



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109414449 A

(43)申请公布日 2019.03.01

(21)申请号 201780038175.3

(22)申请日 2017.05.05

(30)优先权数据

62/333,004 2016.05.06 US

62/410,487 2016.10.20 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.12.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/031381 2017.05.05

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/193053 EN 2017.11.09

(71)申请人 托德·M·伍尔夫

地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 托德·M·伍尔夫

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理  
事务所(普通合伙) 11371

代理人 王晖 许洪洁

(51)Int.Cl.

A61K 31/7088(2006.01)

A61K 31/7115(2006.01)

A61K 31/712(2006.01)

C12N 5/10(2006.01)

C12N 15/09(2006.01)

C12N 15/11(2006.01)

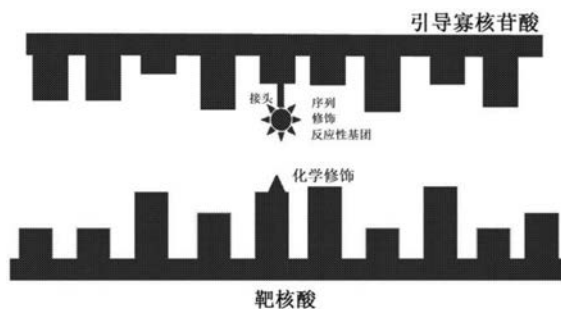
权利要求书1页 说明书54页 附图35页

(54)发明名称

利用和不利用可设计核酸酶编辑基因组的改进方法

(57)摘要

本发明包括用于在分离的细胞内或生物体内基因组编辑的组合物和方法。编辑寡核苷酸含有寡核苷酸链,其可以含有将编辑部分定位在适当位置的接头,用于修饰靶向核碱基和crisprRNA结构域以及失活的Cas9结构域,其引起靶向核碱基的脱氨基。编辑寡核苷酸还可含有来自基因组中的靶向序列的至少一种核苷酸序列变化。该方法的某些实施方式包括利用编辑寡核苷酸修饰细胞内的基因组序列,而不需要在编辑过程中用外源性蛋白质辅助。与未修饰的寡核苷酸相比,编辑寡核苷酸可以包括增加寡核苷酸的核酸酶稳定性的骨架修饰。



1. 一种编辑寡核苷酸,包括crisprRNA结构域和连接到碱基修饰活性剂的失活的Cas9结构域,其中,所述crisprRNA结构域和所述失活的Cas9结构域定位于基因组序列中的靶向核碱基附近,其中所述碱基修饰活性剂引起所述靶向核碱基的脱氨基。

2. 一种基因组序列中靶核碱基的位点引导的脱氨基的方法,由包括crisprRNA结构域和连接到碱基修饰活性剂的失活的Cas9结构域的编辑寡核苷酸引导,包括以下步骤:将根据权利要求1所述的编辑寡核苷酸引入细胞或生物体中,没有额外的外源性蛋白质或核酸辅助编辑所述靶核碱基,其中,所述编辑寡核苷酸包括一个或多个修饰,其中所述一个或多个修饰是一个或多个骨架修饰、一个或多个糖修饰和/或一个或多个核碱基修饰,其中所述编辑寡核苷酸与含有所述靶核碱基的所述基因组序列基本上互补,其中所述编辑寡核苷酸的所述修饰提高编辑效率,并且其中所述靶核碱基的所述位点引导的脱氨基是将胞嘧啶核碱基脱氨基成尿嘧啶核碱基,由所述编辑寡核苷酸的crisprRNA以及所述失活的Cas9而引导。

## 利用和不利用可设计核酸酶编辑基因组的改进方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 以下申请要求于2016年5月6日提交的美国临时专利申请系列号62/333,004和于2016年10月20日提交的美国临时申请系列号62/410,487的优先权。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 不适用

[0005] 对于联合研究协议的缔约方的名称

[0006] 不适用

[0007] 在光盘上提交的材料引用并入

[0008] 不适用

### 技术领域

[0009] 本发明涉及修饰基因组或RNA的序列的多聚核苷酸,包括寡核苷酸或多肽,包括蛋白质,应用于人和动物治疗(包括体内和体外治疗应用)、美容手术(cosmetic procedure)、临床前开发、基础研究和用于农业以提高食品储备、改良动物品种的畜牧业(农场动物和其他驯养动物)以提供理想的特征以及能源生产的领域中的用途。

### 背景技术

[0010] 生来患有简单基因突变导致的关键功能蛋白(诸如代谢酶)丧失的患者目前几乎没有校正治疗的选择。对于少数先天性代谢缺陷的患者来说,外源性蛋白质递送已经成功用于提供治疗用替代酶,并需要终身治疗。不幸的是,适合蛋白质替代的病症的数量是有限的,因为大多数基因缺陷需要在患者的特定细胞类型内产生蛋白质,并不能简单地通过施用蛋白质来治疗。

[0011] 基因替代疗法(“基因疗法”)有可能成为功能上校正遗传缺陷的更加普遍有用的方法。然而,基因替代疗法是用词不当的,因为在大多数情况下,cDNA插入细胞(而不是整个基因),且缺陷基因没有被替代,而是野生型cDNA被插入到细胞染色体外或不同位点,而不是内源性基因。

[0012] 对于这一技术的巨大潜力的最初热情已经被数十年的临床试验缓和,从而使基因疗法成为药物的观点更现实。已经出现的是认识到基因疗法有许多局限性,包括1)对病毒载体的不良免疫应答的可能性,2)整合病毒载体以激活癌基因导致癌症的可能性,3)转基因的表观遗传沉默以及4)表达的转基因诱导细胞免疫应答的可能性。寡核苷酸化学和体内核酸递送技术在过去十年的发展已经开启了DNA和RNA修饰疗法的潜力。许多临床试验中的阳性数据和美国首例系统性反义药物Mipomersen(Ionis Pharmaceuticals, San Diego, CA)的批准已进一步证明了寡核苷酸药物的临床应用。

[0013] 虽然已经证明使用治疗性寡核苷酸通过调节RNA水平抑制蛋白质表达的临床益处,但是核酸编辑或修复方法的治疗潜力可能会超过这些抑制方法的临床潜力(Woolf等人,PNAS 92:8298-8302,1995和Woolf,Nat.Biotech 16:341-344,1998)。稳健的编辑技术

平台能够实现突变DNA的位点特异性校正,保护性等位基因的产生或以其他方式产生针对研究、治疗、美容或农业目的所期望的在整个生物体、细胞或组织的基因组中的变化。

[0014] 这种平台作为对由基因点突变和其他基因病变引起的广泛疾病的治疗性干预以及潜在治疗将具有广泛应用。与基因疗法不同,基因组编辑具有修复一种或多种实际病变的可能性,使编辑的染色体具有野生型序列,而没有载体序列,其他位点整合的可能性,或随机插入或缺失的可能性。这种“无足迹”方法对于治疗适应症是极其需要的,因为它排除了由于非天然序列引起的潜在副作用。此外,如果基因组编辑治疗剂无意中编辑了患者的种系,对野生型的精确“无足迹”编辑将不会在后代内产生非天然序列。

[0015] 有两种常规的用核酸的序列编辑机制。这些机制是化学修饰和将核酸序列掺入靶。通过化学修饰机制,编辑寡核苷酸引起被靶向的核碱基的化学修饰,使得被靶向的核碱基的编码改变。第二种常规机制是将一种或多种寡核苷酸掺入靶RNA或DNA序列。在这种机制中,寡核苷酸通常被称为“供体”DNA。这种机制被不严格地称为同源重组(HR)或同源性定向修复,但也可以包括机制,诸如基因转换、错配修复的诱导(参见PCT/US2015/65348中的图1)和反式剪接或链侵入后引发核酸合成。

[0016] 由下一代测序(Next Generation Sequencing)和SNP分析推动的关于遗传途径和分子途径的信息的激增已经提供了大量用于治疗性编辑的靶以治疗单基因疾病和多基因疾病(参见PCT/US2015/65348)。DNA编辑修复的治疗潜力已经被有前景的数据证明。已经使用工程化锌指核酸酶(Sangamo Biosciences, Inc., Richmond, CA)来治疗HIV,以及用外显子跳跃反义吗啉(Sarepta Therapeutics, Inc., Cambridge, MA)修复mRNA,已被用于治疗肌营养不良症。使用可设计核酸酶来提高编辑效率的CRISPR/Cas-9和其他基因编辑方法催生了治疗应用的许多研究产品和重大投资。

[0017] Woolf等人在脊椎动物模型系统中首次证实了治疗性mRNA编辑(PNAS 92:8298-8302, 1995)。在该系统中,杜氏肌营养不良(Duchenne Muscular Dystrophy)mRNA中的被靶向的终止密码子突变在靶位点处用诱导被酶靶向的核碱基的化学修饰的编辑反义RNA通过双链体形成(duplex formation)来修饰。该酶是内源性腺苷脱氨酶,其将靶腺苷修饰为肌苷,其主要翻译为鸟嘌呤。Woolf等人的工作诱导了限于特异性的编辑。

[0018] Montiel等人(PNAS 110(45):18285-90, 2013)证实了囊性纤维化的mRNA修复的相关机制,其中在哺乳动物细胞中实现了20%的校正。虽然这成功地证明了治疗性编辑的原理,但是Montiel的方法对临床应用来说太复杂。其主要原因是Montiel等人的方法需要通过基因疗法、mRNA疗法或其他方法将修饰的基因、mRNA或蛋白质引入细胞。因此,基因疗法和mRNA疗法所公认的所有已知的缺点也与Montiel的治疗性编辑方法有关。

[0019] 在另一方法中,Singer等人(Nucleic Acids Research, 27(24):38-45, 1999)用与由RecA蛋白辅助的靶链杂交的烷基化寡聚物靶向DNA。然而,将入侵的寡核苷酸交联到靶DNA通常导致分布在DNA区域上的各种突变,并且可能导致复制的抑制。已经实现了反应性碱基修饰化学物质与寡核苷酸的缀合和对被靶向的dsDNA序列的序列特异性修饰(Nagatsugi, 等人Nucleic Acids Research, Vol. 31(6):e31D0I:10.1093/nar/gng031, 2003)。该研究证明了具有针对被靶向的碱基的某种特异性的被靶向的序列的位点特异性突变以及显著却低的效率(一次处理为0.3%)。然而,这种方法具有与Singer等人相同的缺点,因为其引起交联。

[0020] Sasaki等人(J. Am. Chem. Soc., 126 (29):8864-8865, 2004; 还参见美国专利号7, 495, 095) 开发了一种将一氧化氮(NO) 递送到DNA序列的特异性胞嘧啶位点后对胞嘧啶碱基特异性脱氨基的方法。该技术需要非生理pH以允许反应发生, 以及长的孵育时间, 其不一定适用于治疗干预。此外, 化学反应性寡核苷酸策略即使在细胞中有效, 也需要复杂的化学合成, 并且可能与非被靶向的细胞成分(包括不理想的DNA) 有反应性。它们针对每种碱基变化还需要不同的靶向化学物质, 并且大多适于转换而不适于颠换, 这限制了它们的普遍应用。此外, 该方法不修复缺失和插入, 这是对其校正任何突变的普遍应用的进一步限制。尽管如此, 这种化学修饰方法进行编辑具有如下的优点: 其不需要向细胞添加外源蛋白质以便于编辑, 并且其原则上可以与高度修饰的寡核苷酸骨架一起使用, 该骨架可以允许比具有一个或多个未修饰DNA键的寡核苷酸更大的核酸酶抗性、更好的组织分布和细胞摄取。

[0021] 使用单链编辑寡核苷酸进行编辑导致一致的可重复编辑, 但效率相对较低(约0.1-1%)。最活跃的单链编辑寡核苷酸具有未修饰的DNA内部区域, 其导致细胞中快速的核酸酶降解并且可能导致Toll样受体激活。通过以下方法提高编辑效率:

[0022] 1. 在编辑寡核苷酸的每个端添加三个硫代磷酸酯残基(但是, 所得到的编辑寡核苷酸其中仍然易受细胞内快速核酸内切酶消化并且硫代磷酸酯增加其毒性);

[0023] 2. 同步细胞周期使得在S期期间用编辑寡核苷酸处理细胞。不幸的是, 虽然这在一定程度上提高了编辑效率, 但是对于体内治疗而言, 该方法是麻烦的并且并不总是实用的;

[0024] 3. 用减慢复制叉进展和/或在细胞中诱导DNA链切割的试剂处理细胞, 这导致细胞中DNA修复增加(然而尽管在一定程度上这提高了编辑效率, 但是对于体内治疗而言, 该方法也是麻烦的并且并不总是实用的);

[0025] 以及

[0026] 4. 加入在被靶向的编辑附近结合的PNA夹或链入侵单链PNA(Bahal等人Current Gene Therapy 14(5):331-42, 2014, Chin等人PNAS105(36):13514-13519, 2008, Rogers等人PNAS 99(26):16695-16700, 2002, 美国专利8, 309, 356)。

[0027] 这些改进在模型体外细胞系统中提高编辑效率高达每次治疗约8%, 但是每种方法都有上述限制(Kmiec, Surgical Oncology 24:95-99, 2015)。

[0028] 可设计核酸酶, 诸如锌指核酸酶、TALEN和基于I-CreI归巢内切核酸酶的核酸内切酶(诸如, Precision Biosciences, Durham, NC的ARCUS™) 已被用于在编辑靶点附近, 通过切割染色体来增强供体DNA序列向染色体的掺入。近些年, 用CRISPR-Cas9系统靶向切割也已用于增强编辑基因组的效率。然而, 可设计核酸酶时常导致脱靶修饰, 并且需要在染色体中潜在危险的以及不期望的单链断裂和双链断裂。使用可设计核酸酶的一种具体地不良后果是在一个或多个切割位点产生随机插入和缺失(插入缺失)。供体DNA所需的精确编辑与插入缺失的产生竞争, 留下了精确编辑的染色体和具有各种插入缺失的染色体的混合物。该系统还严格要求将外来工程化蛋白表达或以功能形式递送到细胞。工程化蛋白Cas9是免疫原性的, 并因此对于治疗应用而言是不太合意的。此外, 蛋白质到细胞的表达或递送是临床发展的实质性挑战。为了将一个序列特异性地改变为另一个定义的序列, 除了Cas9之外, CRISPR-Cas9系统需要超过70个核苷酸的gRNA和用于插入到基因组中的一个或两个另外的寡核苷酸。因此, CRISPR/Cas9编辑系统是非常复杂的, 并且这种复杂性为临床开发带来了挑战。

[0029] 因此,在生物医学和生物技术工业中需要工作更有效并且要求不严格的核酸编辑化合物:将编辑剂交联到被靶向的核酸的核碱基作为作用方法;或通过外源可设计核酸酶引入插入缺失诱导靶核酸中断裂以获得编辑。此外,希望这些编辑剂能够通过编辑被靶向的DNA序列和在一些实施方式中的RNA序列来修复点突变以及在一些情况下插入和缺失,在编辑含有增强药代动力学的化学修饰并具有生物分布和细胞内核酸酶稳定性的寡核苷酸的情况下,不实质减少编辑活性,可选地减少To11样受体的激活,并且校正疾病背后的遗传原因。

## 发明内容

[0030] 本发明的一个方面是一种利用与基因组的DNA链之一或RNA互补的单链寡核苷酸用于序列编辑的方法(Woolf,T.M.等人Nature Reviews Drug Discovery 16,296(2017))。该方法包括以下步骤:将单链寡核苷酸引入细胞或生物体,而不严格需要外源蛋白质来辅助编辑所述靶序列。在某些实施方式中,除了相对于靶序列的一个或多个错配(包括插入或缺失),寡核苷酸与靶序列基本上互补。这种寡核苷酸在本文中可称为寡核苷酸、本发明的寡核苷酸或编辑寡核苷酸。

[0031] 在某些实施方式中,靶识别结构域是编辑寡核苷酸,其与靶序列结合并且与靶序列基本上互补,并且可以包含一种或多种化学修饰。

[0032] 在一些实施方式中,靶序列识别结构域(参见实施例的表1)与核碱基修饰活性剂非共价连接,或激活核碱基修饰活性剂,该核碱基修饰活性剂与靶序列上的核苷酸反应或促进与靶序列上的核苷酸反应(例如图1)。核碱基修饰活性剂可以是反应性化学物质、催化剂或酶。这些反应的实例包括烷基化、乙酰化、交联、氨基化或去氨基化。

[0033] 这些编辑寡核苷酸可以包括如下结构:其中每个寡核苷酸与所述靶核酸基本互补并且为约10至约50个或10至约200个核苷酸,以及其中至少一个所述寡核苷酸可以包括crisprRNA和Cas 9,其具有连接至定位在靶向核碱基附近的具有修饰活性剂的碱基的非活性核酸酶结构域,其中所述碱基修饰活性剂引起被靶向核碱基的脱氨基。被靶向的核酸可以是RNA或DNA。靶标为RNA时,优选mRNA。

[0034] 这种寡核苷酸在本文中也可以称为寡核苷酸、本发明的寡核苷酸或编辑寡核苷酸。寡核苷酸可以优选地具有一种或多种化学修饰。这种或多种化学修饰可以包括一种或多种骨架修饰、糖修饰、核碱基修饰、接头和/或缀合。

[0035] 寡核苷酸与基因组中的靶序列互补,并可以与靶序列错配,如下所述。与未修饰的寡核苷酸相比或与每个末端上具有三个硫代磷酸酯的寡核苷酸相比,修饰可通过增加核酸酶稳定性提高编辑效率。

[0036] 在一种实施方式中,编辑寡核苷酸序列是编辑完成后所期望的序列。所期望的编辑可能是转换或颠换,或者是缺失或插入。不希望受特定理论或机制的束缚,当在诸如转录或复制的细胞过程期间靶序列与相反的基因组链分离时,编辑寡核苷酸结合到部分或完全互补的靶基因组DNA序列。在一些情况下,编辑寡核苷酸与双链基因组DNA靶标的杂交可以在靶DNA的“呼吸(打开,breathing)”或瞬时熔解期间发生。在一些实施方式中,编辑寡核苷酸侵入双链基因组DNA可选地由一种或多种蛋白质促进,诸如Cas-9(或Cas-9同源物)或RecA和单链DNA结合蛋白,或其他增强链侵入的蛋白质,诸如表VIII中列出的那些。

[0037] 在一种实施方式中,一旦在编辑寡核苷酸和靶基因组DNA链之间形成异源双链体,则通过细胞DNA修复来校正非完美互补区域。当编辑寡核苷酸用作修复的“正确”模板时,所期望的编辑将被掺入被靶向的基因组DNA链或RNA链中。在细胞中还可能发生的第二种机制中,编辑寡核苷酸通过同源重组(HR)或其他导致编辑寡核苷酸序列掺入靶DNA或RNA的过程而被掺入靶核酸中,诸如DNA中。

[0038] 在一种实施方式中,各编辑寡核苷酸包括表II和表IV中分别列出的核苷酸间连接或糖修饰中的至少一种。蛋白质或催化核酸可以与编辑寡核苷酸结合以增强编辑效率(表VIII)。

[0039] 其他实施方式包括药物组合物和含有一种或多种编辑寡核苷酸的细胞,该药物组合物包括药物载体(pharmaceutical carrier)或递送媒介物(delivery vehicle)以及一种或多种编辑寡核苷酸,其中载体可以是水、盐水或生理缓冲盐水。

[0040] 本发明的另一方面是一种改善需要针对医学病症进行治疗的个体的健康或者减少或消除或预防需要针对医学病症进行治疗的个体的病症的方法,包括将含有至少一种编辑寡核苷酸的组合物施用至个体。一些施用方法和靶向适应症列举在(PCT/US2015/65348)。

[0041] 本发明的其他方面包括向疑似具有可通过这种施用治疗的病症的个体施用至少一种编辑寡核苷酸的方法,其中可以通过以下方式来减少、预防或消除该病症:将靶核酸中的突变的核苷酸回复到野生型核苷酸;修饰靶核酸中的突变的密码子的非突变核苷酸以产生野生型密码子;将靶核酸中的成熟前终止密码子转变为通读非野生型密码子;或修饰靶核酸中的突变的密码子以产生导致非致病氨基酸的非野生型密码子,还编辑寡核苷酸插入或缺失多个核苷酸(即,在一些情况下小于约10个、小于5个或小于3个)(参见(PCT/US2015/65348))。

[0042] 本发明的另一方面是用于修饰编码蛋白质或功能性RNA的核酸、或者调控基因的转录水平以调节所述蛋白质的或RNA的活性或者修饰突变蛋白质以抑制其致病影响的方法,其包括以下步骤:向细胞或个体施用至少一种编辑寡核苷酸或蛋白质。在这些方法中,用于编辑的靶核酸是DNA。

[0043] 本发明的编辑寡核苷酸或蛋白质可以执行以下功能中的一种或多种,所述功能包括:突变的碱基精确回复到具有野生型DNA或RNA序列的编码特异性的碱基;改变突变的密码子以编码导致非致病氨基酸的非野生型密码子;将终止密码子修饰为非野生型通读密码子(仍然允许被靶向的蛋白质的活性或部分活性的密码子);改变突变的密码子的非突变碱基,这导致野生型密码子或非疾病氨基酸密码子;改变蛋白质的核酸序列,以增加或减少(或消除)该蛋白质的结构域的活性;改变RNA或DNA的序列,以产生已知能够防护疾病的等位基因;改变被靶向的突变蛋白质中除突变的或疾病变异的密码子以外的位点,这抑制突变基因的致病影响;改变基因或RNA中除突变的或疾病变体以外的位点,这抑制突变基因的致病影响(第二位点抑制物);改变基因的启动子、增强子或沉默区域,这调节疾病相关基因的表达,使疾病状态变弱(向上或向下调控或调节基因表达对环境变化的反应);DNA中糖的甲基化,以改变被靶向的序列的表观遗传状态和/或在DNA或RNA水平上改变剪接位点序列以获得治疗疾病状态的剪接模式。

[0044] 自递送寡核苷酸是指有效进入细胞内部而没有递送媒介物的化学物质,诸如Gal-

NAC (N-乙酰-D-半乳糖胺) 缀合的寡核苷酸、亲脂基团缀合的编辑寡核苷酸(美国专利申请 20120065243 A1) 或者具有硫代磷酸酯尾部或具有约8个或更多个硫代磷酸酯键的寡核苷酸(美国专利申请20120065243 A1)。

### 附图说明

[0045] 图1:通过化学修饰被靶向的核碱基起作用的编辑寡核苷酸的实施方式的组分(大矩形代表嘧啶,以及较小矩形代表嘌呤)。

[0046] 图2:编辑和辅助寡核苷酸的示例性列举。4个文本串(碱基修饰(如果有)、序列、糖和骨架)形成修饰的寡核苷酸的示意图。对于骨架部分提供以下缩写:o=磷酸二酯;s=硫代磷酸酯;以及m=甲基膦酸酯。对于序列提供以下缩写:当RNA或RNA类似物时,“T”被理解为“U”;以及P=末端磷酸。对于糖部分提供以下缩写:D=DNA;R=RNA;M=2'-O-甲基;F=2' F;L=LNA;以及U=解锁核酸。对于碱基部分提供以下缩写:A=腺嘌呤;T=胸腺嘧啶;U=尿嘧啶;,G=鸟嘌呤;C=胞嘧啶;以及5=5甲基C。以下特征用于表示接头“-”=接头。其他缩写包括:ND=无数据;PNA以具有“N末端”的序列串开始;K=赖氨酸,O=8-氨基-2,6-二氧杂辛酸接头;以及J=代表假异胞嘧啶。带下划线的亚基如下:对于ETAGEN系列号100197= $\gamma$  miniPEG (PNA BIO,Thousand Oakes,California),对于ETAGEN系列号100198和100199=谷氨酸(PNA BIO,Thousand Oakes,California)。

### 具体实施方式

[0047] 除非另有定义,否则本文使用的所有术语具有与本发明所属领域的技术人员通常理解的相同的含义。本文整个公开内容所提及的所有专利、专利申请、网站发布和出版物均通过引用以其整体并入本文。在本文中术语有多个定义的情况下,以本节定义为准。

[0048] 如本文所用的,字母“G”、“C”、“A”、“T”和“U”各自通常分别代表含有鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶作为碱基的核苷酸。然而,应当理解,术语“核苷酸”也可以指经修饰的核苷酸,如下面进一步详述的。在序列中可以理解的是,如果所采用的化学物质是RNA或修饰的RNA,则“T”是指“U”。类似地,在序列中,在DNA或修饰的DNA中“U”被理解为的“T”。本领域技术人员十分清楚,鸟嘌呤、胞嘧啶、腺嘌呤、胸腺嘧啶和尿嘧啶可以被其他部分替换,而基本上不改变包含具有这种替换部分的核苷酸的寡核苷酸的碱基配对性质。例如,不限于,含有肌苷作为其碱基的核苷酸可以与含有腺嘌呤、胞嘧啶或尿嘧啶的核苷酸碱基配对。此外,例如,5-甲基C可以代替C存在于靶位点DNA中或在编辑寡核苷酸中。

[0049] 本文所用的术语“寡核苷酸”是指核苷酸(核糖核苷酸(RNA)、脱氧核糖核苷酸(DNA)或诸如肽核酸(PNA)(包括 $\gamma$ (包如和手性 $\gamma$ 手性A)的其他替代物的聚合形式,其是掺入以下长度范围的天然和非天然核苷酸的核碱基的聚合形式:至少8个、或一般约5个至约200个或当化学制备时最高500个,或者更常见至约100个可从许多来源(包括TriLink Biotechnologies(San Diego,CA)、Exiqon(Woburn,MA)或PNA BIO(Thousand Oakes,California))商业获得的以及用本领域已知的方法所制备的寡核苷酸(Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications(寡核苷酸合成:方法和应用),In Methods in Molecular Biology(分子生物学中的方法)288卷(2005)Piet Herdewijn(编辑)ISBN:1588292339Springer-Verlag New York,LLC)或更长的寡核苷酸,Integrated DNA

Technologies (Coralville, Iowa)。在采用专门的合成方法的情况下,诸如当采用非化学合成的单链DNA源时,诸如单链载体DNA或来自体外转录的质粒mRNA的逆转录cDNA,单链编辑“寡核苷酸”或供体DNA可以高达2,000个核苷酸。因此,该术语包括双链和单链DNA以及单链RNA。此外,寡核苷酸可以是核酸酶抗性的,并且包括但不限于2'-O-甲基核糖核苷酸,约束的核酸或锁核酸(LNA),2'氟、硫代磷酸酯核苷酸(包括手性富集的硫代磷酸酯核苷酸),二硫代磷酸酯核苷酸,氨基磷酸酯核苷酸和甲基磷酸酯核苷酸(包括手性富集的甲基磷酸酯)。寡核苷酸还可以含有非天然核苷间键(internucleosidyl linkage),诸如PNA或吗啉基核酸(MNA)中的那些。包括在短语“编辑寡核苷酸”中的上述定义是指可以进一步包含与靶序列(例如,亚硝酸胺)上的核苷酸反应或促进与靶序列上的核苷酸的反应的一种或多种化学修饰(例如,亚硝酸胺)的寡核苷酸。

[0050] 关于PNA,术语“5'”和“3'”应分别理解为意指N-末端或C-末端。

[0051] 本文所用的术语“核酸”是指多核苷酸化合物,其包括寡核苷酸,包含具有通过标准磷酸二酯键或其他键(linkage)共价键合的含氮杂环碱基或碱基类似物的核苷或核苷类似物。核酸包括具有2'-修饰的糖的核酸、DNA、RNA、嵌合DNA-RNA聚合物或其类似物。在核酸中,骨架可以由多种键(表II)组成,包括糖-磷酸二酯键、肽-核酸(PNA)键(PCT申请号W095/32305)、硫代磷酸酯键或其组合中的一者或多者。核酸中的糖部分可以是核糖、脱氧核糖或具有取代(例如,2'甲氧基和2'卤化物(例如,2'-F)、LNA(或其他构象约束修饰的寡核苷酸)和UNA(未连接的核酸)取代)的类似化合物(表IV)。

[0052] 本文所用的关于核酸的术语“2'-修饰的糖”是指2'F、2'氨基、2'-O-X(其中X是本领域已知的导致杂交能力寡核苷酸的修饰,包括但不限于烷基(例如,甲基、乙基或丙基)或取代的烷基,诸如甲氧基乙氧基或将2'核糖桥联到4'核糖位置的基团(即通常称为约束的核苷酸),包括但不限于LNA和cET-BNA、桥联3'-CH<sub>2</sub>-或5'-CH<sub>2</sub>-、桥联3'-酰胺(-C(O)-NH-)或5'-酰胺(-C(O)-NH-)或其任何组合(额外的实例参见表IV)。

[0053] 本文所用的术语“靶序列”是指待由编辑寡核苷酸修饰的细胞中的DNA序列或细胞中的RNA序列的核苷酸序列的连续部分。

[0054] 术语“crisprRNA”当用于本文时是指crRNA或CRISPR RNA。

[0055] 术语“互补的”当用于描述与第二核苷酸序列相关的第一核苷酸序列时(例如编辑寡核苷酸和靶核酸)是指包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在某些条件下与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸杂交并形成双链体(或三链体)结构的能力,如将被技术人员理解的。优选的杂交条件是在生物体内可能遇到的生理学相关条件,可以应用。技术人员将能够根据杂交核苷酸的最终应用来确定最适合于两个序列的互补性检验的一组条件。

[0056] 杂交包括包含第一核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸与包含第二核苷酸序列的寡核苷酸或多核苷酸在第一和第二核苷酸序列的整个长度上的碱基配对。这样的序列在本文中可以被称为相对于彼此“完全互补”,但是在本发明的编辑寡核苷酸的某些情况下,一个或多个碱基不同于靶序列的互补碱基。

[0057] 如本文所用的,术语“基本互补”是指本发明的寡核苷酸与靶基因组序列之间的关系,其中寡核苷酸的足够百分比的核苷酸与靶序列的核苷酸配对以促进杂交。在一些实施方式中,百分比大于百分之99、大于百分之95或大于百分之90。在一些实施方式中,百分比

大于百分之80、大于百分之70或大于百分之60。

[0058] 如本文所用的,术语“互补序列”还可以包括或完全由非沃森-克里克碱基对和/或由非天然和修饰的核苷酸形成的碱基对形成,只要满足上述关于其杂交能力的要求即可。

[0059] 本文所用的术语“杂交 (hybridization)”、“杂交 (hybridize)”、“退火 (anneal)”或“退火 (annealing)”是指在适当条件下具有基本上互补序列的核酸通过沃森和克里克碱基配对彼此结合的能力。核酸退火或杂交技术是本领域公知的(参见,例如,Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition*, Cold Spring Harbor Press, Plainview, N.Y. (1989); Ausubel, F.M., 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, Secaucus, N.J. (1994), 或者细胞内的生理条件)。

[0060] 如本文所用的术语“引入 (introducing into) 细胞”、“引入 (introduction into) 细胞”是指促进摄取或吸收到细胞中,如本领域技术人员所理解的。编辑寡核苷酸的吸收或摄取可以通过独立扩散或活性细胞过程或者通过助剂或辅助装置进行。该术语的意义不限于体外细胞;编辑寡核苷酸也可以被“引入细胞”,其中细胞是活生物体的一部分。在这种情况下,引入细胞将包括递送到生物体。在这种情况下,引入细胞将包括施用于生物体。例如,对于体内递送,可以将编辑寡核苷酸注射到组织部位或全身施用。例如,对于体内递送,可以将编辑寡核苷酸注射到组织部位或全身给药。进入细胞的体外引入包括本领域已知的方法,诸如电穿孔、微量注射、核转染、脂质转染或弹道方法 (ballistic method)。

[0061] 当用于提及靶序列时,术语“编辑”在此是指靶基因的至少部分编辑,如由靶基因序列的变化所表现的。编辑的程度可以通过第一细胞或第一组细胞中分离RNA或DNA来确定,其中靶基因被转录并且第一细胞或第一组细胞与第二细胞或第二组细胞相比已经用编辑寡核苷酸处理,所述第二细胞或第二组细胞与第一细胞或第一组细胞基本上相同但未被如此处理(对照细胞)。

[0062] 可替换地,编辑程度可以根据与靶基因转录在功能上相关的参数(例如靶基因编码的由细胞分泌的蛋白质的量或显示某种表型(例如凋亡)的细胞的数量)的减少或增加来给出。原则上,可以通过任何适当的测定在任何表达靶的细胞中确定编辑。

[0063] 例如,在某些情况下,通过本发明的编辑寡核苷酸的施用,在至少约0.1%、1%、3%、5%、10%、20%、25%、35%或50%的靶细胞中编辑靶基因。在具体实施方式中,通过本发明的编辑寡核苷酸的施用,在至少约60%、70%或80%的靶细胞中编辑靶基因。靶细胞通常含有两个拷贝的靶基因,并且可以对这些拷贝中的一个或两个进行编辑。在一些情况下,靶细胞仅包含一个拷贝的为编辑所靶向的基因,并因此每个细胞只能进行一次所期望的编辑。

[0064] 术语“治疗 (treat)”、“治疗 (treatment)”等是指缓解或减轻病症。在本发明的上下文中,只要涉及下文所述的任何其他病症,术语“治疗 (treat)”、“治疗 (treatment)”等意味着缓解或减轻与这种病症相关的至少一种症状,或者减慢或逆转这种病症的进展,或者防止将来的疾病形成。治疗还可以包括在农业和工业应用的情况下改变生物体的性质。

[0065] 如本文所用,语句“治疗有效量”和“预防有效量”是指在治疗、预防或管理病症或病症的明显症状的情况下提供治疗益处的量。治疗有效的具体量可以由普通医师容易地确定,并且可以根据本领域已知的因素而变化,诸如例如,疾病的类型、患者的病史和年龄、疾病的阶段以及可能的其他治疗剂的施用。

[0066] 如本文所用的，“药物组合物”包含药理学有效量的编辑寡核苷酸和药学上可接受的载体。如本文所用的，“药理学有效量”、“治疗有效量”或简称“有效量”是指有效产生预期药理学、治疗性或预防性结果的编辑寡核苷酸的量。例如，如果在与疾病或疾患相关的可测量参数至少降低25%时将给定的临床治疗视为有效，则用于治疗该疾病或疾患的药物的治疗有效量是实现该参数降低至少25%所需的量(包括可能的多个剂量)。

[0067] 术语“药学上可接受的载体”是指用于治疗剂施用的载体。这些载体包括但不限于在(PCT/US2015/65348)中描述的载体。

[0068] 为了特异性编辑靶序列位点，编辑剂必须具有识别靶核酸序列的结构域(参见表I)。在某些实施方式中，靶识别结构域是编辑寡核苷酸，其与靶序列结合并且与靶序列基本上互补，并且可以包含一种或多种化学修饰。在一些实施方式中，靶核酸被工程化序列特异性核酸结合蛋白(例如工程化转录因子)所识别。

[0069] 表I

[0070] 靶序列识别模式

[0071]

<b>寡核苷酸结合模式:</b>
1. Waston-Crick 杂交 (寡核苷酸的单链区结合靶单链以形成双链体)。
2. 三链体 (寡核苷酸的单链区结合靶双链体以形成三链体)。
钳或尾钳 (寡核苷酸的单链通过 Waston/crick 双链体结合单链靶标，并且另一单链区结合得到的双链体，形成三链体 (例如，McNeer 等人，2015，同上))
<b>靶序列识别蛋白:</b>
1.天然存在的或工程化序列特异性 RNA 结合蛋白。
2.工程化转录因子:
Talen (没有核酸酶活性)
锌指
CRISPR 核糖核酸蛋白质
DNE 没有核酸酶活性，如由
Precision BioSciences, Durham, NC 所述的

[0072] RNA编辑模式受限于被靶向的核碱基模式的化学修饰或外显子跳跃的诱导,因为同源重组和DNA复制模式不适用于RNA靶标。

[0073] 在本发明的一个方面,与基因组的DNA链之一互补的单链寡核苷酸用于序列编辑(参见PCT/US2015/65348中的图1)。所期望的编辑可能是转换或颠换,或者是缺失或插入。在本发明的这个方面,编辑寡核苷酸序列是完成编辑之后期望的序列。不受特定理论或机制的束缚,当在诸如转录或复制的细胞过程期间靶序列与相反的基因组链分离时,编辑寡核苷酸结合部分互补或完全互补的靶基因组DNA序列。当在DNA复制期间发生结合时,编辑寡核苷酸可以引发DNA合成,并且因此被掺入到新生的基因组DNA链中。在一些情况下,编辑寡核苷酸与双链基因组DNA靶的杂交可以在靶DNA的“呼吸”、瞬时熔解或解开期间发生。一旦在编辑寡核苷酸和靶基因组DNA链之间形成异源双链体,则通过细胞DNA修复(包括同源重组(HR))来校正非完美互补区域。当使用编辑寡核苷酸作为修复模板时,所期望的编辑将被掺入靶基因组DNA链。

[0074] 与使用比未包封的自递送编辑寡核苷酸大得多的纳米颗粒(诸如脂质体)进行组织穿透相比,自递送编辑寡核苷酸对于允许增强的组织穿透特别有用。例如,纳米颗粒掺入的编辑寡核苷酸能够在可及的细胞培养物和鼻上皮细胞中更有效地编辑CFTR $\delta$ F508突变体,但在深肺中产生的编辑效率要低得多(McNeer等人,Nature Comm.DOI:10.1038/ncomms7952pgs.1-11,2015)。特别地,CF患者的肺具有额外的粘液,并且粘液很难用纳米颗粒穿透,但是粘液能够被大小范围为20-70个核苷酸长的编辑寡核苷酸的分子穿透。事实上,其他形式的自递送治疗性寡核苷酸(例如硫代磷酸酯均一修饰的反义寡核苷酸)已经通过吸入递送至肺部深处。

[0075] 本发明的编辑寡核苷酸包括以下片段中的一些或全部,以从5'至3'的顺序列出:5'末端片段;5'近端片段;5'编辑片段;编辑位点;3'编辑片段;3'近端片段;以及3'末端片段。这些节段通过其位置和/或化学修饰而被识别,但是能够被核酸骨架(无论是修饰的还是天然的DNA或RNA)毗连地连接。可以可选地修饰这些片段中的每一个中的核苷酸以改善编辑寡核苷酸的一种或多种以下特性:编辑效率;药代动力学特性;生物分布;血清中核酸酶稳定性;核内体/溶酶体途径中的核酸酶稳定性;细胞质和核质中的核酸酶稳定性;毒性(例如toll样受体的免疫刺激)和有效编辑所需的最小长度(例如,较短的寡核苷酸通常以较少的成本制造并且在体内更容易递送至细胞)。下表中提供了这些修饰的非限制性实例。

[0076] 表II

[0077] 寡核苷酸骨架的有用化学物质

[0078]

磷酸二酯
含烯烃骨架
酰胺骨架
具有混合的 N、O、S 和-CH <sub>2</sub> 组分部分的骨架
桥联 3'-NH-或 5'-NH-
桥联 3'-S-或 5'-S-
甲酰乙酰
LNA 和其他受约束的糖（可以认为 LNA 是骨架修饰和糖修饰）
亚甲基甲酰乙酰
亚甲基肼
亚甲基亚氨基
磷酸甲酯核苷酸（包括手性富集的甲基磷酸酯）
莫兰磷酸酯（Moranophosphate）
吗啉代
非桥联二烷基磷酰胺酯
硼化硫
磷酰胺酯

[0079]

硫代磷酸酯核苷酸（包括手性富集的硫代磷酸酯核苷酸）
磷酸三酯（烷基、芳基、杂烷基、杂芳基）
PNA 包括 $\gamma$ PNA 和右旋版 $\gamma$ PNA，包括 mini-PEG（诸如 di-PEG），右旋 $\gamma$ PNA 和环戊烷 PNA，以及其衍生物（Sahu 等人 <i>the Journal of Organic Chemistry</i> 76 (14) : 5614-27, 2011 和 Bahal 等人 <i>Current Gene Therapy</i> 14 (5) :331-42, 2014）。Mini-PEG、PEG 单元可以是一个、两个、三个或四个单元长（Roger 等人， <i>Conjugate Molecular Therapy</i> 20(1):109-118, 2012 doi:10.1038/mt. 2011. 163 和 Watson-Crick <i>Curr. Gene Ther.</i> 14(5):331-342, 2014）或 $\gamma$ 硫酸 PNA（Concetta 等人， <i>PLoS One.</i> 2012; 7(5):e35774.）。
磷酸三酯骨架修饰，其可以在细胞液和或核质中通过内源性酯酶去除
硅氧烷
氨基磺酸盐
硫化物、亚砷
磺酰胺
磺酸酯
砷
UNA（解锁核酸）
硫代甲酰乙酰
三环 DNA（tcDNA）

[0080] 表III

[0081] 寡核苷酸的有用的核碱基修饰

[0082]

2-氨基腺嘌呤

[0083]

腺嘌呤和鸟嘌呤的 2-丙基以及其他烷基衍生物
2-硫代胞嘧啶
2-硫代胸腺嘧啶
2-硫代尿嘧啶
3-脱氮腺嘌呤
3-脱氮鸟嘌呤
4-硫代尿嘧啶
C-5 丙炔
5-卤代，特别是 5-溴代、5-三氟甲基以及其他取代的尿嘧啶和胞嘧啶
5-卤代尿嘧啶和胞嘧啶
5-羟基甲基胞嘧啶
5-甲基胞嘧啶 (5-me-C)
5-丙炔尿嘧啶和胞嘧啶
5-尿嘧啶 (也称为假尿嘧啶)
6-偶氮尿嘧啶、胞嘧啶和胸腺嘧啶
腺嘌呤和鸟嘌呤的 6-甲基以及其他烷基衍生物
7-脱氮腺嘌呤
7-脱氮鸟嘌呤
7-甲基腺嘌呤
7-甲基鸟嘌呤
8-氮杂腺嘌呤

[0084]

8-氮杂鸟嘌呤
8-卤代、8-氨基、8-硫代、8-硫代烷基、8-羟基以及其他 8-取代的腺嘌呤和鸟嘌呤
9-（氨基乙氧基）吩噻嗪（G-钳）
生物素化的碱基
荧光标记的碱基
假异胞嘧啶（优选三链体形成寡核苷酸）
次黄嘌呤
假互补碱基
公共碱基（Universal base）（结合所有互补碱基（A、T（或U）、C和G）
黄嘌呤

[0085] 表IV

[0086] 寡核苷酸的有用的糖

[0087]

未修饰的 DNA 糖（脱氧核糖）
未修饰的 RNA 糖（核糖）
糖修饰的实例：
2'-氨基
2'-氟代
2'-O-MCE
2'-甲氧基乙氧基
2'-O-取代的烷基

[0088]

2'-O-X (其中 X 是本领域已知的修饰以产生能够杂交的寡核苷酸
桥联到 4'核糖位置的 2'核糖 (即, 通常称为约束的核苷酸或锁核苷酸), 包括但不限于 LNA 和 cET-BNA、桥联 3'-CH <sub>2</sub> -或 5'-CH <sub>2</sub> -、桥联 3'-酰胺 (-C(O)-NH-)或 5'-酰胺(-C(O)-NH-)或其任何组合。
2'-O-烯丙基
2'-O-氨基烷基
2'-O-氨基烷基、2'-O-烯丙基
2'-O-乙基
2'-O-甲基
2'-O-丙基
$\alpha$ 异头物
$\beta$ 异头物
D-阿拉伯糖核酸 (ANA)
2'-脱氧-2'-氟- $\beta$ -D-阿拉伯糖核酸 (FANA)

[0089] 表V

[0090] 编辑和辅助寡核苷酸的有用接头\*

[0091]

8-氨基-2,6-二氧杂辛酸接头
3' C3 氨基接头
3' C7 氨基接头
5'&3' C6 氨基接头
5' C12 氨基接头

[0092]

5'可光解氨基接头
3' C3 二硫化接头
5'&3' C6、二硫化接头
二硫代接头
4-甲酰苯甲酰胺醛
C8-炔-胸腺嘧啶
羧基-dT 接头
DADE 接头 (5'羧基接头)
3'甘油基
5'乙醛
胸腺嘧啶-5-C2
C6 氨基接头
2'-脱氧腺苷
8-C6 氨基接头
2'-脱氧胞嘧啶-5-C6 氨基接头
2'-脱氧鸟嘌呤-8-C6 氨基接头
内部氨基接头
*接头长度可以在一个碳到约二十个碳的范围内，也可以是其他化学物质等同的长度，但优选地低于十个碳原子或十个碳等同的长度。

[0093] 表VI

[0094] 编辑和辅助寡核苷酸的有用缀合物(还参见表VII、核碱基化学修饰的序列修饰部分以及PCT/US2015/65348)

[0095]

受体的配体（即 N-乙酰-D-半乳糖胺或胰高血糖素样肽-1）
亲脂缀合物（其增强了细胞穿透）诸如在 Khvorova 等人美国专利申请 2014/0364482 和 Alynlam 美国专利号 8,106,022 和 8,106,022, 用于亲脂修饰和递送配体缀合物。
延长循环的聚合物（例如 PEG）
用于肺摄取和穿透：
缓激肽受体-9aa 配体
特异性外源凝集素/抗体
血细胞凝集素/神经氨酸苷酶
带负电部分：硫酸根、藻糖、唾液酸
内皮素
单克隆抗体（例如通过单克隆抗体的核酸递送，参见 <a href="http://www.aviditybiosciences.com/Avidity%20Biosciences,%20La%20Jolla,%20California">www.aviditybiosciences.com/Avidity Biosciences, La Jolla, California</a> ）。
ENaC-18aa 肽配体（S18）靶标和内化

[0096] 编辑寡核苷酸可以包括上面列出的七种片段的子集或全部，并且将包括编辑位点和编辑位点5'和3'的至少一种片段。这些片段中的每一种可以可选地含有相同或不同的化学修饰以增强编辑寡核苷酸的特性，且在一些情况下，修饰在整个片段中是均一的，并在其他情况下仅在片段中核苷酸的一部分上发生。

[0097] 其他实施方式包括用可逆的电荷-中和磷酸三酯骨架修饰来编辑寡核苷酸，如 PCT/US2015/65348所描述的。

[0098] I. 编辑寡核苷酸

[0099] 在某些实施方式中，本发明的编辑寡核苷酸具有根据式I的结构：

[0100]  $T_5-P_5-E_5-S_E-E_3-P_3-T_3$

[0101] (I)

[0102] A. 5'末端片段( $T_5$ )

[0103] 5'末端片段比3'末端更适用于多种不同类型的修饰，因为3'末端可能在启动DNA延伸中起作用，这在某些情况下可能将3'末端片段限制为具有一般游离的3'羟基的修饰。

在5'末端通常不需要这种起动功能。可选的5'末端片段(其长度可以为零至五个核苷酸)用于阻断5'核酸外切酶,否则可能容易在体液(例如,血液或间质液)、培养基、内吞途径或者细胞质或核质中降解编辑寡核苷酸。此片段可以包含比5'近端片段(例如,反向碱基,诸如反向T)更具核酸酶抗性的非核苷酸端基封闭基团和/或一种或多种修饰的核苷酸。5'磷酸酯可以增加编辑效率,并且在某些实施方式中包含的5'磷酸酯没有(Radecke等人The Journal of Gene Medicine 8(2):217-28,2006)或具有硫代磷酸酯修饰(以增强对细胞磷酸酶的稳定性)。可以在编辑寡核苷酸的5'末端使用的另一种核酸酶稳定的5'磷酸类似物是5'-(E)-乙基磷酸酯。5'-(E)-乙基磷酸酯修饰对于加载到Argonaut中的编辑寡核苷酸特别有用(R.Parmar,J.L.S.Willoughby等人ChemBioChem 17:85.2016)。如果不采用5'末端片段,则5'近端片段就是编辑寡核苷酸的最5'部分。非核苷酸端基封闭基团可包括本领域技术人员已知的用于执行该任务的任何接头(参见表V,对于此位置的这些和其他有用接头的列表)。接头长度可以在一个碳到约二十个碳的范围内,也可以是其他化学物质等等的长度,但优选地低于十个碳原子或十个碳等等的长度。接头可以用于连接递送部分,诸如胆固醇或1-3N-乙酰-D-半乳糖胺部分。

[0104] 5'末端核苷酸核酸外切酶抗性片段可以包含一个、两个、三个或四个硫代磷酸酯修饰。除了这些一个或多个硫代磷酸酯修饰之外或代替它们的是,5'末端核酸外切酶抗性核苷酸可以包含2'糖修饰,已知其增强核酸外切酶的稳定性。此外,中性核苷酸类似物(诸如甲基膦酸酯、吗啉基或PNA)对核酸外切酶具有高度抗性,并且在5'末端的一种、两种、三种、四种或五种这样的修饰可以用作核酸外切酶端基封闭基团。在特别有用的实施方式中,5'末端是两个甲基膦酸酯(参见PCT/US2015/65348中的图2)。这些末端基团不一定必须与靶标互补。

[0105] B.5'近端片段(P5)

[0106] 由于与对上述5'末端片段前面所述的一些相同的原因,5'近端片段可能比3'末端更适合某些类型的修饰。长度可以为一个至150个核苷酸,或者长度为最高达1500个核苷酸,以及优选地长度为约五个至约二十个核苷酸。5'近端片段的主要功能是增强编辑寡核苷酸与靶序列杂交的亲合性和能力。因此,该片段可以可选地比编辑片段更实质地被修改。5'近端片段可以含有本文提及的任何寡核苷酸修饰。该片段可以包括DNA或RNA(可选地2'修饰的RNA广泛地定义为包括LNA和其他受约束的骨架)。尽管在该区域中替代的硫代磷酸酯(例如,具有增强的手性纯度的二硫代磷酸酯和硫代磷酸酯)对于核酸酶稳定性不是严格要求的,但是这些替代的硫代磷酸酯将用于增强RNA和DNA键的核酸酶稳定性。同样,即使当该片段中的硫代磷酸酯对核酸酶稳定性不是必需的时,它们可增加总硫代磷酸酯含量,这是由于硫代磷酸酯的化学“粘性”性质会增加血清蛋白结合和细胞结合,这导致动物和人类中的血清半衰期增加,并增强细胞质摄取。由于这些原因,在特别有用的实施方式中,编辑寡核苷酸的总硫代磷酸酯含量可以大于五个、十个、十五个或二十个。约二十个硫代磷酸酯的含量通常提供优异的血清蛋白结合和细胞结合/摄取。然而,因为编辑寡核苷酸的互补区中的大量(例如,多于6个)的硫代磷酸酯键可以抑制编辑效率,所以可以将硫代磷酸酯尾加到与靶DNA互补的区的5'或3'末端。该尾的长度可以为1个至约4个、约5个至约9个核苷酸或约10个至约25个核苷酸,并且可优选地与靶标不互补。本文所述的其他修饰可以掺入到5'近端片段中以增强核酸酶稳定性、减少免疫刺激和/或增加靶DNA结合亲和性,诸如ANA或

FANA修饰的核苷酸。当使用处于“自递送”模式(未包封的)的编辑寡核苷酸时,寡核苷酸必须能在经过具有高核酸内切酶活性的内容酶体途径的运送中存活下来。因此,处于“自递送”模式的编辑寡核苷酸,在编辑寡核苷酸中的大多数或全部核苷酸具有核酸内切酶抗性修饰是特别有用的。这可以用各种修饰来实现,但是硫代磷酸酯和/或2'-O-甲基修饰在5'近端片段中尤为有用。如果需要使5'末端片段从细胞内移除用以例如暴露游离的5'OH或5'磷酸,可以可选地将一个至若干个未修饰的DNA或RNA接头或在细胞内不稳定的其他接头置于该片段的5'大多数区域中。

#### [0107] C. 5'编辑片段(E<sub>5</sub>)

[0108] 5'编辑片段长度为1个至约十个核苷酸、或1个至约100个核苷酸、或1个至约200个核苷酸,并位于编辑位点的5'端,其足够接近编辑位点以影响导致相反的基因组靶DNA链的编辑的细胞机构。虽然不受任何理论约束,但DNA错配修复系统可以使用编辑片段(其是5'编辑片段、编辑位点和3'编辑片段)作为用于编辑靶链或在编辑寡核苷酸掺入复制叉之后随后的染色体DNA复制的模板链。因此,5'编辑片段和3'编辑片段中的大多数核苷酸优选地基本上与天然DNA(例如,编辑寡核苷酸100013具有编辑位点5'的约8个未修饰的核苷酸(参见图2),与母体化合物相比其不抑制整体编辑效率)或天然DNA化学相似,并且可能未经修饰或包括一种或多种修饰,诸如硫代磷酸酯(Radecke等人, *The Journal of Gene Medicine* 8:217-28, 2006)、5'S、2'F、2'氨基或3'S、可逆的电荷-中和磷酸三酯和核碱基修饰。

[0109] 在本发明的一种特别有用的实施方式中,编辑寡核苷酸中的一个、一些或全部的脱氧胞嘧啶被修饰为5甲基胞嘧啶,特别是在一个或多个编辑位点的5'或3'约五个至约10个碱基以内的胞嘧啶核苷。将5甲基胞嘧啶掺入编辑寡核苷酸的一个原因是在复制之后进行错配修复期间,错配修复机构将未甲基化的胞嘧啶识别为新生链,并优先地使用含有5甲基胞嘧啶的DNA链作为模板链进行修复。另外,如果编辑寡核苷酸含有很少或没有5甲基胞嘧啶,那么在导致编辑的DNA修复反应期间,修复机制将很可能不会选择该链作为模板。本领域编辑寡核苷酸不含有多个5-甲基胞嘧啶的事实是其编辑效率相对较低的原因之一。

#### [0110] D. 编辑位点(S<sub>E</sub>)

[0111] 编辑位点含有不与靶基因组DNA互补的一种或多种核苷酸,并且其长度可以为一个至六个核苷酸,但根据需要可以更长。在转换/颠换修饰的情况下,编辑位点等于错配碱基数(例如,一个至约六个核苷酸,特别是1个)。在创建缺失的编辑的情况下,编辑位点是靶基因组DNA链进行碱基配对的两个5'和3'核苷酸之间的接合点,靶基因组DNA链正好与基因组DNA中的非碱基配对的核苷酸相反。在创建插入的编辑的情况下,编辑位点将是含有插入的核苷酸。在一些情况下,可以使用一种编辑寡核苷酸来处理在与群体中不同患者中发生的靶DNA互补的区内的附近位点处的不同突变。在这种情况下,根据患者的突变基因型,将有不同的编辑位点。在这些情况下,编辑位点将包括5'和3'大多数突变以及这些突变之间的区。在一种特别有用的实施方式中,编辑位点延伸至靶基因的全部外显子或包括内含子/外显子交界区域的外显子,其通常是突变的位点。可替代地,当采用化学修饰方法时,碱基修饰活性剂置于被靶向编辑的核碱基的附近。在这种情况下,碱基修饰活性剂可以与编辑寡核苷酸在沿寡核苷酸的任何位置共价缀合,或者可与编辑寡核苷酸非共价结合(Woolf等人PNAS USA92(18):8298-302, 1995, Woolf *Nature biotechnology*.16(4):341-4, 1998,

Montiel-Gonzalez等人PNAS110(45):18285-90,2013和Komor等人Nature,2016;提前在线出版(Komor等人Nature.April 20 2016;提前在线出版doi:10.1038/nature17946)。在编辑位点的硫代磷酸酯修饰与重要编辑活性一致(Radecke等人The Journal of Gene Medicine 8:217-28,2006and Papaioannou等人The Journal of Gene Medicine 11:267-74,2009)。

[0112] 在特别有用的实施方式中,编辑寡核苷酸在编辑位点CpG序列中具有5-甲基胞嘧啶。在更有用的实施方式中,编辑位点中的该CpG对靶序列中的TpG错配。在这种情况下,细胞的5-甲基结合蛋白将与错配的甲基化CpG结合,并导致细胞错配修复系统将错配的T转变成匹配的C。5'编辑片段可以不含有修饰的核苷酸,或含有一个或多个修饰的核苷酸,最高达片段中核苷酸的数量。

[0113] 当编辑寡核苷酸与靶DNA链结合,导致靶序列和编辑寡核苷酸之间错配时,细胞错配修复机制可以修复靶DNA序列使其与编辑寡核苷酸序列(“生产性修复(productive repair)”)匹配,或细胞错配修复机制可以“修复”编辑寡核苷酸(“非生产性修复”)。非生产性修复将编辑寡核苷酸改变成突变体或其他不需要的靶DNA序列。尽管不希望被任何特定理论或机制所束缚,避免“非生产性修复”的一种方法是化学修饰编辑寡核苷酸的“编辑位点”,和/或具有能抑制“非生产性修复”的修饰的5'编辑片段和/或3'编辑片段的核苷酸侧翼“编辑位点”(参见PCT/US2015/65348)。显示抑制细胞错配修复机制的“非生产性”修复的修饰的核苷酸包括2'F(Rios,X.等人PLoS ONE 7,e36697,2012doi:10.1371/journal.pone.0036697)和LNA(van Ravesteyn,T.W.等人PNAS USA 113,4122-4127,2016doi:10.1073/pnas.1513315113)。对“编辑位点”3'和/或5'的其他有用修饰包括本文所述的寡核苷酸化学修饰,并且特别是本文所述的核酸酶抗性化学修饰,以及特别是ANA、FANA,并且更特别是本文所述的2'修饰,以及特别是2'-O-烷基修饰,其化学上在2'F和LNA“之间”,并且比2'F和LNA更容易制造并且具有更低的毒性,并且更具体地,如本文中列举的2'-O-甲基(参见图2中的实例)。在该位置(多个位置),除了标准LNA,也可以采用约束核酸,诸如cET化学。

[0114] 在正在编辑的一种或多种错配的情况下,可以修饰错配的碱基(“编辑位点”)或者可以修饰一个或多个错配的碱基加上下一个或多个核苷酸“编辑位点”3'和/或5'(PCT/US2015/65348,Rios,X.等人PLoS ONE 7,e36697,2012doi:10.1371/journal.pone.0036697和van Ravesteyn,T.W.等人,Proc Natl Acad.Sci.USA 113,4122-4127,2016doi:10.1073/pnas.1513315113)。在插入一个或多个核苷酸的编辑寡核苷酸(例如,囊性纤维化 $\delta$ -F508的修复寡核苷酸(参见实施例4和本文的囊性纤维化 $\delta$ -F508寡核苷酸序列)的情况下,可以修饰插入的序列,或者可以修饰“编辑位点”的下一个核苷酸(多个核苷酸)3'和/或5'(van Ravesteyn,T等人,PNAS USA 113,4122-4127,2016doi:10.1073/pnas.1513315113)。这些修饰模式(PCT/US2015/65348)可能导致编辑的显著增强,特别是当进行错配修复的细胞被靶向编辑的时候(van Ravesteyn,T.W.等人PNAS USA 113,4122-4127,2016doi:10.1073/pnas.1513315113)。

[0115] E.3'编辑片段(E<sub>3</sub>)

[0116] 3'编辑片段除了其处于编辑位点的3'的位置以外可具有与E<sub>5</sub> 3'编辑片段相同的特征、特性、化学修饰和参数的范围。

[0117] F. 3'近端片段(P<sub>3</sub>)

[0118] 3'近端片段除了其相对于其他片段的位置以外具有与5'近端片段相同的特征和参数的范围。在特别有用的实施方式中,3'近端片段由2'修饰的核苷酸组成,并且在更加特别有用的实施方式中,其由2'F修饰的核苷酸组成。在一种特别有用的实施方式中,它包括8个2'F修饰核苷酸(PCT/US2015/65348的图2和本文的图2)。本文所述的其他化学修饰可以掺入到3'近端片段中以增强核酸酶稳定性、减少免疫刺激和/或增加靶DNA结合亲和性,诸如ANA或FANA修饰的核苷酸。

[0119] G. 3'末端片段(T<sub>3</sub>)

[0120] 3'末端片段除了下面详细说明书的以外可以包括与5'末端片段相同的特征和特性的范围。3'末端片段可以用作DNA复制和修复期间DNA合成的引物,从而允许编辑寡核苷酸变得连续地掺入基因组DNA中。因此,在一种实施方式中,该片段将具有游离的3'羟基并且可以由天然样修饰或未修饰的DNA或RNA制成。

[0121] 尽管在3'末端的非核苷酸端基封闭基团在某些情况下可能会减少或消除编辑活性,但如果在编辑位点和编辑寡核苷酸的3'末端之间存在当编辑寡核苷酸与靶DNA杂交时被RNA酶H切割的RNA区域,则将会产生适合作为链延伸的引物的游离的3'羟基。释放游离3'羟基的其他设计包括未修饰的DNA区域(例如,长度为1-10个核苷酸),其将被细胞核内的核酸内切酶降解,如Monia等人已经清楚地证明了细胞中寡核苷酸内内部磷酸二酯DNA键的核酸外切酶降解(Monia等人J. Biol. Chem. 271 (24) :14533-40, 1996)。释放游离3'羟基的另一种方法是使用热不稳定接头或端基封闭基团,可以调节它们以在各种温度,优选生理温度下缓慢降解释放3'羟基基团(Lebedev等人Nucleic Acids Res. 36 (20) :e131, 2008)。同样,称为错配修复的另一编辑机制可能不需要游离3'羟基或在3'末端与靶标配对的编辑寡核苷酸碱基的区域(PCT/US2015/65348)。

[0122] 式(I)的寡核苷酸可以包含20-2000个核苷酸或最高达约3000个核苷酸。在一种实施方式中,寡核苷酸可以包含100-250个核苷酸。在另一实施方式中,寡核苷酸可以包含250-2000个核苷酸。在具体实施方式中,寡核苷酸包含20-100个核苷酸。在具体实施方式中,寡核苷酸包含25-90个核苷酸。在特别有用的实施方式中,寡核苷酸包含19-50个核苷酸。当采用增强编辑寡核苷酸对靶DNA的亲亲和性的修饰化学物质时,12个核苷酸的短的编辑寡核苷酸是有用的。

[0123] 使用Brachman和Kmiec的方法的单链编辑寡核苷酸的当前设计采用未修饰的DNA(其编辑效率较低),或者每个末端上的三个硫代磷酸酯,同时其余编辑寡核苷酸包含未修饰的DNA,这对编辑更有效,在两种情况下具有约七十二个核苷酸的最佳长度。虽然Brachman和Kmiec发现在S期中处理的同步细胞被最有效地编辑(Engstrom和Kmiec, Cell Cycle 7 (10) :1402-1414, 2008),但是现在我们知道上述Kmiec的编辑寡核苷酸设计对于细胞核酸内切酶是高度敏感的。为了提高编辑效率和不需要细胞同步(例如因为稳定的编辑寡核苷酸将保持在每个细胞中,直到细胞自然地进入S期),本发明提供具有增强的核酸酶抗性的编辑寡核苷酸的实施方式。图2提供了这些编辑寡核苷酸的实例。通过将一种或多种核苷酸键修饰为位于5'和/或3'末端附近的硫代磷酸酯键可实现对细胞核酸内切酶的抗性的增加。在一种实施方式中,在一个或两个末端有四种或更多种硫代磷酸酯键是特别有用的。还可以通过用硫代磷酸酯键取代除了“编辑片段”之外所有核苷酸键来实现抗性。在一

些实施方式中,硫代磷酸酯修饰可以包含围绕编辑碱基(例如,与靶序列不同的碱基)的一个至七个核苷酸键。在一种实施方式中,编辑寡核苷酸的所有键是硫代磷酸酯DNA。在其他实施方式中,编辑寡核苷酸具有硫代磷酸酯模式和长度的构型,其在(PCT/US2015/65348)中表2中示出。硫代磷酸酯键也可以是全部地或部分地交替的,同时每隔一个键是硫代磷酸酯键,或者每第三个键是硫代磷酸酯键,或者两个硫代磷酸酯键与一个或两个磷酸二酯键等交替。编辑寡核苷酸可以包含约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的硫代磷酸酯键。尽管在具有~50%或更多硫代磷酸酯DNA(ETAGEN 100007、100010和100022)的细胞培养物中测试的编辑寡核苷酸在我们的细胞培养GFP靶系统中的上述背景下具有较低或没有GFP细胞计数,这些化学物质还是靶RNA的活性反义切割子。活性反义化学物质将通过反义瞬时(几天)抑制GFP,因此这在该测定中混淆了这些化合物的编辑效率分析。在以正义方向使用编辑寡核苷酸的其他细胞靶系统中,在寡核苷酸的3'一半上具有约一半硫代磷酸酯取代的正义DNA编辑寡核苷酸具有高基因组编辑效率,并且甚至100%硫代磷酸酯DNA编辑寡核苷酸保留减少但显著的编辑效率(Radecke等人The journal of gene medicine 8,217-28,2006)。即使100%的硫代磷酸酯取代降低了编辑效率,分子也会分布到组织中并且足够核酸酶稳定以有效地“自递送”到细胞内部,这在动物和人类中使用裸(非胶囊化)编辑寡核苷酸时是一个主要优势。这些硫代磷酸酯构型可与如本文所述的其他修饰或天然糖结合。特别地,DNA糖中的一些可以用RNA糖代替。优选地,RNA取代将包含在3'末端开始并沿5'方向延伸的一个、两个、三个、四个、五个、七个、八个、九个或十个碱基的封闭RNA键。这是为了使3'端出现为天然的冈崎片段(Okazaki fragment)或DNA引物,这将导致更自然的合成的启动和被RNA酶H的去除。然而,3个或更多个未修饰RNA核苷酸段在“编辑片段”中不是优选的,因为不希望使编辑片段被RNA酶H去除。

[0124] 尽管通过同源重组或引物延伸起作用的编辑寡核苷酸的上述描述,如果编辑寡核苷酸被设计为仅通过包括修饰靶向核碱基的反应性化学基团或酶活性的来编辑,则编辑寡核苷酸修饰模式的要求更简单。这类编辑寡核苷酸可以由一种或两种均一的化学修饰组成,诸如所有PNA,或所有硫代磷酸酯以及所有2'修饰(即所有硫代磷酸酯与所有2'-O-甲基,或所有硫代磷酸酯与所有LNA)。

[0125] H. 其他修饰和修饰模式

[0126] 使编辑寡核苷酸更有效的方法是通过化学修饰增加亲和力。本文所述的修饰可以组合在编辑寡核苷酸中并且包括2'-O-甲基RNA、2'F RNA和约束核酸(constrained nucleic acid),包括LNA。这些修饰具有以下额外的优点:它们也可以减少免疫刺激。可以将修饰分组以形成用于杂交的高亲和力“种子”区。在特别有用的实施方式中,该种子区将位于5'近端片段中,具有约两个至约十二个连续修饰。在其他实施方式中,种子区可以位于3'近端片段中。修饰可以是在5'片段、编辑片段和/或3'片段中的交替或是每第三个或第四个键。5'片段、3'片段或编辑片段中的化学修饰的核碱基的总比例可以从约20%、30%、50%、60%、70%、80%、90%或100%独立地变化。在一种实施方式中,编辑寡核苷酸包括8个或更多个交替2'F和2'-O-甲基键的段,因为已知它们与Argonaut蛋白相互作用良好,其可以增强与靶标杂交速率以增加效力。

[0127] 本文提供了式(I)的寡核苷酸的各种实施方式。例如,式(I)可以是RNA、DNA,单链的、未修饰的和/或化学修饰的,其可以包括糖修饰(特别地,例如2'-O-甲基和2'-氟)。式

(I) 可以包括一种或多种骨架修饰和/或接头,如本文所述。式(I)还可以包括缀合分子(例如,N-乙酰-D-半乳糖胺或亲脂性修饰)。上述修饰可以以各种组合存在。例如,一种、两种或三种骨架修饰可以与一种、两种或三种糖修饰和/或接头和/或缀合分子一起存在。

[0128] 本发明的某些寡核苷酸包括与靶序列上的核苷酸反应或促进其与靶序列上的核苷酸的反应的一种或多种化学修饰。此类反应的实例包括烷基化、乙酰化、交联、胺化、脱胺、产生游离的(非共价结合的)反应性化合物。在表VII中描述了用于编辑寡核苷酸的各类序列修饰部分,并在PCT/US2015/65348中详述了这些部分中的一些的结构、合成和缀合。

[0129] 表VII

[0130] 核碱基化学修饰的序列修饰部分

[0131]

<b>基于化学: *</b>
-烷基化剂
-乙酰化剂
-交联剂
-氨化剂
-脱氨剂

[0132]

-生成游离的(非共价结合的)反应性化合物
<b>酶:</b>
-烷基化剂
-乙酰化剂
-脱氨剂
<b>催化核酸(例如核糖酶或DNA酶)</b>
*在上述每一种情况中,可选地包括保护反应性基团在合成、纯化、储存期间和在到达细胞内靶标之前避免反应,该保护基团通过以下释放: pH, 诸如在核内体或溶酶体细胞内酯酶中的低 pH, 或对细胞的还原环境敏感。

[0133] 作为采用寡核苷酸编辑的替代,核碱基修饰活性剂(从表VII)可以结合或缀合,或

稠合至仅蛋白质靶序列识别结构域(参见表VIII中这种蛋白的实例),以实现基因组编辑。

[0134] 表VIII

[0135] 可以与编辑寡核苷酸组合以增强编辑效率的蛋白质和催化核酸

[0136]

#### 可设计或可以设计的位点特异性核酸酶:

具有核酸酶活性的核糖核蛋白(即)CRISPR-Cas9变体的形式列于表IX或Argonauts,诸如Natronobacterium gregoryi Argonaute((Gao F, Shen XZ, Jiang F, Wu Y, Han C. DNA-guided genome editing using the Natronobacterium gregoryi Argonaute. Nat. Biotech. 2016; 提前网上公开)

TALENS

锌指

大核酸酶(meganuclease)包括DNE,如Precision BioSciences, Durham, NC所述的。

[0137]

**增强链侵入和/或重组的外源性蛋白质：**

核酸酶失活核糖核酸蛋白质（即列于表 IX 的 CRISPR-Cas9 和变体，CRISPR/Cas9 变体的形式。

RecA 和单链 DNA 结合蛋白

$\lambda$  期  $\beta$  蛋白（美国专利号 7,566,535）

RAD

**非蛋白质 DNA 剪切催化剂：**

催化核酸（例如核糖酶或 DNA 酶）缀合的或整合至编辑或辅助寡核苷酸  
 （Marcel Hollenstein *Molecules* 2015, 20(11), 20777-20804, 2015  
 doi:10.3390/molecules201119730 和 Edmund 等人 *Chemistry&Biology*  
 November T:761-770, 1995

上文列举的蛋白质和催化核酸可以共价连接至编辑寡核苷酸、非共价连接、或可以在施用于细胞或动物前与编辑寡核苷酸混合，或可以与编辑寡核苷酸分开施用，直接或通过表达载体。

[0138] 在某些实施方式中，化学修饰方法可以与“HR”编辑方法组合以偏向内源性错配 DNA 修复机制以修复靶向基因组 DNA 链。在这种实施方式中，靶向 DNA 链的化学修饰可以靶向靶向编辑的核碱基或靠近待编辑的核碱基的核碱基或核苷酸（例如，在 1-10 个或 1-50 个碱基距离范围内），并且简单地通过使用编辑寡核苷酸作为模板，对靶链引起损伤（加合）激活内源性修复机制以修复 DNA 损伤和损伤附近的错配（生产性编辑）。

[0139] 本发明的寡核苷酸可以包括保护基团。合适的保护基团是本领域技术人员已知的，以在合成、纯化、储存期间和在使用过程中保护化学反应性基团（例如，以保护寡核苷酸免受包括酸性、细胞内酯酶或还原条件的条件）。

[0140] 虽然仅使用单个寡核苷酸来实现编辑是方便的，但是对本文的实施方式的某些增强包括另外的寡核苷酸。使用一种“辅助”寡核苷酸或多种“辅助”寡核苷酸，其中一种或多种“辅助”寡核苷酸是指将与编辑寡核苷酸串联合（例如，在两种辅助寡核苷酸的情况下在 3' 端、5' 端或两端或更远离编辑寡核苷酸结合位点，例如编辑位点 5' 或 3' 的 200 个核苷酸内）的寡核苷酸。辅助寡核苷酸将帮助打开靶位点的结构，或以其他方式提高编辑寡核苷酸的结合效率。对于通过 Watson/Crick 结合的链侵入全部或部分结合的辅助寡核苷酸，高亲

和力化学物质特别有用。特别地,对靶DNA具有比靶DNA对天然相对DNA链的亲合力更高亲和力的化学物质是特别有用的,使得形成的置换环在能量上是有利的。甚至更高的亲和力,诸如可以通过LNA获得 (Geny等人Nucl. Acids Res. (2016) doi:10.1093/nar/gkw021首次线上公开:February 8, 2016) 或通过包括R mini-PEG  $\gamma$  PNA的PNA获得,可以允许更高的链侵入效率 (Sahu等人Journal of Organic Chemistry 76 (14):5614-27, 2011, Bahal等人Current Gene Therapy 14 (5):331-42, 2014) 和Bahal, R. 等人Nat. Commun. 7, 13304 (2016)。辅助寡核苷酸的另一靶标可能是由编辑序列靶向的DNA链的相反链。在这种情况下,一种或多种辅助寡核苷酸优选地仅结合编辑寡核苷酸的结合位点的5'和/或3',从而不与编辑寡核苷酸本身强烈杂交。在其他实施方式中,5'和/或3'辅助寡核苷酸与编辑寡核苷酸结合位点重叠约1-5个、约5-10个或约1-15个碱基。以这种方式,辅助寡核苷酸不会太紧密地结合编辑寡核苷酸而不利地影响编辑寡核苷酸结合靶。这些辅助寡核苷酸可以可选地通过磷酸二酯或修饰的磷酸二酯键或通过其他共价接头共价地连接到编辑寡核苷酸 (参见表V, 用于编辑和辅助寡核苷酸的有用接头的接头实例)。在另一实施方式中,形成寡核苷酸或寡核苷酸类似物的三链体在编辑位点的约200个核苷酸内结合到靶DNA,从而导致编辑效率提高 (McNeer等人, Nature Comm. DOI:10.1038/ncomms 7952 pgs. 1-11, 2015), Bahal等人Current Gene Therapy 14 (5) pp331-42 (2014), Chin等人PNAS 105 (36):13514-13519 (2008), Rogers等人PNAS 99 (26):16695-16700 (2002), 美国专利8,309,356和Bahal, R. 等人Nat. Commun. 7, 13304 (2016)。

[0141] 一些辅助寡核苷酸保护与编辑寡核苷酸互补的寡核苷酸,并通过单链特异性核酸酶阻断核酸酶降解 (PCT/US2015/65348)。

[0142] 辅助寡核苷酸可以制成包括本文所述的自递送化学物质。对于天然骨架辅助寡核苷酸,可以采用诸如本领域已知的PNA、自递送带电基团或氨基酸串 (Natee Jearawiriyapaisarn等人Molecular Therapy 16:1624-1629, 2008, Sazani等人Nature Biotechnology, 20:1228-1233, 2002)。例如,参见辅助寡核苷酸,其中赖氨酸位于PNA寡核苷酸的末端,以允许在图2中在细胞培养物和体内递送裸寡核苷酸。

[0143] 虽然从临床安全角度来看不切割靶向DNA是有用的,但已知靶向DNA的切割可以提高编辑效率。在需要更高编辑效率的情况下,可以将化学DNA切割部分 (例如chelator, Simon等人Nucleic Acids Research 36 (11):3531-3538, 2008. doi:10.1093/nar/gkn231.) 与编辑寡核苷酸或辅助寡核苷酸缀合以切割靶向DNA的一条或两条链,以进一步增强编辑活性。该方法比本领域已知的可设计核酸酶方法具有优势,因为该方法不需要免疫原性工程化蛋白的递送或表达,并且因为切割活性与编辑寡核苷酸共价连接,使编辑寡核苷酸置于切割位点附近。

[0144] I. 用外源性蛋白质和内源性蛋白质增强编辑

[0145] 虽然在编辑组合中不严格地需要外源蛋白是有利的,但是通过保护编辑寡核苷酸免于核酸酶降解并通过增强编辑寡核苷酸与靶基因组DNA的结合,某些外源蛋白可以增强上述实施方式。本文所述的化学修饰的编辑寡核苷酸可用作用可设计核酸酶来改善编辑效率和准确性的同源重组编辑的供体寡核苷酸 (Renaud等人, 2016, Cell Reports 14, 2263-2272 March 8, 2016)。一种或多种以下蛋白质或核糖核蛋白可以与编辑寡核苷酸 (也参见表VIII和表IX) 一起加入:包括锌指核酸酶的可设计的核酸酶 (Carroll D. Genetics

188:773e82. (2011)), TALEN, 大型TALEN, 其他归巢核酸内切酶、CRISPR-Cas9 (Jinek等人 *Elife* 2013;2:e00471), 或已被选择通过减少DNA结合亲和力而增加靶特异性的同源或类似作用的核糖核蛋白 (即Cpf1、C2C1或C2C3) (包括其突变形式) (eSpCas9, Slaymaker等人, *Rationally Engineered Cas9 Nucleases with Improved Specificity*, *Science* (2015)), 以及已被选择以耐受crRNA区中更多的DNA取代使得“crRNA”可以作为用于编辑的供体DNA的突变形式, 以及其中Cas9核酸酶失活的突变形式, Argonauts (也写成Argonautes, 诸如 *Natronobacterium gregoryi* Argonaute) ((Gao等人 *Nat Biotech.* 2016; advance online publication doi:10.1038/nbt.3547) 以及使用DNA引导的相关argonaut, 和缺少DNA切割活性的这种Argonaut (“死亡Argonaut”) 的突变形式。当采用死亡Argonaut, 通过使用引导DNA实现编辑, 引导DNA是具有期望编辑序列或连接至修饰编辑活性的核碱基的编辑寡核苷酸。使用死亡DNA引导Argonaute的优势是可以使DNA引导对应于期望编辑的序列, 因此DNA引导可以实现编辑而不需要靶DNA切割也不需要分离编辑寡核苷酸 (“供体DNA”)。可替代地, 当使用具有RNA或DNA引导的Argonaute时, 引导可以是与靶DNA完美匹配的编辑寡核苷酸, 其中编辑寡核苷酸连接至靶核碱基修饰活性剂以实现编辑 (参见表VII)。

[0146] 表IX

[0147] CRISPR/Cas9变体的形式

[0148]

CRISPR/Cas9 和有用的变体	描述	一种或多种益处
SpCas9	从酿脓链球菌	最广泛使用的 CRISPR

[0149]

	( <i>Streptococcus pyogenes</i> )中分离的原始野生型核酸酶	核酸酶
(酿脓链球菌 ( <i>Streptococcus pyogene</i> ) Cas9)		
SaCas9	比 SpCas9 在尺寸上小约 25%	由于其较小的尺寸，它可以封装进适合体外递送系统的腺病毒载体
(金黄色葡萄球菌 ( <i>Staphylococcus aureus</i> ) Cas9)		
Cas9n	在野生型 Cas9 (SpCas9 或 SaCas9) 的两个核酸酶结构域之一中突变	用于在靶 DNA 的一个链上制造切口
(Cas9 切口酶)		
dCas9 (死亡 Cas9)	在 Cas9 (SpCas9 或 SaCas9) 的两个核酸酶结构域中突变	用于转录调控和后生研究应用
eSpCas9 (高效 SpCas9)	在结合至 DNA 的非靶链的某些氨基酸残基的突变	这些突变显示出具有不可测的脱靶切割同时具有高靶向切割效率
或 SpCas9-HF1 (SpCas9 高保真)		

[0150]

Cpf1	最近确定的 CRISPR 核酸酶, 其与 Cas9 相比具有不同的性质	富含 'T' 的 PAM
(来自普氏菌属 (Prevotella) 和弗朗西斯氏菌属 1 (Francisella 1) 的 CRISPR)		
		PAM 是靶序列的上游
		单个 RNA 引导的 (仅 crRNA 足够; 不需要示踪 RNA)
		产生具有 4 或 5 个核苷酸 5' 单链突出端的交错的 DNA 双链间断。
重新工程化的 Cas-9 以接受 DNA 编辑寡核苷酸作为 crRNA		
CRISPR 或 CRISPR 变体, 具有用 DNA 核苷酸延伸的 crRNA, DNA 核苷酸充当供体 DNA (编辑寡核苷酸), 其中延伸与靶标持续互补, 或与附近靶编辑互补。		

[0151] 促进基因组编辑的蛋白质可以与编辑寡核苷酸分开制备,纯化,然后与一种或多种编辑寡核苷酸预先复合(Kim等人*Genome Res.*24:1012e9(2014)),或者蛋白质可以在靶细胞/组织中表达。外源蛋白在细胞或组织中的表达可以用本领域已知的方法进行,所述方法包括基因治疗载体、裸DNA转染或mRNA转染。

[0152] 当采用Cas9时,特别有用的实施方式采用了本领域已知的用突变而失活的两个核酸酶结构域的Cas9(被称为死亡Ca9或dCas9)。crRNA优选与tracrRNA分离并具有期望的编辑序列。crRNA还可以在编辑位点中和可选地在编辑位点周围取代的一个以及最高达约十五个DNA键,如本文所限定的(以下参考文献示出在tracrRNA的引导区可以进行DNA取代: Zachary Kartje等人Abstract 12<sup>th</sup>Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society,September,2016,<https://custom.cvent.com/F89D960A94384DD B8049882DD4DFBD4E/files/Cdb733770e9e4c14ac0a51b7386a9462.pdf>)。以这种方式,由核酸酶失活的Cas9(dCas9)驱动的增强的靶杂交形成将在功效上增强Brachman Kmiec型基因组编辑或采用含有化学反应性基团的寡核苷酸的编辑的特异性和非染色体切割优势,所述化学反应性基团如本文所述修饰靶核碱基以改变其编码。在另一实施方式中,使用编辑寡核苷酸将crRNA或tracrRNA的约18个核苷酸的引导RNA部分延伸至5'或3'。编辑寡核苷酸可以是未修饰的或具有本文所述的各种修饰。编辑寡核苷酸将通过磷酸二酯(或磷酸二酯类似物)键或化学接头共价地或者通过碱基配对于CRISPR引导RNA的一部分或CRISPR引导RNA的延伸部分非共价地附着至crRNA或tracrRNA引导。在特别有用的实施方式中,编辑寡核苷酸部分将与互补于tracrRNA或crRNA的引导部分的序列连续地杂交,将具有靶DNA的双链体延伸至被靶向的突变的区域中。由于Cas-9/CRISPR增强了链侵入的效率,这种方法将比不使用CRISPR-Cas9的寡核苷酸导向基因组方法更有效。这种方法比常见的切割被靶向的染色体并且需要单独的供体寡核苷酸的Cas-9/CRISPR方法更具选择性和简单性。我们的上述编辑方法与使用CRISPR/Cas9以获得精确编辑的常规方法之间的重要区别是使用CRISPR/Cas9的常规方法包括gRNA或crRNA的引导部分(链侵入部分),其与靶DNA链完全互补,而本文我们的方法包括crRNA或gRNA的引导部分,其具有期望的编辑序列(例如,野生型序列,当期望的编辑是从点突变变成野生型)。现今的编辑方法还在crRNA或gRNA引导片段具有与突变结合的区域,并在编辑位点中和可选地在编辑位点附近含有DNA取代,其可以充当用于编辑的供体DNA(通过用作修复的模板或通过HR)。

[0153] 在另一种实施方式中,crRNA(从tracrRNA中分离,或作为gRNA的片段)与核碱基修饰部分相关,因此crRNA作为本发明的和我们之前提交的PCT/US15/65348的编辑寡核苷酸,并且近期工作证明了该发明(Komor等人*Nature*,2016Apr 20.doi:10.1038/nature17946,打印前的Epub)。

[0154] J. 增强编辑的小分子

[0155] 小分子也能增强编辑频率。添加小分子没有添加可设计核酸酶那么麻烦(参见表X,可与编辑寡核苷酸组合以增强编辑效率的非催化剂)。在每种情况下,可以通过用药物处理靶细胞或生物体来可选地增强编辑效率,所述药物使细胞在暴露于编辑寡核苷酸期间或之前在S期(诸如阿非迪霉素(aphidicolin))同步,减慢复制叉(Erin E.Brachman和Eric B.Kmiec *DNA Repair* 4:445-457(2005)),或以其他方式增加同源DNA修复机制的表达和/或活性,诸如羟基脲、HDAC抑制剂或喜树碱(Ferrara和Kmiec *Nucleic Acids Research*,32

(17):5239-5248,2004) (参见表X,可以与编辑寡核苷酸组合以增强编辑效率的非催化剂)。

[0156] 表X

[0157] 可以与编辑寡核苷酸组合以增强编辑效率的非催化剂

[0158]

试剂可以可选地与本发明的寡核苷酸组合（非共价连接或共价连接）以增强编辑效率，或可以与编辑寡核苷酸一起施用，或可以在施用编辑寡核苷酸时或时间附近单独施用（例如，在 24 小时内）

#### 小分子编辑增强剂

A. 阻断细胞分裂的剂，诸如阿非迪霉素，当去除时导致细胞分裂的爆发，然后用编辑寡核苷酸以及可选的辅助寡核苷酸治疗当同步细胞达到 S 期时（例如 Engstrom 和 Kmiec Cell Cycle (2008) 7:10, 1402-141）

B. 减缓复制叉的剂，使得编辑寡核苷酸更多时间与暴露的单链靶基因组 DNA 杂交（例如 ddC(2',3'-二脱氧胞嘧啶或胸腺嘧啶（（例如 Rios, X.等人 Stable Gene Targeting in Human Cells Using Single-Strand Oligonucleotides with Modified Bases. PLoS ONE 7, e36697, doi:10.1371/journal.pone.0036697 (2012)））。

C. 打开染色体结构的剂，使得靶 DNA 更易于接近编辑寡核苷酸，诸如 HDAC 抑制剂（例如美国公开号 US20070072815 A1 申请号 US11/120,810）

用刺激靶细胞增殖的剂预防治疗或联合疗法。

A. 生长因子（例如红细胞生成素、EGF 或干细胞生长因子）

#### B. 细胞因子

[0159] 用于增强化学修饰的“供体”编辑寡核苷酸的同源重组效率的另一方法是在靶突变附近添加PNA-钳(PNA-clamp) (Schleifman等人, Chem. Biol. 18 (9) :1189-1198, 2011)。虽然Glazer已经采用具有第二代编辑化学物质的这种技术(例如在供体DNA寡核苷酸的两端之一上的三个硫代磷酸酯修饰),但PNA-钳没有与本文描述和参考的第三代更严格修饰的供体DNA一起被采用。(Bahal等人 Current Gene Therapy 14 (5) :331-42, 2014, Chin等人 PNAS 105 (36) :13514-13519, 2008, Rogers等人 PNAS 99 (26) :16695-16700, 2002和美国专利 8,309,356)。本发明的另一实施方式将本文所述的内部修饰的编辑寡核苷酸(不仅在末端

或末端附近修饰)与PNA辅助寡核苷酸(包括PNA钳、尾钳和链侵入PNA)组合。

#### [0160] K. 合成

[0161] 可以在本领域找到关于待用作本发明的编辑寡核苷酸的具体寡核苷酸的合成的教导,包括在PCT/US2015/65348和(PCT/US2015/65348)内的引用文献中。

[0162] 磷酸二酯或磷酸二酯类似物编辑寡核苷酸可以通过本领域已知的方法(例如,Rogers等人PNAS 99(26):16695-700,2002)与PNA缀合(例如,PNA辅助寡核苷酸或可以形成编辑寡核苷酸片段的PNA)。

#### [0163] L. 核苷酸间键

[0164] 本文描述了特别有用的修饰核苷酸间键或骨架(参见表II和(PCT/US2015/65348)。还包括各种盐、混合盐和游离酸形式。

#### [0165] M. 核苷模拟物

[0166] 在其他特别有用的寡核苷酸模拟物中,核苷单位的糖和核苷间键(即骨架)都被新的基团取代。维持核碱基单位以与合适的核酸靶化合物杂交。已经显示具有优异杂交特性的一种这样的寡核苷酸(寡核苷酸模拟物)被称为肽核酸(PNA)。在PNA化合物中,寡核苷酸的糖骨架被含酰胺的骨架特别是氨基乙基甘氨酸骨架取代。核碱基被保留并且直接或间接地结合于骨架的酰胺部分的原子。教导PNA化合物制备的代表性的美国专利包括但不限于美国专利号5,539,082、5,714,331和5,719,262。PNA化合物的更多教导可发现于Nielsen等人,Science,254:1497,1991。

[0167] 本发明的一些特别有用的实施方式采用具有硫代磷酸酯键的寡核苷酸和具有杂原子骨架的寡核苷酸,特别是以上引用的美国专利号5,489,677的 $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{O}-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{O}-\text{CH}_2-$ (称为亚甲基(甲基亚氨基)或MMI骨架)、 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 、 $-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-$ 和 $-\text{O}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ (其中天然磷酸二酯骨架表示为 $-\text{O}-\text{P}-\text{O}-\text{CH}_2-$ )以及以上引用的美国专利号5,602,240的酰胺骨架。还特别有用的是具有以上引用的美国专利号5,034,506的吗啉基骨架结构的寡核苷酸。

#### [0168] N. 核碱基修饰

[0169] 在本发明的编辑寡核苷酸中采用的寡核苷酸可另外地或可替换地包含核碱基修饰或取代。如本文所用的,“未修饰的”或“天然的”核碱基包括嘌呤碱基腺嘌呤(A)和鸟嘌呤(G),以及嘧啶碱基胸腺嘧啶(T)、胞嘧啶(C)和尿嘧啶(U)。修饰的核碱基包括其他的合成的和天然的核碱基(核碱基修饰和合成,参见PCT/US2015/65348)(还参见表III,用于寡核苷酸的有用的核碱基修饰)。

#### [0170] O. 互补性

[0171] 当足够数量的寡核苷酸核碱基可以与靶核酸的相应核碱基氢键合时,编辑寡核苷酸和靶核酸彼此互补,从而将产生期望的效果(例如,允许杂交后发生所期望的碱基修饰)。

[0172] 只要剩余的编辑寡核苷酸能够与靶核酸特异性杂交,则可以耐受编辑寡核苷酸和靶核酸之间的非互补核碱基。在某些实施方式中,本文提供的寡核苷酸或其指定部分为或至少为70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%互补于靶核酸、靶区域、靶片段或其指定部分(参见表III,用于寡核苷酸的有用的核碱基修饰,可能的核碱基修饰的列表。在某些实施方式中,本文提供的编辑寡核苷酸或其指定部分为或至少为70%、80%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、

92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%互补于靶核酸或其指定部分。使用常规方法可以确定编辑寡核苷酸与靶核酸的互补性百分比。例如,其中20个核碱基中的16个与靶核酸互补且因此将特异性杂交的编辑寡核苷酸将表示80%的互补性。在该实例中,剩余的非互补核碱基可以被聚集或散布有互补核碱基并且不需要彼此邻接或与互补核碱基邻接。它们可以在编辑寡核苷酸的5'端、3'端或内部位置。在另一实例中,如下的编辑寡核苷酸将具有与靶核酸的94.4%整体互补性,并将因此将落入本发明的范围内:所述编辑寡核苷酸长度为18个碱基,具有1个(一个)非互补核碱基,所述非互补核碱基的侧翼是与靶核酸完全互补的两个寡核苷酸。

[0173] 编辑寡核苷酸与靶核酸区的互补性百分比可以使用本领域已知的BLAST程序(基本局部比对检索工具)和PowerBLAST程序常规地确定(Altschul等人,J.Mol.Biol.,215:403-410,1990;Zhang和Madden,Genome Res.,7:649-656,1997)。也可以使用利用默认设置,利用Smith和Waterman的算法(Adv.Appl.Math.,2:482-489,1981)等的Gap程序(Wisconsin Sequence Analysis Package,Version 8for Unix,Genetics Computer Group,University Research Park,Madison WI)。

[0174] II.作用模式

[0175] A.杂交

[0176] 编辑寡核苷酸和靶核酸之间的杂交可以在不同的严格条件下发生,是序列依赖性的,并且由待杂交的核酸分子的性质和组成决定。最常见的杂交机制涉及核酸分子的互补核碱基之间的氢键(例如,Watson-Crick,Hoogsteen或反向的Hoogsteen氢键)。

[0177] 确定序列是否与靶核酸特异性杂交的方法是本领域公知的。在某些实施方式中,本文提供的编辑寡核苷酸是与靶核酸可特异性杂交的。

[0178] B.靶向结合

[0179] 本发明的编辑寡核苷酸被设计为靶向DNA或RNA。一种或多种编辑核苷酸可以在一侧或两侧侧翼具有与靶核酸完全互补或基本上互补的寡核苷酸。

[0180] 特别有用的结合方法是通过导致与DNA的Watson或Crick链杂交的链置换,或者当RNA是靶时通过反义编辑寡核苷酸与正义RNA链杂交。

[0181] C.编辑寡核苷酸

[0182] 编辑寡核苷酸可以可选地含有将递送部分共价附着至寡核苷酸的“接头”。接头可以附着至编辑寡核苷酸中的任何核碱基,到5'末端、到3'末端、到糖残基或者到骨架。接头可以是本领域技术人员已知的用于执行该任务的任何接头。(参见表V,这些和其他接头的编辑和辅助寡核苷酸的有用接头)。接头长度可以在1个碳至约20个碳的范围内或其他化学成分等同的长度,但优选地低于10个碳或10个碳等同的长度。

[0183] D.通过被靶向的核碱基的化学修饰进行编辑

[0184] 图1示出了利用本发明的编辑寡核苷酸的编辑化学修饰模式的编辑机制。编辑寡核苷酸可以是如本文所述的各种长度。

[0185] 用于化学修饰编辑方法中的编辑寡核苷酸包含至少三种成分,其包括“引导寡核苷酸”、将“序列修饰反应性部分”附着至“引导寡核苷酸”的“接头”或非共价连接。在PCT/US2015/65348中描述了通过核碱基化学修饰模式起作用的编辑寡核苷酸的合成方法、使用方法、实例和组合物。在图1中,示出了附着至编辑寡核苷酸的核碱基的接头。然而,可以附

着至编辑寡核苷酸中的任何核碱基、到5'末端、到3'末端、到糖残基或者到骨架。接头可以是本领域技术人员已知的用于执行该任务的任何接头。如本文所述的接头可以包括至“序列修饰部分”的非共价键(Montiel等人,PNAS110(45):18285-90,2013.Woolf,等人,PNAS 92:8298-8302,1995.)。可替换地,可以使用和检验接头以确定其在编辑寡核苷酸中的表现。例如,在本申请中可以使用的接头包括表V中的那些。接头长度可以在1个碳至约20个碳的范围内或其他化学成分等同的长度,但优选地低于10个碳或10个碳等同的长度。作为化学共价接头的替代,可以制备编辑寡核苷酸和序列修饰部分之间的非共价连接(例如,参见(Montiel等人,PNAS110(45):18285-90,2013,Woolf,等人,PNAS 92:8298-8302,1995,以及Woolf,Nat.Biotech16:341-344,1998)。

[0186] 用化学修饰模式的编辑寡核苷酸成功处理导致“靶核酸”的一些部分被修饰。在图1中,“化学修饰”(三角形)表示化学部分(例如甲基)的添加,但是如本文所述的修饰可以是靶核酸序列的被靶向的核碱基中的化学基团的多种添加或去除之一(例如脱氨基)。

[0187] 参见表VII,核碱基化学修饰和PCT/US2015/65348的化学修饰的序列修饰部分,可以导致编辑。

[0188] E. 化学物质

[0189] 参见表VII和PCT/US2015/65348,可以通过核碱基修饰导致编辑的化学反应。

[0190] F. 编辑作用

[0191] 本发明提供了可以减少或消除由多种突变引起的影响的编辑寡核苷酸。如果需要,通过使用本文的方法和组合物,施用将编辑变回原始序列的编辑寡核苷酸,编辑可以被逆转。能够逆转编辑的潜能是增强用于治疗应用的基因组编辑的安全性的重要选择。

[0192] 在本发明的一种实施方式中,可以校正在西方人群中引起囊性纤维化的常见突变序列 $\delta F508$ 。可以通过用编辑寡核苷酸插回缺失的3个核苷酸来实现对如 $\delta F508$ 的缺失突变的修复。McNeer等人(Nature Comm.DOI:10.1038/ncomms 1pgs.1-11,2015)提供了在每端上具有三个硫代磷酸酯修饰的编辑寡核苷酸的实例。靶向相同区的具有本发明的编辑寡核苷酸的改进的化学修饰模式和构型的寡核苷酸可以代替在每端上具有三个硫代磷酸酯修饰的编辑寡核苷酸,类似于McNeer等人使用的寡核苷酸。然而,与插入相比,通过编辑可以更有效地实现单碱基转换或颠换,因此在CF蛋白编码序列中从R 553到M(R553M)的变化是纠正这种突变的表型效应另一种替换方法,该变化抑制了 $\delta F508$ 突变的有害作用(Liu等人Biochemistry 51(25):5113-5124,2012.doi:10.1021/bi300018e。在CF蛋白编码序列中从R 555到K(R555K)的另一变化抑制了 $\delta F508$ 突变的有害作用(Liu等人同上)。

[0193] 可以通过本文的方法和组合物校正的常见CFTR突变的其他非限制性实例包括:M470V、W1282X、G542X、Y122X和3849+10Kb C->T。

[0194] 本发明的另一方面包括将编辑寡核苷酸施用至个体以在其DNA或RNA中产生对一种或多种疾病有保护作用的等位基因序列(参见并例如PCT/US2015/65348)。

[0195] III. 治疗

[0196] A. 疾病

[0197] 一些靶标疾病、适应症和通过本发明的组合物和方法来治疗这种疾病和适应症的编辑类别,参见(PCT/US2015/65348)的图22。

[0198] 关于(PCT/US2015/65348)的图22中未列出的内容,靶标适应症、基因和编辑核苷

酸序列,包括编辑寡核苷酸序列,在美国专利7,258,854、7,226,785和美国专利申请20150118311和20150232881中描述。

[0199] 与代表性疾病和疾患相关的靶基因的编辑寡核苷酸的非限制性实例在图中。

[0200] 与代表性疾病和疾患相关的靶基因的编辑寡核苷酸的示例性(非限制性)列表在(PCT/US2015/65348)的图24中示出。

[0201] B. 药物组合物

[0202] 本发明的药物组合物以足以实现靶基因表达的剂量给药。通常,合适剂量的编辑寡核苷酸将在每天接受者每千克体重0.01至5.0毫克的范围内,如果需要,最高达每千克50毫克,优选地在每天每千克体重0.1至200微克的范围内,更优选地在每天每千克体重0.1至100微克的范围内,甚至更优选地在每天每千克体重1.0至50微克的范围内以及最优选地在每天每千克体重1.0至25微克的范围内。药物组合物可以每天给药一次,或者编辑寡核苷酸可以在整个一天中以适当的间隔或甚至使用连续输注给药2次、3次、4次、5次、6次或更多次的亚剂量。在这种情况下,每亚剂量中所含的编辑寡核苷酸必须相应地较小以达到总日剂量。剂量单位也可以复合用于在几天内递送,例如使用在几天内提供编辑寡核苷酸持续释放的常规缓释制剂。缓释制剂是本领域中公知的。在此实施方式中,剂量单位含有每日剂量的相应倍数。

[0203] i. 剂量

[0204] 某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量和时间,包括但不限于疾病或疾患的严重程度、先前的治疗、受试者的总体健康和/或年龄以及存在的其他疾病。此外,用治疗有效量的组合物治疗受试者可以包括单次治疗或一系列治疗。用可设计核酸酶编辑已经设计了一种或几种治疗,这是由于对可设计核酸酶和载体蛋白的免疫应答以及由于通过可设计核酸酶的切割通过导致随机插入和缺失来破坏大部分的靶序列。本文所述的编辑寡核苷酸的免疫原性降低和编辑精确度(少或没有随机插入和缺失)允许多次给药,最多3次,最多20次,最多50次或最多100次或更多次。多次给药具有安全优势,因为可以按照编辑进程随时间对患者进行监控。此外,复制细胞更适合基因组编辑,因此当细胞分裂时,多剂量允许更长的治疗跨度以编辑细胞。对本发明所涵盖的用于个体的编辑寡核苷酸的有效剂量和体内半衰期的估算可以使用常规方法或基于使用适当的动物模型的体内测试来进行,如本文别处所述的。

[0205] ii. 施用途径

[0206] 涵盖在本发明中的药物组合物可以以本领域已知的任何方式施用(参见PCT/US2015/65348的非限制性实例)。

[0207] 根据本发明有用的药物组合物还包括包封的制剂以保护编辑寡核苷酸免于从身体快速消除,诸如控释制剂,包括植入物和微囊化递送系统(参见PCT/US2015/65348的非限制性实例)。这些可以根据本领域的技术人员已知的方法制备,例如,如在美国专利号4,522,811;PCT申请号W0 91/06309;以及欧洲专利公开EP-A-43075中所述的,或者从Northern Lipids(Burnaby,British Columbia)、Avanti Polar Lipids(Alabaster,Alabama)或Arbutus BioPharma(Burnaby,British Columbia)商购获得。也可以使用纳米颗粒递送,并且实例描述于Zhou等人Pharmaceuticals,6:85-107,2013;doi:10.3390/ph6010085,McNeer等人,Gene Ther.20(6):658-669,2013;doi:10.1038/gt.2012.82,

McNeer等人, Nature Comm. DOI:10.1038/ncomms 7952 pgs.1-11, 2015和Yuen Y.C.等人 Pharmaceuticals, 5:498-507, 2013; doi:10.3390/pharmaceutics5030498。本发明的寡核苷酸也可以按照制造商所述的包封在Invivofectamine 3.0中 (Thermo Fisher, Waltham, MA), 或按照制造商所述的包封在LUNAR纳米颗粒中 (Arcturus, San Diego, California, 美国专利申请号20150141678)。关于细胞培养用途, Lipofectamine 2000特别适用于递送编辑寡核苷酸, 因为它在血清存在下起作用, 并且允许寡核苷酸在细胞复制时在数小时或数天内递送 (Thermo Fisher, Waltham, MA)。

[0208] iii. 毒性和功效

[0209] 这种化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养或实验动物中的标准药物程序来确定 (参见PCT/US2015/65348)。

[0210] iv. 组合物和方法

[0211] 本发明的寡核苷酸以下述组合物和方法提供。

[0212] 在一方面, 本文提供了一种修饰在分离的细胞内或生物体中的细胞内的核酸序列的方法, 包括将寡核苷酸引入细胞的步骤, 致使互补细胞核酸结果的一种修饰或多种修饰, 其中修饰创建一种防护免受疾病的等位基因、修复突变或失活基因。

[0213] 在另一实施方式中, 防护免受疾病的等位基因不会使被靶向的基因的功能失活, 而是调节被靶向的基因的功能。

[0214] 在又另一实施方式中, 该方法导致被靶向的基因功能的调节。被靶向的基因功能的调节可增加基因产物的活性或表达。被靶向的基因功能的调节可部分地降低基因产物的活性或表达。

[0215] 被靶向的基因功能的调节可将修饰细胞中的基因产物的活性或表达部分地降低不超过50%。被靶向的基因功能的调节可将修饰细胞中的基因产物的活性或表达部分地降低不超过75%。被靶向的基因功能的调节可将修饰细胞中的基因产物的活性或表达部分地降低不超过90%。

[0216] 在该方法的某些实施方式中, 被靶向的基因产物是被蛋白酶切割所翻译后修饰的蛋白质。在具体实施方式中, 被靶向的基因蛋白是APP, 并且该基因的修饰改变了APP的序列以使得其不太容易被 $\beta$ -分泌酶切割。APP中序列编码位置673可以从丙氨酸改变为苏氨酸。

[0217] 在另一方面本文提供的是包含本发明的寡核苷酸的组合物。该组合物可以用于本文所述的方法中。在一些实施方式中, 寡核苷酸存在于制剂 (例如, 编辑寡核苷酸制剂) 中。在一种实施方式中, 编辑寡核苷酸制剂包含增加编辑效率的外源蛋白或核糖核蛋白 (或表达所述蛋白或核糖核蛋白的核酸)。提高编辑效率的外源蛋白质或核糖核蛋白可以是可设计的核酸酶。提高编辑效率的外源蛋白或核糖核蛋白可以是CRISPR-Cas9、锌指或Talen可设计的核酸酶。编辑寡核苷酸可以是单链的未修饰的DNA。编辑寡核苷酸可以是单链的并含有至少10个脱氧核糖。编辑寡核苷酸可以被化学地修饰。在一种实施方式中, 编辑寡核苷酸通过本领域已知的方法与可设计的核酸酶 (例如, Talen或Cas-9) 结合 (非共价地或共价地), 以增加编辑寡核苷酸在切割位点附近的局部浓度, 并从而增加HR的频率, 与插入缺失的频率相比。当HR和精确编辑是期望结果的时候, 降低插入缺失的比率是有用的, 因为插入缺失通常破坏靶向修复的基因的功能。

[0218] 编辑寡核苷酸的化学修饰可以包括硫代磷酸酯。编辑寡核苷酸的化学修饰可以在

每个末端上包括3个硫代磷酸酯核苷酸间键。编辑寡核苷酸的化学修饰可以在末端包括总共1-5个硫代磷酸酯核苷酸间键。编辑寡核苷酸的化学修饰可以包括总共7个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间键。在一种实施方式中,编辑寡核苷酸的化学修饰包括总共7个或更多个硫代磷酸酯核苷酸间键,但仍保留至少10个不是硫代磷酸酯修饰的核苷酸间键。在一种实施方式中,修饰不包含任何硫代磷酸酯修饰,以降低毒性,当使用包封的编辑寡核苷酸时这尤其有用,因为包封保护编辑寡核苷酸免于血清和内溶酶体核酸酶。在一种实施方式中,修饰包括不是硫代磷酸酯的核酸外切酶端基封闭基团。

[0219] 在某些实施方式中,该组合物包含具有化学修饰的核碱基的寡核苷酸。一个或多个化学修饰的核碱基可以是5甲基脱氧胞苷。在一些实施方式中,存在1个至约500个5甲基脱氧胞苷。在其他实施方式中,存在1个至约50个5甲基脱氧胞苷。在其他实施方式中,存在1个至约10个5甲基脱氧胞苷。在其他实施方式中,存在1个至约5个5甲基脱氧胞苷。在其他实施方式中,存在1个至约5个5甲基脱氧胞苷。在其他实施方式中,存在一个5甲基脱氧胞苷。在其他实施方式中,5甲基脱氧胞苷中的一个位于与错配的5' TG杂交的5' CpG序列中,并且该修饰将编辑导向靶链。在具体实施方式中,此5' TG靶位点是甲硫氨酸起始密码子的TG,并且此编辑减少了或消除了功能性靶蛋白的产生。在其他实施方式中,在很少或没有序列限制的情况下,跨靶核苷酸的修饰可以将编辑导向靶链,一种实施方式中的所述化学物质是2'F、2'-O-烷基或LNA。在一种更具体的实施方式中,在编辑寡核苷酸的编辑位点或编辑位点附近的将编辑导向靶链的修饰是没有硫代磷酸酯的编辑寡核苷酸,以便将毒性降至最小(实例参见图2)。在其他实施方式中,将编辑导向靶链的修饰的化学物质与硫代磷酸酯键组合,以进一步增强核酸酶稳定性并增加体内生物分布(实例参见图2)。在一些实施方式中,编辑寡核苷酸包括>15个硫代磷酸酯,以及在编辑位点或编辑位点附近将编辑导向靶链的修饰(实例参见图2)。在一些实施方式中,编辑寡核苷酸设计成修复缺失,并且将编辑导向靶链的化学修饰直接置于编辑寡核苷酸序列的5'和3'核苷酸中,其可以被插入以校正缺失(参见ETAGEN系列号100243-100245,分别使用LNA、2'-O-甲基和2'F的此修饰模式的实例参见图2,其中在这种情况下靶向囊性纤维化 $\delta$ F508突变)。在一些实施方式中,具有将编辑导向靶链的跨靶核碱基的化学修饰的编辑寡核苷酸与5'磷酸修饰组合,其也可以增加编辑效率。

[0220] 在一些实施方式中,当需要低毒性和高核酸酶稳定性时,编辑寡核苷酸具有大量的用2'修饰修饰的键,却没有硫代磷酸酯,并且具有将编辑导向靶链的跨编辑位点的化学修饰,诸如2'-O-烷基、2'F或LNA(实例参见图2)。在一些实施方式中,上文中所述的编辑寡核苷酸还具有自递送缀合物,其中在一种特别有用的实施方式中,包括N-乙酰-D-半乳糖胺。

[0221] 在若干特别有用的实施方式中,在该组合物和方法部分中的编辑寡核苷酸与表VIII中的可设计核酸酶一起体外或体内递送至细胞。

[0222] 在本文所述的方法和组合物的具体实施方式中,编辑寡核苷酸包括2'糖修饰。在本文所述的方法和组合物的另一具体实施方式中,编辑寡核苷酸仅包括2'修饰。在具体实施方式中,编辑寡核苷酸包括编辑位点5'的2'F和编辑位点3'的2'-O-mt或者这两者。在另一具体实施方式中,编辑寡核苷酸包括增加编辑位点附近亲和力的修饰碱基,其中所述修饰的碱基不是5甲基C。

[0223] 在本文所述的方法和组合物的其他具体实施方式中,寡核苷酸被包封在递送媒介物中(对核酸的递送媒介物的描述,参见Yin等人Nature Reviews,Genetics.15:541-555,2014),用于编辑的寡核苷酸包括列于表XIV中的辅助寡核苷酸或包括列于表XIV中的辅助寡核苷酸之一的序列。

[0224] 寡核苷酸包含4个或更多个可选的片段或5个这些可选的片段,或6个这些可选的片段,或所有7个这些可选的片段;并且寡核苷酸主要通过下表XI中所述的模式之一起作用。

[0225] 表XI

[0226] 通过编辑寡核苷酸实现的编辑类型(靶序列改变)

[0227]

类型	方法
敲除	产生预成熟终止密码子错义突变,其完全或部分失活蛋白质的功能 将 AUG 起始密码子变成不同的密码子 产生中断功能性靶蛋白产生的片突变
突变的修复/校正	改变核苷酸 插入或缺失 修复的类型 -精确校正 -精确氨基酸、不同的 DNA -基因内第二位点抑制物 -基因间第二位点抑制物 -被突变剪接位点跳读的永久性突变

[0228]

	体外显子
插入保护性等位基因	改变核苷酸
调节表达水平	-改变核苷酸 -插入或缺失

[0229] 在本文所述的方法和组合物的具体实施方式中,寡核苷酸还包含赋予增强的细胞摄取的缀合分子。

[0230] 在本文所述的方法和组合物的具体实施方式中,该方法和组合物还包含一种或多种辅助寡核苷酸。

[0231] 在本文所述的方法和组合物的具体实施方式中,本发明的寡核苷酸具有一种或多种本文列举的和/或表XII中援引的改良性能和优点。

[0232] 表XII

[0233] 编辑和辅助寡核苷酸的化学修饰导致的改良性能

[0234]

性能	一个或多个优点
增加杂交亲和力	通过增加侵入双链体 DNA 靶链的能力增加效力
降低被 TCR 和其他细胞核酸传感器的识别	降低来自免疫刺激的毒性
核酸酶抗性	增加效力,编辑持续时间以及无包封情况下,通过递送缀合物递送的可容性 增强血清半衰期
“自递送”	没那么复杂、没那么贵并且较少毒性制剂

[0235]

	更好的组织穿透
--	---------

[0236] 在本文所述的方法和组合物的具体实施方式中,本发明的寡核苷酸使用一种或多种本文列举的和/或表XII中列举的递送媒介物递送。

[0237] 表XIII

[0238] 用于将编辑寡核苷酸递送至靶细胞的递送媒介物的非限制性实例

[0239]

本领域已知的用于递送核酸的非病毒载体,其可用于递送本发明的寡核苷酸,包括在 Hao 等人, Nature Review, Genetics 15;514-554,2014 中描述和引用的那些。

PLGA 和聚(β氨基酯)(PBAE),包括通过 PEG 化磷脂接头(DSPE-PEG2000)与 MPG 衍生的 PLGA/PBAE 纳米颗粒(McNeer 等人, Gene Ther. 20(6):658-669, 2013; doi: 10.1038/gt.2012.82, McNeer 等人, Nature Comm. DOI:10.1038/ncomms 7952:1-11, 2015, Saltzman 美国专利申请号 2011/0268810 和 2015/0118311)

在美国专利申请号 20130225663 中描述的递送媒介物

本发明的寡核苷酸还可用于包封在 LUNAR 纳米颗粒中,如制造商所述的(Arcturus, San Diego, California, 美国专利申请#20150141678)。

动态极性缀合物(Arrowhead Research, Wooddell 等人 Molecular Therapy. 26 February 2013; doi:10.1038/mt.2013.31)

脂质体和脂质体 2000 和 Invivofectamine 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts)。

SNALPS (Atbutus Biopharma (原名 Tekmira), Burnaby, British Columbia)

脂质体悬浮液(包括靶向用单克隆抗体感染细胞成病毒抗原的脂质体。(美国专利 No.4,522,811; PCT 申请 No. WO 91/06309; 以及欧洲专利公开

[0240]

EP-A-43075。脂质体可以从 Northern Lipids (Burnaby, British Columbia)、Avanti Polar Lipids (Alabaster, Alabama) 或 Arbutus BioPharma (Burnaby, British Columbia) 商购获得。

[0241] 在一个方面,本文提供了编辑寡核苷酸,其中编辑寡核苷酸可以编辑细胞中的互补靶序列,并且其中编辑寡核苷酸包括选自列于表II的修饰中的一种类型的骨架修饰,或列于表II的两种类型的修饰,或列于表II的3种或更多种类型的修饰。

[0242] 在编辑寡核苷酸的一种实施方式中,骨架修饰是中性的。骨架修饰可以包括1个至约20个中性修饰。在具体实施方式中,骨架修饰包括2个至约4个中性修饰。

[0243] 在另一实施方式中,骨架修饰是甲基膦酸酯。骨架修饰可以包含1个至约20个甲基膦酸酯。在具体实施方式中,骨架修饰包含2-4个甲基膦酸酯。在具体实施方式中,骨架修饰包含2个甲基膦酸酯。在更具体的实施方式中,骨架修饰包括5'末端上的2个甲基膦酸酯。

[0244] 在另一实施方式中,编辑寡核苷酸可以在单个被修饰的骨架编辑寡核苷酸中包含1个至约20个骨架修饰。在一种实施方式中,至少两种修饰在末端片段中。在具体实施方式中,编辑寡核苷酸在5'末端包含两种修饰。

[0245] 在另一方面,本文提供的是使用如本文所述的编辑寡核苷酸来编辑细胞或生物体中的基因的方法。在一种实施方式中,细胞是分离的人类细胞。

[0246] 在一种实施方式中,生物体是人类。在某些实施方式中,该方法用于治疗选自(PCT/US2015/65348)的图23中列出的适应症中的适应症。在具体实施方式中,适应症是选自(PCT/US2015/65348)的图24中列出的适应症。

[0247] 在一种实施方式中,该基因是(PCT/US2015/65348)的图23中所列的靶基因。在具体实施方式中,编辑寡核苷酸包含(PCT/US2015/65348)的图24中所列序列的至少百分之25。在另一具体实施方式中,编辑寡核苷酸包含(PCT/US2015/65348)的图24中的序列的至少51%。

[0248] 在另一方面,本文提供的是编辑寡核苷酸,其中所述编辑寡核苷酸可以编辑细胞内的互补靶序列,并且其中所述编辑寡核苷酸包含表III(用于寡核苷酸的有用核碱基修饰)中所列的一种或多种核碱基修饰。在一种实施方式中,编辑寡核苷酸包含来自表III的1个至约100个修饰的核碱基。在一种实施方式中,编辑寡核苷酸包含来自表III的1个至约30个修饰的核碱基。在一种实施方式中,编辑寡核苷酸包含来自表III的1个至约10个修饰的核碱基。在具体实施方式中,编辑寡核苷酸包含根据表III中的修饰模式种类的一个或多个修饰的核碱基。

[0249] 在编辑寡核苷酸的另一实施方式中,修饰的核碱基通过对哺乳动物中的寡核苷酸进行编辑来降低免疫刺激。在具体实施方式中,修饰的核碱基包含5'甲基C化学修饰。在另一具体实施方式中,核碱基修饰增加了编辑寡核苷酸对其互补靶的亲合力。

[0250] 在另一方面,本文提供的是编辑寡核苷酸,其中所述编辑寡核苷酸可以编辑细胞内的互补靶序列,并且其中编辑寡核苷酸包含表IV(用于寡核苷酸的有用的糖)中所列的一种或多种糖修饰。在一种实施方式中,糖修饰选自2'糖修饰。2'糖修饰可以是2'F。2'糖修饰

可以是2'-O-甲基。2'糖修饰可以是2'F和2'-O-甲基修饰的组合。

[0251] 在编辑寡核苷酸的一种实施方式中,大多数(例如,大于50%)的2'F修饰是在编辑位点的3'。在编辑寡核苷酸的另一实施方式中,大多数(例如,大于50%)的2'-O-甲基修饰是在编辑位点的5'。

[0252] 2'糖修饰可以增加寡核苷酸对其靶核酸的亲合力。在一种实施方式中,编辑寡核苷酸包含1-75个糖修饰。在另一实施方式中,编辑寡核苷酸包含2-30个糖修饰。在另一实施方式中,编辑寡核苷酸包含2-16个糖修饰。

[0253] 在一种实施方式中,编辑寡核苷酸包含约5-100%化学修饰的碱基。在另一实施方式中,编辑寡核苷酸包含约25-75%化学修饰的碱基。在另一实施方式中,编辑寡核苷酸包含约40-60%化学修饰的碱基。在具体实施方式中,编辑寡核苷酸包含2种修饰。在一种具体实施方式中,编辑寡核苷酸含有2'F和2'-O-甲基修饰。

[0254] 在一种实施方式中,编辑寡核苷酸靶向(PCT/US2015/65348)的图23中所列的基因。

[0255] 在另一方面,本文提供的是通过基因组编辑治疗人类疾病的方法,其包括将本文所述的编辑寡核苷酸施用于需要这种治疗的人的步骤。

[0256] 在又另一方面,本文提供的是编辑寡核苷酸,其包含一种或多种递送缀合物。在具体实施方式中,编辑寡核苷酸包含一种递送缀合物。递送缀合物可以促进寡核苷酸的细胞摄取。递送缀合物可以增强在生物体中细胞对寡核苷酸的摄取。递送缀合物可以是与编辑寡核苷酸直接或间接共价键合的化学部分。直接共价键合包括例如化学部分与寡核苷酸的共价键合。间接共价键合包括例如使用与寡核苷酸和化学部分均共价键合的接头。在一种实施方式中,编辑寡核苷酸不被增强生物体细胞中摄取的递送媒介物包封。

[0257] 在一种实施方式中,递送缀合物是受体的配体。在特别有用的实施方式中,配体是1至10个N-乙酰-D-半乳糖胺。在另一具体实施方式中,配体是三个N-乙酰-D-半乳糖胺。在一种实施方式中,递送缀合物是亲脂基团。亲脂基团可以具有约10个至约50个碳。亲脂基团可以是胆固醇形式。

[0258] 包含一种或多种递送缀合物的编辑寡核苷酸用于治疗疾病。在一方面,本文提供的是通过将如本文所述的包含一种或多种递送缀合物的编辑寡核苷酸施用需要这种治疗的患者来治疗或预防人类疾病的方法。在一种实施方式中,该方法靶向用于编辑的基因,其中该靶向基因列于(PCT/US2015/65348)的图23中。在另一实施方式中,用于治疗的靶向基因列于(PCT/US2015/65348)的图24中。在该方法的一种实施方式中,编辑寡核苷酸序列包含(PCT/US2015/65348)的图24中的序列之一。

[0259] 采用包封的编辑寡核苷酸的组合物和方法。一种实施方式是与基因组DNA靶序列相比具有八个或更少的序列差异的编辑寡核苷酸。序列差异的每一个都是错配,其可能导致与靶序列相比的转换或颠换、一个或多个核苷酸的插入和/或缺失,由此编辑寡核苷酸将靶基因组DNA序列编辑成编辑寡核苷酸的序列,并且由此得到的编辑对编辑寡核苷酸处理的生物体(或离体处理的细胞)具有治疗益处,或者对研究靶细胞或生物体有用的期望变化。该编辑寡核苷酸还可以:在5'末端和/或3'末端具有1-4个核酸外切酶封闭基团和/或;具有少于8个的硫代磷酸酯修饰;被包封在纳米颗粒中;具有能降低免疫刺激的一个或多个核碱基化学修饰;和/或在与靶向基因组DNA的序列差异处或附近具有化学修饰,其能阻断

内源性错配修复机制编辑编辑寡核苷酸。

[0260] 在某些实施方式中,编辑寡核苷酸与基因组DNA靶序列相比,具有六个或更少的序列差异,四个或更少的序列差异,两个或更少的序列差异或具有一个序列差异。在任一前述实施方式中,在编辑寡核苷酸中,与基因组DNA靶序列相比的序列差异是错配时,则当编辑寡核苷酸与DNA靶序列相互作用时,会引起一个或多个转换和/或一个或多个颠换。可替代地,在编辑寡核苷酸中,与基因组DNA靶序列相比的编辑寡核苷酸序列差异,当编辑寡核苷酸与DNA靶标相互作用时,会导致靶向基因组DNA中的一个或多个核苷酸的插入或在靶向基因组DNA中的一个或多个核苷酸的缺失。

[0261] 编辑寡核苷酸可以具有:在其5'末端的1-4个核酸外切酶封闭基团以及在其3'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其5'末端的三个核酸外切酶封闭基团以及在其3'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其5'末端的两个核酸外切酶封闭基团以及在其3'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其5'末端的一个核酸外切酶封闭基团以及在其3'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其3'末端的1-4个核酸外切酶封闭基团以及在其5'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其3'末端的三个核酸外切酶封闭基团以及在其5'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其3'末端的两个核酸外切酶封闭基团以及在其5'末端没有核酸外切酶封闭基团;或者在其3'末端的一个核酸外切酶封闭基团以及在其5'末端没有核酸外切酶封闭基团。

[0262] 另外,一个或多个核酸外切酶封闭基团是:硫代磷酸酯键;不是硫代磷酸酯键;非核苷酸接头;氨基接头;C2至C9氨基接头;C3氨基接头;或受约束的核酸。一个或多个核酸外切酶封闭基团可以具有2'糖修饰(包括受约束的核酸)。当核酸酶封闭基团是受约束的核酸,其是:2',4'-BNA;cET;或不是LNA;或是LNA。

[0263] 阻断内源性错配修复机制修复编辑寡核苷酸的一种或多种编辑寡核苷酸化学修饰是:一种或多种2'糖修饰,包括受约束的核酸;一种或多种2'糖修饰,包括受约束的核酸,但不包括一个或多个LNA;一种或多种2'糖修饰,但不包括2'F;是LNA;或2'F糖修饰。

[0264] 包封的编辑寡核苷酸可以静脉施用:至生物体;十次或更多次以实现治疗相关编辑;或20次或更多次以实现治疗相关编辑。

[0265] 编辑寡核苷酸可以用于对通过编辑寡核苷酸治疗生物体(或离体处理的细胞)或通过所述编辑寡核苷酸治疗的人类(或离体处理的人类细胞)产生治疗益处。

[0266] 编辑寡核苷酸和使用编辑寡核苷酸的方法另外在末端或末端核酸外切酶封闭基团与邻近与靶向基因组DNA的序列差异的修饰之间具有2'糖修饰,其阻断内源性错配修复机制修复编辑寡核苷酸。另外的2'糖修饰是:编辑位点的5'和3'二者;仅编辑位点的3'或仅编辑位点的5'。在某些实施方式中,编辑位点的3'的2'糖修饰是2'F或编辑位点的5'的2'糖修饰是2'-O-甲基。

[0267] 编辑寡核苷酸可以还:具有5'磷酸或其核酸酶稳定的类似物;与另外的寡核苷酸组合,该寡核苷酸在编辑位点的200个核苷酸内结合基因组DNA,并提高编辑寡核苷酸的编辑效率;或者与PNA寡核苷酸组合,所述PNA寡核苷酸结合编辑位点的200个核苷酸内的基因组DNA,并提高编辑寡核苷酸的编辑效率。

[0268] 用于本发明方法的编辑寡核苷酸的编辑效率可以具有通过用可设计核酸酶在靶位点的200个核苷酸内切割来增强的编辑效率。

[0269] 可以利用本发明的编辑寡核苷酸和使用编辑寡核苷酸的方法来治疗疾病,疾病包

括β地中海贫血、囊性纤维化或杜氏肌营养不良、阿尔兹海默氏病、2型糖尿病、镰状细胞病和β地中海贫血。

[0270] 编辑寡核苷酸可以靶向基因组DNA的正义链或基因组DNA的反义链。

[0271] 采用非包封编辑寡核苷酸的组合物和方法包括具有八个或更少的与基因组DNA靶序列相比的序列差异的编辑寡核苷酸,序列差异的每一个都是错配,其可能导致与靶序列相比的转换或颠换、核苷酸的插入和/或缺失,由此编辑寡核苷酸将靶基因组DNA序列编辑成编辑寡核苷酸的序列,并且由此得到的编辑对编辑寡核苷酸处理的生物体(或离体处理的细胞)具有治疗益处,或者对研究靶细胞或生物体有用的期望变化。另外,该编辑寡核苷酸具有:在5'末端和/或3'末端具有1-4个核酸外切酶封闭基团和/或;没有被包封在纳米颗粒或其他递送媒介物中;能降低免疫刺激的一个或多个核碱基化学修饰;以及在与靶向基因组DNA的序列差异处或附近的化学修饰,其能阻断内源性错配修复机制编辑该编辑寡核苷酸。

[0272] 上述实施方式中的编辑寡核苷酸具有:六个或更少的与基因组DNA靶序列相比的序列差异;四个或更少的与基因组DNA靶序列相比的序列差异;两个或更少的与基因组DNA靶序列相比的序列差异;或具有一个与基因组DNA靶序列相比的序列差异。与基因组DNA靶序列相比的编辑寡核苷酸序列差异:通过具有导致一个或多个转换和/或一个或多个颠换的错配;这将导致在靶基因组DNA中插入一个或多个核苷酸;会导致靶基因组DNA中一个或多个核苷酸的缺失。

[0273] 编辑寡核苷酸可以具有:在其5'末端的1-4个核酸外切酶封闭基团以及在其3'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其5'末端的三个核酸外切酶封闭基团以及在其3'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其5'末端的两个核酸外切酶封闭基团以及在其3'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其5'末端的一个核酸外切酶封闭基团以及在其3'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其3'末端的1-4个核酸外切酶封闭基团以及在其5'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其3'末端的三个核酸外切酶封闭基团以及在其5'末端没有核酸外切酶封闭基团;在其3'末端的两个核酸外切酶封闭基团以及在其5'末端没有核酸外切酶封闭基团;或者在其3'末端的一个核酸外切酶封闭基团以及在其5'末端没有核酸外切酶封闭基团。

[0274] 一个或多个核酸外切酶封闭基团可以是:硫代磷酸酯键;非硫代磷酸酯键;非核苷酸接头;氨基接头;C2至C9氨基接头;或C3氨基接头。一个或多个核酸外切酶封闭基团可以具有2'糖修饰(包括受约束的核酸)或受约束的核酸。受约束的核酸可以是:2',4'-BNA; LNA; cET;或非LNA约束的核酸。

[0275] 编辑寡核苷酸中,阻断内源性错配修复机制修复编辑寡核苷酸的一种或多种化学修饰包括2'糖修饰,并且可以还含有受约束的核酸,但可以不包括一个或多个LNA和/或2'F。可替代地,阻断内源性错配修复机制修复寡核苷酸的一种或多种化学修饰可以是LNA或2'F糖修饰。

[0276] 本发明的编辑寡核苷酸可以通过皮下注射、静脉注射或输注、玻璃体内注射或吸入施用至生物体。编辑寡核苷酸可以施用十次或更多次以实现治疗相关编辑,或施用20次或更多次以实现治疗相关编辑。由编辑寡核苷酸得到的编辑可以用于对通过编辑寡核苷酸治疗生物体(或离体处理的细胞)或通过所述编辑寡核苷酸治疗的人类(或离体处理的人类细胞)产生治疗益处。

[0277] 本发明的方法和组合物包括编辑寡核苷酸,其另外在末端或末端核酸外切酶封闭基团与邻近与靶向基因组DNA的序列差异的修饰之间具有2'糖修饰,其阻断内源性错配修复机制修复编辑寡核苷酸。另外的2'糖修饰可以是:编辑位点的5'和3'二者;仅编辑位点的3'或仅编辑位点的5'。在其他实施方式中,编辑位点的3'的2'糖修饰是2'F或编辑位点的5'的是2'-O-甲基。编辑寡核苷酸可含有:5'磷酸或其核酸酶稳定的类似物;每个核苷酸间键处的硫代磷酸酯修饰;>90%的核苷酸间键处的硫代磷酸酯修饰;>40%的核苷酸间键处的硫代磷酸酯修饰;8个或更多个核苷酸间键处的硫代磷酸酯修饰;或者在40%或更多的非硫代磷酸酯键处的其他核酸内切酶抗性修饰。编辑寡核苷酸可以具有:40%或更多的非硫代磷酸酯键处的2'糖修饰的核酸内切酶抗性修饰;在40%或更多的非硫代磷酸酯键处的2'-O-甲基修饰的核酸内切酶抗性修饰;或20%或更多的非硫代磷酸酯键处的BNA修饰的核酸内切酶抗性修饰。在一种实施方式中,BNA修饰是LNA或cET。

[0278] 在其他实施方式中,编辑寡核苷酸可以与以下缀合:促进递送至靶细胞和/或靶组织的配体;促进递送至靶细胞和/或靶组织的配体,并且所述配体包括一个或多个N-乙酰-D-半乳糖胺残基;促进递送至靶细胞和/或靶组织的配体,并且所述配体包括亲脂基团;或者促进递送至靶细胞和/或靶组织的配体,并且所述配体包括胆固醇或胆固醇类似物。另外,编辑寡核苷酸可以与另外的寡核苷酸组合,其在编辑位点的200个核苷酸内结合基因组DNA,并提高编辑寡核苷酸的编辑效率;或者与PNA寡核苷酸组合,其结合编辑位点的200个核苷酸内的基因组DNA,并提高编辑寡核苷酸的编辑效率。

[0279] 编辑寡核苷酸编辑效率可以通过用可设计核酸酶在靶位点的200个核苷酸内切割来增强。可以用本发明的编辑寡核苷酸和方法治疗的疾病包括β地中海贫血、囊性纤维化或杜氏肌营养不良、阿尔兹海默氏病、2型糖尿病、镰状细胞病和β地中海贫血。

[0280] 编辑寡核苷酸可以靶向基因组DNA的正义链或基因组DNA的反义链。

[0281] V. 结果

[0282] 图2中显示的寡核苷酸构建物和修饰模式用于研究、治疗和本文所述的其他应用(尽管它们在细胞培养物中的活性可能低于母体化合物),因为这些寡核苷酸中的每一种都有助于预期的治疗益处,与未修饰的DNA或在每个末端上具有三个硫代磷酸酯的DNA相比诸如减少的免疫刺激、更高的核酸酶稳定性、更高的靶特异性、降低的化学毒性和/或更高的亲和力。

[0283] 图2中列出的编辑寡核苷酸的实例具有改良在基因组编辑中的用处的各种特征。硫代磷酸酯键允许血清蛋白结合以增强血清半衰期和组织分布,与仅端基封闭单独相比增加核酸酶稳定性并且在没有递送媒介物的情况下细胞摄取到细胞质。更多的硫代磷酸酯导致增加的核酸酶稳定性。均一(全部)硫代磷酸酯取代的寡核苷酸足够稳定以在没有递送媒介物的情况下有效地摄取并且在经过高核酸酶内溶酶体区室的运送中有效地存活下来。然而,均一的硫代磷酸酯取代也降低了递送到细胞内部的编辑效率,因此在硫代磷酸酯碱基和磷酸二酯的数量之间存在折衷。广泛的硫代磷酸酯取代更容许在编辑寡核苷酸的3'一半编辑直到编辑位点,这是在编辑寡核苷酸的3'大约一半上具有硫代磷酸酯键的示例性寡核苷酸的基本原理。减少硫代磷酸酯键的另一种设计放置了允许在磷酸二酯键处编辑的其他修饰,如在具有朝向编辑寡核苷酸的3部分的2'F磷酸二酯片段的设计中所例示的。编辑位点处或附近的硫代磷酸酯取代也将抑制非生产性错配修复。

[0284] 设计五撇(five prime) (5') 磷酸酯以提高编辑效率,特别是具有短序列(<30mer)和稳定序列,如所有硫代磷酸酯(Radecke等人,2006)。5'硫代磷酸酯设计成进一步稳定以对抗细胞磷酸酶的去。较短的寡核苷酸增强了细胞的自由摄取,并且它们简化并降低了合成的成本,这与一些较长寡核苷酸的增强的编辑效率相平衡。5甲基C修饰增强对靶标的亲和力,减少免疫刺激并将编辑导向靶链。5'非硫代磷酸酯端基封闭,诸如接头或具有荧光缀合物的接头(例如6FAM)比硫代磷酸酯端基封闭具有更低的毒性,并且允许编辑。对于与靶DNA不互补的四个3'硫代磷酸酯末端被细胞机修剪,允许天然的3'OH末端。两个到五个非互补3'端基封闭是特别有用的。

[0285] 胆固醇缀合物增强细胞摄取,特别是当用于可以在内溶酶体核酸酶下存活的高度核酸酶稳定的寡核苷酸上时。对于肝脏摄取,本领域已知的与siRNA和反义链体内起作用的N-乙酰-D-半乳糖胺缀合物可以代替胆固醇作为递送缀合物。可以在缀合物旁边的末端插入一段3'未修饰的核碱基,以允许细胞核酸酶切割释放游离3'OH的缀合物,这是最有效编辑所需的。

[0286] 在“编辑位点”处或附近的二撇(2')修饰(即2'F、LNA、2'-O-甲基)抑制编辑寡核苷酸的非生产性错配修复以提高编辑效率,并且还增加杂交亲和力(增强功效),增加核酸酶稳定性并减少免疫刺激。

[0287] 三撇(3')F片段增强编辑效率(增加亲和力)并减少免疫刺激。LNA末端修饰增强核酸酶稳定性并且增加了杂交亲和力,导致了更高的编辑效率和降低的免疫刺激、降低了毒性。然而,在末端处多于一个LNA键可以降低编辑效率。

[0288] 本文图2中列出的辅助PNA编辑寡核苷酸的实例具有增加在基因组编辑中的用处的各种特征。PNA键赋予核酸酶稳定性和靶标高亲和力。高靶标亲和力促进链侵入。末端的赖氨酸增强溶解性并增强链侵入,并允许在没有递送媒介物的情况下向培养中细胞和体内的细胞“自递送”。 $\gamma$  miniPEG或 $\gamma$  谷氨酸PNA取代增强溶解度和靶亲和力。谷氨酸赋予负电荷,当与带正电荷的递送媒介物一起使用时,其允许有效的包封(实施例参见图2)。

[0289] 编辑寡核苷酸100034具有5'和3'的2'F臂(5'和3'近端片段),并且显示低但显著的编辑。这是意想不到的,因为2'F在空间上比2'-O-甲基更类似于DNA,并且2'F在掺入3'臂中时在编辑方面高度活跃。在5'臂中,2'-O-甲基修饰比2'F修饰更好地耐受,这又是意想不到的。这意味着,与在每个臂中具有相同修饰的构建体相比,像编辑寡核苷酸100058的构建物特别有用。

[0290] 编辑寡核苷酸100047所见的广泛修饰与编辑相容,这是有用的,因为每种修饰相对于本领域常用的母体寡核苷酸(5'和3'硫代磷酸酯DNA核酸外切酶封闭末端片段是本领域中通常使用的)降低了预期毒性。据信这种降低毒性的部分是由于与DNA中的2'H或RNA中的2'OH相比,2'修饰键减少了Toll样受体的活化。实现更高的靶特异性是因为臂不能作为有效的编辑位点,因此存在较少潜在的脱靶编辑。

[0291] 尽管5'甲基磷酸酯核酸外切酶封闭末端片段相当活跃,但使用5'和3'甲基磷酸酯末端片段是有用的,但较不活跃。这种结构在许多体外测定中除去了与阻断细胞增殖相关的所有硫代磷酸酯。

[0292] 编辑位点附近的单个5甲基C修饰与相对高的编辑效率一致,多个5甲基C修饰也是。

[0293] 由于干扰编辑反应,将一段3'近端片段修饰向3'编辑片段延伸可能不太优选,但这些另外的修饰被预计进一步增加核酸酶稳定性并降低免疫刺激(例如编辑寡核苷酸100062)。5'修饰也是如此情况(例如编辑寡核苷酸100066)。

[0294] 更长的编辑寡核苷酸具有可以在远离5'或3'编辑片段或编辑位点(例如编辑寡核苷酸100072)的位置被修饰的更多键。

[0295] 而甲基磷酸酯成为优异的5'端基封闭。编辑寡核苷酸100074具有CY35'端基封闭和在3'端上3个互补的硫代磷酸酯DNA,并提供另一种有用的修饰组合。

[0296] 锁核酸(LNA)也可以用作端基封闭基团,但它们可以增加体内毒性。因此,采用解锁核酸(UNA)(例如编辑寡核苷酸100078)或在一个或两个末端上的简单接头为核酸酶端基封闭的实施方式是特别有用的(参见表V)。虽然核酸外切酶可以跳过DNA的单个修饰,但是与2'-修饰的末端残基组合(例如编辑寡核苷酸100080)可能不是问题。端基封闭接头具有额外的优点,它们也可以用于将缀合物连接到编辑寡核苷酸。这些缀合物(例如,与胆固醇(美国专利申请号20130131142A1)和N-乙酰-D-半乳糖胺(美国专利号8,106,022)的缀合已显示增加了在培养物中和动物体内的细胞中寡核苷酸的摄取。可以使用本领域已知的方法制备这些部分与编辑寡核苷酸的缀合物,并且这些缀合物将消除对添加费用和/或毒性的递送媒介物(例如脂质体)的需要。

[0297] 编辑寡核苷酸100082包含与编辑寡核苷酸100005、100031和该序列的其他寡核苷酸互补的端基封闭。编辑寡核苷酸可以与互补寡核苷酸分开加入细胞中,或者可以与本文所述的任何修饰的化学物质的互补编辑寡核苷酸预杂交以形成双链体。预形成双链体的优点是双链DNA对单链核酸酶具有抗性。然而,双链体的感知缺点可能是碱基无法自由地与靶DNA杂交,除非一些细胞修复/重组机构促进靶结合。根据靶基因、细胞类型和给药途径,单链或双链编辑寡核苷酸可能更适合于编辑。

[0298] 编辑寡核苷酸100083是具有端基封闭的RNA保护性寡核苷酸,所述端基封闭与编辑寡核苷酸100005、100031以及本文公开的一系列化学修饰的编辑寡核苷酸靶向GFP中的其他编辑寡核苷酸互补。该寡核苷酸保护互补的编辑引导寡核苷酸免受血清、内溶酶体途径和细胞质中的核酸酶的影响。当在细胞质或核质中时,RNA链最终将被内源性RNA酶H降解,释放单链编辑寡核苷酸以与靶DNA杂交。这是对2'-O-甲基保护寡核苷酸的改进,其降低了编辑寡核苷酸的活性,这可能是由于干扰了与靶DNA的杂交。

[0299] 已经设计了编辑寡核苷酸100085,使得5'近端区在与保护性寡核苷酸10086杂交时形成能够载入RNA诱导沉默复合物(RISC)中的双链体。由于被载入Argonaut中,引导链对互补靶核酸(RNA和DNA靶;Saloman,等人Cell 162:84-96,2015)的杂交率显著增加。通过RISC的杂交速率的这种增强使得siRNA是相应的反义(例如,用反义观察到的通过RISC没有增强)效力的约10-100倍。因此,被载入Argonaut中的编辑寡核苷酸的5'端将更快地与靶染色体DNA杂交,增加基因组编辑的效力和/或效率。该机制使用内源性细胞机构来增强靶结合,并因此不需要添加外源蛋白如Cas9或格氏嗜盐碱杆菌(*Natronobacterium gregoryi*) Argonaute以加速增强靶结合。本发明的此实施方式的优点在于它避免了将外源蛋白递送到细胞的挑战。一旦与靶DNA的结合被与Argonaut复合的编辑寡核苷酸的5'近端区开始(引发,seed),则剩余的双链体将快速形成。

[0300] 基于本文关于编辑寡核苷酸100037的数据,编辑寡核苷酸的5'端区可以用2'-O-

甲基RNA进行修饰,同时保持编辑效率,而用2'-O-甲基修饰的寡核苷酸的部分修饰与RISC载入的要求是相容的(美国专利申请号20130317080、20150267200、20150105545、20110039914和美国专利申请系列号12/824,011)。保护性寡核苷酸(过客链(随从链, passenger strand))优选为10-50个核苷酸、更优选为12-30个核苷酸以及最优选为19-27个核苷酸,并且完全或基本上与靶互补。在这种构建物中,编辑寡核苷酸是按照一般公认的制备RNAi或微小RNA(miRNA)的设计规则设计的。例如,过客链的两个碱基对3'悬突(overhang)是特别有用的,但与RNAi相容的平端结构和其他端结构也是有用的。还提供了引导(编辑链)上的游离的5'羟基或磷酸化的5'羟基。在该编辑策略中可以采用与RNAi相容的一系列化学修饰和结构。特别有用的是与过客RNA成双链体的编辑寡核苷酸的5'端不具有与过客链中RNA结合的多于约4个DNA键,这可以激活过客链的RNA酶H切割,降低RISC载入。在特别有用的实施方式中,当采用长度足以用作dicer底物(dicer substrate)的编辑寡核苷酸内的RISC载入双链区时,可以以本领域中已知的方式插入化学修饰或错配以减少或消除dicer切割,诸如在一个或多个dicer切割位点上掺入一个或多个2'-O-甲基修饰(Salomon等人Nucleic Acids Research,38(11):3771-9Feb.2010)。减少dicer切割是有益的,因为编辑寡核苷酸在双链体最接近编辑位点的侧上被dicer切割将使RISC载入的区从编辑寡核苷酸的其余部分分离,如果这发生在链侵入被靶向的DNA双链体之前则这将消除RISC载入的优势。

[0301] 能够载入到RISC中的双链结构是本领域中已知的,并且包括STEALTH RNAi化合物(Life Technologies,San Diego CA和美国专利号8,815,821)、Dicer底物(美国专利号8,349,809、8,513,207和8,927,705)、rxRNA ori(RXi Pharmaceuticals,Marlborough, Massachusetts)、具有缩短双链体的RNAi触发(2009年提交的美国专利申请号20120065243)和siRNA(美国专利号7,923,547;7,956,176;7,989,612;8,202,979;8,232,383;8,236,944;8,242,257;8,268,986;8,273,866和美国专利申请系列号13/693,478)。只要在细胞内保持或释放编辑链上自由的5'羟基或磷酸化的5'羟基,可将具有已知支持RISC载入并在一些情况下增强组织和细胞摄取的各种化学修饰模式的这些RNAi触发配置掺入编辑寡核苷酸中,正如在本文所述的RISC载入编辑寡核苷酸(与100086杂交的ETAGEN系列号100085)中的siRNA已经完成的。编辑寡核苷酸寡核苷酸的另外实例列于图2中,且辅助寡核苷酸列于表XIV中,其包括上文所述的各种特征。图2中描述的编辑寡核苷酸和可选的辅助寡核苷酸的化学修饰模式、长度和构型可以使用本文所述的方法,应用于各种编辑靶标,包括本文列出的那些。每种化学修饰的数目和位置可以与本文所述的不同。

[0302] VI. 优点

[0303] 采用Kmiec方法的本发明的实施方式比化学修饰方法具有一些优点,因为Kmiec方法不需要将化学反应性基团附接至编辑寡核苷酸,实现碱基至任何其他天然碱基的编辑,并且允许创建插入或缺失。如果需要,这些“无足迹”编辑可以更容易逆转,通过进行额外的“无足迹”编辑返回原始序列。这是基因组编辑疗法的重要安全特征。

[0304] 采用化学修饰方法的本发明的实施方式比Kmiec方法具有一些优点,因为化学修饰方法涉及具体基团的添加或去除(即,甲基化、乙基化或脱氨基)以改变靶向核碱基碱基配对特异性,并且因此不需要活性细胞重组机构。

[0305] 可以使用本发明的编辑寡核苷酸而不需CRISPR或蛋白质,诸如锌指或工程可设计

核酸酶。使用CRISPR和/或锌指的方法是使用单链寡核苷酸,该单链寡核苷酸不是CRISPR中的引导RNA、而是作为修复该位点的供体的单独的单链寡核苷酸。然而,本发明的方法和组合物不严格需要这些其他外源蛋白质组分,并且导致与当前方法的精确编辑相似或基本相似的效率。

[0306] 本发明是与严格需要CRISPR/Cas9、锌指和Talen DNA核酸酶的方法不同的核酸修复方法,因为它直接且准确地修复突变序列而不会要求在DNA中产生潜在的危险破坏。此外,本发明的一些实施方式可以在没有递送颗粒或免疫原性蛋白质的情况下可选地施用。

[0307] 本发明可以用于通过产生位点特异性突变来永久性失活任何基因,例如在期望位置处防止翻译的终止密码子。本发明的独特应用之一是对调节或校正不能通过其他已知沉默方法处理的基因功能的点突变(例如,由显性突变引起的功能获得性突变)进行靶向。

[0308] 诸如竞争基因治疗和mRNA替代策略的其他方法可以替代突变的基因产物。然而,本发明的某些实施方式具有的优点是在不掺入载体序列或不在载体插入位点引起染色体损伤的情况下实现完全正常的基因调节和表达水平。

[0309] 应当理解的是,任何上述方法可以与本文中的某些其他方法组合使用,或不以这样的组合使用。此外,任何上述组合物可以可选地用本文所述的某些方法使用和/或与本文的其他组合物组合使用。另外,本文所述的编辑寡核苷酸和可选的辅助寡核苷酸组合物的改进的特征(即化学修饰、诸如发夹的结构以及递送媒介物)可以与本文所述的编辑寡核苷酸和可选的辅助寡核苷酸组合物的其他的改进的特征组合使用。

[0310] VII. 实施例

[0311] 图2描述了本发明编辑寡核苷酸的实施例。图2中的编辑寡核苷酸序列中的一些靶向绿色荧光蛋白中的无效突变(null mutation),并将该突变校正为可以通过测定荧光来容易地监测的功能序列(Erin E. Braachman和Eric B. Kmiec,同上)。图2中的其他寡核苷酸靶向其他基因。然而,图2中的化学修饰模式可用于编辑靶向突变的寡核苷酸、用于产生保护性等位基因的编辑寡核苷酸或用于在其他靶基因的基因组中产生其他所期望的变化的编辑寡核苷酸。在这些实施例的每种情况下,当尚未由所公开的序列确定时,并且在本发明的其他实施方式中,编辑位点可以在编辑寡核苷酸的中心区中,或者可以朝向5'-末端或3'-末端偏移(offset)。在特别有用的实施方式中,编辑位点是来自任一末端多于五个的核苷酸。也可以优选在未修饰的或如果修饰具有仍被修复靶DNA链的细胞机制和/或复制机制认定为模板DNA的修饰(即硫代磷酸酯、2'-F、LNA、2'-O-甲基或5甲基C)的DNA区中具有编辑位点。

[0312] 编辑寡核苷酸可以被设计为与基因组DNA的任一链互补。特别有用的是它们将被设计成结合用于滞后链合成的模板链,因为这往往导致更有效的编辑。然而,可以靶向每个链,并且可以容易地确定哪条链导致更有效的编辑。本发明的编辑寡核苷酸的有用的硫代磷酸酯骨架修饰模式和长度可以在PCT/US2015/65348中找到。

[0313] 表XIV本发明的示例性辅助寡核苷酸序列

[0314]

主要的 一个或多个指标	靶标	可选的辅助寡核苷酸:
AIDS	CCR5 (McNeer 等人 2013)	N-末端 KKKJTTJTTJTTJ000TCTTCTTCATTTCKKK
AIDS	CCR5 (McNeer 等人 2013)	N-末端 KKKJTTJTTJTTJ000TCTTCTTCATTTCKKK
$\beta$ - 地中海贫血	HBB (McNeer 等人 2013)	N-末端 KKKKKKJTTJTTJTT000TTCTTCTCC N 末端 KKKJTTTJTTTJTTJTOOOTCTCTTTCTTTTCAGGGCAK KK 或者
$\beta$ - 地中海贫血	HBB (McNeer 等人 21013)	N 末端 KKK- JJTJJTTJTOOOTCTTCTCCACAGCTCC-KKK
囊性 纤维化	CFTR (McNeer 等人 2015)	N-末端 KKKTJTTJTTTTOOOTTTCTCTATGGGTAAGKKK

[0315] 钳 (bis-PNA (双体肽核酸) 或 PNA 尾钳: k 是赖氨酸, 0 是 8-氨基-2,6-二氧杂辛酸接头并且 J 是假异胞嘧啶)

[0316] 用于生成图 2 中编辑效率数据的实验所采用的一般方法。

[0317] A. 细胞系和培养条件

[0318] 对于 GFP 靶标, 通常采用修饰的 HCT116 细胞。HCT116 细胞从 ATCC (American Type Cell Culture, Manassas, VA) 获得。通过整合含有突变的 eGFP 基因的 pEGFP-N3 载体 (Clontech, Palo Alto, CA) 来产生 HCT116-19。突变的 eGFP 基因在 167 位具有无义突变, 导致非功能性 eGFP 蛋白。对于这些实验, 将 HCT116-19 细胞在补充有 10% 的胎牛血清、2mM 的 L-谷氨酰胺和 1% 的青霉素/链霉素的 McCoy's 5A Modified Medium (改良培养基) (Thermo Scientific, Pittsburgh, PA) 中培养。将细胞保持在 37°C 和 5% 的二氧化碳之下。

[0319] B. HCT116-19 细胞的转染

[0320] 对于利用同步细胞的实验, 将 HCT116-19 细胞在 100mm 培养皿中以  $2.5 \times 10^6$  个细胞接种, 并在靶向前与 6mM 的阿非迪霉素 (aphidicolin) 同步 24 小时。在胰蛋白酶消化和转染前通过用 PBS (2/2) 洗涤和加入完全生长培养基将细胞释放 4 小时 (或指示时间)。在 4mm 间隙比色皿 (BioExpress, Kaysville, UT) 中使用  $\sim 1\mu\text{g}$  的编辑寡核苷酸以  $5 \times 10^5$  个细胞/100 $\mu\text{l}$  的浓度转染同步和不同步的 HCT116-19 细胞。使用 Bio-Rad Gene Pulser XCell™ 电穿孔系统 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 对单链寡核苷酸进行电穿孔 (250V, LV, 13ms 脉冲长度, 2 个脉冲, 1 秒间隔)。然后在分析前将细胞在 6 孔板中用完全生长培养基于 37°C 持续指定时间回收 (复苏, recover)。基因编辑的细胞的分析。用 Guava EasyCyte 5HT™ 流式细胞仪 (Millipore, Temecula, CA) 测量荧光 (eGFP)。通过胰蛋白酶消化收获细胞, 用 PBS 洗涤一次, 并重悬于缓冲液 (具有 0.5% 的 BSA、2mM 的 EDTA、2mg/mL 碘化丙啶 (PI) 的 PBS) 中。碘化丙啶用于测量细胞活力本身, 活细胞对 PI (摄取) 的染色阴性。将校正效率作为在各样品中总的活 eGFP 阳性细胞对总的活细胞的百分比来计算。误差条是使用标准误差的计算从三组数据点而产生的 (参见以下方法: Bialk P, Rivera-Torres N, Strouse B, Kmiec EB. PLoS One. 2015; 10 (6) : e0129308)。

[0321] 用于优化编辑寡核苷酸的长度和定位的过程的实例可以在 PCT/US2015/65348 中

找到。

[0322] 实施例1

[0323] 用于制备在细胞中具有最优编辑活性的编辑寡核苷酸的方法

[0324] 编辑寡核苷酸易于使用以下步骤检测在细胞中的编辑以获得最优的编辑寡核苷酸序列：

[0325] A. 将靶向编辑的核碱基5'的编辑寡核苷酸3(或者,如果该区域中存在多于一个靶标,则3'最多靶向的核苷酸)定义为编辑寡核苷酸序列的5'末端互补核苷酸;以一个核苷酸增量移动,添加编辑寡核苷酸的单个5'核苷酸延伸;并重复上述过程30次,或最多达50次或最多达200次;

[0326] B. 定义编辑寡核苷酸的3'末端,进行与上述相同的过程,除了靶向编辑的核碱基的3'(或者如果该区域中存在多个靶标,则为5'最多靶向的核苷酸);以一个、二个、5个或10个核苷酸的增量移动,加入编辑寡核苷酸的一个、二个、5个或10个3'核苷酸延伸;并重复上述过程30次,或最多达50次或最多达200次。

[0327] C. 制备编辑寡核苷酸的所有所得5'和3'末端核苷酸的矩阵,消除小于12个核苷酸的编辑寡核苷酸序列,因为这些序列在基因组中不太可能是独特的,然后选择等于或小于30个、50个或200个核苷酸的所有其余序列,并测试它们在细胞中的编辑活性以确定最有效的编辑寡核苷酸序列。

[0328] 实施例3

[0329] 辅助寡核苷酸序列的设计

[0330] 从至少8个碱基长的辅助寡核苷酸序列开始进行设计辅助寡核苷酸序列。对于辅助寡核苷酸,W/C结合区的特别有用长度为小于25个核苷酸或小于50个核苷酸。对于辅助寡核苷酸,序列可以以一个核苷酸增量移位5'或3'(在PNA的情况下为N末端或C末端),直至结合位点距编辑位点超过100个核苷酸,或超过200个核苷酸,或超过400个核苷酸。对于辅助寡核苷酸上的三联体形成区域,它们通常靶向所有嘌呤位点,或75%或更多嘌呤的位点,或所有嘧啶位点或75%或更多嘧啶的位点。对于辅助寡核苷酸上三链体形成区域,位点可以移位或延长仅为了达到维持所需碱基组成的程度。三链体区域可以匹配钳的反义区域(在PNA的情况下有时称为bis-PNA(双体肽核酸)),或者反义序列可以比三链体区域更长,通过在5'或3'方向中延伸与靶标的互补链(参见McNeer,2013同上,McNeer 2015同上,Bahal等人Current Gene Therapy 14(5):331-42,2014,Nielsen等人Current Issues in Molecular Biology 1(1-2):89-104,1999和Gaddis等人Oligonucleotides,2006Summer; 16(2):196-201.[Http://spi.mdanderson.org/tfo/](http://spi.mdanderson.org/tfo/)其提供确定三链体结合位点的搜索引擎和表XIV,钳的实例)

[0331] 实施例4

[0332] 选择最优CFTR靶向编辑寡核苷酸

[0333] A. 在细胞培养中优化编辑寡核苷酸

[0334] 1. 用于优化编辑寡核苷酸序列的起始细胞培养筛选

[0335] 选择20个编辑寡核苷酸序列用于起始细胞培养功效筛选,以及突变体序列的对照编辑寡核苷酸。编辑寡核苷酸将被设计为校正导致囊性纤维化的 $\delta F508$ 突变。靶向CFTR的现有活性编辑寡核苷酸用作阳性对照和参考序列(参见McNeer等人,2015,同上)。这些筛选在

人类细胞系中进行。筛选开始于具有以 $\delta F508$ 突变位点为中心的 $\sim 40$ 个核苷酸的长度的编辑寡核苷酸,其通常在功效和易于制造之间提供良好的平衡。在文献中的大多数实例中,编辑位点大致位于编辑寡核苷酸的中心。这导致一定水平的编辑效率,但不一定是最优的。因此,编辑核苷酸的长度、靶链(反义或正义)和5'-3'定位将是变化的。通过脂质转染或电穿孔测试编辑寡核苷酸在细胞中的编辑活性,以确定优化编辑寡核苷酸序列,如通过PCR/Next Gen测序(参见下面的方法)所测定的。从第一轮优化具有所期望的编辑效率范围的编辑寡核苷酸序列开始,可以通过在5'末端、3'末端或二者末端上添加或去除与靶标互补的碱基来进一步修饰编辑寡核苷酸序列的长度。细胞中的额外编辑功效测试将产生前导和备用前导编辑寡核苷酸序列。类似地,辅助寡核苷酸PNA钳如本文所述的改变,并用最佳编辑寡核苷酸测试,以鉴定最活跃的辅助寡核苷酸。然后可以实现通过测序测定的每次体外处理的DNA水平的基线编辑效率为2%或更高。

#### [0336] 2. 化学和构型优化以及序列微调

[0337] 尽管化学修饰的端基封闭的供体成功应用于细胞和动物的编辑,但端基封闭的编辑寡核苷酸的预计半衰期在细胞中仅为10-30分钟。因此,它们需要高剂量并且导致适度的编辑效率。已经用反义间隔体证实了哺乳动物细胞中的高DNA核酸内切酶活性,其中甚至一个或几个未修饰的DNA键导致较低的细胞内半衰期和降低的功效(Monia等人,1995,同上)。在反义的情况下,除了任选的端基封闭之外,通过在整个寡核苷酸中使用内部修饰已经解决了核酸内切酶稳定性。存在一系列核酸内切酶抗性修饰的核酸化学,但大多数不被细胞重组/修复机制识别,因此当在内部放置在编辑位点附近时不支持编辑。本发明在沿其长度的多个位置修饰编辑寡核苷酸以改善核酸的治疗性质,其包括:减少炎症;增加核酸酶稳定性;增加靶标结合增强功效;通过缀合递送配体增加自由摄取(无包封的自递送);以及在通过内溶酶体途径转运过程中稳定抗核酸酶。

[0338] 已经发现某些核酸外切酶稳定的修饰可以在编辑寡核苷酸(这里称为第三代编辑寡核苷酸)内部使用。利用第三代化学修饰的工具箱来优化用于细胞和体内的编辑寡核苷酸。采用的高级化学修改模式和构型的实例如下:

[0339] 1. 来自PCT/US2015/65348中图2的代(Gen) 3A、3B和3C。

[0340] 2. 已经发现,组合各种构型和化学物质的辅助寡核苷酸PNA通过编辑寡核苷酸来提高编辑效率(器始测试使用已经显示具有基线活性的PNA-Clamp(钳),特别是McNeer等人2015同上的hCFPNA-2)。

[0341] 3. 实施编辑寡核苷酸结构化学物质,使其与内源RNAi细胞机制相互作用,显示增强的与DNA杂交率;以及

[0342] 4. 利用编辑寡核苷酸的自递送缀合物与更严重修饰的编辑寡核苷酸的组合,所述更严重修饰的编辑寡核苷酸将在通过内溶酶体途径的转运中存活并且允许在没有包封的情况下递送。

[0343] 5. 在编辑位点或附近采用化学修饰,诸如2'F、LNA或2'-O-甲基以抑制编辑寡核苷酸的错配修复(参见图2中靶向编辑寡核苷酸的CFTR $\delta 508$ )。

[0344] 6. 包括如本文所述并在图2中例示说明的5'磷酸或5'磷酸类似物。

[0345] 通过PCR测定,这将在每次处理实现2-8%的编辑或更好的基因组DNA水平,并通过靶蛋白测定确认。编辑寡核苷酸在动物和最终临床试验中采用多次给药以获得所需的累积

编辑水平(参见McNeer,2015,同上,用于制剂、转染以及DNA和功能测定)。编辑和辅助寡核苷酸配制用于雾化,并且患者通过吸入治疗。全身制剂用于靶向受CF影响的继发组织。

### [0346] 3. 编辑寡核苷酸合成

[0347] 现已发现,更高质量的化合物具有更好的编辑效率。因此,高质量控制的凝胶分离的编辑寡核苷酸将以1微摩尔规模合成,并使用质谱来确认同一性和分析型HPLC以确认纯度。高质量编辑寡核苷酸以可扩展和可再现的方式纯度>80% (>1mg量),以便可以制备具有类似活性和更大规模的未来批次的先导编辑寡核苷酸用于动物研究和最终的人体试验。

### [0348] 4. 编辑效率的测定

#### [0349] i. 靶核酸

[0350] 核酸靶序列的测定使用基因组PCR和RT-PCR凝胶进行以测定拼接跳跃。为了测序,将设计和合成用于基因组DNA PCR的引物以测定编辑效率。将采用已建立的方案来控制潜在的PCR伪影,包括时间零重建控制,以及除了期望的校正之外的沉默突变编辑,以区分真正的编辑和潜在的环境人类DNA污染。如先前已建立的那样进行下一代测序以测定基因组编辑。

#### [0351] ii. 靶蛋白的测定

[0352] 利用蛋白质印迹(Western blot)分析、免疫组织化学和功能性NPD进行蛋白靶标的测定(参见McNeer,2015,见上)。

### [0353] 5. 在培养的细胞中对于脱靶编辑的测定

[0354] 测量特异性是治疗性基因组编辑的重要步骤。当使用供体DNA时,脱靶编辑的最显著结果是供体DNA可能插入非靶向位点。通过FISH、PCR或全基因组测序可以容易地测定供体DNA的完全或部分插入。测试用于脱靶编辑的10个最同源的基因组位点,以获得每次处理的每个位点处小于0.1%的脱靶编辑。探测基因组DNA的编辑寡核苷酸序列的脱靶整合,以实现每1000个细胞少于一个脱靶整合事件。然后在原代靶细胞中进行验证测试。这些研究为动物研究奠定了基础。

### [0355] 6. 优化体内编辑

[0356] 用细胞培养筛选中开发的引导编辑寡核苷酸进行小鼠的动物功效和制剂研究。然后进行初步的PK ADME和毒性研究。

[0357] 这些研究:优化制剂或自传递化学物质,以最大化体内编辑效率;鉴定引导编辑寡核苷酸,其在体内每次处理编辑2-5%的靶DNA;通过靶向基因组测序评估脱靶效应;以及进行初步毒性评估。一个考虑因素是编辑寡核苷酸序列通常是物种特异性的,因此如果一个编辑寡核苷酸序列用于人细胞培养和小鼠动物测试,则使用工程化的敲入转基因动物。

[0358] 测试了两种递送模式。自递送(也称为游离或裸寡聚体)将使用递送缀合物与核酸酶稳定内部化学修饰组合以获得自由摄取(自递送而无需包封)。通过内溶酶体途径的摄取使编辑寡核苷酸暴露于有效的核酸酶,因此与编辑寡核苷酸一起采用核酸酶抗性修饰,达到修饰模式与保持与内源修复系统的相互作用一致的程度。将采用已经显示与编辑寡核苷酸具有相似大小和电荷的寡聚体实现自递送的化学物质(即Byrne等人,2013同上和Alterman等人,2016,同上)。用于纳米颗粒或直接编辑寡核苷酸缀合的潜在肺特异性缀合物包括受体配体、增加保留时间的附着靶标和/或扩散增强物以更好地穿透糖酵解。

[0359] 纳米颗粒的体内递送是具有挑战性的,因为纳米颗粒不能被血清去稳定,并且它

们必须扩散到靶组织中。幸运的是,包封的核酸在去往靶细胞的途中被完全保护免受核酸酶的影响。来自耶鲁大学的Saltzman、Glazer和Egan小组的初步结果已经确定了纳米颗粒制剂,其适合于通过鼻内滴注小鼠以适度的编辑效率向鼻和肺纤毛上皮细胞递送编辑寡核苷酸(McNeer等人,2015,同上)。用于体外和体内递送基因组编辑寡核苷酸的特定递送载体包括:PLGA和15%(按重量计)的聚( $\beta$ 氨基酯)(PBAE)。当使用中性辅助寡核苷酸(诸如PNA钳)时,这些聚合物特别有用,因为中性或带正电荷的辅助寡核苷酸可以与带负电的编辑寡核苷酸一起容易且有效地加载到这些颗粒中。通过PEG化的磷脂接头(DSPE-PEG2000)与MPG衍生的PLGA/PBAE纳米颗粒也已显示出增强体内摄取,特别是在肺中。(McNeer等人, *Gene Ther.* 20 (6) :658–669, 2013. doi:10.1038/gt.2012.82, McNeer, 等人, *Nature Comm.* DOI: 10.1038/ncomms 7952:1–11, 2015)

[0360] 最初可以使用McNeer等人,2015年同上,以前使用的动物模型和给药方案,其中编辑寡核苷酸和递送聚合物作为阳性对照。评估递送颗粒组合和替代递送颗粒(包括上文在自递送部分中列出的可替代配体缀合物)的变化,目的是增加编辑寡核苷酸向靶上皮细胞和上皮细胞祖细胞的递送,从而提高编辑效率。也参见Bahal, R. 等人 *Nat. Commun.* 7, 13304 (2016) 作为体内递送编辑寡核苷酸并成功体内编辑的实例。

[0361] 实施例5

[0362] 通过用工程化转录因子,不用寡核苷酸靶向核碱基化学修饰的编辑

[0363] 通过核碱基修饰我们的基因组编辑方法的另一个具体例证是Yang等人2016 (Yang, L. 等人 *bioRxiv*, doi:10.1101/066597, 2016, 还发表了Yang, L. 等人 *Nat. Commun.* 7, 13330 (2016) doi:10.1038/ncomms13330), 其中脱氨酶核碱基修饰活性剂(也称为序列修饰或编辑部分)与工程化转录因子(例如,锌指或TALEN)融合,并用于在培养的哺乳动物细胞中获得高度精确的点编辑。该方法可用于各类编辑、核碱基化学修饰,其导致本文所述的那些基因内的序列改变、靶标指示和相应的靶基因以及靶编辑。在酶促变化的情况下,相关的核碱基修饰酶可以与工程化的转录因子连接或融合。在反应性化学物质的情况下,反应性化学物质可以与工程化转录因子缀合。除脱氨基之外,可以使用本文所述的其他化学修饰(参见表VII)。

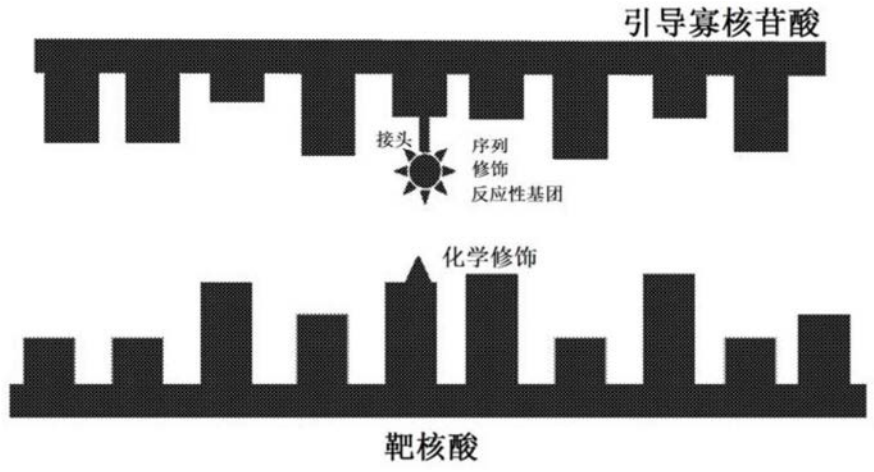


图1



ETAGEN 序号100005	专利 SEQ ID No. 005								
碱基									
SEQ 5'	CGGCTGAAGCACTGCACGCCCTAGGTCAGGGTGGTCACGA								
糖	DD								
BB	SS								
注释	每个末端上3个硫代磷酸酯端基封闭 (母体)								
野生型或突变体	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的								
疾病迹象 -									
靶位点	密码子 67								
									长度 ~ 40
									<input type="radio"/> 其他...
									靶基因 GFP
									% 编辑
									1.69 +/-0.63
ETAGEN 序号100006	专利 SEQ ID No. 006								
碱基									
SEQ 5'	CGGCTGAAGCACTGCACGCCCTAGGTCAGGGTGGTCACGA								
糖	DD								
BB	SS								
注释	阴性对照 每个末端上3个硫代磷酸酯端基封闭								
野生型或突变体	<input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的								
疾病迹象 -									
靶位点	密码子 67								
									长度 ~ 40
									<input type="radio"/> 其他...
									靶基因 GFP
									% 编辑
									0.00 +/-0.00
ETAGEN 序号100007	专利 SEQ ID No. 007								
碱基									
SEQ 5'	CGGCTGAAGCACTGCACGCCCTAGGTCAGGGTGGTCACGA								
糖	DD								
BB	SS								
注释	具有未修饰编辑区的约一半硫代磷酸酯阳性40 mer (9s-20s-10s)								
野生型或突变体	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的								
疾病迹象 -									
靶位点	密码子 67								
									长度 ~ 40
									<input type="radio"/> 其他...
									靶基因 GFP
									% 编辑
									0.01 +/-0.01
ETAGEN 序号100008	专利 SEQ ID No. 008								
碱基									
SEQ 5'	CGGCTGAAGCACTGCACGCCCTAGGTCAGGGTGGTCACGA								
糖	DD								
BB	SS								
注释	阴性对照 具有未修饰编辑区的约一半硫代磷酸酯阳性40 mer (9s-20s-10s)								
野生型或突变体	<input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的								
疾病迹象 -									
靶位点	密码子 67								
									长度 ~ 40
									<input type="radio"/> 其他...
									靶基因 GFP
									% 编辑
									0.11 +/-0.01

图2续

ETAGEN 序号100009		专利 SEQ ID No. 009	
碱基	CTGGGAGATCGCGGGCAGCGCCATGCTGAGGCTCGTACAGA	其他...	长度~40
SEQ 5'	DD		
糖	SS		
BB			
注释 阴性对照具有未修饰编辑区的约一半硫代磷酸酯阳性(9s-20s-10s)			
野生型或突变体	<input type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input checked="" type="radio"/> 加扰的	
疾病迹象 -		靶基因 GFP	
靶位点	密码子 67	% 编辑	0.01 +/-0.01
ETAGEN 序号100010		专利 SEQ ID No. 010	
碱基	CGGCTGAAGCACTGCACGCCGCTAGGTGTCAGGGTGGTCACGA	其他...	长度~40
SEQ 5'	DD		
糖	SS		
BB			
注释 除了编辑区中的为多数硫代磷酸酯 (16s-60-17s)			
野生型或突变体	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 加扰的	
疾病迹象 -		靶基因 GFP	
靶位点	密码子 67	% 编辑	0.00 +/-0.00
ETAGEN 序号100011		专利 SEQ ID No. 011	
碱基	CGGCTGAAGCACTGCACGCCCTAGGTGTCAGGGTGGTCACGA	其他...	长度~40
SEQ 5'	DD		
糖	SS		
BB			
注释 阴性对照除了编辑区中的为多数硫代磷酸酯 (16s-60-17s)			
野生型或突变体	<input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 加扰的	
疾病迹象 -		靶基因 GFP	
靶位点	密码子 67	% 编辑	0.01 +/-0.00
ETAGEN 序号100012		专利 SEQ ID No. 012	
碱基	CTGGGAGATCGCGGGCAGCGCCATGCTGAGGCTCGTACAGA	其他...	长度~40
SEQ 5'	DD		
糖	SS		
BB			
注释 阴性对照除了编辑区中的为多数硫代磷酸酯 (16s-60-17s)			
野生型或突变体	<input type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input checked="" type="radio"/> 加扰的	
疾病迹象 -		靶基因 GFP	
靶位点	密码子 67	% 编辑	0.03 +/-0.01

图2续





<p><b>ETAGEN 序号100021</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> UCGUGACCCACCCU 糖 MIMMIMMIMMIMM BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 对编辑寡核苷酸的位置28-40互补的2'-O-甲基“保护剂”寡核苷酸  <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的            靶基因 GFP % 编辑 ND +/- 长度~ 16</p> <p>野生型或突变体 疾病迹象 - 靶位点 密码子 67</p>	<p>专利 <b>SEQ ID No. 021</b></p>
<p><b>ETAGEN 序号100022</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> GCACGTGCACGCCCTAGGTCAGGGTG 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25 mer全硫代磷酸酯DNA, “自递送”化学  <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的            靶基因 GFP % 编辑 ND +/- 长度~ 25</p> <p>野生型或突变体 疾病迹象 - 靶位点 密码子 67</p>	<p>专利 <b>SEQ ID No. 022</b></p>
<p><b>ETAGEN 序号100023</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> GCACGTGCACGCCCTAGGTCAGGGTG 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 阴性对照25 mer全硫代磷酸酯DNA, “自递送”化学  <input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的            靶基因 GFP % 编辑 ND +/- 长度~ 25</p> <p>野生型或突变体 疾病迹象 - 靶位点 密码子 67</p>	<p>专利 <b>SEQ ID No. 023</b></p>
<p><b>ETAGEN 序号100024</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCGCGGCAGCGCCCATGCTGAGGATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 阴性对照25 mer全硫代磷酸酯DNA  <input type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input checked="" type="radio"/> 加扰的            靶基因 GFP % 编辑 ND +/- 长度~ 25</p> <p>野生型或突变体 疾病迹象 - 靶位点 密码子 67</p>	<p>专利 <b>SEQ ID No. 024</b></p>

图2续

<p><b>ETAGEN 序号100031</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> CGGCTGAAGCACTGCACGCCCGTAGGTCAGGGTGGTCACCGA 糖 DDD BB SSS</p> <p>注释 每个末端上3个硫代磷酸酯端基封闭(母体)</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护的等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~40</p> <p>疾病迹象 - 靶位点 密码子 67</p> <p>靶基因 GFP % 编辑 2.07 +/-0.46</p>	<p>专利 SEQ ID No. 025</p>
<p><b>ETAGEN 序号100032</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> CGGCTGAAGCACTGCACGCCCGTAGGTCAGGGTGGTCACCGA 糖 DDD BB SSS</p> <p>注释 阴性对照(在每个末端具有3个硫代磷酸酯)</p> <p>野生型或突变体 <input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护的等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~40</p> <p>疾病迹象 - 靶位点 密码子 67</p> <p>靶基因 GFP % 编辑 0.04 +/-0.01</p>	<p>专利 SEQ ID No. 026</p>
<p><b>ETAGEN 序号100033</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> CGGCTGAAGCACTGCACGCCCGTAGGTCAGGGTGGTCACCGA 糖 DDDFFFFFFFDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSS</p> <p>注释 阴性对照具有5'端基封闭的5'和3' 8*2'F高亲和和力臂</p> <p>野生型或突变体 <input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护的等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~40</p> <p>疾病迹象 - 靶位点 密码子 67</p> <p>靶基因 GFP % 编辑 0.00 +/-0.00</p>	<p>专利 SEQ ID No. 027</p>
<p><b>ETAGEN 序号100034</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> CGGCTGAAGCACTGCACGCCCGTAGGTCAGGGTGGTCACCGA 糖 DDDFFFFFFFDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSS</p> <p>注释 具有5'端基封闭的5'和3' 8*2'F高亲和和力臂</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护的等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~40</p> <p>疾病迹象 - 靶位点 密码子 67</p> <p>靶基因 GFP % 编辑 0.25 +/-0.04</p>	<p>专利 SEQ ID No. 028</p>

图2续





<p><b>ETAGEN 序号100043</b></p> <p>碱基  <b>SEQ 5'</b> CGGCTGAAGCACTGCACGGCCGTAGGTCAGGGTGGTCCACGA            DDD            BB SSSDD</p> <p>注释 关于哪条链是新生的方面愚弄修复机构的用5'甲基C代替中央C            野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的</p> <p>疾病迹象 - 靶基因 GFP            靶位点 密码子 67 % 编辑 1.27 +/-0.36 长度~ 40  <input type="radio"/> 其他...</p>	<p>专利 SEQ ID No. 037</p>
<p><b>ETAGEN 序号100044</b></p> <p>碱基  <b>SEQ 5'</b> CGGCTGAAGCACTGCACGGCCGTAGGTCAGGGTGGTCCACGA            DDD            BB SSSDD</p> <p>注释 阴性对照关于哪条链是新生的方面愚弄修复机构的用5'甲基C代替中央C            野生型或突变体 <input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的</p> <p>疾病迹象 - 靶基因 GFP            靶位点 密码子 67 % 编辑 0.02 +/-0.01 长度~ 40  <input type="radio"/> 其他...</p>	<p>专利 SEQ ID No. 038</p>
<p><b>ETAGEN 序号100045</b></p> <p>碱基  <b>SEQ 5'</b> TTCGGCTGAAGCACTGCACGGCCGTAGGTCAGGGTGGTCCACGATT            DDD            BB TTTDD</p> <p>注释 无硫代磷酸酯的甲基磷酸酯端基封闭, 5'甲基C的s和2'F臂            野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的</p> <p>疾病迹象 - 靶基因 GFP            靶位点 密码子 67 % 编辑 ND +/- 长度~ 44  <input type="radio"/> 其他...</p>	<p>专利 SEQ ID No. 039</p>
<p><b>ETAGEN 序号100047</b></p> <p>碱基  <b>SEQ 5'</b> TTCGGCTGAAGCACTGCACGGCCGTAGGTCAGGGTGGTCCACGA            DDD            BB TTTDD</p> <p>注释 5'甲基磷酸酯端基封闭, 3' s-端基封闭, 5'甲基C的s和3' 2'F臂            野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的</p> <p>疾病迹象 - 靶基因 GFP            靶位点 密码子 67 % 编辑 0.19 +/-0.06 长度~ 42  <input type="radio"/> 其他...</p>	<p>专利 SEQ ID No. 040</p>

图2续













ETAGEN 序号 100198	专利 SEQ ID No. 065
碱基 SEQ 5' N 末端 -KKK- <u>Δ</u> ACCCTTACATCAGTTACA-KKKK-C- 末端	
糖 BB	
注释 WC 辅助寡聚物, 下划线是手性谷氨酸 $\gamma$ PNA	
野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他...	长度 ~ 20
疾病迹象 $\beta$ 地中海贫血	靶基因血红蛋白 HBB
靶位点 IVS2-654	% 编辑 ND +/-
ETAGEN 序号 100199	专利 SEQ ID No. 066
碱基 SEQ 5' N 末端 - <u>Δ</u> ACCCTTACATCAGTTACA-C- 末端	
糖 BB	
注释 WC 辅助寡聚物, 下划线是手性谷氨酸 $\gamma$ PNA	
野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他...	长度 ~ 20
疾病迹象 $\beta$ 地中海贫血	靶基因血红蛋白 HBB
靶位点 IVS2-654	% 编辑 ND +/-
ETAGEN 序号 100240	专利 SEQ ID No. 067
碱基 SEQ 5' TCTGGGTTAAGGCAA TAGCAATATC	
糖 BB	
注释 25mer 未修饰 DNA	
野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他...	长度 ~ 25
疾病迹象 $\beta$ 地中海贫血	靶基因血红蛋白 HBB
靶位点 IVS2-654	% 编辑 ND +/-
ETAGEN 序号 100232	专利 SEQ ID No. 068
碱基 SEQ 5' TCTGGGTTAAGGCAA TAGCAATATC	
糖 BB	
注释 25mer L-L, 非硫代磷酸酯核酸外切酶封闭	
野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他...	长度 ~ 25
疾病迹象 $\beta$ 地中海贫血	靶基因血红蛋白 HBB
靶位点 IVS2-654	% 编辑 ND +/-

图2续



ETAGEN 序号100229 碱基 SEQ 5' 糖 BB	专利 SEQ ID No. 073	TCTGGGTTAAGGTTAAGCAATATC LDDDDDDDDDDLLDDDDDDDDDD Ooooooooooooooooooooooooooooo	长度~25
野生型或突变体 疾病迹象β地中海贫血	<input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他...	靶基因血红蛋白 HBB % 编辑 ND +/-	
靶位点 IVS2-654			
ETAGEN 序号100175 碱基 SEQ 5' 糖 BB	专利 SEQ ID No. 074	AAAGAAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATCTGCAATATAAATATTA [CY5]-DD Ooo	长度~64
野生型或突变体 疾病迹象β地中海贫血	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他...	靶基因血红蛋白 HBB % 编辑 ND +/-	
靶位点 IVS2-654			
ETAGEN 序号100206 碱基 SEQ 5' 糖 BB	专利 SEQ ID No. 075	5 PAAAGAAATAACAGTGATAATTTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATCTGCAATATAAATAT 5 DD 5 OSSSOoo	长度~75
野生型或突变体 疾病迹象β地中海贫血	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他...	靶基因血红蛋白 HBB % 编辑 ND +/-	
靶位点 IVS2-654			
ETAGEN 序号100177 碱基 SEQ 5' 糖 BB	专利 SEQ ID No. 076	PTCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATC DD BB OSSSOoo	长度~25
野生型或突变体 疾病迹象β地中海贫血	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他...	靶基因血红蛋白 HBB % 编辑 ND +/-	
靶位点 IVS2-654			

图2续





ETAGEN 序号100174 碱基 SEQ 5' AAAGAATAACAGTGATAAATTCTGGGTTAAGGTAATAGCAATATCTCTGCATATAAATAT 糖 BB SSS	Patent SEQ ID No. 085	长度~ 61
注释 阴性对照61mer 3S-3S, 核酸外切酶端基封闭GEN2 ETAMER 野生型或突变体 <input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB	IVS2-654	% 编辑 ND +/-
ETAGEN 序号100176 碱基 SEQ 5' AAAGAATAACAGTGATAAATTCTGGGTTAAGGTAATAGCAATATCTCTGCATATAAATAT 糖 BB SSS	Patent SEQ ID No. 086	长度~ 60
注释 60mer 3S-所有5甲基Cs, 核酸外切酶端基封闭 野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB	IVS2-654	% 编辑 ND +/-
ETAGEN 序号100220 碱基 SEQ 5' AAAGAATAACAGTGATAAATTCTGGGTTAAGGTAATAGCAATATCTCTGCATATAAATAT 糖 BB SSS	Patent SEQ ID No. 087	长度~ 61
注释 60mer 3S-错配的F以抑制寡聚物-3S的MMR, 核酸外切酶端基封闭 野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB	IVS2-654	% 编辑 ND +/-
ETAGEN 序号100225 碱基 SEQ 5' AAAGAATAACAGTGATAAATTCTGGGTTAAGGTAATAGCAATATCTCTGCATATAAATAT 糖 BB SSS	Patent SEQ ID No. 088	长度~ 61
注释 60mer 3S-错配的L以抑制寡聚物-3S的MMR核酸外切酶端基封闭GEN3基线 野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB	IVS2-654	% 编辑 ND +/-

图2续



<p><b>ETAGEN 序号100224</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 3S-错配的F以抑制寡聚物-9F-3S的MMR核酸外切酶端基封闭</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~ 25</p> <p>疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB % 编辑 ND +/-</p> <p>靶位点 IVS2-654</p>
<p><b>ETAGEN 序号100209</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 3S-错配的L以抑制寡聚物-3S的MMR核酸外切酶端基封闭</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~ 25</p> <p>疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB % 编辑 ND +/-</p> <p>靶位点 IVS2-654</p>
<p><b>ETAGEN 序号100221</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 3S-错配的M以抑制寡聚物-3S的MMR核酸外切酶端基封闭</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~ 25</p> <p>疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB % 编辑 ND +/-</p> <p>靶位点 IVS2-654</p>
<p><b>ETAGEN 序号100230</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 阴性对照 25mer 3S-错配的M-3S核酸外切酶端基封闭</p> <p>野生型或突变体 <input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~ 25</p> <p>疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB % 编辑 ND +/-</p> <p>靶位点 IVS2-654</p>

图2续

<p><b>ETAGEN</b> 序号100213</p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCCAA TAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDFDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 3S-错配的F-12S</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB</p> <p>靶位点 IVS2-654 % 编辑 ND +/- 长度~ 25</p>	
<p><b>ETAGEN</b> 序号100235</p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCCAA TAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDFDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 3S-12S</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB</p> <p>靶位点 IVS2-654 % 编辑 ND +/- 长度~ 25</p>	
<p><b>ETAGEN</b> 序号100214</p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCCAA TAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDFDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 3S-错配的L以抑制寡聚物-12S的MMR修复</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB</p> <p>靶位点 IVS2-654 % 编辑 ND +/- 长度~ 25</p>	
<p><b>ETAGEN</b> 序号100215</p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCCAA TAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDFDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 3S-错配的M以抑制寡聚物-12S的MMR</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB</p> <p>靶位点 IVS2-654 % 编辑 ND +/- 长度~ 25</p>	

图2续

<p><b>ETAGEN 序号 100236</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGTAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 阴性对照25mer 3S-错配的M以抑制寡聚物-12S的MMIR  <input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的                      野生型或突变体 <input type="radio"/> 其他...                      疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB</p> <p>靶位点 IVS2-654 % 编辑 ND +/- 长度 ~ 25</p>	<p>专利 SEQ ID No. 101</p>
<p><b>ETAGEN 序号 100207</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> PTC TGGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer PS-3S-错配的F以抑制寡聚物-3S的错配修复  <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的                      野生型或突变体 <input type="radio"/> 其他...                      疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB</p> <p>靶位点 IVS2-654 % 编辑 ND +/- 长度 ~ 26</p>	<p>专利 SEQ ID No. 102</p>
<p><b>ETAGEN 序号 100238</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 25S "自递送" 化学物质  <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的                      野生型或突变体 <input type="radio"/> 其他...                      疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB</p> <p>靶位点 IVS2-654 % 编辑 ND +/- 长度 ~ 25</p>	<p>专利 SEQ ID No. 103</p>
<p><b>ETAGEN 序号 100212</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> TCTGGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 12S-错配的L以抑制寡聚物-12S的MMIR "自递送" 化学物质  <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的                      野生型或突变体 <input type="radio"/> 其他...                      疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB</p> <p>靶位点 IVS2-654 % 编辑 ND +/- 长度 ~ 25</p>	<p>专利 SEQ ID No. 104</p>

图2续



<p><b>ETAGEN 序号100180</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> PTC TGGGTTAAGGTAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 阴性对照25mer 5'硫代磷酸酯-25S "自递送" 化学物质</p> <p>野生型或突变体 <input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~ 25</p> <p>疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB ND +/-</p> <p>靶位点 IVS2-654</p>	<p>专利 SEQ ID No. 109</p>
<p><b>ETAGEN 序号100219</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> PTC TGGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDFDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 5'硫代磷酸酯-12S-错配的F以抑制寡聚物-12S的MMR</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~ 26</p> <p>疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB ND +/-</p> <p>靶位点 IVS2-654</p>	<p>专利 SEQ ID No. 110</p>
<p><b>ETAGEN 序号100223</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> PTC TGGGTTAAGGCAATAGCAATATC 糖 DDDDDDDDDDDDFDDDDDDDDDDDDDDDD BB SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS</p> <p>注释 25mer 5'硫代磷酸酯-12S-错配的F以抑制寡聚物-12S的MMR所有C的S甲基</p> <p>野生型或突变体 <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~ 26</p> <p>疾病迹象β地中海贫血 靶基因血红蛋白 HBB ND +/-</p> <p>靶位点 IVS2-654</p>	<p>专利 SEQ ID No. 111</p>
<p><b>ETAGEN 序号100195</b></p> <p>碱基 <b>SEQ 5'</b> N-末端 KKK-JTTTTJJJ-0-0-0-CCCTTTTCAAGGTGAGTAG-KKKK C-末端 糖 注释 尾锚 PNA BB <input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因 <input type="radio"/> 加扰的 <input type="radio"/> 其他... 长度~ 27</p> <p>野生型或突变体 靶基因CFTR ND +/-</p> <p>疾病迹象囊性纤维化 (CF) 靶位点 6F508</p>	<p>专利 SEQ ID No. 112</p>

图2续



ETAGEN 序号100192		专利 SEQ ID No. 116	
碱基	SEQ 5'	野生型或突变体	长度 ~ 35
糖	PTCATCATAGGAAACACCAATAAATTTCTTTTGAT	<input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 其他...
BB	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD	<input type="radio"/> 加扰的	
	OSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS	靶基因 CFTR	% 编辑 ND +/-
	注释 阴性对照35mer 5'磷酸3SS "自递送" 化学物质		
疾病迹象囊性纤维化 (CF)			
靶位点	ΔF508		
ETAGEN 序号100183		专利 SEQ ID No. 118	
碱基	SEQ 5'	野生型或突变体	长度 ~ 61
糖	TCTTATATCTGTACTCATATAGGAAACACCAAGATAATGTTCTTGTAGTACCCGG	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 其他...
BB	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD	<input type="radio"/> 加扰的	
	SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS	靶基因 CFTR	% 编辑 ND +/-
	注释 来自McNeer等人2015的61mer 3S-3S阳性对照磷酸酯端基封闭		
疾病迹象囊性纤维化 (CF)			
靶位点	ΔF508		
ETAGEN 序号100184		专利 SEQ ID No. 119	
碱基	SEQ 5'	野生型或突变体	长度 ~ 61
糖	TCTTATATCTGTACTCATATAGGAAACACCAATAAATTTCTTGTAGTACCCGG	<input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 其他...
BB	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD	<input type="radio"/> 加扰的	
	SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS	靶基因 CFTR	% 编辑 ND +/-
	注释 阴性对照61mer 3S-3S		
疾病迹象囊性纤维化 (CF)			
靶位点	ΔF508		
ETAGEN 序号100193		专利 SEQ ID No. 120	
碱基	SEQ 5'	野生型或突变体	长度 ~ 91
糖	CTTTGATGACCGTTCTGTATCTATATTCATATCATAGGAAACACCAAGATAATGTTCTTAAATGGTGCCAGGCATAATCCAGGAAAACATG	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 其他...
BB	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD	<input type="radio"/> 加扰的	
	SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS	靶基因 CFTR	% 编辑 ND +/-
	注释 91mer 3S-3S核酸外切酶端基封闭		
疾病迹象囊性纤维化 (CF)			
靶位点	ΔF508		

图2续



ETAGEN 序号 100191		专利 SEQ ID No. 125	
碱基	PTCATCATAGGAAACACCAATAAATTTCTTTGAT		
SEQ 5'	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD		
糖	SSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS		
BB	注释 阴性对照35mer 5'硫代磷酸酯3SS "自递送" 化学物质		
野生型或突变体	<input type="radio"/> WT <input checked="" type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 加扰的	<input type="radio"/> 其他...
疾病迹象囊性纤维化 (CF)		靶基因 CFTR	长度~35
靶位点 ΔF508		% 编辑	ND +/-
ETAGEN 序号 100242		专利 SEQ ID No. 126	
碱基	PTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTT		
SEQ 5'	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD		
糖	OSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS		
BB	注释 LNA的侧翼第3mt缺失加错配以抑制寡聚物的MMR, "自递送" 化学物质		
野生型或突变体	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 加扰的	<input type="radio"/> 其他...
疾病迹象囊性纤维化 (CF)		靶基因 CFTR	长度~36
靶位点 ΔF508		% 编辑	ND +/-
ETAGEN 序号 100243		专利 SEQ ID No. 127	
碱基	PTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTT		
SEQ 5'	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD		
糖	OSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS		
BB	注释 LNA的侧翼第3mt缺失以抑制寡聚物的MMR, "自递送" 化学物质		
野生型或突变体	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 加扰的	<input type="radio"/> 其他...
疾病迹象囊性纤维化 (CF)		靶基因 CFTR	长度~36
靶位点 ΔF508		% 编辑	ND +/-
ETAGEN 序号 100244		专利 SEQ ID No. 128	
碱基	PTCATCATAGGAAACACCAAGATGATATTTCTTT		
SEQ 5'	DDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDDD		
糖	OSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSSS		
BB	注释 2'-O-甲基侧翼第3mt缺失加错配以抑制寡聚物的MMR, 有 "自递送" 化学物质		
野生型或突变体	<input checked="" type="radio"/> WT <input type="radio"/> MU <input type="radio"/> 保护性等位基因	<input type="radio"/> 加扰的	<input type="radio"/> 其他...
疾病迹象囊性纤维化 (CF)		靶基因 CFTR	长度~36
靶位点 ΔF508		% 编辑	ND +/-

图2续



