	264	MG3-6/3-4 TRBC1 E2	GGCCTGGGAGTCTGTGCCAACT
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	265	MG3-6/3-4 TRBC1 F2	CTGACTTTACTTTTAATTGCCT
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	266	MG3-6/3-4 TRBC1 G2	TGACTTTACTTTTAATTGCCTA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	267	MG3-6/3-4 TRBC1 H2	GACTTTACTTTTAATTGCCTAT
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	268	MG3-6/3-4 TRBC1 A3	GGGAAGGAGAAGCTGGAGTCAC
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	269	MG3-6/3-4 TRBC1 B3	GGAAGGAGAAGCTGGAGTCACC
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	270	MG3-6/3-4 TRBC1 C3	AACTCCTGGCTCTTAATAACCC
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	271	MG3-6/3-4 TRBC1 D3	AACTTTCTCTTCTGCAGGTCAA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	272	MG3-6/3-4 TRBC1 E3	ACTCCACTTCCAGGGCTGCCTT
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	273	MG3-6/3-4 TRBC1 F3	CTCCACTTCCAGGGCTGCCTTC
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	274	MG3-6/3-4 TRBC1 G3	TCCTTTCTCTTGACCTGCAGAA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	275	MG3-6/3-4 TRBC1 H3	AGCCAGGAGTTGTGAGGATTGA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	276	MG3-6/3-4 TRBC1 A4	AGTAGTAGGGCCCATTGACCAC
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	277	MG3-6/3-4 TRBC1 B4	TGCAAGTTATCTTCTGAGGCAC
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	278	MG3-6/3-4 TRBC1 C4	AGTTATCTTCTGAGGCACCTGA

[0481]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	279	MG3-6/3-4 TRBC1 D4	GTTATCTTCTGAGGCACCTGAA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	280	MG3-6/3-4 TRBC1 E4	TCAAGAACCATGAGAGAGGGAG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	281	MG3-6/3-4 TRBC1 F4	CAAGAACCATGAGAGAGGGAGA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	282	MG3-6/3-4 TRBC1 G4	TTACCCGAGGTAAAGCCACAGT
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	283	MG3-6/3-4 TRBC1 H4	CCGAGGTAAAGCCACAGTCTGA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	284	MG3-6/3-4 TRBC1 A5	CAGTCTGAAAGAAAGCAGGGAG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	285	MG3-6/3-4 TRBC1 B5	AGTCTGAAAGAAAGCAGGGAGA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	286	MG3-6/3-4 TRBC1 C5	GTCTGAAAGAAAGCAGGGAGAG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	287	MG3-6/3-4 TRBC1 D5	GAAAGAAAGCAGGGAGAGGAAA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	288	MG3-6/3-4 TRBC1 E5	GAGACCTTATTTTCATAGGCAA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	289	MG3-6/3-4 TRBC1 F5	GATGAGAGTTACACAGGCCACA
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	290	MG3-6/3-4 TRBC1 G5	AGCTGCTTGGCTCTGTTGGGCT
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	291	MG3-6/3-4 TRBC1 H5	TGTTGGGCTGAGAATCTGGGAG
TRBC1 靶位点的 DNA 序列	292	MG3-6/3-4 TRBC1 A6	GGAACACCTTGTTCAGGTCCTC
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	293	MG3-6/3-4 TRBC2 A1	mA*mC*mC*rUrCrUrUrCrCrCrUrUrUrCrCrArGrA rGrGrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrAr UrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCr CrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrC rCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGr CrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	294	MG3-6/3-4 TRBC2 B1	mC*mC*mU*rCrUrUrCrCrCrUrUrUrCrCrArGrArG rGrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrAr UrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCr CrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrC rCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGr CrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的	295	MG3-6/3-4	mC*mU*mC*rUrUrCrCrCrUrUrUrCrCrArGrArGr

[0482]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
MG3-6/3-4 sgRNA		TRBC2 C1	GrArCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	296	MG3-6/3-4 TRBC2 D1	mC*mA*mG*rArArGrCrArGrArGrArUrCrUrCrCr CrArCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	297	MG3-6/3-4 TRBC2 E1	mC*mC*mA*rCrGrUrGrGrArGrCrUrGrArGrCrUr GrGrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	298	MG3-6/3-4 TRBC2 F1	mA*mG*mU*rCrCrArGrUrUrCrUrArCrGrGrGrCr UrCrUrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	299	MG3-6/3-4 TRBC2 G1	mG*mA*mU*rUrArGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCr UrArCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	300	MG3-6/3-4 TRBC2 H1	mA*mU*mU*rArGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUr ArCrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	301	MG3-6/3-4 TRBC2 A2	mU*mU*mA*rGrGrUrGrArGrArCrCrArGrCrUrAr CrCrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	302	MG3-6/3-4 TRBC2 B2	mU*mG*mA*rGrArCrCrArGrCrUrArCrCrArGrGr GrArArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

[0483]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	303	MG3-6/3-4 TRBC2 C2	mU*mA*mG*rCrGrGrArCrArArGrArCrUrArGrArUrCrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	304	MG3-6/3-4 TRBC2 D2	mC*mC*mC*rCrCrArCrCrArArGrArArGrCrArUrArGrArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	305	MG3-6/3-4 TRBC2 E2	mU*mC*mU*rGrCrUrCrUrCrGrArArCrCrArGrGrGrCrArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	306	MG3-6/3-4 TRBC2 F2	mG*mG*mA*rArCrArUrCrArCrArCrArUrGrGrGrCrArUrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	307	MG3-6/3-4 TRBC2 G2	mC*mC*mU*rArArUrArUrArUrCrCrUrArUrCrArCrCrUrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	308	MG3-6/3-4 TRBC2 H2	mA*mC*mC*rArUrArArUrGrArArGrCrCrArGrArCrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	309	MG3-6/3-4 TRBC2 A3	mC*mC*mA*rUrArArUrGrArArGrCrCrArGrArCrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	310	MG3-6/3-4 TRBC2 B3	mC*mA*mU*rArArUrGrArArGrCrCrArGrArCrUrGrGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGr

[0484]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	311	MG3-6/3-4 TRBC2 C3	mG*mC*mC*rArGrArCrUrGrGrGrGrArGrArArAr ArUrGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	312	MG3-6/3-4 TRBC2 D3	mG*mG*mA*rGrArArArArUrGrCrArGrGrGrArAr UrArUrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	313	MG3-6/3-4 TRBC2 E3	mG*mG*mA*rGrArCrArArCrCrArGrCrGrArGrCr CrCrUrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	314	MG3-6/3-4 TRBC2 F3	mU*mA*mC*rUrCrCrUrGrCrUrGrUrGrCrCrArUr ArGrCrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	315	MG3-6/3-4 TRBC2 G3	mC*mU*mG*rUrGrCrCrArUrArGrCrCrCrCrUrGr ArArArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	316	MG3-6/3-4 TRBC2 H3	mU*mG*mU*rGrCrCrArUrArGrCrCrCrCrUrGrAr ArArCrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	317	MG3-6/3-4 TRBC2 A4	mG*mU*mG*rCrCrArUrArGrCrCrCrCrUrGrArAr ArCrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	318	MG3-6/3-4 TRBC2 B4	mU*mG*mU*rUrCrUrCrUrCrUrUrCrCrArCrArGr GrUrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr

[0485]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	319	MG3-6/3-4 TRBC2 C4	mG*mA*mA*rArGrGrArUrUrCrCrArGrArGrGrCr UrArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	320	MG3-6/3-4 TRBC2 D4	mG*mG*mA*rUrGrGrUrUrUrUrGrGrArGrCrUrAr GrCrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	321	MG3-6/3-4 TRBC2 E4	mC*mC*mC*rUrGrGrUrUrCrGrArGrArGrCrArGr ArGrArCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	322	MG3-6/3-4 TRBC2 F4	mA*mG*mC*rArGrArGrArCrGrGrCrGrArArArGr ArUrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	323	MG3-6/3-4 TRBC2 G4	mG*mC*mA*rGrArGrArCrGrGrCrGrArArArGrAr UrArGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	324	MG3-6/3-4 TRBC2 H4	mC*mA*mG*rArGrArCrGrGrCrGrArArArGrArUr ArGrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	325	MG3-6/3-4 TRBC2 A5	mU*mU*mA*rCrCrGrGrArGrGrUrGrArArGrCrCr ArCrArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的	326	MG3-6/3-4	mC*mG*mG*rArGrGrUrGrArArGrCrCrArCrArGr

[0486]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
MG3-6/3-4 sgRNA		TRBC2 B5	UrCrUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	327	MG3-6/3-4 TRBC2 C5	mG*mG*mA*rGrGrUrGrArArGrCrCrArCrArGrUr CrUrGrArArGrUrUrGrArGrGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	328	MG3-6/3-4 TRBC2 D5	mA*mC*mA*rGrUrCrUrGrArArArGrArArArArCr ArGrGrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	329	MG3-6/3-4 TRBC2 E5	mC*mA*mG*rUrCrUrGrArArArGrArArArArCrAr GrGrGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	330	MG3-6/3-4 TRBC2 F5	mA*mG*mU*rCrUrGrArArArGrArArArArCrArGr GrGrGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	331	MG3-6/3-4 TRBC2 G5	mG*mU*mC*rUrGrArArArGrArArArArCrArGrGr GrGrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	332	MG3-6/3-4 TRBC2 H5	mA*mC*mA*rGrGrGrGrArArGrArArArArArUrGr GrArUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	333	MG3-6/3-4 TRBC2 A6	mG*mC*mG*rArArGrUrGrGrUrCrArCrUrArUrGr ArUrCrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

[0487]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	334	MG3-6/3-4 TRBC2 B6	mU*mU*mA*rGrGrArArArCrCrArGrGrArCrCrCr CrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	335	MG3-6/3-4 TRBC2 C6	mU*mA*mU*rGrGrCrUrGrGrUrCrCrUrCrArGrGr GrArGrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	336	MG3-6/3-4 TRBC2 D6	mC*mU*mA*rArGrGrUrGrUrCrArGrGrArUrCrUr GrArArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 TRBC2 的 MG3-6/3-4 sgRNA	337	MG3-6/3-4 TRBC2 E6	mG*mG*mA*rArCrArCrGrUrUrUrUrUrCrArGrGr UrCrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	338	MG3-6/3-4 TRBC2 A1	ACCTCTTCCCTTTCCAGAGGAC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	339	MG3-6/3-4 TRBC2 B1	CCTCTTCCCTTTCCAGAGGACC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	340	MG3-6/3-4 TRBC2 C1	CTCTTCCCTTTCCAGAGGACCT
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	341	MG3-6/3-4 TRBC2 D1	CAGAAGCAGAGATCTCCCACAC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	342	MG3-6/3-4 TRBC2 E1	CCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	343	MG3-6/3-4 TRBC2 F1	AGTCCAGTTCTACGGGCTCTCG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	344	MG3-6/3-4 TRBC2 G1	GATTAGGTGAGACCAGCTACCA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	345	MG3-6/3-4 TRBC2 H1	ATTAGGTGAGACCAGCTACCAG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	346	MG3-6/3-4 TRBC2 A2	TTAGGTGAGACCAGCTACCAGG
TRBC2 靶位点	347	MG3-6/3-4	TGAGACCAGCTACCAGGGAAAA

[0488]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
的 DNA 序列		TRBC2 B2	
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	348	MG3-6/3-4 TRBC2 C2	TAGCGGACAAGACTAGATCCAG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	349	MG3-6/3-4 TRBC2 D2	CCCCCACCAAGAAGCATAGAGG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	350	MG3-6/3-4 TRBC2 E2	TCTGCTCTCGAACCAGGGCATG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	351	MG3-6/3-4 TRBC2 F2	GGAACATCACACATGGGCATAA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	352	MG3-6/3-4 TRBC2 G2	CCTAATATATCCTATCACCTCA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	353	MG3-6/3-4 TRBC2 H2	ACCATAATGAAGCCAGACTGGG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	354	MG3-6/3-4 TRBC2 A3	CCATAATGAAGCCAGACTGGGG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	355	MG3-6/3-4 TRBC2 B3	CATAATGAAGCCAGACTGGGGA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	356	MG3-6/3-4 TRBC2 C3	GCCAGACTGGGGAGAAAATGCA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	357	MG3-6/3-4 TRBC2 D3	GGAGAAAATGCAGGGAATATCA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	358	MG3-6/3-4 TRBC2 E3	GGAGACAACCAGCGAGCCCTAC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	359	MG3-6/3-4 TRBC2 F3	TACTCCTGCTGTGCCATAGCCC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	360	MG3-6/3-4 TRBC2 G3	CTGTGCCATAGCCCCTGAAACC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	361	MG3-6/3-4 TRBC2 H3	TGTGCCATAGCCCCTGAAACCC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	362	MG3-6/3-4 TRBC2 A4	GTGCCATAGCCCCTGAAACCCT
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	363	MG3-6/3-4 TRBC2 B4	TGTTCTCTCTTCCACAGGTCAA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	364	MG3-6/3-4 TRBC2 C4	GAAAGGATTCCAGAGGCTAGCT
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	365	MG3-6/3-4 TRBC2 D4	GGATGGTTTTGGAGCTAGCCTC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	366	MG3-6/3-4 TRBC2 E4	CCCTGGTTCGAGAGCAGAGACG

[0489]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	367	MG3-6/3-4 TRBC2 F4	AGCAGAGACGGCGAAAGATAGA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	368	MG3-6/3-4 TRBC2 G4	GCAGAGACGGCGAAAGATAGAG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	369	MG3-6/3-4 TRBC2 H4	CAGAGACGGCGAAAGATAGAGA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	370	MG3-6/3-4 TRBC2 A5	TTACCGGAGGTGAAGCCACAGT
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	371	MG3-6/3-4 TRBC2 B5	CGGAGGTGAAGCCACAGTCTGA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	372	MG3-6/3-4 TRBC2 C5	GGAGGTGAAGCCACAGTCTGAA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	373	MG3-6/3-4 TRBC2 D5	ACAGTCTGAAAGAAAACAGGGG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	374	MG3-6/3-4 TRBC2 E5	CAGTCTGAAAGAAAACAGGGGA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	375	MG3-6/3-4 TRBC2 F5	AGTCTGAAAGAAAACAGGGGAA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	376	MG3-6/3-4 TRBC2 G5	GTCTGAAAGAAAACAGGGGAAG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	377	MG3-6/3-4 TRBC2 H5	ACAGGGGAAGAAAAATGGATGA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	378	MG3-6/3-4 TRBC2 A6	GCGAAGTGGTCACTATGATCTT
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	379	MG3-6/3-4 TRBC2 B6	TTAGGAAACCAGGACCCCAGAA
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	380	MG3-6/3-4 TRBC2 C6	TATGGCTGGTCCTCAGGGAGAC
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	381	MG3-6/3-4 TRBC2 D6	CTAAGGTGTCAGGATCTGAAGG
TRBC2 靶位点的 DNA 序列	382	MG3-6/3-4 TRBC2 E6	GGAACACGTTTTTCAGGTCCTC
（r =天然核糖碱基，m = 2'-O 甲基修饰的碱基，F = 2'氟修饰的碱基，* =硫代磷酸酯键）			

[0490] 实例16-Hep3B细胞中ANGPTL3在DNA水平下的基因编辑结果的分析

[0491] 使用电穿孔将包括下表9D和SEQ ID NO:383-572中描述的sgRNA的MG3-6/4RNP(104pmol蛋白质/120pmol向导)核转染到Hep3B细胞(100,000个)中。采集细胞,并且在转染后三天制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以确定基因编辑(图21)。结果显示,在此测定中sgRNA E5、C6、A7、A8、A9、G9、G10、E11、A12和C12是性能最高的sgRNA。

[0492] 表9D:实例16中使用的gRNA和靶向序列

[0493]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	383	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A1	mU*mU*mG*rUrUrCrCrUrCrUrArGrUrUrArUrUrUrCrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	384	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B1	mA*mU*mU*rUrGrArUrUrCrUrCrUrArUrCrUrCrCrArGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	385	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C1	mU*mU*mU*rGrArUrUrCrUrCrUrArUrCrUrCrCrArGrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	386	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D1	mA*mA*mG*rArUrUrUrGrCrUrArUrGrUrUrArGrArCrGrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	387	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E1	mA*mG*mA*rUrUrUrGrCrUrArUrGrUrUrArGrArCrGrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	388	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F1	mG*mA*mU*rUrUrGrCrUrArUrGrUrUrArGrArCrGrArUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

[0494]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	389	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G1	mA*mC*mU*rUrUrGrUrCrCrArUrArArGrArCrGrArArGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	390	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H1	mA*mG*mG*rGrCrCrArArArUrUrArArUrGrArCrArUrArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	391	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A2	mG*mG*mG*rCrCrArArArUrUrArArUrGrArCrArUrArUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	392	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B2	mU*mA*mU*rGrArUrCrUrArUrCrGrCrUrGrCrArArArCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	393	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C2	mA*mU*mG*rArUrCrUrArUrCrGrCrUrGrCrArArArCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	394	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D2	mC*mA*mA*rArCrCrArGrUrGrArArArUrCrArArArGrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	395	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E2	mA*mA*mA*rCrCrArGrUrGrArArArUrCrArArArGrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	396	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F2	mA*mC*mA*rArGrUrCrArArArArArUrGrArArGrArGrGrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGr

[0495]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	397	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G2	mG*mA*mA*rUrArUrGrUrCrArCrUrUrGrArArCr UrCrArArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	398	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H2	mU*mC*mA*rCrUrUrGrArArCrUrCrArArCrUrCr ArArArArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	399	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A3	mU*mC*mA*rArArArCrUrUrGrArArArGrCrCrUr CrCrUrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	400	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B3	mC*mA*mA*rArArCrUrUrGrArArArGrCrCrUrCr CrUrArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	401	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C3	mA*mA*mA*rArCrUrUrGrArArArGrCrCrUrCrCr UrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	402	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D3	mA*mA*mA*rCrUrUrGrArArArGrCrCrUrCrCrUr ArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	403	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E3	mA*mA*mC*rUrUrGrArArArGrCrCrUrCrCrUrAr GrArArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	404	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F3	mG*mU*mU*rCrUrGrGrArGrUrUrUrCrArGrGrUr UrGrArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr

[0496]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	405	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G3	mC*mA*mC*rUrGrGrUrUrUrGrCrArGrCrGrArUr ArGrArUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	406	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H3	mA*mC*mU*rGrGrUrUrUrGrCrArGrCrGrArUrAr GrArUrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	407	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A4	mC*mG*mA*rUrArGrArUrCrArUrArArArArArGr ArCrUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	408	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B4	mC*mC*mC*rArArCrUrGrArArGrGrArGrGrCrCr ArUrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	409	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C4	mC*mC*mA*rArCrUrGrArArGrGrArGrGrCrCrAr UrUrGrGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	410	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D4	mC*mU*mU*rGrArUrUrUrUrGrGrCrUrCrUrGrGr ArGrArUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	411	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E4	mU*mU*mU*rUrGrGrCrUrCrUrGrGrArGrArUrAr GrArGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3	412	MG3-6/3-4	mU*mC*mU*rGrGrArGrArUrArGrArGrArArUrCr

[0497]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
的 MG3-6/3-4 sgRNA		ANGPTL3 F4	ArArArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	413	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G4	mG*mA*mA*rUrUrGrUrCrUrUrGrArUrCrArArUr UrCrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	414	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H4	mA*mA*mU*rUrGrUrCrUrUrGrArUrCrArArUrUr CrUrGrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	415	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A5	mG*mG*mA*rGrGrArArArUrArArCrUrArGrArGr GrArArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	416	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B5	mG*mA*mG*rGrArArArUrArArCrUrArGrArGrGr ArArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	417	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C5	mA*mC*mU*rCrUrCrUrArUrArUrCrCrArGrArCr UrUrUrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	418	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D5	mC*mU*mC*rUrCrUrArUrArUrCrCrArGrArCrUr UrUrUrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	419	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E5	mU*mC*mU*rCrUrArUrArUrCrCrArGrArCrUrUr UrUrGrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

[0498]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	420	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F5	mA*mA*mC*rArArUrUrArArArCrCrArArCrArGr CrArUrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	421	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G5	mA*mU*mU*rArArArCrCrArArCrArGrCrArUrArAr GrUrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	422	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H5	mA*mA*mC*rCrArArCrArGrCrArUrArGrUrCrAr ArArUrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	423	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A6	mA*mC*mC*rArArCrArGrCrArUrArGrUrCrArAr ArUrArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	424	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B6	mG*mA*mU*rGrCrUrArUrUrArUrCrUrUrGrUrUr UrUrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	425	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C6	mA*mG*mG*rArCrUrArGrUrArUrUrCrArArGrAr ArCrCrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	426	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D6	mG*mG*mA*rCrUrArGrUrArUrUrCrArArGrArAr CrCrCrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	427	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E6	mA*mA*mG*rArArCrUrArCrUrCrCrCrUrUrUrCr UrUrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr

[0499]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	428	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F6	mA*mC*mU*rArCrUrCrCrCrUrUrUrCrUrUrCrAr GrUrUrGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	429	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G6	mC*mU*mA*rCrUrCrCrCrUrUrUrCrUrUrCrArGr UrUrGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	430	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H6	mC*mC*mU*rUrUrCrUrUrCrArGrUrUrGrArArUr GrArArArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	431	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A7	mG*mG*mU*rGrCrUrCrUrUrGrGrCrUrUrGrGrAr ArGrArUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	432	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B7	mG*mU*mG*rCrUrCrUrUrGrGrCrUrUrGrGrArAr GrArUrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	433	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C7	mA*mU*mA*rGrArGrArArArUrUrUrCrUrGrUrGr GrGrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	434	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D7	mG*mA*mA*rUrArCrUrArGrUrCrCrUrUrCrUrGr ArGrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	435	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E7	mU*mU*mA*rUrUrGrArUrUrCrUrArGrGrCrArUr UrCrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr

[0500]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	436	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F7	mG*mU*mC*rUrArCrUrGrUrGrArUrGrUrUrArUr ArUrCrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	437	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G7	mC*mU*mG*rArUrArUrArArCrArUrCrArCrArGr UrArGrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	438	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H7	mU*mG*mA*rUrArUrArArCrArUrCrArCrArGrUr ArGrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	439	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A8	mG*mA*mU*rArUrArArCrArUrCrArCrArGrUrAr GrArCrArUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	440	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B8	mC*mA*mC*rUrUrGrUrArUrGrUrUrCrArCrCrUr CrUrGrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	441	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C8	mU*mA*mU*rArArArUrGrGrUrGrGrUrArCrArUr UrCrArGrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	442	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D8	mU*mG*mG*rUrArCrArUrUrCrArGrCrArGrGrAr ArUrGrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3	443	MG3-6/3-4	mG*mU*mC*rCrArUrGrGrArCrArUrUrArArUrUr

[0501]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
的 MG3-6/3-4 sgRNA		ANGPTL3 E8	CrArArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	444	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F8	mU*mU*mC*rArArCrArUrCrGrArArUrArGrArUr GrGrArUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	445	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G8	mA*mU*mA*rGrArUrGrGrArUrCrArCrArArArAr CrUrUrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	446	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H8	mU*mU*mC*rArArUrGrArArArCrGrUrGrGrGrAr GrArArCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	447	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A9	mA*mG*mU*rCrCrCrCrUrUrArCrCrArUrCrArAr GrCrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	448	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B9	mU*mU*mU*rGrUrGrArUrCrCrArUrCrUrArUrUr CrGrArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	449	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C9	mU*mG*mA*rArUrUrArArUrGrUrCrCrArUrGrGr ArCrUrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	450	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D9	mU*mU*mU*rArCrGrArArUrUrGrArGrUrUrGrGr ArArGrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

[0502]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	451	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E9	mG*mG*mC*rArArUrGrUrCrCrCrCrArArUrGrCrArArUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	452	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F9	mG*mC*mA*rArUrGrUrCrCrCrCrArArUrGrCrArArUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	453	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G9	mG*mU*mU*rUrUrCrUrArCrUrUrGrGrGrArUrCrArCrArArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	454	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H9	mC*mC*mU*rUrUrUrGrCrUrUrUrGrUrGrArUrCrCrCrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	455	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A10	mC*mU*mU*rUrUrGrCrUrUrUrGrUrGrArUrCrCrCrArArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	456	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B10	mU*mU*mG*rUrGrArUrCrCrCrArArGrUrArGrArArArArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	457	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C10	mA*mG*mU*rUrGrGrUrUrUrCrGrUrGrArUrUrUrCrCrCrArArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	458	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D10	mG*mU*mU*rGrGrUrUrUrCrGrUrGrArUrUrUrCrCrCrArArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGr

[0503]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	459	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E10	mG*mU*mU*rUrCrGrUrGrArUrUrUrCrCrCrArArGrUrArArArGrUrUrGrArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	460	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F10	mU*mU*mC*rCrArGrUrCrUrUrCrCrArArCrUrCrArArUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	461	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G10	mA*mG*mU*rArUrArUrCrUrUrCrUrCrUrArGrGrCrCrCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	462	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H10	mG*mU*mA*rUrArUrCrUrUrCrUrCrUrArGrGrCrCrCrArArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	463	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A11	mU*mC*mU*rArGrGrCrCrCrArArCrCrArArArArUrUrCrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	464	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B11	mC*mU*mA*rGrGrCrCrCrArArCrCrArArArArUrUrCrUrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	465	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C11	mG*mC*mC*rCrArArCrCrArArArArUrUrCrUrCrCrUrGrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	466	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D11	mU*mG*mG*rUrGrGrUrGrGrCrArUrGrArUrGrArGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArArGrGrCrArUrCrCrUrUr

[0504]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
			CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	467	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E11	mG*mG*mU*rGrGrUrGrGrCrArUrGrArUrGrArGr UrGrUrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	468	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F11	mU*mG*mA*rUrGrArGrUrGrUrGrGrArGrArArAr ArCrArArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	469	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G11	mU*mG*mU*rGrGrArGrArArArArCrArArCrCrUr ArArArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	470	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H11	mG*mG*mU*rArArArUrArUrArArCrArArArCrCr ArArGrArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	471	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A12	mG*mA*mA*rGrArGrGrArUrUrArUrCrUrUrGrGr ArArGrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	472	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B12	mA*mA*mG*rArGrGrArUrUrArUrCrUrUrGrGrAr ArGrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	473	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C12	mU*mC*mA*rArArArUrGrGrArArGrGrUrUrArUr ArCrUrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3	474	MG3-6/3-4	mC*mA*mA*rArArUrGrGrArArGrGrUrUrArUrAr

[0505]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
的 MG3-6/3-4 sgRNA		ANGPTL3 D12	CrUrCrUrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	475	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E12	mA*mU*mG*rUrUrGrArUrCrCrArUrCrCrArArCr ArGrArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	476	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F12	mC*mA*mU*rCrCrArArCrArGrArUrUrCrArGrAr ArArGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 ANGPTL3 的 MG3-6/3-4 sgRNA	477	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G12	mG*mC*mC*rUrCrArGrUrUrCrArUrUrCrArArAr GrCrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGr ArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUr CrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrU rCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGr GrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	478	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A1	TTGTTCCTCTAGTTATTTCCTC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	479	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B1	ATTTGATTCTCTATCTCCAGAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	480	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C1	TTTGATTCTCTATCTCCAGAGC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	481	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D1	AAGATTTGCTATGTTAGACGAT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	482	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E1	AGATTTGCTATGTTAGACGATG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	483	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F1	GATTTGCTATGTTAGACGATGT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	484	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G1	ACTTTGTCCATAAGACGAAGGG
ANGPTL3 靶位	485	MG3-6/3-4 ANGPTL3	AGGGCCAAATTAATGACATATT

[0506]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
点的 DNA 序列		H1	
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	486	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A2	GGGCCAAATTAATGACATATTT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	487	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B2	TATGATCTATCGCTGCAAACCA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	488	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C2	ATGATCTATCGCTGCAAACCAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	489	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D2	CAAACCAGTGAAATCAAAGAAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	490	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E2	AAACCAGTGAAATCAAAGAAGA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	491	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F2	ACAAGTCAAAAATGAAGAGGTA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	492	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G2	GAATATGTCACTTGAACTCAAC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	493	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H2	TCACTTGAACTCAACTCAAAAC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	494	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A3	TCAAAACTTGAAAGCCTCCTAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	495	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B3	CAAAACTTGAAAGCCTCCTAGA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	496	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C3	AAAACTTGAAAGCCTCCTAGAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	497	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D3	AAACTTGAAAGCCTCCTAGAAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	498	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E3	AACTTGAAAGCCTCCTAGAAGA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	499	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F3	GTTCTGGAGTTTCAGGTTGATT
ANGPTL3 靶位	500	MG3-6/3-4 ANGPTL3	CACTGGTTTGCAGCGATAGATC

[0507]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
点的 DNA 序列		G3	
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	501	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H3	ACTGGTTTGCAGCGATAGATCA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	502	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A4	CGATAGATCATAAAAAGACTGA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	503	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B4	CCCAACTGAAGGAGGCCATTGG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	504	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C4	CCAACTGAAGGAGGCCATTGGC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	505	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D4	CTTGATTTTGGCTCTGGAGATA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	506	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E4	TTTTGGCTCTGGAGATAGAGAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	507	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F4	TCTGGAGATAGAGAATCAAATG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	508	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G4	GAATTGTCTTGATCAATTCTGG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	509	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H4	AATTGTCTTGATCAATTCTGGA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	510	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A5	GGAGGAAATAACTAGAGGAACA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	511	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B5	GAGGAAATAACTAGAGGAACAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	512	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C5	ACTCTCTATATCCAGACTTTTG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	513	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D5	CTCTCTATATCCAGACTTTTGT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	514	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E5	TCTCTATATCCAGACTTTTGTA
ANGPTL3 靶位	515	MG3-6/3-4 ANGPTL3	AACAATTAAACCAACAGCATAG

[0508]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
点的 DNA 序列		F5	
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	516	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G5	ATTAAACCAACAGCATAGTCAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	517	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H5	AACCAACAGCATAGTCAAATAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	518	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A6	ACCAACAGCATAGTCAAATAAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	519	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B6	GATGCTATTATCTTGTTTTTCT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	520	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C6	AGGACTAGTATTCAAGAACCCA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	521	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D6	GGACTAGTATTCAAGAACCCAC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	522	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E6	AAGAACTACTCCCTTTCTTCAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	523	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F6	ACTACTCCCTTTCTTCAGTTGA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	524	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G6	CTACTCCCTTTCTTCAGTTGAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	525	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H6	CCTTTCTTCAGTTGAATGAAAT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	526	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A7	GGTGCTCTTGGCTTGGAAGATA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	527	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B7	GTGCTCTTGGCTTGGAAGATAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	528	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C7	ATAGAGAAATTTCTGTGGGTTC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	529	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D7	GAATACTAGTCCTTCTGAGCTG
ANGPTL3 靶位	530	MG3-6/3-4 ANGPTL3	TTATTGATTCTAGGCATTCCTG

[0509]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
点的 DNA 序列		E7	
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	531	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F7	GTCTACTGTGATGTTATATCAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	532	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G7	CTGATATAACATCACAGTAGAC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	533	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H7	TGATATAACATCACAGTAGACA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	534	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A8	GATATAACATCACAGTAGACAT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	535	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B8	CACTTGTATGTTCACCTCTGTT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	536	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C8	TATAAATGGTGGTACATTCAGC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	537	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D8	TGGTACATTCAGCAGGAATGCC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	538	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E8	GTCCATGGACATTAATTCAACA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	539	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F8	TTCAACATCGAATAGATGGATC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	540	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G8	ATAGATGGATCACAAAACTTCA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	541	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H8	TTCAATGAAACGTGGGAGAACT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	542	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A9	AGTCCCCTTACCATCAAGCCTC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	543	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B9	TTTGTGATCCATCTATTCGATG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	544	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C9	TGAATTAATGTCCATGGACTAC
ANGPTL3 靶位	545	MG3-6/3-4 ANGPTL3	TTTACGAATTGAGTTGGAAGAC

[0510]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
点的 DNA 序列		D9	
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	546	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E9	GGCAATGTCCCCAATGCAATCC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	547	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F9	GCAATGTCCCCAATGCAATCCC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	548	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G9	GTTTTCTACTTGGGATCACAAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	549	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H9	CCTTTTGCTTTGTGATCCCAAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	550	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A10	CTTTTGCTTTGTGATCCCAAGT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	551	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B10	TTGTGATCCCAAGTAGAAAACA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	552	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C10	AGTTGGTTTCGTGATTTCCCAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	553	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D10	GTTGGTTTCGTGATTTCCCAAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	554	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E10	GTTTCGTGATTTCCCAAGTAAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	555	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F10	TTCCAGTCTTCCAACTCAATTC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	556	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G10	AGTATATCTTCTCTAGGCCCAA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	557	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H10	GTATATCTTCTCTAGGCCCAAC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	558	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A11	TCTAGGCCCAACCAAAATTCTC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	559	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B11	CTAGGCCCAACCAAAATTCTCC
ANGPTL3 靶位	560	MG3-6/3-4 ANGPTL3	GCCCAACCAAAATTCTCCTGAA

[0511]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
点的 DNA 序列		C11	
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	561	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D11	TGGTGGTGGCATGATGAGTGTG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	562	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E11	GGTGGTGGCATGATGAGTGTGG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	563	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F11	TGATGAGTGTGGAGAAAACAAC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	564	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G11	TGTGGAGAAAACAACCTAAATG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	565	MG3-6/3-4 ANGPTL3 H11	GGTAAATATAACAAACCAAGAG
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	566	MG3-6/3-4 ANGPTL3 A12	GAAGAGGATTATCTTGGAAGTC
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	567	MG3-6/3-4 ANGPTL3 B12	AAGAGGATTATCTTGGAAGTCT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	568	MG3-6/3-4 ANGPTL3 C12	TCAAAATGGAAGGTTATACTCT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	569	MG3-6/3-4 ANGPTL3 D12	CAAAATGGAAGGTTATACTCTA
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	570	MG3-6/3-4 ANGPTL3 E12	ATGTTGATCCATCCAACAGATT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	571	MG3-6/3-4 ANGPTL3 F12	CATCCAACAGATTCAGAAAGCT
ANGPTL3 靶位点的 DNA 序列	572	MG3-6/3-4 ANGPTL3 G12	GCCTCAGTTCATTCAAAGCTTT
(r =天然核糖碱基，m = 2'-O 甲基修饰的碱基，F = 2'氟修饰的碱基，* =硫代磷酸酯键)			

[0512] 实例17-Hep3B细胞中PCSK9在DNA水平下的基因编辑结果的分析

[0513] 使用电穿孔将包括下表9E和SEQ ID NO:573-602中描述的sgRNA的MG3-6/4RNP(104pmol蛋白质/120pmol向导)核转染到Hep3B细胞(100,000个)中。采集细胞,并且在转染后三天制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以确定基因编辑(图22)。结果表明,sgRNA B1、F1、A2和E2实现了最高的编辑性能,其中对于D2、C2、B2、H1和F2也发生了明显的编辑。

[0514] 表9E:实例17中使用的gRNA和靶向序列

[0515]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	573	MG3-6/3-4 PCSK9 A1	mA*mC*mC*rCrCrUrCrCrArCrGrGrUrArCrCrGrGrGrCrGrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	574	MG3-6/3-4 PCSK9 B1	mA*mC*mC*rArGrCrArUrArCrArGrArGrUrGrArCrCrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	575	MG3-6/3-4 PCSK9 C1	mC*mC*mA*rGrCrArUrArCrArGrArGrUrGrArCrCrArCrCrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	576	MG3-6/3-4 PCSK9 D1	mC*mA*mG*rGrGrUrCrArUrGrGrUrCrArCrCrGrArCrUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	577	MG3-6/3-4 PCSK9 E1	mC*mC*mU*rCrCrCrArGrGrCrCrUrGrGrArGrUrUrUrArUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	578	MG3-6/3-4 PCSK9 F1	mC*mU*mC*rCrCrArGrGrCrCrUrGrGrArGrUrUrUrArUrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9	579	MG3-6/3-4	mC*mA*mG*rGrCrUrGrGrArCrCrArGrCrUrGrGrCr

[0516]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
的 MG3-6/3-4 sgRNA		PCSK9 G1	UrUrUrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArU rUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrG rArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrG rUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrG rUrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	580	MG3-6/3-4 PCSK9 H1	mG*mG*mU*rGrGrCrCrCrArArCrUrGrUrGrArUr GrArCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGr ArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGr UrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	581	MG3-6/3-4 PCSK9 A2	mG*mC*mC*rCrCrGrCrCrGrCrUrUrCrCrCrArCrUr CrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGr ArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGr UrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	582	MG3-6/3-4 PCSK9 B2	mA*mG*mU*rGrUrGrCrUrGrArCrCrArUrArCrArGr UrCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGr ArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGr UrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	583	MG3-6/3-4 PCSK9 C2	mC*mC*mU*rGrCrArArArArCrArGrCrUrGrCrCrAr ArCrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGr ArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGr UrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	584	MG3-6/3-4 PCSK9 D2	mC*mU*mG*rCrArArArArCrArGrCrUrGrCrCrArAr CrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGr ArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGr UrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	585	MG3-6/3-4 PCSK9 E2	mA*mA*mU*rGrGrCrGrUrArGrArCrArCrCrCrUrCr ArCrCrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUr UrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGr ArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGr UrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGr UrArUrGrU*mU*mU*mU
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	586	MG3-6/3-4 PCSK9 F2	mU*mC*mC*rUrGrCrUrGrCrCrArUrGrCrCrCrCrAr GrGrUrCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArU rUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrG rArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrG rUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrG rUrArUrGrU*mU*mU*mU

[0517]

类别	SEQ ID NO:	名称	序列
靶向 PCSK9 的 MG3-6/3-4 sgRNA	587	MG3-6/3-4 PCSK9 G2	mU*mG*mG*rArArUrGrCrArArArGrUrCrArArGrGrArGrCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	588	MG3-6/3-4 PCSK9 A1	ACCCCTCCACGGTACCGGGCGG
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	589	MG3-6/3-4 PCSK9 B1	ACCAGCATACAGAGTGACCACC
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	590	MG3-6/3-4 PCSK9 C1	CCAGCATACAGAGTGACCACCG
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	591	MG3-6/3-4 PCSK9 D1	CAGGGTCATGGTCACCGACTTC
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	592	MG3-6/3-4 PCSK9 E1	CCTCCCAGGCCTGGAGTTTATT
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	593	MG3-6/3-4 PCSK9 F1	CTCCCAGGCCTGGAGTTTATTC
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	594	MG3-6/3-4 PCSK9 G1	CAGGCTGGACCAGCTGGCTTTT
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	595	MG3-6/3-4 PCSK9 H1	GGTGGCCCCAACTGTGATGACC
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	596	MG3-6/3-4 PCSK9 A2	GCCCCGCCGCTTCCCACTCCTG
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	597	MG3-6/3-4 PCSK9 B2	AGTGTGCTGACCATACAGTCCT
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	598	MG3-6/3-4 PCSK9 C2	CCTGCAAAACAGCTGCCAACCT
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	599	MG3-6/3-4 PCSK9 D2	CTGCAAAACAGCTGCCAACCTG
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	600	MG3-6/3-4 PCSK9 E2	AATGGCGTAGACACCCTCACCC
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	601	MG3-6/3-4 PCSK9 F2	TCCTGCTGCCATGCCCCAGGTC
PCSK9 靶位点的 DNA 序列	602	MG3-6/3-4 PCSK9 G2	TGGAATGCAAAGTCAAGGAGCA
（r =天然核糖碱基，m = 2'-O 甲基修饰的碱基，F = 2'氟修饰的碱基，* =硫代磷酸酯键）			

[0518] 实例18-通过全身施用脂质纳米颗粒传递的嵌合核酸酶MG3-6/3-4在小鼠肝脏中进行体内基因编辑

[0519] 为了评估MG3-6/3-4嵌合II型核酸酶在活动物体内编辑基因组的能力,使用脂质纳米颗粒来递送编码MG3-6/3-4核酸酶的mRNA(例如,SEQ ID NO:603的RNA版本)和靶向小鼠HAO-1基因的编码序列的不同部分的单向导RNA(sgRNA)(例如,在下表10中描述的)。HAO-1基因编码乙醇酸氧化酶,所述乙醇酸氧化酶是参与乙醇酸代谢的酶,并且主要在肝脏中的

肝细胞中表达。在小鼠肝脏细胞系Hepa1-6中执行靶向HAO-1编码序列的sgRNA的筛选,以鉴定活性向导。选择用编码MG3-6/3-4核酸酶的mRNA转染时在Hepa1-6细胞中表现出46％和26％编辑的sgRNA mH364-7和mH364-20用于在小鼠中进行测试。mH364-7靶向外显子2,并且mH364-20靶向外显子4。

[0520] 将天然RNA结构的多种化学修饰掺入这些sgRNA中。当在来自哺乳动物细胞的提取物中温育时,基于这些化学修饰在体外改善sgRNA的稳定性而不对编辑活性产生负面影响的能力来选择所述化学修饰。对于小鼠中的初始测试,选择掺入化学1和化学35的sgRNA mH364-7和mH364-20用于测试,并且命名为mH364-7-1、mH364-20-1、mH364-7-35、mH364-20-35。包含化学修饰的这些向导的序列示出于下表10中。

[0521] 表10:在小鼠中体内测试的向导RNA的序列和化学修饰

[0522]

向导名称	序列	SEQ ID NO:
mH364-7-1	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAG AAUCGAAAGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAU GCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGC GGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1795
mH364-20-1	mU*mU*mC*AGCAAGUCCACUGUUGUCUGUUGAG AAUCGAAAGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAU GCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGC GGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1808
mH364-7-35	mG*mA*mG*mC*UGGCCACUGUGCGAGGUAGUUG AGAAUCmG*mA*mA*mA*GAUUCUUAAUAAGGCA UCmC*mU*mU*mC*mC*GAUGCUGACUUCUCACCG UCCGUUUUCCmA*mA*mU*mA*GGAGCGGGCGGU A*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1816
mH364-20-35	mU*mU*mC*mA*GCAAGUCCACUGUUGUCUGUUG AGAAUCmG*mA*mA*mA*GAUUCUUAAUAAGGCA UCmC*mU*mU*mC*mC*GAUGCUGACUUCUCACCG UCCGUUUUCCmA*mA*mU*mA*GGAGCGGGCGGU A*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1826

[0523] m:2'-O甲基修饰的碱基,*:硫代磷酸酯主链

[0524] 编码MG3-6/3-4核酸酶的mRNA通过使用T7 RNA聚合酶、核苷酸和酶,通过线性化质粒模板的体外转录产生。

[0525] 转录到RNA中的DNA序列(SEQ ID NO:603)以5'至3'的顺序包括以下元件:T7 RNA聚合酶启动子、5'非翻译区(5'UTR)、核定位信号、短接头、MG3-6/3-4核酸酶的编码序列、短接头、核定位信号和3'非翻译区以及大约100个核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:2865)(不包含在SEQ ID NO:603中)。

[0526] 此MG3-6/3-4盒中编码的合成mRNA中编码的蛋白质序列从5'至3'包括以下元件:来自SV40的核定位信号、五个氨基酸接头(GGGGS(SEQ ID NO:2864))、从其去除起始甲硫氨酸密码子的MG3-6/3-4核酸酶的蛋白质编码序列、3个氨基酸接头(SGG)和来自核质蛋白的核定位信号。修饰此盒的蛋白质编码区的DNA序列,以反映人中的密码子使用。在用于体外转录的质粒中编码大约100个核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:2865)并且共转录地对mRNA进行封端。将mRNA中的尿苷用N1-甲基假尿苷置换。

[0527] 使用脂质纳米颗粒(LNP)制剂递送MG3-6/3-4mRNA和包括4种脂质组分的向导RNA。

将四种脂质组分溶解于乙醇中,并且以适当的摩尔比混合以制备脂质工作混合物。mRNA和向导RNA在调配之前以1:1的质量比混合或者在单独的LNP中调配,然后以两种RNA的1:1质量比共同注射到小鼠体内。在任一情况下,RNA在100mM乙酸钠(pH 4.0)中稀释以制备RNA工作储备液。将脂质工作储备液和RNA工作储备液在微流体装置中分别以1:3的流速比和12毫升/分钟的流速混合。LNP针对磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析2至16小时,并且然后浓缩,直到实现期望的减少体积。使用Ribogreen试剂测量LNP制剂中RNA的浓度。LNP的直径和多分散性(PDI)通过动态光散射测定。代表性LNP的直径范围为65nm至120nm,其中PDI为0.05至0.20。LNP以每kg体重1mg RNA的总RNA剂量通过尾静脉静脉注射到8至12周龄的C57B16野生型小鼠中(每只小鼠0.1mL)。给药后十一天,处死每组5只小鼠中的3只,并且收集肝脏并使用珠磨器在消化缓冲液中均质化。从所得匀浆物中纯化基因组DNA,并通过测量260nm处的吸光度进行定量。将从仅注射缓冲液的小鼠中纯化的基因组DNA用作对照。给药后28天,处死每组剩余2只小鼠,并且收集肝脏并使用珠磨器在消化缓冲液中均质化。从所得匀浆物中纯化基因组DNA,并通过测量260nm处的吸光度进行定量。将从仅注射缓冲液的小鼠中纯化的基因组DNA用作对照。

[0528] 然后使用侧接两个向导靶向的区域的第一组引物对肝脏基因组DNA进行PCR扩增。所使用的PCR引物示出于下表11中。

[0529] 表11:用于分析小鼠体内基因组编辑的PCR引物和下一代测序引物的序列

[0530]

引物组名称	目的	左引物序列	右引物序列
mHAO1-NGS-P4	扩增用于向导mH364-7的HAO1外显子2中的靶位点	GTAAAGAAAAACAAGGAATGTAAT(SEQ ID NO: 2866)	ATCTGTCAACTTCTGTTTTAGGAC(SEQ ID NO: 2868)
mHAO1-NGS-P5	扩增用于向导mH364-20的HAOI外显子4中的靶位点	GCAAAGTAGAGAAATGACAAACC(SEQ ID NO: 2867)	ACCAAGTCAGATATAAACTGTCT(SEQ ID NO: 2869)

[0531] 这些引物的5'端包括与第二PCR中使用的PCR引物互补的保守区域,随后5N以提供序列多样性并提高测序质量,并且以与小鼠基因组中的靶区域互补的序列结束。使用100ng的基因组DNA进行PCR,并且粘接温度为60℃,持续总共30个循环。随后使用引物进行第2轮10个循环的PCR,所述引物被设计成添加唯一的双条形码以用于进行下一代测序。使用150bp配对端读段将每个样品测序到大于10,000个读段的深度。合并读段以产生单个250bp序列,其中计算Indel百分比和INDEL曲线。

[0532] 对于个体小鼠,给药后第11天来自小鼠的INDEL的NGS分析结果示出于表12中,并且汇总于图23中。

[0533] 表12:在LNP给药后第11天,通过下一代测序分析的野生型小鼠全肝中MG3-6/3-4在HAO-1基因座处的基因组编辑。

[0534]

动物编号	向导 RNA	总 NGS 读段	Indel%	Indel OOF 的%	平均 INDEL	相对于总体的平均 OOF%
1	PBS 对照	210962	0.09	100	0.2	0.2
2	PBS 对照	259982	0.29	99.87		
3	PBS 对照	211193	0.08	100		
6	364mHA-G7-1	164396	54.06	87.02	53.0	46.0
7	364mHA-G7-1	163409	51.93	85.9		
8	364mHA-G7-1	183054	52.94	87.6		

[0535]

动物编号	向导 RNA	总 NGS 读段	Indel%	Indel OOF 的%	平均 INDEL	相对于总体的平均 OOF%
11	364mHA-G7-35	38835	22.71	91.57	23.6	21.1
12	364mHA-G7-35	269963	26.83	89.59		
13	364mHA-G7-35	190007	21.32	87.11		
16	364mHA-G20-1	227766	8.53	88.62	8.9	7.5
17	364mHA-G20-1	202915	5.01	90.36		
18	364mHA-G20-1	236757	13.06	80.52		
21	364mHA-G20-35	177059	2.78	80.98	2.5	2.0
22	364mHA-G20-35	163515	2.29	67.62		
23	364mHA-G20-35	136634	2.31	89.32		

[0536] 示出了关于单个小鼠的数据。所有接受向导RNA LNP的小鼠也接受封装MG3-6/3-4mRNA的LNP。Indel OOF的％是产生HAO1编码序列出框的序列的所有INDEL的百分比。相对于总体的平均OOF％是HAO1编码序列出框的所有等位基因的平均百分比。给出NGS测序读段的总数目。

[0537] 第2组小鼠接受封装向导RNA mH364-7-1的LNP。第3组小鼠接受封装向导RNAmH364-7-35的LNP。第4组小鼠接受封装向导RNA mH364-20-1的LNP。第5组小鼠接受封装向导RNAmH364-20-35的LNP。第2至5组中的所有小鼠还接受LNP,所述LNP封装在注射之前与含有1:1RNA质量比的向导RNA混合的MG3-6/3-4mRNA。在注射PBS缓冲液的小鼠的肝脏中未检测到INDEL(参见表12)。用封装向导364mHA-G7-1和MG3-6/3-4mRNA的LNP注射的小鼠在HAO-1中的靶位点处以53.0％的平均频率表现出INDEL。用封装向导364mHA-G7-35和MG3-6/3-4mRNA的LNP注射的小鼠在HAO-1中的靶位点处以23.6％的平均频率表现出INDEL。用封装向导364mHA-G20-1和MG3-6/3-4mRNA的LNP注射的小鼠在HAO-1中的靶位点处以8.9％的平均频率表现出INDEL。用封装向导364mHA-G20-35和MG3-6/3-4mRNA的LNP注射的小鼠在HAO-1中的靶位点处以2.5％的平均频率表现出indel。这些数据证实,当比较具有相同化学修饰的向导时,具有间隔子7的向导(364mHA-G7-1和364mHA-G7-35)在体内比具有间隔子20的向导(364mHA-G20-1和364mHA-G20-35)显著更有效力。这与通过基于mRNA的转染在Hepa1-6细胞中观测到的这2个向导序列的较高编辑水平一致(在Hepa1-6细胞中mH364-7表现出46％的INDEL并且mH364-20表现出26％的INDEL)。针对向导7(对于化学物质编号1,2.2倍编辑)和向导20(对于化学物质编号1,3.5倍编辑)两者,向导化学物质编号1产生比化学物质编号35的编辑水平更高的编辑水平。这些数据表明,MG3-6/3-4核酸酶可以在小鼠中在sgRNA指

定的靶位点处进行体内编辑。此外,当使用LNP递送时,具有一组指定为化学物质编号1的化学修饰的sgRNA能够促进全肝脏中53％的基因组DNA的编辑。这些研究中使用的LNP通过载脂蛋白E(apoE)与LNP的结合而被吸收,所述LNP是与低密度脂蛋白受体结合的配体。

[0538] 肝脏由许多不同的细胞类型构成。在小鼠的肝脏中,肝细胞占所有细胞的约52％(并且35％的肝细胞含有两个核),其中库普弗细胞(Kupffer cell)(18％)、Ito细胞(8％)和内皮细胞(22％)构成其余细胞。通过外推,在不希望受理论束缚的情况下,预测小鼠肝脏中总核的约60％[((52+(0.35x52))/(48+(52+(0.35x 52)))]源自肝细胞。因为LDL受体主要在肝脏中的肝细胞上表达,本文所述描的小鼠研究中使用的LNP预计主要被肝细胞吸收。因为肝细胞核占小鼠全肝所有核的约60％,所以可以预测,如果编辑所有肝细胞核,则预测在全肝中测量的INDEL水平为约60％。MG3-6/3-4的LNP递送能够达到53％的INDEL率的发现表明编辑了大多数肝细胞核。

[0539] HAO1基因编码蛋白质乙醇酸氧化酶(GO),一种参与乙醇酸代谢的胞内酶。为了确定在HAO1基因中观察到的基因编辑是否导致肝脏中GO蛋白的表达减少,在相同研究中从小鼠的肝脏的单独叶中提取总蛋白质。使用针对小鼠GO蛋白的可商购获得的抗体,用蛋白质印迹测定来检测GO蛋白。将蛋白质黏着斑蛋白用作蛋白质印迹的上样对照,因为预测黏着斑蛋白水平不受HAO1基因的基因编辑的影响。如图24所示出的,用封装MG3-6/3-4mRNA和靶向HAO1的sgRNA的LNP处理的小鼠的肝脏中GO蛋白的水平显著降低。使用图像分析软件的蛋白质印迹的定量以及GO相对于黏着斑蛋白水平的归一化表明,在分别用sgRNA mH364-7-1、mH364-7-35、mH364-20-1和mH364-20-35处理的小鼠中,GO水平平均降低了75％、58％、4％和24％。GO蛋白减少的程度与这些小鼠组中的INDEL频率相关(参见表12)。这些数据表明,与适当设计的sgRNA组合的MG3-6/3-4核酸酶可以用于在活哺乳动物体内的所关注的基因中创建indel,并且减少(敲低)由所述基因编码的蛋白质的产生。减少特定基因的表达在特定疾病中可以是治疗有益的。在编码GO蛋白的HAO1基因的情况下,预期肝脏中GO蛋白水平的降低在患有遗传性疾病原发性高草酸尿症I型的患者中是有益的。因此,MG3-6/3-4核酸酶连同含有靶向HAO1基因的适当化学修饰的适当sgRNA是治疗原发性高草酸尿症I型的潜在方法。

[0540] 实例19-使用具有四种不同化学修饰的相同向导RNA序列比较小鼠中的MG3-6/3-4基因编辑效率

[0541] 通过测试引入到相同向导RNA序列中的4种不同向导化学,进一步研究了对sgRNA的化学修饰对体内编辑效率的影响。用化学修饰编号1、编号35、编号42或编号45合成靶向小鼠HAO1基因的向导RNA 7。这些向导的序列在下表13中示出。

[0542] 表13:靶向小鼠HAO1的MG3-6/3-4sgRNA向导7的序列

[0543]

向导名称	序列	SEQ ID NO:
mH364-7-1	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCGAAAGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1821
mH364-7-35	mG*mA*mG*mC*UGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCmG*mA*mA*mA*GAUUCUUAAUAAGGCAUCmC*mU*mU*mC*mC*GAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmA*mA*mU*mA*GGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1822
mH364-7-42	mG*mA*mG*mC*fUfGfGfCfCfAfCfUfGfUfGfCfGfAfGfGfUAGUUGAGAAUCG*A*A*A*GAUUCUUAAUAAGGCAUCC*U*U*C*C*GAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCA*A*U*A*GGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1823
mH364-7-45	mG*mA*mG*mC*fUfGfGfCfCfAfCfUfGfUfGfCfGfAfGfGfUAGUUGAGAAUCmG*mA*mA*mA*GAUUCUUAAUAAGGCAUCmC*mU*mU*mC*mC*GAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmA*mA*mU*mA*GGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1824
m：2'-O 甲基修饰的碱基，*：硫代磷酸酯主链		

[0544] 编码MG3-6/3-4核酸酶的mRNA通过使用T7 RNA聚合酶、核苷酸和酶,通过线性化质粒模板的体外转录产生。转录到RNA中的DNA序列以5'至3'的顺序包括以下元件:T7 RNA聚合酶启动子、5'非翻译区(5'UTR)、核定位信号、短接头、MG3-6/3-4核酸酶的编码序列、短接头、核定位信号和3'非翻译区(SEQ ID NO:603)以及大约100个核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:2865)(不包含在SEQ ID NO:603中)。

[0545] 此MG3-6/3-4盒中编码的合成mRNA中编码的蛋白质序列从5'至3'包括以下元件:来自SV40的核定位信号、五个氨基酸接头(GGGGS(SEQ ID NO:2864))、从其去除起始甲硫氨酸密码子的MG3-6/3-4核酸酶的蛋白质编码序列、3个氨基酸接头(SGG)和来自核质蛋白的核定位信号。修饰此盒的蛋白质编码区的DNA序列,以反映人中的密码子使用。在用于体外转录的质粒中编码大约100个核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:2865)并且共转录地对mRNA进行封端。将mRNA中的尿苷用N1-甲基假尿苷置换。用于递送MG3-6/3-4mRNA和向导RNA的脂质纳米颗粒(LNP)制剂基于如上文所描述的LNP制剂。将四种脂质组分溶解于乙醇中,并且以适当的摩尔比混合以制备脂质工作混合物。mRNA和向导RNA在调配之前以1:1的质量比混合或者在单独的LNP中调配,然后以两种RNA的1:1质量比共同注射到小鼠体内。在任一情况下,RNA在100mM乙酸钠(pH 4.0)中稀释以制备RNA工作储备液。将脂质工作储备液和RNA工作储备液在微流体装置中分别以1:3的流速比和12毫升/分钟的流速混合。LNP针对磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析2至16小时,并且然后浓缩,直到实现减少的体积。使用Ribogreen试剂测量LNP制剂中RNA的浓度。LNP的直径和多分散性(PDI)通过动态光散射测定。代表性LNP的直径范围为65nm至120nm,其中PDI为0.05至0.20。LNP以每kg体重1mg RNA的总RNA剂量通过尾静脉静脉注射到8至12周龄的C57B16野生型小鼠中(每只小鼠0.1mL)。给药后十天,处死每组5只小鼠中的3只,并且收集肝脏并使用珠磨器在消化缓冲液中均质化。从所得匀浆物中纯化基因组DNA,并通过测量260nm处的吸光度进行定量。将从仅注射缓冲液的小鼠中纯化的基

因组DNA用作对照。给药后28天,处死每组剩余2只小鼠,并且收集肝脏并使用珠磨器在消化缓冲液中均质化。从所得匀浆物中纯化基因组DNA,并通过测量260nm处的吸光度进行定量。将从仅注射缓冲液的小鼠中纯化的基因组DNA用作对照。

[0546] 然后使用侧接两个向导靶向的区域的第一组引物对肝脏基因组DNA进行PCR扩增。所使用的PCR引物在表11中示出。这些引物的5'端包括与第二PCR中使用的PCR引物互补的保守区域,随后5N以提供序列多样性并提高测序质量,并且以与小鼠基因组中的靶区域互补的序列结束。在100ng的基因组DNA上进行PCR,并且粘接温度为60℃,持续总共30个循环。随后使用引物进行第2轮10个循环的PCR,所述引物被设计成添加唯一的双条形码以用于进行下一代测序。使用150bp配对端读段将每个样品测序到大于10,000个读段的深度。合并读段以产生单个250bp序列,其中计算Indel百分比和INDEL曲线。

[0547] 编辑结果汇总于图25中并且在表14中列出。

[0548] 表14:用封装MG3-6/3-4mRNA和靶向具有化学修饰42(mH364-7-42)、45(mH364-7-45)、1(mH364-7-1)和35(mH364-7-35)的HAO-1基因的向导RNA 7的LNP处理的单个小鼠的全肝HAO1基因中的基因组编辑频率

[0549]

天数	mH364 向导 7 化学物质	小鼠	INDEL%	平均组 INDEL	标准偏差
10	PBS 对照	1	0.01	0.0	0.0
10	PBS 对照	2	0.01		
10	PBS 对照	3	0.01		
28	PBS 对照	4	0.02		
28	PBS 对照	5	0.02		
10	42	6	33.54	32.4	2.5
10	42	7	28.48		
10	42	8	31.3		
28	42	9	34.43		
28	42	10	34.19		
10	45	11	29.22	32.1	5.8
10	45	12	37.04		
10	45	13	37.24		
28	45	14	33.57		
28	45	15	23.63		
10	1	16	42.04	46.1	3.1
10	1	17	45.38		
10	1	18	50.8		
28	1	19	46.31		
28	1	20	45.98		
10	35	21	24.95	26.6	2.3
10	35	22	29.93		
10	35	23	24.75		
28	35	24	28.14		
28	35	25	25.22		

[0550] 用PBS缓冲液注射的对照小鼠在向导7的靶位点处不含有可测量的INDEL。接受含

有向导mH364-7-1、mH364-7-35、mH364-7-42和mH364-7-45的LNP小鼠的平均INDEL频率分别为46.1％、26.6％、32.4％和32.1％，这表明向导RNA化学物质编号1效力最强，其次为编号42和编号45，其中化学物质编号35效力最弱。这些数据表明，在向导RNA的5'和3'端处对碱基和主链的化学修饰在所测试的化学中提供了最高的体内效力。内部碱基的另外修饰并没有提高体内效力。这些发现与已发表的针对spCas9 sgRNA的数据形成对比，其中sgRNA两端处和内部序列处的碱基或主链的修饰是最佳体内编辑所必需的，并且仅sgRNA的5'和3'端的修饰使用类似的LNP递送，在肝脏中实现低水平的编辑(20％ INDEL)。

[0551] 从表14中描述的相同小鼠的肝脏的单独叶纯化总RNA，并且用于通过数字液滴PCR(dd-PCR)测量HAO-1mRNA水平。注射PBS的小鼠用作对照，并且将编辑的小鼠肝脏中HAO-1mRNA的水平与这些对照进行比较。dd-PCR测定是使用分子生物学技术设计和优化的。ddPCR是一种用于确定复杂混合物中特定核酸的绝对拷贝数的高度准确的方法。首先通过逆转录将总肝脏RNA转化为cDNA，然后使用GAPDH作为内部对照在dd-PCR测定中进行定量，以在样品之间进行归一化。如表15A所示出的，用封装MG3-6/3-4mRNA和靶向小鼠HAO1基因的sgRNA的LNP处理的单个小鼠中HAO1 mRNA水平降低，并且降低的幅度与INDEL频率相关。

[0552] 表15A:用封装MG3-6/3-4mRNA和靶向具有化学修饰42(mH364-7-42)、45(mH364-7-45)、1(mH364-7-1)和35(mH364-7-35)的HAO-1基因的向导RNA 7的LNP处理的单个小鼠的全肝中HAO1mRNA水平。

[0553]

采集天数	mH364 向导 7 化学物质	小鼠	HAO mRNA 降低%	HAO mRNA 平均组降低%	标准偏差
10	42	6	47.4	35.5	8.8
10	42	7	42.4		
10	42	8	29.0		
28	42	9	29.6		
28	42	10	28.9		
10	45	11	20.3	38.0	10.2
10	45	12	38.6		
10	45	13	41.8		
28	45	14	45.9		
28	45	15	43.2		
10	1	16	57.0	60.0	3.9
10	1	17	54.7		
10	1	18	62.5		
28	1	19	63.1		
28	1	20	62.6		
10	35	21	18.3	23.4	20.8

[0554]

采集天数	mH364 向导 7 化学物质	小鼠	HAO mRNA 降低%	HAO mRNA 平均组降低%	标准偏差
10	35	22	-2.5		
10	35	23	14.8		
28	35	24	52.6		
28	35	25	33.8		

[0555] 对如表10中的相同小鼠进行分析。

[0556] 在用sgRNA mH364-7-1处理的小鼠组中观察到HAO1 mRNA的最大减少,而在用sgRNA mH364-7-35处理的小鼠中观察到HAO-1mRNA的最小减少。当通过一种被称为无义介导的衰变的机制将移码突变引入到基因的编码序列中时,可能发生HAO1 mRNA减少。用MG3-6/3-4在HAO-1基因处编辑的小鼠肝脏中HAO-1mRNA减少的观察与引起高移码率的INDEL的存在一致,如表15A-15B所示出的。

[0557] 表15B:用封装MG3-6/3-4mRNA和靶向HAO-1基因的sgRNA编号7(G7)的LNP处理的小鼠的肝脏中引起移码的编辑频率的分析

处理	平均 INDEL	INDEL 的标准偏差	相对于总体的平均 OOF%	相对于总体的OFF%标准偏差
PBS 对照	0.0	0.0	0.0	0.0
mH364-7-42	31.1	2.1	28.6	1.7
mH364-7-45	34.5	3.7	31.2	3.2
mH364-7-1	46.1	3.6	41.9	3.4
mH364-7-35	26.5	2.4	24.3	2.5

[0558] 通过分析NGS数据来计算出框百分比(OOF%)。

[0559] 在表15B中,引起HAO1编码序列移码的INDEL平均频率是根据NGS数据确定的。此分析表明,大多数INDEL引起所有四种测试的sgRNA的移码。

[0560] HAO1基因编码蛋白质乙醇酸氧化酶(GO),即,参与乙醇酸代谢的胞内酶。为了确定在HAO1基因中观察到的基因编辑是否导致肝脏中GO蛋白的表达减少,在图25和表14至15B所描述的相同研究中从小鼠的肝脏的单独叶中提取总蛋白质。使用针对小鼠GO蛋白的可商购获得的抗体,用蛋白质印迹测定来检测GO蛋白。将等量的蛋白质装载到蛋白质印迹上。如图26所示出的,用封装MG3-6/3-4mRNA和靶向HAO1的sgRNA的LNP处理的小鼠的肝脏中GO蛋白的水平降低。向导mH364-7-42(小鼠7、8)、mH364-7-45(小鼠12、13)和mH364-7-1(小鼠17、18)导致GO蛋白明显减少。在被测的4个向导中,具有最低水平的INDEL的向导mH364-7-35(小鼠22、23)未明显降低GO蛋白水平。这些数据表明,与适当设计的sgRNA组合的MG3-6/3-4核酸酶可以用于在活哺乳动物体内的所关注的基因中创建INDEL,并且减少(敲低)由所述基因编码的蛋白质的产生。减少特定基因的表达在特定疾病中可以是治疗有益的。在编码GO蛋白的HAO1基因的情况下,预期肝脏中GO蛋白水平的降低在患有遗传性疾病原发性高草酸尿症I型的患者中是有益的。因此,MG3-6/3-4核酸酶连同含有靶向HAO1基因的适当化学修饰的适当sgRNA是治疗原发性高草酸尿症I型的潜在方法。

[0561] 实例20-使用Hep3B细胞的mRNA转染对人HAO-1基因进行MG3-6/3-4核酸酶向导筛选

[0562] 通过搜索PAM序列5'NNAAA(A/T)N 3',在计算机上鉴定了靶向人HAO-1基因(编码乙醇酸氧化酶)外显子1至4的MG3-6/3-4核酸酶的向导RNA。通过在MG3-6/3-4的向导支架中插入靶向序列(例如,SEQ ID NO:722或SEQ ID NO:863),将人类基因组中具有最少预测脱靶位点的总共20个向导化学合成为具有端修饰的单向导RNA,命名为AltR1/AltR2。

[0563] Hep3B转染方案

[0564] 如下将300ng mRNA和120ng单向导RNA转染到人肝细胞瘤细胞系Hep3B中。

[0565] 在转染前一天,将已在EMEM-10％ FBS-2mM谷氨酰胺-1％ NEAA培养基中培养少于10天的Hep3B细胞,在无Pen/步骤的情况下接种到经TC处理的24孔板中。对细胞进行计数,并且将含有60,000个活细胞的体积添加到每个孔中。将另外的预平衡培养基添加到每个孔中,以使总体积达到500μL。

[0566] 在转染当天,将300ng MG3-6/3-4mRNA和120ng sgRNA转染到Hep3B细胞中。

[0567] 转染后两天,从Hep3B细胞的每个孔中吸出培养基,并且通过自动磁珠纯化对基因组DNA进行纯化。

[0568] 通过桑格测序进行PCR扩增和编辑分析

[0569] 使用外显子特异性引物(下表16),通过来自经纯化的基因组DNA的PCR扩增由单个向导靶向的HAO-1基因序列。

[0570] 表16:针对人HAO1基因设计的引物,用于前四个外显子的PCR扩增和用于桑格测序。

[0571]

靶外显子	用途	引物名称	引物序列	SEQ ID NO:
人HAO1外显子1	正向PCR	PCR_hHe1_F_+490	TTTCATGGATGCCCCGTTCA	2870
	反向PCR	PCR_hHe1_R_-412	ACGAAAAGCCAGCAGGAAGA	2871
	测序	Seq_hHe1_R_-121	AGCCCCAAGAACTTTTCCCT	2872
人HAO1外显子2	正向PCR	PCR_hHe2_F_+391	TGCATCAGTGGTTGTCAGGG	2873
	反向PCR	PCR_hHe2_R_-387	CCTAGCTGTGACTTTGGGCA	2874
	测序	Seq_hHe2_R_-152	TGGAAAGAAGAGGAGCAGGAC	2875
人HAO1外显子3	正向PCR	PCR_hHe3_F_+238	AGGCTGGATGTTCAGGTTCTT	2876
	反向PCR	PCR_hHe3_R_-212	TCCCAAAGCCAAAGCCCTTA	2877
	测序	Seq_hHe3_F_+186	AGCAGAAATAACTCCAGTAGCCA	2878
人HAO1外显子4	正向PCR	PCR_hHe4_F_+324	GCTGGCTGAAAATCGTGTCAA	2879
	反向PCR	PCR_hHe4_R_-348	TCCTTGGGGCTTCTCTTTGG	2880
	测序	Seq_hHe4_F_+174	ACTGATTAAGACCACTAGAGTATCACA	2881

[0572] 纯化并浓缩PCR产物,并且使40ng PCR产物经受桑格测序。分析桑格测序色谱图在每个向导的预测靶位点处的插入和缺失(INDEL)。靶位点处INDEL的存在是DNA中双链断裂的产生的结果,然后通过引入插入和缺失的易错细胞修复机制进行修复。根据此筛选,向导hH364-9、23、32和35被鉴定为要测定的用于在PHH细胞中进行编辑的最活跃向导(下图27和表17)。

[0573] 表17:基于MG3-6/3-4向导,靶向通过mRNA转染递送的人HAO1基因的MG3-6/3-4向导的编辑活性

[0574]

向导名称	PAM	SEQ ID NO:	间隔子序列（靶向序列）	Hep3B 中的编辑活性（平均 INDEL%）	PHH 中的编辑活性（平均 INDEL%）
hH364-	ACAAATT	2882	CATGTTGTTCATAATCATTG	6.0	

[0575]

向导名称	PAM	SEQ ID NO:	间隔子序列（靶向序列）	Hep3B 中的编辑活性（平均 INDEL%）	PHH 中的编辑活性（平均 INDEL%）
1			AT		
hH364-2	CTAAATC	2883	ATCAATGATTATGAACAACATG	0.0	
hH364-4	GCAAATG	2884	ATATGACTATTACAGGTCTGGG	11.0	
hH364-9	AGAAAAT	2885	ATATTGCAGCATTTTCCAGGTA	27.5	25.7
hH364-12	CTAAAAC	2886	ATTGGCATGCTGACCCTCTGTC	0.0	
hH364-14	ACAAATA	2887	CAGGTAAGGTGTGTCCACTGTC	0.0	
hH364-16	TAAAATA	2888	CTGGTTTCAAAATTTTTCATCC	0.0	
hH364-17	CTAAAAT	2889	ACTGGTTTCAAAATTTTTCATC	0.0	
hH364-18	TGAAAAA	2890	TTATGCATTTCTTATTTTAGGA	0.0	
hH364-19	GAAAAAT	2891	TATGCATTTCTTATTTTAGGAT	2.5	
hH364-20	AAAAATT	2892	ATGCATTTCTTATTTTAGGATG	7.0	
hH364-22	CAAAATT	2893	GAAAATGATAAAGTACTGGTTT	0.0	
hH364-23	TCAAAAT	2894	AGAAAATGATAAAGTACTGGTT	36.5	26.3
hH364-27	GGAAAAT	2895	GTACTTTATCATTTTCTCCTGA	0.0	
hH364-28	GAAAATT	2896	TACTTTATCATTTTCTCCTGAG	0.0	
hH364-29	CAAAATT	2897	GCAGCAAGTCCACTGTCGTCTC	0.0	
hH364-30	CCAAAAT	2898	TGCAGCAAGTCCACTGTCGTCT	10.5	
hH364-32	TCAAATG	2899	CCATCTATCAGCTGGGAAGATA	60.0	25.0
hH364-34	CAAAATG	2900	GTAGAGAAATAAACGAACCTCT	0.0	
hH364-35	TCAAAAT	2901	AGTAGAGAAATAAACGAACCTC	20.0	26.3

[0576] 实例21-使用原代人肝细胞(PHH)的mRNA转染对人HAO-1基因进行MG3-6/3-4核酸酶向导筛选

[0577] 用端修饰(下表18)对在Hep3B细胞中具有最高编辑活性的四种MG3-6/3-4单向导RNA(向导9、23、32和35)进行化学合成,通过HPLC纯化,并且转染到原代人肝细胞中。

[0578] 表18:在原代人肝细胞中测定的经化学修饰的MG3-6/3-4向导的序列(m=2'-O甲基修饰的碱基,*=硫代磷酸酯键)

[0579]

向导	序列	SEQ ID NO:
hH364-9	mA*mU*mA*UUGCAGCAUUUUCCAGGUAGUUGAGAAUCGAA AGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACC GUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1862
hH364-23	mA*mG*mA*AAAUGAUAAAGUACUGGUUGUUGAGAAUCGAA AGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACC GUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1863
hH364-32	mC*mC*mA*UCUAUCAGCUGGGAAGAUAGUUGAGAAUCGAA AGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACC GUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1864
hH364-35	mA*mG*mU*AGAGAAAUAAACGAACCUCGUUGAGAAUCGAA AGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCUCACC GUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1865
化学修饰的符号：m = 2'O-甲基核糖核苷酸（例如，mC =具有 2'-O 甲基而不是 2'羟基的胞嘧啶核糖核苷酸）；f = 2'氟核糖核苷酸（例如，fC =具有 2'氟而不是 2'羟基的胞嘧啶核糖核苷酸）；* =硫代磷酸酯键。所有其它碱基是天然核糖核苷酸。		

[0580] 原代人肝细胞转染方案

[0581] 如下将779.76ng MG3-6/3-4mRNA和470.24ng具有适当靶向序列的MG3-6/3-4单向导RNA(mRNA:向导RNA的摩尔比为1:20)转染到原代人肝细胞(PHH)细胞中。

[0582] 在转染前一天,将PHH细胞解冻并且以每孔1,000,000个活细胞接种到经胶原蛋白处理的12孔板中。

[0583] 在转染当天,将779.76ng MG3-6/3-4mRNA和470.24ng sgRNA混合,并转染到PHH细胞中。转染后,每天更换培养基,直到采集。

[0584] 在转染后三天,通过自动磁珠纯化对经转染的细胞的基因组DNA进行纯化。

[0585] 通过下一代测序(NGS)进行PCR扩增和编辑分析

[0586] 用Q5高保真DNA聚合酶和具有与用于下一代测序(NGS)的条形码引物互补的衔接子的基因特异性引物(下表19)对每个特异性sgRNA靶向的HAO-1基因的区进行PCR扩增,总共扩增29个循环。

[0587] 表19:用于扩增每个人HAO1向导靶位点和用于NGS的引物

[0588]

向导	引物组名称	具有 Miseq 衔接子的正向	SEQ ID NO:	具有 Miseq 衔接子的反向	SEQ ID NO:
hH364-9	hHAO1-NGS-P8	GCTCTTCCGATCTNNNNNCCCAAGAACTTTTCCCTCTC	2902	GCTCTTCCGATCTNNNNNCCCCCGGCTAATTTGTATCA	2906
hH364-23	hHAO1-NGS-P9	GCTCTTCCGATCTNNNNNGATGTCAGTCTTCTCAGCCA	2903	GCTCTTCCGATCTNNNNNGAGCAGTGAACAGCCAATTG	2907
hH364-32	hHAO1-NGS-P4	GCTCTTCCGATCTNNNNNTATGAACGTATCCACAAAGGAT	2904	GCTCTTCCGATCTNNNNNTCTCCTGAGGAAAATTTTGGAG	2908
hH364-35	hHAO1-NGS-P10	GCTCTTCCGATCTNNNNNGAGTTGGAATGTCTCTCTCAA	2905	GCTCTTCCGATCTNNNNNTGGAGACGACAGTGGACTTG	2909

[0589] 使用使用总共10个循环的NGS的条形码引物对此第一PCR反应的产物进行PCR扩增。使所得产物经受NGS,对结果进行分析,以产生在HAO-1基因中的靶向位点处含有插入或缺失(indel)的测序读段的百分比。结果指示,所有四个向导都以类似活性编辑PHH中的HAO-1基因(图28和表17)。PHH是用于体内编辑肝细胞的替代物。这些数据表明,MG3-6/3-4核酸酶和适当的单向导RNA可用于在HAO-1基因的编码序列中产生插入和缺失(indel)。使用从NGS测序获得的indel曲线来确定导致移码(即,插入或缺失的碱基的数量不是3或3的倍数)的indel的百分比。对于向导9、23、32和35,经编辑的PHH中的出框的indel的百分比分别为87.1%、89.8%、77.8%和82.0%。

[0590] 实例22-哺乳动物细胞编辑的证明和两种MG3-6嵌合酶的PAM序列的测定

[0591] 创建了慢病毒文库,其中随机分配的七个碱基对区域侧接活性向导RNA的靶位点的序列。产生293个细胞的群体,其中每个细胞平均由来自文库的五个慢病毒颗粒转导。将适当的向导RNA和编码嵌合酶的匹配mRNA(其中使用MG3-7和MG3-8的PAM相互作用结构域来替换MG3-6中的类似结构域)电穿孔到293个细胞的群体(2,000,000个细胞,2500ng mRNA和1200pmol向导RNA)中。对靶位点的indel形成进行了监测,并编制了一致的PAM序列,并且在图29中示出。

[0592] 实例23-具有不同化学修饰的MG3-6/3-4单向导RNA的体内编辑活性

[0593] 为了评估MG3-6/3-4II型核酸酶在活动物体内编辑基因组的能力,使用脂质纳米颗粒递送编码MG3-6/-34核酸酶的mRNA和具有相同核苷酸序列但不同RNA化学物质的六个向导RNA之一。这些向导的序列在表20中示出。

[0594] 表20:在小鼠中体内测试的向导RNA的序列和化学修饰

[0595]

向导 RNA	序列	SEQ ID NO:
mH364-7-1	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCG AAAGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCU CACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUAUGU*mU* mU*mU	1812
mH364-7-2	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCG AAAGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAUGCUGACUUCU CACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGGCGGUA*mU*mG* mU*mU*mU*mU	1813
mH364-7-9	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCm GmAmAmAGAUUCUUAAUAAGGCAUCmCmUmUmCmCGAU GCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmAGGAGCG GGCGGUAUGU*mU*mU*mU	1814
mH364-7-10	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCG* A*A*A*GAUUCUUAAUAAGGCAUCC*U*U*C*C*GAUGCUG ACUUCUCACCGUCCGUUUUCCA*A*U*A*GGAGCGGGCGG UAUGU*mU*mU*mU	1815
mH364-7-46	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCm GmAmAmAGAUUCUUAAUAAGGCAUCmCmUmUmCmCGAU GCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmAGGAGCG GGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1819
mH364-7-47	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUAGUUGAGAAUCG* A*A*A*GAUUCUUAAUAAGGCAUCC*U*U*C*C*GAUGCUG ACUUCUCACCGUCCGUUUUCCA*A*U*A*GGAGCGGGCGG UA*mU*mG*mU*mU*mU*mU	1820

[0596] 化学修饰的符号:m＝2'O-甲基核糖核苷酸(例如,mC＝具有2'-O甲基而不是2'羟基的胞嘧啶核糖核苷酸);f＝2'氟核糖核苷酸(例如,fC＝具有2'氟而不是2'羟基的胞嘧啶核糖核苷酸);*＝硫代磷酸酯键。所有其它碱基是天然核糖核苷酸。

[0597] 这些向导中的间隔子序列靶向小鼠HAO-1基因。向导mH364-7-1具有端修饰。向导mH364-7-2在3'端处具有另外的甲基和硫代磷酸酯修饰。向导mH364-7-9在所有三个环中具有端修饰加上甲基。向导mH364-7-10在所有三个环中具有端修饰加上硫代磷酸酯键。向导mH364-7-46在所有三个环中具有与mH364-7-2相同的5'和3'端修饰和甲基。向导mH364-7-47具有与mH364-7-2相同的5'和3'端修饰,加上所有三个环中与mH364-7-10中的相同的硫代磷酸键。由于sgRNA中的化学修饰影响sgRNA稳定性,这对于体内效力至关重要,因此评估这些变化对体内编辑的影响是重要的。

[0598] MG3-6/3-4mRNA的制备

[0599] 编码MG3-6/3-4的mRNA通过使用T7 RNA聚合酶,通过线性化质粒模板的体外转录产生。MG3-6/3-4盒的蛋白质编码序列从5'至3'包括以下元件:来自SV40的核定位信号、五个氨基酸接头(GGGGS(SEQ ID NO:2864))、从其去除起始甲硫氨酸密码子的MG3-6/3-4核酸酶的蛋白质编码序列、3个氨基酸接头(SGG)和来自核质蛋白的核定位信号。针对人对此盒的DNA序列进行密码子优化。在用于体外转录的质粒中编码大约100个核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:2865)并且共转录地对mRNA进行封端。将mRNA中的尿苷用N1-甲基假尿苷置换。

[0600] 脂质纳米颗粒的制备

[0601] 用于递送MG3-6/3-4mRNA和向导RNA的脂质纳米颗粒(LNP)制剂基于如上文所描述

的LNP制剂。将四种脂质组分溶解于乙醇中,并且以适当的摩尔比混合以制备脂质工作储备液。将RNA在100mM乙酸钠(pH 4.0)中稀释以制备RNA工作储备液。将脂质工作储备液和RNA工作储备液在微流体装置中分别以1:3的流速比和12毫升/分钟的流速混合。LNP针对磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析2至16小时,并且然后浓缩。使用Ribogreen试剂测量LNP制剂中RNA的浓度。LNP的直径和多分散性(PDI)通过动态光散射测定。代表性LNP的直径在70nm至84nm的范围内,并且PDI为0.098至0.150。

[0602] 小鼠给药和采集

[0603] 将mRNA和sgRNA的LNP以1:1的质量比混合,并且以0.5mg RNA每kg体重的总RNA剂量通过尾静脉(每只小鼠0.1mL)静脉内注射到7周龄的C57B16野生型小鼠中。在给药后七天,处死小鼠,并且收集肝脏的左侧叶、中间叶和右侧叶,分别制备DNA、RNA和蛋白质。通过心脏穿刺放血收集血液,并收集到BD微量容器(肝素包被)上。在离心之前,将样品保持在湿冰上不超过30分钟。将样品在2,000G下离心10分钟,并将血浆转移到1.5mL冷冻管中并在-80℃下储存。

[0604] 通过下一代测序(NGS)进行基因组DNA制备和编辑分析

[0605] 在消化缓冲液中使用Bead Ruptor使肝脏的左侧叶(100mg)均质化。从所得匀浆物中纯化基因组DNA,并通过测量260nm处的吸光度进行定量。将从仅注射PBS缓冲液的小鼠中纯化的基因组DNA用作对照。用Q5高保真DNA聚合酶和具有与用于下一代测序(NGS)的条形码引物互补的衔接子的基因特异性引物(表21)对每个特异性sgRNA靶向的HAO-1基因的区进行PCR扩增,总共扩增29个循环。使用用于总共10个循环的NGS的条形码引物对此第一PCR反应的产物进行PCR扩增。使所得产物经受NGS,并且对结果进行分析,以产生在HAO-1基因中的靶向位点处含有插入或缺失(indel)的测序读段的百分比。

[0606] 表21:用于扩增HAO1向导靶位点和用于NGS的引物

[0607]

向导	引物组名称	具有 Miseq 衔接子的正向	具有 Miseq 衔接子的反向
mH364-7（间隔子 7）	mHAO1-NGS-P4	GCTCTTCCGATCTNNNNNGTAAAGAAAAACAAGGAATGTAAT（SEQ ID NO: 2910）	GCTCTTCCGATCTNNNNNATCTGTCAACTTCTGTTTTAGGAC（SEQ ID NO: 2911）

[0608] 通过RT-ddPCR进行RNA制备和分析

[0609] 肝脏的中间叶储存在储存缓冲液中,以在均质化之前保持RNA的完整性。将最多10mg的组织转移到含有1.4mm陶瓷珠的2mL管中,并且按照软组织均质化方案,使用Bead Ruptor均质化:5.00米/秒,持续10-15秒。然后用另外的45分钟柱上DNA酶I消化处理对经均质化的组织进行加工和处理。通过测量在260nm处的吸光度来定量RNA产物。经分离的RNA样品然后经历另外的DNA酶处理和逆转录。然后通过测量在260nm处的吸光度来定量cDNA产物。

[0610] 使用与管家基因GAPDH复用的定制的基于ddPCR探针的测定法定量HAO1 mRNA水平。HAO1用HEX探针标记,而GAPDH用FAM探针标记。两种探针均侧接对产生约115bp的扩增子的相应基因具有特异性的引物。用于测定的模板材料是来自上述过程的25ng的cDNA产物,所述cDNA产物与900nM的每种引物和250nM的每个基因测定的探针连同10μL的用于探针的ddPCR Supermix(无dUTP)混合,用无核酸酶水将最终体积升至20μL。进行ddPCR并进行分

析。将结果分成四个部分:阴性液滴(无荧光)、单个阳性液滴(HEX或FAM阳性荧光)和双阳性液滴(HEX和FAM荧光两者)。对于每个样品,计算每μL HAO1和GAPDH的拷贝数。比较了用mH29-29处理的小鼠与用单独的缓冲液处理的小鼠的HAO1与GAPDH的比率。

[0611] 表22A:扩增HAO1和GAPDH ddPCR测定中使用的引物和探针

[0612]

靶基因	探针荧光	探针序列	正向引物序列	反向引物序列
HAO1	HEX	AGTG+GGTG+C+CA+GAAT+GTGAA（SEQ ID NO: 2912）	GGGGAGAAAGGTGTTCAAGATGT（SEQ ID NO: 2914）	CTCACCAATGTCTTGTCGATGA（SEQ ID NO: 2916）
GAPDH	FAM	CATGACCA+CAGT+C+CATGCCATC（SEQ ID NO: 2913）	GCACCACCAACTGCTTAG（SEQ ID NO: 2915）	CCATCCACAGTCTTCTGGG（SEQ ID NO: 2917）

[0613] 化学修饰的符号:+=锁定核酸(LNA)碱基修饰。

[0614] 结果与结论

[0615] 小鼠肝脏基因组DNA的NGS分析表明,在用包封MG3-6/3-4mRNA的LNP和六个sgRNA中的每一个给药的组的HAO-1基因中的sgRNA的靶位点处进行的编辑在总肝脏基因组DNA的25%至33%的范围内(图30)。大多数组之间存在微小差异,指示具有化学物质1、2、9、10和46的向导RNA以类似效率编辑,并且化学物质47可能不太有效。

[0616] 来自用包封mH364-7 sgRNA和MG3-6/3-4mRNA的LNP处理的组的小鼠的肝脏中的HAO1 mRNA的GAPDH归一化水平在对照组的67%至79%的范围内(图30)。将INDEL引入到编码序列中的HAO-1基因的编辑可能导致由于无义介导的mRNA衰变而使表达的HAO-1mRNA的量减少。HAO-1mRNA的降低幅度与基因组编辑效率相关。总之,基因组编辑和HAO-1mRNA敲低数据表明,不同的sgRNA化学物质1、2、9、10、46和47对体内效力具有次要影响。

[0617] 实例24-K562细胞中VCP在DNA水平下的基因编辑结果的分析

[0618] 使用电穿孔将MG3-6/3-8或MG3-6/3-4mRNA和向导(500ng mRNA,150pmol向导)核转染到K562细胞(200,000个)中。向导具有靶向R155的单个错配。采集细胞,并且在转染后三天制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以确定基因编辑(图31)。

[0619] 表22B:如实例24中所描述的用于编辑VCP的向导序列

[0620]

SEQ ID NO:	向导 RNA	序列
723	MG3-6/3-8-人 VCP A1	mG*mC*mA*rCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
724	MG3-6/3-8-人 VCP B1	mG*mC*mA*rCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
725	MG3-6/3-8-人 VCP C1	mA*mC*mG*rCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
726	MG3-6/3-8-人 VCP D1	mA*mC*mG*rCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArArGrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
727	MG3-6/3-8-人 VCP E1	mC*mG*mG*rArCrArArGrArArArArArUrGrUrCrUrCrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
728	MG3-6/3-8-人 VCP F1	mU*mG*mG*rArCrArArGrArArArArArUrGrUrCrUrCrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
729	MG3-6/3-8-人 VCP G1	mG*mG*mA*rGrArCrArUrUrUrUrUrCrUrUrGrUrCrCrGrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
730	MG3-6/3-8-人 VCP H1	mG*mG*mA*rGrArCrArUrUrUrUrUrCrUrUrGrUrCrCrArUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
731	MG3-6/3-8-人 VCP A2	mA*mG*mA*rCrArUrUrUrUrUrCrUrUrGrUrCrCrGrUrGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU

[0621]

SEQ ID NO:	向导 RNA	序列
732	MG3-6/3-8-人 VCP B2	mA*mG*mA*rCrArUrUrUrUrUrCrUrUrGrUrCrCrArUrGrGrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
733	MG3-6/3-8-人 VCP C2	mU*mG*mU*rCrCrGrUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
734	MG3-6/3-8-人 VCP D2	mU*mG*mU*rCrCrArUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
735	MG3-6/3-8-人 VCP E2	mG*mU*mC*rCrGrUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
736	MG3-6/3-8-人 VCP F2	mG*mU*mC*rCrArUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
737	MG3-6/3-8-人 VCP G2	mU*mC*mC*rGrUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
738	MG3-6/3-8-人 VCP H2	mU*mC*mC*rArUrGrGrUrGrGrGrArUrGrCrGrUrGrCrUrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
739	MG3-6/3-8-人 VCP A1	GCACGCATCCCACCACGGACAA
740	MG3-6/3-8-人 VCP B1	GCACGCATCCCACCATGGACAA
741	MG3-6/3-8-人 VCP C1	ACGCATCCCACCACGGACAAGA
742	MG3-6/3-8-人 VCP D1	ACGCATCCCACCATGGACAAGA
743	MG3-6/3-8-人 VCP E1	CGGACAAGAAAAATGTCTCCTG

[0622]

SEQ ID NO:	向导 RNA	序列
744	MG3-6/3-8-人 VCP F1	TGGACAAGAAAAATGTCTCCTG
745	MG3-6/3-8-人 VCP G1	GGAGACATTTTTCTTGTCCGTG
746	MG3-6/3-8-人 VCP H1	GGAGACATTTTTCTTGTCCATG
747	MG3-6/3-8-人 VCP A2	AGACATTTTTCTTGTCCGTGGT
748	MG3-6/3-8-人 VCP B2	AGACATTTTTCTTGTCCATGGT
749	MG3-6/3-8-人 VCP C2	TGTCCGTGGTGGGATGCGTGCT
750	MG3-6/3-8-人 VCP D2	TGTCCATGGTGGGATGCGTGCT
751	MG3-6/3-8-人 VCP E2	GTCCGTGGTGGGATGCGTGCTG
752	MG3-6/3-8-人 VCP F2	GTCCATGGTGGGATGCGTGCTG
753	MG3-6/3-8-人 VCP G2	TCCGTGGTGGGATGCGTGCTGT
754	MG3-6/3-8-人 VCP H2	TCCATGGTGGGATGCGTGCTGT
755	MG3-6/3-4-人 VCP A3	mC*mA*mG*rCrArCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
756	MG3-6/3-4-人 VCP B3	mC*mA*mG*rCrArCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
757	MG3-6/3-4-人 VCP C3	mA*mG*mC*rArCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
758	MG3-6/3-4-人 VCP D3	mA*mG*mC*rArCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
759	MG3-6/3-4-	mG*mC*mA*rCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArArGrUr

[0623]

SEQ ID NO:	向导 RNA	序列
	人 VCP E3	UrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
760	MG3-6/3-4-人 VCP F3	mG*mC*mA*rCrGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArArGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrCrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
761	MG3-6/3-4-人 VCP G3	mC*mA*mC*rGrCrArUrCrCrCrArCrCrArCrGrGrArCrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrCrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
762	MG3-6/3-4-人 VCP H3	mC*mA*mC*rGrCrArUrCrCrCrArCrCrArUrGrGrArCrArArGrGrUrUrGrArGrArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrCrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU
763	MG3-6/3-4-人 VCP A3	CAGCACGCATCCCACCACGGAC
764	MG3-6/3-4-人 VCP B3	CAGCACGCATCCCACCATGGAC
765	MG3-6/3-4-人 VCP C3	AGCACGCATCCCACCACGGACA
766	MG3-6/3-4-人 VCP D3	AGCACGCATCCCACCATGGACA
767	MG3-6/3-4-人 VCP E3	GCACGCATCCCACCACGGACAA
768	MG3-6/3-4-人 VCP F3	GCACGCATCCCACCATGGACAA
769	MG3-6/3-4-人 VCP G3	CACGCATCCCACCACGGACAAG
770	MG3-6/3-4-人 VCP H3	CACGCATCCCACCATGGACAAG
化学修饰的符号：m＝2'O-甲基核糖核苷酸（例如，mC =具有 2'-O 甲基而不是 2'羟基的胞嘧啶核糖核苷酸）；f＝2'氟核糖核苷酸（例如，fC =具有 2'氟而不是 2'羟基的胞嘧啶核糖核苷酸）；*=硫代磷酸酯键。所有其它碱基是天然核糖核苷酸。		

[0624] 实例25-mRNA的体外转录

[0625] 对嵌合体mRNA的序列进行密码子优化以用于人表达,然后合成并克隆到高拷贝氨苄青霉素(ampicillin)质粒中。将编码T7启动子、UTR、嵌合体ORF和NLS序列的合成构建体用HindII和BamHI从主链消化,并且连接到pUC19质粒主链(SEQ ID NO:1788)中。完整的嵌合体mRNA质粒包括ORI、氨苄青霉素抗性盒、合成构建体和经编码的polyA尾。使用线性化嵌合体mRNA质粒通过体外转录(IVT)合成嵌合体mRNA。将此质粒线性化并且用苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,v/v)纯化,在乙醇中沉淀,并以500ng/μL的经调整浓度重新悬浮于无核酸酶

水中。用于产生嵌合体mRNA的IVT反应在50℃下进行1小时。1小时后,停止IVT反应,并且通过添加250U/mL DNaseI消化质粒DNA,并在37℃下温育10分钟。将嵌合体mRNA纯化,并且通过UV测定转录物浓度,并且通过毛细管凝胶电泳进一步分析。

[0626] 实例26-II型核酸内切酶的蛋白质重组

[0627] MG3-6是高活性且特异性的双链DNA(dsDNA)切割酶。将酶工程化以适应对PAM(原间隔子邻近基序,DNA识别所需的DNA序列的短段)的更一般或不同的偏好将进一步增加酶靶向DNA中的额外序列的效用。通过交换包含部分RuvC(例如,RuvC-III,表示为R)、WED(表示为W)和PAM相互作用结构域(表示为PI)结构域的结构域来产生一组MG3-6嵌合体。为了简单起见,这些嵌合系统单独地指定为MG3-6,随后是_MG编号和RWP。为了扩大PAM在基因组中的相容性,将MG3-6的WED和PI结构域(PAM相互作用结构域)与MG3和MG150(MG3样家族)蛋白的结构域交换。在RuvC-III和WED结构域之间的非结构化环中选择断点(参见图41小图(a)和(b))。为了确定用于结构重组的特定氨基酸位置,分析了MG3和MG150的同源序列,并且在组氨酸之后立即交换WED和PI结构域,与MG3-6的残基838相对应(参见图41小图(c))(作为SEQ ID NO:774-807提供的嵌合序列)。

[0628] 嵌合蛋白的活性的特征在于自动体外PAM富集,其中活性酶消化dsDNA,并且根据以下程序,随后的加工产生DNA片段作为产物。针对大肠杆菌表达,对嵌合体序列进行密码子优化,合成并克隆到pAL3载体(SEQ ID NO:920)中。PAM序列通过在基于大肠杆菌裂解物的表达系统中的表达来确定或通过体外翻译重构。大肠杆菌密码子优化的蛋白质序列在T7启动子的控制下从PCR片段转录和翻译。将此混合物稀释到具有蛋白质特异性sgRNA和PAM质粒文库(PAM文库U67/U40)的反应缓冲液(10mM Tris pH 7.5,100mM NaCl,10mM $MgCl_2$)中。具体地,MG3-6 sgRNA用于MG3-6嵌合体与MG3和MG150成员重组(SEQ ID NO:863)。合成向导。质粒文库含有与单个向导中的间隔子序列匹配的间隔子序列,后跟8N混合碱基,其中的一个子集将具有优选的PAM(SEQ ID NO:921)。在1-3小时之后,停止反应,并且回收DNA。使II型嵌合体的消化产生的经切割的DNA产物经受平末端连接反应,所述反应将衔接子序列添加到切割的文库质粒中,同时保持完整的环状质粒不变。使用对文库和衔接子序列具有特异性的引物(LA065和LA125)(SEQ ID NO:1786-1787)进行PCR,并且将产物在凝胶上分解以鉴定活性蛋白复合物。使用高通量测序引物通过PCR进一步扩增所得PCR产物。对经受NGS分析的样品进行定量并合并在一起。对NGS文库进行纯化和定量。对此文库(起始8N文库的子集)进行测序揭示了含有正确的PAM的序列。

[0629] 琼脂糖凝胶结果表明,33个与MG3和MG150重组MG3-6中有20个是活性的,此断点命中率为60%(参见图42A)。MG3-6与MG150重组的成功率较低可能是由于结构破坏。虽然在琼脂糖凝胶上未观察到MG3-6_3-2WP、MG3-6_3-42WP、MG3-6_3-91WP、MG3-6_3-94WP、MG3-6_3-101WP的条带,但用敏感性NGS分析获得了seqlogo。据观察,紧密相关的PID可以共享类似的PAM。例如,MG3-6_150-1WP、MG3-6_150-7WP和MG3-6_150-8WP在8N文库中的第四位置和第五位置上表现出CC的序列偏好。通过这种蛋白质工程化方法,MG3-6 PAM(nnRGRYYn)扩大到各种PAM序列(参见图42B)。

[0630] MG3-6的部分RuvC-III、WED和PI与MG3-8的结构域交换将其PAM从nnRGRYYn改变为nnRRnnYn,导致MG3-6_3-8能够增加基因组中的靶向密度。为了改变MG3-6_3-8RWP的PAM而不损害其活性,N末端MG3-6和来自MG3-8的部分RuvC III加WED结构域维持为用于重组的核

酸酶底座(nuclease chassis)。用于重组的PID结构域来源于MG3、MG15和MG150成员(参见图43小图(a)和(b))。在WED和PID当中的软环(floppy loop)中选择重组MG3和MG150的MG3-6_3-8的断点(参见图43小图(c))(SEQ ID NO:808-841)。类似地,选择相同区域用于重组MG15成员的MG3-6_3-8的重组(SEQ ID NO:842-862)。在测试的33个嵌合体中,22个嵌合体在琼脂糖凝胶上显示出不同的条带,表明这些核酸酶的切割活性。先前,MG3-6_3-2WP、MG3-6_42WP和MG3-6_3-91WP未显示出如所建议的琼脂糖凝胶结果那样的高活性。然而,给定新的断点,观察到其可以使用MG3-6_3-8底座变得更具活性(图44A)。随后的NGS分析揭示了一组用于更广泛基因组靶向的多样化PAM(图44B)。

[0631] 实例27-哺乳动物细胞中的嵌合体的筛选

[0632] 使用电穿孔,在K562细胞(每个向导200,000个细胞)、Hep3B细胞(每个向导100,000个细胞)或Hepa1-6细胞(每个向导100,000个细胞)中进行mRNA和向导(500ng mRNA,150pmol向导)的核转染。用于筛选的向导是化学合成的。采集细胞,并且在转染后三天制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以确定基因编辑。

[0633] 在K562细胞中检查MG3-6_3-3RWP、MG3-6_3-7RWP和MG3-6_3-8RWP的基因编辑活性,其中RWP表示部分RuvC-III、WED和PID(SEQ ID NO:771-773)。MG3-6_3-3RWP、MG3-6_3-7RWP和MG3-6_3-8RWP的PAM分别为nnnCCCYR、nnRnYAYn和nnRRnnYn。MG3-6_3-3RWP的25个向导的筛选揭示了TRAC基因座上的向导A1和AAVS1基因座上的向导A2、E2、A3和F3显示出超过50%的indel(图32)(SEQ ID NO:922-924和928-949)。同样的两个基因座也用于筛选MG3-6_3-7RWP的58个向导,并且结果显示,TRAC的向导C3和AAVS1的向导B8显示出超过50%的indel(图33)(SEQ ID NO:972-991和1012-1049)。对TRAC基因座上的MG3-6_3-8RWP的237个向导进行筛选,并且结果表明,45个向导显示出超过50%的编辑。值得注意的是,多个位点在向导筛选过程中显示出超过90%的编辑(图34和35)(SEQ ID NO:1088-1183和1280-1320)。

[0634] 除了TRAC和AAVS1位点之外,还设计了用于MG3-6_3-4RWP靶向Hep3B细胞中的PCSK9和ANGPTL3、用于MG3-6_3-8RWP靶向Hep3B细胞中的APOA1以及用于MG3-6_3-7RWP靶向Hepa1-6细胞中的GPR146和APOA1的向导。MG3-6_3-4RWP的筛选结果显示,PCSK9上的四个向导实现了超过50%的indel率,并且ANGPTL3上的三个向导实现了接近100%的indel率(图36和37)(SEQ ID NO:1362-1376和1392-1489)。在APOA1上MG3-6_3-8RWP的靶向位点中,四个向导显示出超过50%的indel形成(图38)(SEQ ID NO:1764-1774)。在GPR146和APOA1上对MG3-6_3-7RWP的筛选显示出一个和七个向导通过了超过50%的indel率(图39和40)(SEQ ID NO:1588-1656和1726-1744)。

[0635] 实例28-具有不同化学修饰的MG3-6/3-4单向导RNA的体内编辑活性

[0636] 为了评估MG3-6/3-4II型核酸酶在活动物体内编辑基因组的能力,使用脂质纳米颗粒递送编码MG3-6/-3-4核酸酶的mRNA和具有相同核苷酸序列但不同RNA化学物质的五个向导RNA之一。这些向导的序列在表23中示出。

[0637] 表23:在小鼠中体内测试的向导RNA的序列和化学修饰

[0638]

向导 RNA	SEQ ID NO:	序列（间隔子-主链）
mH364-7-46	1819	mG*mA*mG*CUGGCCACUGUGCGAGGUA-GUUGAGAAU CmGmAmAmAGAUUCUUAAUAAGGCAUCmCmUmUmCm CGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAmUmA GGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU
mH364-7-48	1821	mG*mA*mG*fCfUfGfGfCfCfAfCfUfGfUfGfCfGAGGUA-GUU GAGAAUCGAAAGAUUCUUAAUAAGGCAUCCUUCCGAU GCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCAAUAGGAGCGGG CGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU
mH364-7-50	1822	mG*mA*mG*fCfUfGfGfCfCfAfCfUfGfUfGfCfGAGGUA-GUU GAGAAUCmGmAmAmAGAUUCUUAAUAAGGCAUCmCm UmUmCmCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmA mAmUmAGGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU
mH364-7-52	1823	mG*mA*mG*CfUGfGCfCAfCUfGUfGCGAGGUA-GUUGAG AAUCmGmAmAmAGAUUCUUAAUAAGGCAUCmCmUmU mCmCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAm UmAGGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU
mH364-7-53	1824	mG*mA*mG*fCUfGGfCCfACfUGfUGfCGAGGUA-GUUGAG AAUCmGmAmAmAGAUUCUUAAUAAGGCAUCmCmUmU mCmCGAUGCUGACUUCUCACCGUCCGUUUUCCmAmAm UmAGGAGCGGGCGGUA*mU*mG*mU*mU*mU*mU

[0639] 化学修饰的符号:m＝2'O-甲基核糖核苷酸(例如,mC＝具有2'-O甲基而不是2'羟基的胞嘧啶核糖核苷酸);f＝2'氟核糖核苷酸(例如,fC＝具有2'氟而不是2'羟基的胞嘧啶核糖核苷酸);*＝硫代磷酸酯键。所有其它碱基是天然核糖核苷酸。

[0640] 这些向导中的间隔子序列靶向小鼠HAO-1基因。所有向导RNA具有相同的端修饰,所述端修饰由三个在5'端处具有硫代磷酸酯键的2'甲基和六个在3'端处具有硫代磷酸酯键的2'甲基组成。在先前的小鼠研究中具有最高编辑活性的向导mH364-7-46在向导主链序列的所有三个环中具有另外的2'甲基修饰。向导mH364-7-48在间隔子序列中具有2'氟修饰,但在主链环中没有甲基修饰。向导mH364-7-50组合化学物质46和48的间隔子2'氟和主链环2'甲基修饰。向导mH364-7-52在间隔子中具有比化学物质50更少的2'氟,但具有与化学物质50相同的主链甲基修饰。向导mH364-7-53在间隔子的不同残基上具有与化学物质52不同的2'氟,并且具有与化学物质50和52相同的主链甲基修饰。由于sgRNA中的化学修饰影响sgRNA稳定性,这对于体内效力至关重要,因此评估这些不同修饰对体内编辑的影响是重要的。

[0641] MG3-6/3-4mRNA的制备

[0642] 编码MG3-6/3-4的mRNA通过使用T7 RNA聚合酶,通过线性化质粒模板的体外转录产生。MG3-6/3-4盒的蛋白质编码序列从5'至3'包括以下元件:来自SV40的核定位信号、五个氨基酸接头(GGGS(SEQ ID NO:2918))、从其去除起始甲硫氨酸密码子的MG3-6/3-4核酸酶的蛋白质编码序列、3个氨基酸接头(SGG)和来自核质蛋白的核定位信号。针对人表达对此盒的DNA序列进行密码子优化。在用于体外转录的质粒中编码大约100个核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:2865)并且共转录地对mRNA进行封端。将mRNA中的尿苷用N1-甲基假尿苷置换。

[0643] 脂质纳米颗粒的制备

[0644] 用于递送MG3-6/3-4mRNA和向导RNA的脂质纳米颗粒(LNP)制剂基于如上文所描述

的LNP制剂。将四种脂质组分溶解于乙醇中,并且以适当的摩尔比混合以制备脂质工作混合物。将RNA在100mM乙酸钠(pH 4.0)中稀释以制备RNA工作储备液。将脂质工作储备液和RNA工作储备液在微流体装置中分别以1:3的流速比和12毫升/分钟的流速混合。LNP针对磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析2至16小时,并且然后浓缩。使用Ribogreen试剂测量LNP制剂中RNA的浓度。LNP的直径和多分散性(PDI)通过动态光散射测定。典型LNP的直径在70nm至84nm的范围内,并且PDI为0.098至0.150。

[0645] 小鼠给药和采集

[0646] 将mRNA和sgRNA的LNP以1:1的质量比混合,并且以0.5mg RNA每kg体重的总RNA剂量通过尾静脉(每只小鼠0.1mL)静脉内注射到7周龄的C57B16野生型小鼠中。在给药后十四天,处死小鼠,并且收集肝脏的左侧叶、中间叶和右侧叶,分别制备DNA、RNA和蛋白质。通过心脏穿刺放血收集血液,并收集到BD微量容器(肝素包被)上。在离心之前,将样品保持在湿冰上不超过30分钟。将样品以2,000G离心10分钟,并将血浆转移到1.5mL冷冻管中并在-80℃下储存。

[0647] 通过下一代测序(NGS)进行基因组DNA制备和编辑分析

[0648] 将肝脏的左侧叶(100mg)在消化缓冲液中均质化。从所得匀浆物中纯化基因组DNA,并通过测量260nm处的吸光度进行定量。将从仅注射PBS缓冲液的小鼠中纯化的基因组DNA用作对照。用Q5高保真DNA聚合酶和具有与用于下一代测序(NGS)的条形码引物互补的衔接子的基因特异性引物(表24)对每个特异性sgRNA靶向的HAO-1基因的区进行PCR扩增,总共扩增29个循环。使用用于总共10个循环的NGS的条形码引物对此第一PCR反应的产物进行PCR扩增。使所得产物经受NGS,并且对结果进行分析,以产生在HAO-1基因中的靶向位点处含有插入或缺失(INDEL)的测序读段的百分比。

[0649] 小鼠肝脏基因组DNA的NGS分析表明,在用包封MG3-6/3-4mRNA的LNP和五个sgRNA中的每一个给药的组的HAO-1基因中的sgRNA的靶位点处进行的编辑在总肝脏基因组DNA的26%至47%的范围内(图46)。化学物质46以最低效率编辑。具有化学物质48、50和52的向导表现出与具有化学物质46的向导类似或略高的编辑水平。具有化学物质53的向导具有最高编辑效率,为47%,这几乎是具有化学物质46的相同核苷酸序列的向导实现的编辑的两倍。

[0650] 表24:用于扩增HAO1向导靶位点和用于NGS的引物

[0651]

向导间隔子	引物组名称	具有 Miseq 衔接子的正向	具有 Miseq 衔接子的反向
mH364-7(间隔子 7)	mHAO1-NGS-P4	GCTCTTCCGATCTNNNNNGTAAAGAAAAACAAGGAATGTAAT(SEQ ID NO: 2910)	GCTCTTCCGATCTNNNNNATCTGTCAACTTCTGTTTTAGGAC(SEQ ID NO: 2911)

[0652] 通过RT-ddPCR进行RNA制备和分析

[0653] 肝脏的中间叶储存在储存缓冲液中,以在均质化之前保持RNA的完整性。将最多10mg的组织转移到含有1.4mm陶瓷珠的2mL管中并且均质化。然后用另外的45分钟柱上DNA酶I消化处理对经均质化的组织进行加工。通过测量在260nm处的吸光度来定量RNA产物。经分离的RNA样品然后经历另外的DNA酶处理和逆转录。然后通过测量在260nm处的吸光度来定量cDNA产物。

[0654] 使用与管家基因GAPDH复用的定制的基于ddPCR探针的测定法定量HAO1 mRNA水

平。HAO1用HEX探针标记,而GAPDH用FAM探针标记。两种探针均侧接对产生约115bp的扩增子的相应基因具有特异性的引物。用于测定的模板材料是来自上述过程的25ng的cDNA产物,所述cDNA产物与900nM的每种引物和250nM的每个基因测定的探针混合,使其经受ddPCR并进行分析。将结果分成四个部分:阴性液滴(无荧光)、单个阳性液滴(HEX或FAM阳性荧光)和双阳性液滴(HEX和FAM荧光两者)。对于每个样品,计算每μL HAO1和GAPDH的拷贝数。比较了用mH29-29处理的小鼠与仅用缓冲液处理的小鼠的HAO1与GAPDH的比率。

[0655] 来自用包封mH364-7 sgRNA和MG3-6/3-4mRNA的LNP处理的组的小鼠的肝脏中的HAO1 mRNA的敲低的范围比未经处理的对照组低36%至58%(图46)。将出框(OOF)INDEL引入到编码序列中的HAO-1基因的编辑可能导致由于无义介导的mRNA衰变而使HAO-1mRNA的量减少。具有5种不同化学修饰的向导对HAO-1mRNA的减少的幅度与基因组编辑效率的幅度相关,其中向导化学物质53具有最大敲低,这与其具有最高indel%一致。总之,基因组编辑和HAO-1mRNA敲低数据指示向导化学物质53在体内具有改善的效力。

[0656] 表25:扩增HAO1和GAPDH ddPCR测定中使用的引物和探针

[0657]

靶基因	探针荧光	探针序列	正向引物序列	反向引物序列
HAO1	HEX	AGTG+GGTG+C+CA+GAAT+GTGAA(SEQ ID NO: 2912)	GGGGAGAAAGGTGTTCAAGATGT(SEQ ID NO: 2914)	CTCACCAATGTCTTGTCGATGA(SEQ ID NO: 2916)
GAPDH	FAM	CATGACCA+CAGT+C+CATGCCATC(SEQ ID NO: 2913)	GCACCACCAACTGCTTAG(SEQ ID NO: 2915)	CCATCCACAGTCTTCTGGG(SEQ ID NO: 2917)

[0658] 化学修饰的符号:+=锁定核酸(LNA)碱基修饰。

[0659] 实例29-跨两种不同细胞类型中的多个基因靶标的MG3-6嵌合体(MG3-6/3-8)的哺乳动物细胞筛选

[0660] 先前证实,通过将MG3-6酶的C末端与其紧密相关的同源物,尤其是WED和PAM相互作用结构域交换而产生的嵌合蛋白识别与来自II型同源物酶的PAM相对应的新PAM序列。MG3-6/3-8(SEQ ID NO:12),通过将MG3-6与来自MG3-8的WED和PID结构域组合而产生的嵌合体,可以成功地编辑人细胞系中的多个靶位点。这些结果在本文中通过使用MG3-6/3-8嵌合体在两个新细胞系中的四个另外的基因座处扩大。

[0661] mRNA产生

[0662] 对MG3-6/3-8嵌合体(SEQ ID NO:12)mRNA的序列进行密码子优化以用于人表达,然后合成并克隆到高拷贝氨苄青霉素质粒中。将编码T7启动子、UTR、嵌合体ORF和NLS序列的合成构建体用HindII和BamHI从主链消化,并且连接到pUC19质粒主链中。完整的嵌合体mRNA质粒由复制起点、氨苄青霉素抗性盒、合成构建体和经编码的polyA尾组成。使用线性化嵌合体mRNA质粒通过体外转录(IVT)合成mRNA。将此质粒线性化并且用苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1,v/v)纯化,在EtOH中沉淀,并以500ng/μL的经调整浓度重新悬浮于无核酸酶水中。用于产生mRNA的IVT反应在50℃下进行1小时。1小时后,停止IVT,并且通过添加250U/mL DNaseI消化质粒DNA,并在37℃下温育10分钟。将mRNA纯化,并且通过UV测定转录物,并且通过毛细管凝胶电泳进一步分析。

[0663] 用于筛选的细胞培养、转染、下一代测序和编辑分析

[0664] 使用电穿孔仪,在Hepa1-6细胞(每个想到100,000个细胞)和Hep3B细胞(每个向导100,000个细胞)中进行mRNA和向导(500ng mRNA,150pmol向导)的核转染。用于筛选的向导是化学合成的。采集细胞,并且在转染后三天制备基因组DNA。产生适用于基于NGS的DNA测序的PCR引物,对其进行优化,并且用于扩增每个向导RNA的单独的靶序列。对扩增子进行测序和分析,以测量基因编辑。

[0665] 结果

[0666] 为了测试工程化MG3-6/3-8嵌合体(SEQ ID NO:12)的基因编辑活性,设计并购买了靶向具有MG3-6/3-8(PAM序列:nnRRnnYn(SEQ ID NO:2863)的小鼠基因组中的APOA1(SEQ ID NO:1866-1961和2058-2088)、ANPTL3(SEQ ID NO:2120-2215和2312-2350)和TRAC(SEQ ID NO:2390-2485和2582-2617)基因的394个向导。这些向导通过核转染与Hepa1-6(小鼠永生化小鼠肝细胞细胞系)或Hep3B(人肝脏细胞系)中的体外合成的mRNA共转染,并且在核转染后三天测定indel形成。总之,平均indel形成在APOA1处(跨127个向导)为40.7%,在ANGPTL3处(跨135个向导)为27.4%,并且在TRAC位点处(跨132个向导)为25.1%。179个向导显示出大于80%的indel形成。总之,MG3-6/3-8嵌合体在小鼠细胞系和人细胞系两者中显示了跨四个独立基因座的稳健基因编辑(图47-49)。

[0667] 实例30-通过全身施用脂质纳米颗粒传递的嵌合核酸酶MG3-6/3-8在小鼠肝脏中进行体内基因编辑

[0668] 为了评估MG3-6/3-8嵌合II型核酸酶体内编辑基因组的能力,使用脂质纳米颗粒来递送编码MG3-6/3-8核酸酶的mRNA和靶向小鼠APOA1和ANGPTL3基因的外显子区域的单向导RNA(sgRNA)(表26)。

[0669] 表26:小鼠研究中使用的sgRNA和靶向间隔子序列

[0670]

靶位点名称	间隔子 DNA 序列	sgRNA 序列
Apoa1 A4	TCTCCTGGAAAACTGGGACACT（SEQ ID NO: 1986）	mU*mC*mU*rCrCrUrGrGrArArArArCrUrGrGrGrArCrArCrUrGrUrUrGrArGrArArArUrCrGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU（SEQ ID NO: 1890）
Apoa1 A5	CTGGGATAACCTGGAGAAAGAA（SEQ ID NO: 1994）	mC*mU*mG*rGrGrArUrArArCrCrUrGrGrArGrArArArGrArArGrUrUrGrArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU（SEQ ID NO: 1898）
Apoa1 C5	TTGGGTGAGACAGGAGATGAAC（SEQ ID NO: 1996）	mU*mU*mG*rGrGrUrGrArGrArCrArGrGrArGrArArUrGrArArCrGrUrUrGrArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU（SEQ ID NO: 1900）
Apoa1 F4	AGGAACGGCTGGGCCCATTGAC（SEQ ID NO: 1991）	mA*mG*mG*rArArCrGrGrCrUrGrGrGrCrCrCrArUrUrGrArCrGrUrUrGrArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU（SEQ ID NO: 1895）
Apoa1 G4	GGAACGGCTGGGCCCATTGACT（SEQ ID NO: 1992）	mG*mG*mA*rArCrGrGrCrUrGrGrGrCrCrCrArUrUrGrArCrUrGrUrUrGrArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU（SEQ ID NO: 1896）
Angptl3 C12	ACTATTAAACCAAGAAACTCCC（SEQ ID NO: 1993）	mA*mC*mU*rArUrUrArArArCrCrArArGrArArArCrUrCrCrCrGrUrUrGrArGrArArArGrArUrUrCrUrUrArArUrArArGrGrCrArUrCrCrUrUrCrCrGrArUrGrCrUrGrArCrUrUrCrUrCrArCrCrGrUrCrCrGrUrUrUrUrCrCrArArUrArGrGrGrArGrCrGrGrGrCrGrGrUrArUrGrU*mU*mU*mU（SEQ ID NO: 2210）
（r =天然核糖碱基，m = 2'-O 甲基修饰的碱基，* =硫代磷酸酯键）		

[0671] 靶向小鼠肝细胞中的APOA1和ANGPTL3编码序列的sgRNA的筛选(实例29)用于鉴定用于体内小鼠研究的高活性向导(图47-49)。具体地,当用编码MG3-6/3-8核酸酶的mRNA转染时,sgRNA MG3-6/3-8mApoa1P1-A4(SEQ ID NO:1890)、MG3-6/3-8mApoa1P1-A5(SEQ ID NO:1898)、MG3-6/3-8mApoa1P1-C5(SEQ ID NO:1900)、MG3-6/3-8mApoa1P1-F4(SEQ ID NO:1895)和MG3-6/3-8mAngptl3P1-C12(SEQ ID NO:2210)在Hepa1-6中表现出大于95%的编辑,并被选择在小鼠中进行测试。另外地,还选择显示出相对较少的编辑(53%)的MG3-6/3-8mApoa1P1-G4(SEQ ID NO:1896)用于在小鼠研究中了解具有中等活性的位点。此外,将天然RNA结构的多种化学修饰掺入到这些sgRNA中。当在来自哺乳动物细胞的提取物中温育

时,基于这些化学修饰在体外改善sgRNA的稳定性而不对编辑活性产生负面影响的能力来选择所述化学修饰。

[0672] MG3-6/3-8mRNA的制备

[0673] 编码MG3-6/3-8核酸酶的mRNA通过线性化质粒模板的体外转录产生。转录到RNA中的DNA序列以5'至3'的顺序包括以下元件:T7 RNA聚合酶启动子、5'非翻译区(5'UTR)、核定位信号、短接头、MG3-6/3-8核酸酶的编码序列、短接头、核定位信号、3'非翻译区以及大约100个核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:2865)。

[0674] 此MG3-6/3-8盒中编码的合成mRNA中编码的蛋白质序列从5'至3'包括以下元件:来自SV40的核定位信号、五个氨基酸接头(GGGGS(SEQ ID NO:2864))、从其去除起始甲硫氨酸密码子的MG3-6/3-8核酸酶的蛋白质编码序列、3个氨基酸接头(SGG)和来自核质蛋白的核定位信号。使用可商购获得的算法修饰此盒的蛋白质编码区的DNA序列,以反映人中的密码子使用。在用于体外转录的质粒中编码大约100个核苷酸polyA尾(SEQ ID NO:2865)并且共转录地对mRNA进行封端。将mRNA中的尿苷用N1-甲基假尿苷置换。

[0675] 脂质纳米颗粒的制备

[0676] 用于递送MG3-6/3-8mRNA和向导RNA的脂质纳米颗粒(LNP)制剂基于如上文所描述的LNP制剂。将四种脂质组分溶解于乙醇中,并且以适当的摩尔比混合以制备脂质工作混合物。在调配之前,以1:1的质量比混合mRNA和向导RNA。将RNA在100mM乙酸钠(pH 4.0)中稀释以制备RNA工作储备液。将脂质工作储备液和RNA工作储备液在微流体装置中混合。LNP针对磷酸盐缓冲盐水(PBS)透析2至16小时,并且然后浓缩。使用Ribogreen试剂测量LNP制剂中RNA的浓度。LNP的直径和多分散性(PDI)通过动态光散射测定。代表性LNP直径范围为65nm至120nm,其中PDI为0.05至0.20。

[0677] 小鼠给药和采集

[0678] 将mRNA和sgRNA的LNP以1:1的质量比混合,并且以1mg RNA每kg体重的总RNA剂量通过尾静脉(每只小鼠0.1mL)静脉内注射到7周龄的C57B16野生型小鼠中。给药后七天,处死每组中的所有四只小鼠。收集左肝叶并快速冷冻。

[0679] 通过下一代测序(NGS)进行基因组DNA制备和编辑分析

[0680] 将肝脏的左侧叶(100mg)在消化缓冲液中均质化。从所得匀浆物中纯化基因组DNA,并通过测量260nm处的吸光度进行定量。将从仅注射PBS缓冲液的小鼠中纯化的基因组DNA用作对照。用Q5高保真DNA聚合酶和具有与用于下一代测序(NGS)的条形码引物互补的衔接子的基因特异性引物对每个特异性sgRNA靶向的APOA1和ANGPTL3基因的区进行PCR扩增,总共扩增29个循环。使用用于总共10个循环的NGS的条形码引物对此第一PCR反应的产物进行PCR扩增。使所得产物经受NGS,并且针对在APOA1和ANGPTL3基因中的靶向位点处含有插入或缺失(indel)的测序读段的百分比对结果进行分析。

[0681] 结果

[0682] 基因编辑结果汇总于表27中。

[0683] 表27:用封装MG3-6/3-8mRNA和靶向APOA-1和ANGPTL3基因的sgRNA的LNP处理的小鼠的肝脏中引起移码(插入/缺失)的编辑频率的分析

[0684]

处理	向导	平均 INDEL	INDEL 的标准偏差	相对于总体的平均 OOF%	相对于总体的 OOF%标准偏差
PBS 对照	Apoa1 A4	0.03	0.02	0.03	0.02
	Apoa1 A5	0.01	0.01	0.01	0.01
	Apoa1 C5	0.01	0.01	0.01	0.01
	Apoa1 F4	0.04	0.01	0.04	0.01
	Apoa1 G4	0.04	0.01	0.03	0.01
	Angptl3 C12	0.02	0.01	0.02	0.01
MG3-6_3-8	Apoa1 A4	79.30	6.23	75.40	5.87
	Apoa1 A5	65.23	3.96	55.51	3.49

[0685]

处理	向导	平均 INDEL	INDEL 的标准偏差	相对于总体的平均 OOF%	相对于总体的 OOF%标准偏差
	Apoa1 C5	77.82	1.88	73.90	1.55
	Apoa1 F4	43.07	13.67	30.37	11.77
	Apoa1 G4	34.76	9.83	38.97	8.64
	Angptl3 C12	42.80	3.34	37.18	3.12

[0686] 小鼠肝脏基因组DNA的NGS分析表明,在用包封MG3-6/3-8mRNA的LNP和六个sgRNA中的每一个给药的组的APOA1和ANGPTL3基因中的sgRNA的靶位点处进行的编辑在总肝脏基因组DNA的35％至80％的范围内(图50)。大多数处理组之间存在微小差异,指示稳健并且可再现的编辑结果。总的来说,使用MG3-6/3-8嵌合核酸酶在APOA1和ANGPTL3位点处进行基因组编辑以敲低基因以调节下游蛋白质产物通过靶向基因编辑证明了其治疗潜力。

[0687] 实例31-V-A型嵌合核酸酶的体外切割活性

[0688] 生物信息学分析

[0689] 通过连接来自不同同源物的结构域以及来自通过祖先序列重构(ASR)获得的新颖人工设计的核酸酶序列的结构域来工程化V-A酶MG29-1的14种新蛋白质变体(图51-52)。这些新颖V-A型嵌合体将MG29-1酶的PAM靶向能力扩展到其典型PAM序列之外。类似于先前工程化的V-A型嵌合体MG29-1/29-5(SEQ ID NO:109)和MG29-1/57-1(SEQ ID NO:110),嵌合序列被设计成具有新颖MG29-1同源物MG29-13至MG29-21(SEQ ID NO:2842-2849),以及具有更远的V-A型核酸酶,即MG11-18和MG79-1(SEQ ID NO:2850-2851)。

[0690] 另外地,为了产生V-A型核酸酶的进一步多样性,使用祖先序列重构(ASR)算法。ASR是使用现有蛋白质序列及其之间推断的关系来重建远古的现在灭绝的蛋白质的序列的计算技术。此技术用于计算重建V-A型家族的新颖序列以用于MG29-1嵌合体产生(chimeragenesis)。对于此分析,对330个V-A型蛋白质序列进行了比对,并构建了系统发育树(图52A)。使用四个V-L型序列作为外组来植根树。重建序列,并且对于每个重建节点,手动识别插入和缺失。最终,以高置信度重构三个V-A型祖先序列(MG29-229至MG29-231),并且选择用于与MG29-1(SEQ ID NO:2852-2854)的嵌合体产生(表28和图52)。

[0691] 表28:对于Wed-II、PI和Wed-III结构域,计算衍生的V-A型祖先相对于MG29-1的比较。

[0692]

祖先亲本（WED II + PID + WED-III）	平均支持	MG29-1同一性%	交换结构域长度（氨基酸）
MG29-229	0.94	65	295
MG29-230	0.97	65	295
MG29-231	0.96	64	294

[0693] 平均支持值以0至1的尺度指示重建序列的平均概率。支持值>0.7指示重建序列中的高置信度。

[0694] 基于MG29-1的预测结构及其与FnCas12a(也被称为Cpf1)的底物结合的R环结构的比对,鉴定了可能负责PAM序列识别和结合的MG29-1的WED-II、PID和WED-III结构域的边界、其同源物和祖先序列(图51B和52B)。

[0695] 构建了所选野生型和ASR产生的V-A型核酸内切酶以及MG29-1和参考Cpf1的多序列比对(图53A)。基于此比对,这些新颖MG酶的各种功能结构域被定义并用于随后确定用于嵌合体产生的适当REC-WED-II和WED-III-RuvC断点(图53B-53C)。嵌合组合物的详细信息示出于表29中。

[0696] 表29:用于使用MG29-1作为底座的嵌合架构

[0697]

嵌合体类型	嵌合体名称	WED-I REC	WED-II + PI + WED-III	RuvC + Nuc
所有天然序列的组合	MG29-1_29-13	MG29-1(1, 560)	MG29-13 (558, 859)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-14	MG29-1(1, 560)	MG29-14 (544, 845)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-15	MG29-1(1, 560)	MG29-15 (344, 645)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-16	MG29-1(1, 560)	MG29-16 (524, 825)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-17	MG29-1(1, 560)	MG29-17 (565, 866)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-18	MG29-1(1, 560)	MG29-18 (537, 830)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-20	MG29-1(1, 560)	MG29-20 (556, 857)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-21	MG29-1(1, 560)	MG29-21 (514, 815)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_11-18	MG29-1(1, 560)	MG11-18 (527, 872)	MG29-1(862, 1280)

[0698]

嵌合体类型	嵌合体名称	WED-I REC	WED-II + PI + WED-III	RuvC + Nuc
	MG29-1_79-1	MG29-1(1, 560)	MG79-1 (564, 865)	MG29-1(862, 1280)
天然序列与ASR产生的序列的组合	MG29-1_29-229	MG29-1(1, 560)	MG29-1_29-229 (561, 855)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-230	MG29-1(1, 560)	MG29-1_29-230 (561, 855)	MG29-1(862, 1280)
	MG29-1_29-231	MG29-1(1, 560)	MG29-1_29-231 (561, 854)	MG29-1(862, 1280)

[0699] 结果

[0700] 本文使用的核酸酶的PAM序列通过在基于大肠杆菌裂解物的表达系统中的表达来确定或在体外翻译中重构。使用MG29-1主链以及来自MG29家族同源物和祖先序列的PID和WED结构域进行的嵌合核酸酶的PAM富集测定指示,当用MG29-1靶向向导RNA测试时,九个V-A型嵌合体是活性的(图54-55)。所需的PAM基序示出于图56中并且汇总于表30中。

[0701] 表30:与源自MG29-1的活性嵌合体相关的PAM。

[0702]

嵌合体名称	PAM序列
MG29-1_29-13	TTTn
MG29-1_29-14	TYYn
MG29-1_29-15	非活性
MG29-1_29-16	TTTn
MG29-1_29-17	非活性
MG29-1_29-18	nYTn
MG29-1_29-20	TTYn
MG29-1_29-21	非活性
MG29-1_11-18	非活性
MG29-1_79-1	非活性
MG29-1_29-229	nTTn
MG29-1_29-230	nYYn
MG29-1_29-231	nYYn

[0703] 参考文献

[0704] Kauffman,K.J.等人用分数因子和最终筛选设计优化脂质纳米颗粒制剂用于体内mRNA递送(Optimization of Lipid Nanoparticle Formulations for mRNA Delivery in Vivo with Fractional Factorial and Definitive Screening Designs).《纳米快报(Nano Lett)》15,7300-7306(2015)。

[0705] Harms,M.和Thornton J.W.使用祖先基因重建分析蛋白质结构和功能(Analyzing protein structure and function using ancestral gene reconstruction).《结构生物学的当前观点(Current Opinion in Structural Biology)》,20:360-366(2010)。

[0706] Katoh K,Standley DM.MAFFT多序列比对软件第7版:性能和可用性的改进(MAFFT multiple sequence alignment software version 7:improvements in performance

and usability).《分子生物学与进化(Mol Biol Evol)》.2013;30(4):772-780.doi:10.1093/molbev/mst010。

[0707] Stamatakis,A.RAxML第8版:用于大系统发生学的系统发生分析和后分析的工具(RAxML version 8:a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies).《生物信息学(Bioinformatics)》30(9),1312-1313(2014)。

[0708] Yang,Z.PAML 4:用于通过最大可能性进行的系统发生分析的程序包(PAML 4:a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood).《分子生物学与进化(Molecular Biology and Evolution)》24:1586-1591(2007)。

[0709] 虽然已经在本文示出并描述了本公开的优选实施例,但是对本领域的普通技术人员而言应当显而易见的是此类实施例仅以举例方式提供。本公开不旨在受说明书中提供的具体实施例的限制。尽管已经参考上述说明书描述了本公开,但本文中的实施例的描述和说明并不打算以限制意义理解。在不背离本公开的情况下,本领域的技术人员现在将想到许多变化、改变和替代。此外,应当理解,本公开的所有方面不限于本文所阐述的取决于各种条件和变量的特定描绘、配置或相对比例。应当理解,本文所描述的本公开的实施例的多种替代方案可以用于实践本公开。因此,经考虑本公开应同样涵盖任何这类替代方案、修改、变型或等效物。下列权利要求旨在界定本公开的范围,并据此涵盖这些权利要求及其同等物范围内的方法和结构。

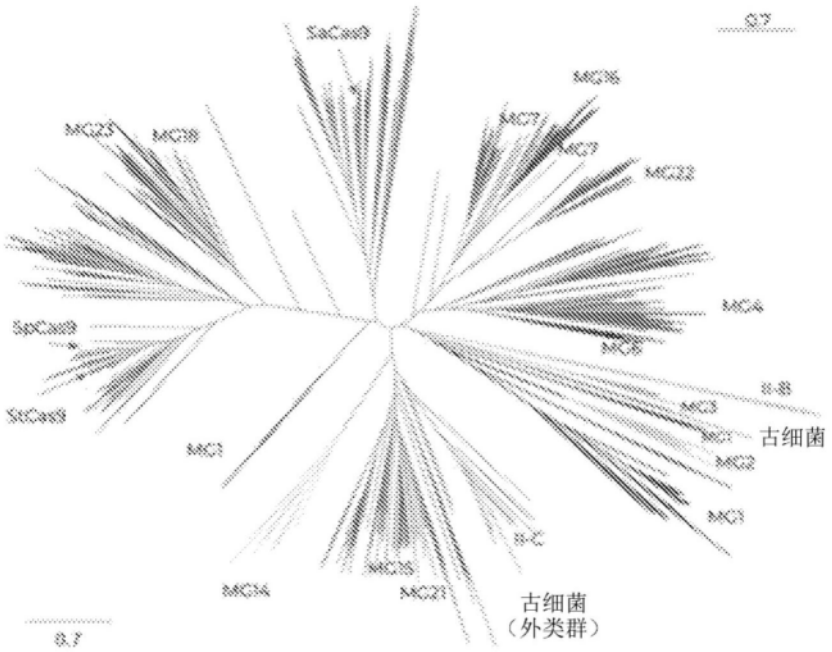


图1A

基因	PAM
MG1-4	nRRR
MG1-5	nnnnYY
MG1-6	nnRRAY
MG1-7	nRRRAAG
MG2-4	nAGG
MG2-7	nnnRTA
MG3-1	不适用
MG3-2	不适用
MG3-3	nnnCCCYR
MG3-4	nnAAAABn
MG3-6	nnRGGnT
MG3-7	nnRnYAY
MG3-8	nnRGGTY
MG4-2	YRnMCC
MG4-5	nRCCV
MG6-3	nRRTA
MG7-1	nRRnCG
MG14-1	nRnnGRKA
MG15-1	CNNNCNAA
MG16-1	nRRnMC
MG18-1	nRWART
SpCas9	nGG
SaCas9	nGGRRT

图1B

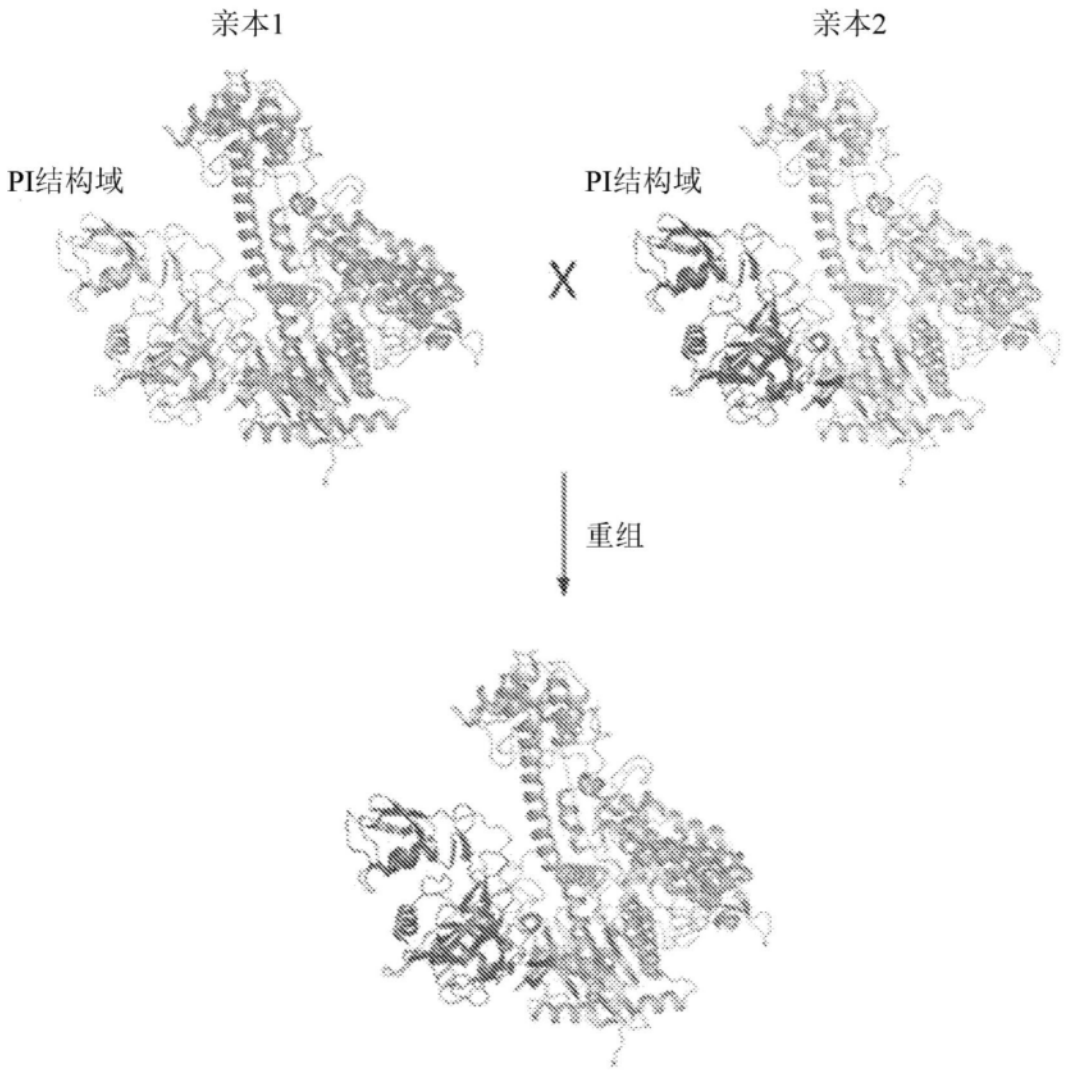


图2

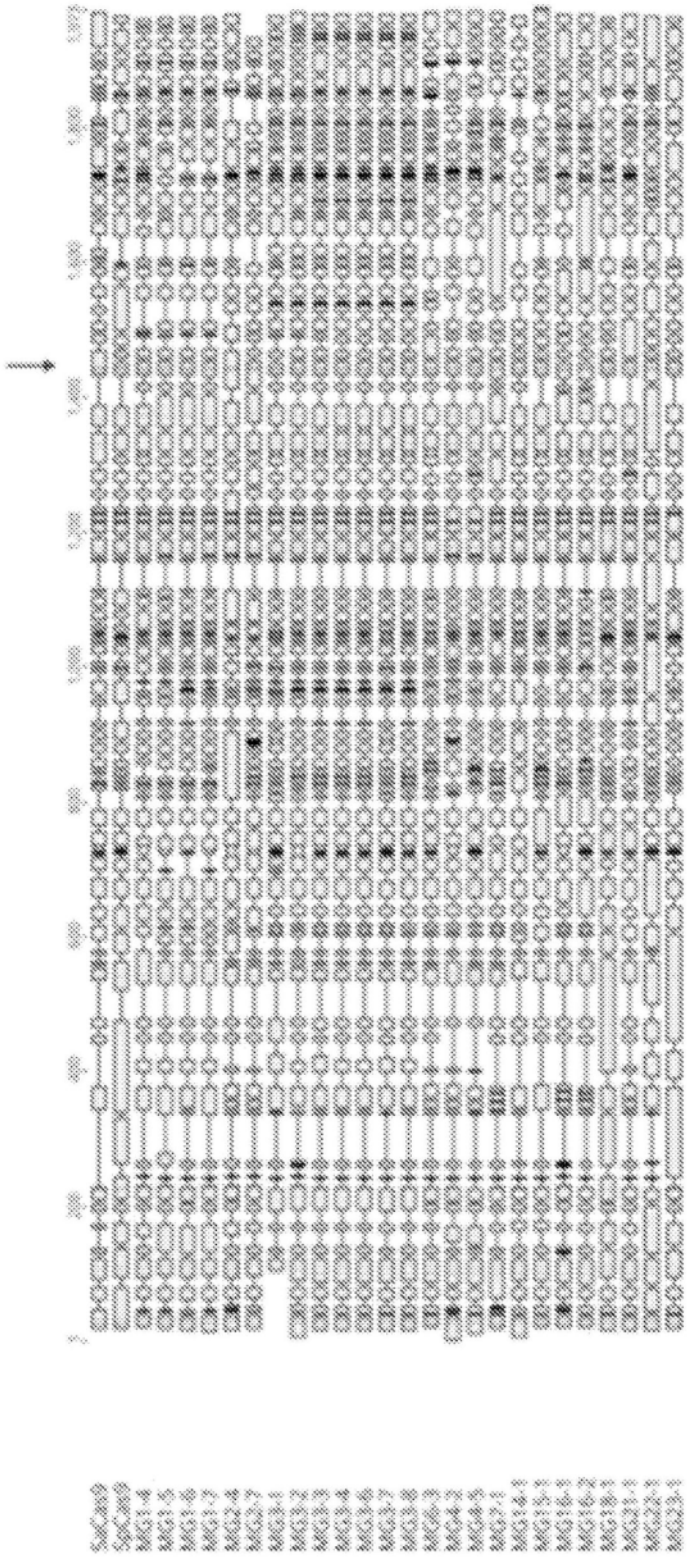


图3A

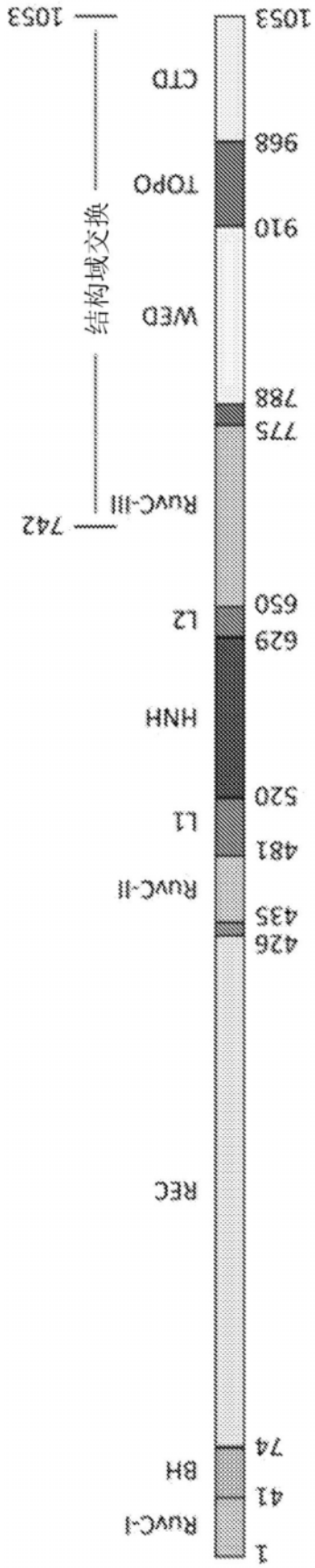

1053
CTD
968
TOPO
910
WED
788
775
RuvC-III
742
650
L2
629
HNH
520
L1
481
RuvC-II
435
426
REC
74
BH
41
RuvC-I
1
结构域交换
1053

图3B

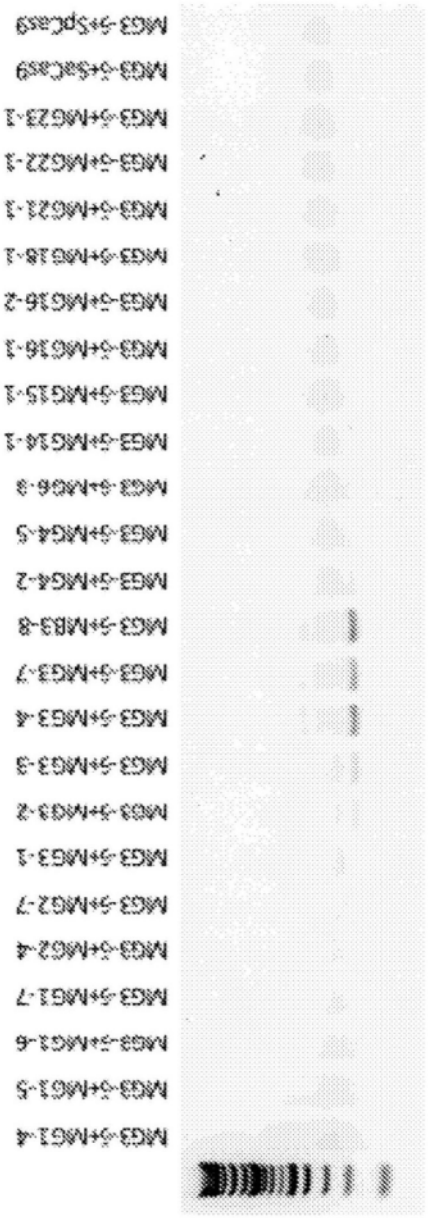

MG3-5+MG1-4
MG3-5+MG1-5
MG3-5+MG1-6
MG3-5+MG1-7
MG3-5+MG2-4
MG3-5+MG2-7
MG3-5+MG3-1
MG3-5+MG3-2
MG3-5+MG3-3
MG3-5+MG3-4
MG3-5+MG3-7
MG3-5+MB3-8
MG3-5+MG4-2
MG3-5+MG4-5
MG3-5+MG6-3
MG3-5+MG14-1
MG3-5+MG15-1
MG3-5+MG16-1
MG3-5+MG16-2
MG3-5+MG18-1
MG3-5+MG21-1
MG3-5+MG22-1
MG3-5+MG23-1
MG3-5+SaCas9
MG3-5+SpCas9

图4

亲本
嵌合体
MG3-3 (nnnCCCYR)
MG3-4 (nnAAAAnn)
MG3-6 (nnRGGnT)
MG3-7 (nnRnYAY)
MG3-8 (nnRGGTY)
MG3-6+MG3-2 (nnRMYYMW)
MG3-6+MG3-3 (nnnCCCYR)
MG3-6+MG3-4 (nnAAAAnn)
MG3-6+MG3-7 (nnRnYAY)
MG3-6+MG3-8 (nnRGGTY)

图5A

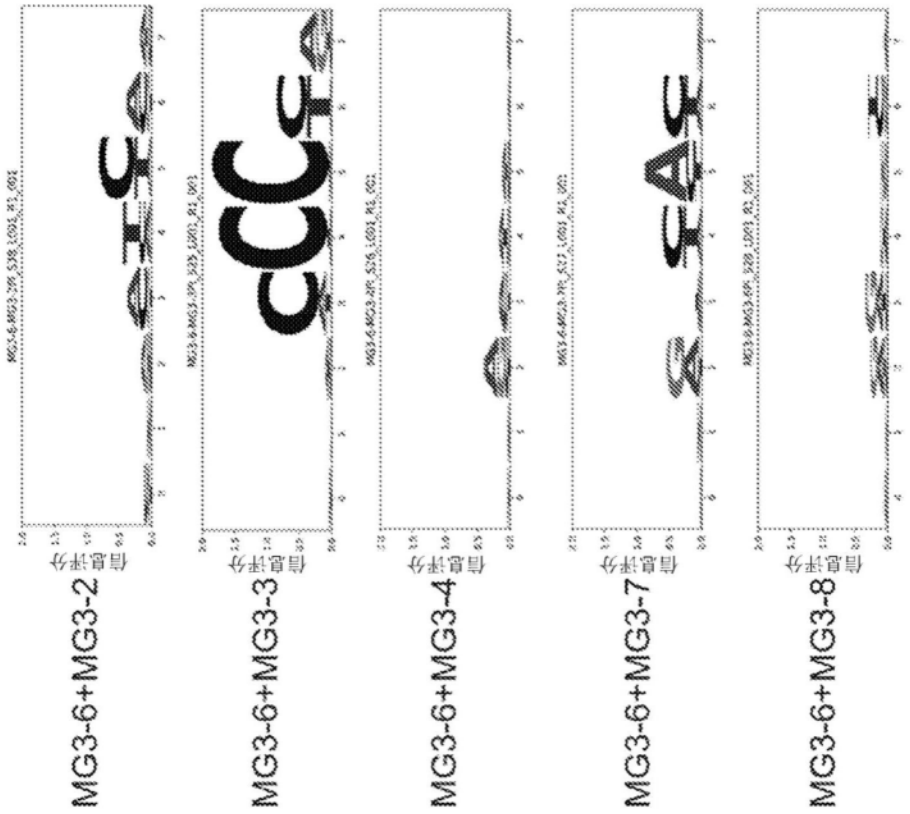

MG3-6+MG3-2
MG3-6+MG3-3
MG3-6+MG3-4
MG3-6+MG3-7
MG3-6+MG3-8
信息评分

图5B

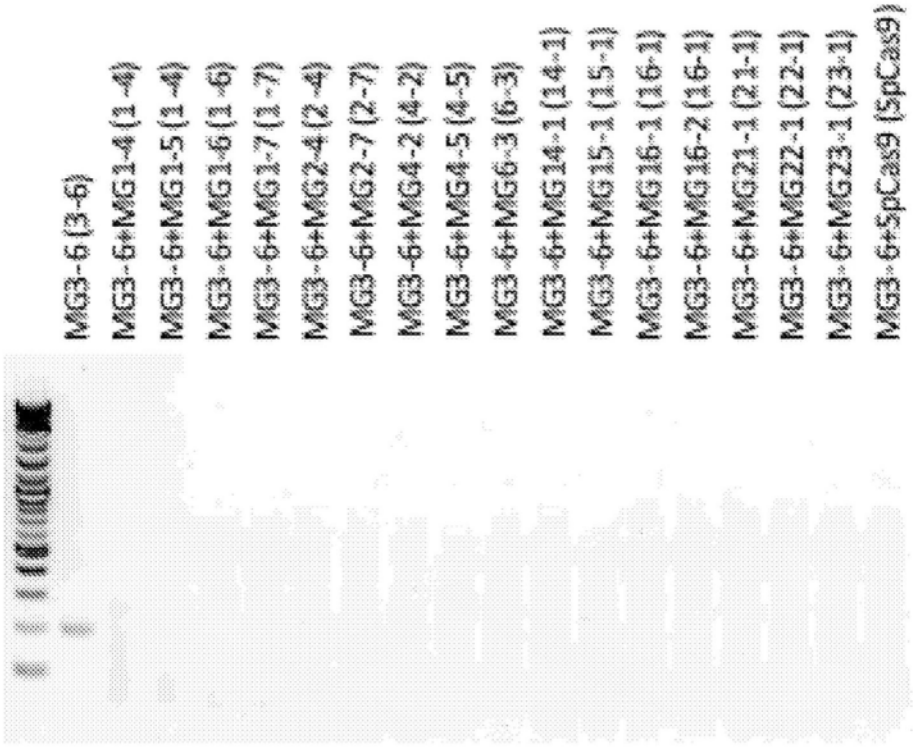

MG3-6 (3-6)
MG3-6+MG1-4 (1-4)
MG3-6+MG1-5 (1-4)
MG3-6+MG1-6 (1-6)
MG3-6+MG1-7 (1-7)
MG3-6+MG2-4 (2-4)
MG3-6+MG2-7 (2-7)
MG3-6+MG4-2 (4-2)
MG3-6+MG4-5 (4-5)
MG3-6+MG6-3 (6-3)
MG3-6+MG14-1 (14-1)
MG3-6+MG15-1 (15-1)
MG3-6+MG16-1 (16-1)
MG3-6+MG16-2 (16-1)
MG3-6+MG21-1 (21-1)
MG3-6+MG22-1 (22-1)
MG3-6+MG23-1 (23-1)
MG3-6+SpCas9 (SpCas9)

图6

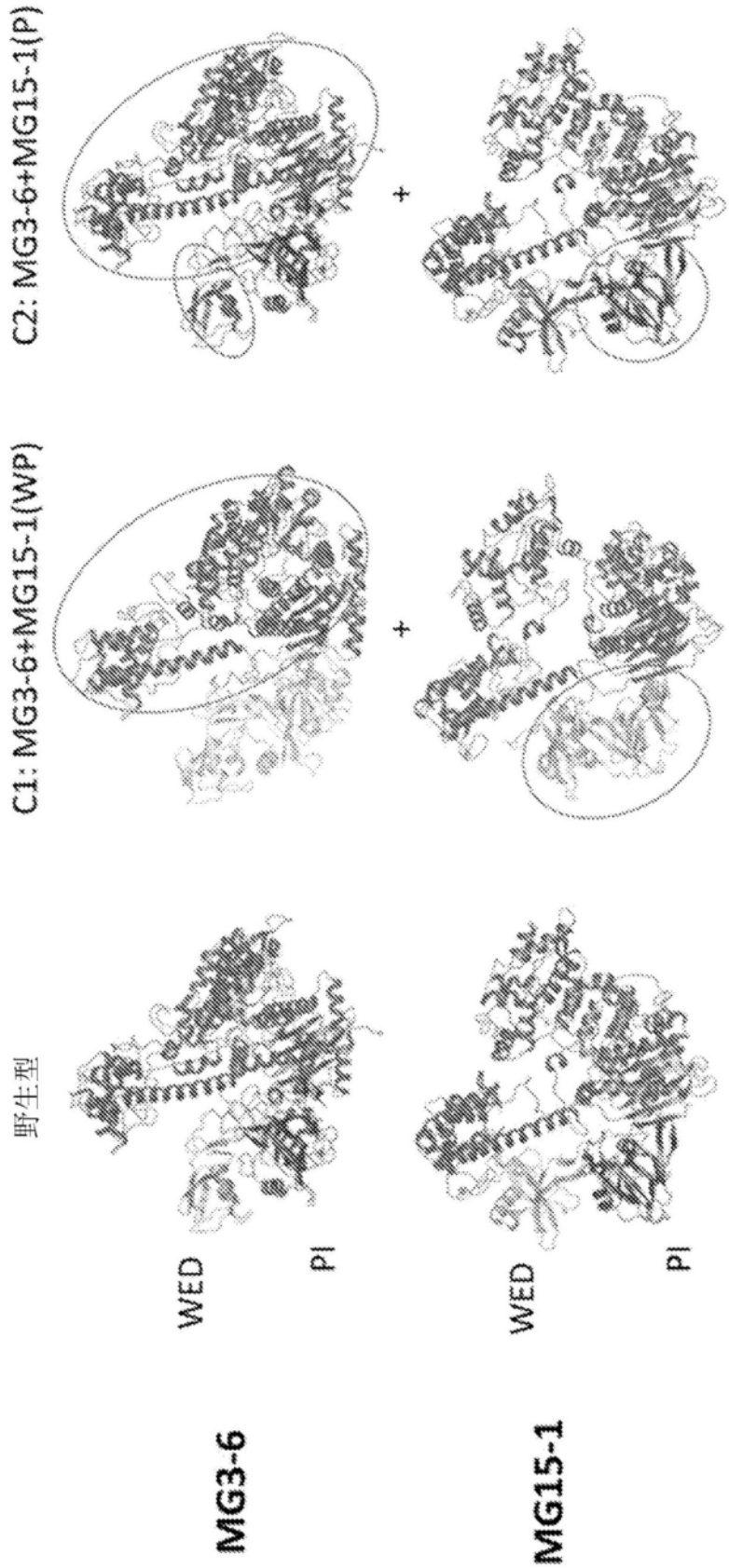


图7

桑格测序结果

基因	PAM		
	1	2	3
MG3-6	NNRGGTYA	NNRGGTYN	NNRGGTYN
MG15-1	CNNNCNAA	CNNNCCAA	CNNNCCAA
MG3-6_MG15-1(WP)	CNNNCNAA	CNANCWAA	CNANCWAA
MG3-6_MG15-1(P)		NNNNCWAA	CNNNCWAA

图8A

图8B

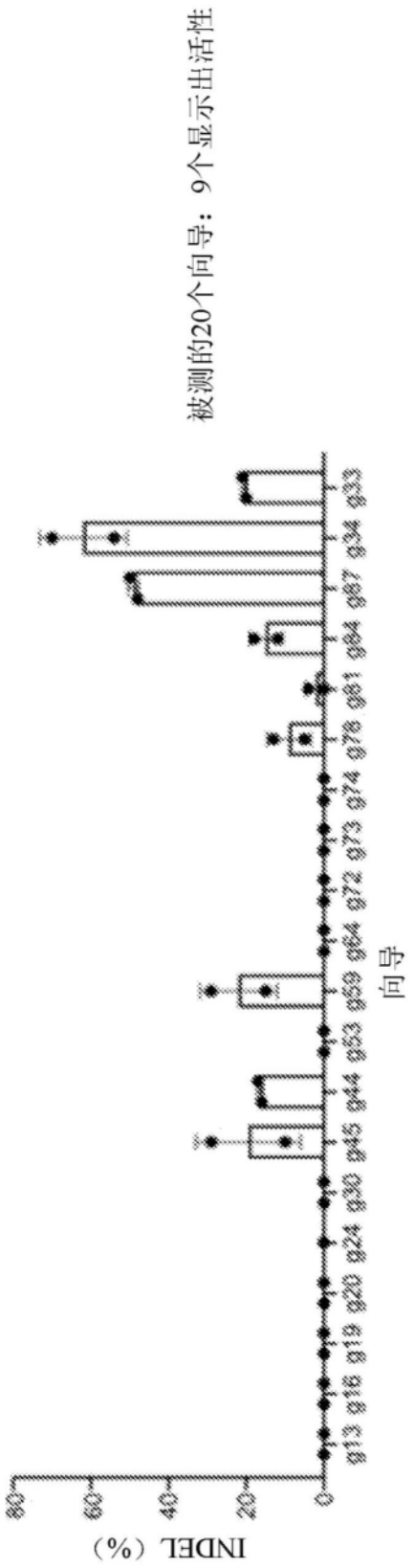

被测的20个向导：9个显示出活性
INDEL（%）
0
20
40
60
80
向导
g13 g16 g19 g20 g24 g30 g45 g44 g53 g59 g64 g72 g73 g74 g78 g81 g84 g87 g34 g33

图9A

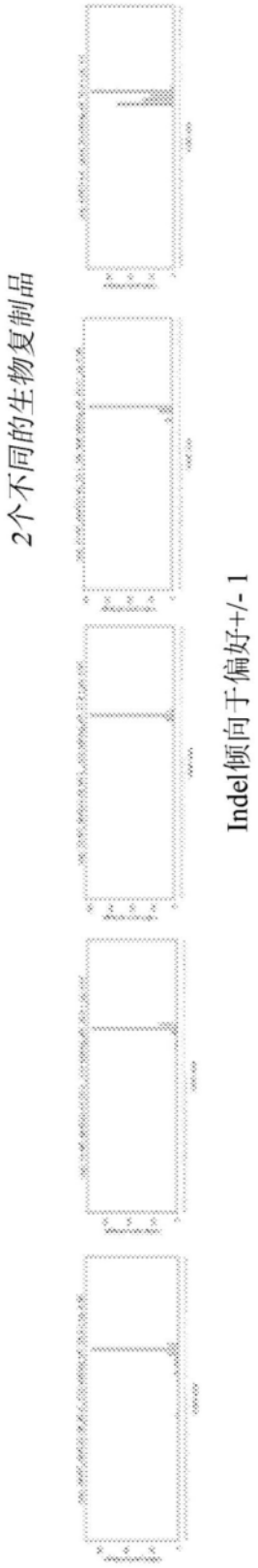


图9B

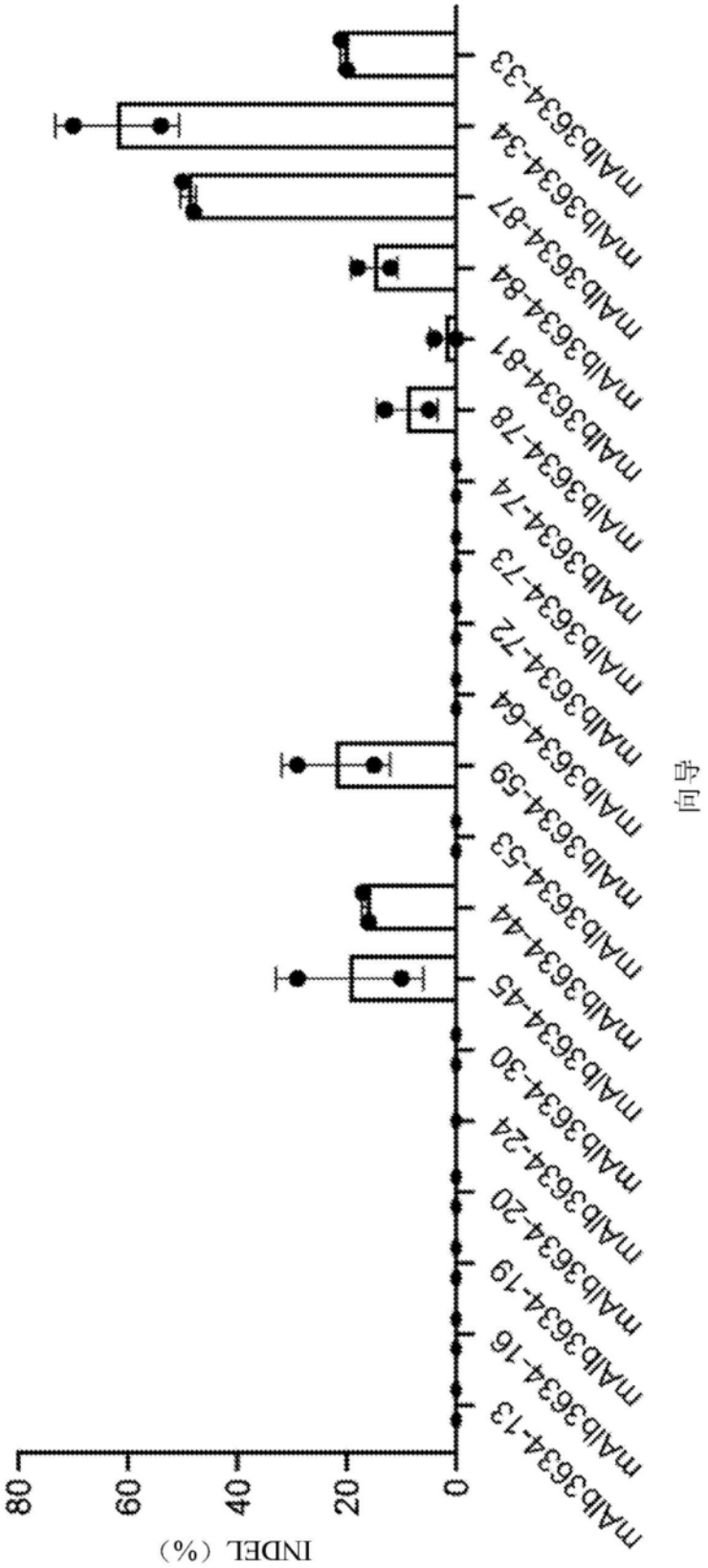

INDEL（%）
80
60
40
20
0
mAlb3634-33
mAlb3634-34
mAlb3634-87
mAlb3634-84
mAlb3634-81
mAlb3634-78
mAlb3634-74
mAlb3634-73
mAlb3634-72
mAlb3634-64
mAlb3634-59
mAlb3634-53
mAlb3634-44
mAlb3634-45
mAlb3634-30
mAlb3634-24
mAlb3634-20
mAlb3634-19
mAlb3634-16
mAlb3634-13
样品

图10

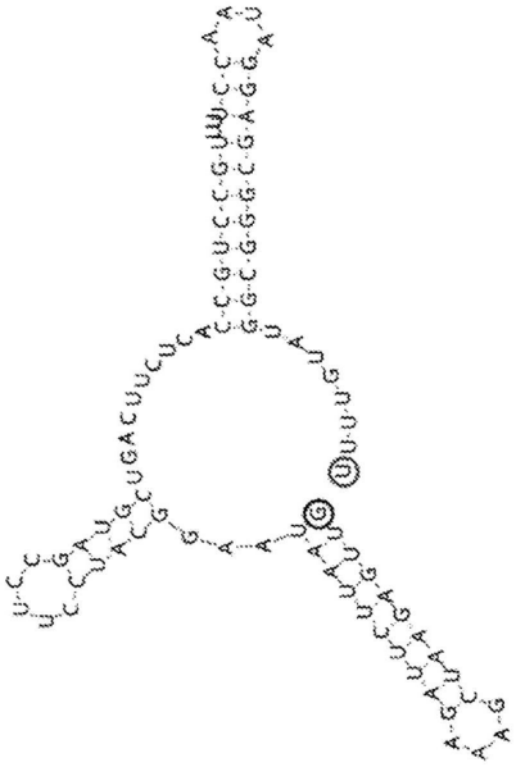


图11A

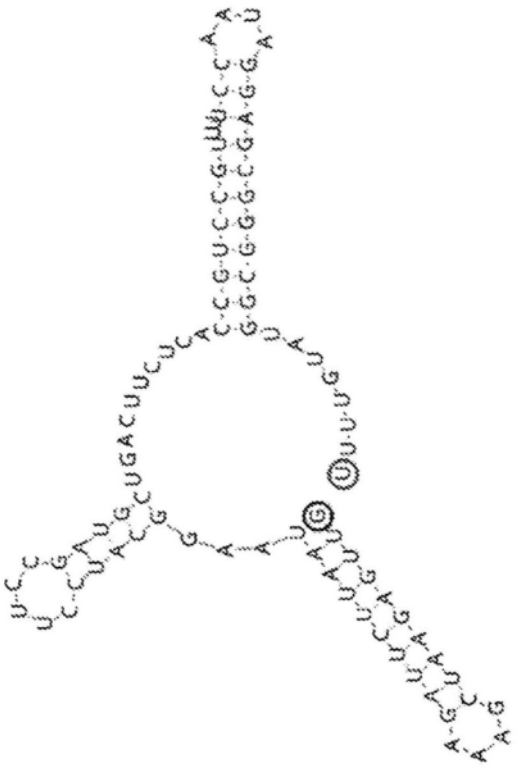


图11B

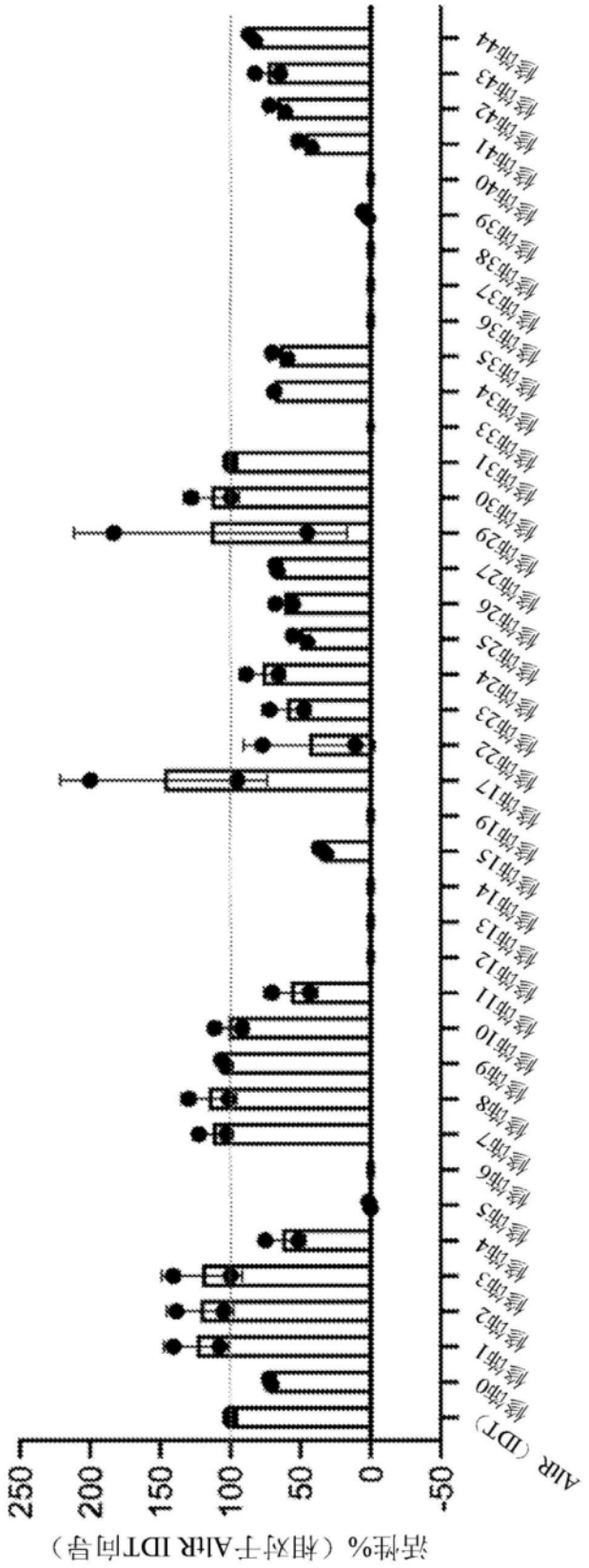

活性%（相对于AltR IDT向导）
250
200
150
100
50
0
-50
AltR（IDT）
接触0
接触1
接触2
接触3
接触4
接触5
接触6
接触7
接触8
接触9
接触10
接触11
接触12
接触13
接触14
接触15
接触19
接触17
接触22
接触23
接触24
接触25
接触26
接触27
接触29
接触30
接触31
接触33
接触34
接触35
接触36
接触37
接触38
接触39
接触40
接触41
接触42
接触43
接触44

图12

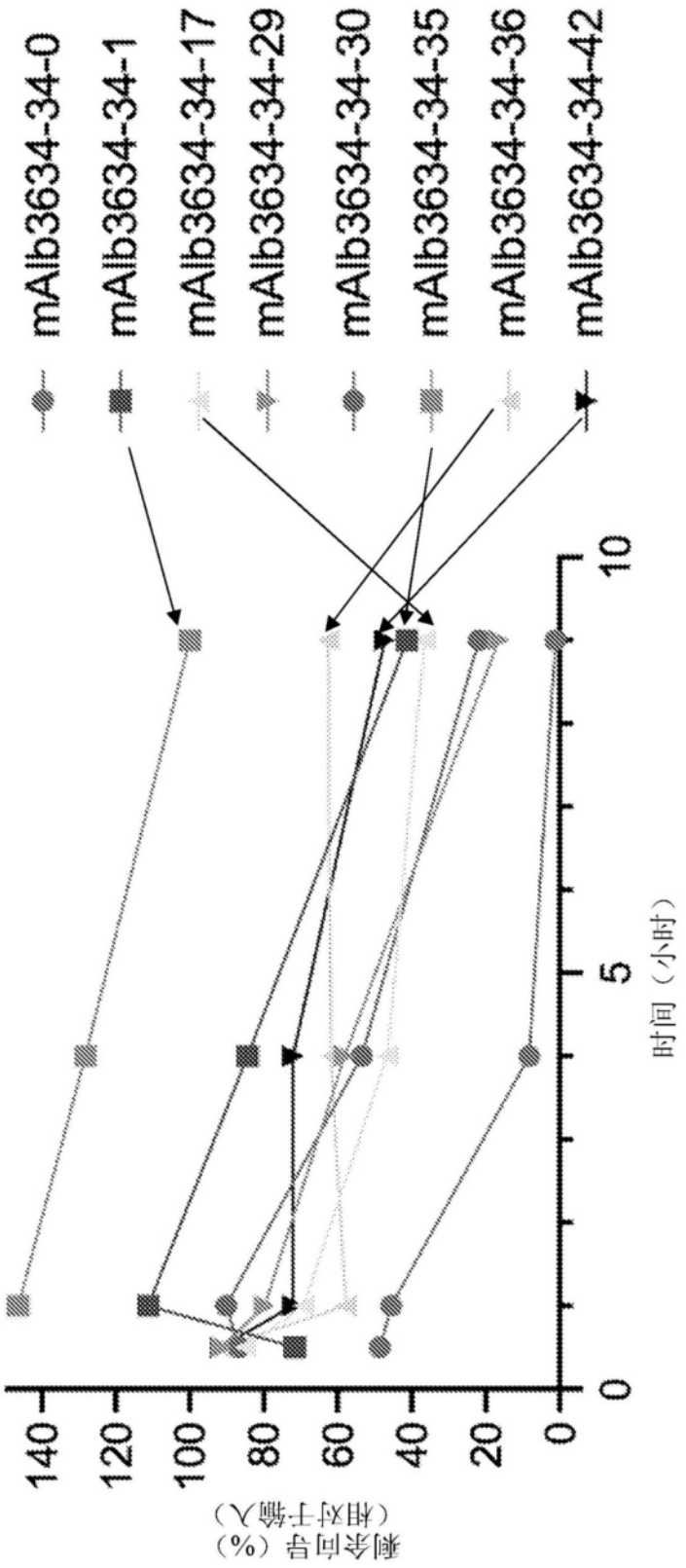

mAlb3634-34-0
mAlb3634-34-1
mAlb3634-34-17
mAlb3634-34-29
mAlb3634-34-30
mAlb3634-34-35
mAlb3634-34-36
mAlb3634-34-42
剩余向导（%）
（相对于输入）
140
120
100
80
60
40
20
0
0
5
10
时间（小时）

图13

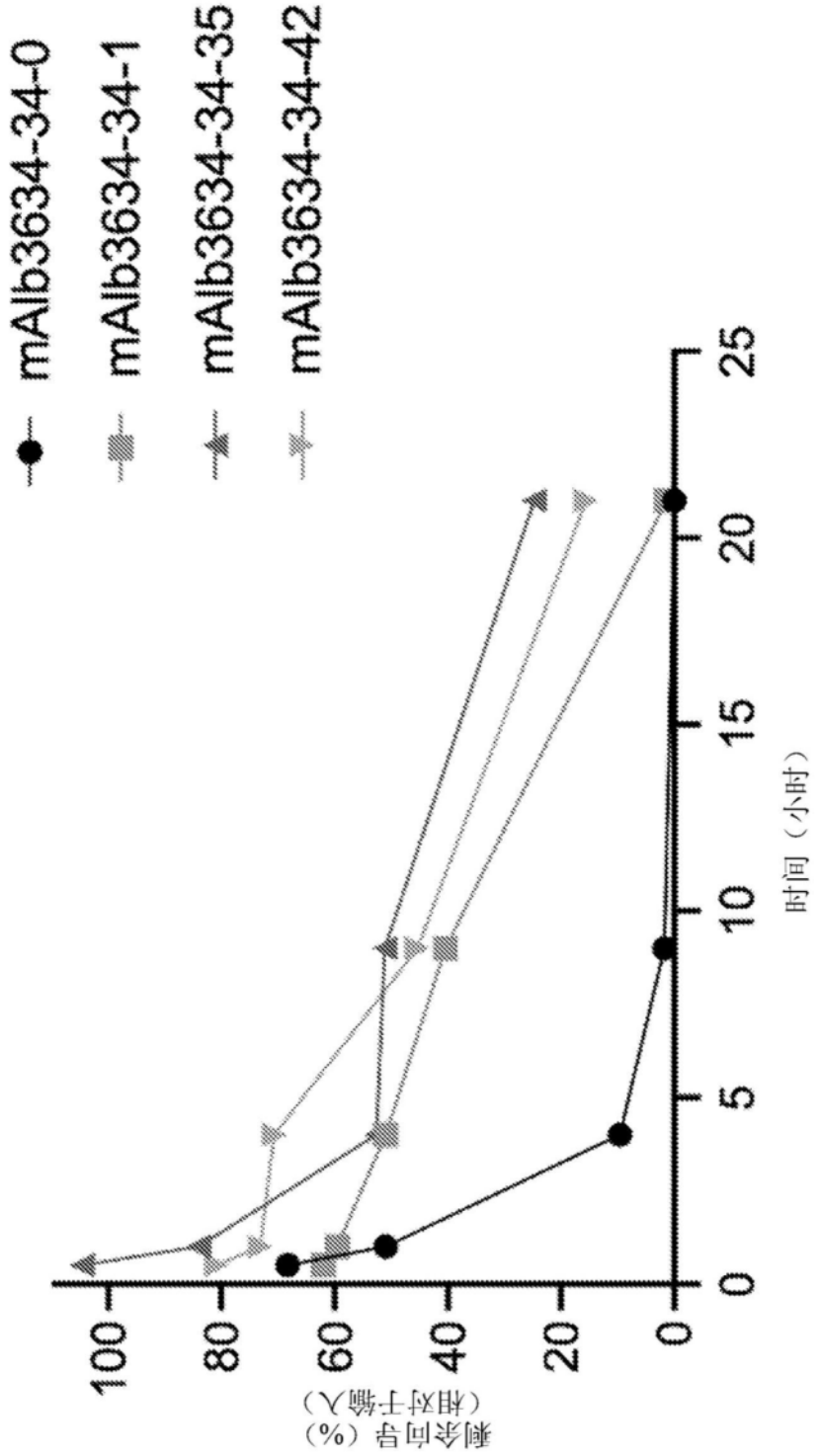

mAlb3634-34-0
mAlb3634-34-1
mAlb3634-34-35
mAlb3634-34-42
剩余向导（%）
（相对于输入）
100
80
60
40
20
0
0
5
10
15
20
25
时间（小时）

图14

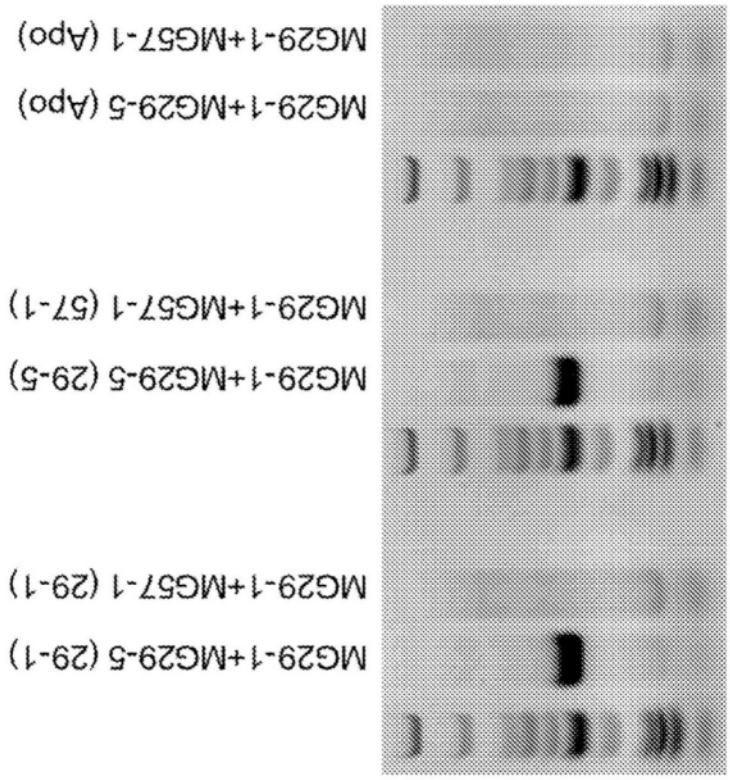

MG29-1+MG57-1 (Apo)
MG29-1+MG29-5 (Apo)
MG29-1+MG57-1 (57-1)
MG29-1+MG29-5 (29-5)
MG29-1+MG57-1 (29-1)
MG29-1+MG29-5 (29-1)

图15A

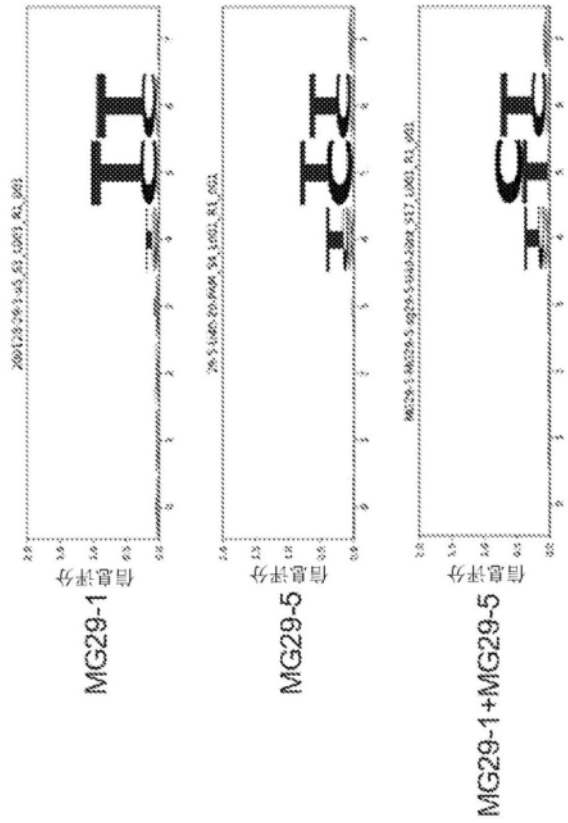


图15B

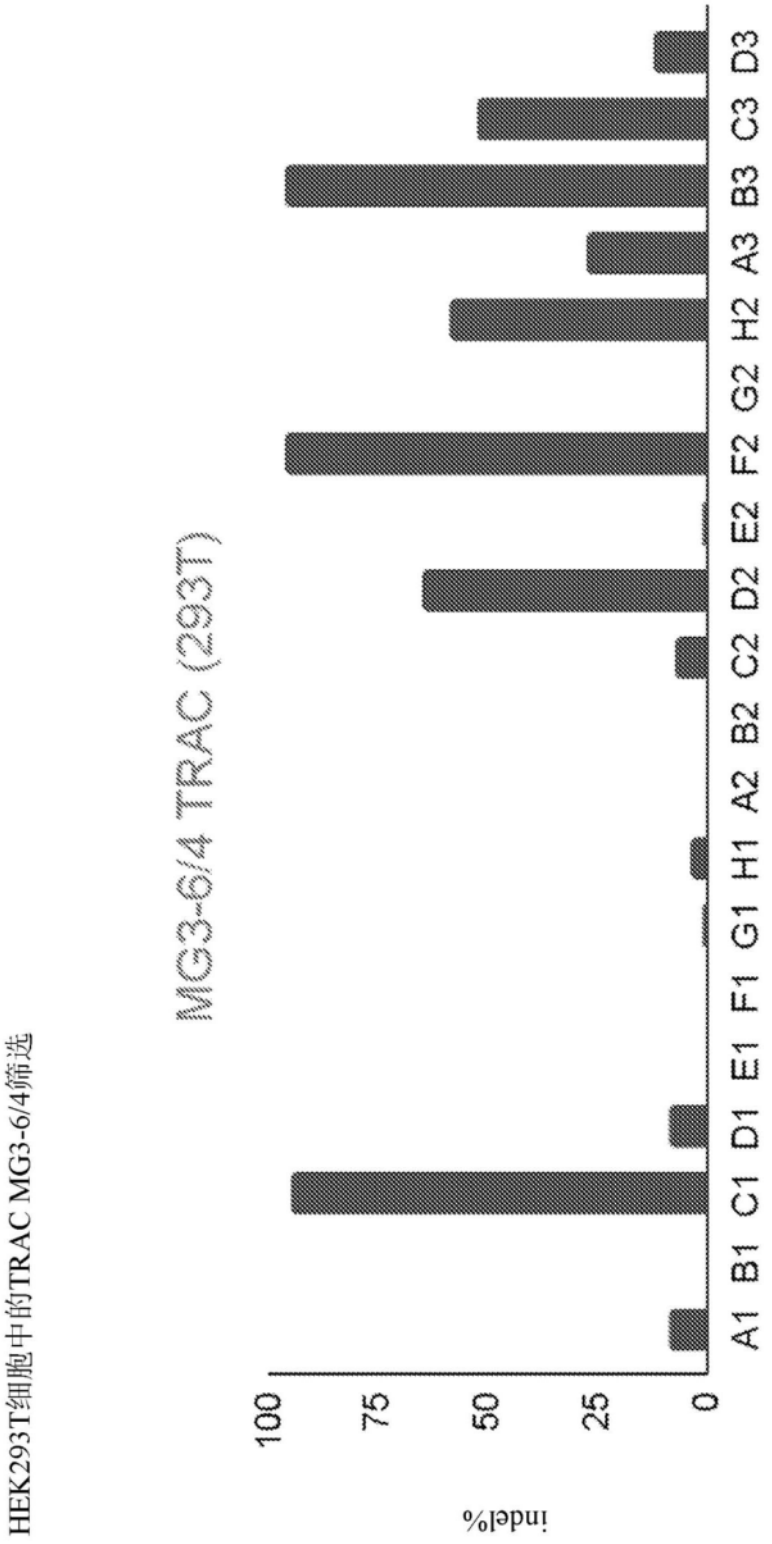

HEK293T细胞中的TRAC MG3-6/4筛选
MG3-6/4 TRAC (293T)
indel%
100
75
50
25
0
A1 B1 C1 D1 E1 F1 G1 H1 A2 B2 C2 D2 E2 F2 G2 H2 A3 B3 C3 D3

图16

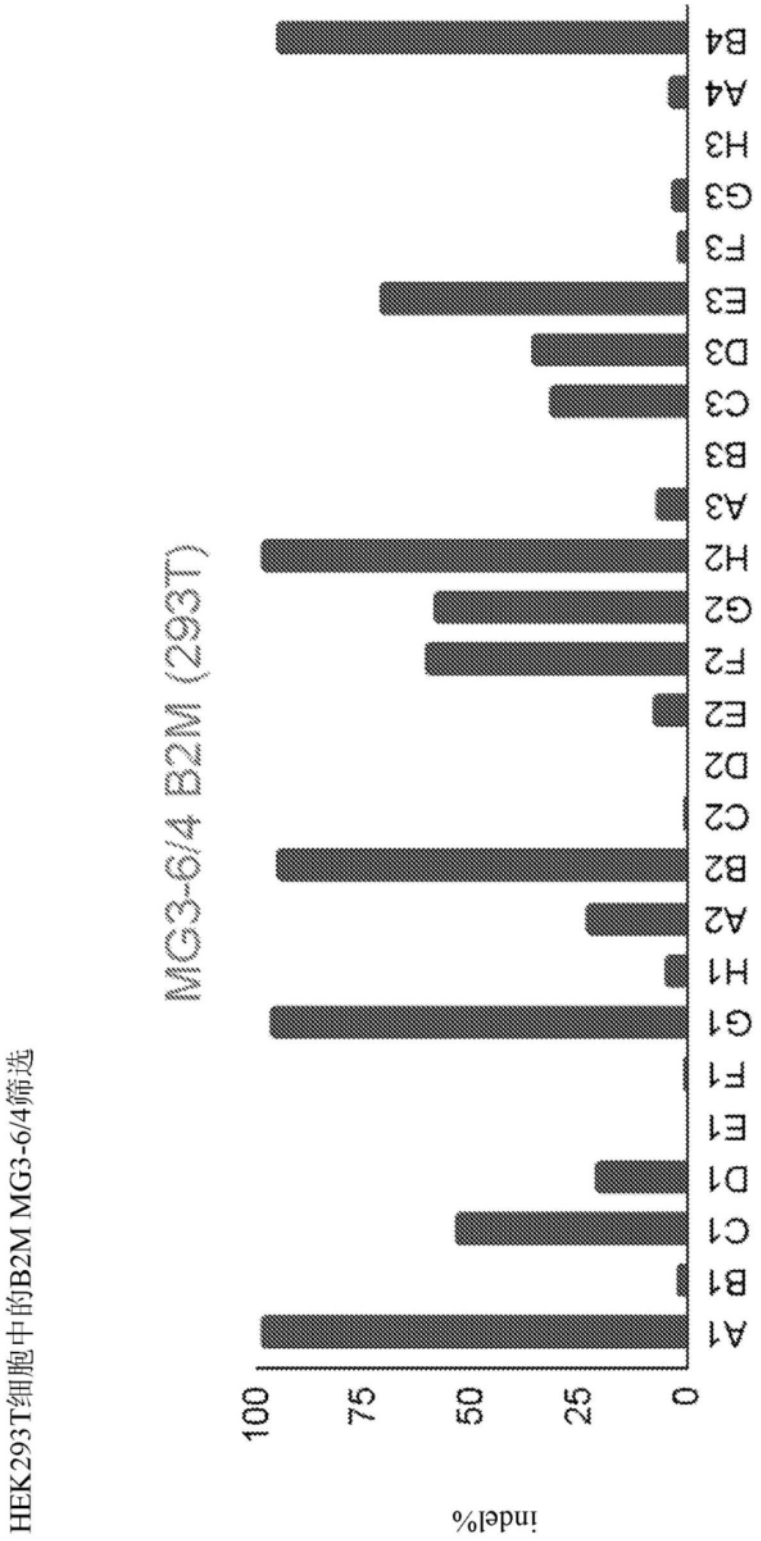

HEK293T细胞中的B2M MG3-6/4筛选
MG3-6/4 B2M (293T)
indel%
100
75
50
25
0
A1
B1
C1
D1
E1
F1
G1
H1
A2
B2
C2
D2
E2
F2
G2
H2
A3
B3
C3
D3
E3
F3
G3
H3
A4
B4

图17

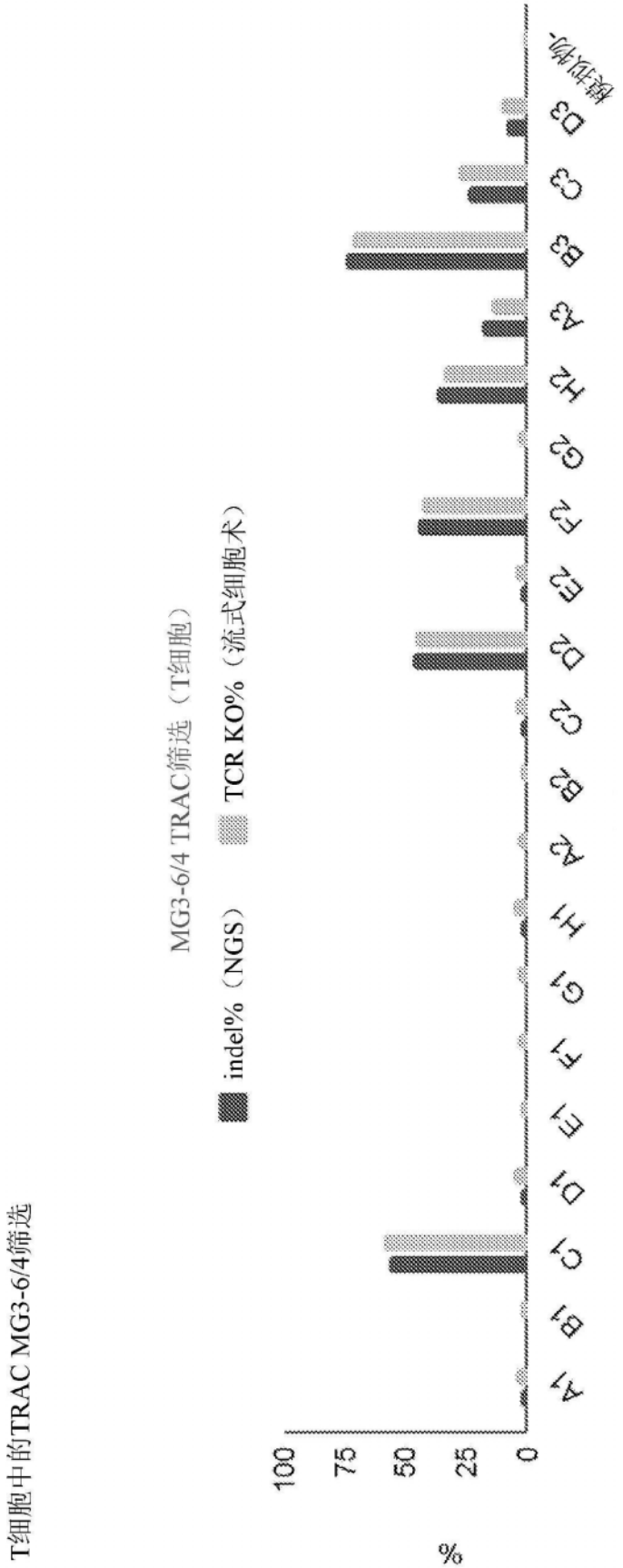

T细胞中的TRAC MG3-6/4筛选
MG3-6/4 TRAC筛选（T细胞）
indel%（NGS）
TCR KO%（流式细胞术）
%
100
75
50
25
0
A1
B1
C1
D1
E1
F1
G1
H1
A2
B2
C2
D2
E2
F2
G2
H2
A3
B3
C3
D3
靶点物

图18

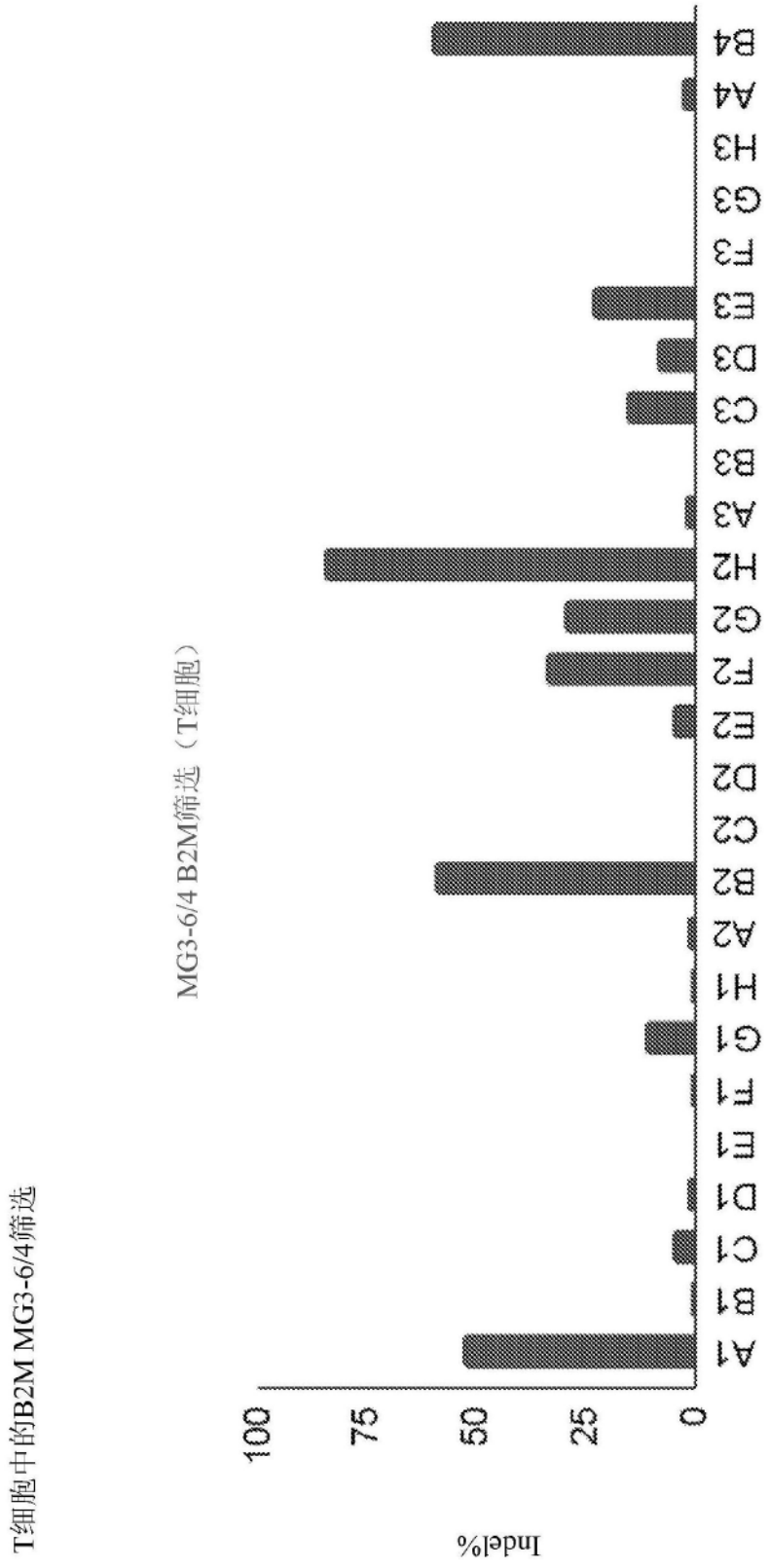

T细胞中的B2M MG3-6/4筛选
MG3-6/4 B2M筛选（T细胞）
Indel%
100
75
50
25
0
A1
B1
C1
D1
E1
F1
G1
H1
A2
B2
C2
D2
E2
F2
G2
H2
A3
B3
C3
D3
E3
F3
G3
H3
A4
B4

图19

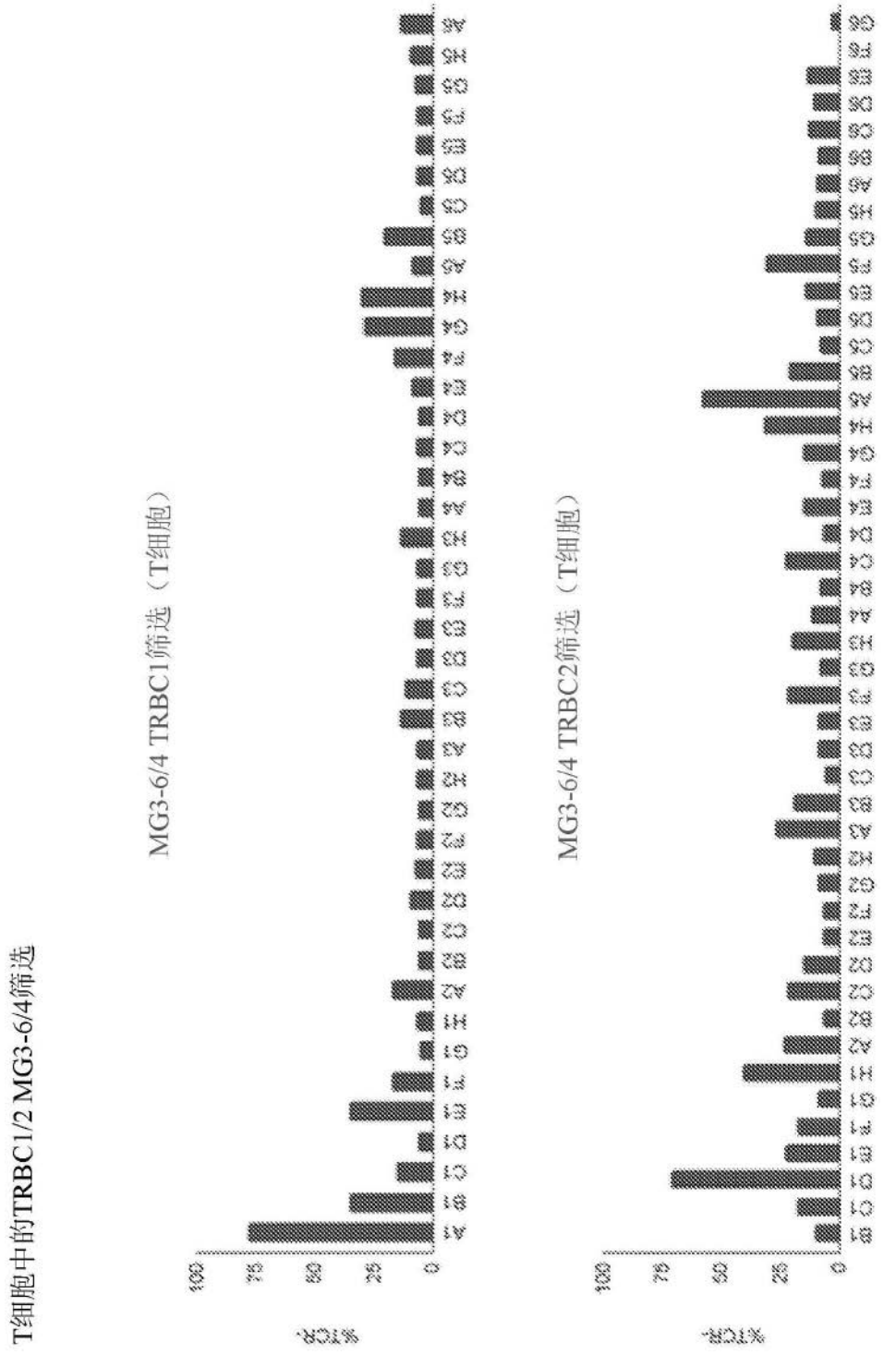

T细胞中的TRBC1/2 MG3-6/4筛选
MG3-6/4 TRBC1筛选（T细胞）
MG3-6/4 TRBC2筛选（T细胞）
%TCR-
100
75
50
25
0

图20

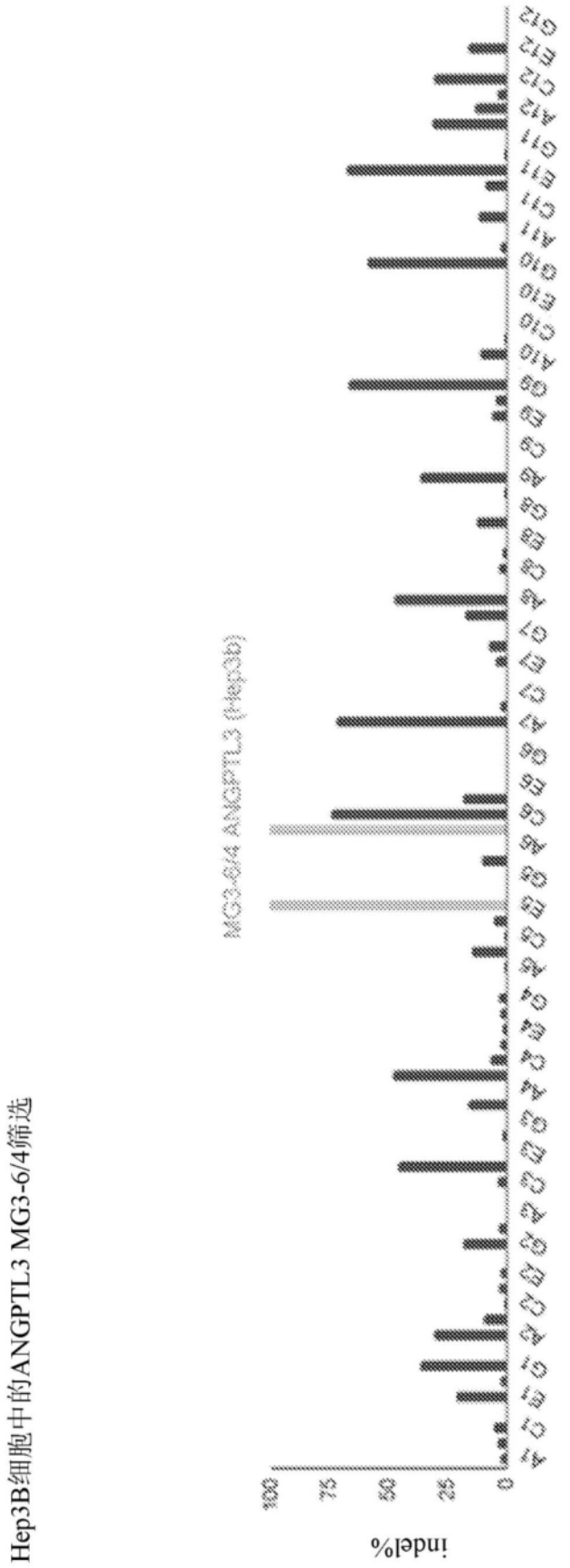

Hep3B细胞中的ANGPTL3 MG3-6/4筛选
MG3-6/4 ANGPTL3 (Hep3b)
indel%
100
75
50
25
0

图21

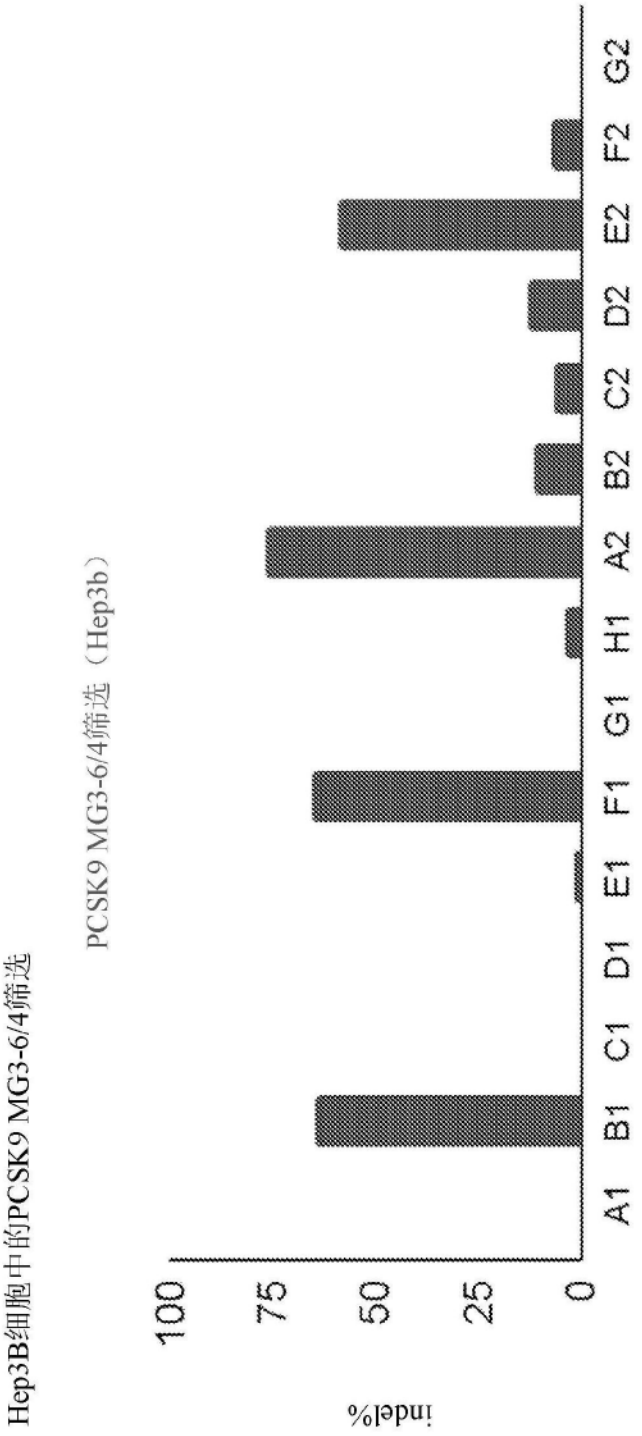

Hep3B细胞中的PCSK9 MG3-6/4筛选
PCSK9 MG3-6/4筛选（Hep3b）
indel%
100
75
50
25
0
A1
B1
C1
D1
E1
F1
G1
H1
A2
B2
C2
D2
E2
F2
G2

图22

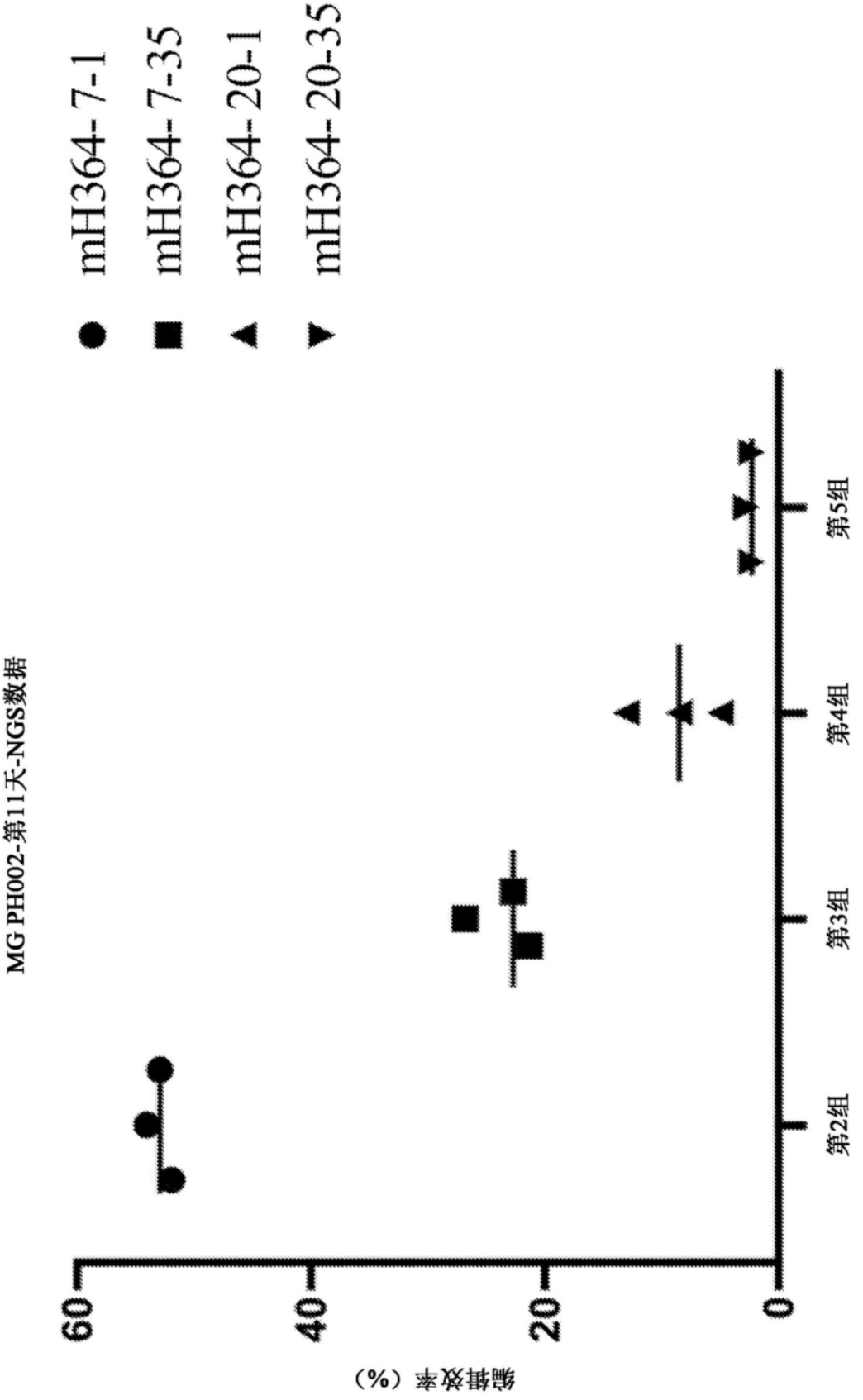

MG PH002-第11天-NGS数据
mH364-7-1
mH364-7-35
mH364-20-1
mH364-20-35
编辑效率（%）
60
40
20
0
第2组
第3组
第4组
第5组

图23

蛋白质印迹的定量

向导RNA	化学物质	小鼠	GO蛋白敲低%#	平均GO蛋白敲低%
mH364-7-1	1	6	65	75
		7	86	
mH364-7-35	35	11	56	58
		12	60	
mH364-20-1	1	16	4	4
		17	4	
mH364-20-35	35	21	21	24
		22	26	

#相对于黏着斑蛋白归一化的GO蛋白水平，以相对于未经处理对照的%表示

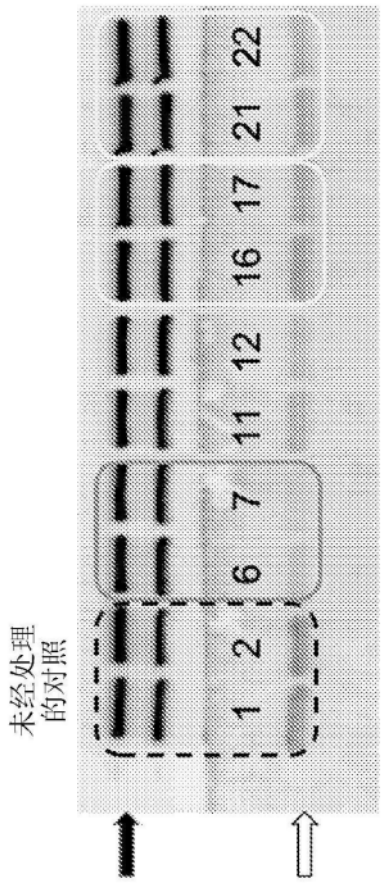


图24

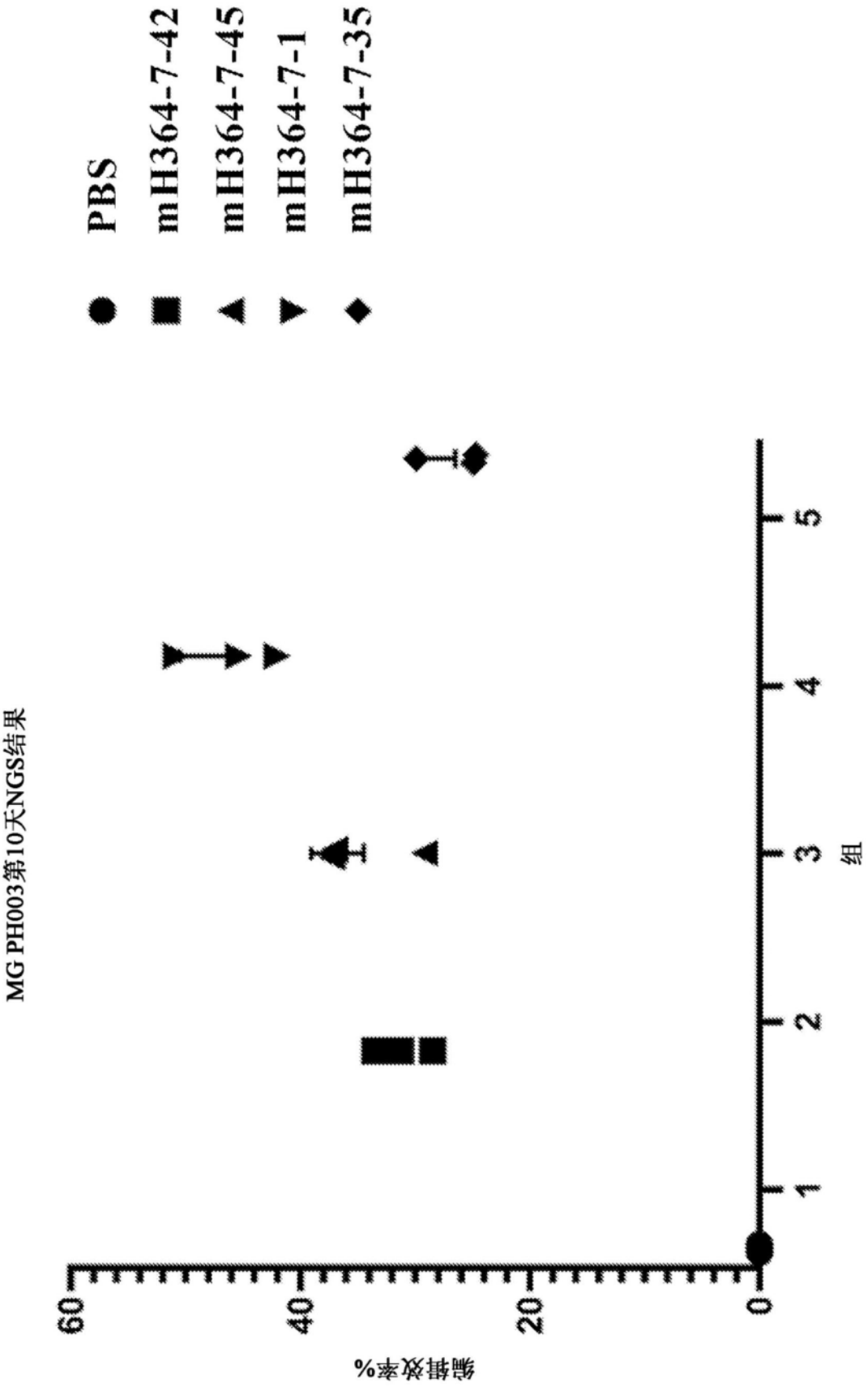

MG PH003第10天NGS结果
PBS
mH364-7-42
mH364-7-45
mH364-7-1
mH364-7-35
编辑效率%
0
20
40
60
1
2
3
4
5
组

图25

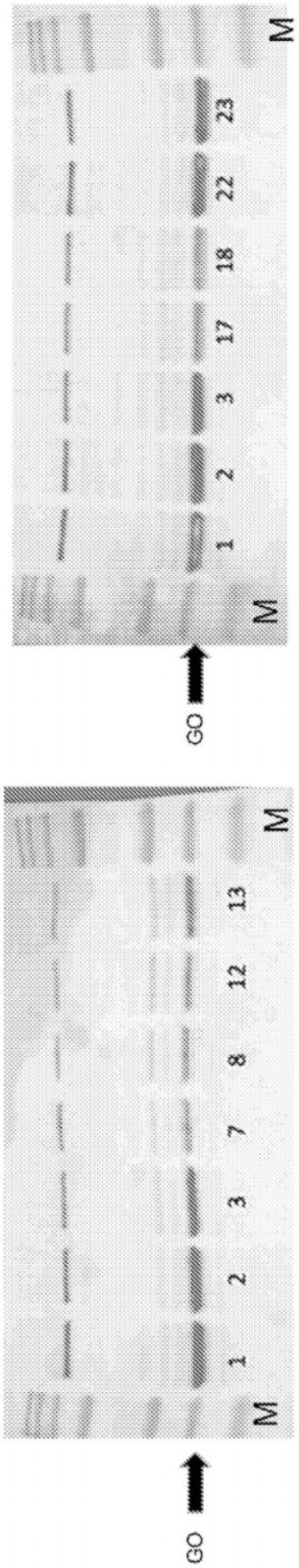


图26

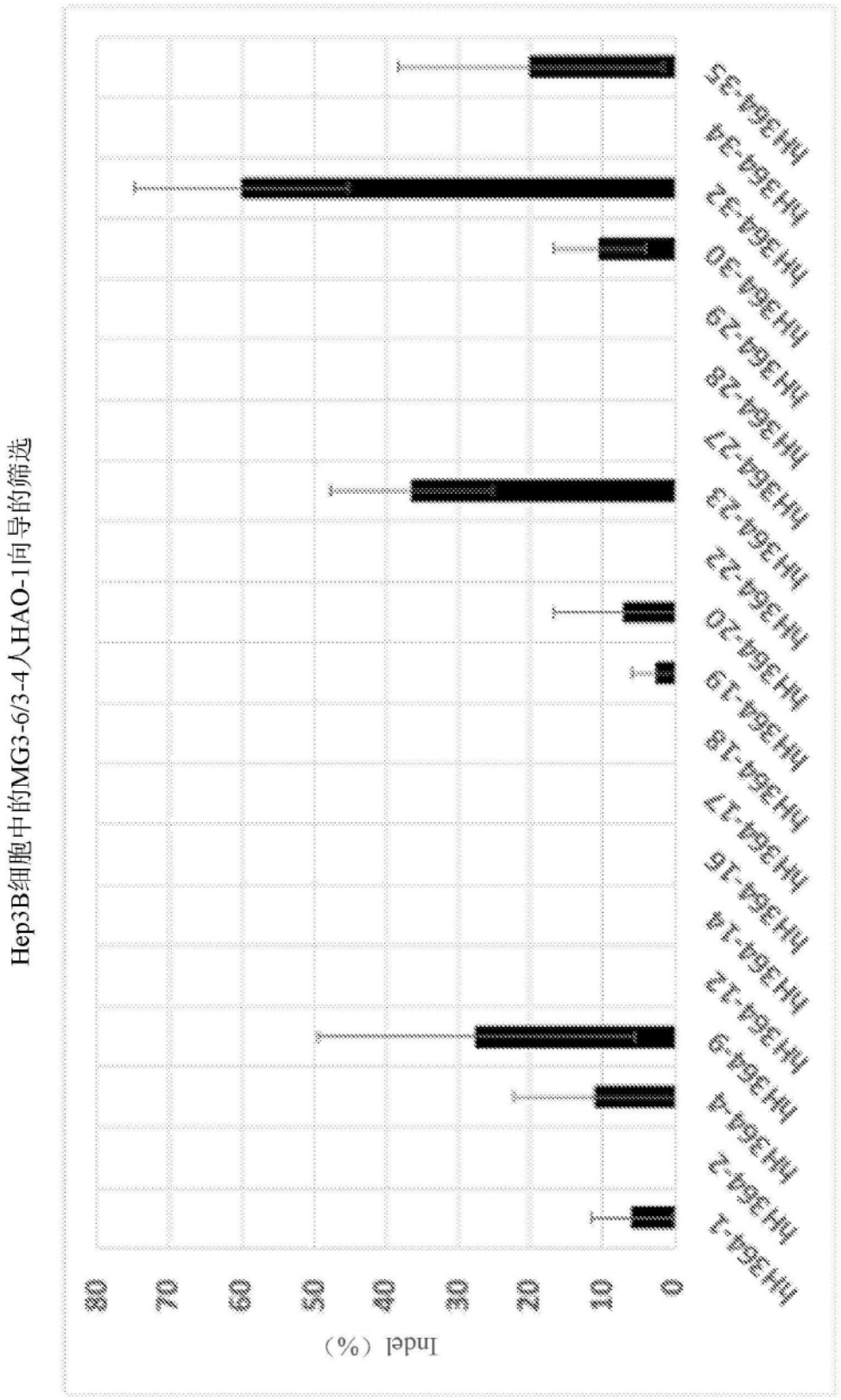

Hep3B细胞中的MG3-6/3-4人HAO-1向导的筛选
Indel（%）
0
10
20
30
40
50
60
70
80
HH3Ga-1
HH3Ga-2
HH3Ga-4
HH3Ga-9
HH3Ga-12
HH3Ga-14
HH3Ga-16
HH3Ga-17
HH3Ga-18
HH3Ga-19
HH3Ga-20
HH3Ga-22
HH3Ga-23
HH3Ga-27
HH3Ga-28
HH3Ga-29
HH3Ga-30
HH3Ga-32
HH3Ga-34
HH3Ga-35

图27

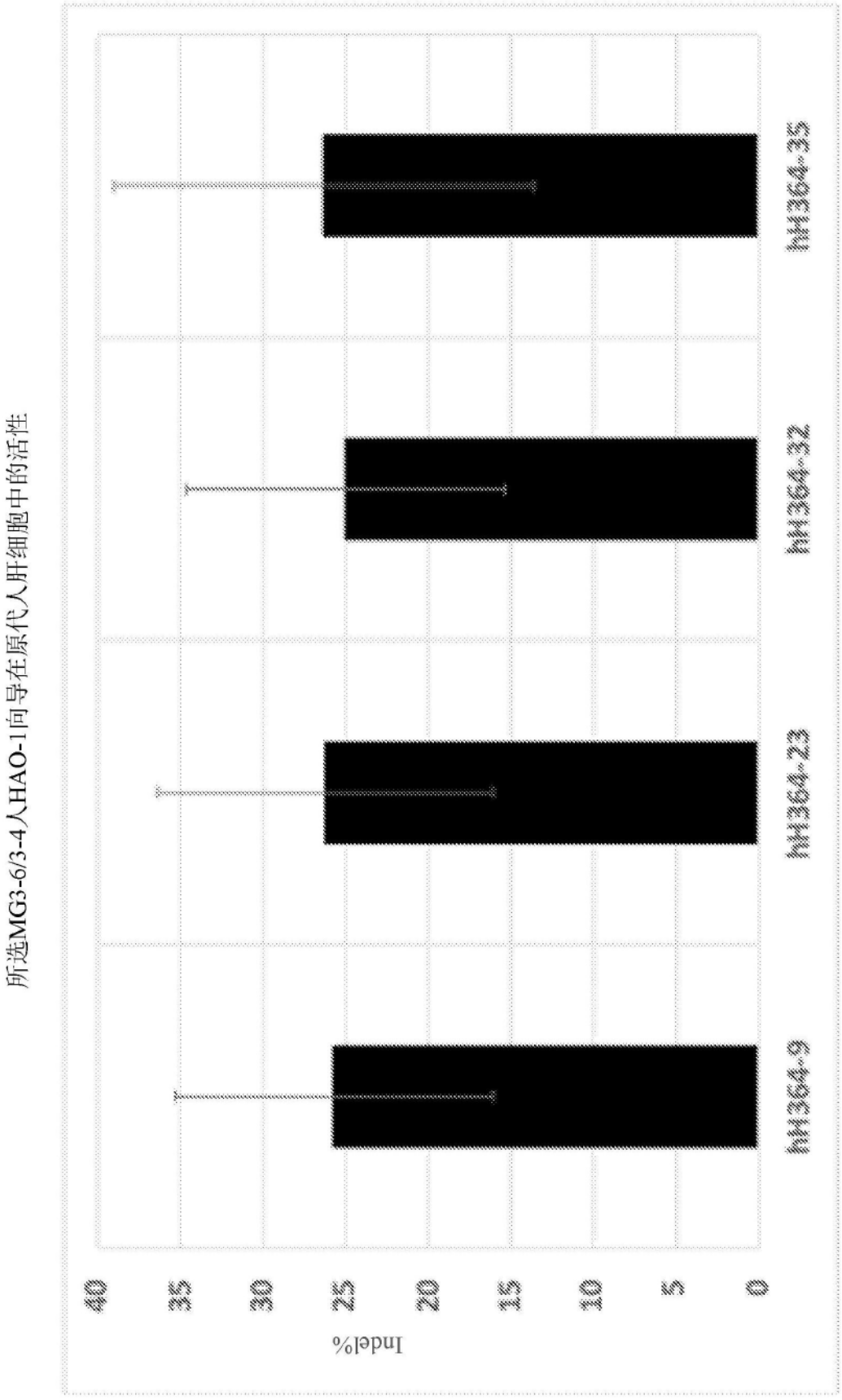

所选MG3-6/3-4人HAO-1向导在原代人肝细胞中的活性
Indel%
40
35
30
25
20
15
10
5
0
hH364-9
hH364-23
hH364-32
hH364-35

图28

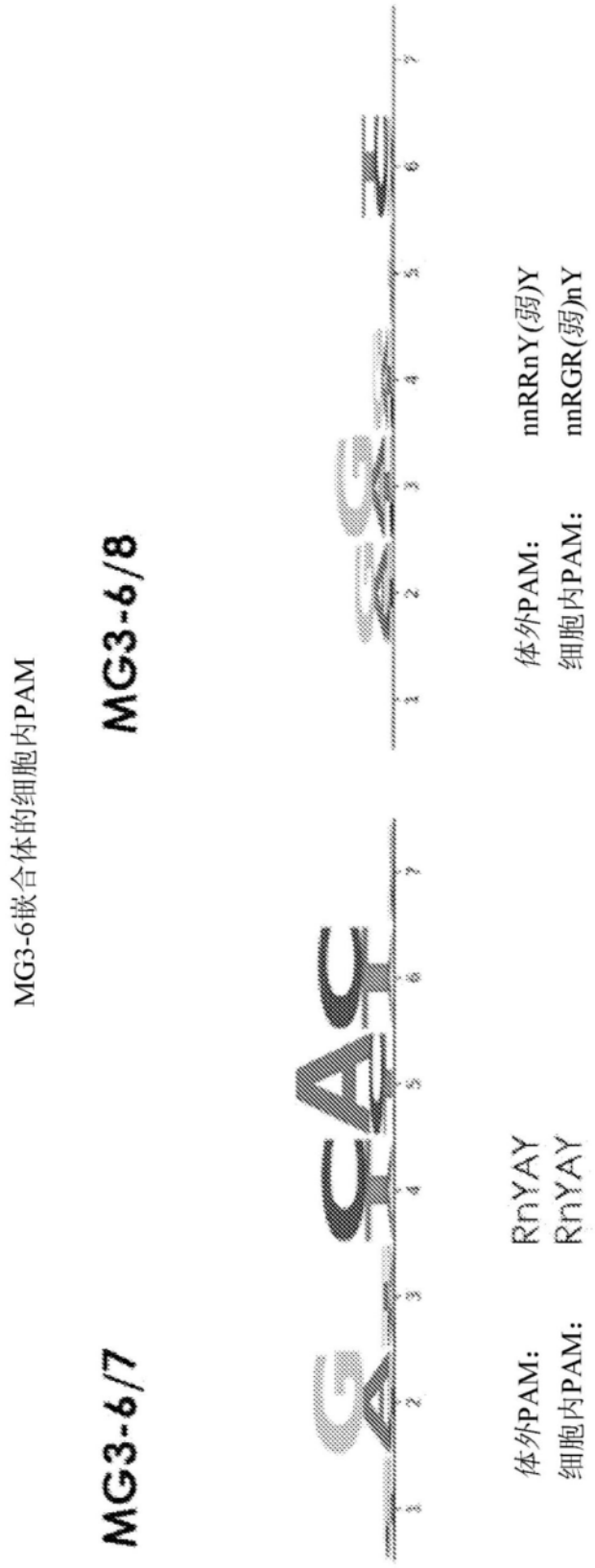

MG3-6嵌合体的细胞内PAM
MG3-6/7
体外PAM: RnYAY
细胞内PAM: RnYAY
MG3-6/8
体外PAM: nnRRnY(弱)Y
细胞内PAM: nnRGR(弱)nY

图29

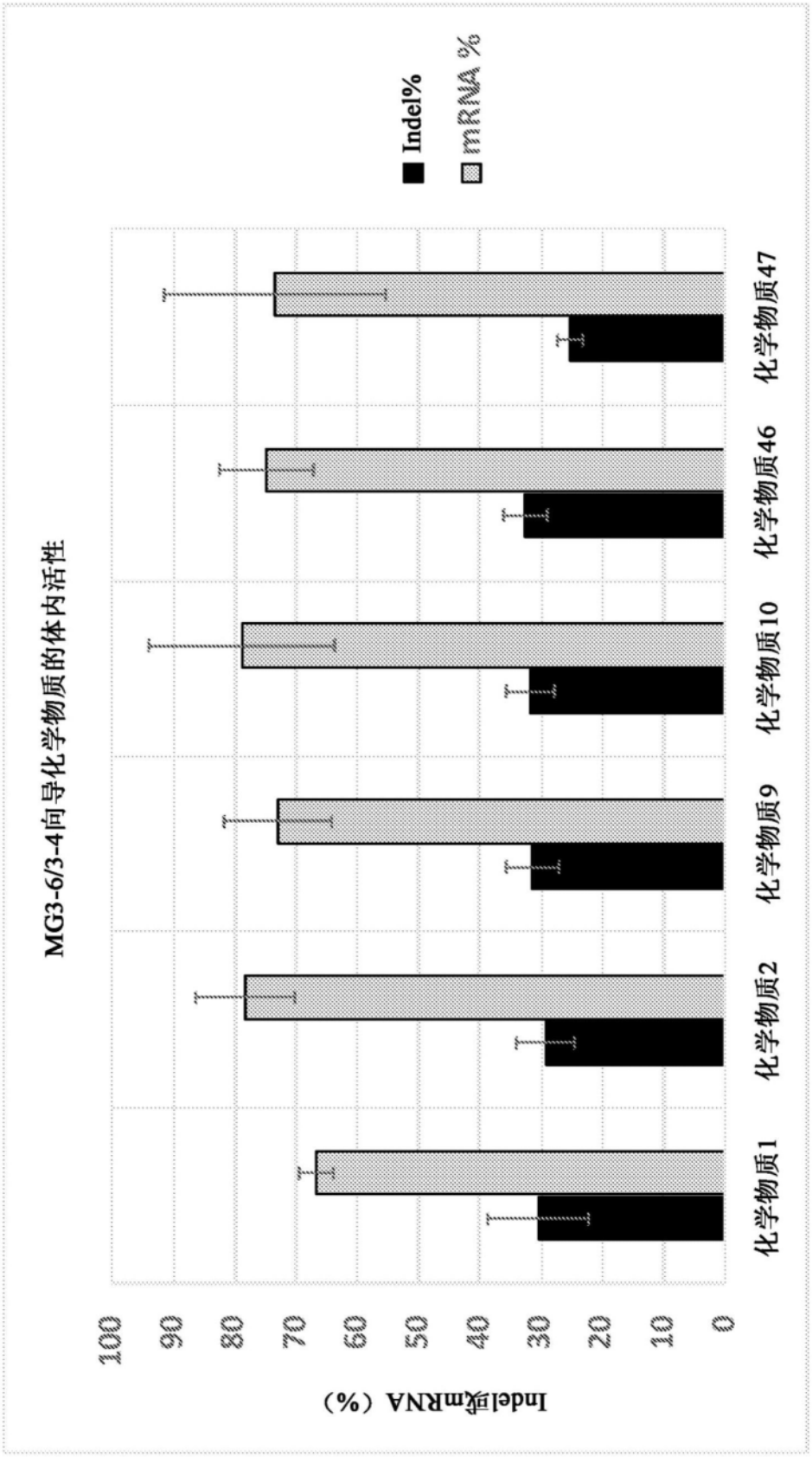

MG3-6/3-4向导化学物质的体内活性
Indel或mRNA（%）
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Indel%
mRNA %
化学物质1
化学物质2
化学物质9
化学物质10
化学物质46
化学物质47

图30

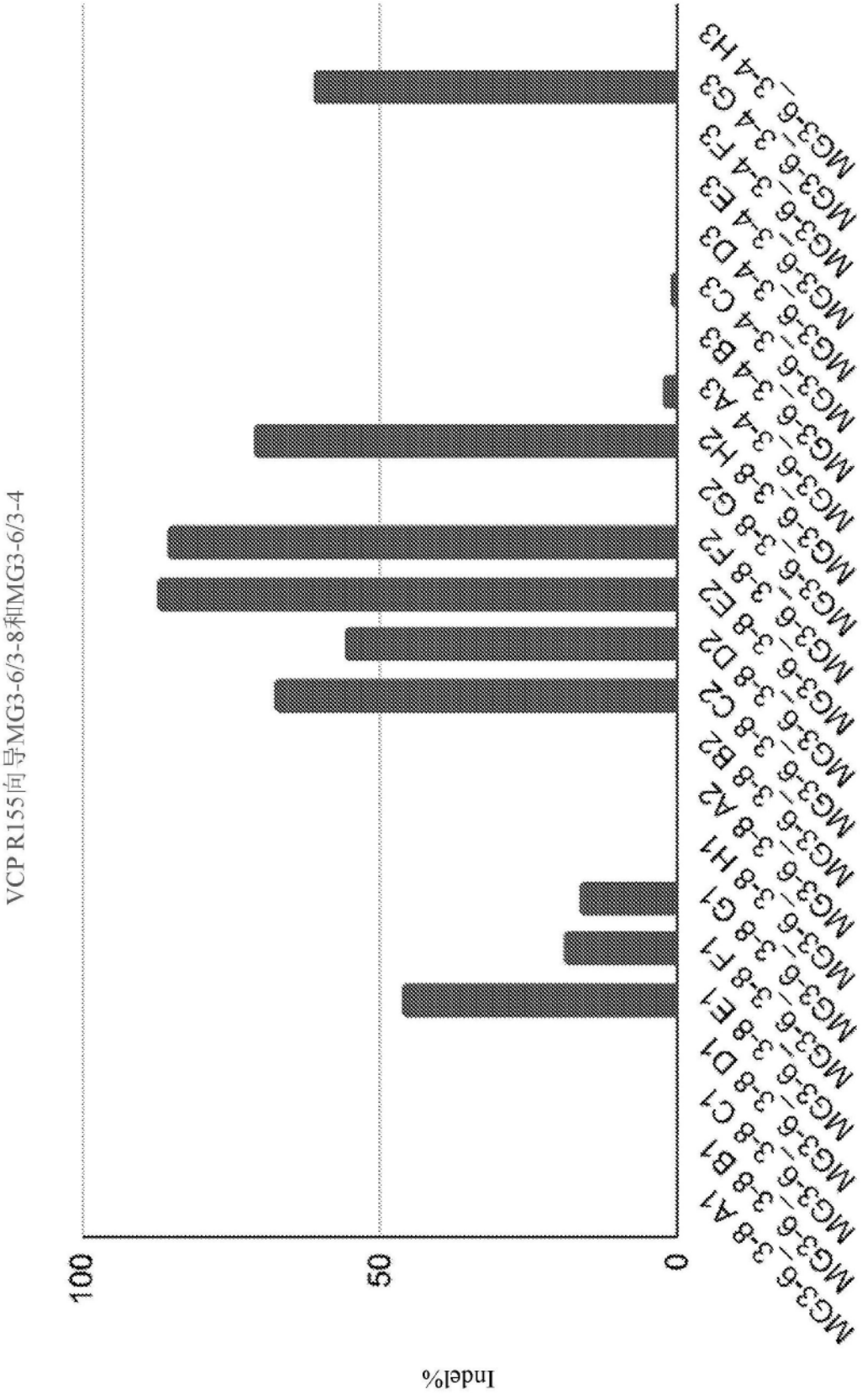

VCP R155向导MG3-6/3-8和MG3-6/3-4
Indel%
100
50
0
MG3-6_3-8 A1
MG3-6_3-8 B1
MG3-6_3-8 C1
MG3-6_3-8 D1
MG3-6_3-8 E1
MG3-6_3-8 F1
MG3-6_3-8 G1
MG3-6_3-8 H1
MG3-6_3-8 A2
MG3-6_3-8 B2
MG3-6_3-8 C2
MG3-6_3-8 D2
MG3-6_3-8 E2
MG3-6_3-8 F2
MG3-6_3-8 G2
MG3-6_3-8 H2
MG3-6_3-4 A3
MG3-6_3-4 B3
MG3-6_3-4 C3
MG3-6_3-4 D3
MG3-6_3-4 E3
MG3-6_3-4 F3
MG3-6_3-4 G3
MG3-6_3-4 H3

图31

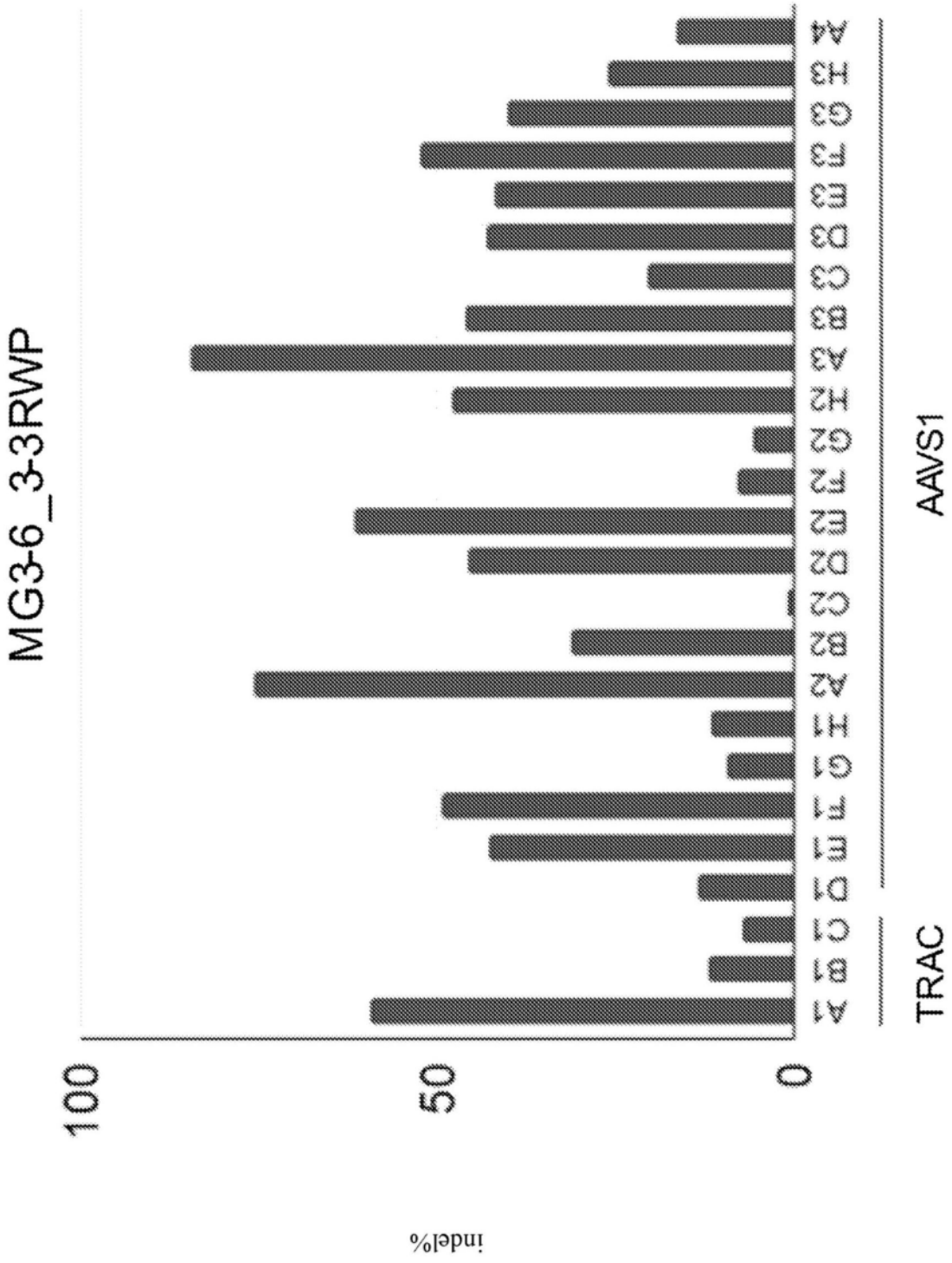

MG3-6_3-3RWP
100
50
0
indel%
A1
B1
C1
D1
E1
F1
G1
H1
A2
B2
C2
D2
E2
F2
G2
H2
A3
B3
C3
D3
E3
F3
G3
H3
A4
TRAC
AAVS1

图32

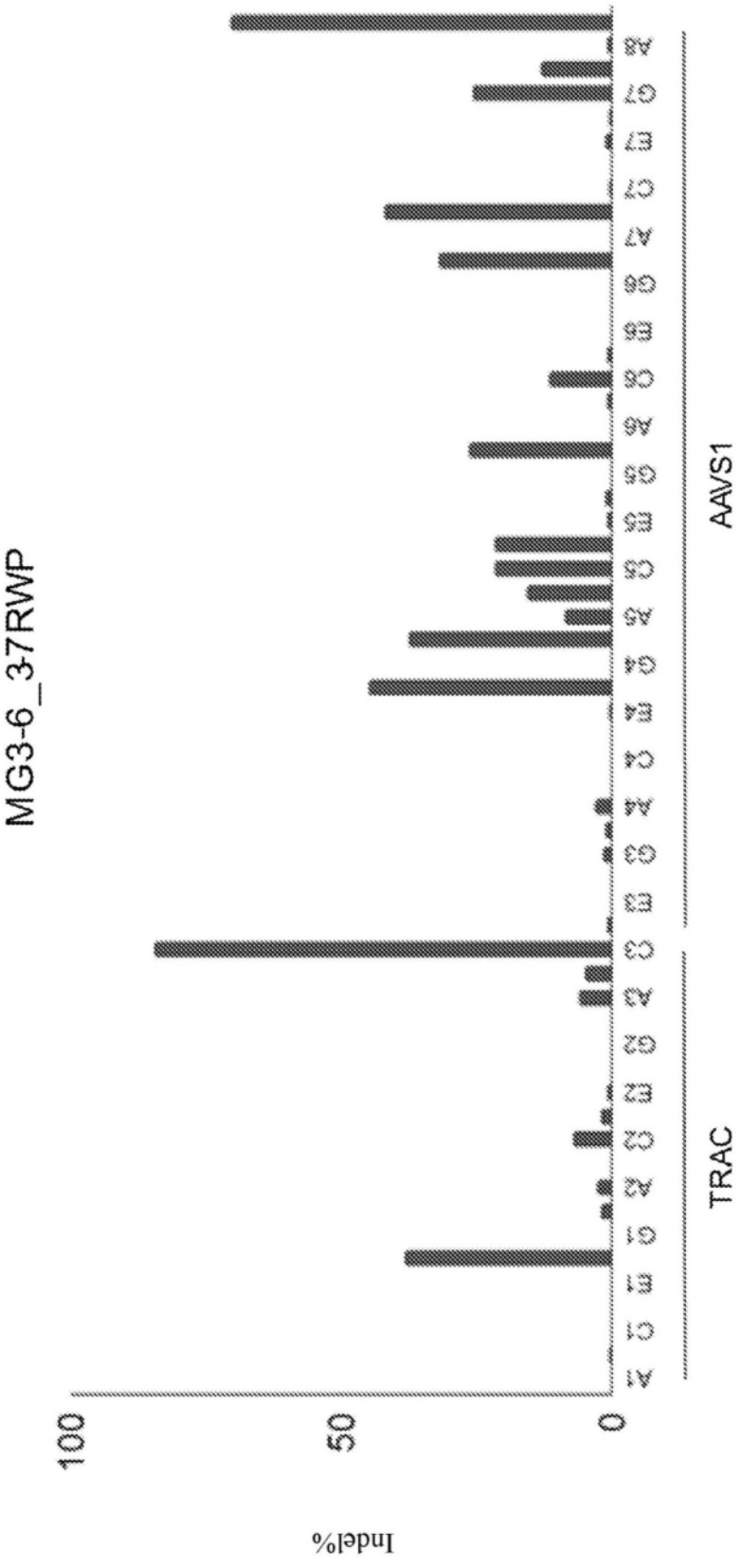

MG3-6_37RWP
Indel%
100
50
0
A1
C1
E1
G1
A2
C2
E2
G2
A3
C3
E3
G3
A4
C4
E4
G4
A5
C5
E5
G5
A6
C6
E6
G6
A7
C7
E7
G7
A8
TRAC
AAVS1

图33

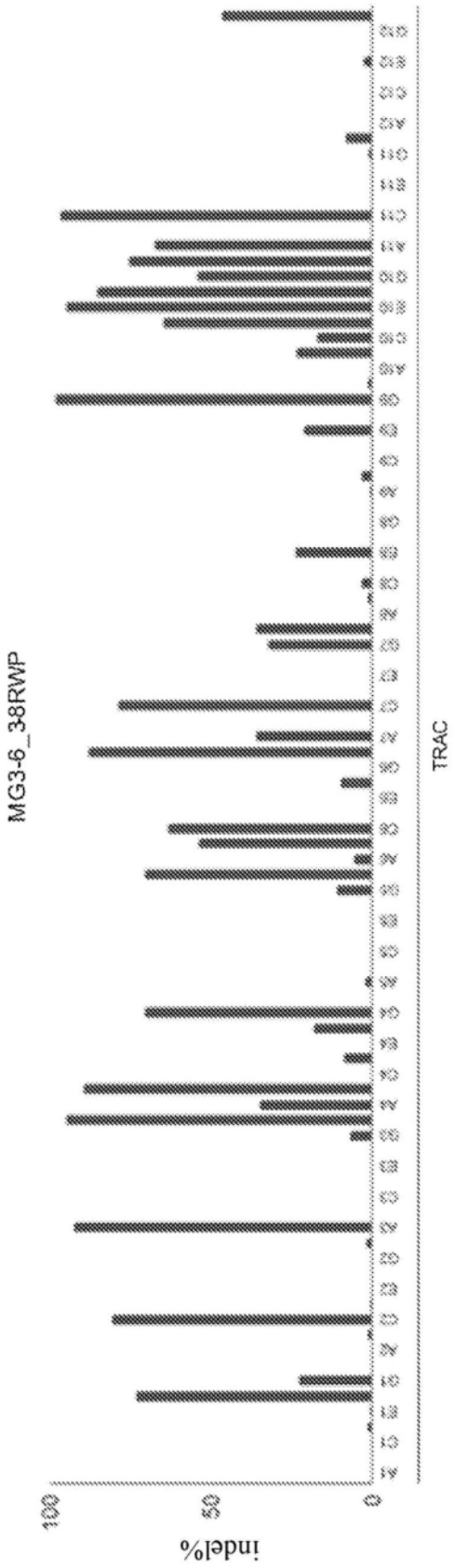


图34

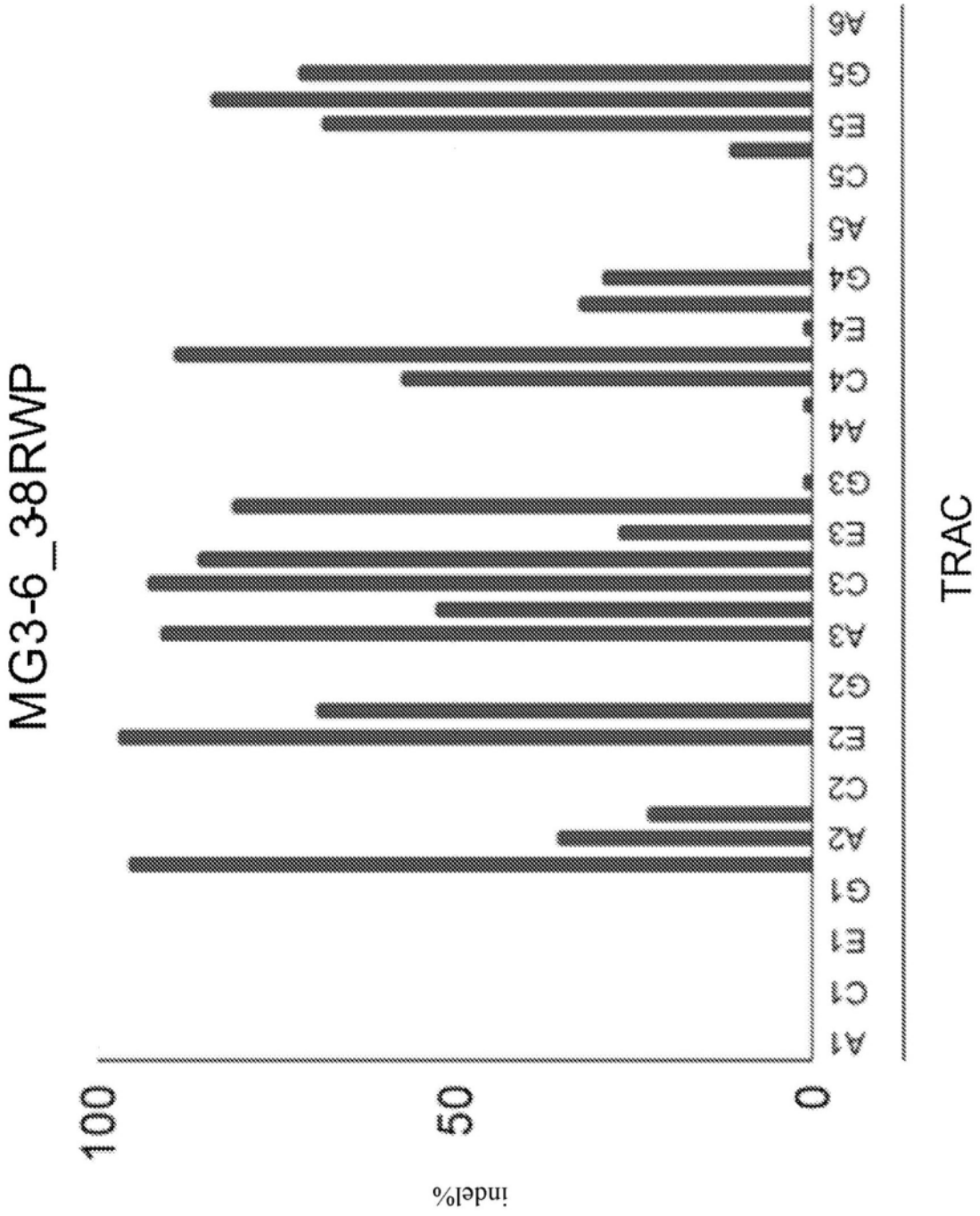

MG3-6_3-8RWP
TRAC
indel%
100
50
0
A1
C1
E1
G1
A2
C2
E2
G2
A3
C3
E3
G3
A4
C4
E4
G4
A5
C5
E5
G5
A6

图35

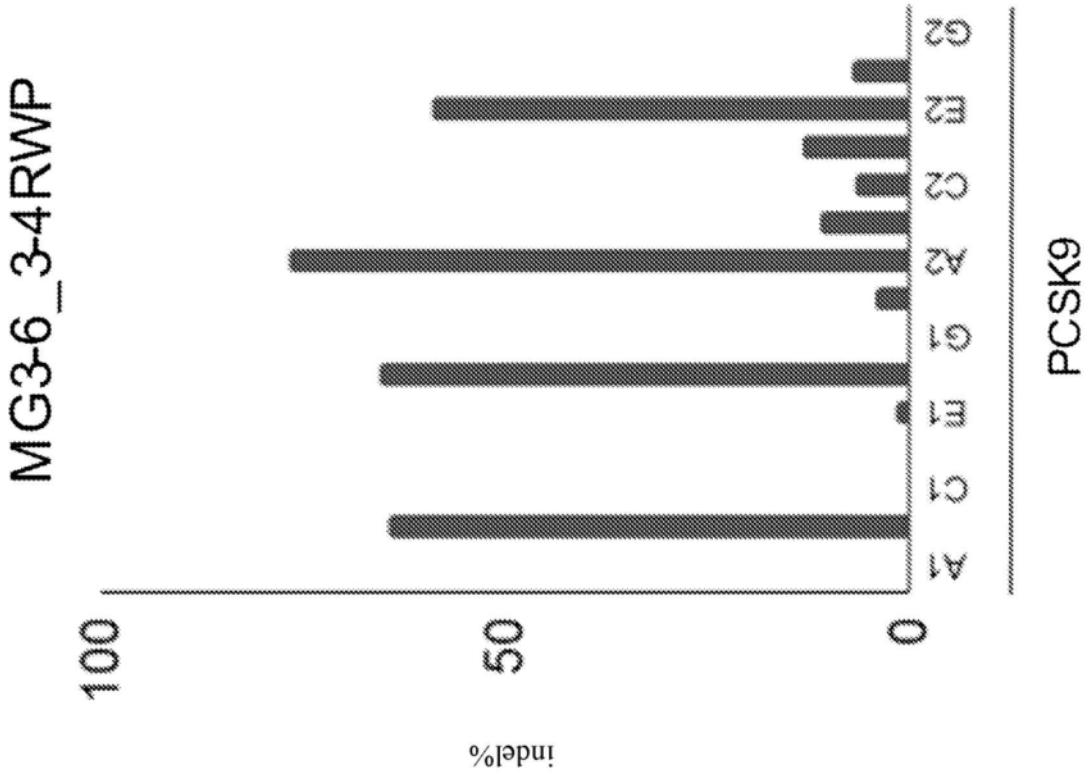


图36

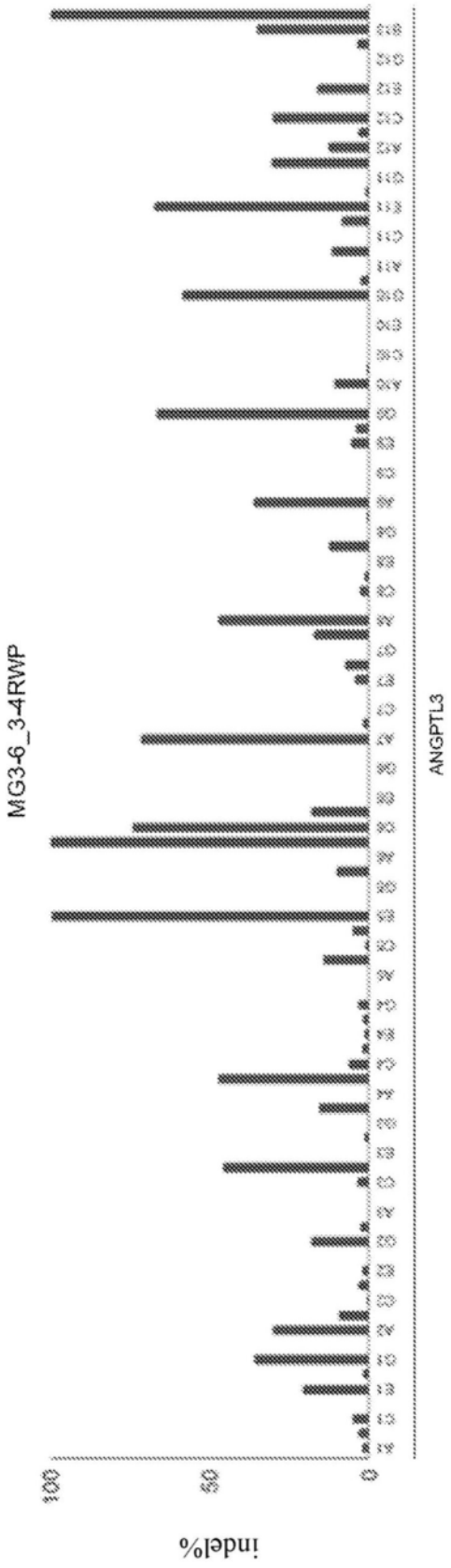


图37

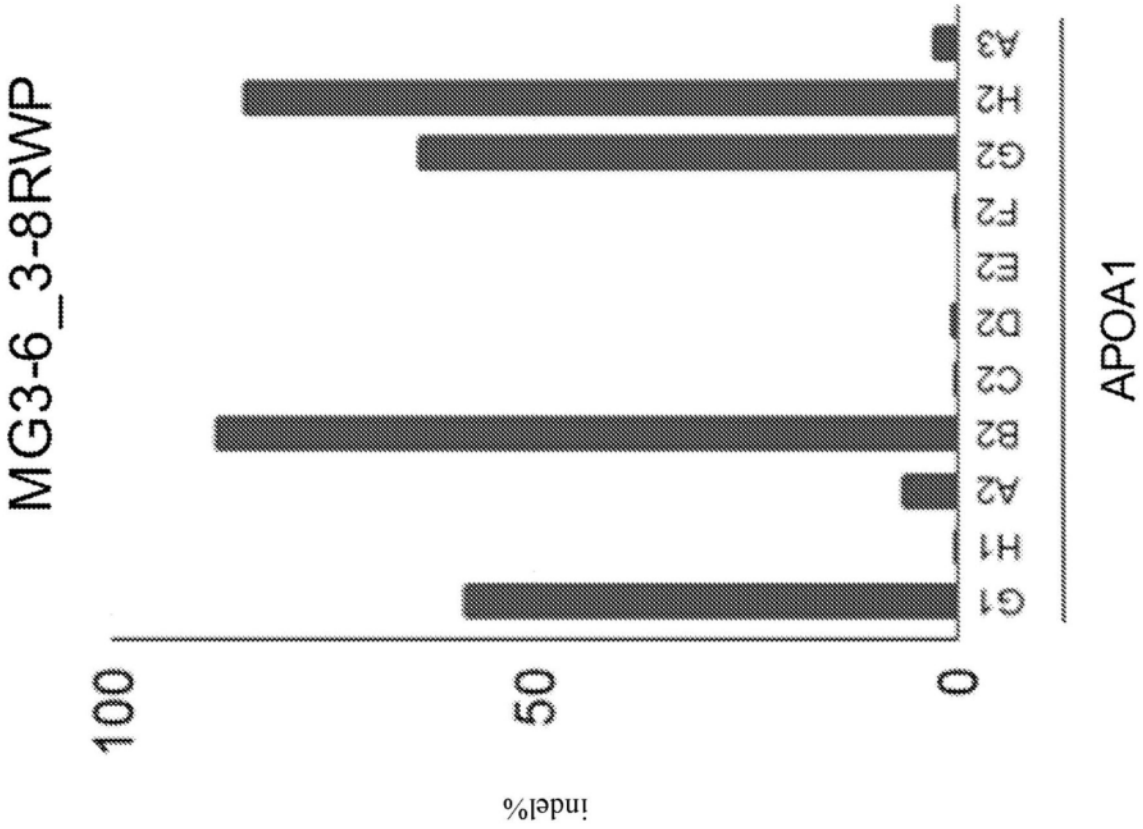


图38

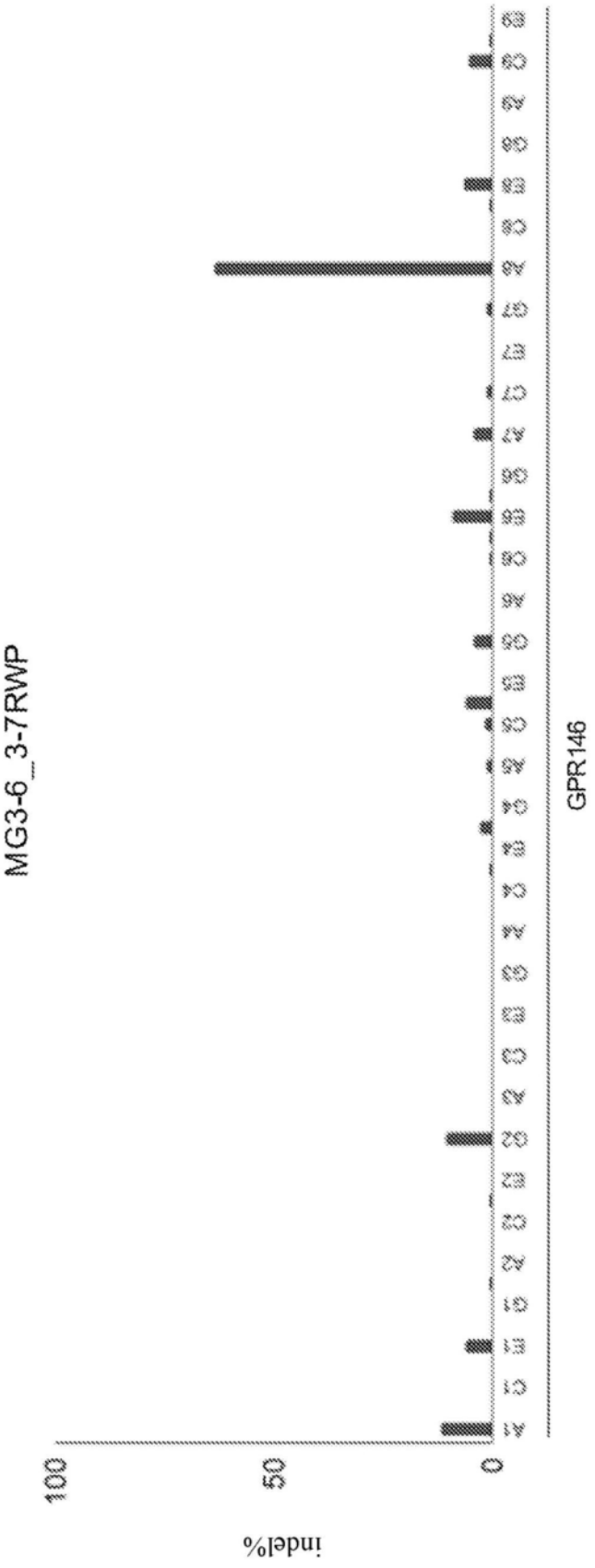


图39

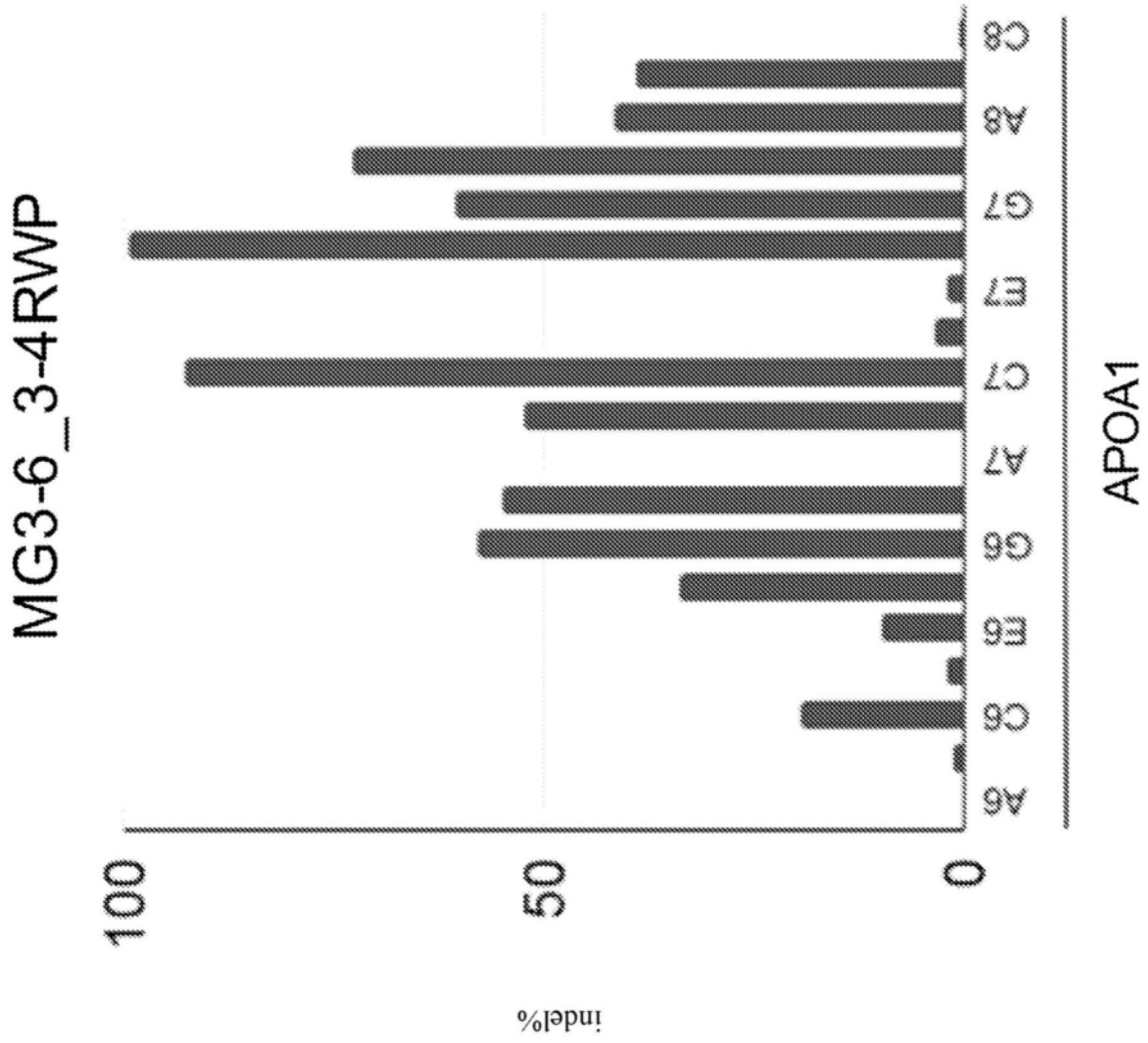


图40

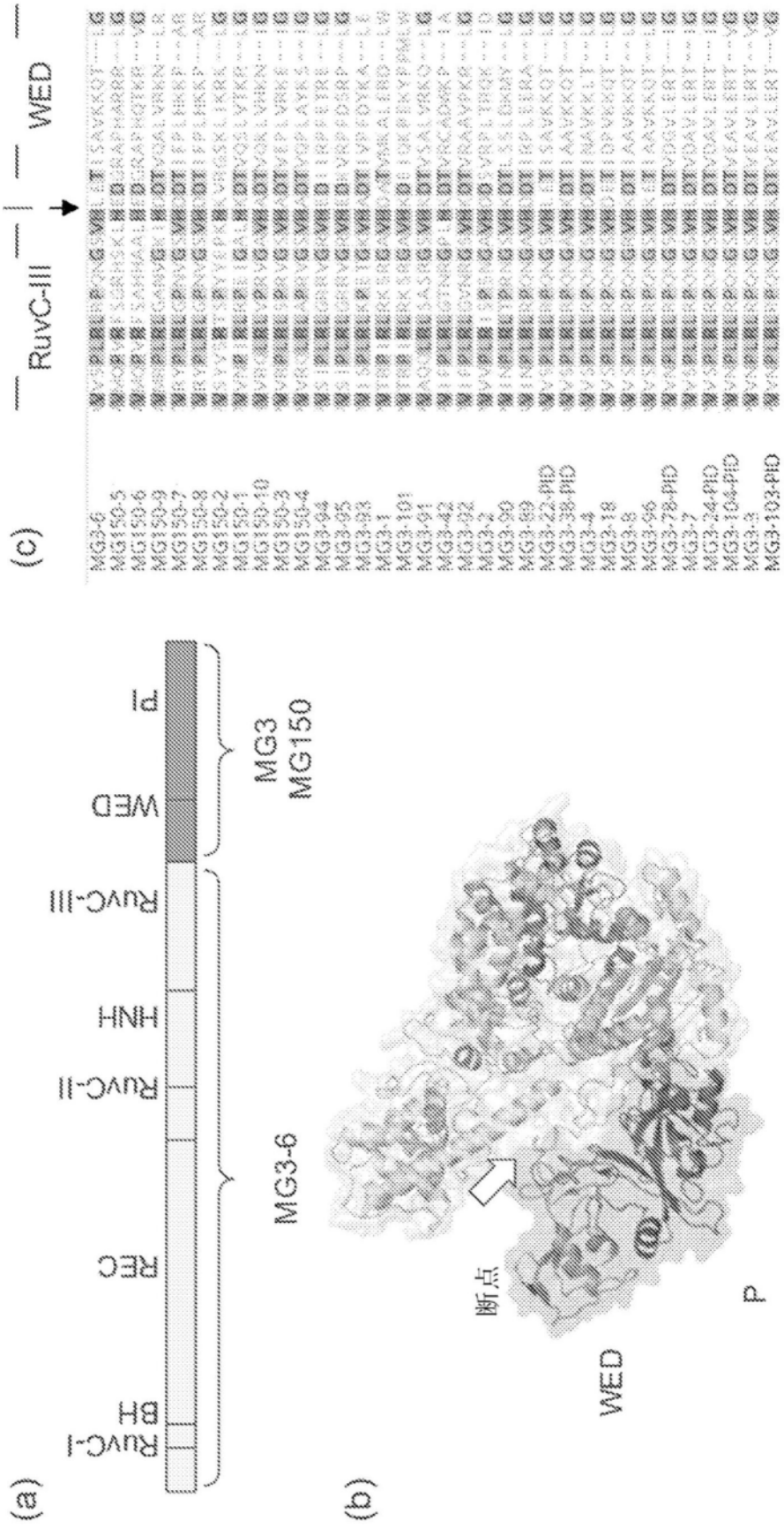

(c)
RuvC-III
WED
MG3-6
MG150-5
MG150-6
MG150-9
MG150-7
MG150-8
MG150-2
MG150-1
MG150-10
MG150-3
MG150-4
MG3-94
MG3-95
MG3-93
MG3-1
MG3-101
MG3-91
MG3-42
MG3-92
MG3-2
MG3-90
MG3-89
MG3-22-PID
MG3-38-PID
MG3-4
MG3-18
MG3-8
MG3-96
MG3-78-PID
MG3-7
MG3-24-PID
MG3-104-PID
MG3-5
MG3-103-PID
(a)
RuvC-I
BH
REC
RuvC-II
HNH
RuvC-III
WED
PI
MG3-6
MG3
MG150
(b)
WED
断点
P

图41

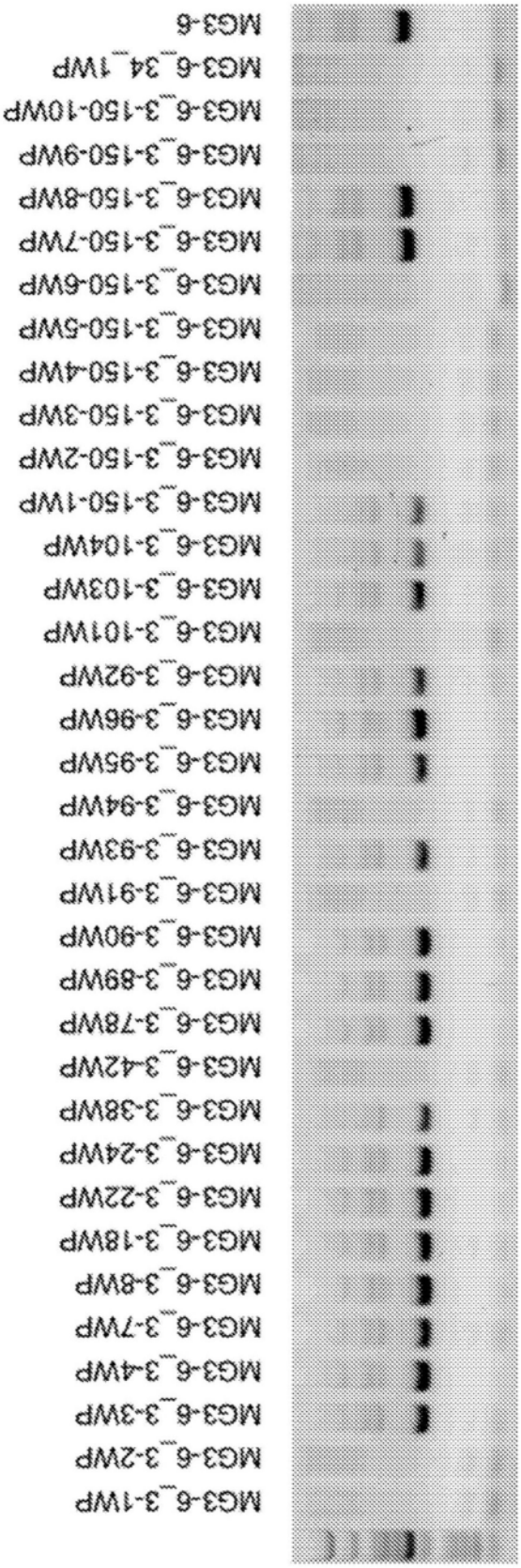

MG3-6
MG3-6_34_1WP
MG3-6_3-150-10WP
MG3-6_3-150-9WP
MG3-6_3-150-8WP
MG3-6_3-150-7WP
MG3-6_3-150-6WP
MG3-6_3-150-5WP
MG3-6_3-150-4WP
MG3-6_3-150-3WP
MG3-6_3-150-2WP
MG3-6_3-150-1WP
MG3-6_3-104WP
MG3-6_3-103WP
MG3-6_3-101WP
MG3-6_3-92WP
MG3-6_3-96WP
MG3-6_3-95WP
MG3-6_3-94WP
MG3-6_3-93WP
MG3-6_3-91WP
MG3-6_3-90WP
MG3-6_3-89WP
MG3-6_3-78WP
MG3-6_3-42WP
MG3-6_3-38WP
MG3-6_3-24WP
MG3-6_3-22WP
MG3-6_3-18WP
MG3-6_3-8WP
MG3-6_3-7WP
MG3-6_3-4WP
MG3-6_3-3WP
MG3-6_3-2WP
MG3-6_3-1WP

图42A

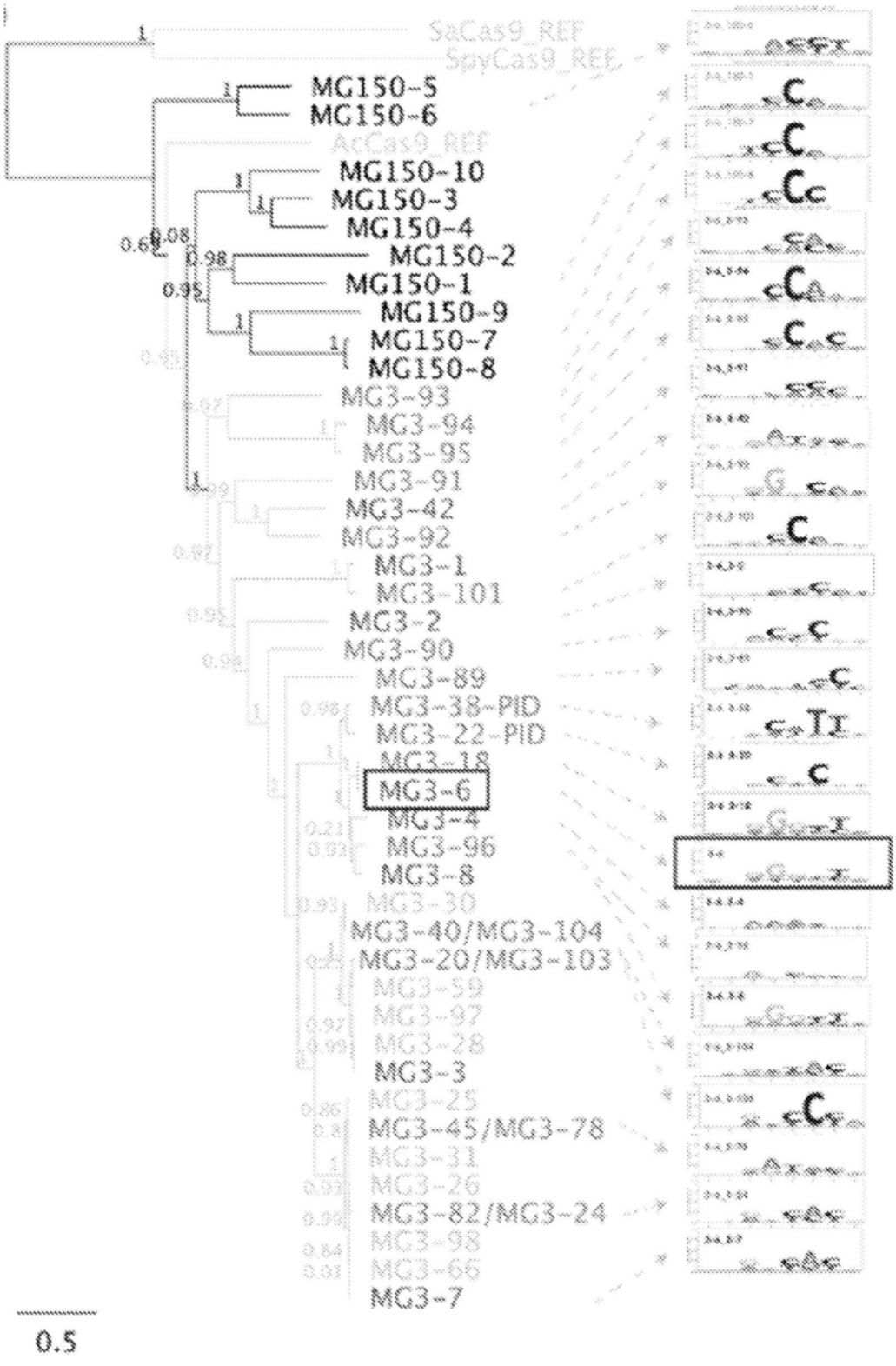

SaCas9_REF
SpyCas9_REF
MG150-5
MG150-6
AcCas9_REF
MG150-10
MG150-3
MG150-4
MG150-2
MG150-1
MG150-9
MG150-7
MG150-8
MG3-93
MG3-94
MG3-95
MG3-91
MG3-42
MG3-92
MG3-1
MG3-101
MG3-2
MG3-90
MG3-89
MG3-38-PID
MG3-22-PID
MG3-18
MG3-6
MG3-4
MG3-96
MG3-8
MG3-30
MG3-40/MG3-104
MG3-20/MG3-103
MG3-59
MG3-97
MG3-28
MG3-3
MG3-25
MG3-45/MG3-78
MG3-31
MG3-26
MG3-82/MG3-24
MG3-98
MG3-66
MG3-7
0.5

图42B

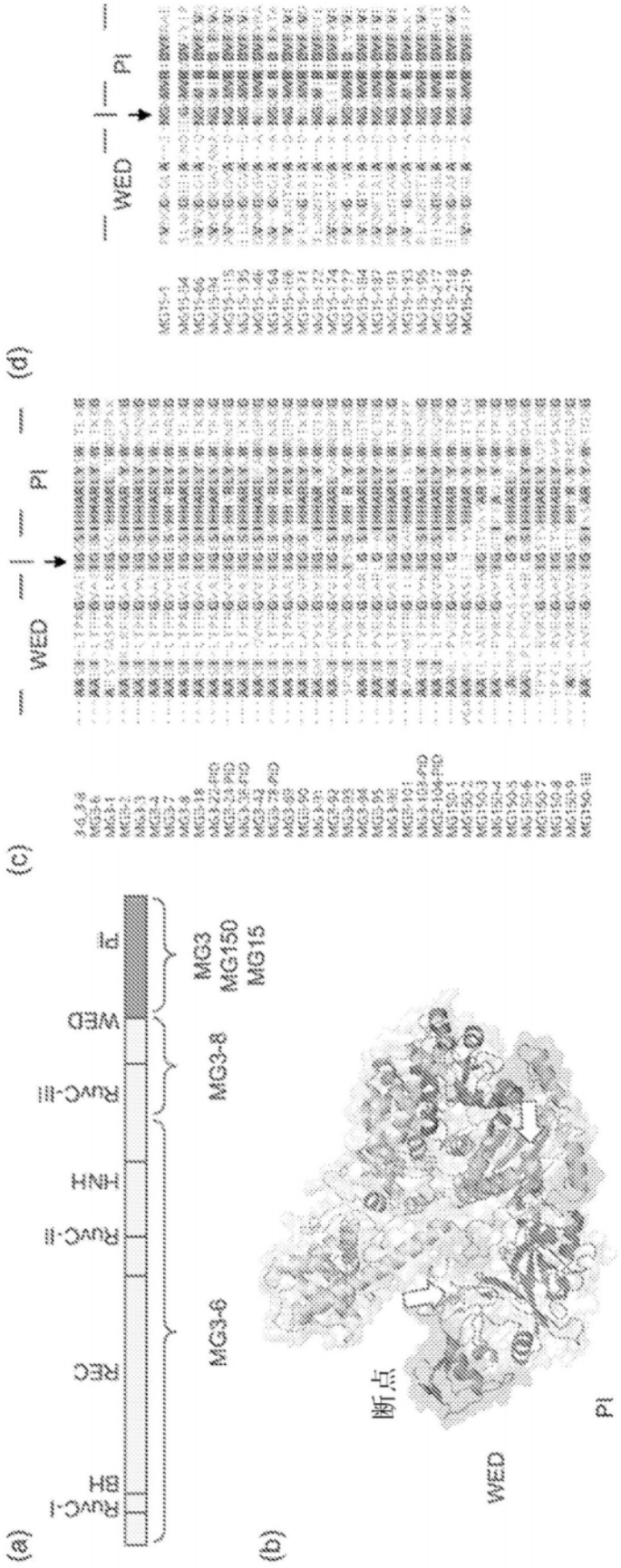

(a)
RuvC-I
BH
REC
RuvC-II
HNH
RuvC-III
WED
PI
MG3
MG150
MG15
MG3-8
MG3-6
(b)
断点
WED
PI
(c)
(d)
WED
PI

图43

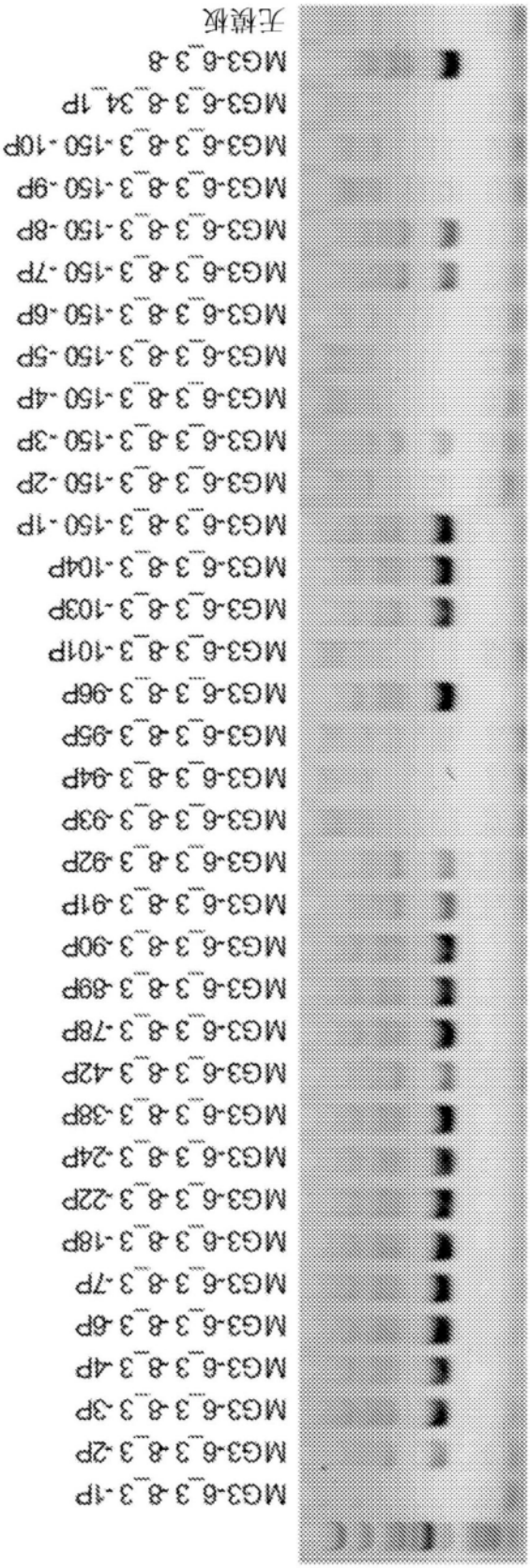

无模板
MG3-6_3-8
MG3-6_3-8_34_1P
MG3-6_3-8_3-150-10P
MG3-6_3-8_3-150-9P
MG3-6_3-8_3-150-8P
MG3-6_3-8_3-150-7P
MG3-6_3-8_3-150-6P
MG3-6_3-8_3-150-5P
MG3-6_3-8_3-150-4P
MG3-6_3-8_3-150-3P
MG3-6_3-8_3-150-2P
MG3-6_3-8_3-150-1P
MG3-6_3-8_3-104P
MG3-6_3-8_3-103P
MG3-6_3-8_3-101P
MG3-6_3-8_3-96P
MG3-6_3-8_3-95P
MG3-6_3-8_3-94P
MG3-6_3-8_3-93P
MG3-6_3-8_3-92P
MG3-6_3-8_3-91P
MG3-6_3-8_3-90P
MG3-6_3-8_3-89P
MG3-6_3-8_3-78P
MG3-6_3-8_3-42P
MG3-6_3-8_3-38P
MG3-6_3-8_3-24P
MG3-6_3-8_3-22P
MG3-6_3-8_3-18P
MG3-6_3-8_3-7P
MG3-6_3-8_3-6P
MG3-6_3-8_3-4P
MG3-6_3-8_3-3P
MG3-6_3-8_3-2P
MG3-6_3-8_3-1P

图44A

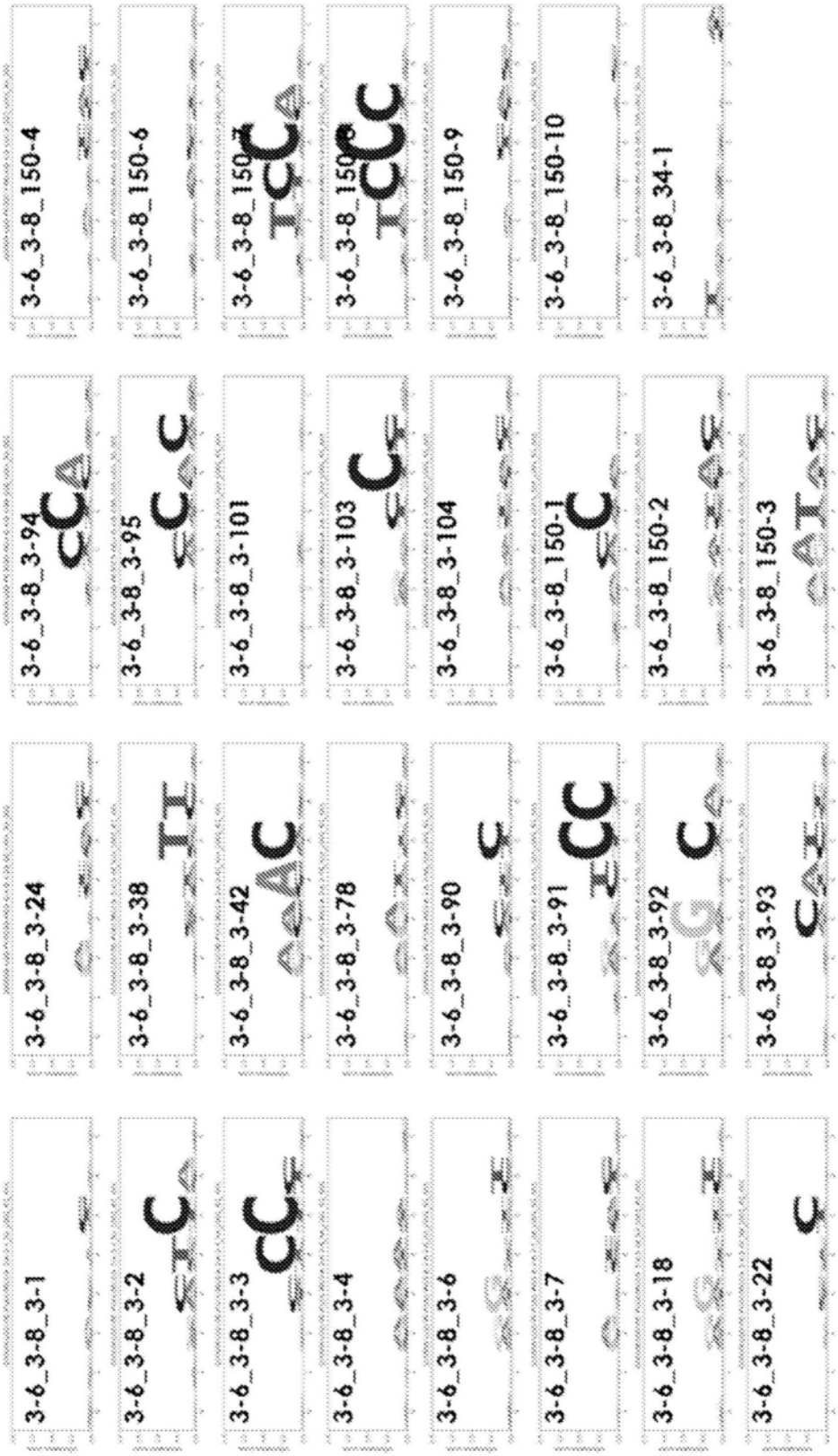
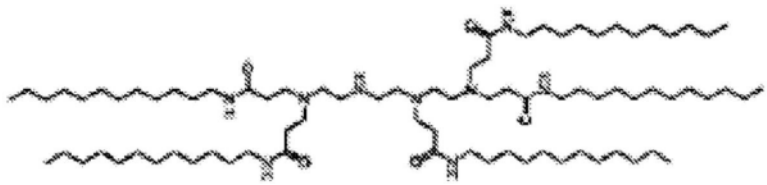
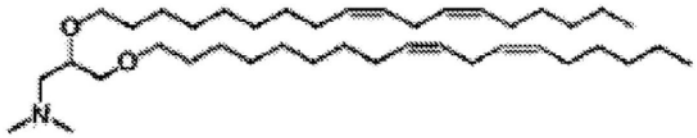

3-6_3-8_3-1
3-6_3-8_3-2
3-6_3-8_3-3
3-6_3-8_3-4
3-6_3-8_3-6
3-6_3-8_3-7
3-6_3-8_3-18
3-6_3-8_3-22
3-6_3-8_3-24
3-6_3-8_3-38
3-6_3-8_3-42
3-6_3-8_3-78
3-6_3-8_3-90
3-6_3-8_3-91
3-6_3-8_3-92
3-6_3-8_3-93
3-6_3-8_3-94
3-6_3-8_3-95
3-6_3-8_3-101
3-6_3-8_3-103
3-6_3-8_3-104
3-6_3-8_150-1
3-6_3-8_150-2
3-6_3-8_150-3
3-6_3-8_150-4
3-6_3-8_150-6
3-6_3-8_150-7
3-6_3-8_150-8
3-6_3-8_150-9
3-6_3-8_150-10
3-6_3-8_34-1

图44B

98N12-5 (TETA5-LAP)



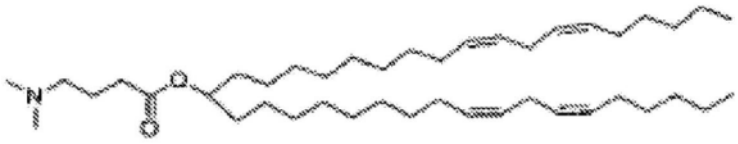
DLin DMA



DLin-K-DMA（2,2-二亚油基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环）

DLin-KC2-DMA

DLin-MC3-DMA



C12-200

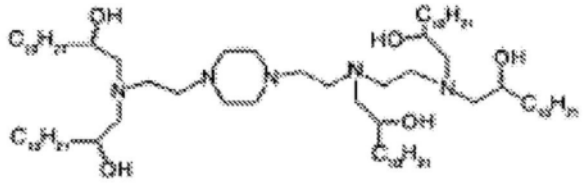


图45

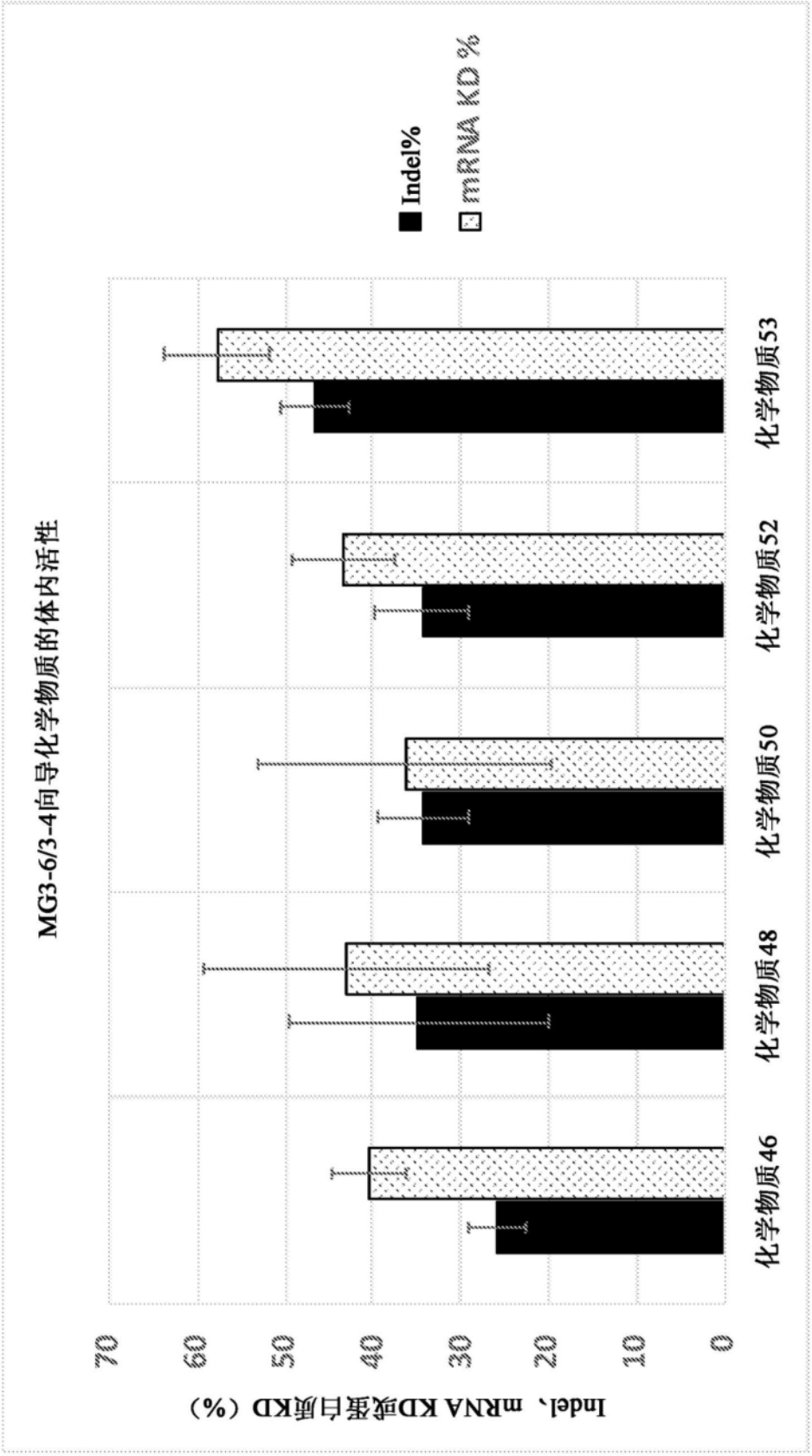
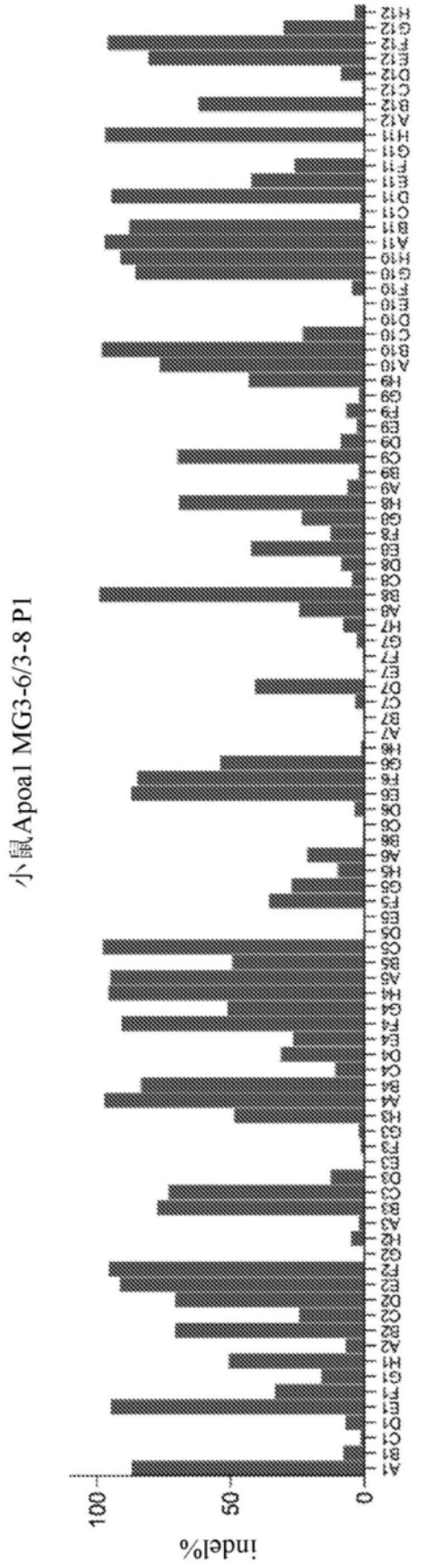

MG3-6/3-4向导化学物质的体内活性
Indel%
mRNA KD %
Indel、mRNA KD或蛋白质KD（%）
70
60
50
40
30
20
10
0
化学物质46
化学物质48
化学物质50
化学物质52
化学物质53

图46


小鼠Apoa1 MG3-6/3-8 P1
indel%
100
50
0

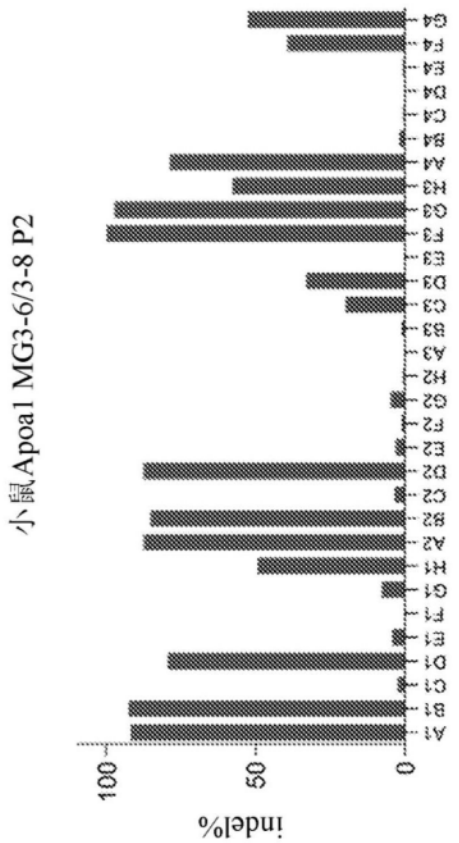
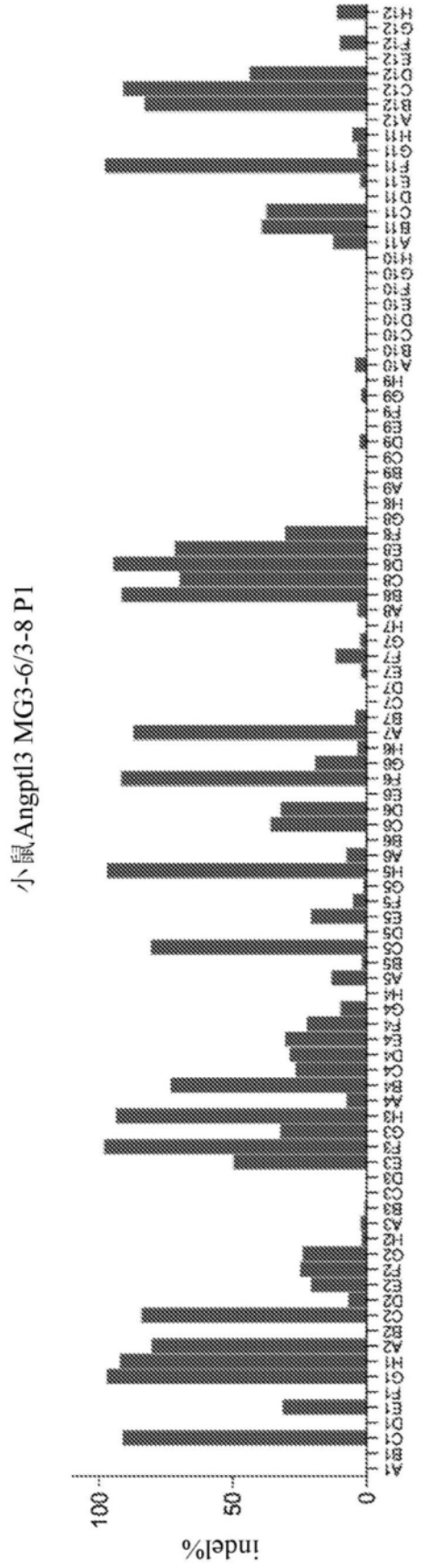

小鼠Apoa1 MG3-6/3-8 P2
indel%
100
50
0

图47


小鼠Angptl3 MG3-6/3-8 P1
indel%
100
50
0

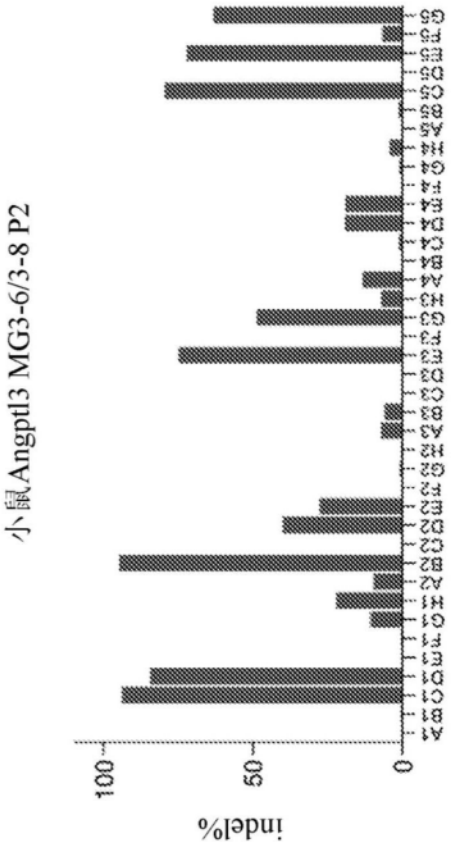
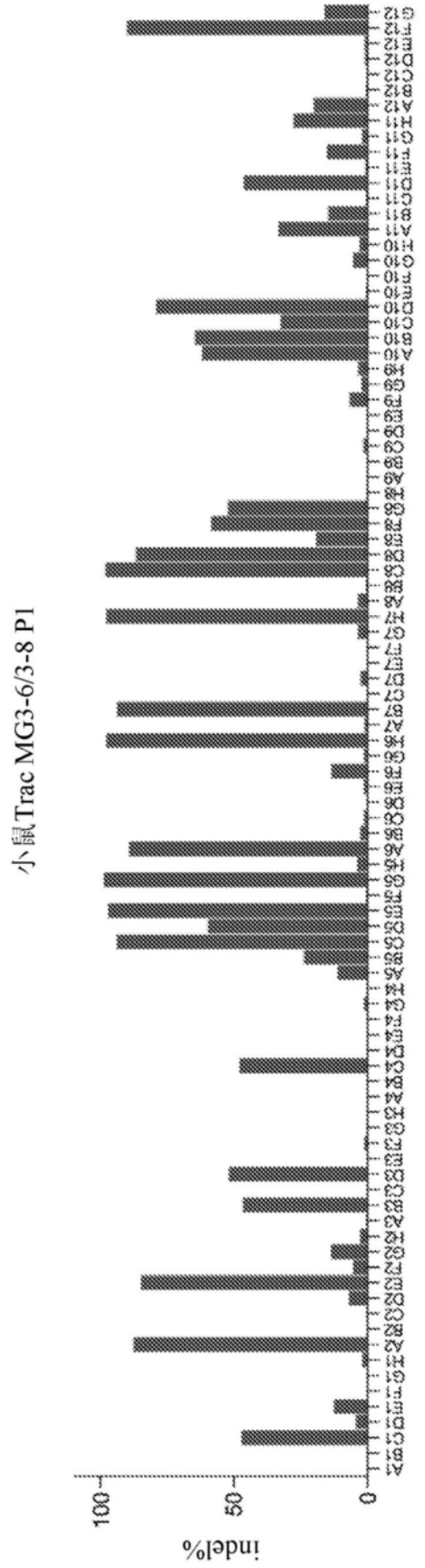

小鼠Angptl3 MG3-6/3-8 P2
indel%
100
50
0

图48


小鼠Trac MG3-6/3-8 P1
indel%
100
50
0

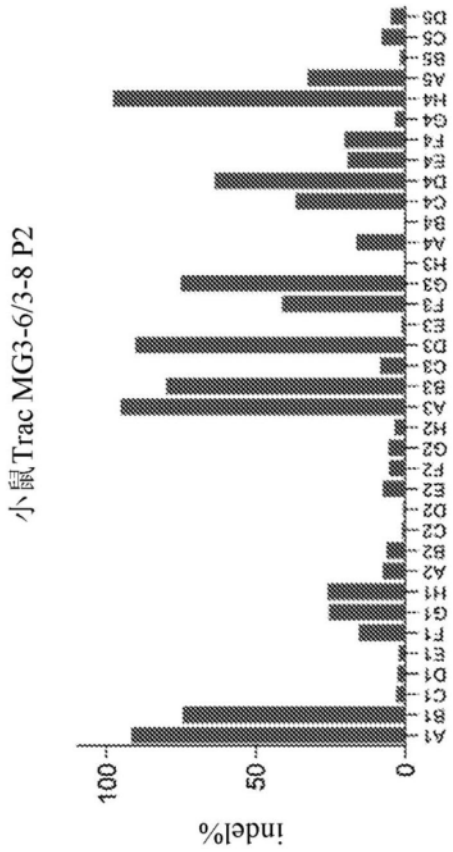

小鼠Trac MG3-6/3-8 P2
indel%
100
50
0

图49

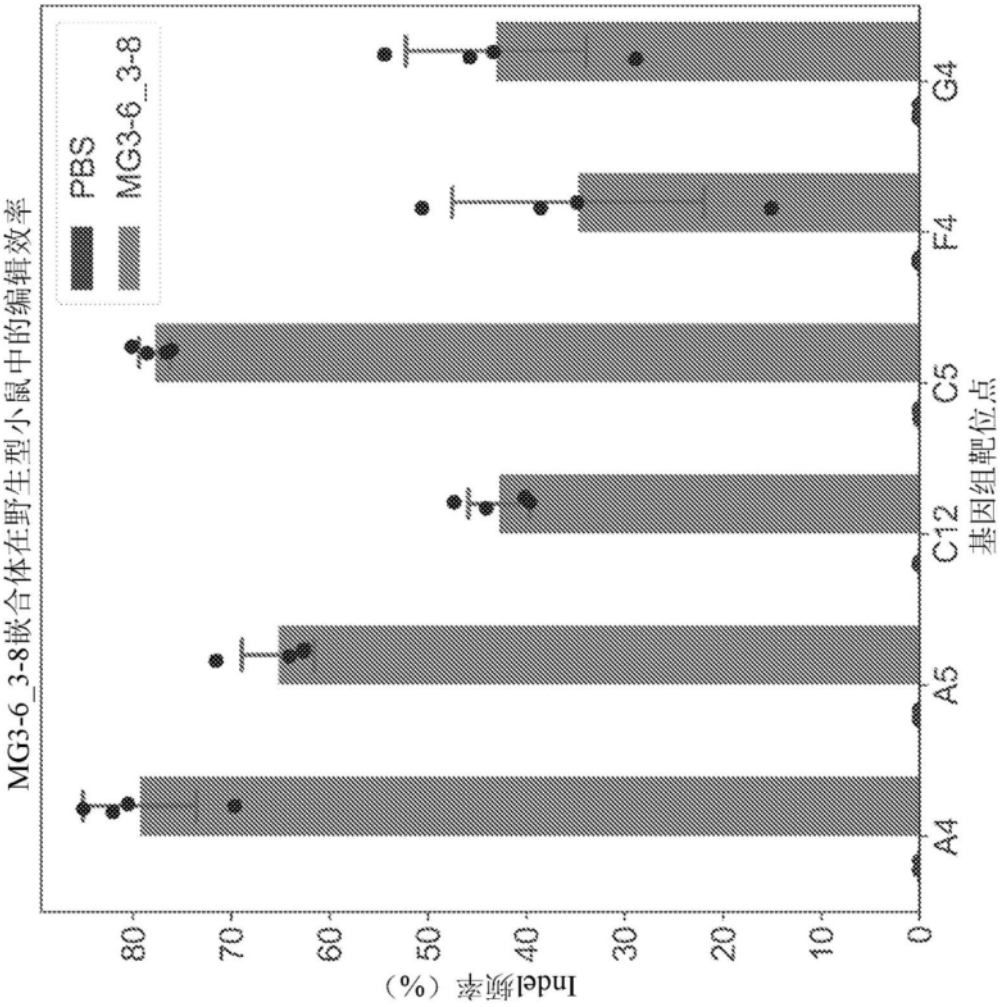

MG3-6_3-8嵌合体在野生型小鼠中的编辑效率
PBS
MG3-6_3-8
Indel频率（%）
0
10
20
30
40
50
60
70
80
A4
A5
C12
C5
F4
G4
基因组靶位点

图50

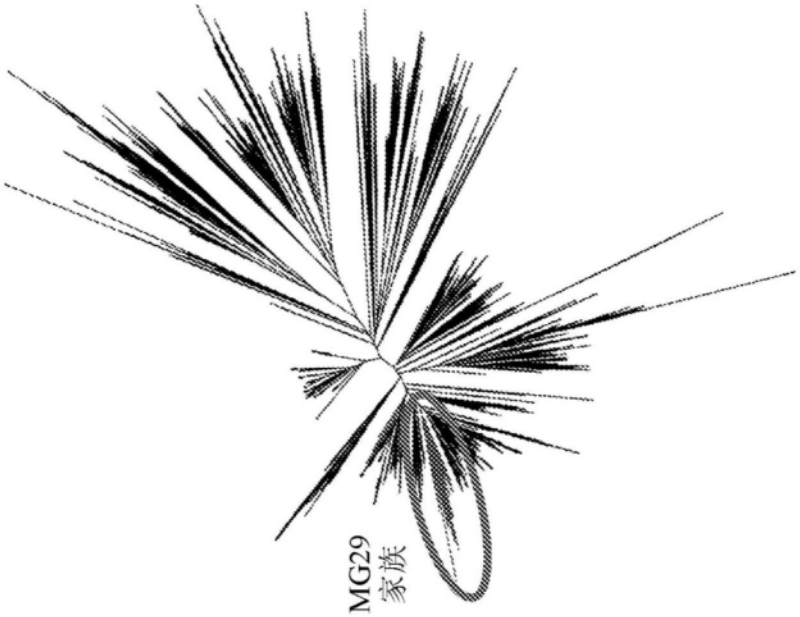


图51A

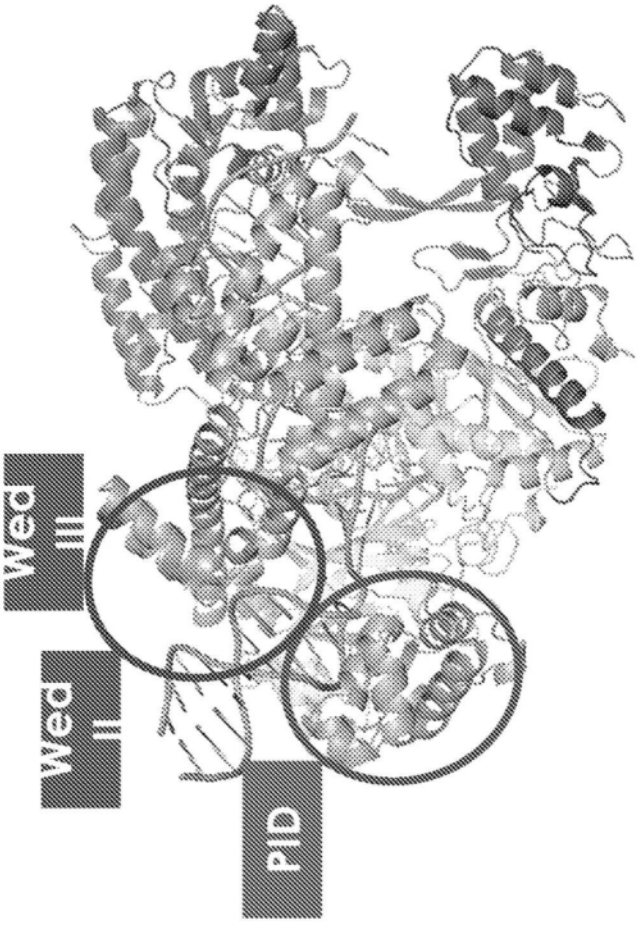


图51B

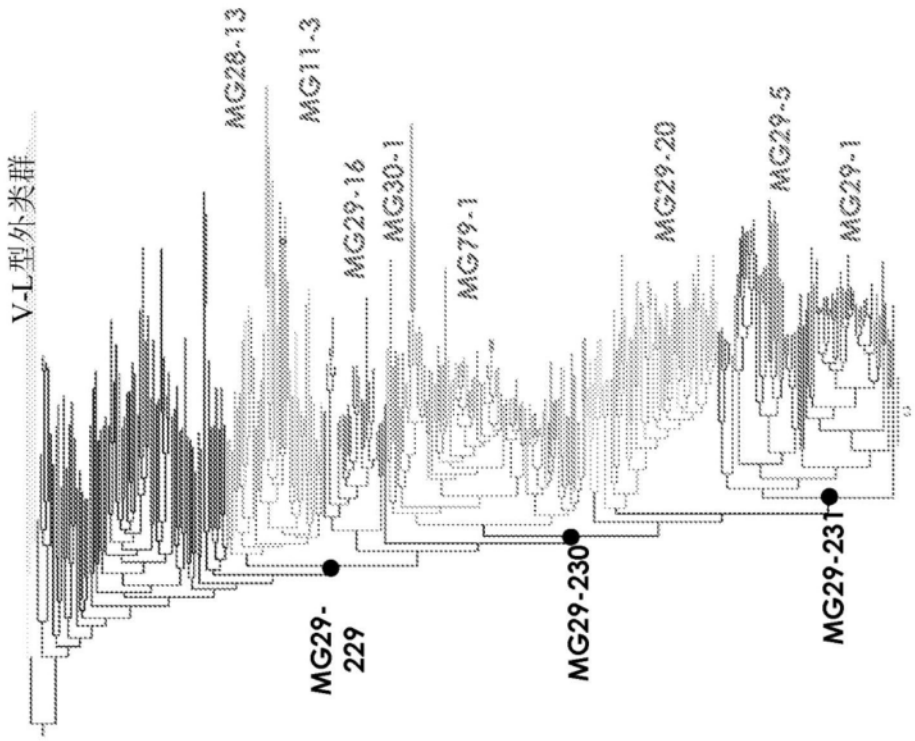

V-L型外类群
MG28-13
MG11-3
MG29-16
MG30-1
MG79-1
MG29-20
MG29-5
MG29-1
MG29-229
MG29-230
MG29-231

图52A

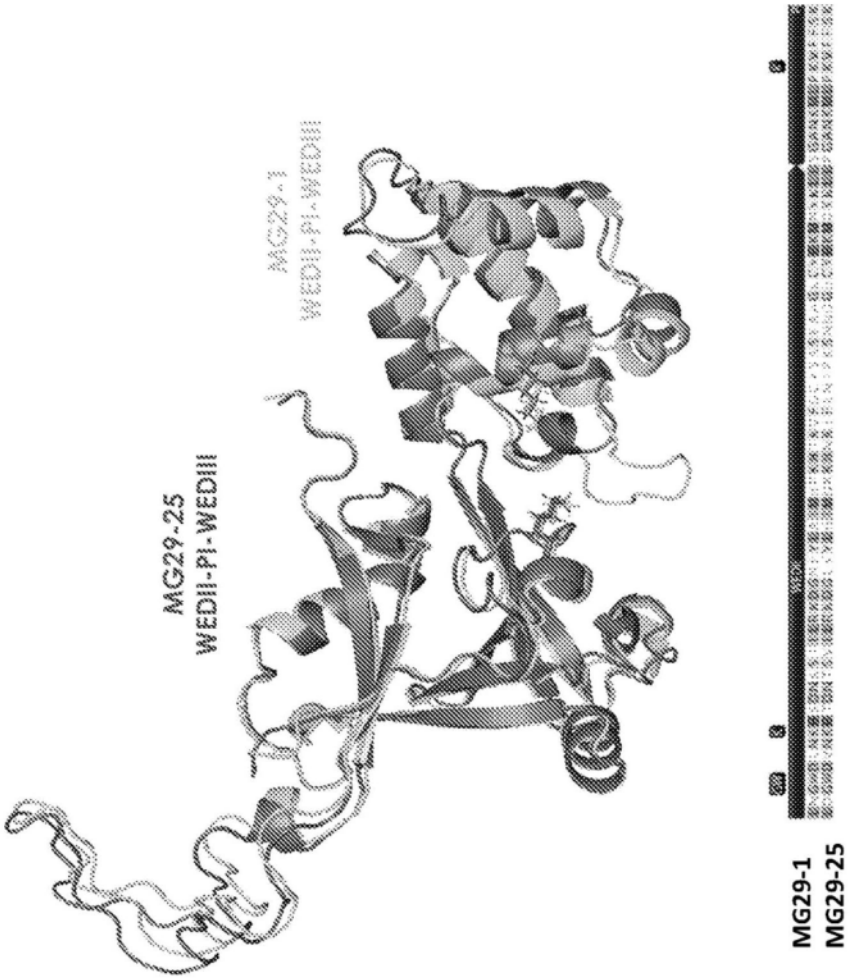


图52B

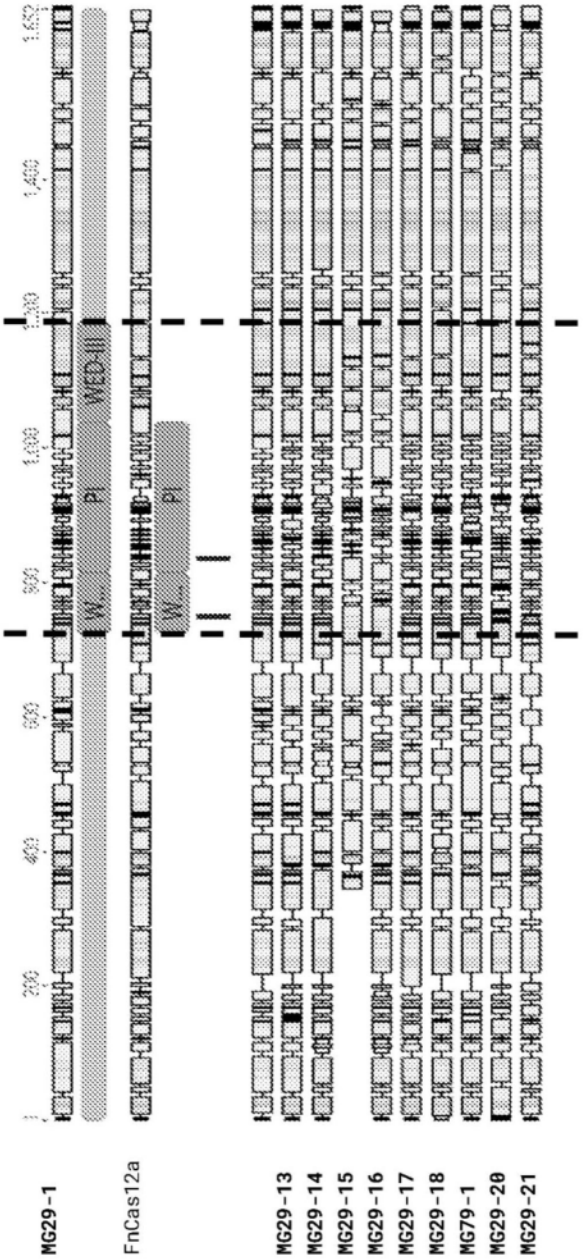

MG29-1
FnCas12a
MG29-13
MG29-14
MG29-15
MG29-16
MG29-17
MG29-18
MG79-1
MG29-20
MG29-21
WED-III
PI
WED-II
REC

图53A

图53B

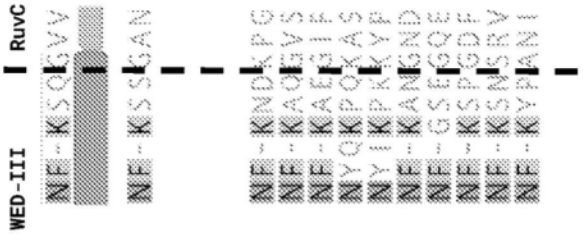

RuvC
WED-III

图53C

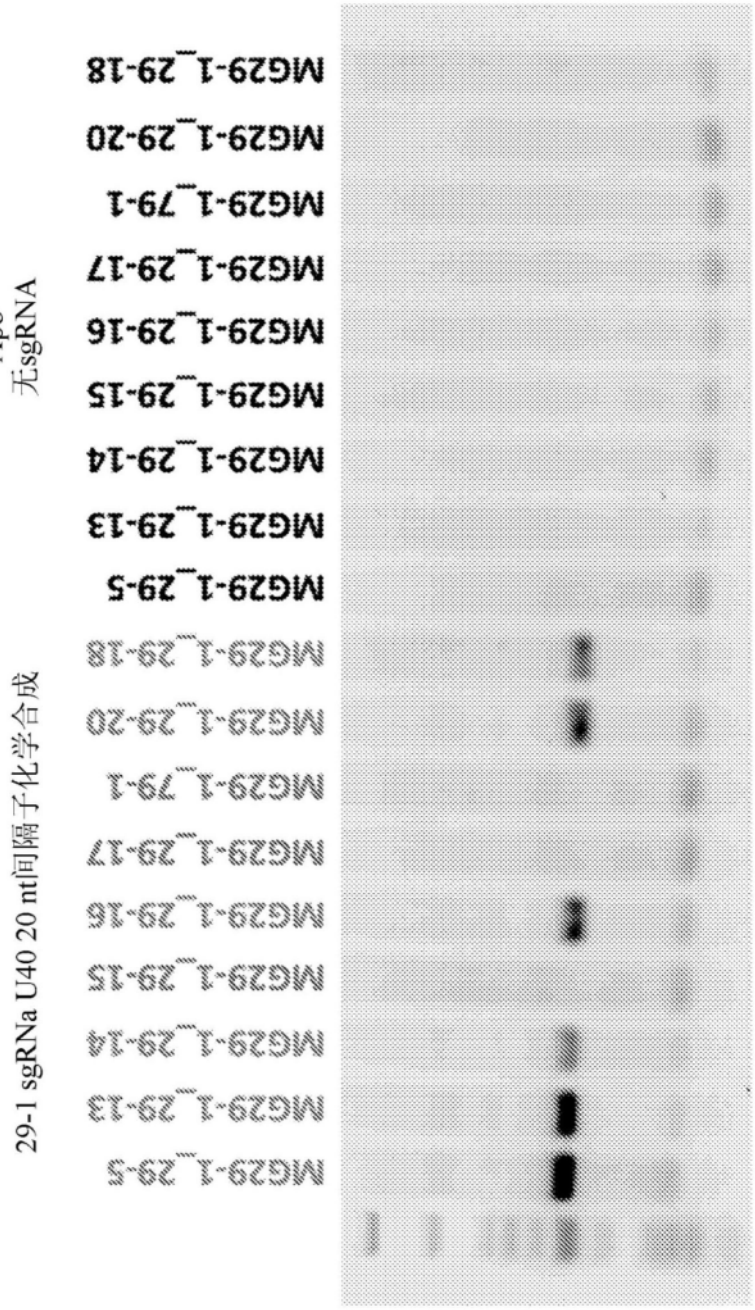

Apo
无sgRNA
29-1 sgRNa U40 20 nt间隔子化学合成
MG29-1_29-18
MG29-1_29-20
MG29-1_79-1
MG29-1_29-17
MG29-1_29-16
MG29-1_29-15
MG29-1_29-14
MG29-1_29-13
MG29-1_29-5

图54

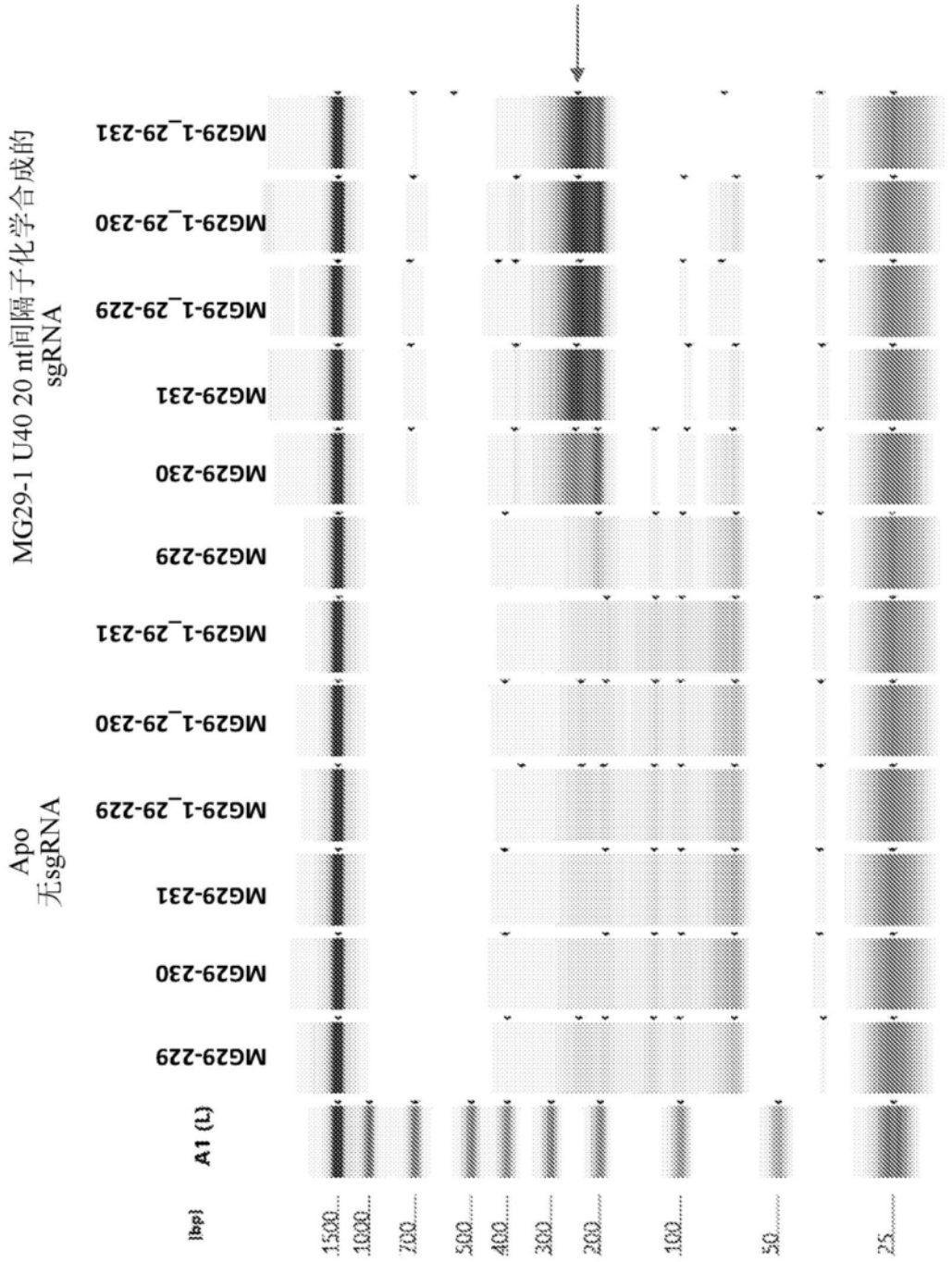

MG29-1 U40 20 nt间隔子化学合成的 sgRNA
MG29-1_29-231
MG29-1_29-230
MG29-1_29-229
MG29-231
MG29-230
MG29-229
Apo 无sgRNA
MG29-1_29-231
MG29-1_29-230
MG29-1_29-229
MG29-231
MG29-230
MG29-229
A1 (L)
[bp]
1500
1000
700
500
400
300
200
100
50
25

图55

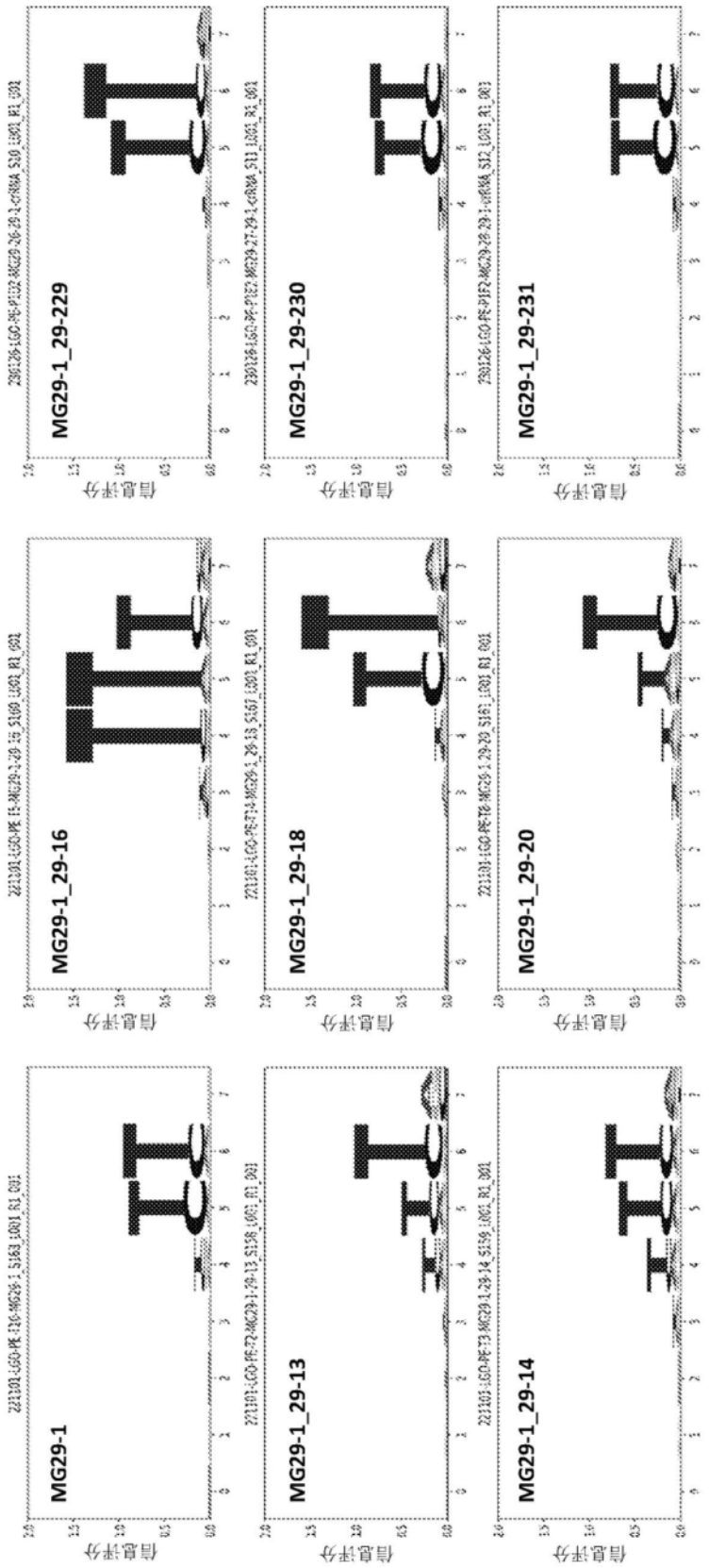

MG29-1
MG29-1_29-13
MG29-1_29-14
MG29-1_29-16
MG29-1_29-18
MG29-1_29-20
MG29-1_29-229
MG29-1_29-230
MG29-1_29-231
信息评分

图56