(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119487196 A
(43)申请公布日 2025.02.18

(21)申请号 202380040112.7
(22)申请日 2023.05.12
(30)优先权数据
63/341,960 2022.05.13 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.11.12
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2023/066950 2023.05.12
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/220729 EN 2023.11.16
(71)申请人 旗舰创业创新七公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 亚历山德拉·雷切尔·斯奈德
雅各布·罗森布鲁姆·鲁本斯
卡米洛·阿亚拉·布雷顿
(74)专利代理机构 深圳鹰翅知识产权代理有限公司 44658
专利代理师 王怡瑾 黄幸兒
(51)Int.Cl.
C12N 15/64(2006.01)
C12N 15/85(2006.01)

权利要求书4页 说明书102页
序列表（电子公布） 附图19页

(54)发明名称

双链DNA组合物及相关方法

(57)摘要

本披露提供了例如治疗性双链构建体(TDSC)。在一些实施例中,所述TDSC包含双链DNA区、上游封闭末端和下游封闭末端。在一些实施例中,所述TDSC包含经化学修饰的核苷酸。在一些实施例中,所述TDSC对核酸内切酶消化具有抗性和/或对免疫传感器识别具有抗性,并且支持所述TDSC中编码的异源负载的表达。

CN 119487196 A

1.一种TDSC,其包含:

a)上游DNA末端形式,其为封闭末端;

b)双链区;

c)下游DNA末端形式,其为封闭末端,

其中所述TDSC包含一个或多个经化学修饰的核苷酸,

其中一个或多个经化学修饰的核苷酸包含经化学修饰的胞嘧啶核苷酸和/或硫代磷酸酯键。

2.如权利要求1所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式和下游DNA末端形式之一或两者包含环。

3.如权利要求1或2所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式、所述下游DNA末端形式和/或所述双链区包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

4.如权利要求1-3中任一项所述的TDSC,其中所述经化学修饰的核苷酸中的一个或多个缀合至肽或蛋白。

5.如权利要求1-4中任一项所述的TDSC,其中所述经化学修饰的核苷酸中的一个或多个包含硫代磷酸酯键。

6.如权利要求1-5中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC的第一链和第二链各自包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

7.如权利要求1-6中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC的第一链和第二链各自包含一个或多个硫代磷酸酯键。

8.如权利要求1-7中任一项所述的TDSC,其中所述上游和/或下游DNA末端形式各自包含至少1、2、3、4、5或6个硫代磷酸酯键(例如,在所述上游和下游DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

9.如权利要求1-8中任一项所述的TDSC,其中一个或多个经化学修饰的核苷酸包含经化学修饰的胞嘧啶核苷酸。

10.如权利要求9所述的TDSC,其中所述经化学修饰的胞嘧啶核苷酸在所述胞嘧啶的碳5处具有除氢以外的取代。

11.如权利要求1-10中任一项所述的TDSC,其包含以下的一项或多项:

i)启动子序列(其中任选地,所述启动子序列位于所述双链区中);

ii)可操作地连接至所述启动子序列的负载序列(例如,治疗性负载序列)(其中任选地,所述负载序列位于所述双链区中);

iii)异源功能序列,例如核靶向序列或调节序列;

iv)维持序列;和/或

v)复制起点。

12.如权利要求11所述的TDSC,其中所述负载序列编码多肽(例如蛋白)。

13.如权利要求11或12所述的TDSC,其中所述负载序列编码功能性RNA(例如,miRNA、siRNA或tRNA)。

14.如权利要求11-13中任一项所述的TDSC,其中所述负载序列对于靶细胞是异源的。

15.如权利要求1-14中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC对核酸内切酶消化具有抗性

和/或对免疫传感器识别具有抗性。

16.如权利要求1-15中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式和所述下游DNA末端形式具有相同的核苷酸序列。

17.如权利要求1-15中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式和所述下游DNA末端形式具有不同的核苷酸序列。

18.如权利要求1-17中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者包含发夹。

19.如权利要求1-18中任一项所述的TDSC,其中所述封闭末端包含一个或多个(例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50个)未杂交(例如,不是双链区的一部分)的核苷酸。

20.如权利要求1-17中任一项所述的TDSC,其中所述封闭末端不包含任何未杂交的核苷酸(例如,其中所述封闭末端的所有核苷酸都与另一核苷酸杂交)。

21.如权利要求1-20中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式、所述下游DNA末端形式或两者包含原核端粒酶序列。

22.如权利要求1-20中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式、所述下游DNA末端形式或两者不包含原核端粒酶序列。

23.如权利要求1-22中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC的80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的糖是脱氧核糖。

24.如权利要求1-23中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC能被复制(例如,通过对于包含所述TDSC的细胞而言天然的DNA聚合酶)。

25.如权利要求1-23中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC不能被复制。

26.如权利要求1-25中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC是线性的并且能环化。

27.如权利要求1-25中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC是线性的并且不能环化。

28.如权利要求1-27中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC或其部分能整合到基因组中。

29.如权利要求1-27中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC或其部分不能整合到基因组中。

30.如权利要求1-29中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC能多联体化。

31.如权利要求1-29中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC不能多联体化。

32.一种TDSC,其包含:

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

b)双链区;以及

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

其中所述TDSC包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

33.如权利要求32所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者是开放末端。

34.如权利要求32或33所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者是平末端或粘性末端。

35.一种TDSC,其包含:

a)上游双链平末端DNA末端形式(例如,呈双链平末端的上游核酸外切酶抗性DNA末端

形式),其在每条链上包含硫代磷酸酯修饰;

b)双链区;以及

c)下游双链平末端DNA末端形式(例如,呈双链平末端的下游核酸外切酶抗性DNA末端形式),其在每条链上包含硫代磷酸酯修饰。

36.一种TDSC,其包含:

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

b)双链区;

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者包含Y-衔接子构型,

任选地,其中所述TDSC包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

37.一种TDSC,其包含:

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

b)双链区;

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者包含以下的一种或多种:核靶向序列、维持序列、或结合靶细胞中内源多肽的序列。

38.一种TDSC,其包含:

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

b)双链区;

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者具有以下特征中的一种或多种:

i)不包含核酸序列TATCAGCACACAATTGCCCATTATACGC(SEQ ID NO:55)和GCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATA(SEQ ID NO:56),或与所述核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列;和/或核酸序列TATCAGCACACAATAGTCCATTATACGC(SEQ ID NO:57)和GCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA(SEQ ID NO:58);

ii)所述TDSC中的每个核苷酸与所述TDSC中的另一个核苷酸结合;

iii)所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有长度小于约28或56个核苷酸或长度大于约28或56个核苷酸的环大小;或

iv)所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有长度小于约28或56个核苷酸或长度大于约28或56个核苷酸的环大小。

39.一种包含双链DNA(dsDNA)的药物组合物,所述双链DNA包含效应子序列,其中:

a)所述dsDNA缺乏载体主链或缺乏载体主链的材料部分,或不包含非人(例如细菌)复制起点;

b)所述dsDNA是未衣壳化的,基本上不含病毒蛋白,不包含病毒包装信号,或不包含病毒ITR;

c)所述dsDNA包含核酸外切酶抗性末端;以及

d)所述dsDNA包含至少一个经化学修饰的核苷酸。

40.一种药物组合物,其包含如权利要求1-38中任一项所述的TDSC。

41.如权利要求39或40所述的药物组合物,其中所述dsDNA或TDSC包含在脂质纳米颗粒(LNP)中。

42.一种原TDSC,其包含:

a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

b)双链区;

c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

其中:

(i)所述原TDSC包含一个或多个(例如,1或2个)尿嘧啶核苷酸,或

(ii)所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含粘性末端,和/或其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含粘性末端。

43.一种在靶细胞中表达异源负载的方法,所述方法包括:

(i)将如权利要求1-41中任一项所述的TDSC或组合物引入靶细胞中,其中所述TDSC的双链区包含编码异源负载的序列;以及

(ii)将所述细胞在适合于从所述TDSC表达所述异源负载的条件下维持(例如,孵育);

从而在所述靶细胞中表达所述异源负载。

44.一种将异源负载递送至靶细胞的方法,所述方法包括:

将如权利要求1-41中任一项所述的TDSC或组合物引入靶细胞中,其中所述TDSC的双链区包含编码异源负载的序列;

从而将所述异源负载递送至所述靶细胞。

45.一种调节(例如,增加或减少)靶细胞中的生物活性的方法,所述方法包括:

(i)将如权利要求1-41中任一项所述的TDSC或组合物引入靶细胞中,其中所述TDSC的双链区包含编码异源负载的序列,所述异源负载调节所述靶细胞中的生物活性;以及

(ii)将所述细胞在适合于从所述TDSC表达所述异源负载的条件下维持(例如,孵育);

从而调节所述靶细胞中的生物活性。

46.一种治疗有需要的细胞、组织或受试者的方法,所述方法包括:

向所述细胞、组织或受试者施用如权利要求1-41中任一项所述的TDSC或组合物,其中所述TDSC的双链区包含编码异源负载的序列;

从而治疗所述细胞、组织或受试者。

47.一种制备TDSC的方法,所述方法包括连接:

双链DNA分子至

包含第一区和第二区的自退火DNA分子,其中所述第一区与所述第二区杂交;

从而产生TDSC,

任选地,其中所述自退火DNA分子进一步包含所述第一区和所述第二区之间的环。

双链DNA组合物及相关方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2022年5月13日提交的美国序列号63/341,960的优先权,其全部内容通过援引并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请包含序列表,所述序列表已以XML格式电子提交,并通过援引以其全文特此并入。创建于2023年5月10日的所述XML副本被命名为F2128-7002WO_SL.xml,并且大小是183,436字节。

背景技术

[0005] 需要新颖治疗方式来解决未满足的医疗需求。

发明内容

[0006] 本文描述了药物DNA组合物,构建体,制剂,使用此类组合物、构建体和制剂的方法,及其制备方法。

[0007] 一方面,本发明的特征在于一种治疗性双链构建体(“TDSC”)。

[0008] 列举的实施例

[0009] 1.一种TDSC,其包括:

[0010] a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

[0011] b)双链区;以及

[0012] c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

[0013] 其中所述TDSC包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0014] 2.一种TDSC,其包括:

[0015] a)上游DNA末端形式,其为封闭末端;

[0016] b)双链区;

[0017] c)下游DNA末端形式,其为封闭末端,

[0018] 其中所述TDSC包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0019] 3.如实施例1所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者是开放末端。

[0020] 4.一种TDSC,其包括:

[0021] a)包含Y-衔接子构型的上游DNA末端形式(例如,上游核酸外切酶抗性DNA末端形式);

[0022] b)双链区;以及

[0023] c)包含Y-衔接子构型的下游DNA末端形式(例如,下游核酸外切酶抗性DNA末端形式),

[0024] 其中所述TDSC包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0025] 5.如实施例1或3所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述

下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者是平末端或粘性末端。

[0026] 6.一种TDSC,其包括:

[0027] a)上游双链平末端DNA末端形式(例如,呈双链平末端的上游核酸外切酶抗性DNA末端形式),其在每条链上包含硫代磷酸酯修饰;

[0028] b)双链区;以及

[0029] c)下游双链平末端DNA末端形式(例如,呈双链平末端的下游核酸外切酶抗性DNA末端形式),其在每条链上包含硫代磷酸酯修饰,

[0030] 其中任选地,所述TDSC进一步包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0031] 7.如实施例1所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者是封闭末端。

[0032] 8.如实施例1-3、5或7中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者包含环。

[0033] 9.一种TDSC,其包括:

[0034] a)上游DNA末端形式(例如,上游核酸外切酶抗性DNA末端形式),其是封闭末端;

[0035] b)双链区;

[0036] c)下游DNA末端形式(例如,下游核酸外切酶抗性DNA末端形式),其是封闭末端,

[0037] 其中所述TDSC包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0038] 10.如实施例1-9中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式(例如,上游核酸外切酶抗性DNA末端形式)包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0039] 11.如实施例1-10中任一项所述的TDSC,其中所述下游DNA末端形式(例如,下游核酸外切酶抗性DNA末端形式)包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0040] 12.如实施例1-11中任一项所述的TDSC,其中所述一个或多个经化学修饰的核苷酸包含主链、糖或碱基中的修饰。

[0041] 13.如实施例1-12中任一项所述的TDSC,其中所述一个或多个经化学修饰的核苷酸缀合至肽或蛋白。

[0042] 14.如实施例1-13中任一项所述的TDSC,其中所述一个或多个经化学修饰的核苷酸包含经化学修饰的胞嘧啶核苷酸和/或硫代磷酸酯键。

[0043] 15.如实施例1-14中任一项所述的TDSC,其中所述一个或多个经化学修饰的核苷酸包含经化学修饰的胞嘧啶核苷酸。

[0044] 16.如实施例15所述的TDSC,其中所述经化学修饰的胞嘧啶核苷酸在所述胞嘧啶的碳5处具有除氢以外的取代。

[0045] 17.如实施例1-16中任一项所述的TDSC,其中所述一个或多个经化学修饰的核苷酸包含硫代磷酸酯键。

[0046] 18.如实施例1-17中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC的第一链和第二链各自包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0047] 19.如实施例1-18中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC的第一链和第二链各自包含一个或多个硫代磷酸酯键。

[0048] 20.如实施例1-19中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个硫代磷酸酯键(例如,在所述上游核酸外切酶抗性

DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0049] 21.如实施例1-20中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少3个硫代磷酸酯键(例如,在所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0050] 22.如实施例1-20中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少6个硫代磷酸酯键(例如,在所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0051] 23.如实施例1-22中任一项所述的TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个硫代磷酸酯键(例如,在所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0052] 24.如实施例1-23中任一项所述的TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少3个硫代磷酸酯键(例如,在所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0053] 25.如实施例1-23中任一项所述的TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含至少6个硫代磷酸酯键(例如,在所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0054] 26.如实施例1-20或23中任一项所述的TDSC,其中所述上游和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式各自包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个硫代磷酸酯键(例如,在所述上游和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0055] 27.如实施例1-21、23、24或26中任一项所述的TDSC,其中所述上游和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式各自包含至少3个硫代磷酸酯键(例如,在所述上游和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0056] 28.如实施例1-20、22、23、25或26中任一项所述的TDSC,其中所述上游和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式各自包含至少6个硫代磷酸酯键(例如,在所述上游和下游核酸外切酶抗性DNA末端形式的1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个末端核苷酸之间,例如,在所述第一链上、所述第二链上、或所述第一链和所述第二链两者上)。

[0057] 29.如实施例1-28中任一项所述的TDSC,其中所述一个或多个经化学修饰的核苷酸包含甲基基团。

[0058] 30.一种TDSC,其包括:

[0059] a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

[0060] b)双链区;

[0061] c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

[0062] 其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者包含Y-衔接子构型。

[0063] 31.如实施例30所述的TDSC,其中所述Y-衔接子通过用尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)和DNA糖基化酶-裂解酶核酸内切酶VIII(例如,USER酶混合物)切割而形成。

[0064] 32.如实施例30或31所述的TDSC,其中所述Y-衔接子包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0065] 33.如实施例30-32中任一项所述的TDSC,其中所述Y-衔接子中的每个核苷酸都是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼烷磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0066] 34.一种TDSC,其包括:

[0067] a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

[0068] b)双链区;

[0069] c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

[0070] 其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者包含以下的一种或多种:核靶向序列、维持序列、或结合靶细胞中内源多肽的序列。

[0071] 35.一种TDSC,其包括:

[0072] a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

[0073] b)双链区;

[0074] c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

[0075] 其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者具有以下特征中的一种或多种:

[0076] i)不包含核酸序列TATCAGCACACAATTGCCCATTATACGC(SEQ ID NO:55)和GCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATA(SEQ ID NO:56),或与所述核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列;和/或核酸序列TATCAGCACACAATAGTCCATTATACGC(SEQ ID NO:57)和GCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA(SEQ ID NO:58);

[0077] ii)所述TDSC中的每个核苷酸与所述TDSC中的另一个核苷酸结合;

[0078] iii)所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有长度小于约28或56个核苷酸或长度大于约28或56个核苷酸的环大小;或

[0079] iv)所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有长度小于约28或56个核苷酸或长度大于约28或56个核苷酸的环大小。

[0080] 36.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其包含以下的一个或多个:

[0081] i)启动子序列(其中任选地,所述启动子序列位于所述双链区中);

[0082] ii)可操作地连接至所述启动子序列的负载序列(例如,治疗性负载序列)(其中任选地,所述负载序列位于所述双链区中);

[0083] iii)异源功能序列,例如核靶向序列或调节序列;

[0084] iv)维持序列;和/或

[0085] v)复制起点。

[0086] 37.如实施例36所述的TDSC,其包括:

[0087] i、ii和iii;

[0088] i、ii和iv;

[0089] i、ii和v;

[0090] i、ii、iii和iv;

[0091] i、ii、iii和v;

[0092] i、ii、iv和v;或

[0093] i、ii、iii、iv和v。

[0094] 38.如实施例36或37所述的TDSC,其中所述核靶向序列包含CT3序列(例如,AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA(SEQ ID NO:59)的序列),或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。

[0095] 39.如实施例36-38中任一项所述的TDSC,其中所述核靶向序列结合hnRNPK蛋白(例如,人hnRNPK蛋白)。

[0096] 40.如实施例2、7-29或36-39中任一项所述的TDSC,其中所述封闭末端中的一个或两个包含环,其中所述环中的一个或两个包含表3中列出的核靶向序列,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列。

[0097] 41.如实施例2、7-29或36-40中任一项所述的TDSC,其中所述封闭末端中的一个或两个包含环,其中所述环中的一个或两个包含与表3中列出的核输入蛋白结合的核靶向序列。

[0098] 42.如实施例36-41中任一项所述的TDSC,其中所述负载序列编码多肽(例如,蛋白)。

[0099] 43.如实施例36-42中任一项所述的TDSC,其中所述负载序列编码功能性RNA(例如,miRNA、siRNA或tRNA)。

[0100] 44.如实施例36-43中任一项所述的TDSC,其中所述负载序列对于靶细胞是异源的。

[0101] 45.如实施例1-44中任一项所述的TDSC,其中所述双链区包含有义链和反义链。

[0102] 46.如实施例45所述的TDSC,其中所述反义链包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0103] 47.如实施例45或46所述的TDSC,其中所述有义链不包含任何经化学修饰的核苷酸。

[0104] 48.如实施例45或46所述的TDSC,其中所述有义链包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0105] 49.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC对核酸内切酶消化具有抗性和/或对免疫传感器识别具有抗性。

[0106] 50.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式对核酸内切酶消化具有抗性。

[0107] 51.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形

式对免疫传感器识别具有抗性。

[0108] 52.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式对核酸内切酶消化具有抗性。

[0109] 53.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式对免疫传感器识别具有抗性。

[0110] 54.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述双链区对核酸内切酶消化具有抗性。

[0111] 55.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述双链区对免疫传感器识别具有抗性。

[0112] 56.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式和所述下游DNA末端形式具有相同的核苷酸序列。

[0113] 57.如实施例1-55中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式和所述下游DNA末端形式具有不同的核苷酸序列。

[0114] 58.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有相同的结构。

[0115] 59.如实施例1-57中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式具有不同的结构。

[0116] 60.如实施例1、7、8或10-59中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者是开放末端(例如,平末端、粘性末端或Y-衔接子)。

[0117] 61.如实施例1-3、5或7-60中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者是封闭末端(例如,发夹)。

[0118] 62.如实施例61所述的TDSC,其中所述封闭末端包含一个或多个(例如,至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、40或50)未杂交(例如,不是双链区的一部分)的核苷酸。

[0119] 63.如实施例61所述的TDSC,其中所述封闭末端不包含任何未杂交的核苷酸(例如,其中所述封闭末端的所有核苷酸都与另一核苷酸杂交)。

[0120] 64.如实施例30-63中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式、所述下游DNA末端形式或两者包含至少一个经化学修饰的核苷酸。

[0121] 65.如实施例30-64中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式和所述下游DNA末端形式都包含所述有义链上的至少一个经化学修饰的核苷酸和所述反义链上的至少一个经化学修饰的核苷酸。

[0122] 66.如实施例30-65中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式和所述下游DNA末端形式都在每个有义链位置和每个反义链位置处包含经化学修饰的核苷酸。

[0123] 67.如实施例30、31、34-45、47或49-63中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式、所述下游DNA末端形式或两者包含反向末端重复序列(ITR),其中任选地所述dsDNA不包含经化学修饰的核苷酸。

[0124] 68.如实施例1-67中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式、所述下游DNA末端形式或两者不包含原核端粒酶(protelomerase)序列。

[0125] 69.如实施例30、31、34-45、47、49-63或67中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式、所述下游DNA末端形式或两者包含原核端粒酶序列,其中任选地所述dsDNA不包含经化学修饰的核苷酸。

[0126] 70.如实施例69所述的TDSC,其中所述原核端粒酶中的一个或多个包含(例如,以5’至3’顺序)核酸序列TATCAGCACACAATTGCCCATTATACGC(SEQ ID NO:55)和GCGTATAATGGGCAATTGTGTGCTGATA(SEQ ID NO:56),或与所述核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。

[0127] 71.如实施例69或70所述的TDSC,其中所述原核端粒酶中的一个或多个包含(例如,以5’至3’顺序)核酸序列TATCAGCACACAATAGTCCATTATACGC(SEQ ID NO:57)和GCGTATAATGGACTATTGTGTGCTGATA(SEQ ID NO:58),或与所述核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。

[0128] 72.如实施例69-71中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶中的一个或多个包含(例如,以5’至3’顺序)核酸序列ACCTATTTCAGCATACTACGC(SEQ ID NO:60)和GCGTAGTATGCTGAAATAGGT(SEQ ID NO:61),或与所述核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。

[0129] 73.如实施例69-72中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶中的一个或多个包含(例如,以5’至3’顺序)核酸序列CACACAATTGCCCATTATACGCGCGTATAATGGGCAATTGTGTG(SEQ ID NO:62),或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。

[0130] 74.如实施例69-73中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列中的一个或多个包含(例如,以5’至3’顺序)以下核酸序列:

[0131] (i)TAAATATAATTTAA(SEQ ID NO:63)和TTAAATTATATTTA(SEQ ID NO:64),

[0132] (ii)AATATATAATCTAA(SEQ ID NO:65)和TTAGATTATATATT(SEQ ID NO:66),

[0133] (iii)TATTTATTATCTTT(SEQ ID NO:67)和AAAGATAATAAATA(SEQ ID NO:68),

[0134] (iv)ATATAATTTTTAATTAGTATAGAATATGTTAA(SEQ ID NO:69)和TTAACATACTCTATACTAATTAAAAATTATAT(SEQ ID NO:70),

[0135] (v)TATAATTTGATATTAGTACAAATCCC(SEQ ID NO:71)和GGGATTTGTACTAATATCAAATTATA(SEQ ID NO:72),

[0136] (vi)ATATAATATTTATTTAGTACAAAGTTC(SEQ ID NO:73)和GAACTTTGTACTAAATAAATATTATAT(SEQ ID NO:74),

[0137] (vii)ATATAATTTTTTATTAGTATAGAGTAT(SEQ ID NO:75)和ATACTCTATACTAATAAAAAATTATAT(SEQ ID NO:76),

[0138] (viii)TAAATATAATTTAA(SEQ ID NO:63)和TTAAATTATATTTA(SEQ ID NO:64);或与这些核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。

[0139] 75.如实施例69-74中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列中的一个或多个进一步包含(例如,以5’至3’顺序)以下核酸序列:

[0140] (i)TAGTATAAAAAACTGT(SEQ ID NO:77)和ACAGTTTTTTATACTA(SEQ ID NO:78),

[0141] (ii)TAGTATACAAAAGATT(SEQ ID NO:79)和AATCTTTTGTATACTA(SEQ ID NO:80),

[0142] (iii)TAGTATATATATCTCT(SEQ ID NO:81)和AGAGATATATATACTA(SEQ ID NO:82),或

[0143] (viii)TAGTATAAAAAAAATT(SEQ ID NO:83)和AATTTTTTTTATACTA(SEQ ID NO:84);

[0144] 或与这些核酸序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的核酸序列。

[0145] 76.如实施例69-75中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列通过TelN原核端粒酶、ResT原核端粒酶、Tel PY54原核端粒酶或TelK原核端粒酶消化产生。

[0146] 77.如实施例69-75中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列不是通过TelN原核端粒酶消化产生。

[0147] 78.如实施例69-75或77中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列不是通过Tel PY54原核端粒酶消化产生。

[0148] 79.如实施例69-75、77或78中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列不是通过TelK原核端粒酶消化产生。

[0149] 80.如实施例69-75或77-79中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列不是通过ResT原核端粒酶消化产生。

[0150] 81.如实施例69-80中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列的长度为约28或56个核苷酸。

[0151] 82.如实施例69-81中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列的长度小于28(例如,小于15、20、25、26、27或28)个核苷酸。

[0152] 83.如实施例69-82中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列的长度在约28(例如,25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35)个核苷酸和约56(例如,50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60)个核苷酸之间。

[0153] 84.如实施例69-83中任一项所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列的长度大于约56(例如,大于50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、65、70、75、80、90或100)个核苷酸。

[0154] 85.如实施例30-94中任一项所述的TDSC,其中所述上游DNA末端形式、所述下游DNA末端形式或两者包含Y-衔接子。

[0155] 86.如实施例85所述的TDSC,其中任选地所述dsDNA不包含经化学修饰的核苷酸。

[0156] 87.如实施例69所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列由被TelN原核端粒酶或ResT原核端粒酶识别的第一原核端粒酶识别序列(PRS)和第二PRS产生。

[0157] 88.如实施例69所述的TDSC,其中所述原核端粒酶序列由被Tel PY54原核端粒酶或TelK原核端粒酶识别的第一原核端粒酶识别序列(PRS)和第二PRS产生。

[0158] 89.如实施例1-85、87或88中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者包含至少一个经化学修饰的核苷酸(例如,在每个有义链核苷酸和每个反义链核苷酸上包含化学修饰)。

[0159] 90.如实施例1-85或87-89中任一项所述的TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式和所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式之一或两者包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0160] 91.如实施例1-85或87-90中任一项所述的TDSC,其中双链区包含一个或多个经化

学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0161] 92.如实施例1-85或87-91中任一项所述的TDSC,其中所述双链区编码负载序列,并且其中所述负载序列的反义链包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0162] 93.如实施例1-92中任一项所述的TDSC,其中所述双链区编码负载序列,并且其中所述负载序列的有义链包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0163] 94.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC的80%、85%、90%、95%、98%、99%或100%的糖是脱氧核糖。

[0164] 95.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC包含编码RNA(例如,mRNA、siRNA或miRNA)的序列。

[0165] 96.如实施例1-94中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC不包含编码RNA的序列。

[0166] 97.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC能被复制(例如,通过对于包含所述TDSC的细胞而言天然的DNA聚合酶)。

[0167] 98.如实施例1-96中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC不能被复制。

[0168] 99.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC是线性的并且能被环化。

[0169] 100.如实施例1-98中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC是线性的并且不能被环化。

[0170] 101.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC或其一部分能整合至基因组中。

[0171] 102.如实施例1-100中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC或其部分不能整合至基因组中。

[0172] 103.如前述实施例中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC能多联体化。

[0173] 104.如实施例1-102中任一项所述的TDSC,其中所述TDSC不能多联体化。

[0174] 105.一种包含双链DNA(dsDNA)的药物组合物,所述双链DNA包含效应子序列,其中:

[0175] a.所述dsDNA缺乏载体主链或缺乏载体主链的材料部分,或不包含非人类(例如细菌)复制起点;

[0176] b.所述dsDNA是未衣壳化的,基本上不含病毒蛋白,不包含病毒包装信号,或不包含病毒ITR;

[0177] c.所述dsDNA包含核酸外切酶抗性末端;以及

[0178] d.所述dsDNA包含至少一个经化学修饰的核苷酸。

[0179] 106.一种药物组合物,其包含如前述实施例中任一项所述的TDSC。

[0180] 107.如实施例105或106所述的药物组合物,其中所述dsDNA或TDSC包含在脂质纳米颗粒(LNP)中。

[0181] 108.如实施例105-107中任一项所述的药物组合物,其进一步包含电穿孔缓冲液。

[0182] 109.如实施例105-108中任一项所述的药物组合物,其进一步包含转染试剂。

[0183] 110.一种原TDSC(proto-TDSC),其包括:

[0184] a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

[0185] b)双链区;

[0186] c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

[0187] 其中所述原TDSC包含一个或多个(例如,1或2个)尿嘧啶核苷酸。

[0188] 111.如实施例110所述的原TDSC,其中上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含一个或多个(例如,1或2个)尿嘧啶核苷酸。

[0189] 112.如实施例110或111所述的原TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含一个或多个(例如,1或2个)尿嘧啶核苷酸。

[0190] 113.如实施例110-112中任一项所述的原TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含环结构。

[0191] 114.如实施例110-113中任一项所述的原TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含环结构。

[0192] 115.如实施例110-114中任一项所述的原TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0193] 116.如实施例110-115中任一项所述的原TDSC,其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式中的每个核苷酸都是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0194] 117.如实施例110-116中任一项所述的原TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0195] 118.如实施例110-117中任一项所述的原TDSC,其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式中的每个核苷酸都是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸、硼磷酸酯修饰的核苷酸、5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸、7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸和/或甲基化的核苷酸)。

[0196] 119.一种原TDSC,其包含:

[0197] a)上游核酸外切酶抗性DNA末端形式;

[0198] b)双链区;

[0199] c)下游核酸外切酶抗性DNA末端形式,

[0200] 其中所述上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含粘性末端,和/或其中所述下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含粘性末端。

[0201] 120.一种在靶细胞中表达异源负载的方法,所述方法包括:

[0202] (i)将如前述实施例中任一项所述的TDSC或组合物引入靶细胞中,其中所述TDSC的双链区包含编码异源负载的序列;以及

[0203] (ii)将所述细胞在适合于从所述TDSC表达所述异源负载的条件下维持(例如,孵育);

[0204] 从而在所述靶细胞中表达所述异源负载。

[0205] 121.一种在靶细胞中表达异源负载的方法,所述方法包括:

[0206] (i)提供包含如实施例1-119中任一项所述的TDSC或组合物的靶细胞,其中所述TDSC的双链区包含编码异源负载的序列;以及

[0207] (ii)将所述细胞在适合于从所述TDSC表达所述异源负载的条件下维持(例如,孵育);

[0208] 从而在所述靶细胞中表达所述异源负载。

[0209] 122.如实施例120或121所述的方法,其在离体或体内进行。

[0210] 123.一种将异源负载递送至靶细胞的方法,所述方法包括:

[0211] 将如实施例1-119中任一项所述的TDSC或组合物引入靶细胞中,其中所述TDSC的双链区包含编码异源负载的序列;

[0212] 从而将所述异源负载递送至所述靶细胞。

[0213] 124.一种调节(例如,增加或减少)靶细胞中的生物活性的方法,所述方法包括:

[0214] (i)将如实施例1-119中任一项所述的TDSC或组合物引入靶细胞,其中所述TDSC的双链区包含编码调节所述靶细胞中的生物活性的异源负载的序列;以及

[0215] (ii)将所述细胞在适合于从所述TDSC表达所述异源负载的条件下维持(例如,孵育);

[0216] 从而调节所述靶细胞中的生物活性。

[0217] 125.一种调节(例如,增加或减少)靶细胞中的生物活性的方法,所述方法包括:

[0218] (i)提供包含如实施例1-119中任一项所述的TDSC或组合物的靶细胞,其中所述TDSC的双链区包含编码调节所述靶细胞中的生物活性的异源负载的序列;以及

[0219] (ii)将所述细胞在适合于从所述TDSC表达所述异源负载的条件下维持(例如,孵育);

[0220] 从而调节所述靶细胞中的生物活性。

[0221] 126.如实施例124或125所述的方法,其中所述异源负载增加所述靶细胞中的生物活性。

[0222] 127.如实施例124或125所述的方法,其中所述异源负载减少所述靶细胞中的生物活性。

[0223] 128.如实施例124-127中任一项所述的方法,其中所述生物活性包括细胞生长、细胞代谢、细胞信号传导、细胞运动、特化、相互作用、分裂、运输、稳态、渗透或扩散。

[0224] 129.如实施例120-128中任一项所述的方法,其中所述细胞是动物细胞,例如哺乳动物细胞,例如人细胞。

[0225] 130.一种治疗有需要的细胞、组织或受试者的方法,所述方法包括:

[0226] 向所述细胞、组织或受试者施用如实施例1-119中任一项所述的TDSC或组合物,其中所述TDSC的双链区包含编码异源负载的序列;

[0227] 从而治疗所述细胞、组织或受试者。

[0228] 131.一种制备TDSC的方法,所述方法包括:

[0229] (i)连接:

[0230] 双链DNA分子至

[0231] 发夹DNA分子,其包含:包含一个或多个经化学修饰的核苷酸的环区和双链区;

[0232] 从而产生连接的dsDNA;以及

[0233] (ii)将所述连接的dsDNA与酶一起孵育,所述酶从所述连接的dsDNA上切割所述环区;

[0234] 从而制备TDSC。

[0235] 132.如实施例131所述的方法,其进一步包括将所述dsDNA(例如,在步骤ii之后)与产生平末端的酶(例如,绿豆核酸酶)一起孵育。

[0236] 133.如实施例131或132所述的方法,其中从所述连接的dsDNA切割所述环区的酶是尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)和DNA糖基化酶-裂解酶核酸内切酶VIII(例如,USER酶混合物)。

[0237] 134.一种制备TDSC的方法,所述方法包括:

[0238] (i)连接:

[0239] 双链DNA分子至

[0240] 发夹DNA分子,其包含:

[0241] 环区,以及

[0242] 双链区,

[0243] 其中所述发夹DNA分子包含,例如在环区中包含一个或多个经化学修饰的核苷酸;

[0244] 从而产生连接的dsDNA;以及

[0245] (ii)将所述连接的dsDNA与打开或切割所述环区的酶一起孵育;

[0246] 从而制备TDSC。

[0247] 135.如实施例134所述的方法,其中所述环区包含尿嘧啶核苷酸。

[0248] 136.如实施例134或135所述的方法,其中打开或切割所述环区的酶是尿嘧啶DNA糖基化酶(UDG)和DNA糖基化酶-裂解酶核酸内切酶VIII(例如,USER酶混合物)。

[0249] 137.一种制备TDSC的方法,所述方法包括连接:

[0250] 双链DNA分子至

[0251] 包含第一区和第二区的自退火DNA分子,其中所述第一区与所述第二区杂交;

[0252] 从而产生TDSC。

[0253] 138.如实施例137所述的方法,其中所述自退火DNA分子进一步包含所述第一区和所述第二区之间的环。

[0254] 139.如实施例138所述的方法,其中所述环包含异源功能序列,例如核靶向序列(例如CT3序列);或调节序列。

[0255] 140.如实施例138或139所述的方法,其中所述环包含如表3中所列的核靶向序列,或与其具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列。

[0256] 141.如实施例138-140中任一项所述的方法,其中所述环包含与表3中所列的核输入蛋白结合的核靶向序列。

[0257] 142.如实施例137-141中任一项所述的方法,其中所述自退火DNA分子不包含任何未杂交的核苷酸(例如,其中所述自退火DNA分子的所有核苷酸均与另一核苷酸杂交)。

[0258] 143.如实施例131-142中任一项所述的方法,其进一步包括将第二发夹DNA分子连接至所述双链DNA分子,其中所述第二发夹DNA分子包含环区和双链区,其中任选地所述第二发夹DNA分子包含所述环区或所述双链区之一或两者中的一个或多个经化学修饰的核苷酸。

[0259] 144.一种制备或制造TDSC的方法,所述方法包括:

[0260] a)提供包含封闭末端的TDSC,例如本文所述的TDSC;

[0261] b)将所述TDSC与双链DNA核酸外切酶例如核酸外切酶III,例如1μL的核酸外切酶III/5μg DNA在50μL中在37℃下孵育1小时,例如,如实例10中所述;

[0262] c)任选地,例如通过二氧化硅膜柱纯化步骤b)中处理的TDSC,例如,如实例10中所述,

[0263] 从而制备或制造所述TDSC。

[0264] 145.一种制备或制造TDSC的方法,所述方法包括:

[0265] a)提供原TDSC,例如已经用核酸外切酶III处理的原TDSC,其中所述原TDSC包含各自包含尿嘧啶的封闭DNA末端形式;

[0266] b)将所述原TDSC与尿嘧啶切除酶例如USER酶一起孵育,例如,将3μL的USER酶与100μL中的5μg DNA例如在37℃下孵育1小时,例如,如实例12中所述;

[0267] c)任选地,将所述TDSC与单链DNA核酸酶,例如绿豆核酸酶,例如10U绿豆核酸酶与约100μL中的5μg DNA例如在30℃下孵育30min,例如,如实例12中所述;

[0268] d)任选地,例如通过二氧化硅膜柱纯化步骤c)中处理的TDSC,例如,如实例12中所述,

[0269] 从而制备或制造所述TDSC。

[0270] 146.如实施例144或145所述的方法,其进一步包括例如通过琼脂糖凝胶测定TDSC的降解,例如,如实例10中所述。

[0271] 147.如实施例146所述的方法,其进一步包括响应于对降解的测定(例如,响应于确定降解低于预定值),执行以下一项或多项:释放所述TDSC、将所述TDSC放入容器中、配制所述TDSC、或向所述TDSC添加一种或多种赋形剂。

[0272] 148.一种制备或制造TDSC的方法,所述方法包括:

[0273] a)提供TDSC,例如,如实施例1-119中任一项所述的TDSC;

[0274] b)确定所述TDSC的结构是否与参考结构匹配;

[0275] 从而制备或制造所述TDSC。

[0276] 149.如实施例148所述的方法,其中(b)的确定包括对所述TDSC进行测序。

[0277] 150.如实施例148或149所述的方法,其中(b)的确定包括用限制酶消化TDSC。

[0278] 151.如实施例148-150中任一项所述的方法,其中与所述参考结构匹配的所述TDSC的结构与所述参考结构相同。

[0279] 152.如实施例148-151中任一项所述的方法,其中与所述参考结构匹配的所述TDSC的结构具有与所述参考结构相同的序列。

[0280] 153.如实施例148-152中任一项所述的方法,其中与所述参考结构匹配的所述TDSC的结构具有与所述参考结构相同的长度。

[0281] 在实施例中,TDSC具有至少15个核苷酸、至少30个核苷酸、至少50个核苷酸、至少

75个核苷酸、100个核苷酸、至少200个核苷酸、至少300个核苷酸、至少500个核苷酸、至少750个核苷酸、至少1,000个核苷酸、至少2,000个核苷酸、至少3,000个核苷酸、至少4,000个核苷酸、至少5,000个核苷酸、至少10,000个核苷酸、至少15,000个核苷酸、至少20,000个核苷酸、至少25,000个核苷酸、至少30,000个核苷酸、至少35,000个核苷酸、至少40,000个核苷酸、至少45,000个核苷酸、至少50,000个核苷酸、至少60,000个核苷酸或更多。

[0282] 在实施例中,TDSC具有20至1000个核苷酸、20至50个核苷酸、100至500个核苷酸、500至50,000个核苷酸、1,000至50,000个核苷酸、2,000至40,000个核苷酸、5,000至50,000个核苷酸、500至50,000个核苷酸、500至25,000个核苷酸、1,000至20,000个核苷酸、1,000至10,000个核苷酸、10,000至60,000个核苷酸、1,000至20,000个核苷酸、1,000至40,000个核苷酸。

[0283] 在实施例中,TDSC包含至少一种核苷酸修饰,例如,共价核苷酸修饰,例如选自:N6-甲基腺苷(m6A,6mA);5-甲酰基胞嘧啶(5-甲酰基-2'-脱氧胞嘧啶,5fC,f5C);5-羧基胞嘧啶(5-羧基-2'-脱氧胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶、ca5C、5caC);5-羟基甲基胞嘧啶(5-羟基甲基-2'-脱氧胞嘧啶、5hmC、hm5C);5-甲基脱氧胞嘧啶(5-甲基胞嘧啶;5-甲基-2'-脱氧胞嘧啶;m5dC;5mC,m5C);5'-甲基胞嘧啶;3-甲基胞嘧啶(m3C);5-甲基嘧啶;8-氧代鸟嘌呤(8-oxoG);硫代磷酸酯;S和R硫代磷酸酯键联;甲基胸腺嘧啶;N3'-P5'氨基磷酸酯(NP)。在一些实施例中,核苷酸修饰是碱基修饰。在一些实施例中,核苷酸修饰是主链修饰。在一些实施例中,核苷酸修饰是糖修饰。在一些实施例中,核苷酸修饰包含肽缀合物。在一些实施例中,核苷酸修饰包含蛋白缀合物。

[0284] 在实施例中,效应子序列是编码治疗性RNA(例如,mRNA或调节RNA)的DNA序列,其可操作地连接至启动子。在实施例中,RNA可以是例如mRNA、tRNA、lncRNA、miRNA、rRNA、snRNA、微小RNA、siRNA、piRNA、snoRNA、snRNA、exRNA、scaRNA、Y RNA或hnRNA。

[0285] 在实施例中,效应子序列是编码治疗性肽或多肽的DNA序列,其可操作地连接至启动子。治疗性肽或多肽可以是例如DNA结合蛋白;RNA结合蛋白;转运蛋白;转录因子;翻译因子;核糖体蛋白;染色质重塑因子;表观遗传修饰因子;抗原;激素;酶(例如核酸酶,例如核酸内切酶,例如CRISPR系统的核酸酶元件,例如Cas9、dCas9、Cas9切口酶、Cpf/Cas12a);Crispr连接的酶,例如碱基编辑器或引导编辑器(prime editor);移动遗传元件蛋白(例如,转座酶、逆转录转座酶、重组酶、整合酶);基因书写器(Gene Writer)多肽;聚合酶;甲基化酶;去甲基化酶;乙酰化酶;去乙酰化酶;激酶;磷酸酶;连接酶;去泛素酶;蛋白酶;整合酶;重组酶;拓扑异构酶;旋转酶;解旋酶;溶酶体酸性水解酶);抗体(例如完整抗体、其片段,或纳米抗体);信号传导肽;受体配体;受体;凝血因子(clotting factor);凝血因子(coagulation factor);结构蛋白;胱天蛋白酶;膜蛋白;线粒体蛋白;核蛋白;或工程改造的结合剂,例如centyrin、darpin或纤维连接蛋白(adnectin)。在实施例中,效应子序列是编码报告蛋白的DNA序列。

[0286] 在实施例中,TDSC可以包括多个效应子序列。多个效应子序列可以是相同或不同类型,例如,TDSC可以包括作为结构DNA的效应子序列和作为编码功能性RNA或多肽的DNA序列的第二效应子序列。TDSC可以包括作为编码功能性RNA的DNA序列的效应子序列和作为编码功能性多肽的DNA序列的第二效应子序列。多个效应子序列可以是相同类型的相同或不同序列。

[0287] 在实施例中,TDSC不置于载剂中,例如,其被配制用于裸施用。

[0288] 在实施例中,TDSC与载剂一起配制,所述载剂例如基于脂质的载剂,例如LNP。

[0289] 在实施例中,TDSC与药物赋形剂一起配制。

[0290] 在实施例中,TDSC被配制用于肠胃外施用。

[0291] 在实施例中,药物组合物被配制用于局部施用。

[0292] 在实施例中,药物组合物基本上不含选自下组的杂质或过程副产物,所述组由以下组成:内毒素、单核苷酸、经化学修饰的单核苷酸、DNA片段或截短物以及蛋白(例如酶,例如连接酶、限制性酶)。在一些实施例中,药物组合物基本上不含环状DNA。

[0293] 另一方面,本发明包括将效应子递送至受试者例如有需要的受试者的方法。所述方法包括向受试者施用本文所述的组合物,例如上述任何如实施例中描述的组合物。在实施例中,受试者患有或已被诊断患有可用效应子治疗的病症。

[0294] 另一方面,本发明包括调节(例如,增加或减少)细胞、组织或受试者中的生物参数的方法。所述方法包括向受试者施用本文所述的组合物,例如上述任何如实施例中描述的组合物。在实施例中,生物学参数是靶细胞、组织或受试者中主题基因的基因表达的增加或减少,所述增加或减少是通过本文所述的效应子序列实现的。在实施例中,受试者患有或已被诊断患有可用效应子治疗的病症。

[0295] 另一方面,本发明包括治疗细胞、组织或受试者的方法。所述方法包括向有需要的细胞、组织或受试者施用本文所述的、例如上述任何实施例中描述的TDSC或构建体。在实施例中,受试者患有或已被诊断患有可用效应子治疗的病症。

[0296] 本披露还提供了制备本文所述的TDSC和dsDNA组合物的方法。在实施例中,所述方法包括执行金门(golden gate)组装。

[0297] 在实施例中,所述方法进一步包括富集或纯化TDSC。

[0298] 在实施例中,富集或纯化包括从TDSC中基本上去除选自以下的一种或多种杂质:内毒素、单核苷酸、经化学修饰的单核苷酸、单链DNA、DNA片段或截短物以及蛋白(例如酶,例如连接酶、限制性酶)。

[0299] 在实施例中,所述方法进一步包括配制用于药用的富集或纯化的TDSC,例如将TDSC与药学上可接受的赋形剂和/或与载剂例如LNP一起配制。

[0300] 定义

[0301] 如本文所用,术语“抗体”是指与特定抗原特异性结合或进行免疫反应的分子,并且至少包括重链的可变结构域,并且通常至少包括免疫球蛋白的重链和轻链的可变结构域。抗体及其抗原结合片段、变体或衍生物包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人抗体、人源化抗体、灵长类化抗体或嵌合抗体、异源缀合抗体(例如双、三和四特异性抗体、双抗体、三抗体和四抗体)、单结构域抗体(sdAb)、表位结合片段(例如Fab、Fab’和$F(ab')_2$、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、rlgG、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、纳米抗体、包括VL或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段、和抗独特型(抗Id)抗体。本文所述的抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。此外,除非另有说明,否则术语“克隆抗体”(mAb)意在包括完整分子以及能够特异性结合靶蛋白的抗体片段(例如,Fab和F(ab’)2片段)。Fab和F(ab’)2片段缺少完整抗体的Fc片段。

[0302] 如本文所用,术语“载剂”意指利于或促进组合物(例如,编码本文所述的dsDNA的TDSC或核酸)转运或递送至细胞中的化合物、组合物、试剂或分子。例如,载剂可以是部分或完全包封剂。

[0303] 如本文所用,术语“经化学修饰的核苷酸”,如本文关于DNA所使用的,是指相对于规范脱氧核糖核苷酸(即G、T、C和A)包含一个或多个结构差异的核苷酸。经化学修饰的核苷酸可以具有(相对于规范核苷酸)经化学修饰的核碱基、经化学修饰的糖、经化学修饰的磷酸二酯键联或其组合。没有暗示特定的制备过程;例如,经化学修饰的核苷酸可以通过化学合成直接产生,或者通过共价修饰规范核苷酸来产生。

[0304] 如本文所用,术语“经化学修饰的胞嘧啶核苷酸”,如本文关于DNA所使用的,是指经化学修饰的核苷酸,其中核碱基包含单环6元环,其中碳4共价键合到不是环的六个成员之一的氮上,其中所述经化学修饰的胞嘧啶核苷酸的核碱基包含相对于规范胞嘧啶核碱基的一个或多个结构差异。在一些实施例中,核碱基的C-5位置可以具有除H之外的取代。没有暗示特定的制备过程。

[0305] 如本文所用,术语“封闭末端”是指DNA分子的位于双链区一端的一部分,其中所述DNA分子的所述部分内的所有核苷酸均共价附接至任一侧相邻的核苷酸。在一些实施例中,封闭末端可以包括包含不与另一核苷酸杂交的一个或多个核苷酸的环。在一些实施例中,封闭末端的每个核苷酸都与另一核苷酸杂交。在一些实施例中,TDSC包含第一封闭末端(例如,异源目标序列的上游)和第二封闭末端(例如,异源目标序列的下游)。

[0306] 如本文所用,术语“开放末端”是指DNA分子的位于双链区一端的一部分,其中至少一个核苷酸(“末端核苷酸”)仅与一个其他核苷酸共价附接。在一些实施例中,末端核苷酸包含游离的5’磷酸。在一些实施例中,末端核苷酸包含游离的3’OH。在一些实施例中,在包含第一DNA链和第二DNA链的TDSC中,开放末端包含第一DNA链上的第一末端核苷酸和第二DNA链上的第二末端核苷酸。在一些实施例中,TDSC包含第一开放末端(例如,异源目标序列的上游)和第二开放末端(例如,异源目标序列的下游)。在一些实施例中,开放末端包括平末端、粘性末端或Y-衔接子。

[0307] 如本文所用,术语“DNA”是指包含至少两个(例如,至少10个、至少20个、至少50个、至少100个)共价连接的脱氧核糖核苷酸的任何化合物和/或物质。在一些实施例中,DNA是单个寡核苷酸链,而在其他实施例中,DNA包含多个寡核苷酸链,而在又其他实施例中,DNA是寡核苷酸链的一部分。在一些实施例中,DNA是经由磷酸二酯键被掺入或可以被掺入寡核苷酸链的化合物和/或物质。在一些实施例中,DNA仅包含规范核苷酸。在一些实施例中,DNA包含一个或多个经化学修饰的核苷酸。在一些实施例中,DNA的至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、至少99%或100%的糖是脱氧核糖。在一些实施例中,DNA通过以下一种或多种来制备:从天然来源分离、通过基于互补模板的聚合的酶促合成(体内或体外)、在重组细胞或系统中复制以及化学合成。

[0308] 如本文所用,术语“DNA末端形式”是指包含位于TDSC末端的DNA的结构。在一些实施例中,DNA末端形式包含封闭末端。在其他实施例中,DNA末端形式包含开放末端。在一些实施例中,DNA末端形式包含发夹、环、Y-衔接子、平末端或粘性末端。DNA末端形式可包含单链区和双链区之一或两者。DNA末端形式可包含规范核苷酸、经化学修饰的核苷酸或其组合。在一些实施例中,DNA末端形式包含3-100个核苷酸。在一些实施例中,TDSC包含在第一

末端的第一DNA末端形式和在第二末端的第二DNA末端形式。在一些实施例中,TDSC的第一DNA末端形式和第二DNA末端形式是相同类型。在一些实施例中,TDSC的第一DNA末端形式和第二DNA末端形式是不同类型。

[0309] 如本文所用,术语“核酸外切酶抗性”当用于描述DNA时,表示所述DNA如果包含封闭末端,则对实例10中描述的核酸外切酶测定具有抗性,并且如果它包含开放末端(例如,两个开放末端),则对实例11中描述的核酸外切酶测定具有抗性。

[0310] 如本文所用,当用于参考第二元件来描述第一元件时,术语“异源的”意指第一元件和第二元件在自然界中不以如所描述的布置存在。例如,异源多肽、核酸分子、构建体或序列是指(a)对于表达其的细胞而言不是天然的多肽、核酸分子或多肽或核酸分子序列的一部分,(b)相对于其天然状态已发生改变或突变的多肽或核酸分子或多肽或核酸分子的一部分,或(c)具有与在类似条件下的天然表达水平相比改变的表达的多肽或核酸分子。例如,异源调节序列(例如启动子、增强子)可以用于调节基因或核酸分子的表达,其方式不同于基因或核酸分子通常在自然界中表达的方式。在另一个实例中,多肽或核酸序列的异源结构域(例如,多肽的DNA结合结构域或编码多肽的DNA结合结构域的核酸)可以相对于其他结构域布置,或者可以是不同的序列或相对于多肽的其他结构域或部分或其编码核酸来自不同来源。在某些实施例中,异源核酸分子可以存在于天然宿主细胞基因组中,但是可以具有改变的表达水平或具有不同的序列或两者。在其他实施例中,异源核酸分子对于宿主细胞或宿主基因组可能不是内源的,而是通过转化(例如,转染、电穿孔)引入宿主细胞的,其中所添加的分子可以整合到宿主基因组中,或可以作为染色体外遗传材料短暂存在(例如,mRNA)或半稳定存在超过一代(例如,游离病毒载体、质粒或其他自我复制载体)。

[0311] 如本文所用,术语“异源功能序列”是指与相邻(例如,直接相邻)核酸序列异源并具有一种或多种生物学功能的核酸序列。在一些实施例中,生物学功能包括靶向细胞器,例如核靶向。在一些实施例中,异源功能序列包含核靶向序列或调节序列。

[0312] 如本文所用,术语“增加”和“减少”是指相对于参考,调节分别产生指标的功能、表达或活性更大或更小的量。例如,在本文所述的方法中施用TDSC之后,本文所述的指标的量(例如,基因表达的水平或先天免疫的标志物)可以在受试者中增加或减少至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或98%或更多,这是相对于施用前所述标志物的量,或相对于施用对照TDSC,例如与未修饰的TDSC相比包含经化学修饰的核苷酸的TDSC。通常,在施用已达到所述作用的时间,例如在开始治疗方案后至少一天、一周、一个月、3个月、或6个月时,测量施用后的指标。

[0313] 如本文所用,关于本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸的术语“线性”是指包含彼此杂交的两条DNA链或部分链(从而形成双链区)的核酸,其中所述结构包括两个末端。末端可以是封闭末端或开放末端。彼此杂交的两条链可以部分或完全互补。在一些实施例中,线性TDSC由在变性条件下为环状的DNA单链组成,其中在生理条件下,所述链的第一部分与所述链的第二部分杂交(从而形成双链区),并且线性TDSC包含含有第一环的第一封闭末端和含有第二环的第二封闭末端。

[0314] 如本文所用,术语“环”是指单链核酸序列。环的两个末端通过称为“茎”的双链区连接,形成“茎环”。

[0315] 如本文所用,术语“维持序列”是能够实现或促进DNA分子通过细胞分裂保留在细胞核中的DNA序列或基序。维持序列通常通过与促进染色质成环的蛋白相互作用来实现DNA在细胞核中的复制和/或转录。维持序列的实例是支架/基质附着区域(S/MAR元件)。

[0316] 如本文所用,“核靶向序列”是能够实现或促进DNA进入靶细胞核中的DNA序列。在一些实施例中,核靶向序列是表3的DNA序列。

[0317] 如本文所用,“药物组合物”或“药物制剂”是指用于动物(例如人)或兽医药物用途,例如用于非人动物或人的预防、诊断或治疗用途的组合物或制剂。药物制剂包含与药学上可接受的赋形剂或稀释剂组合的对受试者的细胞或组织具有生物学作用(例如具有药理学活性或缓解、治疗或预防疾病的作用)的活性剂。药物组合物还意指预防性、诊断性或治疗性组合物的成品剂型或配制品。

[0318] 如本文所用,术语“肽”、“多肽”和“蛋白”可互换使用,并且是指包含通过肽键或肽键以外的方式共价连接的氨基酸残基的化合物。蛋白或肽必须含有至少两个氨基酸,并且对可以包含蛋白或肽的序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含两个或更多个通过肽键或通过除了肽键之外的方式相互连接的氨基酸的任何肽或蛋白。如本文所用,所述术语是指短链和长链二者,所述短链在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚体,并且所述长链在本领域中通常称为蛋白,这些蛋白具有许多类型。在一些实施例中,多肽包含非规范氨基酸残基。如本文所用,术语“原核端粒酶序列”是指能够由将第一原核端粒酶识别序列(PRS)连接到第二PRS的原核端粒酶产生的核苷酸序列。在一些实施例中,原核端粒酶序列通过涉及原核端粒酶的方法产生,并且在其他实施例中,原核端粒酶序列通过不涉及原核端粒酶的方法(例如,通过固相合成)产生。

[0319] 如本文所用,dsDNA的“有义链”是与编码功能蛋白的mRNA或前体mRNA(pre-mRNA)具有相同序列并且不用作转录模板的链。dsDNA的“反义链”是具有与编码功能蛋白的mRNA或前体mRNA互补的序列和/或可以用作转录模板的链。

[0320] 如本文所用,术语“双链DNA”或dsDNA是指包含彼此碱基配对的两条互补脱氧核糖核苷酸链的DNA组合物。两条互补链可以具有完全互补性,或者可以具有一个或多个错配,例如形成凸起。在一些实施例中,两条链中的任一条可以具有成对的自我互补区域,其以折叠构型形成分子内/链内双链基序,例如可以形成发夹环、连接、凸起或内环。在一些实施例中,dsDNA包含一个或两个封闭末端。在一些实施例中,dsDNA分子是环状或线性的。在一些实施例中(例如,在具有封闭末端的dsDNA分子中),脱氧核糖核苷酸的两条互补链是共价连接的。

[0321] 如本文所用,术语“治疗性双链构建体”(“TDSC”)是指包含DNA的线性构建体,其中所述构建体是至少部分双链的。TDSC不包含质粒主链序列(例如,不包含细菌复制起点)。TDSC不包含病毒衣壳或病毒包膜。在一些实施例中,TDSC包含封闭末端或开放末端(例如,平末端或粘性末端)。在一些实施例中,TDSC适合施用于人受试者。

[0322] 如本文所用,术语“原TDSC”是指可以转化为TDSC的构建体。在一些实施例中,原TDSC是制造中间体,其可以经历一个或多个步骤(例如,切割步骤)以转化成TDSC。在一些实施例中,原TDSC落入TDSC的定义之内,例如,原TDSC是第一TDSC,并且可以经历一个或多个步骤以转化成第二TDSC。

[0323] 如本文所用,术语“末端核苷酸”是指仅与一个其他核苷酸共价附接的核苷酸。在

一些实施例中,末端核苷酸包含游离的5’磷酸。在一些实施例中,末端核苷酸包含游离的3’OH。

[0324] 如本文所用,“治疗(treatment和treating)”是指对受试者进行的旨在改善、减轻、稳定(即不恶化)、预防或治愈疾病、病理状况或障碍的医疗管理。所述术语包括活性治疗(旨在改善疾病、病理状况或障碍的治疗)、病因治疗(针对相关疾病、病理状况或障碍的原因的治疗)、姑息治疗(旨在缓解症状的治疗)、预防性治疗(旨在最大程度减少或部分或完全抑制相关疾病、病理状况或障碍发展的治疗);以及支持治疗(用于补充另一疗法的治疗)。治疗还包括削减疾病或病症的程度;预防疾病或病症的传播;延迟或减缓疾病或病症的进展;改善或减轻疾病或病症;以及缓解(不管是部分缓解还是完全缓解),不管是可检测的还是不可检测的。改善或减轻疾病或病症意指与缺乏治疗下的程度或时间进程相比,所述疾病、障碍或病症的程度和/或不良临床表现减少和/或进展的时间进程被减缓或加长。“治疗”还可以意指与不接受治疗的预期存活相比延长存活。需要治疗的那些包括已经患有病症或障碍的那些,以及易于患有病症或障碍的那些,或其中要预防病症或障碍的那些。

[0325] 如本文所用,术语“Y-衔接子”是指包含彼此互补(例如,完全互补)的第一核酸区域和第二核酸区域的核酸结构;第一和第二区可以杂交以形成双链区。第一核酸区域与第三核酸区域共价连接,第二核酸区域与第四核酸区域共价连接,并且第三和第四核酸区域基本上彼此不互补;第三和第四区域可以是单链的。第一核酸区域在第三核酸区域的3’并且第二核酸区域在第四核酸区域的5’。结果,第三和第四区域可以位于双链区的同一侧。Y-衔接子可以是TDSC的一部分。

附图说明

[0326] 图1A-1B的一系列图显示了可包含在如本文所述的治疗性双链构建体(TDSC)(例如,在TDSC的一个末端或两个末端)中的示例性共价封闭DNA末端形式。图1A所示的是示例性TDSC,其不包含环末端(例如原核端粒酶序列)、反向末端重复序列(ITR)或末端发夹,其可以由未修饰的核苷酸(白色符号)构成或者可以包含经化学修饰的核苷酸(灰色符号)。经化学修饰的核苷酸可包括例如在主链、糖或碱基中修饰的核苷酸,或与肽或蛋白缀合的核苷酸。在一些情况下,两条DNA链都未修饰。在某些情况下,两条DNA链都经化学修饰。在一些情况下,反义链经化学修饰。在一些情况下,有义链经化学修饰。图1A中的实线框表示末端用发夹共价封闭的dsDNA分子,例如具有包含硫代磷酸酯修饰的末端形式的线性共价封闭dsDNA分子。图1A中的虚线框表示共价封闭且没有环末端的dsDNA分子,例如具有TelN末端形式的线性共价封闭dsDNA分子。

[0327] 图2的一系列图显示双链DNA构建体,包括示例性TDSC,其包含非共价封闭的示例性DNA末端形式(例如,在一个或两个末端)。此类示例性TDSC可以包含Y末端(例如,Y衔接子,例如,如本文所述)。在一些情况下,DNA末端形式可以由未修饰的核苷酸(白色符号)构成。在一些情况下,DNA末端形式包含经化学修饰的核苷酸(灰色符号)。经化学修饰的核苷酸可包括例如在主链、糖或碱基中修饰的核苷酸,或与肽或蛋白缀合的核苷酸。在一些情况下,两条DNA链都未修饰。在某些情况下,两条DNA链都经化学修饰。在一些情况下,反义链经化学修饰。在一些情况下,有义链经化学修饰。右上角还显示了缺乏DNA末端形式或化学修饰的示例性DNA构建体(即未修饰的双链DNA分子)。

[0328] 图3的一系列图显示包含平末端DNA末端形式的示例性TDSC的产生,所述平末端DNA末端形式包括在每条链的末端核苷酸之间的三个硫代磷酸酯修饰。简而言之,将茎末端包含硫代磷酸酯修饰的核苷酸的发夹结构连接至加A尾的双链DNA。发夹包含一对尿嘧啶核苷酸(箭头)。随后用USER酶处理导致尿嘧啶位置处的切割,产生突出端,然后使用核酸酶(例如,单链特异性核酸酶,例如绿豆核酸酶)将其修剪回硫代磷酸酯修饰的核苷酸。图3分别按出现的顺序披露了SEQ ID NO 85和86。

[0329] 图4的一系列图显示包含平末端DNA末端形式的示例性TDSC的产生,所述平末端DNA末端形式包括在每条链的末端核苷酸之间的六个硫代磷酸酯修饰。简而言之,将茎末端包含硫代磷酸酯修饰的核苷酸的发夹结构连接至加A尾的双链DNA。发夹包含一对尿嘧啶核苷酸(箭头)。随后用USER酶处理导致尿嘧啶位置处的切割,产生突出端,然后使用核酸酶(例如,单链特异性核酸酶,例如绿豆核酸酶)将其修剪回硫代磷酸酯修饰的核苷酸。图4分别按出现的顺序披露了SEQ ID NO 87和88。

[0330] 图5的一系列图显示在每个末端包含Y衔接子DNA末端形式的示例性TDSC的产生。简而言之,将环区中包含尿嘧啶核苷酸的发夹结构连接至加A尾的双链DNA。在实施例中,环区包含核苷酸之间的硫代磷酸酯修饰。随后用USER酶处理导致环中尿嘧啶切割,产生两条非杂交链,其在dsDNA的末端形成Y衔接子结构。图5分别按出现的顺序披露了SEQ ID NO 89-92、92和91。

[0331] 图6的一系列图显示可包括在如本文所述的TDSC中的示例性共价封闭DNA末端形式。DNA形式包括,例如,包含发夹的小环衔接子、大环衔接子(例如,包含发夹,所述发夹在其单链环区中包含一个或多个功能元件,例如CT3 ssDNA序列),和无环衔接子,其中DNA末端形式的每个核苷酸与另一个核苷酸杂交并且其中末端共价封闭。这些示例性末端形式中的每一种可以例如连接至双链DNA以形成如本文所述的TDSC的一个末端。图6分别按出现的顺序披露了SEQ ID NO 93-95。

[0332] 图7A描绘了显示核酸外切酶处理后的TDSC的琼脂糖凝胶。图7B显示了指定为6a的TDSC,对应于琼脂糖凝胶的泳道3和4。图7C显示了指定为3a的TDSC,对应于琼脂糖凝胶的泳道5和6。图7D显示了指定为Ya的TDSC的一个末端,对应于琼脂糖凝胶的泳道7和8。图7D分别按出现的顺序披露了SEQ ID NO 96和97。

[0333] 图8的图描述了具有包含六个硫代磷酸酯修饰的末端形式(P6形式)的共价封闭TDSC的产生。图8分别按出现的顺序披露了SEQ ID NO 98和99。

[0334] 图9的图描绘了具有Te1N末端形式的共价封闭TDSC的产生。图9分别按出现的顺序披露了SEQ ID NO 100、100和101。

[0335] 图10的图描述了产生环状dsDNA分子的示例性方法。线性dsDNA分子可以与限制性酶(例如KpnI)接触,产生相容的粘性末端,然后可以通过连接将粘性末端彼此连接,产生环状dsDNA。图10分别按出现的顺序披露了SEQ ID NO 102-105。

[0336] 图11显示了在使用25%5-甲酰基-dCTP的反应中产生的环状dsDNA的片段分析仪迹线。

[0337] 图12显示了在使用25%5-甲酰基-dCTP的反应中产生的具有包含硫代磷酸酯修饰的末端形式的共价封闭TDSC的片段分析仪迹线。

[0338] 图13显示了在使用25%5-甲酰基-dCTP的反应中产生的具有Te1N末端形式的共价

封闭TDSC的片段分析仪迹线。

[0339] 图14A和14B的图显示了报告蛋白mCherry在HEKa细胞中的表达,所述细胞被共价封闭的TDSC脂转染,所述TDSC包含TelN末端形式(TelN形式)、包含在每个末端形式中有六个硫代磷酸酯修饰的末端形式(P6形式)的共价封闭TDSC、或环状dsDNA分子(cdsDNA形式)。TDSC和环状dsDNA分子是在使用未修饰的胞嘧啶或25%5-甲酰基-dCTP的反应中产生的。图14A显示了表达mCherry的细胞的百分比,并且图14B显示了总荧光,其定义为表达细胞的百分比乘以平均荧光强度。

[0340] 图15A-15C的一系列图显示了用共价封闭TDSC进行脂质转染后HEKa细胞中IFNβ(图15A)、CXCL10(图15B)和IL6(图15C)的mRNA水平,所述TDSC包含TelN末端形式(TelN形式)、包含在每个末端形式中有六个硫代磷酸酯修饰的末端形式(P6形式)的共价封闭TDSC、或环状dsDNA分子(cdsDNA形式)。TDSC和环状dsDNA分子是在使用未修饰的胞嘧啶或25%5-甲酰基-dCTP的反应中产生的。RNA表达针对GAPDH进行归一化,并表示为相对于方法对照(无DNA转染)的倍数变化。

[0341] 图16A-16C的一系列图显示了用共价封闭TDSC进行脂质转染后THP1细胞中IFNβ(图16A)、CXCL10(图16B)和IL6(图16C)的mRNA水平,所述TDSC包含TelN末端形式(TelN形式)、包含在每个末端形式中有六个硫代磷酸酯修饰的末端形式(P6形式)的共价封闭TDSC、或环状dsDNA分子(cdsDNA形式)。TDSC和环状dsDNA分子是在使用未修饰的胞嘧啶或25%5-甲酰基-dCTP的反应中产生的。RNA表达针对GAPDH进行归一化,并表示为相对于方法对照(无DNA转染)的倍数变化。

[0342] 图17的散点图显示了HEKa细胞对包含以下的TDSC的先天免疫应答:硫代磷酸化末端衔接子和在胞嘧啶的C-5位置处的指定修饰(即,5-甲酰基胞嘧啶、5-羟基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶或5-羟基甲基胞嘧啶)。X轴代表干扰素信号传导的减少,定义为标志物IFNB和CXCL10相对于使用未修饰的胞嘧啶产生的TDSC的平均倍数变化减少。Y轴代表炎性细胞因子信号传导的减少,定义为标志物IL6和TNFa相对于使用未修饰的胞嘧啶产生的TDSC的平均倍数变化减少。

具体实施方式

[0343] 本披露涉及用于向细胞、组织或受试者(例如体内或体外)提供效应子(例如治疗性效应子)的组合物和方法。效应子可以是DNA序列、多肽(例如治疗性蛋白)或RNA(例如调节性RNA或mRNA)。

[0344] DNA构建体的元件

[0345] 本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸含有足以将效应子序列递送至靶细胞、组织或受试者的元件。在一些实施例中,效应子序列是DNA序列。在一些实施例中,TDSC驱动效应子的表达,例如包含启动子和编码RNA或多肽(例如治疗性RNA或多肽)的序列。在一些实施例中,本文所述的DNA构建体进一步包含以下一者或两者:核靶向序列和维持序列。虽然本文的许多如实施例涉及TDSC,但应理解,如果适用,涉及TDSC的如实施例也可适用于包含dsDNA的核酸。

[0346] 核酸外切酶抗性DNA末端形式

[0347] 本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸在双链DNA分子的每个末端包含DNA末端形

式。在一些情况下,本文所述的DNA末端形式可以包含封闭末端,其中DNA末端形式的每个核苷酸共价附接至DNA末端形式的两个其他核苷酸。在其他情况下,本文所述的DNA末端形式包含开放末端,所述开放末端包含仅共价连接至DNA末端形式的一个其他核苷酸的至少一个核苷酸。DNA末端形式通常具有核酸外切酶抗性。在一些情况下,包含封闭末端(例如,共价封闭末端)的DNA末端形式对实例10中描述的核酸外切酶测定具有抗性。在一些情况下,包含开放末端(例如,例如Y衔接子、平末端或粘性末端,例如,如本文所述)的DNA末端形式对实例11中所述的核酸外切酶测定具有抗性。

[0348] 封闭末端,例如发夹

[0349] 在一些实施例中,核酸外切酶抗性DNA末端形式包含DNA发夹。发夹通常包含在5'和3'末端共价附接至双链茎区的单链环区。在某些实施例中,单链环区包含一个或多个未与另一核苷酸杂交的核苷酸(例如,1-2、2-5、5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-35、或35-40个核苷酸)。示例性发夹结构和包含发夹的示例性TDSC显示于图1A中。

[0350] 在某些实施例中,单链环区包含一种或多种功能元件(例如,核输入序列(例如,CT3 ssDNA序列)或调节序列。在实施例中,单链环区中包含的功能元件与DNA末端形式和/或包含DNA末端形式的TDSC的一个或多个其他元件异源。在某些实施例中,发夹环的单链环区的长度小于约5、10、15、20、25、26、27、28、29或30个核苷酸。

[0351] 在实施例中,发夹包含在具有狗骨(doggybone)构象的TDSC中。在实施例中,发夹包含原核端粒酶序列(例如,如本文所述)。在实施例中,原核端粒酶序列通过TelN原核端粒酶、ResT原核端粒酶、Tel PY54原核端粒酶或TelK原核端粒酶消化产生。在实施例中,原核端粒酶序列的长度小于约15、20、25、26、27、28、29或30个核苷酸。在实施例中,原核端粒酶序列的长度在约28(例如,25、26、27、28、29、30、31、32、33、34或35)个核苷酸和约56(例如,50、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60)个核苷酸之间。在实施例中,原核端粒酶序列的长度大于约56(例如,大于50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、65、70、75、80、90或100)个核苷酸。

[0352] 发夹可以附接至双链DNA分子(例如,如本文所述的原TDSC)的一个末端或两个末端,例如通过连接(例如,如本文所述)。在一些实施例中,本文所述的TDSC在一个末端或两个末端包含DNA发夹环。在一些实施例中,本文所述的TDSC的上游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含DNA发夹环。在一些实施例中,本文所述的TDSC的下游核酸外切酶抗性DNA末端形式包含DNA发夹环。

[0353] 在某些实施例中,DNA发夹环包含一个或多个未修饰的核苷酸。在实施例中,DNA发夹环完全由未修饰的核苷酸组成。在某些实施例中,DNA发夹环包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,DNA发夹环完全由经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)组成。

[0354] 在某些实施例中,DNA发夹环的单链环区包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,单链环区中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%的核苷酸是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,DNA发夹环的单链环区完全由经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)组成。在某些实施例中,DNA发夹环的单链环区包含一个或多个未修饰的核苷酸。在实施例中,DNA

发夹环的单链环区完全由未修饰的核苷酸组成。

[0355] 在某些实施例中,DNA发夹环的双链茎区包含一个或多个未修饰的核苷酸。在实施例中,DNA发夹环的双链茎区完全由未修饰的核苷酸组成。在某些实施例中,DNA发夹环的双链茎区包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,双链茎区中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%的核苷酸是经修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,DNA发夹环的双链茎区完全由经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)组成。

[0356] 在实施例中,DNA发夹环的单链环区包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)并且双链茎区包含一个或多个未修饰的核苷酸。在实施例中,单链环区中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%的核苷酸是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,DNA发夹环的单链环区完全由经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)组成并且双链茎区完全由未修饰的核苷酸组成。

[0357] Y-衔接子

[0358] 在一些实施例中,本文所述的核酸外切酶抗性DNA末端形式包含Y-衔接子。如本文所述,Y-衔接子通常包含一对单链DNA区,其各自在一个末端附接至双链DNA区的链,从而形成“Y”形状(其中“Y”的基部代表双链DNA区,“Y”的每个上叉代表两个单链DNA区)。示例性的Y-衔接子结构和包含Y-衔接子的示例性TDSC示于图2中。

[0359] 在一些实施例中,Y-衔接子通过将包含单链区的发夹环附接至双链DNA区的末端(例如,通过连接)来产生,所述单链区包含可切割部分(例如,尿嘧啶核苷酸)。然后可以切割可切割部分(例如,通过用能够切割可切割部分的酶,例如USER酶处理)以产生Y-衔接子的两个单链DNA区。

[0360] 在某些实施例中,Y-衔接子的单链DNA区(例如,一个或两个单链DNA区)包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,单链DNA区中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%的核苷酸是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,Y-衔接子的单链DNA区(例如,一个或两个单链DNA区)完全由经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)组成。在某些实施例中,Y-衔接子的单链DNA区(例如,一个或两个单链DNA区)包含一个或多个未修饰的核苷酸。

[0361] 在实施例中,Y-衔接子的单链DNA区(例如,一个或两个单链DNA区)包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)并且Y-衔接子的双链DNA区包含一个或多个未修饰的核苷酸。在实施例中,一个或多个单链DNA区中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%的核苷酸是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,Y-衔接子的单链DNA区(例如,一个或两个单链DNA区)完全由经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)组成并且Y衔接子的双链DNA区完全由未修饰的核苷酸组成。

[0362] 无环封闭DNA末端形式

[0363] 在一些实施例中,本文所述的TDSC包含共价封闭但不包括发夹环的核酸外切酶抗

性DNA末端形式。例如,在某些实施例中,共价封闭DNA末端形式的每个核苷酸与另一核苷酸杂交(例如,如图6的示例性“无环衔接子”所示)。在某些实施例中,共价封闭DNA末端形式包含第一区和第二区,其中第一区能够整体与第二区杂交(例如,其中第一区与第二区互补)并且其中第一区的3’末端共价附接至第二区的5’末端。在实施例中,如本文所述的共价封闭DNA末端形式可以例如通过连接而附接至如本文所述的原TDSC的一个末端。

[0364] 开放DNA末端形式

[0365] 在一些实施例中,本文所述的TDSC包含非共价封闭的核酸外切酶抗性DNA末端形式。在某些实施例中,DNA末端形式包含平末端(例如,包含如本文所述的一种或多种化学修饰的平末端)或粘性末端(例如,包含如本文所述的一种或多种化学修饰的粘性末端)。

[0366] 在某些实施例中,开放DNA末端形式通过核酸酶消化共价封闭DNA末端形式例如DNA发夹产生。在实施例中,DNA发夹包含双链茎区,所述双链茎区在每条链上包含可切割部分(例如,尿嘧啶核苷酸),并且然后使DNA发夹与能够切割所述可切割部分的酶(例如,USER酶)接触。在实施例中,这导致包含突出端的粘性末端的形成。在实施例中,用酶(例如,单链特异性核酸酶,例如绿豆核酸酶)消化突出端以形成平末端。

[0367] 在某些实施例中,包含平末端的DNA末端形式包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,包含平末端的DNA末端形式中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%的核苷酸是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,包含平末端的DNA末端形式完全由经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)组成。在实施例中,包含平末端的DNA末端形式的末端碱基对包含经化学修饰的核苷酸(例如,碱基对的一个或两个核苷酸被化学修饰),例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述。在实施例中,DNA末端形式的末端处的多个碱基对(例如,2、3、4、5或6个碱基对)包含经化学修饰的核苷酸(例如,碱基对的一个或两个核苷酸被化学修饰),例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述。在实施例中,DNA末端形式的末端处的三个碱基对包含经化学修饰的核苷酸(例如,碱基对的一个或两个核苷酸被化学修饰),例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述。在实施例中,DNA末端形式的末端处的六个碱基对包含经化学修饰的核苷酸(例如,碱基对的一个或两个核苷酸被化学修饰),例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述。

[0368] 在某些实施例中,包含粘性末端的DNA末端形式包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,包含粘性末端的DNA末端形式中至少50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%或99%的核苷酸是经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)。在实施例中,包含粘性末端的DNA末端形式完全由经化学修饰的核苷酸(例如,硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述)组成。在实施例中,包含粘性末端的DNA末端形式的末端核苷酸包含经化学修饰的核苷酸(例如,碱基对的一个或两个核苷酸被化学修饰),例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述。在实施例中,DNA末端形式的粘性末端的突出端区域包含一个或多个经化学修饰的核苷酸,例如硫代磷酸酯修饰的核苷酸,例如,如本文所述。

[0369] 反向末端重复序列(ITR)

[0370] 在一些实施例中,如本文所述的TDSC包含含有反向末端重复序列(ITR)的核酸外

切酶抗性DNA末端形式。在一些实施例中,ITR是来自病毒例如腺病毒或腺相关病毒(AAV)的ITR。在一些实施例中,ITR包含与来自病毒例如腺病毒或腺相关病毒(AAV)的ITR序列具有至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列同一性的核酸序列。在某些实施例中,ITR包含复制起点(例如,病毒复制起点)。在实施例中,本文所述的TDSC包含在每个末端含有ITR(例如,如本文所述)的核酸外切酶抗性DNA末端形式。在一些实施例中,TDSC不包含ITR。

[0371] 启动子和其他调节序列

[0372] 本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸可以含有可操作地连接至效应子序列的启动子(RNA聚合酶和转录因子直接或间接结合以启动转录的DNA序列)。启动子可以在自然界中发现,其可操作地连接至效应子序列,或者可以与效应子序列异源。本文所述的启动子可以是靶细胞或组织天然的,或对于靶细胞或组织异源的。启动子可以是组成型的、诱导型的和/或组织特异性的。

[0373] 组成型启动子的实例包括逆转录病毒劳斯肉瘤病毒(RSV)LTR启动子(任选地具有RSV增强子)、巨细胞病毒(CMV)启动子(任选地具有CMV增强子)(参见,例如,Boshart等人,Cell[细胞],41:521-530(1985))、SV40启动子、二氢叶酸还原酶启动子、β-肌动蛋白启动子、磷酸甘油激酶(PGK)启动子和EF1α启动子。

[0374] 诱导型启动子允许对表达的调节并且可以受到外源提供的化合物、环境因素(如温度)、或存在特异性生理状态(例如,急性期、细胞的特定分化状态、或仅在复制细胞时)的调节。诱导型启动子和诱导型系统可从多种来源获得。受外源提供的启动子调节的诱导型启动子的实例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],93:3346-3351(1996)),四环素抑制系统(Gossen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],89:5547-5551(1992)),四环素诱导系统(Gossen等人,Science[科学],268:1766-1769(1995),另见Harvey等人,Curr.Opin.Chem.Biol.[化学生物学新见],2:512-518(1998)),RU486诱导系统(Wang等人,Nat.Biotech.[自然-生物技术],15:239-243(1997)和Wang等人,Gene Ther.[基因治疗],4:432-441(1997))和雷帕霉素诱导型系统(Magari等人,J.Clin.Invest.[临床研究杂志],100:2865-2872(1997))。

[0375] 在一些实施例中,可以使用编码效应子的序列的天然启动子。

[0376] 在一些实施例中,调节序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下,组织特异性调节序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。此类组织特异性调节序列(例如,启动子、增强子等)是本领域已知的。示例性组织特异性调节序列包括但不限于以下组织特异性启动子:肝特异性甲状腺素结合球蛋白(TBG)启动子、胰岛素启动子、胰高血糖素启动子、生长抑素启动子、胰多肽(PPY)启动子、突触蛋白-1(Syn)启动子、肌酸激酶(MCK)启动子、哺乳动物结蛋白(DES)启动子、α-肌球蛋白重链(a-MHC)启动子或心肌肌钙蛋白T(cTnT)启动子。其他示例性启动子包括:β-肌动蛋白启动子、乙型肝炎病毒核心启动子,Sandig等人,Gene Ther.[基因治疗],3:1002-9(1996);甲胎蛋白(AFP)启动子,Arbuthnot等人,Hum.Gene Ther.[人类基因治疗],7:1503-14(1996)),骨钙素启动子(Stein等人,Mol.Biol.Rep.[分子生物学报告],24:185-96(1997));骨唾液蛋白启动子

(Chen等人,J.Bone Miner.Res.[骨与矿物质研究杂志]11:654-64(1996)),CD2启动子(Hansal等人,J.Immunol.[免疫学杂志],161:1063-8(1998);免疫球蛋白重链启动子;T细胞受体α链启动子,神经元例如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等人Cell.Mol.Neurobiol.[细胞和分子神经生物学],13:503-15(1993)),神经丝轻链基因启动子(Piccioli等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊],88:5611-5(1991)),和神经元特异性vgf基因启动子(Piccioli等人,Neuron[神经元],15:373-84(1995)),以及其他本领域技术人员将已知的。

[0377] 表1列出了组织/细胞特异性启动子的实例:

[0378] 表1:组织或细胞特异性启动子

[0379]

组织/细胞	启动子	登录号;人基因组坐标(hg38)
骨骼肌	ACTA1	NM_001100; chr1:229,439,090-229,432,090
黑色素瘤	TYR	NM_000372; chr11:89,300,750-89,293,750
肝细胞癌	甲胎蛋白	NM_001354717; chr4:73,461,175-73,454,175
乳腺癌	粘蛋白 1	NM_001371720; chr1:155,197,900-155,190,900
前列腺癌	KLK3	NM_001648;chr19: 50,865,760-50,858,760
神经元细胞	ENO2	NM_001975; chr12:6,928,700-6,921,700
对缺氧的应答	HIF-1α	NM_001530; chr14:61,753,200-61,746,200
视网膜母细胞瘤	E2F1	NM_005225;chr20:

[0380]

组织/细胞	启动子	登录号；人基因组坐标（hg38）
		33,691,380-33,684,380
电离辐射	EGR-1	NM_001964； chr5:138,474,303-138,467,303
癌基因	ErbB2	NM_004448； chr17:39,735,530-39,728,530
内皮细胞	vWF	NM_000552； chr12:6,129,670-6,122,670
内皮细胞	FLT-1	NM_002019； chr13:28,500,100-28,493,100
内皮细胞	ICAM-2	NM_001099786； chr17:64,025,630-64,018,630
视网膜色素上皮	VMD2	NM_004183； chr11:61,972,630-61,965,630
视杆细胞	RHO	NM_000539； chr3:129,540,350-129,533,350
视锥细胞	红/绿视蛋白（OPN1LW）	NM_020061； chrX:154,164,030-154,157,030
神经节细胞	胸腺细胞抗原（Thy1）	NM_006288； chr11:119,428,150-119,421,150
T 细胞	TIM3	NM_032782； chr5:157,114,050-157,107,050
T 细胞	FOXP3	NM_014009； chrX:49,269,700-49,262,700
PBMC	Vβ6.7	ENST00000390373.2； chr7:142,493,295-142,486,295
细胞周期	Cdk1	NM_001786； chr10:60,799,850-60,792,850

[0381] 本文所述的构建体还可以包括其他天然或异源表达控制元件，例如增强子元件、聚腺苷酸化位点或科扎克共有序列。

[0382] 效应子序列

[0383] 本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸的效应子序列可以是例如功能性DNA序列，例如治疗功能性DNA序列；编码治疗性肽、多肽或蛋白的DNA序列；或编码治疗性RNA（例如，非

编码RNA)的DNA序列。

[0384] DNA效应子:

[0385] 治疗功能性DNA序列可以是形成功能性结构的DNA序列,例如包含DNA适体、脱氧核酶或等位基因特异性寡核苷酸(DNA ASO)的DNA序列。治疗功能性DNA序列可以不具有可操作连接的启动子。在实施例中,本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸可以包括一个或多个功能性DNA序列,例如2、3、4、5、6或更多个序列,其可以相同或不同。

[0386] 多肽效应子:

[0387] 编码治疗性多肽的DNA序列可以是编码一种或多种效应子的DNA序列,所述效应子是肽、蛋白或其组合。例如,DNA序列编码mRNA。肽或蛋白可以是:DNA结合蛋白;RNA结合蛋白;转运蛋白;转录因子;翻译因子;核糖体蛋白;染色质重塑因子;表观遗传修饰因子;抗原;激素;酶(例如核酸酶,例如核酸内切酶,例如CRISPR系统的核酸酶元件,例如Cas9、dCas9、Cas9切口酶、Cpf/Cas12a);Crispr连接的酶,例如碱基编辑器或引导编辑器;移动遗传元件蛋白(例如,转座酶、逆转录转座酶、重组酶、整合酶);基因书写器;聚合酶;甲基化酶;去甲基化酶;乙酰化酶;去乙酰化酶;激酶;磷酸酶;连接酶;去泛素酶;蛋白酶;整合酶;重组酶;拓扑异构酶;旋转酶;解旋酶;溶酶体酸性水解酶);抗体(例如完整抗体、其片段,或纳米抗体);信号传导肽;受体配体;受体;凝血因子(clotting factor);凝血因子(coagulation factor);结构蛋白;胱天蛋白酶;膜蛋白;线粒体蛋白;核蛋白;工程改造的结合剂,例如centyrin、darpin或纤维连接蛋白。参见,例如,Gebauer&Skerra.2020.Annual Review of Pharmacology and Toxicology[药理学和毒理学年度综述]60:1,391-415。

[0388] 在实施例中,本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸可以包括编码多肽的一个或多个序列,例如编码多肽的2、3、4、5、6或更多个序列。多个序列中的每个可编码相同或不同的蛋白。例如,本文所述的TDSC或序列可以包括编码多个蛋白(例如生物途径中的多个蛋白)的多个序列。

[0389] 在一些实施例中,本文所述的TDSC或序列可包括多个编码多肽的序列,例如2、3、4、5、6或更多个编码多肽的序列,其被自切割肽例如P2A、T2A、E2A或F2A分开。自切割肽长18-22个氨基酸,可以在蛋白翻译过程中诱导核糖体跳跃,从而可以在同一转录物中编码两个多肽。每个多肽可以编码相同或不同的蛋白。在一个实施例中,本文所述的TDSC或序列可以包括启动子,其后是编码第一目的多肽的序列、编码2A自切割肽的序列、编码第二目的多肽的序列和聚A位点。在另一个实施例中,本文所述的TDSC或序列可以包括启动子,其后是编码第一目的多肽的序列、编码第一2A自切割肽的序列、编码第二目的多肽的序列、编码第二2A自切割肽的序列、编码第三目的多肽的序列和聚A位点。

[0390] 在一些实施例中,效应子包含细胞穿透多肽。在一些实施例中,效应子是包含细胞穿透多肽和第二氨基酸序列的融合蛋白。

[0391] RNA效应子:

[0392] 效应子序列可以是编码非编码RNA(例如短干扰RNA(siRNA)、微小RNA(miRNA)、长非编码RNA、piwi相互作用RNA(piRNA)、小核仁RNA(snoRNA)、小卡哈尔体特异性RNA(scaRNA)、转移RNA(tRNA)、核糖体RNA(rRNA)、RNA适体和小核RNA(snRNA)中的一种或多种)的DNA序列。

[0393] 在一些实施例中,本文披露的TDSC或包含dsDNA的核酸包含编码调节RNA(例如修

饰内源基因和/或外源基因的表达的RNA)的一个或多个表达序列。在一些实施例中,本文披露的TDSC或序列可以包含与调节核酸(像非编码RNA,诸如但不限于tRNA、lncRNA、miRNA、rRNA、snRNA、microRNA、siRNA、piRNA、snoRNA、snRNA、exRNA、scaRNA、Y RNA和hnRNA)反义的序列。在一个实施例中,调节核酸靶向宿主基因。调节核酸可以包括但不限于与内源基因杂交的核酸(例如反义RNA、指导RNA)、与外源核酸(例如病毒DNA或RNA)杂交的核酸、与RNA杂交的核酸、干扰基因转录的核酸、干扰RNA翻译的核酸、稳定RNA或去稳定RNA的核酸(例如通过靶向降解),以及调节DNA或RNA结合因子的核酸。在一个实施例中,序列是miRNA。在一些实施例中,调节核酸靶向宿主基因的有义链。在一些实施例中,调节核酸靶向宿主基因的反义链。

[0394] 在一些实施例中,本文披露的TDSC或序列编码指导RNA。指导RNA序列通常被设计为具有与靶向的核酸序列互补的长度在15-30个核苷酸(例如,17、19、20、21、24个核苷酸)之间的序列,以及促进复合物形成的区域(例如,使用tracrRNA或核酸酶)。定制gRNA生成器和算法可通过商业途径获得,用于设计有效的指导RNA。使用嵌合性“单指导RNA”(“sgRNA”)也可以实现基因编辑,这是一种工程化(合成)的单一RNA分子,模拟天然存在的crRNA-tracrRNA复合物,并同时含有tracrRNA(用于结合核酸酶)和至少一个crRNA(以将核酸酶引导至被靶向序列进行编辑)。人们也已证明,在基因组编辑中,经化学修饰的sgRNA是有效的;参见,例如,Hendel等人(2015)Nature Biotechnol.[自然-生物技术],985-991。gRNA可识别特定DNA序列(例如,与基因的启动子、增强子、沉默子或阻遏子相邻或位于其内的序列)。在一个实施例中,gRNA被用作CRISPR系统的一部分用于基因编辑。为了基因编辑的目的,本文披露的TDSC或序列可被设计为包括编码对应于所期望的靶DNA序列的指导RNA序列的一个或多个序列;参见例如,Cong等人(2013)Science[科学],339:819-823;Ran等人(2013)Nature Protocols[自然实验手册],8:2281-2308。

[0395] 所披露的TDSC或序列可以编码某些调节核酸,其可通过RNA干扰(RNAi)的生物过程抑制基因表达。RNAi分子包含RNA或RNA样结构,这些结构典型地含有15-50个碱基对(如约18-25个碱基对),并且具有与细胞内的表达的靶基因中的编码序列同一的(互补的)或接近同一的(基本上互补的)核碱基序列。此类RNAi分子包括但不限于:短干扰RNA(siRNA)、双链RNA(dsRNA)、微小RNA(miRNA)、短发夹RNA(shRNA)、部分双螺旋和dicer底物(美国专利号8,084,599、8,349,809和8,513,207)、RNA反义寡核苷酸(RNA ASO)。

[0396] 在一个实施例中,本文披露的TDSC或序列包含含有lncRNA的有义链的序列。在一个实施例中,本文披露的TDSC或序列包含编码lncRNA的反义链的序列。

[0397] 本文披露的TDSC或序列可以编码与内源基因或基因产物(例如,mRNA)的片段基本上互补或完全互补的调节核酸。调节核酸可与内含子和外显子之间的边界处、外显子之间的内部或邻近外显子的序列互补,从而防止特异性基因的新生成的核RNA转录物成熟化为用于转录的mRNA。与特定基因互补的调节核酸可与所述基因的mRNA杂交并防止其翻译。反义调节核酸可以是DNA、RNA或其衍生物或杂交体。在一些实施例中,调节核酸包含可以与参与内源基因或外源基因表达调节的蛋白结合的蛋白结合位点。

[0398] 本文披露的可编码与目的转录物杂交的调节核酸的TDSC或序列的长度可以是例如约5至30个核苷酸、约10至30个核苷酸、或约11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30个或更多个核苷酸。调节核酸与靶向转录物的同一性程度应为

至少75％、至少80％、至少85％、至少90％或至少95％。

[0399] 本文披露的TDSC或序列可编码与靶基因的约5至约30个连续核苷酸相同的微小RNA(miRNA)分子。在一些实施例中,miRNA序列靶向mRNA并从二核苷酸AA开始,其GC含量为约30％-70％(约30％-60％、约40％-60％或约45％-55％),并且例如,如通过标准BLAST搜索所确定的,与要引入其中的哺乳动物基因组中的靶标以外的任何核苷酸序列不具有高百分比同一性。在一些实施例中,本文披露的TDSC或序列编码至少一种miRNA,例如2、3、4、5、6或更多种。在一些实施例中,本文披露的TDSC或序列包含编码与这些核苷酸序列中任一个或与跟靶序列互补的序列具有至少约75％、80％、85％、90％、95％、96％、97％、98％、99％或100％核苷酸序列同一性的miRNA的序列。已知miRNA序列的列表可在研究组织维护的数据库中找到,这些组织如维康信托基金会桑格研究院(Wellcome Trust Sanger Institute)、宾夕法尼亚生物信息学中心(Penn Center for Bioinformatics)、斯隆凯特灵癌症中心(Memorial Sloan Kettering Cancer Center)和欧洲分子生物学实验室(European Molecule Biology Laboratory)等。已知的有效的siRNA序列和同源结合位点也很好地呈现在相关文献中。RNAi分子很容易通过本领域已知的技术设计。另外,有一些计算工具可以增加找到有效和特异性序列基序的机会(参见例如,Lagana等人,Methods Mol.Bio.[分子生物学方法],2015,1269:393-412)。

[0400] 本文披露的TDSC或序列可以调节基因编码的RNA的表达。因为多个基因可能彼此共享一定程度的序列同源性,所以在一些实施例中,可以设计本文披露的TDSC或序列以靶向具有充分序列同源性的一类基因。在一些实施例中,本文披露的TDSC或序列可以包含与在不同基因靶标之间共享的序列或对于特定基因靶标是独特的序列具有互补性。在一些实施例中,可以设计本文披露的TDSC或序列以靶向RNA序列的在若干基因之间具有同源性的保守区域,从而靶向基因家族中的几个基因(例如,不同的基因同种型、剪接变体、突变基因等)。在一些实施例中,可以设计本文披露的TDSC或序列以靶向单个基因的特定RNA序列所特有的序列。

[0401] 在实施例中,编码调节RNA的效应子序列具有小于5000bp的长度(例如,小于约5000bp、4000bp、3000bp、2000bp、1000bp、900bp、800bp、700bp、600bp、500bp、400bp、300bp、200bp、100bp、50bp、40bp、30bp、20bp、10bp或更低)。在一些实施例中,效应子序列独立地或另外具有大于10bp的长度(例如,至少约10bp、20bp、30bp、40bp、50bp、60bp、70bp、80bp、90bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、600bp、700bp、800bp、900bp、1000kb、1.1kb、1.2kb、1.3kb、1.4kb、1.5kb、1.6kb、1.7kb、1.8kb、1.9kb、2kb、2.1kb、2.2kb、2.3kb、2.4kb、2.5kb、2.6kb、2.7kb、2.8kb、2.9kb、3kb、3.1kb、3.2kb、3.3kb、3.4kb、3.5kb、3.6kb、3.7kb、3.8kb、3.9kb、4kb、4.1kb、4.2kb、4.3kb、4.4kb、4.5kb、4.6kb、4.7kb、4.8kb、4.9kb、5kb或更大)。

[0402] 在一些实施例中,本文披露的TDSC或序列包含一个或多个上文描述的特征,例如一种或多种结构DNA序列、编码一种或多种肽或蛋白的序列、编码一种或多种调节元件的序列、编码一种或多种调节核酸(例如一种或多种非编码RNA)的序列、其他表达序列、以及上述的任何组合。本文所述的构建体可以具有一个或多个效应子序列,例如2、3、4、5或更多个效应子序列。在单个构建体中有多个效应子序列的情况下,效应子序列可以相同或不同。

[0403] 在一个实施例中,TDSC包括治疗功能性结构DNA序列。在一个实施例中,TDSC包括

启动子和编码本文所述的治疗性肽、多肽或蛋白的序列。在一个实施例中,TDSC包括启动子和编码本文所述的调节RNA的序列。

[0404] 在一些实施例中,编码多肽或蛋白的效应子序列是密码子优化的,例如针对在哺乳动物(例如人)中表达进行密码子优化。一般而言,密码子优化是指通过用所述宿主细胞的基因中更常用或最常用的密码子替换原始序列的至少一个密码子(例如,一个或多个,例如1、2、3、4、5、10、15、20、25、50或更多个密码子;例如,至少1%、5%、10%、20%、25%、50%、60%、70%、80%、90%或100%)同时保留原始氨基酸序列,修饰核酸序列以在目的宿主细胞中增强表达。密码子使用表可在例如http://www.kazusa.or.jp/codon/处的"密码子使用数据库"中获得。这些表可以通过多种方式进行修改,例如参见Nakamura等人,2000,Nucl.Acids Res.[核酸研究]28:292。用于密码子优化特定序列以在特定宿主细胞中表达的计算机算法也是可得的,诸如基因制造(Gene Forge)。

[0405] 核靶向序列(NTS)

[0406] TDSC或包含dsDNA的核酸(例如,如本文披露的)可以包括促进DNA从细胞质转运至细胞核的核靶向序列(NTS)。NTS包括与蛋白(例如转录因子、分子伴侣等)结合的位点,这些蛋白与通过核孔复合体将货物运输到细胞核中的核输入蛋白结合。在实施例中,NTS可以总体性发挥作用(例如SV40增强子NTS)。在其他实施例中,NTS可以是细胞或组织特异性的,例如,含有在独特细胞类型中表达的转录因子的结合位点,这些转录因子(例如SRF、Nkx3)可以以细胞特异性方式将本文所述的TDSC靶向细胞核。NTS可以在本文所述的TDSC中的多个位置发挥功能,例如在启动子之前和/或在效应子序列之后。

[0407] NTS可以是病毒衍生的或非病毒衍生的。例如,NTS描述于Le Guen等人2021.Nucleic Acids[核酸]第24卷:477-486。表2中披露了NTS的实例:

[0408] 表2:示例性核靶向序列病毒的/非病毒的名称 序列病毒的 SV40 5'-cccaagaagaagaggaaagtc-3'(SEQ ID NO:1)

[0409] 非病毒的 3NF 5'-ctggggactttccagcctggggactttccagctgggactttccagg-3'

[0410] (SEQ ID NO:106)

[0411] 在一些实施例中,NTS具有根据表2的序列,或与其具有至少80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的功能性序列。

[0412] 核输入蛋白

[0413] 在一些实施例中,TDSC或包含dsDNA的核酸(例如,如本文所述)能够例如通过核输入蛋白(例如,如表3中列出的核输入蛋白)输入到细胞核中。在一些实施例中,TDSC或包含dsDNA的核酸(例如,如本文所述)可以与核输入蛋白(例如,如表3中列出的核输入蛋白)结合。在一些实施例中,TDSC或包含dsDNA的核酸(例如,如本文所述)包含核输入蛋白(例如,如表3的任何一行中列出的)的识别序列。在一些实施例中,TDSC或包含dsDNA的核酸(例如,如本文所述)包含如表3中列出的识别序列,或与其具有至少75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列。在一些实施例中,核酸外切酶抗性DNA末端形式(例如,包含在TDSC或包含dsDNA的核酸中,例如,如本文所述)包含如表3中列出的识别序列,或与其具有至少75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核酸序列。

[0414] 示例性输入蛋白包括例如碱性螺旋-环-螺旋(bHLH)蛋白、核内不均一核糖核蛋白(hnRNP)同种型、核因子I(NFI)蛋白,例如表3中列出的那些。在一些实施例中,bHLH蛋白包

含乙酰胆碱受体亚单位,例如,α亚单位,例如,CHRNA1、CHRNA2、CHRNA3、CHRNA4、CHRNA5或CHRNA7。在一些实施例中,乙酰胆碱受体亚单位包含γ或ε亚单位。在一些实施例中,输入蛋白包含结蛋白。在一些实施例中,输入蛋白包含hnRNP,例如,hnRNP A1、hnRNP C、hnRNP K和hnRNP U。在一些实施例中,输入蛋白包含核输入蛋白。在一些实施例中,输入蛋白包含肌球蛋白轻链。在一些实施例中,输入蛋白包含NFI。在一些实施例中,输入蛋白包含NFKB。在一些实施例中,输入蛋白包含核苷二磷酸激酶,例如,NM23-H2。在一些实施例中,输入蛋白包含Oct1。在一些实施例中,输入蛋白包含Oct2。

[0415] 在一些实施例中,输入蛋白包含SRF。在一些实施例中,输入蛋白包含TEF-1。在一些实施例中,输入蛋白包含AP2。在一些实施例中,输入蛋白包含肌钙蛋白,例如,肌钙蛋白I,例如,肌钙蛋白I 2。在一些实施例中,输入蛋白包含TTF-1。在一些实施例中,输入蛋白包含Ran结合蛋白,例如,RanBP3或RanBP1。在一些实施例中,输入蛋白包含同源框转录因子,例如,Chx10。

[0416] 在一些实施例中,输入因子特异性结合E-盒、DTS(例如,SV40 DTS或SMGA DTS)、启动子(例如,SP-C启动子或htk启动子)、端粒、ATTT基序、细胞周期调节单元(CCRU)、CT3序列、S/MAR、拓扑异构酶II共有序列、ARS共有序列、3NF、病毒ori(例如,EBV oriP位点)。

[0417]

表 3：示例性核输入蛋白及其相应的识别序列

促进核进入的蛋白	蛋白基因 ID	蛋白的 GenBank 登录号	蛋白识别的序列名称	相应的 DNA 识别序列
心脏 α-肌动蛋白	70	NP_005150.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA1 同种型 b	1134	NP_000070.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA1 同种型 a	1134	NP_001034612.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2 同种型 1	1135	NP_000733.2	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2 同种型 2	1135	NP_001269384.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2 同种型 3	1135	NP_001334634.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2 同种型 3	1135	NP_001334635.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA2 同种型 3	1135	NP_001334636.1	E-盒	5'-CANNTG-3'

[0418]

种型 4				5'-CANNTG-3'
CHRNA2 同种型 4	1135	NP_001334637.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA3 同种型 1	1136	NP_000734.2	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA3 同种型 2	1136	NP_001160166.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA4 同种型 1	1137	NP_000735.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA4 同种型 2	1137	NP_001243502.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5 同种型 1	1138	NP_000736.2	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5 同种型 2	1138	NP_001294874.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5 同种型 3	1138	NP_001382100.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
CHRNA5 同	1138	NP_001382101.1	E-盒	5'-CANNTG-3'

[0419]

种型 4					5'-CANNTG-3'
CHRNA5 同种型 5	1138	NP_001382102.1	E-盒		5'-CANNTG-3'
CHRNA5 同种型 6	1138	NP_001382103.1	E-盒		5'-CANNTG-3'
CHRNA5 同种型 7	1138	NP_001382104.1	E-盒		5'-CANNTG-3'
CHRNA7 同种型 1	1139	NP_000737.1	E-盒		5'-CANNTG-3'
CHRNA7 同种型 2	1139	NP_001177384.1	E-盒		5'-CANNTG-3'
CHRNE	1145	NP_000071.1	E-盒		5'-CANNTG-3'
CHRNG	1146	NP_005190.4	E-盒		5'-CANNTG-3'
M-肌酸激酶（MCK）	1158	NP_001815.2	E-盒		5'-CANNTG-3'
结蛋白同种型 2	1674	NP_001369637.1	E-盒		5'-CANNTG-3'
结蛋白同种	1674	NP_001369638.1	E-盒		5'-CANNTG-3'

[0420]

型 3				
结蛋白同种型 4	1674	NP_001369639.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
结蛋白同种型 5	1674	NP_001369640.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
结蛋白同种型 6	1674	NP_001369641.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
结蛋白同种型 7	1674	NP_001369642.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
结蛋白同种型 1	1674	NP_001918.3	E-盒	5'-CANNTG-3'
AP1（Fos）	2353	NP_005243.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
GATA-6	2627	NP_005248.2	SP-C 启动子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGCACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCCGAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTGGGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGGGGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGG

[0421]

				GCCAGGAACAAACAGGCTTCAAGCCAAGGGCTTGGCTGG CACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTA CGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
hnRNP A1 同种型 a	3178	NP_002127.1	来自人染色体带11q13（登录号AC000353）的dsDNA 序列	5'-GGCTGGTCTTGAACTCCTG (A/G) GCTCA (A/G) GTGATCCTCC-3' (SEQ ID NO: 109)
hnRNP A1 同种型 b	3178	NP_112420.1	来自人染色体带11q13（登录号AC000353）的dsDNA 序列	5'-GGCTGGTCTTGAACTCCTG (A/G) GCTCA (A/G) GTGATCCTCC-3' (SEQ ID NO: 109)
hnRNP A1 同种型 a	3178	NP_002127.1	端粒（与端粒重复序列结合）	5'-(TTAGGG)n-3'
hnRNP A1 同种型 b	3178	NP_112420.1	端粒（与端粒重复序列结合）	5'-(TTAGGG)n-3'
hnRNP A1 同种型 a	3178	NP_002127.1	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)

[0422]

hnRNP A1 同种型 b	3178	NP_112420.1	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP A1 同种型 a	3178	NP_002127.1	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP A1 同种型 b	3178	NP_112420.1	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)

[0423]

hnRNP C 同种型 a	3183 NP_001070910.1	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP C 同种型 b	3183 NP_001070911.1	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP C 同种型 b	3183 NP_004491.2	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)

[0424]

hnRNP C 同种型 a	3183	NP_112604.2	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	5'-TGCGGCCAAATCTCCCGCCAGGTCAGC-3' (SEQ ID NO: 110)
hnRNP C 同种型 a	3183	NP_001070910.1	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP C 同种型 b	3183	NP_001070911.1	人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)

[0425]

hnRNP C 同种型 b	3183	NP_004491.2	调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	
			人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP C 同种型 a	3183	NP_112604.2	调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	
			人胸苷激酶（htk）启动子，细胞周期调节单元（CCRU）内含有的 ATTT 序列基序	3'-ACGCCGGTTTAGAGGGCGGTCCAGTCG-5' (SEQ ID NO: 111)
hnRNP K 同种型 c	3190	NP_001305115.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)

[0426]

hnRNP K 同种型 d	3190	NP_001305116.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K 同种型 b	3190	NP_001305117.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K 同种型 a	3190	NP_002131.2	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K 同种型 b	3190	NP_112552.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP K 同种型 a	3190	NP_112553.1	CT3	5'-AATTCTCCTCCCCACCTTCCCCACCCTCCCCA-3' (SEQ ID NO: 112)
hnRNP U（aka SAF-A）同种型 b	3192	NP_004492.2	S/MAR	5'-TATATTT-3'
hnRNP U（aka SAF-A）同种型 a	3192	NP_114032.2	S/MAR	5'-TATATTT-3'

[0427]

hnRNP U（aka SAF-A）同种型 b	3192 NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/G) N (T/C) NNCNNG (T/C) NG (G/T) TN (T/C) N (T/C)-3'（SEQ ID NO: 113）
hnRNP U（aka SAF-A）同种型 a	3192 NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/G) N (T/C) NNCNNG (T/C) NG (G/T) TN (T/C) N (T/C)-3'（SEQ ID NO: 113）
hnRNP U（aka SAF-A）同种型 b	3192 NP_004492.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3'（SEQ ID NO: 114）
hnRNP U（aka SAF-A）同种型 a	3192 NP_114032.2	S/MAR	5'-(A/T) TTTAT (A/G) TTT (A/T)-3'（SEQ ID NO: 114）
AP1（Jun）	3725 NP_002219.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3'（SEQ ID NO: 107）

[0428]

核输入蛋白β1	3837	XP_548162.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
肌球蛋白轻链（MLC）1/3同种型 1f	4632	NP_524144.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌球蛋白轻链（MLC）1/3同种型 3f	4632	NP_524146.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
NFI 同种型 1	4782	NP_001231931.1	SP-C 启动子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCC GAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTG

[0429]

				GGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGG GGGCTCTCACAGGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGG GCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGG CACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTA CGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
NFI 同种型 3	4782	NP_001231933.1	SP-C 启动子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCC GAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTG GGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGG GCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGG CACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTA CGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
NFI 同种型 4	4782	NP_001231934.1	SP-C 启动子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCC GAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTG GGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGG

[0430]

				GCCAGGAACAAACAGGCTTCAAGCCAAGGGCTTGGCTGG CACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTA CGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
NFI 同种型 5	4782	NP_005588.2	SP-C 启动子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCC GAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTG GGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGG GCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGG CACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTA CGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
NFI 同种型 2	4782	NP_995315.1	SP-C 启动子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCC GAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTG GGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGG GCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGG CACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTA

[0431]

				CGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
NFKB 同种型 2	4790	NP_001158884.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB 同种型 2	4790	NP_001306155.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB 同种型 1	4790	NP_001369554.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB 同种型 1	4790	NP_001369555.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB 同种型 2	4790	NP_001369556.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB 同种型 3	4790	NP_001369557.1	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB 同种型 1	4790	NP_003989.2	3NF	5'-CTGGGGACTTTCCAGCCTGGGGACTTTCCAGCTGGGACTT TCCAGG-3' (SEQ ID NO: 116)
NFKB 同种型 2	4790	NP_001158884.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID

[0432]

NFKB 同种型 2	4790	NP_001306155.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB 同种型 1	4790	NP_001369554.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB 同种型 1	4790	NP_001369555.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB 同种型 2	4790	NP_001369556.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB 同种型 3	4790	NP_001369557.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB 同种型 1	4790	NP_003989.2	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NFKB 同种型	4790	NP_001158884.1	由 Igκ κB 基序	5'-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGAC

[0433]

型 2		5‘-GGGGACTTTCCC-3‘（SEQ ID NO: 117）的五个串联重复序列组成的片段	TTTCCGGGGACTTTCC-3‘（SEQ ID NO: 118）
NFKB 同种型 2	4790 NP_001306155.1	由 Igκ κB 基序 5‘-GGGGACTTTCCC-3‘（SEQ ID NO: 117）的五个串联重复序列组成的片段	5‘-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGGAC TTTCCGGGGACTTTCC-3‘（SEQ ID NO: 118）
NFKB 同种型 1	4790 NP_001369554.1	由 Igκ κB 基序 5‘-GGGGACTTTCCC-3‘（SEQ ID NO: 117）的五个串联重复序列组成的片段	5‘-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGGAC TTTCCGGGGACTTTCC-3‘（SEQ ID NO: 118）
NFKB 同种	4790 NP_001369555.1	由 Igκ κB 基序	5‘-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGGAC

[0434]

型 1			5‘-GGGGACTTTCC-3’（SEQ ID NO: 117）串联重复序列组成的片段	TTTCCGGGGACTTTCC-3‘（SEQ ID NO: 118）
NFKB 同种型 2	4790	NP_001369556.1	由 Igκ κB 基序 5‘-GGGGACTTTCC-3’（SEQ ID NO: 117）的五个串联重复序列组成的片段	5‘-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGGAC TTTCCGGGGACTTTCC-3‘（SEQ ID NO: 118）
NFKB 同种型 3	4790	NP_001369557.1	由 Igκ κB 基序 5‘-GGGGACTTTCC-3’（SEQ ID NO: 117）的五个串联重复序列组成的片段	5‘-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGGAC TTTCCGGGGACTTTCC-3‘（SEQ ID NO: 118）
NFKB 同种	4790	NP_003989.2	由 Igκ κB 基序	5‘-GGGGACTTTCCGGGGACTTTCCGGGGGAC

[0435]

型 1			5'-GGGGACTTTCC-3'（SEQ ID NO: 117）的五个串联重复序列组成的片段	TTTCCGGGGACTTTCC-3'（SEQ ID NO: 118）
NM23-H2 同种型 a	4831	NP_001018147.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NM23-H2 同种型 a	4831	NP_001018148.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NM23-H2 同种型 a	4831	NP_001018149.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NM23-H2 同种型 b	4831	NP_001185611.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
NM23-H2 同种型 a	4831	NP_002503.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)

[0436]

Oct2（POU2F2）同种型 1	5452	NP_001193954.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2（POU2F2）同种型 3	5452	NP_001193955.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2（POU2F2）同种型 4	5452	NP_001234923.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2（POU2F2）同种型 5	5452	NP_001380863.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2（POU2F2）同种型 6	5452	NP_001380864.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2（POU2F2）同种型 7	5452	NP_001380865.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)

[0437]

Oct2（POU2F2）同种型 8	5452	NP_001381305.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2（POU2F2）同种型 9	5452	NP_001381306.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2（POU2F2）同种型 10	5452	NP_001381307.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct2（POU2F2）同种型 2	5452	NP_002689.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
RanBP1	5902	XP_514990.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAGGGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATGGTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGGGCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTGTTTATGCAAGTGCAGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCCACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA

[0438]

				ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
Oct1（POU2F1）同种型 2	5451	NP_001185712.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct1（POU2F1）同种型 3	5451	NP_001185715.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct1（POU2F1）同种型 4	5451	NP_001352777.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct1（POU2F1）同种型 4	5451	NP_001352778.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
Oct1（POU2F1）同种型 1	5451	NP_002688.3	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
SRF 同种型 2	6722	NP_001278930.1	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCC

[0439]

				CCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATTG CTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAA GAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGC CAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 119)
SRF 同种型 1	6722	NP_003122.1	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCTTCCCTACCC CCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACCTTATATGGTAATATTG CTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAA GAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGC CAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 119)
TEF-1 同种型 2	7008	NP_001138870.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
TEF-1 同种型 1	7008	NP_003207.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2（TFAP2A）同种型 b	7020	NP_001027451.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2（TFAP2A）	7020	NP_001035890.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID

[0440]

同种型 c				NO: 107)
AP2（TFAP2A）同种型 a	7020	NP_001358995.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2（TFAP2B）	7021	NP_003212.2	SV40 DTS	5'-GGTGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
AP2（TFAP2C）	7022	NP_003213.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID NO: 107)
肌钙蛋白 I 1	7135	NP_003272.3	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌钙蛋白 I 2-同种型 1	7136	NP_001139301.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌钙蛋白 I 2-同种型 2	7136	NP_001139313.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌钙蛋白 I 2-同种型 1	7136	NP_003273.1	E-盒	5'-CANNTG-3'
肌钙蛋白 I 3	7137	NP_000354.4	E-盒	5'-CANNTG-3'

[0441]

TTF-1 同种型 2	7270	NP_001192225.1	SP-C 启动子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCC GAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTG GGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGG GCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGG CACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTA CGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
TTF-1 同种型 1	7270	NP_031370.2	SP-C 启动子	5'-CAGGGCAGCAGGGGCAGGTGCCAGCAAGGAAGGCAGGC ACGCCAGGAAGACACCCATGGTGAGAAGTGCAGATGGCCC GAGGGCAAGTTTGCTCAACTCACCCAGGTTTGCTCTTGCTG GGGCCAAGAGGACTCATGTGCCAGGGCCAAGGGCCCTTGG GGGCTCTCACAGGGGGCTTATCTGGGCTTCGGTTCTGGAGG GCCAGGAACAAACAGGCTTCAAAGCCAAGGGCTTGGCTGG CACACAGGGGGCTTGGTCCTTCACCTCTGTCCCCTCTCCCTA CGGACACATATAAGACCCTGGTCACACCTGGGAGAGGAGGA GAGGAGAGCATAG-3' (SEQ ID NO: 108)
H2B	8349	NP_003519.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID

[0442]

				NO: 107)
RanBP3 同种型 4	8498	NP_001287794.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC ACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 a	8498	NP_003615.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC ACTGAGTCCTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT

[0443]

				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 b	8498	NP_015559.2	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 d	8498	NP_015561.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT

[0444]

				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 X1	8498	XP_006722991.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG
				GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG
				GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG
				GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC
				AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC
				ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT
				ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA
				ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC
				TTTTTAGGGACTTTGTTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT
				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 X1	8498	XP_006722992.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG
				GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG
				GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG
				GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC
				AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC
				ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT
				ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA
				ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC
				TTTTTAGGGACTTTGTTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT

[0445]

				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 X1	8498	XP_011526695.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG
				GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG
				GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG
				GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC
				AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC
				ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT
				ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA
				ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC
				TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT
				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 X1	8498	XP_011526694.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG
				GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG
				GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG
				GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC
				AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC
				ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT
				ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA
				ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC
				TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT

[0446]

				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 X1	8498	XP_011526696.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG
				GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG
				GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG
				GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC
				AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC
				ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT
				ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA
				ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC
				TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT
				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
RanBP3 同种型 X1	8498	XP_024307517.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG
				GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG
				GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG
				GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC
				AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC
				ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT
				ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA
				ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC
				TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT

[0447]

				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
核输入蛋白 7	10527	NP_006382.1	SMGA DTS	5'-AGGCAGACCCAGGGGCCGCATGCAGCAGGGCCTGAGGAG
				GGAGGTGTGGACGGAGGAGGCCCGCTGCCATTCTTGGTATG
				GTTCTCACTCCAGGAGCACAGCTGCATCTGGTCTCACTCTGG
				GCAGCTTATAAGGCCTGGTGTGAGTTTTGTTTATGCAAGTGC
				AGCATAAAAGGAACAAATCTACCAGCACCGGGGCTGTTGCC
				ACTGAGTCCTTTTTGCATACATTTTTCAAATGATAACTCACTCT
				ACCCACCCCCCTTCCCTACCCCCAAGGCGATTTATTGAAAAA
				ACCACCTTATATGGTAATATTGCTAACACACCGTCAGCTGGCC
				TTTTTAGGGACTTTGTTTAAAGAAGATCCGCCTCTGGGGTTT
				TATATTGCTCTGGTATTCATGCCAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 115)
Chx10	338917	NP_878314.1	SV40 DTS	5'-GGTGTGGAAAGTCCCCAGGCTCCCCAGCAGGCAGAAGTA
				TGCAAAGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCA-3' (SEQ ID
				NO: 107)
EBNA-1	3783774	YP_401677.1	EBV oriP 位点	5'-CATGCAGGAAAAGGACAAGCAGCGAAAATTCACGCCCCC
				TTGGGAGGTGGCGGCATATGCAAAGGATAGCACTCCCACTCT
				ACTACTGGGTATCATATGCTGACTGTATATGCATGAGGATAGC
				ATATGCTACCCGGATACAGATTAGGATAGCATATACTACCCAG
				ATATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCAGATATAGATTAGGAT
				AGCCTATGCTACCCAGATATAAATTAGGATAGCATATACTACC

[0448]

CAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTACCCAGATATAGATTA			
GGATAGCCTATGCTACCCAGATATAGATTAGGATAGCATATGC			
TACCCAGATATAGATTAGGATAGCATATGCTATCCAGATATTTG			
GGTAGTATATGCTACCCAGATATAAATTAGGATAGCATATACTA			
CCCTAATCTCTATTAGGATAGCATATGCTACCCGGATACAGAT			
TAGGATAGCATATACTACCCAGATATAGATTAGGATAGCATAT			
GCTACCCAGATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACCCAGATAT			
AAATTAGGATAGCATATACTACCCAGATATAGATTAGGATAGC			
ATATGCTACCCAGATATAGATTAGGATAGCCTATGCTACCCAG			
ATATAGATTAGGATAGCATATGCTATCCAGATATTTGGGTAGTA			
TATGCTACCCATGGCAACATTAGCCCACCGTGCTCTCAGCGA			
CCTCGTGAATATGAGGACCAACAACCCTGTGCTTGGCGCTC			
AGGCGCAAGTGTGTGTAATTTGTCCTCCAGATCGCAGCAATC			
GCGCCCCTATCTTGGCCCGCCCACCTACTTATGCAGGTATTCC			
CCGGGGGTGCCATTAGTGGTTTTGTGGGCAAGTGGTTTGACC			
GCAGTGGTTAGCGGGGGTTACAATCAGCCAAGTTATTACACCC			
TTATTTTACAGTCCAAAACCGCAGGGCGGCGTGTGGGGGCT			
GACGCGTGCCCCCACTCCACAATTTCAAAAAAAAGAGTGGC			
CACTTGTCTTTGTTTATGGGCCCCATTGGCGTGGAGCCCCGT			
TTAATTTTCGGGGGGTGTTAGAGACAACCAGTGGAGTCCGCT			

[0449]

GCTGTCGGCGTCCACTCTCTTTCCCCTTGTTACAAATAGAGT			
GTAACAACATGGTTCACCTGTCTTGGTCCCTGCCTGGGACAC			
ATCTTAATAACCCCAGTATCATATTGCACTAGGATTATGTGTT			
GCCCATAGCCATAAATTCGTGTGAGATGGACATCCAGTCTTT			
ACGGCTTGTCCCCACCCCATGGATTTCTATTGTTAAAGATATT			
CAGAATGTTTCATTCCTACACTAGTATTTATTGCCCAAGGGGT			
TTGTGAGGGTTATATTGGTGTCATAGCACAATGCCACCACTG			
AACCCCCCGTCCAAATTTTATTCTGGGGGGCGTCACCTGAAAC			
CTTGTTTTCGAGCACCTCACATACACCTTACTGTTCACAACT			
CAGCAGTTATTCTATTAGCTAAACGAAGGAGAATGAAGAAG			
CAGGCGAAGATTCAGGAGAGTTCACTGCCCGCTCCTTGATC			
TTCAGCCACTGCCCTTGTGACTAAAATGGTTCACTACCCTCG			
TGGAATCCTGACCCCATGTAAATAAAACCGTGACAGCTCATG			
GGGTGGGAGATATCGCTGTTCCTTAGGACCCTTTTACTAACC			
CTAATTCGATAGCATATGCTTCCCGTTGGGTAACATATGCTATT			
GAATTAGGGTTAGTCTGGATAGTATATACTACTACCCGGGAA			
GCATATGCTACCCGTTTAGGGTTAACAAGGGGGGCCTTATAAA			
CACTATTGCTAATGCCCCTCTTGAGGGTCCGCTTATCGGTAGCT			
ACACAGGCCCCCTCTGATTGACGTTGGTGTAGCCTCCCCGTAGT			
CTTCCTGGGCCCCTGGGAGGTACATGTCCCCCAGCATTGGTG			

[0450]

				TAAGAGCTTCAGCCAAGAGTTACACATAAAGGCAATGTTGT GTTGCAGTCCACAGACTGCAAAGTCTGCTCCAGGATGAAAG CCACTCAGTGTTGGCAAATGTGCACATCCATTTATAAGGATG TCAACTACAGTCAGAGAACCCCTTTGTGTTTGGTCCCCCCCC GTGTCACATGTGGAACAGGGCCCAGTTGGCAAGTTGTACCA ACCAACTGAAGGGATTACATGCACTGCCCCGC-3' (SEQ ID NO: 120)
NKX3-1/3-2 同种型 2	4824	NP_001243268.1	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCC CCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACACCTTATATGGTAATATTG CTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAA GAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGC CAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 119)
NKX3-1/3-2 同种型 1	4824	NP_006158.2	SMGA DTS	5'-TTCAAATGATAACTCACTCTACCCACCCCCCTTCCCTACCC CCAAGGCGATTTATTGAAAAAACCACACCTTATATGGTAATATTG CTAACACACCGTCAGCTGGCCTTTTTAGGGACTTTGTTTAAA GAAGATCCGCCTCTGGGGTTTTATATTGCTCTGGTATTCATGC CAAAGAC-3' (SEQ ID NO: 119)

[0451] 维持序列

[0452] 本文披露的TDSC或包含dsDNA的核酸可以包括维持序列,其支持或使得本发明的

TDSC能够在宿主细胞中通过连续轮的细胞分裂和/或祖细胞分化而持续基因表达。在实施例中,维持序列是核支架/基质附着区(S/MAR)。S/MAR元件是多样化的、富含AT的序列,所述序列范围从60-500bp不等,在物种间保守,被认为在间期将染色质锚定到核基质蛋白上(Bode等人.2003.Chromosome Res[染色体研究]11,435-445)。S/MAR可以掺入本文所述的TDSC中以促进长期转基因表达和染色体外维持。在一个实施例中,维持序列是人干扰素-β MAR(5'tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttatttttttacatataaatatatttccctgtttttctaaaaa agaaaaagatcatcattttcccattgtaaaatgccatatttttttcataggtcacttacata-3'(SEQ ID NO:39)),或与其具有至少80%、90%、95%或98%同一性的功能性序列。在实施例中,可通过在http://bioinfo.net.in/MARome搜索MARome来找到可用于本文所述的构建体中的S/MAR,这也描述于Narwade等人2019.Nucleic Acids Research.[核酸研究]第47卷,第14期:7247-7261。

[0453] 在实施例中,本文所述的TDSC能够在哺乳动物细胞例如人细胞中复制。在一些实施例中,本文所述的TDSC通过至少一次细胞分裂维持在宿主细胞、组织或受试者中。例如,本文所述的TDSC维持在宿主细胞、组织或受试者中经至少2、3、4、5、6、7、8、10、15、20、40、50次或更多次细胞分裂。在体外,细胞分裂可以通过流式细胞术或显微镜来追踪。在体内,可以通过活体显微镜追踪细胞分裂。

[0454] 其他元件

[0455] 本文披露的TDSC或包含dsDNA的核酸还可以包括以允许其在靶细胞中转运、定位、转录、翻译和/或表达,或促进其在非靶细胞中降解或抑制表达的方式可操作地连接至效应子序列(例如编码效应子的序列)的其他控制元件。如本文所用,"可操作地连接的"序列包括与编码效应子的序列邻接的表达控制序列和反式或相距一定距离起作用以控制编码效应子的序列的表达控制序列。宿主细胞中基因表达所需的调节序列的确切性质可能因物种、组织或细胞类型而异,但根据需要,一般可以包括分别与转录和翻译起始有关的5'非转录和5'非翻译序列,例如TATA盒、加帽序列、CAAT序列、增强子元件等。根据需要,调节序列还可以包括增强子序列或上游激活子序列。本文所述的构建体可以任选地包括5'前导序列或信号序列。

[0456] 经化学修饰的核苷酸

[0457] TDSC或包含dsDNA的核酸和本文所述的组合物可以具有核碱基、糖和/或磷酸主链的化学修饰(例如,如图1A-2中所示)。虽然不希望受理论束缚,但此类修饰可用于保护DNA免遭降解(例如,免遭核酸外切酶降解)或免遭宿主组织或受试者的免疫系统的降解。一般来说,经化学修饰的核苷酸具有与未修饰的核苷酸相同的碱基配对特异性,例如经化学修饰的腺嘌呤"A"可以与胸腺嘧啶"T"碱基配对。嘧啶核碱基的一个或多个原子可以被任选取代的氨基、任选取代的硫醇、任选取代的烷基(例如甲基或乙基)或卤代(例如氯代或氟代)替代或取代。在某些实施例中,在每个糖和核苷间键联中存在化学修饰(例如,一个或多个修饰)。

[0458] 在一些实施例中,TDSC包含至少一个化学修饰。合适的修饰描述于Sood等人2019.DNAmod:the DNA modification database.[DNA修饰:DNA修饰数据库]JCheminform[化学信息学]11,30。DNAmod是开源数据库(https://dnamod.hoffmanlab.org),它对经化学修饰的核苷酸进行分类并提供单一来源以了解其特性。DNAmod提供了网络界面以轻松浏

览并搜索这些修饰。所述数据库注释了所有精选的经化学修饰的DNA碱基的化学特性和结构,以及更大的候选化学实体列表。DNAmod包括可用测序方法的手动注释、其在自然界中出现的描述,并提供现有的和建议的命名法。可用于本文所述方法中的DNA的化学修饰的实例包括例如N6-甲基腺苷(m6A,6mA);5-甲酰基胞嘧啶(5-甲酰基-2'-脱氧胞嘧啶,5fC,f5C);5-羧基胞嘧啶(5-羧基-2'-脱氧胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶、ca5C、5caC);5-羟基甲基胞嘧啶(5-羟基甲基-2'-脱氧胞嘧啶、5hmC、hm5C);5-甲基脱氧胞嘧啶(5-甲基胞嘧啶;5-甲基-2'-脱氧胞嘧啶;m5dC;5mC,m5C);5'-甲基胞嘧啶;3-甲基胞嘧啶(m3C);2'-氟-2'脱氧核苷;5-葡萄糖基甲基胞嘧啶;5-甲基嘧啶;8-氧代鸟嘌呤(8-oxoG);硫代磷酸酯;S和R硫代磷酸酯键联;甲基胸腺嘧啶;N3'-P5'氨基磷酸酯(NP);环己烷核酸(CeNA);三环DNA(tcDNA)。例如,参见Pu等人.2020.An in-vitro DNA phosphorothioate modification reaction.[体外DNA硫代磷酸酯修饰反应]Mol Microbiol.[分子微生物学]113:452-463;Zheng&Sheng.2021.Synthesis of N4-methylcytidine(m4C)and N4,N4-dimethylcytidine(m42C)modified RNA[N4-甲基胞苷(m4C)和N4,N4-二甲基胞苷(m42C)修饰的RNA的合成].Current Protocols[当前方案],1,e248;Ohkubo等人2021.Chemical synthesis of modified oligonucleotides containing 5′-amino-5′-deoxy-5′-hydroxymethylthymidine residues[含有5′-氨基-5′-脱氧-5′-羟基甲基胸苷残基的经修饰的寡核苷酸的化学合成].Current Protocols[当前方案],1,e70;Bao和Xu.2021.Observation of Z-DNA structure via the synthesis of oligonucleotide DNA containing 8-trifluoromethyl-2-deoxyguanosine[经由合成含有8-三氟甲基-2-脱氧鸟苷的寡核苷酸DNA观察Z-DNA结构].Current Protocols[当前方案],1,e28;Skakuj等人2020.Automated synthesis and purification of guanidine-backbone oligonucleotides[胍主链寡核苷酸的自动合成和纯化].Current Protocols in Nucleic Acid Chemistry[当前核酸化学方案],81,e110。

[0459] 在一些实施例中,本文所述的TDSC可包含硫代磷酸酯修饰的核苷酸。在一些实施例中,本文所述的DNA末端形式(例如,核酸外切酶抗性DNA末端形式)可包含硫代磷酸酯修饰的核苷酸。在一些实施例中,本文所述的TDSC可包括S和R硫代磷酸酯修饰的核苷酸键联。在一个实施例中,硫代磷酸酯键联根据Iwamoto等人,2017,Nature Biotechnology[自然生物技术],第35卷:845-851产生。简而言之,核苷3'-噁唑磷烷衍生物的单体经过立体控制的通过迭代加帽和硫化的寡核苷酸合成来产生立体控制的硫代磷酸酯键联。通过反相高效液相色谱(RP-HPLC)和超高效液相色谱质谱(UPLC/MS)分析最终样品,以确定修饰的立体化学。含有硫代磷酸酯键联的核酸也是可商购的。

[0460] 在一些实施例中,本文所述的TDSC可以包括硼烷磷酸酯修饰的核苷酸,例如,根据Sergueev和Shaw,1998,J Am Chem Soc[美国化学学会杂志],第120卷,第37期:9417-9427中的方法。简而言之,H-膦酸酯链伸长后进行硼化,用硼烷基团取代磷酸酯主链中的非桥接氧。将最终样品纯化并通过RP-HPLC进行分析,以确定修饰的立体化学。硼烷磷酸酯修饰的核苷酸也是可商购的。

[0461] 在一些实施例中,本文所述的TDSC可以包括5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸,例如按照Lin等人,2002,Mol Cell Biol[分子与细胞生物学],第22卷,第3期:704-723中的方法制备。简而言之,使用未标记的S-腺苷甲硫氨酸(AdoMet)将胞嘧啶或含有胞嘧啶的序列与野

生型Dnmt3a(GST-3a)蛋白的谷胱甘肽S-转移酶融合体一起孵育。纯化核苷酸并通过HPLC进行分析,以确定核苷酸在正确的位置被甲基化。5-甲基胞嘧啶修饰的核苷酸也可商购获得。

[0462] 在一些实施例中,本文所述的TDSC可以包括7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸。在一个实施例中,7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸按照Jones和Robins,1963,Purine nucleosides.III.Methylation studies of certain naturally occurring purine nucleosides[嘌呤核苷.III.某些天然存在的嘌呤核苷的甲基化研究],J Am Chem Soc[美国化学学会杂志],第85卷:193中的方法制备。简而言之,用碘甲烷处理二甲亚砜中的2'-脱氧鸟苷。纯化核苷酸并通过HPLC进行分析,以确定核苷酸在正确的位置被甲基化。在另一实施例中,7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸根据Hendler等人,1970,第9卷,第21期:4141:4153,以及Kore和Parmar,2006,Biochemistry[生物化学],第25卷,第3期:337-340中描述的方法制备。简而言之,将水中的鸟嘌呤5'-二磷酸代替鸟苷5'-二磷酸添加到硫酸二甲酯中,以产生7-甲基GDP。纯化核苷酸并通过HPLC进行分析,以确定核苷酸在正确的位置被甲基化。7-甲基鸟嘌呤修饰的核苷酸也可商购获得。

[0463] 在一些实施例中,本文所述的TDSC包含在一个或多个CpG或GpC二核苷酸处的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由AluI甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由BamHI甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由CpG甲基转移酶(M.Sssl)引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由dam甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由EcoGII甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由EcoRI甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由GpC甲基转移酶(M.CviPI)引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由HaeIII甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由HhaI甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由HpaII甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由MspI甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的TDSC包含由TaqI甲基转移酶引入的甲基化。在一些实施例中,本文所述的方法包括使dsDNA与AluI甲基转移酶、BamHI甲基转移酶、M.Sssl、dam甲基转移酶、EcoGII甲基转移酶、EcoRI甲基转移酶、M.CviPI、HaeIII甲基转移酶接触、HhaI甲基转移酶、HpaII甲基转移酶、MspI甲基转移酶或TaqI甲基转移酶接触。

[0464] 在一些实施例中,本文所述的TDSC包含羧基修饰或甲酰基修饰。

[0465] 在实施例中,本文所述的TDSC或TDSC的一条链(例如,有义链或反义链)包含1%-100%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-90%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-80%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-70%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-60%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-50%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-40%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-30%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-20%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-15%之间的经化学修饰的核苷酸、1%-10%之间的经化学修饰的核苷酸、20%-90%之间的经化学修饰的核苷酸、20%-80%之间的经化学修饰的核苷酸。在实施例中,本文所述的TDSC或TDSC的一条链(例如,有义链或反义链)包含至少1%的经化学修饰的核苷酸、至少5%的经化学修饰的核苷酸;至少10%的经化学修饰的核苷酸;至少15%的经化学修饰的核苷酸;至少20%的经化学修饰的核苷酸;至少25%的经化学修饰的核苷酸;至少30%的经化学修饰的核苷酸;至少40%的经化学修饰的核苷酸;至少50%的经化学修饰的核苷酸;至少60%的

经化学修饰的核苷酸;至少70%的经化学修饰的核苷酸;至少80%的经化学修饰的核苷酸;至少85%的经化学修饰的核苷酸;至少90%的经化学修饰的核苷酸;至少92%的经化学修饰的核苷酸;至少95%的经化学修饰的核苷酸;至少97%的经化学修饰的核苷酸。在实施例中,本文所述的TDSC或TDSC的一条链(例如,有义链或反义链)包含每个不同核苷酸的0%-100%化学修饰的核苷酸,例如,对于每个构建体,0%-100%化学修饰的T核苷酸、0%-100%化学修饰的A核苷酸、0%-100%化学修饰的C核苷酸和0%-100%化学修饰的G核苷酸。在实施例中,本文所述的TDSC或TDSC的一条链(例如,有义链或反义链)包含每个不同核苷酸的0%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%化学修饰的核苷酸,例如,0%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%化学修饰的T核苷酸;0%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%化学修饰的A核苷酸;0%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%化学修饰的C核苷酸;或0%-100%、10%-100%、20%-100%、30%-100%、40%-100%、50%-100%、60%-100%、10%-50%化学修饰的G核苷酸。例如,TDSC可以含有100%化学修饰的T核苷酸、50%化学修饰的A核苷酸、0%化学修饰的C核苷酸和25%化学修饰的G核苷酸。

[0466] 在实施例中,经化学修饰的核苷酸,例如本文所述的修饰,可以被引入本文所述的TDSC的整个序列中;在序列的元件内,例如本文所述的元件;在5'-或3'-末端;和/或5'-或3'-末端的最后10、8、6、5、4、3或2个核苷酸之间。

[0467] 在一些实施例中,本文所述的TDSC仅在一条链上包含经化学修饰的核苷酸(例如,如图1A中所示)。在一些实施例中,本文所述的TDSC在反义链上包含经化学修饰的核苷酸。在一些实施例中,本文所述的TDSC在有义链上包含经化学修饰的核苷酸。

[0468] 在一些实施例中,本文所述的TDSC在两条链上包含经化学修饰的核苷酸(例如,如图1A和2中所示)。在某些实施例中,两条链在相同位置处包含化学修饰(例如,一条链上的经化学修饰的核苷酸与相对链上的经化学修饰的核苷酸碱基配对,和/或一条链上的未化学修饰的核苷酸碱基与相对链上的经未化学修饰的核苷酸碱基配对)。在实施例中,两条链全部由经化学修饰的核苷酸构成。在其他实施例中,如本文所述的TDSC的两条链包含不同的化学修饰模式(例如,一条链上的一个或多个经化学修饰的核苷酸与另一链上的未化学修饰的核苷酸碱基配对)。在实施例中,本文所述的TDSC包含其中两条链都被化学修饰的一个或多个双链区,和/或其中两条链都未被化学修饰的一个或多个双链区。在实施例中,本文所述的TDSC包含一个或多个双链区,其中一条链被化学修饰而另一条链未被化学修饰。

[0469] 在实施例中,本文所述的TDSC包含一种或多种DNA末端形式(例如,核酸外切酶抗性DNA末端形式,例如,共价封闭DNA末端形式或非共价封闭DNA末端形式,例如,如本文所述),其中每个包含一个或多个经化学修饰的核苷酸(例如,在DNA末端形式的一条或两条链上)。在实施例中,TDSC分子包含侧翼有包含经化学修饰的核苷酸的非共价封闭的核酸外切酶抗性DNA末端形式的双链区,例如,如本文所述(例如,图2)。

[0470] 在实施例中,本文所述的TDSC具有一个或多个化学修饰,其破坏了TDSC的一部分形成双链结构的能力,例如本文所述的TDSC在具有分子内互补性的区域中存在的核苷酸上具有一个或多个化学修饰。在实施例中,本文所述的TDSC具有一个或多个化学修饰,相对于

TDSC的未修饰序列,其破坏分子内互补性区域的碱基配对。在一些实施例中,跟未修饰的核苷酸与未修饰的核苷酸进行碱基配对的倾向相比,本文使用的经化学修饰的核苷酸具有降低的与经化学修饰的核苷酸进行碱基配对的倾向。在一些实施例中,与经修饰的核苷酸相比,本文使用的经化学修饰的核苷酸具有增加的与未修饰的核苷酸进行碱基配对的倾向。

[0471] 还设想了其他修饰。例如,本文所述的线性DNA的末端可以被化学修饰,例如,以保护它们免受核酸外切酶的影响。例如,可以将一个或多个双脱氧核苷酸残基添加到线性分子的3'末端和/或将自互补寡核苷酸连接到一个或两个末端。例如,参见Chang等人.(1987)Proc.Nail.Acad.Sci.USA[美国国家科学院院刊]84:4959-4963;Nehls等人(1996)Science[科学]272:886-889。

[0472] 在一些实施例中,与相同序列的未修饰的TDSC相比,本文所述的经化学修饰的TDSC在宿主组织或受试者中展现出DNA传感器的识别减少,例如,与相同序列的未修饰的TDSC相比,在宿主组织或受试者中由DNA传感器的识别减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些实施例中,与相同序列的未修饰的TDSC相比,本文所述的经化学修饰的TDSC展现出DNA核酸酶降解减少,例如,与未修饰的TDSC相比,在宿主组织或受试者中由DNA核酸酶的降解减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些实施例中,与相同序列的未修饰的TDSC相比,本文所述的经化学修饰的TDSC在靶/宿主组织或受试者中显示出先天性免疫系统的激活降低,例如,与相同序列的未修饰的TDSC相比,在靶/宿主组织或受试者中先天性免疫系统的激活降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。

[0473] 在一些实施例中,与相同序列的不包含经化学修饰的核苷酸的dsDNA(未修饰的dsDNA)相比,包含本文所述的经化学修饰的核苷酸的TDSC在靶/宿主组织或受试者中表现出任何以下特性:外源构建体在靶细胞基因组中的整合增加;通过复制在靶细胞中的保留增加;二级或三级结构的形成减少;与先天免疫传感器的相互作用减少;与核酸酶的相互作用减少;稳定性增强;寿命延长;毒性降低;递送加强;表达增加;跨膜运输增加;与DNA结合部分(例如核DNA结合蛋白、转录因子、分子伴侣、DNA聚合酶)的结合增加。在实施例中,与相同序列的未修饰的dsDNA相比,以上列出的特性中的任一个在靶/宿主组织或受试者中被调节至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。

[0474] DNA构建体的结构

[0475] 在一些实施例中,本文披露的TDSC或包含dsDNA核酸具有至少约20个核苷酸、至少约30个核苷酸、至少约40个核苷酸、至少约50个核苷酸、至少约75个核苷酸、至少约100个核苷酸、至少约200个核苷酸、至少约300个核苷酸、至少约500个核苷酸、至少约1000个核苷酸、至少约2000个核苷酸、至少约3000个核苷酸、至少约4000个核苷酸、至少约5000个核苷酸、至少约6000个核苷酸、至少约7000个核苷酸、至少约8000个核苷酸、至少约9000个核苷酸、至少约10,000个核苷酸、至少约20,000个核苷酸、至少约30,000个核苷酸、至少约40,000个核苷酸或至少约50,000个核苷酸的长度。在一些实施例中,本文披露的TDSC或包含dsDNA核酸的长度在20-30、30-40、40-50、50-75、75-100、100-200、200-300、300-500、500-1000、1000-2000、2000-3000、3000-4000、4000-5000、5000-6000、6000-7000、7000-8000、8000-9000、9000-10,000、10,000-20,000、20,000-30,000、30,000-40,000或40,000-50,000个核苷酸之间。在一些实施例中,本文披露的TDSC的大小是足以编码有用的多肽或RNA

的长度。

[0476] 在一些实施例中,TDSC或包含dsDNA的核酸包含核酸外切酶抗性DNA末端形式(例如,如本文所述)。在一些实施例中,DNA末端形式的长度是至少2、3、4、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90或100个核苷酸。在一些实施例中,DNA末端形式的长度小于10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90或100个核苷酸。在一些实施例中,DNA末端形式的长度是2-5、5-10、10-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50、50-55、55-60、60-70、70-80、80-90或90-100个核苷酸。

[0477] 在一些实施例中,TDSC或包含dsDNA的核酸包含编码效应子(例如,多肽或RNA,例如,如本文所述)的双链区,例如位于两个核酸外切酶抗性DNA末端形式之间。在一些实施例中,双链区长度是至少10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、20,000、30,000、40,000或50,000个核苷酸。在一些实施例中,双链区形式的长度小于50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000、8000、9000、10,000、20,000、30,000、40,000或50,000个核苷酸。在一些实施例中,双链区的长度是10-15、15-20、20-25、25-30、30-35、35-40、40-45、45-50、50-55、55-60、60-70、70-80、80-90、90-100、100-200、200-300、300-400、400-500、500-600、600-700、700-800、800-900、900-1000、1000-2000、2000-3000、3000-4000、4000-5000、5000-6000、6000-7000、7000-8000、8000-9000、9000-10,000、10,000-20,000、20,000-30,000、30,000-40,000或40,000至50,000个核苷酸。

[0478] 本文所述的TDSC可以具有低于阈值水平的单链结构。在一个实施例中,TDSC不包含超过20、18、16、14、12、10、8、7、5、4、3、2或1个长于100、80、70、60、50、40、30、20或10个碱基的单链区域,例如不包含长于100、80、70、60、50、40、30、20或10个碱基的单链区。在一个实施例中,由本文所述的TDSC形成的双链区如以下所述测定:Xayaphoummine等人2005.Kinefold web server for RNA/DNA folding path and structure prediction including pseudoknots and knots.[用于RNA/DNA折叠路径和结构预测的Kinefold网络服务器,包括假结和结]Nucleic Acids Research[核酸研究],第33卷:W605-610。在一个实施例中,Kinefold网站(http://kinefold.curie.fr/cgi-bin/form.pl)用于使用以下参数预测本文所述构建体的双链区:

[0479] • 要折叠的序列:输入并选择“DNA序列”

[0480] • 随机模拟:共转录折叠,3毫秒

[0481] • 模拟分子时间:默认

[0482] • 假结:不允许

[0483] • 纠缠:不交叉

[0484] • 随机种子:11453

[0485] 生产

[0486] 在一些实施例中,本文所述TDSC或包含dsDNA的核酸由经组装以含有本文所述的所期望元件的质粒生产。例如,可以使用金门克隆来组装质粒模板,以使用一锅组装程序在接受体载体中以限定的线性顺序组装多个DNA片段。Marillonnet&Grützner,2020,Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular

cloning pipeline[利用金门克隆和分级模块化克隆流水线合成DNA组装],Current Protocols in Molecular Biology[当前分子生物学方案],130:e115中描述了金门克隆。在一些实施例中,例如通过用核酸酶(例如,限制性核酸内切酶)消化或通过来自质粒模板的线性核酸序列的PCR扩增来线性化质粒模板(例如,如实例2中所述)。在某些实施例中,质粒模板的线性化产生如本文所述的原TDSC(例如,包含在一个末端或两个末端不包含核酸外切酶抗性DNA末端形式的dsDNA的线性核酸)。

[0487] 在一些实施例中,通过使用dNTP混合物扩增一条链(例如,来自质粒模板)来产生在一条链上包含化学修饰的TDSC或原TDSC序列,所述混合物包含一个或多个经化学修饰的核苷酸和能够扩增TDSC或原TDSC序列的一条链的引物(例如,如实例3中所述)。在某些实施例中,相对链(例如,未修饰的链或不同化学修饰的链,例如,如本文所述,例如图1A-2中)在单独的扩增反应中产生,例如使用包含未修饰的核苷酸或不同组的经化学修饰的核苷酸的dNTP混合物,以及能够扩增TDSC或原TDSC序列的相对链的引物(例如,如实例3中所述)。

[0488] 在一些实施例中,通过使用dNTP混合物扩增TDSC或原TDSC链(例如,来自质粒模板)产生在两条链上包含相同的化学修饰的TDSC或原TDSC,所述混合物包含一个或多个经化学修饰的核苷酸和能够扩增TDSC或原TDSC序列两条链的引物(例如,如实例4中所述)。

[0489] 在一些实施例中,将核酸外切酶抗性DNA末端形式(例如,如本文所述)引入(例如,连接)至原TDSC的一个末端或两个末端。在某些实施例中,DNA末端形式通过连接而附接至原TDSC的末端(例如,如实例5或6中所述)。在实施例中,DNA末端形式(例如,共价封闭DNA末端形式)与原TDSC的附接(例如,连接)产生最终的TDSC。在某些实施例中,例如通过在核酸外切酶(例如,核酸外切酶III、USER酶和/或绿豆核酸酶)存在下孵育TDSC来确认所附接的DNA末端形式的核酸外切酶抗性,例如,如实例10和11中所述。在实施例中,例如通过在核酸外切酶III存在下孵育TDSC来确认所附接的DNA末端形式的核酸外切酶抗性。在实施例中,DNA末端形式包含平末端、粘性末端或Y-衔接子(例如,如本文所述),并且通过在核酸外切酶III和(例如,随后、之前或同时)绿豆核酸酶和/或USER酶存在下孵育TDSC来确认所附接的DNA末端形式的核酸外切酶抗性。

[0490] 在某些实施例中,DNA末端形式以新生形式附接着至原TDSC的末端(例如,非共价封闭DNA末端形式可以作为发夹附接至原TDSC,例如,如在实例5和图3-4中所述)。在随后的步骤中,DNA末端形式的新生形式可以被进一步修饰(例如,切割)以产生最终的DNA末端形式。例如,非共价封闭DNA末端形式可以通过例如通过核酸酶切割新生形式来产生。在实施例中,新生形式包含一个或多个尿嘧啶核苷酸。在实施例中,使用USER酶在一个或多个尿嘧啶核苷酸处切割新生形式。在一些实施例中,包含突出端或粘性末端的新生形式(例如,如图3-4所示通过USER酶切割产生的新生形式)可通过用单链特异性核酸酶(例如绿豆核酸酶)消化而转化为平末端(例如,如实例5中所述)。在一些实施例中,包含在其单链环区中含有可切割部分(例如,尿嘧啶核苷酸)的发夹的新生形式通过可切割部分的切割(例如,通过USER酶)而转化为Y-衔接子,例如,如实例7中所述。T

[0491] TDSC可以从选自下组的杂质或副产物中富集或纯化,所述组由以下组成:内毒素、单核苷酸、经化学修饰的单核苷酸、单链DNA、环状DNA、蛋白(例如酶,例如连接酶、限制性酶)、DNA片段或截短物。在一些实施例中,纯化的TDSC基本上不含过程副产物和杂质,例如本文所述的过程副产物或杂质。

[0492] 在一些实施例中,TDSC与基于脂质的载剂例如脂质纳米颗粒(LNP)一起配制,例如如实例8中所述。

[0493] 可以对TDSC进行测序以确认所期望的设计序列。在实施例中,可以进行TDSC的其他结构分析(例如,限制酶分析)以确认或验证其序列。

[0494] 药物组合物

[0495] 本披露包括与一种或多种药学上可接受的赋形剂和/或载剂组合的TDSC或包含dsDNA的核酸和相关组合物。

[0496] 药物组合物可任选地包含一种或多种另外的活性物质,例如治疗性和/或预防性活性物质。本发明的药物组合物通常是无菌的和/或无热原的。

[0497] 本文所述的TDSC可以在没有载剂的情况下配制,例如本文所述的TDSC可以"裸"施用于宿主细胞、组织或受试者。裸配制品可包含药物赋形剂或稀释剂但缺乏载剂。

[0498] 药学上可接受的赋形剂或稀释剂可以包含用作本文所述组合物的媒剂或介质的非活性物质,例如由美国食品和药品管理局(United States Food and Drug Administration)(FDA)批准并且在非活性成分数据中列出的任一种非活性成分,其通过援引并入本文。药学上可接受的赋形剂或稀释剂的非限制性实例包括溶剂、水性溶剂、非水性溶剂、张力剂、分散介质、冷冻保护剂、稀释剂、悬浮助剂、表面活性剂、等渗剂、增稠剂、乳化剂、防腐剂、透明质酸酶、分散剂、防腐剂、润滑剂、造粒剂、崩解剂、粘合剂、抗氧化剂、缓冲剂(例如磷酸盐缓冲盐水(PBS))、润滑试剂、油及其混合物。

[0499] 可在以下文献中找到药剂的配制和/或生产中的总体考虑:例如,Remington:The Science and Practice of Pharmacy[雷明顿:药物科学与实践]第21版,Lippincott Williams&Wilkins[利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司],2005(通过援引并入本文)。

[0500] 载剂

[0501] 本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸也可以与载剂一起配制或包含在载剂内。载剂和药剂递送的一般考虑可以在例如以下中找到:Delivery Technologies for Biopharmaceuticals:Peptides,Proteins,NucleicAcids and Vaccines[生物制药的递送技术:肽、蛋白、核酸和疫苗](Lene Jorgensen和Hanne Morck Nielson编辑)Wiley[威利出版社];第1版(2009年12月21日);和Vargason等人2021.Nat Biomed Eng[自然生物医学工程]5,951-967。

[0502] 载剂的非限制性实例包括碳水化合物载剂(例如,酸酐修饰的植物糖原或糖原型材料,GalNAc)、纳米颗粒(例如,包封或共价连接至TDSC的纳米颗粒、金纳米颗粒、二氧化硅纳米颗粒)、脂质颗粒(例如,脂质体、脂质纳米颗粒)、阳离子载剂(例如,阳离子脂质聚合物或转染试剂)、融合体(fusosome)、无核细胞(例如,离体分化的网织红细胞)、有核细胞、外泌体、蛋白载剂(例如,共价连接至TDSC的蛋白)、肽(例如,细胞穿透肽)、材料(例如,氧化石墨烯)、单一纯脂质(例如,胆固醇)、DNA折纸(origami)(例如,DNA四面体)。

[0503] 在一个实施例中,本文所述的TDSC组合物、构建体和系统可以配制在脂质体或其他类似的囊泡中。脂质体是球形囊泡结构,这些球形囊泡结构由围绕内部水性隔室的单层或多层的脂质双层和相对不可渗透的外部亲脂性磷脂双层构成。脂质体可以是阴离子的、中性的或阳离子的。脂质体具有生物相容性,无毒,可以递送亲水性和亲脂性药物分子,保护其货物免受血浆酶的降解,并将其负载运输穿过生物膜和血脑屏障(BBB)(有关综述,参

见,例如,Spuch和Navarro,Journal of Drug Delivery[药物递送杂志],第2011卷,文章ID 469679,第12页,2011.doi:10.1155/2011/469679)。

[0504] 囊泡可以由若干种不同类型的脂质制成;然而,磷脂最常用于生成脂质体作为药物载剂。用于制备多层囊泡脂质的方法是本领域已知的(参见例如美国专利号6,693,086,其关于多层囊泡脂质制备的传授内容通过援引并入本文)。尽管当脂质膜与水溶液混合时,囊泡形成可以是自发的,但也可以通过经由使用均质器、超声波仪或挤压设备以振荡的形式施加力来加快囊泡形成(关于综述,参见例如,Spuch和Navarro,Journal of Drug Delivery[药物递送杂志],第2011卷,文章ID 469679,第12页,2011.doi:10.1155/2011/469679)。可以通过挤出通过具有减小尺寸的过滤器来制备挤出的脂质,如Templeton等人,Nature Biotech[自然生物技术],15:647-652,1997中所述,所述文献关于挤出脂质制备的传授内容通过援引并入本文。

[0505] 外泌体也可用作本文所述的组合物和系统的药物递送媒剂。对于综述,参见Ha等人2016年7月.Acta Pharmaceutica Sinica B[药学学报]第6卷第4期,第287-296页;https://doi.org/10.1016/j.apsb.2016.02.001。

[0506] 离体分化的红细胞也可以用作本文所述的药剂(例如,TDSC)的载剂。参见,例如,WO 2015073587;WO 2017123646;WO 2017123644;WO 2018102740;WO 2016183482;WO 2015153102;WO 2018151829;WO 2018009838;Shi等人2014.Proc Natl Acad Sci USA.[美国国家科学院院刊]111(28):10131-10136;美国专利9,644,180;Huang等人2017.Nature Communications[自然通讯]8:423;Shi等人2014.Proc Natl Acad Sci USA.[美国国家科学院院刊]111(28):10131-10136。

[0507] 例如如WO 2018208728中所述的融合体组合物也可以用作载剂递送本文所述的TDSC。

[0508] 脂质纳米颗粒:

[0509] 脂质纳米颗粒(LNP)是由可电离脂质制成的载剂。LNP通过内吞作用被细胞摄取,其特性允许内体逃逸,从而允许货物释放到靶细胞的细胞质中。除了可电离的脂质外,LNP还可能含有促进细胞结合的辅助脂质、填充脂质之间间隙的胆固醇和/或减少血清蛋白调理作用和网状内皮清除的聚乙二醇(PEG)。在一些实施例中,脂质纳米颗粒包含一种或多种离子脂质,诸如非阳离子脂质(例如,中性或阴离子或两性离子脂质);一种或多种缀合脂质(如WO 2019217941的表5中描述的PEG缀合脂质或缀合至聚合物的脂质;其通过援引以其全文并入本文);一种或多种固醇(例如,胆固醇);以及,任选地,一种或多种靶向分子(例如,缀合的受体、受体配体、抗体);或前述内容的组合。

[0510] 可用于形成纳米颗粒的脂质(例如,脂质纳米颗粒)包括例如WO 2019217941的表4中描述的那些,其通过援引并入本文-例如,含脂质的纳米颗粒可包含WO 2019217941的表4中的一种或多种脂质。脂质纳米颗粒可以包括另外的要素,如聚合物,如通过援引并入的WO 2019217941的表5中描述的聚合物。

[0511] 在一些实施例中,缀合脂质,当存在时,可以包括以下的一种或多种:PEG-二酰基甘油(DAG)(如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸二酰基甘油(PEGS-DAG)(如4-O-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-O-(w-甲氧基(聚乙氧基)

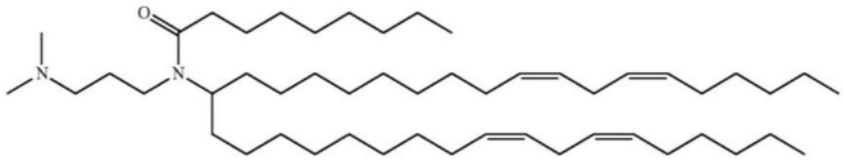
乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐,以及在WO 2019051289的表2中描述的那些(通过援引并入)和前述的组合。

[0512] 在一些实施例中,可掺入脂质纳米颗粒中的固醇包括胆固醇或胆固醇衍生物中的一种或多种,如通过援引并入的WO 2009/127060或US2010/0130588中的那些。另外的示例性固醇包括植物固醇,包括通过援引并入本文的Eygeris等人(2020),dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386中描述的那些。

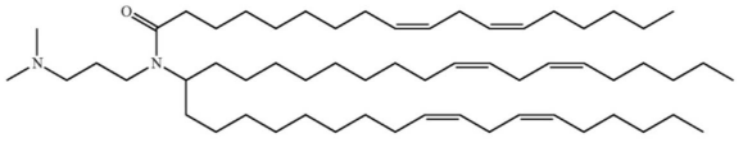
[0513] 在一些实施例中,脂质颗粒包含可电离脂质、非阳离子脂质、抑制颗粒聚集的缀合脂质和固醇。这些组分的量可以独立地变化,以获得所需特性。例如,在一些实施例中,脂质纳米颗粒包含:可电离脂质,其量是总脂质的约20mol%至约90mol%(在其他实施例中,它可以是存在于脂质纳米颗粒中的总脂质的20-70%(mol)、30-60%(mol)或40-50%(mol);约50mol%至约90mol%);非阳离子脂质,其量是总脂质的约5mol%至约30mol%;缀合脂质,其量是总脂质的约0.5mol%至约20mol%,以及固醇,其量是总脂质的约20mol%至约50mol%。总脂质与核酸的比率可以根据需要变化。例如,总脂质与核酸(质量或重量)的比率可为约10:1至约30:1。

[0514] 在一些实施例中,脂质与核酸的比率(质量/质量比率;w/w比)可处于约1:1至约25:1、约10:1至约14:1、约3:1至约15:1、约4:1至约10:1、约5:1至约9:1或约6:1至约9:1的范围内。可以调节脂质和核酸的量以提供所需的N/P比,例如3、4、5、6、7、8、9、10或更高的N/P比。通常,脂质纳米颗粒配制品的总脂质含量可在约5mg/ml至约30mg/mL的范围内。

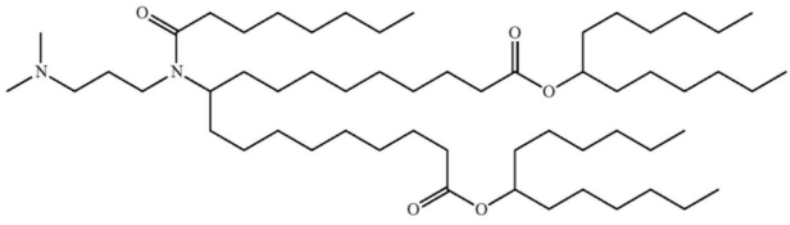
[0515] 可用于(例如,与其他脂质组分组合)形成用于递送本文所述的组合物,例如本文所述的核酸的脂质纳米颗粒的脂质化合物的一些非限制性实例包括:

[0516] 
(i)

[0517] 在一些实施例中,包含式(i)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。

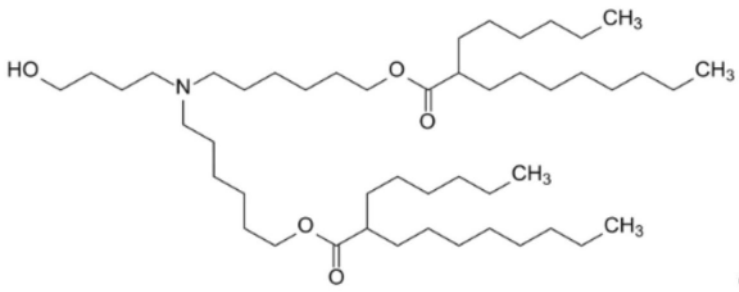
[0518] 
(ii)

[0519] 在一些实施例中,包含式(ii)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。

[0520] 
(iii)

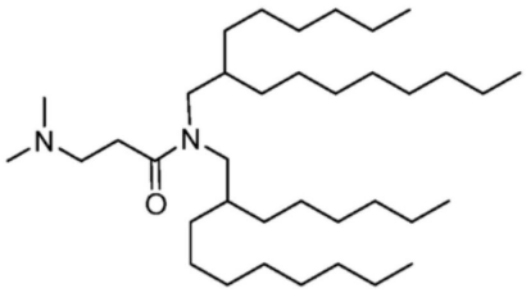
[0521] 在一些实施例中,包含式(iii)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或

肝细胞。



(iv)

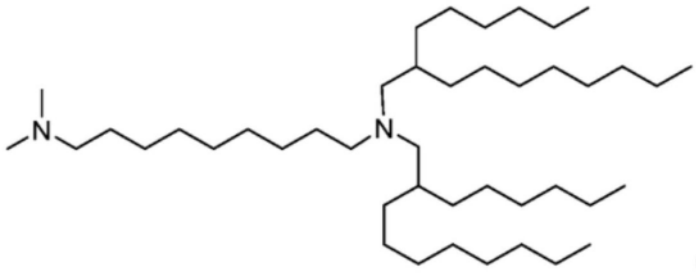
[0522]



(v)

[0523] 在一些实施例中,包含式(v)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。

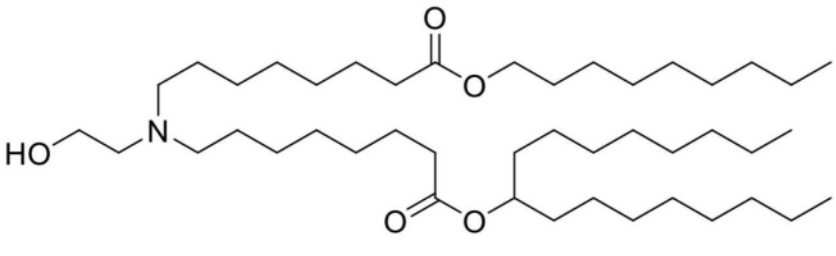
[0524]



(vi)

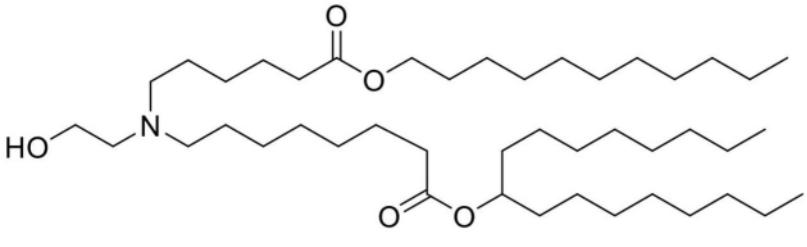
[0525] 在一些实施例中,包含式(vi)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。

[0526]



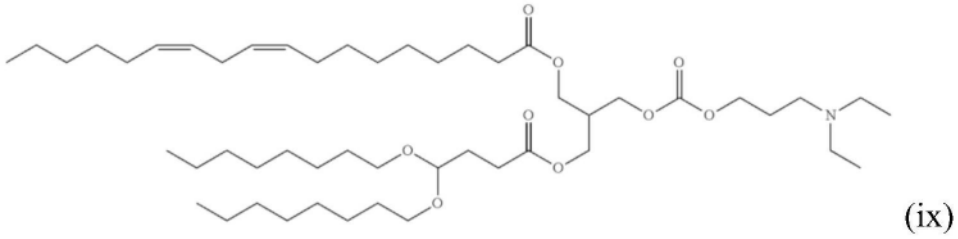
(vii)

[0527]



(viii)

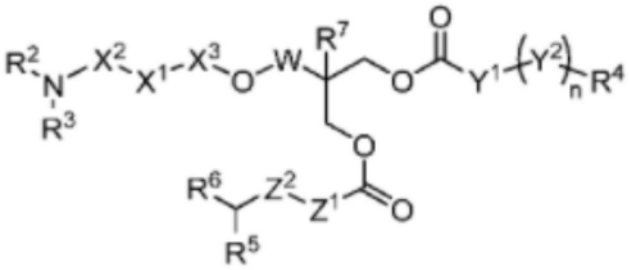
[0528] 在一些实施例中,包含式vii或(viii)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。

[0529] 

(ix)

[0530] 在一些实施例中,包含式(ix)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。

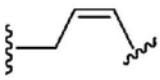
[0531] 在一些实施例中,包含式(x)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞:

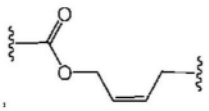
[0532] 

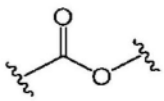
(x)

[0533] 其中

[0534] X^1是O、NR^1或直接键,X^2是C2-5亚烷基,X^3是C(=O)或直接键,R^1是H或Me,R^3是Ci-3烷基,R^2是Ci-3烷基,或R^2与它所附接的氮原子和X^2的1-3个碳原子一起形成4元、5元或6元环,或X^1是NR^1,R^1和R^2与它们所附接的氮原子一起形成5元或6元环,或R^2与R^3和它们所附接的氮原子一起形成5元、6元或7元环,Y^1是C2-12亚烷基,Y^2选自

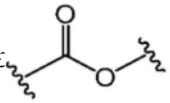
[0535] 

(在任一取向上), 

(在任一取向上), 

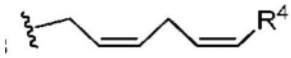
(在任一取向上),

[0536] n是0至3,R^4是Ci-15烷基,Z^1是Ci-6亚烷基或直接键,

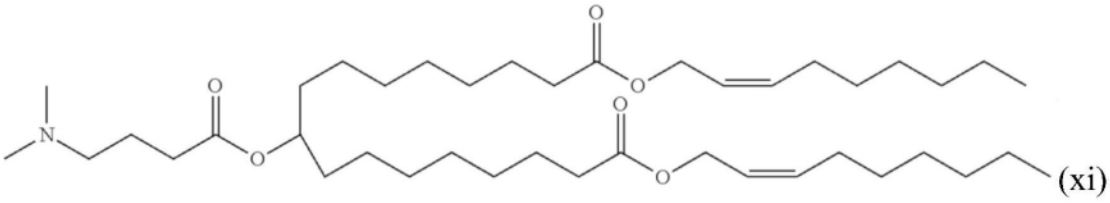
[0537] Z^2是 

[0538] (在任一取向上)或不存在,条件是如果Z^1是直接键,则Z^2不存在;

[0539] R^5是C5-9烷基或C6-10烷氧基,R^6是C5-9烷基或C6-10烷氧基,W是亚甲基或直接键,并且R^7是H或Me,或其盐,条件是如果R^3和R^2是C2烷基,X^1是O,X^2是直链C3亚烷基,X^3是C(=O),Y^1是直链Ce亚烷基,(Y^2)n-R^4是

[0540] 

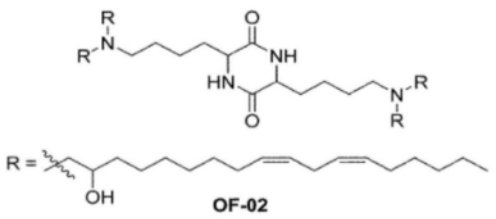
[0541] ,R^4是直链C5烷基,Z^1是C2亚烷基,Z^2不存在,W是亚甲基,并且R^7是H,则R^5和R^6不是C_x烷氧基。

[0542] 

(xi)

[0543] 在一些实施例中,包含式(xi)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。

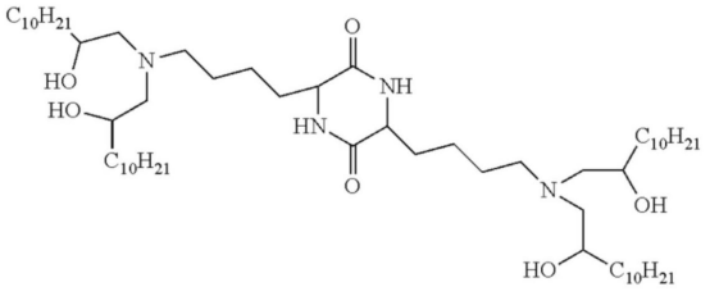
[0544] 在一些实施例中,包含式(xii)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。



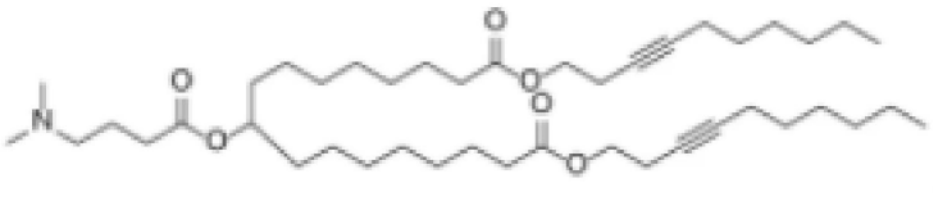
OF-02

其中 R= 

(xii)

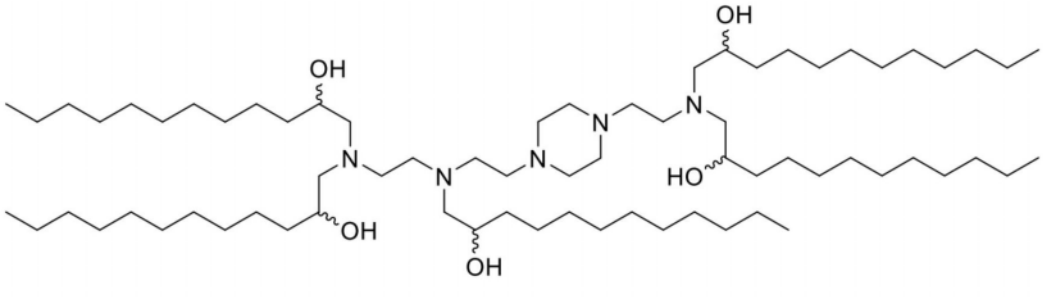
[0545] 

(xiii)

[0546] 

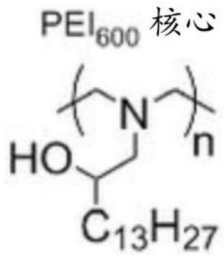
(xiv)

[0547] 在一些实施例中,LNP包含式(xiii)的化合物和式(xiv)的化合物。

[0548] 

(xv)

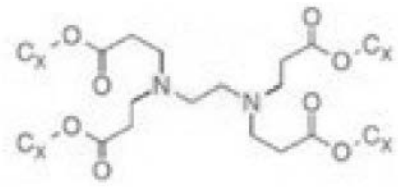
[0549] 在一些实施例中,包含式(xv)的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肝和/或肝细胞。

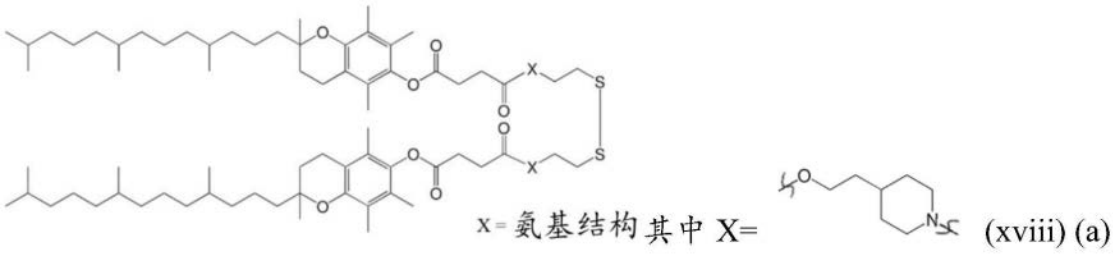
[0550] 

(xvi)

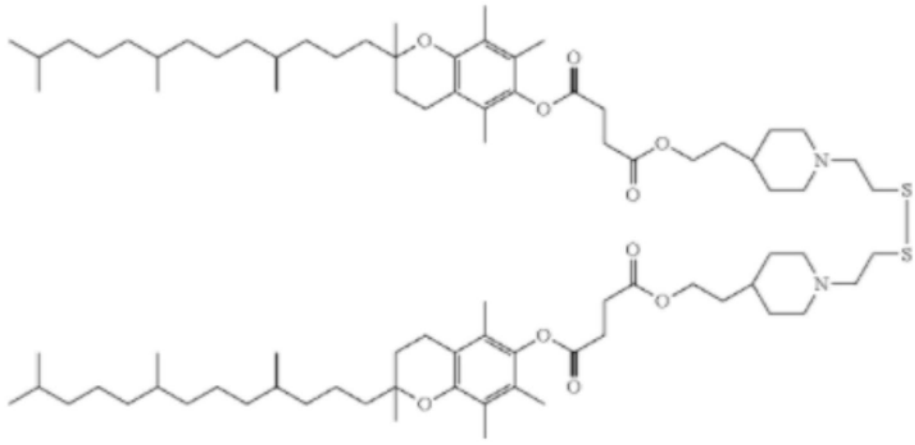
[0551] 在一些实施例中,包含式(xvi)的配制品的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肺内皮细胞。

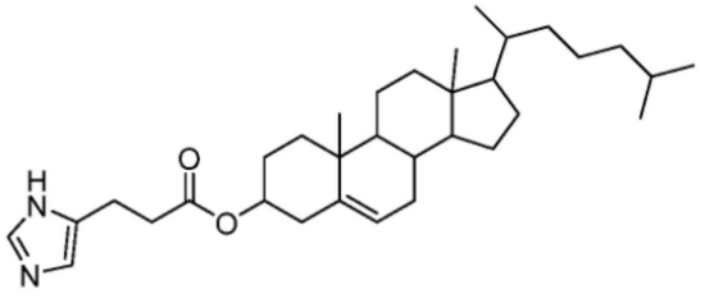
[0552] 在一些实施例中,包含式(xvii)、(xviii)或(xix)的配制品的LNP用于将本文所述的DNA组合物递送至肺内皮细胞。


(xvii)

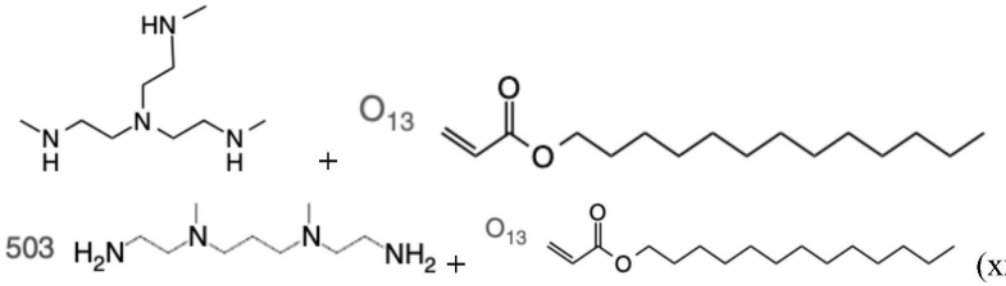
[0553] 

(xviii) (a)

[0554] 
(xviii)(b)


(xix)

[0555] 在一些实施例中,用于形成用于递送本文所述组合物(例如本文所述的核酸)的脂质纳米颗粒的脂质化合物通过以下反应之一制备:

[0556] 

[0557] 在一些实施例中,本文所述的组合物(例如,核酸或蛋白)在包含可电离脂质的LNP中提供。在一些实施例中,可电离脂质是十七烷-9-基8-((2-羟乙基)(6-氧代-6-(十一烷氧基)己基)氨基)辛酸酯(SM-102);例如,如US 9,867,888的实例1中所述(通过援引以其全文并入本文)。在一些实施例中,可电离脂质是9Z,12Z)-3-((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-((((3-(二乙基氨基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基十八碳-9,12-二烯酸酯(LP01),例如,如WO 2015/095340(通过援引以其全文并入本文)的实例13中合成的。在一些实施例中,可电离脂质是9-((4-二甲基氨基)丁酰基)氧基)十七烷二酸二((Z)-壬-2-烯-1-基)酯(L319),例如如US2012/0027803(通过援引以其全文并入本文)的实例7、实例8或实例9中合成的。在一些实施例中,可电离脂质是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)氮烷二基)双(十二烷-2-醇)(C12-200),例如,如WO 2010/053572(通过援引以其全文并入本文)的实例14和实例16中合成的。在一些实施例中,可电离脂质是咪唑胆固醇酯(ICE)脂质(3S,10R,13R,17R)-10,13-二甲基-17-((R)-6-甲基庚-2-基)-2,3,4,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17-十四氢-1H-环戊烯并[a]菲-3-基3-(1H-咪唑-4-基)丙酸酯,例如来自WO 2020/106946(通过援引以其全文并入本文)的结构(I)。

[0558] 在一些实施例中,可电离脂质可以是阳离子脂质、可电离阳离子脂质,例如可以根据pH以带正电荷的形式或中性形式存在的阳离子脂质,或可以容易地质子化的含胺脂质。在一些实施例中,阳离子脂质是例如在生理条件下能够带正电的脂质。示例性的阳离子脂质包括一个或多个带有正电荷的胺基。在一些实施例中,脂质颗粒包含与中性脂质、可电离含胺脂质、可生物降解的炔脂质、类固醇、包括多不饱和脂质的磷脂、结构脂质(例如固醇)、PEG、胆固醇和聚合物缀合脂质中的一种或多种配制的阳离子脂质。在一些实施例中,阳离子脂质可以是可电离的阳离子脂质。如本文所披露的示例性阳离子脂质可具有超过6.0的有效pKa。在实施例中,脂质纳米颗粒可包含具有与第一阳离子脂质不同的有效pKa(例如,大于第一有效pKa)的第二阳离子脂质。脂质纳米颗粒可包含40摩尔%至60摩尔%的包封在脂质纳米颗粒内或与脂质纳米颗粒缔合的阳离子脂质、中性脂质、类固醇、聚合物缀合的脂质和治疗剂(例如本文所述的核酸)。在一些实施例中,核酸与阳离子脂质共同配制。核酸可以吸附到LNP(例如包含阳离子脂质的LNP)的表面。在一些实施例中,核酸可以包封在LNP(例如包含阳离子脂质的LNP)中。在一些实施例中,脂质纳米颗粒可包含靶向部分,例如用靶向剂包被的靶向部分。在实施例中,LNP配制品是生物可降解的。在一些实施例中,包含一种或多种本文所述的脂质(例如式(i)、(ii)、(ii)、(vii)和/或(ix))的脂质纳米颗粒包封至少1%、至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少92%、至少95%、至少97%、至少98%或100%的分子TDSC。

[0559] 可用于脂质纳米颗粒配制品中的示例性可电离脂质包括但不限于通过援引并入

本文的WO 2019051289的表1中所列的那些。另外的示例性脂质包括但不限于下式中的一种或多种:US2016/0311759的X;US20150376115或US2016/0376224中的I;US20160151284的I、II或III;US20170210967的I、IA、II或IIA;US20150140070的I-c;US2013/0178541的A;US2013/0303587或US2013/0123338的I;US 2015/0141678的I;US2015/0239926的II、III、IV或V;US2017/0119904的I;WO 2017/117528的I或II;US2012/0149894的A;US2015/0057373的A;WO 2013/116126的A;US2013/0090372的A;US2013/0274523的A;US2013/0274504的A;US 2013/0053572的A;WO 2013/016058的A;WO 2012/162210的A;US2008/042973的I;US2012/01287670的I、II、III或IV;US2014/0200257的I或II;US2015/0203446的I、II或III;US2015/0005363的I或III;US2014/0308304的I、IA、IB、IC、ID、II、IIA、IIB、IIC、IID或III-XXIV;US2013/0338210的;WO 2009/132131的I、II、III或IV;US2012/01011478的A;US2012/0027796的I或XXXV;US2012/0058144的XIV或XVII;US2013/0323269的;US2011/0117125的I;US2011/0256175的I、II或III;US2012/0202871的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI、XII;US2011/0076335的I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、X、XII、XIII、XIV、XV或XVI;US2006/008378的I或II;US2013/0123338的I;US2015/0064242的I或X-A-Y-Z;US2013/0022649的XVI、XVII或XVIII;US2013/0116307的I、II或III;US2013/0116307的I、II或III;US2010/0062967的I或II;US2013/0189351的I-X;US2014/0039032的I;US2018/0028664的V;US2016/0317458的I;US2013/0195920的I;US10,221,127的5、6或10;WO 2018/081480的III-3;WO 2020/081938的I-5或I-8;US 9,867,888的18或25;US2019/0136231的A;WO 2020/219876的II;US 2012/0027803的1;US2019/0240349的OF-02;US10,086,013的23;Miao等人(2020)的cKK-E12/A6;WO 2010/053572的C12-200;Dahlman等人(2017)的7C1;Whitehead等人的304-013或503-013;US 9,708,628的TS-P4C2;WO 2020/106946的I;WO 2020/106946的I。

[0560] 在一些实施例中,可电离脂质是MC3(6Z,9Z,28Z,31Z)-三十七烷-6,9,28,31-四烯-19-基-4-(二甲基氨基)丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3),例如,如WO 2019051289A9(通过援引以其全文并入本文)的实例9中所述。在一些实施例中,可电离脂质是脂质ATX-002,例如,如WO 2019051289A9(通过援引以其全文并入本文)的实例10中所述。在一些实施例中,可电离脂质是(13Z,16Z)-A,A-二甲基-3-壬基二十二-13,16-二烯-1-胺(化合物32),例如,如WO 2019051289A9(通过援引以其全文并入本文)的实例11中所述。在一些实施例中,可电离脂质是化合物6或化合物22,例如,如WO 2019051289A9(通过援引以其全文并入本文)的实例12中所述。

[0561] 示例性非阳离子脂质包括但不限于二硬脂酰-sn-甘油基-磷酸乙醇胺、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、二油酰-磷脂酰乙醇胺4-(N-马来酰亚胺甲基)-环己烷-1-羧酸酯(DOPE-mal)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷酸乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰-磷脂酰-乙醇胺(DSPE)、单甲基-磷脂酰乙醇胺(诸如16-O-单甲基PE)、二甲基-磷脂酰乙醇胺(诸如16-O-二甲基PE)、18-1-反式PE、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、氢化大豆磷脂酰胆碱(HSPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、神经鞘磷脂(SM)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰甘油(DMPG)、二硬脂酰磷

脂酰甘油(DSPG)、二芥酰基磷脂酰胆碱(DEPC)、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、二反油烯酰-磷脂酰乙醇胺(DEPE)、卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血卵磷脂、溶血磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、卵鞘磷脂(ESM)、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、双十六烷基磷酸、溶血磷脂酰胆碱、二亚油酰基磷脂酰胆碱或其混合物。应当理解,也可以使用其他二酰基磷脂酰胆碱和二酰基磷脂酰乙醇胺磷脂。这些脂质中的酰基基团优选为源自具有C10-C24碳链的脂肪酸的酰基基团,例如月桂酰基、肉豆蔻酰基、棕榈酰基、硬脂酰基或油酰基。在某些实施例中,另外的示例性脂质包括但不限于通过援引并入本文的Kim等人(2020)dx.doi.org/10.1021/acs.nanolett.0c01386中描述的那些。在一些实施例中,此类脂质包括发现会改善用mRNA进行肝转染的植物脂质(例如DGTS)。

[0562] 适合用于脂质纳米颗粒中的非阳离子脂质的其他实例包括但不限于非磷脂质,例如硬脂胺、十二烷基胺、十六烷基胺、乙酰基棕榈酸酯、蓖麻酸甘油酯、硬脂酸十六烷基酯、肉豆蔻酸异丙酯、两性丙烯酸聚合物、三乙醇胺-月桂基硫酸盐、烷基-芳基硫酸盐、聚乙氧基化脂肪酸酰胺、双十八烷基二甲基溴化铵、神经酰胺、鞘磷脂等。其他非阳离子脂质在WO 2017/099823或美国专利公开US2018/0028664中描述,其内容通过援引以其全文并入本文。

[0563] 在一些实施例中,非阳离子脂质是油酸或通过援引以其全文并入的US 2018/0028664的式I、II或IV的化合物。非阳离子脂质可以占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的例如0-30%(摩尔)。在一些实施例中,非阳离子脂质含量是脂质纳米颗粒中存在的总脂质的5%-20%(mol)或10%-15%(mol)。在实施例中,可电离脂质与中性脂质的摩尔比为约2:1至约8:1(例如,约2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1或8:1)。

[0564] 在一些实施例中,脂质纳米颗粒不包含任何磷脂。

[0565] 在一些方面,脂质纳米颗粒可进一步包含诸如固醇的组分以提供膜完整性。可用于脂质纳米颗粒中的一种示例性固醇是胆固醇及其衍生物。胆固醇衍生物的非限制性实例包括极性类似物,诸如5a-胆甾烷醇、53-粪甾烷醇、胆甾醇基-(2'-羟基)-乙基醚、胆甾醇基-(4'-羟基)-丁基醚和6-酮胆甾烷醇;非极性类似物,诸如5a-胆甾烷、胆甾烯酮、5a-胆甾烷酮、5p-胆甾烷酮和胆甾醇癸酸酯;及其混合物。在一些实施例中,胆固醇衍生物是极性类似物,例如,胆甾醇基-(4'-羟基)-丁基醚。示例性的胆固醇衍生物在PCT公开WO 2009/127060和美国专利公开US2010/0130588中描述,其中每个通过援引以其全文并入本文。

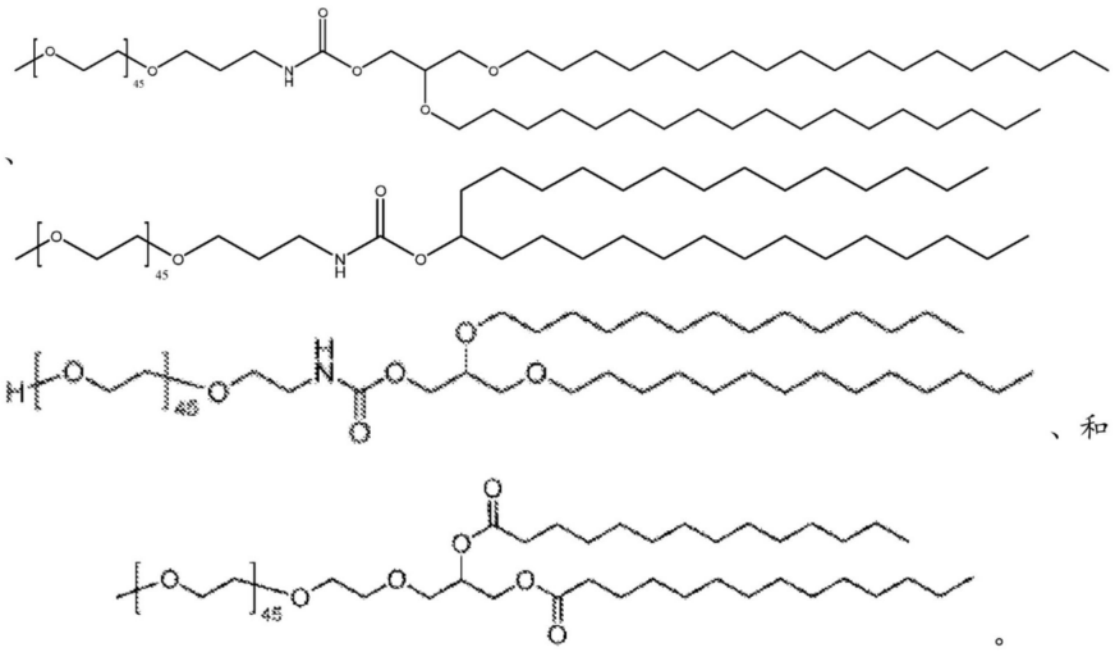
[0566] 在一些实施例中,提供膜完整性的组分,诸如固醇,可占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的0-50%(摩尔)(例如,0-10%、10%-20%、20%-30%、30%-40%或40%-50%)。在一些实施例中,这样的组分是脂质纳米颗粒的总脂质含量的20%-50%(mol)、30%-40%(mol)。

[0567] 在一些实施例中,脂质纳米颗粒可包含聚乙二醇(PEG)或缀合的脂质分子。通常,这些用于抑制脂质纳米颗粒的聚集和/或提供空间稳定。示例性的缀合脂质包括但不限于PEG-脂质缀合物、聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(如ATTA-脂质缀合物)、阳离子聚合物脂质(CPL)缀合物及其混合物。在一些实施例中,缀合脂质分子是PEG-脂质缀合物,例如(甲氧基聚乙二醇)缀合脂质。

[0568] 示例性的PEG-脂质缀合物包括但不限于PEG-二酰基甘油(DAG)(如1-(单甲氧基-聚乙二醇)-2,3-二肉豆蔻酰甘油(PEG-DMG))、PEG-二烷氧基丙基(DAA)、PEG-磷脂、PEG-神经酰胺(Cer)、聚乙二醇化磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)、PEG琥珀酸二酰基甘油(PEGS-DAG)(诸如

4-O-(2',3'-二(十四烷酰氧基)丙基-1-O-(w-甲氧基(聚乙氧基)乙基)丁二酸酯(PEG-S-DMG))、PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯、N-(羰基-甲氧基聚乙二醇2000)-1,2-二硬脂酰-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺钠盐或其混合物。另外的示例性PEG-脂质缀合物例如在US 5,885,613、US 6,287,591、US2003/0077829、US2003/0077829、US2005/0175682、US2008/0020058、US2011/0117125、US2010/0130588、US 2016/0376224、US2017/0119904和US/099823中描述,所有这些的内容通过援引以其全文并入本文。在一些实施例中,PEG-脂质是US2018/0028664的式III、III-a-I、III-a-2、III-b-1、III-b-2或V的化合物,其内容通过援引以其全文并入本文。在一些实施例中,PEG-脂质具有US20150376115或US2016/0376224的式II,两者的内容通过援引以其全文并入本文。在一些实施例中,PEG-DAA缀合物可以是例如PEG-二月桂基氧基丙基、PEG-二肉豆蔻基氧基丙基、PEG-二棕榈基氧基丙基或PEG-二硬脂基氧基丙基。PEG-脂质可以是以下的一种或多种:PEG-DMG、PEG-二月桂基甘油、PEG-二棕榈酰甘油、PEG-二硬脂基甘油、PEG-二月桂基甘油脂酰胺、PEG-二肉豆蔻基甘油脂酰胺、PEG-二棕榈酰甘油脂酰胺、PEG-二硬脂基甘油脂酰胺、PEG-胆固醇(1-[8'-(胆甾-5-烯-3[β]-氧基)甲酰胺基-3',6'-二氧杂辛基]氨基甲酰基-[ω]-甲基-聚(乙二醇))、PEG-DMB(3,4-双十四烷氧基苄基-[ω]-甲基-聚(乙二醇)醚)和1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些实施例中,PEG-脂质包含PEG-DMG、1,2-二肉豆蔻酰基-sn-甘油-3-磷酸乙醇胺-N-[甲氧基(聚乙二醇)-2000]。在一些实施例中,PEG-脂质包含选自以下的结构:

[0569]



[0570] 在一些实施例中,与PEG以外的分子缀合的脂质也可用于代替PEG-脂质。例如,聚噁唑啉(POZ)-脂质缀合物、聚酰胺-脂质缀合物(如ATTA-脂质缀合物)和阳离子聚合物脂质(GPL)缀合物可用于代替PEG-脂质或与PEG-脂质一起使用。

[0571] 示例性的缀合脂质,即PEG-脂质、(POZ)-脂质缀合物、ATTA-脂质缀合物和阳离子聚合物-脂质在WO 2019051289A9的表2中列出的PCT和LIS专利申请中描述,所有这些的内容通过援引以其全文并入本文。

[0572] 在一些实施例中,PEG或缀合脂质可以占脂质纳米颗粒中存在的总脂质的0-20%

(摩尔)。在一些实施例中,PEG或缀合脂质的含量为脂质纳米颗粒中存在的总脂质的0.5%-10%或2%-5%(mol)。可电离脂质、非阳离子脂质、固醇和PEG/缀合脂质的摩尔比可以根据需要变化。例如,脂质颗粒可包含按组合物的摩尔或总重量计30%-70%的可电离脂质,按组合物的摩尔或总重量计0-60%的胆固醇,按组合物的摩尔或总重量计0-30%的非阳离子脂质和按组合物的摩尔或总重量计1%-10%的缀合脂质。优选地,组合物包含按组合物的摩尔或总重量计30%-40%的可电离脂质,按组合物的摩尔或总重量计40%-50%的胆固醇,和按组合物的摩尔或总重量计10%-20%的非阳离子脂质。在一些其他实施例中,所述组合物是按组合物的摩尔或总重量计50%-75%的可电离脂质,按组合物的摩尔或总重量计20%-40%的胆固醇和按组合物的摩尔或总重量计5%至10%的非阳离子脂质以及按组合物的摩尔或总重量计1%-10%的缀合脂质。所述组合物可以含有按组合物的摩尔或总重量计60%-70%的可电离脂质,按组合物的摩尔或总重量计25%-35%的胆固醇,以及按组合物的摩尔或总重量计5%-10%的非阳离子脂质。所述组合物还可含有按组合物的摩尔或总重量计至多90%的可电离脂质和按组合物的摩尔或总重量计2%至15%的非阳离子脂质。配制品也可以是脂质纳米颗粒配制品,例如包含按组合物的摩尔或总重量计8%-30%的可电离脂质,按组合物的摩尔或总重量计5%-30%的非阳离子脂质,以及按组合物的摩尔或总重量计0-20%的胆固醇;按组合物的摩尔或总重量计4%-25%的可电离脂质,按组合物的摩尔或总重量计4%-25%的非阳离子脂质,按组合物的摩尔或总重量计2%至25%的胆固醇,按组合物的摩尔或总重量计10%至35%的缀合脂质,以及按组合物的摩尔或总重量计5%的胆固醇;或按组合物的摩尔或总重量计2%-30%的可电离脂质,按组合物的摩尔或总重量计2%-30%的非阳离子脂质,按组合物的摩尔或总重量计1%至15%的胆固醇,按组合物的摩尔或总重量计2%至35%的缀合脂质,以及按组合物的摩尔或总重量计1%-20%的胆固醇;或按组合物的摩尔或总重量计甚至高达90%的可电离脂质和按组合物的摩尔或总重量计2%-10%的非阳离子脂质,或按组合物的摩尔或总重量计甚至100%的阳离子脂质。在一些实施例中,脂质颗粒配制品包含摩尔比为50:10:38.5:1.5的可电离脂质、磷脂、胆固醇和聚乙二醇化脂质。在一些其他实施例中,脂质颗粒配制品包含摩尔比为60:38.5:1.5的可电离脂质、胆固醇和聚乙二醇化脂质。

[0573] 在一些实施例中,脂质颗粒包含可电离脂质、非阳离子脂质(例如磷脂)、固醇(例如胆固醇)和聚乙二醇化脂质,其中可电离脂质的脂质摩尔比在20至70摩尔%的范围内,目标为40-60摩尔%,非阳离子脂质的摩尔百分比在0至30摩尔%的范围内,目标为0至15摩尔%,固醇的摩尔百分比在20至70摩尔%的范围内,目标为30至50摩尔%,并且聚乙二醇化脂质的摩尔百分比在1至6摩尔%的范围内,目标为2至5摩尔%。

[0574] 在一些实施例中,脂质颗粒包含摩尔比为50:10:38.5:1.5的可电离脂质/非阳离子脂质/固醇/缀合脂质。

[0575] 在一个方面,本披露提供了包含磷脂、卵磷脂、磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺的脂质纳米颗粒配制品。

[0576] 在一些实施例中,还可以包括一种或多种另外的化合物。那些化合物可以单独施用,或者另外的化合物可以包括在本发明的脂质纳米颗粒中。换言之,除核酸或至少第二核酸之外,脂质纳米颗粒可含有不同于第一核酸的其他化合物。非限制性地,其他另外的化合物可以选自由以下组成的组:小的或大的有机分子或无机分子、单糖、二糖、三糖、寡糖、多

糖、肽、蛋白、其肽类似物和衍生物、肽模拟物、核酸、核酸类似物和衍生物、由生物材料制成的提取物,或其任何组合。

[0577] 在一些实施例中,通过添加靶向结构域将LNP定向至特定组织。例如,可以将生物配体展示在LNP的表面,以增强与展示同源受体的细胞的相互作用,从而推动与细胞表达受体的组织的缔合和向其中的载物递送。在一些实施例中,生物配体可以是驱动递送至肝的配体,例如展示GalNAc的LNP促使核酸载物递送至展示无唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)的肝细胞。Akinc等人Mol Ther[分子治疗]18(7):1357-1364(2010)的工作传授了将三价GalNAc配体与PEG-脂质缀合(GalNAc-PEG-DSG)以产生依赖于ASGPR的LNP以获得可观察的LNP载物效应(参见,例如,Akinc等人2010,同上的图6)。其他展示配体的LNP配制品,例如掺入叶酸、转铁蛋白或抗体的配制品,在WO 2017223135中进行了讨论,其通过援引以其全文并入本文,此外还有在其中使用的参考文献也并入本文:即,Kolhatkar等人,Curr Drug Discov Technol[当代药物发现技术].2011 8:197-206;Musacchio和Torchilin,Front Biosci.[生物科学前沿]2011 16:1388-1412;Yu等人,Mol Membr Biol.[分子膜生物学]2010 27:286-298;Patil等人,Crit Rev Ther Drug Carrier Syst[治疗性药物载剂系统的重要评论].200825:1-61;Benoit等人,Biomacromolecules[生物大分子].2011 12:2708-2714;Zhao等人,Expert Opin Drug Deliv[药物递送专家观点].2008 5:309-319;Akinc等人,Mol Ther[分子治疗].2010 18:1357-1364;Srinivasan等人,Methods Mol Biol[分子生物学方法].2012820:105-116;Ben-Arie等人,Methods Mol Biol[分子生物学方法].2012757:497-507;Peer 2010J Control Release[控释杂志].20:63-68;Peer等人,Proc Natl Acad Sci U SA.[美国国家科学院院刊]2007 104:4095-4100;Kim等人,Methods Mol Biol.[分子生物学方法]2011 721:339-353;Subramanya等人,Mol Ther[分子治疗].2010 18:2028-2037;Song等人,Nat Biotechnol.[自然生物技术]2005 23:709-717;Peer等人,Science[科学].2008 319:627-630;以及Peer和Lieberman,Gene Ther[基因治疗].201118:1127-1133。

[0578] 在一些实施例中,通过将选择性器官靶向(Selective ORgan Targeting,SORT)分子添加至包含传统组分(例如可电离的阳离子脂质、两亲性磷脂、胆固醇和聚(乙二醇)(PEG))的配制品中来针对组织特异性活性对LNP进行选择。Cheng等人Nat Nanotechnol[自然纳米技术]15(4):313-320(2020)的传授内容证明,添加补充的“SORT”组分可根据SORT分子的百分比和生物物理特性精确地改变体内RNA递送谱并介导组织特异性(例如,肺、肝、脾)基因递送和编辑。

[0579] 在一些实施例中,LNP包含生物可降解的可电离脂质。在一些实施例中,LNP包含(9Z,12Z)-3-((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-((((3-(二乙基氨基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基十八碳-9,12-二烯酸酯,也称为3-((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-((((3-(二乙基氨基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基(9Z,12Z)-十八碳-9,12-二烯酸酯)或另一种可电离脂质。参见,例如WO 2019/067992、WO/2017/173054、WO 2015/095340、和WO 2014/136086,以及其中提供的参考文献的脂质。在一些实施例中,在LNP脂质的上下文中术语阳离子和可电离是可互换的,例如,其中可电离脂质根据pH是阳离子的。

[0580] 在一些实施例中,LNP配制品的平均LNP直径可以在数十nm和数百nm之间,例如通过动态光散射(DLS)测量的。在一些实施例中,LNP配制品的平均LNP直径可以为约40nm至约

150nm,如约40nm、45nm、50nm、55nm、60nm、65nm、70nm、75nm、80nm、85nm、90nm、95nm、100nm、105nm、110nm、115nm、120nm、125nm、130nm、135nm、140nm、145nm或150nm。在一些实施例中,LNP配制品的平均LNP直径可为约50nm至约100nm、约50nm至约90nm、约50nm至约80nm、约50nm至约70nm、约50nm至约60nm、约60nm至约100nm、约60nm至约90nm、约60nm至约80nm、约60nm至约70nm、约70nm至约100nm、约70nm至约90nm、约70nm至约80nm、约80nm至约100nm、约80nm至约90nm或约90nm至约100nm。在一些实施例中,LNP配制品的平均LNP直径可为约70nm至约100nm。在特定的实施例中,LNP配制品的平均LNP直径可为约80nm。在一些实施例中,LNP配制品的平均LNP直径可为约100nm。在一些实施例中,LNP配制品的平均LNP直径范围为约1 mm至约500mm、约5mm至约200mm、约10mm至约100mm、约20mm至约80mm、约25mm至约60mm、约30mm至约55mm、约35mm至约50mm,或约38mm至约42mm。

[0581] 在一些情况下,LNP可以是相对均质的。多分散性指数可用于指示LNP的均质性,例如脂质纳米颗粒的粒度分布。小的(例如,小于0.3)多分散性指数通常指示窄的粒度分布。LNP的多分散性指数可为约0至约0.25,如0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.10、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、0.19、0.20、0.21、0.22、0.23、0.24或0.25。在一些实施例中,LNP的多分散性指数可为约0.10至约0.20。

[0582] LNP的ζ电位可用于指示组合物的电动电位。在一些实施例中,ζ电位可以描述LNP的表面电荷。具有相对低电荷(正电荷或负电荷)的脂质纳米颗粒通常是期望的,因为更高电荷的物质可能不理想地与体内的细胞、组织和其他元素相互作用。在一些实施例中,LNP的ζ电位可为约-10mV至约+20mV、约-10mV至约+15mV、约-10mV至约+10mV、约-10mV至约+5mV、约-10mV至约0mV、约-10mV至约-5mV、约-5mV至约+20mV、约-5mV至约+15mV、约-5mV至约+10mV、约-5mV至约+5mV、约-5mV至约0mV、约0mV至约+20mV、约0mV至约+15mV、约0mV至约+10mV、约0mV至约+5mV、约+5mV至约+20mV、约+5mV至约+15mV或约+5mV至约+10mV。

[0583] 蛋白和/或核酸的包封效率描述了相对于所提供的初始量,在制备后被包封或以其他方式与LNP缔合的蛋白和/或核酸的量。包封效率理想的是较高(例如,接近100%)。包封效率可以例如通过比较在用一种或多种有机溶剂或去垢剂破碎脂质纳米颗粒之前和之后含有脂质纳米颗粒的溶液中蛋白或核酸的量来测量。阴离子交换树脂可用于测量溶液中游离蛋白或核酸的量。荧光可用于测量溶液中游离蛋白和/或核酸的量。对于本文所述的脂质纳米颗粒,蛋白和/或核酸的包封效率可以是至少50%,例如50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施例中,包封效率可以是至少80%。在一些实施例中,包封效率可以是至少90%。在一些实施例中,包封效率可以是至少95%。

[0584] LNP可以任选地包含一层或多层包衣。在一些实施例中,LNP可以配制在具有包衣的胶囊、膜或片剂中。包含本文所述的组合物的胶囊、膜或片剂可具有任何可用的尺寸、拉伸强度、硬度或密度。

[0585] 另外的示例性脂质、配制品、方法和LNP表征由WO 2020061457传授,其通过援引以其全文并入本文。还参见:Hou等人Lipid nanoparticles for mRNA delivery[用于mRNA递送的脂质纳米颗粒].Nat Rev Mater[自然评论材料](2021).https://doi.org/10.1038/s41578-021-00358-0。

[0586] 在一些实施例中,使用Lipofectamine MessengerMax(赛默飞世尔(Thermo

Fisher))或TransIT-mRNA转染试剂(米卢斯生物(Mirus Bio))进行体外或离体细胞脂质体转染。在某些实施例中,使用GenVoy_ILM可电离脂质混合物(精密纳米系统(Precision NanoSystems))配制LNP。在某些实施例中,使用2,2-二亚油烯基-4-二甲基氨基乙基-[1,3]-二氧戊环(DLin-KC2-DMA)或二亚油烯基甲基-4-二甲基氨基丁酸酯(DLin-MC3-DMA或MC3)配制LNP,其配制和体内用途在Jayaraman等人Angew Chem Int Ed Engl[德国应用化学]51(34):8529-8533(2012)中传授,其通过援引以其全文并入本文。

[0587] 优化用于递送CRISPR-Cas系统(例如Cas9-gRNA RNP、gRNA、Cas9 mRNA)的LNP配制品在两者均通过援引并入的WO 2019067992和WO 2019067910中描述。

[0588] 可用于递送核酸的另外的特定LNP配制品在两者均通过援引并入的US 8158601和US 8168775中描述,其包括帕替西兰(patisiran)中使用的以名称ONPATTRO销售的配制品。

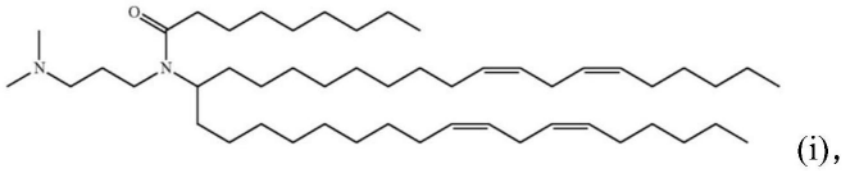
[0589] 本文所述的DNA与LNP的示例性给药可以包括约0.1、0.25、0.3、0.5、1、2、3、4、5、6、8、10或100mg/kg(DNA)。

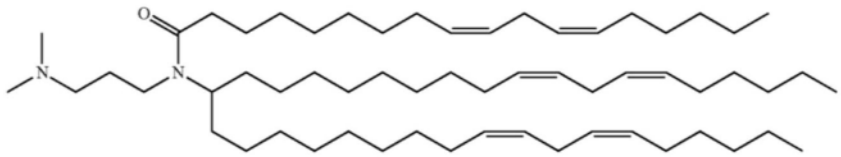
[0590] 设想了以下如实施例:

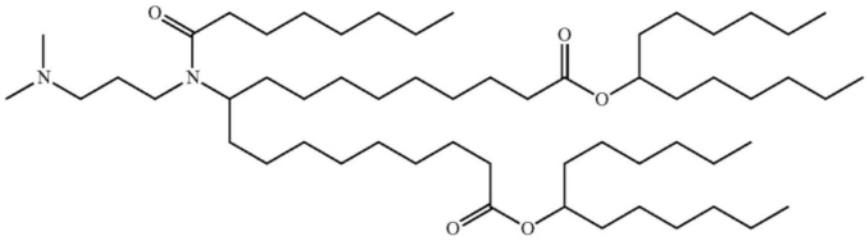
[0591] A.一种脂质纳米颗粒(LNP),其包含本文所述的TDSC构建体、序列或组合物。

[0592] B.如实施例A所述的LNP,其包含阳离子脂质。

[0593] C.如实施例B所述的LNP,其中所述阳离子脂质具有根据以下的结构:

[0594] 
(i),


(ii), 或


(iii)。

[0595] D.如实施例A-C中任一项所述的LNP,其进一步包含一种或多种中性脂质,例如,DSPC、DPPC、DMPC、DOPC、POPC、DOPE、SM,类固醇,例如胆固醇,和/或一种或多种聚合物缀合的脂质,例如聚乙二醇化脂质,例如PEG-DAG、PEG-PE、PEG-S-DAG、PEG-cer或PEG二烷氧基丙基氨基甲酸酯。

[0596] 在实施例中,包含本文所述的TDSC的LNP制剂可以通过用靶向效应子进行表面修饰来靶向期望的细胞类型。此类靶向效应子包括例如结合靶细胞的细胞特异性受体配体;针对靶细胞的抗体或其他结合物;中心蛋白(centryins);细胞穿透肽;能够实现内体逃逸的肽(例如GALA、KALA)。例如,对于综述参见Tai&Gao.2017.Adv Drug Deliv Rev.[先进药物递送综述]110-111:157-168的表1和表2。

[0597] 在实施例中,包含本文所述的TDSC的LNP制剂可以与佐剂共同施用,例如与佐剂在同一制剂中共同递送。

[0598] 施用途径

[0599] 通过任何合适的途径将本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸引入细胞、组织或受试者中。

[0600] 向靶细胞或组织(例如,离体)施用可以通过本领域已知的方法,例如转染,使用试剂(例如脂质体、磷酸钙)或物理手段(例如电穿孔、基因枪、显微注射、微流体剪切、细胞挤压)的瞬时或稳定转染。其他方法描述于例如Rad等人2021.Adv.Mater.[高级材料]33:2005363,其通过援引并入本文。

[0601] 可以通过肠胃外(例如静脉内、肌内、腹膜内、皮下或颅内)途径向受试者(例如哺乳动物,例如人受试者)施用;通过局部施用、透皮施用或经皮施用。其他合适的途径包括口服、直肠、经粘膜、鼻内、吸入(例如,通过气雾剂)、口腔(例如,舌下)、阴道、鞘内、眼内、透皮、内皮内、子宫内(或卵内)、胸膜内、脑内、关节内、局部、淋巴管内。还包括直接组织或器官注射(例如,至肝、眼、骨骼肌、心肌、隔膜、肌肉或脑)。

[0602] 应用

[0603] 本文所述的TDSC或包含dsDNA的核酸可以用于受试者(例如,人或非人动物)的治疗或健康应用。虽然对在此提供的药物组合物的描述主要涉及适合用于向人施用的药物组合物,但熟练技术人员将理解此类组合物通常是适合用于向任何其他动物施用。受试者可以是任何动物,例如哺乳动物,例如人或非人哺乳动物。在实施例中,所述受试者是脊椎动物(例如,哺乳动物、鸟、鱼、爬行动物、或两栖动物)。在实施例中,所述受试者是人。在实施例中,所述方法受试者是非人哺乳动物。在实施例中,受试者是非人哺乳动物,诸如非人灵长类动物(例如猴、猿)、有蹄类动物(例如家牛、水牛、绵羊、山羊、猪、骆驼、美洲驼、羊驼、鹿、马、驴)、肉食动物(例如狗、猫)、啮齿动物(例如大鼠、小鼠)或兔类动物(例如兔)。在实施例中,所述受试者是鸟,如以下鸟类分类群的成员:鸡形目(例如鸡、火鸡、野鸡、鹌鹑)、雁形目(例如鸭、鹅)、古颚下纲(例如鸵鸟、鸸鹋)、鸽形目(例如鸽子、野鸽)、或鹦形目(例如鹦鹉)。在实施例中,受试者是无脊椎动物,诸如节肢动物(例如昆虫、蜘蛛、甲壳类动物)、线虫、环节动物、蠕虫或软体动物。

[0604] 在一些实施例中,本文所述的DNA以约0.1-100mg/kg DNA的剂量提供。

[0605] 在一些实施例中,本文所述的TDSC在以下的时间段内给宿主细胞、组织或受试者赋予效应子的生物学效应,例如治疗性多肽的表达:至少2、3、4、5、6天或一周;至少8、9、10、12、14天或两周;至少16、18、20天或3周;至少22、24、25、27、28天或一个月;至少2个月、3个月、4个月、5个月、6个月或更多;一周和6个月之间、1个月至6个月之间、3个月至6个月之间。

[0606] 在一些实施例中,本文所述的TDSC在宿主细胞的至少1次细胞分裂的时间段内给宿主细胞、组织或受试者赋予效应子的生物学效应,例如治疗性多肽的表达。

[0607] 在实施例中,本文所述的TDSC可用于将效应子,例如本文所述的效应子递送至细胞、组织或受试者。

[0608] 在实施例中,本文所述的TDSC可用于调节(例如,增加或减少)细胞、组织或受试者中的生物学参数。生物学参数可以是靶细胞、组织或受试者中主题基因的基因表达的增加或减少。

[0609] 在实施例中,本文所述的TDSC可用于通过向有需要的细胞、组织或受试者施用本文所述的TDSC来治疗此类细胞、组织或受试者。

[0610] 在实施例中,TDSC将效应子递送至选自淋巴细胞(例如,T细胞或单核细胞)、癌细胞(例如,骨肉瘤细胞)、HEK293细胞、肝细胞或表皮细胞(例如,角质形成细胞)的细胞。

[0611] 实例

[0612] 实例1:线性TDSC的质粒模板的设计和组装

[0613] 本实例描述了如何为经化学修饰的线性TDSC构建体创建质粒模板。在本实例中,使用以下特定序列组分设计了构建体模板:

[0614] • 启动子Ef1a:

[0615] 5'ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgc ctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttg ccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgcc ttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcg aggccttgcgcttaaggagcccccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgc gaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgc tgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttttggg gccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccga gaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgcc ctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcaggg agctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgt cctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttg gagtacgtcgtctttaggttgggggaggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaa gttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctca agcctcagacagtggttcaaagttttttttcttccatttcaggtgtcgtga-3'(SEQ ID NO:37)

[0616] • 编码模型/标志物蛋白的效应子序列(mCherry):

[0617] 5'atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcac atggagggctcc gtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcacccag accgccaagctgaaggtgaccaagggtggcccccctgcccttcgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacg gctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtg gagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttc atctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctggg aggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaagga cggcggccactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaac gtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggcc gccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaa-3'(SEQ ID NO:38)

[0618] 任选地,构建体还可以包括NTS或维持序列之一或两者,例如:

[0619] • NTS:SV40增强剂:5'-cccaagaagaagaggaaagtc-3'(SEQ ID NO:1)

[0620] • 维持序列:人干扰素-βMAR

[0621] 5’tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttttatttttttacata taaatatatttccctgtttttctaaa aaagaaaaagatcatcatttcccattgtaaaatgccatatttttttca taggtcacttacata3’(SEQ ID NO:121)

[0622] •聚A位点:

[0623] 5’ctgtgccttctagttgccagccatctgttgtttgcccctcccccgtgccttccttgaccctggaag gtgccactcccactgtc ctttcctaataaaatgaggaaattgcatcgcattgtctgagtaggtgtcattctattc tgggggggtggggtggggcaggacagcaag ggggaggattgggaagacaatagcaggcatgctggggatgcggtgg gctctatgg3’(SEQ ID NO:122)

[0624] 使用标准DNA设计操作软件用这些元件设计质粒模板。组装是通过金门组装遵循已发布的方案和市售试剂盒进行的(Marillonnet&Grützner.2020.Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline.[使用金门克隆和分层模块化克隆管道进行合成DNA组装]Current Protocols in Molecular Biology.[分子生物学现行方案]130:e115;Golden Gate Assembly Protocol for Using NEB Golden Gate Assembly Mix(E1600)[使用NEB金门组装混合物(E1600)的金门组装方案](新英格兰生物实验室)。使用一系列120bp长的引物进行设计构建体的金门组装,其中前30bp与相关相邻片段匹配,接下来的60bp编码新序列,且最后30bp退火至靶序列。将片段组装成最终构建体设计(NEB金门组装试剂盒),并根据制造商方案通过桑格测序(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich))确认序列。

[0625] 实例2:将质粒DNA转化为未修饰的TDSC

[0626] 本实例描述了包含线性dsDNA且不含经化学修饰的核苷酸的TDSC的创建。在本实例中,根据制造商方案(宝生物公司(Takara),R045Q)使用PrimeSTAR®Max DNA聚合酶从实例1中的质粒制备线性dsDNA。根据制造商方案(宝生物公司,740609)使用NucleoSpin® Gel和PCR Clean-Up纯化dsDNA,并根据制造商方案(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),Q33265)通过Qubit™1X dsDNA Broad Range测定dsDNA浓度。

[0627] 实例3:将质粒DNA转化为仅对有义链或反义链进行了化学修饰的TDSC

[0628] 本实例描述了包含线性dsDNA的TDSC的生成,所述线性dsDNA仅对有义链或反义链进行了化学修饰。按照Minev等人,2019,Rapid in vitro production of singlestranded DNA[单链DNA的体外快速产生],Nucleic Acids Research[核酸研究],第47卷,第22期:11956-11962(将其通过援引并入本文)中的方法将实例1中的质粒构建体转化为线性ssDNA。简而言之,将经化学修饰的核苷酸5-甲基胞嘧啶(5mC)与标准腺嘌呤(dATP)、鸟嘌呤(dGTP)和胸腺嘧啶(dTTP)混合,生成用于PCR的dNTP混合物,从而创建经化学修饰的链。使用带有甲醇响应聚合物的正向引物的PCR生成标记的扩增子,所述扩增子能够在变性条件下选择性沉淀经化学修饰的链。线性ssDNA(有义链或反义链)的浓度由Qubit™ssDNA测定试剂盒根据制造商方案(赛默飞世尔公司,Q10212)测定。

[0629] 通过将ssDNA与相应的引物以及带有未修饰核苷酸的PCR混合物一起孵育可以创建互补链。根据制造商方案(宝生物公司,740609)使用NucleoSpin®Gel和PCR Clean-Up纯化dsDNA,并根据制造商方案(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),Q33265)通过Qubit™1X dsDNA Broad Range测定dsDNA浓度。

[0630] 实例4:将质粒DNA转化为有义链和反义链均经化学修饰的TDSC

[0631] 本实例描述了包含线性dsDNA的TDSC的生成,所述线性dsDNA在有义链和反义链中均包含经化学修饰的核苷酸。通过将5-甲基胞嘧啶(5mC)与dATP、dGTP和dTTP混合以创建用于PCR的dNTP混合物,将实例1中的质粒构建体转化为经化学修饰的线性dsDNA。根据制造商方案(宝生物公司,R045Q),dNTP混合物与PrimeSTAR®Max DNA聚合酶一起使用。根据制造商方案(宝生物公司,740609)使用NucleoSpin®Gel和PCR Clean-Up纯化dsDNA,并根据制造商方案(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),Q33265)通过Qubit™1X dsDNA Broad Range测定dsDNA浓度。

[0632] 实例5:将包含经化学修饰的核苷酸的核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC末端

[0633] 本实例描述了包含实例2-4中的线性dsDNA的TDSC的创建,所述线性dsDNA在构建体的两个末端包含经化学修饰的核苷酸。

[0634] 具有以下序列的定制衔接子被设计为包含经化学修饰的核苷酸:5'-C*C*C*GAGGCGGUACGAGCCACACGTACTACGCTCGTACCGCCUC*G*G*GT-3'(SEQ ID NO:85)(*表示硫代磷酸酯键,粗体核苷酸上互补的)。根据制造商方案(新英格兰实验室(New England Biolabs),E7546)用NEBNext® Ultra™II末端修复/dA加尾模块处理来自实例2-4中任一个的线性dsDNA。所述试剂盒用于将非模板化腺嘌呤添加到线性dsDNA中有义链和反义链两者的3'末端。接下来,根据制造商方案(新英格兰实验室,E7595),使用NEBNext® Ultra™II连接模块将定制衔接子连接到加A尾的dsDNA。为了去除每个末端没有衔接子分子的dsDNA构建体,用核酸外切酶VIII处理dsDNA,并根据制造商方案(新英格兰实验室,M0545S)进行截短。为了去除衔接子中不含硫代磷酸酯键的剩余片段,根据制造商方案将dsDNA与USER®酶一起孵育,以去除衔接子中的尿嘧啶核苷酸(新英格兰实验室,M5505)。然后用绿豆核酸酶处理dsDNA,以去除衔接子上的单链DNA突出端,并创建包含在末端处具有硫代磷酸酯修饰的平末端dsDNA的TDSC(新英格兰实验室,M0250)。

[0635] 根据制造商方案(宝生物公司,740609)使用NucleoSpin®Gel和PCR Clean-Up纯化dsDNA,并根据制造商方案(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),Q33265)通过Qubit™1X dsDNA Broad Range测定dsDNA浓度。

[0636] 实例6:将包含环结构的核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC末端

[0637] 本实例描述了包含实例2-4中的线性dsDNA的TDSC的创建,其中在构建体的每个末端具有环结构。

[0638] 具有以下序列的定制衔接子被设计为包含经化学修饰的核苷酸:5'-**CCCGGGCGGAAGAGC**CACACGTACTAC**GCTCTTCCGCCCGGG**T-3'(SEQ ID NO: 93)(粗体核苷酸是互补的)。根据制造商方案(新英格兰实验室(New England Biolabs),E7546)用NEBNext® Ultra™II末端修复/dA加尾模块处理来自实例2-4中任一个的线性dsDNA。所述试剂盒用于将非模板化腺嘌呤添加到线性dsDNA中有义链和反义链两者的3'末端。接下来,根据制造商方案(新英格兰实验室,E7595),使用NEBNext® Ultra™II连接模块将定制衔接子连接到加A尾的dsDNA。为了去除每个末端没有衔接子分子的dsDNA构建体,用核酸外切酶VIII处理dsDNA,并根据制造商方案(新英格兰实验室,

M0545S)进行截短。

[0639] 根据制造商方案(宝生物公司,740609)使用NucleoSpin®Gel和PCR Clean-Up纯化dsDNA,并根据制造商方案(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),Q33265)通过Qubit™1X dsDNA Broad Range测定dsDNA浓度。

[0640] 实例7:将包含Y-衔接子的核酸外切酶抗性DNA末端形式添加至TDSC末端

[0641] 本实例描述了包含实例2-4任一个中的线性dsDNA的TDSC的创建,其中在构建体的每个末端具有Y-衔接子。

[0642] 具有以下序列的定制衔接子被设计为包含经化学修饰的核苷酸:5'-CCCGGGCGGA*C*A*G*C*A*CUC*A*C*G*A*C*TCCGCCCGGGT-3'(SEQ ID NO:89)(*表示硫代磷酸酯键,粗体核苷酸是互补的)。根据制造商方案(新英格兰实验室(New England Biolabs),E7546)用NEBNext®Ultra™II末端修复/dA加尾模块处理来自实例2-4中任一个的线性dsDNA。所述试剂盒用于将非模板化腺嘌呤添加到线性dsDNA中有义链和反义链两者的3'末端。接下来,根据制造商方案(新英格兰实验室,E7595),使用NEBNext® Ultra™II连接模块将定制衔接子连接到加A尾的dsDNA。为了去除每个末端没有衔接子分子的dsDNA构建体,用核酸外切酶VIII处理dsDNA,并根据制造商方案(新英格兰实验室,M0545S)进行截短。为了将环转化为线性ssDNA链,根据制造商方案将dsDNA与USER®酶一起孵育,以去除衔接子中的尿嘧啶核苷酸(新英格兰实验室,M5505)。

[0643] 根据制造商方案(宝生物公司,740609)使用NucleoSpin® Gel和PCR Clean-Up纯化dsDNA,并根据制造商方案(赛默飞世尔公司(Thermo Fisher),Q33265)通过Qubit™1X dsDNA Broad Range测定dsDNA浓度。

[0644] 实例8:用LNP配制TDSC

[0645] 本实例描述了如何用脂质纳米颗粒(LNP)配制如先前实例中所述制备的构建体。

[0646] 根据Chen等人2012.J Am Chem Soc.[美国化学学会杂志]第134卷,第16期:6948-6951的方法,通过微流体装置将核酸构建体与脂质成分组合。简而言之,微流体装置是根据标准光刻程序在聚二甲基硅氧烷(PDMS)中制造的(McDonald&Whitesides.2002.Accounts Chem Res[会计化学研究]第35卷,第7期:491-499)。将脂质组分(通常含有阳离子脂质、胆固醇、辅助脂质、聚乙二醇修饰的脂质和促进靶向部分缀合的脂质(任选))组合并且溶解在90%乙醇中。将核酸构建体溶解在缓冲液中。将核酸溶液、脂质溶液和磷酸盐缓冲盐水(PBS)注入微流体装置中。使用MWCO为3.5kD的膜对新鲜制备的LNP用PBS缓冲液进行透析,以除去乙醇并交换缓冲液。

[0647] 使用动态光散射(DLS)(ZetaPALS,布鲁克海文仪器公司(Brookhaven Instruments),NY,15mW激光,入射光束676nm)对LNP的有效直径、多分散性和ζ电位进行表征;并且根据制造商方案(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific),Q33232),通过裂解颗粒并使用高灵敏度(HS)和宽范围(BR)Quant-iT™1X dsDNA测定试剂盒来确定总核酸浓度。

[0648] 实例9:体外细胞中表达和先天免疫应答的评估

[0649] 本实例描述了如何测试基因表达,以及如何确定TDSC对培养细胞的先天免疫应答的影响。

[0650] 如上文实例2-7中制备实验TDSC构建体。将构建体和对照经由电穿孔以多种浓度施用至选自HEK、角质形成细胞、巨噬细胞、T细胞和上皮细胞的细胞。可以并行运行未经处理的对照样品。电穿孔后,将细胞移至最终的培养容器中。将用LNP配制的构建体直接施用于孔板中的细胞。

[0651] 为了确定编码荧光报告基因mCherry的构建体的表达,在流式细胞术分析之前首先用PBS洗涤细胞。所有流式细胞术均在美天旎公司(Miltenyi)的MACSQuant VYB上进行。为了检测mCherry信号,使用黄色激光(波长561nm)进行激发,并使用615/620nm发射过滤器。每个样品记录了20,000个事件,并使用Flowjo V.9.0软件分析数据。首先在FSC-A和SSC-A图上对细胞进行门控以去除细胞碎片。将群体进一步绘制在FSC-A和FSC-H图上以限制单细胞群体。最后,使用荧光信号表达细胞和非表达细胞之间的双变量图来确定表达细胞的百分比。使用表达细胞的分布来确定每个细胞内的表达水平。在多个时间点进行表达分析。

[0652] 如Jakobsen等人2013.Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]第110卷,第48期:E4571-80中所述对细胞进行qPCR以确定测试细胞中IFN-b的RNA水平。简而言之,qPCR中使用的探针引物组是人IFN-b(赛默飞世尔公司,Hs01077958_s1)和b-肌动蛋白(赛默飞世尔公司,Hs00357333_g1)。使用预制Taqman测定和RNA-to-Ct一步法试剂盒(应用生物系统公司(Applied Biosystems))进行分析。qPCR在MX3005系统(斯塔基公司(Stratagene))上进行。RNA表达针对b-肌动蛋白和相关未处理对照进行归一化。数据表示为生物重复的平均值±SEM。

[0653] 根据制造商方案对细胞上清液进行ELISA以确定IFN-b的分泌水平。

[0654] 实例10.确定包含封闭末端的TDSC的核酸外切酶抗性

[0655] 所述实例描述了如何测试包含封闭末端(例如,衔接子连接的线性dsDNA构建体)的TDSC是否具有核酸外切酶III(M0206,新英格兰生物实验室公司(New England Biolabs Inc.))抗性。TDSC在非核酸酶对照旁边进行测试。非核酸酶对照含有与目的TDSC具有相同序列的DNA,除了它经历了用于将核酸外切酶抗性DNA末端形式添加到TDSC的衔接子连接方案,但没有向混合物中添加衔接子寡核苷酸。50μL中添加1μL核酸外切酶III(起始浓度为100单位/uL)/5μg DNA。将管充分混合并离心。将管在热循环仪上于37℃运行1小时,并于70℃热灭活30分钟。

[0656] 根据制造商的方案,使用真空歧管,通过Nucleospin®凝胶和PCR净化试剂盒(目录号740609,马歇雷-纳格尔公司(Macherey-Nagel))纯化样品。简而言之,将洗脱缓冲液加热至70℃。将2x体积的NTI结合缓冲液添加到1x体积的Exo III处理的DNA中。将样品混合直至均匀分布并在室温下放置5分钟。固定真空歧管上的柱,打开阀门并打开真空。将375μL DNA-NTI混合物添加到2x柱中,并使其完全通过每个柱。添加700μL NTC洗涤缓冲液两次。将柱从真空歧管取出并放入收集管中。将组件以11,000xg离心1分钟。将柱放入新的低结合微量离心管中,添加25μL预热缓冲液,并将组件在70℃下孵育5min。将组件以11,000xg离心1min。第二次重复孵育和洗脱步骤。根据制造商方案,通过Qubit 4荧光计(Q33226,赛默飞世尔科技公司)上的dsDNA BR Qubit(Q32850,赛默飞世尔科技公司(Thermo Fisher Scientific))对收集的DNA进行定量。

[0657] 将样品以每孔16ng DNA的量装入各个孔中的E-Gel EX、1%琼脂糖凝胶(G402021,

赛默飞世尔科技公司)中。将阶梯物(ladder)(10488090,赛默飞世尔科技公司)以2μl加载到凝胶的最左侧泳道中。根据制造商方案(G8100、G8200,赛默飞世尔科技公司)使凝胶运行通过E-Gel Power Snap电泳系统。凝胶运行后,可以看到核酸外切酶抗性TDSC,其分子量对应于全长DNA加封闭衔接子序列。如果所述泳道中凝胶中出现的至少95%的产物对应于全长TDSC,则在此测定中TDSC将被视为具有核酸外切酶抗性。

[0658] 实例11.确定包含开放末端(例如,两个开放末端)的TDSC的核酸外切酶抗性

[0659] 本实例描述了如何测试包含开放末端(例如,衔接子连接的线性dsDNA构建体)的TDSC是否具有核酸外切酶III(M0206,新英格兰生物实验室公司)抗性。TDSC在非核酸酶对照旁边进行测试。非核酸酶对照含有与目的TDSC具有相同序列的DNA,除了它经历了用于将核酸外切酶抗性DNA末端形式添加到TDSC的衔接子连接方案,但没有向混合物中添加衔接子寡核苷酸。在20ul反应中,每200ng DNA(10ng/ul)添加2单位核酸外切酶III。将管充分混合并离心。将管在热循环仪上于37℃运行30min。

[0660] 将样品以每孔20ng DNA的量装入各个孔中的E-Gel EX、1%琼脂糖凝胶(G402021,赛默飞世尔科技公司)中。将梯(ladder)(10488090,赛默飞世尔科技公司)以2μl加载到凝胶的最左侧泳道中。根据制造商方案(G8100、G8200,赛默飞世尔科技公司),凝胶通过E-Gel Power Snap电泳系统运行。凝胶运行后,可以看到核酸外切酶抗性TDSC,其分子量对应于全长DNA加封闭衔接子序列。如果所述泳道凝胶中出现的至少95%的产物对应于全长TDSC,则在此测定中TDSC将被视为具有核酸外切酶抗性。

[0661] 本实例中的核酸外切酶III消化方案对四个样品进行:对照(未修饰)TDSC,指定为“Ct”;指定为“6a”的TDSC,其在每条链的5'和3'末端各包含6个硫代磷酸酯键(图7B中所示);指定为“3a”的TDSC,其在每条链的5'和3'末端各包含3个硫代磷酸酯键(图7C中所示);以及指定为“Ya”的TDSC,其在每个末端包含相同的Y-衔接子,每个Y-衔接子在每条链的末端包含6个硫代磷酸酯键(图7D中所示)。如图7A所示,对照DNA“Ct”被消化,而三个硫代磷酸酯修饰的TDSC对核酸外切酶III消化具有抗性。

[0662] 实例12:制造包含开放末端的TDSC

[0663] 本实例描述了如何使用USER(M5505,新英格兰生物实验室)和绿豆核酸酶(M0250,新英格兰生物实验室)处理步骤产生包含开放末端(例如,包含硫代磷酸酯键)的TDSC。所述过程从包含封闭末端的原TDSC开始。原TDSC在非核酸酶对照旁边进行处理。非核酸酶对照含有与TDSC具有相同序列的DNA,除了它经历了用于将核酸外切酶抗性DNA末端形式添加到TDSC的衔接子连接方案,但没有向混合物中添加衔接子寡核苷酸。

[0664] 这些原TDSC样品首先按照实例10中所述的步骤进行处理,以确认核酸外切酶III抗性。将3μL USER酶添加到100μL中的来自实例10的纯化样品的5μg DNA中。通过去除位于环中的尿嘧啶,USER处理打开封闭末端以形成Y-衔接子样结构。样品在37℃下孵育1小时。将1μL绿豆核酸酶(10U/μL)添加到每个管中。将样品在30℃下孵育30min。绿豆核酸酶降解单链DNA,产生平末端TDSC。

[0665] 根据制造商的方案,使用真空歧管,通过Nucleospin®凝胶和PCR净化试剂盒(740609,马歇雷-纳格尔公司(Macherey-Nagel))纯化样品。简而言之,将洗脱缓冲液加热至70℃。将2x体积的NTI结合缓冲液添加到1x体积的USER/MBN处理的DNA中。将样品混合直至均匀分布并在室温下放置5分钟。固定真空歧管上的柱,打开阀门并打开真空。将DNA-NTI

混合物添加到柱中并使其完全通过每个柱。添加700μL NTC洗涤缓冲液两次。将柱从真空歧管取出并放入收集管中。将组件以11,000xg离心1分钟。将柱放入新的低结合管中,添加25μL预热缓冲液,并将组件在70℃下孵育5min。将组件以11,000xg离心1min。第二次重复孵育和洗脱步骤。根据制造商方案,通过Qubit 4荧光计(Q33226,赛默飞世尔科技公司)上的dsDNA BR Qubit(Q32850,赛默飞世尔科技公司)对收集的DNA进行定量。

[0666] 为了确认TDSC的产生,将样品以每孔16ng DNA的量装入各个孔中的E-GelEX、1%琼脂糖凝胶(G402021,赛默飞世尔科技公司)中。将梯(10488090,赛默飞世尔科技公司)以2μl加载到凝胶的最左侧泳道中。根据制造商方案(G8100、G8200,赛默飞世尔科技公司)使凝胶运行通过E-Gel Power Snap电泳系统。凝胶运行后,可以看到TDSC,其分子量对应于全长DNA加衔接子序列。

[0667] 实例13:制造包含Y-衔接子的TDSC

[0668] 本实例描述了如何使用USER(M5505,新英格兰实验室)创建开放末端形式来产生包含Y-衔接子末端修饰的线性dsDNA构建体的TDSC。所述过程从包含封闭末端的原TDSC开始。原TDSC在非核酸酶对照旁边进行测试。非核酸酶对照含有与TDSC具有相同序列的DNA,除了它经历了用于将核酸外切酶抗性DNA末端形式添加到TDSC的衔接子连接方案,但没有向混合物中添加衔接子寡核苷酸。

[0669] 这些原TDSC样品首先按照实例10中所述的步骤进行处理,以确认核酸外切酶III抗性。将3μL USER酶添加到100μL中的来自实例10的纯化样品的5μg DNA中。样品在37℃下孵育1小时。通过去除位于环中的尿嘧啶,USER处理打开封闭末端以形成Y-衔接子,产生包含Y-衔接子末端形式的TDSC。

[0670] 根据制造商的方案,使用真空歧管,通过Nucleospin®凝胶和PCR净化试剂盒(740609,马歇雷-纳格尔公司(Macherey-Nagel))纯化样品。简而言之,将洗脱缓冲液加热至70℃。将2x体积的NTI结合缓冲液添加到1x体积的USER/MBN处理的DNA中。将样品混合直至均匀分布并在室温下放置5分钟。固定真空歧管上的柱,打开阀门并打开真空。将DNA-NTI混合物添加到柱中并使其完全通过每个柱。添加700μL NTC洗涤缓冲液两次。将柱从真空歧管取出并放入收集管中。将组件以11,000xg离心1分钟。将柱放入新的低结合管中,添加25μL预热缓冲液,并将组件在70℃下孵育5min。将组件以11,000xg离心1min。第二次重复孵育和洗脱步骤。根据制造商方案,通过Qubit 4荧光计(Q33226,赛默飞世尔科技公司)上的dsDNA BR Qubit(Q32850,赛默飞世尔科技公司)对收集的DNA进行定量。

[0671] 为了证明最终的末端形式已创建,在50μL反应中,用1μL核酸外切酶III/5μgDNA处理一小等分试样的USER处理过的DNA。如果最终的末端形式已成功创建,核酸外切酶III将降解所述等分试样的TDSC。

[0672] 将样品以每孔16ng DNA的量装入各个孔中的E-Gel EX、1%琼脂糖凝胶(G402021,赛默飞世尔科技公司)中。将梯(10488090,赛默飞世尔科技公司)以2μl加载到凝胶的最左侧泳道中。根据制造商方案(G8100、G8200,赛默飞世尔科技公司)使凝胶运行通过E-Gel Power Snap电泳系统。凝胶运行后,带Y-衔接子的TDSC的分子量对应于全长DNA加衔接子序列,而核酸外切酶III处理的带Y-衔接子的DNA形式在凝胶上不可见。

[0673] 实例14:用于生产双链DNA(dsDNA)分子的质粒模板的设计和组装

[0674] 本实例描述了dsDNA分子(例如TDSC)的质粒模板的产生。在本实例中,使用以下特

定序列组分设计了构建体模板。

[0675] • 启动子Ef1a：

[0676] 5’ggctccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcccacagtccccgagaagttgggggggaggg gtcggcaatt gaaccggtgcctagagaaggtggcgcggggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgc ctttttcccgagggtgggggagaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttctttttcgcaacgggtttg ccgccagaacacaggtaagtgccgtgtgtggttcccgcgggcctggcctctttacgggttatggcccttgcgtgcc ttgaattacttccacctggctgcagtacgtgattcttgatcccgagcttcgggttggaagtgggtgggagagttcg aggccttgcgcttaaggagcccttcgcctcgtgcttgagttgaggcctggcctgggcgctggggccgccgcgtgc gaatctggtggcaccttcgcgcctgtctcgctgctttcgataagtctctagccatttaaaatttttgatgacctgc tgcgacgctttttttctggcaagatagtcttgtaaatgcgggccaagatctgcacactggtatttcggttttttggg gccgcgggcggcgacggggcccgtgcgtcccagcgcacatgttcggcgaggcggggcctgcgagcgcggccaccga gaatcggacgggggtagtctcaagctggccggcctgctctggtgcctggcctcgcgccgccgtgtatcgccccgcc ctgggcggcaaggctggcccggtcggcaccagttgcgtgagcggaaagatggccgcttcccggccctgctgcaggg agctcaaaatggaggacgcggcgctcgggagagcgggcgggtgagtcacccacacaaaggaaaagggcctttccgt cctcagccgtcgcttcatgtgactccacggagtaccgggcgccgtccaggcacctcgattagttctcgagcttttg gagtacgtcgtctttaggttgggggaggggttttatgcgatggagtttccccacactgagtgggtggagactgaa gttaggccagcttggcacttgatgtaattctccttggaatttgccctttttgagtttggatcttggttcattctca agcctcagacagtggttcaaagtttttttcttccatttcaggtgtcgtga-3’(SEQ ID NO:37)

[0677] • 编码模型/标志物蛋白的效应子序列(mCherry)：

[0678] 5’atggtgagcaagggcgaggaggataacatggccatcatcaaggagttcatgcgcttcaaggtgcac atggagggctcc gtgaacggccacgagttcgagatcgagggcgagggcgagggccgcccctacgagggcacccag accgccaagctgaaggtgaccaagggtggcccctgcccttcgcctgggacatcctgtcccctcagttcatgtacg gctccaaggcctacgtgaagcaccccgccgacatccccgactacttgaagctgtccttccccgagggcttcaagtg ggagcgcgtgatgaacttcgaggacggcggcgtggtgaccgtgacccaggactcctccctgcaggacggcgagttc atctacaaggtgaagctgcgcggcaccaacttcccctccgacggccccgtaatgcagaagaagaccatgggctggg aggcctcctccgagcggatgtaccccgaggacggcgccctgaagggcgagatcaagcagaggctgaagctgaagga cggcggccactacgacgctgaggtcaagaccacctacaaggccaagaagcccgtgcagctgcccggcgcctacaac gtcaacatcaagttggacatcacctcccacaacgaggactacaccatcgtggaacagtacgaacgcgccgagggcc gccactccaccggcggcatggacgagctgtacaagtaa-3’(SEQ ID NO:38)

[0679] 任选的：

[0680] • NTS:SV40增强剂:5’-cccaagaagaagaggaaagtc-3’(SEQ ID NO:1)

[0681] • 维持序列:人干扰素-βMAR

[0682] 5’tataattcactggaatttttttgtgtgtatggtatgacatatgggttccctttattttttacata taaatatatttccctgtttttctaaa aaagaaaaagatcatcatttcccattgtaaaatgccatatttttttca taggtcacttacata3’(SEQ ID NO:39)

[0683] • 第二链基序:AAV2野生型ITR

[0684] 5’aggaacccctagtgatggagttggccactccctctctgcgcgctcgctcgctcactgaggccgggc gaccaaaggtcg cccgacgcccgggctttgcccgggcggcctcagtgagcgagcgagcgcgcagctgcctgcagg-3’(SEQ ID NO:26)

[0685] 使用标准DNA设计操作软件用这些元件设计质粒模板。设计完成后,从商业供应商(金斯瑞公司)订购质粒,用作PCR扩增的模板。

[0686] 实例15:产生具有化学修饰的TDSC

[0687] 本实例展示了双链DNA(dsDNA)分子(例如TDSC)的制备,其含有具有化学修饰的胞嘧啶,所述化学修饰是例如5-甲酰基-2'-脱氧胞嘧啶(5-甲酰基胞嘧啶)。

[0688] 质粒DNA(10ng/50ul PCR反应)用作PCR扩增的模板,使用KOD聚合酶(710864,西格玛奥德里奇公司)或KOD Xtreme(KODX)聚合酶(719753,西格玛奥德里奇公司)。也可以使用其他市售聚合酶。所使用的产品版本被分成其组成成分,而不是以母混合物形式购买的,以确保经修饰核苷酸与标准dNTP的精确比例。每种酶的PCR反应条件包括:

[0689] a.对于KOD酶,终浓度为2mM的$MgSO_4$。

[0690] b.100mM dNTP溶液组(N0446,新英格兰生物实验室),终浓度为200μM。

[0691] c.将经修饰的脱氧核苷三磷酸(例如5-甲酰基-dCTP、N-2064,三联生物技术公司(Trilink Biotechnologies))与其同源dNTP以不同比例添加,总计为200μM(即200μM dATP、200μM dCTP、200μM dTTP和200μM dGTP)。因此,设计为25%掺入的反应将是50μM经修饰的核苷酸和150μM未修饰的核苷酸。

[0692] d.正向和反向引物的终浓度为300μM。

[0693] 对于共价封闭TDSC的合成,引物包含用于提高连接效率的磷酸基团或TelN识别序列。

[0694] 对于环状双链DNA形式的合成,除了包含与质粒互补的序列外,引物还包含在下游过程中有用的其他序列:

[0695] a.一种或多种切口酶的识别序列;

[0696] b.限制性酶识别序列(例如BsaI、KpnI或NheI),用于在限制性酶消化后在DNA中产生粘性末端并促进DNA环化;以及

[0697] c.另外的碱基(例如,5'-CCGTGGTCCTTC-3')(SEQ ID NO:40)以提高限制性酶消化效率。

[0698] 对于所有形式,PCR产物均使用标准DNA纯化柱进行纯化。

[0699] 图8描绘了具有包含硫代磷酸酯修饰的末端形式的共价封闭TDSC的产生。对于具有包含硫代磷酸酯修饰的末端形式(硫代磷酸酯末端形式)的TDSC,每个反应将多达10μg的50μL PCR DNA添加到NEBNext Ultra II末端修复/dA-加尾缓冲液(8μL)和酶(3μL)混合物(E7546L)中,并首先在20℃下30min,然后在65℃下30min。在冰上短暂冷却后,添加NEBNext Ultra II连接模块组分,其包括连接混合物(30μL)、连接增强剂(1μL)和3μL含有待连接的DNA衔接子的100μM溶液。所述反应孵育>1小时,但通常过夜。然后通过Nucleospin Midi柱纯化连接的PCR-衔接子溶液,通过Nanodrop定量,并使用ExoIII(NEB M0206)在37℃下净化任何未连接的PCR一小时。

[0700] 图9描绘了具有TelN末端形式的共价封闭TDSC的产生。对于具有TelN末端形式的TDSC,将1μg PCR DNA在含有4μL 10x ThermoPol缓冲液、2μL TelN原核端粒酶(M0651,新英格兰生物实验室)的40μL反应中在30℃下孵育1小时。然后通过Zymo DCC-100柱纯化TelN修饰的DNA,通过Nanodrop定量,并使用ExoIII(NEB M0206)在37℃下净化任何未修饰的PCR一小时。

[0701] 图10描绘了环状dsDNA分子的产生。为了合成环状dsDNA分子,在过夜反应中使用与限制性酶识别序列相对应的限制性酶,例如KpnI-HF-V2(R3142,新英格兰生物实验室)消化DNA。然后使用DNA纯化柱纯化DNA。使用T3 DNA连接酶(M0317,新英格兰生物实验室)在26℃下将消化的DNA环化一小时。通过将DNA与T5核酸外切酶(M0663L,新英格兰生物实验室)在37℃下孵育一小时来降解非环化DNA。T5核酸外切酶用于消化线性dsDNA,但不消化环状dsDNA。使用DNA纯化柱纯化DNA。也可以使用其他类似的方法,例如琼脂糖凝胶纯化。

[0702] 使用CRISPR Discovery试剂盒(DNF-930-K1000CP)在安捷伦(Agilent)5300片段分析仪上对所得双链DNA形式的组成和纯度进行分析。dsDNA进样缓冲液和带有嵌入染料的电泳凝胶每天新鲜制备,而带有矿物油覆盖层和毛细管调节溶液的标记托盘每月新鲜制备。缓冲液是按照制造商的规格制备的。将环状双链DNA样品用水稀释至终浓度100pg/uL。对于每个样品孔,将2uL DNA样品添加到22uL稀释缓冲液(0.1X TE)中,每个样品运行2-4个重复,其中一个孔用于MDK DNA梯。使用CRISPR Discovery方法(CRP-910-33)的默认设置通过仪器控制器软件运行样品。

[0703] 使用ProSize数据分析软件v4.0.2.7分析样品迹线。dsDNA的峰分析条件设置为“峰宽(秒)”为5,“最小峰高(RFU)”为50,“额外谷点数”为3,以及“谷间基线”打开。手动基线设置为距下标记-2min,距上标记+2min。在这些条件下,软件会自动检测峰,并由软件选择峰宽度,但由于宽峰、峰肩或窄尺寸范围内的多个峰而需要手动调整的情况除外。

[0704] 图11-13显示了具有5’胞嘧啶修饰的dsDNA形式的片段分析器迹线。图11显示了在使用25%5-甲酰基胞嘧啶的反应中产生并如上所述纯化的环状dsDNA构建体。图12-13显示了具有硫代磷酸酯末端形式(图12)和TelN末端形式(图13)的线性共价封闭dsDNA构建体,其在使用25%5-甲酰基胞嘧啶的反应中产生并如上所述进行纯化。在每条迹线中,单个峰(用箭头指示)清晰可见。这些结果表明可以产生和纯化多种TDSC形式,包括那些包含经化学修饰的核苷酸(例如,5-甲酰基胞嘧啶)的形式。

[0705] 实例16:体外TDSC基因表达的评估

[0706] 本实例展示了使用经化学修饰的TDSC在培养细胞中检测和定量基因表达。

[0707] 实验构建体和对照经由脂质转染(脂质体转染)施用。根据制造商的说明,使用Lipofectamine3000转染试剂(#L3000001,赛默飞世尔公司)在HEKa细胞中进行DNA脂转染。所有DNA构建体和对照均使用1:2:3比例的DNA:P3000:Lipofectamine3000。转染前一天,将10,000个细胞预先接种到96孔板的每个孔中。当细胞达到大约80%至90%汇合时进行转染。对于96孔板的每个孔,首先将3XLipofectamine3000在5uL Opti-MEM™I低血清培养基(#31985070,赛默飞世尔公司)中稀释。使用2X P3000试剂在5uL Opti-MEM™I低血清培养基中稀释DNA。然后将DNA添加到含有Opti-MEM™I低血清培养基的Lipofectamine3000中,并通过移液器轻轻混合。室温孵育15分钟后,将DNA-Lipofectamine3000复合物滴加到含有完全培养基的靶细胞的孔的不同区域。轻轻地前后左右摇动板,使DNA-Lipofectamine3000复合物均匀分布。转染后,将细胞在CO2组织培养箱中孵育,转染后6至8小时更换培养基。

[0708] 为了确定编码荧光报告子mCherry的构建体的表达,在流式细胞术分析之前首先用PBS洗涤细胞。所有流式细胞术均在美天旎公司(Miltenyi)的MACSQuant VYB上进行。为了检测mCherry信号,使用黄色激光(波长561nm)进行激发,并使用615/620nm发射滤光片。每个样品记录了20,000个事件,并使用Flowjo V.9.0软件分析数据。首先在FSC-A和SSC-A

图上对细胞进行门控以去除细胞碎片。将群体进一步绘制在FSC-A和FSC-H图上以限制单细胞群体。最后,使用荧光信号表达细胞和非表达细胞之间的双变量图来确定表达细胞的百分比。使用表达细胞的分布来确定每个细胞内的表达水平。在多个时间点进行表达分析。

[0709] 图14A-14B显示了在有或没有化学修饰的情况下产生的多个TDSC构建体能够表达报告基因。在HEKa细胞中,具有三种不同结构的dsDNA(环状双链、具有硫代磷酸酯末端形式的共价封闭TDSC和具有TelN末端形式的共价封闭TDSC)产生了报告蛋白mCherry的可检测表达。如实例15中所述,其中脱氧胞嘧啶至少部分地被5-甲酰基胞嘧啶取代的DNA分子也保留了功能,如表达mCherry的细胞的类似比例所定义的。这些结果表明,即使经过化学修饰,具有不同末端形式的TDSC也可以转录并产生蛋白产物。

[0710] 实例17:TDSC对体外细胞中先天免疫应答的影响的评估。

[0711] 本实例描述了经化学修饰的dsDNA构建体(例如TDSC)对培养的细胞先天免疫应答的影响。

[0712] 如上文实例15中那样制备实验构建体,然后如上文实例16中那样施用于细胞。对细胞进行qPCR以确定一组促炎细胞因子的RNA水平,包括人IFNL1、CXCL8、TNF、IL17B、IL6、IFNB1、CCL2、IL23、IL17E、CXCL10、CXCL1、CCL5、IL1B、IL5、IL33、IL1A、CXCL2、IL17C和IL18。人GAPDH用作分析的内源对照。引物序列可以见附表4。简而言之,根据制造商的说明,使用PicoPure RNA分离试剂盒(赛默飞世尔公司#KIT0204)从细胞中提取mRNA。根据制造商的说明,使用RNA至cDNA EcoDry™Premix(寡dT)(宝生物公司(Takara)#639542)试剂盒合成cDNA。使用QuantStudio7 Flex实时PCR系统和生命技术公司(Life Technologies Corporation)的SYBR Select Master Mix进行分析。RNA表达针对GAPDH进行归一化,并表示为相对于方法对照(不含DNA的脂转染试剂)的倍数变化。

[0713] 表4.用于免疫标志物的qPCR定量的引物序列。

[0714]

基因名称	5'-序列-3'	SEQ ID NO:
h-GAPDH-F	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	41
h-GAPDH-R	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA	42
h-IL6-F	AGACAGCCACTCACCTCTTCAG	43

[0715]

h-IL6-R	TTCTGCCAGTGCCTCTTTGCTG	44
h-CXCL10-F	GGTGAGAAGAGATGTCTGAATCC	45
h-CXCL10-R	GTCCATCCTTGGAAGCACTGCA	46
h-IL33-F	GCCTGTCAACAGCAGTCTACTG	47
h-IL33-R	TGTGCTTAGAGAAGCAAGATACTC	48
h-IFNL1-F	AACTGGGAAGGGCTGCCACATT	49
h-IFNL1-R	GGAAGACAGGAGAGCTGCAACT	50
h-IFNB1-F	CTTGGATTCCTACAAAGAAGCAGC	51
h-IFNB1-R	TCCTCCTTCTGGAACTGCTGCA	52
h-CXCL1-F	AGCTTGCCTCAATCCTGCATCC	53
h-CXCL1-R	TCCTTCAGGAACAGCCACCAGT	54
h-IL1A-F	TGTATGTGACTGCCCAAGATGAAG	123
h-IL1A-R	AGAGGAGGTTGGTCTCACTACC	124
h-CXCL8-F	GAGAGTGATTGAGAGTGGACCAC	125
h-CXCL8-R	CACAACCCTCTGCACCCAGTTT	126
h-CCL2-F	AGAATCACCAGCAGCAAGTGTCC	127
h-CCL2-R	TCCTGAACCCACTTCTGCTTGG	128
h-CCL5-F	CCTGCTGCTTTGCCTACATTGC	129
h-CCL5-R	ACACACTTGGCGGTTCTTTCGG	130
h-CXCL2-F	GGCAGAAAGCTTGTCTCAACCC	131
h-CXCL2-R	CTCCTTCAGGAACAGCCACCAA	132
h-TNF-F	CTCTTCTGCCTGCTGCACTTTG	133
h-TNF-R	ATGGGCTACAGGCTTGTCACTC	134
h-IL23A-F	GAGCCTTCTCTGCTCCCTGATA	135
h-IL23A-R	GACTGAGGCTTGGAATCTGCTG	136
h-IL1B-F	CCACAGACCTTCCAGGAGAATG	137
h-IL1B-R	GTGCAGTTCAGTGATCGTACAGG	138
h-IL17C-F	GCCCTCAGCTACGACCCAGTG	139
h-IL17C-R	AGCTTCTGTGGATAGCGGTCCT	140
h-IL17B-F	GCTGTGGATGTCCAACAAGAGG	141
h-IL17B-R	TCCTGCATGGTGAAGGGGTTCA	142

[0716]

h-IL17E-F	AACCGCCACCCAGAGTCCTGT	143
h-IL17E-R	ACAGGCAACGGGCGTGGTACA	144
h-IL5-F	GGAATAGGCACACTGGAGAGTC	145
h-IL5-R	CTCTCCGTCTTTCTTCTCCACAC	146
h-IL18-F	GATAGCCAGCCTAGAGGTATGG	147
h-IL18-R	CCTTGATGTTATCAGGAGGATTCA	148

[0717] 图15A-15C和16A-16C显示了HEKa(图15A-15C)和THP1细胞(图16A-16C)对使用或不使用5-甲酰胞嘧啶产生的TDSC的先天免疫应答。在HEKa和THP1细胞中,具有三种不同结构的dsDNA(环状双链、具有硫代磷酸酯末端形式的线性TDSC和具有TelN末端形式的线性TDSC)产生了可测量的先天免疫应答,如细胞因子IFNB、CXCL10和IL6的可检测表达所定义。对于共价封闭TDSC,用5-甲酰基胞嘧啶部分地取代胞嘧啶会降低HEKa和THP1细胞中的免疫应答,如IFNB、CXCL10和IL6表达减少所定义。这些结果表明,TDSC的末端结构和化学修饰(例如5-甲酰胞嘧啶)的存在可以影响对双链DNA的先天免疫应答,同时保留编码功能性蛋白产物的能力。

[0718] 图17显示了HEKa细胞对具有硫代磷酸酯末端衔接子并在胞嘧啶的碳5(C-5)位置处包含各种修饰的共价封闭TDSC的先天免疫应答。对于每个经不同化学修饰的dsDNA分子,先天免疫应答被可视化为散点图,其中X轴代表干扰素信号传导的减少,定义为标志物IFNB和CXCL10相对于包含未修饰胞嘧啶的TDSC的平均倍数变化减少,并且其中Y轴代表炎性细胞因子信号传导的减少,定义为标志物IL6和TNFa相对于包含未修饰胞嘧啶的TDSC的平均倍数变化减少。这些结果表明,在TDSC的胞嘧啶的C-5位置掺入特定化学修饰可以减少免疫活性细胞系中对dsDNA的先天免疫应答。

[0719] 本文引用的所有出版物、专利和专利申请均通过援引以其全文并入本文,其程度如同特别且单独地指出将每个单独的出版物、专利或专利申请通过援引并入一样。如果本文中的术语与并入的参考文献中的术语发生冲突,则以本文中的术语为准。

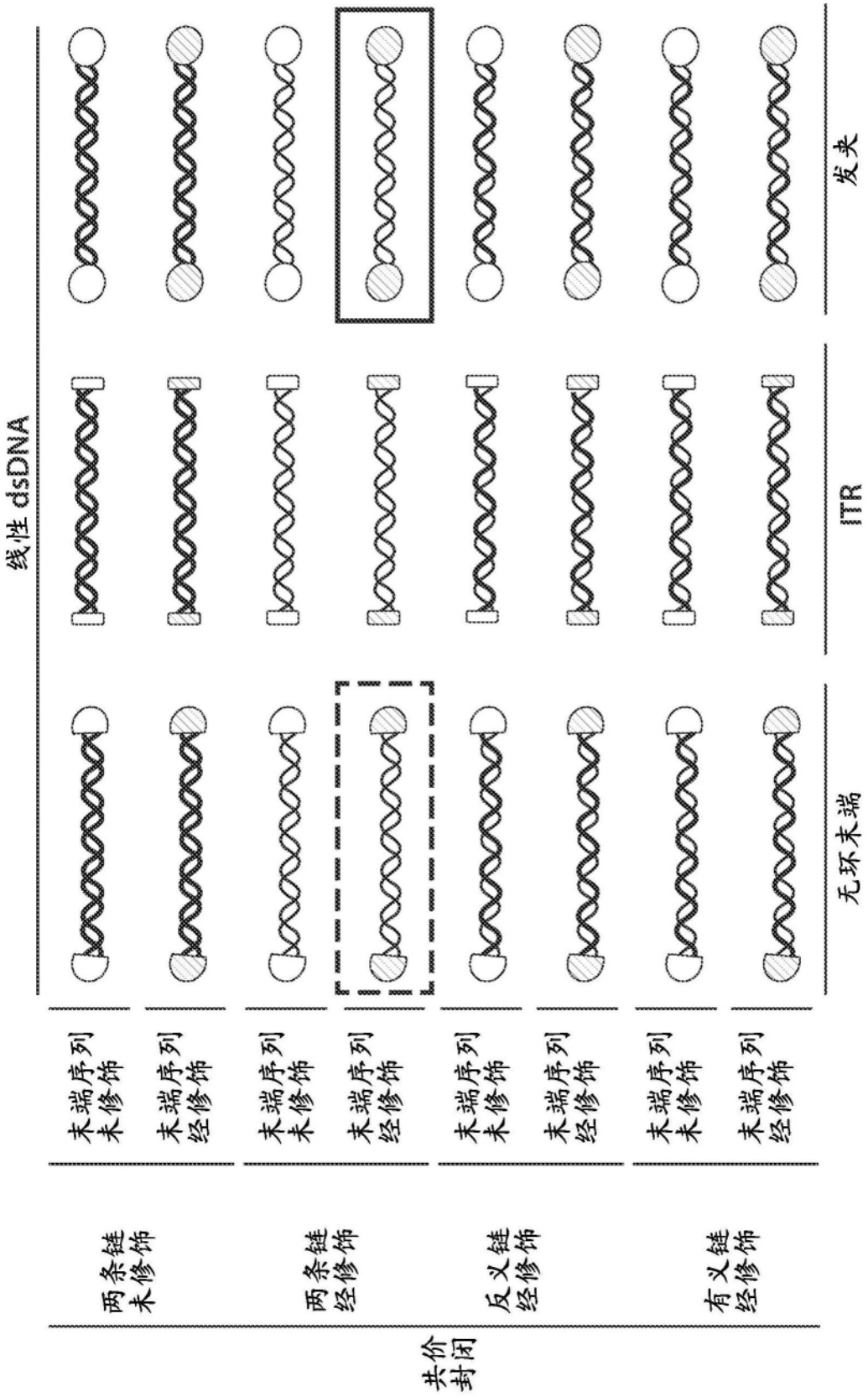

线性 dsDNA
两条链未修饰
两条链经修饰
反义链经修饰
有义链经修饰
共价封闭
末端序列未修饰
末端序列经修饰
末端序列未修饰
末端序列经修饰
末端序列未修饰
末端序列经修饰
末端序列未修饰
末端序列经修饰
无环末端
ITR
发夹

图1A

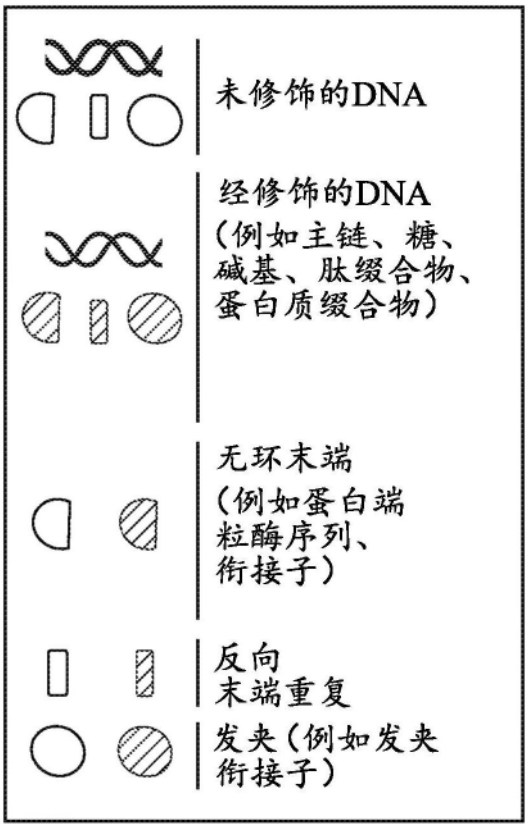

未修饰的DNA
经修饰的DNA
(例如主链、糖、
碱基、肽缀合物、
蛋白质缀合物)
无环末端
(例如蛋白端
粒酶序列、
衔接子)
反向
末端重复
发夹(例如发夹
衔接子)

图1B

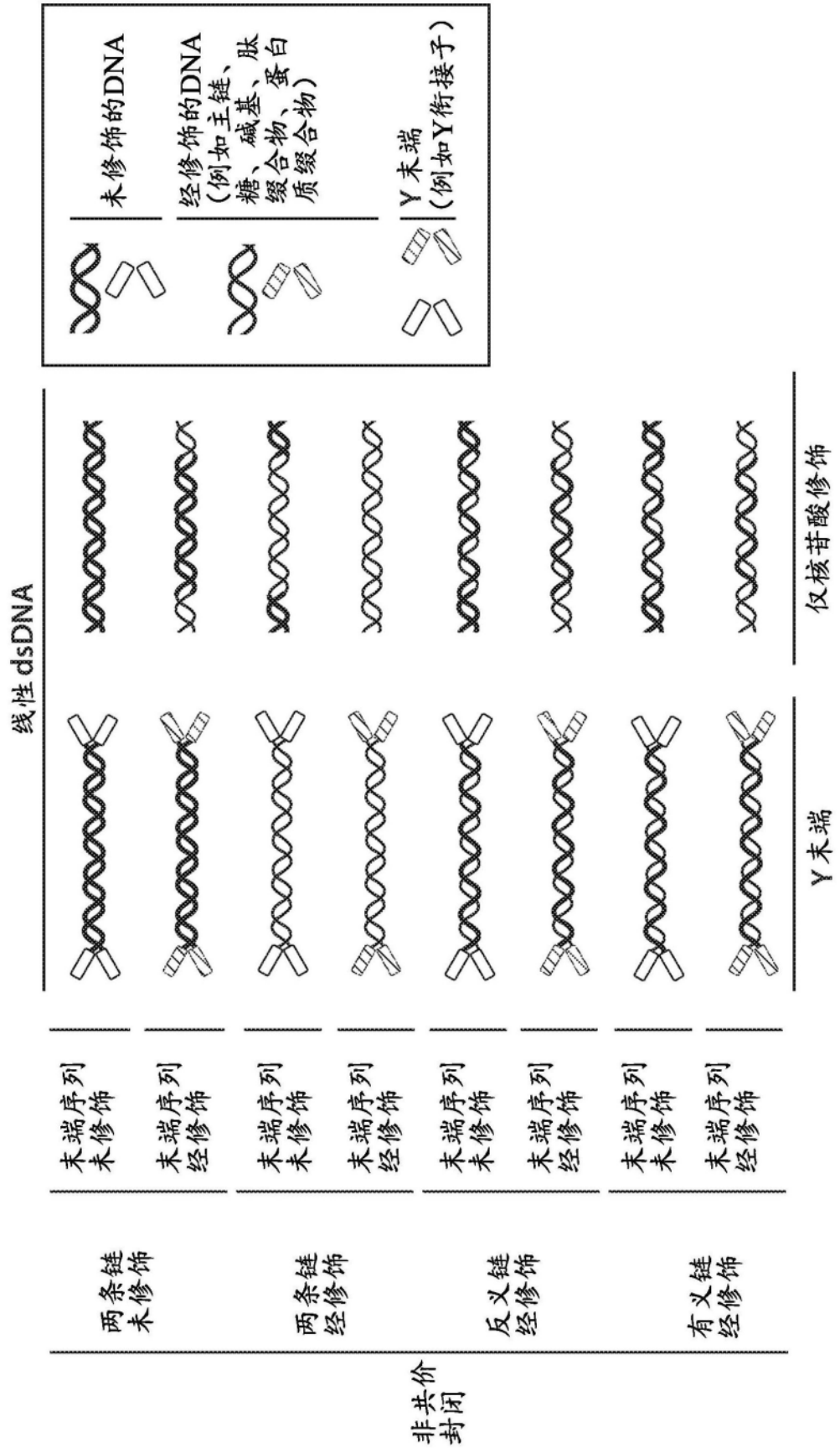

线性 dsDNA
非共价封闭
两条链未修饰
两条链经修饰
反义链经修饰
有义链经修饰
末端序列未修饰
末端序列经修饰
末端序列未修饰
末端序列经修饰
末端序列未修饰
末端序列经修饰
末端序列未修饰
末端序列经修饰
Y 末端
仅核苷酸修饰
未修饰的DNA
经修饰的DNA（例如主链、糖、碱基、肽缀合物、蛋白质缀合物）
Y 末端（例如Y衔接子）

图2

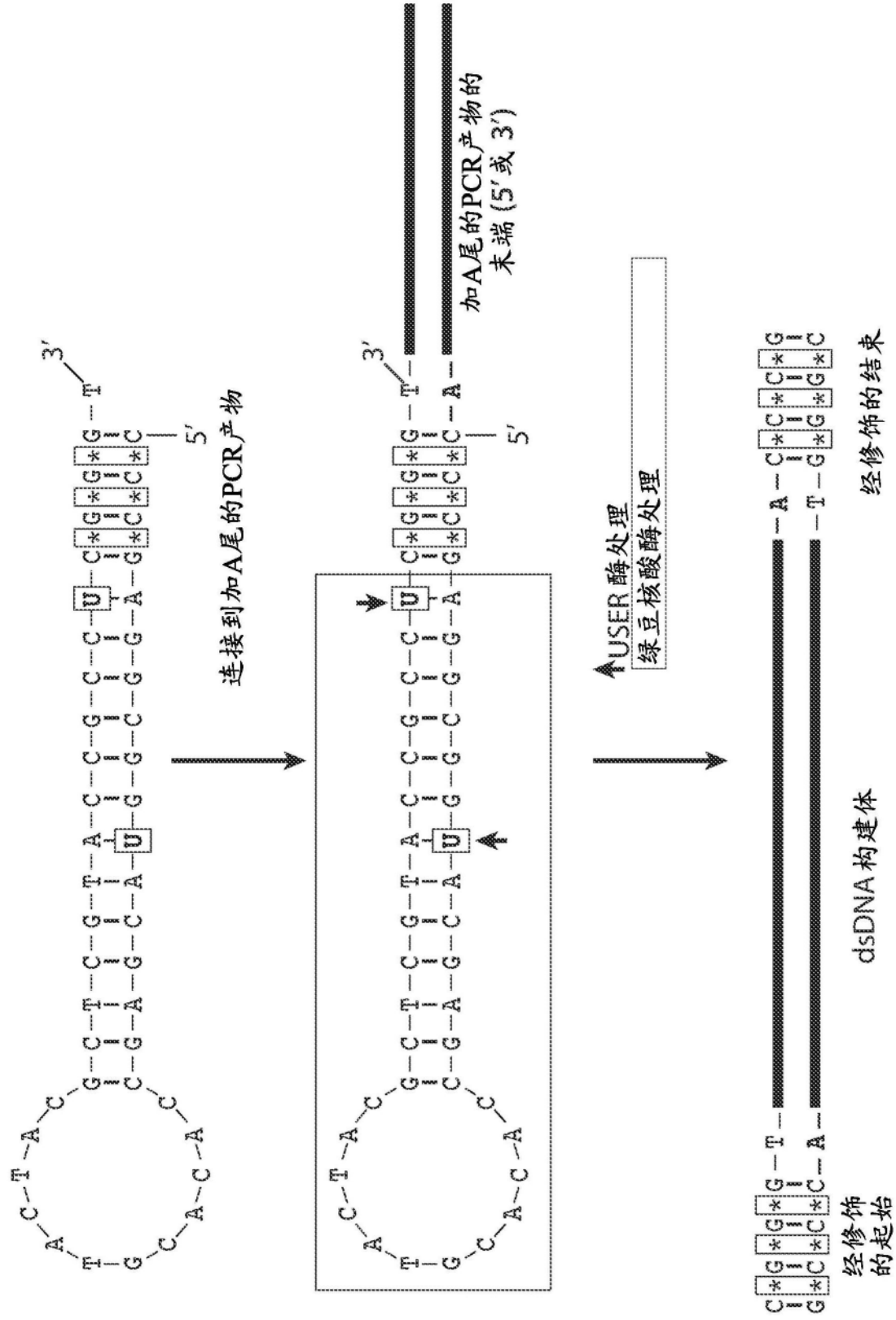

3′
5′
连接到加A尾的PCR产物
加A尾的PCR产物的
末端 (5′或 3′)
USER 酶处理
绿豆核酸酶处理
经修饰的结束
dsDNA 构建体
经修饰
的起始

图3

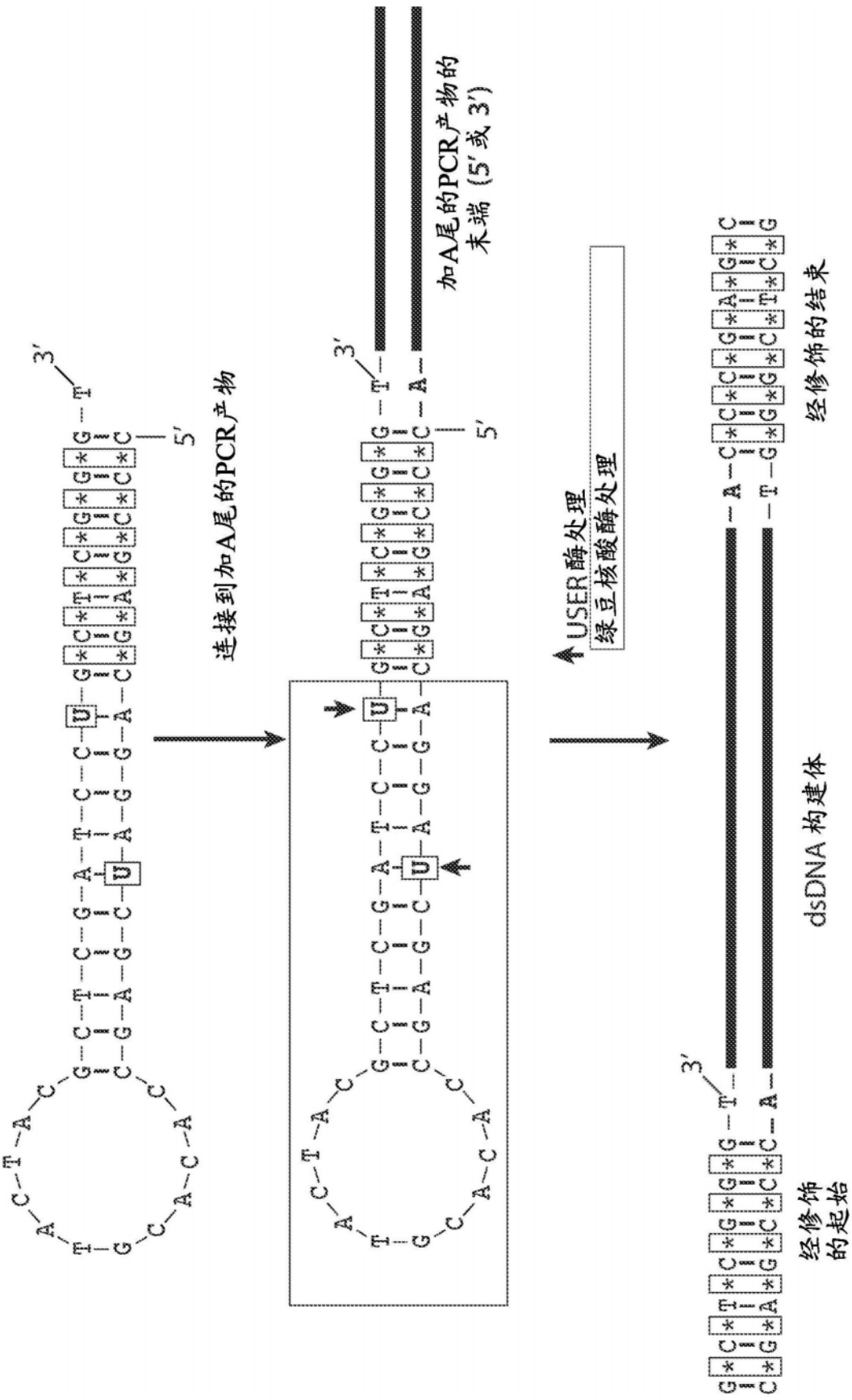

连接到加A尾的PCR产物
加A尾的PCR产物的末端 (5′或 3′)
USER酶处理
绿豆核酸酶处理
经修饰的结束
dsDNA 构建体
经修饰的起始

图4

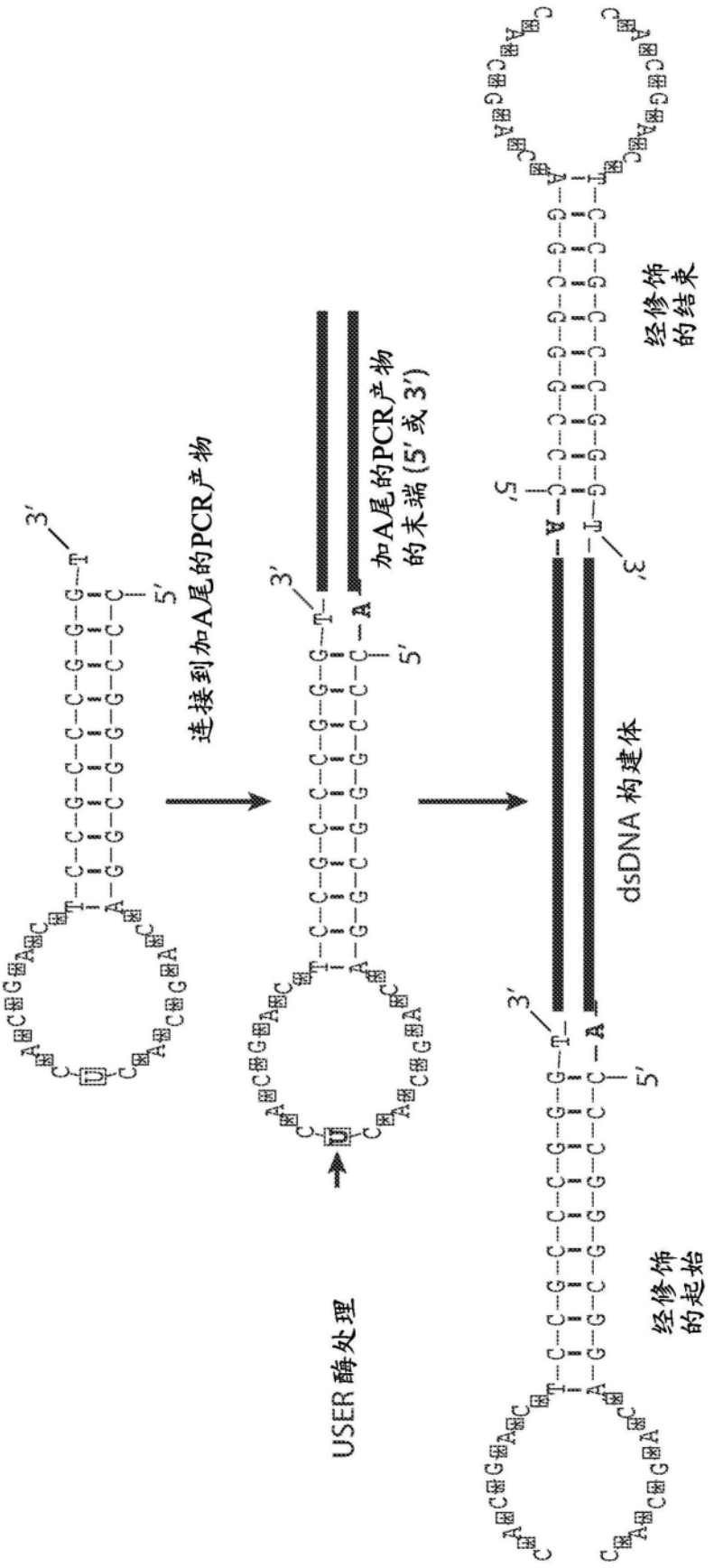

连接到加A尾的PCR产物
加A尾的PCR产物
的末端 (5′ 或 3′)
USER 酶处理
dsDNA 构建体
经修饰
的起始
经修饰
的结束

图5

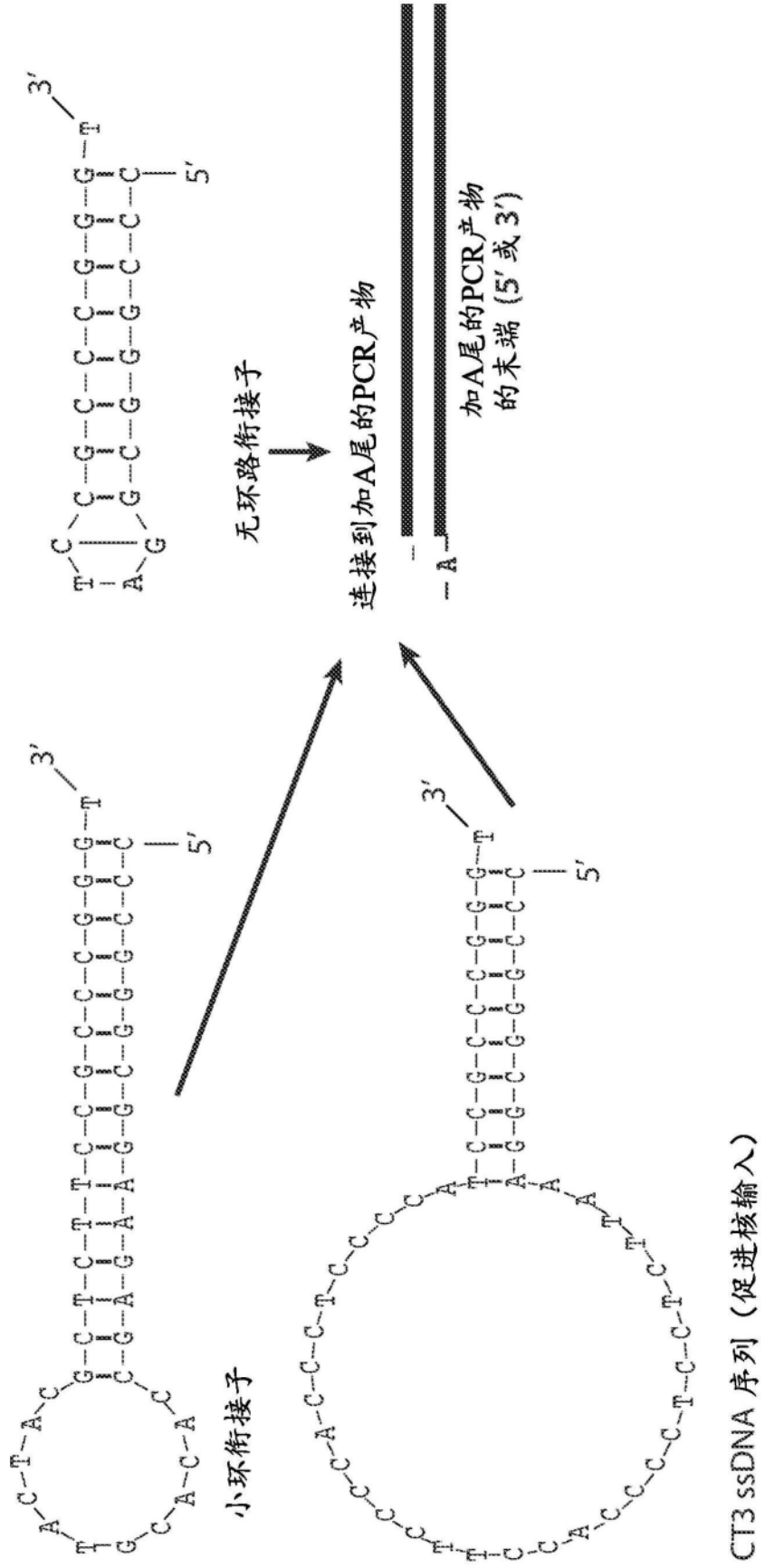

3′
5′
无环路衔接子
连接到加A尾的PCR产物
加A尾的PCR产物
的末端 (5′或3′)
小环衔接子
CT3 ssDNA 序列（促进核输入）

图6

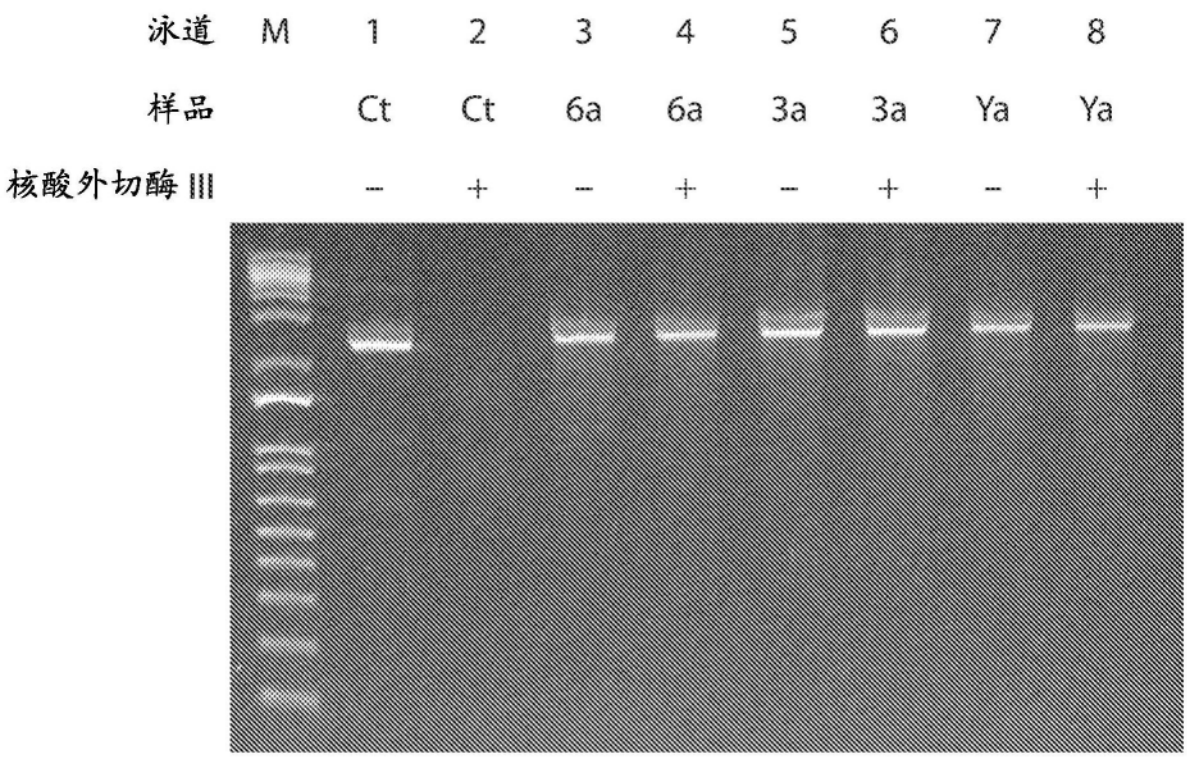

泳道 M 1 2 3 4 5 6 7 8
样品 Ct Ct 6a 6a 3a 3a Ya Ya
核酸外切酶 III – + – + – + – +

图7A

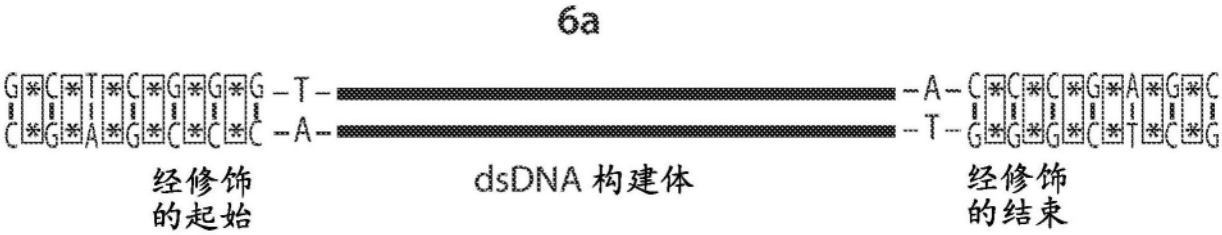

6a
经修饰的起始
dsDNA 构建体
经修饰的结束

图7B

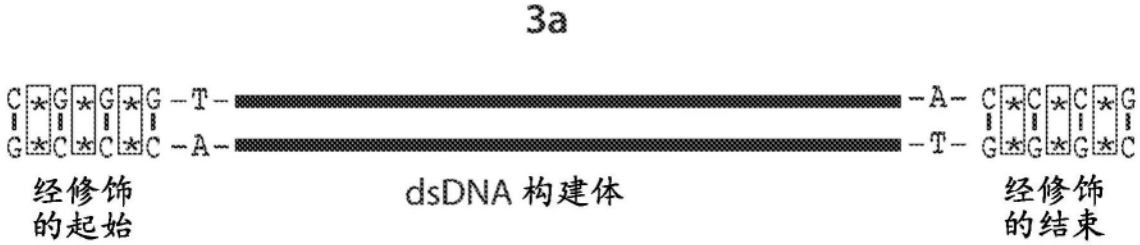

3a
经修饰的起始
dsDNA 构建体
经修饰的结束

图7C

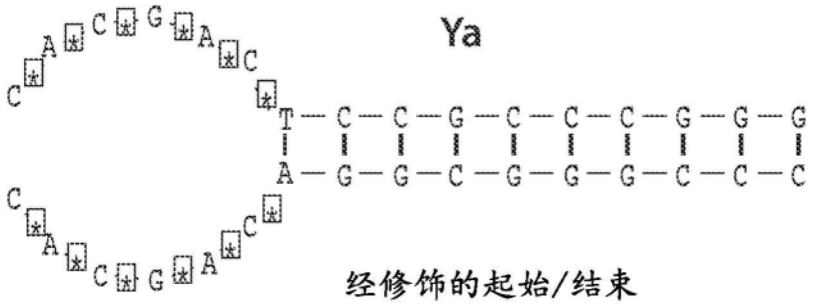


图7D

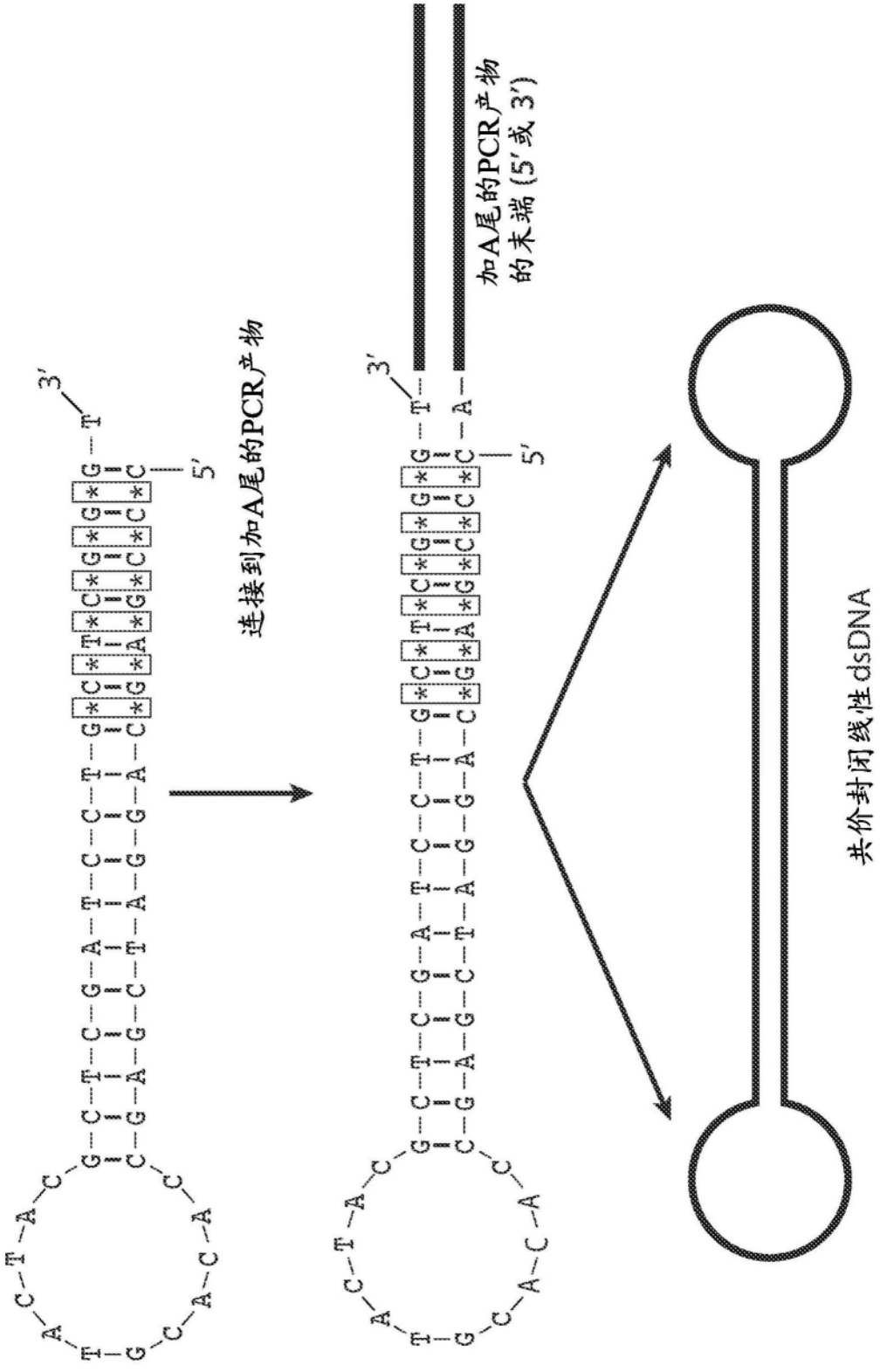


图8

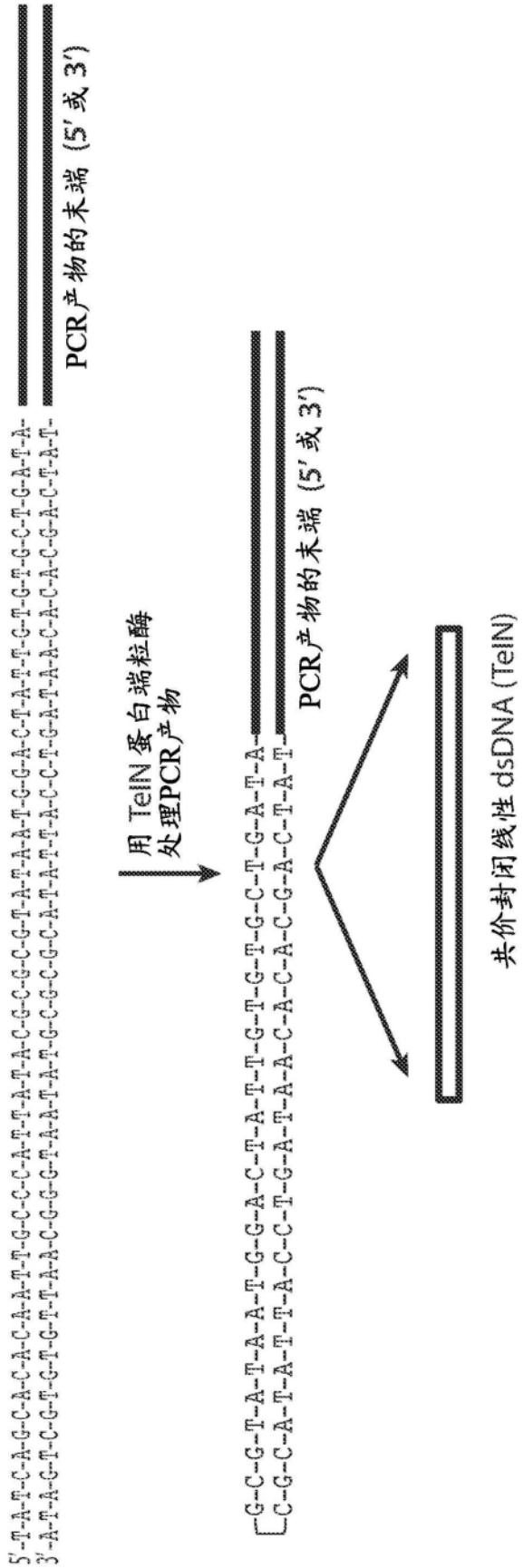

PCR产物的末端 (5′或 3′)
用 TelN 蛋白端粒酶
处理PCR产物
PCR产物的末端 (5′或 3′)
共价封闭线性 dsDNA (TelN)

图9

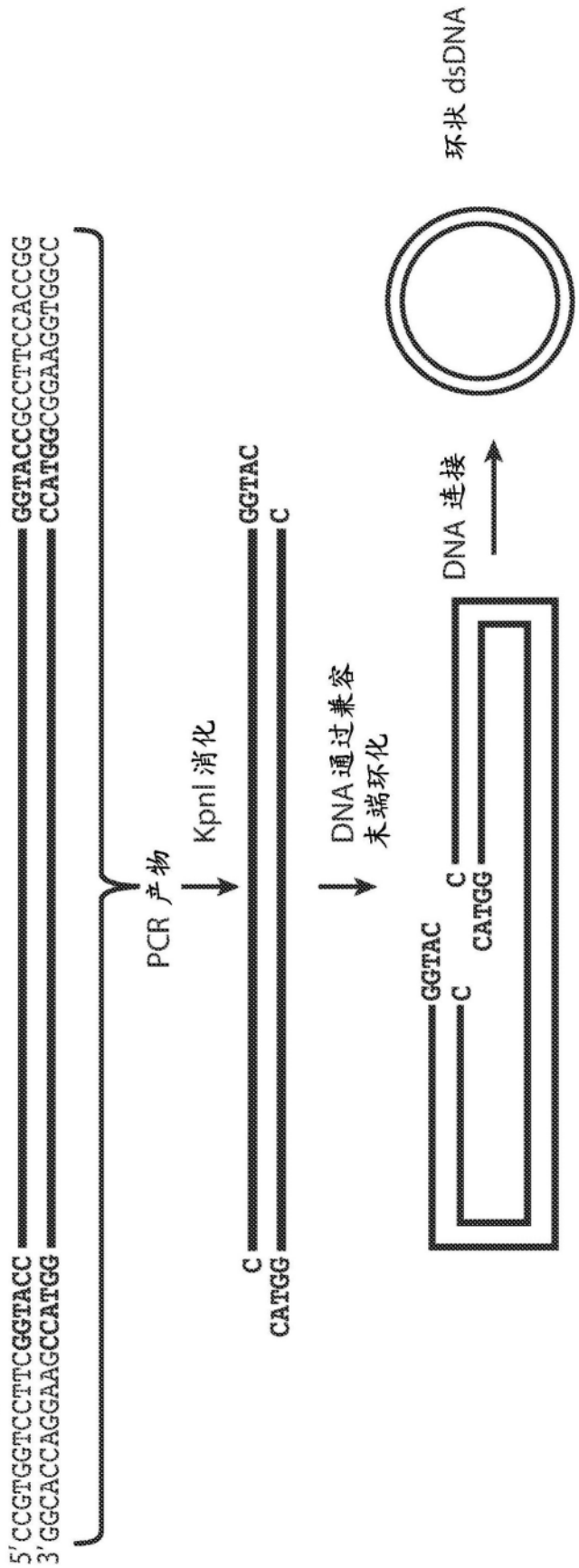

KpnI 限制位点
5′CCGTGGTCCTTCGGTACC
3′GGCACCAGGAAGCCATGG
KpnI 限制位点
GGTACCGCCTTCCACCGG
CCATGGCGGAAGGTGGCC
PCR 产物
KpnI 消化
C
CATGG
GGTAC
C
DNA 通过兼容
末端环化
GGTAC
C
C
CATGG
DNA 连接
环状 dsDNA

图10

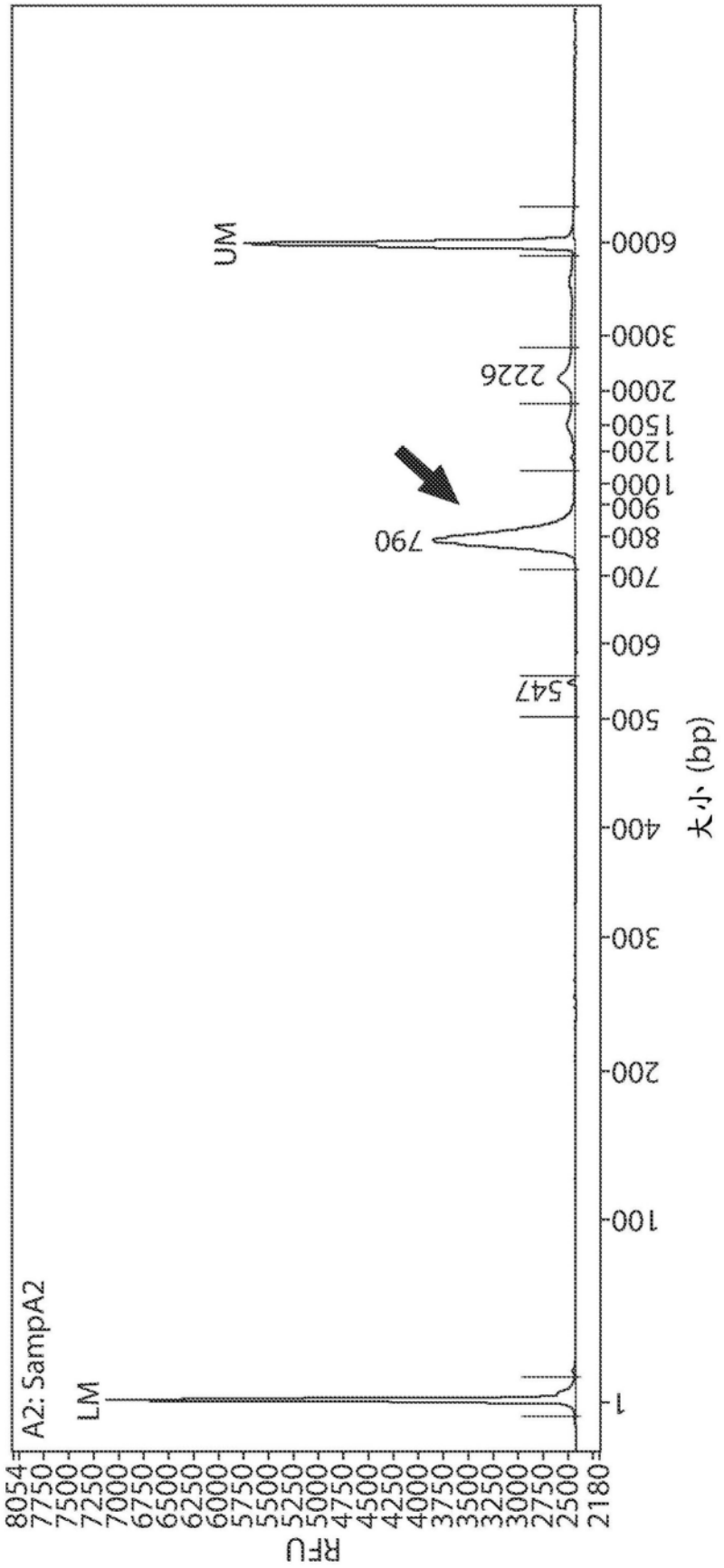


图11

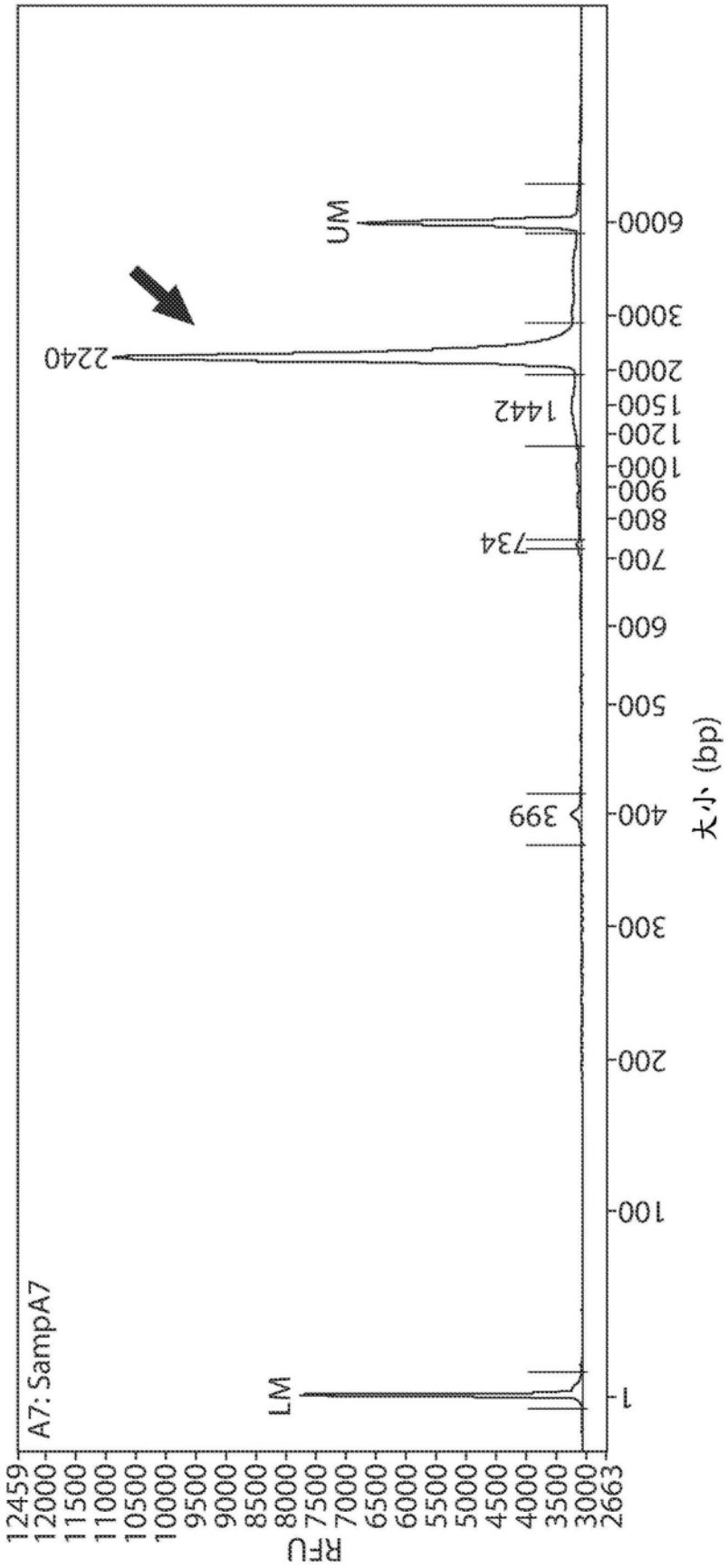

A7: SampA7
RFU
12459
12000
11500
11000
10500
10000
9500
9000
8500
8000
7500
7000
6500
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2663
LM
UM
2240
1442
734
399
大小 (bp)
1
100
200
300
400
500
600
700
800
900
1000
1200
1500
2000
3000
6000

图12

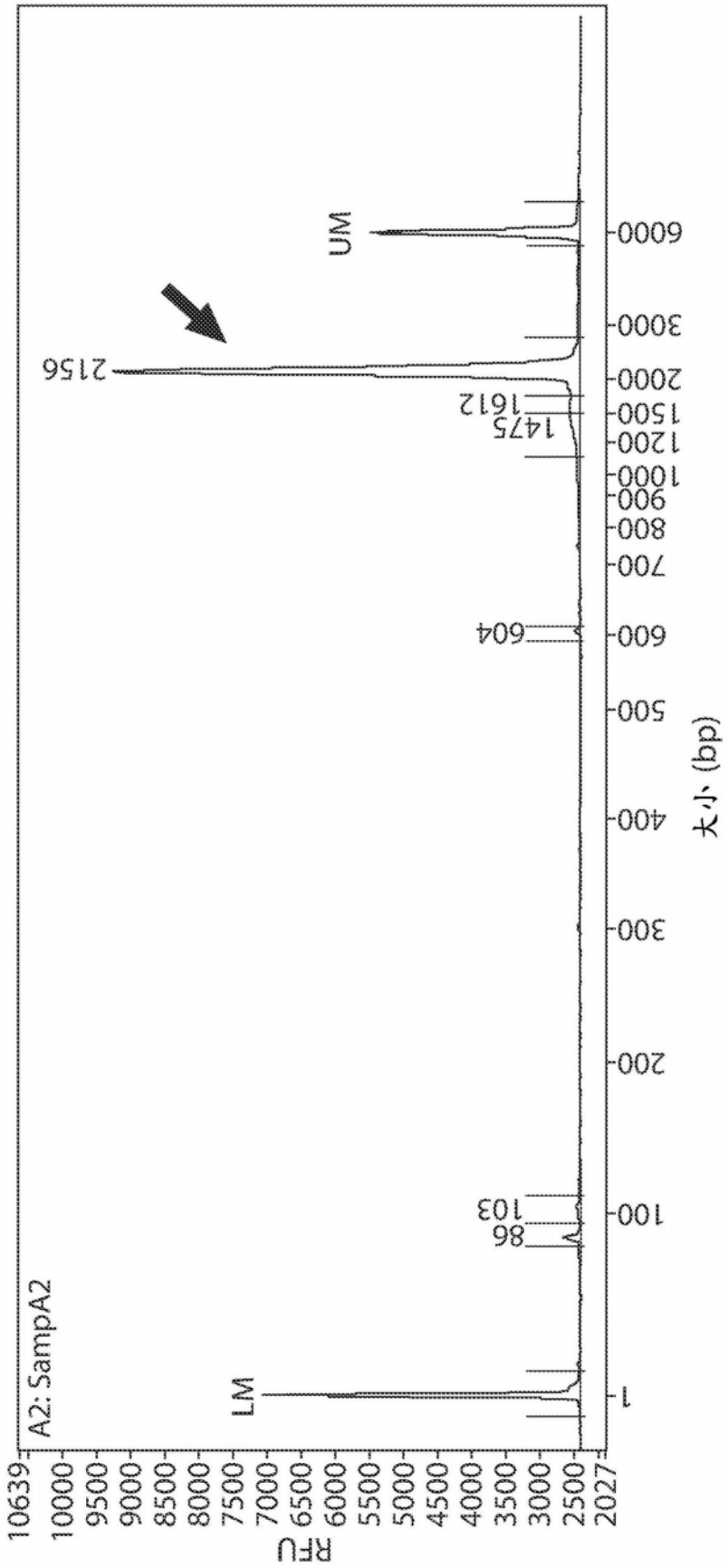

A2: SampA2
RFU
10639
10000
9500
9000
8500
8000
7500
7000
6500
6000
5500
5000
4500
4000
3500
3000
2500
2027
LM
UM
2156
1612
1475
604
103
86
大小 (bp)
6000
3000
2000
1500
1200
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
1

图13

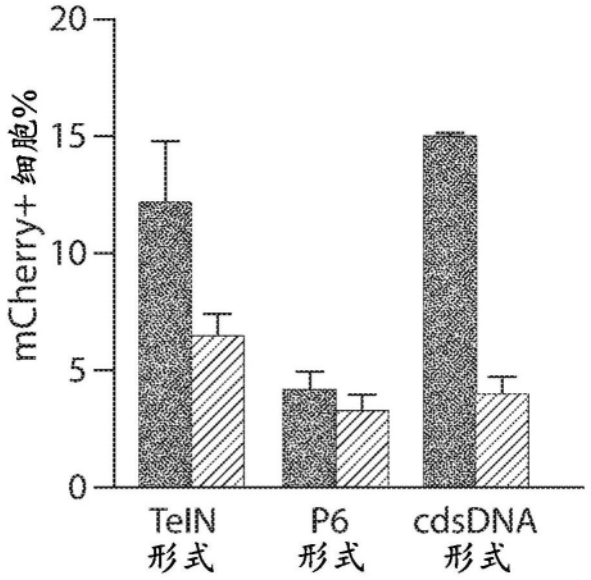

20
15
10
5
0
mCherry+ 细胞%
TeIN 形式
P6 形式
cdsDNA 形式

图14A

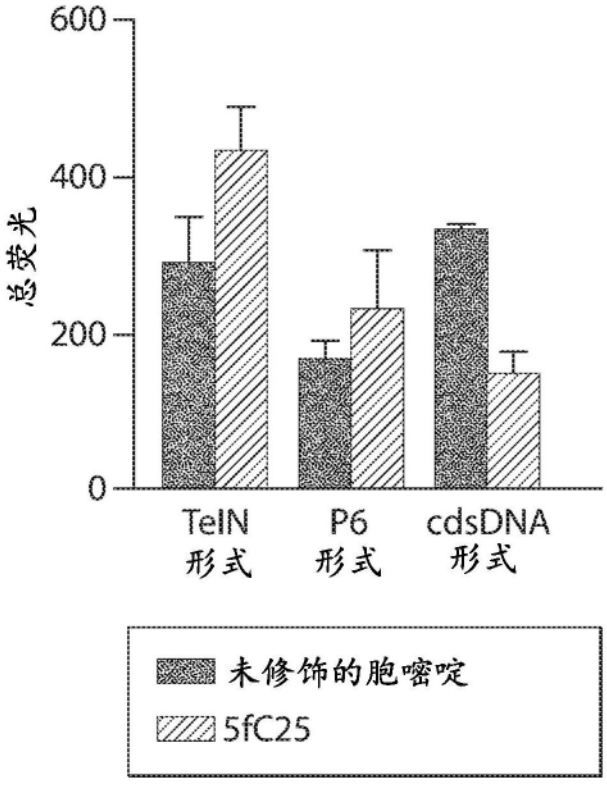
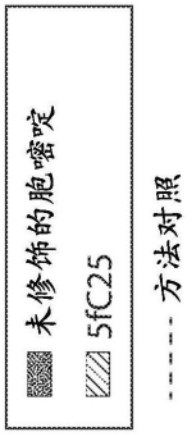

600
400
200
0
总荧光
TeIN 形式
P6 形式
cdsDNA 形式
未修饰的胞嘧啶
5fC25

图14B



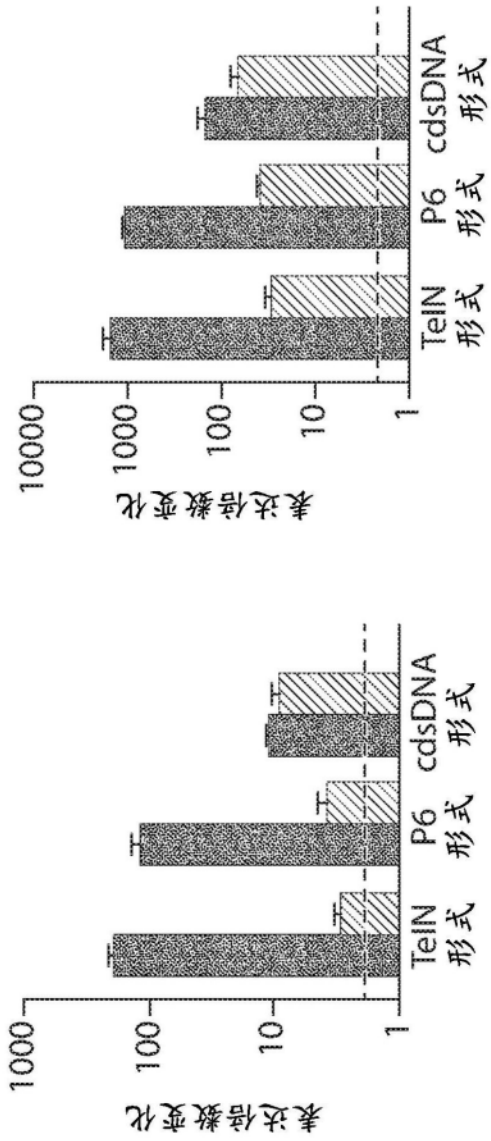


图 15A 图 15B 图 15C

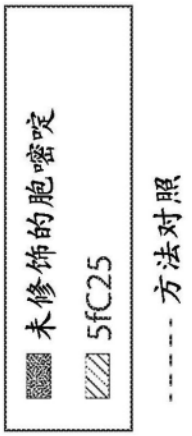


图 16A

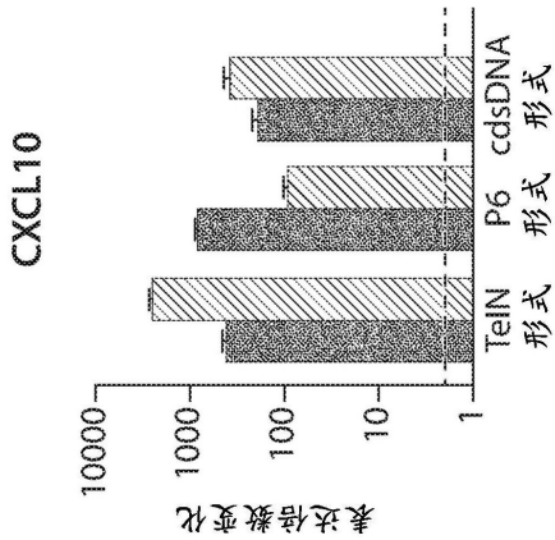


图 16B

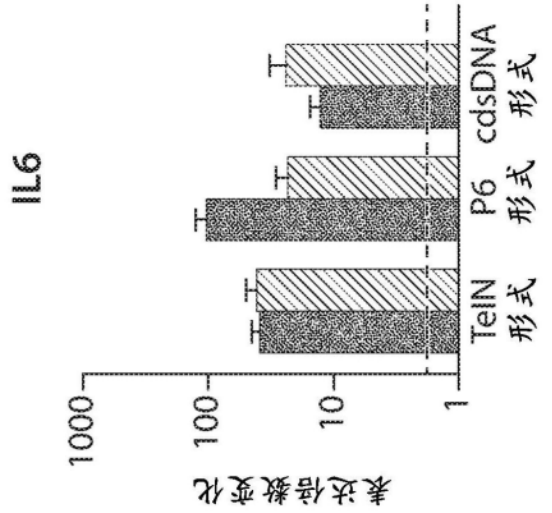


图 16C

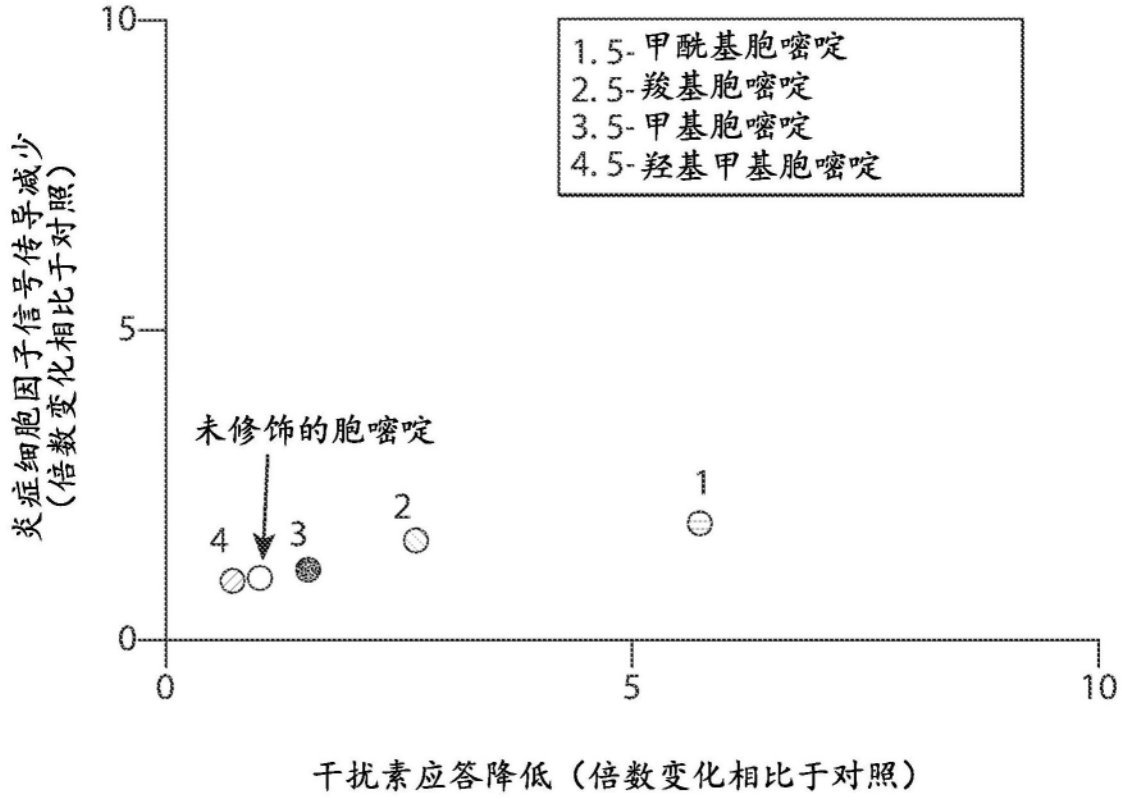

1.5-甲酰基胞嘧啶
2.5-羧基胞嘧啶
3.5-甲基胞嘧啶
4.5-羟基甲基胞嘧啶
炎症细胞因子信号传导减少
(倍数变化相比于对照)
未修饰的胞嘧啶
10
5
0
0
5
10
干扰素应答降低（倍数变化相比于对照）

图17