



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114657180 A

(43) 申请公布日 2022. 06. 24

(21) 申请号 202210293007.1

A61K 48/00 (2006.01)

(22) 申请日 2016.04.15

A61P 43/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/162,720 2015.05.16 US

(62) 分案原申请数据

201680041691.7 2016.04.15

(71) 申请人 建新公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G·阮 A·斯盖利亚

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理人 岑晓东

(51) Int.Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 9/22 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

权利要求书3页 说明书124页

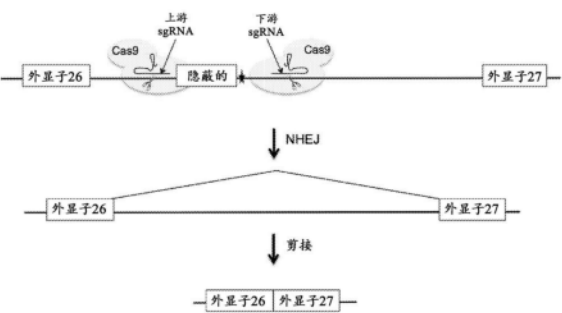
序列表28页 附图10页

(54) 发明名称

深内含子突变的基因编辑

(57) 摘要

本发明涉及深内含子突变的基因编辑。本文中提供了使用工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) -CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统治疗与深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物、方法、试剂盒和病毒颗粒。在一些方面,本文中提供了自限性 CRISPER-Cas系统。



1. 一种用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物,所述组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) Cas蛋白,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

2. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物,所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

3. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的组合物,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) Cas蛋白,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

4. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸的组合物,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

5. 一种包含病毒载体的病毒颗粒,其中所述病毒载体包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与个体核酸中的深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包

含所述深内含子突变的靶DNA部分。

6. 一种生成与核酸中的深内含子突变相关的眼部疾病的体外模型的方法,所述方法包括

- a) 向真核细胞中引入编码CRISPR-Cas系统的核酸,其中所述CRISPR-Cas系统包含
 - i) 靶向所述核酸中的内含子的靶DNA序列的单一引导RNA,
 - ii) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,
 - iii) 包含同源定向修复 (HDR) 模板的单链寡核苷酸,所述模板包含在预期的内含子突变侧翼的同源臂和原型间隔序列毗邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM); 和
- b) 分离包含组入所述核酸中的突变的细胞。

7. 一种用于切割细胞中的靶核酸的方法,包括向所述细胞递送有效量的组合物,所述组合物包含:

- a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交; 和
- b) Cas表达盒,其包含
 - i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列, 和
 - ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分; 并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

8. 一种治疗与个体核酸中的突变相关的疾病或疾患的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含:

- a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交; 和
- b) Cas表达盒,其包含
 - i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列, 和
 - ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分; 并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

9. 一种用于切割细胞中的靶核酸的组合物,其包含:

- a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相

关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和

b) Cas表达盒,其包含

i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和

ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

10. 一种治疗与个体核酸中的突变相关的疾病或疾患的组合物,所述组合物包含:

a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和

b) Cas表达盒,其包含

i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和

ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

深内含子突变的基因编辑

相关申请的交叉引用

[0001] 本申请是申请日为2016年04月15日、中国申请号为201680041691.7、发明名称为“深内含子突变的基因编辑”的发明申请的分案申请。本申请要求2015年5月16日提交的美国临时专利申请No.62/162,720的优先权,出于所有目的将其内容通过提述完整并入本文。

以ASCII文本文件提交序列表

[0002] 以下提交的ASCII文本文件的内容通过提述完整并入本文:序列表的计算机可读形式(CRF)(文件名:159792013440SEQLIST.TXT,记录日期:2016年4月14日,大小:49KB)。

发明领域

[0003] 本发明涉及使用工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统治疗与深内含子突变相关的疾病或疾患的方法,以及与其相关的组合物、试剂盒和病毒颗粒。

发明背景

[0004] 诸如内含子的非编码序列中的突变牵涉广泛的疾病。人类基因组比其他生物如蠕虫和苍蝇含有更高比例的内含子;超过90%的人类内含子的长度多于100个核苷酸,所有内含子中超过三分之一为2,000个核苷酸或更长(Molecular Biology of the Cell, 6th ed. (Alberts, B.等人编辑,2014)。另外,深内含子突变已经被鉴定为人类疾病的重要且可能被忽略的原因,而大量鉴定疾病关联突变的努力集中于编码序列(Homolova, K.等人, (2010) Hum. Mutat. 31:437-444)。由于在人类中mRNA剪接的复杂性,这些深内含子突变可能潜在地由于特别是包括mRNA失稳、降解和错误剪接(例如,产生隐蔽剪接位点)的机制而引起多种病理状态。事实上,有人估计,人类中高达5%的孟德尔疾病可能与深内含子突变相关(Cooper, D.N.等人, (2010) Hum. Mutat. 31:631-655)。

[0005] 作为在某些情况下与深内含子突变关联的病症的示例性实例,莱伯(Leber)先天性黑朦(LCA)是遗传性视网膜营养不良的最严重形式,在生命的第一年出现症状(Leber, T.K.G.v. (1869) Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 15:1-25)。LCA患者的视敏度很少超过20/400(Cremers, F.P.等人, (2002) Human molecular genetics 11:1169-1176)。在一般人群中, LCA累及大约3万分之一的个体, 占有遗传性视网膜营养不良的5% (Koenekoop, R.K. (2004) Survey of ophthalmology 49:379-398)。在欧洲国家和美国, 占有LCA病例的大约15%的LCA的最常见遗传原因是CEP290基因内含子26中的深内含子突变c.2991+1655A>G, 其产生导致包含异常外显子的隐蔽剪接供体位点, 所述异常外显子含有CEP290 mRNA的提前终止密码子(p.C998X) (den Hollander, A.I. et al. (2006) Am. J. Hum. Genet. 79:556-561; Perrault, I. et al. (2007) Hum. Mutat. 28:416; Stone, E.M. (2007) Am. J. Ophthalmol. 144:791-811; Wyszniowski, W. et al. (2011) Hum. Genet. 129:319-327)。由CEP290突变引起的LCA疾病被称为LCA10。在纯合的受累个体中, 隐蔽外显子成为CEP290 mRNA的选择性剪接发生在一些但不是全部mRNA转录物中 (den Hollander, A.I. et al. (2006) Am. J. Hum. Genet. 79:556-561), 强调这种内含子突变的次形

态 (hypomorphic) 性质。

[0006] 人CEP290基因包含编码2479个氨基酸的蛋白质的54个外显子。CEP290是一种中心体蛋白,在纤毛组装和纤毛蛋白运输两者中都起着重要作用 (Barbelanne, M. 等人, (2013) Hum. Mol. Genet. 22:2482-2494; Craigie, B. 等人, (2010) J. Cell Biol. 190:927-940)。在光感受器 (最受CEP290突变影响的视网膜细胞) 中, CEP290定位于连接纤毛 (Chang, B. 等人, (2006) Hum. Mol. Genet. 15:1847-1857), 所述纤毛使光感受器的内段和外段连接。

[0007] 目前尚不能治愈CEP290突变导致的LCA。用于解决这种疾病的两种临床前方法是基因增强和反义寡核苷酸 (AON)。人CEP290互补DNA (cDNA) 的大小超过了重组腺相关病毒 (rAAV) 的承载大小 (cargo size) (约4.8kb)。慢病毒载体系统可以容纳全长CEP290 cDNA; 然而, 它可能不能精确地控制CEP290的表达水平。先前的报告已经证明, 光感受器对转基因表达水平敏感, 并且CEP290的过表达具有细胞毒性 (Burnight, E. R. 等人, (2014) Gene Ther. 21:662-672; Tan, E. 等人, (2001) Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 42:589-600)。替代策略是使用AON来干扰CEP290的异常剪接 (Collin, R. W. 等人, (2012) Mol. Ther. Nucleic Acids 1:e14; Gerard, X. 等人, (2012) Mol. Ther. Nucleic Acids 1:e29)。然而, 这种方法需要视网膜专家每周或每月进行一次视网膜下注射, 持续数年。

[0008] 因此, 迫切需要改进的治疗方法来治疗与深内含子突变关联的疾患, 如CEP290突变引起的LCA10。

发明简述

[0009] 本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物, 所述组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统, 所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交, 和b) Cas蛋白, 其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子, 从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中, 本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物, 所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸, 所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交, 和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列, 其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子, 从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中, 与深内含子突变相关的疾病或疾患为: 无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病

(mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸-δ-转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。在一些实施方案中,深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

[0010] 在一些方面,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) Cas蛋白,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁视网膜色素变性。在一些实施方案中,深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

[0011] 在上述实施方案的一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦。在一些实施方案中,第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:45 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:46 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:47 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:50 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:51 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:52 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:43 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:44 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:48 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:49 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:21 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:22 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:53 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:54 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,CEP290是人CEP290。在一些实施方案中,CEP290包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0012] 在上述实施方案的一些实施方案中,深内含子突变位于基因的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于基因的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变在基因中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

[0013] 在上述实施方案的一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas9蛋白是酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白 (SEQ ID NO:40)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白 (SEQ ID NO:55)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*) Cas9蛋白。在一些实施方案中,将Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。在一些实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,真核细胞是人类细胞。

[0014] 在上述实施方案的一些实施方案中,CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号 (NLS)。在一些实施方案中,Cas蛋白包含一个或多个NLS。在一些实施方案中,NLS是SV40大T抗原中的C端序列。在一些实施方案中,NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

[0015] 在上述实施方案的一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。在一些实施方案中,tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

[0016] 在上述实施方案的一些实施方案中,CRISPR-Cas系统 (例如第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白) 与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸和/或蛋白质的细胞摄取的药剂复合。

[0017] 在上述实施方案的一些实施方案中,在真核细胞中表达编码第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白的核酸。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA和/或Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段 (minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子 (LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子 (CAG) 启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶 (PDE) 启动子、视网膜色素变性 (RP1) 启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因 (IRBP) 启动子。

[0018] 在上述实施方案的一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体与递送系统复合。在一些实施方案中,载体与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

[0019] 在上述实施方案的一些实施方案中,载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒 (HSV) 载体。在一些实施方案中,载体是重组腺病毒载体。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。在一些实施方案中,重组腺病

毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

[0020] 在一些实施方案中,载体是重组慢病毒载体。在一些实施方案中,重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

[0021] 在一些实施方案中,载体是rHSV载体。在一些实施方案中,rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

[0022] 在一些实施方案中,载体是重组AAV(rAAV)载体。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施方案中,载体是自身互补型载体。

[0023] 在一些实施方案中,载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

[0024] 在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。在一些实施方案中,重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

[0025] 在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。在一些实施方案中,重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

[0026] 在一些实施方案中,病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。在一些实施方案中,AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。在一些实施方案中,rAAV载体包含AAV2 ITR。

[0027] 在一些方面,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物,所述方法包括向所述个体给予治疗有效量的组合物,所述组合物包含工程

改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR 相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) Cas蛋白,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物,所述方法包括向所述个体给予治疗有效量的组合物,所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR 相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,与深内含子突变相关的疾病或疾患为:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。在一些实施方案中,深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

[0028] 在多个方面,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述方法包括向所述个体给予治疗有效量的组合物,所述组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR 相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述方法包括向所述个体给予治疗有效量的组合物,所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR 相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位

于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病(Stargardt disease)、厄舍综合征(Usher syndrome)或X连锁视网膜色素变性。在一些实施方案中,深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

[0029] 在上述方法的一些实施方案中,个体是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,将所述组合物施用于个体的眼睛。在一些实施方案中,施用于视网膜下或玻璃体内。

[0030] 在上述方法的一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦。在一些实施方案中,第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:45 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:46 (对于SaCas9)或SEQ ID NO:47 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:50 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:51 (对于SaCas9)或SEQ ID NO:52 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:43 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:44 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:48 (对于SaCas9)或SEQ ID NO:49 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:21 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:22 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:53 (对于SaCas9)或SEQ ID NO:54 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,CEP290是人CEP290。在一些实施方案中,CEP290包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0031] 在上述方法的一些实施方案中,深内含子突变位于基因的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于基因的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变在基因中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

[0032] 在上述方法的一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas9蛋白是酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*) Cas9蛋白。在一些实施方案中,将Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。在一些实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,真核细胞是人类细胞。

[0033] 在上述方法的一些实施方案中,CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号(NLS)。在一些实施方案中,Cas蛋白包含一个或多个NLS。在一些实施方案中,NLS是SV40大T抗原中的C端序列。在一些实施方案中,NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

[0034] 在上述方法的一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。在一些实施方案中,tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

[0035] 在上述方法的一些实施方案中,CRISPR-Cas系统(例如第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白)与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸和/或蛋白质的细胞摄取的

药剂复合。

[0036] 在上述方法的一些实施方案中,在真核细胞中表达编码第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白的核酸。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA和/或Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段(minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子(LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶(hTERT)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG)启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶(PDE)启动子、视网膜色素变性(RP1)启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因(IRBP)启动子。

[0037] 在上述方法的一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体与递送系统复合。在一些实施方案中,载体与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

[0038] 在上述实施方案的一些实施方案中,载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒(HSV)载体。在一些实施方案中,载体是重组腺病毒载体。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

[0039] 在一些实施方案中,载体是重组慢病毒载体。在一些实施方案中,重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

[0040] 在一些实施方案中,载体是rHSV载体。在一些实施方案中,rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

[0041] 在一些实施方案中,载体是重组AAV(rAAV)载体。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施方案中,载体是自身互补型载体。

[0042] 在一些实施方案中,载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包

含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

[0043] 在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。在一些实施方案中,重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

[0044] 在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。在一些实施方案中,重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

[0045] 在一些实施方案中,病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。在一些实施方案中,AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。在一些实施方案中,rAAV载体包含AAV2 ITR。

[0046] 在上述方法的一些实施方案中,所述组合物是药物组合物。

[0047] 在一些方面,本发明提供了上述实施方案中任一个的组合物用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾患的用途。在一些方面,本发明提供了上述实施方案中任一个的组合物在制造用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾患的药物中的用途。在一些实施方案中,与深内含子突变相关的疾病或疾患为:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征(Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征(Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病(Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血(Fanconi anemia)、吉特曼综合征(Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调(Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征(Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征(Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病(mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病(multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征(Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征(Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征(Werner syndrome)、X-连锁高

免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。在一些实施方案中,深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。在一些实施方案中,与深内含子突变相关的疾病或疾患是眼部疾病。在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病(Stargardt disease)、厄舍综合征(Usher syndrome)或X连锁视网膜色素变性。在一些实施方案中,深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。在一些实施方案中,所述个体是哺乳动物。在一些实施方案中,哺乳动物是人。在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦。

[0048] 在上述用途的一些实施方案中,将所述组合物配制为施用于个体的眼睛。在一些实施方案中,将所述组合物配制为视网膜下或玻璃体内施用。

[0049] 在上述用途的一些实施方案中,第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:45 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:46 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:47 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:50 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:51 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:52 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:43 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:44 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:48 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:49 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:21 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:22 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:53 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:54 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,CEP290是人CEP290。在一些实施方案中,CEP290包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0050] 在上述用途的一些实施方案中,深内含子突变位于基因的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于基因的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变引入剪接供体位点或剪接受体位点。

[0051] 在一些方面,本发明提供了包含上述实施方案中任一个的组合物的试剂盒。在一些实施方案中,所述试剂盒包含在本文所述的任何方法中使用的上述实施方案中任一个的组合物。在一些实施方案中,所述试剂盒进一步包括使用说明书。

[0052] 在一些方面,本发明提供了包含病毒载体的病毒颗粒,其中所述病毒载体包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)—CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统的核酸,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与个体基因中的所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,个体基因中的所述深内含子突变与下列疾病相关:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征(Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征(Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白

内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。在一些实施方案中,个体基因中的所述深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

[0053] 在一些实施方案中,所述病毒颗粒用于治疗患有下列疾病的个体:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

[0054] 在一些方面,本发明提供了包含病毒载体的病毒颗粒,其中所述病毒载体包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与在眼部疾病或疾患相关个体的基因中的所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,眼部疾病或疾患是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁视网膜色素变性。在一些实施方案中,深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。在一些实施方案中,所述病毒颗粒用于治疗莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁

视网膜色素变性。

[0055] 在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦。在一些实施方案中,第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:45 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:46 (对于SaCas9)或SEQ ID NO:47 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:50 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:51 (对于SaCas9)或SEQ ID NO:52 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:43 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:44 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:48 (对于SaCas9)或SEQ ID NO:49 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:21 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:22 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:53 (对于SaCas9)或SEQ ID NO:54 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,CEP290是人CEP290。在一些实施方案中,CEP290包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0056] 在上述病毒颗粒的一些实施方案中,深内含子突变位于基因的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于基因的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变在基因中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

[0057] 在上述病毒颗粒的一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas9蛋白是酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*) Cas9蛋白。在一些实施方案中,将Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。在一些实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,真核细胞是人类细胞。

[0058] 在上述病毒颗粒的一些实施方案中,CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号 (NLS)。在一些实施方案中,Cas蛋白包含一个或多个NLS。在一些实施方案中,NLS是SV40大T抗原中的C端序列。在一些实施方案中,NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

[0059] 在上述病毒颗粒的一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。在一些实施方案中,tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

[0060] 在上述病毒颗粒的一些实施方案中,在真核细胞中表达编码第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白的核酸。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA和/或Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段 (minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK)

启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子 (LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子 (CAG) 启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶 (PDE) 启动子、视网膜色素变性 (RP1) 启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因 (IRBP) 启动子。

[0061] 在上述病毒颗粒的一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体与递送系统复合。在一些实施方案中,载体与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

[0062] 在上述病毒颗粒的一些实施方案中,载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒 (HSV) 载体。在一些实施方案中,载体是重组腺病毒载体。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

[0063] 在一些实施方案中,载体是重组慢病毒载体。在一些实施方案中,重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒 (Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。在一些实施方案中,重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒 (Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

[0064] 在一些实施方案中,载体是rHSV载体。在一些实施方案中,rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。在一些实施方案中,重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

[0065] 在一些实施方案中,载体是重组AAV (rAAV) 载体。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施方案中,载体是自身互补型载体。在一些实施方案中,病毒颗粒是包含重组

AAV载体的重组AAV病毒颗粒。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。在一些实施方案中,AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。在一些实施方案中,rAAV载体包含AAV2ITR。

[0066] 在上述病毒颗粒的一些实施方案中,所述病毒颗粒在药物组合物中。

[0067] 在一些方面,本发明提供了产生与基因中的深内含子突变相关的眼部疾病的体外模型的方法,所述方法包括a)向真核细胞中引入编码CRISPR-Cas系统的核酸,其中所述CRISPR-Cas系统包含i)与所述基因中的内含子的靶DNA序列的相反链杂交的单一引导RNA,ii)编码Cas蛋白的核苷酸序列,iii)包含同源定向修复(HDR)模板的单链寡核苷酸,所述模板包含在预期的内含子突变侧翼的同源臂和原型间隔序列毗邻基序(proto spacer adjacent motif,PAM);和b)分离包含组入基因中的突变的细胞。

[0068] 在一些实施方案中,深内含子突变位于基因的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于基因的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变在基因中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

[0069] 在一些实施方案中,PAM包含突变以避免单链寡核苷酸被细胞中表达的Cas蛋白切割。

[0070] 在一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas9蛋白是酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*) Cas9蛋白。在一些实施方案中,将Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。在一些实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,真核细胞是人类细胞。在一些实施方案中,真核细胞是眼部细胞。在一些实施方案中,眼部细胞是视网膜细胞。

[0071] 在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号(NLS)。在一些实施方案中,Cas蛋白包含一个或多个NLS。在一些实施方案中,NLS是SV40大T抗原中的C端序列。在一些实施方案中,NLS包括序列PKKKRKV(SEQ ID NO:26)或PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)。

[0072] 在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与反式激活cr(tracr)序列融合。在一些实施方案中,tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

[0073] 在一些实施方案中,在真核细胞中表达编码第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白的核酸。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA和/或Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。

在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段(minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子(LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶(hTERT)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG)启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶(PDE)启动子、视网膜色素变性(RP1)启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因(IRBP)启动子。

[0074] 在一些实施方案中,编码单一引导RNA、Cas蛋白或单链寡核苷酸中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。

[0075] 在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病(Stargardt disease)、厄舍综合征(Usher syndrome)或X连锁视网膜色素变性。在一些实施方案中,深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。在一些实施方案中,所述病毒颗粒用于治疗莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病(Stargardt disease)、厄舍综合征(Usher syndrome)或X连锁视网膜色素变性。

[0076] 在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦。在一些实施方案中,第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa(CEP290)基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41(对于SpCas9)、SEQ ID NO:45(对于SaCas9)、SEQ ID NO:46(对于SaCas9)或SEQ ID NO:47(SaCas9)的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19(对于SpCas9)、SEQ ID NO:50(对于SaCas9)、SEQ ID NO:51(对于SaCas9)或SEQ ID NO:52(SaCas9)的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42(对于SpCas9)、SEQ ID NO:43(对于SpCas9)、SEQ ID NO:44(对于SpCas9)、SEQ ID NO:48(对于SaCas9)或SEQ ID NO:49(SaCas9)的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20(对于SpCas9)、SEQ ID NO:21(对于SpCas9)、SEQ ID NO:22(对于SpCas9)、SEQ ID NO:53(对于SaCas9)或SEQ ID NO:54(SaCas9)的序列的DNA编码。在一些实施方案中,CEP290是人CEP290。在一些实施方案中,CEP290包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0077] 在一些方面,本发明提供了切割细胞中的靶核酸的方法,其包括向所述细胞递送有效量的组合物,所述组合物包含:a)编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR))-CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和b)Cas表达盒,所述表达盒包含:i)编码Cas蛋白的核苷酸序列,和ii)第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;其中所述Cas蛋白切割所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。在一些方面,本发明提供了用于治疗与个体核酸中的突变相关的疾

病或疾患的方法,其包括向所述个体给予治疗有效量的组合物,所述组合物包含:a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR))-CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和b) Cas表达盒,所述表达盒包含:i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;其中所述Cas蛋白切割所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。在一些方面,本发明提供了用于治疗与个体核酸中的突变相关的眼部疾病或疾患的方法,其包括向所述个体给予治疗有效量的组合物,所述组合物包含:a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR))-CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和b) Cas表达盒,所述表达盒包含:i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;其中所述Cas蛋白切割所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。在一些实施方案中,所述Cas表达盒进一步包含:iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交;其中所述Cas蛋白在第一和第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas蛋白表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

[0078] 在上述方法的一些实施方案中,第一引导RNA与第一引导RNA靶位点和第二引导RNA靶位点杂交。在一些实施方案中,第二引导RNA与第一引导RNA靶位点和第二引导RNA靶位点杂交。在一些实施方案中,第一引导RNA与第一引导RNA靶位点杂交,并且第二引导RNA与第二引导RNA靶位点杂交。在一些实施方案中,Cas表达盒进一步包含与编码Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的多腺苷酸化(polyA)序列。在一些实施方案中,polyA序列是SV40 polyA序列。在一些实施方案中,通过Cas蛋白切割第一或第二引导RNA靶位点中断了编码Cas蛋白的核苷酸序列与polyA序列之间的可操作连接。在一些实施方案中,第一或第二引导RNA靶位点位于编码Cas蛋白的核苷酸序列与polyA序列之间。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核苷酸序列与编码一个或多个核定位信号(NLS)的核苷酸序列可操作连接,使得从Cas表达盒表达的Cas蛋白与一个或多个NLS框内融合。在一些实施方案中,编码一个或多个NLS的核苷酸序列位于编码Cas蛋白的核苷酸序列与多腺苷酸化(polyA)序列之间。在一些实施方案中,第一或第二引导RNA靶位点位于编码一个或多个NLS的核苷酸序列与polyA序列之间。在一些实施方案中,一个或多个NLS包含SV40大T抗原中的C端序列。在一些实施方案中,一个或多个NLS包括序列PKKKRKV(SEQ ID NO:26)或PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,编码CRISPR-Cas系统和/或Cas表达盒的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核苷酸序列与启动子可操作连接。在一些实施方案中,通过Cas蛋白切割第一或第二引导RNA靶位点中断了所述调控元件与编

码Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接。在一些实施方案中,第一或第二引导RNA靶位点位于启动子与编码Cas蛋白的核苷酸序列之间。

[0079] 在上述方法的一些实施方案中,所述Cas表达盒进一步包含:iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交,并且其中所述第二引导RNA靶位点邻近Cas蛋白特异的原型间隔序列毗邻基序(PAM);其中通过Cas蛋白切割第一引导RNA靶位点中断了所述调控元件与编码Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接;其中通过Cas蛋白切割第二引导RNA靶位点中断了编码Cas蛋白的核苷酸序列与polyA序列之间的可操作连接;并且其中在表达所述Cas蛋白和切割所述靶DNA序列后,所述Cas蛋白在所述第一和第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。在一些实施方案中,所述Cas表达盒进一步包含:iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交;其中所述第一引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列和与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的启动子之间;其中所述第二引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列和与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的polyA序列之间;并且其中所述Cas蛋白在所述第一和第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas蛋白表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

[0080] 在上述方法的一些实施方案中,与深内含子突变相关的疾病或疾患为:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征(Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征(Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病(Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血(Fanconi anemia)、吉特曼综合征(Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调(Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征(Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征(Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病(mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病(multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征(Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征(Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征(Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。在一些实施方案中,深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

[0081] 在一些方面,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)—CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统的核酸,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部

分。在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)—CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统,所述系统包含a)第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b)Cas蛋白,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病(Stargardt disease)、厄舍综合征(Usher syndrome)或X连锁视网膜色素变性。在一些实施方案中,深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

[0082] 在上述实施方案的一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦。在一些实施方案中,第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa(CEP290)基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41(对于SpCas9)、SEQ ID NO:45(对于SaCas9)、SEQ ID NO:46(对于SaCas9)或SEQ ID NO:47(SaCas9)的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19(对于SpCas9)、SEQ ID NO:50(对于SaCas9)、SEQ ID NO:51(对于SaCas9)或SEQ ID NO:52(SaCas9)的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42(对于SpCas9)、SEQ ID NO:43(对于SpCas9)、SEQ ID NO:44(对于SpCas9)、SEQ ID NO:48(对于SaCas9)或SEQ ID NO:49(SaCas9)的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20(对于SpCas9)、SEQ ID NO:21(对于SpCas9)、SEQ ID NO:22(对于SpCas9)、SEQ ID NO:53(对于SaCas9)或SEQ ID NO:54(SaCas9)的序列的DNA编码。在一些实施方案中,CEP290是人CEP290。在一些实施方案中,CEP290包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0083] 在上述实施方案的一些实施方案中,深内含子突变位于基因的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于基因的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变在基因中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

[0084] 在上述实施方案的一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas9蛋白是酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)Cas9蛋白(SEQ ID NO:40)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)Cas9蛋白(SEQ ID NO:55)、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*)Cas9蛋白或齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*)Cas9蛋白。在一些实施方案中,将Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。在一些实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,真核细胞是人类细胞。

[0085] 在上述实施方案的一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与反式激活cr(tracr)序列融合。在一些实施方案中,tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

[0086] 在上述实施方案的一些实施方案中,CRISPR-Cas系统(例如第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白)与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸和/或蛋白质的细胞摄

取的药剂复合。

[0087] 在上述实施方案的一些实施方案中,在真核细胞中表达编码第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白的核酸。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA和/或Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段(minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子(LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶(hTERT)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG)启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶(PDE)启动子、视网膜色素变性(RP1)启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因(IRBP)启动子。

[0088] 在上述实施方案的一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体与递送系统复合。在一些实施方案中,载体与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

[0089] 在上述实施方案的一些实施方案中,载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒(HSV)载体。在一些实施方案中,载体是重组腺病毒载体。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

[0090] 在一些实施方案中,载体是重组慢病毒载体。在一些实施方案中,重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

[0091] 在一些实施方案中,载体是rHSV载体。在一些实施方案中,rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

[0092] 在一些实施方案中,载体是重组AAV(rAAV)载体。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施方案中,载体是自身互补型载体。

[0093] 在一些实施方案中,载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包

含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

[0094] 在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。在一些实施方案中,重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

[0095] 在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。在一些实施方案中,重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

[0096] 在一些实施方案中,病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。在一些实施方案中,AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。在一些实施方案中,rAAV载体包含AAV2 ITR。

[0097] 在一些方面,本发明提供了用于切割细胞中的靶核酸的组合物,所述组合物包含:
a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR))-CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和b) Cas表达盒,所述表达盒包含:i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;其中所述Cas蛋白切割所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。在一些方面,本发明提供了用于治疗与个体核酸中的突变相关的疾病或疾患的组合物,所述组合物包含:a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR))-CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和b) Cas表达盒,所述表达盒包含:i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与第一引导RNA靶位点杂交;其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;其中所述Cas蛋白切割所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。在

一些方面,本发明提供了用于治疗与个体核酸中的突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述组合物包含:a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR))-CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和b) Cas表达盒,所述表达盒包含:i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与第一引导RNA靶位点杂交;其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;其中所述Cas蛋白切割所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。在一些实施方案中,所述Cas表达盒进一步包含:iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交;其中所述Cas蛋白在第一和第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas蛋白表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

[0098] 在上述组合物的一些实施方案中,第一引导RNA与第一引导RNA靶位点和第二引导RNA靶位点杂交。在一些实施方案中,第二引导RNA与第一引导RNA靶位点和第二引导RNA靶位点杂交。在一些实施方案中,第一引导RNA与第一引导RNA靶位点杂交,并且第二引导RNA与第二引导RNA靶位点杂交。在一些实施方案中,Cas表达盒进一步包含与编码Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的多腺苷酸化(polyA) 序列。在一些实施方案中,polyA序列是SV40 polyA序列。在一些实施方案中,通过Cas蛋白切割第一或第二引导RNA靶位点中断了编码Cas蛋白的核苷酸序列与polyA序列之间的可操作连接。在一些实施方案中,第一或第二引导RNA靶位点位于编码Cas蛋白的核苷酸序列与polyA序列之间。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核苷酸序列与编码一个或多个核定位信号(NLS) 的核苷酸序列可操作连接,使得从Cas表达盒表达的Cas蛋白与一个或多个NLS框内融合。在一些实施方案中,编码一个或多个NLS的核苷酸序列位于编码Cas蛋白的核苷酸序列与多腺苷酸化(polyA) 序列之间。在一些实施方案中,第一或第二引导RNA靶位点位于编码一个或多个NLS的核苷酸序列与polyA序列之间。在一些实施方案中,一个或多个NLS包含SV40大T抗原中的C端序列。在一些实施方案中,一个或多个NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。在一些实施方案中,编码CRISPR-Cas系统和/或Cas表达盒的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核苷酸序列与启动子可操作连接。在一些实施方案中,通过Cas蛋白切割第一或第二引导RNA靶位点中断了所述调控元件与编码Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接。在一些实施方案中,第一或第二引导RNA靶位点位于启动子与编码Cas蛋白的核苷酸序列之间。

[0099] 在上述组合物的一些实施方案中,所述Cas表达盒进一步包含:iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交,并且其中所述第二引导RNA靶位点邻近Cas蛋白特异的原型间隔序列毗邻基序(PAM);其中通过Cas蛋白切割第一引导RNA靶位点中断了所述调控元件与编码Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接;其中通过Cas蛋白切割第二引导RNA靶位点中断了编码Cas蛋白的核苷酸序列与polyA序列之间的可操作连接;并且其中在表达所述Cas蛋白和切割所述靶DNA序列后,所述Cas蛋白在所述第一和第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达

盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。在一些实施方案中,所述Cas表达盒进一步包含:iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交;其中所述第一引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列和与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的启动子之间;其中所述第二引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列和与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的polyA序列之间;并且其中所述Cas蛋白在所述第一和第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas蛋白表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

[0100] 在上述组合物的一些实施方案中,与深内含子突变相关的疾病或疾患为:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。在一些实施方案中,深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

[0101] 在一些方面,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) Cas蛋白,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁视网膜色素变性。在一些实施方案中,深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

[0102] 在上述组合物的一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦。在一些实施方案中,第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:45 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:46 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:47 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:50 (对于SaCas9)、SEQ ID NO:51 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:52 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:43 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:44 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:48 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:49 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:21 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:22 (对于SpCas9)、SEQ ID NO:53 (对于SaCas9) 或SEQ ID NO:54 (SaCas9) 的序列的DNA编码。在一些实施方案中,CEP290是人CEP290。在一些实施方案中,CEP290包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0103] 在上述组合物的一些实施方案中,深内含子突变位于基因的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于基因的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变在基因中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

[0104] 在上述组合物的一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9蛋白。在一些实施方案中,Cas9蛋白是酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白 (SEQ ID NO:40)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白 (SEQ ID NO:55)、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*) Cas9蛋白。在一些实施方案中,将Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。在一些实施方案中,真核细胞是哺乳动物细胞。在一些实施方案中,真核细胞是人类细胞。

[0105] 在上述组合物的一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。在一些实施方案中,tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

[0106] 在上述组合物的一些实施方案中,CRISPR-Cas系统 (例如第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白) 与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸和/或蛋白质的细胞摄取的药剂复合。

[0107] 在上述组合物的一些实施方案中,在真核细胞中表达编码第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白的核酸。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA和/或Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。在一些实施方案中,RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段 (minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子 (LSP)、E2F启动子、

EF1 α 启动子、端粒酶(hTERT)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG)启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶(PDE)启动子、视网膜色素变性(RP1)启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因(IRBP)启动子。

[0108] 在上述组合物的一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。在一些实施方案中,载体是质粒。在一些实施方案中,载体与递送系统复合。在一些实施方案中,载体与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

[0109] 在上述组合物的一些实施方案中,载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒(HSV)载体。在一些实施方案中,载体是重组腺病毒载体。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

[0110] 在一些实施方案中,载体是重组慢病毒载体。在一些实施方案中,重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

[0111] 在一些实施方案中,载体是rHSV载体。在一些实施方案中,rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

[0112] 在一些实施方案中,载体是重组AAV(rAAV)载体。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。在一些实施方案中,AAV ITR是AAV2 ITR。在一些实施方案中,载体是自身互补型载体。

[0113] 在一些实施方案中,载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

[0114] 在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。在一些实施方案中,重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

[0115] 在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。在一些

实施方案中,重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

[0116] 在一些实施方案中,病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。在一些实施方案中,AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。在一些实施方案中,rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。在一些实施方案中,AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。在一些实施方案中,rAAV载体包含AAV2 ITR。

[0117] 在本文中引证的所有参考文献,包括专利申请和出版物,均通过提述完整并入本文。

附图简述

[0118] 图1是CEP290基因中内含子c.2291+1655 A>G突变的示意图。A>G突变发生在位于内含子26内的隐蔽外显子的5'剪接位点的+5位置。CEP290外显子26至外显子27区域的外显子-内含子结构分别由框和线以及野生型(实线)和突变型(虚线)转录物的剪接模式表示。突变的核苷酸用粗体和下划线表示,并用实心星形标记。将隐蔽外显子的5'剪接位点序列与它们的剪接位点强度评分一起呈现,所述评分正如利用BDGP:通过神经网络预测剪接位点(参见,例如www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html and Reese,M.G.等人,(1997) J.Comput.Biol.4:311-323)计算的。外显子核苷酸以大写字母显示。外显子和内含子大小标注在图的下方。

[0119] 图2是显示缺失CEP290的c.2991+1655 A>G突变侧翼的内含子区域的策略的示意图。上游sgRNA指导位于内含子突变上游的第一Cas9切割,而下游sgRNA指导位于突变下游的第二Cas9切割。注意上游靶基因座可以位于隐蔽外显子的上游或隐蔽外显子内。两个切割末端通过非同源末端连接(NHEJ)过程直接连接,其中缺失c.2991+1655 A>G突变侧翼的内含子片段。在mRNA加工过程中通过RNA剪接进一步去除内含子26。

[0120] 图3A-3C显示了在不同细胞系中的mRNA(图3A和3B)和蛋白质(图3C)表达水平。图3A和3B显示了通过RT-qPCR确定的在野生型细胞(白色条)、具有对于携带c.2991+1655A>G和c.2991+1666C>G突变的染色体而言为杂合的细胞(灰色条)、以及纯合的c.2991+1655A>G和c.2991+1666C>G细胞(突变体细胞;黑色条)中的野生型(图3A)和突变型(图3B)mRNA的基础表达水平的图形。数据表示为来自三次独立转染的样品的平均值±标准偏差(n=3)。使用单因素方差分析(ANOVA)进行比较,然后进行Tukey HSD事后检验。*=p<0.05,**=p<0.01,***=p<0.001。图3C是由野生型细胞(WT)、杂合细胞(Het)和突变型细胞(MT)制备的裂解物的免疫印迹。探测膜的CEP290(顶部)和作为上样对照的β-肌动蛋白(底部)。

[0121] 图4A和4B显示了如通过PCR(图4A)和下一代测序(图4B)所确定的具有配对的sgRNA和SpCas9的靶向缺失的效率。在图4A中,使用预期缺失区之外的引物。上面的条带是从野生型CEP290的内含子26扩增的PCR产物,而下面的条带是在预期的基因组缺失之后从CEP290等位基因扩增的PCR产物(分别标记为“Wt”和“Trunc”)。M,1kb DNA梯。图4B显示了如

通过下一代测序(NGS)确定的用配对的sgRNA和SpCas9转染的突变型细胞中野生型DNA和截短DNA的百分比。

[0122] 图5A-5C显示了用配对的sgRNA和SpCas9对CEP290表达的拯救。图5A和5B显示了如通过RT-qPCR测量的用配对的sgRNA和SpCas9转染的野生型(白色条)、杂合(灰色条)和突变型(黑色条)细胞中的野生型(图5A)和突变型(图5B)mRNA的表达水平。数据表示为来自两次独立转染的样品的平均值±标准偏差($n=2$)。使用单因素方差分析(ANOVA)进行比较,然后进行Tukey HSD事后检验。 $*=p<0.05$, $**=p<0.01$ 。图5C是由配对的sgRNA和SpCas9转染的突变型细胞制备的裂解物的免疫印迹。探测膜的CEP290(顶部)和作为上样对照的 β -肌动蛋白(底部)。

[0123] 图6A-6E显示了自限性CRISPR-SpCas9系统。图6A是在自限性CRISPR-SpCas9系统中使用的pAAV-SpCas9载体的示意图。将SpCas9核酸酶的识别序列(sgRNA靶序列加上PAM基序)组入到插入位点1(在minCMV启动子和SpCas9之间)和/或插入位点2(在SpCas9-NLS和SV40 pA之间)中。NLS,核定位信号。SV40 pA,猿猴病毒40多腺苷酸化信号。图6B是从用表达U1D3 sgRNA对的第一AAV包装质粒和表达SpCas9的第二AAV包装质粒转染的突变型细胞制备的裂解物的免疫印迹。SpCas9质粒在两个插入位点中包含U1 sgRNA识别序列(U1T)和/或D3 sgRNA识别序列(D3T)。在此将仅用U1D3质粒转染的突变型细胞用作对照。探测膜的SpCas9(顶部)和作为上样对照的 β -肌动蛋白(底部)。图6C显示了如通过PCR确定的用U1D3 sgRNA对和自限性SpCas9转染突变型细胞之后的靶向缺失。上面的条带是从野生型CEP290的内含子26扩增的PCR产物,而下面的条带是在U1 sgRNA和D3 sgRNA引导的基因组缺失之后从CEP290等位基因扩增的PCR产物。M,1kb DNA梯。图6D和6E显示了如通过RT-qPCR测量的在用U1D3 sgRNA对和自限性SpCas9转染的突变型细胞中野生型(图6D)和突变型(图6E)mRNA的表达水平。数据表示为来自三次独立转染的样品的平均值±标准偏差($n=3$)。使用单因素方差分析(ANOVA)进行比较,然后进行Tukey HSD事后检验。 $*=p<0.05$, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$,与仅用U1D3 sgRNA对转染的细胞相比。

[0124] 图7A和7B显示了借助于双重AAV系统的在鼠视网膜中Cep290基因的内含子25中的区域的缺失。图7A是在视网膜下注射中使用的双重AAV的示意图。图7B显示了如通过PCR确定的利用(1)AAV5-RK-EGFP(对照)或AAV5-U11D11 sgRNA对-RK-EGFP和(2)AAV5-SpCas9的靶向缺失。上面的条带是从野生型小鼠Cep290内含子25扩增的PCR产物,而下面的条带是在U11 sgRNA和D11 sgRNA引导的基因组缺失之后从Cep290等位基因扩增的PCR产物。M,1kb DNA梯。

[0125] 图8A-8C显示了如通过PCR(图8A)和通过RT-qPCR(图8B和8C)确定的利用金黄色葡萄球菌Cas9(SaCas9)和SpCas9的靶向缺失。用配对的sgRNA对与SaCas9或SpCas9一起转染突变型细胞。请注意配对的sgRNA和SaCas9在一个AAV包装质粒中,而配对的sgRNA和SpCas9在两个独立的AAV包装质粒中。在图8A中,上面的条带是从野生型CEP290的内含子26扩增的PCR产物,而下面的条带是在预期的基因组缺失之后从CEP290等位基因扩增的PCR产物(分别标记为“Wt”和“Trunc”)。M,1kb DNA梯。图8A和8B显示了如通过RT-qPCR测量的在用配对的sgRNA与SaCas9(白色条)或SpCas9(灰色条)一起转染的突变型细胞中野生型(图8A)和突变型(图8B)mRNA的表达水平。数据表示为来自三次独立转染的样品的平均值±标准偏差($n=3$)。使用单因素方差分析(ANOVA)进行比较,然后进行Tukey HSD事后检验。 $*=p<0.05$, $**$

= $p < 0.01$, ***= $p < 0.001$ 。#= $p < 0.05$, 与仅用SaCas9转染的突变型细胞相比。

发明详述

[0126] 本发明提供了用于编辑深内含子突变的组合物、方法和病毒颗粒。在一些实施方案中,用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)—CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 系统,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) Cas蛋白,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。在其他实施方案中,用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)—CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

[0127] 在一些方面,本发明提供了用于治疗眼部疾病的组合物、方法和病毒颗粒。如上所述,LCA最常见的遗传原因是CEP290基因的内含子26中的深内含子突变c.2991+1655A>G,其产生导致包含异常外显子的隐蔽的剪接供体位点,所述异常外显子含有针对CEP290 mRNA的提前终止密码子(p.C998X) (图1)。本发明人设计了一种简单而有效的用于治疗在CEP290基因中包含内含子c.2991+1655 A>G突变的LCA患者的方法,所述方法为:通过一对单引导RNA (sgRNA) 以及成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR) 和CRISPR相关蛋白(Cas) 系统进行人细胞中的靶向基因组DNA缺失(图2)。该方法使内含子c.2991+1655 A>G突变有效且永久地缺失,从而阻止了插入CEP290 mRNA中的隐蔽外显子的剪接,同时使内源基因调控元件保持完整。

I. 一般技术

[0128] 本文中描述或引用的技术和程序通常为本领域技术人员熟知并通过使用常规方法学普遍采用,所述方法学例如在下列文献中描述的广泛使用的方法学:Molecular Cloning:A Laboratory Manual (Sambrook等人,4th ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,2012);Current Protocols in Molecular Biology (F.M.Ausubel等人编辑,2003);the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.);PCR 2:A Practical Approach (M.J.MacPherson,B.D.Hames和G.R.Taylor编辑,1995);Antibodies,A Laboratory Manual (Harlow和Lane编辑,1988);Culture of Animal Cells:A Manual of Basic Technique and Specialized Applications (R.I.Freshney, 6th ed.,J.Wiley and Sons,2010);Oligonucleotide Synthesis (M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press;Cell Biology:A Laboratory Notebook (J.E.Cellis编辑,Academic Press,1998);Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P.Mather和P.E.Roberts,Plenum Press,1998);Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures (A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,J.Wiley and Sons,1993-8);Handbook of Experimental Immunology (D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑,1996);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.Miller和M.P.Calos编辑,

1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction, (Mullis等人编辑,1994);Current Protocols in Immunology (J.E.Coligan等人编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology (Ausubel等人编辑,J.Wiley and Sons,2002);Immunobiology (C.A.Janeway等人,2004);Antibodies (P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach (D.Catty.编辑,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach (P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual (E.Harlow和D.Lane,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies (M.Zanetti和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers,1995);和Cancer:Principles and Practice of Oncology (V.T.DeVita等人编辑,J.B.Lippincott Company,2011)。

II. 定义

[0129] 如本文中使用的,“CRISPR-Cas”是指具有引导RNA和Cas核酸内切酶的双组分核糖核蛋白复合物。CRISPR是指成簇规律间隔短回文重复序列II型系统。虽然CRISPR被发现为使细菌和古细菌能够察觉和沉默外来核酸(例如来自病毒或质粒)的适应性防御系统,但是其已经被改造用于多种细胞类型以允许序列特异性方式的多核苷酸编辑(参见,例如, Jinek,M.等人,(2012) Science 337:816-821和Ran,F.A.等人(2013) Nat. Protoc. 8:2281-2308)。在II型系统中,引导RNA与Cas相互作用并使Cas酶的核酸酶活性针对与RNA引导序列相同的靶DNA序列。用靶序列的相反链引导RNA碱基对。然后,Cas核酸酶活性在靶DNA中产生双链断裂。在一些实施方案中,Cas蛋白是Cas9蛋白。

[0130] 如本文中使用的,“CRISPR-Cas单引导RNA”(术语“单引导RNA”和“sgRNA”在本文中可互换使用)是指能够指导Cas介导的靶DNA切割的单一RNA种类。在一些实施方案中,单引导RNA可含有对于Cas(例如,Cas9)核酸酶活性所必需的序列和与感兴趣的靶DNA相同的引导序列。

[0131] 术语“嵌合RNA”、“嵌合引导RNA”、“引导RNA”、“单引导RNA”和“合成的引导RNA”在本文中可互换使用,并且指包括引导序列、tracr序列和tracr配对序列的多核苷酸序列。如本文中使用的术语“引导序列”是指引导RNA内的指定靶位点的约20bp序列,并且可以与术语“引导”或“间隔序列”或“原型间隔序列”互换使用。术语“tracr配对序列”也可以与术语“同向重复序列”互换使用。

[0132] 如本文中使用的,“sgRNA引导序列”可指与靶DNA序列的相反链结合并将Cas(例如Cas9)核酸酶活性导向至该基因座的sgRNA的核苷酸序列。在一些实施方案中,sgRNA引导序列与靶序列相同。不一定需要完全的同源性,条件是其相似性足以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成。引导序列可以包含任何多核苷酸,如DNA或RNA多核苷酸。

[0133] 如本文中使用的,“Cas”多肽是与引导RNA(例如sgRNA)复合时起核酸酶作用的多肽。在一些实施方案中,Cas多肽是Cas9多肽(CRISPR相关9,也称为Csn1)。当与crRNA: tracrRNA引导或单一引导RNA结合时,Cas多肽(例如Cas9)能够在与sgRNA引导序列相同并且与PAM基序相邻的序列处切割靶DNA。与其他Cas多肽不同,Cas9多肽是II型CRISPR-Cas系统的特征(关于不同CRISPR-Cas系统的Cas蛋白的描述,参见Makarova,K.S.等人,(2011) Nat. Rev. Microbiol. 9 (6):467-77)。如本文中使用的,除非另有说明,否则“Cas”可指核糖核蛋白复合物,其具有sgRNA或所述复合物的多肽组分。

[0134] 如本文中使用的术语“CRISPR RNA (crRNA)”是指包含CRISPR-Cas系统所使用的引导序列的RNA,以指导针对靶DNA序列的切割。如本文中使用的术语“反式激活crRNA (tracrRNA)”是指包含形成CRISPR-Cas效应复合物所需的结构的序列的RNA,所述效应复合物介导DNA切割。在内源性细菌和古细菌II型CRISPR-Cas系统中,效应CRISPR-Cas复合物包括与两个多核糖核苷酸分子:crRNA和tracrRNA复合的Cas蛋白(例如Cas9蛋白)。crRNA含有介导靶识别的约20个核苷酸的引导序列和与tracrRNA形成双链体的序列。crRNA:tracrRNA双链体结合Cas蛋白并且是CRISPR-Cas效应复合物功能所需要的。在一些实施方案中,crRNA和tracrRNA功能可以通过单一RNA(单一引导RNA或sgRNA)进行,所述单一RNA含有介导靶识别的序列和产生CRISPR-Cas效应复合物所需的结构的序列。

[0135] 如本文中使用的术语“深内含子突变”是指在野生型剪接受体和剪接供体序列之外的区域处的内含子序列内的突变。在一些情况下,深内含子突变可能导致相关基因的剪接改变,例如在成熟mRNA中包含内含子序列。在非限制性实例中,深内含子突变在外显子下游(即3')大于约100bp处,在外显子上游(即5')大于约100bp处,或在第一外显子下游大于约100bp处并且在第二外显子上游大于约100bp处。

[0136] 如本文中使用的,术语“莱伯先天性黑朦 (LCA)”是指以视力丧失、视网膜功能障碍和眼球震颤为特征的一组早发性疾病。多种突变与LCA有关,但LCA通常以常染色体隐性遗传病方式遗传。关于更多描述以及示例性LCA疾病基因和基因座,参见例如OMIM Entry 204000。

[0137] 如本文中使用的术语“CEP290”是指编码参与纤毛发生的中心体蛋白的基因,也称为MKS4、CT87、POC3、rd16、BBS14、LCA10、JBTS5、NPHP6、SLSN6、和3H11Ag。CEP290的突变与LCA有关。这种突变的一个例子是c.2991+1655A>G突变,其引入了隐蔽的剪接供体位点,导致包含具有提前终止密码子的异常外显子。关于示例性的人类基因和蛋白质序列,分别参见例如NCBI基因ID号80184和UniProt ID号015078。CEP290基因的其他实例包括但不限于小鼠CEP290(例如,NCBI基因ID号216274)、大鼠CEP290(例如,NCBI基因ID号314787)、恒河猴CEP290(例如,NCBI基因ID号708286)、斑马鱼CEP290(例如,NCBI基因ID号560588)、狗CEP290(例如,NCBI基因ID号482591)、黑猩猩CEP290(例如,NCBI基因ID号452113)、猫CEP290(例如,NCBI基因ID号100113471)、鸡CEP290(例如,NCBI基因ID号417887)和牛CEP290(例如,NCBI基因ID号282707)。在一些实施方案中,CEP290基因包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0138] 如本文中使用的,“载体”是指包含将被体外或体内递送到宿主细胞中的核酸的重组质粒或病毒。

[0139] 如本文中使用的术语“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸的聚合形式:核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。因此,该术语包括但不限于单链、双链或多链DNA或RNA,基因组DNA、cDNA、DNA-RNA杂交体,或包含嘌呤和嘧啶碱基或其他天然的、化学修饰的或生物化学修饰的、非天然的或衍生化的核苷酸碱基的聚合物。多核苷酸主链可以包含糖和磷酸基团(如通常可见于RNA或DNA中)或修饰或取代的糖或磷酸基团。或者,多核苷酸主链可以包含合成亚基例如氨基磷酸酯的聚合物,因此可以是寡脱氧核苷氨基磷酸酯(P-NH₂)或混合的氨基磷酸酯-磷酸二酯寡聚物。另外,通过合成互补链并在适当条件下将链退火,或者通过使用DNA聚合酶以适当的引物从头(de novo)合成互补链,可以从化学合成的单链多核苷

酸产物获得双链多核苷酸。

[0140] 术语“多肽”和“蛋白质”可互换使用,是指氨基酸残基的聚合物,并且不限于最小长度。这种氨基酸残基聚合物可以含有天然或非天然氨基酸残基,并且包括但不限于含有氨基酸残基的肽、寡肽、二聚体、三聚体和多聚体。全长蛋白质及其片段都包含在定义中。这些术语还包括多肽的表达后修饰,例如糖基化、唾液酸化、乙酰化、磷酸化,等等。此外,出于本发明的目的,“多肽”是指包括针对天然序列的修饰,例如缺失、添加和取代(通常在性质上保守)的蛋白质,只要该蛋白质保持期望的活性即可。这些修饰可以是有意的,比如通过定点诱变,或者可以是偶然的,比如通过产生蛋白质的宿主的突变或由于PCR扩增引起的错误。

[0141] “重组病毒载体”是指包含一个或多个异源序列(即,不是病毒来源的核酸序列)的重组多核苷酸载体。在重组AAV载体的情况下,重组核酸侧接至少一个反向末端重复序列(ITR)。在一些实施方案中,重组核酸侧接两个ITR。

[0142] “重组AAV载体(rAAV载体)”是指包含侧接有至少一个AAV反向末端重复序列(ITR)的一个或多个异源序列(即,不是AAV来源的核酸序列)的多核苷酸载体。当存在于已经用适合的辅助病毒感染(或表达适合的辅助功能)并表达AAV rep和cap基因产物(即AAV Rep和Cap蛋白)的宿主细胞中时,这种rAAV载体可以被复制并包装在感染性病毒颗粒中。当将rAAV载体整合到更大的多核苷酸中时(例如,在染色体中或在用于克隆或转染的质粒等另一种载体中)时,则所述rAAV载体可以被称为“原载体(pro-vector)”,其可以在AAV包装功能和适合的辅助功能的存在下通过复制和衣壳化获得“拯救”。rAAV载体可以是多种形式中的任何一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合的、包封在脂质体内的、以及被衣壳包装在病毒颗粒(例如AAV颗粒)中的。可以将rAAV载体包装到AAV病毒衣壳中以生成“重组腺相关病毒颗粒(rAAV颗粒)”。

[0143] “rAAV病毒”或“rAAV病毒颗粒”是指由至少一种AAV衣壳蛋白和壳体化的rAAV载体基因组组成的病毒颗粒。

[0144] “重组腺病毒载体”是指包含侧接有至少一个AAV反向末端重复序列(ITR)的一个或多个异源序列(即,不是腺病毒来源的核酸序列)的多核苷酸载体。在一些实施方案中,重组核酸侧接两个反向末端重复序列(ITR)。当存在于正在表达从重组病毒基因组中缺失的必需腺病毒基因(例如,E1基因、E2基因、E4基因等)的宿主细胞中时,这样的重组病毒载体可以被复制并包装到感染性病毒颗粒中。当将重组病毒载体整合到更大的多核苷酸中时(例如,在染色体中或在用于克隆或转染的质粒等另一种载体中)时,则所述重组病毒载体可以被称为“原载体(pro-vector)”,其可以在腺病毒包装功能的存在下通过复制和衣壳化获得“拯救”。重组病毒载体可以是多种形式中的任何一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合的、包封在脂质体内的、以及被衣壳包装在病毒颗粒(例如腺病毒颗粒)中的。可将重组病毒载体包装到腺病毒衣壳中以生成“重组腺病毒颗粒”。

[0145] “重组慢病毒载体”是指包含侧接有至少一个慢病毒末端重复序列(LTR)的一个或多个异源序列(即,不是慢病毒来源的核酸序列)的多核苷酸载体。在一些实施方案中,重组核酸侧接两个慢病毒末端重复序列(LTR)。当存在于已经被适合的辅助功能感染的宿主细胞中时,这样的重组病毒载体可以被复制并包装到感染性病毒颗粒中。可以将重组慢病毒载体包装到慢病毒衣壳中以生成“重组慢病毒颗粒”。

[0146] “重组单纯疱疹病毒载体(重组HSV载体)”是指包含侧接有HSV末端重复序列的一个或多个异源序列(即,不是HSV来源的核酸序列)的多核苷酸载体。当存在于已经被适合的辅助功能感染的宿主细胞中时,这样的重组病毒载体可以被复制并包装到感染性病毒颗粒中。当将重组病毒载体整合到更大的多核苷酸中时(例如,在染色体中或在用于克隆或转染的质粒等另一种载体中)时,则所述重组病毒载体可以被称为“原载体(pro-vector)”,其可以在HSV包装功能的存在下通过复制和衣壳化获得“拯救”。重组病毒载体可以是多种形式中的任何一种,包括但不限于质粒、线性人工染色体、与脂质复合的、包封在脂质体内的、以及被衣壳包装在病毒颗粒(例如HSV颗粒)中的。可将重组病毒载体包装到HSV衣壳中以生成“重组单纯疱疹病毒颗粒”。

[0147] “异源”意指源自与跟其进行比较的其余实体或者其所引入或组入其中的其余实体在基因型上不同的实体。例如,通过基因工程技术引入不同细胞类型中的多核苷酸是异源多核苷酸(并且,在表达时,能够编码异源多肽)。类似地,组入病毒载体中的细胞序列(例如,基因或其部分)相对于载体是异源核苷酸序列。

[0148] 术语“转基因”是指被引入细胞并且能够被转录成RNA并任选地在适当条件下翻译和/或表达的多核苷酸。在一些方面,它向其所引入的细胞赋予期望的性质,或另外导致期望的治疗或诊断结果。另一方面,可将其转录成介导RNA干扰的分子,如miRNA、siRNA或shRNA。

[0149] 如涉及病毒滴度所使用的术语“基因组颗粒(gp)”、“基因组等同物”或“基因组拷贝”是指含有重组AAV DNA基因组的病毒体(virion)的数目,而不论感染力或功能性如何。能够通过例如本文实施例中或例如在Clark等人,(1999) Hum. Gene Ther., 10:1031-1039; Veldwijk等人,(2002) Mol. Ther., 6:272-278中描述的程序来测量特定载体制剂中的基因组颗粒数。

[0150] 如本文中使用的术语“载体基因组(vg)”可以指包含载体例如病毒载体的一组多核苷酸序列的一个或多个多核苷酸。载体基因组可以被衣壳包装在病毒颗粒中。取决于具体的病毒载体,载体基因组可以包含单链DNA、双链DNA或单链RNA或双链RNA。载体基因组可以包括与特定病毒载体相关的内源序列和/或通过重组技术插入特定病毒载体的任何异源序列。例如,重组AAV载体基因组可以包括侧接启动子、填充物(stuffer)、感兴趣序列(例如RNAi)和多腺苷酸化序列的至少一个ITR序列。完整的载体基因组可以包括载体的一组完整的多核苷酸序列。在一些实施方案中,病毒载体的核酸滴度可以测量为vg/mL的形式。适合于测量该滴度的方法是本领域已知的(例如定量PCR)。

[0151] 如涉及病毒滴度所使用的术语“感染单位(iu)”、“感染性颗粒”或“复制单位”是指如通过感染中心测定法(也称为复制中心测定法)测量的感染性的具有复制能力的重组AAV载体颗粒的数目,正如例如在McLaughlin等人,(1988) J. Virol., 62:1963-1973中所述。

[0152] 如涉及病毒滴度所使用的术语“转导单位(tu)”是指导致产生功能性转基因产物的感染性重组AAV载体颗粒的数目,正如例如描述于本文实施例中的功能测定法或例如在Xiao等人(1997), xp. Neurobiol., 144:113-124;或在Fisher等人,(1996) J. Virol., 70:520-532 (LFU测定法)中所测量的。

[0153] “反向末端重复序列”或“ITR”序列是本领域熟知的术语,并且是指病毒基因组末端存在的取向相反的相对较短的序列。

[0154] 本领域熟知的术语“AAV反向末端重复序列 (ITR)”是大约145个核苷酸的序列,其存在于天然单链AAV基因组的两个末端。ITR的最外侧的125个核苷酸可以以两种可选取向中的任一种存在,导致不同AAV基因组之间以及单个AAV基因组两端之间的异质性。最外侧的125个核苷酸还含有几个较短的自身互补区(指定为A、A'、B、B'、C、C'和D区),从而允许在ITR的这个部分内发生链内碱基配对。

[0155] “末端解析序列”或“trs”是在病毒DNA复制过程中被AAV rep蛋白切割的AAV ITR的D区中的序列。突变的末端解析序列难以受到AAV rep蛋白的切割。

[0156] 用于AAV的“辅助病毒”是指允许AAV(其为缺陷型细小病毒)通过宿主细胞复制并且包装的病毒。已经鉴定了多种这样的辅助病毒,包括腺病毒、疱疹病毒和痘病毒,如牛痘。腺病毒涵盖多个不同的亚组,不过亚组C的腺病毒5型(Ad5)最常使用。多种人、非人哺乳动物和鸟类来源的腺病毒是已知的,并且可从保藏中心如ATCC获得。也可从保藏中心如ATCC获得的疱疹病毒科的病毒包括例如单纯疱疹病毒(HSV)、EB病毒(Epstein-Barr viruse (EBV))、巨细胞病毒(CMV)和伪狂犬病病毒(PRV)。

[0157] 相对于参考多肽或核酸序列的“序列同一性百分比(%)”定义为在序列比对和引入空位(如果需要的话,达到最大序列同一性百分比,并且不考虑作为序列同一性的一部分的任何保守取代)之后候选序列中与参考多肽或核酸序列中的氨基酸残基或核苷酸相同的氨基酸残基或核苷酸的百分比。可以多种方式实现为了确定氨基酸或核酸序列同一性的比对,这些方式是本领域内的技术,例如,使用可公开获得的计算机软件程序,例如,描述于Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel等人编辑,1987),增刊30,7.7.18节,表7.7.1中的,并且包括BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。比对程序的例子是ALIGN Plus(Scientific and Educational Software,Pennsylvania)。本领域技术人员可确定测量比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需要的任何算法。为本文的目的,如下计算给定氨基酸序列A相对于(与或针对)给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性%(或者可表述为给定氨基酸序列A相对于(与或针对)给定氨基酸序列B具有或包含一定的氨基酸序列同一性%): $100 \times \frac{X}{Y}$,其中X为在A与B的序列比对程序的比对中通过该程序评定为相同匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y为B中的氨基酸残基的总数。应当理解的是,在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下,A相对于B的氨基酸序列同一性%不会等于B相对于A的氨基酸序列同一性%。为本文的目的,如下计算给定核酸序列C相对于(与或针对)给定核酸序列D的核酸序列同一性%(或者可表述为给定核酸序列C相对于(与或针对)给定核酸序列D具有或包含一定的核酸序列同一性%): $100 \times \frac{W}{Z}$,其中W为在C与D的序列比对程序的比对中通过该程序评定为相同匹配的核苷酸的数目,且其中Z为D中的核苷酸的总数。应当理解的是,在核酸序列C的长度不等于核酸序列D的长度的情况下,C相对于D的核酸序列同一性%不会等于D相对于的核酸序列同一性%。

[0158] “分离的”分子(例如,核酸或蛋白质)或细胞意指其已经从其天然环境的组分中鉴定和分离和/或回收。

[0159] “有效量”是足以实现有益的或期望的结果的量,所述结果包括临床结果(例如,症状的缓解,临床终点的实现,等等)。可按一次或多次给药的形式给予有效量。就疾病状态而言,有效量是足以使疾病改善、稳定或延迟其发展的量。

[0160] “个体”或“受试者”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养动物(例如,母牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类动物(例如,人类和非人灵长类动物如猴)、兔、和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,所述个体或受试者是人。

[0161] 如本文中使用的,“治疗”是用于获得有益或期望的临床结果的途径。出于本发明的目的,有益或期望的临床结果包括但不限于:症状的减轻、疾病程度的降低、疾病状态的稳定化(例如,未恶化)、阻止疾病扩散(例如转移)、延迟或减缓疾病进展、疾病状态的改善或减轻、以及缓解(不管是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的。如果没有接受治疗,“治疗”也可能意味着相比于预期生存的生存期延长。

[0162] 如本文中使用的,术语“预防性治疗”是指这样的治疗,其中个体已知或疑似患有疾患或处于患该疾患的风险,但没有表现出疾患的症状或表现出轻微症状。对于经受预防性治疗的个体,可以在症状发作之前进行治疗。

[0163] 如本文中使用的,“治疗性”药剂(例如,治疗性多肽、核酸或转基因)是提供有益的或期望的临床结果(例如上述示例性临床结果)的药剂。正因为如此,治疗剂可以用于如上所述的治疗。

[0164] 如本文中使用的术语“中央视网膜”是指外黄斑和/或内黄斑和/或中央凹(fovea)。如本文中使用的术语“中央视网膜细胞类型”是指中央视网膜的细胞类型,例如像RPE和感光细胞。

[0165] 术语“黄斑”是指灵长类动物中央视网膜的区域,其与周围视网膜相比,含有较高相对浓度的感光细胞,特别是视杆细胞和视锥细胞。如本文中使用的术语“外黄斑”也可以被称为“周围黄斑”。如本文中使用的术语“内黄斑”也可以被称为“中央黄斑”。

[0166] 术语“中央凹”是指灵长类动物中央视网膜中的小于约0.5mm直径的小区域,其与周围视网膜和黄斑相比含有较高相对浓度的感光细胞,特别是视锥细胞。

[0167] 如本文中使用的术语“视网膜下腔”是指在感光细胞和视网膜色素上皮细胞之间的视网膜中的位置。如在任何视网膜下注射流体之前,视网膜下腔可以是潜在的空间。视网膜下腔也可以含有注入该潜在的空间中的流体。在这种情况下,流体“与视网膜下腔接触”。“与视网膜下腔接触”的细胞包括在视网膜下腔边界的细胞,如RPE和感光细胞。

[0168] 如本文中使用的术语“泡”是指眼睛视网膜下腔内的流体空间。本发明的泡可如下产生:通过将流体单次注入单个空间,通过将一种或多种流体多次注入同一个空间,或通过多次注入多个空间,当所述流体重新定位时产生总流体空间,这对于实现在视网膜下腔的期望部分上的治疗效果是有用的。

[0169] 在本文中提及的“大约”值或参数包括(并描述)针对该值或参数本身的实施方案。例如,提及“大约X”的描述包括“X”的描述。

[0170] 如本文中使用的,单数形式的冠词“一个(种)(a)”、“一个(种)(an)”、以及“该”包括复数个指示物,除非另外指明。

[0171] 应当理解的是,在本文中描述的本发明的方面和实施方案包括“包含”、“由...组成”和/或“基本上由...组成”的方面和实施方案。

III. CRISPR-Cas

[0172] 本公开的某些方面涉及工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)-CRISPR相关(Cas)(CRISPR-Cas)系统。这些系统尤其可用于治疗与个体基因中的

深内含子突变相关的疾病或疾患,例如与深内含子突变相关的眼部疾病或疾患。在一些实施方案中,所述CRISPR-Cas系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和编码Cas蛋白的核苷酸序列,其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

[0173] 如上所述,CRISPR-Cas系统最初是作为针对细菌和古细菌中的外来核酸的适应性防御而被发现的。实际上,已经在40种以上的原核生物中鉴定出CRISPR基因座(参见,例如,Jansen,R.等人,(2002) *Mol. Microbiol.* 43:1565-1575和Mojica,F.J.等人,(2005) *J. Mol. Evol.* 60:174-182),包括但不限于:气火菌属(*Aeropyrum*)、热棒菌属(*Pyrobaculum*)、硫化叶菌属(*Sulfolobus*)、古球菌属(*Archaeoglobus*)、盐盒菌属(*Halocarcula*)、甲烷杆菌属(*Methanobacterium*)、甲烷球菌属(*Methanococcus*)、甲烷八叠球菌属(*Methanosarcina*)、甲烷火菌属(*Methanopyrus*)、焦球菌属(*Pyrococcus*)、嗜酸菌属(*Picrophilus*)、热原体属(*Thermoplasma*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、产水菌属(*Aquifex*)、紫单胞菌属(*Porphyromonas*)、绿菌属(*Chlorobium*)、栖热菌属(*Thermus*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、利斯特菌属(*Listeria*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、梭菌属(*Clostridium*)、好热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacter*)、支原体属(*Mycoplasma*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)、固氮弓菌属(*Azarcus*)、色杆菌属(*Chromobacterium*)、奈瑟氏菌属(*Neisseria*)、亚硝化单胞菌属(*Nitrosomonas*)、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、地杆菌属(*Geobacter*)、粘球菌属(*Myrococcus*)、弯曲杆菌属(*Campylobacter*)、类杆菌属(*Wolinella*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、欧文菌属(*Erwinia*)、埃希菌属(*Escherichia*)、军团菌属(*Legionella*)、甲基球菌属(*Methylococcus*)、巴斯德菌属(*Pasteurella*)、发光细菌属(*Photobacterium*)、沙门菌属(*Salmonella*)、黄单胞菌属(*Xanthomonas*)、耶尔森菌属(*Yersinia*)、密螺旋体属(*Treponema*)、和栖热袍菌属(*Thermotoga*)。

[0174] 在细菌中,Cas(例如Cas9)蛋白与两种不同的引导RNA结合:CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA)。crRNA和tracrRNA核糖核苷酸碱基配对并形成Cas介导的靶DNA切割所需的结构。然而,最近已经证明,单个引导RNA(sgRNA)可以被工程改造而形成crRNA:tracrRNA结构并且指导Cas介导的靶DNA切割(Jinek,M.,等人,(2012) *Science* 337(6096):816-21)。由于Cas核酸酶活性的特异性由引导RNA决定,所以CRISPR-Cas系统已经被用作指导异源细胞中双链DNA断裂的工具,使可定制的基因组编辑成为可能(Mali,P.,等人,(2013) *Science* 339(6121):823-6)。示例性CRISPR-Cas系统和与其相关的使用方法的进一步描述可以特别地在美国专利No.8,697,359中找到。在一些实施方案中,如本文所述的引导RNA(例如第一或第二引导RNA)包括单一引导RNA(sgRNA),其包括CRISPR RNA(crRNA)和反式激活crRNA(tracrRNA)。在一些实施方案中,如本文所述的引导RNA(例如第一或第二引导RNA)与反式激活cr(tracr)序列融合。在一些实施方案中,所述反式激活cr(tracr)序列包含SEQ ID NO:25的序列。

[0175] 正因为如此,由于许多原因,本文所述的CRISPR-Cas系统可与天然存在的CRISPR-Cas系统形成对比。例如,本公开的CRISPR-Cas系统尤其可以包括与非天然序列(例如真核生物内含子)杂交的一个或多个引导RNA。天然存在的CRISPR-Cas系统识别细菌和古细菌通

常接触的序列,如质粒或噬菌体序列。而且,本公开的许多CRISPR-Cas系统包括单一引导RNA,而天然存在的CRISPR-Cas系统通常涉及单独的CRISPR RNA (crRNA) 和反式激活crRNA (tracrRNA)。

[0176] 在一些实施方案中,本文所述的CRISPR-Cas系统可以是自限性的。例如,如下文所述,CRISPR-Cas系统可以包括与系统本身内的靶序列杂交的一个或多个引导RNA,所述靶序列例如其切割影响系统组分例如Cas蛋白的表达水平的序列。不希望受理论的束缚,人们认为由于CRISPR-Cas系统不必在宿主细胞中持续表达,因此将该系统设计为“自限性的”(例如以持续性和/或表达降低为特征)可能是有利的,例如,用于减少脱靶效应,减少不需要的免疫应答的可能性和/或安全问题等等。

[0177] 在自限性CRISPR-Cas系统中,CRISPR-Cas复合物靶向载体中的一个或多个位点,所述载体用于表达复合物自身的一种或多种组分。因此,在表达引导RNA和Cas蛋白时,CRISPR-Cas系统靶向感兴趣的基因座(例如,如本文所述的突变位点)以及Cas载体中的一个或多个靶标,最终导致Cas载体的切割和Cas蛋白表达的降低或消除(在感兴趣的基因座处切割之后)。下文实施例3表明,这种自限性CRISPR-Cas系统的特征在于减少了Cas持续时间,同时仍然允许在感兴趣的靶序列处的有效切割(例如,深内含子突变的切除)。

[0178] 本公开的某些方面涉及使用自限性CRISPR-Cas系统治疗与个体基因中的突变相关的疾病或疾患的方法。例如,突变可以通过CRISPR-Cas系统从个体基因切除的不需要的序列(例如,深内含子突变)。在其他实施方案中,突变可以通过CRISPR-Cas系统校正的错义突变、点突变或其他突变(例如,在切割的DNA序列处的同源DNA修复,特别是如果包括同源性模板的话)。在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统在组合物中。在一些实施方案中,以治疗有效量向个体施用所述组合物。

[0179] 在一些实施方案中,所述组合物包括a) 编码包含第一引导RNA和第二引导RNA的CRISPR-Cas系统的核酸,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与感兴趣的突变(包括但不限于本文所述的深内含子突变)侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和b) Cas表达盒。在一些实施方案中,Cas表达盒包括编码Cas蛋白的核苷酸序列和引导RNA靶位点。所述第一或第二引导RNA与所述引导RNA靶位点杂交,从而允许CRISPR-Cas系统催化在引导RNA靶位点处的切割。引导RNA靶位点还可以包括对Cas蛋白特异的与杂交至引导RNA的序列相邻的原型间隔序列毗邻基序(PAM)。在表达Cas蛋白后,Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分。在表达Cas蛋白后,Cas蛋白也在引导RNA靶位点处切割Cas表达盒,从而降低Cas蛋白的表达。正因为如此,在Cas表达盒引入细胞后,Cas表达盒最初增加,但是随着Cas蛋白在细胞中积累,Cas蛋白切割Cas表达盒。当更多的Cas表达盒被Cas蛋白中断时,另外的Cas蛋白的表达被降低(即,Cas限制其自身表达盒的表达并且可以被认为是自限性Cas表达盒)。在一些实施方案中,Cas蛋白的表达以最初增加为特征,随后是在引导RNA靶位点处切割后的表达下降。如本文所述,降低Cas蛋白的表达可以指降低Cas蛋白的量和/或持续性。在一些实施方案中,与切割Cas表达盒之前相比,Cas蛋白的表达可以被降低(例如,与Cas的最初表达相比)。在一些实施方案中,与使用缺乏引导RNA靶位点的Cas表达盒相比,Cas蛋白的表达可以被降低。在一些实施方案中,可以使用包含自限性Cas表达盒的组合物来切割靶核酸。在一些实施方案中,可以使用组合物在体外或体内切割靶核酸。在一些实施方案中,可以使用组合物切割包含突变(例如深内含子突变)的靶核酸。例

如,使用自限性Cas表达盒来治疗与核酸中的突变相关的疾病或疾患。

[0180] 在一些实施方案中,Cas表达盒进一步包括第二引导RNA靶位点,其中第一引导RNA或第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交,并且其中所述第二引导RNA靶位点邻近对Cas蛋白特异的原型间隔序列毗邻基序(PAM)。在表达Cas蛋白后,Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分。此外,在表达Cas蛋白后,Cas蛋白在两个引导RNA靶位点处切割Cas表达盒,从而降低Cas蛋白的表达。如下例示,一个引导RNA可以与两个引导RNA靶位点杂交;第一引导RNA可以与第一引导RNA靶位点杂交,并且第二引导RNA可以与第二引导RNA靶位点杂交;或者第二引导RNA可以与第一引导RNA靶位点杂交,并且第一引导RNA可以与第二引导RNA靶位点杂交。

[0181] 在一些实施方案中,Cas表达盒可以包括对于指导/促进Cas蛋白的表达有用的一个或多个启动子、增强子、内含子、多腺苷酸化(polyA)序列、终止子、存在于5'或3'非翻译区中的调控元件等等。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核苷酸序列可以与启动子可操作连接。在一些实施方案中,引导RNA靶位点可位于启动子和编码Cas蛋白的核苷酸序列之间,导致Cas蛋白在切割后表达减少。在一些实施方案中,通过切割启动子和编码Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接来减少Cas蛋白的表达。在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核苷酸序列可以与polyA序列可操作连接。在一些实施方案中,引导RNA靶位点可位于polyA序列和编码Cas蛋白的核苷酸序列之间,导致Cas蛋白在切割后表达减少。在一些实施方案中,通过切割编码Cas蛋白的核苷酸序列与多腺苷酸化序列之间的可操作连接来减少Cas蛋白的表达。在一些实施方案中,第一引导RNA靶位点可以位于启动子和编码Cas蛋白的核苷酸序列之间,并且第二引导RNA靶位点可以位于polyA序列和编码Cas蛋白的核苷酸序列之间,导致Cas蛋白在切割后表达减少。在一些实施方案中,可将Cas蛋白与一个或多个NLS框内融合,并且引导RNA靶位点可位于编码一个或多个NLS的序列与polyA序列之间(特别是如果NLS(一个或多个)与Cas蛋白的C端融合的话),导致切割后NLS融合的Cas蛋白的表达减少。

[0182] 如本文所述,诸如自限性CRISPR-Cas系统的CRISPR-Cas系统可以被编码在一个或多个载体上,例如本文所述的任何载体或病毒载体/颗粒。在一些实施方案中,编码第一和第二引导RNA的核酸可以与Cas表达盒处于同一个载体上。在其他实施方案中,编码第一和第二引导RNA的核酸可以与Cas表达盒处于不同的载体上。例如,第一和第二引导RNA可以由第一rAAV载体编码,而Cas表达盒可以由第二rAAV载体编码。在一些实施方案中,可用两种载体转染靶细胞,从而导致自限性CRISPR-Cas系统的表达。

[0183] 在一些实施方案中,所述Cas蛋白在突变(例如,深内含子突变)侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述突变的靶DNA部分。例如,诸如非同源末端连接(NHEJ)的DNA修复过程可以通过连接切割的末端来修复切割的DNA序列,从而切除包含深内含子突变的靶DNA部分。在其他实例中,同源DNA修复可以修复切割的DNA序列,特别是如果包括同源模板的话。如本文中所描述和例示的,在靶DNA序列(例如带有深内含子突变的序列)侧翼的两个引导RNA的使用允许切除靶DNA序列的一部分,例如带有深内含子突变的序列(关于使用CRISPR-Cas系统的示例性基因缺失策略的描述还参见Brandl,C.等人,(2014)FEBS Open Bio.5:26-35;Zheng,Q.等人,(2014)Biotechniques 57:115-124)。在一些实施方案中,靶DNA序列的切除部分包含内含子DNA。在一些实施方案中,靶DNA序列的切除部分仅由内含子DNA组成。

[0184] 在一些实施方案中,第一和/或第二引导RNA与突变(例如,深内含子突变)侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。不希望受理论的束缚,人们认为第一和/或第二引导RNA可以与位于内含子内与深内含子突变相距任何距离的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,第一和/或第二引导RNA与距离深内含子突变1个碱基对和约10,000个碱基对之间的靶DNA序列的相反链杂交。在一些实施方案中,第一和/或第二引导RNA与位于距离所述深内含子突变小于约任何下述距离(以核苷酸计)的靶DNA序列的相反链杂交:10,000;9500;9000;8500;8000;7500;7,000;6500;6000;5500;5000;4500;4000;3500;3000;2500;2000;1500;1000;950;900;850;800;750;700;650;600;550;500;450;400;350;300;250;200;150;100;95;90;85;80;75;70;65;60;55;50;45;40;35;30;25;20;15;10;9;8;7;6;5;4;3;2;或其间的任何值。在一些实施方案中,第一和/或第二引导RNA与位于距离所述深内含子突变大于约任何下述距离(以核苷酸计)的靶DNA序列的相反链杂交:1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;15;20;25;30;35;40;45;50;55;60;65;70;75;80;85;90;95;100;150;200;250;300;350;400;450;500;550;600;650;700;750;800;850;900;950;1,000;1,500;2,000;2,500;3,000;3,500;4,000;4,500;5,000;5,500;6,000;6,500;7,000;7,500;8,000;8,500;9,000;9,500;或其间的任何值。也就是说,第一和/或第二引导RNA可以与位于距离所述深内含子突变一定距离处的靶DNA序列的相反链杂交,所述距离可以是一系列距离中的任何距离(以核苷酸计),所述距离具有下列上限:10,000;9,500;9,000;8,500;8,000;7,500;7,000;6,500;6,000;5,500;5,000;4,500;4,000;3,500;3,000;2,500;2,000;1,500;1,000;950;900;850;800;750;700;650;600;550;500;450;400;350;300;250;200;150;100;95;90;85;80;75;70;65;60;55;50;45;40;35;30;25;20;15;10;9;8;7;6;5;4;3;2;或其间的任何值以及独立选择的下列下限:1;2;3;4;5;6;7;8;9;10;15;20;25;30;35;40;45;50;55;60;65;70;75;80;85;90;95;100;150;200;250;300;350;400;450;500;550;600;650;700;750;800;850;900;950;1,000;1,500;2,000;2,500;3,000;3,500;4,000;4,500;5,000;5,500;6,000;6,500;7,000;7,500;8,000;8,500;9,000;9,500;或其间的任何值,其中下限小于上限。

[0185] Cas蛋白的非限制性实例包括:Cas1、Cas1B、Cas2、Cas3、Cas4、Cas5、Cas6、Cas7、Cas8、Cas9(也称为Csn1和Csx12)、Cas10、Csy1、Csy2、Csy3、Cse1、Cse2、Csc1、Csc2、Csa5、Csn2、Csm2、Csm3、Csm4、Csm5、Csm6、Cmr1、Cmr3、Cmr4、Cmr5、Cmr6、Csb1、Csb2、Csb3、Csx17、Csx14、Csx10、Csx16、CsaX、Csx3、Csx1、Csx15、Csf1、Csf2、Csf3、Csf4、其同源物或其修饰形式。这些酶是本领域普遍已知的。

[0186] 在一些实施方案中,Cas蛋白(例如CRISPR酶)是Cas9蛋白。在一些实施方案中,未修饰的CRISPR酶如Cas9具有DNA切割活性。示例性的Cas9蛋白包括但不限于酿脓链球菌Cas9(参见例如SwissProt数据库登录号Q99ZW2)、金黄色葡萄球菌Cas9(参见例如GenBank登录号CCK74173)、嗜热链球菌Cas9(参见例如SwissProt数据库登录号G3ECR1)、脑膜炎奈瑟氏菌Cas9(参见例如UniProt登录号C9X1G5)和齿垢密螺旋体Cas9(参见例如GenBank登录号EMB41078)。在一些实施方案中,Cas9来自酿脓链球菌或肺炎链球菌。在一些实施方案中,该CRISPR酶指导在靶序列位置处(例如在该靶序列之内和/或在该靶序列的互补物之内)的一条链或两条链的切割。在一些实施方案中,该CRISPR酶指导距离靶序列的第一个或最后一个核苷酸约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、15、20、25、50、100、200、500个或更多个碱基对之内的一条链或两条链的切割。

[0187] 在一些实施方案中,编码本公开的CRISPR蛋白的酶编码序列经密码子优化,以便在特定的细胞如真核细胞中表达。真核细胞可以是特定生物的那些或来源于特定生物,如哺乳动物,包括但不限于人、小鼠、大鼠、兔、狗或非人类灵长动物。一般而言,密码子优化是指通过用在宿主细胞的基因中更频繁地或者最频繁地使用的密码子代替天然序列的至少一个密码子同时维持该天然氨基酸序列而修饰核酸序列以便增强在感兴趣宿主细胞中的表达的方法。不同的物种对于具有特定氨基酸的某些密码子展示出特定的偏好。密码子使用表是容易获得的,例如,在“密码子使用数据库”,并且这些表可以适合于多种方式(参见例如Nakamura,Y.等人,(2000) *Nucleic Acids Res.* 28:292)。用于密码子优化特定的数列以便在特定的宿主细胞中表达的计算机算法也是可得的,如Gene Forge (Aptagen; Jacobus, Pa.),也是可得的。

[0188] 在一些实施方案中,Cas蛋白是包含一个或多个异源蛋白结构域(例如除了该CRISPR酶之外的约或多于约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个结构域)的融合蛋白。Cas融合蛋白可以包含任何其他蛋白质,以及任选地在任何两个结构域之间的连接序列。可以融合到Cas蛋白上的蛋白质结构域的实例包括但不限于:表位标签、报告基因序列、以及具有下列活性的一者或多者的蛋白质结构域:甲基酶活性、脱甲基酶活性、转录激活活性、转录阻抑活性、转录释放因子活性、组蛋白修饰活性、RNA切割活性和核酸结合活性。表位标签的实例包括但不限于组氨酸(His)标签、V5标签、FLAG标签、流感病毒血凝素(HA)标签、Myc标签、VSV-G标签、和硫氧还蛋白(Trx)标签。报告基因的实例包括但不限于谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、辣根过氧化物酶(HRP)、氯霉素乙酰转移酶(CAT)、 β -半乳糖苷酶、 β -葡萄糖醛酸糖苷酶、萤光素酶和荧光蛋白(例如GFP、CFP、YFP、BFP等)。Cas蛋白可以融合到编码蛋白质或蛋白质片段的基因序列上,所述蛋白质或蛋白质片段结合DNA分子或结合其他细胞分子,其包括但不限于麦芽糖结合蛋白(MBP)、S-标签、Lex A DNA结合结构域(DBD)融合物、GAL4A DNA结合结构域融合物、以及单纯疱疹病毒(HSV) BP16蛋白融合物。在一些实施方案中,对Cas蛋白进行修饰以增强功能。

[0189] 在一些实施方案中,Cas蛋白是突变型Cas蛋白。在一些实施方案中,Cas蛋白(例如Cas9蛋白)是切口酶突变体(Ran等人,2013 *Cell* 1156(6):1380-9)。在一些实施方案中,将Cas9切口酶突变体与成对的引导RNA一起使用以引入具有减少的脱靶DNA切割的靶向双链断裂。

[0190] 在一些实施方案中,所述Cas蛋白是包含氨基酸改变并显示稳健的中靶活性但可忽略的脱靶切割的高保真Cas蛋白变体(Slaymaker,I.M.等人,(2016) *Science* 351(6268):84-88;Kleinstiver,B.P.等人,(2016) *Nature* 529:490-495)。

[0191] 在一些实施方案中,CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号(NLS)。例如,Cas蛋白(例如Cas9蛋白)可以包含一个或多个NLS。包含具有NLS的Cas9的示例性质粒可见于Ran,F.A.等人,(2013) *Nat. Protoc.* 8:2281-2308。适合于一系列宿主细胞的多种NLS是本领域已知的。例如但不限于,NLS可以是SV40 NLS(例如,如Mali,P.等人,(2013) *Science* 339(6121):823-6)中描述的)、SV40大T抗原单组分NLS、核质蛋白NLS和hnRNP A1 NLS。可以使用的示例性NLS序列包括但不限于PKKKRKV(SEQ ID NO:26)或PKKKRKVEDPKKKRKVD(SEQ ID NO:27)(参见例如Jinek,M.等人,(2013) *eLife* 2:e00471)。

[0192] CRISPR复合物(包含与靶序列的相反链杂交并且与一种或多种Cas蛋白复合的引

导序列)的形成通常导致在内源性CRISPR系统中的靶序列中或其附近(例如在1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、50或更多个碱基对距离之内)的一条链或两条链的切割。比如,通过沿着tracr序列的至少部分与tracr配对序列(例如与引导序列可操作连接的tracr配对序列)的全部或部分的杂交,tracr序列(可包含野生型tracr序列的全部或部分)也被认为能够形成CRISPR复合物的部分。

[0193] 一般而言,tracr配对序列可以包括与tracr序列具有足够互补性的任何序列,以促进在含有相应tracr序列的细胞中的tracr配对序列侧翼的引导序列的切除;包含在靶序列处与tracr序列杂交的tracr配对序列的CRISPR复合物的形成;或这两者。在一些实施方案中,tracr序列与tracr配对序列具有足够的互补性,以便杂交并参与CRISPR复合物的形成。如下文关于靶序列所述,人们相信至少在功能上的足够互补性是需要(即不需要tracr和tracr配对序列之间的完全互补性)。

[0194] 通常,互补程度是指tracr配对序列与tracr序列沿着这两个序列的较短者的长度的最佳比对。可以通过任何适合的比对算法来确定最佳比对,并且可以进一步对二级结构做出解释,比如在tracr序列或tracr配对序列之内的自我互补性。在一些实施方案中,tracr序列在长度上为约或多于约5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、40、50个或更多个核苷酸。在一些实施方案中,当最佳比对时,tracr序列具有沿着tracr配对序列的长度的至少50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%的序列互补性(例如,如通过本文所述的任何示例性比对方法确定的)。

[0195] 不希望受理论的束缚,人们认为任何期望的感兴趣的靶DNA序列可以被sgRNA引导序列靶向,并且对于靶DNA序列的唯一要求是与sgRNA靶序列相邻的原型间隔序列毗邻基序(PAM)的存在(Mali,P.等人,(2013) Science 339(6121):823-6)。已知不同的Cas复合物具有不同的PAM基序。例如,来自酿脓链球菌的Cas9具有GG二核苷酸PAM基序。对于进一步的实例,金黄色葡萄球菌Cas9的PAM基序是GRRT,其中R是嘌呤(A或G),脑膜炎奈瑟氏菌Cas9的PAM基序是GATT,嗜热链球菌Cas9的PAM基序是AGAA,齿垢密螺旋体Cas9的PAM基序是AAAAC。

[0196] 一般而言,引导序列可以是与靶多核苷酸序列具有足够相似性以便与靶序列的相反链杂交并且指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的任何多核苷酸序列。在一些实施方案中,在引导序列与其相应的靶序列之间的同一性程度是约或高于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更高。可以使用任何适合的用于比对序列的算法来确定最佳比对,非限制性实例包括史密斯-沃特曼(Smith-Waterman)算法、尼德曼-翁施(Needleman-Wunsch)算法、基于伯罗斯-惠勒变换(Burrows-Wheeler Transform)的算法(例如伯罗斯-惠勒比对工具(Burrows Wheeler Aligner))、ClustalW、Clustal X、BLAT、Novoalign(Novocraft Technologies)、ELAND(Illumina, San Diego, Calif.)、SOAP(在soap.genomics.org.cn可获得)、Maq(在maq.sourceforge.net可获得)等等。

[0197] 在一些实施方案中,引导序列在长度上为约或多于约5、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、40、45、50、75个或更多个核苷酸中的任一者。在一些实施方案中,引导序列在长度上为少于约75、50、45、40、35、30、25、20、15、12个或更少的核苷酸中的任一者。用于确定引导序列指导CRISPR复合物与靶序列的序列特异性结合的能力的测定法是本领域已知的。例如,足以形成CRISPR复合物的CRISPR系统的组分,包括有待测试的引导序列在内,可以例如通过用编码CRISPR序列的组分的载体进行转

染而被提供到具有相应靶序列的宿主细胞中,随后评估靶序列内的优先切割,例如,正如在美国专利No.8,697,359中描述的。

[0198] 在一些实施方案中,本公开的引导RNA(例如,第一引导RNA)包含SEQ ID NO:41(对于SpCas9)、SEQ ID NO:45(对于SaCas9)、SEQ ID NO:46(对于SaCas9)或SEQ ID NO:47(SaCas9)的序列。在一些实施方案中,本公开的引导RNA(例如,第一引导RNA)包含SEQ ID NO:19(对于SpCas9)、SEQ ID NO:50(对于SaCas9)、SEQ ID NO:51(对于SaCas9)或SEQ ID NO:52(SaCas9)的序列。在一些实施方案中,引导RNA包含SEQ ID NO:41(对于SpCas9)、SEQ ID NO:45(对于SaCas9)、SEQ ID NO:45(对于SaCas9)、SEQ ID NO:46(对于SaCas9)、SEQ ID NO:47(对于SaCas9)、SEQ ID NO:19(对于SpCas9)、SEQ ID NO:50(对于SaCas9)、SEQ ID NO:51(对于SaCas9)或SEQ ID NO:52(对于SaCas9)的序列的1、2、3、4或5个取代、缺失或插入,同时保持其作为CEP290基因的Cas切割的引导RNA的功能。在一些实施方案中,引导RNA是具有SEQ ID NO:41(对于SpCas9)、SEQ ID NO:45(对于SaCas9)、SEQ ID NO:45(对于SaCas9)、SEQ ID NO:46(对于SaCas9)、SEQ ID NO:47(对于SaCas9)、SEQ ID NO:19(对于SpCas9)、SEQ ID NO:50(对于SaCas9)、SEQ ID NO:51(对于SaCas9)或SEQ ID NO:52(对于SaCas9)的引导RNA的变体,其中作为CEP290基因的Cas切割的引导RNA的功能增强。

[0199] 在一些实施方案中,本公开的引导RNA(例如,第二引导RNA)包含SEQ ID NO:42(对于SpCas9)、SEQ ID NO:43(对于SpCas9)、SEQ ID NO:44(对于SpCas9)、SEQ ID NO:48(对于SaCas9)或SEQ ID NO:49(SaCas9)的序列。在一些实施方案中,本公开的引导RNA(例如,第二引导RNA)包含SEQ ID NO:20(对于SpCas9)、SEQ ID NO:21(对于SpCas9)、SEQ ID NO:22(对于SpCas9)、SEQ ID NO:53(对于SaCas9)或SEQ ID NO:54(SaCas9)的序列。在一些实施方案中,引导RNA包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:18的序列的1、2、3、4或5个取代、缺失或插入,同时保持其作为CEP290基因的Cas切割的引导RNA的功能。在一些实施方案中,引导RNA是具有SEQ ID NO:42(对于SpCas9)、SEQ ID NO:43(对于SpCas9)、SEQ ID NO:44(对于SpCas9)、SEQ ID NO:48(对于SaCas9)、SEQ ID NO:49(对于SaCas9)、SEQ ID NO:20(对于SpCas9)、SEQ ID NO:21(对于SpCas9)、SEQ ID NO:22(对于SpCas9)、SEQ ID NO:53(对于SaCas9)或SEQ ID NO:54(对于SaCas9)的引导RNA的变体,其中作为CEP290基因的Cas切割的引导RNA的功能增强。

[0200] 在一些实施方案中,tracr序列和tracr配对序列被包含在单个转录物中,使得在这两者之间的杂交产生具有二级结构(例如发夹)的转录物。在一些实施方案中,用于发夹结构的环形成序列的长度是四个核苷酸。在一些实施方案中,环形成序列具有序列GAAA。然而,可以使用更长或更短的环序列,正如可替代的序列。其他环形成序列的实例包括但不限于CAAA和AAAG。在一些实施方案中,转录物或转录的多核苷酸序列具有至少两个或更多个发夹,例如两个、三个、四个或五个发夹。在一些实施方案中,单个转录物进一步包括转录终止序列,例如polyT序列,比如六个T核苷酸。

IV. 深内含子突变

[0201] 本公开的某些方面涉及深内含子突变。如上所述,深内含子突变可能导致在成熟的(例如剪接的)mRNA中内含子序列的异常包含。例如,深内含子突变可以在基因中引入剪接供体位点、剪接受体位点或剪接增强子位点。结果,内含子序列可能作为隐蔽外显子被包含在内。这通常导致突变的多肽,特别是如果隐蔽外显子包含移码突变或提前终止密码子

的话。

[0202] 如上所述,深内含子突变是指在野生型剪接受体和剪接供体序列外部的突变,即与内源性剪接受体或剪接供体处的突变相反。通常,深内含子突变发生在距离内源剪接受体/剪接供体位点一定距离处。

[0203] 在一些实施方案中,深内含子突变位于距离基因的5'剪接供体位点至少约100个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于距离基因的3'剪接受体位点至少约100个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变位于距离基因的5'剪接供体至少约100个核苷酸处和距离基因的3'剪接受体位点至少约100个核苷酸处。在一些实施方案中,深内含子突变发生在距离内源剪接受体和/或剪接供体位点(例如5'剪接供体和/或3'剪接受体位点)超过约100个核苷酸、超过约150个核苷酸、超过约200个核苷酸、超过约250个核苷酸、超过约300个核苷酸、超过约350个核苷酸、超过约400个核苷酸、超过约450个核苷酸、超过约500个核苷酸、超过约550个核苷酸、超过约600个核苷酸、超过约650个核苷酸、超过约700个核苷酸、超过约750个核苷酸、超过约800个核苷酸、超过约850个核苷酸、超过约900个核苷酸、超过约950个核苷酸、超过约1,000个核苷酸、超过约1,500个核苷酸、超过约2,000个核苷酸、超过约2,500个核苷酸、超过约3,000个核苷酸、超过约3,500个核苷酸、超过约4,000个核苷酸、超过约4,500个核苷酸、超过约5,000个核苷酸、超过约5,500个核苷酸、超过约6,000个核苷酸、超过约6,500个核苷酸、超过约7,000个核苷酸、超过约7,500个核苷酸、超过约8,000个核苷酸、超过约8,500个核苷酸、超过约9,000个核苷酸、超过约9,500个核苷酸、超过约10,000个核苷酸、超过约15,000个核苷酸、超过约20,000个核苷酸、超过约25,000个核苷酸、超过约30,000个核苷酸、超过约35,000个核苷酸、超过约40,000个核苷酸、超过约45,000个核苷酸、超过约50,000个核苷酸、超过约55,000个核苷酸、超过约60,000个核苷酸、超过约65,000个核苷酸、超过约70,000个核苷酸、超过约75,000个核苷酸、超过约80,000个核苷酸或超过约85,000个核苷酸处。

[0204] 在一些实施方案中,深内含子突变发生在距离内源剪接受体和/或剪接供体位点(例如,5'剪接供体位点或3'剪接受体)的小于约任何以下距离(以核苷酸计)处:85,000;80,000;75,000;70,000;65,000;60,000;55,000;50,000;45,000;40,000;35,000;30,000;25,000;20,000;15,000;10,000;9,500;9,000;8,500;8,000;7,500;7,000;6,500;6,000;5,500;5,000;4,500;4,000;3,500;3,000;2,500;2,000;1,500;1,000;950;900;850;800;750;700;650;600;550;500;450;400;350;300;250;200;或150。在一些实施方案中,深内含子突变发生在距离内源剪接受体和/或剪接供体位点的大于约任何以下距离(以核苷酸计)处:100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900;950;1,000;1,500;2,000;2,500;3,000;3,500;4,000;4,500;5,000;5,500;6,000;6,500;7,000;7,500;8,000;8,500;9,000;9,500;10,000;15,000;20,000;25,000;30,000;35,000;40,000;45,000;50,000;55,000;60,000;65,000;70,000;75,000;或80,000。也就是说,从所述深内含子突变到所述内源剪接受体和/或剪接供体位点(例如5'剪接供体位点)的距离可以是一系列距离中的任何距离(以核苷酸计),所述距离具有下列上限:85,000;80,000;75,000;70,000;65,000;60,000;55,000;50,000;45,000;40,000;35,000;30,000;25,000;20,000;15,000;10,000;9,500;9,000;8,500;8,000;7,500;7,000;6,500;6,000;5,500;5,000;4,500;4,000;3,500;3,000;2,500;2,000;1,500;1,000;950;900;850;800;750;700;

650;600;550;500;450;400;350;300;250;200;或150以及独立选择的下列下限:100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、850、900;950;1,000;1,500;2,000;2,500;3,000;3,500;4,000;4,500;5,000;5,500;6,000;6,500;7,000;7,500;8,000;8,500;9,000;9,500;10,000;15,000;20,000;25,000;30,000;35,000;40,000;45,000;50,000;55,000;60,000;65,000;70,000;75,000;或80,000,其中下限小于上限。

[0205] 本公开的某些方面涉及尤其可用于治疗与例如个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的方法、试剂盒、组合物和病毒颗粒。多种深内含子突变是本领域已知的。下表1提供了与疾病相关的示例性深内含子突变(注意,表1中提供的具体突变、基因和内含子大小是指作为参考的人DNA序列)。

表1. 与深内含子突变相关的示例性疾病.

表型	基因	突变	内 含子大 小	Pub Med 文 章编号
无纤维蛋白原血症	<i>FGB</i>	IVS1+2076A> G	26 75	1885 3456
奥尔波特综合征 (Alport syndrome)	<i>COL</i> <i>4A5</i>	IVS6+1873G> A	25 91	1243 6246
奥尔波特综合征 (Alport syndrome)	<i>COL</i> <i>4A5</i>	IVS29+2750A>G	80 19	1243 6246
肌萎缩性侧索硬化症	<i>SOD</i> <i>1</i>	IVS4+792C> G	10 95	1984 7927
共济失调毛细血管扩张症	<i>ATM</i>	IVS26+2968A >G	31 26	1564 3608
共济失调毛细血管扩张症	<i>ATM</i>	IVS37+1126A >G	21 75	8755 918
常染色体隐性多囊肾病	<i>PKH</i> <i>DI</i>	IVS46+653A> G	12 453	1902 1639
巴氏综合征(Barth syndrome)	<i>TAZ</i>	IVS3+110G> A	22 9	1173 5032
β-地中海贫血	<i>HBB</i>	IVS2+645C> T	85 0	6585 831
β-地中海贫血	<i>HBB</i>	IVS2+705T> G	85 0	6298 782
β-地中海贫血	<i>HBB</i>	IVS2+745C> G	85 0	6188 062
先天性无纤维蛋白原血症	<i>FGG</i>	IVS6+660A> T	97 9	1785 4317

表型	基因	突变	内含子大小	PubMed 文章编号
先天性白内障面 部畸形神经病综合征	<i>CTD</i> <i>P1</i>	IVS6+389C> T	25 05	1451 7542
先天性糖基化异 常 Ia 型	<i>PMM</i> 2	IVS7+19139C >T	34 617	1730 7006
先天性糖基化异 常 II 型	<i>SLC3</i> <i>5A1</i>	IVS6+286insC ACT	44 4	1557 6474
囊性纤维化	<i>CFT</i> <i>R</i>	IVS12+1634A >G	25 19	7534 040
囊性纤维化	<i>CFT</i> <i>R</i>	IVS19+11505 C>G	12 808	1113 4243
囊性纤维化	<i>CFT</i> <i>R</i>	IVS22+12191 C>T	14 967	1384 328
二氢蝶啶还原酶 缺乏症	<i>QDP</i> <i>R</i>	IVS3+2552A> G	90 78	9341 885
法布里病 (Fabry disease)	<i>GLA</i>	IVS4+919G> A	17 19	1182 8341
家族性黑素瘤	<i>CDK</i> <i>N2A</i>	IVS2-105A>G	26 59	1172 6555
家族性血小板疾 病并急性髓性白血病 倾向	<i>CYB</i> <i>B</i>	IVS5+979G> T	21 40	1156 6256
家族性血小板疾 病并急性髓性白血病 倾向	<i>CYB</i> <i>B</i>	IVS6+1657A> G	28 03	1651 6412
范可尼贫血 (Fanconi anemia)	<i>BRIP</i> <i>I</i>	IVS11+2767A >T	32 64	1611 6423
吉特曼综合征	<i>SLC1</i>	IVS13+1361C	15	1966

表型	基因	突变	内 含子大 小	Pub Med 文 章编号
(Gitelman syndrome)	2A3	>T	51	8106
生长激素不敏感	GHR	IVS6+792A> G	11 204	1146 8686
弗里德赖希共济 失 调 (Friedrich's ataxia)	FXN	GAA 三联体 重复	10 437	9259 271
听力损失	MYO 6	IVS23+2321T >G	41 85	1821 2818
A 型血友病	F8	IVS1+1567A> G	22 809	1816 0816
A 型血友病	F8	IVS10+325A> G	39 03	1528 4851
A 型血友病	F8	IVS18+530C> T	17 38	2380 9411
A 型血友病	F8	IVS18+941C> T	17 38	2380 9411
遗传性巨幼细胞 性贫血 1	CUB N	IVS23+881C> G	13 20	1008 0186
赫曼斯基-普德拉 克 综 合 征 (Hermansky-Pudlak syndrome)	HPS3	IVS16+2499G >A	41 11	7901 342
同型胱氨酸尿症	MTR R	IVS6+469T> C	24 20	2012 0036
枫糖尿症	DBT	IVS8-550A>G	40 57	9621 512
马 凡 综 合 征 (Marfan syndrome)	FBN1	IVS63+375G> T	27 93	1879 5226

表型	基因	突变	内含子大小	PubMed 文章编号
甲硫氨酸合成酶缺乏症	<i>MTR</i>	IVS3+2305A>G	24 70	9683 607
甲硫氨酸合成酶缺乏症	<i>MTR</i>	IVS6+1088G>A	27 59	9683 607
甲基丙二酸血症	<i>MUT</i>	IVS11+3691C>A	75 82	1796 6092
线粒体三功能蛋白缺乏症	<i>HAD</i> <i>HB</i>	IVS7+615A>G	14 53	1869 3053
粘多糖病 II 型	<i>IDS</i>	IVS7+3083A>G	32 15	8940 265
多微小轴空病 (multi-minicore disease)	<i>RYR1</i>	IVS100+2990A>G	44 38	1271 9381
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS1+36846G>A	19 1081	1465 9407
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS1+36947G>A	19 1081	1704 1906
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS2+5591T>A	17 0318	1252 2557
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS9+46806C>T	52 717	1465 9407
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS25+2036A>G	86 06	1275 4707
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS25+2240A>G	86 06	1009 4556
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS27+6298C>A	71 41	2048 5447
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS60+80228	95	1465

表型	基因	突变	内 含子大 小	Pub Med 文 章编号
		G>T	846	9407
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS62+62296 A>G	62 581	1275 4707
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS65+1215A >G	28 30	1704 1906
肌营养不良	<i>DMD</i>	IVS67+2714C >T	21 056	2048 5447
神经纤维瘤病 I 型	<i>NF1</i>	IVS3+2025T> G	40 92	1924 1459
神经纤维瘤病 I 型	<i>NF1</i>	IVS39+332A> G	43 39	8829 638
神经纤维瘤病 I 型	<i>NF1</i>	IVS39+4060A >G	43 39	1647 0740
神经纤维瘤病 I 型	<i>NF1</i>	IVS54+790C> G	11 10	1924 1459
C 型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)	<i>NPC</i> <i>I</i>	IVS9+2021G> A	30 30	1971 8781
眼白化病 I 型	<i>GPR</i> <i>143</i>	IVS7+748G> A	16 18	1655 0551
鸟氨酸-δ-转氨酶 缺乏症	<i>OAT</i>	IVS3+303C> G	30 07	1992 472
系统性红斑狼疮 倾向	<i>IRF5</i>	IVS1+198G> T	40 21	1664 2019
丙酸血症	<i>PCC</i> <i>A</i>	IVS14+2778A >G	41 93	1796 6092
丙酸血症	<i>PCC</i> <i>B</i>	IVS6+462A> G	98 08	1796 6092

表型	基因	突变	内含子大小	PubMed 文章编号
横纹肌样瘤	<i>SNF5</i> <i>/INI1</i>	IVS1+559A> G	44 93	1055 6283
施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)	<i>HSP</i> <i>G2</i>	IVS6+481C> T	19 14	1692 7315
斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)	<i>COL</i> <i>2A1</i>	IVS23+135G> A	37 1	1675 2401
系统性红斑狼疮	<i>MFG</i> <i>E8</i>	IVS6+936A> G	17 39	2021 3738
结节性硬化症	<i>TSC2</i>	IVS8+281C> T	15 68	1106 8191
维尔纳综合征 (Werner syndrome)	<i>WRN</i>	IVS18+7636A >G	10 659	1747 8382
X-连锁高免疫球蛋白 M 血症	<i>CD40</i> <i>L</i>	IVS3+1011A> T	19 25	1535 8621
X 连锁低磷血症	<i>PHE</i> <i>X</i>	IVS7+1268G> T	28 55	1150 2821

[0206] 在一些实施方案中,与深内含子突变相关的疾病或疾患为:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、β-地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常 Ia 型、先天性糖基化异常 II 型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A 型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血 1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II 型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病 I 型、C 型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病 I 型、鸟氨酸-δ-转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner

syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。在一些实施方案中,深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

[0207] 在一些实施方案中,与深内含子突变相关的疾病或疾患是眼部疾病。如本文中使用的,术语“眼部疾病”以最广义的方式加以使用,并且可以指起源于或导致眼睛的任何结构的病理状况的疾病,所述结构包括但不限于角膜、虹膜、晶状体、视网膜、视神经、房水、结膜、一条或多条眼肌、巩膜、玻璃体、黄斑、中央凹、睫状体、一条或多条韧带或悬韧带小带、瞳孔、前房和/或后房。下表2提供了与眼部疾病相关的示例性深内含子突变(注意,表2中提供的具体突变、基因和内含子大小是指作为参考的人DNA序列)。

表2. 与深内含子突变相关的眼部疾病.

表型	基因	突变	内含子大小	PubMed 文章编号
莱伯先天性黑朦	<i>CE</i> <i>P290</i>	IVS26+165 5A>G	58	1690
			38	9394
视神经萎缩	<i>OPA1</i>	IVS4b+364 G>A	10	2497
			31	0096
视网膜色素变性	<i>PR</i> <i>PF31</i>	IVS13+654 C>G	19	1961
			92	8371
视网膜母细胞瘤	<i>RB</i> <i>I</i>	IVS23+659 4A>G	79	1729
			91	9438
斯塔加特病	<i>AB</i>	IVS30+200	43	2391
(Stargardt disease)	<i>CA4</i>	1G>A	96	8662
厄舍综合征 (Usher syndrome)	<i>US</i> <i>H1C</i>	内含子 5 中的 VNTR	18	1097
			2	3247
厄舍综合征 (Usher syndrome)	<i>US</i> <i>H2A</i>	IVS40+887 7A>G	110	2392
			20	4366
X 连锁视网膜色素变性	<i>OF</i> <i>DI</i>	IVS9+706 A>G	17	2261
			15	9378
X 连锁视网膜色素变性	<i>RP</i> <i>GR</i>	IVS9+363 G>A	21	1740
			05	5150

[0208] 在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁视网膜色素变性。在一些实施方案中,深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

[0209] 在一些实施方案中,眼部疾病是莱伯先天性黑朦。莱伯先天性黑朦(LCA)是指一组以严重视力丧失、眼球震颤、视网膜功能障碍、畏光、指眼征(例如眼部摩擦、戳眼和按压)和圆锥角膜等症状为特征的眼部疾患。LCA通常在出生时表现出极度的视力丧失和眼球震颤。虽然LCA的实例通常以常染色体隐性遗传病的方式遗传,但其牵涉多种基因座的突变。例如,表3列出了一些牵涉LCA形式的基因座。

表3.LCA疾病基因座。

LCA 的类型	突变基因	人类中的基因座
LCA1	<i>GUCY2D</i>	17p13.1
LCA2	<i>RPE65</i>	1p31
LCA3	<i>SPATA7</i>	14q31.3
LCA4	<i>AIPL1</i>	17p13.1
LCA5	<i>LCA5</i>	6q14.1
LCA6	<i>RPGRIP1</i>	14q11
LCA7	<i>CRX</i>	19q13.3
LCA8	<i>CRB1</i>	1q31-32
LCA9	<i>NMNAT1</i>	1p36
LCA10	<i>CEP290</i>	12q21
LCA11	<i>IMPDH1</i>	7q31.3-q32
LCA12	<i>RD3</i>	1q32.3
LCA13	<i>RDH12</i>	14q24.1
LCA14	<i>LRAT</i>	4q31
LCA15	<i>TULP1</i>	6p21.3
LCA16	<i>KCNJ13</i>	4q31
LCA17	<i>GDF6</i>	8q22
LCA18	<i>PRPH2</i>	6p21

[0210] 最常见的LCA类型是由CEP290中的突变引起的,CEP290编码在中心体和纤毛发育中起重要作用的中心体蛋白(关于示例性人类基因和蛋白质序列分别参见例如NCBI基因ID号80184和UniProt ID号015078)。CEP290在细胞膜上的初级纤毛的形成中是必需的,其在视网膜后部的光感受器以及在肾、脑和许多其他身体器官中起重要作用。CEP290也被称为MKS4、CT87、POC3、rd16、BBS14、LCA10、JBTS5、NPHP6、SLSN6、和3H11Ag。在一些实施方案中,致病突变是c.2991+1655A>G突变,其引入了隐蔽的剪接供体位点,导致包含具有提前终止密码子的异常外显子。在一些实施方案中,第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa(CEP290)基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。在某些实施方案中,深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。在一些实施方案中,CEP290是人CEP290(参

见例如依照NCBI参考序列NG_008417的人CEP290序列)。在一些实施方案中,CEP290包含SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

[0211] 本公开的某些方面进一步涉及用于生成与基因中的深内含子突变相关的眼部疾病的体外模型的方法。在一些实施方案中,所述方法包括向真核细胞中引入编码CRISPR-Cas系统的核酸,其中所述CRISPR-Cas系统包含i) 靶向基因中的内含子的DNA序列的单一引导RNA,ii) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,iii) 包含同源定向修复(HDR)模板的单链寡核苷酸,所述模板包含在预期的内含子突变侧翼的同源臂和原型间隔序列毗邻基序(PAM);和分离包含组入基因中的突变的细胞。在下面的实施例中说明了与这种途径相关的示例性方法。如上所述,CRISPR-Cas介导的DNA切割可以通过NHEJ得以修复,导致例如靶DNA序列的切除。然而,CRISPR-Cas介导的DNA切割也可以通过同源定向修复(HDR)得以修复,导致例如存在于HDR模板中的序列的引入(例如,引入深内含子突变)。参见,例如,Ran,F.A.等人,(2013) Nat.Protoc.8:2281-2308。这些方法可以包括本文中关于治疗方法、病毒颗粒、组合物和试剂盒描述的任何特征、方面或要素。

[0212] 同源定向修复(HDR)模板可以采取多种形式,例如双链DNA多核苷酸或单链DNA寡核苷酸(ssODN)。HDR模板可以包括在预期内含子突变侧翼的一个或多个同源臂。这些同源臂可以在相对于靶基因座的有义或反义方向上。在一些实施方案中,一个或多个同源臂可以距离靶基因座至少约40个碱基对、至少约50个碱基对、至少约60个碱基对、至少约70个碱基对、至少约80个碱基对、至少约90个碱基对或至少约100个碱基对。

[0213] HDR模板还可以包括原型间隔序列毗邻基序(PAM)。在一些实施方案中,PAM包含突变以避免单链寡核苷酸被细胞中表达的Cas蛋白切割。例如,PAM可以被突变为使得特定表达的Cas蛋白不切割HDR模板,或者被突变为使得在CRISPR-Cas介导的基因组基因座编辑时引入标识序列(例如,如以下实施例中说明的独特限制性位点)。

[0214] 任何适合的真核细胞都可以用于体外模型。在一些实施方案中,真核细胞是哺乳动物或人类细胞。在一些实施方案中,真核细胞是细胞系,比如人细胞系(例如,HeLa、A549、293等)、哺乳动物细胞系、脊椎动物细胞系或昆虫细胞系(例如,Sf9或S2)。在一些实施方案中,真核细胞是视网膜细胞(例如WERI细胞),比如感光细胞。

V. 递送方法

[0215] 本公开的某些方面涉及治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患。在一些方面,本发明提供了用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的本公开的组合物,例如包含编码本公开的工程改造的非天然存在的CRISPR-Cas系统的核酸的组合物。在一些实施方案中,编码工程改造的非天然存在的CRISPR-Cas系统的核酸可以是DNA或RNA。在一些实施方案中,将Cas蛋白作为蛋白质加以递送。

载体

[0216] 在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。在一些实施方案中,将驱动CRISPR系统的一个或多个元件的表达的一个或多个载体引入到细胞中,使得所述CRISPR系统的所述元件的表达在一个或多个靶位处指导CRISPR复合物的形成。例如,Cas酶、与tracr配对序列连接的引导序列、以及tracr序列可以各自与在分开的载体上的分开的调节元件可操作连接。或者,上

述二个或更多个元件可以从相同或不同调节元件表达,和/或可以结合在单一载体中,任选地其中提供所述CRISPR系统的任何组分的一个或多个另外的载体不包括在第一载体中。结合在载体中的CRISPR系统元件可以按照任何适合的取向排列。例如,一个元件的编码序列可以位于第二元件的编码序列的同一条链或相反链上,和/或取向为相同或相反的方向。

[0217] 在一些实施方案中,单个启动子驱动编码Cas蛋白的转录物以及所述引导序列、tracr配对序列(任选地与所述引导序列可操作连接)、和嵌入在一个或多个内含子序列之内(例如,各自在不同的内含子中,两个或更多个在至少一个内含子中,或全部都在单个内含子中)的tracr序列中的一者或多者的表达。在一些实施方案中,所述Cas蛋白、引导序列、tracr配对序列、和tracr序列与相同的启动子可操作连接并且从所述启动子表达。在一些实施方案中,第一引导RNA、第二引导RNA和/或编码Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件和/或启动子可操作连接。

[0218] 在一些实施方案中,载体是质粒。

[0219] 在一些实施方案中,在真核细胞中表达第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白。在一些实施方案中,第一引导RNA、第二引导RNA和Cas蛋白与允许在真核细胞中表达的一个或多个启动子可操作连接。在真核细胞中表达的各种启动子是本领域已知的。下面提供了示例性的启动子而没有限制。

[0220] 在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。RNA聚合酶III启动子可包括全长启动子或其足以驱动经由RNA聚合酶III的转录的片段。关于RNA聚合酶III启动子类型、结构特征和与RNA聚合酶III的相互作用以及适合的RNA聚合酶III启动子的更详细的描述,参见Schramm, L. 和Hernandez, N. (2002) *Genes Dev.* 16:2593-620。可以使用本领域已知的任何适合的RNA聚合酶III启动子,包括但不限于tRNA、5S RNA、U6snRNA、H1、7SK、RNA酶P、信号识别颗粒的RNA组分和snoRNA的启动子(参见例如, Ma, H. 等人 (2014) *Mol. Ther. Nucleic Acids* 3:e161)。在一些实施方案中, RNA聚合酶III启动子是U6、H1或7SK启动子。在一些实施方案中,第一引导RNA和/或第二引导RNA与RNA聚合酶III终止子可操作连接。RNA聚合酶III终止子的实例可以包括但不限于长度为至少5-6个碱基的一串尿苷核苷酸(关于RNA聚合酶III终止子的更多信息,参见Marck, C. 等人, (2006) *Nucleic Acids Res* 34(6):1816-35)。

[0221] 在一些实施方案中,编码Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。RNA聚合酶II启动子可包括全长启动子或其足以驱动经由RNA聚合酶II的转录的片段。可以使用本领域已知的任何适合的RNA聚合酶II启动子,包括但不限于巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段(minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子和CK6启动子、转甲状腺素启动子(TTR)、TK启动子、四环素反应性启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子(LSP)、E2F启动子、端粒酶(hTERT)启动子;巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG启动子;Niwa等人, *Gene*, 1991, 108(2):193-9)和延伸因子1- α 启动子(EF1- α)启动子(Kim等人, *Gene*, 1990, 91(2):217-23和Guo等人, *Gene Ther.*, 1996, 3(9):802-10)。在一些实施方案中,启动子包括与鸡 β -肌动蛋白(CBA)启动子连接的人 β -葡糖醛酸糖苷酶启动子或巨细胞病毒增强子。启动子可以是组成型、诱导型或抑制型启动子。在一些实施方案中,启动子能够在眼细胞中表达异源核酸。在一些实施方案中,启动子能够在感光细

胞或RPE中表达异源核酸。在多个实施方案中,启动子是视紫红质激酶(RK)启动子;例如人RK启动子。在一些实施方案中,启动子是视蛋白启动子;例如人视蛋白启动子或小鼠视蛋白启动子。在一些实施方案中,启动子是视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶(PDE)启动子、视网膜色素变性(RP1)启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因(IRBP)启动子。

[0222] 诱导型启动子允许调节基因表达,并且可以受到外源提供的化合物、环境因素如温度或具体的生理状态例如急性期的存在、细胞的特定分化状态的调节,或仅在正在复制的细胞中受到调节。诱导型启动子和诱导型系统可以从各种商业来源获得,包括但不限于Invitrogen、Clontech和Ariad。已经描述了许多其他系统,并且可以由本领域技术人员容易地进行选择。被外源提供的启动子调节的诱导型启动子的实例包括锌诱导型绵羊金属硫蛋白(MT)启动子、地塞米松(Dex)诱导型小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)启动子、T7聚合酶启动子系统(WO 98/10088);蜕皮激素昆虫启动子(No等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,93:3346-3351(1996))、四环素阻遏系统(Gossen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:5547-5551(1992))、四环素诱导系统(Gossen等人,Science,268:1766-1769(1995)),还参见Harvey等人,Curr.Opin.Chem.Biol.,2:512-518(1998))、RU486诱导系统(Wang等人,Nat.Biotech.,15:239-243(1997)和Wang等人,Gene Ther.,4:432-441(1997))和雷帕霉素诱导系统(Magari等人,J.Clin.Invest.,100:2865-2872(1997))。可用于这种情况的其他类型的诱导型启动子是受具体的生理状态(例如温度、急性期、细胞的特定分化状态)调节或仅在正在复制的细胞中受到调节的启动子。

[0223] 在另一个实施方案中,将使用针对转基因的天然启动子或其片段。当期望转基因的表达将要模拟天然表达时,可以使用天然启动子。当必须在时序上或在发育上或以组织特异性方式或响应于特异性转录刺激调节转基因的表达时,可以使用天然启动子。在一个进一步的实施方案中,其他天然表达调控元件,例如增强子元件、多腺苷酸化位点或Kozak共有序列也可以用于模拟天然表达。

[0224] 在一些实施方案中,调控序列赋予组织特异性基因表达能力。在一些情况下,组织特异性调控序列结合以组织特异性方式诱导转录的组织特异性转录因子。这样的组织特异性调控序列(例如启动子、增强子等)在本领域中是公知的。示例性组织特异性调控序列包括但不限于以下组织特异性启动子:神经元的,如神经元特异性烯醇化酶(NSE)启动子(Andersen等人,Cell.Mol.Neurobiol.,13:503-15(1993))、神经丝轻链基因启动子(Piccioli等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,88:5611-5(1991))、和神经元特异性vgf基因启动子(Piccioli等人,Neuron,15:373-84(1995))。在一些实施方案中,组织特异性启动子是选自以下基因的启动子:神经元核抗原(NeuN)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)、结肠腺瘤样息肉蛋白(APC)和离子化钙结合适体分子1(Iba-1)。其他适当的组织特异性启动子对于本领域技术人员将是显而易见的。在一些实施方案中,启动子是鸡 β -肌动蛋白启动子。

[0225] 本发明考虑使用重组病毒基因组来引入一个或多个核酸序列(例如,引导RNA和/或编码Cas蛋白的核苷酸序列),用于包装到病毒颗粒例如下文描述的病毒颗粒中。重组病毒基因组可以包括用于建立引导RNA和/或编码Cas蛋白的核苷酸序列的表达的任何元件,例如启动子、ITR、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择标志物、内含子、polyA信号和/或复制起点。下文更详细地描述了用于一系列病毒颗粒的示例性病毒基因组元件和递送方

法。

非病毒递送系统

[0226] 也可使用常规的非病毒基因转移方法将核酸引入细胞或靶组织中。非病毒载体递送系统包括DNA质粒、RNA (例如, 引导RNA或编码Cas蛋白的核苷酸序列)、裸核酸 (例如DNA或RNA)、以及与递送系统复合的核酸 (例如DNA或RNA)。例如, 载体可以与脂质 (例如阳离子或中性脂质)、脂质体、聚阳离子、纳米颗粒或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。载体可以与适合于本文所述的任何递送方法的药剂复合。

[0227] 核酸的非病毒递送方法包括脂质转染、核转染、显微注射、生物射弹、纳米颗粒 (参见例如Jin, S. 等人, (2009) *Methods Mol. Biol.* 544:547-557)、病毒体、脂质体、免疫脂质体、聚阳离子或脂质:核酸缀合物、裸DNA、人工病毒体和药剂增强的DNA摄取。脂质转染描述于例如美国专No. 5,049,386、4,946,787和4,897,355中, 并且脂质转染试剂在市场上有售 (例如, **Lipofectamine®**、Transfectam[™]和Lipofectin[™])。适合于多核苷酸的有效受体识别脂质转染的阳离子脂质和中性脂质包括Felgner的WO 91/17424和WO 91/16024中的那些脂质。

[0228] 包括靶向的脂质体如免疫脂质复合物的脂质:核酸复合物的制备是本领域技术人员熟知的 (参见例如Crystal, Science 270:404-410 (1995); Blaese等人, Cancer Gene Ther. 2:291-297 (1995); Behr等人, Bioconjugate Chem. 5:382-389 (1994); Remy等人, Bioconjugate Chem. 5:647-654 (1994); Gao等人, Gene Therapy 2:710-722 (1995); Ahmad等人, Cancer Res. 52:4817-4820 (1992); 美国专利No. 4,186,183、4,217,344、4,235,871、4,261,975、4,485,054、4,501,728、4,774,085、4,837,028、和4,946,787)。

[0229] 可以与本公开的载体复合的其他化合物包括但不限于阳离子肽 (例如聚-L-赖氨酸)、盐 (例如磷酸钙)、DEAE葡聚糖、树枝状聚合物 (例如聚酰胺胺或PAMAM)、聚乙二醇、聚乙烯亚胺 (PEI) 及其缀合物等。关于这些试剂的更详细的讨论, 参见例如, Luo, D. 和Saltzman, W.M. (2000) *Nature Biotechnology* 18:33-37.'

[0230] 在一些实施方案中, 核酸在药物制剂中。在一些实施方案中, 药物制剂包含药学上可接受的载体。这样的载体在本领域中是熟知的 (参见例如, Remington's Pharmaceutical Sciences, 15th Edition, pp.1035-1038 and 1570-1580)。在一些实施方案中, 包含本文所述的核酸和药学上可接受的载体的药物组合物适合于眼部注射。这样的药学上可接受的载体可以是无菌液体, 如水或油, 包括石油、动物、植物或合成来源的那些, 如花生油、大豆油、矿物油等等。也可以采用盐水溶液和葡萄糖水溶液、聚乙二醇 (PEG) 和甘油溶液作为液体载体, 特别是用于注射溶液。药物组合物可以进一步包含另外的成分, 例如防腐剂、缓冲剂、张度剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子润湿剂或澄清剂、增稠剂等。本文所述的药物组合物可以包装为单一单位剂量或多剂量形式。通常将组合物配制成无菌的基本上等渗的溶液。

病毒颗粒

[0231] 在一些实施方案中, 载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒 (HSV) 载体。

rAAV颗粒

[0232] 在一些实施方案中, 载体是重组AAV (rAAV) 载体。在一些实施方案中, 编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重

复 (ITR) 序列。在一些实施方案中,病毒颗粒是包含核酸的重组AAV颗粒,所述核酸包含侧翼为一个或两个ITR的转基因。在一些实施方案中,编码第一引导RNA、第二引导RNA或Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。

[0233] 在一些实施方案中,核酸包括本公开的一种或两种引导性RNA和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列、在转录方向上可操作连接的组分、包括转录起始和终止序列在内的控制序列,从而形成表达盒。表达盒在5'和3'端的侧翼为至少一个功能性AAV ITR序列。“功能性AAV ITR序列”意指ITR序列按预期用于AAV病毒体的拯救、复制和包装。参见Davidson等人,PNAS,2000,97(7)3428-32;Passini等人,J.Virol.,2003,77(12):7034-40;和Pechan等人,Gene Ther.,2009,16:10-16,通过提述将所有这些文献完整并入本文。为了实践本发明的某些方面,重组载体至少包含衣壳化必需的全部AAV序列和被rAAV感染的物理结构。用于本发明载体的AAV ITR不必具有野生型核苷酸序列(例如,如Kotin,Hum.Gene Ther.,1994,5:793-801中所述),并且可以通过核苷酸的插入、缺失或取代而改变,或者AAV ITR可以源自几种AAV血清型中的任何一种。目前已知有40多种AAV血清型,新的血清型和现有血清型的变体有待确定。参见Gao等人,PNAS,2002,99(18):11854-6;Gao等人,PNAS,2003,100(10):6081-6;和Bossis等人,J.Virol.,2003,77(12):6799-810。

[0234] 任何AAV血清型的使用都被认为在本发明的范围内。在一些实施方案中,rAAV载体是源自AAV血清型的载体,包括但不限于,AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV ITR等。在一些实施方案中,AAV中的核酸包含AAV的ITR,所述ITR来自AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV等。在某些实施方案中,AAV ITR是AAV2 ITR。

[0235] 在一些实施方案中,载体可以包括填充(stuffer)核酸。在一些实施方案中,填充核酸可以编码绿色荧光蛋白。在一些实施方案中,填充核酸可以位于启动子与本公开的一种或两种引导RNA和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列中的一者或多者之间。

[0236] 在一些方面,本发明提供了包含重组自身互补型基因组的病毒颗粒。在一些实施方案中,载体是自身互补型载体。具有自身互补型基因组的AAV病毒颗粒和使用自身互补型AAV基因组的方法描述于美国专利No.6,596,535;7,125,717;7,765,583;7,785,888;7,790,154;7,846,729;8,093,054;和8,361,457;以及Wang Z.,等人,(2003)Gene Ther 10:2105-2111中,将每篇文献通过提述完整并入本文。包含自身互补型基因组的rAAV将借助于其部分互补的序列(例如转基因的互补编码和非编码链)而迅速形成双链DNA分子。在一些实施方案中,本发明提供了包含AAV基因组的AAV病毒颗粒,其中所述rAAV基因组包含第一异源多核苷酸序列(例如本公开的一种或两种引导RNA和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列)和第二异源多核苷酸序列(例如本公开的一种或两种引导RNA的非编码链或反义链和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列),其中所述第一异源多核苷酸序列可以与所述第二多核苷酸序列沿其大部分或全部长度形成链内碱基对。

[0237] 在一些实施方案中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过有利于链内碱基配对的序列(例如发夹DNA结构)连接。发夹结构在本领域中是已知的,例如在siRNA分子中。在一些实施方案中,第一异源多核苷酸序列和第二异源多核苷酸序列通过突

变的ITR(例如,右侧ITR)连接。突变的ITR包括包含D区域的缺失,所述D区域包含末端解析序列。结果,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,因此,包含以下5'至3'顺序的重组病毒基因组将被包装在病毒衣壳中:AAV ITR、包括调控序列的第一异源多核苷酸序列、突变的AAV ITR、与第一异源多核苷酸取向相反的第二异源多核苷酸和第三AAV ITR。

[0238] 在一些实施方案中,第一异源核酸序列和第二异源核酸序列通过突变的ITR(例如,右侧ITR)连接。在一些实施方案中,ITR包含多核苷酸序列5'-CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAGGTCGCCCACGCCCCGGGCTTTGCCCGGGCG-3'(SEQ ID NO:24)。突变的ITR包括包含D区域的缺失,所述D区域包含末端解析序列。结果,在复制AAV病毒基因组时,rep蛋白将不会在突变的ITR处切割病毒基因组,因此,包含以下5'至3'顺序的重组病毒基因组将被包装在病毒衣壳中:AAV ITR、包括调控序列的第一异源多核苷酸序列、突变的AAV ITR、与第一异源多核苷酸取向相反的第二异源多核苷酸和第三AAV ITR。

[0239] 在一些实施方案中,载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。在一些实施方案中,病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。使用不同的AAV血清型来优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如眼组织)内的具体细胞类型。rAAV颗粒可以包含相同血清型或混合血清型的病毒蛋白和病毒核酸。例如,在一些实施方案中,rAAV颗粒可以包含本发明的AAV2衣壳蛋白和至少一个AAV2 ITR,或者其可以包含AAV2衣壳蛋白和至少一个AAV1ITR。本文中提供了用于产生rAAV颗粒的AAV血清型的任何组合,如同每个组合已经在本文中明确陈述一样。在一些实施方案中,本发明提供了包含本发明的AAV2衣壳的rAAV颗粒。在一些实施方案中,本发明提供了包含本发明的AAVrh8R衣壳的rAAV颗粒。

[0240] 在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV1衣壳、AAV2衣壳、AAV3衣壳、AAV4衣壳、AAV5衣壳、AAV6衣壳(例如,野生型AAV6衣壳或变体AAV6衣壳,例如如US PG Pub.2012/0164106中描述的ShH10)、AAV7衣壳、AAV8衣壳、AAVrh8衣壳、AAVrh8R衣壳、AAV9衣壳(例如野生型AAV9衣壳或如U.S.PG Pub.2013/0323226中描述的修饰的AAV9衣壳)、AAV10衣壳、AAVrh10衣壳、AAV11衣壳、AAV12衣壳、酪氨酸衣壳突变体、肝素结合衣壳突变体、AAV2R471A衣壳、AAVAAV2/2-7m8衣壳、AAV DJ衣壳(例如AAV-DJ/8衣壳、AAV-DJ/9衣壳或如U.S.PG Pub.2012/0066783中描述的任何其他衣壳)、AAV2 N587A衣壳、AAV2 E548A衣壳、AAV2 N708A衣壳、AAV V708K衣壳、山羊AAV衣壳、AAV1/AAV2嵌合衣壳、牛AAV衣壳、小鼠AAV衣壳、rAAV2/HBoV1衣壳或在美国专利No.8,283,151或国际公开号W0/2003/042397中描述的AAV衣壳。在一些实施方案中,突变体衣壳蛋白维持形成AAV衣壳的能力。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV5酪氨酸突变体衣壳(Zhong L.等人,(2008)Proc Natl Acad Sci U S A 105(22):7827-7832。在进一步的实施方案中,rAAV颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型的衣壳蛋白(Gao,等人,J.Virol.2004,78(12):6381)。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV1衣壳蛋白或其突变体。在其他实施方案中,rAAV颗粒包含AAV2衣壳蛋白或其突变体。在一些实施方案中,AAV血清型是AAV1、AAV2、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10或AAVrh10。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV血清型1(AAV1)衣壳。在一些实施方案中,rAAV颗粒包含AAV血清型2(AAV2)衣壳。在一些实施方案中,重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。在一些实施方案中,AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变,例如,如下文所述。

[0241] 已知AAV (例如AAV2、AAVrh8R等) 的衣壳包括三种衣壳蛋白:VP1、VP2和VP3。这些蛋白含有大量重叠氨基酸序列和独特的N端序列。AAV2衣壳包括60个以二十面体对称排列的亚基(Xie,Q.等人,(2002) Proc.Natl.Acad.Sci.99(16):10405-10)。发现VP1、VP2和VP3以1:1:10的比例存在。

[0242] 已知AAV2衣壳蛋白和HSPG之间的结合经由碱性AAV2衣壳蛋白残基和带负电荷的糖胺聚糖残基之间的静电相互作用而发生(Opie,SR等人,(2003) J.Virol.77:6995-7006; Kern,A等人,(2003) J.Virol.77:11072-11081)。涉及这些相互作用的具体衣壳残基包括R484、R487、K532、R585和R588。已经显示这些残基中的突变降低了AAV2与Hela细胞和自身乙酰肝素的结合(Opie,SR等人,(2003) J.Virol.77:6995-7006;Kern,A等人,(2003) J.Virol.77:11072-11081;WO 2004/027019 A2、美国专利No.7,629,322)。此外,不希望受理论的束缚,人们认为在对应于基于AAV2的VP1编号的氨基酸编号484、487、532、585或588的一个或多个残基处的氨基酸取代可以调变不与HSPG结合的AAV衣壳类型的转导特性,或者可以不依赖其结合HSPG的能力来调变AAV衣壳类型的转导特性。

[0243] 在一些实施方案中,rAAV颗粒在衣壳蛋白中与HSPG相互作用的残基处或在对应于基于AAV2的VP1编号的氨基酸编号484、487、532、585或588的一个或多个残基处具有突变。因此,在一些实施方案中,与包含具有参考rAAV衣壳蛋白(例如野生型rAAV衣壳蛋白)的rAAV衣壳的rAAV颗粒的异源核酸的表达水平相比,由rAAV载体编码的异源核酸在递送后以增加的表达水平表达。在一些实施方案中,核酸的表达增加至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约75%或至少约100%。在一些实施方案中,与包含参考rAAV衣壳蛋白(例如野生型rAAV衣壳蛋白)的rAAV颗粒相比,rAAV颗粒在递送后引起神经炎症减轻。在一些实施方案中,神经炎症减轻至少约10%、至少约25%、至少约50%、至少约75%或至少约100%。适合的参考rAAV衣壳蛋白可以包括在与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖相互作用的一个或多个位置处缺乏一个或多个氨基酸取代的任何衣壳蛋白(参考衣壳因此可以含有一个或多个不改变与HSPG结合的“背景”取代)。

[0244] 在一些实施方案中,rAAV颗粒包含a) 包含rAAV衣壳蛋白的rAAV衣壳,所述rAAV衣壳蛋白包含在与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖相互作用的一个或多个位置处的一个或多个氨基酸取代,以及b) 包含异源核酸和至少一个AAV反向末端重复序列的rAAV衣壳。

[0245] 在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代使rAAV颗粒与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的结合减少约至少10%、约至少25%、约至少50%、约至少75%或约至少100%。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代使rAAV颗粒与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的结合减少约至少10%、约至少15%、约至少20%、约至少25%、约至少30%、约至少35%、约至少40%、约至少45%、约至少50%、约至少55%、约至少60%、约至少65%、约至少70%、约至少75%、约至少80%、约至少85%、约至少90%、约至少95%或约至少100%(与包含野生型衣壳的rAAV颗粒的结合相比)。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代使rAAV颗粒与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖的结合减少下列任一百分比:约10%至约100%、约20%至约100%、约30%至约100%、约40%至约100%、约50%至约100%、约60%至约100%、约70%至约100%、约80%至约100%、约90%至约100%、约10%至约90%、约20%至约90%、约30%至约90%、约40%至约90%、约50%至约90%、约60%至约90%、约70%至约90%、约80%至约90%、约10%至约80%、约20%至约80%、约30%至约80%、约40%至约80%、约50%至约

80%、约60%至约80%、约70%至约80%、约10%至约70%、约20%至约70%、约30%至约70%、约40%至约70%、约50%至约70%、约60%至约70%、约10%至约60%、约20%至约60%、约30%至约60%、约40%至约60%、约50%至约60%、约10%至约50%、约20%至约50%、约30%至约50%、约40%至约50%、约10%至约40%、约20%至约40%、约30%至约40%、约10%至约30%、约20%至约30%或约10%至约20% (与包含野生型衣壳的rAAV颗粒的结合相比)。在一些实施方案中,与野生型rAAV颗粒的结合相比,一个或多个氨基酸取代导致没有可检测的rAAV颗粒与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖结合。测量AAV颗粒与HSPG结合的手段是本领域已知的;例如与硫酸乙酰肝素色谱介质结合或与已知在细胞表面上表达HSPG的所述细胞结合。例如,参见Opie,SR等人,(2003) J.Virol.77:6995-7006和Kern,A等人,(2003) J.Virol.77:11072-11081。

[0246] 在一些实施方案中,rAAV颗粒包含减少或消除rAAV颗粒与硫酸乙酰肝素蛋白聚糖结合的衣壳蛋白的一个或多个氨基酸取代,和/或其中所述一个或多个氨基酸取代在基于AAV2的VP1编号的位置编号484、487、532、585或588处。如本文中使用的,“基于AAV2的VP1的编号”是指与所述AAV2的VP1的氨基酸对应的所述衣壳蛋白的氨基酸。例如,如果一个或多个氨基酸取代处于基于AAV2的VP1编号的位置347、350、390、395、448、451、484、487、527、532、585和/或588处,则所述一个或多个氨基酸取代位于对应于AAV2的VP1的氨基酸347、350、390、395、448、451、484、487、527、532、585和/或588的所述衣壳蛋白的氨基酸处。在一些实施方案中,所述一个或多个氨基酸取代在AAV2的VP1的位置484、487、532、585或588处。在一些实施方案中,基于AAV2的VP1编号,所述一个或多个氨基酸取代在AAV3的VP1的位置484、487、532、585或588处。在一些实施方案中,基于AAVrh8R的VP1编号,所述一个或多个氨基酸取代在位置485、488、528、533、586或589处。在一些实施方案中,对应于氨基酸585和/或588(基于AAV2的VP1的编号)的位置处的一个或多个氨基酸被精氨酸残基替换(例如AAV1或AAV6的S586和/或T589;AAV9的S586和/或A589;AAVrh8R的A586和/或T589;AAV8的Q588和/或T591;和AAVrh10的Q588和/或A591)。在其他实施方案中,在对应于氨基酸484、487、527和/或532(基于AAV2的VP1的编号)的位置处的一个或多个氨基酸(例如,精氨酸或赖氨酸)被非正电荷氨基酸(诸如丙氨酸)替换(例如,AAV1或AAV6的R485、R488、K528和/或K533;AAV9或AAVrh8R的R485、R488、K528和/或R533;和AAV8或AAVrh10的R487、R490、K530和/或R535)。

其他病毒颗粒

[0247] 在一些实施方案中,载体是重组腺病毒载体。在一些实施方案中,病毒颗粒是腺病毒颗粒。在一些实施方案中,腺病毒颗粒是重组腺病毒颗粒,例如包含在两个ITR之间的本公开的一种或两种引导RNA和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列的多核苷酸载体。在一些实施方案中,所述腺病毒颗粒缺乏或含有一个或多个E1基因的缺陷拷贝,致使腺病毒复制缺陷。腺病毒包含位于大的(约950Å)无包膜的二十面体衣壳内的线性双链DNA基因组。腺病毒具有可以组入超过30kb的异源序列(例如,代替E1和/或E3区域)的大的基因组,使得它们特别适合用于较大的异源基因。已知它们感染分裂细胞和非分裂细胞,并且不会自然整合到宿主基因组中(虽然杂交变体可能具备这种能力)。在一些实施方案中,腺病毒载体可以是具有代替E1的异源序列的第一代腺病毒载体。在一些实施方案中,腺病毒载体可以是具有在E2A、E2B和/或E4中的其他突变或缺失的第二代腺病毒载体。在一些实施方案

中,腺病毒载体可以是第三代或空壳 (guttled) 腺病毒载体,其缺乏所有病毒编码基因,仅保留ITR和包装信号,并且需要用于复制和包装的反式辅助腺病毒。已经研究腺病毒颗粒用作哺乳动物细胞瞬时转染的载体以及基因治疗载体。关于进一步的描述参见,例如,Danthinne,X.和Imperiale,M.J. (2000) *Gene Ther.* 7:1707-14,以及Tatsis,N.和Ertl,H.C. (2004) *Mol. Ther.* 10:616-29。

[0248] 在一些实施方案中,病毒颗粒是包含包括本公开的一种或两种引导RNA的核酸和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列的重组腺病毒颗粒。任何腺病毒血清型的使用都被认为在本发明的范围内。在一些实施方案中,重组腺病毒载体是源自腺病毒血清型的载体,包括但不限于腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。在一些实施方案中,重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

[0249] 在一些实施方案中,载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。在一些实施方案中,重组病毒颗粒包括与一种或多种外来病毒衣壳蛋白组合的腺病毒颗粒。这样的组合可以被称为假型化重组腺病毒颗粒。在一些实施方案中,用于假型化重组腺病毒颗粒的外来病毒衣壳蛋白源自外来病毒或来自另一种腺病毒血清型。在一些实施方案中,外来病毒衣壳蛋白源自(包括但不限于)呼肠孤病毒3型。在假型化腺病毒颗粒中使用的载体和衣壳蛋白组合的实例可以在以下参考文献中找到(Tatsis,N.等人,(2004) *Mol. Ther.* 10 (4) :616-629 and Ahi,Y.等人,(2011) *Curr. Gene Ther.* 11 (4) :307-320)。可以使用不同的腺病毒血清型来优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如患病组织)内的具体细胞类型。具体的腺病毒血清型所靶向的组织或细胞包括但不限于:肺(例如HuAd3)、脾和肝(例如HuAd37)、平滑肌、滑膜细胞、树突细胞、心血管细胞、肿瘤细胞系(例如HuAd11)和树突细胞(例如用呼肠孤病毒3型假型化的HuAd5、HuAd30或HuAd35)。关于进一步的描述,参见Ahi,Y.等人,(2011) *Curr. Gene Ther.* 11 (4) :307-320,Kay,M.等人,(2001) *Nat. Med.* 7 (1) :33-40,和Tatsis,N.等人,(2004) *Mol. Ther.* 10 (4) :616-629。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒可以含有来自腺病毒血清型(包括但不限于)2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad3型的衣壳。在一些实施方案中,重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

[0250] 在一些实施方案中,载体是重组慢病毒载体。在一些实施方案中,病毒颗粒是慢病毒颗粒。在一些实施方案中,慢病毒颗粒是重组慢病毒颗粒,例如包含在两个LTR之间的本公开的一种或两种引导RNA和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列的多核苷酸载体。慢病毒是具有大约10kb基因组的正义的ssRNA逆转录病毒。已知慢病毒整合到分裂细胞和非分裂细胞的基因组中。可以例如通过将多个质粒(通常将慢病毒基因组以及复制和/或包装所需的基因分开以防止病毒复制)转染到包装细胞系中产生慢病毒颗粒,所述包装细胞系将修饰的慢病毒基因组包装到慢病毒颗粒中。在一些实施方案中,慢病毒颗粒可以指缺乏

包膜蛋白的第一代载体。在一些实施方案中,慢病毒颗粒可以指缺乏除gag/pol和tat/rev区域之外的所有基因的第二代载体。在一些实施方案中,慢病毒颗粒可以指无tat基因的仅含有内源性rev、gag和pol基因并且具有用于转导的嵌合LTR的第三代载体(参见Dull,T.等人,(1998) J.Virol.72:8463-71)。关于进一步的描述,参见Durand,S.和Cimarelli,A.(2011) Viruses 3:132-59。

[0251] 在一些实施方案中,病毒颗粒是包含包括本公开的一种或两种引导RNA的核酸和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列的重组慢病毒颗粒。任何慢病毒载体的使用都被认为在本发明的范围内。在一些实施方案中,慢病毒载体源自慢病毒,包括但不限于人类免疫缺陷病毒-1 (HIV-1)、人类免疫缺陷病毒-2 (HIV-2)、猴免疫缺陷病毒 (SIV)、猫免疫缺陷病毒FIV)、马传染性贫血病毒 (EIAV)、牛免疫缺陷病毒 (BIV)、Jembrana病病毒 (JDV)、绵羊脱髓鞘病毒 (VV) 和山羊关节炎脑炎病毒 (CAEV)。

[0252] 在一些实施方案中,载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。在一些实施方案中,重组病毒颗粒包括与一种或多种外来病毒衣壳蛋白组合的慢病毒载体。这样的组合可以被称为假型化重组慢病毒颗粒。在一些实施方案中,用于假型化重组慢病毒颗粒的外来病毒衣壳蛋白源自外来病毒。在一些实施方案中,用于假型化重组慢病毒颗粒中的外来病毒衣壳蛋白是水疱性口炎病毒糖蛋白 (VSV-GP)。VSV-GP与普遍存在的细胞受体相互作用,从而为假型化重组慢病毒颗粒提供广泛的组织嗜性。另外,VSV-GP被认为给假型化重组慢病毒颗粒提供了更高的稳定性。在其他实施方案中,外来病毒衣壳蛋白源自(包括但不限于)金迪普拉病毒 (Chandipura virus)、狂犬病病毒、莫科拉病毒 (Mokola virus)、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、辛德毕斯病毒 (Sindbis virus)、塞姆利基森林病毒 (Semliki Forest virus, SFV)、委内瑞拉马脑炎病毒、雷斯顿埃博拉病毒 (Ebola virus Reston)、扎伊尔埃博拉病毒 (Ebola virus Zaire)、马尔堡病毒、拉沙病毒、禽白血病毒 (ALV)、绵羊加亚嘉西科逆转录病毒 (Jaagsiekte sheep retrovirus, JSRV)、莫洛尼鼠白血病毒 (Moloney Murine leukemia virus, MLV)、长臂猿白血病毒 (GALV)、猫内源性逆转录病毒 (RD114)、嗜人T淋巴细胞病毒1 (HTLV-1)、人泡沫病毒、梅迪-维斯纳病毒 (Maedi-visna virus, MVV)、SARS-CoV、仙台病毒 (Sendai virus)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、人副流感病毒3型、丙型肝炎病毒 (HCV)、流感病毒、鸡瘟病毒 (FPV) 或苜蓿银纹夜蛾多核多角体病毒 (AcMNPV)。

[0253] 在一些实施方案中,重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒 (Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。用于假型化慢病毒颗粒中的载体和衣壳蛋白组合的实例可以例如在Cronin,J.等人,(2005) .Curr.Gene Ther.5 (4) :387-398中找到。可以使用不同的假型化重组慢病毒颗粒来优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如患病组织)内的具体细胞类型。例如,被具体假型化重组慢病毒颗粒靶向的组织包括但不限于:肝(例如用VSV-G、LCMV、RRV或SeVF蛋白假型化)、肺(例如用埃博拉病毒、马尔堡病毒、SeVF和HN或JSRV蛋白假型化)、胰岛细胞(例如用LCMV蛋白假型化)、中枢神经系统(例如用VSV-G、LCMV、狂犬病病毒或莫科拉病毒蛋白假型化)、视网膜(例如用VSV-G或莫科拉病毒蛋白假型化)、单核细胞或肌肉(例如用莫科拉病毒或埃博拉病毒蛋白假型化)、

造血系统(例如用RD114或GALV蛋白假型化)或癌细胞(例如用GALV或LCMV蛋白假型化)。关于进一步的描述,参见Cronin,J.等人,(2005).*Curr. Gene Ther.* 5 (4):387-398和Kay,M.等人,(2001)*Nat. Med.* 7 (1):33-40。在一些实施方案中,重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

[0254] 在一些实施方案中,载体是rHSV载体。在一些实施方案中,病毒颗粒是单纯疱疹病毒(HSV)颗粒。在一些实施方案中,HSV颗粒是rHSV颗粒,例如包含在两个TR之间的本公开的一种或两种引导RNA和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列的多核苷酸载体。HSV是具有大约152kb基因组的有包膜的双链DNA病毒。有利地,其大约一半的基因是非必需的,并且可以被缺失以容纳异源序列。HSV颗粒感染非分裂细胞。另外,它们在神经元中自然地建立潜伏,通过逆行运输移行,并且可以跨突触转移,使得它们有利于转染神经元和/或涉及神经系统的基因治疗方法。在一些实施方案中,HSV颗粒可以是复制缺陷的或具有复制能力的(例如,通过失活一个或多个晚期基因而具有单个复制周期的能力)。关于进一步的描述,参见Manservigi,R.等人,(2010)*Open Virol. J.* 4:123-56。

[0255] 在一些实施方案中,病毒颗粒是包含包括本公开的一种或两种引导RNA的核酸和/或编码本公开的Cas蛋白的核苷酸序列的rHSV颗粒。任何HSV载体的使用都被认为在本发明的范围内。在一些实施方案中,HSV载体源自HSV血清型,包括但不限于HSV-1和HSV-2。

[0256] 在一些实施方案中,载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。在一些实施方案中,病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。在一些实施方案中,重组病毒颗粒包括与一种或多种外来病毒衣壳蛋白组合的HSV载体。这样的组合可以被称为假型化rHSV颗粒。在一些实施方案中,用于假型化rHSV颗粒的外来病毒衣壳蛋白源自外来病毒或来自另一种HSV血清型。在一些实施方案中,用于假型化rHSV颗粒的外来病毒衣壳蛋白是水疱性口膜炎病毒糖蛋白(VSV-GP)。VSV-GP与普遍存在的细胞受体相互作用,从而为假型化rHSV颗粒提供广泛的组织向性。另外,VSV-GP被认为给假型化rHSV颗粒提供了更高的稳定性。在其他实施方案中,外来病毒衣壳蛋白可以来自不同的HSV血清型。例如,HSV-1载体可以含有一种或多种HSV-2衣壳蛋白。可以使用不同的HSV血清型来优化特定靶细胞的转导或靶向特定靶组织(例如患病组织)内的具体细胞类型。被具体腺病毒血清型靶向的组织或细胞包括但不限于中枢神经系统和神经元(例如HSV-1)。关于进一步的描述,参见Manservigi,R.等人,(2010)*Open Virol J* 4:123-156,Kay,M.等人,(2001)*Nat. Med.* 7 (1):33-40,和Meignier,B.等人,(1987)*J. Infect. Dis.* 155 (5):921-930。在一些实施方案中,重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

病毒颗粒的产生

[0257] 本领域已知有许多方法用于产生腺病毒载体颗粒。例如,对于空壳腺病毒载体,可以将腺病毒载体基因组和辅助腺病毒基因组转染到包装细胞系(例如,293细胞系)中。在一些实施方案中,辅助腺病毒基因组可以含有侧接其包装信号的重组位点,并且两个基因组都可以被转染到表达重组酶的包装细胞系中(例如可以使用Cre/loxP系统),使得感兴趣的腺病毒载体比辅助腺病毒更有效地被包装(参见例如Alba,R.等人,(2005)*Gene Ther.* 12 Suppl 1:S18-27)。可以使用标准方法比如本文所述的方法收获和纯化腺病毒载体。

[0258] 本领域已知有许多方法用于产生慢病毒载体颗粒。例如,对于第三代慢病毒载体,

可以将含有具有gag和pol基因的感兴趣的慢病毒基因组的载体与含有rev基因的载体一起共转染到包装细胞系(例如,293细胞系)中。感兴趣的慢病毒基因组还含有在没有Tat的情况下促进转录的嵌合LTR(参见Dull,T.等人,(1998) J.Virol.72:8463-71)。可以采用本文所述的方法收获和纯化慢病毒载体(例如,Segura MM等人,(2013) Expert Opin Biol Ther.13(7):987-1011)。

[0259] 本领域已知有许多方法用于产生HSV颗粒。可以使用标准方法比如本文所述的方法收获和纯化HSV载体。例如,对于复制缺陷型HSV载体,可以将缺乏所有立即早期(IE)基因的感兴趣的HSV基因组转染到提供病毒产生所需基因的互补细胞系中,如ICP4、ICP27和ICP0(参见例如Samaniego,L.A.等人(1998) J.Virol.72:3307-20)。可以使用所述方法收获和纯化HSV载体(例如Goins,WF等人,(2014) Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology 1144:63-79)。

[0260] 本领域已知有许多方法用于产生rAAV载体,包括转染、稳定细胞系的产生以及感染性杂交病毒产生系统,所述系统包括腺病毒-AAV杂交体、疱疹病毒-AAV杂交体(Conway,JE等人,(1997) J.Virology 71(11):8780-8789)和杆状病毒-AAV杂交体。用于产生rAAV病毒颗粒的rAAV产生培养物都需要:1) 适合的宿主细胞;2) 适合的辅助病毒功能,3) AAV rep和cap基因以及基因产物;4) 侧接有至少一个AAV ITR序列(例如超大rAAV载体基因组)的核酸(例如治疗性核酸);和5) 支持rAAV产生的适当介质和介质成分。在一些实施方案中,适合的宿主细胞是灵长类宿主细胞。在一些实施方案中,适合的宿主细胞是人源细胞系,例如HeLa、A549、293或Perc.6细胞。在一些实施方案中,适合的辅助病毒功能由野生型或突变型腺病毒(例如温度敏感性腺病毒)、疱疹病毒(HSV)、杆状病毒或提供辅助功能的质粒构建体提供。在一些实施方案中,AAV rep和cap基因产物可以来自任何AAV血清型。一般而言,但不是强制性的,AAV rep基因产物与rAAV载体基因组的ITR具有相同的血清型,只要rep基因产物可以起到复制和包装rAAV基因组的作用即可。本领域已知有适合的培养基可以用于产生rAAV载体。这些培养基包括但不限于由Hyclone Laboratories和JRH生产的培养基,包括改良伊格尔培养基(MEM)、达尔伯克改良伊格尔培养基(DMEM)、定制配方,如美国专利No.6,566,118中所述的那些;以及如美国专利No.6,723,551中所述的Sf-900 II SFM培养基,通过提述将每篇文献完整并入本文,特别是关于用于产生重组AAV载体的定制培养基配方。在一些实施方案中,AAV辅助功能由腺病毒或HSV提供。在一些实施方案中,AAV辅助功能由杆状病毒提供,并且宿主细胞为昆虫细胞(例如草地贪夜蛾(Sf9)细胞)。用于复制AAV的腺病毒辅助功能的实例包括E1A功能、E1B功能、E2A功能、VA功能和E4orf6功能。可从保藏中心获得的杆状病毒包括苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒。

[0261] 可以使用本领域已知的方法产生rAAV颗粒。参见,例如,美国专利No.6,566,118;6,989,264;和6,995,006。在实施本发明时,用于产生rAAV颗粒的宿主细胞包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、微生物和酵母。宿主细胞也可以是包装细胞,其中AAV rep和cap基因稳定地保持在宿主细胞中,或可以是生产细胞,其中AAV载体基因组被稳定保持。示例性的包装和生产细胞来自293、A549或HeLa细胞。使用本领域已知的标准技术纯化和配制AAV载体。

[0262] 在一些实施方案中,可以通过三重转染方法产生rAAV颗粒,例如下文提供的示例性三重转染方法。简言之,可以将含有rep基因和衣壳基因的质粒与辅助腺病毒质粒一起转

染(例如,使用磷酸钙法)到细胞系(例如HEK-293细胞)中,并且可以收集病毒并任选地进行纯化。

[0263] 在一些实施方案中,可以通过生产细胞系方法产生rAAV颗粒(参见,例如,Martin等人,(2013) Human Gene Therapy Methods 24:253-269)。简言之,可以用含有rep基因、衣壳基因和启动子-转基因序列的质粒稳定地转染细胞系(例如,HeLa细胞系)。可以筛选细胞系来选择用于rAAV产生的先导克隆,然后可以将其在生产生物反应器中扩增,并用作为辅助者的腺病毒(例如野生型腺病毒)感染来启动rAAV产生。随后可以收获病毒,可使腺病毒失活(例如通过加热)和/或将其去除,并可纯化rAAV颗粒。在一些实施方案中,生产细胞系源自HeLa、293、A549或Perc.6细胞。在一些实施方案中,生产细胞系适于悬浮生长。在一些实施方案中,AAV辅助功能由腺病毒、HSV或杆状病毒提供。

[0264] 在一些实施方案中,在提供辅助功能之后约48小时至约96小时之间收集rAAV颗粒。例如,在一些实施方案中,在提供辅助功能之后约48小时、约60小时、约72小时、约84小时或约96小时收集rAAV颗粒。在一些实施方案中,在提供辅助功能之后约48小时和约96小时、约48小时和约84小时、约48小时和约72小时、约48小时和约60小时、约60小时和约96小时、约60小时和约84小时、约60小时和约72小时、约72小时和约96小时、约72小时和约84小时或约84小时和约96小时收集rAAV颗粒。

[0265] 本发明的适合rAAV生产培养基可以以0.5%-20% (v/v或w/v)的水平补充血清或血清来源的重组蛋白。或者,如本领域已知的,可以在无血清条件下产生rAAV载体,所述条件也可以被称为不含动物源产物的培养基。本领域的普通技术人员可以理解,设计用于支持rAAV载体产生的商业或定制培养基也可以补充有本领域已知的一种或多种细胞培养组分,包括但不限于葡萄糖、维生素、氨基酸和/或生长因子,目的是增加生产培养基中rAAV的滴度。

[0266] rAAV生产培养物可以在适合于所采用的特定宿主细胞的各种条件下(在宽的温度范围内,持续不同的时间长度,等等)生长。如本领域已知的,rAAV生产培养物包括附着依赖性培养物,其可以在适合的附着依赖性容器例如像滚瓶、中空纤维过滤器、微载体和填充床或流化床生物反应器中培养。rAAV载体生产培养物还可以包括悬浮适应的宿主细胞,例如可以以多种方式培养的HeLa、293和SF-9细胞,包括例如旋转瓶、搅拌罐生物反应器和一次性系统比如波浪袋系统。

[0267] 可以通过裂解生产培养物的宿主细胞或通过收获来自生产培养物的用过的培养基从rAAV生产培养物中收获本发明的rAAV载体颗粒,条件是在本领域已知的条件下培养细胞以引起rAAV颗粒从完整细胞释放到培养基中,如美国专利No.6,566,118中更充分描述的)。裂解细胞的适合方法在本领域中也是已知的,并且包括例如多个冷冻/解冻循环、超声处理、微流化和用化学品如洗涤剂和/或蛋白酶处理。

[0268] 在一个另外的实施方案中,将病毒颗粒纯化。如本文中使用的,术语“纯化的”包括病毒颗粒制剂,所述制剂至少没有在病毒颗粒天然存在或最初由其制备的情况下可能也存在的一些其他组分。因此,例如,可以使用纯化技术来制备分离的病毒颗粒,以此从源混合物(例如培养物裂解物或生产培养物上清液)富集分离的病毒颗粒。可以通过多种方式来量度富集,例如通过溶液中存在的DNA酶抗性颗粒(DRP)或基因组拷贝(gc)的比例或通过感染性来量度,或者可以根据存在于源混合物中的第二潜在干扰物质加以量度,所述干扰物质

例如污染物,包括生产培养污染物或过程中污染物,包括辅助病毒、培养基成分等。

[0269] 在一些实施方案中,将病毒生产培养物收获物澄清以除去宿主细胞碎片。在一些实施方案中,通过一系列深度过滤器过滤来澄清生产培养物收获物,所述过滤器包括例如a级DOHC Millipore Millistak+HC Pod过滤器、a级A1HC Millipore Millistak+HC Pod过滤器和0.2 μ m Filter Opticap XL10 Millipore Express SHC亲水膜过滤器。也可以通过本领域已知的多种其他标准技术来实现澄清,例如离心或通过本领域已知的0.2 μ m或更大孔径的任何乙酸纤维素过滤器过滤。

[0270] 在一些实施方案中,用Benzonase[®]进一步处理病毒生产培养物收获物以消化存在于生产培养物中的任何高分子量DNA。在一些实施方案中,在本领域已知的标准条件下进行Benzonase[®]消化,所述条件包括例如终浓度为1-2.5单位/ml的Benzonase[®],在环境温度至37℃的温度下持续30几分钟到几个小时的时间。

[0271] 可以使用一个或多个以下纯化步骤分离或纯化rAAV颗粒:平衡离心;流通阴离子交换过滤;用于浓缩rAAV颗粒的切向流过滤(TFF);通过磷灰石色谱进行rAAV捕获;辅助病毒的热灭活;通过疏水相互作用色谱进行rAAV捕获;通过尺寸排阻色谱(SEC)进行缓冲液交换;纳米过滤;并通过阴离子交换色谱、阳离子交换色谱或亲和色谱进行rAAV捕获。这些步骤可以单独地、以各种组合方式或以不同的顺序加以使用。纯化rAAV颗粒的方法在例如Xiao等人,(1998) Journal of Virology 72:2224-2232;美国专利号6,989,264和8,137,948;和W0 2010/148143中找到。纯化腺病毒颗粒的方法在例如Bo,H等人,(2014) Eur.J.Pharm.Sci.67C:119-125中找到。纯化慢病毒颗粒的方法在例如Segura MM等人,(2013) Expert Opin Biol Ther.13(7):987-1011中找到。纯化HSV颗粒的方法在例如Goins,WF等人,(2014) Herpes Simplex Virus Methods in Molecular Biology 1144:63-79中找到。

[0272] 在一些实施方案中,病毒颗粒在药物制剂中。在一些实施方案中,药物制剂包含药学上可接受的载体。这样的载体在本领域中是熟知的(参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,15th Edition,pp.1035-1038 and 1570-1580)。在一些实施方案中,包含本文所述的病毒颗粒和药学上可接受的载体的药物组合物适合于眼部注射。这样的药学上可接受的载体可以是无菌液体,如水或油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油等等。也可以采用盐水溶液和葡萄糖水溶液、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液作为液体载体,特别是用于注射溶液。药物组合物可以进一步包含另外的成分,例如防腐剂、缓冲剂、张度剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子润湿剂或澄清剂、增稠剂等。本文所述的药物组合物可以包装为单一单位剂量或多剂量形式。通常将组合物配制成无菌的基本上等渗的溶液。

VI. 治疗方法

[0273] 本公开的某些方面涉及向个体施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含例如如上所述的编码本公开的工程改造的、非天然存在的CRISPR-Cas系统的核酸。

[0274] 在一些实施方案中,本公开的方面涉及向个体施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含本公开的Cas蛋白和一种或多种包含第一引导RNA和第二引导RNA的核酸,其中第一引导RNA和第二引导RNA与突变(包括例如如上所述的深内含子突变)侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。也就是说,对于本公开的任何方法、组合物和试剂盒,Cas蛋白可以被提供为编

码Cas蛋白的核苷酸序列,或提供为多肽。作为非限制性实例,可以使用阳离子脂质介导的递送将Cas蛋白与一种或多种引导RNA(例如,sgRNA)一起施用(参见,例如,Zuris,J.A.等人,Nat Biotechnol.33:73-80)。在一些实施方案中,可以将Cas蛋白与一种或多种引导RNA以复合物的形式施用,例如,如CRISPR-Cas效应复合物。应该理解的是,下文描述的递送和/或给药方法中的任一种可以用于递送与一种或多种引导RNA一起施用的Cas蛋白。在一些实施方案中,从如上所述的自限性表达盒表达Cas蛋白。

[0275] 在一些实施方案中,以静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眼内、植入、吸入、鞘内、心室内或鼻内方式施用包含编码本公开的工程改造的、非天然存在的CRISPR-Cas系统的核酸的组合物(或包含本公开的Cas蛋白和本公开的一种或多种引导RNA的组合物)。

[0276] 在一些实施方案中,以视网膜下或玻璃体内方式施用包含编码本公开的工程改造的、非天然存在的CRISPR-Cas系统的核酸的组合物(或包含本公开的Cas蛋白和本公开的一种或多种引导RNA的组合物)。视网膜疾病(例如与深内含子突变相关的眼部疾病)的基因治疗方案需要将核酸局部递送至视网膜中的细胞。在这些疾病中作为治疗靶标的细胞是视网膜中的感光细胞或感觉神经性视网膜下的RPE细胞。向这些细胞输送核酸需要注射到视网膜和RPE之间的视网膜下腔。

[0277] 在一些方面,本发明提供了包含本文所述的任何核酸的组合物,其任选地在药学上可接受的赋形剂中。如本领域所熟知的,药学上可接受的赋形剂是相对惰性的物质,其有利于药理学有效物质的给药,并且可以被提供为液体溶液或悬浮液、提供为乳液或提供为适于在使用前溶解或悬浮于液体中的固体形式。例如,赋形剂可以赋予形式或稠度,或用作稀释剂。适合的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿剂和乳化剂、用于改变渗透性的盐、包封剂、pH缓冲物质和缓冲剂。这样的赋形剂包括适于直接递送至眼睛的任何药剂,其可以被施用而没有过分的毒性。药学上可接受的赋形剂包括但不限于山梨糖醇、各种TWEEN化合物中的任何一种,以及诸如水、盐水、甘油和乙醇的液体。其中可以包括药学上可接受的盐,例如无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸的盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。药学上可接受的赋形剂的彻底论述可获自REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub.Co.,N.J.1991)。

[0278] 通常,这些组合物被配制成为通过视网膜下注射给药。因此,这些组合物可以与药学上可接受的媒介物如盐水、林格平衡盐溶液(pH 7.4)等组合。虽然不是必需的,但是组合物可以任选地被提供为适于精确量给药的单位剂型。

视网膜下递送方法

[0279] 视网膜下递送方法是本领域已知的。例如,参见WO 2009/105690,将其通过提述并入本文。简言之,可以通过下面的简要概述来展示向视网膜下黄斑和中央凹递送组合物(例如,编码本公开的工程改造的、非天然存在的CRISPR-Cas系统的核酸,其可通过如上所述的病毒或非病毒递送方式进行递送)的一般方法。这个例子仅仅意在说明该方法的某些特征,绝不意味着是限制性的。

[0280] 通常,可以使用手术显微镜在直接观察下以眼内(视网膜下)注射组合物的形式递送载体。这个程序可能涉及玻璃体切除术,接着使用细套管经由一处或多处小的视网膜切开将载体悬液注射到视网膜下腔中。

[0281] 简言之,可在适当位置缝合输注套管,以便通过在整个操作中输注(例如盐水)来维持正常的球体积(globe volume)。使用具有适当内径尺寸(例如20至27号)的套管来进行玻璃体切除术,其中切除的玻璃体凝胶的体积被来自输注套管的输注盐水或其他等渗溶液代替。进行玻璃体切除术有利是因为(1)去除其皮质(玻璃体后界膜)促进套管穿透视网膜;(2)其切除和用流体(例如盐水)置换产生容纳眼内注射载体的空间,和(3)其受控的切除降低了视网膜撕裂和意外视网膜脱离的可能性。

[0282] 在一些实施方案中,通过利用具有适当孔径(例如27-45号)的套管,将载体组合物直接注射到中央视网膜外的视网膜下腔中,由此在视网膜下腔中产生泡。在其他实施方案中,在视网膜下注射载体组合物之前,将小体积(例如,约0.1至约0.5ml)的适当流体(如盐水或林格溶液)视网膜下注射到中央视网膜外的视网膜下腔中。到视网膜下腔中的这种初始注射在视网膜下腔内建立了初始流体泡,从而引起在初始泡位置的局部视网膜脱离。这种初始流体泡可促进将载体组合物到视网膜下腔的靶向递送(通过在载体递送之前限定注射平面),并使可能进入脉络膜的载体施用以及注射或回流至玻璃体腔的可能性最小化。在一些实施方案中,可以进一步用包含一种或多种载体组合物和/或一种或多种另外的治疗剂的流体注射这种初始流体泡(通过使用相同或另外的细孔径套管将这些流体直接施用于所述初始流体泡)。

[0283] 可以使用附接于注射器的细孔径套管(例如27-45号)进行载体组合物和/或初始小体积流体的眼内施用。在一些实施方案中,该注射器的柱塞可以由机械化装置驱动,例如通过压下脚踏板。根据要靶向的视网膜区域(但是在中央视网膜之外),在每个受试者中预先确定的位置,通过巩膜切开术使细孔径套管穿过玻璃体腔并进入视网膜。在直接观察下,将载体悬浮液机械注射到感觉神经性视网膜下,利用自密封非扩张视网膜切开术(self-sealing non-expanding retinotomy)引起局部视网膜脱离。如上所述,可以将载体组合物直接注射到视网膜下腔中,从而产生在中央视网膜之外的泡,或者可以将载体注射到中央视网膜之外的初始泡中,从而使其扩张(并使视网膜脱离区扩张)。在一些实施方案中,注射载体组合物之后将另一种流体注射到泡中。

[0284] 不希望受理论的束缚,视网膜下注射的速率和位置可导致局部剪切力,其可损伤黄斑、中央凹和/或下面的RPE细胞。可以按照使剪切力最小化或避免剪切力的速率进行视网膜下注射。在一些实施方案中,在约15-17分钟内注射载体组合物。在一些实施方案中,在约17-20分钟内注射载体。在一些实施方案中,在约20-22分钟内注射载体组合物。在一些实施方案中,以约35至约65l/min的速率注射载体组合物。在一些实施方案中,以约35l/min的速率注射载体组合物。在一些实施方案中,以约40l/min的速率注射载体组合物。在一些实施方案中,以约45l/min的速率注射载体组合物。在一些实施方案中,以约50l/min的速率注射载体组合物。在一些实施方案中,以约55l/min的速率注射载体组合物。在一些实施方案中,以约60l/min的速率注射载体组合物。在一些实施方案中,以约65l/min的速率注射载体组合物。本领域的普通技术人员将认识到,对泡注射的速率和时间可以通过例如下述情况指定:产生足够的视网膜脱离以进入中央视网膜细胞所需要的载体组合物的体积或泡的大小,用于递送载体组合物的套管的尺寸,以及安全地保持本发明的套管的位置的能力。

[0285] 在本发明的一些实施方案中,注射到视网膜的视网膜下腔的组合物的体积大于约1 μ l、2 μ l、3 μ l、4 μ l、5 μ l、6 μ l、7 μ l、8 μ l、9 μ l、10 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l、50 μ l、75 μ l、100 μ l、200 μ

1、300 μ l、400 μ l、500 μ l、600 μ l、700 μ l、800 μ l、900 μ l或1mL中的任一者，或其间的任何量。

[0286] 在一些实施方案中，所述方法包括向眼睛施用(例如通过视网膜下和/或玻璃体内施用)有效量的包含本公开的载体的重组病毒颗粒。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为至少约 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 或 50×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一者。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为约 5×10^{12} 至 6×10^{12} 、 6×10^{12} 至 7×10^{12} 、 7×10^{12} 至 8×10^{12} 、 8×10^{12} 至 9×10^{12} 、 9×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 11×10^{12} 、 11×10^{12} 至 15×10^{12} 、 15×10^{12} 至 20×10^{12} 、 20×10^{12} 至 25×10^{12} 、 25×10^{12} 至 30×10^{12} 、 30×10^{12} 至 50×10^{12} 或 50×10^{12} 至 100×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一者。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为约 5×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 25×10^{12} 或 25×10^{12} 至 50×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一者。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为至少约 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 或 50×10^9 个转导单位/mL中的任一者。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为约 5×10^9 至 6×10^9 、 6×10^9 至 7×10^9 、 7×10^9 至 8×10^9 、 8×10^9 至 9×10^9 、 9×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 11×10^9 、 11×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 20×10^9 、 20×10^9 至 25×10^9 、 25×10^9 至 30×10^9 、 30×10^9 至 50×10^9 或 50×10^9 至 100×10^9 个转导单位/mL中的任一者。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为约 5×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 15×10^9 或 15×10^9 至 25×10^9 或 25×10^9 至 50×10^9 个转导单位/mL中的任一者。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 11×10^{10} 、 15×10^{10} 、 20×10^{10} 、 25×10^{10} 、 30×10^{10} 、 40×10^{10} 或 50×10^{10} 个感染单位/mL中的任一者。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 至 6×10^{10} 、 6×10^{10} 至 7×10^{10} 、 7×10^{10} 至 8×10^{10} 、 8×10^{10} 至 9×10^{10} 、 9×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 11×10^{10} 、 11×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 20×10^{10} 、 20×10^{10} 至 25×10^{10} 、 25×10^{10} 至 30×10^{10} 、 30×10^{10} 至 40×10^{10} 、 40×10^{10} 至 50×10^{10} 或 50×10^{10} 至 100×10^{10} 个感染单位/mL中的任一者。在一些实施方案中，组合物的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 15×10^{10} 或 15×10^{10} 至 25×10^{10} 或 25×10^{10} 至 50×10^{10} 个感染单位/mL中的任一者。

[0287] 在一些实施方案中，所述方法包括向个体(例如，人)的眼睛施用(例如通过视网膜下和/或玻璃体内施用)有效量的包含本公开的载体的重组病毒颗粒。在一些实施方案中，向个体施用的病毒颗粒的剂量为至少约 1×10^8 至约 1×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重中的任一者。在一些实施方案中，向个体施用的病毒颗粒的剂量为约 1×10^8 至约 1×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重中的任一者。

[0288] 可以产生一个或多个(例如2个、3个或更多个)泡。通常，通过本发明的方法和系统产生的一个或多个泡的总体积不能超过眼的流体体积，例如在一般人类受试者中为约4ml。每个单独泡的总体积可以是至少约0.3ml，或者至少约0.5ml，目的是促进具有足够大小的视网膜脱离，以暴露中央视网膜的细胞类型，并产生具有足够依赖性的泡以便于最佳操作。本领域的普通技术人员将认识到，在根据本发明的方法和系统产生气泡时，必须维持适当的眼内压以避免损伤眼结构。每个单独泡的大小可以为例如约0.5至约1.2ml、约0.8至约1.2ml、约0.9至约1.2ml、约0.9至约1.0ml、约1.0至约2.0ml、约1.0至约3.0ml。因此，在一个实例中，为了注射总共3ml的载体组合物悬浮液，可以建立各自约1ml的3个泡。所有组合的泡的总体积可以为例如约0.5至约3.0ml、约0.8至约3.0ml、约0.9至约3.0ml、约1.0至约

3.0ml、约0.5至约1.5ml、约0.5至约1.2ml、约0.9至约3.0ml、约0.9至约2.0ml、约0.9至约1.0ml。

[0289] 为了安全且有效地将靶视网膜区域(例如,中央视网膜)转换到泡的原始位置的边缘之外,可以操纵该泡以将泡重新定位到用于转导的靶区域。泡的操纵可以通过如下方式进行:由泡的体积产生的泡的依赖性,对包含泡的眼的重新定位,对具有包含一个或多个泡的一只或两只眼的人的头部的重新定位、和/或借助于流体-空气交换。这与中央视网膜尤其相关,因为这个区域通常抵抗通过视网膜下注射所致的脱离。在一些实施方案中,利用流体-空气交换将泡重新定位;来自输注套管的流体暂时被空气代替,例如来自吹到视网膜表面上的空气。当空气的体积使玻璃体腔流体从视网膜表面移位时,玻璃体腔内的流体可以从套管流出。玻璃体腔流体暂时缺乏压力,引起泡移动并通过重力吸引到眼的相关部位。通过适当地定位眼球,操纵视网膜下载体组合物的泡,以牵涉相邻区域(例如黄斑和/或中央凹)。在一些情况下,即使不使用流体-空气交换,泡的质量也足以使其受到重力吸引。通过改变受试者头部的位置,可以进一步促进所述泡向期望的位置移动,从而使所述泡能够被重力吸引到期望的眼中位置。一旦实现期望的泡结构,就使流体返回玻璃体腔。所述流体是适当的流体,例如新鲜的盐水。通常,视网膜下载体组合物可以保留在原位而不用针对视网膜切开术的视网膜粘结术,且不用眼内填充物,视网膜将在约48小时内自发地重新附着。

[0290] 通过用本公开的载体安全有效地转导眼细胞(例如,RPE和/或例如黄斑和/或中央凹的感光细胞),本发明的方法可用于治疗个体;例如具有与深内含子突变相关的眼部疾患的人,其中转导的细胞以足以治疗眼部疾患的量产生CRISPR-Cas系统。

[0291] 根据治疗的目标,施用有效量的载体(在一些实施方案中以病毒颗粒的形式)。例如,在低百分比的转导可以实现期望的治疗效果的情况下,治疗的目标通常是达到或超过此转导水平。在一些情况下,可以通过转导仅约1至5%的靶细胞,在一些实施方案中通过转导至少约20%,在一些实施方案中至少约50%,在一些实施方案中至少约80%,在一些实施方案中至少约95%,在一些实施方案中至少约99%的期望的组织类型的细胞来实现此转导水平。作为引导,每次注射施用的病毒颗粒的数量通常在约 1×10^6 至约 1×10^{14} 个颗粒之间,约 1×10^7 至 1×10^{13} 个颗粒之间,约 1×10^9 至 1×10^{12} 个颗粒之间或约 1×10^{11} 个颗粒之间。可以通过一次或多次视网膜下注射施用载体组合物,或在同一个程序中施用,或间隔数天、数周、数月或数年。在一些实施方案中,可以使用多种载体来治疗人。

[0292] 在一些实施方案中,向视网膜施用有效量的本公开的载体或核酸在施用位置处或其附近转导感光细胞。在一些实施方案中,多于约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%或100%中任一者的感光细胞被转导。在一些实施方案中,约5%至约100%、约10%至约50%、约10%至约30%、约25%至约75%、约25%至约50%或约30%至约50%的感光细胞被转导。鉴定转导的感光细胞的方法是本领域已知的;例如,免疫组织化学或标志物诸如增强型绿色荧光蛋白的使用可用于检测转导。

[0293] 在本发明的一些实施方案中,所述方法包括向哺乳动物的视网膜下(例如视网膜下腔)施用有效量的本公开的载体或核酸来治疗具有眼部疾患的个体;例如具有与深内含子突变相关的眼部疾患的人。在一些实施方案中,将组合物注射到视网膜下的一个或多个位置以允许核酸在感光细胞中表达。在一些实施方案中,将组合物注射到视网膜下的一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个或十个以上位置的任一者。

[0294] 在一些实施方案中,将组合物同时或依次施用于一个以上的位置。在一些实施方案中,多次注射的间隔不超过一个小时、两个小时、三个小时、四个小时、五个小时、六个小时、九个小时、十二个小时或24个小时。在一些实施方案中,多次注射的间隔为一天、两天、三天、四天、五天、六天、七天、十天、15天、20天、25天或30天。在一些实施方案中,多次注射的间隔为一个月、两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、八个月、十个月或十一个月。在一些实施方案中,多次注射的间隔是一年、两年、三年、四年、五年、六年、八年、十年、15年、20年、25年、30年、35年、40年、45年、50年、55年或60年。

玻璃体内注射方法

[0295] 可以通过下面的简要概述来说明玻璃体内注射的一般方法。这个例子仅仅意在说明该方法的某些特征,绝不意味着是限制性的。玻璃体内注射的程序是本领域已知的(参见例如Peyman,G.A.等人,(2009) *Retina* 29 (7):875-912以及Fagan,X.J.和Al-Qureshi,S.(2013) *Clin.Experiment.Ophthalmol.* 41 (5):500-7)。

[0296] 简言之,为了给受试者进行玻璃体内注射,可以通过瞳孔扩大、眼部消毒和施用麻醉剂为该程序做好准备。本领域已知的任何适合的扩瞳剂可用于瞳孔扩大。可在治疗前确认足够的瞳孔扩大。灭菌可以通过应用灭菌性眼部处理来实现,例如含碘化物的溶液,如聚维酮碘(BETADINE®)。也可以使用相似的溶液来清洁眼睑、睫毛和任何其他附近的组织(例如皮肤)。可以使用任何适合的麻醉剂,例如任何适合浓度的利多卡因或丙美卡因。可以通过本领域已知的任何方法施用麻醉剂,包括但不限于局部滴剂、凝胶或凝胶剂,以及结膜下应用麻醉剂。

[0297] 在注射之前,可以使用无菌开睑器来清除该区域的睫毛。可以用注射器标记注射部位。可以基于患者的晶状体来选择注射部位。例如,在人工晶状体或无晶状体患者中,注射部位距边缘的距离可以是3-3.5mm,而在有晶状体患者中,注射部位距边缘的距离为3.5-4mm。患者可以朝与注射部位相反的方向看。

[0298] 在一些实施方案中,所述方法包括向眼睛施用(例如通过视网膜下和/或玻璃体内施用)有效量的包含本公开的载体的重组病毒颗粒。在一些实施方案中,组合物的病毒滴度为至少约 5×10^{12} 、 6×10^{12} 、 7×10^{12} 、 8×10^{12} 、 9×10^{12} 、 10×10^{12} 、 11×10^{12} 、 15×10^{12} 、 20×10^{12} 、 25×10^{12} 、 30×10^{12} 或 50×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一者。在一些实施方案中,组合物的病毒滴度为约 5×10^{12} 至 6×10^{12} 、 6×10^{12} 至 7×10^{12} 、 7×10^{12} 至 8×10^{12} 、 8×10^{12} 至 9×10^{12} 、 9×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 11×10^{12} 、 11×10^{12} 至 15×10^{12} 、 15×10^{12} 至 20×10^{12} 、 20×10^{12} 至 25×10^{12} 、 25×10^{12} 至 30×10^{12} 、 30×10^{12} 至 50×10^{12} 或 50×10^{12} 至 100×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一者。在一些实施方案中,组合物的病毒滴度为约 5×10^{12} 至 10×10^{12} 、 10×10^{12} 至 25×10^{12} 或 25×10^{12} 至 50×10^{12} 个基因组拷贝/mL中的任一者。在一些实施方案中,组合物的病毒滴度为至少约 5×10^9 、 6×10^9 、 7×10^9 、 8×10^9 、 9×10^9 、 10×10^9 、 11×10^9 、 15×10^9 、 20×10^9 、 25×10^9 、 30×10^9 或 50×10^9 个转导单位/mL中的任一者。在一些实施方案中,组合物的病毒滴度为约 5×10^9 至 6×10^9 、 6×10^9 至 7×10^9 、 7×10^9 至 8×10^9 、 8×10^9 至 9×10^9 、 9×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 11×10^9 、 11×10^9 至 15×10^9 、 15×10^9 至 20×10^9 、 20×10^9 至 25×10^9 、 25×10^9 至 30×10^9 、 30×10^9 至 50×10^9 或 50×10^9 至 100×10^9 个转导单位/mL中的任一者。在一些实施方案中,组合物的病毒滴度为约 5×10^9 至 10×10^9 、 10×10^9 至 15×10^9 或 15×10^9 至 25×10^9 或 25×10^9 至 50×10^9 个转导单位/mL中的任一者。在一些实施方案中,组合物

的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 、 6×10^{10} 、 7×10^{10} 、 8×10^{10} 、 9×10^{10} 、 10×10^{10} 、 11×10^{10} 、 15×10^{10} 、 20×10^{10} 、 25×10^{10} 、 30×10^{10} 、 40×10^{10} 或 50×10^{10} 个感染单位/mL中的任一者。在一些实施方案中,组合物的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 至 6×10^{10} 、 6×10^{10} 至 7×10^{10} 、 7×10^{10} 至 8×10^{10} 、 8×10^{10} 至 9×10^{10} 、 9×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 11×10^{10} 、 11×10^{10} 至 15×10^{10} 、 15×10^{10} 至 20×10^{10} 、 20×10^{10} 至 25×10^{10} 、 25×10^{10} 至 30×10^{10} 、 30×10^{10} 至 40×10^{10} 、 40×10^{10} 至 50×10^{10} 或 50×10^{10} 至 100×10^{10} 个感染单位/mL中的任一者。在一些实施方案中,组合物的病毒滴度为至少约 5×10^{10} 至 10×10^{10} 、 10×10^{10} 至 15×10^{10} 或 15×10^{10} 至 25×10^{10} 或 25×10^{10} 至 50×10^{10} 个感染单位/mL中的任一者。

[0299] 在一些实施方案中,所述方法包括向个体(例如,人)的眼睛施用(例如通过视网膜下和/或玻璃体内施用)有效量的包含本公开的载体的重组病毒颗粒。在一些实施方案中,向个体施用的病毒颗粒的剂量为至少约 1×10^8 至约 1×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重中的任一者。在一些实施方案中,向个体施用的病毒颗粒的剂量为约 1×10^8 至约 1×10^{13} 个基因组拷贝/kg体重中的任一者。

[0300] 在注射过程中,可以使针垂直于巩膜插入并且指向眼睛的中心。可以如此插入针,使得尖端终止于玻璃体腔而不是视网膜下腔。可以使用本领域已知的用于注射的任何适合的体积。注射后,可以用灭菌剂如抗生素处理眼睛。也可以冲洗眼睛以去除多余的灭菌剂。

视网膜结构和确定核酸递送有效性的方法

[0301] 已知视网膜包含多个层。视网膜中的细胞层可以包括内界膜、神经纤维层、神经节细胞层、内丛状层、内核层、外丛状层、外核层、外界膜、感光细胞层和视网膜色素上皮层。最靠近玻璃体的层是内界膜。这层可以含有Müller细胞,为一类胶质细胞。神经纤维层可以含有来自形成视神经的神经节细胞的轴突。神经节细胞层可以包括神经节细胞和无长突细胞。内丛状层可以含有在神经节和无长突细胞的树突与双极细胞的轴突之间的突触。内核层可以含有无长突细胞、双极细胞和水平细胞的细胞核。外丛状层可以含有在水平细胞树突和感光细胞突起之间的突触。外核层可以含有感光细胞体。外部或外界膜可包括Müller细胞顶端过程之间以及这些过程与感光细胞内段之间的细胞连接,例如粘着连接和桥粒。感光层(也称为视杆细胞和视锥细胞层以及Jacob's膜)可以包含感光细胞,包括视杆细胞和视锥细胞。离玻璃体最远的视网膜层是视网膜色素上皮(RPE),其可以包括一层含有色素颗粒的六边形上皮细胞。

[0302] 已知视网膜还含有许多不同的细胞类型。视网膜神经元可以包括感光细胞、双极细胞、神经节细胞、无长突细胞和水平细胞。感光细胞对光敏感。它们可以感应光线,并通过双极细胞和神经节细胞向视神经传递信号而作出反应。感光细胞可包括通常感应低光照条件下的光的视杆细胞和通常感应颜色和明亮光感的视锥细胞。双极细胞可以接收来自感光细胞的输入并且通过突触传输到无长突细胞或神经节细胞上。神经节细胞可以接收来自无长突细胞或水平细胞的信息,并且它们的轴突形成视神经。水平细胞可以整合来自多个感光细胞的输入,并有助于调节光水平。无长突细胞是中间神经元,它有助于调节双极细胞并向神经节细胞提供输入。视网膜的胶质细胞可以包括Müller细胞、星形胶质细胞和小胶质细胞。

[0303] 可以通过如本文所述的几个标准来监测通过视网膜下或玻璃体内注射进行核酸递送的有效性。在一些实施方案中,通过检测样品中深内含子突变和/或侧翼序列的缺失来

测定有效性,所述样品包括一种或多种核酸递送到其中的细胞。可通过本领域已知的任何手段检测缺失,包括但不限于Southern印迹、PCR、qPCR、DNA测序(例如Sanger测序和下一代测序)、原位杂交、DNA微阵列和Surveyor核酸酶测定法(参见,例如Ran, F. A. 等人, (2013) Nat. Protoc. 8:2281-2308)。在下面的实施例中说明了示例性方法。

[0304] 在一些实施方案中,在功能上测定有效性。例如,在使用本发明的方法在受试者中进行治疗之后,可以通过一个或多个临床参数评估受试者的例如疾病状态的一种或多种体征或症状的进展的改善和/或稳定化和/或延迟。这样的测试的例子是本领域已知的,并且包括客观以及主观的(例如受试者报告的)测量。例如,为了测量治疗对受试者视觉功能的有效性,可以评估以下一项或多项:受试者的主观视觉质量或改善的中央视觉功能(例如,受试者的流利阅读和面部识别能力的改善)、受试者的视觉移动性(例如,导航迷宫所需时间的减少)、视敏度(例如,受试者的LogMAR评分的改善)、微视野检查(例如,受试者的dB评分的改善)、暗适应视野检查(例如受试者的dB评分的改善)、精细矩阵映射(例如,受试者的dB分数的改善)、Goldmann视野检查(例如,减小的暗点区(即,盲区)大小和解析较小目标的能力的改善)、闪烁敏感度(例如,赫兹的改善)、自发荧光和电生理学测量(例如,ERG的改善)。在一些实施方案中,通过受试者的视觉移动性来量度视觉功能。在一些实施方案中,通过受试者的视敏度来量度视觉功能。在一些实施方案中,通过微视野检查来量度视觉功能。在一些实施方案中,通过暗适应视野检查来量度视觉功能。在一些实施方案中,通过ERG来量度视觉功能。在一些实施方案中,通过受试者的主观视觉质量来量度视觉功能。

[0305] 在导致进行性退行性视觉功能的疾病的情况下,早期治疗受试者不仅可以使疾病进展减缓或停止,还可以减轻或防止由于后天性弱视所致的视觉功能丧失。弱视可以有两种类型。在从出生到甚至几个月大的处于完全黑暗状态的非人类灵长类动物和小猫的研究中,即使在使动物随后暴露于光线时,其也在功能上是不可逆转地盲的,尽管具有视网膜发送的功能信号也是如此。这种盲的发生是因为皮层的神经连接和“训练”在发育上由于刺激停止而从出生时起就停止。这个功能是否能够被恢复是未知的。在视网膜变性疾病的情况下,正常的视觉皮层环路最初经过“学习”或在发育上是适当的,直到变性产生显著的功能障碍的点为止。就功能失调眼中的发信号而言,视觉刺激的丧失造成“后天性”或“学习性”功能障碍(“后天性弱视”),导致大脑不能解读信号或“使用”该眼睛。在这些“获得性弱视”的情况下,由于弱视眼的基因治疗所致的视网膜发信号改善除了减缓进展或疾病状态的稳定化之外是否能够导致获得更正常的功能尚不清楚。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于30岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于20岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于18岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于15岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于14岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于13岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于12岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于10岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于8岁。在一些实施方案中,被治疗的人年龄小于6岁。

[0306] 在一些眼部疾患中,存在“抚育细胞”现象,其中改善一种细胞类型的功能改善了另一种细胞的功能。例如,用本发明的核酸转导中央视网膜的RPE可以当时改善视杆细胞的功能,进而视杆细胞功能的改善导致视锥细胞功能的改善。因此,一种细胞的治疗可以引起另一种细胞的功能改善。

[0307] 特定载体和组合物的选择取决于许多不同的因素,包括但不限于个人病史以及病

症和被治疗个体的特征。对这些特征的评估和适当的治疗方案的设计最终是处方医师的责任。

[0308] 在一些实施方案中,待治疗的人具有遗传性眼病(例如,与深内含子突变相关),但尚未表现出临床体征或症状。在一些实施方案中,待治疗的人具有眼部疾患(例如,与深内含子突变相关)。在一些实施方案中,待治疗的人已经表现出眼部疾患的一种或多种体征或症状(例如,与深内含子突变有关)。在一些实施方案中,已经在待治疗的人中鉴定了深内含子突变。

[0309] 本发明的组合物可单独使用或与一种或多种另外的治疗剂联合用于治疗眼部疾患。顺序施用之间的间隔可以是至少(或者可选地,小于)数分钟、数小时或数天。

[0310] 在一些实施方案中,可以将一种或多种另外的治疗剂施用于视网膜下或玻璃体(例如,通过玻璃体内施用)。另外的治疗剂的非限制性实例包括多肽神经营养因子(例如GDNF、CNTF、BDNF、FGF2、PEDF、EPO)、多肽抗血管生成因子(例如,sFlt、血管抑素、内皮抑素)、抗血管生成核酸(例如,siRNA、miRNA、核酶),例如针对VEGF的抗血管生成核酸;抗血管生成吗啉代,例如针对VEGF的抗血管生成吗啉代;抗血管生成抗体和/或抗体片段(例如Fab片段),例如针对VEGF的抗血管生成抗体和/或抗体片段。

VII. 试剂盒

[0311] 如本文所述的组合物、核酸和病毒颗粒可以包含在设计用于本文所述的本发明方法之一的试剂盒内。

[0312] 本发明的组合物、核酸和病毒颗粒可进一步包装成试剂盒,其中所述试剂盒可进一步包含使用说明书。在一些实施方案中,使用说明书包括依照本文所述的方法之一的说明。

[0313] 在一些实施方案中,试剂盒进一步含有缓冲剂和/或药学可接受的赋形剂。如本领域所熟知的,药学上可接受的赋形剂是相对惰性的物质,其有利于药理学有效物质的给药,并且可以被提供为液体溶液或悬浮液、提供为乳液或提供为适于在使用前溶解或悬浮于液体中的固体形式。例如,赋形剂可以赋予形式或稠度,或用作稀释剂。适合的赋形剂包括但不限于稳定剂、润湿剂和乳化剂、用于改变渗透性的盐、包封剂、pH缓冲物质和缓冲剂。这样的赋形剂包括适于直接递送至眼睛的任何药剂,其可以被施用而没有过分毒性。药学上可接受的赋形剂包括但不限于山梨糖醇、各种TWEEN化合物中的任何一种,以及诸如水、盐水、甘油和乙醇的液体。其中可以包括药学上可接受的盐,例如无机酸盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、磷酸盐、硫酸盐等;和有机酸的盐,如乙酸盐、丙酸盐、丙二酸盐、苯甲酸盐等。药学上可接受的赋形剂的彻底论述可获自REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub.Co., N.J.1991)。

[0314] 在一些实施方案中,药学上可接受的赋形剂可以包括药学上可接受的载体。这样的药学上可接受的载体可以是无菌液体,如水或油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,如花生油、大豆油、矿物油等等。也可以采用盐水溶液和葡萄糖水溶液、聚乙二醇(PEG)和甘油溶液作为液体载体,特别是用于注射溶液。还可以使用另外的成分,例如防腐剂、缓冲剂、张度剂、抗氧化剂和稳定剂、非离子润湿剂或澄清剂、增稠剂等。本文所述的试剂盒可以包装为单一单位剂量或多剂量形式。通常将试剂盒的内容物配制成无菌的基本上等渗的溶液。

实施例

[0315] 通过参考以下实施例将更充分地理解本发明。然而,它们不应被解释为限制本发明的范围。可以理解的是,在本文中描述的实例和实施方案仅用于说明的目的,依照它们的各种修改或改变将对本领域技术人员作出暗示并且将被包括在本申请的精神和权限以及所附权利要求书的范围内。

实施例1:利用Crispr-Cas9技术产生Leber先天性黑朦的体外模型

方法

质粒

[0316] 表达SpCas9的pSpCas9质粒从Sigma订购(目录号:CAS9P-1EA)。使用QuikChange Lightning定点诱变试剂盒(Stratagene)和一对诱变引物(SEQ ID NOS:28-29)按照制造商的方案去除BGH polyA中的BbsI限制性位点。通过GeneArt (Life Technologies)合成U6启动子-BbsI:BbsI-sgRNA支架-U6终止子盒(SEQ ID NO:30),并将其插入到pSpCas9-BbsI空质粒的PciI和NruI限制位点中以产生pSpCas9 (BB) 质粒。然后按照之前描述的方案将sgRNA寡核苷酸(SEQ ID NOS:1-2)亚克隆到pSpCas9 (BB) 质粒的两个BbsI限制位点中(Ran, F.A.等人, (2013) Nat. Protoc. 8:2281-2308)。

核转染

[0317] 使用Amaya SF细胞系4D-Nucleofector X试剂盒L (Lonza)和在4D-Nucleofector系统(Lonza)中的程序CM-130,按照制造商的方案,将2.5微克pSpCas9 (BB) -U6-sgRNA质粒DNA和5微升ssODN (10微摩尔) (SEQ ID NO:3)共转染到 1×10^6 个HEK 293FT细胞中。

筛选

[0318] 为了鉴定携带CEP290的c.2991+1655A>G突变的克隆,在共转染后48小时使细胞解离成单细胞,并连续稀释至每100微升0.5个细胞的终浓度,以降低每孔具有多个细胞的可能性。将100微升稀释的细胞铺板在九个96孔板的每个孔中。使细胞在5%CO₂37℃培养箱中增殖2周。

[0319] 鉴定235个单细胞克隆并对所述单细胞筛选CEP290的c.2991+1655A>G突变。使用QuickExtract DNA提取溶液(Epicentre)提取基因组DNA,并用GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega)和内含子突变侧翼的PCR引物(SEQ ID NOS:4-5)进行扩增。用以下循环参数实现PCR产物的扩增:95℃2分钟1个循环;35个循环的95℃30秒、60℃30秒和72℃3分钟;72℃15分钟1个循环。对PCR产物进行SnaBI消化并用测序引物(SEQ ID NO:6)进行Sanger测序。

RT-qPCR

[0320] 使用RNeasy Plus Mini Kit (Qiagen)根据制造商的方案从WT、Het和MT细胞中提取mRNA。使用iScript cDNA合成试剂盒(Bio-Rad),按照制造商的方案使用1微克总RNA来合成cDNA。在ABI Prism 7500实时PCR系统(Applied Biosystems)上,使cDNA在含有低ROX (Biotium)的Fast Plus EvaGreen qPCR Master Mix和引物的缓冲液中进行实时PCR扩增,所述引物分别特异性检测野生型CEP290 mRNA(SEQ ID NOS:7-8)和突变型CEP290 mRNA(SEQ ID NOS:9-10)。使用以下条件:50℃2分钟1个循环;95℃10分钟1个循环;40个循环的95℃15秒和60℃60秒。根据在每轮结束时进行熔解曲线分析来确定扩增产物的特异性,所述每轮使用95℃15秒、60℃60秒、95℃15秒和60℃15秒的循环。使用SDS 2.3软件(Applied

Biosystems) 分析数据。将CEP290表达水平标准化为PPIA mRNA的表达水平(对于引物序列, 请参见SEQ ID NOS:31-32)。

Western印迹分析

[0321] 在冰上将细胞在补充有1毫摩尔/升苯甲基磺酰氟(PMSF;Cell Signaling Technology)和1X蛋白酶抑制剂混合物(Cell Signaling Technology)的RIPA裂解缓冲液(Cell Signaling Technology)中裂解。然后将细胞刮下,收集在Eppendorf管中,通过在4℃以13,000rpm离心6分钟使裂解物澄清。通过添加NuPage 4X LDS样品缓冲液和NuPage 10X还原剂(都来自LifeTechnologies),在70℃加热10分钟并以13,000rpm离心1分钟来制备样品。将蛋白质样品与HiMark预染色的蛋白质标准品(都来自Life Technologies)一起上样到NuPAGE 3-8%Tris-乙酸盐凝胶上。通过180伏的凝胶电泳将样品解析1小时。使用的运行缓冲液是Tris-乙酸盐SDS运行缓冲液(Life Technologies)。为了转移,将聚偏二氟乙烯(PVDF)膜在甲醇中短暂处理,并用水冲洗以使其亲水。通过在XCell II Blot Module(Life Technologies)中将PVDF膜和凝胶夹入滤纸和海绵之间来制备转移夹层。使用的转移缓冲液是具有20%甲醇的NuPage 20X转移缓冲液(Life Technologies)。在SureLock Mini-Cell(Life Technologies)中以30伏进行转移2小时。转移后,将PVDF膜在含有1%脱脂奶粉的Pierce TBST缓冲液(含Tween 20洗涤剂的Tris缓冲盐水;Thermo Fisher Scientific)中封闭,在室温下振荡1小时。然后将印迹在封闭溶液中制备的一级抗体溶液中温育,在4℃摇动过夜。使用的一级抗体为兔多克隆抗CEP290抗体(在伍斯特市马萨诸塞大学的Hemant Khanna教授的友情赠品)、小鼠单克隆抗Cas9抗体(克隆7A9;Millipore)、HRP缀合的兔单克隆抗-β-肌动蛋白抗体(克隆13E5;Cell Signaling Technology)。用TBST洗涤未结合的一级抗体3次,每次10分钟。然后将在封闭溶液中的二级抗体(Alexa Fluor 647缀合的抗兔或抗小鼠IgG;Cell Signaling Technology)加入到膜上,并在室温下在摇床上保持1小时。用TBST将膜洗涤3次,每次10分钟,以降低非特异性背景。使用Pierce增强化学发光(ECL)蛋白质印迹底物(Thermo Fisher Scientific)将膜显影4分钟。通过在Kodak X-OMAT 2000处理器中将胶片曝光不同的时间间隔,最后使印迹中的蛋白质条带可视化。为了重新探测抗-β-肌动蛋白抗体的印迹,首先通过在恢复蛋白质印迹剥离缓冲液(Thermo Fisher Scientific)中在37℃温育30分钟进行剥离,然后用抗-β-肌动蛋白抗体重新探测。在这项工作中显示的印迹数据至少代表三个独立的实验。

结果

[0322] 首先,使用CRISPR-Cas9基因组编辑技术产生携带CEP290中的内含子剪接突变c.2991+1655 A>G的细胞模型。这种细胞模型是评估用于治疗包含CEP290中的c.2991+1655 A>G突变的LCA患者的治疗剂的有价值的工具。

[0323] 通过在由sgRNA靶序列和原型间隔序列毗邻基序(PAM)定义的靶向基因组基因座处引入双链断裂(DSB),启动用细菌II型CRISPR-Cas9系统进行的基因组编辑,随后通过同源定向修复(HDR)或非同源末端连接(NHEJ)来修复所述DSB(Jinek,M.等人,(2012) Science 337:816-821;Ran,F.A.等人,(2013) Nat. Protoc. 8:2281-2308)。在存在HDR模板的情况下,CRISPR-Cas9系统可用于通过HDR过程在靶向的基因座处产生精确的和定义的修饰。

[0324] 为了获得靶向的基因组DNA替换,通过核转染将表达sgRNA和酿脓链球菌Cas9(SpCas9)以及线性HDR模板的质粒引入293FT细胞中。HDR模板是单链DNA寡核苷酸(ssODN;

SEQ ID NO:3), 其含有在c.2991+1655A>G突变侧翼的75bp同源臂以及突变的PAM(c.2991+1666C>G)。突变的PAM将避免供体ssODN在细胞中被Cas9降解, 同时向CEP290的内含子26引入独特的SnaBI限制性位点。

[0325] 为了获得携带CEP290的c.2991+1655A>G突变的细胞, 从sgRNA/SpCas9和ssODN共转染的细胞中分离出235个单细胞克隆并进行筛选。提取基因组DNA并用在内含子突变侧翼的PCR引物(SEQ ID NOS:4-5)扩增。对PCR产物进行SnaBI消化并用测序引物(SEQ ID NO:6)进行Sanger测序。

[0326] 在235个单细胞克隆中, 一个克隆在两个CEP290等位基因上都含有c.2991+1655A>G和c.2991+1666C>G突变(此后称为“突变细胞”或“MT细胞”)。另一个克隆含有在一个CEP290等位基因上的两个突变和在另一个等位基因上的内源性野生型CEP290DNA(此后称为“杂合细胞”或“Het细胞”)。含有内源性野生型CEP290的两个等位基因的细胞此后被称为“野生型细胞”或“WT细胞”。

[0327] 使用特异性检测野生型CEP290 mRNA(SEQ ID NOS:7-8)和突变型CEP290 mRNA(SEQ ID NOS:9-10)的引物, 通过逆转录定量PCR(RT-qPCR)测量野生型和突变型CEP290 mRNA在野生型细胞、杂合细胞和突变型细胞中的表达水平。将结果标准化为PPIA mRNA(SEQ ID NOS:31-32)的表达水平。

[0328] 与野生型细胞相比, 在杂合细胞和突变型细胞中的野生型CEP290的mRNA水平分别降低了27%和48%(图3A)。正如预期, 野生型细胞不表达突变型CEP290 mRNA, 而在突变型细胞中的突变型CEP290 mRNA水平比杂合细胞中高24%(图3B)。与杂合细胞相比, 突变型细胞表达显著较低水平的野生型CEP290 mRNA和显著较高水平的突变型CEP290 mRNA。因此, 这种细胞模型概括了携带c.2991+1655 A>G突变的LCA患者的表型, 因为这些患者表达降低约50%的野生型CEP290 mRNA水平(den Hollander, A.I. et al. (2006) Am. J. Hum. Genet. 79:556-561)。

[0329] 通过Western印迹分析检查野生型细胞、杂合细胞和突变型细胞中的CEP290的蛋白质水平。与野生型细胞相比, 在杂合细胞和突变型细胞中的CEP290蛋白水平大大降低(图3C)。与杂合细胞相比, 突变型细胞表达较低水平的CEP290蛋白(图3C)。因此, 免疫印迹数据与RT-qPCR数据是一致的。

实施例2:c.2991+1655A>G突变的靶向缺失

方法

质粒

[0330] 如前所述, 用Golden Gate克隆方法构建一体式表达载体(Sakuma, T. 等人, (2014) Sci. Rep. 4:5400)。简言之, 通过GeneArt (Life Technologies) 合成含有U6启动子-BbsI: BbsI-sgRNA支架-CMV启动子的DNA片段(SEQ ID NO:33), 并将其插入到上述pSpCas9-BbsI空质粒的PciI和NheI限制位点中, 以产生用于亚克隆上游sgRNA引导序列的pSpCas9 (BBU) 质粒。为了构建用于亚克隆下游sgRNA引导序列的pSpCas9 (BBD) 质粒, 使用Phusion高保真DNA聚合酶(New England Biolabs Inc) 以及作为DNA模板的pSpCas9 (BB) 质粒DNA和一对PCR引物(SEQ ID NOS:34-35)进行PCR反应。循环参数为: 98°C 1分钟1个循环; 35个循环的98°C 20秒和72°C 30秒; 72°C 5分钟1个循环。将PCR产物插入pSpCas9 (BBU) 质粒的PciI和KpnI位点中。在这个pSpCas9 (BBD) 质粒中, 两个BsaI位点位于U6启动子驱动的sgRNA的侧翼。按照

之前描述的方案,将U1 sgRNA寡核苷酸(SEQ ID NOS:11-12)退火,然后亚克隆到pSpCas9 (BBU) 质粒的两个BbsI限制性位点中,并且将D1、D2和D3 sgRNA寡核苷酸(SEQ ID NOS:13-18)退火,然后亚克隆到pSpCas9 (BBD) 质粒的两个BbsI限制性位点中(Ran, F.A. 等人, (2013) Nat. Protoc. 8:2281-2308)。使用限制酶BsaI从pSpCas9 (BBD) 质粒中进一步切下生成的D1-D3 sgRNA与U6启动子,然后亚克隆到pSpCas9 (BBU) -U1 sgRNA质粒的两个BsaI位点中。生成的pSpCas9 (BBUD) 质粒表达两种U6启动子驱动的sgRNA和一种CMV启动子驱动的SpCas9。作为对照质粒,使用上述方法将两种对照sgRNA的寡核苷酸(SEQ ID NOS:36-39)亚克隆到相同的一体式表达载体的BbsI限制位点中。

转染和PCR分析

[0331] 使用Lipofectamine 3000转染试剂(Life Technologies)按照制造商的方案将成对的sgRNA-SpCas9质粒转染到野生型细胞、杂合细胞和突变型细胞中。

[0332] 转染后48小时,使用QuickExtract DNA提取溶液(Epicentre)从细胞中提取基因组DNA,并用GoTaq Hot Start Green Master Mix (Promega) 和内含子突变侧翼的PCR引物(SEQ ID NOS:4-5)进行扩增。用以下循环参数实现PCR产物的扩增:95°C 2分钟1个循环;35个循环的95°C 30秒、60°C 30秒和72°C 3分钟;72°C 15分钟1个循环。然后对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳。

下一代测序(NGS)

[0333] 将上述获得的PCR产物送到ACGT (Wheeling, IL) 进行NGS测序。通过超声处理将样品DNA片段化至平均350bp的靶片段大小,将其用于使用Illumina TruSeq DNA无PCR样品制备试剂盒来构建测序文库。通过Qubit和2100 Bioanalyzer定量该文库,并将其加载到Illumina平台上以产生PE150读段。每样品产生大约150K读段($\pm 20\%$)。将原始的Illumina解复用并转换成.fastq格式,并且将低质量(Q<20)的短读段(N<50)滤除。使用Bowtie2将过滤的读段与参考序列(野生型DNA和截短DNA)比对。为了定量,使用对于野生型DNA或截短DNA而言独特的与U1 sgRNA切割位点侧翼的40bp序列(切割位点之前20bp和切割位点之后20bp)比对的读段的数目,计算每个样品中的野生型DNA和截短DNA的百分比。

结果

[0334] 然后,使用上述模型来测试用于产生c.2991+1655 A>G突变的靶向缺失的方法。

[0335] 将靶向隐蔽外显子内的基因座的一个上游sgRNA(U1, SEQ ID NOS:19)与三个下游sgRNA(D1、D2、D3; SEQ ID NOS:20-22)中的每一个一起在与SpCas9相同的载体中表达。上游和下游sgRNA对均位于c.2991+1655A>G突变的侧翼,预期分别产生283bp、187bp和231bp的基因组缺失,正如先前的研究已经证明,配对的sgRNA诱导的基因组缺失的修复在很大程度上通过精确的末端连接来完成(Brandl, C. 等人, (2014) FEBS Open Bio. 5:26-35; Zheng, Q. 等人, (2014) Biotechniques 57:115-124)。将两个对照sgRNA亚克隆到与对照相同的质粒中。

[0336] 如上所述将配对的sgRNA-SpCas9质粒转染到野生型细胞、杂合细胞和突变型细胞中,然后使用缺失区域侧翼的引物(SEQ ID NOS:4-5)进行PCR分析。通过凝胶电泳解析野生型和截短的基因组片段。对于所有三个测试的上游/下游sgRNA对,检测到PCR产物,其指示预期的基因组缺失的存在,而这在对照sgRNA转染的细胞中不存在(图4A)。这些结果表明,配对的sgRNA和SpCas9能够去除c.2991+1655A>G突变。从突变型细胞制备的4个PCR样品的

新一代测序(NGS)分析进一步揭示,60.7%、65.9%和72.4%的NGS读段分别与U1D1、U1D2和U1D3转染的细胞中的截短DNA对应。因此,所有三个sgRNA对和SpCas9在去除c.2991+1655A>G突变方面都是高效的。

[0337] 为了证实配对的sgRNA能够拯救杂合细胞和突变型细胞中的野生型CEP290表达水平,用表达配对的sgRNA和SpCas9的质粒转染野生型细胞、杂合细胞和突变型细胞,然后如上所述对CEP290 mRNA进行RT-qPCR分析。将结果标准化为PPIA mRNA的表达水平。

[0338] 与对照sgRNA相比,sgRNA对(尤其是U1D3对)显著拯救了杂合细胞和突变型细胞中的野生型CEP290 mRNA水平(图5A)并且降低了突变型CEP290 mRNA水平(图5B)。重要的是,三个sgRNA对中没有有一个显著改变野生型CEP290 mRNA水平(图5A),表明靶向的基因组缺失不干扰CEP290转录物的正常剪接。U1D3 sgRNA对显著拯救了杂合细胞和突变型细胞中的野生型CEP290 mRNA水平,使其达到与野生型细胞相当的水平(图5A)。U1D2 sgRNA对也显著增加了杂合细胞中的野生型CEP290 mRNA水平(图5A)。所有三个sgRNA对均显著降低了杂合细胞中的突变型CEP290mRNA水平(图5B)。U1D2和U1D3 sgRNA对显著降低了MT细胞中的突变型CEP290 mRNA水平(图5B)。

[0339] 为了证实配对的sgRNA能够拯救野生型CEP290蛋白在突变型细胞中的表达,如上所述用成对的sgRNA和SpCas9转染突变型细胞,然后进行Western印迹分析。与对照sgRNA相比,所有三个sgRNA对均拯救了CEP290蛋白表达(图5C)。

[0340] 总之,这些数据证明,上游/下游sgRNA对,特别是U1D3对在阻止突变型隐蔽外显子的剪接和恢复野生型CEP290表达方面是高效的。这些结果证明,与Cas9偶联的一对引导RNA可以使CEP290的c.2991+1655 A>G突变侧翼的内含子区域永久缺失,以阻止插入CEP290 mRNA中的隐蔽外显子的剪接。

实施例3:开发自限性Crispr-Cas9系统来限制SpCas9的持续时间

方法

质粒

[0341] 构建了用于自限性Crispr-Cas9系统的AAV包装质粒pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA。简言之,通过GeneArt (Life Technologies) 合成含有来源于CMV启动子(minCMV启动子)(SEQ ID NO:56)的最小启动子片段的DNA片段,并将其插入上述Sigma pSpCas9质粒的MluI和ApoI限制性位点,以产生pminCMV-SpCas9-NLS-BGH pA质粒。然后,通过GeneArt (Life Technologies) 合成含有SV40早期poly(A)信号(SV40 pA)(SEQ ID NO:57)的DNA片段,并将其插入上述质粒的XhoI和BbsI限制性位点,以产生pminCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA质粒。最后,将minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA片段亚克隆到AAV包装质粒中,以产生pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA。

[0342] 为了构建自限性pSpCas9质粒,将SpCas9核酸酶的识别序列(U1和D3 sgRNA靶序列加上对应的PAM基序;SEQ ID NOS:58-59)亚克隆到插入位点1(在minCMV启动子和SpCas9之间)和/或插入位点2(在SpCas9-核定位信号(NLS)和SV40 poly(A)之间)中。

[0343] 用于自限性Crispr-Cas9系统的第二个AAV包装质粒是pAAV-U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNA-BGH pA。为了构建这个质粒,使用限制酶PciI和KpnI从pSpCas9(BBUD)-U1D3质粒中切出U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNA片段,然后亚克隆到AAV包装质粒的EcoRV和KpnI位点中,以产生pAAV-U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNA质粒。为了AAV滴度测定,将BGH pA片段(SEQ ID NO:

60) 克隆到该质粒的SpeI和HindIII位点中。

结果

[0344] CRISPR-Cas9是用于基因组编辑的有力工具,但尚不清楚细菌蛋白Cas9的表达在患者中的耐受性如何。CRISPR-Cas9可以快速(数小时至数天)起作用,并且不必在细胞中长时间存在。不需要的免疫应答和潜在的安全问题可能是由外源蛋白质的延长表达引起的。例如,外源标记蛋白绿色荧光蛋白(GFP)的表达可以引出大量不需要的免疫应答(Stripe R等人,(1999) Gene Ther. 6:1305-1312)。另外,最近的一份报告表明,在体内递送CRISPR-Cas9之后,诱导了针对Cas9的体液免疫和潜在存在的Cas9特异性细胞免疫应答(Wang, D.等人,(2015) Hum. Gene Ther. 26:432-442)。因此,其中暴露于Cas9蛋白质受到限制的“击中就走”(“hit and go”)方法可能有益于CRISPR-Cas9的体内递送。这种“击中就走”的方法还可以减少脱靶效应,因为这会减少Cas9与非预期靶标之间的相互作用时间。

[0345] 为此,我们开发了一种自限制性Crispr-Cas9系统,通过将sgRNA的识别位点组入到SpCas9载体自身中来限制SpCas9的持续时间,从而在SpCas9表达开始后不久就切除和破坏所述载体。自限性Crispr-Cas9系统包含两个载体:表达sgRNA对U1和D3的pAAV-U6-U1 sgRNA-U6-D3 sgRNA载体,以及表达minCMV启动子驱动的SpCas9的pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA载体。将U1和/或D3 sgRNA的识别序列(靶序列加上对应的PAM基序)组入到第二载体的两个插入位点中的一个或两个中。插入位点1位于minCMV启动子和SpCas9编码序列之间,插入位点2位于核定位信号(NLS)和SV40 poly(A)信号之间(图6A)。因此,在这个自限性Crispr-Cas9系统中,U1和D3 sgRNA将引导SpCas9蛋白用于靶向基因组的缺失和自限性SpCas9载体自身的切割,这将防止所述载体产生过量的SpCas9蛋白。

[0346] 为了在体外测试所述自限性Crispr-Cas9系统,用上述两种载体转染突变型体细胞,然后如上所述进行CEP290 mRNA的Western印迹分析(图6B)、基因组DNA PCR(图6C)和RT-qPCR分析(图6D和6E)。

[0347] 当将单个sgRNA识别序列(U1T或D3T; SEQ ID NOS: 58-59)插入到自限性SpCas9载体中时,与不包含sgRNA识别序列的对照SpCas9载体相比,SpCas9蛋白水平大幅降低(图6B)。当将两个U1T、两个D3T或联合的D3T和U1T插入到自限性SpCas9载体中时,几乎消除了SpCas9蛋白水平(图6B)。因此,自限性Crispr-Cas9系统可以有效地限制SpCas9的表达。

[0348] 为了证实自限性Crispr-Cas9系统仍然能够诱导靶向基因组缺失并且去除LCA10 c.2991+1655A>G突变,我们在双载体转染的突变型细胞中进行了基因组DNA的PCR分析(图6C)。对应于截短DNA的PCR条带在SpCas9载体转染的对照细胞和自限性SpCas9载体转染的细胞中都存在,表明自限性Crispr-Cas9系统仍然能够去除LCA10内含子突变,尽管SpCas9的持续时间短。值得注意的是,在图6C中观察到的基因组缺失不如在图4A中看到的缺失那样稳健。这可能是由于这两项研究的不同实验条件所致。首先,在图4A中使用了一体化载体,而在图6C中使用了双重载体。其次,SpCas9表达由图4A中的CMV启动子驱动,并由图6C中的minCMV启动子驱动。

[0349] 然后,我们检测了用双载体转染的突变型细胞中的野生型和突变型CEP290 mRNA水平。与单独的U1D3 sgRNA(对照)相比,对照SpCas9载体显著拯救了突变型细胞中的野生型CEP290 mRNA水平(图6D)。类似地,在任一插入位点包含D3 sgRNA识别序列的SpCas9载体显著增加了野生型CEP290 mRNA水平(图6D)。其他自限性SpCas9载体也增加了野生型

CEP290 mRNA水平, 尽管差异与对照相比不具有统计学意义(图6D)。另外, 所有自限性SpCas9载体和对照SpCas9载体显著降低了突变型CEP290 mRNA水平(图6E)。

[0350] 总之, 这些数据证明, 自限性Crispr-Cas9系统能够限制SpCas9持续时间, 去除LCA10 c.2991+1655A>G突变, 拯救野生型CEP290表达, 并降低突变型CEP290表达。

实施例4: 小鼠视网膜中的小鼠Cep290基因的内含子区的靶向缺失

方法

质粒

[0351] 我们使用双重AAV系统在小鼠视网膜中进行靶向基因组缺失。如上所述用AAV包装质粒pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA产生第一AAV。用AAV包装质粒pAAV-U6-U11 sgRNA-U6-D11 sgRNA-RK-EGFP-BGH pA产生第二AAV。为了构建该质粒, 如上所述将U11 sgRNA引导序列(SEQ ID NO:61)和D11 sgRNA引导序列(SEQ ID NO:62)亚克隆到pSpCas9(BBUD)质粒中, 以产生pSpCas9(BBUD)-U11D11质粒。将RK启动子-EGFP-BGH pA片段(SEQ ID NO:63)插入该质粒的KpnI和XhoI位点中, 然后使用限制酶PciI和PmeI将整个U6-U11 sgRNA-U6-D11sgRNA-RK-EGFP-BGH pA盒从该质粒中切出, 然后亚克隆到上述AAV包装质粒的BamHI和SphI位点中, 以产生最终的质粒。还产生了对照质粒pAAV-RK-EGFP-BGH pA。

AAV产生

[0352] 如前所述通过三重转染人胚肾癌293细胞(HEK-293)产生重组AAV载体(Xiao, X.等人, (1998) J. Virol. 72:2224-2232)。简言之, 使用AAV包装质粒、含有来自血清型2的rep基因和来自血清型5的衣壳基因的质粒、以及辅助腺病毒质粒(Stratagene)。转染后72小时收集病毒, 通过AVB Sepharose亲和色谱法(GE Healthcare)进行纯化。如前所述通过基于TaqMan的定量PCR分析(Applied Biosystems)确定AAV载体的基因组拷贝(GC)滴度(Gerits, A.等人, (2015) Neurophotonics. 2:031209)。

动物

[0353] 从Jackson实验室(Bar Harbor, ME)购买8-10周龄雌性C57BL/6J小鼠并保存在Sanofi的动物饲养所。在研究期间动物自由地获取食物和水。所有的动物程序均遵守“动物福利法”(the Animal Welfare Act)、“实验动物护理和使用指南”(the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals)、实验动物福利办公室(the Office of Laboratory Animal Welfare), 并且遵循“ARVO在眼科和视力研究中使用动物的声明”(the ARVO Statement for the Use of Animals in Ophthalmic and Vision Research)。

视网膜下AAV注射

[0354] 使用以800毫升/分钟的氧气携带的3.5%异氟烷经由鼻锥递送至动物(小鼠), 使小鼠镇静。在局部施用托吡卡胺(Alcon, Fort Worth, TX)的小鼠中诱导瞳孔散大和睫状肌麻痹。在角膜中做导向(pilot)切口, 将33号(gauge)钝头针头定向穿过切口并在虹膜和晶状体囊之间向后推进, 直到尖端穿透后部感觉神经性视网膜。将AAV5-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA(图7A中的AAV5-SpCas9)的 1×10^9 个病毒基因组颗粒连同AAV5-U6-U11 sgRNA-U6-D11 sgRNA-RK-EGFP-BGH pA(图7A中的AAV5-U11D11-RK-EGF)的 1×10^9 个病毒基因组颗粒或对照AAV5-U6-RK-EGFP-BGH pA(图7B中的AAV5-RK-EGFP)以在一秒时间内一微升的体积递送至每只小鼠的OS眼中。在抽出之前, 将针头保持在适当位置约5秒钟。在返回其笼子之前使动物从麻醉中恢复。

[0355] 在注射后2周和4周,使用Micron IV视网膜显微镜(Phoenix Research Labs)评估在活体动物视网膜中的EGFP表达,并且从研究中排除缺乏EGFP表达的小鼠。在注射后四周使所有动物安乐死。

视网膜解剖

[0356] 将小鼠眼睛摘除并置于磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。在解剖显微镜下用微型解剖剪分离视网膜。仔细地去掉视网膜色素上皮(RPE)层。

基因组DNA表达和PCR分析

[0357] 在QuickExtract DNA提取液(Epicentre)中,用无线马达(VWR)驱动的杵将视网膜匀浆。遵循制造商的说明(Epicentre)提取基因组DNA,稀释到并10纳克/微升,然后用GoTaq Hot Start Green Master Mix(Promega)和缺失区域侧翼的PCR引物(SEQ ID NOS:64-65)进行扩增。用以下循环参数实现PCR产物的扩增:95℃2分钟1个循环;35个循环的95℃30秒、62℃30秒和72℃2分钟;72℃12分钟1个循环。然后对PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳。

结果

[0358] 我们在LCA10的细胞模型中的研究支持了我们配对的sgRNA和SpCas9方法在体外去除LCA10 c.2991+1655A>G突变的效率。然后,我们在体内环境下评估我们的CRISPR-Cas9方法。由于目前没有表达由LCA10内含子剪接突变引起的隐蔽外显子的动物模型,因此我们测试了一对sgRNA与SpCas9一起是否可以在小鼠Cep290基因的内含子25中诱导靶向基因组缺失,所述小鼠Cep290基因的内含子25与c.2991+1655A>G突变所在位置的人CEP290基因的内含子26同源。

[0100] 我们决定使用AAV载体进行体内基因递送,因为它们具有低免疫原性和允许某些细胞类型的优先感染的血清型范围。最受CEP290突变影响的视网膜细胞是光感受器,以前的研究已经显示视网膜下注射AAV血清型5(AAV5)可以有效地转导光感受器(Boye, S.E. 等人, (2012) Hum. Gene Ther. 23:1101-1115)。因此,我们决定使用AAV5将SpCas9和成对的sgRNA递送至光感受器。

[0359] 由于AAV载体的低包装能力(约4.8kb)和测量为4.1kb(关于氨基酸序列,参见SEQ ID NO:40)的SpCas9编码序列长度,因此将一个SpCas9组分和两个U6-sgRNA组分包装在单个AAV载体中具有挑战性。因此,我们使用双重AAV系统进行我们的体内验证研究(图7A)。第一AAV载体是表达上游sgRNA U11(SEQ ID NO:61)和下游sgRNA D11(SEQ ID NO:62)、以及视紫红质激酶(RK)启动子驱动的EGFP报告基因的AAV5-U11D11-RK-EGFP。预期U11和D11 sgRNA对在小鼠Cep290基因的内含子25中产生557bp的基因组缺失。还产生了对照AAV AAV5-RK-EGFP。第二AAV载体是AAV5-SpCas9,其表达minCMV启动子驱动的SpCas9。

[0360] 将AAV5-U11D11-RK-EGFP(或AAV5-RK-EGFP)和AAV5-SpCas9(各自 1×10^9 个病毒基因组颗粒)共同注射到成年C57BL/6J小鼠的视网膜下腔(subretinal space)中。评估在活体动物视网膜中的EGFP表达,从研究中排除缺乏EGFP表达的小鼠。在注射后四周,使动物安乐死,从视网膜提取基因组DNA,然后使用缺失区域侧翼的引物(SEQ ID NOS:64-65)进行PCR分析。通过凝胶电泳解析野生型和截短的基因组片段。对于注射了AAV5-U11D11-RK-EGFP和AAV5-SpCas9的动物,检测到PCR产物,表明用U11和D11sgRNA对进行的预期基因组缺失的存在,而这在注射AAV5-RK-EGFP和AAV5-SpCas9的动物中是不存在的(图7B)。这些结果证明,我们的双重AAV系统能够在体内诱导靶向的基因组缺失。

实施例5:采用一对上游/下游sgRNA和SaCas9去除LCA10 c.2991+1655A>G突变

方法

质粒

[0361] 为了构建SaCas9质粒,在GenScript合成了minCMV-SaCas9-NLS-FLAG-BGH pA-U6-BsaI:BsaI-sgRNA支架片段(SEQ ID NO:66)并亚克隆到Sigma pSpCas9质粒的PciI和BbsI限制性位点中,以替换CMV-SpCas9-BGH pA盒并产生pminCMV-SaCas9-BGH pA-U6质粒。使用Benchling的在线基因组编辑设计工具鉴定5个sgRNA引导序列(aU1、aU2、aU3、aD1、aD2;SEQ ID NOS:45-49),然后亚克隆到上述质粒的两个BsaI限制性位点中。为了使上游sgRNA(aU1、aU2、aU3)和下游sgRNA(aD1、aD2)配对,使用限制酶KpnI和NotI从其质粒中切出U6-aD1sgRNA盒和U6-aD2sgRNA盒,然后亚克隆到表达aU1、aU2或aU3 sgRNA的质粒的NotI位点中。结果,我们产生了表达六个不同sgRNA对(aU1aD1、aU1aD2、aU2aD1、aU2aD2、aU4aD1、aU4aD2)的六种质粒。最后,将这六种质粒中的minCMV-SaCas9-BGH pA-U6配对的sgRNA片段亚克隆到AAV包装质粒中,以产生pAAV-minCMV-SaCas9-BGH pA-U6配对的sgRNA质粒。还产生了不表达sgRNA的对照质粒pAAV-minCMV-SaCas9-BGH pA。

结果

[0362] 从上述研究中我们已经证明,一对上游/下游sgRNA可以有效地引导SpCas9去除LCA10c.2991+1655A>G突变并恢复野生型CEP290表达。SpCas9编码序列的长度(约4.1kb)使得难以将一个minCMV-SpCas9组分和两个U6-sgRNA组分包装在单个AAV载体中。Ran等人,(Ran,F.A.等人,(2015)Nature 520:186-191)最近发现了在哺乳动物细胞中也显示裂解活性的、较短的Cas9酶金黄色葡萄球菌Cas9(SaCas9;1053个氨基酸;SEQ ID NO:55)。SaCas9的较小尺寸使得可以将一个minCMV-SaCas9组分和两个U6-sgRNA组分包装在单个AAV载体中。为了测试配对的sgRNA和SaCas9是否也能够去除LCA10内含子突变,我们使用Benchling的在线基因组编辑设计工具设计了特别针对SaCas9的三个上游sgRNA引导序列(aU1、aU2、aU3;SEQ ID NOS:45-47)和两个下游sgRNA引导序列(aD1、aD2;SEQ ID NOS:48-49)。将上游/下游sgRNA配对并亚克隆到AAV包装质粒中。相同的质粒也表达minCMV启动子驱动的人密码子优化的SaCas9(SEQ ID NO:66)。

[0363] 如上所述将配对的sgRNA-SaCas9质粒转染到突变型细胞中。为了比较SaCas9和SpCas9,还用双重SpCas9 AAV质粒(pAAV-minCMV-SpCas9+pAAV-U1D3 sgRNA对)或仅用单独的质粒转染突变型细胞。使用缺失区域侧翼的引物(SEQ ID NOS:4-5)进行PCR分析。通过凝胶电泳解析野生型和截短的基因组片段。对于所有测试的上游/下游sgRNA对,检测到PCR产物,其指示预期的基因组缺失的存在,而这在对照质粒转染的细胞中不存在(图8A)。这些结果证明,SaCas9和SpCas9两者都能够与配对的sgRNA一起发挥作用去除LCA10内含子剪接突变。

[0364] 然后,我们检测了用上述AAV包装质粒转染的突变型细胞中的野生型和突变型CEP290 mRNA水平。令人惊讶的是,与单独的SaCas9质粒相比,上游/下游sgRNA对都没有显著增加野生型CEP290 mRNA水平,不过aU2aD1对和aU2aD2对显示出增加的趋势(图8B)。相比之下,与单独的质粒相比,用于SpCas9的双重AAV质粒显著拯救了野生型CEP290 mRNA水平(图8B)。与分开的SaCas9和质粒相比,所有配对的sgRNA-SaCas9质粒均显著降低了突变型CEP290 mRNA水平(图8C)。类似地,与单独的质粒相比,用于SpCas9的双重AAV质粒显著降低

了突变型CEP290 mRNA水平(图8C)。尽管在目前的研究中,SaCas9在拯救突变型细胞中的野生型CEP290 mRNA水平方面不如SpCas9有效,但我们不能排除有力的sgRNA对可以引导SaCas9有效去除LCA10内含子剪接突变并且显著拯救突变型细胞中的野生型CEP290 mRNA水平的可能性。

序列

除非另有说明,所有核酸序列均呈现为5'至3'。

除非另有说明,所有氨基酸序列都呈现为N端至C端。

用于同源定向修复(HDR)的sgRNA的上链寡核苷酸(SEQ ID NO:1)

caccgAAGACACTGCCAATAGGGAT

用于同源定向修复(HDR)的sgRNA的下链寡核苷酸(SEQ ID NO:2)

aaacATCCCTATTGGCAGTGTCTTc

HDR模板(SEQ ID NO:3)

CCACCCGCCTCGGCCTCCTAAAGTGCTGGGATTACAGATGTGAGCCACCGCACCTGGCCCCAGTTGTAA
TTGTGAGTATCTCATACGTATCCCTATTGGCAGTGTCTTAGTTTTATTTTTTATTATCTTTATTGTGGCAGCCATTA
TTCCTGTCTCTA

CEP290内含子26F核酸引物(SEQ ID NO:4)

GGTCCCTGGCTTTTGTTCCT

CEP290内含子26R核酸引物(SEQ ID NO:5)

CAGGAGGCTGAGGGTGTCTT

CEP290内含子26测序引物(SEQ ID NO:6)

AGTAGAGATGGGGTTTCACC

野生型CEP290 F核酸引物(SEQ ID NO:7)

TGACTGCTAAGTACAGGGACATCTTG

野生型CEP290 R核酸引物(SEQ ID NO:8)

AGGAGATGTTTTCACTCCAGGT

突变型CEP290 F核酸引物(SEQ ID NO:9)

CTGGCCCCAGTTGTAATTTGTGA

突变型CEP290 R核酸引物(SEQ ID NO:10)

CTGTTCCCAGGCTTGTTCATAGT

U1 sgRNA的上链寡核苷酸(SEQ ID NO:11)

caccGGCGGGTGGATCACGAGTTC

U1 sgRNA的下链寡核苷酸(SEQ ID NO:12)

aaacGAACTCGTGATCCACCCGCC

D1 sgRNA的上链寡核苷酸(SEQ ID NO:13)

caccgAAAGCTACCGTTACCTGAA

D1 sgRNA的下链寡核苷酸(SEQ ID NO:14)

aaacTTCAGGTAACCGGTAGCTTTc

D2 sgRNA的上链寡核苷酸(SEQ ID NO:15)

caccgTCATTCTTGTGGCAGTAAGG

D2 sgRNA的下链寡核苷酸(SEQ ID NO:16)

aaacCCTTACTGCCACAAGAATGAc

D3 sgRNA的上链寡核苷酸(SEQ ID NO:17)

caccGGAGTCACATGGGAGTCACA

D3 sgRNA的下链寡核苷酸(SEQ ID NO:18)

aaacTGTGACTCCCATGTGACTCC

U1 sgRNA序列(SEQ ID NO:19)

GGCGGGTGGATCACGAGTTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA
CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT

D1 sgRNA序列(SEQ ID NO:20)

GAAAGCTACCGTTACCTGAAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA
ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT

D2 sgRNA序列(SEQ ID NO:21)

GTCATTCTTGTGGCAGTAAGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCA
ACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT

D3 sgRNA序列(SEQ ID NO:22)

GGAGTCACATGGGAGTCACAGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAA
CTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTT

CEP290内含子26序列(注意:c.2991+1655A>G突变是这个序列中的第1655个核苷酸并且是粗体和加下划线的)(SEQ ID NO:23)

GTAAGTTTGTGTGATTCTTGAACCTTGTGAAATTAGCCATTTTTCTTCAAT
ATTTTTGTGTTTGGGGGGATTTGGCAGATTTTAATTAAAGTTTGCCTGCAT
TTATATAAATTTAACAGAGATATAATTATCCATATTATTCATTTCAGTTTAG
TTATAAATATTTTGTTCACACATAACACACACACACACACAATATATTA
TCTATTTATAGTGGCTGAATGACTTCTGAATGATTATCTAGATCATTCTCC
TTAGGTCACCTTGCATGATTTAGCTGAATCAAACCTCTTTTAACCAGACATC
TAAGAGAAAAAGGAGCATGAAACAGGTAGAATATTGTAATCAAAGGAGGGA
AGCACTCATTAAGTGCCCATCCCTTTCTCTTACCCCTGTACCCAGAACAAA
CTATTCTCCCATGGTCCCTGGCTTTTGTTCCTTGGAATGGATGTAGCCAAC
AGTAGCTGAAATATTAAGGGCTCTTCCTGGACCATGGATGCACTCTGTAAA
TTCTCATCATTTTTTTATTGTAGAATAAATGTAGAATTTTAATGTAGAATAA
ATTTATTTAATGTAGAATAAAAAATAAAAAAACTAGAGTAGAATATCATAA

GTTACAATCTGTGAATATGGACCAGACCCTTTGTAGTTATCTTACAGCCAC
TTGAACTCTATACCTTTTACTGAGGACAGAACAAGCTCCTGATTTGTTCAT
CTTCCTCATCAGAAATAGAGGCTTATGGATTTTGGATTATTCTTATCTAAG
ATCCTTTCACAGGAGTAGAATAAGATCTAATTCTATTAGCTCAAAAGCTTT
TGCTGGCTCATAGAGACACATTCAGTAAATGAAAACGTTGTTCTGAGTAGC
TTTCAGGATTCCTACTAAATTATGAGTCATGTTTATCAATATTATTTAGAA
GTAATCATAATCAGTTTGCTTTCTGCTGCTTTTGCCAAAGAGAGGTGATTA
TGTTACTTTTTATAGAAAATTATGCCTATTTAGTGTGGTGATAATTTATTT
TTTTCCATTCTCCATGTCCTCTGTCCTATCCTCTCCAGCATTAGAAAGTCC
TAGGCAAGAGACATCTTGTGGATAATGTATCAATGAGTGATGTTTAACGTT
ATCATTTTCCCAAAGAGTATTTTTCATCTTTCCTAAAGATTTTTTTTTTTT
TTTTTTGAGATGGAGTTTCATTCTGTCACCCAGGCTGAGTGCAGTGGCACG
ATCTCGGCTTAACGCTTACTGCATCCTCTGCCTCCCAGATTCAAGCAGTTC
TCCTGCCTCAGCCTCTGAGTAGCTGGGATTACAGGTGTGCACCACCACACC
AGCTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTGGAGGCAGAGTCTCGCTCTGT
CACCCAGGCTGGAGTGCAGTGGCGCCATCTTGGCTCACTGCAAGCTCCACC
TCCCGGGTTCAGGCCGTTCTCCTGCCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGGTACCA
CAGGCACCCACCATCATGCCCGGCTAATTTTTTTGTATTTTATAGTAGAGATG
GGGTTTCACCTTGTTAGCCAGGATGGTGTGATCTCCTGAACTCGTGATCC
ACCCGCCTCGGCCTCCTAAAGTGCTGGGATTACAGATGTGAGCCACCGCAC
CTGGCCCCAGTTGTAATTGTGAGTATCTCATACTATCCCTATTGGCAGTG
TCTTAGTTTTATTTTTTATTATCTTTATTGTGGCAGCCATTATTCCTGTCT
CTATCTCCAGTCTTACATCCTCCTTACTGCCACAAGAATGATCATTCTAAA
CATGAATCCTACCCTGTGACTCCCATGTGACTCCCCGCCTTAAAACTGTC
AAAAGCTACCGGTTACCTGAAGGGTAAAAGTCAAGTCCCCTACTTACCTCA
TGTCATCTAGAGCAAGAGATGAACTAGCTGAGTTTTCTGACCACAGTGTTT
TTTCTTATGTATGTTCTTTTGTACGTGCTCTTTTCTATATATAGGGAACCA
TTTCTCTCTTCCAGTTGTTTTGCTCAGTGAATTTCTATTCCTGTTTCAAAA
CTTGTTTCAGGCATTACCTTTTTTTTTCTTAAGCATACTTTTTTTAATGGAAC
AAAGTCACTCCTGTCTACACTAGTTCTGCATCTTATACATAGGTTTTGTAC
ATAGTACATATTTATATCACATCAAATTATATGTGTTTACATATCTGTCTT

CCTTAATGGAATATAAGTCTTTTGATATAAGGAACTATTTAATTTGTTTCT
GTGTGTTGAGTATCTCCTGTTTGGCACAGAGTTCAAGCTAATACATGAGAG
TGATTAGTGGTGGAGAGCCACAGTGCATGTGGTGTCAAATATGGTGCTTAG
GAAATTATTGTTGCTTTTTTGAGAGGTAAAGGTTTCATGAGACTAGAGGTCAC
GAAAATCAGATTTTCATGTGTGAAGAATGGAATAGATAATAAGGAAATACAA
AAACTGGATGGGTAATAAAGCAAAAGAAAACTTGAAATTTGATAGTAGAA
GAAAAAAGAAATAGATGTAGATTGAGGTAGAATCAAGAAGAGGATTCTTTT
TTTGTTGTTTTTTTTTTTTGAAACAGAGTCTCACTGTGTTGCCCAGGCTGGA
GTGCAGTGGAGTGATCTTGGCTTACTGCAACCTCTGCCTCCCAGGTTCAG
CGATTCTTCTGCTTCAGTCTCCCGAGTAGCTGGAATTACAGGTGCCACCA
GCACGGCCGGCTAATTTAGTAGAGACAGGGTTTTGCCATGTTGGCCGGGCT
GGTCTCAAACCTTGGATCTCAGGTAATCCGCCAGCCTCAACTTCCCAAAGT
GCTGGGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCCCAGCCTGTTTTTTTTTTTTTA
AAGGAGACCAGTGAAGTTTCAGGAGGAGGGAAAGAAAATTTAGAGTTACTA
GGGAGAGAGTGATGAAGATAAGAGATGAAAGTGGTAATAAGGGAAATAGCA
AAATATCAGGGTAGGTGGGAGAAAAAGAGATTTGTAACAAACAATAGGATT
ATCCTGTGAAAAAGGATGAAAGGAAGAAAAAATGGATAGAAAGATATTTA
AAACACCCTCAGCCTCCTGTTTTCCCTCCTGTGTATTCATAGTATATAAAA
CTATAATTATGTACTTTACTTAAAAATATATTATTATTACCTTATCGTGC
TTATTTAATCATAGCATGTCCTCTTTTTAGTCTCATTACCCTGTTTGTATT
ATTCTTCATAACACTTAATACCTGACATTGTATTATATATTGGCTTATTTT
CCAGGTACTCCACTCAAATATAAGTTCTAGGATATAATTTATTTATCACTG
AAATCCATTGCTTAGAGTACCTGGCATGTAGTAAATAGGCATTCTGTTTTT
TCAAATAAAAAATAAAGGAACTTAAGATATATATTTATGTTATATCGCCAG
CCTTTTTCTCACAGCTCTATTCTGTTGTACAGAATTACCTACTTTACAAT
TCCTGTGTTTCAAGGGGATCTCAAATTTAACGTGTCCACAATGAACTCCTG
ATTTCTGTTTCTCTCCTAGTCATTCTTATTTCAATATATGTTTCAGTTACCT
AACCAGCTAGTCAAGGCAGATACTTTAGAGTTATTCTGTAGTCATTCTTTT
TCCCTACCATTTTTGTTTTCCAAATGTAATTTATGTGTGTCTTCTTCATCC
TCGCAGCTCTAACCCTTGTCCAAACCAGCATCATCACTCATCTGGAGTTCC
ACAATGTCTTTCTGGCTAGTTTCCCTGATTTCTCTATTGACCCCTTTATTC

TCCACAGTGCAGCCAGAATGATTGTTTAAAACCTCCTCCTTAAAATCTTTA
AATTGTTTTCTTTTATACGTAAAGTTAAATTCAGTTCCTTGTCTTGGCAT
GCCATGCCCTGCCTGGTGTGGCCCCCTGATGGTCTCTCCAACCTCATGTTTT
ACTACTATTGACTCTTATTTTTTGCTTACTCTGCTTGGGTGCTCCAGTCCTC
CAAATCATTTCTGCTCCAATCATTTCAATCATTTTTTCTCTCAGATCTT
ATAGTATTCCAAATGCTTTCTTCCTTTGGAGCATCTGGGTTTACTAATAAA
TACTTCGTACCTCACAGTTCAGCTTAAATATCAATTATTTGGTGGTTAAGA
CATCCTTCAACCGCTCTATCTAAATGTTCCCTTCTATTATTCAGTGGCTCA
GTACTCTGTTTTTATTTTCTTTCTAAATGTCAACTTTTTTTTTTTTGAGTC
AGGGTCTCACTGTTGCCCAGGCTCGAGTGCAGTTGCACAATCATAGCTCAT
TGCAGCCTTGCCCTCCTGGGATCAAGTAATTCTCCCACCTCAGCCTCCAAA
ATAGCTGGGATTACAGGTATGCATCACCATGCTCAGCTAATTTTTTGTGTT
TTTTTGTAGAGATGAGGTCTCACTTTGTTGCCCAGGCTGGTCTCAAACCTCC
TGGA CTCAAGTGATTCTCCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGGTTACAG
GTGTGAGCCACTGCACCTGGTCGATACTGACTTTTTTTTTTTTTTGAGATG
GAGTTTTGCTCTGTTGCCCAGGCTAGAGCGCAGTGGTGTGATCTCAGCTCA
CTGCAACCTCCACCTCCCAGGTAAAGGGATTCTTCTGCCTCAGTCTCCTG
AGTAGCTGGGATTACAGGCAAGTGCCATCATGACTGGCTAATTTTTGTATT
TTTAGCACTATGTTTAGTACTGTGTTGGCCAGGCTTGTCTCGAACTCCTGA
CCTCAAGTGATCCACCCACCTCAGCCTCCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTG
TGAGCCACCGTAATCGGCCAACATTGACATTTT TAGTAGACTTTTTGTTTG
TTTACTTGCTTATTATCTGCTGCCTTCCACACTCTGGCGAAATCCTGCCAC
CCACCCACACACACATAGGCACTGAATGGGCAGAACTCTGAAGGCCAGAAT
TTTATATTTCTTTTCACTGTAAACATCATCATCTGTCACTGATGGCACACT
AGGATGCTCAGCAACTGTGTGCATGAAGGAAGTAAGCACTAGTTTGTGAAG
GCTGCAAACTCTTGAGTATTCTAAGAGTTTTGGCCAAAATGAATGTACAG
CTTTAGTGGCAGAAGCTAATACTCAGAAATTGAGGCCGTATATTGGATAAC
ACAGGATTTGGATGATTATTTTAAAATAATTTTACATTGTATATATATGTG
TGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTATATATATATAT
GTATGTATGTGTATTAGTCCGTTCTCATGCTGCTATGAAGAAATACCTGAG
ACTGGGTAATTTATAAAGGAAAGAGGTTTAATTGACTCACAGTTCACAGA

GCTGGGGAGGCCTCAGAAACTTAACAGTTATGGCAGAAGGGGAAGCAAAC
ACATTTTTTCTTCACATGGTGGCCGGAATTAGAAGAATGTGAGCCGAGCAAA
GGGGAAAGCCCCCTTATAAAACCATCAGACATCGTGAGAACTTACTATTATG
AGAATAGCGTGGGGGAAACCACCCCCACGATTCAATTACCTCCCACCAAAT
CCCTCCCATGACATATGAGGATTATGGGAACTATGATTCAAGATGAGATTT
GGGTAGGGACACAGCCAAACCATATCAGTATGTATATGTATACAAGTATTA
TATATATATGTATGTGTTTGTATGCATACATGTATTATATATGGAGGAAAT
TCTAATTTTGTAAAAAACTGGATTGTGAGTTTTTAAGGAGATGTTATATAAA
GTTAAGACAATGTCATTTTGTGGTATTGGTCTGAATTACAATGTAGTTTCT
TAGTGATATTTTTTCCTTTATTTCAG

突变的ITR序列 (SEQ ID NO:24)

CACTCCCTCTCTGCGCGCTCGCTCGCTCACTGAGGCCGGGCGACCAAAGGTCGCCACGCCCGGGCTTT
GCCCGGGCG

tracr序列 (SEQ ID NO:25)

TAGCAAGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGC

NLS序列

PKKKRKV (SEQ ID NO:26)

PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)

用于BbsI限制性位点突变的正向核酸引物 (SEQ ID NO:28)

GGGAGGATTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTG

用于BbsI限制性位点突变的反向核酸引物 (SEQ ID NO:29)

CAGCATGCCTGCTATTCTCTTCCAATCCTCCC

用于构建pSpCas9 (BB) 的U6启动子-BbsI:BbsI-sgRNA支架-U6终止子盒,其中U6启动子序列加下划线 (SEQ ID NO:30)

CACATGTGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAGAT
AATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGGGT
AGTTTGCAGTTTTAAATTATGTTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAAGTAAAGTATTTTCGATTTCTTG
GCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCGGTCTTCGAGAAGACCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTA
AAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCA
AGTTAAATAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGGTACCC

PPIA F核酸引物 (SEQ ID NO:31)

TTCATCTGCACTGCCAAGAC

PPIA R核酸引物 (SEQ ID NO:32)

TCGAGTTGTCCACAGTCAGC

用于构建pSpCas9 (BBU) 的U6启动子-BbsI:BbsI-sgRNA支架-U6终止子-CMV启动子,其中U6启动子和CMV启动子序列加下划线 (SEQ ID NO:33)

CTCACATGTGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTGCATATACGATACAAGGCTGTTAGAGAG

ATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAAGTAATAATTTCTTGG
GTAGTTTGCAGTTTTTAAATTATGTTTTTAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACCTGAAAGTATTTTCGATTTCT
TGGCTTTATATATCTTGTGAAAGGACGAAACACCGGGTCTTCGAGAAGACCTGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGT
TAAATAAAGGCTAGTCCGTTATCAACTGAAAAAGTGGCACCAGTCGGTGCTTTTTTGTTTTAGAGCTAGAAATAG
CAAGTTAAATAAAGGCTAGTCCGTTTTTAGCGCGTGCGCCAATTCTGCAGACAAATGGCTCTAGAGACCGGCGCCGC
TACAGGCTTTCCACCGGTGGTCTCTTCTAGAGGTACCCGTTACATCTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCA
TTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGA
CCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGG
TGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTACGCCCCCTATTGACGTC
AATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTA
CGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGTTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGTTTTGACTCAC
GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAA
TGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCT
CTGGCTAACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGAACCAAGCTGGCT
AGCCGC

用于构建pSpCas9 (BBD) 的正向核酸引物 (SEQ ID NO:34)

ATAACATGTGGTCTCACTCTAGAGGCATGTGAGGGCCTATTTCCC

用于构建pSpCas9 (BBD) 的反向核酸引物 (SEQ ID NO:35)

TATGGTACCGGTCTCATAGAGCCATTTGTCTGCAGA

对照1 sgRNA的上链寡核苷酸 (SEQ ID NO:36)

caccGCACTACCAGAGCTAACTCA

对照1 sgRNA的下链寡核苷酸 (SEQ ID NO:37)

aaacTGAGTTAGCTCTGGTAGTGC

对照2 sgRNA的上链寡核苷酸 (SEQ ID NO:38)

caccgTGCGAATACGCCACGCGAT

对照2 sgRNA的下链寡核苷酸 (SEQ ID NO:39)

aaacATCGCGTGGCGTATTCGCac

酿脓链球菌Cas9氨基酸序列 (SEQ ID NO:40)

MDKKYSIGLDIGTNSVGWAVITDEYKVPSKKFKVLGNTRHSIKKNLIGALLFDSGETAEATRLKRTAR
RRYTRRKNRICYLQEIFSNEMAKVDDSFHRLEESFLVEEDKKHERHPFGNIVDEVAYHEKYPTIYHLRKKLVDST
DKADLRLIYLALAHMIKFRGHFLIEGDLNPDNSDVKLFIQLVQTYNQLFEENPINASGVDAKAILSARLSKSRRL
NLIAQLPGEKKNGFLGNLIALSLGLTPNFKSNFDLAEDAKLQLSKDTYDDDLNLLAQIGDQYADLFLAAKNLSDAI
LLSDILRVNTEITKAPLSASMIKRYDEHHQDLTLLKALVRQQLPEKYKEIFFDQSKNGYAGYIDGGASQEEFYKFIK
PILEKMDGTEELLVKLNREDLLRKQRTFDNGSIPHQIHLGELHAILRRQEDFYFPLKDNREKIEKILTFRIPYYVGP
LARGNSRFAWMTRKSEETITPWNFEEVVDKGASQSFIERMTNFDKNLPNEKVLPKHSLLEYFTVYNELTKVKYVT
EGMRKPAFLSGEQKKAIVDLLFKTNRKVTVKQLKEDYFKKIECFDSVEISGVEDRFNASLGTYHDLLKIIKDKDFLD
NEENEDILEDIVLTLTLFEDREMIEERLKTYAHLFDDKVMKQLKRRRYTGWGRLSRKLINGIRDKQSGKTILDFLKS
DGFANRNFMLIHDDSLTFKEDIQKAQVSGQGSLSHEHIANLAGSPAIIKKGILQTVKVVDELVKVMGRHKPENIVIE
MARENQTTQKGQKNSRERMKRIEELIKELGSQILKEHPVENTQLQNEKLYLYLQNGRDMYVDQELDINRLSDYD

HIVPQSFLKDDSIDNKVLTRSDKNRGKSDNVPSEEVVKMKNYWRQLLNAKLITQRKFDNLTKAERGGLSELDKAGF
IKRQLVETRQITKHVAQILDSRMNTKYDENDKLIREVKVITLKSCLVSDFRKDFQFYKREINNYHHAHDAYLNAV
GTALIKKYPKLESEFVYGDYKVYDVRKMIKSEQEIGKATAKYFFYSNIMNFFKTEITLANGEIRKRPLIETNGETG
EIVWDKGRDFATVRKVL SMPQVNIVKKTEVQTGGFSKESILPKRNSDKLIARKKDWDPKKYGGFDSPTVAYSVLVVA
KVEKGSKKLKSVKELLGITIMERSSEFEKNPIDFLEAKGYKEVKDLIIKLPKYSLEFLENGRKRMLASAGELQKGN
ELALPSKYVNFLYLASHYEKLKGSPEDEQKQLFVEQHKHYLDEIEQISEFSKRVILADANLDKVL SAYNKHDRDP
IREQAENIIHLFTLTNLGAPAAFKYFDTTIDRKRYTSTKEVLDTLHQSITGLYETRIDLSQLGGD

U1 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:41)

GGCGGGTGGATCACGAGTTC

D1 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:42)

AAAGCTACCGTTACCTGAA

D2 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:43)

TCATTCTTGTGGCAGTAAGG

D3 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:44)

GGAGTCACATGGGAGTCACA

aU1 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:45)

TTTAACGTTATCATTTTCCCA

aU2 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:46)

AGTTTCATTCTGTCACCCAGG

aU3 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:47)

AAAAATTAGCCGGGCATGATG

aD1 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:48)

TGTAAGACTGGAGATAGAGAC

aD2 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:49)

CTTTTGACAGTTTTTAAGGCG

aU1 sgRNA序列 (SEQ ID NO:50)

GTTTAACGTTATCATTTTCCCAGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCC
GTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTT

aU2 sgRNA序列 (SEQ ID NO:51)

GAGTTTCATTCTGTCACCCAGGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCC
GTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTT

aU3 sgRNA序列 (SEQ ID NO:52)

GAAAAATTAGCCGGGCATGATGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCC
GTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTT

aD1 sgRNA序列 (SEQ ID NO:53)

GTGTAAGACTGGAGATAGAGACGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCC
GTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTT

aD2 sgRNA序列 (SEQ ID NO:54)

GCTTTTGACAGTTTTTAAGGCGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCC

GTGTTTATCTCGTCAACTTGTTGGCGAGATTTTT

金黄色葡萄球菌Cas9氨基酸序列 (SEQ ID NO:55)

MKRNILGLDIGITSVGYGIIIDYETRDVIDAGVRLFKEANVENNEGRRSKRGARRLKRRRRHRIQRVKK
LLFDYNLLTDHSELSGINPYEARVKGLSQKLSEEEFSAALLHLAKRRGVHNVNEVEEDTGNELSTKEQISRNSKALE
EKYVAELQLERLKKDGEVRGSINRFKTSYVKEAKQLLKVKAYHQLDQSFIDTYIDLLETRRTYYEGPGEGSPFGW
KDIKEWYEMLMGHCTYFPEELRSVKYAYNADLYNALNDLNNLVITRDENEKLEYEKFQIIENVFKQKKKPTLKQIA
KEILVNEEDIKGYRVTSTGKPEFTNLKVYHDIKDITARKEI IENAELLDQIAKILTIYQSSEDIQEELTNLNSLTQ
EEIEQISNLKGYTGTHNLSLKAINLILDELWHTNDNQIAIFNRLKLVPKKVDLSQQKEIPTTLVDDFILSPVVKRSF
IQSIKVINAI IKKYGLPNDII IELAREKNSKDAQKMINEMQKRNQRTNERIEE IIRTTGKENAKYLIEKIKLHDMQE
GKCLYSLEAIPLEDLLNNPFNYEVDHI IPRSVSFDNSFNKVLVKQEENSCKGNRTPFYQLSSSDSKISYETFKKHI
LNLAKGKGRISKTKKEYLLEERDINRFSVQKDFINRNLVDTRYATRGLMNLRSYFRVNNLDVKVKSINGGFTSFLR
RKWKFKKERNKGYKHHAEDAL IIANADFIKWKKLDKAKKVMENQMFEEKQAESMPEIETEQEYKEIFITPHQIKH
IKDFKDYKYSHRVDKKPNRELINDTLYSTRKDDKGNTLIVNNLNGLYDKDNDKLLKLINKSPEKLLMYHHDPTQYQK
LKLIMEQYGDEKNPLYKYEEETGNYLTKYSKKDNGPVIKKIKYYGNKLNHLHDITDDYPNSRNKVVKLSLKPYRFDV
YLDNGVYKFVTVKNLDVIKKENYYEVNSKCYEEAKKLKISNQAEIFASFYNNDLIKINGELYRVIGVNNDLLNRIE
VN MIDITYREYLENMNDKRPPRI IKTIASKTQSIKKYSTDILGNLYEVKSKKHPQIIKKG

用于构建pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA的minCMV启动子-SpCas9序列,其中minCMV启动子加下划线 (SEQ ID NO:56)

TATACGCGTGTTGACACTAGTTTCGCGAAATATTGACTCACGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGAC
GTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCA
AATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCGCCACCA
TGGACAAGAAGTACAGCATCGGCCTGGACATCGGCACCAACTCTGTGGGCTGGGCCGTGATCACCGACGAGTACAAG
GTGCCCAGCAAGAAATTCAAG

用于构建pAAV-minCMV-SpCas9-NLS-SV40 pA的SV40 pA序列,其中SV40早期poly(A)信号加下划线 (SEQ ID NO:57)

TGACTCGAGAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAA
AATAAAGCATTTTTTTTACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGCAATAT
TTCGCGAGAAGACAATAGCAGG

U1 sgRNA识别序列 (U1T;U1 sgRNA引导序列+PAM) (SEQ ID NO:58)

GGCGGGTGGATCACGAGTTCAGGD3 sgRNA识别序列 (D3T;D3 sgRNA引导序列+PAM) (SEQ ID NO:59)

GGAGTCACATGGGAGTCACAGG

含有BGH pA的片段,其中BGH pA加下划线 (SEQ ID NO:60)

CTAGTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATAGTGTCACCTAAATGCTAGAGCTC
GCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTG
GAAGGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCTAATAAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTAT
TCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATGCTGGGGAGCTAGAGT
CGACCGGACCGCTGCAGGCATGCA

U11 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:61)

GCATAAGGACTAAAGACCTA

D11 sgRNA引导/原型间隔序列 (SEQ ID NO:62)

GGTAGTGGTTGAACTCACA

RK启动子-嵌合内含子-EGFP-BGH pA片段 (SEQ ID NO:63)

GGGCCCCAGAAGCCTGGTGGTTGTTTGTCTCTCAGGGGAAAAGTGAGGCGGCCCTTGAGGAAGGG
GCCGGGCAGAATGATCTAATCGGATTCCAAGCAGCTCAGGGGATTGTCTTTTTCTAGCACCTTCTTGCCACTCCTAA
GCGTCCTCCGTGACCCCGGCTGGGATTTAGCCTGGTGCTGTGTCAGCCCCGGTCTCCCAGGGGCTTCCCAGTGGTCC
CCAGGAACCCTCGACAGGGCCCGGTCTCTCTCGTCCAGCAAGGGCAGGGACGGGCCACAGGCCAAGGGCGGAGTCGC
TGCGACGCTGCCTTCGCCCCGTGCCCCGTCCGCCGCCCTCGCGCCGCCCGCCCCGGCTCTGACTGACCGGTTA
CTCCACAGGTGAGCGGGCGGGACGGCCCTTCTCCTCCGGGCTGTAATTAGCGCTTGGTTTAATGACGGCTTGTTC
TTTTCTGTGGCTGCGTGAAAGCCTTGAGGGGCTCCGGGAGGGCCCTTGTGCGGGGGGAGCGGCTCGGGGGGTGCGT
GCGTGTGTGTGTGCGTGGGGAGCGCCGCTGCGGCTCCGCGTCCCCGGCGGCTGTGAGCGTGCGGGCGCGGCGCG
GGGCTTTGTGCGTCCGAGTGTGCGCGAGGGGAGCGCGCCGGGGCGGTGCCCGCGGTGCGGGGGGGCTGCGA
GGGGAACAAAGGCTGCGTGCGGGGTGTGTGCGTGGGGGGTGAGCAGGGGTGTGGGCGCGTCGGTCGGGCTGCAAC
CCCCCTGCACCCCCCTCCCCGAGTTGCTGAGCACGGCCCGGCTTCGGGTGCGGGGCTCCGTACGGGGCGTGCGCG
GGGCTCGCCGTGCCGGGCGGGGGTGCGCGCAGGTGGGGTGCCGGGCGGGGCGGGGCCCTCGGGCCGGGGAGGG
CTCGGGGGAGGGGCGCGGCGGCCCGGAGCGCCGGCGGCTGTGAGGCGCGCGAGCCGAGCCATTGCCTTTTAT
GGTAATCGTGCGAGAGGGCGCAGGGACTTCCTTTGTCCCAAATCTGTGCGGAGCCGAAATCTGGGAGGCGCCCGC
ACCCCTCTAGCGGGCGGGGCGAAGCGGTGCGGCGCCGGCAGGAAGGAAATGGGCGGGAGGGCCTTCGTGCGTC
GCCGCGCCGCGTCCCTTCTCCTCTCCAGCCTCGGGGCTGTCCGCGGGGGACGGCTGCCTTCGGGGGGGACGGG
GCAGGGCGGGGTTCGGCTTCTGCGTGTGACCGCGGCTCTAGAGCCTCTGCTAACCATTGTCATGCCTTCTTCTT
TTCCTACAGCTCCTGGGCAACGTGCTGGTTATTGTGCTGTCTCATTTTTGGCAAAGAATTCTTCGAAAGATCTGC
TAGCTTAATTAACCCGGTCGCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCGGGGTGGTGCCATCCTGGTCG
AGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTG
ACCCTGAAGTTCATCTGCACCACCGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCGT
GCAGTGCTTCAGCCGCTACCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCC
AGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGACGACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG
GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAGCTGGAGTACAATA
CAACAGCCACAACGTCTATATCATGGCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAAGTTCAGATCCGCCACAACA
TCGAGGACGGCAGCGTGAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCC
GACAACCACTACCTGAGCACCCAGTCCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTCTGCTGGA
GTTCTGTACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGTAAAGCGGCCAAATCGTACGCCTAGGTG
ATCAAGATCTGCTAGCTTAATTAACCCGGGACTAGTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGAGGGCCCTATTCTATA
GTGTACCTAAATGCTAGAGCTCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTTGCCCT
CCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCCACTGTCTTTCCTAATAAAATGAGGAAATTGCATCGCAT
TGTCTGAGTAGGTGTATTCTATTCTGGGGGGTGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGAGGATTGGGAAGACAATAG
CAGGCATGCTGGGA

小鼠Cep290内含子25F核酸引物 (SEQ ID NO:64)

CCCCTCGCCTGTACTGAAAG

小鼠Cep290内含子25R核酸引物 (SEQ ID NO:65)

GCACATCATCTGAGGCAGGT

minCMV-SaCas9-NLS-FLAG-BGH pA-U6-BsaI:BsaI-sgRNA支架片段,其中minCMV和SaCas9序列加下划线 (SEQ ID NO:66)

ATGAATTCTCTAGACAATTGGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTT
TGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAACAACTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGG
CGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCACGCGTGCCACCATGAAGCGGAA
CTACATCCTGGGCCTGGACATCGGCATCACCAGCGTGGGCTACGGCATCATCGACTACGAGACACGGGACGTGATCG
ATGCCGGCGTGC GGCTGTTCAAAGAGGCCAACGTGGAAAAACAAGAGGGCAGGCGGAGCAAGAGAGGCGCCAGAAGG
CTGAAGCGGCGGAGGCGGCATAGAATCCAGAGAGTGAAGAAGCTGCTGTTCTGACTACAACCTGCTGACCGACCACAG
CGAGCTGAGCGGCATCAACCCCTACGAGGCCAGAGTGAAGGGCCTGAGCCAGAAGCTGAGCGAGGAAGAGTTCTCTG
CCGCCCTGCTGCACCTGGCCAAGAGAAGAGGCGTGCAACCGTGAACGAGGTGGAAGAGGACACCGGCAACGAGCTG
TCCACCAAAGAGCAGATCAGCCGGAACAGCAAGGCCCTGGAAGAGAAATACGTGGCCGAACCTGCAGCTGGAACGGCT
GAAGAAAGACGGCGAAGTGCGGGCAGCATCAACAGATTCAAGACCAGCGACTACGTGAAAGAAGCCAAACAGCTGC
TGAAGGTGCAGAAGGCCTACCACCAGCTGGACCAGAGCTTCATCGACACCTACATCGACCTGCTGGAACCCGGCGG
ACCTACTATGAGGGACCTGGCGAGGGCAGCCCCCTTCGGCTGGAAGGACATCAAAGAATGGTACGAGATGCTGATGGG
CCACTGCACCTACTTCCCCGAGGAACCTGCGGAGCGTGAAGTACGCCTACAACGCCGACCTGTACAACGCCCTGAACG
ACCTGAACAATCTCGTGATCACCAGGGACGAGAACGAGAAGCTGGAATATTACGAGAAGTTCCAGATCATCGAGAAC
GTGTTCAAGCAGAAGAAGAAGCCACCCTGAAGCAGATCGCCAAAGAAATCCTCGTGAACGAAGAGGATATTAAGGG
CTACAGAGTGACCAGCACCGGCAAGCCCGAGTTCACCAACCTGAAGGTGTACCACGACATCAAGGACATTACCGCCC
GGAAAGAGATTATTGAGAACGCCGAGCTGCTGGATCAGATTGCCAAGATCCTGACCATCTACCAGAGCAGCGAGGAC
ATCCAGGAAGAACTGACCAATCTGAACTCCGAGCTGACCCAGGAAGAGATCGAGCAGATCTCTAATCTGAAGGGCTA
TACCGGCACCCACAACCTGAGCCTGAAGGCCATCAACCTGATCCTGGACGAGCTGTGGCACACCAACGACAACCAGA
TCGCTATCTTCAACCGGCTGAAGCTGGTGCCCAAGAAGGTGGACCTGTCCAGCAGAAAGAGATCCCCACCACCCTG
GTGGACGACTTCATCCTGAGCCCCGTCGTGAAGAGAAGCTTCATCCAGAGCATCAAAGTGATCAACGCCATCATCAA
GAAGTACGGCCTGCCCAACGACATCATTATCGAGCTGGCCCGCGAGAAGAACTCCAAGGACGCCCAGAAAATGATCA
ACGAGATGCAGAAGCGGAACCGGCAGACCAACGAGCGGATCGAGGAAATCATCCGACCACCGGCAAAGAGAACGCC
AAGTACCTGATCGAGAAGATCAAGCTGCACGACATGCAGGAAGGCAAGTGCCTGTACAGCCTGGAAGCCATCCCTCT
GGAAGATCTGCTGAACAACCCCTTCAACTATGAGGTGGACCACATCATCCCAGAAGCGTGTCTTCGACAACAGCT
TCAACAACAAGGTGCTCGTGAAGCAGGAAGAAAAACAGCAAGAAGGGCAACCGGACCCCATTCAGTACCTGAGCAGC
AGCGACAGCAAGATCAGCTACGAAACCTTCAAGAAGCACATCCTGAATCTGGCCAAGGGCAAGGGCAGAATCAGCAA
GACCAAGAAAGAGTATCTGCTGGAAGAACGGGACATCAACAGGTTCTCCGTGCAGAAAGACTTCATCAACCGGAACC
TGGTGGATACCAGATACGCCACCAGAGGCTGATGAACCTGCTGCGGAGCTACTTCAGAGTGAACAACCTGGACGTG
AAAGTGAAGTCCATCAATGGCGGCTTACCAGCTTTCTGCGGCGGAAGTGAAGTTTAAGAAAGAGCGGAACAAGGG
GTACAAGCACCACGCCGAGGACGCCCTGATCATTGCCAACGCCGATTCATCTTCAAAGAGTGAAGAAACTGGACA
AGGCCAAAAAGTGATGGAAGAACAGATGTTTCGAGGAAAAAGCAGGCCGAGAGCATGCCCGAGATCGAAACCGAGCAG
GAGTACAAAGAGATCTTCATCACCCCCACCAGATCAAGCACATTAAGGACTTCAAGGACTACAAGTACAGCCACCG
GGTGGACAAGAAGCCTAATAGAGAGCTGATTAACGACACCCTGTACTCCACCCGGAAGGACGACAAGGGCAACACCC
TGATCGTGAACAATCTGAACGGCCTGTACGACAAGGACAATGACAAGCTGAAAAAGCTGATCAACAAGAGCCCCGAA

AAGCTGCTGATGTACCACCACGACCCCCAGACCTACCAGAACTGAAGCTGATTATGGAACAGTACGGCGACGAGAA
GAATCCCCTGTACAAGTACTACGAGGAAACCGGGAACCTGACCAAGTACTCCAAAAAGGACAACGGCCCCGTGA
TCAAGAAGATTAAGTATTACGGCAACAACTGAACGCCCATCTGGACATCACCGACGACTACCCCAACAGCAGAAAC
AAGGTCGTGAAGCTGTCCCTGAAGCCCTACAGATTCGACGTGTACCTGGACAATGGCGTGTACAAGTTCGTGACCGT
GAAGAATCTGGATGTGATCAAAAAAGAAAATACTACGAAGTGAATAGCAAGTGCTATGAGGAAGCTAAGAAGCTGA
AGAAGATCAGCAACCAGGCCGAGTTTATCGCCTCCTTCTACAACAACGATCTGATCAAGATCAACGGCGAGCTGTAT
AGAGTGATCGGCGTGAACAACGACCTGCTGAACCGGATCGAAGTGAACATGATCGACATCACCTACCGCGAGTACCT
GGAAAACATGAACGACAAGAGGCCCCCCAGGATCATTAAGACAATCGCCTCCAAGACCCAGAGCATTAGAAGTACA
GCACAGACATTCTGGGCAACCTGTATGAAGTGAAATCTAAGAAGCACCTCAGATCATAAAAAGGGCGGATCCCCC
AAGAAAAAGCGCAAAGTGGACTACAAAGACGATGACGACAAGTGAGCTAGCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCAT
CTGTTGTTTGGCCCTCCCCCGTGCCTTCCTTGACCCTGGAAGTGCCACTCCCACTGTCCTTTCTAATAAAATGAG
GAAATTGCATCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGA
TTGGGAAGAGAATAGCAGGCATGCTGGTACCTGAGGGCCTATTTCCTCATATTTGCATATACGATAC
AAGGCTGTTAGAGAGATAATTGGAATTAATTTGACTGTAAACACAAAGATATTAGTACAAAATACGTGACGTAGAAA
GTAATAATTTCTTGGGTAGTTTGCAGTTTTAAAATTATGTTTTAAAATGGACTATCATATGCTTACCGTAACTTGAA
AGTATTTTCGATTTCTTGGCTTTATATATCTTGTGGAAAGGACGAAACACCGGAGACCACGGCAGGTCTCAGTTTTAG
TACTCTGGAAACAGAATCTACTAAAACAAGGCAAAATGCCGTGTTTATCTCGTCAACTGTTGGCGAGATTTTTGCG
GCCGCGTCGACAT

本发明涉及下述实施方案。

1. 一种用于治疗与个体基因中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物, 所述组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR 相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统, 所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交, 和

b) Cas蛋白,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子, 从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

2. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的疾病或疾患的组合物, 所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR 相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸, 所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交, 和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子, 从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

3. 实施方案1或2的组合物, 其中与深内含子突变相关的疾病或疾患为: 无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖

基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

4. 实施方案1-3中任一项的组合物, 其中所述深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

5. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物, 所述组合物包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸, 所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交, 和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子, 从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

6. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的组合物, 所述组合物包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统, 所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交, 和

b) Cas蛋白,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子, 从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

7. 实施方案5或6的组合物, 其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁视网膜色素变性。

8. 实施方案5-7中任一项的组合物, 其中所述深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

9. 实施方案5-8中任一项的组合物, 其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦。

10. 实施方案5-9中任一项的组合物, 其中所述第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。

11. 实施方案5-10中任一项的组合物, 其中所述深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。

12. 实施方案5-11中任一项的组合物,其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、或SEQ ID NO:47的序列的DNA编码。

13. 实施方案5-12中任一项的组合物,其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、或SEQ ID NO:52的序列的DNA编码。

14. 实施方案5-13中任一项的组合物,其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48、或SEQ ID NO:49的序列的DNA编码。

15. 实施方案5-14中任一项的组合物,其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:53、或SEQ ID NO:54的序列的DNA编码。

16. 实施方案10-15中任一项的组合物,其中所述CEP290是人CEP290。

17. 实施方案10-16中任一项的组合物,其中所述CEP290包含在SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

18. 实施方案1-17中任一项的组合物,其中所述深内含子突变位于核酸的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

19. 实施方案1-18中任一项的组合物,其中所述深内含子突变位于核酸的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

20. 实施方案1-19中任一项的组合物,其中所述深内含子突变在核酸中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

21. 实施方案1-20中任一项的组合物,其中所述Cas蛋白是Cas9蛋白。

22. 实施方案21的组合物,其中所述Cas9蛋白是酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*) Cas9蛋白。

23. 实施方案21或22的组合物,其中对Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。

24. 实施方案23的组合物,其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。

25. 实施方案23或24的组合物,其中所述真核细胞是人类细胞。

26. 实施方案1-25中任一项的组合物,其中所述CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号(NLS)。

27. 实施方案26的组合物,其中所述Cas蛋白包含一个或多个NLS。

28. 实施方案26或27的组合物,其中所述NLS是SV40大T抗原中的C端序列。

29. 实施方案28的组合物,其中所述NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

30. 实施方案1-29中任一项的组合物,其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。

31. 实施方案30的组合物,其中所述tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

32. 实施方案2-4和6-31中任一项的组合物,其中在真核细胞中表达编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA和所述Cas蛋白的核酸。

33. 实施方案2-4和6-32中任一项的组合物,其中编码所述第一引导RNA、所述第二

引导RNA和/或所述Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。

34. 实施方案33的组合物, 其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。

35. 实施方案34的组合物, 其中所述RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。

36. 实施方案33-35中任一项的组合物, 其中编码所述Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。

37. 实施方案36的组合物, 其中所述RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段 (minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子 (LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子 (CAG) 启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶 (PDE) 启动子、视网膜色素变性 (RP1) 启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因 (IRBP) 启动子。

38. 实施方案1、3-5或7-31的组合物, 其中所述CRISPR-Cas系统与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸和/或蛋白质的细胞摄取的药剂复合。

39. 实施方案2-4和6-37中任一项的组合物, 其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA或所述Cas蛋白中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。

40. 实施方案39的组合物, 其中所述载体是质粒。

41. 实施方案39或40的组合物, 其中所述载体与递送系统复合。

42. 实施方案41的组合物, 其中所述载体与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

43. 实施方案29的组合物, 其中所述载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒 (HSV) 载体。

44. 实施方案43的组合物, 其中所述载体是重组腺病毒载体。

45. 实施方案44的组合物, 其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。

46. 实施方案44或45的组合物, 其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

47. 实施方案43的组合物, 其中所述载体是重组慢病毒载体。

48. 实施方案47的组合物, 其中所述重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒 (Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

49. 实施方案43的组合物, 其中所述载体是rHSV载体。

50. 实施方案49的组合物, 其中所述rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

51. 实施方案43的组合物, 其中所述载体是重组AAV (rAAV) 载体。

52. 实施方案51的组合物, 其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA或所述

Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。

53. 实施方案52的组合物, 其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA或所述Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。

54. 实施方案52或实施方案53的组合物, 其中所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。

55. 实施方案52-54中任一项的组合物, 其中所述AAV ITR是AAV2ITR。

56. 实施方案52-55中任一项的组合物, 其中所述载体是自身互补型载体。

57. 实施方案43的组合物, 其中所述载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。

58. 实施方案57的组合物, 其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。

59. 实施方案58的组合物, 其中所述重组腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。

60. 实施方案58或59的组合物, 其中所述重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

61. 实施方案57的组合物, 其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。

62. 实施方案61的组合物, 其中所述重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

63. 实施方案57的组合物, 其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。

64. 实施方案63的组合物, 其中所述重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

65. 实施方案57的组合物, 其中所述病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。

66. 实施方案65的组合物, 其中所述重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。

67. 实施方案65或66的组合物, 其中所述AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

68. 实施方案65-67中任一项的组合物, 其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。

69. 实施方案65-67中任一项的组合物, 其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。

70. 实施方案65-69中任一项的组合物, 其中所述重组AAV病毒颗粒包含AAV1、

AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。

71. 实施方案70的组合物, 其中所述AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。

72. 实施方案65-71中任一项的组合物, 其中所述rAAV载体包含AAV2ITR。

73. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的疾病或疾患的方法, 所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的组合物, 所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交, 和

b) Cas蛋白,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子, 从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

74. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的疾病或疾患的方法, 所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸的组合物, 所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交, 和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子, 从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

75. 实施方案73或74的方法, 其中与深内含子突变相关的疾病或疾患为: 无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

76. 实施方案73-75中任一项的方法, 其中所述深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

77. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的方法,

所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的包含工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR 相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的组合物,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) Cas蛋白,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

78. 一种用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的眼部疾病或疾患的方法,所述方法包括向所述个体施用治疗有效量的包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —CRISPR 相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸的组合物,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与所述深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

79. 实施方案77或78的方法,其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁视网膜色素变性。

80. 实施方案77-79中任一项的方法,其中所述深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

81. 实施方案73-80中任一项的方法,其中所述个体是哺乳动物。

82. 实施方案81的方法,其中所述哺乳动物是人。

83. 实施方案77-82中任一项的方法,其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦。

84. 实施方案77-83中任一项的方法,其中将所述组合物施用至所述个体的眼睛。

85. 实施方案84的方法,其中所述施用是视网膜下或玻璃体内施用。

86. 实施方案77-85中任一项的方法,其中所述第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。

87. 实施方案77-86中任一项的方法,其中所述深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。

88. 实施方案77-87中任一项的方法,其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47的序列的DNA编码。

89. 实施方案77-88中任一项的方法,其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的序列的DNA编码。

90. 实施方案77-89中任一项的方法,其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49的序列的DNA编码。

91. 实施方案77-90中任一项的方法,其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的序列的DNA编码。

92. 实施方案86-91中任一项的方法,其中所述CEP290是人CEP290。

93. 实施方案86-92中任一项的方法,其中所述CEP290包含在SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

94. 实施方案73-93中任一项的方法,其中所述深内含子突变位于核酸的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

95. 实施方案73-94中任一项的方法,其中所述深内含子突变位于核酸的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

96. 实施方案73-95中任一项的方法,其中所述深内含子突变在核酸中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

97. 实施方案73-96中任一项的方法,其中所述Cas蛋白是Cas9蛋白。

98. 实施方案97的方法,其中所述Cas9蛋白是酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*) Cas9蛋白。

99. 实施方案97或98的方法,其中对Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。

100. 实施方案99的方法,其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。

101. 实施方案99或100的方法,其中所述真核细胞是人类细胞。

102. 实施方案73-101中任一项的方法,其中所述CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号(NLS)。

103. 实施方案102的方法,其中所述Cas蛋白包含一个或多个NLS。

104. 实施方案102或103的方法,其中所述NLS是SV40大T抗原中的C端序列。

105. 实施方案102-104中任一项的组合物,其中所述NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

106. 实施方案73-105中任一项的方法,其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。

107. 实施方案106的方法,其中所述tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

108. 实施方案73-107中任一项的方法,其中在真核细胞中表达所述第一引导RNA、所述第二引导RNA和所述Cas蛋白。

109. 实施方案74-76和78-108中任一项的方法,其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA和/或所述Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。

110. 实施方案109的方法,其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。

111. 实施方案110的方法,其中所述RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。

112. 实施方案109-111中任一项的方法,其中编码所述Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。

113. 实施方案112的方法,其中所述RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段 (minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特

异性启动子 (LSP)、E2F 启动子、EF1 α 启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子 (CAG) 启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶 (PDE) 启动子、视网膜色素变性 (RP1) 启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因 (IRBP) 启动子。

114. 实施方案73、75-77和79-107中任一项的方法,其中所述CRISPR-CAS系统与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

115. 实施方案74-76和78-114中任一项的方法,其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA或所述Cas蛋白中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。

116. 实施方案115的方法,其中所述载体是质粒。

117. 实施方案115或116的方法,其中所述载体与递送系统复合。

118. 实施方案117的方法,其中所述载体与脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

119. 实施方案115的方法,其中所述载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒 (HSV) 载体。

120. 实施方案119的方法,其中所述载体是重组腺病毒载体。

121. 实施方案120的方法,其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad3型。

122. 实施方案120或121的方法,其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

123. 实施方案119的方法,其中所述载体是重组慢病毒载体。

124. 实施方案123的方法,其中所述重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒 (Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

125. 实施方案119的方法,其中所述载体是rHSV载体。

126. 实施方案125的方法,其中所述rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

127. 实施方案119的方法,其中所述载体是重组AAV (rAAV) 载体。

128. 实施方案127的方法,其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA或所述Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。

129. 实施方案128的方法,其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA或所述Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。

130. 实施方案128或129的方法,其中所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。

131. 实施方案128-130中任一项的方法,其中所述AAV ITR是AAV2ITR。

132. 实施方案127-131中任一项的方法,其中所述载体是自身互补型载体。

133. 实施方案119的方法,其中所述载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。

134. 实施方案133的方法,其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹腺病毒载体的重组腺

病毒颗粒。

135. 实施方案134的方法, 其中所述重组腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。

136. 实施方案135的方法, 其中所述重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

137. 实施方案133的方法, 其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。

138. 实施方案137的方法, 其中所述重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

139. 实施方案133的方法, 其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。

140. 实施方案139的方法, 其中所述重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

141. 实施方案133的方法, 其中所述病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。

142. 实施方案141的方法, 其中所述重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。

143. 实施方案141或142的方法, 其中所述AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

144. 实施方案141-143中任一项的方法, 其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。

145. 实施方案141-143中任一项的方法, 其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。

146. 实施方案141-145中任一项的方法, 其中所述重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。

147. 实施方案146的方法, 其中所述AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。

148. 实施方案141-147中任一项的方法, 其中所述rAAV载体包含AAV2ITR。

149. 实施方案73-148中任一项的方法, 其中所述组合物是药物组合物。

150. 实施方案1-72中任一项的组合物用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的疾患的用途。

151. 实施方案1-72中任一项的组合物在制造用于治疗与个体核酸中的深内含子突变相关的疾患的药物中的用途。

152. 实施方案150或151的用途, 其中与深内含子突变相关的疾病或疾患为: 无纤

维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

153. 实施方案150-152中任一项的用途, 其中所述深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

154. 实施方案150-153中任一项的用途, 其中与所述深内含子突变相关的疾病或疾患是眼部疾病。

155. 实施方案154的用途, 其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁视网膜色素变性。

156. 实施方案154或155的用途, 其中所述深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

157. 实施方案150-156中任一项的用途, 其中所述个体是哺乳动物。

158. 实施方案157的用途, 其中所述哺乳动物是人。

159. 实施方案154-158中任一项的用途, 其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦。

160. 实施方案154-159中任一项的用途, 其中将所述组合物配制为用于施用至所述个体的眼睛。

161. 实施方案160的用途, 其中将所述施用安排为视网膜下或玻璃体内施用。

162. 实施方案154-161中任一项的用途, 其中所述第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。

163. 实施方案154-162中任一项的用途, 其中所述深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。

164. 实施方案154-163中任一项的用途, 其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47的序列的DNA编码。

165. 实施方案154-164中任一项的用途, 其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的序列的DNA编码。

166. 实施方案154-165中任一项的用途, 其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO:

42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49的序列的DNA编码。

167. 实施方案154-166中任一项的用途,其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的序列的DNA编码。

168. 实施方案162-167中任一项的用途,其中所述CEP290是人CEP290。

169. 实施方案162-168中任一项的用途,其中所述CEP290包含在SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

170. 实施方案150-169中任一项的用途,其中所述深内含子突变位于核酸的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

171. 实施方案150-170中任一项的用途,其中所述深内含子突变位于核酸的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

172. 实施方案150-171中任一项的用途,其中所述深内含子突变引入剪接供体位点或剪接受体位点。

173. 一种包含实施方案1-72中任一项的组合物的试剂盒。

174. 一种用于在实施方案73-149中任一项的方法中使用的试剂盒,其中所述试剂盒包含实施方案1-73中任一项的组合物。

175. 实施方案173或174的试剂盒,其中所述试剂盒进一步包括使用说明书。

176. 一种包含病毒载体的病毒颗粒,其中所述病毒载体包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR)—CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与个体核酸中的深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

177. 实施方案176的病毒颗粒,其中个体核酸中的所述深内含子突变与下列疾病相关:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征(Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征(Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病(Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血(Fanconi anemia)、吉特曼综合征(Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调(Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征(Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征(Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病(mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病(multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征(Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征(Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征(Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁

低磷血症。

178. 实施方案176或177的病毒颗粒,其中个体核酸中的所述深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

179. 实施方案176-178中任一项的病毒颗粒,其中所述病毒颗粒用于治疗患有下列疾病的个体:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征(Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征(Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病(Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血(Fanconi anemia)、吉特曼综合征(Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调(Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征(Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征(Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病(mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病(multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征(Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征(Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征(Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

180. 一种包含病毒载体的病毒颗粒,其中所述病毒载体包含编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR) — CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含

a) 第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与眼部疾病或疾患相关个体的核酸中的深内含子突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交,和

b) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

其中所述Cas蛋白在位于所述深内含子突变侧翼的位点处切割靶DNA分子,从而切除包含所述深内含子突变的靶DNA部分。

181. 实施方案180的病毒颗粒,其中所述眼部疾病或疾患是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病(Stargardt disease)、厄舍综合征(Usher syndrome)或X连锁视网膜色素变性。

182. 实施方案180或181的病毒颗粒,其中所述深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

183. 实施方案180-182中任一项的病毒颗粒,其中所述病毒颗粒用于治疗莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病(Stargardt disease)、厄舍综合征(Usher syndrome)或X连锁视网膜色素变性。

184. 实施方案180-183中任一项的病毒颗粒,其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦。

185. 实施方案180-184中任一项的病毒颗粒,其中所述第一引导RNA和第二引导RNA引导序列与中心体蛋白290kDa (CEP290) 核酸的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相

反链杂交。

186. 实施方案180-185中任一项的病毒颗粒,其中所述深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。

187. 实施方案180-186中任一项的病毒颗粒,其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47的序列的DNA编码。

188. 实施方案180-187中任一项的病毒颗粒,其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的序列的DNA编码。

189. 实施方案180-188中任一项的病毒颗粒,其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49的序列的DNA编码。

190. 实施方案180-189中任一项的病毒颗粒,其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的序列的DNA编码。

191. 实施方案185-190中任一项的病毒颗粒,其中所述CEP290是人CEP290。

192. 实施方案185-191中任一项的病毒颗粒,其中所述CEP290包含在SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

193. 实施方案176-192中任一项的病毒颗粒,其中所述深内含子突变位于核酸的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

194. 实施方案176-193中任一项的病毒颗粒,其中所述深内含子突变位于核酸的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

195. 实施方案176-194中任一项的病毒颗粒,其中所述深内含子突变在核酸中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

196. 实施方案176-195中任一项的病毒颗粒,其中所述Cas蛋白是Cas9蛋白。

197. 实施方案196的病毒颗粒,其中所述Cas9蛋白是酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*) Cas9蛋白。

198. 实施方案196或197的病毒颗粒,其中对Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。

199. 实施方案198的病毒颗粒,其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。

200. 实施方案198或199的病毒颗粒,其中所述真核细胞是人类细胞。

201. 实施方案176-200中任一项的病毒颗粒,其中所述CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号(NLS)。

202. 实施方案201的病毒颗粒,其中所述Cas蛋白包含一个或多个NLS。

203. 实施方案201或202的病毒颗粒,其中所述NLS是SV40大T抗原中的C端序列。

204. 实施方案201-203中任一项的病毒颗粒,其中所述NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

205. 实施方案176-204中任一项的病毒颗粒,其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。

206. 实施方案205的病毒颗粒,其中所述tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

207. 实施方案176-206中任一项的病毒颗粒,其中在真核细胞中表达所述第一引导RNA、所述第二引导RNA和所述Cas蛋白。

208. 实施方案176-207中任一项的病毒颗粒,其中所述第一引导RNA、所述第二引导RNA和/或编码所述Cas蛋白的核酸与一个或多个调控元件可操作连接。

209. 实施方案208的病毒颗粒,其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。

210. 实施方案209的病毒颗粒,其中所述RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。

211. 实施方案208-210中任一项的病毒颗粒,其中编码所述Cas蛋白的核酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。

212. 实施方案211的病毒颗粒,其中所述RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段(minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子(LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶(hTERT)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG)启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶(PDE)启动子、视网膜色素变性(RP1)启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因(IRBP)启动子。

213. 实施方案176-212的病毒颗粒,其中所述载体是重组腺相关病毒(rAAV)载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒(HSV)载体。

214. 实施方案213的病毒颗粒,其中所述载体是重组腺病毒载体。

215. 实施方案214的病毒颗粒,其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。

216. 实施方案214或215的病毒颗粒,其中所述重组腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。

217. 实施方案216的病毒颗粒,其中所述重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

218. 实施方案213的病毒颗粒,其中所述载体是重组慢病毒载体。

219. 实施方案218的病毒颗粒,其中所述重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

220. 实施方案218或219的病毒颗粒,其中所述重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

221. 实施方案213的病毒颗粒,其中所述载体是rHSV载体。

222. 实施方案221的病毒颗粒,其中所述rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

223. 实施方案221或222的病毒颗粒,其中所述重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

224. 实施方案213的病毒颗粒,其中所述载体是重组AAV (rAAV) 载体。

225. 实施方案224的病毒颗粒,其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA或所述Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。

226. 实施方案225的病毒颗粒,其中编码所述第一引导RNA、所述第二引导RNA或所述Cas蛋白中的一者或多者的核酸的侧翼为两个AAV ITR。

227. 实施方案225或226的病毒颗粒,其中所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。

228. 实施方案224-227中任一项的病毒颗粒,其中所述AAV ITR是AAV2 ITR。

229. 实施方案224-228中任一项的病毒颗粒,其中所述载体是自身互补型载体。

230. 实施方案224-229中任一项的病毒颗粒,其中所述重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。

231. 实施方案224-230中任一项的病毒颗粒,其中所述AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

232. 实施方案225-231中任一项的病毒颗粒,其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。

233. 实施方案225-231中任一项的病毒颗粒,其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。

234. 实施方案224-233中任一项的病毒颗粒,其中所述重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。

235. 实施方案234的病毒颗粒,其中所述AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。

236. 实施方案224-235中任一项的病毒颗粒,其中所述rAAV载体包含AAV2 ITR。

237. 实施方案176-236中任一项的病毒颗粒,其中所述病毒颗粒在药物制剂中。

238. 一种生成与核酸中的深内含子突变相关的眼部疾病的体外模型的方法,所述方法包括

a) 向真核细胞中引入编码CRISPR-Cas系统的核酸,其中所述CRISPR-Cas系统包含

i) 靶向所述核酸中的内含子的靶DNA序列的单一引导RNA,

ii) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,

iii) 包含同源定向修复 (HDR) 模板的单链寡核苷酸,所述模板包含在预期的内含子突变侧翼的同源臂和原型间隔序列毗邻基序 (protospacer adjacent motif, PAM); 和

b) 分离包含组入所述核酸中的突变的细胞。

239. 实施方案238的方法,其中所述深内含子突变位于核酸的5'剪接供体位点下

游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

240. 实施方案238或239的方法,其中所述深内含子突变位于核酸的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

241. 实施方案238-240中任一项的方法,其中所述深内含子突变在核酸中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

242. 实施方案238-241中任一项的方法,其中所述PAM包含突变以避免单链寡核苷酸被细胞中表达的Cas蛋白切割。

243. 实施方案238-242中任一项的方法,其中所述Cas蛋白是Cas9蛋白。

244. 实施方案243的方法,其中所述Cas9蛋白是酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*) Cas9蛋白。

245. 实施方案243或244的方法,其中对Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。

246. 实施方案238-245中任一项的方法,其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。

247. 实施方案246的方法,其中所述真核细胞是人类细胞。

248. 实施方案238-247中任一项的方法,其中所述真核细胞是眼部细胞。

249. 实施方案248的方法,其中所述眼部细胞是视网膜细胞。

250. 实施方案238-249中任一项的方法,其中所述CRISPR-Cas系统进一步包含一个或多个核定位信号 (NLS)。

251. 实施方案250的方法,其中所述Cas蛋白包含一个或多个NLS。

252. 实施方案250或251的方法,其中所述NLS是SV40大T抗原中的C端序列。

253. 实施方案250-252中任一项的方法,其中所述NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

254. 实施方案238-253中任一项的方法,其中所述单一引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。

255. 实施方案254的方法,其中所述tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

256. 实施方案238-255中任一项的方法,其中所述单一引导RNA和/或编码所述Cas蛋白的核酸和所述单链寡核苷酸与一个或多个调控元件可操作连接。

257. 实施方案256的方法,其中所述单一引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。

258. 实施方案257的方法,其中所述RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。

259. 实施方案256-258中任一项的方法,其中编码所述Cas蛋白的核酸和/或所述单链寡核苷酸与RNA聚合酶II启动子可操作连接。

260. 实施方案259的方法,其中所述RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段 (minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特

异性启动子 (LSP)、E2F 启动子、EF1 α 启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子 (CAG) 启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶 (PDE) 启动子、视网膜色素变性 (RP1) 启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因 (IRBP) 启动子。

261. 实施方案238-260中任一项的方法,其中编码所述单一引导RNA、所述Cas蛋白或所述单链寡核苷酸中的一者或多者的核酸位于所述系统的相同或不同载体上。

262. 实施方案238-261中任一项的方法,其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 或X连锁视网膜色素变性。

263. 实施方案262的方法,其中所述深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

264. 实施方案262或263的方法,其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦。

265. 实施方案262-264中任一项的方法,其中所述单一引导RNA靶向中心体蛋白 290kDa (CEP290) 基因的内含子序列。

266. 实施方案262-265中任一项的方法,其中所述引入的深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。

267. 实施方案262-266中任一项的方法,其中所述单一引导RNA由包含SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO:2的序列的DNA编码。

268. 实施方案262-267中任一项的方法,其中所述单链寡核苷酸包含SEQ ID NO:3的序列。

269. 实施方案262-268中任一项的方法,其中所述CEP290是人CEP290。

270. 实施方案269的方法,其中所述CEP290包含在SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

271. 一种用于切割细胞中的靶核酸的方法,包括向所述细胞递送有效量的组合物,所述组合物包含:

a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和

b) Cas表达盒,其包含

i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和

ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

272. 一种治疗与个体核酸中的突变相关的疾病或疾患的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含:

a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) —

CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和

b) Cas表达盒,其包含

i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和

ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

273. 一种治疗与个体核酸中的突变相关的眼部疾病或疾患的方法,其包括向所述个体施用治疗有效量的组合物,所述组合物包含:

a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和

b) Cas表达盒,其包含

i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和

ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

274. 实施方案271-273中任一项的方法,其中所述Cas表达盒进一步包含:

iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白在所述第一和所述第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

275. 实施方案274的方法,其中所述第一引导RNA与所述第一引导RNA靶位点和所述第二引导RNA靶位点杂交。

276. 实施方案274的方法,其中所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点和所述第二引导RNA靶位点杂交。

277. 实施方案274的方法,其中所述第一引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交,并且所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交。

278. 实施方案271-277中任一项的方法,其中Cas表达盒进一步包含与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的多腺苷酸化 (polyA) 序列。

279. 实施方案278的方法,其中所述polyA序列是SV40 polyA序列。

280. 实施方案278或279的方法,其中通过所述Cas蛋白切割所述第一或所述第二引导RNA靶位点中断了编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与所述polyA序列之间的可操作连接。

281. 实施方案278-280中任一项的方法,其中所述第一或所述第二引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与所述polyA序列之间。

282. 实施方案271-281中任一项的方法,其中编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与编码一个或多个核定位信号(NLS)的核苷酸序列可操作连接,使得从所述Cas表达盒表达的所述Cas蛋白与所述一个或多个NLS框内融合。

283. 实施方案282的方法,其中编码所述一个或多个NLS的核苷酸序列位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与多腺苷酸化(polyA)序列之间。

284. 实施方案283的方法,其中所述第一或所述第二引导RNA靶位点位于编码所述一个或多个NLS的核苷酸序列与所述polyA序列之间。

285. 实施方案282-284中任一项的方法,其中所述一个或多个NLS包括SV40大T抗原中的C端序列。

286. 实施方案282-285中任一项的方法,其中所述一个或多个NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26)或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

287. 实施方案271-286中任一项的方法,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和/或所述Cas表达盒与一个或多个调控元件可操作连接。

288. 实施方案287的方法,其中编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与启动子可操作连接。

289. 实施方案287或288的方法,其中通过所述Cas蛋白切割所述第一或所述第二引导RNA靶位点中断了所述调控元件与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接。

290. 实施方案288或289的方法,其中所述第一或所述第二引导RNA靶位点位于启动子与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列之间。

291. 实施方案271-273中任一项的方法,其中所述Cas表达盒进一步包含:

iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交,并且其中所述第二引导RNA靶位点邻近对Cas蛋白特异的原型间隔序列毗邻基序(PAM);

其中通过Cas蛋白切割所述第一引导RNA靶位点中断了所述调控元件与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接;

其中通过Cas蛋白切割所述第二引导RNA靶位点中断了编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与所述polyA序列之间的可操作连接;并且

其中在表达所述Cas蛋白和切割所述靶DNA序列后,所述Cas蛋白在所述第一和所述第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

292. 实施方案271-273中任一项的方法,其中所述Cas表达盒进一步包含:

iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交;

其中所述第一引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列和与编码所述

Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的启动子之间；

其中所述第二引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列和与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的polyA序列之间；并且

其中所述Cas蛋白在所述第一和所述第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒，从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

293. 实施方案288-292中任一项的方法，其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。

294. 实施方案293的方法，其中所述RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。

295. 实施方案288-294中任一项的方法，其中编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与RNA聚合酶II启动子可操作连接。

296. 实施方案295的方法，其中所述RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒 (CMV) 立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段 (minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1 (PGK) 启动子、猿猴病毒40 (SV40) 启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子 (TTR)、TK启动子、四环素应答启动子 (TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子 (LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶 (hTERT) 启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子 (CAG) 启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶 (PDE) 启动子、视网膜色素变性 (RP1) 启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因 (IRBP) 启动子。

297. 实施方案272-296中任一项的方法，其中所述突变是深内含子突变。

298. 实施方案297的方法，其中个体核酸中的所述深内含子突变与下列疾病相关：无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

299. 实施方案297或298的方法，其中个体核酸中的所述深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

300. 实施方案297-299中任一项的方法，其中所述方法用于治疗患有下列疾病的个体：无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征 (Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征 (Barth syndrome)、 β -地中海贫血

血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病 (Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血 (Fanconi anemia)、吉特曼综合征 (Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调 (Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征 (Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征 (Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸-δ-转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

301. 实施方案272-297中任一项的方法, 其中所述疾病或疾患是选自下组各项的眼部疾病或疾患: 莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 和X连锁视网膜色素变性。

302. 实施方案301的方法, 其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦。

303. 实施方案297的方法, 其中所述深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

304. 实施方案272-303中任一项的方法, 其中所述个体是哺乳动物。

305. 实施方案304的方法, 其中所述哺乳动物是人。

306. 实施方案273-305中任一项的方法, 其中将所述组合物施用至所述个体的眼睛。

307. 实施方案306的方法, 其中所述施用是视网膜下或玻璃体内施用。

308. 实施方案272-307中任一项的方法, 其中所述第一和所述第二引导RNA与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。

309. 实施方案308的方法, 其中所述深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。

310. 实施方案272-309中任一项的方法, 其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO: 41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47的序列的DNA编码。

311. 实施方案272-309中任一项的方法, 其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的序列的DNA编码。

312. 实施方案272-311中任一项的方法, 其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO: 42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49的序列的DNA编码。

313. 实施方案272-312中任一项的方法, 其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO: 20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的序列的DNA编码。

314. 实施方案308-313中任一项的方法, 其中所述CEP290是人CEP290。

315. 实施方案308-314中任一项的方法, 其中所述CEP290包含在SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

316. 实施方案297-315中任一项的方法, 其中所述深内含子突变位于核酸的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

317. 实施方案297-316中任一项的方法,其中所述深内含子突变位于核酸的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

318. 实施方案297-317中任一项的方法,其中所述深内含子突变在核酸中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

319. 实施方案271-318中任一项的方法,其中所述Cas蛋白是Cas9蛋白。

320. 实施方案319的方法,其中所述Cas9蛋白是酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌(*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体(*Treponema denticola*) Cas9蛋白。

321. 实施方案319或320的方法,其中对Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。

322. 实施方案321的方法,其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。

323. 实施方案321或322的方法,其中所述真核细胞是人类细胞。

324. 实施方案271-323中任一项的方法,其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。

325. 实施方案324的方法,其中所述tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

326. 实施方案271-325中任一项的方法,其中在真核细胞中表达所述第一引导RNA、所述第二引导RNA和所述Cas蛋白。

327. 实施方案271-326中任一项的方法,其中所述CRISPR-CAS系统与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

328. 实施方案271-327中任一项的方法,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和所述Cas表达盒位于相同或不同的载体上。

329. 实施方案328的方法,其中所述载体是质粒。

330. 实施方案328或329的方法,其中所述载体与递送系统复合。

331. 实施方案330的方法,其中所述载体与脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

332. 实施方案328的方法,其中所述载体是重组腺相关病毒(rAAV) 载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒(HSV) 载体。

333. 实施方案332的方法,其中所述载体是重组腺病毒载体。

334. 实施方案333的方法,其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad3型。

335. 实施方案333或334的方法,其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

336. 实施方案332的方法,其中所述载体是重组慢病毒载体。

337. 实施方案336的方法,其中所述重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、

莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

338.实施方案332的方法,其中所述载体是rHSV载体。

339.实施方案338的方法,其中所述rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

340.实施方案332的方法,其中所述载体是重组AAV(rAAV)载体。

341.实施方案340的方法,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和所述Cas表达盒位于不同的rAAV载体上。

342.实施方案340或341的方法,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和/或所述Cas表达盒的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复(ITR)序列。

343.实施方案342的方法,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和/或所述Cas表达盒的侧翼为两个AAV ITR。

344.实施方案342或343的方法,其中所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。

345.实施方案342-344中任一项的方法,其中所述AAV ITR是AAV2ITR。

346.实施方案340-345中任一项的方法,其中所述载体是自身互补型载体。

347.实施方案332的方法,其中所述载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。

348.实施方案347的方法,其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。

349.实施方案348的方法,其中所述重组腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。

350.实施方案348或349的方法,其中所述重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

351.实施方案347的方法,其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。

352.实施方案351的方法,其中所述重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

353.实施方案347的方法,其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。

354.实施方案353的方法,其中所述重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

355.实施方案347的方法,其中所述病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。

356.实施方案347或355的方法,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸位于第一重组AAV病毒颗粒的第一rAAV载体上,并且其中所述Cas表达盒位于第二重组AAV病毒颗粒的第二rAAV载体上。

357.实施方案355或356的方法,其中所述重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的

AAV血清型衣壳。

358. 实施方案355-357中任一项的方法, 其中所述AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

359. 实施方案355-358中任一项的方法, 其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。

360. 实施方案355-358中任一项的方法, 其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。

361. 实施方案355-360中任一项的方法, 其中所述重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。

362. 实施方案361的方法, 其中所述AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。

363. 实施方案355-362中任一项的方法, 其中所述rAAV载体包含AAV2ITR。

364. 实施方案272-363中任一项的方法, 其中所述组合物是药物组合物。

365. 一种用于切割细胞中的靶核酸的组合物, 其包含:

a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸, 所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交; 和

b) Cas表达盒, 其包含

i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列, 和

ii) 第一引导RNA靶位点, 其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列, 从而切除包含所述突变的靶DNA部分; 并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒, 从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

366. 一种治疗与个体核酸中的突变相关的疾病或疾患的组合物, 所述组合物包含:

a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列 (CRISPR) — CRISPR相关 (Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸, 所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA, 其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交; 和

b) Cas表达盒, 其包含

i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列, 和

ii) 第一引导RNA靶位点, 其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列, 从而切除包含所述突变的靶

DNA部分;并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

367.一种治疗与个体核酸中的突变相关的眼部疾病或疾患的组合物,所述组合物包含:

a) 编码工程改造的、非天然存在的成簇规律间隔短回文重复序列(CRISPR) — CRISPR相关(Cas) (CRISPR-Cas) 系统的核酸,所述系统包含第一引导RNA和第二引导RNA,其中所述第一引导RNA和所述第二引导RNA与突变侧翼的靶DNA序列的相反链杂交;和

b) Cas表达盒,其包含

i) 编码Cas蛋白的核苷酸序列,和

ii) 第一引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白由所述Cas表达盒表达;

其中所述Cas蛋白切割在所述突变侧翼的靶DNA序列,从而切除包含所述突变的靶DNA部分;并且

其中所述Cas蛋白在所述第一引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

368.实施方案365-367中任一项的组合物,其中所述Cas表达盒进一步包含:

iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交;

其中所述Cas蛋白在所述第一和所述第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

369.实施方案368的组合物,其中所述第一引导RNA与所述第一引导RNA靶位点和所述第二引导RNA靶位点杂交。

370.实施方案368的组合物,其中所述第二引导RNA与所述第一引导RNA靶位点和所述第二引导RNA靶位点杂交。

371.实施方案368的组合物,其中所述第一引导RNA与所述第一引导RNA靶位点杂交,并且所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交。

372.实施方案365-371中任一项的组合物,其中Cas表达盒进一步包含与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的多腺苷酸化(polyA)序列。

373.实施方案372的组合物,其中所述polyA序列是SV40 polyA序列。

374.实施方案372或373的组合物,其中通过所述Cas蛋白切割所述第一或所述第二引导RNA靶位点中断了编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与所述polyA序列之间的可操作连接。

375.实施方案372-374中任一项的组合物,其中所述第一或所述第二引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与所述polyA序列之间。

376.实施方案365-375中任一项的组合物,其中编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与编码一个或多个核定位信号(NLS)的核苷酸序列可操作连接,使得从所述Cas表达盒表达的所述Cas蛋白与所述一个或多个NLS框内融合。

377. 实施方案376的组合物,其中编码所述一个或多个NLS的核苷酸序列位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与多腺苷酸化(polyA)序列之间。

378. 实施方案377的组合物,其中所述第一或所述第二引导RNA靶位点位于编码所述一个或多个NLS的核苷酸序列与所述polyA序列之间。

379. 实施方案376-378中任一项的组合物,其中所述一个或多个NLS包括SV40大T抗原中的C端序列。

380. 实施方案376-379中任一项的组合物,其中所述一个或多个NLS包括序列PKKKRKV (SEQ ID NO:26) 或PKKKRKVEDPKKKRKVD (SEQ ID NO:27)。

381. 实施方案365-380中任一项的组合物,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和/或所述Cas表达盒与一个或多个调控元件可操作连接。

382. 实施方案381的组合物,其中编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与启动子可操作连接。

383. 实施方案381或382的组合物,其中通过所述Cas蛋白切割所述第一或所述第二引导RNA靶位点中断了所述调控元件与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接。

384. 实施方案382或383的组合物,其中所述第一或所述第二引导RNA靶位点位于启动子与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列之间。

385. 实施方案365-384中任一项的组合物,其中所述Cas表达盒进一步包含:

iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交,并且其中所述第二引导RNA靶位点邻近对Cas蛋白特异的原型间隔序列毗邻基序(PAM);

其中通过Cas蛋白切割所述第一引导RNA靶位点中断了所述调控元件与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列之间的可操作连接;

其中通过Cas蛋白切割所述第二引导RNA靶位点中断了编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与所述polyA序列之间的可操作连接;并且

其中在表达所述Cas蛋白和切割所述靶DNA序列后,所述Cas蛋白在所述第一和所述第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

386. 实施方案365-367中任一项的组合物,其中所述Cas表达盒进一步包含:

iii) 第二引导RNA靶位点,其中所述第一引导RNA或所述第二引导RNA与所述第二引导RNA靶位点杂交;

其中所述第一引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列和与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的启动子之间;

其中所述第二引导RNA靶位点位于编码所述Cas蛋白的核苷酸序列和与编码所述Cas蛋白的核苷酸序列可操作连接的polyA序列之间;并且

其中所述Cas蛋白在所述第一和所述第二引导RNA靶位点处切割所述Cas表达盒,从而与切割所述Cas表达盒之前的所述Cas蛋白的表达相比降低了所述Cas蛋白的表达。

387. 实施方案382-386中任一项的组合物,其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与RNA聚合酶III启动子可操作连接。

388. 实施方案387的组合物,其中所述RNA聚合酶III启动子是U6、7SK或H1启动子。

389. 实施方案382-388中任一项的组合物,其中编码所述Cas蛋白的核苷酸序列与RNA聚合酶II启动子可操作连接。

390. 实施方案389的组合物,其中所述RNA聚合酶II启动子是巨细胞病毒(CMV)立即早期启动子、源自CMV启动子的最小启动子片段(minCMV启动子)、RSV LTR、MoMLV LTR、磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子、猿猴病毒40(SV40)启动子、CK6启动子、转甲状腺素启动子(TTR)、TK启动子、四环素应答启动子(TRE)、HBV启动子、hAAT启动子、LSP启动子、嵌合肝特异性启动子(LSP)、E2F启动子、EF1 α 启动子、端粒酶(hTERT)启动子、巨细胞病毒增强子/鸡 β -肌动蛋白/兔 β -珠蛋白启动子(CAG)启动子、视杆细胞视蛋白启动子、视锥细胞视蛋白启动子、 β 磷酸二酯酶(PDE)启动子、视网膜色素变性(RP1)启动子或光感受器间类视黄醇结合蛋白基因(IRBP)启动子。

391. 实施方案366-390中任一项的组合物,其中所述突变是深内含子突变。

392. 实施方案391的组合物,其中个体核酸中的所述深内含子突变与下列疾病相关:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征(Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征(Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病(Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血(Fanconi anemia)、吉特曼综合征(Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调(Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征(Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征(Marfan syndrome)、甲硫氨酸合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病(mucopolysaccharidosis)II型、多微小轴空病(multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病(Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征(Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征(Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征(Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

393. 实施方案391或392的组合物,其中个体核酸中的所述深内含子突变是表1中呈现的深内含子突变。

394. 实施方案391-393中任一项的组合物,其中组合物方法用于治疗患有下列疾病的个体:无纤维蛋白原血症、奥尔波特综合征(Alport syndrome)、肌萎缩性侧索硬化症、共济失调毛细血管扩张症、常染色体隐性多囊肾病、巴氏综合征(Barth syndrome)、 β -地中海贫血、先天性无纤维蛋白原血症、先天性白内障面部畸形神经病综合征、先天性糖基化异常Ia型、先天性糖基化异常II型、囊性纤维化、二氢蝶啶还原酶缺乏症、法布里病(Fabry disease)、家族性血小板疾病并急性髓性白血病倾向、范可尼贫血(Fanconi anemia)、吉特曼综合征(Gitelman syndrome)、生长激素不敏感、弗里德赖希共济失调(Friedrich's ataxia)、A型血友病、遗传性巨幼细胞性贫血1、赫曼斯基-普德拉克综合征(Hermansky-Pudlak syndrome)、同型胱氨酸尿症、枫糖尿症、马凡综合征(Marfan syndrome)、甲硫氨酸

合成酶缺乏症、甲基丙二酸血症、线粒体三功能蛋白缺乏症、粘多糖病 (mucopolysaccharidosis) II型、多微小轴空病 (multi-minicore disease)、肌营养不良、神经纤维瘤病I型、C型尼曼-皮克病 (Niemann-Pick disease type C)、眼白化病I型、鸟氨酸- δ -转氨酶缺乏症、系统性红斑狼疮倾向、丙酸血症、横纹肌样瘤、施瓦茨-詹姆佩尔二氏综合征 (Schwartz-Jampel syndrome)、斯蒂克勒综合征 (Stickler syndrome)、系统性红斑狼疮、结节性硬化症、维尔纳综合征 (Werner syndrome)、X-连锁高免疫球蛋白M血症或X连锁低磷血症。

395. 实施方案366-391中任一项的组合物, 其中所述疾病或疾患是选自下组各项的眼部疾病或疾患: 莱伯先天性黑朦、视神经萎缩、视网膜色素变性、视网膜母细胞瘤、斯塔加特病 (Stargardt disease)、厄舍综合征 (Usher syndrome) 和X连锁视网膜色素变性。

396. 实施方案395的组合物, 其中所述眼部疾病是莱伯先天性黑朦。

397. 实施方案391的组合物, 其中所述深内含子突变是表2中呈现的深内含子突变。

398. 实施方案366-397中任一项的组合物, 其中所述个体是哺乳动物。

399. 实施方案398的组合物, 其中所述哺乳动物是人。

400. 实施方案367-399中任一项的组合物, 其中所述组合物用于施用至所述个体的眼睛。

401. 实施方案400的组合物, 其中所述施用是视网膜下或玻璃体内施用。

402. 实施方案367-401中任一项的组合物, 其中所述第一和所述第二引导RNA与中心体蛋白290kDa (CEP290) 基因的深内含子突变的侧翼的靶DNA序列的相反链杂交。

403. 实施方案402的组合物, 其中所述深内含子突变是c.2991+1655A>G突变。

404. 实施方案367-403中任一项的组合物, 其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47的序列的DNA编码。

405. 实施方案367-403中任一项的组合物, 其中所述第一引导RNA由包含SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:52的序列的DNA编码。

406. 实施方案367-405中任一项的组合物, 其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:48或SEQ ID NO:49的序列的DNA编码。

407. 实施方案367-406中任一项的组合物, 其中所述第二引导RNA由包含SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54的序列的DNA编码。

408. 实施方案402-407中任一项的组合物, 其中所述CEP290是人CEP290。

409. 实施方案402-408中任一项的组合物, 其中所述CEP290包含在SEQ ID NO:23中列出的序列的深内含子突变。

410. 实施方案391-409中任一项的组合物, 其中所述深内含子突变位于核酸的5'剪接供体位点下游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

411. 实施方案391-410中任一项的组合物, 其中所述深内含子突变位于核酸的3'剪接受体位点上游约1-10,000个核苷酸、约1-1000个核苷酸或约100-1000个核苷酸处。

412. 实施方案365-411中任一项的组合物, 其中所述深内含子突变在核酸中引入剪接供体位点或剪接受体位点。

413. 实施方案365-412中任一项的组合物, 其中所述Cas蛋白是Cas9蛋白。

414. 实施方案413的组合物,其中所述Cas9蛋白是酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) Cas9蛋白、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*) Cas9蛋白、嗜热链球菌 (*Streptococcus thermophilus*) Cas9蛋白、脑膜炎奈瑟氏菌 (*Neisseria meningitidis*) Cas9蛋白或齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*) Cas9蛋白。

415. 实施方案413或414的组合物,其中对Cas9进行密码子优化以便在真核细胞中表达。

416. 实施方案415的组合物,其中所述真核细胞是哺乳动物细胞。

417. 实施方案415或416的组合物,其中所述真核细胞是人类细胞。

418. 实施方案365-417中任一项的组合物,其中所述第一引导RNA和/或所述第二引导RNA与反式激活cr (tracr) 序列融合。

419. 实施方案418的组合物,其中所述tracr序列包含由SEQ ID NO:25编码的核苷酸序列。

420. 实施方案365-419中任一项的组合物,其中在真核细胞中表达所述第一引导RNA、所述第二引导RNA和所述Cas蛋白。

421. 实施方案365-420中任一项的组合物,其中所述CRISPR-CAS系统与脂质、阳离子脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

422. 实施方案365-421中任一项的组合物,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和所述Cas表达盒位于相同或不同的载体上。

423. 实施方案422的组合物,其中所述载体是质粒。

424. 实施方案422或423的组合物,其中所述载体与递送系统复合。

425. 实施方案424的组合物,其中所述载体与脂质、脂质体、聚阳离子或增强核酸的细胞摄取的药剂复合。

426. 实施方案422的组合物,其中所述载体是重组腺相关病毒 (rAAV) 载体、重组腺病毒载体、重组慢病毒载体或重组单纯疱疹病毒 (HSV) 载体。

427. 实施方案426的组合物,其中所述载体是重组腺病毒载体。

428. 实施方案427的组合物,其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型。

429. 实施方案427或428的组合物,其中所述重组腺病毒载体源自腺病毒血清型2或腺病毒血清型5的变体。

430. 实施方案426的组合物,其中所述载体是重组慢病毒载体。

431. 实施方案430的组合物,其中所述重组慢病毒载体源自用水疱性口炎病毒 (VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒 (LCMV)、罗斯河病毒 (RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒 (Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的慢病毒。

432. 实施方案426的组合物,其中所述载体是rHSV载体。

433. 实施方案432的组合物,其中所述rHSV载体源自rHSV-1或rHSV-2。

434. 实施方案426的组合物,其中所述载体是重组AAV (rAAV) 载体。

435. 实施方案434的组合物,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和所述Cas表达

盒位于不同的rAAV载体上。

436. 实施方案434或435的组合物,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和/或所述Cas表达盒的侧翼为一个或多个AAV反向末端重复 (ITR) 序列。

437. 实施方案436的组合物,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸和/或所述Cas表达盒的侧翼为两个AAV ITR。

438. 实施方案436或437的组合物,其中所述AAV ITR是AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV DJ、山羊AAV、牛AAV或小鼠AAV衣壳血清型ITR。

439. 实施方案436-438中任一项的组合物,其中所述AAV ITR是AAV2ITR。

440. 实施方案436-439中任一项的组合物,其中所述载体是自身互补型载体。

441. 实施方案426的组合物,其中所述载体被衣壳包裹在病毒颗粒中。

442. 实施方案441的组合物,其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹腺病毒载体的重组腺病毒颗粒。

443. 实施方案442的组合物,其中所述重组腺病毒颗粒包含来自腺病毒血清型2、1、5、6、19、3、11、7、14、16、21、12、18、31、8、9、10、13、15、17、19、20、22、23、24-30、37、40、41、AdHu2、AdHu3、AdHu4、AdHu24、AdHu26、AdHu34、AdHu35、AdHu36、AdHu37、AdHu41、AdHu48、AdHu49、AdHu50、AdC6、AdC7、AdC69、牛Ad 3型、犬Ad 2型、绵羊Ad或猪Ad 3型的衣壳。

444. 实施方案442或443的组合物,其中所述重组腺病毒颗粒包含腺病毒血清型2衣壳或腺病毒血清型5衣壳的变体。

445. 实施方案442的组合物,其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组慢病毒载体的重组慢病毒颗粒。

446. 实施方案445的组合物,其中所述重组慢病毒颗粒包含用水疱性口炎病毒(VSV)、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)、罗斯河病毒(RRV)、埃博拉病毒、马尔堡病毒、莫卡拉病毒(Mokala virus)、狂犬病病毒、RD114或其中的变体假型化的衣壳。

447. 实施方案442的组合物,其中所述病毒颗粒是用衣壳包裹重组HSV载体的重组HSV颗粒。

448. 实施方案447的组合物,其中所述重组HSV颗粒是rHSV-1颗粒或rHSV-2病毒颗粒。

449. 实施方案442的组合物,其中所述病毒颗粒是包含重组AAV载体的重组AAV病毒颗粒。

450. 实施方案442或449的组合物,其中编码所述CRISPR-Cas系统的核酸位于第一重组AAV病毒颗粒的第一rAAV载体上,并且其中所述Cas表达盒位于第二重组AAV病毒颗粒的第二rAAV载体上。

451. 实施方案449或450的组合物,其中所述重组AAV病毒颗粒包含来自进化枝A-F的AAV血清型衣壳。

452. 实施方案449-451中任一项的组合物,其中所述AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV3、AAV4、AAV5、AAV6、AAV7、AAV8、AAVrh8、AAVrh8R、AAV9、AAV10、AAVrh10、AAV11、AAV12、AAV2R471A、AAV2/2-7m8、AAV DJ、AAV2 N587A、AAV2 E548A、AAV2 N708A、AAV V708K、山羊AAV、嵌合AAV1/AAV2、牛AAV或小鼠AAV衣壳rAAV2/HBoV1血清型衣壳。

453. 实施方案449-452中任一项的组合物,其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自相同的AAV血清型。

454. 实施方案449-452中任一项的组合物,其中所述rAAV病毒颗粒的ITR和衣壳源自不同的AAV血清型。

455. 实施方案449-454中任一项的组合物,其中所述重组AAV病毒颗粒包含AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳。

456. 实施方案455的组合物,其中所述AAV1、AAV2、AAV8、AAVrh8R、AAV9和/或AAVrh10衣壳包含酪氨酸突变或乙酰肝素结合突变。

457. 实施方案449-456中任一项的组合物,其中所述rAAV载体包含AAV2 ITR。

458. 实施方案365-457中任一项的组合物,其中所述组合物是药物组合物。

序列表

<110> 建新公司
<120> 深内含子突变的基因编辑
<130> 15979013440
<140> 尚未指定
<141> 随附提交
<150> 62/162,720
<151> 2015-05-16
<160> 66
<170> 用于Windows的FastSEQ版本4.0
<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 1
cacccaagac actgccaata gggat 25
<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 2
aaacatccct attggcagtg tcttc 25
<210> 3
<211> 158
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 3
ccaccgcct cggcctccta aagtgetggg attacagatg tgagccaccg cacctggccc 60
cagttgtaat tgtgagtatc tcatacgtat ccctattggc agtgtcttag ttttattttt 120
tattatcttt attgtggcag ccattattcc tgtctcta 158
<210> 4
<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 4
ggtccctggc ttttgttcct 20
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 5
caggaggctg aggggtgtttt 20
<210> 6
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 6
agtagagatg gggtttcacc 20
<210> 7
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 7
tgactgctaa gtacaggac atcttg 26
<210> 8
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 8
aggagatgtt ttcacactcc aggt 24
<210> 9

<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 9
ctggccccag ttgtaatttg tga 23
<210> 10
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 10
ctgttcccag gcttgttcaa tagt 24
<210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 11
caccggcggg tggatcacga gttc 24
<210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 12
aaacgaactc gtgatccacc cgcc 24
<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 13
caccgaaagc taccggttac ctgaa 25

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 14
aaacttcagg taaccggtag ctttc 25
<210> 15
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 15
cacggtcatt cttgtggcag taagg 25
<210> 16
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 16
aaacccttac tgccacaaga atgac 25
<210> 17
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 17
cacggagtc acatgggagt caca 24
<210> 18
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 18

aaactgtgac tcccatgtga ctcc 24

<210> 19

<211> 102

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

ggcgggtgga tcacgagttc gtttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60

cggttatcaac ttgaaaaaagt ggcaccgagt cggtgctttt tt 102

<210> 20

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

gaaagctacc gggtacctga agtttttagag ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt 60

ccgttatcaa cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt ttt 103

<210> 21

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 21

gtcattcttg tggcagtaag gtttttagag ctagaaatag caagttaaaa taaggctagt 60

ccgttatcaa cttgaaaaag tggcaccgag tcggtgcttt ttt 103

<210> 22

<211> 102

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

ggagtcacat gggagtcaca gtttttagagc tagaaatagc aagttaaaat aaggctagtc 60

cggttatcaac ttgaaaaaagt ggcaccgagt cggtgctttt tt 102

<210> 23

<211> 5838

<212> DNA

<213> 智人 (Homo Sapiens)

<400> 23

```

gtaagtttgt gtgattcttg aaccttgtga aattagccat ttttcttcaa tttttttgtg 60
tttgggggga tttggcagat ttttaattaaa gtttgccctgc atttatataa atttaacaga 120
gatataatta tccatattat tcattcagtt tagttataaa tttttgttcc ccacataaca 180
cacacacaca cacacaatat attatctatt tatagtggct gaatgacttc tgaatgatta 240
tctagatcat tctccttagg tcacttgcac gatttagctg aatcaaacct cttttaacca 300
gacatctaag agaaaaagga gcatgaaaca ggtagaatat tgtaatcaaa ggagggaagc 360
actcattaag tgcccatccc tttctcttac cctgtaccc agaacaact attctcccat 420
ggctccctggc ttttgttccct tggaatggat gtagccaaca gtagctgaaa tattaagggc 480
tcttcctgga ccatggatgc actctgtaaa ttctcatcat tttttattgt agaataaatg 540
tagaatttta atgtagaata aatttattta atgtagaata aaaaataaaa aaactagagt 600
agaatatcat aagttacaat ctgtgaatat ggaccagacc cttttagtct atcttacagc 660
cacttgaact ctataccttt tactgaggac agaacaagct cctgatttct tcatcttccct 720
catcagaaat agaggcttat ggattttgga ttattcttat ctaagatcct ttcacaggag 780
tagaataaga tctaattcta ttagctcaaa agcttttctg ggctcataga gacacattca 840
gtaaataaaa acgttgttct gagtagcttt caggattcct actaaattat gtagcatgtt 900
tatcaatatt atttagaagt aatcataatc agtttgcctt ctgctgcttt tgccaaagag 960
aggtgattat gttacttttt atagaaaatt atgcctatct agtgtggtga taatttatct 1020
ttttccattc tccatgtcct ctgtcctatc ctctccagca ttagaaagtc ctaggcaaga 1080
gacatcttgt ggataatgta tcaatgagtg atgtttaacg ttatcatttt cccaaagagt 1140
atttttcatc tttcctaaag attttttttt tttttttttg agatggagtt tcattctgtc 1200
acccaggctg agtgcagtgg cacgatctcg gcttaacgct tactgcatcc tctgcctccc 1260
agattcaagc agttctcctg cctcagcctc tgagtagctg ggattacagg tgtgcaccac 1320
cacaccagct aatttttttt tttttttttt tttttttgag gcagagtctc gctctgtcac 1380
ccaggctgga gtgcagtggc gccatcttgg ctactgcaa gctccacctc ccgggttcag 1440
gccgttctcc tgcctcagcc tcctgagtag ctggtaccac aggcaccac catcatgccc 1500
ggctaatttt ttgtattttt agtagagatg gggtttcacc ttgttagcca ggatggtgtc 1560
gatctcctga actcgtgatc caccgcctc ggctcctaa agtgctggga ttacagatgt 1620
gagccaccgc acctggcccc agttgtaatt gtgagtatct catacctatc cctattggca 1680
gtgtcttagt tttatttttt attatcttta ttgtggcagc cattattcct gtctctatct 1740
ccagtcttac atcctcctta ctgccacaag aatgatcatt ctaaacaatga atcctacct 1800
gtgactccca tgtgactccc cgcttaaaaa actgtcaaaa gctaccggtt acctgaaggg 1860
taaaagtcaa gtcccctact tacctcatgt catctagagc aagagatgaa ctagctgagt 1920
tttctgacca cagtgttctt tcttatgtat gttcttttct acgtgctctt ttctatatat 1980
agggaacatc ttctctcttc cagttgtttt gctcagtga tttctattcc tgtttcaaaa 2040
cttgctcagg cattaccttt tttttcttaa gcatactttt tttaatggaa caaagtcact 2100
cctgtctaca ctagttctgc atcttataca taggttttct acatagtaca tttttatct 2160

```

acatcaaatt atatgtgttt acatatctgt cttccttaat ggaatataag tcttttgata 2220
 taaggaacta tttaatgtgt ttctgtgtgt tgagtatctc ctgtttggca cagagttcaa 2280
 gctaatacat gagagtgatt agtgggtggag agccacagtg catgtggtgt caaatatggt 2340
 gcttaggaaa ttattgttgc tttttgagag gtaaaggttc atgagactag aggtcacgaa 2400
 aatcagatgt catgtgtgaa gaatggaata gataataagg aaatacaaaa actggatggg 2460
 taataaagca aaagaaaaac ttgaaatttg atagtagaag aaaaaagaaa tagatgtaga 2520
 ttgaggtaga atcaagaaga ggattctttt tttgttgttt ttttttttga aacagagtct 2580
 cactgtgttg cccaggctgg agtgcagtgg agtgatcttg gcttactgca acctctgcct 2640
 cccagggtca agcgattctt ctgcttcagt ctcccagta gctggaatta cagggtccca 2700
 ccagcacggc cggctaattt agtagagaca gggttttgcc atgttggtgg ggctggtctc 2760
 aaacttttga tctcaggtaa tccgccagcc tcaacttccc aaagtgtctg gattacaggc 2820
 atgagccact gtgcccagcc tgtttttttt tttttaaagg agaccagtga agtttcagga 2880
 ggagggaaaag aaaaatttaga gttactaggg agagagtgat gaagataaga gatgaaagtg 2940
 gtaataaggg aaatagcaaa atatcagggt aggtgggaga aaaagagatt tgtaacaaac 3000
 aataggatta tcctgtgaaa aaggatgaaa ggaagaaaaa aatggataga aagatattta 3060
 aaacaccctc agcctcctgt tttccctcct gtgtattcat agtatataaa actataatta 3120
 tgtactttac ttaaaaaata tattattatt acctatctgt gcttatttaa tcatagcatg 3180
 tcctcttttt agtctcatta ccctgtttgt attattcttc ataacttta atacctgaca 3240
 ttgtattata tattggctta tttccaggt actccactca aatataagtt ctaggatata 3300
 atttatttat cactgaaatc cattgcttag agtacctggc atgtagtaaa taggcattct 3360
 gttttttcaa ataaaaaata aaggaactta agatatatat ttatgttata tcgccagcct 3420
 ttttcctcac agctctattc tgtgtacag aattacctac ttacaattc ctgtgtttca 3480
 aggggatctc aaatttaacg tgtccacaat gaactcctga tttctgtttc tctcctagtc 3540
 attcttattt caatatatgt tcagttacct aaccagctag tcaaggcaga tactttagag 3600
 ttattctgta gtcattcttt ttccctacca ttttgtttt ccaaagttaa tttatgtgtg 3660
 tcttcttcat cctcgcagct ctaacccttg tccaaaccag catcatcact catctggagt 3720
 tccacaatgt ctttctggct agtttcctg atttctctat tgacctctt attctccaca 3780
 gtgcagccag aatgattgtt taaaacttcc tccttaaaat ctttaaattg ttttctttta 3840
 tacgttaagt taaattccag ttcttgtct tggeatgcca tgccctgcct ggtgtggccc 3900
 ctgatggtct ctccaacttc atgttttact actattgact cttatttttg cttactctgc 3960
 ttgggtgctc cagtcctcca aatcatttcc tgctccaatc atttcaatca tttttcctc 4020
 tcagatctta tagtattcca aatgttttct tcctttggag catctgggtt tactaataaa 4080
 tacttcgtac ctacagttc agcttaaata tcaattattt ggtggttaag acatccttca 4140
 accgtctat ctaaatgttc ctttctatta ttactggct cagtactctg tttttatttt 4200
 ctttctaaat gtcaactttt ttttttttga gtcagggtct cactgttgcc caggctcgag 4260
 tgcagttgca caatcatagc tcattgcagc cttgcctcc tgggatcaag taattctccc 4320
 acctcagcct ccaaaaatagc tgggattaca ggtatgcatc accatgctca gctaattttt 4380
 tgtgtttttt tgtagagatg aggtctcact ttgttgccca ggctggtctc aaactcctgg 4440
 actcaagtga ttctcccacc tcagcctccc aaagtgtctg ggttacaggt gtgagccact 4500

gcacctgggtc gatactgact tttttttttt tttgagatgg agttttgctc tgttgcccag 4560
 gctagagcgc agtgggtgtga tctcagctca ctgcaacctc cacctcccag gttaaaggga 4620
 ttctttctgcc tcagtctcct gagtagctgg gattacaggc aagtgccatc atgactggct 4680
 aatttttgtgta ttttttagcac tatgttttagt actgtgttgg ccaggcttgt ctcgaactcc 4740
 tgacctcaag tgatccaccc acctcagcct cccaaagtgc tgggattaca ggtgtgagcc 4800
 accgtaatcg gccaacattg acatttttag tagacttttt gtttgttttac ttgcttatta 4860
 tctgtctgcct tccacactct ggcgaaatcc tgccacccac ccacacacac ataggcactg 4920
 aatgggcaga actctgaagg ccagaatttt atattttctt tcactgtaaa catcatcatc 4980
 tgtcactgat ggcacactag gatgctcagc aactgtgtgc atgaaggaag taagcactag 5040
 tttgtgaagg ctgcaaaaact cttgagtatt ctaagagttt tggccaaaat gaatgtacag 5100
 ctttagtggc agaagctaata actcagaaat tgaggccgta tattggataa cacaggattt 5160
 ggatgattat tttaaaataa tattttacat tgtatatatg tgtgtgtgtg tgtgtgtgtg 5220
 tgtgtgtatg tgtgtgtgtg tgtatatata tatgtatgta tgtgtattag tccgtttctca 5280
 tgctgctatg aagaaatacc tgagactggg taatttataa aggaaagagg ttttaattgac 5340
 tcacagttcc acagagctgg ggaggcctca gaaaacttaa cagttatggc agaaggggaa 5400
 gcaaacacat ttttcttcac atggtggccg gaattagaag aatgtgagcc gagcaaaggg 5460
 gaaagcccct tataaaacca tcagacatcg tgagaactta ctattatgag aatagcgtgg 5520
 gggaaaccac cccacagatt caattacctc ccaccaaate cctcccatga catatgagga 5580
 ttatgggaac tatgattcaa gatgagattt gggtaggac acagccaaac catatcagta 5640
 tgtatatgta tacaagtatt atatatatat gtatgtgttt gtatgcatac atgtattata 5700
 tatggaggaa attctaattt tgtaaaaaac tggattgtga gttttaagga gatgttatat 5760
 aaagttaaga caatgtcatt ttgtggtatt ggtctgaatt acaatgtagt ttcttagtga 5820
 tatttttcct ttattcag 5838

<210> 24

<211> 78

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

cactccctct ctgcgcgtc gctcgtcac tgaggccggg cgaccaaagg tcgcccacgc 60
 ccgggctttg cccgggcg 78

<210> 25

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 25

tagcaagtta aaataaggct agtccgttat caacttgaaa aagtggcacc gagtcggtgc 60

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> 猿猴空泡病毒40

<400> 26

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5

<210> 27

<211> 17

<212> PRT

<213> 猿猴空泡病毒40

<400> 27

Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val Glu Asp Pro Lys Lys Lys Arg Lys Val

1 5 10 15

Asp

<210> 28

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 28

gggaggattg ggaagagaat agcaggcatg ctg 33

<210> 29

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 29

cagcatgcct gctattctct tcccaatcct ccc 33

<210> 30

<211> 447

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 30

cacatgtgag ggcctatttc ccatgattcc ttcataattg catatacgat acaaggctgt 60
 tagagagata attggaatta atttgactgt aaacacaaag atattagtagt aaaatacgtg 120
 acgtagaaaag taataatttc ttgggtagtt tgcagtttta aaattatggt ttaaaatgga 180
 ctatcatatg cttaccgtaa cttgaaagta tttcgatttc ttggctttat atatcttggt 240
 gaaaggacga aacaccgggt cttcgagaag acctgtttta gagctagaaa tagcaagtta 300
 aaataaggct agtccgttat caacttgaaa aagtggcacc gagtcggtgc ttttttgttt 360
 tagagctaga aatagcaagt taaaataagg ctagtccgtt tttagcgcgt gcgccaattc 420
 tgcagacaaa tggctctaga ggtaccc 447

<210> 31

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 31

ttcactctgca ctgccaagac 20

<210> 32

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 32

tcgagttgtc cacagtcagc 20

<210> 33

<211> 1153

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 33

ctcacatgtg agggcctatt tcccatgatt cttcatatt tgcatatacg atacaaggct 60
 gtttagagaga taattggaat taatttgact gtaaacacaa agatattagt acaaaatacg 120
 tgacgtagaa agtaataatt tcttgggtag tttgcagttt taaaattatg ttttaaaatg 180
 gactatcata tgcttaccgt aacttgaaag tatttcgatt tcttggcttt atatatcttg 240
 tggaaaggac gaaacaccgg gtcttcgaga agacctgttt tagagctaga aatagcaagt 300
 taaaataagg ctagtccgtt atcaacttga aaaagtggca ccgagtcggt gcttttttgt 360
 ttttagagcta gaaatagcaa gttaaaaataa ggctagtcgg ttttttagcg gtgcgccaat 420
 tctgcagaca aatggctcta gagaccggcg ccgctacagg ctttccaccg gtggtctctt 480

ctagagggtac ccgttacatc tagttattaa tagtaatcaa ttacggggtc attagttcat 540
agcccatata tggagttccg cgttacataa cttacggtaa atggcccgcc tggctgaccg 600
cccaacgacc cccgcccatt gacgtcaata atgacgtatg ttcccatagt aacgccaata 660
gggactttcc attgacgtca atgggtggag tatttacggt aaactgcca cttggcagta 720
catcaagtgt atcatatgcc aagtacgccc cctattgacg tcaatgacgg taaatggccc 780
gcctggcatt atgcccagta catgacctta tgggactttc ctacttggca gtacatctac 840
gtattagtca tcgctattac catggtgatg cggttttggc agtacatcaa tgggcgtgga 900
tagcggtttg actcacgggg atttccaagt ctccaccca ttgacgtcaa tgggagtttg 960
ttttggcacc aaaaatcaacg ggactttcca aaatgtcgta acaactccgc ccattgacg 1020
caaatgggcg gtaggcgtgt acggtgggag gtctatataa gcagagctct ctggctaact 1080
agagaacca ctgcttactg gcttatcgaa attaatacga ctactatag ggagaaccaa 1140
gctggctagc cgc 1153

<210> 34

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 34

ataacatgtg gtctcactct agaggcatgt gagggcctat ttccc 45

<210> 35

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

tatgggtaccg gtctcataga gccatttgtc tgcaga 36

<210> 36

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 36

caccgcacta ccagagctaa ctca 24

<210> 37

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 37

aaactgagtt agctctggta gtgc 24

<210> 38

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 38

caccgtgcga atacgccacg cgat 24

<210> 39

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 39

aaacatcgcg tggcgtattc gcac 24

<210> 40

<211> 1368

<212> PRT

<213> 酿脓链球菌 (Streptococcus pyogenes)

<400> 40

Met Asp Lys Lys Tyr Ser Ile Gly Leu Asp Ile Gly Thr Asn Ser Val

1 5 10 15

Gly Trp Ala Val Ile Thr Asp Glu Tyr Lys Val Pro Ser Lys Lys Phe

20 25 30

Lys Val Leu Gly Asn Thr Asp Arg His Ser Ile Lys Lys Asn Leu Ile

35 40 45

Gly Ala Leu Leu Phe Asp Ser Gly Glu Thr Ala Glu Ala Thr Arg Leu

50 55 60

Lys Arg Thr Ala Arg Arg Arg Tyr Thr Arg Arg Lys Asn Arg Ile Cys

65 70 75 80

Tyr Leu Gln Glu Ile Phe Ser Asn Glu Met Ala Lys Val Asp Asp Ser

85 90 95

Phe Phe His Arg Leu Glu Glu Ser Phe Leu Val Glu Glu Asp Lys Lys

100	105	110
His Glu Arg His Pro Ile Phe Gly Asn Ile Val Asp Glu Val Ala Tyr		
115	120	125
His Glu Lys Tyr Pro Thr Ile Tyr His Leu Arg Lys Lys Leu Val Asp		
130	135	140
Ser Thr Asp Lys Ala Asp Leu Arg Leu Ile Tyr Leu Ala Leu Ala His		
145	150	155
Met Ile Lys Phe Arg Gly His Phe Leu Ile Glu Gly Asp Leu Asn Pro		
165	170	175
Asp Asn Ser Asp Val Asp Lys Leu Phe Ile Gln Leu Val Gln Thr Tyr		
180	185	190
Asn Gln Leu Phe Glu Glu Asn Pro Ile Asn Ala Ser Gly Val Asp Ala		
195	200	205
Lys Ala Ile Leu Ser Ala Arg Leu Ser Lys Ser Arg Arg Leu Glu Asn		
210	215	220
Leu Ile Ala Gln Leu Pro Gly Glu Lys Lys Asn Gly Leu Phe Gly Asn		
225	230	235
Leu Ile Ala Leu Ser Leu Gly Leu Thr Pro Asn Phe Lys Ser Asn Phe		
245	250	255
Asp Leu Ala Glu Asp Ala Lys Leu Gln Leu Ser Lys Asp Thr Tyr Asp		
260	265	270
Asp Asp Leu Asp Asn Leu Leu Ala Gln Ile Gly Asp Gln Tyr Ala Asp		
275	280	285
Leu Phe Leu Ala Ala Lys Asn Leu Ser Asp Ala Ile Leu Leu Ser Asp		
290	295	300
Ile Leu Arg Val Asn Thr Glu Ile Thr Lys Ala Pro Leu Ser Ala Ser		
305	310	315
Met Ile Lys Arg Tyr Asp Glu His His Gln Asp Leu Thr Leu Leu Lys		
325	330	335
Ala Leu Val Arg Gln Gln Leu Pro Glu Lys Tyr Lys Glu Ile Phe Phe		
340	345	350
Asp Gln Ser Lys Asn Gly Tyr Ala Gly Tyr Ile Asp Gly Gly Ala Ser		
355	360	365
Gln Glu Glu Phe Tyr Lys Phe Ile Lys Pro Ile Leu Glu Lys Met Asp		
370	375	380
Gly Thr Glu Glu Leu Leu Val Lys Leu Asn Arg Glu Asp Leu Leu Arg		
385	390	395
Lys Gln Arg Thr Phe Asp Asn Gly Ser Ile Pro His Gln Ile His Leu		
405	410	415

Gly	Glu	Leu	His	Ala	Ile	Leu	Arg	Arg	Gln	Glu	Asp	Phe	Tyr	Pro	Phe	420	425	430
Leu	Lys	Asp	Asn	Arg	Glu	Lys	Ile	Glu	Lys	Ile	Leu	Thr	Phe	Arg	Ile	435	440	445
Pro	Tyr	Tyr	Val	Gly	Pro	Leu	Ala	Arg	Gly	Asn	Ser	Arg	Phe	Ala	Trp	450	455	460
Met	Thr	Arg	Lys	Ser	Glu	Glu	Thr	Ile	Thr	Pro	Trp	Asn	Phe	Glu	Glu	465	470	475
Val	Val	Asp	Lys	Gly	Ala	Ser	Ala	Gln	Ser	Phe	Ile	Glu	Arg	Met	Thr	485	490	495
Asn	Phe	Asp	Lys	Asn	Leu	Pro	Asn	Glu	Lys	Val	Leu	Pro	Lys	His	Ser	500	505	510
Leu	Leu	Tyr	Glu	Tyr	Phe	Thr	Val	Tyr	Asn	Glu	Leu	Thr	Lys	Val	Lys	515	520	525
Tyr	Val	Thr	Glu	Gly	Met	Arg	Lys	Pro	Ala	Phe	Leu	Ser	Gly	Glu	Gln	530	535	540
Lys	Lys	Ala	Ile	Val	Asp	Leu	Leu	Phe	Lys	Thr	Asn	Arg	Lys	Val	Thr	545	550	555
Val	Lys	Gln	Leu	Lys	Glu	Asp	Tyr	Phe	Lys	Lys	Ile	Glu	Cys	Phe	Asp	565	570	575
Ser	Val	Glu	Ile	Ser	Gly	Val	Glu	Asp	Arg	Phe	Asn	Ala	Ser	Leu	Gly	580	585	590
Thr	Tyr	His	Asp	Leu	Leu	Lys	Ile	Ile	Lys	Asp	Lys	Asp	Phe	Leu	Asp	595	600	605
Asn	Glu	Glu	Asn	Glu	Asp	Ile	Leu	Glu	Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Leu	Thr	610	615	620
Leu	Phe	Glu	Asp	Arg	Glu	Met	Ile	Glu	Glu	Arg	Leu	Lys	Thr	Tyr	Ala	625	630	635
His	Leu	Phe	Asp	Asp	Lys	Val	Met	Lys	Gln	Leu	Lys	Arg	Arg	Arg	Tyr	645	650	655
Thr	Gly	Trp	Gly	Arg	Leu	Ser	Arg	Lys	Leu	Ile	Asn	Gly	Ile	Arg	Asp	660	665	670
Lys	Gln	Ser	Gly	Lys	Thr	Ile	Leu	Asp	Phe	Leu	Lys	Ser	Asp	Gly	Phe	675	680	685
Ala	Asn	Arg	Asn	Phe	Met	Gln	Leu	Ile	His	Asp	Asp	Ser	Leu	Thr	Phe	690	695	700
Lys	Glu	Asp	Ile	Gln	Lys	Ala	Gln	Val	Ser	Gly	Gln	Gly	Asp	Ser	Leu	705	710	715
His	Glu	His	Ile	Ala	Asn	Leu	Ala	Gly	Ser	Pro	Ala	Ile	Lys	Lys	Gly			

	725		730		735
Ile Leu Gln Thr Val Lys Val Val Asp Glu Leu Val Lys Val Met Gly					
	740		745		750
Arg His Lys Pro Glu Asn Ile Val Ile Glu Met Ala Arg Glu Asn Gln					
	755		760		765
Thr Thr Gln Lys Gly Gln Lys Asn Ser Arg Glu Arg Met Lys Arg Ile					
	770		775		780
Glu Glu Gly Ile Lys Glu Leu Gly Ser Gln Ile Leu Lys Glu His Pro					
785		790		795	800
Val Glu Asn Thr Gln Leu Gln Asn Glu Lys Leu Tyr Leu Tyr Tyr Leu					
	805		810		815
Gln Asn Gly Arg Asp Met Tyr Val Asp Gln Glu Leu Asp Ile Asn Arg					
	820		825		830
Leu Ser Asp Tyr Asp Val Asp His Ile Val Pro Gln Ser Phe Leu Lys					
	835		840		845
Asp Asp Ser Ile Asp Asn Lys Val Leu Thr Arg Ser Asp Lys Asn Arg					
	850		855		860
Gly Lys Ser Asp Asn Val Pro Ser Glu Glu Val Val Lys Lys Met Lys					
865		870		875	880
Asn Tyr Trp Arg Gln Leu Leu Asn Ala Lys Leu Ile Thr Gln Arg Lys					
	885		890		895
Phe Asp Asn Leu Thr Lys Ala Glu Arg Gly Gly Leu Ser Glu Leu Asp					
	900		905		910
Lys Ala Gly Phe Ile Lys Arg Gln Leu Val Glu Thr Arg Gln Ile Thr					
	915		920		925
Lys His Val Ala Gln Ile Leu Asp Ser Arg Met Asn Thr Lys Tyr Asp					
	930		935		940
Glu Asn Asp Lys Leu Ile Arg Glu Val Lys Val Ile Thr Leu Lys Ser					
945		950		955	960
Lys Leu Val Ser Asp Phe Arg Lys Asp Phe Gln Phe Tyr Lys Val Arg					
	965		970		975
Glu Ile Asn Asn Tyr His His Ala His Asp Ala Tyr Leu Asn Ala Val					
	980		985		990
Val Gly Thr Ala Leu Ile Lys Lys Tyr Pro Lys Leu Glu Ser Glu Phe					
	995		1000		1005
Val Tyr Gly Asp Tyr Lys Val Tyr Asp Val Arg Lys Met Ile Ala Lys					
	1010		1015		1020
Ser Glu Gln Glu Ile Gly Lys Ala Thr Ala Lys Tyr Phe Phe Tyr Ser					
1025		1030		1035	1040

Asn Ile Met Asn Phe Phe Lys Thr Glu Ile Thr Leu Ala Asn Gly Glu		
1045	1050	1055
Ile Arg Lys Arg Pro Leu Ile Glu Thr Asn Gly Glu Thr Gly Glu Ile		
1060	1065	1070
Val Trp Asp Lys Gly Arg Asp Phe Ala Thr Val Arg Lys Val Leu Ser		
1075	1080	1085
Met Pro Gln Val Asn Ile Val Lys Lys Thr Glu Val Gln Thr Gly Gly		
1090	1095	1100
Phe Ser Lys Glu Ser Ile Leu Pro Lys Arg Asn Ser Asp Lys Leu Ile		
1105	1110	1115
Ala Arg Lys Lys Asp Trp Asp Pro Lys Lys Tyr Gly Gly Phe Asp Ser		
1125	1130	1135
Pro Thr Val Ala Tyr Ser Val Leu Val Val Ala Lys Val Glu Lys Gly		
1140	1145	1150
Lys Ser Lys Lys Leu Lys Ser Val Lys Glu Leu Leu Gly Ile Thr Ile		
1155	1160	1165
Met Glu Arg Ser Ser Phe Glu Lys Asn Pro Ile Asp Phe Leu Glu Ala		
1170	1175	1180
Lys Gly Tyr Lys Glu Val Lys Lys Asp Leu Ile Ile Lys Leu Pro Lys		
1185	1190	1195
Tyr Ser Leu Phe Glu Leu Glu Asn Gly Arg Lys Arg Met Leu Ala Ser		
1205	1210	1215
Ala Gly Glu Leu Gln Lys Gly Asn Glu Leu Ala Leu Pro Ser Lys Tyr		
1220	1225	1230
Val Asn Phe Leu Tyr Leu Ala Ser His Tyr Glu Lys Leu Lys Gly Ser		
1235	1240	1245
Pro Glu Asp Asn Glu Gln Lys Gln Leu Phe Val Glu Gln His Lys His		
1250	1255	1260
Tyr Leu Asp Glu Ile Ile Glu Gln Ile Ser Glu Phe Ser Lys Arg Val		
1265	1270	1275
Ile Leu Ala Asp Ala Asn Leu Asp Lys Val Leu Ser Ala Tyr Asn Lys		
1285	1290	1295
His Arg Asp Lys Pro Ile Arg Glu Gln Ala Glu Asn Ile Ile His Leu		
1300	1305	1310
Phe Thr Leu Thr Asn Leu Gly Ala Pro Ala Ala Phe Lys Tyr Phe Asp		
1315	1320	1325
Thr Thr Ile Asp Arg Lys Arg Tyr Thr Ser Thr Lys Glu Val Leu Asp		
1330	1335	1340
Ala Thr Leu Ile His Gln Ser Ile Thr Gly Leu Tyr Glu Thr Arg Ile		

1345	1350	1355	1360
Asp Leu Ser Gln Leu Gly Gly Asp			
	1365		
<210> 41			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 41			
ggcgggtgga tcacgagttc 20			
<210> 42			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 42			
aaagctaccg gttacctgaa 20			
<210> 43			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 43			
tcattcttgt ggcagtaagg 20			
<210> 44			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 44			
ggagtcacat gggagtcaca 20			
<210> 45			
<211> 21			
<212> DNA			
<213> 人工序列			

<220>
<223> 合成构建体
<400> 45
tttaacgtta tcattttccc a 21
<210> 46
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 46
agtttcattc tgcacccag g 21
<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 47
aaaaattagc cgggcatgat g 21
<210> 48
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 48
tgtaagactg gagatagaga c 21
<210> 49
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 49
cttttgacag tttttaaggc g 21
<210> 50
<211> 103
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 50

gtttaacggtt atcattttcc cagtttttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60
caaaatgccg tgtttatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

<210> 51

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

gagtttcatt ctgtcaccca gggtttttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60
caaaatgccg tgtttatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

<210> 52

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 52

gaaaaattag ccgggcatga tggtttttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60
caaaatgccg tgtttatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

<210> 53

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 53

gtgtaagact ggagatagag acgttttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60
caaaatgccg tgtttatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

<210> 54

<211> 103

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 54

gcttttgaca gtttttaagg cggtttttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg 60
 caaaatgccg tgtttatctc gtcaacttgt tggcgagatt ttt 103

<210> 55

<211> 1053

<212> PRT

<213> 金黄色葡萄球菌 (Staphylococcus aureus)

<400> 55

Met	Lys	Arg	Asn	Tyr	Ile	Leu	Gly	Leu	Asp	Ile	Gly	Ile	Thr	Ser	Val
1				5					10					15	
Gly	Tyr	Gly	Ile	Ile	Asp	Tyr	Glu	Thr	Arg	Asp	Val	Ile	Asp	Ala	Gly
			20					25					30		
Val	Arg	Leu	Phe	Lys	Glu	Ala	Asn	Val	Glu	Asn	Asn	Glu	Gly	Arg	Arg
			35				40					45			
Ser	Lys	Arg	Gly	Ala	Arg	Arg	Leu	Lys	Arg	Arg	Arg	Arg	His	Arg	Ile
			50				55					60			
Gln	Arg	Val	Lys	Lys	Leu	Leu	Phe	Asp	Tyr	Asn	Leu	Leu	Thr	Asp	His
65				70					75					80	
Ser	Glu	Leu	Ser	Gly	Ile	Asn	Pro	Tyr	Glu	Ala	Arg	Val	Lys	Gly	Leu
				85					90					95	
Ser	Gln	Lys	Leu	Ser	Glu	Glu	Glu	Phe	Ser	Ala	Ala	Leu	Leu	His	Leu
			100					105						110	
Ala	Lys	Arg	Arg	Gly	Val	His	Asn	Val	Asn	Glu	Val	Glu	Glu	Asp	Thr
			115				120					125			
Gly	Asn	Glu	Leu	Ser	Thr	Lys	Glu	Gln	Ile	Ser	Arg	Asn	Ser	Lys	Ala
			130				135					140			
Leu	Glu	Glu	Lys	Tyr	Val	Ala	Glu	Leu	Gln	Leu	Glu	Arg	Leu	Lys	Lys
145				150					155					160	
Asp	Gly	Glu	Val	Arg	Gly	Ser	Ile	Asn	Arg	Phe	Lys	Thr	Ser	Asp	Tyr
				165					170					175	
Val	Lys	Glu	Ala	Lys	Gln	Leu	Leu	Lys	Val	Gln	Lys	Ala	Tyr	His	Gln
			180					185					190		
Leu	Asp	Gln	Ser	Phe	Ile	Asp	Thr	Tyr	Ile	Asp	Leu	Leu	Glu	Thr	Arg
			195				200					205			
Arg	Thr	Tyr	Tyr	Glu	Gly	Pro	Gly	Glu	Gly	Ser	Pro	Phe	Gly	Trp	Lys
			210				215					220			
Asp	Ile	Lys	Glu	Trp	Tyr	Glu	Met	Leu	Met	Gly	His	Cys	Thr	Tyr	Phe
225				230					235					240	
Pro	Glu	Glu	Leu	Arg	Ser	Val	Lys	Tyr	Ala	Tyr	Asn	Ala	Asp	Leu	Tyr

	245		250		255
Asn Ala Leu Asn Asp Leu Asn Asn Leu Val Ile Thr Arg Asp Glu Asn					
	260		265		270
Glu Lys Leu Glu Tyr Tyr Glu Lys Phe Gln Ile Ile Glu Asn Val Phe					
	275		280		285
Lys Gln Lys Lys Lys Pro Thr Leu Lys Gln Ile Ala Lys Glu Ile Leu					
	290		295		300
Val Asn Glu Glu Asp Ile Lys Gly Tyr Arg Val Thr Ser Thr Gly Lys					
305		310		315	320
Pro Glu Phe Thr Asn Leu Lys Val Tyr His Asp Ile Lys Asp Ile Thr					
	325		330		335
Ala Arg Lys Glu Ile Ile Glu Asn Ala Glu Leu Leu Asp Gln Ile Ala					
	340		345		350
Lys Ile Leu Thr Ile Tyr Gln Ser Ser Glu Asp Ile Gln Glu Glu Leu					
	355		360		365
Thr Asn Leu Asn Ser Glu Leu Thr Gln Glu Glu Ile Glu Gln Ile Ser					
	370		375		380
Asn Leu Lys Gly Tyr Thr Gly Thr His Asn Leu Ser Leu Lys Ala Ile					
385		390		395	400
Asn Leu Ile Leu Asp Glu Leu Trp His Thr Asn Asp Asn Gln Ile Ala					
	405		410		415
Ile Phe Asn Arg Leu Lys Leu Val Pro Lys Lys Val Asp Leu Ser Gln					
	420		425		430
Gln Lys Glu Ile Pro Thr Thr Leu Val Asp Asp Phe Ile Leu Ser Pro					
	435		440		445
Val Val Lys Arg Ser Phe Ile Gln Ser Ile Lys Val Ile Asn Ala Ile					
	450		455		460
Ile Lys Lys Tyr Gly Leu Pro Asn Asp Ile Ile Ile Glu Leu Ala Arg					
465		470		475	480
Glu Lys Asn Ser Lys Asp Ala Gln Lys Met Ile Asn Glu Met Gln Lys					
	485		490		495
Arg Asn Arg Gln Thr Asn Glu Arg Ile Glu Glu Ile Ile Arg Thr Thr					
	500		505		510
Gly Lys Glu Asn Ala Lys Tyr Leu Ile Glu Lys Ile Lys Leu His Asp					
	515		520		525
Met Gln Glu Gly Lys Cys Leu Tyr Ser Leu Glu Ala Ile Pro Leu Glu					
	530		535		540
Asp Leu Leu Asn Asn Pro Phe Asn Tyr Glu Val Asp His Ile Ile Pro					
545		550		555	560

Arg Ser Val Ser Phe Asp Asn Ser Phe Asn Asn Lys Val Leu Val Lys		
565	570	575
Gln Glu Glu Asn Ser Lys Lys Gly Asn Arg Thr Pro Phe Gln Tyr Leu		
580	585	590
Ser Ser Ser Asp Ser Lys Ile Ser Tyr Glu Thr Phe Lys Lys His Ile		
595	600	605
Leu Asn Leu Ala Lys Gly Lys Gly Arg Ile Ser Lys Thr Lys Lys Glu		
610	615	620
Tyr Leu Leu Glu Glu Arg Asp Ile Asn Arg Phe Ser Val Gln Lys Asp		
625	630	635
Phe Ile Asn Arg Asn Leu Val Asp Thr Arg Tyr Ala Thr Arg Gly Leu		
645	650	655
Met Asn Leu Leu Arg Ser Tyr Phe Arg Val Asn Asn Leu Asp Val Lys		
660	665	670
Val Lys Ser Ile Asn Gly Gly Phe Thr Ser Phe Leu Arg Arg Lys Trp		
675	680	685
Lys Phe Lys Lys Glu Arg Asn Lys Gly Tyr Lys His His Ala Glu Asp		
690	695	700
Ala Leu Ile Ile Ala Asn Ala Asp Phe Ile Phe Lys Glu Trp Lys Lys		
705	710	715
Leu Asp Lys Ala Lys Lys Val Met Glu Asn Gln Met Phe Glu Glu Lys		
725	730	735
Gln Ala Glu Ser Met Pro Glu Ile Glu Thr Glu Gln Glu Tyr Lys Glu		
740	745	750
Ile Phe Ile Thr Pro His Gln Ile Lys His Ile Lys Asp Phe Lys Asp		
755	760	765
Tyr Lys Tyr Ser His Arg Val Asp Lys Lys Pro Asn Arg Glu Leu Ile		
770	775	780
Asn Asp Thr Leu Tyr Ser Thr Arg Lys Asp Asp Lys Gly Asn Thr Leu		
785	790	795
Ile Val Asn Asn Leu Asn Gly Leu Tyr Asp Lys Asp Asn Asp Lys Leu		
805	810	815
Lys Lys Leu Ile Asn Lys Ser Pro Glu Lys Leu Leu Met Tyr His His		
820	825	830
Asp Pro Gln Thr Tyr Gln Lys Leu Lys Leu Ile Met Glu Gln Tyr Gly		
835	840	845
Asp Glu Lys Asn Pro Leu Tyr Lys Tyr Tyr Glu Glu Thr Gly Asn Tyr		
850	855	860
Leu Thr Lys Tyr Ser Lys Lys Asp Asn Gly Pro Val Ile Lys Lys Ile		

865	870	875	880
Lys Tyr Tyr Gly Asn Lys Leu Asn Ala His Leu Asp Ile Thr Asp Asp			
	885	890	895
Tyr Pro Asn Ser Arg Asn Lys Val Val Lys Leu Ser Leu Lys Pro Tyr			
	900	905	910
Arg Phe Asp Val Tyr Leu Asp Asn Gly Val Tyr Lys Phe Val Thr Val			
	915	920	925
Lys Asn Leu Asp Val Ile Lys Lys Glu Asn Tyr Tyr Glu Val Asn Ser			
	930	935	940
Lys Cys Tyr Glu Glu Ala Lys Lys Leu Lys Lys Ile Ser Asn Gln Ala			
945	950	955	960
Glu Phe Ile Ala Ser Phe Tyr Asn Asn Asp Leu Ile Lys Ile Asn Gly			
	965	970	975
Glu Leu Tyr Arg Val Ile Gly Val Asn Asn Asp Leu Leu Asn Arg Ile			
	980	985	990
Glu Val Asn Met Ile Asp Ile Thr Tyr Arg Glu Tyr Leu Glu Asn Met			
	995	1000	1005
Asn Asp Lys Arg Pro Pro Arg Ile Ile Lys Thr Ile Ala Ser Lys Thr			
	1010	1015	1020
Gln Ser Ile Lys Lys Tyr Ser Thr Asp Ile Leu Gly Asn Leu Tyr Glu			
1025	1030	1035	1040
Val Lys Ser Lys Lys His Pro Gln Ile Ile Lys Lys Gly			
	1045	1050	

<210> 56

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 56

tatacgcgtg ttgacactag ttcgcgaaat attgactcac ggggatttcc aagtctccac 60
cccattgacg tcaatgggag tttgttttgg caccaaaatc aacgggactt tccaaaatgt 120
cgtaacaact ccgccccatt gacgcaaatt ggcggttaggc gtgtacggtg ggaggtctat 180
ataagcagag ctcgttttagt gaaccgtcag atcgccgcca ccatggacaa gaagtacagc 240
atcggcctgg acatcggcac caactctgtg ggctgggccg tgatcaccga cgagtacaag 300
gtgcccagca agaaattcaa g 321

<210> 57

<211> 168

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 57

tgactcgaga acttgtttat tgcagcttat aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca 60
aatttcacaa ataaagcatt tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc 120
aatgtatctt atcatgtctg caatatttcg cgagaagaca atagcagg 168

<210> 58

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 58

ggcgggtgga tcacgagttc agg 23

<210> 59

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 59

ggagtcacat gggagtcaca ggg 23

<210> 60

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 60

ctagtggcgg ccgctcgagc atgcatctag agggccctat tctatagtgt cacctaaatg 60
ctagagctcg ctgatcagcc tcgactgtgc cttctagttg ccagccatct gttgtttgcc 120
cctcccccggt gccttccttg accctggaag gtgccactcc cactgtcctt tcctaataaa 180
atgaggaaat tgcacgcgat tgtctgagta ggtgtcattc tattctgggg ggtggggtgg 240
ggcaggacag caagggggag gattgggaag acaatagcag gcatgctggg gagctagagt 300
cgaccggacc gctgcaggca tgca 324

<210> 61

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 61

gcataaggac taaagaccta 20

<210> 62

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 62

ggtagtggtt gaactcacia 20

<210> 63

<211> 2471

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 63

gggccccaga agcctggtgg ttgtttgtcc ttctcagggg aaaagtgagg cggcccccttg 60
 gaggaagggg ccgggcagaa tgatctaatac ggattccaag cagctcaggg gattgtcttt 120
 ttctagcacc ttcttgccac tcctaagcgt cctccgtgac cccggctggg atttagcctg 180
 gtgctgtgtc agccccggtc tcccaggggc ttcccagtgg tccccaggaa ccctcgacag 240
 ggccccgtct ctctcgcca gcaagggcag ggacgggcca caggccaagg gcggagtcgc 300
 tgcgacgctg ccttcgcccc gtgccccgct ccgcccgcgc ctgcgcccgc ccgccccggc 360
 tctgactgac cgcgttactc ccacaggtga gcgggcggga cggcccttct cctccgggct 420
 gtaattagcg cttggtttaa tgacggcttg tttcttttct gtggctgcgt gaaagccttg 480
 aggggctccg ggagggccct ttgtgcgggg ggagcggctc ggggggtgcg tgcgtgtgtg 540
 tgtgcgtggg gagcgcgcg tgcggtccg cgctgcccg cggctgtgag cgctgcgggc 600
 gcggcgcggg gctttgtgct ctccgcagtg tgcgcgaggg gagcgcggcc gggggcggtg 660
 ccccgcggtg cggggggggc tgcgagggga acaaaggctg cgtgcggggg gtgtgcgtgg 720
 gggggtgagc aggggggtgt ggcgctcgg tcgggctgca accccccctg cccccccctc 780
 cccgagttgc tgagcacggc ccggtctcgg gtgcggggct ccgtacgggg cgtggcgcg 840
 ggctcgccgt gccgggcggg gggtggcggc aggtgggggt gccgggcggg gcggggccgc 900
 ctggggccgg ggagggctcg ggggaggggc gcggcgggcc ccggagcgcc ggcggctgtc 960
 gaggcgcggc gagccgcagc cattgccttt tatggtaatc gtgcgagagg gcgcaggagc 1020
 ttctttgtc ccaaattctgt gcggagccga aatctgggag gcgccgccgc accccctcta 1080
 gcgggcgcgg ggcaagcgg tcgggcgccg gcaggaagga aatgggcggg gagggccttc 1140

gtgcgtcgcc gcgccgccgt ccccttctcc ctctccagcc tcggggctgt ccgcgggggg 1200
acggctgcct tcggggggga cggggcaggg cggggttcgg cttctggcgt gtgaccggcg 1260
gctctagagc ctctgctaac catgttcatg ctttcttctt tttcctacag ctcttgggca 1320
acgtgctggg tattgtgctg tctcatcatt ttggcaaaga attcttcgaa agatctgcta 1380
gcttaattaa cccggtcgcc accatgggta gcaagggcga ggagctgttc accgggggtg 1440
tgcccatcct ggtcgagctg gacggcgacg taaacggcca caagttcagc gtgtccggcg 1500
agggcgaggg cgatgccacc tacggcaagc tgaccctgaa gttcatctgc accaccggca 1560
agctgcccgt gccctggccc accctcgtga ccacctgac ctacggcgtg cagtgttca 1620
gccgctaccc cgaccacatg aagcagcacg acttcttcaa gtccgccatg cccgaaggct 1680
acgtccagga gcgcaccatc ttcttcaagg acgacggcaa ctacaagacc cgcgccgagg 1740
tgaagttcga gggcgacacc ctggtgaacc gcatcgagct gaagggcatc gacttcaagg 1800
aggacggcaa catcctgggg cacaagctgg agtacaacta caacagccac aacgtctata 1860
tcatggccga caagcagaag aacggcatca aggtgaactt caagatccgc cacaacatcg 1920
aggacggcag cgtgcagctc gccgaccact accagcagaa caccctcctc ggcgacggcc 1980
ccgtgctgct gcccgacaac cactacctga gcaccagtc cgccctgagc aaagacccca 2040
acgagaagcg cgatcacatg gtctgtctgg agttcgtgac cgccgccggg atcactctcg 2100
gcatggacga gctgtacaag taaagcggcc aaatcgtacg cctaggtgat caagatctgc 2160
tagcttaatt aaccggggac tagtggcggc cgctcgagca tgcacttaga gggccctatt 2220
ctatagtgtc acctaaatgc tagagctcgc tgatcagcct cgactgtgcc ttctagttagc 2280
cagccatctg ttgtttgccc ctccccctg ccttccttga ccctggaagg tgccactccc 2340
actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt gcatcgcatt gtctgagtag gtgtcattct 2400
attctggggg gtgggggtgg gcaggacagc aagggggagg attgggaaga caatagcagg 2460
catgctgggg a 2471

<210> 64

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 64

cccctgcct gtactgaaag 20

<210> 65

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 65

gcacatcatc tgaggcaggt 20

<210> 66

<211> 4009

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

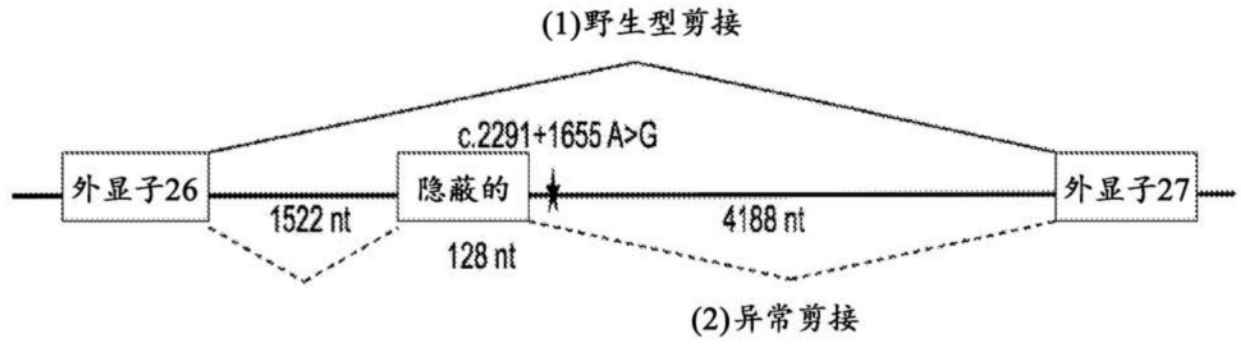
<400> 66

```

atgaattctc tagacaattg gactcacggg gatttccaag tctccacccc attgacgtca 60
atggggagttt gttttggcac caaaatcaac gggactttcc aaaatgtcgt aacaactccg 120
ccccattgac gcaaatgggc ggtaggcgtg tacggtggga ggtctatata agcagagctc 180
gtttagtgaa ccgtcagatc acgcgtgcca ccatgaagcg gaactacatc ctgggcctgg 240
acatcggcat caccagcgtg ggctacggca tcatcgacta cgagacacgg gacgtgatcg 300
atgccggcgt gcggctgttc aaagaggcca acgtggaaaa caacgagggc aggcggagca 360
agagaggcgc cagaaggctg aagcggcgga ggcggcatag aatccagaga gtgaagaagc 420
tgctgttcga ctacaacctg ctgaccgacc acagcgagct gagcggcatc aaccctacg 480
aggccagagt gaagggcctg agccagaagc tgagcgagga agagttctct gccgccctgc 540
tgcacctggc caagagaaga ggctgcaca acgtgaacga ggtggaagag gacaccggca 600
acgagctgtc caccaaagag cagatcagcc ggaacagcaa ggccctggaa gagaaatacg 660
tgccgaact gcagctggaa cggctgaaga aagacggcga agtgcggggc agcatcaaca 720
gattcaagac cagcgactac gtgaaagaag ccaaacagct gctgaagtg cagaaggcct 780
accaccagct ggaccagagc ttcatcgaca cctacatcga cctgctggaa acccgcgga 840
cctactatga gggacctggc gagggcagcc cttcggctg gaaggacatc aaagaatggt 900
acgagatgct gatggggcac tgcacctact tccccgagga actgcggagc gtgaagtacg 960
cctacaacgc cgacctgtac aacgccctga acgacctgaa caatctctg atcaccaggg 1020
acgagaacga gaagctggaa tattacgaga agttccagat catcgagaac gtgttcaagc 1080
agaagaagaa gcccaccctg aagcagatcg ccaaagaaat cctcgtgaac gaagaggata 1140
ttaagggcta cagagtgacc agcaccggca agcccagatt caccaacctg aaggtgtacc 1200
acgacatcaa ggacattacc gcccggaaag agattattga gaacgccgag ctgctggatc 1260
agattgccaa gatcctgacc atctaccaga gcagcgagga catccaggaa gaactgacca 1320
atctgaactc cgagctgacc caggaagaga tcgagcagat ctctaactctg aagggtata 1380
ccggcaccca caacctgagc ctgaaggcca tcaacctgat cctggacgag ctgtggcaca 1440
ccaacgacaa ccagatcgct atcttcaacc ggctgaagct ggtgcccaag aaggtggacc 1500
tgtcccagca gaaagagatc cccaccacc tggtggacga cttcatcctg agccccgtcg 1560
tgaagagaag cttcatccag agcatcaaag tgatcaacgc catcatcaag aagtacggcc 1620
tgcccaacga catcattatc gagctggccc gcgagaagaa ctccaaggac gccagaaaa 1680
tgatcaacga gatgcagaag cggaaccggc agaccaacga gcggatcgag gaaatcatcc 1740
ggaccaccgg caaagagaac gccaaagtacc tgatcgagaa gatcaagctg cacgacatgc 1800
aggaaggcaa gtgcctgtac agcctggaag ccatcctctt ggaagatctg ctgaacaacc 1860
ccttcaacta tgaggtggac cacatcatcc ccagaagcgt gtccttcgac aacagcttca 1920

```

acaacaaggt gctcgtgaag caggaagaaa acagcaagaa gggcaaccgg accccattcc 1980
 agtacctgag cagcagcgac agcaagatca gctacgaaac cttcaagaag cacatcctga 2040
 atctggccaa gggcaagggc agaatcagca agaccaagaa agagtatctg ctggaagaac 2100
 gggacatcaa caggttctcc gtgcagaaag acttcatcaa ccggaacctg gtggatacca 2160
 gatacgccac cagaggcctg atgaacctgc tgcggagcta cttcagagtg aacaacctgg 2220
 acgtgaaagt gaagtccatc aatggcggct tcaccagctt tctgcggcgg aagtgggaagt 2280
 ttaagaaaga gcggaacaag gggtaacaagc accacgccga ggacgccctg atcattgcc 2340
 acgccgattt catcttcaaa gagtgggaaga aactggacaa ggccaaaaaa gtgatggaaa 2400
 accagatgtt cgaggaaaaag caggccgaga gcatgcccgat gatcgaaacc gagcaggagt 2460
 acaaagagat cttcatcacc ccccaccaga tcaagcacat taaggacttc aaggactaca 2520
 agtacagcca ccgggtggac aagaagccta atagagagct gattaacgac accctgtact 2580
 ccacccggaa ggacgacaag ggcaacaccc tgatcgtgaa caatctgaac ggctgttacg 2640
 acaaggacaa tgacaagctg aaaaagctga tcaacaagag ccccgaaaag ctgctgatgt 2700
 accaccacga ccccgagacc taccagaaac tgaagctgat tatggaacag tacggcgacg 2760
 agaagaatcc cctgtacaag tactacgagg aaaccgggaa ctacctgacc aagtactcca 2820
 aaaaggacaa cggccccgtg atcaagaaga ttaagtatta cggcaacaaa ctgaacgccc 2880
 atctggacat caccgacgac taccccaaca gcagaaacaa ggtcgtgaag ctgtccctga 2940
 agccctacag attcgacgtg tacctggaca atggcgtgta caagttcgtg accgtgaaga 3000
 atctggatgt gatcaaaaaa gaaaactact acgaagtga tagcaagtgc tatgaggaag 3060
 ctaagaagct gaagaagatc agcaaccagg ccgagtttat cgcctccttc tacaacaacg 3120
 atctgatcaa gatcaacggc gagctgtata gagtgatcgg cgtgaacaac gacctgtga 3180
 accggatcga agtgaacatg atcgacatca cctaccgca gtacctggaa aacatgaacg 3240
 acaagaggcc ccccgagatc attaagacaa tcgcctccaa gaccagagc attaagaagt 3300
 acagcacaga cattctgggc aacctgtatg aagtgaatc taagaagcac cctcagatca 3360
 tcaaaaaggc cgcatcccc aagaaaaagc gcaaagtga ctacaaagac gatgacgaca 3420
 agtgagctag cgactgtgcc ttctagtgc cagccatctg ttgtttgccc ctccccgtg 3480
 ccttccttga ccctggaagg tgccactccc actgtccttt cctaataaaa tgaggaaatt 3540
 gcatcgcat gtctgagtag gtgtcattct attctggggg gtgggggtggg gcaggacagc 3600
 aagggggagg attgggaaga gaatagcagg catgctggta cctgagggcc tatttcccat 3660
 gattccttca tatttgcata tacgatacaa ggctgttaga gagataattg gaattaattt 3720
 gactgtaaac acaaagatat tagtacaaaa tacgtgacgt agaaagtaat aatttcttgg 3780
 gtagtttgca gttttaaaat tatgttttaa aatggactat catatgctta ccgtaacttg 3840
 aaagtatttc gatttcttgg ctttatatat cttgtggaaa ggacgaaaca ccggagacca 3900
 cggcaggtct cagttttagt actctggaaa cagaatctac taaaacaagg caaatgccg 3960
 tgtttatctc gtcaacttgt tggcgagatt tttgcggccg cgtcgacat 4009



5'剪接位点

野生型: TGTAATTgtgaatat 得分:0

突变体: TGTAATTgtgagtat 得分:0.90

图1

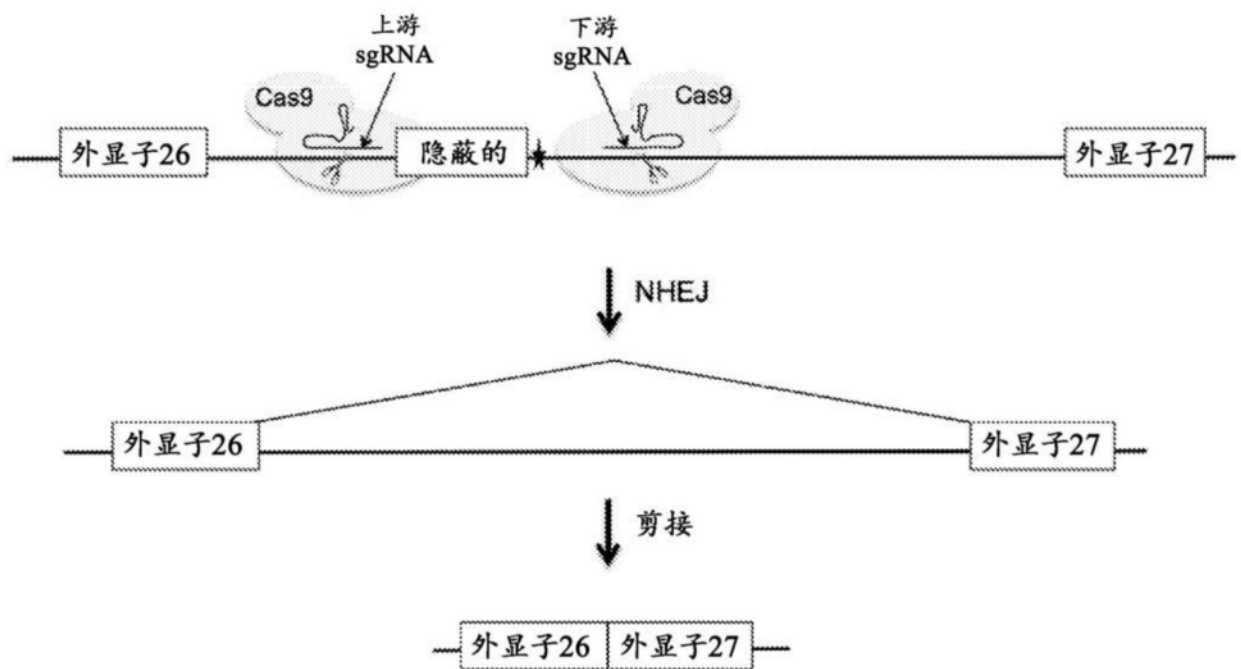


图2

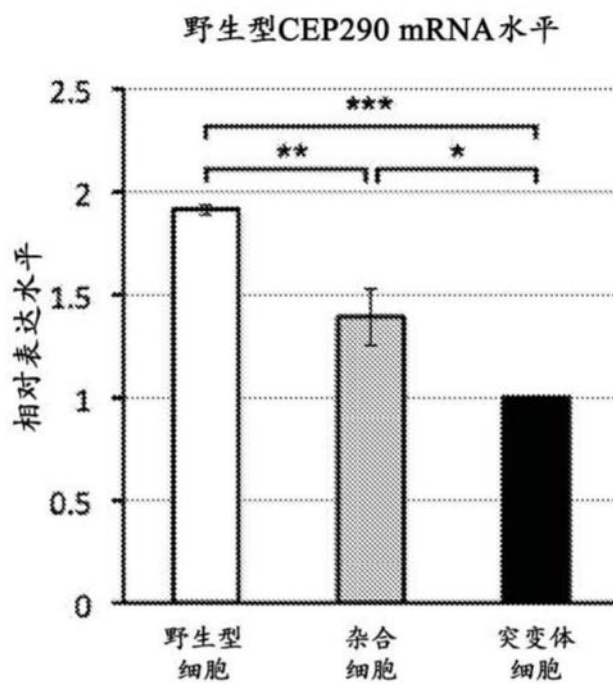


图3A

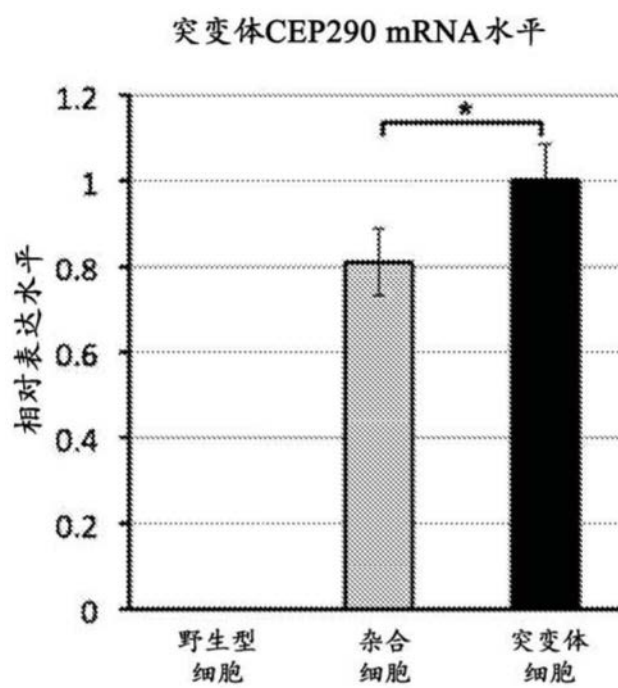


图3B

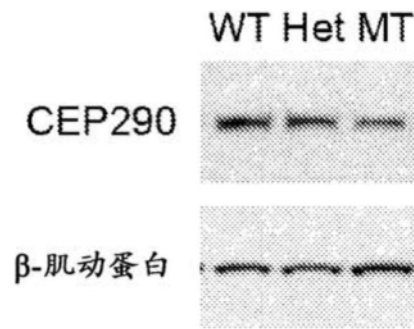


图3C

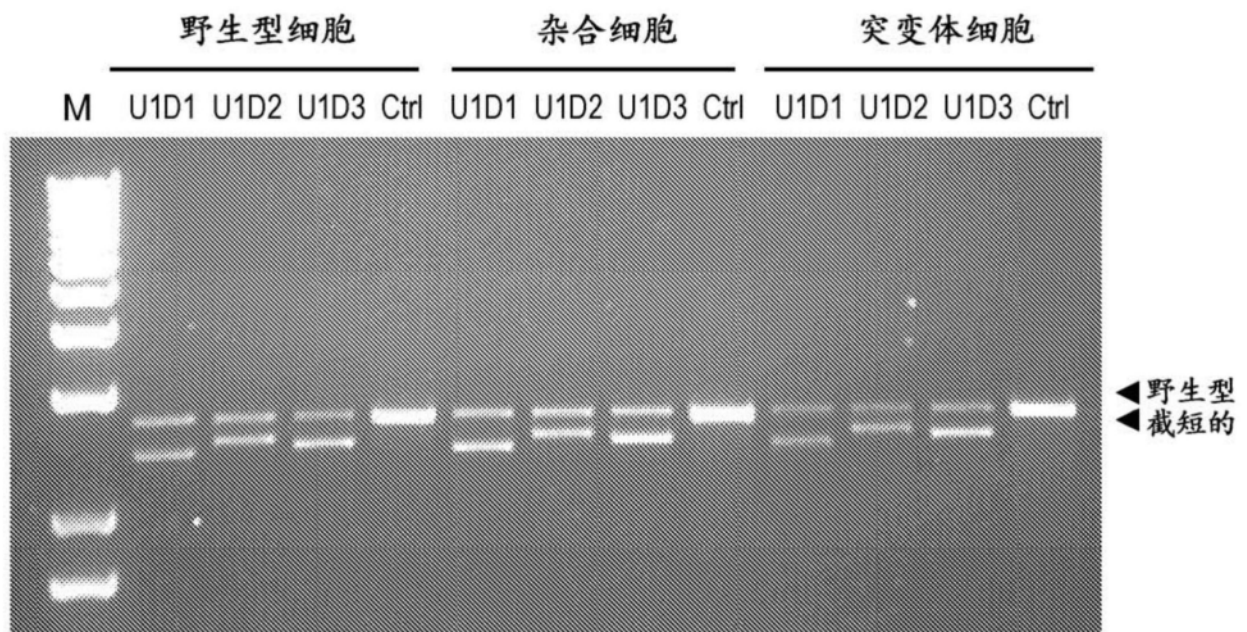


图4A

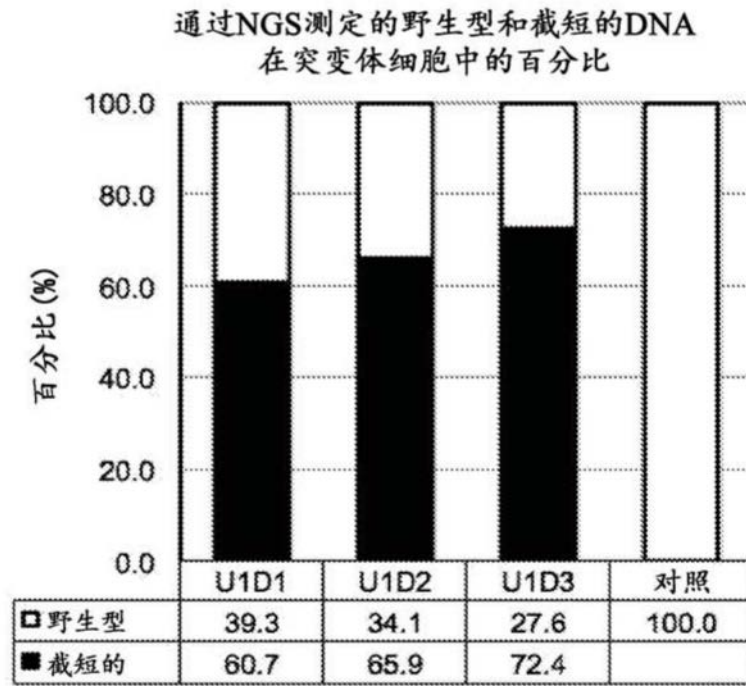


图4B

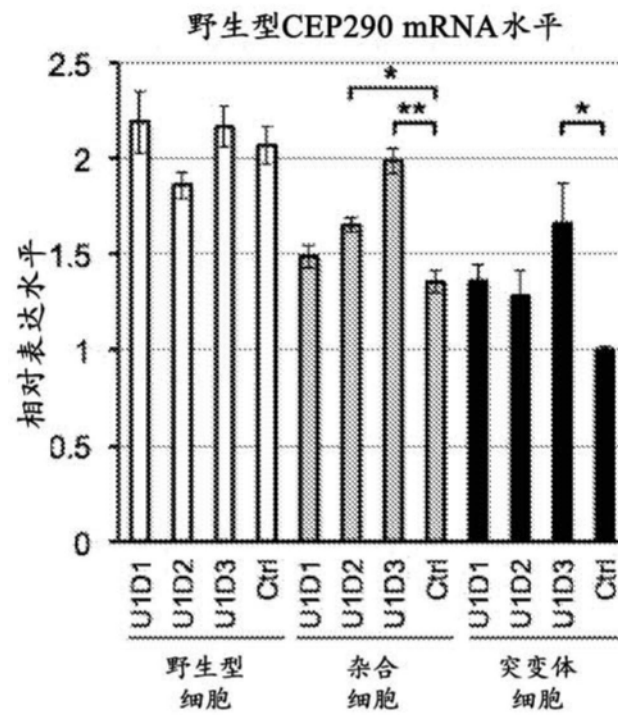


图5A

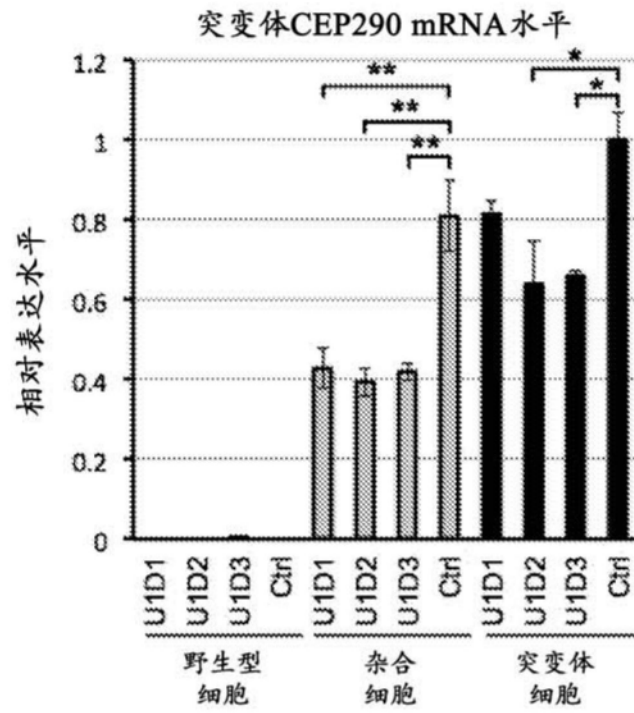


图5B

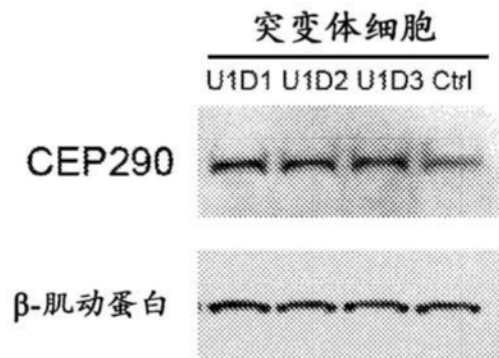


图5C

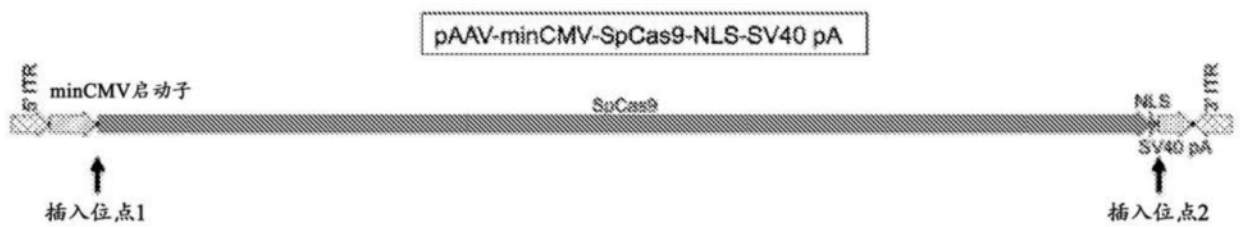


图6A

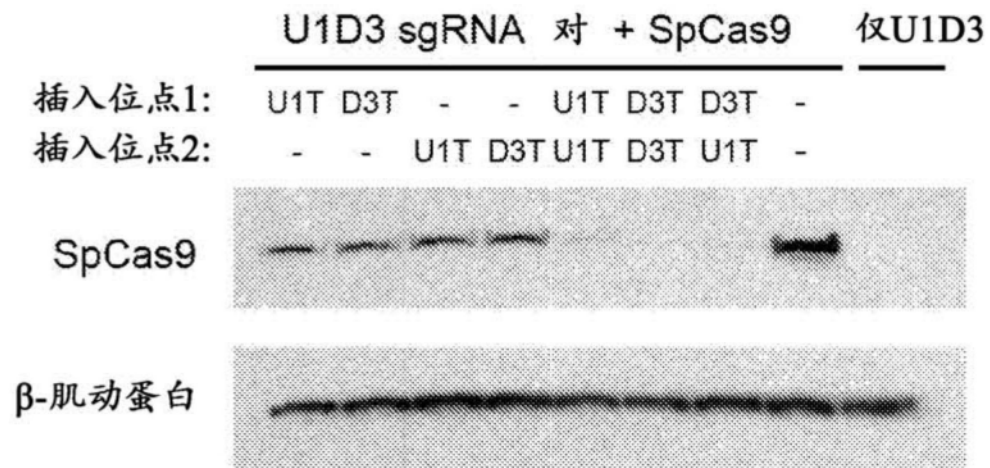


图6B

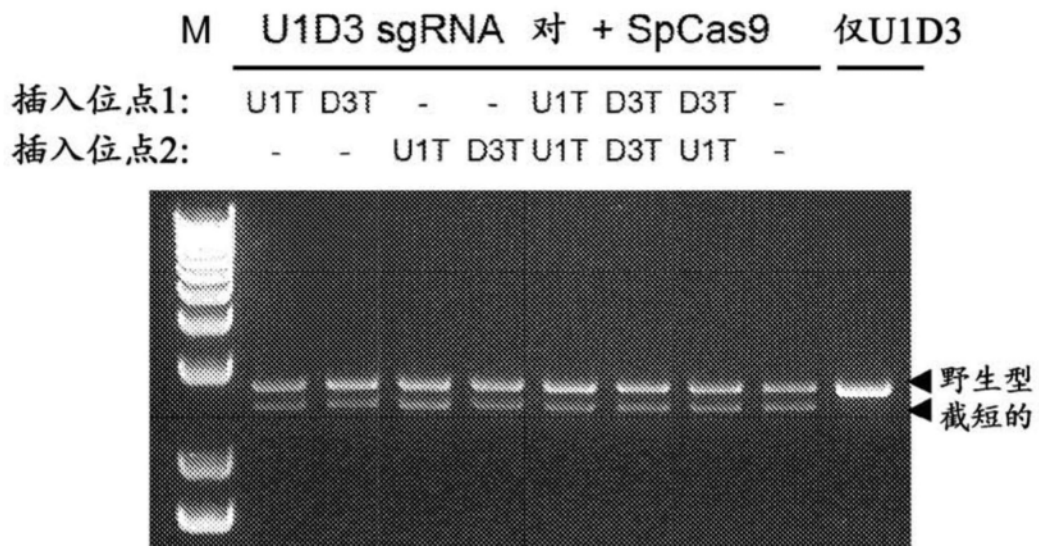


图6C

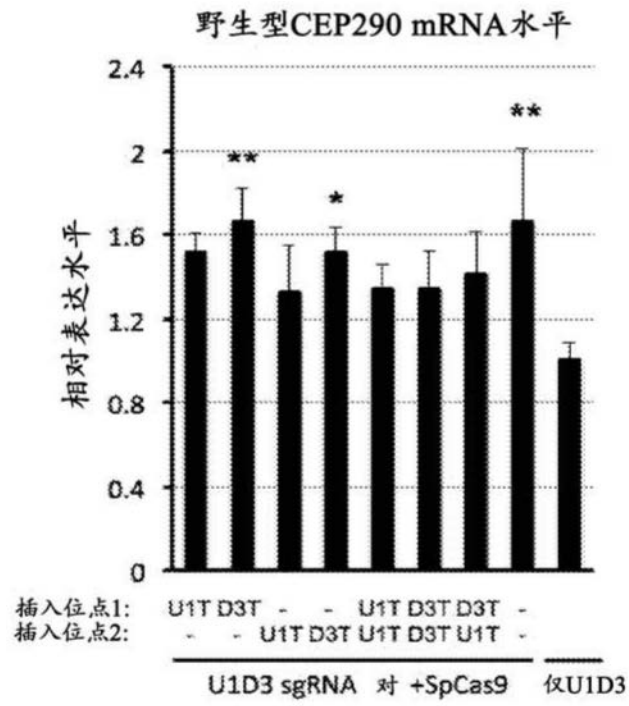


图6D

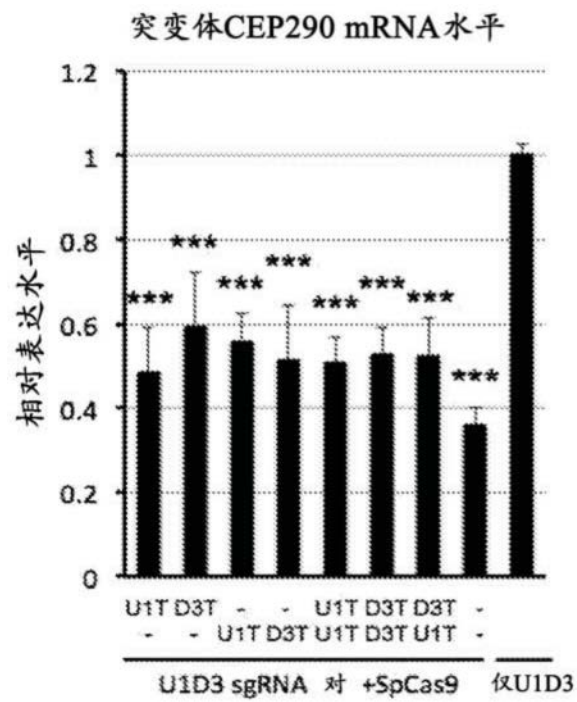


图6E

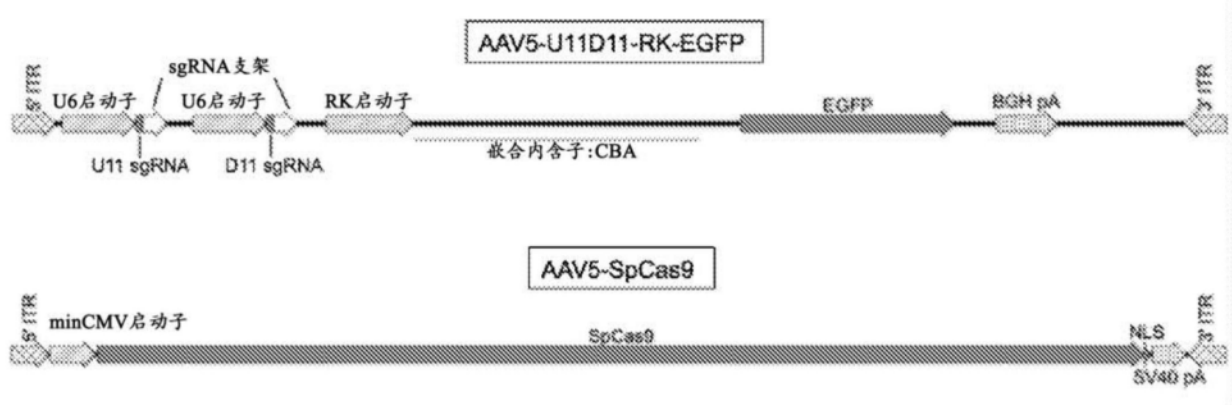


图7A

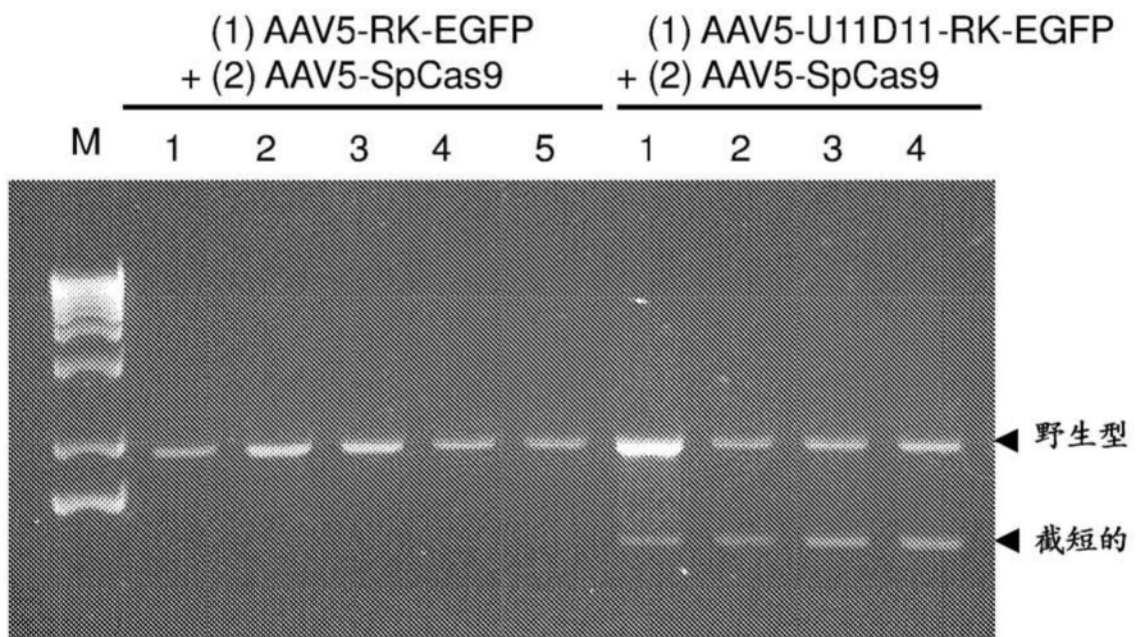


图7B

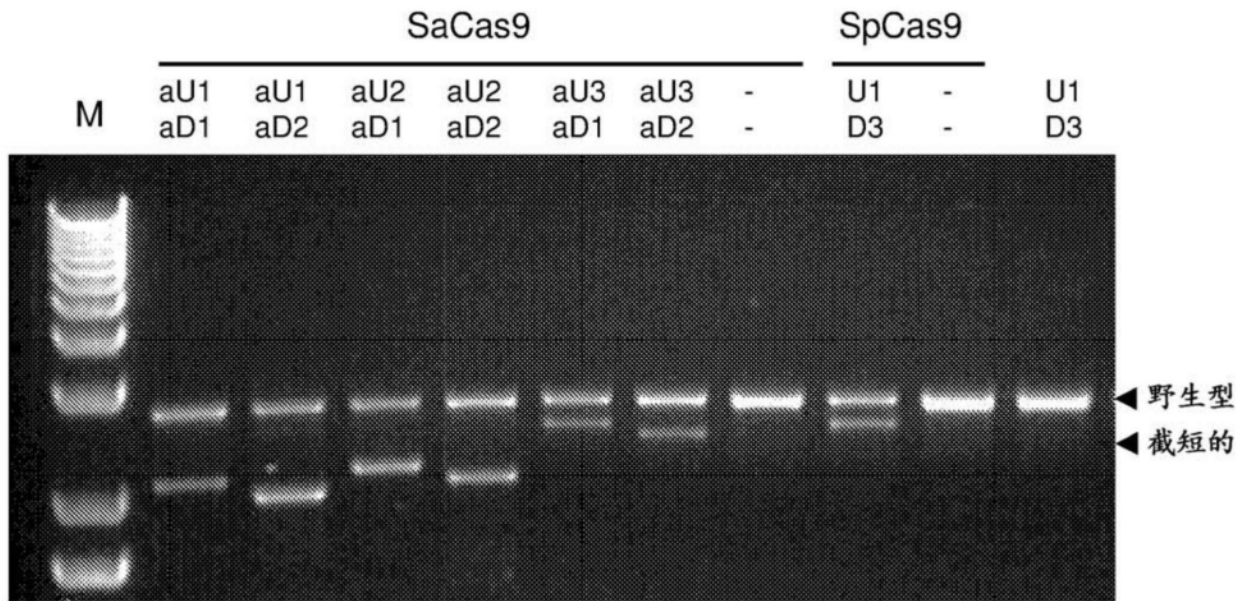


图8A

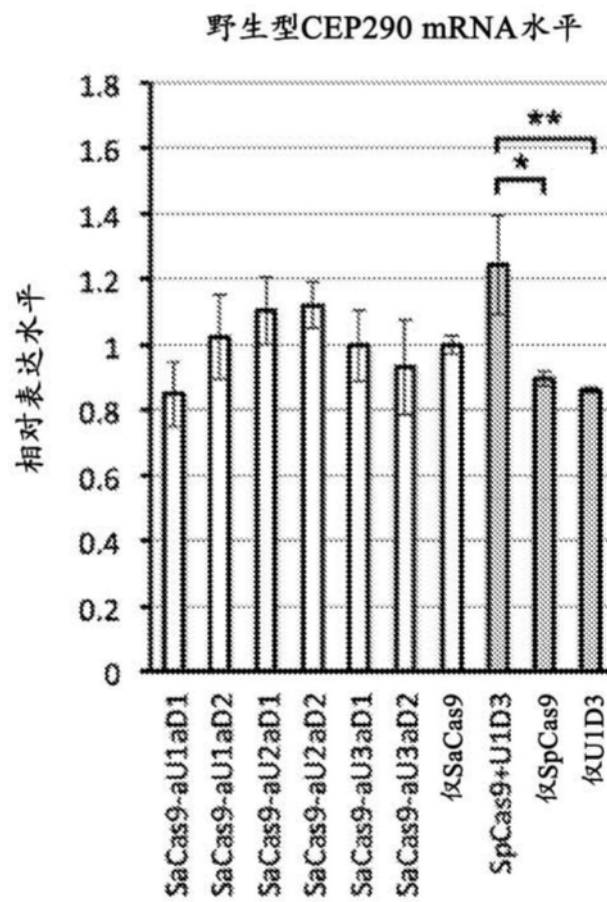


图8B

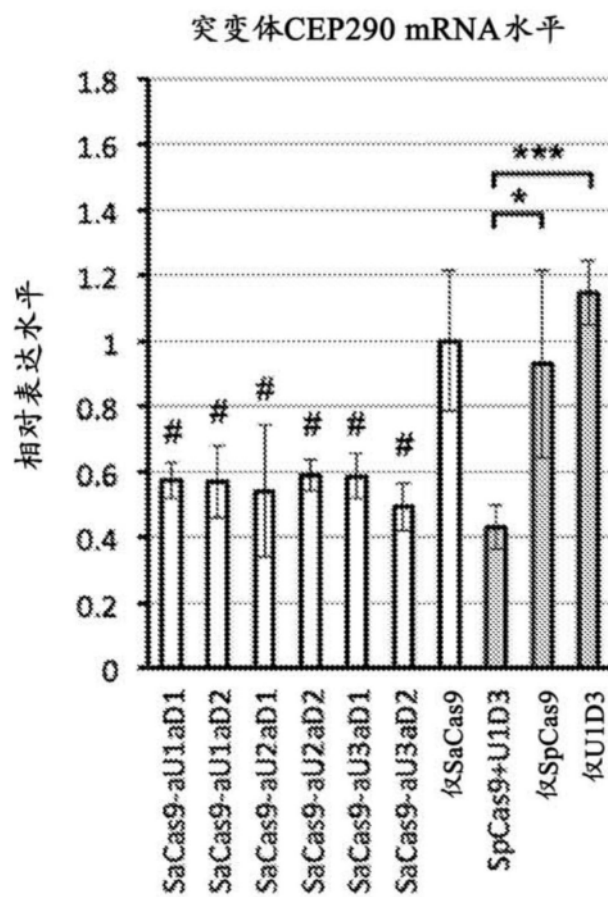


图8C