



(21) 申请号 202411573640.1

(22) 申请日 2017.12.08

(30) 优先权数据

62/431,756 2016.12.08 US

(62) 分案原申请数据

201780085888.5 2017.12.08

(71) 申请人 因特利亚治疗公司

地址 美国

(72) 发明人 A·M·R·史密斯 D·V·莫里西

W·斯特雷普斯

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

专利代理师 张莉 黄革生

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

权利要求书1页 说明书106页

序列表(电子公布) 附图39页

(54) 发明名称

经修饰的指导RNA

(57) 摘要

本发明关于经修饰的单指导RNA及双指导RNA,该单指导RNA及双指导RNA在基因编辑方法中具有提高的体外及体内活性。

1. 单指导RNA,其包含5'端修饰及以下一个或多个中的一个或多个修饰:
 - a. 上部茎区;
 - b. 发夹1区;及
 - c. 发夹2区,其中5'端修饰在5'末端的前七个核苷酸内包含至少两个硫代磷酸酯(PS)键。
2. 如权利要求1的sgRNA,其中至少一个修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。
3. 如权利要求1或权利要求2的sgRNA,其中至少一个修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。
4. 如权利要求1至3中任一项的sgRNA,其中至少一个修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。
5. 如权利要求1至4中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含上部茎区中的一个或多个修饰。
6. 如权利要求5的sgRNA,其包含US1至US12处的修饰。
7. 如权利要求1至6中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含发夹1区中的一个或多个修饰。
8. 如权利要求7的sgRNA,其中sgRNA包含H1-1处的修饰。
9. 如权利要求1至8中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含发夹2区中的一个或多个修饰。
10. 如权利要求9的sgRNA,其中sgRNA包含H2-1处的修饰。

经修饰的指导RNA

[0001] 本申请是申请日为2017年12月08日的、发明名称为“经修饰的指导RNA”的中国专利申请201780085888.5(PCT/US2017/065306)的分案申请。

[0002] 本申请包含序列表,该序列表已经以ASCII格式电子提交,并且其全部内容通过引用并入本文。2017年12月7日创建的该ASCII拷贝命名为01155-0004-00PCT_SeqList.txt,大小为118,877字节。

[0003] 本申请要求2016年12月8日提交的美国临时申请No.62/431,756的优先权,该临时申请通过引用整体并入。

[0004] 本发明涉及使用CRISPR/Cas系统进行基因编辑的领结构域,CRISPR/Cas是用以识别及切割外源性遗传元件的原核生物免疫系统的一部分。CRISPR/Cas系统依赖于称为CRISPR相关蛋白质9(CRISPR-associated protein 9;Cas9)的单一核酸酶,其在DNA中诱发位点特异性断裂。Cas9被称为指导RNA(guide RNA;gRNA)的小RNA分子引导至特定DNA序列。指导RNA包含trRNA(也称为tracrRNA)及crisprRNA(crRNA)。trRNA及crRNA可包含于单指导RNA(sgRNA)内或双指导RNA(dgRNA)的两个独立RNA分子中。Cas9并与trRNA及crRNA或sgRNA的组合被称为Cas9核糖核蛋白复合物(ribonucleoprotein complex;RNP)。

[0005] 寡核苷酸,尤其是RNA,有时会通过核酸内切酶或核酸外切酶切割,在细胞及血清中降解。需要用于防止这种降解、改善gRNA稳定性和增强基因编辑效率的改进方法及组合物,尤其是对于治疗应用。

发明概述

[0007] 在一些实施例中,提供包含经修饰的指导RNA的治疗基因组编辑工具。本文所述的经修饰的指导RNA可改良指导RNA及指导RNA/Cas9复合物的稳定性,且改善Cas9(例如SpyCas9及等效物)切割靶DNA的活性。在一些实施方案中,该指导RNA为sgRNA。在一些实施方案中,该指导RNA为dgRNA。在一些实施方案中,该指导RNA为tracrRNA。在一些实施方案中,该指导RNA为crRNA。

[0008] 本文所述的指导RNA包含至少一个经修饰核苷酸。该修饰可包括2'-O-甲基(2'-O-Me)、'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)、2'-氟(2'-F)、核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键、G-C取代,及核苷酸之间的反向无碱基键(abasic linkage)及其等效物。本发明的实施方案包括:

[0009] 在一些实施方案中,涵盖单指导RNA(sgRNA),其包含5'端修饰及以下一个或多个中的一个或多个修饰:上部茎区;发夹1区;及发夹2区,其中5'端修饰包含5'末端的5'端处前七个核苷酸内的至少两个硫代磷酸酯键。在一些情况下,该修饰为经2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,该修饰为经2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。

[0010] 在一些实施方案中,sgRNA包含US1至US12处的修饰及/或H1-1处的修饰及/或H2-1中的修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含H1-1至H1-12及/或H2-1至H2-15处的修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含上部茎区、发夹1区及发夹2区中每一个处的一个或多个修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含发夹1区与发夹2区之间的经修饰的核苷酸。在一些实施方案中,

该sgRNA包含下部茎区中的修饰。

[0011] 在一些实施方案中,sgRNA包含5'末端及/或3'末端处的修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含3'末端中的3'端修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含3'末端的3'端处最后四个核苷酸中至少两个处的修饰。在一些实施方案中,该sgRNA包含5'末端中的5'端修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含5'末端的5'端处前四个核苷酸中至少两个的修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含3'末端中的3'端修饰及5'末端中的5'端修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含3'末端的3'端处最后四个核苷酸中至少两个及5'末端的5'端处前四个核苷酸中至少两个的修饰。在一些情况下,这些修饰为2'-O-Me、2'-F、2'-O-moe或连接核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键。在一些实施方案中,sgRNA包含3'末端的3'端处最后四个核苷酸中至少两个及/或5'末端的5'端处前四个核苷酸中至少两个之间的PS键。在一些情况下,sgRNA包含具有超过一个如本文所述的修饰的5'末端及3'末端,该修饰诸如PS键及2'-O-Me修饰。

[0012] 在一些实施方案中,sgRNA包含突起区(bulge region)中的修饰。在一些实施方案中,突起区中50%的核苷酸经修饰,其中该修饰为2'-O-Me或2'-F。

[0013] 在一些实施方案中,sgRNA包含连接区(nexus region)中的修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含连接区中N15、N16、N17及/或N18处的修饰,其中该修饰为2'-O-Me或2'-F。在一些情况下,N16、N17及N18与PS键连接。

[0014] 在一些实施方案中,sgRNA包含的5'末端的5'端处至少前三个核苷酸及3'末端的3'端处最后三个核苷酸经修饰。

[0015] 在一些实施方案中,sgRNA包含3'末端及/或5'末端处的修饰。在一些情况下,5'末端的5'端处前四个核苷酸及3'末端的3'端处最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。在一些实施方案中,5'及3'修饰包含2'-O-Me或2'-O-moe。在一些实施方案中,5'及3'修饰包含2'-F。在一些实施方案中,5'及/或3'修饰包含连接核苷酸的PS键。在一些实施方案中,5'及/或3'修饰包含2'-O-Me、2'-O-moe、2'-F及连接核苷酸的PS键中的一个或多个。

[0016] 在一些实施方案中,sgRNA包含5'末端的5'端处前四个核苷酸及3'末端的3'端处最后四个核苷酸处的修饰。在一些情况下,这些修饰为连接PS键(也即连接前四个及最后四个核苷酸的PS键)。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含5'末端的5'端处前三个核苷酸及3'末端的3'端处最后三个核苷酸处的2'-O-Me修饰。

[0017] 在一些实施方案中,sgRNA包含5'末端的5'端处的前四个核苷酸及3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的修饰,其中修饰至少为连接四个核苷酸的PS键,且另外,其中5'末端的5'端处的前三个核苷酸及3'末端的3'端处的最后三个核苷酸包含2'-O-Me、2'-O-moe或2'-F修饰。

[0018] 在一些实施方案中,sgRNA包含修饰LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12,其中修饰为2'-O-Me或2'-F。

[0019] 在一些实施方案中,sgRNA包含突起区中的核苷酸中的每一个处的修饰,其中该修饰为2'-O-Me或2'-F。

[0020] 在一些实施方案中,sgRNA包含上部茎区中的核苷酸中的每一个处的修饰,其中该修饰为2'-O-Me或2'-F。

[0021] 在一些实施方案中,sgRNA包含发夹1区中的核苷酸中的每一个处的修饰,其中该修饰为2'-O-Me或2'-F。

[0022] 在一些实施方案中,sgRNA包含发夹2区中的核苷酸中的每一个处的修饰,其中该修饰为2'-O-Me或2'-F。

[0023] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含以下位置处的2'-O-Me修饰核苷酸:

[0024] a. 5'末端的5'端处的前三个核苷酸;

[0025] b. 下部茎区中的LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及/或LS12;

[0026] c. 突起区中的B1及/或B2;

[0027] d. 上部茎区中的各核苷酸;

[0028] e. 连接区中的N16、N17及/或N18;

[0029] f. 发夹1区中的各核苷酸;

[0030] g. 发夹2区中的各核苷酸;及

[0031] h. 3'末端的3'端处的最后四个核苷酸。

[0032] 在一些实施方案中,B3至B6经2'-O-Me修饰。在一些情况下,sgRNA进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键,及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中,sgRNA包含LS9及LS10处的2'-F修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含N15、N16、N17及N18处的2'-F修饰。在一些实施方案中,该sgRNA包含H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14及H2-15处的2'-F修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含3'末端的3'端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰。

[0033] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含以下位置处的2'-F修饰核苷酸:

[0034] a. 下部茎区中的LS9及LS10;

[0035] b. 连接区中的N15、N16、N17及N18;及

[0036] c. 发夹2区中的H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14及H2-15。

[0037] 在一些实施方案中,sgRNA包含3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键,及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中,sgRNA包含5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸及3'末端的3'端处的最后四个核苷酸中的三个处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸。

[0038] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:

[0039] a. 5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0040] b. LS1及/或LS6处的任选的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0041] c. US至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0042] d. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0043] e. 发夹1区与发夹2区之间的任选的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0044] f. H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及

[0045] g. 3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;且任选

[0046] 进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0047] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:

[0048] a. 5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0049] b. LS1至LS6处的2'-F修饰核苷酸;

- [0050] c.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0051] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0052] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0053] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0054] g.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;且任选
- [0055] 进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0056] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0057] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0058] b.LS2至LS5处的2'-F修饰核苷酸;
- [0059] c.LS1及LS6处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0060] d.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0061] e.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0062] f.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0063] g.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0064] h.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸,且任选
- [0065] 进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0066] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0067] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0068] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0069] c.LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0070] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0071] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0072] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0073] g.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸,
- [0074] 且任选进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0075] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0076] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0077] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0078] c.LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0079] d.LS9及LS10处的2'-F修饰核苷酸;
- [0080] e.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0081] f.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0082] g.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0083] h.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸,
- [0084] 且任选进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。

- [0085] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0086] a. 5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0087] b. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0088] c. LS8、LS10及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0089] d. LS7、LS9及LS11处的2'-O-F修饰的核苷酸;
- [0090] e. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0091] f. 发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0092] g. H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0093] h. 3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸,且任选
- [0094] 进一步包含三个连接5'末端5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0095] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0096] a. 5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0097] b. LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸
- [0098] c. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0099] d. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0100] e. 发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0101] f. H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0102] g. 3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸,且任选
- [0103] 进一步包含三个连接5'末端5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0104] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0105] a. 5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0106] b. LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0107] c. LS9及LS10处的2'-F修饰核苷酸;
- [0108] d. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0109] e. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0110] f. 发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0111] g. H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0112] h. 3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸,且任选
- [0113] 进一步包含三个连接5'末端5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0114] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0115] a. 5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0116] b. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0117] c. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0118] d. 发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0119] e. H2-1至H2-8处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0120] f. H2-9至H2-15处的2'-F修饰核苷酸;

- [0121] g. 3' 末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸;及
- [0122] h. 3' 末端处的最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸,且任选
- [0123] 进一步包含三个连接5' 末端的5' 端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3' 末端的3' 端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0124] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0125] a. 5' 末端的5' 端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0126] b. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0127] c. H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10及H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0128] d. H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9及H1-11处的2'-F修饰核苷酸;
- [0129] e. 发夹1区与发夹2区之间的2'-F修饰核苷酸;
- [0130] f. H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12及H2-14处的2'-F修饰核苷酸;
- [0131] g. H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13及H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0132] h. 3' 末端处的倒数第二个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸;及
- [0133] i. 3' 末端的3' 端处的倒数第三个及最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸,
- [0134] 且任选进一步包含三个连接5' 末端的5' 端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3' 末端的3' 端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0135] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含:
- [0136] a. LS8、LS10、LS12、H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10、H1-12、H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13及H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0137] b. LS7、LS9、LS11;H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9、H1-11、H1-13、H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12及H2-14处的2'-F修饰核苷酸,且任选
- [0138] 进一步包含三个连接5' 末端的5' 端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键,及三个连接3' 末端的3' 端处的最后四个核苷酸的PS键;且任选进一步包含:
- [0139] c. 3' 末端的3' 端处的最后一个及倒数第三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;及/或
- [0140] d. 3' 末端的3' 端处的倒数第二个、倒数第四个及/或最后一个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸。
- [0141] 在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含SEQ ID No:228至353中任一个的核酸,包括表4的修饰。在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含SEQ ID No:228至332中任一个,包括表4的修饰。在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个,包括表4的修饰。在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含SEQ ID No:240。在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含SEQ ID No:240,包括表4的修饰。在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含SEQ ID No:242。在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含SEQ ID No:358。在其他实施方案中,sgRNA包含与SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中对应于表4中的参考序列标识符的核苷酸的sgRNA的各核苷酸处的修饰与表4中的参考序列标识符中示出的修饰相同或等效,任选进一步包含三个连接5' 末端的5' 端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键,及三个连接3' 末端的3' 端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中,

sgRNA进一步包含至少三个连接发夹1区中的核苷酸的PS键。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含至少三个连接发夹2区中的核苷酸的PS键。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含至少三个连接上部茎区中的核苷酸的PS键。在一些实施方案中,sgRNA与酿脓链球菌(*S. pyogenes*) Cas9形成核糖核蛋白复合体。

附图简述

[0143] 图1显示在通过经修饰的crRNA连同Cas9 mRNA及未经修饰的trRNA(TR000002)转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠运甲状腺素蛋白(TTR)基因的第二代测序(NGS)所测量的编辑%。

[0144] 图2显示在通过经修饰的trRNA连同未经修饰的crRNA(CR000686)及Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。

[0145] 图3显示在通过Cas9 mRNA及具有未发现于亲本序列中的G-C配对的crRNA及trRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。

[0146] 图4显示在通过经修饰的crRNA、trRNA连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。标准差遵循该值。

[0147] 图5显示在通过经修饰的sgRNA连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。

[0148] 图6显示在通过经修饰的crRNA、未经修饰的trRNA(TR000002)连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。星号表示出于技术原因在此实验中不显示活性的双指导。此双指导在图9中表示的实验中再次测试,该双指导在其中显示编辑活性。

[0149] 图7显示在通过未经修饰的crRNA(CR000686)、经修饰的trRNA连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。

[0150] 图8显示在通过Cas9 mRNA、crRNA,及具有未发现于亲本序列中的G-C配对或G-U错配的trRNA配对转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。

[0151] 图9显示在通过经修饰的crRNA、经修饰的trRNA连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。标准差遵循该值。

[0152] 图10显示在通过经修饰的sgRNA连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR基因的NGS所测量的编辑%。

[0153] 图11显示在通过经修饰的sgRNA连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠因子VII(FVII)基因的NGS所测量的编辑%。

[0154] 图12A及12B显示在通过经修饰的crRNA及未经修饰的trRNA连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TI'R(图12A)或FVII(图12B)的NGS所测量的编辑%。

[0155] 图13A及13B显示在通过经修饰的trRNA及未经修饰的crRNA连同Cas9 mRNA转染Neuro2A细胞之后,通过小鼠TTR(图13A)或FVII(图13B)的NGS所测量的编辑%。

[0156] 图14A、14B、14C及14D显示在体内施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后,血清中的干扰素 α (IFN- α ,14A)、白介素6(IL-6,14B)、单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemotactic protein 1,MCP-1,14C)及肿瘤坏死因子 α (TNF- α ,14D)的水平。

[0157] 图15A、15B及15C显示在施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后的体内结果。图15A

显示肝中总编辑的百分比。图15B显示血清TTR水平。图15C显示图15A的结果的平均值及标准差。图15D概括对G000209sgRNA (SEQ ID NO:228) 的修饰。图15E概括对G000267sgRNA (SEQ ID NO:234) 的修饰。在图15D及15E中,呈粗体的核苷酸经2'-O-Me修饰。

[0158] 图16A、16B、16C及16D显示在体内施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后,血清中的干扰素 α (IFN- α , 16A)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 16B)、白介素6 (IL-6, 16C) 及单核细胞趋化蛋白1 (MCP-1, 16D) 的水平。

[0159] 图17A、17B、17C及17D显示在施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后的体内结果。图17A显示肝中总编辑的百分比。图17B显示图17A的结果的平均值及标准差。图17C显示血清TTR水平。图17D显示图17B的结果的平均值及标准差。

[0160] 图18A、18B及18C显示在施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后的体内结果。图18A显示肝中总编辑的百分比。图18B概括肝编辑数据。图18C显示血清TTR水平。MPK=毫克/公斤;BL0D=低于检测水平。

[0161] 图19A、19B、19C及19D显示在体内施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后,血清中的干扰素 α (IFN- α , 19A)、单核细胞趋化蛋白1 (MCP-1, 19B)、白介素6 (IL-6, 19C) 及肿瘤坏死因子 α (TNF- α , 19D) 的水平。

[0162] 图20A及20B显示在体内施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后,FVII基因座(图20A)及TTR基因座(图20B)的肝中编辑。

[0163] 图21A、21B及21C显示注释的sgRNA (SEQ ID NO:341) (图21A)、未注释的dgRNA CR000686 (SEQ ID NO:1) 及TR000002 (SEQ ID NO:188) (图21B),注释的dgRNA CR000686 (SEQ ID NO:1) 及TR000002 (SEQ ID NO:188) (图21C) 的示意图。

[0164] 图22A、22B及22C显示在施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后的体内结果。图22A显示肝中的TTR基因座的总编辑的百分比。图22B概括肝编辑数据。图22C显示血清TTR水平。

[0165] 图23A、23B及23C显示在施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP之后的体内结果。图23A显示肝中的TTR基因座的总编辑的百分比。图23B概括肝编辑数据。图23C显示血清TTR水平。

[0166] 图24A、24B及24C显示在施用包含Cas9 mRNA及sgRNA的LNP后,原代小鼠肝细胞中的编辑。FIG24A显示TTR基因座的总编辑的编辑百分比。FIG24B显示随用于计算EC50的mRNA剂量而变的编辑百分比的归一化变换。图24C显示测试的LNP的EC50值。

发明详述

[0168] 本文提供用于基因编辑方法的经修饰的指导RNA,包括双指导RNA及单指导RNA。经修饰的指导相比于其未经修饰的对应物更稳定且显示改良的体外及体内功效。经改造及测试的指导RNA的序列显示于

[0169] 表4中。

[0170]

表 4:

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
	crRNA			
1	CR000686		未经修饰	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
2	CR003393	CR686-1	上部	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmG
3	CR003394	CR686-2	部分上部	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGGUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmG
4	CR003395	CR686-3	部分上部	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGGUUUUAGAGCUUmUmGmUmUmG
5	CR003396	CR686-4	部分上部	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGGUUUUAGAGCUUmUmUmUmG
6	CR003397	CR686-5	下部	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
7	CR003398	CR686-6	下部走道 (lower walk)	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
8	CR003399	CR686-7	下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
9	CR003400	CR686-8	下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
10	CR003401	CR686-9	下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
11	CR003402	CR686-10	下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
12	CR003403	CR686-11	下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGGUUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG

[0172]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
30	仅CR003404-修饰		部分下部	GmUmUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
31	仅CR003405-修饰		部分下部	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
32	CR003721	CR686-14	上部及下部	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
33	CR003722	CR686-15	下部组合	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAGAGCUAUGCUGUUUUG
34	CR003723	CR686-16	上部、下部组合	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
35	CR003724	CR686-17	下部组合	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
36	CR003725	CR686-18	上部、下部组合	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
37	CR003726	CR686-19	连接走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
38	CR003727	CR686-20	连接走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
39	CR003728	CR686-21	连接走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
40	CR003729	CR686-22	连接走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG
41	CR003730	CR686-23	2'F下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAAAGGmGUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmUmUmUmG

[0173]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				mUmGmUmUmUmUmG
42	CR003731	CR686-24	2'F下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
43	CR003732	CR686-25	2'F下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
44	CR003733	CR686-26	2'F下部走道	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
45	CR003734	CR686-27	2'F下部组合	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGfGfUfUfUfA GAmGmCmUmAmUmG mCmUmGmUmUmUmG
46	CR003735	CR686-28	下部alt	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGfGmUfUmUfUmA GAmGmCmUmAmU mGmCmUmGmUmUmUmG
47	CR003736	CR686-29	下部alt	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GmGfUmUfUmUfA GAmGmCmUmAmU mGmCmUmGmUmUmUmG
48	CR003737	CR686-GC6	下部GC	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGGUCUCAGAmGmCmUmAmUmGmCm UmGmUmUmUmUmG
49	CR003738	CR686-GC7	下部C走道	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGGCUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCm UmGmUmUmUmUmG
50	CR003739	CR686-GC8	下部C走道	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGGUCUUAGAmGmCmUmAmUmGmCm UmGmUmUmUmUmG
51	CR003740	CR686-GC9	下部C走道	CCAGUCCAGCGAGGCCAAA GGGUUCUAGAmGmCmUmAmUmGmCm UmGmUmUmUmUmG

[0174]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
52	CR003741	CR686-GC10	下部 C 走道	CCAGUCCAGCGAGGCAAGGGUUUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
53	仅CR003721-修饰	仅CR686-14-修饰	上部及下部	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
54	仅CR003722-修饰	仅CR686-15-修饰	下部组合	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
55	仅CR003723-修饰	仅CR686-16-修饰	上部、下部组合	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
56	仅CR003724-修饰	仅CR686-17-修饰	下部组合	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
57	仅CR003725-修饰	仅CR686-18-修饰	上部、下部组合	mGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
58	仅CR003726-修饰	仅CR686-19-修饰	连接走道	GUUUUAmGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
59	仅CR003727-修饰	仅CR686-20-修饰	连接走道	GUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
60	仅CR003728-修饰	仅CR686-21-修饰	连接走道	GUUUUAfGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
61	仅CR003729-修饰	仅CR686-22-修饰	连接走道	GUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
62	仅CR003730-修饰	仅CR686-23-修饰	2'F下部走道	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
63	仅CR003731-修饰	仅CR686-24-修饰	2'F下部走道	GUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
64	仅CR003732-修饰	仅CR686-25-修饰	2'F下部走道	GUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
65	仅CR003733-修饰	仅CR686-26-修饰	2'F下部走道	GUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
66	仅CR003734-修饰	仅CR686-27-修饰	2'F下部组合	fGfUUfUUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
67	仅CR003735-修饰	仅CR686-28-修饰	下部alt	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
68	仅CR003736-修饰	仅CR686-29-修饰	下部alt	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
69	仅CR003737-修饰	仅CR686-GC6-修饰	下部GC	GUCUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
70	仅CR003738-修饰	仅CR686-GC7-修饰	下部C走道	GCUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmUmG

[0175]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
71	仅CR003739-修饰	仅CR686-GC8-修饰	下部C走道	GUCUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
72	仅CR003740-修饰	仅CR686-GC9-修饰	下部C走道	GUUCUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
73	仅CR003741-修饰	仅CR686-GC10-修饰	下部C走道	GUUUCAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
74	CR000705		未经修饰	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
75	CR004188	CR705-1	上部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmG
76	CR004189	CR705-2	部分上部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmG
77	CR004190	CR705-3	部分上部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmG
78	CR004191	CR705-4	部分上部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmG
79	CR004192	CR705-5	下部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
80	CR004193	CR705-6	下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
81	CR004194	CR705-7	下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
82	CR004195	CR705-8	下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
83	CR004196	CR705-9	下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
84	CR004197	CR705-10	下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUG
85	CR004198	CR705-11	下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
86	CR004199	CR705-14	上部及下部	UUACAGCCACGUCUACAGCAGmGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmG

[0176]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
87	CR004200	CR705-15	下部组合	mCmUmGmUmUmUmUmG UUACAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUmAmAGAGCUAUGCUGUUU UG
88	CR004201	CR705-16	上部、下部组合	UUACAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUmAmAmUmUmGm CmUmGmUmUmUmUmG
89	CR004202	CR705-17	下部组合	UUACAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUmAmAGAGCUAUGCUGUUU G
90	CR004203	CR705-18	上部、下部组合	UUACAGCCACGUCUACAGCAmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
91	CR004204	CR705-19	连接走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAmGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
92	CR004205	CR705-20	连接走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
93	CR004206	CR705-21	连接走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAFgAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
94	CR004207	CR705-22	连接走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
95	CR004208	CR705-23	2'F下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
96	CR004209	CR705-24	2'F下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG

[0177]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
97	CR004210	CR705-25	2'F下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
98	CR004211	CR705-26	2'F下部走道	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
99	CR004212	CR705-27	2'F下部组合	UUACAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
100	CR004213	CR705-28	下部alt	UUACAGCCACGUCUACAGCAfGmUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
101	CR004214	CR705-29	下部alt	UUACAGCCACGUCUACAGCAmGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
102	CR004215	CR705-GC1	下部GC	UUACAGCCACGUCUACAGCGGCGAGAGCUAUGCUGUUUUUG
103	CR004216	CR705-GC3	上部GC	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUAUGCUGGCGCG
104	仅CR004188-修饰	仅CR705-1-修饰	上部	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
105	仅CR004189-修饰	仅CR705-2-修饰	部分上部	GUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
106	仅CR004190-修饰	仅CR705-3-修饰	部分上部	GUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmG
107	仅CR004191-修饰	仅CR705-4-修饰	部分上部	GUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmUmG
108	仅CR004192-修饰	仅CR705-5-修饰	下部	mGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
109	仅CR004193-修饰	仅CR705-6-修饰	下部走道	mGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
110	仅CR004194-修饰	仅CR705-7-修饰	下部走道	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
111	仅CR004195-修饰-修饰	仅CR705-8-修饰	下部走道	GUUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
112	仅CR004196-修饰	仅CR705-9-修饰	下部走道	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG

[0178]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
113	仅CR004197-修饰	仅CR705-10-修饰	下部走道	GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
114	仅CR004198-修饰	仅CR705-11-修饰	下部走道	GUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
115	仅CR004199-修饰	仅CR705-14-修饰	上部及下部	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
116	仅CR004200-修饰	仅CR705-15-修饰	下部组合	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
117	仅CR004201-修饰	仅CR705-16-修饰	上部、下部组合	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
118	仅CR004202-修饰	仅CR705-17-修饰	下部组合	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
119	仅CR004203-修饰	仅CR705-18-修饰	上部、下部组合	mGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
120	仅CR004204-修饰	仅CR705-19-修饰	连接走道	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
121	仅CR004205-修饰	仅CR705-20-修饰	连接走道	GUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
122	仅CR004206-修饰	仅CR705-21-修饰	连接走道	GAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
123	仅CR004207-修饰	仅CR705-22-修饰	连接走道	GfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
124	仅CR004208-修饰	仅CR705-23-修饰	2'F下部走道	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
125	仅CR004209-修饰	仅CR705-24-修饰	2'F下部走道	GUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
126	仅CR004210-修饰	仅CR705-25-修饰	2'F下部走道	GUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
127	仅CR004211-修饰	仅CR705-26-修饰	2'F下部走道	GUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
128	仅CR004212-修饰	仅CR705-27-修饰	2'F下部组合	fGUUUUUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
129	仅CR004213-修饰	仅CR705-28-修饰	下部alt	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
130	仅CR004214-修饰	仅CR705-29-修饰	下部alt	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
131	CR000657		未经修饰	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
132	CR004218	CR657-1	上部	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCCGUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCm

[0179]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				UmGmUmUmUmUmG
133	CR004219	CR657-2	部分上部	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGm UmUmUmUmG
134	CR004220	CR657-3	部分上部	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUm mUmUmG
135	CR004221	CR657-4	部分上部	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUm UmG
136	CR004222	CR657-5	下部	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCmGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUG UUUUG
137	CR004223	CR657-6	下部走道	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCmGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
138	CR004224	CR657-7	下部走道	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
139	CR004225	CR657-8	下部走道	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCGUmUUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
140	CR004226	CR657-9	下部走道	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCGUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
141	CR004227	CR657-10	下部走道	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCGUUUUmUAGAGCUAUGCUGUUUUUG
142	CR004228	CR657-11	下部走道	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUUG
143	CR004229	CR657-14	上部及下部	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCmGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUm GmCmUmGmUmUmUmG
144	CR004230	CR657-15	下部组合	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCmGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUU UG
145	CR004231	CR657-16	上部、下部组合	CAGGGCUCUUUGAAGAUCUCGCCmGUUUUmAGAmGmCmUmAmUmG mCmUmGmUmUmUmG

[0180]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
146	CR004232	CR657-17	下部组合	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUU G
147	CR004233	CR657-18	上部、下部组合	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
148	CR004234	CR657-19	连接走道	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
149	CR004235	CR657-20	连接走道	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
150	CR004236	CR657-21	连接走道	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
151	CR004237	CR657-22	连接走道	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
152	CR004238	CR657-23	2'F下部走道	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
153	CR004239	CR657-24	2'F下部走道	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
154	CR004240	CR657-25	2'F下部走道	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
155	CR004241	CR657-26	2'F下部走道	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmC mUmGmUmUmUmUmG
156	CR004242	CR657-27	2'F下部组合	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCmGUUUUfAGAmGmCmUmAmUmG mUmGmUmUmUmUmG

[0181]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
157	CR004243	CR657-28	下部alt	mCmUmGmUmUmUmUmG CAGGGCUCUUGAAGAUCUCUCCfGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmU mGmCmUmGmUmUmUmUmG
158	CR004244	CR657-29	下部alt	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCUCCfGmUfUmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmU mGmCmUmGmUmUmUmUmG
159	CR004245	CR657-GC1	下部GC	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCUCCGGCGCAGAGCUAUGCUGUUUUG
160	CR004246	CR657-GC3	上部GC	CAGGGCUCUUGAAGAUCUCUCCGUUUUAGAGCUAUGCUGGGCGG
161	仅CR004218-修饰	仅CR657-1-修饰	上部	GUUUUAGAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
162	仅CR004219-修饰	仅CR657-2-修饰	部分上部	GUUUUAGAGCUAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
163	仅CR004220-修饰	仅CR657-3-修饰	部分上部	GUUUUAGAGCUAUGCmUmGmUmUmUmUmG
164	仅CR004221-修饰	仅CR657-4-修饰	部分上部	GUUUUAGAGCUAUGCUGUmUmUmUmG
165	仅CR004222-修饰	仅CR657-5-修饰	下部	mGmUmUmUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
166	仅CR004223-修饰	仅CR657-6-修饰	下部走道	mGUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
167	仅CR004224-修饰	仅CR657-7-修饰	下部走道	GmUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
168	仅CR004225-修饰	仅CR657-8-修饰	下部走道	GUUUUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
169	仅CR004226-修饰	仅CR657-9-修饰	下部走道	GUUmUUAGAGCUAUGCUGUUUUG
170	仅CR004227-修饰	仅CR657-10-修饰	下部走道	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
171	仅CR004228-修饰	仅CR657-11-修饰	下部走道	GUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
172	仅CR004229-修饰	仅CR657-14-修饰	上部及下部	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG
173	仅CR004230-修饰	仅CR657-15-修饰	下部组合	mGUUUUmUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
174	仅CR004231-修饰	仅CR657-16-修饰	上部、下部组合	mGUUUUmUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmUmG

[0182]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
175	仅CR004232-修饰	仅CR657-17-修饰	下部组合	mGUUUUmAGAGCUAUGCUGUUUUG
176	仅CR004233-修饰	仅CR657-18-修饰	上部、下部组合	mGUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
177	仅CR004234-修饰	仅CR657-19-修饰	连接走道	GUUUUAmGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
178	仅CR004235-修饰	仅CR657-20-修饰	连接走道	GUUUUAGmAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
179	仅CR004236-修饰	仅CR657-21-修饰	连接走道	GUUUUAfGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
180	仅CR004237-修饰	仅CR657-22-修饰	连接走道	GUUUUAGfAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
181	仅CR004238-修饰	仅CR657-23-修饰	2'F下部走道	GfUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
182	仅CR004239-修饰	仅CR657-24-修饰	2'F下部走道	GUfUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
183	仅CR004240-修饰	仅CR657-25-修饰	2'F下部走道	GUUUUUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
184	仅CR004241-修饰	仅CR657-26-修饰	2'F下部走道	GUUUfUAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmUmG
185	仅CR004242-修饰	仅CR657-27-修饰	2'F下部组合	fGfUfUfUfUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmG
186	仅CR004243-修饰	仅CR657-28-修饰	下部alt	fGmUfUmUfUmAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmG
187	仅CR004244-修饰	仅CR657-29-修饰	下部alt	mGfUmUfUmUfAGAmGmCmUmAmUmGmCmUmGmUmUmG
	trRNA			
188	TR000002		未经修饰	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUUUU
189	TR000110	TR2-v2-1	缩短尾	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUU
190	TR000111	TR2-v2-2	上部、发夹	mAmAmCmAmGmCmUmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUC CGUUUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmCmGmUmGmCmUmUmUmU

[0183]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
191	TR000112	TR2-v2-3	仅上部	mAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
192	TR000113	TR2-v2-4	发夹1	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmUmGmUmGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
193	TR000114	TR2-v2-5	发夹2	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGmGmCmAmCmGmAmUmUmGmGmUmUmGmCmUmUm UmUmU
194	TR000115	TR2-v2-6	上部、发夹2	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUC CGUUAUCAACUUGAAAAAGUGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCm GmGmUmGmCmUmUmUmU
195	TR000116	TR2-v2-7	两个发夹	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmUmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmUm CmGmGmUmUmUmUmU
196	TR000117	TR2-v2-8	下部走道	AACAGCAUAGCAAGUmUmAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
197	TR000118	TR2-v2-9	下部走道	AACAGCAUAGCAAGUUAmAmAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
198	TR000119	TR2-v2-10	下部走道	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAAC UUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
199	TR000120	TR2-v2-11	部分连接	AACAGCAUAGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGmUmUmAUCAA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU

[0184]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
200	TR000121	TR2-v2-12	部分连接	AACAGCAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAA CUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
201	TR000122	TR2-GC1	下部GC	AACAGCAUAGCAAGUUGCGCUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
202	TR000123	TR2-GC3	上部GC	GCCAGCAUAGCAAGUUAUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
203	TR000124	TR2-GC5	下部上部GC	GCCAGCAUAGCAAGUUGCGCUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
204	TR000125	TR2 all OMe		mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAmAmAmAm UmAmAmGmGmCmUmAmGmUmCmCmGmUmUmAmUmCmAmAmC mUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUm CmGmGmUmGmCmUmUmUmUmUmUmU
205	TR000126	TR2-v2-13	下部	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAmAmAmAmUAAAGG CUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmG mCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
206	TR000127	TR2-v2-14	下部	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
207	TR000128	TR2-v2-15	下部	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGm CmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU

[0185]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
208	TR000129	TR2-v2-16	下部alt	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUmUfAmAfAmAUAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
209	TR000130	TR2-v2-17	下部alt	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAAGGCU AGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmC mAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
210	TR000131	TR2-v2-18	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
211	TR000132	TR2-v2-19	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUmCmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
212	TR000133	TR2-v2-20	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUC CGUUAUmCmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
213	TR000134	TR2-v2-21	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUC CGUUmAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
214	TR000135	TR2-v2-22	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUC CGUmUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU

[0186]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
215	TR000136	TR2-v2-23	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUC CGmUUUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmCmGmUmGmCmUmUmUmU
216	TR000137	TR2-v2-24	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUC CGUUAUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmCmGmUmGmCmUmUmUmU
217	TR000138	TR2-v2-25	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUC CGUUfAUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmCmGmUmGmCmUmUmUmU
218	TR000139	TR2-v2-26	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUC CGfUfUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAm CmCmGmAmGmUmCmCmGmUmGmCmUmUmUmU
219	TR000140	TR2-v2-27	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGmGmCUA GUCCGUUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
220	TR000141	TR2-v2-28	连接走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAAGGCUAGUm CmCmGUUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCm AmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
221	TR000142	TR2-v2-29	隆突走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCmAmAGUUAAAUAAAGGCUAG UCCGUUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmCmGmUmGmCmUmUmUmU

[0187]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
222	TR000143	TR2-v2-30	隆突走道	mAmAmCmAmGmCmAmUmAmGmCAAmGmUUAUUUUUAAAGGCUAG UCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmA mCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmUmU
223	TR000144	TR2-GC6	下部GC	AACAGCAUAGCAAGUUGAGAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCCGAGUCGGUGCUUUU
224	TR000145	TR2-GC7	下部GC走道	AACAGCAUAGCAAGUUAAGUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCCGAGUCGGUGCUUUU
225	TR000146	TR2-GC8	下部GC走道	AACAGCAUAGCAAGUUAAGUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCCGAGUCGGUGCUUUU
226	TR000147	TR2-GC9	下部GC走道	AACAGCAUAGCAAGUUAAGUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCCGAGUCGGUGCUUUU
227	TR000148	TR2-GC10	下部GC走道	AACAGCAUAGCAAGUUAAGUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUU GAAAAAGUGGCACCCGAGUCGGUGCUUUU
	sgRNA			
228	G000209			mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUUUAGAGGCUAGAAAU GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU
229	G000262	G209-1	发夹2	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUUUAGAGGCUAGAAAU GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUm GmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
230	G000263	G209-2	发夹	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUUUAGAGGCUAGAAAU

[0188]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmUmCmGmUmCmGmUmGmUmCmUmU*mU*mU
231	G000264	G209-3	四核苷酸环	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAAGCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
232	G000265	G209-4	上部	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUUAGAmGmCmUmAGA AAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUG AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
233	G000266	G209-5	上部及环	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
234	G000267	G209-6	上部、环、发夹	mC*mC*mA*GUCCAGCGAGGCAAGGGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm mGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
235	G000262-修饰	G209-1-修饰	发夹2	GUUUUAGAGGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAACUUGAAAAAGUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
236	G000263-修饰	G209-2-修饰	发夹	GUUUUAGAGGCUAGAAAAUAGCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCm

[0189]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
237	G000264-修饰	G209-3-修饰	四核苷酸环	GUUUUAGAGCUAmGmAmAmAUAGCAAGUUAAGUUAAGGCUAGU CCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCmU*mU*m U*U
238	G000265-修饰	G209-4-修饰	上部	GUUUUAGAmGmCmUmAGAAAmUmAmGmCAAGUUAAGUUAAGG CUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCm U*mU*mU*U
239	G000266-修饰	G209-5-修饰	上部及环	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAGUUA AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGG UGCmU*mU*mU*U
240	G000267-修饰	G209-6-修饰	上部、环、发夹	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAGUUA AAGGCUAGUCCGUUAUCAAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU U
241	G000211		末端修饰	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAGCUAGAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU*U
242	G000282		mod6	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAGUUAAGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAm GmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU

[0190]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
243	G000201		未经修饰	UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAGCUAGAAUAGCAAG UUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUUAAAAAGUGGCACC GAGUCGGUGCUUUU mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUUmAGAmGmCmUm AmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
244	G000331	G211-7	下部	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfAGAmGmCmUm AmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
245	G000332	G211-8	下部	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGfUfUfUfUfAGAmGmCmUm AmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
246	G000333	G211-9	下部	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGfUfUfUfUfAGAmGmCmUm mAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
247	G000334	G211-10	下部	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
248	G000335	G211-11	下部	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmG mAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAAGGCUAGUCCGU

[0191]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU
				mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU
249	G000336	G211-12	下部	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU
250	G000337	G211-13	下部所有	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU
251	G000338	G211-14	下部所有	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmUAAAGGCUAGUCGUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU
252	G000339	G211-15	下部所有	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU
253	G000340	G211-16	下部所有	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmGmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU

[0193]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
259	G000346	G211-22	连接	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmU*mU*mU
260	G000347	G211-23	下部所有	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAfGfUfUfUfAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmU*mU*mU
261	G000348	G211-24	无PS	mUmUmACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUmUmU
262	G000349	G211-25	2 OMε PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmCmGmUmGmCmUmU*mU*mU
263	G000350	G211-26	2'F发夹	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
264	G000351	G211-27	Alt发夹	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUAGAmCmUmAmGmAmU

[0194]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				mAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
265	仅G000331-修饰	仅G211-7-修饰	下部	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU
266	仅G000332-修饰	仅G211-8-修饰	下部	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m
267	仅G000333-修饰	仅G211-9-修饰	下部	U*mU mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*
268	仅G000334-修饰	仅G211-10-修饰	下部	mU*mU GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAA mAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*
269	仅G000335-修饰	仅G211-11-修饰	下部	mU*mU GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAf AmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm

[0195]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				AmGmUmGmGmCmAmCmGmAmCmGmUmCmGmCmUmGmCmUm*mU *mU*mU
270	仅G000336-修饰	仅G211-12-修饰	下部	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUUmAfAm AfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUm*mU* mU*mU
271	仅G000337-修饰	仅G211-13-修饰	下部所有	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUmUmA AAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUm*m U*mU*mU
272	仅G000338-修饰	仅G211-14-修饰	下部所有	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUmUmA fAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUm* mU*mU*mU
273	仅G000339-修饰	仅G211-15-修饰	下部所有	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUUmAf AmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmA mAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUm*m U*mU*mU
274	仅G000340-修饰	仅G211-16-修饰	下部所有	fGUUUUmAfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUmUm AAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmUm* mU*mU*mU

[0196]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				mU*mU*mU
275	仅G000341-修饰	仅G211-17-修饰	下部所有	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmAmCmUmCmGmUmGmCmUmU*mU*mU*mU
276	仅G000342-修饰	仅G211-18-修饰	下部所有	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU*mU
277	仅G000343-修饰	仅G211-19-修饰	隆突cr	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
278	仅G000344-修饰	仅G211-20-修饰	隆突tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUA AAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU
279	仅G000345-修饰	仅G211-21-修饰	连接	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmU*mU*mU

[0197]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
280	仅G000346-修饰	仅G211-22-修饰	连接	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUAUmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmCmGmUmGmCmUm*mU*m U*mU
281	仅G000347-修饰	仅G211-23-修饰	下部所有	fGfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAm GmUmUmAfAmAmUAAAGGCUAGUCCGUAUmUmCmAmAmCmUm UmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmG mGmUmGmCmUm*mU*mU
282	仅G000348-修饰	仅G211-24-修饰	无PS	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
283	仅G000349-修饰	仅G211-25-修饰	2 OMe PS	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUm*mU GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmUmUm*mU
284	仅G000350-修饰	仅G211-26-修饰	2F发夹	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmU mGmGmCmAmCmCmGmAmGfUfGfGfUfGfUfUfU*mU
285	仅G000351-修饰	仅G211-27-修饰	Alt发夹	GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAGGCUAGUCCGUAUCAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGf CmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mU
286	G000208		末端修饰	mC*mA*mG*GGCUCUUGAAGAUCCGUAUAGAGCUAGAAAAUA

[0198]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				GCAAGUUA AAAU AAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCGGUGCmU*mU*mU
287	G000373		mod6	mC*mA*mG*GGCU CUUGAAGAUCCGCUUUAAGAmGmUmAm GmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
288	G000352	G208-7	下部tr	mC*mA*mG*GGCU CUUGAAGAUCCGCUUUAAGAmGmCmUm AmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
289	G000353	G208-8	下部tr	mC*mA*mG*GGCU CUUGAAGAUCCGCUUUAAGAmGmCmUm AmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAGGCUAGUCCGUUA UCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
290	G000354	G208-9	下部tr	mC*mA*mG*GGCU CUUGAAGAUCCGCUUUAAGAmGmCmUm mAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAGGCUAGUCCGUUA AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmG mAmGmUmCmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
291	G000355	G208-10	下部tr	mC*mA*mG*GGCU CUUGAAGAUCCGCUUUAAGAmGmCmUmAm GmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCm

[0199]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
292	G000356	G208-11	下部	GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCGUGUUUAGAmGmUmAm GmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAmAmUAAAGGCUAGUCCG UUUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU
293	G000357	G208-12	下部	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCGUGUUUAGAmGmUmAm GmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAmUAAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmCmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU
294	G000358	G208-13	下部所有	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCmGUUUUmAGAmGmCmUm AmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAAmAmUAAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU
295	G000359	G208-14	下部所有	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCmGUUUUmAGAmGmCmUm AmGmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAfAmAmUAAAGGCUAGUC CGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmC mCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU
296	G000360	G208-15	下部所有	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCmGUUUUmAGAmGmCmUm AmGmAmAmUmAmGmCAAGUfUmAfAmAmUAAAGGCUAGUCC GUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCm CmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU

[0201]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				GmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUfAfUfCfAmAmCmUmUmGmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mUm*mUm
303	G000367	G208-22	连接	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCGUUUUAGAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mUm*mUm
304	G000368	G208-23	下部所有	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCGfUfUfUfAmGmAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAmAmUAAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmGmUmGmCmUmUmGmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmUmGmCmU*mUm*mUm
305	G000369	G208-24	无PS	mCmAmGGGCUUUUGAAGAUCCGUUUUAGAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmUmCmGmUmGmCmUmUmUm
306	G000370	G208-25	2 OMe PS	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCGUUUUAGAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmUmCmGmUmGmCmUmUmU*mUm*mUm
307	G000371	G208-26	2'F发夹	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCGUUUUAGAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCGmAmAmAmUmAmGmCmAmCmCmU

[0202]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGfUfCfGfGfUfGfCfU*fU*fU*mU
308	G000372	G208-27	Alt发夹	mC*mA*mG*GGCUUUUGAAGAUCCGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmG fGmUfGmCfU*mU*fU*mU
309	仅G000352-修饰	仅G208-7-修饰	下部cr	mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU *mU
310	仅G000353-修饰	仅G208-8-修饰	下部cr	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAm GmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*m U*mU
311	仅G000354-修饰	仅G208-9-修饰	下部cr	mGfUfUfUfUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUA AAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
312	仅G000355-修饰	仅G208-10-修饰	下部tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUmAAA mAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*

[0203]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				mU*mU
				GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmCmUmGmCmUm*mU
313	仅G000356-修饰	仅G208-11-修饰	下部tr	*mU*mU
				GUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmCmUmGmCmUm*mU
314	仅G000357-修饰	仅G208-12-修饰	下部tr	mU*mU
				mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUmUmAAAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmCmUmGmCmUm*mU
315	仅G000358-修饰	仅G208-13-修饰	下部所有	U*mU*mU
				mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUmUmAfAfAmAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmCmUmGmCmUm*mU
316	仅G000359-修饰	仅G208-14-修饰	下部所有	mU*mU*mU
				mGUUUUmAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUfUmAfAmAfAmUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmGmAmGmUmCmGmCmUmGmCmUm*mU
317	仅G000360-修饰	仅G208-15-修饰	下部所有	U*mU*mU

[0204]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
318				fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUm AAAmAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU
	仅G000361-修饰	仅G208-16-修饰	下部所有	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUmUm AfAfAmAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmA mAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCm U*mU*mU*mU
319				fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmA fAmAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU
	仅G000362-修饰	仅G208-17-修饰	下部所有	fGfUfUfUfAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUfUmA fAmAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAm AmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU
320				GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU *mU
	仅G000363-修饰	仅G208-18-修饰	下部所有	GUUUUAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAA AUAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmG mUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU *mU
321			隆突tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
	仅G000364-修饰	仅G208-19-修饰	隆突tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
322	仅G000365-修饰	仅G208-20-修饰	隆突tr	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU
323	仅G000366-修饰	仅G208-21-修饰	连接	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUUA AAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmA mGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU* mU*mU

[0205]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				AAAGCUAGUCCGUUfAfAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmCmUm*mU*mU
				GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAAGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmUmCmGmCmUm*mU*mU
324	仅G000367-修饰	仅G208-22-修饰	连接	fGfUfUfUfAmGmAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCmAmAmGmUmUmAfAfAmUAAAGGCUAGUCCGUUAmUmCmAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmUmCmGmCmUmGmCmUmGmUmGmCmUm*mU
325	仅G000368-修饰	仅G208-23-修饰	下部所有	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAAGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmCmUmUmUmU
326	仅G000369-修饰	仅G208-24-修饰	无PS	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAAGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmCmUmUmUmU
327	仅G000370-修饰	仅G208-25-修饰	2 OMe PS	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAAGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmCmUmUmUmU
328	仅G000371-修饰	仅G208-26-修饰	2'F发夹	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU AAAGCUAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmCmUmUmUmU
329	仅G000372-修饰	仅G208-27-修饰	Alt发夹	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAAGUUAAAAU

[0206]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				AAAGGCUAGUCCGUAUAfAmCfUmUfGmAfAmAfAmAfGmUfGmGfCmAfCmCfGmAfGmUfCmGfGmUfGmCfU*mU*fU*mUmC*mC*mC*AUACUCCUACAGCACCCAGUUUUUAGAGCUAGAAUA GCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUG GCACCGAGUCCGGUGCmU*mU*mU*U
330	G000269		末端修饰	mC*mC*mC*AUACUCCUACAGCACCCAGUUUUUAGAmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCA mAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
331	G000283		mod6	CCCAUACUCCUACAGCACCCAGUUUUUAGAGCUAGAAUAUAGCAAGU UAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCG AGUCGGUGCUUUU
332	G000285		未经修饰	mU*mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmCmUmAm GmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmA mGmUmCmGmGmUmGmCmUmUmUmU
342	G000537	G211-33	5'末端3xOMePS	mUmUmACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmCmUmAmGm AmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
343	G000538	G211-34	3'末端3xOMePS	mU*mU*mU*mA*mC*mA*GCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmCmUm mU*mU*mU*mA*mC*mA*GCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmCmUm
344	G000539	G211-35	5xOMePS	

[0207]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
345	G000541	G211-37	3xOMePS+2PS	mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmG*mC*mU*mU*mU*mU
346	G000542	G211-38	3xOMePS+7PS	mU*mU*mA*C*A*GCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmCmUmA mGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU CAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGm AmGmUmCmGmGmUmG*mC*mU*mU*mU*mU
347	G000543	G211-39	反向无碱基	mU*mU*mA*C*A*G*C*C*A*C*GUCUACAGCAGUUUUAGAmCm mUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCG UUUUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCm CmGmAmGmU*mC*mG*mU*mG*mC*mU*mU*mU*mU
348	G000544	G211-40	反向无碱基 + 3xOMePS	(invd)UUACAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmCmUmAmGm AmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUUCAm AmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmGmAmG mUmCmGmGmUmGmCmUmUmU(inv d)
349	G000564	G211-42	3xMOE-PS	(invd)mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmCmU mAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUU AUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCm GmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU(inv d) moeU*moeU*moeA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmCm UmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU

[0208]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
350	G000545	G211-43	US环PS	UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmoeU*moeU*mU mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmA* mG*mA*mA*mA*mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
351	G000546	G211-44	H1环PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmU*mG*mA*mA*mA*mA*AmAmGmUmGmCmAmCmC mGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
352	G000547	G211-45	H2环PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmAm GmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUC AmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmAmGmUmGmCmAmCmCmG*m A*mG*mU*mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
353	G000548	G211-46	所有环PS	mU*mU*mA*CAGCCACGUCUACAGCAGUUUUAGAmGmCmUmA* mG*mA*mA*mA*mUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGCUAGUCCGU UAUCAmAmCmUmU*mG*mA*mA*mA*mA*AmAmGmUmGmCmAm mCmCmG*mA*mG*mU*mCmGmGmUmGmCmU*mU*mU*mU
354			Mod6 (具有未显示 于序列表中的修 饰)	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNGUUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmAmGm

[0209]

SEQ ID NO	名称	别名	描述	序列
				UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU N = 任何核苷酸
355			仅不可变区	GUUUUAGAGCUAGAAAUAGCAAGUUAAAAUAGGCUA GUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGU GCUUUU
356			Mod6模式; 仅不可 变区	GUUUUAGAmGmCmUmAmGmAmAmUmAmGmCAAGU UAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAmCmUmUmGmAm AmAmAmAmGmUmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGm GmUmGmCmU*mU*mU*mU
357			可変及不可变区	NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAGCUAGAAAU AGCAAGUUAAAAUAAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGA AAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUU
358			具有未显示于序列 表中的修饰Mod6	mN*mN*mN*NNNNNNNNNNNNNNNNNGUUUAGAmGm CmUmAmGmAmAmAmUmAmGmCAAGUUAAAAUAAAGGC UAGUCCGUUAUCAmAmCmUmUmGmAmAmAmAmAmGm UmGmGmCmAmCmCmGmAmGmUmCmGmGmUmGmCmU* mU*mU*mU N =任何核苷酸

[0210] “指导RNA”及“gRNA”在本文中可互换使用,共同指代sgRNA、trRNA (也称为 tracrRNA) 或crRNA (也称为CRISPR RNA)。crRNA及trRNA可以联合在一个RNA分子上(单指导

RNA[sgRNA])或呈两个分开的RNA分子(双指导RNA[dgRNA])联合。“指导RNA”或“gRNA”是指各类型。

[0211] trRNA序列可为天然存在的,或相比于天然存在的序列,trRNA序列可包括修饰或变化。

[0212] 如本文所用的“编辑效率”或“编辑百分比”或“编辑%”为相比于通过Cas RNP之后的序列读段(sequence read)总数,具有插入或缺失的核苷酸进入目的靶区结构域的序列读段的总数。

[0213] 如本文所用的“发夹”描述当核酸链折叠且与相同链的另一部分形成碱基对时产生的核酸环。发夹可形成包含环或U-形的结构。在一些实施方案中,发夹可由RNA环组成。发夹可由在单一核酸分子中结合在一起的两个互补序列形成,伴以分子的折叠或皱褶(wrinkling)。在一些实施方案中,发夹包含茎或茎环结构。

[0214] 如本文所用的“区(结构域)”描述保守核酸组。区也可称为“模块”或“结构域”。gRNA的区可执行特定功能,例如引导RNP的核酸内切酶活性,例如如Briner AE等人,Molecular Cell 56:333-339(2014)中所述。gRNA的区描述于表1-3中。

[0215] 如本文所用的“核糖核蛋白”(RNP)或“RNP复合物”描述gRNA,例如连同核酸酶,诸如Cas蛋白质。在一些实施方案中,RNP包含Cas9及gRNA。

[0216] 如本文所用的“茎环”描述形成结束于不成对核酸的环中的碱基配对“茎”的核苷酸的二级结构。具有相同核酸链的两个区在以相反方向读取时,序列至少部分互补的情况下,可形成茎。如本文所用的“环”描述可能覆盖茎的不碱基配对(也即不互补)的核苷酸的区。“四核苷酸环”描述4个核苷酸的环。如本文所用,sgRNA的上部茎可包含四核苷酸环。

[0217] 在涉及dgRNA的某些实施方案中,如本文所用的“茎”区描述在crRNA与trRNA的某些区(例如各RNA的下部与上部茎区)之间形成碱基配对区的核苷酸的二级结构。dgRNA的“茎”区也可在此项技术中称作“旗杆”区。

[0218] 如本文所用的“治疗”涵盖任何施用或施用用于个体的疾病的治疗剂,且包括抑制疾病、遏制其发展、缓解疾病的一种或多种症状、治愈疾病或预防疾病的一种或多种症状的复发。

[0219] 1. 修饰类型

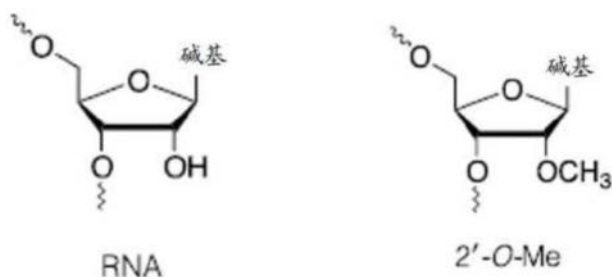
[0220] A. 2'-O-甲基修饰

[0221] 相信经修饰的糖控制核苷酸糖环的皱褶,该皱褶为影响寡核苷酸对于互补链的结合亲和力、双螺旋形成及与核酸酶的相互作用的物理特性。糖环上的取代可因此改变这些糖的确认及皱褶。举例而言,2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰可增加寡核苷酸的结合亲和力及核酸酶稳定性,尽管如实例中所示,寡核苷酸中的给定位置处的任何修饰的效应需要凭经验确定。

[0222] 术语“mA”、“mC”、“mU”或“mG”是用于指示已经2'-O-Me修饰核苷酸。

[0223] 2'-O-甲基核糖核苷酸形式的核糖核苷酸的修饰可如下描绘:

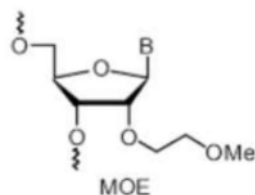
[0224]



[0225] B. 2'-O-(2-甲氧基乙基)修饰

[0226] 在一些实施方案中,修饰可为2'-O-(2-甲氧基乙基) (2'-O-moe)。2'-O-moe核糖核苷酸形式的核糖核苷酸的修饰可如下描绘:

[0227]



[0228] 术语“moeA”、“moeC”、“moeU”或“moeG”是用于指示已经2'-O-moe修饰的核苷酸。

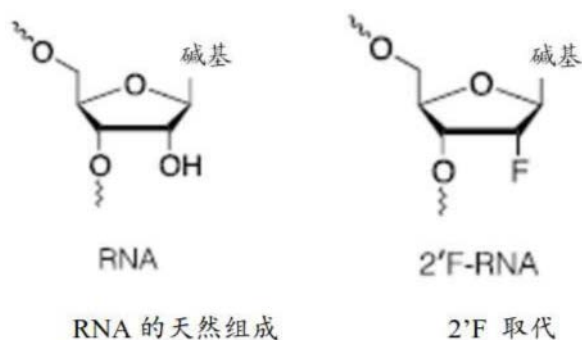
[0229] C. 2'-氟修饰

[0230] 已显示影响核苷酸糖环的另一化学修饰为卤素取代。举例而言,核苷酸糖环上的2'-氟(2'-F)取代可增加寡核苷酸结合亲和力及核酸酶稳定性。

[0231] 在本申请案中,术语“fA”、“fC”、“fU”或“fG”是用于指示已经2'-F取代的核苷酸。

[0232] 2'-F的取代可如下描绘:

[0233]



[0234] D. 硫代磷酸酯修饰

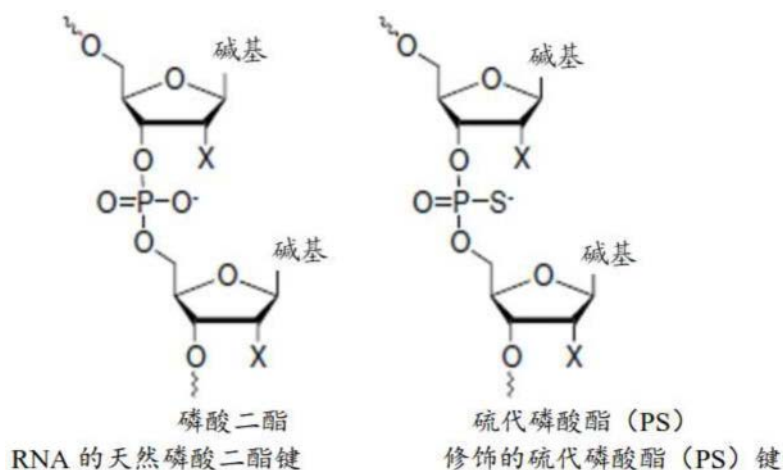
[0235] 硫代磷酸酯(PS)连接或键是指硫取代磷酸二酯连接,例如核苷酸碱基之间的键中的一个非桥联磷酸酯氧的键。当硫代磷酸酯用于产生寡核苷酸时,经修饰的寡核苷酸也可称为S-寡核苷酸。

[0236] “*”是用于描绘PS修饰。在本申请案中,术语A*、C*、U*或G*是用于指示连接至具有PS键的下一个(例如3')核苷酸的核苷酸。

[0237] 在本申请案中,术语“mA*”、“mC*”、“mU*”或“mG*”是用于指示已经2'-O-Me取代且连接至具有PS键的下一个(例如3')核苷酸的核苷酸。类似地,术语“fA*”、“fC*”、“fU*”或“fG*”是用于指示已经2'-F取代且连接至具有PS键的下一个(例如3')核苷酸的核苷酸。本文所述的实施方案涵盖PS连接或键的等效物。

[0238] 下图显示将S-取代为非桥联磷酸酯氧,产生PS键来替代磷酸二酯键:

[0239]



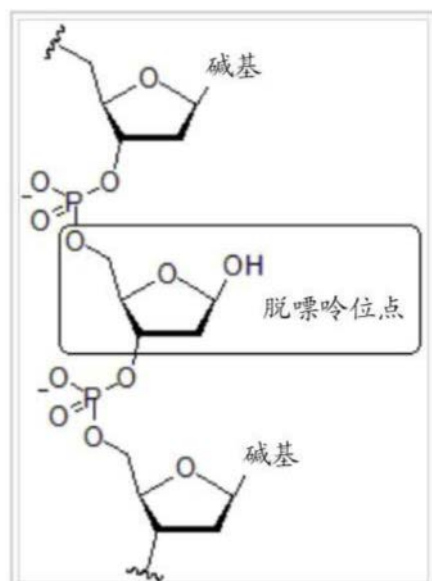
[0240] E.G-C取代

[0241] 在一些实施方案中,gRNA经不包含化学修饰的序列取代修饰。在一些实施方案中,修饰的gRNA用G-C配对(例如,在下部和/或上部茎区中)改造,这在亲代gRNA序列中未发现。在一些实施方案中,经修饰的gRNA经未发现于亲本gRNA序列中的G-U错配(“GU摆动(GU wobbles)”或错配的配对)改造。

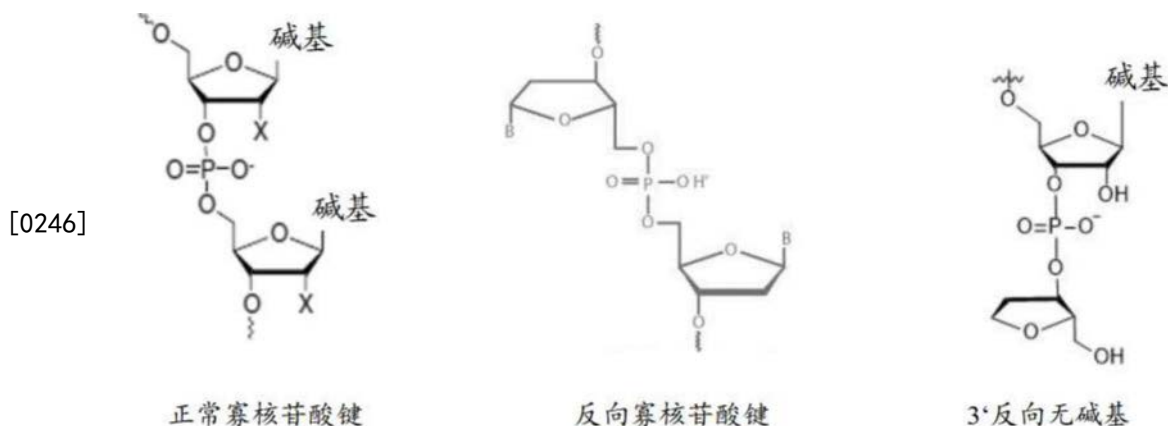
[0242] F.反向无碱基修饰

[0243] 无碱基核苷酸是指缺乏含氮碱基的那些核苷酸。下图描绘具有缺乏碱基的无碱基(也称为脱嘌呤)位点的寡核苷酸:

[0244]



[0245] 反向碱基是指具有自正常5'至3'键反向的键(也即5'至5'键或3'至3'键)的那些碱基。举例而言:



[0247] 无碱基核苷酸可连接反向键。举例而言,无碱基核苷酸可经由5'至5'键连接至末端5'核苷酸,或无碱基核苷酸可经由3'至3'键连接至末端3'核苷酸。末端5'或3'核苷酸处的反向无碱基核苷酸也可称作反向无碱基端帽。在本申请案中,术语“invd”指示反向无碱基核苷酸键。

[0248] 以上修饰及其等效物包括在本文所述的实施方案的范畴内。

[0249] 2. 指导RNA组合物

[0250] 本发明涵盖包含指导RNA的组合物。在一些实施方案中,指导RNA包含trRNA。在一些实施方案中,指导RNA包含crRNA。在一些实施方案中,指导RNA包含crRNA及trRNA。在一些实施方案中,指导RNA在一个RNA分子上包含crRNA及trRNA作为sgRNA。在一些实施方案中,指导RNA在两个RNA分子上包含crRNA及trRNA作为dgRNA。在dgRNA中,两个RNA分子可经由碱基配对结合(associate)。

[0251] 在一些实施方案中,指导RNA包含5'末端区。在一些实施方案中,指导RNA不包含5'末端区。在一些实施方案中,5'末端区包含如关于sgRNA在BrinerAE等人,Molecular Cell 56:333-339(2014)中所述的“间隔”区(但在本文中适用于所有指导RNA)。在一些实施方案中,5'末端区包含5'端修饰。具有或不具有间隔区的5'末端区可与crRNA、trRNA、sgRNA及/或dgRNA结合。间隔区在本文中且由其他文献有时也称为“指导区”、“指导结构域”或“目标结构域”。如本文所用的“靶序列”是指引导区/结构域指导核酸酶切割的核酸序列。在一些实施方案中,spyCas9蛋白可被指导区/结构域通过间隔区中存在的核苷酸导向靶核酸分子的靶序列。在一些实施方案中,指导RNA不包含间隔区。

[0252] 在一些实施方案中,本文所述的指导RNA包含或由表4中示出的序列中任一个组成。然而,应注意,当序列显示指导/间隔区时,应认识到,组合物可包含或不包含此区。另外,涵盖指导RNA,其包含表4中示出及SEQ ID No标识的序列中任一个的修饰。也即,核苷酸可相同或不同,但显示的修饰模式可与表4的指导序列的修饰模式相同或类似。修饰模式包括gRNA或gRNA区(例如5'末端区、下部茎区、突起区、上部茎区、连接区、发夹1区、发夹2区、3'末端区)的修饰的相对定位及种类(identity)。在一些实施方案中,修饰模式含有表4的序列栏中示出的序列中任一个的修饰,或经该序列的一个或多个区的修饰的至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%。在一些实施方案中,修饰模式与表4的序列栏中示出的序列中任一个的修饰模式至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,修饰模式经表4中示出的序列的一个或多个区,例如5'末端区、下部茎区、突起区、上部茎区、连

接区、发夹1区、发夹2区及/或3'末端区至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。例如,在一些实施方案中,涵盖指导RNA,其中修饰模式与经5'末端区的序列的修饰模式至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,涵盖指导RNA,其中修饰模式与下部茎区至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,涵盖指导RNA,其中修饰模式与突起区至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,涵盖指导RNA,其中修饰模式与上部茎区至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,涵盖指导RNA,其中修饰模式与连接区至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,涵盖指导RNA,其中修饰模式与发夹1区至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,涵盖指导RNA,其中修饰模式与发夹2区至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,涵盖指导RNA,其中修饰模式与3'末端区至少50%、55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%及99%相同。在一些实施方案中,修饰模式在0、1、2、3、4、5或6个核苷酸处不同于表4的序列,或此类序列的区域(例如5'末端、下部茎、突起、上部茎、连接、发夹1、发夹2、3'末端)的修饰模式。在一些实施方案中,gRNA包含在0、1、2、3、4、5或6个核苷酸处不同于表4的序列的修饰的修饰。在一些实施方案中,gRNA包含在0、1、2、3、4、5或6个核苷酸处不同于表4的序列的区域(例如5'末端、下部茎、突起、上部茎、连接、发夹1、发夹2、3'末端)的修饰的修饰。

[0253] 在一些实施方案中,gRNA包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,gRNA包含2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,gRNA包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,gRNA包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。

[0254] 在一些实施方案中,gRNA包含5'端修饰、3'端修饰或5'及3'端修饰。在一些实施方案中,5'端修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。在一些实施方案中,5'端修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)及/或2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,5'末端修饰包含至少一个硫代磷酸酯(PS)键及2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)及/或2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸中的一个或多个。(末端修饰可包含硫代磷酸酯(PS)、2'-O-甲基(2'-O-Me)、2'-O-(2-甲氧基乙基)(2'-O-moe)及/或2'-氟(2'-F)修饰。本文所述的实施方案也涵盖等效(末端修饰。在一些实施方案中,gRNA包含与gRNA的一个或多个区的修饰组合的(末端修饰。

[0255] A. sgRNA的组合物

[0256] 在一些实施方案中,本发明的组合物及方法包含gRNA,其包含将诸如Cas9的核酸酶引导至靶DNA序列的crRNA及trRNA。在一些实施方案中,本文所述的gRNA可结合在一个RNA分子上(单指导RNA或sgRNA)。

[0257] 在一些实施方案中,本发明包含sgRNA,其包含或由SEQ ID No:228至332中所述的序列中任一个组成。

[0258] 在一些实施方案中,提供包含SEQ ID No:235至240、265至285及309至329的经修

饰序列中任一个的sgRNA。在一些实施方案中,涵盖sgRNA,其包含SEQ ID No:235至240、265至285及309至329的经修饰序列中任一个,其中sgRNA进一步包含与靶序列互补的5'“间隔”序列(“指导序列”),且将Cas9引导至其靶靶以进行切割。在一些情况下,本发明包含sgRNA,其包含与SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个的核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。

[0259] 1.sgRNA的结构域

[0260] Briner AE等人,Molecular Cell 56:333-339(2014)描述在本文中称为“结构域”的sgRNA的功能性结构域,包括负责靶向的“间隔”结构域、“下部茎”、“突起”、“上部茎”(其可包括四核苷酸环)、“连接”及“发夹1”及“发夹2”结构域。参见Briner等人,第334页,图1A。

[0261] 表1及图21A提供如本文所用的sgRNA的结构域的描述。在表1中,区之间的“n”表示核苷酸的可变数目,例如0到1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。在一些实施方案中,n等于0。在一些实施方案中,n等于1。

[0262] 表1:sgRNA的区(线性查看,5'至3')

	LS1-6		B1-2		US1-12		B3-6	
5'末端区(n)	下部茎区	n	隆突区	n	上部茎区	n	隆突区	n

[0264] (下文继续)

LS7-12		N1-18		H1-1至H1-12		H2-1至H2-15	
下部茎区	n	连接区	n	发夹1区	n	发夹2区	3'末端区

[0266] a) 5'末端区

[0267] 在一些实施方案中,sgRNA包含如表1中所示的5'末端处的核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA的5'末端包含用以将Cas蛋白质引导至靶核苷酸序列的间隔区或指导区。在一些实施方案中,5'末端不包含间隔区或指导区。在一些实施方案中,5'末端包含间隔子及不用以将Cas蛋白质引导至靶核苷酸区的其他核苷酸。

[0268] 在一些实施方案中,指导区包含sgRNA的5'端处的前1至10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸。在一些实施方案中,指导区包含20个核苷酸。在一些实施方案中,指导区可包含5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个或超过25个核苷酸。在一些实施方案中,指导区可包含17个核苷酸。在一些实施方案中,指导区可包含18个核苷酸。在一些实施方案中,指导区可包含19个核苷酸。

[0269] 在一些实施方案中,指导区的选择是基于用于编辑的目的基因内的靶序列而判定。举例而言,在一些实施方案中,sgRNA包含与目的基因的靶序列互补的指导区。

[0270] 在一些实施方案中,目的基因中的靶序列可与sgRNA的指导区互补。在一些实施方案中,sgRNA的指导区与目的基因中的其对应靶序列之间的互补性或同一性程度可为约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,sgRNA的指导区与目的基因的靶区结构域可100%互补或一致。在其他实施方案中,sgRNA的指导区及目的基因的靶区结构域可含有至少一个错配。举例而言,sgRNA的指导区及目的基因的靶序列可含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配,其中靶序列的总长度为至少约17、18、19、20碱基对或超过20个碱基对。在一些实施方案中,sgRNA的指导区及目的基因的靶区结构域可含有1至6个错配,其中指导序列包含至少约17、18、19、20个

核苷酸或超过20个核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA的指导区及目的基因的靶区结构域可含有1、2、3、4、5或6个错配,其中指导序列包含约20个核苷酸。5'末端可包含不视为指导区(也即不用以将cas9蛋白质引导至靶核酸)的核苷酸。

[0271] b) 下部茎区

[0272] 在一些实施方案中,sgRNA包含当线性地查看时,由突起区及上部茎区分离的下部茎(LS)区。参见表1。

[0273] 在一些实施方案中,下部茎区包含1至12个核苷酸,例如在一个实施方案中,下部茎区包含LS1至LS12。在一些实施方案中,下部茎区包含比表1及图21A中所示出少的核苷酸。在一些实施方案中,下部茎区包含比表1及图21A中所示出多的核苷酸。当下部茎区包含比表1及图21A的示意图中所示出少或多的核苷酸时,应维持如本领域技术人员显而易见的修饰模式。

[0274] 在一些实施方案中,当以相反方向读取时,下部茎区具有核酸序列互补的核苷酸。在一些实施方案中,下部茎区的核酸序列中的互补性产生sgRNA中的茎的二级结构(例如该区可彼此碱基配对)。在一些实施方案中,当以相反方向读取时,下部茎区可不彼此完全互补。

[0275] c) 突起区

[0276] 在一些实施方案中,sgRNA包含突起区,其包含六个核苷酸B1至B6。当线性地查看时,突起区分为两个区。参见表1。在一些实施方案中,突起区包含六个核苷酸,其中前两个核苷酸之后为上部茎区,接着为突起区之后四个核苷酸。在一些实施方案中,突起区包含比表1及图21A中所示出少的核苷酸。在一些实施方案中,突起区包含比表1及图21A中所示出多的核苷酸。当突起区包含比表1及图21A的示意图中所示出少或多的核苷酸时,应维持如本领域技术人员显而易见的修饰模式。

[0277] 在一些实施方案中,突起区的存在导致sgRNA中的上部与下部茎模块之间的定向扭结。

[0278] d) 上部茎区

[0279] 在一些实施方案中,sgRNA包含上部茎区,其包含12个核苷酸。在一些实施方案中,上部茎区包含环序列。在一些情况下,环为四核苷酸环(由四个核苷酸组成的环)。

[0280] 在一些实施方案中,上部茎区包含比表1及图21A中所示出少的核苷酸。在一些实施方案中,上部茎区包含比表1及图21A中所示出多的核苷酸。当上部茎区包含比表1及图21A的示意图中所示出少或多的核苷酸时,应维持如本领域技术人员显而易见的修饰模式。

[0281] 在一些实施方案中,当以相反方向读取时,上部茎区具有核酸序列互补的核苷酸。在一些实施方案中,上部茎区的核酸序列中的互补性产生sgRNA中的茎的二级结构(例如该区可彼此碱基配对)。在一些实施方案中,当以相反方向读取时,上部茎区可不彼此完全互补。

[0282] e) 连接区

[0283] 在一些实施方案中,sgRNA包含位于下部茎区与发夹1区之间的连接区。在一些实施方案中,连接区包含18个核苷酸。在一些实施方案中,连接区包含如表1及图21A中所示的核苷酸N1至N18。

[0284] 在一些实施方案中,连接区包含比表1及图21A中所示出少的核苷酸。在一些实施

方案中,连接区包含比表1及图21A中所示出多的核苷酸。当连接区包含比表1及图21A的示意图中所示出少或多的核苷酸时,应维持如本领域技术人员显而易见的修饰模式。

[0285] 在一些实施方案中,当以相反方向读取时,连接区具有核酸序列互补的核苷酸。在一些实施方案中,核酸序列中的互补性产生sgRNA中的茎及/或茎环的二级结构(例如连接区中的某些核苷酸可彼此碱基配对)。在一些实施方案中,当以相反方向读取时,连接区可不彼此完全互补。

[0286] f) 发夹区

[0287] 在一些实施方案中,sgRNA包含一个或多个发夹区。在一些实施方案中,发夹区在连接区下游(例如相对于其为3')。在一些实施方案中,将紧邻连接区下游的核苷酸的区称为“发夹1区”或“H1”。在一些实施方案中,将相对于发夹1为3'核苷酸的区称为“发夹2区”或“H2”。在一些实施方案中,发夹区包含发夹1区及发夹2区。在一些实施方案中,sgRNA仅包含发夹1区或发夹2区。

[0288] 在一些实施方案中,发夹1区包含12个紧邻连接区下游的核酸。在一些实施方案中,发夹1区包含如表1及图21A中所示的核苷酸H1-1至H1-12。

[0289] 在一些实施方案中,发夹2区包含15个发夹1区下游的核酸。在一些实施方案中,发夹2区包含如表1及图21A中所示的核苷酸H2-1至H2-15。

[0290] 在一些实施方案中,一个或多个核苷酸存在于发夹1区与发夹2区之间。发夹1区与发夹2区之间的一个或多个核苷酸可经修饰或未经修饰。在一些实施方案中,发夹1区与发夹2区通过一个核苷酸分离。在一些实施方案中,发夹区包含比表1及图21A中所示出少的核苷酸。在一些实施方案中,发夹区包含比表1及图21A中所示出多的核苷酸。当发夹区包含比表1及图21A的示意图中所示出少或多的核苷酸时,应维持如本领域技术人员显而易见的修饰模式。

[0291] 在一些实施方案中,当以相反方向读取时,发夹区具有核酸序列互补的核苷酸。在一些实施方案中,当以相反方向读取时,发夹区可不彼此完全互补(例如发夹区的顶部或环包含不成对核苷酸)。

[0292] 在一些实施方案中,sgRNA包含经核苷酸“n”取代发夹1区,其中“n”为1与50、40、30、20、15、10、5、4、3及2之间的整数。在一些实施方案中,sgRNA的发夹1区经2个核苷酸取代。

[0293] g) 3' 末端区

[0294] 在一些实施方案中,sgRNA包含发夹区之后的核苷酸。在一些实施方案中,3' 末端区包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个核苷酸或超过20个核苷酸,例如不与发夹区的二级结构结合。在一些实施方案中,3' 末端区包含1、2、3或4个不与发夹区的二级结构结合的核苷酸。在一些实施方案中,3' 末端区包含4个不与发夹区的二级结构结合的核苷酸。在一些实施方案中,3' 末端区包含1、2或3个不与发夹区的二级结构结合的核苷酸。

[0295] 2. sgRNA的修饰

[0296] 在一些实施方案中,本发明包含sgRNA,其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰:5' 末端处的核苷酸;下部茎区;突起区;上部茎区;连接区;发夹1区;发夹2区;及3' 末端处的核苷酸。

[0297] 在一些实施方案中,修饰包含2' -O-甲基(2' -O-Me)修饰的核苷酸。在一些实施方

案中,修饰包含2'-00-(2-甲氧基乙基)(2'-0-moe)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。

[0298] 在一些实施方案中,sgRNA包含其5'端处的前4个核苷酸中的1、2、3或4个处的修饰。在一些实施方案中,5'末端处的前三个或四个核苷酸,及3'末端处的最后三个或四个核苷酸经修饰。在一些实施方案中,5'末端处的前四个核苷酸,及3'末端处的最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。在一些实施方案中,修饰包含2'-0-Me。在一些实施方案中,修饰包含2'-F。在一些实施方案中,修饰包含2'-0-moe。

[0299] 在一些实施方案中,sgRNA包含5'端处的前4个核苷酸中的1、2、3或4个处的修饰。在一些实施方案中,sgRNA包含3'端处的前4个核苷酸中的1、2、3或4个处的修饰。在一些实施方案中,5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-0-Me或2'-0-moe修饰。

[0300] 在一些实施方案中,5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-F修饰。

[0301] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其中LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12经2'-0-Me修饰。在一些实施方案中,sgRNA的突起区中的核苷酸中的每一个经2'-0-Me修饰。在一些实施方案中,sgRNA的上部茎区中的核苷酸中的每一个经2'-0-Me修饰。在一些实施方案中,sgRNA的连接区中的N16、N17及N18经2'-0-Me修饰。在一些实施方案中,sgRNA的发夹1区中的核苷酸中的每一个经2'-0-Me修饰。在一些实施方案中,sgRNA的发夹2区中的核苷酸中的每一个经2'-0-Me修饰。

[0302] 在一些实施方案中,sgRNA包含以下核苷酸处的2'-0-Me修饰核苷酸:5'末端处的前三个核苷酸;LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12;突起区中的B1及B2;sgRNA的上部茎区中的核苷酸中的每一个;连接区中的N16、N17及N18;发夹1区中的核苷酸中的每一个;发夹2区中的核苷酸中的每一个;及3'末端处的最后四个核苷酸。

[0303] 在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-0-Me或2'-F修饰的核苷酸,及3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-0-Me或2'-F修饰的核苷酸。在一些实施方案中,LS9及LS10经2'-F修饰。在一些实施方案中,N15、N16、N17及N18经2'-F修饰。在一些实施方案中,H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、HS-14及H2-15经2'-F修饰。在一些实施方案中,3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸经2'-F修饰。

[0304] 在一些实施方案中,提供包含以下核苷酸处的2'-F修饰的核苷酸的单指导RNA(sgRNA):下部茎区中的LS9及LS10;连接区中的N15、N16、N17及N18;以及发夹2区中的H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、HS-14及H2-15。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-0-Me或2'-F修饰的核苷酸,及3'末端处的最后四个核苷酸中的三个处的2'-0-Me或2'-F修饰的核苷酸。

[0305] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;LS1及LS6处的2'-O-Me修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;H2.1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0306] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;LS1至LS6处的2'-F修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的“n”处的2'-O-Me修饰核苷酸;H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0307] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;LS2至LS5处的2'-F修饰核苷酸;LS1及LS6处的2'-O-Me修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的“n”处的2'-O-Me修饰核苷酸;H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0308] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的“n”处的2'-O-Me修饰核苷酸;H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0309] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;LS8、LS10及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;LS7、LS9及LS11处的2'-O-F修饰的核苷酸;H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0310] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0311] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处

的2'-O-Me修饰核苷酸;LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;LS9及LS10处的2'-F修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0312] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;H2-1至H2-8处的2'-O-Me修饰核苷酸;H2-9至H2-15处的2'-F修饰核苷酸;3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸;及3'末端处的最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0313] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10及H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9及H1-11处的2'-F修饰核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的2'-F修饰核苷酸;H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12及H2-14处的2'-F修饰核苷酸;H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13及H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;3'末端处的倒数第二个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸;及3'末端处的倒数第三个及最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0314] 在一些实施方案中,本文公开单指导RNA (sgRNA),其包含核苷酸LS8、LS10、LS12、H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10、H1-12、H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13及H2-15处的2'-O-Me修饰;及LS7、LS9、LS11;H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9、H1-11、H1-13、H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12及H2-14处的2'-F修饰。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含3'末端处的最后一个及倒数第三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;及3'末端处的倒数第二个及倒数第三个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸。

[0315] 在一些实施方案中,本文公开包含SEQ ID No:228至232中任一个的核酸的sgRNA。在一些实施方案中,本文公开包含SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个的核酸的sgRNA。在一些实施方案中,本文公开sgRNA,其包含与SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个的核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。在一些实施方案中,sgRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0316] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含5'端修饰及以下一个或多个中的一个或多个修饰:上部茎区;发夹1区;及发夹2区,其中5'端修饰包含5'末端之前七个核苷酸内的至

少两个硫代磷酸酯键。

[0317] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含5'端修饰及以下一个或多个中的一个或多个修饰:上部茎区;发夹1区;及发夹2区,其中5'端修饰包含RNA的5'端处的一个或多个硫代磷酸酯键。在一些实施方案中,一个或多个硫代磷酸酯键连接5'末端核苷酸。

[0318] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含5'端修饰及以下一个或多个中的一个或多个修饰:上部茎区;发夹1区及发夹2区,其中5'端修饰包含5'末端之前七个核苷酸内的一个或多个硫代磷酸酯键。

[0319] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含SEQ ID No:228至332的经修饰sgRNA序列中任一个。

[0320] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含或由SEQ IDNo:235至240、265至285及309至329的经修饰sgRNA序列中任一个组成。

[0321] 在一些实施方案中,本发明包含sgRNA,其包含SEQ ID No:235至240、265至285及309至329的经修饰序列中任一个,其中sgRNA进一步包含与靶序列至少部分互补的5'间隔序列,且将Cas9引导至其靶以进行切割。

[0322] 在一些实施方案中,本发明包含sgRNA,其包含与SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个的核苷酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核苷酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。也即,相比于序列中所示出的,核苷酸A、U、C及G可相差99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%,但修饰保持不变。

[0323] 在一些实施方案中,本发明包含sgRNA,其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰:5'末端处的核苷酸;下部茎区;突起区;上部茎区;连接区;发夹1区;发夹2区;及3'末端处的核苷酸。

[0324] 在一些实施方案中,修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。在一些实施方案中,修饰包含反向无碱基核苷酸。

[0325] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含以下处的2'-O-Me修饰核苷酸:5'末端区之前三个核苷酸;下部茎区中的LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12;突起区中的B1及B2;上部茎区中的核苷酸中的每一个;连接区中的N16、N17及N18;发夹1区中的核苷酸中的每一个;发夹1区与发夹2区之间的一个核苷酸;发夹2区中的核苷酸中的每一个;及3'末端处的最后四个核苷酸。在一个实施方案中,sgRNA进一步包含5'末端处的前四个核苷酸之间的三个PS键及3'末端处的最后四个核苷酸之间的三个PS键。

[0326] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含以下处的2'-O-Me修饰核苷酸:5'末端区之前三个核苷酸;下部茎区中的LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12;突起区中的B1至B6;上部茎区中的核苷酸中的每一个;连接区中的N16、N17及N18;发夹1区中的核苷酸中的每一个;发夹1区与发夹2区之间的一个核苷酸;发夹2区中的核苷酸中的每一个;及3'末端处的最后四个核苷酸。在一个实施方案中,sgRNA进一步包含5'末端处的前四个核苷酸之间的三个PS键及3'末端处的最后四个核苷酸之间的三个PS键。

[0327] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含以下处的2'-F修饰核苷酸:下部茎区中的LS9及LS10;连接区中的15-N18;发夹2区中的H2-9至HS-15;及3'末端区中的倒数第二个、倒

数第三个及倒数第四个核苷酸。

[0328] 在一些实施方案中,提供sgRNA,其包含以下处的2'-F修饰核苷酸:下部茎区中的各核苷酸;连接区中的15-N18;发夹2区中的H2-9至HS-15;及3'末端区中的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸。

[0329] 在一些实施方案中,提供单指导RNA (sgRNA),其包含LS8、LS10、LS12、H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10、H1-12、H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13、H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸,及3'末端的最后一个及倒数第三个核苷酸;以及LS7、LS9、LS11;H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9、H1-11、H1-13、H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12、H2-14处的2'-F修饰,及3'末端处的倒数第二个及倒数第四个核苷酸。

[0330] 本发明涵盖以下实施方案中的每一个:

[0331] 实施方案01.一种单指导RNA (sgRNA),其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰:

[0332] a. 5'末端;

[0333] b. 下部茎区;

[0334] c. 突起区;

[0335] d. 上部茎区v

[0336] e. 连接区;

[0337] f. 发夹1区;

[0338] g. 发夹2区;及

[0339] h. 3'末端。

[0340] 实施方案02.如实施方案1的sgRNA,其中该修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。

[0341] 实施方案03.如实施方案1的sgRNA,其中该修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。

[0342] 实施方案04.如实施方案1的sgRNA,其中该修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。

[0343] 实施方案05.如实施方案1至3中任一项的sgRNA,其中5'末端处的前三个或四个核苷酸,及3'末端处的最后三个或四个核苷酸经修饰。

[0344] 实施方案06.如实施方案1至5中任一项的sgRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸,及3'末端处的最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。

[0345] 实施方案07.如实施方案5的sgRNA,其中该修饰包含2'-O-Me。

[0346] 实施方案08.如实施方案5的sgRNA,其中该修饰包含2'-F。

[0347] 实施方案09.如实施方案1至7中任一项的sgRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-O-Me修饰。

[0348] 实施方案10.如实施方案1至8中任一项的sgRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-F修饰。

[0349] 实施方案11.如实施方案1至10中任一项的sgRNA,其中LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12经2'-O-Me修饰。

[0350] 实施方案12.如实施方案1至11中任一项的sgRNA,其中突起区中的核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0351] 实施方案13.如实施方案1至12中任一项的sgRNA,其中上部茎区中的核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0352] 实施方案14.如实施方案1至13中任一项的sgRNA,其中连接区中的N16、N17及N18经2'-O-Me修饰。

[0353] 实施方案15.如实施方案1至14中任一项的sgRNA,其中发夹1区中的核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0354] 实施方案16.如实施方案1至15中任一项的sgRNA,其中发夹2区中的核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0355] 实施方案17.一种单指导RNA (sgRNA),其包含以下核苷酸处的2'-O-Me修饰的核酸:

[0356] a. 5'末端处的前三个核苷酸;

[0357] b. 下部茎区中的LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12;

[0358] c. 突起区中的B1及B2;

[0359] d. 上部茎区中的各核苷酸;

[0360] e. 连接区中的N16、N17及N18;

[0361] f. 发夹1区中的各核苷酸;

[0362] g. 发夹2区中的各核苷酸;及

[0363] h. 3'末端处的最后四个核苷酸。

[0364] 实施方案18.如实施方案17的sgRNA,其中B3至B6经2'-O-Me修饰。

[0365] 实施方案19.如实施方案17的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0366] 实施方案20.如实施方案1至10中任一项的sgRNA,其中LS9及LS10经2'-F修饰。

[0367] 实施方案21.如实施方案1至10及20中任一项的sgRNA,其中N15、N16、N17及N18经2'-F修饰。

[0368] 实施方案22.如实施方案1至10及20至21中任一项的sgRNA,其中H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14及H2-15经2'-F修饰。

[0369] 实施方案23.如实施方案1至10及21至22中任一项的sgRNA,其中3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸经2'-F修饰。

[0370] 实施方案24.一种单指导RNA (sgRNA),其包含以下位置处的2'-F修饰核苷酸:

[0371] a. 下部茎区中的LS9及LS10;

[0372] b. 连接区中的N15、N16、N17及N18;及

[0373] c. 发夹2区中的H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14及H2-15。

[0374] 实施方案25.如实施方案24的sgRNA,其进一步包含3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸。

[0375] 实施方案26.如实施方案24或25中任一项的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0376] 实施方案27.如实施方案24至26中任一项的sgRNA,其进一步包含5'末端处的前三

个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸,及3'末端处的最后四个核苷酸中的三个处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸。

[0377] 实施方案28.一种单指导RNA(sgRNA),其包含

[0378] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0379] b.LS1及LS6处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0380] c.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0381] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0382] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0383] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及

[0384] g.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0385] 实施方案29.如实施方案28的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0386] 实施方案30.一种单指导RNA(sgRNA),其包含

[0387] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0388] b.LS1至LS6处的2'-F修饰核苷酸;

[0389] c.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0390] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0391] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0392] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及

[0393] g.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0394] 实施方案31.如实施方案30的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0395] 实施方案32.一种单指导RNA(sgRNA),其包含

[0396] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0397] b.LS2至LS5处的2'-F修饰核苷酸;

[0398] c.LS1及LS6处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0399] d.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0400] e.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0401] f.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0402] g.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及

[0403] h.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0404] 实施方案33.如实施方案32的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0405] 实施方案34.一种单指导RNA(sgRNA),其包含

[0406] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0407] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0408] c.LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0409] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0410] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;

- [0411] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0412] g.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0413] 实施方案35.如实施方案34的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0414] 实施方案36.一种单指导RNA(sgRNA),其包含
- [0415] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0416] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0417] c.LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0418] d.LS9及LS10处的2'-F修饰核苷酸;
- [0419] e.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0420] f.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0421] g.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0422] h.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0423] 实施方案37.如实施方案36的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0424] 实施方案38.一种单指导RNA(sgRNA),其包含
- [0425] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0426] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0427] c.LS8、LS10及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0428] d.LS7、LS9及LS11处的2'-O-F修饰的核苷酸;
- [0429] e.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0430] f.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0431] g.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0432] h.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0433] 实施方案39.如实施方案32的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0434] 实施方案40.一种单指导RNA(sgRNA),其包含
- [0435] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0436] b.LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸
- [0437] c.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0438] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0439] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0440] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0441] g.3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0442] 实施方案41.如实施方案40的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0443] 实施方案42.一种单指导RNA(sgRNA),其包含
- [0444] a.5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0445] b.LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

- [0446] c. LS9及LS10处的2'-F修饰核苷酸;
- [0447] d. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0448] e. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0449] f. 发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0450] g. H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0451] h. 3'末端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0452] 实施方案43. 如实施方案43的sgRNA, 其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0453] 实施方案44. 一种单指导RNA(sgRNA), 其包含
- [0454] a. 5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0455] b. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0456] c. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0457] d. 发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0458] e. H2-1至H2-8处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0459] f. H2-9至H2-15处的2'-F修饰核苷酸;
- [0460] g. 3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸;及
- [0461] h. 3'末端处的最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0462] 实施方案45. 如实施方案44的sgRNA, 其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0463] 实施方案46. 一种单指导RNA(sgRNA), 其包含
- [0464] a. 5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0465] b. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0466] c. H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10及H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0467] d. H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9及H1-11处的2'-F修饰核苷酸;
- [0468] e. 发夹1区与发夹2区之间的2'-F修饰核苷酸;
- [0469] f. H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12及H2-14处的2'-F修饰核苷酸;
- [0470] g. H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13及H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0471] h. 3'末端处的倒数第二个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸;及
- [0472] i. 3'末端处的倒数第三个及最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0473] 实施方案47. 如实施方案46的sgRNA, 其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0474] 实施方案48. 一种单指导RNA(sgRNA), 其包含
- [0475] a. LS8、LS10、LS12、H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10、H1-12、H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13及H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0476] b. LS7、LS9、LS11; H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9、H1-11、H1-13、H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12及H2-14处的2'-F修饰核苷酸。
- [0477] 实施方案49. 如实施方案48的sgRNA, 其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0478] 实施方案50.如实施方案48至49中任一项的sgRNA,其进一步包含
 [0479] a.3'末端处的最后一个及倒数第三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
 [0480] b.3'末端处的倒数第二个及倒数第三个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸。
 [0481] 实施方案51.一种sgRNA,其包含SEQ ID No:228至332中任一个的核酸。
 [0482] 实施方案52.一种sgRNA,其包含SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个的核酸。

[0483] 实施方案53.一种sgRNA,其包含与SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个的核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。

[0484] 实施方案54.如实施方案51至53中任一项的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0485] B.dgRNA的组合物

[0486] 在一些实施方案中,本发明的组合物及方法包含gRNA,其包含将诸如Cas9的核酸酶引导至靶DNA序列的crRNA及trRNA。在一些实施方案中,gRNA却结合在两个独立RNA分子上(双指导RNA或dgRNA)。

[0487] 表2及图21C提供如本文所用的crRNA的结构域的描述。5'末端区可包含crRNA的5'末端处或附近的间隔区且用以将Cas9引导至DNA中的靶区结构域,例如如本文所述。在表2中,区之间的“n”表示核苷酸的可变数目,例如0到1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。在一些实施方案中,n等于0。本文所述的dgRNA中任一个可包括任何结构域之间的“n”。

[0488] 表3及图21C提供如本文所用的trRNA的结构域的描述。在表3中,区之间的“n”表示核苷酸的可变数目,例如0到1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更大。在一些实施方案中,n等于0。本文所述的dgRNA中任一个可包括任何结构域之间的“n”。

[0489] 1.dgRNA的结构域

[0490] 如Briner 2014中所述,dgRNA可基于在本文中称为“结构域”的特定功能性结构域,包括负责定向的间隔结构域、下部茎、突起、上部茎、连接及发夹结构域开发。在dgRNA中,crRNA包含gRNA的一些组分且trRNA包含gRNA的一些组分。

[0491] crRNA的区提供于表2及图21C中。trRNA的区提供于表3及图21C中。图21C显示示例性dgRNA的示意图。

[0492] 表2:crRNA的区(线性查看,5'至3')

[0493]

	LS1-6		B1-2		US1-14	
5'末端区(n)	下部茎区	n	隆突区	n	上部茎区	3'末端区

[0494] 表3:trRNA的区(线性查看,5'至3')

[0495]

	US1-11		B1-4		LS1-6		N1-18		H1-1至H1-12		H2-1至H2-15	
5'末端区(n)	上部茎区	n	隆突区	n	下部茎区	n	连接区	n	发夹1区	n	发夹2区	3'末端区

[0496] a)5'末端区

[0497] 在一些实施方案中,dgRNA包含如表2-3及图21C中所示的crRNA及trRNA的5'末端处的核苷酸。

[0498] 在一些实施方案中,crRNA的5'末端包含用以将Cas蛋白质引导至靶核苷酸序列的间隔区或指导区。在一些实施方案中,5'末端不包含间隔区或指导区。在一些实施方案中,5'末端包含间隔子及不用以将Cas蛋白质引导至靶核苷酸区的额外核苷酸。

[0499] 在一些实施方案中,指导区包含crRNA的5'端之前1至10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个核苷酸。在一些实施方案中,指导区包含20个核苷酸。在一些实施方案中,指导区可包含5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个或超过25个核苷酸。在一些实施方案中,指导区可包含17个核苷酸。在一些实施方案中,指导区可包含18个核苷酸。在一些实施方案中,指导区可包含19个核苷酸。

[0500] 在一些实施方案中,指导区的选择是基于用于编辑的目的基因内的靶序列而判定。举例而言,在一些实施方案中,crRNA包含与目的基因的靶序列互补的指导区。

[0501] 在一些实施方案中,目的基因中的靶序列可与crRNA的指导区互补。在一些实施方案中,crRNA的指导区与目的基因中的其对应靶序列之间的互补性或同一性程度可为约50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在一些实施方案中,crRNA的指导区与目的基因的靶区结构域可100%互补或一致。在其他实施方案中,crRNA的指导区及目的基因的靶区结构域可含有至少一个错配。举例而言,crRNA的指导区及目的基因的靶序列可含有1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个错配,其中靶序列的总长度为至少约17、18、19、20或超过20个碱基对。在一些实施方案中,crRNA的指导区及目的基因的靶区结构域可含有1至6个错配,其中指导序列包含至少约17、18、19、20或超过20个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA的指导区及目的基因的靶区结构域可含有1、2、3、4、5或6个错配,其中指导序列包含约20个核苷酸。

[0502] 在一些实施方案中,trRNA包含5'末端区。在一些实施方案中,trRNA包含部分形成dgRNA的上部茎区的5'末端区。trRNA的5'末端区不与靶基因的区互补。

[0503] b) 下部茎区

[0504] 在一些实施方案中,dgRNA包含下部茎(LS)区。下部茎区包含如图21C中所示地结合的crRNA下部茎区及trRNA下部茎区。在一些实施方案中,crRNA的下部茎区与trRNA的下部茎区至少部分互补。在一些实施方案中,crRNA的下部茎区与trRNA的下部茎区完全互补。

[0505] 在一些实施方案中,crRNA及trRNA的下部茎区各自包含6个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA及trRNA的下部茎区各自包含比表2-3及图21C中所示出少的核苷酸。在一些实施方案中,下部茎区包含比表2-3及图21C中所示出多的核苷酸。当下部茎区包含比表2-3及图21C的示意图中所示出少或多的核苷酸时,维持本领域技术人员显而易见的修饰模式。在一些实施方案中,crRNA的下部茎区中的核苷酸的数目不同于trRNA的下部茎区中的核苷酸的数目。

[0506] c) 突起区

[0507] 在一些实施方案中,dgRNA包含突起(B)区。在一些实施方案中,crRNA包含一个突起区且trRNA包含一个突起区。在一些实施方案中,各突起区包含1至4个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA的突起区包含两个核苷酸,且trRNA的突起区包含四个核苷酸。

[0508] 在一些实施方案中,crRNA突起区位于crRNA的下部茎区与上部茎区之间。在一些实施方案中,crRNA的突起区包含两个核苷酸。在一些实施方案中,crRNA的突起区包含如表2及图21C所示的核苷酸B1及B2。

[0509] 在一些实施方案中, trRNA突起区位于trRNA的上部茎区与下部茎区之间。在一些实施方案中, trRNA的突起区包含四个核苷酸。在一些实施方案中, trRNA的突起区包含如表3及图21C所示的核苷酸B1至B4。

[0510] 在一些实施方案中, 突起区的存在导致dgRNA中的上部与下部茎模块之间的定向扭结。crRNA突起区及trRNA突起区可部分互补。crRNA突起区及trRNA突起区可不互补。

[0511] 在一些实施方案中, crRNA及trRNA的突起区包含比表2-3及图21C中所示出多的核苷酸。当突起区包含比表2-3及图21C的示意图中所示出少或多的核苷酸时, 维持本领域技术人员显而易见的修饰模式。在一些实施方案中, crRNA的突起区中的核苷酸的数目不同于trRNA的突起区中的核苷酸的数目。

[0512] d) 上部茎区

[0513] 在一些实施方案中, dgRNA包含上部茎(US)区。上部茎区包含如图21C中所示地结合的crRNA上部茎区及trRNA上部茎区。在一些实施方案中, crRNA的上部茎区与trRNA的上部茎区至少部分互补。在一些实施方案中, crRNA的上部茎区与trRNA的上部茎区完全互补。

[0514] 在一些实施方案中, crRNA的上部茎区包含十四个核苷酸。在一些实施方案中, trRNA的上部茎区包含十一个核苷酸。在一些实施方案中, crRNA及trRNA的上部茎区各自包含比表2-3及图21C中所示出少的核苷酸。在一些实施方案中, crRNA及trRNA的上部茎区包含比表2-3及图21C中所示出多的核苷酸。当上部茎区包含比表2-3及图21C的示意图中所示出少或多的核苷酸时, 维持本领域技术人员显而易见的修饰模式。

[0515] 在一些实施方案中, crRNA的上部茎包含如表2及图21C中所示的核苷酸US1至US14。

[0516] 在一些实施方案中, trRNA的上部茎包含如表3及图21C中所示的核苷酸US1至US11。

[0517] e) 连接区

[0518] 在一些实施方案中, dgRNA包含含有连接区的trRNA。在一些实施方案中, 连接区在trRNA的下部茎区与发夹1区之间。在一些实施方案中, 连接区紧邻地位于trRNA的下部茎区下游。在一些实施方案中, 连接区包含十八个核苷酸。在一些实施方案中, trRNA的连接区包含如表3及图21C所示的核苷酸N1至N18。在一些实施方案中, 连接区包含比表3及图21C中所示出少的核苷酸。在一些实施方案中, trRNA的连接区包含比表3及图21C中所示出多的核苷酸。当连接区包含比3及图21C中所示出少或多的核苷酸时, 维持本领域技术人员显而易见的修饰模式。

[0519] 在一些实施方案中, 当以相反方向读取时, 连接区具有核酸序列互补的核苷酸。在一些实施方案中, 核酸序列中的互补性产生sgRNA中的茎及/或茎环的二级结构(例如连接区中的某些核苷酸可彼此碱基配对)。在一些实施方案中, 当以相反方向读取时, 连接区可不彼此完全互补。

[0520] f) 发夹区

[0521] 在一些实施方案中, trRNA的发夹区在连接区下游。在一些实施方案中, 将紧邻连接区下游的核苷酸的区称为“发夹1区”。在一些实施方案中, 将紧邻发夹1区下游的核苷酸的区称为“发夹2区”。在一些实施方案中, 发夹区包含发夹1区及发夹2区。在一些情况下, 发夹1区及发夹2区通过一个或多个核苷酸“n”分离。在一些实施方案中, $n=1$ 。在一些实施方

案中, trRNA仅包含发夹1区或发夹2区。

[0522] 已显示经2个核苷酸取代trRNA的发夹1区允许编辑Cas RNP的活性(参见US20150376586,图16)。在一些实施方案中, trRNA包含经核苷酸“n”取代发夹1区,其中“n”为1与50、40、30、20、15、10、5、4、3及2之间的整数。在一些实施方案中, trRNA的发夹1区经2个核苷酸取代。

[0523] 在一些实施方案中, trRNA的发夹1区包含十二个紧邻连接区下游的核苷酸。在一些实施方案中, trRNA的发夹1区包含如表3及图21C中所示的核苷酸H1-1至H1-12。

[0524] 在一些实施方案中, 非发夹核苷酸存在于trRNA的发夹1区与发夹2区之间。在一些实施方案中, 一至两个非发夹核苷酸存在于发夹1区与发夹2区之间。

[0525] 在一些实施方案中, trRNA的发夹2区包含十五个在发夹1之后(相对于其为3')的核苷酸。在一些实施方案中, trRNA的发夹2区包含如表3及图21C中所示的核苷酸H2-1至H2-15。在一些实施方案中, trRNA的发夹2区包含如表3中所示的核苷酸H2-1至H2-15, 且发夹1区与发夹2区之间的“n”为1或2。

[0526] 在一些实施方案中, trRNA的发夹区包含比表3及图21C中所示出多的核苷酸。当发夹区包含比表3及图21C中所示出少或多的核苷酸时, 维持本领域技术人员显而易见的修饰模式。

[0527] 在一些实施方案中, 当以相反方向读取时, 发夹区具有核酸序列互补的核苷酸。在一些实施方案中, 当以相反方向读取时, 发夹区可不彼此完全互补(例如发夹区的顶部或环包含不成对核苷酸)。

[0528] 在一些实施方案中, trRNA包含经核苷酸“n”取代发夹1区, 其中“n”为1与50、40、30、20、15、10、5、4、3及2之间的整数。在一些实施方案中, trRNA的发夹1区经2个核苷酸取代。

[0529] g) 3' 末端区

[0530] 在一些实施方案中, dgRNA包含含有3' 末端区的trRNA, 该3' 末端区在发夹区之后(相对于其为3') 包含额外核苷酸。在一些实施方案中, 3' 末端区包含1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15或20个或超过20个不与发夹区的二级结构结合的核苷酸。在一些实施方案中, 3' 末端区包含1、2、3或4个不与发夹区的二级结构结合的核苷酸。在一些实施方案中, 3' 末端区包含4个不与发夹区的二级结构结合的核苷酸。在一些实施方案中, 3' 末端区包含1、2或3个不与发夹区的二级结构结合的核苷酸。

[0531] 2. dgRNA的修饰

[0532] 在一些实施方案中, dgRNA包含经修饰的crRNA及未经修饰的trRNA。在一些实施方案中, dgRNA包含未经修饰的crRNA及经修饰的trRNA。在一些实施方案中, dgRNA的crRNA及trRNA均包含修饰。

[0533] 在一些实施方案中, 本文所述的gRNA在两个独立RNA分子上(双指导RNA或dgRNA)。参见表2、3及图21C。

[0534] 在一些实施方案中, 本发明包含dgRNA, 其包含或由以下者组成: a) SEQ ID No: 1至187的crRNA序列中任一个; 及b) SEQ ID No: 188至227中所述的trRNA序列中任一个。

[0535] 在一些实施方案中, 提供包含1至187的经修饰crRNA序列中任一个的dgRNA。

[0536] 在一些实施方案中, 提供包含188至227的经修饰trRNA序列中任一个的dgRNA。

[0537] 在一些实施方案中,提供包含SEQ ID No:19至31、53至73及104至130的经修饰crRNA序列中任一个的dgRNA。在一些实施方案中,本发明包含dgRNA,其包含SEQ ID No:19至31、53至73及104至130的经修饰序列中任一个,其中crRNA进一步包含与靶序列至少部分互补的5' 间隔序列,且将Cas9引导至其靶以进行切割。

[0538] 在一些实施方案中,本发明包含crRNA,其包含SEQ ID No:1至187中所述的序列中任一个。在一些实施方案中,本发明包含crRNA,其包含或由SEQ ID No:19至31、53至73及104至130中所述的序列中任一个组成。在一些实施方案中,本发明包含crRNA,其包含SEQ ID No:19至31、53至73及104至130中所述的序列中任一个及间隔区。

[0539] 在一些实施方案中,本发明包含trRNA,其包含或由SEQ ID No:188至277中所述的序列中任一个组成。

[0540] 在一些实施方案中,本发明包含crRNA,其包含与SEQ ID No:1至187中任一个的核苷酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核苷酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。也即,相比于序列中所示出的,核苷酸A、U、C及G可相差99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%,但修饰保持不变。

[0541] 在一些实施方案中,本发明包含trRNA,其包含与SEQ ID No:188至277中任一个的核苷酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核苷酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。也即,相比于序列中所示出的,核苷酸A、U、C及G可相差99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%,但各核苷酸上的修饰保持不变。

[0542] 3. 具有修饰的crRNA、trRNA及dgRNA

[0543] 在一些实施方案中,crRNA包含5' 末端区、下部茎区、突起区、上部茎区及3' 末端区中的一个或多个内的一个或多个经修饰的核苷酸。

[0544] 在一些实施方案中,修饰包含2' -O-Me。

[0545] 在一些实施方案中,修饰包含2' -F。

[0546] 在一些实施方案中,修饰包含连接一个或多个核苷酸的硫代磷酸酯(PS) 键。在一些实施方案中,修饰为连接5' 末端处的前四个核苷酸的三个PS键及连接3' 末端处的最后四个核苷酸的三个PS键。

[0547] 在一些实施方案中,修饰包含反向无碱基核苷酸。

[0548] 在一些实施方案中,提供crRNA,其包含上部茎区中的各核苷酸处的2' -O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,crRNA的US-1至US-14各经2' -O-Me修饰。在一些实施方案中,crRNA的LS1及LS6经2' -O-Me修饰。在一些实施方案中,crRNA的LS5经2' -O-Me修饰。

[0549] 在一些实施方案中,提供crRNA,其包含上部茎区中的核苷酸中的每一个,及下部茎区中的LS1及LS6处的2' -O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,crRNA进一步包含5' 及/或3' 末端区中,例如5' 及/或3' 端修饰中的一个或多个2' -O-Me或2' -O-moe修饰的核苷酸。

[0550] 在一些实施方案中,提供crRNA,其包含上部茎区中的核苷酸中的每一个、下部茎区中的LS1、LS5及LS6处的2' -O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,crRNA进一步包含5' 及/或3' 末端区中,例如5' 及/或3' 端修饰中的一个或多个2' -O-Me或2' -O-moe修饰的核苷酸。

[0551] 在一些实施方案中,本发明包含crRNA,其包含下部茎区中的LS1、LS2及LS6处的2' -F修饰核苷酸。在一些实施方案中,crRNA进一步包含突起区中的B1及B2中的每一个处的

2'-F修饰核苷酸。在一些实施方案中,本发明包含crRNA,其包含下部茎区中的LS1、LS2及LS6,及突起区中的B1及B2中的每一个处的2'-F修饰核苷酸。在一些实施方案中,crRNA进一步包含5'及/或3'末端区中,例如5'及/或3'端修饰中的一个或多个2'-O-Me或2'-O-moe修饰的核苷酸。

[0552] 在一些实施方案中,crRNA包含下部茎区中的核苷酸LS1及LS6;突起区中的核酸中的每一个;及上部茎区中的核酸中的每一个处的2'-O-Me修饰核苷酸。在一些实施方案中,crRNA的LS5核苷酸也经2'-O-Me修饰。在一些实施方案中,crRNA的LS2、LS3及LS4未经修饰。在一些实施方案中,crRNA进一步包含5'及/或3'末端区中,例如5'及/或3'端修饰中的一个或多个2'-O-Me或2'-O-moe修饰的核苷酸。

[0553] 在一些实施方案中,crRNA包含下部茎区中的LS1、LS2及LS6,及突起区中的核苷酸中的每一个处的2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,crRNA包含下部茎区中的LS1、LS2及LS6处,及突起区中的B2及B2处的2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,crRNA包含下部茎区中的LS1-LS6,及突起区中的核苷酸中的每一个处的2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,crRNA进一步包含5'及/或3'末端区中,例如5'及/或3'端修饰中的一个或多个2'-O-Me或2'-O-moe修饰的核苷酸。

[0554] 在一些实施方案中,本发明包含trRNA,其包含以下区中的一个或多个内的一个或多个经修饰的核苷酸:5'末端区;上部茎区;突起区;下部茎区;连接区;发夹1区;发夹1区与发夹2区之间的中间区(intervening region);发夹2区;及3'末端区。

[0555] 在一些实施方案中,修饰包含2'-O-Me。

[0556] 在一些实施方案中,修饰包含2'-F。

[0557] 在一些实施方案中,修饰包含连接一个或多个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键。在一些实施方案中,修饰为连接5'末端处的前四个核苷酸的三个PS键及连接3'末端处的最后四个核苷酸的三个PS键。

[0558] 在一些实施方案中,修饰包含反向无碱基核苷酸。

[0559] 在一些实施方案中,trRNA包含以下各处的2'-O-Me修饰核苷酸:上部茎区中的各核酸;突起区中的B1及B2;下部茎区中的LS1及LS2;连接区中的N3、N4、N5、N15、N16、N17及N18;发夹1区中的各核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的一个核苷酸;及发夹2区中的各核苷酸。在一些实施方案中,trRNA进一步包含5'及/或3'末端区中,例如5'及/或3'端修饰中的一个或多个2'-O-Me或2'-O-moe修饰的核苷酸。

[0560] 在一些实施方案中,trRNA包含以下各处的2'-O-Me修饰核苷酸:上部茎区中的各核酸;突起区中的各核苷酸;下部茎区中的LS1、LS2、LS5及LS6;连接区中的N3至N5、N10至N18;发夹1区中的各核苷酸;发夹1区与发夹2区之间的一个核苷酸;及发夹2区中的各核苷酸。在一些实施方案中,crRNA进一步包含5'及/或3'末端区中,例如5'及/或3'端修饰中的一个或多个2'-O-Me或2'-O-moe修饰的核苷酸。

[0561] 在一些实施方案中,trRNA包含连接区中的N15至N18处的2'-F修饰核苷酸。在一些实施方案中,trRNA进一步包含5'及/或3'末端区中,例如5'及/或3'端修饰中的一个或多个2'-F修饰核苷酸。

[0562] 在一些实施方案中,trRNA包含下部茎区中的LS4及LS5,及连接区中的N13至N18处的2'-F修饰核苷酸。在一些实施方案中,trRNA进一步包含5'及/或3'末端区中,例如5'及/

或3'端修饰中的一个或多个2'-F修饰核苷酸。

[0563] 在一些实施方案中, trRNA包含下部茎区中的LS1、LS3及LS5处的2'-F修饰核苷酸, 及下部茎区中的LS2、LS4及LS6处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0564] 在一些实施方案中, 本文公开crispr RNA (crRNA), 其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰: 5'末端处的前五个核苷酸; 下部茎区; 突起区; 上部茎区; 及3'末端处的最后五个核苷酸。在一些实施方案中, 修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。在一些实施方案中, 修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中, 修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。在一些实施方案中, 5'末端处的前三个核苷酸, 及3'末端处的最后三个核苷酸经修饰。在一些实施方案中, 5'末端处的前四个核苷酸, 及3'末端处的最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。在一些实施方案中, 修饰包含2'-O-Me。在一些实施方案中, 修饰包含2'-F。在一些实施方案中, 5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接, 且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-O-Me修饰。在一些实施方案中, 5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接, 且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-F修饰。在一些实施方案中, LS1及LS6经2'-O-Me修饰。在一些实施方案中, 上部茎区中的核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0565] 在一些实施方案中, 本发明包含crispr RNA (crRNA), 其包含以下核苷酸处的2'-O-Me修饰的核酸: 下部茎区中的LS1及LS6; 及上部茎区中的各核苷酸。在一些实施方案中, crRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中, crRNA进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸, 及3'末端处的最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸。在一些实施方案中, LS1、LS2及LS6经2'-F修饰。在一些实施方案中, 突起区中的各核苷酸经2'-F修饰。

[0566] 在一些实施方案中, 本文公开crispr RNA (crRNA), 其包含以下核苷酸处的2'-F修饰的核酸: 下部茎区中的LS1、LS2及LS6; 及突起区中的各核苷酸。在一些实施方案中, crRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中, crRNA进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸, 及3'末端处的最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸。

[0567] 在一些实施方案中, 提供crRNA, 其包含SEQ ID No: 1至187中任一个的核酸。在一些实施方案中, 提供crRNA, 其包含SEQ ID No: 19至31、53至73、104至130及161至187中任一个的核酸。在一些实施方案中, 提供crRNA, 其包含与SEQ ID No: 19至31、53至73、104至130及161至187中任一个的核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸, 其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。在一些实施方案中, crRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0568] 本发明也涵盖tracr RNA (trRNA), 其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰: 5'末端处的前五个核苷酸; 上部茎区; 突起区; 下部茎区; 连接区; 发夹1区; 发夹2区; 及3'末端处的最后五个核苷酸。在一些实施方案中, 修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的

核苷酸。在一些实施方案中,修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。在一些实施方案中,修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。在一些实施方案中,5'末端处的前四个核苷酸,及3'末端处的最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。在一些实施方案中,5'末端处的前三个核苷酸,及3'末端处的最后三个核苷酸经修饰。在一些实施方案中,修饰包含2'-O-Me。在一些实施方案中,修饰包含2'-F。在一些实施方案中,5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-O-Me修饰。在一些实施方案中,5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-F修饰。在一些实施方案中,上部茎区中的各核苷酸经2'-O-Me修饰。在一些实施方案中,突起区内的B1及B2经2'-O-Me修饰。在一些实施方案中,连接区中的N3、N4、N5、N15、N16、N17及N18经2'-O-Me修饰。在一些实施方案中,发夹1区中的各核苷酸经2'-O-Me修饰。在一些实施方案中,发夹2区中的各核苷酸经2'-O-Me修饰。

[0569] 在一些实施方案中,本发明包含tracrRNA(trRNA),其包含以下核苷酸处的2'-O-Me修饰的核酸:上部茎区中的各核苷酸;突起区内的B1及B2;连接区中的N3、N4、N5、N15、N16、N17及N18;发夹1区中的各核苷酸;及发夹2区中的各核苷酸。在一些实施方案中,trRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中,trRNA进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸,及3'末端处的最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸。在一些实施方案中,N15、N16、N17及N18经2'-F修饰。在一些实施方案中,LS1、LS3及LS5经2'-F修饰,且LS2、LS4及LS6经2'-O-Me修饰。在一些实施方案中,trRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。在一些实施方案中,trRNA进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸,及3'末端处最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸。

[0570] 在一些实施方案中,提供trRNA,其包含SEQ ID No:188至227中任一个的核酸。在一些实施方案中,提供trRNA,其包含与SEQ ID No:188至227中任一个的核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。在一些实施方案中,trRNA进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0571] 在一些情况下,提供包含crRNA及trRNA的双指导,其中crRNA包含SEQ ID No:1至187中任一个的核酸,且其中trRNA包含SEQ ID No:188至227中任一个的核酸。

[0572] 本发明涵盖包含本文所公开的crRNA及本文所公开的trRNA的双指导,也涵盖包含本文所公开的crRNA及未经修饰的trRNA的双指导。在一些实施方案中,提供包含未经修饰的crRNA及本文所公开的经修饰的trRNA的双指导。

[0573] 在一些实施方案中,并涵盖以下:

[0574] 实施方案55.一种crisprRNA(crRNA),其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰:

[0575] a. 5'末端处的前五个核苷酸;

[0576] b. 下部茎区;

[0577] c. 突起区;

- [0578] d.上部茎区;及
- [0579] e.3'末端处的最后五个核苷酸。
- [0580] 实施方案56.如实施方案55的crRNA,其中该修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。
- [0581] 实施方案57.如实施方案55的crRNA,其中该修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。
- [0582] 实施方案58.如实施方案55的crRNA,其中该修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。
- [0583] 实施方案59.如实施方案55至58中任一项的crRNA,其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸经修饰。
- [0584] 实施方案60.如实施方案55至58中任一项的crRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。
- [0585] 实施方案61.如实施方案59的crRNA,其中该修饰包含2'-O-Me。
- [0586] 实施方案62.如实施方案59的crRNA,其中该修饰包含2'-F。
- [0587] 实施方案63.如实施方案55至62中任一项的crRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-O-Me修饰。
- [0588] 实施方案64.如实施方案55至62中任一项的crRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-F修饰。
- [0589] 实施方案65.如实施方案55至60中任一项的crRNA,其中LS1及LS6经2'-O-Me修饰。
- [0590] 实施方案66.如实施方案55至60及65中任一项的crRNA,其中上部茎区中的核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。
- [0591] 实施方案67.一种crispr RNA(crRNA),其包含以下处的2'-O-Me修饰核苷酸:
- [0592] a.下部茎区中的LS1及LS6;及
- [0593] b.上部茎区中的各核苷酸。
- [0594] 实施方案68.如实施方案67的crRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0595] 实施方案69.如实施方案67或68的crRNA,其进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸,及3'末端处的最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸。
- [0596] 实施方案70.如实施方案55至60中任一项的crRNA,其中LS1、LS2及LS6经2'-F修饰。
- [0597] 实施方案71.如实施方案55至60及70中任一项的crRNA,其中突起区中的各核苷酸经2'-F修饰。
- [0598] 实施方案72.一种crispr RNA(crRNA),其包含以下处的2'-F修饰核苷酸:
- [0599] a.下部茎区中的LS1、LS2及LS6;及
- [0600] b.突起区中的各核苷酸。
- [0601] 实施方案73.如实施方案70至72中任一项的crRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0602] 实施方案74.如实施方案72或73的crRNA,其进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸,及3'末端处的最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸。

[0603] 实施方案75.一种crRNA,其包含SEQ ID No:1至187中任一个的核酸。

[0604] 实施方案76.一种crRNA,其包含SEQ ID No:19至31、53至73、104至130及161至187中任一个的核酸。

[0605] 实施方案77.一种crRNA,其包含与SEQ ID No:19至31、53至73、104至130及161至187中任一个的核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。

[0606] 实施方案78.如实施方案75至77中任一项的crRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0607] 实施方案79.一种tracrRNA(trRNA),其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰:

[0608] a.5'末端处的前五个核苷酸;

[0609] b.上部茎区;

[0610] c.突起区;

[0611] d.下部茎区;

[0612] e.连接区;

[0613] f.发夹1区;

[0614] g.发夹2区;及

[0615] h.3'末端处的最后五个核苷酸。

[0616] 实施方案80.如实施方案79的trRNA,其中该修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。

[0617] 实施方案81.如实施方案79的trRNA,其中该修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。

[0618] 实施方案82.如实施方案79的trRNA,其中该修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。

[0619] 实施方案83.如实施方案79至82中任一项的trRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。

[0620] 实施方案84.如实施方案79至82中任一项的trRNA,其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸经修饰。

[0621] 实施方案85.如实施方案84的trRNA,其中该修饰包含2'-O-Me。

[0622] 实施方案86.如实施方案84的trRNA,其中该修饰包含2'-F。

[0623] 实施方案87.如实施方案79至86中任一项的trRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-O-Me修饰。

[0624] 实施方案88.如实施方案79至86中任一项的trRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-F修饰。

[0625] 实施方案89.如实施方案79至84中任一项的trRNA,其中上部茎区中的各核苷酸经

2'-O-Me修饰。

[0626] 实施方案90.如实施方案79至84及89中任一项的trRNA,其中突起区内的B1及B2经2'-O-Me修饰。

[0627] 实施方案91.如实施方案79至84及89至90中任一项的trRNA,其中连接区中的N3、N4、N5、N15、N16、N17及N18经2'-O-Me修饰。

[0628] 实施方案92.如实施方案79至84及89至91中任一项的trRNA,其中发夹1区中的各核苷酸经2'-O-Me修饰。

[0629] 实施方案93.如实施方案79至84及89至92中任一项的trRNA,其中发夹2区中的各核苷酸经2'-O-Me修饰。

[0630] 实施方案94.一种tracrRNA(trRNA),其包含以下处的2'-O-Me修饰核苷酸:

[0631] a.上部茎区中的各核苷酸;

[0632] b.突起区内的B1及B2;

[0633] c.连接区中的N3、N4、N5、N15、N16、N17及N18;

[0634] d.发夹1区中的各核苷酸;及

[0635] e.发夹2区中的各核苷酸。

[0636] 实施方案95.如实施方案94的trRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0637] 实施方案96.如实施方案94或95的crRNA,其进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸,及3'末端处的最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸。

[0638] 实施方案97.如实施方案79至84中任一项的trRNA,其中N15、N16、N17及N18经2'-F修饰。

[0639] 实施方案98.如实施方案79至84及97中任一项的trRNA,其中LS1、LS3及LS5经2'-F修饰,且LS2、LS4及LS6经2'-O-Me修饰。

[0640] 实施方案99.如实施方案87至98中任一项的trRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0641] 实施方案100.如实施方案98或99的trRNA,其进一步包含5'末端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸,及3'末端处的最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸。

[0642] 实施方案101.一种trRNA,其包含SEQ ID No:188至227中任一个的核酸。

[0643] 实施方案102.一种trRNA,其包含与SEQ ID No:188至227中任一个的核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中修饰模式与参考序列标识符中示出的修饰模式相同。

[0644] 实施方案103.如实施方案101至102中任一项的trRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0645] 实施方案104.一种包含crRNA及trRNA的双指导,其中crRNA包含SEQ ID No:1至187中任一个的核苷酸,且其中trRNA包含SEQ IDNo:188至227中任一个的核酸。

[0646] 实施方案105.一种双指导,其包含如实施方案55至78中任一项的crRNA及如实施

方案79至103中任一项的trRNA。

[0647] 实施方案106.一种双指导,其包含如实施方案55至78中任一项的crRNA及未经修饰的trRNA。

[0648] 实施方案107.一种双指导,其包含未经修饰的crRNA及如实施方案79至103中任一项的trRNA。

[0649] C.末端核苷酸的修饰

[0650] 在一些实施方案中,本文所述的指导RNA中任一个的5' 或3' 末端核苷酸经修饰。在一些实施方案中,指导RNA,包括例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者的3' 末端区中的末端(也即最后)1、2、3、4、5、6或7个核苷酸经修饰。在一些实施方案中,指导RNA的3' 末端区中的末端(也即最后)1、2、3、4、5、6或7个核苷酸包含超过一个修饰。在一些实施方案中,3' 末端区处的末端(也即最后)1、2、3、4、5、6或7个核苷酸中的至少一个经修饰。在一些实施方案中,3' 末端区中的末端(也即最后)1、2、3、4、5、6或7个核苷酸中的至少两者经修饰。在一些实施方案中,3' 末端区中的末端(也即最后)1、2、3、4、5、6或7个核苷酸中的至少三者经修饰。在一些实施方案中,修饰包含PS键。

[0651] 在一些实施方案中,5' 末端区的5' 端经修饰,例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者之前1、2、3、4、5、6或7个核苷酸经修饰。在一些实施方案中,指导RNA的3' 末端区之前1、2、3、4、5、6或7个核苷酸包含超过一个修饰。在一些实施方案中,5' 端处的末端(也即第一)1、2、3、4、5、6或7个核苷酸中的至少一个经修饰。在一些实施方案中,5' 端处的末端1、2、3、4、5、6或7个核苷酸中的至少两者经修饰。在一些实施方案中,5' 端处的末端1、2、3、4、5、6或7个核苷酸中的至少三者经修饰。在一些实施方案中,修饰包含PS键。

[0652] 在一些实施方案中,指导RNA,例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者的5' 及3' 末端(例如端部)均经修饰。在一些实施方案中,仅指导RNA,例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者的5' 末端经修饰。在一些实施方案中,仅指导RNA,例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者的3' 末端经修饰。

[0653] 在一些实施方案中,gRNA包含gRNA的5' 端处的前7个核苷酸中的1、2、3、4、5、6或7者处的修饰。在一些实施方案中,gRNA包含3' 端处的7个末端核苷酸中的1、2、3、4、5、6或7者处的修饰。在一些实施方案中,5' 端处的前4个核苷酸中的2、3或4者,及/或3' 端处的末端4个核苷酸中的2、3或4者经修饰。在一些实施方案中,5' 端处的前4个核苷酸中的2、3或4者与硫代磷酸酯(PS)键连接。

[0654] 在一些实施方案中,对5' 末端及/或3' 末端的修饰包含对核苷酸的2' -O-甲基(2' -O-Me)或2' -O-(2-甲氧基乙基)(2' -O-moe)修饰。在一些实施方案中,修饰包含对核苷酸的2' -氟(2' -F)修饰。在一些实施方案中,修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。在一些实施方案中,修饰包含反向无碱基核苷酸。在一些实施方案中,修饰包含超过一个选自2' O-Me、2' -O-moe、2' -氟(2' -F)、核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键及反向无碱基核苷酸的修饰。在一些实施方案中,涵盖等效修饰。

[0655] 在一些实施方案中,指导RNA,例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者包含5' 末端处的前一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个核苷酸之间的一个或多个硫代磷酸酯(PS)键。在一些实施方案中,指导RNA,例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者包含3' 末端处的前一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个核苷酸之间的一个

或多个PS键。在一些实施方案中,指导RNA,例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者包含5'末端及3'末端处的最后一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个核苷酸之间的一个或多个PS键。在一些实施方案中,除PS键以外,5'及3'末端核苷酸可包含2'-O-Me、2'-O-moe或2'-F修饰核苷酸。

[0656] 在一些实施方案中,指导RNA,例如sgRNA、dgRNA、crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者包含5'及3'末端处的经修饰的核苷酸,及表1-3及图21A或21C中所述的一个或多个其他区中的经修饰的核苷酸。

[0657] 在一些实施方案中,crRNA、trRNA或crRNA及trRNA两者包含不在5'或3'末端处的经修饰的核苷酸。特定修饰模式描述于下文及表4中。

[0658] 3. gRNA及Cas蛋白质的递送

[0659] 在一些实施方案中,除至少一个gRNA以外,本文提供的组合物另外包含核酸酶。在一些实施方案中,核酸酶为Cas蛋白质。在一些实施方案中,gRNA连同Cas蛋白质称作Cas RNP。在一些实施方案中,Cas蛋白质是来自Type-II CRISPR/Cas系统。在一些实施方案中,Cas蛋白质为Cas9。在一些实施方案中,Cas9蛋白质为野生型Cas9。在一些实施方案中,Cas9蛋白质源自酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白质,例如酿脓链球菌Cas9。在一些实施方案中,Cas9蛋白质不源自酿脓链球菌,但以与酿脓链球菌Cas9相同的方式起作用,使得对酿脓链球菌Cas9具有特异性的gRNA将引导非酿脓链球菌Cas9至其目标位点。在一些实施方案中,Cas诱发靶DNA中的双链断裂。本文所述的实施方案涵盖酿脓链球菌Cas9蛋白质的等效物。

[0660] Cas9涵盖其经修饰形式及变体。具有一个非活性催化结构域(RuvC或HNH)的Cas9的经修饰形式被称为“切口酶”。切口酶仅切割靶DNA上的一条链,因此产生单链断裂。单链断裂也可称为“切口”。在一些实施方案中,组合物及方法包含切口酶。在一些实施方案中,组合物及方法包含在靶DNA中诱发切口而非双链断裂的切口酶Cas9。

[0661] 在一些实施方案中,Cas蛋白质可经修饰以仅含有一个功能核酸酶结构域。举例而言,Cas蛋白质可经修饰以使得核酸酶结构域中的一个经突变或完全或部分缺失以降低其核酸切割活性。在一些实施方案中,使用具有活性降低的RuvC结构域的切口酶Cas。在一些实施方案中,使用具有非活性RuvC结构域的切口酶Cas。在一些实施方案中,使用具有活性降低的HNH结构域的切口酶Cas。在一些实施方案中,使用具有非活性HNH结构域的切口酶Cas。

[0662] 在一些实施方案中,Cas蛋白质核酸酶结构域内的保守氨基酸经取代以降低或改变核酸酶活性。在一些实施方案中,Cas蛋白质可包含RuvC或RuvC样核酸酶结构域中的氨基酸取代。RuvC或RuvC样核酸酶结构域中的例示性氨基酸取代包括D10A(基于酿脓链球菌Cas9蛋白质)。在一些实施方案中,Cas蛋白质可包含HNH或HNH样核酸酶结构域中的氨基酸取代。HNH或HNH样核酸酶结构域中的例示性氨基酸取代包括E762A、H840A、N863A、H983A及D986A(基于酿脓链球菌Cas9蛋白质)。

[0663] 在一些实施方案中,本文所述的RNP复合物包含切口酶及一对分别与靶序列的有义链及反义链互补的指导RNA。在此实施方案中,指导RNA将切口酶引导至靶序列且通过在靶序列的相对链上产生切口(也即双重切口)引入双链断裂(DSB)。在一些实施方案中,使用双重切口可提高特异性及减少脱靶效应。在一些实施方案中,连同靶向DNA的相对链的两个

独立指导RNA使用切口酶Cas以在靶DNA中产生双重切口。在一些实施方案中,与经选择以非常接近的两个独立指导RNA一起使用切口酶Cas以在靶DNA中产生双重切口。

[0664] 在一些实施方案中,使用嵌合Cas蛋白质,其中蛋白质的一个结构域或区经不同蛋白质的一部分取代。在一些实施方案中,Cas核酸酶结构域可经来自诸如FokI的不同核酸酶的结构域取代。在一些实施方案中,Cas蛋白质可经核酸酶修饰。

[0665] 在一些实施方案中,Cas蛋白质包含融合蛋白,其包含连接至异源功能性结构域的催化非活性Cas9(参见例如W02014152432)。在一些实施方案中,催化非活性Cas9来自酿脓链球菌。在一些实施方案中,催化非活性Cas9包含使Cas9不活化的突变。在一些实施方案中,异源功能性结构域为修饰基因表现、组蛋白或DNA的结构域。在一些实施方案中,异源功能性结构域为转录活化结构域或转录抑制因子结构域。

[0666] A. PAM

[0667] 在一些实施方案中,靶序列可邻近于PAM。在一些实施方案中,PAM可邻近于或在靶序列的3'端的1、2、3或4个核苷酸内。PAM的长度及序列可取决于使用的Cas蛋白质。举例而言,PAM可选自共有序列或用于特定Cas9蛋白质或Cas9直向同源物的特定PAM序列,包括公开于Ran等人,Nature 520:186-191(2015)的图1中的那些,该文献以引用的方式并入本文中。在一些实施方案中,PAM可包含长度为2、3、4、5、6、7、8、9或10个的核苷酸。非限制例示性PAM序列包括NGG、NAG、NGA、NGAG、NGCG、NNGRRT、TTN、NGGNG、NG、NAAAAN、NNAAAAN、NNNNACA、GNNNCNNA及NNNNGATT(其中N定义为任何核苷酸,且w定义为A或T,且R定义为A或G)。在一些实施方案中,PAM序列可为NGG。在一些实施方案中,PAM序列可为NGGNG。在一些实施方案中,PAM序列可为NNAAAAN。

[0668] B. 经修饰gRNA的递送

[0669] 脂质纳米颗粒(LNP)为递送核苷酸及蛋白质货物(cargo)的熟知方法,且可用于递送本文所公开的gRNA、mRNA、Cas9及RNP。在一些实施方案中,LNP递送核酸、蛋白质或核酸以及蛋白质。

[0670] 在一些实施方案中,本发明包含向个体递送本文所公开的gRNA中任一个的方法,其中gRNA与LNP结合。在一些实施方案中,gRNA/LNP也与Cas9或编码Cas9的mRNA联合。

[0671] 在一些实施方案中,本发明包含含有所公开的gRNA中任一个及LNP的组合物。在一些实施方案中,组合物进一步包含Cas9或编码Cas9的mRNA。

[0672] 在一些实施方案中,LNP包含阳离子脂质。在一些实施方案中,LNP包含(9Z,12Z)-3-(((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基十八-9,12-二烯酸酯,也称作3-(((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸酯)。在一些实施方案中,LNPs包含约4.5的阳离子脂质胺与RNA磷酸酯的摩尔比(N:P)。

[0673] 在一些实施方案中,与本文所公开gRNA结合的LNP是用于制备用于治疗疾病或病症的药物。

[0674] 电穿孔为递送货物的熟知方法,且任何电穿孔方法可用于递送本文所公开的gRNA中任一个。在一些实施方案中,电穿孔可用于递送本文所公开的gRNA中任一个及Cas9或编码Cas9的mRNA。

[0675] 在一些实施方案中,本发明包含将本文所公开的gRNA中任一个递送至离体细胞的

方法,其中gRNA与LNP结合或不与LNP结合。在一些实施方案中,gRNA/LNP或gRNA也与Cas9或编码Cas9的mRNA结合。

[0676] 4. 基因调节方法

[0677] 在一些实施方案中,本发明包含药物制剂,其包含本文所公开的gRNA中任一个以及可药用载体。在一些实施方案中,本发明包含药物制剂,其包含本文所公开的gRNA中任一个及LNP以及可药用载体。在一些实施方案中,本发明包含药物制剂,其包含本文所公开的gRNA中任一个、Cas9蛋白质或编码Cas9蛋白质的mRNA、LNP以及可药用载体。在一些实施方案中,药物制剂用于制备用于治疗疾病或病症的药物。在一些实施方案中,本发明包含治疗人类患者的方法,其包含施用本文所述的gRNA或药物制剂中任一个。

[0678] 在一些实施方案中,本发明包含修饰靶DNA的方法或用途,其包含施用或递送Cas蛋白质或Cas mRNA及本文所公开的gRNA中的任何一个或多个。

[0679] 在一些实施方案中,本发明包含调节靶基因的方法或用途,其包含施用或递送Cas蛋白质或Cas mRNA及本文所公开的gRNA中的任何一个或多个。在一些实施方案中,调节为靶基因编辑。在一些实施方案中,调节为通过靶基因编码的蛋白质的表达的变化。

[0680] 在一些实施方案中,该方法或用途导致基因编辑。在一些实施方案中,该方法或用途导致靶基因内的双链断裂。在一些实施方案中,该方法或用途导致在DSB的非同源末端接合期间形成插入缺失突变。在一些实施方案中,该方法或用途导致靶基因中的核苷酸的插入或缺失。在一些实施方案中,靶基因中的核苷酸的插入或缺失导致移码突变或提前终止密码子,其产生非功能蛋白质。在一些实施方案中,靶基因中的核苷酸的插入或缺失导致靶基因表现的敲除或消除。在一些实施方案中,该方法或用途包含DSB的同源性定向修复。在一些实施方案中,该方法或用途进一步包含向细胞递送模板,其中模板的至少一部分并入至通过Cas蛋白质诱发的双链断裂位点处或附近的靶DNA中。

[0681] 在一些实施方案中,该方法或用途导致基因调节。在一些实施方案中,基因调节为基因表现的增加或减少、DNA的甲基化状态的变化或组蛋白亚基的修饰。在一些实施方案中,该方法或用途导致通过靶基因编码的蛋白质的表达增加或减少。

[0682] 在一些实施方案中,本文所公开的gRNA中任一个可适用于制备用于治疗疾病或病症的药物。

[0683] A. 基因调节的测量

[0684] 可在体外及体内测试经修饰的gRNA的功效。在一些实施方案中,本发明包含本文所公开的gRNA中的一个或多个,其中gRNA在与Cas9一起提供至细胞时导致基因调节。在一些实施方案中,gRNA的功效可在体外或体内分析中测量。

[0685] 1. 体外测量Cas功效

[0686] 在一些实施方案中,将包含经修饰的sgRNA的Cas RNP的活性与包含未经修饰的sgRNA的Cas RNP的活性进行比较。

[0687] 在一些实施方案中,将包含含有经修饰的trRNA的dgRNA的Cas RNP的活性与包含含有未经修饰的trRNA的dgRNA的Cas RNP的活性。

[0688] 在一些实施方案中,将包含含有经修饰的crRNA的dgRNA的Cas RNP的活性与包含含有未经修饰的crRNA的dgRNA的Cas RNP的活性进行比较。

[0689] 在一些实施方案中,将包含含有经修饰的crRNA及经修饰的trRNA的dgRNA的Cas

RNP的活性与包含未经修饰的crRNA及未经修饰的trRNA的Cas RNP的活性进行比较。

[0690] 在一些实施方案中,gRNA增加或减少靶蛋白表达的效率通过测量靶蛋白的量确定。在一些实施方案中,本发明包含本文所述的gRNA中任一个,其中gRNA增加或减少产生自靶向基因的蛋白质的量。在一些实施方案中,本发明包含调节蛋白质表现的方法,其包含向个体施用本文所公开的gRNA中任一个,其中gRNA将Cas9引导至编码靶蛋白的基因,且相比于不将Cas9靶向至该基因的gRNA对照,靶蛋白表达增加或减少。

[0691] 在一些实施方案中,经特定gRNA编辑的效率是通过递送Cas9及gRNA(包含crRNA及trRNA的sgRNA或dgRNA)之后存在于基因组中的目标位置处的编辑测定。在一些实施方案中,经特定gRNA编辑的效率通过第二代测序来测量。在一些实施方案中,测定目的靶区结构域的编辑百分比。在一些实施方案中,在递送gRNA及Cas9之后测量相比于序列读段总数的具有向目的靶区结构域中的核苷酸插入或缺失的序列读段总数。在一些实施方案中,本发明包含增加基因编辑效率的方法,其包含向细胞施用或递送本文所述的经修饰的gRNA中任一个,其中基因编辑的百分比相比于未经类似修饰的对照gRNA增加。

[0692] 在一些实施方案中,经特定gRNA编辑的效率通过经成功基因编辑引入的核苷酸插入或缺失的存在来测量。在一些实施方案中,本发明包含在基因中产生核苷酸插入或缺失的方法,其包含向细胞施用或递送本文所述的经修饰的gRNA中的任一个,其中相比于未经类似修饰的对照gRNA,核苷酸插入或缺失。在一些实施方案中,在生物化学分析中测试Cas9及gRNA的活性。在一些实施方案中,在无细胞切割分析中测试Cas9及gRNA的活性。在一些实施方案中,在Neuro2A细胞中测试Cas9及gRNA的活性。

[0693] 在一些实施方案中,相比于包含未经修饰的crRNA及trRNA的未经修饰的sgRNA或dgRNA,Cas9及包含经修饰的crRNA及/或trRNA的sgRNA或dgRNA显示类似、较大或减小的活性。在一些实施方案中,相比于包含未经修饰的crRNA及trRNA的未经修饰的sgRNA或dgRNA,Cas9及包含经修饰的crRNA及/或trRNA的经修饰的sgRNA或dgRNA显示增强的活性。

[0694] 2. 体内测量Cas功效

[0695] 在一些实施方案中,经修饰的gRNA的活性在体内施用包含经修饰的gRNA及Cas蛋白质或编码Cas蛋白质的mRNA的LNP之后测量。

[0696] 在一些实施方案中,本文提供的gRNA或组合物的体内功效是通过在施用gRNA及Cas9之后编辑从组织(例如肝组织)提取的DNA中测量的功效测定。

[0697] 3. 体内测量免疫系统活化

[0698] 如本文所公开的gRNA的修饰可减少个体对体内施用gRNA的免疫反应。在一些实施方案中,个体的免疫反应的活化是通过体内施用包含trRNA及crRNA的sgRNA或dgRNA连同Cas9 mRNA或蛋白质(例如在LNP中配制)之后的一种或多种细胞因子的血清浓度来测量。在一些实施方案中,细胞因子为干扰素- α (IFN- α)、白介素6 (IL-6)、单核细胞趋化蛋白1 (MCP-1) 及/或肿瘤坏死因子 α (TNF- α)。在一些实施方案中,本发明包含降低个体对递送gRNA的免疫反应的方法,其包含施用本文所公开的gRNA中任一个,其中gRNA在施用后通过个体的免疫系统产生降低的反应。在一些实施方案中,本发明包含相比于未经类似修饰的对照gRNA,在施用后降低个体的免疫系统中的活化的方法。

[0699] 在一些实施方案中,相比于施用未经修饰的sgRNA,施用Cas RNP或Cas9 mRNA连同经修饰的gRNA(例如sgRNA或dgRNA)产生免疫细胞因子的较低血清浓度。在一些实施方案

中,本发明包含降低个体的免疫细胞因子的血清浓度的方法,其包含施用本文所公开的gRNA中任一个,其中相比于未经类似修饰的对照gRNA,gRNA在个体的血清中产生免疫细胞因子的较低浓度。

[0700] 不应将本说明书和示例性实施方案视为限制。为了本说明书和所附权利要求的目的,除非另有说明,否则在说明书和权利要求中使用的表示数量、百分比或比例以及其他数值的所有数字应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰,程度为其尚未如此修饰。因此,除非有相反的指示,否则在本说明书和所附权利要求书中列出的数值参数是近似值,其可以根据试图获得的所需性质而变化。至少,并不是试图将等同原则的应用限制在权利要求的范围内,每个数值参数至少应该根据所报导的有效数字的数量并通过应用一般舍入技术来解释。

[0701] 应注意,如在本说明书和所附权利要求中所使用的,单数形式“一”,“一个”和“该/所述”,以及任何单词的任何单数用法,包括复数指示物,除非明确且不含糊地限于一个指示物。如本文所用,术语“包括”及其语法变体旨在是非限制性的,使得列表中的项目的叙述不排除可以替换或添加到所列项目的其他类似项目。

实施例

[0702] 提供以下实例以说明某些所公开的实施方案且不应理解为以任何方式限制本发明的范畴。

[0703] 实施例1-材料及方法

[0704] A.合成性指导RNA(gRNA)

[0705] 通过商业供货商以如表4中所提供的经修饰核苷酸及键结方式,利用化学方式合成呈双指导(dgRNA,也即crRNA及trRNA)及单指导(sgRNA)两种形式的gRNA。

[0706] B.Cas9 mRNA的体外转录(“IVT”)

[0707] 含有N1-甲基假-U的封端及聚腺苷酸化Cas9 mRNA是通过使用线性化质粒DNA模板及T7 RNA聚合酶的体外转录产生。含有T7启动子及100个核苷酸(nt)的聚(A/T)区的质粒DNA通过XbaI线性化且获自商业制造商。用于产生Cas9修饰的mRNA的IVT反应物在37℃下在以下条件下孵育4小时:50ng/μL线性化质粒;2mM的GTP、ATP、CTP及N1-甲基假-UTP(Trilink)中的每一个;10mM ARCA(Trilink);5U/μL T7 RNA聚合酶(NEB);1U/μL鼠RNA酶抑制剂(NEB);0.004U/μL无机大肠杆菌焦磷酸酶(NEB);及1×反应缓冲液。在4小时孵育之后,添加TURBO脱氧核糖核酸酶(ThermoFisher)至0.01U/μL的最终浓度,且再孵育反应物30分钟以移除DNA模板。Cas9 mRNA使用标准方案纯化自酶及核苷酸,包括二氧化硅结合柱,诸如MegaClear Transcription Clean-up试剂盒(ThermoFisher)或使用LiCl继之以EtOH与NaOAc的沉淀步骤。通过测量260nm处的光吸收(Nanodrop)测定转录物浓度,且通过以Bioanalyzer(Agilent)进行毛细电泳法而分析转录物。

[0708] C.Neuro2A细胞中的Cas9 mRNA及gRNA转染

[0709] 小鼠细胞株Neuro2A在补充有10%小牛血清的DMEM培养基中培养且在转染之前24小时以每孔15,000个细胞的密度铺板于96孔板中。在转染当天,自细胞抽吸培养基且经新鲜培养基替换。脂转染胺-2000(Invitrogen)在Opti-MEM(Invitrogen)中以1:50(v/v)稀释。Cas9 mRNA及单指导RNA在Opti-MEM中分开稀释。对于双指导形式,crRNA及trRNA在

Opti-MEM中以1:1摩尔比稀释在一起。Cas9 mRNA及gRNA分开与稀释的脂转染胺-2000以1:1 (v/v) 混合,产生两种脂复合体。在孵育5分钟之后,将脂复合体连续添加至细胞,以得到100ngCas9 mRNA/孔的最终浓度及0.4 μ L总脂质粒转染试剂。对于各实验以两个剂量水平进行测试,包括25nM及2.5nM、16.7nM及1.67nM、10nM及1nM、8.3nM及0.83nM以及3nM及0.3nM。对于双指导,此浓度包括等摩尔量的crRNA及trRNA,使得例如25nM crRNA及25nMtrRNA产生25nM总双指导。细胞在转染后24小时裂解,且裂解物直接用于通过NGS分析编辑的PCR反应。

[0710] 具有1xNLS的Cas9 mRNA (SEQ ID NO:359):

```
GGGUCCCGCAGUCGGCGUCCAGCGGCUCUGCUUGUUCGUGUGUGUGUCGUUGCAGGC
CUUAUUCGGAUCCAUGGAUAAGAAGUACUCAAUCCGGCUGGAUAUCGGAACUAAUUC
CGUGGGUUGGGCAGUGAUCACGGAUGAAUACAAAGUGCCGUCCAAGAAGUUCAGGU
CCUGGGGAACACCGAUAGACACAGCAUCAAGAAAAUCUCAUCGGAGCCCUGCUGUU
UGACUCCGGCGAAACCGCAGAAGCGACCCGGCUCAAACGUACCGCGAGGCGACGCUA
CACCCGGCGGAAGAAUCGCAUCUGCUAUCUGCAAGAGAUUUUUCGAACGAAAUGGC
AAAGGUCGACGACAGCUUCUCCACCGCCUGGAAGAAUCUUUCCUGGUGGAGGAGGA
CAAGAAGCAUGAACGGCAUCCUAUCUUUGGAAACAUCGUCGACGAAGUGGCGUACCA
CGAAAAGUACCCGACCAUCUACCAUCUGCGGAAGAAGUUGGUUGACUCAACUGACAA
[0711] GGCCGACCUCAGAUUGAUCUACUUGGCCUCGCCC AU AUGAUCAAUUCGCGGACA
CUUCCUGAUCGAAGGCGAUCUGAACCUCGAUAACUCCGACGUGGAUAAGCUUUUCAU
UCAACUGGUGCAGACCUACAACCAACUGUUCGAAGAAAACCCAAUCA AUGCUAGCGG
CGUCGAUGCCAAGGCCAUCCUGUCCGCCCGCUGUCGAAGUCGCGGCGCCUCGAAAA
CCUGAUCGCACAGCUGCCGGGAGAGAAAAAGAACGGACUUUUCGGCAACUUGAUCGC
UCUCUCACUGGGACUCACUCCCAAUUUCAAGUCCAAUUUUGACCUGGCCGAGGACGC
GAAGCUGCAACUCUCAAGGACACCUACGACGACGACUUGGACAAUUGCUGGCACA
AAUUGGCGAUCAGUACGCGGAUCUGUCCUUGCCGCUAAGAACCUUUCGGACGCAAU
CUUGCUGUCCGAUAUCCUGCGCGUGAACACCGAAUAACCAAAGCGCCGCUUAGCGC
CUCGAUGAUUAAGCGGUACGACGAGCAUACCAAGGAUCUCACGCUGCUCAAAGCGCU
```

[0712]

CGUGAGACAGCAACUGCCUGAAAAAGUACAAGGAGAUUCUUCGACCAGUCCAAGAA
UGGGUACGCAGGGUACAUCGAUGGAGGCGCUAGCCAGGAAGAGUUCUAUAAGUUCAU
CAAGCCAAUCCUGGAAAAAGAUUGGACGGAACCGAAGAACUGCUGGUCAAGCUGAACAG
GGAGGAUCUGCUCCGAAAAAGAGAAACCUUUGACAACGGAUCCAUCCCCACCAGAU
CCAUCUGGGUGAGCUGCACGCCAUUCUUGCGGCGCCAGGAGGACUUUUACCCAUUCCU
CAAGGACAACCGGAAAAAGAUUCGAGAAAAUUCUGACGUUCCGCAUCCCGUAUUACGU
GGGCCACUGGCGCGCGGCAAUUCGCGCUUCGCGUGGAUGACUAGAAAAUCAGAGGA
AACCAUCACUCCUUGGAAUUCGAGGAAGUUGUGGAUAAGGGAGCUUCGGCACAAAG
CUUCAUCGAACGAAUGACCAACUUCGACAAGAAUCUCCCAAACGAGAAGGUGCUUCC
UAAGCACAGCCUCCUUACGAAUACUUCACUGUCUACAACGAACUGACUAAAGUGAA
AUACGUUACUGAAGGAAUGAGGAAGCCGGCCUUUCUGUCCGGAGAACAGAAGAAAGC
AAUUGUCGAUCUGCUGUUAAGACCAACCGCAAGGUGACCGUCAAGCAGCUUAAAGA
GGACUACUUAAGAAGAUUGAGUGUUUCGACUCAGUGGAAAUCAGCGGGUGGAGGA
CAGAUUCAACGCUUCGCGUGGGAACCUAUCAGAUUCUGAAGAUCAUAAGGACAA
GGACUUCUUGACAACGAGGAGAACGAGGACAUCUGGAAGAUUCGUCCUGACCUU
GACCCUUUUCGAGGAUCGCGAGAUGAUCGAGGAGAGGCUUAAGACCUACGCUCAUCU
CUUCGACGAUAAGGUCAUGAAACAACUCAAGCGCCGCCGGUACACUGGUUGGGGCCG
CCUCUCCCGCAAGCUGAUCAACGGUAUUCGCGAUAAACAGAGCGGUAAAACUAUCCU
GGAUUUCUCAAUUCGGAUGGCUUCGCUAAUCGUAACUUCAUUGCAAUUGAUCCACGA
CGACAGCCUGACCUUUAAGGAGGACAUCCAAAAAGCACAAAGUGUCCGGACAGGGAGA
CUCACUCCAUGAACACAUCGCGAAUCUGGCCGGUUCGCCGGCGAUUAAGAAGGGAAU
UCUGCAAACUGUGAAGGUGGUCGACGAGCUGGUGAAGGUCAUGGGACGGCACAAACC
GGAGAAUUCUGGAUUGAAAUGGCCCGAGAAAACCAGACUACCCAGAAAGGGCCAGAA
AAACUCCCGCGAAAGGAUGAAGCGGAUCGAAGAAGGAUCAAGGAGCUGGGCAGCCA
GAUCCUGAAAGAGCACCCGGUGGAAAAACACGCAGCUGCAGAACGAGAAGCUUACCU
GUACUAUUUGCAAAAUGGACGGGACAUGUACGUGGACCAAGAGCUGGACAUCAAUCG
GUUGUCUGAUUACGACGUGGACCACAUCGUUCCACAGUCCUUUCUGAAGGAUGACUC
GAUCGAUAAACAAGGUGUUGACUCGCGAGCGACAAGAACAGAGGGAAGUCAGAUAAUGU
GCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUAGAAGAAUACUGGCGGCAGCUCCUGAAUGC
GAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAGCGCGGCGGACU
CUCAGAGCUGGAUAAGGCUUGAUUCAAAACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAU
UACCAAGCACGUGGCGCAGAUUCUUGACUCCCGCAUGAACACUAAAUACGACGAGAA
CGAUAAAGCUAACCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGA
CUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUACCAUCGCG
GCAUGACGCAUACCUCAACGCGUGGUGCGGUACCGCCUGAUCAAAAAGUACCCUAA
ACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUGAU
AGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAUAUCUUCUUUACUCAA
CAUCAUGAACUUUUCAAGACUGAAAUAACGCGUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAG
GCCACUGAUCGAAACUAAACGGAGAAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGA
CUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAAUUUGUGAAGAAAAC
CGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUUCAAAGGAUUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAAGCGA
CAAGCUCAUUGCACGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUC
GCCGACUGUCGAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAA
AAAGCUCAAAUCCGUCAAAAGAGCUGCUGGGGAUUACCAUCAUGGAACGAUCCUCGU
CGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCUUGAGGCGAAGGGUUAACAAGGAGGUGAAGAAGGA
UCUGAUCAUCAAAUCUCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAAUGGUCGGAAGCG
CAUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUGCCUAGCAA
GUACGUCAACUCCUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAAGGGUACCCGGA
AGAUAAACGAACAGAAGCAGCUUUUCUGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUGGAUGAAU
CAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCAACUCGA
CAAAGUCCUGUCGGCCUACAAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGA
GAACAUUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUAAGUA
CUUCGAUACUACUUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGGACGC
GACCCUGAUCCACCAAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGA
GCUGGGUGGCGAUGGCGGUGGAUCUCCGAAAAAGAGAGAAAGGUGUAAUGAGCUAG
CCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGCCUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGA

[0715]

[0716]

GCCAUCGGAGGAGGUCGUGAAGAAGAUGAAGAAUACUGGCGGCAGCUCCUGAAUGC
GAAGCUGAUUACCCAGAGAAAGUUUGACAAUCUCACUAAAGCCGAGCGCGGCGGACU
CUCAGAGCUGGAUAAAGGUCGGAUUCAUCAAACGGCAGCUGGUCGAGACUCGGCAGAU
UACCAAGCACGUGGCGCAGAUUCUUGGACUCCCGCAUGAACACUAAAACGACGAGAA
CGAUAAAGCUCAUCCGGGAAGUGAAGGUGAUUACCCUGAAAAGCAAACUUGUGUCGGA
CUUUCGGAAGGACUUUCAGUUUUACAAAGUGAGAGAAAUCAACAACUACCAUCACGC
GCAUGACGCAUACCUCAACGCUGUGGUCGGUACCGCCUGAUCAAAAAGUACCCUAA
ACUUGAAUCGGAGUUUGUGUACGGAGACUACAAGGUCUACGACGUGAGGAAGAUGAU
AGCCAAGUCCGAACAGGAAAUCGGGAAAGCAACUGCGAAAACUUCUUUUACUCAA
CAUCAUGAACUUUUCAAGACUGAAAUAACGCUGGCCAAUGGAGAAAUCAGGAAGAG
GCCACUGAUCGAAACUAAACGGAGAAAACGGGCGAAAUCGUGUGGGACAAGGGCAGGGA
CUUCGCAACUGUUCGCAAAGUGCUCUCUAUGCCGCAAGUCAAUUUGUGAAGAAAAC
CGAAGUGCAAACCGGCGGAUUUUCAAAGGAAUCGAUCCUCCCAAAGAGAAAUAAGCGA
CAAGCUCAUUGCAGCAAGAAAGACUGGGACCCGAAGAAGUACGGAGGAUUCGAUUC
GCCGACUGUCGCAUACUCCGUCCUCGUGGUGGCCAAGGUGGAGAAGGGAAAGAGCAA
AAAGCUCAAAUCGUCAAAAGAGCUGCUGGGGAUUAACCAUCAUGGAACGAUCCUCGUU
CGAGAAGAACCCGAUUGAUUUCUUCGAGGCGAAGGGUUAACAAGGAGGUGAAGAAGGA
UCUGAUCAUCAAAACUCCCCAAGUACUCACUGUUCGAACUGGAAAUGGUCGGAAGCG
CAUGCUGGCUUCGGCCGGAGAACUCCAAAAGGAAAUGAGCUGGCCUUGCCUAGCAA
GUACGUCAACUCCUCUAUCUUGCUUCGCACUACGAAAAACUCAAAGGGUCACCGGA
AGAUAAACGAACAGAAGCAGCUUUUCGUGGAGCAGCACAAGCAUUAUCUGGAUGAAAU
CAUCGAACAAAUCUCCGAGUUUUCAAAGCGCGUGAUCCUCGCCGACGCCAACCUCGA
CAAAGUCCUGUCGGCCUACAUAAGCAUAGAGAUAAAGCCGAUCAGAGAACAGGCCGA
GAACAUUAUCCACUUGUUCACCCUGACUAACCUGGGAGCCCCAGCCGCCUUAAGUA
CUUCGAUACUACUAUCGAUCGCAAAAGAUACACGUCCACCAAGGAAGUUCUGGACGC
GACCCUGAUCCACCAAGCAUCACUGGACUCUACGAAACUAGGAUCGAUCUGUCGCA
GCUGGGUGGCGAUGGCUCGGCUUACCCAUACGACGUGCCUGACUACGCCUCGCUCGG
AUCGGGCUCCCCCAAAAAGAAACGGAAGGUGGACGGAUCCCCGAAAAAGAGAGAAA
GGUGGACUCCGGAUGAGAAUUAUGCAGUCUAGCCAUCACAUUUAAAAGCAUCUCAGC
CUACCAUGAGAAUAAGAGAAAGAAAAUGAAGAUCAAUAGCUUAUUCUUCUUUUUC
UUUUUCGUUGGUGUAAAGCCAACACCCUGUCUAAAAAACAUAAAUUUCUUUAAUCAU
UUUGCCUCUUUUCUCUGUGCUUCAAUUAUAAAAAUGGAAAGAACCUCGAGAAAAA
AA
AAAUCUAG

[0717] D. 初生肝细胞

[0718] 根据制造商的方案 (Invitrogen, 方案11.28.2012) 培养初生小鼠肝细胞 (PMH) (Gibco)。简言之, 将细胞解冻且再悬浮于具有补充剂的肝细胞解冻培养基 (Gibco, 目录号CM7000) 中, 接着在100g下离心10分钟。弃去上清液且沉淀的 (pelleted) 细胞再悬浮于肝细胞铺板培养基加上补充包 (Invitrogen, 目录号A1217601及CM3000) 中。细胞经计数且以每孔15,000个细胞的密度铺板于Bio-coat胶原蛋白I涂布的96孔板 (ThermoFisher, 目录号877272) 上且在37℃及5%CO₂氛围下孵育5小时以允许形成单层。在5小时之后, 移除铺板培养基且经含有LNP配制的Cas9 mRNA及指导RNA加上3%小、鼠血清的补充的肝细胞培养基 (Invitrogen, 目录号A1217601及CM4000) 替换。LNP自每孔100ng Cas9 mRNA及大致30nM指导RNA的起始剂量水平稀释, 进行连续稀释直至每孔0.1ng mRNA及0.03nM指导RNA。细胞在37℃及5%CO₂氛围下孵育大致48小时, 随后进行如本文所述的细胞裂解及NGS分析。

[0719] E. 脂质纳米颗粒 (“LNP”) 配制物

[0720] LNP以约4.5的阳离子脂质胺与RNA磷酸酯 (N:P) 摩尔比配制。脂质纳米颗粒组分以如下摩尔比溶解于100%乙醇中: 45mol% (12.7mM) 阳离子脂质 (例如 (9Z, 12Z) -3-((4,4-双

(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基十八-9,12-二烯酸酯,也称作3-((4,4-双(辛氧基)丁酰基)氧基)-2-(((3-(二乙胺基)丙氧基)羰基)氧基)甲基)丙基(9Z,12Z)-十八-9,12-二烯酸酯);44mol% (12.4mM)辅助脂质(例如胆固醇);9mol% (2.53mM)中性脂质(例如DSPC);及2mol% (.563mM)PEG(例如PEG2k-DMG)。RNA货物在25mM乙酸钠缓冲液,pH4.5中制备,产生大致0.45mg/mL的RNA货物浓度。

[0721] LNP是通过根据制造商的方案,使用Precision Nanosystems NanoAssemblr™台式仪器将脂质及RNA溶液微流体混合而形成。使用差分流动速率在混合期间维持水相与有机溶剂的2:1比率。

[0722] LNP配制方案A:在混合之后,收集LNP,在磷酸盐缓冲盐水(PBS,大致1:1)中稀释,且接着将其余的缓冲液交换至PBS中(样品体积100倍过量),在4℃下在使用10kDa Slide-a-Lyzer™ G2透析盒(ThermoFisher Scientific)温和搅拌下过夜。LNP使用10kDa Amicon自旋过滤器浓缩(在4000g在4℃下离心)以达成所需浓度。所得混合物接着使用0.2μm无菌过滤器过滤。所得滤液储存于2-8℃下。

[0723] LNP配制方案B:在混合之后,收集LNP,在pH 7.5的50mM Tris中稀释(大致1:1),且接着将LNP交换至pH 7.5的50mM Tris中(样品体积100倍过量),在4℃下在使用10kDa Slide-a-Lyzer™ G2透析盒(ThermoFisher Scientific)温和搅拌下过夜。LNP使用10kDa Amicon自旋过滤器浓缩(在4000g在4℃下离心)以达成所需浓度的两倍。这些浓缩的LNP与pH 7.5的50mM Tris、90mM NaCl、10%蔗糖(2×TSS)1:1混合。所得混合物接着使用0.2μm无菌过滤器过滤。所得滤液储存于-80℃下。

[0724] LNP配制物方案C:RNA货物在pH 5的25mM柠檬酸钠、100mM氯化钠中制备,产生大致0.45mg/mL的RNA货物的浓度。在混合之后,LNP以3:1的比率于水中收集。LNP在室温下孵育一小时且与水1:1混合。接着,其使用制造商的方案,在PD-10柱(GE Healthcare)上缓冲液交换至1×TSS(pH 7.5的50mM Tris,45mM NaCl,5%蔗糖)中。LNP使用10kDa Amicon自旋过滤器浓缩(在4000g在4℃下离心)以达成所需浓度。所得混合物接着使用0.2μm无菌过滤器过滤。所得滤液储存于-80℃下。

[0725] F.用于命中切割效率的第二代测序(“NGS”)及分析

[0726] 为了定量地测定基因组中的目标位置处的编辑效率,深度测序用于识别通过基因编辑引入的插入及缺失的存在。

[0727] 在目标位点(例如TTR、FVII)周围设计PCR引物,且扩增目的基因组区结构域。引物序列提供于下表5中。

[0728] 表5

指导	基因	正向引物(5'-3')	SEQ ID	反向引物(5'-3')	SEQ ID
[0729] 对于通过基于CR000686/G000209靶向结构域指导的实验	TTR	AGTCAATAATCA GAATCAGCAGGT	333	AGAAGGCACTTCT TCTTTATCTAAGGT	337
	TTR	GTTTTGTTCCA GAGTCTATCACCG	334	ACACGAATAAGAG CAAATGGGAAC	338
	TTR	ATTACCAGCTTA GCATCCTGTGAA	335	ACACGTTTATAG AGCAAGAACAC	339
	FVII	AGCACATGAGAC CTTCTGTTTCTC	336	GACATAGGTGTGA CCCTCACAAATC	340

[0730] 根据制造商的方案(Illumina)进行额外PCR以对于测序添加所需化学性质。在

Illumina MiSeq仪器上对扩增子测序。在消除具有低质量评分的读段之后,将读段与人类参考基因组(例如hg38)比对。将含有读段的所得档案映像至参考基因组(BAM档案),其中选择与目的靶区结构域重叠的读段且计算野生型读段的数目相对于含有插入、取代或缺失的读段的数目。

[0731] 编辑百分比(例如“编辑效率”或“编辑%”)定义为具有插入或缺失的序列读段的总数相比于包括野生型的序列读段的总数。

[0732] G. 体内的LNP递送

[0733] 在6-10周龄范围内的CD-1雌性小鼠用于各研究。对动物称重且根据体重分组以基于组平均体重制备施用溶液。经由侧尾静脉以每只动物0.2mL(每公斤体重大致10mL)的体积施用LNP。在给药后大致6小时,对动物观测副作用。在投药后二十四小时处测量体重,且动物通过在异氟烷麻醉下经由心脏穿刺放血而在各个时间点安乐死。将血液收集至血清分离管中或含有用于如本文所述的血浆的缓冲柠檬酸钠的管中。对于涉及体内编辑的研究,肝组织收集自来自各动物的中叶以用于DNA提取及分析。

[0734] H. 细胞因子诱导分析

[0735] 对于此分析,通过尾静脉切口收集大致50-100 μ L血液用于血清细胞因子测量。使血液在室温下凝固大致2小时,且接着在1000xg下离心10分钟,随后收集血清。测量IL-6、TNF- α 、IFN- α 及MCP-1的基于Luminex的磁珠多重分析(Affymetrix ProcartaPlus,目录号Exp040-00000-801)用于收集样品中的细胞因子分析。如制造商的方案中所指导地制备试剂盒试剂及标准品。将25 μ L小鼠血清添加至含有25 μ L稀释抗体涂布的磁珠的孔中。将平板在室温下孵育2小时且接着洗涤。稀释生物素抗体(50 μ L)添加至小珠且在室温下孵育1小时。再次洗涤小珠,随后添加50 μ L稀释抗生蛋白链菌素-PE至各孔,接着孵育30分钟。再次洗涤小珠且接着悬浮于100 μ L洗涤缓冲剂中且在Bio-Plex 200仪器(Bio-Rad)上读取。使用BioplexManager版本6.1分析程序包,通过使用五参数逻辑曲线拟合脱离标准曲线计算的细胞因子浓度分析数据。

[0736] I. 基因组DNA分离

[0737] 对于体内研究,使用基于小珠的提取试剂盒MagMAX-96DNA多样品试剂盒(ThermoFisher,目录号4413020),根据制造商的方案从10mg组织中提取基因组DNA,该方案包括使组织在裂解缓冲液中匀浆(大致400 μ L/10mg组织)。所有DNA样品标准化至100ng/ μ L浓度以用于PCR及后续NGS分析,如本文所述。

[0738] J. 运甲状腺素蛋白(TTR)ELISA分析

[0739] 收集血液且如所指示地分离血清。使用小鼠前白蛋白(运甲状腺素蛋白)ELISA试剂盒(Aviva SystemsBiology,目录号OKIA00111)测定总TTR血清水平。根据制造商的方案制备试剂盒试刺及标准品。通过1 $\times$ 分析稀释剂将小鼠血清稀释至10,000倍的最终稀释度。此如下进行:进行两个连续50倍稀释,产生2500倍稀释。进行最终4倍稀释步骤以使得总样品稀释度为10,000倍。标准曲线稀释液(各100 μ L)及稀释的血清样品均添加至预涂有捕捉抗体的ELISA板的各孔中。平板在室温下孵育30分钟,随后洗涤。添加酶-抗体缀合物(100 μ L/孔)进行20分钟孵育。移除非结合抗体缀合物且再次洗涤该平板,随后添加显色底物溶液。孵育该平板10分钟,随后添加100 μ L终止溶液,例如硫酸(大致0.3M)。在SpectraMax M5平板读取器上以450nm的吸光度读取该平板。使用脱离标准曲线的四参数逻辑曲线拟合通

过SoftMaxPro软件版本6.4.2计算血清TTR水平。对于分析稀释调节最终血清值。

[0740] 实施例2-改造经修饰的gRNA及体外测试

[0741] 以双指导形式(dgRNA)设计经修饰的gRNA,如表4中所示。因此,经修饰的crRNA及trRNA均经设计及化学合成以允许形成dgRNA的经修饰及未经修饰的组分的配对。这些配对以如图式中所指示的浓度转染至Neuro2A细胞中且通过NGS来测量编辑效率(例如编辑%),如实施例1中所述。

[0742] 靶向小鼠TTR基因的某些来自表4的经修饰的crRNA经Cas9 mRNA及未经修饰的trRNA(TR000002)转染。测试的指导包括SEQ ID No:1至18。如图1中所示,相比于未经修饰的对照,经修饰的crRNA中的一些(连同未经修饰的trRNA)赋予类似或增强的活性,而其他经修饰的crRNA降低活性。

[0743] 同时,来自表4的经修饰的trRNA经靶向小鼠TTR基因的相同序列的Cas9 mRNA连同未经修饰的crRNA(CR000686)转染。测试的指导包括SEQ ID No:188至200及204。如图2中所示,相比于未经修饰的对照,许多经修饰的trRNA(连同未经修饰的crRNA)赋予类似或增强的活性,而经修饰的trRNA中的一些降低活性。

[0744] 除取代化学修饰的核苷酸以外,测试的crRNA及trRNA配对中的一些也经序列取代改造,例如产生未发现于亲本序列中的G-C配对。测试的指导包括SEQ ID No:15及201;SEQ ID No:16及202;SEQ ID No:1及188。如图3中所示,相比于未经修饰的对照,一个此类配对(SEQ ID No:16及202)产生类似或增强的活性,而配对中的两个降低活性。

[0745] 随后,测试来自表4的经修饰的crRNA及经修饰的trRNA的配对。如图4中所示,相比于未经修饰的对照,经修饰的crRNA与经修饰的trRNA的配对中的一些赋予类似或增强的活性,而配对中的一些降低活性。在图4中,标题行描绘用于实验中的不同trRNA,且标题列描绘使用的不同crRNA。为了确定用于实验中的组合,将行与列匹配。TR000002及CR000686为未经修饰的对照(参见右下方细胞)。

[0746] 基于dgRNA设计,改造相应的单指导RNA(sgRNA),以具有经修饰的crRNA及trRNA中的一些的特征(aspect),如表4及图15D中所示。这些sgRNA,SEQ ID No:228至234也在Neuro2A细胞中测试,且如图5中所示,经修饰的sgRNA中的每一个显示与仅含有5'及3'端修饰的对照(G0000209;SEQ ID NO:228)类似的活性。

[0747] 对于表4及图6中描绘的额外dgRNA指导进行类似实验集合。测试的指导包括SEQ ID No:32至47及1。也靶向小鼠TTR基因的经修饰的crRNA经Cas9 mRNA及未经修饰的trRNA(TR000002)转染。如图6中所示,相比于未经修饰的对照(CR000686),一些经修饰的crRNA(连同未经修饰的trRNA)赋予类似或增强的活性,而其他经修饰的crRNA降低活性。

[0748] 同时,如图7中所示,来自表4的经修饰的trRNA经靶向小鼠TTR基因的相同序列的Cas9 mRNA连同未经修饰的crRNA(CR000686)转染。测试的指导包括SEQ ID No:205至222及1。如图7中所示,相比于未经修饰的对照(TR000002),许多经修饰的trRNA(连同未经修饰的crRNA)赋予类似或增强的活性,而经修饰的trRNA中的一些降低活性。

[0749] 除取代化学修饰的核苷酸以外,来自表4的测试的crRNA及trRNA配对中的一些也经序列取代改造,例如产生未发现于亲本序列中的G-C配对或G-U错配("GU摆动")。如图8中所示,相比于未经修饰的对照,修饰及配对中的一些赋予类似或增强的活性,而一些(例如"GU摆动"或错配的配对)降低活性。图8显示使用SEQ ID No:223至227及188中示出的trRNA

指导与SEQ ID No:48至52及1中示出的crRNA指导的结果。

[0750] 随后,如图9中所示地测试来自表4的经修饰的crRNA及经修饰的trRNA的选定配对。相比于未经修饰的对照,经修饰的crRNA与经修饰的trRNA的配对中的一些赋予类似或增强的活性,而配对中的一些降低活性。在图9中,标题行描绘用于实验中的不同trRNA,且标题列描绘使用的不同crRNA。为了确定用于实验中的组合,将行与列匹配。未经修饰的对照为TR000002及CR000686。

[0751] 也在纯粹生物化学分析(也即无细胞切割分析)中测试来自表4的经修饰的gRNA(dgRNA及sgRNA)中的一些。有趣的是,许多在Neuro2A细胞中在很大程度上非活性的经修饰的gRNA在生物化学分析中具活性,指示此类生物化学分析可能无法预测细胞阻止经修饰的gRNA活性(资料未示出)。

[0752] 实施例3.对于其他靶进一步测试经修饰的gRNA

[0753] 已确定某些修饰影响gRNA活性,随后测试这些修饰是否将在靶向(1)相同基因中的独立序列或(2)不同基因中的序列时影响活性。因此,靶向小鼠TTR基因中的另一序列以及小鼠因子-VII(FVII)基因中的序列的gRNA经改造及合成以具有实施例2中测试的某些修饰模式(参见表4)。这些gRNA以如图式中所指示的浓度转染至Neuro2A细胞中且通过NGS来测量编辑效率(例如编辑%),如实施例1中所述。

[0754] 靶向小鼠TTR基因(与实施例2中所靶向不同的序列)或小鼠FVII基因的来自表4的经修饰的crRNA经Cas9 mRNA及未经修饰的trRNA(TR000002)转染。测试的指导包括图12A及12B中所展示的那些。相比于未经修饰的对照,一些经修饰的crRNA(连同未经修饰的trRNA)赋予类似或增强的活性,而其他经修饰的crRNA降低活性。

[0755] 同时,来自表4的经修饰的trRNA经靶向小鼠TTR基因的相同序列(CR000705;与实施例2中所靶向不同的序列)或与小鼠FVII基因相同的序列(CR000657)的Cas9 mRNA连同未经修饰的crRNA转染。如图13A及13B中所示,相比于未经修饰的对照,许多经修饰的trRNA(连同未经修饰的crRNA)赋予类似或增强的活性,而经修饰的trRNA中的一些降低活性。此数据显示某些修饰模式倾向于经不同序列具有类似效应。

[0756] 基于上文所述的dgRNA设计,改造相应的单指导RNA(sgRNA)以具有经修饰的crRNA及trRNA中的一些的态样。参见表4。也在Neuro2A细胞中测试这些sgRNA。结果显示于图10(小鼠TTR)及图11(小鼠FVII)中。这些实验显示一些修饰模式即使在靶向不同基因时也产生类似效应。

[0757] 实施例4.体内测试经修饰的gRNA

[0758] 在体外测试之后,将经修饰的sgRNA在六个独立研究中递送至动物以判定修饰是否赋予体内编辑任何益处。

[0759] LNP经IVTCas9 mRNA连同化学修饰的sgRNA(靶向TTR或FVII)配制,如实施例1中所述。按RNA组分的重量计,mRNA:sgRNA的比率大致为1:1。除非另外规定,否则用于此实施例中所述的研究中的Cas9 mRNA具有SEQ ID NO:360的序列且LNP是使用上文所述的LNP配制方案A配制。

[0760] 在一个实验中,以2mg/kg向小鼠(n=5只每组)施用LNP的单次剂量且在给药后四小时收集血液用于血清细胞因子分析。给药后7天,在尸检时收集肝及血液分别用于编辑效率的NGS测量及血清TTR分析。此实验中的sgRNA中的每一个靶向TTR基因中的相同序列,

sgRNA之间的唯一差别为对每一个作出的修饰(参见图14A至D及15A至E;表4SEQ ID No:228至234)。G000209(测试两个批次)充当较少修饰的对照,仅分别在sgRNA的5'及3'末端处的三个末端核苷酸处及之间具有2'-O-甲基修饰及硫代磷酸酯键。(参见图15D)。

[0761] 图14A至D中展示的结果显示相比于较少修饰的G000209对照,在更大程度上修饰的sgRNA倾向于对于分析的细胞因子中的每一个诱发较小反应。在更大程度上修饰的sgRNA也在治疗的动物的肝中赋予较大编辑效率,其中相比于较少修饰的对照(G000209批次)的约44-47%,在更大程度上修饰的sgRNA中的两者(例如G000263及G000267)的编辑%达到约60%(图15A)。重要的是,编辑效率与表型变化相关,因为TTR水平的血清敲低与较少修饰的对照相当或显著更大(参见例如图15A至15B中的G000263及G000267相对于G000209批次)。末端修饰的G000209与高度修饰的G000267之间的差异概述于图15D及15E中(2'-O-Me修饰核苷酸以粗体显示,且*表示硫代磷酸酯键)。

[0762] 在另一体内研究中,测试三种靶向小鼠TTR基因中的独立序列的sgRNA。以2mg/kg、1mg/kg或0.3mg/kg向小鼠(n=5只每组)施用LNP的单次剂量。在给药后四小时收集血液用于血清细胞因子分析。给药后7天,在尸检时收集肝及血液分别用于编辑效率的NGS测量及血清TTR分析。在此研究中,sgRNA中的每一个靶向TTR基因中的相同序列(与前述体内研究中靶向的序列不同的序列),其中一个sgRNA完全未经修饰(G000201(SEQ ID NO:243)),另一个仅具有末端修饰(G000211(SEQ ID NO:241)),分别在sgRNA的5'及3'末端处的三个末端核苷酸处及之间具有2'-O-甲基修饰及硫代磷酸酯键),且第三个sgRNA具有与前述体内研究中的G000267相同的修饰模式(G000282(SEQ ID NO:242))。

[0763] 如图16A至16D中所示,sgRNA中的每一个对于测试的细胞因子中的每一个以剂量依赖性方式产生类似反应。对于编辑效率,未经修饰的sgRNA(G000201(SEQ ID NO:243))赋予极小体内编辑,而在很大程度上修饰的sgRNA(G000282(SEQ ID NO:242))在2mg/kg的剂量下赋予达到约60%的水平,其显著大于在较少修饰的sgRNA(G000211(SEQ ID NO:241))的情况下实现的水平(图17A及B)。如同前述体内研究,编辑水平与血清TTR敲除的量相关(图17C及D)。

[0764] 随后通过靶向小鼠TTR基因中的不同TTR序列(靶向与两个前述体内研究中靶向的序列不同的序列)的另外三个sgRNA的集合进行与第二体内研究类似的研究。以2mg/kg、1mg/kg或0.3mg/kg向小鼠(n=5只每组)施用LNP的单次剂量。在给药后四小时收集血液用于血清细胞因子分析。给药后7天,在尸检时收集肝及血液分别用于编辑效率的NGS测量及血清TTR分析。在此研究中,sgRNA中的每一个靶向TTR基因中的相同序列(与前述两个体内研究中靶向的序列不同的序列),其中一个sgRNA完全未经修饰(G000285;(SEQ ID NO:332)),另一个仅具有末端修饰(G000269(SEQ ID NO:330)),分别在sgRNA的5'及3'末端处的三个末端核苷酸处及之间具有2'-O-甲基修饰及硫代磷酸酯键),且第三个sgRNA具有与前述两个体内研究中的G000267及G000282相同的修饰模式(G000283(SEQ ID NO:331))。

[0765] 在此研究中,未经修饰的sgRNA(G000285(SEQ ID NO:332))赋予极小体内编辑,而在很大程度上修饰的sgRNA(G000283(SEQ ID NO:331))在2mg/kg的剂量下赋予达到约60%的水平,其显著大于在较少修饰的sgRNA(G000269(SEQ ID NO:330))的情况下实现的水平(图18A至18B)。如同前述体内研究,编辑水平与血清TTR敲除的量相关(图18C)。

[0766] 在第四体内研究中,对于另一基因(FVII)评估对gRNA的修饰的效应。对于研究内

比较,包括第一体内研究中测试的sgRNA中的两个(G000209及G000267)。以2mg/kg、1mg/kg或0.3mg/kg向小鼠(n=5只每组)施用LNP的单次剂量且在给药后四小时收集血液用于血清细胞因子分析。在给药后6天,在尸检时收集肝用于编辑效率的NGS测量。在此研究中,sgRNA中的每一个靶向TTR或FVII基因中的相同序列,其中各基因的一个sgRNA仅具有末端修饰,对于FVII为(G000208(SEQ ID NO:286)),对于TTR为G000209,两者分别在sgRNA的5'及3'末端处的三个末端核苷酸处及之间具有2'-O-甲基修饰及硫代磷酸酯键),且第二个sgRNA与对于FVII之前述体内研究中的G000267、G000282及G000283(G000373(SEQ ID NO:287));对于TTR的G000267(SEQ ID NO:234)具有相同的修饰模式)。

[0767] 如图19A至19D中所示,sgRNA中的每一个对于测试的细胞因子中的每一个以剂量依赖性方式产生类似反应。对于编辑效率,相比于较少修饰的形式(G000208(SEQ ID NO:286)),靶向FVII的在更大程度上修饰的sgRNA(G000373(SEQ ID NO:287))的编辑效率在测试的剂量中的每一个中增加(图18A)。也对于靶向TTR的sgRNA观测到这些结果(图20A至20B)。

[0768] 在另一体内研究中,测试另外十个与G000282靶向小鼠TTR基因中的相同序列的sgRNA。G000282也包括于研究中用于比较目的。以1mg/kg或0.5mg/kg向小鼠(n=5只每组)施用LNP的单次剂量。使用上文所述的LNP配制方案B配制用于此研究中的LNP。给药后七(7)天,在尸检时收集肝及血液分别用于编辑效率的NGS测量及血清TTR分析。在此研究中,sgRNA中的每一个靶向TTR基因中的相同序列。测试的各sgRNA的修饰模式变化且包括sgRNA的5'末端区、3'末端区、发夹1区、发夹2区、连接区、下部茎区、突起区及上部茎区中的2'-OMe、2'-F及PS修饰。此研究的结果显示于图22A至22C中,包括编辑%(图22A)、平均编辑及标准差(图22B)及血清TTR水平(图22C)。根据本文所描述的方法在初生小鼠肝细胞中测试这些相同sgRNA。此剂量反应TTR编辑研究的结果显示于图24A至24C中,包括编辑%(图24A)、剂量反应曲线(图24B)及EC50值(图24C)。

[0769] 在另一体内研究中,测试另外十三个与G000282靶向小鼠TTR基因中的相同序列的sgRNA。G000282也包括于研究中用于比较目的。以1mg/kg向小鼠(n=5只每组)施用LNP的单次剂量。使用上文所述的LNP配制方案C配制用于此研究中的LNP。用于此研究中的Cas9mRNA具有SEQ ID NO:359的序列。在给药后四小时收集血液用于血清细胞因子分析。在给药后7天,在尸检时收集肝及血液分别用于编辑效率的NGS测量及血清TTR分析。在此研究中,sgRNA中的每一个靶向TTR基因中的相同序列。测试的sgRNA包括sgRNA的5'末端区、3'末端区、发夹1区、发夹2区及上部茎区中的额外2'-OMe及PS修饰。此研究的结果显示于图23A-23C中,包括编辑%(图23A)、平均编辑%(图23B)及血清TTR水平(图23C)。

[0770] 本公开的一些实施方案:

[0771] 1.单指导RNA,其包含5'端修饰及以下一个或多个中的一个或多个修饰:

[0772] a.上部茎区;

[0773] b.发夹1区;及

[0774] c.发夹2区,

[0775] 其中5'端修饰在5'末端的5'端处的前七个核苷酸内包含至少两个硫代磷酸酯(PS)键。

[0776] 2.如实施方案1的sgRNA,其中至少一个修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷

酸。

[0777] 3.如实施方案1或实施方案2的sgRNA,其中至少一个修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。

[0778] 4.如实施方案1至3中任一项的sgRNA,其中至少一个修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。

[0779] 5.如实施方案1至4中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含上部茎区中的一个或多个修饰。

[0780] 6.如实施方案5的sgRNA,其包含US1至US12处的修饰。

[0781] 7.如实施方案1至6中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含发夹1区中的一个或多个修饰。

[0782] 8.如实施方案7的sgRNA,其中sgRNA包含H1-1处的修饰。

[0783] 9.如实施方案1至8中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含发夹2区中的一个或多个修饰。

[0784] 10.如实施方案9的sgRNA,其中sgRNA包含H2-1处的修饰。

[0785] 11.如实施方案1至10中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含H1-1至H1-12处的修饰。

[0786] 12.如实施方案1至11中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含H2-1至H2-15处的修饰。

[0787] 13.如实施方案1至12中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含上部茎区、发夹1区及发夹2区中的每一个中的一个或多个修饰。

[0788] 14.如实施方案1至13中任一项的sgRNA,其中sgRNA包含发夹1区与发夹2区之间的经修饰的核苷酸。

[0789] 15.如实施方案1至14中任一项的sgRNA,其进一步包含含有修饰的下部茎区。

[0790] 16.如实施方案1至15中任一项的sgRNA,其进一步包含含有修饰的3'末端区。

[0791] 17.如实施方案16的sgRNA,其进一步包含3'末端中的3'端修饰。

[0792] 18.如实施方案17的sgRNA,其中3'末端的3'端处的最后四个核苷酸中的至少两者经修饰。

[0793] 19.如实施方案17的sgRNA,其中3'末端的3'端处的最后四个核苷酸中的至少两者经2'-O-Me、2'-F或2'-O-moe修饰。

[0794] 20.如实施方案17至19中任一项的sgRNA,其进一步包含3'末端的3'端处的最后四个核苷酸中的一个或多个之间的硫代磷酸酯(PS)键。

[0795] 21.如实施方案1至20中任一项的sgRNA,其进一步包含含有修饰的突起区。

[0796] 22.如实施方案1至21中任一项的sgRNA,其进一步包含含有修饰的连接区。

[0797] 23.如实施方案1至22中任一项的sgRNA,其中5'末端的5'端处的至少前三个核苷酸及3'末端的3'端处的最后三个核苷酸经修饰。

[0798] 24.如实施方案1至23中任一项的sgRNA,其中5'末端的5'端处的前四个核苷酸及3'末端的3'端处的最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。

[0799] 25.如实施方案24的sgRNA,其中端修饰包含2'-O-Me。

[0800] 26.如实施方案24的sgRNA,其中端修饰包含2'-F。

[0801] 27.如实施方案1至26中任一项的sgRNA,其中5'末端的5'端处的前四个核苷酸及3'末端的3'端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端的5'端处的前三个核苷酸及

3'末端的3'端处的最后三个核苷酸包含2'-O-Me修饰。

[0802] 28.如实施方案1至26中任一项的sgRNA,其中5'末端处的前四个核苷酸及3'末端处的最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端处的前三个核苷酸及3'末端处的最后三个核苷酸包含2'-O-Me、2'-F及/或2'-O-moe修饰。

[0803] 29.如实施方案1至28中任一项的sgRNA,其中LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及/或LS12经2'-O-Me修饰。

[0804] 30.如实施方案1至29中任一项的sgRNA,其中突起区核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0805] 31.如实施方案1至29中任一项的sgRNA,其中突起区核苷酸中的至少50%经2'-O-Me修饰。

[0806] 32.如实施方案1至31中任一项的sgRNA,其中上部茎区核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0807] 33.如实施方案1至32中任一项的sgRNA,其中连接区中的N16、N17及/或N18经2'-O-Me修饰。

[0808] 34.如实施方案1至32中任一项的sgRNA,其中连接区中的N15、N16、N17及/或N18经修饰。

[0809] 35.如实施方案33或实施方案34的sgRNA,其中连接区中的修饰选自2'-O-Me及2'-F。

[0810] 36.如实施方案32至35中任一项的sgRNA,其中N16、N17及N18与PS键连接。

[0811] 37.如实施方案1至36中任一项的sgRNA,其中发夹1区核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0812] 38.如实施方案1至37中任一项的sgRNA,其中发夹2区核苷酸中的每一个经2'-O-Me修饰。

[0813] 39.单指导RNA(sgRNA),其包含以下位置处的2'-O-Me修饰核苷酸:

[0814] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸;

[0815] b.下部茎区中的LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及/或LS12;

[0816] c.突起区中的B1及/或B2;

[0817] d.上部茎区中的各核苷酸;

[0818] e.连接区中的N16、N17及/或N18;

[0819] f.发夹1区中的各核苷酸;

[0820] g.发夹2区中的各核苷酸;及

[0821] h.3'末端处的最后四个核苷酸。

[0822] 40.如实施方案39的sgRNA,其中B3至B6经2'-O-Me修饰。

[0823] 41.如实施方案39的sgRNA。其进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0824] 42.如前述实施方案中任一项的sgRNA,其中LS9及LS10例如经2'-F或2'-OMe修饰。

[0825] 43.如前述实施方案中任一项的sgRNA,其中N15、N16、N17及N18例如经2'-F或2'-OMe修饰。

[0826] 44.如前述实施方案中任一项的sgRNA,其中H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-

14及H2-15经2'-F修饰。

[0827] 45.如前述实施方案中任一项的sgRNA,其中3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸经2'-F修饰。

[0828] 46.单指导RNA (sgRNA),其包含以下位置处的2'-F修饰核苷酸:

[0829] a.下部茎区中的LS9及LS10;

[0830] b.连接区中的N15、N16、N17及N18;及

[0831] c.发夹2区中的H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14及H2-15。

[0832] 47.如实施方案46的sgRNA,其进一步包含3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸。

[0833] 48.如实施方案46或实施方案47的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯 (PS) 键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。

[0834] 49.如实施方案46至48中任一项的sgRNA,其进一步包含5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸及3'末端的3'端处的最后四个核苷酸中的三个处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸。

[0835] 50.单指导RNA (sgRNA),其包含:

[0836] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0837] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0838] c.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0839] d.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及

[0840] e.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0841] 51.如实施方案50的sgRNA,其进一步包含LS1及/或LS6处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0842] 52.如实施方案50或实施方案51的sgRNA,其进一步包含发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0843] 53.单指导RNA (sgRNA),其包含:

[0844] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0845] b.LS1至LS6处的2'-F修饰核苷酸;

[0846] c.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0847] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0848] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0849] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及

[0850] g.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。

[0851] 54.单指导RNA (sgRNA),其包含:

[0852] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0853] b.LS2至LS5处的2'-F修饰核苷酸;

[0854] c.LS1及LS6处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0855] d.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0856] e.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

[0857] f.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;

- [0858] g.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0859] h.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0860] 55.单指导RNA(sgRNA),其包含
- [0861] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0862] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0863] c.LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0864] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0865] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0866] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0867] g.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0868] 56.单指导RNA(sgRNA),其包含
- [0869] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0870] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0871] c.LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0872] d.LS9及LS10处的2'-F修饰核苷酸;
- [0873] e.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0874] f.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0875] g.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0876] h.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0877] 57.单指导RNA(sgRNA),其包含
- [0878] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0879] b.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0880] c.LS8、LS10及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0881] d.LS7、LS9及LS11处的2'-O-F修饰的核苷酸;
- [0882] e.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0883] f.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0884] g.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0885] h.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0886] 58.单指导RNA(sgRNA),其包含:
- [0887] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0888] b.LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸
- [0889] c.US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0890] d.H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0891] e.发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0892] f.H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0893] g.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0894] 59.单指导RNA(sgRNA),其包含
- [0895] a.5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0896] b.LS1、LS6、LS7、LS8、LS11及LS12处的2'-O-Me修饰核苷酸;

- [0897] c. LS9及LS10处的2'-F修饰核苷酸;
- [0898] d. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0899] e. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0900] f. 发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0901] g. H2-1至H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0902] h. 3'末端的3'端处的最后四个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0903] 60. 单指导RNA (sgRNA), 其包含
- [0904] a. 5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0905] b. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0906] c. H1-1至H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0907] d. 发夹1区与发夹2区之间的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0908] e. H2-1至H2-8处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0909] f. H2-9至H2-15处的2'-F修饰核苷酸;
- [0910] g. 3'末端处的倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸;及
- [0911] h. 3'末端的3'端处的最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0912] 61. 单指导RNA (sgRNA), 其包含
- [0913] a. 5'末端的5'端处的前三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0914] b. US1至US12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0915] c. H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10及H1-12处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0916] d. H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9及H1-11处的2'-F修饰核苷酸;
- [0917] e. 发夹1区与发夹2区之间的2'-F修饰核苷酸;
- [0918] f. H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12及H2-14处的2'-F修饰核苷酸;
- [0919] g. H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13及H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;
- [0920] h. 3'末端处的倒数第二个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸;及
- [0921] i. 3'末端的3'端处的倒数第三个及最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0922] 62. 如实施方案50至61中任一项的sgRNA, 其进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯 (PS) 键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0923] 63. 如实施方案50至61中任一项的sgRNA, 其进一步包含5'末端的5'端处的前七个核苷酸内的至少一个硫代磷酸酯 (PS) 键。
- [0924] 64. 单指导RNA (sgRNA), 其包含
- [0925] a. LS8、LS10、LS12、H1-2、H1-4、H1-6、H1-8、H1-10、H1-12、H2-1、H2-3、H2-5、H2-7、H2-9、H2-11、H2-13及H2-15处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0926] b. LS7、LS9、LS11; H1-1、H1-3、H1-5、H1-7、H1-9、H1-11、H1-13、H2-2、H2-4、H2-6、H2-8、H2-10、H2-12及H2-14处的2'-F修饰核苷酸。
- [0927] 65. 如实施方案64的sgRNA, 其进一步包含三个连接5'末端的5'端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯 (PS) 键及三个连接3'末端的3'端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0928] 66. 如实施方案64或实施方案65的sgRNA, 其进一步包含

- [0929] a. 3'末端的3'端处的最后一个及倒数第三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸;及
- [0930] b. 3'末端的3'端处的倒数第二个及倒数第四个核苷酸处的2'-F修饰核苷酸。
- [0931] 67. 包含SEQ ID No:228至332中任一个的sgRNA,其包括表4的修饰。
- [0932] 68. 包含SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个的sgRNA,其包括表4的修饰。
- [0933] 69. sgRNA,其包含SEQ ID No:240。
- [0934] 70. 包含SEQ ID No:240的sgRNA,其包括表4的修饰。
- [0935] 71. 包含SEQ ID No:242的sgRNA,其包括表4的修饰。
- [0936] 72. sgRNA,其包含SEQ ID No:242的修饰,如表4中所示。
- [0937] 73. sgRNA,其包含SEQ ID No:358。
- [0938] 74. sgRNA,其包含与SEQ ID No:235至240、265至285及309至329中任一个的核酸具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中对应于表4中参考序列标识符的核苷酸的sgRNA的各核苷酸处的修饰与表4中的参考序列标识符中示出的修饰相同或等效。
- [0939] 75. 如实施方案66至74中任一项的sgRNA,其进一步包含三个连接5'末端处的前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端处的最后四个核苷酸的PS键。
- [0940] 75. 如实施方案1至74中任一项的sgRNA,其进一步包含至少三个连接发夹1区中的核苷酸的PS键。
- [0941] 76. 如实施方案1至75中任一项的sgRNA,其进一步包含至少三个连接发夹2区中的核苷酸的PS键。
- [0942] 77. 如实施方案1至76中任一项的sgRNA,其进一步包含至少三个连接上部茎区中的核苷酸的PS键。
- [0943] 78. 如实施方案1至77中任一项的sgRNA,其中sgRNA与酿脓链球菌Cas9形成核糖核蛋白复合物。
- [0944] 79. 指导RNA,其包含上部茎区中的各核苷酸处的2'-O-Me修饰。
- [0945] 80. 指导RNA,其包含以下核苷酸中的一、二、三或四、五、六、七、八、九、十或十一个处的2'-O-Me修饰:US1、US2、US3、US4、US5、US6、US7、US8、US9、US10、US11及US12。
- [0946] 81. 指导RNA,其包含发夹1区及发夹2区核苷酸中50%或大于50%处的2'-O-Me修饰。
- [0947] 82. 指导RNA,其包含上部茎区中的各核苷酸处的2'-O-Me修饰以及发夹1区及发夹2区核苷酸中50%或大于50%处的2'-O-Me修饰。
- [0948] 83. 指导RNA,其包含起始于H2-1或H2-2处的各核苷酸至3'末端的最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰,或由起始于H2-1或H2-2处的各核苷酸至3'末端的最后一个核苷酸处的2'-O-Me修饰组成。
- [0949] 84. 指导RNA,其包含LS1及/或LS6处的2'-O-Me修饰及LS2至LS5处无修饰,或由LS1及/或LS6处的2'-O-Me修饰及LS2至LS5处无修饰组成。
- [0950] 85. 指导RNA,其包含LS8、LS9、LS10、LS11及/或LS12中的2个或大于2个处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0951] 86. 如实施方案85的指导RNA,其中至少LS8及LS10经2'-O-Me修饰。

- [0952] 87.如实施方案79至86中任一项的指导RNA,其进一步包含连接区中核苷酸中50%或大于50%处的2'-O-Me修饰。
- [0953] 88.如实施方案87的指导RNA,其中连接区核苷酸中的至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%经2'-O-Me修饰。
- [0954] 89.指导RNA,其包含连接区中至多50%核苷酸处的2'-O-Me修饰。
- [0955] 90.指导RNA,其包含连接区中四个或大于四个核苷酸处的2'-O-Me修饰。
- [0956] 91.如实施方案90的指导RNA,其中连接区中核苷酸N2至N6中的至少一个、两个、三个、四个或五个经2'-O-Me修饰。
- [0957] 92.指导RNA,其包含连接区中十个或大于十个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0958] 93.如实施方案92的指导RNA,其中至少N2至N6经2'-O-Me修饰。
- [0959] 94.指导RNA,其包含突起区中核苷酸中50%或大于50%处的2'-O-Me修饰。
- [0960] 95.如实施方案94的指导RNA,其中突起区核苷酸中的至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%经2'-O-Me修饰。
- [0961] 96.如实施方案94的指导RNA,其中B2、B3及/或B4经2'-O-Me修饰。
- [0962] 97.指导RNA,其包含突起区中的三个或大于三个核苷酸处的2'-O-Me修饰核苷酸。
- [0963] 98.如实施方案97的指导RNA,其中B2、B3及/或B4经2'-O-Me修饰。
- [0964] 99.包含SEQ ID NO:357核苷酸的指导RNA,其具有如前述实施方案中任一项的指导RNA的修饰模式。
- [0965] 100.包含SEQ ID NO:356核苷酸的指导RNA,其具有如前述实施方案中任一项的指导RNA的修饰模式。
- [0966] 101.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其进一步包含5'末端区的5'端处前三个、四个或五个核苷酸处的2'-O-Me修饰。
- [0967] 102.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其进一步包含3'末端区的3'端处最后三个、最后四个或最后五个核苷酸处的2'-O-Me修饰。
- [0968] 103.如实施方案102的指导RNA,其中3'末端区的3'端处最后一个核苷酸未经修饰。
- [0969] 104.如实施方案102的指导RNA,其中仅3'末端区的3'端处倒数第二个及倒数第三个核苷酸经修饰。
- [0970] 105.如实施方案102的指导RNA,其中仅3'末端区中倒数第二个、倒数第三个及倒数第四个核苷酸经修饰。
- [0971] 106.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其进一步包含5'末端的5'端处前三个、四个或五个核苷酸之间的PS键。
- [0972] 107.如实施方案106的指导RNA,其中5'末端的5'端处前四个核苷酸与PS键连接。
- [0973] 108.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其进一步包含3'末端的3'端处最后三个、四个或五个核苷酸之间的PS键。
- [0974] 109.如实施方案108的指导RNA,其中3'末端的3'端处最后四个核苷酸与PS键连接。
- [0975] 110.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中5'末端的5'端处前三个或四个核苷酸及3'末端的3'端处的最后三个或四个核苷酸包含2'-O-Me修饰。

[0976] 111.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中5'末端的5'端处前三个或四个核苷酸与PS键连接,且3'末端的3'端处最后三个或四个核苷酸与PS键连接。

[0977] 112.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中5'末端的5'端处前三个或四个核苷酸包含2'-O-Me修饰且与PS键连接,及3'末端的3'端处最后三个或四个核苷酸包含2'-O-Me修饰且与PS键连接。

[0978] 113.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中核苷酸LS8、LS9、LS10、LS11及LS12中的至少两者包含2'-O-Me修饰。

[0979] 114.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中至少LS8及LS10经2'-O-Me修饰。

[0980] 115.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中连接区核苷酸中的至少50%经2'-O-Me修饰。

[0981] 116.如实施方案115的指导RNA,其中连接区核苷酸中的至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%经2'-O-Me修饰。

[0982] 117.如实施方案115的指导RNA,其中至少N2至N6经2'-O-Me修饰。

[0983] 118.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中连接区核苷酸中的至少十个经2'-O-Me修饰。

[0984] 119.如实施方案115的指导RNA,其中至少N2至N6经2'-O-Me修饰。

[0985] 120.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中突起区核苷酸中的至少50%经2'-O-Me修饰。

[0986] 121.如实施方案120的指导RNA,其中突起区核苷酸中的至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%经2'-O-Me修饰。

[0987] 122.如实施方案121的指导RNA,其中B2、B3及/或B4经2'-O-Me修饰。

[0988] 123.如实施方案79至100中任一项的指导RNA,其中突起区核苷酸中的至少三个经2'-O-Me修饰。

[0989] 124.如实施方案123的指导RNA,其中B2、B3及/或B4经2'-O-Me修饰。

[0990] 125.如实施方案79至124中任一项的指导RNA,其中指导RNA为sgRNA。

[0991] 126.如实施方案79至125中任一项的指导RNA,其中指导RNA为dgRNA。

[0992] 127.如实施方案81或82的指导RNA,其中发夹1区及发夹2区核苷酸中的至少55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%经2'-OMe修饰。

[0993] 128.如实施方案79至127中任一项的指导RNA,其中sgRNA与酿脓链球菌Cas9形成核糖核蛋白复合体。

[0994] 129.单指导RNA(sgRNA),其包含以下处的2'-O-Me修饰核苷酸或由以下处的2'-O-Me修饰核苷酸组成:

[0995] a.5'末端的5'端处前三个核苷酸;

[0996] b.上部茎区中的各核苷酸;

[0997] c.发夹1区中的各核苷酸;

[0998] d.发夹1区与发夹2区之间的核苷酸;

[0999] e.发夹2区中的各核苷酸;及

[1000] f.3'末端的3'端处的最后四个核苷酸。

[1001] 130.如实施方案129的sgRNA,其进一步包含连接5'末端的5'端处前四个核苷酸的PS键及连接3'末端的3'端处最后四个核苷酸的PS键。

[1002] 131.具有如SEQ ID NO:350、351、352或353所示的修饰模式的sgRNA,如表4中所示。

[1003] 132.单指导RNA(sgRNA),其包含以下处的2'-O-Me修饰核苷酸或由以下处的2'-O-Me修饰核苷酸组成:

[1004] a.5'末端的5'端处前三个、四个、五个或七个核苷酸;

[1005] b.上部茎区中的各核苷酸;

[1006] c.发夹1区中的各核苷酸;

[1007] d.发夹1区与发夹2区之间的核苷酸;

[1008] e.发夹2区中的各核苷酸;及

[1009] f.3'末端的3'端处最后四个核苷酸。

[1010] 133.单指导RNA(sgRNA),其包含以下处的2'-O-Me修饰核苷酸或由以下处的2'-O-Me修饰核苷酸组成:

[1011] a.5'末端的5'端处前三个、四个、五个或七个核苷酸;

[1012] b.核苷酸US1、US2、US3、US4、US5、US6、US7、US8、US9、US10、US11及US12中的每一个;

[1013] c.核苷酸H1-1、H1-2、H1-3、H1-4、H1-5、H1-6、H1-7、H1-8、H1-9、H1-10、H1-11及H1-12中的每一个;

[1014] d.发夹1区与发夹2区之间的核苷酸;

[1015] e.核苷酸H2-1、H2-2、H2-3、H2-4、H2-5、H2-6、H2-7、H2-8、H2-9、H2-10、H2-11、H2-12、H2-13、H2-14及H2-15中的每一个;及

[1016] f.3'末端的3'端处最后四个核苷酸。

[1017] 134.如实施方案129至133中任一项的sgRNA,其进一步包含连接5'末端的5'端处前四个核苷酸的PS键及连接3'末端的3'端处最后四个核苷酸的PS键。

[1018] 135.sgRNA,其具有如表4中所示的SEQ ID NO:350、351、352或353的修饰模式。

[1019] 136.如实施方案129至135中任一项的sgRNA,其中sgRNA与酿脓链球菌Cas9形成核糖核蛋白复合物。

[1020] 137.crispr RNA(crRNA),其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰:

[1021] a.5'末端的5'端处前五个核苷酸;

[1022] b.下部茎区;

[1023] c.突起区;

[1024] d.上部茎区;及

[1025] e.crRNA的3'端处最后五个核苷酸。

[1026] 138.如实施方案136的crRNA,其进一步包含5'端修饰,其中5'端修饰包含5'末端的5'端处前七个核苷酸内的一个或多个硫代磷酸酯键。

[1027] 139.如实施方案136的crRNA,其进一步包含5'端修饰,其中5'端修饰包含5'末端的5'端处前七个核苷酸内的至少两个硫代磷酸酯键。

[1028] 140.如实施方案137至139中任一项的crRNA,其中至少一个修饰包含2'-O-甲基

(2' -O-Me) 修饰的核苷酸。

[1029] 141. 如实施方案137至140中任一项的crRNA, 其中至少一个修饰包含2' -氟(2' -F) 修饰的核苷酸。

[1030] 142. 如实施方案137至141中任一项的crRNA, 其中至少一个修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS) 键。

[1031] 143. 如实施方案137至142中任一项的crRNA, 其中5' 末端的5' 端处前三个核苷酸及3' 末端的3' 端处最后三个核苷酸经修饰。

[1032] 144. 如实施方案137至143中任一项的crRNA, 其中5' 末端的5' 端处前四个核苷酸及3' 末端的3' 端处最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS) 键连接。

[1033] 145. 如实施方案143的crRNA, 其中修饰包含2' -O-Me。

[1034] 146. 如实施方案143的crRNA, 其中修饰包含2' -F。

[1035] 147. 如实施方案137至146中任一项的crRNA, 其中5' 末端的5' 端处前四个核苷酸及3' 末端的3' 端处最后四个核苷酸与PS键连接。且其中5' 末端的5' 端处前三个核苷酸及3' 末端的3' 端处最后三个核苷酸包含2' -O-Me修饰。

[1036] 148. 如实施方案137至146中任一项的crRNA, 其中5' 末端的5' 端处前四个核苷酸及3' 末端的3' 端处最后四个核苷酸与PS键连接, 且其中5' 末端的5' 端处前三个核苷酸及3' 末端的3' 端处最后三个核苷酸包含2' -F修饰。

[1037] 149. 如实施方案137至148中任一项的crRNA, 其中LS1及LS6经2' -O-Me修饰。

[1038] 150. 如实施方案137至149中任一项的crRNA, 其中上部茎区核苷酸中的每一个经2' -O-Me修饰。

[1039] 151. crispr RNA(crRNA), 其包含以下处的2' -O-Me修饰核苷酸:

[1040] a. 下部茎区中的LS1及LS6; 及

[1041] b. 上部茎区中的各核苷酸。

[1042] 152. 如实施方案151的crRNA, 其进一步包含三个连接5' 末端的5' 端处前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS) 键及三个连接3' 末端的3' 端处最后四个核苷酸的PS键。

[1043] 153. 如实施方案151或实施方案152的crRNA, 其进一步包含5' 末端的5' 端处前三个核苷酸处的2' -O-Me或2' -F修饰核苷酸及3' 末端的3' 端处最后三个核苷酸处的2' -O-Me或2' -F修饰核苷酸。

[1044] 154. 如实施方案137至153中任一项的crRNA, 其中LS1、LS2及LS6经2' -F修饰。

[1045] 155. 如实施方案137至154中任一项的crRNA, 其中突起区中的各核苷酸经2' -F修饰。

[1046] 156. crisprRNA(crRNA), 其包含以下处的2' -F修饰核苷酸:

[1047] a. 下部茎区中的LS1、LS2及LS6; 及

[1048] b. 突起区中的各核苷酸。

[1049] 157. 如实施方案137至156中任一项的crRNA, 其进一步包含三个连接5' 末端的5' 端处前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS) 键及三个连接3' 末端的3' 端处最后四个核苷酸的PS键。

[1050] 158. 如实施方案137至157中任一项的crRNA, 其进一步包含5' 末端的5' 端处前三个核苷酸处的2' -O-Me或2' -F修饰核苷酸及3' 末端的3' 端处最后三个核苷酸处的2' -O-Me

或2'-F修饰核苷酸。

[1051] 159. 包含SEQ ID No:1至187中任一个的crRNA,其包括表4的修饰。

[1052] 160. 包含SEQ ID No:19至31、53至73、104至130及161至187中任一个的crRNA,其包括表4的修饰。

[1053] 161. crRNA,其包含与SEQ ID No:19至31、53至73、104至130及161至187中任一个具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中对应于表4中参考序列标识符的核苷酸的crRNA的各核苷酸处的修饰与表4中的参考序列标识符中示出的修饰相同或等效。

[1054] 162. 如实施方案159至161中任一项的crRNA,其进一步包含三个连接5'末端的5'端处前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处最后四个核苷酸的PS键。

[1055] 163. 如实施方案137至162中任一项的crRNA,其中与trRNA组合的crRNA与酿脓链球菌Cas9形成核糖核蛋白复合体。

[1056] 164. tracrRNA(trRNA),其包含以下区中的一个或多个中的一个或多个修饰:

[1057] a. 5'末端的5'端处前五个核苷酸;

[1058] b. 上部茎区;

[1059] c. 突起区;

[1060] d. 下部茎区;

[1061] e. 连接区;

[1062] f. 发夹1区;

[1063] g. 发夹2区;及

[1064] h. 3'末端的3'端处最后五个核苷酸。

[1065] 165. 如实施方案164的trRNA,其中至少一个修饰包含2'-O-甲基(2'-O-Me)修饰的核苷酸。

[1066] 166. 如实施方案164或实施方案165的trRNA,其中至少一个修饰包含2'-氟(2'-F)修饰的核苷酸。

[1067] 167. 如实施方案164至166中任一项的trRNA,其中至少一个修饰包含核苷酸之间的硫代磷酸酯(PS)键。

[1068] 168. 如实施方案164至167中任一项的trRNA,其中5'末端的5'端处前四个核苷酸及3'末端的3'端处最后四个核苷酸与硫代磷酸酯(PS)键连接。

[1069] 169. 如实施方案164至168中任一项的trRNA,其中5'末端的5'端处前三个核苷酸及3'末端的3'端处最后三个核苷酸经修饰。

[1070] 170. 如实施方案169的trRNA,其中修饰包含2'-O-Me。

[1071] 171. 如实施方案169的trRNA,其中修饰包含2'-F。

[1072] 172. 如实施方案164至171中任一项的trRNA,其中5'末端的5'端处前四个核苷酸及3'末端的3'端处最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端的5'端处前三个核苷酸及3'末端的3'端处最后三个核苷酸包含2'-O-Me修饰。

[1073] 173. 如实施方案164至171中任一项的trRNA,其中5'末端的5'端处前四个核苷酸及3'末端的3'端处最后四个核苷酸与PS键连接,且其中5'末端的5'端处前三个核苷酸及3'

末端的3'端处最后三个核苷酸包含2'-F修饰。

[1074] 174.如实施方案164至173中任一项的trRNA,其中上部茎区中的各核苷酸经2'-O-Me修饰。

[1075] 175.如实施方案164至174中任一项的trRNA,其中突起区内的B1及B2经2'-O-Me修饰。

[1076] 176.如实施方案164至175中任一项的trRNA,其中连接区中的N3、N4、N5、N15、N16、N17及/或N18经2'-O-Me修饰。

[1077] 177.如实施方案164至176中任一项的trRNA,其中发夹1区中的各核苷酸经2'-O-Me修饰。

[1078] 178.如实施方案164至177中任一项的trRNA,其中发夹2区中的各核苷酸经2'-O-Me修饰。

[1079] 179.tracrRNA(trRNA),其包含以下处的2'-O-Me修饰核苷酸:

[1080] a.上部茎区中的各核苷酸;

[1081] b.突起区内的B1及/或B2;

[1082] c.连接区中的N3、N4、N5、N15、N16、N17及/或N18;

[1083] d.发夹1区中的各核苷酸;及

[1084] e.发夹2区中的各核苷酸。

[1085] 180.如实施方案179的trRNA,其进一步包含三个连接5'末端的5'端处前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处最后四个核苷酸的PS键。

[1086] 181.如实施方案179或实施方案180的trRNA,其进一步包含5'末端的5'端处前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸及3'末端的3'端处最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰的核酸。

[1087] 182.如实施方案164至181中任一项的trRNA,其中N15、N16、N17及N18经2'-F修饰。

[1088] 183.如实施方案164至182中任一项的trRNA,其中LS1、LS3及LS5经2'-F修饰,且LS2、LS4及LS6经2'-O-Me修饰。

[1089] 184.如实施方案164至183中任一项的trRNA,其进一步包含三个连接5'末端的5'端处前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处最后四个核苷酸的PS键。

[1090] 185.如实施方案164至184中任一项的trRNA,其进一步包含5'末端的5'端处前三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸及3'末端的3'端处最后三个核苷酸处的2'-O-Me或2'-F修饰核苷酸。

[1091] 186.包含SEQ ID No:188至227中任一个的trRNA,其包括表4的修饰。

[1092] 187.trRNA,其包含与SEQ ID No:188至227中任一个具有至少99、98、97、96、95、94、93、92、91、90、85、80、75或70%同一性的核酸,其中对应于表4中参考序列标识符的核苷酸的trRNA的各核苷酸处的修饰与表4中的参考序列标识符中示出的修饰相同或等效。

[1093] 188.如实施方案186至187中任一项的trRNA,其进一步包含三个连接5'末端的5'端处前四个核苷酸的硫代磷酸酯(PS)键及三个连接3'末端的3'端处最后四个核苷酸的PS键。

[1094] 189.如实施方案164至188中任一项的trRNA,其中与crRNA组合的trRNA与酿脓链

球菌Cas9形成核糖核蛋白复合体。

[1095] 190. 包含crRNA及trRNA的双指导,其中crRNA包含如表4中所示的SEQ ID No:1至187中任一个,且其中trRNA包含如表4中所示的SEQ ID No:188至227中任一个的核酸。

[1096] 191. 双指导,其包含如实施方案137至163中任一项的crRNA及如实施方案164至189中任一项的trRNA。

[1097] 192. 双指导,其包含如实施方案137至163中任一项的crRNA及未经修饰的trRNA。

[1098] 193. 双指导,其包含未经修饰的crRNA及如实施方案137至189中任一项的trRNA。

[1099] 194. 如实施方案190至193中任一项的双指导,其中双指导与酿脓链球菌Cas9形成核糖核蛋白复合体。

[1100] 195. LNP组合物,其包含如实施方案1至78及129至136中任一项的sgRNA。

[1101] 196. 包含gRNA的LNP组合物,gRNA包含如实施方案1至193中任一项的RNA或由如实施方案1至193中任一项的RNA组成。

[1102] 197. 组合物,其包含与脂质纳米颗粒(lipid nanoparticle;LNP)联合的如实施方案1至78及129至136中任一项的sgRNA。

[1103] 198. 组合物,其包含与脂质纳米颗粒(LNP)联合的如实施方案137至163中任一项的crRNA。

[1104] 199. 组合物,其包含与脂质纳米颗粒(LNP)联合的如实施方案164至189中任一项的trRNA。

[1105] 200. 组合物,其包含如实施方案1至78及129至136中任一项的sgRNA、如实施方案79至128中任一项的gRNA、如实施方案137至163中任一项的crRNA、如实施方案164至189中任一项的trRNA、如实施方案190至194中任一项的dgRNA或如实施方案195至199中任一项的组合物,其进一步包含核酸酶或编码核酸酶的mRNA。

[1106] 201. 如实施方案200的组合物,其中核酸酶为Cas蛋白质。

[1107] 202. 如实施方案201的组合物,其中Cas蛋白质为Cas9。

[1108] 203. 如实施方案202的组合物,其中Cas9为酿脓链球菌(*S. pyogenes*)Cas9。

[1109] 204. 如实施方案200至203中任一项的组合物,其中核酸酶为切口酶(nickase)。

[1110] 205. 如实施方案200至204中任一项的组合物,其中核酸酶是经修饰的核酸酶。

[1111] 206. 如实施方案205的组合物,其中经修饰的核酸酶包含核定位信号(nuclear localization signal;NLS)。

[1112] 207. 如实施方案200至206中任一项的组合物,其包含编码核酸酶的mRNA。

[1113] 208. 药物制剂,其包含如实施方案1至78及129至136中任一项的sgRNA、如实施方案79至128中任一项的gRNA、如实施方案137至163中任一项的crRNA、如实施方案164至189中任一项的trRNA、如实施方案190至194中任一项的dgRNA或如实施方案195至207中任一项的组合物及可药用载体。

[1114] 209. 修饰靶DNA的方法,其包含将Cas蛋白质或编码Cas蛋白质的核酸及以下中的任何一个或多个递送至细胞:

[1115] a. 如实施方案1至78及129至136中任一项的sgRNA;

[1116] b. 如实施方案79至128中任一项的gRNA;

[1117] c. 如实施方案137至163中任一项的crRNA;

- [1118] d.如实施方案164至189中任一项的trRNA;
- [1119] e.如实施方案190至194中任一项的dgRNA;
- [1120] f.如实施方案195至207中任一项的组合物;或
- [1121] g.如实施方案208的药物制剂。
- [1122] 210.如实施方案209的方法,其中方法导致在基因中产生插入或缺失。
- [1123] 211.如实施方案209的方法,其进一步包含向细胞递送模板,其中模板至少一部分并入至经以Cas蛋白质所诱发的双链断裂位点处或靠近处的标靶DNA中。
- [1124] 212.如实施方案1至78及129至136中任一项的sgRNA,其用于制备用于治疗疾病或病症的药物。
- [1125] 213.如实施方案737至163中任一项的crRNA,其用于制备用于治疗疾病或病症的药物。
- [1126] 214.如实施方案164至189中任一项的trRNA,其用于制备用于治疗疾病或病症的药物。
- [1127] 215.如实施方案137至163中任一项的crRNA与如实施方案164至189中任一项的trRNA的组合,其用于制备用于治疗疾病或病症的药物。
- [1128] 216.如实施方案208的药物制剂,其用于制备用于治疗疾病或病症的药物。

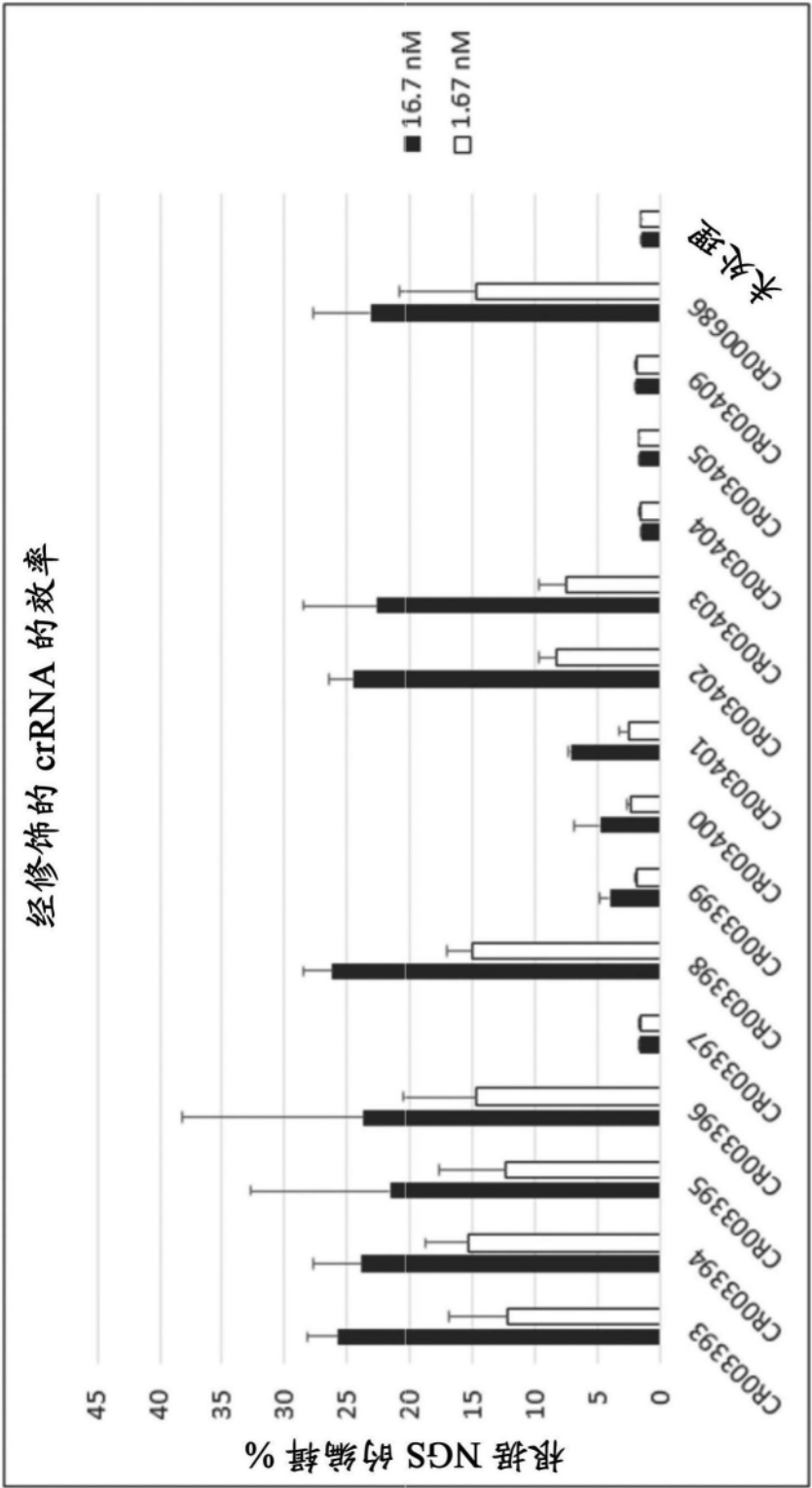


图1

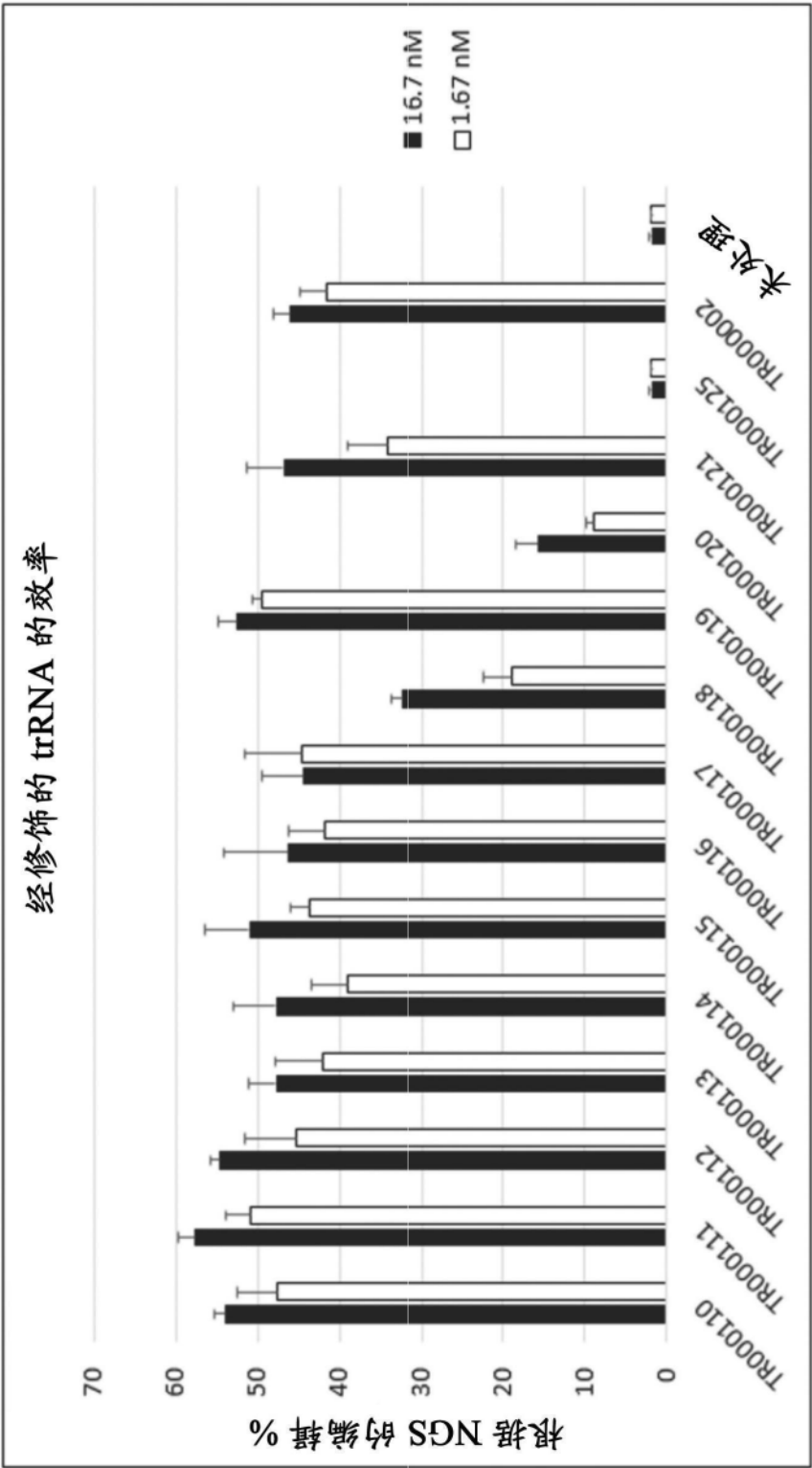


图2

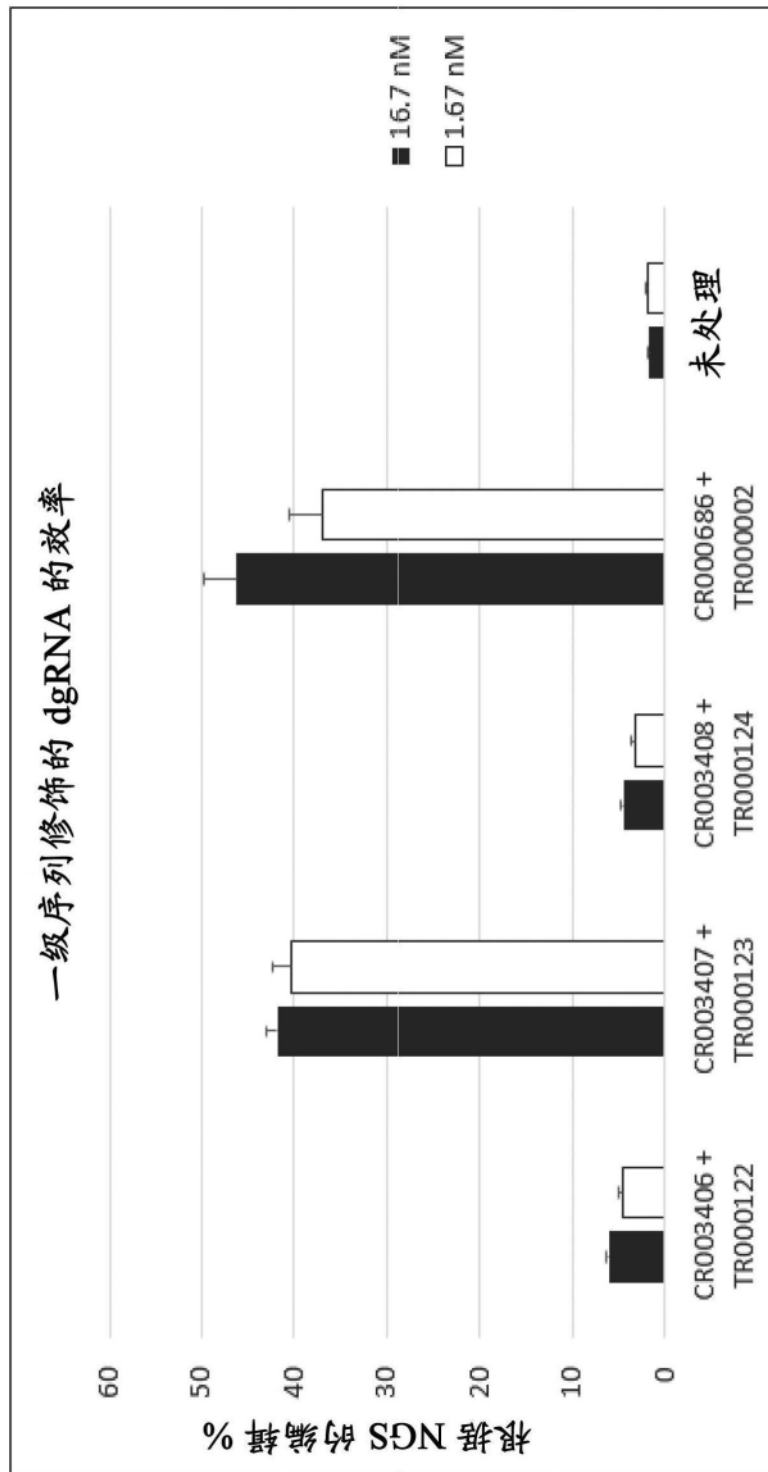


图3

25 nM												
	TR000110	TR000111	TR000112	TR000113	TR000114	TR000115	TR000116	TR000117	TR000118	TR000119	TR000121	TR000002
CR003393	54.1 ± 5	61.2 ± 3.1	56.7 ± 5	55.9 ± 4	53.8 ± 10.7	56.3 ± 10	52.7 ± 5.8	55.5 ± 7	40.7 ± 12.9	48.5 ± 8.1	51.3 ± 11.4	
CR003394	57.7 ± 4.7	61.5 ± 8.2	64.8 ± 6.4	65.4 ± 8.9	60.1 ± 2.5	61.6 ± 4.6	57.3 ± 7.2	57.8 ± 8.3	38.6 ± 7.9	50.9 ± 10.3	54.8 ± 8.9	
CR003395	52.4 ± 2.4	62.8 ± 6.8	61.1 ± 7.2	62.8 ± 11.1	55.9 ± 7.6	57 ± 4.9	53.4 ± 7.1	52.5 ± 8.1	38.2 ± 7.5	49.7 ± 14.4	53.1 ± 11.7	
CR003396	56 ± 3.9	56.4 ± 7.6	58.7 ± 7.3	58.1 ± 7.3	54.7 ± 4.9	58.8 ± 5	48.9 ± 2.8	52.5 ± 9.7	34.3 ± 6	48.3 ± 10.3	52.4 ± 9.5	
CR003398	50.8 ± 10.2	56.2 ± 8.2	62.5 ± 6.9	59.7 ± 8.9	56.3 ± 3.4	61.2 ± 5	53 ± 7.1	53.8 ± 9.2	29.4 ± 9.3	52.2 ± 12.2	51.9 ± 15.6	
CR003402	42.7 ± 4.5	53.3 ± 5.4	56.9 ± 11	57.4 ± 12.1	52.8 ± 9.3	55.1 ± 8.5	46.1 ± 8.4	50.5 ± 8.8	17.7 ± 6.7	45.2 ± 12	52.8 ± 11.3	
CR003403	45.8 ± 9.9	52.7 ± 8.6	59.7 ± 13.9	54.8 ± 13.7	47.2 ± 12.1	50.9 ± 8.4	43.4 ± 10.3	47 ± 13	10.5 ± 5.9	44.5 ± 15.2	46 ± 19.3	
CR000686												34.5 ± 6.4

2.5 nM												
	TR000110	TR000111	TR000112	TR000113	TR000114	TR000115	TR000116	TR000117	TR000118	TR000119	TR000121	TR000002
CR003393	41.8 ± 6.2	50.4 ± 3.2	40.2 ± 4.7	43.4 ± 2	40.1 ± 4.8	43.1 ± 3.9	39.1 ± 4.2	43 ± 6	15.6 ± 3.1	34.9 ± 11.6	38.6 ± 2.2	
CR003394	45.4 ± 4.7	49.6 ± 7.9	43.9 ± 6.6	46.7 ± 5.6	40.4 ± 7.5	47.2 ± 6.9	46.8 ± 3.1	43.9 ± 2.4	13.7 ± 1.6	28.9 ± 4.3	35.9 ± 6.2	
CR003395	39 ± 10	56 ± 5.1	42.2 ± 3.5	48.2 ± 3.2	36 ± 2.8	47.4 ± 7.3	44.4 ± 5.9	41.6 ± 7	12 ± 1.4	25.8 ± 1	31.4 ± 1.8	
CR003396	34.8 ± 2.3	46.5 ± 0.4	42 ± 4.9	42.4 ± 1.8	32 ± 4	44.4 ± 5.5	41.1 ± 7.7	40.5 ± 5.1	20.7 ± 1.2	26 ± 1.2	42.4 ± 8.9	
CR003398	33.6 ± 3.3	47 ± 6.8	41.9 ± 2.6	41.9 ± 1.1	37.1 ± 4.1	43.2 ± 9.4	40.1 ± 3.9	42.9 ± 3.6	1.4 ± 0.1	34.2 ± 2	40.7 ± 7.4	
CR003402	31.2 ± 4.7	46.4 ± 5	38.5 ± 2.8	40.7 ± 3.5	29.9 ± 1.1	42.4 ± 6.6	31.7 ± 2.9	32.8 ± 4.6	7 ± 0.8	31.3 ± 2.1	46.8 ± 3.8	
CR003403	28 ± 4.3	38.3 ± 3.3	37.5 ± 4.4	36.4 ± 2.7	31.4 ± 4.6	34.6 ± 3.7	32.9 ± 4	35.8 ± 4.2	1.4 ± 0.1	34.6 ± 6.1	40.7 ± 6.6	
CR000686												21.7 ± 4.9

图4

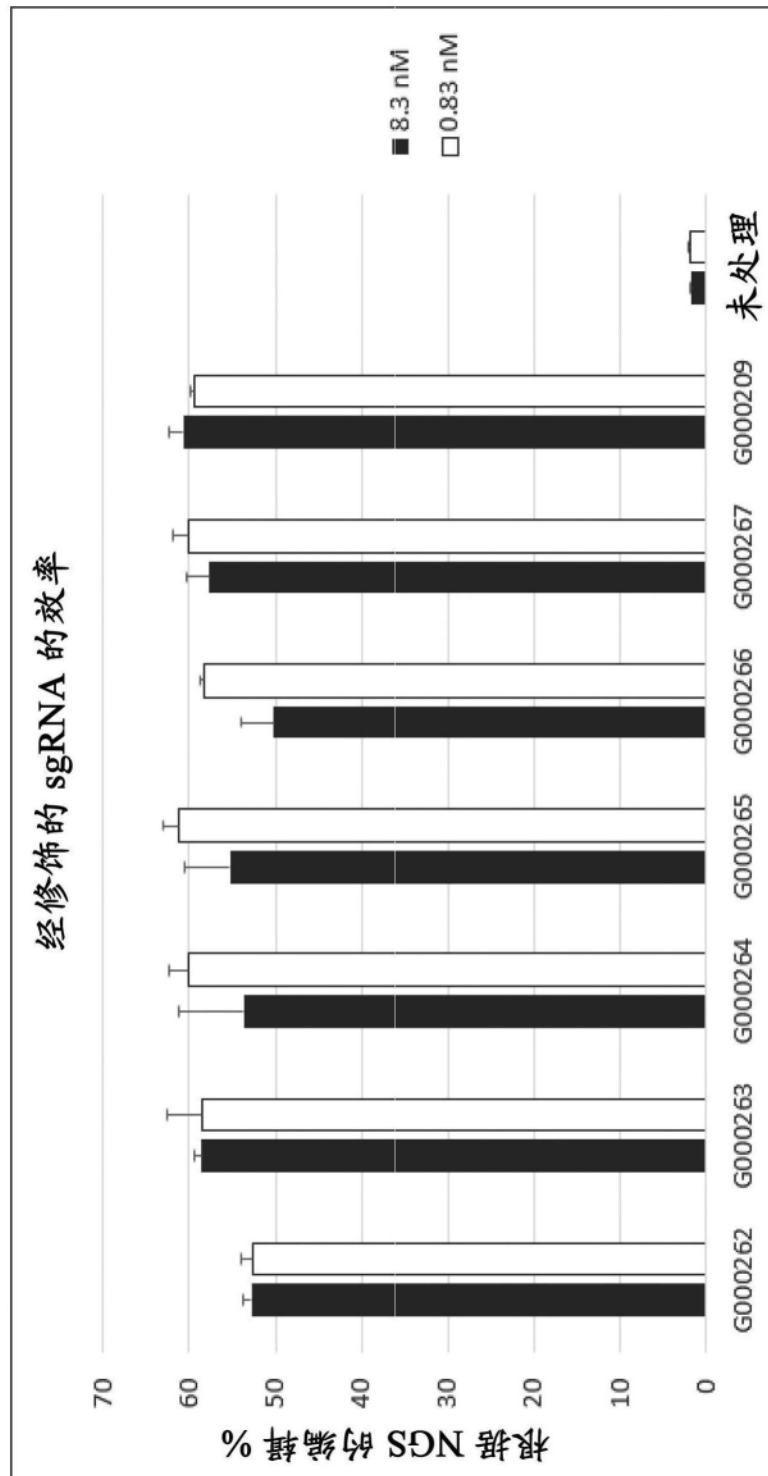


图5

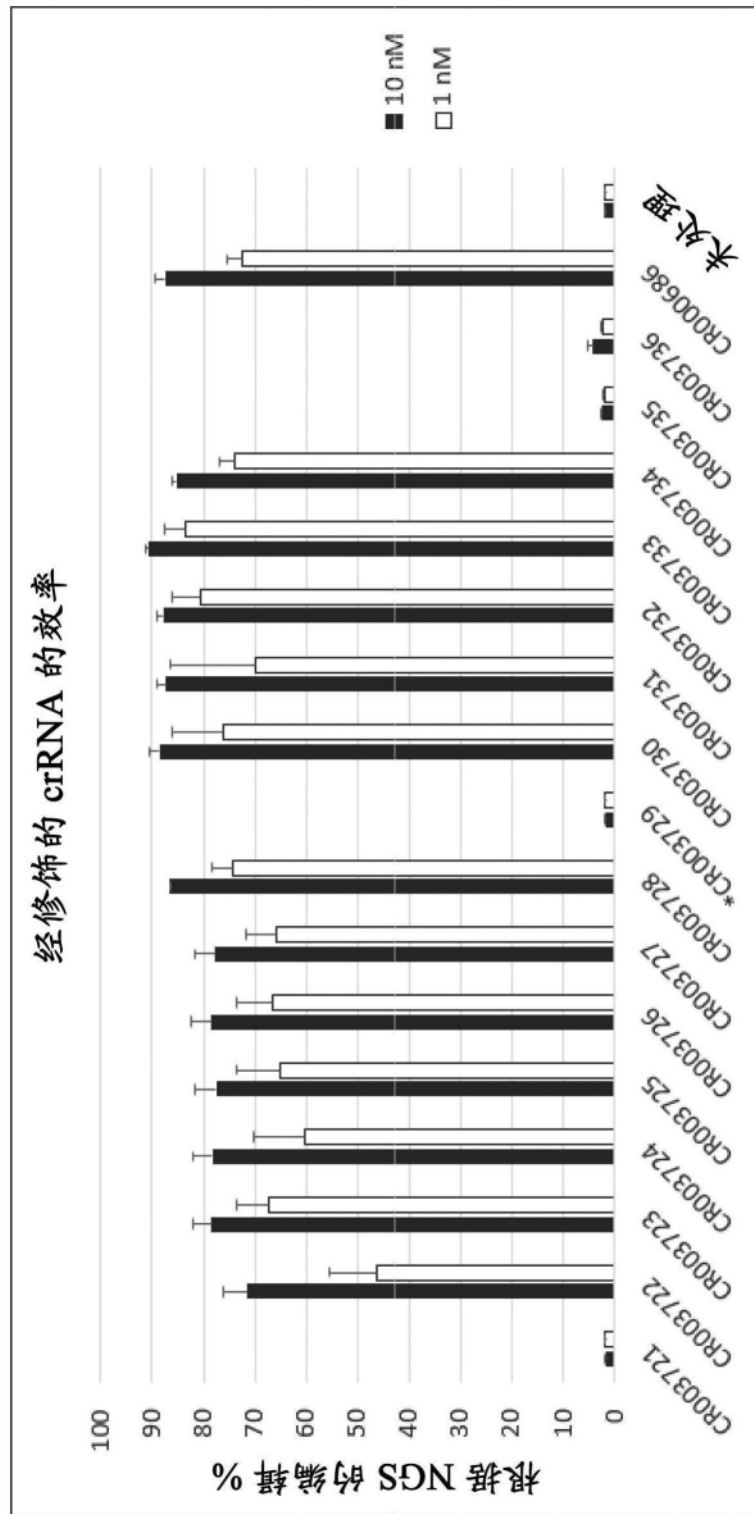


图6

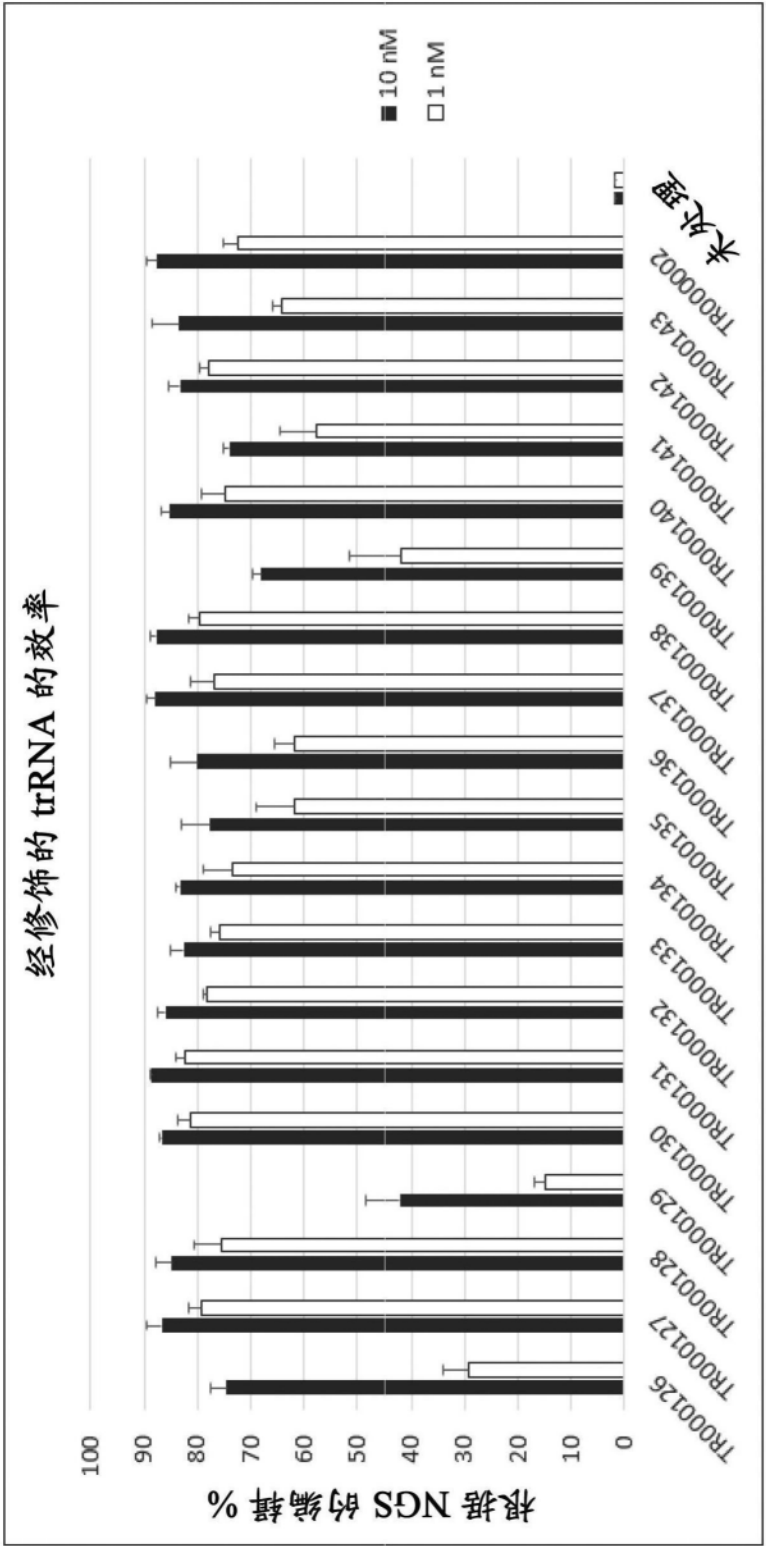


图7

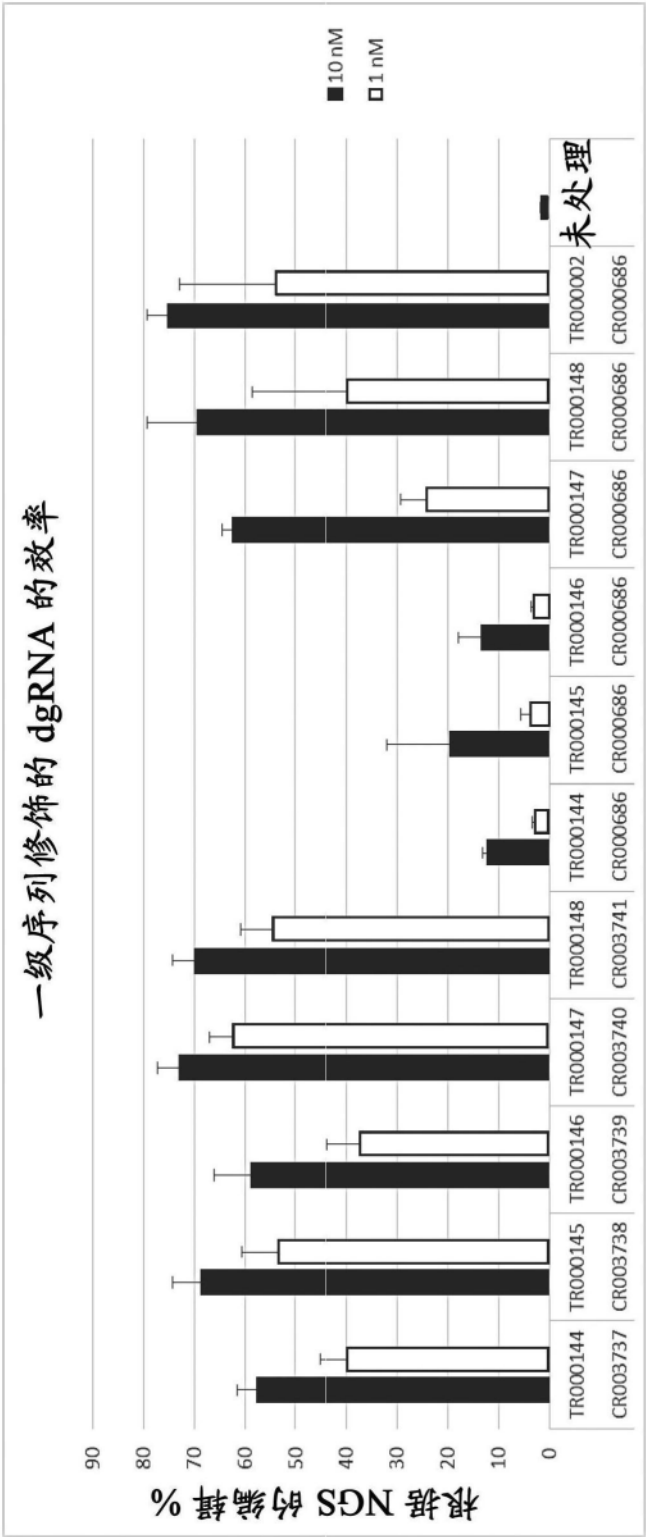


图8

10 nM													
	TR000127	TR000128	TR000130	TR000134	TR000135	TR000136	TR000137	TR000138	TR000139	TR000142	TR000143	TR000002	
CR003723	18 ± 13.8	22.8 ± 4.1	24 ± 2.6	26.9 ± 2.8	20.8 ± 5	22.2 ± 5.7	26.7 ± 5	23.6 ± 4.1	13.7 ± 2.4	22.3 ± 4.4	10.8 ± 2.2	18.5 ± 1.5	
CR003725	28.4 ± 1.2	29.2 ± 4.2	27.9 ± 1.3	30.6 ± 3.4	26.1 ± 3.8	25.9 ± 4.4	30 ± 3	26.9 ± 2	18.5 ± 2.2	25.1 ± 0.9	23.1 ± 1.7		
CR003726	30.4 ± 1.1	31.3 ± 3.2	30.6 ± 2.9	32 ± 2.2	29.8 ± 2.5	29.9 ± 2.8	32.3 ± 1	28.7 ± 2.2	20.9 ± 2.4	27 ± 1.4	23.6 ± 2.3	24.9 ± 1.1	
CR003727	31.6 ± 2.1	27 ± 2.7	29.6 ± 0.8	32.1 ± 1.3	26.7 ± 1.2	27.2 ± 5.2	31 ± 2	28.1 ± 0.7	19.2 ± 0.7	26.7 ± 2.1	22.5 ± 1.2	25.6 ± 3	
CR003728	34.6 ± 2.4	2.4 ± 0.1	34.9 ± 2.6	37.7 ± 3.1	33.1 ± 2.1	33.1 ± 4	35.4 ± 0.9	32.4 ± 2.9	25.8 ± 4.8	30.7 ± 2.7	28.2 ± 2.2	28.6 ± 0.7	
CR003729	34.8 ± 0.9	32.3 ± 1.5	33.8 ± 1.1	34.8 ± 2.5	29.8 ± 1.8	31.5 ± 3.6	32.6 ± 1.7	31 ± 1.9	25.4 ± 3.7	28.6 ± 0.5	25.6 ± 1.1	27.8 ± 0.6	
CR003734	27.5 ± 0.3	21.5 ± 1.5	29.8 ± 1.6	29.5 ± 1.6	13.7 ± 2.1	14.6 ± 1.2	31 ± 2.4	28 ± 2.5	7 ± 1.1	25.5 ± 1.3	3.4 ± 0.1	22.7 ± 2.8	
CR000686	23 ± 2.8	22.4 ± 3.9	23.6 ± 6.2	26.4 ± 1	22.2 ± 2	19.5 ± 1.1	24.6 ± 3	27.4 ± 2.6	12.2 ± 1.7	22.9 ± 1.8	20.2 ± 1.1	22.6 ± 3	
1 nM													
	TR000127	TR000128	TR000130	TR000134	TR000135	TR000136	TR000137	TR000138	TR000139	TR000142	TR000143	TR000002	
CR003723	18.3 ± 14.1	16 ± 12.1	25.3 ± 0.8	22.5 ± 3.4	14.3 ± 10.6	17.5 ± 2	23.1 ± 3.8	21 ± 1.4	8.8 ± 1.4	18.3 ± 0.7	8.3 ± 1.5	14.6 ± 0.4	
CR003725	26.9 ± 1.8	25.1 ± 4.1	25 ± 2.7	24.8 ± 2.3	23.1 ± 2.8	16.2 ± 12.1	17.3 ± 13.1	22.5 ± 1	15.2 ± 1.7	22.7 ± 1.5	19.7 ± 3.1		
CR003726	16.8 ± 12.9	26.4 ± 2	23.6 ± 2.6	25.2 ± 1.5	22.7 ± 3.4	20.7 ± 1.5	26.6 ± 1.4	20.4 ± 0.9	13.3 ± 0.3	21.6 ± 1.5	18.6 ± 0.5	17 ± 1	
CR003727	24.1 ± 3.1	20.3 ± 1.4	21 ± 1.3	23.6 ± 2.6	19.7 ± 1.7	20.3 ± 1.4	15.3 ± 11.3	20.2 ± 1.5	11.7 ± 1.7	20.7 ± 0.7	15.1 ± 0.8	19.7 ± 4.2	
CR003728	26.9 ± 0.8	2.4 ± 0.1	28.2 ± 2.4	27.9 ± 0.6	26.4 ± 3.2	22.9 ± 1.2	26.4 ± 1.9	24.8 ± 0.5	18.8 ± 1.8	23.3 ± 1.4	20.3 ± 1.1	23.4 ± 3.7	
CR003729	26.3 ± 2.5	30.5 ± 4.6	28.3 ± 2.7	28.6 ± 2	25.3 ± 3.1	24.6 ± 1.6	25 ± 0.3	23.7 ± 0.6	17.1 ± 1.7	21.9 ± 0.5	21 ± 2	22 ± 2	
CR003734	18.9 ± 5.3	15.2 ± 3	21.4 ± 1.7	20.1 ± 0.1	8.5 ± 1.7	7.4 ± 0.9	20.4 ± 0.8	20.4 ± 1.4	3 ± 0.1	19.3 ± 0.8	2.5 ± 0.3	17.3 ± 2.1	
CR000686	16.2 ± 1	17.3 ± 3.4	18.3 ± 3.3	20.5 ± 5	15.4 ± 1.2	14.8 ± 3	18.9 ± 3.6	20.1 ± 1.7	7.9 ± 2.3	17.5 ± 3.3	15.4 ± 1	14.1 ± 1.6	

图9

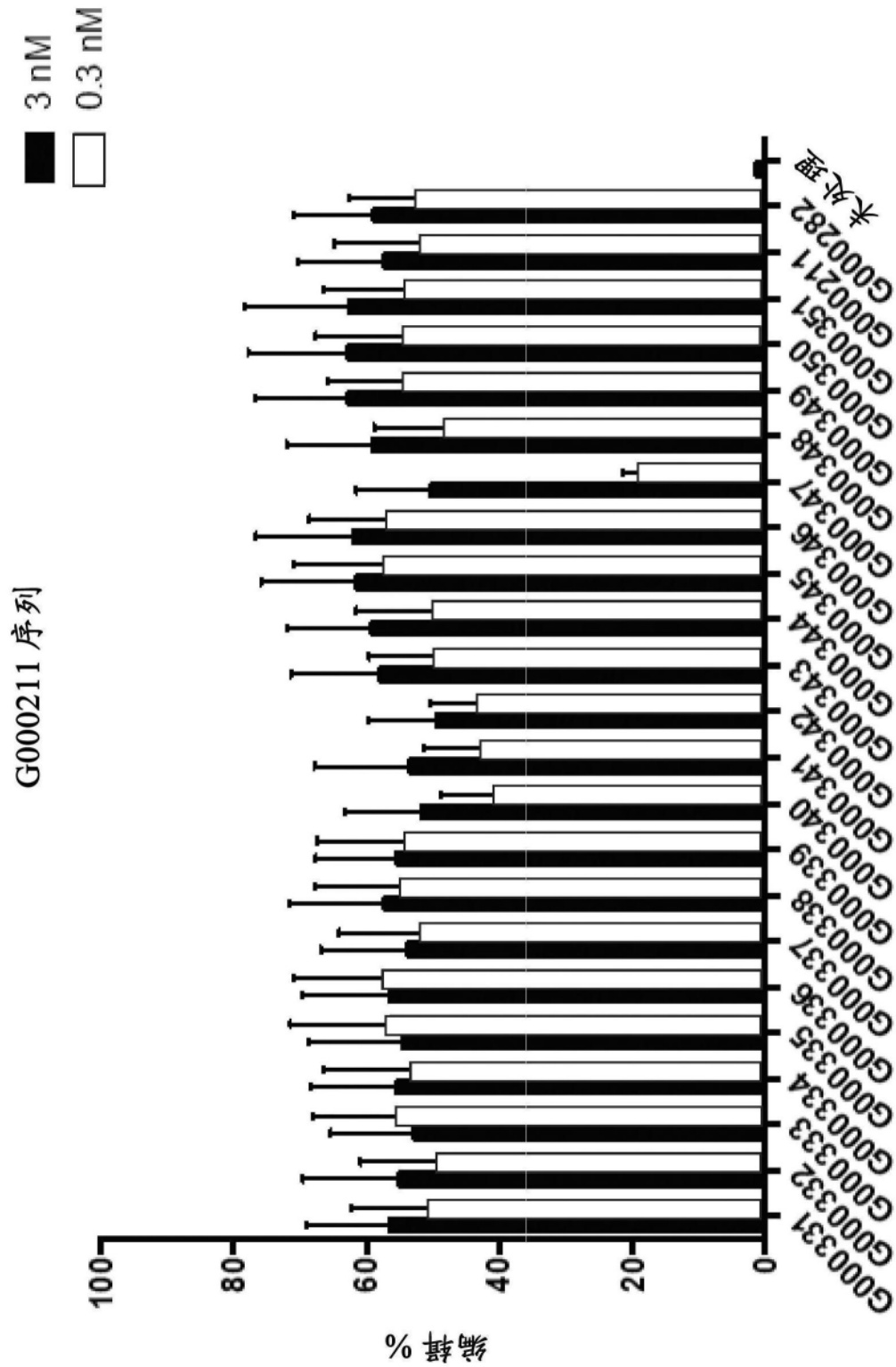


图10

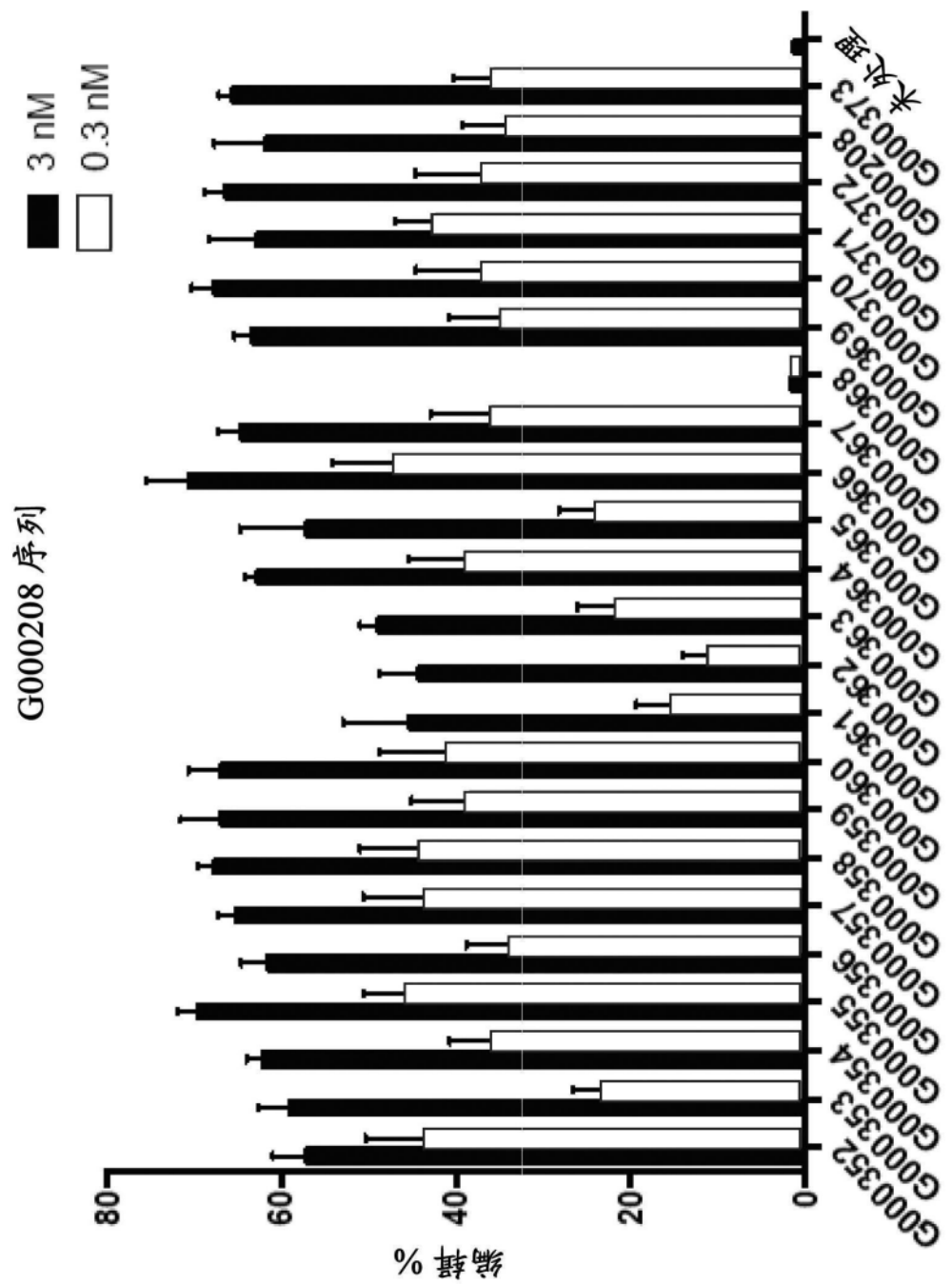


图11

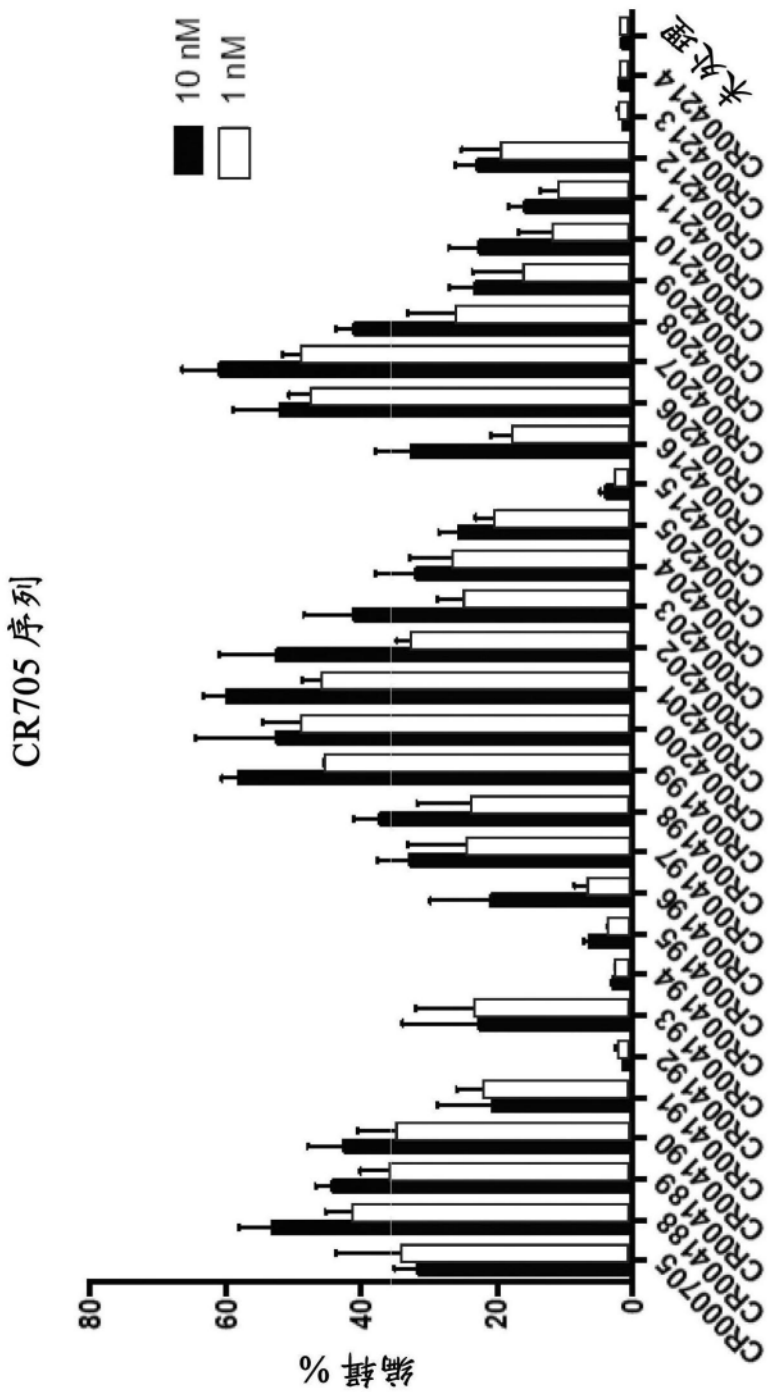


图12A

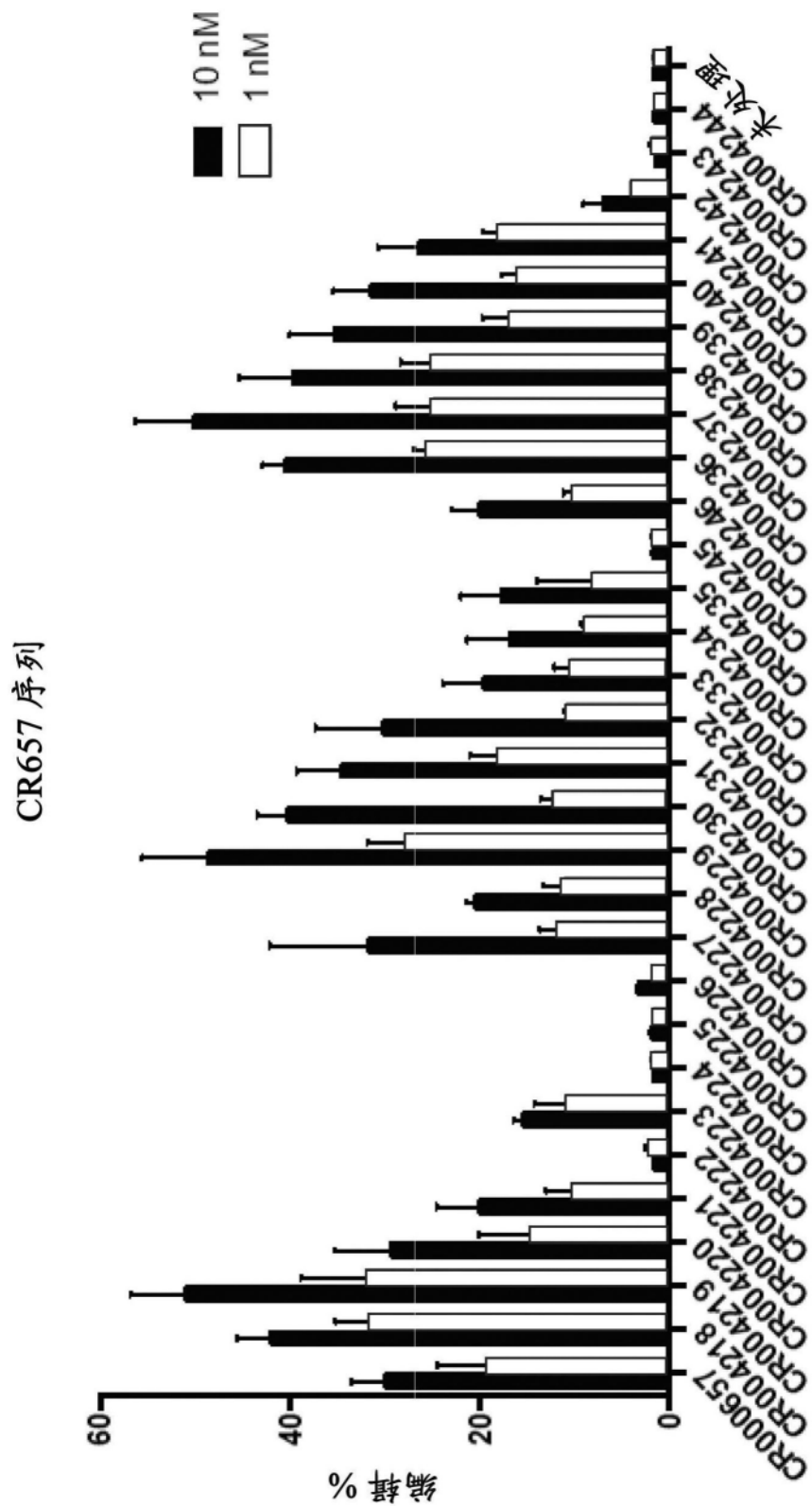


图12B

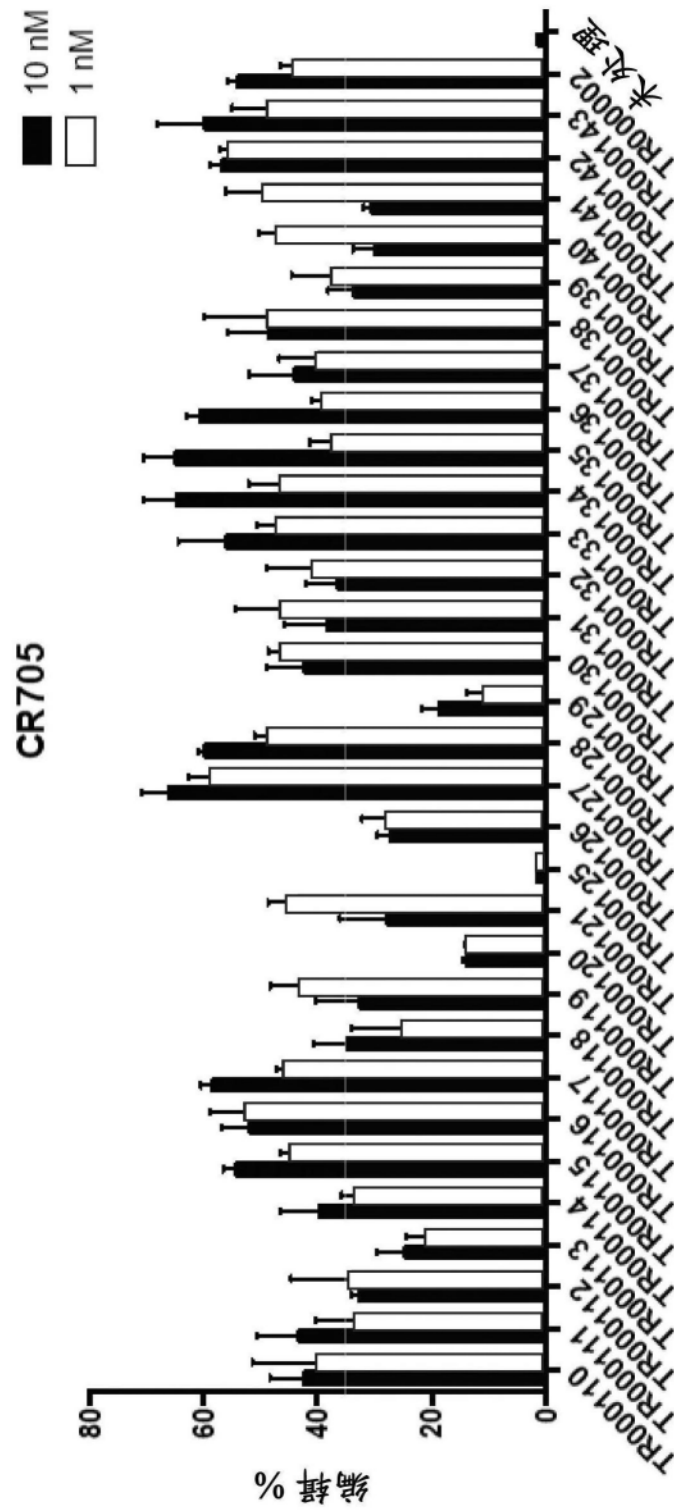


图13A

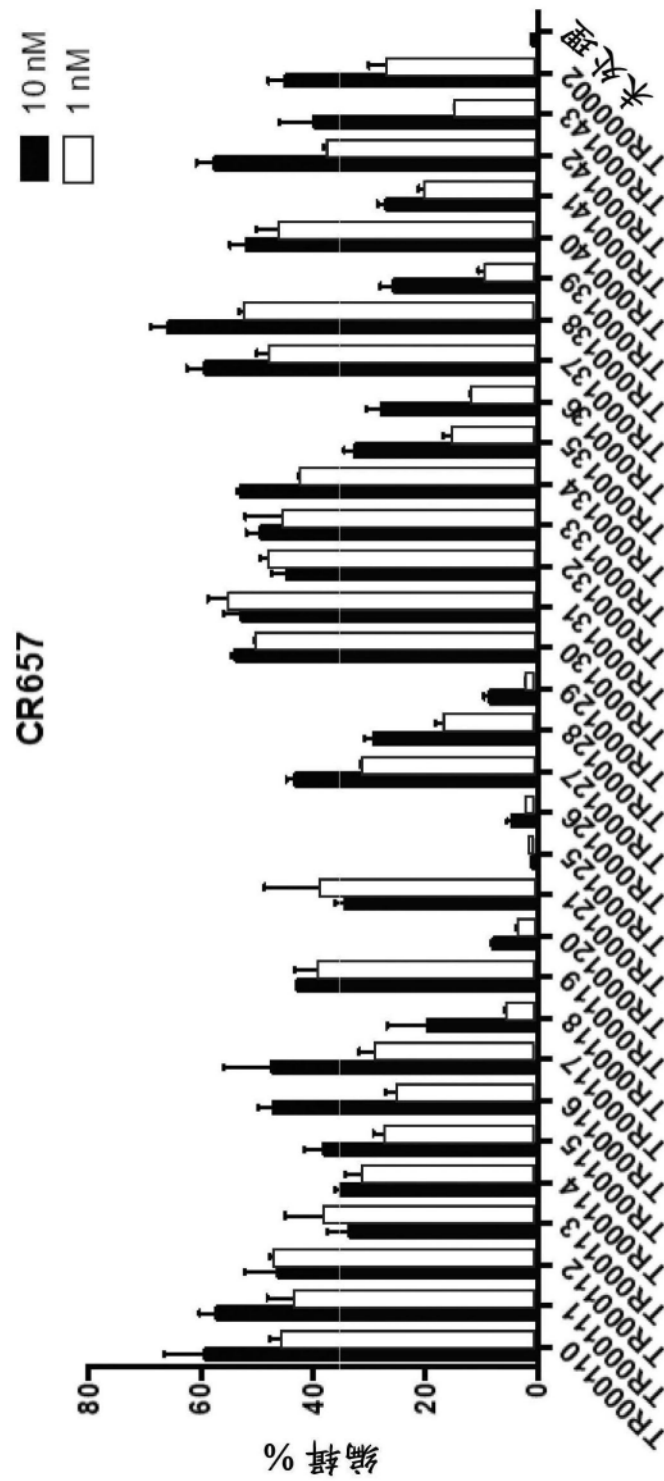


图13B

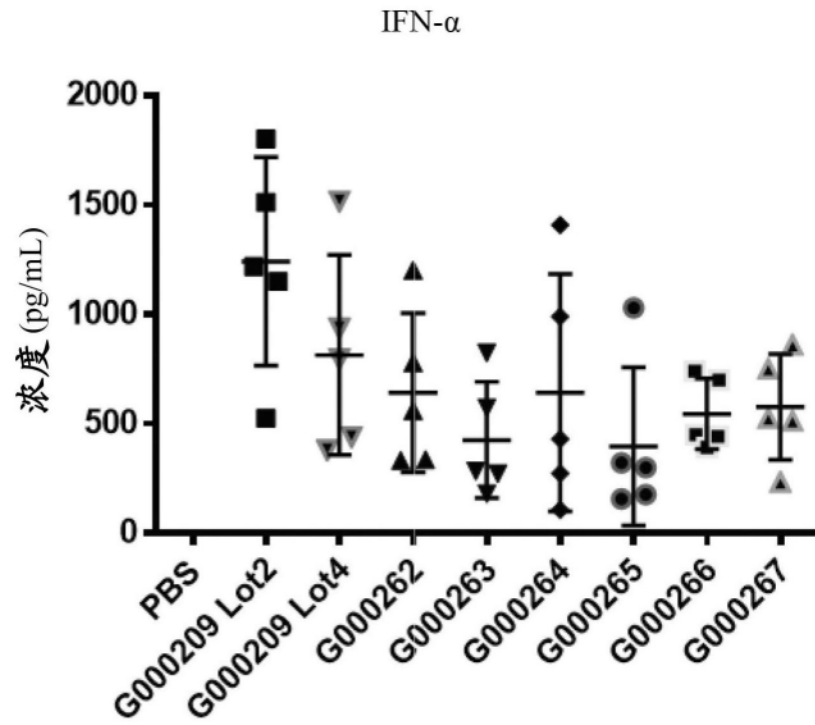


图14A

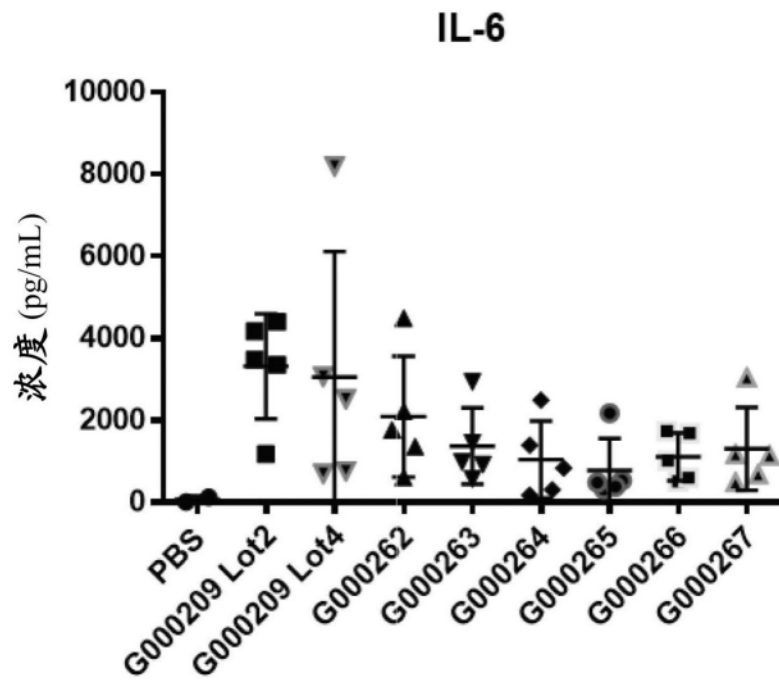


图14B

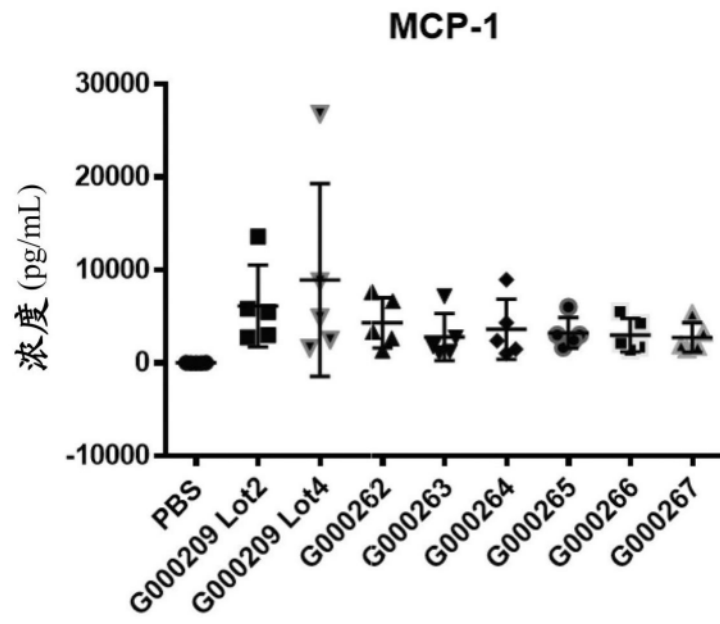


图14C

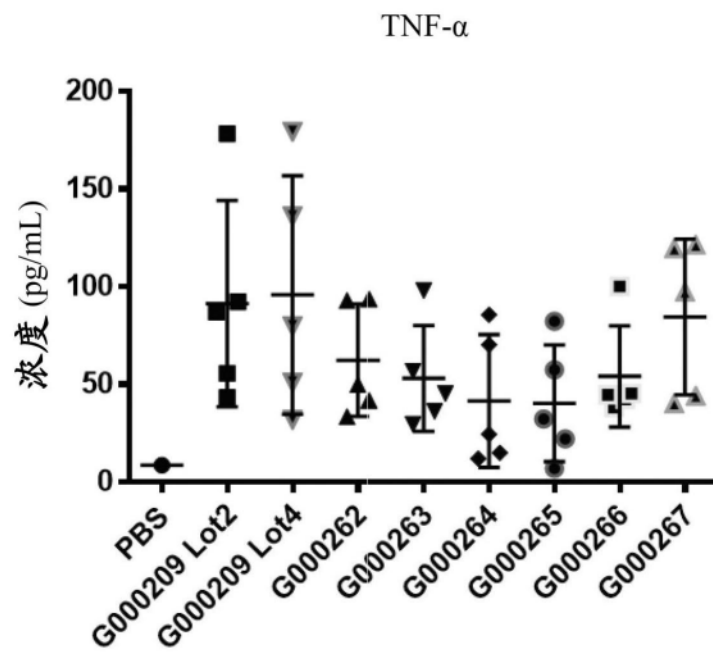


图14D

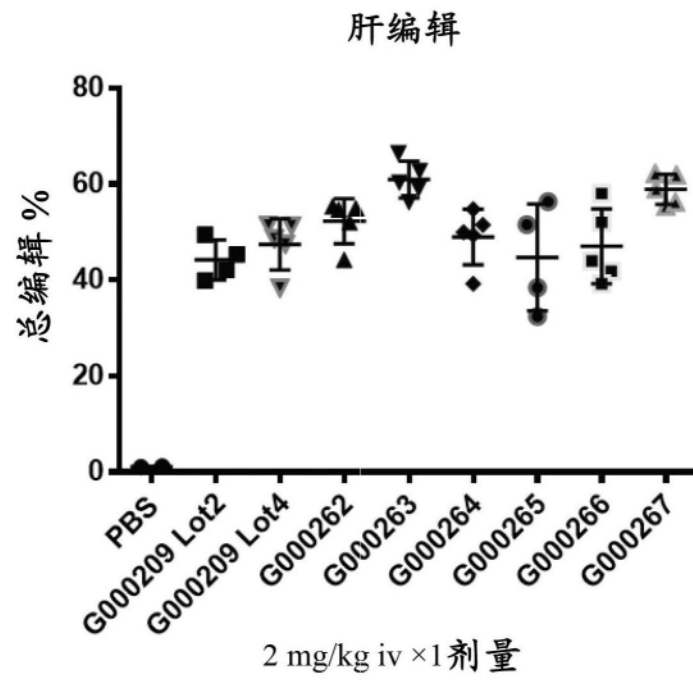


图15A

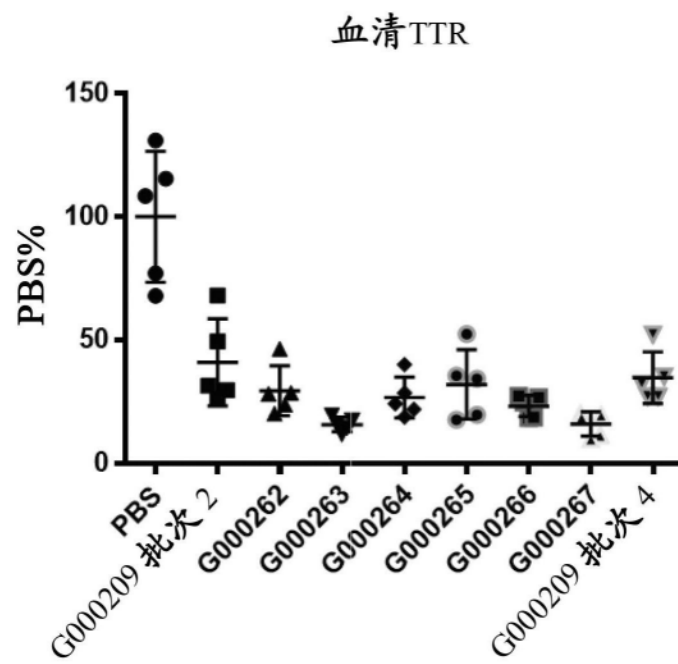
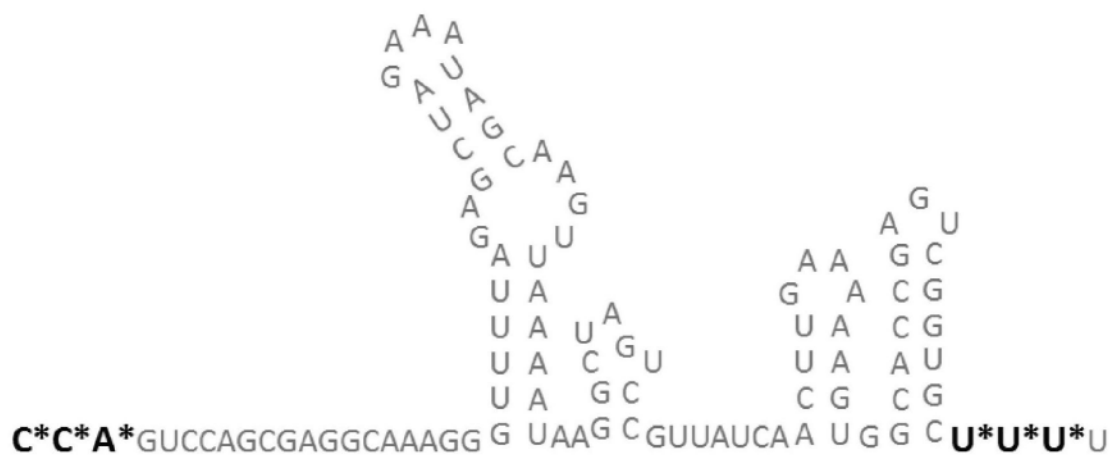


图15B

指导	平均编辑 %	标准差
G209 批号 2	44.2	4.1
G209 批号 4	47.5	5.3
<i>G262</i>	52.2	4.7
<i>G263</i>	60.9	3.8
<i>G264</i>	48.9	5.8
<i>G265</i>	44.7	11.1
<i>G266</i>	47.0	7.8
<i>G267</i>	58.9	3.1

图15C

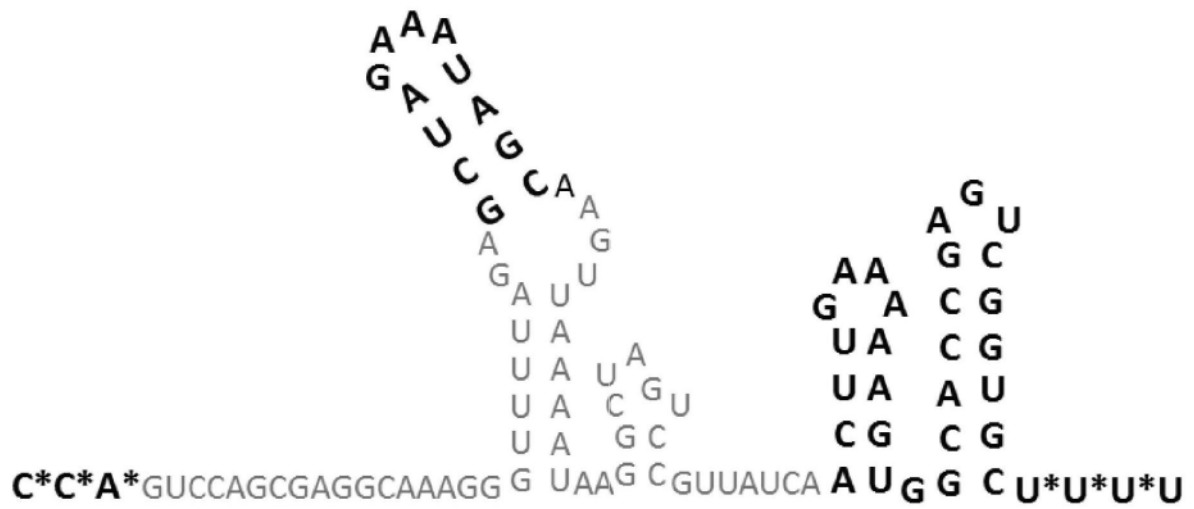


*=硫代磷酸酯

末端修饰的sgRNA

G000209

图15D



*=硫代磷酸酯

高度修饰的sgRNA

G000267

图15E

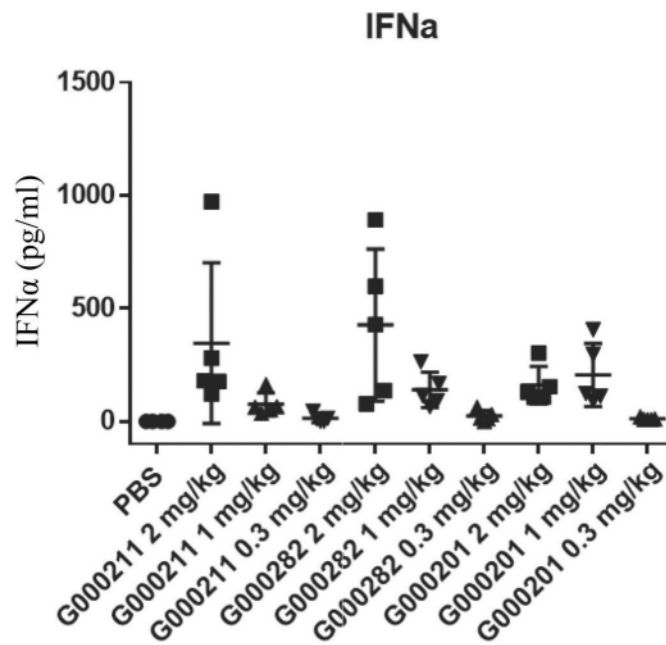


图16A

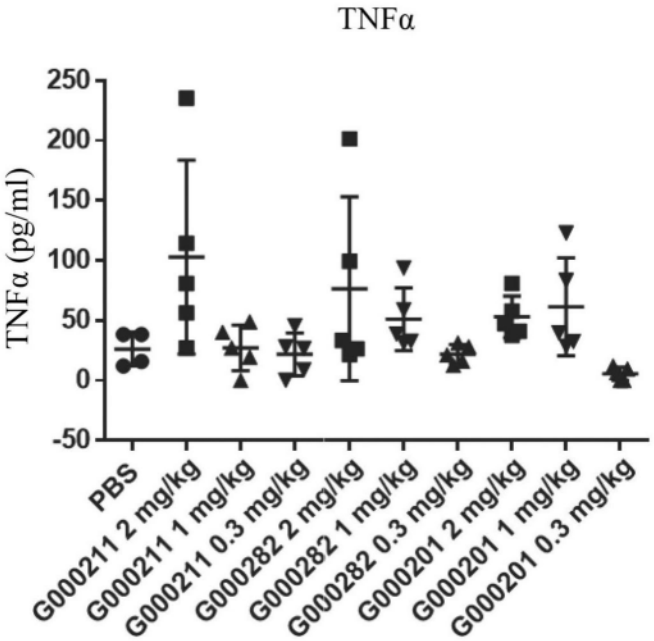


图16B

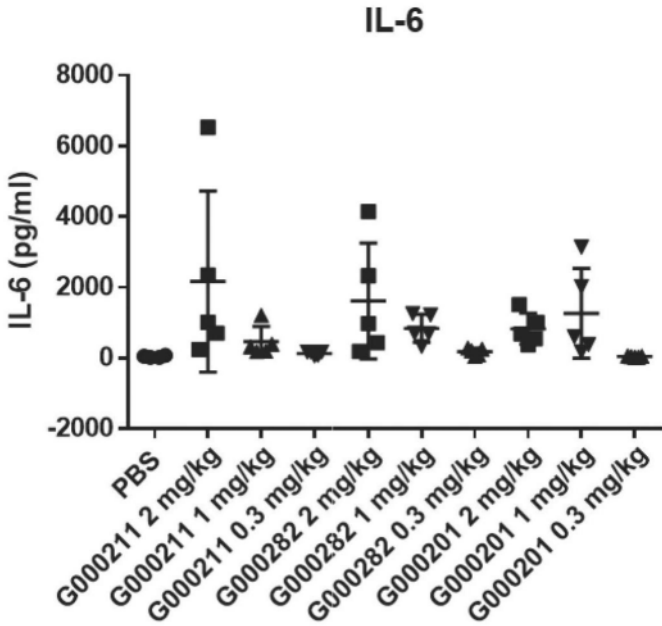


图16C

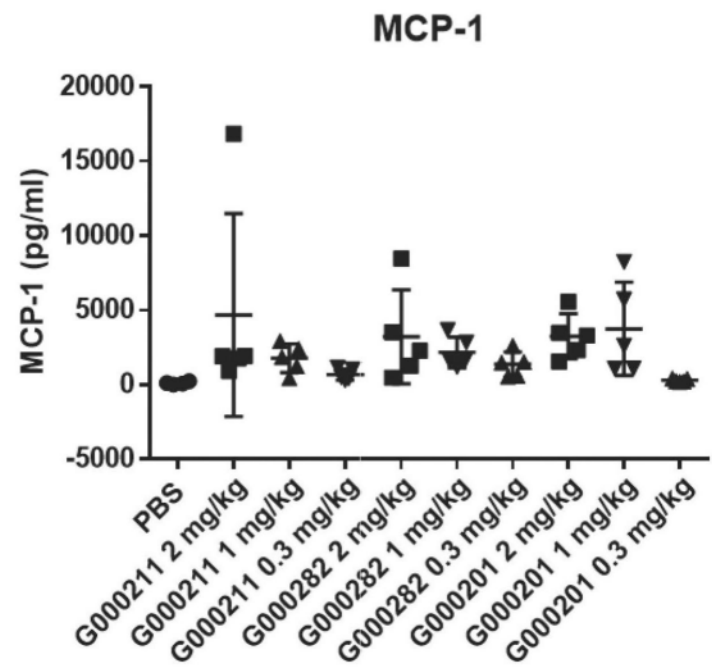


图16D

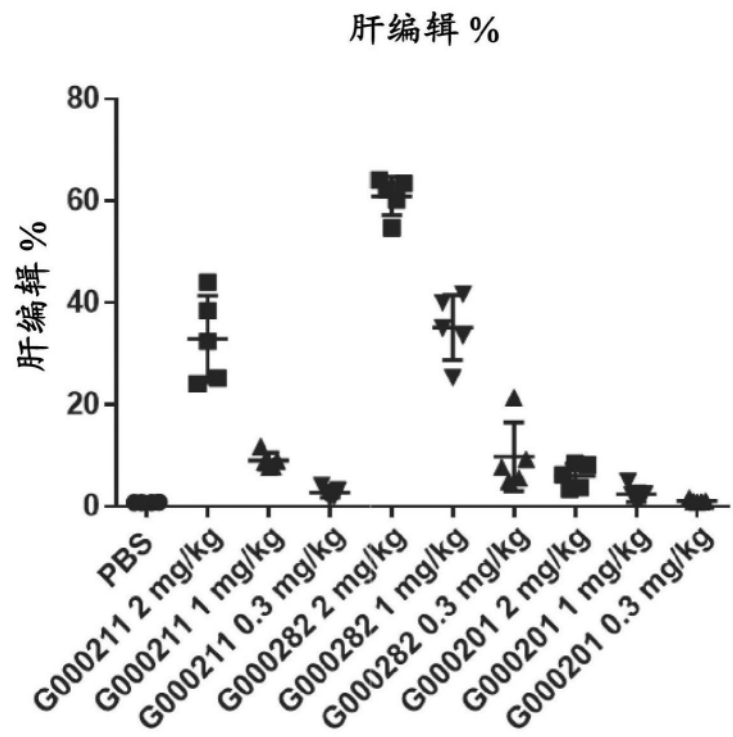


图17A

	平均编辑 %	标准差
PBS	0.8370155	0.03184162
G211 2 mg/kg	32.89082	8.520595
G211 1 mg/kg	9.024511	1.640143
G211 0.3 mg/kg	2.762495	0.9668095
G282 2 mg/kg	60.99886	3.792423
G282 1 mg/kg	35.13641	6.434229
G282 0.3 mg/kg	9.812781	6.713302
G284 2 mg/kg	6.007987	2.434861
G284 1 mg/kg	2.413099	1.540902
G284 0.3 mg/kg	1.130903	0.3189707

图17B

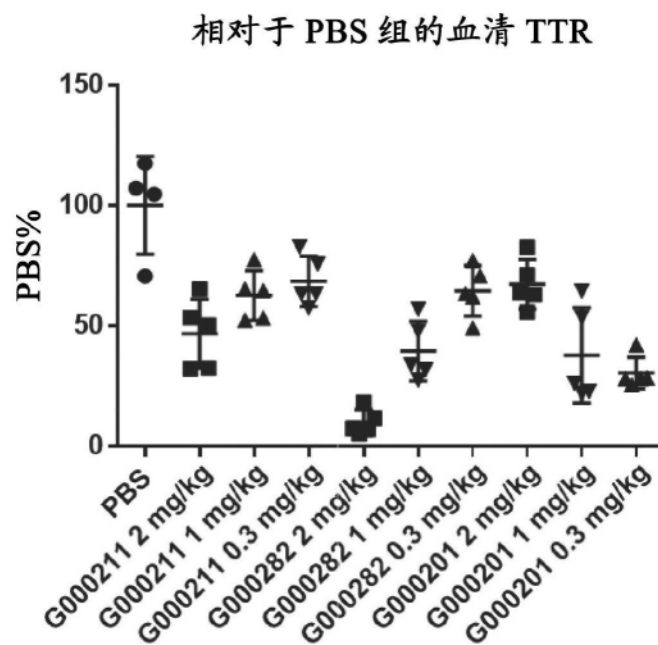


图17C

	平均 TTR 减少 %	标准差
PBS	100.000	20.31276
G211 2 mg/kg	46.73565	14.33137
G211 1 mg/kg	62.66805	10.30656
G211 0.3 mg/kg	68.51203	10.40399
G282 2 mg/kg	9.890765	5.288372
G282 1 mg/kg	39.58118	12.35095
G282 0.3 mg/kg	64.59702	10.51861
G284 2 mg/kg	67.28742	10.217
G284 1 mg/kg	37.76873	19.77835
G284 0.3 mg/kg	30.4822	6.612638

图17D

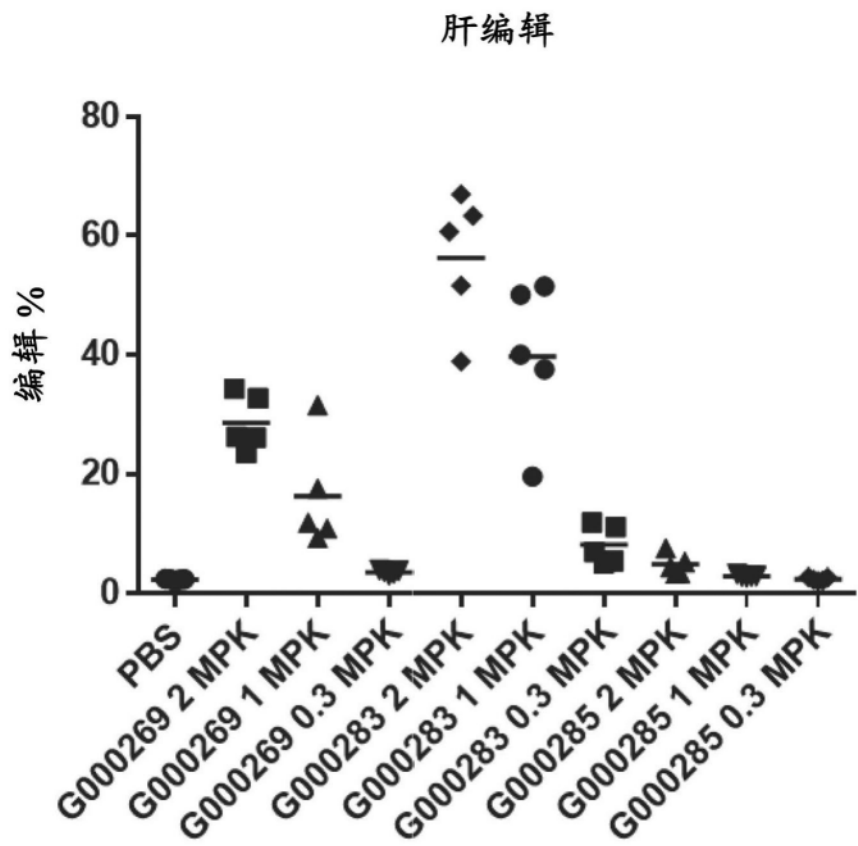


图18A

指导	剂量	平均编辑 %
<i>PBS</i>		<i>2.38</i>
<i>G269</i>	<i>2 MPK</i>	<i>28.57</i>
	<i>1 MPK</i>	<i>16.21</i>
	<i>0.3 MPK</i>	<i>3.54</i>
<i>G283</i>	<i>2 MPK</i>	<i>56.32</i>
	<i>1 MPK</i>	<i>39.73</i>
	<i>0.3 MPK</i>	<i>8.08</i>
<i>G285</i>	<i>2 MPK</i>	<i>4.80</i>
	<i>1 MPK</i>	<i>2.90</i>
	<i>0.3 MPK</i>	<i>2.44</i>

图18B

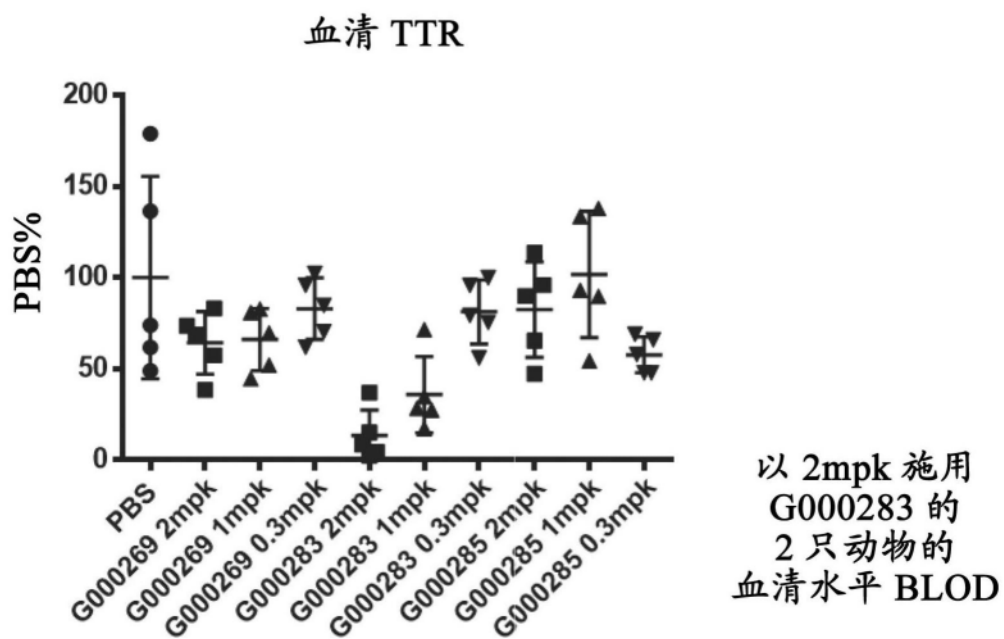


图18C

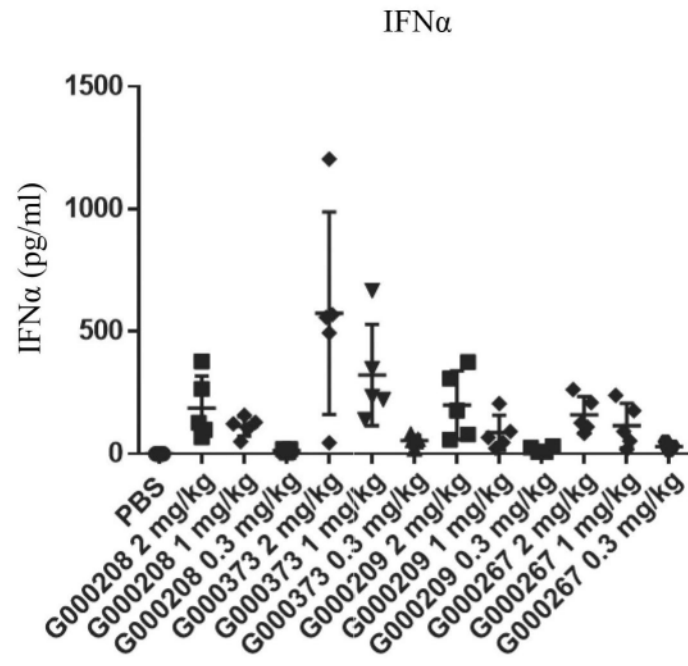


图19A

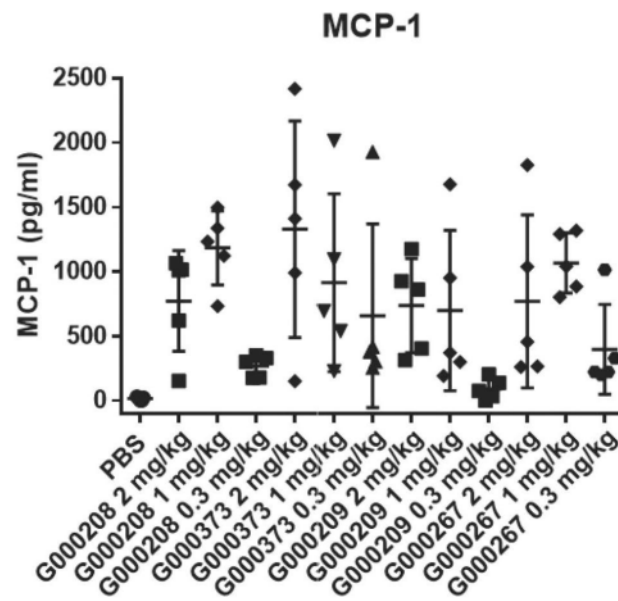


图19B

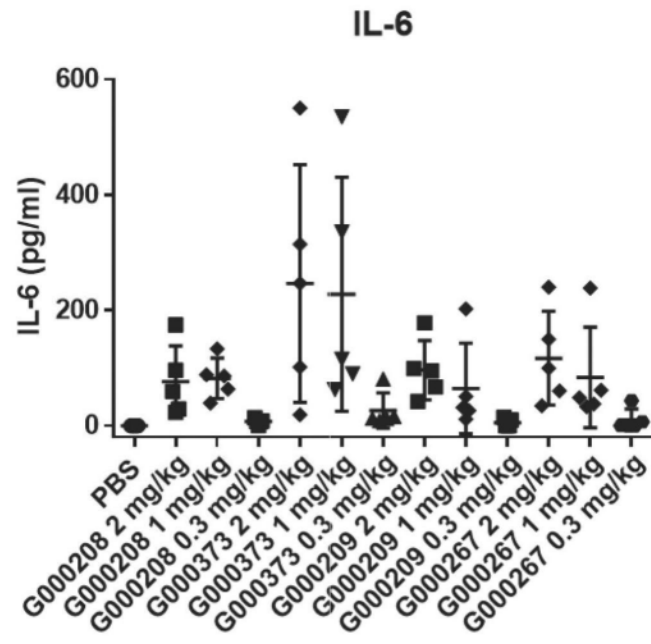


图19C

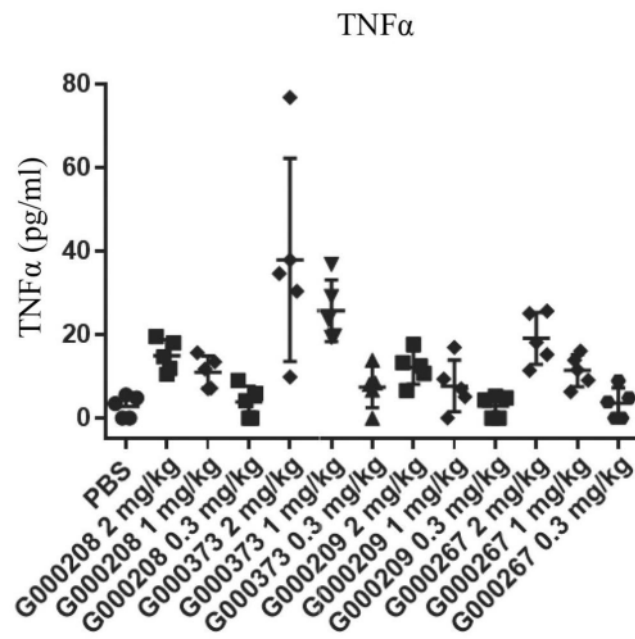


图19D

肝中 FVII 基因座处的编辑

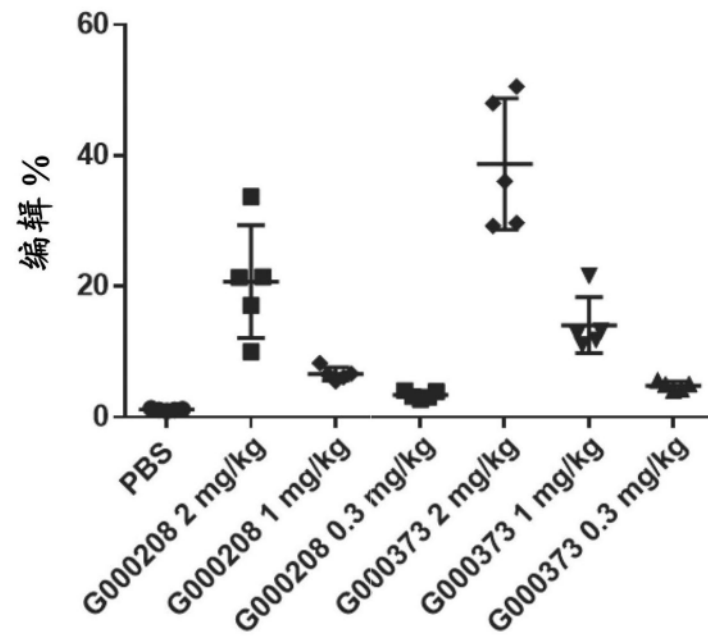


图20A

肝中 TTR 基因座处的编辑

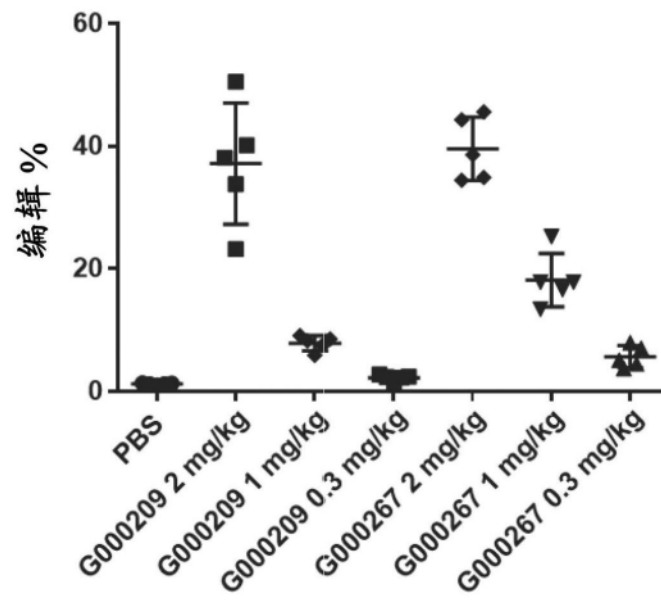


图20B

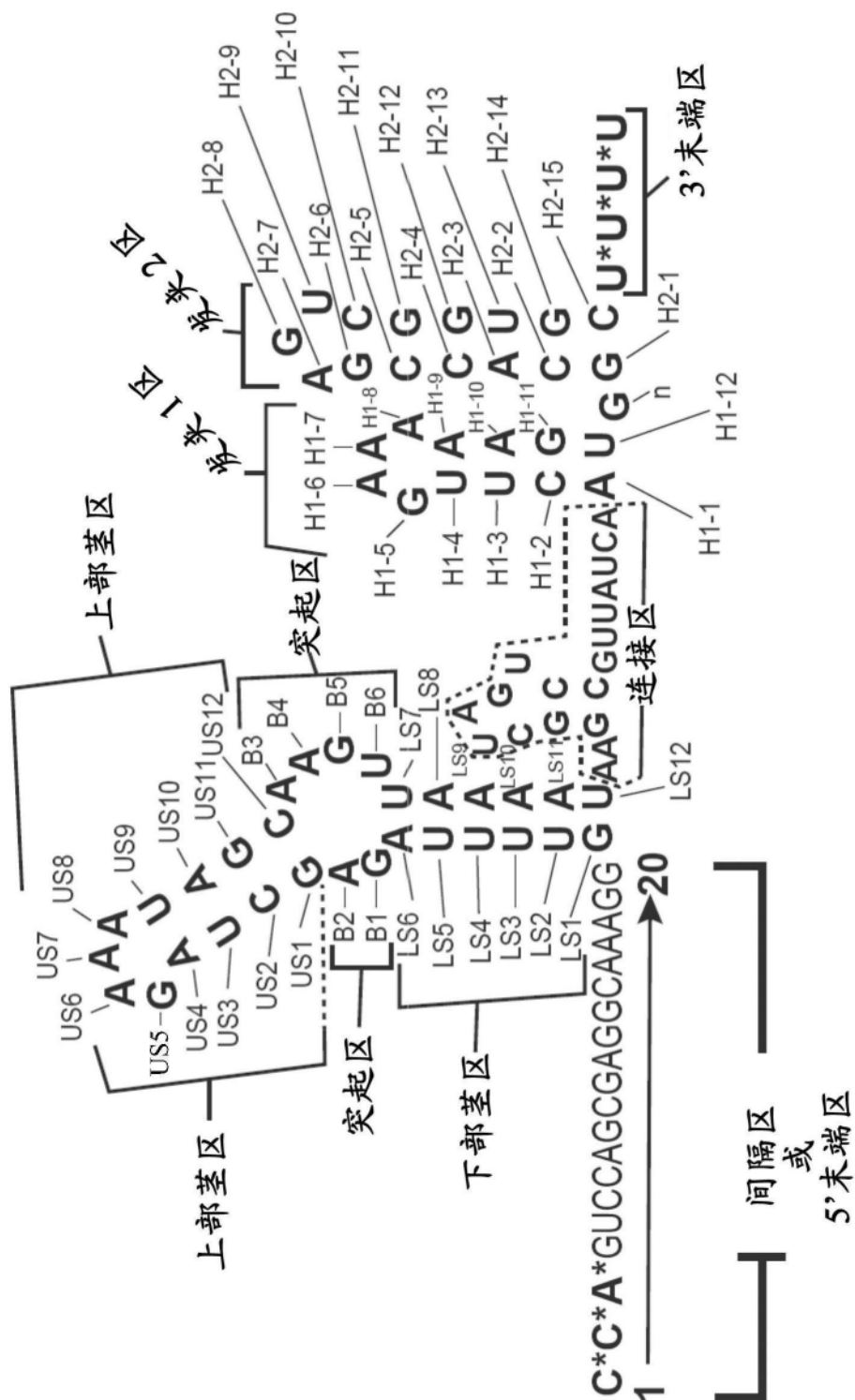
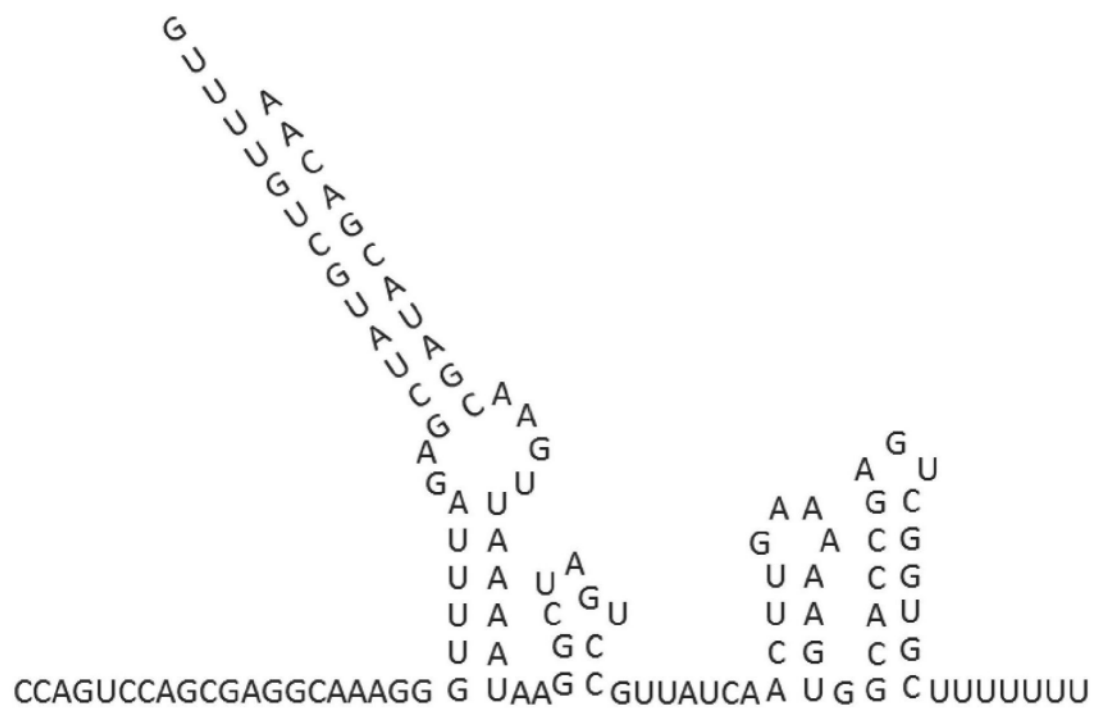


图21A



dgRNA

CR000686 + TR000002

图21B

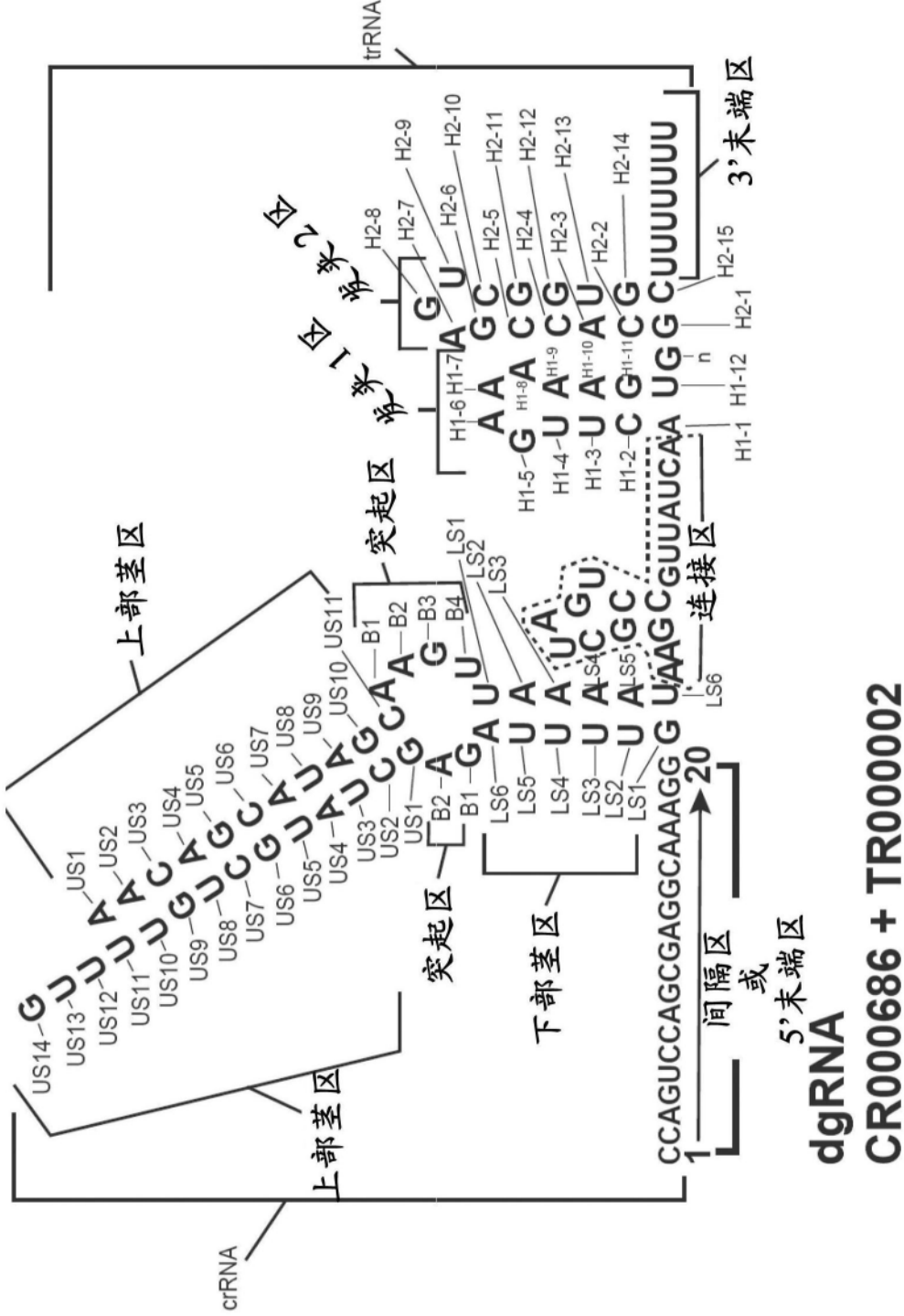


图21C

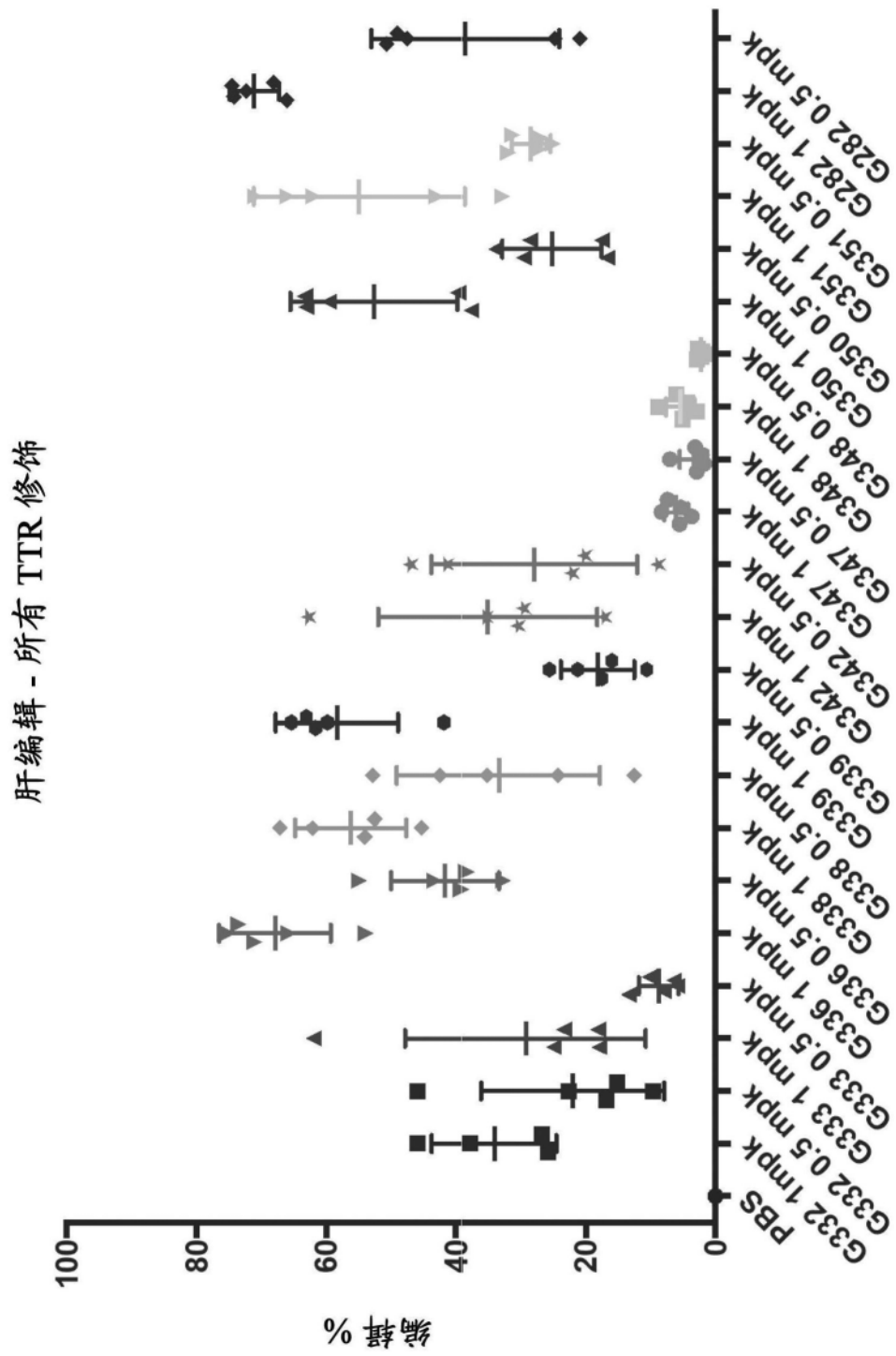


图22A

组	平均编辑 %	标准差
PBS	0	0
G332 1mpk	34.14	9.575
G332 0.5 mpk	22.08	14.13
G333 1 mpk	29.28	18.53
G333 0.5 mpk	8.801	3.082
G336 1 mpk	67.92	8.609
G336 0.5 mpk	41.72	8.277
G338 1 mpk	56.25	8.561
G338 0.5 mpk	33.48	15.63
G339 1 mpk	58.36	9.444
G339 0.5 mpk	18.23	5.654
G342 1 mpk	35.12	16.84
G342 0.5 mpk	27.94	15.83
G347 1 mpk	6.073	1.825
G347 0.5 mpk	3.399	2.13
G348 1 mpk	5.464	2.171
G348 0.5 mpk	2.333	0.448
G350 1 mpk	52.66	12.88
G350 0.5 mpk	25.27	7.695
G351 1 mpk	54.94	16.24
G351 0.5 mpk	28.52	3.014
G282 1 mpk	71.08	3.789
G282 0.5 mpk	38.6	14.45

图22B

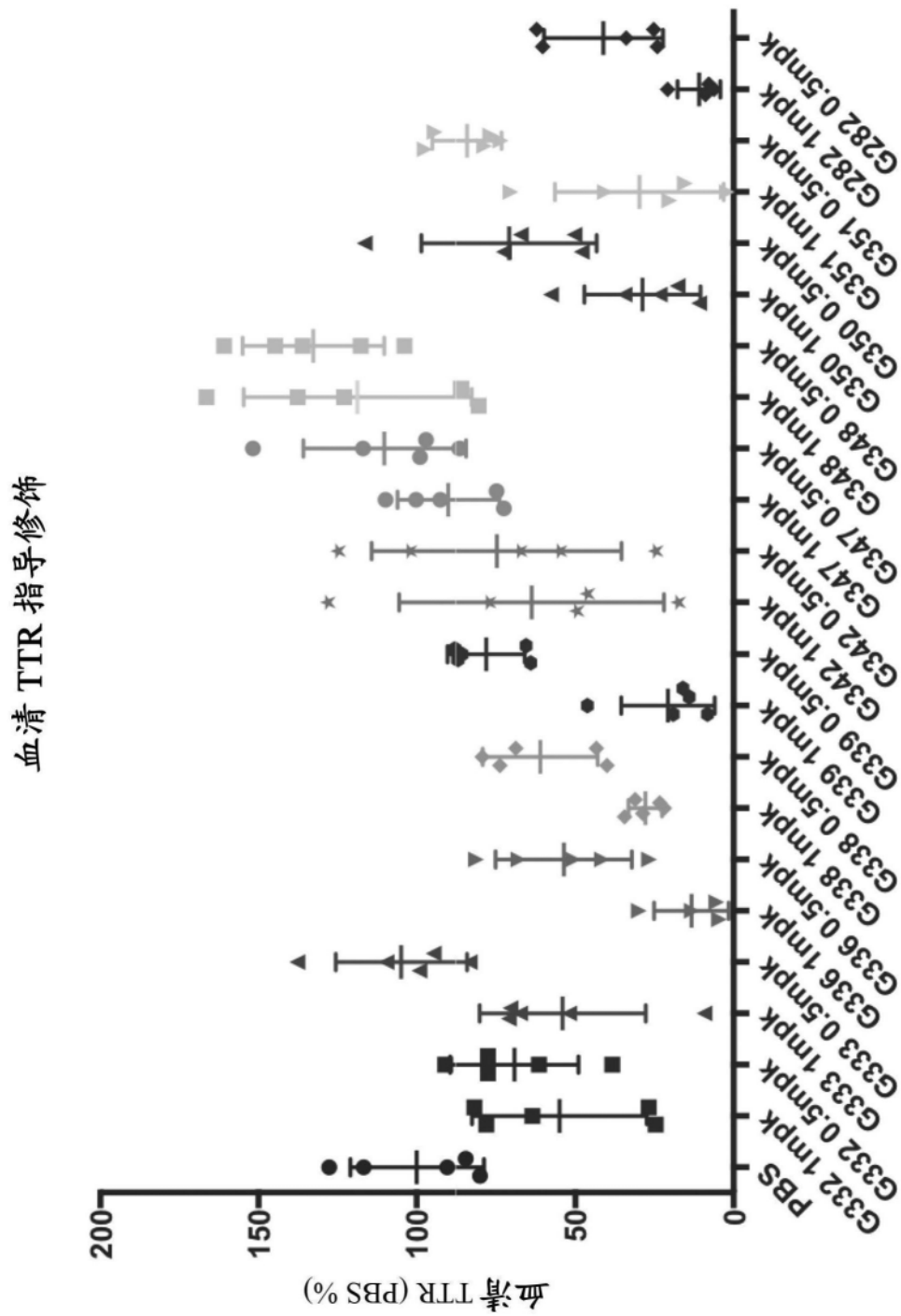


图22C

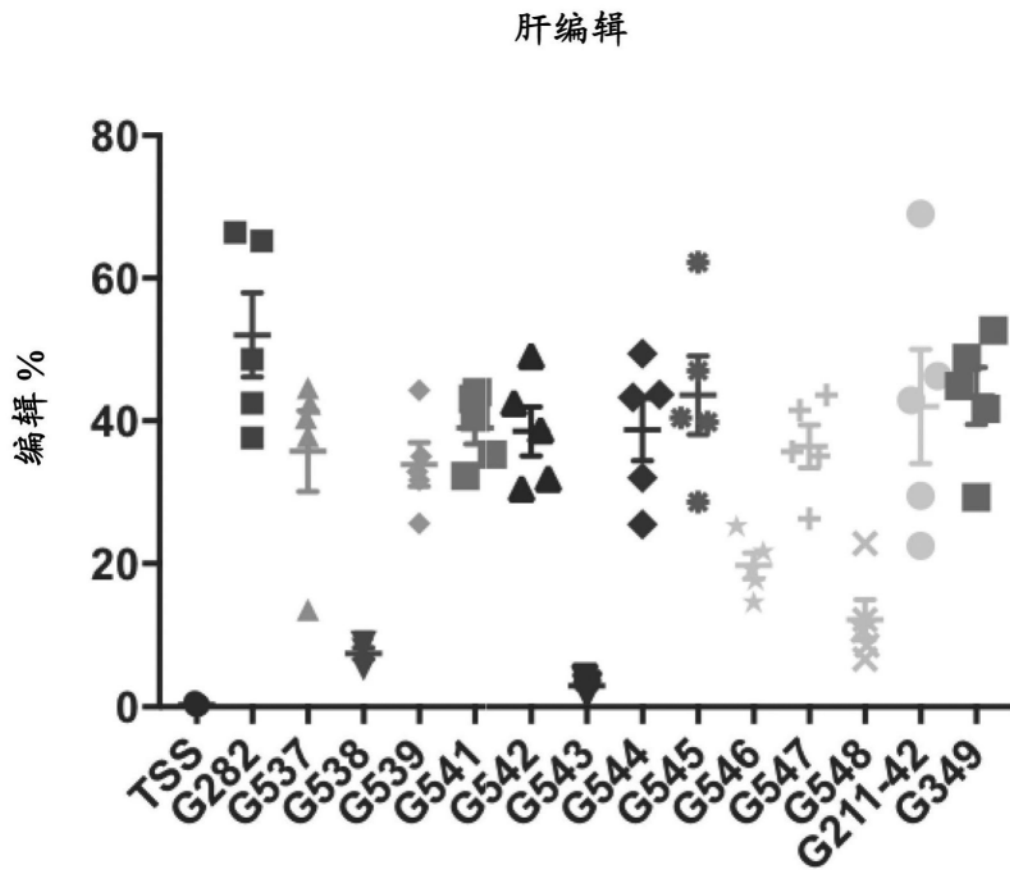


图23A

指导	平均编辑 %
TSS	0.32
G282	52.06
G537	35.78
G538	7.5
G539	33.9
G541	39.04
G542	38.54
G543	2.96
G544	38.78
G545	43.6
G546	19.74
G547	36.44
G548	12.2
G211-42	42.04
G349	43.48

图23B

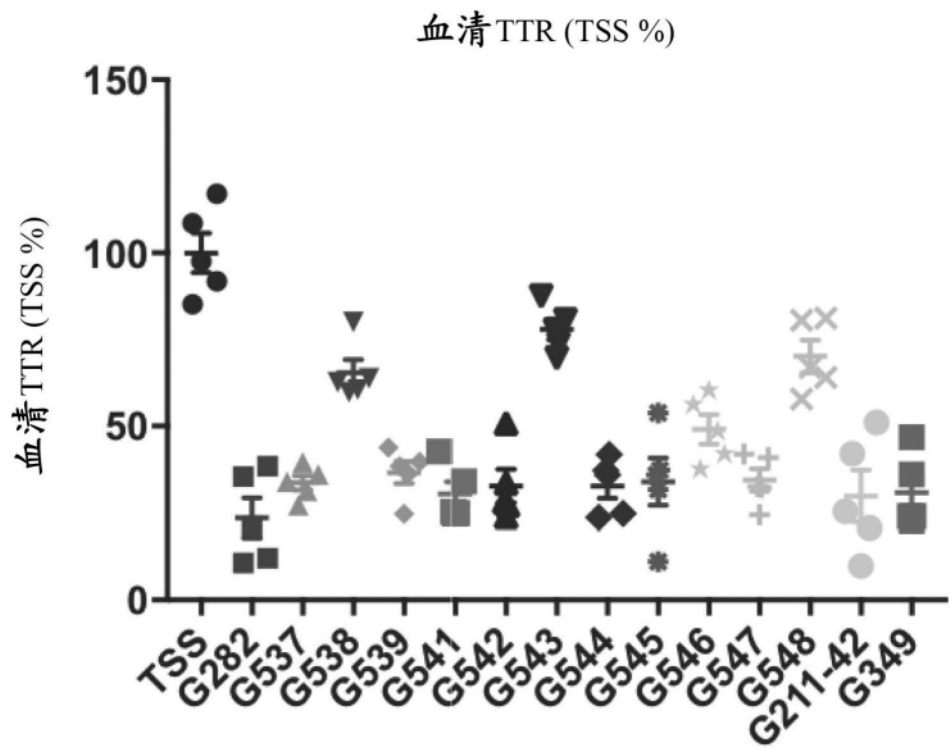


图23C

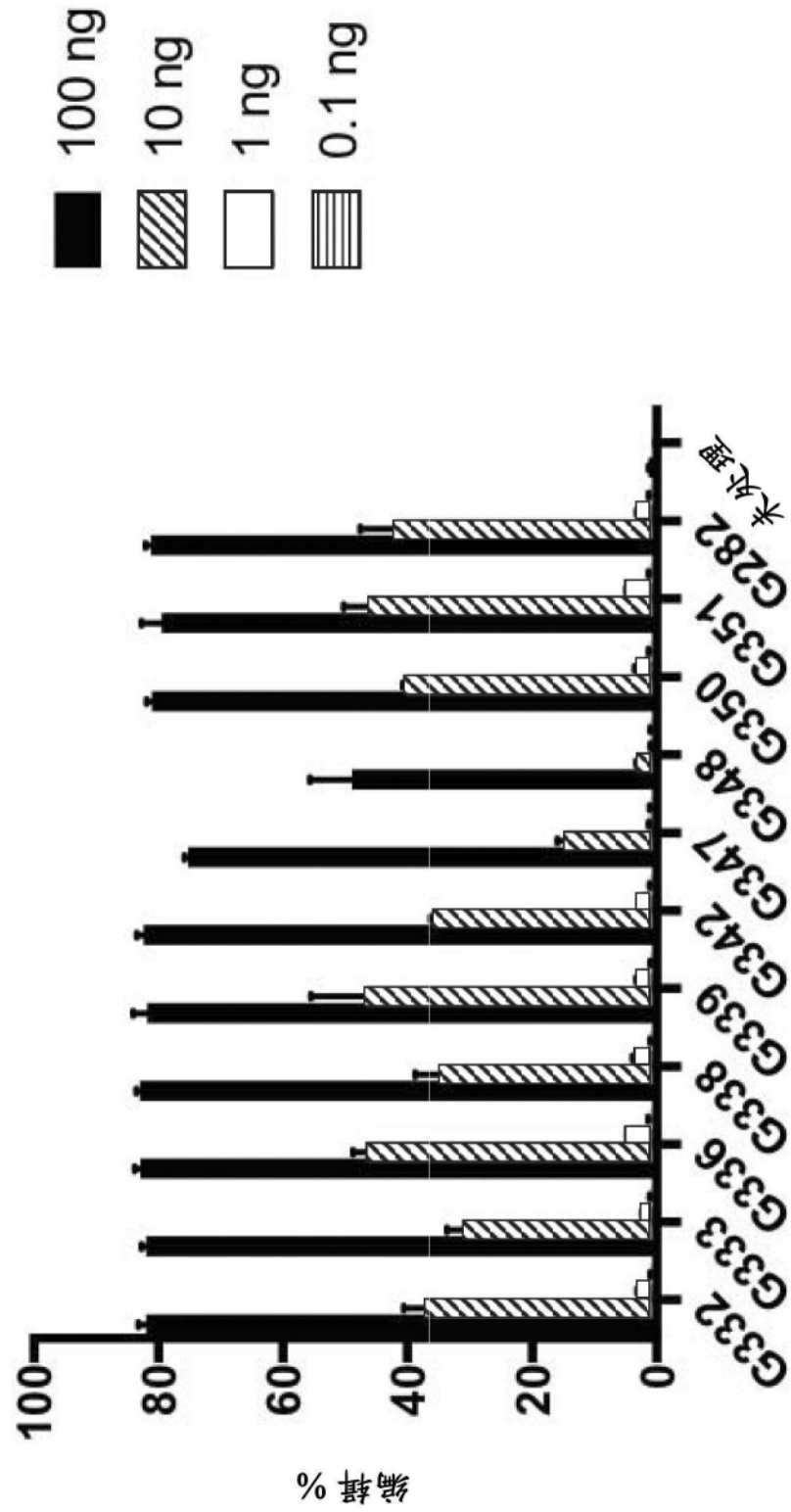


图24A

EC50 计算值转化的归一化

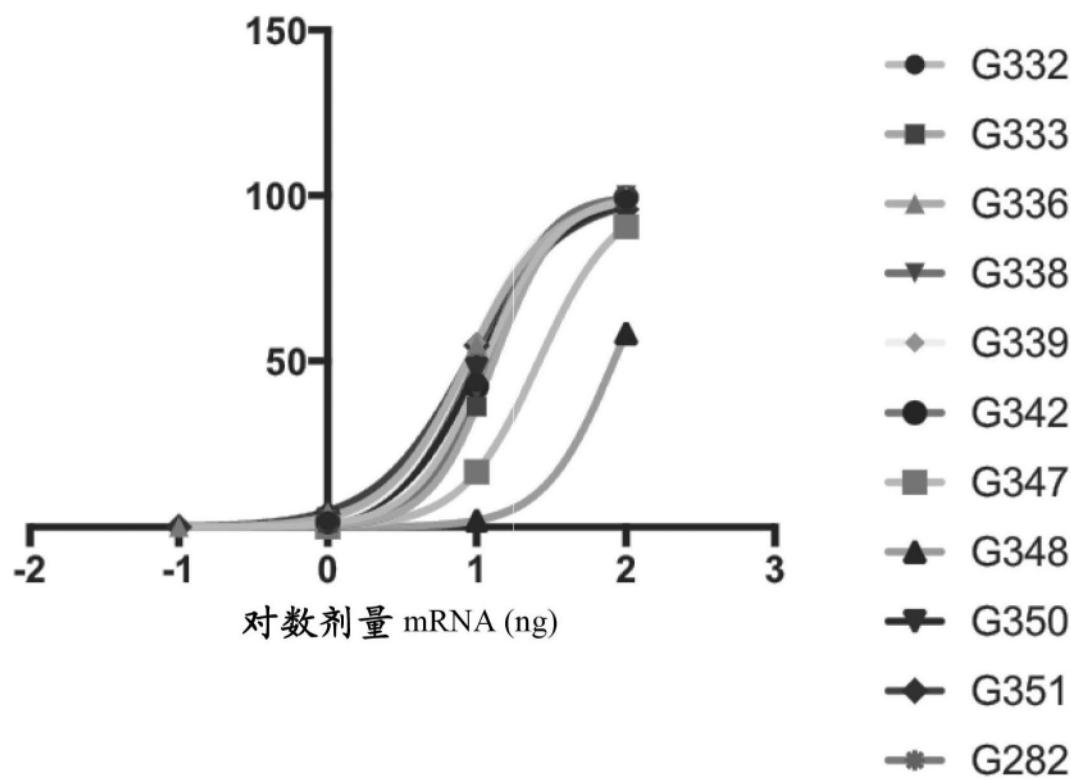


图24B

指导	EC50
G332	11.42
G333	13.07
G336	8.735
G338	11.80
G339	8.778
G342	11.60
G347	26.07
G348	83.09
G350	10.57
G351	8.797
G282	10.04

图24C