(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118542952 A
(43)申请公布日 2024.08.27

(21)申请号 202410230951.1

(22)申请日 2017.07.06

(30)优先权数据
62/358,763 2016.07.06 US
62/461,874 2017.02.22 US

(62)分案原申请数据
201780054058.6 2017.07.06

(71)申请人 沃泰克斯药物股份有限公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 A·S·伦德伯格 S·库尔卡尼
L·克莱因 H·K·帕德马纳布汉

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 李芳芳

(51)Int.Cl.
A61K 48/00(2006.01)
C12N 15/864(2006.01)
C12N 15/113(2010.01)
C12N 15/12(2006.01)
A61K 38/46(2006.01)
A61K 35/30(2015.01)
A61P 25/00(2006.01)
A61P 29/00(2006.01)
A61P 25/02(2006.01)

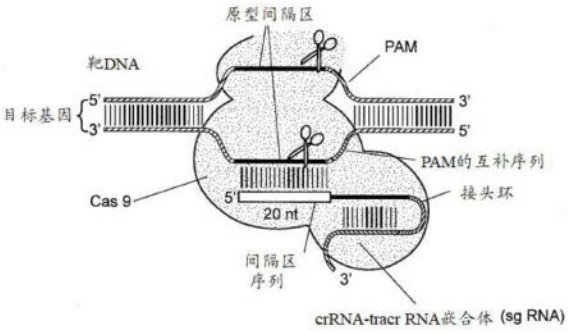
权利要求书3页 说明书89页
序列表（电子公布） 附图11页

(54)发明名称

用于治疗疼痛相关病症的材料和方法

(57)摘要

本申请提供了用于无论是离体还是体内治疗患有与SCN9A相关的一种或多种疾患的患者的材料和方法。此外,本申请提供了用于通过基因组编辑来编辑细胞中的SCN9A基因和/或调节所述基因的表达的材料和方法。



CN 118542952 A

1.一种用于通过基因组编辑在细胞中编辑电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因的方法,所述方法包括:向所述细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

2.一种用于治疗患有SCN9A相关疾患或病症的患者的离体方法,所述方法包括:

(a)在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近编辑患者特异性诱导型多能干细胞(iPSC);

(b)使所述编辑的iPSC分化成周围神经系统的神经元;以及

(c)将所述周围神经系统的所述神经元施用至所述患者。

3.如权利要求2所述的方法,其中所述编辑步骤包括:向所述iPSC中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

4.一种用于治疗患有SCN9A相关疾患或病症的患者的离体方法,所述方法包括:

(a)在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近编辑间充质干细胞;

(b)使所述编辑的间充质干细胞分化成周围神经系统的神经元;以及

(c)将所述周围神经系统的所述神经元施用至所述患者。

5.如权利要求4所述的方法,其中所述编辑步骤包括:向所述间充质干细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

6.一种用于治疗患有SCN9A相关病症的患者的体内方法,所述方法包括:编辑所述患者的细胞中的电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因。

7.如权利要求6所述的方法,其中所述编辑步骤包括:向所述细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

8.如权利要求6-7中任一项所述的方法,其中所述细胞是周围神经系统的神经元。

9.如权利要求8所述的方法,其中经由直接神经节内或脊柱内注射或鞘内递送将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶递送至所述周围神经系统的所述神经元。

10.一种改变细胞中的SCN9A基因的连续基因组序列的方法,所述方法包括:使所述细胞与一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶接触以实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB)。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述连续基因组序列的所述改变发生在所述SCN9A

基因的一个或多个外显子中。

12.如权利要求1-11中任一项所述的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是选自SEQ ID NO:1-620中的那些序列以及与SEQ ID NO:1-620中公开的那些序列中的任一个具有至少90%同源性的变体中的任一个。

13.如权利要求12所述的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是一种或多种蛋白质或多肽。

14.如权利要求12所述的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是编码所述一种或多种DNA核酸内切酶的一种或多种多核苷酸。

15.如权利要求14所述的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是编码所述一种或多种DNA核酸内切酶的一种或多种核糖核酸(RNA)。

16.如权利要求15所述的方法,其中所述一种或多种核糖核酸(RNA)是一种或多种化学修饰的RNA。

17.如权利要求16所述的方法,其中所述一种或多种核糖核酸(RNA)在编码区中经化学修饰。

18.如权利要求14-17中任一项所述的方法,其中所述一种或多种多核苷酸或所述一种或多种核糖核酸(RNA)是密码子优化的。

19.如权利要求1-18中任一项所述的方法,其中所述方法还包括:向所述细胞中引入一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。

20.如权利要求19所述的方法,其中所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA包含与所述SCN9A基因内或附近的DNA序列互补的间隔区序列。

21.如权利要求19-20中任一项所述的方法,其中所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA经化学修饰。

22.如权利要求19-21中任一项所述的方法,其中使所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA与所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶预复合。

23.如权利要求22所述的方法,其中所述预复合涉及所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA与所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶的共价连接。

24.如权利要求12-23中任一项所述的方法,其中将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶配制在脂质体或脂质纳米颗粒中。

25.如权利要求19-23中任一项所述的方法,其中将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶配制在脂质体或脂质纳米颗粒中,所述脂质体或脂质纳米颗粒还包含所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。

26.如权利要求10或19-20中任一项所述的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶在AAV载体颗粒中编码。

27.如权利要求19-20中任一项所述的方法,其中所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA在AAV载体颗粒中编码。

28.如权利要求19-20中任一项所述的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶在AAV载体颗粒中编码,所述AAV载体颗粒还编码所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。

29.如权利要求26-28中任一项所述的方法,其中所述AAV载体颗粒是选自由SEQ ID

NO:4734-5302和表2中公开的那些中的任一个组成的组。

30.一种单分子指导RNA,其包含:至少一个间隔区序列,所述至少一个间隔区序列是对应于SEQ ID NO:5305-125469中的任一个的RNA序列。

31.如权利要求30所述的单分子指导RNA,其中所述单分子指导RNA还包含间隔区延伸区。

32.如权利要求30所述的单分子指导RNA,其中所述单分子指导RNA还包含tracrRNA延伸区。

33.如权利要求30-32所述的单分子指导RNA,其中所述单分子指导RNA经化学修饰。

34.如权利要求30-33中任一项所述的单分子指导RNA,其与DNA核酸内切酶预复合。

35.如权利要求34所述的单分子指导RNA,其中所述DNA核酸内切酶是Cas9或Cpf1核酸内切酶。

36.如权利要求35所述的单分子指导RNA,其中所述Cas9或Cpf1核酸内切酶是选自由以下组成的组:化脓性链球菌Cas9、金黄色葡萄球菌Cas9、脑膜炎奈瑟氏菌Cas9、嗜热链球菌CRISPR1 Cas9、嗜热链球菌CRISPR 3Cas9、齿垢密螺旋体Cas9、毛螺菌科细菌ND2006 Cpf1和氨基酸球菌属BV3L6 Cpf1以及与所述核酸内切酶具有至少90%同源性的变体。

37.如权利要求36所述的单分子指导RNA,其中所述Cas9或Cpf1核酸内切酶包含一个或多个核定位信号(NLS)。

38.如权利要求37所述的单分子指导RNA,其中至少一个NLS位于所述Cas9或Cpf1核酸内切酶的氨基末端的50个氨基酸处或之内,和/或至少一个NLS位于所述Cas9或Cpf1核酸内切酶的羧基末端的50个氨基酸处或之内。

39.一种DNA,其编码如权利要求30-33中任一项所述的单分子指导RNA。

用于治疗疼痛相关病症的材料和方法

[0001] 本申请是基于申请日为2017年7月6日,优先权日为2016年7月6日,申请号为201780054058.6,发明名称为“用于治疗疼痛相关病症的材料和方法”的专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本公开涉及基因编辑领域,并且具体地涉及电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因的改变。

[0003] 相关申请

[0004] 本申请要求2016年7月6日提交的美国临时申请号62/358,763和2017年2月22日提交的美国临时申请号62/461,874的权益,所述临时申请两者均以引用的方式整体并入本文。

[0005] 以引用的方式并入序列表

[0006] 本申请包括呈计算机可读形式的序列表[文件名:170152PCT(SCN9A)sequence listing(Part 1):18,643,508字节-ASCII文本文件;创建于2017年6月28日;170152PCT(SCN9A)sequence listing(Part 2):16,350,005字节-ASCII文本文件;创建于2017年6月28日;和170152PCT(SCN9A)sequence listing(Part 3):14,922,048字节-ASCII文本文件;2017年6月28日创建],其以引用的方式整体并入本文并构成本公开的一部分。

背景技术

[0007] 基因组工程化是指用于活生物体的遗传信息(基因组)的靶向特异性修饰的策略和技术。由于广泛范围的可能应用,特别是在人类健康领域,基因组工程化是非常活跃的研究领域。例如,基因组工程化可用于改变(例如,校正或敲除)携带有害突变的基因或探索基因的功能。开发用于将转基因插入活细胞中的早期技术通常受到新序列插入基因组中的随机性质的限制。随机插入基因组可导致破坏相邻基因的正常调控,从而导致严重的有害作用。此外,随机整合技术几乎不提供可再现性,因为不能保证序列将被插入两个不同细胞中的相同位置处。最近的基因组工程化策略,如锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)、归巢核酸内切酶(HE)和MegaTAL使得能够修饰DNA的特定区域,从而与早期技术相比提高改变的精确度。这些较新的平台提供更大程度的可再现性,但仍具有其局限性。

[0008] 尽管世界各地的研究人员和医疗专业人员一直在努力解决遗传病症,并且尽管基因组工程化方法的前景,但仍然迫切需要开发涉及SCN9A相关适应症的安全且有效的治疗。

[0009] 通过使用基因组工程化工具来产生基因组的永久性变化,只需单次治疗即可解决SCN9A相关病症或疾患,所得治疗可完全补救某些SCN9A相关适应症和/或疾病。

发明内容

[0010] 本文提供了用于通过基因组编辑在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近引入至少一个核苷酸的一个或多个插

入、缺失或突变来产生所述基因组的永久性变化以及减少或消除电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因产物的细胞、离体和体内方法,所述方法可用于治疗疼痛。本文还提供了用于进行此类方法的组分和组合物以及载体。

[0011] 本文提供了一种用于通过基因组编辑在细胞中编辑电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因的方法,所述方法包括:向所述细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

[0012] 本文还提供了一种用于治疗患有SCN9A相关疾患或病症的患者的离体方法,所述方法包括:在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近编辑患者特异性诱导型多能干细胞(iPSC);使所述编辑的iPSC分化成周围神经系统的神经元;以及将所述周围神经系统的神经元施用至所述患者。

[0013] 在一些方面,所述编辑步骤包括:向所述iPSC中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

[0014] 本文还提供了一种用于治疗患有SCN9A相关疾患或病症的患者的离体方法,所述方法包括:在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近编辑间充质干细胞;使所述编辑的间充质干细胞分化成周围神经系统的神经元;以及将所述周围神经系统的神经元施用至所述患者。

[0015] 在一些方面,所述编辑步骤包括:向所述间充质干细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

[0016] 本文还提供了一种用于治疗患有SCN9A相关病症的患者的体内方法,所述方法包括:编辑所述患者的细胞中的电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因。

[0017] 在一些方面,所述编辑步骤包括:向所述细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

[0018] 在一些方面,所述细胞是周围神经系统的神经元。在一些方面,经由直接神经节内或脊柱内注射或鞘内递送将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶递送至所述周围神经系统的神经元。

[0019] 本文还提供了一种改变细胞中的SCN9A基因的连续基因组序列的方法,所述方法包括:使所述细胞与一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶接触以实现一个或多个单

链断裂(SSB)或双链断裂(DSB)。在一些方面,所述连续基因组序列的改变发生在所述SCN9A基因的一个或多个外显子中。

[0020] 在一些方面,所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是选自SEQ ID NO:1-620中的那些和与SEQ ID NO:1-620中列出的序列中的任一个具有至少90%同源性的变体中的任一个。

[0021] 在一些方面,所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是一种或多种蛋白质或多肽。在一些方面,所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是编码所述一种或多种DNA核酸内切酶的一种或多种多核苷酸。在一些方面,所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是编码所述一种或多种DNA核酸内切酶的一种或多种核糖核酸(RNA)。在一些方面,所述一种或多种核糖核酸(RNA)是一种或多种化学修饰的RNA。在一些方面,所述一种或多种核糖核酸(RNA)在所述编码区中经化学修饰。在一些方面,所述一种或多种多核苷酸或一种或多种核糖核酸(RNA)是密码子优化的。

[0022] 在一些方面,所述方法还包括向所述细胞中引入一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。在一些方面,所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA包含与所述SCN9A基因内或附近的DNA序列互补的间隔区序列。在一些方面,所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA经化学修饰。在一些方面,使所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA与所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶预复合。在一些方面,所述预复合涉及所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA与所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶的共价连接。

[0023] 在一些方面,将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶配制在脂质体或脂质纳米颗粒中。在一些方面,将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶配制在脂质体或脂质纳米颗粒中,所述脂质体或脂质纳米颗粒还包含所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。

[0024] 在一些方面,所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶在AAV载体颗粒中编码。在一些方面,所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA在AAV载体颗粒中编码。在一些方面,所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶在AAV载体颗粒中编码,所述AAV载体颗粒还编码所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。在一些方面,所述AAV载体颗粒是选自SEQ ID NO:4734-5302和表2中公开的那些中的任一个。

[0025] 本文还提供了一种单分子指导RNA,其包含:至少一个间隔区序列,所述至少一个间隔区序列是对应于SEQ ID NO:5305-125469中的任一个的RNA序列。在一些方面,所述单分子指导RNA还包含间隔区延伸区。在一些方面,所述单分子指导RNA还包含tracrRNA延伸区。在一些方面,所述单分子指导RNA经化学修饰。

[0026] 在一些方面,所述单分子指导RNA与位点定向多肽预复合。在一些方面,所述位点定向多肽是DNA核酸内切酶。在一些方面,所述DNA核酸内切酶是Cas9或CPf1核酸内切酶。在一些方面,所述Cas9或Cpf1核酸内切酶是选自由以下组成的组:化脓性链球菌Cas9、金黄色葡萄球菌Cas9、脑膜炎奈瑟氏菌Cas9、嗜热链球菌CRISPR1Cas9、嗜热链球菌CRISPR 3Cas9、齿垢密螺旋体Cas9、毛螺菌科细菌ND2006 Cpf1和氨基酸球菌属BV3L6 Cpf1以及与这些核酸内切酶具有至少90%同源性的变体。在一些方面,所述Cas9或Cpf1核酸内切酶包含一个或多个核定位信号(NLS)。在一些方面,至少一个NLS位于所述Cas9或Cpf1核酸内切酶的氨基末端的50个氨基酸处或内,和/或至少一个NLS位于所述Cas9或Cpf1核酸内切酶的羧基末

端的50个氨基酸处或内。

[0027] 本文还提供了编码本文所述的单分子指导多核苷酸的RNA。

[0028] 本文还提供了编码本文所述的CRISPR/Cas系统的RNA。

[0029] 本文还提供了编码本文所述的单分子指导RNA的DNA。

[0030] 本文还提供了编码本文所述的CRISPR/Cas系统的DNA。

[0031] 本文还提供了一种载体,所述载体包含编码单分子指导RNA或CRISPR/Cas系统的DNA。在一些方面,所述载体是质粒。在一些方面,所述载体是AAV载体颗粒,其中所述AAV载体血清型是选自SEQ ID NO:4734-5302或表2中列出的那些。

附图说明

[0032] 通过参考附图可更好地理解在本说明书中公开和描述的材料和方法的各个方面,其中:

[0033] 图1A-1B描绘II型CRISPR/Cas系统;

[0034] 图1A是包括gRNA的II型CRISPR/Cas系统的描绘;

[0035] 图1B是包括sgRNA的II型CRISPR/Cas系统的另一个描绘;

[0036] 图2A-2G描述经由体外转录(IVT)gRNA筛选选择的化脓性链球菌gRNA的切割效率;

[0037] 图2A描述经由体外转录(IVT)gRNA筛选选择的化脓性链球菌gRNA的93.3%-98.5%范围内的切割效率;

[0038] 图2B描述经由体外转录(IVT)gRNA筛选选择的化脓性链球菌gRNA的86.1%-93%范围内的切割效率;

[0039] 图2C描述经由体外转录(IVT)gRNA筛选选择的化脓性链球菌gRNA的78.8%-86%范围内的切割效率;

[0040] 图2D描述经由体外转录(IVT)gRNA筛选选择的化脓性链球菌gRNA的67.2%-78.8%范围内的切割效率;

[0041] 图2E描述经由体外转录(IVT)gRNA筛选选择的化脓性链球菌gRNA的50.7%-66.8%范围内的切割效率;

[0042] 图2F描述经由体外转录(IVT)gRNA筛选选择的化脓性链球菌gRNA的23.4%-49.8%范围内的切割效率;

[0043] 图2G描述经由体外转录(IVT)gRNA筛选选择的化脓性链球菌gRNA的4.1%-22.1%范围内的切割效率;

[0044] 图3A-3C描述靶向SCN9A基因的HEK293T细胞中化脓性链球菌gRNA的切割效率;

[0045] 图3A描述靶向SCN9A基因的HEK293T细胞中化脓性链球菌gRNA的80.9%-98.5%范围内的切割效率;

[0046] 图3B描述靶向SCN9A基因的HEK293T细胞中化脓性链球菌gRNA的50.7%-80.9%范围内的切割效率;并且

[0047] 图3C描述靶向SCN9A基因的HEK293T细胞中化脓性链球菌gRNA的4.1%-49.8%范围内的切割效率。

[0048] 序列表简述

[0049] SEQ ID NO:1-620是Cas核酸内切酶直向同源物序列。

[0050] SEQ ID NO:621-631不包括序列。

[0051] SEQ ID NO:632-4715是微小RNA序列。

[0052] SEQ ID NO:4716-4733不包括序列。

[0053] SEQ ID NO:4734-5302是AAV血清型序列。

[0054] SEQ ID NO:5303是SCN9A核苷酸序列。

[0055] SEQ ID NO:5304是包含SCN9A基因上游和/或下游的1-5千碱基对的基因序列。

[0056] SEQ ID NO:5305-6250是用齿垢密螺旋体Cas9核酸内切酶在SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近靶向的20bp间隔区序列。

[0057] SEQ ID NO:6251-8561是用嗜热链球菌Cas9核酸内切酶在SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近靶向的20bp间隔区序列。

[0058] SEQ ID NO:8562 -13614是用金黄色葡萄球菌Cas9核酸内切酶在SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近靶向的20bp间隔区序列。

[0059] SEQ ID NO:13615-18988是用脑膜炎奈瑟氏菌Cas9核酸内切酶在SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近靶向的20bp间隔区序列。

[0060] SEQ ID NO:18989-56863是用化脓性链球菌Cas9核酸内切酶在SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近靶向的20bp间隔区序列。

[0061] SEQ ID NO:56864-125469是用氨基酸球菌属、毛螺菌科和新杀手弗朗西斯菌Cpf1核酸内切酶在SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近靶向的20bp间隔区序列。

[0062] SEQ ID NO:125470-125499不包括序列。

[0063] SEQ ID NO:125500是化脓性链球菌Cas9核酸内切酶的样品指导RNA(gRNA)。

[0064] SEQ ID NO:125501-125503示出样品sgRNA序列。

具体实施方式

[0065] I.引言

[0066] 基因组编辑

[0067] 本公开提供用于活生物体的遗传信息(基因组)的靶向特异性改变的策略和技术。如本文所用,术语“改变”或“遗传信息的改变”是指细胞基因组中的任何变化。在治疗遗传病症的背景下,改变可包括但不限于插入、缺失和校正。如本文所用,术语“插入”是指在DNA序列中添加一个或多个核苷酸。插入可在几个核苷酸的小插入至诸如cDNA或基因的大区段的插入。术语“缺失”是指DNA序列中一个或多个核苷酸的丧失或除去或基因功能的丧失或除去。在一些情况下,缺失可包括例如几个核苷酸、外显子、内含子、基因区段或基因的完整序列的丧失。在一些情况下,基因的缺失是指基因或其基因产物的功能或表达的消除或减少。这不仅可由所述基因内或附近的序列的缺失引起,而且可由破坏所述基因的表达的其他事件(例如插入、无义突变)引起。如本文所用的术语“校正”是指细胞中基因组的一个或多个核苷酸的变化,无论是通过插入、缺失还是取代。这种校正可产生对所校正的基因组位点的更有利的基因型或表型结果,无论是在结构还是功能上。“校正”的一个非限制性实例包括将突变体或缺陷型序列校正为野生型序列,其恢复基因或其基因产物的结构或功能。取决于突变的性质,可经由本文公开的各种策略实现校正。在一个非限制性实例中,可通过

用其野生型对应物置换含有突变的区域来校正错义突变。作为另一个实例,可通过除去额外序列来校正基因中的重复突变(例如,重复扩增)。

[0068] 在一些方面,改变还可包括基因敲入、敲除或敲低。如本文所用,术语"敲入"是指将DNA序列或其片段添加到基因组中。待敲入的此类DNA序列可包括一个或多个完整基因,可包括与基因相关的调控序列或前述的任何部分或片段。例如,可将编码野生型蛋白质的cDNA插入携带突变型基因的细胞的基因组中。敲入策略不必全部或部分置换缺陷型基因。在一些情况下,敲入策略可进一步涉及用所提供的序列取代现有序列,例如用野生型拷贝取代突变型等位基因。另一方面,术语"敲除"是指基因或基因的表达的消除。例如,可通过缺失或添加导致阅读框破坏的核苷酸序列来敲除基因。作为另一个实例,可通过用不相关的序列置换基因的一部分来敲除所述基因。最后,如本文所用的术语"敲低"是指基因或其基因产物的表达降低。作为基因敲低的结果,蛋白质活性或功能可减弱或者蛋白质水平可降低或消除。

[0069] 基因组编辑通常是指优选以精确或预定的方式修饰基因组的核苷酸序列的过程。本文描述的基因组编辑的方法的实例包括使用位点定向核酸酶在基因组中的精确靶位置切割脱氧核糖核酸(DNA)、从而在所述基因组内的特定位置产生单链或双链DNA断裂的方法。如Cox等人,Nature Medicine 21(2),121-31(2015)中所综述,通过自然的、内源性的细胞过程,如同源定向修复(HDR)和非同源末端连接(NHEJ),可以并且定期地修复此类断裂。这两个主要的DNA修复过程由一系列替代途径组成。NHEJ直接连接由双链断裂产生的DNA末端,有时伴随丧失或添加核苷酸序列,其可破坏或增强基因表达。HDR利用同源序列或供体序列作为模板,用于在断裂点插入限定的DNA序列。同源序列可在内源基因组中,如姊妹染色半体。或者,供体可以是外源核酸,如质粒、单链寡核苷酸、双链寡核苷酸、双链体寡核苷酸或病毒,所述外源核酸具有与核酸酶裂解的基因座高度同源的区域、但是还可含有额外的序列或序列改变,包括可并入裂解的靶基因座中的缺失。第三种修复机制可以是微同源介导的末端连接(MMEJ),也称为"替代NHEJ",其中遗传结果类似于NHEJ,在于小缺失和插入可在裂解位点发生。MMEJ可利用DNA断裂位点侧翼的几个碱基对的同源序列来驱动更有利的DNA末端连接修复结果,并且最近的报道进一步阐明了这种过程的分子机制;参见,例如,Cho和Greenberg,Nature 518,174-76(2015);Kent等人,Nature Structural and Molecular Biology,Adv.Online doi:10.1038/nsmb.2961(2015);Mateos-Gomez等人,Nature 518,254-57(2015);Ceccaldi等人,Nature528,258-62(2015)。在一些情况下,可能有可能基于DNA断裂位点处的潜在微同源性的分析来预测可能的修复结果。

[0070] 这些基因组编辑机制中的每一种都可用于产生所需的基因组改变。基因组编辑过程中的步骤可以是在预期突变位点附近的目标基因座中产生一个或两个DNA断裂,后者为双链断裂或两个单链断裂。这可经由使用如本文所述和说明的位点定向多肽来实现。

[0071] CRISPR核酸内切酶系统

[0072] 可在许多原核生物(例如,细菌和古细菌)的基因组中发现CRISPR(成簇规律间隔的短回文重复序列)基因组基因座。在原核生物中,CRISPR基因座编码产物,所述产物充当一种类型的免疫系统,以帮助保护原核生物免受外来侵入物,如病毒和噬菌体。存在CRISPR基因座功能的三个阶段:新序列整合到CRISPR基因座中、CRISPR RNA(crRNA)的表达和外来侵入物核酸的沉默。已经鉴别了五种类型的CRISPR系统(例如,I型、II型、III型、U型和V

型)。

[0073] CRISPR基因座包含多个称为“重复序列(repeats)”的短重复序列(repeating sequence)。当表达时,所述重复序列可形成二级结构(例如,发夹)和/或包含非结构化的单链序列。所述重复序列通常以簇的形式出现,并且经常在物种之间相异。所述重复序列规律地被称为“间隔区”的独特插入序列间隔,从而产生重复序列-间隔区-重复序列基因座构造。所述间隔区与已知的外来侵入物序列相同或具有高度同源性。间隔区-重复序列单元编码crisprRNA(crRNA),其被加工成间隔区-重复序列单元的成熟形式。crRNA包含参与靶向靶核酸的“种子”或间隔区序列(在原核生物中呈天然存在的形式,所述间隔区序列靶向外来侵入物核酸)。间隔区序列位于crRNA的5’或3’端处。

[0074] CRISPR基因座还包含编码CRISPR相关(Cas)基因的多核苷酸序列。Cas基因编码参与原核生物中crRNA功能的生物发生和干扰阶段的核酸内切酶。一些Cas基因包含同源的二级和/或三级结构。

[0075] II型CRISPR系统

[0076] II型CRISPR系统中的crRNA生物发生本质上需要反式活化CRISPR RNA(tracrRNA)。II型CRISPR系统的非限制性实例在图1A和1B中示出。tracrRNA可通过内源性RNA酶III修饰,且然后与pre-crRNA阵列中的crRNA重复序列杂交。可募集内源性RNA酶III以裂解pre-crRNA。裂解的crRNA可进行核糖核酸外切酶修整以产生成熟的crRNA形式(例如,5’修整)。tracrRNA可保持与crRNA杂交,并且tracrRNA和crRNA与位点定向多肽(例如Cas9)缔合。crRNA-tracrRNA-Cas9复合物的crRNA可将复合物引导至crRNA可与其杂交的靶核酸。crRNA与靶核酸的杂交可活化Cas9以进行靶向核酸裂解。II型CRISPR系统中的靶核酸被称为原型间隔区相邻基序(PAM)。在自然界中,PAM对于促进位点定向多肽(例如,Cas9)与靶核酸的结合是必需的。II型系统(也称为Nmeni或CASS4)被进一步细分为II-A型(CASS4)和II-B型(CASS4a)。Jinek等人,Science,337(6096):816-821(2012)表明CRISPR/Cas9系统可用于RNA可编程基因组编辑,并且国际专利申请公布号WO2013/176772提供了用于位点特异性基因编辑的CRISPR/Cas核酸内切酶系统的许多实例和应用。

[0077] V型CRISPR系统

[0078] V型CRISPR系统与II型系统具有若干重要差异。例如,Cpf1是单一RNA引导的核酸内切酶,其与II型系统相反,缺乏tracrRNA。事实上,可将Cpf1相关的CRISPR阵列加工成成熟的crRNA,而不需要额外的反式活化tracrRNA。可将V型CRISPR阵列加工成长度为42-44个核苷酸的短成熟crRNA,其中每个成熟crRNA以19个核苷酸的直接重复序列开始,然后是23-25个核苷酸的间隔区序列。相比之下,II型系统中的成熟crRNA可以20-24个核苷酸的间隔区序列开始,然后是约22个核苷酸的直接重复序列。此外,Cpf1可利用富含T的原型间隔区相邻基序,以使得Cpf1-crRNA复合物有效裂解之前带有短富含T的PAM的靶DNA,其与II型系统的靶DNA之后的富含G的PAM形成对比。因此,V型系统在远离PAM的点处裂解,而II型系统在与PAM相邻的点处裂解。此外,与II型系统相比,Cpf1经由具有4或5个核苷酸的5’突出端的交错DNA双链断裂裂解DNA。II型系统经由平的双链断裂裂解。与II型系统类似,Cpf1含有预测的RuvC样核酸内切酶结构域,但缺乏第二HNH核酸内切酶结构域,这与II型系统形成对比。

[0079] Cas基因/多肽和原型间隔区相邻基序

[0080] 示例性CRISPR/Cas多肽包括如Fonfara等人,Nucleic Acids Research,42:2577-2590(2014)中公开的Cas9多肽。自Cas基因被发现以来,CRISPR/Cas基因命名系统已经经历了广泛的改写。Fonfara等人还提供了来自不同物种的Cas9多肽的PAM序列(也参见以下表1)。

[0081] II.本公开的组合物和方法

[0082] 本文提供了用于使用基因组工程化工具来通过使SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列缺失或突变而产生基因组的永久性变化的细胞、离体和体内方法。此类方法使用核酸内切酶如CRISPR相关(Cas9、Cpf1等)核酸酶,来在SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列的基因组基因座内或附近永久地编辑。以这种方式,本公开中阐述的实施例可有助于仅用单次治疗(而不是在患者的一生中递送潜在疗法)即可减少或消除SCN9A基因的表达。

[0083] 位点定向多肽(核酸内切酶,酶)

[0084] 位点定向多肽是用于基因组编辑以裂解DNA的核酸酶。位点定向多肽可作为一种或多种多肽或一种或多种编码多肽的mRNA施用于细胞或患者。SEQ ID NO:1-620中列出或本文公开的任何酶或直向同源物可用于本文的方法中。单分子指导RNA可与位点定向多肽预复合。所述位点定向多肽可以是本文公开的任何DNA核酸内切酶。

[0085] 在CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1系统的背景下,位点定向多肽可与指导RNA结合,所述指导RNA进而指定多肽被引导至的靶DNA中的位点。在本文公开的CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1系统中,位点定向多肽可以是核酸内切酶,如DNA核酸内切酶。

[0086] 位点定向多肽可包含多个核酸裂解(即核酸酶)结构域。两个或更多个核酸裂解结构域可经由接头连接在一起。例如,所述接头可包含柔性接头。接头可包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30、35、40或更多个氨基酸的长度。

[0087] 天然存在的野生型Cas9酶包含两个核酸酶结构域、HNH核酸酶结构域和RuvC结构域。本文中,术语“Cas9”是指天然存在的和重组的Cas9。本文考虑的Cas9酶可包含HNH或HNH样核酸酶结构域,和/或RuvC或RuvC样核酸酶结构域。

[0088] HNH或HNH样结构域包含McrA样折叠。HNH或HNH样结构域包含两个反向平行的β-链和α-螺旋。HNH或HNH样结构域包含金属结合位点(例如,二价阳离子结合位点)。HNH或HNH样结构域可裂解靶核酸的一条链(例如,crRNA靶向链的互补链)。

[0089] RuvC或RuvC样结构域包含RNA酶H或RNA酶H样折叠。RuvC/RNA酶H结构域参与各种基于核酸的功能,包括作用于RNA和DNA。RNA酶H结构域包含被多个α-螺旋围绕的5个β-链。RuvC/RNA酶H或RuvC/RNA酶H样结构域包含金属结合位点(例如,二价阳离子结合位点)。RuvC/RNA酶H或RuvC/RNA酶H样结构域可裂解靶核酸的一条链(例如,双链靶DNA的非互补链)。

[0090] 位点定向多肽可在核酸(例如基因组DNA)中引入双链断裂或单链断裂。双链断裂可刺激细胞的内源性DNA修复途径(例如,同源依赖性修复(HDR)或NHEJ或替代非同源末端连接(A-NHEJ)或微同源介导的末端连接(MMEJ))。NHEJ可修复裂解的靶核酸而无需同源模板。这有时可在裂解位点处的靶核酸中产生小的缺失或插入(插入缺失),并且可导致基因表达的破坏或改变。当可获得同源修复模板或供体时,可发生HDR。同源供体模板可包含与

靶核酸裂解位点侧翼的序列同源的序列。细胞可使用姊妹染色半体作为修复模板。然而,出于基因组编辑的目的,修复模板可作为外源核酸,如质粒、双链寡核苷酸、单链寡核苷酸或病毒核酸提供。使用外源供体模板,可在同源性的侧翼区之间引入另外的核酸序列(如转基因)或修饰(如单个或多个碱基变化或缺失),以使得额外的或改变的核酸序列也变得并入靶基因座中。MMEJ可产生类似于NHEJ的遗传结果,在于小的缺失和插入可在裂解位点处发生。MMEJ可利用位于裂解位点侧翼的几个碱基对的同源序列来驱动有利的末端连接DNA修复结果。在一些情况下,可能有可能基于核酸酶靶区域中的潜在微同源性的分析来预测可能的修复结果。

[0091] 因此,在一些情况下,同源重组可用于将外源多核苷酸序列插入靶核酸裂解位点中。外源多核苷酸序列在本文中称为"供体多核苷酸"(或供体或供体序列)。可将供体多核苷酸、供体多核苷酸的一部分、供体多核苷酸的拷贝或供体多核苷酸的拷贝的一部分插入靶核酸裂解位点中。供体多核苷酸可以是外源多核苷酸序列,即在靶核酸裂解位点不天然存在的序列。

[0092] 由于NHEJ和/或HDR引起的靶DNA的修饰可导致例如突变、缺失、改变、整合、基因校正、基因置换、基因标记、转基因插入、核苷酸缺失、基因破坏、易位和/或基因突变。使基因组DNA缺失并将非天然核酸整合到基因组DNA中的过程是基因组编辑的实例。

[0093] 所述位点定向多肽可包含与野生型示例性位点定向多肽[例如,来自化脓性链球菌的Cas9,US2014/0068797序列ID No.8或Sapranauskas等人,Nucleic Acids Res,39(21):9275-9282(2011)]和各种其他位点定向多肽具有至少10%、至少15%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%或100%氨基酸序列同一性的氨基酸序列。所述位点定向多肽可在10个连续氨基酸上与野生型位点定向多肽(例如,来自化脓性链球菌的Cas9,同上)具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%同一性。所述位点定向多肽可在10个连续氨基酸上与野生型位点定向多肽(例如,来自化脓性链球菌的Cas9,同上)具有至多70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%同一性。所述位点定向多肽可在位点定向多肽的HNH核酸酶结构域中的10个连续氨基酸上与野生型位点定向多肽(例如,来自化脓性链球菌的Cas9,同上)具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%同一性。所述位点定向多肽可在位点定向多肽的HNH核酸酶结构域中的10个连续氨基酸上与野生型位点定向多肽(例如,来自化脓性链球菌的Cas9,同上)具有至多70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%同一性。所述位点定向多肽可在位点定向多肽的RuvC核酸酶结构域中的10个连续氨基酸上与野生型位点定向多肽(例如,来自化脓性链球菌的Cas9,同上)具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%同一性。所述位点定向多肽可在位点定向多肽的RuvC核酸酶结构域中的10个连续氨基酸上与野生型位点定向多肽(例如,来自化脓性链球菌的Cas9,同上)具有至多70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或100%同一性。

[0094] 所述位点定向多肽可包含修饰形式的野生型示例性位点定向多肽。所述修饰形式的野生型示例性位点定向多肽可包含降低位点定向多肽的核酸裂解活性的突变。所述修饰形式的野生型示例性位点定向多肽可具有野生型示例性位点定向多肽(例如,来自化脓性链球菌的Cas9,同上)的核酸裂解活性的小于90%、小于80%、小于70%、小于60%、小于

50％、小于40％、小于30％、小于20％、小于10％、小于5％或小于1％。所述修饰形式的位点定向多肽可不具有实质性核酸裂解活性。当位点定向多肽是不具有实质性核酸裂解活性的修饰形式时,其在本文中称为“酶失活的”。

[0095] 所述修饰形式的位点定向多肽可包含突变,以使得其可诱导靶核酸上的单链断裂(SSB)(例如,通过切割双链靶核酸的糖-磷酸主链中的仅一个)。在一些方面,所述突变可产生野生型位点定向多肽(例如,来自化脓性链球菌的Cas9,同上)的多个核酸裂解结构域中的一个或多个中的核酸裂解活性的小于90％、小于80％、小于70％、小于60％、小于50％、小于40％、小于30％、小于20％、小于10％、小于5％或小于1％。在一些方面,所述突变可产生所述多个核酸裂解结构域中的一个或多个,从而保留裂解靶核酸的互补链的能力、但降低其裂解靶核酸的非互补链的能力。所述突变可产生所述多个核酸裂解结构域中的一个或多个,从而保留裂解靶核酸的非互补链的能力、但降低其裂解靶核酸的互补链的能力。例如,使野生型示例性化脓性链球菌Cas9多肽中的残基(如Asp10、His840、Asn854和Asn856)突变以使多个核酸裂解结构域(例如,核酸酶结构域)中的一个或多个失活。待突变的残基可对应于野生型示例性化脓性链球菌Cas9多肽中的残基Asp10、His840、Asn854和Asn856(例如,如通过序列和/或结构比对所确定)。突变的非限制性实例包括D10A、H840A、N854A或N856A。本领域技术人员将认识到除丙氨酸取代以外的突变可以是合适的。

[0096] 在一些方面,D10A突变可与H840A、N854A或N856A突变中的一个或多个组合以产生基本上缺乏DNA裂解活性的位点定向多肽。H840A突变可与D10A、N854A或N856A突变中的一个或多个组合以产生基本上缺乏DNA裂解活性的位点定向多肽。N854A突变可与H840A、D10A或N856A突变中的一个或多个组合以产生基本上缺乏DNA裂解活性的位点定向多肽。N856A突变可与H840A、N854A或D10A突变中的一个或多个组合以产生基本上缺乏DNA裂解活性的位点定向多肽。包含一个基本上无活性的核酸酶结构域的位点定向多肽被称为“切口酶”。

[0097] RNA引导的核酸内切酶(例如Cas9)的核酸酶变体可用于增加CRISPR介导的基因组编辑的特异性。野生型Cas9通常由单一指导RNA引导,所述指导RNA被设计为与靶序列(如内源性基因组基因座)中的指定约20个核苷酸的序列杂交。然而,在指导RNA与靶基因座之间可容忍若干错配,从而有效地将靶位点中所需的同源性的长度减少至例如少至13nt的同源性,并且由此产生由靶基因组中其他位置的CRISPR/Cas9复合物结合和双链核酸裂解的可能性增加-也称为脱靶裂解。因为Cas9的切口酶变体各自仅切割一条链,所以为了产生双链断裂,一对切口酶必须紧密接近且在靶核酸的相反链上结合,从而产生一对切口,其等效于双链断裂。这要求两个单独的指导RNA(每种切口酶一个)必须紧密接近且在靶核酸的相反链上结合。这一要求实质上使双链断裂发生所需的最小同源性长度加倍,从而降低双链裂解事件将在基因组中其他地方发生的可能性,其中两个指导RNA位点(如果它们存在)不太可能彼此足够接近以使得形成双链断裂。如本领域中所描述,切口酶也可用于促进HDR对比NHEJ。HDR可用于通过使用有效介导所需变化的特定供体序列将选定变化引入基因组中的靶位点中。

[0098] 预期的突变可包括取代、添加和缺失,或它们的任何组合。所述突变将突变的氨基酸转化为丙氨酸。所述突变将突变的氨基酸转化为另一种氨基酸(例如,甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、组氨酸、赖氨酸或精氨酸)。所述突变将突变的氨基

酸转化为非天然氨基酸(例如,硒代甲硫氨酸)。所述突变将突变的氨基酸转化为氨基酸模拟物(例如,磷酸模拟物)。所述突变可以是保守突变。例如,所述突变将突变的氨基酸转化为类似于所述突变氨基酸的大小、形状、电荷、极性、构象和/或旋转异构体的氨基酸(例如,半胱氨酸/丝氨酸突变、赖氨酸/天冬酰胺突变、组氨酸/苯丙氨酸突变)。所述突变可引起阅读框架的移位和/或提前终止密码子的产生。突变可引起影响一种或多种基因的表达的基因或基因座的调控区的变化。

[0099] 位点定向多肽(例如,变体、突变的、酶失活的和/或条件性酶失活的位点定向多肽)可靶向核酸。位点定向多肽(例如,变体、突变的、酶失活的和/或条件性酶失活的核糖核酸内切酶)可靶向DNA。位点定向多肽(例如,变体、突变的、酶失活的和/或条件性酶失活的核糖核酸内切酶)可靶向RNA。

[0100] 所述位点定向多肽可包含一个或多个非天然序列(例如,位点定向多肽是融合蛋白)。

[0101] 所述位点定向多肽可包含与来自细菌(例如化脓性链球菌)的Cas9具有至少15%氨基酸同一性的氨基酸序列、核酸结合结构域和两个核酸裂解结构域(即,HNH结构域和RuvC结构域)。

[0102] 所述位点定向多肽可包含与来自细菌(例如化脓性链球菌)的Cas9具有至少15%氨基酸同一性的氨基酸序列和两个核酸裂解结构域(即,HNH结构域和RuvC结构域)。

[0103] 所述位点定向多肽可包含与来自细菌(例如,化脓性链球菌)的Cas9具有至少15%氨基酸同一性的氨基酸序列和两个核酸裂解结构域,其中所述核酸裂解结构域中的一个或两个与来自源自细菌(例如,化脓性链球菌)的Cas9的核酸酶结构域具有至少50%氨基酸同一性。

[0104] 所述位点定向多肽可包含与来自细菌(例如,化脓性链球菌)的Cas9具有至少15%氨基酸同一性的氨基酸序列、两个核酸裂解结构域(即,HNH结构域和RuvC结构域)和非天然序列(例如,核定位信号)或将所述位点定向多肽连接至非天然序列的接头。

[0105] 所述位点定向多肽可包含与来自细菌(例如,化脓性链球菌)的Cas9具有至少15%氨基酸同一性的氨基酸序列、两个核酸裂解结构域(即,HNH结构域和RuvC结构域),其中所述位点定向多肽在所述核酸裂解结构域中的一个或两个中包含突变,所述突变使所述核酸酶结构域的裂解活性降低至少50%。

[0106] 所述位点定向多肽可包含与来自细菌(例如,化脓性链球菌)的Cas9具有至少15%氨基酸同一性的氨基酸序列和两个核酸裂解结构域(即,HNH结构域和RuvC结构域),其中所述核酸酶结构域中的一个包含天冬氨酸10的突变,和/或其中所述核酸酶结构域中的一个可包含组氨酸840的突变,并且其中所述突变使所述核酸酶结构域的裂解活性降低至少50%。

[0107] 一种或多种位点定向多肽(例如DNA核酸内切酶)可包含两种切口酶,所述两种切口酶一起在基因组中的特定基因座处实现一个双链断裂;或四种切口酶,所述四种切口酶一起在基因组中的特定基因座处实现或引起两个双链断裂。或者,一种位点定向多肽(例如DNA核酸内切酶)可在基因组中的特定基因座处实现或引起一个双链断裂。

[0108] 来自其他细菌菌株的Cas9直向同源物的非限制性实例包括但不限于,在以下中鉴别的Cas蛋白:海洋蓝绿菌(Acaryochloris marina)MBIC11017;阿拉伯糖醋盐杆菌

(Acetohalobium arabaticum)DSM 5501;喜温嗜酸硫杆菌(Acidithiobacillus caldus);嗜酸氧化亚铁硫杆菌(Acidithiobacillus ferrooxidans)ATCC 23270;酸热脂环酸芽孢杆菌(Alicyclobacillus acidocaldarius)LAA1;酸热脂环酸芽孢杆菌酸热亚种(Alicyclobacillus acidocaldarius subsp.acidocaldarius)DSM 446;酒色别样着色菌(Allochromatium vinosum)DSM 180;丹氏制氨菌(Ammonifex degensii)KC4;多变鱼腥藻(Anabaena variabilis)ATCC 29413;极大节旋藻(Arthrospira maxima)CS-328;钝顶节旋藻菌株Paraca(Arthrospira platensis str.Paraca);节旋藻属(Arthrospira sp.)PCC 8005;假蕈状芽孢杆菌(Bacillus pseudomycoides)DSM 12442;还原硒酸盐芽孢杆菌(Bacillus selenitireducens)MLS10;伯克氏菌目细菌(Burkholderiales bacterium)1_1_47;热解纤维素菌(Caldicelulosiruptor becscii)DSM 6725;金矿菌(Candidatus Desulforudis audaxviator)MP104C;热液口热解纤维素菌(Caldicellulosiruptor hydrothermalis)_108;梭菌属噬菌体c-st;肉毒杆菌A3菌株Loch Maree;肉毒杆菌Ba4菌株657;艰难梭菌QCD-63q42;海洋固氮蓝藻(Crocosphaera watsonii)WH 8501;蓝杆藻属(Cyanothece sp.)ATCC 51142;蓝杆藻属CCY0110;蓝杆藻属PCC 7424;蓝杆藻属PCC 7822;西伯利亚微小杆菌(Exiguobacterium sibiricum)255-15;大芬戈尔德菌(Finegoldia magna)ATCC 29328;消旋纤线杆菌(Ktedonobacter racemifer)DSM 44963;德氏乳杆菌保加利亚亚种(Lactobacillus delbrueckii subsp.bulgaricus)PB2003/044-T3-4;唾液乳杆菌(Lactobacillus salivarius)ATCC 11741;无害李斯特菌(Listeria innocua);鞘丝藻属(Lyngbya sp.)PCC 8106;海杆菌属(Marinobacter sp.)ELB17;调查甲烷盐菌(Methanohalobium evestigatum)Z-7303;微囊藻属(Microcystis)噬菌体Ma-LMM01;铜绿微囊藻(Microcystis aeruginosa)NIES-843;海洋微颤菌(Microscilla marina)ATCC 23134;原型微鞘藻(Microcoleus chthonoplastes)PCC 7420;脑膜炎奈瑟氏菌;嗜盐亚硝化球菌(Nitrosococcus halophilus)Nc4;达氏拟诺卡氏菌达氏亚种(Nocardiopsis dassonvillei subsp.dassonvillei)DSM 43111;泡沫节球藻(Nodularia spumigena)CCY9414;念珠藻属(Nostoc sp.)PCC 7120;颤藻属(Oscillatoria sp.)PCC 6506;嗜热丙酸降解菌(Pelotomaculum_thermopropionicum)_SI;运动石袍菌(Petrotoga mobilis)SJ95;食萘极单胞菌(Polaromonas naphthalenivorans)CJ2;单胞菌属(Polaromonas sp.)JS666;游海假交替单胞菌(Pseudoalteromonas haloplanktis)TAC125;始旋链霉菌(Streptomyces pristinaespiralis)ATCC 25486;始旋链霉菌ATCC 25486;嗜热链球菌;绿色产色链霉菌(Streptomyces viridochromogenes)DSM 40736;玫瑰链孢囊菌(Streptosporangium roseum)DSM 43021;聚球藻属(Synechococcus sp.)PCC 7335;以及非洲栖热腔菌(Thermosipho africanus)TCF52B(Chylinski等人,RNA Biol.,2013;10(5):726-737)。

[0109] 除了Cas9直向同源物外,其他Cas9变体如无活性dCas9的融合蛋白和具有不同功能的效子应结构域可充当遗传调节的平台。任何前述酶可用于本公开中。

[0110] 可在本公开中使用的核酸内切酶的其他实例在SEQ ID NO:1-620中给出。这些蛋白质可在使用前进行修饰,或者可在核酸序列(如DNA、RNA或mRNA)中或在载体构建体(如本文教导的质粒或AAV载体)内编码。此外,它们可以是密码子优化的。

[0111] SEQ ID NO:1-620公开了核酸内切酶序列的非穷举列表。

[0112] 靶向基因组的核酸

[0113] 本公开提供了一种靶向基因组的核酸,所述核酸引导相关多肽(例如,位点定向多肽)对靶核酸内的特异性靶序列的活性。所述靶向基因组的核酸可以是RNA。靶向基因组的RNA在本文中称为“指导RNA”或“gRNA”。指导RNA可至少包含与目标靶核酸序列和CRISPR重复序列杂交的间隔区序列。在II型系统中,所述gRNA还包含称为tracrRNA序列的第二RNA。在II型指导RNA(gRNA)中,所述CRISPR重复序列和tracrRNA序列彼此杂交以形成双链体。在V型指导RNA(gRNA)中,所述crRNA形成双链体。在两种系统中,所述双链体可结合位点定向多肽,以使得指导RNA和位点定向多肽形成复合物。所述靶向基因组的核酸凭借其与位点定向多肽的缔合可为所述复合物提供靶特异性。因此,所述靶向基因组的核酸可引导位点定向多肽的活性。

[0114] 示例性指导RNA包括序列表的SEQ ID NO:5305-125469中的间隔区序列。如本领域普通技术人员所理解的,每种指导RNA可被设计为包含与其基因组靶序列互补的间隔区序列。例如,序列表的SEQ ID NO:5305-125469中的每个间隔区序列可放入单一RNA嵌合体或crRNA(以及相应的tracrRNA)中。参见Jinek等人,Science,337,816-821(2012)和Deltcheva等人,Nature,471,602-607(2011)。

[0115] 所述靶向基因组的核酸可以是双分子指导RNA。所述靶向基因组的核酸可以是单分子指导RNA。

[0116] 双分子指导RNA可包含两条RNA链。第一链在5’至3’方向上包含任选的间隔区延伸序列、间隔区序列和最小CRISPR重复序列。第二链可包含最小tracrRNA序列(与最小CRISPR重复序列互补)、3’tracrRNA序列和任选的tracrRNA延伸序列。

[0117] II型系统中的单分子指导RNA(sgRNA)可在5’至3’方向上包含任选的间隔区延伸序列、间隔区序列、最小CRISPR重复序列、单分子指导接头、最小tracrRNA序列、3’tracrRNA序列和任选的tracrRNA延伸序列。任选的tracrRNA延伸可包含为指导RNA提供额外功能性(例如,稳定性)的元件。所述单分子引导接头可连接最小CRISPR重复序列和最小tracrRNA序列以形成发夹结构。任选的tracrRNA延伸可包含一个或多个发夹。

[0118] sgRNA可在sgRNA序列的5’端包含20个核苷酸的间隔区序列。sgRNA可在sgRNA序列的5’端包含少于20个核苷酸的间隔区序列。sgRNA可在sgRNA序列的5’端包含超过20个核苷酸的间隔区序列。sgRNA可在sgRNA序列的5’端包含具有17-30个核苷酸的可变长度间隔区序列(参见表1)。

[0119] sgRNA可在sgRNA序列(如表1的SEQ ID NO:125502中)的3’端不包含尿嘧啶。sgRNA可在sgRNA序列(如表1中的SEQ ID NO:125503中)的3’端包含一个或多个尿嘧啶。例如,sgRNA可在sgRNA序列的3’端包含1个尿嘧啶(U)。sgRNA可在sgRNA序列的3’端包含2个尿嘧啶(UU)。sgRNA可在sgRNA序列的3’端包含3个尿嘧啶(UUU)。sgRNA可在sgRNA序列的3’端包含4个尿嘧啶(UUUU)。sgRNA可在sgRNA序列的3’端包含5个尿嘧啶(UUUUU)。sgRNA可在sgRNA序列的3’端包含6个尿嘧啶(UUUUUU)。sgRNA可在sgRNA序列的3’端包含7个尿嘧啶(UUUUUUU)。sgRNA可在sgRNA序列的3’端包含8个尿嘧啶(UUUUUUUU)。

[0120] sgRNA可以是未修饰的或修饰的。例如,修饰的sgRNA可包含一个或多个2’-O-甲基硫代磷酸酯核苷酸。

[0121] 表1

[0122]

SEQ ID NO.	sgRNA 序列
125501	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugcuuuu
125502	nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnguuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuaucaacuugaaaaaguggcaccgagucggugc
125503	$n_{(17-30)}$guuuuagagcuagaaauagcaaguuaaaauaaggcuaguccguuauca

[0123]

	acuugaaaaagu ggcaccgagucggugcu$_{(1-8)}$

[0124] V型系统中的单分子指导RNA(sgRNA)可在5'至3'方向上包含最小CRISPR重复序列和间隔区序列。

[0125] 举例说明,CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1系统中使用的指导RNA或其他较小的RNA可通过化学手段容易地合成,如下文所示和本领域中所描述。虽然化学合成程序在不断扩展,但是通过诸如高效液相色谱发(HPLC,其避免使用诸如PAGE的凝胶)的程序纯化此类RNA倾向于变得更具挑战性,因为多核苷酸长度显著增加超过一百个左右的核苷酸。用于产生更大长度的RNA的一种方法是产生两个或更多个连接在一起的分子。更长的RNA(如编码Cas9或Cpf1核酸内切酶的那些)更容易酶促产生。可在化学合成和/或酶促产生RNA期间或之后引入各种类型的RNA修饰,例如增强稳定性、降低先天免疫应答的可能性或程度和/或增强其他属性的修饰,如本领域中所描述。

[0126] 间隔区延伸序列

[0127] 在靶向基因组的核酸的一些实例中,间隔区延伸序列可修饰活性,提供稳定性和/或提供靶向基因组的核酸修饰的位置。间隔区延伸序列可修饰中靶或脱靶活性或特异性。在一些实例中,可提供间隔区延伸序列。所述间隔区延伸序列可具有多于1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、1000、2000、3000、4000、5000、6000或7000或更多个核苷酸的长度。所述间隔区延伸序列可具有少于1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、1000、2000、3000、4000、5000、6000、7000或更多个核苷酸的长度。所述间隔区延伸序列的长度可少于10个核苷酸。所述间隔区延伸序列的长度可在10-30个核苷酸之间。所述间隔区延伸序列的长度可在30-70个核苷酸之间。

[0128] 所述间隔区延伸序列可包含另一个部分(例如,稳定性控制序列、核糖核酸内切酶结合序列、核酶)。所述部分可降低或增加靶向核酸的核酸的稳定性。所述部分可以是转录终止子区段(即,转录终止序列)。所述部分可在真核细胞中起作用。所述部分可在原核细胞中起作用。所述部分可在真核细胞和原核细胞两者中起作用。合适的部分的非限制性实例包括:5'帽(例如,7-甲基鸟苷酸帽(m7 G));核糖开关序列(例如,通过蛋白质和蛋白质复合物允许调控的稳定性和/或调控的可接近性);形成dsRNA双链体(即,发夹)的序列;将RNA靶向亚细胞位置(例如,细胞核、线粒体、叶绿体等)的序列;提供追踪(例如,直接缀合至荧光分子、缀合至促进荧光检测的部分、允许荧光检测的序列等)的修饰或序列;和/或提供用于蛋白质(例如,作用于DNA的蛋白质,包括转录活化物、转录阻抑物、DNA甲基转移酶、DNA脱甲基酶、组蛋白乙酰转移酶、组蛋白脱乙酰酶等)的结合位点的修饰或序列。

[0129] 间隔区序列

[0130] 所述间隔区序列与目标靶核酸中的序列杂交。靶向基因组的核酸的间隔区可经由杂交(即,碱基配对)以序列特异性方式与靶核酸相互作用。所述间隔区的核苷酸序列可根据目标靶核酸的序列而变化。

[0131] 在本文的CRISPR/Cas系统中,所述间隔区序列可被设计为与位于所述系统中使用的Cas9酶的PAM的5'的靶核酸杂交。所述间隔区可与靶序列完全匹配或可具有错配。每种Cas9酶具有它在靶DNA中识别的特定PAM序列。例如,化脓性链球菌在靶核酸中识别包含序列5'-NRG-3'的PAM,其中R包含A或G,其中N是任何核苷酸,并且N紧邻由所述间隔区序列靶向的靶核酸序列的3'。

[0132] 所述靶核酸序列可包含20个核苷酸。所述靶核酸可包含少于20个核苷酸。所述靶核酸可包含多于20个核苷酸。所述靶核酸可包含至少5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。所述靶核酸可包含至多5、10、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、30个或更多个核苷酸。所述靶核酸序列可包含紧邻PAM的第一个核苷酸的5'的20个碱基。例如,在包含5'-NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNRG-3'(SEQ ID NO:125500)的序列中,靶核酸可包含对应于N的序列,其中N是任何核苷酸,并且加下划线的NRG序列是化脓性链球菌PAM。此靶核酸序列通常被称为PAM链,并且互补核酸序列通常被称为非PAM链。本领域技术人员将认识到间隔区序列与靶核酸的非PAM链杂交(图1A和1B)。

[0133] 与靶核酸杂交的间隔区序列可具有至少约6个核苷酸(nt)的长度。所述间隔区序列可以是至少约6nt、至少约10nt、至少约15nt、至少约18nt、至少约19nt、至少约20nt、至少约25nt、至少约30nt、至少约35nt或至少约40nt、约6nt至约80nt、约6nt至约50nt、约6nt至约45nt、约6nt至约40nt、约6nt至约35nt、约6nt至约30nt、约6nt至约25nt、约6nt至约20nt、约6nt至约19nt、约10nt至约50nt、约10nt至约45nt、约10nt至约40nt、约10nt至约35nt、约10nt至约30nt、约10nt至约25nt、约10nt至约20nt、约10nt至约19nt、约19nt至约25nt、约19nt至约30nt、约19nt至约35nt、约19nt至约40nt、约19nt至约45nt、约19nt至约50nt、约19nt至约60nt、约20nt至约25nt、约20nt至约30nt、约20nt至约35nt、约20nt至约40nt、约20nt至约45nt、约20nt至约50nt或约20nt至约60nt。在一些实例中,所述间隔区序列可包含20个核苷酸。在一些实例中,所述间隔区可包含19个核苷酸。在一些实例中,所述间隔区可包含18个核苷酸。在一些实例中,所述间隔区可包含22个核苷酸。

[0134] 在一些实例中,所述间隔区序列与所述靶核酸之间的互补性百分比是至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约97%、至少约98%、至少约99%或100%。在一些实例中,所述间隔区序列与所述靶核酸之间的互补性百分比是至多约30%、至多约40%、至多约50%、至多约60%、至多约65%、至多约70%、至多约75%、至多约80%、至多约85%、至多约90%、至多约95%、至多约97%、至多约98%、至多约99%或100%。在一些实例中,所述间隔区序列与所述靶核酸之间的互补性百分比是在所述靶核酸的互补链的靶序列的六个连续最5'端核苷酸上100%。所述间隔区序列与所述靶核酸之间的互补性百分比可以是在约20个连续核苷酸上至少60%。所述间隔区序列和所述靶核酸的长度可相差1至6个核苷酸,这可被认为是一个或多个凸起。

[0135] 可使用计算机程序设计或选择间隔区序列。计算机程序可使用变量,如预测的解

链温度、二级结构形成、预测的退火温度、序列同一性、基因组背景、染色质可接近性、%GC、基因组出现(例如,相同或相似但由于错配、插入或缺失而在一个或多个斑点中变化的序列)的频率、甲基化状态、SNP的存在等。

[0136] 最小CRISPR重复序列

[0137] 在一些方面,最小CRISPR重复序列是与参考CRISPR重复序列(例如,来自化脓性链球菌的crRNA)具有至少约30%、约40%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或100%序列同一性的序列。

[0138] 在一些方面,最小CRISPR重复序列包含可与细胞中的最小tracrRNA序列杂交的核苷酸。所述最小CRISPR重复序列和最小tracrRNA序列可形成双链体,即碱基配对的双链结构。所述最小CRISPR重复序列和所述最小tracrRNA序列一起可结合至位点定向多肽。所述最小CRISPR重复序列的至少一部分可与最小tracrRNA序列杂交。所述最小CRISPR重复序列的至少一部分可包含与最小tracrRNA序列至少约30%、约40%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或100%互补。在一些方面,所述最小CRISPR重复序列的至少一部分包含与最小tracrRNA序列至多约30%、约40%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或100%互补。

[0139] 所述最小CRISPR重复序列可具有约7个核苷酸至约100个核苷酸的长度。例如,所述最小CRISPR重复序列的长度是约7个核苷酸(nt)至约50nt、约7nt至约40nt、约7nt至约30nt、约7nt至约25nt、约7nt至约20nt、约7nt至约15nt、约8nt至约40nt、约8nt至约30nt、约8nt至约25nt、约8nt至约20nt、约8nt至约15nt、约15nt至约100nt、约15nt至约80nt、约15nt至约50nt、约15nt至约40nt、约15nt至约30nt或约15nt至约25nt。在一些方面,所述最小CRISPR重复序列的长度是大约9个核苷酸。在一些方面,所述最小CRISPR重复序列的长度是大约12个核苷酸。

[0140] 所述最小CRISPR重复序列可与参考最小CRISPR重复序列(例如,来自化脓性链球菌的野生型crRNA)在一段至少6、7或8个连续核苷酸上至少约60%相同。例如,所述最小CRISPR重复序列可与参考最小CRISPR重复序列在一段至少6、7或8个连续核苷酸上至少约65%相同、至少约70%相同、至少约75%相同、至少约80%相同、至少约85%相同、至少约90%相同、至少约95%相同、至少约98%相同、至少约99%相同或100%相同。

[0141] 最小tracrRNA序列

[0142] 最小tracrRNA序列可以是与参考tracrRNA序列(例如,来自化脓性链球菌的野生型tracrRNA)具有至少约30%、约40%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或100%序列同一性的序列。

[0143] 最小tracrRNA序列可包含与细胞中的最小CRISPR重复序列杂交的核苷酸。最小tracrRNA序列和最小CRISPR重复序列形成双链体,即碱基配对的双链结构。所述最小tracrRNA序列和所述最小CRISPR重复序列一起可结合至位点定向多肽。所述最小tracrRNA序列的至少一部分可与最小CRISPR重复序列杂交。所述最小tracrRNA序列可与最小CRISPR重复序列至少约30%、约40%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或100%互补。

[0144] 所述最小tracrRNA序列可具有约7个核苷酸至约100个核苷酸的长度。例如,所述最小tracrRNA序列可以是约7个核苷酸(nt)至约50nt、约7nt至约40nt、约7nt至约30nt、约

7nt至约25nt、约7nt至约20nt、约7nt至约15nt、约8nt至约40nt、约8nt至约30nt、约8nt至约25nt、约8nt至约20nt、约8nt至约15nt、约15nt至约100nt、约15nt至约80nt、约15nt至约50nt、约15nt至约40nt、约15nt至约30nt或约15nt至约25nt长。所述最小tracrRNA序列的长度可以是大约9个核苷酸。所述最小tracrRNA序列可以是大约12个核苷酸。所述最小tracrRNA可由Jinek等人,同上中描述的tracrRNA nt 23-48组成。

[0145] 所述最小tracrRNA序列可与参考最小tracrRNA(例如,来自化脓性链球菌的野生型tracrRNA)序列在一段至少6、7或8个连续核苷酸上至少约60％相同。例如,所述最小tracrRNA序列可与参考最小tracrRNA序列在一段至少6、7或8个连续核苷酸上至少约65％相同、约70％相同、约75％相同、约80％相同、约85％相同、约90％相同、约95％相同、约98％相同、约99％相同或100％相同。

[0146] 所述最小CRISPR RNA与所述最小tracrRNA之间的双链体可包含双螺旋。所述最小CRISPR RNA与所述最小tracrRNA之间的双链体可包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个核苷酸。所述最小CRISPR RNA与所述最小tracrRNA之间的双链体可包含至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个核苷酸。

[0147] 所述双链体可包含错配(即,所述双链体的两条链不是100％互补的)。所述双链体可包含至少约1、2、3、4或5个或错配。所述双链体可包含至多约1、2、3、4或5个或错配。所述双链体可包含不超过2个错配。

[0148] 凸起

[0149] 在一些情况下,在最小CRISPR RNA与最小tracrRNA之间的双链体中可能存在“凸起”。凸起是双链体内未配对的核苷酸区域。凸起可有助于双链体与位点定向多肽的结合。凸起可在双链体的一侧上包含未配对的5’-XXXY-3’,其中X是任何嘌呤,并且Y包含可与相反链上的核苷酸形成摆动对的核苷酸和在所述双联体的另一侧上的未配对的核苷酸区域。所述双链体两侧上的未配对核苷酸的数量可不同。

[0150] 在一个实例中,凸起可包含凸起的最小CRISPR重复序列链上的未配对的嘌呤(例如腺嘌呤)。在一些实例中,凸起可包含凸起的最小tracrRNA序列链的未配对的5’-AAGY-3’,其中Y包含可与最小CRISPR重复序列链上的核苷酸形成摆动配对的核苷酸。

[0151] 所述双链体的最小CRISPR重复序列侧上的凸起可包含至少1、2、3、4或5个或更多个未配对的核苷酸。所述双链体的最小CRISPR重复序列侧上的凸起可包含至多1、2、3、4或5个或更多个未配对的核苷酸。所述双链体的最小CRISPR重复序列侧上的凸起可包含1个未配对的核苷酸。

[0152] 所述双链体的最小tracrRNA序列侧上的凸起可包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个未配对的核苷酸。所述双链体的最小tracrRNA序列侧上的凸起可包含至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个未配对的核苷酸。所述双链体的第二侧(例如,双链体的最小tracrRNA序列侧)上的凸起可包含4个未配对的核苷酸。

[0153] 凸起可包含至少一个摆动配对。在一些实例中,凸起可包含至多一个摆动配对。凸起可包含至少一个嘌呤核苷酸。凸起可包含至少3个嘌呤核苷酸。凸起序列可包含至少5个嘌呤核苷酸。凸起序列可包含至少一个鸟嘌呤核苷酸。在一些实例中,凸起序列可包含至少一个腺嘌呤核苷酸。

[0154] 发夹

[0155] 在各种实例中,一个或多个发夹可位于3'tracrRNA序列中的最小tracrRNA的3'。

[0156] 发夹可从最小CRISPR重复序列和最小tracrRNA序列双链体中的最后一个配对核苷酸的3'的至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个或更多个核苷酸处起始。发夹可从最小CRISPR重复序列和最小tracrRNA序列双链体中的最后一个配对核苷酸的3'的至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个核苷酸处起始。

[0157] 发夹可包含至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个或更多个连续核苷酸。发夹可包含至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15个或更多个连续核苷酸。

[0158] 发夹可包含CC二核苷酸(即,两个连续的胞嘧啶核苷酸)。

[0159] 发夹可包含双链体核苷酸(例如,发夹中的核苷酸,一起杂交)。例如,发夹可包含CC二核苷酸,其与3'tracrRNA序列的发夹双链体中的GG二核苷酸杂交。

[0160] 一个或多个发夹可与位点定向多肽的指导RNA相互作用区域相互作用。

[0161] 在一些实例中,存在两个或更多个发夹,并且在其他实例中,存在三个或更多个发夹。

[0162] 3'tracrRNA序列

[0163] 3'tracrRNA序列可包含与参考tracrRNA序列(例如,来自化脓性链球菌的tracrRNA)具有至少约30%、约40%、约50%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%或100%序列同一性的序列。

[0164] 所述3'tracrRNA序列可具有约6个核苷酸至约100个核苷酸的长度。例如,所述3'tracrRNA序列可具有约6个核苷酸(nt)至约50nt、约6nt至约40nt、约6nt至约30nt、约6nt至约25nt、约6nt至约20nt、约6nt至约15nt、约8nt至约40nt、约8nt至约30nt、约8nt至约25nt、约8nt至约20nt、约8nt至约15nt、约15nt至约100nt、约15nt至约80nt、约15nt至约50nt、约15nt至约40nt、约15nt至约30nt或约15nt至约25nt的长度。所述3'tracrRNA序列可具有大约14个核苷酸的长度。

[0165] 所述3'tracrRNA序列可与参考3'tracrRNA序列(例如,来自化脓性链球菌的野生型3'tracrRNA序列)在一段至少6、7或8个连续核苷酸上至少约60%相同。例如,所述3'tracrRNA序列可与参考3'tracrRNA序列(例如,来自化脓性链球菌的野生型3'tracrRNA序列)在一段至少6、7或8个连续核苷酸上至少约60%相同、约65%相同、约70%相同、约75%相同、约80%相同、约85%相同、约90%相同、约95%相同、约98%相同、约99%相同或100%相同。

[0166] 所述3'tracrRNA序列可包含多于一个双链体区域(例如,发夹、杂交区)。所述3'tracrRNA序列可包含两个双链体区域。

[0167] 所述3'tracrRNA序列可包含茎环结构。所述3'tracrRNA中的茎环结构可包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个或更多个核苷酸。所述3'tracrRNA中的茎环结构可包含至多1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个或更多个核苷酸。所述茎环结构可包含功能部分。例如,所述茎环结构可包含适体、核酶、蛋白质相互作用发夹、CRISPR阵列、内含子或外显子。所述茎环结构可包含至少约1、2、3、4或5个或更多个功能部分。所述茎环结构可包含至多约1、2、3、4或5个或更多个功能部分。

[0168] 所述3'tracrRNA序列中的发夹可包含P结构域。在一些实例中,所述P结构域可包含发夹中的双链体区域。

[0169] tracrRNA延伸序列

[0170] 无论tracrRNA是在单分子指导还是双分子指导的背景下,都可提供tracrRNA延伸序列。所述tracrRNA延伸序列可具有约1个核苷酸至约400个核苷酸的长度。所述tracrRNA延伸序列可具有多于1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380或400个核苷酸的长度。所述tracrRNA延伸序列可具有约20至约5000或更多个核苷酸的长度。所述tracrRNA延伸序列可具有多于1000个核苷酸的长度。所述tracrRNA延伸序列可具有少于1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400个或更多个核苷酸的长度。所述tracrRNA延伸序列可具有少于1000个核苷酸的长度。所述tracrRNA延伸序列的长度可包含少于10个核苷酸。所述tracrRNA延伸序列的长度可以是10-30个核苷酸。所述tracrRNA延伸序列的长度可以是30-70个核苷酸。

[0171] 所述tracrRNA延伸序列可包含功能部分(例如,稳定性控制序列、核酶、核糖核酸内切酶结合序列)。所述功能部分可包含转录终止子区段(即转录终止序列)。所述功能部分可具有约10个核苷酸(nt)至约100个核苷酸、约10nt至约20nt、约20nt至约30nt、约30nt至约40nt、约40nt至约50nt、约50nt至约60nt、约60nt至约70nt、约70nt至约80nt、约80nt至约90nt、或约90nt至约100nt、约15nt至约80nt、约15nt至约50nt、约15nt至约40nt、约15nt至约30nt或约15nt至约25nt的总长度。所述功能部分可在真核细胞中起作用。所述功能部分可在原核细胞中起作用。所述功能部分可在真核细胞和原核细胞两者中起作用。

[0172] 合适的tracrRNA延伸功能部分的非限制性实例包括:3'聚腺苷酸化尾;核糖开关序列(例如,通过蛋白质和蛋白质复合物允许调控的稳定性和/或调控的可接近性);形成dsRNA双链体(即,发夹)的序列;将RNA靶向亚细胞位置(例如,细胞核、线粒体、叶绿体等)的序列;提供追踪(例如,直接缀合至荧光分子、缀合至促进荧光检测的部分、允许荧光检测的序列等)的修饰或序列;和/或提供用于蛋白质(例如,作用于DNA的蛋白质,包括转录活化物、转录阻抑物、DNA甲基转移酶、DNA脱甲基酶、组蛋白乙酰转移酶、组蛋白脱乙酰酶等)的结合位点的修饰或序列。所述tracrRNA延伸序列可包含引物结合位点或分子索引(例如,条形码序列)。所述tracrRNA延伸序列可包含一个或多个亲和标签。

[0173] 单分子指导接头序列

[0174] 单分子指导核酸的接头序列可具有约3个核苷酸至约100个核苷酸的长度。在Jinek等人,同上中,例如使用简单的4个核苷酸的"四核苷酸环"(-GAAA-),Science,337(6096):816-821(2012)。说明性接头具有约3个核苷酸(nt)至约90nt、约3nt至约80nt、约3nt至约70nt、约3nt至约60nt、约3nt至约50nt、约3nt至约40nt、约3nt至约30nt、约3nt至约20nt、约3nt至约10nt的长度。例如,所述接头可具有约3nt至约5nt、约5nt至约10nt、约10nt至约15nt、约15nt至约20nt、约20nt至约25nt、约25nt至约30nt、约30nt至约35nt、约35nt至约40nt、约40nt至约50nt、约50nt至约60nt、约60nt至约70nt、约70nt至约80nt、约80nt至约90nt或约90nt至约100nt的长度。单分子指导核酸的接头可以是4与40个核苷酸之间。所述接头可以是至少约100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500或7000个或更多个核苷酸。所述接头可以是至多约100、500、1000、1500、2000、2500、3000、3500、4000、4500、5000、5500、6000、6500或7000个或更多个核苷酸。

[0175] 接头可包含多种序列中的任一种,但在一些实例中,接头将不包含与指导RNA的其

他部分具有广泛同源区域的序列,这可能导致可干扰指导的其他功能区域的分子内结合。在Jinek等人,同上中,使用简单的4个核苷酸的序列-GAAA-,Science,337(6096):816-821(2012),但是同样可使用许多其他序列,包括更长的序列。

[0176] 接头序列可包含功能部分。例如,接头序列可包含一个或多个特征,包括适体、核酶、蛋白质相互作用发夹、蛋白质结合位点、CRISPR阵列、内含子或外显子。接头序列可包含至少约1、2、3、4或5个或更多个功能部分。在一些实例中,接头序列可包含至多约1、2、3、4或5个或更多个功能部分。

[0177] 核酸修饰(化学修饰和结构修饰)

[0178] 在一些方面,引入细胞中的多核苷酸可包含可单独或组合使用的一种或多种修饰,例如以增强活性、稳定性或特异性,改变递送,减少宿主细胞中的先天性免疫应答,或用于其他增强,如本文中进一步描述和本领域中已知的。

[0179] 在某些实例中,修饰的多核苷酸可用于CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1系统中,在这种情况下,指导RNA(单分子指导或双分子指导)和/或编码引入细胞中的Cas9或Cpf1核酸内切酶的DNA或RNA可进行修饰,如文下所描述和说明的。此类修饰的多核苷酸可用于CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1系统中以编辑任何一个或多个基因组基因座。

[0180] 出于此类用途的非限制性说明的目的使用CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1系统,可使用指导RNA的修饰来增强包含指导RNA(其可以是单分子指导或双分子)以及Cas9或Cpf1核酸内切酶的CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1基因组编辑复合物的形成或稳定性。指导RNA的修饰也可或替代地用于增强基因组编辑复合物与基因组中的靶序列之间的相互作用的起始、稳定性或动力学,其可用于例如增强中靶活性。指导RNA的修饰也可或替代地用于增强特异性,例如与在其他(脱靶)位点处的作用相比在中靶位点处的基因组编辑的相对速率。

[0181] 修饰也可或替代地用于增加指导RNA的稳定性,例如通过增加其对细胞中存在的核糖核酸酶(RNA酶)降解的抗性,从而使其在细胞中的半衰期增加。增强指导RNA半衰期的修饰在将Cas9或Cpf1核酸内切酶经由需要翻译以产生核酸内切酶的RNA引入待编辑的细胞的方面特别有用,因为增加与编码核酸内切酶的RNA同时引入的指导RNA的半衰期可用于增加指导RNA和编码的Cas9或Cpf1核酸内切酶在细胞中共存的时间。

[0182] 修饰也可或替代地用于降低引入细胞中的RNA引发先天性免疫应答的可能性或程度。已经在RNA干扰(RNAi),包括小干扰RNA(siRNA)的背景下充分表征的此类应答(如下文和本领域中所描述)倾向于与RNA的半衰期降低和/或与免疫应答相关的细胞因子或其他因子的引发相关。

[0183] 还可对编码引入细胞中的核酸内切酶的RNA进行一种或多种类型的修饰,包括但不限于增强RNA稳定性的修饰(如通过增加其通过细胞中存在的RNA酶降解)、增强所得产物(即核酸内切酶)的翻译的修饰和/或降低引入细胞的RNA引发先天性免疫应答的可能性或程度的修饰。

[0184] 同样可使用诸如前述和其他的修饰的组合。在CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1的情况下,例如可对指导RNA进行一种或多种类型的修饰(包括上文例示的那些),和/或可对编码Cas核酸内切酶的RNA进行一种或多种类型的修饰(包括上文例示的那些)。

[0185] 举例说明,CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1系统中使用的指导RNA或其他较小的RNA可通过化学手段容易地合成,从而使得能够容易地并入许多修饰,如下文所示和本领域中所

描述。虽然化学合成程序在不断扩展,但是通过诸如高效液相色谱发(HPLC,其避免使用诸如PAGE的凝胶)的程序纯化此类RNA倾向于变得更具挑战性,因为多核苷酸长度显著增加超过一百个左右的核苷酸。可用于产生更大长度的化学修饰的RNA的一种方法是产生两个或更多个连接在一起的分子。更长的RNA(如编码Cas9核酸内切酶的那些)更容易酶促产生。虽然可用于酶促产生的RNA的修饰类型较少,但仍存在可用于例如增强稳定性、降低先天性免疫应答的可能性或程度和/或增强其他属性的修饰,如下文和本领域中所进一步描述的;并且正在定期开发新的修饰类型。

[0186] 作为各种类型的修饰的说明,特别是经常用于较小化学合成的RNA的那些修饰,修饰可包含在糖的2'位置修饰的一个或多个核苷酸,在一些方面包含2'-O-烷基、2'-O-烷基-O-烷基或2'-氟代修饰的核苷酸。在一些实例中,RNA修饰包括嘧啶的核糖、RNA的3'端处的无碱基残基或倒置碱基上的2'-氟、2'-氨基以及2'-O-甲基修饰。此类修饰按照常规并入寡核苷酸中并且这些寡核苷酸已显示针对给定靶标具有比2'-脱氧寡核苷酸更高的Tm(即,更高的靶标结合亲和力)。

[0187] 多个核苷酸和核苷修饰已显示使得并入它们的寡核苷酸对核酸酶消化比天然寡核苷酸具有更大的抗性;这些修饰的寡核苷酸比未修饰的寡核苷酸完整存留更长的时间。修饰的寡核苷酸的具体实例包括以下那些,它们包含修饰的主链,例如,硫代磷酸酯、磷酸三酯、甲基膦酸酯、短链烷基或环烷基糖间键联或短链杂原子或杂环糖间键联。一些寡核苷酸是具有硫代磷酸酯主链的寡核苷酸和具有杂原子主链的那些,特别是CH_2-NH-O-CH_2、CH、~N(CH_3)~O~CH_2(已知为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI主链)、CH_2-O-N(CH_3)-CH_2、CH_2-N(CH_3)-N(CH_3)-CH_2和O-N(CH_3)-CH_2-CH_2主链,其中天然的磷酸二酯主链表示为O-P-O-CH);酰胺主链[参见De Mesmaeker等人,Ace.Chem.Res.,28:366-374(1995)];吗啉代主链结构(参见Summerton和Weller,美国专利号5,034,506);肽核酸(PNA)主链(其中寡核苷酸的磷酸二酯主链被聚酰胺主链置换,核苷酸直接或间接地结合至所述聚酰胺主链的氮杂氮原子,参见Nielsen等人,Science 1991,254,1497)。含磷的键联包括但不限于硫代磷酸酯、手性硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、磷酸三酯、氨基烷基磷酸三酯、甲基以及其他烷基膦酸酯(包括3'亚烷基膦酸酯和手性膦酸酯)、亚膦酸酯、氨基磷酸酯(包括3'-氨基氨基磷酸酯和氨基烷基氨基磷酸酯)、硫代氨基磷酸酯、硫代烷基膦酸酯、硫代烷基磷酸三酯,以及具有正常3'-5'键联的硼烷磷酸酯、这些硼烷磷酸酯的2'-5'连接类似物,以及其中相邻对的核苷单位以3'-5'至5'-3'或2'-5'至5'-2'来连接的、具有反向极性的那些,参见美国专利号3,687,808;4,469,863;4,476,301;5,023,243;5,177,196;5,188,897;5,264,423;5,276,019;5,278,302;5,286,717;5,321,131;5,399,676;5,405,939;5,453,496;5,455,233;5,466,677;5,476,925;5,519,126;5,536,821;5,541,306;5,550,111;5,563,253;5,571,799;5,587,361;以及5,625,050。

[0188] 基于吗啉代的低聚化合物描述于Braasch和David Corey,Biochemistry,41(14):4503-4510(2002);Genesis,第30卷,第3期,(2001);Heasman,Dev.Biol.,243:209-214(2002);Nasevicius等人,Nat.Genet.,26:216-220(2000);Lacerra等人,Proc.Natl.Acad.Sci.,97:9591-9596(2000);以及1991年7月23日发布的美国专利号5,034,506中。

[0189] 环己烯基核酸寡核苷酸模拟物描述于Wang等人,J.Am.Chem.Soc.,122:8595-8602

(2000)中。

[0190] 其中不包括磷原子的经过修饰的寡核苷酸主链具有由短链烷基或环烷基核苷间键联、混合杂原子和烷基或环烷基核苷间键联或一个或多个短链杂原子或杂环核苷间键联形成的主链。这些包括具有吗啉键联(部分地由核苷的糖部分形成)的那些主链;硅氧烷主链;硫化物、亚砜以及砜主链;甲乙酰基和硫代甲乙酰基主链;亚甲基甲乙酰基和硫代甲乙酰基主链;含烯烃的主链;氨基磺酸酯主链;亚甲基亚氨基以及亚甲基肼基骨架;磺酸酯和磺酰胺主链;酰胺主链;以及具有混合N、O、S和CH_2组成部分的其他主链,参见美国专利号5,034,506;5,166,315;5,185,444;5,214,134;5,216,141;5,235,033;5,264,562;5,264,564;5,405,938;5,434,257;5,466,677;5,470,967;5,489,677;5,541,307;5,561,225;5,596,086;5,602,240;5,610,289;5,602,240;5,608,046;5,610,289;5,618,704;5,623,070;5,663,312;5,633,360;5,677,437;以及5,677,439。

[0191] 还可包括一个或多个取代的糖部分,例如,在2'位置处的以下各项中的一者:OH、SH、SCH_3、F、OCN、OCH_3 OCH_3、OCH_3 $O(CH_2)nCH_3$、$O(CH_2)n$ NH_2或$O(CH_2)n$ CH_3,其中n是1至约10;C1至C10低级烷基、烷氧基烷氧基、取代的低级烷基、烷芳基或芳烷基;Cl;Br;CN;CF_3;OCF_3;O-、S-或N-烷基;O-、S-或N-烯基;$SOCH_3$;SO_2 CH_3;ONO_2;NO_2;N_3;NH_2;杂环烷基;杂环烷芳基;氨基烷基氨基;多烷基氨基;取代的甲硅烷基;RNA裂解基团;报告基团;嵌入剂;用于改善寡核苷酸的药物代谢动力学性质的基团;或用于改善寡核苷酸的药效学性质的基团以及具有类似性质的其他取代基。在一些方面,修饰包括2'-甲氧基乙氧基(2'-O-$CH_2CH_2OCH_3$,也称为2'-O-(2-甲氧基乙基))(Martin等人,HeIv.Chim.Acta,1995,78,486)。其他修饰包括2'-甲氧基(2'-O-CH_3)、2'-丙氧基(2'-OCH_2 CH_2CH_3)以及2'-氟代(2'-F)。类似的修饰还可在寡核苷酸的其他位置处,尤其是3'末端核苷酸上糖的3'位置以及5'末端核苷酸的5'位置上进行。寡核苷酸还可具有糖模拟物(如环丁基)来代替戊呋喃糖基。

[0192] 在一些实例中,核苷酸单元的糖与核苷间键联(即,主链)两者均可被新基团置换。可维持碱基单元用于与适当的核酸靶化合物杂交。这样一种低聚化合物(已显示具有优异的杂交性质的寡核苷酸模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖主链可被含酰胺的主链,例如氨基乙基甘氨酸主链置换。核碱基可被保留并且直接或间接地结合至主链的酰胺部分的氮杂氮原子。教导PNA化合物的制备的代表性美国专利包括但不限于:美国专利号5,539,082;5,714,331和5,719,262。PNA化合物的其他教义可在Nielsen等人,Science,254:1497-1500(1991)中找到。

[0193] 指导RNA还可另外或可替代地包括核碱基(本领域中经常简单地称为“碱基”)修饰或取代。如本文所用,“未修饰的”或“天然的”核碱基包括腺嘌呤(A)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)以及尿嘧啶(U)。经修饰的核碱基包括在天然核酸中仅很少或短暂存在的核碱基,例如次黄嘌呤、6-甲基腺嘌呤、5-甲基嘧啶(特别是5-甲基胞嘧啶,也称为5-甲基-2'脱氧胞嘧啶并且在本领域中常称为5-Me-C)、5-羟甲基胞嘧啶(HMC)、糖基HMC和龙胆二糖基HMC;以及合成的核碱基,例如2-氨基腺嘌呤、2-(甲基氨基)腺嘌呤、2-(咪唑基烷基)腺嘌呤、2-(氨基烷基氨基)腺嘌呤或其他杂取代的烷基腺嘌呤、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羟甲基尿嘧啶、8-氮鸟嘌呤、7-脱氮鸟嘌呤、N6(6-氨基己基)腺嘌呤和2,6-二氨基嘌呤。Kornberg,A.,DNA Replication,W.H.Freeman&Co.,San Francisco,第75-77页(1980);Gebeyehu等人.,Nucl.Acids Res.15:4513(1997)。还可包括本领域中已知的“通

用”碱基,例如肌苷。已显示5-Me-C取代使核酸双链体稳定性提高0.6℃-1.2℃。(Sanghvi,Y.S.,于Crooke,S.T.和Lebleu,B.,编辑,Antisense Research and Applications,CRC Press,Boca Raton,1993,第276-278页)并且是碱基取代的方面。

[0194] 修饰的核碱基可包括其他合成以及天然的核碱基,如5-甲基胞嘧啶(5-me-C)、5-羟甲基胞嘧啶、黄嘌呤、次黄嘌呤、2-氨基腺嘌呤、腺嘌呤和鸟嘌呤的6-甲基以及其他烷基衍生物、腺嘌呤和鸟嘌呤的2-丙基以及其他烷基衍生物、2-硫尿嘧啶、2-硫胸腺嘧啶以及2-硫胞嘧啶、5-卤代尿嘧啶以及胞嘧啶、5-丙炔基尿嘧啶以及胞嘧啶,6-偶氮基尿嘧啶、胞嘧啶以及胸腺嘧啶,5-尿嘧啶(假尿嘧啶)、4-硫尿嘧啶,8-卤基、8-氨基、8-氢硫基、8-硫烷基、8-羟基以及其他8-取代腺嘌呤和鸟嘌呤,5-卤基尤其5-溴、5-三氟甲基以及其他5-取代的尿嘧啶和胞嘧啶、7-甲基鸟嘌呤和7-甲基腺嘌呤、8-氮杂鸟嘌呤和8-氮杂腺嘌呤、7-脱氮杂鸟嘌呤和7-脱氮腺嘌呤、以及3-脱氮鸟嘌呤和3-脱氮腺嘌呤。

[0195] 此外,核碱基可包括美国专利号3,687,808中公开的那些;’The Concise Encyclopedia of Polymer Science And Engineering’,第858-859页,Kroschwitz,J.I.,编辑John Wiley&Sons,1990中公开的那些;Englisch等人,Angewandle Chemie、INternational Edition’,1991,30,第613页公开的那些;以及Sanghvi,Y.S.,第15章,Antisense Research and Applications’,第289-302页,Crooke,S.T.和Lebleu,B.编辑,CRC Press,1993公开的那些。这些核碱基中的某些特别适用于提高本公开的低聚化合物的结合亲和力。这些包括5-取代的嘧啶、6-氮杂嘧啶以及N-2、N-6和O-6取代的嘌呤,包括2-氨基丙基腺嘌呤、5-丙炔基尿嘧啶以及5-丙炔基胞嘧啶。已显示5-甲基胞嘧啶取代使核酸双链体稳定性增加0.6℃-1.2℃(Sanghvi,Y.S.,Crooke,S.T.和Lebleu,B.,编辑,’Antisense Research and Applications’,CRC Press,Boca Raton,1993,第276-278页)并且是碱基取代的方面,甚至更特别地当与2’-O-甲氧基乙基糖修饰组合时。修饰的核碱基描述于美国专利号3,687,808和4,845,205;5,130,302;5,134,066;5,175,273;5,367,066;5,432,272;5,457,187;5,459,255;5,484,908;5,502,177;5,525,711;5,552,540;5,587,469;5,596,091;5,614,617;5,681,941;5,750,692;5,763,588;5,830,653;6,005,096;以及美国专利申请公布2003/0158403中。

[0196] 因此,术语“修饰的”是指并入指导RNA、核酸内切酶或指导RNA和核酸内切酶两者中的非天然糖、磷酸或碱基。不必在给定寡核苷酸中的所有位置上均一修饰,并且实际上可将多于一种上述修饰并入单一寡核苷酸中或者甚至并入寡核苷酸内的单一核苷中。

[0197] 编码核酸内切酶的指导RNA和/或mRNA(或DNA)可与增强寡核苷酸的活性、细胞分布或细胞摄取的一种或多种部分或缀合物化学连接。此类部分包括但不限于脂质部分如胆固醇部分[Letsinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,86:6553-6556(1989)];胆酸[Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Let.,4:1053-1060(1994)];硫醚,例如,己基-S-三苯甲基硫醇[Manoharan等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,660:306-309(1992)和Manoharan等人,Bioorg.Med.Chem.Let.,3:2765-2770(1993)];硫代胆固醇[Oberhauser等人,Nucl.Acids Res.,20:533-538(1992)];脂族链,例如十二烷二醇或十一烷基残基[Kabanov等人,FEBS Lett.,259:327-330(1990)和Svinarchuk等人,Biochimie,75:49-54(1993)];磷脂,例如二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-磷酸酯[Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,36:3651-3654(1995)和Shea等人,Nucl.Acids

Res.,18:3777-3783(1990)];聚胺或聚乙二醇链[Mancharan等人,Nucleosides&Nucleotides,14:969-973(1995)];金刚烷乙酸[Manoharan等人,Tetrahedron Lett.,36:3651-3654(1995)];棕榈基部分[(Mishra等人,Biochim.Biophys.Acta,1264:229-237(1995)];或十八烷基胺或己基氨基-羰基-羟胆固醇部分[Crooke等人,J.Pharmacol.Exp.Ther.,277:923-937(1996)]。还参见美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717;5,580,731;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203;5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928和5,688,941。

[0198] 糖和其他部分可用于将包含核苷酸的蛋白质和复合物(如阳离子多核糖体和脂质体)靶向特定位点。例如,肝细胞定向转移可经由去唾液酸糖蛋白受体(ASGPR)介导;参见例如,Hu等人,Protein Pept Lett.21(10):1025-30(2014)。本领域中已知的和定期开发的其他系统可用于将本发明案例中使用的生物分子和/或其复合物靶向特定的目标靶细胞。

[0199] 这些靶向部分或缀合物可包括共价结合至诸如伯羟基或仲羟基的官能团的缀合物基团。本发明的缀合物基团包括嵌入剂、报告分子、聚胺、聚酰胺、聚乙二醇、聚醚、增强低聚物的药效学性质的基团以及增强低聚物的药物代谢动力学性质的基团。典型的缀合物基团包括胆固醇、脂质、磷脂、生物素、吩嗪、叶酸、菲啶、蒽醌、吖啶、荧光素、罗丹明、香豆素以及染料。在本公开的背景中增强药效学性质的基团包括提高吸收、增强对降解的抗性和/或加强与靶核酸的序列特异性杂交的基团。在本公开的背景中增强药物代谢动力学性质的基团包括提高对本公开的化合物的摄取、分布、代谢或排泄的基团。代表性的缀合物基团在1992年10月23日提交的国际专利申请号PCT/US92/09196(公布为WO1993007883)和美国专利号6,287,860中公开。缀合物部分包括但不限于脂质部分(如胆固醇部分)、胆酸、硫醚(例如,己基-5-三苯甲基硫醇)、硫代胆固醇、脂族链(例如,十二烷二醇或十一烷基残基)、磷脂(例如,二-十六烷基-外消旋-甘油或三乙基铵1,2-二-O-十六烷基-外消旋-甘油-3-H-膦酸酯)、聚胺或聚乙二醇链,或金刚烷乙酸、棕榈基部分,或十八烷基胺或己基氨基-羰基-羟胆固醇部分。参见例如,美国专利号4,828,979;4,948,882;5,218,105;5,525,465;5,541,313;5,545,730;5,552,538;5,578,717,5,580,731;5,580,731;5,591,584;5,109,124;5,118,802;5,138,045;5,414,077;5,486,603;5,512,439;5,578,718;5,608,046;4,587,044;4,605,735;4,667,025;4,762,779;4,789,737;4,824,941;4,835,263;4,876,335;4,904,582;4,958,013;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,082,830;5,112,963;5,214,136;5,245,022;5,254,469;5,258,506;5,262,536;5,272,250;5,292,873;5,317,098;5,371,241;5,391,723;5,416,203,5,451,463;5,510,475;5,512,667;5,514,785;5,565,552;5,567,810;5,574,142;5,585,481;5,587,371;5,595,726;5,597,696;5,599,923;5,599,928以及5,688,941。

[0200] 较不易于化学合成并且通常通过酶促合成产生的较长多核苷酸也可通过各种方

法进行修饰。此类修饰可包括,例如,引入某些核苷酸类似物、在分子的5'或3'端并入特定序列或其他部分以及其他修饰。举例来说,编码Cas9的mRNA的长度是大约4kb,并且可通过体外转录合成。对mRNA的修饰可应用于例如增加其翻译或稳定性(如通过增加其对细胞降解的抗性),或降低RNA在引入外源RNA、特别是较长的RNA(如编码Cas9的RNA)之后在细胞中经常观察到的引发先天性免疫应答的趋势。

[0201] 在本领域中已经描述了许多此类修饰,如聚A尾、5'帽类似物(例如,抗反向帽类似物(ARCA)或m7G(5')ppp(5')G(mCAP))、修饰的5'或3'非翻译区(UTR)、使用修饰的碱基(如假-UTP、2-硫代-UTP、5-甲基胞嘧啶-5'-三磷酸(5-甲基-CTP)或N6-甲基-ATP)或用磷酸酶处理以除去5'末端磷酸酯。这些和其他修饰是本领域中已知的,并且定期开发新的RNA修饰。

[0202] 存在许多修饰的RNA的商业供应商,包括例如TriLink Biotech、AxoLabs、Bio-Synthesis Inc.、Dharmacon以及许多其他。如TriLink所描述,例如,5-甲基-CTP可用于赋予令人希望的特征,如增加的核酸酶稳定性、增加的翻译或降低的先天性免疫受体与体外转录的RNA的相互作用。5-甲基胞嘧啶-5'-三磷酸(5-甲基-CTP)、N6-甲基-ATP以及假-UTP和2-硫代-UTP也显示减少在培养物和体内的先天性免疫刺激,同时增强翻译,如Kormann等人和下文提及的Warren等人的出版物中所说明。

[0203] 已经显示,体内递送的化学修饰的mRNA可用于实现改善的治疗作用;参见,例如,Kormann等人,Nature Biotechnology 29,154-157(2011)。此类修饰可用于例如增加RNA分子的稳定性和/或降低其免疫原性。使用化学修饰如假-U、N6-甲基-A、2-硫代-U和5-甲基-C,发现分别用2-硫代-U和5-甲基-C取代仅四分之一的尿苷和胞苷残基导致小鼠中toll样受体(TLR)介导的mRNA识别的显著降低。通过减少先天性免疫系统的活化,这些修饰可用于有效地增加体内mRNA的稳定性和寿命;参见,例如,Kormann等,同上。

[0204] 还已经显示,重复施用包含并入旨在绕过先天性抗病毒应答的修饰的合成信使RNA可将分化的人细胞重新编程为多能性。参见例如,Warren,等人,Cell Stem Cell,7(5):618-30(2010)。充当主要重新编程蛋白的此类修饰的mRNA可以是重新编程多种人细胞类型的有效手段。此类细胞被称为诱导型多能干细胞(iPSC),并且据发现并入5-甲基-CTP、假-UTP和抗反向帽类似物(ARCA)的酶促合成的RNA可用于有效逃避细胞的抗病毒应答;参见例如,Warren等人,同上。

[0205] 本领域中描述的多核苷酸的其他修饰包括例如,使用聚A尾、添加5'帽类似物(如m7G(5')ppp(5')G(mCAP))、5'或3'非翻译区(UTR)的修饰或用磷酸酶处理以除去5'末端磷酸-并且正在定期开发新的方法。

[0206] 已经与RNA干扰(RNAi)、包括小干扰RNA(siRNA)的修饰结合开发了许多适用于产生用于本文的修饰的RNA的组合物和技术。siRNA在体内存在特殊挑战,因为它们经由mRNA干扰对基因沉默的影响通常是短暂的,这可能需要重复施用。此外,siRNA是双链RNA(dsRNA),并且哺乳动物细胞具有进化以检测和中和dsRNA的免疫应答,dsRNA通常是病毒感染的副产物。因此,存在可介导对dsRNA的细胞应答的哺乳动物酶如PKR(dsRNA反应性激酶)和潜在的视黄酸诱导型基因I(RIG-I),以及可响应于此类分子而触发细胞因子的诱导的Toll样受体(如TLR3、TLR7和TLR8);参见,例如,Angart等人,Pharmaceuticals(Basel)6(4):440-468(2013);Kanasty等人,Molecular Therapy 20(3):513-524(2012);Burnett等

人,Biotechnol J.6(9):1130-46(2011);Judge和MacLachlan,Hum Gene Ther19(2):111-24(2008)的综述;以及其中引用的参考文献。

[0207] 已经开发并应用了多种修饰以增强RNA稳定性、减少先天性免疫应答和/或实现可与将多核苷酸引入人细胞结合而有用的其他益处,如本文所述;参见,例如,Whitehead KA等人,Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering,2:77-96(2011);Gaglione和Messere,Mini Rev Med Chem,10(7):578-95(2010);Chernolovskaya等人,Curr Opin Mol Ther.,12(2):158-67(2010);Deleavey等人,Curr Protoc Nucleic Acid Chem Chapter 16:Unit 16.3(2009);Behlke,Oligonucleotides 18(4):305-19(2008);Fucini等人,Nucleic Acid Ther22(3):205-210(2012);Bremsen等人,Front Genet 3:154(2012)的综述。

[0208] 如上所述,存在修饰的RNA的许多商业供应商,其中许多专门研究旨在改进siRNA的有效性的修饰。基于文献中报告的各种发现提供了多种方法。例如,Dharmacon指出,用硫(硫代磷酸酯,PS)置换非桥接氧已被广泛用于改进siRNA的核酸酶抗性,如Kole,Nature Reviews Drug Discovery 11:125-140(2012)所报告。据报告,核糖的2'-位置的修饰改进核苷酸间磷酸键的核酸酶抗性,同时增加双链体稳定性(Tm),其也已显示提供保护免于免疫活化。中等PS主链修饰与小的、良好耐受的2'-取代(2'-O-甲基、2'-氟、2'-Hydro)的组合一直与用于体内应用的高度稳定的siRNA相关,如Soutschek等人Nature432:173-178(2004)所报告;并且据报告2'-O-甲基修饰可有效改进稳定性,如Volkov,Oligonucleotides 19:191-202(2009)所报告。关于降低先天性免疫应答的诱导,据报告用2'-O-甲基、2'-氟、2'-Hydro修饰特定序列可减少TLR7/TLR8相互作用,同时通常保持沉默活性;参见,例如,Judge等人,Mol.Ther.13:494-505(2006);和Cekaite等人,J.Mol.Biol.365:90-108(2007)。另外的修饰,如2-硫尿嘧啶、假尿嘧啶、5-甲基胞嘧啶、5-甲基尿嘧啶和N6-甲基腺苷也已显示使由TLR3、TLR7和TLR8介导的免疫效应最小化;参见,例如,Kariko,K.等人,Immunity 23:165-175(2005)。

[0209] 如本领域所已知并且可商购获得,许多缀合物可应用于用于在本文使用的多核苷酸如RNA,所述缀合物可增强所述多核苷酸的递送和/或由细胞摄取,所述缀合物包括例如胆固醇、生育酚和叶酸、脂质、肽、聚合物、接头和适体;参见,例如,Winkler,Ther.Deliv.4:791-809(2013)的综述以及其中引用的参考文献。

[0210] 密码子优化

[0211] 编码位点定向多肽的多核苷酸可根据本领域中的标准方法进行密码子优化,以在含有目标靶DNA的细胞中表达。例如,如果预期的靶核酸在人细胞中,则编码Cas9的人密码子优化的多核苷酸被考虑用于产生Cas9多肽。

[0212] 靶向基因组的核酸与位点定向多肽的复合物

[0213] 靶向基因组的核酸与位点定向多肽(例如,核酸引导的核酸酶,如Cas9)相互作用,从而形成复合物。靶向基因组的核酸将位点定向多肽引导至靶核酸。

[0214] 核糖核蛋白复合物(RNP)

[0215] 位点定向多肽和靶向基因组的核酸可各自分别施用至细胞或患者。另一方面,位点定向多肽可与一种或多种指导RNA或一种或多种crRNA以及tracrRNA预复合。然后可将预复合的材料施用至细胞或患者。这种预复合材料被称为核糖核蛋白颗粒(RNP)。RNP中的位

点定向多肽可以是例如Cas9核酸内切酶或Cpf1核酸内切酶。位点定向多肽可通过一个或多个核定位信号(NLS)位于N-末端、C-末端或N-末端和C-末端两者的侧翼。例如,Cas9核酸内切酶可侧接两个NLS,一个NLS位于N末端,并且第二个NLS位于C末端。NLS可以是本领域中已知的任何NLS,如SV40 NLS。RNP中靶向基因组的核酸与位点定向多肽的重量比可以是1:1。例如,RNP中sgRNA与Cas9核酸内切酶的重量比可以是1:1。

[0216] 核酸编码系统组分

[0217] 本公开提供了一种核酸,其包含编码本公开的靶向基因组的核酸、本公开的位点定向多肽和/或实施本公开方法的方面所必需的任何核酸或蛋白质分子的核苷酸序列。

[0218] 编码本公开的靶向基因组的核酸、本公开的位点定向多肽和/或实施本公开方法的方面所必需的任何核酸或蛋白质分子的核酸可包含载体(例如,重组表达载体)。

[0219] 术语“载体”是指能够运输与其连接的另一种核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指其中可连接另外的核酸片段的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中另外的核酸区段可连接至病毒基因组中。某些载体(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)能够在它们被引入的宿主细胞中自主复制。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入宿主细胞中后被整合到所述宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。

[0220] 在一些实例中,载体可能能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”,或更简单地称为“表达载体”,其发挥等效的功能。

[0221] 术语“可操作地连接”是指目标核苷酸序列以允许表达核苷酸序列的方式与调控序列连接。术语“调控序列”意图包括例如启动子、增强子以及其他表达控制元件(例如聚腺苷酸化信号)。此类调控序列是本领域中熟知的且描述于例如Goeddel;Gene Expression Technology:Methods in Enzymology 185,Academic Press,San Diego,CA(1990)中。调控序列包括引导核苷酸序列在许多类型的宿主细胞中的组成型表达的那些序列以及引导所述核苷酸序列只在某些宿主细胞中表达的那些序列(例如,组织特异性调控序列)。本领域技术人员应了解,表达载体的设计可取决于诸如靶细胞的选择、所需的表达水平等因素。

[0222] 所考虑的表达载体包括但不限于,基于痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒、腺病毒、腺相关病毒、SV40、单纯疱疹病毒、人免疫缺陷病毒、逆转录病毒(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒)的病毒载体,以及源自逆转录病毒如劳氏肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、慢病毒、人免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒的载体和其他重组载体。预期用于真核靶细胞的其他载体包括但不限于载体pXT1、pSG5、pSVK3、pBPV、pMSG和pSVLSV40(Pharmacia)。可使用其他载体,只要它们与宿主细胞相容即可。

[0223] 在一些实例中,载体可包含一种或多种转录和/或翻译控制元件。取决于所使用的宿主/载体系统,可在表达载体中使用任何许多适合的转录和翻译控制元件,包括组成型和诱导型启动子、转录增强子元件、转录终止子等。所述载体可以是自灭活载体,其灭活病毒序列或CRISPR机器或其他元件的组分。

[0224] 合适的真核启动子(即,在真核细胞中起作用的启动子)的非限制性实例包括来自巨细胞病毒(CMV)立即早期、单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶、早期和晚期SV40、来自逆转录病毒的长末端重复序列(LTR)、人延伸因子-1启动子(EF1)、包含与鸡β-肌动蛋白启动子(CAG)融合的巨细胞病毒(CMV)增强子的杂合构建体、鼠干细胞病毒启动子(MSCV)、磷酸甘油酸激

酶-1基因座启动子(PGK)和小鼠金属硫蛋白-I的那些。

[0225] 为了表达小RNA,包括与Cas核酸内切酶结合使用的指导RNA,各种启动子如RNA聚合酶III启动子(包括例如U6和H1)可以是有利的。用于增强此类启动子的使用的描述和参数是本领域中已知的,并且定期描述另外的信息和方法;参见,例如,Ma,H.等人,Molecular Therapy-Nucleic Acids 3,e161(2014)doi:10.1038/mtna.2014.12。

[0226] 所述表达载体还可含有用于翻译起始的核糖体结合位点和转录终止子。所述表达载体还可包含用于扩增表达的适当序列。所述表达载体还可包含编码非天然标签(例如,组氨酸标签、血凝素标签、绿色荧光蛋白等)的核苷酸序列,所述非天然标签融合至位点定向多肽,从而产生融合多肽。

[0227] 启动子可以是诱导型启动子(例如,热激启动子、四环素调控的启动子、类固醇调控的启动子、金属调控的启动子、雌激素受体调控的启动子等)。启动子可以是组成型启动子(例如,CMV启动子、UBC启动子)。在一些情况下,所述启动子可以是空间限制的和/或时间限制的启动子(例如,组织特异性启动子、细胞类型特异性启动子等)。

[0228] 编码本公开的靶向基因组和/或位点定向多肽的核酸可包装到递送媒介物中或递送媒介物的表面上以递送至细胞。预期的递送载体包括但不限于纳米球、脂质体、量子点、纳米颗粒、聚乙二醇颗粒、水凝胶和胶束。如本领域所描述,可使用多种靶向部分来增强此类媒介物与所需细胞类型或位置的优先相互作用。

[0229] 将本公开的复合物、多肽和核酸引入细胞中可通过病毒或噬菌体感染、转染、缀合、原生质体融合、脂质转染、电穿孔、核转染、磷酸钙沉淀、聚乙烯亚胺(PEI)介导的转染、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质体介导的转染、基因枪技术、磷酸钙沉淀、直接微量注射、纳米颗粒介导的核酸递送等。

[0230] 治疗方法

[0231] 本文提供了用于治疗患有疼痛的患者的方法。这种方法的一个方面是离体基于细胞的疗法。例如,进行患者的周围神经的活检。可从患者的皮肤或腿部分离神经组织。然后,从活检材料中分离周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)。然后,可使用本文所述的材料和方法编辑周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)的染色体DNA。最后,将编辑的周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)植入患者体内。任何来源或类型的细胞都可用作祖细胞。

[0232] 这种方法的另一方面是离体基于细胞的疗法。例如,可产生患者特异性诱导的多能干细胞(iPSC)。然后,可使用本文描述的材料和方法编辑这些iPSC细胞的染色体DNA。接下来,基因组编辑的iPSC可分化成周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)。最后,将分化的周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)植入患者体内。

[0233] 这种方法的又一个方面是离体基于细胞的疗法。例如,间充质干细胞可从患者分离,其可从患者的骨髓或外周血中分离。接下来,可使用本文描述的材料和方法编辑这些间充质干细胞的染色体DNA。接下来,基因组编辑的间充质干细胞可分化成周围神经系统的细

胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)。最后,将分化的周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)植入患者体内。

[0234] 离体细胞疗法方法的一个优点是在施用前对治疗剂进行全面分析的能力。基于核酸酶的治疗剂可具有一定程度的脱靶效应。离体进行基因编辑允许在植入前表征编辑的细胞群体。本公开包括对编辑的细胞的整个基因组进行测序以确保脱靶效应(如果有的话)可在与患者的最小风险相关的基因组位置中。此外,可在植入之前分离特定细胞群,包括克隆群体。

[0235] 离体细胞疗法的另一个优点涉及与其他原代细胞来源相比,iPSC中的遗传修饰。iPSC是多产的,从而使得容易获得基于细胞的疗法将所需的大量细胞。此外,iPSC是用于进行克隆分离的理想细胞类型。这允许筛选正确的基因组修饰,而不存在降低活力的风险。相比之下,其他原代细胞(如神经胶质细胞)存活持续仅几次传代并且难以克隆扩增。因此,用于治疗疼痛的iPSC的操作可更容易,并且可缩短进行所需遗传修饰所需的时间的量。

[0236] 方法还可包括基于体内的疗法。使用本文描述的材料和方法编辑患者的细胞的染色体DNA。在一些方面,基于体内的疗法中的靶细胞是周围神经系统的神经元。

[0237] 尽管某些细胞为离体治疗和疗法提供有吸引力的靶标,但递送的功效增加可允许直接体内递送至此类细胞。理想情况下,靶向和编辑将针对相关细胞。通过使用仅在某些细胞和/或发育阶段中有活性的启动子,也可防止其他细胞中的裂解。另外的启动子是可诱导的,并且因此如果核酸酶作为质粒递送,则可在时间上控制。还可使用添加的处理或结构域以改变半衰期来调整递送的RNA和蛋白质保留在细胞中的时间的量。体内治疗将消除许多治疗步骤,但较低的递送速率可能需要较高的编辑速率。体内治疗可消除来自神经元和神经胶质细胞的离体治疗和植入以及植入后适当地整合至现有脑回路中的问题和损失。

[0238] 体内基因疗法的优点可以是治疗性生产和施用的容易性。相同的治疗方法和疗法将具有用于治疗多于一名患者,例如具有相同或相似基因型或等位基因的许多患者的潜力。相比之下,离体细胞疗法通常需要使用患者自身的细胞,将所述细胞分离、操作并返回同一患者。

[0239] 本文还提供了用于通过基因组编辑编辑细胞中的SCN9A基因的细胞方法。例如,可从患者或动物中分离细胞。然后,可使用本文描述的材料和方法编辑细胞的染色体DNA。

[0240] 本文提供的方法(无论是细胞方法还是离体方法或体内方法)可涉及通过在SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近引入一个或多个插入、缺失或突变来减少(敲低)或消除(敲除)SCN9A基因的表达。

[0241] 例如,敲低或敲除策略可涉及通过引入由于不精确的NHEJ修复途径而产生的随机插入或缺失(插入缺失)来破坏SCN9A基因中的阅读框。这可通过用一种或多种CRISPR核酸内切酶和gRNA(例如,crRNA+tracrRNA,或sgRNA)在SCN9A基因中诱导一个单链断裂或双链断裂,或用两种或更多种CRISPR核酸内切酶和两种或更多种sgRNA在SCN9A基因中诱导两个或更多个单链断裂或双链断裂来实现。这种方法可能需要开发和优化SCN9A基因的sgRNA。

[0242] 或者,敲低或敲除策略还可涉及缺失SCN9A基因或编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近的一个或多个区段。这种缺失策略需要至少一对能够结合至SCN9A基因和一种或多种CRISPR核酸内切酶内或附近的两个不同位点的gRNA(例如,crRNA+tracrRNA

或sgRNA)。配置有两种gRNA的CRISPR核酸内切酶在所需位置诱导两个双链断裂。在裂解后,无论是平的还是具有突出端,两端都可通过NHEJ连接,从而导致插入片段的缺失。在某些方面,NHEJ修复途径可导致接点处的插入、缺失或突变。

[0243] 除了上述基因组编辑策略以外,另一种策略涉及通过在调控序列中编辑来调节SCN9A的表达、功能或活性。

[0244] 除了上文列出的编辑选项以外,Cas9或类似蛋白质可用于将效应子结构域靶向可被鉴别用于编辑的相同靶位点或效应子区域范围内的另外靶位点。一系列染色质修饰酶、甲基化酶或去甲基化酶可用于改变靶基因的表达。一种可能性是如果突变导致不期望的活性,则降低SCN9A蛋白的表达。这些类型的表观遗传调控具有一些优点,特别是因为它们在可能的脱靶效应方面受到限制。

[0245] 除了编码和剪接序列之外,还可存在许多类型的基因组靶位点。

[0246] 转录和翻译的调控涉及与细胞蛋白质或核苷酸相互作用的许多不同类别的位点。通常,转录因子或其他蛋白质的DNA结合位点可被靶向用于突变或缺失以研究所述位点的作用,尽管它们也可被靶向以改变基因表达。可通过非同源末端连接NHEJ或通过同源定向修复(HDR)进行的直接基因组编辑来添加位点。增加基因组测序、RNA表达和转录因子结合的全基因组研究的使用增加了鉴别所述位点如何导致发育或时间基因调控的能力的能力。这些控制系统可以是直接的,或者可涉及广泛的协同调控,这可能需要整合来自多个增强子的活性。转录因子通常结合6-12bp长的简并DNA序列。由单独位点提供的低特异性水平表明复杂的相互作用和规则涉及于结合和功能结果中。具有较少简并性的结合位点可提供更简单的调控方式。可设计人工转录因子以指定在基因组中具有较少相似序列并且具有较低的脱靶裂解潜力的较长序列。可突变、缺失或甚至产生任何这些类型的结合位点以实现基因调控或表达的改变(Canver,M.C.等人,Nature(2015))。

[0247] 具有这些特征的另一类基因调控区是微小RNA(miRNA)结合位点。miRNA是在转录后基因调控中起关键作用的非编码RNA。miRNA可调控30%的所有编码哺乳动物蛋白的基因的表达。发现了通过双链RNA(RNAi)进行的特异性和有效的基因沉默,以及另外的小的非编码RNA(Canver,M.C.等人,Nature(2015))。对基因沉默重要的最大类别的非编码RNA是miRNA。在哺乳动物中,miRNA首先被转录为长RNA转录物,其可以是单独的转录单元、蛋白质内含子的一部分或其他转录物。长转录物被称为初级miRNA(pri-miRNA),其包括不完全碱基配对的发夹结构。这些pri-miRNA可通过微处理器(细胞核中涉及Drosha的一种蛋白质复合物)裂解成一个或多个较短的前体miRNA(pre-miRNA)。

[0248] pre-miRNA是具有2个核苷酸的3'-突出端的约70个核苷酸长度的短茎环,所述茎环被输出到成熟的19-25个核苷酸的miRNA:miRNA*双链体中。具有较低碱基配对稳定性的miRNA链(引导链)可负载到RNA诱导的沉默复合物(RISC)上。过客链(用*标记)可起作用,但通常降解。成熟miRNA将RISC栓系至主要在3'非翻译区(UTR)内发现的靶mRNA中的部分互补序列基序并诱导转录后基因沉默(Bartel,D.P.Cell 136,215-233(2009);Saj,A.&Lai,E.C.Curr Opin Genet Dev 21,504-510(2011))。

[0249] miRNA可在发育、分化、细胞周期和生长控制中以及哺乳动物和其他多细胞生物中的几乎所有生物途径中是重要的。miRNA还可参与细胞周期控制、细胞凋亡和干细胞分化、造血、缺氧、肌肉发育、神经发生、胰岛素分泌、胆固醇代谢、衰老、病毒复制和免疫应答。

[0250] 单一miRNA可靶向数百种不同的mRNA转录物,而单个miRNA转录物可被许多不同的miRNA靶向。在最新发布的miRBase(v.21)中已经注释了超过28645种微小RNA。一些miRNA可由多个基因座编码,所述基因座中的一些可由串联共转录的簇表达。这些特征允许具有多种途径和反馈控制的复杂调控网络。miRNA可以是这些反馈和调控回路的组成部分,并且可通过将蛋白质产生保持在限度内来帮助调控基因表达(Herranz,H.&Cohen,S.M.Genes Dev 24,1339-1344(2010);Posadas,D.M.&Carthew,R.W.Curr Opin Genet Dev 27,1-6(2014))。

[0251] miRNA还可在与异常miRNA表达相关的大量人类疾病中是重要的。这种关联强调了miRNA调控途径的重要性。最近的miRNA缺失研究已将miRNA与免疫应答的调控联系起来(Stern-Ginossar,N.et al.,Science 317,376-381(2007))。

[0252] miRNA还与癌症具有较强的联系并且可在不同类型的癌症中发挥作用。已经发现miRNA在许多肿瘤中下调。miRNA可在关键的癌症相关途径的调控(如细胞周期控制和DNA损伤应答)中是重要的,并且因此可用于诊断并且可在临床上靶向。微小RNA可精细地调控血管生成的平衡,以使得消减所有微小RNA的实验遏制肿瘤血管生成(Chen,S.等人,Genes Dev 28,1054-1067(2014))。

[0253] 如已经针对蛋白质编码基因所示,miRNA基因也可经受与癌症一起出现的表观遗传变化。许多miRNA基因座可与CpG岛相关联,从而增加它们通过DNA甲基化进行调控的机会(Weber,B.,Stresemann,C.,Brueckner,B.&Lyko,F.Cell Cycle 6,1001-1005(2007))。大多数研究使用染色质重塑药物治疗来揭示表观遗传学上沉默的miRNA。

[0254] 除了它们在RNA沉默中的作用外,miRNA还可活化翻译(Posadas,D.M.&Carthew,R.W.Curr Opin Genet Dev 27,1-6(2014))。敲除miRNA位点可导致靶向基因的表达降低,而引入这些位点可增加表达。

[0255] 可通过使种子序列(微小RNA的碱基2-8)突变来最有效地敲除单个miRNA,这对于结合特异性可以是重要的。在此区域中裂解、然后通过NHEJ错误修复可通过阻断与靶位点的结合来有效地消除miRNA功能。miRNA也可通过与回文序列相邻的特殊环区域的特异性靶向来抑制。催化失活的Cas9也可用于抑制shRNA表达(Zhao,Y.等人,Sci Rep 4,3943(2014))。除了靶向miRNA以外,还可靶向结合位点并使所述结合位点突变以防止通过miRNA沉默。

[0256] 根据本公开,任何微小RNA(miRNA)或其结合位点可并入本发明的组合物中。

[0257] 所述组合物可具有区域,如但不限于包含SEQ ID NO:632-4715中列出的任何微小RNA的序列的区域、SEQ ID NO:632-4715中列出的微小RNA的反向互补序列或SEQ ID NO:632-4715中列出的任何微小RNA的微小RNA抗种子区域。

[0258] 本公开的组合物可包含一种或多种微小RNA靶序列、微小RNA序列或微小RNA种子。此类序列可对应于任何已知的微小RNA,如美国公布US2005/0261218和美国公布US2005/0059005中教导的那些。作为非限制性实例,已知的微小RNA、它们的序列以及它们在人类基因组中的结合位点序列在下文在SEQ ID NO:632-4715中列出。

[0259] 微小RNA序列包含“种子”序列,即成熟微小RNA的位置2-8的区域中的序列,所述序列与miRNA靶序列具有完美的沃森-克里克(Watson-Crick)互补性。微小RNA种子可包含成熟微小RNA的位置2-8或2-7。在一些方面,微小RNA种子可包含7个核苷酸(例如,成熟微小

RNA的核苷酸2-8),其中对应miRNA靶标中的种子互补位点由与微小RNA位置1相反的腺嘌呤(A)侧接。在一些方面,微小RNA种子可包含6个核苷酸(例如,成熟微小RNA的核苷酸2-7),其中对应miRNA靶标中的种子互补位点由与微小RNA位置1相反的腺嘌呤(A)侧接。参见例如,Grimson A,Farh KK,Johnston WK,Garrett-Engele P,Lim LP,Bartel DP;Mol Cell.2007年7月6日;27(1):91-105。微小RNA种子的碱基与靶序列具有完全互补性。

[0260] 已经报告了微小RNA、微小RNA靶区及其表达模式和在生物学中的作用的鉴别(Bonauer等人,Curr Drug Targets 2010 11:943-949;Anand和Cheresh Curr Opin Hematol 2011 18:171-176;Contreras和Rao Leukemia 2012 26:404-413(2011年12月20日.doi:10.1038/leu.2011.356);Bartel Cell 2009 136:215-233;Landgraf等人,Cell,2007 129:1401-1414;Gentner和Naldini,Tissue Antigens.201280:393-403)。

[0261] 例如,如果所述组合物不意图被递送至肝但最终被递送至肝,那么在miR-122(在肝中丰富的一种微小RNA)的一个或多个靶位点被工程化至编码所述靶序列的多核苷酸中的情况下,miR-122可抑制所递送的序列的表达。可工程化不同微小RNA的一个或多个结合位点的引入以便进一步降低寿命、稳定性和蛋白质翻译,从而提供额外的可延展性层。

[0262] 如本文所用,术语“微小RNA位点”是指微小RNA靶位点或微小RNA识别位点或微小RNA所结合或缔合的任何核苷酸序列。应理解“结合”可遵循传统沃森-克里克杂交规则或可反映微小RNA与靶序列在或邻近微小RNA位点处的任何稳定的缔合。

[0263] 相反地,出于本公开的组合物的目的,可将微小RNA结合位点从它们所天然存在的序列中工程化出来(即,除去)以便增加特定组织中的蛋白质表达。

[0264] 具体而言,已知微小RNA在免疫细胞(也称为造血细胞)中差异表达,所述免疫细胞如抗原呈递细胞(APC)(例如树突细胞和巨噬细胞)、巨噬细胞、单核细胞、B淋巴细胞、T淋巴细胞、粒细胞、自然杀伤细胞等。免疫细胞特异性微小RNA参与免疫原性、自身免疫性、对感染的免疫应答、炎症以及基因疗法和组织/器官移植后的不相要的免疫应答。免疫细胞特异性微小RNA还调控造血细胞(免疫细胞)的发育、增殖、分化和凋亡的许多方面。例如,miR-142和miR-146仅在免疫细胞中表达,特别是在骨髓树突细胞中丰富。将miR-142结合位点引入本公开的多肽的3’-UTR中可通过miR-142介导的mRNA降解而选择性地遏制抗原呈递细胞中的基因表达,从而限制专职APC(例如树突细胞)中的抗原呈递且由此在基因递送后阻止抗原介导的免疫应答(参见Annoni A等人,blood,2009,114,5152-5161)。

[0265] 在一个实例中,已知在免疫细胞、特别是抗原呈递细胞中表达的微小RNA结合位点可被工程化到多核苷酸中以通过微小RNA介导的RNA降解来遏制所述多核苷酸在APC中的表达,从而抑制抗原介导的免疫应答,同时在免疫细胞特异性微小RNA不表达的非免疫细胞中维持所述多核苷酸的表达。

[0266] 许多微小RNA表达研究已经进行并且在本领域中进行了描述,以分析微小RNA在各种癌细胞/组织和其他疾病中的差异表达。一些微小RNA在某些癌细胞中异常过表达,而其他则表达不足。例如,微小RNA在以下中差异表达:癌细胞((WO2008/154098、US2013/0059015、US2013/0042333、WO2011/157294);癌症干细胞(US2012/0053224);胰腺癌和疾病(US2009/0131348、US2011/0171646、US2010/0286232、US8389210);哮喘和炎症(US8415096);前列腺癌(US2013/0053264);肝细胞癌(WO2012/151212、US2012/0329672、WO2008/054828、US8252538);肺癌细胞(WO2011/076143、WO2013/033640、WO2009/070653、

US2010/0323357);皮肤T细胞淋巴瘤(WO2013/011378);结肠直肠癌细胞(WO2011/0281756、WO2011/076142);癌症阳性淋巴结(WO2009/100430、US2009/0263803);鼻咽癌(EP2112235);慢性阻塞性肺病(US2012/0264626、US2013/0053263);甲状腺癌(WO 2013/066678);卵巢癌细胞(US2012/0309645、WO2011/095623);乳腺癌细胞(WO2008/154098、WO2007/081740、US2012/0214699)、白血病和淋巴瘤(WO2008/073915、US2009/0092974、US2012/0316081、US2012/0283310、WO2010/018563)。

[0267] 微小RNA序列和靶向组织和/或细胞的非限制性实例公开于SEQ ID NO:632-4715中。

[0268] 基因组工程化策略

[0269] 在一些方面,本公开的方法可涉及编辑一个或两个等位基因。用于修饰等位基因的基因编辑具有永久改变靶基因或基因产物的优点。

[0270] 本公开的离体方法的步骤可包括使用基因组工程化编辑从患者分离的周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)。或者,本公开的离体方法的步骤可包括编辑患者特异性iPSC或间充质干细胞。同样地,本公开的体内方法的步骤涉及使用基因组工程化编辑经历疼痛的患者中的细胞。类似地,本公开的细胞方法中的步骤可包括通过基因组工程化编辑人细胞中的SCN9A基因。

[0271] 经历疼痛的患者可能在SCN9A基因中表现出广泛突变。因此,不同的患者可能需要不同的编辑策略。任何CRISPR核酸内切酶可用于本公开的方法中,每种CRISPR核酸内切酶具有其自身的相关PAM,其可以是或可以不是疾病特异性的。

[0272] 例如,可通过引入由于不精确的NHEJ修复途径而产生的随机插入或缺失(插入缺失)来破坏或消除SCN9A基因的表达。靶区域可以是SCN9A基因的编码序列(即,外显子)。将核苷酸插入或缺失到基因的编码序列中可导致“移码”,其中正常的3字母密码子模式被扰乱。以这种方式,可减少或消除基因表达并因此减少或消除蛋白质产生。这种方法也可用于靶向SCN9A基因的任何内含子、内含子:外显子接合点或调控性DNA元件,其中序列改变可干扰SCN9A基因的表达。

[0273] 作为另一个实例,NHEJ也可用于直接或通过经由靶向若干位置的一个gRNA或若干gRNA裂解来改变剪接供体或受体位点而缺失基因的区段。如果小的随机插入缺失对于敲除靶基因是无效的,则这可能是有用的。成对的gRNA已经用于这种类型的缺失。

[0274] 在没有供体存在的情况下,可使用若干个非同源修复途径连接来自DNA断裂的末端或来自不同断裂的末端,其中DNA末端在接合点处在很少或没有碱基配对的情况下连接。除了规范的NHEJ以外,还存在类似的修复机制,如alt-NHEJ。如果存在两个断裂,则可缺失或倒置插入区段。NHEJ修复途径可导致接点处的插入、缺失或突变。

[0275] NHEJ还可导致与同源性无关的靶标整合。例如,在供体和染色体两者的体内核酸酶裂解后,在供体质粒上包含核酸酶靶位点可促进转基因整合到染色体双链断裂中(Cristea.,Biotechnol Bioeng.2013年3月;110(3):871-80)。NHEJ用于在核酸酶裂解后将15-kb诱导型基因表达盒插入人细胞系中的确定基因座中。(参见例如,Maresca,M.,Lin,V.G.,Guo,N.&Yang,Y.,Genome Res 23,539-546(2013);Suzuki等人Nature,540,144-149(2016))。整合的序列可破坏SCN9A基因的阅读框或改变基因的结构。

[0276] 作为另一种替代方案,同源定向修复(HDR)也可用于敲除基因或改变基因功能。例

如,HDR敲除策略可涉及通过向SCN9A基因中插入非功能性或不相关的序列来破坏SCN9A基因的结构或功能。这可通过在外源引入以引导对同源定向修复的细胞DSB应答的供体DNA模板存在下(所述供体DNA模板可以是短单链寡核苷酸、短双链寡核苷酸、长单链或双链DNA分子)用一种或多种CRISPR核酸内切酶和gRNA(例如,crRNA+tracrRNA或sgRNA)在目标基因中诱导一个单链断裂或双链断裂或者用一种或多种CRISPR核酸内切酶和两种或更多种gRNA在目标基因中诱导两个或更多个单链断裂或双链断裂来实现。这种方法可需要开发和优化SCN9A基因的gRNA和供体DNA分子。

[0277] 同源定向修复(HDR)在本质上是无错误的机制,所述机制在DSB修复期间使用所提供的同源DNA序列作为模板。HDR的速率是突变与切割位点之间的距离的函数,因此选择重叠或最近的靶位点是重要的。模板可包括侧接同源区的额外序列,或者可含有与基因组序列不同的序列,从而允许序列编辑。

[0278] HDR的最常见形式是同源重组。存在HDR的另外途径,包括单链退火和替代HDR。基因组工程化工具允许研究人员操纵细胞同源重组途径,以产生对基因组的位点特异性修饰。已经发现细胞可使用呈反式提供的合成供体分子修复双链断裂。因此,通过在特定突变附近引入双链断裂并提供合适的供体,可在基因组中进行靶向变化。特异性裂解使HDR的速率比接受单独同源供体的10^6个细胞中的1个的速率超过1000倍。在特定核苷酸处的同源定向修复(HDR)的速率是与切割位点的距离的函数,因此选择重叠或最近的靶位点是重要的。基因编辑提供优于基因添加的优点,因为原位编辑使基因组的其余部分不受干扰。

[0279] 用于通过HDR进行编辑的供应的供体显著不同,但可含有具有小的或大的侧翼同源臂的预期序列,以允许退火至基因组DNA。在引入的遗传变化侧翼的同源区可以是30bp或更小,或者与可含有启动子、cDNA等的多千碱基盒一样大。已经使用了单链和双链寡核苷酸供体两者。这些寡核苷酸的大小范围从少于100nt至超过许多kb,尽管也可产生并使用更长的ssDNA。可使用双链供体,包括PCR扩增子、质粒和小环。通常,已发现AAV载体可以是递送供体模板的非常有效的手段,尽管个体供体的包装限制是<5kb。供体的活性转录使HDR增加三倍,从而表明包含启动子可增加转化。相反,供体的CpG甲基化降低基因表达和HDR。

[0280] 除了野生型核酸内切酶如Cas9以外,还存在切口酶变体,所述变体使一个或另一个核酸酶结构域失活,从而导致仅切割一条DNA链。HDR可从单独Cas切口酶引导或使用位于靶区域侧翼的成对切口酶。供体可以是单链的、带切口的或dsDNA。

[0281] 供体DNA可与核酸酶一起提供或者通过各种不同的方法(例如通过转染、纳米颗粒、微量注射或病毒转导)独立地提供。已经提出了一系列系栓选择,以增加供体对HDR的可用性。实例包括将供体连接至核酸酶、连接至在附近结合的DNA结合蛋白或者连接至参与DNA末端结合或修复的蛋白质。

[0282] 修复途径选择可通过许多培养条件(如影响细胞周期的培养条件)或通过靶向DNA修复和相关蛋白来指导。例如,为了增加HDR,可遏制关键的NHEJ分子,如KU70、KU80或DNA连接酶IV。

[0283] 除了通过NHEJ或HDR进行基因组编辑以外,还进行了使用NHEJ途径和HDR两者的位点特异性基因插入。组合方法可适用于某些设置,可能包括内含子/外显子边界。NHEJ可证明对内含子中的连接有效,而无错误的HDR可能更适合于编码区。

[0284] SCN9A基因含有如表3中所示的多个外显子。可靶向这些外显子或附近内含子中的

任何一个或多个以产生破坏阅读框并最终消除异常SCN9A蛋白活性的一个或多个插入缺失。

[0285] 在一些方面,所述方法可提供通过在不想要的序列侧翼的位置切割基因两次来进行缺失的gRNA对。此序列可包含一个或多个外显子、内含子、内含子:外显子接合点、编码SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列或其组合。切割可通过各自在基因组中产生DSB的一对DNA核酸内切酶或者通过一起在基因组中产生DSB的多个切口酶完成。

[0286] 或者,所述方法可提供一种gRNA以在编码或剪接序列内进行一次双链切割。所述双链切割可通过单一DNA核酸内切酶或在基因组中一起产生DSB的多种切口酶来形成。

[0287] 剪接供体和受体通常在相邻内含子的100个碱基对内。在一些实例中,方法可提供相对于每个目标外显子/内含子接合点切割大约+/-100-3100bp的gRNA。

[0288] 对于任何基因组编辑策略,可通过测序或PCR分析来确认基因编辑。

[0289] 目标序列选择

[0290] 相对于特定参考基因座5'边界和/或3'边界的位置的移位可用于促进或增强基因编辑的特定应用,其部分取决于选择用于编辑的核酸内切酶系统,如本文进一步描述并说明的

[0291] 在这种靶序列选择的第一非限制性实例中,许多核酸内切酶系统具有可引导用于裂解的潜在靶位点的初始选择的规则或标准,如在CRISPR II型或V型核酸内切酶的情况下在与DNA裂解位点相邻的特定位置中需要PAM序列基序。

[0292] 在靶序列选择或优化的另一个非限制性实例中,可相对于中靶活性的频率评估靶序列和基因编辑核酸内切酶的特定组合的脱靶活性的频率(即,在除所选择的靶序列以外的位点处发生的DSB的频率)在一些情况下,已经在所需基因座处正确编辑的细胞可相对于其他细胞具有选择性优点。选择性优点的说明性、但非限制性的实例包括获得诸如在引入患者体内后增强的复制速率、持久性、对某些条件的抗性、在体内成功移植或持久性率增强等属性,以及与维持或增加此类细胞的数量或活力相关的其他属性。在其他情况下,可通过用于鉴别、分类或以其他方式选择已经正确编辑的细胞的一种或多种筛选方法来肯定地选择已在所需基因座处正确编辑的细胞。选择优点和定向选择方法两者均可利用与改变相关的表型。在一些情况下,可将细胞编辑两次或更多次以产生第二修饰,所述第二修饰产生用于选择或纯化预期细胞群体的新表型。可通过添加能够表达可选择或可筛选标记的第二gRNA来产生这种第二修饰。在一些情况下,可使用含有cDNA以及还有选择性标记的DNA片段在所需的基因座处正确地编辑细胞。

[0293] 无论任一选择性优点是否适用或是否在特定情况下应用任何定向选择,还可通过考虑脱靶频率来引导靶序列选择,以便增强应用的有效性和/或降低在除所需靶标以外的位点处的不期望的改变的可能性。如本文和本领域中进一步描述和说明,脱靶活性的发生可受许多因素影响,包括靶位点与各种脱靶位点之间的相似性和不相似性,以及所用的特定核酸内切酶。可获得帮助预测脱靶活性的生物信息学工具,并且此类工具通常也可用于鉴别脱靶活性的最可能的位点,所述位点然后可在实验设置中进行评估以评价脱靶与中靶活性的相对频率,从而允许选择具有较高相对中靶活性的序列。本文提供了此类技术的说明性实例,并且其他技术在本领域中是已知的。

[0294] 靶序列选择的另一方面涉及同源重组事件。共享同源区的序列可充当产生插入序

列的缺失的同源重组事件的焦点。此类重组事件在染色体和其他DNA序列的正常复制过程中发生,并且还在合成DNA序列的其他时间(如在修复双链断裂(DSB)的情况下)发生,所述事件在正常细胞复制周期期间定期发生、但也可通过各种事件(如UV光和DNA断裂的其他诱导剂)的出现或某些试剂(如各种化学诱导剂)的存在来增强。许多此类诱导剂导致DSB在基因组中不加选择地发生,并且DSB可在正常细胞中定期诱导和修复。在修复期间,可完全保真地重构原始序列,然而,在一些情况下,在DSB位点引入小插入或缺失(称为"插入缺失")。

[0295] DSB还可在特定位置特异性地诱导,如在本文所述的核酸内切酶系统的情况,其可用于在选定的染色体位置引起定向或优先的基因修饰事件。同源序列在DNA修复(以及复制)的背景下进行重组的趋势可在许多情况下利用,并且是基因编辑系统(如CRISPR)的一种应用的基础,其中使用同源定向修复来将通过使用"供体"多核苷酸提供的目标序列插入所需的染色体位置中。

[0296] 特定序列之间的同源区(其可以是可包含少至10个碱基对或更少的"微同源"的小区域)也可用于产生所需的缺失。例如,可在具有附近序列的表现出微同源性的位点处引入单个DSB。在这种DSB的正常修复过程中,高频率发生的结果是由于DSB和伴随的细胞修复过程促进重组而导致的插入序列的缺失。

[0297] 然而,在一些情况下,在同源区内选择靶序列也可产生更大的缺失,包括基因融合(当缺失在编码区中时),其在给定特定情况下可能需要或可能不需要。

[0298] 本文提供的实施例进一步说明了用于产生DSB的各种靶区域的选择,所述DSB旨在诱导导致SCN9A蛋白活性降低或消除的插入、缺失或突变;以及在此类区域内选择特定靶序列,所述区域旨在使脱靶事件相对于中靶事件最小化。

[0299] 人细胞

[0300] 为了改善与SCN9A相关的疼痛或任何病症,如本文所述和说明的,用于基因编辑的主要靶标是人细胞。例如,在离体方法中,人细胞可以是体细胞,所述体细胞在使用如所描述的技术修饰后可产生分化的细胞,如周围神经系统或祖细胞的神经元。例如,在体内方法中,人细胞可以是周围神经系统的神经元,或来自其他受影响器官的细胞。

[0301] 通过在源自并且因此已经与有需要的患者完全匹配的自体细胞中进行基因编辑,有可能产生可安全地重新引入患者中的细胞,并且有效地产生将有效地改善与患者疾病相关的一种或多种临床病状的细胞群体。

[0302] 干细胞能够增殖并产生更多的祖细胞,这些祖细胞进而能够产生大量的母细胞,所述母细胞进而可产生分化的或可分化的子细胞。可诱导子细胞本身增殖并产生子代,所述子代随后分化成一种或多种成熟细胞类型,同时还保留一种或多种具有亲本发育潜力的细胞。术语"干细胞"然后是指在特定情况下具有分化成更特化或分化的表型的能力或潜力的细胞,并且所述细胞在某些情况下保持增殖能力而基本上不分化。在一个方面,术语祖细胞或干细胞是指广义母细胞,其后代(子代)通常在不同方向上通过分化,例如通过获得完全个体特征而特化,如在胚胎细胞和组织的进行性多样化中发生的那样。细胞分化是通常通过许多细胞分裂发生的复杂过程。分化细胞可源自多能细胞,所述多能细胞本身源自多能细胞,等等。虽然这些多能细胞中的每一种可被认为是干细胞,但是每种细胞类型的范围可变化很大。一些分化细胞也具有产生更大发育潜力的细胞的能力。这种能力可以是天然的,或者可在用各种因素处理后人工诱导。在许多生物学实例中,干细胞也可以是"多能

的”,因为它们可产生多于一种不同细胞类型的子代,但这不是“干细胞”性所必需的。

[0303] 自我更新可以是干细胞的另一个重要方面。理论上,自我更新可通过两种主要机制中的任一种发生。干细胞可不对称分裂,其中一个子代保留茎状态,并且另一个子代表达一些不同的其他特定功能和表型。或者,群体中的一些干细胞可对称地分裂两个茎,从而在作为整体的群体中维持一些干细胞,而群体中的其他细胞仅产生分化的子代。通常,“祖细胞”具有更原始的细胞表型(即,与完全分化的细胞相比在沿发育途径或进展的更早步骤)。通常,祖细胞也具有显著或非常高的增殖潜力。祖细胞可产生多种不同的分化细胞类型或单一分化细胞类型,这取决于发育途径和细胞发育并分化的环境。

[0304] 在细胞个体发生的背景下,形容词“被分化的”或“分化的”为相对术语。“分化的细胞”是比与其比较的细胞在发育途径上更进一步向下进展的细胞。因此,干细胞可分化成谱系限制性前体细胞(如肌细胞祖细胞),所述前体细胞进而可在所述途径上进一步向下分化成其他类型的前体细胞(如肌细胞前体细胞),且然后至终末期分化的细胞如肌细胞,所述细胞在某种组织类型中起特征性作用,并且可以保持或可以不保持进一步增殖的能力。

[0305] 诱导型多能干细胞

[0306] 本文描述的遗传工程化的人细胞可以是诱导型多能干细胞(iPSC)。使用iPSC的一个优点是细胞可源自与祖细胞所施用至的相同受试者。也就是说,体细胞可从受试者获得,重新编程为诱导型多能干细胞,且然后再分化成祖细胞以施用于受试者(例如,自体细胞)。因为祖细胞基本上来源于自体来源,所以与使用来自另一个受试者或受试者组的细胞相比,可降低移植物排斥或过敏反应的风险。此外,iPSC的使用否定了对从胚胎来源获得的细胞的需要。因此,在一个方面,所公开方法中使用的干细胞不是胚胎干细胞。

[0307] 尽管在生理背景下分化通常是不可逆的,但最近已开发了几种方法来将体细胞重新编程为iPSC。示例性方法是本领域技术人员已知的并且在下文中简要描述。

[0308] 术语“重新编程”是指改变或逆转分化细胞(例如体细胞)的分化状态的过程。换句话说,重新编程是指驱动细胞分化回成更未分化或更原始类型的细胞的过程。应该注意的是,将许多原代细胞置于培养物中可导致一些完全分化的特征的丧失。因此,简单地培养术语分化细胞中包括的此类细胞不会使这些细胞成为非分化细胞(例如,未分化细胞)或多能细胞。分化细胞向多能性的转变需要超出导致培养物中分化特征的部分丧失的刺激物的重新编程刺激物。与原代细胞亲本相比,重新编程的细胞还具有延长的传代能力而不丧失生长潜力的特征,所述原代细胞亲本通常具有培养物中仅有限数量的分裂的能力。

[0309] 在重新编程之前,待重新编程的细胞可以是部分或终末分化的。重新编程可涵盖分化细胞(例如,体细胞)的分化状态完全逆转至多能状态或多潜能状态。重新编程可涵盖分化细胞(例如,体细胞)的分化状态完全或部分逆转至未分化细胞(例如,胚胎样细胞)。重新编程可使得细胞表达特定基因,其表达进一步有助于重新编程。在本文所述的某些实例中,分化细胞(例如,体细胞)的重新编程可引起分化细胞呈现未分化状态(例如,是未分化的细胞)。所得细胞被称为“重新编程的细胞”或“诱导型多能干细胞(iPSC或iPS细胞)”。

[0310] 重新编程可涉及在细胞分化过程中发生的可遗传的核酸修饰模式(例如,甲基化)、染色质浓缩、表观遗传变化、基因组印记等中的至少一些的改变,例如逆转。重新编程不同于简单地维持已经是多能的细胞的现有未分化状态或维持已经是多潜能细胞(例如,肌源性干细胞)的细胞的现有不完全分化状态。重新编程也不同于促进已经是多能或多潜

能的细胞的自我更新或增殖,尽管在一些实例中,本文所述的组合物和方法也可用于此类目的。

[0311] 许多方法是本领域中已知的,所述方法可用于从体细胞产生多能干细胞。将体细胞重新编程为多能表型的任何这种方法都适用于本文所述的方法。

[0312] 已经描述了使用确定的转录因子组合产生多能细胞的重新编程方法。可通过直接转导Oct4、Sox2、Klf4和c-Myc将小鼠体细胞转化为具有扩大的发育潜力的ES细胞样细胞;参见,例如,Takahashi和Yamanaka,Cell 126(4):663-76(2006)。iPSC类似于ES细胞,因为它们恢复了多能性相关的转录回路和大部分表观遗传背景。此外,小鼠iPSC满足多能性的所有标准测定:具体地,体外分化成三个胚层的细胞类型、畸胎瘤形成、对嵌合体的贡献、种系传递[参见例如,Maherali和Hochedlinger,Cell Stem Cell.3(6):595-605(2008)]和四倍体互补。

[0313] 可使用类似的转导方法获得人iPSC,并且已经建立了转录因子三组分体(trio)OCT4、SOX2和NANOG作为控制多能性的转录因子的核心组;参见,例如,Budniatzky和Gepstein,Stem Cells Transl Med.3(4):448-57(2014);Barrett等人,Stem Cells Trans Med 3:1-6sctm.2014-0121(2014);Focosi等人,Blood Cancer Journal 4:e211(2014);和其中引用的参考文献。iPSC的产生可通过历史上使用病毒载体将编码干细胞相关基因的核酸序列引入成体体细胞中来实现。

[0314] iPSC可产生于或来源于终末分化的体细胞以及成体干细胞或体干细胞。也就是说,可通过重新编程使非多能祖细胞成为多能或多潜能。在此类情况下,可能没有必要包括重新编程终末分化的细胞所需的尽可能多的重新编程因子。此外,重新编程可通过非病毒引入重新编程因子诱导,例如通过引入蛋白质本身或通过引入编码重新编程因子的核酸或通过引入信使RNA诱导,所述信使RNA在翻译时产生重新编程因子(参见例如,Warren等人,Cell Stem Cell,7(5):618-30(2010)。重新编程可通过引入编码干细胞相关基因的核酸的组合来实现,所述基因包括例如Oct-4(也称为Oct-3/4或Pouf51)、Soxl、Sox2、Sox3、Sox 15、Sox 18、NANOG、Klfl、Klf2、Klf4、Klf5、NR5A2、c-Myc、1-Myc、n-Myc、Rem2、Tert以及LIN28。使用本文所述的方法和组合物重新编程可进一步包括将Oct-3/4、Sox家族的成员、Klf家族的成员和Myc家族的成员中的一个或多个引入体细胞。本文所述的方法和组合物可进一步包括引入Oct-4、Sox2、Nanog、c-MYC和Klf4中的每一种的一种或多种以用于重新编程。如上所述,用于重新编程的确切方法对于本文所述的方法和组合物不一定是关键的。然而,在从重新编程的细胞分化的细胞用于例如人类疗法的情况下,在一个方面,重新编程不受改变基因组的方法的影响。因此,在此类实例中,可例如在不使用病毒或质粒载体的情况下实现重新编程。

[0315] 可通过添加各种剂,例如小分子来增强源自起始细胞群体的重新编程的效率(即,重新编程的细胞的数量),如由Shi等人,Cell-Stem Cell 2:525-528(2008);Huangfu等人,Nature Biotechnology26(7):795-797(2008)和Marson等人,Cell-Stem Cell 3:132-135(2008)所示。因此,增强诱导型多能干细胞产生的效率或速率的剂或剂的组合可用于产生患者特异性或疾病特异性iPSC。增强重新编程效率的剂的一些非限制性实例包括可溶性Wnt、Wnt条件培养基、BIX-01294(G9a组蛋白甲基转移酶)、PD0325901(MEK抑制剂)、DNA甲基转移酶抑制剂、组蛋白脱乙酰酶(HDAC)抑制剂、丙戊酸、5'-氮杂胞苷、地塞米松、辛二酰苯

胺、异羟肟酸(SAHA)、维生素C和曲古抑菌素(TSA)等。

[0316] 重新编程增强剂的其他非限制性实例包括:辛二酰苯胺异羟肟酸(SAHA(例如,MK0683、伏立诺他)和其他异羟肟酸)、BML-210、狄普特辛(Depudecin)(例如,(-)-狄普特辛)、HC毒素、Nullscript(4-(1,3-二氧代-1H,3H-苯并[de]异喹啉-2-基)-N-羟基丁酰胺)、苯基丁酸盐(例如,苯基丁酸钠)和丙戊酸((VP A)和其他短链脂肪酸)、斯瑞普肽(Scriptaid)、苏拉明钠、曲古抑菌素A(TSA)、APHA化合物8、阿匹西定、丁酸钠、特戊酰氧基丁酸甲酯(Pivanex,AN-9)、曲破辛(曲破辛)B、克林霉素(Chlamydocin)、缩肽(还称为FR901228或FK228)、苯甲酰胺(例如,CI-994(例如,N-乙酰基地那林)和MS-27-275)、MGCD0103、NVP-LAQ-824、CBHA(间羧基肉桂酸双异羟肟酸)、JNJ16241199、Tubacin、A-161906、proxamide、oxamflatin、3-Cl-UCHA(例如,6-(3-氯苯基脲基)己酸异羟肟酸)、AOE(2-氨基-8-氧代-9,10-环氧癸酸)、CHAP31和CHAP 50。其他重新编程增强剂包括例如HDAC的显性阴性形式(例如,催化失活形式)、HDAC的siRNA抑制剂和特异性地结合至HDAC的抗体。此类抑制剂可例如从BIOMOL International、Fukasawa、Merck Biosciences、Novartis、Gloucester Pharmaceuticals、Titan Pharmaceuticals、MethylGene和Sigma Aldrich获得。

[0317] 为了证实用于本文所述方法的多能干细胞的诱导,可针对干细胞标志物的表达测试分离的克隆。在源自体细胞的细胞中的这种表达将细胞鉴别为诱导型多能干细胞。干细胞标志物可选自包括以下的非限制性组:SSEA3、SSEA4、CD9、Nanog、Fbxl5、Ecatl、Esgl、Eras、Gdf3、Fgf4、Cripto、Daxl、Zpf296、Slc2a3、Rexl、Utfl和Natl。在一种情况下,例如,表达Oct4或Nanog的细胞被鉴别为多能性。用于检测此类标志物的表达的方法可包括,例如,RT-PCR和检测编码的多肽的存在的免疫学方法,如蛋白质印迹或流式细胞术分析。检测不仅可涉及RT-PCR,而且还可包括蛋白质标志物的检测。细胞内标志物可经由RT-PCR或蛋白质检测方法如免疫细胞化学来最佳地鉴定,而细胞表面标志物可通过例如免疫细胞化学容易地鉴定。

[0318] 分离的细胞的多能干细胞特征可通过评价iPSC分化成三个胚层中的每一个的细胞的能力的测试来确认。作为一个实例,裸鼠中的畸胎瘤形成可用于评价分离的克隆的多能特性。可将细胞引入裸鼠中,并且可对源自所述细胞的肿瘤进行组织学和/或免疫组织化学。例如,包含来自所有三个胚层的细胞的肿瘤的生长进一步表明所述细胞是多能干细胞。

[0319] 周围神经系统的细胞

[0320] 在一些方面,本文描述的遗传工程化人细胞是脑和脊髓外的神经元和神经。处理信息的神经元和为神经系统提供机械和代谢支持的神经胶质细胞是周围神经系统的两大类细胞。神经元的非限制性实例包括感觉神经元(从诸如皮肤、肌肉和器官的区域中的感觉受体收集脉冲并且通过神经将那些脉冲传递至CNS)和运动神经元(收集来自CNS的传出消息并将它们传递至适当的身体器官,从而指导它们需要采取什么行动)。神经胶质细胞的非限制性实例包括神经中的施万细胞或神经节中的卫星细胞。

[0321] 产生患者特异性iPSC

[0322] 本公开的离体方法的一个步骤可涉及产生患者特异性iPS细胞、患者特异性iPS细胞或患者特异性iPS细胞系。本领域中存在许多已建立的方法用于产生患者特异性iPS细胞;如在Takahashi和Yamanaka 2006;Takahashi,Tanabe等人2007中所描述。例如,产生步

骤可包括:a)从患者分离体细胞,如皮肤细胞或成纤维细胞;以及b)将一组多能性相关基因引入体细胞,以便诱导所述细胞成为多能干细胞。所述组多能性相关基因可以是选自由以下组成的组的基因中的一种或多种:OCT4、SOX1、SOX2、SOX3、SOX15、SOX18、NANOG、KLF1、KLF2、KLF4、KLF5、c-MYC、n-MYC、REM2、TERT和LIN28。

[0323] 进行患者组织的活检或抽吸物

[0324] 活检或抽吸物是从身体取出的组织或流体的样品。存在许多种不同的活检或抽吸物。它们几乎全部涉及使用锋利的工具来除去少量组织。如果活检将在皮肤或其他敏感区域上,则可首先施加麻木剂。可根据本领域中的任何已知方法进行活检或抽吸物。例如,在骨髓抽吸物中,使用大针来进入骨盆骨以收集骨髓。例如,在来自皮肤或腿部的神经活检以分离周围神经系统的神经元的情况下,切除造成最小的机械损伤的神经节段。避免挤压或拉伸神经,并且不尝试过度除去脂肪或结缔组织。

[0325] 分离周围神经系统的神经元

[0326] 可根据本领域中任何已知的方法来分离周围神经系统的神经元。例如,在无菌条件下切除造成最小机械损伤的神经节段。严格避免挤压或拉伸神经,并且不尝试过度除去脂肪或结缔组织。由于神经纤维对机械损伤非常敏感,因此首先进行近端神经切断。在分离后,除去并收集最外层的结缔组织层、神经外膜以用于酶消化。在细镊子的帮助下梳理纤维,直到所有的神经束分成单根纤维。然后将神经外膜和梳理的纤维进行用分散酶II和I型胶原酶进行酶消化过夜。过滤并通过离心收集消化的产物。将所得细胞悬浮液接种在粘合PLL/层粘连蛋白基底上。培养粘附细胞用于分析(Andersen等人,Scientific Reports-Nature,2016,6:31781)。

[0327] 分离间充质干细胞

[0328] 可根据本领域中已知的任何方法分离间充质干细胞,如从患者的骨髓或外周血分离。例如,可将骨髓抽吸物收集到具有肝素的注射器中。可在Percoll上洗涤细胞并离心。可在含有10%胎牛血清(FBS)的杜氏改良的伊格尔氏培养基(DMEM)(低葡萄糖)中培养细胞(Pittinger MF,Mackay AM,Beck SC等人,Science 1999;284:143-147)。

[0329] 遗传修饰的细胞

[0330] 术语“遗传修饰的细胞”是指包含通过基因组编辑(例如,使用CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1系统)引入的至少一种遗传修饰的细胞。在本文的一些离体实例中,遗传修饰的细胞可以是遗传修饰的祖细胞。在本文的一些体内实例中,遗传修饰的细胞可以是周围神经系统的遗传修饰的神经元。本文考虑了一种遗传修饰的细胞,其包含外源靶向基因组的核酸和/或编码靶向基因组的核酸的外源核酸。

[0331] 术语“对照处理的群体”描述了已经用相同培养基、病毒诱导、核酸序列、温度、汇合、烧瓶大小、pH等处理的细胞群体,除了添加基因组编辑组分。本领域中已知的任何方法可用于测量SCN9A基因的转录或蛋白质表达或活性,例如SCN9A蛋白的蛋白质印迹分析或用于定量SCN9A mRNA的实时PCR。

[0332] 术语“分离的细胞”是指从最初发现它的生物体中除去的细胞,或这种细胞的后代。任选地,所述细胞可在体外培养,例如在限定条件下或在其他细胞存在下培养。任选地,可将所述细胞随后引入第二生物体中或重新引入自其分离所述细胞的生物体中(或所述细胞自其传代的细胞)。

[0333] 关于分离的细胞群体的术语“分离的群体”是指已从混合或异质的细胞群体中除去并分离的细胞群体。在一些情况下,与自其分离或富集细胞的异质群体相比,分离的群体可以是基本上纯的细胞群体。在一些情况下,与包含人祖细胞和所述人祖细胞所来源的细胞的异质细胞群体相比,所述分离的群体可以是人祖细胞的分离的群体,例如,基本上纯的人祖细胞群体。

[0334] 关于特定细胞群体,术语“基本上增强的”是指其中特定类型的细胞的出现(取决于例如此类细胞的所需水平)相对于预先存在或参考水平增加至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少20倍、至少50倍、至少100倍、至少400倍、至少1000倍、至少5000倍、至少20000倍、至少100000倍或更多倍以改善疼痛的细胞群体

[0335] 关于特定细胞群体的术语“基本上富集的”是指相对于构成总细胞群体的细胞至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%或更多的细胞群体。

[0336] 关于特定细胞群体的术语“基本上纯的”是指相对于构成总细胞群体的细胞至少约75%、至少约85%、至少约90%或至少约95%纯的细胞群体。也就是说,关于祖细胞群体的术语“基本上纯的”或“实质上纯化的”是指含有少于约20%、约15%、约10%、约9%、约8%、约7%、约6%、约5%、约4%、约3%、约2%、约1%或少于1%的不是由本文的术语定义的祖细胞的细胞的细胞群体。

[0337] 使基因组编辑的iPSC分化成周围神经系统的细胞

[0338] 本公开的离体方法的另一步骤可包括使基因组编辑的iPSC分化成周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)。可根据本领域中已知的任何方法进行分化步骤。例如,使用脑源性神经营养因子(BDNF)、神经胶质细胞源性的神经营养因子(GDNF)、神经生长因子(NGF)和二丁酰基环状AMP(dbcAMP)的组合诱导iPSC的神经元分化。然后,使用睫状神经营养因子(CNTF)、神经调节蛋白1β和dbcAMP将iPSC源性的神经细胞进一步分化成施万细胞(Wang等人,Biomaterials.2011;32(22):5023-5032)。

[0339] 使基因组编辑的间充质干细胞分化成周围神经系统的细胞

[0340] 本公开的离体方法的另一步骤可包括使基因组编辑的间充质干细胞分化成周围神经系统的细胞(例如,神经元或神经胶质细胞,如神经中的施万细胞或神经节中的卫星神经胶质细胞)。可根据本领域中已知的任何方法进行分化步骤。例如,用各种因子和激素处理MSC,所述因子和激素包括碱性成纤维细胞生长因子、人重组血小板源性生长因子、毛喉素和神经胶质生长因子-2(Ladak等人、EXperimental Neurology 228(2011)242-252)。

[0341] 将细胞植入患者体内

[0342] 本公开的离体方法的另一步骤可包括将所述基因组编辑的周围神经系统的神经元植入患者体内。此植入步骤可使用本领域中已知的任何植入方法完成。例如,遗传修饰的细胞可直接注射在患者的血液中或以其他方式施用于患者。

[0343] III.制剂和递送

[0344] 药学上可接受的载体

[0345] 将祖细胞施用至本文考虑的受试者的离体方法涉及使用包含祖细胞的治疗性组合物。

[0346] 治疗性组合物可含有溶解或分散在其中作为活性成分的生理学上可耐受的载体和细胞组合物以及任选的至少一种如本文所述的另外的生物活性剂。在一些情况下,除非如此需要,否则当施用至哺乳动物或人患者用于治疗目的时,所述治疗性组合物基本上不具有免疫原性。

[0347] 通常,本文所述的祖细胞可作为具有药学上可接受的载体的悬浮液施用。本领域技术人员将认识到,待用于细胞组合物中的药学上可接受的载体将不包括基本上干扰待递送至受试者的细胞的活力的量的缓冲剂、化合物、冷冻保存剂、防腐剂或其他剂。包含细胞的制剂可包含例如允许维持细胞膜完整性的渗透缓冲液和在施用时维持细胞活力或增强植入的任选的营养物。此类制剂和悬浮液是本领域中的技术人员已知的和/或可使用常规实验适用于如本文所述的祖细胞。

[0348] 细胞组合物也可乳化或作为脂质体组合物存在,条件是乳化程序不会不利地影响细胞活力。细胞和任何其他活性成分可与赋形剂混合,所述赋形剂是药学上可接受的且与活性成分相容并且其量适合用于本文所述的治疗方法中。

[0349] 包含在细胞组合物中的额外剂可包括其中的组分的药学上可接受的盐。药学上可接受的盐包括酸加成盐(由多肽的游离氨基形成),所述盐由例如像盐酸或磷酸的无机酸,或诸如乙酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成。由游离羧基形成的盐也可衍生自无机碱(例如像钠、钾、铵、钙或铁氢氧化物)和有机碱(诸如异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等)。

[0350] 生理学上可耐受的载体是本领域中熟知的。示例性液体载体是无菌水溶液,所述无菌水溶液不含除活性成分和水以外的材料,或者含有诸如生理pH值下的磷酸钠、生理盐水或两者(如磷酸盐缓冲盐水)的缓冲剂。此外,水性载体可含有多于一种缓冲盐以及诸如氯化钠和氯化钾的盐、右旋糖、聚乙二醇和其他溶质。液体组合物还可含有液相,所述液相包含或不包含水。此类另外的液相的实例是甘油、植物油如棉籽油和水-油乳液。在治疗具体病症或疾患中有效的细胞组合物中使用的活性化合物的量可取决于所述病症或疾患的性质,并且可通过标准临床技术确定。

[0351] 指导RNA制剂

[0352] 本公开的指导RNA可用药学上可接受的赋形剂如载体、溶剂、稳定剂、佐剂、稀释剂等进行配制,这取决于特定施用模式和剂型。可配制指导RNA组合物以获得生理上相容的pH并且在pH约3至pH约11、约pH 3至约pH 7的范围内,这取决于制剂和施用途径。在一些情况下,可将pH调节至约pH 5.0至约pH 8的范围。在一些情况下,所述组合物可包含治疗有效量的如本文所述的至少一种化合物和一种或多种药学上可接受的赋形剂。任选地,所述组合物可包含本文所述的化合物的组合,或者可包含可用于治疗或预防细菌生长的第二活性成分(例如但不限于抗细菌剂或抗微生物剂),或者可包含本公开的试剂的组合。

[0353] 合适的赋形剂包括例如,载体分子,所述载体分子包括较大的缓慢代谢的大分子如蛋白质、多糖、聚乳酸、聚乙醇酸、聚氨基酸、氨基酸共聚物和失活病毒颗粒。其他示例性赋形剂可包括抗氧化剂(例如但不限于抗坏血酸)、螯合剂(例如但不限于EDTA)、碳水化合物(例如但不限于糊精、羟烷基纤维素和羟烷基甲基纤维素)、硬脂酸、液体(例如但不限于,油、水、盐水、甘油和乙醇)、润湿剂或乳化剂、pH缓冲物质等。

[0354] 递送

[0355] 指导RNA多核苷酸(RNA或DNA)和/或核酸内切酶多核苷酸(RNA或DNA)可通过本领域中已知的病毒或非病毒递送载体递送。或者,核酸内切酶多肽可通过本领域中已知的病毒或非病毒递送媒介物(如电穿孔或脂质纳米颗粒)递送。在其他替代方面,所述DNA核酸内切酶可作为单独或与一种或多种指导RNA预复合的一种或多种多肽递送或一种或多种crRNA和tracrRNA递送。

[0356] 多核苷酸可通过非病毒递送媒介物递送,所述媒介物包括但不限于纳米颗粒、脂质体、核糖核蛋白、带正电荷的肽、小分子RNA缀合物、适体-RNA嵌合体和RNA-融合蛋白复合物。一些示例性非病毒递送媒介物描述于Peer和Lieberman,Gene Therapy,18:1127-1133(2011)中(其集中于用于siRNA的非病毒递送媒介物,所述媒介物也可用于递送其他多核苷酸)。

[0357] 对于本公开的多核苷酸,制剂可选自例如在国际申请PCT/US2012/069610中教导的那些中的任一种。

[0358] 可通过脂质纳米颗粒(LNP)将多核苷酸(如指导RNA、sgRNA和编码核酸内切酶的mRNA)递送至细胞或患者。

[0359] LNP是指直径小于1000nm、500nm、250nm、200nm、150nm、100nm、75nm、50nm或25nm的任何颗粒。或者,纳米颗粒的尺寸可在1-1000nm、1-500nm、1-250nm、25-200nm、25-100nm、35-75nm或25-60nm的范围内。

[0360] LNP可由阳离子、阴离子或中性脂质体制成。中性脂质如促融合磷脂DOPE或膜组分胆固醇可作为“辅助脂质”包含在LNP中,以增强转染活性和纳米颗粒稳定性。阳离子脂质的限制包括由于稳定性差和快速清除所致的低功效,以及炎症或抗炎症应答的产生。

[0361] LNP还可包含疏水性脂质、亲水性脂质或疏水性脂质和亲水性脂质两者。

[0362] 本领域中已知的任何脂质或脂质的组合都可用于产生LNP。用于产生LNP的脂质的实例是:DOTMA、DOSPA、DOTAP、DMRIE、DC-胆固醇、DOTAP-胆固醇、GAP-DMORIE-DPyPE和GL67A-DOPE-DMPE-聚乙二醇(PEG)。阳离子脂质的实例是:98N12-5、C12-200、DLin-KC2-DMA(KC2)、DLin-MC3-DMA(MC3)、XTC、MD1和7C1。中性脂质的实例是:DPSC、DPPC、POPC、DOPE和SM。PEG修饰的脂质的实例是:PEG-DMG、PEG-CerC14和PEG-CerC20。

[0363] 所述脂质可以任何数量的摩尔比组合以产生LNP。此外,多核苷酸可与广泛范围的摩尔比的脂质组合以产生LNP。

[0364] 如先前所述,位点定向多肽和靶向基因组的核酸可各自分别施用至细胞或患者。另一方面,位点定向多肽可与一种或多种指导RNA或一种或多种crRNA以及tracrRNA预复合。然后可将预复合的材料施用至细胞或患者。这种预复合材料被称为核糖核蛋白颗粒(RNP)。

[0365] RNA能够与RNA或DNA形成特异性相互作用。虽然这种性质在许多生物过程中利用,但它也具有在富含核酸的细胞环境中混杂相互作用的风险。这一问题的一种解决方案是形成核糖核蛋白颗粒(RNP),其中RNA与核酸内切酶预复合。RNP的另一个益处是保护RNA免于降解。

[0366] RNP中的核酸内切酶可被修饰或未修饰。同样地,gRNA、crRNA、tracrRNA或sgRNA可被修饰或未修饰。许多修饰是本领域中已知的并且可使用。

[0367] 核酸内切酶和sgRNA通常可以1:1摩尔比组合。或者,核酸内切酶、crRNA和

tracrRNA通常可以1:1:1摩尔比组合。然而,可使用广泛范围的摩尔比来产生RNP。

[0368] AAV(腺相关病毒)

[0369] 重组腺相关病毒(AAV)载体可用于递送。用于产生rAAV颗粒的技术是本领域的标准,其中包含待递送的多核苷酸的待包装的AAV基因组、rep和cap基因以及辅助病毒功能被提供至细胞。rAAV的产生通常需要,以下组分存在于单细胞内(在本文中表示为包装细胞):rAAV基因组、与rAAV基因组分离(即不在其中)的AAV rep和cap基因以及辅助病毒功能。AAV rep和cap基因可来自重组病毒可来源的任何AAV血清型,并且可来自与rAAV基因组ITR不同的AAV血清型,包括但不限于本文所述的AAV血清型。假型化rAAV的产生在例如国际专利申请公布号WO 01/83692中公开。

[0370] AAV血清型

[0371] 编码本公开的组合物(例如本公开的核酸内切酶、供体序列或RN A指导分子)的AAV颗粒包装多核苷酸可包含或源自任何天然或重组AAV血清型。根据本公开,AAV颗粒可利用或基于选自以下血清型及其变体中的任一者的血清型,包括但不限于AAV1、AAV10、AAV106.1/hu.37、AAV11、AAV114.3/hu.40、AAV12、AAV127.2/hu.41、AAV127.5/hu.42、AAV128.1/hu.43、AAV128.3/hu.44、AAV130.4/hu.48、AAV145.1/hu.53、AAV145.5/hu.54、AAV145.6/hu.55、AAV16.12/hu.11、AAV16.3、AAV16.8/hu.10、AAV161.10/hu.60、AAV161.6/hu.61、AAV1-7/rh.48、AAV1-8/rh.49、AAV2、AAV2.5T、AAV2-15/rh.62、AAV223.1、AAV223.2、AAV223.4、AAV223.5、AAV223.6、AAV223.7、AAV2-3/rh.61、AAV24.1、AAV2-4/rh.50、AAV2-5/rh.51、AAV27.3、AAV29.3/bb.1、AAV29.5/bb.2、AAV2G9、AAV-2-pre-mi RNA-101、AAV3、AAV3.1/hu.6、AAV3.1/hu.9、AAV3-11/rh.53、AAV3-3、AAV33.12/hu.17、AAV33.4/hu.15、AAV33.8/hu.16、AAV3-9/rh.52、AAV3a、AAV3b、AAV4、AAV4-19/rh.55、AAV42.12、AA V42-10、AAV42-11、AAV42-12、AAV42-13、AAV42-15、AAV42-1b、AAV42-2、AAV42-3a、AAV42-3b、AAV42-4、AAV42-5a、AA V42-5b、AAV42-6b、AAV42-8、AAV42-aa、AAV43-1、AAV43-12、AAV43-20、AAV43-21、AAV43-23、AAV43-25、AAV43-5、AAV4-4、AAV44.1、AAV44.2、AAV44.5、AAV46.2/hu.28、AAV46.6/hu.29、AAV4-8/r11.64、AAV4-8/rh.64、AAV4-9/rh.54、AAV5、AAV52.1/hu.20、AAV52/hu.19、AAV5-22/rh.58、AAV5-3/rh.57、AAV54.1/hu.21、AAV54.2/hu.22、AAV54.4R/hu.27、AAV54.5/hu.23、AAV54.7/hu.24、AAV58.2/hu.25、AAV6、AAV6.1、AAV6.1.2、AAV6.2、AAV7、AAV7.2、AAV7.3/hu.7、AAV8、AAV-8b、AAV-8h、AAV9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84、AAV9.9、AAVA3.3、AAVA3.4、AAVA3.5、AAVA3.7、AAV-b、AAVC1、AAVC2、AAVC5、AAVCh.5、AAVCh.5R1、AAVcy.2、AAVcy.3、AAVcy.4、AAVcy.5、AAVCy.5R1、AAVCy.5R2、AAVCy.5R3、AAVCy.5R4、AAVcy.6、AAV-DJ、AAV-DJ8、AAVF3、AAVF5、AAV-h、AAVH-1/hu.1、AAVH2、AAVH-5/hu.3、AAVH6、AAVhE1.1、AAVhER1.14、AAVhEr1.16、AAVhEr1.18、AAVhER1.23、AAVhEr1.35、AAVhEr1.36、AAVhEr1.5、AAVhEr1.7、AAVhEr1.8、AAVhEr2.16、AAVhEr2.29、AAVhEr2.30、AAVhEr2.31、AAVhEr2.36、AAVhEr2.4、AAVhEr3.1、AAVhu.1、AAVhu.10、AAVhu.11、AAVhu.11、AAVhu.12、AAVhu.13、AAVhu.14/9、AAVhu.15、AAVhu.16、AAVhu.17、AAVhu.18、AAVhu.19、AAVhu.2、AAVhu.20、AAVhu.21、AAVhu.22、AAVhu.23.2、AAVhu.24、AAVhu.25、AAVhu.27、AAVhu.28、AAVhu.29、AAVhu.29R、AAVhu.3、AAVhu.31、AAVhu.32、AAVhu.34、AAVhu.35、AAVhu.37、AAVhu.39、AAVhu.4、AAVhu.40、AAVhu.41、AAVhu.42、AAVhu.43、AAVhu.44、AAVhu.44R1、

AAVhu.44R2、AAVhu.44R3、AAVhu.45、AAVhu.46、AAVhu.47、AAVhu.48、AAVhu.48R1、AAVhu.48R2、AAVhu.48R3、AAVhu.49、AAVhu.5、AAVhu.51、AAVhu.52、AAVhu.53、AAVhu.54、AAVhu.55、AAVhu.56、AAVhu.57、AAVhu.58、AAVhu.6、AAVhu.60、AAVhu.61、AAVhu.63、AAVhu.64、AAVhu.66、AAVhu.67、AAVhu.7、AAVhu.8、AAVhu.9、AAVhu.t 19、AAVLG-10/rh.40、AAVLG-4/rh.38、AAVLG-9/hu.39、AAVLG-9/hu.39、AAV-LK01、AAV-LK02、AAVLK03、AAV-LK03、AAV-LK04、AAV-LK05、AAV-LK06、AAV-LK07、AAV-LK08、AAV-LK09、AAV-LK10、AAV-LK11、AAV-LK12、AAV-LK13、AAV-LK14、AAV-LK15、AAV-LK17、AAV-LK18、AAV-LK19、AAVN721-8/rh.43、AAV-PAEC、AAV-PAEC11、AAV-PAEC12、AAV-PAEC2、AAV-PAEC4、AAV-PAEC6、AAV-PAEC7、AAV-PAEC8、AAVpi.1、AAVpi.2、AAVpi.3、AAVrh.10、AAVrh.12、AAVrh.13、AAVrh.13R、AAVrh.14、AAVrh.17、AAVrh.18、AAVrh.19、AAVr h.2、AAVrh.20、AAVrh.21、AAVrh.22、AAVrh.23、AAVrh.24、AA Vrh.25、AAVrh.2R、AAVrh.31、AAVrh.32、AAVrh.33、AAVrh.34、AAVrh.35、AAVrh.36、AAVrh.37、AAVrh.37R2、AAVrh.38、AAVr h.39、AAVrh.40、AAVrh.43、AAVrh.44、AAVrh.45、AAVrh.46、AAVrh.47、AAVrh.48、AAVrh.48、AAVrh.48.1、AAVrh.48.1.2、AAVrh.48.2、AAVrh.49、AAVrh.50、AAVrh.51、AAVrh.52、AAVrh.53、AAVrh.54、AAVrh.55、AAVrh.56、AAVrh.57、AAVrh.58、AAVrh.59、AAVrh.60、AAVrh.61、AAVrh.62、AAVrh.64、AAVrh.64R1、AAVrh.64R2、AAVrh.65、AAVrh.67、AAVrh.68、AAVrh.69、AAVrh.70、AAVrh.72、AAVrh.73、AAVrh.74、AAVrh.8、AAVrh.8R、AA Vrh8R、AAVrh8R A586R突变体、AAVrh8R R533A突变体、BAA V、BNP61 AAV、BNP62 AAV、BNP63 AAV、牛AAV、山羊AA V、日本人AAV 10、真实型AAV(ttAAV)、UPENN AAV 10、AA V-LK16、AAAV、AAV改组100-1、AAV改组100-2、AAV改组100-3、AAV改组100-7、AAV改组10-2、AAV改组10-6、AAV改组10-8、AAV SM 100-10、AAV SM 100-3、AAV SM 10-1、AA V SM 10-2和/或AAV SM 10-8。

[0372] 在一些方面,所述AAV血清型可以是或具有AAV9序列中的突变,如N Pulicherla等人(Molecular Therapy 19(6):1070-1078(2011))所描述,如但不限于AAV9.9、AAV9.11、AAV9.13、AAV9.16、AAV9.24、AAV9.45、AAV9.47、AAV9.61、AAV9.68、AAV9.84。

[0373] 在一些方面,所述AAV血清型可以是或具有如美国专利号US6156303中所描述的序列,如但不限于AAV3B(U.S.6156303的SEQ ID NO:1和10)、AAV6(U.S.6156303的SEQ ID NO:2、7和11)、AAV2(U.S.6156303的SEQ ID NO:3和8)、AAV3A(U.S.6156303的SEQ ID NO:4和9)或其衍生物。

[0374] 在一些方面,所述血清型可以是AAVDJ或其变体,如AAVDJ8(或AAV-DJ8),如Grimm等人(Journal of Virology 82(12):5887-5911(2008))所描述。AAVDJ8的氨基酸序列可包含两个或更多个突变以除去肝素结合结构域(HBD)。作为非限制性实例,描述为美国专利号7,588,772中的SEQ ID NO:1的AAV-DJ序列可包含两种突变:(1)R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)改变为谷氨酰胺(Q;Gln)和(2)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)改变为苏氨酸(T;Thr)。作为另一个非限制性实例,可包含三种突变:(1)K406R,其中氨基酸406处的赖氨酸(K;Lys)改变为精氨酸(R;Arg),(2)R587Q,其中氨基酸587处的精氨酸(R;Arg)改变为谷氨酰胺(Q;Gln)以及(3)R590T,其中氨基酸590处的精氨酸(R;Arg)改变为苏氨酸(T;Thr)。

[0375] 在一些方面中,所述AAV血清型可以是或具有如国际公布号WO2015121501中所述的序列,如但不限于真实型AAV(ttAAV)(WO2015121501的SEQ ID NO:2)、“UPenn AAV10”

(WO2015121501的SEQ ID NO:8)、“日本人AAV10”(WO2015121501的SEQ ID NO:9)或其变体。

[0376] 根据本公开,AAV衣壳血清型选择或使用可来自多种物种。在一个实例中,所述AAV可以是禽类AAV(AAAV)。所述AAAV血清型可以是或具有如美国专利号9238800中所描述的序列,如但不限于AAAV(US9,238,800的SEQ ID NO:1、2、4、6、8、10、12和14)或其变体。

[0377] 在一个实例中,所述AAV可以是牛AAV(BAAV)。所述BAAV血清型可以是或具有如美国专利号9,193,769中所描述的序列,如但不限于BAAV(U.S.9193769的SEQ ID NO:1和6)或其变体。所述BAAV血清型可以是或具有如美国专利号7427396中所描述的序列,如但不限于BAAV(US7427396的SEQ ID NO:5和6)或其变体。

[0378] 在一个实例中,所述AAV可以是山羊AAV。所述山羊AAV血清型可以是或具有如美国专利号7427396中所描述的序列,如但不限于山羊AAV(US7427396的SEQ ID NO:3)或其变体。

[0379] 在其他实例中,所述AAV可被工程化为来自两种或更多种亲本血清型的杂合AAV。在一个实例中,所述AAV可以是AAV2G9,其包含来自AAV2和AAV9的序列。所述AAV2G9 AAV血清型可以是或具有如美国专利公布号20160017005中所描述的序列。

[0380] 在一个实例中,所述AAV可以是由AAV9衣壳文库产生的血清型,其具有氨基酸390-627(VP1编号)中的突变,如Pulicherla等人(Molecular Therapy 19(6):1070-1078(2011)所描述。血清型和相应的核苷酸和氨基酸取代可以是但不限于,AAV9.1(G1594C;D532H)、AAV6.2(T1418A和T1436X;V473D和I479K)、AAV9.3(T1238A;F413Y)、AAV9.4(T1250C和A1617T;F417S)、AAV9.5(A1235G、A1314T、A1642G、C1760T;Q412R、T548A、A587V)、AAV9.6(T1231A;F411I)、AAV9.9(G1203A、G1785T;W595C)、AAV9.10(A1500G、T1676C;M559T)、AAV9.11(A1425T、A1702C、A1769T;T568P、Q590L)、AAV9.13(A1369C、A1720T;N457H、T574S)、AAV9.14(T1340A、T1362C、T1560C、G1713A;L447H)、AAV9.16(A1775T;Q592L)、AAV9.24(T1507C、T1521G;W503R)、AAV9.26(A1337G、A1769C;Y446C、Q590P)、AAV9.33(A1667C;D556A)、AAV9.34(A1534G、C1794T;N512D)、AAV9.35(A1289T、T1450A、C1494T、A1515T、C1794A、G1816A;Q430L、Y484N、N98K、V606I)、AAV9.40(A1694T、E565V)、AAV9.41(A1348T、T1362C;T450S)、AAV9.44(A1684C、A1701T、A1737G;N562H、K567N)、AAV9.45(A1492T、C1804T;N498Y、L602F)、AAV9.46(G1441C、T1525C、T1549G;G481R、W509R、L517V)、9.47(G1241A、G1358A、A1669G、C1745T;S414N、G453D、K557E、T582I)、AAV9.48(C1445T、A1736T;P482L、Q579L)、AAV9.50(A1638T、C1683T、T1805A;Q546H、L602H)、AAV9.53(G1301A、A1405C、C1664T、G1811T;R134Q、S469R、A555V、G604V)、AAV9.54(C1531A、T1609A;L511I、L537M)、AAV9.55(T1605A;F535L)、AAV9.58(C1475T、C1579A;T492I、H527N)、AAV.59(T1336C;Y446H)、AAV9.61(A1493T;N498I)、AAV9.64(C1531A、A1617T;L511I)、AAV9.65(C1335T、T1530C、C1568A;A523D)、AAV9.68(C1510A;P504T)、AAV9.80(G1441A;G481R)、AAV9.83(C1402A、A1500T;P468T、E500D)、AAV9.87(T1464C、T1468C;S490P)、AAV9.90(A1196T;Y399F)、AAV9.91(T1316G、A1583T、C1782G、T1806C;L439R、K528I)、AAV9.93(A1273G、A1421G、A1638C、C1712T、G1732A、A1744T、A1832T;S425G、Q474R、Q546H、P571L、G578R、T582S、D611V)、AAV9.94(A1675T;M559L)以及AAV9.95(T1605A;F535L)。

[0381] 在一个实例中,所述AAV可以是包含至少一种AAV衣壳CD8+T细胞表位的血清型。作为非限制性实例,血清型可以是AAV1、AAV2或AAV8。

[0382] 在一个实例中,AAV可以是变体,如Deverman.2016.Nature Biotechnology.34(2):204-209中描述的PHP.A或PHP.B。

[0383] 在一个实例中,AAV可以是选自在SEQ ID NO:4734-5302和表2中发现的那些中的任一种的血清型。

[0384] 在一个实例中,AAV可由SEQ ID NO:4734-5302和表2中公开的序列、片段或变体编码。

[0385] rAAV产生的一般原理综述于例如,Carter,1992,Current Opinions in Biotechnology,1533-539;和Muzyczka,1992,Curr.Topics in Microbial.and Immunol.,158:97-129)中。各种方法描述于Ratschin等人,Mol.Cell.Biol.4:2072(1984);Hermonat等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6466(1984);Tratschin等人,Mol.Cell.Biol.5:3251(1985);McLaughlin等人,J.Virol.,62:1963(1988);以及Lebkowski等人,1988Mol.Cell.Biol.,7:349(1988)中。Samulski等人(1989,J.Virol.,63:3822-3828);美国专利号5,173,414;WO 95/13365和相应的美国专利号5,658,776;WO 95/13392;WO 96/17947;PCT/US98/18600;WO 97/09441(PCT/US96/14423);WO 97/08298(PCT/US96/13872);WO 97/21825(PCT/US96/20777);WO 97/06243(PCT/FR96/01064);WO 99/11764;Perrin等人(1995)Vaccine 13:1244-1250;Paul等人(1993)Human Gene Therapy 4:609-615;Clark等人(1996)Gene Therapy3:1124-1132;美国专利号5,786,211;美国专利号5,871,982;以及美国专利号6,258,595。

[0386] AAV载体血清型可与靶细胞类型匹配。例如,以下示例性细胞类型可尤其通过指定的AAV血清型转导。

[0387] 表2.组织/细胞类型和血清型

[0388]

组织/细胞类型	血清型
肝脏	AAV3、AAV8、AAV5、AAV9
骨骼肌	AAV1、AAV7、AAV6、AAV8、AAV9
中枢神经系统	AAV5、AAV1、AAV4、AAV9
RPE	AAV5、AAV4
感光细胞	AAV5
肺	AAV9
心脏	AAV8
胰腺	AAV8
肾脏	AAV2、AAV8
造血干细胞	AAV6

[0389] 除腺相关病毒载体以外,还可使用其他病毒载体。此类病毒载体包括但不限于慢病毒、甲病毒、肠病毒、瘟病毒、杆状病毒、疱疹病毒、爱泼斯坦巴尔病毒、乳多空病毒、痘病毒、痘苗病毒和单纯疱疹病毒。

[0390] 在一些方面,Cas9 mRNA、靶向SCN9A基因中的一个或两个位点的sgRNA和供体DNA可各自分别配制成脂质纳米颗粒,或者全部共配制成一个脂质纳米颗粒。

[0391] 在一些方面,Cas9 mRNA可配制在脂质纳米颗粒中,而sgRNA和供体DNA可在AAV载体中递送。

[0392] 选择可用于将Cas9核酸酶作为DNA质粒、作为mRNA或作为蛋白质递送。指导RNA可从相同的DNA表达,或者也可作为RNA递送。可对RNA进行化学修饰以改变或改进其半衰期,或降低免疫应答的可能性或程度。核酸内切酶蛋白可在递送前与gRNA复合。病毒载体允许有效递送;Cas9的分裂型式和Cas9的较小直向同源物可包装在AAV中,用于HDR的供体也可如此。还存在一系列可递送这些组分中的每一种的非病毒递送方法,或者可串联使用非病毒方法和病毒方法。例如,纳米颗粒可用于递送蛋白质和指导RNA,而AAV可用于递送供体DNA。

[0393] 在本文所述的基于体内的疗法的一些方面,编码核酸内切酶、指导RNA和/或供体DNA的病毒载体可经由直接神经节内或脊柱内注射或鞘内递送而递送至周围神经系统的神经元,如初级感觉和运动神经元(Hoyng的人,Front Mol Neurosci.2015年7月15日;8:32)。

[0394] IV.给药和施用

[0395] 术语“施用”、“引入”和“移植”在通过使得引入的细胞至少部分定位在所需部位(如受损伤或修复的部位)的方法或途径将细胞(例如祖细胞)置于受试者中以使得产生所需作用的情况下可互换使用。所述细胞(例如祖细胞)或其分化的子代可通过任何适当的途径施用,所述途径使得递送至受试者中的所需位置,其中植入的细胞或所述胞的组分的至少一部分保持存活。在施用至受试者后细胞的活力的时间可短至几小时(例如二十四小时),至几天,至长达几年,或甚至患者的终生,即长期植入。例如,在本文所述的一些方面,经由全身施用途径(如腹膜内或静脉内途径)施用有效量的祖细胞。

[0396] 术语“个体”、“受试者”、“宿主”和“患者”在本文中可互换使用并且是指需要诊断、治疗或疗法的任何受试者。在一些方面,所述受试者是哺乳动物。在一些方面,所述受试者是人类。

[0397] 当预防性地提供时,本文所述的祖细胞可在任何疼痛症状之前施用至受试者。因此,预防性施用祖细胞群体用于预防疼痛。

[0398] 根据本文所述的方法施用的祖细胞群体可包含从一个或多个供体获得的同种异体祖细胞。此类祖细胞可具有任何细胞或组织来源,例如肝脏、肌肉、心脏等。“同种异体”是指祖细胞或包含从相同物种的一个或多个不同供体获得的祖细胞的生物样品,其中在一个或多个基因座处的基因不相同。例如,施用至受试者的肝脏祖细胞群体可源自一个或多个不相关的供体受试者,或源自一个或多个不相同的同胞。在一些情况下,可使用同源祖细胞群体,如从遗传上相同的动物或从同卵双胞胎获得的那些。祖细胞可以是自体细胞;也就是说,所述祖细胞从受试者获得或分离并施用至同一受试者,即供体和受体是相同的。

[0399] 术语“有效量”是指预防或减轻至少一种或多种疼痛病征或症状所需的祖细胞群体或其子代的量,并且涉及足够量的组合物以提供所需作用,例如,治疗患有疼痛的受试者。因此,术语“治疗有效量”是指祖细胞或包含祖细胞的组合物的在施用至典型受试者(如患有疼痛或处于疼痛风险的受试者)时足以促进特定作用的量。有效量还将包括足以预防或延迟疾病症状的发展、改变疾病症状的病程(例如但不限于减缓疾病症状的进展)或逆转疾病症状的量。应理解,对于任何给定情况,适当的“有效量”可由本领域普通技术人员使用常规实验方法确定。

[0400] 为了用于本文所述的各个方面,有效量的祖细胞包括至少10^2个祖细胞、至少5X 10^2个祖细胞、至少10^3个祖细胞、至少5X 10^3个祖细胞、至少10^4个祖细胞、至少5X 10^4个祖细胞、至少10^5个祖细胞、至少2X 10^5个祖细胞、至少3X 10^5个祖细胞、至少4X 10^5个祖细胞、至少5X 10^5个祖细胞、至少6X 10^5个祖细胞、至少7X 10^5个祖细胞、至少8X 10^5个祖细胞、至少9X 10^5个祖细胞、至少1X 10^6个祖细胞、至少2X 10^6个祖细胞、至少3X 10^6个祖细胞、至少4X 10^6个祖细胞、至少5X 10^6个祖细胞、至少6X 10^6个祖细胞、至少7X 10^6个祖细胞、至少8X 10^6个祖细胞、至少9X 10^6个祖细胞或其倍数。祖细胞可源自一个或多个供体,或者可从自体来源获得。在本文所述的一些实例中,祖细胞可在施用至有需要的受试者之前在培养物中扩增。

[0401] 在患有疼痛的患者的细胞中表达的SCN9A的水平的适度和逐渐降低可有益于改善疾病的一种或多种症状,用于增加长期存活,和/或用于减少与其他治疗相关的副作用。在向人患者施用此类细胞后,产生降低的SCN9A水平的祖细胞的存在是有益的。在一些情况下,相对于经治疗受试者中的总SCN9A,对受试者的有效治疗引起SCN9A减少至少约3%、5%或7%。在一些实例中,SCN9A的减少将是总SCN9A的至少约10%。在一些实例中,SCN9A的减少将是总SCN9A的至少约20%至30%。类似地,甚至相对有限的具有显著降低的SCN9A水平的细胞亚群的引入可在各种患者中是有益的,因为在一些情况下,标准化的细胞将相对于患病细胞具有选择性优势。然而,即使适度水平的具有降低的SCN9A水平的祖细胞也可有益于改善患者的疼痛的一个或多个方面。在一些实例中,此类细胞所施用于的患者中的约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约70%、约80%、约90%或更多的祖细胞产生降低水平的SCN9A。

[0402] “施用的”是指通过使得细胞组合物至少部分地定位在所需位点的方法或途径将祖细胞组合物递送至受试者体内。细胞组合物可通过在受试者中产生有效治疗的任何适当的途径施用,即施用产生递送至受试者中的所需位置,其中递送所述组合物的至少一部分,即至少1x 10^4个细胞被递送至所需部位持续一段时间。

[0403] 在所述方法的一个方面,所述药物组合物可经由诸如但不限于以下的途径施用:肠内(进入肠中)、胃肠、硬膜外(硬膜外)(进入硬脑膜中)、口服(通过口腔)、经皮、硬膜外(硬膜外)、大脑内(进入大脑)、脑室内(进入脑室)、表皮(施加在皮肤上)、皮内(进入皮肤本身)、皮下(在皮肤之下)、经鼻施用(通过鼻)、静脉内(进入静脉)、静脉内推注、静脉内滴注、动脉内(进入动脉)、肌内(进入肌肉)、心脏内(进入心脏)、骨内输注(进入骨髓)、鞘内(进入椎管内)、腹膜内(输注或注射至腹膜中)、膀胱内输注、玻璃体内(通过眼睛)、海绵体内注射(进入病理性腔)、腔内(进入阴茎根部)、阴道内施用、子宫内、羊膜腔外施用、经皮(通过完整皮肤扩散以用于全身分布)、经粘膜(通过粘膜扩散)、经阴道、吹入(鼻吸)、舌下、唇下、灌肠、滴眼剂(到结膜上)、滴耳液、耳(耳中或通过耳)、颊(针对脸颊)、结膜、皮肤、牙(至一个或多个牙齿或牙齿)、电渗透、子宫颈内、窦内、气管内、体外、血液透析、浸润、间质、腹内、羊膜内、关节内、胆囊内、支气管内、囊内、软骨内(在软骨内)、尾部内(在马尾内)、脑池内(在小脑延髓池内)、角膜内(在角膜内)、牙冠内、冠状动脉内(在冠状动脉内)、海绵体内(在阴茎的阴茎海绵体的可膨胀空间内)、椎间盘内(在椎间盘内)、管内(在腺管内)、十二指肠内(在十二指肠内)、硬膜内(在硬膜内或下)、表皮内(至表皮)、食管内(至食管)、胃内(在胃内)、齿龈内(在齿龈内)、回肠内(在小肠的远端部分内)、病灶内(在局部病变内或直接引入

至局部病变)、管腔内(在管的内腔内)、淋巴管内(在淋巴内)、髓内(在骨的骨髓腔内)、脑膜内(在脑膜内)、心肌内(在心肌内)、眼内(在眼睛内)、卵巢内(在卵巢内)、心包内(在心包内)、胸膜内(在胸膜内)、前列腺内(在前列腺内)、肺内(在肺或其支气管内)、窦内(在鼻或眶周窦内)、脊柱内(在脊柱内)、滑膜内(在关节的滑液腔内)、腱内(在腱内)、睾丸内(在睾丸内)、鞘内(在脑脊髓轴的任何水平下的脑脊液内)、胸内(在胸部内)、小管内(在器官的小管内)、肿瘤内(在肿瘤内)、鼓室内(在中耳(aurus media)内)、血管内(在一个或多个血管内)、心室内(在心室内)、离子电渗(通过电流,其中可溶性盐的离子迁移至身体组织中)、冲洗(用于浸洗或冲洗开放性伤口或体腔)、喉(直接在喉上)、鼻饲(通过鼻且进入胃)、封闭敷料技术(局部途径施用,其然后通过封闭所述区域的敷料覆盖)、眼(至外眼)、口咽(直接至口腔和咽)、胃肠外、经皮、关节周围、硬膜外、神经周、牙周、直肠、呼吸道(在呼吸道内通过口或鼻吸入以用于局部或全身作用)、眼球后(脑桥后或眼球后)、心肌内(进入心肌)、软组织、蛛网膜下、结膜下、粘膜下、局部、经胎盘(通过或穿过胎盘)、经气管(通过气管壁)、经鼓室(穿过或通过鼓室)、输尿管(至输尿管)、尿道(至尿道)、阴道、骶管阻滞、诊断、神经阻滞、胆道灌注、心脏灌注、光分离置换法以及脊柱。

[0404] 施用模式包括注射、输注、滴注和/或摄取。“注射”包括但不限于静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、脑室内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、脑脊髓内和胸骨内注射和输注。在一些实例中,途径是静脉内。为了递送细胞,可进行通过注射或输注施用。

[0405] 所述细胞可全身施用。短语“全身施用”、“全身施用的”、“外周施用”和“外周施用的”是指施用除了直接进入靶位点、组织或器官以外的祖细胞群体,以使得所述祖细胞群体替代地进入受试者的循环系统并因此进行代谢和其他类似的过程。

[0406] 包含用于治疗疼痛的组合物的治疗的功效可由熟练的临床医生确定。然而,如果任何一个或所有病征或症状(作为仅一个实例,SCN9A的水平)以有益的方式改变(例如,减少至少10%)或其他临床上接受的疾病症状或标志物得到改善或减轻,则治疗被认为是“有效治疗”。功效还可通过如通过住院所评估个体不再恶化或者需要医疗干预(即,疾病的进展停止或至少减缓)来测量。测量这些指示物的方法是本领域的技术人员已知的和/或在本文进行了描述。治疗包括对个体或动物(一些非限制性实例包括人或哺乳动物)的疾病的任何治疗并且包括:(1)抑制疾病,例如,阻止或减缓症状的进展;或(2)缓解疾病,例如引起症状消退;以及(3)预防症状发展或降低症状发展的可能性。

[0407] 根据本公开的治疗可通过降低或改变个体中SCN9A蛋白的量来改善与疼痛相关的一种或多种症状。

[0408] V.电压门控的钠通道IX型α亚基(SCN9A)基因的特征和性质

[0409] SCN9A一直与疾病和病症相关,所述疾病和病症如但不限于先天性疼痛不敏感症、嗅觉缺失症、假想人格、边缘型人格障碍、乳腺恶性肿瘤、非小细胞肺癌、寒冷耐受不良、发热性惊厥、糖尿病(Diabetes)、糖尿病(Diabetes Mellitus)、解离性障碍、癫痫、红斑性肢痛、原发性红斑肢痛症、面部疼痛、疱疹病毒感染、遗传性感觉自主神经病5型、增生、神经痛、遗传性感觉和自主神经病、退行性多关节炎、疼痛、肢体疼痛、术后疼痛、帕金森病、带状疱疹后遗神经痛、前列腺肿瘤、瘙痒症、癫痫、躯体形式障碍、烟草使用障碍、三叉神经痛、滑膜囊肿、慢性疼痛、急性发作疼痛、先天性副肌强直(病症)、不适、感觉不适、灼痛、痛觉淡

漠、炎性疼痛、机械性疼痛、头皮痛、遗传性运动和感觉神经病II型、常见偏头痛、痛觉缺失、前列腺恶性肿瘤、疼痛障碍、膝骨性关节炎、神经病、复合性局部疼痛综合征、强直-阵挛性发作、遗传性神经病、前列腺癌、乳腺癌、婴儿严重肌阵挛性癫痫、粘液样囊肿、通道病、阵发性极端疼痛障碍、疼痛性神经病变、压迫性神经病、先天性疼痛淡漠常染色体隐性遗传、全身性癫痫伴高热惊厥+2型、全身性癫痫伴高热惊厥+7、家族性高热惊厥3B和小纤维神经病(成人发作被称为小纤维神经病)。使用本文描述的任何方法编辑SCN9A基因可用于治疗、预防和/或减轻本文所述的疾病和病症的症状。

[0410] SCN9A基因编码名称为NaV1.7的钠通道的α亚基。NaV1.7主要在感觉神经元中表达,并且在伤害感受信号传导中起重要作用。已知SCN9A基因的突变引起疼痛感知障碍,包括原发性红斑肢痛症、阵发性极端疼痛障碍、先天性无痛症和小纤维神经病。SCN9A基因中的功能获得性突变导致如在原发性红斑肢痛症和阵发性极度疼痛病症中观察到的自发性疼痛。因此,在患有原发性红斑肢痛症或阵发性极端疼痛障碍的患者中敲除或敲除SCN9A基因可用于治疗、预防和/或减轻相关症状。

[0411] 原发性红斑性肢痛症是一种罕见的常染色体显性病症,其特征在于响应于热量和运动而在脚和手中发作灼痛。受影响的个体通常在儿童早期出现病征和症状,尽管在较轻微的情况下症状可能出现在生命的晚期。这种疾患的管理主要是对症。除了避免疼痛触发(如热量、运动和酒精),治疗选择包括冷却和抬高肢体、使用诸如利多卡因和mexilitine的麻醉药,以及在极端情况下使用阿片类药物。

[0412] 阵发性极端疼痛障碍是另一种罕见病症,其特征在于直肠、眼部和下颌区域的严重发作性疼痛以及皮肤发红。这种疾患的症状通常始于新生儿期或儿童早期,并且可在整个生命过程中保留。用于治疗慢性神经性疼痛病症的剂通常用于缓解由所述疾病引起的疼痛发作。卡马西平(一种钠通道阻滞剂)已证明在这些治疗中最有效。

[0413] 在一个实例中,所述基因是电压门控的钠通道IX型α亚基(SCN9A),其也可称为电压门控的钠通道α亚基9、电压门控的钠通道IX型α多肽、电压门控的钠通道亚基αNav1.7、钠通道蛋白IX型亚基α、神经内分泌钠通道、周围钠通道1、HNE-Na、NENA、PN1、GEFSP7、HSAN2D、Nav1.7、FEB3B、ETHA和SFNP。SCN9A具有2q24.3的细胞遗传学位置,并且基因组坐标位于位置166、195、185-166、375、993处的正向链上的染色体2上。SCN9A的核苷酸序列示出为SEQ ID NO:5303。SCN7A是反向链上SCN9A上游的基因,并且RN7SKP152是反向链上SCN9A下游的基因。AC010127.3是位于SCN9A对面的正向链上的基因。SCN9A的NCBI基因ID为6335,Uniprot ID为Q15858,并且Ensembl基因ID为ENSG00000169432。SCN9A具有3906个SNP、39个内含子和38个外显子。来自Ensembl的外显子标识符以及内含子和外显子的起始/终止位点在表3中示出。

[0414] 表3.SCN9A的内含子和外显子

[0415]

外显子	外显子 ID	起始/终止	内含子	基于外显子 ID 的内含子	起始/终止

[0416]

编号			编号		
EX1	ENSE00001589707	166,375,993 - 166,375,697	INT1	内含子 ENSE00001589707 - ENSE00001584414	166,375,696 - 166,311,807
EX2	ENSE00001584414	166,311,806 - 166,311,499	INT2	内含子 ENSE00001584414 - ENSE00001585608	166,311,498 - 166,307,075
EX3	ENSE00001585608	166,307,074 - 166,306,956	INT3	内含子 ENSE00001585608 - ENSE00001578488	166,306,955 - 166,306,600
EX4	ENSE00001578488	166,306,599 - 166,306,510	INT4	内含子 ENSE00001578488 - ENSE00003608010	166,306,509 - 166,305,921
EX5	ENSE00003608010	166,305,920 - 166,305,792	INT5	内含子 ENSE00003608010 - ENSE00003584389	166,305,791 - 166,304,330
EX6	ENSE00003584389	166,304,329 - 166,304,238	INT6	内含子 ENSE00003584389 - ENSE00001129637	166,304,237 - 166,303,303
EX7	ENSE00001129637	166,303,302 - 166,303,090	INT7	内含子 ENSE00001129637 - ENSE00001128428	166,303,089 - 166,294,663
EX8	ENSE00001128428	166,294,662 - 166,294,599	INT8	内含子 ENSE00001128428 - ENSE00001128421	166,294,598 - 166,293,373
EX9	ENSE00001128421	166,293,372 - 166,293,231	INT9	内含子 ENSE00001128421 - ENSE00001128530	166,293,230 - 166,288,644
EX10	ENSE00001128530	166,288,643 - 166,288,437	INT10	内含子 ENSE00001128530 - ENSE00001128525	166,288,436 - 166,286,624
EX11	ENSE00001128525	166,286,623 - 166,286,336	INT11	内含子 ENSE00001128525 - ENSE00001585370	166,286,335 - 166,284,825
EX12	ENSE00001585370	166,284,824 - 166,284,486	INT12	内含子 ENSE00001585370 - ENSE00001128510	166,284,485 - 166,281,809
EX13	ENSE00001128510	166,281,808 - 166,281,679	INT13	内含子 ENSE00001128510 - ENSE00001128413	166,281,678 - 166,280,596
EX14	ENSE00001128413	166,280,595 - 166,280,357	INT14	内含子 ENSE00001128413 - ENSE00002474880	166,280,356 - 166,278,314

[0417]

EX15	ENSE00002474880	166,278,313 - 166,278,140	INT15	内含子 ENSE00002474880 - ENSE00002495223	166,278,139 - 166,277,340
EX16	ENSE00002495223	166,277,339 - 166,276,983	INT16	内含子 ENSE00002495223 - ENSE00001128485	166,276,982 - 166,272,876
EX17	ENSE00001128485	166,272,875 - 166,272,399	INT17	内含子 ENSE00001128485 - ENSE00001128480	166,272,398 - 166,251,886
EX18	ENSE00001128480	166,251,885 - 166,251,765	INT18	内含子 ENSE00001128480 - ENSE00001128404	166,251,764 - 166,242,657
EX19	ENSE00001128404	166,242,656 - 166,242,502	INT19	内含子 ENSE00001128404 - ENSE00001128471	166,242,501 - 166,238,268
EX20	ENSE00001128471	166,238,267 - 166,238,094	INT20	内含子 ENSE00001128471 - ENSE00001128466	166,238,093 - 166,233,463
EX21	ENSE00001128466	166,233,462 - 166,233,340	INT21	内含子 ENSE00001128466 - ENSE00001128459	166,233,339 - 166,228,973
EX22	ENSE00001128459	166,228,972 - 166,228,691	INT22	内含子 ENSE00001128459 - ENSE00001128456	166,228,690 - 166,227,724
EX23	ENSE00001128456	166,227,723 - 166,227,670	INT23	内含子 ENSE00001128456 - ENSE00002481484	166,227,669 - 166,226,705
EX24	ENSE00002481484	166,226,704 - 166,226,567	INT24	内含子 ENSE00002481484 - ENSE00001128397	166,226,566 - 166,204,465
EX25	ENSE00001128397	166,204,464 - 166,204,360	INT25	内含子 ENSE00001128397 - ENSE00001128443	166,204,359 - 166,204,226
EX26	ENSE00001128443	166,204,225 - 166,203,955	INT26	内含子 ENSE00001128443 - ENSE00001128389	166,203,954 - 166,199,865
EX27	ENSE00001128389	166,199,864 - 166,195,185	INT27	内含子 ENSE00001638161 - ENSE00003608010	166,306,509 - 166,305,921
EX28	ENSE00001638161	166,306,571 - 166,306,510	INT28	内含子 ENSE00003608010 - ENSE00002527733	166,305,791 - 166,304,123
EX29	ENSE00002527733	166,304,122 - 166,304,031	INT29	内含子 ENSE00002527733 -	166,304,030 - 166,303,303

[0418]

				ENSE00001129637	
EX30	ENSE00001728682	166,281,808 - 166,281,760	INT30	内含子 ENSE00001585370 - ENSE00001728682	166,284,485 - 166,281,809
EX31	ENSE00001128517	166,284,824 - 166,284,453	INT31	内含子 ENSE00001128525 - ENSE00001128517	166,286,335 - 166,284,825
EX32	ENSE00001578080	166,311,756 - 166,311,499	INT32	内含子 ENSE00001128517 - ENSE00001728682	166,284,452 - 166,281,809
EX33	ENSE00001577861	166,199,864 - 166,198,672	INT33	内含子 ENSE00001578080 - ENSE00001585608	166,311,498 - 166,307,075
EX34	ENSE00003545902	166,305,920 - 166,305,792	INT34	内含子 ENSE00001128517 - ENSE00001128510	166,284,452 - 166,281,809
EX35	ENSE00003645381	166,304,329 - 166,304,238	INT35	内含子 ENSE00001128443 - ENSE00001577861	166,203,954 - 166,199,865
EX36	ENSE00001934531	166,303,302 - 166,302,619	INT36	内含子 ENSE00003545902 - ENSE00003645381	166,305,791 - 166,304,330
EX37	ENSE00002257282	166,375,987 - 166,375,697	INT37	内含子 ENSE00003645381 - ENSE00001934531	166,304,237 - 166,303,303
EX38	ENSE00002232442	166,199,864 - 166,195,194	INT38	内含子 ENSE00002257282 - ENSE00001584414	166,375,696 - 166,311,807
			INT39	内含子 ENSE00001128443 - ENSE00002232442	166,203,954 - 166,199,865

[0419] 表4提供基于Ensembl数据库关于SCN9A基因的所有转录物的信息。表4中提供了来自Ensembl的转录物ID和转录物的相应NCBI RefSeq ID、来自Ensembl的翻译ID和蛋白质的相应NCBI RefSeq ID、通过Ensembl分类的转录物序列的生物型以及基于表3中的信息的转录物中的外显子和内含子。

[0420] 表4.SCN9A的转录物信息

[0421]

转录物 ID	转录物 NCBI RefSeq ID	翻译 ID	蛋白质 NCBI RefSeq ID	序列生物型	来自表3的外显子 ID	来自表 3 的内含子 ID
ENST00000409672.5	NM_002977	ENSP00000386306	NP_002968	蛋白质编码	EX1、EX2、EX3、EX4、EX5、EX6、EX7、EX8、EX9、EX10、EX11、EX12、EX13、EX14、EX15、EX16、EX17、EX18、EX19、EX20、EX21、EX22、EX23、EX24、EX25、EX26、EX27	INT1、INT2、INT3、INT4、INT5、INT6、INT7、INT8、INT9、INT10、INT11、INT12、INT13、INT14、INT15、INT16、INT17、INT18、INT19、INT20、INT21、INT22、INT23、INT24、INT25、INT26
ENST00000303354.10	-	ENSP00000304748	-	蛋白质编码	EX2、EX3、EX4、EX5、EX6、EX7、EX8、EX9、EX10、EX11、EX13、EX14、EX15、EX16、EX17、EX18、EX19、EX20、	INT2、INT3、INT4、INT5、INT6、INT7、INT8、INT9、INT10、INT13、INT14、INT15、INT16、INT17、INT18、INT19、INT20、INT21、

[0422]

					EX21、EX22、EX23、EX24、EX25、EX26、EX31、EX37、EX38	INT22、INT23、INT24、INT25、INT31、INT34、INT38、INT39
ENST00000409435.5	-	ENSP00000386330	-	蛋白质编码	EX3、EX4、EX5、EX6、EX7、EX8、EX9、EX10、EX11、EX13、EX14、EX15、EX16、EX17、EX18、EX19、EX20、EX21、EX22、EX23、EX24、EX25、EX26、EX31、EX32、EX33	INT3、INT4、INT5、INT6、INT7、INT8、INT9、INT10、INT13、INT14、INT15、INT16、INT17、INT18、INT19、INT20、INT21、INT22、INT23、INT24、INT25、INT31、INT33、INT34、INT35
ENST00000452182.1	-	ENSP00000393141	-	蛋白质编码	EX5、EX7、EX8、EX9、EX10、EX11、EX28、EX29、EX30、EX31	INT7、INT8、INT9、INT10、INT27、INT28、INT29、INT31、INT32
ENST00000454569.5	-	ENSP00000413212	-	蛋白质编	EX5、EX7、EX8、	INT7、INT8、INT9、

[0423]

				码	EX9、EX10、EX11、EX12、EX28、EX29、EX30	INT10、INT11、INT27、INT28、INT29、INT30
ENST00000472119.1	-	-	-	保留的内含子	EX34、EX35、EX36	INT36、INT37

[0424] SCN9A具有3906个SNP,并且这一SCN9A基因的NCBI rs编号和/或UniProt VAR编号是VAR_019947、VAR_019948、VAR_019949、VAR_019950、VAR_030444、VAR_032014、VAR_032015、VAR_032016、VAR_032017、VAR_032018、VAR_032019、VAR_032020、VAR_032021、VAR_032022、VAR_032023、VAR_064595、VAR_064596、VAR_064597、VAR_064598、rs71428908、VAR_064600、VAR_064601、VAR_064602、VAR_064603、VAR_064604、VA R_064605、VAR_064606、VAR_064607、VAR_064608、VAR_064609、VAR_064610、VAR_064611、VAR_064612、VAR_064613、VA R_072279、VAR_072280、VAR_072280、VAR_072281、rs951510、rs952462、rs952463、rs1011778、rs1358532、rs1406272、rs1540870、rs1540871、rs1540875、rs1919177、rs1881436、rs1881437、rs1881438、rs1881439、rs1997291、rs1528481、rs1528483、rs1528484、rs1528487、rs2893013、rs4131159、rs4131160、rs4131632、rs4488677、rs4408747、rs4331519、rs4429487、rs4001001、rs4273234、rs4583483、rs4438497、rs4286289、rs4546021、rs4455168、rs4455169、rs4605385、rs4465779、rs4384809、rs4386335、rs4667512、rs5836099、rs6432898、rs6432899、rs6432900、rs6432901、rs6432902、rs6432903、rs6432904、rs6432905、rs6432906、rs6432907、rs6432910、rs6723900、rs6720769、rs6715214、rs6712015、rs6712019、rs6708450、rs6708715、rs6725355、rs6725732、rs6722807、rs6716736、rs6723160、rs6726575、rs6760472、rs6723789、rs6728885、rs6738419、rs6729030、rs6732627、rs6719276、rs6729980、rs6738102、rs6750593、rs6756635、rs6718922、rs6718791、rs7576631、rs7569509、rs7563366、rs6708467、rs6715470、rs6757555、rs6731773、rs6715367、rs7577446、rs6732135、rs6714902、rs7570862、rs6746587、rs6721003、rs7558866、rs6432909、rs7584766、rs7589477、rs7584892、rs7559171、rs6432908、rs7590179、rs7572553、rs7566965、rs7602898、rs6432897、rs6432896、rs7580299、rs7603335、rs7597876、rs4667883、rs4667882、rs7582061、rs9287866、rs5836096、rs10171225、rs4564789、rs7594979、rs4459751、rs7606521、rs4599137、rs9646771、rs4076255、rs4447616、rs4443015、rs10188002、rs3956542、rs4132348、rs4132347、rs4131162、rs4131161、rs1528486、rs1528485、rs1881440、rs1609311、rs1540876、rs1540874、rs10930216、rs10930217、rs10930218、rs10930219、rs1540873、rs1540872、rs6728894、rs11280107、rs11686478、rs7424841、rs12105034、rs13000874、rs6734919、rs11674528、rs12692794、rs12692795、rs6753017、rs6744871、rs6736291、rs11340941、rs12478446、rs6757314、rs13004059、rs11693091、rs6757502、rs6737120、rs6732242、rs12463992、rs12612992、rs12464575、rs13417859、rs13395456、rs12615462、rs6746615、rs7420705、rs13027418、

rs12616699、rs12467272、rs11898284、rs7589743、rs16851931、rs7597083、rs7597178、rs16851958、rs16851960、rs7598695、rs7592978、rs16851968、rs9759544、rs7606196、rs16852023、rs16852031、rs16852043、rs16852048、rs16852054、rs16852069、rs13030011、rs11899120、rs13013237、rs12469343、rs7606274、rs13401294、rs12992260、rs10190952、rs9646772、rs7608288、rs10193767、rs10538478、rs12994338、rs13016545、rs12994880、rs13405544、rs13034090、rs13017469、rs10556841、rs13017637、rs11888456、rs10600584、rs13035164、rs10611611、rs10634344、rs12473416、rs13431341、rs13020056、rs10638743、rs13021236、rs12999243、rs13000233、rs13000683、rs10655845、rs13387119、rs11435802、rs35244507、rs10688081、rs10696005、rs10710576、rs11463044、rs35280187、rs10497283、rs34327610、rs13390803、rs34920657、rs10497284、rs34355606、rs35730267、rs34926643、rs35333199、rs34936668、rs36101458、rs12476306、rs12105169、rs58078583、rs12692796、rs58159440、rs41268677、rs11890824、rs58184464、rs35789805、rs56058874、rs35353363、rs34490209、rs35821032、rs35360495、rs34449821、rs35425598、rs56999748、rs11681893、rs35473199、rs11682860、rs11676630、rs11693152、rs13004690、rs12615972、rs34617014、rs13026637、rs56149857、rs16851928、rs35911982、rs16851935、rs16851943、rs55681559、rs16851964、rs16851966、rs35542360、rs16851974、rs16852010、rs11885693、rs17766038、rs17766243、rs17766561、rs17766807、rs11901118、rs13426370、rs57275972、rs12993435、rs13427940、rs12472033、rs12622435、rs12622743、rs35187227、rs13035599、rs36035794、rs12996068、rs13021074、rs34784693、rs60461278、rs59265133、rs56282252、rs36096260、rs59348143、rs56292816、rs16826112、rs35257630、rs34813283、rs55945526、rs13411967、rs60930703、rs67175205、rs73025509、rs73025522、rs73025523、rs73025528、rs28532836、rs73025590、rs35683510、rs13391197、rs62176964、rs62176965、rs55989063、rs62178525、rs35433129、rs33999505、rs34533574、rs71428911、rs71428912、rs71428915、rs71428916、rs71428917、rs71428918、rs71428919、rs60050530、rs71428910、rs34038642、rs72149794、rs35077026、rs35080467、rs34582751、rs57073619、rs57087440、rs34082367、rs73972306、rs73972316、rs73972318、rs74336612、rs75477543、rs56152529、rs76673713、rs71031239、rs34099849、rs34101964、rs35129718、rs76710665、rs76711511、rs79030107、rs74445522、rs79031716、rs74449889、rs75597232、rs76740831、rs75608447、rs34132334、rs34649195、rs35552412、rs77937563、rs72882854、rs72882859、rs72882882、rs72882899、rs72882901、rs72884703、rs17766014、rs17766982、rs72884732、rs72884741、rs72884745、rs72884753、rs72884762、rs72884775、rs72884780、rs72884785、rs72884786、rs35962214、rs72884797、rs72884798、rs17817307、rs72884802、rs75675344、rs72886606、rs72886608、rs17817547、rs79140856、rs79147031、rs17817679、rs80356466、rs35182375、rs80356469、rs35595054、rs55754250、rs75773428、rs60310134、rs60392208、rs36073771、rs71395218、rs115848509、rs66472972、rs79202357、rs75794168、rs57861261、rs71405933、rs73025538、rs112373468、rs62176960、rs75818857、rs62176961、rs67339035、rs62178526、rs115911128、rs75848558、rs60056351、rs71428914、rs115946138、rs74706664、rs113603623、rs111285706、rs111302354、rs77046324、rs60145586、rs113610968、rs72330491、rs112490413、rs73969684、rs112504933、rs111337704、

rs74757084、rs116013127、rs73969685、rs74768783、rs73969700、rs116037918、rs73969701、rs72520704、rs74385849、rs71031240、rs79417925、rs74791755、rs71031242、rs74423851、rs75620229、rs79061212、rs75645300、rs113739900、rs72884720、rs113758466、rs72884726、rs72884789、rs72884800、rs78215125、rs75709114、rs77151034、rs77154470、rs111426485、rs80356465、rs80356468、rs114760918、rs80356470、rs114985967、rs79187718、rs74613934、rs112644902、rs76904702、rs111528010、rs78278362、rs115847294、rs112347596、rs115028579、rs113518536、rs78304745、rs79221441、rs79222523、rs112718465、rs115074698、rs113962992、rs111624869、rs75818591、rs115099720、rs74658674、rs75006765、rs115881388、rs113988866、rs114811473、rs111281728、rs111679051、rs75029843、rs112761603、rs78428931、rs112768548、rs113629537、rs111705022、rs111705421、rs75053746、rs78118515、rs79645790、rs115979359、rs113660887、rs114893976、rs78162977、rs114048544、rs115193623、rs75093813、rs78510947、rs77373314、rs76244722、rs112835924、rs76247525、rs113698317、rs78552930、rs74778123、rs116048770、rs116373723、rs75949647、rs114920745、rs116069340、rs112869318、rs114923155、rs114926041、rs115322950、rs113737673、rs112561342、rs77143068、rs79446427、rs111404258、rs112919255、rs111415017、rs75225428、rs111458233、rs112945476、rs111470787、rs79493055、rs116451742、rs111899000、rs77487847、rs113850984、rs77192374、rs76448913、rs78250271、rs116188445、rs112675405、rs111948101、rs111953170、rs77231154、rs114267271、rs115435826、rs79853207、rs77579497、rs113911089、rs78334485、rs79876905、rs76510000、rs76102017、rs116547783、rs115473061、rs111643968、rs115489522、rs77639503、rs116268225、rs111654843、rs113989468、rs114344033、rs77682648、rs115119378、rs77328118、rs112779076、rs78452939、rs113173376、rs76571042、rs115522370、rs114032727、rs78863850、rs113195803、rs78454756、rs116653005、rs77784194、rs77797040、rs78906046、rs75468572、rs80095598、rs138982989、rs138989210、rs114358903、rs113283978、rs113182934、rs114525222、rs115555277、rs75069209、rs79684957、rs115244856、rs113309940、rs113311364、rs80160529、rs115251943、rs115274753、rs112867239、rs114118902、rs139080215、rs114143095、rs116773598、rs148713442、rs142480223、rs77432282、rs140701967、rs148765803、rs145478117、rs79741845、rs142518463、rs139170417、rs77441037、rs75200610、rs148846057、rs145575900、rs116422705、rs111858722、rs116435828、rs116962683、rs75230883、rs148931877、rs112947029、rs121908920、rs121908921、rs140792426、rs115783892、rs113436493、rs111884740、rs139281380、rs139288692、rs112970706、rs115393048、rs112995109、rs75273355、rs77539813、rs115812636、rs142707672、rs78731163、rs184266839、rs140830160、rs111972606、rs149102734、rs78763917、rs116547537、rs114319629、rs145811912、rs184317901、rs77642761、rs149157378、rs115495114、rs79918973、rs142779717、rs149194222、rs112047115、rs181405366、rs76564908、rs78843438、rs181423521、rs184404793、rs80126387、rs149285180、rs137950241、rs184447464、rs149297295、

rs78947176、rs117581394、rs187270227、rs139017042、rs116710246、rs149301325、rs142909834、rs140574148、rs137962506、rs190380742、rs137966449、rs116713443、rs149350025、rs112222195、rs184515932、rs116748713、rs142952951、rs139064023、rs181563231、rs181572301、rs181577442、rs78998616、rs145366755、rs113361139、rs115726491、rs184560681、rs184561606、rs148819190、rs190457189、rs142559100、rs149429956、rs143007711、rs142585699、rs114681048、rs140761356、rs145608272、rs121908916、rs142666506、rs187410330、rs115802383、rs187428818、rs149490896、rs149507189、rs113450348、rs149034908、rs146213117、rs145737444、rs184675901、rs146234445、rs181717210、rs184685668、rs181276399、rs187500785、rs145769973、rs190597640、rs181734340、rs184275120、rs143161505、rs146267489、rs149592596、rs190625704、rs115823295、rs141042794、rs138081618、rs190666356、rs190668591、rs184760546、rs149648597、rs145798468、rs184289118、rs142753783、rs187145433、rs181814822、rs146333890、rs187164514、rs187187436、rs181818571、rs181414054、rs184784994、rs181414423、rs181840211、rs187627632、rs145969336、rs187630476、rs187638933、rs181864169、rs117600380、rs143281561、rs149739106、rs187660096、rs184471275、rs139433712、rs143307775、rs187686954、rs143323637、rs146453073、rs184491945、rs184503606、rs149812467、rs187735078、rs181543382、rs187739615、rs149846122、rs181976860、rs181544216、rs184525265、rs187760599、rs190446880、rs137993592、rs184557454、rs182005122、rs184956974、rs184558307、rs184973913、rs184975345、rs190455017、rs146114242、rs182041228、rs149440243、rs190971448、rs139677117、rs138238059、rs143020225、rs187396655、rs149989224、rs191004585、rs187404611、rs150021077、rs146148893、rs182164896、rs182169962、rs149458240、rs187420437、rs187457184、rs141218614、rs146210131、rs146758972、rs185134458、rs187483230、rs187499307、rs138051487、rs139537793、rs190630868、rs150115235、rs149656478、rs191129855、rs187982120、rs182221863、rs184769972、rs181809487、rs141258921、rs146330125、rs184777485、rs139562000、rs188023656、rs150184169、rs139564447、rs191220059、rs146882468、rs184798240、rs187628994、rs143699917、rs143713899、rs184829398、rs143292594、rs188117229、rs143733438、rs141345692、rs188123311、rs188145250、rs146953750、rs141083667、rs143769263、rs181942663、rs146963548、rs149811195、rs190856490、rs191334405、rs190873215、rs191343221、rs139815430、rs181981693、rs191359321、rs149865252、rs150371036、rs143829355、rs191372613、rs138452077、rs138452908、rs185386849、rs143842609、rs188237643、rs150393847、rs187773100、rs187775085、rs184966574、rs184977393、rs191427726、rs188275827、rs182035257、rs184996404、rs141453198、rs188284141、rs190995816、rs138488726、rs139848912、rs182512669、rs191445085、rs146642805、rs191006637、rs182521362、rs188309132、rs150023650、rs191085791、rs185460522、rs185466137、rs182175100、rs191091185、rs191109954、rs185493398、rs146761679、rs182203285、rs185502977、rs150107947、rs191122461、rs139722857、rs141521157、rs185512688、rs188369589、rs191126523、rs139884364、rs139732025、rs143623645、rs138334413、

rs185538321、rs182251259、rs138341036、rs182626281、rs191206839、rs182313512、rs141315817、rs147236226、rs144030757、rs141338230、rs182655507、rs191614297、rs150639101、rs143731425、rs188153399、rs144066296、rs141603539、rs150324876、rs141375532、rs185622259、rs191640401、rs146970406、rs188513575、rs141629021、rs150341781、rs191351429、rs141401072、rs188532495、rs188248808、rs147057677、rs188544520、rs191692191、rs144131152、rs147074129、rs182496397、rs191429109、rs182500442、rs141673661、rs139846473、rs150446261、rs150785198、rs182820808、rs182520122、rs182835951、rs182529061、rs188657481、rs182852687、rs138621998、rs182529589、rs185798678、rs150473901、rs141757967、rs182553426、rs185815125、rs143943780、rs185496131、rs150902480、rs185498433、rs191884045、rs185502994、rs185503388、rs188365371、rs188776686、rs185517165、rs141530060、rs188383084、rs191914888、rs191918328、rs191918870、rs150560390、rs191920350、rs144365987、rs144372216、rs191935835、rs188403481、rs188811649、rs185898649、rs147221067、rs182626458、rs150991753、rs144016113、rs191958942、rs150590478、rs183013605、rs182641899、rs183026897、rs139927718、rs144435180、rs144435267、rs140119151、rs188473580、rs147697530、rs139930314、rs151064878、rs150652684、rs185979948、rs185640009、rs140151023、rs188519035、rs183095706、rs188522328、rs150690124、rs191679645、rs183115017、rs183125824、rs183133746、rs186044551、rs141940569、rs151168288、rs138746989、rs191681855、rs144136503、rs150725477、rs191708188、rs191711647、rs182806094、rs144573884、rs147831105、rs147833108、rs147430160、rs185756419、rs188657198、rs141742493、rs144270467、rs138636241、rs186110761、rs186125436、rs151258913、rs150885548、rs192222550、rs192233893、rs147939855、rs183284329、rs147539362、rs185839773、rs188756672、rs138823585、rs188769302、rs140057840、rs183353183、rs188780390、rs183367774、rs188784746、rs185874593、rs188790411、rs192366053、rs188810319、rs188814235、rs189287946、rs182991290、rs144392389、rs147640034、rs151008517、rs192402484、rs183036253、rs138700080、rs138700579、rs183064984、rs185993526、rs189320567、rs183090065、rs192417863、rs142157838、rs180836507、rs186006161、rs148149379、rs144500679、rs151120735、rs180884797、rs180886733、rs186060853、rs144552092、rs189017951、rs189022051、rs186460536、rs140492487、rs186461495、rs189023255、rs186466472、rs141954437、rs189522976、rs189523541、rs189049999、rs148313223、rs151210240、rs189054543、rs147849719、rs189539871、rs189064184、rs189068219、rs192210846、rs147956569、rs186209759、rs189569164、rs192674981、rs144747253、rs186238424、rs183351491、rs183367424、rs192699758、rs183370069、rs189262728、rs192363212、rs183403867、rs192726587、rs142134626、rs183711149、rs142138406、rs181081805、rs192738555、rs142140153、rs200131264、rs140380560、rs181094108、rs200134765、rs144841509、rs183732115、rs192406551、rs142150794、rs148096531、rs200162971、rs186321392、rs370110583、rs148456006、rs192433693、rs186364672、rs186633344、rs180802944、rs200178927、rs200194515、rs375200578、rs200182914、rs145193907、rs183502133、

rs140445008、rs180893354、rs138915544、rs145244774、rs148241180、rs186442256、rs200240989、rs186465363、rs148278257、rs145257168、rs189524843、rs148315085、rs183628282、rs189533865、rs183640056、rs148556202、rs200292819、rs192655074、rs192658579、rs189564784、rs138962140、rs148362057、rs142347131、rs189586446、rs200341902、rs200063079、rs370018897、rs200099565、rs192906198、rs183704773、rs192723631、rs181075520、rs186767700、rs181079869、rs370059723、rs186771296、rs529190860、rs370067909、rs529209086、rs186784826、rs200394559、rs200399998、rs183730817、rs538838362、rs370082676、rs200408344、rs142400656、rs200411606、rs145182185、rs145187060、rs186806270、rs200172456、rs192975309、rs375204316、rs370455867、rs200449501、rs186648437、rs534019932、rs529286738、rs375210239、rs370472054、rs192801395、rs370474533、rs186654635、rs200213811、rs186674692、rs538940239、rs375250531、rs200482081、rs375566600、rs181175263、rs200486515、rs370211696、rs181183562、rs181186118、rs193052322、rs200518320、rs200258203、rs186875141、rs181200412、rs375314088、rs184015802、rs375635737、rs186886737、rs529393841、rs375684756、rs539081952、rs200296022、rs189773617、rs375344768、rs375717078、rs189783847、rs193147774、rs189793333、rs189802138、rs375383262、rs200341995、rs148603098、rs370331208、rs183883370、rs190038995、rs190041054、rs200356611、rs192916635、rs148622242、rs539165024、rs534237861、rs189833651、rs200381002、rs539201442、rs529545926、rs190079309、rs529224329、rs538840251、rs200677133、rs538845547、rs370750101、rs534286923、rs375828071、rs200417967、rs539238807、rs184127871、rs375484262、rs190100237、rs200702592、rs538865759、rs200441726、rs370458490、rs375873835、rs370471482、rs370474188、rs534038802、rs534350762、rs534357040、rs200464271、rs184169321、rs193007084、rs529641451、rs529320212、rs375570049、rs529339341、rs538978492、rs193043836、rs200774110、rs189961043、rs200780217、rs534113220、rs370879581、rs534409097、rs534414126、rs534415144、rs370562444、rs200579922、rs199528742、rs200815709、rs534171106、rs539098927、rs539117115、rs200830395、rs186937907、rs370939400、rs539140140、rs200617539、rs200619065、rs184228905、rs200835066、rs376036522、rs539143083、rs200849406、rs539479843、rs376051261、rs529755984、rs534486080、rs534488673、rs193152357、rs375749001、rs375763051、rs193166864、rs539520802、rs529783271、rs200878465、rs534232221、rs375776919、rs200884318、rs190061595、rs534278901、rs190082049、rs545837483、rs375825189、rs187135957、rs375828938、rs193224590、rs376111502、rs553880123、rs193232467、rs375856563、rs553890257、rs534545311、rs200709311、rs539583140、rs200720228、rs199625995、rs539285858、rs375886661、rs539314440、rs529638862、rs200757990、rs193290821、rs200764978、rs370859545、rs193298128、rs190162179、rs529872397、rs554016514、rs370874132、rs539661794、rs375980172、rs200809157、rs545964402、rs539677853、rs200826539、rs200972952、rs554071139、rs534456457、rs529727269、rs184226889、rs554100480、rs376022705、rs200831251、rs200999865、rs201000497、rs529730407、rs200843960、rs184246546、

rs190358218、rs554163756、rs554165274、rs199576878、rs539500156、rs376288233、rs199589622、rs184260785、rs371207844、rs200882280、rs199599557、rs199756028、rs529983093、rs200885240、rs187133567、rs563464573、rs201061055、rs539547053、rs554273987、rs529802379、rs199609865、rs553889410、rs546154866、rs553889944、rs534551405、rs553911796、rs371042731、rs554309833、rs554312712、rs199784484、rs201087484、rs371264016、rs199791955、rs563543796、rs554341821、rs546194264、rs371271639、rs545893207、rs539907191、rs546211175、rs539907650、rs554376047、rs534785673、rs200925482、rs201111027、rs546225573、rs190283527、rs553954986、rs199824489、rs200939963、rs199828294、rs539633485、rs534590465、rs530084774、rs199836776、rs553992440、rs200946565、rs376437229、rs534834256、rs545955340、rs529878459、rs534839750、rs539669267、rs563692075、rs546307681、rs199679924、rs554081720、rs534850887、rs554088921、rs540043962、rs554092522、rs190336684、rs199879584、rs530137975、rs200995410、rs530143022、rs371164212、rs190349718、rs546362979、rs199717009、rs371397880、rs540082625、rs201198963、rs201021546、rs563799556、rs199737519、rs371414170、rs554199061、rs199746311、rs546391192、rs190379146、rs199753578、rs201051190、rs199757256、rs199915769、rs546428044、rs554663323、rs199924841、rs540148616、rs563477777、rs199933920、rs546146748、rs563898086、rs201243874、rs546456054、rs199940586、rs530215503、rs563913729、rs530218681、rs376579866、rs199948709、rs540192719、rs540198060、rs554750370、rs563492226、rs554287627、rs546498422、rs546158464、rs540216332、rs554299241、rs199968973、rs546516362、rs563983733、rs199780289、rs199780984、rs371286659、rs371523166、rs530267604、rs199987389、rs540258346、rs534786295、rs546227682、rs535009588、rs371537833、rs546570808、rs546572548、rs534792758、rs554861011、rs530289862、rs539955067、rs199832245、rs199832681、rs199841742、rs554463637、rs535055981、rs564125461、rs200028908、rs546625033、rs199848155、rs376692400、rs564139470、rs199850424、rs201155458、rs554499889、rs535082824、rs554501599、rs371367087、rs563737735、rs200056934、rs564203583、rs546340639、rs371630270、rs540400302、rs376746720、rs201185327、rs546352773、rs575423992、rs376493135、rs546717270、rs371397187、rs540431428、rs534892966、rs201205411、rs199903431、rs376515297、rs563817371、rs563824187、rs546746556、rs555098627、rs575492002、rs201217172、rs376529993、rs554686400、rs546760948、rs534939379、rs563953797、rs540206408、rs546500427、rs540485824、rs376608116、rs554799633、rs540505612、rs201445594、rs546799753、rs540240449、rs534999520、rs540519101、rs564030716、rs376835362、rs530454237、rs564030746、rs199998975、rs200004737、rs564394299、rs540551673、rs575674513、rs564399141、rs564446433、rs200011236、rs575695879、rs530483113、rs530485751、rs575707171、rs564466723、rs376885423、rs535039496、rs546880794、rs371565974、rs546882633、rs371773562、rs535234661、rs540598706、rs564107843、rs201343843、rs201354058、rs201503351、rs530342843、rs546907614、rs376908183、rs201510411、rs554978785、rs201511761、rs200048101、rs546921591、

rs530350892、rs376922975、rs564200680、rs200060978、rs201533181、rs575403459、rs564241971、rs564580989、rs546961299、rs201544671、rs201545926、rs371836327、rs540688834、rs201398365、rs575434258、rs564263518、rs564274418、rs376775745、rs575466805、rs555444508、rs201414746、rs546745027、rs564310081、rs376792809、rs564315036、rs547017479、rs530416775、rs564331757、rs547021107、rs564332268、rs564662103、rs540733381、rs555135086、rs555471824、rs576009530、rs530597787、rs576019908、rs555139503、rs201589695、rs546790645、rs576055160、rs564376709、rs564714000、rs201599943、rs530619739、rs547065965、rs575600523、rs540522467、rs540547244、rs547082685、rs564445595、rs540567098、rs540796514、rs371731981、rs564769026、rs546879622、rs377073478、rs540589456、rs555621992、rs371916205、rs371958712、rs530634413、rs575756239、rs376897349、rs371780831、rs376904842、rs535249716、rs575804340、rs555336411、rs540652005、rs530685640、rs376937738、rs555659985、rs201659566、rs530547787、rs575882807、rs201664439、rs564870320、rs376965890、rs564871823、rs546993077、rs575943952、rs201560701、rs540907392、rs564896638、rs564896690、rs547000677、rs564899870、rs201563763、rs576373898、rs564640008、rs555445641、rs575973973、rs372028184、rs371863491、rs555773796、rs564960625、rs547253736、rs576455029、rs540974086、rs564986496、rs564993510、rs201726729、rs371864190、rs565010528、rs540730019、rs201574893、rs376994924、rs530783315、rs201577842、rs201741634、rs201743233、rs547309884、rs371884028、rs372088334、rs377222716、rs576572380、rs576041557、rs547054615、rs201761066、rs377231210、rs576600072、rs576089157、rs530626933、rs541061398、rs530815395、rs576098220、rs565110303、rs540810897、rs555612139、rs541084553、rs576662260、rs547128261、rs540853945、rs555633602、rs377085474、rs547403854、rs565167501、rs530849811、rs576712624、rs547415198、rs201649913、rs201651716、rs377093160、rs535596388、rs576773731、rs576676610、rs535558092、rs565234556、rs377328308、rs555955176、rs565256471、rs556091995、rs372131207、rs201845924、rs555645605、rs541215463、rs564833136、rs565311283、rs565318120、rs540868515、rs576946641、rs556156424、rs547539536、rs201883775、rs535414368、rs372262107、rs530959005、rs540871938、rs577021824、rs535419397、rs201895529、rs540879571、rs372269123、rs377116511、rs547186293、rs565405762、rs547588654、rs201905108、rs556236282、rs201905758、rs547191791、rs540903705、rs547201834、rs530979178、rs372002155、rs576377214、rs555741423、rs577086434、rs201915876、rs530989045、rs540941092、rs556278477、rs535735811、rs201707595、rs576479846、rs541356065、rs541358959、rs535499788、rs541362812、rs565031158、rs535511711、rs577214491、rs372339994、rs377206205、rs576544612、rs377226193、rs576585621、rs541054278、rs577266682、rs565097315、rs565571242、rs577289107、rs556405965、rs576629767、rs535795174、rs530825627、rs565155125、rs565186443、rs201992546、rs541131401、rs377540035、rs377540898、rs541131406、rs565224250、rs201821518、rs541464325、rs577369845、rs565254553、rs577404457、rs372203675、rs565602281、rs202014643、rs576881042、

rs577440102、rs547742253、rs577443766、rs531116715、rs377543079、rs565709853、rs201999985、rs377592540、rs541216093、rs201867764、rs565371438、rs372263773、rs547573283、rs201896555、rs535696383、rs201899627、rs530977363、rs577068583、rs201908866、rs547600407、rs547600820、rs535712483、rs556270749、rs541350117、rs577567218、rs577154533、rs565779439、rs541577543、rs577175836、rs531022872、rs565800474、rs565519424、rs541591158、rs547675018、rs541594618、rs565809092、rs372495273、rs541395767、rs202083986、rs556650900、rs565547663、rs577251799、rs556665730、rs556373614、rs531050542、rs565585913、rs531203453、rs565871418、rs535797353、rs202109432、rs577720248、rs201987450、rs531083937、rs577393911、rs531100303、rs556716582、rs577747466、rs556487424、rs372559804、rs556713829、rs531103846、rs565682322、rs372563835、rs577815172、rs377588911、rs565947211、rs547813798、rs531250791、rs556789899、rs531125112、rs541713728、rs556819410、rs377754745、rs556713324、rs547819277、rs536000213、rs377597385、rs202165845、rs556543920、rs535860380、rs556549617、rs577508369、rs556552102、rs548057554、rs565736915、rs202180059、rs556878947、rs547836679、rs202051580、rs577538470、rs577539276、rs531148427、rs556584085、rs531302114、rs202061011、rs535883810、rs556612694、rs531317317、rs202071016、rs372490157、rs372654175、rs556940143、rs372655989、rs541594525、rs578059299、rs541831570、rs577625085、rs547898574、rs372511122、rs202219028、rs531188532、rs547913013、rs541630786、rs547938227、rs578134604、rs541870309、rs556706372、rs202110802、rs372557663、rs547975937、rs566204756、rs566207903、rs577796497、rs556764057、rs557048933、rs202241586、rs531379120、rs557050535、rs541923828、rs556774205、rs578243189、rs541702079、rs535980549、rs531270141、rs535997775、rs566269762、rs556841303、rs557109946、rs745311902、rs548256739、rs556848020、rs548043362、rs536155895、rs566022284、rs577936356、rs541985091、rs548053319、rs556871781、rs536168223、rs566049151、rs577967498、rs566340038、rs386391721、rs386391722、rs557188530、rs367584747、rs386391723、rs566366442、rs536028182、rs542030965、rs578005069、rs566085715、rs566086387、rs578024455、rs367621683、rs548346140、rs372833423、rs548105826、rs202211195、rs745531940、rs202215137、rs578072210、rs372665054、rs531338785、rs536243045、rs566133697、rs578090160、rs367666265、rs578114636、rs548158077、rs566180671、rs397765197、rs536089884、rs557356456、rs397767714、rs367683945、rs566528668、rs745659906、rs267598976、rs557071588、rs267598977、rs367701477、rs566564807、rs536281976、rs578242489、rs566583346、rs548214486、rs548476797、rs536129992、rs548482202、rs566262563、rs566594213、rs267607030、rs372744611、rs557461504、rs745754029、rs566617243、rs566617297、rs548258391、rs566310144、rs548519839、rs745338187、rs536158076、rs548274093、rs745823712、rs536163412、rs397868358、rs548542674、rs536168659、rs745839147、rs566338405、rs566348964、rs557535791、rs548558816、rs548565032、rs745383244、rs397870091、rs548565940、rs542287393、rs566709971、rs372990045、rs557204387、rs745418676、rs566409045、

rs566730224、rs566752170、rs566753733、rs372818817、rs397722222、rs745983399、rs367830408、rs745480989、rs566793485、rs397734324、rs548645786、rs557669888、rs745516750、rs548657650、rs548381702、rs745552432、rs536425753、rs397973279、rs746070730、rs548387911、rs557708733、rs372854250、rs745569838、rs548698515、rs566482323、rs557734401、rs746118213、rs542420738、rs367667669、rs397986566、rs566902157、rs531528009、rs548736753、rs566500747、rs542456172、rs746187360、rs367671512、rs566932278、rs745660727、rs367697326、rs548464529、rs531756169、rs542471936、rs566573122、rs566962886、rs542498214、rs566982218、rs542504451、rs557806739、rs398090827、rs746306232、rs536489917、rs531803128、rs745714010、rs367720972、rs557918693、rs746350953、rs745725339、rs367991453、rs527241020、rs531579666、rs746381295、rs542208653、rs397818828、rs746391927、rs557954773、rs531600512、rs566644132、rs548866946、rs536555587、rs566656331、rs372959324、rs548538509、rs567102431、rs745838757、rs397868838、rs746437505、rs397868962、rs548885146、rs531845059、rs536570765、rs372983721、rs557571631、rs566719571、rs536584686、rs566723075、rs542325703、rs542643487、rs368055368、rs373019820、rs567192923、rs548936551、rs542349880、rs558065104、rs542355012、rs368062692、rs536415135、rs397963856、rs746552388、rs557690548、rs542394071、rs746083843、rs548693261、rs557732835、rs746143575、rs542699414、rs558122779、rs567298923、rs536465674、rs558134318、rs531746406、rs527346644、rs548743673、rs368107300、rs367917548、rs746198188、rs557871766、rs567022998、rs567363028、rs373168195、rs567043047、rs567054046、rs558207456、rs542763237、rs746378441、rs536545503、rs542568822、rs548865256、rs368147111、rs542580556、rs558228752、rs536555646、rs746772302、rs536557590、rs531975462、rs746796860、rs527408032、rs746420496、rs536564089、rs368176642、rs558272974、rs746431232、rs531844054、rs527275962、rs746843910、rs567526414、rs542614723、rs549120414、rs549124141、rs536578689、rs549140206、rs567586614、rs536744845、rs558044120、rs746516190、rs558055629、rs746920567、rs558060550、rs368061706、rs527461217、rs567208316、rs531886773、rs746554596、rs567220976、rs542895321、rs746974389、rs567222661、rs549185419、rs567237436、rs527336026、rs527483460、rs558121403、rs548993925、rs567691347、rs747002615、rs548995543、rs746650412、rs368271911、rs567723777、rs747040934、rs747050192、rs746670993、rs567347819、rs527512680、rs531938194、rs549242146、rs549032856、rs567373871、rs567394422、rs368307024、rs542980503、rs558508221、rs536676061、rs536681562、rs558516052、rs549052565、rs368145556、rs532090630、rs527554992、rs532120905、rs558490145、rs747176695、rs542991566、rs542774236、rs368150079、rs373340022、rs558242385、rs549357789、rs531980410、rs368389084、rs746808580、rs549368350、rs567506427、rs531991551、rs536910845、rs549105394、rs746848184、rs373384143、rs549407905、rs558344252、rs527453833、rs549417854、rs746919102、rs746928276、rs527655882、rs368229380、rs558364672、rs549168229、rs368463219、rs568161057、rs558762757、rs532232329、rs549168547、rs747470520、

rs549464271、rs543190810、rs543192154、rs368241422、rs536968067、rs747507965、rs558804203、rs542903509、rs747524681、rs567666371、rs558400652、rs549194158、rs527487277、rs368267915、rs536991033、rs568290255、rs558428181、rs567744716、rs527721202、rs568321346、rs568324171、rs568330046、rs567746937、rs568347691、rs747644321、rs747646048、rs567759326、rs747078793、rs536831479、rs568368464、rs558924666、rs543302057、rs543307320、rs747708818、rs558953446、rs568439076、rs532106809、rs558517679、rs558548847、rs747224561、rs568476272、rs567841142、rs549626904、rs373748468、rs747772882、rs747777569、rs559008851、rs549332923、rs373735201、rs747760347、rs568467648、rs568540915、rs568478645、rs568552353、rs368374445、rs747265095、rs567978316、rs559065366、rs527824027、rs537109464、rs747287657、rs747918167、rs536895056、rs373815330、rs536905377、rs537128261、rs558672062、rs568679804、rs537140055、rs747362082、rs543122161、rs558701088、rs747382624、rs373841126、rs532429751、rs568724063、rs543132278、rs747426187、rs543154656、rs373616597、rs747448727、rs558755199、rs543176875、rs558793028、rs549483878、rs559205579、rs549801876、rs748064481、rs549805500、rs568786830、rs368724653、rs368741155、rs558812967、rs373650798、rs558827971、rs527935102、rs549505744、rs532266308、rs568910791、rs543588977、rs568921105、rs543252094、rs568938831、rs568308434、rs748230779、rs558889724、rs543276363、rs532518466、rs549553842、rs558900091、rs568478922、rs373953968、rs549933491、rs559388880、rs569021337、rs748301976、rs527792590、rs748304870、rs537274423、rs527797934、rs549957716、rs559020013、rs747831682、rs747839515、rs537094901、rs568565984、rs549993366、rs373786499、rs568616456、rs528024377、rs569138531、rs373808223、rs748419478、rs568648416、rs747947163、rs543458934、rs527866121、rs748000776、rs748452908、rs543474534、rs559511141、rs532596683、rs528051938、rs748032198、rs559524225、rs559189600、rs748504526、rs537164960、rs569247301、rs748039029、rs549789421、rs559564579、rs543501994、rs748048145、rs748564719、rs368926174、rs532635443、rs373862049、rs559205490、rs532651681、rs368949323、rs374099497、rs543549351、rs537201581、rs550141100、rs537202219、rs532674344、rs543574164、rs748190208、rs559321177、rs559677369、rs569424535、rs748690640、rs748695381、rs527959809、rs748236906、rs537243887、rs568970879、rs559373028、rs373953011、rs569027161、rs543882002、rs559723934、rs549952543、rs528001989、rs748754609、rs569502538、rs532712684、rs374154008、rs369022060、rs569525422、rs543668808、rs550218083、rs369031999、rs532562751、rs537295453、rs543930117、rs537468875、rs550244319、rs569098216、rs550247150、rs569123332、rs748398622、rs569610503、rs569138600、rs559826745、rs559831361、rs537315654、rs374011315、rs569152152、rs559871284、rs550298627、rs550018415、rs374021078、rs748455811、rs369107141、rs569197685、rs569789352、rs544062895、rs550041205、rs749055063、rs544064839、rs569814685、rs532613900、rs537352949、rs550065962、rs569844606、rs559995442、rs569277903、rs550412301、rs569291008、rs368934346、rs569896484、rs550421090、

rs748602707、rs374102129、rs560036890、rs528121884、rs537409772、rs569406301、rs749187435、rs560050695、rs374116302、rs749215366、rs560073328、rs749217434、rs569413716、rs569435862、rs537425379、rs559701154、rs550504055、rs537429508、rs537648288、rs528365663、rs748720721、rs559707544、rs748725716、rs570053547、rs748745862、rs528373215、rs537657709、rs749311576、rs569486858、rs544215781、rs374387803、rs748789887、rs369261656、rs544222244、rs559774900、rs369037062、rs528392678、rs569589072、rs569594721、rs537484448、rs560194858、rs532943697、rs528207220、rs550610763、rs570175462、rs543970760、rs532756083、rs749422762、rs537706167、rs550630579、rs528430659、rs569673848、rs570223084、rs544008440、rs748956951、rs532972999、rs560270291、rs749479220、rs560277925、rs559882854、rs749000031、rs544323417、rs570287651、rs749525560、rs528461391、rs537558317、rs749079120、rs374481593、rs550724860、rs560344389、rs559975872、rs374497861、rs569835399、rs749602473、rs749608721、rs570379112、rs749616223、rs570383918、rs560388069、rs550404028、rs550788771、rs532851603、rs532852070、rs528314905、rs570419018、rs528315588、rs374522881、rs569919976、rs550435904、rs570456628、rs569926252、rs550450442、rs749695781、rs749701713、rs374544338、rs528533074、rs537818590、rs570492575、rs570495057、rs544454714、rs374350913、rs570000771、rs570005998、rs570551342、rs369229821、rs749284610、rs570558380、rs528366547、rs550901951、rs550527209、rs570048995、rs550533340、rs570063206、rs369464511、rs528383682、rs374397762、rs550927757、rs550923680、rs560539816、rs533107673、rs374594002、rs369476119、rs749864558、rs570646108、rs550966261、rs749881351、rs749897918、rs550925375、rs544544030、rs544231457、rs560608042、rs560181527、rs544551194、rs369520775、rs533153225、rs528632986、rs749364100、rs544577577、rs369534920、rs570119696、rs570782066、rs528411030、rs550621249、rs551063575、rs750002442、rs750005785、rs528650251、rs369296369、rs560255202、rs374670592、rs551081825、rs570227654、rs570232101、rs550676640、rs560705198、rs551103406、rs750060579、rs570253110、rs570861231、rs551126930、rs560742915、rs532994198、rs537750141、rs528481236、rs374500828、rs528693904、rs544387925、rs528695618、rs544671979、rs749640667、rs528701463、rs570957540、rs528504065、rs528504422、rs560405294、rs570985462、rs560819326、rs560408978、rs533248873、rs544410928、rs570467358、rs571031386、rs544422821、rs571046788、rs550875084、rs544456517、rs533083149、rs528558257、rs570555980、rs749782980、rs571112937、rs533289922、rs560511642、rs533297953、rs528567800、rs544487770、rs750377110、rs369709511、rs750395605、rs560523856、rs570685646、rs560602815、rs533104605、rs571201597、rs369722062、rs538095397、rs537898453、rs560644731、rs533167279、rs560669576、rs551401679、rs369545306、rs561042263、rs551429062、rs750017693、rs369556343、rs551090369、rs538124443、rs750042378、rs537945859、rs374872804、rs571350458、rs561086455、rs571361273、rs570859811、rs570896555、rs570898206、rs544911099、rs561103484、rs750110593、rs544921736、rs528872305、rs571410824、rs571416933、

rs369592808、rs528882230、rs551531848、rs551164285、rs528891024、rs533405417、rs750148529、rs571464240、rs750175883、rs551569090、rs560811710、rs544697883、rs571001720、rs544980017、rs571007860、rs551236739、rs551249244、rs528924602、rs571065554、rs528745212、rs750724319、rs538210953、rs528933846、rs571071311、rs750755032、rs528942614、rs538036504、rs538040234、rs544760124、rs560927301、rs544802212、rs538235148、rs528956488、rs551342807、rs533481144、rs369899370、rs551359194、rs369900308、rs750399158、rs538259887、rs528795367、rs750864433、rs750411662、rs533498494、rs560998810、rs571707506、rs561331700、rs375028919、rs545103329、rs571703952、rs544837618、rs528807734、rs551400406、rs571269005、rs544875089、rs529020508、rs533357560、rs750951154、rs551440261、rs750514774、rs544886311、rs551792787、rs561404804、rs571366310、rs528855590、rs751001567、rs375069289、rs533379792、rs571842712、rs533382711、rs561137186、rs571879284、rs750631806、rs529077450、rs561470191、rs750638359、rs529093387、rs551558117、rs551573774、rs551579214、rs571500446、rs561525428、rs545229175、rs751136819、rs551581886、rs750707641、rs571528077、rs755813688、rs561214522、rs572015044、rs571536730、rs369860008、rs528947505、rs551963416、rs538225517、rs545277826、rs533634090、rs561260903、rs571600152、rs369874176、rs571638665、rs552017588、rs571666279、rs571668997、rs369907063、rs769057914、rs552049341、rs769065818、rs751325083、rs561669214、rs552061128、rs572187861、rs756005334、rs538475444、rs756013985、rs545099670、rs552106230、rs545375585、rs572237867、rs561726025、rs769150127、rs529011948、rs538288286、rs571755014、rs571757393、rs538515826、rs545115612、rs533712836、rs545115642、rs750944314、rs529029702、rs571778387、rs529035618、rs552177570、rs571826748、rs751000526、rs369968332、rs571851662、rs545431594、rs561799159、rs561460464、rs571880265、rs769270578、rs533571445、rs571940318、rs756189754、rs545217019、rs571959447、rs751128080、rs538381958、rs755804903、rs751159961、rs751175785、rs572018867、rs756228072、rs751582483、rs561574977、rs561576248、rs572437382、rs755851030、rs561611663、rs552286628、rs545506688、rs768991354、rs769402083、rs769406063、rs572087546、rs538428981、rs769026589、rs755939083、rs572579811、rs769491361、rs561982435、rs769046166、rs751371429、rs572259896、rs545578378、rs756446498、rs751798524、rs572656276、rs756457749、rs769554090、rs538674345、rs751813574、rs552419780、rs756076130、rs552432031、rs769194199、rs533853260、rs572717577、rs769195919、rs572295505、rs533714676、rs538700995、rs545631150、rs538526606、rs572321690、rs572759437、rs538715990、rs562093903、rs552491193、rs552493086、rs751920813、rs572323525、rs552522135、rs769705492、rs751482341、rs572334430、rs751492391、rs545682563、rs751495665、rs538752299、rs545696456、rs538535248、rs572354221、rs751523153、rs545446264、rs572377516、rs533919054、rs572892333、rs769771450、rs769774967、rs572382379、rs572388571、rs756700849、rs756704425、rs769807240、rs769295468、rs572950216、rs562222303、rs751550702、rs752097894、rs769296900、rs572978709、

rs572982359、rs561835001、rs552229556、rs552242552、rs533760063、rs552650520、rs752133481、rs561858372、rs756247571、rs769912734、rs756277853、rs545508686、rs561928325、rs572544925、rs561951163、rs756369671、rs752191138、rs769511874、rs751770785、rs769520412、rs756476767、rs545617350、rs573120275、rs552452362、rs552743787、rs552722759、rs573125010、rs572720574、rs752267943、rs572723257、rs562364859、rs769633498、rs752289745、rs770063371、rs756983343、rs552799307、rs756541837、rs756588238、rs752355486、rs770120624、rs572827353、rs751960880、rs552847137、rs573278742、rs769713298、rs752418228、rs573311661、rs533903238、rs552555197、rs562163326、rs573336871、rs770205263、rs562492571、rs552901035、rs573360915、rs770226861、rs552927404、rs752501530、rs752008244、rs756662298、rs752010591、rs752027589、rs562558634、rs573456683、rs769784952、rs752598240、rs572946713、rs756749599、rs756758706、rs752107556、rs769861427、rs562628042、rs573532135、rs752123654、rs573539819、rs752651234、rs757322465、rs545769534、rs757324658、rs573014318、rs752159218、rs752669367、rs545789688、rs562288190、rs573583431、rs752694131、rs553077185、rs752705175、rs562290070、rs573057895、rs756846139、rs752187308、rs757406912、rs573077799、rs552710847、rs757431594、rs573668899、rs553131814、rs562733566、rs562322012、rs573698013、rs770570377、rs769977143、rs752262387、rs752842135、rs553198489、rs562795927、rs573769337、rs752265531、rs770014639、rs757542280、rs573778414、rs573160530、rs573173020、rs756996519、rs757574398、rs573226807、rs573830638、rs573832648、rs770130183、rs770143495、rs770714259、rs752395219、rs757620158、rs562472371、rs757091887、rs757651862、rs573329574、rs552932842、rs757678036、rs562906731、rs573398771、rs573931855、rs757698701、rs573423419、rs757196334、rs573956248、rs562590653、rs770844073、rs753073195、rs757264923、rs770368521、rs562966673、rs553375250、rs757286231、rs562624182、rs553028786、rs562631637、rs553396451、rs757816346、rs752659859、rs770424435、rs753158893、rs753161012、rs553429432、rs757326234、rs562658586、rs757848676、rs563030100、rs757851276、rs770440360、rs553444080、rs562685659、rs770998439、rs757903328、rs752715463、rs753243305、rs574158047、rs753248999、rs573615359、rs771049218、rs553520048、rs574218458、rs574218497、rs770484072、rs770507859、rs757415695、rs573692993、rs771127117、rs753348681、rs770572267、rs574279980、rs573729847、rs553217886、rs752874223、rs574313437、rs770646119、rs753375127、rs553594673、rs753413529、rs563204921、rs563204956、rs573793230、rs553615720、rs770669377、rs752915464、rs752935458、rs771254688、rs563250976、rs752936829、rs573845641、rs758171359、rs553671701、rs757627939、rs770755089、rs770761836、rs573905888、rs758213818、rs574458879、rs758231448、rs770785487、rs563313026、rs758251421、rs758252419、rs573944942、rs753048798、rs771377765、rs563340232、rs553350853、rs758286245、rs562957866、rs553362365、rs757786023、rs574020661、rs753630953、rs562989702、rs574575080、rs753648561、rs753119257、rs753668162、rs753149666、rs563015753、rs753169837、rs553433381、

rs770963601、rs574621082、rs753732662、rs758421005、rs574670231、rs757870156、rs771562041、rs574145206、rs574724729、rs757927255、rs553537463、rs771111770、rs574251637、rs553550103、rs563161459、rs758527549、rs574771040、rs753843081、rs553570026、rs771649415、rs574292008、rs771662229、rs574805977、rs574854330、rs771738593、rs563201986、rs758651382、rs574315059、rs758656020、rs574340577、rs758660161、rs771774637、rs758691949、rs758107372、rs754017346、rs771227297、rs563235099、rs553661695、rs754045274、rs563260674、rs754055297、rs563269397、rs553682936、rs574438316、rs771304275、rs758800428、rs753559306、rs771919739、rs753582578、rs754141945、rs575081551、rs563336388、rs575092590、rs753600502、rs575125159、rs771392468、rs563351273、rs758888190、rs563353671、rs758905037、rs771413333、rs553772622、rs574587211、rs753682189、rs758373659、rs772039702、rs772039784、rs772048626、rs754275081、rs771477905、rs753690596、rs553815137、rs575278958、rs574681748、rs575303100、rs771582810、rs758485743、rs759087854、rs575348590、rs753812341、rs759111100、rs772225059、rs758499442、rs754462186、rs754476252、rs574742878、rs754490813、rs772285262、rs753828829、rs574761563、rs772336893、rs754543076、rs759290654、rs772395366、rs753849639、rs754638250、rs758555473、rs759384662、rs574887579、rs754694440、rs772505511、rs754710057、rs753978827、rs771768782、rs772542224、rs772565872、rs574947376、rs759493094、rs771816020、rs574962188、rs758720517、rs754046765、rs772538411、rs754056327、rs759582553、rs754072901、rs759604608、rs759618021、rs759618971、rs772713563、rs754073647、rs754934055、rs754977237、rs772800001、rs758784984、rs754113212、rs575064964、rs575092333、rs771950039、rs575127361、rs771984656、rs771998562、rs772005602、rs759809047、rs772905789、rs575158631、rs755129606、rs754241027、rs755139637、rs754241912、rs759868988、rs575188566、rs755204073、rs773012423、rs773015695、rs773030286、rs575222561、rs759000378、rs575270437、rs772133229、rs759054169、rs760019571、rs575323599、rs772196281、rs755344662、rs755345735、rs759150088、rs773161532、rs755360952、rs755361509、rs772283807、rs760088897、rs773197006、rs773259205、rs760189302、rs755471441、rs755501706、rs754512913、rs760244093、rs755553046、rs772335325、rs759300259、rs772449743、rs773425925、rs772489586、rs754719129、rs755653914、rs755666694、rs760410743、rs759482720、rs759520309、rs754870625、rs760471093、rs759523063、rs754822550、rs773686703、rs754840578、rs760600919、rs760603637、rs772672495、rs754892941、rs760523838、rs760451171、rs755736948、rs760557658、rs760816228、rs772714587、rs755000613、rs772804611、rs755017523、rs759736603、rs759736945、rs760912489、rs774006498、rs772843217、rs759766086、rs755067851、rs759784688、rs761013330、rs772909429、rs772930184、rs761116601、rs761152276、rs774249327、rs774251259、rs774274995、rs772944744、rs761216742、rs774309167、rs772964132、rs761267824、rs761373885、rs759949565、rs755275181、rs774519927、rs774522732、rs761441210、rs761463732、rs773084045、rs773099131、rs773104432、rs760030368、rs774666634、rs761564783、

rs761565126、rs755324498、rs773159916、rs761601211、rs755370020、rs761671328、rs774795813、rs774799502、rs760228901、rs774812992、rs774858304、rs761769631、rs755586452、rs761781232、rs774899950、rs773396301、rs760333909、rs755619723、rs774976082、rs761920258、rs761927300、rs761950663、rs773446299、rs761963623、rs775079499、rs755705775、rs773689919、rs760624162、rs760699862、rs762086202、rs775205757、rs762111294、rs762125145、rs760733738、rs773860024、rs775323392、rs762225419、rs775369857、rs775376322、rs773919023、rs773782386、rs760694869、rs775387692、rs773967655、rs760882331、rs762340832、rs762148321、rs762202141、rs775464792、rs775131844、rs762435356、rs775544399、rs762034007、rs762510204、rs775614853、rs775627209、rs773976748、rs760891383、rs760906241、rs774029965、rs775822699、rs762720619、rs774047193、rs774053322、rs762804252、rs774058465、rs774129861、rs761104208、rs762966087、rs762968069、rs776089462、rs761185751、rs774332033、rs774469859、rs776158237、rs774482073、rs774589810、rs761511663、rs763179120、rs761511750、rs774646303、rs761588559、rs774694132、rs774728176、rs761697288、rs774886139、rs774922349、rs761826946、rs761845760、rs775063793、rs762003012、rs776637872、rs776654464、rs763546628、rs775110547、rs762276860、rs775383881、rs775461240、rs762422181、rs776740578、rs763649134、rs775386066、rs762309744、rs762328054、rs762349561、rs763826888、rs776958522、rs763851219、rs763608389、rs776992703、rs763887905、rs776685090、rs763905132、rs763962939、rs763974094、rs777096875、rs764029915、rs763580952、rs775580427、rs762627922、rs777288188、rs762666941、rs762675794、rs775794317、rs762726532、rs762730738、rs762889511、rs762892329、rs762959657、rs763002281、rs763002290、rs763012243、rs776218442、rs777563631、rs776244370、rs777622383、rs776251366、rs776332292、rs763230781、rs776360258、rs776427552、rs764653324、rs776476300、rs763360058、rs763363216、rs776553236、rs763457677、rs777864926、rs763480814、rs763480911、rs776628475、rs763552752、rs763566743、rs778010014、rs778022974、rs778036245、rs763698303、rs776874241、rs777012344、rs763688323、rs778143440、rs777215702、rs778289549、rs778300575、rs764096123、rs776939122、rs776981873、rs778119782、rs778380666、rs778267601、rs765112370、rs778321318、rs778494297、rs765311513、rs764145516、rs777290815、rs765318979、rs765320933、rs764873930、rs764888631、rs778333649、rs778374010、rs764194425、rs778674007、rs777339467、rs777382966、rs777418612、rs777478358、rs765540232、rs764346157、rs764347894、rs778800909、rs764349631、rs764377819、rs764399440、rs778929063、rs779079123、rs777546243、rs764445619、rs765838143、rs779164966、rs777646023、rs779192695、rs764496311、rs777703989、rs777740982、rs777812604、rs777829093、rs764661916、rs777840632、rs779461736、rs777844017、rs777855721、rs766045094、rs766058889、rs764699511、rs764719051、rs764746314、rs764794225、rs779681069、rs777969265、rs779840641、rs779874157、rs778055850、rs778396766、rs779957394、rs766239824、rs780023870、rs780043145、rs766263796、rs766274346、rs778441261、rs765258572、rs780109322、

rs778501127、rs765316534、rs766324084、rs778543495、rs765369653、rs778602129、rs766393434、rs780316047、rs765423637、rs778611965、rs780347157、rs765492974、rs765497371、rs778714853、rs780447105、rs765533323、rs766481843、rs780503041、rs780639638、rs765541870、rs780693341、rs778736307、rs765643844、rs765653200、rs765673912、rs765800389、rs766622658、rs780798844、rs779132370、rs766649583、rs779175706、rs779230028、rs779282960、rs779344629、rs779375751、rs765948436、rs779425422、rs781124123、rs779450397、rs765993652、rs766010851、rs766066655、rs766071038、rs779649545、rs779679057、rs779738791、rs766206300、rs766879944、rs779928230、rs766901141、rs766933679、rs780083168、rs766940667、rs766287305、rs766299085、rs766300702、rs781535786、rs781539021、rs781551678、rs780193488、rs780222163、rs780296350、rs766400518、rs796125137、rs767194024、rs780344643、rs767261742、rs780357335、rs766453651、rs766456874、rs780494441、rs766560176、rs796454833、rs767330330、rs766575026、rs780717433、rs796834572、rs780751522、rs796879015、rs796895878、rs796908878、rs796943897、rs780779741、rs767568953、rs767585211、rs767665163、rs780791041、rs780805821、rs767821897、rs767874262、rs780879054、rs767995767、rs768064437、rs766687711、rs766688014、rs766704428、rs768290765、rs781060177、rs781072045、rs768466223、rs781072572、rs781158522、rs781159679、rs768587771、rs768603693、rs768623038、rs768653386、rs768702122、rs768711176、rs768744959、rs768781393、rs781188766、rs768844255、rs781231699、rs768884828、rs768886558、rs781253062、rs781284676、rs766863424、rs781317195、rs781327688、rs781361862、rs781448754、rs781467412、rs766956430、rs781531817、rs767039336、rs767055311、rs781777533、rs767184929、rs796249942、rs796309254、rs767265990、rs796349008、rs796352290、rs796380704、rs796730002、rs796797940、rs796870168、rs796981058、rs767788312、rs767804500、rs767905631、rs768152740、rs768239772、rs768260693、rs768385834、rs768416620、rs768531332、rs768574136、rs768585281、rs768804885以及rs768853312。

[0425] 在一个实例中,本公开中使用的指导RNA可包含表5中列出的至少一种20个核苷酸(nt)的靶核酸序列。表5中提供了基因符号和基因的序列标识符(基因SEQ ID NO),所述基因序列包括靶基因上游和/或下游的1-5千碱基对(延伸的基因SEQ ID NO),以及20nt靶核酸序列(20nt靶序列SEQ ID NO)。在列出相应靶基因的序列中,用于靶向基因的链(由序列表中的(+)链或(-)链标记),对于20nt靶核酸序列(SEQ ID NO:5305-125469)中的每一个描述了相关的PAM类型和PAM序列。在本领域中应理解,间隔区序列(其中“T”是“U”)可以是对应于表5中列出的20nt序列的RNA序列。

[0426] 表5.核酸序列

[0427]

基因符号	基因 SEQ ID NO	延伸的基因 SEQ ID NO	20 nt靶序列 SEQ ID NO
SCN9A	5303	5304	5305-125469

[0428] 在一个实例中,本公开中使用的指导RNA可包含至少一个间隔区序列(其中“T”是

“U”),所述间隔区序列可以是对应于20个核苷酸(nt)的靶序列的RNA序列,如但不限于SEQ ID NO:5305-125469中的任一个。

[0429] 在一个实例中,本公开中使用的指导RNA可包含至少一个间隔区序列(其中“T”是“U”),所述间隔区序列是对应于20nt序列的RNA序列,如但不限于SEQ ID NO:5305-125469中的任一个。

[0430] 在一个实例中,指导RNA可包含与PAM类型相关的20个核苷酸(nt)的靶核酸序列,如但不限于NAAAAC、NNAGAAW、NNGRRT、NNNNGHTT、NRG或YTN。作为非限制性实例,特定靶基因和特定PAM类型的20nt靶核酸序列可以是(其中“T”是“U”)对应于表6中的20nt核酸序列中的任一个的RNA序列。

[0431] 表6.核酸序列(PAM类型)

[0432]

基因符号	PAM:NAAAAC	PAM:NNAGAAW	PAM:NNGRRT	PAM:NNNNGHTT	PAM:NRG	PAM: YTN
	20 nt 靶核酸 SEQ ID NO	20 nt 靶核酸 SEQ ID NO	20 nt 靶核酸 SEQ ID NO	20 nt 靶核酸 SEQ ID NO	20 nt 靶核酸 SEQ ID NO	20 nt 靶核酸 SEQ ID NO
SCN9A	5305-6250	6251-8561	8562-13614	13615-18988	18989-56863	56864-125469

[0433] 在一个实例中,指导RNA可包含与YTN PAM类型相关的20个核苷酸(nt)的靶核酸序列。作为非限制性实例,特定靶基因的20nt靶核酸序列可包含20nt核心序列,其中所述20nt核心序列(其中“T”是“U”)可以是对应于SEQ ID NO:56864-125469的RNA序列。作为另一个非限制性实例,特定靶基因的20nt靶核酸序列可包含核心序列,其中所述核心序列(其中“T”是“U”)可以是对应于SEQ ID NO:56864-125469中的任一个的RNA序列的片段、区段或区域。

[0434] VI.其他治疗方法

[0435] 可使用工程化以靶向特定序列的核酸酶进行基因编辑。迄今为止,存在四种主要类型的核酸酶:大范围核酸酶及其衍生物、锌指核酸酶(ZFN)、转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)和CRISPR-Cas9核酸酶系统。核酸酶平台的设计难度、靶向密度和作用方式各不相同,特别是因为ZFN和TALEN的特异性是通过蛋白质-DNA相互作用,而RNA-DNA相互作用主要指导Cas9。

[0436] CRISPR核酸内切酶(如Cas9)可用于本公开的方法中。然而,本文描述的教义(如治疗靶位点)可应用于其他形式的核酸内切酶,如ZFN、TALEN、HE或MegaTAL,或使用核酸酶的组合。然而,为了将本公开的教义应用于此类核酸内切酶,将尤其需要工程化针对特定靶位点的蛋白质。

[0437] 可将额外的结合结构域与Cas9蛋白融合以增加特异性。这些构建体的靶位点将映射至鉴别的gRNA指定位点,但是将需要额外的结合基序,如对于锌指结构域。在Mega-TAL的情况下,大范围核酸酶可与TALE DNA结合结构域融合。大范围核酸酶结构域可增加特异性并提供裂解。类似地,灭活或死亡的Cas9(dCas9)可与裂解结构域融合,并且需要sgRNA/Cas9靶位点和融合的DNA结合结构域的相邻结合位点。除了催化失活以外,这可能需要dCas9的一些蛋白质工程化以减少结合而无额外的结合位点。

[0438] 锌指核酸酶

[0439] 锌指核酸酶(ZFN)是模块化蛋白质,其由与II型核酸内切酶FokI的催化结构域连接的工程化的锌指DNA结合结构域组成。因为FokI仅作为二聚体起作用,所以必须将一对ZFN工程化以结合至相对DNA链上的同源靶“半位点”序列并且它们之间具有精确的间隔以使得能够形成催化活性的FokI二聚体。在FokI结构域二聚化时,其自身本身没有序列特异性,在ZFN半位点之间产生DNA双链断裂作为基因组编辑中的起始步骤。

[0440] 每个ZFN的DNA结合结构域通常由丰富的Cys2-His2结构的3-6个锌指组成,其中每个指主要识别靶DNA序列的一条链上的核苷酸三联体,尽管与第四个核苷酸的交叉链相互作用也可以是重要的。改变与DNA进行关键接触的位置中的指改变了给定指的序列特异性。因此,四指锌指蛋白将选择性地识别12bp靶序列,其中所述靶序列是由每个指贡献的三联体偏好的复合,尽管三联体偏好可被相邻指不同程度地影响。ZFN的一个重要方面是,简单地通过修饰单独指就可容易地将它们重新靶向至几乎任何基因组地址,尽管需要相当多的专业知识才能做到这一点。在ZFN的大多数应用中,使用分别识别12-18bp的4-6个指的蛋白质。因此,一对ZFN通常将识别24-36bp的组合靶序列,不包括半位点之间的典型5-7bp间隔区。所述结合位点可用更大的间隔区(包括15-17bp)进一步分离。假设在设计过程中排除重复序列或基因同源物,则这一长度的靶序列可能在人基因组中是独特的。然而,ZFN蛋白-DNA相互作用的特异性不是绝对的,因此脱靶结合和裂解事件确实发生,作为两个ZFN之间的异二聚体或作为ZFN中的一个或另一个的同二聚体。通过工程化FokI结构域的二聚化界面以产生“+”和“-”变体(也称为专性异二聚体变体)可有效地消除后一种可能性,所述变体只能彼此二聚化,而不能与它们自身二聚化。强制专性异二聚体阻止同二聚体的形成。这极大地增强了ZFN以及采用这些FokI变体的任何其他核酸酶的特异性。

[0441] 在本领域中已经描述了各种基于ZFN的系统,定期报告其修饰,并且许多参考文献描述了用于指导ZFN设计的规则和参数,参见例如,Segal等人,Proc Natl Acad Sci USA 96(6):2758-63(1999);Dreier B等人,J Mol Biol.303(4):489-502(2000);Liu Q等人,J Biol Chem.277(6):3850-6(2002);Dreier等人,J Biol Chem 280(42):35588-97(2005);以及Dreier等人,J Biol Chem.276(31):29466-78(2001)。

[0442] 转录活化因子样效应物核酸酶(TALEN)

[0443] TALEN代表模块化核酸酶的另一种形式,其中与ZFN一样,工程化的DNA结合结构域与FokI核酸酶结构域连接,并且一对TALEN串联操作以实现靶向DNA裂解与ZFN的主要区别在于DNA结合结构域的性质和相关的靶DNA序列识别特性。TALEN DNA结合结构域源自TALE蛋白,其最初描述于植物细菌病原体黄单胞菌属中。TALE由33-35个氨基酸重复序列的串联阵列组成,其中每个重复序列识别靶DNA序列中的单个碱基对,所述碱基对的长度通常达20bp,从而得到总靶序列长度达40bp。每个重复序列的核苷酸特异性由复可变双残基(RVD)确定,其仅包含位置12和13处两个氨基酸。碱基鸟嘌呤、腺嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶主要被四种RVD识别:分别Asn-Asn、Asn-Ile、His-Asp和Asn-Gly。这构成了比对于锌指而言更简单的识别代码,并且因此代表了对于核酸酶设计而言优于后者的优点。然而,与ZFN一样,TALEN的蛋白质-DNA相互作用在其特异性方面不是绝对的,并且TALEN也受益于使用FokI结构域的专性异二聚体变体来降低脱靶活性。

[0444] 已经产生了FokI结构域的另外变体,所述变体在其催化功能方面失活。如果TALEN

或ZFN对中的一半含有无活性的FokI结构域,则仅在靶位点而不是DSB处发生单链DNA裂解(切口)。结果与使用CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1“切口酶”突变体相当,其中Cas9裂解结构域之一已经失活。DNA切口可用于驱动通过HDR进行基因组编辑,但效率低于使用DSB。与DSB不同(其易于NHEJ介导的错误修复),主要的益处是快速且准确地修复脱靶切口。

[0445] 在本领域中已经描述了各种基于TALEN的系统,并且定期报告其修饰;参见例如,Boch,Science 326(5959):1509-12(2009);Mak等人,Science 335(6069):716-9(2012);以及Moscou等人,Science 326(5959):1501(2009)。基于“金门(Golden Gate)”平台或克隆方案的TALEN的使用已由多个组描述;参见,例如,Cermak等人,Nucleic Acids Res.39(12):e82(2011);Li等人,Nucleic Acids Res.39(14):6315-25(2011);Weber等人,PLoS One.6(2):e16765(2011);Wang等人,J Genet Genomics 41(6):339-47,Epub 2014年5月17日(2014);以及Cermak T等人,Methods Mol Biol.1239:133-59(2015)。

[0446] 归巢核酸内切酶

[0447] 归巢核酸内切酶(HE)是序列特异性核酸内切酶,所述核酸内切酶具有长识别序列(14-44个碱基对)并且裂解具有高特异性的DNA-通常在基因组中独特的位点处。如根据其结构分类,存在至少六个已知的HE家族,包括GIY-YIG、His-Cis盒、H-N-H、PD-(D/E)xK和Vsr样,它们源自广泛范围的宿主,包括真核生物、原生生物、细菌、古细菌、蓝细菌和噬菌体。与ZFN和TALEN一样,HE可用于在靶基因座处产生DSB作为基因组编辑中的初始步骤。此外,一些天然和工程化的HE仅切割DNA单链,从而充当位点特异性切口酶。HE的大靶序列及其提供的特异性使它们成为产生位点特异性DSB的有吸引力的候选物。

[0448] 在本领域中已经描述了各种基于HE的系统,并且定期报告其修饰;参见,例如,Steentoft等人,Glycobiology 24(8):663-80(2014);Belfort和Bonocora,Methods Mol Biol.1123:1-26(2014);Hafez和Hausner,Genome 55(8):553-69(2012)的综述;以及其中引用的参考文献。

[0449] MegaTAL/Tev-mTALEN/MegaTev

[0450] 作为杂合核酸酶的其他实例,MegaTAL平台和Tev-mTALEN平台使用TALE DNA结合结构域和催化活性HE的融合体,从而利用TALE的可调DNA结合和特异性两者,以及HE的裂解序列特异性;参见,例如,Boissel等人,NAR 42:2591-2601(2014);Kleinstiver等人,G3 4:1155-65(2014);以及Boissel和Scharenberg,Methods Mol.Biol.1239:171-96(2015)。

[0451] 在另一种变化中,MegaTev结构是大范围核酸酶(Mega)与源自GIY-YIG归巢核酸内切酶I-TevI(Tev)的核酸酶结构域的融合体。两个活性位点在DNA底物上相距约30bp,并且产生两个具有不相容的粘性末端的DSB;参见,例如,Wolfs等人,NAR 42,8816-29(2014)。预期现有的基于核酸酶的方法的其他组合将发展并且可用于实现本文所述的靶向基因组修饰。

[0452] dCas9-FokI或dCpf1-Fok1和其他核酸酶

[0453] 组合上述核酸酶平台的结构和功能特性提供了可潜在克服一些固有缺陷的基因组编辑的另一种方法。作为一个实例,CRISPR基因组编辑系统通常使用单一Cas9核酸内切酶来产生DSB。靶向的特异性由指导RNA中的20或24个核苷酸的序列驱动,所述序列经历与靶DNA的沃森-克里克碱基配对(在来自化脓性链球菌的Cas9的情况下,在相邻NAG或NGG PAM序列中加上另外2个碱基)。这种序列足够长以在人基因组中是独特的,然而,RNA/DNA相

互作用的特异性不是绝对的,有时容许显著混杂性,特别是在靶序列的5'半部分中,从而有效地减少了驱动特异性的碱基的数量。对此的一种解决方案是使Cas9或Cpf1催化功能完全失活-仅保留RNA引导的DNA结合功能-并且替代地使FokI结构域与失活的Cas9融合;参见,例如,Tsai等人,Nature Biotech 32:569-76(2014);和Guilinger等人,Nature Biotech.32:577-82(2014)。因为FokI必须二聚化以具有催化活性,所以需要两个指导RNA来将两个FokI融合体紧密栓系以形成二聚体并裂解DNA。这基本上使组合的靶位点中碱基的数量加倍,从而增加了通过基于CRISPR的系统靶向的严格性。

[0454] 作为其他实例,TALE DNA结合结构域与催化活性HE(如I-TevI)的融合利用了TALE的可调DNA结合和特异性,以及I-TevI的裂解序列特异性,期望可进一步减少脱靶裂解。

[0455] VII.药盒

[0456] 本公开提供了用于实施本文所述的方法的药盒。药盒可包括一种或多种靶向基因组的核酸、编码靶向基因组的核酸的多核苷酸、位点定向多肽、编码位点定向多肽的多核苷酸和/或实施本文所述的方法的方面所必需的任何核酸或蛋白质分子或其任何组合。

[0457] 药盒可包括:(1)载体,所述载体包含编码靶向基因组的核酸的核苷酸序列,(2)位点定向多肽或包含编码所述位点定向多肽的核苷酸序列的载体,和(3)用于重构和/或稀释所述载体和或多肽的试剂。

[0458] 药盒可包括:(1)载体,所述载体包含(i)编码靶向基因组的核酸的核苷酸序列,和(ii)编码位点定向多肽的核苷酸序列;以及(2)用于重构和/或稀释载体的试剂。

[0459] 在任何上述药盒中,所述药盒可包括单分子指导靶向基因组的核酸。在任何上述药盒中,所述药盒可包括双分子靶向基因组的核酸。在任何上述药盒中,所述药盒可包括两个或更多个双分子指导或单分子指导。所述药盒可包括载体,所述载体编码靶向核酸的核酸。

[0460] 在任何上述药盒中,所述药盒还可包括待插入以实现所需的遗传修饰的多核苷酸。

[0461] 药盒的组分可处于单独的容器中;或合并在单个容器中。

[0462] 上述任何药盒还可包括一种或多种另外的试剂,其中此类额外试剂是选自缓冲剂、用于将多肽或多核苷酸引入细胞中的缓冲剂、洗涤缓冲剂、对照试剂、对照载体、对照RNA多核苷酸、用于从DNA体外产生多肽的试剂、用于测序的衔接子等。缓冲剂可以是稳定缓冲剂、复原缓冲剂、稀释缓冲剂等。药盒还可包括一种或多种组分,所述一种或多种组分可用于促进或增强核酸内切酶对DNA中靶结合或裂解,或改进靶向的特异性。

[0463] 除了以上提及的组分,药盒可还包括用于使用药盒的组分来实践所述方法的说明书。用于实践所述方法的说明书可被记录在合适的记录介质上。例如,说明书可印刷在诸如纸或塑料的基底)上。说明书可包装插页形式存在于药盒中,存在于药盒或其部件(即与包装或小包装相关的部件)的容器的标签中。说明书可作为存在于合适的计算机可读存储介质例如CD-ROM、磁盘、闪存驱动器等上的电子存储数据文档存在。在一些情况中,实际说明书不存在于药盒中,但可提供用于自远程来源(例如经由因特网)获得说明书的手段。这种情况的一个实例是包括可察看说明书所处的和/或自其可下载说明书的网址的药盒。如同说明书一样,用于获得说明书的这种手段被记录在合适的基底上。

[0464] VIII.本发明的具体方法和组合物

[0465] 因此,本公开特别涉及根据本公开的以下非限制性方法:在第一方法,方法1中,本公开提供了一种用于通过基因组编辑在细胞中编辑电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因的方法,所述方法包括:向所述细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

[0466] 在另一种方法,方法2中,本公开提供了一种用于治疗患有SCN9A相关疾患或病症的患者的离体方法,所述方法包括:在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近编辑患者特异性诱导型多能干细胞(iPSC);使所述编辑的iPSC分化成周围神经系统的神经元;以及将所述周围神经系统的神经元施用至所述患者。

[0467] 在另一种方法,方法3中,本公开提供了一种用于治疗患有SCN9A相关疾患或病症的患者的离体方法,所述方法包括:获得患者特异性诱导型多能干细胞(iPSC);在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近编辑所述iPSC;使所述编辑的iPSC分化成周围神经系统的神经元;以及将所述周围神经系统的神经元施用至所述患者。

[0468] 在另一种方法,方法4中,本公开提供了方法2或3的方法,其中所述编辑步骤包括:向所述iPSC中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

[0469] 在另一种方法,方法5中,本公开提供了一种用于治疗患有SCN9A相关疾患或病症的患者的离体方法,所述方法包括:在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近编辑间充质干细胞;使所述编辑的间充质干细胞分化成周围神经系统的神经元;以及将所述周围神经系统的神经元施用至所述患者。

[0470] 在另一种方法,方法6中,本公开提供了一种用于治疗患有SCN9A相关疾患或病症的患者的离体方法,所述方法包括:从所述患者获得间充质干细胞;在电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因或编码所述SCN9A基因的调控元件的其他DNA序列内或附近编辑间充质干细胞;使所述编辑的间充质干细胞分化成周围神经系统的神经元;以及将所述周围神经系统的神经元施用至所述患者。

[0471] 在另一种方法,方法7中,本公开提供了方法5或6的方法,其中所述编辑步骤包括:向所述间充质干细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

[0472] 在另一种方法,方法8中,本公开提供了一种用于治疗患有SCN9A相关病症的患者的体内方法,所述方法包括:编辑所述患者的细胞中的电压门控的钠通道α亚基9(SCN9A)基因。

[0473] 在另一种方法,方法9中,本公开提供了方法8的方法,其中所述编辑步骤包括:向

所述细胞中引入一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶以在所述SCN9A基因或SCN9A调控元件内或附近实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB),所述一个或多个单链断裂或双链断裂导致所述SCN9A基因内或附近的至少一个核苷酸的一个或多个永久性插入、缺失或突变,从而减少或消除SCN9A基因产物的表达或功能。

[0474] 在另一种方法,方法10中,本公开提供了方法8-9中任一项的方法,其中所述细胞是周围神经系统的神经元。

[0475] 在另一种方法,方法11中,本公开提供了方法10的方法,其中经由直接神经节内或脊柱内注射或鞘内递送将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶递送至所述周围神经系统的所述神经元。

[0476] 在另一种方法,方法12中,本公开提供了一种改变细胞中的SCN9A基因的连续基因组序列的方法,所述方法包括:使所述细胞与一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶接触以实现一个或多个单链断裂(SSB)或双链断裂(DSB)。

[0477] 在另一种方法,方法13中,本公开提供了方法12的方法,其中所述连续基因组序列的所述改变发生在所述SCN9A基因的一个或多个外显子中。

[0478] 在另一种方法,方法14中,本公开提供了方法1-13中任一项的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是选自SEQ ID NO:1-620中的那些以及与SEQ ID NO:1-620中列出的那些中的任一个具有至少90%同源性的变体中的任一个。

[0479] 在另一种方法,方法15中,本公开提供了方法14的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是一种或多种蛋白质或多肽。

[0480] 在另一种方法,方法16中,本公开提供了方法14的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是编码所述一种或多种DNA核酸内切酶的一种或多种多核苷酸。

[0481] 在另一种方法,方法17中,本公开提供了方法16的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶是编码所述一种或多种DNA核酸内切酶的一种或多种核糖核酸(RNA)。

[0482] 在另一种方法,方法18中,本公开提供了方法17的方法,其中所述一种或多种核糖核酸(RNA)是一种或多种化学修饰的RNA。

[0483] 在另一种方法,方法19中,本公开提供了方法18的方法,其中所述一种或多种核糖核酸(RNA)在编码区中经化学修饰。

[0484] 在另一种方法,方法20中,本公开提供了方法16-19中任一项的方法,其中所述一种或多种多核苷酸或所述一种或多种核糖核酸(RNA)是密码子优化的。

[0485] 在另一种方法,方法21中,本公开提供了方法1-20中任一项的方法,其中所述方法还包括:向所述细胞中引入一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。

[0486] 在另一种方法,方法22中,本公开提供了方法21的方法,其中所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA包含与所述SCN9A基因内或附近的DNA序列互补的间隔区序列。

[0487] 在另一种方法,方法23中,本公开提供了方法21-22中任一项的方法,其中所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA经化学修饰。

[0488] 在另一种方法,方法24中,本公开提供了方法21-23中任一项的方法,其中使所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA与所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶预复合。

[0489] 在另一种方法,方法25中,本公开提供了方法24的方法,其中所述预复合涉及所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA与所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶的共价连接。

[0490] 在另一种方法,方法26中,本公开提供了方法14-25中任一项的方法,其中将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶配制在脂质体或脂质纳米颗粒中。

[0491] 在另一种方法,方法27中,本公开提供了方法21-25中任一项的方法,其中将所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶配制在脂质体或脂质纳米颗粒中,所述脂质体或脂质纳米颗粒还包含所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。

[0492] 在另一种方法,方法28中,本公开提供了方法12或21-22中任一项的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶在AAV载体颗粒中编码。

[0493] 在另一种方法,方法29中,本公开提供了方法21-22中任一项的方法,其中所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA在AAV载体颗粒中编码。

[0494] 在另一种方法,方法30中,本公开提供了方法21-22中任一项的方法,其中所述一种或多种脱氧核糖核酸(DNA)核酸内切酶在AAV载体颗粒中编码,所述AAV载体颗粒还编码所述一种或多种gRNA或一种或多种sgRNA。

[0495] 在另一种方法,方法31中,本公开提供了方法28-30中任一项的方法,其中所述AAV载体颗粒是选自由SEQ ID NO:4734-5302和表2中公开的那些中的任一个组成的组。

[0496] 本公开还提供了一种组合物,组合物1,所述组合物包含单分子指导RNA,所述单分子指导RNA包含:至少一个间隔区序列,所述至少一个间隔区序列是对应于SEQ ID NO:5305-125469中的任一个的RNA序列。

[0497] 在另一种组合物,组合物2中,本公开提供了组合物1的单分子指导RNA,其中所述单分子指导RNA还包含间隔区延伸区。

[0498] 在另一种组合物,组合物3中,本公开提供了组合物1的单分子指导RNA,其中所述单分子指导RNA还包含tracrRNA延伸区。

[0499] 在另一种组合物,组合物4中,本公开提供了组合物1-3的单分子指导RNA,其中所述单分子指导RNA经化学修饰

[0500] 在另一种组合物,组合物5中,本公开提供了与位点定向多肽预复合的组合物1-4的单分子指导RNA。

[0501] 在另一种组合物,组合物6中,本公开提供了与DNA核酸内切酶预复合的组合物1-5的单分子指导RNA。

[0502] 在另一种组合物,组合物7中,本公开提供了组合物6的组合物,其中所述DNA核酸内切酶是Cas9或Cpf1核酸内切酶。

[0503] 在另一种组合物,组合物8中,本公开提供了组合物7的组合物,其中所述Cas9或Cpf1核酸内切酶是选自由以下组成的组:化脓性链球菌Cas9、金黄色葡萄球菌Cas9、脑膜炎奈瑟氏菌Cas9、嗜热链球菌CRISPR1 Cas9、嗜热链球菌CRISPR 3Cas9、齿垢密螺旋体Cas9、毛螺菌科细菌ND2006 Cpf1和氨基酸球菌属BV3L6 Cpf1以及与所述核酸内切酶具有至少90%同源性的变体。

[0504] 在另一种组合物,组合物9中,本公开提供了组合物8的组合物,其中所述Cas9或Cpf1核酸内切酶包含一个或多个核定位信号(NLS)。

[0505] 在另一种组合物,组合物10中,本公开提供了组合物9的组合物,其中至少一个NLS位于所述Cas9或Cpf1核酸内切酶的氨基末端的50个氨基酸处或之内,和/或至少一个NLS位于所述Cas9或Cpf1核酸内切酶的羧基末端的50个氨基酸处或之内。

[0506] 在另一种组合物,组合物11中,本公开提供了编码组合物1-4中任一项的单分子指导RNA的DNA。

[0507] 在另一种组合物,组合物12中,本发明提供了非天然存在的CRISPR/Cas系统,其包含编码Cas9或Cpf1核酸内切酶的多核苷酸和组合物1-4的至少一种单分子指导RNA。

[0508] 在另一种组合物,组合物13中,本公开提供了组合物11的CRISPR/Cas系统,其中所述编码Cas9或Cpf1核酸内切酶的多核苷酸是选自由以下组成的组:化脓性链球菌Cas9、金黄色葡萄球菌Cas9、脑膜炎奈瑟氏菌Cas9、嗜热链球菌CRISPR1 Cas9、嗜热链球菌CRISPR 3Cas9、齿垢密螺旋体Cas9、毛螺菌科细菌ND2006 Cpf1和氨基酸球菌属BV3L6 Cpf1以及与所述核酸内切酶具有至少90%同源性的变体。

[0509] 在另一种组合物,组合物14中,本公开提供了组合物13的CRISPR/Cas系统,其中所述编码Cas9或Cpf1核酸内切酶的多核苷酸包含一个或多个核定位信号(NLS)。

[0510] 在另一种组合物,组合物15中,本公开提供了组合物14的CRISPR/Cas系统,其中至少一个NLS位于所述编码Cas9或Cpf1核酸内切酶的多核苷酸的氨基末端的50个氨基酸处或之内,和/或至少一个NLS位于所述编码Cas9或Cpf1核酸内切酶的多核苷酸的羧基末端的50个氨基酸处或之内。

[0511] 在另一种组合物,组合物16中,本公开提供了组合物15的CRISPR/Cas系统,其中所述编码Cas9或Cpf1核酸内切酶的多核苷酸经密码子优化以在真核细胞中表达。

[0512] 在另一种组合物,组合物17中,本公开提供了一种编码组合物12-16中任一项的CRISPR/Cas系统的DNA。

[0513] 在另一种组合物,组合物18中,本公开提供了一种包含组合物12-17中任一项的DNA的载体。

[0514] 在另一种组合物,组合物19中,本公开提供了组合物18的载体,其中所述载体是质粒。

[0515] 在另一种组合物,组合物20中,本公开提供了组合物18的载体,其中所述载体是AAV载体颗粒,并且所述AAV载体血清型是选自由SEQ ID NO:4734-5302和表2中公开的那些组成的组。

[0516] IX.定义

[0517] 术语“包含(comprising)”或“包含(comprises)”关于本公开所必需的组合物、方法及其对应组分使用,其仍然为包括未指定的要素的开放式的术语,无论所述要素是否必需。

[0518] 术语“基本上由……组成”是指那些要素是给定方面所需的。所述术语允许存在不会实质上影响本公开的所述方面的一个或多个基本特征和新颖特征或功能特征的额外要素。

[0519] 术语“由……组成”是指如本文所述的组合物、方法及其对应组分不包括在所述方面的描述中未叙述的任何要素。

[0520] 除非上下文另外明确规定,否则单数形式“一个/种(a/an)”和“所述”包括复数个

指示物。

[0521] 本说明书中列举的任何数值范围都描述了在所列举范围内包括的相同数值精度(即,具有相同数量的指定数字)的所有子范围。例如,所列举的“1.0至10.0”的范围描述了所列举的最小值1.0与所列举的最大值10.0之间(并且包括所述最小值和最大值)的所有子范围,例如像“2.4至7.6”,即使“2.4至7.6”的范围未在说明书的文本中明确列举。因此,本申请人保留修改本说明书(包括权利要求书)的权利,以明确列出归入本说明书中所明确列出的范围内的相同数值精度的任何子范围。所有此类范围在本说明书中固有地描述,以使得修改以明确地叙述任何此类子范围将符合书面描述、描述的充分性和附加的物质要求,包括在美国法典第35篇112条(a)款和条款123(2)EPC下的要求。此外,除非上下文明确指出或以其他方式要求,否则本说明书中描述的所有数值参数(如表述值、范围、量、百分比等的那些)可被读作好像以“约”为前缀,即使词语“约”并未明确地出现在一个数字之前。另外,本说明书中描述的数值参数应根据报告的有效数字的数量、数值精度和通过应用一般的舍入技术来解释。还应理解,本说明书中描述的数值参数将必然具有用于确定参数数值的基础测量技术的固有可变性特征。

[0522] 本公开的一个或多个实施例的细节在下文的随附描述中进行阐述。虽然在本公开的实践或测试中可使用与本文中描述的材料和方法类似或等效的任何材料和方法,但是现在描述优选的材料和方法。本公开的其他特征、目标和优点将根据所述描述显而易知。在说明书中,除非上下文另外明确规定,否则单数形式也包括复数。除非另外定义,否则本文所用的所有技术和科学术语都具有与由本公开所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。在冲突的情况下,以本说明书为准。

[0523] 本公开通过以下非限制性实施例进一步说明。

[0524] X.实施例

[0525] 通过参考以下实施例将更全面地理解本公开,所述实施例提供本发明的说明性非限制性方面。

[0526] 所述实施例描述了使用CRISPR系统作为说明性基因组编辑技术,以在SCN9A基因中产生限定的治疗性基因组缺失、插入或置换(在本文中称为“基因组修饰”),所述基因组缺失、插入或置换导致SCN9A基因的永久性缺失或突变,所述永久性缺失或突变减少或消除SCN9A蛋白质活性。如本文所述和所示,引入所定义的治疗修饰代表了用于潜在改善疼痛的新颖治疗策略。

[0527] 针对切割评价各种Cas直向同源物。gRNA以RNA形式递送并从质粒中的U6启动子表达。相应的Cas蛋白被敲入目标细胞系并组成型地表达,以mRNA形式递送或以蛋白质形式递送。使用HEK293T细胞中的TIDE分析评价所有形式的gRNA活性。

[0528] 如本文所述和说明的,引入限定上文所述的治疗修饰代表了用于潜在改善疼痛和相关病症的新颖治疗策略。

[0529] 实施例1-SCN9A基因的CRISPR/SpCas9靶位点

[0530] 扫描SCN9A基因的区域以获得靶位点。扫描每个区域以获得具有序列NRG的原型间隔区相邻基序(PAM)。然后鉴别对应于PAM的gRNA 20bp间隔区序列,如序列表的SEQ ID NO:18989-56863中所示。

[0531] 实施例2-SCN9A基因的CRISPR/SaCas9靶位点

[0532] 扫描SCN9A基因的区域以获得靶位点。扫描每个区域以获得具有序列NNGRRT的原型间隔区相邻基序(PAM)。然后鉴别对应于PAM的gRNA 20bp间隔区序列,如序列表的SEQ ID NO:8562-13614中所示。

[0533] 实施例3-SCN9A基因的CRISPR/StCas9靶位点

[0534] 扫描SCN9A基因的区域以获得靶位点。扫描每个区域以获得具有序列NNAGAAW的原型间隔区相邻基序(PAM)。然后鉴别对应于PAM的gRNA 20bp间隔区序列,如序列表的SEQ ID NO:6251-8561中所示。

[0535] 实施例4-SCN9A基因的CRISPR/TdCas9靶位点

[0536] 扫描SCN9A基因的区域以获得靶位点。扫描每个区域以获得具有序列NAAAAC的原型间隔区相邻基序(PAM)。然后鉴别对应于PAM的gRNA 20bp间隔区序列,如序列表的SEQ ID NO:5305-6250中所示。

[0537] 实施例5-SCN9A基因的CRISPR/NmCas9靶位点

[0538] 扫描SCN9A基因的区域以获得靶位点。扫描每个区域以获得具有序列NNNNGHTT的原型间隔区相邻基序(PAM)。然后鉴别对应于PAM的gRNA 20bp间隔区序列,如序列表的SEQ ID NO:13615-18988中所示。

[0539] 实施例6-SCN9A基因的CRISPR/Cpf1靶位点

[0540] 扫描SCN9A基因的区域以获得靶位点。扫描每个区域以获得具有序列YTN的原型间隔区相邻基序(PAM)。然后鉴别对应于PAM的gRNA 20bp间隔区序列,如序列表的SEQ ID NO:56864-125469中所示。

[0541] 实施例7-引导链的生物信息学分析

[0542] 然后将在单个过程或多步骤过程中筛选和选择候选指导,所述过程涉及在中靶和脱靶位点处的理论结合活性和实验评估的活性。举例来说,可使用可用于评估脱靶结合的各种生物信息学工具中的一种或多种评估具有使特定中靶位点(如SCN9A基因内的位点)与相邻的PAM匹配的序列的候选指导的具有相似序列的脱靶位点处裂解的潜力,如下文更详细描述和说明的,以便评估除了意图的那些以外的染色体位置处的影响的可能性。

[0543] 然后可通过实验评估预测具有相对较低的脱靶活性潜力的候选物,以测量它们的中靶活性,且然后在不同位点的脱靶活性。优选的指导具有足够高的中靶活性以在所选基因座处实现所需水平的基因编辑,并且具有相对较低的脱靶活性以降低在其他染色体基因座处改变的可能性。中靶活性与脱靶活性的比率通常被称为指导的“特异性”。

[0544] 对于预测的脱靶活性的初始筛选,存在可用于预测最可能的脱靶位点的许多已知且可公开获得的生物信息学工具;并且由于与CRISPR/Cas9或CRISPR/Cpf1核酸酶系统中的靶位点的结合由互补序列之间的沃森-克里克碱基配对驱动,因此不相似程度(且因此降低的脱靶结合的可能性)基本上与一级序列差异有关:错配和凸起,即改变为非互补碱基的碱基,以及相对于靶位点的潜在脱靶位点中碱基的插入或缺失。称为COSMID(具有错配、插入和缺失的CRISPR脱靶位点)的示例性生物信息学工具(可在网上在crispr.bme.gatech.edu获得)编译此类相似性。其他生物信息学工具包括但不限于autoCOSMID和CCTop。

[0545] 生物信息学用于使脱靶裂解最小化,以减少突变和染色体重排的有害影响。关于CRISPR/Cas9系统的研究表明,由于引导链与具有碱基对错配和/或凸起的DNA序列的非特异性杂交所致的脱靶活性的可能性,特别是在远离PAM区域的位置处。因此,除了碱基对错

配以外,具有可鉴别在RNA引导链与基因组序列之间具有插入和/或缺失的潜在脱靶位点的生物信息学工具是重要的。基于脱靶算法CCTop的生物信息学工具用于搜索基因组以获得潜在CRISPR脱靶位点(CCTop可在网上在crispr.cos.uni-heidelberg.de/获得)。输出基于错配的数量和位置对潜在脱靶位点进行排序,从而允许更明智地选择靶位点,并且避免使用更可能脱靶裂解的位点。

[0546] 使用另外的生物信息学管道,其权衡区域中gRNA靶向位点的估计的中靶活性和/或脱靶活性。可用于预测活性的其他特征包括关于所讨论的细胞类型、DNA可接近性、染色质状态、转录因子结合位点、转录因子结合数据和其他CHIP-seq数据的信息。权衡预测编辑效率的另外的因素,如gRNA对的相对位置和方向、局部序列特征和微同源性。

[0547] CRISPR/Cas9靶位点的初始评价和筛选集中于SCN9A基因的外显子2-17和自这些外显子侧翼的内含子2-16的100-300bp序列。这些gRNA还可用于编辑一个或多个核苷酸、外显子序列和/或内含子序列。

[0548] 初始生物信息学分析鉴别了靶向外显子2-17、内含子2-16以及位于内含子序列侧翼的100-300bp序列的602个gRNA。对预测的脱靶位点的进一步分析和SCN9A基因内的gRNA靶位点的评价产生了选择用于筛选的192个gRNA。使用spCas9测试靶向SCN9A基因的192个单一gRNA的优先列表的切割效率(表7)。

[0549] 表7

[0550]

SEQ ID NO.	名称	序列
46832	SCN9A_Int13_Int14_T4	TGTGCAAATCTGTACCACCA
49122	SCN9A_Int5_Int6_T10	CAAATAGTTGGAGTTATGAG
49431	SCN9A_Int2_Int5_T31	CAGCAGTTTACCTTTCTACA
47474	SCN9A_Int10_Int11_T22	CACCTATTAGCATAACAACA
47446	SCN9A_Int10_Int11_T6	TATGCCCTTCGACACCAAGG
28779	SCN9A_Int8_Int9_T21	GAGCTTTGACACTTTCAGCT
29821	SCN9A_Int6_Int7_T3	CAGGCCTGAAGACAATTGTA
28146	SCN9A_Int10_Int11_T17	GTGAAAGATGTCCTGTCCTA
49436	SCN9A_Int2_Int5_T35	GCCATCAGACTCCAGCAATG
47224	SCN9A_Int11_Int12_T26	CTGGCAGAAGCTGTCCATTG
47462	SCN9A_Int10_Int11_T12	CCGCTGCCGCTGCAATTGCC
47240	SCN9A_Int11_Int12_T3	CGTTCACCGGCAGCATTGGT
27323	SCN9A_Int14_Int15_T1	AGTTCTGCGATCATTCAGAC
27522	SCN9A_Int13_Int14_T2	GGAACACCACCCAATGACTG
27893	SCN9A_Int11_Int12_T20	TAGGTCCCCACCAATGCTGC
47261	SCN9A_Int11_Int12_T28	AAGGAGCCACGAATGCTGAG
28137	SCN9A_Int10_Int11_T21	GCCCAACCAGGCAATTGCAG
49367	SCN9A_Int2_Int5_T8	CCAGTCCGGTGGGTTATTCA
47232	SCN9A_Int11_Int12_T8	GGCTGAGCGTCCATCAACCA
47445	SCN9A_Int10_Int11_T7	GCCTATGCCCTTCGACACCA
49313	SCN9A_Int2_Int5_T38	TATATTGGAGGATGGCTGTT
47267	SCN9A_Int11_Int12_T24	ATAAATACCACTGAACCCAC
30622	SCN9A_Int1_Int2_T9	CCATCCAGGCCTCTTATGTG
47231	SCN9A_Int11_Int12_T5	GGGCTGAGCGTCCATCAACC
26766	SCN9A_Int16_Int17_T10	TGACAGTGCCAATTGCACCT
28139	SCN9A_Int10_Int11_T4	GTTAACGTCTTGGCCCAACC
46079	SCN9A_Int16_Int17_T9	TAGGTTTAGGACCTATATCA
48091	SCN9A_Int8_Int9_T18	CTCAAGGTTTCTTCTATAGG
46833	SCN9A_Int13_Int14_T1	GCAAATCTGTACCACCAAGG
26765	SCN9A_Int16_Int17_T16	GACAGTGCCAATTGCACCTG
27876	SCN9A_Int11_Int12_T27	GCCAGAGGTGATAATAGATA
47241	SCN9A_Int11_Int12_T18	GTTCACCGGCAGCATTGGTG
47248	SCN9A_Int11_Int12_T22	GCGTCGCTCCTGGGGTCTGT
30051	SCN9A_Int2_Int5_T34	CCCAATGGAATCTTGTGTTT
30111	SCN9A_Int2_Int5_T18	TATGACCATGAATAACCCAC
28760	SCN9A_Int8_Int9_T16	TGTTAAGAGCCTGTATTAGG
28085	SCN9A_Int10_Int11_T23	ATAGGCGAGCACATGAAAAG
27254	SCN9A_Int15_Int16_T19	AAGATCATTGGTAACTCAGT
30163	SCN9A_Int2_Int5_T9	GATAGATGCGTTGATGACAT
49303	SCN9A_Int2_Int5_T44	CCTAAACACAAGATTCCATT

[0551]

28083	SCN9A_Int10_Int11_T2	GAGGTTGTCTACCCCCAATC
49344	SCN9A_Int2_Int5_T30	GCAGGTTAATATCATAGAGG
47245	SCN9A_Int11_Int12_T2	GTTACTGCTGCGTCGCTCCT
48090	SCN9A_Int8_Int9_T22	ACTCAAGGTTTCTTCTATAG
28132	SCN9A_Int10_Int11_T16	CGGCTGAATATACAAGTATT
27328	SCN9A_Int14_Int15_T2	GGAGCTCTTTCTAGCAGATG
46078	SCN9A_Int16_Int17_T8	ATAGGTTTAGGACCTATATC
28773	SCN9A_Int8_Int9_T7	GCTAATGACCCAAGATTACT
46496	SCN9A_Int15_Int16_T12	ACATCTGGTTACATACCACC
27885	SCN9A_Int11_Int12_T23	GGTGTGGTCTCCCTGGTTGA
29928	SCN9A_Int5_Int6_T2	AATACCTTGACTAAAGGCTC
27933	SCN9A_Int11_Int12_T7	CAGTCACCACTCAGCATTCG
46039	SCN9A_Int16_Int17_T2	TTTTCCAAATCGGATTCCCC
47439	SCN9A_Int10_Int11_T10	CAATTTGGGTGGTACCTGAT
28774	SCN9A_Int8_Int9_T1	GGCTAATGACCCAAGATTAC
47455	SCN9A_Int10_Int11_T24	AGCACTTTTAGAGCTCAGTT
30020	SCN9A_Int2_Int5_T24	TATGAAAGCTAGTCATTGAT
47236	SCN9A_Int11_Int12_T15	CTGTGCATTTTCCCGTTCAC
28089	SCN9A_Int10_Int11_T3	ACCTTGGTGTCGAAGGGCAT
26813	SCN9A_Int16_Int17_T14	ATAGGTCCTAAACCTATTTC
47464	SCN9A_Int10_Int11_T9	GCCGCTGCAATTGCCTGGTT
28091	SCN9A_Int10_Int11_T8	GTTTCCACCTTGGTGTCGAA
29908	SCN9A_Int5_Int6_T11	AGTAATTGGTGTGAAGCATT
27892	SCN9A_Int11_Int12_T12	CCACCAATGCTGCCGGTGAA
28776	SCN9A_Int8_Int9_T15	GGGCCTTCTTAGCCTTGTTT
28783	SCN9A_Int8_Int9_T17	ATTGGCAGAAACCCTGATTA
27252	SCN9A_Int15_Int16_T13	GATCATTGGTAACTCAGTAG
29930	SCN9A_Int5_Int6_T12	GTAGAAAATACCTTGACTAA
47625	SCN9A_Int9_Int10_T1	CCAGCAGCACGCAGCGTCTA
49945	SCN9A_Int1_Int2_T16	AGCAATGCGTTGTTCAATGA
30106	SCN9A_Int2_Int5_T10	ACCAAAAATGTCGAGTAAGT
48060	SCN9A_Int8_Int9_T12	TTGGGTCATTAGCCTAAACA
29831	SCN9A_Int6_Int7_T8	GATATAATGCATGACTTTCT
47239	SCN9A_Int11_Int12_T10	CCGTTCACCGGCAGCATTGG
49355	SCN9A_Int2_Int5_T41	TCATAAATGCAGTAACTTCC
26774	SCN9A_Int16_Int17_T7	CAGCGTGGACAAACACTTGA
30050	SCN9A_Int2_Int5_T15	GTGTTTAGGTACACTTTTAC
47246	SCN9A_Int11_Int12_T9	TTACTGCTGCGTCGCTCCTG
27250	SCN9A_Int15_Int16_T16	GGTAACTCAGTAGGGGCTCT
49124	SCN9A_Int5_Int6_T9	ACACCAATTACTTCTTACCT
30053	SCN9A_Int2_Int5_T22	TTTCACATCTAGTATCCCAA
49362	SCN9A_Int2_Int5_T11	ACCCACTTACTCGACATTTT
47238	SCN9A_Int11_Int12_T11	TTCCCGTTCACCGGCAGCAT
49418	SCN9A_Int2_Int5_T45	AAGCAGGTGTGGCATTGAAA
27544	SCN9A_Int13_Int14_T3	ATGCCTGACTGATTTGTATC
46080	SCN9A_Int16_Int17_T5	GTTTAGGACCTATATCAGGG
26775	SCN9A_Int16_Int17_T15	CAGTGGTTTTGGAAGCAGCG
30079	SCN9A_Int2_Int5_T4	ATTTTTGATAGAAGCAATGT
48052	SCN9A_Int8_Int9_T8	TTCTCTTGGTACTCACCTGT
46081	SCN9A_Int16_Int17_T6	TTTAGGACCTATATCAGGGT
49424	SCN9A_Int2_Int5_T40	ATACTATGAAAGTCTGCAGG
47440	SCN9A_Int10_Int11_T14	AATTTGGGTGGTACCTGATT
49331	SCN9A_Int2_Int5_T36	TGTGTAACATGTCTAAGAAC
30612	SCN9A_Int1_Int2_T5	ATGGCAATGTTGCCTCCCCC
47441	SCN9A_Int10_Int11_T18	ATTTGGGTGGTACCTGATTG

[0552]

47626	SCN9A_Int9_Int10_T7	ACGCAGCGTCTAGGGAAAAA
49314	SCN9A_Int2_Int5_T23	GGAGGATGGCTGTTGGGTTA
27530	SCN9A_Int13_Int14_T5	TCTGGAATTGCTCTCCATAT
48081	SCN9A_Int8_Int9_T14	TTATAGGTGAGAGTGTCTTC
30065	SCN9A_Int2_Int5_T42	TAGACCTATTGTAGTTTAAT
46040	SCN9A_Int16_Int17_T4	TCGGATTCCCCAGGTGCAAT
49962	SCN9A_Int1_Int2_T24	AGCTCCTCACATAAGAGGCC
49976	SCN9A_Int1_Int2_T14	CTAGAATTATCAGCTTGTTA
27248	SCN9A_Int15_Int16_T15	AGGTAACCTCACCTTAGTGT
29814	SCN9A_Int6_Int7_T2	CTGAGTGTGTTTGCACTAAT
30162	SCN9A_Int2_Int5_T25	TGACATTGGAACCACATTGC
49302	SCN9A_Int2_Int5_T33	ACCTAAACACAAGATTCCAT
49366	SCN9A_Int2_Int5_T1	CATTTTTGGTCCAGTCCGGT
26764	SCN9A_Int16_Int17_T1	TGCACCTGGGGAATCCGATT
46082	SCN9A_Int16_Int17_T11	TTAGGACCTATATCAGGGTG
49048	SCN9A_Int6_Int7_T1	AAGCCCCTACAATTGTCTTC
28788	SCN9A_Int8_Int9_T11	CGTGTGTAGTCAGTGTCCAG
47633	SCN9A_Int9_Int10_T10	CATGAGCAAATCTGACAGTT
49290	SCN9A_Int2_Int5_T28	CAAAATCCAGCCAGTTCCAC
27222	SCN9A_Int15_Int16_T17	TACATGATGGTCATGGTCAT
30107	SCN9A_Int2_Int5_T14	GACCAAAAATGTCGAGTAAG
27336	SCN9A_Int14_Int15_T3	ATGAGTATTTCCAAGTAGGC
49142	SCN9A_Int5_Int6_T3	CTTACCTGAGCCTTTAGTCA
48073	SCN9A_Int8_Int9_T4	TTCACACAGGTGTACCCCTC
28305	SCN9A_Int9_Int10_T9	CTTTGTCGTAGTGATTTTCC
49145	SCN9A_Int5_Int6_T4	CAAGGTATTTTCTACGTTTG
30061	SCN9A_Int2_Int5_T32	CTCCAATATATGTCTTCCAG
47463	SCN9A_Int10_Int11_T11	TGCCGCTGCAATTGCCTGGT
48054	SCN9A_Int8_Int9_T5	TGGTACTCACCTGTTGGTAA
49365	SCN9A_Int2_Int5_T6	ACATTTTTGGTCCAGTCCGG
27253	SCN9A_Int15_Int16_T18	AGATCATTGGTAACTCAGTA
49352	SCN9A_Int2_Int5_T37	AGCAAGCATATAACATGGGA
30110	SCN9A_Int2_Int5_T2	CCATGAATAACCCACCGGAC
27887	SCN9A_Int11_Int12_T14	TGCTGTGGACTGCAACGGTG
47243	SCN9A_Int11_Int12_T17	TTGGTGGGGACCTACTGGCT
27868	SCN9A_Int11_Int12_T25	TTACATAGCTCAGGCATGGC
27891	SCN9A_Int11_Int12_T6	CACCAATGCTGCCGGTGAAC
46834	SCN9A_Int13_Int14_T7	CCAAGGTGGACATTTTTGTC
30043	SCN9A_Int2_Int5_T5	TCACTTTTCTTCGTGACCCG
49944	SCN9A_Int1_Int2_T2	CAGCAATGCGTTGTTCAATG
49316	SCN9A_Int2_Int5_T29	ACACCCTATTAAACTACAAT
26767	SCN9A_Int16_Int17_T3	GTGACAGTGCCAATTGCACC
28273	SCN9A_Int9_Int10_T3	GAGGCTCTGCGGTATATGCT
47242	SCN9A_Int11_Int12_T13	CAGCATTGGTGGGGACCTAC
47624	SCN9A_Int9_Int10_T2	GCCAGCAGCACGCAGCGTCT
29811	SCN9A_Int6_Int7_T6	ATTGGACTACAGCTGTTCAT
49422	SCN9A_Int2_Int5_T27	TCAATACTATGAAAGTCTGC
28081	SCN9A_Int10_Int11_T1	TGCTAAATGTGTATCACCCG
46050	SCN9A_Int16_Int17_T17	TGCTCATTTCAGCAAGTGTA
27870	SCN9A_Int11_Int12_T16	AAGGACGTTTTACATAGCTC
47472	SCN9A_Int10_Int11_T15	ATCCTAGGAAACCCTAGGAC
49952	SCN9A_Int1_Int2_T27	TGGACAAAGCTCTGAGGTCC
28780	SCN9A_Int8_Int9_T9	CGAGCTTTGACACTTTCAGC
46099	SCN9A_Int16_Int17_T13	AAGTACACTTTTCCGAATAT
49143	SCN9A_Int5_Int6_T1	GTCAAGGTATTTTCTACGTT

[0553]

28150	SCN9A_Int10_Int11_T19	CACCATGTTGTTATGCTAAT
27873	SCN9A_Int11_Int12_T4	CAACTTCTGATGACAGCGTA
47244	SCN9A_Int11_Int12_T1	TGTTACTGCTGCGTCGCTCC
30041	SCN9A_Int2_Int5_T7	TCGTGACCCGTGGAACTGGC
47604	SCN9A_Int9_Int10_T8	TAGCTTCTTCAATGTTTGCC
49357	SCN9A_Int2_Int5_T43	AAATGCAGTAACTTCCTGGC
28275	SCN9A_Int9_Int10_T5	AATGCAAACGGTTACAACAG
28092	SCN9A_Int10_Int11_T5	AGTTTCCACCTTGGTGTCGA
49283	SCN9A_Int2_Int5_T19	CCCCAGAGGTTTGCTGTTAT
28141	SCN9A_Int10_Int11_T13	TCATTTAAGTGTTAACGTCT
30628	SCN9A_Int1_Int2_T20	TTTAATGGGCCTTTCTTGGC
46066	SCN9A_Int16_Int17_T12	ATCTGGAGGTTGTTTGCATC
49364	SCN9A_Int2_Int5_T12	TCGACATTTTTGGTCCAGTC
28307	SCN9A_Int9_Int10_T4	CCCTAGACGCTGCGTGCTGC
28143	SCN9A_Int10_Int11_T20	TCCTAGGGTTTCCTAGGATT

[0554] 注意,SEQ ID NO代表基因组靶标的DNA序列,而gRNA或sgRNA间隔区序列将是DNA序列的RNA型式。

[0555] 实施例8-在体外转录(IVT)的gRNA筛选中测试优选的指导

[0556] 为了鉴别能够编辑同源DNA靶区域的大范围的gRNA对,进行了体外转录(IVT)的gRNA筛选。使用gRNA设计软件提交相关的基因组序列用于分析。基于序列的唯一性(仅筛选基因组中其他地方没有完全匹配的gRNA)和最小预测的脱靶,将所得gRNA列表缩小为如上所述的选择的gRNA列表。将这组gRNA在体外转录,并使用Lipofectamine MessengerMAX转染到组成型表达Cas9的HEK293T细胞中。在转染后48小时收获细胞,分离基因组DNA,并使用TIDE分析评价切割效率。(图2A-2G;图3A-3C)。

[0557] 然后可在培养的细胞中追踪具有显著活性的gRNA或gRNA对以测量SCN9A蛋白表达。可再次追踪脱靶事件。可转染多种细胞并测量基因校正水平和可能的脱靶事件。这些实验允许优化核酸酶和供体设计和递送。

[0558] 实施例9-在细胞中针对脱靶活性测试优选的指导

[0559] 使用杂交捕获测定GUIDE Seq.和除其他方法以外的全基因组测序测试了上述实施例中来自IVT筛选的具有最佳中靶活性的gRNA的脱靶活性。

[0560] 实施例10-相关动物模型中的体内测试

[0561] 在重新评估了CRISPR-Cas9/指导组合后,将在动物模型中体内测试前导制剂。

[0562] 如上所述,人细胞中的培养允许对人靶标和背景人基因组的直接测试。

[0563] 通过在小鼠模型中植入周围神经系统的修饰的小鼠或人神经元,可观察临床前功效和安全性评价。在植入后的几个月中可观察到修饰的细胞。

[0564] XI.等效物和范围

[0565] 本领域的技术人员将认识到,或仅使用常规实验就能够确定本文描述的根据本发明的具体实施例的许多等效物。本公开的范围不意图限于以上描述,而是如所附权利要求书中所阐述。

[0566] 除非相反指出或另外从上下文明显看出,否则如果一个、多于一个或所有组成员存在于、被用于或以其他方式关联于给定的产物或方法,则认为包括在组的一个或多个成员之间的“或”的权利要求或描述得到了满足。本公开包括其中恰有组中的一个成员存在于、被用于或以其他方式关联于给定产物或方法的实施例。本公开包括其中多于一个或全

部组成员存在于、被用于或以其他方式关联于给定产物或方法的实施例。

[0567] 另外,应理解,在现有技术内的本公开的任何具体实施例可从任何一个或多个权利要求中明确排除。因为认为此类实施例为本领域普通技术人员所已知的,即使本文没有明确阐述排除,也可排除它们。本公开的组合物的任何特定实施例(例如,任何抗生素、治疗性或活性成分;任何产生方法;任何使用方法;等等)可出于无论是否与现有技术存在相关的任何原因而从任何一个或多个权利要求中排除。

[0568] 应理解,已使用的措辞为描述性措辞,而不是限制性措辞,并且可在随附权利要求的范围内做出改变,而不脱离在本公开的更宽的方面内的本发明的真实范围和精神。

[0569] 虽然已关于若干所描述的实施例相当详细并相当具体地描述了本发明,但是并不预期本发明应限于任何所述细节或实施例或任何特定实施例,而是参考随附权利要求进行说明,以便考虑到现有技术提供所述权利要求的最广泛的可能解释,并且因此有效地涵盖本发明的预期范围。

[0570] 关于说明性实施例的注释

[0571] 虽然为了说明本公开和/或其潜在应用的各个方面,本公开提供了各种具体方面的描述,但应理解,本领域技术人员将想到变化和修改。

[0572] 因此,本文描述的一种或多种发明应被理解为至少与它们要求保护的范围一样广泛,而不是由本文提供的特定说明性方面更狭义地限定。

[0573] 本文识别的任何专利、出版物或其他公开的全部内容以引用的方式并入本说明书中,除非另有说明,但仅仅达到并入的材料不与现有描述、定义、表述或本说明书明确阐述的其他公开材料冲突的程度。这样并且在必要的程度上,本说明中所阐述的明确公开取代以引用的方式并入的任何冲突材料。任何材料或其一部分(据说通过引用并入本说明书中,但与现有定义、表述或本文所阐述的其他公开材料冲突)仅仅在并入的材料与现有的公开材料之间无冲突发生的程度上并入。申请人保留修改本说明书的权利,以明确列出以引用的方式并入本文的任何主题或其一部分。

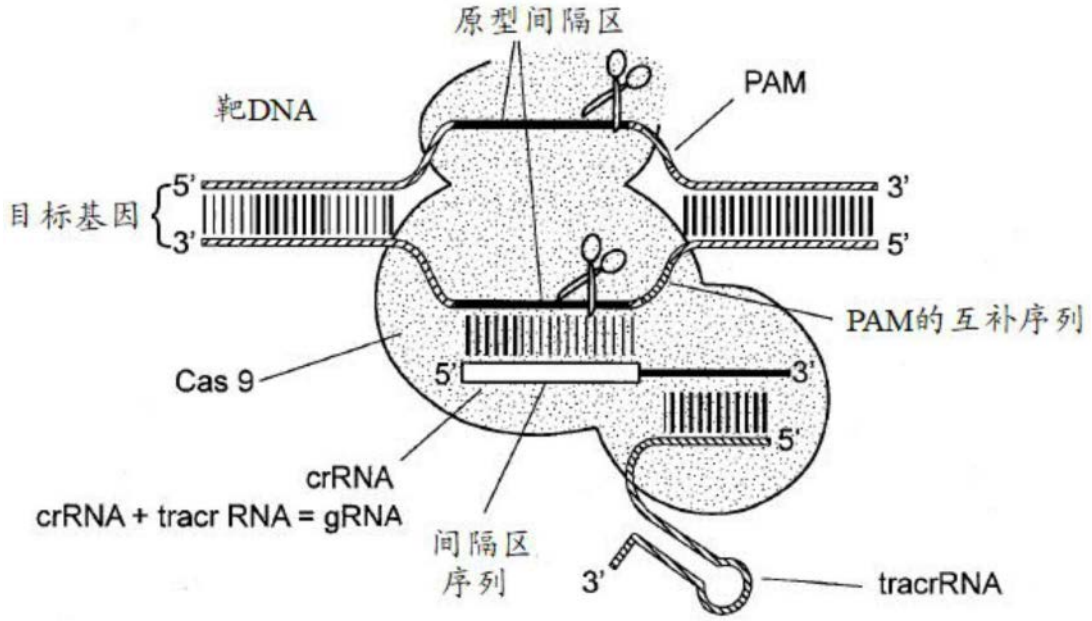

原型间隔区
靶DNA
PAM
目标基因
5'
3'
3'
5'
PAM的互补序列
Cas 9
5'
3'
5'
crRNA
crRNA + tracr RNA = gRNA
间隔区
序列
3'
tracrRNA

图1A

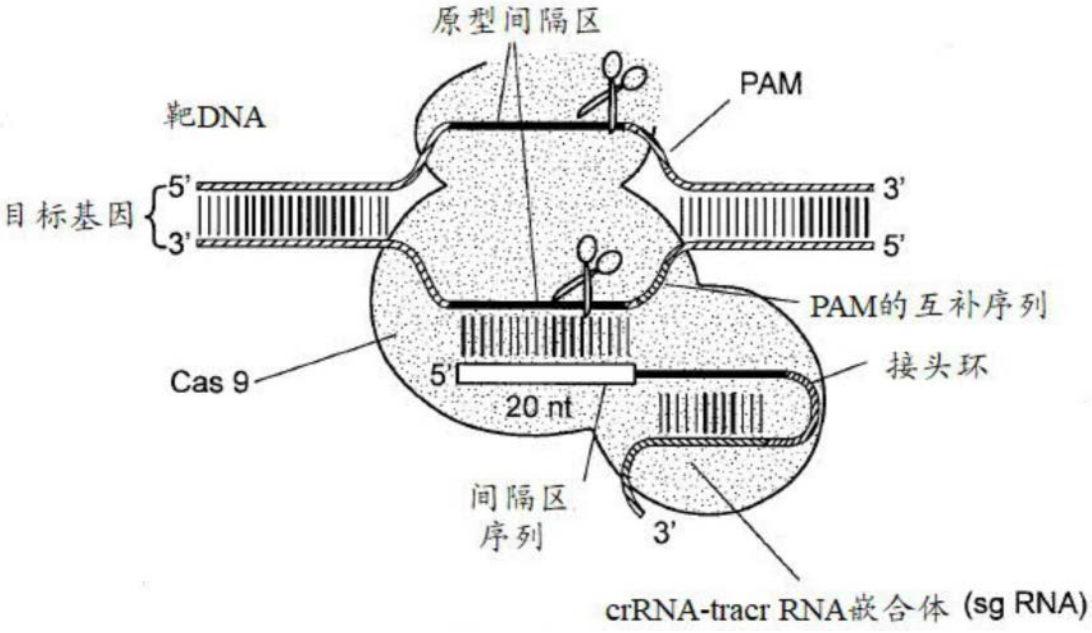

原型间隔区
PAM
靶DNA
目标基因
5'
3'
3'
5'
PAM的互补序列
接头环
Cas 9
5'
20 nt
间隔区
序列
3'
crRNA-tracr RNA嵌合体 (sg RNA)

图1B

SEQ ID NO.	名称	序列	插入缺失	R2
46832	SCN9A_Int13_Int14_T4	TGTGCAAATCTGTACCACCA	98.5	0.9854
49122	SCN9A_Int5_Int6_T10	CAAATAGTTGGAGTTATGAG	97.5	0.975
49431	SCN9A_Int2_Int5_T31	CAGCAGTTTACCTTTCTACA	96.9	0.9844
47474	SCN9A_Int10_Int11_T22	CACCTATTAGCATAACAACA	96.7	0.9848
47446	SCN9A_Int10_Int11_T6	TATGCCCTTCGACACCAAGG	96.4	0.9869
28779	SCN9A_Int8_Int9_T21	GAGCTTTGACACTTTCAGCT	96.4	0.9861
29821	SCN9A_Int6_Int7_T3	CAGGCCTGAAGACAATTGTA	96	0.9712
28146	SCN9A_Int10_Int11_T17	GTGAAAGATGTCCTGTCCTA	95.9	0.9618
49436	SCN9A_Int2_Int5_T35	GCCATCAGACTCCAGCAATG	95.9	0.9683
47224	SCN9A_Int11_Int12_T26	CTGGCAGAAGCTGTCCATTG	95.6	0.9894
47462	SCN9A_Int10_Int11_T12	CCGCTGCCGCTGCAATTGCC	95.6	0.974
47240	SCN9A_Int11_Int12_T3	CGTTCACCGGCAGCATTGGT	95.5	0.9825
27323	SCN9A_Int14_Int15_T1	AGTTCTGCGATCATTCAGAC	95.1	0.9812
27522	SCN9A_Int13_Int14_T2	GGAACACCACCCAATGACTG	95	0.9498
27893	SCN9A_Int11_Int12_T20	TAGGTCCCCACCAATGCTGC	94.8	0.9897
47261	SCN9A_Int11_Int12_T28	AAGGAGCCACGAATGCTGAG	94.6	0.9866
28137	SCN9A_Int10_Int11_T21	GCCCAACCAGGCAATTGCAG	94.4	0.9559
49367	SCN9A_Int2_Int5_T8	CCAGTCCGGTGGGTTATTCA	94.3	0.9456
47232	SCN9A_Int11_Int12_T8	GGCTGAGCGTCCATCAACCA	94.1	0.9419
47445	SCN9A_Int10_Int11_T7	GCCTATGCCCTTCGACACCA	93.9	0.9884
49313	SCN9A_Int2_Int5_T38	TATATTGGAGGATGGCTGTT	93.9	0.9718
47267	SCN9A_Int11_Int12_T24	ATAAATACCACTGAACCCAC	93.8	0.9543
30622	SCN9A_Int1_Int2_T9	CCATCCAGGCCTCTTATGTG	93.8	0.9864
47231	SCN9A_Int11_Int12_T5	GGGCTGAGCGTCCATCAACC	93.3	0.9599

图2A

26766	SCN9A_Int16_Int17_T10	TGACAGTGCCAATTGCACCT	93	0.9654
28139	SCN9A_Int10_Int11_T4	GTTAACGTCTTGGCCCAACC	92.4	0.989
46079	SCN9A_Int16_Int17_T9	TAGGTTTAGGACCTATATCA	92	0.9684
48091	SCN9A_Int8_Int9_T18	CTCAAGGTTTCTTCTATAGG	91.2	0.9861
46833	SCN9A_Int13_Int14_T1	GCAAATCTGTACCACCAAGG	91.1	0.9634
26765	SCN9A_Int16_Int17_T16	GACAGTGCCAATTGCACCTG	91	0.955
27876	SCN9A_Int11_Int12_T27	GCCAGAGGTGATAATAGATA	90.8	0.9079
47241	SCN9A_Int11_Int12_T18	GTTCACCGGCAGCATTGGTG	90.7	0.9566
47248	SCN9A_Int11_Int12_T22	GCGTCGCTCCTGGGGTCTGT	90.7	0.9566
30051	SCN9A_Int2_Int5_T34	CCCAATGGAATCTTGTGTTT	90.7	0.9414
30111	SCN9A_Int2_Int5_T18	TATGACCATGAATAACCCAC	90.4	0.9198
28760	SCN9A_Int8_Int9_T16	TGTTAAGAGCCTGTATTAGG	89.8	0.9789
28085	SCN9A_Int10_Int11_T23	ATAGGCGAGCACATGAAAAG	89.6	0.9545
27254	SCN9A_Int15_Int16_T19	AAGATCATTGGTAACTCAGT	89.4	0.9459
30163	SCN9A_Int2_Int5_T9	GATAGATGCGTTGATGACAT	89.3	0.9015
49303	SCN9A_Int2_Int5_T44	CCTAAACACAAGATTCCATT	89	0.9199
28083	SCN9A_Int10_Int11_T2	GAGGTTGTCTACCCCCAATC	88.8	0.9471
49344	SCN9A_Int2_Int5_T30	GCAGGTTAATATCATAGAGG	88.6	0.9133
47245	SCN9A_Int11_Int12_T2	GTTACTGCTGCGTCGCTCCT	87.6	0.9615
48090	SCN9A_Int8_Int9_T22	ACTCAAGGTTTCTTCTATAG	87.3	0.9635
28132	SCN9A_Int10_Int11_T16	CGGCTGAATATACAAGTATT	87.1	0.9525
27328	SCN9A_Int14_Int15_T2	GGAGCTCTTTCTAGCAGATG	86.7	0.8798
46078	SCN9A_Int16_Int17_T8	ATAGGTTTAGGACCTATATC	86.5	0.9711
28773	SCN9A_Int8_Int9_T7	GCTAATGACCCAAGATTACT	86.5	0.9112
46496	SCN9A_Int15_Int16_T12	ACATCTGGTTACATACCACC	86.1	0.8996
27885	SCN9A_Int11_Int12_T23	GGTGTGGTCTCCCTGGTTGA	86.1	0.9434

图2B

29928	SCN9A_Int5_Int6_T2	AATACCTTGACTAAAGGCTC	86	0.8809
27933	SCN9A_Int11_Int12_T7	CAGTCACCACTCAGCATTCG	85.9	0.9717
46039	SCN9A_Int16_Int17_T2	TTTTCCAAATCGGATTCCCC	85.2	0.952
47439	SCN9A_Int10_Int11_T10	CAATTTGGGTGGTACCTGAT	84	0.9863
28774	SCN9A_Int8_Int9_T1	GGCTAATGACCCAAGATTAC	83.9	0.9273
47455	SCN9A_Int10_Int11_T24	AGCACTTTTAGAGCTCAGTT	83.8	0.9811
30020	SCN9A_Int2_Int5_T24	TATGAAAGCTAGTCATTGAT	83.5	0.8574
47236	SCN9A_Int11_Int12_T15	CTGTGCATTTTCCCGTTCAC	83.1	0.9042
28089	SCN9A_Int10_Int11_T3	ACCTTGGTGTCGAAGGGCAT	83.1	0.847
26813	SCN9A_Int16_Int17_T14	ATAGGTCCTAAACCTATTTC	82.8	0.9369
47464	SCN9A_Int10_Int11_T9	GCCGCTGCAATTGCCTGGTT	81.7	0.8389
28091	SCN9A_Int10_Int11_T8	GTTTCCACCTTGGTGTCGAA	81.3	0.9816
29908	SCN9A_Int5_Int6_T11	AGTAATTGGTGTGAAGCATT	81	0.8373
27892	SCN9A_Int11_Int12_T12	CCACCAATGCTGCCGGTGAA	80.9	0.9922
28776	SCN9A_Int8_Int9_T15	GGGCCTTCTTAGCCTTGTTT	80.9	0.827
28783	SCN9A_Int8_Int9_T17	ATTGGCAGAAACCCTGATTA	80.9	0.934
27252	SCN9A_Int15_Int16_T13	GATCATTGGTAACTCAGTAG	80.5	0.8174
29930	SCN9A_Int5_Int6_T12	GTAGAAAATACCTTGACTAA	80.5	0.897
47625	SCN9A_Int9_Int10_T1	CCAGCAGCACGCAGCGTCTA	80.2	0.9761
49945	SCN9A_Int1_Int2_T16	AGCAATGCGTTGTTCAATGA	79.8	0.9753
30106	SCN9A_Int2_Int5_T10	ACCAAAAATGTCGAGTAAGT	79.7	0.8658
48060	SCN9A_Int8_Int9_T12	TTGGGTCATTAGCCTAAACA	79.6	0.9502
29831	SCN9A_Int6_Int7_T8	GATATAATGCATGACTTTCT	79.5	0.8465
47239	SCN9A_Int11_Int12_T10	CCGTTCACCGGCAGCATTGG	79.3	0.9666
49355	SCN9A_Int2_Int5_T41	TCATAAATGCAGTAACTTCC	78.9	0.8446
26774	SCN9A_Int16_Int17_T7	CAGCGTGGACAAACACTTGA	78.8	0.986

图2C

30050	SCN9A_Int2_Int5_T15	GTGTTTAGGTACACTTTTAC	78.8	0.8501
47246	SCN9A_Int11_Int12_T9	TTACTGCTGCGTCGCTCCTG	78.6	0.9339
27250	SCN9A_Int15_Int16_T16	GGTAACTCAGTAGGGGCTCT	77.8	0.9081
49124	SCN9A_Int5_Int6_T9	ACACCAATTACTTCTTACCT	77	0.7704
30053	SCN9A_Int2_Int5_T22	TTTCACATCTAGTATCCCAA	76.9	0.8784
49362	SCN9A_Int2_Int5_T11	ACCCACTTACTCGACATTTT	75.9	0.9543
47238	SCN9A_Int11_Int12_T11	TTCCCGTTCACCGGCAGCAT	75.8	0.9612
49418	SCN9A_Int2_Int5_T45	AAGCAGGTGTGGCATTGAAA	75.4	0.7977
27544	SCN9A_Int13_Int14_T3	ATGCCTGACTGATTTGTATC	74.9	0.9498
46080	SCN9A_Int16_Int17_T5	GTTTAGGACCTATATCAGGG	74.8	0.982
26775	SCN9A_Int16_Int17_T15	CAGTGGTTTTGGAAGCAGCG	73.7	0.9893
30079	SCN9A_Int2_Int5_T4	ATTTTTGATAGAAGCAATGT	73.6	0.9499
48052	SCN9A_Int8_Int9_T8	TTCTCTTGGTACTCACCTGT	73.1	0.8926
46081	SCN9A_Int16_Int17_T6	TTTAGGACCTATATCAGGGT	72.6	0.8862
49424	SCN9A_Int2_Int5_T40	ATACTATGAAAGTCTGCAGG	71.9	0.8943
47440	SCN9A_Int10_Int11_T14	AATTTGGGTGGTACCTGATT	71.6	0.922
49331	SCN9A_Int2_Int5_T36	TGTGTAACATGTCTAAGAAC	70.3	0.8103
30612	SCN9A_Int1_Int2_T5	ATGGCAATGTTGCCTCCCCC	70.1	0.9169
47441	SCN9A_Int10_Int11_T18	ATTTGGGTGGTACCTGATTG	69.9	0.9539
47626	SCN9A_Int9_Int10_T7	ACGCAGCGTCTAGGGAAAAA	69.6	0.9564
49314	SCN9A_Int2_Int5_T23	GGAGGATGGCTGTTGGGTTA	69.4	0.7808
27530	SCN9A_Int13_Int14_T5	TCTGGAATTGCTCTCCATAT	67.9	0.8398
48081	SCN9A_Int8_Int9_T14	TTATAGGTGAGAGTGTCTTC	67.9	0.7989
30065	SCN9A_Int2_Int5_T42	TAGACCTATTGTAGTTTAAT	67.9	0.8691
46040	SCN9A_Int16_Int17_T4	TCGGATTCCCCAGGTGCAAT	67.8	0.9378
49962	SCN9A_Int1_Int2_T24	AGCTCCTCACATAAGAGGCC	67.2	0.9019

图2D

49976	SCN9A_Int1_Int2_T14	CTAGAATTATCAGCTTGTTA	66.8	0.9416
27248	SCN9A_Int15_Int16_T15	AGGTAACCTCACCTTAGTGT	64.9	0.9318
29814	SCN9A_Int6_Int7_T2	CTGAGTGTGTTTGCACTAAT	64.6	0.9659
30162	SCN9A_Int2_Int5_T25	TGACATTGGAACCACATTGC	64.1	0.6897
49302	SCN9A_Int2_Int5_T33	ACCTAAACACAAGATTCCAT	62.5	0.7737
49366	SCN9A_Int2_Int5_T1	CATTTTTGGTCCAGTCCGGT	62.5	0.8884
26764	SCN9A_Int16_Int17_T1	TGCACCTGGGGAATCCGATT	62.2	0.8398
46082	SCN9A_Int16_Int17_T11	TTAGGACCTATATCAGGGTG	60.9	0.9655
49048	SCN9A_Int6_Int7_T1	AAGCCCCTACAATTGTCTTC	60.6	0.7797
28788	SCN9A_Int8_Int9_T11	CGTGTGTAGTCAGTGTCCAG	60.3	0.663
47633	SCN9A_Int9_Int10_T10	CATGAGCAAATCTGACAGTT	60.2	0.9542
49290	SCN9A_Int2_Int5_T28	CAAAATCCAGCCAGTTCCAC	58	0.6231
27222	SCN9A_Int15_Int16_T17	TACATGATGGTCATGGTCAT	57.5	0.859
30107	SCN9A_Int2_Int5_T14	GACCAAAAATGTCGAGTAAG	57.3	0.8715
27336	SCN9A_Int14_Int15_T3	ATGAGTATTTCCAAGTAGGC	56.2	0.9135
49142	SCN9A_Int5_Int6_T3	CTTACCTGAGCCTTTAGTCA	55.5	0.8324
48073	SCN9A_Int8_Int9_T4	TTCACACAGGTGTACCCCTC	55.3	0.8246
28305	SCN9A_Int9_Int10_T9	CTTTGTCGTAGTGATTTTCC	55	0.9279
49145	SCN9A_Int5_Int6_T4	CAAGGTATTTTCTACGTTTG	53.9	0.9381
30061	SCN9A_Int2_Int5_T32	CTCCAATATATGTCTTCCAG	52.6	0.7103
47463	SCN9A_Int10_Int11_T11	TGCCGCTGCAATTGCCTGGT	52.1	0.7771
48054	SCN9A_Int8_Int9_T5	TGGTACTCACCTGTTGGTAA	52	0.9139
49365	SCN9A_Int2_Int5_T6	ACATTTTTGGTCCAGTCCGG	51.6	0.664
27253	SCN9A_Int15_Int16_T18	AGATCATTGGTAACTCAGTA	51.3	0.8976
49352	SCN9A_Int2_Int5_T37	AGCAAGCATATAACATGGGA	51.2	0.6484
30110	SCN9A_Int2_Int5_T2	CCATGAATAACCCACCGGAC	50.7	0.8218

图2E

27887	SCN9A_Int11_Int12_T14	TGCTGTGGACTGCAACGGTG	49.8	0.9532
47243	SCN9A_Int11_Int12_T17	TTGGTGGGGACCTACTGGCT	49.6	0.9388
27868	SCN9A_Int11_Int12_T25	TTACATAGCTCAGGCATGGC	48.5	0.7899
27891	SCN9A_Int11_Int12_T6	CACCAATGCTGCCGGTGAAC	48.4	0.8152
46834	SCN9A_Int13_Int14_T7	CCAAGGTGGACATTTTTGTC	48.2	0.9607
30043	SCN9A_Int2_Int5_T5	TCACTTTTCTTCGTGACCCG	47.6	0.9582
49944	SCN9A_Int1_Int2_T2	CAGCAATGCGTTGTTCAATG	46	0.9926
49316	SCN9A_Int2_Int5_T29	ACACCCTATTAAACTACAAT	45.3	0.9238
26767	SCN9A_Int16_Int17_T3	GTGACAGTGCCAATTGCACC	44.1	0.9752
28273	SCN9A_Int9_Int10_T3	GAGGCTCTGCGGTATATGCT	44	0.4837
47242	SCN9A_Int11_Int12_T13	CAGCATTGGTGGGGACCTAC	43.8	0.9894
47624	SCN9A_Int9_Int10_T2	GCCAGCAGCACGCAGCGTCT	41.1	0.9805
29811	SCN9A_Int6_Int7_T6	ATTGGACTACAGCTGTTCAT	40.8	0.429
49422	SCN9A_Int2_Int5_T27	TCAATACTATGAAAGTCTGC	40.1	0.9581
28081	SCN9A_Int10_Int11_T1	TGCTAAATGTGTATCACCCG	39.9	0.9746
46050	SCN9A_Int16_Int17_T17	TGCTCATTTCAGCAAGTGTA	38.5	0.9915
27870	SCN9A_Int11_Int12_T16	AAGGACGTTTTACATAGCTC	36.8	0.3684
47472	SCN9A_Int10_Int11_T15	ATCCTAGGAAACCCTAGGAC	36.6	0.9894
49952	SCN9A_Int1_Int2_T27	TGGACAAAGCTCTGAGGTCC	34.9	0.9874
28780	SCN9A_Int8_Int9_T9	CGAGCTTTGACACTTTCAGC	32.2	0.9531
46099	SCN9A_Int16_Int17_T13	AAGTACACTTTTCCGAATAT	29.8	0.9835
49143	SCN9A_Int5_Int6_T1	GTCAAGGTATTTTCTACGTT	27.6	0.8857
28150	SCN9A_Int10_Int11_T19	CACCATGTTGTTATGCTAAT	26	0.9945
27873	SCN9A_Int11_Int12_T4	CAACTTCTGATGACAGCGTA	25.8	0.9859
47244	SCN9A_Int11_Int12_T1	TGTTACTGCTGCGTCGCTCC	25.6	0.9923
30041	SCN9A_Int2_Int5_T7	TCGTGACCCGTGGAACTGGC	23.4	0.9831

图2F

47604	SCN9A_Int9_Int10_T8	TAGCTTCTTCAATGTTTGCC	22.1	0.9675
49357	SCN9A_Int2_Int5_T43	AAATGCAGTAACTTCCTGGC	18.5	0.9816
28275	SCN9A_Int9_Int10_T5	AATGCAAACGGTTACAACAG	17.3	0.2165
28092	SCN9A_Int10_Int11_T5	AGTTTCCACCTTGGTGTCGA	16.1	0.9885
49283	SCN9A_Int2_Int5_T19	CCCCAGAGGTTTGCTGTTAT	12.2	0.9888
28141	SCN9A_Int10_Int11_T13	TCATTTAAGTGTTAACGTCT	10.2	0.9934
30628	SCN9A_Int1_Int2_T20	TTTAATGGGCCTTTCTTGGC	9.4	0.9392
46066	SCN9A_Int16_Int17_T12	ATCTGGAGGTTGTTTGCATC	8.7	0.9932
49364	SCN9A_Int2_Int5_T12	TCGACATTTTTGGTCCAGTC	8.5	0.989
28307	SCN9A_Int9_Int10_T4	CCCTAGACGCTGCGTGCTGC	5.1	0.9929
28143	SCN9A_Int10_Int11_T20	TCCTAGGGTTTCCTAGGATT	4.1	0.9928

图2G

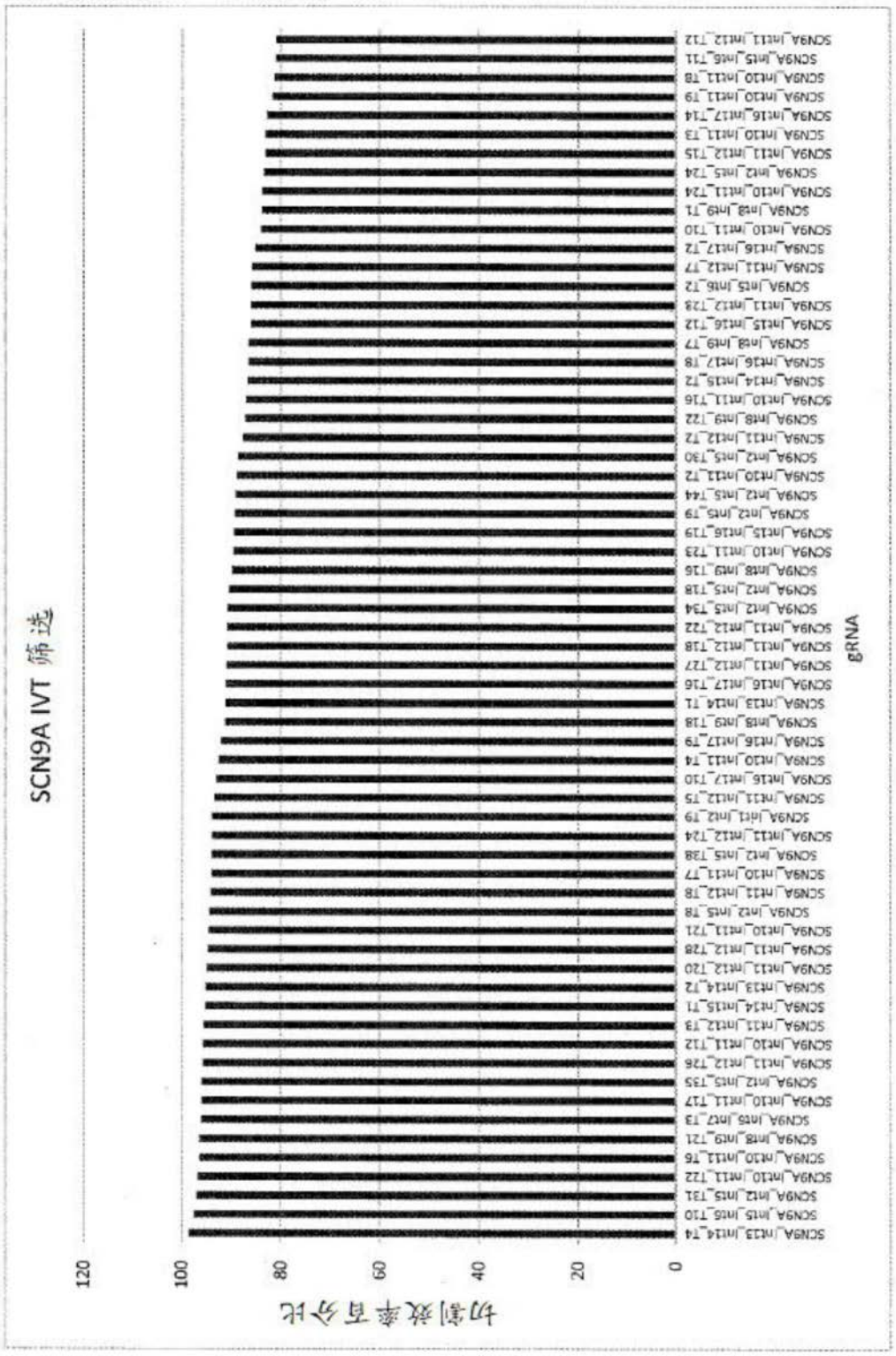


图3A

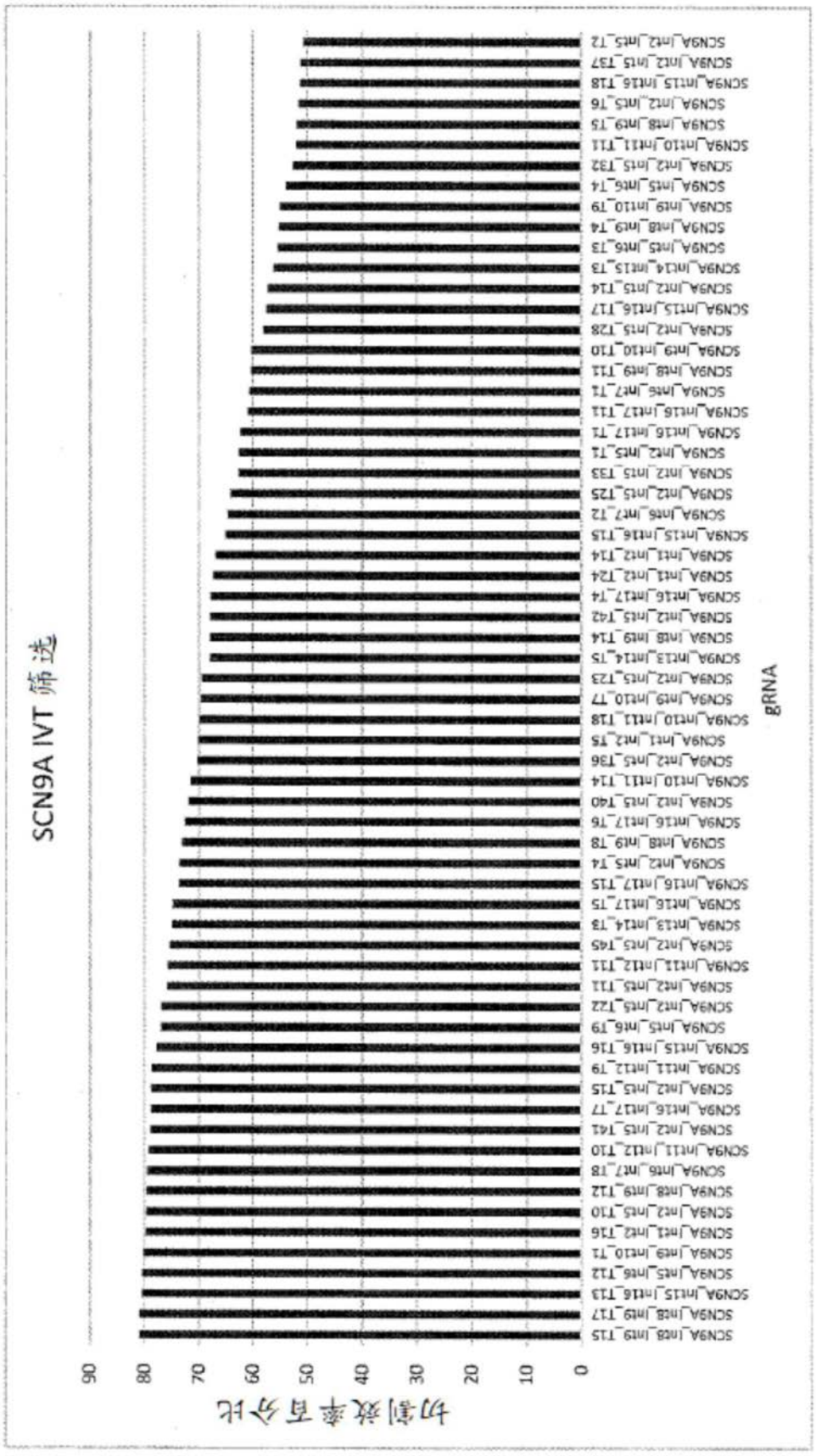

SCN9A IVT 筛选
切割效率百分比
gRNA
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
SCN9A_Int8_Int9_T15
SCN9A_Int8_Int9_T17
SCN9A_Int15_Int16_T13
SCN9A_Int5_Int6_T12
SCN9A_Int9_Int10_T1
SCN9A_Int1_Int2_T16
SCN9A_Int2_Int5_T10
SCN9A_Int8_Int9_T12
SCN9A_Int6_Int7_T8
SCN9A_Int11_Int12_T10
SCN9A_Int2_Int5_T41
SCN9A_Int16_Int17_T7
SCN9A_Int2_Int5_T15
SCN9A_Int11_Int12_T9
SCN9A_Int15_Int16_T6
SCN9A_Int5_Int6_T9
SCN9A_Int2_Int5_T22
SCN9A_Int2_Int5_T11
SCN9A_Int11_Int12_T11
SCN9A_Int2_Int5_T45
SCN9A_Int13_Int14_T3
SCN9A_Int16_Int17_T5
SCN9A_Int15_Int17_T5
SCN9A_Int2_Int5_T4
SCN9A_Int8_Int9_T8
SCN9A_Int16_Int17_T6
SCN9A_Int2_Int5_T40
SCN9A_Int10_Int11_T14
SCN9A_Int2_Int5_T36
SCN9A_Int1_Int2_T5
SCN9A_Int10_Int11_T8
SCN9A_Int9_Int10_T7
SCN9A_Int2_Int5_T23
SCN9A_Int13_Int14_T5
SCN9A_Int8_Int9_T14
SCN9A_Int2_Int5_T42
SCN9A_Int16_Int17_T4
SCN9A_Int1_Int2_T24
SCN9A_Int1_Int2_T14
SCN9A_Int15_Int16_T5
SCN9A_Int6_Int7_T2
SCN9A_Int2_Int5_T25
SCN9A_Int2_Int5_T33
SCN9A_Int2_Int5_T1
SCN9A_Int16_Int17_T1
SCN9A_Int16_Int17_T11
SCN9A_Int6_Int7_T1
SCN9A_Int8_Int9_T11
SCN9A_Int9_Int10_T10
SCN9A_Int2_Int5_T28
SCN9A_Int15_Int16_T17
SCN9A_Int2_Int5_T14
SCN9A_Int14_Int15_T3
SCN9A_Int5_Int6_T3
SCN9A_Int8_Int9_T4
SCN9A_Int9_Int10_T9
SCN9A_Int5_Int6_T4
SCN9A_Int2_Int5_T32
SCN9A_Int10_Int11_T11
SCN9A_Int8_Int9_T5
SCN9A_Int2_Int5_T6
SCN9A_Int15_Int16_T18
SCN9A_Int2_Int5_T37
SCN9A_Int2_Int5_T2

图3B

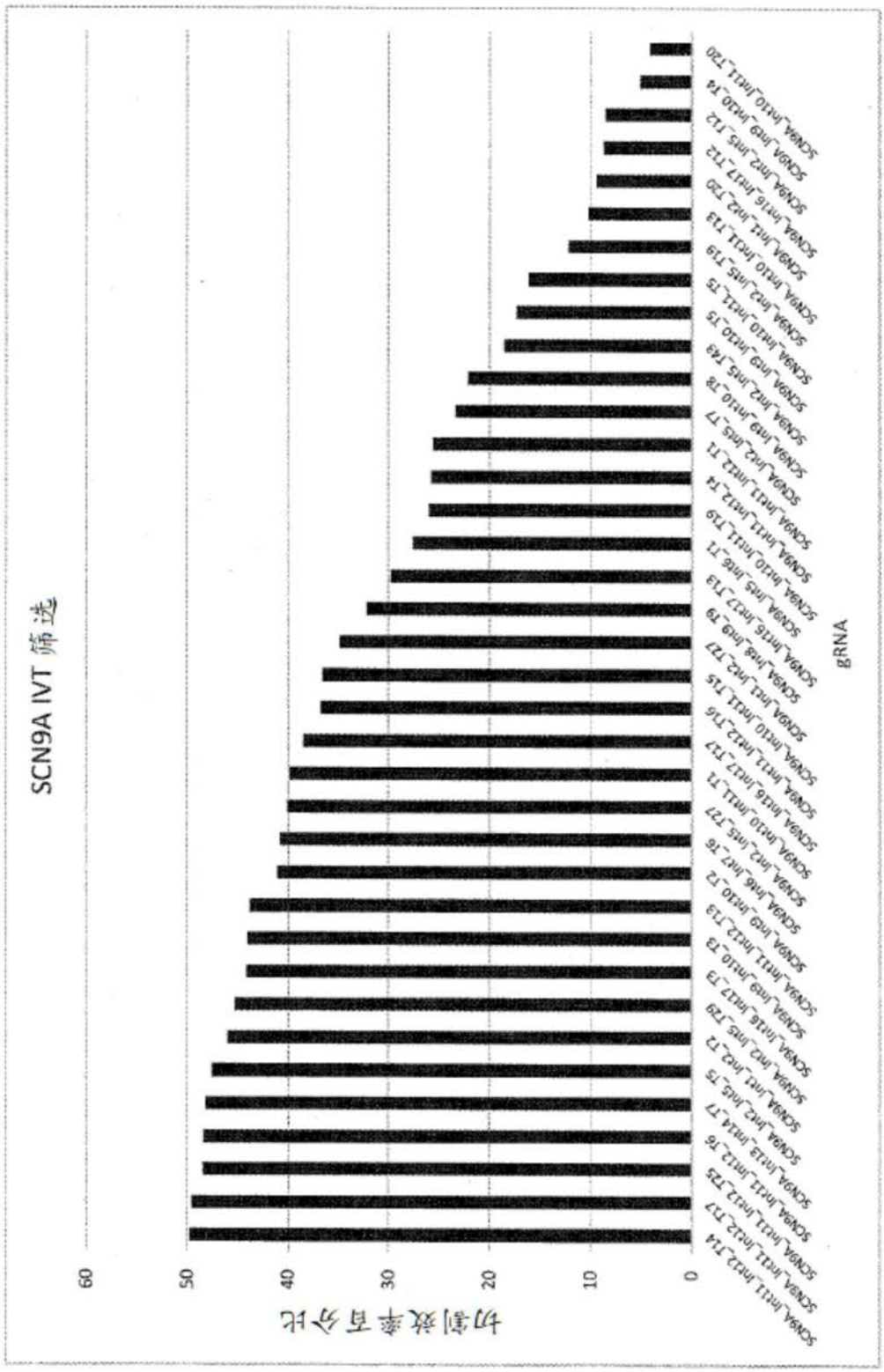

SCN9A IVT 筛选
切割效率百分比
gRNA
60
50
40
30
20
10
0
SCN9A_In11_In12_T14
SCN9A_In11_In12_T17
SCN9A_In11_In12_T25
SCN9A_In13_In12_T6
SCN9A_In2_In14_T7
SCN9A_In2_In5_T5
SCN9A_In2_In2_T2
SCN9A_In2_In5_T29
SCN9A_In16_In17_T9
SCN9A_In9_In10_T3
SCN9A_In11_In12_T3
SCN9A_In9_In10_T2
SCN9A_In6_In7_T6
SCN9A_In2_In5_T27
SCN9A_In10_In11_T1
SCN9A_In11_In12_T7
SCN9A_In16_In12_T6
SCN9A_In11_In11_T5
SCN9A_In1_In2_T27
SCN9A_In15_In12_T9
SCN9A_In5_In6_T1
SCN9A_In10_In11_T9
SCN9A_In11_In12_T4
SCN9A_In2_In5_T1
SCN9A_In9_In10_T8
SCN9A_In2_In5_T9
SCN9A_In10_In11_T5
SCN9A_In2_In5_T9
SCN9A_In16_In17_T2
SCN9A_In1_In2_T20
SCN9A_In10_In11_T4
SCN9A_In9_In10_T4
SCN9A_In2_In5_T2

图3C